

化学发光免疫法检测美洲大蠊 sIgE 水平的研究

王勤, 刘志刚*, 吉坤美

【提要】 将 6 只美洲大蠊全虫用液氮研磨提取粗浸液, 用阴离子交换剂 (DEAE, Sephadex A-50) 纯化后测定蛋白浓度, 并配制成不同浓度梯度, 分别将粗浸液及纯化后的不同浓度变应原点于硝酸纤维膜 (NC 膜) 上, 依次加入不同蟑螂过敏患者血清、生物素-亲和素系统的 IgE 二抗和辣根过氧化物酶 (HRP), 以及鲁米诺化学发光底物进行化学发光反应。结果表明, 化学发光免疫法可检测美洲大蠊粗浸液最低蛋白浓度为 0.87 $\mu\text{g/ml}$ 。在此浓度下, 其检出结果与皮试阳性患者血清符合率为 90%, 与皮试阴性及健康人血清的符合率均为 100%。

【关键词】 美洲大蠊; 特异性变应原; sIgE; 化学发光; 酶联免疫

中图分类号: R384.9

文献标识码: B

Detection of *Periplaneta americana* sIgE with Chemiluminescent Immunoassay (CLIA)

WANG Qin, LIU Zhi-gang*, JI Kun-mei

(Institute of Allergy and Immunology, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China)

【Abstract】 Crude extract of *Periplaneta americana* was prepared by liquid nitrogen grinding. After being purified with DEAE Sephadex A-50 ion exchange chromatography, the protein content of the extract was determined and the extract solution was prepared at gradient concentrations. The crude extract and purified allergen at different concentrations were dotted respectively on nitrocellulose (NC) membrane. Patient serum, bio-IgE, sa-HRP, luminal reagents were added to the membrane. The chemiluminescence was displayed by exposing to X-film. The result revealed that the minimum protein content of crude *Periplaneta americana* extract detected by CLIA is 0.87 $\mu\text{g/ml}$, with 90% accordance to skin test positive patients, and 100% accordance to those with negative skin test and ELISA detection.

【Key words】 *Periplaneta americana*; Specific allergen; sIgE; Chemiluminescence; Immunoassay

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 39860071, 30571625); Guangdong Province Science and Technology Project (No. 2003A3080502); Shenzhen City Science and Technology Project (No. 200326)

* Corresponding author, E-mail: lzg@szu.edu.cn

在引起变态反应性疾病的众多变应原中, 蟑螂变应原蛋白是引起 I 型变态反应的一种重要昆虫变应原。目前发现华南地区约有 40%~50% 的哮喘患者对蟑螂过敏。我国南方蟑螂中美洲大蠊占 70%, 为优势种群^[1]。目前, 过敏性哮喘诊断方法主要包括过敏原皮肤试验和体外血清中过敏原特异性 IgE 的测定等两种。皮肤点刺试验操作简便、特异性高, 但需用高浓度的变应原, 易出现假阴性, 且结果的评价受年龄、药物、个体差异的影响, 极少数患者甚至会出现严重的过敏反应。血清特异性 IgE 的检测可靠性较高, 可减少误诊。其中以 Uni-CAP 体外检测系统应用最为广泛, 但所用的过敏原均为进口, 价格昂贵, 且与我国变应原间存在一定差异^[2]。本研究选用化学发光检测途径结合酶联免疫过程, 对我国华南地区人血清中美洲大蠊变应原 sIgE 水平进行检测, 探索该方法在过敏性哮喘特异性诊断中的应用。

1 材料与方法

1.1 美洲大蠊及血清 美洲大蠊由广东省疾病预防控制中心惠赠, 经本室培养后取材制备粗浸液。蟑螂过敏患者皮试阳性血清(++级)和皮试阴性血清均由海南省海口市人民医院提供, 健康人血清(ELISA 方法测定)由广东省深圳市南山区卫生疾病预防控制中心提供。

1.2 主要试剂 阴离子交换剂(DEAE, Sephadex A-50)购于北京泽平科技有限责任公司, 重组蛋白 A 琼脂糖凝胶(Protein A)购于北京本元正阳基因技术有限公司, 生物素标记的 IgE 二抗、辣根过氧化物酶(HRP)标记的亲和素(链霉亲和素)、生物素洗液和鲁米诺化学发光底物试剂盒均为美国 KPL 公司生产, 显影液和酸性定影液购于石家庄太行科工有限公司, 小牛血清白蛋白(BSA)购于上海生工生物工程技术有限公司, 硝酸纤维膜(NC 膜)为美国 PALL Life Sciences 产品, JP-200 富士胶片购于广州鼎国生物责任有限公司。

