

应用免疫金电镜技术快速鉴定 动物病毒方法的研究

STUDY ON THE METHODS FOR RAPID IDENTIFICATION OF ANIMAL
VIRUSES BY IMMUNOGOLD ELECTRON MICROSCOPY

李成 谷守林 郝桂玉 姜绍德 张坦

(中国农业科学院哈尔滨兽医研究所)

Li Cheng Gu Shoulin Hao Guiyu Jiang Saode Zhang Tan

(Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences)

摘要 本文提出了一种改进的免疫金电镜技术,即,离心法、快速鉴定动物病毒。发现了离心法比混合法和滴附法较为理想,非特异性反应较小,灵敏度高,可作为常规快速鉴定动物病毒方法。

关键词 免疫金;电镜技术;轮状病毒;细小病毒

Key words Immunogold; Electron Microscopic technique; Rotavirus; Parvovirus

应用直接电镜技术对临床样品或细胞培养材料中动物病毒的检出和鉴定,由于杂质的干扰,是比较困难的。当向样品中加入特异性抗体时,抗体将病毒粒子包被起来或形成抗原-抗体复合物,电镜下较容易观察到,但由于难掌握合适的抗原,抗体结合的浓度,往往也得不到较满意的结果。经进一步改进,把抗体用电子散射力强的胶体金标记上,因为金颗粒在电镜下是非常容易识别出,而金颗粒标记的抗体与相应抗原(病毒粒子)相结合,当找到了胶体金颗粒,就非常容易地鉴定出病毒粒子或抗原物质来,但由于制样方法不当,往往出现非特异性反应,也就是非病毒粒子或非抗原物质上也附着金颗粒。为了消除此种现象,本试验利用猪轮状病毒和猪细小病毒进行了多次试验,找出了合适的方法,得出了较满意的结果,兹介绍如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 含有轮状病毒的猪腹泻粪便,兔抗猪轮状病毒高免血清,由王玉春副研究员惠赠。

1.1.2 接种猪细小病毒的猪胎肾细胞培养物以及猪细小病毒高免血清,由王润芝副研究员惠赠。

1.1.3 葡萄球菌蛋白 A 包被了的胶体金(PAG),粒径约 5 nm(自制)。

1.2 方法

方法一(混合法),取待检样品 50 μ l、PAG 50 μ l 放在一起混合,混匀后,置于 37℃ 温箱中感作 1 h,再置 4℃ 冰箱中过夜(有时不经过放置冰箱步骤),将感作后的混合液滴附在蜡盘上,把碳福尔马膜铜网,膜面向下放在液滴上,经 1 min 后,取下铜网,用滤纸吸掉多余的样品液,再将该铜网放在 pH6.5 2% 磷钨酸液滴上,染色约 1 min 后,用滤纸将多余的染液吸干,自然干燥,电镜检查。

方法二(滴附法): (1) 将 10 μl 病毒液滴附在蜡盘上, 把带碳-福尔马膜铜网膜面向下置于液滴上。约 1 min, 用滤纸将多余的病毒液吸掉; (2) 10 μl 高免血清 (1:10 $\times$) 滴附在蜡盘上, 把带有病毒液的铜网置于该液滴上并放在 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中感作 30 min 后, 用滤纸吸掉多余的血清液; (3) 用蒸馏水以液滴方式洗 2 次; (4) 10 μl PAG 滴附在蜡盘上, 再将经上述步骤处理的铜网置于该液滴上, 约 1 h 后, 用滤纸吸掉多余的 PAG 液; (5) 用蒸馏水以液滴方式洗一次, 然后用滤纸吸掉多余液体; (6) 用 pH6.5 2% 磷钨酸负染 1 min 左右, 滤纸吸干后镜检。

方法三(离心法): (1) 病毒液 50 μl 和相应的高免血清 50 μl 混合、混匀; (2) 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中感作 1 min; (3) 用蒸馏水以充满管的方式高速离心, 速率为 10 000 r/min, 离心 30 min, 弃上清, 此步骤可以反复 2 次, 目的是去掉没有结合的游离在上清中的抗原或抗体成分; (4) 取其沉淀物, 用蒸馏水 100 μl 将其悬浮; (5) 加 50 μl PAG 液混合、混匀; (6) 放在 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中感作 30 min; (7) 用蒸馏水以充满管的方式同样速率高速离心 30 min; (8) 弃上清, 取其沉淀物, 用 100 μl 蒸馏水将其悬浮; (9) 粪便样品和细胞培养物分别由 pH7.0 和 pH6.5 磷钨酸电子染色, 电镜观察。

