

# 用单克隆抗体检测霍乱肠毒素

刘奎 黄全荣 徐元 李清华 李慧萍 黄可泰

(宁波市医学科学研究所)

Holmes 等<sup>[1]</sup>在 1978 年曾报道了一种检测霍乱肠毒素的快速而又灵敏的方法——反向间接血凝试验,但致敏红细胞的抗体提纯相当复杂。我们在建株了霍乱肠毒素单克隆抗体的杂交瘤细胞以后,利用该杂交瘤细胞分泌的单克隆抗体致敏醛化羊红细胞从而检测霍乱肠毒素,不仅方法简单,而且快速敏感,同时重复性也相当好。现将其方法和结果介绍如下:

## 材 料 和 方 法

### (一) 单克隆抗体

1. 本文使用的杂交瘤细胞是一株通过细胞融合方法获得的,能稳定地分泌抗霍乱弧菌肠

---

浙江省人民卫生实验院江德果副研究员和浙江省卫生防疫站鲍行豪副主任技师惠赠试剂并给予支持,特致谢意。

毒素 B 亚单位单克隆抗体的杂交瘤细胞 (2H<sub>4</sub>)<sup>[2,3]</sup>。将该杂交瘤细胞接种 BALB/C 小鼠腹腔诱生腹水,待产生腹水后,收集小鼠腹水并用硫酸铵沉淀法粗提霍乱肠毒素单克隆抗体<sup>[2]</sup>。用紫外分光光度计测定蛋白含量,并用生理盐水调节蛋白含量为 10mg/ml。

2. 将杂交瘤细胞 (2H<sub>4</sub>) 接种于 BALB/C 小鼠皮下,待长成实体瘤以后,眼眶静脉放血,并分离血清。经间接血凝试验测得抗体效价为 8192 以上。

### (二) 醛化羊红细胞

按文献[4]法用戊二醛醛化羊红细胞。

### (三) 致敏羊红细胞

按文献[4]用金属阳离子——抗体球蛋白鞣酸法进行操作。致敏的抗体分别为粗提单克隆抗体,单克隆抗体小鼠血清,正常 BALB/C 小鼠血清及用霍乱肠毒素免疫三次的 BALB/C 小鼠血清。

### (四) 反向血凝试验

1. 待检抗原:霍乱弧菌 569B 肠毒素系由上海生物制品所生产,血管渗透因子活性 (PF) 为 20 万 BD/ml。Eltor 霍乱弧菌肠毒素 (肠积液) 由浙江省卫生防疫站提供。产肠毒素的大

肠杆菌和金黄色葡萄球菌菌株由省卫生防疫站提供,分别用水解酪蛋白产毒培养基和杜尔曼产毒培养基培养并提取毒素。其中大肠杆菌不耐热肠毒素经家兔肠攀试验检查为阳性。

2. 凝集试验在“V”型板内进行。抗原分别作适当稀释后,每孔加入抗原液 25μl,致敏羊红细胞 25μl,微型振荡器振荡混匀,置 37℃ 2 小时后观察反应。“++”以上判为阳性。

## 结 果

### (一) 致敏羊红细胞的敏感性

用 pH4.8 0.075M 醋酸缓冲盐水将粗提的单克隆抗体及小鼠血清稀释为不同浓度去致敏醛化羊红细胞,另设正常小鼠血清和用霍乱肠毒素免疫过的小鼠血清作为对照。对霍乱弧菌肠毒素 569B 进行测定,其结果见表 1。

由表 1 的结果可见:单克隆抗体小鼠血清致敏的红细胞比通常的方法免疫的小鼠血清所致敏的红细胞敏感 100 倍。粗提的单克隆抗体致敏的羊红细胞敏感性更高,可高出 1000 倍。并且增加抗体的浓度未见到有自凝现象。但单克隆抗体小鼠血清在稀释度小于 1:64 时观察到轻度自凝。为此,在以下的实验中致敏红细

表 1 不同浓度抗体致敏羊红细胞的敏感性

抗 体 浓 度		霍乱弧菌肠毒素稀释倍数						对 照 (0.25% NRNS)
		1:2×10 <sup>2</sup>	1:2×10 <sup>3</sup>	1:2×10 <sup>4</sup>	1:2×10 <sup>5</sup>	1:2×10 <sup>6</sup>	1:2×10 <sup>7</sup>	
粗提单克隆抗体	1:4	#	#	#	+++	+++	-	-
	1:16	#	#	#	+++	+++	-	-
	1:64	#	#	#	+++	+++	-	-
	1:128	#	#	#	+++	+++	-	-
	1:320	#	#	#	+++	++	-	-
	1:640	#	#	+++	++	±	-	-
单克隆抗体小鼠血清	1:4	#	#	#	+++	±	±	±
	1:16	#	#	#	+++	±	±	±
	1:64	#	#	#	+++	±	±	±
	1:128	#	#	+++	+++	±	-	-
	1:320	#	#	+++	+++	±	-	-
	1:640	#	#	+++	+	-	-	-
正常小鼠血清 1:100		-	-	-	-	-	-	-
免疫小鼠血清 1:100		+++	++	-	-	-	-	-

注: NRNS——正常兔血清生理盐水。

表 2 贮存时间对致敏羊红细胞敏感性的影响

贮存天数	0 天	7 天	30 天	60 天
血凝终滴度 <sup>1</sup>	1:2×10 <sup>6</sup>	1:2×10 <sup>6</sup>	1:2×10 <sup>6</sup>	1:2×10 <sup>6</sup>
血凝终滴度 <sup>2</sup>	1:2×10 <sup>5</sup>	1:2×10 <sup>5</sup>	1:2×10 <sup>5</sup>	1:2×10 <sup>4</sup>

