

应用亲和素——生物素——过氧化物酶复合物技术检测组织细胞中的禽呼肠孤病毒抗原*

孙彦伟** 刘福安
(兽医系)

摘要 应用亲和素——生物素——过氧化物酶复合物(ABC)技术检测经不同途径接种 ARV 的鸡只,结果表明 ARV 抗原广泛分布于内脏实质器官、肠道、腱鞘和滑膜。在接种后4周除腱鞘和滑膜外,都检不到病毒抗原的存在,而这两种组织到试验结束时(60 d)仍为阳性,感染鸡血液涂片的 ABC 检测结果均为阴性。ABC 技术比病毒分离法更敏感。

关键词 ABC 技术;呼肠孤病毒分布

病毒分离是鸡病毒性关节炎常用诊断方法之一,然而其病原——禽呼肠孤病毒(ARV)在病鸡^[9]和没有临床症状的鸡^[10]都能分离到,因而降低了这种方法的特异性;荧光抗体技术虽应用于检测组织细胞中的 ARV 抗原^[7],但 Menendez 等^[10]和 Naqi 等^[11]证明病毒分离比荧光抗体技术更可靠。Hsu 等(1981)首先建立亲和素——生物素——过氧化物酶复合物(ABC)技术并且检测到甲醛固定、石蜡包埋组织中的抗原,在敏感性、特异性和染色强度上都比荧光抗体技术和其他免疫酶方法包括过氧化物酶——抗过氧化物酶法强^[5],Tang 等^[12]应用 ABC 技术检测到石蜡包埋组织中的 ARV 抗原。

ABC 试剂国内已有生产,这类试剂稳定性能好,标记的抗体活性没有受到影响^[3],而且 ABC 技术简单,一般光学显微镜下即可观察,样品可以保存。本试验试图应用该技术检测 ARV 抗原的分布状况,同时与病毒分离法做比较。

1 材料与方法

1.1 人工感染试验

1.1.1 病毒 从关节炎病鸡跗关节中分离的禽呼肠病毒(ARV)^[2],经空斑纯化,非免疫蛋孵化的 9 d 龄胚繁殖。

1.1.2 鸡只 来自非病毒性关节炎疫苗免疫鸡群后代的刚出壳 AA 雏鸡(购自广州市郊区某鸡场)。

把 127 只没有 ARV 母源抗体的雏鸡随机分成 4 组,1 d 龄时进行如下处理:

第 1 组:32 只,颈部皮下(SC)注射 ARV 0.2 ml ($10^{4.5}$ TCID₅₀),5 只不做任何处理,同栏混养,作为接触感染鸡(SIC)。第 2 组:32 只,经口接种(OR),即食道内注入 ARV

- 本论文是第一作者硕士论文第 3 部分。
 - 1989 年硕士毕业生,现在广东省兽医防疫检疫站工作。
- 1991-06-04 收稿

0.2 ml ($10^{4.5}$ TCID₅₀), 5 只不做任何处理, 同栏混养, 为接触感染鸡 (OIC)。第 3 组: 32 只, 左脚足垫注射 ARV 0.1 ml ($0.5 \times 10^{4.5}$ TCID₅₀), 5 只同法注射不含病毒的无菌 Hanks' 平衡盐溶液 0.1 ml, 并同栏混养, 做为接触感染鸡 (PIC)。第 4 组: 16 只, 不做任何处理, 隔离饲养, 作为非接种对照组 (Con)。

各组鸡只隔离饲养, 让其自由采食饲料, 人员入鸡舍换鞋, 穿工作服, 手也进行消毒, 以防混合感染。在接种后 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 13, 17, 22, 28, 33, 39, 46, 53, 60 d 每次杀死第 1, 2, 3 组的 ARV 接种鸡各 2 只 (包括死亡的), 第 4 组 1 只; 各组的同栏混养鸡分别在混养后 3, 7, 13, 39 和 60 d 各杀死 1 只, 进行如下处理:

