

旋毛虫 Ts87 抗原的免疫学特性及保护性的初步研究*

杨 静 诸欣平** 杨雅平 雷丽萍

(首都医科大学基础医学院寄生虫学教研室 北京 100054)

摘要:应用 Western blot 和 ELISA 方法对纯化的重组蛋白 PET-28a(+)/Ts87 进行免疫学特性鉴定及保护性研究。Western blot 和 ELISA 结果显示, Ts87 抗原可被人工感染旋毛虫的兔血清、病猪血清、病人血清及抗 Ts87 的兔血清所识别。Ts87 抗原免疫 BABL/c 小鼠, 较对照组减虫率为 29%, 说明 Ts87 抗原可作为旋毛虫免疫诊断和疫苗的候选抗原。

关键词:旋毛形线虫; Ts87 抗原; 诊断; 保护性免疫; ELISA

中图分类号: R383.15 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2003)03-52-04

Immunological Characteristics and Protective Immunity of the *Trichinella spiralis* Ts87 Antigen

YANG Jing ZHU Xin-Ping YANG Ya-Ping LEI Li-Ping

(Department of Parasitology, University of Medical Sciences, Beijing 100054, China)

Abstract:The immunological characteristics and protective immunity of the purified recombinant protein Ts87 were analyzed by Western blot and ELISA. The Ts87 antigen could be recognized by infected rabbit sera, infected swine sera, infected human sera and antisera against Ts87 by Western blot and ELISA. The immunoprotective effect of the Ts87 antigen of *Trichinella spiralis* was studied by a challenge experiment. Compared with a control group, numbers of larvae in the muscle of immunized mice decreased by 29%. The results showed that the Ts87 antigen might be both a promising immunodiagnosis antigen and a vaccine candidate for *Trichinella spiralis*.

Key words: *Trichinella spiralis*; Ts87 antigen; Diagnosis; Protective immunity; ELISA

旋毛形线虫简称旋毛虫, 是一种成虫和幼虫分别寄生于同一宿主小肠和肌细胞内的线虫, 引起旋毛虫病, 是一种严重的人兽共患寄生虫病。近年来, 随着人们食肉习惯的改变, 流行程度有明显上升趋势^[1]。由于旋毛虫抗原的复杂性, 旋毛虫病临床症状的多样性, 肌肉活检病原体又不易被病人所接受, 使旋毛虫病的临床诊断困难。随着基因重组技术的发展, 由基因重组抗原制备的疫苗在其它寄生虫病的免疫预防上取得很大进步^[2,3], 并且应用血清免疫学试验诊断旋毛虫病的研究进展迅速。然而由于受到普遍关注的旋毛虫肌幼虫排泄分泌抗原(ES 抗原)的制备程序繁琐^[4], 使抗原的使用受到限制。本实验室通过免疫筛选、克隆表

达了一个新的 Ts87 抗原基因^[5], 表达产物约为 40 ku。本文报道以基因工程表达的重组蛋白 PET-28a(+)/Ts87 为抗原, 用 Western blot 及 ELISA 的方法对此蛋白进行免疫学特性研究, 并用其免疫 BABL/c 小鼠, 观察诱导

* 美国中华医学学会(CMB)(Parasitology 98-674), 北京市教委科技发展基金(2001-2004)、北京市跨世纪优秀人材工程(01KJ-091)资助项目;

** 通讯作者, E-mail: zhuxinping@yahoo.com;

第一作者介绍 杨静, 女, 30 岁, 博士研究生, 讲师; 主要从事分子寄生虫学方面的研究。

收稿日期: 2003-01-30, 修回日期: 2003-03-10

的保护性免疫力,为进一步研究旋毛虫病的诊断和免疫保护提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 虫种、实验血清及动物 旋毛虫(河南猪株)为本室传代保种。

