

# 猪瘟荧光抗体的制造和 在人工感染猪瘟病例的应用

李东成 肖俊杰 赵余放 寇改霞

(西北农学院畜牧兽医系)

## 摘 要

制成了高质量的猪瘟荧光抗体。用该荧光抗体的128倍稀释液,对猪瘟强毒人工感染猪扁桃体冰冻切片进行染色,隐窝上皮细胞胞浆内可出现特异性荧光。用32倍稀释液对猪瘟强毒人工感染猪的扁桃体、脾脏、淋巴结、腮腺、胰腺、肝脏、肾脏冰冻切片染色,可出现明亮的特异性荧光细胞,此种特异性荧光可被猪瘟阳性血清抑制,但不能被阴性血清抑制。该荧光抗体不能使健康猪、冻死猪和传染性胃肠炎病猪的同种组织冰冻切片出现特异性荧光细胞。

猪瘟的诊断至今仍是科学家们研究的一个课题。虽然现在已有许多诊断方法,但这些方法或者因为需要较精密的实验室设备和熟练的技术,或者因为得出诊断结果需要较长的时日,因而限制了这些方法的应用,尤其是近年非典型猪瘟病例,在有些国家内日渐增多,即使是最精确的病毒分离技术,对于这类病例也难免会得出错误的结果。

用免疫荧光法诊断猪瘟,具有快速、灵敏、准确而且检出率高等优点,因此,现在日本、美国、法国、丹麦等许多国家已广泛应用该法诊断猪瘟。国内有许多单位从事猪瘟荧光抗体制造的研究,但研制成功并得到令人信服的结果者不多。

我们从1978年起开始进行猪瘟免疫荧光的研究,现在已获得了令人满意的初步结果在猪瘟人工感染猪的检验方面做了较为系统的研究。

## 一、材 料 和 方 法

### 1. 猪瘟种毒

猪瘟强毒系由中央兽医生物药品监察所取回的石门系强毒冻干毒,将其接种给确证未接种过猪瘟疫苗的健康幼猪进行复壮。接种后经过72小时左右,体温升高 $1.5^{\circ}\text{C}$ 左右,高热稽留48小时以上,待体温开始下降时,直接以灭菌注射器从心脏采血,经脱纤处理后,置 $-20^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,此为血毒。另外,以无菌手术切开腹腔,采取脾脏(其边缘有明显的出血性梗死),置40%甘油缓冲盐水中,也放入 $-20^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用,此为脾

毒。

### 2. 猪瘟高免血清的制备

选未注射过任何疫苗，体重在100市斤左右的健康杂种阉猪两头，隔离观察7天，体温、食欲皆无异常，遂开始免疫，免疫程序见下表：

注射次数	与前次注射间隔时间	注射材料和每头注射量	注射途径	备 注
1		猪瘟免化弱毒脾淋毒 1:100稀释液2ml	肌肉	基础免疫
2	10日	猪瘟免化弱毒脾淋毒 1:100稀释液10ml	肌肉	强化基础免疫
3	10日	猪瘟强毒(血毒) 100ml	分点皮下 注射	第一次强毒攻击
4	10日	猪瘟强毒(血毒) 200ml	皮下、肌 肉、腹腔	第二次强毒攻击
5	10日	猪瘟强毒(血毒) 350ml	皮下、静 脉	第三次强毒攻击，其中 一头猪差血毒50ml，故 以脾毒1g作成1:50稀 释液皮下注射代替
6	10日	猪瘟强毒(脾毒)5g， 作1:20稀释	皮下	第四次强毒攻击

最后一次强毒攻击后，间隔15天，进行颈动脉放血，分离血清备用。

### 3. 荧光抗体的制备

取猪瘟高免血清50ml，向其中加入0.01M，pH7.4 PBS 50ml，在不断搅拌的情况下，缓慢加入饱和硫酸铵溶液25ml，使成20%饱和，然后经4000转/分离心，弃去沉淀(纤维蛋白)，向上清液中再补加饱和硫酸铵溶液75ml，使成50%饱和，继续在电磁搅拌器上搅拌3—4分钟后，4000转/分离心20分钟，弃去上清液(中有白蛋白)，将沉淀用0.01M，pH7.4 PBS稀释至50ml，再加饱和硫酸铵溶液25ml，使成33%饱和，经7000转/分离心20分钟，弃去上清(中有伪球蛋白)。后一过程重复3次。最后加少量0.01M，pH7.4 PBS将沉淀物溶解，装入透析袋中，在0.01M，pH7.4 PBS中，4℃环境下透析过夜(中间换液数次)，通过葡聚糖凝胶G50，除去盐离子，收集蛋白液，用弗林氏法测定蛋白含量。用0.5M，pH9.5碳酸缓冲液调至每毫升含蛋白20毫克左右，pH在9.0—9.5之间。按蛋白含量的1/80称取异硫氰酸荧光素(FITC，美国Sigma)，溶解于少量0.5M，pH9.5碳酸缓冲液中，并在电磁搅拌下逐滴加入上述已调好的蛋白液中(边加边测定pH，使其pH维持在9.0以上)。室温(10—12℃)搅拌结合2小时，然后立即通过葡聚糖凝胶G50柱，去除游离的荧光素。收集荧光抗体，分装，-20℃保存备用。

