

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810048728.6

[51] Int. Cl.

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 16/02 (2006.01)

C07K 1/14 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2010年2月10日

[11] 公开号 CN 101643507A

[22] 申请日 2008.8.7

[21] 申请号 200810048728.6

[71] 申请人 华中科技大学

地址 430074 湖北省武汉市洪山区珞喻路
1037号

[72] 发明人 刘文琪

[74] 专利代理机构 武汉开元知识产权代理有限公司

代理人 樊戎

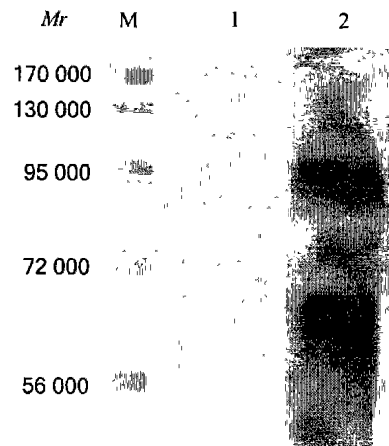
权利要求书2页 说明书10页 附图2页

[54] 发明名称

抗日本血吸虫可溶性虫卵抗原的鸡卵黄抗体
及其制备和应用

[57] 摘要

本发明利用血吸虫的特异性抗原皮下多点注射的方法免疫母鸡，从鸡蛋黄中提取、纯化并鉴定特异性 IgY，并结合单克隆抗体技术，建立 ELISA 诊断体系 IgY - ELISA。建立了一种新型的，高效、敏感和特异的，同时具有疗效考核作用的检测血吸虫循环抗原的方法。同时也为其它众多的病原体的检测和感染性疾病的诊断开创新的技术和手段。



1. 一种抗日本血吸虫虫卵可溶性抗原 SEA 的鸡卵黄抗体, 其特征在于, 它是用血吸虫的特异性抗原以注射的方法免疫母鸡后, 从被免疫母鸡的鸡蛋黄中提取的特异性免疫球蛋白免疫球蛋白 IgY。

2. 制备抗日本血吸虫虫卵可溶性抗原 SEA 的鸡卵黄免疫球蛋白 IgY 的方法, 包括以下步骤:

- (1) 制备日本血吸虫虫卵可溶性抗原 SEA;
- (2) 用日本血吸虫虫卵可溶性抗原 SEA 免疫母鸡, 并收集鸡蛋;
- (3) 从被免疫母鸡的鸡蛋黄中提取、纯化特异性 IgY。

3. 根据权利要求 2 所述的制备日本血吸虫虫卵可溶性抗原 SEA 的鸡卵黄免疫球蛋白 IgY 的方法, 其特征在于所述的日本血吸虫虫卵可溶性抗原 SEA 的制备方法是: 将感染日本血吸虫的钉螺在 25°C, 光照充分的情况下逸出尾蚴, 将至少 20 只钉螺逸出的尾蚴混合, 经皮肤感染清洁级新西兰大白兔, 感染量为 800 条尾蚴/兔, 感染 45 天后麻醉感染的兔, 生理盐水心脏灌注, 然后剖杀并取出肝脏, 分离并收集肝脏虫卵。将收集的虫卵在冰浴中反复匀浆后, 4°C 沉淀 48h, 10 000×g 离心 1h, 吸取上清, 收集分装, 即为虫卵可溶性抗原 SEA。

4. 根据权利要求 2 所述的制备日本血吸虫虫卵可溶性抗原 SEA 的鸡卵黄免疫球蛋白 IgY 的方法, 其特征在于所述的用日本血吸虫虫卵可溶性抗原 SEA 免疫母鸡的方法是: 将 60 μg/ml 的 SEA 0.5ml 与等体积的完全福氏佐剂混合, 充分乳化后经翅膀下静脉免疫。首次免疫后 10 d, 改用抗原加不完全福氏佐剂经鸡背部皮下加强免疫 3 次, 免疫剂量为 30 μg SEA / 只, 每次间隔 10d。自首次免疫后 7d 起收集鸡蛋, 做好标记于 4°C 冰箱保存。

5. 根据权利要求 2 所述的制备日本血吸虫虫卵可溶性抗原 SEA 的鸡卵黄免疫球蛋白 IgY 的方法, 其特征在于所述的从被免疫母鸡的鸡蛋黄中提取、纯化特异性 IgY 的方法是: 取初次免疫后 60d 的鸡蛋, 去除蛋壳, 用去离子水洗去卵黄外面的蛋清。去掉卵黄衣膜, 将卵黄与两倍体积的 0.01mol/L pH 7.6 的磷酸盐缓冲液 (Phosphate Buffer Solution, PBS) 混合, 并充分搅拌。加聚乙二醇 6 000 (PEG 6 000) 至最终浓度为 5%, 并搅拌至 PEG 完全溶解。4420×g 室温离心 20min, 将上清液过滤, 继续加 PEG 至其浓度为 20%, 充分搅拌溶解后 12, 000×g 室温离心 10min。去掉上清液, 用 1/6 的原卵黄体积的 PBS 重新溶解沉淀, 蒸馏水中 4°C 透析 2h, 其间换水 3~4 次。最后置 PEG 中浓缩至原体积的 1/10, 收集浓缩后的 IgY, 分装后置 -20°C 保存备用。

