

【论著】

文章编号:1000-7423(2003)-05-0275-04

用噬菌体十二肽库筛选日本血吸虫病诊断抗原

朱晓华 姜昌富 魏兰英 雷家慧 时红波 潘虹

【摘要】 目的 从噬菌体十二肽库中筛选出特异、灵敏的日本血吸虫病诊断抗原。方法 以日本血吸虫急感患者血清免疫球蛋白(Ig)作为靶分子,免疫筛选噬菌体随机十二肽库。经过3轮吸附-洗脱-扩增的淘筛过程,随机挑取10个蓝色噬菌斑扩增,用ELISA检测其免疫活性,并通过对并殖吸虫病及旋毛虫病患者血清的检测分析其诊断日本血吸虫病的价值。结果 6个克隆可以与日本血吸虫急感患者血清免疫球蛋白(Ig)特异结合。其中 A_{492} 值最高的克隆(SJA1)具有较好的特异性和灵敏度。结论 从噬菌体随机十二肽库中筛选到的克隆对日本血吸虫病具有较高的诊断价值。

【关键词】 日本血吸虫病;噬菌体肽库;诊断抗原

中图分类号:R532.21

文献标识码:A

Screening of Schistosomiasis japonica Diagnostic Antigen with Phage 12-mer Peptide Library

ZHU Xiao-hua, JIANG Chang-fu, WEI Lan-ying, LEI Jia-hui, SHI Hong-bo, PAN Hong
(Department of Pathogenic Biology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030)

【Abstract】 Objective To obtain the mimic epitope of specific and sensitive diagnostic antigen in schistosomiasis japonica from phage 12-mer peptide library. **Methods** Specific Ig was purified from sera of patients with acute schistosomiasis and used to immunoscreen the phage peptide library (PH. D. -12). After 3 rounds of panning, 10 positive plaques were selected and amplified. The immunoactivity of each clone was examined by ELISA. The sensitivity and specificity of immunoactive clones were confirmed by detecting the sera of patients with different parasitosis. **Results** Six clones could bind to the specific Ig purified from sera of patients with acute schistosomiasis. One clone with the highest A_{492} value showed a high sensitivity and specificity. **Conclusion** The clone (SJA1) identified by the specific Ig from the library played a better part in the immunodiagnosis of schistosomiasis.

【Key words】 schistosomiasis japonica, phage peptide library, diagnostic antigen

血吸虫病是一种严重危害人类健康的人兽共患寄生虫病。目前,常用的血吸虫病诊断抗原是虫卵抗原和成虫抗原,但这些抗原成分复杂,难以纯化,且不易大量获得^[1]。噬菌体表面呈现技术(phage display technique)^[2]是指将外源蛋白通过与丝状噬菌体外壳蛋白融合而表达于噬菌体表面的一种技术,表达产物具有生物活性,可通过靶分子筛选出特定功能的多肽结构。利用该技术构建的噬菌体肽库包括了某一长度短肽的各种可能序列或其中的绝大部分,因此可用来进行抗原表位的定位等研究^[3]。本实验旨在从噬菌体十二肽库中筛选出能与急性日本血吸虫感染者血清免疫球蛋白(Ig)特异结合的短肽分子,并进一步检测其灵敏性和特异性,为血吸虫病的临床诊断提供更好的诊断试剂。

材料与方 法

1 抗体制备

日本血吸虫急感患者血清,采自血吸虫病疫区湖北省武汉市东西湖区粪检阳性的患者。

作者单位:华中科技大学同济医学院病原生物学系,武汉 430030

用饱和硫酸铵改良法提取患者血清中的免疫球蛋白(Ig),并与日本血吸虫可溶性虫卵抗原(SEA)做dot-ELISA,测定所制备抗体的活性和滴度,置4℃保存备用。

2 血清

32例急性日本血吸虫感染患者血清(Sj)、16例并殖吸虫病患者血清(Pw)、16例旋毛虫病患者血清(Ts)均由华中科技大学同济医学院病原生物学教研室提供;16例健康者血清(Hp)采自南航飞行员。

3 试剂

噬菌体十二肽库、受体菌ER2738、链霉亲和素(streptavidin)均购于英国Biolabs公司。辣根过氧化物酶标记的羊抗人IgG(IgG-HRP)购自北京中山生物技术公司,其他均为国产试剂分析纯。

