第 25 卷 第 2 期　　昆 虫 学 报　　Vol. 25, No. 2
1982 年 5 月　　ACTA ENTOMOLOGICA SINICA　　May, 1982

用免疫酶法对油桐尺蠖、家蚕核型多角体病毒的测定

祝庆荃　刘 军　刘宇兰
（中国科学院武汉病毒研究所）

免疫酶法（ELISA）* 是在萤光抗体和组织化学的基础上将抗原——抗体的免疫反应同酶的高效催化作用有机地结合起来而形成的一种新技术。在不破坏酶活性和免疫球蛋白的免疫反应的情况下，酶分子和免疫球蛋白共价结合形成标记抗体，成为保持免疫学与生物化学活性的指示剂。这种指示剂与待检物呈特异性结合，借助于酶对底物的作用而产生可见的不溶性反应产物。免疫酶法不仅能在光学显微镜下进行细胞水平上的抗原、抗体的定位研究，而且可用电子显微镜在分子水平上进行抗原、抗体超微结构的观察。本文试图应用 ELISA 对昆虫核型多角体病毒进行检测，并且在研究昆虫病毒的感染机制方面作出病原定位。

材 料 与 方 法

一、病毒抗原及其相应抗血清的制备

所用油桐尺蠖（*Buzura suppressaria*）核型多角体来自自然罹病幼虫；家蚕（*Bombyx mori*）核型多角体由广东省蚕业研究所供给。将病虫尸体加水磨碎，纱布过滤后，低速离心弃沉渣，上清液 3,000rpm 离心 30 分钟，沉淀用蒸馏水、生理盐水及 PBS 反复交替洗涤数次，然后在 40% 和 60%(W/W) 蔗糖梯度溶液中 8,000 g 4℃ 离心 30 分钟，多角体在 40% 和 60% 蔗糖之间形成一条区带，用蒸馏水洗涤 2 次得到纯净的核型多角体。

取纯净多角体约 100 毫克悬浮于 3 毫升蒸馏水中，加等体积 0.05M Na_2CO_3 + 0.16M NaCl 溶液在 30℃ 水浴中保温 10 分钟，立即加到 40%、55% 蔗糖梯度溶液的上部，在 MSE-75 型离心机上 60,000 g 离心 30 分钟，收集 40% 和 55% 蔗糖溶液之间形成的白色区带。吸取此区带悬浮于蒸馏水中加 Lyphogel 反复浓缩 2—3 次后，在 pH 7.4 0.01M PBS 中平衡，经电镜检查为均一的核型多角体病毒（NPV）**（图版 I:1）。以此病毒抗原免疫豚鼠，制得相应抗血清。

二、第二抗体的制备及纯化

健康新鲜豚鼠血清经 56℃，30 分钟灭活以破坏补体，先在 pH7.4，0.01M PBS 中透析过夜，然后通过 DEAE-Sephadex A-50 层析柱，柱床 1.5×40cm，流速 0.5 毫升/分，用 pH7.4，0.01M PBS 洗脱，合并浓缩第一蛋白峰，经聚丙烯酰胺圆盘电泳测定，在 r 区内呈现一条区带，即为豚鼠 IgG。用纯化的豚鼠 IgG 免疫正常家兔以获得兔抗豚鼠 IgG 抗体，家兔在免疫前经琼脂扩散试验检查证明与豚鼠血清无交叉反应者，于两腘窝淋巴结内注射含等量弗氏完全佐剂之纯化豚鼠 IgG 最后一次加强免疫后两周放血。兔抗豚鼠 IgG 血清的纯化按豚鼠 IgG 提取的同一方法进行。合并具有抗体活性之洗脱液，浓缩后用紫外分光光度计测定蛋白质含量，聚丙烯酰胺凝胶电泳检查符合纯度要求，即为纯化之兔抗豚鼠 IgG 抗体。

