

文章编号: 1000-7423(2001)-03-0166-03

【实验报道】

重组犬钩虫分泌蛋白抗血清的免疫反应性

闻礼永¹ Hotez PJ²

【摘要】 目的 分析重组犬钩虫分泌蛋白抗血清与钩虫不同种、期抗原的免疫反应性。方法 用微型垂直电泳槽进行 SDS-PAGE, 以低分子量标准蛋白作参照。ELIB 试验: 以重组犬钩虫分泌蛋白-1 (Ac-rAsp-1) 或重组犬钩虫分泌蛋白-2 (Ac-rAsp-2) 免疫鼠血清作第一抗体, 羊抗鼠 IgG-HRP 作第二抗体, 用 Western blotting 发光底物试剂反应, 全自动摄影, 按照底片中显示带的位置测出相应分子量。结果与结论 Ac-rAsp-1 组分为 45 kDa, 其免疫血清能识别犬钩虫第 II 期幼虫 (Ac-L₃) 抗原和 Ac-rAsp-1, 不与十二指肠钩虫成虫 (Ad-A)、十二指肠钩虫第 III 期幼虫 (Ad-L₃)、美洲钩虫成虫 (Na-A)、犬钩虫成虫 (Ac-A)、巴西日圆线虫成虫 (Nb-A) 抗原和 Ac-rAsp-2 起反应; Ac-rAsp-2 组分为 24 kDa, 其免疫血清能识别 Ad-A、Ad-L₃、Na-A、Ac-A、Ac-L₃ 抗原和 Ac-rAsp-2, 不与 Nb-A 抗原和 Ac-rAsp-1 起反应。

【关键词】 重组犬钩虫分泌蛋白; 钩虫; 免疫反应性

中图分类号: R382.312

文献标识码: A

Studies on Immunological Reaction of the Antiserum of Recombinant Secreted Protein from *Ancylostoma Caninum*

WEN Li-yong¹, Hotez PJ²

(1 Institute of Parasitic Diseases, Zhejiang Academy of Medical Sciences*, Hangzhou 310013;

2 Yale University School of Medicine, Connecticut)

【Abstract】 Objective To analyze the immunological reaction of the antiserum of recombinant secreted protein from *Ancylostoma caninum* with antigens of various species hookworms at different developmental stages. **Methods** SDS-PAGE and ELIB technique were employed in the study. **Results and Conclusion** The protein component of Ac-rAsp-1 was 45 kDa, its immune serum can recognize the antigens of Ac-L₃ and Ac-rAsp-1 protein, but not react to the antigens of Ad-A, Ad-L₃, Na-A, Ac-A, Nb-A and Ac-rAsp-2 protein. The protein component of Ac-rAsp-2 was 24 kDa, its immune serum can recognize the antigens of Ad-A, Ad-L₃, Na-A, Ac-A, Ac-L₃ and Ac-rAsp-2 protein, but not react to the antigens of Nb-A and Ac-rAsp-1 protein.

【Key words】 recombinant secreted protein from *Ancylostoma caninum*, hookworm, immunological reactivity

* WHO Collaborating Center for Research on Helminthiasis

重组犬钩虫分泌蛋白-1 (recombinant *Ancylostoma*-secreted protein 1 from *Ancylostoma caninum*, Ac-rAsp-1) 和重组犬钩虫分泌蛋白-2 (recombinant *Ancylostoma*-secreted protein 2 from *Ancylostoma caninum*, Ac-rAsp-2) 系采用生物基因工程技术合成的、在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 表达的重组抗原, 是钩虫感染期幼虫侵入宿主时分泌的一类大分子蛋白, 属 ES 抗原。为了解重组犬钩虫分泌蛋白 (Ac-rAsp) 的免疫反应性, 采用 SDS-PAGE 和 ELIB 技术开展了如下研究。

材料与方法

1 抗原制备

1.1 十二指肠钩虫抗原 第 II 期幼虫 (*Ancylostoma duodenale* larva II, Ad-L₃) 抗原: 按文献^[1]建立十二指肠钩虫幼犬动物模型。参照文献^[2]方法收集制备抗原, 蛋白含量为 1.13 mg/ml; 成虫 (*A. duodenale* adult, Ad-A) 抗原: 剖杀十二指肠钩虫动物模型幼犬, 从小肠收集 Ad-A, 经显微镜鉴定后按上述方法制备抗原, 蛋白含量为 1.19 mg/ml。

1.2 美洲钩虫成虫 (*Necator americanus* adult, Na-A) 抗原 用噻嘧啶从钩虫病患者体内驱出新鲜虫体, 经显微镜鉴定后按上述方法制备抗原, 蛋白含量为 1.22 mg/ml。

作者单位:

- 1 浙江省医学科学院寄生虫病研究所, 世界卫生组织蠕虫病研究合作中心, 杭州 310013;
- 2 美国耶鲁大学医学院公共卫生和流行病学系, 康州

1.3 犬钩虫抗原 第Ⅱ期幼虫 (*A. caninum* larva Ⅱ, Ac-L₃) 抗原: 每只犬经腹部皮下接种犬钩虫感染期幼虫 (由中国预防医学科学院寄生虫病研究所提供) 500±10 条, 虫卵阳性犬粪使用泥土培养法在 25℃ 孵箱内培养 8 d, 分离收集 Ac-L₃。按上述方法制备抗原, 蛋白含量为 1.19 mg/ml; 成虫 (*A. caninum* adult, Ac-A) 抗原: 解剖钩虫卵阳性犬, 从小肠内挑取 Ac-A, 显微镜鉴定后按上述方法制备抗原, 蛋白含量为 1.39 mg/ml。

