

文章编号: 1000-7423(2000)-04-0216-04

旋毛虫部分抗原表位的识别与分析*

詹艳爱¹ 严自助² 王文² 吕再翼² 朱振勤¹

(1 华东师范大学生物系, 上海 200062; 2 中国预防医学科学院寄生虫病研究所[△], 上海 200025)

摘要 [目的] 筛选旋毛虫肌幼虫可溶性抗原中具有免疫显性的表位。[方法] 采用杂交瘤技术, 获得 15 株特异性单克隆抗体, 随后用酶联免疫吸附试验 (ELISA)、免疫印迹法 (Western blotting) 和间接免疫荧光试验 (IFA) 对部分免疫显性抗原进行分析。[结果] Western blotting 试验显示, 6 株单抗与旋毛虫肌幼虫可溶性抗原反应显示有特异条带, 分子量为 40~70 kDa; 而多抗血清则可识别 20~200 kDa 之间 10 条条带。IFA 可观察到, 6 株单抗中有 4 株单抗的靶抗原定位在旋毛虫肌幼虫表皮层上, 另 2 株定位于杆状体 (stichosome) 及表皮层。[结论] 识别与分析部分旋毛虫肌幼虫可溶性抗原中具有免疫显性的表位, 为纯化旋毛虫的抗原及疫苗靶抗原的研制提供了有价值的实验依据。

关键词: 旋毛虫, 表位, 单克隆抗体, 免疫印迹法, 免疫荧光

中图分类号: R383.15

文献标识码: A

旋毛线虫 (*Trichinella spiralis*) 简称旋毛虫, 可感染人及 150 多种动物, 引起严重的人畜共患寄生虫病^[1]。在旋毛虫病的免疫学检测中, 主要应用肌幼虫抗原、成虫抗原、新生幼虫抗原或排泄分泌抗原。其中应用最多的是肌幼虫抗原和排泄分泌抗原。肌幼虫抗原比排泄分泌抗原更易获得, 花费少, 产量高, 而且利用肌幼虫抗原的间接 ELISA 可用于旋毛虫病的早期诊断^[2]。近年来, 不少实验室用单克隆抗体及多克隆抗体对不同发育阶段旋毛虫 (感染期幼虫, 成虫或新生幼虫) 抗原进行研究, 以期找出免疫显性的表位^[3~5]。如果能获得与旋毛虫病患者血清反应的特异性抗原成分, 将大大提高肌幼虫抗原用于免疫诊断的特异性和敏感性, 并用以发展新的免疫诊断试验。本文采用杂交瘤技术制备单克隆抗体, 用 ELISA、Western blotting 及 IFA 等技术识别我国河南旋毛虫肌幼虫抗原中具有免疫显性的表位。以期改进诊断试剂及疫苗的研究和制备提供依据。

材料与方 法

1 试验血清

患者血清采自河南省旋毛虫病暴发流行区普查旋毛病患者, 由中国预防医学科学院寄生虫病研究所常正山研究员提供。健康人血清为上海大学学生体检血样。免疫前对 BALB/c 小鼠尾静脉采血, 获得正常鼠血清; 免疫后, 于小鼠眼底静脉采血, 获得免疫血清; 昆明系鼠经口灌服活的旋毛虫肌幼虫, 剂量为 (200 ± 10) 条/只, 3 个月后颈动脉放血获得感染鼠血清。所获血清储于 -20℃ 冰箱备

用。

2 抗原提取

旋毛虫 (由常正山研究员提供) 在小鼠中保种传代, 感染旋毛虫的小鼠肌肉用人工消化液 (2% 胃蛋白酶-0.7% HCl) 于 37℃ 消化 14 h, 生理盐水沉淀, 洗涤 3 次, 玻璃研磨器研磨, 超声, 7 000 g 离心 1 h, 去渣。上清液即为旋毛虫肌幼虫可溶性抗原, 置于 -20℃ 待用。蛋白含量用 Lowry 方法测得, 浓度为 0.8~1.2 mg/ml。