4 筛选过程

4.1 肽库筛选 将日本血吸虫急感患者血清Ig作1:70稀释,每孔加入150μl,置湿盒中于4℃孵育过夜。用封闭液(0.1mol/L NaHCO₃(pH 8.6), 5mg/

ml 牛血清白蛋白 (BSA) 加满每孔, 4 °C 封闭 2 h。用 TBST [三羟甲基氨基甲烷缓冲液 (TBS) + 0.1% (V/V) Tween-20] 快速洗涤 6 次。每孔加 10 μl 噬菌体肽库原液和 100 μl TBST, 于室温轻摇 60 min。去掉未结合的噬菌体, 用 TBST 洗涤平皿 10 次, 每孔加入 100 μl 甘氨酸溶液 [0.2 mol/L 甘氨酸-盐酸 (pH 2.2) 和 1 mg/ml BSA], 轻摇 8 min, 吸取洗脱液至微量离心管中, 再加 15 μl 1 mol/L Tris-HCl (pH 9.1) 中和, 此为第 1 轮阳性噬菌体洗脱液。除用 1 μl 洗脱液进行滴度测定外, 剩余加入 20 ml ER2738 培养液 (处于对数早期) 进行扩增。37 °C 振荡培养 4.5 h, 16 000 g, 4 °C 离心 10 min, 取上清, 加入 1/6 体积 PEG/NaCl [20% (W/V) 聚乙二醇 8000, 2.5 mol/L NaCl], 4 °C 沉淀过夜。16 000 g, 4 °C 离心 15 min, 弃去上清, 200 μl TBS [50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 150 mmol/L NaCl] 悬浮沉淀, 即为第 1 轮洗脱扩增液。将 Ig 作 1:140 稀释, 包板过夜, 封闭后加入第 1 轮洗脱扩增液, 同法进行第 2 轮筛选和扩增。将 Ig 作 1:280 稀释, 再进行第 3 轮筛选, 每轮筛选的条件 (表 1) 不同。将每一轮的洗脱液和扩增液分别作噬菌体滴度测定。

表 1 用日本血吸虫急感患者血清 Ig 筛选噬菌体十二肽库的条件
Table 1 The condition of screening phage 12-mer peptide library using purified Ig from sera of patients with schistosomiasis japonica (SJ-Ig)

筛选轮次 Screening round No.	日本血吸虫急 感患者血清 Ig (mg/ml) Sj-Ig (mg/ml)	作用时间 (min) Interaction time of Ig and peptide library (min)	Tween-20 (%)
第 1 轮 First	0.100	60	0.1
第 2 轮 Second	0.050	40	0.5
第 3 轮 Third	0.025	20	1.0

4.2 噬菌体滴度测定 用 LB (Luria-Bertani) 培养基对筛选的洗脱液作 1:10 ~ 1:10⁴ 稀释, 洗脱扩增液作 1:10⁸ ~ 1:10¹¹ 稀释, 取稀释液 10 μl 与 200 μl 过夜培养的 ER2738 混匀, 室温孵育 5 min, 加入 3 ml 顶琼脂糖, 快速混匀后倒入 LB 培养基/异丙基-β-D-硫代半乳糖苷/5-溴-4-氯-3 吡啶-β-D-半乳糖苷 (LB/IPTG/Xgal) 培养皿上, 37 °C 孵育过夜。计数培养皿上的噬斑数, 计算噬菌体滴度: 每 10 μl 噬菌体滴度 (pfu) = 噬斑数目 × 稀释倍数。将第 3 轮的洗脱液铺板, 孵育过夜后, 随机挑取 10 个阳性噬斑进行扩增。

4.3 噬斑扩增 将挑取的单个阳性噬斑, 转入 1 ml 过夜培养的 ER2738, 培养 4.5 ~ 5 h, 16 000 g, 4 °C 离心 30 s 后的上清即为噬斑扩增液。

5 酶联免疫吸附试验 (ELISA)

将第 3 轮噬斑扩增液用 pH 9.6 的碳酸钠缓冲液做 1:80 稀释, 包板过夜。同时设立空白对照和 SEA

阳性对照。用磷酸缓冲液 (PBS)-Tween-20 稀释的 10% 小牛血清封闭 2 h; 加入 1:200 稀释的日本血吸虫急感患者血清, 37 °C 孵育 2 h; 加入羊抗人 HRP-IgG (1:50 000 稀释), 置 37 °C, 2 h; 加入底物 (邻苯二胺) 溶液, 充分显色后用 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应。在 ELISA 检测仪上读取 A₄₉₂, 以判断结果。从中挑选 3 个 A₄₉₂ 较高的克隆用同样的方法检测不同寄生虫病患者血清, 以分析其灵敏性和特异性。

