

文章编号: 1000-7423(2011)-01-0021-04

【论著】

rSj26-Sj32 融合蛋白 Dot-ELISA 检测慢性日本血吸虫病患者血清 IgG

蔡世飞, 李文桂*, 王敏

【摘要】 目的 探讨 rSj26-Sj32 融合蛋白对慢性日本血吸虫患者的诊断价值。方法 分别用 rSj26-Sj32 融合蛋白和日本血吸虫成虫抗原(SjAWA)作为包被抗原, 采用 Dot-ELISA 检测慢性日本血吸虫病患者(40 例)血清 IgG, 同时以华支睾吸虫病(21 例)、卫氏并殖吸虫病(13 例)、泡型棘球蚴病(10 例)、囊型棘球蚴病(9 例)、乙型肝炎(20 例)和肺结核患者(20 例)及健康人(43 例)血清作为对照。结果 rSj26-Sj32 融合蛋白检测慢性日本血吸虫患者的敏感性和特异性分别为 92.5% (37/40)和 94.9% (129/136); SjAWA 的为 95.0% (38/40)和 91.9% (125/136), 两种抗原检测率间的差异无统计学意义 ($P>0.05$)。两种方法与华支睾吸虫病、卫氏并殖吸虫病和泡型棘球蚴病患者血清均有不同程度的交叉反应; 但与囊型棘球蚴病、乙型肝炎和肺结核患者血清均无交叉反应。rSj26-Sj32 融合蛋白诊断慢性日本血吸虫病的阳性预测值、阴性预测值及诊断效率分别为 84.1%(37/44)、97.7%(129/132)和 94.3%(166/176), SjAWA 的为 77.6%(38/49)、98.4%(125/127)和 92.6%(163/176)。两种方法检测率间的差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 rSj26-Sj32 融合蛋白可替代 SjAWA, 用于慢性日本血吸虫病的免疫诊断。

【关键词】 rSj26-Sj32 融合蛋白; Dot-ELISA; 日本血吸虫成虫抗原; 免疫诊断

中图分类号: R383.24

文献标识码: A

Detection of specific IgG in the Sera of Patients with Chronic Schistosomiasis Japonica by Dot-ELISA with the Recombinant Sj26-Sj32 Fusion Protein

CAI Shi-fei, LI Wen-gui*, WANG Min

(Institute of Infectious and Parasitic Diseases, The First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

【Abstract】 Objective To study the diagnostic value of the Dot ELISA with rSj26-Sj32 fusion protein for chronic schistosomiasis japonica. Methods rSj26-Sj32 fusion protein and SjAWA were used to establish the HRP-IgG-Dot-ELISA. Serum samples from patients with chronic schistosomiasis japonica(40 cases), clonorchiasis sinensis(21 cases), paragonimiasis westermani(13 cases), alveolar echinococcosis(10 cases), cystic echinococcosis(9 cases), hepatitis B(20 cases), pulmonary tuberculosis (20 cases) and healthy persons (43 cases) were examined. Results Sensitivity and specificity were respectively 92.5% (37/40) and 95.4% (129/136) for rSj26-Sj32-Dot-ELISA and 95.0% (38/40) and 93.0% (40/43) for SjAWA-Dot-ELISA, and there was no significant difference between two antigens ($P>0.05$). There were different cross reactions to the sera of patients with clonorchiasis sinensis, paragonimiasis westermani or alveolar echinococcosis, but no cross reaction to the sera of patients with cystic echinococcosis, hepatitis B or pulmonary tuberculosis. The positive and negative predictive value and efficiency of diagnosis of rSj26-Sj32-Dot-ELISA for chronic schistosomiasis japonica were 84.1%(37/44), 97.7%(129/132), and 94.3%(166/176), respectively, and those of SjAWA-Dot-ELISA were 77.6%(38/49), 98.4%(125/127), and 92.6%(163/176), respectively. There was no significant difference between the two methods ($P>0.05$). Conclusion rSj26-Sj32 fusion protein can be applied to immunodiagnosis for chronic schistosomiasis japonica.