3 单克隆抗体的制备

可溶性旋毛虫肌幼虫抗原免疫的 BALB/c 小鼠脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞按常规法融合。经过 ELISA 筛选和 3 次克隆后, 将分泌特异 McAb 的杂交瘤细胞注入 BALB/c 小鼠腹腔获得高浓度单抗的腹水。单抗亚类的鉴定采用琼脂双向扩散法。

4 间接免疫荧光试验 (IFA)

制备旋毛虫肌幼虫组织冰冻切片, -20℃ 保存。单抗以 PBS 稀释为 1:100, 滴加在抗原片上置 37℃ 1 h, 经 PBS 洗涤 3 次后, 用荧光素标记的羊抗鼠 IgG (Rantan, NJ08869) 37℃ 孵育 30 min, 洗涤 3 次, 吹干后甘油封片。荧光显微镜下观察。同时设 SP2/0 培养清液为参考阴性对照, 1:50 感染鼠血清为参考阳性对照。

5 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)

采用 3% 浓缩胶, 12.5% 分离胶及标准分子量 (Bio-Rad, Richmond, CA94804, USA), 待检样品

* 卫生部科学基金会资助项目 (96-1-076)

** 世界卫生组织疟疾、血吸虫病和丝虫病合作中心

与等量电泳样品缓冲液混合, 于 100℃ 水浴 4 min, 电泳电压为 80~100 V, 电流为 30 mA。电泳毕, 胶片以 0.25% 考马斯亮蓝染色。

6 免疫印迹法 (Western blotting)

将未染色 SDS-PAGE 凝胶中抗原电转移至硝酸纤维素膜 (NC 膜 0.45 μm), 缓冲液为含 20% 甲醇的 Tris 甘氨酸缓冲液。NC 膜以 5% 脱脂奶粉 PBS 封闭, 加 1:500 稀释的单抗腹水或多抗血清, 孵育后再与过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG (Bio-Rad 产品) 作用, 加 DAB (二氨基联苯胺, Sigma 产品) H₂O₂ 底物染色, 置蒸馏水中终止反应。

结 果

1 单克隆抗体的制备及鉴定

在滴入融合细胞的 2 块板共 192 孔中, 167 孔有杂交瘤细胞生长, 融合率为 87%。用 ELISA 检测 3 次, 其中 25 孔的上清液具有抗旋毛虫肌幼虫可溶性抗原的抗体活性, 抗体阳性率为 15%。选上清液中含抗体滴度高的 5 孔杂交瘤细胞进行 3 次克隆, 筛选细胞生长好, 抗体滴度高的阳性杂交细胞注入小鼠腹腔, 获得 15 株分泌抗旋毛虫肌幼虫可溶性抗原的单克隆抗体腹水。用 ELISA 法检测 15 株腹水, 其抗体滴度为 1:100~1:1 600。15 株单抗免疫球蛋白型除 3 株为 IgM, 其余均属 IgG1 亚类。(表 1)。

2 旋毛虫肌幼虫可溶性抗原组分及免疫显性表位分析

旋毛虫肌幼虫可溶性抗原成分复杂, 至少含 30 种成分, 分子量在 10~200 kDa 之间, 其中主要条带分子量为 110、94、76、69、68、59、57、55、46、45、38、37、32、28 和 25 kDa (图 1)。在免疫印迹中, 6 株单抗能识别 NC 膜上数种抗原表位, 见表 1。感染鼠、免疫鼠和旋毛虫病患者血清, 分别能识别 10 条条带, 分子量介于 20~200 kDa 之间 (图 2)。正常鼠血清与 NC 膜上旋毛虫肌幼虫抗原无反应。

