

“全胚双氟碳法”制备禽脑脊髓炎琼扩抗原的研究

赵立红 陈德威 李军 秦秀慧

(中国农业大学动物医学院)

摘要 用禽脑脊髓炎病毒(AEV) Van Rockel 毒株接种 6 日龄 SPF 鸡胚, 感染 11 d 后, 分别收集鸡胚、绒毛尿囊膜及尿囊液, 鸡胚剔除羽毛、眼球、爪和喙后与绒毛尿囊膜一起, 制成匀浆, 反复冻融 3 次。通过 2 次氟碳(三氯三氟乙烷)从全胚匀浆中萃取制备 AE 琼扩抗原(AGP-Ag)。用进口标准 AE AGP 试剂进行标化, 结果发现: 制备的 AE AGP-Ag 与标准阳性血清之间有清晰、致密的沉淀线, 并与标准 AE AGP-Ag 的沉淀线完全吻合, 表明两者的沉淀反应一致, 从而建立了 AE AGP-Ag 制备新方法——“全胚双氟碳法”。其制备 AE AGP-Ag 有如下特点: 产量高, 平均每 3 个 SPF 鸡胚可获得 1 mL AE AGP-Ag; 特异, 与类症阳性血清无交叉反应; 敏感, AGP 试验中毋需重复加样, 普通琼脂板即可出线; 稳定性好, 保存期长; 与标准 AE AGP-Ag 阳性检出符合率均达 100%。本研究表明用“全胚双氟碳法”制备的 AE AGP-Ag 达到了进口标准 AE AGP-Ag 质量, 可用于 SPF 鸡 AE 抗体的监测, 且生产成本低, 也可用于商品鸡 AEV 感染的检测。

关键词 禽脑脊髓炎(AE); 琼扩抗原(AGP-Ag); SPF 鸡

分类号 S854.43

Preparation of the Agar-Gel-Precipitating Antigen for Avian Encephalomyelitis by Double Fluorocarbon Extractions from Whole Embryo

Zhao Lihong Chen Dewei Li Jun Qin Xiuhui

(College of Veterinary Medicine, CAU)

Abstract Six-day-old SPF chicken embryos were inoculated with Avian Encephalomyelitis Virus (AEV) Van Rockel, and the whole embryos (without feathers, eyes, claws and beaks) were collected and homogenized at 11 days after inoculation. The homogenate was frozen-thawed for 3 times, and extracted twice with Fluorocarbon. The extracted sample was ultracentrifugated at $7 \times 10^4 \text{ g} \cdot \text{min}^{-1}$ for 3 h to obtain the concentrated AE AGP-Ag. The Ag was evaluated with the standard AE AGP-reagents. The results showed that there was clear precipitation line between the Ag and the standard positive serum, and the line matched with the standard Ag's line exactly, which suggested that the two kinds of Ag reacted in the same manner. The Ag output is higher and the Ag is specific and sensitive. 1 mL Ag could be produced with 3 SPF chicken embryos. The Ab detection rate of the Ag was identified with that of the standard Ag in monitoring SPF chickens and immunized or infected chickens. This revealed that the prepared Ag can be used to monitor AE-Ab of SPF chickens, immunized

收稿日期: 2000-09-13

农业部九五重点资助项目(39670073)

赵立红, 北京圆明园西路 2 号中国农业大学(西校区), 100094

breeder flocks and infected commercial chickens

Key words avian encephalomyelitis (AE); agar-gel-precipitating antigen (AGP-Ag); SPF chicken

禽脑脊髓炎(AE)是由AEV引起的主要侵害雏鸡的急性传染病。AEV可由感染母鸡垂直传递给雏鸡,导致1月龄内的雏鸡发生共济失调,头颈震颤和后肢麻痹,衰竭死亡。成年母鸡则表现为产蛋率和孵化率降低,给养鸡业造成极大危害。检测AE抗体的血清学方法有许多种,其中AGP的特异性最好,是国际SPF鸡和商品鸡AE抗体监测通用的首选方法。而AEA-AGP-Ag及阳性血清的制备是影响AEA-AGP特异性和准确性的关键所在。迄今,许多学者对AEA-AGP-Ag的制备进行了研究^[1-6]。有试验证明AEV感染鸡胚,除脑组织含AEV较高外,在内脏、胚体、绒毛尿囊膜和尿囊液中均含有AEV^[7]。AEV对有机溶剂具有抵抗力^[8],重复用氟碳处理可将鸡胚匀浆中的杂蛋白除去,从而消除其非特异性反应。本研究通过2次氟碳萃取法,从感染鸡全胚中提取AEA-AGP-Ag,旨在消除非特异性,提高敏感性的同时,降低生产成本,制备一种可用于SPF鸡AE抗体监测和商品鸡AEV感染检测的特异、敏感、标准的AEA-AGP-Ag。

