

葡萄球菌A蛋白与动物血清 结合力的测定

董雯昕

(中国兽药监察所)

摘要

用单向扩散、双向扩散, 对流免疫电泳、微量环状沉淀试验、吸收实验和抑制实验等方法测定了SPA与四种动物血清的结合力, 证明SPA与猪血清的结合力最强, 可结合大部分的IgG及少量的IgM; 与牛和绵羊血清的结合均只发生在IgG₂上; 与马血清的结合则主要是通过IgGa、IgGb、IgGc和IgG(T)。

葡萄球菌蛋白A (SPA) 以其特有的能与抗体Fc段非特异结合的性质已被广泛用于免疫学、细胞学和微生物学等领域中。国内国外资料表明, 有关各种畜用动物抗体与SPA结合力的研究报道还很有限^[1, 2, 5, 10]。本实验采用多种方法, 同时测定了SPA与马、猪、牛和绵羊四种动物血清抗体的结合力, 以探讨SPA在这四种动物疾病抗体检测方面的应用价值。

材料与方 法

一、SPA的提取与鉴定

(一) 菌株: No1800菌株, 由遵义医学院惠赠, 为SPA阳性株; Wood46菌株, 购于北京药品生物制品检定所, 为SPA阴性对照株。

(二) SPA的提取: 参照Rodey等人^[11]的方法提取, 即将生长良好的菌苔洗二次以后, 用pH5.9PB制成悬液, 100℃水浴1小时后迅速冷至4℃, 离心弃菌体, 上清用HCl调pH3.0, 沉淀用少量PB溶解后, 离心去沉淀, 上清加入4.7倍体积的95%乙醇, 离心后, 将沉淀吹干, 再溶于PB中, 4℃保存备用。同法提取Wood46对照菌株的蛋白。

(三) SPA纯度的鉴定: 将提取的SPA过Sephadex G-200柱, 流速控制在1ml/分, 分管收集洗脱液, 于751分光光度计上测定各管在波长280nm处的OD值, 并进行聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定。

二、SPA与动物血清结合力的测定

(一) 单向扩散: 将马、猪、牛和绵羊四种动物的血清分别与溶化的琼脂混合, 使血清稀释为1:300, 待琼脂凝固于板上后打孔, 加入10μl鉴定后的SPA (5mg/ml), 37℃扩散过夜, 观察结果。

(二) 双向扩散: 在琼脂板上分别打孔, 以四种动物之血清对SPA和Wood46菌株蛋白作双扩散, 并设生理盐水对照孔, 37°C扩散过夜。

(三) 微量环状沉淀试验: 各种动物血清以生理盐水对倍稀释, 从2倍至1024倍, 各稀释度分别取20 μ l加入到微量环状沉淀管管底, 再轻轻在其液面上加入20 μ l的SPA(10mg/ml)或Wood46菌株蛋白, 同时设SPA与生理盐水和各血清与生理盐水对照管, 室温1小时观察结果。

(四) 对流免疫电泳: 将SPA和对照株Wood46菌株蛋白(5mg/ml)分别按2倍至256倍稀释后加入到阴极端的一系列孔中, 四种动物的血清加入到阳极端的一系列孔中, 4mA/cm电泳45分钟, 观察结果。

(五) 吸收实验: 1. 吸收血清的制备: 参照Kronvall^[7]方法进行, 将生长良好的No1800菌株和Wood46菌株的菌苔洗下离心后, 按1g湿菌体分别加入1ml各动物血清, 混合7小时, 离心取上清, 再重复与湿菌体混合, 离心后所得上清即为吸收的血清。2. 双向扩散: 基本按Lind^[9]方法, 将各动物的未经吸收的、No1800菌体吸收后的和Wood46菌体吸收后的血清分别对SPA做双向扩散。3. 免疫电泳: 据Lind^[8]和Kronvall^[7]方法进行, 将各动物血清及经No1800株和Wood46株吸收后的相应动物血清, 分别加在琼脂板的孔中电泳, 再在槽中加入各动物的抗血清或抗IgG, 37°C扩散过夜。4. 聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE): 将上述四种动物血清及No1800株和Wood46株菌体吸收后的血清同时做PAGE, 胶浓度为10%, 10mA电泳7—8小时后, 取下胶用0.05%氨基黑染色10分钟, 再用7%醋酸脱色。

(六) 抑制实验: 1. Seligmann抑制法: 按Kronvall^[6]介绍方法进行, 琼脂原度1mm, 以方阵型打孔, 孔中分别加生理盐水, SPA、骨髓瘤球蛋白用猪血清代替之, 另一孔加入各动物血清, 37°C扩散过夜。2. Forsgren氏^[4]方法: 取猪、马、牛和绵羊血清IgG(10mg/ml)0.5ml, 分别与5mgSPA混合, 37°C下2小时, 然后将混合的液体对猪IgG做双向扩散。

