

豬二種黴漿菌 (*Mycoplasma hyopneumoniae* & *Mycoplasma flocculare*) 抗原性之比較

27-4

林文華¹ 翁仲男² 楊揚輝¹ 邱仕炎¹

台灣省家畜衛生試驗所
台灣養豬科學研究所

以 Tween-20 溶解的黴漿菌抗原應用於間接血球凝集試驗、免疫擴散試驗和免疫轉印法，以了解高免疫血清對抗 *M. hyopneumoniae* 及 *M. flocculare* 抗原之間的交叉反應情形。結果，在間接血球凝集試驗，*M. flocculare* 抗原與 *M. hyopneumoniae* 抗血清之間的交叉反應比 *M. hyopneumoniae* 抗原與 *M. flocculare* 抗血清之間的反應強。同樣的，在免疫擴散試驗也發生交叉反應，除各在同源性與異源性抗血清之間有數條沉澱線相融合外，另有一條明顯的沉澱線出現在 *M. hyopneumoniae* 之抗原與抗血清之間，不與 *M. flocculare* 之抗血清間的那些沉澱線相融合。更進一步以免疫轉印的方法，亦證明 *M. hyopneumoniae* 及 *M. flocculare* 之間交叉反應的抗原成份，分子量都位於 34 K 以上，其中有些抗原成份與 BHL 培養基是相同的。

豬流行性肺炎是由豬肺炎黴漿菌 (*Mycoplasma hyopneumoniae*) 所引起的一種慢性呼吸道疾病，在豬群中的感染相當普遍而且會造成嚴重的經濟損失^(13,16)。因此對於本病之診斷，在血清學上就發展了各種檢測抗體的方法，如補體結合試驗⁽⁹⁾，間接血球凝集試驗⁽⁶⁾，間接免疫螢光試驗⁽³⁾及酵素結合免疫吸附法^(4,10)等。然而，雖然如此，至今在這些方法之中，卻沒有一種的特異性是可以令人得到非常滿意的，原因就是由於本菌抗原會與其它的豬黴漿菌抗原產生交叉反應^(5,12)

。因此對於豬肺炎黴漿菌之抗原於動物體內產生的抗體反應特性是有必要加以分析及了解的，因而為了這項目的，本實驗將藉由間接血球凝集試驗、免疫擴散反應試驗及蛋白質免疫轉印法 (Immunoblotting) 分析豬肺炎黴漿菌與 *M. flocculare* 之可溶性抗原的交叉反應情形。

材料與方法

(一) 供試菌株：

M. hyopneumoniae ST-11 菌株。

本文原載於中華民國獸醫學會雜誌第 17 卷 3 號

(1) 台灣省家畜衛生試驗所，淡水，台北，中華民國

(2) 台灣養豬科學研究所病理系，苗栗縣竹南鎮

M. flocculare Ms 42 菌株。

(一) 抗原之製備：

M. hyopneumoniae 及 *M. flocculare* 分別以含有 20% 豬血清的 BHL 液體培養基⁽¹⁷⁾ 培養於 37°C 振盪式的水浴槽內，約經 2 至 3 天後直到培養基之 pH 下降，即收集全部的培養液以 8,000 rpm 在 4°C 下離心 40 分鐘，然後去掉上層液，將沉澱的微漿菌細胞再以 0.15 MPBS (pH 7.2) 洗三次，最後將供為免疫兔子的微漿菌細胞懸浮於 PBS 內成為原來培養液的 1/100 濃度⁽¹⁴⁾。而另外使用於間接血球凝集試驗、免疫擴散試驗及電泳的抗原，係參照翁等⁽¹⁾ 的處理方法，將 1/100 濃度的微漿菌細胞懸浮液，再加等量的 1% PBST (PBS 100 ml : 1 ml Tween-20) 置於 37°C 溫水浴槽內振盪 40 分鐘，然後經 10,000 rpm 在 4°C 下離心 40 分鐘，取上層液以 0.45 μm 濾膜濾過，濾過液以 0.85% NaCl 在 4°C 下透析 24 小時並換液三次，最後用 polyethylenglycl (PEG) 6,000 濃縮成為原來的濃度，以小量分裝存於 -80°C 備用，此即為 Tween-20 抗原。

