

猴血球低温冷冻保存的研究

中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所流行病学研究室 武士珍 王枢群

在病毒病的诊断中,血凝抑制试验是最常用和最简便可靠的方法。其反应基础是某种病毒产生对某种动物血球发生凝集作用的物质,即血凝素。这种凝集作用可被相应的抗血清所抑制。抑制作用的强度代表了抗血清中抗体水平。因此,猴血球在麻疹血凝抑制试验中是不可缺少的试剂。当前麻疹已被列入消除的传染病之一,其基本措施是靠麻疹活疫苗的普遍应用。因而,人群血清中血凝抑制抗体也是预测流行和采取预防措施的重要根据。由于全国各地普遍开展消除麻疹的工作,需要进行大量血清学试验,因此,对猴血球的需要量是很可观的。

猴血球不仅来源不多和不能随时可得,而且不易保存。猴血球在4℃冰箱保存二周以上敏感性下降。这就更增加了猴血球的供应困难。

鉴于以上情况,我们着手研究长期保存猴血球的方法,为各地清除麻疹工作提供一定的技术条件。

目前我们已研究出一种简便的猴血球低温冷冻保存液。新鲜猴血球放在其中保存于-20℃,五个月后仍保持新鲜血球的物理状态,不改变对麻疹血凝素的敏感性。在麻疹血凝抑制试验中证明与新鲜猴血球效果一致。现将其保存方法及使用效果报告如下:

材料和方法

一、新鲜猴血球:采自北京市儿研所、天津市防病中心及四川省卫生防疫站。系猕猴和恒河猴。由静脉无菌手续采血后,放于阿氏液中保存备用。

二、麻疹血凝素及麻疹免疫血清:购自中

国药品生物制品检定所。

三、猴血球的洗涤:将阿氏液中保存的猴血球经2000rpm离心10分钟,弃去上清后,即为压紧血球备用。

四、冷冻保存液的配制:

1.基础液:蔗糖10克,明胶1克、NaCl 0.85克,蒸馏水100毫升。

将以上物质混溶后,经8磅10分钟灭菌,放4℃冰箱保存备用。

2.保存液:基础液80毫升、二甲基亚砷20毫升、正常兔血清0.1毫升。

将上述溶液混合后即成为冷冻保存液。

五、猴血球低温保存方法:将压紧猴血球按10%加于冷冻保存液中,混匀后,分装于小容器中(如10毫升或5毫升小瓶中),用棉塞塞紧瓶口,放-20℃冰箱保存。

六、冷冻猴血球的使用方法:在使用冷冻猴血球的前一天,将冷冻猴血球从低温冰箱取出放4℃冰箱过夜,使用当天从4℃冰箱取出放室温,使其自然融化,然后用pH7.2的1/15M PBS洗至没有溶血为止(一般3~4次)。每次2000rpm离心10分钟,最后将压紧血球配成1%悬液即可应用。

七、猴血球溶血程度的测定:为了测定保存液保持细胞完整不被破溶的能力,采用的主要指标是血红素释放程度。血红素的测定是用常规光电比色法^[1]。所用的仪器是72-1型分光光度计,选用波长为540nm。

八、麻疹血凝素敏感性测定:按常规法^[2,3]进行,即将麻疹血凝素进行一系列2倍稀释,然后加入等量1%猴血球,37℃1小时观察血球凝集的情况。

九、血凝抑制试验^[2]:即将2个单位血凝

素和等量的不同稀释度的血清混合,37℃ 30分钟后,加入1%猴血球,再放37℃ 30分钟,观察被检血清的抑制血凝反应的效价。

十、冻存血球与新鲜血球检测人群麻疹抗体水平的比较:取同批猴血球,分别放在-20℃冻存及普通冰箱保存。保存一周后,取出此两种方法保存的猴血球平行地用于检测人群血清的血凝抑制抗体。

人群血清系来自河南省洛阳市轴承厂职工医院,系在麻疹流行期间所采集的血清,共115份。

结 果

一、二甲基亚砷最适浓度的选择:在明确二甲基亚砷的保存效果后,比较了不同浓度的区别,以期选出最适浓度。在基础液中分别加入不同量的二甲基亚砷(即0%、5%、7.5%、10%、12.5%、15%、20%),再配成10%血球悬液,在-20℃冰箱保存24小时后,由低温冰箱取出,放室温使之融化,再经2000rpm离心10分钟,取出上清液测定血凝素的OD值(表1)。

表1 不同浓度的二甲基亚砷冻存猴血球的效果观察

二甲基亚砷 浓度(%)	20	15	12.5	10	7.5	5	0
OD值	≈0	≈0	0.005	0.003	0.06	0.30	0.975
保护%	100	100	99.9	99.7	93.8	69.0	0

$$\text{保护}\% = (1 - \frac{\text{样品上清液OD}}{\text{O(对照)OD}}) \times 100$$

由表1可以看出,无冷冻保存液的猴血球经冻存后,全部溶血,而含不同浓度二甲基亚砷的保存液对猴血球显示出不同程度的保护。其中20%~10%的配方差别不大,都表现出几乎100%地防止了溶血现象的发生。

