

应用间接荧光抗体技术测定免疫猴疟疾抗体

马 杲 吕延福 李英杰

(中国人民解放军第一军医大学疟疾免疫研究室,广州)

本文报告了以诺氏疟原虫(P. Knowlesi)薄血膜片为抗原,以异硫氰酸荧光黄标记的羊抗人球蛋白为荧光抗球蛋白,对被不同组分的诺氏疟原虫抗原免疫的恒河猴,用间接荧光抗体技术测定其血清中疟疾抗体的实验研究结果。

材 料 和 方 法

(一) 抗原血膜片的准备

将肝素化诺氏疟原虫感染血1毫升,由静脉接种于健康恒河猴,经6~10天,当原虫血症达30~60%时,在其裂殖体期,从静脉抽取感染血,用肝素抗凝混匀后,在载玻片上用推片推成24×30mm的薄血膜片若干,室温下晾干,放入密闭的容器内,置-30℃低温冰箱中保存备用。

(二) 实验动物及被检血清的准备

实验动物为广西恒河猴,15只分成甲、乙、丙三组,每组5只。甲组肌注I号抗原,乙组肌注II号抗原,丙组肌注生理盐水作为对照。抗原的分离及免疫方法详见本室的另一篇报告^[1]。自注射前一周起,每周定期由实验猴小腿静脉抽血2~3毫升,分离血清,置4℃冰箱内保存备检。

(三) 荧光抗球蛋白的制备

在Coudert等^[2]工作基础上,我们试用荧

光标记的羊抗人球蛋白测定猴血清疟疾抗体。

1. 高价免疫血清的制备。用“O”型人血清对雄黑山羊进行增量异位连环免疫注射,所获得的羊抗人免疫血清,环状沉淀反应抗体最高滴度为1:64,000。

2. 荧光抗体的制备。用饱和硫酸铵沉淀法从羊抗人免疫血清中提取丙种球蛋白,通过葡聚糖凝胶过滤去盐,用紫外吸收法测定蛋白含量,以异硫氰酸荧光黄标记羊抗人球蛋白,用搅拌标记法^[3]进行标记。荧光抗体加1:10,000的硫柳汞,4℃冰箱内保存备用。

(四) 荧光抗体染片操作步骤

1. 抗原血膜片自-30℃冰箱取出后,立即置于干燥器内复温30分钟;

2. 在血膜均匀处选择4小块3×3毫米的血膜(见图1),其余血膜用滤纸条沾蒸馏水抹

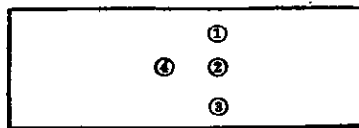


图1 抗原血膜片上各实验区示意图

(1,2,3为甲、乙、丙组猴试验血清。4为P. B. S对照)去;

3. 将血膜片置于盛有蒸馏水的立式染色缸中,浸泡10分钟,除去血红蛋白;

4. 移至 0.01M P.B.S 液 (pH7.2) 中浸泡 2 分钟,取出后用滤纸吸干血膜以外的液体,分别滴加不灭活的用 P.B.S 液稀释的甲、乙、丙组猴血清 1 滴于 3 小块血膜上,余下的 1 小块血膜上滴加 P.B.S 液,然后置于密闭的铝盒中,37℃ 孵育 40 分钟;

5. 孵育后,用 P.B.S 液冲洗血膜片,并放入盛有 P.B.S 液的染色缸中振摇浸洗 10 分钟;

6. 用滤纸吸去血膜以外的 P.B.S 液,在 4 小块血膜上各滴加荧光抗体 1 滴,置铝盒中,37℃ 孵育 30 分钟;

7. 孵育后,用 P.B.S 液冲洗血膜片,方法同 5;

