

点免疫结合测定法检测家蚕病毒

郭锡杰 钱元骏 胡雪芳 王红林

(中国农业科学院蚕业研究所, 镇江)

在抗原抗体检测中, ELISA 法是非常灵敏的定量定性方法。Hawkes 等 (1982) 以硝酸纤维素薄膜代替 ELISA 法中的固相载体, 建立了点免疫结合测定法 (Dot immunobinding assay——DIBA), 用于检测单克隆抗体与人体病理血清中的混合抗体^[1]。该方法反应结果可以保存, 随时观察。日比 (1984) 改良了该方法, 使得操作更加简便, 以非常高的灵敏度检测了植物病毒^[2]。我们用醋酸纤维素薄膜代替硝酸纤维素薄膜并进一步改进后, 用于检测家蚕病毒获得成功, 比以往的检测方法^[3]如双向扩散、对流免疫电泳等具有更高的灵敏度, 现报道如下。

材料与 方法

(一) 病毒与抗血清

1. 家蚕质型多角体病毒 (CPV): 收集感染 CPV 的家蚕中肠, 匀浆后用磷酸缓冲盐水离心洗涤, 分离出多角体。将多角体碱解后调 pH 至中性, 离心 (3500r/min) 去除沉淀。将收集的上清液经 Sephadex G-200 柱层析分离, 用 0.01M, pH 7.8 磷酸缓冲液洗脱, 可得到纯的 CPV。以此为抗原, 静脉注射免疫雄性家兔, 制备得到抗血清^[4]。

2. 家蚕浓核病毒 (DNV): 收集感染 DNV 的发病蚕中肠, 匀浆后采用氯仿去除脂质, 硫酸铵盐析和差速离心的简易纯化法纯化 DNV, 并以此为抗原免疫雄性家兔, 制备抗血清^[5]。

(二) 酶标抗体

辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 结合物 (HRP-IgG), 卫生部北京生物制品研究所制备, 使用时 1 支加 0.5ml 无离子水溶解, 再以 0.05M, pH 7.4 Tris-HCl 缓冲盐水 (TBS) 稀释。

(三) DIBA 法操作步骤

按文献[2]中步骤改进而得:

1. 将醋酸纤维素薄膜(下称薄膜)用蒸馏水

或 TBS 浸湿, 晾干。

2. 用微量注射器在薄膜毛面上点样, 每斑 1 μ l (如为病蚕组织匀浆液则用毛细滴管点样), 室温下晾干, 使病毒固定在薄膜上。

3. 将薄膜浸入 1% 牛血清白蛋白溶液中 5—10 分钟。

4. 取出薄膜并平贴于平板玻璃上, 滴加抗病毒血清, 37 $^{\circ}$ C 湿盒内进行第一次培养, 30 分钟。

5. 先将薄膜在蒸馏水中漂洗, 再用 TBS-Tween 20 (Tween 20 含 0.05%) 漂洗 30 分钟, 换液 3 次。

6. 取出薄膜平贴于平板玻璃上, 用滤纸吸去过多的水份, 滴加 HRP-IgG, 37 $^{\circ}$ C 湿盒内进行第二次培养, 30 分钟。

7. 同 5 步骤漂洗。

8. 取出薄膜以底物溶液(二氨基联苯胺四盐酸盐 75mg 于 100 ml pH 7.6、0.05M Tris-HCl 中搅拌溶解, 过滤后加入 0.01% H_2O_2) 显色 5—10 分钟, 保持薄膜湿润状态观察结果。薄膜可晾干后黑暗保存, 必要时将薄膜浸湿即可重复观察结果。

(四) 对流免疫电泳和双向扩散

均按文献[3]中方法进行。

结 果

(一) DIBA 法检测家蚕病毒的实用效果

用纯化的家蚕 DNV 和 CPV 分别点样, 并分别以相对应的抗血清进行第一次培养。经第二次培养和显色后, 在白色薄膜背景上病毒斑点部位都呈现棕黄色, 即为阳性反应。以 TBS 代替病毒抗原或以正常血清代替抗病毒血清均为阴性反应。DIBA 法对 DNV 的最小检出量 (O. D) 为

本文于 1986 年 11 月 12 日收到。

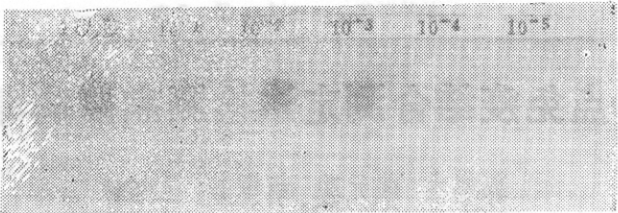


图1 DIBA 法检测纯化 DNV

1×10^{-4} (图1), 而对流免疫电泳 (CIE) 和双向免疫扩散 (DID) 法只能检出 0.1 (表1), 即 DIBA 法的检出灵敏度比对流免疫电泳和双向免疫扩散提高了 1000 倍。