注: 1 为 1:100 稀释的粗提单克隆抗体致敏羊红细胞  
2 为 1:100 稀释的单克隆抗体小鼠血清致敏羊红细胞

胞用的单克隆抗体均采用 1:100 稀释度。

(二) 致敏羊红细胞的稳定性

上述致敏的羊红细胞在 4℃ 冰箱保存不同时间测定霍乱肠毒素血凝情况, 结果见表 2。

可见, 在 4℃ 贮存 1 个月并不影响其敏感性。

(三) 致敏羊红细胞的重复性

用二次不同批号的单克隆抗体小鼠血清和粗提单克隆抗体致敏醛化羊红细胞并测定其和霍乱肠毒素的凝集情况, 结果见表 3。

表 3 不同批号的单克隆抗体致敏羊红细胞的敏感性

致敏羊红细胞	No1 血凝终滴度	No2 血凝终滴度
(1)	1:2×10 <sup>6</sup>	1:2×10 <sup>6</sup>
(2)	1:2×10 <sup>5</sup>	1:2×10 <sup>5</sup>

注(1)为 1:100 稀释的粗提单克隆抗体致敏的羊红细胞。  
(2) 为 1:100 稀释的单克隆抗体小鼠血清致敏羊红细胞。No1 和 No2 指不同批号的单克隆抗体和小鼠血清致敏的羊红细胞。

由表 3 可见来源于二批小鼠的单克隆抗体致敏的羊红细胞对霍乱肠毒素的测定结果完全

一致。

(四) 用反向血凝试验检测其它细菌肠毒素

用反向血凝试验对 1 株霍乱弧菌 569B, 1 株大肠杆菌 LT, 及 2 株 Eitor 弧菌在肠襻试验中所产生的肠积液及制备的大肠杆菌毒素和金黄色葡萄球菌肠毒素的检测结果见表 4。

由表 4 可见: 霍乱弧菌 569B 和 Eitor 弧菌所产生的肠积液中都可用反向血凝试验检测出肠毒素, 但未见到和大肠杆菌耐热肠毒素及不耐热肠毒素以及金黄色葡萄球菌发生凝集反应。

讨 论

反向间接血凝是一种微量、快速敏感的血清学方法。用于检测肠毒素具有不少优点。但用通常的抗血清致敏的红细胞却不易获得良好的血凝结果。其主要原因是抗血清中的蛋白成分复杂, 当非抗体蛋白分子在血球表面占据到一定数量时, 此致敏的红细胞就不再与抗原形成肉眼可见的凝集。小鼠接种杂交瘤细胞后, 小鼠腹水和血清中单克隆抗体的效价比通常方法

表 4 细菌肠毒素抗原的反向血凝试验

抗 原	抗 体 浓 度					0.25% NRNS	培养基
	1:1	1:10	1:100	1:1000	1:10000		
大肠杆菌 LT	—	—	—	—	—	—	—
大肠杆菌 ST	—	—	—	—	—	—	—
金黄色葡萄球菌肠毒素	—	—	—	—	—	—	—
大肠杆菌 LT 肠积液	—	—	—	—	—	—	—
Eitor 肠积液(1)	≠	+++	++	—	—	—	—
Eitor 肠积液(2)	—	+++	+++	—	—	—	—
569B 肠积液	≠	+++	+++	—	—	—	—
569B 肠毒素	≠	≠	≠	≠	≠	—	—

注 NRNS: 正常兔血清生理盐水。Eitor 肠积液(1)和(2)为二株不同的 Eitor 弧菌诱生的肠积液。培养基: 大肠杆菌为水解酪蛋白产毒培养基, 金黄色葡萄球菌为杜尔曼产毒培养基。

免疫小鼠的抗血清效价高出几百倍，而且特异性强。本实验表明：应用粗提单克隆抗体和小鼠血清致敏醛化羊红细胞，当抗原(霍乱肠毒素569B)分别作  $1:2 \times 10^5$  和  $1:2 \times 10^5$  稀释，仍可出现良好的凝集。同时，用二次不同批次的单克隆抗体致敏醛化羊红细胞，敏感性一致，重复性很好。

据报道<sup>[5]</sup>，单克隆抗体不如多克隆抗体稳定，在贮存过程中，活性会逐渐降低。为了检查单克隆抗体致敏的醛化羊红细胞是否稳定，我们比较了存贮时间对致敏羊红细胞敏感性的影响。在  $4^\circ\text{C}$  贮存一个月，不影响致敏细胞的敏感性，贮存2个月有些影响，但不严重。

对几种不同的肠毒素抗原也进行了检测，可检测出兔肠积液中由于569B霍乱弧菌和

Eltor 弧菌所产生的肠毒素并且未见到与大肠杆菌肠毒素 LT 和 ST 以及金黄色葡萄球菌肠毒素发生交叉反应。因此应用单克隆抗体，通过反向间接血凝的方法不仅可用来检测霍乱肠毒素，而且也是测定霍乱弧菌和 Eltor 副霍乱弧菌在动物体内产毒情况的一种快速、简便而又灵敏的方法。

### 参 考 文 献

- [1] Holmes. R. K; et al.: *Infect. Immunity*, **9**: 101-106, 1978.
- [2] 黄嘉陵: 细胞生物学杂志, **3**: 43, 1981.
- [3] Remmers EF, et al.: *Infect. Immunity*, **37**: 70, 1982.
- [4] 韩澄源: 间接血凝技术, 科学出版社, 1979.
- [5] 王世中等; 中华微生物学和免疫学杂志, **5(2)**: 109, 1985.