## 4. 标本片的制备

## (1) 猪瘟强毒感染猪新鲜病料标本片

先用猪瘟强毒感染未接种过猪瘟疫苗的健康仔猪11头,除两头系在死后取料外,其余9头分别在感染后4—10天(即体温升高后的1—5天)扑杀,采取其扁桃体、脾脏、颌下淋巴结、腮腺、胰腺和肾脏,放入普通冰箱内,于1—2日内按常规方法用半导体冷冻切片机制成5—8微米厚的切片,立即用电扇吹干,冷丙酮-20℃下固定15分钟,取出风干,进行染色,或用塑料袋密封,置-20℃冰箱中保存备用。该11头猪的扑杀取材时间见下表:

猪号	采取检验样品的时间(天)		备 注
	感 染 后	体 温 上 升 后	
1	5	3	} 扑杀后,病料和切片在普通冰箱内保存两个月以上
2	5	2	
3	5	3	扑杀
4	7	4	"
5	4	1	"
6	6	2	"
7	7	3	"
8	10	5	"
9	6	2	"
10	8	3	自行死亡
11	7	2	自行死亡

## (2) 猪瘟强毒感染猪陈旧病料标本片

将部分猪瘟强毒感染猪的扁桃体分别置于14℃和普通冰箱内,前者于3天后,后者于两个月后制成冰冻切片。

## (3) 健康猪组织标本片

取健猪5头,扑杀后,按猪瘟强毒感染猪采取病料的方法采取同种样品,制成冰冻切片。

## (4) 自然冻死猪组织标本片

自然冻死猪1头,采取材料和制片方法同上。

## (5) 传染性胃肠炎病料标本片

传染性胃肠炎人工感染猪3头,采取材料和制片方法同上。

## 5. 染色、观察、判定

(1) 染色——将猪瘟荧光抗体用0.01M, pH8.0 PBS稀释4—128倍,滴加在固定过的各种标本片上,置入37℃水浴箱内染色30分钟,取出后立即用0.01M, pH8.0 PBS反复涮洗3次,然后滴加0.1%伊文思兰,作用2—3秒后,立即用上述缓冲液涮洗,

甩去多余的缓冲液，然后用9：1缓冲甘油封裱，即可观察。

将猪瘟强毒感染猪病料标本片，以猪瘟高免血清作一步法抑制试验，即向1滴猪瘟荧光抗体中加入猪瘟阳性血清11滴，0.01M，pH8.0 PBS20滴，混和后，用其染标本片30分钟，然后按上述办法用伊文思兰复染，封裱观察。

(2) 观察——用Reichert大型研究显微镜，加FITC滤片，透射光观察。也曾用国产(浑江)光源配以普通生物显微镜进行过观察。

(3) 结果判定——按照荧光亮度分为以下5个等级：

- ++++ 很强的苹果绿色荧光
- +++ 较强的苹果绿色荧光
- ++ 亮苹果绿色荧光
- + 稍弱的苹果绿色荧光
- 无特异性荧光细胞

## 二、结 果

### 1. 猪瘟强毒人工感染猪各种组织标本片染色结果

从猪瘟强毒感染猪(包括感染后不同时期扑杀的和自行死亡的)采取的7种材料制备的冰冻切片，用4—128倍稀释的猪瘟荧光抗体染色后，均可看到一定的细胞胞浆内出现苹果绿色荧光，不过8倍以下非特异性荧光较强，64倍以上荧光亮度较弱，遂确定工作浓度为32倍稀释。各种组织标本片染色结果如下：

(1) 扁桃体(包括新鲜组织切片，14℃放置3天后制成的切片，在普通冰箱内保存2个月以上的组织制成的切片以及在普通冰箱内保存2个月以上的组织切片)——隐窝上皮细胞+++~++++，但荧光细胞多少不一，多者环绕隐窝的上皮细胞大多发亮，形成一个苹果绿色亮带将隐窝包围，甚至上皮下的淋巴样细胞也出现了稍弱的特异性荧光；少者，只有部分隐窝上皮细胞出现荧光。未着染的细胞呈现红色。用国产荧光光源配以普通生物显微镜观察时，隐窝上皮细胞荧光亮度较弱，但因背景晦暗，荧光细胞仍清晰可辨(见照片1)。