6 阳性克隆 DNA 序列测定及同源性分析

将经过 ELISA 鉴定具有生物学活性的克隆进行扩增, 按照 PH. D. -12™ Phage Display Peptide Library Kit (Biolabs, #8110s) 的方法提取单链 DNA, 用-96 primer 进行测序, 分析所获得表位的氨基酸序列及其之间的同源性。

7 Western 印迹免疫分析

用样品液对每一轮筛选的洗脱液作 1:2 稀释, 各取 5 μl 按 Ruppel 等^[4] 的方法进行 SDS-PAGE, 单一胶的浓度为 13%, 所用的蛋白标志物为 SDS-PAGE 低分子量标准蛋白质 (14 000 ~ 97 400, 上海生物化学研究所)。电泳后, 电转移至硝酸纤维薄膜 (NC 膜) 上, 置 0.05% TBS-Tween-20 中封闭 2 h, 加日本血吸虫急感患者血清, 37 °C 孵育 2 h; 加入羊抗人 HRP-IgG (1:5 000 稀释), 置 37 °C 2 h。加入底物溶液 (4-氯-1-萘酚), 充分显色后用自来水冲洗, 终止反应。观察结果, 证明筛选的富集现象。

结 果

1 日本血吸虫急感患者血清 Ig 免疫活性的测定

日本血吸虫急感患者血清提纯后的 Ig 蛋白质含量为 7.185 mg/ml。与 SEA 做 dot-ELISA, 结果显示, 稀释至 800 倍时仍有很强的免疫活性。

2 阳性克隆的筛选

将日本血吸虫急感患者血清 Ig 包板, 经过 3 轮筛选, 每一轮筛选的条件不同 (表 1), 通过降低靶分子的浓度, 缩短作用时间和增加 Tween-20 的百分含量, 以期筛选到亲和力较高的噬菌体克隆。按下列公式计算每一轮的噬菌体回收率, 结果见表 2。

噬菌体回收率 = (洗脱噬菌体/加入噬菌体) × 100%

3 特异噬菌体克隆的 ELISA 检测

将第 3 轮的洗脱液铺板, 孵育过夜后, 随机挑取

10 个阳性噬斑进行扩增,通过 ELISA 进行活性检测。其中有 6 个克隆可以与 Ig 特异结合。挑取 3 个 A_{492} 较高的克隆 SJA1、SJA2、SJA3 (目的克隆) 进行灵敏性和特异性鉴定 (SEA 为阳性对照), 结果见表 3。

表 2 用日本血吸虫急感患者血清 Ig 进行 3 轮亲和筛选中噬菌体回收率的改变

Table 2 The changes in yield of phages during the panning of three rounds using purified Ig from sera of patients with schistosomiasis japonica (Sj-Ig)

筛选轮次 Screening round No	加入噬菌体 (pfu) Phages added (pfu)	洗脱噬菌体 (pfu) Phages eluted (pfu)	噬菌体回收率 (%) Yield of phages (%)
第 1 轮 First	1.0×10^{12}	5.4×10^4	5.4×10^{-6}
第 2 轮 Second	1.0×10^{12}	1.5×10^5	1.5×10^{-5}
第 3 轮 Third	1.0×10^{12}	5.0×10^5	5.0×10^{-5}

注: pfu 为噬斑形成单位

Note: pfu = plaque forming units

表 3 目的克隆对不同寄生虫病患者血清 ELISA 鉴定的阳性反应率 (%)

Table 3 Positive rate of sera from patients with different parasitosis by ELISA using positive clones (%)

血清来源 Source of serum	检测例数 No. cases detected	SEA	SJA1	SJA2	SJA3
Sj	32	32 (100)	32 (100)	14 (43.75)	6 (18.75)
Pw	16	8 (50)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Ts	16	8 (50)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Hp	16	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

