

# 高效特异的抗日本血吸虫 循环抗原免疫血清制备的研究

黎世涛 王秀珍 周蕊 王稚秋

张声海 胡宗勤 周贤坤

(四川省寄生虫病防治研究所)

制备高效特异的抗血吸虫循环抗原的免疫血清，是提高检测循环抗原方法灵敏度的重要环节。Bawden(1974)曾用淀粉凝胶电泳分离循环抗原，用甲基化牛血清白蛋白作为载体致敏动物，但所得的抗血清特异性较差。平田瑞成(1976)用酚抽提循环抗原制备抗血清，但免疫源性较差。Deelder(1976)和Houba(1976)证明曼氏血吸虫宿主血循环中存在多种抗原组分，其中三种循环抗原为虫源性，两种不耐热、不溶于三氯醋酸。

目前，学者多用三氯醋酸提取物为免疫源。以该提取物致敏动物获得的抗血清不足以检出全部循环抗原(Nash, 1974, 杨士静, 1981)，为提高抗血清的敏感度和特异性以增加血吸虫循环抗原的检出率，我们进行了如下研究。

## 材 料 和 方 法

### 一、抗原及载体的制备

(一) 抗原种类：血吸虫成虫可溶性抗原(AWA)、血吸虫循环抗原(CSA)即三氯醋酸提取物、成虫代谢抗原(M—AWA)，分别用Lowry氏酚试剂法、蒽酮法、地衣酚试剂法进行蛋白、多糖及核糖核酸定量。

(二) 甲基化载体蛋白的制备：将小牛血清白蛋白(FSA)、兔血清白蛋白(RSA)及血吸虫虫体蛋白(SWP)按病毒学基本技术介绍的方法制备。

### 二、抗原分组：

(一) 单纯成虫抗原组：1%可溶性成虫抗原(含蛋白质1.25mg/ml，含糖85.94 $\mu$ g/ml)。

(二) 加甲基化载体的成虫抗原组：1%可溶性成虫抗原按1%比例(W/V)加入甲基化的牛血清白蛋白。

(三) 复合核苷酸添加佐剂组：在加甲基化载体的成虫抗原中加入复合核苷酸钠盐(8mg/兔)作添加佐剂。

(四)单纯三氯醋酸提取的循环抗原组：用1mg / ml的CSA按1%比例加入甲基化的兔血清白蛋白。

(五)单纯成虫分泌代谢抗原组：经台氏液体外培养24小时的成虫分泌代谢产物，经透析浓缩后冻干。配制成1mg / ml溶液，按1%比例加入甲基化的兔血清白蛋白。

(六)纯化的CSA组：将CSA用Sephadex—G200和DEAE纤维素柱纯化，收集活性峰，浓缩后冻干。配制成1mg / ml溶液，并按1%比例加入甲基化的兔血清白蛋白。

(七)混合型循环抗原组：用三氯醋酸提取物加等量代谢抗原。分别将SWP、A、RSA三种载体蛋白按1%量(W / V)加入。

### 三、免疫方法：

选择健康家兔，用血吸虫虫卵抗原与家兔血清作对流免疫电泳，检测为阴性者备用。分别用全量免疫法、微量免疫法(参照陈淑贞，1981)和作者改良的膈窝淋巴结内注射法进行免疫。

改良膈窝淋巴结内注射法的首次抗原用量为1mg / ml，加等量1号福氏完全佐剂(含卡介苗3mg / ml)，按每点0.25ml分别注入四肢足掌、双侧臀部、肩胛及双侧膈窝淋巴结。两周后进行第二次免疫，以抗原0.5mg / ml，加等量1号福氏完全佐剂，注入肿大的膈窝淋巴结内，每点0.25ml。免疫结束后二周试血，效价达6400以上者即可放血，如需获得较多血清量，可采取分次心脏采血，每次30ml左右。

获得的抗血清与不同稀释度的相对应的免疫抗原作对流免疫电泳测定其效价，与定量的代谢抗原作对流电泳以检出最低的CSA的毫微克数，确定其敏感度。

## 结 果

三种不同的免疫方法用同一免疫源免疫均能获得较好的成功率，用后两种方法免疫获得的抗血清的效价较全量免疫法高一个滴度(表1)。

表 1 三种不同方法的免疫效果比较

免疫方法	免疫动物 (只)	阳性动物数 (只)	抗 血 清 效 价			阴性动物数 (只)
			1:6400	1:12800	1:25600	
全量免疫法	11	9	4	4	1	2
微量免疫法	22	17	1	1	15	5
改良窝淋巴 结内注射法	15	15	0	0	15	0

成虫抗原免疫血清对分泌代谢抗原检出为0，而加入甲基化载体蛋白的成虫抗原免疫血清对代谢抗原敏感度可达25ng。但两种抗血清对成虫抗原都能产生较高的效价(表2)。

表 2

两种不同抗原制备抗血清效果比较

抗原种类	免疫动物 (只)	抗血清对成虫抗原的效价				抗血清对M—AWA单向敏感度			
		阳	1:6400	1:12800	1:25600	阳	125ng	50ng	25ng
		性 (只)				性 (只)			
单纯成虫抗原	7	4	3	1	0	0	0	0	0
加入甲基化 载体蛋白的 成虫抗原	15	12	2	4	6	12	2	9	1

