



# 猴泡沫病毒间接免疫荧光检测方法的建立及初步应用

栗景蕊, 贺争鸣

(中国药品生物制品检定所, 北京 100050)

**【摘要】** 目的 建立检测血清中猴泡沫病毒(SFV)抗体的间接免疫荧光方法,为检测实验用猴群中SFV的感染情况提供参考依据。方法 用SFV-1病毒感染BHK-21细胞,待50%细胞出现病变时,用胰蛋白酶消化细胞后以 $2 \times 10^7$ /mL浓度40  $\mu$ L的细胞滴到10孔镀膜的玻片上,丙酮固定。利用制备的抗原片通过间接免疫荧光法对34份猴血清标本进行检测。结果 建立了检测SFV抗体的间接免疫荧光染色方法,SFV抗体阳性19例,15例血清检测为阴性。结论 本方法具有良好的特异性,可作为SFV检测的可靠方法。

**【关键词】** 猴泡沫病毒; 间接免疫荧光

**【中图分类号】** R373; R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)07-0059-03

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.07.013

## Establishment and Application of Assay for the Detection of SFV by Immunofluorescence Assay

LI Jing-rui, HE Zheng-ming

(National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China)

**【Abstract】 Objective** Establishing the method of detecting the simian foamy virus (SFV) antibody with Immunofluorescence assay (IFA), to provide reference in the the detection of SFV infections in monkeys. **Methods** Selected SFV sensitive cell BHK-21, take the procedure of one step digestive treatment with trypsin while 50 percent of cell has pathological changes, titrate the cells 40  $\mu$ L with the concentration of  $2 \times 10^7$ /mL on the slide. Then it is fixed with acetone. Testing 34 serum with the antigen slide in IFA. **Results** We established the immunofluorescence assay to test SFV, 19 serum was positive, and 15 serum was negative. **Conclusion** This method can test SFV with high specificity.

**【Key words】** Simian foamy virus; IFA

免疫荧光技术在病毒领域应用最为广泛,并且取得很大成就,主要用于病毒抗原在器官细胞内的定位,病毒感染过程的研究,也可用来检查血清中的抗病毒抗体<sup>[1]</sup>。猴群中猴泡沫病毒的自然感染率较高,检测血清中抗体可以作为有效的筛查方法。由于间接免疫荧光法测定血清中抗体特异性和稳定性较好,通过浓度梯度滴定,分别确定了一

抗猴血清和二抗 FITC 标记的羊抗人 IgG 抗体的最佳工作浓度,建立了针对猴血清的间接免疫荧光方法(IFA)来检测 SFV,为保证猴源性生物材料使用的安全性打下了基础。

用 SFV 病毒 BHK-21 细胞培养的方法制备抗原,通过浓度梯度滴定,分别确定了一抗猴血清的最佳工作浓度和二抗 FITC 标记的羊抗人 IgG 抗体

[作者简介]栗景蕊(1983-),女,免疫学硕士。研究方向:实验动物病毒学。

[通讯作者]贺争鸣(1957-),男,研究员,博士。研究方向:实验动物微生物学。E-mail: hezm@nicpbp.org.cn。

的最佳工作浓度。建立针对猴血清的间接免疫荧光方法(IFA),从而用以检测实验用猴群中 SFV 的感染情况。根据荧光强度可以对猴血清抗体水平进行半定量分析。

## 1 材料和方法

### 1.1 毒种和培养细胞

SFV-1 株,购自 ATCC,编号:VR-276。培养细胞为幼仓鼠肾传代细胞(BHK-21),中国药品生物制品检定所实验动物质量检测室保存。

1.2 0.01 mol/L、pH 7.2 的 PBS

1.3 FITC 标记的羊抗人 IgG 抗体:KPL 公司产品,实验中用 1% 伊文思兰稀释。

1.4 1% 伊文思兰:实验中用 0.01 mol/L、pH 7.2 PBS 作 1:10000 稀释。

1.5 猴血清标本:采自国内几个实验用恒河猴生产厂家。

1.6 猴 SFV IgG 抗体阳性血清、阴性血清:为 2008 年采集的血清标本,并用 ELISA 方法鉴定。

### 1.7 SFV 的细胞培养

将 BHK-21 细胞传代培养,在传代 24 h 之内形成 50~70% 单层时接种 SFV 毒种 1 mL。置 37℃ 的 CO<sub>2</sub> 培养箱内吸附 3 h,加入细胞维持液 3 mL,置 37℃ 的 CO<sub>2</sub> 培养箱继续培养,每日观察细胞病变效应。

