

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07K 16/18

C07K 14/435

A61K 39/00

A61P 33/00

G01N 33/53



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03802969.3

[43] 公开日 2005 年 6 月 8 日

[11] 公开号 CN 1625567A

[22] 申请日 2003. 1. 30 [21] 申请号 03802969. 3

[30] 优先权

[32] 2002. 1. 30 [33] AU [31] PS0214

[86] 国际申请 PCT/NZ2003/000010 2003. 1. 30

[87] 国际公布 WO2003/064475 英 2003. 8. 7

[85] 进入国家阶段日期 2004. 7. 29

[71] 申请人 奥维塔有限公司

地址 新西兰达尼丁

[72] 发明人 加文·伯纳德·李尔·哈里森

韦恩·罗伯特·海恩

休·道格拉斯·普尔福德

查理·比克斯·舒梅克

[74] 专利代理机构 北京金信联合知识产权代理有限公司

代理人 南 霆

权利要求书 4 页 说明书 33 页 附图 32 页

[54] 发明名称 新的单克隆抗体和线虫幼虫抗原

[57] 摘要

本发明涉及到分离的单克隆抗体 mAb PAB - 1, 该抗体于 2002 年 1 月 24 保藏于 ATCC, 登记号为 PTA - 4005, 其能与线虫 L3 的表面抗原结合。本发明还涉及到能与该单克隆抗体结合的抗原以及该单克隆抗体和抗原在诊断和治疗或预防线虫感染方面的应用。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、分离的单克隆抗体 mAb PAB-1, 于 2002 年 1 月 24 日在 ATCC 保藏, 登记号为 PTA-4005, 其能够与线虫 L3 表面的抗原
5 结合。

2、如权利要求 1 所述的分离的单克隆抗体, 其中该抗体与源自蛇形毛圆线虫 (*T.colubriformis*) L3 的抗原结合, 且在还原的条件下该抗原在 SDS PAGE 凝胶中约 35kDa 处出现条带。

10

3、如权利要求 1 所述的分离的单克隆抗体, 其与 L3 的表面抗原结合, 该表面抗原选自:

a) 古巴毛样线虫 (*C.curticei*) 上的表面抗原, 其在还原条件下 SDS PAGE 凝胶中基本上在 46kDa 处和 22kDa 处出现条带;

15 b) 匙状细颈毛样线虫 (*N. Spathiger*) 上的表面抗原, 其在还原条件下 SDS PAGE 凝胶中基本上在 22kDa 处出现条带;

c) 捻转血矛线虫 (*H.contortus*) 上的表面抗原, 其在还原条件下 SDS PAGE 凝胶中基本上在 35kDa 处出现条带;

20 d) 环颈奥斯他胃虫 (*O.circumcincta*) 上的表面抗原, 其在还原条件下 SDS PAGE 凝胶中基本上在约 35-39kDa 处出现条带;

e) *T.axei* 或 *T.vitrinus* 上的表面抗原, 其在还原条件下 SDS PAGE 凝胶中基本上在 35kDa 处出现条带;

f) 结节线虫 (*O.ostertagi*) 上的表面抗原, 其在还原条件下在 SDS PAGE 凝胶中基本上在 30-45kDa 处出现条带;

25 g) *C. oncophora* 上的表面抗原, 其在还原条件下 SDS PAGE 凝胶中基本上在 20kDa 处和约 45kDa 处出现条带;

h) 巴西奴卡菌 (*N.brasiliensis*) 上的表面抗原, 其在还原条件下 SDS PAGE 凝胶中基本上在 9kDa 处和约 12kDa 处出现条带;

i) *D. eckerti* 上的表面抗原，其在还原条件下 SDS PAGE 凝胶中基本上在 30kDa 处出现条带。

4、如权利要求 1 所述的分离的单克隆抗体，其中当该抗体与
5 固体支持物连结时，其能用于通过免疫亲和色谱法纯化表面抗原。

5、源自线虫 L3 的分离的糖表面抗原，其中该抗原能与单克隆抗体 mAb PAB1 结合，该单克隆抗体已于 2002 年 1 月 24 日在
10 ATCC 保藏，登记号为 PTA-4005。

6、基本上如权利要求 5 所述的分离的抗原，其中该抗原在还原条件下 SDS PAGE 凝胶中基本上在 20-35kDa 间出现条带，或基本上在 9kDa 和 12kDa 处出现条带。

15

7、如权利要求 5 所述的分离的抗原，其中该抗原源自蛇形毛圆线虫 L3。

8、如权利要求 5 所述的分离的抗原，其中该抗原源自线虫
20 L3，该线虫 L3 分离自古巴毛样线虫、匙状细颈毛样线虫、捻转血矛线虫、环颈奥斯他胃虫、*T. axei*、*T. vitriyus*、结节线虫、*Concophora*、巴西奴卡菌或 *D. eckerti*。

9、含有如权利要求 5 所述的抗原和药学上或兽学上可接受的
25 载体或稀释剂的组合物。

10、如权利要求 5 所述的抗原在制备用于预防、治疗线虫感染或降低线虫感染易感性的组合物的用途。

11、如权利要求 9 所述的组合物用于受线虫感染的易感羊，
以预防、治疗线虫感染或降低其感染易感性，这些线虫选自蛇形
毛圆线虫、古巴毛样线虫、匙状细颈毛样线虫、捻转血矛线虫、
5 环颈奥斯他胃虫、*T.axei*、*T.vitrinus*、结节线虫、*C.oncophera*、巴
西奴卡菌和 *D.eckerti*。

12、如权利要求 9 所述的组合物，该组合物用于除羊之外的
易感动物以预防、治疗线虫感染或降低线虫感染易感性，其中这
10 些其它种类的线虫也具有可通过与上述单克隆抗体 PAB-1 反应来
检测的幼虫表面抗原。

13、如权利要求 9 所述的组合物，其中的组合物还包含至少
一种佐剂或细胞因子。

15

14、诊断易感动物线虫感染的方法，该方法包括如下步骤：

a) 自动物获得血液样品；

b) 通过合适的检验方法，分析血样是否存在抗如权利
要求 3 所述抗原的抗体。

20

15、如权利要求 3 所述的分离的抗体，其中该抗体来源于动
物的胃肠道粘液，这些动物用选自下列的线虫的截短型感染免
疫：蛇形毛圆线虫、古巴毛样线虫、匙状细颈毛样线虫、捻转血
矛线虫、环颈奥斯他胃虫、*T.axei*、*T.vitrinus*、结节线虫、
25 *C.oncophera*、巴西奴卡菌和 *D.eckerti*。

16、通过用如权利要求 9 所述的组合物给药来预防、治疗动
物线虫感染或降低线虫感染易感性的方法。

17、如权利要求 5-8 中任一项所述的抗原用于在羊或其他易感动物的肠道粘液内引起抗体反应以预防、治疗线虫感染或降低线虫感染易感性的用途。

5

18、如权利要求 1-3 中任一项所述的抗体用于检测羊体内线虫感染的用途。

新的单克隆抗体和线虫幼虫抗原

5 技术领域

本发明涉及单克隆抗体及线虫幼虫抗原。具体地，本发明涉及对寄生线虫的第三阶段幼虫（L3）的表面抗原具有特异性的单克隆抗体。

10 背景技术

线虫类动物寄生虫，如羊和牛寄生虫的群袭现象在农业上具有重要的经济学意义，通常用驱虫药给药治疗线虫感染。

然而，常规驱虫药的主要缺点是：线虫对大量的驱虫药产生抗性变得越来越广泛，因而产生严重困扰(Waller, 1997; Sangster et al, 1999; Van Wyk et al, 1999)。

已有许多假设试图解释线虫被驱除出免疫羊的肠道的机理(Rothwell 1989)。有证据表明速发型超敏反应因素与其有关，在该反应中，抗原刺激 IgE 敏感性粘膜柱细胞而使可能影响线虫存活的化合物在粘液积累 (Miller 1996; Emery 等 1997)。粘液的抗线虫属性与化学介质(Douch 等 1983; Jones 等 1990) 及抗体 (Lee & Ogilvie 1981; Miller 1987; Carlisle 等 1991) 的存在有关。最近本发明人发现通过多次截短型感染使羊体免疫后，获取其肠道粘液与幼虫混合，后注入初次接受免疫的羊的十二指肠，能够改变幼虫形成的模式(Harrison 等 1999)。从对蛇形毛圆线虫 (Trichostrongylus colubriformis) 具免疫力的羊的小肠中收集粘液，发现其具有抗线虫活性，将其与幼虫通过十二指肠导管注入初次接受免疫的羊后，其使线虫在体外结块，从而显著减少了羊体内幼虫形成的数目。

免疫印迹表明免疫粘液内含有 IgG 和 IgA 抗体，它们对分子量约为 35kDa 的抗原具有识别优势。从培养在免疫粘液中的幼虫的表面洗脱得到的抗体也与线虫匀浆物印迹上的 35 kDa 的抗原反应。免疫荧光检测法和免疫金电镜显微实验表明该 35 kDa 的抗原存在于 L3 的上表皮，在向 L4 蜕变过程中减少。在虫卵、L1、L2、L4 及成虫上不存在该抗原，仅仅在感染前及感染后 5 天内的 L3 提取物中发现。该结果表明抗体与幼虫表面结合防止了幼虫在其偏好部位生长，并将它们清除出肠道。用部分纯化的 35kDa 的抗原免疫羊，蛇形毛圆线虫感染后的虫卵数目显著下降，这表明该抗原在疫苗方面的潜在用途。

制备称为 PAB-1 的单克隆抗体 (PAB-1 单抗, MAbs PAB-1) 来对抗幼虫表面抗原。PAB-1 单抗与羊粘液抗体均识别 35 kDa 的蛇形毛圆线虫幼虫的抗原，且与捻转血矛线虫 (*Haemonchus contortus*) 和环颈奥斯他胃虫 (*Ostertagia circumcincta*) 寄生性线虫的 L3 提取物印迹上的一种具有相似分子量的抗原及古巴毛样线虫 (*Cooperia curticei*) 和匙状细颈毛样线虫 (*Nematodirus spathiger*) 的 L3 提取物的抗原印迹上的 22kDa 的抗原发生交叉反应。这表明其他线虫种属上也存在具有免疫潜力的通用表面抗原，该抗原被 PAB-1 单抗识别。35 kDa 的幼虫抗原及相关分子可能是宿主免疫应答的新靶标，因此可在抗线虫感染的疫苗或在其他免疫疗法中使用。

PAB-1 单克隆抗体在标准亲和色谱法中可用来纯化表面抗原。用连结于诸如琼脂糖、琼脂糖凝胶(sepharose)等固相支持物上的 PAB-1 单克隆抗体与 L3 粗提物中的表面抗原结合，使用低 pH 值的缓冲液可将表面抗原从抗体基质上洗脱出来，经 SDS PAGE 电泳法显示得到的表面抗原基本已提纯。通过此法提纯的表面抗原以羊的免疫粘液抗体印迹法检测，并可用检测糖类的方法进行染色。

已知 35kDa 的幼虫抗原及其相关大分子具有糖优势结构，该抗原对蛋白激酶 K 消化具有抗性的原因是因为：其在胶中不被敏感的蛋白染色剂染色；而被糖类染色剂染色，且能被诸如生物素一酰肼等的糖类标记试剂标记。

5 因此，PAB-1 单抗可能可用于鉴别及分离表面抗原以研制抗线虫感染的疫苗或其他免疫疗法。

感染了蛇形毛圆线虫的羊的血清及肠道粘液中含有能识别 35kDa 幼虫抗原及其相关分子的抗体，因此，当存在针对幼虫抗原的抗体时，表明感染了寄生虫；所以，PAB-1 单抗可能可用于
10 鉴定动物感染的有效工具。

包括任何专利或专利申请在内的所有本说明书引用的参考文献均在此被引为参考，这并不是认可任何参考文献都构成现有技术。关于参考文献提及的其作者的主张的讨论，申请人保留对所引用文献的准确性及妥当性提出质疑的权利。需要清楚解释的
15 是，虽然一些现有技术的文献在此被涉及，但是并不认为这些文献在新西兰或任何其他国家已经成为该领域的公知知识。

发明概述

本发明的第一方面提供了分离的单克隆抗体 mAb PAB-1，该
20 抗体已于 2002 年 1 月 24 日在 ATCC 保藏，登记号为 PTA-4005，其能与线虫 L3 表面抗原结合。

本发明的第二方面提供了如上所述的分离的单克隆抗体，其中该抗体与源自蛇形毛圆线虫 L3 的抗原结合，且还原条件下该抗原在 SDS PAGE 胶中约 35kDa 处出现条带。

25 本发明的第三方面提供了如上所述的分离的单克隆抗体，其与 L3 的表面抗原结合，该表面抗原选自：

a) 古巴毛样线虫 (*C.curticei*) 上的表面抗原，其在还原条件下在 SDS PAGE 凝胶中约 46kDa 处和约 22kDa 处出现条带；

b) 匙状细颈毛样线虫 (*N.spathiger*) 上的表面抗原, 其在还原条件下在 SDS PAGE 凝胶中约 22kDa 处出现条带;

c) 捻转血矛线虫 (*H.contortus*) 上的表面抗原, 其在还原条件下在 SDS PAGE 凝胶中约 35kDa 处和约 22kDa 处出现条带; 及

5 d) 环颈奥斯他胃虫 (*O.circumcincta*) 上的表面抗原, 其在还原条件下在 SDS PAGE 凝胶中约 35-39kDa 处出现条带;

e) *T. axei* 或 *T. vitrinus* 上的表面抗原, 其在还原条件下在 SDS PAGE 凝胶中约 35kDa 处出现条带;

10 f) 结节线虫 (*O.ostertagi*) 上的表面抗原, 其在还原条件下在 SDS PAGE 凝胶中约 30-45kDa 处出现条带;

g) *C. oncophora* 上的表面抗原, 其在还原条件下在 SDS PAGE 凝胶中约 20kDa 处和约 45kDa 处出现条带;

h) 巴西奴卡菌 (*N. brasiliensis*) 上的表面抗原, 其在还原条件下在 SDS PAGE 凝胶中约 9kDa 处和约 12kDa 处出现条带;

