

流行性感胃研究的實驗室技術

I. 可溶性抗原免疫血清的制备

聞仲权 朱既明

(中央生物制品研究所, 北京)

与許多种其他病毒一样, 流行性感胃病毒具有两种抗原; 其一种为病毒抗原, 另一种为可溶性抗原, 针对此二种抗原, 在免疫动物的血清中亦可以產生两种抗体。这两种抗原和抗体均能用补体結合試驗來測定, 但所測定的到底是那一种或是两种的混合, 就完全决定于所用的血清中含有那一种抗体, 所用的抗原中含有那一种抗原了。

流行性感胃可溶性抗原免疫血清, 可以用來作早期臨床診斷(用病人含漱液作抗原的大量补体結合法)^[1], 鑒別新分离的流行性感胃病毒的型別, 并用來檢定补体結合試驗用标准抗原。而可溶性抗原的免疫血清來源有几个方面: 首先可以应用病人恢复期血清, 其缺点是我們不可能獲得足够的人血清供作長期試驗应用, 且所得血清常为各型混合陽性的, 因之在鑒別抗原上存在着困难; 其次可以应用試驗室动物制造血清, 但由于可溶性抗原的抗体一定要在感染后恢复期血清中才產生, 用注射方法免疫人或試驗室动物則不產生此种抗体, 所以必須感染对流感病毒敏感的动物來制造血清。在國外一些試驗室中多应用雪貂(对流感敏感), 但在我們試驗室沒有雪貂, 只好另尋來源。

为了解决补体結合試驗用可溶性抗原的免疫血清問題, 在我們試驗室曾經用过小白鼠及地鼠來制造, 但是初步的結果不够令人滿意, 除地鼠用PR₈株來感染有相当效价外, 其他都不能獲得可用的效价。这两种动物很小, 所獲得血清量很少, 再有保存时常常產生抗补体现象, 因之均不够理想。

苏联的几篇文献中提到^[2,3,4], 应用大白鼠免疫血清及豚鼠免疫血清, 進行补体結合試驗, 但所用抗原为尿液, 其中主要为病毒抗原, 而并非可溶性抗原, 且沒有找到詳細的制造方法, 只提到用多次鼻腔滴入法可以得到高效价的免疫血清。我們根据了文献片段的記載, 計劃了本試驗的步驟和方法。獲得了高效价的特异的补体結合試驗血清。

材料与方法

动物

大白鼠:100—150克,不分雌雄,每組6只。

豚鼠:250—300克(血清試制的試驗为300—350克),不分雌雄,每組4只。

免疫抗原

尿囊液抗原 PR₈(甲型)及 Lee(乙型)株,用 10^{-3} 稀釋病毒接种10日齡鷄胚尿囊腔,接种量0.1毫升,培育于35°C 40—44小时,收集尿液,PR₈及 Lee 株鷄血球凝集效价皆为1:2560,免疫时用原尿液不稀釋。

鼠肺抗原 小白鼠体重12—14克,用小白鼠適應株 PR₈, Lee, 及 FM₁(亞甲型)感染,尿液用肉水作 10^{-2} 稀釋后,在安全接种櫥內將小白鼠用乙醚-氯仿(2:1)混合剂輕度麻醉,由鼻腔滴入0.05毫升。接种后3日剔除死鼠,將發病与未發病的完全用氯仿殺死解剖,取出肺臟。取出的鼠肺于当日应用或放于-35°C低温冰箱中冻结保存。鼠肺懸液制备:鼠肺称其重量,移入組織研磨器或乳鉢中磨碎,然后按重量加肉湯制成20%的懸液,經离心机每分鐘3000迴轉沉淀20分鐘,吸取上清液,測定鷄血球凝集效价,即为鼠肺抗原。血凝效价 PR₈ 1:32; Lee 1:1,鷄胚感染效价 10^{-4} ; FM₁ 1:24。第四次免疫用 Lee 抗原为另一批,其血凝效价为1:64。

免疫方法

分組見表1—5。免疫途徑及剂量分三个系統:第1个系統,鼻腔滴入0.5毫升,共進行3次或4次,每次間隔一星期;第2个系統,鼻腔滴入0.5毫升,同时腹腔注射2毫升,進行3次或4次,每次間隔一星期;第3个系統,前三次進行鼻腔滴入0.5毫升,第4次鼻腔滴入0.5毫升,同时腹腔注射2毫升。