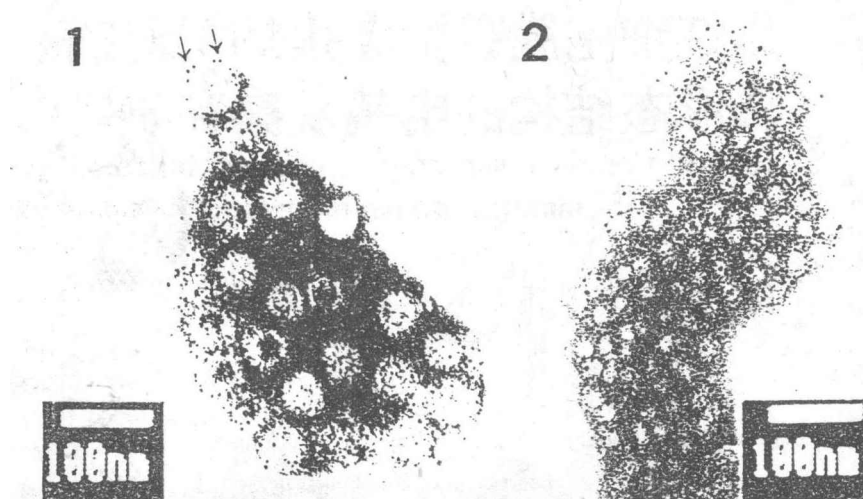
2 结果和讨论

应用方法三所制备的免疫金样品, 通过电镜观察, 发现了在单个病毒粒子或集堆的病毒粒子表面和周围有许多金颗粒附着, 金颗粒呈现出非常强的反差, 在被金颗粒围绕的结构, 清楚地表明了是病毒粒子或抗原物质(图 1-2), 从图 1 中可以观察到破碎的病毒粒子表面附有大量的金颗粒, 这说明病毒破碎后, 表现出较强的抗原性。

应用方法二和方法一所制备的样品, 通过电镜观察, 发现存在一定非特异性反应, 也就是在非病毒结构或碳-福尔马膜空白处同样发现了一定量的金颗粒。不过方法二比方法一的非特异性反应较小些。

通过上述结果, 我们认为方法三所制备的样品特异性比较高, 也就是说应该标记金颗粒的地方都有金颗粒附着, 不应该标记的地方基本看不到金颗粒存在。方法三是通过两次高速离心的方法去掉多余的反应物。第一次高速离心是除掉抗原抗体结合后, 没有参与形成复合物而过剩的抗原或抗体物质。因为这些过剩的抗原或抗体游离在样品中, 当加入 PAG 时, 也会与其反应, 产生非特异性标记。通过 10 000 r/min 离心, 只能把抗原抗体复合物离心下来, 而游离的抗原或抗体一般是沉淀不下来的, 仍存在于上清液中弃掉。第二次高速离心是去掉多余的 PAG, 没有能与形成复合物的 PAG 混在样品中也会产生非特异性反应, 因为铜网的碳福尔马膜对一切蛋白质都有一定吸附能力, 如果被检样品中通过纯化处理后, 即没有游离的抗原, 也没有游离的抗体, 再没有游离的 PAG, 全是特异性结合的抗原抗体-PAG 结合物, 就不会担心有其他非特异性物质干扰。

方法二比方法一非特异性反应小, 因为方法二在操作中也有两次用蒸馏水洗, 洗掉过剩的反应物, 但不会彻底洗掉, 因为铜网膜对这些物质还有一定的吸附力, 只能是减小一些非特异性而已。方法一, 是把所有的反应物统统放在一起, 各反应物合适的反应量很难掌握, 容易出现某一反应不足或过剩, 这是产生非特异性反应的主要因素。



图版 1 猪腹泻粪便中的轮状病毒，在病毒粒子表面，尤其是在破碎了的粒子表面有许多免疫金颗粒（箭头）

2 猪肾初代细胞培养物上的细小病毒，在细小病毒聚集体表面及周围有许多的免疫金颗粒