365—368 6867(13)

维普资讯 http://www.cqvip.com

第11卷第4期 中国病毒学 Vol.11 No.4
1996年12月 VIROLOGICA SINICA Dec. 1996

中国对虾两种球状病毒的免疫检测

石正丽 肖连春 高 玮 陈棣华
(中国科学院武汉病毒研究所,武汉 430071)

S945.299

提 要 以江苏、河北某虾场病虾组织中提取的对虾的两种球状病毒作为抗原,制备出特异性强、效价较高的抗血清,用对流免疫电泳,酶联免疫吸附,免疫电镜技术对五个不同地区的病虾材料进行检测,结果表明:江苏、青岛、河北地区的病虾组织中均含有相应的球状病毒病原。

关键词 球状病毒,免疫检测,中国对虾

近几年来,对虾病毒病害大面积发生,给我国对虾养殖业带来巨大经济损失。与人体病毒一样,控制对虾病毒病的发生主要以预防为主。因此急切需要研究出能早期检测病毒病原的方法。本文报道应用不同的免疫学技术,对河北、福建、江苏、山东、辽宁等五省的虾病材料进行了检测,现将结果报道如下:

材料与方法

1 材料

病虾分别由江苏大丰、河北乐亭水产养殖场、青岛国家海洋局一所、大连水产学院及福建水产研究所提供。

2 病毒的分离提纯

取江苏、河北某虾场病虾的头胸部及肠道,加0.01 mol/L pH 7.0的PBS缓冲液,研磨、匀浆、低速离心去粗渣,有机溶剂去脂及细胞碎片,上清经PEG浓缩后在10~60%蔗糖梯度上离心,60000 g 2 h,取10~20%内的病毒带,脱糖、电镜观测,冷藏备用。

3 抗血清的制备

用提纯的两种病毒做抗原分别免疫1.5 kg左右的雄性家兔。首次免疫使用完全福氏佐剂,抗原从腘淋巴结注射,每次0.5 mL。10 d后进行第二次免疫,使用不完全福氏佐剂,皮下多点注射,抗原量为0.5 mL。以后每隔7 d各免疫一次,共两次,抗原从耳静脉注射。第四次免疫一周后颈动脉放血,测效价,收集血清,并用正常虾组织抽提液吸收、分装冷藏。

4 血清学检测

4.1 对流免疫电泳 按常规方法进行,琼脂糖为1.5%,以出现特异性沉淀线为阳性反应。

4.2 酶联免疫吸附(ELISA) 采用间接酶联免疫吸附法,观察颜色反应,同时,用酶联免疫检测仪测OD_{492}值,与阴性对照比值大于2~3倍以上为阳性结果。

阳性对照:虾病毒+抗病毒血清
阴性对照:抗原稀释液+抗病毒血清
抗体稀释液+虾病毒

4.3 免疫电镜 葡萄球菌A蛋白(SPA)0.2 mg/mL吸附铜网10 min,0.1 mol/L pH 8.0的PBS缓冲液冲洗,

本文于1996年4月8日收到,5月8日修回

维普资讯 http://www.cqvip.com

滤纸吸干，吸附抗体10 min，洗涤，滤纸吸干，然后吸附病毒悬液30 min，洗涤同上，滤纸吸干多余水份、PTA染色，电镜观测。

结果与讨论

1 **病毒的纯化** 经纯化的病毒在电镜下观察，能见到大小分别为20 nm左右及35 nm左右的两种球状病毒(图1,2)。对前者进行超微结构及理化特性等方面的初步研究鉴定该病毒属于细小病毒科[1]。另一种病毒的若干研究结果已经报道[2]，理化特性分析正在研究。

2 **血清学检测** 对流免疫电泳、ELISA、免疫电镜检测结果见表1及图版III—VII。

表1 血清学检测结果

Table 1 Serological tests

	抗原:抗体 Ab:Ag	1	2	3	4	5	阴性对照1 Neg. control. 1	阴性对照2 Neg. control. 2
对流免疫电泳	L	+	+	+	±	±	−	−
Counter immuno-electrophoresis	D	+	+	+	±	±	−	−
酶联免疫吸附	L	+	+	+	±	±	−	−
ELISA	D	+	+	+	±	±	−	−
免疫电镜	L	+	+	+	±	±	−	−
Immunogical EM	D	+	+	+	±	±	−	−

表1 1、2、3、4、5分别为河北、江苏、青岛、大连、福建地区的病虾组织提取物；L为中国抗细小病毒抗体(抗体L)，D为抗另一种病毒抗体(抗体D)，阴性对照1为抗原稀释液+抗病毒血清，阴性对照2为抗体稀释液+虾病毒。

Table 1 1、2、3、4、5 are isolates of disease shrimps from Hebei, Jiangsu, Qingdao, Dalian and Fujian, respectively. L was antibody to *Penaeus chinensis* Parvovirus, D was the other antibody. Neg. control 1 was antugen dilution + antibody, Neg. control 2 was antibody dilution + shrimp virus.

