微生物学报 29 (5): 348—353, 1989
Acta Microbiologica Sinica

抗大肠埃希氏菌 K88ab、K88ac 和 K88ad 特异单克隆抗体

李 毅 刘秀梵
(江苏农学院畜牧兽医系，扬州)

应用淋巴细胞杂交瘤技术生产出针对大肠埃希氏菌 K88 粘附素 a、b、c 和 d 4 种抗原因子特异的单克隆抗体（MCA）12 株。经酶联免疫吸附试验（ELISA）、间接免疫荧光试验（IF）和直接凝集试验（DA）证明：K88a 因子特异 MCA 有 4 株，与所试的 33 株 K88 菌株都产生阳性反应；K88b、K88c 和 K88d 因子特异 MCA 各 1 株，分别与所试的 3 株 K88ab 菌株、22 株 K88ac 菌株和 6 株 K88ad 菌株都产生阳性反应。

用 MCA 对 K88 粘附素抗原结构进行分析表明：在 K88ab、K88ac 和 K88ad 三种血清型中，同一种血清型的菌株至少能表达一个共同的型特异抗原决定簇；K88ad 菌株和 K88ac 菌株都能稳定地表达一个 K88ab 菌株不具有的共同的抗原决定簇；某些抗原决定簇仅存在于同一种 K88 血清型的部分菌株中。

关键词 大肠埃希氏菌；粘附素；单克隆抗体

产肠毒素性大肠埃希氏菌（ETEC）能引起多种幼畜和婴儿的急性腹泻，其致病机理主要表现在二个方面：一是它们带有粘附素，能在小肠内定居；二是它们能分泌一种或多种肠毒素[1]。ETEC 的粘附素是位于细菌表面的蛋白质性丝状突起物。目前有 4 种粘附素 K88、K99、987P 和 F41 证明与幼畜的下痢有关[1]。

含有 K88 粘附素的 ETEC 是新生仔猪下痢的最常见的病原体[1]。K88 粘附素由分子量为 23500—26000 的相同的蛋白质亚基聚合而成[2]。不同菌株所携带的 K88 粘附素在血清学反应上存在差异，现已将其区分为 K88ab、K88ac 和 K88ad 三种血清型[3]。

用于 K88 菌株血清型鉴定的因子血清一般都采用抗原吸附方法制成，存在效价低、易发生交叉反应等缺陷[4]。七十年代中期发展起来的淋巴细胞杂交瘤技术使生产高特异、高效价的单克隆抗体成为可能[5]。刘秀梵等[6,7]曾研制出 K88b 因子和 K88c 因子特异 MCA 各 1 株，但这 2 株 MCA 并不能对所有的 K88ab 或 K88ac 菌株反应，因此，尚不能用于 K88 菌株的血清学分型。

本研究的目的是生产能用于 K88ab、K88ac 和 K88ad 三种血清型鉴定的 K88b、K88c 和 K88d 因子特异 MCA，并应用 MCA 对 K88 抗原结构进行初步研究。

材料和方法

（一）菌种和培养基

所用菌种及其来源见表 1。K88 菌株的培养基为蛋白胨-大豆胨琼脂；培养 K99 菌株和 F41 菌株用 Minca 培养基；培养 987P 菌株用 Slanetz 培养基。

（二）K88 抗原的制备及纯化

用于制备 K88ab、K88ac 和 K88ad 抗原用的

本文于 1987 年 11 月 14 日收到。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

菌株分别为 G-7、C83907 和 UP001。制备方法基本按文献[8]进行。将细菌在 37℃ 培养 18h 后，62℃ 振荡 20min 使粘附素脱落，离心去菌体后，等电点法使粘附素沉淀，进一步经 Sephadex G-200（瑞典 Pharmacia 公司产品）柱层析分离纯化，收集第 1 峰的前半峰，用紫外吸收法测蛋白质含量后，−20℃ 冻存备用。

（三）细胞融合及杂交瘤细胞培养上清液的检测

BALB/c 小鼠免疫剂量和程序如文献[6]方法。细胞融合基本同文献[9]方法。所用的骨髓瘤细胞为 Sp2/0-Ag-14。融合剂为 50% 聚乙二醇（分子量为 1000，美国 Baker 公司产品）。杂交瘤细胞培养上清液的检测用间接酶联免疫吸附试验（ELISA），方法如文献[10]。包被 40 孔聚苯乙烯酶标板用的 K88 抗原其浓度为 20μg/ml。山羊抗BALB/C小鼠 IgG的辣根过氧化物酶(HRPO)结合物为卫生部北京生物制品研究所产品。底物为邻苯二胺(OPD)。阳性杂交瘤用有限稀释法克隆化。MCA 的亚类鉴定如文献[6]介绍。

