

旋毛虫病 p49 抗原相关抗体的 ELISA 检测^{*}

蔡海松¹ 宋思扬² 张伟光¹ 黄耀坚² 林新坚¹ 郑忠辉² 苏文金²

摘要:目的 以纯化的融合蛋白 p49/GST 为抗原建立 ELISA 检测方法。方法 对一批试验血清进行间接 ELISA 检测。结果 19 份人工感染鼠血清、5 份人工感染猪血清、4 份旋毛虫病猪血清、4 份病人血清呈 IgG 抗体阳性, 21 份人工感染鼠血清呈 IgM 抗体阳性, 而正常对照血清及 300 份屠宰场待检猪血清均呈阴性反应, 其结果与常规压片法结果相符。结论 融合蛋白 p49/GST 对于研制旋毛虫病的诊断抗原具有的潜在应用价值。

关键词: 旋毛形线虫; 旋毛虫病; 融合蛋白 p49/GST; ELISA

DIAGNOSIS OF TRICHINOSIS BY ELISA WITH P49/GST ANTIGEN

CAI Haisong, SONG Siyang, ZHENG Weiguang, et al

(Fujian Academy of Agricultural Science, Institute of Soil and Fertilizer, Fuzhou 350013)

ABSTRACT: **Aim** To establish ELISA detecting method for the specific antibodies of *Trichinella spiralis*. **Method** A series of confirmed trichinosis sera were detected with ELISA with fusion protein p49/GST. **Results** Positive results of IgG antibody were found in 19 sera of experimental infected mouse and 3 sera of infected swine and 4 sera of patients; positive results of IgM antibody were found in 21 sera of experimental infected mouse. All normal sera were negative. **Conclusion** The ELISA with p49/GST can be regarded as a sensitive, specific immunological method for the diagnosis of trichinosis.

KEY WORDS *Trichinella spiralis*; Trichinosis; Fusion protein p49; ELISA

中图分类号: R383 文献标识码: A

旋毛虫病是由旋毛形线虫 (*Trichinella spiralis*) 引起的一种严重的人兽共患寄生虫病^[1]。近年来应用血清免疫学试验诊断旋毛虫病的研究进展迅速, 已发展为微量、高效和快速的免疫检测。来源于体外培养的旋毛虫肌幼虫排泄分泌抗原 (ES 抗原) 以其检测的特异性强、灵敏度高而受到普遍关注^[2,3]。然而由于 ES 抗原的制备程序繁琐, 而且不易去除无关成分的干扰^[4], 使抗原的使用受到限制。本文报道了以基因工程表达的融合蛋白 p49/GST 为抗原, 用 ELISA 的方法对旋毛虫病相关抗体进行检测的结果。

1 材料和方法

1.1 虫种及试验血清 旋毛虫虫种 (猪源) 由重庆医科大学陈雅棠教授惠赠; 人工感染的猪、鼠血清由本实验室感染后制备, 旋毛虫病猪血清由中国农业科学院兰州兽医研究所提供, 300 份待检猪血清采自厦门市屠宰场, 病人血清由云南省卫生防疫站提供, 正常的动物血清采自封闭饲养的动物, 正常人血清采自健康人群。

1.2 基因工程表达的融合蛋白 p49/GST 的制备

参考文献^[7~9]进行, 蛋白质含量为 1.58mg/ml

1.3 ES 抗原的制备 参考文献^[3]进行。

1.4 抗血清的纯化 血清中 IgG 抗体的纯化参考文献^[5]进行。

1.5 肌肉镜检 参考文献^[1]进行。

1.6 ELISA 检测方法的建立

1.6.1 抗体效价的确定 将肌幼虫 ES 抗原包被于聚苯乙烯微孔板上, 每孔 100 μ l, 4 $^{\circ}$ C 过夜, 100 μ l 2% 的 BSA-PBS 37 $^{\circ}$ C 封闭 1.5h, 加入 100 μ l 1% BSA-PBS 梯度稀释的抗旋毛虫 IgG 抗体, 37 $^{\circ}$ C 温育 1h, 加入酶标羊抗鼠 IgG 抗体, 37 $^{\circ}$ C 1h, 加入底物 (TMB-H₂O₂) 10min, 终止反应后, 在自动酶标仪 M-3550 上读取 OD₄₅₀ 值。