試血在最后一次免疫后一星期,有滿意效价时即用心臟放血法采血。

血清补体結合效价滴定

补体結合試驗用的抗原分鷄胚尿膜抗原及鼠肺抗原二种。尿膜抗原系將11日齡鷄胚尿囊感染后,培育40—44小时,除去气室端卵殼,吸尽尿液后,將鷄胎、卵黃囊及蛋白倒出弃去,遺留尿膜粘着于卵殼內,然后用鑷子取出,于每个尿膜中加1毫升鹽水,置低温冰箱及室温中冻化3次,离心除去粗塊,吸取上清液保存。鼠肺抗原制法同免疫用抗原,但稀釋液用生理鹽水,且再經冻化一次,并除掉沉淀物。抗原保存于-35°C。抗原用量为0.1毫升,内含4个單位。被檢血清于試驗当日置56°C水箱30分鐘滅能,用二倍稀釋法自1:5开始,每管0.1毫升。补体用豚鼠8—10只的混合血清,-35°C冻结保存,用时取出,用量0.2毫升内含2个單位。敏感化綿羊紅血球(2%羊

血球加等量稀釋成二个單位的溶血素) 用 0.2 毫升, 試驗全量为 0.6 毫升。各成分对照試驗如常規。試驗中所用稀釋液用 Veronal 緩衡液^[5]。补体結合在 2—8°C 冰箱中進行 16—18 小时, 再放 37°C 水箱中 5—10 分鐘, 然后加入敏感化羊血球, 放 37°C 水箱中 30 分鐘后讀取結果。效价以 50% 溶血为終点。

血清鷄血球凝集抑制效价測定

血清用霍乱濾液处理^[6], 除掉非特异性抑制素, 進行鷄血球凝集抑制試驗^[7]。

免 疫 結 果

各組动物的免疫方法, 及獲得的血清的試驗結果, 見表 1、2、3、4。由以下的各表中, 可以观察到下述的情况。

表 1 PR₈ 株抗原免疫的大白鼠血清补体結合試驗結果

組 号	动 物 号	免 疫 抗 原	免疫次数及途径				血 清 效 价				
			1. 次	2 次	3 次	4 次	免 疫 次 数	尿 膜 抗 原		鼠 肺 抗 原	
								PR。	Lee	PR。	Lee
1	5—1	尿 液 抗 原	○	○	○	○	3 4	60 20	40 15	30	17.5
	5—2		○	○	○	○	4	30	25	30	8.5
	5—3		○	○	○	—	3	17.5	7.5	70	70
	5—4		○	○	○	—	3	25	15	70	10
	5—5		○	○	○	—	3	60	10	70	7.5
2	6—1	尿 液 抗 原	△	△	△	△	3 4	30 15	6 7.5	17.5	<5
	6—2		△	△	△	△	4	15	<5	30	<5
	6—3		△	△	△	△	4	10	<5	12.5	<5
	6—4		△	△	△	—	3	7.5	<5	17.5	5
	6—5		△	△	△	—	3	20	<5	35	30
3	9—1	鼠 肺 抗 原	△	△	△	○	3 4	30 >120	<5 <5	240	120
	9—2		△	△	△	○	4	60	<5	>240	7.5
	9—3		△	△	△	○	4	60	<5	160	30
	9—4		△	△	△	—	3	7.5	<5	40	17.5
	9—5		△	△	△	—	3	10	<5	30	7.5
	9—6		△	△	△	—	3	17.5	<5	60	17.5
4	10—1	鼠 肺 抗 原	△	△	△	△	3 4	12.5 25	<5 <5	60	7.5
	10—2		△	△	△	△	4	20	<5	80	40
	10—3		△	△	△	—	3	5	<5	15	<5
	10—4		△	△	△	—	3	30	<5	70	25

注: ○ 鼻腔与腹腔混合免疫; △ 鼻腔免疫; — 未免疫。以后表同。

表2 PR₈株抗原免疫的豚鼠血清补体结合试验结果

組 号	动 物 号	免 疫 抗 原	免 疫 次 数 及 途 徑				血 清 效 价				
			1 次	2 次	3 次	4 次	免 疫 次 数	尿膜抗原		鼠肺抗原	
								PR。	Lee	PR。	Lee
5	2365	尿 液	○	○	○	○	3 4	>240 120	60 60	>240	<5
	2346		○	○	○	○	4	120	30	>640	<5
	2348		○	○	○	—	3	400	12.5	240	<5
	2356		○	○	○	—	3	>480	60	560	<5
6	2372	抗 原	△	△	△	△	4	200	30	240	<5
	2366		△	△	△	△	3 4	>240 60	7.5 7.5	<5	<5
	2357		△	△	△	—	3	>480	60	>640	<5
	2378		△	△	△	—	3	70	10	60	<5
7	2352	鼠肺抗原	△	△	△	—	3	120	<5		
8	2351		△	△	△	△	4	200	<5	>320	>320
	2381		○	○	○	—	3	>240	<5		

