

用荧光抗体双重染色法快速检验炭疽芽孢杆菌

甄宏太 杨素贤

(呼和浩特商品检验局, 呼和浩特)

用 FITC 标记的抗带荚膜的炭疽芽孢杆菌球蛋白和 RB-200 标记的抗无荚膜的炭疽芽孢杆菌和巨大芽孢杆菌菌体球蛋白进行双重染色, 结果带荚膜的炭疽芽孢杆菌显示特异性染色反应, 其荚膜发明亮的黄绿色荧光, 荚膜内的菌体呈黄红色。而蜡状芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌(形成荚膜或不形成荚膜的)等都被染成红色, 与带荚膜的炭疽芽孢杆菌形成鲜明的对比。这样就避免了交叉反应, 成为一种特异性很高的快速检验炭疽芽孢杆菌的方法。

自 1958 年 Lavina 氏首次试用免疫荧光技术检验炭疽芽孢杆菌 (*Bacillus anthracis*, 以下简称炭疽菌) 以来, 已有过不少关于这方面的研究报告^[1-3]。在所报道的方法中, 荚膜荧光抗体法检验组织或体液内的炭疽菌, 简便、快速、敏感性高, 因此较广泛地被采用。但用此法检验炭疽菌, 存在着与蜡状芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌等的交叉反应, 特异性较差^[4-6], 所以在实际应用上有局限性。本文报道有关用荧光抗体双重染色法(以下简称双染法)消除交叉反应的研究结果。

材 料 和 方 法

(一) 菌株

制备抗血清用的无毒炭疽菌 202, 由农业部兽医药品监察所提供。3 株强毒炭疽菌系本试验室从病羊皮分离而得。鉴定荧光抗体试剂用的蜡状芽孢杆菌 (*B. cereus*)、巨大芽孢杆菌 (*B. megaterium*)、蕈状芽孢杆菌 (*B. mycoides*)、枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*)、马铃薯芽孢杆菌 (*B. mesentericus*) 等由卫生部药品生物制品检定所提供。所有供鉴定用的菌株, 事先接种在碳酸氢钠琼脂斜面, 在含 CO₂ 的容器内培养 18—24 小时, 用 1% 福尔马林盐水制成菌悬液, 置 4℃ 冰箱保存。

(二) 抗血清的制备

1. 抗炭疽荚膜血清

用 202 作免疫原。将其 16—18 小时肉汤培养物接种碳酸氢钠琼脂平板, 放在含 15—20% CO₂ 的容器内, 37℃ 培养 24 小时。用 0.5% 福尔马林将菌洗下, 于 60℃ 水浴加热一小时。经活菌检查为阴性后, 用无菌盐水稀释成 10 亿个菌/毫升的菌液。免疫用健康家兔, 先经腹腔注射菌液 0.5、1.0 毫升, 再静脉注射 2.0、4.0、4.0 毫升。每次注射间隔 3 天, 末次注射后一周试血, 玻片凝集试验测定凝集效价达 1:8 以上时, 全放血, 分离血清。如效价较低, 再注射 1—2 针。

2. 抗炭疽菌体血清

系内蒙古兽医生物药品制造厂生产之炭疽沉淀素血清(马)。

3. 抗巨大芽孢杆菌菌体血清

免疫原为形成荚膜的巨大芽孢杆菌 CM771 株。将其 14—16 小时普通琼脂培养物用 0.5% 福尔马林盐水洗下, 在 60℃ 水浴加热一小时灭活, 用无菌盐水稀释成 10 亿个菌/毫升的菌液, 免疫家兔, 剂量及程序同炭疽荚膜血清的制备。

(三) 荧光抗体的制备

1. 异硫氰酸盐荧光黄 (FITC) 标记抗炭疽荚膜抗体球蛋白

将抗炭疽荚膜血清用 40% 饱和硫酸铵沉淀 4 次。所得球蛋白用双缩脲法测定其浓度, 参照 Kawamura 等的方法^[7], 加 FITC 异构体 I 进行标记。制成品用形成荚膜的炭疽菌培养物测定

本文于 1978 年 12 月 30 日收到。

染色效价后,冻干贮存。

2. 四乙基罗丹明 (RB-200) 标记抗菌体抗体球蛋白

将抗炭疽菌血清和抗巨大芽孢杆菌菌体血清等量混合,用 50% 饱和硫酸铵沉淀一次,粗提球蛋白。参照 Kawamura 等的方法制备 SO_2Cl 化的 RB-200,并进行球蛋白的标记。标记所用色素量比原法增加一倍,标记时间延长 30 分钟。制成品冻干贮存。

