DOI:10.16016/j.1000-5404.1992.01.017

技术与方法

狂犬病毒ELISA抗原提取的初步研究

万泽生 沈定霞 王守良* （第三军医大学训练部 微生物学教研室） 630038

在狂犬病的确诊和疫苗效果考查工作中，目前仍然主要依靠血清学方法检测特异性抗体或抗原，其中又以ELISA法更为实用[1]。在我国现已开始采用这一技术，用于狂犬病的诊断、防治以及科研工作中[2]。一般制备狂犬病毒抗原大多用BHK-21细胞培养扩增病毒，继之浓缩和提纯。由于狂犬病毒在组织培养细胞中增殖缓慢，产量不高；而该病毒在感染小鼠脑组织中能大量增殖。为此，我们选用感染鼠脑来制备狂犬病毒抗原，并获得较为满意的结果。现将制备抗原的方法和结果报道如下：

1 材料和方法

1.1 毒株和感染鼠脑的制备

狂犬病毒固定毒株北京株（卫生部长春生物制品所惠赠，已传258代，至本室传种5代），用无菌肉汤配制成10%悬液，由脑内接种2周龄昆明种小鼠（为本校动物所繁殖，雌雄不拘）。小鼠发病濒死时立即解剖取脑，共得80个感染鼠脑，置-20℃保存供制备狂犬病毒抗原用。

1.2 自感染鼠脑中提纯病毒颗粒抗原

采用Sokol自感染培养细胞上清液中提取和纯化狂犬病毒的方法[3]，稍加改进，简述如下：

将80个感染鼠脑（重为24g）置无菌乳钵中研磨后，用TNE缓冲液（0.05mol/LTris-HCl,pH7.8，0.13mol/L NaCl，0.001mol/L EDTA-Na_2）制成10%匀浆液，经紫外照射和加热56℃各30min灭活后，即以4000rpm离心30min（4℃），取上清液按1/50体积，加入1mol/L $Zn(Ac)_2$（pH6.0）盐析沉淀20min，再经3000rpm离心40min（4℃）后弃上清，将沉淀用饱和EDTA-Na_2液重悬，并覆盖于预先配制好的20%，30%，40%，50%和60%不连续蔗糖密度梯度液5层（每层5ml）管顶部。使用RPS27-2转头，以54 000×g离心4h（4℃），而后收集含有病毒的区带，经透析除去蔗糖后即得纯化病毒颗粒抗原液。

1.3 狂犬病毒颗粒抗原制剂的鉴定

1.3.1 病毒颗粒的形态检查

纯化的病毒液负染色后，直接在JEM-2000EX透射电镜下观察病毒形态。

1.3.2 抗原制剂的蛋白含量测定

用岛津分光光度计（UV-265）测定样品OD280和OD_{260}值，按公式：（1.45×OD_{280}值-0.74×OD_{260}值）×稀释倍数，计算出蛋白含量（mg/ml）以表示狂犬病毒抗原液的浓度

1.3.3 狂犬病毒制剂的抗原性检定

1.3.3.1 抗狂犬病毒的免疫血清为本室自制。以狂犬病毒感染鼠脑悬液，按常规法免疫小鼠制得抗体Ⅰ；或免疫家兔并经正常鼠脑吸收后制得抗体Ⅰ；用狂犬病毒疫苗（卫生部长春生物制品研究所产品）免疫家兔制得抗体Ⅱ。两种动物均在末次免疫1周后，分别采血分离血清。

1.3.3.2 纯化狂犬病毒颗粒抗原液的抗原性检定采用Perrin[4]双夹心ELISA法。包被抗体用阳性病人血清（免疫双扩散滴度为1:8）；抗狂犬病毒特异性抗体用自制抗体Ⅰ（免疫荧光滴度为1:40）。

