

应用单抗和流式细胞仪分析淋球菌的表面抗原

端 青 赵忠利 黄 策 张双喜*

(军事医学科学院微生物流行病学研究所 北京 100071)

摘 要 报告了利用流式细胞仪测定分析 10 株抗淋球菌脂寡糖单克隆抗体所识别的抗原分子表达的特点,定量地显示了这些抗原分子表达的稳定性和数量的多少,评价了单克隆抗体与不同血清型淋球菌的反应性。

关键词 淋球菌,单克隆抗体,流式细胞仪

淋球菌表面抗原复杂,变异频度较高,这是机体感染后不能获得永久性免疫,可发生再次感染的原因,也是血清学诊断淋病的困难所在。流式细胞仪已广泛应用于真核细胞表面分子的研究,本文报告了利用流式细胞仪测定分析 10 株抗淋球菌脂寡糖单克隆抗体所识别的抗原分子表达的特点,定量地显示了这些抗原分子表达的稳定性和数量的多少,评价了单克隆抗体与不同血清型淋球菌的反应性。

1 材料和方法

1.1 菌株

不同血清型淋球菌标准株(表 1),由比利时 ITM 实验室提供,购自卫生部药品生物制品检定所。

表 1 淋球菌标准株及其血清变化型和血清分型

Table 1 Serovars and serogroup of *N. gonorrhoeae* reference strains

菌 株	血清变化型	血清群
Strains	Serovars(Gs- / Ph-System)	Serogroup
4471	Ae / Av	W I
4472	Aedih / Arst	W I
4469	Bacjk / Bropt	W II / W III
4466	Bajk / Bopy	W II / W III
4437	Back / Bropyt	W II / W III

1.2 抗淋球菌单克隆抗体

Ng1 (IgM, λ)、Ng6 (IgM, λ)、Ng12 (IgG2b, k)、Ng15 (IgG3, λ)、Ng18 (IgG3, λ)、Ng23 (IgG1, k)、Ng36 (IgG3, λ)、Ng51 (IgM, λ)、Ng54 (IgG2b, λ)、Ng181 (IgM, λ), 均为

* 军事医学科学院基础医学研究所。

本文于 1995 年 4 月 7 日收到。

本实验室研制,经 Western Blotting 分析抗原位点均为淋球菌脂寡糖,单抗的制备及鉴定已由另文发表^[1]。

1.3 淋球菌的免疫荧光染色

淋球菌接种 WGC 培养基(卫生部武汉生物制品研究所生产,添加 10%新鲜兔血),37℃ 5%CO₂ 培养 20h,无菌生理盐水洗下菌苔,菌体用盐水洗 2 遍悬于 0.5%甲醛生理盐水中,4℃ 放置过夜备用。

上述甲醛固定全细菌经 0.01mol / L pH7.4PBS 洗 2 次,配成 1×10⁸ / ml 菌悬液,取 0.5ml 加入经适当稀释的 FITC 标记单抗 0.5ml 中,混匀放置 37℃ 水浴 30min,离心弃上清,PBS 洗 2 次后恢复至 0.5ml 即为待测样品,以未经荧光抗体处理的菌悬液作为阴性对照。

1.4 流式细胞仪测定

美国 Becton Dickinson 公司 FACS440 型流式细胞仪,5W 氩离子激光器,激发光波长 488nm,输出功率 200W,开机后先以对照调节,设置频道范围[30, 255],每个样品收集约 10000 个菌,PDP11 / 73 计算机收集数据,自动绘出频道分布组方图,并同时给出测定结果:阳性率(P)、平均荧光强度(MN)和变异系数(CV)^[2,3]。

