

研究简报

用酶联免疫吸附试验快速检测虹鳟的传染性
胰脏坏死病病毒*

江育林 于 平 李正秋

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

RAPID DETECTION OF INFECTIOUS PANCREATIC
NECROSIS VIRUS (IPNV) WITH THE ENZYME-
LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

Jiang Yulin Yu Ping and Li Zhengqiu

(Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan 430072)

关键词 酶联免疫吸附试验, 传染性胰脏坏死病毒, 鱼病, 病毒病**Key words** ELISA, IPNV, Fish disease, Virus disease

我国于1987年从进口的虹鳟中分离了传染性胰脏坏死病病毒(Infectious pancreatic necrosis virus 简称 IPNV), 并进行了血清学鉴定^[1]。由于病鱼没有特有的临床症状, 所以迅速查找鱼体内特异性的病毒是十分必要的^[2]。本文报道了用酶联免疫吸附试验(ELISA)鉴定细胞培养中分离出的 IPN 病毒及从鱼组织中直接检测 IPN 病毒抗原的方法, 着重对该方法速度、灵敏度和特异性进行研究。其目的是发展成试剂盒的形式, 使之不仅可用仪器测定, 而且也可用目测来判断检测结果。

材料与方 法

试剂 包被稀释液(0.05 mol/L 碳酸钠缓冲液, pH = 9.6); 底物稀释液(0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液, pH = 5.0); PBS(0.02 mol/L 磷酸缓冲液, pH = 7.6, 含 0.15 mol/L 氯化钠); PBST(含 0.05% Tween-20 的 PBS); 底物(邻苯二胺即 OPD, 80 mg/100 ml, 含 H₂O₂ 80 μ l);

酶(辣根过氧化物酶即 HRP)。

抗原 IPNV 参考株 IPN-He、IPN-Ab、IPN-Sp(从西德带回)及中国分离株 87/7。在 PG(狗鱼性腺细胞)中 20℃ 培养, 并测定其病毒量, 用 TCID₅₀ 值(半数细胞病变剂量)表示。

对照病毒 PFR(白斑狗鱼幼鱼弹状病毒)、33/86(新分离的杆状病毒)^[3]、FV(青蛙病毒)均从西德带回。

抗血清制备 将 IPNV 在 PG 细胞中扩增。每 20 ml 感染细胞的收获液经两次差异离心纯化后, 重悬于 1 ml PBS 中。按前人的方法^[4]免疫山羊和大白兔以制备抗血清。得到抗血清加等体积的 PG 细胞悬液混合以充分吸收其非特异性抗体。测定免血清效价后置 -20℃ 保存备用。羊血清中的 IgG 则通过两个轮次 45% 的硫酸铵沉淀, 再在 PBS 中 4℃ 透析两天提纯, -20℃ 保存。

* 国家自然科学基金资助项目。

1989年11月6日收到。

备用。

病鱼材料 从山西省虹鳟试验场、晋祠渔场和朔县虹鳟渔场收集的虹鳟稚鱼样品(约 0.3g)。整条鱼剪碎匀浆后按每 g 组织加 10 ml 培养液悬浮, 4℃ 过夜后离心收集上清液作 ELISA 检测, 并按常规分离法接种于 PG 细胞中测定其 IPN 病毒的滴度。

ELISA 测定 用羊抗 IPNV 的 IgG 包埋微孔滴定板, 依次加入待测样品、兔抗 IPNV 血清及辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG (Sigma 化学公司产品), 分别在 37℃ 下反应 2h, 每两步之间用 PBST 洗 3 次, 最后用邻苯二胺显色, 目测或在酶标测定仪上测定 490 nm 波长时的光密度 (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 (即 $P/N > 2$) 时定为阳性。

