

瘤相关抗原的肿瘤有所选择。不过几乎所有否定的证据,都是通过检测抗移植以及通常与免疫T细胞活性相关的其它免疫反应所设计的一些步骤获得的。假使正如本文所提出的,在免疫监视中有NK细胞和K细胞作用的话,那么提出抗原性和抗肿瘤生长等问题就必须依据检

测这种功能以及免疫T细胞介导细胞毒性的功能所设计的方案。

王球达译自 In: The Lymphocyte eds.
by Sell, KW, & Miller, WV. p 33—43.
NY. Alan R. Liss, Inc. 1981. 姚曾序校



黄地老虎颗粒体病毒的研究

III. 黄地老虎颗粒体病毒的酶联免疫分析

石玉瑚 吴祖银

(新疆农科院微生物研究所, 乌鲁木齐)

邱并生 徐绍华 王小凤 裴美云

(中国科学院微生物研究所, 北京)

黄地老虎颗粒体病毒(*Agrotis segetum granulosis virus* 简称 AsGV)已在防治黄地老虎的危害上获得成功,其杀虫率达95%以上,具有无残毒、用药少、经济简便和长效等优点^[1]。我们已对AsGV在黄地老虎细胞中的超微结构,AsGV的包涵体,病毒粒子的分离提纯及其形态结构作了报道^[2-3]。酶联免疫法是近年来发展起来的一种新的血清学技术,具有特异性强,灵敏度高,操作简便等优点,既适用于昆虫病毒潜伏性感染,病毒复制和区分昆虫病毒的种属关系等理论研究,也可以作为实际应用中的残毒分析,产品剂量标准化及田间普查的一种定性定量的监测手段。但是与植物病毒和其他动物病毒比较,ELISA法在昆虫病毒方面的工作不多^[4-8]。

本文用ELISA的双抗体夹心法分析了AsGV侵染黄地老虎幼虫后不同时期各组织内的AsGV的含量,并用酶联免疫组化进行定位测定。

材 料 和 方 法

(一) 抗原制备 感染AsGV的黄地老虎幼虫的病虫害体,用1.5体积的蒸馏水浸泡腐败,匀浆过滤,以2,000转/分10分钟与10,000转/分30分钟的差速离心,2次10—70%(V/V)的甘油梯度离心(3,200转/分40分钟)和1次10—70%(W/V)的蔗糖梯度离心(8,000转/分50分钟),获得纯化的AsGV包涵体,试验细节和纯度检查参见前文^[3]。

(二) 兔抗AsGV包涵体血清的制备及其IgG的提纯 用提纯的AsGV包涵体免疫家兔,1毫升(3毫克)抗原加等量的 Freund 全佐剂乳化后,肌肉注射,每次注射间隔一星期,共注射3次,末次注射后3周采血,抗血清效价经试管沉淀法测定为1:1024。

从抗血清中用33%饱和度的硫酸铵粗提IgG,用DEAE-纤维素(DE-32)纯化^[9]。

(三) 标记抗体的制备和测定 采用过碘酸盐氧化法把辣根过氧化物酶标记到抗AsGV的IgG上并用双抗体夹心法测定抗原^[9]。

新疆农科院微生物所严民范同志参加实验工作,文中电镜照片系由中国科学院微生物所技术室拍摄,一并在此致谢。

抗 AsGV 的 IgG 以 0.1M pH 9.5 的碳酸缓冲液配制成 6 微克/毫升的溶液, 加 200 微升到聚乙烯多孔板的各小孔中, 在 37°C 中 3 小时, 继后冰箱内过夜进行包被, 然后用含 0.05% Tween-20 0.85% NaCl 的 0.02M 磷酸缓冲液 (pH 7.2) 的洗涤液洗 3 次, 每次 5 分钟, 然后加被测样品。

病虫和健虫 (作为对照) 组织在玻璃匀浆器内, 加少量 0.05M Na_2CO_3 , 0.05M NaCl 溶液研磨, 在 20—23°C 水浴中 2—3 小时, 用 0.1N HCl 将 pH 调至 7.0 左右。低速离心除去渣质即为被测样品。冷冻干燥的纯化包涵体也在上述碱溶液中进行水解。用含 0.5% 牛血清白蛋白的上述洗涤液稀释成不同浓度的待测样品, 加 200 微升到各小孔中, 37°C 反应 3 小时, 用洗涤液洗 3 次后, 再加 200 微升的由 0.5% 牛血清白蛋白的洗涤液配制浓度为 3 微克/毫升的酶标记抗体, 37°C 反应 3 小时, 洗涤后加底物溶液 (含 0.1% 联大茴香胺的无水甲醇 1.7 毫升, 0.01M pH 6.0 的磷酸缓冲液 100 毫升, 30% H_2O_2 10 微升) 200 微升, 37°C 反应 1 小时, 每孔加 50 微升的 0.5N HCl 终止反应, 在 721 型分光光度计上测定波长 400 毫微米的吸收值。

