

抗大肠杆菌 987P 粘着素单克隆抗体及其初步应用

董国雄* 秦爱建** 江美娟

(江苏农学院, 扬州)

共研制出 11 株抗大肠杆菌 987P 粘着素单克隆抗体, 对其部分免疫学特性作了测定。这些单抗不仅效价很高, 而且特异性强, 对不具有 987P 抗原的大肠杆菌及所试的其他肠道杆菌均无交叉反应。以 FITC 或 HRPO 标记的 987P 单抗作实验室诊断, 具有简易、快速、敏感和准确的优点。酶标 EPN3 株单抗检测的灵敏度可达 2×10^3 个/ml 987P⁺ 菌, 对人工发病仔猪的粪样和小肠内容物的阳性检出比分别为 4/4 和 2/2。EP22 株荧光标记单抗对病猪小肠粘膜触片的阳性检出比为 6/6。11 株单抗中 7 株能不同程度地阻断 987P⁺ 菌对仔猪小肠上皮细胞的吸附作用。ELISA 和荧光抑制试验表明, 11 株单抗是针对 987P 粘着素上三种不同的抗原决定簇。EPN2 株单抗的免疫胶体金定位还表明, 987P 粘着素似呈螺旋状结构, 且含有许多相同的抗体结合位点。这些单抗不仅可用于 ETEC 菌株的 987P 柔毛鉴定, 而且可用于 987P 分子结构和生物学特性的研究。

关键词 大肠杆菌; 987P 粘着素; 单克隆抗体

初生幼畜腹泻的重要病原之一是肠毒素型大肠杆菌 (ETEC)。其肠毒素是导致腹泻的直接因素并决定着感染的特征和症状的严重程度, 但菌细胞表面的柔毛样粘着素有助于 ETEC 在宿主小肠内的定居, 故它在幼畜腹泻的发病机制上具有重要作用。ETEC 的血清型复杂, 粘着素种类和抗原性又彼此不同。迄今, 在动物中已发现的 ETEC 粘着素主要有 K88、K99、987P 和 F41 四种。因此, 粘着素是鉴定 ETEC 的重要指标之一。自 1976 年 Nagy 等人^[1]首次报道了 987P 以来, 人们对其形态、抗原特性与免疫性已作了许多深入研究, 但对 987P⁺ 菌的快速鉴定一直未能得到满意解决, 若制备 987P 单因子抗血清既耗时费工又效价不高。为此, 作者研制了 987P 单克隆抗体, 以图取代常规抗血清, 为今后临床及实验室鉴定和研究 987P 抗原提供高质量检测与分析试剂。

材料和方法

(一) 菌株

本试验所用菌株详见表 1。

(二) 987P 免疫抗原制备

纯化的 987P 抗原基本上按 Douglas 等人方法^[1,2]制备。另一种 987P 免疫原是用 NADC1592 菌株以 0.4% 甲醛液灭活后, 经灭菌生理盐水洗涤并配制成 10 亿个/ml 细胞的菌悬液 (以下简称灭活菌 987P 抗原)。

(三) 987P 抗原免疫小鼠

纯化 987P 抗原对小鼠的免疫程序按 Goding 方法^[3]进行。灭活菌 987P 抗原首次以每鼠 1—2 亿菌腹腔注射 BALB/C 小鼠, 2—3 周后, 以同样剂量追加免疫一次。所有的免疫小鼠在末次注射后 72h 致死, 取其脾淋巴细胞供融合。

本文于 1988 年 1 月 15 日收到。

* 第二作者导师。

** 本研究主要完成者。试验中得到本院刘秀梵、高锦梁和邵天浩等老师的大力协助, 谨此一并致谢。

表 1 本试验所用菌株
Table 1 Bacterial strains used in the study

菌株 Strain	血清型 Serotype	菌株 Strain	血清型 Serotype
大肠杆菌 (<i>E. coli</i>)			
NADC1592	09:K103, 987P:NM	UP001	08:K87, K88ad
C83915	09:K103, 987P:NM	NADC1637	09:K103
C83916	020:K101, 987P:NM	鼠伤寒沙门氏菌 (<i>Salmonella typhimurium</i>)	4, 12:j:1,2
C83917	09:K103, 987P:NM	猪霍乱沙门氏菌 (<i>Salmonella choleraesuis</i>)	6,7: c:1,5
C83710	020:987P	产气杆菌 (<i>Enterobacter aerogens</i>)	
大兴株	064:987P	普通变形杆菌 (<i>Proteus vulgaris</i>)	
C83912	K12:K99	痢疾志贺氏菌 (<i>Shigella dysentery</i>)	
C83914	0101:K30, K99:H-		
C83709	064:K99		
C83919	0101:K27, F41		
C83921	0101:K27, F41: H-		
C83613	08:K87, K88ac		
C83901	08:K87, K88ab		