结果与讨论

1 感染细胞中 IPN 病毒抗原的检测

为了检验该方法的灵敏度, 把 IPN 病毒接种于 PG 细胞后, 每隔 24h 取样, 测定其病毒的 TCID₅₀ 值, 并与在 ELISA 试验中测得的 OD 值比较 (表 1)。结果表明, 当肉眼可见的细胞病变 (CPE) 出现后, 其细胞上清液用 ELISA 法可得

到很强的 OD 值 ($A_{490} > 1.8$) 和 P/N 值 (大于 3); 而在未出现 CPE 时, ELISA 仍可得到阳性结果 ($P/N \geq 2.3$)。由此可见, 当细胞培养用于从病鱼材料中分离病毒时, 即便在细胞出现 CPE 之前, 或者由于病鱼材料中存在有毒物质的作用而掩盖了 CPE 的发展时, ELISA 技术都能从细胞悬液中检测到 IPN 病毒抗原。一般高于 10^4 TCID₅₀/0.1ml 的病毒量能很容易的检测出来, 低于此值则得到模棱两可的结果。由于样品中含有无感染力的 IPN 病毒抗原, 它在 ELISA 试验中能参加反应, 因此病毒滴度与样品的 OD 值之间并没有严格的相关性。

在 ELISA 检测中 IPN 病毒与其他病毒的交叉反应 (表 2) 的结果表明, IPN 病毒与 PFR、FV 和 33/86 等病毒没有交叉反应, 而 IPN 病毒的不同株之间有一定的交叉反应。这与中和反应的情况相符^[6]。进一步的交叉中和试验也表明, 只有相对应的抗原、抗体在中和试验中才有最高的中和指数, 在 ELISA 试验中也有强阳性结果。而不相对应的抗原只有较低交叉反应 (表 3)。

2 IPN 病毒抗原的检测

从收集的病鱼样品经 ELISA 检测和经细胞培养分离的结果见表 4。尽管取样时已错过发病

表 1 PG 细胞接种 IPN 病毒后每隔 24h 其上清液的 ELISA 测定值

Tab. 1 ELISA absorbance values of IPNV antigen in infected PG cells harvested at 24h intervals after infection

时间 Time after infection (h)	细胞病变 CPE (%)	病毒滴度 Virus titer (TCID ₅₀ /0.1ml)	样品 P/N 值 Samples	1:10 稀释后的 P/N 值 P/N in ELISA 1:10 dilution
未感染 No infection	0	0	1.00	1.01
1	0	$10^{1.5}$	0.98	1.03
24	0	$10^{3.5}$	2.3	1.10
48	10	10^4	3.4	2.2
72	60	$10^{6.5}$	3.8	2.9

表 2 不同病毒在 ELISA 试验中的交叉反应

Tab. 2 Cross-reaction with other viruses in ELISA*

病毒 Viruses	PFR	FV	33/86	IPN-Ab	IPN-He	IPN-Sp	IPN-87/7
P/N 值 P/N values	1.1	1.6	1.7	2.15	3.4	3.9	3.8

* 试验中所用血清为兔抗 IPN-87/7 和羊抗 IPN-87/7 血清。

The serum used in ELISA is anti-IPN-87/7 serum.

表3 IPN 病毒不同株之间在 ELISA 试验及在中和试验里的交叉反应
Tab. 3 Cross-reaction of IPN-Sp, Ab and He in ELISA technique and neutralization

抗原 Antigen	P/N 值 ELISA (P/N)			抗血清 Antiserum 中和指数 Neutralizing index		
	Sp	Ab	He	Sp	Ab	He
IPN-Sp	3.7	2.5	2.4	16 000	50	50
IPN-Ab	2.2	3.4	2.0	160	15 000	80
IPN-He	2.5	2.0	4.0	160	30	15 000

