

• 论 著 •

rSj26-Sj32-Immunogold-IgG-Dipstick 法用于急性日本血吸虫患者的诊断价值*

王 敏, 李文桂, 蔡世飞

(重庆医科大学附属第一医院传染病寄生虫病研究所 400016)

摘 要:目的 探讨 rSj26-Sj32-Immunogold-IgG-Dipstick 法用于急性日本血吸虫患者的诊断价值。方法 利用纯化的 rSj26-Sj32 融合蛋白和日本血吸虫成虫抗原(SjAWA)建立 Immunogold-IgG-Dipstick 法,检测急性日本血吸虫病患者血清,并以华支睾吸虫病、卫氏并殖吸虫病、棘球蚴病、乙型肝炎、肺结核患者和健康人血清作对照。结果 rSj26-Sj32 检测急性日本血吸虫病患者血清的敏感性为 96.00%,特异性为 97.67%;SjAWA 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存在不同程度的交叉反应,而 rSj26-Sj32 则未见交叉反应。结论 纯化的 rSj26-Sj32 融合蛋白是 1 种较好的免疫诊断抗原。

关键词:血吸虫病,日本; 病毒融合蛋白质类; 免疫学试验; Dipstick 法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.10.005

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)10-1030-03

The diagnostic value of rSj26-Sj32-Immunogold-IgG-Dipstick assay for the patients with acute schistosomiasis japonicum*

Wang Min, Li Wengui, Cai Shi fei

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

Abstract:Objective To study the diagnostic value of rSj26-Sj32-Immunogold-IgG-Dipstick assay for the patients with acute schistosomiasis japonicum. **Methods** Serums from patients with acute schistosomiasis japonicum were detected by rSj26-Sj32-Immunogold-IgG-Dipstick and schistosoma japonicum adult worm antigen(SjAWA)-Immunogold-IgG-Dipstick, and serums from patients with clonorchiasis sinensis, paragonimiasis westermani, echinococcosis, hepatitis B, lung tuberculosis and from health donors were also detected as control groups. **Results** The sensitivity and specificity of rSj26-Sj32-Immunogold-IgG-Dipstick assay in the detection of acute schistosomiasis japonicum were 96.00% and 97.67%. There exist certain cross reaction between SjAWA and paragonimiasis sinensis, clonorchiasis westermani and alveolar echinococcosis but not between rSj26-Sj32 and the other diseases. **Conclusion** Purified rSj26-Sj32 is one ideal type of immunodiagnostic antigen.

Key words: schistosomiasis japonica; viral fusion proteins; immunologic tests; Dipstick assay

日本血吸虫病是由日本血吸虫(Sj)引起的 1 种严重危害人类健康的人兽共患寄生虫病,是国家卫生部规划防治的五大寄生虫病之一。中国现有患者 67.12 万,病牛 2.48 万头,受威胁人口 4 000 万以上^[1]。rSj26 和 Sj32 是两种具有诊断价值的抗原^[2-3]。胶体染料试纸条法已被证实在日本血吸虫病检测中具有操作简便、快速、高效,且敏感性和特异性高等优点^[4-5]。本研究利用 rSj26-Sj32 融合蛋白建立 Immunogold-IgG-Dipstick 法检测急性日本血吸虫病患者血清中 IgG 抗体水平,并设置对照,以了解其诊断价值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 血清标本 急性日本血吸虫病患者血清 50 份由武汉市卫生局王家刚老师惠赠;华支睾吸虫病患者血清 21 份、卫氏并殖吸虫病患者血清 13 份、泡型棘球蚴病患者血清 10 份、囊型棘球蚴病患者血清 9 份和肺结核患者血清 20 份由本室保存。健康人血清 43 份和乙肝患者血清 20 份由本院检验科罗亚老师惠赠。

1.1.2 仪器及试剂 异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)、丙烯酰胺、N,N'-亚甲基丙烯酰胺、R250 考马斯亮蓝、过硫酸胺、中相对分子质量蛋白质标准 Marker 和 N,N,N,N-四甲基乙二胺

(TEMED)购自上海生工生物工程技术有限公司,硝酸纤维素(NC)膜、胶体金(Immunogold)标记的羊抗人 IgG 购自 Southern Biotechnology Associates 公司, rBL21(pET28α-Sj26-Sj32)由本室保存。酶标仪 ELx 800 购自 Bio-Tek 公司, Gel Doc 1000 T2A 凝胶成像仪购自 Bio Rad 公司。