3 单抗靶抗原的定位

参考阴性对照在荧光显微镜下未见明显的绿色荧光。感染鼠血清的靶抗原定位于整个旋毛虫肌幼虫横切面上, 无论在表皮层或虫体内部均显示很强的亮绿色荧光。按照荧光定位的不同, 单抗可分为 2 组, 其中与单抗 4A3C4、2E5B2、2G7E3 和 3F3B5 孵育的抗原片上, 在旋毛虫的表皮层, 可见一层较强的绿色荧光, 表明这组单抗的靶抗原表位在旋毛虫肌幼虫的表皮层。与单抗 1B6D2 和 3E2C5 反应的切片, 在幼虫横切面的表皮层及内部杆状体上均有显著的荧光显现, 表明这组单抗靶抗原定位在幼虫表皮层及杆状体 (表 1, 图 3)。

表 1 15 株单克隆抗体的特性
Table 1 Characterization of fifteen McAbs

编号 Number	单抗名称 McAb designation	免疫球 蛋白亚类 Isotype	抗体 滴度 Antibody titer	ELISA OD* (492 nm)	靶抗原定位 Localization of target antigen	靶抗原表位分子量 Target antigen epitope (kDa)
1	4A3C4	IgM	800	1.23	表皮层 Cuticle surface	55 57 59 68 69
2	2E5D3	IgG1	1 600	1.51	-	-
3	1B6D2	IgG1	1 600	1.40	表皮层、杆状体 Cuticle surface, stichoso	38
4	2E5B2	IgG1	800	1.07	表皮层 Cuticle surface	45 46
5	4B2A5	IgG1	100	0.87	-	-
6	3E2C5	IgG1	800	1.15	表皮层、杆状体 Cuticle surface, stichoso	55 57 59 68 69 76
7	2G7E3	IgG1	1 600	1.29	表皮层 Cuticle surface	55 57 59 68
8	1D2G3	IgG1	400	0.98	-	-
9	1B7A6	IgG1	400	1.05	-	-
10	3F3B5	IgG1	1 600	1.68	表皮层 Cuticle surface	55 57 59 68 69 76
11	2F8A1	IgG1	800	1.62	-	-
12	3F6C5	IgG1	400	1.10	-	-
13	4A3D7	IgM	200	0.95	-	-
14	5A7G2	IgG1	800	1.21	-	-
15	5D2E5	IgM	400	0.98	-	-

* 3 次 ELISA 测定的 OD 值的均数 * The means of OD₄₉₂ values in ELISA from three independent assays