(四) 染色方法

1. 双染色法

将样品涂于薄的无荧光载玻片上,自然干燥。浸入无水乙醇:三氯甲烷:福尔马林 = 6:3:1 的混合液内固定 15 分钟,经 95% 乙醇略加漂洗,自然干燥。在涂膜上加 RB-200 标记抗体,放湿盒内 30 分钟取出。用 pH 7.4 磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 冲去荧光抗体,浸入上述固定液内 3—5 分钟,自然干燥。在涂膜上加 FITC 标记抗体,放湿盒内 20—30 分钟取出。用 PBS 冲去荧光抗体,经蒸馏水漂洗,自然干燥。加缓冲甘油 (pH 8.5—9.0),封片,镜检。

2. 单染色法

单染色法(以下简称单染法)除不加 RB-200 标记抗体外,其余同双染法。

(五) 荧光显微镜

用 Zetopan-Binolux III 型显微镜。光源 HBO-200 W 高压汞灯,装油浸系暗视野聚光器,激发滤光片 30.8×3 BG12/h,吸收滤光片 18×1.5 OG 530 + 181GG9。以 63 倍物镜和 10 倍目镜观察结果。

(六) 镜检结果的判定

+++：荚膜肥厚,发闪亮的黄绿色荧光,中央菌体呈明显或不明显的橙红色。

++：荚膜肥厚,发明亮的黄绿色荧光,中央菌体呈明显或不明显的橙红色。

++：荚膜较厚,发较弱而清晰的黄绿色荧光,中央菌体呈明显或不明显的橙红色。

++：荚膜不显著,绿色荧光暗淡,中央菌体呈明显或不明显的橙红色。

—：无黄绿色荧光构成的菌形。

“++”以上者,判为阳性。

(七) 显微摄影

显微镜、光源、聚光器和滤光片同前述。摄影胶片为 23° Din 柯达彩色正片。曝光时间 40—60 秒。最大放大倍数为 320—900 倍。

结果和讨论

(一) 双染法的特异性

双染法显示了良好的消除交叉反应的效果(表 1),用 FITC 标记的抗炭疽荚膜荧光抗体单染,蜡状芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、犍状芽孢杆菌和有些枯草芽孢杆菌,都不同程度地染上特异性荧光,尤其是形成荚膜的巨大芽孢杆菌 CM 771,肥厚的荚膜也发黄绿色荧光,与带荚膜的炭疽菌很难区分(见图版 I-1、2)。但标本先用 RB-200 标记的抗菌体荧光抗体染色后,再用 FITC 标记的抗荚膜荧光抗体染色,则上述非炭疽菌全都染成橙红色,只有炭疽菌周围荚膜发明亮的黄绿色荧光,中央菌体呈黄红色(见图版 I-3、4),从而把炭疽菌与非炭疽菌,有毒炭疽菌(形成荚膜)和无毒炭疽菌(不形成荚膜)明显地区分开。

表 1 双染法和单染法染色结果比较

菌 名	株数	荧光反应阳性数	
		双染法	单染法
强毒炭疽菌(带荚膜)	6	6	6
无毒炭疽菌(带荚膜)	1	1	1
无毒炭疽菌(无荚膜)	1	0	1
蜡状芽孢杆菌	5	0	5
巨大芽孢杆菌(带荚膜)	1	0	1
巨大芽孢杆菌(无荚膜)	2	0	1
犍状芽孢杆菌	1	0	1
枯草芽孢杆菌	6	0	1
马铃薯芽孢杆菌	1	0	0

(二) 炭疽病皮检测结果

取待消毒的绵、山羊炭疽病皮或可疑炭疽病皮(由呼和浩特市畜产公司仓库提供)20 张,用沾盐水的无菌棉拭子擦拭不同部位之皮毛,得小样 40 份。每份涂抹一

表 2 炭疽病或可疑炭疽病皮检测结果

试验样品数(份)	碳酸氢钠琼脂平板分离(+)*	荚膜荧光抗体双染法(+)	核 准 试 验					符合率(%)
			革兰氏染色(+)	动力检查(-)	串珠试验(+)**	噬菌体荧光抗体染色(+)	小白鼠接种(+)**	
40	39	39	39	39	39	39	39	100

* 挑取到典型的 M 型菌落; ** 试验动物于接种后 48—72 小时内死亡,心血涂片显微镜发现典型炭疽菌;

*** 被检菌在含 0.05—0.5 单位青霉素/毫升的培养基内变膨大,菌链呈念珠状。

个碳酸氢钠琼脂平板,放在含 CO₂ 的容器内,于 37℃ 温箱培养 18—24 小时。然后由平板挑取粘液型(M)菌落,做荚膜荧光抗体双染法检查。对于双染法阳性的培养物,进一步用噬菌体荧光抗体法^[3]、革兰氏染色、动力检查、串珠试验和动物(小白鼠)接种试验加以核准(见表 2)。