1.6.2 融合蛋白抗原活性的测定 包被梯度稀释的融合蛋白 p49/GST, 依据 1.6.1 结果加入抗旋毛虫 IgG。以感染的正常鼠血清纯化的 IgG 的作为对照, 其余同 1.6.1。

* 福建省重点 (农医) 项目资助 (项目号: 95-Z-150)。

作者单位: 1. 福建省农业科学院土壤肥料研究所 (福州, 350013)

2. 厦门大学细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室

1.6.3 间接 ELISA 检测 按常规方法^[6]进行。根据 1.6.2 的结果,用 0.05mol/L pH9.6 的碳酸盐缓冲液对抗原进行适当稀释,包被于聚苯乙烯微孔反应板上。待检血清(根据 1.5.1 的结果)适当稀释。羊抗人 IgG-HRP、羊抗猪 IgG-HRP、羊抗鼠 IgG-HRP(华美生物公司)工作浓度为 1:1 000,羊抗鼠 IgM(Sigma 公司)酶标抗体的制备参照文献^[1]进行,工作浓度 1:500;封闭液为含 2%BSA 的 PBS (pH 7.4),稀释液为含 1% BSA 的 PBS (pH 7.4),洗涤液为含 0.1%Tween-20 的 PBS (pH 7.4),底物为 TMB-H₂O₂。终止反应后,阴性孔无色或微

黄色,阳性孔为黄色;M-3550 自动酶标分析仪(Bio-Rad 公司)读取 OD₄₅₀值, P/N ≥ 2 为阳性, P/N < 2 为阴性。

2 结 果

2.1 抗体效价的确定 以 ES 为抗原,测定纯化后 IgG 抗体的效价。图 1、2 分别表示人工感染小鼠及猪血清制备的 IgG 抗体的 ELISA 结果。根据比值高、差值大、吸收值位于剂量反应曲线的线性范围上 1/3 部的原则^[6],确定 3 种抗体的效价分别为:鼠抗旋毛虫抗体 1:400,猪抗旋毛虫抗体 1:400。

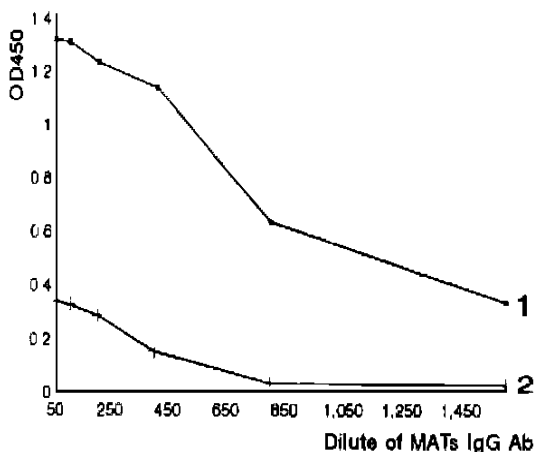


图 1 鼠抗旋毛虫抗体的效价

Fig. 1 Titre assay of MATs Ab (1), normal mouse Ab (2) as negative control

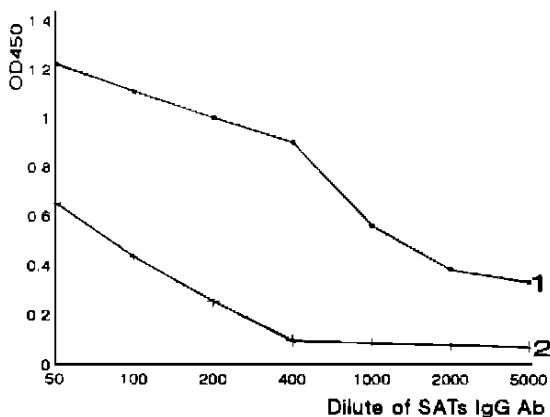


图 2 猪抗旋毛虫抗体的效价

Fig. 2 Titre assay of SATs IgG Ab (1), normal swine IgG Ab (2) as negative control