讨 论

宿主感染旋毛虫后, 可获得抵抗再感染的能

力^[6]。Mackenzie 等^[7]对巴西日本圆线虫及旋毛虫的研究提示线虫体表具免疫学特征, 提示了研究这

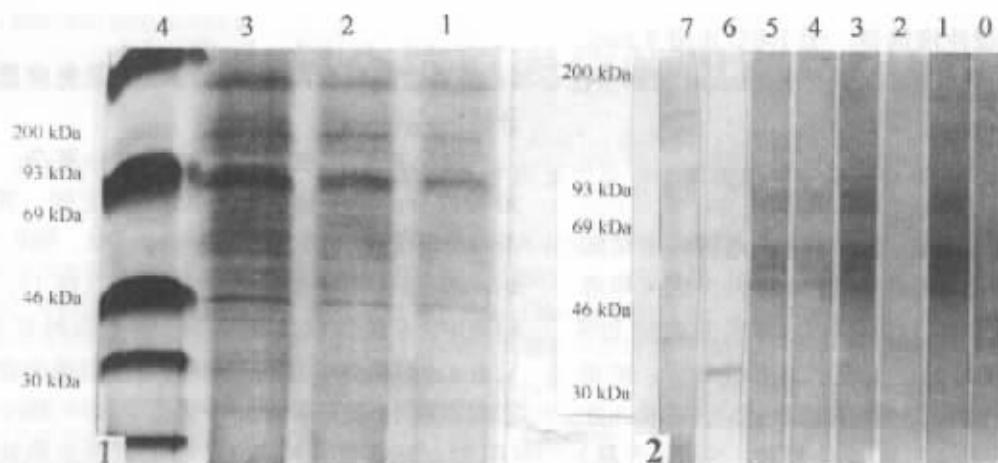


图1 旋毛虫肌幼虫可溶性抗原 12.5% SDS-PAGE 图谱 (1 Marker 2 抗原蛋白浓度为 1.2 mg/ml 3 抗原蛋白浓度为 0.6 mg/ml 4 抗原蛋白浓度为 0.3 mg/ml) 图2 多抗及 6 株单抗与肌幼虫可溶性抗原的免疫印迹反应

Fig.1 12.5% SDS-PAGE electrophoresis profile of *T. s.* muscle larva soluble antigens Fig. 2 Western blotting of *T. s.* muscle larva antigens reacted with 6 McAbs and polyclonal antibodies (0, 7: 感染鼠血清; 1: 3F3B5; 2: 2E5B2; 3: 3E2C5; 4: 2G7E3; 5: 4A3C4; 6: 1B6T2)

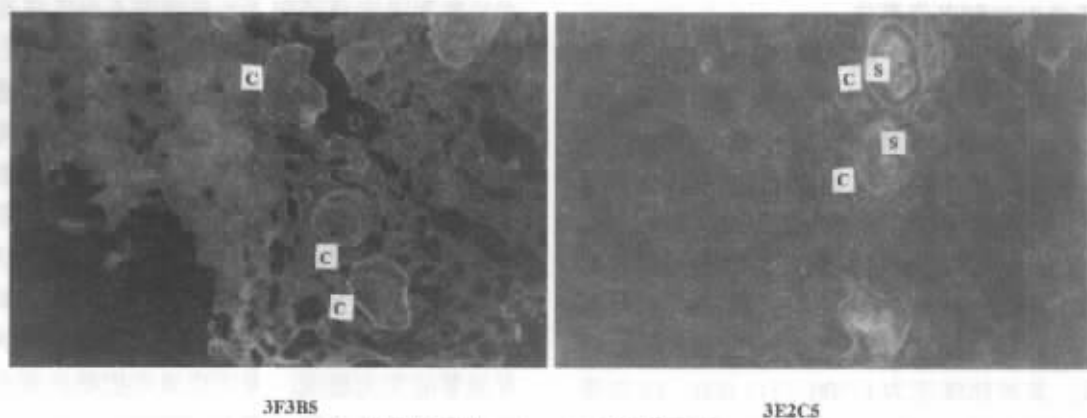


图3 3F3B5 与 3E2C5 两株单抗与旋毛虫肌幼虫冰冻切片反应的免疫荧光定位 300 ×

Fig.3 Immunofluorescence localization of reactivity of 2 McAbs with *T. s.* muscle larva frozen section 300 ×

些旋毛虫抗原的重要性及其在疫苗研究中的广阔前景。本研究以旋毛虫肌幼虫可溶性抗原免疫 BALB/c 小鼠, 通过杂交瘤技术获得 15 株单克隆抗体, 其中 3 株属 IgM, 12 株属 IgG1 亚类。Western blotting 结果表明, 15 株单抗中有 6 株与 *T. s.* 肌幼虫可溶性抗原表位发生特异性反应。单抗 3F3B5 与 3E2C5 幼虫抗原反应的条带各有 6 条, 分子量分别为 55、57、59、68、69 及 76 kDa; 单抗 4A3C4 识别肌幼虫抗原中分子量为 55、57、59、68 及 69 kDa 之条带; 单抗 2G7E3 识别分子量为 58、57、59 及 68 kDa 之条带; 单抗 1B6D2 识别分子量为 38 kDa 之条带; 单抗 2E5B2 识别分子量为 45 及 46 kDa 之条带。而感染鼠、免疫鼠和旋毛虫病患者血清与 *T. s.* 肌幼虫可溶性抗原表位反应的条带多达 10 多条, 分子量从 20~200 kDa 不等。由此可见, 单抗的特异性明显高于多抗血清。这种特异性提示了单抗在旋毛虫病免疫诊断中的应用前景。