6. 一种体外检测血吸虫循环抗原的方法，其特征在于，以权利要求1所述的抗日本血吸虫可溶性虫卵抗原的鸡卵黄抗体接触待测血清。

7. 一种检测血吸虫抗原的试剂盒，包括：

- (1) 已用抗 SEA 的 IgY 包被的 96 孔酶联板两块；
- (2) 以非血吸虫疫区健康人血清制备的冻干标准品 1 瓶 0.5mg；
- (3) 样品稀释液 0.01mol/l pH 7.4 的磷酸盐缓冲液 1 瓶 15ml；
- (4) 检测用抗体 辣根过氧化酶标记抗 SEA 单克隆抗体 1 瓶：25ml
- (5) 洗涤液 0.05%pH 7.4 的磷酸盐缓冲液-吐温 20 1 瓶：500ml
- (6) 底物溶液 四甲基联苯胺 1 瓶：20ml
- (7) 终止液 2mol/l 硫酸 1 瓶：20ml
- (8) 操作说明书。

抗日本血吸虫可溶性虫卵抗原的鸡卵黄抗体及其制备和应用

技术领域

本发明涉及寄生虫的诊断技术，特别涉及日本血吸虫

背景技术

血吸虫是一种寄生在静脉血管中的蠕虫，可感染人和牛等家畜在内的多种哺乳动物引起血吸虫病。血吸虫病病人若得不到及时的诊断和治疗，可引起以肝硬化和腹水为主的晚期血吸虫病，病人完全丧失劳动能力和生活自理能力，并最终因肝昏迷或不可控制的上消化道出血而死亡。目前，血吸虫病仍是一种严重危害人类健康和经济发展的寄生虫病，全世界有74个国家和地区流行此病，每年感染人数仍达2亿之多，在我国流行的为日本血吸虫病。血吸虫病在我国长江流域及以南的湖南、湖北、江西、安徽、江苏、云南、四川、浙江、广东、广西、上海、福建等13个省、市、自治区的370个县市流行，累计感染者达1160万人，钉螺面积为143亿 m^2 ，受威胁人口在1亿以上。因此，血吸虫病防治工作所面临的形势仍然十分严峻。

人及牛、猪、鼠等多种哺乳动物是血吸虫的终宿主，当人或牛等接触含有血吸虫尾蚴的疫水时，尾蚴钻入宿主皮肤并脱掉尾部转变成童虫，在宿主皮下组织作短暂停留后，进入血管或淋巴管，随血流经右心到肺，再由左心进入大循环，到达肠系膜动脉的童虫可穿过毛细血管进入肝门静脉。童虫在肝门静脉发育到性器官初步分化后，即雌、雄合抱，再移行到肠系膜静脉及直肠静脉寄居、交配、产卵。从尾蚴钻入皮肤到虫体发育成熟并产卵，日本血吸虫约需24天。成虫寄生于门脉—肠系膜静脉系统，雌虫产卵于肠粘膜下层静脉末梢内。一部分虫卵随静脉血流沉积在肝或结肠肠壁组织内，另一部分虫卵可随破溃的组织落入肠腔，并随宿主粪便排出体外。排出体外的虫卵必需入水，在合适的温度、渗透压和光照等条件下孵出毛蚴，当毛蚴遇到其中间宿主钉螺时即钻入钉螺体内，经过母胞蚴、子胞蚴的无性繁殖阶段发育成尾蚴。尾蚴自螺体逸出后即可感染新的宿主，开始新一代的繁殖。

早期、正确的诊断是控制血吸虫病流行的重要环节。我国经过半个多世纪的血防工作，目前绝大部分疫区的血吸虫病感染率和患者的感染度都有明显下降，处于轻中度感染（5-10%）。在血吸虫病的诊断中，粪检发现虫卵是确诊血吸虫感染的依据，但由于排卵量受

感染度和感染阶段等诸多因素的影响，在中度或低度血吸虫病流行区粪检的敏感性并不能令人满意，漏检率高，特别是在我国，单纯依靠粪检已不能满足血吸虫病诊断的需要，因此免疫学检查已成为血吸虫病诊断的重要手段。传统的免疫学诊断主要是检测患者血清中抗血吸虫抗原的特异性抗体。常用的抗体检测方法有皮内试验 (intradermal test, IDT)、环卵沉淀试验 (circumoval precipitin test, COPT)、间接红细胞凝集试验(indirect haemagglutination test, IHA)、酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、间接荧光抗体试验 (indirect fluorescent antibody method, IFA) 等。但抗体存在时间长，无法区分现症和既往感染，对病人治疗的指导意义不大。而循环抗原 (circulating antigens, CAg) 是活的虫体在人体内寄生时排泄分泌的，一般认为,在急性血吸虫病患者血清中 CAg 含量高，而在慢性血吸虫病患者血清中,由于 CAg 不断与血清抗体结合形成血吸虫循环免疫复合物,故 CAg 含量较少。所以，CAg 检测对于血吸虫病的早期诊断和区分现症感染和既往感染特别有价值，并能作为疗效考核的指标，但因含量少，所以对检测方法的灵敏性要求更高。