【Key words】 rSj26-Sj32 fusion protein; Dot-ELISA; SjAWA; Immunodiagnosis

Supported by the Specific Fund of Endemic Diseases of Chongqing (No. 2008AB5055, 2008AA5008 and 2008AB5054)

* Corresponding author, E-mail: Li_wengui@yahoo.com.cn

基金项目: 重庆市科委地方病重大专项基金 (No. 2008AB5055, 2008-AB5008, 2008AB5054)

作者单位: 重庆医科大学附属第一医院传染病寄生虫病研究所, 重庆 400016

* 通讯作者, E-mail: Li_wengui@yahoo.com.cn

日本血吸虫病是一种严重危害人类健康的人兽共患寄生虫病。至 2008 年底我国现症患者 41.29 万人, 病牛 1.97 万头, 钉螺面积 37.23 亿平方米, 受威胁人口 3 000 万以上^[1]。日本血吸虫病目前多以病原学和

免疫学检验为诊断依据。Dot-ELISA 是在 ELISA 的基础上建立起来的, 具有反应结果直观、快速、敏感、准确、简便、清晰和试剂稳定等优点, 因此适合于日本血吸虫病现场研究, 具有推广应用价值。沈定文等^[2]利用 Dot-ELISA 检测急性日本血吸虫病患者血清特异性 IgG 抗体, 发现 Dot-ELISA 和常规 ELISA 的阳性率分别为 94.0% 和 97.4%, 两种方法检测结果的阳性符合率均为 92.7%, 但 Dot-ELISA 操作简便, 对诊断有一定的参考价值。融合蛋白(fusion protein)是通过基因工程技术将编码两种或多种蛋白质的目的基因采用不同接头连接成为融合基因, 再与载体连接, 导入受体菌种进行表达, 从而获得融合蛋白。采用融合蛋白进行免疫学诊断可提高血清学方法的特异性, 且易于标准化。本研究利用纯化的 rSj26-Sj32 融合蛋白作为包被抗原, 建立 Dot-ELISA 检测慢性日本血吸虫病患者血清中 IgG 抗体水平, 以探讨其诊断价值。

材料与方 法

1 材 料

1.1 血清来源 慢性日本血吸虫病患者血清由武汉市疾病预防控制中心周水茂老师惠赠, 健康人血清由本院检验科罗亚老师惠赠。其他血清由本室保存。

1.2 主要试剂和仪器 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)、丙烯酰胺、N,N-亚甲基丙烯酰胺、R250 考马斯亮兰、过硫酸胺、四氨基联苯胺(TMB)、蛋白质标志物和 N,N,N',N'-四甲基乙二胺(TEMED)均购自上海生工生物工程技术有限公司, 硝酸纤维素(NC)膜和辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗人 IgG 购自美国 SBA 公司, rBL21(pET32 α -Sj26-Sj32)由本室保存。酶标仪(ELx 800)为英国 Bio-Tek 公司产品, 凝胶成像仪(Gel Doc 1000 T2A)为美国 Bio Rad 公司产品。

1.3 Dot-ELISA 测定装置 参照丁建祖等^[3]报道的方法进行制作。垫料上放置硝酸纤维素膜(NC 膜)一片, 硝酸纤维素膜为 1.0 cm \times 1.5 cm, 在 PBS(pH 7.4)中浸泡 30 min, 待其干燥后装入测定装置。

2 方 法

2.1 重组质粒 pET32 α -Sj26GST-Sj32 在大肠埃希菌 BL21(DE3)中的诱导表达 经鉴定含有重组质粒 pET-32 α -Sj26GST-Sj32 的大肠埃希菌 BL21(DE3)在 LB 培养基(含 0.05 g/L 氨苄青霉素)中 37 $^{\circ}$ C 250 r/min 振荡培养至吸光度(A_{600} 值)为 0.5~0.8 时, 取 6 ml 作为未诱导对照, 其余加入终浓度 1 mmol/L 的 IPTG 于 37 $^{\circ}$ C 诱导表达, 分别在诱导 1、3、5、7、9、11 和 13 h

