

病毒免疫荧光染色中的细胞滴片技术

军事医学科学院微生物流行病学研究所 李钟铎 宋光昌 何锦芳

病毒免疫荧光染色中的抗原底物组织培养小玻片，染色效果好，细胞结构清晰。但从准备小玻片到获得感染标本手续烦琐。我们采用镀膜玻片代替国外常用的聚四氟乙烯塑料多点玻片制备细胞滴片，用于病毒免疫荧光染色获得满意结果，兹将方法介绍如下：

1. 十点镀膜玻片的制备：用进口尼龙绸布制成十点模板，园点直径为5毫米，孔距为5毫米，在厚1毫米长宽76×26(毫米)的一级标本载玻片上通过模板涂漆料，经350~500°C高温烤干，涂漆与载玻片即牢固结合，涂漆可根据需要配制成不同颜色，喷漆膜厚度为0.04毫米，此膜不宜太厚使园点中滴入液体不向外流即可，载玻片一端约1.5厘米不喷漆，烧制成毛玻璃，供检查时做标记使用(图1)。此玻片由北京玻璃器皿厂协助制作。

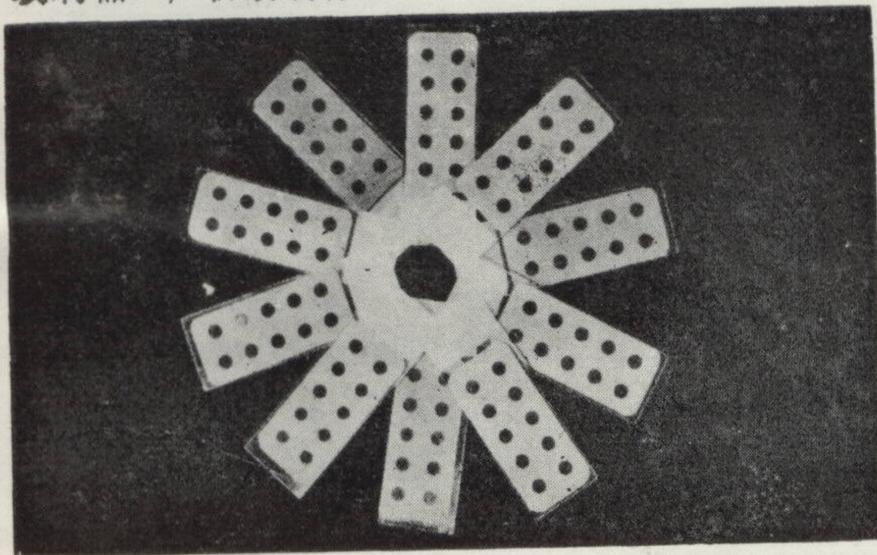


图1 十点镀膜玻片

2. 二氧化碳培育盒的制备：用有机玻璃制成，包括罩子，底盘及格板组成。罩子长21厘米，宽16厘米，高11厘米，左上方有排气口，右下方有进气口。底盘长22.5厘米，宽19厘米，高2厘米呈槽状，中间有两条高2厘米的有机玻璃条，供放镀膜玻片格板使用。格板两边粘1厘米高的有机玻璃条，每格板放8张镀膜玻片(图2)，每个培育盒中可放格板6块。

3. 感染细胞抗原滴片的方法：实验中分别采用BHK₁₁₃、BHK₂₁、及C6/36、LLC-MK-2等传代细胞株，前二种细胞用于感染乙脑病毒，后二种用于感染登革热病毒，在生长好的单层细胞上接种适量病毒，于未出现细胞病变以前用胰酶分散细胞，按40~60万/毫升细胞数的浓度加入199或Eagle氏液(内含10%小牛血清及青链霉素)制成细胞悬液，滴在十点镀膜玻