(四) 杂交瘤细胞单抗生产及其 Ig 亚类鉴定

免疫小鼠脾淋巴细胞与骨髓瘤细胞 SP2/0-Ag14 的融合按 Calfre 氏方法^[3]进行。用常规 ELISA 和免疫荧光 (IF) 法筛选杂交瘤细胞, 对强阳性反应的克隆细胞经多次克隆化后建立单克隆杂交瘤细胞系, 并制备培养上清和小鼠腹水单抗。对部分 987P 单抗测定其免疫学特性和 Ig 亚类。

(五) 免疫胶体金染色

将 NADC 1592 菌株在 Slanetz 培养基上 37℃ 培养 18h, 以灭菌蒸馏水制成 8 亿个/ml 菌细胞悬液, 再将铜网膜覆于其上, 使细菌吸附在网膜上。然后用 pH7.4、0.05mol/L TBS 漂洗三次, 各 5min, 再先后飘浮于 987P 单抗和兔抗小鼠 IgG 液滴上, 分别在 37℃ 作用 0.5h, 并以上述 TBS 液漂洗三次。此后, 在 pH8.2、0.02mol/L TBS 液中漂洗三次, 置于 10nm 金颗粒的羊抗兔 IgG 免疫胶体金液滴上, 4℃ 过夜。次日再经 pH8.2、0.02mol/L TBS 和 pH7.4、0.05mol/L TBS 各漂洗三次, 滤纸吸干后, 在透射电镜下观察。

(六) 不同株 987P 单抗间的交互抑制试验

除先将包被有灭活菌 987P 抗原的酶标板与单抗 A (培养上清) 作用, 并以兔抗小鼠 IgG 封闭单抗 A 的抗原决定簇外, 其余步骤同常规 ELISA。

以同理作各株 987P 单抗间的 IF 交互封闭试验。

(七) 标记单抗对人工发病仔猪的检验

以 C83710 株菌口服感染二日龄仔猪 6 头, 发病后函头采集粪便和回肠内容物, 以 987P 酶标单抗对所采粪样和肠内容物的 PBS 悬液离心上清作夹心 ELISA 检测。另对病死猪的小肠粘膜触片用荧光标记的 987P 单抗作直接染色镜检。在确定酶标单抗的检测灵敏度时, 仍用夹心 ELISA, 但抗原为不同浓度的 987P⁺ 菌悬液。

(八) 各株单抗对 987P⁺ 菌吸附小肠上皮细胞的体外抑制试验

先按 Burrow 等人的方法^[4]制备仔猪小肠上皮细胞悬液。然后, 将 987P⁺ 菌与适当浓度的 987P 单抗于 37℃ 作用 0.5h, 再加入肠上皮细胞液, 37℃ 作用 0.5h, 离心, 取沉淀制成压滴标本, 置相差镜下观察吸附抑制效果。以不加单抗的菌细胞和不加菌体的肠上皮细胞两种标本分别作为阴性和空白对照。

结 果

(一) 987P 单抗的免疫学特性

经多次融合试验与单抗检测, 共获得 11 株能稳定分泌 987P 单抗的杂交瘤细胞系, 分别命名为 EP22、EPG1、EPN2、

表2 抗大肠杆菌 987P 粘着素抗原单克隆抗体的免疫学特性

Table 2 Immunological properties of MAbs against 987P adhesin antigen of *E. coli*

单抗 MAb	Ig 亚类 Isotype	特异性 Specificity		腹水单抗效价 Titers of ascites fluid in		
		987P+ <i>E. coli</i>	Control* bacteria	DA ^b	IF	ELISA
EP22	IgG ₁	+	- ^a	4×10 ²	10 ⁵	—
EPG1	IgG ₁	+	—	4×10 ²	10 ⁶	—
EPN2	IgG ₁	+	—	2 ¹¹	10 ⁵	10 ⁶
EPN3	IgG ₁	+	—	2 ¹¹	10 ⁶	10 ⁷
EPII3	IgG ₁	+	—	10 ³	10 ⁶	10 ⁵
EPA4	ND**	+	—	ND	ND	ND
EP48	IgG _{2a}	+	—	ND	ND	ND
EPI8	ND	+	—	ND	ND	ND
EP46	ND	+	—	ND	—	ND
EPI5	IgG ₃	+	—	ND	ND	ND
EP43	ND	+	—	ND	—	ND