本文于 1980 年 12 月收到。
本文承蓝萍章同志提供培养细胞，本所电镜室摄制照片，特此致谢。

* ELISA 为 enzyme linked immunosorbent assay 的简写，译作免疫酶法。

** NPV 为 Nuclear Polyhedrosis Virus 核型多角体简称。

三、辣根过氧化物酶［即 Peroxidase (horse radish)］标记兔抗豚鼠 IgG

基本上按照北京市神经外科研究所(1978)标记马抗人 IgG 的方法进行。用上海生化所生产的辣根过氧化物酶 RZ 2.5—3。5 毫克辣根过氧化物酶溶于 1 毫升 pH8.1，0.3M Na_2HCO_3 中加入 0.1 毫升 1% 氟二硝基苯，于暗处电磁搅拌 1 小时后加入 1 毫升 0.06M 过碘酸钠继续搅拌半小时，然后加 1 毫升 0.16M 乙二醇在室温轻轻搅拌 1 小时。在 pH9.5，0.01M 碳酸盐缓冲液中透析过夜。再加入 5 毫克兔抗豚鼠 IgG 室温暗处搅拌 3 小时。加入 5 毫克 $NaBH_4$ 置 4℃ 下 3 小时，在 pH7.4，0.01M PBS 中透析过夜。然后小量分装，加等量 60% 甘油保存于 4℃ 备用。每制备一批酶标抗体均作活性测定，即用琼脂双扩散试验检查特异性沉淀带，以酶底物染色呈现阳性反应者为有活性之酶标抗体。

底物溶液配制：

1.3-3′ 二氨基联苯胺 (DAB) 75 毫克溶于 100 毫升 pH7.4，0.05M Tris-HCl 缓冲液中，室温避光搅拌 3 小时后置冰箱备用。用前滤纸过滤。每 10 毫升滤液中加 0.3%H_2O_2 0.1 毫升，产生棕黄色反应为阳性。

2.邻苯二胺 40 毫克溶于 100 毫升柠檬酸盐缓冲液 (pH5.0) 中，用时加入 30% $H_2O_2$0.15 毫升，产生橙黄色反应物为阳性反应。

四、试验方法

1. ELISA 对油桐尺蠖 NPV 作定量检查

(1) 以聚苯乙烯微量滴定板作载体，用包被缓冲液稀释待测抗原，每孔加入 0.2 毫升，在 4℃ 孵育过夜。

(2) 将孔内抗原液倒掉，用 pH7.4，PBS-Tween20 (简称 PBS-T) 充满各孔，室温放置 3 分钟后倒掉，如此重复 3 次，甩干水分(以下简称洗 3′×3，甩开水分)。

(3) 加入 0.2 毫升用 PBS-T 稀释的豚鼠抗油桐尺蠖 NPV 抗血清，放在垫有湿纱布的带盖搪瓷盘(以下简称湿盒)中室温结合 2 小时。

(4) 洗 3′×3，甩干水分。

(5) 加入 0.2 毫升用 PBS-T 稀释的酶标兔抗豚鼠 IgG 在湿盒中室温结合 3 小时。

(6) 洗 3′×3，甩干水分。

(7) 加入 0.2 毫升新鲜配制的酶作用底物—邻苯二胺，在湿盒内置室温 15—30 分钟。

(8) 每孔加入 1 滴 3M，NaOH 终止反应。根据颜色深浅不同确定其滴价。

每次试验前，先作酶标抗体活性检查：即在酶作用底物中加入少许酶标抗体，出现显色反应阳性者才能作正式试验之用。

2. ELISA 对油桐尺蠖血细胞培养的抗原定位：

(1) 培养 2 天的油桐尺蠖幼虫单层血细胞经油桐尺蠖 NPV 吸附 1 小时后在 26℃ 中继续培养 5 天，倾去培养液用 0.02%EDTA 室温消化片刻即将细胞轻轻吸刮成均匀的悬液，滴加在玻片上，待其自然干燥。对照细胞除不经病毒吸附外，处理同上。

