

金黄色葡萄球菌 C₂ 型肠毒素抗血清的制备

雷祚荣 曲丽云 王鲁明

(军事医学科学院微生物流行病学研究所,北京)

日益发展的免疫学诊断方法的首要条件是获得特异高效价抗血清。金黄色葡萄球菌(以下简称金葡菌)各型肠毒素诊断血清尚无商品供应,多数实验室都自己制备,因此免疫方案各不相同。金葡菌肠毒素分子量小、毒性大、免疫需要佐剂和小剂量逐渐增加的多次注射,毒素用量大。Genigeorgis 等^[1]利用减少抗原用量的水剂抗原注射方案,我们曾用它制备 C₁ 型肠毒素血清,造成了 90% 动物死亡。为此改进了 Genigeorgis 的方案,得到了较为满意的结果。本次实验试图以改进的 Genigeorgis 方案制备 C₂ 型肠毒素血清。同时观察 MDP 和 BCG 的佐剂效果。MDP 代替 BCG 对肠毒素免疫的佐剂作用,尚未见到国内外的文献报道。

材 料 和 方 法

(一) 抗原制备

1. 菌株: FRI₃₆₁ 株,产 C₂ 型肠毒素(Bergdoll 教授供给)。

2. 产毒: 培养基由 4% 蛋白胨胰酶消化酪蛋白,0.0001% 维生素 B₁, 0.001% 烟酸组成。用玻璃纸覆盖琼脂方法产毒^[2]。

3. 肠毒素提取: 按 Avena^[3] 方法加以改变。用 CM-纤维素和葡聚糖凝胶两步法提取毒素, Oudin 试验测毒,毒素纯度 90%。

(二) 免疫方案

1. 改进的 Genigeorgis^[1] 方案: 将水剂抗原注射改为佐剂抗原。I 组、II 组肠毒素纯度 90%, 福氏完全佐剂。II 组以 MDP 代替佐剂中的 BCG, 用量 400 μ g/kg 体重。III 组肠毒素纯度 46%, 福氏完全佐剂。处理方法见表 1。

表 1 处理方法

注射次数	间隔(周)	剂量 (mg/0.5ml)	注射途径
1		0.01	皮下
2	1	0.02	皮下
3	1	0.11	肌肉
4	1	0.58	肌肉
5	4	2.00	肌肉
6	4	5.70	肌肉
7	放血	10.00	肌肉

2. 动物: 青紫兰家兔, 雌性, 体重 2—3kg, 没有测出 C₂ 型肠毒素自然抗体。每组用 5 只。

3. 注射: 每针剂量注射两个点, 背部皮下或臀部肌肉。每次加强注射的同时, 腹腔注射 20ml 5% 无菌葡萄糖盐水, 以增强家兔抵抗力。

4. 采血: 抗体效价达到 1:64 以上即可放血。

5. 抗血清效价测定: 双向琼脂玻片扩散实验。对照品 C₂ 型肠毒素和抗肠毒素由 Bergdoll

本工作得到李刚副研究员的指导, 陈钰同志参加部分工作, 特此致谢。

实验结果

(一) 胞壁酰二肽与卡介苗佐剂效果比较

从肠毒素免疫抗体产生滴度动态看出,基础免疫后 MDP 组抗体滴度上升较快,BCG 组上升较慢。双向琼脂玻片扩散平均效价前者为 21,后者为 6。加强免疫后,两组抗体滴度动态曲线基本相同。第一次注射,抗体效价平稳上升。第二次注射后的第 3 周抗体效价达高峰,第 4 周下降。第三次注射抗体效价高峰在第 4 周出现。无论是 MDP 还是 BCG 佐剂组都能获得高效价抗肠毒素血清。MDP 组 3/5 家兔双向琼脂玻片扩散抗体滴度 1:128,BCG 组是 2/5 达 1:128 (见表 2)。BCG 组有一只家兔直到加强注射一次后,血清中仍没有可测出的抗体,因而弃掉。

表 2 MDP 和 BCG 佐剂效果比较

兔 号	双向琼脂玻片扩散效价	
	BCG	MDP
1	1:128	1:64
2	—*	1:32
3	1:64	1:128
4	1:64	1:128
5	1:128	1:128

* 基础免疫和第一针追加注射后血清无效价。

(二) 两种纯度肠毒素免疫效果的观察

为了获得粗肠毒素血清,供鉴定肠毒素纯度使用,我们用 46% 纯度和 90% 纯度抗原免疫家兔。90% 纯度抗原组抗血清效价较高,双向琼脂玻片扩散效价 1:64—1:128,46% 纯度组较低,为 1:32—1:64 (见表 3)。低纯度抗原组有 3 只家兔最后一次加强注射后反应重,在 1—2 周内死亡。