15 i) *D. eckerti* 上的表面抗原, 其在还原条件下在 SDS PAGE 凝胶中约 30kDa 处出现条带;

本发明的第四方面提供了如上所述的分离的单克隆抗体, 其中当该抗体与固体支持物连结时, 其能用于通过免疫亲和色谱法纯化表面抗原。

20 本发明的第五方面提供了源自线虫 L3 的分离的糖表面抗原, 其中该抗原能与的单克隆抗体 mAb PAB1 结合, 该单克隆抗体已于 2002 年 1 月 24 日在 ATCC 保藏, 登记号为 PTA-4005。

最优选的所述抗原在 1 M NaOH 中对沸腾有抗性。

25 本发明的第六方面提供了分离的与上述抗原基本上一致的抗原, 其中该抗原在还原条件下 SDS PAGE 凝胶中基本上在 20-35kDa 间出现条带; 或基本上在 9kDa 和 12kDa 处出现条带。

本发明的第七方面提供了分离的与上述抗原基本上一致的抗原, 其中该抗原源自蛇形毛圆线虫 L3。

本发明的第八方面提供了一种分离的与上述抗原基本上一致的抗原，其中该抗原源自线虫 L3，该线虫 L3 分离自：古巴毛样线虫、匙状细颈毛样线虫、捻转血矛线虫、环颈奥斯他胃虫、T.axei、T.vitrinus、结节线虫、C.oncophera、巴西奴卡菌和
5 D.eckerti。

本发明的第九方面提供了含有与上述抗原基本上一致的抗原和药学上或兽学上可接受的载体或稀释剂的组合物。

本发明的第十方面提供了与上述抗原基本上一致的抗原的用途，该用途是生产用于预防、治疗线虫感染或降低线虫感染易感性的组合物。
10

本发明的第十一方面提供了与上述组合物基本上一致的组合物用于受线虫感染的易感羊体以预防、治疗线虫感染或降低其感染易感性的用途，这些线虫选自蛇形毛圆线虫、古巴毛样线虫、匙状细颈毛样线虫、捻转血矛线虫、环颈奥斯他胃虫、T.axei、
15 T.vitrinus、结节线虫、C.oncophera、巴西奴卡菌和 D.eckerti。

本发明的第十二方面提供了与上述组合物基本上一致的组合物，该组合物用于除羊之外的易感动物以预防、治疗线虫感染或降低线虫感染易感性；其中这些其它种类的线虫也具有可通过与上述单克隆抗体 PAB-1 反应来检测的幼虫表面抗原。

20 优选地，这些其它种类动物可是任何易感于线虫感染的如前所述的动物，还可以是小鼠、大鼠、豚鼠、兔、山羊、绵羊、马、猪、犬、猫、鸡、牛或鹿等。

本发明的第十三方面提供了与上述组合物基本上一致的组合物，其中该组合物还含有至少一种佐剂或细胞因子。

25 本发明的第十四方面提供了诊断易感动物线虫感染的方法，该方法包含如下步骤：

a) 自动物上获得血液样品；

b) 通过合适的检验方法，分析血样是否存在抗本发明第三方面所述抗原的抗体。

优选地，所述的检验方法可是 ELISA 或 western 印迹法，但这并不能看作是对可用的其它方法的限制。

5 本发明的第十五方面提供了与上述抗体基本相同的分离的抗体，其中该抗体来源于动物的胃肠道粘液，这些动物用选自下列的线虫的截短型感染（truncated infection）免疫：蛇形毛圆线虫、古巴毛样线虫、匙状细颈毛样线虫、捻转血矛线虫、环颈奥斯他胃虫、T.axei、T.vitrinus、结节线虫、C.oncophora、巴西奴卡菌和
10 D.eckerti。

本发明的第十六方面提供了通过用本发明的组合物给药来预防或治疗动物线虫感染的方法。

本发明的第十七方面提供了本发明的抗原用于在羊或其他易感动物的肠道粘液内引起抗体反应以预防、治疗线虫感染或降低
15 线虫感染易感性的用途。

本发明的第十八方面提供与上述单克隆抗体基本一致的抗体用于检测羊体内线虫感染的用途。

术语“分离的”的意思是指本发明的单克隆抗体或糖已经从原始环境中移离，并与提供该抗体或糖的天然系统中的所有或部分
20 共存物质分离。

术语“L3”指的是线虫生活周期中特定的幼虫发育阶段。

除非在上下文中另有指定，35kDa 抗原一般指具有基本相同分子量的蛇形毛圆线虫抗原。术语“易感动物”是指容易感染线虫，如蛇形毛圆线虫、古巴毛样线虫、匙状细颈毛样线虫、捻转
25 血矛线虫、环颈奥斯他胃虫、T.axei、T.vitrinus、结节线虫、C.oncophora、巴西奴卡菌和 D.eckerti 的羊，或指容易感染那些具有有用所述 PAB-1 单抗检测出的抗原的线虫的其他动物。

发明的详细说明

本发明的单克隆抗体是一种能够识别寄生性线虫 L3 上的糖类表面抗原的单克隆抗体。本发明人发现，该单克隆抗体与用蛇形毛圆线虫免疫的羊的肠道粘液中存在的抗幼虫抗体具有相同的
5 特异性。能产生单克隆抗体 mAb PAB-1 的杂交瘤于 2002 年 1 月 24 日在 ATCC 保藏，相应的登记号为 PTA-4005。

下文用通用的非限制性术语对本发明的抗体鉴定步骤进行了简要描述。

容易遭受线虫感染的羊自出生至 4 月龄在无线虫环境中饲养
10 成长，四月龄时一些既定数目的动物被施以一系列的蛇形毛圆线虫截短型感染致免疫。其它的免疫羊继续在无线虫条件下饲养成长。优选地，所用的羊在一段时间内被进行 3 次截短型感染，每次感染在经历一段既定的时限后停止。优选地，这一既定的时限是 14 天，再次感染的时间约是前次结束后 7 天，但是这些时限
15 的数值不应该视为限制。

最后一次感染结束后，屠杀羊，取其小肠内的粘液。这基本上按照 Harrison et al, 1999 的描述进行，但是该方法不应视为限制，其理由是也可以应用其他的一些方法。未感染的未感染羊的粘液也如上法取得。

20 一旦获得粘液样品，分析免疫的和未感染的羊的粘液未感染羊样品以观察蛋白差异。例如用 SDS PAGE 凝胶及 Coomassie 蓝、银染分析。

然后特征鉴定粘液抗体，优选地通过免疫印迹均匀混合抗原和碳针检测免疫的及未感染羊的粘液样品进行检测。检测抗体的
25 结合时，可以通过与商业上可用的抗羊免疫球蛋白产生的并与酶结合的抗血清反应来进行。优选地，结合的该抗体可以通过 RAS/IgG-HRP 法检测。

可以通过下法制备 L3 均匀混合物：在适合的清洁剂或变性剂的存在或不存在的条件下，借助机械手段或化学手段将任何一种在此列出的寄生性线虫的出鞘的(exsheathed)L3 裂解；随后以离心和/或过滤法使提取物澄清。

- 5 最优选地，可以通过裂解冷冻于液氮的蛇形毛圆线虫的出鞘的 L3 来制备均匀混合物，即用研钵及乳槌将冷冻的 L3 研磨直至裂解。随后将幼虫的组分提取入中性缓冲液，如含有 1~2% 诸如 CHAPS、去氧胆酸钠、豚或 SDS 等助溶剂的、pH7.5 的 50mM 的 Tris-HCl 缓冲液。以 100,000×g 离心提取物 1 小时，或用孔径
- 10 逐渐变小，如 5.0μM 至 0.2μM 的系列滤膜过滤来使其澄清。

制备单克隆抗体 mAb PAB 的方法可以是任何合适方法，如 Kohler 及 Milstein (1975) 所述的方法。

- 例如，可以从聚丙烯酰胺凝胶片上切下 35kDa 片段，用同体积的不完全油佐剂浸泡并混合，然后给药到需要免疫的动物的腹腔、皮下或脚垫等位置，所述动物如小鼠、大鼠、豚鼠、兔、山羊、绵羊、马、猪、犬、猫、鸡、牛或鹿等。这些动物中优选小鼠。
- 15

- 诸如脾细胞、淋巴细胞、外周血细胞等的抗体产生细胞，可以从免疫动物上收集，与骨髓瘤细胞（一种肿瘤细胞株）融合后形成杂交瘤。优选脾细胞作为抗体产生细胞。
- 20

细胞融合用的骨髓瘤细胞优选那些与免疫动物异源的细胞系，但是各种动物的细胞系均可使用。

优选地，NS-1 细胞可以用作骨髓瘤细胞，但是这不应该视为对本发明范围的限制。

- 25 虽然本发明所述的单克隆抗体一般是一种通过杂交瘤产生的抗体，但是通过诸如血浆酶、胃蛋白酶、木瓜蛋白酶等不具降解抗原结合位点 (Fab) 能力的蛋白水解酶与抗体相互作用获得的抗体片段，如 Fab, F(ab')₂, Facb 等，或通过分子克隆技术生产的

抗体片段均包括在本发明的单克隆抗体之内，条件是只要它们具备本发明的单克隆抗体的性质。

本发明的糖类表面抗原存在于蛇形毛圆线虫、古巴毛样线虫、匙状细颈毛样线虫、捻转血矛线虫、环颈奥斯他胃虫、
5 T.axei、T.vitrinus、结节线虫、C.oncophora、巴西奴卡菌和 D.eckerti 的 L3 表面。

下文用通用的非限制性术语对本发明的抗体鉴定步骤进行了简要描述。

本发明的糖类表面抗原可以从此处列出的线虫 L3 提取物中
10 分离出。优选地，糖类抗原从如上所述的蛇形毛圆线虫 L3 的提取物中分离。PAB-1 单克隆抗体先与固体支持介质相连结，优选地与蛋白 A—琼脂糖或蛋白 G—并共价连结以防止抗体从凝胶上脱落。

随后将凝胶装塞入色谱柱，采用 L3 提取物。用中性缓冲液
15 冲洗后，优选含有 0.05% Tween 20 的 PBS 冲洗以防止非特异性结合后，用高 pH 值或低 pH 值或高盐水平的洗脱缓冲液使结合的糖类抗原从柱上洗脱，优选地，用 pH 2.5-2.8 的甘油—盐酸缓冲液洗脱抗原。洗脱后糖类抗原的 pH 值可以用添加 1M Tris 的方法提高到中性，随后电泳法和免疫羊粘液抗体的印迹法进行进
20 一步分析鉴定该糖类抗原。用检测糖类的银染法染色和结合糖类的生物素—酰肼试剂进行印迹，可以检测糖类抗原的性质。

本领域的技术人员能够理解其他检测糖类的方法也可以使用，这些方法包括但不限于凝集素结合、HPLC、TLC、荧光基团辅助的糖电泳、MS 及 NMR。

25 制备药剂组合物的方法及药学载体是本领域内公知的，正如教科书 Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th Edition, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, USA) 所述。

本发明所述物质、疫苗或组合物可以用任何合适的途径给药，本领域的技术人员能够容易地根据治疗的情况确定最合适的给药途径及剂量。剂量由相关的内科医生或兽医审慎判断后决定，取决于治疗情况的状态和性质、治疗对象的年龄、总体健康状况、给药途径及给药的前期治疗。

所述的载体或稀释剂、及其他赋形剂取决于给药途径，本领域的普通技术人员根据个案能够容易地确定最合适的配方。

为了实现本说明书的目的，很明显“包含”一词的意思是“包括但不限于”，与“含有”的意思相同。

10

附图的简要说明

通过实施例并参考如下附图，下文将对本发明的其它方面座更清除的说明。

图 1 显示了在将幼虫与不同量的未感染羊粘液或免疫羊粘液共孵育后在未感染的羊中的幼虫数量；

图 2 显示了显示了在将幼虫与未感染羊粘液或免疫羊粘液共孵育不同时间后在未感染的羊中的幼虫数量；

图 3 显示了用未感染的或免疫的粘液中的 L3 混合物灌輸未感染的受体羊后未感染羊的最近部分和最远部分的幼虫数量；

图 4 显示了在免疫不同时间后免疫粘液的抗幼虫活性；

图 5 显示了免疫的和未感染的粘液的 SDS PAGE 分析结果；

图 6 显示了免疫的和未感染的粘液的植物凝集素印迹结果，

A: UEA-1 (α -L-果糖) B: JAC (α -gal-Me-吡喃糖苷)

C: WGA (N-乙酰氨基葡萄糖) D: LL(甘露糖，葡萄糖)；

图 7 显示了免疫的和未感染的粘液的植物凝集素印迹结果，

A: PNA (β -半乳糖-N-乙酰氨基半乳糖)

B: EcorA (β -半乳糖-N-乙酰氨基半乳糖)

C: SBA (N-乙酰氨基半乳糖)

D: ECA (β -半乳糖-N-乙酰氨基半乳糖) ;

图 8 显示了免疫的和未感染的粘液的植物凝集素印迹结果,

A: SNA (唾液酸)

5 B: 用 RAS/IgG-HRP 免疫印迹探查

图 9 显示了蛇形毛园线虫 L3 抗原的免疫印迹结果, 其中的 L3 抗原用免疫羊 (第 1、5、10、11、12 和 19 道) 或未感染羊 (第 13-18 道) 的肠粘液、免疫粘液的 $100\ 000\times g$ 离心上清 (第 3 道)、从蛋白 G-琼脂糖纯化出的免疫粘液上清 (第 4 和 7 10 道)、从出鞘的蛇形毛园线虫 L3 洗脱出的抗体 (第 6 和 20 道)、来自免疫羊的硫酸胺沉淀的肠道内腔液体的抗体 (第 8 和 9 道) 探测。第 2 道显示了用胶体金着色的蛇形毛园线虫 L3 蛋白, 用 RAS/IgG-HRP 检测 IgG 抗体 (第 1-18 道), 用 MAS/IgA, 接着用 RAS/IgG-HRP 检测 IgA 抗体(第 19 和 20 道);

