



应用 ELISA 方法快速检测 IHNV-B 病毒

RAPID DETECTION OF INFECTIOUS HEMATOPOITIC NECROSIS VIRUS BENXI STRAIN (IHNV-B) WITH THE ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

赵志壮 牛鲁祺

(中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 哈尔滨 150076)

刘长明

(中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 150001)

Zhao Zhizhuang and Niu Luqi

(Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Harbin 150076)

Liu Changming

(Harbin Veterinary Research Institute, 150001)

关键词 酶联免疫吸附试验, 虹鳟, 传染性造血器官坏死病毒本溪株, 检测
KEYWORDS ELISA, rainbow trout, IHNV-B, detection

采用酶联免疫吸附试验(ELISA)快速诊断病毒性疾病, 由于具有灵敏度高、特异性强和简便等优点, 已在医学和兽医学上得到了广泛的应用。在鱼类病毒检测方面, Dixon, P. F. 和 Hill, B. J. 用 ELISA 方法(1983)快速检测传染性胰脏坏死症病毒(IPNV)^[1]和(1984)几种鱼类弹状病毒^[2], 江育林等(1990)曾报道用此技术快速检测 IPN 病毒^[3], 1990 年在我国本溪虹鳟鱼苗中分离出一株弹状病毒, 暂称之为传染性造血器官坏死症病毒中国本溪株(IHNV-B)^[4], 由于该病毒对虹鳟(rainbow trout)鱼苗危害极为严重, 为预防和控制其蔓延, 本文报道了应用 ELISA 方法对感染的鱼苗、鱼卵和细胞培养物中的 IHNV-B 病毒进行快速检测, 可用目测或酶标检测仪来判定结果。

材 料 与 方 法

1. 病毒培养及提取 取经挑斑法纯化后的 IHNV-B 病毒, 接种于 CHSE 单层细胞中, 待 CPE 出

瓶后,冻融,低速离心取上清液,经(M8型 BAKMON 离心机,130,000g)超速离心后,悬于 PBS 中,567 HITACHI 型紫外分光光度计测定病毒蛋白含量,抗原样品于-20℃备用。

2. 抗血清制备 以混合法免疫大白兔,以腹腔注射法免疫 BALB/C 鼠,以琼脂双向扩散法^[4]测定血清效价水平,待效价达 1:16 时,从颈动脉采集兔血,从眼眶采集鼠血,用冻融后等体积的 CHSE 细胞碎片悬液与血清混合,离心后取上清液,以消除非特异性抗体;以硫酸铵沉淀法提纯血清后,分装冻存。采用方阵滴定法确定使用抗体的稀释倍数。

3. 被检材料的处理 将病毒接种于 FHM 细胞,吸附后加入无胎牛血清的 1640 培养液,每隔 24 小时取样一次;将感染鱼苗内脏匀浆,加入 10 倍量(W/V)的 1640 培养液(内含青霉素 1000U/ml 和链霉素 1000μg/ml),4℃过夜,离心后取上清液;以不同浓度的病毒悬液浸泡虹鳟鱼卵,与感染鱼苗做同样处理。以上各组取样时均分成 2 份,一份在 CHSE 细胞上测定其 TCID_{50/0.1ml} 值,另一份为 ELISA 检测样品。

4. 对照病毒 传染性胰脏坏死症病毒的 IPNV-Sp、IPNV-He 和 IPNV-Ab 株,病毒性出血性坏死症病毒 VHSV,上述病毒均由中国科学院水生生物研究所三室提供。

5. 试剂 包被稀释液(0.05mol/L 碳酸钠缓冲液, pH9.6);洗涤液(含 0.05% 吐温-20 的 PBS,即 PBS-T, pH7.2-7.4);抗体稀释液(含 0.25% 白明胶的 PBS-T);底物稀释液(0.1mol/L 柠檬酸缓冲液, pH5.5);酶标抗体(辣根过氧化物酶标记的兔抗 BALB/C 鼠 IgG,由卫生部北京生物制品研究所生产);底物(邻苯二胺 40mg/50ml,含 H₂O₂ 150μl);终止液(2MH₂SO₄)。

6. ELISA 测定 用兔抗血清包被微量反应板,4℃过夜,然后依次加入待检样品、鼠抗血清和酶标抗体各 100μl/孔,分别于 37℃ 孵育 1 小时,每两步间用 PBS-T 洗 3 次,3 分钟/次,然后加入底物溶液 100μl/孔,37℃ 避光 5~10 分钟后,加入 50μl/孔终止液,目测或在 MB-II 型酶标检测仪上测定波长为 490nm 的光密度(OD 值),以样品孔的 OD 值(P)与阴性对照孔的 OD 值(N)之比大于 2.1(即 P/N > 2.1)定为阳性。

结果与讨论

1. 以琼脂双向扩散方法经 48 小时后,测得兔抗血清效价为 1:16, BALB/C 鼠抗血清效价为 1:32,由于这两种抗体效价均达 1:16,具备了进行 ELISA 试验的必要条件^[4,5],提纯后经方阵滴定确定二种使用抗体的稀释倍数均为 100×。

2. 本实验采用 CHSE 作为免疫用抗原病毒的增殖细胞,以 FHM 作为检测用病毒的增殖细胞,这样来消除抗体内存留的抗 CHSE 细胞成分,减少非特异性反应,保证 ELISA 方法检测该病毒的特异性。将病毒接种于 FHM 细胞后,每隔 24 小时取样,测定其 TCID_{50/0.1ml} 值及相应的 ELISA 试验