旋毛虫病猪血清、正常猪血清(各4份)由美国国家研究委员会(National Research Council)Gamble H Ray博士提供;旋毛虫病人血清(8份)、蛔虫病人血清(2份)、钩虫病人血清(2份)、鞭虫病人血清(2份)、肝吸虫病人血清(2份)、血吸虫病人血清(2份)均由同济医科大学提供;包虫、囊虫病人血清各1份分别由青海医学院和吉林农业大学囊虫病研究所提供。正常人血清(8份)采自我校健康人群。人工感染旋毛虫兔血清由本实验室制备。

实验动物 BABL/c 鼠,雌性,体重 20~22 g,购自中国军事医学科学院。

1.2 基因工程表达的重组 Ts87 抗原的制备 将 Ts87 抗原基因克隆入原核表达载体 PET-28a(+)中,并大量表达、纯化,蛋白含量为 1.39 mg/ml。

1.3 Ts87 抗原的免疫学特性鉴定

1.3.1 Ts87 抗原的多克隆抗体的制备 按常规方法,用纯化的 200 μ g Ts87 抗原与等量完全弗氏佐剂充分乳化,多点注入新西兰兔(2只)背部、爪垫。分别于第 14、21、28 d 于背部、皮下、淋巴结多点注入相同剂量 Ts87 抗原与不完全弗氏佐剂的乳化物加强免疫。再经 2 周,颈动脉取血,获得特异的多克隆抗血清,用 ELISA 鉴定血清效价。

1.3.2 Western blot 鉴定 Ts87 纯化抗原参照文献[6]进行 Western blot。20 ng Ts87 抗原 SDS-PAGE 电泳后,转移至 PVDF 膜上,一抗分别为旋毛虫感染兔血清(1:1 000),旋毛虫感染猪血清、旋毛虫病人血清(1:200)、Ts87 抗原免疫兔血清(1:10 000)、其它蠕虫病人血清(1:200)及正常人、猪血清(1:200)、兔血清(1:1 000)。用 ECL 法检测印迹蛋白。

1.3.3 ELISA 鉴定 Ts87 纯化抗原作为包被抗原,以旋毛虫感染猪血清、病人血清及其它病人血清进行 ELISA 检测。通过倍比稀释选择最佳包被抗原浓度(1 μ g/孔)和血清最适工作稀释度(1:200),并以正常猪、人血清作为阴性对照。待测血清 OD_{492 nm} 与健康人血清平均值之比 ≥ 2 判为阳性结果。

1.4 免疫接种及攻击感染 8 只 BABL/c 鼠随机分为 2 组,每组 4 只。Ts87 抗原免疫组注射的抗原加等量完全弗氏佐剂(FCA),分别于第 10、20、30 d 各免疫 1 次,共 3

次,每只鼠均同时采用腹腔、皮下注射,每次注射的抗原剂量为 20 μ g。末次注射后 10 d,每只鼠用 200 条旋毛虫肌幼虫进行攻击感染。对照组注射等量生理盐水,注射和攻击方法同 Ts87 抗原免疫组。

1.5 旋毛虫肌幼虫检查 于攻击感染后 30 d,每组解剖 4 只小鼠,取全部肌肉,搅碎后用 1%胃蛋白酶-1%盐酸消化,收集全部肌幼虫、计数。

2 结 果

2.1 免疫特性分析

2.1.1 Ts87 抗原的免疫原性 Ts87 抗原经皮肤多点注射免疫家兔,5 周后颈动脉取血,获得特异的多克隆抗血清。与 Ts87 纯化抗原进行 Western blot 反应,同时以正常兔血清做阴性对照。结果表明,该特异的多克隆抗血清可特异识别 Ts87 抗原(图 1),说明该抗原免疫动物,刺激动物发生了特异性的免疫应答,从而产生特异抗体。测定此多克隆抗血清效价为 1:128 000 以上,表明 Ts87 抗原具有较强的免疫原性。