### 1.8 制备抗原片

待接种 SFV 病毒的 BHK-21 细胞病变达到 50% 时,弃细胞液,用 PBS 洗涤细胞表面一次,弃 PBS。胰酶消化后,用 PBS 将细胞轻轻吹打下来,收集于离心管内。1000 rpm 离心 10 min,弃上清,以适量 PBS 重悬细胞液。将重悬的细胞液滴于抗原片玻片孔中,使细胞铺层面积达到 50~80%。室温晾干,至冷丙酮中于 4℃ 固定 15 min,取出于蒸馏水中漂洗一遍,室温晾干。同法设立正常 BHK-21 细胞对照。

### 1.9 SFV 的间接免疫荧光染色

取细胞抗原片以 PBS 漂洗一次,室温晾干。滴加用 PBS 梯度(1:10, 1:20, 1:40)稀释的血清样品,置湿盒中,37℃ 保温 30 min。用 PBS 漂洗三次,5 min/次,室温晾干。滴加以 1% 伊文思兰梯度(1:100, 1:250, 1:500)稀释的 FITC 标记的羊抗人 IgG 抗体,37℃ 保温 30 min。用 PBS 漂洗三次,5 min/次,室温晾干。用 50% 的甘油封片,荧光显微镜下

观察结果,并确定一抗和二抗的最佳工作浓度。判断标准,“-”无或可见微弱荧光“+”可见的荧光“++”可见有明亮的荧光“+++”可见耀眼的荧光。

### 1.10 特异性检测

用猴泡沫病毒抗原片、小鼠白血病病毒抗原片以及正常细胞片与最佳稀释浓度的 SFV 抗体阳性血清进行间接免疫荧光实验,以验证该检测方法的特异性。

### 1.11 SFV 抗体间接免疫荧光检测方法的初步应用

应用所建立的间接免疫荧光方法对采集的猴血清进行检测。荧光显微镜下观察结果。

## 2 结果

### 2.1 一抗(血清)及二抗(FITC 标记的羊抗人 IgG 抗体)最佳稀释浓度的确定

由实验结果可得:当荧光抗体作 1:100 稀释时,特异性荧光最强,非特异性荧光最弱。1:10, 1:20, 1:40 稀释的一抗均可见特异性荧光,其中 1:10 可见阳性细胞中清晰的荧光颗粒,荧光效果最好,所以,通过浓度梯度滴定,分别确定了一抗猴血清的最佳工作浓度为 1:10,二抗 FITC 标记的羊抗人 IgG 抗体的最佳工作浓度为 1:100。IFA 检测方法抗体工作浓度滴定结果见表 1。

表 1 IFA 检测方法抗体工作浓度

Tab. 1 The concentration of antibody in IFA detection method

一抗 the first antibody	1:10		1:20		1:40	
	BHK-21	SFV	BHK-21	SFV	BHK-21	SFV
1:100	-	+++	-/+	+++	-	++
1:250	-	+++	-	++	-	++
1:500	-	++	-	+	-	-

注: -/+ 表示荧光背景干扰

Note: -/+ refers to the interference of fluorescence background

### 2.2 特异性检测结果

用猴泡沫病毒抗原片、小鼠白血病病毒抗原片以及正常细胞片与最佳稀释浓度血清进行 IFA 实验,猴泡沫病毒抗原片为阳性,小鼠白血病病毒抗原片及正常细胞片均为阴性。这一结果表明,制备 SFV 抗原片用间接免疫荧光法检测猴血清中 SFV IgG 抗体特异性较好,检测结果较可靠。

### 2.3 应用所建立的间接免疫荧光方法对采集的猴血清进行检测

荧光显微镜下观察结果。见彩插 4 图 1, BHK-

21 细胞对照无荧光出现,也未观察到荧光背景干扰。阳性血清的 IFA 检测可见绿色荧光,且细胞形态完整。在阳性血清(3)图中可见形成合胞体细胞,与 SFV 的致细胞病变效应一致,SFV 感染机体组织,可使细胞圆缩、脱落并伴合胞体形成。阴性血清的 IFA 检测结果为红色细胞,未见绿色荧光,为典型的 IFA 检测阴性表现。34 份猴血清检测结果为:SFV 抗体阳性 19 例,阴性 15 例,与猴泡沫病毒在猴群中较高的感染率一致。同时说明所建立的猴泡沫病毒抗体的间接免疫荧光检测方法效果较好。