(1) 抹血片, 自然干燥后用 4℃ 丙酮固定 10 min, 待丙酮挥发后, -20℃ 保存, 以作亲和素——生物素——过氧化物酶复合物 (ABC) 检测。(2) 心脏穿刺采血, 分离血清, 检测血清中的 ARV 中和抗体, 以找出抗体与组织细胞中抗原的关系。(3) 剖开鸡只, 取肝、心、肌腱 (单侧), 分别磨成匀浆, 冻融 3 次后离心, 取上清液和泄殖腔洗出液分别接种鸡胚肾细胞 (CEK) 单层, 进行病毒回收。(4) 取肝、心、脾、肺、肾、腔上囊、胸腺、十二指肠、空肠、盲肠、趾屈肌腱、腓肠肌腱、心包膜, 10% 甲醛溶液固定, 石蜡包埋, 制成 5 μm 厚的切片, 每一组织取两个样品, 每样品切 8 片, 载于 4 块玻板上, 进行 ABC 试验。

1.2 亲和素——生物素——过氧化物酶复合物 (ABC) 技术检测组织细胞中的 ARV 抗原

1.2.1 抗原的繁殖、浓缩与提纯 空斑纯化的 ARV 接种由非免疫蛋孵化的 9 d 龄鸡胚, 收获死胚的尿囊液。

含病毒的尿囊液经 9 000 r/min 离心 30 min 去除沉淀物后, 40 000 r/min 离心 1 h 沉淀病毒, 用少量的 TSE (0.02 mol/L Tris, 0.15 mol/L NaCl, 0.002 mol/L EDTA) 分散病毒沉淀物。

初步提纯的病毒液经 Sephadex G200 层析柱, 用 TSE 洗脱, 核酸——蛋白检测仪 λ 254 nm 检测, 收获第一峰, 即为纯病毒馏分, 用 Beckman Du-7 紫外分光光度计检测病毒液的紫外吸收特性及含量。

1.2.2 兔抗 ARV 免疫球蛋白 G (IgG) 的制备 参照王世中 (1980) 的《免疫化学技术》^[1]介绍的方法进行。

健康的新西兰白兔 2 只, 体重约 4 kg, 购自某大学实验动物场。

免疫计划: 第 1 次两后足掌和腹股沟皮内多点注射有弗氏佐剂的浓缩 ARV 抗原, 1 ml/只; 第 2 次, 即第 1 次注射后 3 周, 皮下多点注射不加佐剂的浓缩 ARV 抗原, 总量 1 ml/只; 第 3 次, 即第 2 次注射后 1 周, 注射不加佐剂的浓缩抗原 2 ml/只; 第 3 次注射后 10 d, 用琼扩法测得抗血清的效价为 1:32。特异性检查发现除抗 ARV 特异性抗原外, 存在抗正常鸡组织抗原的成分。4 d 后颈动脉放血, 分离血清, 用正常鸡肝脏制备的组织干粉吸收血清, 除去血清中抗鸡组织抗原的成分, 硫酸铵盐析法提纯兔抗 ARV IgG, 用琼扩法测定 IgG 的纯度和特异性, 结果只出现一条沉淀线, 说明抗鸡组织抗原的成分已被除去, 纯度较高, 用紫外分光光度计测知 IgG 的含量为 14 mg/ml。

1.2.3 ABC 检测程序 参照 Tang 等 (1987)^[13]介绍的方法进行。

生物素化羊抗兔 IgG (b-SARG), 批号 87-1, 使用浓度 1:1000 稀释。

亲和素——生物素——过氧化物酶复合物 (ABC) 溶液, 批号 88-4, 使用浓度 1:100 稀释。

以上两种试剂均购自卫生部上海生物制品研究所。

磷酸盐缓冲液 (PBS), 0.01 mol/L, pH7.2, 用于冲洗组织切片, 用 PBS 稀释的 10% 正常山羊血清, 用于配制 b-SARG 和处理组织切片。

