

文章编号: 1000-7423(2000)-02-0092-02

多克隆与单克隆抗体夹心 ELISA 法检测日本血吸虫病患者血清循环抗原*

袁丽姝 冯正 张永红 李浩

(中国预防医学科学院寄生虫病研究所[†], 上海 200025)

摘要 [目的] 检测血吸虫患者的循环抗原。[方法] 用多抗与单抗夹心 ELISA 法检测日本血吸虫病患者血清循环抗原。[结果] 用于检测150例血吸虫患者的循环抗原, 其敏感性平均为84.7% (72.0%~91.0%), 40例正常人未出现假阳性反应, 74例其他寄生虫感染者中, 有2例并殖吸虫病患者阳性, 其余均未出现交叉反应。[结论] 多抗与单抗夹心 ELISA 法是一种较为理想的循环抗原检测方法。

关键词: 日本血吸虫病, 循环抗原检测, 夹心法 ELISA

中图分类号: R532.210.43

文献标识码: B

近年来国内外学者致力于通过检测循环原来诊断日本血吸虫病。作者等曾报告用单克隆抗体直接斑点-ELISA 法检测日本血吸虫患者的循环表膜抗原, 其敏感性为84.5%, 特异性为96.9%^[1]。直接斑点-ELISA 法以目测判断结果, 不能排除主观性。因此如何建立起双抗体夹心法 ELISA 检测系统是我们的努力目标。经过单抗筛选、多抗制备及组合配对, 我们建立了以多克隆抗体为捕捉抗体, 以单克隆抗体为探针的夹心法 ELISA, 初步测试获得较理想结果。

材料与方 法

单克隆抗体制备

以人工感染血吸虫的 BALB/c 小鼠脾细胞与 SP2/0骨髓瘤细胞融合, 经过 ELISA 筛选和3次克隆化后, 获得单克隆细胞株9SA₃。该单抗属 IgM 类, 在 ELISA 试验中与虫卵抗原及成虫表膜粗抗原反应较强, 对成虫 TCA 抗原也出现弱阳性反应。

单克隆抗体的纯化和酶标记

单克隆抗体的纯化参照 Neoh (1986)^[2]将腹水经 SiO₂ 脱脂后再用 PEG (MW 6 000) 沉淀的方法。纯化后的单抗用过磷酸钠法标记辣根过氧化物酶, 工作浓度为 1:1 000。

多克隆抗体制备及纯化

以虫卵抗原 (SEA) 免疫家兔, 每兔注射抗原1 mg/次。第1针加福氏全佐剂, 第2针加福氏不全佐

剂, 第3针不加佐剂, 间隔均为2 wk。末次注射后1 wk 放血。双扩散法测抗体效价达1:32。免疫免血清用正辛酸-硫酸铵法^[3]进行纯化。

血清

寄生虫确诊的血吸虫病患者血清150份取自湖北和江西两省流行区, 正常人血清40份系上海第二医科大学新生体检血清, 交叉反应血清74份中囊虫病、包虫病、并殖吸虫病和华支睾吸虫病患者血清各10份, 弓形虫病患者血清4份, 采自门诊临床确诊患者 (症状、体征、CT 及/或免疫反应阳性); 疟疾及黑热病患者血清各10份及10例确诊钩虫病患者的血清均由本所提供。

夹心 ELISA 检测方法

以兔抗虫卵抗原 IgG (10 μg/ml) 为包被抗体, 包被聚苯乙烯软板 (天津产) 100 μl/井, 4℃过夜; 用 PBS/T 连续洗涤8次, 甩干; 以1%BSA 于37℃封闭1 h, 甩干后加1:10稀释受检血清, 100 μl/井, 37℃ 1 h; PBS/T 洗涤如前; 加单抗探针 HRP-9SA₃ (1:1 000稀释), 100 μl/井, 37℃ 1 h; PBS/T 洗涤如前, 加 OPD 底物系统显色后在 BIO-RAD550酶标仪上, 取490 nm, 读 OD 值。阈值为 OD ≥ 0.2。

