DOI:10.16016/j.1000-5404.1999.07.010

抗脆弱类杆菌单克隆抗体的研制与鉴定*

甘 露** 张雅萍 肖光夏 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所)重庆,400038

提 要 目的:为了获得高效价和高特异性的抗 *Bf* 抗体。方法:以脆弱类杆菌的标准株免疫BALB/C小鼠,采用杂交瘤技术选择能稳定分泌抗脆弱类杆菌的杂交瘤细胞株。结果:建立了3株稳定的杂交瘤细胞株,ELISA法测定腹水McAb效价分别为1∶6 000,1∶6 000和1∶12 000,敏感性为10^2～10^3 cfu,与其它杆菌、梭菌无交叉反应,竞争抑制试验表明3株McAb作用于细胞表面不同的抗原决定簇。将3株单克隆抗体两两混合制成单克隆抗体池用ELISA测定其敏感性较一株单克隆抗体提高2～4倍。结论:高效价和高特异性抗脆弱类杆菌的McAb对于研究脆弱类杆菌及其引起的感染性疾病有十分重要的意义。

关键词 脆弱类杆菌;单克隆抗体;ELISA
中图法分类号 R378.99;R446

脆弱类杆菌(*Bacteroids fragilis*,*Bf*)是引起外科感染尤其是化脓性感染最常见也是最重要的无芽胞厌氧菌[1,2],其98%产生β-内酰胺酶[3],因此对许多头孢类抗生素不敏感,对氨基甙类抗生素则天然耐药。本研究的目的是期望制备出高效价的抗 *Bf* 的McAb,并建立快速、简便、敏感性和特异性都较高的检测方法,为临床诊断及治疗及时提供依据,并为保护性抗体的筛选及疫苗的研制打下基础。

1 材料与方法

1.1 免疫原及主要试剂

Bf 标准株(ATCC 25285)购自美国ATCC公司,HRP标记的猪抗鼠IgG抗体、胎牛血清(FCS)及PEG等为华美生物工程公司产品,BALB/C小鼠由本校动物所提供,其它试剂为分析纯或化学纯。

1.2 单克隆抗体的制备

Bf 经0.5%甲醛生理盐水固定,0.9%生理盐水反复清洗3次,以10^9 cfu/ml常规腹腔免疫BALB/C小鼠3次,融合前3 d加强免疫1次。将免疫小鼠脾细胞与SP2/0骨髓瘤细胞在50%PEG作用下融合,HAT培养液选择性培养,采用间接ELISA法对杂交瘤培养上清进行检测筛选,经有限稀释法将阳性孔进行克隆化培养至100%孔均为阳性。扩大培养后将杂交瘤细胞接种于已腹腔注射降植烷0.5 ml一周以上的BALB/C小鼠腹腔制备腹水。

1.3 腹水单克隆抗体效价测定及纯化

1.3.1 采用间接ELISA法测定腹水McAb效价 将 *Bf* 超声粉碎后紫外分光光度计测定其蛋白浓度,以5～10 μg/ml包被酶连板,0.5%BSA-PBC封闭,加入待检样品(腹水或培养上清),设培养液阴性对照及鼠抗 *Bf* 多抗血清的阳性对照;HRP-猪抗鼠IgG染色,ODP显色系统。

1.3.2 单克隆抗体的提纯 采用饱和硫酸胺法(ASA)对腹水IgG进行粗提。沉淀物以2/3腹水量的PBS重悬。粗提后的McAb装入透析袋,置于0.01 mol/L pH7.4的PBS液中透析,透析过的McAb,过滤除菌后分装－20℃保存备用。

1.4 McAb特性分析

1.4.1 杂交瘤染色体检查 在已克隆化培养的杂交瘤细胞中加入终浓度为0.4 μg/ml的秋水仙素继续培养4 h,按常规方法低渗处理和固定,冰水滴片,空气干燥,Giemsa染色。干燥后封片计算染色体众数。