* 对照菌由表 1 所列的那些 K88⁺, K99⁺, F41⁺ 大肠杆菌株和肠杆菌科中其他一些种细菌组成。

The control bacteria were composed of those K88⁺, K99⁺, F41⁺ *E. coli* strains and other species in Enterobacteriaceae as described in table 1.

** 未测定 ND, Not determined. a—: 表示阴性反应 Negative reaction.

b: 直接凝集反应 DA, Direct agglutination.



图1 EPN2 单抗-免疫胶体金复合物在 NADC1592 菌株 987P 柔毛上分布的电镜照片
在每根柔毛上均分布着 10nm 的金颗粒,细菌表面无金颗粒标记。

Fig. 1 Electron micrograph of distribution of the MAb EPN2-immunogold compound on 987P pili of *E. coli* strain NADC1592

The 10nm diameter gold particles are distributed on each of the pili, the surface of the bacteria is not labeled(×40000).

表 3 不同株单抗的交互阻抑效果

Table 3 Cross-blocking effect of various MAbs in ELISA and/or IF test

单抗 B MAb B	试 验 Test	单抗 A (阻抑单抗) MAb A (blocking MAb)											
		EP22	PEG1	EPN2	EPN3	EPII4	EPA4	EPI8	EPI5	EP48	EP46	EP43	EK409 ^a
EP22	IF	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EPG1	IF	±	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EPN2	IF	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	ELISA	NT	NT	0.00	0.03	0.02	0.14	0.15	0.00	0.15	0.63	0.42	0.30
EPN3	IF	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	ELISA	NT	NT	0.00	0.00	0.09	0.07	0.00	0.00	0.14	0.45	0.32	0.34
EPII4	IF	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	ELISA	NT	NT	0.00	0.00	0.00	0.01	0.05	0.03	0.08	0.41	0.35	0.38
EPA4	IF	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	ELISA	NT	NT	0.06	0.19	0.00	0.00	0.07	0.11	0.18	0.39	0.41	0.38
EPI8	IF	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	ELISA	NT	NT	0.11	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.35	0.32	0.38
EPI5	IF	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	ELISA	NT	NT	0.05	0.03	0.00	0.00	0.00	0.04	0.00	0.29	0.25	0.33
EP48	IF	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	ELISA	NT	NT	0.03	0.10	0.05	0.10	0.00	0.01	0.00	0.33	0.30	0.40
EP46	ELISA	NT	NT	0.29	0.35	0.30	0.28	0.25	0.29	0.28	0.10	0.00	0.25
EP43	ELISA	NT	NT	0.29	0.28	0.25	0.23	0.29	0.20	0.20	0.00	0.06	0.23

* 抗 K99 单克隆抗体

MAb to K99 adhesin of *E. coli*

EPN3、EPII4、EPA4、EP48、EPI8、EP46、EPI5 和 EP43。对部分单抗测定了 Ig 亚类和免疫学特性及其阳性反应效价，详细结果见表 2。除 EP46 和 EP43 二株单抗无荧光反应外，其余各株单抗在荧光图像上可分为两种，EP22 和 EPG1 对 987P⁺ 菌的荧光呈菌体四周连续分布，菌影较大且清晰，而 EPN2、EPN3 和 EPII4 等 7 株的荧光呈菌体四周的柔毛样放射状分布，菌影较小且不明显。

(二) 987P 单抗的反应特异性

从表 2 可见，各株 987P 单抗只对 987P⁺ 菌发生反应，而对具有其他粘着素

(K88、K99 和 F41) 的大肠杆菌或所试的其他肠道杆菌均无结合能力。因此，11 株 987P 粘着素单抗具有高度的型特异性。

(三) 987P 单抗的胶体金染色的抗原定位

从图 1—2 清楚可见，胶体金颗粒只分布于 987P 柔毛上，对菌体无非特异性吸附现象，此结果与 EPN2 株单抗的荧光染色所见情况一致。另外，金颗粒在一根 987P 柔毛上的排布似呈一定的间隔和周期性，且一根柔毛上具有许多相同的抗体结合位点，使整根柔毛好像呈现一种螺旋状结构(图 2)。