在国内外研究者的共同努力下，血吸虫病的免疫学诊断取得了显著的进步，但仍然存在一些关键的技术问题。

(1) 现行的血吸虫病检测系统的疗效考核价值均不理想，主要原因是现有的大量检测试剂都是检测抗体的，而抗体在病人治疗后的 1-3 年甚至十几年后仍可在血清中检测到，无法区分现症和既往感染，因此需为疗效考核提供一种有效的以检测抗原为主的诊断系统。

(2) 循环抗原检测方法的主要困难在于患者特别是慢性期患者体内的循环抗原含量非常少，目前的检测体系的敏感性较低，尤其是在对大量的轻度流行区的评估上还没有十分行之有效的办法。

(3) 血吸虫病诊断试剂种类很多，水平参差不齐，试剂质量存在批间生产的差异和不稳定的问题；诊断标准不够客观化，易导致人为误差等。

当前，寻找敏感和特异的循环抗原检测方法并推向广大的流行区是血吸虫病诊断试剂研究与开发的主要方向。

鸡卵黄免疫球蛋白 (Egg yolk immunoglobulin, IgY) 是鸡血液中的 IgG 抗体选择性转移到卵黄中形成的，是普遍存在于鸟类、爬行动物和两栖类血清和卵黄中的典型的低分子量抗体，不具有类似于 IgG 的 50kDa 重链 γ ，且 IgY 的重链明显大于哺乳动物 IgG 的重链；在功能上等价于哺乳动物 IgG，而抗原性方面存在较大的差异，在免疫诊断方面比哺乳动物源性的 IgG 更具优势。

IgY 由两条重链(H)和轻链(L)组成(见图 1), 没有铰链结构, 分子量为 180KDa (7.8S), 重链为 67—70KDa, 轻链为 25Kda, 有一个小体积副本, 120KDa (5.7S), 存在于野鸭和某些龟类中。较小的 IgY 的 H 链缺乏 C3、C4 区, 由于使用了特异的末端外显子(位于 C2 和 C3 恒定区外显子间的内含子中), 5.7S IgY 与 F(ab) 2 片段十分相似, 因此正确名称为 IgY (Δ Fc), 其 H 链为 ν (Δ Fc)。7.8S IgY 和 5.7S IgY (Δ Fc) 可共存于同一种动物或单独存在。IgY 抗体仅在脊椎动物中发现, 其分子结构存在多样性, 与抗原结合位点构成组分相关, 其编码基因是可变基因(V)、多样化基因(D)和结合基因(J), 通过 V、D 和 J 基因的随机选择重组产生所有多样性初级抗体。低等脊椎动物对抗原应答所产生的抗体呈现较窄的、受限制的多样性。鸡的抗体 L 和 H 基因座位仅有一个 V 基因和一个 J 基因, 只有 D 基因成簇存在(16 个基因)。因此鸡的 Ig 基因多样性是以基因转变的形式通过同源重组产生, 缺乏选择高亲和性的体细胞突变的机制。

IgY 和 IgY (Δ Fc) 都含有 2 个抗原结合位点, 原则上来说, 可以与多个抗原发生沉淀或凝集反应现象, 但事实并非如此。大多数鸡的抗体能牢固地结合抗原却只有在高盐浓度下(如 1.5M NaCl) 才能引起沉淀或凝集反应。鸭的抗体经常不能表现有效地沉淀或凝集作用, 那些没有发生凝集的抗体即使在提高盐的浓度下仍不能获得凝集抗原的能力。这是因为两个 Fab 片段的距离太近, 由于空间位阻的原因, 阻碍了它们与大分子抗原的结合。在高盐或低 pH 情况下, IgY 释放 Fab 间的距离以允许它们各自独立地结合抗原分子。Ig 的许多效应器功能是通过 Fc 区介导的, 故而 IgY (Δ Fc) 不能激活哺乳动物的补体系统、不与 RF 因子、类风湿因子结合和 SPA、SPG 结合等功能。从系统进化角度来说, Δ Fc Igs 的存在是具有一定的选择优势。

用母鸡作为免疫动物和把鸡蛋作为抗体的来源有很多优势。(1) 由于种系发生之间距离大, 母鸡可对哺乳动物的抗原产生更强的免疫应答。(2) 母鸡可以持续的产生高亲和力的抗体。20—30mg 的高度保守的哺乳动物抗原可引起高效价的 IgY 长时间的分泌。(3) 无损伤的抗体收集。只需收集免疫母鸡的鸡蛋即可获得 IgY。(4) 高产。一只母鸡一年可产下约 280 只蛋, 每只蛋含有 100—150mg 的 IgY, 这样每只鸡每年可生产 28—42g 的 IgY。(5) 不和类风湿因子结合。在检测中应用 IgY 可避免假阳性结果。(6) 与补体不发生反应。哺乳动物的 IgG 可激活补体, 导致假阴性的产生。IgY 不和补体发生反应, 在检测哺乳动物的血清时, 可减少由补体造成的干扰。

