

# 豬胸膜肺炎放線桿菌單株抗體之研製

張惟茗 吳義興 楊喜金 林士鈺

台灣省家畜衛生試驗所

以豬胸膜肺炎放線桿菌 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*, AP) 第1型全菌免疫 Balb/C 小鼠後，取其脾臟細胞與 SP 2/0 骨髓瘤細胞融合，經 ELISA 篩選與限數稀釋，獲得 12 個具分泌抗 AP 抗體之融合瘤細胞。選取其中兩個融合瘤細胞 (B6c 和 E4d)，以酵素連接免疫轉印試驗測試發現 B6c 與 AP 62, 36, 35, 34 K 抗原有作用，E4d 則與 33 K 抗原有作用。以間接螢光抗體法與免疫酵素標示法，B6c 和 E4d 均能使 AP 菌體有特異性反應，但不具血清型特異性。E4d 單源抗體使用免疫斑點法大約可測出 500 CFU AP 第1或第5型菌，樣品煮沸處理不影響其敏感度。

台灣地區自從 1976 年豬首次發生胸膜肺炎放線桿菌 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*, AP) 感染以來<sup>(5)</sup>，目前已在全省蔓延開來，造成重大經濟損失。在已知 AP 12 種血清型中，根據 1990 年之調查台灣地區已由 1982 年以前之單純第 5 型感染轉變成複雜之多型 (第 1、2、3、5、7 和 8 型) 感染，其中以第 1 型為最主要約佔 80.3% (1990)，污染豬場偶可分離 2~3 種不同血清型，此外 AP 與它種病原菌如 *Pasteurella multocida*, *Salmonella choleraesuis*, *Streptococcus* spp. 等混合感染情形也越來越常見，尤其是 *Pasteurella multocida* 的分離率越來越高<sup>(6)</sup>。這些因素造成 AP 的診斷，越趨困難。由於單株抗體具有高特異性，是作為診斷用途的良好工具，因此本實驗之目的即在於 AP 單株抗體之研製。

## 材料與方法

菌株及免疫用抗原之製備：

所使用之菌株為 AP 第一血清型分離株。細菌之培養是將菌株接種在含 5% 脫纖馬血之巧克力培養基上，37°C、5% CO<sub>2</sub> 恆溫箱培養 8 個小時。收取的菌體以 PBS 沖洗三次後，加入最終濃度為 0.3% 的福馬林 37°C、1 小時不活化處理後，再調成 10% 菌體懸浮液，此即為 Balb/c 小鼠免疫用抗原。

單株抗體之製備：

首先取 10% 菌體懸浮液與等量沸氏完全佐劑充分混合後，0.1 ml 腹腔注射免疫 Balb/c 小鼠 4 次。免疫完成後之 Balb/c 小鼠再取出其脾臟細胞與 SP 2/0 骨髓瘤細胞進行融合。融合方法主要依照 Kohler 和 Milstein 之方法<sup>(6,7)</sup>。融合成功的細胞再以酵素結合免疫吸

附法進行篩選，以限數稀釋 (limiting dilution) 進行選殖 (cloning)。腹水之生產是先將 0.5 ml 的 pristane (Sigma) 注射入 Balb/c 小鼠腹腔，1 週後再將融合瘤細胞 (約  $10^7$  個) 腹腔注射 Balb/c 小鼠，約 1 週後抽取腹水備用。

SDS-PAGE 電泳和酵素連接免疫轉印試驗 (Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot, EITB):

SDS-PAGE 電泳所使用的方法係依照 Laemmli 的方法<sup>(6)</sup>。先將 AP 第 1 型全菌溶於樣品緩衝液，煮沸 3 分鐘，再將樣品加入預先準備之 10% 板膠以定電流 25 mA 進行分離。將電泳後之板膠以轉印器 ( $3 \text{ mA/cm}^2$ , Bio-Rad) 轉印到硝化纖維紙 (nitrocellulose, S&S) 上。轉印後之硝化纖維紙再依照 Healey 之方法與單株抗體反應，並使用 3-3'-diaminobenzidine (Sigma) 呈色<sup>(4)</sup>。

