

抗幼畜腹泻病原菌 *E. coli* 表面抗原 (K99) 单克隆抗体细胞株的建立与抗体特性分析

王 河 伍宁丰 范云六

(中国农业科学院分子生物学研究室,北京)

本文概述了抗幼畜腹泻病原菌细胞表面抗原 K 99 蛋白的单克隆抗体杂交瘤细胞株的建立与抗体特性的鉴定。经过近半年的体外培养,大多细胞株仍能持续分泌较高滴度的单克隆抗体。腹水中抗体的 ELISA 反应滴度可达 2×10^7 。通过 ELISA、免疫荧光、斑点试验、免疫扩散和玻板凝集等多种免疫学方法证明了该抗体是抗 K 99 蛋白的单克隆抗体。该抗体的特异性与稳定性分析,为使单克隆抗 K 99 抗体成为幼畜细菌性腹泻病的大规模诊断与防治的标准免疫学试剂提供了基础。

关键词 K 99 抗原蛋白;单克隆抗体;幼畜腹泻

K 99 抗原是幼畜细菌性腹泻病病原体——*E. coli* 表面的一类蛋白质成分,以纤毛 (pili) 的形式存在,使得产生毒素的细菌得以粘附到寄主小肠上皮 (因而又称之为粘附因子, adhesin), 繁衍并分泌毒素,造成腹泻病害,因而 K 99 抗原的理论与应用研究均受到国际上的重视^[1]。

本实验室曾对 K 99 抗原蛋白的编码基因进行了体外重组^[2],还对 K 99 抗原蛋白的特性进行了分析^[3]。在上述工作的基础上,我们利用杂交瘤技术,建立了分泌特异抗 K 99 抗原的单克隆抗体细胞株,试图为 K 99 基因表达等理论研究和畜牧业疾病的诊断与防治提供有力的工具。

材 料 和 方 法

(一) 材料

实验动物: 纯系 BALB/C 鼠分别来自卫生部北京生物制品研究所和医学科学院实验动物中心。

Sp2/0 骨髓瘤细胞系: 由预防医学科学院上海寄生虫病研究所严自助老师赠送。

用于 ELISA 与 IFA (间接免疫荧光分析) 检

测的酶标与荧光素标羊抗鼠 IgG 均来自卫生部北京生物制品研究所。

抗体亚类鉴定用标准抗血清来自美国 Miles 公司。

³H-Leu (亮氨酸): 上海原子能研究所(比强为 $122 \mu\text{Ci}/\text{mmol}$)。

(二) 方法

1. 动物免疫与细胞融合及克隆化: 制备抗原与免疫 BALB/C 鼠见文献 [3,4]; 细胞融合与抗体阳性杂交瘤的克隆化见文献 [5]。

2. 单克隆抗体的检测: 用 ELISA 及 IFA 方法^[4,7] 检测杂交瘤培养上清液中的特异抗体; 放射免疫用 ³H-抗体的标记方法^[4]。

3. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE): 基本按文献 [6] 进行。SDS-PAGE 胶中蛋白质的电转移改动后的条件为: 电极缓冲液是将 SDS-PAGE 的电极缓冲液 (不加 SDS) 稀释 2.7 倍, 附加 10% 甲醇; 电流强度为 75—85 mA, 电泳过夜 (电压不超过 80V)。

4. 特异性分析中的部分方法: 电转移后硝酸

本文于 1986 年 9 月 19 日收到。

致谢: 本工作得到了中国预防医学科学院上海寄生虫病研究所严自助老师的大力支持与热情指导, 在此表示衷心感谢。

纤维素膜的免疫学方法分析: (1)ELISA 法^[4]; (2)IFA 法: 以硝酸纤维素膜上的蛋白带为抗原,与菌体为抗原的 IFA 法^[6]相近,在紫外检测灯下观察。

菌体结合剩余抗体的 ELISA 检查: 将待测细菌培养悬浮液与适量的培养上清液混合, 37℃ 保温一小时或 4℃ 过夜。测定上述混合物离心后上清液中剩余抗体的 ELISA 反应阳性情况。