发明内容

本发明的任务是提供一种抗日本血吸虫虫卵可溶性抗原(soluble egg antigens, SEA)的鸡

卵黄免疫球蛋白 (Egg yolk immunoglobulin, IgY)。

本发明的另一任务是提供一种体外检测血吸虫循环抗原的方法。

本发明的又一任务是提供一种检测血吸虫抗原的试剂盒。

实现本发明第一个任务的技术方案是：

本发明提供的抗日本血吸虫虫卵可溶性抗原 (soluble egg antigens, SEA) 的鸡卵黄免疫球蛋白 (Egg yolk immunoglobulin, IgY)，是用血吸虫的特异性抗原以注射的方法免疫母鸡后，从被免疫母鸡的鸡蛋黄中提取的特异性 IgY，制备抗日本血吸虫虫卵可溶性抗原 SEA 的鸡卵黄免疫球蛋白的方法，包括以下步骤：

- (1) 制备日本血吸虫虫卵可溶性抗原 SEA；
- (2) 用日本血吸虫虫卵可溶性抗原 SEA 免疫母鸡，并收集鸡蛋；
- (3) 从被免疫母鸡的鸡蛋黄中提取、纯化特异性 IgY。

上述步骤 (1) 所述的制备日本血吸虫虫卵可溶性抗原 SEA 的具体方法是：将感染日本血吸虫的钉螺在 25°C，光照充分的情况下逸出尾蚴，将至少 20 只钉螺逸出的尾蚴混合，经皮肤感染清洁级新西兰大白兔，感染量为 800 条尾蚴/兔，感染 45 天后麻醉感染的兔，生理盐水心脏灌注，然后剖杀并取出肝脏，分离并收集肝脏虫卵。将收集的虫卵在冰浴中反复匀浆后，4°C 沉淀 48h，10 000×g 离心 1h，吸取上清，收集分装，即为虫卵可溶性抗原 SEA。

上述步骤 (2) 所述的用日本血吸虫虫卵可溶性抗原 SEA 免疫母鸡和收集鸡蛋的具体方法是：将 60 μg/ml 的 SEA 0.5ml 与等体积的完全福氏佐剂混合，充分乳化后经翅膀下静脉免疫。首次免疫后 10 d，改用抗原加不完全福氏佐剂经鸡背部皮下加强免疫 3 次，免疫剂量为 30 μg SEA/只，每次间隔 10 天，自首次免疫后 7 天起收集鸡蛋，做好标记于 4°C 冰箱保存。

上述步骤 (3) 所述的从被免疫母鸡的鸡蛋黄中提取、纯化特异性 IgY 的具体方法是：取初次免疫后 60 天的鸡蛋，去除蛋壳，用去离子水洗去卵黄外面的蛋清，去掉卵黄衣膜，将卵黄与两倍体积的 0.01mol/L pH 7.6 的磷酸盐缓冲液 (Phosphate Buffer Solution, PBS) 混合，并充分搅拌，加聚乙二醇 6 000 (PEG 6 000) 至最终浓度为 5%，并搅拌至 PEG 完全溶解，4420×g 室温离心 20min，将上清液过滤，继续加 PEG 至其浓度为 20%，充分搅拌溶解后 12,000×g 室温离心 10min，去掉上清液，用 1/6 的原卵黄体积的 PBS 重新溶解沉淀，蒸馏水中 4°C 透析 2h，其间换水 3~4 次，最后置 PEG 中浓缩至原体积的 1/10，收集浓缩后的 IgY，分装后置 -20°C 保存备用。

实现本发明第二个任务体外检测血吸虫循环抗原的技术方案是：以抗日本血吸虫可溶性虫卵抗原的鸡卵黄抗体接触待测血清。

实现本发明第三个任务的技术方案是：本发明提供的检测血吸虫抗原的试剂盒包括：

(1) 已用抗 SEA 的 IgY 包被的 96 孔酶联板两块；

(2) 冻干标准品，为非血吸虫疫区健康人血清，1 瓶：0.5mg，临用前以双蒸水稀释至 1ml，临用前 15 分钟内配制；

(3) 样品稀释液，为 0.01mol/l pH 7.4 的磷酸盐缓冲液，1 瓶：15ml；

(4) 检测用抗体，为辣根过氧化酶标记抗 SEA 单克隆抗体，1 瓶：25ml；

(5) 洗涤液，为 0.05%pH 7.4 的磷酸盐缓冲液-吐温 20，1 瓶：500ml；

(6) 底物溶液，为四甲基联苯胺，1 瓶：20ml；

(7) 终止液，为 2mol/l 硫酸，1 瓶：20ml；

(8) 操作说明书：每板均设标准孔 2 孔和待测样品孔，分别加稀释的标准品或待测样品 100 μ l，轻轻混匀，37 $^{\circ}$ C，120 分钟，弃去液体，甩干，洗涤液洗板 5 次，350 μ l/每孔，甩干；每孔加检测用抗体 100 μ l，37 $^{\circ}$ C，60 分钟，洗涤液洗板 5 次，350 μ l/每孔，甩干；每孔加底物溶液 90 μ l，37 $^{\circ}$ C 避光显色 30 分钟；每孔加终止溶液 50 μ l，终止反应。用 ELISA 读数仪在 450nm 波长测量各孔的吸光度值，待见样品的吸光度值与标准品的吸光度值的比值大于 2.1 即为阳性。操作注意事项：①各试剂在使用前应平衡至室温；②每次洗涤时间不应少于 1 分钟；③试剂盒 4 $^{\circ}$ C 保存，拆封后请尽量于 12 个月内使用完毕。

