

固氮螺菌的血清学研究

II. 固氮螺菌五个血清型的抗原定性分析

蒋亚平 罗孝扬 曾宽容 蔡全芝
周亿闾 杨宝玉 阮小安* 王子芳

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉)

本文采用琼脂双扩散、对流电泳及免疫电泳等技术对固氮螺菌五个血清型的代表菌株进行抗原定性分析。试验结果说明: 五个不同的血清型的可溶性抗原具有共同的抗原成份, 但各自存在着特异性抗原。

材料和方法

(一) 可溶性抗原制备^[1,2]

将五个不同血清型的代表菌株 Ma99、Sp7、Sp107st、Mi224、Ma242 分别在牛肉膏蛋白胨液体培养基中振荡培养 48 小时, 离心, 沉淀用生理盐水洗涤二次, 再用生理盐水制成悬浮液然后用超声波破碎(波长 50Hz/15 分, 电流 400 mA)。离心, 所得上清液即为可溶性抗原, 用 751G 型紫外分光光度计在 280nm 处测定其蛋白质含量。同时将可溶性抗原加 0.1% NaN₃ 置冰箱备用。

(二) 抗血清制备

1. 选择 2—3 kg 健康家兔用加佐剂或不加佐剂方案进行免疫^[1,2], 两种方案均在末次免疫后 4—7 天进行试血, 抗血清效价达 1:2560 立即由颈动脉放血, 收集血清, 加入 0.1% NaN₃ 防腐, 分装安瓿 1—2ml/瓶, 冰箱保存备用。

2. 抗血清效价测定^[3,4]: (1) 毛细管环状测定法: 在一系列内径为 2.5 mm 的小试管内, 先加入一定浓度的抗血清然后徐徐加入不同稀

度的等体积可溶性抗原液, 几秒或几分钟后在两液界处即可出现乳白色沉淀环。明显沉淀环的最后稀释度的倒数表示抗血清效价。

(2) 双向琼脂扩散法: 在玻片上(7.5cm × 2.5cm)涂一薄层 1% (W/V) 融化琼脂, 于 70℃ 烘干, 再将 1% 生理盐水(pH7.5)琼脂(含 0.1% NaN₃) 加热、融化, 趁热吸 5ml 放于上述载玻片上, 凝固后按孔径 0.3 mm, 孔距 5 mm 打孔, 中心孔加抗原, 周围六孔按顺时针方向分别加入 1/2、1/4、1/8、1/16、1/32、1/64 的抗血清, 置 37℃ 湿盒(加 0.1% 新洁尔灭)扩散 12—24 小时, 当抗原抗体比例合适则出现乳白色沉淀线(见图版 I-6)。

(3) 对流电泳: 配制 1% pH 8.6 的巴比妥缓冲**琼脂加热融化, 吸 5 ml 于上述载玻片上(7.5cm × 2.5cm), 凝固后成对打孔(孔距 3mm, 孔径 5 mm), 抗原加负极端, 抗血清加正极端, 在 pH 8.6 巴比妥缓冲液中电泳, 以双层纱布搭桥, 电压 10—12 V/cm 板长或电流 4—6 mA/cm 板宽。抗原、抗体在外加电场力和介质电渗力

