

## 布鲁氏菌抗独特型抗体的研究\*

顾文艺 谷登峰 袁 燕 依米提

(新疆畜牧科学院兽医研究所, 乌鲁木齐 830000)

在建立布鲁氏菌单克隆抗体细胞株的基础上, 筛选具有保护作用的单抗 A7 免疫家兔制备抗独特型抗体 (简称二抗)。经阻断试验和竞争抑制试验证实, 该二抗具有抗原“内影象”。将其提纯后配制成甘油佐剂免疫豚鼠和小白鼠, 检测结果表明: 免疫豚鼠和小白鼠产生了布鲁氏菌凝集抗体; 免疫小鼠的循环 T ANAE<sup>+</sup> 细胞百分数明显高于对照组; 免疫豚鼠在免疫后 4 个月时强毒菌株攻击有 79.2% 获得保护。因此认为, 该二抗不仅具有抗原的“内影象”结构, 而且具有良好的免疫原性, 可供作疫苗用。

**关键词** 布鲁氏菌; 单克隆抗体; 抗独特型抗体

根据 Jerne 的免疫网络学说, 1981 年 Nisonoff 和 Roitt 提出具有抗原“内影象”的抗独特型抗体可作为抗传染病的疫苗<sup>[1]</sup>。至今已报道的二抗苗有几十种。由于它具有安全性好, 可替代脂多糖类抗原进行免疫、诊断等优点, 并在自身免疫性疾病及肿瘤的免疫调节或治疗上有一定作用, 因此这方面的研究日益受到重视。布鲁氏菌病是威胁养羊、养牛业的主要传染病, 每年均造成较大的经济损失。目前, 急需研制新型疫苗。

### 材料与 方法

#### (一) 材料

牛布鲁氏菌地方菌株 S85A 及其保护性单抗株 A7 由本所研制<sup>[3]</sup>。本所动物室提供健康、体重 18g 小鼠 30 只。布鲁氏菌株 104M、544A 及供试的 40 只豚鼠来自新疆地方病防治研究所。布鲁氏菌凝集抗原购自黑龙江兽药一厂 (批号为 8901), 19 号菌苗为新疆生物制药厂生产 (批号为 9001)。辣根酶 IgG 结合物购自北京生物制品研究所。

#### (二) 方法

1. 二抗苗制备: 用提纯的 A7 单抗加福氏佐剂免疫家兔, 共免疫 5 次。于最后一次免疫后 4 天开始测二抗效价 (ELISA 双单抗夹心法), 达 1:12800 以上者放血制血清。用盐析法提纯血清中 IgG, 脱盐, 测定蛋白含量后, 加等量灭菌甘油及 0.5% 吐温-80 混匀备用。

2. 抗原“内影象”检测: (1) 竞争抑制 ELISA 各孔先包被单抗 A7 100 $\mu$ l, 洗板后分别加入 S85A 破碎抗原的浓度梯度各 50 $\mu$ l 及等量的 1:1000 稀释的二抗血清, 37 $^{\circ}$ C 湿盒中作用 2 小时。再加羊抗兔 IgG 酶结合物 37 $^{\circ}$ C 1 小时, 加底物显色 15 分钟后测 OD 值。

本文于 1991 年 11 月 14 日收到。

\* 承蒙中国科学院微生物研究所田波先生审阅指导, 特此致谢。

设阳性对照：1：2000 的二抗血清各 100 $\mu$ l；阴性对照：1：2000 稀释的正常兔血清各 100 $\mu$ l；空白对照：稀释液各 100 $\mu$ l。(2) 二抗捕获阻断 ELISA：先将二抗血清的稀释梯度与 1：32 稀释的 A7 细胞培养上清液等量混合在 37 $^{\circ}$ C 湿盒中作用 1 小时，然后分别取 100 $\mu$ l 混合液加入包被过 S85A 的抗原孔中，37 $^{\circ}$ C 作用 1 小时，加羊抗 BALB/C 鼠 IgG 酶结合物，加底物显色。设阳性对照：1：64 细胞上清液 100 $\mu$ l；阴性对照：二抗梯度各 100 $\mu$ l；空白对照，稀释液 100 $\mu$ l。(3) 抑制率、阻断率 =  $[(\text{阳性 OD 值} - \text{试验 OD 值}) / (\text{阳性 OD 值} - \text{阴性 OD 值})] \times 100\%$ 。

3. 体液免疫和细胞免疫检测：用 Wright's 反应测血清中凝集抗体滴度；用酯酶染色 (ANAE 染色) 法测外周血液中酯酶染色阳性 T 淋巴细胞的百分数 (T ANAE $^{+}$  数)<sup>[4]</sup>。

