97-97
维普资讯 http://www.cqvip.com

抗脆弱类杆菌单克隆抗体的研制及其初步应用

临床微生物学教研室 王 跃* 邓一平

提 要 用脆弱类杆菌ATCC25285免疫BALB/C小鼠，取其脾细胞与骨髓瘤细胞SP2/0融合，得到一株能稳定分泌高效价特异性抗体的杂交瘤细胞株(2C$_7$)。经鉴定该单抗主要与脆弱类杆菌的菌体抗原LPS发生反应。玻片凝集试验和ELISA检测，该单抗只与脆弱类杆菌呈现阳性反应，而与其它厌氧菌和需氧菌均呈阴性反应。应用该单抗建立的ELISA夹心法快速检测脆弱类杆菌，具有特异性和敏感性高，方法简便、快速的优点。

关键词 脆弱类杆菌；单克隆抗体；ELISA夹心法；快速诊断
中图分类号 R446.2 R446.5

脆弱类杆菌(Bacteroides fragilis, Bf)是临床厌氧菌感染中最常见的细菌之一，其所致感染遍及临床各科[1]。对脆弱类杆菌快速而准确的诊断有助于对该菌的感染进行及时有效的治疗。单克隆抗体具有效价高、特异强和对抗原高度亲和的优点，对于脆弱类杆菌的诊断和鉴定及抗原物质的分析等都是非常有用的工具。我们应用淋巴细胞杂交瘤技术，成功地制备了抗脆弱类杆菌单克隆抗体，对其某些特性进行了初步鉴定，并用该单抗建立了一种脆弱类杆菌的快速诊断方法。现将结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 动物

BALB/C小鼠，6－8周龄，由本校实验动物中心提供。

1.2 菌株及培养

脆弱类杆菌ATCC25285和多形类杆菌ATCC29741由上海医科大学惠赠；脆弱类杆菌TMP4500和TMP10、多形类杆菌CDC104－A、具核梭杆菌ATCC10953、中间普氏菌ATCC25261和产黑色素普氏菌ATCC33184均引自华西医科大学。其余实验用菌株，包括脆弱类杆菌9株及其他厌氧菌16株、需氧菌14株，均由本室保存或从临床标本中分离所得，并以标准方法鉴定。

将厌氧菌接种牛心脑浸液血琼脂平板，置厌氧罐厌氧培养37℃48h。需氧菌接种于血琼脂平板需氧培养37℃24h。用0.25%福尔马林生理盐水洗下菌苔，置室温作用1h，最后用无菌生理水洗涤3次，置4℃保持存备用。

1.3 脆弱类杆菌外膜复合物(OM)的制备

采用Kasper和Seiler的方法[2]将细菌用Triton X－100处理后经高速离心去除不溶性残渣而得。

1.4 脆弱类杆菌脂多糖LPS的提取

参照Weintraub的方法[3]，冻干细菌经热酚法粗提后，再经PCP法提取和超速离心纯化，获得高纯度的LPS。

1.5 脆弱类杆菌单抗的制备

1.5.1 免疫小鼠

将Bf ATCC25285菌液调至菌液浓度为2×10^9菌体/ml。腹腔免疫BALB/C小鼠，0.2ml/鼠，隔周以同样浓度剂量加强免疫，共三次。末次免疫十天后断尾取血用ELISA测抗体效价，再2×10^9菌体/ml、0.2ml/鼠腹腔加强免疫一次。

1.5.2 融合及筛选

取末次免疫3天后的小鼠脾细胞与SP2/0小鼠骨髓瘤细胞用50%PEG作融合剂进行融合。用Bf ATCC252856 $\times10^5$菌体/ml包被酶标板，0.1ml/孔，用ELISA间接法检测培养上清液，筛选分泌高滴度抗体的杂交交瘤细胞，再以有限稀释法反复进行克隆化至阳性克隆率为100%。

1.5.3 腹水McAb的制备

每只BALB/C小鼠腹腔内注射0.5ml不完全福氏佐剂，一周后接种杂交瘤细胞约$2－3\times10^6$个，10－14天后收集腹水，离心1500r/min，10min，去除细胞沉淀及脂肪，置－20℃保存。

1.6 Bf－McAb特性鉴定

1.6.1 McAb的Ig类别及亚类鉴定

杂交瘤细胞培养上清液用饱和硫酸铵盐析法浓缩约10倍，以标准羊抗鼠IgM、IgG及其亚类(军事医学科学院产品)在1%琼脂糖(含3% PEG MW6000)上作免疫双扩试验。

