

应用 12D5 和 21B7 单克隆抗体检测 广州管圆线虫循环抗原的研究

黄达娜 陈木新 耿艺介 李晓恒 高世同 张仁利

【摘要】 目的 研制快速诊断广州管圆线虫感染的金标层析检测试剂。方法 双抗体 (12D5 和 21B7) 夹心 ELISA 检测实验感染广州管圆线虫的大鼠、广州管圆线虫感染病例血清循环抗原 (CAg), 同时将 12D5 和 21B7 单抗点样于固相的硝酸纤维膜上, 以胶体金-protein A 为标记物制备金标免疫层析试剂快速检测实验感染广州管圆线虫的大鼠、广州管圆线虫感染病例血清循环抗原。结果 经鉴定单抗 12D5 为 IgG1, 21B7 为 IgM, 两株单抗同时识别广州管圆线虫成虫相对分子质量 55×10^3 的蛋白, 12D5 和 21B7 双抗体夹心 ELISA 和金标层析法对实验感染广州管圆线虫的大鼠血清中 CAg 检出率为 100% (48/48), 广州管圆线虫感染病例血清 CAg 检出率为 100% (32/32), 与日本血吸虫、肝吸虫、肺吸虫、旋毛虫、蛔虫、包虫病例血清无交叉反应, 与健康人血清无反应。结论 12D5、21B7 双抗体夹心 ELISA 和金标层析法对感染广州管圆线虫人和动物血清中 CAg 检测的特异性强, 金标层析法操作简便、快速, 结果判读容易, 不需特殊设备, 且敏感性高, 能够确定现症感染。

【关键词】 广州管圆线虫; 单克隆抗体; 金标层析法

Detection of circulating antigen of *Angiostrongylus cantonensis* by 12D5 and 21B7 monoclonal antibodies HUANG Da-na, CHEN Mu-xin, GENG Yi-jie, LI Xiao-heng, CAO Shi-tong, ZHANG Ren-li. Shenzhen Centre for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518020, China

Corresponding author: ZHANG Ren-li, Email: renlizhang@tom.com

This work was supported by a grant from the Guangdong Natural Science Foundation (No. 8151802003000002)

【Abstract】 Objective To detect the rate of *Angiostrongylus cantonensis* infection and to study the effects of treatment so as to prepare monoclonal antibodies (McAbs), and gold immunochromatography assay (GICA) with 12D5 and 21B7 McAbs could be prepared in advance. **Methods** Two McAbs (12D5 and 21B7) were applied to detect the circulating antigen (CAg) in the sera of rats infected with *A. cantonensis* and angiostrongyliasis patients respectively by double antibody sandwich ELISA. Either 12D5 or 21B7 McAbs was used as antibody and protein A was conjugated with colloid gold as the detection marker. A special pad for GICA was designed according to the reaction procedure, and CAg were detected by GICA in the sera of rats infected with *A. cantonensis* and angiostrongyliasis patients respectively. **Results** 12D5 McAb was identified as IgG1 and 21B7 McAb was IgM. Results from Western blotting showed that two McAbs could be used to identified 55 KD protein of adult worms of *A. cantonensis*. The detection rates of CAg in the sera of infected rats was 100% (48/48) and the detection rates of CAg in the sera of angiostrongyliasis patients was 100% (32/32). No cross-reaction to sera of patients with other infection of parasites, such as clonochiasis, fasiolopsiasis, ancylostomiasis, ancylostomiasis, anisakiasis as well as schistosomiasis were seen and normal sera did not react with 12D5 and 21B7 McAbs. **Conclusion** Results from sandwich ELISA and GICA with 12D5 and 21B7 McAbs showed high specificity and acting as detecting CAg of *A. cantonensis* in sera of infected animals and patients. We noticed that GICA with 12D5 and 21B7 was not only rapid and simple that without requirement of special instrument, but also rather sensitive and specific for the detection of current infection with *A. cantonensis*.