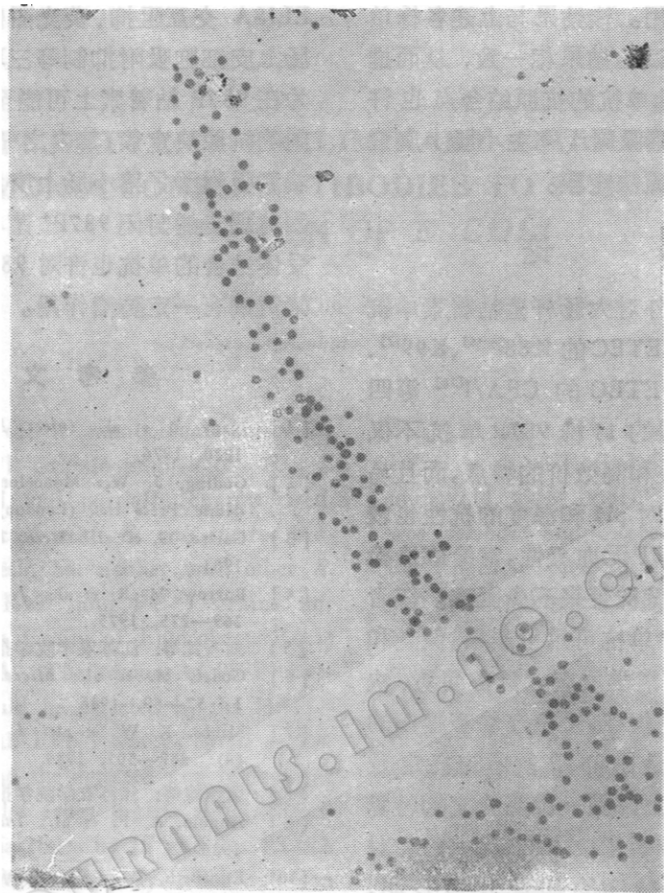


图2 EPN2 单抗与 987P 粘着素抗原结合位点的电镜照片
10nm 金颗粒有规律地分布在 987P 柔毛上,该柔毛似乎表现一种螺旋状结构。
Fig. 2 Electron micrograph of the binding points of MAb EPN2 with
the 987P adhesin antigen of *E. coli*

The 10nm diameter gold particles are regularly distributed on 987P pilus, the pilus appears to show a spiral structure($\times 50000$).

(四) 标记单抗对人工发病仔猪的检验效果

在 6 头人工发病猪中,用 EPN3 株酶标单抗检验了 4 头猪粪便和 2 头猪的小肠内容物,阳性检出比分别为 4/4 和 2/2,其敏感度可达 2×10^3 个/ml 987P⁺ 菌。用 EPN2 株荧光标记单抗检测了 6 头猪的小肠粘膜触片,阳性检出比为 6/6。

(五) 各株单抗与相应抗原结合位点的差异

从表 3 可知,EPN2、EPN3、EPII4、EPA4、EPI8、EPI5 和 EP48 这 7 株单抗

在 ELISA 和 IF 试验中均有明显的交叉阻抑作用,但 EP22 和 EPG1 以及 EP46 和 EP43 这两对单抗对上述 7 株单抗均无交互阻抑反应,它们仅限于各自一对间的交互抑制作用。这表明 11 株单抗在 987P 粘着素分子上的结合位点有差异。

(六) 单抗对 987P⁺ 菌体外吸附小肠上皮细胞的抑制作用

试验结果表明,EPN2、EPN3、EPI5、EPII4、EPI8、EPA4 和 EP48 这 7 株单抗在体外均能不同程度地阻断 987P⁺ 菌对仔猪小肠上皮细胞的吸着作用,而其余 4

株单抗都无此作用。该结果与上述各株单抗间的交互抑制试验结果相一致,从而推测 EPN2 等 7 株单抗的抗原结合点也许就是 987P 粘着素吸附于宿主小肠上皮细胞受体的那种抗原决定簇。

