

## 抗恶性疟原虫谷氨酸脱氢酶单克隆抗体的研制与胶体金免疫层析方法的建立

疟疾诊断一直是疟疾防治工作的一个重要环节。近年来发展的以单克隆抗体为基础的免疫层析技术，以其快速、简便、可靠等优点在疟疾诊断中显示了广阔的应用前景，目前国外开发的试剂盒主要有ParaSight-F、ICT、OpitiMAL[1][2]，但这些方法都存在一定的不足并且价格昂贵，很难在基层推广应用。我国急需开发具有自己知识产权的疟疾诊断试剂盒，恶性疟原虫谷氨酸脱氢酶(GDH)是疟原虫物质和能量代谢过程中十分重要的功能分子，在疟原虫整个红内期均能表达，更为重要的是宿主红细胞内没有此酶[3][4]，因此该酶有望成为疟疾快速诊断的新型候选分子。作者等应用杂交瘤技术制备了抗GDH单克隆抗体，并胶体金标记，建立了胶体金免疫层析方法，为恶性疟快速诊断试剂盒的研制打下基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 骨髓瘤细胞和实验动物

小鼠骨髓瘤细胞SP2/0由军事医学科学院二所惠赠。6周龄雌性Balb/C小鼠，购自南方医科大学实验动物中心。

#### 1.2 血样标本来源

恶性疟病人血样、间日疟病人血样、正常人血样由杭州艾康生物技术有限公司提供，刚地弓形虫血样、日本血吸虫血样由我校寄生虫教研室提供。

#### 1.3 主要试剂

RPMI 1640培养基、胎牛血清、HAT、HT(美国Gibco BRL产品)，弗氏佐剂、聚乙二醇(PEG<sub>20000</sub>) (美国Sigma产品)，鼠单克隆抗体亚类检测试剂盒(HyCult biotechnology b.v. 产品)，其它试剂均为国产试剂纯。建立胶体金免疫层析方法的试剂和材料由杭州艾康生物技术有限公司提供。

#### 1.4 单克隆抗体杂交瘤细胞株的建立

GDH抗原为本室制备[5]，常规法免疫、细胞融合制备单克隆抗体杂交瘤细胞株。

#### 1.5 单克隆抗体的鉴定

1.5.1 单克隆抗体的亚类鉴定 按检测试剂盒说明书操作。

1.5.2 抗体亲和常数测定 参照文献报道的方法进行[6]，即选用间接ELISA方法测定，将重组GDH蛋白分别以0.625、1.125、2.5和5 μg/ml包被，加入倍比稀释的单克隆抗体，再加入HRP标记羊抗鼠IgG抗体，TMB显色测D(λ)值。以抗体浓度的对数为横座标，以D(λ)值为纵座标，每种单克隆抗体可得出4条反应曲线，以每条曲线上部平坦段的D(λ)值作为100%，在曲线上查出50% D(λ)值时相对应的抗体浓度，按公式 $K=(n-1)/2(n[Ab']_t-[Ab]_t)$ 计算亲和常数。

#### 1.6 胶体金免疫层析法的建立

1.6.1 抗体的纯化及包被 采用protein-G亲和层析柱，先用PBS平衡柱子，上样(按1:10的比例用

PBS稀释的腹水), 用PBS洗杂, 再用甘氨酸缓盐酸冲液(pH2.9)洗脱, 收集洗脱峰, 分光光度计测定抗体浓度。将各株抗GDH单抗作为T线(检测线)分别包被在硝酸纤维素膜(NC)上(Millipore产品), C线(质控线)包被羊抗鼠IgG(杭州艾康生物技术有限公司自制), 浓度均为2.5 mg/ml, 喷量为0.8  $\mu$ l/cm, 37  $^{\circ}$ C孵箱烘干过夜。

1.6.2 抗体的胶体金标记及点金标 胶体金的制备采用柠檬酸三钠还原法, 取1%氯金酸1 ml, 加去离子水稀释成100 ml加热煮沸, 一次快速加入37  $^{\circ}$ C预温的柠檬酸三钠10 g/L 2 ml, 待溶液由蓝逐渐变为紫红色, 继续煮沸15~30 min, 冷却后再以0.2 mol/L碳酸钾调pH为8.0~8.2, 0.45  $\mu$ m滤膜过滤, 分光光度计测 $D_{540}$ 。按每ml胶体金加入30.8  $\mu$ g抗体, 将二者在电磁搅拌下混合均匀, 10 min后加入10%BSA40  $\mu$ l, 继续搅拌30 min, 加1%PEG<sub>20000</sub> 20  $\mu$ l再搅拌5 min。取1 ml Ab-胶体金结合物按上述方法进行稳定性实验。用高速离心法纯化Ab-胶体金, 0.45  $\mu$ m滤膜过滤, 分光光度计测各株抗体的 $D_{540}$ 值, 4  $^{\circ}$ C避光保存。将各株单抗都稀释至 $D_{540}$ 值为80, 分别点在聚脂膜上, 喷量为3  $\mu$ l/cm, 37  $^{\circ}$ C孵箱烘干至少5 h以上。

