

利用免疫膠體金方法觀察細胞內豬瘟病毒 分佈之微細構造

黎南榮* 林榮培 黃天祥

台灣省家畜衛生試驗所

利用豬瘟病毒A76株抗血清與A蛋白膠體金免疫電顯負染法可特異性的測定豬瘟病毒，此種敏感性極高之免疫法可用於部份純化及病毒量較少之檢體。

培養於CPK細胞之A76豬瘟病毒經過L.R White包埋及膠體金染色，可於粗糙網狀內皮組織，類似融酶體顆粒，細胞質空泡上見到特異性的15nm膠體金染色，經過不同病毒及抗血清之試驗，證實A蛋白膠體金可作為通用性的金染色，而不必再以特異性初級抗體或次級抗體吸附於金粒子，且不會喪失其特異性及敏感性，也不會增加背景染色。

利用免疫學方法可提供抗原與宿主細胞間相互關係的有關資料，以過氧化酵素-抗過氧化酵素(PAP)及鐵蛋白(ferritin)法來進行，雖然效果不錯，但因其對比度及特異性較差，不足以提供足夠的研究所需資料，為了克服此困難Faulk及Taylor於1971年首先利用膠體金作為標示抗體進行免疫電子顯微鏡研究以來，膠體金染色目前已廣為學者應用^(2,3)。膠體金因其原子量大，對比度極高使非特異性反應減至最低⁽⁴⁾。一般而言膠體金粒子愈小其特異性及解析力愈強，豬瘟為豬之重要傳染病對仔豬之育成關係為重要⁽⁵⁾。

本年度計畫以免疫膠體金法研討豬瘟病毒於

細胞之繁殖情形，及以膠體金負染法鑑定豬瘟病毒之可行性。

材料與方法

1. 稀釋液：

供血清，檢體稀釋及沖洗用，其成份為含5%牛血清白蛋白之0.1M磷酸緩衝液。

2. 豬瘟病毒抗血清：

豬隻經初代免疫豬瘟病毒後補強注射而得。

3. A蛋白膠體金：

購買自Amersham Auroprobe EM protein A G15 RPN439，膠體金粒子大小

*抽印本索取作者

台灣省家畜衛生試驗所

為15nm。

4. 超薄切片免疫染色：

CPK細胞接種豬瘟病毒於第4天以含0.5% Glutaraldehyde (GA)、5% Paraformaldehyde與3.5% Sucrose之固定液固定1小時，經沖洗酒精皆脫水至70%後利用L.R. White浸潤隔夜，第2日以新鮮L.R. White浸潤4小時後包埋於gelatin capsule經50°C 24小時聚合，厚切選取適當部位再薄切成60~90nm厚度以300mesh之鎳網片收集。染色時先以稀釋液浸潤30分鐘，再與抗豬瘟之抗血清於4°C感作一夜，次晨以稀釋液沖洗3~5次後與Protein A Colloidal Gold感作4小時再以稀釋液沖洗3~5次，後以鈾及鉛進行雙重染色。

5. 免疫負染色：

取初步純化之病毒液與抗血清於4°C感作1夜，遠心除去上清液再以稀釋液沖洗兩次，以20倍稀釋之Protein A-Gold 4°C感作4小時後清洗，以磷鎢酸鉀 (PTA) 負染色鏡檢。

結 果

CPK細胞接種A76豬瘟病毒後，細胞有明顯的空泡化現象，經抗血清與A蛋白膠體金染色後於細胞質、空泡內及其邊緣 (圖1、圖2) 有明顯的膠體金染色。

免疫膠體金負染色時病材經抗體感作後可見到12nm (圖3) 及38~45nm (圖4) 兩種抗原特異性之顆粒聚集及膠體金染色，而於細胞碎片及背景均未見到金粒子證實其特異性極高。

討 論

膠體金染色因其特異性及對此度高為一良好的研究抗原分佈之方法，但為了保存其抗原性，

常須考慮標本之固定方法，一般電顯常用之2.5% 戊二醛 (Glutaraldehyde) 及1% 四氧化錳 (Osmium Tetraoxide) 後固定法雖對組織之微細結構保存良好但亦使其抗原性消失，為了保存組織之抗原性常須將戊二醛之濃度降低而以三聚甲醛 (Paraformaldehyde) 取代，且省略四氧化錳，因而使組織之結構固定較差。包埋劑目前趨向於使用親水性之L.R. White。因其可於70%酒精濃度即進行包埋且聚合之溫度為50°C對抗原之損失較小，使其特異性提高，在判讀時因固定劑及包埋劑之影響使組織之微細結構保存較差，故需充分瞭解細胞之微細結構以利判定。

誌 謝

本試驗承呂蓮葉小姐精緻細密之電顯材料製備工作始得以完成，僅致萬分之謝意。

參 考 文 獻

1. Faulk, W.P., Taylor G.M. (1971). An immunogold method for the electron microscope. *Immunochemistry* 8: 1081-1083.
2. Garzon, S., Bendayan, M., Kurstak, E. (1982). Ultrastructural localization of viral antigens using protein A-gold technique. *J. Virol Methods* 5:67-73.
3. Mecker, R.A., Saif, L.J., Muer, G.W. (1989). Development of protein A-gold immunoelectron microscopy for detection of bovine coronavirus in calves: Comparison with ELISA and direct immunofluorescence of nasal epithelial cells.
4. Patterson, S., Verduin, B.J.M. (1987).