2.2 融合蛋白 p49/GST 抗原活性的确定 图 3 显示了 p49/GST 浓度梯度与 OD₄₅₀ 的关系。根据图 3 的结果,我们选择阳性抗体的吸光度 ≥ 1.0, 阴性抗体的吸光度 < 0.2 时的抗原最高稀释度作为抗原的工作浓度,因此,融合蛋白的最适用量为 1.28 μg/ml。

2.3 鼠血清的检测结果 由上述确定的 ELISA 法对人工感染旋毛虫的小鼠血清 IgG 及 IgM 进行检测,结果见图 4。由图 4 可见,感染旋毛虫后分别在第 5 天和第 9 天检测到 IgM 和 IgG 的存在;并随着感染时间的延长,抗体的滴度逐步提高,但 IgM 抗体在感染 25d 后又逐步下降的趋势。

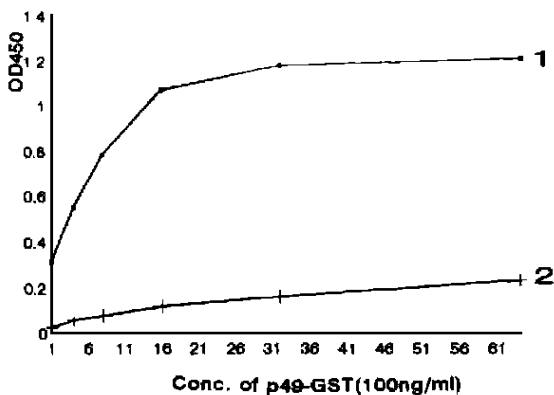


图 3 融合蛋白 p49/GST 最佳包被浓度的确定

Fig. 3 Curves showing the relationship between The concentration of p49/GST protein and O. D450 in indirect ELISA. 1: MATs IgG; 2: normal mouse IgG

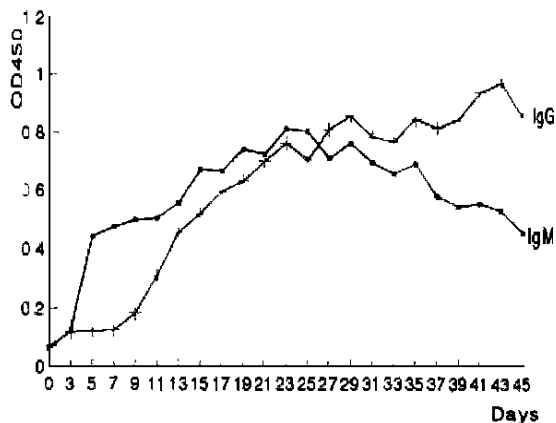


图 4 人工感染小鼠血清抗体的 ELISA 检测

Fig. 4 The ELISA assay of the sera of artificially infected mice

2.4 猪血清的检测结果 猪血清的来源包括人工感染的猪血清、病猪血清以及屠宰场随机采集的血清,其检测结果列于表1及表2。由表1可知,在人工感染旋毛虫后第10天可测出抗旋毛虫IgG抗体,随着时间的延长,其抗体滴度逐步提高,约27d后

达到最高值。3份病猪血清的检测结果均为强阳性。表2显示了300份屠宰场随机抽检的血清,其检测结果均为阴性,其OD₄₅₀值多在0.05~0.2之间,为慎重起见,我们还对采集到的300份血清的相应肌肉样品进行镜检,均未发现旋毛虫及其囊包。

表1 人工感染及病猪血清的ELISA检测结果

| 样品号* | P-1 | P3 | P6 | P10 | P15 | P20 | P24 | P27 | P31 | PI | PII | PIII |
|-------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| OD ₄₅₀ | 0.129 | 0.201 | 0.215 | 0.428 | 0.600 | 0.737 | 0.759 | 0.804 | 0.787 | 1.056 | 0.923 | 1.256 |
| IgG 结果判定** | - | - | - | + | + | ++ | ++ | +++ | ++ | +++ | +++ | +++ |

