

流行性乙型脑炎病毒 荧光抗体染色方法的研究

中国人民解放军后字二三六部队五所病毒诊断小组

近年来免疫荧光技术在荧光抗体的结合及去除非特异性染色等方面有了很大改进^[2,3,6,7,10],并已较广泛地试用于临床诊断。本文报道用免疫荧光染色方法检查流行性乙型脑炎(以下简称乙脑)病毒的初步结果。

材料和方法

一、病毒

(一) 乙脑病毒

采用京卫研 1 株,由中国医学科学院病毒研究所赠给,在小白鼠脑内已传 34 代,鼠脑滴定 LD_{50} 7.5 左右。

(二) 森林脑炎(下简称森脑)病毒

采用森张株,由长春生物制品所赠给,为小白鼠脑内传代株, LD_{50} 8.0 左右。

二、免疫血清

(一) 抗乙脑病毒免疫血清

感染乙脑病毒的 10% 鼠脑悬液经每分钟 10,000 转离心 1 小时,取上清液作肌肉及腹腔交替接种家兔。或用地鼠肾细胞的乙脑病毒培养液免疫家兔。每周接种 1 次,每次 5—10 毫升,共 5—6 次,试测血清中和指数在 10^3 以上或补体结合效价在 1:64 以上放血,分离血清,置低温 (-30°C) 保存备用。

(二) 猪血清

取自北京市食品公司屠宰场, 将全血取回实验室分离血清, 经空斑抑制法测定抗乙脑病毒中和抗体效价为 10^4-10^5 者, 置 -30°C 低温冰箱保存备用。

(三) 抗森脑病毒免疫血清

系用森脑病毒株免疫家兔, 补体结合效价在 1:64 以上。

(四) 羊抗兔免疫血清

取新鲜兔血清加等量的饱和硫酸铵溶液, 边加边搅拌, 加足量后再搅拌 1—2 分钟, 于室温下静置 2—6 小时, 之后以每分钟 9,000 转离心沉淀 15 分钟, 将沉淀物溶解于原血清量的生理盐水中, 再加等量饱和硫酸铵溶液盐析, 反复 3 次, 最后 1 次将沉淀物溶于少量的生理盐水中, 在 4°C 下用生理盐水透析除去铵离子, 再以蔡氏滤器过滤除菌, 测定球蛋白含量, 4°C 下保存备用。免疫时将球蛋白配成 2—4% 的溶液与等量完全福氏佐剂混合制成乳剂, 给健康雄性绵羊作肌肉注射, 每次 8 毫升, 分两处, 每周 1 次, 于第 3 次接种后改用眼结膜注射, 3 天 1 次, 每次各注射 1 毫升, 共 3 次, 于 3 天后进行血清环状沉淀试验, 稀释抗原效价在 1:8,000 以上(或稀释抗血清效价在 1:128 以上)放血分离血清, 低温冰箱保存备用。

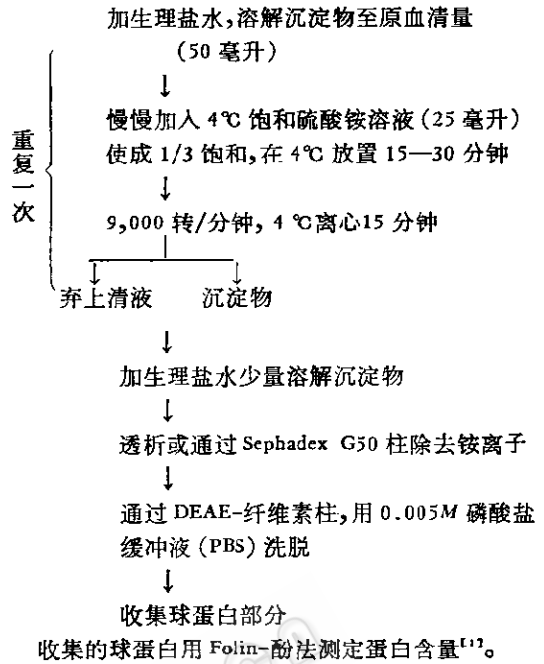
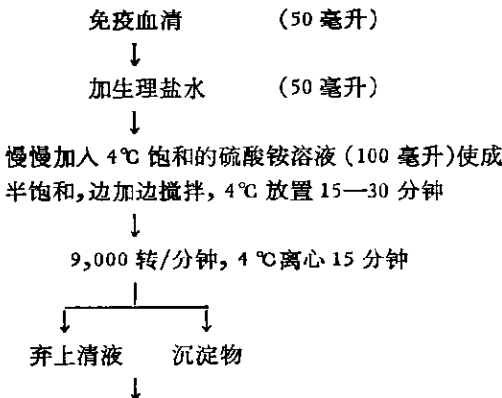
三、组织培养单层细胞的制备

