

## 技术与方法

## 用 ELISA 法和核酸电泳法检测牛轮状病毒

梅魁敏

伍学州

范青生

(江西省儿童医院中心实验室) (江西中医学院微生物教研室) (中德联合研究院“江西-OAI”)

**摘要** 本文用 ELISA、核酸电泳法检测腹泻病牛粪便标本。21 例中检出轮状病毒抗原有 4 例为阳性,占 19.05%。ELISA 法与核酸电泳法结果相符,前者被认为是最值得推广的方法。本研究在江西省首次证明了引起牛腹泻的牛轮状病毒的存在,为防治牛腹泻病采取有效手段提供了病原学依据。

**关键词** 轮状病毒;酶联免疫吸附试验;基因分析

1969 年美国的 Megus 等用电子显微镜观察了犊牛下痢粪便,首次证实其病原为病毒,并于 1976 年正式命名。自此引起了世界各国学者的重视,认为它是引起人畜腹泻病原中最主要的一种病毒,人、牛、马、猪、羊、兔、鹿等均可能感染轮状病毒(Rotavirus, RV)而引起急性腹泻。数年来,我省时有发现乳牛、黄牛、水牛出现以喷射状水泻为主要特征的腹泻,由于病原诊断不明确,不能采取有效的防治措施。1985—1986 年,我们在研究婴幼儿腹泻病毒病原的基础上,用 ELISA 法和核酸电泳法开展了牛腹泻的病原学研究,首次证实了我省牛轮状病毒是引起牛腹泻的病原之一。

## 材料与方 法

## (一) 被检材料

在南昌艾溪湖乳牛场、江西省畜牧良种场和星子县农村分别收集到患腹泻牛粪便标本 21 例,内加 0.1% 叠氮钠防腐,置-20℃ 低温冰箱保存备用。

## (二) 病毒核酸聚丙烯酰胺板状凝胶电泳

参照 Herring<sup>[1]</sup> 和 Gaul<sup>[2]</sup> 等方法进行。

1. 病毒核酸的提取: 取粪便悬液上清液 0.25ml, 加入 Eppendorf 离心管中。加等量 2% SDS-0.2 mol/L 醋酸缓冲液, 振荡 30 秒。

立即加入苯酚-间甲酚-氯仿混合液 0.5 ml, 振荡后 10000 r/min 离心 5min。用毛细管吸出上部水层放入另一离心管中, 此即核酸样品, 立即电泳或置-30℃ 保存。

2. 聚丙烯酰胺板状凝胶电泳: 应用 10% 聚丙烯酰胺凝胶制成凝胶板。取核酸样品 20μl, 加入样品缓冲液 10μl 和 0.1% 溴酚蓝液 2μl。混匀后, 用微量注射器加入凝胶样品槽内, 以 Tris-甘氨酸作为电极缓冲液, 以 30—40mA 恒定电流进行电泳。电泳毕, 取下凝胶板置固定液(10% 酒精和 0.5% 醋酸)中振荡半小时。然后改用 0.01mol/L AgNO<sub>3</sub> 液振荡染色 30min, 洗涤后置显影液(3% NaOH 和 0.3% 甲醛)中, 振荡 10 min 即可见到核酸区带。用 5% 醋酸定影, 洗后烘干存放。

## (三) ELISA 法

1. 检测轮状病毒酶标试剂: 由卫生部兰州生物制品研究所供给 Rotavirus ELISA Kit, 批号为 85005。

2. 方法: 以包被缓冲液溶解抗 Rota IgG, 加入微孔板中, 每孔 0.1ml, 4℃ 过夜。用 PBS 洗涤后加稀释一倍的待测粪便上清 0.1 ml, 置 37℃ 2 小时。洗涤后加入酶标记抗 Rota IgG,

江西省家畜防疫站李宝英主管技师提供部分标本, 特致谢。

37℃ 2 小时后洗涤,加入底物溶液,以 2 mol/L  $H_2SO_4$  终止反应。用 GXM-201 型酶标光度计(四川分析仪器厂)检测 OD 值。P/N > 3.0 为阳性, < 2.0 为阴性, 2.0—3.0 为可疑。

## 结果与讨论

用 ELISA 法检测三个地区 21 头牛下痢粪,结果在二个地区检出了轮状病毒抗原,阳性者 4 例,占 19.05%。P/N 值分别为 7.7, 11.0, 17.0 和 3.1。其中艾溪湖乳牛场 1 例(1/5), 星子县 3 例(3/4), 江西畜牧良种场全部阴性(0/12)。

对其中 ELISA 法阳性者,直接从粪便标本中提取 RNA 进行了核酸电泳分型,结果均出现了符合轮状病毒特征的核酸电泳型<sup>[4]</sup>,即病毒基因组由 11 个片段组成,共分为四组。第一组为 4 个较大的片段(第 1—4 条带)。第二组为第 5—6 条带组成的 2 个中等片段。第三组为靠近在一起的 3 个片段(第 7—9 条带)。第四组为第 10—11 条带组成的 2 个片段。

吴城等从牛的泻粪中用电镜和免疫电镜检出轮状病毒,从而确认了牛轮状病毒在我国的存在<sup>[5]</sup>。但由于电子显微镜价格昂贵,使用复杂,而且必须在粪便含有大量病毒颗粒时( $10^7$ — $10^8$  以上)才能检测,故难于广泛使用。本

实验结果表明,ELISA 法和轮状病毒核酸电泳法用于牛腹泻临床诊断,是两种准确、灵敏、快速、简便的检测方法。特别是 ELISA 法被认为是最敏感的方法,并且可用肉眼自测代替分光光度计。即在载体中设一个阈值孔作为标准孔,被测孔颜色与其相比,明显深时为阳性,反之则为阴性。当二者颜色接近时,可分别将被测孔和阈值孔中液体吸入小管中,再用肉眼区别颜色深浅,可辨别出 0.03 的消光值差异,这就便于在我国现有条件下推广和大规模查病用。

福建省牛轮状病毒腹泻多发生在寒冷的二月份,我们分别在 1985 和 1986 年二月份收集到的 21 份粪样中检测出了牛轮状病毒,这与文献<sup>[4,5]</sup>报道相符。

本研究在江西省首次证实了引起牛腹泻的牛轮状病毒的存在,这就要求兽医界在防病治病时必须考虑牛腹泻是否为牛轮状病毒引起。因此,在治疗时必须防止滥用抗生素,以免发生副作用,或迅速采取有效的防治措施。

## 参 考 文 献

1. Herring Y E et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 16 (3): 472, 1982.
2. Gaul K S et al.: *J. Microbiol.*, 16 (3): 495, 1982.
3. 余伯荣等: 中国兽医杂志, 14(6): 12, 1988.
4. 孙茂盛等: 中国人兽共患病杂志, 4(1): 51, 1988.
5. 吴 城等: 畜牧兽医学报, 15(4): 249, 1984.