(2) 脾脏——脾小体中心细胞+++~++++，外围细胞++~+++，红髓区也可见到散在的荧光细胞++~+++ (见照片2)。

(3) 淋巴结——淋巴小结内细胞与脾小体细胞的着染情况相同(见照片3)。

(4) 腮腺——腮腺腺泡(末房)细胞++~+++，有时为少数细胞发亮，尤以分泌管和排泄管周围的腺胞，此种荧光细胞多见(见照片4)。

(5) 胰腺——胰岛细胞有成堆的细胞(有时为整个胰岛的细胞)有荧光++~+++，有时叶间结缔组织周围也有许多极亮的荧光细胞+++~++++ (见照片5)。

(6) 肝脏——窦隙内枯否氏细胞++，肝小叶下、小叶间亦可看到荧光细胞++~+++ (见照片6)。

(7) 肾脏——肾小球内细胞+++，肾小管外围也可见到散在的荧光细胞+++

(见照片7)。

2. 猪瘟强毒感染猪的7种病料组织切片, 经用猪瘟阳性血清一步抑制处理后, 均可使苹果绿色荧光消失。但用阴性血清处理, 不能抑制荧光。

3. 健康猪、因冻死亡的猪以及胃肠炎病猪的各种组织切片不出现荧光。

4. 证明自制的猪瘟荧光抗体为一种特异性很强的制品, 将其稀释至128倍仍可出现特异性荧光。

5. 根据实验室目前对病料的检验速度估计, 从收到病料算起, 可在2小时内得出可靠的结果, 从而可以说明用猪瘟荧光抗体诊断猪瘟是一种准确性高、操作简便的快速诊断方法。

### 三、几点体会

1. 初步体会到制造猪瘟荧光抗体成败的关键主要有两个方面。第一, 所用的猪瘟高免血清效价很高时, 才能制出高质量的猪瘟荧光抗体。按照我们的免疫程序所免疫的两头猪的血清, 都能制出比较理想的猪瘟荧光抗体。第二, 所用的异硫氰酸荧光素质量要高, 贮存时间不能过长。开始我们用的是英国BDH和上海军医大学朝阳制药厂生产的过期荧光素, 尽管在制造方法上作过许多探索, 花了很长时间均未成功; 后来改用沈阳药学院生产的荧光素, 但该批荧光素未注明批号和制造日期, 也未能制成猪瘟荧光抗体。最后采用美国新生产的荧光素, 虽在制造荧光抗体的方法上并未作太大改变, 但一举而制造成功。这两个方面究竟哪一个更为重要, 有待于进一步试验, 才能得出结论。

2. 据有关材料介绍, 被检材料的新鲜程度与荧光出现的强弱和检出率都有密切的关系, 冷藏和室温保存的材料以冷藏检出率高。如果被检材料不新鲜或未冷藏保存, 用猪瘟荧光抗体进行诊断, 将会使部分猪瘟病猪得不出正确的诊断结论, 这就使猪瘟荧光抗体的应用受到了限制。但用我们所制的猪瘟荧光抗体对从猪瘟病猪采取, 并在14℃保存了三天的扁桃体制成的冰冻切片进行染色, 仍能出现明亮的特异性荧光。这一方面说明我们所制造的猪瘟荧光抗体是一种质量较高的荧光抗体制品, 另一方面说明提高了猪瘟荧光抗体的质量以后, 对于病料保存寄送的条件, 要求并不十分苛刻。我们设想, 如果地区兽医诊断室配备有猪瘟荧光抗体, 该地区所属各县如果发生了猪瘟, 按当前我国的交通条件, 在县上用冰瓶装扁桃体送往地区检验, 还不至出现材料保藏不当造成无法检验的结果。

### 主要参考文献

1. 安徽农学院译:《荧光抗体技术及其在兽医上的应用》, 上海人民出版社, 1975年版。
2. 西北农学院译:《荧光抗体技术》, 1977, (内部资料)。
2. 第四军医大学编:《荧光免疫组织化学(荧光抗体)方法和荧光组织化学方法》, (科技资料), 2, 1974。
4. 湖南农学院译:《荧光抗体法在兽医检验中的应用概况》, (农业科技译丛),

- 
- 2, 1973。
  5. 川村明义:《荧光抗体法》,(新病毒学),2,P.145—176,朝仓书店,1972。
  6. Akiyoshi Kawamura, Jr.: *Fluorescent Antibody Techniques and Their Applications*, Second Edition, 1977。
  7. Curlis A. Williams and Merrill W. Chase: *Methods in Immunology and Immunochemistry*, Vol. 5, 1976。