后, 各收集 1 ml 菌液。

2.2 重组蛋白 rSj26-Sj32 的纯化 PBS 重悬上述菌液, 超声粉碎, 4 000 \times g 离心 10 min, 用 pET 表达载体携带的聚组氨酸(His-tag)标签, 镍 NTA 琼脂糖凝胶(Ni-NTA)试剂盒纯化, 测定其蛋白浓度, 用双蒸水稀释至 0.1 μ g/ μ l。分别取不同培养时间诱导表达的重组蛋白 20 μ l 进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE), 凝胶成像仪成像, 图像分析系统进行分析。

2.3 日本血吸虫成虫粗抗原制备 日本血吸虫成虫粗抗原(AWA)的制备按赵巍等^[4]的方法进行。测定蛋白浓度为 2.01 mg/ml, 用双蒸水稀释至 1 μ g/ μ l。

2.4 最佳 rSj26-Sj32 和 SjAWA 抗原包被浓度和血清稀释度的确定 在进行 Dot-ELISA 前, 先进行 ELISA 试验。rSj26-Sj32 融合蛋白按 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8 和 1.0 μ g/孔进行包被(抗原包被液 200 μ l/孔), SjAWA 按 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0、2.2 和 2.4 μ g/孔包被; 血清按 1:100、1:200、1:400 和 1:800 稀释; 羊抗人 HRP-IgG 的工作浓度为 1:500; 以四氨基联苯胺作为底物检测 10 份日本血吸虫病患者混合血清(阳性参照)和 10 份健康人混合血清(阴性参照)的 A_{450} 值, 以阳性参照/阴性参照的 A_{450} 值之比最大、PBS 对照本底最低时, 为最适条件。将 10 份日本血吸虫病患者混合血清和 10 份健康人混合血清分别以 1:50、1:100、1:200、1:400 和 1:800 稀释度进行预实验, 以阳性参照血清吸光度 A_{450} 值与阴性参照血清 A_{450} 值的比值(S/N)最大时的稀释度为最佳稀释度。

2.5 rSj26-Sj32 和 SjAWA-HRP-IgG-Dot-ELISA 检测 40 例慢性日本血吸虫病患者(粪检阳性确诊)、21 例华支睾吸虫病患者(粪检阳性确诊)、13 例卫氏并殖吸虫病患者(粪检阳性确诊)、10 例泡型棘球蚴病患者(B超结合临床症状确诊)、9 例囊型棘球蚴病患者(B超结合临床症状确诊)、20 例乙型肝炎患者(检测乙肝五项确诊)、20 例肺结核患者(痰涂片阳性确诊)和 43 份健康人血清。在 NC 膜中央点滴加 rSj26-Sj32 融合蛋白 4 μ l(0.1 μ g/ μ l)或 SjAWA 2 μ l(1 μ g/ μ l), 室温干燥; 加入封闭液 200 μ l, 室温干燥; 再加入 1:50 稀释血清 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h; 加入 1:500 稀释 HRP-GAH-IgG 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min; 再加底物液 50 μ l, 37 $^{\circ}$ C 孵育 20 min, 加双蒸水 100 μ l 终止反应。5 min 内肉眼观察结果, 若 NC 膜上出现棕黄色斑点即为阳性, 否则为阴性。

计算两种抗原的阳性预测值、阴性预测值和诊断效率, 公式为: 阳性预测值=阳性患者数/总阳性数;

阴性预测值=真阴性患者数/总阴性数；诊断效率=(阳性患者数+阴性人数)/检测总人数。

3 统计学分析

用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。敏感性、特异性、交叉反应之间的比较采用 χ^2 检验，阳性预测值、阴性预测值及诊断效率的比较按照文献[5]进行。