1 材料与方 法

1.1 材 料

毒株 AEV an Rockel 株由美国ATCC引进,经SPF鸡胚传代增殖,ED₅₀为10⁻⁶·mL⁻¹, -70 保存。

SPF(蛋)胚 SPF蛋由中监所SPF动物房提供,本室孵化至6日龄胚。

标准AEA-AGP-Ag及AE阳性血清和SPF鸡阴性血清 均购自美国SPAFAS公司。

ND, MG, B, BD, AI等类症阳性血清 购自哈尔滨兽医研究所及中监所。

SPF隔离器 本所自制产品。

玻璃匀浆机 日本National产品。

琼脂糖 上海药物研究所产品。

1.2 方 法

1.2.1 AEA-AGP-Ag的制备 取6日龄SPF鸡胚,经卵黄囊接种0.2 mL含10³ ED₅₀的AEV an Rockel,感染胚继续孵化11 d,取出放4℃冰箱过夜。分别收集鸡胚、绒毛尿囊膜和尿囊液。鸡胚剔除羽毛、眼球、爪和喙后与绒毛尿囊膜一起称重按1:3加入尿囊液(不够用PBS补足),用玻璃匀浆机匀浆5 min成乳剂,反复冻融3次。将冻融过的鸡胚匀浆2.1×10³ g·min⁻¹离心30 min,上清液加等量氟碳匀浆2 min,2.1×10³ g·min⁻¹离心30 min,取上层水相再用氟碳处理1次。取2次氟碳处理过的上层水相,4℃ 1.2 g·min⁻¹离心20 min,取上清液4~7×10⁴ g·min⁻¹超速离心3 h。收集沉淀,加原液1/60容积的Tris-EDTA使其溶解悬浮。将悬浮液超声裂解处理1 min,即成AEA-AGP-Ag,加防腐剂保存备用。

阴性抗原的制备同上,只是鸡胚接种不含AEV的PBS。

1.2.2 阳性血清的制备 取4只2月龄SPF鸡,饲养于SPF隔离器中,将AEV an Rockel稀释成10⁴ ED₅₀·mL⁻¹,每只鸡胸部肌肉多点注射。每周1次,共免疫4次。其免疫程序为:第1

周注射 1 mL, 第 2 周 1.5 mL, 第 3 周 2.0 mL, 第 4 周 2.5 mL。末次免疫 2 周后心脏采血, 分离血清测定 A GP 效价, 加防腐剂分装保存。

1.2.3 琼扩试验

1.2.3.1 琼脂板的制备 称取 1 g 优质琼脂(糖)加入 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 7.2 的 PBS 100 mL 中, 煮沸至琼脂完全溶解后, 分别加入 8 g 和 15 g NaCl 快速摇匀溶解, 冷却至 50 ~ 60 倒板, 厚度约为 3 mm, 制成 2 种含盐量不同的琼脂板。待琼脂凝固后倒置于湿盒中, 4 保存备用。

1.2.3.2 加样及结果判定 按六角梅花图案打孔, 孔径 4 mm, 孔距 4 mm。按常规加入抗原和血清, 37 条件扩散 2 h 后, 倒置继续孵育 24~ 72 h 判定结果。抗原与阳性血清或待检血清之间出现清晰的沉淀线为阳性反应。

1.2.4 标化验证 在含 8% NaCl 和 15% NaCl 的琼脂板上分别做 A GP, 用进口标准 A E-A GP 试剂对制备 A E A GP-A g 及其阳性血清进行标化验证。

1.2.5 特异性试验 中间孔加制备 A E A GP-A g, 外周孔加 A E 阳性血清及 ND, M G, B, B D, A I 等类症阳性血清, 观察有无交叉反应。