15 图 10 显示了用未感染的或免疫的粘液探查的蛇形毛园线虫 L3 抗原的免疫印迹结果, 抗原带与未感染的粘液或免疫的粘液反应, 然后与 RAS/IgG、抗 IgG₁ 的 mAB、抗 IgG₂ 的 mAB、抗 IgA 的 mAB、抗 IgM 的 mAB 反应;

20 图 11 显示了蛇形毛园线虫 L3 抗原, 古巴毛样线虫 L3 抗原和匙状细颈毛样线虫 L3 抗原的免疫印迹结果;

图 12 显示了捻转血矛线虫、环颈奥斯他胃虫、匙状细颈毛样线虫、古巴毛样线虫和蛇形毛园线虫的 L3 的抽提物的免疫印迹分析的结果;

25 图 13 显示了蛇形毛园线虫 L3 抗原的肠粘液 IgG 和 IgA 抗体滴度与抗感染保护作用的关系;

图 14 显示了肠粘液中的 IgG 和 IgA 抗体滴度随时间的推移逐渐降低;

图 15 显示了与免疫的或未感染的粘液反应的出鞘的蛇形毛园线虫 L3 (上图), 并显示了在感染并与免疫粘液反应后第 5 天收集的蛇形毛园线虫的幼虫 (下图);

图 16 显示了在与未感染的 (A) 或免疫的 (B) 粘液反应后 5 出鞘的蛇形毛园线虫 L3 的电子显微照片。图 C-F 显示了在感染并与免疫的粘液反应后第 2、3、4 或 5 天收集的蛇形毛园线虫的幼虫;

图 17 显示了对蛇形毛园线虫卵渐近线 SDS PAGE 和免疫印迹分析的结果。图 A、C 和 D 与免疫粘液反应, 图 B 是银染色蛋白;

图 18 显示了感染前和感染后不同时间的蛇形毛园线虫 L3 的 SDS PAGE 和免疫印迹分析结果;

图 19 显示了与免疫粘液或单克隆抗体 PAB-1 反应的蛇形毛园线虫 L3 抽提物和蛋白酶 K 消化的 L3 抽提物的免疫印迹分析结果;

图 20 显示了来自与单克隆抗体 PAB-1 反应的 5 个线虫种的 L3 抗原抽提物和蛋白酶 K 消化的 L3 抽提物的印迹分析结果;

图 21 显示了与对照的单克隆抗体 (左和中间的图) 或与单克隆抗体 PAB-1 (右图) 反应的出鞘蛇形毛园线虫 L3 的表面荧光;

图 22 显示了 Tc 幼虫表面抗原的分析结果, 该抗原用单克隆抗体 PAB-1 进行免疫亲和色谱来纯化;

图 23 显示了加热、氧化、消化或用有机溶剂沉淀后的蛇形毛园线虫 L3 抽提物的免疫印迹分析结果;

图 24 显示了用蛋白酶或脂酶消化后蛇形毛园线虫 L3 抽提物的免疫分析结果;

图 25 显示了用蛋白酶消化后蛇形毛园线虫 L3 抽提物的免疫分析结果;

图 26 显示了用糖苷酶消化后蛇形毛圆线虫 L3 抽提物的免疫分析结果；

图 27 显示了显示了碱分解后蛇形毛圆线虫 L3 抽提物的免疫分析结果；

5 图 28 显示了加热或碱或酸分解后蛇形毛圆线虫 L3 抽提物的免疫印迹分析结果；

图 29 显示了加热或碱或酸分解后蛇形毛圆线虫 L3 抽提物的免疫分析结果；

图 30 显示了加热或碱分解或蛋白酶消化后蛇形毛圆线虫 L3
10 抽提物的免疫分析结果；

图 31 显示了在原始条件下或在脲或去氧胆酸钠存在的条件下电泳后蛇形毛圆线虫 L3 抽提物的免疫印迹分析和蛋白染色结果；

图 32 显示了在二维电泳后蛇形毛圆线虫 L3 抽提物的免疫印
15 迹分析和蛋白染色结果；

图 33 显示了在 6 只其它线虫的 L3 抽提物中存在糖着色分子；

图 34 显示了蛇形毛圆线虫 L3 抽提物 (L3) 和在非变性条件下 (无去污剂或还原剂) 电泳纯化的糖基幼虫抗原 (C) 的凝胶
20 电泳 (8% PAGE) 和免疫印迹分析结果。

实现发明的最佳方式

1. 材料与amp;方法

25 1.1 截短型感染对羊的免疫

所有的羊的实验均按照 Wallaceville 动物伦理委员会的规定进行。Romney 羊自出生开始就在无线虫的条件下成长，圈养并饲以市售羊饲料，干草及水，自由进食。羊在进行免疫感染时至少

4月龄。以40000只蛇形毛圆线虫L3截短型感染免疫羊，至少进行三次。每次感染均在14天后通过口腔灌喂奥芬达唑(Systamex, Schering Plough Ltd., 4.5 mg kg⁻¹)中止，羊在灌喂7天后重复进行感染操作。在一些实验中，羊还被给予第四次的感染（加强剂
5 量），此时不用灌喂给药法中止，而是在加强给药2—3天后将羊屠杀。

1.2. 采样

羊以枪杀及放血法被屠杀。羊的小肠被打结成5米的片段，
10 每个片段用4×150毫升的生理盐水冲洗以收集幼虫。为了供生化分析及体内注射用，收集小肠前6米处的粘液，以哈里森(Harrison 等 1999)所述的方法改良后处理，改良如下述。在轻柔地用100毫升生理盐水淋洗去除肠的内容物后，在4°C放置小肠2小时，然后以拇指和食指用力挤压小肠使流出粘液，随后以2
15 ×5毫升的生理盐水洗涤。收集粘液和洗液，并以哈里森(Harrison 等 1999)所述方法处理，贮存在-20°C。

对于进行了4次截短型感染的羊，在最后一次免疫后的第3, 16, 35天收集粘液的活组织检查样本。在手术时，定位十二指肠肠并用手术钳轻柔夹取分离一段5厘米的片段。应用具钝端的
20 18规格的针头注入3毫升生理盐水。液体前后摇荡10次使粘液与生理盐水混合后，取样2-3毫升。缝合切口，使羊逐渐康复。

1.3 不同方法处理对粘液体外活性的影响

通过幼虫结块实验评价粘液结合幼虫的能力，将2000只出鞘
25 的L3放入一个置于振动平台的Eppendorf管中，37°C下与0.4毫升的粘液共孵育。四小时后，检验样本并估算幼虫结块的程度，以与未感染的粘液或生理盐水共孵育的L3为对照，与对照比较。

免疫粘液以多种不同的方法处理，然后分析其幼虫结块的效力。等分取1毫升免疫粘液 IP5 置于 4°C 生理盐水中透析 24 小时，在 10000×g、10000×g 或 100000×g 下离心，60°C 加热或 100°C 加热 5 分钟，在 10mM 的 DTT 中还原或烷基化 1 小时，然后在冰上与 20mM 碘乙酰胺反应 30 分钟，再以 pH7.4 的 TBS 水解过夜，以除去多余的盐分。以胃蛋白酶处理时，粘液以 1M HCl 调节 pH 至 4.5，在 3 毫升粘液中加入含 3 毫克胃蛋白酶的 pH4.5 的 0.1M 乙酸缓冲液，于振动平台上 37°C 共孵育 20 小时，加入 Tris 至浓度为 2M 令反应停止。以蛋白水解酶处理时，于每 10 毫升粘液中加入溶于 pH7.5 的 0.1M Tris 的 1 毫克链蛋白酶，于振动平台上 37°C 共孵育 20 小时，反应通过加入蛋白水解酶抑制剂而停止。粘液以脂肪酶处理时，每毫升粘液用 1 毫克的脂肪酶处理，于 pH7.2 的 PBS 中 37°C 下孵育 20 小时，然后冷冻贮存。粘液氧化处理时，以醋酸调节 pH 值至 4.5，加入高碘酸盐于 pH4.5 的 50mM 醋酸钠缓冲液中至 120mM，并于室温搅拌下避光孵育 2 15 小时，加入硼氢化钠至 50mM，搅拌下孵育 1 小时。超滤粘液时，将 5 毫升免疫粘液 IP5 稀释至 250 毫升的 pH7.2 的 PBS 中，然后在 Filtron 100000mw 的膜上浓缩至 5 毫升，随后将滤液在 10000mw 的膜上浓缩至 5 毫升，然后将滤液在 3000mw 的膜上浓 20 缩至 5 毫升。冻干低 mw 膜的滤液，重溶于 5 毫升的蒸馏水中，置入 1000mw 管中蒸馏水透析。

通过上述步骤处理后，冷冻储存粘液样品直至测定。

1.4 体内粘液实验

25 40000 只出鞘的 L3 与 2.5-10ml 未感染羊体积的免疫羊或未感染羊的粘液共孵育 24 小时，然后通过一个特别的外科植入导管 (Harrison 等. 1999) 注入到未经线虫感染的羊的十二指肠。一周后杀死羊，对每 5 米小肠片段内的生长的线虫的数目进行计数。

40000 只出鞘的 L3 于 37°C 下与 10ml 体积的免疫羊或未感染羊的粘液，或与经 100000×g 离心后的 2×10ml 体积的粘液上清共孵育 4 小时。未感染羊孵育后取一等分的未感染羊及免疫羊的上清在 200×g 离心 3 分钟以沉淀幼虫。立即去除上清，以 10ml 生理盐水清洗 L3，如上法离心，去除上清，将 L3 在 10ml 生理盐水重混悬。每 10ml 未感染羊等量的液体通过十二指肠管注入未感染羊肠道。一周后，杀死羊，计幼虫数目。

1.5 粘液生化分析

以 SDS-PAGE 法和 Coomassie 蓝染未感染羊或银染染色法分析免疫羊组和未感染羊组样品的蛋白差异。以凝集素印迹法检查糖基化的差异，其中凝集素以生物素标记，以抗生蛋白链菌素-过氧化物酶检测。粘液中 IgG 的存在与否通过 RAS/IgG-HRP 印迹法显示。

1.6 粘液抗体的特征鉴定

对免疫羊及未感染羊的样品进行 L3 均匀混合抗原的免疫印迹法探查。抗体的结合通过对羊的 IgG1, IgG2, IgA, 及 IgM 的 RAS/IgG-HRP 或 mAb 检测及随后的 GAM/Ig-HRP 法进行测定。

出鞘的 L3 与粘液上清在 37°C 下孵育 4 小时，用 45%硫酸铵从粘液中沉淀抗体，或用蛋白 G 从粘液中纯化抗体。孵育后幼虫用 TBS-Tw 清洗 3 次，通过在 pH 2.4 的 0.1M 甘油-盐酸缓冲液中孵育 5 分钟洗脱全部结合态抗体。洗脱液以 1M tris 中和，用于探查 Tc, Ns, Cc 中的 L3 抗原的印迹。

体积为 500 毫升的免疫羊肠道内容物用 45%硫酸铵处理以回收抗体。在透析后将抗体用于探查 L3 抗原，从蛋白 G-Sepharose 上洗脱的粘液上清或粘液抗体与幼虫共孵育 2 小时，用 TBS-Tw

清洗3次后，与 FITC-RAS/IgG 反应。清洗后用荧光显微法检查幼虫。

幼虫在羊经感染后的不同时间收集，用上述免疫荧光及免疫印迹法和免疫金电镜检查法进行分析。将幼虫固定在 BGPA 固定剂（90℃的含 1%戊二醛及 15%饱和苦味酸的 0.1M 磷酸缓冲液）中。埋入部分以蛋白 G 纯化的粘液抗体进行染色，随后用金标记抗羊抗体。

用于体内感染实验的粘液样本的抗体滴度以 EIA 法估算。微滴度板以 Tc L3 抗原包被，并与粘液稀释液反应。经清洗后，结合态抗体通过对羊的 IgA 的 RAS/IgG-HRP 或 mAb 检测及随后的 GAM/Ig-HRP 法进行测定。

1.7 单克隆抗体 PAB-1 的制备

小鼠以含有 Tc 幼虫表面抗原的多聚酰胺凝胶胶片进行免疫，该抗原在胶中的位置通过印迹相邻泳道和检测所述的粘液抗体来确定。浸泡含有抗原的凝胶胶片，将其与等量的不完全油佐剂混合，并注射入小鼠，共注射 2 次，每次相隔两周。十天后取受试血液，筛选 Tc L3 抗原的粗产品，并对表面抗原进行部分纯化。采用制备单抗的标准方法将阳性反应最强的小鼠的脾细胞与 NS-1 细胞融合，使用 ELISA 及印迹法进行初级和次级筛选以证实特异性。制备出的大量 mAb PAB-1 培养物，以等分在 -20℃ 保存。

用单克隆抗体 PAB-1 探查幼虫抗原的印迹，用 RAM/IgG-HRP 检测结合态抗体。在 90℃ 加热出鞘的幼虫 20 分钟使其固定，与 PAB-1 反应，以 TBS-Tw 全面清洗，与 RAM/IgG-FITC 反应，并在紫外光下检验。针对非相关蛋白（羊细胞因子）的且具有相同 PAB-1 亚型的单克隆抗体用作阴性对照。

1.8 幼虫抗原的免疫亲和纯化

单克隆抗体与蛋白 A-琼脂糖反应从而使该抗体结合，在 PBS 清洗去除未结合抗体之后，结合态抗体通过与交联剂 DSS(disuccinimidyl suberate)反应而永久地固定在蛋白 A 上。再次清洗后，L3 提取物流过用含有 0.05% Tween 20 的 PBS 液全面清洗过的 PAB-1-蛋白 A-琼脂糖柱，以 pH2.5 的 0.2M 甘油-盐酸液洗脱全部的结合抗原。洗脱液以 1M Tris 中和，在 pH8.0 的 5mM Tris 中透析，在 Speedvac 浓缩器中浓缩。抗体柱以 PBS 全面清洗重平衡。