【Key words】 *Angiostrongylus cantonensis*; Monoclonal antibodies; Gold immunochromatography assay

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2010.01.019

基金项目: 广东省自然科学基金 (8151802003000002)

作者单位: 518020 深圳市疾病预防控制中心

通信作者: 张仁利, Email: renlizhang@tom.com

广州管圆线虫病为新发人畜共患自然疫源性寄生虫病。由于广州管圆线虫病原学诊断取样困难且检出率不高(<10%),目前主要以临床诊断结合实验室抗体检测作为间接诊断依据。为有效控制广州管圆线虫病的感染迫切需要研制出能诊断现症感染和考核治疗效果,同时又能在现场快速简便操作的诊断试剂。本研究应用本实验室研制的广州管圆线虫诊断循环抗原单克隆抗体,将单克隆抗体发展为胶体金免疫层析(gold immunochromatography assay),作为诊断广州管圆线虫现症感染和考核治疗效果,并适合现场使用的快速诊断技术,对于广州管圆线虫病的辅助诊断、疗效考核和流行病学调查都有重要的意义。

对象与方法

1. 研究对象:

(1)实验动物及细胞株:7~9周龄SD大鼠48只。雌雄均有,体重150~160g,购自南方医科大学实验动物中心,12D5和21B7单克隆抗体细胞株为本实验室研制和筛选。

(2)各类寄生虫抗原:人蛔虫抗原为华南农业大学人兽共患病实验室赠送,日本血吸虫成虫抗原、肝吸虫成虫和广州管圆线虫成虫抗原为本实验室制备,将各类虫体用无菌生理盐水漂洗干净,加入少量生理盐水研磨成匀浆,反复冻融后再超声粉碎,4℃离心沉淀(4000 r/min, 30 min),收集上清,测定蛋白浓度备用。

(3)血清样本:广州管圆线虫病患者血清共32份,其中4例为病原学确诊,其余的28例符合临床诊断标准,实验室抗体诊断阳性,有生食和半生食淡水螺肉史,健康人血清30份采自本实验室,日本血吸虫、肝吸虫、肺吸虫、蛔虫、包虫和旋毛虫病患者的血清为病原学诊断阳性。

(4)主要试剂:50%聚乙二醇(PEG)分子质量1500、单克隆抗体免疫球蛋白亚类检测试剂盒为美国Sigma产品;硝酸纤维素膜、聚酯膜结合垫、聚酯膜样品垫、吸收垫等购自BioScience Inc公司,辣根过氧化物酶为Bostar Inc公司产品,胶体金和胶体金-SPA标记物为深圳市康佰特生物科技有限公司生产。

2. 检测方法:

(1)金标层析检测试剂研制:以单抗12D5为标记抗体,最适标记量的测定、免疫胶体金的制备方法按照参考文献[1]。

(2)单抗亚类的鉴定:采用单克隆抗体免疫球蛋白亚类检测试剂盒快速测定(美国, SouthernBiotech公司)。

(3)单抗的纯化:在BALB/c鼠腹腔分别接种稳定分泌单抗12D5和21B7杂交瘤细胞株,待腹水后,取腹水、用饱和硫酸铵沉淀、透析后,再用FPLC系统过Sephacryl S-200分子筛纯化,SDS-PAGE鉴定纯度,蔗糖包埋浓缩。再用0.005 mol/L的NaCl溶液透析30 h,1000×g离心去除蛋白聚合物,并用蛋白检测仪测定含量,ELISA鉴定活性。

(4)单抗酶标记:采用改良HRP二步标记法。取HRP 10 mg溶于0.4 ml, 0.25 mol/L pH值6.8 PBS液中或0.05 mol/L pH值9.6碳酸盐缓冲液中,加入25%戊二醛0.1 ml, 37℃温育2 h后加入冰冷的分析纯的无水乙醇2 ml, 2500 r/min离心沉淀10~15 min,倾去溶液。沉淀以80%乙醇4~5 ml混悬,同上离心,倾去乙醇,将管倒置,使乙醇充分流出。沉淀用1 ml 0.05 mol/L pH值9.6碳酸盐缓冲液溶解,加入0.5~1 ml抗12D5单克隆抗体溶液(含抗体15 mg左右),放在冰箱内过夜后,加KH₂PO₄,使近中性备用。