表3 Lee株抗原免疫的大白鼠血清补体结合试验结果

组 号	动 物 号	免 疫 抗 原	免 疫 次 数 及 途 径				血 清 效 价				
			1 次	2 次	3 次	4 次	免 疫 次 数	尿膜抗原		鼠肺抗原	
								PR ₈	Lee	PR ₈	Lee
9	3—1	尿 液 抗 原	○	○	○	○	3 4	25 ≤5	60 30	≤5	60
	3—2		○	○	○	○	4	7.5	60	≤5	40
	3—3		○	○	○	○	4	15	25	≤5	70
	3—4		○	○	○	—	3	12.5	60	≤5	30
	3—5		○	○	○	—	3	12.5	30	≤5	10
10	4—2	原	△	△	△	△	4	≤5	7.5	≤5	8.5
	4—3		△	△	△	△	4	≤5	30	≤5	40
	4—1		△	△	△	—	3	≤5	60	≤5	30
	4—4		△	△	△	—	3	≤5	30	≤5	17.5
11	7—2	鼠 肺 抗 原	△	△	△	○	4	≤5	>120	≤5	140
	7—3		△	△	△	○	4	≤5	60	12.5	70
	7—1		△	△	△	—	3	≤5	10	≤5	≤5
	7—4		△	△	△	—	3	≤5	5	≤5	≤5
	7—5		△	△	△	—	3	≤5	10	≤5	7.5
12	8—2	原	△	△	△	△	4	≤5	40	≤5	60
	8—1		△	△	△	—	3	≤5	20	≤5	15
	8—3		△	△	△	—	3	≤5	≤5	≤5	5
	8—4		△	△	△	—	3	≤5	≤5	≤5	5

表4 Lee 株抗原免疫的豚鼠血清补体結合試驗結果

組 号	动 物 号	免 疫 抗 原	免疫次数及途径				血 清 效 价				
			1 次	2 次	3 次	4 次	免 疫 次 数	尿 膜 抗 原		鼠 肺 抗 原	
								PR。	Lee	PR。	Lee
13	2350	尿 液 抗 原	○	○	○	○	3 4	120 35	120 35	<5	35
	2380		○	○	○	○	4	120	120	<5	60
	2359		○	○	○	—	3	70	70	<5	35
14	2368	尿 液 抗 原	△	△	△	△	3 4	50 100	140 120	<5	140
	2382		△	△	△	—	3	20	60	7.5	40
	2383		△	△	△	—	3	140	140	<5	20
15	2370	鼠 肺 抗 原	△	△	△	△	3 4	<5 <5	30 60	<5	140
	2375		△	△	△	—	3	<5	30		
16	2347	鼠 肺 抗 原	△	△	△	○	4	<5	>120	50	400
	2369		○	○	○	○	3 4	<5 <5	20 30	60	60
	2349		△	△	△	—	3	<5	15	8.5	7.5

1. 大白鼠 PR₀ 尿液免疫者, 用尿膜抗原滴定結果, 鼻腔免疫產生的抗体效价, 較鼻腔腹腔混合免疫的效价为低, 但对尿膜抗原所產生的非特异性反应亦低 (見表 1 第 1、2 組)。由于本組大白鼠系用尿液抗原免疫的, 故除针对流感的抗体外, 同时刺激產生针对尿膜的抗体, 这是不难理解的。比較难以解釋的是, 用鼠肺抗原滴定时, 亦出現非特异性的反应, 特別以鼻腔腹腔混合免疫者为顯著。

2. 大白鼠 PR₀ 鼠肺抗原免疫者, 用尿膜抗原滴定时, 不論单独鼻腔免疫, 或鼻腔腹腔混合免疫者, 均沒有非特异性反应。鼻腔免疫無論 3 次或 4 次, 血清效价都較低。前三次用鼻腔接种, 第 4 次用鼻腔腹腔混合免疫, 則效价顯著增高 (見表 1 第 3、4 組), 皆达 1:60 以上, 最高可达 1:120 以上。用鼠肺抗原滴定时, 則二組均呈不同程度的非特异性反应, 表現在对 Lee 的抗原亦呈陽性。

3. 豚鼠 PR₀ 尿液抗原免疫者, 不論是 3 次或 4 次免疫, 其效价均很高, 一般超过 1:120, 对尿膜抗原非特异性反应亦相当高, 最高的到 1:60 (見表 2 第 5、6 組)。另外第 4 次免疫似乎沒有提高效价的作用, 鼻腔腹腔混合免疫的亦沒有什麼区别。用鼠肺抗原滴定时, 二組血清效价均高, 且無非特异性反应。

4. 豚鼠 PR₀ 鼠肺抗原免疫者, 鼻腔及鼻腔腹腔混合免疫者效价都很高 (見表 2 第 7、8 組), 但由于本組动物死亡太多, 影响观察結果。本組血清对尿膜抗原沒有非特异性反应, 但其中一个血清同鼠肺抗原滴定时, 呈極高的非特异性反应。

5. 大白鼠 Lee 尿液抗原免疫者, 鼻腔与鼻腔腹腔混合免疫者没有显著的区别 (见表 3 第 9、10 组), 3 次与 4 次免疫亦没有显著的区别, 一般效价中等, 最高没有超过 1:60 的。在对尿膜抗原的非特异性反应方面, 单纯鼻腔免疫者没有非特异性反应, 鼻腔腹腔混合免疫者, 则出现非特异性的反应。本组血清用鼠肺抗原滴定时, 无非特异性反应。

6. 大白鼠 Lee 鼠肺抗原免疫者, 单是鼻腔 3 次免疫者效价很低 (见表 3 第 11、12 组), 进行第 4 次鼻腔免疫的, 或前三次鼻腔免疫后, 第 4 次行鼻腔腹腔混合免疫, 则效价有显著的增高, 对尿膜抗原没有非特异性反应, 对鼠肺抗原仅个别动物呈非特异性反应。

7. 豚鼠 Lee 尿液抗原免疫者, 用尿膜抗原滴定时, 不论鼻腔或鼻腔腹腔混合免疫, 非特异性反应都高, 仅仅个别血清能看出其对甲乙二型抗原效价的差别。3 次或 4 次免疫没有什么区别 (见表 4 第 13、14 组)。用鼠肺抗原滴定时, 则可以看出相当高的特异效价, 且无非特异性反应。

8. 豚鼠 Lee 鼠肺抗原免疫者, 不论鼻腔或鼻腔腹腔混合免疫, 一般呈中等效价, 个别血清效价较高, 达 1:120 以上。3 次或 4 次免疫没有显著区别。对尿膜抗原没有非特异性反应, 对鼠肺抗原则有显著的非特异性反应。

讨 论

由试验结果可看出以下几个问题:

1. 二种抗原与二种动物在免疫学上的价值: 一般看来免疫时用鼠肺抗原和尿液抗原没有什么区别。豚鼠血清效价较高, 产血量较多, 血清清晰不易呈抗补体现象, 且在操作上较大大白鼠容易管理, 是其优点, 但大白鼠也有实用价值。

2. 由试验结果可看出, 为了避免非特异性反应, 用鼠肺抗原免疫的血清, 一定要用尿膜抗原来滴定, 反之亦然。二种抗原应用到工作中, 在免疫效果上尿液与鼠肺抗原只要含有一定量的病毒, 则均可以产生满意的血清。一般鼠肺比尿膜抗原的制备复杂, 成本高, 工作量大, 而尿膜抗原则在一般的试验室都可以制备。所以最好用鼠肺抗原来制造血清, 用尿膜抗原来作补体结合试验抗原。

3. 3 次免疫与 4 次免疫大都都没有显著的差别, 仅大白鼠用鼠肺免疫时, 于起先三次用鼻腔免疫, 第 4 次用鼻腔腹腔混合免疫时, 抗体有显著上升的现象。

4. 鼻腔免疫与鼻腔腹腔混合免疫法, 在抗体效价方面的影响不大, 但鼻腔腹腔混合免疫后, 非特异性反应效价较高。此外, 豚鼠血清的非特异性反应亦较大大白鼠为高。但若应用以上鼠肺作免疫抗原, 用尿膜作试验抗原时, 则非特异性反应可以完全免除。

5. 由试验结果, 3 次鼻腔腹腔混合免疫方法是可以应用的, 但是在前三次鼻腔免

疫，第 4 次行鼻腔腹腔混合免疫方法，亦可獲得高效价血清。用后法能够節省抗原^{1/2}，即用前法免疫一个豚鼠需要 8 个鼠肺，用后法僅用 4 个即可，缺点是時間延長一星期，多進行免疫一次。

6. 由于在免疫时需要麻醉，用麻醉致死的动物百分率較高，占 12.5%。免疫期中死亡占 15%，其中大部分系由肺炎致死。豚鼠对流感常呈隱性感染，但亦可能續發細菌感染而致肺炎，此点由于未深入研究，故不能确定。

血 清 試 制

根据試驗結果，我們進行了下面的試驗，用鼠肺抗原免疫豚鼠制造了一批血清。免疫方法采用第 3 个系統，即前三次鼻腔滴入 0.5 毫升，第 4 次鼻腔滴入 0.5 毫升，同时腹腔注射 2 毫升。試驗結果見表 5。

表 5 鼠肺抗原免疫豚鼠血清用尿膜抗原滴定結果

組別	免疫抗原	免疫抗原血凝效价				豚 鼠		血清补体結合抗体效价			非特异性效价
		1 次	2 次	3 次	4 次	免疫数	生存数	混合	單	分	
1	PR ₈	32	16	60	24	14	12	120	400, 320, 240, 240, 240, 240, 140, 120, 120, 80, 60		<5
2	FM ₁	24	16	40	12	13	6	480	560, 640, 480, 240, 240, 80		<5
3	Lee	1	1	1	64	13	9	120	480, 160, 120, 100, 60, 60, 12.5, 7.5, <5		<5

1. 表 5 可看出，制出血清效价一般很高，且全無非特异性反应。Lee 血清效价較不規則，豚鼠間的个体差异很大，可能系因首三次所用的免疫抗原含病毒量过少之故。

2. PR₈ 和 FM₁ 血清同时用 PR₈ 和 FM₁ 二个尿膜抗原來滴定的結果，PR₈ 血清效价各为 140 和 140，FM₁ 各为 240 和 400，可以証明制得的血清为型特异，而非株特异的。

3. 按本法制得的血清亦可用作血球凝集抑制試驗的标准血清，有很滿意的抑制效价，其株間交互关系如表 6。

表 6 豚鼠血清的血球凝集抑制效价

抗 原 \ 血 清	PR ₈	FM ₁	Lee
PR ₈	1280	<10	<10
FM ₁	<10	240	<10
Lee	<10	<10	480

表 6 中的結果系首先用霍乱濾液处理血清，除去非特异性抑制素，而后獲得，如不經处理，血清非特异性抑制素亦比較低，对 PR₈ 和 Lee 为 <10，对 FM₁ 为 15。

4. 动物死亡率: 麻醉致死 7.5%, 免疫期中死亡 25%, 死亡病症如前述。动物健康与否与死亡关系很大, 在免疫期中动物管理饲养的条件很重要, 如我们的试验是在冬季进行的, FM₁ 组的笼子放在水泥地上较冷, 死亡亦多, 更明显的 Lee 组共二笼饲养, 在地上的一笼死亡高。PR₉ 组在架上则死亡较少。另外笼子小, 动物拥挤亦为死亡多的原因。

結 論

1. 本文叙述制备高效价的、含有对可溶性抗原的抗体的补体结合试验用血清的方法, 该血清同时亦可用作血球凝集抑制试验。

2. 制造血清用动物, 以豚鼠为适宜, 免疫时用鼠肺抗原, 试验时用尿膜抗原, 则可完全免除非特异性反应。

参 考 文 献

- [1] Смородинов, А. А., Клячко, Н. С., Колдобский, А. М. и Юрикас, И. А. *Новости медицины*, 38: 101.
- [2] Канторович, Р. А. Грипп, *Труды АМН СССР*, 28:104, 1953.
- [3] Лузянина, Т. Я. Грипп, *Труды АМН СССР*, 28:38, 1953.
- [4] Юрикас, И. А. Грипп, *Труды АМН СССР*, 28:138, 1953.
- [5] Fulton, F. & Dumbell, K. R. *J. Gen. Microbiol.* 3:97, 1949.
- [6] 黄元洞、朱既明: 流行性感冒研究的实验室技术 II. 霍乱滤液的制备和应用, *微生物学报* 4 (1): 175—183, 1956.
- [7] Chu, C. M., Andrewes, C. H. & Gledhill, A. W., *Bull. World. Hlth. Org.*, 3: 187, 1950.

LABORATORY TECHNIQUE IN THE STUDY OF INFLUENZA I. PREPARATION OF ANTISERUM AGAINST THE SOLUBLE ANTIGEN

WEN CHUNG-CHUAN AND CHU CHI-MING
National Vaccine and Serum Institute, Peking

Antiserum against the soluble antigen is usually obtained from patients and ferrets after an attack of influenza; both of them are usually unavailable for the ordinary laboratory workers in this country. In order to solve this problem, studies have been made in this laboratory to prepare antiserum from guinea pigs and white rats. Mouse lung virus was employed as the immunizing agent, while the allantoic fluid served as the antigen for the complement fixation test. By this procedure, a satisfactory antiserum against the soluble antigen of influenza virus has been obtained in guinea pigs. The method is detailed in this paper.