(2) 涂片用 PBS 洗 3 次，空气中干燥后加丙酮 4℃ 下固定 5—10 分钟。

(3) 加豚鼠抗油桐尺蠖 NPV 血清于涂片上，置湿盒于 37℃ 下 30—60 分钟，用 PBS 洗 3 次。

(4) 加酶标兔抗豚鼠 IgG，置湿盒中 37℃，30—60 分钟，PBS 洗 3 次。

(5) 加入底物 3-3′ 二氨基联苯胺，置湿盒中 10—20 分钟，PBS 洗 3 次后镜检。

3. ELISA 检查整体感染的油桐尺蠖幼虫

(1) 油桐尺蠖 NPV 感染两天和未经感染的正常组织压片和血液涂片自然干燥后，置 4℃ 丙酮中 5—10 分钟。

(2) 加豚鼠抗油桐尺蠖 NPV 血清于涂片上，37℃ 湿盒中保温 30—60 分钟，PBS 洗 3 次。

(3) 加酶标兔抗豚鼠 IgG，置 37℃ 湿盒中 30—60 分钟，PBS 洗 3 次。

(4) 加 3-3′ 二氨基联苯胺作用 10—20 分钟，PBS 洗涤。

(5) 苏木精复染 10 分钟，水洗后镜检。

五、对流免疫电泳

用 pH8.8，0.02M 巴比妥-甘氨酸/Tris 缓冲液配制 0.8% 琼脂糖，在载玻片上浇制凝胶板，抗体端接正极，抗原端接负极，以两层纱布为盐桥，于 pH8.8，0.02M 巴比妥-甘氨酸/Tris 缓冲液中进行电泳，电流 2—3mA/CM，泳动 1 小时观察沉淀线。

核型多角体病毒的电泳技术见 Harrap (1977) 及 Faulkner(1972)。

结　　果

1. 用过碘酸钠氧化法标记兔抗豚鼠 IgG 抗体在聚苯乙烯微量滴定板上对油桐尺蠖 NPV 及家蚕 NPV 作酶联免疫吸附试验，用邻苯二胺作酶底物时，呈现以橙黄色为阳性的反应产物。用 3-3′ 二氨基联苯胺为酶底物对培养细胞作用时出现棕黄色的阳性反应，与阴性反应有肉眼可见的明显差别。酶标结合物最适稀释度经方阵测定以 1:100 最为理想。特异性第一抗体的最适稀释度；油桐尺蠖 NPV 抗血清为 1:500；家蚕 NPV 抗血清为 1:200。

2. 将油桐尺蠖、家蚕 NPV 的原液作系列稀释。对流免疫电泳法证明油桐尺蠖 NPV 的浓度在 1:5；家蚕 NPV 的浓度在 1:4 以内可出现阳性反应。超过此稀释度即不出现沉淀线。而用 ELISA 测定时，油桐尺蠖 NPV 稀释至 1:800 出现阳性反应，比对流免疫电泳法敏感 160 倍，家蚕 NPV 稀释至 1:1280 仍出现阳性反应，比对流免疫电泳法敏感 320 倍（表 1）。

表 1　免疫酶法与对流免疫电泳敏感度的比较*

免疫酶法	油桐尺蠖 NPV 稀释度	1/50	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	PBS
	油桐尺蠖 NPV 抗血清 (1:500)	+++	+++	++	++	++	+	+	±	−
	家蚕 NPV 稀释度	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120	PBS
	家蚕 NPV 抗血清 (1:200)	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	±	−
对流电泳法	油桐尺蠖 NPV 稀释度	原液	1/2	1/3	1/4	1/5	1/6	1/7	1/8	
	油桐尺蠖 NPV 抗血清 (1:4)	+	+	+	+	+	−	−	−	
	家蚕 NPV 稀释度	原液	1/2	1/3	1/4	1/5	1/6	1/7	1/8	
	家蚕 NPV 抗血清 (1:2)	+	+	+	+	−	−	−	−	

* 免疫酶法判定：无色或浅黄(−)，黄色(+)，橙色(++)，橙红色(+++)。(++)者为阳性，以下同

3. 在不同稀释度的油桐尺蠖及家蚕 NPV 中，一份加入相应抗体，另一份用正常豚鼠血清代替特异性抗体（表 2），结果表明：与相应抗体结合的包被抗原孔内出现不同程度的显色反应；加入正常豚鼠血清的抗原孔内则出现一致的极微弱的浅黄色，相比之下有肉眼可见的明显差别，表明此结合物有较强的特异性。

