

包虫病诊断抗原的纯化及诊断效价

郭中敏¹, 陆家海^{2,3}, 胡旭初³, 单志新⁴, 余新炳³

(1. 中山大学实验动物中心, 广东 广州 510080; 2. 广东省疾病预防控制中心, 广东 广州 510300;
3. 中山大学中山医学院寄生虫学教研室, 广东 广州 510080; 4. 广东省人民医院, 广东 广州 510100)

摘要:【目的】建立一种简便快速、适合基层的包虫病诊断方法。【方法】采用简便的一步层析方法从包囊液内纯化具有诊断价值的脂蛋白抗原,应用酶联免疫吸附试验(ELISA)和诊断试纸法(Dipstick法),对血清进行检测,评价其效果。【结果】ELISA检测包虫病人血清48份,阳性45份,检出率93.7%,和10份羊多房棘球蚴血清中的1份起交叉反应,而和羊细颈囊尾蚴、弓形虫、血吸虫血清不起反应。用Dipstick方法检测24份包虫病人血清,19份阳性,检出率79.2%,和其它寄生虫血清无交叉反应。【结论】本试验为包虫病诊断试剂盒的研制奠定了基础。

关键词: 细粒棘球蚴; 包囊液; 抗原

中图分类号: R383.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2003)01-0046-03

Purification of Diagnosis Antigens from Hydatid Cyst Fluid and Its Application

GUO Zhong-min¹, LU Jia-hai^{2,3}, HU Xu-chu³, SHAN Zhi-xin⁴, YU Xin-bing³

(1. Center of Experimental Animal of SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China;
2. Guangdong Province Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou 510300, China;
3. Department of Parasitology of Zhongshan Medical College, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China;
4. Guangdong Province People's Hospital, Guangzhou 510100, China)

Abstract: 【Objective】 To establish the diagnostic method for hydatid disease. 【Methods】 a simple, one step chromatographic fractionation procedure based on the binding of lipoprotein to heparin, was used to purified a lipoprotein fraction from hydatid cyst fluid as the diagnostic antigen. The purified antigen was used to diagnose hydatid disease by rapid dipstick tests and enzyme-linked immunosorbent (ELISA). 【Results】 The sensitivity and specificity of rapid immunodiagnostic test based on the detection of antibody with the purified antigen were 93.7% and 97.1 % by ELISA, 79.2% and 100% by Dipstick respectively. 【Conclusion】 This test is a valuable diagnostic tool for hydatid disease and this work establishes a basis for the development of a new rapid test kit.

Key words: *Echinococcus granulosus*; hydatid cyst fluid; antigens

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2003,24(1):46~48]

在棘球蚴囊液中主要含有抗原5和抗原B两种成份^[1],这两种抗原尽管相对分子质量不同,但都属于脂蛋白,均被用于包虫病的诊断研究。抗原5(又称抗原A)曾被认为在包虫病诊断中最有价值,但随着免疫化学研究的深入,发现该抗原对猪囊虫病、其它绦虫病、吸虫病有严重交叉反应,且敏

感性也不高^[2]。上述抗原存在的敏感性低和特异性差的主要原因是抗原纯化的方法不同所致。同时由于提取抗原B和抗原5的方法繁琐,也影响了实际工作中的应用^[3]。随着对包虫病免疫诊断技术的研究深入,提取这两种抗原的方法不断得到改进。本研究根据国内外纯化包囊液抗原的方法,选

收稿日期:2002-09-11

基金项目:中国博士后科研基金资助项目(中博基1999[17]号)

作者简介:郭中敏(1963-),女,河北满城人,硕士,副研究员,中山大学动物中心;陆家海(1964-)男,博士,副教授,中山大学基础医学院博士后流动站在站博士后,通讯作者 E-mail:jiahailu@yahoo.com.cn.

择了一种较为简单实用的一步层析提取法,并将纯化的包囊液抗原首次应用诊断试纸法(Dipstick法)和常规的酶联免疫吸附试验(ELISA)方法进行比较,为研制包虫病的快速诊断试剂盒奠定基础,现将结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 包囊液(hydatid cyst fluid, HCF)

从外科手术的包虫病人和乌鲁木齐四桥屠宰场屠宰的包虫病羊体内采集肝包虫病肝脏,在无菌条件下采集包囊液,放入 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2 血清

临床上手术确诊的包虫病人血清48份,冻干保存,由新疆地方病防治研究所(卫生部包虫病防治基地)李雄副研究员惠赠;羊多房棘球蚴人血清10份、细颈囊尾蚴羊血清12份采自新疆;弓形虫病人血清2份,血吸虫病人血清5份,正常人血清2份,由中山医学院寄生虫学教研室李道宁主任技师惠赠。

