

粗糙型布鲁氏菌单克隆抗体的制备及应用于种型鉴定的实验研究

中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所

鲁齐发 尚德秋 王惠秋 常炳功 张 伟

提要 应用首次制备的犬种及绵羊附睾种布鲁氏菌单克隆抗体对不同种型布鲁氏菌株检测的实验研究表明,两种单克隆抗体对粗糙型布鲁氏菌具有特异性,可应用于粗糙型与光滑型布鲁氏菌的鉴别,并且较之常规凝集试验,不仅可定性或定量检测,而且应用ELISA试验检查具有很高的敏感性。

关键词 布鲁氏菌 单克隆抗体 酶联免疫吸附试验

迄今,在国内外已相继制备了多种布鲁氏菌单克隆抗体并已应用于布鲁氏菌病的诊断与鉴别诊断〔1~3〕。但对粗糙型布鲁氏菌单克隆抗体的制备并应用于种型的鉴定目前尚未见有报道。

1988年我们报道了在国内首次制备出抗布氏菌表面抗原A和M的单克隆抗体并应用于光滑型布氏菌种型鉴定之后,我们又先后制备了犬种(*B.canis*)及绵羊附睾种(*B.ovis*)粗糙型单克隆抗体,在实验条件下,对部分布氏菌株进行了种型鉴定的研究,现将结果简述如下。

材料与方 法

一、布氏菌株:主要有犬种RM6/66、绵羊附睾种63/290、羊种16M、牛种544A、猪种1330S以及从现场获得的部分犬种布氏菌。

二、试剂:主要有DMEM培养粉(GIBCO产品),氨基喋呤(Aminopterin, Sigma产品),次黄嘌呤(Hypoxanthin, Sigma产品),胸腺嘧啶核苷(Thymidine, Sigma产品)及小牛血清(中国科学院生物物理所生物化学试剂厂产品)。

三、实验动物及其免疫:所用动物均为本所饲养的BALB/C雌性6~10周龄小鼠。

免疫方法:用犬种RM6/66或绵羊附睾种63/

290加热杀死的菌悬液,首次需制成福氏不完全佐剂于BALB/C小鼠腹腔内注入0.5ml/只(含菌 5×10^8 /ml);两周后再注入菌悬液0.5ml/只(5×10^8 /ml),融合前4日再重复注射一次。

四、融合方法:见参考文献〔5〕。

五、小鼠腹水单克隆抗体的制备:事先用灭菌液体石蜡0.5ml/只注入小鼠腹腔内,7~10天后以同样途径注入杂交瘤细胞 1×10^6 (0.5ml/只),大约7~14天可得腹水,经离心取其上清即可。所得腹水单克隆抗体可进一步纯化,也可直接应用。

实验结果

一、融合情况:对*B.canis*,在2个24孔培养板共计48孔中,阳性者17孔,融合率为35.4%;对*B.ovis*,在2个培养板共计48孔中,阳性者2孔,融合率4.2%。

二、单克隆细胞上清及腹水单克隆抗体的检查结果:见表1、2。从表1、2可知,对*B.canis*或*B.ovis*细胞上清液的单克隆抗体,应用ELISA检查OD值是较高的,分别达1.36和0.95, SAT检查其滴度较低,分别为1:40和1:8,而用RBPT检查则均为阴性。对腹水中的单克隆抗体,上述三种试验均可获阳性结果,尤其ELISA可达1:12800。

表1 SAT及RBPT的检查结果

Mab	细胞上清液		腹	水
	SAT	RBPT	SAT	RBPT
<i>B. canis</i>	1:40	—	1:6400	+
<i>B. ovis</i>	1:8	—	1:1600	+

SAT: 试管凝集试验; RBPT: 虎红平板凝集试验

表2 ELISA检查结果

Mab	细胞上清液 (OD值)	腹 水
<i>B. canis</i>	1.36	1:12800
<i>B. ovis</i>	0.95	1:12800

三、两种单克隆抗体分别与犬种 RM6/66 及绵羊附睾种63/290布氏菌抗原的检查结果: 见表3。从表3不难看出, 犬种布氏菌单克隆抗体对犬种布氏菌及绵羊附睾种布氏菌抗原, 用SAT检测的抗体滴度分别为 1:6400 和 1:3200, 用ELISA检测的抗体滴度分别为 1:12800和1:6400, 均只相差1个稀释度, *ovis* 种布氏菌单克隆抗体, 用SAT检测的抗体滴度也只相差2个稀释度, 尤其是用ELISA检测其抗体均相同, 表明两者间存在难于鉴别的交叉反应。

表3 SAT及ELISA对两种单克隆抗体 (腹水) 的检查结果

Mab	试验方法	对 <i>B. canis</i>	对 <i>B. ovis</i>
		布氏菌抗原	布氏菌抗原
<i>B. canis</i>	SAT	1:6400	1:3200
<i>B. ovis</i>	SAT	1:400	1:1600
<i>B. canis</i>	ELISA	1:12800	1:6400
<i>B. ovis</i>	ELISA	1:12800	1:12800

四、两种单克隆抗体对部分布氏菌株的检查结果: 鉴于研究的需要, 本次检查的菌株包括了实验室常用的三个种的标准株即羊种 16M、牛种544A和猪种1330S, 另一部分是来

