(印刷中)。

[7] 林斯骏等, 1981, 细胞生物学杂志, 2: 33-36。

[8] Pharmacia Laboratory, PhastSystem dev-

elopment technique file No. 200, 1989.

[9] 林斯骏和周明华, 1990, 解剖学报, 21: 291-296。

胶体金免疫电子显微技术用于病毒抗原的检测

陈保平

(湖北医学院医学基础实验中心电镜室)

陈敏诗

(湖北医学院病毒学研究所细胞生物室)

为了特异地显示抗原-抗体复合物在细胞超微结构内的定位, Singer(1959)首先提出了用电子致密物质铁蛋白标记抗体的方法, 并得到了广泛的运用。但由于经铁蛋白标记的抗原-抗体复合物的颗粒直径过大, 以致达不到抗原在超微结构上的准确定位。

自1983年以来, 一种以胶体金作为标记的免疫细胞化学方法得到普遍的应用, 并在应用中发展成为一种新的免疫电子显微镜技术。它的特点是根据需要制备出各种大小不同的金颗粒。亦可用两种大小不同的金颗粒标记两种不同的抗体, 用以在同一标本上显示两种不同的抗原。这种方法曾广泛运用于细胞内某些生物活性物质的定位, 如胰腺腺泡细胞内各种分泌蛋白的定位, 肝细胞线粒体内结构蛋白的定位等。但是很少应用于病毒抗原的检测。此外为了抗原的良好保存及金颗粒易于进入到细胞内部, 在国外一般均采用冰冻超薄切片。在国内目前由于超薄冰冻切片机的数量少, 使此方法的推广应用受到一定的限制。本实验参照有关文献^[1-6], 将超薄冰冻切片改为低温包埋的常规超薄切片, 以II型单纯疱疹病毒(HSV-2)为例, 进行了显示病毒抗原的实验, 现将结果报道如下:

材料与方 法

一、金探针的制备

1. 胶体金的制备

本实验根据鞣酸-柠檬酸钠还原法^[1], 并采用10 nm大小的金颗粒。

A液: 1%HAuCl ₄	1 ml
双蒸水	79 ml
B液: 1%柠檬酸钠	4 ml
1%鞣酸	0.1 ml
0.1 mol/L K ₂ CO ₃	0.025 ml
双蒸水加至 20 ml	

将A、B两液分别加热至60℃, 在搅拌下将B液加入A液之内, 并继续加热至沸腾1分钟, 此时液体颜色由蓝变红, 最后出现紫红色, 表明胶体金颗粒已经形成。使用前将其pH值用0.1 mol/L的K₂CO₃调至6.0。

2. A蛋白-金颗粒复合物(pAg)的制备

实验证明用以稳定1 ml胶体金所需A蛋白量大约为5 μg, 所以将255 μg(溶于0.3 ml的双蒸水中)的A蛋白加入到50 ml的胶体金内, 5分钟后再加5%聚乙二醇(PEG)(Carbowax 20 mol/L)0.5 ml, 以保证金颗粒的最大稳定性。然后以60,000 rpm离心45分钟。将红色疏松之沉淀物用PBS混悬至原体积的1%, 并4℃储存, 备用。

二、病毒样本的制备

以常规组织培养方法(Eagle培养液, 内含小牛血清10%, 青、链霉素各100单位/ml)培养原代兔肾细胞(BRK)。待单层形成时, 接种HSV-2(333)株, 24小时后立即收集细胞, 同时收集未感染细胞作为对照。

三、兔抗HSV-2血清系由湖北医学院病毒所细胞生物室提供, 免疫荧光效价为1:500。

四、电镜标本之制备

将培养细胞的培养液吸去, 用PBS将培养瓶洗刷多次, 然后用橡皮刮子将附壁的细胞轻轻刮下, 连带少量的PBS, 低速(500 rpm)离心15分钟, 弃上清液, 加1%戊二醛于离心管内, 固定1小时。为避免

