



使用抗补体免疫荧光方法检测 EB 病毒决定的细胞核抗原

张容华 姚曾序

(中国科学院 上海细胞生物学研究所)

在 EB 病毒感染的细胞中存在着这种病毒所决定的核抗原(EB Virus-determined nuclear antigen, 简称 EBNA), 这种抗原的许多生物学特性与 SV₄₀ 病毒的 T 抗原非常相似。虽然由 EB 病毒所引起的转化细胞中一般都有这种蛋白合成, 但是由于含量甚微, 目前只能用灵敏度较高的抗补体 (C₃) 免疫荧光法才能在细胞内作定位观察^[1]。

建立抗人 C₃ 免疫荧光法首先需要制备出较纯的, 效价较高的抗 C₃ 血清。利用 TEAE——纤维素和羟基磷灰石层析柱等分离和纯化步骤, 可以获得较纯的 C₃ 作为抗原, 不过过程似嫌繁琐, 不适合一般实验室使用, 所以目前仍推荐 Mardiney 和 Müller-Eberhard^[2] 所建立的用酵母多糖特异的吸附新鲜血清中的 C₃ 所形成的复合物, 作为免疫原^[3], 并着重指出要大剂量一次免疫, 三星期后取血样检测, 避免因时间延长而又出现其他抗体成份。可见用这种复合物制备适于标记荧光素的 C₃ 抗血清, 似仍存在技术上的问题。我们用上述方法也发现抗体不纯的情况。酵母多糖—C₃ 复合物虽经多次用等渗巴比妥缓冲液洗涤, 但与抗正常人新鲜混合血清的抗血清作免疫电泳检测时, 除 β 区域有一条沉淀线外, 在 γ 区域也出现较深的沉淀线, 表明复合物仍较牢固地附着 γ 球蛋白。经人 γ 球蛋白干粉吸收之后, 可以得到较纯的人 C₃ 抗血清, 可惜效价较低, 不适合荧光素标记之用。

最近, 我们用菊糖代替酵母多糖获得在纯度和效价方面都较满意的人 C₃ 抗血清。经荧

光素异硫氰酸盐标记之后, 作 EBNA 的细胞内定位, 效果也较好。现将制备过程及检测结果报道如下:

一、人 C₃ 抗血清的制备, 纯度鉴定和荧光素标记

1. 菊糖—C₃ 复合物的制备。

菊糖 1.4 克加正常人新鲜血清 27 毫升, 充分搅匀后放 37°C 温箱中继续缓慢搅拌或振荡约 1 小时, 然后低温离心 (3000 转/分, 15 分钟), 弃去上清液, 沉淀物用巴比妥缓冲液 (pH7.4) 充分洗涤八次, 每次洗后均经 3,000 转/分沉淀, 最后加相同缓冲液 4ml, 充分摇匀使成悬液, 放 -30°C 低温保存备用。

2. 免疫电泳检测

上述菊糖—人 C₃ 复合物, 在免疫动物之前均经过与抗人新鲜混合全血清作免疫电泳, 鉴定所吸附血清中的蛋白成份。用 pH8.2 巴比妥缓冲液配制 1% 琼脂糖, 内含 0.005 M 乙胺四乙酸钠 (EDTA-Na), 以防止在电泳过程中 C₃ 变性 (即由 β_1 C 变为 β_2 A 蛋白)。图版 1 的穴内加所制备的菊糖—C₃ 复合物, 中央槽内放抗血清。电泳结果表明, 只在 β 区域呈现一条较粗的沉淀线。因为 C₃ 是 β 蛋白, 故可以初步肯定菊糖所吸附的是血清中的 C₃。另外由于 C₃ 是吸附在菊糖微细的颗粒表面, 所以较单纯的 C₃ (即 β_1 C 蛋白) 的电泳移动率稍显缓慢。

3. 免疫动物

低温保存并经电泳检测合用的复合物悬液

4毫升,加等量 Freund 完全佐剂,乳化后免疫健康成年家兔。每只动物一次免疫剂量为2毫升,多点注射,包括脚蹼,膈关节附近及腹股沟淋巴结。每周再以相同剂量重复免疫一次,共免疫3次。在最后免疫一周后放血分离血清。每次免疫动物均用新鲜制备的菊糖— C_3 复合物,并经免疫电泳鉴定。