5. 染色体分析: 杂交瘤细胞株的染色体分析见文献[6]。

6. 抗体滴度的测定: 采用两种方法。一种为直接玻板凝集法, 将不同稀释度的杂交瘤细胞培养上清液或腹水与等量培养至指数生长后期的细菌悬液混合, 观察抗体的凝集滴度(最大可引起凝集反应的稀释度)。另一种将一定浓度的抗原(0.02mg/ml) 包被聚乙烯板, 采用间接 ELISA 反应测得类似的反应阳性的抗体稀释度。

7. pH 值对单克隆抗体活性的影响: 将收集到的培养上清液经 50% 与 30% 两次 (NH₄)₂SO₄ 沉淀, 沉淀悬于 PBS 中, 透析后, 用一合适的稀释度将上述抗体稀释在不同的 pH 缓冲体系中^[11], 室温放置 3 小时, 加入等量 1 mol/L Tris 缓冲液 (pH 7.2) 中和至中性 (pH 7.2)。测定中和前后反应液中的抗体活性。

8. 免疫扩散^[12]检测抗体的特异性及鉴定抗体的 Ig 亚型。

结 果

(一) 抗 K 99 抗体阳性融合子的筛选和稳定杂交瘤细胞株的建立与染色体分析

将免疫 BALB/C 鼠脾细胞与骨髓瘤 Sp 2/0 细胞融合的细胞培养上清液进行 ELISA 和 IFA 检测, 确定抗体阳性孔, 并根据细胞生长量选择抗体绝对阳性较高的培养孔做为克隆对象, 克隆后同上选择阳性孔, 在扩大培养同时进一步亚克隆化、经多次克隆选择和长期体外培养, 得到 MK1-1、MK 1-18、MK 1-30、MK 2-3-1、

MK 2-3、MK 2-6 和 MK 2-11 共七株杂交瘤细胞。

在体外连续培养 4—6 个月(细胞繁殖 200 代以上)后, 除 MK 2-11 丢失了抗体阳性及 MK 1-18 失传外, 其余均能保持稳定的 K 99 抗体阳性和旺盛的分裂状态与均一的形态。

为说明上述细胞的稳定性, 对其染色体数稳定性进行了分析(表 1), 达到了成株细胞的稳定水平。

表 1 抗 K 99 杂交瘤细胞株的染色体分析
Table 1 Chromosomal analysis in anti-K99 hybridoma cell lines

	X ± s (90%)
MK 99-1-1	93.2 ± 2.68
MK 99-2-3-1	91.3 ± 2.64
MK 99-2-3	96.3 ± 2.37
MK 99-2-6	96.6 ± 2.32
Sp2/0	70.9 ± 2.13

(二) 杂交瘤细胞株分泌抗体的类型及亚类型

MK1-1 与 MK1-30 的抗体类型为 IgM, 而 MK 2-3-1 MK 2-3 和 MK 2-6 为 IgG, 亚型鉴定结果表明后三株均为 IgG₁。

(三) 单克隆抗体的特异性

1. 抗原抗体免疫扩散(图1)表明, K 99 纯化抗原与各株抗体均能形成免疫沉淀线。

2. 免疫电转移的结果表明, 上述筛选得到的单克隆抗体能够在分子水平上与 K99 蛋白反应。通过 SDS-PAGE 分离的 K99 蛋白经过电泳转移到硝酸纤维素膜上, ELISA 与 IFA 检测都说明我们得到的是特异的 K 99 抗体(图 2), 而不与其它蛋白成分反应。