* 华中农学院 82 届毕业生在本所实习。

本文照片由武汉生物制品所马利民同志拍摄, 特此致谢。

** pH8.6 巴比妥缓冲液配制: 取巴比妥钠 15.45g, 巴比妥 2.76g, 加蒸馏水溶解稀释至 1000ml, 将 1g 日本琼脂粉或琼脂糖溶解于 100ml 的上述缓冲液中, 即成 1% 巴比妥缓冲琼脂。

作用下分别向正、负极相对泳动,电泳 40'—60' 出现沉淀线。

3. 抗原定性分析^[4,5]: (1) 琼脂双扩散: 方法与测抗血清效价相同,中间孔加抗血清,周围孔加不同的抗原。

(2) 免疫电泳: 于涂底的载玻片上加 5ml 融化的 1% 巴比妥缓冲琼脂并趁热在琼脂板上插入 2 mm 厚,长约 6 cm 的小玻片(小玻片上涂有一薄层硅油)待琼脂凝固后轻轻取出小玻片,即成一小槽,在槽的左上方打一小孔,置 0.1% 新洁尔灭湿盒中备用。先在小孔中加抗原进行电泳,电泳条件与以上对流电泳条件相同。电泳时,可在抗原孔中加 0.5% 溴酚蓝酒精溶液作泳动部位的指示,泳动 2.5—3 小时取出琼脂板,在小槽中加抗血清(1:2)放置 0.1% 新洁尔灭湿盒中,37°C 或冰箱中扩散 12—24 小时,即可见明显的沉淀线。

结 果

1. 采用琼脂双扩散法对 5 个不同血清型的抗原株 Ma99、Sp7、Sp107st、Mi224、Ma242 进行交叉扩散结果说明,五个不同血清型的抗原各具有一定程度的同源成份,沉淀线吻合,但又各自存在着特异的抗原-抗体系统组分,沉淀线不吻合(图版 I-1-a—f)。

2. 免疫电泳对五个不同血清型的抗原定性分析结果,说明五个不同血清型的抗原株,虽然培养条件、抗原破碎方法、免疫方案和免疫电泳条件完全一致,但出现沉淀线的最低数目、电泳迁移率和自由扩散率均不相同(图版 I-2-a—f)。

3. 五个不同血清型 Ma99、Sp7、Sp107st、Mi224、Ma242、Ma99 (抗血清由颗粒抗原 Ma99 产生)进行对流电泳,抗原浓度 10mg/ml,抗血清 1:4,电泳条件相同,而电泳图谱各不相同

(图版 I-5-a—f)。

4. 对 Ma99 采用颗粒抗原和可溶性抗原分别免疫家兔,产生相应的抗血清,同时用 Ma99 可溶性抗原进行免疫电泳、琼脂扩散和对流电泳进行比较见图版 I-2-a.f, 图版 I-4-a.f、图版 I-5-a.f (f 抗血清由 Ma99 颗粒抗原产生)。由图谱可见两抗原-抗体扩散图谱完全不同。

5. 用 Sp7 抗血清与对应抗原,同型抗原 W261-1 及不同型抗原 Ma201 分别进行琼脂交叉扩散。见图版 I-3-a.b 沉淀线相吻合; c 右上孔为 Ma201 与 Sp7 抗血清不产生沉淀线。

讨 论

1. 抗原制备、提取方法不同,则琼脂扩散免疫电泳出现的沉淀线数目不同,本文用 Ma99 颗粒抗原和用超声波破碎后的可溶抗原免疫产生的抗血清进行扩散,图谱特征不同。

2. 抗原保存的时间不同,对出现沉淀线的数目有影响见图版 I-3-a—c, 图版 I-3-1-a—c 前者抗原保持时间久,而且经常从冰箱取出暴露室温时间较长,部分抗原破坏,致使扩散图谱沉淀线减少。后者新制备的抗原用浓度相同的抗原、抗体比例扩散而出现沉淀线数目增多。因此对不同抗原定性分析、比较需在同一条件下进行。

参 考 文 献

- [1] Farr, R. S. and F. J. Dixon: *J. Immunol.*, **85**: 250, 1960.
- [2] Leskowitz, S. and B. H. Waksman: *J. Immunol.*, **84**: 58, 1960.
- [3] Ross N. R. et al.: *Methods in Immunology*, p. 4—8, 1973.
- [4] 中山大学生物系教研室编: 生化技术导论. 人民教育出版社, 252—259页, 1978.
- [5] 《植物病毒鉴定》编写组: 植物病毒鉴定, 农业出版社, 北京, 1979, 5, 63—97页.