1.4 巴西日圆线虫成虫 (*Nippostrongylus brasiliensis* adult, Nb-A) 抗原 以皮内接种法感染 SD 大鼠, 每鼠感染巴西日圆线虫感染期幼虫 (由中国预防医学科学院寄生虫病研究所提供) 300±5 条, 从虫卵阳性鼠小肠内壁粘膜表面挑取成虫, 按上述方法制备抗原, 蛋白含量为 1.02 mg/ml。

1.5 重组犬钩虫分泌蛋白 Ac-rAsp-1 和 Ac-rASP-2 含量均为 1.0 mg/ml, 由美国耶鲁大学 Peter 教授提供。

2 实验血清

Ac-rAsp-1 和 Ac-rAsp-2 免疫鼠血清: 血清稀释度均为 1:64 000, 由美国耶鲁大学 Peter 教授提供。

3 羊抗鼠 IgG-HRP

Sigma 公司产品, 酶稀释度为 1:10 000。

4 实验方法

4.1 SDS-PAGE 按文献^[3]方法进行。用微型垂直电泳槽 (Bio-Rad) 进行 SDS-PAGE。浓缩胶浓度为 3%, 分离胶浓度为 10%。加样后蛋白浓度为 10 μg/孔, 在恒压 100 V 下电泳 1 h。每次均以低分子量标准蛋白 (Marker, Bio-Rad) 作参照。凝胶经考马斯亮蓝 R₂₅₀ 染色 4 h, 冰醋酸-甲醛溶液脱色, 含 20% 甘油玻璃纸封闭过夜干燥后, 测绘蛋白带谱并摄影。

4.2 ELIB (enzyme-linked immunoblotting technique) 试验^[3] SDS-PAGE 电泳分离蛋白, 经转移电泳槽 (Bio-Rad) 将蛋白条带湿电转移至转印膜 (孔径 0.45 μm) 上。转印电压 30 V, 电流 140 mA, 在磁力搅拌下置 4℃ 冷库内转印 16 h。切下 Marker

部分, 膜用 5% PBS-milk 缓冲液 37℃ 封闭 1 h。以 Ac-rAsp-1 或 Ac-rAsp-2 免疫鼠血清作第一抗体, 羊抗鼠 IgG-HRP 作第二抗体, 分别置 37℃ 作用 1 h。用 Western blotting 发光底物试剂盒 (renaissance Western blotting chemiluminescence reagent plus kits, life science products, INC. USA 产品) 反应 1 min, 保鲜膜包裹, 置全自动摄影机内, 用柯达胶片曝光并冲洗。按照底片中显示条带的位置测出相应分子量。

结 果

1 SDS-PAGE 后 Ac-rAsp 的蛋白组份

Ac-rAsp-1 和 Ac-rAsp-2 经 SDS-PAGE, 考马斯亮蓝 R₂₅₀ 染色后各显示 1 蛋白条带, 分子量分别为 45 kDa 和 24 kDa (图 1)。

2 ELIB 后 Ac-rAsp 的免疫反应性

Ac-rAsp-1 和 Ac-rAsp-2 经 SDS-PAGE、带湿电转移后, 与 Ac-rAsp-1 免疫鼠血清进行 ELIB。结果免疫鼠血清在 45 kDa 处与 Ac-rAsp-1 发生阳性反应; 与 Ac-rAsp-2 未产生反应条带 (图 2)。

Ac-rAsp-1 和 Ac-rAsp-2 经 SDS-PAGE、电转移后, 与 Ac-rAsp-2 免疫鼠血清进行 ELIB。结果 Ac-rAsp-2 免疫鼠血清在 24 kDa 处与 Ac-rAsp-2 发生阳性反应; 与 Ac-rAsp-1 未发生阳性反应 (图 3)。

3 ELIB 后 Ac-rAsp-1 免疫血清的反应性

Ad-A、Ad-L₃、Na-A、Ac-A、Ac-L₃ 和 Nb-A 抗原经 SDS-PAGE、带湿电转移后, 分别与 Ac-rAsp-1 免疫鼠血清进行 ELIB。结果 Ac-L₃ 抗原在 45 kDa 处与其发生阳性反应, 其余抗原均未出现反应条带 (图 4)。

4 ELIB 后 Ac-rAsp-2 免疫血清的反应性

Ad-A、Ad-L₃、Na-A、Ac-A、Ac-L₃ 和 Nb-A 抗原经 SDS-PAGE、带湿电转移后, 分别与 Ac-rAsp-2 免疫鼠血清进行 ELIB。结果 Ad-A、Ad-L₃、Ac-L₃ 抗原在 24 kDa 处与其发生强阳性反应, Na-A、Ac-A 抗原在 24 kDa 处与其发生弱阳性反应, Nb-A 抗原未出现反应条带 (图 5)。