間接螢光抗體與免疫酵素標示法:

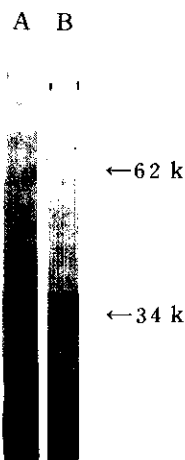
將 AP 第 1 型菌懸浮液滴於玻片上，風乾後滴上 100  $\mu\text{l}$  的單株抗體溶液 37°C、30 分鐘感作。以含 0.25% Tween 20 之 PBS 洗 3 次後，再分別滴上抗小白鼠 IgG 螢光色素 (FITC) 或過氧化氫酵素 (HRP) 標示抗體 (Nordic)，37°C、30 分鐘感作。再以含 0.05% Tween 20 之 PBS 洗 3 次後，置於螢光顯微鏡觀察，或以 3-3'-diaminobenzidine 染色後置於一般光學顯微鏡觀察<sup>(2)</sup>。AP 第 2、5 型，大腸桿菌、沙氏桿菌標示法如上。

免疫斑點法 (Dot blot assay):

分別將 AP 第 1 型全菌 ( $10^8 \text{ CFU/ml}$ )、煮沸過之第 1 型全菌 ( $10^8 \text{ CFU/ml}$ )、第 5 型全菌 ( $10^8 \text{ CFU/ml}$ ) 和煮沸過之第 5 型全菌 ( $10^8 \text{ CFU/ml}$ ) 以蒸餾水做 10 倍連續稀釋後，取 5  $\mu\text{l}$  滴於硝化纖維紙上，再加填塞溶液 (PBS 含 3% 脫脂奶) 37°C、15 分鐘後，以含 0.05% Tween 20 之 PBS 洗 3 次後，用 E4d 單株抗體感作 (37°C、30 分鐘)。再以含 0.05% Tween 20 之 PBS 洗 3 次後，與抗小白鼠 IgG 過氧化氫酵素標示抗體感作 (37°C、30 分鐘)。再以含 0.05% Tween 20 之 PBS 洗 3 次後，使用 Enzygraphic web (Kodak) 呈色。

## 結 果

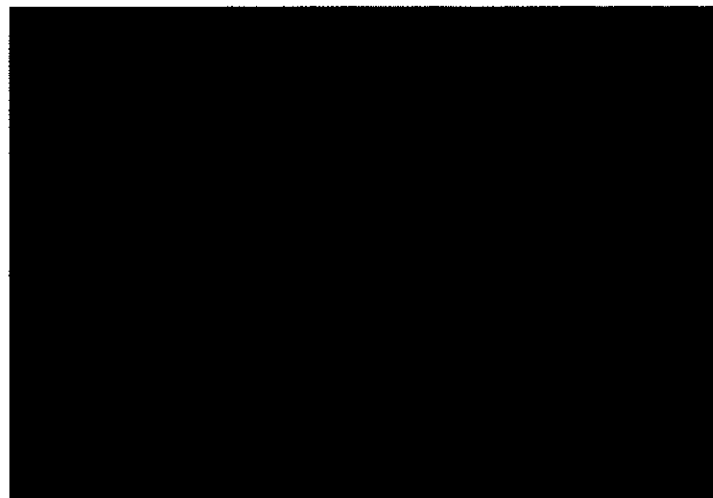
融合後的細胞經 ELISA 試驗篩選和限數稀釋選殖後得到 12 個具有分泌抗 AP 抗體之融合瘤細胞。再選出兩個分泌抗體力價最高之細胞，分別命名為 B6c 和 E4d (腹水 ELISA 力價分別為 1:3,200 與 1:6,000)，來做進一步之定性。以 EITB 分析 B6c 和 E4d 分泌抗體對 AP 全菌抗原之反應，發現 B6c 作用於 62k、36、35 和 34k 四條帶，E4d 則作用於 33k 帶如圖一。以間接螢光抗體法與免疫酵素標示法，B6c 與 E4d 均能使 AP 第 1 型菌體發出特異性黃綠螢光或產生紅褐色沉澱如圖二和圖三，但是 B6c 與 E4d 均不具血清型特異性，在 AP 第 2、5 型菌體也能被標上特異螢光或產生紅褐色沉澱，沙氏桿菌和大腸桿菌則均呈陰性反應。以間接螢光抗體法和免疫酵素標示法染色，菌體周圍反應均較為強烈，後者且可觀察到菌體有明顯之雙極 (bipolar) 現象。以 E4d 單源抗體使用免疫斑點法和 AP 第 1 型菌、煮沸過之第 1 型菌、第 5 型菌、煮沸過之第 5 型菌作用，大約可測出 500 CFU AP 第 1 或第 5 型菌，樣品煮沸處理不影響其敏感度如圖四。



