DOI:10.16016/j.1000-5404.1983.02.007

荧光标记A蛋白检测IgG抗体的研究

张邦燮 李士珍* 罗中华** 李水明

葡萄球菌A蛋白（SPA）对多种哺乳动物免疫球蛋白G（IgG）有很强的亲和性。SPA可同荧光色素、放射性同位素或酶等结合成各种IgG试剂。在检出IgG抗体中使用标记SPA和标记抗IgG（抗体）这两类IgG指示性试剂，各有优点和缺点。一般认为前者敏感性略差，但是，非特异性反应较轻。[2,3,4,5,6,8,9,11,12]

Ghetie（1974）[7]首先报导应用异硫氰酸基荧光黄（FITC）标记SPA（F-SPA）于淋巴细胞表面IgG受体的研究。Biberfeld（1975）[1]和Enzmann（1979）[5]报导用F-SPA鉴定细胞膜表面抗原和鉴定宽膜病毒（Togavirus）。由于F-SPA与IgG的反应不是免疫荧光法中的抗原-抗体反应，用F SPA检测抗体IgG可以避免一些难于消除的非特异性反应。因此，此法在检测血清中抗体IgG的问题是应该予以重视的。本文为了建立F-SPA检测血清中IgG抗体的试验方法，通过实验探讨了各步骤的反应条件，并试用于人和小白鼠、豚鼠两种动物的血清标本，包括抗核抗体、疟疾抗体、Q热抗体和抗伤寒沙门氏菌等抗体IgG的检测。

材料与方法

1．实验动物免疫血清

豚鼠抗Q热恢复期免疫血清：Q热立克次体I相Henzerling株感染的鸡胚卵黄囊，用肉浸汤配成1:100悬液，腹腔接种0.5ml于体重约150g的豚鼠，45天后采血并分离血清。

小白鼠抗伤寒沙门氏菌免疫血清：本室保存的伤寒沙门氏菌在肉汤琼脂平板上培养24小时，用生理盐水洗下菌苔并配成约9亿/ml悬液，腹腔接种0.5ml于约20g体重的小白鼠，于第14天采血并分离血清。

2．临床病人血清

疟疾病人血清：4份疟疾病人血清为本校寄生虫学教研室惠赠，该血清系1981年8月采自海南岛疟疾疫区患者。

全身性红斑狼疮患者血清：6份血清为本校附属一院皮肤科惠赠，曾经该科结合临床表现和免疫荧光抗核抗体试验证实。

Q热患者血清：1981年采自新疆阿克苏第二人民医院，补体结合效价皆在1:32以上。

3．抗原基底片制备

疟原虫血膜片：上海寄生虫研究所提供，系经体外培养的成熟期原虫。

Q热立克次体感染脾印片：取Henzerling株I相Q热立克次体感染的鸡胚卵黄囊，配成

* 成都军区军医学校

** 昆明军区军医学校

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1∶100肉浸汤悬液，经腹腔接种0.5ml于约20g体重的小白鼠。于第5天解剖取脾制成印片，经丙酮固定10分钟，4℃保存备用。

肝印片：剪断小白鼠腋窝血管，待失血死亡后立即解剖取出肝脏，切开并以断面印片，晾干后以1∶1乙醇-丙酮固定15分钟，4℃保存备用。

4．荧光显微镜检查 荧光抗体染色方法及镜检按本室常规方法[14]。本文采用Olympus落射光荧光显微镜AH-RFL型。滤光片用BG12配合OG515。

5．葡萄球菌A蛋白及标记荧光色素

制备和提纯葡萄球菌A蛋白基本上按潘锄云（1981）法[15]，但菌种采用金黄色葡萄球菌“1800”株。标记异硫氰酸基荧光黄按Ghetie（1974）法[7]。

6．荧光标记A蛋白检测抗体IgG试验法 在抗原基底片上加一滴待检血清或免疫血清稀释液，置湿合中于37℃作用160分钟，在含TritonX100 0.05%的PBS（T-PBS）中荡洗10分钟，再加一滴pH6.5～7.2的F-SPA稀释液，于37℃～61℃作用10分钟，用T-PBS荡洗3分钟后镜检。