本发明利用血吸虫的特异性抗原皮下多点注射的方法免疫母鸡，从鸡蛋黄中提取、纯化并鉴定特异性 IgY，并结合单克隆抗体技术，建立 ELISA 诊断体系(IgY-ELISA)，建立了一种新的高效、敏感和特异的，同时具有疗效考核作用的检测血吸虫循环抗原的方法。同时也为其它众多的病原体的检测和感染性疾病的诊断开创新的技术和手段。

实验资料

1. 日本血吸虫 SEA 的制备

本实验室传代的感染日本血吸虫的湖北钉螺（大陆株）在 25 $^{\circ}$ C，光照充分的情况下逸出尾蚴，将至少 20 只钉螺逸出的尾蚴混合，经皮肤感染新西兰大白兔（同济医学院实验动物中心提供，清洁级），感染量为 800 条尾蚴/兔，感染 45 天后麻醉感染的兔，生理盐水心脏灌注，然后剖杀并取出肝脏，分离并收集肝脏虫卵。将收集的虫卵在冰浴中反复匀浆后，4 $^{\circ}$ C 沉淀 48h 后，10 000 \times g 离心 1h。吸取上清，收集分装，即为虫卵可溶性抗原（soluble egg antigens, SEA）。

SEA 蛋白含量的测定采用 BCA 法（BCA Protein Assay Kit，美国 BIPEC）。将浓度为 0、0.1mg/ml、0.2mg/ml、0.4mg/ml、0.6mg/ml、0.8mg/ml、1mg/ml 的标准品 20 μ l 分别加到 96

孔酶标板的标准品孔中,再将样品 20 μ l 加到样品孔中,各孔加入 200 μ l 的 BCA 工作液, 37 $^{\circ}$ C 反应 30min, 562nm 处读取吸光度值。绘制标准曲线, 计算样品的蛋白含量。BCA 法测得 SEA 的蛋白质含量 ≥ 5 mg / ml。

2. 免疫及鸡蛋收集

将 60 μ g/ml 的 SEA 0.5ml 与等体积的完全福氏佐剂混合, 充分乳化后经翅膀下静脉免疫。首次免疫后 10 d, 改用抗原加不完全福氏佐剂经鸡背部皮下加强免疫 3 次, 免疫剂量为 30 μ g SEA /只, 每次间隔 10 天。自首次免疫后 7d 起收集鸡蛋, 做好标记于 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

3. 聚乙二醇法提取和纯化 IgY

取初次免疫后 60 天的鸡蛋, 去除蛋壳, 用去离子水洗去卵黄外面的蛋清。去掉卵黄衣膜, 将卵黄与两倍体积的 0.01mol/L pH 7.6 的磷酸盐缓冲液 (Phosphate Buffer Solution, PBS) 混合, 并充分搅拌。加 5% 的 PEG 并搅拌至 PEG 完全溶解。室温离心(4420 \times g, 20min)。将上清液过滤, 继续加 PEG 至 20%, 充分搅拌溶解后室温离心 (12, 000 \times g, 10min)。去掉上清液, 用 1/6 的原卵黄体积的 PBS 重新溶解沉淀。置常规处理过的透析袋中, 蒸馏水中 4 $^{\circ}$ C 透析 2 小时, 其间换水 3~4 次。最后置聚乙二醇 6 000 (PEG 6 000) 中浓缩至原体积的 1/10, 收集分装后置 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。提纯后 IgY 的蛋白浓度约为 6mg/ml。每只鸡蛋经盐析、透析、浓缩后可以得到 61mg 的 IgY。

4. IgY 的十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 和蛋白质印迹 (Western blotting) 分析

非还原型 SDS-PAGE 检测相对分子质量 (M_r) 及纯化程度, 其浓缩胶浓度为 5%, 分离胶浓度为 7%。还原型 SDS-PSGE 鉴定特异性, 其浓缩胶浓度为 5%, 分离胶浓度为 15%; 每孔的上样量为 7 μ g。Western blotting 是将 SEA 进行 SDS-PAGE 电泳后, 转移到硝酸纤维素膜上, 用 1% 的脱脂奶粉 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜。一抗为免疫后的 IgY (浓度为 1:1 000), 未免疫的 IgY 作为对照; 二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗鸡 IgY (浓度为 1:100 000)。4-氯-1-萘酚 + 3% H_2O_2 显色。

纯化后的完整的 IgY 有一条主带, 其相对分子质量 M_r 约为 130 000。还原型 SDS-PAGE 的结果显示: 裂解后的 IgY 共七条带, 其中含有 M_r 为 66 000 和 35 000 的两条主带和五条次带见图 2。Western blotting 结果显示, SEA 可被免疫后的 IgY 识别结合, 而与未免疫的 IgY 不发生反应, 见图 3。

5. IgY 敏感性的检测

ELISA 板每孔包被 30 μ g 的 IgY, 10% 牛血清白蛋白 (BSA) 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜, 0.05% pH 7.4