底物液: 0.05% 3,3'—二氨基联苯二胺盐酸盐 (DAB) 含 0.045% H₂O₂ (0.1 mol/L pH5.0 的柠檬酸盐缓冲液用时即配)。

ABC 检测程序

经脱腊和水化后的组织切片或丙酮固定的血液抹片, 浸于含 0.3% H₂O₂ 的纯甲醇溶液中 30 min, 以抑制内源性过氧化物酶。

↓ PBS 洗 3 次

滴加含 10% 正常山羊血清的 PBS, 37℃ 30 min 以去除非特异性背景染色

↓

滴加不同含量的兔抗 ARV IgG (第一抗体) (25, 50, 100, 200 μg/ml), 37℃ 湿盒中孵育 1 h

↓ PBS 洗 3 次

滴加 b-SARG (第二抗体), 37℃ 孵育 1 h

↓ PBS 洗 3 次

滴加 ABC 溶液, 37℃ 孵育 30 min

↓ PBS 洗 4 次

滴加即配底物液, 37℃ 10 min

↓ 自来水洗 5 min, 双蒸水洗 1 次

苏木素衬染 15 min, 脱水, 透明, 封片后在普通光学显微镜下检查

1.2.4 对照组

(1) 阴性组织对照组: 用非感染鸡的血液抹片和组织切片代替病毒接种鸡的血液抹片和组织切片。(2) 阴性血清对照: 以正常兔血清代替兔抗 ARV IgG。(3) 空白对照: 用非感染鸡的血液抹片和组织切片直接进行 ABC 染色。(4) 内源性过氧化物酶对照: 脱腊组织切片和血液抹片直接滴加底物液。

2 结果

2.1 ABC 检测病毒抗原及其在机体中的分布, 详见表 2, 3。兔抗 ARV IgG 的最适使用浓度为 50 μg/ml (见表 1)。

表 1 兔抗 ARV IgG 各种浓度的 ABC 染色结果

IgG 浓度 (μg/ml)	25	50	100	200
阳性染色强度	弱	黄棕	深棕	浓棕
背景染色	没有	没有	淡黄	浅黄

表 2 不同接种途径组织细胞 ABC 技术检测病毒抗原的分布情况

感染后天数 组别	2		3		4		5		6		7		9		13		17		22~28		33~39		46		53~60	
	FP	SC OR	FP	SC OR	EP	SC OR	FP	SC OR	EP	SC OR	FP	SC OR	FP	SC OR	FP	SC OR	FP	SC OR	FP	SC OR	FP	SC OR	FP	SC OR	FP	SC OR
肝脏	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
心肌	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
脾脏			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
肺脏				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
肾脏			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
滑膜肌腱鞘			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
胸腺	+		+																							
腔上囊			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+												
心包膜				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
十二指肠	+		+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
空肠			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
盲肠	+		+						+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

“+”表示 ABC 技术检测到病毒抗原。
FP：足垫接种；SC：皮下接种；OR：经口感染。

在下列细胞的胞浆中可见黄棕色的特异性染色,呈颗粒状或不规则形,镜下每一视野可见有1~5个细胞有这种颗粒。这些阳性染色的细胞是:肝坏死灶周围的肝细胞和枯否氏细胞;心肌纤维和心肌纤维间浸润的单核细胞;脾脏的干细胞;肺脏的尘细胞;肾脏的肾小管上皮;腱鞘的增生成纤维细胞和组织细胞,滑膜上皮;胸腺的干细胞;心包膜浸润的巨噬细胞;肠粘膜上皮;法氏囊的上皮、干细胞。

从表2可以看出,ARV经足垫、皮下和经口感染后,病毒抗原广泛分布于内脏实质器官、肠道、肌腱和滑膜,在接种后4周除肌腱鞘和滑膜外,都检不到病毒抗原的存在,而这两种组织到试验结束时(60 d)仍为阳性。

表3 不同接种途径同居鸡组织细胞ABC技术检测病毒抗原的分布状况*

天龄	3	7	13	39	60
组别	FIC SIC OIC	FIC SIC OIC	FIC SIC OIC	FIC SIC OIC	FIC SIC OIC
肝 脏		+	+		
心 脏		+	+		
脾 脏					
肺 脏		+			
肾 脏					
滑膜肌腱鞘			+	+	+
胸 腺					
腔 上 囊		+			
心 包 膜					
十二指肠					
空 肠					
盲 肠			+		

