

利用免疫膠體金方法觀察細胞內病毒 分佈之微細構造：假性狂犬病

76-10

黎南榮 林榮培 何維莊

台灣省家畜衛生試驗所

膠體金免疫電子顯微鏡負染色法可特異性的測出假性狂犬病病毒，此種快速而敏感性之免疫法可用於部份純化之樣本。利用間接膠體金方法可以 5 nm 及 15 nm 之膠體金粒子標示 RK13 細胞上之假性狂犬病病毒，膠體金粒可特異性的標示於病毒之外套膜及其核膜，膠體金染色法可提供病毒與宿主細胞間之進一步資料。

利用免疫學方法可提供研究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，爲了克服此困難 Faulk 及 Taylor 於 1971 年首先利用膠體金作爲標示抗體進行免疫電子顯微鏡研究以來，膠體金染色法，目前漸爲學者所廣爲應用^(2,3) 膠體金粒子可依需要製成直徑 3 至 80 nm 之粒子，不同抗體以不同大小之膠體金標示，則可同時研究數種抗原於同一細胞內之分佈情形及研究抗原間之相互關係。膠體金因其原子量較大，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。

穿透式電子顯微鏡以 3 至 30 nm 應用最多^(6,7)，本年度之試驗爲研討以膠體金法是否能定位假性狂犬病在細胞之分佈情形。

材料與方法

兔抗假性狂犬病血清：以假性狂犬病疫苗皮下接種紐西蘭白兔後再補強注射使抗體力價升高後分離血清純化備用。

山羊抗兔球蛋白膠體金抗體：購買自 Jonssen Biotech 之 Auroprobe EMGAR 5 及 15，膠體金粒子直徑分別爲 5 及 15 nm。

超薄切片之免疫染色：RK 13 接種假性狂犬病 TNL 株後，俟 CPE 達 50 % 時以 4 % Formaldehyde 固定經水洗，階梯性脫水，以 Epon 及 Spurr 包埋，切成 60 ~ 90 nm 厚度以 300 mesh 之鎳網片及 200 mesh 之金網片收集，採集之薄切片先以飽和之 Sodium metaperiodate 水溶液侵蝕 60 分鐘經水洗以後以 5 % 牛血清白蛋白作用 15 分鐘後與兔抗假性狂犬病抗血清感作 1 小時，沖洗後再與 Auroprobe EM 感作 1 小時，沖洗後以鉛、鈷進行雙重染色鏡檢。

免疫負染色：初步純化之假性狂犬病病毒與兔抗假性狂犬病抗血清感作 30 分鐘經生理鹽水沖洗後以 Auroprobe EM GAR 15 感

作 30 分鐘經沖洗後以 2% PTA 進行負染色鏡檢。

結 果

感染假性狂犬病病毒之細胞超薄切片以膠體金染色時，於細胞核及細胞質內之病毒核及完整之病毒顆粒皆可見到特異性之膠體金染色（圖 1 及圖 2）細胞核之染色質（Chromatin）有明顯的週邊化現象（如圖 1）於對照組未見膠體金染色，可證其特異性。

利用膠體金免疫負染色法可很成功的標示假性狂犬病病毒（如圖 3）。

討 論

感染假性狂犬病病毒細胞之病毒核及外套膜皆可見到膠體金粒子，可能為初代抗假性狂犬病病毒抗體係經長期重覆多次免疫而得之多力價血清有關。而每一病毒所染之膠體金粒子較少可能係長時間固定及包埋切片後再染色所致。目前之研究結果顯示膠體金染色可作為研究病毒與細胞間關係之一有效工具。

利用膠體金免疫負染色法可很成功的標示假性狂犬病病毒（如圖 3）免疫膠體金負染色之操作較為簡便，可利用其免疫特性來區分不同的疱疹病毒。

免疫膠體金染色法因其特異性及對比性高，為一良好的研究抗原分佈之方法，但因標本之固定包埋過程會使其抗原性喪失，因此各種不同抗原皆須嘗試數種之固定及包埋法⁽⁵⁾，以求得最佳之結果。