实验结果

1．荧光标记A蛋白在免疫血清处理过的抗原基底上作用时间的影响

在Q热立克次体感染的脾印片上，用豚鼠抗Q热免疫血清（1∶8）于37℃作用30分钟，用T-PBS荡洗15分钟，再用荧光标记A蛋白液（1∶8）在各片上于37℃作用不同时间（3～30分钟），用T-PBS荡洗3分钟后镜检；此外，按上述方法在伤寒沙门氏菌涂片上，用小白鼠抗伤寒菌免疫血清（1∶8）处理后，用荧光标记A蛋白染色及镜检。

实验结果表明：在3～30分钟染色时间内皆可染出特异性荧光，且其亮度随F-SPA作用时间的延长而增强；但是，以上两种实验皆在12分钟以后出现非特异性荧光，并且也随其作用时间而显著增强。因此，在以下的实验中我们选择10分钟作为标记A蛋白染色的最佳时间。

2．中间层免疫血清对抗原基底作用时间的影响

为了测定F-SPA的工作浓度和挑选合适的中间层免疫血清稀释度，用pH7.2 PBS稀释F-SPA 1∶2～1∶16四种浓度，稀释豚鼠抗Q热免疫血清1∶2～1∶64六种浓度作合字滴定。实验结果（表1）表明F-SPA与免疫血清的终点虽各自为1∶16，但是，免疫血清1∶16配合F-SPA 1∶8是其共同的终点。因此在观察中间层免疫血清对抗原基底作用时间的影响实验中，F-SPA与免疫血清皆用1∶8稀释液。

表1 F-SPA与豚鼠抗Q热免疫血清合字滴定

F-SPA	豚鼠抗Q热免疫血清					
	1∶2	1∶4	1∶8	1∶16	1∶32	1∶61
1∶2	+	+	+	+	−	−
1∶4	+	+	+	+		
1∶8	+	+	+	+	−	−
1∶16	+	−	−			−

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

在Q热立克次体抗原基底片上，加1滴1:8豚鼠抗Q热免疫血清，置37℃作用时间5～160分钟，各片分别用T-PBS荡洗10分钟，再各加1滴1:8 F-SPA，置37℃作用10分钟，用T-PBS荡洗3分钟后镜检。猪抗豚鼠IgG荧光抗体（1:8）作为对照。实验结果（表2）表明：

表2　免疫血清的作用时间对F-SPA法染色的影响

中间层免疫血清的作用时间（分）		特异性荧光（荧光亮度/膨胀度/立克次体数量）			非特异性荧光（背景荧光/对比度/大片荧光物）		
F-SPA	5	+	−	++	亮	差	−
	15	++	++	+++	暗	强	−
	30	++	++	+++	暗	强	−
	60	++	++	+++	亮	差	大部分
	120	+++	+++	+++	暗	强	−
	160	+++	+++	+++	暗	强	−
荧光抗体	5	++	+	+++	亮	差	−
	15	+++	+++	+++	暗	强	−
	30	+++	+++	+++	暗	强	−
	60	+++	+++	+++	暗	强	−
	120	+++	+++	+++	暗	强	−
	160	+++	+++	+++	暗	强	−

在F-SPA法染色过程中，特异性荧光亮度和立克次体的膨胀度皆随中间层免疫血清与抗原基底的作用时间延长而显著增强。5分钟未见明显的膨胀，特异性荧光的亮度也很差；15分钟到60分钟则有中等度的膨胀，特异性荧光也较亮；作用120分钟已有较好的膨胀度和较强的特异性荧光；160分钟可达最大的膨胀度和明亮耀眼的特异性荧光。在非特异性荧光方面没有发生随其作用时间而增强的变化。在平行实验的免疫荧光法中，中间层免疫血清作用15分钟已能达到最大的膨胀度和明亮耀眼的特异性荧光，再延长时间也未发现显著的变化；15～160分钟的实验中都有暗背景荧光和强对比度，特别是在免疫荧光法中未发现过能遮盖立克次体特异性荧光的大片非特异性荧光物质，而在F-SPA法中，曾在个别标本片上出现这种物质，从而影响立克次体特异性荧光与其背景的对比度。

3. F-SPA染色温度的影响

在Q热立克次体抗原基底片上加1滴（1:8）豚鼠抗Q热免疫血清，于37℃作用160分钟，用T-PBS荡洗10分钟，再各加1滴1:8 F-SPA或1:8猪抗豚鼠IgG荧光抗体，于不同温度染色10分钟，最后用T-PBS荡洗3分钟并镜检。实验结果（表3）表明在F-SPA法中染色温