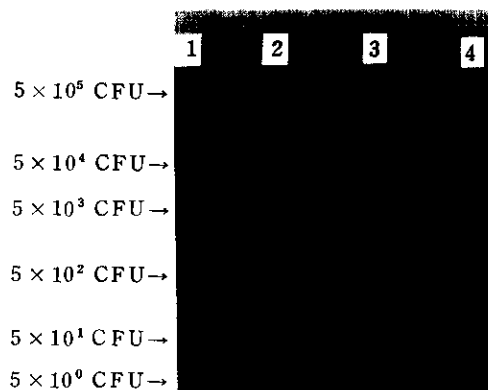
圖一 抗 AP 單株抗體 E4d、B6c 與 AP 第 1 血清型菌反應之酵素連接免疫轉印試驗。A: E4d 抗體，B: B6c 抗體。



圖二 AP第1血清型菌，與E4d抗體做間接螢光抗體染色所得之影像（1000倍）



圖三 AP第1血清型菌，與E4d抗體做免疫酵素標示所得之影像（1000倍）



圖四 應用E4d抗體以免疫斑點法檢測AP抗原。1：AP第1型全菌 2：煮沸處理過之AP第1型全菌。3：AP第5型全菌。4：煮沸處理過之AP第5型全菌。

## 討 論

AP之鑑定方法除了傳統之生化同定之外，其它如凝集試驗、補體結合試驗、酵素連接免疫吸附法、間接螢光抗體法、間接血球凝集試驗、凝結試驗（Coagglutination test）等均能作有效之鑑定<sup>(11,12)</sup>。惟其準確性取決於抗體的特異性，多價高免血清例如AP第3、6和8型間，第1、9和11型間，第2、4和7型間就常產生交叉反應的困擾。由於單株抗體具有高專一性，或許對此可提供解決之道。單株抗體的應用，不僅在於診斷方面的用途，它更是研究病原抗原作用的利器。1990 Smith研製出能有效保護離乳小豬耐過AP攻擊的單株抗體，這些單株抗體將能提供作為更詳細研究AP在molecular level上致病機制之用<sup>(13)</sup>。

由免疫AP第1型全菌而來之B6c分別與62、36、35和34k抗原有特異性結合，顯示這些抗原間享有共同之抗原決定位。E4d則和33k抗原反應。由間接螢光抗體與免疫酵素標示法觀察，發現菌體周圍會發出較強烈螢光或較深紅褐色沉澱，AP第2和5型也可觀察到相同現象。這顯示這些抗原位於菌體表層，並且不具血清型特異性，惟這些抗原之本質仍有待更進一步實驗確認，1987年Lida研究出5株抗AP表層抗原之單株抗體也不具血清型特異性只有specics specificity，甚至由免疫第3型而來的單株抗體對第7、8、9和10型抗原產生更強反應或對不同株3型菌沒有反應的情形發生<sup>(9)</sup>。這顯示了AP血清型抗原間的複雜。可能的解釋為決定血清型的抗原決定位不止一個，並且別的血清型可能也含此抗原決定位，血清型的決定是由其分布比例而定<sup>(10)</sup>。