1.1.3 Dipstick 法测定装置 参照何伟等^[6]的报道,将 NC 膜(孔径 0.45 nm)切成 60 mm×3 mm 的长条,中间为检测膜,上端加吸水垫,长 26 mm,下端加样品垫,长 5 mm,在 pH7.4 的 PBS 中浸泡 30 min,待其自然干燥后装入测定装置,置室温备用。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒 pET28α-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 pET28α-Sj26GST-Sj32 的大肠埃希菌 BL21(DE3)在 LB 培养基(含卡那霉素 0.5%)中 37℃,离心半径 3 cm,250 r/min 振荡培养至 A₆₀₀ 值为 0.5~0.8 时,取 6 mL 作为未诱导对照,其余加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 于 37℃诱导表达,分别在诱导后 1、3、5、7、9、11 和 13 h 各收集 1 mL 菌液。

1.2.2 重组质粒 pET28α-Sj26GST-Sj32 表达产物的 SDS-PAGE 分析 上述菌液经离心半径 21 cm,10 000 r/min,离心

* 基金项目:重庆市科委地方病重大专项基金资助项目(2008AB5055、2008AB5008、2008AB5054)。

2 min,分别收集菌体,以 50 μL 的 1×蛋白上样缓冲液重悬后煮沸 5 min,取 20 μL 用 5% 的浓缩胶和 10% 的分离胶进行 SDS-PAGE 电泳(考马斯亮蓝染色),凝胶扫描分析系统分析重组蛋白的表达情况。

1.2.3 rSj26-Sj32 的纯化 PBS 重悬上述的细菌沉淀进行超声粉碎,以离心半径 15 cm,5 000 r/min 离心 10 min,用 pET 表达载体携带的聚组氨酸(His-tag)标签,Ni-NTA 试剂盒纯化,测定其蛋白浓度,用双蒸水稀释至 0.1 μg/μL。分别取不同培养时间诱导表达的融合蛋白 20 μL,用 5% 的浓缩胶和 10% 的分离胶进行 SDS-PAGE 电泳(考马斯亮蓝染色),凝胶成像仪成像,图像分析系统进行分析。

1.2.4 SjAWA 制备 日本血吸虫成虫粗抗原(AWA),按报道方法制备^[7]。从感染 2 000 条血吸虫尾蚴后 43 d 的家兔体内收集成虫,低温干燥后加入适量 PBS,冰浴下磨成匀浆,反复冻融,以离心半径 21 cm,10 000 r/min 低温离心 30 min,取上清液即为 AWA,测定蛋白浓度为 2.011 μg/μL,用双蒸水稀释至 1 μg/μL。

1.2.5 rSj26-Sj32 和 SjAWA 抗原包被浓度选择 在进行 Immunogold-IgG-Dipstick 法实验前先进行常规 ELISA 实验,按 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8 和 1.0 微克/孔的 rSj26-Sj32 融合蛋白进行包板(抗原包被液 200 微升/孔),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 微克/孔的 SjAWA 进行包板;1:1 000 羊抗人 IgG 的工作浓度;在常规操作下检测 10 份日本血吸虫病患者混合血清(阳参)和 10 份健康人混合血清(阴参),以阳参/阴参的 A 值之比最大,PBS 对照本底最低时选择为最适条件。

1.2.6 Dipstick 法检测 在距底端 20 mm 处滴加 0.1 μg/μL 的 rSj26-Sj32 4 μL 作为检测点,同时滴加封闭液 200 μL,在距底端 30 mm 处滴加 1 μg/μL 的 SjAWA 2 μL 作为对照点,同时滴加封闭液 200 μL,室温干燥;在 NC 膜加样处滴加 20 μL 待检血清和 1:100 稀释的 Immunogold-IgG 50 μL 混合液,混合液即沿层析膜向上渗透,约 5~10 min 后,待对照点出现红色斑点时,观察结果。结果判断:检测点和对照点均出现红色斑点为阳性反应;对照点出现红色斑点,而检测点不出现红色斑点为阴性反应;对照点不出现红色斑点为无效反应。

