

文章编号: 1000-7423(2009)-03-0223-04

【实验研究】

应用磁分离酶联免疫技术检测 抗日本血吸虫虫卵抗体

黄进¹, 刘振世^{2,3}, 姚蓝¹, 董素娟¹, 何其林⁴, 熊涛⁴, 魏兰英¹, 方正明¹, 姜昌富^{1*}

【摘要】目的 建立检测日本血吸虫病患者血清中特异性虫卵抗体的磁微粒分离酶联免疫法 (MPAIA)。**方法** 采用异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记日本血吸虫可溶性虫卵抗原 (Sj-SEA) 为检测抗原, 标记羊抗 FITC 抗体的磁微粒为固相载体, 碱性磷酸酶 (ALP) 标记羊抗人免疫球蛋白 G (IgG) 作为酶标二抗, 以单磷酸酚酞溶液为底物, 检测日本血吸虫病患者血清中虫卵特异性抗体。**结果** 用磁微粒分离酶联免疫法检测日本血吸虫虫卵抗体, 阳性检出率为 96.7% (116/120), 与旋毛虫、并殖吸虫、囊尾蚴等其他寄生蠕虫抗体无交叉反应现象, 检测试剂 4℃可保存 12 个月。灵敏度参考品的灵敏度为 1:1 600, 精密度参考品的精密度 (CV) <10%。**结论** 磁微粒分离酶联免疫法具有灵敏度高、特异性强、技术先进, 试剂保存时间长等特点。

【关键词】 日本血吸虫; 磁微粒分离酶联免疫法; 抗体检测

中图分类号: R532.21

文献标识码: A

Application of Magnetic Particle Antibody Immunoassay in Detection of Anti-Schistosoma japonicum Egg Antibody

HUANG Jin¹, LIU Zhen-shi^{2,3}, YAO Lan¹, DONG Su-juan¹, HE Qi-lin⁴, XIONG Tao⁴, WEI Lan-ying¹, EANG Zheng-ming¹, JIANG Chang-fu^{1*}

(1 Department of Parasitology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China; 2 School of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China; 3 Beijing Bio-ekon Biotechnology Co., Ltd, Beijing 100070, China; 4 Qianjiang Institute of Schistosomiasis Control and Prevention, Qianjiang 433100, China)

【Abstract】 Objective To establish a magnetic particle antibody immunoassay (MPAIA) for the detection of specific antibody in sera of schistosomiasis patients. **Methods** Fluorescein isothiocyanate (FITC) was used to label Schistosoma japonicum soluble egg antigen (Sj-SEA). Anti-human IgG coated with alkaline phosphatase (ALP) as enzyme-labeled second antibody, and magnetic beads were coupled with sheep anti-FITC antibody as solid phase. Phenolphthalein in monophosphate was used as substrate to set up MPAIA for the detection. Serum samples from cases with schistosomiasis or other helminth infections were tested. **Results** The positive rate of MPAIA was 96.7% (116/120) with the sera of S. japonicum-infected cases. No cross reaction was observed with sera of trichinellosis, paragonimiasis or cysticercosis cases. The positive titer with reference sample was 1:1 600. The precision was lower than 10%. The MPAIA tips can be stored at 4℃ for 12 months. **Conclusion** MPAIA shows a high sensitivity, proper specificity and long-term validity for schistosomiasis detection.

【Key words】 Schistosoma japonicum; Magnetic particle antibody immunoassay; Antibody detection

* Corresponding author, E-mail: jcfjmu@yahoo.com.cn

磁微粒分离技术简单可靠, 适用于各类免疫分子的测定, 该技术采用游离物/结合物分离的固相载体磁微粒 (直径<1 μm), 其蛋白吸附力为聚苯乙烯微孔板载体的 1 000 倍以上, 反应迅速、敏感度高, 是目

前理想的固相免疫分离方法之一^[1]。本研究应用磁微粒分离酶联免疫法 (magnetic particle antibody immunoassay, MPAIA) 检测日本血吸虫虫卵抗体。