4. 人 C_3 抗血清的效价和纯度

抗血清效价的测定用琼脂双扩散,专一性的鉴定用琼脂双扩散和免疫电泳。铺片用的琼脂糖均含有 $0.005M$ EDTA- Na_2 。测抗体效价用稀释抗原法。中央孔分别为四只免疫家兔的抗血清,周围各孔为从 $1/40$ 稀释度开始倍比稀释的正常人新鲜混合血清。四只家兔的人 C_3 抗体效价均达到 $1:160$ 。再用制备的抗血清与抗人 C_3 血清标准样品作双扩散检测,两种样品的沉淀线互相联合(图版2),同时免疫电泳鉴定均只在 β 区域呈现一条清晰的沉淀线,电泳移动率也一致(图版3)。上述结果表明抗体的纯度及效价都符合制备荧光素标记抗体,用以检测 EBNA 的要求。

5. 异硫氰酸盐荧光素标记抗体

根据我们过去的经验,仍参照 Clark 和 Shepard^[4] 的透析法标记家兔抗人免疫球蛋白 G, 随后再按 Kawamura^[5] 方法进行标记抗体的纯化。纯化后的标记抗体取用荧光素/抗体蛋白比值为 $1-2$ 的部分作免疫荧光染色用,非特异荧光比较少见,不须再经过伊文思兰或甲基绿—羊毛酪黑复染。

二、存在 EB 病毒基因组的细胞中, EBNA 的检测

凡是含有 EB 病毒基因组的细胞都存在 EBNA。EB 病毒的 DNA 是同宿主细胞的染色质相结合。为了鉴定所标记的人 C_3 抗体对细胞内 EBNA 定位的特异性,我们选用了存在着 EB 病毒基因组的三株细胞,即 Raji, P₃HR-1, B95-8; 另外以不存在该病毒基因组的三株细胞即 BJAB, CNE, BEL-7402,

作为对照。用 Henle 等^[6] 所介绍的三步法进行上述细胞的抗补体免疫荧光反应显示 EBNA, 用以避免假阳性或前带反应 (Prozone reaction)。所用稀释液或洗涤全部用含有 Mg^{++} 和 Ca^{++} 离子的 pH6.9 平衡生理盐水,以提高补体活力^[4]。补体系 $1/10$ 稀释度的 EB 病毒抗体阴性的正常人血清。除 BEL-7402 细胞和 CNE 细胞是使用小玻璃片上生长的贴壁细胞外,其余各株细胞均系悬浮生长的细胞。取生长旺盛时期的细胞,作细胞涂片。涂片或贴壁细胞甲醇—丙酮混合液(比例为 $1:2$)冷固定 10 分钟后,取出吹干后加 EBNA 抗体阳性血清,在 $37^{\circ}C$ 温箱保温 1 小时,随后用平衡生理水洗涤 3 次,各 10 分钟,吹干以后加补体 ($1/10$ 稀释),继续在 $37^{\circ}C$ 保温 1 小时,再用平衡盐水洗 3 次后,加上上述异硫氰酸盐荧光素标记的兔抗人免疫球蛋白 G。保温和冲洗时间均同前述。最后用半永久性封固剂封片,在 ML-Ⅱ 型落射光荧光显微镜下观察。对照组除表 1 所列的细胞外,还包括补体灭活 ($56^{\circ}C$, 30 分钟) 和以平衡生理盐水代替所加的补体。表 1 所示,完全符合所预期的结果。另外,补

表 1 实验和对照组细胞的 EBNA 免疫荧光反应

	细胞株*	来源及特征	EBNA 反应
实验组	Raji	非洲 Burkitt 淋巴瘤, 含 EB 病毒基因组	阳性
	P ₃ HR-1	同上	阳性
	B95-8	EB 病毒转化的猴 B 淋巴细胞, 含 EB 病毒基因组	阳性
对照组	BJAB	Burkitt 淋巴瘤, 不含 EB 病毒基因组	阴性
	CNE	高度分化的人鼻咽癌上皮细胞	阴性
	BEL-7402	人肝癌上皮细胞。	阴性

* Raji, B95-8, P₃HR-1 及 BJAB 细胞株分别引自美国 Sloan-Kettering 肿瘤研究所, Ralph 实验室和美国国家卫生研究所, Nonoyama 实验室。CNE 细胞株引自中国医学科学院肿瘤研究所病毒室。

