

抗大肠埃希氏菌 F41 粘附素特异单克隆抗体的 研制及其初步应用

杨 亮* 刘 秀 梵

(江苏农学院牧医系传染病教研室,扬州)

应用杂交瘤技术获得 7 株能稳定分泌 F41 特异单克隆抗体的杂交瘤细胞系,分别命名为 L10、B10、C32、B1、E7、E40 和 B49。在直接凝集试验、酶联免疫吸附试验和间接荧光试验中,这 7 株单克隆抗体对所试的 31 株肠道菌中所有 F41 阳性菌株都发生反应,与 F41 阴性菌株则无反应性。抗原竞争 ELISA 试验结果发现,这些单克隆抗体是针对 F41 粘附素上相同或十分相近的抗原决定簇。采用胶体金标记技术和免疫电镜证实,这些抗原决定簇在 F41 粘附素的每条纤毛上多次重复出现。体外肠吸附抑制试验表明,7 株 F41 特异单克隆抗体对 B41M 菌株具有很强的抑制能力,对 B41 菌株则必须用 F41 和 K99 单克隆抗体同时作用才具有完全的肠吸附抑制效果。本文用直接酶标单克隆抗体建立的酶联免疫斑点试验具有高度的特异性和灵敏性,可广泛用于现场快速诊断。

关键词 F41 粘附素;单克隆抗体;酶联免疫斑点试验

产肠毒素性大肠埃希氏菌 (ETEC) 是引起人类和初生幼畜腹泻的主要病原体之一。细菌首先通过菌体表面的粘附素与小肠上皮细胞受体结合,并定居繁殖,继而产生肠毒素而致病。可见,粘附素是其致病的先决条件。

自 φrskov 于 1961 年发现引起仔猪腹泻的 ETEC 带有 K88 粘附素以来,已不断发现许多新的粘附素。对幼畜致病的 ETEC 粘附素主要还有 K99、987P 和 F41 等^[1]。

F41 粘附素是 De Graaf 等人^[2]于 1982 年首先报道的。近年来,国外许多学者对 F41 粘附素的各种特性作了详细的研究^[3-7,10]。董国雄等^[9]首先在国内报道了一株从仔猪腹泻粪样中分离的同时含有 F41 和 K99 两种粘附素的野毒株 (Fc 株)。鉴定了前几年在北京、福建、湖北和宁夏等地从仔猪、羔羊和犊牛腹泻粪样中分离到的十几个野毒株,发现不少是 F41

阳性菌株。可见,具有 F41 粘附素的 ETEC 在我国有一定的流行区域和宿主感染范围。

由于常规抗血清存在着许多缺点,本文采用杂交瘤技术生产出一组对 F41 粘附素抗原特异单克隆抗体的杂交瘤细胞系,用以深入研究 F41 粘附素抗原结构与生物学功能的关系,并运用这些单克隆抗体建立一种酶联免疫斑点试验方法,对幼畜腹泻进行现场快速诊断。

材料和方法

(一) 材料

1. 菌种和培养基:所用菌种及其来源见表 1。F41 阳性菌株和 K99 阳性菌株均用 Minca 培养基^[2];K88 阳性菌株用

本文于 1988 年 11 月 7 日收到。

本文得到张如宽、董国雄、李毅、秦爱建和高锦梁等同志的帮助,在此一并致谢。

* 现在江西省卫生防疫站中心实验室工作。

TSA (BBL Microbiol system, Md) 培养基; 987P 阳性菌株则用 Slanetz 培养基。

2. 直接酶标 F41 特异单克隆抗体均由本室制备。针对 K88 的 A3 单克隆抗体由本室李毅同志赠送; 针对 987P 的 P3-34 单克隆抗体和针对 K99 的 409 单克隆抗体由本院微生物室秦爱建同志赠送。

3. 单克隆抗体亚类鉴定用的标准羊抗小鼠亚类血清来自卫生部上海生物制品研究所。

(二) 方法

1. F41 粘附素抗原的制备及纯化: 制备 F41 粘附素抗原的菌株用 C83707、C83919 和 B41M, 按 De Graaf 等人^[2]报道的方法进行并稍加改进。将 F41 阳性菌株接种到 Minca 培养基上, 于 37℃ 保温 18 小时后, 用生理盐水从克氏瓶中洗下菌苔。60℃ 水浴保温半小时并不时摇震, 使 F41 粘附素从菌体上脱落下来。经 10000×g 离心半小时后, 收集上清液, 并用 60% 饱和度 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀上清液中 F41 抗原, 4℃ 放置过夜。最后将溶解液经 Sephadex G200 柱, 收集第一峰即为纯化的 F41 粘附素抗原。