1.4.2 McAb类型测定 用羊抗鼠IgG各亚类抗血清(上海生物制品研究所)与所获腹水做琼脂免疫双向扩散。

1.4.3 McAb特异性分析 用多种杆菌及梭菌进行ELISA交叉试验。即包被相同浓度的 *Bf* 和其它各菌,再用ELISA间接法检测,同时设不包被抗原的阴性对照。

1.4.4 McAb敏感性鉴定 以 *Bf* 稀释成不同浓度(10^0～10^6 cfu/ml)的菌液进行包被,再用间接ELISA法检测。

1.4.5 McAb决定簇分析 采用竞争抑制法在包被有 *Bf* 的微孔中加入一种(稀释10倍)单抗;另一孔加入两种(稀释20倍)单抗的混合液。以间接ELISA法测定 D_{492} 值。抗体之间产生的相加效应程度用相加指数(AI)表示。$AI=[(2A_{1+2})/(A_1+A_2)-1]\times100\%$,其中 A_1 和 A_2 表示不同单抗分别与抗原作用时的 D_{492} 值,A_{1+2} 表示两种单抗混合后与抗原作用时的 D_{492} 值。当AI>40%时表示两种McAb识别不同的抗原决定簇,当AI<25%时表示两种McAb识别同一抗原决定簇。

2 结果

2.1 杂交瘤细胞系的建立

经 *Bf* 免疫的BALB/C小鼠脾细胞与SP2/0细胞用50% PEG常规融合法进行细胞融合,融合率78%,特异性抗体阳性率为13.4%,经有限稀释法连续克隆3次后,选出效价较高阳性率达100%的3株抗 *Bf* 的杂交瘤细胞系,命名为$1G_{10}$,$3H_9$和$3G_9$。经冻存复苏3月后仍能稳定分泌抗体。

2.2 McAb的鉴定

2.2.1 McAb腹水效价的测定 3株杂交瘤细胞系腹水效

* 全军"九五"攻关项目,No. 96L042
** 甘 露,男,39岁,主治医师,讲师,博士

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

价经间接 ELISA 法测定分别为 1∶6 000,1∶12 000 和 1∶6 000。纯化后蛋白含量测定抗体浓度 5～10 mg/ml。

2.2.2 杂交瘤细胞染色体检查 3 株($1G_{10}$、$3H_9$ 和 $3G_9$)克隆细胞株的染色体众数分别为 87,92,93,大多为端着丝点染色体,并有中部着丝点和亚中部着丝点的染色体。

2.2.3 McAb 亚类鉴定 用琼脂免疫双向扩散测得 3 株 McAb 亚类为 $1G_{10}$和 $3H_9$ 属 IgG1,$3G_9$ 为 IgG2a。

2.2.4 McAb 特异性鉴定 以变形杆菌、大肠杆菌、枯草杆菌、产气荚膜杆菌、厌氧性链球菌、产黑类杆菌、金黄色葡萄球菌、化脓性链球菌、白色念珠菌等包被,常规间接 ELISA 法检测,未发现有交叉反应孔。

2.2.5 McAb 敏感性鉴定 $1G_{10}$、$3H_9$ 和 $3G_9$ 的敏感性分别为 4×10^2、2×10^2、4×10^2 cfu,任何两种单抗混合后敏感性为(1～2)$\times10^2$ cfu,敏感性可提高 2～4 倍。

2.2.6 McAb 抗原决定簇的分析 竞争抑制试验表明 3 株 McAb 作用于不同的抗原决定簇,见表 1。

表 1 McAb 所针对的抗原决定簇分析

Tab 1 Analysis of epitope specific for McAb

	$1G_{10}$	$3H_9$	$3G_9$	$1G_{10}+3H_9$	$1G_{10}+3G_9$	$3H_9+3G_9$
D_{492}	0.60	0.64	0.61	0.86	0.88	0.89
AI				38.7%	40.8%	42.4%