的 PBS-吐温 (Tween) 20 (PBST) 洗涤 3 次; 加连续稀释的 SEA 37°C 温育 1h; 同上用 PBST 洗涤 3 次后加入抗 SEA 的 IgG, 37°C 温育 1h 后, 同上法洗涤, 加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔 IgG (工作浓度为 1:100 000) 37°C 温育 1h, 加底物 OPD 显色 15min, 在酶标仪 (Multiskan Ascent 354, 芬兰 Labsystems 公司) 上读取吸光度。双抗体夹心 ELISA 法测得结果表明: 将抗原 SEA 稀释到 2.4ng/ml, 其 A 值为 0.4546, 阴性对照的 A 值为 0.2132, S/N 大于 2.1, 结果仍为阳性。

稀释度 dilution	免疫后卵黄蛋白 A 值 Absorbance of immunized IgY	S/N [*]	阴性对照 Negative control	空白对照 Blank control
1: 10	0.6577	3.08	0.2132	0.1117
1:100	0.5171	2.43		
1:1 000	0.4607	2.16		
1:10 000	0.4546	2.13		
1:100 000	0.4248	1.99		

6. 抗日本血吸虫 SEA 的单抗 NP28-5B 的制备及标记

4 周龄 BALB/C 小鼠, 感染 8 条日本血吸虫尾蚴, 感染后 4 个月取小鼠脾细胞作为杂交瘤供体细胞。将供体细胞与同系小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 混合, 加入 PEG4000 使其融合。将细胞培养上清与日本血吸虫 SEA 进行 ELISA, 阳性孔细胞经反复亚克隆, 直至所有杂交瘤细胞生长孔的培养上清均能与 SEA 产生阳性反应为止。此时确认单克隆抗体细胞系建立。

传代培养后收集培养细胞上清, 用 50%饱和硫酸铵沉淀后, 溶解于 0.01M, pH7.4 的 PBS, 充分透析后放置 -70°C 冰箱备用。经免疫双扩散鉴定, NP28-5B 的同型为 IgG1, 其靶抗原分子量为 140KD。采用简易过碘酸钠法, 将辣根过氧化物酶 (HRP, RZ \geq 3.0) 结合至 NP28/5B 上, 经滴定确定其工作浓度。

7. IgY-夹心 ELISA (Sandwich-ELISA) 诊断技术

7.1 动物分组, 感染及血清采集

20-25g 雌性 BALB/C 小鼠 40 只, 随机分成 2 组, 一组经皮感染日本血吸虫尾蚴 40 条/鼠 (本领域常规感染方法), 另一组做正常对照, 不感染血吸虫。两组小鼠饲养条件、饮食饮水等均相同。

感染 45 天后, 2 组小鼠均采集外周静脉血并分离血清, -20°C 保存备用。小鼠采血后麻醉, 经肝门静脉生理盐水灌注冲虫, 并做肝组织压片, 镜检虫卵, 以证实小鼠感染成功。冲

虫后，感染组每只小鼠均可冲出成虫，肝组织压片可见大量虫卵结节，证明血吸虫感染是成功的。未感染的对照组小鼠则既未见虫卵也未见成虫。

7.2 IgY- sandwich-ELISA

(1)取上述制备鉴定好的 IgY30 μ g/ml 每孔包被 96 孔 ELISA 板,4 $^{\circ}$ C 过夜后,用 0.1% pH 7.4 的 PBST 洗涤 3 次。

(2) 10%牛血清 BSA200 μ l/孔 37 $^{\circ}$ C 封闭 1h, 同上法洗 3 次。

(3) 加入 1:10 稀释的待检感染血吸虫的鼠血清, 37 $^{\circ}$ C 温育 2h, 用 PBST 代替待检血清作空白对照, 同种健康未感染鼠血清作阴性对照。温育后同上法洗 3 次。

(4) 加入 HRP 标记的 1:6000 稀释的 NP28, 37 $^{\circ}$ C 温育 30min, 同上法洗 3 次

(5) 底物 TMB100 μ l/孔 37 $^{\circ}$ C 显色 25min。

(6) 2mol/l 硫酸 50 μ l/孔终止反应, 在酶标仪上读取 450nm 处的吸光度值

结果显示: 感染组所有感染血吸虫小鼠的血清 A 值与阴性对照小鼠的比值均大于 2.1, 平均 A 值为 **1.48**, 阴性对照组平均 A 值为 **0.36**, S/N 比值达到 **4.0**, 远超出 ELISA 检测中阳性与阴性比值需达到 2.1 的要求。本实验每份血清样本至少重复 2 次, 稳定性好。

综上所述, 本发明研究结果显示, 本发明技术能够制备稳定、特异的抗日本血吸虫 SEA 的 IgY 抗体, 并提供了基于这种 IgY 的 sandwich-ELISA 诊断血吸虫感染的技术, 实验室检测感染动物的敏感性达 100%。

