

免疫金银染色鉴定斑点热群立克次体方法的建立

胥照平 陈香蕊 汪民

(军事医学科学院微生物流行病学研究所,北京)

摘要 本文将免疫金银染色技术应用于斑点热群立克次体的鉴定,建立了方法,对4株斑点热立克次体和1株Q热立克次体的鉴定获得了初步结果,并与免疫酶标染色法进行了比较。结果表明,免疫

本文承本院基础医学研究所陈德意教授、张贺秋技师指导,谨此致谢。

金银染色法的特异性同免疫酶标染色法,可将不同种斑点热立克次体区分开;而前者的效价一般高于后者2—8倍。文中还讨论了洗涤、显色、衬染等条件对结果的影响。

关键词 免疫金银染色法;斑点热群立克次体

免疫金银染色 (Immunogold-silver staining, IGSS) 是近年来迅速发展起来的一种免疫金标记技术^[1,2]。它既可用于电镜,也可用于光镜,甚至可用肉眼观察,现已广泛应用于生物医学研究的众多领域^[3]。但在立克次体方面的应用尚未见报道。在进行斑点热群立克次体血清学鉴定的研究中,我们曾建立了斑点法免疫酶标染色技术^[4]。为探索更敏感、更简便的染色方法,我们又将免疫金银染色技术应用于斑点热群立克次体的鉴定,并与酶标染色法作了比较。现将初步结果报告如下。

材料和方法

(一) 毒株

西伯利亚立克次体 (*Rickettsia sibirica*) Barbash 株,自 WHO 引进;西伯利亚立克次体 246 株,自美国 ATCC 引进;精河株立克次体,自新疆精河县草原革螨 (*Dermacentor nuttalli*) 分离得到^[5];黑龙江立克次体 54 株,自黑龙江绥芬河森林革螨 (*D. silvarum*) 分离得到^[6];内蒙古 Q 热立克次体 06 株,自内蒙古达茂旗腾格淖尔亚东璃眼螨 (*Hyalomma asiaticum*) 分离得到。

(二) 免疫血清

取感染立克次体鸡胚卵黄囊膜,用肉汤制成 1:10 悬液,腹腔接种小鼠 0.2 ml。4 周后加强免疫一次,末次免疫后两周放血,分离血清, -20℃ 保存。

(三) 胶体金标记羊抗鼠结合物

本院基础医学研究所提供,工作滴度 1:10。

(四) 抗原片制备

将立克次体感染鸡胚后,选立克次体量达 Giemsa 染色“+++”的卵黄囊膜,制成 1:10 悬液,分装。用沾水笔蘸抗原,点于 4 × 10 孔载玻片上,自然干燥,丙酮固定,待检。

(五) 免疫金银染色

于抗原片各孔内加立克次体免疫鼠血清, 37℃ 湿盒 30 分钟。加胶体金标记羊抗鼠抗体同上结合, Tris 缓冲液 (TBS) 洗两次,蒸馏水洗一次,吹干。然后将抗原片置银显影液 (1% 明胶 30 ml, 枸橼酸缓冲液 (pH3.5) 5 ml, 含 0.85 g 对苯二酚的水溶液 15 ml, 含 21.3 mg 硝酸银水溶液 1 ml, 用前配制) 中,室温显色 20—25 分钟,蒸馏水洗两次,复红衬染 10 秒钟。普通显微镜 × 100 倍镜检。经金银染色后,立克次体呈黑褐色颗粒,大小较酶标染色约大 2 倍。按一定顺序对各抗原点观察比较,根据具有一定形态的黑褐色颗粒的数目和着色深浅,综合判断为“+++”“+”。以呈“+”的免疫血清最高稀释倍数为终点,无特异性着色为阴性。实验均设阳性及阴性对照。

(六) 斑点法酶标染色

见文献 [4]。

结 果

(一) 特异性和敏感性

应用免疫金银染色法和酶标染色法对 5 株立克次体进行鉴定的结果如表 1 所示。从表 1 中可以看出,这两种染色方法的鉴别结果是一致的,被试的斑点热立克次体与 Q 热立克次体之间均无交叉反应,在斑点热群内,同种的效价均明显高于异种的效价。说明免疫金银染色法具有与酶标染色法相同的特异性,能够把不同群、种的立克次体区分开。在实验中我们发现,新疆精河株的滴度几乎与西伯利亚立克次体 246 株的滴度完全一致,而与 Barbash 株有一定差别,这为精河株的分类学位置的确定似又提供了新的实验依据。比较免疫金银染色法和酶标染色法的滴度,不难看出前者的效价一般高于后者的 2—8 倍,表明在我们的实验条件下,前者的敏感性明显高于后者。

(二) 不同缓冲液对染色结果的影响(表 2)

表 1 免疫金银染色与免疫酶标染色结果的比较*

抗原	抗血清滴度									
	免疫金银染色					免疫酶标染色				
	246	B	精	54	06	246	B	精	54	06
西伯利亚立克次体										
246 株	32768	4096	32768	1024	—	4096	512	4096	256	—
Barbash 株	2048	16384	2048	128	—	512	2048	512	—	—
精河株立克次体	32768	8192	32768	1024	—	4096	1024	4096	256	—
黑龙江立克次体										
54 株	512	512	512	8192	—	256	256	256	2048	—
Q 热立克次体										
06 株	—	—	—	—	>16384**	—	—	—	—	>16384**

