

病毒免疫荧光结合物性能的研究*

肖继何 黄祥瑞 李 红

赵金开 李中锋

(军事医学科学院微生物流行病学研究所,北京)

统一测定荧光血清中各种成分的方法,观察荧光素(F)、蛋白质(P)及免疫活性抗体(ab)间的比例关系,使之规格化,对荧光血清的制备检定有重要意义,也是免疫荧光技术在推广应用中的亟待解决的问题。E. H. Beutner^[1-3]报告了抗人IgG的检定及其对抗梅毒螺旋体抗体及抗核抗体的染色效果。E. H. Hébert,等^[6]报告了细菌的直接荧光抗体制剂的最适F/P。为了解病毒染色中抗IgG荧光抗体的适用范围,我们先后制备检定了19批荧光血清,观察了F/P, ab/P及ab/F等参数对森林脑炎病毒及腺病毒11型的染色关系,提出了荧光抗体适用敏感性范围,兹将结果报告如下:

材料与方 法

1. 病毒及组织培养标本的制备: 森林脑炎病毒(以下简称森脑病毒)(长春生物制品所供给): 接种在地鼠肾细胞100LD₅₀, 24小时收片固定, 4℃保存。

腺病毒11型(医科院儿科研究所供给): 接种在兔肾细胞100—1000TCID₅₀, 48小时收片固定, 4℃保存。

2. 抗病毒免疫血清: 抗森脑病毒兔血清^[7], 抗腺病毒兔血清(医科院儿科研究所供给)。

3. 羊抗兔IgG荧光抗体的制备及染色方

法^[7]。

4. 荧光血清的检定及其参数测定:

(1) 蛋白质(P)的测定: 用Folin酚显色法。

(2) 荧光素(F)的测定: 以荧光素二醋酸酯为标准试剂, O. D₄₉₃为纵坐标, F(μg/ml)值为横坐标绘制标准曲线。

(3) 抗体蛋白(ab)的测定: 用琼脂逆向免疫扩散试验测定荧光血清中有免疫活性的抗体蛋白浓度(mg/ml)^[8]。

(4) 抗体单位(μ)的测定: 用琼脂双扩散试验以出现沉淀弧的荧光血清的最高稀释度为本荧光血清的抗体单位。

(5) 荧光血清的纯度分析: 用琼脂免疫电泳和聚丙烯酰胺圆盘电泳。

(6) 荧光血清的F/P、ab/P、ab/F重量比和分子比计算(以实验结果中的第17号荧光血清为例): 荧光素(F) 8.6μg/ml; 蛋白质(P) 8.0mg/ml; 抗体蛋白(ab) 1.75mg/ml。

$$a. F/P = (8.6\mu\text{g/ml}) / (8.0 \times 10^3\mu\text{g/ml}) = 1.075 \times 10^{-3}$$

$$\text{分子比 } F/P = 1.075 \times 10^{-3} \times$$

$$\frac{160000}{389} = 1.075 \times 0.41 = 0.44\text{molar}$$

* 本文承黄志尚副教授指导,致谢。

$$b. ab/P = (1.75\text{mg/ml}) / (8.0\text{mg/ml}) = 0.22$$

分子比 $ab/P = 0.22\text{molar}$

$$c. ab/F = (1.75\text{mg/ml}) / (8.6 \times 10^{-3}\text{mg/ml}) = 203.5$$

$$\text{分子比 } ab/F = 203.5 \times \frac{389}{160000} =$$

0.5molar

实验结果

一、荧光素用量和洗脱液中 NaCl 浓度与 F/P 比值关系 (见表 1)

按蛋白质质量的 1/25—1/1000 称取荧光素进行标记,经 DEAE 纤维素柱层析,用含 0.1M 和 0.3M NaCl (pH7.3) 的 0.01 M PBS 分步洗脱。琼脂免疫电泳及聚丙烯酰胺圆盘电泳证明,洗脱物均无白蛋白成分,测定的 F/P 值及对森脑病毒的染色结果见表 1。