(三) 二次固定在双染法中的作用

双染法的特点是,在经过 RB-200 标记抗体染色并冲去多余的荧光抗体后,需将涂片再浸入原固定液内 3—5 分钟,然后加 FITC 标记抗体染色,这样可使已结合的 RB-200 标记抗体能够较彻底地阻断其所覆盖的菌体抗原与 FITC 标记抗体相结合,而使交叉反应菌染成橙红色,与发黄绿色荧光的炭疽菌形成鲜明的对比。这种增强阻断的作用,用间接法荧光抗体染色时,也可以看出。如表 3 所示,在正常的操作程序(I),被检菌着染很强的荧光(+++);而在操作程序 II,在加初级抗体后再一次经固定液处理,次级抗体即不再与初级抗体相结合,被检菌全无荧光反应。关于这种作用的机理,可能与福尔马林的强还原作用有关。因为当上述固定液内去掉福尔马林,或单独用乙醇、三氯甲烷、甲醇、丙酮等处理,并不能收到增强阻断作用的效果;用硫代硫酸钠、氯胺等还原剂处理,则能达到此目的。此外,经含福尔马林的固定液处理后,如充分水洗,即不再呈现增强阻断作用,说明这种作用是可逆的,能随着福尔马

林被除去而消失,因此在染片时应加以注意。

表 3 二次固定在间接法染色中对初、次级抗体结合的阻断试验

操 作 程 序	I	II	III
1. 标本固定	√	√	√
2. 加相应抗血清(兔)	√	√	√
3. 二次固定	-	√	-
4. 加羊抗兔球蛋白荧光抗体	√	√	√
5. 三次固定	-	-	√
6. 镜检荧光反应	++++	(-)	++++*

注: 标本系炭疽菌,沙门氏菌和大肠埃希氏菌;固定液如前述: √ 表示进行该项程序; - 表示未进行该项程序; ++++ 菌体发明亮的黄绿色荧光; +++* 菌体发明亮的金黄色荧光; (-) 无荧光反应。

(四) 巨大芽孢杆菌的荚膜被染成橙红色的原因

巨大芽孢杆菌的荚膜和炭疽菌的荚膜同样是由 d-谷氨酸多肽组成^[6],但经双染法染色,却与 RB-200 标记的抗菌体球蛋白相结合,染为橙红色。Tomcsik 报告^[9],巨大芽孢杆菌的荚膜除多肽基质外,还有菌体多醣构成之骨架。我们用抗巨大芽孢杆菌菌体血清对巨大芽孢杆菌荚膜进行间接荧光抗体法染色,得到类似的结果。在双染法中,巨大芽孢杆菌荚膜被染为橙红色,可能是由于其中的菌体多醣成分着染,再经二次固定,具有对后加的 FITC 标记抗荚膜球蛋白的强阻断作用的缘故。

参 考 文 献

- [1] Redys, J. J. et al.: *J. Bacteriol.*, **80**: 823—829, 1960.
- [2] Cherry B. W. et al.: *Zbl. Bakt. I. Abt. Orig.*, **175**: 582—604, 1959.
- [3] Dowdle, W. R. et al.: *J. Inf. Dis.*, **108**: 125—135, 1961.
- [4] Franěk, J.: *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. (Prague)*, **8**: 111—119, 1964.
- [5] Howard, et al.: *Diagnostic Procedures for Bacterial, Mycotic and Parasitic Infections*, 5 ed., American Public Association, Inc. New York, P., 1970.
- [6] Nairn, R. C.: *Fluorescent Protein Tracing*, 4 ed., Churchill Livingstone Edinburgh London and New York, 1976.
- [7] Kawamura, A. Jr.: *Fluorescent Antibody Technique and their Applications*, 2 ed. Tokyo Univ., 1977.
- [8] 张宪厚等: 《细菌生理学》, 人民卫生出版社, 第10—11页, 1962年。
- [9] 植村定治郎等: 《微生物生理学》(上册), 李知正译, 上海科技出版社, 第80页, 1966年。

THE RAPID IDENTIFICATION OF *BACILLUS ANTHRACIS* WITH DOUBLE FLUORESCENT ANTIBODY STAINING TECHNIQUE

Zhen Hong-tai Yang Su-xian

(Huhhot Commodity Inspection Bureau, Huhhot)

A double staining method was applied to detect the encapsulated *B. anthracis* with FITC labeled antiencapsulated *B. anthracis* globulin and RB-200 labeled anti-non-capsulated *B. anthracis* as well as *B. megaterium* globulin. The encapsulated cells were shown to give good specific staining reaction, as the capsules showed brilliantly yellow-green

fluorescence and the cells within the capsules, yellow-red. Thus, it sharply in contrast to *B. cereus*, encapsulated and non-capsulated *B. megateriums*, which were all stained red. This makes it possible to identify cross-reaction, and a highly specific fluorescent antibody technique for rapid identification of encapsulated *B. anthracis* was obtained.