DOI:10.16016/j.1000-5404.1984.04.005

玻片固相抗体免疫荧光检查Q热立克次体方法的初步建立

万宗举

（微生物学教研室）

提　　要

本实验对用玻片固相抗体免疫荧光检查Q热立克次体进行了实验条件、特异性试验及感染蜱标本的初步研究。与常规免疫荧光技术比较，在检查Q热立克次体的标本中其非特异性荧光显著降低，而检查细胞外的抗原其敏感性也较好。

免疫荧光（IF）技术是Q热立克次体检验的常用方法之一。此法虽然敏感、快速，但在特异性方面往往受到含Q热立克次体的自然标本中非特异性荧光的干扰而影响判断[1]。在染色过程中使用结合小牛血清白蛋白的RB200对非特异性荧光有一定的抑制作用，但也影响了特异性荧光的亮度[2]。本实验参照有关玻片固相抗体的方法[3]，用免疫荧光技术对Q热立克次体的检出进行了实验条件及感染蜱标本检查的研究。其结果初步认为，此方法较Q热立克次体的免疫荧光法非特异性显著降低，用来检查细胞外抗原其敏感性也较好。

材料与方法

1. Q热立克次体纯化抗原： Q热立克次体Hengerling株（本室鸡胚与小鼠交替传代，Ⅰ相）感染鸡胚卵黄囊后制得，每ml含1 mg（1:50 $OD_{420}nm=0.066$）。

2. 细菌悬液： 大肠杆菌、葡萄球菌、枯草杆菌、布氏杆菌的24小时培养物生理盐水悬液，每ml约含9亿。

3. 感染组织悬液： 取Q热立克次体感染豚鼠的肝脏、脾脏（感染后7天），小白鼠脾脏（感染后7天），感染鸡胚卵黄囊（感染后10天）加9倍量（w/v）肉汤用超声波粉碎器（20000Hz，2分钟）粉碎后制成悬液。

4. 免疫血清： 豚鼠抗Q热立克次体血清系用Q热立克次体Ⅰ相Hengerling株感染的鸡胚卵黄囊，以肉汤配成1:10悬液，腹腔接种0.5ml于体重约400g的豚鼠，45天后采血并分离血清，Ⅱ相补体结合效价为1:512，Ⅰ相补体结合效价为1:256，免疫荧光间接法染色效价为1:32。

免抗Q热免疫球蛋白： 兔抗Q热血清，Ⅱ相补体结合效价1:1024，Ⅰ相补体结合效价1:512，按免疫球蛋白粗提法[4]提取免疫球蛋白（16mg/ml）。

猪抗豚鼠IgG荧光抗体： 猪抗豚鼠IgG血清，琼脂扩散效价1:64，提取IgG后用异硫氰酸基荧光黄按本室常规法标记[5]，染色效价1:16。

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

5．蜱体感染：非洲钝缘蜱 (Oraithodoros moubata)(本校寄生虫学教研室提供)，先以无菌生理盐水反复冲洗蜱体表面数次，每只蜱注射含Q热立克次体的卵黄囊悬液(10^{-2}) 5μl，饲养于25℃±1，相对湿度70—80%的环境中。

6．实验载玻片的制备：取内径5mm，外径7mm的橡皮胶管蘸取脂胶滋漆在洁净的玻片上印2排16孔，置160℃烤2小时，待冷却后丙酮浸泡30分钟，洗净后备用。

7．荧光显微镜：采用日本Olympus落射光显微镜AH-RFL型，配用BG12及OG515滤光片，光源为超高压汞银灯200w。

实验结果

一、实验条件的建立

1．抗体(IgG)固定于玻片的最佳条件，是在玻片上的各孔中加入相同量的抗体(0.002ml)，分别置不同条件下固相化后，再加入不同量的Q热立克次体纯化抗原，作用后用免疫荧光间接法染色，比较三种条件下固相抗体对抗原吸附量的影响。（见表1）认为“37℃烘干后火焰瞬间固定”较为理想。

表1　不同固相方法对检测Q热纯化抗原比较

抗体固相化条件	纯化抗原稀释度							
	1:10(0.2μg)	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280
37℃烘干	2+/3+*	2+/3+	2+/2+	2+/2+-+	2+/+	2+/+	2+/+-0	2+/+-0
37℃烘干后火焰瞬间固定	2+/3+	2+/3+	2+/3+	2+/3+	2+/3+-2+	2+/2+	2+/2+-+	2+/+
室温 (22—24℃)	2+/3+	2+/2+-3+	2+/2+-+	2+/+	2+/+	2+/+	2+/+-0	—

*：2+/3+表示“荧光亮度/Q热立克次体数量”，荧光亮度用“+、2+、3+”表示其强弱；Q热立克次体数量用“+、2+、3+”表示其多少，一个视野100个以上者记为“3+”，10—100个者记为“2+”，1—10个者记为“+”。以“2+/+”为阳性结果判别标准。下同。

