

应用酶联免疫吸附法 (ELISA) 诊断家蚕微粒子病的研究*

黄自然

郑祥明

(蚕桑系)

(广东农业科学院蚕业研究所)

提 要

感染微粒子病的家蚕中肠壁匀浆作抗原,注射于家兔制备抗血清。用戊二醛简易法将辣根过氧化物酶与抗体蛋白交联,制成酶联免疫抗体。用ELISA直接法或双抗体(夹心)法均可将未发现孢子的患病中肠检出阳性反应。用分光光度计对聚苯乙烯塑料多孔板吸附免疫反应的读数(OD值)表示更则为准。

酶联抗体—抗原点滴法试验(AST),将抗原滴于硝酸纤维薄膜,再加入酶标抗体,可获得肉眼判别阳性的斑点。

前 言

微孢子虫的分类识别及检验方法有很多改进。Kalalova等(1973)^[14]应用间接荧光抗体技术检出微孢子虫。Fowler等(1974)^[11]将相近似的微孢子虫属的孢子抽提物(蛋白质)作电泳分析,作为分类的依据。Vavra等(1981)^[15]系统介绍了借助化学和免疫技术作为微孢子虫分类的方法。至于家蚕微粒子原虫的检验与诊断技术亦有很多改革。藤原(1966)^[10]报道了家蚕微粒子孢子的荧光抗体的制备方法。佐藤(1981)^[7]应用荧光抗体技术判别多种寄生于家蚕的微孢子虫。作者等(1982、1984)^{[2][8]}应用直接、间接荧光抗体技术识别家蚕微粒子孢子及其类似物。早坂、河原畑等(1983、1984)^{[6][8][9]}先后报道了家蚕微粒子孢子的血清凝集反应及酶联吸附免疫法(ELISA)等检验技术。Huang等(1984)^[11]亦报道了ELISA及抗原点滴试验法(AST)检验和诊断家蚕微粒子病的结果,现将试验方法及结果总结于后。如进一步完善,可应用于家蚕制种场作为微粒子病的预知检查以及母蛾微粒子病的常规检验,以代替目前的显微镜检验。

材 料 与 方 法

酶联免疫是利用免疫学的原理,将微粒子病原做抗原注射于家兔以制备、提纯抗微

* 本文承华南农业大学校长卢永根教授审阅,广东省农业科学院蚕业研究所方定坚同志给予有益的意见,均表深切谢意!

粒子病原的特异性抗体,然后将过氧化物酶联结到抗体蛋白上,称酶联抗体。当酶联抗体与抗原(微粒子病原)接触将会形成特异性的抗原—酶联抗体复合物。加入过氧化物酶的底物——邻苯二胺或8, 3'-二氨基联苯胺时,联结在复合物上的酶即将与之产生反应,呈现肉眼或分光光度计能识别的颜色,从而判定微粒子病原的存在。现将实验方法简述于后。

(一) 抗原的制备^[2]

取健康的五龄起蚕,添食微粒子孢子($10^6/\text{ml}$),正常饲养直至熟蚕时解剖取出感病的中肠,先用75%乙醇作表面消毒,再用无菌水洗涤多次,用吸水纸吸干。每50枚中肠壁加入10ml无菌水研成匀浆,有 0°C 下保存备用,中肠壁除含有孢子外,还有大量的孢子前阶段的原虫。

(二) 抗体的制备与纯化

抗血清的制备:用上述抗原与等体积的完全福氏佐剂充分混合注射于2公斤以上的家兔。每次1ml抗原,作多点注射,每隔7天注射一次,连续9次,最后一次注射后的第20天采血,用免疫凝胶扩散法测定抗血清的效价。

抗体的纯化:用硫酸铵盐析。第一次用半饱和的硫酸铵,第二、三次用 $\frac{1}{2}$ 饱和的硫酸铵盐析,沉淀物透析,直至无硫酸根为止。取出纯化的抗体,用紫外分光光度计或Folin氏法比色以测定抗体蛋白含量。

(三) 酶联抗体的制备^{[1][4]}

按戊二醛简易法进行制备。先将辣根过氧化物酶与戊二醛交联后,再与抗体蛋白的氨基结合成为酶联抗体。

1. 辣根过氧化物酶(Horseradish Peroxidase, 上海东风生化试剂厂) 5mg,溶于pH9.6, 0.1M碳酸盐缓冲液0.4ml及25%戊二醛0.1ml,混匀后置 37°C 温育2小时后备用。