表3　在F-SPA法和免疫荧光法中染色温度的影响

染色温度		0℃	9℃	20℃	30℃	37℃	44℃	57℃	61℃
F-SPA法	特异性荧光（亮度/膨胀度）	+/+	+/+	+/+	++/++	+++/++	+++/+++	+++/+++	+++/+++
	非特异性荧光（背景荧光/对比度）	暗/一般	暗/一般	暗/一般	暗/强	暗/强	暗/强	暗/强	暗/强
免疫荧光法	特异性荧光（亮度/膨胀度）	+++/+++	+++/+++	+++/+++	+++/+++	+++/+++	+++/+++	+++/+++	−/−
	非特异性荧光（背景荧光/对比度）	暗/强	暗/强	暗/强	暗/强	暗/强	暗/强	暗/强	暗/无

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

度有显著的影响。0～20℃特异性荧光弱、膨胀度差、对比度不突出；30℃特异性荧光亮度、膨胀度及对比度皆略强；37～51℃特异性荧光亮度、膨胀度及对比度皆显著增强；61℃达到最强的程度。在免疫荧光法中：0～51℃的效果相似，特异性荧光亮度、膨胀度及对比度都很强；但是，61℃荧光抗体已失去染色作用。在这两种方法中背景荧光都极弱。比较起来，F-SPA法的背景荧光更暗，在有些视野中，标本中的组织细胞几乎不可见。

4. F-SPA稀释液的pH对染色效果的影响

实验方法按“荧光标记A蛋白检测抗体IgG试验法”，唯有F-SPA用pH5.9～8.0 PBS稀释，并且F-SPA染色时间分别为5～30分钟。实验结果(表4a及4b) 表明F-SPA稀释液的pH对特异性和非特异性荧光皆有显著的影响：pH5.9～7.2可染出较好的膨胀度及明亮的特异性荧光；pH7.6～8.0未染出满意的膨胀度和明亮的特异性荧光，即使延长染色时间亦无改善；pH5.9～7.2非特异性荧光很弱，未发生成片的非特异性荧光物质，从而对比度较强，但在染色30分钟的标本上有少数视野出现小片的荧光物质，其中特异性荧光的对比度极差；pH7.6～8.0多数标本出现较多的或大片的非特异性荧光物质，并随染色时间的延长而有增多的趋势。

表4a　F-SPA稀释液的pH对特异性荧光的影响

染色时间(分)	F-SPA稀释液的pH				
	5.9	6.5	7.2	7.6	8.0
5	*++/+++/+++	++/+++/+++	++/+/+++	++/++/+++	+/+/+
10	++/+++/+++	++/+++/+++	+++/+++/+++	+/+/+	+/++/+++
20	++/+++/+++	++/+++/+++	+++/++/+++	+/-/+	+/-/++
30	++/+++/+++	++/+++/+++	+++/+++/+++	++/++/++	++/+/++

● 特异性荧光亮度/膨胀度/立克次体数量

表4b　F-SPA稀释液的pH对非特异性荧光的影响

染色时间(分)	F-SPA稀释液的pH				
	5.9	6.5	7.2	7.6	8.0
5	●●暗/强/无	暗/一般/无	暗/一般/无	暗/强/无	暗/差/无
10	暗/弱/无	暗/一般/无	暗/强/无	亮/弱/有	亮/弱/有
20	暗/强/无	暗/强/无	暗/强/无	暗/差/无	暗/差/有
30	暗/一般/小部分	暗/强/小部分	亮/强/小部分	亮/差/大部分	暗/一般/大部分

●● 非特异性背景荧光/对比度/成片的荧光物质

5. F-SPA法及免疫荧光法对抗核抗体的测定

在小白鼠肝印片上，分别滴加6份全身性红斑狼疮患者血清的各稀释液和6份健康人血清（阴性对照）1:8稀释液，同时平行地用F-SPA法和免疫荧光法测定抗核抗体的效价。测定结果（表5）表明：这两种方法测定的结果基本相同，唯其中有2份患者血清的免疫荧光效价高1～2管。全部阴性对照血清在两方法中皆为阴性。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表5　F-SPA及免疫荧光法对抗核抗体的测定结果