2. BALB/c 小鼠免疫程序采用 Kudo^[6]的方法。将提纯的 F41 粘附素抗原与等量的弗氏完全佐剂充分乳化后, 腹腔注射 8—12 周龄的 BALB/c 小鼠, F41 抗原的注入量为每只 0.2ml (含 100μg)。两周后加强免疫, 方法同第一次, 但不加佐剂。3 天后取其脾脏供融合用。

3. 细胞融合及单克隆抗体的检测: 细胞融合及用直接凝集试验(DA)、酶联免疫吸附试验(ELISA)和间接荧光试验(IFA)检测杂交瘤培养上清液中特异单克隆抗体的方法均见文献^[7]。

4. 抗原竞争试验: 用 pH9.6 碳酸盐缓冲液将 F41 抗原浓度稀释至 4μg/ml,

包被 40 孔聚苯乙烯酶标板。50μl 酶标单克隆抗体(1:1000)分别与倍比稀释的未标记腹水单克隆抗体 50μl 混合后, 加入孔中, 37℃ 作用 2 小时后, 用 PBS 洗 3 次, 底物用 TMBS。测 405nm 处的吸光度值。

5. 免疫胶体金试验:

(1) 胶体金直接标记腹水中单克隆抗体: 采用 Mouton 等人^[8]的方法。本文用 10nm 胶体金标记 L10 单克隆抗体, 标记后加入 1% PEG (MW = 20000) 至终浓度为 0.05%, 以进一步稳定免疫胶体金溶液。

(2) 免疫胶体金电镜观察: 按 Julian 等人^[9]介绍的方法并加以改进。将 37℃ 培养 18 小时的 B41M 菌液用重蒸水调至 1×10^7 个菌/ml 的浓度。吸 10μl 滴于覆有福尔马膜 (Formovar) 的铜网上, 于 37℃ 完全干燥后, 与含 10% 牛血清白蛋白的 PBS 于 37℃ 作用 1 小时, 再与胶体金标记的 L10 单克隆抗体(1:10)在室温下作用 1 小时, 然后用 PBS 将铜网洗四次。最后用 1% 磷钨酸 (pH6.8) 负染 20 秒钟, 铜网干后在 H300 透射电镜下观察。

6. 肠吸附抑制试验: 首先制备犊牛和仔猪小肠上皮细胞, 并调整细胞浓度至 10^6 个细胞/ml。肠吸附抑制试验主要采用 Kudo^[6]报道的方法。将浓度为 10^7 个菌/ml 的细菌与适当浓度 F41 单克隆抗体在 37℃ 作用 1 小时, 再与等量 10^6 个细胞/ml 的犊牛或仔猪肠上皮细胞悬液混合, 置 37℃ 作用半小时, 并不时摇震。然后以 2000r/min 离心 5min, 弃上清液, 加 PBS 将沉淀稀释至原量。将这种悬液制成压滴标本, 在相差显微镜下观察。以细胞上吸附细菌数的减少程度来判定抑制效果。每个压滴标本数为 30 个肠上皮细胞刷状缘

表 1 F41 特异单克隆抗体对 F41 阳性菌株和其他肠道菌的 DA、ELISA 和 IFA 反应谱
Table 1 Binding reactivities of F41-specific MABs with *E. coli* strains bearing F41 adhesin and other enteric bacterial strains in DA, ELISA and IFA

菌株 Strain	抗原式 Serotype	单克隆抗体MABs L10 B10 C32 B1 E7 E40 and B49		
		DA	ELISA	IFA
psLM204*	K-12:F41	+	+	+
B41*	O101:K99,F41	+	+	+
B41M*	O101:F41	+	+	+
307*	O9:K99,F41	-	+	+
C83919	O101:K27,F41	+	+	+
C83707	O101:K30,F41	+	+	+
C83921	O101:K27,F41	+	+	+
C83922	O101:K99,F41	+	+	+
C83260	O101:K99,F41	-	+	+
C83261	O101:K99,F41	-	+	+
C83262	O101:K99,F41	-	+	+
431*	O101:K99,F41	+	+	+
Fc	O101:K99,F41	+	+	+
C82912	K-12:K99	-	-	-
C83529	O101:K99	-	-	-
C83709	O64:K99	-	-	-
C83642	O45:K99	-	-	-
1459*	O9:K35,K99	-	-	-
G7	O8:K87,K88ab	-	-	-
C83907	O149:K91,K88ac	-	-	-
Up001	O8:K87,K88ad	-	-	-
1592*	O9:K103,987P	-	-	-
44696	O101:K-,H33	-	-	-
NY-10	O35:K88	-	-	-
<i>S. typhi</i>	/	-	-	-
<i>S. cholerae</i>	/	-	-	-
<i>suis</i>				

标“*”菌株由美国华盛顿大学微生物及免疫学研究所Moseley 博士赠给;其余菌株来自中国兽药监察所和本院微生物教研室。
Strains signed “*” was provided by Dr. Moseley, Microbiological and Immunological Institute of Washington University in U.S.A. Others came from Control Institute of Veterinary Biological Products and Pharmaceutics in China and from Microbiological Staff of Veterinary Department in Jigsu Agricultural College.