(二) 兔抗微漿菌之高免疫血清的製備：

將洗後的二種微漿菌細胞懸浮液以 0.25% 福爾馬林處理後，再加等量 (0.5 ml : 0.5 ml) 的佛氏不完全佐劑充分混合後，分別行肌肉內注射兔子於數個部位，共二次，每次間隔一週，在最後免疫後的第四週收集血清，然後以間接血球凝集試驗測其力價並和免疫轉印法及免疫擴散試驗法分析其之間的交叉反應情形。

(四) 間接血球凝集試驗：

使用 Glutaraldehyde 固定之豬紅血球及抗原致敏化之紅血球，係參照翁等⁽¹⁾ 製備的過程完成。然後以 96 孔的平板，每孔加入 25 ul 含 1% 不活化之正常兔血清的 PBS，以 2 倍稀釋進行抗血清，每孔量為 25 ul，從 2 倍開始稀釋，後加入抗原致敏化的血球，每孔量 25 ul，於室溫下靜置 2 小時後判讀。

(五) 免疫擴散反應試驗：

參照 Onuma 等之方法⁽¹¹⁾。將配成的 0.8% Agarose 取 15 ml 置於直徑 9 cm 之瓊膠培養皿做成平板瓊脂凝膠層，各培養皿用打孔器打出中央 1 個，周圍 6 個，共 7 個小孔的反應組。其每一小孔之直徑為 5 mm。各小孔距離為 3 mm。反應組中心孔加入 Tween-20 抗原 50 ul，周圍六個孔分別加入免疫前的兔血清、高免疫血清 BHL 培養基各 50 ul，最後將瓊膠平板置於能保持濕度的密閉容器內，於室溫下反應二天判讀。

(六) SDS-PAGE 電泳及免疫轉印法：

SDS-PAGE 電泳及免疫轉印法係參照莊等之方法⁽²⁾。採用 12.5% 分離膠及 4% 焦集膠，然後取二種微漿菌的 Tween-20 抗原及 BHL 液體培養基樣品 30 ul 溶於樣品緩衝液，煮沸 3~5 分鐘，再將樣品加入預先準備的 12.5% 板膠內，然後以 150 V 電壓進行電泳，約 1 小時後，取下板膠作 Coomassie blue R-250 (CBR) 染色或直接再進行免疫轉印法，將抗原蛋白質轉印到硝化纖維紙上，以高免疫血清用 pH 8.0 明膠 NET 溶液 (Gelatin 0.25%, NaCl 0.15 M, EDTA 5 mM, Tween-20 0.05%, Tris 50 mM 稀釋成 200 倍濃度的抗體溶液與之作用，室溫下反應一小時後，以 0.05% PBST 洗 3 次，再改以酵素連結抗體 (酵素連結山羊抗兔的 IgG 稀釋 1,000 倍) 反應一小時，再用 PBST 洗 4~5 次，隨後加入受質 (H₂O₂ 10 ul, PBS 100 ml, 3.3' Diaminobenzidine tetrahydrochloride 5 mg) 作用數分鐘，直至背景加深前倒去受質，以水沖洗數次後涼乾。

結 果

實驗免疫兔子所得的 *M. hyopneumoniae* 及 *M. flocculare* 抗血清，經各別利用 Tween-20 處理的抗原，使用於間接血球凝集試驗測定力價後，兩種抗血清的力價都在 2,048 倍，並且同時進行交叉反應試驗，很明顯的在 *M. hyopneumoniae* 抗血清與 *M.*

flocculare 抗原之間，產生交叉反應的力價倍數較高，而在 *M. flocculare* 抗血清與 *M. hyopneumoniae* 抗原之間，產生的交叉反應力價倍數則較低（如表一）。另再行免疫擴散反應試驗後，兩種微生物之 Tween-20 抗原與抗血清之間，除各有數條沉澱線出現及有些明顯的相融合外，兩種抗血清與培養基之間亦有很明顯相融合的沉澱線產生，同時在圖一