1.6.3 检测试纸条的组装、检测方法及其结果判定 将吸水滤纸、金标聚脂膜、玻璃纤维都粘贴到支持物上(包含有NC膜), 切割成4 mm宽的测试条, 装入检测试剂盒内。吸血样10  $\mu$ l加入检测池, 再滴入PBS缓冲液一滴(约10  $\mu$ l), 全部试验过程只需15~30 min。阳性反应为出现上下两条红线, 阴性反应只有一条红色对照线。对照线必须呈红色, 否则该试剂盒为无效。

1.6.4 配对筛选检测及血样检测 6株抗体分别作为包被抗体, 再与另外5株点金标抗体配对检测恶性疟血样, 以上面获得的最佳配对组合对170份血样进行检测, 以镜检法为参照, 其中恶性疟30份, 间日疟40份, 正常人血样100份。

1.6.5 稳定性的检测 将免疫层析试纸条用塑料袋及铝箔密封, 加干燥剂, 室温保存, 分别于1、10、30、60、90 d后检测同一恶性疟血样, 观察其稳定性。

## 2 结果

### 2.1 抗GDH杂交瘤细胞株的建立

2次融合共获得6株抗GDH单克隆抗体, 分别命名为3C3、2B9、2G2、5A7、3F5、3F6, 均为小鼠IgG1( $\kappa$ ), 亲和常数介于 $1 \times 10^{-8} \sim 2.8 \times 10^{-10}$ 之间。

### 2.2 抗体的纯化

纯化后的抗体经SDS-PAGE电泳(图1), 纯化所制备抗体纯度达90%以上, 测定各株抗体的浓度介于2.5~6.1 mg/ml。

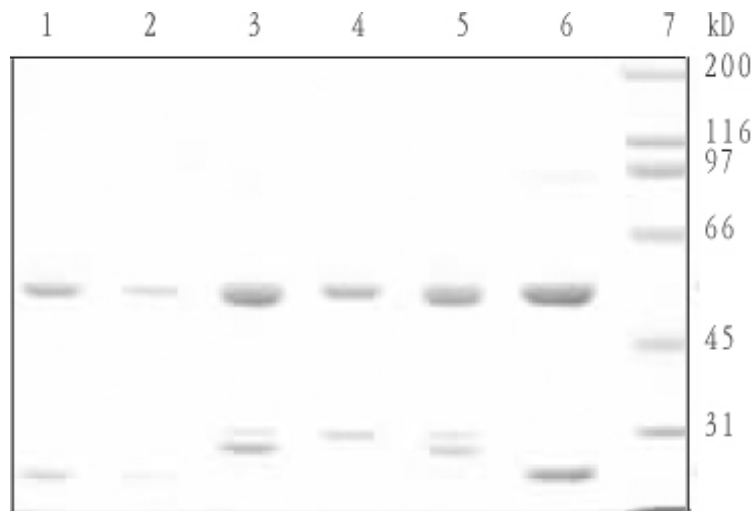


图1单克隆抗体的纯化

Fig.1 Purification of the monoclonal antibodies

Lane 1: 3F6; Lane 2: 3C3; Lane 3: 2B9; Lane 4: 2G2; Lane 5: 5A7; Lane 6: 3F5; Lane 7: Molecular weight marker

### 2.3 抗体的胶体金标记

电镜下观察胶体金颗粒的大小比较均一，颗粒直径40 nm，检测各株抗体胶体金标记后的 $D_{540}$ 的值介于 $106 \sim 137$ 。

### 2.4 配对筛选检测的结果

以2B9、3C3、5A7单抗互相配对组合的模式都能对恶性疟血样做出阳性检测结果(表1)，比较检测结果，发现当以2B9为包被抗体，3C3为金标抗体，检测效果最佳，并且与间日疟血样、刚地弓形虫血样、日本血吸虫血样和正常人血样不发生交叉反应(图2)。