上吸附的细菌总数。抑制率按以下方式计

算:

$$\text{抑制率} = \left(1 - \frac{\text{单克隆抗体作用的 30 个肠上皮细胞刷状缘上细菌总数}}{\text{无单克隆抗体作用的 30 个肠上皮细胞刷状缘上的细菌总数}} \right) \times 100$$

7. 酶联免疫斑点试验 (Dot-ELISA): 在硝酸纤维膜上滴加大肠埃希氏菌分离培养物悬液或粪样溶液 5—10 μ l, 37 $^{\circ}$ C 干燥后, 在 10% 小牛血清中浸 1 小时封闭空白位点, 以阻止非特异结合。再浸入酶标 L10 单克隆抗体 (HRP-L10, 1:500) 溶液中, 37 $^{\circ}$ C 作用 1 小时, PBS 漂洗三次。加底物四盐酸二氨基联苯胺 (DAB) 溶液, 显色 10min, 最后用蒸馏水漂洗以终止反应, 并用肉眼观察。在被检样品中出现棕色斑点者为阳性, 反之为阴性。膜干后可长期保存。

结 果

(一) 单克隆抗体的生产及特性分析

共进行了 5 次细胞融合, 获得 7 株能稳定分泌针对 F41 的特异单克隆抗体的杂交瘤细胞系, 分别命名为: L10、B10、C32、B1、E7、E40 和 B49。单克隆抗体亚类鉴定结果为: B1、B10 和 E7 属 IgG₁; C32 属 IgG_{2a}; L10 属 IgG_{2b}; E40 和 B49 属 IgM。

7 株 F41 特异单克隆抗体培养上清的 ELISA 效价达 10^{-3} , 腹水 ELISA 效价达 10^{-5} — 10^{-7} 。杂交瘤细胞经液氮冻存 6 个月后复苏, 仍生长良好并能稳定地分泌 F41 特异单克隆抗体。

(二) 单克隆抗体对 F41 抗原的特异性

从表 1 可看出, F41 特异单克隆抗体仅与含 F41 的菌株反应, 而不与 K99 阳性菌、K88 阳性菌、987P 阳性菌和其他肠道菌发生反应。

在 HRP 标记 L10 的抗原竞争试验中, B1、B10、C32、E7、E40 和 B49 共 6 种未标记抗体与标记抗体均有完全的竞争效应, 表明 L10 与这 6 种单克隆抗体对 F41 粘附素抗原上的结合部位相同或十分相近

(图 1)。同样, HRP 标记 B1 后所做的竞争试验结果说明, B1 与另 6 株单克隆抗体所针对的抗原决定簇也是相同或十分相近的。

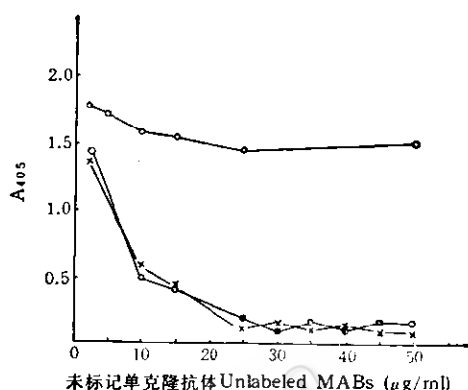


图 1 HRP-L10 固相抗原竞争 ELISA 试验
Fig. 1 Antigen-competition assay based on ELISA with HRP-L10

Symbols: —●—, L10; —×—, B1, B10, C32, E7, E40 and B49; —○—, Control (growth medium)

(三) 免疫胶体金技术的抗原定位

在免疫胶体金电镜中, 10nm 胶体金标记的 L10 单克隆抗体只与 F41 阳性菌株发生反应, 而不与 K99、K88 和 987P 阳性菌株起反应。在电镜下仅可见 B41M 细菌外周 F41 粘附素上有许多金颗粒特异地结合 (图 2)。若 B41M 细菌先与未标记 L10 单克隆抗体作用 1 小时 (37 $^{\circ}$ C) 后, 再与胶体金标记的 L10 单克隆抗体作用, 则铜网上 B41M 细菌外周没有金颗粒特异地结合, 偶尔可见几个金颗粒非特异地沉着于铜网膜上。