1.3.3.3 采用常规间接ELISA法，分别测定抗体Ⅰ和抗体Ⅱ两种免疫血清的滴度。包被塑料微板抗原为纯化狂犬病毒颗粒抗原，其稀释浓度为1:50。

2 结果

2.1 狂犬病毒颗粒抗原纯化制剂的收获量

狂犬病毒粗提液经蔗糖密度梯度离心后，共出现4条区带（图1）。其中Ⅰ带呈乳白色，Ⅱ带呈浅棕色，其余两条区带为深棕色鼠脑组织。Ⅰ带；

* 指导教师

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

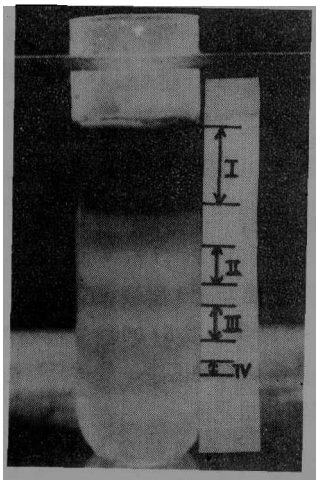


图1　狂犬病毒在蔗糖密度梯度液中的区带

Ⅰ带；狂犬病毒感染鼠脑匀浆液；Zn（Ac）$_2$盐析后的狂犬病毒粗提液等标本中蛋白含量和收获率见附表所示。

附表　各种标本中蛋白含量及其收获率

项　目	标　本			
	感染鼠脑匀浆液	Zn(Ac)$_2$盐析粗提液	蔗糖密度梯度区带Ⅰ	蔗糖密度梯度区带Ⅱ
(1)体积(ml)	240	10	10	10
(2)单位蛋白含量(mg/ml)	8.37	26.56	2.15	1.45
(3)总蛋白量(mg)	2008.80	265.60	21.50	14.50
(4)收获率(%)		13.20	1.07	0.72

从表可知，80个感染鼠脑（重24g）匀浆液的蛋白总含量为2008.80mg；Zn（Ac）$_2$粗提液为265.50mg；区带Ⅰ为21.50mg；区带Ⅱ为14.50mg。后3种提取和纯化液的收获率分别为13.20%，1.07%和0.72%。

2.2　狂犬病毒的形态观察

图2为区带Ⅰ纯化物的电镜负染图像。可以看见弹状的狂犬病毒颗粒；大多病毒颗粒被包绕着一圈电子密度较高的囊膜结构。电镜观察时在个别视野中看见少量鼠脑组织残渣。

2.3　纯化狂犬病毒颗粒的抗原性检定

采用ELISA双夹心法，将区带Ⅰ和区带Ⅱ纯化

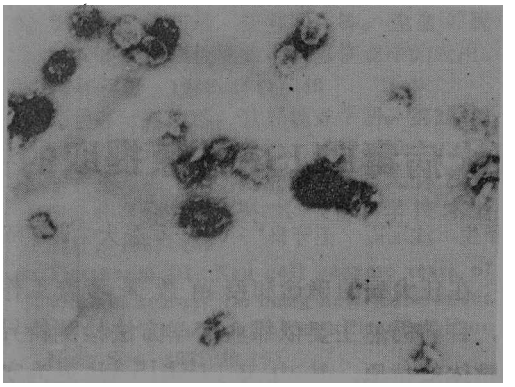


图2　纯化狂犬病毒颗粒抗原电镜图像

（放大×16 000）

狂犬病毒液做不同稀释度，与特异性狂犬病毒抗体Ⅰ进行检定其抗原性，同时用同于从感染鼠脑中提取狂犬病毒的方法获得的正常鼠脑粗提液作为对照。结果见图3所示。由图3可见，区带Ⅰ中纯化病毒抗原的不同浓度，与同一特异性抗体反应的ELISA测定值（OD_{492nm}）呈现剂量正相关；而区带Ⅱ各浓度之间的OD值较低，稀释为1:80以后其OD值变化不明显，且接近正常鼠脑抗原的OD值。如以P/N≥2.1作为判断阳性反应阈值，区带Ⅰ液中含有狂犬病毒颗粒抗原的滴度达1:160，而区带Ⅱ液仅为<1:20。

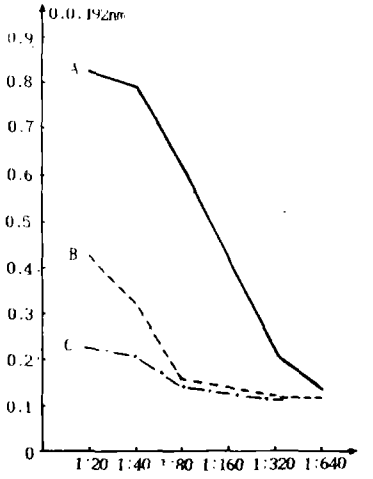


图3　双夹心ELISA法检测狂犬病毒纯化物抗原性

A：Ⅰ带；B：Ⅱ带；C：正常鼠脑

2.4　用制得的狂犬病毒颗粒抗原检测免疫血清中的特异性抗体

为进一步验证制备出的狂犬病毒液的抗原性，

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

我们将区带Ⅰ抗原液作1:50稀释后包被酶联小板微孔，按常规间接ELISA法对感染鼠脑免疫兔血清(抗体Ⅰ)、狂犬病毒疫苗免疫兔血清（抗体Ⅱ）进行了检定，其结果见图4。从图4可以看出，我们制