在本實驗中使用免疫斑點法可測出至少500 CFU之全菌 敏感度稍嫌不足。1989，Blais發展出用來偵測布氏桿菌的cloth-ELISA法，敏感度只有10<sup>5</sup> CFU，但他成功的使用enrichment culture technique克服了這個問題，樣品中布氏桿菌含量至少3 CFU/0.5ml即能被檢測出來<sup>(3)</sup>。此法或許可應用

在AP免疫斑點法的偵測上，以提高敏感度。

## 參 考 文 獻

1. 張靖男、徐興鎔·1991· An epidemiological survey on swine Actinobacillus pleuropneumoniae infection in Tqiwan. Proceedings in Symposium on Animal disease Prevention and Control in Asia. K-1-16.
2. 費昌勇、張惟茗、楊揚輝、邱仕炎·1988· 經福馬林固定之牛脾臟細胞內免疫球蛋白免疫酵素染色法。中華民國獸醫學會雜誌12: 37-42。
3. Blais, B. et al. 1989. Use of hydrophobic cloths and antibody absorbants for enzyme immunoassay: detection of Brucella antigens. Vet. Microbiol. 20: 155-163.
4. Healey, M.C., et al. 1986. Used of monoclonal antibodies to indentify outer membrane antigens of actinobacillus spp. Am. J. Vet. Res. 47(7): 1446-1451.
5. Hsu, F.S. et al. 1981. An epizootic of Haemophoilus parahemolyticus pneumoniae in swine. Proc. Int. Pig Vet. Soc. 6: 19.
6. Kohler, G. and C. Milstein. 1975. Continious cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 256: 495-497.
7. Kohler, G. and C. Milstein. 1976. Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cells frsion. Eur. J. Immunol. 6: 511-519.
8. Laemmli, V.K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of the bactriophage T4. Nature 227: 680-685.
9. Lida, J. and I.K.M. Smith. 1987.

- Binding patterns of monoclonal antibodies to *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Res. Vet. Sci.* 43: 410-412.
10. Lida, J. and I.K.M. Smith. 1990. Use of monoclonal antibodies for classifying *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Res. Vet. Sci.* 49: 8-13.
  11. Mittal, K.R., et al. 1983. Determination of antigenic specificity and relationship among HP serotypes by an indirect hemagglutination test. *J. Clin. Microbiol.* 17 (5): 787-790.
  12. Mittal, K.R., et al. 1983. Detection of type-specific antigens in the lung of HP infected pigs by coagglutination test. *J. Clin. Microbiol.* 18(6): 1355-1357.
  13. Smith, I.K.M. and J. Lida. 1990. Passive protection of Piglet by monoclonal antibodies against experimental infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Res. Vet. Sci.* 49: 144-150.

## The Studies on *Actinobacillus Pleuropneumoniae*:II. Preparation of Monoclonal Antibodies

Chang, W.M., Y.S. Wu, S.G. Yang and S.Y. Lin

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health

### SUMMARY

After being immunized with whole cells of serotype 1 of *Actinobacillus* (*Haemophilus*) *pleuropneumoniae* (AP), the spleen cells of Balb/c mice were fused with SP2/0 myeloma cells. There were 12 hybridoma been isolated which secreted specific antibodies against AP when screened by ELISA and cloned by limiting dilution. However, two of those 12 hybridoma (B6c and E4d) secreted more antibodies than others were selected for further study. In enzyme immunoelectrotransfer blot (EITB) antibody secreted by E4d were found to react with 33k antigens of serotype 1 of AP while antibody secreted by B6c could react with 62K, 36K, 35K and 34K, respectively. Both antibodies had species-specificity but not serotype-specificity when tested by indirect fluorescent antibodies test (IFA) and immuno-peroxidase method. About 500 CFU of serotype 1 of AP, whether boiled or not, could be detected in dot blot assay when reacted with E4d antibody.