（四）MCA 的免疫生物学特性鉴定

应用直接凝集试验（DA）、间接免疫荧光试验（IIF）和 ELISA 对 MCA 与不同菌株的反应性进行鉴定。DA 和 IIF 如文献[6]介绍。用于MCA 免疫生物学特性鉴定的ELISA 试验与用于杂交瘤培养上清液检测的 ELISA 试验稍有不同。酶标板先用 0.1mol/ml NaHCO + 5% 戊二醛室温活化 2 h，然后每孔加 50μl 细菌悬液（10^8/ml），置 37℃ 过夜干燥吸附，10% 新生犊牛血清封闭，以下步骤同常规 ELISA 试验[10]。OD 值大于1.0 时为“+”，0.5—0.99 时为“+/−”，小于 0.5 时为“−”。

结　　果

我们共进行 8 次细胞融合。以 K88ab 为免疫原融合 2 次，获得 1 株 MCA，命名为K-32。以 K88ac 为免疫原融合 4 次，获得 3 株 MCA，分别命名为 K-4、K-13 和 K-6。以 K88ad 为免疫原融合 2 次，获得 8 株 MCA，分别命名为 K-A、K-5、K-11、K-35、K-3、K-59、K-15 和 K-24。12 株 MCA 的亚类分属 IgG1（K-32、K-3、K-A、K-13、K-59、K-15 和 K-35）、IgG2a（K-5 和 K-11）、IgG2b（K-4 和 K-5）和 IgG3（K-6）。12 株杂交瘤细胞株培养上清液中 MCA 的 DA、IIF 和 ELISA 效价分别为 1:1—1:4、10^{-2}—10^{-3} 和 10^{-3}—10^{-4}；腹水中 MCA 的 DA、IIF 和 ELISA 效价分别为 10^{-2}—10^{-3}、10^{-4}—10^{-5} 和 10^{-5}—10^{-7}。12 株杂交瘤培养上清液中的 MCA 与不同 K88 血清型菌株及其它肠道菌株在 IIF 和 ELISA 试验中的结合反应性见表 1。在 DA 试验中，除 K-24 和 K-6 外，其它 10 株杂交瘤培养上清液中的 MCA 与表 1 各种菌株的反应谱相同于它们的 IIF 及 ELISA 反应谱（K-24 和 K-6 的 DA 反应谱未测）。

K-A、K-5、K-35 和 K-11 在 DA、IIF 或 FLISA 试验中都能与所试的全部 K88 菌株反应，而与含 K99、987P 或 F41 粘附素的 ETEC 及其它肠道细菌不反应，因此，这 4 株 MCA 所针对的抗原决定簇存在于所有 K88 菌株，也就是说这 4 株 MCA 是 K88a 特异的。K-32 和 K-4 分别仅能与 K88ab 或 K88ac 菌株反应，因此，它们分别为 K88ab 和 K88ac 特异。K-3 和K-59 都仅能与 K88ad 菌株反应，它们都为 K88ad 特异，但前者能与所试的全部 K88ad菌株反应，而后者仅能与其中的 4 株发生反应。K-5 和 K-24 能与 K88ad 和 K88ac 菌株反应，而与 K88ab 菌株不反应或仅呈弱阳性反应，因此，这两株 MCA 所针对的抗原决定簇仅能在 K88ad 和K88ac 菌株中得到充分表达。K-13 仅与 C83907 菌株反应，可能为株特异 MCA。K-6 除了能与 K88 菌株反应外，还能与 1 株 K99 菌株反应，并且能与 1 株 987P 和 1 株 K88 阴性参考菌株在 IIF 和 ELISA 试验中发生弱阳性反应。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

表1 MCA 与不同 K88 血清型菌和其它肠道菌株在 ELISA 和 IIF 试验中的结合反应性

Table 1 Binding reactivities of MCAs with *E. coli* strains bearing different serotypes of K88 antigens and other enteric bacterial strains in ELISA and IIF