2．确定固相抗体与抗原作用的最佳时间，是在玻片固相抗体上加入相同量的Q热立克次体纯化抗原(0.002ml含0.0025μg)，置37℃经过不同时间作用后，再用免疫荧光间接法染色检查对抗原的吸附效果(见表2)。以60分钟为固相抗体吸附抗原的时间，可对标本中抗原的吸附达最大程度，减少由于长时间作用而带来的非特异性吸附的影响。

表2　Q热固相抗体与抗原在37℃下作用时间对结果的影响

吸附时间	10分钟	30分钟	60分钟	120分钟
结果	2+/2+	2+/2+-3+	2+/3+	2+/3+

3．固相抗体浓度的选择是将兔抗Q热立克次体IgG倍比释稀后加入载玻片上各孔中，经固相化后于每孔中加入相同浓度的Q热立克次体纯化抗原0.002ml，37℃作用1小时后用免疫荧光间接法染色，结果如表3，选定抗体量最小，吸附抗原量较多的0.4μg为实验吸附抗体的用量，这样既可减少非特异性吸附，又可增加背景的反差而便于观察。

表3　固相抗体的浓度对检测结果的影响

每孔IgG含量	3.2μg	1.6μg	0.8μg	0.4μg	0.2μg	0.1μg	0.05μg	0.025μg
结果	2+/3+	2+/3+	2+/3+	2+/3+	2+/2+-3+	2+/2+	2+/+	+/+-0

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

4．固相抗体的存放时间：玻片固相抗体分别存放于三种不同的条件下，经过不同时间取出后测定其对抗原的吸附效果，表4表明，当时间延长到30天时，存放在－10℃时抗体的活性基本未变，其它两种条件下的抗体活性则显著下降。

表4　固相抗体在不同温度下的存放时间对检出Q热抗原的影响

	存放时间（天）				
	3	7	15	21	30
室温	2+/3+	2+/3+	2+/2+-3+	2+/2+-+	2+/2+-0
4℃	2+/3+	2+/3+	2+/2+-3+	2+/3+-+	2+/+
－10℃	2+/3+	2+/3+	2+/3+	2+/3+	2+/2+-3+

二、特异性试验

1．大肠杆菌、葡萄球菌、枯草杆菌、布氏杆菌的悬液分别加到Q热玻片固相抗体上，作用后用抗Q热立克次体抗体做间接免疫荧光检查，结果未见对葡萄球菌、枯草杆菌、布氏杆菌有吸附作用，但对大肠杆菌吸附（$2^+/2^+$）。

2．每ml含0.5mgQ热立克次体纯化抗原分别与大肠杆菌、葡萄球菌、枯草杆菌、布氏杆菌悬液以及与牛奶、血清（1:10）、肉汤作等量混合后加到Q热玻片固相抗体上。免疫荧光间接法染色结果除Q热立克次体与大肠杆菌的混合物中的两种抗原都有吸附外（Q热呈$2^+/3^+$，大肠杆菌呈$3^+/^+$），其余只对Q热克次体有吸附作用（$2^+/3^+$）。对Q热立克次体与牛奶、肉汤混合标本检查的特异性和敏感性均无影响，但与血清混合后，Q热立克次体的数量有所减少（$2^+/2^+$）。

3．各取感染Q热立克次体的豚鼠肝、豚鼠脾、小鼠脾以及鸡胚卵黄囊悬液分别加到玻片固相抗体上，同时用接种环取上述悬液分别涂片作为对照，免疫荧光间接法染色比较二者效果。结果豚鼠脾、小鼠脾悬液吸附后Q热立克次体的数量为“3^+”，豚鼠肝和鸡胚卵黄囊悬液吸附后Q热立克次体的数量为“2＋”。各对照中的数量与吸附后的数量基本相同。但前者的组织碎片和卵黄囊引起的非特异性荧光很强，而后者则无非特异性荧光且背景较暗容易观察。（见照片1、2）

三、玻片固相抗体对感染蜱标本的检查　取感染Q热立克次体的非洲钝缘蜱，按不同时间以5只蜱为一组，用剪肢法取每只蜱的血淋巴液分别置普通玻片上及玻片固相抗体上，前者干燥固定，后者吸附后用免疫荧光间接法染色（结果见表5）。比较二者对Q热立克次体的检出，看不出玻片固相抗体法的优越性。考虑到影响吸附的因素可能是蜱血淋巴液的粘度较大，再加之对细胞内的抗原不能吸附，在第三天时玻片固相抗体法所检查的蜱数全部为阴性就可能是此时的Q热立克次体全部进入细胞所致。为此，从第七天开始，除了检查蜱的血淋巴以外，再把整个蜱放在0.2ml生理盐水中研磨，分别取上清液用常规免疫荧光染色和玻片固相抗体吸附后染色。从表6可以看出，从第七天以后把整个蜱磨碎后分别检查，结果全部为阳性。常规法和玻片固相抗体法所检出的Q热立克次体数量无明显差异，但后者基本无非特异性荧光。