两种纯度的肠毒素免疫,动物产生抗体滴度逐渐上升,46% 纯度组上升幅度稍大。第二次加强注射后第 3 周抗体效价达高峰,第 4 周下降。最后一次加强注射后的抗体滴度动态,第 1 周上升,第 2 周下降,第 3 周上升,第 4 周上升到最高峰。但是 46% 纯度组第 3 周后不

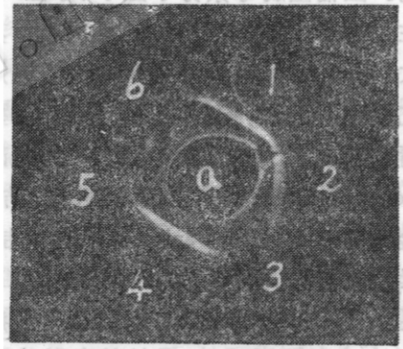
兔 号	双向琼脂玻片扩散效价	
	90% 纯度抗原	46% 纯度抗原
1	1:128	1:32
2	—*	1:64
3	1:64	1:64
4	1:64	1:32
5	1:128	1:32

*: 基础免疫后未产生抗体。

上升。

(三) 交叉反应试验

双向琼脂扩散试验, C_1 型肠毒素抗血清和 A、D 型肠毒素没有沉淀线产生,而与 B 型肠毒素有较清晰的沉淀线,但与 C_1 型肠毒素不融合。 C_2 型肠毒素抗血清与 A、B 型肠毒素不出现沉淀线,而和 D 型肠毒素有较致密的沉淀线,同 C_2 型肠毒素的沉淀线也不融合 (见图 1、2)。

图 1 双向琼脂扩散试验 (C_1 型肠毒素抗血清)

中心孔: a 为 C_1 型肠毒素抗血清。

周围孔: 1. C_1 型肠毒素 (100 μ g/ml)

2. 对照 C_1 型肠毒素 (100 μ g/ml)

3. A 型肠毒素 (100 μ g/ml)

4. C_1 型肠毒素 (100 μ g/ml)

5. B 型肠毒素 (100 μ g/ml)

6. 对照 D 型肠毒素 (100 μ g/ml)

(四) 抗血清的鉴定

对所制的三组免疫血清,以 Bergdoll 教授提供的对照品 C_2 型肠毒素和我们制备的 C_2 型肠毒素,进行双向琼脂扩散试验。结果: 1. 三组 C_2 型肠毒素抗血清同 90% 和 46% 纯度 C_2 型肠毒素,90% 纯度 C_1 型肠毒素以及对照 C_2 型肠毒素产生的沉淀线融合 (见图 3)。2. 对照

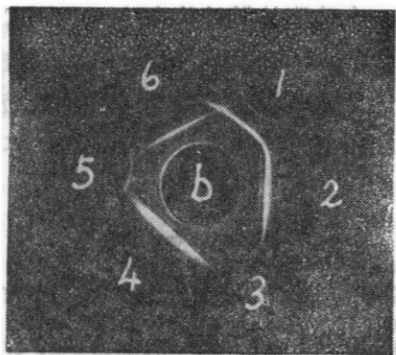


图2 双向琼脂扩散试验(C_2 型肠毒素抗血清)

中心孔: b 为 C_2 型肠毒素抗血清。

- 周围孔: 1. C_2 型肠毒素 ($100\mu\text{g/ml}$)
 2. 对照 C_2 型肠毒素 ($100\mu\text{g/ml}$)
 3. A 型肠毒素 ($100\mu\text{g/ml}$)
 4. C_2 型肠毒素 ($100\mu\text{g/ml}$)
 5. B 型肠毒素 ($100\mu\text{g/ml}$)
 6. 对照D型肠毒素 ($100\mu\text{g/ml}$)

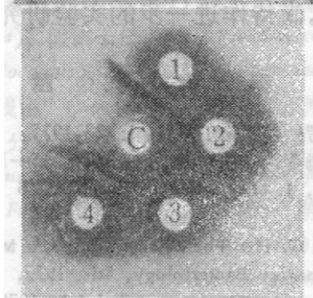
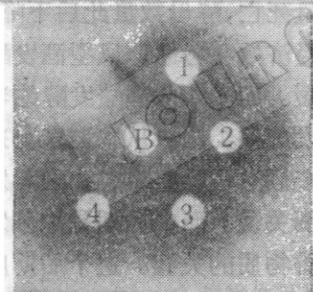
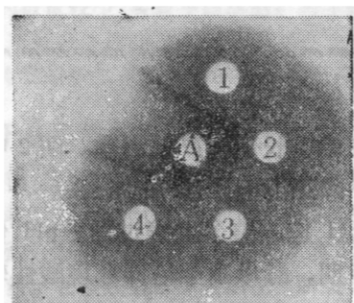