* 表内数字为血清稀释度的倒数;“B”: Barbash 株;“精”: 精河株

** 未再提高血清稀释倍数而得出最后结果

表 2 不同缓冲液对染色结果的影响

抗原 (立克次体)	抗血清滴度							
	TBS(pH7.4)				PBS(pH7.2)			
	246	B	精	54	246	B	精	54
246	32768	4096	32768	1024	32768	4096	32768	1024
B	4096	16384	4096	512	2048	8192	2048	512
精	32768	8192	32768	1024	32768	8192	32768	1024
54	2048	2048	2048	8192	1024	1024	1024	8192

注: 同表 1

表 3 室内与暗室显色结果的比较

抗原 (立克次体)	抗血清滴度									
	室内显色					暗室显色				
	246	B	精	54	06	246	B	精	54	06
246	16384	4096	16384	512	—	16384	4096	16384	256	—
B	1024	8192	1024	256	—	1024	4096	1024	512	—
精	16384	4096	16384	512	—	16384	4096	16384	2048	—
54	256	256	256	2048	—	256	256	256	2048	—
06	—	—	—	—	>16384	—	—	—	—	>16384

注: 同表 1

表 2 比较了用 TBS(pH7.4) 和 PBS(pH 7.2) 两种缓冲液洗涤抗原片对染色结果的影响, 看来这两种缓冲液的洗涤效果一致, 可以替用而不影响免疫金银染色的特异性和敏感性。此外, 由于 PBS 缓冲液是微生物实验室中最常用的缓冲液之一, 放在同时作金银、酶标和荧光染色检验时, 可用同一种缓冲液, 不必另配, 以减少实验步骤, 节省时间。

(三) 室内与暗室显色对结果的影响

国外有文献要求在免疫金银染色法的显色过程中应严格避光。鉴于国内不少实验室不具备暗室条件, 我们试验改用普通室内给显影容器加盖的办法进行, 取得了很好的效果(表 3)。

表 3 结果表明, 在这两种环境条件下显色结果并无差别。因此, 在没有暗室的情况下, 采用本实验所用的银显影液以及室内加盖的办

法,同样可以进行免疫金银染色。

(四) 衬染剂的比较

金标记抗体染色银显色后,金颗粒周围吸附上多层银离子,经物理显影剂作用,使银颗粒还原成黑褐色的金属银。如再用衬染剂衬染,当可取得更好的染色效果。我们选伊文思蓝、苏木素、孔雀绿和复红四种染料作衬染剂,进行比较试验,结果以复红衬染的效果为佳。在浅红色的背景下呈现出黑褐色的抗原颗粒,对比鲜明,易于观察。

(五) 重复性

以上实验重复 3—5 次,结果数据相同或仅相差一个滴度,说明本实验的重复性良好。

讨 论

关于我国分离的新疆精河株立克次体的分类学位置问题,本实验室曾做过大量的实验^[7,8],用多种方法鉴定,证明它与引自 WHO 的西伯利亚立克次体 Barbash 株有所不同。本实验的结果再次证实了这一点,它与 Barbash 株虽有交叉反应,但它们的血清滴度低于同株者甚多,似很难把它们解释为同一个种。而精河株与引自美国 ATCC 的西伯利亚立克次体 246 株的血清滴度几乎完全相等,这似为确定精河株立克次体的分类学位置提供了新的实验依据。当然要完全确定它们之间的关系,还需要作大量的鉴定试验。至于 Barbash 株为什么与 246 株的差别如此之大,尚有待于今后进一步研究和检验。

目前不少实验室应用免疫金银染色法,对其显色条件要求较严。根据我们的初步实践,用 0.01 mol/L PBS 缓冲液 (pH 7.2) 洗涤抗原片,普通室内室温条件下在容器上加盖一层避

光纸或盖子,即可进行金银染色显色。在显色过程中可以取出抗原片,置显微镜下观察,若显色不理想,可再放入显影液中继续作用,直至满意为止。显色时间不宜过长,否则会在背景上出现较多的细小颗粒,但这并不影响结果的判定。另外,可适当延长复红衬染的时间,以增加反差,便于观察。

免疫金银染色技术有许多优点。胶体金标记抗体时,蛋白质分子是靠表面电荷吸附到胶体金颗粒表面上的,因此很少引起蛋白质活性的改变。金标记结合物使用半年,效价不变。金标记染色后再经银显色,可使“信号”放大,大大增加了方法的敏感性。本方法特异、敏感、简便、快速,不需要特殊条件,不接触致癌性物质,且成本较低,标本易于长期保存,很适合于微生物的快速鉴定和检出。我们的实验表明免疫金银染色法应用于斑点热群立克次体的鉴定是可行的,它的特异性与免疫酶标染色法相同,而它的敏感性要比酶标法高 4 倍以上。由于本文的目的在于建立方法,所用的毒株数较少,因此,取得结果仅仅是初步,尚须继续深入工作,以推广用于大量立克次体的鉴定和检验。

参 考 文 献

- [1] Holgate, C. S., et al.: *J. Histochem. Cytochem.*, 31(12): 938, 1983.
- [2] Danscher, G., et al.: *J. Histochem. Cytochem.*, 31(12): 1394, 1983.
- [3] 张贺秋等: 军事医学科学院院刊, 11(6): 515, 1987.
- [4] 符照平等: 中国人兽共患病杂志, 2(2): 30, 1986.
- [5] 孔照敏等: 微生物学通报, 9(1): 11, 1982.
- [6] 娄丹等: 中华微生物学和免疫学杂志, 5(4): 250, 1985.
- [7] 吕正文等: 中华微生物学和免疫学杂志, 2(1): 36, 1982.
- [8] 汪民等: 中华微生物学和免疫学杂志, 4(5): 295, 1984.