3. 通过 ELISA (常规 ELISA, 电转移样品)、免疫荧光(菌体, 电转移样品)、斑点试验、免疫扩散和玻板凝集等多种免疫

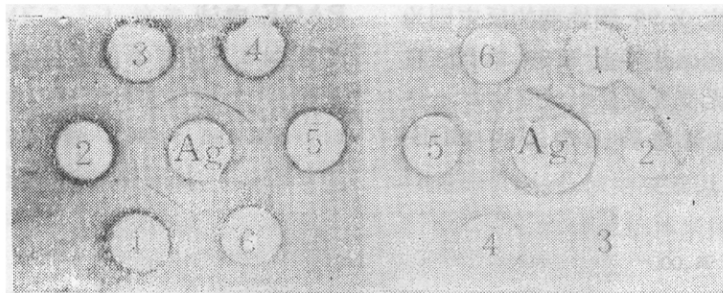


图1 K 99 抗原与各株单克隆抗体间的免疫扩散

Fig. 1 K 99 Antigen-McAb Precipitation Line in Ouchterlony

左: 细胞培养上清 Left: supernatant of cell culture

右: 腹水 Right: ascites fluid

1. MK 99-1-1; 2. MK 99-1-30; 3. MK 99-2-3-1; 4. MK 99-2-3;
5. MK 99-2-6; 6. Sp2/0

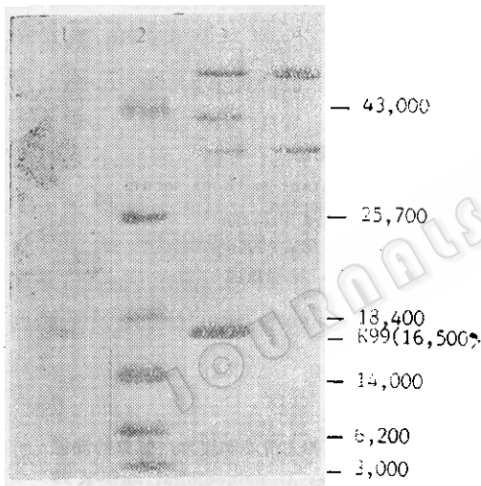


图2 单克隆抗体可特异地与转移到膜上的 K 99 抗原带反应 (ELISA 法)

Fig. 2 McAb can react specially (in ELISA) with K99 antigen band of nitrocellular membrane blotted from PAGE gel

1. 硝酸纤维素膜上的反应条带
Reaction band on nitrocellular membrane
2. PAGE 胶中的标准蛋白
Standard proteins in PAGE gel
3. *E. coli* 1548 (pHK 99) 的蛋白粗提物
Crude protein Sample of *E. coli* 1548 (pHK 99)
4. *E. coli* 1548 的蛋白粗提物(对照)
Crude protein sample of *E. coli* 1549 (control)

学方法鉴定单克隆抗体与 K 99 抗原的反

应均为阳性, 从另一侧面为抗体特异性提供了依据。

4. 为了肯定单克隆抗体与其它相关抗原无特异性反应, 测定了完整菌体在抗体溶液中吸附后, 溶液中剩余抗体的 ELISA 反应。共测试了 K 99 基因重组转化菌及受体菌、标准阳性及阴性菌和其它种粘着素病原菌 (987 P 与 K 88) 等 12 个菌株, 而只有 K 99 阳性菌能够接合单

表2 抗体溶液与过量 K 99 阳性及阴性菌保温后剩余抗体的 ELISA 反应

Table 2 ELISA screening of the remaining McAb in solution after incubation with K99 positive and negative strains of *E. coli*

菌株 Strain	K 99 抗原 K 99 antigen	ELISA 结果 ELISA result
1548 (pHK 99)	+	-
1548 (pBK 99)	+	-
1548	-	+
C 600 (pHK 99)	+	-
C 600 (pBK 99)	+	-
C 600	-	+
A 56 R (pHK 99)	+	-
A 56 R	-	+
C 83912	+	-
C 83913	-	+
K 88-120-84	-	+
987 P	-	+
Positive control		+