* “+”表示ABC技术检测到病毒抗原。

FIC: 与足垫接种鸡同居; SIC: 与皮下接种鸡同居; OIC: 与经口感染鸡同居。

感染鸡的血液抹片没有呈现有阳性结果。阴性组织对照、阴性血清对照和空白对照均为阴性结果,内源性酶对照组可见各种细胞染成淡黄色,尤其是红细胞,说明正常的组织细胞中存在能使底物显色的内源酶,但经H₂O—甲醇处理后,这种染色现象消失,说明内源酶已被破坏。

从表3可以看出,与不同接种途径同居的鸡只的病毒抗原主要存在肝脏、心肌、滑膜和腱鞘,这说明该病毒能发生水平传播。

2.2 病毒的回收结果 详见表4,同一病毒感染鸡的肝脏、心肌、肌腱鞘和滑膜的ABC检测结果与病毒分离结果是相近的,而ABC方法比病毒回收更敏感,在回收不到病毒的情况下用ABC法仍可检出病毒抗原存留,而且ABC法能更早地检出病毒抗原的存在。

2.3 病毒的存留和血清中抗体的关系

详见表5,可见在抗体存在时病毒也同时存在。

表4 不同接种途径病毒的回收结果^{*}

接种后天数	4	5-7	9	13
接种途径	FP SC OR	EP SC OR	FP SC OR	FP SC OR
肝 脏	++	+++	+	
心 肌		+++	+	
肌腱滑膜	+	+	+	+
接种后天数	17-39	46	53	60
接种途径	FP SC OR	EP SC OR	FP SC OR	FP SC OR
肝 脏				
心 肌				
肌腱滑膜		+++	++	+

^{*}“+” 病毒回收阳性。
FP、SC、OR 见表2注解。

表5 试验（一）同一试验鸡病毒存留与血清中和抗体的关系^{*}

接种途径	1~7 d		22~28 d		39 d		46 d		53 d		60 d	
	病毒	抗体	病毒	抗体	病毒	抗体	病毒	抗体	病毒	抗体	病毒	抗体
FP	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
SC	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+		
OR	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+
FIC	+	-			+	+					+	+
SIC	+	-			+	+					+	+
OIC	+	-			+	+					+	+
con	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

· “+”表示病毒存留或抗体存在。只要机体中某一器官检出病毒，就计病毒存留；

“-”表示没有病毒存留或没有抗体存在。

FP、SC、OR、FIC、SIC、OIC、con 见表2，3注解。

3 结论与讨论

ABC 染色技术是近年来建立的免疫化学方法之一^[3]，它操作简单，而且敏感性高，特异性好，用它检测组织细胞中的 ARV 抗原，收到良好的效果，可作为检测 ARV 抗原的一种新方法。

经差速离心法和层析法提纯的病毒抗原免疫兔子制备的高免血清中存在的非特异性的兔抗鸡组织抗原的成分，经过鸡组织干粉吸附后而被消除。在病毒抗原的提纯上，虽然密度梯度离心法是进一步提纯方法之一，但该方法在一般的实验室是难以进行的，而且费用大，而用层析法进一步提纯病毒抗原，虽然难以达到极高纯度，但它简易可行，值得倡用。

非特异性的背景染色是免疫过氧化物酶研究的一个重要问题，它干扰特异性阳性结果的判断。细胞内源性过氧化物酶和细胞色素 C 能够与底物 DAB-H₂O₂ 反应而产生假阳性^[4]，组织切片经 H₂O₂-甲醇预处理后抑制了这种非特异性的产生^[12,13]，本试验证实了上述情况。用制备第二抗体同种动物的非免疫血清预处理，防止了第二抗体与被检组织的非特异性结合。在进行 ABC 染色的过程中，被检组织切片应一直保持湿润状况，如果不留意让其干燥，会增加非特异性染色，尤其在滴加底物的显色过程中。在冲洗过程中，操作应特别小心，否则贴于玻板上的组织切片会被冲走，影响整个染色过程的继续进行。底物 DAB 较难溶于柠檬酸盐缓冲液，在使用前应提前配制，使其充分溶解，同时用滤纸过滤除去未溶解的颗粒，使用时再加入 H₂O₂，这样可以防止未溶解的 DAB 颗粒沉于被检组织上而影响结果的判断。当然，通过调焦，仔细观察可以排除这种干扰。对于 ABC 染色技术，除排除上述种种影响因素外，最关键的是制备高纯度和高特异性的第一抗体。