### 3 讨论

猴泡沫病毒是灵长类动物特有的病毒,在猴群中自然感染率可达 70%<sup>[2]</sup>,这些灵长类动物携带有 SFV,但不会因感染而发病。SFV 已经成为生物学实验研究中常见的有干扰作用的病原体,已有报告证明我国猴群中 SFV 检出率 11.36%<sup>[3]</sup>,抗体阳性率 88.12%<sup>[3]</sup>。猴作为一种重要的模式动物,应用于多种疾病模型,也用于相关生物制品的生产,因此,进一步完善对实验猴群的质量监控迫在眉睫。在实验动物病毒检测等级标准中,猴泡沫病毒是清洁级实验动物应排除的病原体。随着对 SFV 研究的不断深入,探索敏感性更高、特异性更好的检测方法,对于保证实验猴群的质量,控制 SFV 传播和人民用药安全具有深远意义。

猴泡沫病毒间接免疫荧光检测方法是以前血清中的 IgG 抗体为检测对象,准确度较好,特异性高,稳定性好,非特异性荧光染色少。免疫荧光检测方法与猴泡沫病毒的其它常规检测方法如病毒的分离培养鉴定、全病毒 ELISA 法和 RT-nestPCR 相比,不仅取样便捷,检测效率也得到了大幅提高。应用所建立的间接免疫荧光方法检测 SFV 抗体时,取制备好的抗原片,每孔可检测一份血清样本,可以对实验用猴的血样进行批量检测。该检测方法可用于对实验猴养殖单位进行定期检查,有利于保证实验用猴质量,确保疫苗生产用生物材料的安全

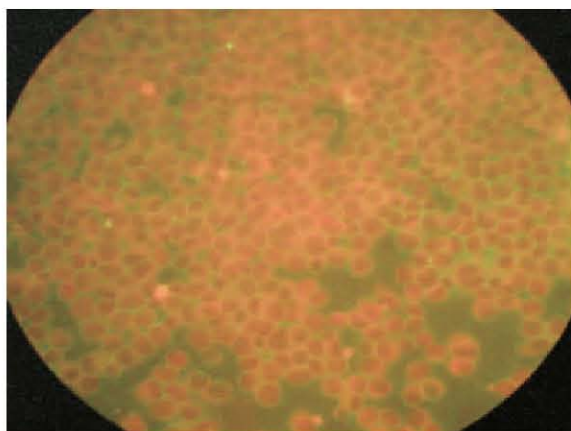
性。该检测方法操作简单易用,并可进一步制成检测试剂盒,操作程序化,适合大面积推广和应用。

SFV 的血清学检测方法中,有报道分别用两种不同的 SFV 抗原:SFV (AGM) (african green monkey) 和 SFV (CPZ) (chimpanzee) 来评价动物体内 SFV 感染。这种方法程序复杂,且仅适合于极少数非人灵长类动物的检测。为使 SFV 的血清学检测更为便捷,Hussain<sup>[4]</sup>等人将来源于 SFV (AGM) 和 SFV (CPZ) 的抗原相结合再进行 CA-WB (CPZ-AGM Western blot) 检测,与 PCR 检测结果一致。利用 CA-WB 还在曾经认为未受 SFV 感染的沼泽猴、长臂猿等体内检测到 SFV,说明 CA-WB 具有较高的敏感性。国外还报道了一些检测 SFV 的特殊技术,包括逆转录酶的测定、透射电子显微术、免疫印迹法以及高敏感性的 PCR 方法<sup>[5]</sup>。猴泡沫病毒在动物体内常呈隐性感染,在分析动物 SFV 感染状况和检测生物制品 SFV 污染时,为了提高检测的准确性,防止漏检错检,适当的联合运用各种检测方法对 SFV 的综合评估非常重要。

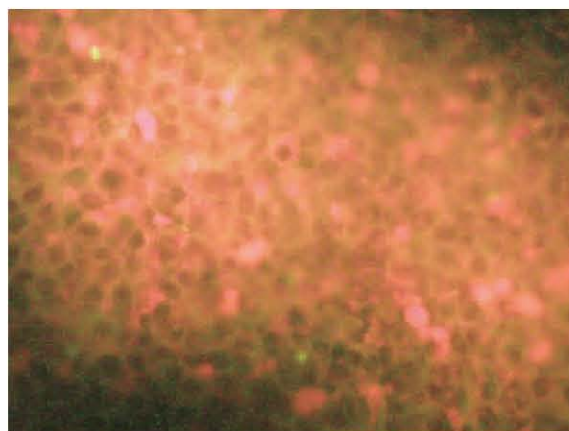
### 参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2010 版第三部, 中国医药科技出版社.
- [2] 高一彤, 曲京华, 赵玫, 等. 灵长类泡沫病毒的调查研究及现状[J]. 医学动物防制, 2006, 22(3): 183-184.
- [3] 张永江. 干扰生物学实验研究的动物疾病[J]. 畜牧兽医学报, 2006, 31(1): 60-62.
- [4] Hussain AI, Shanmugam V, Bhullar VB, et al. Screening for simian foamy virus infection by using a combined antigen Western blot assay: evidence for a wide distribution among Old World primates and identification of four new divergent viruses [J]. Virology, 2003, 309(2): 248-257.
- [5] Khan AS, Sears JF, Muller J, et al. Sensitive assays for isolation and detection of simian foamy retroviruses [J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(8): 2678-2686.