2 结果和讨论

2.1 单克隆抗体荧光染色不同血清型淋球菌的频道分布

结果如图 1。图 1 中纵坐标为细菌数,横坐标为细菌的频道分布,在该频道分布中,频道数越大,该处细菌所标记上的荧光强度就越高,图中显示细菌峰值所在的频道分布于

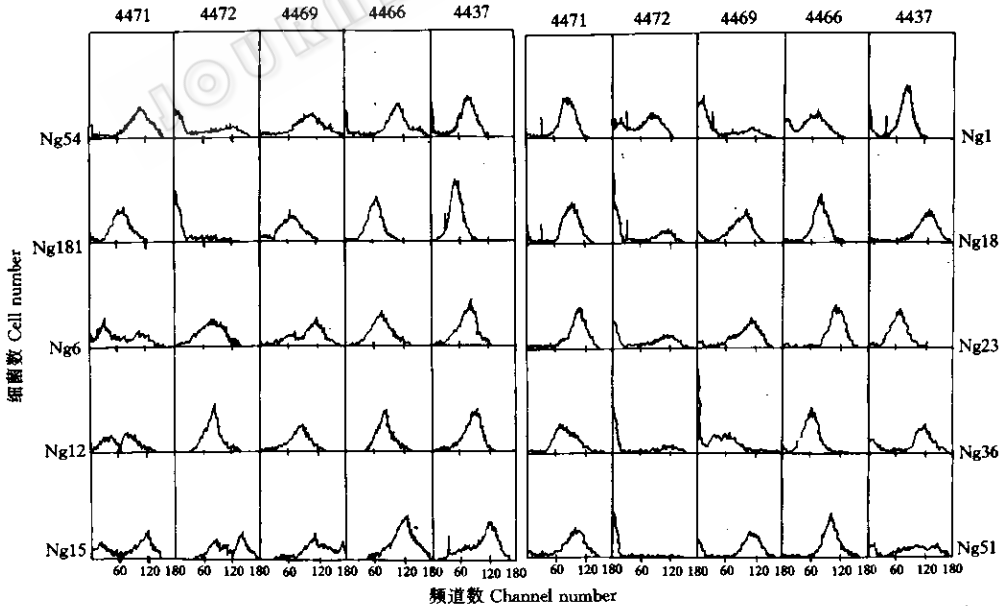


图 1 荧光标记单克隆抗体染色不同血清型淋球菌的频道分布组方图

Fig. 1 Histogram of serovar strains of *N. gonorrhoeae* stained with FITC-McAbs by flow cytometry

70~210 之间, 10 株单抗与细菌结合的峰值分布规律均不相同, 说明 10 株单抗所识别的抗原位点均不相同。

2.2 单抗与不同血清型淋球菌结合的阳性率(P)

阳性率是指仪器所收集的约 10000 个细菌中能够与抗体结合的细菌百分数。阳性率反映了单抗所识别的抗原位点在该株细菌中表达的稳定性, 如阳性率为 50%, 说明单抗所识别的抗原位点在该株 50% 细菌中能够正确表达, 而在另外 50% 细菌中已发生变异, 这部分细菌不再与抗体结合。表 2 显示 10 株单抗与细菌结合的阳性率除划线部分外均在 50% 以上, 说明单抗所识别的抗原位点在大多数淋球菌中能够稳定表达。

表 2 单克隆抗体(McAb)与不同血清型淋球菌结合的阳性率(P)

Table 2 Positive percentages(P) of the McAbs combining with serovar strains of *N. gonorrhoeae*

McAb	P				
	4471	4472	4469	4466	4437
Ng1	92.2	73.1	<u>34.4</u>	69.8	97.3
Ng6	72.0	96.6	95.8	98.0	97.1
Ng12	85.2	99.2	96.9	99.1	98.5
Ng15	84.2	98.9	99.1	99.2	97.4
Ng18	96.5	<u>40.3</u>	85.2	96.3	91.8
Ng23	95.1	<u>50.0</u>	88.8	94.2	91.2
Ng36	92.6	<u>32.6</u>	70.2	95.2	72.9
Ng51	88.1	<u>19.8</u>	75.5	92.1	71.9
Ng54	93.9	<u>55.2</u>	92.5	90.0	92.9
Ng181	91.9	<u>23.9</u>	85.6	95.5	94.9

表 3 荧光标记单克隆抗体(McAb)与不同血清型淋球菌结合的平均荧光强度(MN)

Table 3 Mean intensities(MN) of fluorescence of the FITC-McAbs combining with serovar strains of *N. gonorrhoeae*

