

# 抗大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*) K88抗原特异单克隆抗体的研究

刘秀梵 周维松 张如宽 严定 白凤翎 钟欣

(江苏农学院畜牧兽医系)

## 摘 要

用淋巴细胞杂交瘤技术得到了株抗*E. coli* K88抗原的特异单克隆抗体(MCA): JLZK-7, -10和-178。小鼠腹水中MCA的免疫荧光滴度达 $10^{-5} \sim 10^{-6}$ , 直接凝集滴度为1:500~1:5000, 比用常规方法生产的因子血清高100~1000倍。JLZK-7为IgG<sub>1</sub>亚类, JLZK-10为IgG<sub>2</sub>亚类, JLZK-178为IgG<sub>3</sub>亚类。这3株MCA与K88阴性大肠杆菌和肠杆菌科中的其他细菌无交叉反应。对K88阳性菌株的反应性测定表明, JLZK-7是对K88ab、K88ac和K88ad菌株都起反应的群特异MCA, JLZK-10和-178是分别仅与部分K88ab菌株和部分K88ac菌株反应的型特异MCA。试验结果表明, 这3株MCA可用于初生仔猪下痢病的诊断和大肠杆菌K88血清型鉴定。

产肠毒素大肠埃希菌(ETEC)是引起初生仔猪下痢的主要病原体之一<sup>[1,2]</sup>, 其致病作用主要决定于在小肠上皮定居和产生肠毒素的能力<sup>[3,4]</sup>。ETEC在小肠上皮定居的能力又与其表面柔毛构造上的粘着素有关。引起初生仔猪下痢的ETEC中已发现多种粘着素, 主要的有K88ab、K88ac、K99和987P<sup>[2]</sup>。粘着素抗原只存在于ETEC, 不存在于非产肠毒素*E. coli*。因此对粘着素抗原的研究无论对初生仔猪下痢病的诊断和流行病学研究还是对ETEC的血清型鉴定, 都有十分重要的意义。

K88是发现最早也是最重要的猪源ETEC粘着素抗原, 近年来国内外对此进行了大量的研究工作<sup>[2,5]</sup>。这对初生仔猪下痢病的诊断和流行病学研究, 对猪源ETEC的鉴定和有效疫苗的研制, 以及对K88抗原基因克隆的研究都起了有力的推动作用<sup>[4]</sup>。K88抗原有K88ab、K88ac和K88ad 3个血清型<sup>[4]</sup>。目前用于检测K88抗原的抗血清是用常规的方法生产的, 需进行繁复而费时的吸收, 而且最终产品效价不高, 不能保证供应, 有时还会发生交叉反应<sup>[5]</sup>。本研究应用淋巴细胞杂交瘤技术生产K88抗原特异MCA, 探讨把它们作为检测K88抗原的常规血清替代物, 用于初生仔猪下痢病的诊断和猪源ETEC株型鉴定的可能性。现将试验结果报告如下:

## 材 料 和 方 法

**一、菌种及其来源** 用作免疫抗原和测定MCA反应性的*E. coli*菌株和肠杆菌科中的其他细菌的来源见表1。*E. coli*菌株的OK血清型和粘着素血清型经常规的特异抗血清确定<sup>[5]</sup>。

**二、抗粘着素抗原兔血清** 按郭景煜等<sup>[5]</sup>介绍的方法制得。

表1 菌种及其来源

菌株数	血清型		来源	分离地点
	O血清群	粘着素抗原		
大肠埃希氏菌 4	O8, O147, O141	K88ab	中国兽医药品监察所 卫生部药品生物制品鉴定所	国外引进
27	O8, O9, O101, O26, O141, O138, O147, O149, O157, O117	K88ac	中国兽医药品监察所 卫生部药品生物制品鉴定所 北京农业大学	国外引进 国内7省市
1	O8	K88ad	美国宾州大学	国外引进
6	O149, O60, O5	K88	江苏农学院	江苏上海
6	O101, O141, O45, O64	K99	中国兽医药品监察所	国外引进 北京上海
6	O9, O132, O20, O64	987P	中国兽医药品监察所	国外引进 北京上海
6	O149, O157, O45, O60, O33	—	卫生部药品生物制品鉴定所 江苏农学院	国外引进 江苏
变形杆菌	—	—	江苏农学院	江苏
沙门氏菌	4, 12:i:12, 3	—	江苏农学院	参考株
志贺氏菌	I型	—	江苏农学院	参考株
产气杆菌	—	—	江苏农学院	江苏

三、K88ab和K88ac抗原的分离和提纯 用作免疫抗原和MCA检测的K88抗原从C83901(O8;K87, K88ab)和C83549(O149;K81, K88ac)2株E.coli制得。分离提纯的方法见文献〔6〕。

