DOI:10.16016/j.1000-5404.1988.03.014

从感染鼠脑中提取高纯度森林脑炎病毒ELISA抗原的研究

樊武舫 刘启富 李光平 朱德钟（微生物学教研室）

ELISA技术由于其高度敏感性和特异性，已广泛应用于病毒血清学试验。但在虫媒病毒中应用结果并不满意，主要因为虫媒病毒在感染鼠脑中病毒滴度最高，但不易纯化[1][2]，而高纯度抗原为ELISA技术的关键因素。我们以森林脑炎（森脑）病毒为材料，采用简易程序曾从感染鼠脑中提取了高纯度ELISA抗原，报导于后。

材料与方法

一、毒种

森脑病毒张株。从长春生物制品研究所引进第13代干燥毒种，经在2～3周龄健康小白鼠脑内接种连续传3代后，取感染鼠脑-20℃保存备用。

二、纯化程序

共分六个步骤：（1）将感染鼠脑制成20%组织匀浆（所用液体为pH9.0溶液，内含有0.01mol Na_2HPO_4，0.15mol NaCl，用NaOH调酸碱度至pH9.0），置4℃过夜；（2）添加硫酸鱼精蛋白（上海生化制药厂）使最终浓度3 mg/ml，置4℃ 1 h，然后以16 000×g 4℃离心30min，取上清作为初始病毒液；（3）在上清中添加等体积的10%PEG-6 000（上海化学试剂二厂），搅拌均匀后以16 000×g 4℃离心30min，取沉淀；（4）在沉淀物中加入病毒分散液（20mmol Tris，0.13mol NaCl，1 mmol EDTA），将其吹打分散；（5）在离心管（日立80p-7离心机，RPS27-2转头）中加入20%、30%、40%、50%蔗糖溶液各5 ml，然后将已分散的病毒沉淀物加到20%蔗糖液表面，经27 000rpm（约120 000×g）4℃离心70min后，从下到上以1 ml量为单位取组分，自制的简易装取样器见图1；（6）对各组分进行HA试验，将HA活性≥1∶160的各组分混合，在pH9.0溶液中4℃透析72h，添加NaN_3至万分之一终浓度，分装后4℃保存备用。1月内抗原活性无明显变化。

三、抗原活性及纯度的测定

1. 血凝试验（HA）按Clarke等人所述的方法进行[3]。

2. 蛋白测定 用弗林酚法，以BSA为标准蛋白。

3. H/P（血凝活性/单位蛋白）比值的计算以每毫升病毒标本中所含的HA单位数为分子，以每毫升病毒样本中所含的蛋白毫克数为分母，所求的商即为H/P比值[4]。

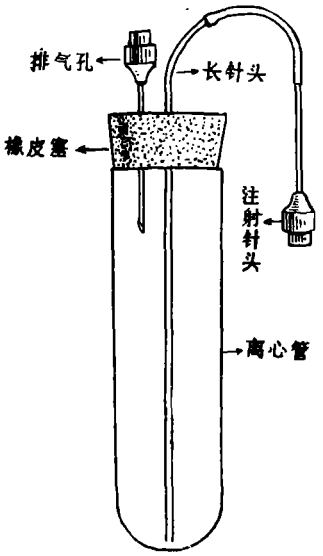


图1 自制的装取样器

用时将其套在离心管口，使长针头紧靠管底。装梯度溶液时，从低向高浓度装；取样时从高向低浓度取，注意在装取此装置时，要垂直移动，并防止气泡。

4. PF（纯化因子）值的计算 以初始病毒液的H/P比值为分母，以纯化后的病毒样本的H/P比值为分子，所得出商数即为PF因子。PF因子是纯化程度的指标[4]。

5. ELISA程序 微量间接法，按樊武舫等人所述的方法进行[5]。

结果

一、纯化病毒抗原的回收率

以HA活性为指标，连续试验三次以上。每次取感染鼠脑30个，制成50ml 20%脑悬液，经鱼精蛋白处理离心沉淀后，得到约40ml上清（初始病毒

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

液)。经测定HA活性为320单位/ml,共含有12 800 HA单位。经PEG-6 000浓缩后,得到3.5ml病毒悬液,HA活性为2 560单位/ml,共计8 960HA单位,HA活性回收率为70%(8 960/12 800)。经蔗糖密度梯度离心纯化后,得到含有HA活性的组分共11ml,平均HA活性为640单位/ml,共计7 040 HA单位,HA活性回收率为78.5%(7 040/8 960)。占初始病毒液HA活性总数的55%(7 040/12 800)。森脑病毒HA活性在蔗糖密度梯度溶液中的分布见图2。