克隆抗体，相应 K 99 阴性菌的反应则为阳性，说明在菌体水平上 K 99 单克隆抗体与其它抗原无交叉反应（表 2）。

(四) 无血清培养上清液的 SDS-

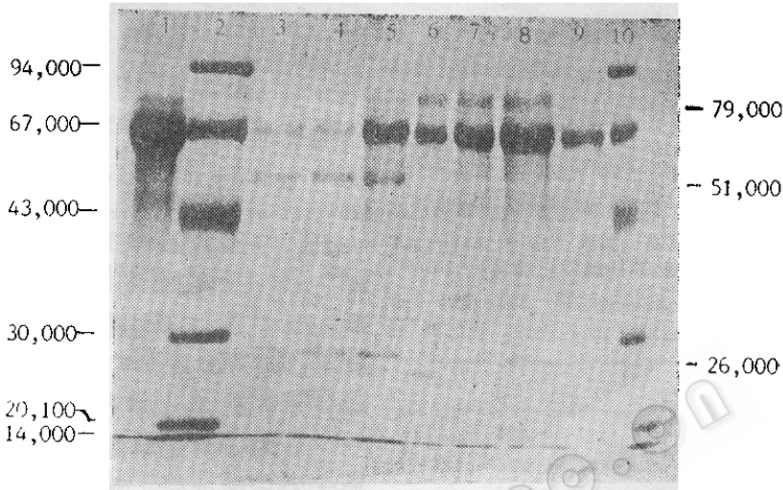


图 3 无血清培养上清中抗体的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 3 SDS-PAGE of Ig in hybridoma cell culture supernatant without serum

1. Sp2/0 (有血清 with serum); 2. 标准蛋白 Standard Protein
3. MK99-2-3; 4. MK99-2-3-1; 5. MK99-2-3-1; 6. MK 99-1-18;
7. MK99-1-30; 8. MK99-1-1; 9. Sp2/0; 10. 标准蛋白 Standard Protein

2-3-1 和 MK 2-3 五株无血清培养上清液在 MW 26,000 即 Ig 分子的轻链位置有一明显带,前三个上清液在 MW 79,000 位置(相当于 IgM 重链位置)有明显的条带(抗体类型鉴定为 IgM)。对应 MK 2-3 与 MK 2-3-1 则在 IgG 重链 51,000 位置有明显的带,而不论在抗体轻链还是在抗体重链(IgG 与 IgM)处 Sp 2/0, 无血清培养上清液对照均无相应蛋白带。从而互为对照地证实了抗体类型的鉴定结果。同时在分子水平上为抗体的单一性提供了可信的证据。

(五) 单克隆抗体的滴度

将实验测得的两株细胞的培养上清液和腹水的 ELISA 与玻板凝集结果列于

PAGE 电泳

图 3 表明了与抗体类型鉴定中的结果一致。

MK 1-1、MK 1-30、MK 1-18、MK

表 3。

表 3 细胞培养上清液和腹水中抗体的滴度
Table 3 Titres of monoclonal anti-K 99 antibody in cell culture supernatant and ascites fluid

		ELISA	玻板凝集 Slide agglutination
细胞培养 上清液 Cell culture supernatant	MK99-2-3-1	$> 5 \times 10^2$	10^2
	MK99-1-30	NT	10^2
腹水 Ascites fluid	MK99-2-3-1	1.25×10^3	10^3
	MK99-1-30	2.5×10^3	10^3

(六) 单克隆抗体的血清学性质:

1. 单克隆抗体对温度的敏感性: MK

1-3-15 与 MK 2-3-1 培养上清液的热稳定性的 ELISA 检测结果表明, 37℃ 处理 90 分钟对抗体活性无明显影响; 65℃ 处理 30 分钟有一定影响; 65℃ 处理 90 分钟则抗体活性接近阴性水平, 而在此条件下抗血清中的抗体活性则无变化。其它株抗体结果相近。

2. pH 对单克隆抗体的影响: 在不同 pH 条件下, 经 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀粗纯化的抗体在室温下放置 3 小时, ELISA 测定结果表明: pH 2.0 与 12.0 的影响最明显, 抗体阳性消失。值得注意的是当用 1 mol/L Tris-HCl (pH 7.4) 中和上述处理液, 此时 pH 2.0 的抗体得以恢复, 说明该单克隆抗体在 pH 2.0 酸性条件下仍具有抗体活性; 而在 pH 12.0 碱性条件下抗体完全丧失活性。其它 pH 条件 (pH 4.0—10.0) 处理 3 小时均能保持抗体阳性。