1.2.6 敏感性试验 中间孔分别加标准与制备 A E A GP-A g, 外周孔加 2, 4, 8, 16, 32, 64 及 128 倍稀释的阳性血清; 中间孔加出线最清晰, 稀释倍数最高的 1/32 的阳性血清, 外周孔加 2, 4, 8 倍稀释的制备 A E A GP-A g (或标准 A E A GP-A g), 检测 A E A GP-A g 的敏感性。

1.2.7 保存期测定 将制备 A E A GP-A g 及阳性血清分别存放于 4 , - 20 , - 70 条件下, 不定期抽检, 检验其稳定性, 确定其保存期。

1.2.8 平行对比试验 用制备 A E A GP-A g 和标准 A E A GP-A g 分别对 100 份 SPF 鸡血清, 200 份 A E V 免疫种鸡血清和 300 份 A E 发病待检鸡血清进行 A E 抗体检测, 求证二者的阳性检出符合率。

2 结果与讨论

2.1 用全胚制备 A E A GP-A g

1982 年 Girshick 曾用氟碳从感染鸡胚脑中提取 A E A GP-A g, 但产量较低^[2]。Burke 和姚大明等证明感染鸡胚的许多组织中都含有 A E V, 除脑组织含量较高外, 内脏、绒毛尿囊膜和尿囊液中也含有 A E V。根据以上结果, 我们分别从胚脑和全胚中, 用双氟碳法试制 A E A GP-A g。结果表明胚脑和全胚提取的抗原均具有特异性。而胚脑占整个胚体比例低, 仅用胚脑提取 A E A GP-A g, 其产量有限。本试验用双氟碳法从全胚中制备 A E A GP-A g, 其产量大大提高, 平均每 3 个胚可获得 1 mL A E A GP-A g。

2.2 制备 A E A GP-A g 与标准 A E A GP-A g 的比较

标化试验证明制备 A E A GP-A g 与标准阳性血清之间有清晰的沉淀线, 而且与标准 A E A GP-A g 的沉淀线完全吻合, 表明两者的沉淀反应一致; 而与阴性血清无沉淀反应(图 1-A)。另据多数研究报道, A E A GP 需用“高盐板”(含 15% ~ 20% 的 NaCl)。本试验用制备 A E A GP-A g 在含 8% NaCl 和 15% NaCl 的琼脂板上分别进行试验, 结果相似。且 8% NaCl 琼脂板“出线”时间更早, 最早为 17 h, 而含 15% NaCl 的琼脂难溶解, 琼脂板的透明度较差, 吸水性强, 不易操作, 本试验确定 A E A GP 使用 8% NaCl 的普通琼脂板。

制备阳性血清用标准与制备 A E A GP-A g 测定, 其效价均高达 1 128, 而与阴性 A E A GP-A g 无沉淀线

2.3 双氟碳法对 A E A GP-A g 非特异性的影响

A E V 对有机溶剂有抵抗力, 用氟碳处理鸡胚匀浆, 可去除脂类和杂蛋白, 而对 A E V 感染力无明显的影响(本研究中用氟碳处理过的水相接种 6 日龄鸡胚, 可引起 A E 典型病变)。特异性试验表明: 制备的 A E A GP-A g 沉淀线单一、致密, 与类症阳性血清没有交叉反应(图 1-B), 表明本研究采用的双氟碳法可有效去除鸡胚匀浆中的杂蛋白, 从而消除了制备 A E A GP-A g 的非特异性。

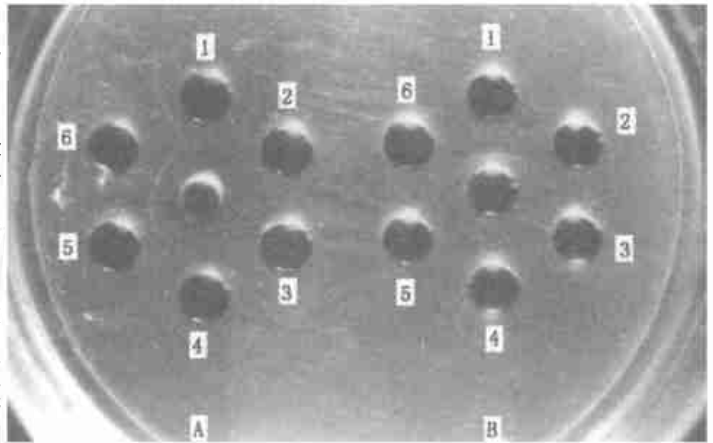


图 1 琼脂扩散试验结果

- A. 标化试验 中间孔为制备 A E A GP-A g;
外周孔分别为: 1 标准 A E A GP-A g; 6 标准 A E 阳性血清;
2 阴性血清; 3, 4, 5 待检血清。
- B. 特异性试验 中间孔为制备 A E A GP-A g;
外周孔分别为: 1 标准 A E 阳性血清; 2~6 依次为 ND, M, G,
B, BD, A I 类症阳性血清。