鸡胚纤维母细胞及地鼠肾上皮细胞, 皆是用胰酶消化分散的组织细胞, 分装于有 22×7 毫米² 小盖玻片的青霉素小瓶内, 于 37°C 温箱中培养, 长成单层后使用。

四、荧光抗体的制备

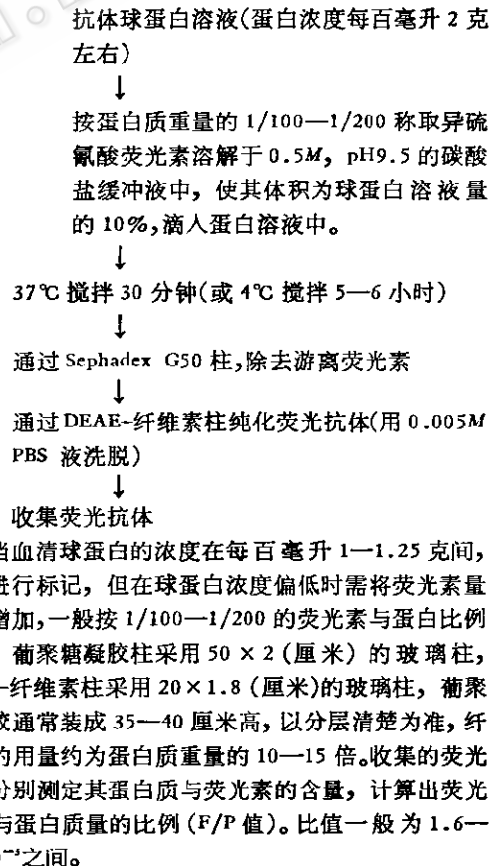
(一) 免疫血清球蛋白的提取

采用硫酸铵盐析法沉淀球蛋白, 过程如下图:



(二) 球蛋白与荧光素的结合

具体步骤如下:



五、标本的制备

(一) 组织培养标本的制备

单层细胞接种病毒作为感染标本。接种正常鼠脑组织悬液的为正常对照标本。感染及对照标本从小瓶中取出后用 0.005M PBS 漂洗一次, 室温干燥, 再将其放入预冷的丙酮中, 置 -20°C — -30°C 低温冰箱中固定 30 分钟, 取出小片, 室温干燥后放入清洁的小瓶, 4°C 保存备染色使用。

(二) 鼠脑标本的制备

1. 冷冻切片: 将放血杀死的小白鼠立即解剖, 取海马回部位横切鼠脑进行冷冻切片, 再用丙酮在室温下固定 10 分钟, 即进行荧光抗体染色。

2. 石蜡切片: 将放血杀死的小白鼠解剖取出鼠脑, 于海马回部位横切, 取 3—4 毫米厚的脑组织一片放 95% 的乙醇中于 4°C 固定, 24 小时后取出, 再于 4°C 条件下经无水乙醇脱水两次, 每次各 1 小时, 再用二甲苯浸 15—20 分钟, 透明后将组织块放 56°C 浸蜡 30 分钟, 制成蜡块, 切片呈 6—8 微米厚。蜡块在 4°C 冰箱中保存。实验证明保存一年后荧光抗体染色仍保持抗原着色能力。石蜡切片标本染色前需经二甲苯脱蜡, 之后用 95% 乙醇洗去二甲苯。

3. 鼠脑印片: 采用热印片及冷印片两种方法。

热印片, 将载玻片通过酒精灯火焰数次用手背感觉微热时立即取鼠脑横切面轻印, 印片放室温干燥, 于丙酮中室温固定 10 分钟, 进行荧光抗体染色。

冷印片, 将载玻片放于自制的低温盒中(用乙醇加二氧化碳干冰降温) 预冷至 -20°C 左右, 将鼠脑横切面迅速压印, 印片后将玻片立即置干燥罐中, 待标本干燥后放丙酮中固定。