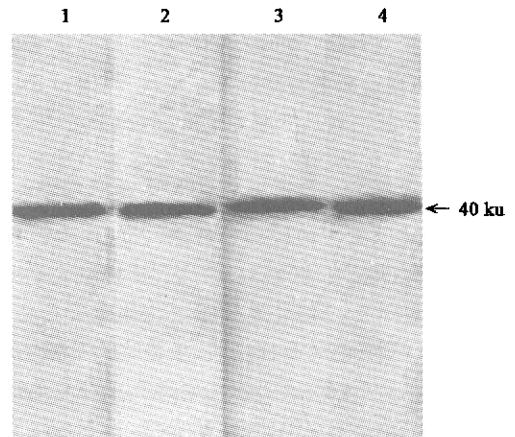


图 1 纯化的 Ts87 抗原与不同抗体血清反应的 Western blot 分析

1. Ts87 抗原与旋毛虫病人血清反应; 2. Ts87 抗原与感染旋毛虫的猪血清反应; 3. Ts87 抗原与感染旋毛虫的兔血清反应; 4. Ts87 抗原与 Ts87 抗原免疫兔血清反应

2.1.2 Ts87 抗原的特异性与敏感性 Western blot 鉴定 20 ng Ts87 纯化抗原与人工感染旋毛虫的兔血清、病猪血清、病人血清均呈阳性反应,在约 40 ku 呈现一明显蛋白印迹带(图 1),正常人血清、蛔虫病人血清、钩虫病人血清、鞭虫病人血清及包虫、囊虫病人血清相应位置无任何识别条带出现。表明 Ts87 抗原具较好的特异性与敏感性,能为感染旋毛虫兔血清、猪血清及人血清所识别。

ELISA 检测:以 1 μg 孔 Ts87 抗原包被 96 孔酶标板。结果显示,该抗原可与感染旋毛虫的猪血清(1:200)及多例病人血清(1:200)发生阳性反应,未包被抗原的孔及一抗为正常猪、人血清的孔均呈阴性反应。对其他病人血清进行检测时,发现与血吸虫病人血清有弱的阳性反应,而与蛔虫病人血清、钩虫病人血清、鞭虫病人血清及包虫、囊虫病人血清均为阴性,提示出 Ts87 抗原具有较好的特异性,可作为免疫诊断的抗原。

2.2 免疫保护性初步检测 实验小鼠攻击感染 30 d 后的肌幼虫检查显示,免疫组肌幼虫数与对照组相比,平均检获肌幼虫均数分别为 $6\ 830.00 \pm 2\ 006.74$ 和 $9\ 665.88 \pm 1\ 578.98$,减虫率为 29%, $P < 0.01$ 。

3 讨论

旋毛虫病是近年来常见的一种食源性寄生虫病,目前国内外众多研究机构都对旋毛虫病诊断及旋毛虫疫苗研制进行了探索性研究。该病临床表现多样,肌肉活检法检出率低,漏诊率高,且难为病人接受^[7],因此血清学检查是临床旋毛虫病诊断的主要辅助措施。有实验证明在 ELISA 检测中使用纯化抗原部分纯化组分,可提高免疫诊断的特异性和敏感性^[8],因而寻找具有特异性的诊断抗原是提高旋毛虫病血清学诊断水平的关键因素之一。从培养虫体上清收集到的旋毛虫排泄分泌抗原具有特异性强、灵敏度高等特点,被用作免疫学上检测旋毛虫病的较理想抗原^[4,9]。然而由于虫源抗原制备程序繁琐,抗原来源有限,使抗原的使用受到限制。作者以 Ts87 纯化基因重组抗原免疫动物,诱导动物产生很强的抗体反应,抗体效价达到 1:128 000,并且可识别 Ts87 抗原,说明此抗原具有良好的免疫原性。以旋毛虫感染的兔血清、病猪血清、病人血清与仅 20 ng 的此抗原进行 Western blot,在 40 ku 处的抗原蛋白条带可被 3 种旋毛虫感染的阳性血清特异识别。ELISA 方法检测结果显示,旋毛虫病猪及病人血清与该抗原呈阳性反应。一些研究表明,旋毛虫虫体体表及代谢分泌抗原中含有与血吸虫共同抗原成分^[7,10,11],本实验中 Ts87 抗原也显示与血吸虫病人血清有弱的交叉反应。但 Ts87 抗原与线虫(蛔、钩、鞭)、肝吸虫、囊虫、包虫病人血清均呈阴性反应,提示此抗原具有较好的特异性和敏感性,可用于旋毛虫病的血清学诊断。