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表5 Q热立克次体感染蜱后血淋巴免疫荧光检测

感染天数	常规免疫荧光检查		玻片固相抗体免疫荧光检查	
	阳性数/检查蜱数	结果	阳性数/检查蜱数	结果
1	2/5	2+/+	5/5	2+/+
3	3/5	2+/+	0/5	—
7	5/5	2+/2+-+	5/5	2+/+
9	5/5	2+/2+	5/5	2+/2+-+
11	5/5	2+/2+-3+	5/5	2+/2+-+
15	5/5	2+/2+-3+	5/5	2+/2+-+
21	5/5	2+/2+-3+	5/5	2+/2+-+
30	5/5	2+/2+-3+	5/5	2+/2+-+

表6 Q热立克次体感染蜱悬液两种方法检测的比较

感染天数	常规免疫荧光检查		玻片固相抗体免疫荧光检查	
	阳性数/检查蜱数	结果	阳性数/检查蜱数	结果
7	5/5	2+/2+-3+/3+*	5/5	2+/3+/-
11	5/5	2+/2+-3+/3+	5/5	2+/3+/-
15	5/5	2+/2+-3+/3+	5/5	2+/3+/-
21	5/5	2+/2+-3+/3+	5/5	2+/3+/-
30	5/5	2+/2+-3+/3+	5/5	2+/3+/-

* “2+/2+-3+/3+”代表“荧光亮度/立克次体数量/非特异性荧光强度

讨 论

本实验对玻片固相抗体免疫荧光检查Q热立克次体进行了实验条件、特异性试验及感染蜱标本的初步研究。考虑到在现场调查Q热流行情况的方便，我们尽可能选用简便、不需复杂仪器测试的条件。实验条件中固相抗体的浓度不是绝对的，不同的抗体，其效价不同，最适浓度的抗体量也各不相同。用免疫荧光间接法染色时，玻片固相抗体和染色中间抗体不能用同种动物来源，否则荧光抗体对二者都有作用从而增加背景的亮度不利于观察。

在特异性试验中，玻片固相抗体对大肠杆菌的吸附是非需要的特异性结合，通过凝集试验证实了这一点。玻片固相抗体对Q热与大肠杆菌混合物中的大肠杆菌吸附量减少可能是竞争性抑制所致。1:10的血清和蜱血淋巴这些高浓度的蛋白液和粘度较大的液体妨碍了抗原与抗体的接触从而影响了玻片固相抗体的吸附效果。把血清稀释成1:100就可消除这种影响，把蜱置生理盐水中磨碎，既减少了粘度又可把细胞内的抗原释放出来，结果玻片固相抗体对Q热立克次体吸附的数量较之常规法多，且基本无非特异性荧光。这说明玻片固相抗体免疫荧光技术对污染杂质较多容易呈现非特异性荧光标本的检测具有明显的优越性。

玻片固相抗体免疫荧光技术是融固相免疫吸附技术和免疫荧光技术为一体，较之经典的固相免疫吸附技术具有操作简便、流程短、快速和不致在活化、洗脱过程中使免疫活性物质失活等优点。用固相的已知抗体检

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

查未知抗原不失为一种良好的方法。在检查Q热立克次体的实验研究中较之常规免疫荧光染色所出现的非特异性显著降低，重复性也较好，而敏感性对检查细胞外的抗原不受影响，值得今后在现场标本中进一步应用并加以完善。

（本文承俞树荣、张邦燮副教授审阅并提出宝贵意见，谨此致谢）

参 考 文 献

1. 俞树荣等：流行病学杂志 1979；(3)：195—198

2. 俞树荣等：中华微生物学和免疫学杂志 1983；3(5)：315

3. 黄 策：军事医学科学院院刊 1983；24(2)：177—182

4. Kawamura A：Jr Fluorescent Antibody Techniques and Applications. Second Edition 1977；p24—27

5. 第三军医大学：细菌武器的医学防护 1977

Preliminary Report on Immunofluorescent Technique with Slide Solid Phase Antibody for Detection of Coxiella Burnetii

Wan Zongju

(Department of Microbiology, The Third Military Medical College)

Immunofluorescent technique with slide solid phase antiboby was used for the detection of Coxiella burnetii. The experimental conditions and the specificity of this new technique were compared with those of the conventional immunofluorescent technique. Both techniques were used to examine the specimens of infected Ornithodoros moubada and the results were also compared. It was found that when the new technique was used to detect C. burnetii, the non-specific fraction of the fluorescence in the specimen was significantly decreased and the sensitivity to the extracellular antigen was not affected.

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net