结 果

一、单扩散 图1中, 可观察到只有在猪血清琼脂板上的SPA在孔周围扩散形成一个放射状环, 而在其它三种血清琼脂板上则没有环所形成。

二、双扩散 结果如图1所示, 只在猪血清与SPA间形成明显可见的沉淀线, 而在其它孔间没有沉淀线形成。

三、对流免疫电泳及微量环状沉淀试验 SPA对猪血清的活性滴度在对流免疫电泳及微量环状沉淀试验中分别为1:64和1:256, 而与其它血清均没有沉淀线或沉淀环形成。

四、吸收实验 (一) 双向扩散: 见图2示, 未经菌体吸收的猪血清和经Wood46菌株菌体吸收后的猪血清与SPA间形成沉淀线, 经No1800菌株菌体吸收后的猪血清与SPA间没有沉淀线形成, 其它各血清与SPA间也没有形成沉淀线。(二) 免疫电泳: 结果见图3。猪血清用No1800菌株菌体吸收后, 其中的IgG全部丢失(箭头所示), IgM沉淀线也变弱, 而Wood46菌株菌体吸收后的血清与未经吸收血清的电泳图型一致, 沉淀线均

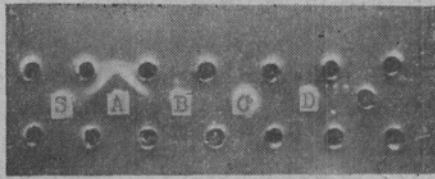


图1 双扩散结果：上行孔中加入SPA，下行孔中加入Wood46菌株蛋白；S孔：生理盐水；A孔：猪血清；B孔：马血清；C孔：牛血清；D孔：绵羊血清

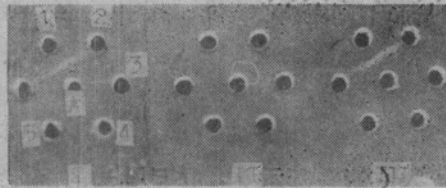


图2 吸收血清双扩散结果 I：未经吸收血清；I No1800菌体吸收后的血清；II Wood46菌体吸收后的血清；1孔：猪血清；2孔：马血清；3孔：牛血清；4孔绵羊血清；5孔：生理盐水；中心A孔：SPA

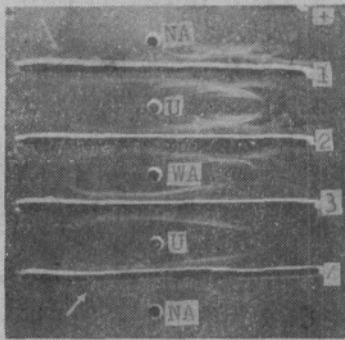


图 3

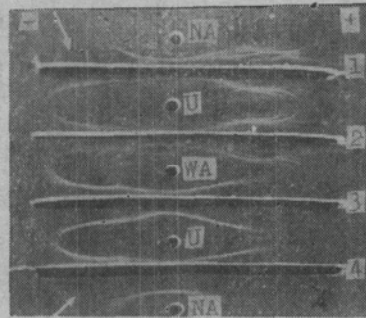


图 4

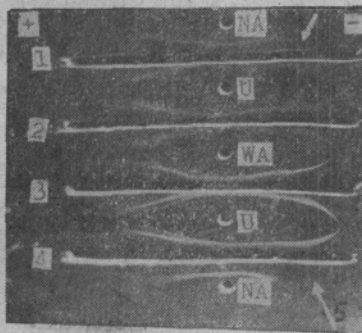


图 5

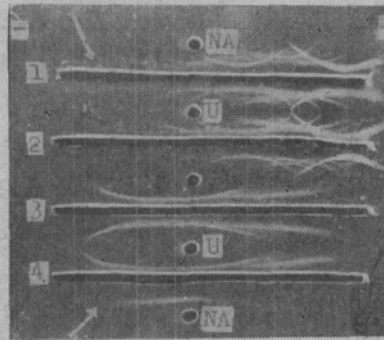


图 6

图3、4、5、6吸收血清（图3为猪血清；图4为绵羊血清；图5为牛血清；图6为马血清）的免疫电泳结果—
 U孔：未经菌体吸收的动物血清；
 NA孔：No1800菌体吸收后的动物血清；
 WA孔：Wood46菌体吸收后的动物血清；
 槽1和槽2：兔抗猪全血清（图3）；兔抗绵羊全血清（图4）；兔抗牛 γ -球蛋白（图5）；兔抗马全血清（图6）
 槽3和槽4：兔抗猪IgG、IgM（图3）；（兔抗绵羊IgG（图4）；兔抗牛IgG（图5）、兔抗马IgG（图6）