1.3 美洲大蠊粗浸液的制备和主要变应原的分离、纯化 取美洲大蠊全虫 6 只, 液氮研磨, 预冷丙酮充分去脂数次, 待上层溶液完全澄清, 倒尽上清丙酮, 自然风干至恒重。将脱脂干燥后美洲大蠊以每克干粉加入 20 ml Coca's 溶液 (5 g/L

基金项目: 国家自然科学基金(No.39860071、30571625); 广东省科技计划重点项目(No.2003A3080502); 深圳市科技计划项目(No. 200326)

作者单位: 深圳大学过敏反应与免疫学研究所, 深圳 518060

* 通讯作者, E-mail: LZG@szu.edu.cn

NaCl、2.75 g/L NaHCO₃、4 g/L 结晶酚) 制备浸液, 匀浆, 弃沉淀, 上清液即为美洲大蠊粗浸液, 用 Tris-HCl 透析, 充分平衡 DEAE, Sephadex A-50 进行离子交换柱层析, 取美洲大蠊粗浸液上样, 阶段洗脱, 分管收集, 测定蛋白浓度值。

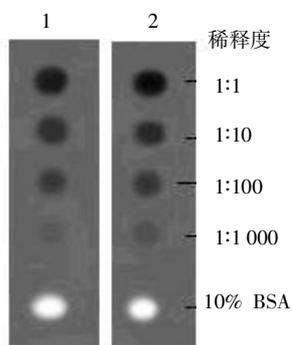
1.4 蟑螂过敏患者阳性血清的纯化 取 3 ml 重组蛋白 A (Protein A) 琼脂糖凝胶装于扩口层析柱中, 3~5 倍柱床体积纯水清洗, 再用平衡缓冲液清洗 5~10 倍柱床体积。缓慢上样蟑螂过敏患者阳性混合血清 (皮试++级, 6 人份) 4 ml, 上样流速 ≤ 2 ml/min。取平衡缓冲液清洗 5 倍柱床体积, 收集流出的溶液即为过柱纯化后稀释的血清样品。

1.5 化学发光酶联免疫检测 取不同稀释度 (1:1、1:10、1:100、1:1 000、1:5 000) 的美洲大蠊粗浸液、纯化后蛋白和阴性对照 (10% BSA) 各 3 μl, 分别点样于 NC 膜上, 将膜置于烘箱 80 °C 1 h, 再将膜转入装有 5 ml 封闭液 (5% BSA/TBST) 的培养皿, 室温封闭 2 h。分别取不同血清 (过敏患者血清、皮试阴性血清和健康人血清, 1:25) 各 200 μl 加入封闭液中孵育 3 h。取出 NC 膜, 用 TBST 缓冲液漂洗 10 min×4 次, 将 NC 膜浸入经 3% BSA/TBST 1:5 000 稀释的生物素标记二抗, 反应 2 h。TBST 缓冲液洗膜 10 min×4 次, 亲和素标记的 HRP 1:1 000 稀释于样品稀释液中, 将膜放置其中反应 1 h。生物素洗脱液漂洗 10 min×4 次。滴加适量鲁米诺化学发光底物 A 液、B 液 (1:2 配制) 于 NC 膜上。取 X 胶片覆盖于 NC 膜上方曝光 1 min, 依次显影 30 s、定影 2 min, 冲净, 待胶片风干后观察结果并拍照。

2 结果

2.1 不同稀释度抗原化学发光的结果 美洲大蠊粗浸液蛋白在 1:1~1:1 000 等 10 倍比稀释的 4 个梯度下, 均能与血清抗体反应发出肉眼可见光, 经 X 胶片曝光得斑点图。点有美洲大蠊粗浸液蛋白处为黑色斑点, 斑点颜色深浅与蛋白浓度成正比。点有阴性对照的 BSA 处均为透亮的圆点, 说明 BSA 未参与酶联反应过程。相同稀释度下, 纯化后蛋白点较纯化前粗浸液点颜色略深 (图 1)。

2.2 化学发光免疫法检出率的比较 不同稀释度的美洲大蠊抗原与皮试阳性患者血清反应较强, 粗浸液 (蛋白浓度为 1.76 mg/ml) 按 1:1 000 稀释时检出率为 90%, 按 1:5 000 稀释时检出率为 20%, 检测限度为 0.87 μg/ml。粗浸液与皮试阴性血清反应较弱, 1:100 稀释时检出率为 37%, 1:1 000 稀释时检出率为 0。粗浸液和健康人血清反应, 高浓度情况下也可见发光, 但