4. 豚鼠免疫试验：40 只豚鼠随机分成 5 组，每组 8 只。I、II、III 组为二抗免疫组 (剂量分别为 250 $\mu$ g, 500 $\mu$ g, 750 $\mu$ g)；IV 组为 104M 免疫组 (注 1000 万个菌)，同时设未免疫对照组。二抗免疫组免疫二次，间隔 14 天，并于二次免疫后 1 个月测血清凝集抗体；3 个半月时进行 544A 强毒攻击试验 (100 个菌/只)。攻毒后观察发病死亡情况并于 4 周时无菌剖检各组豚鼠，取心、肺、脾、淋巴结接种培养基，37 $^{\circ}$ C 培养 48 小时后，有布鲁氏菌生长为阳性。

5. 小白鼠免疫试验：30 只小鼠随机分成 3 组，每组 10 只。I 组为二抗免疫组 (0.1ml/只)；II 组为 19 号菌苗免疫组 (1000 万个菌)；III 组为对照组 (0.1ml 甘油生理盐水)。I、II 组注射两次，间隔 3 周。各组于每次注射后 1 周时检测 T ANAE $^{+}$  数；两周时检测凝集抗体。

结 果

(一) 抗原“内影象”检测

1. 竞争抑制 ELISA 结果见表 1。

表 1 竞争抑制 ELISA 结果\*  
Table 1 Result of competitive inhibiting ELISA

S85A 稀释度 S85A dilutions	1 : 10	1 : 100	1 : 1000	1 : 10000	1 : 20000	1 : 40000
吸光值 OD values	0.13	0.17	0.19	0.22	0.23	0.28
抑制率 (%) Inhibition	60	44	36	24	20	0

\* 阳性对照 = 0.28; 阴性对照 = 0.03; 空白对照 = 0.0  
Positive control = 0.28; Negative control = 0.03; Free control = 0.0

从表 1 可见，随着 S85A 浓度的减小，与二抗竞争结合 A7 的 S85A 分子逐渐减少。实验 OD 值逐渐升高，抑制率逐渐下降。当 S85A 的稀释度达到 1：40000 时 (浓度为 0.185 $\mu$ g/ml) 已不能抑制二抗与单抗的结合，抑制率为 0。

2. 捕获阻断 ELISA 结果见表 2。

表 2 捕获阻断 ELISA 结果\*

Table 2 Result of catch-blocking ELISA

二抗稀释度 Anti-id. dilutions	1 : 10	1 : 100	1 : 1000	1 : 10000	1 : 20000	1 : 40000
吸光值 OD values	0.06	0.08	0.20	0.43	0.52	0.55
阻断率(%) Blocking-rate	97.8	93.9	69.4	22.5	4.1	0

\* 阳性对照=0.54; 阴性对照=0.05; 空白对照=0.0

Positive control=0.54; Negative control=0.05; Free control=0.0

由表 2 看出, 随着二抗浓度的减小, 实验 OD 值逐渐上升, 阻断率逐渐下降。当稀释度在 1 : 30000 左右时, 二抗分子已不足以捕获单抗并阻断它与抗原 S85A 的结合。

(二) 动物免疫试验

1. 豚鼠免疫试验。从表 3 看, 免疫各组均产生了一定滴度的凝集抗体, 其中二抗免疫组的抗体滴度与免疫剂量密切相关, 但各组间均无显著差异。在攻毒试验中, 虽然二抗免疫组保护率明显低于 104M 组, 但其平均保护率仍达到 79.2%(其中 I 组达 87.5%), 说明二抗可使动物获得较好保护。

表 3 豚鼠凝集反应及攻毒试验结果

Table 3 Results of Wright's reaction and challenge test to immunized guinea pigs

组别 Groups	抗体滴度 Ab. titers( $\lg \frac{1}{X}$ )	阳性率 Positive ratio	保护率(%) Protection
I	0.556±0.877	2/8	75
II	0.899±0.992	1/8	87.5
III	0.949±1.046	2/8	75
IV	0.556±0.877	0/8	100
对照组 Controls	0.0	8/8	0

表 4 小白鼠 T ANAE<sup>+</sup>数及抗体滴度变化

Table 4 Changes of the T ANAE<sup>+</sup> number and antibody titer of immunized mice

组别 Groups	一次免疫 Primary immunization		二次免疫 Second immunization	
	T ANAE <sup>+</sup> 数 T ANAE <sup>+</sup> number	抗体滴度 Ab. titer	T ANAE <sup>+</sup> 数 T ANAE <sup>+</sup> number	抗体滴度 Ab. titer
I	79.3±2.86	0	80.0±4.98	1 : 4
II	76.0±4.76	1 : 5	74.8±2.75	1 : 10
III	68.6±2.30	0	68.8±2.69	0