图3 三组免疫血清与不同来源的抗原融合试验

中心孔: A 为 BCG 组血清, B 为 MDP 组血清, C 为 46% 纯度抗原组血清。

周围孔: 1 为 90% 纯度 C_2 型肠毒素, 2 为对照 C_2 型肠毒素, 3 为 C_1 型肠毒素, 4 为 46% 纯度 C_2 型肠毒素。

品 C_2 型肠毒素抗血清同两种纯度以及对照品 C_2 型肠毒素, C_1 型肠毒素产生的沉淀线也融合(见图4)。

用三组 C_2 型肠毒素抗血清分别与不同浓度 90% 和 46% 纯度抗原进行双向琼脂扩散试验, 90% 纯度抗原免疫的 MDP 及 BCG 佐剂组抗血清同 $1500\mu\text{g/ml}$ 抗原产生一条沉淀线, 个别家兔为两条。46% 纯度抗原组抗血清与 $1500\mu\text{g/ml}$ 抗原出现 3—4 条沉淀线。

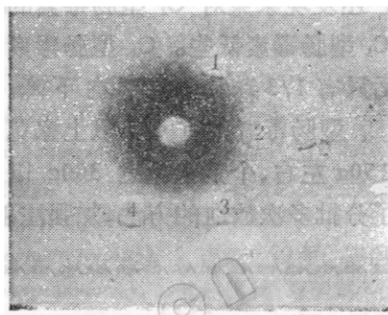


图4 对照 C_2 型肠毒素抗血清与不同来源抗原的融合试验图

中心孔: 对照品 C_2 型肠毒素抗血清。

周围孔: 1 为 90% 纯度 C_2 型肠毒素, 2 为对照 C_2 型肠毒素, 3 为 C_1 型肠毒素, 4 为 46% 纯度 C_2 型肠毒素。

讨 论

利用改进的 Genigorgis C_1 型肠毒素的免疫方案, 制备出了高效价的 C_2 型肠毒素抗血清, 说明改进方案对 C_2 型肠毒素的免疫是适用的。改进的 Genigeorgis 方案抗原用量 18 mg/兔 , 注射七针, 比较节省毒素^[4], 对动物不易引起免疫过程中的死亡^[6]。曾报道过两针注射^[5], 每针剂量 $10\mu\text{g}$ 毒素的方案, 据说血清效价可达 1:128, 因只用一只家兔实验, 没有重复数据。

用 MDP 或 BCG 佐剂制备的血清双向琼脂扩散试验效价都可达到 1:64—1:128。两组动物产生抗体滴度动态曲线基本一致, 这表明 MDP 与 BCG 一样, 具有增强体液免疫的功能, 它完全可以代替 BCG。又因它是人工合成的分枝杆菌中的有效成分, 具有佐剂活性的肽聚糖结构, 比较纯, 对动物毒性小, 优于 BCG。我们的实验证明它是一个很有前途的人工合成佐

剂活性物质。

无论用 90% 或 46% 纯度毒素免疫, 所得血清特异性和质量都是好的。90% 纯度抗原的血清效价较高、特异性较强, 和 A、B、D 型肠毒素没有交叉反应。用 Bergdoll 教授提供的对照品 C₂ 型肠毒素及其相应的抗血清的融合试验也证明了这一点。以 46% 纯度 C₂ 型肠毒素免疫, 最后一次加强注射后, 有 3 只家兔在 2 周内死亡, 可能与低纯度抗原中的杂蛋白含量较多有关。还发现家兔对 C₂ 型肠毒素的感受性似乎比 C₁ 型肠毒素低些。C₂ 型肠毒素每次追加注射后只有 1/3 动物体重平均下降 40g 左右。而 C₁ 型肠毒素则有 4/5 以上家兔体重平均下降 150g 左右, 个别家兔达 300g 以上。我们采取了分批多次放血的方法, 加强注射后, 如

果血清双向琼脂扩散效价在 1:64 以上, 则先从耳边缘静脉放 60ml 血。最后一次加强注射后, 在 3 周内两次耳静脉放血, 一次颈动脉放血。一只家兔能得到 80—110ml 血清, 而抗体效价没有下降。

参 考 文 献

- [1] Genigeorgis, C. et al.: *Appl. Microbiol.* 21(5): 862, 1971.
- [2] 姚忠婧等: 中华微生物学和免疫学杂志, 3(5): 334, 1983.
- [3] Avena, R. M. et al.: *Biochemistry*, 6(5): 1474, 1967.
- [4] Bergdoll, M. S. et al.: *J. Bacteriol.* 90(5): 1481, 1965.
- [5] Shinagawa, K. et al.: *Jap. J. Med. Sci. Biol.* 27 (6): 309, 1974.
- [6] Richter, V. et al.: *Z. Gesamte Hyg Grenzger.* 26 (1): 53, 1980.