(四) F41 特异单克隆抗体对细菌吸附肠上皮细胞的抑制效果

7 株 F41 特异单克隆抗体 (用 1:100 稀释的腹水) 均能很强烈地抑制 B41M 吸附于犊牛或仔猪小肠上皮细胞上, 对 B41 菌株也有很好的抑制作用, 但抑制率不如对 B41M 菌株的高。采用高浓度的单克隆抗体 (1:

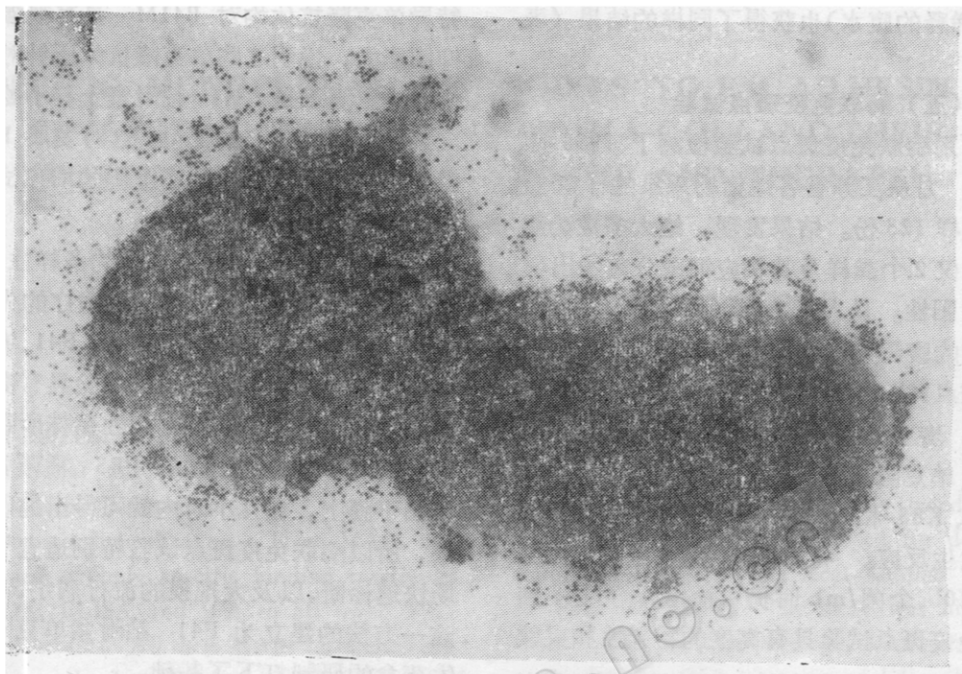


图 2 胶体金标记的 L10 单克隆抗体与 B41M 菌株上 F41 粘附素特异结合的免疫电镜照片

Fig. 2 Immunoelectron micrograph of the F41-fimbriated *E. coli* B41M strain incubated with gold-labeled L10 ($\times 35000$)

表 2 F41 特异单克隆抗体对 B41M 和 B41 菌株的肠吸附抑制效果

Table 2 Inhibition of the attachment of B41M and B41 strains to brush borders of intestinal epithelial cells by F41-specific MABs

单克隆抗体 MABs	30 个细胞刷状缘上粘 附的 B41M 细菌总数 No. of B41M/ 30BB*	抑制率 Inhibited rate	30 个细胞刷状缘上粘 附的 B41 细菌总数 No. of B41/30BB	抑制率 Inhibited rate
L10	2	98.96	83	64.50
C32	7	96.39	53	77.64
B49	16	91.75	67	63.20
E40	14	92.78	38	83.97
B10	4	97.94	25	89.45
E7	8	95.88	62	73.84
Ei	11	94.33	57	75.95
A3	211	0	257	0
409	182	6.19	131	48.95
P3-34	195	0	243	0
409 + L10	0	100.00	0	100.00
兔抗 F41 血清	3	98.45	57	75.95
PBS	194	/	237	/

BB*: 小肠上皮细胞刷状缘

Brush borders of intestinal epithelial cells

10 稀释的腹水)也获得了同样的结果(表2)。

(五) 酶联免疫斑点试验

用酶联免疫斑点试验检测了 1988 年 2—4 月从江苏省各地猪场采集的仔猪腹泻粪样 123 份。结果发现,绝大多数为阴性,仅 2 个粪样及其相应细菌分离物出现 F41 阳性。从人工攻毒(用 B41M 菌株)所致的腹泻仔猪中采集的粪样,作酶联免疫斑点试验和细菌分离物的直接凝集检测,均出现强阳性反应。用直接酶标的 F41 单克隆抗体对硝酸纤维素膜上包被的 K99、K88 和 987P 阳性菌及沙门氏菌均不发生反应。将 F41 阳性菌浓度调至 2×10^5 个菌/ml 时仍可检出。可见,酶联免疫斑点试验具有高度的特异性和灵敏性。