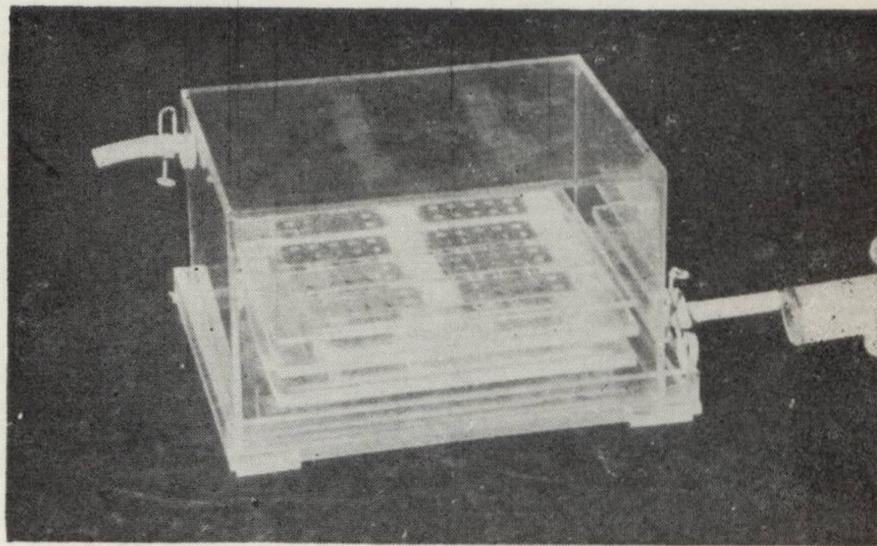


图2 CO₂培育盒，右下方为进气口，用注射器推入CO₂

片的圆点上，每点约加0.025毫升，放二氧化碳培育盒内，培育盒的底盘中加入少量水，将盒罩扣在底盘上密封，之后或按体积从进气口注入7%的CO₂气或用5% CO₂混合气体向罩内通过30~60/秒钟，然后关闭进出气孔，将培育盒放温箱中培养8~10小时，玻片用PBS漂洗三次，空气中晾干后低温丙酮固定30分钟，放低温冰箱中密封保存备用。

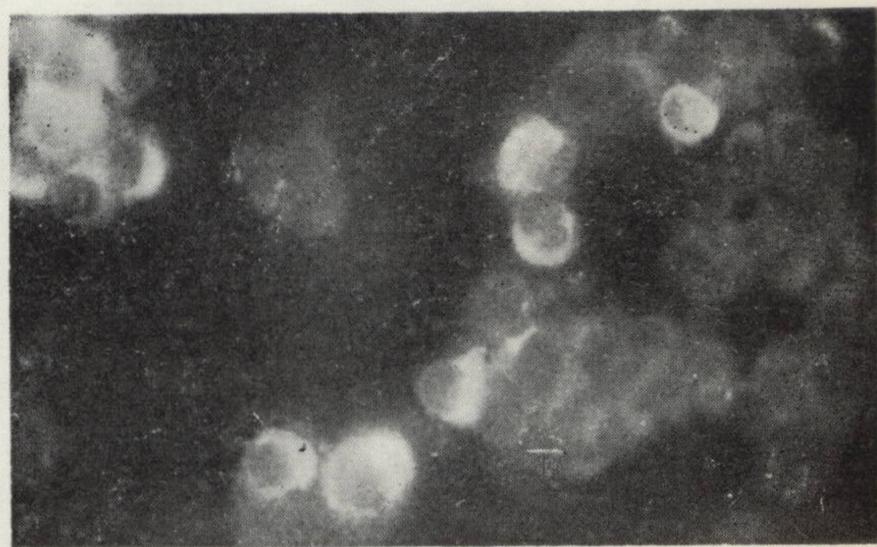


图3 乙脑病毒感染BHK13细胞滴片后培养10小时荧光染色

感染病毒后的BHK₁₁₃、BHK₂₁和LLC-MK-2细胞滴片标本经特异性荧光抗体染色，可见圆形及梭形的细胞，C6/36细胞呈园形，特异性细胞荧光清楚，细胞结构明晰，(图3)。不仅在实验室标本检查中方法简便，省材料，稳定性好，观察方便，而且通过107份乙脑临床病人血清标本检验应用其结果与过去经常使用的小玻片细胞标本的染色结果一致，荧光强度相似，各种对照符合要求。