四、小鼠免疫 按文献〔6〕介绍的方法进行。

五、细胞融合和杂交瘤细胞的克隆化 细胞融合基本上按Galfre氏等〔7〕介绍的方法并作了一些改进。脾细胞与SP2/0细胞之比为5:1; PEG(分子量1000, Baker)的浓度为50%; 融合时温度为38°~40°C; 作用时间2分钟。抗体检测阳性的杂交瘤细胞用有限稀释法进行克隆化〔6〕。

六、被动血球凝集试验(PHA) 按Herbert氏〔8〕的方法用甲醛、丙酮醛固定绵羊红细胞, 并用提纯的K88抗原致敏。检测抗体时将上清液作连续倍比稀释, 然后加入致敏的绵羊红细胞, 在室温下孵育1小时判定结果。

七、酶联免疫吸附试验(ELISA) 方法见文献〔9〕。包被时K88抗原浓度为20μg/ml, 200μl/孔。兔抗小鼠IgG酶标记物为北京生物制品研究所产品。

八、间接免疫荧光试验(IIF) 同文献〔6〕。兔抗小鼠IgG+M为美国Miles公司产品。

九、直接凝集试验(DA) 测定MCA对各细菌的DA试验,取12~18小时斜面培养物,用生理盐水制成适当浓度的悬液,作玻板凝集反应。测定培养上清中MCA时,将样品滴在载玻片上,用铂耳取菌苔少许,直接在样品上磨匀即可。

十、免疫扩散试验(ID) 按常规方法进行。测定MCA时以提纯的K88ab和K88ac为抗原。测定MCA的Ig亚类时,以15倍浓缩的培养上清为抗原,用兔抗小鼠Ig亚类标准血清(美国Litton Bionetics公司产品)为抗体。

## 结 果

一、K88特异杂交瘤细胞的筛选和克隆化 用K88ab和K88ac抗原免疫的小鼠脾细胞各进行一次融合,共出现377孔杂交瘤。经PHA和IIF检测,90孔含有抗K88特异抗体。取3孔滴度高而且分泌抗体稳定的杂交瘤扩大培养并克隆化,得到3个单克隆杂交瘤株:JLZK-7,-10和-178。JLZK-7和-10是以K88ab为抗原得到的杂交瘤株, JLZK-178是以K88ac为抗原得到的杂交瘤株。

二、杂交瘤细胞分泌MCA的能力及其稳定性 JLZK-7,-10和-178均能稳定地分泌高滴度特异抗体,体外连续传代3个月或在液氮中冻存1年后复苏,抗体分泌能力无明显改变。培养上清中的MCA, IIF滴度达1:100, DA滴度为1:1, PHA滴度为1:64。小鼠腹水中MCA, IIF滴度达 $10^0$ , DA滴度达1:500-1:5000, 比常规的抗K88因子血清高100-1000倍(表2)。3株MCA在pH4.5-9.5稳定,在-70℃可长期保存。

表2 接种JLZK-7、JLZK-10和JLZK-178杂交瘤细胞的小鼠的腹水和常规抗K88因子血清的抗体滴度比较

抗体制备	检测方法	抗体制备稀释倍数					
		$10^1$	$10^2$	$10^3$	$10^4$	$10^5$	$10^6$
JLZK-7 腹水	IF	++++	++++	++++	++++	++++	++
	DA	++++	++++	++++	++	—	—
JLZK-10 腹水	IF	++++	++++	++++	++++	++++	—
	DA	++++	++++	++++	—	—	—
JLZK-178 腹水	IF	++++	++++	++++	++++	++++	—
	DA	++++	++++	++++	—	—	—
抗K88a 兔血清	IF	++++	++++	++	—	—	—
	DA	++++	—	—	—	—	—
抗K88b 兔血清	IF	++++	++	—	—	—	—
	DA	++	—	—	—	—	—
抗K88c 兔血清	IF	++++	++	—	—	—	—
	DA	++	—	—	—	—	—

表3 在IIF和DA试验中单克隆抗体与K88抗原阳性和阴性大肠埃希氏菌以及肠杆菌科中其他细菌的反应性

被试菌株数	血清型	反 应 性					
		JLZK-7		JLZK-10		JLZK-178	
		阳性反应数	阴性反应数	阳性反应数	阴性反应数	阳性反应数	阴性反应数
大肠杆菌							
4	K88ab	4	0	2	2	0	4
27	K88ac	27	0	0	27	10	17
1	K88ad	1	0	0	1	0	1
6	K88[11]	6	0	0	6	1	5
6	K99	0	6	0	6	0	6
6	987P	0	6	0	6	0	6
6	无粘着素	0	6	0	6	0	6
沙门氏菌							
2	4,12;i:12,3	0	2	0	2	0	2
变形杆菌							
2	—	0	2	0	2	0	2
志贺氏菌							
2	I型	0	2	0	2	0	2
产气杆菌							
2	—	0	2	0	2	0	2