菌株 Strain		单克隆抗体 Monoclonal antibody											
Strain	Formula	K-A	K-5	K-11	K-35	K-32	K-4	K-3	K-59	K-15	K-24	K-13	K-6
G-7[1]	O8:K87, K88ab	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−	−	−
E68[2]	O141:K88ab:H4	+	+	+	+	+	−	−	−	−	+/−	−	+/−
CA02[3]	K12:K88ab	+	+	+	+	+	−	−	−	−	+/−	−	+/−
UP001	O8:K87, K88ad	+	+	+	+	−	−	+	+	+	+	−	−
56/190[2]	O8:K87,K88ad:H19	+	+	+	+	−	−	+	+	+	+	−	−
190/58[1]	O8:K87, K88ad	+	+	+	+	−	−	+	+	+	+	−	−
190/53[1]	O8:K87, K88ad	+	+	+	+	−	−	+	−	+	+	−	−
CA01[3]	O8:K?, K88ad	+	+	+	+	−	−	+	−	+	+	−	+/−
190/56[1]	O32:K87, K88ad	+	+	+	+	−	−	+	+	+	+	−	−
190/52[1]	O8:K87, K88ac	+	+	+	+	−	+	−	−	+	+	−	+
G205[1]	O8:K87, K88ac	+	+	+	+	−	+	−	−	+	+	−	+
C83902	O8:K87, K88ac	+	+	+	+	−	+	−	−	+	+	−	+
168/9[1]	O45:K88ac	+	+	+	+	−	+	−	−	+	+	−	+
190/114[1]	O138:K81, K88ac	+	+	+	+	−	+	−	−	+	+	−	+
G491	O138:K81, K88ac	+	+	+	+	−	+	−	−	+	+	−	+
190/88[1]	O138:K81, K88ac	+	+	+	+	−	+	−	−	+	+	−	+
G1253[1]	O147:K89, K88ac	+	+	+	+	−	+	−	−	+	+	−	+
C83906	O147:K89, K88ac	+	+	+	+	−	+	−	−	+	+	−	+
44742	O147:K88ac	+	+	+	+	−	+	−	−	+	+	−	+

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

C83907	O149:K91(B), K88ac	+	+	+	+	−	+	−	−	+	+	+	+
190/72[1]	O157:K88ac	+	+	+	+	−	+	−	−	+	+	−	+
44752	O157:K88ac:H19	+	+	+	+	−	+	−	−	+	+	−	+
44563	O8:K87, K88ac:H19	+	+	+	+	−	+	−	−	+	+	−	+
C63	O5:K88+	+	+	+	+	−	+	−	−	+	+	−	+
C83613	O8:K87, K88ac	+	+	+	+	−	+	−	−	+	+	−	+
C83676	O8:K88ac	+	+	+	+	−	+	−	−	+	+	−	+
C83688	O8:K88ac	+	+	+	+	−	+	−	−	+	+	−	+
C83698	O8:K91, K88ac	+	+	+	+	−	+	−	−	+	+	−	+
C83600	O8:K87, K88ac	+	+	+	+	−	+	−	−	+	+	−	+
TM128	O60:K88+	+	+	+	+	−	+	−	−	+	+	−	+
C83668	O141:K88ac	+	+	+	+	−	+	−	−	+	+	−	+
C83673	O149:K88ac	+	+	+	+	−	+	−	−	+	+	−	+
C83549	O149:K81, K88ac	+	+	+	+	−	+	−	−	+	+	−	+
NY10	O33:K88−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+/−
C83912	K12:K99	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+
C83914	O101:K30, K99	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
NADC1592	O9:K103, 987P, NM	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+/−
C83916	O20:K101, 987P, NM	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
C83919	O101:K27, F41	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
S. senftenberg		−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−

(1) 荷兰国家公共卫生研究所 P. A. M. Guinée 博士惠赠。(2) 丹麦世界卫生组织大肠杆菌收藏中心 F. & I. Orskov 博士惠赠。(3) 加拿大顾尔夫大学兽医学院 M. R. Wilson 博士惠赠。

* 其他菌株来自农业部中国兽药监察所和本院微生物教研室。

(1) Strains obtained from Dr. P. A. M. Guinée, National Institute for Public Health, Bilthoven, the Netherlands. (2) Strains obtained from Dr. F. & I. Orskov, WHO Collaborative Center for Reference and Research on *Escherichia coli*, Copenhagen, Denmark. (3) Strains obtained from Dr. M. R. Wilson, Ontaria Veterinary College, University of Guelph, Guelph, Ontaria, Canada.