2.4 制备 A E A GP-A g 的敏感性

A GP-A g 原液与 1 32 稀释的阳性血清出现沉淀反应, 即认为符合 A GP 诊断试剂要求^[3]。本试验制备的 A E A GP-A g 可与 1 128 稀释的阳性血清出现沉淀线,

1 8 稀释(标准 A E A GP-A g 1 4

稀释)后仍可与 1 32 稀释的阳性血清出现阳性反应, 而且 A GP 试验中 A E A GP-A g 毋需重复加样, 表明制备 A E A GP-A g 敏感性高, 达到标准 A E A GP-A g 质量。

表 1 待检血清 A E 抗体检测结果

项 目	SPF 鸡	免疫成鸡	有母源抗体 1 日龄雏鸡	发病成年鸡	发病雏鸡	
					1 日龄	15 日龄
样本数	100	100	100	100	40	160
制备 A E A GP-A g 阳性 检出率 %	0	92	85	94	2	100
标准 A E A GP-A g 阳性 检出率 %	0	92	85	94	2	100

2.5 制备 A E A GP-A g 与标准 A E A GP-A g 的阳性检出率比较

用制备 A E A GP-A g 与标准 A E A GP-A g 对 100 份 SPF 鸡血清检测, 其 A E 抗体阳性检出率为 0%。对免疫种鸡和发病鸡待检血清检测发现: 带有母源抗体的 1 日龄雏鸡的阳性检出率为 85%, 以后随日龄增长, 母源抗体逐渐降低, 30 日龄的阳性检出率降至 24%。而自然发病 1 日龄雏鸡的阳性检出率为 2%, 15 日龄达 100%。制备 A E A GP-A g 与标准 A E A GP-A g 检

测结果一致,阳性检出符合率达 100%。

2.6 制备 AE AGP-Ag 稳定性及保存期

制备 AE AGP-Ag 及阳性血清 4 保存 6 个月, - 20 保存 1 年,反复冻融使用, - 70 保存 3 年,效价基本不变,表明其稳定性好,保存期长。

3 结论

以上研究结果表明:用“全胚双氟碱法”制备的 AE AGP-Ag 产量高而且特异、敏感、稳定,并与标准 AE AGP-Ag 的阳性检出符合率为 100%,完全达到进口标准 AE AGP-Ag 质量,可作为标准试剂用于 SPF 鸡 AE 抗体的监测,而且生产成本低也可用于商品鸡 AEV 感染的检测。

参 考 文 献

- 1 Matsumoto M, Wangelin J R, et al. Purification of avian encephalomyelitis virus by ultracentrifugation in a nonlinear cesium chloride gradient. *Avi Dis*, 1978, 22(3): 496~ 502
- 2 Girshick T, Grary C K. Preparation of an Agar-Gel-Precipitating antigen for avian encephalomyelitis and its use in evaluating the antibody status of poultry. *Avi Dis*, 1982, 26(4): 496~ 502
- 3 朴钟珠,李春风,等.应用琼脂扩散试验诊断禽脑脊髓炎的研究. *中国畜禽传染病*, 1987, (1): 29~ 31
- 4 秦爱建,崔治中,等.禽脑脊髓炎病毒琼扩抗原的制备及其在评价鸡群抗体水平中的应用. *中国兽医科技*, 1994, 24(7): 5~ 7
- 5 赵心力,郭金贵,等.禽脑脊髓炎琼脂扩散沉淀抗原制备与应用的研究. *中国兽医科技*, 1995, 25(2): 6~ 8
- 6 赵继勋,秦卓明,等.禽脑脊髓炎琼扩抗原的研制与应用. *中国家禽*, 1997, (4): 9~ 11
- 7 姚大明,马双年,等.应用感染的鸡胚试制禽脑脊髓炎琼扩沉淀抗原的研究. *家禽*, 1987, (1): 26~ 29
- 8 殷震,刘景华. *动物病毒学*. 北京:科学出版社, 1985, 428