结果与讨论

1 双抗体夹心 ELISA 法的检测结果

以多克隆抗体为包被抗体, 以单克隆抗体结合物 HRP-9SA₃ 为探针的夹心 ELISA 法检测血吸虫病患者血清中循环抗原的敏感性和特异性见表1。对湖北和江西两地血吸虫患者的阳性检出率分别为91%和72%, 平均阳性率为84.7%。40例正常人未出现假阳性反应。74例各类寄生虫病患者血

* 本项目获欧共体资助 (合同号: IC 18C T97-0241) 和“九五”科技攻关课题部分资助

^{††} WHO 疟疾、血吸虫病和丝虫病合作中心, 卫生部寄生虫病原与媒介生物学重点实验室

表 1 双抗体夹心 ELISA 法检测日本血吸虫病患者血清中循环抗原的结果

Table 1 Results of sandwich-ELISA for serum circulating antigen detection in schistosomiasis japonica cases

血清 Serum	检测例数 No. cases detected	阳性例数 No. cases positive	阳性率 Positive rate(%)
日本血吸虫病 Schistosomiasis japonica	150	127	84.7
健康人 Healthy control	40	0	0
并殖吸虫病 Paragonimiasis	10	2	2/10
华支睾吸虫病 Clonorchiasis	10	0	0
囊尾蚴病 Cysticercosis	10	0	0
包虫病 Hydatidosis	10	0	0
疟疾 Malaria	10	0	0
黑热病 Leishmaniasis	10	0	0
弓形虫病 Toxoplasmosis	4	0	0
钩虫病 Hookworm disease	10	0	0

清中除2例并殖吸虫病(2/10)外未出现交叉反应。以双抗体夹心法 ELISA 检测循环抗原,可通过仪器判读结果,克服主观因素具有优越性。本文中使用的

双抗体系统是通过组合配对筛选出来的。从理论上分析用人工免疫方法制备的多克隆抗体针对的抗原表位较广泛,可以捕获较多的循环抗原提高方法的敏感性,而9SA₈单抗又可增加方法的特异性。对血吸虫病患者的阳性检出率以湖北地区为高,可能与当地的流行程度有关(本批血清取自湖北监利重流行区)。关于所测循环抗原的性质,以及该法在现场的应用价值有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] 袁丽姝, 薛海筹, 张水红, 等. 应用单克隆抗体检测血吸虫病患者的循环表膜抗原. 中华传染病杂志, 1992, 10: 230.
 [2] Neoh SH, Gordon C, Potter A, et al. The purification of mouse monoclonal antibodies from ascitic fluid. J Immunol Methods, 1986, 91: 231~235.
 [3] 叶群瑞, 陈伯权, 吴美英, 等. 一种简单、快速、量大的辛酸纯化单克隆抗体法. 生物化学与生物物理进展, 1991, 18: 60~62.

收稿日期: 1999-04-15
(编辑: 任燕芬)

CIRCULATING ANTIGEN DETECTION IN SCHISTOSOMIASIS JAPONICA PATIENTS BY SANDWICH ELISA USING POLYCLONAL AND MONOCLONAL ANTIBODIES*

QIU Li-shu, FENG Zheng, ZHANG Yong-hong, LI Hao

(Institute of Parasitic Diseases, Chinese Academy of Preventive Medicine**, Shanghai 200025)

Abstract [Objective] To detect circulating antigen in the patients with schistosomiasis. [Methods] Polyclonal antibody (PcAb)-monoclonal antibody (McAb) sandwich ELISA. [Results] Sera from 150 patients with schistosomiasis were detected, the average sensitivity was 84.7% (72.0%~91.0%). No false positive reaction was detected in 40 normal controls and none but 2 patients (2/10) with paragonimiasis showed cross reactions among 74 cases with other parasitic infections. [Conclusion] PcAb-McAb sandwich ELISA is a relatively ideal method for circulating antigen detection.

Key Words: Schistosomiasis, circulating antigen detection, sandwich-ELISA.

* Supported by European Community (No. IC 18CT97-0241) and in part by the Ninth Five-year Key Research Project (No. 96-906-04-04)

** WHO Collaborating Centre for Malaria, Schistosomiasis and Filariasis, Key Laboratory of Parasite and Vector Biology, Ministry of Health, P. R. China