1.3 统计学处理 rSj26-Sj32 和 SjAWA 进行 Immunogold-IgG-Dipstick 法检测的敏感性和特异性比较用 χ^2 检验。

2 结 果

2.1 重组质粒 pET28α-Sj26GST-Sj32 在大肠埃希菌 BL21 (DE3)中的表达产物 SDS-PAGE 分析 重组质粒 pET28α-Sj26GST-Sj32 转化大肠埃希菌 BL21(DE3),经 IPTG 诱导表达,菌体蛋白的 SDS-PAGE 结果显示其相对分子质量约 69×10³,与预期值相符。薄层扫描分析显示,Sj26GST-Sj32 融合蛋白在 IPTG 诱导 5~7 h 蛋白表达量达较高水平。

2.2 纯化的 rSj26-Sj32 的 SDS-PAGE 分析 BL21(pET28α-Sj26-Sj32)培养至对数生长期,经 IPTG 诱导 7 h 的表达产物利用 Ni-NTA 试剂盒纯化,然后进行 SDS-PAGE 电泳,纯化后的 rSj26-Sj32 在约 69×10³ 处有明显的蛋白表达条带,其相对分子质量与预期值相符。

2.3 rSj26-Sj32 和 SjAWA 包被浓度选择 在进行 ELISA 实验时,rSj26-Sj32 和 SjAWA 的包被浓度分别为 0.4、2.0 微克/孔,两者的阳参/阴参的 A 值之比分别为最大。因此,在采用 Immunogold-IgG-Dipstick 法时,rSj26-Sj32 和 SjAWA 的包被浓度分别选择 0.4、2.0 微克/孔。

2.4 Immunogold-IgG-Dipstick 法检测 rSj26-Sj32-Immunogold-IgG-Dipstick 法检测急性日本血吸虫患者的敏感性和特异性分别为 96.00%和 97.67%,SjAWA 检测的敏感性和特异性分别为 98.00%和 95.35%,两者比较差异无统计学意义($P>0.05$);SjAWA 检测华支睾吸虫病、卫氏并殖吸虫病和泡型棘球蚴病患者血清时,分别出现 9.52%、7.69%和 20.00% 的交叉反应,而 rSj26-Sj32 则未见交叉反应;两种抗原检测囊型棘球蚴病、肺结核和乙型肝炎患者血清时均未见交叉反应,见表 1。rSj26-Sj32 诊断急性日本血吸虫病的阳性预告值、阴性预告值和诊断效率分别为 97.96%、95.45%和 96.77%;而 SjAWA 分别为 96.08%、97.62%和 96.77%。

表 1 rSj26-Sj32-Immunogold-IgG-Dipstick 法用于急性日本血吸虫患者的诊断价值

检测对象	rSj26-Sj32-Immunogold-IgG-Dipstick		SjAWA -Immunogold-IgG-Dipstick	
	阳性(n)	阳性率(%)	阳性(n)	阳性率(%)
急性日本血吸虫病	48	96.00	49	98.00
华支睾吸虫病	0	0.00	2	9.52
卫氏并殖吸虫病	0	0.00	1	7.69
泡型棘球蚴病	0	0.00	2	20.00
囊型棘球蚴病	0	0.00	0	0.00
乙型肝炎	0	0.00	0	0.00
肺结核	0	0.00	0	0.00
健康人	1	2.33	2	4.65

3 讨 论

Ni-NTA 中 Ni²⁺ 有 4 个共价键与 NTA 结合,使得 Ni 与 NTA 结合更牢固,脱落率低,可提高蛋白纯度,并减少 Ni²⁺ 脱落造成的环境污染。本研究利用 Ni-NTA 纯化试剂盒对重组质粒 pET28α-Sj26GST-Sj32 在大肠埃希菌 BL21(DE3)中诱导的表达产物进行纯化,获得了 rSj26-Sj32 融合蛋白,经电泳鉴定与预期结果吻合,表明 rSj26-Sj32 融合蛋白制备成功。