表 1 各株抗体配对组合检测结果

**Tab.1 Result of monoclonal antibody assembly examination**

Gold label	2B9	2G2	3C3	3F5	3F6	5A7
2B9	/	-	+	-	-	+
3C3	+	-	/	-	-	+
5A7	+	-	+	-	-	/
2G2	-	/	-	-	-	-
3F5	-	-	-	/	-	-
3F6	-	-	-	-	/	-

+ : Positive; - : Negative

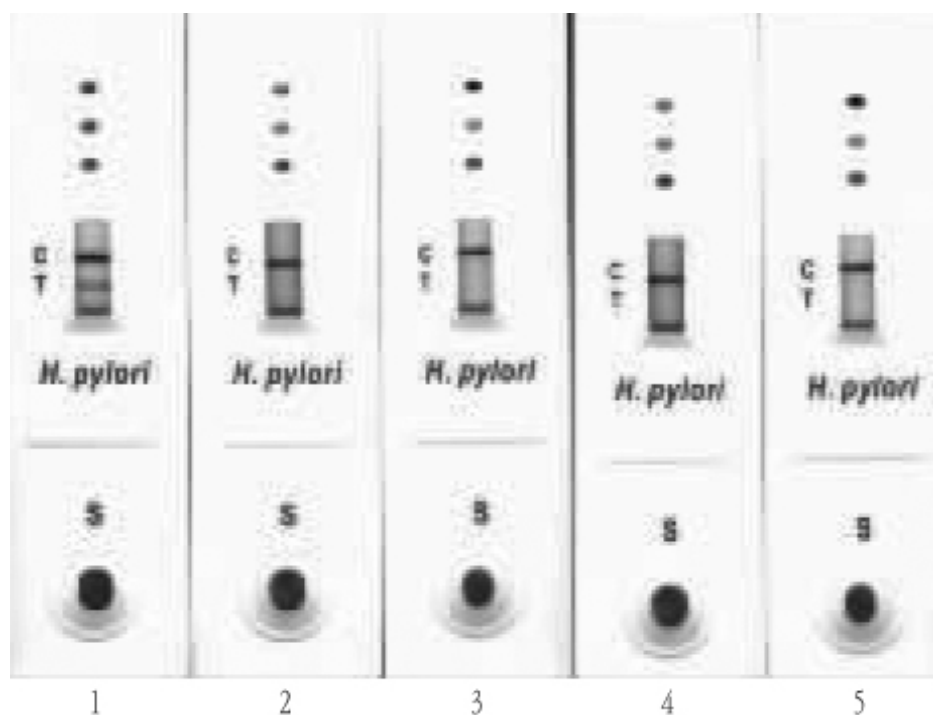


图2 2B9/3C3配对组合检测结果

Fig.2 2B9/3C3 examination result

1: Plasmodium falciparum blood; 2: Plasmodium vivax blood; 3: Toxoplasma gondii blood;  
4: Schistosoma japonicum; 5: Normal human blood

### 2.5 疟疾血样的检测

以2B9为包被抗体、3C3为金标抗体的最佳反应模式对170份血样进行检测，其中恶性疟血样30份，间日疟

血样40份, 正常人血样100份。以镜检法为参照, 检测30份恶性疟原虫血样, 26份为阳性, 4份为阴性; 40份间日疟原虫血样, 3份出现阳性结果, 其余结果都为阴性。正常人血样只有2份出现阳性结果(表2)。我们建立的恶性疟快速免疫反应模式, 以镜检法为标准, 其敏感性为86.66%(26/30), 特异性为96.43%(135/140), 与镜检法的符合率为94.71%(161/170),  $\chi^2$ 表明两者没有显著差异( $P < 0.05$ )。

表 2 G I C A 法检测疟疾的结果

Tab.2 GICA in diagnosis of malaria

Group	n	G I C A	
		Positive	Negative
1	30	26	4
2	40	3	37
3	100	2	98

1: *Plasmodium falciparum* blood; 2: *Plasmodium vivax* blood;  
3: Normal human blood

## 2.6 稳定性的检测

密封保存于铝箔中的试纸条分别于第1、10、30、60、90天取出对标准阳性血样进行检测, 结果均出现阳性反应, 但放置90 d后反应强度稍有降低。

## 3 讨论

近年来发展的以单克隆抗体为基础的免疫层析技术以其操作简便、快速、结果易于判定等特点, 在疟疾的诊断中显示了广阔的应用前景。目前, 国外开发的此类试剂盒主要以捕获恶性疟原虫富组氨酸蛋白-2(HRP-2)和乳酸脱氢酶(LDH)为诊断靶分子, 以恶性疟原虫GDH为诊断靶抗原的研究还未见报道。我们根据恶性疟原虫GDH的一些特性, 认为GDH有望成为疟疾诊断中的新型靶分子。

