

免疫酶技术及其对副流感病毒(仙台株)抗原的定位观察

陈良标* 王见南 洪 涛

(中国医学科学院病毒研究所电镜室, 北京)

采用辣根过氧化物酶标记抗体的方法,对副流感病毒(仙台株)抗原在组织细胞内的繁殖部位进行了光学显微镜和电子显微镜的观察。在受病毒感染的小鼠肺切片上,多数细支气管上皮细胞及部分肺泡细胞胞浆内呈明显阳性;在体外实验中,受感染的单层人胚肾细胞的胞浆膜、胞浆膜表面的病毒颗粒以及部分胞浆均可见阳性反应。

此外,本文还对结果的特异性,酶标记技术中抗原的固定,酶与免疫球蛋白的结合以及酶标记抗体进入组织细胞等方法学问题进行了一些探讨。

过氧化物酶,特别是辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase,以下简称HRPO)作为标记物,标记抗体或抗原,研究抗原抗体相互作用以来,免疫过氧化物酶技术得到了广泛的重视和应用^[1-6]。目前,应用较多的是在病毒抗原和肿瘤抗原的超微结构研究方面。免疫酶技术的优点在于:标本既能用普通光学显微镜观察,又能用电子显微镜观察,因而可在细胞水平和亚细胞水平上同时进行对比研究。目前此项技术仍处在发展提高阶段,离常规应用,尚有一定距离。但与免疫铁蛋白和免疫荧光技术相比,它可能有较大的发展前途。

我们对辣根过氧化物酶标记抗体的方法进行了一些初步探讨并应用于副流感病毒(仙台株)抗原的细胞内定位研究,本文报告此项工作的结果。

材 料 和 方 法

(一) 豚鼠抗病毒免疫血清制备^[1]

副流感病毒 I 型仙台株鸡胚尿囊液 0.5 毫升,正常豚鼠鼻腔吸入感染,一周后腹腔内注射病毒液 5—10 毫升,两周后再次腹腔免疫一次,末次免疫一周后心脏取血,分离血清,血凝抑制滴度在 1:320—640 之间,56℃,30 分钟灭活,置

—20℃ 以下保存备用。

(二) 兔抗豚鼠血清 IgG 抗体的制备

1. 豚鼠血 IgG 的提取: 取正常豚鼠血清用等量生理盐水稀释后,50% 饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 提取一次,40% 饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 提取 2—3 次,透析除盐后过 DEAE-纤维素柱,0.01M pH7.2 的磷酸盐缓冲液(简称 PB)洗脱,20% 磺基水杨酸测定,收集含蛋白峰部分,吹风浓缩,在紫外分光光度计下以 280 毫微米波长测 IgG 含量。

2. 兔抗豚鼠 IgG 免疫血清制备: 取 2.5—3.0 公斤重的健康家兔进行免疫。

第 1 次免疫: 取上述纯化豚鼠血清 IgG 与等量 Freund's 完全佐剂混匀,进行脚掌和背部皮下多点注射,每只兔注射 IgG 总量为 1—2 毫克。

第 2—4 次免疫: 第 1 次免疫一周后进行第 2 次到第 4 次追加免疫,每次免疫间隔时间仍为一周,IgG 量同上,均不加佐剂。末次免疫一周后试血,环状试验法测定滴度 1:1280 以上。—20℃ 以下保存备用。

(三) 辣根过氧化物酶标记兔抗豚鼠血清 IgG 抗体的方法

1. 兔抗豚鼠血清 IgG 抗体的纯化: 取上述兔抗豚鼠 IgG 免疫血清,用等量生理盐水稀释,并用 50% 饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 提取一次,40% 饱和

本文于 1978 年 1 月 25 日收到。

* 现在北京军区总院工作。

1) 由本所病毒气管炎组提供。

(NH_4)₂SO₄ 提取 2—3 次, 透析除去 (NH_4)₂SO₄ 后, 用 0.1 M PB, pH 6.8 平衡 2 小时, 测定其蛋白含量, 供标记使用。