1.3 试剂

肝素分离珠(heparin acylin beads),购于Promega公司;辣根过氧化物酶标记的羊抗人IgG和马抗羊IgG,购于华美公司。

1.4 包囊液抗原的纯化方法

往包囊液(HCF)加入 30 mmol/L CaCl_2 调整,并离心澄清,去掉沉淀。上清液用于亲和层析分离抗原。具体方法为:用 25 mL heparin acylin beads填柱,用平衡液1(3 mmol/L Tri-HCl , pH 7.4, 30 mmol/L CaCl_2)进行平衡。将上述包囊液上清过柱8次,用 $2\times$ 的平衡液2(3 mmol/L $\text{Tris}\cdot\text{HCl}$, pH 7.4, 30 mmol/L CaCl_2)洗脱至 A_{280} 达0.05,洗脱液在 1 g/L 蔗糖溶液透析,透析样品溶于 0.1 mol/L 甘氨酸缓冲液(0.1 mol/L 甘氨酸缓冲液, pH 8.2, 0.5 mol/L NaCl),紫外分光光度计测定蛋白浓度后分装, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。用SDS-PAGE方法对上述样品进行蛋白质大小鉴定。

1.5 胶体金-羊抗人IgG结合物的制备

其主要步骤为:按 1.0 g/L 用双蒸水溶解氯金酸,加热煮沸后加入 10 g/L 柠檬酸三钠水溶液 1.5 mL ,继续煮沸 10 min 。待冷却后用 0.2 mol/L K_2CO_3 调至 pH 8.2。快速搅拌下加入纯化的羊抗人IgG,并继续搅拌 15 min 。加入牛血清白蛋白,

再搅匀 5 min ,最后加入 100 g/L NaCl 溶液,混匀。以 $2\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 10 min (UNIVERSAL, D-78532, 3×12 , Germany),弃沉淀,上清液以 $10\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 30 min 。小心吸去上清液,沉淀物即为胶体金-羊抗人IgG结合物,冻干保存。使用时用磷酸盐缓冲液(PBS)溶解,在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 可保存数月。

1.6 免疫测试条的制备

测试条由吸水保护层、硝酸醋酸混合纤维素膜和吸水滤纸3部分组成。硝酸醋酸混合纤维素膜上用 0.02 mol/L , pH 7.4 PBS稀释的纯化的包囊液抗原和人IgG(对照线)包被成两条约 1 mm 宽的线条,晾干后用含体积分数 10% 牛血清的PBS封闭。切成 3 cm 宽的条,加干燥剂密封保存,根据检测样本数量决定剪成多少条带。

1.7 Dipstick检测

以冻干保存的血清或新选血清用PBS稀释100倍。放入诊断试纸条使其充分吸收;加入胶体金标记羊抗人IgG结合物 $30\text{ }\mu\text{L}$ 。结果判定:出现两条褐红色条带者为阳性。第1条为标记对照线,第2条线为包虫阳性线。若无红色线出现则说明试剂失效。强阳性标本在 2 min 内即可在检测线见到红色胶体金颗粒聚集成线;弱阳性标本在加入胶体金标记结合物约 $5\sim 10\text{ min}$ 出现结果。

1.8 ELISA检测方法

包囊液纯化抗原 100 mg/L 用 pH 9.6的碳酸缓冲液包被, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜;含BSA的磷酸缓冲液封闭;加入 $100\times$ 稀释的包虫病人血清 $100\text{ }\mu\text{L}$; $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 h ,含Tween-80的PBS pH 7.4缓冲液洗3次,加入HRP标记的羊抗人IgG结合物 $100\text{ }\mu\text{L}$, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 h ,含Tween-80的PBS pH 7.4缓冲液洗3次;加入底物 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{OPD}$ (磷苯二胺),室温避光 30 min ;在加入 H_2SO_4 终止。用肉眼和酶标仪测定 A_{492} 。加入阳性和阴性血清对照,同时用弓形虫人血清和血吸虫人血清及细颈囊尾蚴羊血清作为特异性对照试验。

2 结果

2.1 纯化抗原的特性

将纯化抗原经SDA-PAGE,出现有4条带,蛋白相对分子质量分别为 12×10^3 、 16×10^3 、 23×10^3 、 38×10^3 。而未经纯化的包囊液经SDS-PAGE后有多条带(图1)。