结 果

1 rSj26-Sj32 融合蛋白纯化的 SDS-PAGE 分析

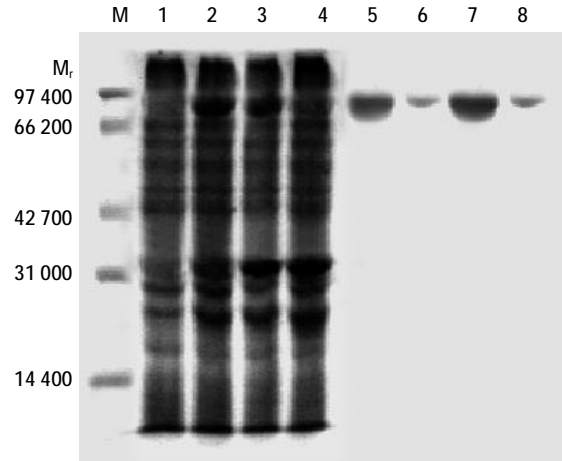
含有重组质粒 pET32 α -Sj26GST-Sj32 的大肠埃希菌 BL21(DE3)培养至对数生长期，经 IPTG 诱导 5 h 后表达产物用 Ni-NTA 纯化试剂盒进行纯化，进行 SDS-PAGE 电泳，纯化的 rSj26GST-Sj32 在相对分子质量约为 M_r 82 000 处有明显的蛋白表达条带，与预期值相符(图 1)。

2 最佳 rSj26-Sj32 和 SjAWA 包被浓度及血清稀释度的确定

ELISA 检测结果显示，rSj26-Sj32 和 SjAWA 的包板浓度分别为 0.4 $\mu\text{g}/\text{孔}$ 和 2 $\mu\text{g}/\text{孔}$ 时，两者的阳参/阴参的 A_{450} 值之比最大。血清稀释度为 1:50 时，其 S/N 值最大。因此，rSj26-Sj32、SjAWA 的最佳包板浓度分别为 0.4 $\mu\text{g}/\text{孔}$ 和 2 $\mu\text{g}/\text{孔}$ ，血清稀释度为 1:50。

3 Dot-ELISA 的结果

rSj26-Sj32 融合蛋白检测慢性日本血吸虫病患者的敏感性和特异性分别为 92.5%(37/40)和 94.9%(129/136)；SjAWA 检测慢性日本血吸虫病患者的敏感性和特异



M: 蛋白质标志物；1~4：1 mmol/L IPTG 分别诱导 1、3、5 和 7 h 的 BL21 (pET32 α -Sj26-Sj32)；5~8：纯化的 rSj26GST-Sj32 蛋白。

M: Protein marker; 1-4: BL21 (pET32 α -Sj26GST-Sj32) induced with 1 mmol/L IPTG for 1, 3, 5 and 7 h, respectively; 5-8: Purified rSj26GST-Sj32 protein.

图 1 重组 Sj26GST-Sj32 蛋白纯化的 SDS-PAGE 分析

Fig.1 SDS-PAGE analysis of the purified rSj26GST-Sj32 protein

性分别为 95.0%(38/40)和 91.9%(125/136)，两种抗原的检测率间的差异无统计学意义 ($P>0.05$)。两种抗原检测与华支睾吸虫病、卫氏并殖吸虫病和泡型棘球蚴病患者血清均有不同程度的交叉反应；但与囊型棘球蚴病、乙型肝炎和肺结核患者血清均无交叉反应(表 1)。

4 阳性预测值、阴性预测值及诊断效率

rSj26-Sj32 融合蛋白诊断慢性日本血吸虫病的阳性预测值、阴性预测值和诊断效率分别为 84.1%(37/44)、97.7%(129/132)和 94.3%(166/176)；SjAWA 诊断慢性日本血吸虫病的阳性预测值、阴性预测值和诊断效

表 1 rSj26-Sj32-HRP-IgG-Dot-ELISA 用于慢性日本血吸虫病诊断价值

Table 1 Diagnostic value of rSj26-Sj32-HRP-IgG-Dot-ELISA for chronic schistosomiasis japonica