二、病毒抗原的纯化程度

试验以PF因子作为病毒抗原的纯化指标。用弗林酚法测定不同样本的蛋白含量,参考各样本相应的HA活性,结果发现在初始病毒液中,蛋白含量为25.7mg/ml,H/P比值为12.5(320/25.7)。在经PEG-6 000浓缩的病毒液中,蛋白含量为11.2 mg/ml,H/P比值为228.6(2 560/11.2),以初始病毒液为基准,PH因子为20.4(228.6/12.5)。经蔗糖密度梯度离心纯化后,病毒液的蛋白含量为0.15mg/ml,H/P比值为4 266.7(640/0.15)。与经PEG-6 000浓缩过的样本比较,PF因子为18.7(4 266.7/228.6);与初始病毒液比较,PF因子为341(4 266.7/12.5)。本结果提示病毒抗原纯度提高了300倍以上。

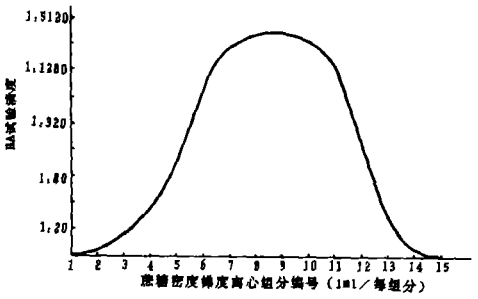


图2 森脑病毒在蔗糖密度梯度溶液中的HA活性分布(12 000×g 70min离心)

1～15组分按蔗糖浓度从低到高依次排列,其中1～5组分相当于20%蔗糖,6～10组分相当于30%蔗糖,11～15组分相当于40%蔗糖。从图中可以看到HA活性集中在30%蔗糖溶液内。

三、用于ELISA试验的效果

用纯化的病毒抗原和正常鼠脑对照抗原分别包被固相微孔板,然后反复检测同一份阳性参考血清(CFT效价1:64,HIT效价1:160,系病人血清)。结果表明,病毒抗原与1:100阳性血清的反应O.D值为1.46,对照抗原与1:100阳性血清的反应O.D值为0.15,P/N值>7.0。阳性血清与病毒抗原的终点反应滴度为1:6400,与对照抗原的终点反应滴度<1:100(以O.D≥0.2作为阳性反应最低界线)。

本文所述的纯化病毒抗原建立了检测森脑病毒特异IgG抗体的间接ELISA系统,并对109份血清标本进行了检测。结果表明ELISA比CFT和HIT分别多检出15份和7份阳性标本,符合率分别为93.6%和86.2%,相关非常显著($\gamma_{CFT}=0.8912$, $\gamma_{HIT}=0.9550$)。ELISA检出滴度分别是CFT的50～200倍,是HIT的10～80倍[5]。

使用相同的纯化病毒抗原,建立了检测森脑病人特异IgM抗体的ELISA系统,亦取得了满意的效果。

试验表明,使用30个感染鼠脑一般可获得30ml左右经透析后的纯化抗原。在致敏ELISA固相载体时,至少还要稀释60倍以上。按每孔抗原包被量0.2ml计算,可包被9 000孔,按市售的40孔酶联板计算,可包被220余块。平均每个感染鼠脑制备的纯化病毒抗原可包被7块酶联板。

试验在纯化的各步骤均设立了正常鼠脑对照,未发现其HA活性,这与血清学试验是一致的。经蛋白含量测定,正常鼠脑经本法纯化后,相应蔗糖组分中的蛋白含量为25μg/ml,而感染鼠脑经纯化后,相应蔗糖组分中的蛋白含量为150μg/ml,提示后者所含的纯病毒组分约为125μg/ml左右,约占总蛋白量的85%。

参考文献

1. Slavik I. Acta Virol 1968; 12:535
2. 顾方舟,等。北京医学 1981; 3(1):1
3. Clarke DA, et al. Amer J Trop Med Hyg 1958; 7:561
4. Heinz F, et al. Acta Virol 1977; 21:301
5. 樊武舫,等。中华流行病学杂志 1984; 5(2):107

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net