脱水及包埋温度对抗原特异性及免疫标记的不良影响, 采用以树脂(Lowicryl K₄M)作包埋剂的低温包埋法^[7], 即 1. 脱水: 30%酒精(0℃, 30分钟); 50%酒精(-20℃, 1小时); 70%、80%、95%及100%酒精(-25℃, 各1小时)。2. 浸透及包埋均在-25℃进行, 即经混合剂100%酒精:树脂(1:1)1小时, 100%酒精:树脂(1:2)1小时, 再经纯树脂1小时。转入纯树脂停留过夜。随后将细胞团块转入无水胶囊内, 加入-25℃预冷的纯树脂, 去气泡, 将其置于装有紫外线灯的小箱内, 于-30℃冷柜内聚合三天左右, 随后进行超薄切片。将载有切片的镍网面向下, 漂浮于有关的液滴上, 进行免疫标记: 1. 1%卵蛋白(溶于PBS)15分钟, 为的是减少切片上的非特异性吸附; 2. HSV-2抗血清(1:30稀释)室温内, 1小时; 3. PBS连续漂洗10分钟×3; 4. 1%卵蛋白15分钟; 5. pAg(1:200稀释)室温30分钟; 6. PBS漂洗10分钟×3; 7. 双蒸水漂洗5分钟×3; 8. 1%锇酸5分钟; 9. PBS漂洗5分钟×3; 10. 双蒸水漂洗5分钟×3; 11. 醋酸双氧铀染色5分钟; 12. 枸橼酸铅染色3分钟; 空气中待干, 透射电镜进行观察。

五、对照样本的制备

1. 不接种HSV-2的细胞, 2. 用PBS代替兔抗HSV-2血清, 3. 以PBS代替pAg, 4. 以胶体金溶液代替pAg。

结果与讨论

阳性结果的判断 在电镜下可见大小一致的黑色颗粒, 将实验样本的观察结果与对照比较, 以确定非特异性的颗粒(背景), 不将其计入阳性结果。图1系HSV-2感染24小时的细胞切片, 以PBS代替pAg进行免疫染色, 未见金颗粒的出现。经其它方法做的对照样本亦全无金颗粒的沉淀。在此图上, 有许多成熟的病毒粒子在胞浆的内质网内, 许多的核衣壳在细胞核内。图2系病毒感染24小时的细胞切片, 经pAg标记染色, 从中可以看出大量的成熟病毒粒子分布在胞浆内, 许多细微的金颗粒定位于HSV-2的囊膜及衣壳上。在胞浆其他部位看不到金颗粒的吸附。用本实验的方法虽然膜的结构保存得不十分理想, 但对病毒的

抗原定位不受影响。图3系病毒感染细胞的胞核部分, 金颗粒定位于核衣壳及“毒浆”所在区域。“毒浆”被认为是HSV-2核衣壳装配的场所^[8], 可分定形成分, 类似衣壳的前身, 及不定形成分, 包括致密的团块。此一结果提示运用本实验方法对HSV-2的形态发育的深入研究可能会有帮助。

摘 要

本文报道了一种改良的胶体金免疫电镜技术: 以低温包埋, 常规超薄切片代替超薄冰冻切片, 成功地显示了细胞内的病毒抗原定位。

图 版 说 明

1. 感染病毒(HSV-2)24小时的兔肾细胞, 胞浆内质网内见大量成熟病毒颗粒; 核内可见大量的核衣壳。以PBS代替pAg进行的胶体免疫技术染色, 未见金颗粒。透射电镜照片, ×20,000
2. 感染病毒(HSV-2)24小时的兔肾细胞, 经胶体金免疫电镜技术染色。在胞浆内有大量的成熟病毒颗粒, 可见大量的金颗粒附着在病毒的囊膜及衣壳上。细胞的膜系统亦有少量的金颗粒吸附。透射电镜照片, ×20,000
3. 材料同图2, 系细胞核的一部分, 可见金颗粒附着在核衣壳上及“毒浆”的定形成分—核衣壳的前身(↓)及不定形成分, 包括致密体上(△)。透射电镜照片, ×40,000

参 考 文 献

- [1] Horisberger M, Rosset J, 1977, *J. Histochem. Cytochem.*, 25:295.
- [2] Geuze H. J, et al., 1981, *J. Cell Biol.*, 89:653.
- [3] Slot J. W, Geuze H. J, 1981, *J. Cell Biol.*, 90:533.
- [4] Bendagan M, 1982, *J. Histochem. Cytochem.*, 30:81.
- [5] Horisberger M, Clerc M. F, 1985, *Histochem.*, 82:219.
- [6] Solt J. W, Geuze H. J, 1985, *Eur. J. Cell Biol.*, 38:87.
- [7] Armbruster B. L, Et al., 1983, *J. Histochem. Cytochem.*, 31:1380.
- [8] 翟中和, 丁明孝, 1980, 实验生物学报, 4, 485.