从柱上洗脱的抗原样本以 SDS PAGE 法及印迹法分析(图 23)。凝胶中的糖类以改良银染法检测 (Kittelberger 等, 1993) ; 印迹上的糖类以生物素-酰肼反应法检测 (Bouchez-Mahiout 等, 1999) 。

1.9 幼虫抗原的特征鉴定

将出鞘的 Tc L3 以液氮冷冻，以研钵及钵槌磨碎，蛋白质以 2% Chaps + 2% Tween 20、1% 脱氧胆酸钠、2% SDS，或 9M 脲溶解提取。提取物在 10000g 离心，上清在 -20°C 下贮存。虫卵、L1、L2、成虫线虫直接溶解于 SDS PAGE 样品缓冲液 (含有 2% SDS, 20mM DTT 的 pH6.8 的 50mM Tris-HCl) 中。将 SDS 抗原提取物用于电泳法及印迹法研究，将 Chaps 及脲提取物用于二维电泳，脲提取物在 pH 7.4 的 50 mM tris-HCl 中透析 2 天后，去除脲，随后进行化学或酶学处理。抗原经适当方法溶解后，也仅在缓冲液，即 0.5% DOC 或 6 M urea 中进行电泳。

在 Tc L3 脲提取物的二维电泳分析中，在以 IPGphor (Pharmacia) 固定于 pI3-10 长条的 IEF 上进行，随后行 SDS PAGE 电泳。蛋白质或以 Coomassie 蓝染/银染，或与粘液抗体印迹发生反应来检测抗原。Tc L3 脲溶解抗原以上述方法透析，通过加入等体积的 10% TCA、10 倍体积的冷冻丙酮、9 倍体积的氯仿:甲

醇(2:1)或9倍体积的己烷:异丙醇(3:2)来使其沉淀。漩涡样品并
振动10分钟,随后在10000g离心10分钟,并应用免疫印迹法分
析离心出的沉淀,通过化学法及酶法降解分析糖。抗原以20mM
的高碘酸在37°C处理24小时,或在60°C以1M NaOH及8M
5 NaBH₄处理18小时。样品在电泳之前进行透析。抗原在100°C下
以胍处理7和14天,或在4°C下以三氟乙酸处理4和16小时,
随后化合物用一个Speedvac离心机挥发,剩余的抗原重溶解在
SDS PAGE 样品缓冲液中。将各种酶溶解于生产商推荐的缓冲液
中,并在37°C下与抗原温浴22小时以进行酶消化。所用的酶
10 是: N-糖苷酶 F, 胰蛋白酶, 胃蛋白酶, 木瓜蛋白酶, 链霉蛋白
酶, 蛋白水解酶 K, 枯草杆菌蛋白酶, 脂肪酶, 溶菌酶, 弹性蛋
白酶, 胶原蛋白酶, 磷酸肌醇-磷脂酶 C, 磷脂酶 A2, 磷脂酶
D。显色底物酪蛋白-试卤灵及弹性蛋白-刚果红作为显示蛋白酶
及弹性蛋白酶的活性的对照。在一个实验中,抗原在90°C下加热
15 变性20分钟,随后以胰蛋白酶或氢氧化钠消化。在0.5%SDS、15
mM DTT、50 mM EDTA 或2 mM CaCl₂存在或不存在的条件下于
50°C下维持18小时来进行蛋白酶 K 的消化。捻转血矛线虫、环
颈奥斯他胃虫、古巴毛样线虫和匙状细颈毛样线虫的幼虫提取物
也在相似的条件用蛋白酶 K 处理。

20

1.10 用 35kDA 的抗原进行的免疫

用溶于含有 Span 85、Tween 85 及蓖麻油 (比例是 5.4:4.6:
90) 的菜油佐剂中的 35kDa 抗原,对 5 只 12 月龄的 Romney 羊进
行腹腔注射,如每 2 周一次,共 3 次。抗原从电泳分离出的 Tc
25 L3 凝胶胶片上得到。电泳后将每一个凝胶的条带转印到硝酸纤维
素上与免疫粘液反应以检测 35kDa 的抗原。用 RAS/IgG-HRP 进
一步处理后,将印迹与凝胶的主要部分重新一一对应,切下与
35kDA 抗原位置相对应的凝胶片段。将取下的胶片置入装有

100mM pH7.8 的 trisHCl 的透析管中，将透析管置入转印槽中在 50v 下维持 3 小时以对凝胶中的抗原进行电洗脱。收集多个洗脱液，通过 BCA 实验估计蛋白产出率约是 0.2mg/ml。用 Ultraturrax 超声匀浆器将抗原与同等量的菜油佐剂相混合。每一只羊每次注射时接受 0.2 毫克左右的总蛋白量，但是糖类抗原的量未知。对照羊腹腔注射生理盐水加佐剂。在第三次注射结束 2 周之后所有的羊通过口服感染 40000 只 Tc L3。在感染 3—4 周后获取粪便中虫卵计数资料。

10 2. 结果

2.1. 体外实验

所有的粘液或经不同处理的粘液在体外引起幼虫结块的能力如表 1 所示，结果显示透析或低速离心不影响免疫粘液使幼虫结块的能力，100000×g 离心使幼虫结块的效应降低，但是洗涤剂 Tx-100 或 CHAPS 存在时例外。粘液在 60℃ 加热 5 分钟后使幼虫结块的能力仍然存在，但是在 100℃ 加热后消失。粘液经蛋白酶消化或高碘酸氧化之后失去活性，但是脂肪酶消化无失活作用。这种幼虫结块作用与粘液中高分子量的成分相关。

20 2.2. 体内实验

L3 与递增体积的粘液共孵育后使未感染受体羊中的幼虫排出或数目减少的效应如图 1 所示。幼虫与 5 或 10 毫升未感染羊的粘液共孵育后仍然能够在小肠前 5 米肠段正常生长。与免疫羊的粘液共孵育的幼虫随共孵育粘液体积的增加而逐渐地移位或消失。与未感染羊的粘液相比较，与 10 毫升免疫羊粘液共孵育的幼虫的生长数目减少 82%，且在肠道的前 5 米肠段幼虫排出率达 100%。

L3 与 10 毫升粘液共孵育不同时间后的效果如图 2 所示。幼虫与免疫羊粘液共孵育的时间低至 1 小时的情况下，幼虫的生长数目减少 46%，且在肠道的前 5 米肠段处幼虫排出率达 81%。共孵育的时间为 4, 10, 24 小时时的减少超过 94%，排出超过 93 5 %。

L3 与 16 份未感染羊的粘液样品及 25 份免疫羊的粘液样品共孵育后对幼虫生长的效应如图 3 所示。总体上，接受 L3+免疫羊粘液的受体的幼虫减少率达 67%（范围 0—95%）；给予 L3+免疫羊粘液的羊的肠道前 5 米肠段的幼虫生长率减少 80% 10 (p<0.001)。

粘液收集时间对其抗幼虫性质的影响如图 4 所示。在最后一次以幼虫免疫 2—3 天后收集到的粘液的活性大致上比一周后或更晚时刻收集的粘液的活性强。回归分析表明免疫后粘液收集时间与其保护作用间呈显著的阴性相关关系。

L3 与未感染羊或免疫羊粘液的经清洗/未经清洗过的 100000 ×g 离心上清共孵育后的效应如表 2 所示。结果显示 L3 与未感染羊粘液的上清或经清洗后的上清共孵育后能够在未感染的受体羊上生长。与此相反，L3 与免疫羊粘液的上清或经清洗后的上清共孵育后大部分不能够在未感染羊接受者上生长，与未感染羊粘液 20 组相比较数目减少了 91%。

2.3 粘液生物化学

粘液的电泳分离结果如图 5 所示。免疫羊及未感染羊粘液的蛋白总体情况高度复杂，两系列的粘液间未见清楚明了的差异， 25 凝集素印迹也表明两系列显示含有糖基的粘液都具有复杂的糖蛋白性质（图 6, 7, 8）。另外凝集素对免疫羊粘液或未感染羊粘液的结合的差异也不明显，而花生凝集素对大部分的免疫羊样品在与 Ig 的重链及轻链对应的约 70000 及 28000mw 处染色增强

(图 7A)。然而,当粘液与 RAS/IgG-HRP 反应时,所有样品均见 55000 及 27000 的主要条带,其可能与 IgG 的重链及轻链对应(图 8B)。

5 2.4 粘液印迹

用粘液或自粘液回收的抗体探查 Tc L3 的免疫印迹结果如图 9 所示。6 个未感染羊的样本(第 13-18 道)不与 L3 抗原反应。免疫羊的粘液样本主要和 35kDa 的条带反应,且两只羊的肠内容物通过硫酸铵沉淀得到的抗体的表现与此相同(第 8, 9 道)。免疫羊粘液上清在蛋白 G-琼脂糖上纯化后的抗体以及 L3 与免疫羊粘液共孵育后酸透析得到的抗体也与 35kDa 条带反应(第 4, 7 道及第 6, 20 道)。接受 3 次 Tc 截短型感染的羊的血清还包括识别 35kDa 抗原和许多其他抗原的抗体(未显示)。与 35 kDa 条带反应的粘液抗体的亚型特异性如图 10 所示。存在 IgG1 及 IgA 亚型抗体,但是 IgG 及 IgM 未检出。

用 Tc 免疫羊粘液探查肠道感染性线虫匙状细颈毛样线虫(Ns)和古巴毛样线虫(Cc)的 L3 抗原提取物的免疫印迹结果发现它主要与 22kDa 的条带反应(图 11, 第 9, 13 道)。接受 Ns 截短型感染的羊的粘液与 Ns 及 Cc 的抗原反应(第 12 及 16 道),也与 Tc 的 35kDa 条带反应(第 8 道)。将 260000 只出鞘的 Tc L3 与 2ml 免疫粘液共孵育使粘液内抗体完全消失(第 1 道)。用胶体金蛋白染色法检测印迹上的蛋白(第 4 道),在与免疫粘液的抗体检测相对应的区域并未发现染色(第 3, 4 道)。肠道线虫匙状细颈毛样线虫及古巴毛样线虫和胃线虫捻转血矛线虫及环颈奥斯他胃虫的 L3 提取物以 Tc 免疫羊粘液探查,发现在 Tc 和 Hc 的 35 kDa 处, Oc 的 39kDa 处; Cc 的 46kDa 和 22kDa 和 Ns 的 22kDa 发生发应(图 12)。图 33 示肠道线虫 T.axei (Ta)、T.vitrinus (Tv)、结节线虫 (Ooi)、C. oncophora(Co)、D. eckerti (De)、胃线虫

捻转血矛线虫 (Hc) 及环颈奥斯他胃虫 (Oc) 的 1 M NaOH 提取物以 Tc 免疫羊粘液探查的结果, 显示在 Ta、Tv 和 Hc 的 35 kDa 处, Oo 的 45,35, 33 和 30 kDa 处, Co 的 45kDa 和 20kDa, Nb 的 12 kDa 和 9 kDa 处, 以及 De 的 30 kDa 处发生反应。

- 5 粘液 IgG 及 IgA 抗体滴度与粘液体内给予时所提供的保护作用之间的相互关系以线性回归法分析 (图 13)。抗 L3 抗原的 IgG 及 IgA 抗体的滴度与其保护作用之间存在着明显的关系 ($R^2 = 0.6, P < 0.01$)

10 粘液活组织检查发现样本的抗体滴度自免疫 3 天后达到高水平 (图 14), 然而, IgG 及 IgA 的滴度到 16 天后下降, 但是至免疫后第 37 天时仍然处于高于基线的水平。

15 幼虫的免疫荧光染色结果如图 15 所示。出鞘的 L3 在与免疫羊粘液共孵育后显示强的表面荧光, 但是与未感染羊的粘液共孵育并不能 (上图)。在感染羊 2, 3, 4 天后获得的幼虫也显示出表面染色 (未图示), 但是感染第 5 天许多幼虫不被抗体染色, 且发现一些处于蜕皮阶段 (下图)。蜕皮的 L3 的表皮与来自免疫羊粘液的抗体反应, 但是出现的 L4 不被染色。在感染的 6, 7 天获得的 L4 不显示表面染色。

20 免疫金电镜检查的结果与此类似, L3 阶段在表皮出现表面标记 (图 16, B)。感染后第 2 天再观察金标记, 在第 3, 4 天变弱, 第 5 天消失 (分别见图 C, D, E 和 F)。

25 在虫卵、L1、L2、L3、及免疫羊感染不同时间后获取的幼虫的抗原提取物以粘液抗体探查进行免疫印迹 (图 17 及 18)。L3 在感染前至感染 5 天后发现存在 35kDa 的抗原, 但是在虫卵期、L1 或 L2、感染后 7~14 天的 L4、或线虫成虫上无此抗原。

2.5 PAB-15 单克隆抗体

PAB-1 单克隆抗体及 Tc 免疫羊粘液的抗体与 Tc L3 抗原的印迹反应的对比在图 19 中显示。单抗在 35kDa 处与主要的 Tc L3 抗原，在 30—40kDa 处与离散抗原和一些更低分子量的抗原反应。

其他种属的线虫的抗原的鉴定结果如图 20 所示。肠道线虫匙状细颈毛样线虫和古巴毛样线虫及胃线虫、捻转血矛线虫和环颈奥斯他胃虫的 L3 提取物以单克隆抗体 PAB-1 探查，发现在 Tc 及 Hc 的大约 35 kDa 处，Oc 的 39kDa 处，Cc 的 46kDa 及 22kDa 处，Ns 的 22kDa 处发生反应（图 20）。将 L3 提取物用蛋白酶 K 消化后，以取自免疫羊粘液的抗体或单克隆抗体 MAB-1 进行免疫印迹发现该酶不消化幼虫抗原（图 19 和 20）。

以抗鼠 FITC 结合物染色与出鞘的 Tc L3 反应的 mAb PAB-1，发现了强的表面荧光（图 21），IgG3 对照单抗不与幼虫表面反应。

2.6 幼虫抗原的免疫亲和纯化

使用键合在蛋白 A-琼脂糖上的单抗 PAB-1 来免疫亲和纯化幼虫抗原的结果如图 22 所示。对洗脱物进行银染发现没有蛋白染色带在幼虫抗原的可能电泳区域出现。在洗脱物中检测出一个单一的糖染色条带，其位置与以免疫羊粘液抗体免疫印迹法检出的抗原在相同的分子量的位置上。用一种能与经高碘酸氧化后暴露的糖基相结合的生物素-酰肼试剂也在原位标记了该条带。