	荧光标记A蛋白法							免疫荧光法						
	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512
樊××	+	+	+	−	−	−	−	+	+	+	−	−	−	−
丁××	+	+	+	−	−	−	−	+	+	+	+	+	−	−
NO.213	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
邱　×	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4份健康人血清	−	0	0	0	0	0	0	−	0	0	0	0	0	0
	1:10	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:10	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280
罗××	+	+	+	−	−	−	−	+	+	+	+	−	−	−
杨××	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2份健康人血清	−	0	0	0	0	0	0	−	0	0	0	0	0	0

注：+为阳性反应，−为阴性反应，0未检查

6．F-SPA及免疫荧光法对疟疾患者血清抗体的测定

将疟原虫血膜片浸泡于pH7.2 PBS中30分钟，再用pH7.2 PBS荡洗10分钟，晾干备用。在此抗原基底上用F-SPA及免疫荧光法检测4份疟疾患者血清，设1份健康人血清作为阴性对照。测定结果（表6）表明这两种方法测定的效价相同。免疫荧光法染出的原虫虽略比F-SPA法亮些，但在健康人血清的试验中有弱荧光反应。F-SPA法的背景荧光极弱，甚至在有些视野中完全无非特异性的背景荧光，从而其对比度较强。在健康人血清处理的标本上常无背景荧光，原虫也不可见。

表6　F-SPA及免疫荧光法对疟疾抗体的测定结果

	荧光标记A蛋白法				免疫荧光法			
	1:10	1:40	1:160	1:320	1:10	1:40	1:160	1:320
李××	*卌	卌	卄	卄	卌	卌	卄	卄
贾××	卌	卌	卄	+	卌	卌	卄	卄
王××	卌	卌	卄	+	卌	卌	卌	卄
吴××	卌	卌	卄	+	卌	卌	卄	+
健康人血清	±	±	−	−	+	+	±	±

注* +～卌为疟原虫特异性荧光亮度。在以上两法中卌判为阳性反应，卄～±皆判为阴性反应

7．F-SPA和免疫荧光法对Q热患者血清抗体的测定

在Q热实验感染小白鼠脾印片上，用F-SPA和免疫荧光法检测Q热患者血清10份，以PBS和健康人血清（1:32）10份作为阴性对照。测定结果（表7）表明10例患者血清中有5例用这两种方法测定的效价相同；1例血清F-SPA法高1管，其余4例血清免疫荧光法测定的效价比F-SPA法高1～2管。F-SPA法的背景荧光极轻微，有些视野中脾组织几乎不可见，从而使立克次体特异性荧光的对比度比免疫荧光法强。

8．小白鼠抗伤寒沙门氏菌免疫血清的抗体测定

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表7　F-SPA及免疫荧光法对Q热患者血清抗体的测定

	荧光标记A蛋白法						免疫荧光法					
	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	PBS对照	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	PBS对照
血清号：2	*+	+	+	+	−	−	+	+	+	+	+	−
5	+	+	+	+	−	−	+	+	+	+	−	−
17	+	+	+	−	−	−	+	+	+	−	−	−
18	+	+	+	−	−	−	+	+	+	−	−	−
19	+	+	−	−	−	−	+	+	+	−	−	−
22	+	+	+	−	−	−	+	+	−	−	−	−
23	+	+	+	+	−	−	+	+	+	+	−	−
25	+	+	+	−	−	−	+	+	+	+	−	−
26	+	+	−	−	−	−	+	+	+	−	−	−
27	+	+	+	+	−	−	+	+	+	+	−	−
10份健康人血清	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	-

注* ＋为免疫荧光法或F-SPA法阳性反应

在伤寒沙门氏菌涂片上（火焰固定）用F-SPA法测定一份小白鼠抗伤寒沙门氏菌免疫血清的抗体效价。结果表明其抗体效价为1:32。细菌的特异性荧光明亮耀眼，膨胀度与对比度皆强，背景荧光极轻微。随样品血清的稀释特异性荧光有减弱的趋势。正常小白鼠血清为阴性反应。