材料与方 法

1 主要试剂

日本血吸虫可溶性虫卵抗原 (Sj-SEA) 由华中科技大学同济医学院病原生物学系提供。碱性磷酸酶

作者单位: 1 华中科技大学同济医学院病原生物学系, 武汉 430030;
2 华中科技大学生命科学与技术学院, 武汉 430074;
3 北京倍爱康生物技术有限公司, 北京 100070;
4 潜江市血吸虫病预防控制所, 潜江 433100

* 通讯作者, E-mail: jcfjmu@yahoo.com.cn

(ALP) 标记的羊抗人 (IgG) (ALP-IgG)、磁分离试剂、洗液、底物溶液、终止液和日本血吸虫抗体试剂 (以下简称试剂) 均为北京倍爱康生物技术有限公司研制。磁分离试剂的主要成分为包被羊抗异硫氰酸荧光素 (FITC) 抗体的免疫磁珠, 底物溶液的主要成分为单磷酸酚酞 (phenolphthale in monophosphate, PMP), 洗液的主要成分为含有磷酸盐的缓冲液, 终止液为含有氢氧化钠的碱性溶液。FITC 购自西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司。

2 血清样本

急性血吸虫病患者血清 20 份、慢性患者血清 55 份、晚期患者血清 45 份, 由潜江市血吸虫病预防控所提供, 所有血清用毛蚴孵化法检测均为阳性。非疫区人群血清 378 份和阴性质控血清为黑龙江省牡丹江市妇女儿童保健医院健康人群体检血清。华支睾吸虫病患者血清 13 份、并殖吸虫病患者血清 16 份、旋毛虫病患者血清 15 份、囊尾蚴病患者血清 10 份, 以及阳性质控血清 (急性血吸虫病患者混合血清) 均由华中科技大学同济医学院病原生物学系提供。

日本血吸虫国家参考品由中国药品生物制品检定所提供, 包括阴性参考品 (N1~N15)、阳性参考品 (P1~P15)、灵敏度参考品 P16 和精密度参考品 P17。

3 检测原理

本系统是间接酶联免疫分析法与磁性微粒分离技术相结合的一种测定方法。检测原理为, FITC 标记的 Sj-SEA 与待测血清样品中 Sj-SEA 抗体结合, 形成 FITC-Sj-SEA-特异性抗体复合物。再利用标记有 FITC 抗体的磁性微粒, 捕获 FITC-Sj-SEA-特异性抗体复合物, 形成磁珠-FITC 抗体-FITC-Sj-SEA-特异性抗体复合物, 在外加磁场作用下, 弃去未结合和非特异的抗原-抗体复合物。羊抗人 IgG-ALP 与磁珠-FITC 抗体-FITC-Sj-SEA-特异性抗体复合物结合, 得到磁珠-FITC 抗体-FITC-Sj-SEA-特异性抗体-ALP-抗人 IgG 复合物。通过基质中的单磷酸酚酞显色, 在含有氢氧化钠的碱性溶液中终止显色反应。用磁分离免疫测定仪 (型号为 BIOZYME I 型, 北京倍爱康生物技术有限公司产品) 读取吸光度 (A_{490}/A_{550} 值)。

4 Sj-SEA-FITC 的制备

5 mg Sj-SEA 按照 1:10 摩尔比的量加入 FITC 溶液 (0.2 mol/L NaHCO_3 , pH 9.0), 室温反应过夜, 用葡聚糖凝胶 (Sephadex) G25 柱层析纯化, 去除游离的 FITC, 紫外分光光度计 (型号为 DU640, 美国

Beckman 公司) 测定荧光素标记抗体的浓度、计算标记率 (F/P) (F 为 FITC, P 为蛋白质)^[2,3]。同时将 Sj-SEA-FITC 进行 1:5、1:10、1:20、1:40 和 1:60 稀释, 与慢性血吸虫病患者混合血清用蛋白质印迹分析 (Western blotting) 检测 Sj-SEA-FITC 活性, -20 °C 冻存。