抗体 IgG 与日本血吸虫急性感染、慢性感染及再感染关系密切,急性日本血吸虫患者的 IgG 含量与慢性血吸虫病患者相近,均远高于健康人。检测特异性 IgG 具有较高的诊断价值和部分疗效考核价值^[8-12]。氯金酸在还原剂的作用下可聚合成一定大小的金颗粒,形成带负电的疏水胶溶液,由于静电作用成为稳定的胶体状态,故称胶体金。由于胶体金对葡萄球菌 A 蛋白、免疫球蛋白、毒素、糖蛋白、酶、抗菌剂、激素及牛血清蛋白多肽缀合物有很强的吸附功能,可以作为标志物进行细胞表面和细胞内生物大分子的精确定位,因而在基础研究和临床检验中是非常有用的工具^[13]。日本血吸虫病疫区人群的感染率随着采用吡喹酮化疗和灭螺的综合防治措施已明显下降,常规的 Kato-Katz 粪检方法对轻度和早期感染者检出率低,且易漏诊^[14]。目前使用较多的免疫诊断方法均存在明显的缺陷,如 COPT 操作复杂、费时和需要显微镜等;IHA 致敏血球稳定性差^[15];ELISA 操作复杂、费时、影响检测因素多及需要酶标仪等。而 Dipstick 法是近年发展起来的 1 种快速、简便、高效的、不需要任何特殊仪器设备的血吸虫病免疫诊断方法,较现有的免疫诊断方法更适合现场大规模应用^[16]。本文利用纯化的 rSj26-Sj32 建立 Immunogold-IgG-Dipstick 法检测急性日本血吸虫病患者血清中的 IgG 抗体,发现其与 SjAWA 有着

相似的敏感性和特异性,而 rSj26-Sj32 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无交叉反应,与 rSj26 和 Sj32 作为单个抗原已报道的结果相一致^[17-19]。本研究提示,纯化的 rSj26-Sj32 融合蛋白用于急性日本血吸虫病患者血清中抗体的检测具有良好的免疫反应性,是 1 种有价值的诊断抗原。今后需扩大样本量进行检测,进一步研究 rSj26-Sj32 融合蛋白在急性日本血吸虫病免疫诊断中的使用价值,为其现场应用提供有价值的材料。

参考文献

[1] 郝阳,吴晓华,郑浩,等. 2007 年全国血吸虫病疫情通报[J]. 中国血吸虫病防治杂志,2008,20(6):401-404.

[2] 罗庆礼,沈继龙,汪学龙,等. 重组日本血吸虫 26 kU 谷胱甘肽-S-转移酶的表达、纯化及其免疫特性分析用于急性血吸虫病免疫诊断[J]. 安徽医科大学学报,2005,40(6):491-494.

[3] 石佑恩,Dell R,Diesfeld HJ,等. 日本血吸虫成虫 31/32×10³ 诊断蛋白与血吸虫单克隆抗体和患者血清的免疫印斑反应[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志,1988,6(4):245-247.

[4] Zhu YC, He W, Liang YS, et al. Development of a rapid simple dipstick dye immunoassay for schistosomiasis diagnosis[J]. J Immunol Meth, 2002, 266(1): 1-5.

[5] 何伟,朱荫昌,陈万全,等. 血吸虫病快速免疫诊断——胶体试纸条法的研究[J]. 中国血吸虫病防治杂志,2000,12(1):18-20.

[6] 何伟,朱荫昌,曹国群,等. 血吸虫病快速诊断试剂盒的优化及其应用[J]. 中国血吸虫病防治杂志,2002,14(6):401-404.

[7] 赵巍,苏川,吴海玮,等. 日本血吸虫(中国大陆株)22.6×10³ 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.

[8] 龚镇奎,骆林,肖红雨,等. ELISA 方法检测血吸虫抗体的研究

[J]. 湖北预防医学杂志,2001,12(5):1-2.

[9] 张仁利,贺连华,吴平芳,等. 日本血吸虫感染者尿液中特异性 IgG 及亚类的检测[J]. 中国热带医学,2004,4(4):156-158.

[10] 鞠川,冯正,胡薇. 日本血吸虫病免疫诊断方法的研究进展[J]. 国际医学寄生虫病杂志,2006,33(5):250-255.

[11] Wu GA. Historical perspective on the immunodiagnosis of schistosomiasis in China[J]. Acta Tropica, 2002, 82(2): 193-198.

[12] 李允鹤. 寄生虫病免疫学及免疫诊断[M]. 南京:江苏科学技术出版社,1991:42-54,210-234.

[13] Chitsulo L, Engels D, Montresor A, et al. The global status of schistosomiasis and its control[J]. Acta Tropica, 2000, 77(1): 41-51.