源于部分疫区并已获得明确鉴定结果的菌株。为了便于比较, 所有待检菌株均统一采用48小时培养物制成的系列菌悬液浓度 (表4)。

不难看出, 这两种单克隆抗体对三个种布氏菌标准株(16M、544A和1330S), 均为阴性反应, 但对绵羊附睾种63/290、犬种RM6/66以及从部分省疫区分离的并经鉴定定为犬种布氏菌的所有菌株均为阳性反应, 检出菌量范围在0.15亿/ml~1.25亿/ml, 特别是犬种布氏菌单克隆抗体对两株非典型菌 (粗糙型) 也为阳性反应, 从而清楚地表明, 应用这两种单克隆抗体, 虽然不能进行布氏菌种的鉴定, 但在确定粗糙型布氏菌上是可行的。

讨 论

1. 上述的犬种及绵羊附睾种布氏菌单克隆抗体, 虽然对三个种布氏菌标准株 (16M、544A及1330S) 均不存在交叉反应, 但在犬种及绵羊附睾种布氏菌间, 无论采用试管凝集试验或酶联免疫吸附试验检查, 均可出现难于鉴别的交叉反应。当然, 无论在国内或国外所制备的光滑型布氏菌单克隆抗体, 与各种型布氏菌(光滑型)也可出现明显的交叉反应〔4, 5〕。这可能是与在光滑型或粗糙型布氏菌间具有共同的抗原决定簇有关。对于布氏菌属各个种间, 也可能存在具有种特异性的抗原簇, 由此筛选出的单克隆抗体, 应用于布氏菌种型的鉴定是可能的。鉴于我们制备的布氏菌单克隆抗体的种类及数量很少, 难于定论, 这需要今后进行大量的工作。

2. 目前, 尽管对粗糙型布氏菌可应用血清凝集试验进行确定〔6〕, 但这种方法仅为定性检查且敏感性较低。

从上不难看出, 应用上述制备的犬种或绵羊附睾种布氏菌单克隆抗体, 特别是采用ELISA对粗糙型布氏菌的确定, 不仅可作为定型或定量性检测, 而且其敏感性明显高于凝集试验。

表4

ELISA 检 查 结 果

Mab	布氏菌	菌 悬 液 (亿/ml)							
		10	5	2.5	1.25	0.62	0.31	0.15	0.075
<i>B. canis</i>	<i>ovis</i> 63/290	+	+	+	+	+	+	+	-
	RM6/66	+	+	+	+	+	+	+	-
	86015*	+	+	+	+	+	+	-	-
	86018*	+	+	+	+	+	-	-	-
	88001*	+	+	+	+	+	-	-	-
	86061**	+	+	+	+	-	-	-	-
	86062**	+	+	+	+	+	+	+	-
	16M	-	-	-	-	-	-	-	-
	544 A	-	-	-	-	-	-	-	-
	1330S	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. ovis</i>	<i>ovis</i> 63/290	+	+	+	+	+	+	+	-
	RM6/66	+	+	+	+	+	+	+	-
	86030*	+	+	+	+	-	-	-	-
	87058*	+	+	+	-	-	-	-	-
	88019*	+	+	+	+	+	+	-	-
	88030*	+	+	+	+	-	-	-	-
	544A	-	-	-	-	-	-	-	-
	16M	-	-	-	-	-	-	-	-
	1330S	-	-	-	-	-	-	-	-

* 分别从广东、广西、湖北、浙江、内蒙和辽宁省疫区分离，经鉴定为犬种布氏菌
** 从青海省分离，常规试验不能定种（粗糙型），后经氧化代谢试验确定为羊种布氏菌

An Experimental Study on Preparing Mono-
clonal Antibodies of rough Brucella Spp.
and Identification Species Brucella Lu
Qifa, et al., Institute of Epidemiology
and Microbiology, Chinese Academy of
Preventive Medicine, Beijing

A report of preparation of monoclonal antibodies of *B. canis* and *B. ovis* and the use of identification for rough species of Brucella was described. The results showed that the above two monoclonal antibodies were specific for rough Brucella Spp. The use of the above described monoclonal antibodies gave us the possibility to differenate rough and smooth Brucella species. The results also showed that the ELISA using monoclonal antibodies of rough Brucella Spp. was more specific than the agglutination test using routine antibodies of rough

Brucella.
Key words Brucella Monoclonal an-
tibodies ELISA

参 考 文 献

1. Bundensen PG, et al. Monocal antibodies directed against Brucella abortus cell surface antigens. Vet Immunol Immunopathol 1985; 8 : 245.
2. Holman PJ, et al. Derivation of monoclonal antibodies against Brucella abortus antigens. Vet Immunol Immunopathol 1983; 4 : 603.
3. 卢景良, 等. 羊型布鲁氏菌单克隆抗体的研究I. M28 ID₂ C-1杂交瘤株的建立. 家畜传染病 1984; 4 : 4.
4. Douglas JT, Palmer DA. Use of monoclonal antibodies to identify the distribution of A and M epitopes on smooth Brucella species. J Clin Micro 1988; 26 (7) : 1353.
5. 鲁齐发, 等. 布氏菌单克隆抗体制备及应用于布氏菌种型鉴定的研究. 中国地方病防治杂志 1989; 3 (布病增刊) : 44.
6. 姜顺求主编. 布鲁氏菌病防治手册. 北京: 人民卫生出版社, 1984 : 49~59.

(1989年5月1日收稿, 1989年10月5日修回)