本文在制备单抗时(免疫及抗体筛选)采用了混合抗原, 包括蛋白质、多糖及糖蛋白抗原, 因而单抗的靶抗原可能为蛋白质、多糖或糖蛋白。但 SDS-PAGE 及 Western blotting 分析免疫表位时只能识别蛋白质抗原分子, 因此 15 株单抗中仅有 6 株与抗原表位产生特异性反应。此外 1 种单抗虽然只能识别 1 个表位, 但不同的抗原分子常可有共同的表位, 表现为有的单抗与抗原反应的条带仅为 1 条, 有的确多达 6 条。用 6 株特异 McAbs 为探针, 应用间接免疫荧光技术, 观察到 4 株单抗的靶抗原位于旋毛虫肌幼虫的表皮层, 2 株单抗的靶抗原位于表皮层和杆状体。此结果与 McLaren 等^[8]制备的抗感染期幼虫 McAbs NIM-M1 和 NIM-M2, Kehayov 等^[1]制备的单抗 Ts3G6 和 Boirean 观察到单抗 La8、La4b10 和 Gamble 等^[9]以抗旋毛虫虫种及其特异的 McAb7C2C5 对幼虫抗原定位的结果一致或相似。但识别的靶抗原表位分子量有所不同, 这可能与制

备的单克隆抗体及实验所用具体条件有所不同有关。根据单抗定位及识别的靶抗原分析, 本次研究中获得的6株单抗的靶抗原基本属于T_sL-1类^[3, 10]。T_sL-1抗原是旋毛虫肌幼虫特有的, 来源于旋毛虫肌幼虫杆状体, 在旋毛虫肌幼虫的表皮和排泄分泌物中含量均很丰富, 具有很强的生化免疫原性。若以这些单抗来分离旋毛虫肌幼虫T_sL-1抗原, 作为ELISA包被抗原, 将有助于提高ELISA的敏感性和特异性。

本研究观察到4株单抗的靶抗原位于旋毛虫肌幼虫的表皮层。有人用不同单抗识别表皮层中具免疫原性的结构复合物, 发现在表皮层的外层中, 至少含有7种抗原结构^[10]。这些抗原能诱导特异的体液或细胞介导的免疫反应^[9], 是宿主产生保护性免疫的靶抗原。所以表皮层是寄生虫-宿主免疫应答相互作用的重要部位。Ortega-Pierres等^[11]用旋毛虫不同发育期虫体特异的McAb检测旋毛虫抗原分子量和定位抗原, 结果发现可诱导免疫反应的抗原是暴露于虫体表面的抗原决定簇。80年代以来, 利用抗幼虫McAb纯化幼虫排泄分泌物, Silberstein等^[12, 13]获得了分子量为48、50和55 kDa以及49和53 kDa靶抗原组分。这些靶抗原组分均能诱导保护性免疫反应。由此可见, 本研究获得的与6株McAbs结合的旋毛虫肌幼虫抗原特定部位, 可能是寄生虫-宿主相互作用部位及功能性抗原来源的组织结构处。利用这些特异性单克隆抗体, 纯化旋毛虫肌幼虫中特异性靶抗原组分, 可用于诱导保护性