表 1 说明, (1) 荧光素用量按蛋白质质量的 1/50—1/250 进行结合,用 0.1M NaCl PBS 洗

脱,结合物的 F/P 在 0.8 左右,而用 0.3 M NaCl PBS 洗脱,则在 1.9—2.9。但二者结合物的染色滴度都在 16—64 之间,未见非特异荧光,效果均较好。(2) F/P 用量以 1/25 的比值进行结合,0.1 M NaCl PBS 洗脱,结合物的 F/P 在 1—2,用 0.3M NaCl PBS 洗脱 F/P 高达 6,染色效果虽然可以,但 F/P 高,非特异荧光也强,说明 F/P 比值只是光学或视觉敏感性参数,与染色滴度(以 PEP 表示)无本质联系。

二、荧光结合物各参数及其对森脑病毒和腺病毒 II 型的平台终点 (PEP) 和平台滴度 (PT) 的测定

我们对 19 批羊抗兔 IgG 荧光结合物各种参数进行了测定,并观察了染色效果 (见表 2)。从表 2 可见 (1) 以抗森脑病毒兔血清及抗腺病毒 II 型兔血清作为第一血清,与 19 批羊抗兔 IgG 免疫荧光结合物分别对森脑病毒及腺病毒 II 型进行方阵滴定,数据经统计处理 (见表 3),可观察到荧光结合物中抗体蛋白的浓度与 PEP 成正比,满足直线回归方程 $Y =$

表 1 荧光素用量与 F/P 比值的关系

羊抗兔 IgG 荧光血清 (No.)	1 6		2 7		3 8		4 9		5 10		17 19		22
结合时 F*/P 用量比	1/50		1/100		1/150		1/200		1/250		1/25		1/1000
洗脱液 NaCl 浓度 (M)	0.1	0.3	0.1	0.3	0.1	0.3	0.1	0.3	0.1	0.3	0.1	0.3	0.3
荧光血清 F/P × 10 ⁻³	1.0	2.2	0.7	1.9	0.7	2.9	0.8	2.9	0.8	2.6	1.1	6.0	0
染色滴度 (PEP)	32	64	64	32	16	64	24	32	32	16	96	76	0

* "F" 示异硫氰酸盐荧光素 (FITC)

表 2 19 批羊抗兔 IgG 荧光结合物各种参数的测定及染色效果

荧光结合物批号		15	20	21	11	10	7	19	9	8	2	6	12	4	1	5	16	17	18	23
抗体单位 (μ)		0	0—1	0—1	0	0	1	1	1	<2	2	2	2	4	2	2	4	16	6	16
逆向扩散直径 (mm)		0	2.5	2.6	3.3	3.6	4.0	4.0	4.4	4.7	5.4	5.8	6.3	6.3	6.5	6.6	7.7	8.0	8.0	0
抗体蛋白浓度 (mg/ml)		0	0.17	0.20	0.26	0.29	0.33	0.33	0.40	0.43	0.57	0.68	0.82	0.83	0.89	0.93	1.41	1.75	1.75	0
荧光素 (F) 浓度 (μg/ml)		7.9	2.0	19.2	3.4	3.25	9.0	7.8	8.0	10.4	4.5	11.4	29	4.4	4.8	4.4	9.6	8.6	18.0	17.6
总蛋白浓度 (P) (mg/ml)		7.3	2.0	2.3	1.0	1.25	4.8	1.3	2.75	3.6	6.4	5.1	8.2	5.7	4.8	5.8	8.4	8.0	7.9	15.2
F/P (g/g) × 10 ⁻³		1.1	1.0	8.3	3.4	2.6	1.9	6.0	2.9	2.9	0.7	2.2	3.5	0.8	1.0	0.8	1.1	1.1	2.3	11.5
ab/P		0	0.09	0.09	0.26	0.23	0.07	0.25	0.14	0.12	0.06	0.13	0.10	0.15	0.19	0.16	0.17	0.22	0.22	0
ab/F (g/g) × 10 ⁻¹		0	0.09	0.01	0.08	0.09	0.04	0.04	0.05	0.03	0.13	0.06	0.03	0.19	0.19	0.21	0.15	0.20	0.10	0
森脑病毒方阵滴定	PT	32	32	128	128	128	128	128	128	128	128	128	128	128	128	128	128	128	128	128
	PEP	8	7	10	20	16	32	76	32	64	64	64	96	24	32	32	128	96	140	12
腺病毒方阵滴定	PT	64	128	128																
	PEP	4	32	32														64	128	