六、染色

(一) 直接法

首先将荧光抗体根据预先测定染色最好的浓度用 0.01M PBS (或用 0.02% 伊文思兰液^[17]) 稀释, 将组织培养标本片放在特制的染色夹中, 之后将稀释的荧光血清滴在标本上, 放 37°C 温箱中染色 30 分钟, 最后用 0.01M PBS 或自来水冲洗 15 分钟。

(二) 间接法

第一抗血清需先经 56°C 灭活 30 分钟, 或加氯仿室温处理 30 分钟, 染色时根据血清的效价用 0.01M PBS (pH7.3) 稀释, 滴于标本上, 放 37°C 30 分钟, 之后用 0.01M PBS 冲洗 15 分钟, 再用经 0.01M PBS (或伊文思兰液) 稀释的羊抗兔荧光抗体于 37°C 染色 30 分钟, 最后用自来水再冲洗 15 分钟。

标本染色后用聚乙烯醇甘油胶加封镜检。

七、镜检

使用普通直筒显微镜, 加 530 毫微米波长的目镜滤光板, 光源为 200W 超高压汞灯荧光光源或 72 型轻便荧光光源。部分工作用西德 Leitz 厂出的 Orthoplan 型荧光显微镜作观察和照相, 其光光源为 200W 超高压汞灯, 用 BG₁₂ 作激发光滤板, 用 K₃₃₀ 滤板作目镜滤光片。用暗视野照相。

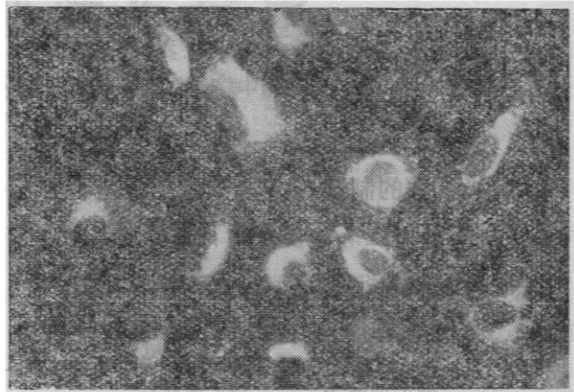
结果判定: 根据特异性荧光强度由强到弱, 判定为“4⁺、3⁺、2⁺、+”, 无特异性荧光细胞为“-”。

实验结果

一、直接荧光抗体染色法的特异性及敏感性

(一) 感染细胞荧光抗体染色标本的特点

鸡胚纤维母细胞及地鼠肾上皮细胞接种乙脑病毒后, 当细胞病变尚未出现时, 经荧光抗体染色可在细胞浆内见到特异性荧光, 有的占满细胞浆, 有的只在近细胞核处分布。特异性荧光呈明亮的黄绿色与周围淡黄色自发荧光的细胞相比呈鲜明对照, 细胞核不着色(见图)。此种细胞的数量随接种病毒量的增加而增加, 随病毒培养时间的延长而增多。正常对照标本染色后没有发现这种特异性荧光细胞。这种特异性荧光抗体染色的细胞, 其荧光分布于细胞浆内的特点与电子显微镜下观察乙脑病毒颗粒分布于细胞浆的特点是一致的。



感染乙脑病毒的地鼠肾细胞直接荧光抗体染色

图为地鼠肾上皮细胞接种 100 LD₅₀ 乙脑病毒培养 24 小时后作直接荧光抗体染色。荧光颗粒特异性地定位于感染细胞浆中, 细胞核不着色。内有少部分细胞无特异荧光为未感染病毒的正常细胞。

采用伊文思兰染料与荧光抗体衬染的标本, 感染细胞的胞浆同样呈黄绿色荧光, 衬底及正常标本染成淡红色。

在鼠脑切片及印片标本上, 经荧光抗体染色的感染标本, 有些细胞的胞浆呈明亮的黄绿色荧光, 脑间质

呈淡黄色,伊文思染料衬染时衬底呈红色,感染细胞的胞浆仍为黄绿色荧光,细胞核不着色呈暗黑色。正常鼠脑标本片的胞浆及脑间质均呈红色,细胞核不显色。乙脑病毒感染初期在海马回部位较易找到感染的特异荧光细胞,但黄绿色荧光不强,晚期感染细胞可分散在大脑皮层各处,在感染的细胞浆内充满黄绿色荧光物质。