当前血吸虫抗体诊断方法虽然日趋成熟, 但关键性的问题是抗体阳性区分不了被检者是现症感染还是既往感染, 因为抗体在患者治愈 3-4 年, 甚至更长时间后仍可存在血清中, 故而无法对药物治疗提供有价值的指导, 会让一些已经治愈的血吸虫病患者无辜服药。而抗原检测阳性则意味着患者为急性感染, 因为体内有活的虫体存在, 才会向血液中释放抗原物质。目前还未报道有敏感性高的血吸虫抗原检测试剂。本发明基于 IgY 的 sandwich ELISA 技术用 IgY 作为扑获抗体, 单抗 NP28 为检测抗体, 既能用 I gY 扑获更多抗原, 从而提高敏感性, 又能用单抗提高检测的特异性, 从而达到免疫学诊断中所要求的敏感与特异的高度结合和协调。并且, IgY 抗体是无创性地从鸡蛋中提取, 来源丰富, 得率高, 均一性好, 不与哺乳动物发生交叉反应, 这些都是常规用哺乳动物抗体做检测所没有的优势。

附图说明

图 1 为 IgY 与 IgG 结构模式图;

图 2 为 IgY 的 SDS-PAGE 分析, A 图为非还原型 SDS-PAGE 分析, 1 处为免疫后经过提纯的 IgY, 2 处为免疫后未提纯的 IgY; B 图为还原型 SDS-PAGE 分析, 1 处为未免疫卵黄提纯的 IgY,

2 处为免疫后卵黄提纯的 IgY;

图 3 为 IgY 的 Western blotting 分析, 1 处为与未免疫卵黄提纯的 IgY 反应, 2 处为与免疫后卵黄提纯的 IgY 反应。

具体实施方式

实施例 1

日本血吸虫 SEA 的制备

本实验室传代的感染日本血吸虫的湖北钉螺(大陆株)在 25°C, 光照充分的情况下逸出尾蚴, 将至少 20 只钉螺逸出的尾蚴混合, 经皮肤感染新西兰大白兔(同济医学院实验动物中心提供, 清洁级), 感染量为 800 条尾蚴/兔, 感染 45 天后麻醉感染的兔, 生理盐水心脏灌注, 然后剖杀并取出肝脏, 分离并收集肝脏虫卵。将收集的虫卵在冰浴中反复匀浆后, 4 °C 沉淀 48h 后, 10 000×g 离心 1h。吸取上清, 收集分装, 即为虫卵可溶性抗原(soluble egg antigens, SEA)。

SEA 蛋白含量的测定采用 BCA 法(BCA Protein Assay Kit, 美国 BIPEC)。将浓度为 0、0.1mg/ml、0.2mg/ml、0.4mg/ml、0.6mg/ml、0.8mg/ml、1mg/ml 的标准品 20μl 分别加到 96 孔酶标板的标准品孔中, 再将样品 20μl 加到样品孔中, 各孔加入 200μl 的 BCA 工作液, 37 °C 反应 30min, 562nm 处读取吸光度值。绘制标准曲线, 计算样品的蛋白含量。BCA 法测得 SEA 的蛋白质含量 ≥ 5 mg / ml。

实施例 2

免疫及鸡蛋收集

将 60 μg/ml 的 SEA 0.5ml 与等体积的完全福氏佐剂混合, 充分乳化后经翅膀下静脉免疫。首次免疫后 10 d, 改用抗原加不完全福氏佐剂经鸡背部皮下加强免疫 3 次, 免疫剂量为 30 μg SEA/只, 每次间隔 10 天, 自首次免疫后 7d 起收集鸡蛋, 做好标记于 4 °C 冰箱保存。

实施例 3

聚乙二醇法提取和纯化 IgY

取初次免疫后 60 天的鸡蛋, 去除蛋壳, 用去离子水洗去卵黄外面的蛋清, 去掉卵黄衣膜, 将卵黄与两倍体积的 0.01mol/L pH 7.6 的磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffer Solution, PBS)混合, 并充分搅拌。加 5%的 PEG 并搅拌至 PEG 完全溶解。室温离心(4420×g, 20min)。将上清液过滤, 继续加 PEG 至 20%, 充分搅拌溶解后室温离心(12, 000×g, 10min)。去掉上清液, 用 1/6 的原卵黄体积的 PBS 重新溶解沉淀。置常规处理过的透析袋中, 蒸馏水中 4 °C 透析 2 小时, 其间换水 3~4 次。最后置聚乙二醇 6 000(PEG 6 000)中浓缩至原体积的 1/10, 收集分

装后置-20 °C 保存备用。提纯后 IgY 的蛋白浓度约为 6mg/ml。每只鸡蛋经盐析、透析、浓缩后可以得到 61mg 的 IgY。

实施例 4

抗日本血吸虫 SEA 的单抗 NP28-5B 的制备及标记

4 周龄 BALB/C 小鼠，感染 8 条日本血吸虫尾蚴，感染后 4 个月取小鼠脾细胞作为杂交瘤供体细胞。将供体细胞与同系小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 混合，加入 PEG4000 使其融合。将细胞培养上清与日本血吸虫 SEA 进行 ELISA，阳性孔细胞经反复亚克隆，直至所有杂交瘤细胞生长孔的培养上清均能与 SEA 产生阳性反应为止。此时确认单克隆抗体细胞系建立。

