

抗黄疸出血群70091株钩端螺旋体 外膜抗原单克隆抗体的研制

微生物学教研室 陆森泉 严 杰 罗海波 陈少菲

免疫研究室 沈建根

内容提要 本实验建立了一株分泌抗黄疸出血群钩端螺旋体外膜抗原的单克隆杂交瘤细胞株ZMA₃。ZMA₃单克隆抗体具有较高的群特异性,经鉴定该抗体属IgG_{2a}亚类。该杂交瘤细胞株经体外持续培养7个月余,分泌抗体性能稳定。

关键词 钩端螺旋体 抗原 单克隆抗体

钩端螺旋体(简称钩体)外膜是钩体抗原的主要成分,具有良好的免疫原性^[1]。汪军等曾成功地建立了分泌抗波摩那型109株钩体外膜抗原的杂交瘤细胞株^[2]。但长期以来我省钩体病的主要流行菌群为黄疸出血群钩体,因此研制抗黄疸出血群钩体外膜抗原的单克隆抗体具有更重要的现实意义。本文报道应用杂交瘤技术建立了一株能分泌抗黄疸出血群70091株外膜抗原单克隆抗体的杂交瘤细胞株(定名为ZMA₃),并对其分泌的单克隆抗体进行了鉴定和研究。

材 料 和 方 法

一、实验动物 BALB/c小鼠

二、肿瘤细胞系 小鼠骨髓瘤细胞P₃-NS₁-Ag4/1。

三、外膜抗原及钩体菌株 黄疸出血群70091株外膜抗原获自卫生部上海生物制品研究所。黄疸出血群56102、56103、56104、56105、56106和56108菌株购自中国药品生物制品检定所,该6型钩体外膜抗原按鲍行豪等介绍方法制备^[3]。其余各型钩体菌株系本实验室保存的国内标准菌株。

四、小鼠免疫脾细胞 以黄疸出血群70091株钩体外膜(加有等量福氏完全佐剂)免疫BALB/c小鼠,每鼠皮下注射1.5mg(分4点),以后每隔一周皮下注射外膜抗原(不加佐剂)1.5mg,共加强2次。末次经尾静脉加强注射1.2mg,3天后将小鼠处死,取脾细胞进行融合。

五、细胞融合、培养和诱生腹水 按常规方法进行^[4]。

六、杂交瘤染色体检查 按常规方法进行。

七、抗体的检测和鉴定

1.显微镜凝集试验(MAT) 按常规方法操作及判断结果。

2.酶联免疫吸附试验(ELISA) 以钩体外膜抗原稀释液(蛋白含量为1.5mg/ml)包被微孔板,加待检抗体,然后加辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠IgG(稀释度为1:1500),选用邻苯二胺作底物。以含抗人B型红细胞单克隆抗体的小鼠腹水或培养液作为阴性对照。

3.单克隆抗体的亚类鉴定 将PEG浓缩后的ZMA₃培养上清液与上海生物制品研究所生产的兔抗鼠IgG、IgG₁、IgG_{2a}、

IgG_{2b}、IgG₃及IgM作琼脂双向免疫扩散试验,进行亚类鉴定。

结 果

一、细胞融合结果 在48孔中获杂交瘤41孔,杂交瘤形成率为85.4%。其中分泌抗体的杂交瘤9孔,占杂交瘤的21.95%。

二、杂交瘤细胞的克隆化培养 从9个阳性杂交瘤孔中挑选出MAT凝集较强的阳性孔杂交瘤细胞(ZMA₃),用有限稀释法连续进行3次克隆化培养,成为稳定分泌抗黄疸出血群钩体外膜抗原单克隆抗体的杂交瘤细胞株。其余8孔以液氮保存。

三、杂交瘤细胞及其染色体核型分析 骨髓瘤NS₁细胞的染色体为65,小鼠脾细胞的染色体为40,杂交瘤ZMA₃的染色体在83~104间,多数为95~98。

四、诱生腹水和肿瘤病理观察 在预先注射石蜡油的BALB/c小鼠腹腔内注射ZMA₃杂交瘤细胞,10天后即诱生出腹水。腹水经MAT与ELISA检测,抗体效价分别达1:25 600及1:51 200。诱生腹水的显凝效价较杂交瘤细胞培养上清液高400倍。解剖后可见腹腔脏器表面布满大小不等的瘤结节。ZMA₃杂交瘤细胞接种于BALB/c小鼠腋窝皮下可诱生实体瘤。瘤组织经病理切片检查证实均为恶性淋巴瘤。

五、ZMA₃分泌抗体的特异性检测 在MAT检测中,杂交瘤细胞诱生腹水对同群内不同型钩体多数可产生不同程度的凝集反应,对异群钩体则不发生交叉凝集现象。对诱生腹水作ELISA检测,群内交叉试验结果与MAT基本一致,而抗体效价明显增高(附表)。