BEL-7402 细胞株是本所第一研究室建株的。

体灭活及以平衡生理盐水替代补体,也均为阴性反应。由于对照组未见细胞核呈阳性反应的细胞,所以可以排除呈阳性反应的细胞核(图版4)是由于血清中存在着与EB病毒无关的抗核抗体的可能性。

三、人鼻咽癌组织中EBNA的定位观察

业经证实,鼻咽未分化癌的细胞中存在着EB病毒基因组。Huang等^[7]曾用抗补体免疫荧光法观察到未分化鼻咽癌细胞核内存在EBNA,证实了De The的报道^[8]。我国虽是鼻咽癌高发区,但尚未见开展这方面的工作。我们初步取8例鼻咽部活检组织,结合病理诊断,进行了EBNA反应的对比观察。活检材料先经RPMI-1640培养液清洗数次,剔除粘膜样组织后,暴露为癌块部分,用眼科小剪刀剪成几小块,分别将组织剖面部分作细胞涂片,其余材料固定后作病理检查。涂片的固定,抗补体免疫荧光法显示EBNA以及相应的对照,均按上节所述。其结果见表2。3例鼻咽癌未分化上皮癌涂片中均见EBNA阳性反应的似癌细胞(图版5、6)而阴性材料除

7904外均为EBNA阴性。

值得注意的是7904号材料。该病人多次活检均未见癌组织,但是几次间隔一段时间作EB病毒外壳抗原(VCA)IgA检测均为强阳性,细胞涂片作EBNA荧光反应,也偶见阳性细胞(图版7)。其细胞的大小与周围阴性的淋巴细胞相差悬殊。是否为鼻咽癌病理分型中的大圆核细胞癌?可惜未作对应的细胞学染色,尚不能确定但是如果血清(VCA)IgA为反应阳性,而且效价高,则既有鼻咽癌确诊的意义,也有一定的早期诊断意义,因此上述所见7904活检材料中的阳性细胞是否属早期癌变细胞,尚须结合细胞学工作,作更多的研究,本文只是一篇初步的报道。此外在国内尚无抗人补体免疫荧光抗体商品供应的情况下,本文所介绍的方法和初步实验结果,对EB病毒感染细胞之后EBNA的动态观察,EBNA与鼻咽癌病理类型的关系,以及是否结合EB病毒(VCA)IgA和早期抗原(EA)IgA的测定等可以作为鼻咽癌早期诊断的手段都提供了一些方便。

表2 人鼻咽部活检组织涂片的EBNA免疫荧光反应

姓名	材料编号*	EBNA反应	病理诊断	备注
唐××	7901	成团的阳性上皮样细胞。	低分化鳞状上皮	
徐××	7902	同上	同上	
李××	7903	散在阳性上皮样细胞	同上	
张××	7904	偶见散在的大圆核阳性细胞	鼻咽粘膜炎症	多次检测EB病毒(VCA)IgA均为阳性,效价1:40
于××	7905	阴性	同上	
诸××	7906	阴性	同上	
张××	7907	阴性	同上	
张××	7908	阴性	同上	

* 活检材料是上海第一医学院耳鼻喉科医院提供,病理诊断也是该院病理室进行的。

参考文献

- [1] Reedman B. M., and Klein G., 1973. *Int. J. Cancer*, 11: 499—520.
- [2] Mardiney, M. R. Jr. and Müller-Eberhard, H. J., 1965. *J. Immunol* 94: 877.
- [3] Chase, M. W. 1977. "Methods in Immunology and Immunochemistry IV", pp 271—274. Williams, C. A. and Chase, M. W. eds.
- [4] Clark, H. T. and Shepard C. C., 1963. *Virol.* 20: 642—644.
- [5] Kawamura, A. J. et al. 1969 *Fluorescent*

antibody techniques and their applications. University of Tokyo Press.

- [6] Henle, W., et al., 1974. *Int. J. Cancer* 13: 751—754.
- [7] Huang, D. P., et al., 1974. *Int. J. Cancer* 14: 580—588.
- [8] De The G., et al., 1973. *Biomedicine* 19: 349—352.

本文所用的抗人C₃(β₁C/β₁A)标准血清,并经异硫氰酸荧光素标记,是由美国哥伦比亚大学徐璋教授实验室提供的,谨致谢意。