(二) 荧光抗体染色的特异性

将灭活的乙脑免疫血清稀释成1:2—1:4滴于标本上,在37℃条件下结合45分钟,然后标本片用0.01M PBS(pH7.3)盐水冲洗15分钟,再用荧光抗体进行染色。结果在乙脑病毒感染的鸡胚纤维母细胞和地鼠肾上皮细胞的标本上都可以看到特异性的荧光被抑制现象,即免疫血清先与标本上的相对应抗原结合,使后加的荧光抗体的特异性染色作用消失,而用其他非对应的免疫血清如抗森林脑炎病毒血清或正常血清作用时,则不能抑制荧光抗体的特异性染色。

为了进一步证明直接荧光抗体染色的特异性,我们使用抗乙脑病毒的荧光抗体和抗森脑病毒的荧光抗体,交叉染色两种病毒感染的细胞标本片,结果只有与荧光抗体相对应的标本被染色(表1),即抗乙脑病毒的荧光抗体对乙脑病毒感染的标本染色呈强阳性(4⁺),对森脑病毒感染的标本染色呈阴性(-),而用抗森脑病毒荧光抗体不能染色乙脑标本,而对森脑病毒感染的标本染色呈强阳性,不论在鸡胚细胞还是在地鼠肾上皮细胞标本上经多次重复染色都得到同样的结果。证明荧光抗体染色是特异性的。

(三) 荧光抗体染色的敏感性

鸡胚细胞接种10,000 LD₅₀的乙脑病毒可在18小时后发现特异性荧光细胞,接种3,000 LD₅₀病毒可在24小时发现。在地鼠肾细胞上接种10,000 LD₅₀时

表1 乙脑及森脑病毒的荧光交叉染色

荧光抗体种类	荧光抗体染色结果		
	感染乙脑病毒标本	感染森脑病毒标本	正常对照标本
抗乙脑病毒荧光抗体	4 ⁺	—	—
抗森脑病毒荧光抗体	—	4 ⁺	—

可在12小时发现,但接种10 LD₅₀则需在24小时才能检出阳性细胞。24小时以后收取的标本特异性荧光细胞增多,亮度增强。

将不同浓度的病毒接种小白鼠脑内,经不同时间进行脑印片检查,接种10,000 LD₅₀的小白鼠于48小时已发现有少许细胞出现荧光,但不透明亮,呈弱阳性,在72小时检查时特异荧光细胞大量出现,但亮度仍不如96小时以后强,当接种100 LD₅₀的病毒时,特异性荧光细胞在72小时以后出现。

以上结果说明,特异性荧光细胞的出现与病毒在细胞内繁殖有关,在不同的组织培养中出现的时间不同,说明地鼠肾上皮细胞较鸡胚纤维母细胞敏感,从鼠脑与细胞的结果对比来看,组织培养较鼠脑印片能更早地检出病毒抗原。

另外在染色鼠脑标本时,我们还比较了鼠脑石蜡切片,冷冻切片,热印片及冷印片等不同方法制备的标本,在接种1,000 LD₅₀病毒的小白鼠都可以在72小时检出特异性荧光细胞。冷冻方法制备的切片或冷印片较热印片和石蜡切片荧光亮度更强些。

二、间接荧光抗体染色法的特异性

间接荧光抗体染色法中感染细胞的荧光染色特征与直接法相似。为证明间接法的特异性,我们采用不同病毒感染的地鼠肾细胞标本对不同的免疫血清作染色

表2 间接荧光抗体染色的结果

标本种类	染色步骤		染色结果	结果的意义
	第一试剂	第二试剂		
乙脑病毒感染标本	PBS	PBS	±	自发荧光
”	”	0.02%伊文思兰	—	自发荧光受抑制
”	抗乙脑病毒免疫血清(1:16)	羊抗兔荧光抗体(1:2 0.01M PBS稀释)	4 ⁺	阳性结果(包括自发荧光)
”	”	羊抗兔荧光抗体(1:2伊文思兰稀释)	4 ⁺	阳性结果(自发荧光已受抑制)
”	PBS	”	—	荧光血清对照
”	正常兔血清(1:16)	”	—	正常兔血清对照
”	抗森脑病毒免疫血清(1:16)	”	—	抗森脑兔血清对照
森脑病毒感染标本	抗森脑病毒免疫血清(1:16)	”	4 ⁺	阳性结果
”	抗乙脑病毒免疫血清(1:16)	”	—	抗乙脑兔血清对照
正常细胞对照标本	”	”	—	正常细胞对照标本
”	正常兔血清(1:16)	”	—	”