二、冻存血球对麻疹血凝素的敏感性测定:同一批血球分成二部分,一部分放入冷冻保存液中冻存;另一部分仍在阿氏液中放普通

冰箱保存。于一周后,同时测定两种血球对麻疹血凝素的敏感性(表2)。

表2 冻存一周及普通冰箱保存一周的猴血球对麻疹血凝素敏感性的比较

麻疹血凝素稀释度(1:)	2	4	8	16	32	64	对照*
冻存猴血球	卅	卅	卅	卅	卅	—	—
普通冰箱保存猴血球	卅	卅	卅	卅	卅	—	—

* 系血球+生理盐水

注:“卅→卅”表示血球凝集程度。

“—”表示血球未发生凝集。

结果(表2)指出,两种方法保存的血球敏感性基本一致。说明冻存不影响其对麻疹血凝素的敏感性。

三、加防腐剂对冻存血球的影响:取常用防腐剂即叠氮钠及硫柳汞,按常用浓度(即分别为1:10,000及1:1,000)加于冷冻保存液中,同时以不加防腐剂的保存液及阿氏液分别按10%放入同批猴血球,置-20℃ 24小时,测定其溶血性及对麻疹血凝素敏感性的影响。

结果指出,这两种防腐剂不改变冷冻保存液的效果,即在其中冻存的血球不增加溶血性,也不降低其对麻疹血凝素的敏感性。

四、冻存血球融化后在普通冰箱保存时间的观察:为了观察冻存血球从结冻状态转到普通冰箱(或冰壶)后能保存多久,将冻存72小时的血球从-20℃冰箱取出后,放冰壶一周,肉眼观察无溶血现象。再继续放入4℃冰箱10天后取出,经2000rpm离心10分钟,取上清液作1:20稀释后测OD,结果为0.053。即微有溶血。由此看出冻存血球可在普通冰箱至少保存2周。

五、冻存血球用于血凝抑制试验效果的观察:用麻疹免疫血清为试剂,对冻存血球用于麻疹血凝抑制试验的效果进行了观察。同时以新鲜猴血球为对照。结果看出,应用冻存血球所得的血清滴度与用新鲜血球所得的滴度是一致的。

六、冻存血球用于检测人群抗体的初试:

为了观察冻存血球用于检测人群麻疹抗体的效果,将同批猴血球分成两部分,分别用冻存及普通冰箱保存。保存一周后,用此两种血球平行地检测了115份人群血清的血凝抑制抗体。结果指出,用两种血球同时检测115份人群血清,两者滴度相同或基本相同(上下相差一个滴度)者113份。两种血球的符合率达98.26%。

讨 论

从上述结果可以看出,用本文研制的保存液冻存的猴血球,不但基本不溶血,而且在血凝抑制试验中保持原有的敏感性。在麻疹血凝抑制试验中冻存的猴血球与新鲜猴血球的结果基本吻合(两者符合率达98.26%),这说明在此试验中完全可以用冻存的猴血球代替新鲜猴血球。

在本实验室利用-20℃冰箱保存猴血球达五个月时间(观察时间),仍保持良好状态。这就使猴血球较长时间保存成为可能。通过这种方法,我们可以大量保存猴血球,以便随时使用。

冻存血球解冻后,在4℃左右条件下可保存2周,不发生明显变化,这就为利用冰壶远距离运输提供可能。

在非无菌条件下采集的猴血球,可在保存液中添加防腐剂,这并不影响猴血球的各种性能。只是使血球颜色变暗,失去新鲜感。

在分别用冻存血球与新鲜血球检测人群抗体的比较试验中,我们观察到冻存血球较新鲜血球似有提高敏感度的趋势。这点需要在今后的试验中进一步观察。

值得提出的是,由于冻存方法的成功,不但可以大量保存猴血球,解决大量供应问题,同时在控制血球质量上也起到很大作用。因为猴血球对麻疹血凝素的敏感性个体差异颇大,常因为使用不同敏感度的猴血球,产生血清抗体滴度的差异。现在我们可在大量血球冻存以前,测定其对麻疹血凝素的敏感性,将敏感性

高的血球混合成批保存。在进行抗体水平的比较研究中使用这种猴血球就避免了血球敏感性个体差异的问题,提高了检测结果的准确性和可比性。

此外,我们也曾用此保存液冻存鸡血球和鹅血球,初步获得同样效果。这种冻存猴血球也有可能用于其他病毒(如腺病毒)的血凝抑制试验中,如果是这样,就更增加了冻存猴血球的使用价值。

摘 要

本文报告了应用含20%二甲基亚砷的蔗糖、明胶液做介质冷冻保存猴血球的研究结果。这种冷冻保存液可保护猴血球在低温冻结条件下不发生细胞破裂;在解冻后,对麻疹血凝素的敏感性不降低;在麻疹血凝抑制试验中与未冻存的新鲜猴血球有相同的效果。冷冻保存液中可加防腐剂,这对猴血球的冷冻保存及血清学应用效果无影响。

由于冻存血球在解冻后仍能在普通冰箱(或冰壶)中至少可保存2周,使供应远距离单位成为可能。

A Study on Storing Monkey Blood Cells in Freezer Wu Shizhen, et al., Institute of Epidemiology & Microbiology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing

A freezing medium containing principally 20% DMSO, 10% sucrose and 1% gelatin was reported as an effective medium to be used in storing monkey blood cells. The blood cells kept in the freezing medium and stored in -20°C freezer still remained intact form without lysis. After thawing, the stored blood cells showed the same sensitivity to measles hemoagglutinin as fresh ones did. The addition of preservatives such as sodium azide and methiolateldid no harm to the blood cells in terms of using them in hemoagglutination inhibition test for measles.

参 考 文 献

- 1.朱忠勇,等.临床医学检验.上海科技出版社,1978:104.
- 2.中国医学科学院流行病学防治研究所.常见病毒病实验技术.科学出版社,1978:246.
- 3.卫生部药品生物制品检定所.麻疹血凝抗体的测定.全国麻疹疫苗质量控制师资培训班讲义 1984,