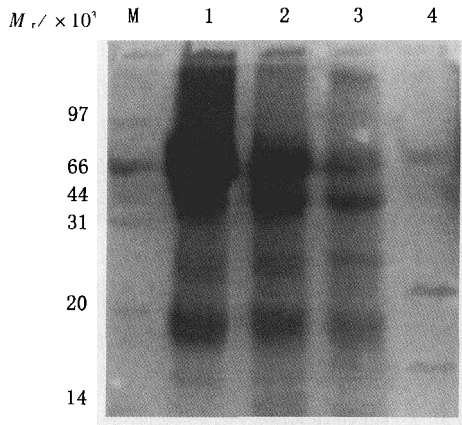


图1 纯化分离抗原聚丙烯酰胺凝胶电泳

Fig.1 Antigens of Purification analysis by SDS-PAGE

Lane 1: HCF(Hydatid cyst fluid); Lane 2,3: unbound fraction;
Lane 4: HBLF(heparin-binding lipoprotein fraction); M: Mark

2.2 ELISA

检测包虫病人血清48份,检出阳性45份,检出率93.7%,和10份羊多房棘球蚴血清中的1份起交叉反应,而和羊细颈囊尾蚴、弓形虫、血吸虫血清不起反应(表1)。

2.3 Dipstick

用Dipstick法检测24份包虫病人血清和3份其它寄生虫血清,敏感性达79.2%,特异性为100%(表1)。

表1 用脂蛋白抗原检测包虫病结果

Table 1 Results of hydatid disease testing for lipoprotein antigen

	Hydatid disease	Other parasites	Sensitivity (%)	Specificity (%)
ELISA	45/48	1/31	93.7	97.1
Dipstick	19/24	0/3	79.2	100.0

3 讨论

用不同的方法从包裹液中纯化抗原的目的主要是为了提高诊断的特异性和敏感性。具有诊断价值的脂蛋白(抗原5和抗原B)的相对分子质量分别为 12×10^3 、 16×10^3 、 23×10^3 、 38×10^3 ,其中 38×10^3 和 23×10^3 与抗原5有关, 12×10^3 、 16×10^3 、 23×10^3 于抗原B有关^[2]。包裹液中也含有其它寄生虫抗原成份和大量的宿主血清蛋白成份。

不同的方法纯化包裹液中具有诊断价值的脂蛋白抗原,由于步骤繁琐和所需特殊的试剂。导致纯化的抗原特异性和敏感性降低,同时纯化的量有限。本研究介绍了一种简单的一步法,其原理基于肝素(heparin)与脂蛋白结合,然后洗脱浓缩即可。采用该方法从包裹液中纯化脂蛋白抗原,在目前完全能够供应实际需要,因为从包虫病人和羊(尤其包虫病羊)采集包裹液十分方便,且量大,并且能够保持包裹液中蛋白质的活性。尽管抗原B基因核苷酸序列已经知道,也已经将其克隆到相关表达载体,但从试验的结果来看尚不能十分满意,原因之一是蛋白表达的量 and 纯化方法以及蛋白的活性存在问题,至少离实际应用还有较长时间^[4,5]。本研究所建立的方法具有简便、快速、特异、敏感等特点,试验的结果也较为满意。

目前诊断包虫病的免疫方法中主要采用ELISA,尚未见到Dipstick法的介绍。本研究用从包裹液中纯化的脂蛋白抗原进行ELISA和Dipstick法检测,其主要目的是建立一种简便快速、适合基层需要的包虫病诊断方法,从试验的结果来看,ELISA敏感性较Dipstick法高,但特异性较Dipstick法低。分析原因可能是胶体金的标记需要进一步摸索条件。本研究可为包虫病的诊断和试剂盒研制奠定了基础。目前正研制一种敏感、快速、特异、便于基层使用的包虫病快速诊断试剂盒。

参考文献:

- [1] Shepherd J C, McManus D P. Specific and cross-reactive antigens of *Echinococcus granulosus* hydatid cyst fluid[J]. Mol Biochem Parasitol, 1987, 25(2): 143.
- [2] Barbieri M, Steria S, Battistoni J *et al.* High performance latex reagent for hydatid serology purified from cyst fluid in one step[J]. Int J Parasitol, 1993, 23(5): 565.
- [3] Sbihi Y, Janssen D, Osuna A. Serologic recognition of hydatid cyst antigen using different purification methods[J]. Parasitology, 1996, 24(4): 205.
- [4] 陆家海, 余新炳, 高劲松, 等. 细粒棘球蚴抗原B亚单位前体蛋白基因的扩增和序列分析[J]. 中山医科大学学报, 2000, 21(4S): 27.
- [5] Gonzalez G, Spinelli P, Lorenzo C, *et al.* Molecular characterization of P-29, a metacestode-specific component of *Echinococcus granulosus* which is immunologically related to, but distinct from antigen 5[J]. Mol Biochem Parasitol, 2000, 105(2): 177.

(编辑 张敏瑞)