

小鼠脾内注射日本血吸虫病患者尿液循环抗原制备单克隆抗体*

吴琛耘 娄文娴 薛纯良

上海第二医科大学寄生虫学教研室 上海 200025

提要 目的: 探讨用一种快速免疫方法制备抗人尿液日本血吸虫循环抗原的单克隆抗体。**方法:** 将日本血吸虫病患者尿液用 15% 三氯醋酸提取循环抗原后采用脾内直接注射法免疫 BALB/c 小鼠制备单克隆抗体。**结果:** 建立了 2 株分泌抗人尿日本血吸虫循环抗原的单克隆细胞株 2E6 及 2B11, 两者免疫球蛋白鉴定均属 IgM 类, ELISA 测得单抗对尿液循环抗原 (IHU-CAg), 效价分别为 2.56×10^5 和 6.4×10^4 。琼脂双扩散试验显示 2 株单抗与正常人尿三氯醋酸提取物均不能形成沉淀线, 而 2E6 与日本血吸虫病患者尿液循环抗原能产生沉淀线。分别用 2B11 和 2E6 腹水为捕捉抗体, HRP-H11 为酶标抗体检测 12 例急性血吸虫病患者尿液, 依次为 6 例和 3 例阳性, 8 例正常人尿液均为阴性。**结论:** 用血吸虫病患者尿液提取的循环抗原经脾脏注射免疫 BALB/c 小鼠制备单克隆抗体用于检测日本血吸虫病患者尿液中循环抗原是可行的。

关键词 日本血吸虫 脾内注射 尿液循环抗原 单克隆抗体

日本血吸虫寄生于宿主门脉-肠系膜静脉系统, 其成虫排出的虫卵多沉积于患者肝脏及肠组织中。虫体的代谢分泌物及虫卵内毛蚴的分泌物存在于患者的血液及尿液中, 成为循环抗原 (circulating antigen, CAg)^[1]。目前, 检测患者血液中的抗体及抗原已取得了较好的进展, 而检测尿液中的循环抗原正日益受到国内外学者的关注, 因为尿液收集简便, 且无损伤性。由于常规免疫法的免疫原用量大, 免疫周期长, 容易引起非特异性反应, 而且尿液循环抗原经肾小球滤过后多为小分子抗原, 用针对大分子抗原的单抗检测尿液循环抗原的效果不甚理想。为此, 我室采用脾内直接注射日本血吸虫病患者尿液中提取的循环抗原免疫小鼠制备单抗, 目的在于只用少量抗原, 就能使靶器官局部有高浓度免疫原, 以增加注射部位的特异 B 细胞亚群数量, 从而提高免疫效果, 并在减少抗原用量、缩短免疫周期、制备针对尿液中小分子抗原单抗方面进行了一些尝试。

材料与方 法

材 料

- 1 BALB/c 小鼠 雄性 $20 \text{ g} \pm 2 \text{ g}$, 雌性 $23 \text{ g} \pm 2 \text{ g}$, 均来自上海第二医科大学实验动物部。
- 2 尿样 阳性尿样 50 份, 采自湖南岳阳日本血吸虫病患者; 正常尿样 3 份, 采自上海第二医科大学寄生虫学教研室青年教师。

方 法

- 1 尿液循环抗原的制备 将 50 份血吸虫病患者尿样混合约 500 ml, 4 000 g 离心 30 min, 弃去沉淀, 上清液加入等量 15% 三氯醋酸, 边加边摇, 充分混匀

后, 4 000 g 离心 30 min, 弃去沉淀, 上清液流水透析过夜, 经超滤后冰冻抽干, 为阳性尿液循环抗原 (IHU-CAg), 4[°] 保存, 备用。正常尿样以同方法提取, 制备对照抗原 (NHU-CAg)。

- 2 兔尿循环抗原 IRU-CAg 为日本血吸虫感染兔尿循环抗原, 与 IHU-CAg 及 NHU-CAg 处理方法相同。为本教研室提供。

- 3 小鼠脾内注射免疫法^[2] 将 IHU-CAg 冻干粉 2 mg 溶于 5 ml 0.9% 生理盐水中, 使溶液中抗原浓度达 $40 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$, 过滤, 4[°] 无菌保存。雄性 BALB/c 小鼠 1 只固定于解剖板, 置于超净台内, 乙醚吸入法麻醉, 新洁尔灭酊及 70% 酒精消毒, 依次切开左侧腹部皮肤及腹膜, 暴露脾脏, 将 OT 针头由脾尾插入脾头, 边退边注射 100 μl IHU-CAg, 观察腹腔内无渗血后, 逐层关闭腹腔。

- 4 制备单克隆抗体 脾内注射 IHU-CAg 1 wk, 将小鼠处死, 取出脾脏, 按我室常规方法^[3] 将脾细胞与骨髓瘤细胞 SP2/0 融合、筛选、克隆化、扩大培养、接种小鼠、诱生腹水。