1: 美洲大蠊粗浸液, 2: 纯化后美洲大蠊主要变应原。

图 1 美洲大蠊不同抗原在不同稀释度下化学发光结果

在 1:100 稀释时, 则无 (表 1)。

表 1 美洲大蠊特异性变应原在化学发光免疫法中对过敏性疾病患者和健康人血清检出率的比较

蛋白浓度 (1.76 mg/ml)	过敏性疾病患者血清检出率 (%)		健康人血清 检出率 (%) n=8
	皮试阳性血清 (++级) n=10	皮试阴性血清 n=8	
1:1	100	100	100
1:10	100	100	75
1:100	100	37	0
1:1 000	90	0	0
1:5 000	20	-	-

2.3 除总 IgG 前、后血清 sIgE 水平观察 蟑螂过敏患者阳性混合血清 (皮试++级, 6 人份) 经 Protein A 琼脂糖纯化去除 IgG 前、后分别参与反应, 结果表明是否去除 IgG 对整个化学发光免疫反应影响不大, 相同抗原情况下, 曝光出来的斑点颜色深浅并无明显差异。

3 讨论

变态反应性疾病的体外特异性诊断 (血清总 IgE 和抗原特异性 IgE 测定), 常用 ELISA、放射免疫分析等方法测定^[3]。近年来, 化学发光免疫作为一种较为新型的技术手段快速发展起来, 把传统的酶联免疫反应和发展中的化学发光反应结合在一起, 用发光剂鲁米诺 (luminol, 3-氨基邻苯二甲酰肼) 为底物, 根据发光强度测定酶联反应的程度。

由于介导 I 型过敏反应的 IgE 抗体是目前已知在人血清中含量最低的一种免疫球蛋白, 本研究试图用 Protein A 吸附去除血清中大量的 IgG 成分, 从而降低 IgG 和 IgE 同时竞争抗原位点的机会, 增加 IgE 抗体与抗原分子结合的可能性。结果表明, 亲和层析纯化前、后血清生物活性并未出现显著差异。这可能与免疫反应机制有关, 也可能与纯化血清的效果有关, 有待进一步研究。

化学发光免疫法是一种痕量分析方法, 检测限可达 (10¹²~10¹⁸) mol/L。本实验由于抗原纯度和血清质量的影响, 灵敏度与此还有一定差异, 但已远高于皮试方法和 ELISA 法。另外, 化学发光分析检测不受仪器检测极限的限制, 多数是受试剂的杂质污染或浓度低而影响。化学发光的线性范围所展示的浓度区间通常较宽, 可高达 3~6 个数量级^[4]。化学发光酶联免疫法集灵敏、准确、特异性高且无污染等优点, 在生物医学科学和临床医学等领域有广泛的应用前景。

参 考 文 献

[1] Qiao BS. Experimental Technology of Allergy [M]. 2nd. Beijing: Peking Union Medical College Press, 2002. 104-105. (in Chinese)
(乔秉善. 变态反应学实验技术 [M]. 第 2 版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2002. 104-105.)

[2] Liu ZG, Huang JL, Yang H, et al. Identification and analysis of the major *Periplaneta americana* allergen Cr-PI gene cloned from the Chinese mainland species [J]. J Trop Med, 2002, 2: 131-134. (in Chinese)
(刘志刚, 黄炯烈, 杨慧, 等. 美洲大蠊主要变应原 Cr-PI 基因同源性分析 [J]. 热带医学杂志, 2002, 2: 131-134.)

文章编号: 1000-7423(2006)-06-0473-03

鸦胆子与补骨脂对大鼠卡氏肺孢子虫肺炎疗效的电镜观察

任一鑫, 秦元华, 郑莉莉, 戴晓冬, 陶林, 陈玉凤, 崔昱*

【摘要】 用鸦胆子和补骨脂合剂 2 ml (鸦胆子 0.12 mg+补骨脂 1.0 mg) 分别治疗经地塞米松皮下注射诱导的卡氏肺孢子虫肺炎(*Pneumocystis carinii* pneumonia, PCP)的 SD 大鼠 7 天和 14 天,同时设阳性对照组和正常对照组。分别于治疗后剖杀各组大鼠,取肺组织制成切片。透射电镜下观察到治疗组大鼠受损肺组织病变减轻,肺间质、I 型和 II 型肺泡上皮细胞形态结构修复。说明鸦胆子和补骨脂合剂对卡氏肺孢子虫肺炎病鼠有一定的疗效。