2. 在“1”中加入18%次氯酸钠液0.1ml,冷无水乙醇2ml,离心去上清液,以除去游离的戊二醛。

3. 在“2”沉淀物中加入冷的80%乙醇4ml,混悬,离心,去上清液。

4. 在“3”沉淀物中加入pH9.6, 0.1M碳酸盐缓冲液0.4ml,以溶解辣根过氧化物酶—戊二醛交联物。

5. 在“4”中加入上述纯化的抗体(含蛋白 $10\text{mg}/\text{ml}$) 0.4ml,混匀备用。

6. 在“5”中加入适量健蚕中肠壁干粉(使用前加入),混匀,置冰箱中过夜,翌日离心除去沉淀,上清液可供用。健蚕中肠干粉主要是除去抗血清中的非特异抗体成份。测定酶联抗体的质量。

(四) 酶联免疫吸附法

1. 设备及药物:聚苯乙烯塑料多孔板(55孔),先用皂液洗涤浸泡过夜,翌日用清水冲洗数次,晾干后备用。

邻苯二胺(OPD): 0.05M柠檬酸48.6ml,邻苯胺40mg,溶解后加入0.1M磷酸氢二钠及30%过氧化氢0.04ml,最后加 Na_2HPO_4 至100ml,定容,避光,临用前配制作

为底物。

3, 3'-二氨基联苯胺(DAB): pH7.6, 0.05M Tris缓冲液100ml, 加入3, 3'-二氨基联苯胺75mg, 搅匀备用。

冲洗液吐温-20磷酸盐缓冲液(PBS): pH7.4磷酸盐缓冲液1000ml, 加入吐温-20 0.5ml。

2. 酶联免疫吸附反应直接法:

(1) 加抗原。在聚苯乙烯塑料多孔板的孔穴中加入待检测的抗原(五龄蚕中肠悬浊液: pH9.6, 0.05M 碳酸盐缓冲液, 1: 20的体积) 0.2ml, 在4℃冰箱中过夜, 使抗原粘附于塑料孔壁上。

(2) 洗涤。将各孔中多余的抗原倾去, 加入吐温-PBS冲洗, 立即甩去。再将吐温-PBS加满各板孔, 置5分钟, 甩去溶液, 如此洗涤2次, 倒置于干毛巾上, 使孔穴中的液体尽量流出。

(3) 加入酶联抗体。各孔穴中加入酶联抗体(一般用吐温-PBS稀释60倍) 0.2ml, 在37℃温育3小时, 使充分结合。

(4) 加底物。用吐温-PBS充分洗涤以除去未结合的酶标抗体, 然后加入底物0.2ml, 于37℃孵育保温30分钟, 用2M 硫酸0.05ml终止反应。

(5) 用72型分光光度计测定其光密度(OD值)。波长492nm, 对照孔为吐温-PBS代替抗原, 其他操作相同。

3. 双抗体(夹心)法:

(1) 包被抗体。多孔板的孔穴中加入0.2ml抗体液(用pH9.6, 0.05M 碳酸盐缓冲液稀释10倍), 置37℃水浴中温育3小时, 移入4℃冰箱中过夜, 按2(2)方法洗涤3次, 使抗体吸附于孔壁上。

(2) 加待检抗原。每孔穴加入待检抗原0.2ml, 同时设阳性、阴性及空白(吐温-PBS), 37℃水浴中温育3小时, 移入冰箱中过夜, 如上法洗涤3次。

(3) 加入酶联抗体。每孔注入酶联抗体(吐温-PBS稀释60倍) 0.2ml, 37℃水浴温育2小时, 如上法洗涤3次。

(4) 加底物。每孔加入底物邻苯二胺液0.2ml, 37℃水浴温育1小时, 加入2M 硫酸0.05ml, 以终止反应。

(5) 用72型分光光度计测定其光密度。波长492nm, 空白管为吐温-PBS代替抗原, 其他操作相同。

(五) 抗原点滴试验法

1. 设备及药物: 硝酸纤维素滤膜, 规格为0.2~0.3交联度, 12cm直径。

3, 3'-二氨基联苯胺·4盐酸盐: 75mg DAB·4HCl溶于100ml pH7.5, 0.05M Tris-HCl中, 过滤, 遮光保存。

标准缓冲液(供冲洗用): pH7.4, 0.1M Tris-HCl液含有0.25% (w/v) 明胶及0.5% (v/v) 吐温-20; pH8.0, 0.1M 硼酸盐缓冲液。

2. 抗原点滴法^[15]

(1) 点滴抗原。将待测的中肠壁匀浆,用硼酸盐缓冲液稀释2~5倍,吸取0.5 μ l点滴于硝酸纤维滤膜上,可作多点点滴,放室温下15分钟使之充分吸附于滤膜上,然后加入标准缓冲液在室温下保持湿润2小时。