讨 论

迄今,国内外对大肠杆菌粘着素单抗的报道已有动物 ETEC 的 K88^[5-6]、K99^[7]、987P^[8-9] 和人类 ETEC 的 CFA/I^[10] 等四类。本试验所得的 11 株 987P 单抗不仅有高度型特异性和高效价的特点,而且易长期低温保存,对 pH 和温度的抗性也较强^[8]。过去因 987P 无血凝性,常给临床检验和实验室鉴定菌株带来不少困难。作者研制的这些 987P 单抗可用于凝集、荧光和 ELISA 等多种血清学反应,具备简易、快速、敏感和准确的优点,无论在幼畜腹泻的流行病学调查还是在 987P 抗原的鉴定及其分子结构研究上都是—种高纯度的特异性检测试剂。作者用胶体金定位技术对 987P 粘着素分子结构的初步观察表明,987P 柔毛上有许多相同的抗体结合位点,在立体构象上似呈—种螺旋状结构。这与 Brinton^[11] 对 I 型菌毛抗原结构的研究以及 Morris 等人^[12] 对纯化 987P 柔毛组成结构的分析基本吻合,但与 Soman 等人^[13] 的研究结果不一致。通过各株单抗间的

ELISA 交互抑制、荧光图像比较及体外小肠上皮细胞吸附抑制等三项试验,我们认为在 987P 粘着素上可能至少存在三种不同的抗原决定簇,其中之一可能与 987P 粘着素吸附于仔猪小肠上皮细胞受体有关。因此那些能封闭 987P⁺ 菌与小肠上皮细胞受体结合的单抗也许对 987P⁺ 菌所致的仔猪黄痢有一定防治作用。

参 考 文 献

- [1] Nagy, B. et al.: *Infect. Immun.*, 13: 1214—1220, 1976.
- [2] Goding, J. W.: *Monoclonal Antibodies*, Academic Press Inc. (London) Ltd., 1983.
- [3] Galfre, G. et al.: *Meth. Enzymol.*, 73: 1—46, 1981.
- [4] Burrow, M. R. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 96: 269—275, 1975.
- [5] 刘秀梵等: *江苏农学院学报*, 6(1): 1—6, 1985.
- [6] Godat, M. et al.: *Microbiology Pathogenesis*, 1: 57—69, 1986.
- [7] Mibbs, K. W. et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 15 (4): 489—501, 1984.
- [8] 董国雄等: *江苏农学院学报*, 8(2): 1—6, 1987.
- [9] Angulo, A. F. et al.: *Index Ves.*, 54(1): 34, 1986.
- [10] Elizabeth, A. et al.: *Infect. Immun.*, 41(3): 1296—1301, 1983.
- [11] Brinton, C. C.: *Trans. N. Y. Acad. Sci.*, 27: 1003—1054, 1965.
- [12] Morris, J. L. A. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 118: 107—113, 1980.
- [13] Soman, N. A.: *J. Exp. Med.*, 158: 1114—1128, 1983.
- [14] Douglas, D. C. et al.: *Infect. Immun.*, 38(2): 764—773, 1982.

DEVELOPMENT AND PRELIMINARY CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES TO 987P ADHESIN ANTIGEN OF *E. COLI*

Dong Guoxiong Qin Ailian Jiang Meijuan

(*Jiangsu Agricultural College, Yangzhou*)

A panel of 11 monoclonal antibodies (MAbs) to 987P adhesin antigen of *E. coli* were developed and partially characterized. They only reacted with *E. coli* strains bearing 987P adhesin but neither with other *E. coli* (K88⁺, K99⁺ and F41⁺) strains nor other species in family of Enterobacteriaceae in IF or ELISA. The amount of 987P⁺ bacteria which could be detected by the HRPO-conjugated MAb EPN3 was as small as 2×10^3 cells/ml, and the detected rate of fecal or intestinal samples from piglets with artificially induced diarrhoea by IF and /or ELISA was 4/4 and 6/6, respectively. The adhesion of 987P⁺ *E. coli* to porcine intestinal epithelial cells could be inhibited by seven of these

MAbs in vitro. The binding pattern of MAb EPN2 with 987P fimbriae as shown in immunogold stain under electron microscope was periodic and discrete distribution along the length of each of the fimbriae. ELISA and IF blocking test suggested that there were at least 3 kinds of determinants on 987P adhesin. These MAbs were not only useful in identification of 987P fimbriae of enterotoxigenic *E. coli*, but also in the studies of its molecular structure and biological function.

Key words

Escherichia coli; 987P adhesin; Monoclonal antibody