- 5 琼脂双扩散法鉴定单抗 Ig 亚类 1% 琼脂糖 4 ml 浇板, 收集单抗培液 20 ml, 用蔗糖浓缩 20 倍至 1 ml 后作亚类鉴定, 48 h 后观察结果。

- 6 单克隆抗体效价测定 将所获得日本血吸虫病患者尿 CAg 冻干粉按 2 mg/ml 浓度包板, 正常人尿三氯醋酸提取物冻干粉亦按 2 mg/ml 包板。单抗作梯度稀释, 用间接 ELISA 法测定效价。

* 本研究为国家自然科学基金资助课题 No. 39570644 和上海市科委自然科学基金资助课题 No. 954119010

7 用琼脂双扩散法及免疫电泳对单抗与日本血吸虫病患者尿抗原及正常人尿三氯醋酸提取物进行分析。

结 果

1 单克隆抗体

获得两株抗人尿日本血吸虫循环抗原的单克隆抗体 2E6 与 2B11, 其效价见表 1。

表 1 两株杂交瘤腹水的效价

Table 1 The titres of 2 hybridoma 's ascitic fluid

单克隆抗体 M cAb	IHU-CA g	NHU-TCA	SEA-TCA	AW-TCA
2E6	2.56×10^5	2×10^3	6.4×10^4	1.28×10^5
2B11	6.4×10^4	1×10^3	6.4×10^4	1.28×10^5

2 琼脂双扩散试验结果

琼脂双扩散试验结果表明 2E6 与 2B11 均属于 IgM 类。2E6 及 2B11 与正常人尿 TCA 提取物均未出现沉淀线, 2E6 与 IHU-CA g 形成清晰的沉淀线, 2B11 与 IHU-CA g 则未出现沉淀线(图 1)。

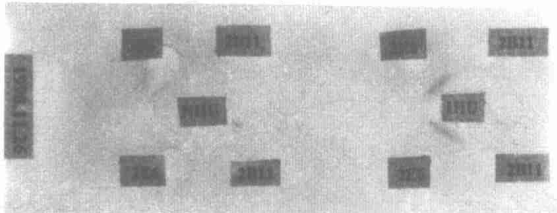


图 1 琼脂双扩散鉴定 2E6 与 2B11 的免疫特性

Fig 1 Characterization of immunospecificity of 2E6 and 2B11 by agarose double diffusion test

3 免疫电泳结果

免疫电泳显示 2E6 与 IHU-CA g 及 IRU-CA g (血吸虫感染兔尿循环抗原)在阳极端均出现 1 条沉淀弧(图 2)。

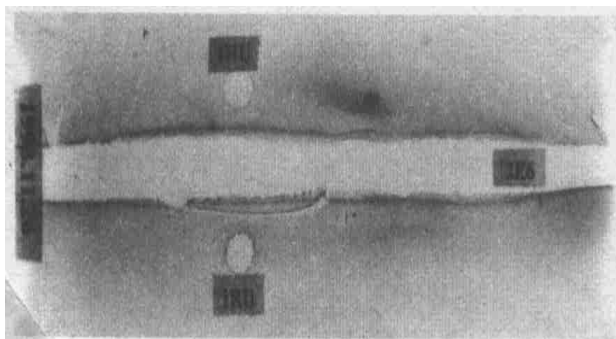


图 2 免疫电泳鉴定 2E6 的免疫特性

Fig 2 Characterization of the immunospecificity of 2E6 by immunoelectrophoresis

4 2B11 与 2E6 腹水检测日本血吸虫病患者与正常人尿液的结果

分别用 2B11 和 2E6 腹水为捕获抗体, 以我室原有的 HRP-H11 为标记抗体, 检测正常人尿液 8 例, 急性血吸虫病患者尿液 12 例, 结果正常人均均为阴性; 以 2B11 为捕获抗体者, 急性血吸虫病患者 6 例阳性, 2E6 仅 3 例阳性。

讨 论

本文将日本血吸虫病患者尿液用 TCA 提取可溶性抗原, 经脾脏直接免疫小鼠制备单克隆抗体, 获两株分泌抗 IHU-CA g 的杂交瘤细胞株(2E6、2B11), 其中 2E6 诱生的腹水在琼脂双扩散中与 IHU-CA g 能形成清晰的沉淀线, 表明该单抗的靶抗原具有重复表位。免疫电泳显示 2E6 与 IHU-CA g 和 IRU-CA g 在阳极端各形成一条沉淀弧, 提示 IHU-CA g 中, 可能 CAA 成分占优势。以 2B11 为捕获抗体, HRP-H11 为酶标抗体检测 12 例急性血吸虫病患者尿液, 6 例呈阳性反应, 而 2E6 仅 3 例阳性, 尽管 2E6 腹水的效价比 2B11 高, 且与 IHU-CA g 能形成沉淀线, 但作为捕获抗体, 2B11 的效果比 2E6 为好, 其原因尚待进一步研究。