4 DNA 测序结果及同源性分析

经 ELISA 鉴定的阳性克隆 DNA 序列及其编码的氨基酸序列见图 1, 通过 Blastp 软件分析, 该 6 个克隆的氨基酸序列无同源性。同时将各序列与所有吸虫 (Trematoda) 的蛋白质数据库进行比较, 发现相互之间均无相似性。

```

SJA1 5' GCTCATTCTGGCTTCCTGGGCTGGGCTTCTTATG 3'
      A H S W L P G A G L L M
SJA2 5' ATTAATATYCCGGAGCCCTCATAGGGCGCTTTT 3'
      I N I P E P P H R A S F
SJA3 5' ATTAATACTTCGTCGAAGCCGGTATTTCGTGTCT 3'
      I N T S S K P V I S L S
SJA4 5' ATTAATAATCTCGAGCCTGTGTATACGCCCTGTGG 3'
      I N N L E P V Y T P A W
SJA5 5' ATTAATCAGGATTTGGCTGTAATCATGGGAATTGG 3'
      I N Q D L A V N H G N W
SJA6 5' ATTGATCAGAGGGGATTCCTTATTTCGAGGCTTACG 3'
      I D Q R G I P Y S R L T
    
```

图 1 6 个阳性克隆的核苷酸及氨基酸序列

Fig. 1 DNA and amino acid sequence of six different positive clones

5 Western 印迹分析

为了证明所筛选到的噬菌体的免疫学活性及在筛选过程中特异性噬菌体克隆的富集现象, 将每一轮的洗脱液进行 Western 印迹分析。结果如图 2 所示; 日本血吸虫急感患者血清免疫球蛋白 (Ig) 均可特异性结

合于融合蛋白的部位, 即相对分子量约为 10.5 kDa 的位置, 并明显呈现出富集现象。

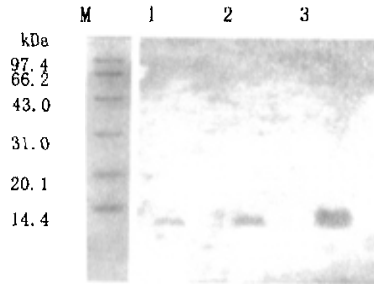


图 2 筛选洗脱液的 Western 印迹分析

M 蛋白标准分子量 1, 2, 3 第 1, 2, 3 轮洗脱液

Fig. 2 Western blotting analysis of each round elution during the panning

M Marker Lanes 1, 2, 3 The first, second, third round elution

讨 论

据文献报道, 现有的日本血吸虫病诊断试剂盒均存在与并殖吸虫、旋毛虫等其它寄生虫病的交叉反应现象^[5,6]。这可能是由于诊断所用的日本血吸虫抗原与并殖吸虫和旋毛虫之间存在着共同表位^[7,8]。近几年来, 许多学者利用基因重组技术对血吸虫多种诊断抗原的基因进行克隆, 并重组表达, 提高了诊断抗原的特异性, 但也降低了它的敏感性。同时由于该重组过程复杂, 需要经过克隆, 鉴定和表达等多个环节, 因而限制了它的广泛应用。所以, 有必要寻找一种特异性高, 灵敏度高, 易大量制备的日本血吸虫病诊断抗原。噬菌体表面呈现技术为寻找这种功能性抗原表位提供了方法学基础。

本研究利用噬菌体表面呈现技术, 用日本血吸虫急感患者血清免疫球蛋白 (Ig) 筛选噬菌体随机十二肽库, 结果发现: ①在筛选到的克隆中, 有 6 个具有免疫活性, 其中 A_{492} 值最高的克隆 (SJA1) 与常规使用的 SEA 相比, 对日本血吸虫病具有更好的诊断价值 (表 3); ②对所得到的阳性克隆进行 DNA 序列测定和氨基酸同源性分析 (图 1), 推测其可能均为日本血吸虫诊断抗原的模拟表位。因此, SJA1 有望代替天然抗原用于血吸虫病的诊断, 为开发新型诊断试剂打下了基础。如何纯化该模拟抗原表位以及该表位能否在动物体内诱导特异性免疫应答, 正在进行。

本研究证明噬菌体表面表达肽能够模拟天然抗原的空间构象, 具有较好的抗原性, 可与相应的抗体高特异性结合, 因此可作为抗原用于免疫诊断。为获得空间结构较为复杂的诊断抗原表位提供了一种新的方法。同时, 该研究也使人们看到噬菌体表面呈现技术在血吸虫病诊断研究方面的应用价值, 对它在其它寄生虫

病诊断研究中的应用具有推动作用。

参 考 文 献

[1] 舒新华. 重组血吸虫诊断抗原研究进展[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2000, 4: 244 - 246.

[2] Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vector that display cloned antigen on the virion surface[J]. Science, 1985, 228: 1315 - 1317.

[3] 俞慕华, 陈代雄, 梁瑜, 等. 噬菌体表面呈现技术及在抗寄生虫免疫中的应用[J]. 中国公共卫生, 2000, 9: 844 - 846.

