

应用免疫金银技术检测猪瘟病毒

兔化弱毒株感染细胞

王 镇 张 海 丁明孝

(北京大学生命科学学院 北京 100871)

摘 要 在应用免疫金银染色技术成功地对猪瘟病毒弱毒疫苗 Thiverval 株(CSFV T株)感染的 PK-15细胞进行检测的基础上,通过改进免疫金银反应的条件,进一步提高了免疫金银法的检测灵敏度和特异性。目前已将该技术应用到对猪瘟病毒兔化弱毒疫苗株(CSFV C株)感染细胞的检测,获得较为满意的实验结果。免疫金银染色技术的应用为研究 CSFV 在细胞中增殖的规律提供更为灵敏的检测手段,并且可望为猪瘟疫苗生产中的滴度测定提供一种简便有效的手段。

关键词 免疫金银染色(IGSS),猪瘟病毒(CSFV),猪瘟病毒弱毒 Thiverval 株(CSFV T株)

分类号 S852.4

自1983年 Holgate 等建立免疫金银染色技术(Immunogold-silver staining, IGSS)以来^[1],这一技术以其灵敏度高,简便易行,试剂价廉无毒,样品可较长期保存等优点得到了广泛的应用^[2~7]。Larochelle R 等人将免疫金银技术用来检测猪增殖及呼吸道症病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus PRRSV)抗原在组织中的分布,获得较高的灵敏度^[8]。国内也有一些对该技术进行探讨与应用的报道^[2~4,9]。本文在成功地应用 IGSS 法对培养细胞中 CSFV T 株抗原进行检测后,进一步改进反应条件以提高其检测灵敏度和特异性,现已能够检测出猪瘟病毒中国兔化弱毒株(classical swine fever virus, CSFV C株)感染细胞。实验结果显示:免疫金银技术可望为猪瘟疫苗生产中的滴度测定提供一个简便有效的中间检测手段。并将为我们研究 CSFV 在宿主细胞中增殖过程提供特异灵敏的检测方法。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

PK-15细胞、CSFV T株和C株以及猪的抗CSFV多克隆抗体:均由中国兽药监察所惠赠;抗CSFV囊膜蛋白E2的单克隆抗体:由荷兰DLO动物科学与健康中心的 Moormann 教授惠赠;葡萄球菌A蛋白交联的胶体

金(SPA-G):购自SIGMA公司。所用PBS缓冲液、硝酸银显影液参照文献[10]的方法配制。

1.2 样品的制备

将PK-15细胞培养在10×10mm的盖片上,接近长满单层时,用CSFV T株或C株于37℃分别感作1h, Hank's液洗涤后,加维持液培养。T株病毒培养2d, C株培养4d。用0.01mol/L pH7.2的PBS缓冲液(含0.85% NaCl)冲洗盖片,自然干燥后在固定剂中固定15min,干燥备用。未接毒的细胞按同样方法处理作为对照组。

1.3 免疫金银染色程序

用0.01mol/L pH7.2的PBS缓冲液冲洗固定后的样品盖片,进行免疫反应。首先加入一定稀释度的猪抗CSFV多抗(一抗),37℃温育1h或4℃过夜。之后,依次用0.05mol/L pH7.4的PBS缓冲液、0.02mol/L pH7.4的PBS缓冲液(含1%BSA)冲洗,再加入一定稀释度的SPA-G于37℃温育1h。0.05M pH7.4的PBS缓冲液冲洗,重蒸水反复冲洗,进行银显色反应。在银显影液中暗处显色10min左右,重蒸水冲洗,自然干燥后,

国家攀登计划资助项目(编号85-44-02-05)

1997-11-19收稿

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

于普通光学显微镜下观察结果。

1.4 免疫荧光染色

按照参考文献 [11] 的方法进行。样品用 Olympus 荧光显微镜于 495nm 激发波长处观察或于激光共聚焦显微镜下观察。

2 实验结果

2.1 免疫金银技术反应条件的研究

2.1.1 固定剂的选择: 分别用丙酮、4% 多聚甲醛 + 0.5% 戊二醛及丙酮甲醛混合液 (1:1) 作为固定剂对培养在盖片上的细胞 (接毒及对照的细胞) 进行固定。结果表明用多聚甲醛与戊二醛固定液固定, 免疫金银反应后细胞表面只有少量的标记银颗粒。丙酮与甲醛混合固定液易使固定的细胞形态受到影响, 细胞皱缩, 细胞间界限不清晰, 免疫反应后的冲洗过程中细胞易脱落。而 100% 丙酮室温下固定细胞 15min, 细胞形态保持较好, 冲洗过程中细胞也不易脱落, 标记率明显增高。

