

# 单克隆抗体抑制性酶联免疫吸附试验 (I-ELISA)检测日本血吸虫虫卵抗原

周蕊 繆德强 张一伟 韩跃 张声海 朱瑞淑

(四川省医学科学院寄生虫病防治研究所)

检测血吸虫抗原较之检测虫体的明显优点是可准确地估计虫荷以及判断是否活动性感染,有助于了解化疗效果。近年来国内已有用双抗体夹心酶联法检测血吸虫循环抗原的报道。使用高效特异的单克隆抗体可望进一步提高检测的敏感性。本文对单克隆抗体(McAb) I-ELISA检测日本血吸虫虫卵抗原的敏感性和特异性作了初步探讨。有关本法检测感染日本血吸虫的动物和病人血中血吸虫虫卵抗原的情况将另文报道。

## 材料与方 法

McAb制备:用日本血吸虫虫卵抗原(SEA)免疫BALB / C小鼠,取其脾细胞与SP2 / O小鼠骨髓瘤细胞融合,经克隆化后获得3株分泌抗日本血吸虫虫卵McAb杂交瘤细胞株,将其中1株细胞接种于小鼠腹腔,诱生的腹水McAb—2D11在-70℃保存一年后用于本项试验。

抗原制备:日本血吸虫可溶性虫卵抗原(SEA)和血吸虫成虫抗原按常规方法制备。肺吸虫成虫抗原、华枝睾吸虫成虫抗原和包虫囊液抗原由本所吸虫室提供。

I-ELISA操作方法:用吐温-PBS(pH7.2)将McAb稀释成1:250,再作2倍稀释至1:32000。用吐温PBS将SEA稀释成120 μg / μl,再作2倍稀释至0.02 μg/ml。将每一稀释度McAb与不同量SEA按1:1比例混合,使各封闭抗原的浓度从0.01 μg / ml至60 μg / ml,置4℃过夜。于55孔微量滴定板上,每孔加入SEA60 μg / 200 μl,置4℃过夜,吐温-PBS洗3次,每孔加入含1%BSA的碳酸缓冲液(pH9.6)200 μl,37℃孵育1小时,同上洗3次。每孔加入不同稀释度McAb与SEA的混合液200 μl,置37℃2小时,洗3次,每孔加入1:40稀释的羊抗鼠IgG酶结合物200 μl,置37℃2小时,洗3次后每孔加入邻苯二胺底物液200 μl,室温30分钟后加入2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>450 μl终止反应,读取490nm光密度(OD)值,按下列公式求出封闭抗原浓度的抑制率,并计算出能产生50%抑制率所需的各封闭抗原量。抑制率=〔(无封闭抗原的McAb平均OD值) - (封闭抗原的McAb平均OD值)〕 / 无封闭抗原的McAb平均OD值 × 100%。

另以日本血吸虫成虫抗原、肺吸虫成虫抗原、华枝睾吸虫成虫抗原、包虫囊液抗原作为封闭抗原进行I-ELISA,以观察本法检测SEA的特异性。

每次试验均作双份标本,并设以下对照孔:(一)包被抗原空白;(二)封闭抗原空白;(三)单克隆抗体空白(以SP2 / O腹水代替);(四)PBS空白(不加封闭抗原、单克隆抗体和酶结合物)。

## 结果

一、 I-ELISA检测SEA的敏感性 在应用低稀释度的(1:1000以下)的McAb时,即使采用60  $\mu\text{g}/\text{ml}$  SEA仍未能抑制50%McAb结合,当McAb稀释为1:4000, 1:8000, 1:16000及1:32000时,产生50%抑制的封闭抗原浓度依次为30, 75, 1.87, 0.11  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。当McAb稀释为1:64000时,无封闭抗原的McAb结合力也很低。半年后,再重复此项工作。-70 保存一年半后的McAb活性有所下降, McAb稀释至1:4000时,产生50%抑制的封闭抗原浓度为0.08  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。I-ELISA检测SEA的敏感性取决于McAb的最适浓度。本法可检出低至0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的SEA(见图1、2)。



图1 不同浓度的McAb与封闭抗原进行I-ELISA的OD值(图中左侧各符号分别表示未经封闭的McAb OD值)



图2 不同浓度的McAb用不同量的抗原封闭后进行I-ELISA的抑制率

二、 I-ELISA检测SEA的特异性 1:32000稀释的McAb,分别用等量的60  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的SEA、血吸虫成虫抗原、肺吸虫成虫抗原、华枝睾吸虫成虫抗原和包虫囊液抗原吸收作I-ELISA,其抑制率分别为70%、35%、35%、35%和32%。除SEA外,其它抗原即使用最高量的封闭抗原也未能抑制50%McAb的结合,证明本法检测SEA有高度特异性。

## 讨论

用单克隆抗体作I-ELISA检测血吸虫虫卵抗原,国内尚未见报道。本法的敏感性取决于单克隆抗体的浓度。无疑,应用单克隆抗体较一般多克隆抗体的免疫血清具有更高的敏感性和特异性。我们用此法可以检出低至0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的SEA,与Abdel-Hafez SK报道用McAb I-ELISA可检出0.3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 曼氏血吸虫SEA的结果接近。本法检测SEA不受其它寄生虫抗原的干扰,重复性好,所需McAb量很少,一旦分泌McAb的杂交瘤细胞株建立,将取之不尽。故认为McAb I-ELISA是一种检测血吸虫卵抗原的好方法。

## 参 考 文 献

- 钱宗立等 1988 日本血吸虫轻感染家兔的循环多糖抗原检测及其免疫反应 寄生虫学与寄生虫病杂志 1(4):21。
- 缪德强等 1986 分泌抗日本血吸虫卵单克隆抗体杂交瘤细胞株的建立 中华预防医学杂志 20(1):58。
- Abdel-Hafez SK, et al. 1984 Schistosoma mansoni: Detection and characterization of Schistosoma derived antigen by inhibition enzyme-linked immunosorbent assay(IELISA)utilizing monoclonal antibodies. Z. Parasitenkd 70(1):105-117.