检测病例 Cases	例数 No. cases	rSj26-Sj32-HRP-IgG-Dot-ELISA		SjAWA-HRP-IgG-Dot-ELISA	
		阳性数 No. positive	阳性率(%) Positive rate	阳性数 No. positive	阳性率(%) Positive rate
慢性日本血吸虫病患者 Patients with chronic schistosomiasis japonica	40	37	92.5	38	95.0
华支睾吸虫病患者 Patients with clonochiasis sinensis	21	2	2/21	3	2/21
卫氏并殖吸虫病患者 Patients with paragonimiasis westermani	13	2	2/13	3	2/13
泡型棘球蚴病患者 Patients with alveolar echinococcosis	10	1	1/10	2	2/10
囊型棘球蚴病患者 Patients with cystic echinococcosis	9	0	0	0	0
乙型肝炎患者 Patients with hepatitis B	20	0	0	0	0
肺结核患者 Patients with pulmonary tuberculosis	20	0	0	0	0
健康人 Healthy persons	43	2	4.6	3	7.0

率分别为 77.6% (38/49)、98.4% (125/127) 和 92.6% (163/176)。两种方法检测效率间的差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

讨 论

Ni-NTA 中 Ni^{2+} 有 4 个共价键与 NTA 结合, 这种强结合力使得 Ni-NTA 比起其他产品如 Ni-IDA 更牢固, Ni^{2+} 脱落率较低, 提高蛋白纯度并减少 Ni^{2+} 脱落造成的环境污染。故本研究利用 Ni-NTA 纯化试剂盒对表达产物进行纯化, 纯化后的 rSj26GST-Sj32 在 M_r 82 000 处有明显的蛋白表达条带, 其相对分子质量与预期值相符。

随着吡喹酮化疗和灭螺对策的实施, 日本血吸虫病患者的数量已有明显下降, 常规的 Kato-Katz 粪检方法对轻度和早期感染者的检出率低, 且漏诊率高^[6]。早在 1975 年 Huldt 等首次用酶标记抗人 IgG 测出曼氏血吸虫病和埃及血吸虫病患者的血清中的抗 SEA 抗体, 并认为 ELISA 可用于血吸虫病的诊断。人感染日本血吸虫后可引起血清中特异性 IgG 抗体水平升高并且可维持较长时间^[7], 重复感染后可使 IgG 水平进一步上升, 化疗后下降速度慢, 尤其是慢性日本血吸虫病患者, 该类患者的 IgG 抗体水平与急性日本血吸虫患者的相似, 且均远高于健康人^[8]。以上研究均表明检测特异性 IgG 具有较高的诊断价值。

自从 Ruppel 等^[9]首次证明 Sm31/32 蛋白抗原可用于诊断曼氏血吸虫病以来, 国内研究者也相继证实日本血吸虫 M_r 31 000/ M_r 32 000 分子 (Sj31/32) 也是一种优良的诊断抗原。王志成等^[10]发现 Sj26 是日本血吸虫可溶性虫卵抗原的主要成分之一。谢可鸣等^[11]用 rSj26 抗原包被硝酸纤维素膜片用于膜片免疫酶测定, 认为其具有日本血吸虫病诊断的实用价值。本研究利用 rSj26-Sj32 融合蛋白作为包被抗原进行 HRP-IgG-Dot-ELISA 研究, 发现 rSj26-Sj32 融合蛋白检测慢性日本血吸虫患者的敏感性和特异性分别为 92.5% 和 94.9%; SjAWA 检测慢性日本血吸虫患者的敏感性和特异性分别为 95.0% 和 91.9%, 两种抗原检测效率间的差异无统计学意义 ($P>0.05$)。两种抗原检测与华支睾吸虫病、卫氏并殖吸虫病和泡型棘球蚴病患者血清均有不同程度的交叉反应; 但与囊型棘球蚴病、乙型肝炎和肺结核患者血清均无交叉反应, 提示 rSj26-Sj32 融合蛋白可用于慢性日本血吸虫病的免疫诊断。

本研究利用 rSj26-Sj32 融合蛋白诊断慢性日本血吸虫病的阳性预测值、阴性预测值及诊断效率分别为 94.9%、97.7% 和 94.3%; SjAWA 则分别为 77.6%、

98.4% 和 92.6%。两种抗原的诊断效率无统计学差异 ($P>0.05$), 提示 rSj26-Sj32 融合蛋白可替代 SjAWA, 用于慢性日本血吸虫病的免疫诊断。