(四) P_{AP} 的制备 用辣根过氧化物酶 (HRP) 免疫家兔产生抗 HRP 的抗血清, 用琼脂双扩散法测定效价为 1:64。用 HRP 和其特异性抗体制成可溶性复合物 (PAP) [10-11], 所制备的 PAP 的克分子比为 1.4。

(五) 感染 AsGV 的昆虫病体的组织切片和 PAP 染色过程 接毒后 6 天的病虫脂肪体, 经 4% 甲醛固定后, 用 0.2M pH 7.2 磷酸缓冲液 (内加 100 单位青霉素) 冲洗 3 次, 滴加 50 微克/毫升抗 AsGV 的 IgG, 然后加 50 微升/毫升羊抗兔抗体, 再加 50 微克/毫升的 PAP 溶液, 每层抗体都在 37°C 反应半小时, 每次处理后用 0.02M 磷酸缓冲液 (pH 7.2) 洗 3 次, 最后用 3,3-二氨基联苯胺 (DAB) 在 25°C 下显色 20 分钟。经上述处理后的组织再经 OsO_4 (2%) 固定 4 小时, 用 0.02M 磷酸缓冲液洗 3 次, 再用乙醇梯度脱水 (30%、50%、70%、90% 和 100%)。在各梯度放置 15 分钟, 在无水丙酮中过夜, 再经纯树脂浸透过夜, 国产 618 树脂包埋, LKB 8800 Ⅱ 型超薄切片机切片, 不经金属盐染色, 直接在日立 H-500 型电镜观察和在光学显微镜下观察。

结果与讨论

(一) 用 ELISA 测定 AsGV 包涵体的灵敏度 通过棋盘滴定法对包被抗体浓度和标记抗

体浓度进行了选择。在我们实验条件下包被抗体浓度为 6 微克/毫升, 标记抗体浓度为 3 微克/毫升, 能测出抗原的最低浓度, 提纯的 AsGV 包涵体为 3 毫微克/毫升, 400 毫微米的吸收值为 0.144, 对照组吸收值为 0.114。被测抗原与 400 毫微米的吸收值具有相关性 (图 1)。测定

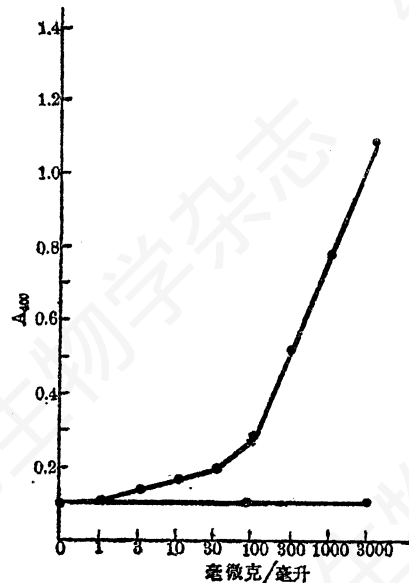


图 1 ELISA 测定提纯的 AsGV 包涵体的灵敏度

提纯的 AsGV 包涵体, ELISA 法比一般试管沉淀法和琼脂双扩散法的灵敏度提高 10^5 倍左右。在测定过程中, 由于 AsGV 包涵体较大, 包被抗体与聚苯乙烯处于表面的物理吸附而不是共价结合状态, 通过一系列处理后, 有些结合不够紧密的将会洗掉, 从而影响效果。我们对 AsGV 包涵体先用碱水解, 即在 0.05M Na_2CO_3 , 0.05M NaCl 溶液中 20—23°C 水浴保温 2—3 小时, 再进行测定, 经过 4 次试验, 可获得重复性的数据 (表 1)。

(二) 用 ELISA 检测黄地老虎幼虫组织里 AsGV 的含量

黄地老虎幼虫感染 AsGV 后, 经 ELISA 法检测黄地老虎的脂肪、皮层、中后肠和马氏管等组织均有该病毒的增殖。其中脂肪体中 AsGV 增量最大, 依次是皮层, 马氏管和中后肠。根据各组织匀浆物的碱水解液在 ELISA 法