免疫反应, 增强抵抗再感染的能力。据此推测, 这种纯化抗原可作为未来制备抗原疫苗的一种候选分子。

参 考 文 献

- [1] 赵慧先. 人体寄生虫学. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 1994: 687.
- [2] Morakote N, Khamboonruang C, Siriprasert V, et al. The value of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for diagnosis of human trichinosis. *Trop Med Parasitol*, 1991, 42: 172.
- [3] Appleton JA, Bell rg, Homan W, et al. Consensus on *Trichinella spiralis* antigens and antibodies. *Parasitol Today*, 1991, 7: 190.
- [4] Ortega-Pierres G, Yopez-mulia L, Homan w, et al. Workshop on a detailed characterization of *Trichinella spiralis* antigen: a platform for future studies on antigens and antibodies to this parasite. *Parasite Immunol*, 1996, 18: 273.
- [5] Kehayov IR, Kyurkchiv SD, Tankov CV, et al. *Trichinella spiralis*: a 76 kDa excretory/secretory larval antigen identified by monoclonal antibody. *Exp Parasitol*, 1991, 73: 150.
- [6] Despommier DD. Immunity to *Trichinella spiralis*. *Am J Trop Med Hyg*, 1977, 26(6): 68~75.
- [7] Mackenzie CD, Preston FM, Ogilvie EM. Immunological properties of the surface of parasitic nematodes. *Nature*, 1978, 276: 826~828.
- [8] McLaren DJ, Ortega-Pierres G, Parkhouse RME. *Trichinella spiralis*: Immunocytochemical localization of surface and intracellular antigens using monoclonal antibody probes. *Parasitology*, 1987, 94: 101~114.
- [9] Durham CP, Murrell KD, Lee CM. *Trichinella spiralis*: Immunization of rats with an antigen fraction enriched for allergenicity. *Exp Parasitology*, 1984, 57: 297~306.
- [10] Boireau M, Vaysrier JF, Fabien C, et al. Characterization of eleven antigenic groups in *Trichinella* genus and identification of stage and species markers. *Parasitology*, 1997, 115: 641.
- [11] Ortega-pierres G, Chayen A, et al. The occurrence of antibodies to hidden and exposed determinants of surface antigens of *Trichinella spiralis*. *Parasitology*, 194, 88: 359.
- [12] Silberstein DS, Despommier DD. Antigens from *Trichinella spiralis* that induce a protective response in the mouse. *J Immunol*, 1984, 132: 898.
- [13] Silberstein DS, Despommier DD. Effects of *Trichinella spiralis* on host responses to purified antigens. *Science*, 1985, 27: 948.

收稿日期: 1999-08-08

(编辑: 李雅卿)

LOCALIZATION AND CHARACTERIZATION OF PARTIAL IMMUNODOMINANT ANTIGEN EPITOPES OF *TRICHINELLA SPIRALIS* *

ZHAN Yan'-ai¹, YAN Zi-zhu², WAN Wen², LU Zai-ying², ZHU Zhen-qin¹

(1 Department of Biology East China Normal University, Shanghai 200062;

2 Institute of Parasitic Diseases, Chinese Academy of Preventive Medicine, Shanghai 200025)

Abstract [Objective] To screen and characterize immunodominant antigen epitopes on the soluble antigens of *Trichinella spiralis* (*T. s.*). [Methods] 15 monoclonal antibodies (McAbs) against *T. s.* muscle larva (ML) soluble antigens were obtained by using hybridoma technique. The reactivity of monoclonal and polyclonal antibodies were tested by ELISA, Western blotting and indirect immunofluorescence assay (IFA). [Results] The Western blotting result showed that of the 15 McAbs, 6 could bind to the *T. s.* ML antigens displaying molecular weights of 40~70 kDa. Polyclonal sera could react with more than 10 bands having molecular weights of 20~200 kDa. Among the 6 McAbs, 4 could recognize epitopes on the cuticle surface and the other two could recognize epitopes on both the cuticle surface and the stichosome. [Conclusion] The antigen epitopes of *T. s.* recognized by 6 McAbs had been characterized.

Key Words: *Trichinella spiralis*, epitope, monoclonal antibody, Western blotting, immunofluorescence

* Supported by the Scientific Research Funds of the Ministry of Health of China (96-1-076)

** WHO Collaborating for Malaria, Schistosomiasis and Filariasis