3 讨论

脆弱类杆菌是引起外科感染尤其是化脓性感染最常见,也是最重要的无芽孢厌氧菌,尤其是脑、耳、鼻、咽喉、口腔、胸腔、腹腔、盆腔及肛周等组织的化脓性感染,80%以上的脓肿都有脆弱类杆菌参与[3～5],可见其重要性及致病性不一般。但目前的诊断主要靠分离培养法,此法除要求有特殊设备外,在临床样本的取材、送检及培养任何一个环节疏忽都将影响检出结果,临床上也往往出现许多脓液培养阴性的情况,且所需时间较长,工作较繁琐,不能及时为临床治疗提供细菌学依据。近年来,国内外学者在这方面也作大量的工作,如采用气相色谱法、多抗免疫萤光及酶标染色法,DNA 探针、PCR 等[1,6～8]。但上述各法均有优缺点,多抗免疫荧光及酶标染色法敏感性较高,但非特异性也强,气相色谱法及 PCR 特异性很高,但假阳性也不少,且设备昂贵,技术操作要求十分严格,不宜推广,本研究就是希望能找到一种不但快速、简便,而且特异性和敏感性都很高的方法。在实验中我们发现将不同抗原决定簇的单抗混在一起制成 McAb 池,不但不影响其特异性,且 McAb 池的敏感性也较单一的 McAb 抗体提高了 2～4 倍,有明显的放大效应,总之该实验研究为 *Bf* 的基础与临床研究提供了高度特异性的抗体,对 *Bf* 感染的快速诊断、治疗及预防(疫苗的研制)将有十分重要的意义。

参考文献

1 Tsarev V N, Iastrebova N E, Vaneeva N P, *et al*. The use of immunoenzyme analysis for diagnosis of an anaerobic infection of the maxillofacial area. Stomatologiia-Mosk,1995,74(1):38

2 Vazguez F, Mendez F J, Perez F, *et al*. Anaerobie bacteremia in general hospital—a retrospective five-year analysis. Rev Infect Dis,1987,9(5):1038

3 上野一惠. 厌氧菌的分离频度与分离菌种. 临床科学,1986,22(2):322

4 张雅萍,肖光夏,秦孝健. 烧伤厌氧菌感染的探索. 中华外科杂志,1991,29(4):240

5 吕文和,刘蓬蓬,张 军,等. 腹腔内感染标本厌氧菌培养结果分析. 临床检验杂志,1993,11(1):27

6 Alvarez M, Rojo P, Latorre M, *et al*. Diagnosis of anaerobic infection of the pleural fluid using gas-liquid chromatography. Enferm Infect Microbiol Clin,1993,11(2):84

7 Kuritza A P, Getty C E, Shaughnessy P, *et al*. DNA probe for identification clinically important bacteroides species. J Clin Microbiol,1986,23(2):343

8 Yamashita Y, Kohno S, Koga H, *et al*. Detection of bacteroides fragilis in clinical specimens by PCR. J Clin Microbiol,1994,32(2):679

(收稿:1999-01-30;修回:1999-04-26)

(编辑 陈聪连)

Production and identification of monoclonal antibodies against *Bacteroids fragilis**

Gan Lu, Zhang Yaping, Xiao Guangxia (Research Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To obtain highly effective and specific monoclonal antibodies (McAbs) against

* This project was supported by the "Ninth five" obligatory budget of PLA, No. 96L042

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Bacteroids fragilis. Methods: BALB/C mice were immunized with *Bacteroids fragilis* (*Bf*). The hybridoma cell lines continuously secreting McAbs against Bf were established by routine hybridoma technique. Results: Three hybridoma cell lines were screelled. The McAb titers of three hybridoma cells lines from ascetic fluid were 1∶6 000, 1∶6 000 and 1∶12 000 by ELISA test respectively. The sensitivity of the McAbs was 10^2～10^3 cfu. The McAbs did not have cross-reactivity with any other bacteroides and clostridia. The competitive inhibition test indicated that the three McAbs reacted with different epoitopes of *Bf*. The sensitivity was increased for 2 to 4 times when the McAbs were mixed to form a pool. Conclusion: The highly effective and specific McAbs plays an important role in diagnosis, treatment and prevention of the infection of *Bf*.

Key words *Bacteroids fragilis*; monoclonal antibody; ELISA

（上接 481 页）

光反射灵敏，颈部强直减轻，双上肢及左下肢肌力Ⅲ级，右下肢肌力Ⅰ级，双侧巴氏征阳性，四肢肌张力正常。22 日 8 点继续按前一日方案进行，治疗完毕后，问之能正确回答问题，并能回忆起潜水作业的深度 40 m，但诉双下肢膝关节轻度疼痛和麻木感。为防止病情反跳，故 23 日改为Ⅳ氧修定方案治疗，但压力为 5 ATA，在治疗过程中病人自诉精神明显好转，能清楚回忆起当时潜水全过程，并出现饥饿感，要求进食。24 日 8 点继续前方案治疗后，患者双下肢疼痛消失，能下床搀扶行走 10 余米，为巩固疗效，防止后续症发生，1 月 25 日起改行常规 HBO 治疗（方案同前），每日 1 次，连续治疗 16 次后症状全部消失。出院前复查：肝功酶谱、头颅核磁共振、脑电图均恢复正常。患者于 1998 年 2 月 13 日痊愈出院（住院 26 d）。出院后 10 d 回单位上班指导潜水打捞工作，经随访 5 个月无后遗症的发生。