表4 用 ELISA 技术从鱼组织中直接检测 IPNV 抗原
Tab. 4 Detection of IPNV antigen in infected fish

样品编号 No.	主要症状 Symptoms	P/N 值 P/N	细胞病变 CPE	病毒滴定 Virus titer (Log ₁₀ X)
89-10	鳍条出血	1.23	—	—
89-11	拖假粪	3.09	+	3.5
89-12	体发黑	2.65	+	3.5
89-13	拖假粪	1.93	+	2.5
89-14	活动迟钝	3.23	+	4.0
89-15	腹膨大	2.82	+	3.5
89-18	腹膨大	2.29	+	3.5
89-19	体发黑	2.21	+	3.0
89-20	无明显症状死亡	2.10	+	3.0
89-21	内脏充血	2.39	+	3.0
89-22	拖假粪	2.47	+	3.5
89-23	拖假粪	2.23	+	3.0

高峰,并且样品在 -20℃ 保存达 6 个月之久,但病鱼样品中的 IPN 病毒基本上都可用 ELISA 技术检测出来,得到与细胞分离试验几乎一致的结果。但直接用 ELISA 技术检查无症状的带毒鱼还有一定困难。如 89-10 样品中病毒量很低,须在细胞培养中盲传一次才能出现 CPE,在用 ELISA 直接检测病鱼样品时就得不到明显的阳性结果。

3 快速检测试验

ELISA 试验所用时间在 8—20h 之间。为了缩短操作时间,方便野外检测,作了缩短反应时间的试验:除包埋外,样品、抗血清和酶标抗抗体的结合时间均缩短在 37℃, 30 min 左右。结果表明缩短时间引起的 OD 值降低对结果的判定影响不大。相反,由于缩短时间使非特异性吸附降低到很低水平,即降低了本底。因此虽然 OD 值降低了, P/N 值反而略有增加(表 5)。

上述研究表明: ELISA 法对于诊断 IPN 病

毒是一个有价值的技术手段。它速度快(约 3h);在大多数情况下,它有足够的灵敏度和特异性;可以用目测法判断样品的阳性与阴性,因此可在野外应用。在 IPN 流行时, ELISA 法可从鱼的抽提物中直接检测病毒抗原。在检测无症状的带毒病鱼时(例如种鱼的常规筛选),可先接种细胞培

表5 不同反应时间对 ELISA 测定结果的影响
Tab. 5 Effect of reaction time on ELISA

样品编号 No.	常规试验 Normal (2h)		快速试验 Rapid (0.5h)	
	O. D	P/N	O. D	P/N
89-18	0.83	2.19	0.47	2.24
89-19	0.84	2.21	0.59	2.81
89-20	0.80	2.10	0.55	2.62
89-21	0.91	2.39	0.59	2.81
89-22	0.94	2.47	0.68	3.23
89-23	0.85	2.23	0.62	2.95
Control	0.38	1.00	0.21	1.00

养一天后再用 ELISA 检测,也可得到较为满意的结果。该技术稍加修改后即可用检测其他鱼类病毒(如草鱼呼肠孤病毒 GCRV)。此项工作正在进行。

参 考 文 献

- [1] 杜平主编, 1985. 医用实验病毒学. 167—180 页. 人民军医出版社。
- [2] Ahne. W., 1985. Viral infections in fishes: etiology, diagnosis and control. *Zbl. Vet. Med.*, **32** 237—264.
- [3] Ahne. W, Jiang Yulin and I. Thomsen, 1987. A new virus isolated from cultured grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Diseases of Aquatic organisms*, **3**: 181—185.
- [4] Jiang Yulin and Li Zhengqiu, 1987. Isolation of IPN virus from imported rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in the P. R. China, *J. of Applied Ichthyology*, **3**: 191—192.
- [5] Hill. B. J, Underwood. B. O, Small. C. J and Brown. F, 1975. Physico-chemical and serological characterization of five Rhabdoviruses infecting fish. *J. of general virology*, **27**: 369—378.
- [6] Hill. B. J., 1981. Infectious pancreatic necrosis virus and its virulence. In Spec. Publ. Soc. Gen. Microbiol., Academic Press, pp. 91—114.