8. 血膜片在蒸馏水中涮洗后,室温下晾干,滴加甘油用盖玻片覆盖后,在荧光显微镜下镜检。

(五) 结果判断

荧光显微镜下观察到的荧光强度,分别用“+”“+++”来表示。“+”示荧光很弱需仔细观察才能发现;“++”示明显可见的荧光;“+++”示明亮的荧光;“++++”示耀眼的荧光。在实验中,少数染片 P.B.S 对照区有“+”的荧光,但在“+”与“++”之间荧光强度有明显差别,所以确定以“++”的荧光强度作为阳性结果的下限,能产生“++”荧光强度的血清最高稀释度,即为该血清中疟疾抗体的最高滴度。

结 果

一、猴血清中疟疾抗体的消长情况 (见图 2)

甲、乙组在第一次免疫注射后的第 19 天,血清中疟疾抗体滴度由 1:1—40 升至 1:160,在第一次免疫注射后的第 40—54 天,最高滴度达 1:640—1280;而丙组血清滴度始终波动在 1:1—40 之间。

二、疟疾抗体最高滴度与攻击感染的关系

在第三次免疫注射后的第 9 天,用 11×10^3 的诺氏疟原虫 (环状体期) 感染红细胞,由静脉注射攻击感染,攻击感染后第五天甲、乙组疟疾抗体滴度由 1:160 升至 1:640—1280;而丙组血清滴度仍在 1:40 以下 (见图 3)。

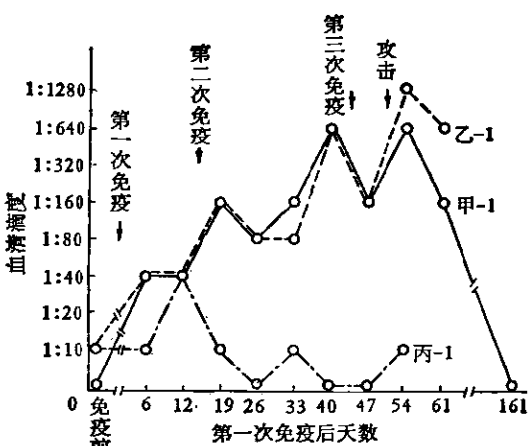


图 2 试验猴血清疟疾抗体滴度消长情况

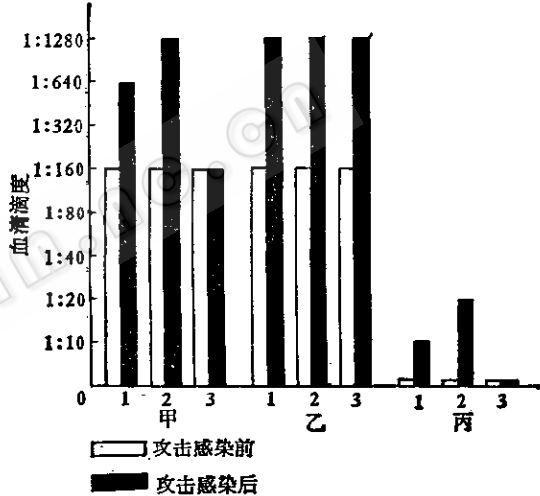


图 3 攻击感染前后猴血清疟疾抗体滴度比较

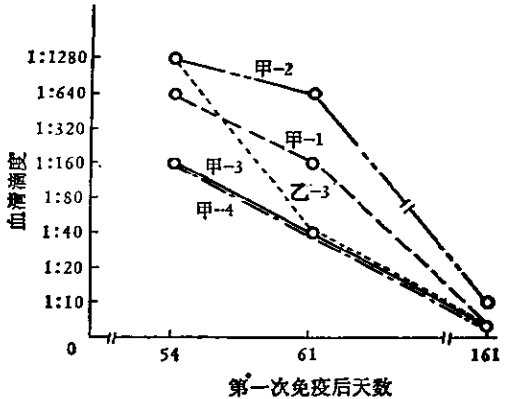


图 4 试验猴血清疟疾抗体滴度下降情况

三、疟疾抗体持续时间 (见图 4)