2.7 幼虫抗原的特征鉴定

L3 抗原的各种化学或酶处理对 35kDa 抗原与粘液抗体的免疫印迹反应的影响如图 23-30 所示。抗原在 37°C 下加热 18 小时对其中的 35kDa 抗原的免疫印迹反应无影响（图 23，第 2 道），用高碘酸或脂肪酶处理轻微降低信号强度（图 23，第 3，5 道），但

是链霉蛋白酶无作用（第4道），35kDa抗原在酸沉淀或溶剂沉淀后发现存在于沉淀物中（第6-9道）。

以胰蛋白酶，胃蛋白酶，蛋白水解酶K，磷脂酶A2处理L3抗原使印迹反应变得更加分散，但是不降低分子量（图24，第2, 3, 5, 11道）。以木瓜蛋白酶，枯草杆菌蛋白酶，裂解酶处理L3抗原引起信号强度降低，但是不改变分子量（第6-8道）。链霉蛋白酶，脂肪酶，溶菌酶，磷酸肌醇-磷脂酶C，磷脂酶D没有作用（第4, 9, 10, 12, 13道）。以弹性蛋白酶处理产生分子量稍微降低的条带（图25，第1道）。胶原蛋白酶、蛋白水解酶K在37℃下无作用（第2, 3, 4道）。在多种条件下蛋白水解酶K在50℃处理18小时也不能毁坏35kDa抗原，仍能够在印迹上检测到（第6-9道）。以N-糖苷酶F处理L3抗原引起35kDa抗原印迹信号强度降低，但是不改变分子量（图26，第4道），而在此条件下对照糖蛋白胎球蛋白被降解（第2道），这说明酶具有活性。以1M氢氧化钠在60℃处理18小时后，印迹上分子量稍微降低的条带的数目增加，但是在35kDa处的反应仍然是主要的（图27，第2道）。用NaOH加NaBH₄处理，银染后未见任何的蛋白，但是35kDa抗原的印迹反应与对照抗原比较未见减弱（图27，第3道）。

L3抗原以氢氟酸在4℃处理48小时，或以酰肼在20℃处理16小时不能毁坏35kDa抗原（图28）。以酰肼在100℃处理7或14天，与未处理的对照抗原相比印迹的强度降低（图29，第1, 2道）。以氢氟酸处理4或16小时毁坏了抗原（图29，第4, 5道）。

如免疫印迹所示（图30），L3抗原以下列程序处理不能毁坏35kDa抗原：蛋白酶K+SDS在50℃下处理4小时或20小时（第1及2道）；0.1-1.0M NaOH在37℃下处理18小时（图30，第3, 6, 7, 8道）；在90℃下进行20分钟的热变性，然后以1M NaOH消

化(第4道); 不论其是否在 90°C 下进行了 20 分钟的热变性都在 37°C 下用胰蛋白酶消化 22 小时(第 10 及 14 道); 蛋白酶 K+SDS+DTT 在 50°C 下处理 22 小时(第 12 道)。来自 5 个种属的线虫的 L3 抗原以蛋白酶 K 消化都不能破坏 35kDa 抗原, 或其他 5 种属的 46、35 或 22 kDa 的交叉反应抗原(图 20)。

Tc L3 提取物在原生条件下和在 0.5%DOC 或 6M 脲存在下以电泳法及印迹法分析。抗原在此条件下电泳出高分子量的模糊带(图 32)。向样品加入还原剂(20mM DTT)和电泳缓冲液不改变这些结果(未图示)。

10 Tc L3 脲提取物进行二维电泳分析显示了 35kDa 处的强免疫印迹反应, 其超出 pH3-10 范围(图 33)。尽管印迹强度大, 但相应区域未见蛋白。

3.6 羊免疫实验

15 FEC (粪便线虫计数) 数据如表 3 所示。在感染 3 周后, 组间 FEC 无显著差异, 但是免疫组第四周的计数显著下降 ($p<0.05$)。综合两周的计数值, 免疫组 FEC 总值具显著的下降 ($p<0.05$)。

20 图 34 显示了蛇形毛圆线虫 L3 提取物及纯化的糖类幼虫抗原 (c)在非变性条件(无洗涤剂及还原剂)下的凝胶电泳(8% PAGE)及免疫印迹分析结果。凝胶进行了蛋白质或糖染色。印迹与 PAB-1 单抗反应后, 与兔抗鼠 Ig-HRP 结合物或免疫羊粘液反应, 最后与免疫羊 Ig-HRP 结合物反应。

25

表 1. 免疫羊粘液经不同处理后的体外抗 L3 活性

处理方法	幼虫结块*
未处理	+++
透析	+++
10000×g 离心, 上清	+++
50000×g 离心, 上清	++
100000×g 离心, 上清	+
100000×g 离心, 上清, DTT	-
100000×g 离心, 上清, TX100	++
100000×g 离心, 上清, CHAPS	++
还原并烷基化	++
60℃加热	++
100℃加热	-
胃蛋白酶	+
链霉蛋白酶	-
高碘酸	-
脂肪酶	++
>100000mw 滞留物	+++
10-100000mw	-
3-10000mw	-

*结块分值 +++=大部分幼虫成大团状结块; ++=一些结块; +=轻微结块; -=无结块。

- 5 表 2. L3 与未感染羊/免疫羊的粘液、经 100000×g 离心的粘液上清或经上述离心后清洗过的上清共孵育, 注入未感染的受体羊一周后小肠 5 米肠段内生长的蛇形毛圆线虫幼虫的数目

样品	0-5 米	5-10 米	10-15 米	总计	减少率%*
未感染羊的粘液	10664	140	0	10804	
上清	24978	590	0	25568	
上清+清洗	8140	148	0	8288	
免疫羊的粘液	148	770	0	918	91
上清	130	0	396	526	98
上清+清洗	224	420	0	644	92

* %与未感染羊的粘液的总计量相比幼虫数目的减少量。

表 3. 用 35kDA 抗原免疫的羊的 FEC 数据

组别	各自的 FEC	平均值	SD
第 3 周			
对照	600 700 1300 1500 1700 1800 2500 2500	1575	715
免疫的	300 400 800 1900 2400	1160	940
第 4 周			
对照	900 1100 1300 1700 1800 2200 2500 4000	1938	993
免疫的	600 600 900 1100 1300	900	308*

与对照有明显差别 ($P < 0.023$, Kruskal-Wallis 测试)

5

3. 讨论

免疫羊粘液影响线虫存活的能力已经在先期的工作中发现，如果将幼虫与粘液共孵育，幼虫出筛迁徙就会受抑制 (Douch 等 1983)。最近我们观察到幼虫与免疫粘液共孵育后常成团结块，且这种幼虫若通过十二指肠导管注入未感染羊后不能正常生长 (Harrison 等 1999)。这些发现引发了本研究，结论性地表明免疫粘液能够有效防止幼虫生长，这种对感染的保护程度取决于免疫后收集粘液的时间及剂量。抗体下降的水平与时间的关系在粘液

或组织检查样本中可以观察到，该样本取自免疫5星期后的截短型感染羊。免疫粘液的 $100000 \times g$ 离心上清也能防止幼虫生长，该发现表明这种作用存在于粘液的可溶性成分中，而不是由于粘液的物理阻碍性，如粘性引起。共孵后清洗幼虫并不影响免疫粘液上清防止幼虫生长的效果，这表明活性因子与幼虫发生了结合。

免疫粘液经透析、离心或分子筛过滤处理后体外进行幼虫结块分析，结果表明其结块能力与粘液中的高分子量成分相关。热处理、蛋白酶消化表明结块需要粘液中的蛋白组分。然而，SDS PAGE 分析及 Coomassie 蓝染/银染法检测蛋白并没有发现免疫羊和未感染羊样品组中的粗蛋白存在差异。与此相似，凝集素印迹法也未发现两组粘液的糖蛋白组分存在差异。例外的是免疫粘液样本中的花生凝集素，其可以检测到存在于重链及轻链上的糖，重链为 70kDa，表明 IgA 存在。印迹法也显示了所有粘液样本中存在 IgG。

上述发现和免疫粘液中存在 IgG 及 IgA 表明是识别线虫抗原的抗体导致了幼虫结块并在体内提供保护。以免疫粘液探查幼虫抗原的免疫印迹发现存在 IgG1 及 IgA 抗体，这些抗体主要与主抗原的 35kDa 反应，也和 9、12、20、30-45kDa 的离散区域反应。重要的是，与免疫粘液共孵育后，用从完整出鞘幼虫中洗脱下的抗体探查 L3 抗原的印迹也表明该抗原是优势反应抗原。这些结果与表面荧光染色法及免疫金电镜法的结果一起说明了抗原表型存在于幼虫表面，抗 35kDa 抗体存在于用于体内感染实验的粘液样本中，而且 IgG、IgA 的滴度与免疫粘液提供的保护程度存在明显相关。蛇形毛圆线虫免疫羊的粘液抗体也识别其它肠道线虫古巴毛样线虫、匙状细颈毛样线虫、*T. axei*、*T. vitrinus*、结节线虫、*C. oncophora*、巴西奴卡菌、*D. eckerti* 和胃线虫捻转血矛线虫及环颈奥斯他胃虫的幼虫提取物印迹上的抗原。这种交叉反应

显示其他种属线虫表面存在与蛇形毛圆线虫抗原功能类似的表面分子，可以是免疫反应的标靶。PAB-1 单抗也与这些抗原反应，因此能用来鉴定与纯化这些种属寄生性线虫的表面抗原。所有产生交叉反应的受试抗原对蛋白酶 K 的消化具有抗性的发现证明了它们同样也不是蛋白质，而是与蛇形毛圆线虫的 35kDa 抗原的性质相似。

与蛋白 A-琼脂糖相联结的 PAB-1 单抗能纯化蛇形毛圆线虫幼虫表面抗原，发现这种蛇形毛圆线虫幼虫表面抗原主要是糖类，这通过其对蛋白酶 K 等蛋白酶消化具有抗性，对糖基进行银染改良法染色和用能与暴露的糖基结合的生物素-酰肼试剂标记得到证实。该抗原不被诸如银染/Coomassie 蓝染法等的蛋白质检测术所染色。该抗原对脂肪酶降解有抗性，且不溶于有机溶剂，这表明脂类成分不存在或不能进入。用 N-糖苷酶 F 处理不影响抗原，这说明糖不是 N-连接的，或者说明酶不能进入而产生攻击作用。碱处理或酰肼广泛水解不毁坏抗原，表明其糖结构不常见。以三氟乙酸进行强酸水解，抗原遭毁坏。

以 PAB-1 单抗探查蛇形毛圆线虫幼虫提取物，观察到印迹上的低分子量抗原以阶梯状条带形式出现多级条带图案，这表明 35kDa 抗原的结构含有由更小单元组成的多聚体。但是，在存在于幼虫表面时的原生状态下，抗原是一个高分子量的复合物，正如非变性条件下进行的电泳结果所显示。将该复合物溶解于 SDS + DTT 使其降解为一种在印迹的 35kDa 处能检测到的抗原，表明该复合物是一种 35kDa 抗原的多聚物或 35kDa 抗原与其他未明组分的异聚体。该抗原在以等电聚焦分离时显示出带电异质性，这再次说明它是一个复杂的结构。上述结果表明了这种存在于幼虫外表面的分子复合物可能对线虫宿主的胃腔、肠道内所能有的物理条件所致的降解具有抗性。线虫表面抗原的这些性质所隐含的功能性作用尚未确定，但是个复合物可能在幼虫通过宿主系统内

的敌对环境达到其嗜好的小肠时发挥临时保护作用。35kDa 抗原仅仅在 L3 感染前直至感染后 5 天内出现，这表明这种覆层是幼虫通过胃腔时保护所需要的。当在小肠内蜕皮成 L4 过程中，由于不需要，因而这种保护性覆层脱离。很明显针对该保护性覆层的免疫反应能严重损坏线虫在宿主体内成功生长的能力，因此对线虫控制具有广泛意义。在对羊的初级疫苗试验中，用含有部分纯化 35kDa 抗原和油佐剂的疫苗对动物免疫，与对照组比较，免疫组的粪便虫卵数量显著减少。

本发明的所有方面仅以实施例的形式描述，需说明的是，在不超出所附权利要求的范围的情况下可以对其进行的修改与增加。

参考文献:

- Bouchez-Mahiout L., Doyen C., Lauriere M. 1999. Accurate detection of both glycoproteins and total proteins on blots: control of side reactions occurring after pefiodate oxidation of proteins. *Electrophoresis*: 20,1412-1417
- 5
- Carlisle MS, McGregor DD, Appleton JA. Intestinal mucus entrapment of *Trichinella spiralis* larvae induced by specific antibodies. *Immunology* 1991 ;74:546-551
- 10 Douch PGC, Harrison GBL, Buchanan LL, Greer KS. In vitro bioassay of sheep gastrointestinal mucus for nematode paralysing activity mediated by substances with some properties characteristic of SRS-A. *Int J Parasitol* 1983; 13:207-212.
- Emery DL, McClure S J, Bendixsen T, Windon RG. Investigations of the role of hypersensitivity responses in immunity against ovine gastrointestinal nematodes. In: Husband AJ, editor. *Mucosal Solutions: Advances in Mucosal Immunology*. University of Sydney Press, 1997;359-366
- 15
- Harrison GBL, Pulford HD, Gatehouse TK, Shaw RJ, Pfeffer A, Shoemaker CB. Studies on the role of mucus and mucosal hypersensitivity reactions during rejection of *Trichostrongylus colubriformis* from the intestine of immune sheep using an experimental challenge model. *Int J Parasitol* 1999; 29:459-468
- 20
- Jones WO, Windon RG, Steel JW, Outteridge PM. Histamine and leukotriene concentrations in duodenal tissue and mucus of lambs selected for high and low Responsiveness to vaccination and challenge with *Trichostrongylus colubriformis*. *Int J Parasitol* 1990;20:1075-1079
- 25

Kittelberger R. and Hilbink F. 1993. Sensitive silver-staining detection of bacterial lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *J. Biochem. Biophys. Methods* 26:81-6

Kohler and Milstein, *Nature*, 256, 495-497 (1975)

5

Lee GB, Ogilvie BM. The mucus layer in intestinal nematode infections. In: Ogra PL and Bienenstock J, editors. *The Mucosal Immune System in Health and Disease*. Columbus:Ross Laboratories 1981; 175-183.