传代培养后收集培养细胞上清，用 50%饱和硫酸铵沉淀后，溶解于 0.01M, pH7.4 的 PBS，充分透析后放置-70°C 冰箱备用。经免疫双扩散鉴定，NP28-5B 的同型为 IgG1，其靶抗原分子量为 140KD。采用简易过碘酸钠法，将辣根过氧化物酶（HRP, RZ≥3.0）结合至 NP28/5B 上，经滴定确定其工作浓度。

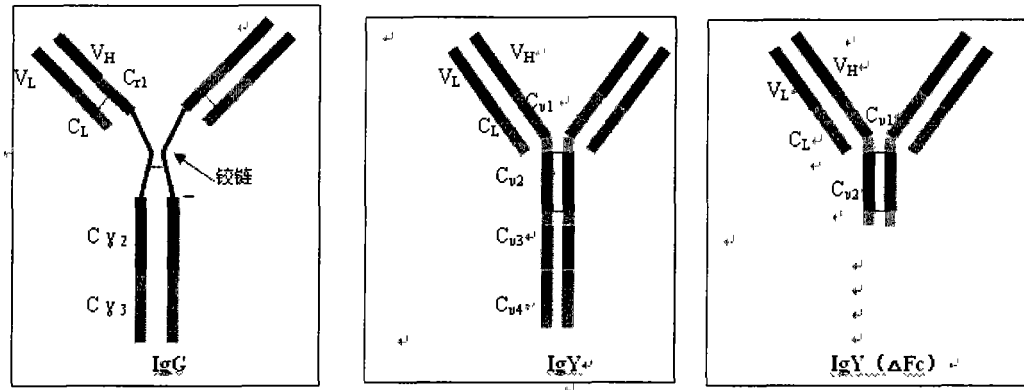


图 1

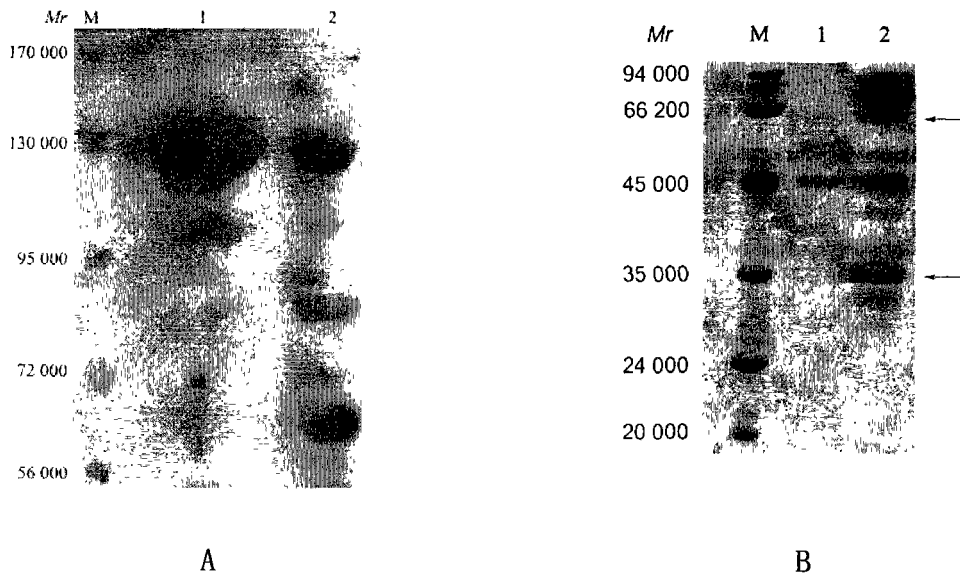


图 2

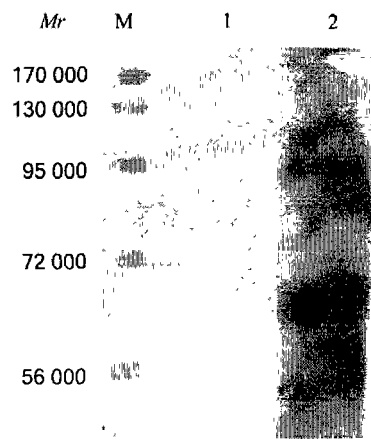


图 3

专利名称(译)	抗日本血吸虫可溶性虫卵抗原的鸡卵黄抗体及其制备和应用		
公开(公告)号	CN101643507A	公开(公告)日	2010-02-10
申请号	CN200810048728.6	申请日	2008-08-07
[标]申请(专利权)人(译)	华中科技大学		
申请(专利权)人(译)	华中科技大学		
当前申请(专利权)人(译)	华中科技大学		
[标]发明人	刘文琪		
发明人	刘文琪		
IPC分类号	C07K16/18 C07K16/02 C07K1/14 G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明利用血吸虫的特异性抗原皮下多点注射的方法免疫母鸡，从鸡蛋黄中提取、纯化并鉴定特异性IgY，并结合单克隆抗体技术，建立ELISA诊断体系IgY - ELISA。建立了一种新型的，高效、敏感和特异的，同时具有疗效考核作用的检测血吸虫循环抗原的方法。同时也为其它众多的病原体的检测和感染性疾病的诊断开创新的技术和手段。