2.1.2 抗体及胶体金最适稀释度的选择: 将猪抗 CSFV 多抗、抗 CSFV E2 蛋白的单抗和 SPA-G 分别按 1:10、1:100、1:1000、1:10000 的稀释度稀释进行育温。结果显示: 1:1000 和 1:10000 稀释的抗体足以与抗原充分反应, 但标记率较低。使用 1:10 稀释度的多抗温育, 非特异性的吸附作用也随之增强。1:100 稀释度的多抗与适当稀释度的胶体金反应可得到特异性较强的染色结果。由此本实验使用的多抗的稀释度为 1:100。同样地, 抗 E2 的单抗最佳稀释度为 1:10。

同样, 经试验一抗反应后使用 1:100 稀释度的 SPA-G 与之温育时, 后继的银染色反应时间可相应缩短, 能够获得特异性较强的理想染色结果。

2.1.3 胶体金颗粒粒径对银染效果的影响: 本实验使用 5nm、10nm 及 20nm 三种直径的蛋白 A 胶体金 (SPA-G) 进行银染的敏感性实验。发现胶体金越小其灵敏度越高。使用 5nm 的 SPA-G, 银显影反应速度快、检测灵敏度最高。反应后银颗粒细小、均匀, 且背景颗粒也很少 (图 2), 可以显示出较少量的抗原的存在。使用 10nm 的 SPA-G, 经银显影后虽灵敏度不如使用 5nm 的 SPA-G, 但其银颗粒均匀、规则, 阴性、阳性结果对比明显, 反差大, 背景染色也较低 (图 1), 染色结果易于判断, 因此更适用于抗原较多的样品。使用 20nm 的 SPA-G, 银显影反应速度慢, 背景颗粒较多, 检测灵敏度低,

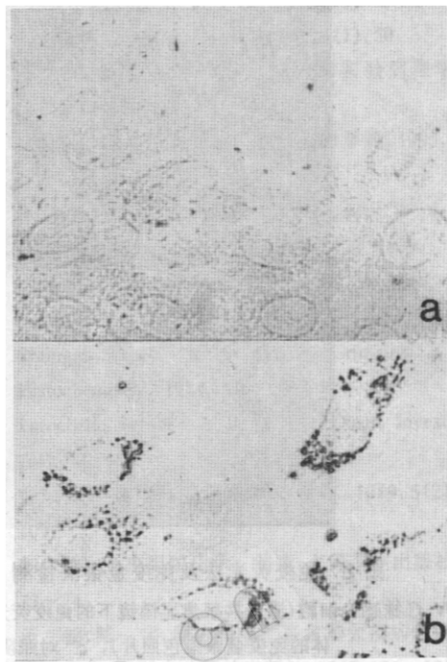


图1 免疫金银法检测CSFV T株感染的细胞(使用 10nm的SPA-G, $\times 400$)

a. 对照, b. CSFV T株感染的细胞

效果不够理想。

2.1.4 免疫反应后戊二醛处理可提高检测的灵敏度: 为减少已结合在 CSFV 抗原部位胶体金颗粒在后面的银显色反应及冲洗过程中脱落, 在 SPA-G 温育后, 增加了 2.5% 戊二醛处理, 通过戊二醛将 SPA 与抗体交联, 以减少银显色反应过程中胶体金的脱落。实验结果表明: 戊二醛处理可以提高整个 IGSS 的检测灵敏度, 尤其对于抗原量较低的 CSFV C 株感染细胞的检测。

2.2 免疫金银染色与免疫荧光染色结果比较

应用免疫金银技术 (使用 10nm 胶体金) 进行免疫标记, 能够非常清楚地显示出未接毒的对照细胞 (图 1a) 与 CSFV 感染的细胞 (图 1b)。在免疫金银染色阳性的细胞中, 银颗粒主要存在感染细胞的胞质中, 尤其集中在细胞核周围, 可清楚地勾划出细胞核轮廓 (图 1b)。CSFV 抗原在细胞中分布的规律与免疫荧光法检测结果相吻合^[11]。免疫金银法检出的阳性细胞中的银颗粒与其周围阴性细胞上的银颗粒数的比值大于 30:1, 显示出较低的本底水平。与免疫荧光法相比, 免疫金银法检测结果反差大, 更易区别阴性和阳性反应细胞 (图 2)。