McAb	MN					
	control	4471	4472	4469	4466	4437
Ng1	35.53	85.79	79.70	95.10	<u>69.19</u>	<u>72.15</u>
Ng6	43.34	<u>82.66</u>	<u>83.32</u>	109.48	<u>80.46</u>	<u>80.64</u>
Ng12	43.34	<u>89.09</u>	<u>86.49</u>	<u>97.08</u>	<u>79.30</u>	<u>82.62</u>
Ng15	43.34	152.56	137.71	171.20	133.32	108.75
Ng18	34.53	92.52	101.86	96.69	83.75	122.91
Ng23	34.53	108.04	104.96	107.09	114.75	71.82
Ng36	34.53	86.03	109.43	<u>69.02</u>	<u>63.66</u>	115.92
Ng51	34.53	103.18	105.48	119.93	108.48	115.23
Ng54	34.53	107.48	100.69	108.52	114.28	80.19
Ng181	34.53	<u>72.51</u>	<u>78.20</u>	<u>75.99</u>	<u>69.03</u>	<u>59.49</u>

2.3 荧光标记单克隆抗体与不同血清型淋球菌结合的平均荧光强度(MN)

平均荧光强度反映单抗所识别的抗原分子在阳性表达株(即表 2 中阳性率所包括的细菌株)中表达的数量多少。一般地说,抗原分子在单个细菌表面表达的数量越多,平均荧光强度则越高,按照血清学实验的惯例,样品的测定值是对照测定值的 2.3 倍以上时样品判为阳性,表 3 中对照的平均荧光强度为 34.53 或 43.34,表中划线部分的数据均小于 69.06(34.53×2.3)或 99.69(43.34×2.3),因此可以认为这些单抗所识别的抗原分子在相应的细菌株表面表达较少。

表 4 单克隆抗体(McAb)与不同血清型淋球菌结合的变异系数(CV)

Table 4 Coefficient of variation (CV) OF The McAbs combining with serovar strains of *N. gonorrhoeae*

McAb	CV					
	Control	4471	4472	4469	4466	4437
Ng1	44.73	18.10	28.69	35.15	28.79	19.13
Ng6	68.47	44.02	33.42	32.02	32.66	27.43
Ng12	68.47	44.49	31.73	34.86	27.77	28.23
Ng15	68.47	34.78	32.83	25.96	28.73	30.02
Ng18	44.23	19.19	29.30	23.02	18.86	21.36
Ng23	44.23	19.31	31.66	24.79	16.38	27.38
Ng36	44.23	28.33	32.63	39.65	27.36	25.37
Ng51	44.23	23.83	41.80	20.61	18.32	33.64
Ng54	44.23	23.25	34.75	28.23	25.74	23.16
Ng181	44.23	29.17	41.92	36.78	29.90	33.34

表 5 单克隆抗体(McAb)与不同血清型淋球菌结合的变异系数的 t 检验

Table 5 t test of CV of the McAbs combining with serovar strains of *N. gonorrhoeae*

McAb	4471		4472		4469		4466		4437	
	t	(P)	t	(P)	t	(P)	t	(P)	t	(P)
Ng1	3.71	(<0.01)	2.29	(<0.05)	1.29	(>0.05)	2.10	(<0.05)	3.57	(<0.05)
Ng6	0.00	(>0.05)	1.83	(>0.05)	2.00	(<0.05)	2.00	(<0.05)	2.43	(<0.05)
Ng12	0.14	(>0.05)	1.71	(>0.05)	1.29	(>0.05)	2.29	(<0.05)	2.29	(<0.05)
Ng15	1.29	(>0.05)	1.83	(>0.05)	2.57	(<0.01)	2.14	(<0.05)	2.00	(<0.05)
Ng18	3.57	(<0.01)	2.14	(<0.05)	3.00	(<0.01)	3.57	(<0.01)	3.29	(<0.01)
Ng23	3.00	(<0.01)	1.71	(>0.05)	2.71	(<0.01)	4.00	(<0.01)	2.43	(<0.05)
Ng36	2.29	(<0.05)	1.83	(>0.05)	0.57	(>0.05)	2.43	(<0.05)	2.71	(<0.01)
Ng51	3.86	(<0.01)	0.29	(>0.05)	3.29	(<0.01)	3.71	(<0.01)	1.43	(>0.05)
Ng54	3.00	(<0.01)	1.29	(>0.05)	2.29	(<0.05)	2.57	(<0.01)	3.00	(<0.01)
Ng181	2.14	(<0.05)	0.29	(>0.05)	1.00	(>0.05)	2.00	(<0.05)	1.83	(>0.05)