本研究应用不同的免疫学技术，对河北、福建、江苏、山东、辽宁等五个省的病虾材料进行了检测，其中河北、江苏、青岛的病虾材料中都能检测到中国对虾细小病毒及另一种球状病毒病原；大连与福建的对虾样品检测结果有时呈阳性，有时呈阴性，这取决于不同的虾样。从检测结果来看，这两种球状病毒广泛存在于我国从南到北的对虾养殖发病区域内。同时，两种病毒的抗原与抗体之间有交叉反应，说明这两种病毒存在一些相同的抗原决定簇。对病虾材料采取两种处理方法，一是按照上叙述方法提纯病毒，另一种是将对虾头胸部研磨、匀浆、低速离心去粗渣，再分别对其进行检测。结果表明，两种方法处理后的检测结果基本一致。

中国对虾细小病毒是导致我国养殖对虾发病死亡的主要病毒病原之一。该病毒核酸为单链DNA，结构蛋白由4条多肽组成，其分子量分别为86 kD、79 kD、70 kD、25.5 kD。在对另一种对虾球状病毒的研究过程虽发现人工感染死亡率为60%，该病毒在健康对虾中存在隐性感染[2]，感染病毒的对虾中无任何病症表现，但生长缓慢，一旦环境因子发生变化，就会造成大面积死亡。该病毒于细胞质内发生，可能是RNA病毒，其分类鉴定还需进行进一步的工作。

ELISA及免疫电镜技术在病毒学诊断中应用十分广泛，其灵敏度高。ELISA法方便、快速、准确，药盒价格低廉，便于野外操作。免疫电镜则更直观、准确。在免疫电镜技术中，利用抗原与抗体的吸附作用，可以在病毒悬液很稀的情况下捕捉病毒粒子，是实验室一种快速、灵敏、方便的检测手段。把这些技术用于对虾病毒病原的检测中，将有助于早期检测对虾病毒病原，从而控制病害，减少经济损失。