5 磁微粒分离酶联免疫法检测

上述方法 2 血清样品, 用磷酸盐缓冲液按 1:200 稀释, 取 15 μl 与 30 μl Sj-SEA-FITC 混匀, 37 °C 温育 15 min。加 60 μl 抗 FITC 磁微粒试剂, 室温静置 5 min。置磁板上分离, 弃上清, 加 300 μl 洗液清洗, 重复 2 次; 弃上清, 加羊抗人 ALP-IgG 60 μl , 混匀, 37 °C 温育 15 min; 置磁板上分离, 弃上清, 加 300 μl 洗液清洗, 重复 2 次; 弃上清, 加 100 μl 底物, 37 °C 温育 15 min, 加 300 μl 终止液终止反应, 在磁分离器上沉淀 10 min, 用磁分离免疫测定仪读取各管的吸光度 (A_{490}/A_{550} 值)。

6 反应体系和参考值 (cut off 值) 的建立

随机取急性、慢性和晚期血吸虫病患者血清各 5 份, 及 10 份非疫区人群血清, 对反应体系的样品用量、试剂用量和反应条件等进行优化, 建立适宜的反应体系。检测 378 份非疫区人群血清, 确定参考值 = $2.1 \times \text{阴性平均值} + 4s$ 。

7 试剂质量检测

7.1 符合率 使用 3 个批号的日本血吸虫抗体试剂 (批号分别为 20070721、20070722 和 20070728) 检测中国药品生物制品检定所日本血吸虫阳性国家参考品 (P1~P15)、阴性国家参考品 (N1~N15)。15 份阳性国家参考品检测结果为阳性符合率, 15 份阴性国家参考品检测结果为阴性符合率。

7.2 灵敏度 使用不同稀释度的灵敏度参考品 P16 (1:50、1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600、1:3200、1:6400、1:12800 和 1:25600), 对上述 3 个批号的试剂进行检测, 以最高稀释倍数为阳性的前一个稀释倍数为灵敏度。

7.3 精密度 用 3 个批号的试剂检测国家精密度参考品 P17, 重复检测 10 次, 计算变异系数 (CV)。变异系数 = 标准差 / 精密度参考品吸光度平均值。

8 稳定性

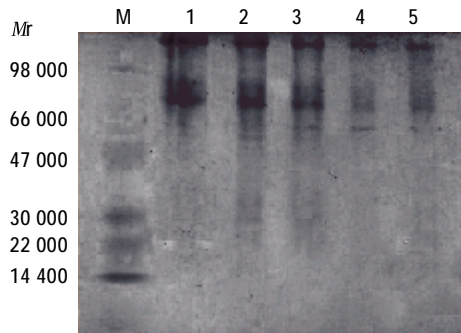
使用上述 3 个批号的试剂同时检测 10 份慢性血吸虫病患者血清, 及 10 份非疫区人群血清, 将上述

试剂在 4 ℃ 保存 12 个月，每个月检测 1 次，观察其吸光度的变化。

结 果

1 FITC 标记 Sj-SEA

FITC 标记 SEA 浓度为 3.38 mg/ml, F/P=7.9。Western blotting 分析结果显示, Sj-SEA-FITC 稀释至 1:60 仍有抗原活性 (图 1)。



M: 蛋白质标志物, 1~5: Sj-SEA-FITC 1:5、1:10、1:20、1:40 和 1:60 稀释。

M: Protein marker, 1-5: Sj-SEA-FITC 1:5, 1:10, 1:20, 1:40 and 1:60 dilution.

图 1 Western blotting 检测 FITC-Sj-SEA 活性

Fig 1 Activity of FITC-Sj-SEA by Western blotting

2 反应体系的建立

待测血清用量经 1:200 稀释、加样量 15 μ l 使抗原抗体结合达到平衡。磁分离试剂经过 5、10、15 min 检测。结果表明随着磁珠分离时间的延长, 吸光度无明显改变, 最佳磁珠分离时间为 5 min。整个体系的反应条件, 除磁分离试剂在室温反应外, 其余步骤全部在 37 ℃ 温育完成。

3 参考值的确定

384 份非疫区人群血清样品吸光度平均值为 0.275, 标准差为 0.058, 参考值为 0.811。

4 试剂质量检测结果

结果表明, 国家参考品的阳性、阴性符合率均为 100% (15/15)。灵敏度国家参考品 (P16) 为 1:1600。精密度国家参考品 (P17) 检测试剂结果显示, 其变异系数 (CV) 分别为 5.1%、1.2% 和 7.5%。