2. 小白鼠免疫试验: 由表 4 可见免疫组一次、二次免疫后 T ANAE<sup>+</sup>数均明显高于对照组( $P < 0.01$ )。其中 I 组在一次、二次免疫后的 T ANAE<sup>+</sup>数还高于 II 组( $P > 0.05$ ), 说明二抗有较强的细胞免疫增强作用。Wright's 反应结果表明二抗免疫组仅在二次免疫后

产生了凝集抗体。

## 讨 论

Nisonoff 等提出具有抗原“内影象”的抗独特型抗体可作为抗传染病的疫苗。因而具有病原体保护性抗原“内影象”的抗独特型抗体可替代病原体保护性抗原进行免疫。要获得保护性二抗可以通过保护性 Ab1 诱导的体液免疫应答或建立单克隆抗独特型抗体细胞株。当应用独特型免疫动物时,所产生的抗独特型抗体是一个多克隆的抗体混合体,其中有  $\alpha$ -型抗独特型抗体,又有  $\beta$ -型抗独特型抗体。但只有  $\beta$ -型具有抗原“内影象”,即它们是针对独特型抗原结合部位表位的抗体,它们具有与抗原决定簇相似的结构,能替代抗原决定簇的作用。本研究选用布鲁氏菌保护性单抗 A7 免疫家兔制备抗独特型抗体,并应用竞争抑制和阻断试验检测多克隆二抗血清中的  $\beta$ -型二抗。结果表明,两个试验均呈现出明显的浓度依赖关系,证明该二抗血清中含有能阻断单抗 A7 与 S85A 结合,同时又能被抗原 S85A 所竞争抑制的  $\beta$ -型二抗。由于并非所有  $\beta$ -型二抗都能成功地诱导免疫应答,有些引起免疫抑制,有些免疫原性很弱。因此,本研究的动物免疫试验旨在检测该  $\beta$ -型二抗的免疫原性,包括体液免疫应答和细胞免疫应答以及攻毒试验。结果表明它不仅诱导免疫动物产生一定的抗体 (Ab3),而且具有增强细胞免疫功能的作用,还使免疫豚鼠获得了较好的保护。另外,攻毒试验表明,在选择适当佐剂及免疫程序的情况下,二抗可以获得较满意的免疫期。二抗也可以通过人工的办法改造,以增强其免疫原性。

## 参 考 文 献

- [1] Jerne, N. K.; *Ann. Immunol. (Paris)*, **125c**: 373, 1974.
- [2] Amy, J. et al.; *The Journal of Immunol.*, **140**: 2760—2762, 1988.
- [3] 依米提等; *新疆农业科学*, **4**: 181—182, 1990.
- [4] 刘忠贵等; *东北农学院学报*, **4**: 56—63, 1984.
- [5] Austin, E. B. et al.; *Immunology*, **67**: 525—530, 1989.
- [6] Thomas, J. et al.; *The Journal of Immunology*, **142**: 1318—1324, 1989.
- [7] Frank, L.; *Cellular Immunol.*, **109**: 419—428, 1987.
- [8] Mary, K.; *Science*, **926**: 1325—1329, 1984.

## RESEARCH ON ANTI-IDIOTYPIC ANTIBODIES TO BOVINE ABORTUS

Gu Wenyi Gu Dengfeng Yuan Yan Hamit Temir

(Institute of Veterinary, Xinjiang Academy of Animal Science, Ürümqi 830000)

Based on the establishment of McAbs to a local *Brucella* strain S85A, the McAb A7 was selected and tested as a protective one. Using A7 to immunize rabbits, we got high titer anti-idiotypic antibodies which were then proved to possess internal image by competitive inhibiting ELISA and catch blocking ELISA. The anti-idiotypic antibodies were then purified and mixed with glycerin to immunize guinea pigs and mice. The results showed that: immunized guinea pigs and mice had produced certain titer antibodies to *Brucella*. 79.2% of immunized guinea pigs had been protected from the challenge of 544A 4 months later from primary immunization. The number of T ANAE<sup>+</sup> in peripheral blood of immunized mice had increased significantly compared to controls. These results suggest that the anti-idiotypic antibodies not only possess the antigen internal image but have the available immunogenicity stimulate animals producing Ab3 and make them get free from the infection.

**Key words** *Brucella abortus*; McAb; Anti-idiotypic antibodies