表 3 荧光结合物抗体蛋白量与染色滴度的关系

荧光结合物批号	抗体蛋白 (ab)		森脑病毒		腺病毒 II 型	
	mg/ml	平均浓度	PEP	平均值	PEP	平均值
14	0		0			
15	0	0	8	4	4	4
20	0.17		7			
21	0.20		10		32	
11	0.26	0.23	20	13	32	32
10	0.29		16			
19	0.33		76			
7	0.33	0.37	32	51		
9	0.40		32			
8	0.43		64			
2	0.57		64			
6	0.68	0.62	64	64		
12	0.82		96			
4	0.83	0.85	24	51		
1	0.89		32			
5	0.93		32			
16	1.41	1.46	128	99		
17	1.75		96		64	
18	1.75		140		128	96

67.43x + 8.09 (Y:PEP; x: 抗体蛋白含量)。

(2) 在病毒的荧光抗体试验中, ab/F 与特异染色滴度, (DSS) 与非特异染色滴度 (NSS) 的比值 (DSS/NSS) 成正比关系(表 4), 并且 ab/F 值大于 0.03, 其 DSS/NSS 均大于 16, 这样的荧光血清都可采用。

三、第一血清抗体滴度与荧光结合物 F/P 值的关系

在病毒的间接荧光染色中, 当固定第一血清时, 若荧光结合物的 F/P 值高, 则平台滴度 (PT) 也高, 而平台终点 (PEP) 基本相同 (表 5)。

四、第一血清抗体效价与平台滴度的关系

我们用几份不同抗体效价的兔抗森脑病毒血清与同一份荧光结合物(羊抗兔 FA) 对森脑病毒进行方阵滴定, 观察到第一血清抗体效价高, 则平台滴度也高 (表 6)。

表 4 森脑病毒方阵滴定中 ab/F 与 DSS/NSS 的关系

荧光结合物批号	21	12	8	7	19	9	6	11	10	18	2	16	1	4	17	5
ab/F × 10 ⁻³	0.01	0.03	0.03	0.04	0.04	0.05	0.06	0.08	0.09	0.10	0.13	0.15	0.19	0.19	0.20	0.21
平均值	0.03						0.08				0.14		0.20			
DSS/NSS	10	96	64	32	76	32	64	20	16	140	64	128	32	24	96	32
平均值	51						80				96		46			

表 5 第一血清抗体滴度与荧光结合物 F/P 值的关系

兔抗森脑血清	荧光结合物		No. 20F/P = 1.0					No. 21F/P = 8.3					
	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128		
1:4	1	1	1	—	—	2	4	±	1	—	—		
1:8	2	2	—	—	—	2	3	4	2	—	—		
1:16	3	2	—	—	—	4	4	2	—	—	—		
1:32	2	1	—	—	—	3	3	2	—	—	—		
1:64	±	±	—	—	—	2	1	1	—	—	—		
1:128	—	—	—	—	—	1	1	±	—	—	—		
1:256	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		

注: 平台滴度 PT = 1:32 PT = 1:128
平台终点 PEP = 1:8 PEP = 1:16

讨 论

1. 从染色效果看: 采用抗体蛋白量的

1/25—1/250 的荧光素用量进行结合, 其结果都较满意。但发现用 1/25 和 1/50 的量结合时, 荧光素浪费很大。DEAE—纤维素层析的洗脱液, 实验证明用 0.1M 及 0.3M NaCl pH7.3 PBS