【关键词】 卡氏肺孢子虫肺炎; 大鼠; 鸦胆子; 补骨脂; 疗效; 透射电镜

中图分类号: R531.9

文献标识码: B

Electron Microscopical Observation on Rats with *Pneumocystis carinii* Pneumonia Treated with *Brucea javanica* and Fructus Psoraleae

REN Yi-xin, QIN Yuan-hua, ZHENG Li-li, DAI Xiao-dong, TAO Lin, CHEN Yu-feng, CUI Yu*

(Department of Parasitology, Dalian Medical University, Dalian 116023, China)

【Abstract】 Rats with *Pneumocystis carinii* pneumonia (PCP) were established by hypodermic injection of dexamethasone and treated by *brucea javanica* combined with fructus psoraleae 2 ml (*Brucea javanica* 0.12 mg and fructus psoraleae 1.0 mg) per rat per day for 7 days or 14 days. The effect of cyst-killing and the pathological change were observed under transmission electron microscope. Lung damage was alleviated or repaired, and a significant reduction of cysts was shown in the treatment group. The results show that a combination of *Brucea javanica* and fructus psoraleae played a significant restraining and killing effect on cysts, and helped repair the impairment of pneumonia.

【Key words】 *Pneumocystis carinii* pneumonia; Rats; *Brucea javanica*; Fructus psoraleae; Therapeutic effect; Transmission electron microscope

Supported by a fund of the Education Department of Liaoning Province (2004D103)

* Corresponding author, E-mail: dlculiyu@dlmedu.edu.cn

卡氏肺孢子虫(*Pneumocystis carinii*, Pc)是一种重要的机会性致病病原体,在一定的条件下可引发卡氏肺孢子虫肺炎(*Pneumocystis carinii* pneumonia, PCP),其病理损害主要表现为肺组织间质性病变。该病又被称为间质性浆细胞肺炎(interstitial plasma cell pneumonia),是一种艾滋病患者和其他免疫缺陷者常见感染性疾病。1951年 Vanek 首次报道在早产间质性浆细胞肺炎的婴儿中查见 Pc 病原体。自 20 世纪 90 年代后,随着临床器官移植,恶性肿瘤和免疫性疾病等患者应用免疫抑制剂或大剂量使用放疗和化疗,使患者的免疫功能低下或受损,致该病发病率日渐增高,且成为 AIDS 患者和其他免疫缺陷者致死的重要原因。在发达国家 AIDS 患者中,PCP 发

病率高达 60%~80%^[1-6]。筛选有效防治卡氏肺孢子虫感染及传播的药物具有非常重要的意义和实际应用价值。本课题组曾研究中药鸦胆子和补骨脂合剂对大鼠的免疫调节及杀虫作用^[7]。本研究用该合剂治疗卡氏肺孢子虫肺炎大鼠,以观察其超微结构及宿主肺泡上皮细胞在治疗前、后的变化。结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验药物及试剂 鸦胆子油口服乳剂为沈阳药大制药厂产品(批号 030303)。补骨脂素购于中国药物检定所,由 70%乙醇加热溶解,配制成 1 mg/ml 溶液。地塞米松注射液购于山东泗水希尔康制药有限公司(批号 030326)。盐酸四环素由宁夏启元药业馈赠。

1.2 建立 PCP 大鼠模型 将 54 只雌性、体重为 180~240 g 的 SD 大鼠(由本校实验动物中心提供),按文献^[7]方法建立

基金项目:辽宁省教育厅科学研究计划资助(2004D103)

作者单位:大连医科大学寄生虫学教研室,大连 116023

* 通讯作者, E-mail: dlculiyu@dlmedu.edu.cn

[3] Shi HZ, Lin JT. Immunology of Lung and Immune Associated Diseases[M]. Beijing: People's Medical Health Publishing House, 2006. 415-428. (in Chinese)
(施焕中, 林江涛. 肺脏免疫学及免疫相关性疾病[M]. 北京:人民卫生出版社, 2006. 415-428.)

[4] Xia ZN. Optical Analytical Chemistry[M]. Chongqing: Chongqing University Press, 2004. 167-180. (in Chinese)
(夏之宁. 光分析化学[M]. 重庆:重庆大学出版社, 2004. 167-180.)

(收稿日期:2006-09-07 编辑:盛慧锋)