Application of immunogold labelling in animal and plant virology. Arch. Virol. 97:1-26.

5. Terpstra, C. (1991) Hog cholera: An update of present knowledge. Br. Vet. J. 147 : 397-406.

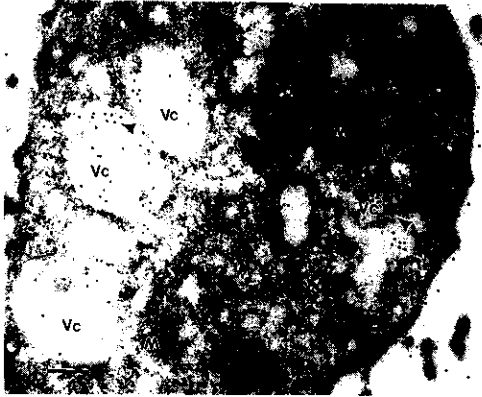


圖1 CPK 細胞接種豬瘟病毒以 Protein A-Gold 進行膠體金染色，於細胞質空泡內可見特異性的膠體金染色(箭頭)。Vc:Vacuole M:Mitochondria bar=250nm

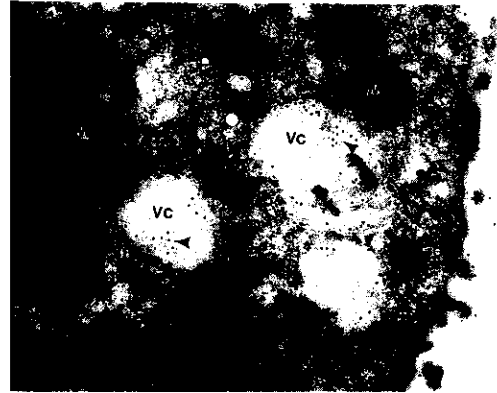


圖2 CPK 細胞接種豬瘟病毒，以Protein A-Gold 進行膠體金染色，於細胞質空泡邊緣有特異性的膠體金染色(箭頭)。Vc:Vacuole M:Mitochondria bar=250nm



圖3 豬瘟病毒以豬瘟抗血清4°C感作一夜 Protein A-Gold 4°C感作4小時再進行負染色，可見直徑 12 nm 之顆粒因抗體而凝集，具有特異性的膠體金染色。bar=100nm

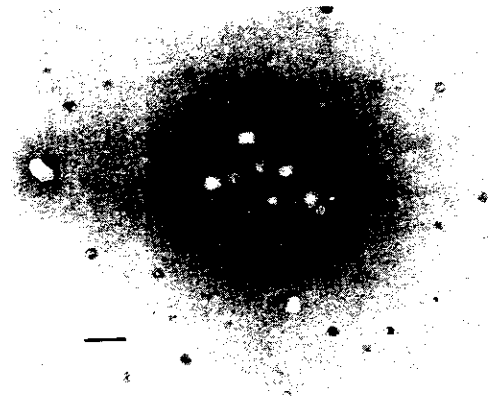


圖4 豬瘟病毒以豬瘟抗血清4°C感作一夜 Protein A-Gold 4°C感作4小時再進行負染色，病毒顆粒周圍有特異性的膠體金染色。bar=100nm

Ultrastructural localization of Hog cholera virus antigen using an immunogold method

N.J.Li*, Y.P.Lin., T.S. Huang

Taiwan Provincial Research Institute for
Animal Health

SUMMARY

Protein A-Colloidal gold immunoelectron microscopy (PAGIEM) has been employed to specifically detect Hog cholera virus with swine anti-A76 serum. This rapid and sensitive immunoassay was found to be applicable to partially purified virus preparation.

Hog cholera virus antigen were labeled in L.R. White embedded ultrathin of CPK cell, using pritein A-colloidal gold. Antigens in the rough endoplasmic reticulum, lysosomelike particles, or cytoplasmic vacuole were tagged with 15 nm gold particles.

Working with different viruses and antisera, protein A-Colloidal gold, can be used as an universal gold stain instead of primary or secondary antibodies adsorbed to gold, without losing sensitivity or increasing background.

*Corresponding author

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health, Taiwan, R.O.C.