[14] 魏泉德,石佑恩. 血吸虫病治疗前后 IgG 及其亚类的变化和疗效考核的研究[J]. 中国人兽共患病杂志,1998,14(1):30-32.

[15] Rabello AL, Garcia MM, da Silva RA, et al. Humoral immune responses in acute schistosomiasis mansoni: relation to morbidity [J]. Clin Inf Dis, 1995, 21(3): 608-615.

[16] Bocter FN, Peter JB. IgG subclasses in human chronic schistosomiasis: over-production of schistosoma-specific and nonspecific IgG₄ [J]. Clin Exp Immunol, 1990, 82(3): 574-578.

[17] 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.

[18] 王细宏,罗飞,沈继龙. 重组日本血吸虫谷胱甘肽-S-转移酶单克隆抗体在急性血吸虫病临床诊断中的应用[J]. 检验医学,2008,23(6):578-581.

[19] 沈定文,罗金萍,陈喜珪,等. 日本血吸虫 31/32×10³ 抗体的检测及其在诊断中的作用[J]. 中国公共卫生,2000,16(1):28-29.

(收稿日期:2011-02-05)

(上接第 1029 页)

体的细菌中,IS903 的移动能引起基因间的沉默(基因的插入或缺失),或基因的相互作用(上游产生或介导启动子),是使其靶基因产生突变的有效方法。

由 ISEcp1B 和 IS903 2 个 IS 连接在 CTX-M 型 ESBLs 的两侧构成了复合转座子。复合转位子很容易携带着抗菌剂抗性基因,从细菌染色体转移到质粒或噬菌体基因组上。转座子的移动或通过分子间的相互作用能引起更广泛的基因重排,包括缺失、插入染色体部分的复制,这些更容易促进基因的进化。复合转座子俘获及启动 CTX-M 型 β-内酰胺酶表达的能力,在一定程度上能解析 bla_{CTX-M} 型 β-内酰胺酶在世界范围内流行的原因。

参考文献

[1] Bae IK, Lee BH, Hwang HY, et al. A novel ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum beta-lactamase, CTX-M-54, with a single amino acid substitution at position 167 in the omega loop [J]. J Antimicrob Chemother, 2006, 58(2): 315-319.

[2] 肖庆忠,苏丹虹,江洁华,等. 广州地区 3 500 株革兰阴性杆菌 CTX-M 型和 OXA 型超广谱 β-内酰胺酶基因分型研究[J]. 中华医院感染学杂志,2005,15(12):1321-1326.

[3] Marie FL, Laurent P, Daniel A, et al. In vitro analysis of ISEcp1B-mediated mobilization of naturally occurring lactamase gene bla_{CTX-M} of kluyvera ascorbata [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(4): 1282-1286.

[4] 韩立中,蒋晓飞,王大方,等. 1 株铜绿假单胞菌中检出两种新的整合子[J]. 中华微生物学和免疫学杂志,2005,25(6):485-489.

[5] Eckert C, Gautier V, Arlet G, et al. DNA sequence analysis of the genetic environment of various bla_{CTX-M} genes [J]. J Antimicrob Chemother, 2006, 57(1): 14-23.

[6] 张永标,张扣兴,唐英春,等. 产质粒介导的 AmpC 酶和 ESBLs 细菌的耐药性及 β-内酰胺酶基因型研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志,2004,24(7):577-582.

[7] 李心晖,石磊,杨维青,等. 三类整合酶基因(intI)的简并引物 PCR 方法建立及应用[J]. 中华微生物学和免疫学杂志,2005,25(2):156-160.

[8] Eckert C, Gautier V, Saladin-Allard M, et al. Dissemination of CTX-M-type-lactamases among clinical isolates of enterobacteriaceae in Paris, France [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(4): 1249-1255.

[9] Poirlet L, Decusser JW, Nordmann P, et al. Insertion sequence ISEcp1B is involved in expression and mobilization of a bla_{CTX-M} beta-lactamase gene [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47(9): 2938-2945.

[10] Ho PL, Shek RH, Chow KH, et al. Detection and characterization of extended-spectrum beta-lactamases among bloodstream isolates of enterobacter spp. in Hong Kong, 2000—2002 [J]. J Antimicrob Chemother, 2005, 5(3): 326-332.

(收稿日期:2011-02-05)