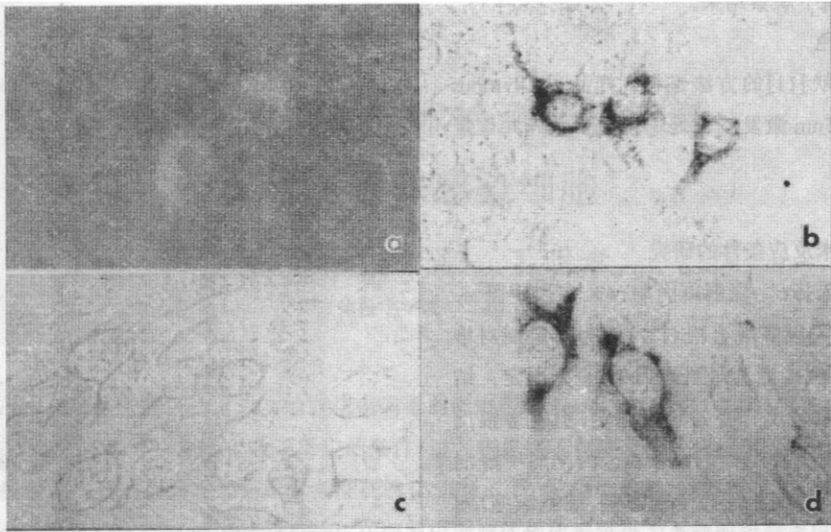


图2 免疫荧光法及免疫金银法检测 CSFV C 株感染的细胞(使用 5nm 的 SPA-G, $\times 400$)

a. CSFV C 株感染细胞(激光共聚焦显微镜下的免疫荧光照片), b. CSFV T 株感染细胞(使用抗 CSFV 囊膜蛋白 E2 的单克隆抗体的免疫金银染色照片), c. 对照阴性细胞, d. CSFV C 感染细胞的免疫金银染色照片

值得注意的是:对 CSFV C 株感染的细胞,用常规的免疫荧光技术难以检测。只有在激光共聚焦显微镜下通过图象叠加技术才可以获得清晰的荧光标记结果(图 2a)。然而应用免疫金银技术,在普通光学显微镜下可以分辨出 C 株病毒感染的阳性细胞和阴性对照细胞(图 2c, 2d)。特别是使用 5nm 的 SPA-G, 经银显影反应后,可清晰地显示 CSFV C 株感染的阳性细胞(图 2d),并且显色时间短,标记的银颗粒细微,灵敏度也优于使用较大颗粒的 SPA-G。我们用特异性更强的病毒囊膜蛋白 E2 的单克隆抗体作为一抗进行免疫反应,同样得到较为理想的结果(图 2b)。

3 讨论

如何简便准确地测定 CSFV 特别是其弱毒株的滴度,是猪瘟疫病毒研究及疫苗生产中有待解决的一个问题。本实验成功地尝试了用灵敏度较高的 IGSS 法对 CSFV T 株感染细胞进行检测。通过对最佳实验条件的摸索,进而清晰地分辨出 CSFV C 株感染细胞。

提高灵敏度势必容易增强非特异性的染色背景,为此在选择最合适的固定与染色条件方面我们进行了一系列必要的探索。常用的多聚甲醛和戊二醛对细胞结构与抗原性保存良好,但染色后效果不佳。而选用丙酮为固定剂则克服了这一弊病。丙酮是脂溶性有机溶剂,可在细胞膜上“打孔”,在脱水的同时使胞内的

CSFV 抗原固定并暴露出来,使免疫金银染色效果明显增强,这也说明 CSFV 的抗原主要存在细胞内部^[11]。

抗体及胶体金的浓度是影响实验灵敏度与特异性的重要因素。本实验条件下,多抗及胶体金的最佳稀释浓度均为 1:100;单抗的最佳稀释度是 1:10。此外,胶体金粒径的大小也是影响实验灵敏度的重要因素之一。本实验使用 5nm、10nm 粒径的胶体金比用 20nm 的胶体金敏感度、特异性要高。实验中粒径小的胶体金更容易到达免疫反应的细胞部位,这可能是其灵敏度高的另一原因。