[4] Ruppel A, Disefeld HJ, Rother U. Immunoblot analysis of schistosomiasis mansoni antigens with sera of schistosomiasis patients: diagnostic potential of an adult schistosome polypeptide[J]. Clin Exp Immunol, 1985,

62: 499 - 506.

[5] 管晓虹, 石佑恩. 评估日本血吸虫病免疫诊断方法疗效考核价值的合作研究[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 1996, 8: 72 - 78.

[6] 湖南医科大学, 湖南省寄生虫病防治研究所, 湖南省血吸虫病专家咨询委员会. 日本血吸虫病循环抗原检测的合作研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1995, 13: 277 - 282.

[7] 罗新松, 何永康, 喻新玲, 等. 简捷-酶联免疫吸附试验检测血吸虫抗体试剂盒的应用研究[J]. 实用预防医学, 1999, 6: 9 - 10.

[8] 曾庆仁, 张悟澄, 陈翠娥, 等. 日本血吸虫卵与卫氏并殖吸虫成虫可溶性抗原的共同抗原组分研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1991, 9: 31 - 34.

(收稿日期: 2002-12-10 编辑: 庄兆农)

文章编号: 1000-7423(2003)-05-0278-01

【简报】

一种延长大劣按蚊虫卵保存时间的方法

李道生

中图分类号: R384.11 文献标识码: B

大劣按蚊(*Anopheles dirus*)是一种非滞育性昆虫,如饲料供应无缺,终年都可繁殖。虫卵在适宜条件下(温度为 $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$,相对湿度 $60\% \sim 85\%$),胚胎发育较快,经3 d几乎全部发育成熟。因此,大劣按蚊的实验室保种,过去只能采用人工长年累月饲养,耗费大量的人力物力。本实验在饲养大劣按蚊过程中,摸索了一种简便的保存虫卵的方法,即将新产下的蚊虫卵置于下有湿棉垫的滤纸上,在 $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的温室中放置12 h,然后可分别在 $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ 或 $17\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中保存。这种保存方法简便实用,可以明显减轻蚊虫饲养员的工作量,为此向同行推荐。

低温对大劣按蚊卵胚发育的影响见表1。

表1 低温对大劣按蚊孵化率的影响

处理温度(°C)	处理时间(d)	移入 $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵化的时间(d)	虫卵数	孵化虫卵数	孵化率%
10	8	2~3	400	2	0.5
12	8	1~2	210	42	20.0
14	8	1~2	405	159	39.3
16	8	1~2	408	313	76.7
26(对照)	2	1~2	250	202	80.1

表1列出5种温度对虫卵发育的影响,适宜大劣按蚊虫卵保存的最低温度为 $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。在此温度时,蚊卵经8 d保存,孵化率仍达 76.17% 。与对照蚊卵的孵化率 80.1% 接近。

根据上述实验结果,挑选 $14\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $17\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $19\text{ }^{\circ}\text{C}$ 进一步试验。待其发育12 h,分别移入不同温度保存(一份在蚊室按常规饲养)。待一定保存期结束后取出,在养蚊室($26\text{ }^{\circ}\text{C}$)条件下分别置于水中,让其自然孵化,并计算孵化率(表2)。

表2 不同温度保存大劣按蚊虫卵的孵化结果

温度(°C)	时间(d)	移入 $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵化的时间(d)	虫卵数	孵化虫卵数	孵化率%
14	28	1~2	1 032	324	31.4
16	28	1~2	388	281	74.8
		1~2	500	356	71.3
17	28	1~2	280	191	68.4
		1~2	258	182	70.5
19	28	1~2	256	148	57.8
		1~2	217	116	53.4
26(对照)	2	1~2	300	232	77.4

由表2结果可知,大劣按蚊虫卵在湿度 95% 的条件下,在 $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $17\text{ }^{\circ}\text{C}$ 中,经分别存放37 d后,仍然保持 71.3% 和 70.5% 的孵化率,与对照蚊卵 77.4% 的孵化率接近。

大劣按蚊是一种热带、亚热带蚊种,它的耐寒能力较差,在 $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时绝大部分虫卵卵胚死亡(表1)。而当 $10\text{ }^{\circ}\text{C} < \text{温度} < 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,虫卵发育迟缓。

作者单位: 中山大学生命科学院寄生虫学研究室, 广州 510275

(收稿日期: 2003-01-13 编辑: 庄兆农)