讨论

减压病一旦确诊立即再加压治疗为此病最有效的治疗方案，如延误治疗常给治疗带来许多困难和后遗症。此患者发病地处边远长江三峡区，出现症状就地医院治疗，加之对减压病治疗认识不足，病情加重仍采用内科常规方法，治疗 2 d 无效后转入本地市级医院行 HBO 治疗，由于再加压的压力不够（舱体设备所限），加之减压时间短，故病情又进一步加重，从而延误了再加压的时间达 100 多小时，此患者主要为重型（脑型）减压病，其中枢神经系统受损以脊髓型多见，脑型少见[1~3]，对延迟治疗昏迷长达 110 h 重型减压病经再加压、HBO 等综合治疗抢救成功国内尚未见报道。

减压病再加压治疗能使其组织气泡及血管中的气栓体积迅速缩小、溶解，达到“压到病除”的作用，但由于种种原因延误治疗，特别是中枢神经系统受损的重型减压病，除上述气泡的机械作用损伤外，受损组织继发性水肿、代谢紊乱等一系列病理变化使病情进一步加重。因此，对其再加压治疗方案选择尤为重要，此例患者延迟治疗时间长达 110 h，我们根据患者作业时潜水深度、水温、作业时间、症状，参考美国及我国空气减压病再加压治疗表Ⅳ氧修定后认为其治疗压力选为 5.6 ATA 较为妥当，并延长各站上升移行的时间：①此压力高于患者潜水深度，再加压能达到使组织、微循环血管的气泡体积缩小及溶解。②由于延误治疗时间达到 100 多小时，受损的组织血液循环障碍较重，故延长各站上升移行的时间，有防止因减压时脱饱和过程中受损的局部组织气泡形成的可能[4]。③此方案中减压到 2.8 ATA 压力后可以间断地吸纯氧治疗，可使受损的组织水肿进一步减轻，特别是打断脑水肿的恶性循环，防止组织细胞的变性或坏死，为受损的组织修复和将来功能恢复打下基础。④较单纯的空气加压治疗减压的时间明显缩短，为患者出舱后进一步在病房配合药物治疗和护理留出时间。

当患者病情缓解后应经常了解病情变化，一旦出现病情反跳现象时，可再加压治疗以达治疗的彻底。本例患者在加压治疗清醒后出现双膝关节疼痛不适，考虑是再加压治疗次数不足的原因，故重新再加压治疗两次后疼痛症状消失。

对于重度延迟治疗减压病，当再加压治疗病情缓解后，应继续配合常规 HBO 治疗。HBO 有助于进一步消除局部组织水肿改善微循环，对受损的神经组织的进一步修复和功能恢复，缩短疗程和减少后遗症的发生起到重要作用。

另外在上述加压和 HBO 治疗的同时，还应针对病人的不同阶段，在再加压、HBO 或在病房治疗过程中均应早期配合其它辅助治疗以提高疗效，如给予扩溶、抗凝、抗感染、皮质激素、降低颅内压，保证足够的热量，输血浆或白蛋白，常压下吸氧和昏迷病人的护理，这对病人的早期康复起到积极作用。

关键词　减压病

中图法分类号　R845.21

参考文献

1　房广才　主编. 临床高压氧医学. 北京：华文出版社，1995. 231，516～518

2　高春锦，杨捷云　编著. 实用高压氧医学. 北京：学苑出版社，1997. 477～478. 105

3　川岛真人. 减压病. 日本医学介绍，1995，16(1)：9

4　陶恒沂，徐伟刚. 关于常规潜水减压病的诊断和治疗中应注意的几个问题. 中华航海医学杂志，1996，3(3)：130

（收稿：1998-07-20；修回：1999-03-31）

（编辑　王　红）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net