六、单克隆抗体Ig亚类鉴定 经琼脂双向扩散试验证实,ZMA₃单克隆抗体属于IgG_{2a}。

七、ZMA₃分泌抗体的稳定性 ZMA₃杂交瘤细胞株经体外持续培养7个月余,分

附表 抗黄疸出血群70091株钩体外膜抗原单克隆抗体(腹水)的MAT和ELISA反应特性

血清群	血清型	检定所 菌 号	效价测定	
			MAT	ELISA
黄 疸 出 血	赖	56601	1:12 800	未测
	黄疸出血	56102	1:25 600	1:51 200
	纳姆	56103	1:6 400	1:51 200
	曼卡索	56104	1:6 400	1:12 800
	萨明	56105	—	1: 400
	比尔金	56106	1:12 800	1:51 200
	恩坦巴里	56108	1:3 200	1:51 200
	沃尔登	70091	未测	1:51 200
流感伤寒	临 6	56609	—	未测
秋 季	秋季	56606	—	未测
波 摩 那	波摩那	56608	—	未测
七 日 热	七日热	56610	—	未测

注:—显凝试验阴性

泌抗体性能稳定。经液氮冻存,复苏后生长良好,分泌抗体能力未见衰退。

讨 论

单克隆抗体不同于多克隆抗体,有严格的特异性,因此可用于钩体菌群(型)分类。Terpstra等使用杂交瘤技术,将对当地人畜都很重要的病原型哈勒焦型(Hardjo)与赛罗群中其他的血清型融合,获得了一套13种单克隆抗体。联合应用这些单克隆抗体获得的独特凝集反应型式,可用以鉴别该群各型钩体⁽⁶⁾。同年,Kobayashi等也应用单克隆抗体作了黄疸出血群血清学分析⁽⁶⁾。

国内抗钩体单克隆抗体的研究首推汪成孝等⁽⁷⁾。汪军等⁽²⁾首次应用波摩那型109株钩体外膜抗原进行杂交瘤融合技术,筛选获得3株分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株LS₁₆、LS₂₂和LS₂₈,其中LS₂₂和LS₂₈单克隆抗体在MAT及ELISA中仅对同株钩体及其外膜抗原出现特异性反应。而LS₁₆为非凝集抗体,在ELISA检测中可与其他7个不同血清群的代表型及同群不同型钩体发

生一定程度的交叉反应。因此汪军等认为钩体外膜抗原的特异性并非仅限于群, 其中既存在凝集抗原, 也存在非凝集抗原。

本实验将NS₁骨髓瘤细胞与黄疸出血群70091株钩体外膜免疫的小鼠脾细胞融合, 建立了一株持续分泌抗黄疸出血群70091株外膜抗原的单克隆杂交瘤细胞株ZMA₃。在MAT检测中发现ZMA₃单克隆抗体具有较高的凝集效价, 对黄疸出血群中大多数不同型钩体菌株可发生不同程度的凝集, 而对我省其他主要流行菌群如流感伤寒群、秋季群、波摩那群及七日热群菌株均不发生交叉凝集反应, 表明ZMA₃单克隆抗体具有较高的群特异性。此结果与以往报道的钩体外膜抗原具有群特异性是相一致的。至于以黄疸出血群钩体外膜抗原制备的单克隆抗体, 在钩体抗原分析和菌群(型)鉴定上的实用意

义, 尚有待于进一步研究。

(本文杂交瘤病理切片由余心如副教授、肖森医师协助进行, 特此致谢)

参 考 文 献

1. 罗海波. 钩端螺旋体病原学, 魏曦主编《钩端螺旋体病学》第1版, 北京: 人民卫生出版社, 1982; 14.
 2. 汪 军, 等. 中国人兽共患病杂志 1986; 2(3): 7.
 3. 鲍行豪, 等. 微生物学报 1980; 20(3): 316.
 4. 沈建根, 等. 浙江医科大学学报 1985; 14(6): 251.
 5. 罗海波, 等. 中国人兽共患病杂志 1986; 2(4): 32.
 6. Kobayashi Y, et al. Microbiol Immunol 1985; 29(12): 1229.
 7. 汪成孝, 等. 四川医学院学报 1984; 16(1): 11.
- (1987年9月1日收稿, 1987年10月10日修回)

PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST THE OUTER-ENVELOPED ANTIGEN OF LEPTOSPIRA INTERROGANS SEROGROUP ICTEROHAEMORRHAGIAE STRAIN 70091

Lu Miaoquan, et al.

Department of Microbiology

This study reports the establishment of a hybridoma cell line (ZMA₃) which secretes monoclonal antibody (McAb) to the OE antigen of leptospiral strain 70091 by cell fusion between mouse NS₁-Ag4/1 myeloma cells and spleen cells of BALB/c mice immunized with OE antigen prepared from *L. interrogans* serogroup icterohaemorrhagiae strain 70091. Analysis of MAT and ELISA has demonstrated to McAb of ZMA₃ to possess a higher group specificity. It could react to the most serovars of the homologous serogroup, but fails to agglutinate any leptospira of other serogroups such as Grippityphosa, Autumnalis, Pomona and Hebdomadis. ZMA₃ has been proved to be able to secrete McAb in vitro for more than 7 months.

The immunoglobulin of ZMA₃ antibody has been confirmed by immunodiffusion, to be of subclass IgG_{2a}.

KEY WORDS Leptospira Antigen Monoclonal Antibody