表 1 FHM 细胞感染病毒后每隔 24 小时其上清液的 ELISA 测定值

Table 1 ELISA absorbance values of IHNV-B antigen in infected FHM cells harvested at 24h intervals after infection

感染时间(h)	细胞病变(%)	病毒滴度 TCID _{50/0.1ml}	样品 P/N 值
未感染	0	—	1.0
1	0	10 ^{1.2}	1.1
24	0	10 ^{1.8}	1.1
48	1	10 ^{2.4}	1.4
72	20	10 ^{4.0}	3.4
96	50	10 ^{6.0}	4.3

中的 P/N 值见表 1, 可看出在接种病毒 72 小时后, 细胞病变微弱, 病毒滴度为 10^4 TCID_{50/0.1 ml} 时, P/N 值达 3.4, 远大于 2.1, 而显出强阳性; 在感染鱼苗和鱼卵的 ELISA 测定中也得到了相近的结果 (表 2), 当病毒滴度为 $10^{3.5}$ TCID_{50/0.1 ml} 以上时, 便出现阳性结果, 故可认为该方法检出 IHNV-B 病毒的灵敏度为 $10^{3.5}$ TCID_{50/0.1 ml}, 高于此滴度时, 可得到明显的阳性, 此时若用肉眼观察, 清晰可见样品孔的颜色深于对照孔。

表2 感染IHNV-B病毒鱼苗和鱼卵ELISA测定值

Table 2 ELISA absorbance values of IHNV-B antigen in infected fish fry and eggs

感 染 样 品	病毒滴度 TCID _{50/0.1ml}	样品 P/N 值	
鱼 苗	A-01	10 ^{2.2}	1.4
	A-02	10 ^{3.4}	1.4
	A-03	10 ^{3.0}	1.7
	A-08	10 ^{3.8}	2.4
	A-09	10 ^{3.8}	2.2
	A-12	10 ^{4.0}	2.4
	A-13	10 ^{4.5}	2.1
	A-19	10 ^{4.5}	3.3
	A-20	10 ^{5.0}	3.4
	鱼 卵	B-10	10 ^{1.5}
B-11		10 ^{1.5}	1.1
B-12		10 ^{2.2}	1.3
B-13		10 ^{2.4}	1.5
B-14		10 ^{2.5}	2.1
B-15		10 ^{3.5}	2.2

虽然在待检样品接种细胞后第 2 天的 TCID₅₀ 值显示有病毒存在, 而 ELISA 检测却为阴性, 但此时并不能确诊为何种病毒, 即无测定的特异性, 如果用中和试验方法来鉴定病毒, 还要经 4~5 天得出结果, 因所需时间长, 设备复杂, 不能满足快速检测的需要。而在特异快速的基础上, 如何进一步提高 ELISA 的灵敏性还有待更深入的研究。

3. 为测定该方法的特异性程度, 应用兔抗和 BALB/C 鼠抗 IHNV-B 血清, 将 IPNV-Sp、IPNV-He、IPNV-Ab 和 VHSV 作为对照病毒进行交叉反应试验 (表 3), 结果表明 IHNV-B 病毒与上述四株病毒不出现交叉反应 (P/N 值 < 2), 说明该方法具有检出 IHNV-B 病毒的特异性, 也证实该病毒与 VHSV 病毒不是同一种病毒。

表3 ELISA试验中不同病毒的交叉反应

Table 3 Cross-reaction with other viruses in ELISA

病 毒	IPNV-Sp	IPNV-He	IPNV-Ab	VHSV	IHNV-B
P/N值	1.1	1.1	1.3	1.2	2.8

4. 本文应用 ELISA 技术中的双抗体夹心间接法与 Dixon 等所用的直接法相比, 除使用的试剂、底物酶等不同外, 在测定步骤中增加了 BALB/C 鼠抗血清做为第二抗体, 虽使测定时间稍有延长 (约增加 1 小时), 但由于酶标抗体 (辣根过氧化物酶标记的兔抗 BALB/C 鼠 IgG 结合物) 作为标准化的生物制品已有市售, 可直接购买应用, 使得在试剂准备时免去制备和鉴定酶标抗体这一复杂过程。此方法在得到高效价的抗血清后, 可用于 IHNV-B 病毒的检测, 在诊断上提供一个快速准确的手段。

参 考 文 献

- [1] 江育林等, 1990。用酶联免疫吸附试验快速检测虹鳟的传染性胰脏坏死病毒。水生生物学报, 14(3):276-279。
- [2] 刘玉斌、苟仕金, 1989。动物免疫学实验技术, 1-40。吉林科学技术出版社(长春)。
- [3] 赵志壮、牛鲁祺, 1991。中国本溪虹鳟传染性造血器官坏死症病毒(IHNV-B)的初步研究(摘要)。蛙 鳟 渔 业, 4(1):57。
- [4] 殷 震、刘景华, 1985。动物病毒学, 262-387。科学出版社(京)。
- [5] 徐宜为, 1991。免疫检测技术, 158-192。科学出版社。
- [6] Dixon, P. F. and Hill, B. J., 1983. Rapid detection of infectious pancreatic necrosis virus(IPNV) by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J. Gen. Virol.*, 64: 321-330.
- [7] —, 1984. Rapid detection of fish rhabdoviruses by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Aqu aculture*, 42: 1-12.