存在。这一结果与Bennell^[8]和Zikan^[12]等人的结果相符合。图4、5所示为绵羊和牛血清免疫电泳之结果。其中,经No1800吸收后的血清电泳图型在靠负极端的慢迁移部分(IgG₂)丢失(箭头所示),而快迁移部分(IgG₁)仍存在,从而证明SPA只与绵羊和牛血清中的IgG₂结合,而不与IgG₁结合;图6中所示为马血清的电泳图型,可见经No1800菌株体吸收后的血清沉淀线在最靠负极端(依次为IgGa, IgGb和IgGc)短了一些(箭头所示),并且孔边的沉淀线(IgG(T))也变弱了,说明SPA与这些抗体部分有结合,但结合量较少。(三)聚丙烯酰胺凝胶电泳:结果表明,由No1800菌株体吸收后的猪血清电泳图型中,上端(负极端)IgG部分丢失,而Wood46菌株体吸收后的血清与未经吸收血清比较,电泳图型区别不大;绵羊、牛和马血清的电泳图型也基本与免疫电泳之结果相符合。

五、抑制实验 (一)在Seligmann抑制法中,只有猪血清为沉淀型,而其它三种动物血清均为不反应型。(二)Forsgren方法的结果表明,只有猪IgG与SPA完全结合,抑制了SPA再与中心孔中的IgG发生反应,而其它动物之IgG则均未与SPA发生结合,使SPA仍可与中心孔中的IgG形成沉淀线。

讨 论

一、本试验在国内首次较系统地采用了多种免疫学基本方法,测定了SPA与畜用动物(猪、马、牛和绵羊)血清抗体的结合力。结果表明,SPA与猪血清的结合力最强,在双向扩散,对流免疫电泳及本试验首次采用的单向扩散和微量环状沉淀试验中均证实了这一点。而牛、绵羊和马血清抗体与SPA在上述四项试验中均不出现沉淀线或环,说明它们与SPA的结合力均不如猪血清抗体与SPA间的结合力。

二、采用菌体吸收血清,继之进行免疫电泳和PAGE的方法证明,SPA可与猪血清全部IgG及部分IgM结合,而仅与牛和绵羊血清中的IgG₂结合,不与IgG₁结合,与马血清也仅结合IgG中的一部分,说明在四种动物血清中,SPA与猪血清抗体的结合量最多。抑制试验的结果也可证实这一点。

三、基于以上结果,我们制备了SPA的辣根酶结合物进行SPA-ELISA检测猪钩端螺旋体病,并与常规用抗抗体结合物ELISA相比较,结果符合率为100%(另见报道),从而说明两者的特异性相同。因此,在猪的传染病抗体检测中,SPA可广为应用。但在对其它三种动物传染病抗体检测时,则视其感染阶段的不同,感染病原的不同等因素也可进行分析使用,因为不同情况下产生的抗体种类和数量也会有所不同,如绵羊在感染布氏菌后,血清中的IgG₂量会相对升高,此时用SPA进行抗体检测,检出率就比较高(另见报道)。因此认为用SPA进行动物血清抗体检测的前景是广阔的。

参 考 文 献

- [1] 王益寿: 1980. 国外医学 (生物制品分册). 8(4): 145.
[2] 薛采芳等: 1982, 中华微生物学和免疫学杂志. 2(2): 125.
[3] Bennell, M. A. et al., 1980. Microbiol. Immunol. 24(9): 371.
[4] Forsgren, A. et al., 1966. J. Immunol. 97(6): 822.
[5] Goudswaard, J. et al., 1978. Scand. J. Immunol. 8: 21.
[6] Kronvall, G. et al., 1969. J. Immunol. 103(4): 828.
[7] Kronvall, G. et al., 1970. J. Immunol. 105(5): 1116.
[8] Lind, I. et al., 1968. Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B. 73: 624
[9] Lind, I. et al., 1970. Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B. 78: 672.
[10] Lindmark, R. et al., 1983. J. Immunol. Meth. 62(1): 1.
[11] Rodey, G. E. et al., 1972. J. Immunol. 108(1): 178.
[12] Zikan, J. 1980. Folia. Microbiol. 25(3): 246.

A STUDY ON THE REACTIVITY BETWEEN STAPHYLOCOCCAL PROTEIN A AND ANIMAL'S SERA

Dong Wen, Xie Xin

(The National Control Institute of Veterinary
Bioproducts and Pharmaceuticals)

Summary

The reactivity of SPA with sera from four species (cattle, swine, sheep and horse) were studied with single radial immunodiffusion, double diffusion, counter immunoelectrophoresis, micro-ring precipitin test, absorption experiment and inhibition experiment. The results showed that the reactivity of SPA with porcine serum was the strongest. SPA was able to react with almost all of the IgG component and with some of IgM in porcine serum, but in bovine and ovine sera, it reacted with IgG₂ only; in equine serum, SPA reacted mainly with IgGa, IgGb and partially with IgGc, IgG(T).