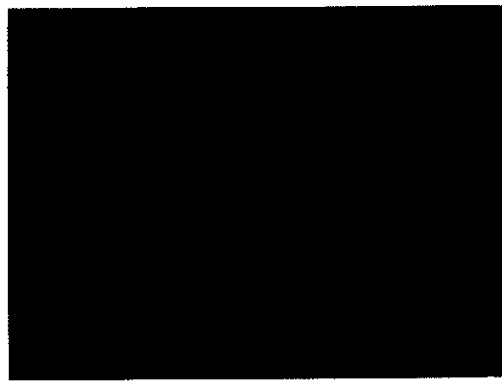
(A)所示，*M. hyopneumoniae* 的抗原與抗血清之間，有一條很明顯的沉澱線，不與 *M. flocculare* 之抗血清和 BHL 培養基的沉澱線相融合，而在圖一(B)，*M. flocculare* 之抗原與抗血清間所發生的沉澱線，都明顯的與 *M. hyopneumoniae* 抗血清間的沉澱線相融合，沒有其它多餘的沉澱線出現。

表 1 *M. hyopneumoniae* 及 *M. flocculare* 之抗原與抗血清的間接血球凝集試驗力價

抗 血 清	Tween - 20 抗 原	
	<i>M. hyopneumoniae</i>	<i>M. flocculare</i>
<i>M. hyopneumoniae</i>	2,048 X	1,024 X
<i>M. flocculare</i>	128 X	2,048 X



圖一 *M. hyopneumoniae* 及 *M. flocculare* 之抗血清與抗原行免疫擴散試驗之反應
 AG : (A) *M. hyopneumoniae* 抗原
 (B) *M. flocculare* 抗原
 AH : *M. hyopneumoniae* 抗血清
 AF : *M. flocculare* 抗血清
 NS : 免疫前的正常兔血清
 M : BHL 培養基



圖二 電泳後經 CBR 染色的 SDS-PAGE
 2, 7 : BHL 培養基
 3, 6 : *M. hyopneumoniae*
 4, 5 : *M. flocculare*
 1, 8 : 標準分子量

兩種微漿菌細胞以 Tween-20 處理過的溶性抗原，經電泳後，以 CBR 染色後的膠體，清楚的見到 *M. hyopneumoniae* 與 *M. flocculare* 有許多分子量相類似的蛋白質帶；尤其大多數的蛋白質分子量是位於 30 K 以上（如圖二）。當再將其同時轉印到硝化纖維紙，與抗血清反應後，*M. hyopneumoniae* 至少有五種抗原成份，可以與 *M. flocculare* 的抗血清反應，分子量分別約 103 K，94 K，

67 K，38 K，34 K，而 *M. flocculare* 則至少有七種抗原成份，可與 *M. hyopneumoniae* 之抗血清反應，分子量分別約 112 K，107 K，103 K，94 K，67 K，38 K，34 K，而約在 34 K 以下的抗原均不產生交叉反應，同時 BHL 培養基亦有三種分子量成份 119 K，62 K，47 K，可與兩種抗血清反應（如圖三、圖四）。



圖三 *M. hyopneumoniae* (E, F) 與 *M. flocculare* (C, D) 及 BHL 培養基 (A, B) 及 SDS-PAGE 電泳後，經轉印到硝化纖維紙與 *M. flocculare* 抗血清反應的測定。箭頭是指示交叉反應的抗原。



圖四 *M. hyopneumoniae* (B, C) 與 *M. flocculare* (D, E) 及 BHL 培養基 (A) 以 SDS-PAGE 電泳後，經轉印到硝化纖維紙與 *M. hyopneumoniae* 抗血清反應的測定。箭頭指示交叉反應的抗原。