(5)免疫印迹试验:用12%分离胶进行SDS-PAGE半干转印,测定单抗所识别的广州管圆线虫成虫可溶性抗原蛋白区带,并做单抗对日本血吸虫成虫抗原、人蛔虫成虫可溶性抗原、肝吸虫成虫可溶性抗原的交叉反应。

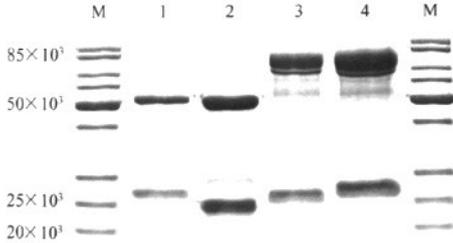
(6)双抗体夹心ELISA法测定血清循环抗原:用纯化的21B7单抗以10 μg/ml、100 μl/孔包被过夜;弃液,0.05%吐温-20 PBS洗涤,5%的小牛血清100 μl/孔 37℃封闭60 min;洗涤,加入100 μl/孔待检血清样本,37℃作用45 min;洗涤,加入酶标记的12D5单抗,37℃作用45 min;洗涤加底物显色。

结 果

1. 12D5和21B7单抗亚类鉴定:制备的单抗纯化后,经免疫球蛋白亚类鉴定,12D5为IgG1,21B7为IgM,培养上清效价分别1:23 600和1:19 800,腹水效价分别为1:75 000和1:69 800。纯化后的单抗SDS-PAGE电泳见图1。

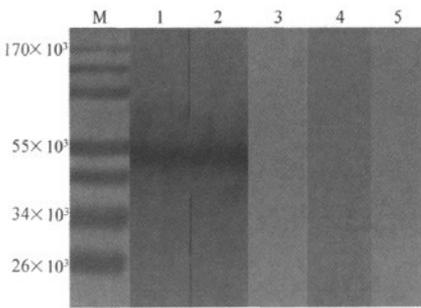
2. 单抗12D5、21B7与寄生虫抗原的免疫印迹反应:将广州管圆线虫、日本血吸虫、肝吸虫和人蛔虫成虫可溶性抗原进行SDS-PAGE电泳,分别与单抗12D5、21B7进行免疫印迹反应,结果显示12D5、21B7仅与广州管圆线虫成虫抗原发生特异性反应,

识别成虫抗原中相对分子质量约 55×10^3 蛋白,与日本血吸虫、肝吸虫和人蛔虫均无反应(图2)。



注: M: Marker; 1: 单抗 12D5; 2: 单抗 15F8; 3: 单抗 21B7; 4: 单抗 14G10; 各单抗分子分离为重链与轻链

图1 单克隆抗体 SDS-PAGE 电泳



注: M: 蛋白参照物; 1, 2: 分别为单抗 12D5、21B7 识别广州管圆线成虫抗原; 3~5: 分别为 12D5、21B7 单抗混合物与血吸虫、肝吸虫和人蛔虫抗原反应

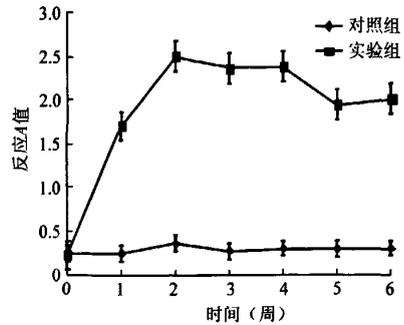
图2 单抗 12D5、21B7 与其他寄生虫抗原的免疫印迹反应

3. 应用单抗 12D5、21B7 双抗体夹心 ELISA 检测广州管圆线虫感染大鼠和人血清中的 CAg: 48 份感染大鼠检测的阳性率为 100% (48/48), 血清反应 A 值为 1.58 ± 0.24 ; 而 10 份对照大鼠血清反应的 A 值为 0.38 ± 0.04 ; 阳性标准为 0.50 (对照血清 A 值 + 3s)。32 份广州管圆线虫患者血清的反应阳性率为 100%, 与其他寄生虫病患者的血清无阳性反应, 阳性反应判断的标准为对照血清 A 值 + 3s。