5 磁微粒分离酶联免疫法检测结果和稳定性

结果显示, 急性、慢性和晚期血吸虫病患者血清的检出率分别为 100% (20/20)、100% (55/55) 和 91.1% (41/45)。非疫区人群、华支睾吸虫病、并殖吸虫病、旋毛虫病和囊尾蚴病等患者血清的检测结果显示均为阴

性。稳定性实验结果显示, 3 个不同批号试剂可在 4 ℃ 保存 12 个月仍具有检测效果。

讨 论

自 1936 年首次在我国血吸虫病防治工作中使用皮内试验以来, 国内外研究者对日本血吸虫病的免疫学诊断方法进行了广泛研究和不断改进, ELISA 与间接血凝试验 (IHA) 是我国目前使用最广泛的血吸虫病免疫诊断技术^[4], 但仍存在灵敏度差, 交叉反应严重的问题。

MPAIA 是一种将免疫磁珠分离技术引入酶联免疫测定系统的方法, 抗原抗体反应快速均匀, 检测可在 2 h 内完成。普通 ELISA 包被的抗体只有少数 Ig 分子的 Fab 段能与液相中的相应抗原特异性结合, 多数 Fab 段因朝向固相面或与抗原平行, 难与抗原结合。此外, 包被的抗体在捕获抗原时, 结合反应也主要发生在固相界面上; 而 MPAIA 中抗原抗体反应可在液相中进行, 提高了抗体与抗原表位的可及性, 再通过 FITC 和抗 FITC 抗体的放大作用, 可进一步提高检测的灵敏度。MPAIA 系统中碱性磷酸酶底物为 PMP, 对人体无害, 无放射污染, 与辣根过氧化物酶标记技术 (以邻苯二胺等致癌试剂为底物) 相比, 更有优越性。

MPAIA 检测方法因其灵敏度较高, 已在激素肽类^[5]的微量检测中崭露头角, 但有关用于检测血吸虫病抗体未见报道。本研究应用磁微粒分离技术检测急性、慢性、晚期血吸虫病患者血清, 非疫区人群血清, 及其他寄生蠕虫病患者血清, 结果显示与其他常见寄生虫病无交叉反应, 该法灵敏度高、特异性强。同时本研究对试剂的制备进行了严格的质量控制, 在每批检测中均设立了质控血清, 提高了试剂检测的准确性。此外, 使用日本血吸虫国家参考品对该试剂的分析性能质量评定结果显示, 阴性、阳性参考品的符合率均为 100%, 参考品的灵敏度为 1:1600, 精密度 (CV) <10%, 可在 4 ℃ 保存 12 个月。

相对于其他血吸虫病免疫诊断试剂 (如间接血凝试剂、ELISA 试剂盒、胶体染色试剂盒等), 磁微粒分离检测系统的样品 (即被检血清) 稀释度为 1:200, 取样量仅 30 μ l; 特异性抗原的检测工作浓度为 5 μ g/ml, 加样量为 15 μ l。加上磁性微粒自身具备的分离特性, 使免疫反应在接近液相条件下进行, 反应更充分、迅速, 使整个检测结果特异性强, 灵敏度高。

MPAIA 检测日本血吸虫病患者血清抗体, 具有灵敏度高、特异性强、技术先进, 试剂保存时间长的特点, 但是整个操作过程尚需进一步优化, 以便更好

地适应现场检测的需要。

参 考 文 献

[1] Siamak P, Yazdankhah, Liv S, et al. Development and evaluation of an immunomagnetic separation-ELISA for the detection of *Staphylococcus aureus* thermostable nuclease in composite milk [J]. *Vet Microbiol*, 1999, 67(2): 113-125.

[2] Rattle SJ, Pumell DR, Williams PIM, et al. New separation method for monoclonal immunoradiometric assays and its application to assays for thyrotropin and human chorionadotropin[J]. *Clin Chem*, 1984, 30(9): 1457-1461.