2B11 及 2E6 在 ELISA 试验中与正常人尿液 TCA 提取物亦可出现阳性反应, 但其滴度与 OD 值均显著低于 IHU-CA g (当腹水 1:1000 倍稀释时 IHU-CA g 的 OD 值分别为 3.0 和 1.57, NHU 则为 0.61 和 0.71)。检测结果提示用 TCA 在血吸虫病患者尿液中提取的抗原含有人尿液中其它非特异性成分, 今后应进一步纯化。

结果表明, 用血吸虫病患者尿液提取的 CA g 免疫小鼠, 能获得针对尿液中小分子抗原的单抗, 以其为探针用于检测血吸虫病患者尿液循环抗原, 可能更具优越性。采用脾内直接注射法免疫 BALB/c 小鼠, 取其脾细胞与 SP2/0 瘤细胞进行融合, 制备单克隆抗体, 不仅缩短了免疫时间, 且抗原用量少, 对于某些稀有抗原或者急需制备单抗时可以考虑采用此法。

参 考 文 献

- 1 Krensnier PG, de Jonge N, Simarro PP et al Quantitative determination of circulating anodic and cathodic antigens in serum and urine of individuals infected with *Schistosoma intercalatum*. Trans Roy Soc Trop Med Hyg 1993; 87: 167
- 2 阎新文 脾内注射免疫方法的改良 中国免疫学杂志 1987; 3: 208
- 3 娄文娟, 杨士静, 盛葵, 等 抗日本血吸虫单克隆抗体的制备及其在诊断中的应用 中国寄生虫学与寄生虫病杂志 1991; 9: 254

1998 年 12 月 15 日收稿 1999 年 3 月 24 日修回

(编辑: 李雅卿)

PREPARATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES BY INTRASPLENIC IMMUNIZATION OF MICE WITH URINE CIRCULATING ANTIGEN FROM PATIENTS INFECTED WITH SCHISTOSOMA JAPONICUM *

WU Chenyun, LOU Wenxian, XU E Chunliang

Department of Parasitology, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025

ABSTRACT

AM: To explore an efficient method for preparing monoclonal antibodies against circulating antigen of *S. japonicum* in the urine of schistosomiasis patients **METHODS:** The urine of schistosomiasis patients were precipitated with 5% trichloroacetic acid, and then used to immunize the BALB/c mice by intrasplenic immunization to prepare MCAb **RESULTS:** Two monoclonal cell lines against the CAg in the urine of schistosomiasis patients have been established. The immunoglobulin subclass of the 2 MCAbs (2E6 and 2B11) were identified as IgM. The titres of 2E6 and 2B11 were 2.56×10^5 and 6.4×10^4 . On immunodiffusion, MCAb 2E6 showed one precipitation line with IHU-CAg, however, both MCAbs did not react with NHU-CAg. Using ascitic fluid of 2B11 and 2E6 as capture antibody separately, and HRP-H11 as labelled antibody to detect the urine of 12 acute schistosomiasis patients, 2B11-2E6 gave 6 and 3 positive, respectively, whereas 8 normal urine were all negative **CONCLUSION:** It is feasible to use CAg from schistosomiasis patients' urine to prepare anti-CAg MCAb by intrasplenic immunization in mice

Key words: *Schistosoma japonicum*, intrasplenic immunization, urine circulating antigen, monoclonal antibody

* Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 39570644) and the Natural Science Foundation of Shanghai (No. 954119010)

新生儿输注血浆感染间日疟一例

湖北省武汉市新洲区三店医院 新洲 431408 徐华么

新生儿男性, 在我院剖宫出生后, 于第 4 d 和第 6 d 曾先后输入血浆 30 ml 和 25 ml。出生后第 10 d, 母子一般情况尚好, 家属要求出院。两个月后, 新生儿因发热、腹泻及谷丙转氨酶升高 (74 u/L), 在当地医院按肝炎治疗无效, 转入我院就诊。入院时患儿体温 37.2, 面色苍黄, 肝脾肿大, 泻水样便。当地医院实验检查结果, 示血红蛋白 89 g/L, 乙肝三系用 ELISA 法阴性, HCV 抗体阳性 (ELISA 法)。拟诊为丙型肝炎。对症治疗后, 全身症状无明显改善。入院 3 d 后发热达 38.4, 呕吐伴啼哭。经厚、薄血片检查, 查到间日疟原虫, 确诊为间日疟。给服磷酸氯喹, d₁ 先服氯喹 (基质) 60 mg, 12 h

后再服 30 mg; d₂ 及 d₃ 各服 30 mg。3 d 后复查, 原虫转阴。为弄清患儿患疟原因, 追查产妇耳垂血, 未查见疟原虫, 且产前无疟史, 产妇和患儿无外出史。追查供血者耳垂血, 查见间日疟原虫。据此, 确诊该患儿系输注血浆而感染间日疟。随访半年, 小儿情况良好, 未见复发。

鉴于婴幼儿疟疾临床表现多半不典型, 对发病前有输注血液或输血浆史、对症治疗无效者, 均应检查疟原虫, 以免贻误诊断与治疗。

1999 年 5 月 4 日 1999 年 5 月 20 日修回

(编辑: 富秀兰)