从存活的 5 只猴看,疟疾抗体滴度在第一

次免疫注射后的第 61 天开始下降,到第 161 天降至免疫注射前的水平。

四、疟疾抗体滴度与保护力的关系(见图 5)

从攻击感染后第 11 天的甲、乙组疟疾抗体滴度来看,死亡的与存活的猴疟疾抗体滴度均在 1:40—640。其结果说明,用荧光技术测得的疟疾抗体滴度高不反映对疟疾保护力的强弱。

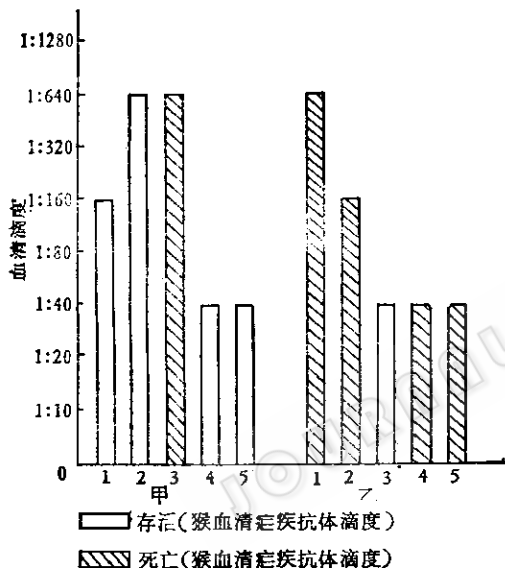


图 5 攻击感染后第 11 天猴血清疟疾抗体滴度比较

讨 论

1. 在疟疾的间接荧光抗体技术中,一般采用 0.1% 盐酸脱去抗原血膜片上的血红蛋白;但处理后的抗原血膜片,荧光着色弱,可降低滴度 64 倍之多^(4,5)。鉴于以上情况,我们改用蒸馏水脱去抗原血膜片上的血红蛋白,结果荧光着色良好,荧光强度可达“++++”。

2. 关于对照组猴血清出现假阳性的问题,在我们的实验里,5 只对照组猴血清有 3 只出现滴度在 1:40 以下的假阳性(见图 5),这是由于非特异荧光着色所引起的。为此,我们在每 1 张抗原血膜片上安排了甲、乙、丙组三个实验区(见图 1),镜检时同时进行观察比较,排除了假阳性的干扰。同时,当对照组猴血清稀释至 1:40 以上时,假阳性就不再出现。因此,对照组猴血清的假阳性不影响实验结果的判断。

3. 用间接荧光抗体技术测出的疟疾抗体, Kuvin 等^[6]认为不是对疟疾的保护性抗体。这在我们的实验中也得到了证实,说明我们测得的疟疾抗体不是抗疟原虫抗体。我们称之为疟疾抗体,是因为这种抗体与疟疾抗原密切相关,这在我们的实验中也得到证实。如图 5 所示,接受 I、II 号抗原免疫注射的甲、乙组 10 只猴,其疟疾抗体滴度由 1:1—40 升至 1:160—1280;而没有接触疟疾抗原的丙组对照的 5 只猴,其血清滴度始终停留在 1:1—40 的水平上。所以,我们称测得的抗体为疟疾抗体。这种抗体是机体免疫反应的一部分,虽不是保护性抗体;但能说明机体接触过疟疾抗原。所以,间接荧光抗体技术已应用于疟疾的流行病学调查。

参 考 文 献

- [1] 李英杰等: 动物学报, 20:203, 1980
- [2] Coudert, J. et al.: *Trop. Dis Bull.*, 63: 1300, 1965.
- [3] Voller, A.: *Bull. WHO*, 30(3): 343, 1964.
- [4] Collins, W. E. et al.: *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 21(5): 690, 1972.
- [5] Sulzer, A. J. et al.: *ibid*, 18(2): 199, 1969.
- [6] Kuvin, S. F. et al.: *ibid*, 11(4): 429, 1962.