[3] Ishikawa E, Imagawa M, Hashida S, et al. Enzyme-labeling of antibodies and their fragments for enzyme immunoassay and im-

munohistochemical staining[J]. *J Immun*, 1983, 4(3):209-327.

[4] Wu GL. Immunodiagnosis of *Schistosoma japonicum* infection in China: review and prospects[J]. *Chin J Parasitol Parasit Dis*, 2005, 23(5): 323-328. (in Chinese)
(吴观陵. 我国血吸虫病免疫诊断发展的回顾与展望[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2005, 23(5): 323-328.)

[5] Liu ZS, Zhou H, Chen HS, et al. Methodological study on magnetic enzymatic immunoassay for detection of free HCG β subunit [J]. *Chin J Cell Mol Immunol*, 2006, 22(3): 392-394. (in Chinese)
(刘振世, 周昊, 陈海生, 等. 人绒毛膜促性腺激素游离 β 亚单位磁分离酶联免疫方法的建立[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2006, 22(3): 392-394.)

(收稿日期: 2008-10-10 编辑: 衣凤芸)

文章编号: 1000-7423(2009)-03-0226-03

【研究简报】

马来丝虫 3-磷酸甘油醛脱氢酶基因的克隆、
序列分析及编码产物 B 细胞表位预测

谢东方, 方政*, 童海燕, 徐邦生, 黄为群, 方浩, 沈勤

【摘要】 根据 GenBank 中马来丝虫 3-磷酸甘油醛脱氢酶基因 (BmG3PD 基因) 序列设计引物, 以马来丝虫 mRNA 为模板, RT-PCR 扩增 BmG3PD 基因, 将其克隆入 pGEM-T 载体, 转化大肠埃希菌 (*E. coli*) DH5 α , 筛选阳性克隆。经 EcoR I 和 Xho I 双酶切及 PCR 鉴定, 获得阳性重组质粒 pGEM-BmG3PD, 经序列分析及同源性比较, 以及对其编码产物进行 B 细胞表位预测, 结果表明 PCR 扩增的特异性条带为 1 020 bp, 与预期相符, 与 GenBank 已知基因序列同源性为 99%。编码产物 B 细胞表位预测, 氨基酸区域可能在 22~36、242~255、303~318 和 326~336 位。

【关键词】 马来丝虫; 3-磷酸甘油醛脱氢酶; 基因克隆; 序列分析; B 细胞表位

中图分类号: R383.161 文献标识码: A

Cloning, Sequencing of G3PD Gene from *Brugia malayi*
and Prediction of B cell Epitopes in its Amino Acid Sequence

XIE Dong-fang, FANG Zheng*, TONG Hai-yan, XU Bang-sheng,
HUANG Wei-qun, FANG Hao, SHEN Qin

(Department of Parasitology, School of Basic Medical Sciences, Nantong University, Nantong 226001, China)

【Abstract】 Specific primers were designed and synthesized based on the reported glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (BmG3PD) gene of *Brugia malayi* (GenBank Accession No. U18137). Total RNA was extracted from *Brugia malayi* and its BmG3PD gene was amplified by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The PCR product was purified and cloned into plasmid pGEM-T, then transformed into *Escherichia coli* DH5 α . The recombinant plasmids were screened and identified by digestion with restriction enzyme and PCR amplification. The positive recombinant plasmid pGEM-T-BmG3PD was confirmed by sequencing and homology comparison. Five parameters and methods were used to predict B-cell epitopes in amino acid sequence of BmG3PD. The amplified DNA fragment (1 020 bp) had a high identity of 99% with the BmG3PD gene sequence of *Brugia malayi*. B-cell epitopes of BmG3PD were probably at or adjacent to 22-36, 242-255, 303-318 and 326-336 in its amino acid sequence.

【Key words】 *Brugia malayi*; G3PD; Gene cloning; Sequence analysis; B-cell epitope

Supported by the Social Progression Fund of Jiangsu Province (No. BS2006522)

* Corresponding author, E-mail: fznt@163.com

基金项目: 江苏省社会发展科技计划项目 (No. BS2006522)

作者单位: 南通大学医学院寄生虫学教研室, 南通 226001 * 通讯作者, E-mail: fznt@163.com