维普资讯 http://www.cqvip.com

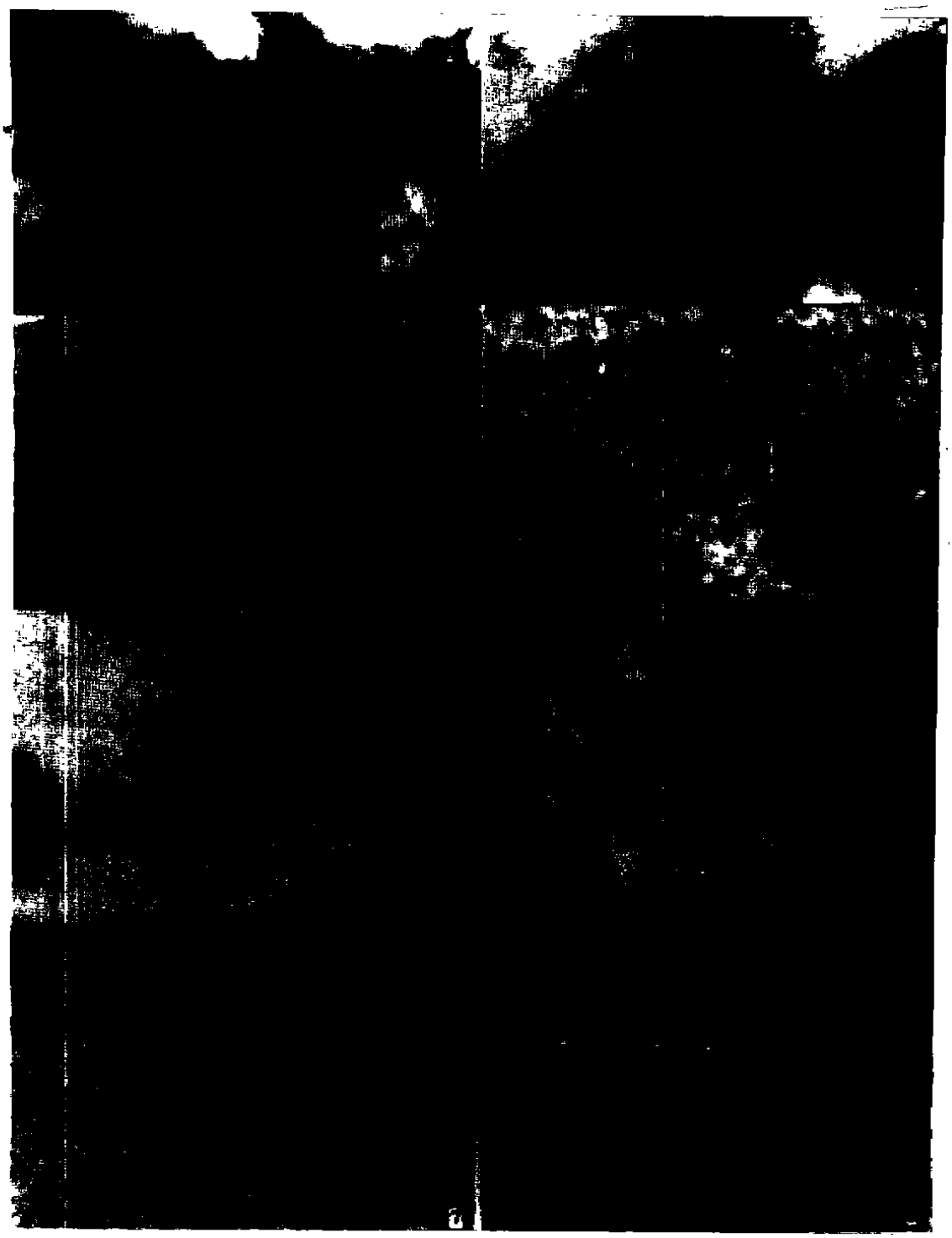

图 1　病虾组织中提取的大小为 35 nm 左右的球状病毒

Fig 1　Spherial virus with size average 35 nm from diseased *Penaeid shrimp*

维普资讯 http://www.cqvip.com

图2 提纯的中国对虾细小病毒

Fig 2 *Penaeus chinensis* parvovirus from disease shrimp

图3～7 免疫电镜检测的部分结果

Fig 3～7 Partial result of immunological EM detection

图3 河北样品+抗体L

Fig 3. Sample from Hebei + antibody L

图4 江苏样品+抗体L

Fig 4 Sample from Jiangsu + antibody L

图5 河北样品+抗体D

Fig 5 Sample from Hebei + antibody D

图6 青岛样品+抗体D

Fig 6 Sample from Qingdao + antibody D

图7 阴性对照

Fig 7 Negative control

图8 对流免疫电泳检测:1、2、3、4、5分别为河北、江苏、青岛、大连、福建五省市的病虾材料,6为阴性对照;7、8分别为抗体L及抗体D。

Fig 8 Detection of counter immunoelectrophoresis: 1, 2, 3, 4, 5 were diseased *penaeid shrimp* samples from Hebei, Jiangsu, Qingdao, Dalian and Fujian; 6 was negative control; 7, 8 were antibody L and D.

参 考 文 献

1 肖连春,石正丽,高玮等.中国对虾一种球状病毒的分离提纯及其核酸蛋白特性的研究.中国病毒学,1995,10(4):356～361

2 陈禄华,张建红,石正丽等.于中国对虾一种球状病毒的分离与提纯.中国病毒学,1995,9(2):170～173

3 石正丽,陈禄华.茶毛虫核型多角体病毒的血清学特性.中国病毒学,1992,7(3):276～286

4 David Katz. Yoheved Strausman, Abraham Shahar. Solid－phase immune electron microscopy for rapid viral diagnosis. J Immunol Methods, 1980, 38:171

Immunological Detection of Two Kinds of Viruses from *Penaeus chinensis*

Shi Zhengli Xiao Lianchun Gao Wei Chen Dihua

(*Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica*, *Wuhan* 430071)

Using two kinds of spherical viruses from diseased *Penaeus chinensis* as antigens, the relative antibodies were prepared. Then diseased shrimp samples from Jiangsu, Hebei, Qingdao, Fujian and Dalian were detected by counter immunoelectrophoresis, ELISA and immunological EM technique. The results showed that samples from Jiangsu, Qingdao and Hebei have relative viral pathogens.

Key words Spherical virus, Immunological detection, *Penaeus chinensis*