(二) DIBA 法检测家蚕病毒的最适条件

1. 抗血清的稀释度: 将抗血清倍比稀释, DNV 10 倍系列稀释, 用 DIBA 法进行方阵滴定, 结果(表2) 可见, 抗血清在 1:32768 稀释时仍能检出较强的阳性反应。但在 1:2048 以下时检出

灵敏度最高, 因此实验中宜用 1:1024—1:2048。

表1 DNV 不同检测方法灵敏度比较

检测方法	检出病毒量 (O.D)	抗血清稀释度
DIBA	1×10^{-4}	1:2048
CIE	1×10^{-1}	1:2048
DID	1×10^{-1}	1:128

注: DIBA 法中 HRP-IgG 为 1:16 稀释。

表2 抗 DNV 血清稀释度与 DNV 最小检出量

血清 DNV (O.D)	抗 DNV 血清									正常血清	
	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096	1:8192	1:16384	1:32768	1:16	1:32
1	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-	-
10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
10^{-2}	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
10^{-3}	+	+	+	+	+	±	-	-	-	-	-
10^{-4}	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
10^{-5}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TBS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

注: ++ 强阳性; + 弱阳性; ± 阳性反应不易识别; - 阴性(下同)。HRP-IgG 为 1:16 稀释。

表3 HRP-IgG 稀释度与阳性反应

DNV (O.D)	HRP-IgG								
	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
1	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	±
10^{-1}	++	++	++	++	++	++	+	±	-
10^{-2}	++	++	++	+	+	+	±	±	-
10^{-3}	+	+	+	+	+	+	±	-	-
10^{-4}	+	+	+	+	±	±	-	-	-
10^{-5}	±	±	±	-	-	-	-	-	-

注: 抗 DNV 血清用 1:100 稀释。

表 4 蚕体内 DNV 的检测

抗 DNV 血清	中肠匀浆	健康 蚕					浓核病蚕				
		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
	1:512	+	±	-	-	-	+++	++	+	+	±
	1:1024	+	±	-	-	-	+++	++	+	+	±
	1:2048	+	±	-	-	-	+++	++	±	-	-

注: HRP-IgG 为 1:16 稀释。

2. HRP-IgG 的稀释度: 点样的薄膜以过量的抗 DNV 血清(1:100)培养后,再用倍比稀释的 HRP-IgG 第二次培养,HRP-IgG 稀释度对阳性反应的影响见表 3。表 3 结果可见,本试验所使用的 HRP-IgG 批次的工作浓度以 1:16—1:64 为宜,低于 1:16 会使薄膜背景着色,影响结果的观察。

3. 对蚕体内 DNV 的检测: 取正常健康蚕和感染 DNV 的发病蚕的中肠,分别按鲜重的 10 倍加 TBS 研磨匀浆,再以同样 TBS 10 倍系列稀释,分别用 DIBA 法检测,结果见表 4。在 10 倍稀释时,正常蚕会表现出较弱的非特异性反应,而当 100 倍稀释时,这种非特异性反应可以完全排除。因此,DIBA 法用于蚕体内 DNV 的检测时,样品必须稀释 100 倍以上(图 2)。

500 倍以上稀释时排除了非特异性反应。另外,牛血清白蛋白的使用对于抑制非特异性反应起着很大的作用。HRP-IgG 因不同批次其工作浓度有所不同,因此对于不同批次的 HRP-IgG 必须进行检测试验,确定其最适稀释度。

Hawkes 等(1982)和日比(1984)均使用硝酸纤维素薄膜作为 DIBA 法中抗原的载体。我们以醋酸纤维素薄膜代替硝酸纤维素薄膜,发现效果更佳。在同样操作条件下,检测效果基本相同,但用硝酸纤维素薄膜时背景也有一定程度的着色,在抗原(病毒)量较少时,影响结果的判读,而醋酸纤维素薄膜背景几乎是纯白色的。

当抗原浓度很低时,阳性反应难以判读,此时可进行 2—3 次重复点样,使阳性反应易于观察,但重复点样次数不能过多,以免非特异性反应的出现。

综上所述,DIBA 法用于家蚕病毒的检测,抗血清用量少,操作简便,灵敏度高,结果观察直观,是一个值得在蚕业生产上逐步推广的新的诊断病毒病的方法。

参 考 文 献

- [1] Hawkes, R. et al.: *Anal. Biochem.*, 119: 142—147, 1982.
- [2] 日比忠明: 植物防疫, 38: 36—40, 1984.
- [3] 钱元骏等: 蚕业科学, 12(2): 89—94, 1986.
- [4] 巫爱珍等: 蚕业科学, 6(4): 227—232, 1980.

图 2 DIBA 法检测蚕体内的 DNV

讨 论

DIBA 法操作简单、检测灵敏度高,且反应结果的棕色斑点与白色的薄膜背景形成明显的对照,极易用肉眼判读。但是由于该方法的灵敏度高,也容易出现非特异性反应。因此要求抗血清具有很高的特异性,同时要对待检样品和抗血清进行适当的稀释。本实验中分别以 100 倍以上和