4. 实验感染大鼠血清中 CAg 动态检测: 实验感染组和对照组各 15 只大鼠不同时间血清 CAg 双抗体夹心 ELISA 测定结果见图 3。从感染第 1 周开始感染大鼠血清中 CAg 显著高于对照组, 第 2 周达到高峰, 直到第 4 周均维持在高的水平, 虽然在第 5 周后比高峰时的 CAg 水平有所下降, 但仍然在一个较高的水平。

5. 应用单抗 12D5、21B7 研制的金标层析检测试剂检测广州管圆线虫感染大鼠和人血清中的 CAg: 用涂覆胶体金标记广州管圆线虫单克隆抗体的金标垫、包被有广州管圆线虫单克隆抗体的检测

线和羊抗鼠 IgG 或 IgM 的质控线构成。将待检的感染广州管圆线虫大鼠和广州管圆线虫病患者血清注入加样孔, 5~15 min 后可以判读反应结果, 阳性反应同时出现质控和待检样本红色反应线, 阴性反应仅显示质控红色反应线(图 4); 感染大鼠 48 只均为阳性反应, 32 例广州管圆线虫患者血清均为阳性反应, 其他寄生虫病患者血清和健康人血清均不起反应。



注: 感染 1 周后血清中 CAg 显著上升, 且维持在较高水平

图3 用单抗 12D5、21B7 双抗体夹心 ELISA 测定实验感染广州管圆线虫大鼠血清 CAg 动态学变化

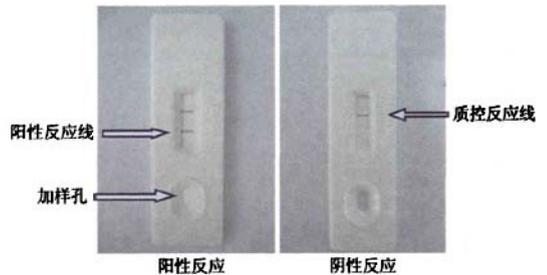


图4 应用单抗 12D5、21B7 研制的金标层析检测试剂检测广州管圆线虫感染大鼠和人血清中的 CAg

讨 论

广州管圆线虫原仅在亚洲及泛太平洋地区流行, 2003 年后在非洲和南美洲国家出现多起暴发, 同时不断有散发病例发现和自然疫源地报道, 并通过贝类中间宿主和转宿主感染人类。而在我国内陆和台湾常有爆发性流行, 在欧洲虽然有散发病例报告, 但患者都是因为是在流行国家和地区工作或旅游而感染, 尚未有自然疫源地报告^[2-6]。广州管圆线虫病的诊断, 目前尚无一种理想的方法, 从患者脑脊液中检出虫体的确诊率极低, 主要依靠病史(是否有生吃、半生吃或接触该虫中间宿主或转宿主的流行病学接触史)、临床诊断以及实验室血清学诊断等。李华等^[7]利用广州管圆线虫 M32000 抗原进行