三、MCA的Ig亚类鉴定 ID试验表明: JLZK-7为IgG1, JLZK-10为IgG26, JLZK-178为IgG3。

四、MCA对K88阳性E.coli的反应性 38株被试K88阳性菌株中4株为K88ab, 27株为88Kac, 1株为K88ad, 另外6株为K88阳性的现场分离物<sup>[11]</sup>。它们分属于12个不同的O血清群。JLZK-7与所有38个K88阳性菌株都起反应, 而JLZK-10仅与4个K88ab阳性菌株中2个起反应, JLZK-178仅与33个K88ac菌株中的11株起反应(表3)。

五、MCA与K88阴性E.coli的反应 3株MCA与所有被试的18个K88阴性菌株均不发生反应。这些菌株包括6个K99菌株, 6个987P菌株和6个不带任何粘着素抗原的非产肠毒素E.coli菌株(表3)。

六、MCA对肠杆菌科中其他细菌的反应性 表3还显示这3株MCA对沙门氏菌、志贺氏菌, 变形杆菌和产气杆菌等肠杆菌科中的其他细菌均不发生反应。

七、MCA在各种不同血清学试验中的反应性 这3株MCA在PHA、IIF、ID、ELISA和DA试验中均能检测出样品中存在的K88抗原。

## 讨 论

抗ETEC粘着素的特异MCA在国内仅有我们不久前的一篇报告<sup>[6]</sup>, 在国外Sherman等报道了抗K99特异MCA<sup>[12]</sup>, 但针对K88抗原的MCA尚未见之于文献。本文介绍的3株K88特异MCA, 小鼠腹水滴度比常规抗K88因子血清高100~1000倍(表2)。这些MCA经38株K88阳性和18株K88阴性E.coli及肠杆菌科中其他细菌的反应性测定, 证明它们是仅与K88阳性E.coli起反应, 不与K88阴性E.coli和肠杆菌科中其他细菌起反应的K88抗原特异MCA(表3)。这3株MCA对K88抗原的特异性从下面事实得到进一步证实, 即它们与K88阴性E.coli中含K99抗原或987P抗原的菌株也不发生反应。

JLZK-7对K88ab、K88ac和K88ad都发生反应, 因此它是针对K88抗原中成分a的群特异MCA。被试的38个K88阳性株分属于12个不同的O抗原群, 包括从不同国家引进的参考株和国内7个省市的分离物, 无一例外地均与JLZK-7发生反应, 表明JLZK-7所针对的抗原决定簇在K88阳性菌的表达是很稳定的。这意味着用JLZK-7检测K88阳性菌时不会漏检, 它可以取代常规抗血清用于初生仔猪下痢病的诊断和E.coli K88抗原的日常鉴定。

JLZK-10和-178分别仅与部分K88ab菌株和部分K88ac菌株反应, 是针对K88抗原中成分b和c的型特异MCA。它们不能检出全部的K88ab菌株和K88ac菌株, 表明它们所针对的抗原决定簇在K88ab菌株和K88ac菌株的表达是不恒定的。最近的研究指出<sup>[4]</sup>, 构成K88抗原成分b、c和d的有多个不同的抗原决定簇, 它们的表达常出现一些差异。因此要制备出能检测出全部K88ab菌株、K88ac菌株或K88ad菌株的分别针对成分b、c和d的MCA将是很困难的。有关研究正在进行中。

本文中报道的3株MCA在5种血清学试验中均能与K88抗原反应, 使它们在临床诊断和基础研究中有可能获得广泛应用, 可根据具体的情况选择合适的检测方法。一种使用JLZK-7直接检出粪便或肠内容物样品中K88抗原的ELISA试验已经建立。这种试验灵敏度高, 所需设备简单, 可迅速检测大量样品, 便于推广使用。