2. 标记(结合)方法: 本实验基本上采用了 Avrameas 以戊二醛为联结剂的标记抗体方法^[7]。取 HRPO (西德产) 12 毫克, 在搅拌下逐渐溶于 1 毫升含 5 毫克兔抗豚鼠抗体中(0.1 M PB, pH 6.8) 继续搅拌 10 分钟至完全溶解, 逐滴加入 1% 戊二醛(经减压蒸馏纯化) 0.05 毫升, 搅拌 10—20 分钟后, 室温下放 2 小时, 然后用 pH 6.8 的 0.01 M PB 在 4℃ 下透析过夜, 透析液更换数次, 除去未结合的戊二醛, 再以 50% 饱和 (NH_4)₂SO₄ 提取标记抗体 1—2 次, 以生理盐水或 0.1 M PB 溶解至原体积, 并于 pH 7.2 的 0.01 M PB 透析液中透析三天, 以除尽 (NH_4)₂SO₄ (以 2% BaCl₂ 测 SO₄²⁻, 奈瑟氏试剂测 NH₄⁺), 如有微量沉淀, 离心除去, 分装小管, 取少量鉴定用。其余 -20℃ 以下保存, 用时 10 倍稀释之。

3. 标记抗体的鉴定: 抗体经标记后应进行效果检查, 测定标记后抗体的免疫活性及其效价, 鉴定 HRPO 与抗体联结的情况以及酶的活性。

我们选用简易琼脂免疫双扩散法。以 1% 琼脂糖盐水制板, 如图 1 所示进行打孔, 图右中心孔加 HRPO 标记的兔抗豚鼠血清 IgG 抗体 (Ab_*), 图左中心孔加未标记的兔抗豚鼠血清 IgG 抗体和按比例加入的 HRPO 混合液 (Ab_0) 作为对照。周围孔加 1:60—480 稀释的正常豚鼠血清, 置 37℃ 或室温下含水气的器皿内免疫扩散 2—3 天。扩散的结果显示: 左侧对照中心孔未标记兔抗豚鼠抗体对 1:320 以下抗原(豚鼠血清)出现肉眼可见的沉淀线。右侧中心孔的标记兔抗豚鼠抗体

与所用各种稀释度的抗原豚鼠血清作用, 未出现肉眼可见沉淀线。将实验琼脂板盐水浸泡 3 天, 除去未反应的抗原及抗体, 此时对照孔沉淀线仍呈白色。经二胺基联苯胺-过氧化氢显色后, 右侧中心孔标记抗体对所有各稀释抗原孔均呈明显的棕色沉淀线, 而对照孔原白色沉淀线则不显色, 表明: (1) HRPO 已与抗体联结, 酶活性存在; (2) 抗体标记后免疫活性明显下降, 经染色才呈现反应沉淀线, 标记抗体滴度经显色后在 1:480 以上。

(四) 标本制备方法(间接法)

1. 光学显微镜标本的制备

(1) 取材及固定: 经仙台病毒 10^{-2} 鼻内感染的小鼠, 3—4 天后发病, 杀死取肺, 冰冻切片(约 12 微米), 印在小盖玻片上, 稍干后用纯丙酮固定 10 分钟, 4℃ 保存备用。同时以正常小鼠肺切片作对照。

仙台病毒 1000 TCID₅₀ 感染生长于小玻片上单层人胚肾细胞, 72 小时病变呈“+”至“++”, 血凝滴度 1:64, 取出玻片细胞, 用缓冲液洗涂培养液成分, 经纯丙酮固定 10 分钟, 4℃ 保存备用。

(2) 免疫血清的作用与漂洗: 仙台病毒豚鼠免疫血清经 56℃ 30 分钟灭活, 稀释 5—10 倍, 取数滴覆盖标本, 在含水气盒内, 37℃ 下作用 45 分钟至 1 小时。正常组织或细胞对照仍加免疫血清, 而同时以另一病毒感染标本用正常豚鼠血清培养作为对照。免疫血清作用后, 以磷酸缓冲液充分漂洗或浸洗 10—30 分钟, 除去未与抗原结合的抗体, 滤纸吸去余液, 保持标本湿润。

