

免疫荧光技术在诊断流感和疱疹上的初步应用

马升阳

(河南省人民医院病毒室, 郑州)

为普及免疫荧光技术, 我们用免疫荧光技术进行了流感、疱疹快速诊断的初步实验, 对提高检验质量, 减少非特异性反应等方面进行了方法学研究。其原理是利用白蛋白肽链上的赖氨酸末端 ϵ -氨基上的氮原子, 与游离荧光素的牢固结合, 将荧光抗体中游离的与球蛋白结合不紧的荧光素去除干净。现将方法和结果介绍如下。

材料与方 法

一、鸡抗流感免疫血清的制备

用流感病毒鸡胚尿囊液(血凝效价应不低于 $1:1024$)免疫来亨公鸡, 每周肌肉注射一次病毒液(3—5 毫升), 共注射三次, 末次免疫后间隔一周采血, 测血凝抑制抗体, 如效价高于 $1:560$, 即可采血分离血清, 提取球蛋白及制备荧光抗体。

二、兔抗疱疹病毒免疫血清制备

取疱疹病毒 S_{m44} 株(上海生物制品研究所毒株)接种兔肾细胞, 培养液为 2% 兔血清水解乳白蛋白汉克氏液, 置 37°C 培养 72 小时, 使细胞病变完全。然后给健康雄兔免疫注射, 第一次注射采用经 60°C 10 分钟灭活的病毒 1 毫升作基础免疫, 以后每三天以活毒进行肌肉注射, 每次 5 毫升, 注射五次后间隔一周采血, 测中和抗体, 如超过 $1:1024$ 即可采血分离血清, 提取球蛋白, 制备荧光抗体。

三、荧光抗体制备

取上述两种免疫血清, 分别加等量的饱和硫酸铵, 用盐析法制得免疫球蛋白, 用透析法在 $0.01M$ 磷酸盐缓冲液($\text{pH}7.6$)中, 4°C 透析, 除去氯离子, 测定球蛋白含量。用上述缓冲液将球蛋白配成 2% 浓度。再用

$0.2M$ 碳酸盐缓冲液调 pH 至 9.2。按球蛋白量的 $1/60$ 称取异硫氰酸荧光黄至小试管中, 加少量丙酮溶解, 然后加到球蛋白中, 置 4°C 冰箱中, 用电磁搅拌进行标记, 6—8 小时后用下述三种方法除去游离荧光素, 进行效果比较。

四、除去游离荧光素的方法

1. 将荧光抗体加入到等量的 10% 卵白蛋白(鸡蛋清)磷酸盐缓冲液中混合摇荡 30 分钟, 然后加等量饱和硫酸铵, 用盐析法沉淀标记的荧光抗体。卵白蛋白吸附了多余的游离荧光素, 存在于上清部分, 将此部分弃去。沉淀的荧光抗体经过半饱和硫酸铵反复洗涤沉淀 2—3 次, 透析除氨, 加 0.9% NaCl 即可应用。

2. 2% 兔血清白蛋白水溶液(即分离兔血清球蛋白时剩余的上清部分, 经透析除氨后使用), 用于吸附荧光抗体中游离荧光素的方法同上。

3. 用葡聚糖凝胶过滤法做对照试验。

结 果

1. 用卵白蛋白、兔血清白蛋白两种方法除去荧光抗体中的游离荧光素与原来用的葡聚糖凝胶柱层析法进行了多次比较试验, 发现葡聚糖凝胶柱层析法由于游离荧光素的存在, 影响了免疫技术测定的准确性, 而且在层析过程中还丢失了大量的荧光抗体蛋白质, 以致使荧光抗体活性降低。结果表明, 在前两种免疫血清的 8 批制品的试验中, 对制品中游离荧光素有较好的吸收效果。

2. 用上述前两种方法处理的制品, 经过敏感性、特异性试验, 以及工作效价测定, 均较葡聚糖凝胶柱层析法为优(见表)。我们用新制得的荧光抗体, 对 5 株新分离的流感病毒(A₁型)及 20 例流感病人鼻咽拭子涂片

进行了荧光抗体检查, 所得结果与病毒分离的结果完全一致。受染流感的标本中, 细胞浆内有大量的大小不等的荧光物质, 疱疹性角膜炎刮片中可查到细胞核膜上有弯月形黄绿色包涵体。应用此法, 可于一小时内检出病毒抗原的存在。

3. 由于白蛋白以分子状态存在, 与荧光抗体混合比较均匀, 而白蛋白结合荧光素的能力比球蛋白强, 不

但可以将荧光抗体中的游离荧光素吸收, 也可以将球蛋白上结合不牢的荧光素吸收下来, 避免标记的荧光素脱落。在标记纯化过程中球蛋白损失甚少, 可回收原量的 80—90%。在纯化过程中, 白蛋白与球蛋白极易分开。白蛋白来源相当广泛, 如使用得当, 还兼有除去抗原不纯所造成的抗体非特异交叉反应的作用。

除去游离荧光素的三种方法效果比较

项 目	葡聚糖凝胶 (G50) 柱层析法		10% 卵白蛋白盐析法		2% 兔血清白蛋白盐析法	
	兔抗疱疹	鸡抗流感	兔抗疱疹	鸡抗流感	兔抗疱疹	鸡抗流感
游离荧光素残存量	++	+	—	—	—	—
荧光抗体含蛋白量(%)	1.10	1.00	1.80	1.85	1.85	1.90
荧光抗体敏感性	差	差	良好	良好	良好	良好
荧光抗体特异性	差	差	良好	良好	良好	良好
荧光抗体工作效价	1:4—1:8	1:4—1:8	1:4—1:32	1:4—1:32	1:4—1:32	1:4—1:32

注: ++ 表示游离荧光素较多; + 表示游离荧光素较少; — 表示无游离荧光素。