1.6.2 McAb的特异性鉴定

1.6.2.1 ELISA试验

细菌抗原用包被稀释成6×10^5菌体/ml，包被酶标板，每孔100μl，置4℃过夜。倾去包被液，洗涤3次后用0.5%明胶填空。加100μl腹水单抗(1:100稀释)，然后加HRP标记兔抗鼠IgG(华美公司产品)，再加底物邻苯二胺，最后加2mol/L的硫酸中止反应，于酶标仪490nm处读取OD值。

1.6.2.2 玻片凝集试验

* 四川省教委重点科研资助项目

女，1958—11出生，讲师

维普资讯 http://www.cqvip.com

将腹水1:5稀释后与不同细菌培养物作玻片凝集试验，观察凝集结果。

1.6.2.3 琼产脂双扩试验

将含特异性单抗的腹水作对倍稀释后，与纯化的脆弱类杆菌LPS在1%琼脂糖上作免疫双扩试验，观察其沉淀线及双扩效价。

1.6.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳及免疫印迹试验

将Bf ATCC25285纯化LPS及粗制外膜复合物以及大肠杆菌LPS(Sigma产品)经适当稀释后作聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS－PAGE)。分离胶浓度12%，按Tasi和Frasch的方法[4]进行银染色。

将上述抗原经SDS－PAGE后电转移至硝酸纤维素膜(NC)上，再以Bf－McAb腹水作为第一抗体，HRP标记兔抗鼠IgG作为第二抗体做免疫印迹试验，DAB底物显色后观察结果。

1.7 Bf－McAb的初步应用

将Bf－McAb腹水用DEAE－52批次法提纯IgG，以辣根过氧化物酶标记制备成Bf酶标诊断试剂，以同样方法纯化的兔抗Bf ATCC25285血清IgG包被酶标板，按常规双抗体夹心法检测细菌抗原，结果可用酶标仪测OD值或目测法观察。

2 结果

2.1 杂交瘤细胞株的建立

本实验细胞融合率为67.1%(129/192)，抗体阳性率为58.1%(75/129)。经反复筛选获得一株能稳定分泌抗脆弱类杆菌ATCC25285的单抗杂交瘤细胞($2C_7$)。接种小鼠腹腔后获得的腹水效价为(10^{-6})。

2.2 抗体类别及亚类鉴定

用琼脂糖作免疫双扩试验，该单抗仅与羊抗鼠IgG及IgG_1抗体发生沉淀反应，与抗IgG_{2a}、IgG_{2b}、IgG_3以及IgM抗体均无反应，表明其单抗亚类属于IgG_1。

2.3 特异性鉴定

2.3.1 将Bf－McAb与14种33株厌氧菌和14种14株需氧菌用ELISA间接法检测。结果12株脆弱类杆菌均呈阳性反应，其平均OD值为0.49，而与所有非脆弱类杆菌株均呈阴性反应，平均OD值为0.023。

2.3.2 用单抗腹水分别与各菌作玻片凝集试验，结果除各脆弱类杆菌菌株外，其余各菌均呈阴性(不凝集)。将腹水作对倍稀释后，与脆弱类杆菌不ATCC25285作玻片凝集，在1:64时仍可出现明显凝集。

2.3.3 用腹水单抗与脆弱类杆菌LPS在琼脂糖上作双扩试验，结果在1:1024仍可见明显单一沉淀线，说明该单抗是针对脆弱类杆菌LPS的。

2.4 SDS－PAGE及免疫印迹试验结果

经SDS－PAGE电泳后，纯化Bf－LPS仅在低分子量区域(10－17.5Kd)出现一条明显条带，而Bf外膜复合物(OM)除在与纯化Bf－LPS相应位置有一明显条带外其他区域尚可见到十余条带(图1)，表明粗制外膜复合物中除含有LPS外，还含有大量杂蛋白。经与单抗作免疫印迹分析，并与电泳图谱比较，该单抗在与Bf－LPS相应的部位都出现了棕黄色沉淀带，而与OM的其他蛋白带和大肠杆菌LPS均无此反应(图2)，说明研制的Bf－McAb对LPS具有特异性。

2.5 Bf－McAb初步应用结果

用双抗体夹心法对47株保存菌株(包括脆弱类杆菌12株，其它细菌35株)进行特异性测定，其结果除12株脆弱类杆菌呈阳性反应外，其余菌株均为阴性，未见交叉反应，阳性率100%。其测定的最低菌含量为5×10^4/ml。