由于天然的GDH来源有限, 且纯化过程繁琐, 我们采用基因工程技术生产GDH产量高、纯度高, 以之为抗原制备了6株抗GDH单克隆抗体, 亲和力高, 结合胶体金标记技术和免疫层析技术, 建立了胶体金免疫层析方法用于恶性疟的检测, 初步配对筛选发现其中3株两两配对对恶性疟都能做出检测, 而另外3株不能与天然的GDH特异性结合, 这说明基因重组的GDH由于在大肠杆菌表达主要以包涵体的形式存在, 在其变性/复性过程中, 可能其空间构象不能完全恢复到其天然构象, 从而导致部分抗原活性遭到破坏。

发现以2B9为包被抗体, 以3C3为金标抗体的反应模式检测效果较佳。以此反应模式对170份血样进行检测, 以镜检法为参照, 结果显示了较好的敏感性和特异性。尽管我们建立的快速反应模式尚不能完全令人满意, 但只要在反应条件、稳定性及工艺上进一步完善, 极有可能标准化为恶性疟快速诊断试剂盒。这种试剂盒由于在材料及抗原、抗体制备方面降低了成本, 市场价格定位低, 较易为病人接受, 必将有非常大的市场。

致谢: 本文在胶体金免疫层析法的建立过程中, 得到了杭州艾康生物技术有限公司的郭饶、陈明的大力支持和帮助, 在此表示衷心的感谢!

### 参考文献:

- [1] WHO. World malaria situation in 1994. Part I. Population at risk[J]. Wkly Epidemiol Rec, 1997, 72(36): 269-74.
- [2] Quintana M, Piper R, Boling HL, et al. Malaria diagnosis by dipstick assay in a Honduran population with coendemic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*[J]. Am J Trop Med Hyg, 1998, 59(6): 868-871.

[3] Vander-Jagt DL, Intress C, Heidrich JE, et al. Marker enzymes of Plasmodium falciparum and human erythrocytes as indicators of parasite purity[J]. J Parasitol, 1982, 68(6): 1068-1971.

[4] Krauth-Siegel RL, Muller JG, Lottspeich F, et al. Glutathione reductase and glutamate dehydrogenase of Plasmodium falciparum, the causative agent of tropical malaria [J]. Eur J Biochem, 1996, 235(1-2): 345-50.

[5] 李妍, 宁云山, 郝文波, 等. 恶性疟原虫谷氨酸脱氢酶融合蛋白复性及纯化的研究[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(12): 1273-6.

Li Y, Ning YS, Hao WB, et al. Refolding and purification of Plasmodium falciparum glutamate dehydrogenase fusion protein[J]. J First Mil Med Uni/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(12): 1273-6.

[6] Loomans EE, Roelen AJ, van Damme HS, et al. Assessment of the functional affinity constant of monoclonal antibodies using an improved enzyme-linked immunosorbent assay[J]. J Immunol Methods, 1995, 184(2): 207-17.

#### 参考文献:

[1] WHO. World malaria situation in 1994. Part I. Population at risk[J]. Wkly Epidemiol Rec, 1997, 72(36): 269-74.

[2] Quintana M, Piper R, Boling HL, et al. Malaria diagnosis by dipstick assay in a Honduran population with coendemic Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax[J]. Am J Trop Med Hyg, 1998, 59(6):868-871.

[3] Vander-Jagt DL, Intress C, Heidrich JE, et al. Marker enzymes of Plasmodium falciparum and human erythrocytes as indicators of parasite purity[J]. J Parasitol, 1982, 68(6): 1068-1971.

[4] Krauth-Siegel RL, Muller JG, Lottspeich F, et al. Glutathione reductase and glutamate dehydrogenase of Plasmodium falciparum, the causative agent of tropical malaria [J]. Eur J Biochem, 1996, 235(1-2): 345-50.

[5] 李妍, 宁云山, 郝文波, 等. 恶性疟原虫谷氨酸脱氢酶融合蛋白复性及纯化的研究[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(12): 1273-6.

Li Y, Ning YS, Hao WB, et al. Refolding and purification of Plasmodium falciparum glutamate dehydrogenase fusion protein[J]. J First Mil Med Uni/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(12): 1273-6.

[6] Loomans EE, Roelen AJ, van Damme HS, et al. Assessment of the functional affinity constant of monoclonal antibodies using an improved enzyme-linked immunosorbent assay[J]. J Immunol Methods, 1995, 184(2): 207-17.