10 Miller HRP. Gastrointestinal mucus, a medium for survival and for elimination of parasitic nematodes and protozoa. *Parasitology* 1987; 94:S77-S100.

Miller HRP. Mucosal mast cells and the allergic response against nematode parasites *Vet Immunol Immunopathol* 1996; 54:331-336.

15

Rothwell TLW. Immune expulsion of parasitic nematodes from the alimentary tract. *Int J Parasitol* 1989; 19:139-168.

Sangster and Gill, *Pharmacology of Anthelmintic Resistance Parasitology Today*.

20 1999, Vol 15, No. 4

Van Wyk, Stenson, Van Der Merwe, Vorster, Viljoen. Anthelmintic Resistance in South Africa: Surveys indicate an extremely serious situation in sheep and goat farming. 1999.

25

Waller, Anthelmintic Resistance. *Veterinary Parasitology*, 1997, 391-412

图1. 与5或10ml未感染羊的粘液（阴影）或与2.5、5、7.5或10ml免疫羊的粘液（黑色）共孵育后在未免疫羊中的幼虫数量

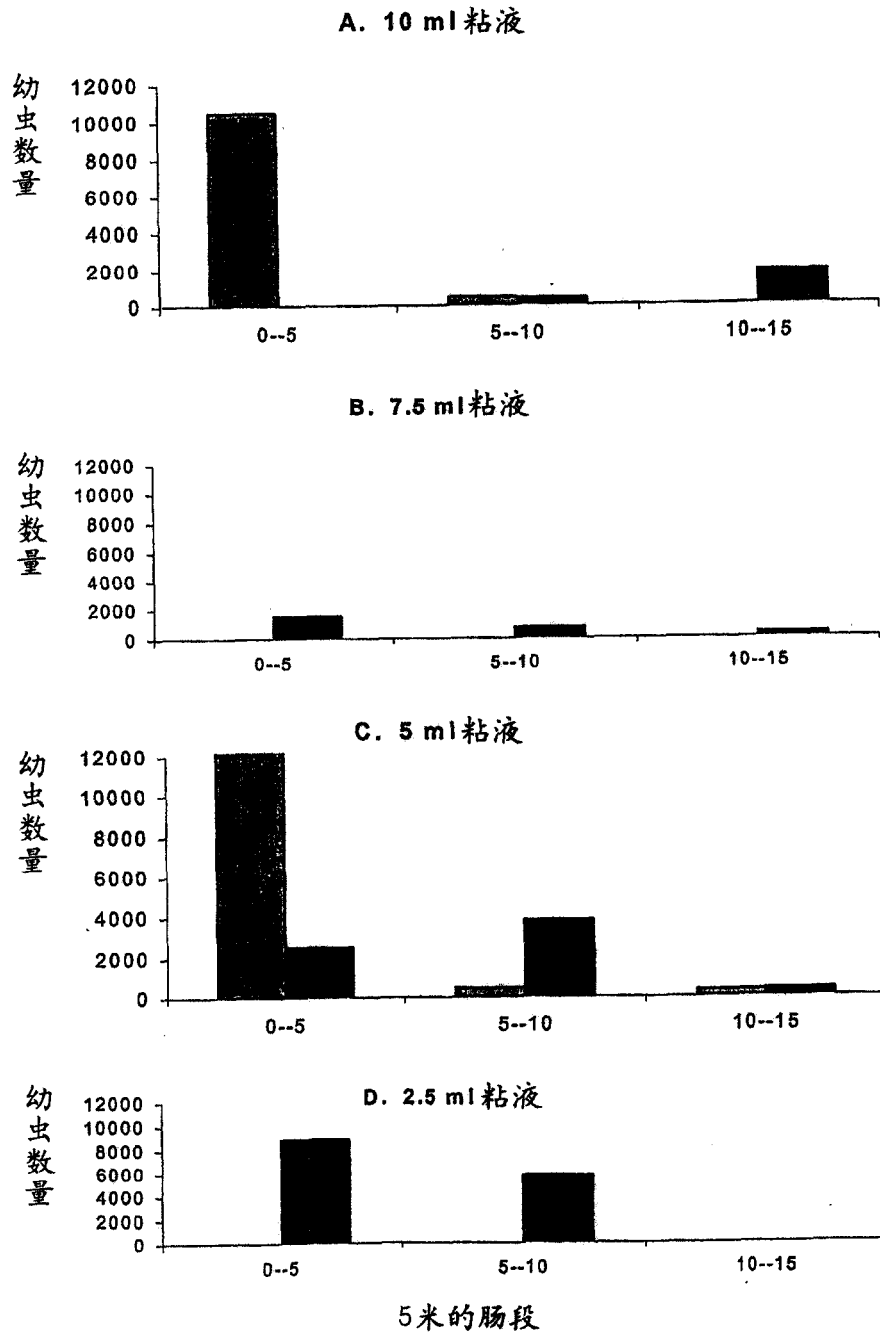


图2. 与未感染羊（阴影）或免疫羊（黑色）的粘液共孵育不同时间后在未感染羊中的幼虫数量。

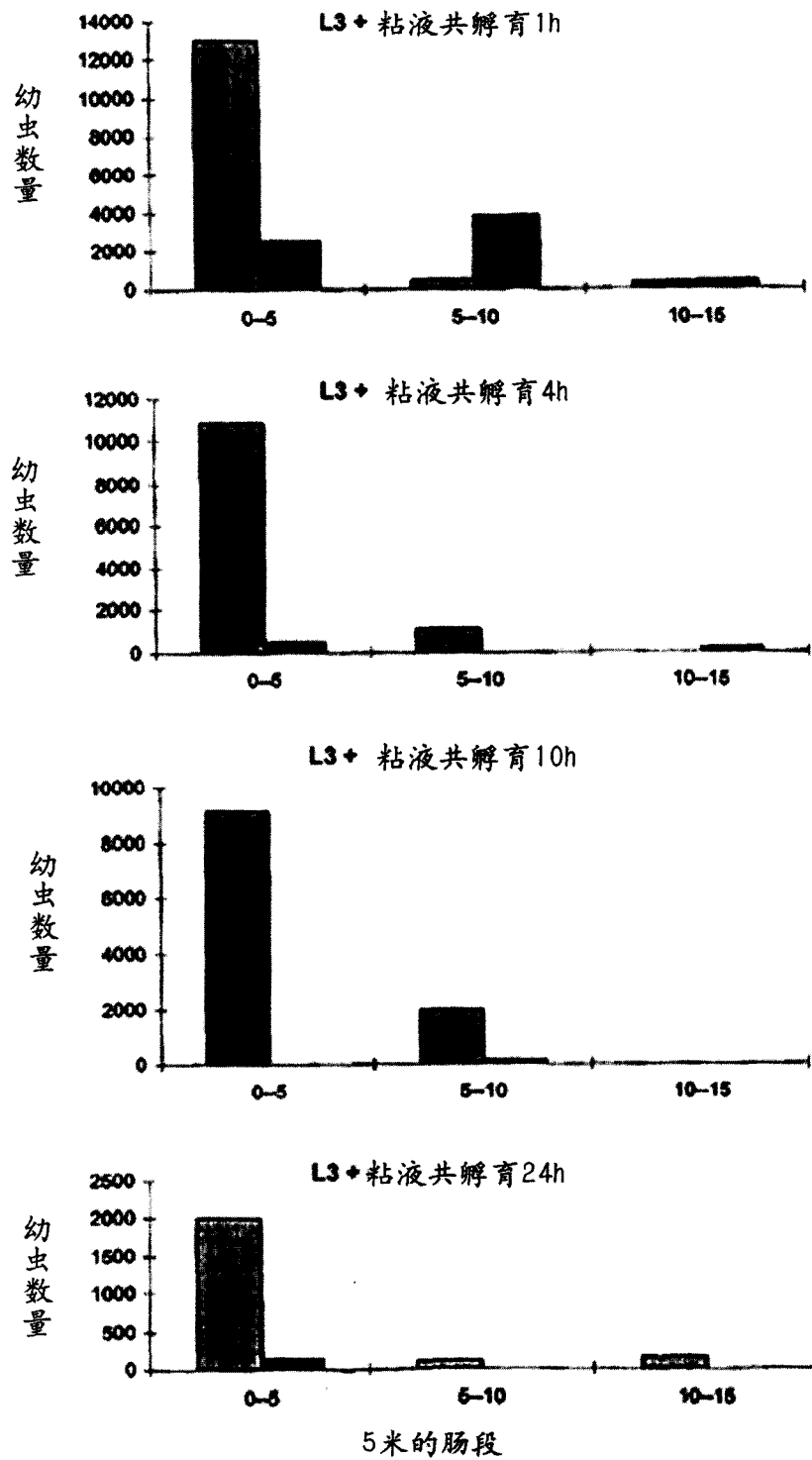


图3. 用未感染粘液（上图）或免疫粘液与L3混合物灌输未感染的受体羊后，在未感染羊中最近的5m肠段和最远的10m肠段中的幼虫数量。

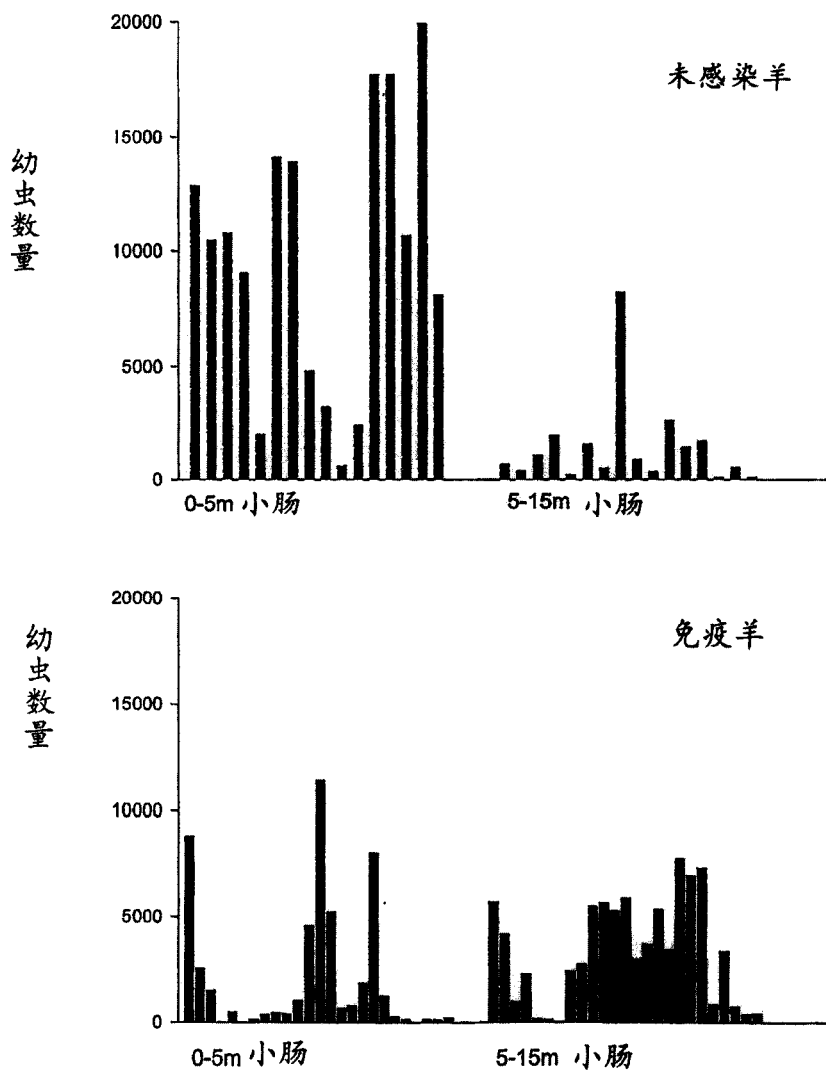


图4. 免疫粘液的抗幼虫活性与免疫后收集时间的关系

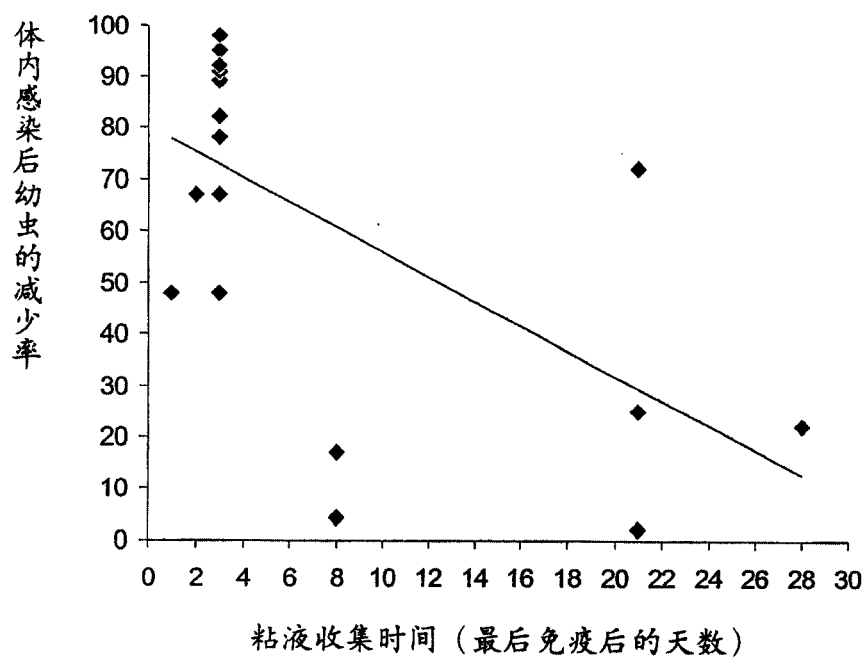


图5. 未感染羊或用*T.colubriformis*截短感染的免疫羊的粘液样品的 SDS PAGE分析结果。上图：用Coomassie蓝染色的样品；下图：用银染色的样品。