对于 CSFV C 株感染的细胞,由于病毒抗原含量较低,为提高对微量抗原检测的灵敏度,我们还对反应条件进行了改进。一抗结合的温育条件改为 4℃ 过夜,使微量抗原与抗体充分地结合。此外,我们注意到偶联有胶体金颗粒的蛋白 A 与猪瘟疫病毒抗体结合的反应 pH 为 7.4,而银染色反应是在较低的 pH(3.5)下进行。为防止已与一抗结合的 SPA-G 在银染色反应中解离,以及在银染色反应后的多步冲洗过程中脱离,我们在免疫反应后,银染色反应前增加用 2.5% 戊二醛室温处理 10min。实验结果显示:通过对免疫金银染色程序的改进,能够用 IGSS 法检测到 CSFV C 株感染细胞。与 CSFV T 株感染细胞相比,在 C 株感染细胞质中,特异性银颗粒密度较低。

银染色反应是被检测信号得到放大的过程。也是

免疫金银染色反应中非常重要的一步。该反应中金颗粒通过催化银离子的还原使银沉积在金颗粒表面形成“银壳”,使得被检测信号得到放大,因此可提高检测的灵敏度。影响该反应的因素较多,如银染时间、温度、显影液的成份等。在显影过程中,Ag⁺可以缓慢地被还原成 Ag⁰而沉积,造成非特异的背景染色。因此,反应时间越长,背景染色越深。由于金颗粒催化的银还原反应较快,因此控制染色时间是免疫金银染色成功的关键。银染色的时间随温度的升高而缩短,需根据室温的高低对银染的时间进行调整。除此之外,我们还注意到反应液中杂质离子对银还原过程也有干扰,因此反应所用器皿要洗涤干净,配制溶液应用重蒸水。在控制好银染温度、器皿的清洁度、实验用水等因素的基础上,通过改变显色时样品在明胶显色液与水显色液中的时间比,能够进一步增大显色反应的信噪比,提高反应的特异性,减少背景染色。

参 考 文 献

[1] Holgate C S, Jackson P J, Cowen P N *et al.* J

Histochem Cytochem, 1983, 31(7):938~944.

[2] 张阳根. 上海免疫学杂志, 1996, 16(1): 50.

[3] 张士敏, 侯勇, 程淑秀等. 临床与实验病理学杂志, 1990, 6(4): 286~288.

[4] 黄瑜, 甘孟候, 刘尚高等. 畜牧兽医学报, 1995, 26(3): 239~244.

[5] de Waele M, de May J, Renmams W *et al.* J Histochem Cytochem, 1986, 34(7):935~939.

[6] Holgate C S, Jackson P, Lauder I *et al.* J Clin Pathol, 1983, 36:742~746.

[7] Springall D R, Hacker G W, Grimelius L *et al.* Histochemistry, 1984, 81:603~608.

[8] Larochelle R, Magar R. J Vet Diagn Invest, 1995, 7(4):540~543.

[9] 倪灿荣. 临床与实验病理学杂志, 1989, 5(2): 107~109.

[10] 刘彦仿. 免疫组织化学. 北京: 人民卫生出版社, 1990, 73~74.

[11] 王 镇, 陆 宇, 翟中等. 畜禽重大疫病免疫防制研究. 北京: 中国农业科技出版社, 1997, 126~131.

DETECTION OF CSFV C STRAIN BY IMMUNOGOLD SILVER STAINING TECHNIQUE

Wang Zhen Zhang Hai Ding Mingxiao

(College of Life Sciences Peking University, Beijing 100871)

Abstract After successfully detecting PK-15 cells infected by Classical Swine Fever Virus Thiverval strain (T strain) with immuno-gold silver staining (IGSS) technique, the sensibility and specificity of IGSS technique are improved by using 5nm SPA-G and glutaraldehyde treatment. The virus-special antigens could be clearly detected in cells infected by the Chinese strain of CSFV (C strain) using the improved IGSS technique. It is showed that IGSS is sensitive in detecting low-concentration CSFV antigens and could be used in titration detection in vaccine production and in the study of CSFV propagation.

Key words Immuno-gold silver staining (IGSS), Classical swine fever virus (CSFV), CSFV Thiverval strain (T strain)