(3) 标记抗体作用及漂洗: HRPO 标记的兔抗豚鼠抗体, 以 0.1 M PB 稀释 10 倍, 吸数滴覆盖标本, 37℃ 水气下作用 45 分钟至 1 小时。缓冲液漂洗 30 分钟, 充分洗去未结合的酶标记抗体, 吸去洗液, 保持标本湿润。

(4) 显色: [酶显色底物溶液配制: 3, 3'-二氨基联苯胺 (DAB) 4 毫克溶于 0.05 M pH 6.8 的 5 毫升 Tris-HCl 缓冲液中, 临用时加 1% H₂O₂ 0.03 毫升]。以 DAB-H₂O₂ 底物溶液于室温下作用 6—10 分钟, 用缓冲液或自来水充分漂洗。

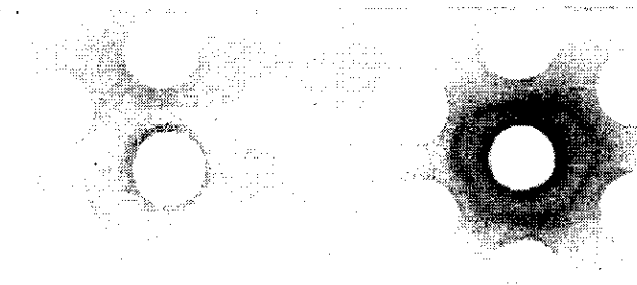


图 1 兔抗豚鼠 γ -HRPO (左: Ab_0 ; 右: Ab_*)

(5) 常规脱水、透明、封固。

2. 免疫电镜标本制备:

(1) 取材及固定: 和常规电镜标本制备要求相似, 仙台病毒感染的单层人胚肾细胞, 经缓冲液洗净后刮下, 并离心制成沉淀细胞小块, 立即转入过碘酸钠-赖氨酸-多聚甲醛 (PLP) 固定液内固定。[PLP 固定液配方: 0.1 M 赖氨酸-盐酸盐磷酸缓冲液 (pH 7.4) 三份与 8% 多聚甲醛一份混合] 在此混合液中加入 0.01 M 过碘酸钠, 此时 pH 由 7.2 降至 6.2, 用时无须再调 pH^[1]。

感染小鼠肺组织快速冷冻切片 (10—50 微米), 融化后低速离心成小块, 立即转入 PLP 固定液, 在 4℃ 下固定。细胞小块固定 30 分钟至 1 小时, 组织固定 1—2 小时。固定后用缓冲液浸洗 30 分钟。

(2) 免疫血清作用及漂洗: 经灭活处理的仙台病毒豚鼠免疫血清稀释 5—10 倍, 作用可在小试管内进行, 置 37℃ 或室温下作用 2—4 小时, 用缓冲液浸洗 1—2 小时, 除去未作用的多余血清, 用 2.5% 戊二醛重固定 30 分钟, 用缓冲液漂洗半小时。设正常对照及实验对照。

(3) 标记抗体的作用及漂洗: HRP 标记的兔抗豚鼠抗体 (1:10), 37℃ 下作用 2—4 小时, 缓冲液浸洗 2—3 小时, 洗去未结合的抗体, 用 2.5% 戊二醛固定 30 分钟, 用缓冲液浸洗半小时。

(4) 显色反应: 用上述 DAB-H₂O₂ 酶底物溶液处理半小时, 用缓冲液浸洗 30 分钟, 1% 四氧化钨固定 1—2 小时。

(5) 电镜按常规方法进行, 超薄切片无须双染色或只用铀染色或丙酮脱水前以 50% 乙醇醋酸氧铀饱和液进行块染。

内出现不同程度的棕褐色的阳性反应产物, 有的是强阳性 (深棕色), 有的呈弱阳性 (棕褐色), 有的细胞基本呈阴性 (图版 I-3)。

(二) 电子显微镜观察结果

在病毒感染的人胚肾细胞表面大量已释放和即将芽生释放的仙台病毒颗粒呈明显的阳性反应, 整个病毒颗粒被电子致密的酶反应产物所包绕。细胞表面呈连续的或断续的阳性反应, 某些细胞微突或其切面断面周围均有反应产物 (图版 II-4)。在少数细胞浆的内质网腔内呈明显的酶反应。上述反应产物应视为病毒抗原的所在部位。