(2) 加酶联抗体。将适当稀释的辣根过氧化物酶联抗体1 ml滴于以上的滤膜上,放入4℃冰箱中过夜。

(3) 洗涤。用标准缓冲液100ml摇浸滤膜,每次30分钟,约需3次,以除净未作用的酶联抗体。

(4) 加底物。将底物DAB溶液滴敷于滤膜上,37℃温育1小时,如遇到微粒子抗原则呈现褐色斑点,可作阳性及阴性的中肠干粉对比。

结果与讨论

(一) 抗微粒子血清的效价

家兔注射患微粒子病中肠壁匀浆抗原后,经1个月采血,用免疫凝胶双扩散法(1%琼脂糖凝胶)测得其滴度为32;8个月后采血时测定其滴度为64。出现二条凝集带,用氨基黑10B染色更为明显。说明除微粒子孢子及其前体外,可能是由于感染微粒子原虫后相应产生的一类抗原物,这与黄自然等(1984)^[9]的报道一致。

(二) 酶联抗体的质量检测

将酶联后的抗体用P.B.S.稀释30倍液,经751—G分光光度计测定280nm及403nm的消光值,按以下公式换算抗体(IgG)量、酶结合量及它们的克分子比值。

$$\text{IgG (mg/ml)} = (\text{OD}_{280\text{nm}} - \text{OD}_{403\text{nm}} \times 0.3) \times 0.62$$

$$\text{酶结合量 (mg/ml)} = \text{OD}_{403\text{nm}} \times 0.4$$

克分子比值 = 酶结合量 (mg/ml) $\times$ 4 / IgG (mg/ml)。结果 $\text{OD}_{280\text{nm}}$ 为0.50, $\text{OD}_{403\text{nm}}$ 为0.21。换算酶联抗体(IgG)为8.1mg/ml,酶结合量为2.52mg/ml,克分子比值为1.24。从这些结果来判断酶联抗体的质量尚属满意,唯结合的酶量稍嫌少些。

(三) 酶联免疫吸附法检测微粒子病的效果

ELISA法检定家蚕微粒子孢子的结果见表1、2。

表1

酶联免疫吸附法直接法检测效果*

抗 体	原		
	患病家蚕中肠壁 匀浆10倍稀释液	正常家蚕中肠壁 匀浆10倍稀释液	空白对照 pH9.6, 0.05M 硼酸盐缓冲液
	光 密 度		OD
酶联抗体10倍液	0.45	0.05	0.0
酶联抗体60倍液	0.50	0.0	0.0

* 底物为3, 3'-二氨基联苯胺

表 2

酶联免疫吸附双抗体法检测效果

抗 体	抗		原
	患病家蚕中肠壁 匀浆10倍稀释液	正常家蚕中肠壁 匀浆10倍稀释液	空 白 对 照 pH9.6, 0.05M 碳酸盐缓冲液
	光	密 度	OD
包被抗体4.4μg 酶联抗体60倍液	0.85	0.0	0.0
包被抗体0.44μg 酶联抗体60倍液	0.63	0.0	0.0

• 底物为邻苯二胺

ELISA直接法检出的效果明显,抗原中除孢子外尚有游走体或裂殖体均能检出,即使未形成孢子的中肠壁(镜检未见孢子)亦可以检出。抗体的滴度稀释10~60倍范围内效果基本一致。应用1983年酶联抗体(冰箱保持半年以上)效果仍保持良好。

酶联双吸附法在聚苯乙烯塑料多孔板上进行,主要使抗体先行良好吸附后,再加入抗原使之形成较好的特异性结合,因而提高对酶联抗体的反应效果,每孔的读数OD值十分明显,即使用肉眼也能判别。此法较直接法更为灵敏。如改用72型分光光度计改装的酶标抗体检测仪测定效果更好。

(四) 酶联抗体—抗原点滴试验

AST法是比较简便而灵敏度高的方法之一。抗原点滴的直径在0.5cm,可连续做多点点滴,或做不同梯度浓度点滴。只要充分洗涤除去未作用的酶联抗体,均能与底物形成较深的颜色,可凭肉眼判别。

以上的酶联抗体方法检验患微粒子病病蚕中肠壁匀浆的结果,效果比较明显。在镜检未发现孢子之时已能准确判别,可供作予知检查之用。如在稚蚕期可将10头蚕儿制成匀浆供作检测。

酶联抗体法的操作似乎很麻烦,但实际上是稳定的程序,可按规程顺序进行。在一块55孔或96孔的聚苯乙烯多孔板上可以容纳每天二千个标本的检验,读数可由仪表显示。

本法如加以改进可以应用于母蛾的抽检,从而可以用半自动的检验流程代替目前的人力显微镜检验法,不但提高准确度,而且可以提高效率,特别免去劳动强度大而辛劳的镜检工作。

参 考 文 献

- [1] 杨贵贞:《医学免疫学》,吉林人民出版社,1980年。
- [2] 郑祥明、黄自然、卢蕴良:家蚕微粒子(*Nosema bombycis* Nageli)孢子的荧光抗体