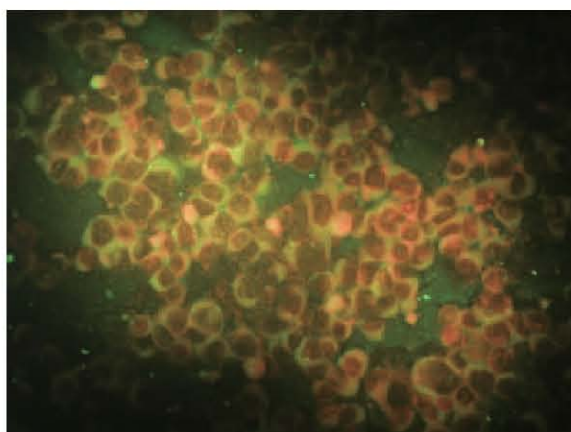
(修回日期) 2011-02-21



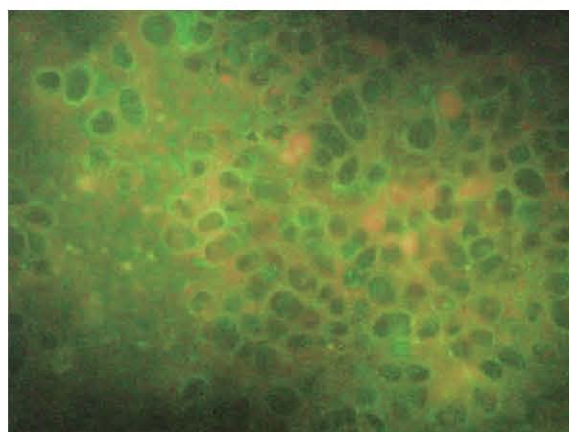
BHK-21 细胞对照  
BHK-21 cell control



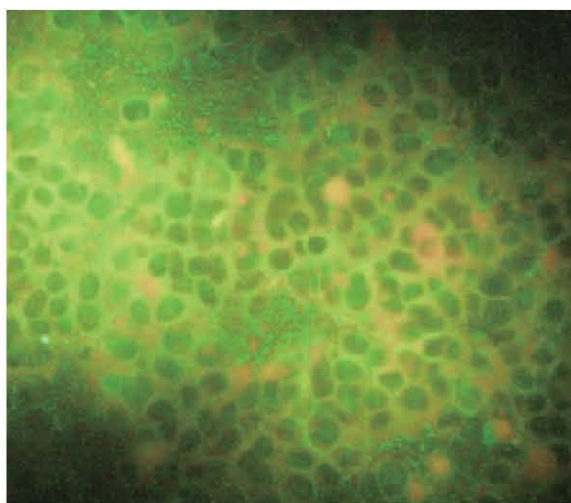
SFV 阴性血清(1)  
SFV negative serum(1)



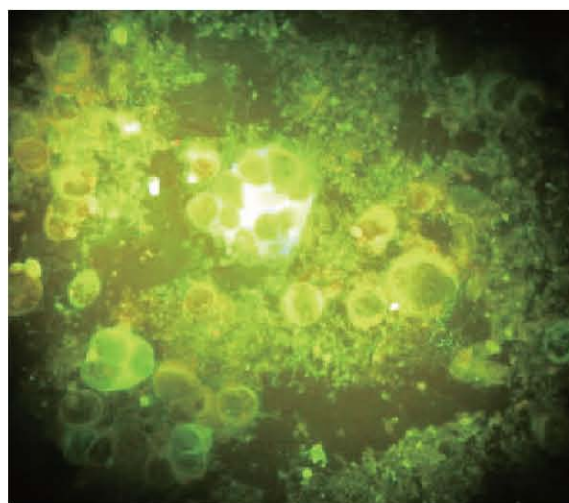
SFV 阴性血清(2)  
SFV negative serum(2)



SFV 阳性血清(1)  
SFV positive serum(1)



SFV 阳性血清(2)  
SFV positive serum(2)



SFV 阳性血清(3)  
SFV positive serum(3)

图 1 猴泡沫病毒的间接免疫荧光检测法

Fig. 1 The method of detecting the simian foamy virus(SFV) antibody with immunofluorescence assay(IFA)