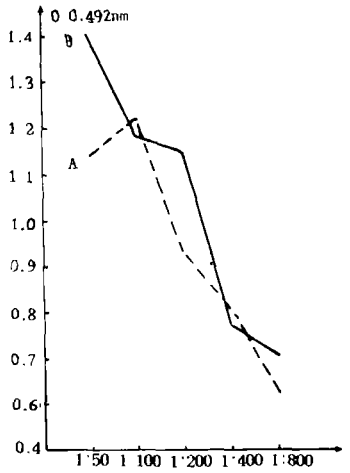


图4、狂犬病毒纯化物检测狂犬病毒抗体
A：抗体Ⅰ；B：抗体Ⅱ

备的狂犬病毒颗粒抗原经ELISA分析证明，能与狂犬病毒免疫血清发生特异性反应。并且，在给定抗原浓度为1:50稀释液(即43ng蛋白/ml)时，ELISA测定的OD值与狂犬病毒抗体的浓度呈现剂量正相关性。若以1:50稀释的正常鼠脑液测定与抗体Ⅰ、抗体Ⅱ反应的OD值，均低于0.4(图中未显示)。

3 讨　论

本文采用Sokol自感染狂犬病毒的培养细胞上清液中提取和纯化狂犬病毒的方法，稍加改进后，能较好地从感染鼠脑中制备出适用于ELISA技术的狂犬病毒颗粒抗原。狂犬病毒感染鼠脑用$Zn(Ac)_2$盐析后的粗提液，经20%～60%(W/V)蔗糖密度梯度离心后，可以达到将病毒颗粒与大量鼠脑组织分离的目的。狂犬病毒颗粒主要集中在40%(W/V)蔗糖密度梯度液处(区带Ⅱ)，其收获量为0.27mg/个鼠脑或0.89mg/g鼠脑，其收获率达1.07%。该纯化抗原物经电镜观察及ELISA双夹心法检定，证明这种方法所制得的狂犬病毒抗原纯度较高，抗原性良好。它与含有狂犬病毒抗体的免疫血清，经间接ELISA法检测，能发生特异性血清学反应。说明本文所用的提取和纯化方法制得的感染鼠脑狂犬病毒颗粒抗原，确可用作ELISA试验的抗原制剂。

目前国外主要采用从感染细胞中提纯狂犬病毒，作为血清学检测法的抗原来源[5]。由于自感染培养细胞或培养上清液中提取病毒的方法，要求准备大量的感染细胞培养物，这不仅增加了工作量而且费时较长，在我国一般实验中难以做到。为此，我们选择病毒繁殖量较大的感染鼠脑组织，作为制备狂犬病毒抗原的来源，并将Sokol的提纯抗原方法进行了简化，使适用于一般病毒实验室中采用。

本文所提纯的狂犬病毒颗粒抗原的纯度，主要为建立ELISA技术的抗原材料来源而确立的。该制备物如用于分子病毒学研究，还需据其研究目的进一步纯化。

关键词　狂犬病病毒；免疫酶技术

参 考 文 献

1. Nicholson KG, Prestage H. ELISA: A rapid reproducible test for the measurement of rabies antibody. J Med Virol 1982; 9 (1):43
2. 文洁　任雅萍　周学良。ELISA用于人血清抗狂犬病毒抗体的检测。中国人兽共患病杂志 1989; 5 (6):7
3. Sokol F, Kuwert E, Wiktor TJ, et al. Purification of rabies virus grown in tissculture. J Virol 1968; 2 (8):836
4. Perrin P, Rollin PE, Sureau P. A rapid rabies enzyme immuno-diagnosis (RREID): A useful and simple technique for the routine diagnosis of rabies. J Biol Standard 1986; 14 (3):217
5. Bunschoten H, Klapmuts RJ, Claassen IJ, et al. Characterization of a new virus-neutralizing epitope that denotes a sequential determinant on the rabies virus glycoprotein. J Gen Virol 1989; 70:291

(收稿：1991-09-13；修回：1991-11-15)

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net