与 ARV 接种鸡同居的鸡只在同居后第 7 d 开始器官中病毒抗原的检出，说明了同居鸡只已被 ARV 接种鸡所传染。

尽管血液中有有一定水平的 ARV 特异性抗体，但仍可在关节部位的肌腱鞘和滑膜回收 ARV，以前也有类似的报道^[6,11]，ABC 染色法检测到腱鞘的增生成纤维细胞和组织细胞以

及滑膜上皮细胞浆的病毒抗原,因而认为存留的病毒潜藏于细胞中,同时由于该部位血管不发达,使病毒逃脱了体液抗体的作用,存留在腱鞘和滑膜中的 ARV 是否会重新转移到其他部位,甚到向外界排毒仍需进一步研究。

致谢 具体试验过程中得到华南农业大学兽医系细胞室戚丹英老师、孔德迎老师、李惠颜同志的帮助,以及切片室的协助,在此致以衷心的感谢。

参 考 文 献

- 1 王世中.免疫化学技术.北京:科学出版社,1980.158~161
- 2 孙彦伟,刘福安.禽呼肠孤病毒的分离和鉴定.中国畜禽传染病,1990(5):1~3
- 3 徐荣佳.ABC技术及其应用.国外医学(临床检验与生化检验),1985,5(4):20~23
- 4 Buijs R M. Intra-and extrahypothalamic vaso-pressin and oxytocin pathways in the rat. Cell Tissue Res, 1978, 192: 423~425
- 5 Hsu S M, Raine L, Fanger H. A comparative Study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radio-immunoassay antibodies. Am. J. Clin. Pathol, 1981, 75: 734~738
- 6 Jones R C and Kibenge F S B. Reovirus-induced tenosynovitis in chickens: The effect of breed. Avian Pathol, 1984, 13: 511~528
- 7 Kawamura H, Tsubahara H. Common antigenicity of avian reoviruses. Nat. Inst. An. Health Quart, 1966, 66: 187~193
- 8 Masquardt J, Hermanns W, Schulz L W and Leibold W. A persistent reovirus infection of chickens as a possible model of human rheumatoid arthritis (RA). Zentralblatt fur Veterinarmedizin B, 1983, 30: 274~284 (Vet. Bull Voi 53 Abst 5843)
- 9 Menendez N A, Calnek B W, Cowen B S. Localization of avian reovirus (FDO isolant) in tissues of chickens. Avian Dis, 1975, 19: 112~117
- 10 Mustaffaa-Babjee A, Spradbrow P B, Omar A R. Characterization of an avian reovirus isolated in Queensland. J Comp Pathol, 1973, 83: 387~400
- 11 Naqi S, Pugh R and Sahin N. Expression of Viral arthritis-tenosynovitis in immunosuppressed chickens. Poult Sci, 1984, 63: 825~827
- 12 Streefkerk J G. Inhibition of erythrocyte pseudoperoxidase activity by treatment with hydrogen peroxide following methanol. J Histochem Cytochem, 1972, 20: 829~830
- 13 Tang K N and Fletcher O J. Application of the avidin-peroxidase complex (ABC) technique for detecting avian reovirus in chickens. Avian Dis. 1987, 31: 591~596

**USE OF THE AVIDIN—BIOTIN—PEROXIDASE COMPLEX (ABC)
TECHNIQUE TO DETECT AVIAN REOVIRUS ANTIGEN**

Sun Yanwei Liu Fuan

(Department of Veterinary Medicine)

Abstract The avidin—biotin—peroxidase complex (ABC) technique was used to detect avian reovirus (ARV) antigen in chickens inoculated with ARV via three routes. The test results suggested that the viral antigen was widely distributed in the visceral parenchymal organs, intestinal tract, tendon sheaths and synovial membranes. Except for the tendon sheaths and synovial membranes, viral antigen was not detected 4 weeks after inoculation, but these two tissues still showed positive results when the 60—day experimental period terminated. No positive ABC staining was observed in the blood cell smears of infected chickens. The ABC method was more sensitive than virus isolation.

Key words ABC technique; Reovirus distribution