观察从感染小鼠气管粘膜刮下的上皮细胞, 发现少数细胞表面或微突上有堆积的反应产物。

为了增加胞膜通透性, 便于免疫血清及标记抗体进入细胞, 以显示细胞内病毒和病毒抗原, 我们曾试探用超声波处理细胞 (频率 20000 赫兹, 振幅 4.5 微米, 处理 45 秒钟), 取得了一定的效果。胞浆内病毒和病毒抗原出现电子致密的酶反应产物 (图版 II-5)。从图版 II-5 可看出, 呈现阳性反应的两个细胞, 仍有部分细胞膜及其微突未见反应产物, 即呈阴性反应。图版 II-6 为同批试验未经超声波处理的结果, 显示两个相邻细胞表面上的病毒或病毒抗原呈阳性反应。

结 果

(一) 光学显微镜观察结果

在感染的小鼠肺冷冻切片上, 可见绝大多数细支气管上皮细胞 (图版 I-1), 终末细支气管上皮细胞呈棕褐色阳性反应。部分肺泡上皮细胞胞浆呈明显阳性反应, 而相邻切片的实验对照则呈阴性反应 (图版 I-2)。受病毒感染的单层人胚肾细胞胞浆

讨 论

(一) 在免疫标记定位研究工作中, 特异性问题应是首先考虑的问题。在我们的工作中, 特别注意做了比较严格的特异性对照试验。图版 I-1 表现明显的阳性反应, 图版 I-2 表现明显的阴性反应, 说明所得结果的特异性。

(二) 以酶作为标记物, 应用于免疫化

学研究已有十余年历史,在医学尤其是病毒学上,酶标记技术有着日益广泛的应用的趋势^[1-6]。近年来有关抗原的固定、酶与免疫球蛋白的结合(标记)以及使酶标记抗体进入组织细胞等方法学上,也有较大的进展^[8]。

1. 关于抗原固定液的选择问题:我们的初步试验结果表明,戊二醛作固定液对仙台病毒的抗原性有较明显的破坏作用。用纯丙酮作为免疫酶光学显微镜标本制备的固定液,所得结果较好,但作为免疫电镜的前固定液,它严重破坏细胞超微结构,使附着于细胞结构上的病毒抗原丢失。用多聚甲醛对细胞超微结构的保存也较差。有人试图通过对糖蛋白中碳水化合物部分的固定而间接的固定蛋白抗原,选择了一种直接针对碳水化合物的新固定液^[9,10],即 PLP 固定液。本实验表明,用 PLP 作为免疫电镜的前固定液,对细胞结构和抗原性的保存确实较好。

2. 酶与免疫球蛋白结合(标记)方法的改进:实验证明,目前市售的 HRPO 与球蛋白结合的比例较低^[11]。我们采用戊二醛标记一步法,从鉴定结果看,抗体活性丢失比较明显,穿入细胞的能力也较差。戊二醛标记二步法^[12],甲苯二异氰酸盐(TC)标记二步法等^[13],通过这些改进可使结合的随机性减少,但 HRPO 与球蛋白结合率仍无明显提高,过碘酸氧化法^[11],以此标记可有 90% 以上免疫球蛋白与 70% HRPO 结合。抗体活性及酶活性均无明显损失。

