

間接蛍光抗体法に用いる抗血清の作製

ウイルス感染細胞培養液を超遠心分離やその他の方法(例えばPEG沈殿限外ろ過など)により濃縮する。次に、この濃縮ウイルス液を塩化セシウムなどの密度勾配遠心法により精製する。得られたウイルス液を0.1%ホルマリンで4℃7日間あるいはβ-プロピオラクトンで37℃2時間感作して不活化する。この不活化ウイルス液を等量のプロイント完全アジュバントと混合して得た免疫原をモルモットまたは家兎の筋肉内に0.5ml~1mlずつ、3週間間隔で2~3回免疫する。最終免疫より2週後に採血し、抗血清とする。なお感染細胞培養液は蛍光抗体法の本試験に用いる細胞とは由来動物種の異なる細胞から得るのが望ましい。蛍光抗体法本試験に際して非特異反応を低減させる目的で、あらかじめ抗血清および蛍光色素標識抗体(市販)の力価の検討を行っておく。方法はスライドあるいはマイクロプレート上で培養した細胞にウイルスを接種する。このウイルス感染細胞をアセトン(マイクロプレートでは80%アセトン)で固定した後、抗血清と蛍光色素標識抗体を用いてボックスタイトレーションを行う。すなわち、1:10より階段希釈した抗血清を細胞上にのせ、モイスチャーチャンバー内で37℃30分間反応させる。抗血清をPBSで3回洗流した後、蛍光色素標識抗体を1:10より階段希釈して細胞にのせる。同様に37℃で30分間反応後、PBSで3回洗浄して細胞を50%グリセリン・PBSで封入し、蛍光顕微鏡で観察する。特異蛍光を示す最大希釈数を抗血清および標識抗体の1単位とし、本試験には抗血清4単位、標識抗体4単位を用いる。なお、常に陰性対照細胞を置いて蛍光が特異的であることを確認しながら進める必要がある。