3. 冻融对抗体活性的影响: 用 ELISA 方法检测 MK 2-6 培养上清液经过 5 次冻融前后的样品, 发现单克隆抗体对冻融处理不敏感, 其它几株杂交瘤的结果相近。

讨 论

1. 为适应国内研究与应用的需要, 我们在分析了 K 99 蛋白的基础上, 建立了能持续分泌高滴度的抗 K 99 蛋白抗体的杂交瘤细胞株。为 K 99 抗原的理论与应用研究建立了新的手段和基础。

2. 我们得到的特异性高 (与相关抗原 K 88 与 987P 无交叉反应)、效价稳定的单克隆抗体, 可用于多种免疫学反应, 在病原菌检测上可直接用于玻板凝集反应以及更灵敏的快速 ELISA 检测, 在疾病防治上也有应用潜力。

3. 抗 K 99 单抗的鉴定过程中, 我们将市售的酶标抗体结合物用于抗原蛋白电转移到硝酸纤维素膜后的 ELISA 反应时, 不论采取什么措施均很难防止该结合物的非特异性吸附, 使结果难以分析, 曾改用另一批号荧光标记鼠抗体来代替酶标抗体, 得到了可信的结果。

4. 在实验中, 培养上清液与腹水中的抗体均可与抗原在免疫扩散中形成沉淀线, 与一般的单克隆抗体的免疫扩散性质相违, 其原因在于 K 99 蛋白在体外可形成多聚体^[10]。

5. 杂交瘤细胞株的培养上清液与腹水可直接用于检测和其它方面的应用。未纯化抗体有较好的热稳定性, 经 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀粗提纯的抗体对 pH 变化也表现出较好的稳定性。

参 考 文 献

- [1] Gaastra, W. and F. K. De Graaf: *Microbiol. Reviews*, 46: 129—161, 1982.
- [2] Fan yunliu, et al.: Proceedings of Sino-Japan Symposium on Biotechnology, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing, China, p. 126—137, 1986.
- [3] 王 河等: 生物工程学报, 3(2):97—101, 1987.
- [4] Galfre, G. and C. Milstein: *Method in Enzymol.*, Academic press, 73: 1—46, 1982.
- [5] Zola, H. and D. Brooks: *Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications* (Ed. by Hurrell, J. G. R.), CRC press, p. 1—57, 1982.
- [6] Campbell, A. M.: *Monoclonal Antibody Technology*, Elsevir, p. 49—58, 1984.
- [7] 严自勤等: 中华医学杂志, 8: 470—478, 1978.
- [8] Tsang, V. C. W., et al.: *Method in Enzymol.*, 92: 377—391, 1983.
- [9] 北京医学院微生物教研组: 实验免疫学, 人民卫生出版社, p. 61—64, 1981.
- [10] De Graaf, F. K. et al.: *Infect. Immun.*, 33: 877—883, 1980.
- [11] 朱 俭等: 生物化学实验, 上海科学技术出版社, p. 47—49, 1981.

ESTABLISHMENT OF THE HYBRIDOMA CELL LINES OF ANTI-K99(ENTEROTOXIGENIC *E. COLI* SURFACE ANTIGEN) AND CHARACTERIZATION OF THE MONOCLONAL ANTIBODY

Wang He Wu Ningfeng Fan Yunliu

(Laboratory of Molecular Biology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing)

Establishment of hybridoma cell lines which secrete anti-K99 (enterotoxigenic *E. coli* surface antigen) monoclonal antibody has been described. High titre of the monoclonal antibody in supernatant of cell culture had been detected after nearly half year culture *in vitro*. The monoclonal antibody had been extensively characterized by ELISA, IFA, RIA (dot immunbinding assay), oucherlony, slide agglutination. The highly specificity of

the antibody could be used as a standard reagent for the diagnosis of the diarrhoea causing by the enterotoxigenic colibacillosis and may provide a means of prevention of enterotoxigenic colibacillosis in calves and piglets.

/Key words

K99 antigen protein; Monoclonal antibody; Domestic animal's diarrhoea