此外,还可利用免疫化学结合取代化学结合的方法^[14],通过抗原(HRPO)与相应的抗体(抗 HRPO 抗体)特异性结合,所

形成的免疫复合物,仍具有酶的活性。显然此法有其优越性,应予以重视。

3. 抗体(包括标记抗体)进入细胞的问题:由于在免疫电镜工作中,采用的是交联性固定液固定的组织块、较厚的组织切片(非超薄切片)或细胞团块,因此存在抗体进入细胞的问题。为使更多抗体进入细胞,过去多采用延长抗体作用时间的方法,但由于标本制备周期长影响超微结构的保存,效果并不理想。近年曾采用:①冷冻切片,它可使抗体进入细胞的速度加快;②采用抗体片段 Fab', 减小抗体分子量,加快其进入细胞的速度;③快速冻融组织或细胞,增加细胞膜的通透性;④适当延长抗体作用及浸洗时间,既能使抗体与细胞内抗原充分作用,又能把未作用的多余抗体充分洗除。我们采用组织冷冻切片、超声波处理和单层细胞直接作用等方法,获得了一定的效果。后一种方法用于细胞表面抗原的定位效果较好(图版 II-4)。此法由于全部操作均在单层细胞上进行,当底物溶液与细胞作用后再将细胞刮下转入电镜常规操作。因此每个细胞都有与抗体和标记抗体作用的充分机会,而且细胞超微结构保存良好。为了显示细胞内病毒和病毒抗原,试用超声波处理的方法,也有一定效果,因此可试用于细胞内病毒抗原的定位工作。

免疫电镜(酶标记)技术仍存在一些问題,如操作标准化问题,一定程度的非特异性问题等。但与免疫铁蛋白技术和免疫荧光技术比较,有较多的优点,有一定的发展前途。

参 考 文 献

- [1] Kurstak, E. et al.: *ANN. NY. Acad. Sci.*, 254:369—384, 1975.
- [2] Benzamin, D. H.: *Appl. Microbiol.*, 28: 47—51, 1974.
- [3] Kurstak, E. et al.: *Viral Immunodiagnosis*, 3—125, 1974.
- [4] Leduc, E. H. et al.: *J. Gen. Virol.*, 4: 609, 1969.
- [5] Manfred, Wagner: *Research in Immunochem. Immunobiol.*, 3:222—227, 1973.
- [6] Andres, G. A. et al.: *Handbook of Exp. Immunol.*, 2:34, 23—39, 1973.
- [7] Avrameas, S.: *Immunochimistry*, 6:43—52, 1969.
- [8] Nakane, P. K.: *Ann. Ny. Acad. Sci.*, 254:203—211, 1975.
- [9] Melean, I., P. K. Nakane: *J. Histochem. Cytochem.*, 22:1077—1083, 1974.
- [10] Martinez-Hernandez, A. E. et al.: *Am. J. Path.*, 76(3):549—556, 1974.
- [11] Nakane, P. K., A. Kawaoi: *J. Histochem. Cytochem.*, 22:1084—1091, 1974.
- [12] Avrameas, S., Ternymck.: *Immunochem.*, 8(2):1175—1179, 1971.
- [13] Otto, H. et al.: *J. Immunol. Methods*, 3: 137—146, 1973.
- [14] Sternberger, L. A. et al.: *J. Histochem. Cytochem.*, 18(5):315—333, 1970.

IMMUNOPEROXIDASE TECHNIQUE AND ITS APPLICATION TO THE INTRACELLULAR LOCALIZATION OF PARAINFLUENZA VIRUS (SENDAI STRAIN)

Chen Liang-biao Wang Jian-nan Hong Tao

(Institute of Virology, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing)

The immunoperoxidase technique for the electron and light microscopic examination was used for the intracellular localization of the Sendai strain of parainfluenza virus. Frozen section preparations of lungs of Swiss mice and monolayer cell cultures of human embryonic kidneys infected with the virus served as materials for study. It was found that in the cytoplasmic membranes, the cytoplasm of the bronchiolar and

alveolar cells, as well as the budding virus were positively stained.

The following problems were discussed: the specificity of the results obtained; the problems of immunoperoxidase technique with regard to the fixation with the antigen, and the coupling of the enzyme with the immunoglobulin; as well as the difficulty of the penetration of the labelled immunoglobulin into the infected cells.