- 检验技术初报,《华南农学院学报》,5(1)1984,88—91。
- [3] 黄自然、郑祥明、卢蕴良,家蚕微孢子孢子的荧光抗体检验技术研究初报,《蚕业科学》,9(1)1982,61—62。
- [4] 骆加里、沈炳贵、宋光承、陈新云、薛海筹,辣根过氧化物酶(HRP)标记抗体的简易方法,《生物化学生物物理学报》,13(1)1981,1—7。
- [5] 张良成等,酶联免疫吸附技术,《植物病理学讲义》,全国植物病理学会编,1982年。
- [6] 早坂昭二、站尺千寻、河原畑 勇,家蚕血清と微孢子虫类孢子間にみられる非特异的凝集反よご除去法,《日本蚕系学杂志》,52(8)1984,270。
- [7] 佐藤令一、小林正彦、渡部 仁、藤原 公,カイコから分离した微孢子虫类孢子的荧光抗体による识别,《日本蚕系学杂志》,50(8)1981,180—184。
- [8] 河原畑 勇、阿部芳彦、早坂昭二、宫本和久,*Nosema bombycis*孢子抗原のELISAによる検出,《日本蚕系学杂志》,52(8)1984,270。
- [9] 宫本和久,酵素結合抗体による*Nosema bombycis*孢子的検出,《日本蚕系学杂志》,52(8)1983,264。
- [10] 藤原 公、扇元敬司、須藤恒二、上田金时,カイコによる*Nosema bombycis*の荧光抗体による制作,《蚕系研究》,58(1986),14—19。
- [11] Fowler, J. L., Reves, E. L., Detection of relationship among microsporidian isolate by electrophoretic analysis, *J. Insect Pathol.* 23 (1974), 8—12.
- [12] Herbrink, P., Van Bussel, J. F., Warnaar, S. O., The antigen spot test (AST), A highly sensitive assay for the detection of antibody, *J. Immunol. Method*, 48 (1982), 293—298.
- [13] Huang Zi-Ran, Zheng Xiang-Ming, Lu Yun-Liang, Detection of pebrine spore, *Nosema bombycis* of silkworm, *Bombyx mori* by fluorescent antibody technique and enzyme linked immunosorbent assay method, International Invertebrate Immunology Conference, France, 1984.
- [14] Kalalova, S., Weiser, J., Identification of microsporidia by indirect antibody test, Proc. V th International Ollloquium of Insect Pathology and Microbial Control, Oxford, 1973, 111.
- [15] Vavra, J., Canning, E. U., Barker, R. J., Charactics of microsporidian genera, *Parasitology*, 82 (1981), 131—142.

STUDIES ON DETECTION OF PEBRINE SPORE, *NOSEMA BOMBYCIS* OF SILKWORM, *BOMBYX MORI* BY ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY AND ANTIGEN SPOT TEST

Huang Ziran

(Department of Sericulture)

Zheng Xiangming

(Institute of Sericulture, Guangdong Academy of Agricultural Science)

ABSTRACT

The high level assay sensitivity and specificity were achieved with enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for detecting pebrine spore of silkworm moth.

The antigen, made of the crushed spore by separating with ultracentrifugation, or homogenate of the silkworm midgut infected with pebrine spore, was injected into the rabbit. immunoserum was labelled with horseradish peroxidase by the one-step method. Glutaric dialdehyde was used as cross-linking agent for coupling enzyme to pebrine spore antibody protein. 0.05% H_2O_2 and ortho-phenylene diamine or diaminobenzidine, 4HCl solution was used as the substrate of the peroxidase. A brown color was induced which indicated the spore of pebrine was found. The more accurate method by reading the O. D. value of the color developed by the reaction of ELISA with spectrophotometer at 492 nm was also used.

Recently, we described an assay for the detection of a antigen of pebrine spore by using nitrocellulose filter as an antibody spot test (AST). Haemolymph of the silkworm moth or the homogenate of the midgut of silkworm was spotted on the nitrocellulose filter, which was then left at room temperature for 15 min. Enzyme linked anti-pebrine spore serum was applied on the filter, which was then incubated at 4°C for 2 hours. Afterward the filter was washed 3 times by shaking for 30 min with buffer. The result of detection was achieved by adding the substrates of H_2O_2 and diaminobenzidine. A brown color spot was appeared if the spore developed in the haemolymph or midgut.