感染者血清抗体测定,证实AC32抗体诊断的敏感性和特异性;顾金保等^[8]利用该虫成虫尿素溶解抗原诊断患者血清抗体,同时也证实AC32的诊断价值;郭鹏娟等^[9]系统综述了该虫免疫学诊断概况,报道广东省广州管圆线虫病的血清学诊断方法仍然为以抗体检测为基础的ELISA, dot-ELISA等技术。本研究利用自行研制的识别广州管圆线虫CAg单克隆抗体检测实验室感染大鼠和该虫感染的患者表现了高特异性,与其他寄生虫病患者血清无交叉反应。本次研究是利用单抗诊断抗原,与以往的研究利用抗原诊断抗体有本质区别。谭峰等^[10]研制诊断广州管圆线虫的一株单克隆抗体应用于感染者循环抗原检测,但其应用价值仍在研究中;Ambu等^[11]研制出诊断广州管圆线虫抗原的单克隆抗体株,虽已发展为Mab-ELISA技术以诊断感染者和考核治疗效果,但其应用成本和技术要求并不适合在我国推广。本研究利用胶体金免疫层析技术将广州管圆线虫诊断循环抗原的单克隆抗体发展为现场快速诊断试剂,其特异性强、敏感性高,并适合于现场推广应用,但可否用于考核治疗效果还有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Wu YS, Li M, Bi HX, et al. Diagnosis of plasmodium falciparum by gold-immunochromatography assay. Chin J Microbiol Immunol, 2002, 22(2): 229-232. (in Chinese)
吴英松, 李明, 毕惠祥, 等. 自制免疫胶体金层析条检测恶性疟原虫的初步研究. 中华微生物学和免疫学杂志, 2002, 22(2): 229-232.

[2] Chen XG, Li H, Lun ZR. Angiostrongyliasis, mainland China. Emerg Infect Dis, 2005, 11(10): 1645-1647.

[3] Tsai HC, Liu YC, Kunin CM, et al. Eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*: report of 17 cases. Am J Med, 2001, 111(2): 109-114.

[4] Pipitgool V, Sithithaworn P, Pongmuttasaya P, et al. *Angiostrongylus* infections in rats and snails in northeast Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 1997, 28

(1): 190-193.

[5] Bartschi E, Bordmann G, Blum J, et al. Eosinophilic meningitis due to *Angiostrongylus cantonensis* in Switzerland. Infection, 2004, 32(2): 116-118.

[6] Raccurt CP, Blaise J, Durette-Desset MC. Presence of *Angiostrongylus cantonensis* in Haiti. Trop Med Int Health, 2003, 8(5): 423-426.

[7] Li H, Chen XG, Shen HX, et al. Value of the antigen with molecular mass of 32 000 in immunodiagnosis of *Angiostrongylus cantonensis*. J First Mil Med Uni, 2005, 25(4): 380-383. (in Chinese)
李华, 陈晓光, 沈浩贤, 等. 广州管圆线虫M32000抗原的免疫诊断效果评价. 第一军医大学学报, 2005, 25(4): 380-383.

[8] Gu JB, Liu M, Li H, et al. Analysis and evaluation of the immunodiagnosis value of the urea-soluble antigens of *Angiostrongylus cantonensis* adult worm. J Trop Med, 2007, 7(4): 303-306. (in Chinese)
顾金保, 刘敏, 李华, 等. 广州管圆线虫尿素溶解抗原分析诊断价值的探讨. 热带医学杂志, 2007, 7(4): 303-306.

[9] Guo PJ, He A, Zhan XM. Research on diagnosis and drug therapy of angiostrongyliasis cantonensis. Inter J Med Parasit Dis, 2007, 34(3): 132-135. (in Chinese)
郭鹏娟, 何蔼, 詹希美. 广州管圆线虫病诊断和药物治疗. 国际医学寄生虫病杂志, 2007, 34(3): 132-135.

[10] Tan F, Pan CW, Liang SH, et al. Preparation and preliminary application of monoclonal antibodies against adult worm of *Angiostrongylus cantonensis*. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2005, 23(4): 209-213. (in Chinese)
谭峰, 潘长旺, 梁韶辉, 等. 抗广州管圆线虫成虫单克隆抗体的研制及初步应用. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2005, 23(4): 209-213.

[11] Ambu S, Rain AN, Mak JW, et al. Detection of *Angiostrongylus malaysiensis* circulating antigen using monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 1997, 28(10): 143-147.

(收稿日期: 2009-05-12)

(本文编辑: 张林东)