4. 用免疫酶法检查被油桐尺蠖 NPV 感染的人工培养油桐尺蠖血细胞，与未经感染的该种细胞分别用抗油桐尺蠖 NPV 抗体及正常豚鼠血清作用，再用酶标记的兔抗豚鼠 IgG 处理。只有结合抗油桐尺蠖

表 2　免疫酶法对油桐尺蠖、家蚕核型多角体病毒特异性试验

油桐尺蠖 NPV 稀释度	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	PBS
油桐尺蠖 NPV 抗血清(1:500)	+++	+++	+++	+++	++	++	−
正常豚鼠血清 (1:500)	−	−	−	−	−	−	−
家蚕 NPV 稀释度	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	PBS
家蚕 NPV 抗血清 (1:200)	+++	+++	+++	+++	+++	++	−
正常豚鼠血清 (1:200)	−	−	−	−	−	−	−

NPV 抗体的感染细胞才在显微镜下显示出棕褐色密集颗粒。而未经感染的细胞及用正常豚鼠血清作用的细胞均为浅黄色阴性反应。证明用酶标记兔抗豚鼠 IgG 测定油桐尺蠖 NPV 有较强的专一性(表 3,图版 I:2)。

表 3 免疫酶法检查油桐尺蠖核型多角体病毒的特异性试验

用油桐尺蠖 NPV 感染的油桐尺蠖幼虫单层血细胞		正常的油桐尺蠖幼虫单层血细胞	
用油桐尺蠖 NPV 抗血清作用	正常豚鼠血清作用	用油桐尺蠖 NPV 抗血清作用	正常豚鼠血清作用
+++ 棕褐色	− 浅黄色	− 浅黄色	− 浅黄色

5.用 ELISA 检查感染油桐尺蠖 NPV 的幼虫,在一些组织中有与油桐尺蠖 NPV 抗体结合后再与底物作用产生的棕色细胞(图版 I:3)。未经感染的正常油桐尺蠖幼虫,虽经同样处理,细胞却只显示苏木精染色的蓝紫色(图版 I:4)。在感染的油桐尺蠖血淋巴涂片中可以观察到受色深浅不一的棕色细胞,有些细胞在核区域内的棕色颗粒更为密集(图版 I:5)。

参 考 文 献

北京市神经外科研究所免疫组 1978 酶标记抗体测定血清抗核抗体。中华医学检验杂志 **1** (2) 77—80。

朱关福 1979 酶联免疫吸附试验在病毒学上的应用。国外医学医用微生物学分册 (4) 163—7。

熊立民 徐伟军 1980 我国禾谷类病毒病的病原问题: 应用酶联免疫测定法检测小麦丛矮病植株。生物化学与生物物理学报 **12** (1) 101—3。

Clark, M. F., A. N. Adams. 1977 Characteristics of the mieroplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J Gen. Virol.* **34**: 475—83.

Crook, N. E., & C. C. Payne, 1980 Comparison of three methods of ELISA for baculoviruses. *J. Gen. Virol.* **46**: 29—37.

Faulkner, P., & J. J. F. Henderson, 1972 Serial passage of a nuclear polyhedrosis disease virus of the cabbage looper (*Trichoplusia ni*) in a continuous tissue culture cell line. *Vird.* **50**: (3) 920—24.