## 参 考 文 献

- [1] 方定一等, 1983, 仔猪白痢大肠杆菌及其特异防治的研究. 畜牧兽医学报, 6(1): 107—115.
- [2] Wilson, M.R., 1981. Enteric Colibacillosis. in Leman, A.D. (ed), Diseases of Swine. The Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA.
- [3] Smith, H.W. et al., 1967. Observations by the ligated intestinal segment and oral inoculation methods in *Escherichia coli* infections in pigs, calves, lambs, and rabbits. J. Pathol. Bacteriol. 93:499—529.
- [4] Gaastra, W. et al., 1982. Host-specific fimbrial adhesins of noninvasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. Microbiol. Rev. 46(2): 129—161.
- [5] 郭景煜等, 1980, 新生仔猪大肠菌病K88<sup>+</sup>抗原菌株分离. 中国兽医杂志, 10:2-5.
- [6] 刘秀梵等, 1985, 抗大肠埃希氏菌粘着素K88的特异单克隆抗体的产生及其特性测定. 江苏农学院学报, 6(1): 1—6.
- [7] Galfre, G. et al., 1977. Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines. Nature. 266:550—552.
- [8] Herbert, W.J., 1978. Passive hemagglutination with special reference to the tanned technique. In Weir, D.M. (ed), Handbook of experimental immunology, Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.
- [9] Engvall, E., Perman, P., 1972. Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. III Quantitation of specific antibodies by enzyme-labelled anti-immunoglobulin in antigen coated tubes. J. Immunol. 100:129-135.
- [10] Lee, L.F., et al., 1983. Monoclonal antibodies with specificity for 3 different serotypes of Marek's diseases in chickens. J. Immunol. 130:1003-1006.
- [11] 崔治中, 1980, 仔猪黄痢的研究——大肠杆菌对肠上皮细胞的吸着性及肠道病原性试验. 家畜传染病, 4:24-30.
- [12] Sherman, D. M. et al., 1983. Protection of calves against fatal enteric colibacillosis by orally administered *E. coli* K99 specific monoclonal antibody. Infect. Immun. 42:653-658.
- [13] Ørskov, I. et al., 1964. K antigens K88ab(L) and K88ac(L) in *E. coli*. A new O antigen, O147 and a new K antigen K89(B). Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B. 62:439-447.
- [14] Guinee, P.A.M. et al., 1979. Behaviour of *E. coli* K antigens K88ab, K88ac, and K88ad in immunoelectrophoresis, double diffusion and hemagglutination. Infect. Immun. 23:700-705.

MONOCLONAL ANTIBODIES SPECIFIC FOR K88 ADHESION  
ANTIGENS OF ENTEROTOXIGENIC *E. COLI* AND THEIR REACTIVITIES  
WITH K88 POSITIVE AND NEGATIVE STRAINS

Liu Xiufan, Zhou Weisong, Zhang Rukuan, Yan Ding,  
Bai Fenglin, Zhong Xing

(*Department of Animal Husbandry and Veterinary Medicine,  
Jiangsu Agricultural College*)

**Abstract**

Three hybridoma cell lines, JLZK-7, JLZK-10, JLZK-178, secreting specific antibodies to K88 adhesin antigens of enterotoxigenic *E. coli* from swine were derived from two separate fusions between mouse myeloma cell line SP2/0 and spleen cells from mice immunized with purified K88 adhesin antigens. The antibodies from culture supernatant had titers up to 100 in the indirect immunofluorescence test, and those from mouse ascitic fluid had titers ranging from  $10^5$ - $10^6$ . As shown in either immunofluorescence test or direct agglutination test, MCA JLZK-7 belonged to the type common, i.e. it reacted with all the K88 adhesin bearing *E. coli* strains tested, including K88ab, K88ac, or K88ad; MCAs JLZK-10 and JLZK-178, on the other hand, belonged to the type specific, i.e. they only reacted with K88ab or K88ac bearing *E. coli* strains. All the 3 MCAs did not react with *E. coli* strains bearing adhesins other than K88 *E. coli* strains without any adhesins, and other bacterial species in the family of Enterobacteriaceae.

**欢迎订阅《中国兽医杂志》**

《中国兽医杂志》是由中国畜牧兽医学编辑的中央级兽医专业综合性期刊。本刊贯彻“百花齐放，百家争鸣”的方针，坚持普及与提高相结合以及理论联系实际的原则，传播兽医科学知识，交流兽医技术经验。介绍国内外兽医学术动态和进展，为我国畜牧兽医事业的发展和兽医科学技术的现代化服务。栏目有：调查研究、临床资料、经验交流、中西兽医结合、兽医卫生检验、文献综述、兽医知识、兽医讲座、兽医药械、学术讨论、兽医咨询、书刊介绍、及兽医动态等。1953年创刊。月刊、农业出版社出版。公开发行。国内订阅：全国各地邮局(所)，国内邮政刊号：2—137。正页56，开本16，单价0.70元。编辑部地址：北京农业大学兽医学院。本刊适合基层畜牧兽医工作者及科研院校专业人员阅读。