有关旋毛虫病免疫预防的研究,国内外均有报道^[12-14]。由于旋毛虫抗原成分复杂,各种抗原诱导产生的免疫效果不一。旋毛虫成虫、新生幼虫、肌幼虫抗原及排泄分泌抗原均可诱导小鼠产生一定的免疫力,而排泄分泌抗原免疫效果较成虫、新生幼虫和肌幼虫

抗原更佳。作者的研究表明,Ts87 抗原基因编码的蛋白属于一种排泄分泌抗原(另文发表),可作为疫苗的候选成分,用 Ts87 纯化抗原免疫 BABL/c 小鼠,进行初步保护性研究,结果显示,此抗原诱导的肌幼虫减虫率为 29%,提示 Ts87 抗原有望成为旋毛虫疫苗的候选抗原分子,为进一步大批量的动物免疫保护性研究打下了基础。

致谢 感谢法国食品安全局的 Dr. Pascal Boireau 在构建旋毛虫 cDNA 文库的工作上给予的友好协作。

参 考 文 献

- [1] 许隆祺,蒋则孝,余素梅等.当前我国人体寄生虫病流行的趋势和特点.中国寄生虫与寄生虫病杂志,1995,13:214~217.
- [2] Ghosh K, Hawdon J M, Hotez P J. Vaccination with alum-prespitiated ASP-1 protects mice against challenge infections with infective hookworm (*Ancylostoma caninum*) larvae. *Journal Infect Disease*, 1996,174:1 380~1 383.
- [3] 朱荫昌,任建功,Ham D A 等.日本血吸虫中国大陆株 23kDa 膜蛋白核酸疫苗对猪免疫保护作用的研究.中国血吸虫病防治杂志,2002,14(1):3~7.
- [4] 蔡海松,宋思扬,张伟光等.旋毛虫病 p49 抗原相关抗体的 ELISA 检测.中国人兽共患病杂志,2001,17(1):45~47.
- [5] 杨雅平,诸欣平,杨静等.旋毛虫成虫 cDNA 文库免疫筛选及序列分析.中国寄生虫与寄生虫病杂志,2002,10(5):270~273.
- [6] 卢圣栋主编.现代分子生物学实验技术(第二版).北京:中国协和医科大学出版社,1999.400~403.
- [7] 申丽洁,黎世涛,王秀珍等.旋毛虫三种抗原作为免疫诊断抗原的比较研究.地方病通报,1999,14(2):10~12.
- [8] 杨毅梅,李桂云.旋毛虫病诊断方法的研究进展.中国寄生虫病防治杂志,1997,10(1):58~59.
- [9] 陈辉,阎玉河,李晓雪等.旋毛虫排泄-分泌抗原重组的研究.河南医科大学学报,1998,33(4):100~102.
- [10] 李燎,雷莉,闫和平等.人旋毛虫病血清与诊断抗原的检测方法的比较研究.泸州医学院学报,1996,19(30):178~181.
- [11] 田明礼,易新元,曾宪芳等.日本血吸虫不同发育阶段与旋毛虫抗原交叉性的研究.湖南医科大学学报,1998,23(3):225~228.
- [12] Goyal P K, Wakelin D. Vaccination against *Trichinella spiralis* in mice using antigens from different isolates. *Parasitology*, 1993,107:311~317.

[13] 申丽洁, 朱声华, 罗仲金等. 旋毛虫成虫可溶性抗原和排泄分泌抗原对小鼠免疫保护作用的比较研究. 中国人兽共患病杂志, 1999, 15(5): 6 ~ 8.

[14] 涂涛, 安桂珍, 杨树森. 旋毛虫成虫、新生幼虫和肌幼虫抗原的保护性免疫研究. 中国人兽共患病杂志, 2001, 17(2): 66 ~ 69.