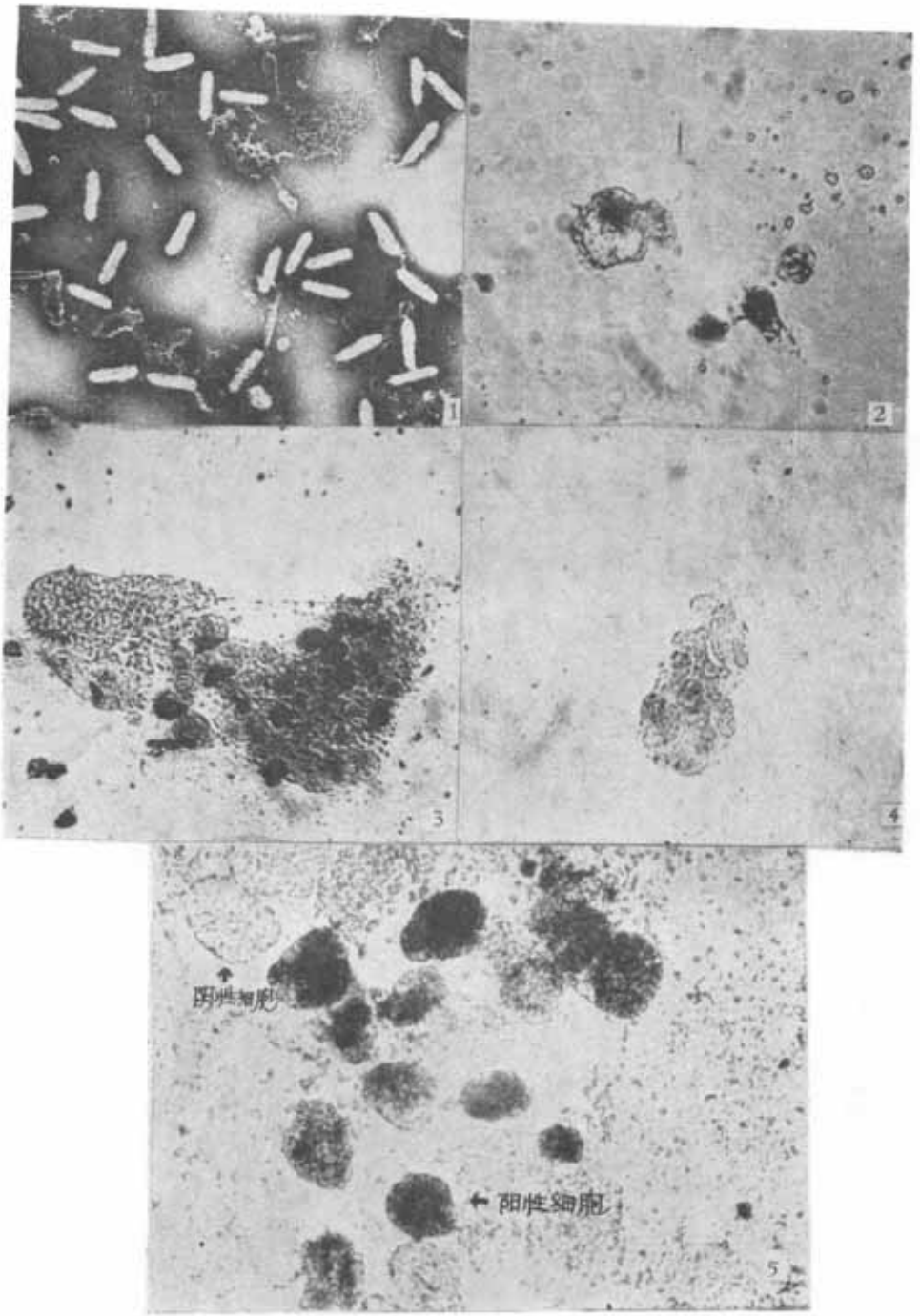
Harrap, K. A., C. C. payne, & J. S. Robrrtson, 1977 The properties of three baculoviruses from closely related hosts. *Virol.* **79**: (1) 14—31.

Kelly, D. C., & H. F. Evans. 1978(a) The use of the enzyme linked immunosorbent assay to detect a nuclear polyhedrosis virus in *Heliothis armigera* larvea. *J. Gen. Virol.* **40**: 465—9.

THE DETECTION OF NUCLEAR POLYHEDROSIS VIRUS IN *BUZURA SUPPRESSARIA* AND *BOMBYX MORI* BY USING THE METHOD OF ELISA

ZHU QING-QUAN LIU JUN LIU YULAN

(Wuhan Institute of Virology, Acadmia Sinica)



1. 提纯的油桐尺蠖 NPV（×20,000）
2. 免疫酶法检查油桐尺蠖 NPV 感染的油桐尺蠖血球细胞(组织培养涂片)
3. 免疫酶法检查整体感染的油桐尺蠖细胞(组织压片)
4. 免疫酶法检查正常油桐尺蠖细胞(组织压片)
5. 免疫酶法检查油桐尺蠖 NPV 整体感染的油桐尺蠖血球细胞(血淋巴涂片)