用单纯三氯醋酸提取物、单纯成虫代谢抗原及两者混合型的循环抗原以及纯化的CSA分别免疫进行比较，以混合型循环抗原效果最好，免疫成功率为90.1%。比单纯CSA免疫效价高2—3个滴度，其检测M—AWA的电泳敏感度最高可达25ng。单纯用M—AWA免疫效果较差，而纯化的CSA免疫效果最差。

应用SWP、FSA及RSA三种不同的载体蛋白结合多糖抗原其免疫成功率分别为100、75及66.7%。用三种抗血清和相应的载体蛋白作双扩及对流免疫电泳均未见沉淀线。

应用复合核苷酸钠作添加佐剂组免疫成功率为87.5%，效价均在1:128001以上。而对照组成功率为7.42%，只有60%的效价在1:12800。

全量法第二次免疫后测效价与第四次免疫后测的效价经统计学处理无显著差异 $P > 0.05$ 。

## 讨 论 与 小 结

三种免疫方法制备的抗血吸虫循环抗原血清，均能获得较满意的结果。

全量法第二次免疫后其效价及对特异性抗原的敏感度已达高峰，再加强二次水剂抗原免疫，效价无显著上升趋势，因此，采取两次加福氏完全佐剂的抗原免疫即可，这样既节省抗原用量又缩短获得抗血清的时间，且效价高峰可维持2—3周，有利于分次采血以增加抗血清的收获量。

淋巴结内注射法抗原用量较省，免疫后效价较全量法高一个滴度，但免疫时必须将抗原完全注入淋巴结内，否则影响成功率。

经作者改良的腭窝淋巴结内注射法，兼备了上述两种方法的优点，注射次数少，免疫时间短，特异性高，即使注入淋巴结附近仍可获得较好的免疫效果。

血吸虫可溶性虫体蛋白与牛血清白蛋白、兔血清白蛋白作载体进行比较，以血吸虫可溶性虫体蛋白略优，但该蛋白来源不易，而用成虫抗原制备抗循环抗原血清，材料来源方便。为提高成虫抗原制备的抗血清检测循环抗原的敏感度，在可溶性成虫抗原中加甲基化载体蛋白是最简便易行的。

佐剂中加入复合核苷酸可提高抗血清的效价，是制备高效抗血清的一种较好的添加佐剂。

采用免疫动物同种载体蛋白(RSA)和异种载体蛋白(FSA)比较其效价未见明显差异。所获得的免疫血清和相对应的载体蛋白在对流免疫电泳和双扩散试验均未发现沉淀线。

## 参 考 文 献

- Bawden MP et al. 1974 *Schistosoma mansoni* circulating antigen detection by complement fixation in sera from infected hamsters and mice. *Am. Trop. Med. Hyg.* 23 : 1077—1084.
- Deelder AM et al. 1976 *Schistosoma mansoni* demonstration of two circulation antigen in infected hamsters. *Exp. Parasitol.* 40 : 189—197.
- Houba V et al. 1976 Soluble antigens and antibodies in sera from baboons infected with *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.* 117 : 705—707.
- Nash TE et al. 1974 The characteristics of a circulating antigen in schistosomiasis. *J. Immunol.* 112 : 1500—1507.
- 杨士静等 1981 反向间接血凝检测日本血吸虫病。上海免疫学杂志 1(3) : 6—12。
- 陈淑贞等 1981 抗血吸虫免疫血清制备方法的研究。南京医学院学报 1(3) : 62—63。
- 中国科学院微生物研究所病毒学基本技术翻译小组 1976 病毒学基本技术 科学出版社。

# 蛇 的 半 阴 茎

张 服 基

(中国科学院成都生物研究所)

蛇是我们生活中最熟悉的动物之一。每当谈起蛇，自然会联想到它细长光滑而没有脚的体形，或出没于荒草野塚间，或隐匿于墙角石隙中的生活习性。蛇的无脚可能是人们印象最深的特征。然而我们不时听到有人说：他们确实曾见到蛇从其肛孔两侧伸出它的一双“脚”来！其实，这并不是脚，而是雄蛇伸出的一对交接器(外生殖器)，又叫半阴茎(hemipenis)。

## 独 特 的 半 阴 茎 结 构

哺乳动物的阴茎(penis)在每个雄体只有一个，由背侧的二个阴茎海绵体和腹面的一个尿道海绵体构成，尿道贯穿其中。爬行动物中的鳄类、龟类以及少数鸟类(如鸵鸟、鸭类)也具有类似的单一阴茎，只不过较为原始罢了，一般由一个长柱形海绵体构成，一条输送精液的精沟纵行其表面，并且具有伸出和缩入泄殖腔中的能力。然而蛇的半阴茎却是一对，位于雄蛇泄殖腔后尾下的囊状物，囊壁中也有所谓海绵体的结构，其