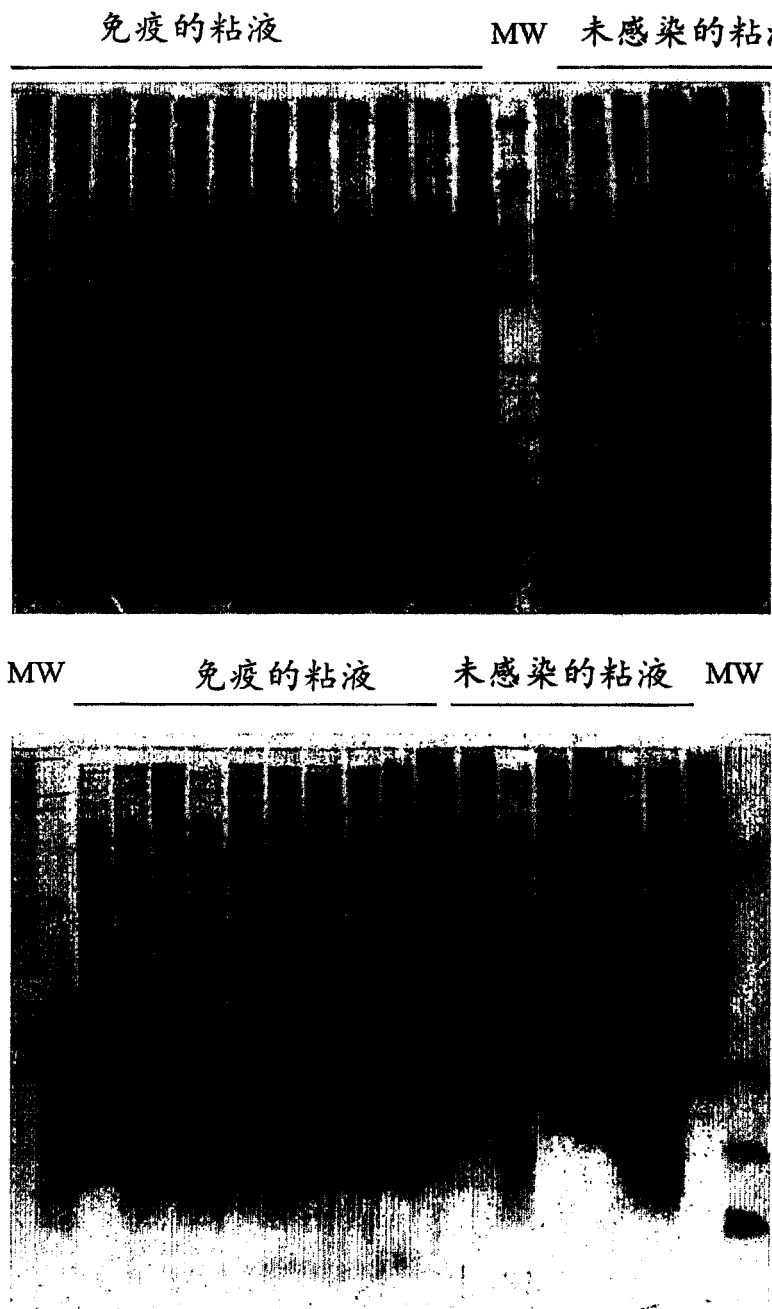


图6. 免疫的粘液 (各图的左半部分) 和未感染的粘液的植物凝集素印迹。
A: UEA-1(α -L-果糖); B: JAC (α -gal-Me-吡喃糖苷);
C: WGA (N-乙酰氨基葡萄糖); D: LL(甘露糖, 葡萄糖).

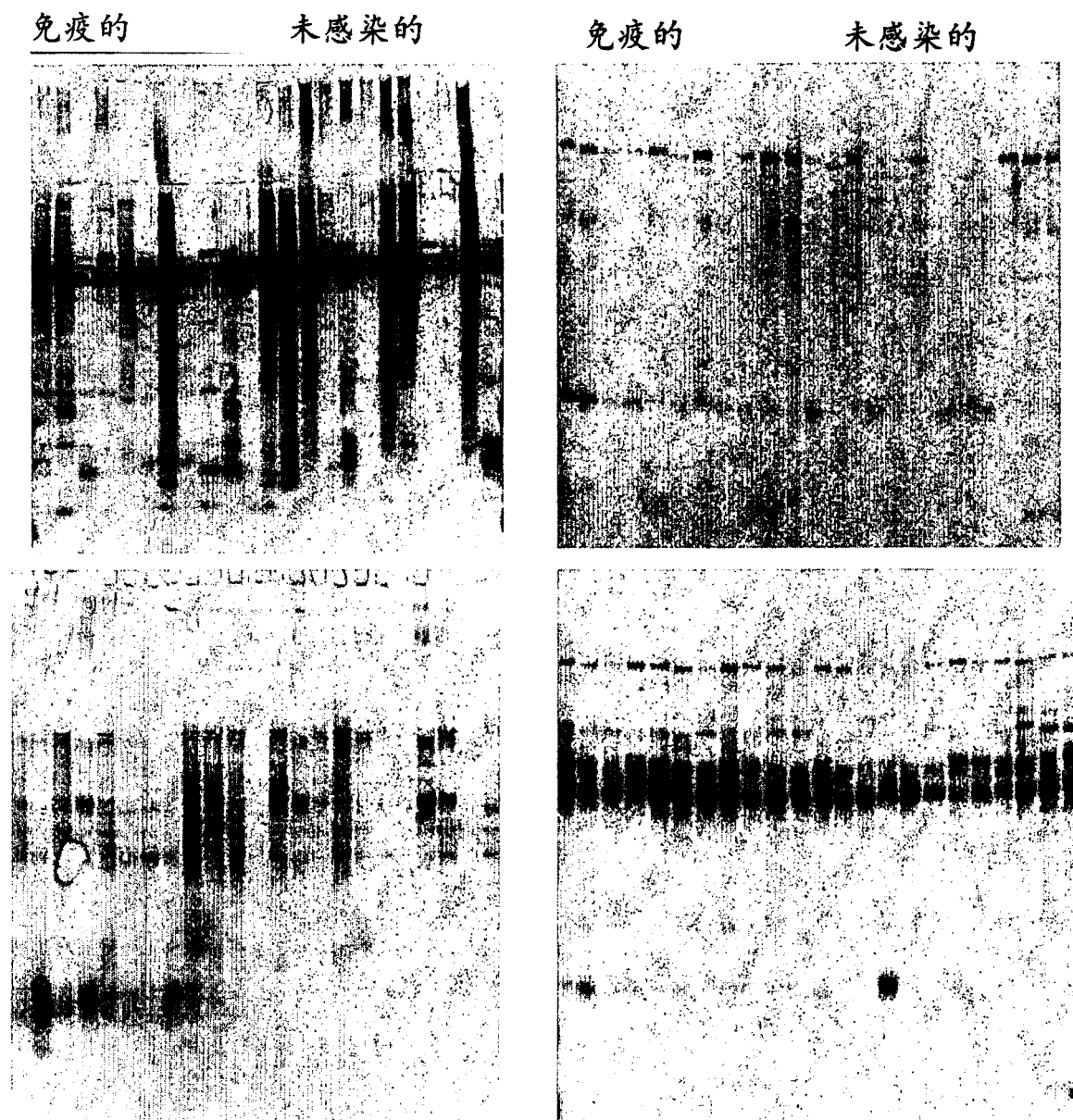


图7. 免疫的和未感染的粘液的植物凝集素印迹结果,
A: PNA(β -半乳糖-N-乙酰氨基半乳糖);
B: EcorA(β -半乳糖-N-乙酰氨基半乳糖);
C: SBA(N-乙酰氨基半乳糖);
D: ECA(β -半乳糖-N-乙酰氨基半乳糖)。
箭头表示70和28kDa