討 論

本實驗以 Tween-20 溶解的 *M. hyopneumoniae* 及 *M. flocculare* 抗原，使用於間接血球凝集試驗與製備的高免疫血清作交叉反應試驗後，結果顯示 *M. flocculare* 抗原與 *M. hyopneumoniae* 抗血清之間產生的交叉反應力價倍數，高於 *M. hyopneumoniae* 抗原與 *M. flocculare* 抗血清之間的交叉反應倍數很多，亦即 *M. hyopneumoniae* 有較多的特異性抗原成份與 *M. flocculare* 不相同

，只有少部份是相同的，因而由此了解到 *M. hyopneumoniae* 和 *M. flocculare* 之間的交叉反應是一種傾向於一方的現象。而這種反應結果，在近年應用 ELISA 之試驗亦有所見⁽⁸⁾，與早期 Meyling & Friis 之報告也是相類似的⁽⁷⁾。

當兩種微漿菌之抗原、高免疫血清和 BHL 培養基同時進行免疫擴散試驗後，在兩種同源性的抗原血清之間都有數條沉澱線產生，且有些會與異源性抗血清之間的相融合，由此亦顯示 *M. hyopneumoniae* 與 *M. flocculare*

之間有些抗原成份是相同的，所以在許多血清學試驗上有交叉反應現象的報告^(5, 12)。而在兩種高免疫血清與 BHL 培養基之間也有明顯的沉澱線，此亦表示了在製備高免疫血清之前，這兩種黴漿菌細胞已經含有了培養基內具有抗原性的成份存在，而這種成份據 Weng 表示，是由於培養基內的豬血清、馬血清和酵母抽出液的因子，於接種動物後所形成的一種非特异性抗體所致⁽¹⁵⁾，故本實驗所製備的高免疫血清會與培養基產生反應。但是，雖然如此，*M. hyopneumoniae* 之抗原與抗血清之間仍有一條很明顯的特异性沉澱線，不與異源性抗血清間的沉澱線相融合，且與 BHL 培養基和抗血清間所形成的沉澱線成交叉現象，而不會融合。

當更進一步以 Tween-20 製備的抗原和 BHL 培養基經電泳再轉印到硝化纖維紙上與抗血清反應後，*M. hyopneumoniae* 至少有五種抗原成份，可以和 *M. flocculare* 之抗血清反應，而 *M. flocculare* 則較多，至少有七種抗原成份可與 *M. hyopneumoniae* 之抗血清反應，同時兩種抗血清也都會與培養基內的三種分子量成份反應，此等結果顯示與上述兩種試驗結果是一致的，同樣的 Young 等也報告指出在 *M. hyopneumoniae* 與 *M. flocculare* 之間，有四種抗原成份會產生交叉反應⁽¹⁸⁾。

參 考 文 獻

1. 翁仲男、林文華、羅麗華。1989。豬黴漿菌肺炎移行抗體之研究。中華民國獸醫學會雜誌。15: 47-51。
2. 莊榮輝、蘇仲卿。1987。蛋白質膠體電泳檢定法，行政院國家科學委員會研討會專集(九)，pp. 69 - 85。
3. Armstrong, C.H., 1974. A diagnostically practical method of isolating and identifying *Mycoplasma hyopneumoniae*. Proc. Int. symp. Vet. Lab. Diagn., 1: 754-771.
4. Armstrong, C.H., Freeman, M.J., Sand, L.L. and Farrington, D.O., 1978. The enzyme-linked Immunosorbent assay(ELISA) for diagnosing mycoplasmal pneumonia of swine. Proc. Am. Assoc. Vet. Diagn., 21: 377-390.
5. Freeman, M.J. Armstrong, C.H. and Sands-Freeman, L.L. et al., 1984. Serological cross-reactivity of porcine reference antisera to *M. Hyopneumoniae*, *M. flocculare*, *M. hyorhinis* and *M. hyosynoviae* indicated by the enzyme-linked immunosorbent assay, complement fixation and indirect hemagglutination test. Can. J. Comp. Med., 48:202-207.
6. Holmgren, H., 1974. An indirect haemagglutination test for detection of antibodies against *Mycoplasma hyopneumoniae* using formalinized tanned swine erythrocytes. Res. Vet. Sci., 16: 341-346.
7. Meyling, A. and Friss, N.F., 1972. Serological identification of new porcine mycoplasma, *M. flocculare* Acta Vet. Scand. 13:287-289.
8. Mori, Y., Hamalka, T., Sato, S. and Takeuchi, S., 1988. Immunoblotting analysis of antibody response in swine experimentally inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. Vet. Immuno. Immunopath. 19: 239-250.
9. Mori, Y., Yoshida, Y., Kuniyasu, C. and Hashimoto, K. 1983. Improvement of complement fixation test antigen for the diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. Natl. Inst. Anim. Health Q., 23: 111-116.
10. Nicolet, J. and Paroz, P., 1980. Tween-20 soluble proteins of *Myc-*