参 考 文 献

- [1] Hao Y, Zheng H, Zhu R, et al. Schistosomiasis status in the People's Republic of China in 2008 [J]. Chin J Schisto Control, 2009, 21(6): 451-456. (in Chinese)
(郝阳, 郑浩, 朱蓉, 等. 2008 年全国血吸虫病疫情通报[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2009, 21(6): 451-456.)
- [2] Shen DW, Chen XG, Luo JP, et al. Experimental study on the rapid diagnosis of schistosomiasis japonica by dot-ELISA[J]. J Xianning Med Coll, 2001, 15(1): 36-38. (in Chinese)
(沈定文, 陈喜珪, 罗金萍, 等. Dot-ELISA 快速检测日本血吸虫病的实验研究[J]. 咸宁医学院学报, 2001, 15(1): 36-38.)
- [3] Ding JZ, Gan XX, Shen HY, et al. Establishment and application of dot immunogold filtration assay for detection of anti-schistosome antibodies[J]. Chin J Parasitic Dis Control, 1998, 11(4): 308-310. (in Chinese)
(丁建祖, 干小仙, 沈慧英, 等. 快速检测抗日本血吸虫抗体的金标免疫渗滤法的建立及应用[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 1998, 11(4): 308-310.)
- [4] Zhao W, Su C, Wu HW, et al. Study on the immunogenicity of 22.6 kDa recombinant antigen of Schistosoma japonicum (Chinese mainland strain)[J]. Chin J Zoonoses, 1998, 14(3): 24-27. (in Chinese)
(赵巍, 苏川, 吴海玮, 等. 日本血吸虫(中国大陆株)22.6kDa 重组抗原的免疫原性研究[J]. 中国人兽共患病杂志, 1998, 14(3): 24-27.)
- [5] Bergquist NR. Immunodiagnostic Approaches in Schistosomiasis [M]. England: John Wiley and Sons Ltd, 1992: 6.
- [6] Wu GL. A historical perspective on the immunodiagnosis of schistosomiasis in China[J]. Acta Trop, 2002, 82(2): 193-198.
- [7] Suzuki T, Damian RT. Schistosomiasis mansoni in baboons IV. The development of antibodies to Schistosoma mansoni adult worm, egg, and cercarial antigens during acute and chronic infections[J]. Am J Trop Med Hyg, 1981, 30(4): 825-835.
- [8] Rabello AL, Garcia MM, da Silva RA, et al. Humoral immune responses in acute schistosomiasis mansoni: relation to morbidity [J]. Clin Infect Dis, 1995, 21(3): 608-615.
- [9] Shi YE, Dell R, Diesfeld HJ, et al. Diagnostic proteins of 31/32 KD in Schistosoma japonicum: reactivity with patient sera and monoclonal antibodies[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 1988, 6(4): 245-248. (in Chinese)
(石佑恩, Dell R, Diesfeld HJ, 等. 日本血吸虫 31/32 kDa 诊断蛋白与血吸虫单克隆抗体和病人血清的免疫印迹反应[J]. 中国寄生虫学和寄生虫病杂志, 1988, 6(4): 245-248.)
- [10] Wang ZC, Xu YH, Wang XL, et al. Schistosoma japonicum glutathione-S-transferase (Sj26GST): expression, localization and its evaluation in diagnosis for schistosomiasis[J]. Acta Univ Med Anhui, 2007, 42(1): 1-4. (in Chinese)
(王志成, 徐元宏, 汪学龙, 等. 日本血吸虫谷胱甘肽-S-转移酶在虫卵阶段的定位[J]. 安徽医科大学学报, 2007, 42(1): 1-4.)
- [11] Xie KM, Chen JX, Liu SX. Serodiagnosis of schistosomiasis japonica by a new method of immunoenzymatic assay with recombinant Sj26(rSj26) antigen[J]. Chin J Schisto Control, 1995, 7(4): 219-222. (in Chinese)
(谢可鸣, 陈家旭, 刘述先. 重组 Sj26(rSj26) 抗原免疫酶测定新方法诊断日本血吸虫病的研究[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 1995, 7(4): 219-222.)

(收稿日期: 2010-08-27 编辑: 衣凤芸)