參 考 文 獻

1. Faulk, W.P., Taylor, G.M. (1971), An immunogold method for the electron microscope. *Immunochimistry* 8: 1081-1083.
2. Garwes, D.J., Stewart, F Cartwright, S.F., Brown, I., (1988). Differentiation of porcine coronavirus from transmissible gastroenteritis virus. *Vet. Rec.* 122: 86-87.
3. Garzon, S., Bendayan, M., Kurstak, E. (1982). Ultrastructural localization of viral antigens using protein A-gold techingus. *J. Virol Methods.* 5: 67-73.
4. Heckert, R. a., Saif, L. J., Myers, G.W. (1989). Development of protein A-Gold immunoelectron microscopy for detection of bovine coronavirus in calves: Comparisen with ELISA and direct immunofluoresence of nasal epithial cells. *Vet. Micro.* 19: 217-213.
5. McClean. J.W., Nakane, P.K. (1974). Application of immunogold labelling in animal and plant virology. *Arch. Virol.* 97: 1-26
7. Petrie, B. L., Greenberg, H.B., Graham, D.Y., Estes MK (1984) Ultrastructural localization of rotavirus antigens using colloidal gold. *Virus. Res.* 1: 133-153.

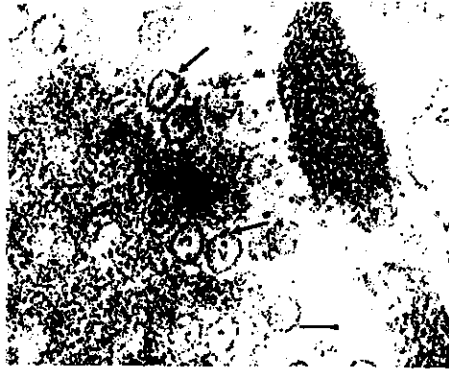


圖1 感染假性狂犬病病毒細胞核之膠體金染色，可於細胞核內見到病毒核(v)及 15 nm 之膠體金粒子(箭頭)，核之染色質(b)有明顯的週邊化現象，nm 為核膜，直綫代表 100 nm。

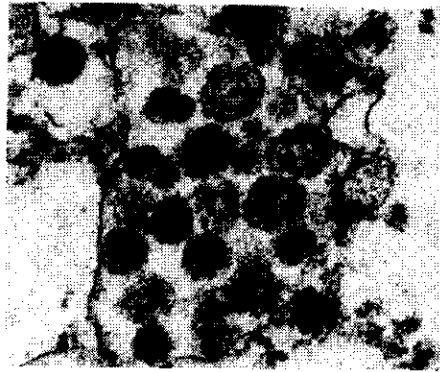


圖2 感染假性狂犬病病毒之細胞質膠體金染色，可於細胞質內見到完整之病毒(v)及 5 nm 之膠體金粒子(箭頭所指)，直綫代表 100 nm。

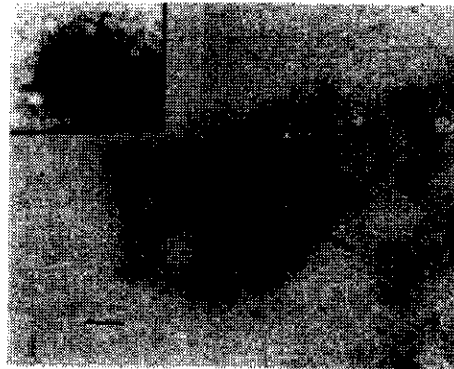


圖3 假性狂犬病病毒(v)及病毒核(左上角插圖C)以兔抗假性狂犬病血清感作 15 nm 膠體金標示之山羊抗兔免疫球蛋白感作後利用 2% PTA 負染色，箭頭所指為膠體金粒子，直綫代表 100 nm。

**Ultrastructural Localization of Virus Antigen Using
an Immunogold Method:Pseudorabies**

N.J. Li., Y.P. Lin., W.C. Ho

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health.

SUMMARY

Colloidal gold immuno electron microscopy has been employed to specifically detect pseudorabies virus antigen in negatively stained specimens. This rapid and sensitive immunoassy was found to be applicable to partially purified virus preparation.

Pseudorabies virus antigen were labeled in ultrathin section of RK13 cell, using indirect immunogold method. Antigens were tagged with 5nm or 15nm gold particles, the gold particles were present on viral nucleocapsid and viral envelopes. Immunogold stain of ultrathin sections can yield additional information of virus-host cell interactions.