3 讨论

有关脆弱类杆菌的音单克隆抗体目前国内未见报道。我们首次采用脆弱类杆菌的典型菌株ATCC25285全菌免疫BALB/C小鼠，获得一株能稳定分泌Bf－McAb的杂交瘤细胞株($2C^7$)。经鉴定该McAb具有高度的特异性，能同时与脆弱类杆菌标准株和临床分离株发生强烈反应，而不能与Bf以外的其他细菌(包括同属于脆弱类杆菌群的多形类杆菌和吉氏类杆菌)反应，表明该McAb具有高度的种特异性，可作为脆弱类杆菌的临床快速诊断或菌种鉴定的免疫学试剂。

LPS作为存在于脆弱类杆菌各菌株之间的共同抗原，目前已被多数学者接受，其抗原特异性主要存在于LPS的低聚糖部分[5,6]。对LPS的提取，早期多采用酚——水法或从外膜复合物(OM)中提取，因此其LPS往往含有荚膜多糖。我们参照Weintraub的方法提取的LPS经SPS－PAGE显示获中了较理想的高纯度，其结果与Weintraub的基本一致。将分离的LPS与Bf－McAb作免疫印迹证实是特异针对LPS的，并且能够与不同来源的

维普资讯 http://www.cqvip.com

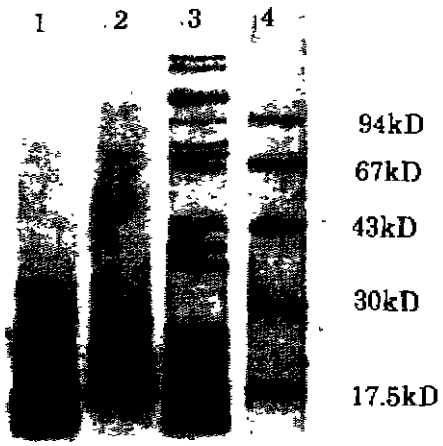


图1 Bf－LPS的SDS－PAGE结果
(1)BF－LPS (3)BF－OM
(2)E.Coli LPS (4)标准蛋白质



图2 Bf－McAb的免疫印迹结果
(1)BF－LPS (3)BF－OM
(2)E.Coli LPS

脆弱类杆菌发生阳性反应，进一步证实LPS可作为脆弱类杆菌表面的共同抗原。

脆弱类杆菌作为临床感染中最常见的细菌，由于其常规分离培养方法繁锁，条件要求高，而且时间长(一般需要7～10d)，从而限制了临床上对它的检测。国内虽然已有用多克隆抗血清制备成的荧光抗体，用于标本中脆弱类杆菌的快速诊断，但由于脆弱类杆菌LPS抗原性弱[6]，不容易获得高效价抗血清，而且用传统方法制备的家兔免疫血清其生产工艺复杂，质量难以保证，一定程度上影响了对该菌的检测。我们利用Bf－McAb与免疫酶标记技术结合，应用双抗体夹心法快速检测脆弱类杆，不但特异性强、敏感性高(其检测的最低菌量为5×10^4/ml)，而且操作简便快速，如果直接用于临床标本的检测可大大缩短检测时间，起到快速诊断目的。同时由于该方法对死菌检测同样有效，因此对某些情况下，由于抗生素使用或标本运送时间太长，导致培养阴性时，用该方法也能检测。此外，由于在检测中不需要使用荧光显微镜，尤其适宜在基层推广应用，具有良好的应用前景。

本研究仅对实验室保存菌株的检测进行了探讨，该方法实际应用于临床标本的检测，有待于进一步考证。

参 考 文 献

1.Duerden BI and Drasar BS(eds). Anaerobes in human disease. London. Edward Arnold, 1991.
2. Kasper DL et al, J Infect Dis 1975;132:440
3.Weintraub,A, et al. Infect Immun 1985;49:197
4. Tsai CM, et al. Anal Biochem 1982;119:115
5.Linke L,et al. Scand J Immunol 1987;25:469
6.赵 虎,等.上海免疫学杂志 1989;9:137

(收稿日期 1996－10－18)

The preparation of monoclonal antibodies against bacteroides fragilis and its preliminary application

Wang Yue, et al
Department of clinical microbiology

A monoclonal antibody (McAb) to Bacteroides fragilis (Bf) was produced by immunizing BALB/c mice before hybridization with whole cell of a strain of Bacteroides fragilis ATCC25285. The Bf－McAb reacted mainly against LPS of Bf by immunoblotting test. Slide agglutination test and ELISA showed that the Bf－McAb is specific to B.fragilis, it reacted only with B.fragilis strains and no cross－reaction was found with other bactereia. Developed sandwich ELISA with Bf－McAb for rapid detection of Bacteroides fragilis is highly specific and sensitive, and the diagnostic methode is simple and rapid, moreover, it's readily applicable in general laboratory.

KEY WORDS Bacteroides fragilis; Monoclonal antibody; Sandiwch ELISA; Rapid diagnosis