表 6 第一血清抗体滴度与平台滴度的关系

第一血清及其稀释度	荧光结合物	No. 18						平台滴度	平台终点		
		1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128			1:256	
抗森脑兔血清	(No. 5)	1:4	4	4	4	4	3	2	1	1:256	1:128
	NT* = 45710	1:8	4	4	4	4	3	1	—		
	HI = 1:280	1:16	4	4	4	4	3	2	—		
		1:32	4	4	4	4	3	2	—		
		1:64	4	4	4	4	3	2	—		
		1:128	4	4	4	4	3	1	—		
兔血清	(No. 1)	1:16	3	2	1	—	—	—	—	1:64	1:16
	HI** = 1:20	1:32	3	2	1	—	—	—	—		
		1:64	2	1	1	—	—	—	—		
		1:128	1	—	—	—	—	—	—		
正常兔血清	(No. 2)	1:16	1	1	1	—	—	—	—	1:32	1:16
		1:32	1	1	1	—	—	—	—		
	HI < 1:10	1:64	—	—	—	—	—	—	—		
正常兔血清		1:4	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		1:8	—	—	—	—	—	—	—		

* NT: 血清中和滴度

** HI: 血清血凝抑制效价

分步洗脱,收集到的结合物量多,染色效果也较好。

2. F/P 比值在方阵滴定中的意义: (1)同一份羊抗兔 IgG 血清所制备的荧光结合物,若 F/P 值高,则第一血清的 PT 也高,而对 PEP 无太大影响。(2) F/P 值愈高,染色非特异性愈强。我们认为在病毒的间接免疫荧光技术中,采用 $0.7-6.0 \times 10^{-3}$ 的 F/P 值较好。

3. 关于 PEP 测定的变异范围: 据 Beutner, E. H. 报告,用抗核抗体进行荧光结合物的 PEP 测定,其变异范围为 2—12 倍。本实验结果表明,其 PEP 变异范围仅为 1—4 倍,故用 PEP 作为荧光结合物染色效果的指标是可行的。

4. 关于 ab/P 比值: 1971 年国际荧光会议建议,特异结合物至少应含 10% 的抗体蛋白(即 $ab/P \geq 0.1$)。本实验的染色结果表明, $ab/P \geq 0.09$ 即可得到良好的染色结果。当

$ab/P < 0.08$ 时(No. 20, 21 荧光结合物) PEP 仅为 1:7—1:10。

5. 关于 ab/F 比值: ab 的浓度与荧光结合物的稀释度有关, ab 大则特异性(DSS)的稀释度高;结合的荧光素量(F)大,则荧光结合物的敏感性高,因而非特异性增强。从本实验结果看, ab/F 比值的适用范围为 80—200 (g/g)。

6. 病毒荧光抗体染色中抗兔 IgG 荧光结合物所需条件及敏感性比例范围归纳如下。

	适用的活性比例范围		建议的合适范围及最小比例	
	重量比	分子比	重量比	分子比
F/P	$0.7-11.5 \times 10^{-3}$	0.29—4.7	$0.1-6.0 \times 10^{-3}$	$0.29-2.5$
ab/F	80—200	0.19—0.5	≥ 8.0	≥ 0.19
ab/P	0.09—0.20	0.09—0.20	≥ 0.09	≥ 0.09

参 考 文 献

- [1] Beutner, E. H.: *J. Imm.* 12: 327, 1967.
- [2] —————: *Bull. W. H. O.* 39: 587, 1968.
- [3] —————: Standardization of Immunofluorescence, 165—169, 1970.
- [4] —————: *Ann. N. Y. Acad. Scie.* 177: 361, 1971.
- [5] —————: *Ann. N. Y. Acad. Scie.* 177: 506, 1971.
- [6] Hebert, G. A. et al.: *J. Clin. Microbiol.* 13: 498—502, 1981.
- [7] 解放军后字 236 部队五所: *微生物学通报*, 2(2): 22, 1975。
- [8] Beutner, E. H. et al.: Standardization of Immunofluorescence, E. J. Holborow, Ed. 1968, Blackwell. Oxford, England.