2.4 变异系数(CV)和 t 检验

表 4 是流式细胞仪测定的荧光标记单抗与不同血清型淋球菌结合的变异系数,反映了抗原抗体的反应性,抗原抗体反应越强,变异系数越小,无抗原抗体反应时(如对照)显示出最大的变异系数。

表 5 为对照和样品的变异系数经数理统计后的 t 值和差异显著性评价,根据 t 检验, $t < 1.96$ 、 $t > 1.96$ 和 $t > 2.56$ 可分别判定样品与对照的变异系数差异不显著($P > 0.05$)、差异显著($P < 0.05$)和差异非常显著($P < 0.01$)。差异不显著说明样品中的抗原抗体反应较弱,与无抗原抗体反应的对照相似,例如表 2 中 6 对结合率没有超过 50%的抗原抗体反应(划线部分),在表 5 中除 Ng18-4472 外均显示差异不显著;差异非常显著说明样品中的抗原抗体有较强的反应,例如表 3 中 19 对平均荧光强度低于对照 2.3 倍的抗原抗体反应(划线部分),在表 5 中均没有显示差异非常显著。另外,如上所述,细菌表面抗原分子数量越多,结合的荧光抗体则越多,平均荧光强度则越高,但反过来却不一定成立。即当平均荧光强度较高时,并不一定说明结合的荧光抗体较多,抗原分子的数量较多。这是因为实验系统中如果存在个别带有较强荧光的蛋白团块(如聚合荧光抗体),会使仪器显示出较高的平均荧光强度,但此时变异系数可以体现真实的抗原抗体反应。例如表 3 中 Ng15 与不同血清型淋球菌均显示了较高的平均荧光强度,但在表 5 中却只有 Ng15-4469 显示了差异非常显著。在免疫荧光实验中也只有 Ng15-4469 抗原抗体反应能够达到++以上,而 Ng15 与其他各株菌均不能;Ng18 单抗与不同血清型淋球菌在免疫荧光实验中均可达到++以上,在表 5 中除 Ng18-4472 显示比较对照差异显著,其他均显示差异非常显著。

综上所述,流式细胞仪所测定的阳性率、平均荧光强度和变异系数定量地反映了单克隆抗体所识别的抗原分子在细菌表面表达的稳定性和数量的多少,以及抗原抗体的反应性,这些指标可用来分析单抗所参与的血清学实验的基础。例如,变异系数较大时抗原抗体反应较弱,这可能是由于抗体所识别的抗原分子表达不稳定(体现为阳性率较低),或是由于抗原分子的数量较少(体现为平均荧光强度较低)。

淋球菌根据其外膜蛋白 I 的不同分为 W I、W II / W III 2 个血清群和多个血清变化型(表 1),Ng18 单抗识别的是淋球菌的共同抗原,该抗原在不同血清型淋球菌表面都有较稳定地表达和较多的数量。这一仪器定量测定结果与荧光显微镜下观察的结果是相一致的,镜下 Ng18 单抗与不同血清型淋球菌反应的荧光亮度均可达到++~++++,另外的免疫荧光实验表明,Ng18 单抗不与脑膜炎奈瑟氏菌、微黄奈瑟氏菌、乳糖发酵奈瑟氏菌、卡它布兰汉氏菌等有关细菌交叉,这些结果是 Ng18 单抗用于淋球菌血清学诊断的基础。

参 考 文 献

- [1] 端青,赵忠利,黄策,等. 单克隆抗体通讯,1994,10(2): 31~33.
- [2] Resnich M. *Curr Microbiol.* 1985, 12(2): 183~187.
- [3] Boye E. *J Gener Microbiol.* 1983, 129(4): 973~977.

ANALYSIS OF SURFACE ANTIGEN MOLECULE EXPRESSION ON SEROVAR STRAINS OF *NEISSERIA GONORRHOEAE* BY FLOW CYTOMETRY

Duan Qing Zhao Zhongli Huang Ce Zhang Shuangxi

(Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071)

Abstract In the present experiment, flow cytometry was employed for analysing expression characteristics of the antigen molecules distinguished by 10 monoclonal antibodies against *Neisseria gonorrhoeae* lipooligosaccharides. Stability of antigen expression and amount of epitope on the surface of *N. gonorrhoeae* were quantitative determined. Reactivity of the monoclonal antibodies with serovar strains of *N. gonorrhoeae* were evaluated.

Key words *Neisseria gonorrhoeae*, Monoclonal antibody, Flow cytometry