试验, 所得结果见表 2。

经过多次重复试验, 发现乙脑及森脑病毒感染细胞的标本, 只有用相应的抗乙脑病毒及抗森脑病毒免疫血清处理后才能被羊抗兔荧光抗体染成阳性, 其余均为阴性, 没有出现交叉染色的情况。说明用间接荧光抗体染色检查乙脑病毒也是特异性的。

利用间接荧光抗体染色法测定乙脑病毒在地鼠肾细胞上的敏感性时, 发现接种 $10,000 LD_{50}$ 病毒时, 可在 18 小时检出荧光细胞, 接种 $10 LD_{50}$ 病毒时可在 24 小时检出, 当接种 $0.5-1 LD_{50}$ 病毒时, 可在 48 小时检出, 当再减少接种病毒量时, 则在培养 96 小时后才检不出特异性荧光细胞。

讨 论

本文报道的乙脑病毒荧光抗体染色方法, 是用鸡胚纤维母细胞, 地鼠肾上皮细胞的组织培养及小白鼠脑切片进行的, 通过大量的实验及染色对照, 证明了已建立方法是特异性的。

我们用 $1/3$ 饱和硫酸铵提取免疫血清球蛋白, 使用异硫氰酸荧光素分别结合了 10 多批荧光血清, 采用 DEAE-纤维素以 $0.005M$ PBS 选择性的洗脱, 纯化荧光抗体, $[F/P$ 值为 $(1.6-6) \times 10^{-3}]$ 。其中有五批采用混合的兔免疫血清, 一批采用单只兔的免疫血清, 六批用北京屠宰场取得的猪血清及六批羊抗兔血清。对各批荧光抗体进行染色检查都得到满意的结果。与用 DEAE-纤维素梯度洗脱层析法, 纯化荧光抗体 $[$ 合适的 $F/P(2.0-3.5) \times 10^{-3}]$ 比较更为简单实用。

关于用猪血清制备的荧光抗体, 可直接用染色鼠脑及组织培养等材料, 不必考虑在制备免疫血清中常遇到的组织交叉问题。猪血清来源充足, 对今后广泛

使用具有实际意义。实验中我们还用了伊文思兰染料与荧光抗体复合衬染的方法, 效果很好, 衬底呈红色与特异性的黄绿色荧光细胞呈鲜明对照, 观察时极易区别, 对除去非特异性染色有一定作用。

乙型脑炎病毒感染的细胞经荧光抗体染色后, 仅在细胞浆中有特异性荧光颗粒, 核内未见荧光染色。在实验中, 我们还采用乙脑京卫研 1 株病毒以外的中山株及 1972 年在北京从病人脑脊液中分离出的一株乙脑病毒, 荧光抗体染色特征都一致。

在荧光亮度的判定标准方面我们只限于肉眼观察, 对亮度的判定在阳性结果定量方面可能有一些偏差, 但对决定有否特异细胞在结果定性方面则并无影响。

荧光抗体间接染色法中同直接法相比, 不易除去非特异性染色, 因此第一个血清的高效价及制备良好的荧光抗体是非常重要的, 实验中可通过高度稀释来除去非特异性染色, 另外第一血清用氯仿等方法处理, 也可除去部分非特异性染色。

参 考 资 料

- [1] 潘家秀: 蛋白质化学研究技术, 科学出版社, 1962。
- [2] Coons, A. H.: *J. Immunol.*, **45**: 159, 1942。
- [3] Goldstein, G.: *J. Exp. Med.*, **114**: 89, 1961。
- [4] Kswamura, A.: *Fluorescent antibody techniques and their applications*, 1969。
- [5] Hayles, L. B.: *Canad. J. Microbiol.*, **16**: 1167, 1970。
- [6] Mckinney, R. M.: *J. Immunol.*, **93**: 232, 1964。
- [7] Mcdevin, H. O.: *J. Immunol.*, **90**: 634, 1963。
- [8] Noyes, W. F.: *J. Exp. Med.*, **109**: 423, 1955。
- [9] Thomason, B. M.: *J. Bacteriol.*, **93**: 768, 1967。
- [10] Tokumar, T.: *J. Immunol.* **89**: 195, 1962。
- [11] Yoshida, J.: *Jap. J. Microbiol.*, **10**: 183, 1966。