- oplasma hyopneumoniae as antigen for an enzyme-linked immunosorbent assay. Res. Vet. Sci., 29:305-309.
11. Onuma, M., Olson, C. and Baumgartner, L.E., 1975. J. Natl. Cancer Inst. 55: 1155-1158.
 12. Ro, L.H. and Ross, R.F., 1983. Comparison of Mycoplasma hyopneumoniae strains by serologic methods. Am. J. Vet. Res. 44: 2087-2094.
 13. Ross, R.F., 1986. Mycoplasmal disease. In: A.D. Leman et al (Editors). Diseases of swine. 6th edition Iowa State University Press, Ames IA, pp. 469-483.
 14. Rottem, S., 1983. Harvest and washing of mycoplasmas. In: S. Razin and J.G. Tully (Editors). Methods in Mycoplasmaology, Vol. 1. Academic Press, New York, NY pp. 221-223.
 15. Weng, C.N., 1989. Use dialysable medium for production of specific mycoplasma antigen. J. Chinese Soc. Vet. Sci. 15: 107-115.
 16. Whittlestone. P., 1979. Porcine mycoplasmas. In: J.G. Tully and R.F. Whitcomb (Editors). The Mycoplasmas, Vol.2. Academic Press, New York, NY, pp. 133-176.
 17. Yamamoto, K. and Ogata, M. 1982. Mycoplasmal and bacterial flora in the lungs of pigs. Proc. 7th Int Congr. Pig Vet. Soc. Mexico, 7:94
 18. Young, T. and Ross, R.F., 1987. Assessment of antibody response of swine infected with Mycoplasma hyopneumoniae by immunoblotting. Am. J. Vet. Res. 48: 651-656.

Comparison of Mycoplasma hyopneumoniae between Mycoplasma flocculare in Antigenicity

W.H. Lin¹ , C.N. Weng² , Y.H. Yang¹ , S.Y. Chiu¹

SUMMARY

In order to understand serological cross reaction among hyperimmune sera against M. hyopneumoniae and M. flocculare antigens, mycoplasma antigens solubilized with Tween-20 were used for indirect hemagglutination (IHA) test, double immunodiffusion test and immunoblotting technique in the study. The result showed that cross reaction between M. flocculare antigen and anti-M. hyopneumoniae serum was stronger than that between M. hyopneumoniae antigen and anti-M. flocculare serum in IHA test. Similarly cross reaction also occurred in double immunodiffusion test, except a few precipitation lines joined between homologous and heterogenous antisera, one precipitation line observed between M. hyopneumoniae antigen and anti-M. hyopneumoniae serum, but did not join to form an continuous line with those between M. hyopneumoniae antigen and anti-M. flocculare serum. Further, Cross reaction between M. hyopneumoniae and M. flocculare was demonstrated by immunoblotting, which revealed that molecular weights of the predominant cross reactive antigens were estimated above 34K, a few antigenic components of cross reactive antigens were same with those of BHL medium.

Reprinted from the J. Chinese Soc. Vet. Sci. 17(3): , 1991.

(1) Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health, Tansui, Taiwan, R.O.C.

(2) Department of Pathology, Pig Research Institute, Taiwan, Chunan, Miaoli, Taiwan, R.O.C.