讨　论

本文实验表明F-SPA可代替免疫荧光间接法中的F-抗IgG（抗体），用于检测免疫血清中的抗体。在荧光显微镜下观察，特异性荧光为明亮的果绿色荧光，也可达到耀眼的亮度，其背景荧光轻微，甚至有些视野无任何非特异性荧光。此现象与Ghetie[7]（1974）、Biberfeld[1]（1975）、Enzmann[5]（1979）和Haaijman[9]（1978）所报导的情况一致。

F-SPA法与免疫荧光法相比较，Biberfeld[1]（1975）认为后者敏感性强4～5倍；Haaijman[9]（1978）认为强30倍；在我们的实验中，用F-SPA检测20例标本血清，其中抗体效价相同者13例，F-SPA法测定的效价比免疫荧光法低2～4倍者6例，只有1例高于免疫荧光法测定的效价2倍。Bystricka[3]（1980）认为抗IgG(抗体）与IgG的轻链和重链上的各个位点都可反应，而SPA只和IgG的CH_2与CH_3交界处的一个位点相结合，所以SPA对IgG-Fc的亲和性虽然比抗IgG（抗体）对IgG的亲和性强，标记SPA检测的抗体效价仍然偏低。

由于在荧光显微镜下判定阳性的重要指标之一是根据特异性荧光的强度，所以增强特异性荧光和降低背景非特异性荧光皆可提高F-SPA法的敏感性。我们的实验表明延长免疫血清与抗原基底的作用时间，可使抗原的膨胀度增大，从而增强了特异性荧光；F-SPA反应保持在pH7.2以下和提高其染色温度皆可增强特异性荧光。T-PBS荡洗3分钟和F-SPA染色时间不超过10分钟都可明显降低背景的非特异性荧光。

葡萄球菌A蛋白可与多种哺乳动物IgG反应，如猪、人、豚鼠、小白鼠、狗及猴等。因此标记SPA可作为广谱的IgG试剂。我们检测了人和豚鼠、小白鼠两种动物的血清标本，结

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

果表明F-SPA在检测血清抗体IgG上可用作广谱的IgG试剂。

小　　结

作为检测抗体IgG的荧光标记A蛋白法，基本上与免疫荧光法相似，但也有其特点。为了获得强特异性荧光而非特异性反应极轻微的效果，本文实验表明其染色方法与免疫荧光法不同的条件如下：免疫血清与抗原基底的作用时间为120～160分钟，F-SPA稀释液pH5.9～7.2，F-SPA染色温度37°～61℃最好。F-SPA染色时间以10分钟为宜。本文采用所建立的试验方法，检测临床患者血清样品20例，包括6例抗核抗体、4例疟疾和10例Q热病人血清。此法与免疫荧光法检测的结果作了比较，二者抗体效价相同的13例（13/20），F-SPA法低于免疫荧光法的6例（6/20），只有1例（1/20）F-SPA法测定的抗体效价高于免疫荧光法。

用荧光标记A蛋白法检测了人和小白鼠、豚鼠两种动物的血清标本，包括自身抗体、原虫、立克次体和细菌感染或免疫的血清抗体IgG。

参 考 文 献

（1）Biberfeld P：J Imm Meth 6:249, 1975

（2）Brown JP：J Imm Meth 15:57, 1977

（3）Bystricka M：Acta Virol 24:265, 1980

（4）Crowther JR：J Imm Meth 34:261, 1980

（5）Enzmann PJ：Acta Virol 23:329, 1979

（6）Falini B：J Imm Meth 39:111, 1980

（7）Ghetie V：Immunology 26:1081, 1974

（8）Goding GW：J Imm Meth 20：241, 1978

（9）Haaijman fJ：Immunofluorescence & Related Staining Techniques pp11—29 Knapp W, 1978

（10）Muller G：J Imm Meth 37:185, 1980

（11）Polakova K：Acta Virol 23:107, 1979

（12）张邦燮：国外医学：临床生化学与检验学分册4：16，1981

（13）沈森昌：荧光素标记葡萄球菌（799）A蛋白在检测抗核抗体中的初步应用。出席大连葡萄球菌A蛋白学术会议资料，1981

（14）张邦燮等：鼻咽癌免疫荧光血清学诊断的研究。本校向国庆卅周年献礼资料选编p18，1979

（15）潘锄云等：亲和层析法提纯葡萄球菌A蛋白。出席大连葡萄球菌A蛋白学术会议资料，1981

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net