* All other strains are from Chinese Institute for the control of Veterinary Biologics & Therapeutics as well as Laboratory for Veterinary Microbiology in the authers' college.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

讨 论

本研究所生产的K88b、K88c和K88d因子特异MCA (K-32、K-4和K-3)分别能与所试的全部K88ab、K88ac或K88ad菌株反应，可望代替常规因子血清用于K88粘附素的血清型鉴定。我们应用此MCA对表1中的2株K88阳性参考菌株(C63和TM168)和从上海地区下痢仔猪粪样中分离到的30株K88阳性菌株进行了血清型鉴定，结果32株细菌都仅与K-4反应，而与K-32或K-3不反应，因此，它们都属K88ac血清型。

我们曾以K88ab为免疫原研制出1株能与所有K88菌株都反应的K88a因子特异MCA (K-7)[6,7]。本次研究又以K88ad为免疫原生产出4株K88a因子特异MCA。这5株MCA所针对的抗原决定簇是否相同还有待以后的试验。

K-15和K-24所针对的抗原决定簇，在K88ad和K88ac菌株中都能稳定地表达，而在K88ab菌株中不表达或表达不充分。这说明K88ad和K88ac菌株至少共有一个K88ab不具有的抗原决定簇。这与K88血清型的流行呈现K88ab→K88ac→K88ad的变异现象相一致[1,3]。K88抗原的3种血清型是依据常规因子血清的试验结果区分的，而如将诱导K-15和K24产生的抗原决定簇归属于K88a、K88b、K88c或K88d因子似乎不很妥当。

K-3和K-59都是K88d因子特异的，但这两株MCA所识别的抗原决定簇显然不同。K88ad菌株可能含有2种或更多种的K88d抗原决定簇。Guinée等[3]也曾观察到不同K88ad菌株所携带的K88ad抗原存在差异。

K-13可能为株特异MCA。这种MCA对于那些需跟踪某一菌株的试验(如排菌时间测定、疫菌免疫效果测定)具有一定的意义。

K-6与不同菌株的反应谱很特殊。特别有趣的是它能与1株K99菌株反应，引起这种现象的原因尚不清楚。

参 考 文 献

[1] Gaastra, W. et al.: *Microbiol. Rev.*, **46**: 129—161, 1982.

[2] Mooi, F. R. et al.: *FEMS Microbiol. Lett.*, **5**: 17—20, 1979.

[3] Guinée, P. A. M. et al.: *Infect Immun.*, **23**: 700—705, 1979.

[4] Parry, S. H. et al.: *Immunology*, **34**: 41—49, 1978.

[5] Köhler, G. et al.: *Nature*, **256**: 495—497, 1975.

[6] 刘秀梵等：江苏农学院学报，**6**: 1—6，1985。

[7] Liu, X. et al.: *J. Agri. Sci.* (Jiangsu), **2** (suppl.): 99—108, 1986.

[8] 崔治中：江苏农学院学报，**5**: 29—31，1984。

[9] Lane, R. D.: *J. Immunol. Methods*, **81**: 223—228, 1985.

[10] MuCulloughb, K. C. et al.: *J. Biol. Standard.*, **12**: 67—74, 1984.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

MONOCLONAL ANTIBODIES SPECIFIC FOR K88ab, K88ac AND K88ad ANTIGENS OF *ESCHERICHIA COLI*

Li Yi　Liu Xiufan

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

A panel of twelve hybridoma cell lines, secreting specific antibodies to K88 adhesin antigens of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) were established from eight separate fusions between mouse myeloma cell line Sp 2/0-Ag-14 and spleen cells from mice immunized with purified K88 antigens. Among the 12 monoclonal antibodies (MCA), K-A, K-35, K-11, and K-15 were K88a specific and reacted with all K88 adhesin bearing *Escherichia coli* strains tested, whatever K88ab, K88ac or K88ad they might be, as shown either in enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) or in direct agglutination test, whereas K32, K-4, and K-3 were sprcific for G88ab, K88ac, and K88ad respectively.

The antigen pattens of 33 K88 bearing *Escherichia coli* strains covering 3 serotypes of K88ab, K88ac, and K88ad were analysed by the use of these MCAs. The preliminary results showed that all Escherichia strins with the same serotype of K88 antigen shared at least one common typespecific antigenic determinant, that K88ad and K88ac strains enjoyed one common antigenic determinent that did not exist on K88ab strains, and that there were a few K88 antigenic determinents that appeared only on limited *Escherichia coli* strains of the same K88 serotype.

Key words

Escherichia coli; Adhesin; Monoclonal antibody

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn