

螢光抗体技术非特异染色因素去除方法的研究

常汝虛 刘錦棠

(中国医学科学院湖北分院, 武昌)

近年来螢光抗体技术有了很多改进, 但螢光血清的非特异染色问题, 仍未获得满意的效果。本文报告消除异硫氰酸螢光黄标记抗体的非特异性螢光染色的试验结果。

一、螢光血清的制备及染色法

1. 免疫血清

直接染色法免疫血清 甲型流感病毒PR₈株, 用豚鼠血球吸附游离法提纯病毒, 心脏注射免疫豚鼠(400—500克), 每只1毫升, 2周后取血测效价为1:640—1:2560。(血球凝集抑制试验)

间接染色法免疫血清 取正常豚鼠血清, 用10%甲明矾沉淀, 沉淀物用生理盐水洗两次, 然后溶解在适量的生理盐水中, 肌肉注射家兔, 每周1次, 共两次, 第二次注射后两周取血测效价为1:16000。(沉淀试验)

2. 提取球蛋白

用半饱和硫酸铵法提取球蛋白。一般总蛋白量为3.5%—5%。

3. 免疫球蛋白与螢光素结合

球蛋白在整个反应液中浓度为2%, 用0.5M碳酸-碳酸氢钠校正pH至8—9。加入异硫氰酸螢光黄, 在搅拌中结合6—8小时, 整个反应过程维持在0—4℃。螢光素与球蛋白结合比例分为四组, 第一组1:20(即每毫克蛋白加0.05毫克色素); 第二组1:40(每毫克蛋白加0.025毫克色素); 第三组1:80(每毫克蛋白加0.0125毫克色素); 第四组1:160(每毫克蛋白加0.00625毫克色素)。结合后用pH7.4磷酸缓冲液透析, 除去剩余的螢光素。

4. 染色方法

直接染色法 将已感染和未感染的鸡胚细胞和兔肾细胞盖玻片自培养瓶中取出, 用磷酸缓冲

盐水洗, 继用丙酮固定10分钟, 滴加螢光血清, 置37℃下作用半小时, 再以磷酸缓冲盐水洗2次, 经过蒸馏水洗后, 即可在螢光显微镜下检查。

间接法 上述细胞盖玻片经固定后, 滴加PR₈豚鼠免疫血清, 置37℃下作用半小时, 用磷酸缓冲液洗后, 再滴加兔抗豚鼠蛋白螢光血清, 置37℃下作用半小时, 其余步骤同直接法。

5. 螢光显微镜

Reichert 牌螢光显微镜, 光源为OSRAM HBO 200W, 滤光系统为UG1和BG12光源滤板及SG9保护滤片。

二、动物肝粉的制备及吸收螢光血清的方法

取动物肝脏用盐水洗净其血液, 剪碎, 再用盐水洗净, 加4倍量丙酮, 室温浸泡两小时; 去掉丙酮, 再用盐水洗两次, 再加丙酮浸泡; 如此重复两次。将洗净的脏器放温箱, 待干燥后, 磨成粉末即成。吸收方法为每毫升螢光血清加100毫克粉末, 室温作用1小时, 不断摇动, 离心后取上清即成。

三、Sephadex 层析法

将Sephadex G50 (uppsala, 瑞典) 浸泡在pH 7.3磷酸缓冲盐水中(每克Sephadex G50约加10—12毫升缓冲盐水), 使其成糊状, 浸泡3—4小时后装入玻柱(所用玻柱直径为3.0厘米, 长20厘米), 装柱时应缓慢, 勿使产生气泡, 于8—10℃过夜使平衡, 次日加pH9.0缓冲液洗柱, 待滴出缓冲液为pH9.0时, 将多余缓冲液轻轻吸去, 然后小心地将螢光血清慢慢加入, 待螢光血清完全进入玻柱后, 加pH7.3缓冲液洗脱, 分段收集, 螢光血清先被洗脱下来, 而未被球蛋白结合的游离

本文1965年6月26日收到。

萤光素则留在玻柱的上面,须较长时间才能洗脱下来。Sephadex 可以回收再用。

经 Sephadex 层析的萤光血清,不须要再进行透析。

几种除去非特异性染色方法效果比较;直接染色法和间接染色法的试验结果基本相似,惟一般间接染色法中的非特异性染色较直接法难于消除,几种去除非特异染色方法效果列于表 1,经多

表 1 几种去除非特异性染色方法的效果比较

处 理 方 法			非特异性染色
萤光素:球蛋白	肝粉吸收次数	Sephadex 层析	
1:20	2	—	+++
1:40	2	—	++
1:80	2	—	+
1:160	2	—	+
1:20	1	+	+
1:80	1	+	—

注:“+++”为非特异性染色明显(见图 1)

“++”为有非特异性染色

“+”为非特异性染色显著减弱

“—”非特异性染色基本消除(见图 2)

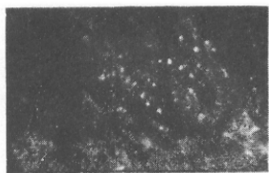


图 1 萤光素与球蛋白结合非特异性染色明显



图 2 萤光素与球蛋白结合非特异性染色基本消除

次重复应用鸡胚细胞和兔肾细胞的结果相同。

一般实验中萤光抗体的标记,所用萤光素与球蛋白比例为 1:20^[1]。我们用不同比例结合,以了解与非特异性萤光染色关系,实验结果表明 1:20 及 1:40 虽经肝粉吸收两次,仍有较明显非特异性染色;比例为 1:80 的用肝粉吸收两次,可使非特异性显著减弱,特异性染色效果良好;比例为 1:160 时,虽能显著去除非特异性染色,但特异性萤光有所减弱,看来在制备流感血清时,所用萤光素与球蛋白比例以 1:80 左右较好。当然满意的标记比例,在每个免疫系统会有所不同,需要通过具体试验加以解决。

近年来国外很多学者,广泛采用层析法处理萤光血清^[2,3]。我们选用 Sephadex G50 层析萤光血清,可使没有和球蛋白结合的萤光素与萤光血清很好的分开。试验结果表明,萤光素与球蛋白结合比例为 1:80 的萤光血清,经层析后用肝粉吸收 1 次,可以基本去除非特异性萤光染色,特异性染色效果也良好。

参 考 文 献

- [1] Coons, A. H.: *General Cytochemical Methods*, 1:399—422, 1958.
- [2] Gordon, M. A., Edwards, M. R., and Tompkins, V. N.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **109**: 96—99, 1962.
- [3] McDevitt, H. O., Peters, J. H., Pollard, L. W., Harter, J. G. and Coons, A. H.: *J. Immunol.*, **90**: 634—642, 1963.