表 1 ELISA 测定提纯 AsGV 包涵体的浓度

| 试 验 批 号 | 对 照 | 400 毫微米的吸收值 | | | | | | | |
|------------|-------|------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | 提纯 AsGV 包涵体的浓度(毫微克/毫升) | | | | | | | |
| | | 1 | 3 | 10 | 30 | 100 | 300 | 500 | 1000 |
| 1 | 0.114 | 0.114 | 0.144 | 0.160 | 0.195 | 0.280 | 0.515 | 0.550 | 0.780 |
| 2 | 0.115 | 0.115 | 0.145 | 0.165 | 0.210 | 0.295 | 0.530 | 0.570 | 0.790 |
| 3 | 0.113 | 0.114 | 0.143 | 0.155 | 0.190 | 0.295 | 0.520 | 0.550 | 0.775 |
| 4 | 0.115 | 0.114 | 0.144 | 0.160 | 0.205 | 0.290 | 0.515 | 0.560 | 0.790 |
| 平均值 | 0.114 | 0.114 | 0.144 | 0.160 | 0.200 | 0.288 | 0.520 | 0.560 | 0.784 |

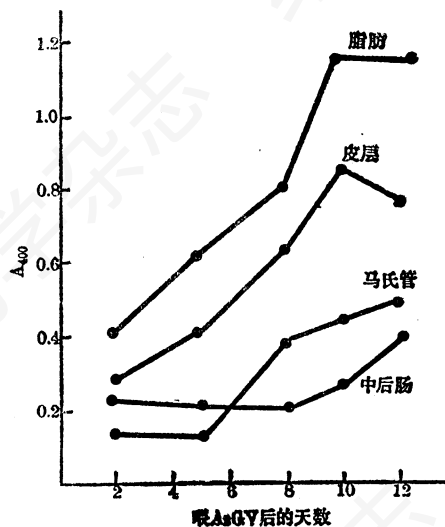


图 2 ELISA 测定喂毒后黄地老虎幼虫组织中 AsGV 包涵体的含量

测定时 400 毫微米的吸收值, 从图 1 查出 AsGV 的浓度, 再折合成组织湿重中 AsGV 的含量, 在我们的实验条件下, 以喂毒后 12 天, 取样测定各种组织中 AsGV 的含量大约是: 脂肪体为 38.4 微克/毫克, 皮层为 32.6 微克/毫克, 马氏管为 7.6 微克/毫克, 肠为 4.8 微克/毫克 (图 2)。ELISA 的检测结果与我们对病虫的病症观察, 即喂毒后 5—7 天发病, 10—12 天死亡及病理解剖脂肪体和皮层的状况是一致的。并与超薄切片观察感染 AsGV 的黄地老虎幼虫各器官细胞中 AsGV 的结果相验证^[1-2]。ELISA 还能检测出超薄切片电镜观察未觉察的增殖部位^[2]。

(三) PAP 法定位测定

在酶免疫组化分析的各种方法中, 以 PAP 法灵敏度最高。我们采用 PAP 法对脂肪体内的 AsGV 包涵体进行了测定。在反应过程中, 以 3,3'-二氨基联苯胺为供氢体, 在电子显微镜观察时不用金属盐染色就可以看到清晰的 AsGV 的存在 (图版图 IA), 厚切片光学显微镜观察, 也可见明显的棕色区 (图版图 IB)。这与用金属盐染色和用 ELISA 测定结果相符。由于 PAP 法是一个比较灵敏的定位方法, 对 AsGV 在虫体内的侵染和复制等进一步研究, 将是一个有效的手段。

参 考 文 献

- [1] 新疆农科院防治黄地老虎协作组, 1978 年, 微生物通报 5(2):1—2。
- [2] 徐绍华等, 1982 年, 微生物学报 22(2): 123—125。
- [3] 王小凤等, 1983 年, 微生物学报 23(1):15—20。
- [4] Kelly, D. C., Edwards, M. L. & Robertson, J. B., 1978a, *J. Gen. Virol.* 40: 464—469。
- [5] Ibid, 1978b, *Annals of applied Biology*, 90: 369—374。
- [6] Flegg, L. L. & Clark, M. F., 1979, *Annls of applied Biology*, 91: 61—65。
- [7] Norman, E. Crook, & Christopher, C. Payne, 1980, *J. Gen. Virol.* 46: 29—37。
- [8] Longworth & Carey, C. P., 1980, *J. Gen. Virol.* 47: 431—438。
- [9] 马德芳等, 1981 年, 微生物学报, 21 (1): 63—67。
- [10] 北京医学院微生物教研组, 1980, 实验免疫学, 267—269。人民出版社。
- [11] Chiu Ben-sin & Tien PO, 1982, *J. Gen. Virol.* 58: 323—327。