讨 论

F41 粘附素只存在于属 O₉ 和 O₁₀₁ 两种血清型的 ETEC 中,且多与 K99 粘附素同时在一种细菌中表达^[1]。近年来,国内外许多学者采用各种理化和生物学方法不断证实了一些以前仅标有 K99 粘附素的菌株如 Fc、B41、431、B44 和 B85 等还含有 F41 粘附素^[5,10,11]。

本试验所得的 7 株单克隆抗体仅对带有 F41 粘附素的大肠埃希氏菌发生特异性反应,且具有较好的稳定性,它不仅可用于 F41 阳性菌株的鉴定及幼畜腹泻的诊断,而且可用于 F41 粘附素抗原特性及其分子结构的研究。

体外肠吸附抑制试验表明,7 株 F41

特异单克隆抗体均对 B41M 具有很强的抑制能力,说明这些单克隆抗体所针对的抗原决定簇正是 F41 粘附素上与小肠上皮细胞受体相结合的部位,这对发展 F41 特异单克隆抗体作为幼畜腹泻的治疗试剂具有重要意义。

由于 ETEC 粘附素抗原的多样性,对幼畜腹泻的特异性免疫预防和治疗的先决条件是准确诊断。本文用酶标 F41 单克隆抗体建立的酶联免疫斑点试验具有高度的特异性和敏感性。F41 阳性菌株所致幼畜腹泻的粪样经过适量的 PBS 稀释后直接滴于膜上,在几小时内就可得出准确结果,所以酶联免疫斑点试验特别适宜于现场快速诊断,以及大规模的流行病学调查。这一方法的建立为 F41 粘附素单克隆抗体药盒的研制打下了基础。

参 考 文 献

- [1] Grastra, et al.: *Microbiol. Rev.*, 46: 129—162, 1982.
- [2] De Graaf, F. K. et al.: *Infect. Immun.*, 36: 751—758, 1982.
- [3] Morris, J. A. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 129: 2753—2759, 1983.
- [4] Sam, C.: *Infect. Immun.*, 43: 549—554, 1984.
- [5] 董国雄等: *江苏农学院学报*, 7(3): 1—6, 1986.
- [6] Kudo, Y. et al.: *Vet. Microbiol.*, 13: 75—85, 1987.
- [7] 刘秀梵: 单克隆抗体技术的实验方法,江苏农学院出版社,扬州, p. 3—38, 1986.
- [8] Mouton, C. et al.: *Canad. J. Microbiol.*, 30: 1008—1013, 1984.
- [9] Julian, E. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 130: 1481—1487, 1984.
- [10] Burrous, M. R. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 96: 269—275, 1976.
- [11] Awad-Masalmeh, M. et al.: *Infect. Immun.*, 35: 305—313, 1982.

SPECIFIC MONOCLONAL ANTIBODIES TO F41 ADHESIN OF ENTEROTOXIGENIC *ESCHERICHIA COLI* AND THEIR POTENTIAL USES AS DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC REAGENTS

Yang Liang Liu Xiufan

(Department of Veterinary Science, Jiangsu Agricultural College, Yangzhou)

A set of hybridoma cell lines, namely, L10, B10, C32, B1, E7, E40 and B49, secreting monoclonal antibodies (MABs) specific to F41 adhesin antigens of ETEC was obtained by somatic hybridization. These MABs manifested strongly specific binding reactivities in DA, ELISA and IFA to all tested F41⁺ ETEC strains. All these MABs recognized the same or closely related epitopes on the adhesin, as indicated in antigen-competition ELISA with HRP-labeled MABs. The distribution patterns of these epitopes which appeared repeatedly on each pilus were visualized by MAB-immunogold technique and immunoelectron microscopy. The adhesion of ETEC bearing F41 adhesin to the epithelial

cells of small intestine from new borne calves and piglets was inhibited *in vitro* by F41-specific MABs.

A dot-immunobinding assay based on F41-specific MABs was developed for determining F41 antigens in fecal samples with HRP-labeled MABs. The assay was highly sensitive and specific, and could be used in rapid detection and screening of F41 adhesin antigens in field samples.

Key words

F41 adhesin; MABs; Dot-ELISA