*: P后面的数字代表感染旋毛虫的天数; PI、PII、PIII 分别代表3份病猪血清
** : P/N≥2 为+, >5 为++, >6 为+++

表2 300份屠宰场猪血清标本ELISA检测结果

| OD ₄₅₀ | 0~0.05 | 0.05~0.1 | 0.1~0.2 | 0.2~0.25 |
|-------------------|--------|----------|---------|----------|
| 标本数 | 56 | 128 | 107 | 9 |

2.5 人血清ELISA检测结果 由表3可知,4份由云南省卫生防疫站提供的旋毛虫病病人血清检测结果均为强阳性反应,与防疫部门的检测结果相符。

表3 人血清ELISA检测结果

| 样品号* | H-1 | H1 | H2 | H3 | H4 |
|-------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| OD ₄₅₀ | 0.086 | 0.739 | 0.810 | 0.597 | 0.688 |
| IgG 结果判定** | - | +++ | +++ | +++ | +++ |

* H后的数字代表病人血清号; ** 同表1。

3 讨论

ELISA法是旋毛虫病免疫诊断的常用方法,其敏感性和特异性在很大程度上取决于抗原的特性和质量^[1]。近年来研究最多的是排泄—分泌抗原(ES抗原),其中49kD的ES抗原是其主要的功能性抗原^[4]。我们克隆了编码旋毛虫49kD抗原的基因,并在大肠杆菌中表达,纯化复性后获得融合蛋白p49/GST,已证实具有抗原活性^[7-9]。在p49/GST ELISA检测方法建立中,我们分别确定了血清抗体的效价及抗原的最佳包被浓度,减少了非特异性吸附和血清抗体内源性过氧化物酶的干扰。

用p49/GST ELISA法检测一系列的试验血清,结果显示19份人工感染的鼠血清、5份人工感染猪血清呈阳性,正常对照血清均呈阴性;3份旋毛

虫病猪血清、4份旋毛虫病病人血清均呈阳性,与提供单位的检测结果相符;我们对采自厦门市屠宰场的300份待检血清进行ELISA检测,同时镜检肌肉进一步确认,均未发现阳性样品。在人工感染旋毛虫后第5天和第9天的鼠体中分别可测出抗旋毛虫IgM抗体和抗旋毛虫IgG抗体,在人工感染旋毛虫后第6天的猪体中可测出抗旋毛虫IgG抗体。这说明p49/GST的ELISA检测技术具有较好的敏感性和特异性,同时可用于旋毛虫病的早期免疫诊断。

4 参考文献

1. 朱兴全. 旋毛虫病[M]. 郑州:河南科学技术出版社,1993. 169~207.
2. Gamble HR, et al. Diagnosis of swine trichinosis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using an excretory-secretory antigen [J]. Vet Parasitol. 1983, 13: 349.
3. Su XZ, et al. A dot-ELISA mimicry western blot test for the detection of swine trichinellosis [J]. J Parasitol. 1990, 77: 76.
4. Gamble HR, et al. Monoclonal antibody-purified antigen for the immunodiagnosis of trichinosis [J]. Am J Vet Res. 1984, 45: 67.
5. 朱平,冯书章. 抗体实用技术[M]. 长春:长春出版社,1994. 173~176.
6. 蒋成渝. 酶免疫测定法[M]. 北京:人民卫生出版社,1984. 31~32.
7. 宋思扬,等. 旋毛虫排泄—分泌抗原p49基因的克隆[J]. 厦门大学学报(自然科学版),1999, 38(1): 117.
8. 张伟光,等. 旋毛虫p49抗原基因克隆体外表达条件的研究[J]. 中国人兽共患病杂志,1998, 14(2): 7.
9. 刘光明,等. 旋毛虫p49抗原基因原核表达产物的纯化[J]. 中国人兽共患病杂志,1999, 15(3): 24.

2000年3月12日收稿 2000年6月20日修回