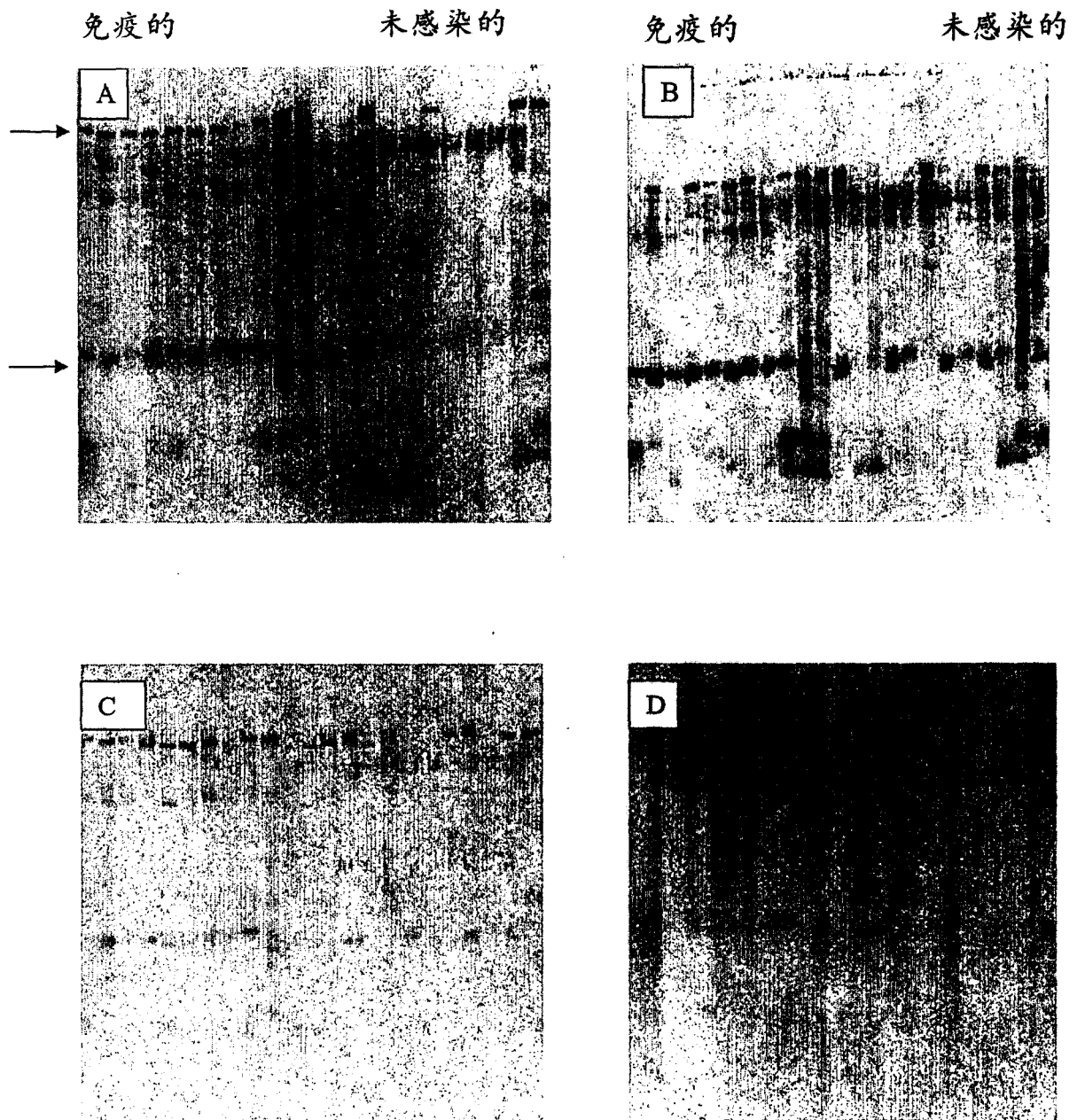


图8. 免疫的和未感染的粘液的植物凝集素印迹结果,
A: SNA (唾液酸); B: 用RAS/IgG-HRP免疫印迹探查。
箭头指示55和27kDa

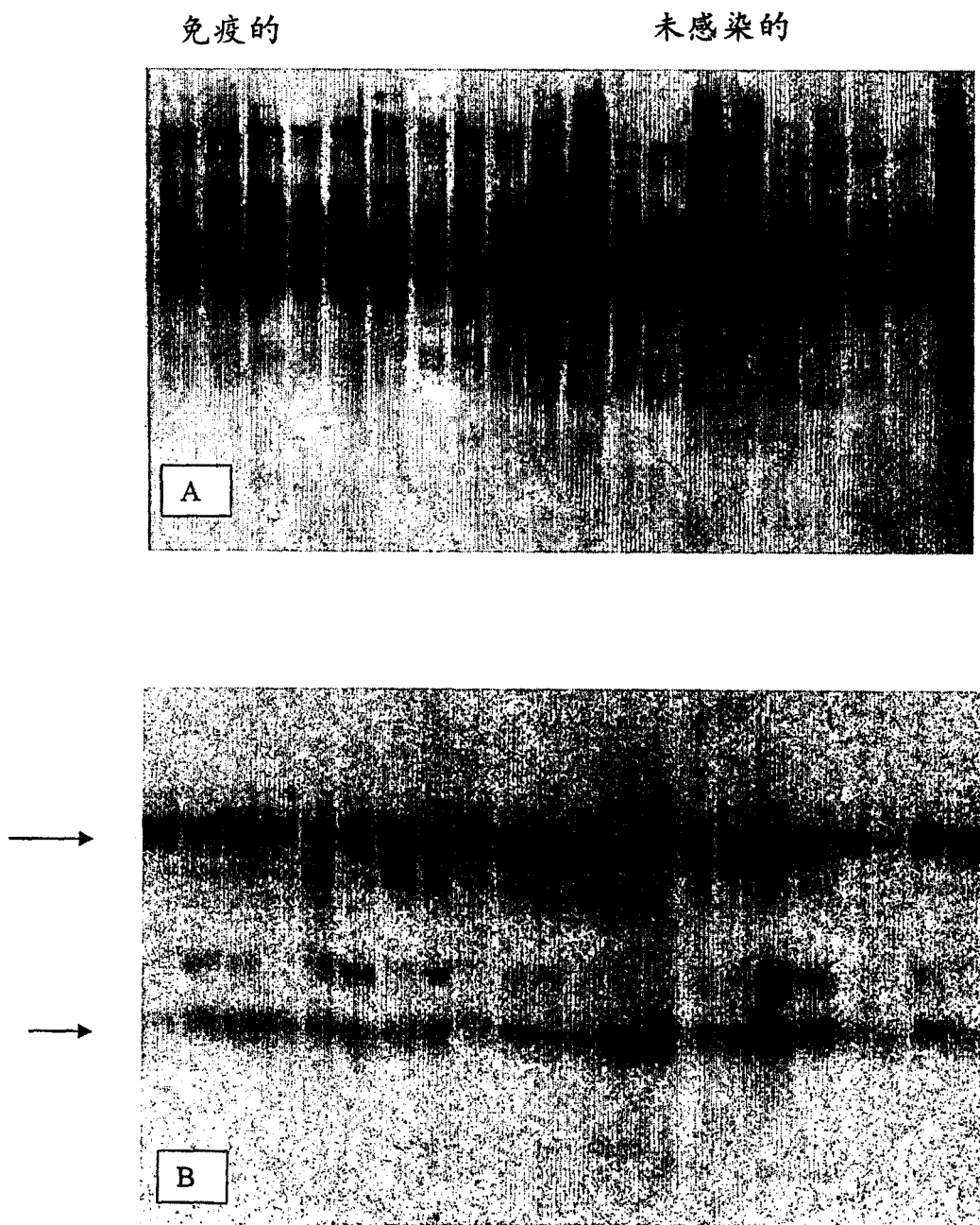


图9. Tc L3抗原的免疫印迹结果，其中的L3抗原用免疫羊（第1、5、10、11、12和19道）或未感染羊（第13-18道）的肠粘液，免疫粘液的 $100\ 000\times g$ 离心上清（第3道），从蛋白G-琼脂糖纯化出的免疫粘液上清（第4和7道），从出鞘的Tc L3洗脱出的抗体（第6和20道），来自两免疫羊的硫酸胺沉淀的肠道内腔液体的抗体（第8和9道）探查。第2道显示了用胶体金着色的Tc L3蛋白，用RAS/IgG-HRP检测IgG抗体（第1-18道），用MAS/IgA，接着用RAS/IgG-HRP检测IgA抗体（第19和20道）。

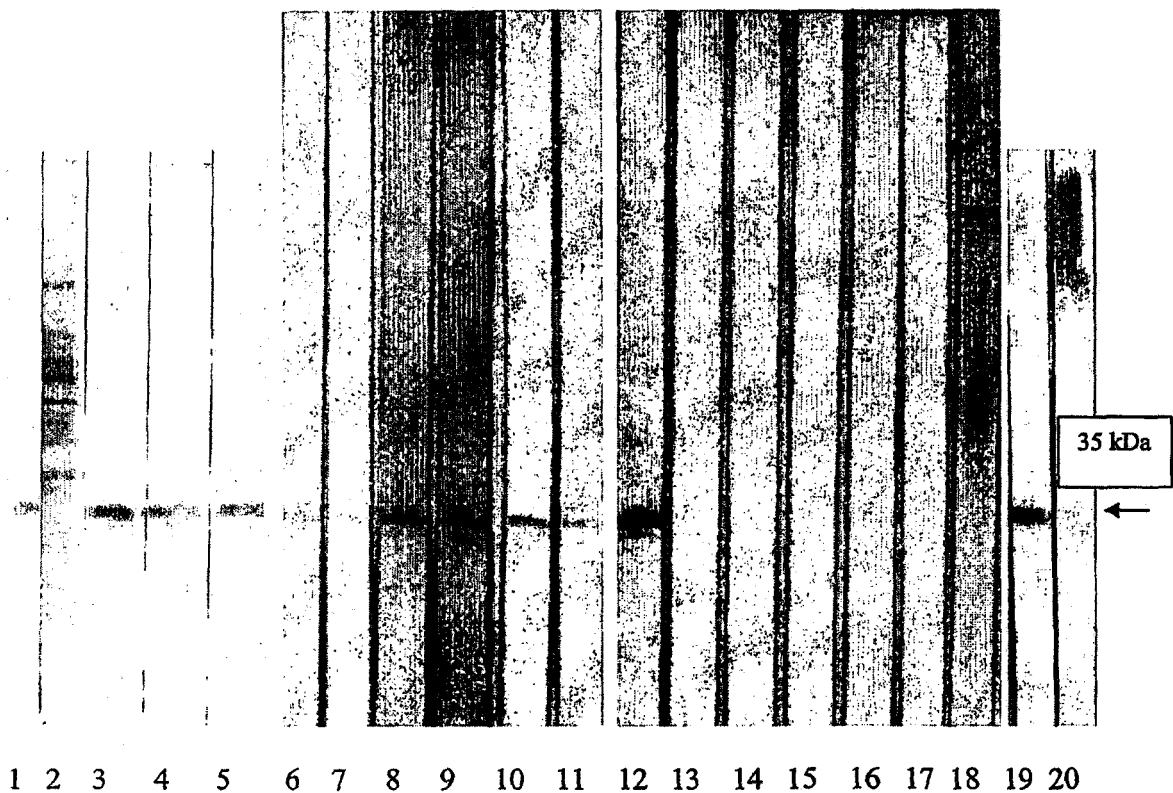


图10. 用未感染的或免疫的粘液探查的Tc L3抗原的免疫印迹结果, 抗原带与未感染的粘液 (第2、4、6、9、11、13道) 或免疫 (第3、5、7、10、12、14道) 的粘液反应, 然后与RAS/IgG (第2和3道)、抗羊IgG1的mAB (第4和5道)、抗羊IgG2的mAB (第6和7道)、抗羊IgA的mAB (第9和10道)、抗羊IgM的mAB (第11-14道) 反应。
第1道: Pharmacia分子量标准; 第8道: Bio Rad预染色的分子量标准。

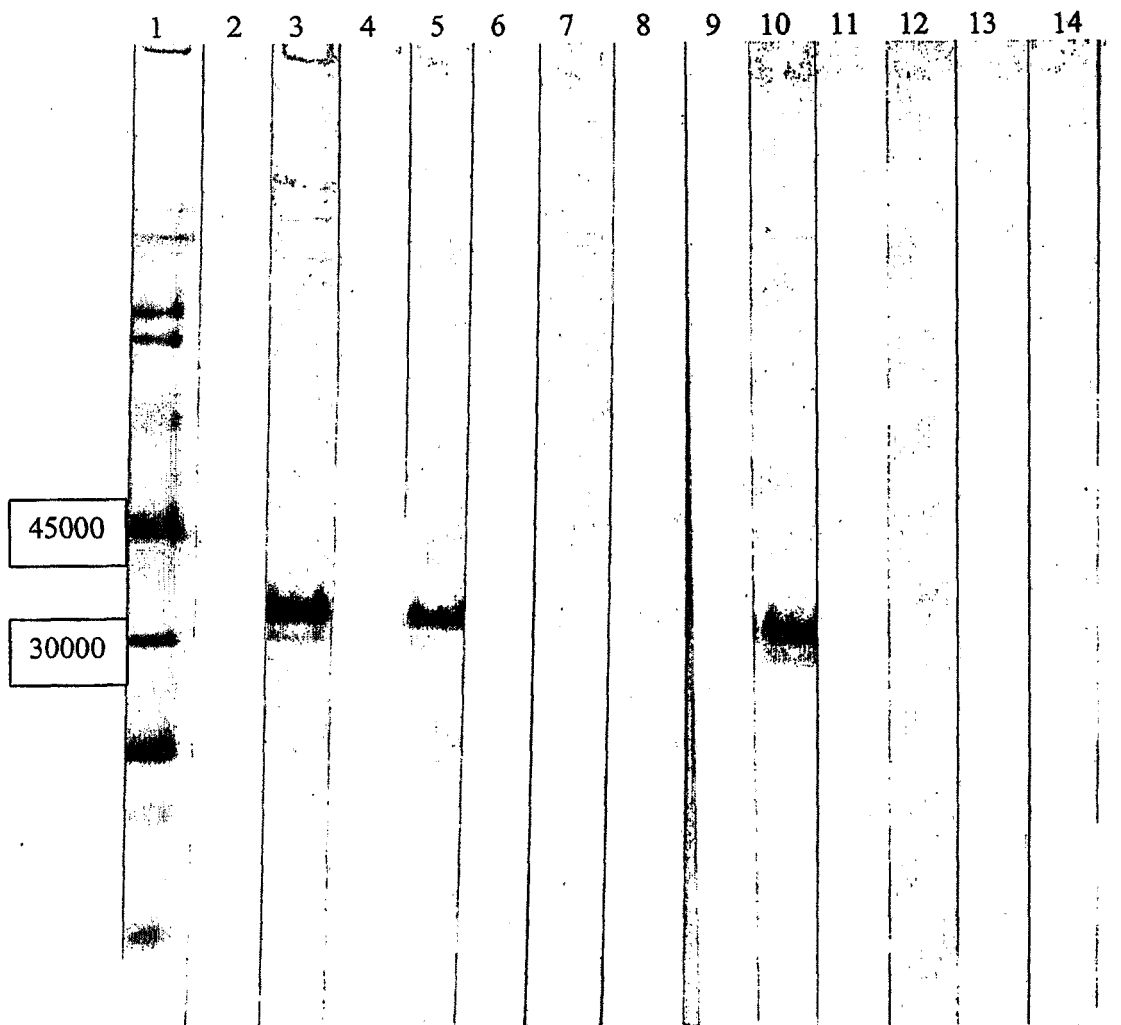


图11. Tc L3抗原 (第1-8道)、Cc L3抗原 (第9-12道) 和Ns L3抗原 (第13-16道)的免疫印迹结果, 用Tc免疫羊的粘液 (第2、3、5、9、13道), Ns免疫羊的粘液 (第6、10、14), Ns免疫羊的肠内容物的硫酸胺沉淀 (第7、11、15道), Ns免疫羊的血清 (第8、12、16道) 探查。第1道: 用吸收了260 000只出鞘的Tc L3后的Tc免疫羊的粘液探查; 第4道: 用胶体金蛋白染色着色的Tc L3抗原。箭头指示35或22kDa抗原的抗原。用AS/IgG-HRP检测抗体。

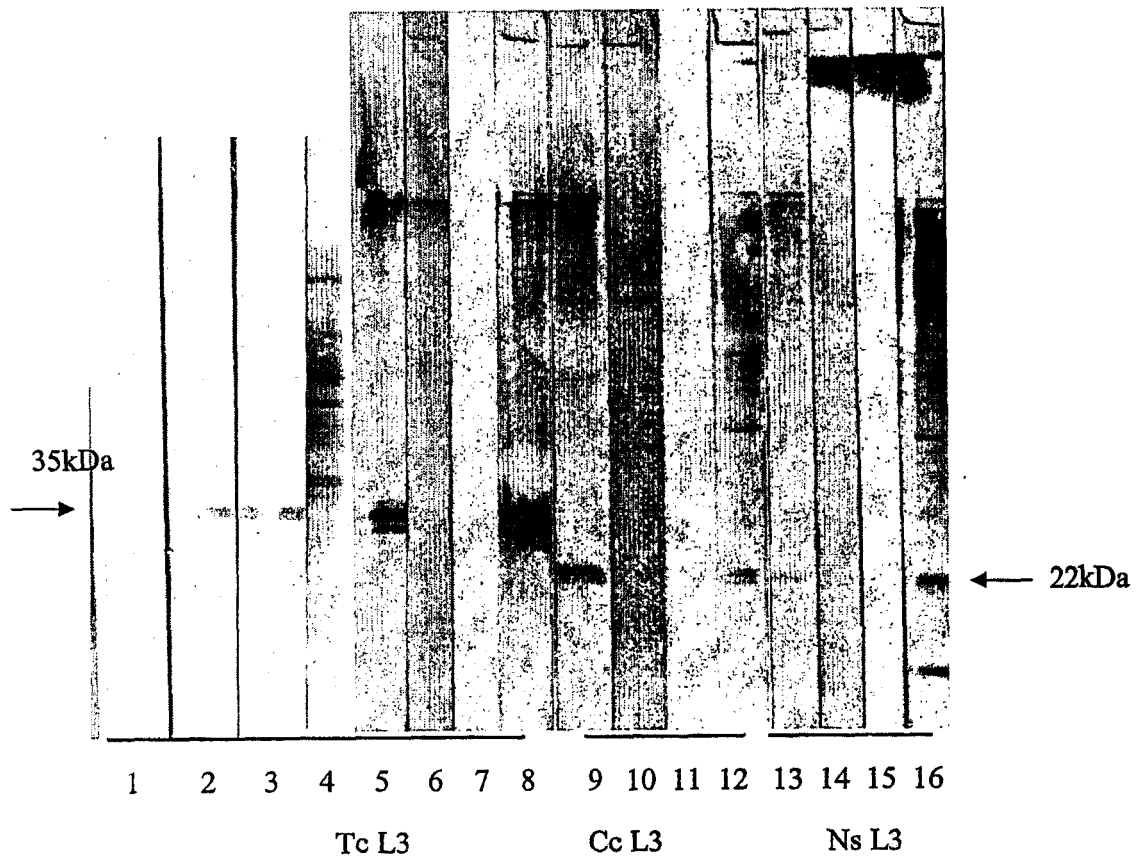


图12. L3的抽提物的免疫印迹分析的结果, 该L3是
第1道: 捻转血矛线虫; 第2道: 环颈奥斯他胃虫;
第3道: 匙状细颈毛样线虫; 第4道: 古巴毛样线虫;
第5道: 蛇形毛园线虫
用Tc免疫羊的粘膜探查后通过TAS/IgG-HRP印迹。
箭头指示35kDa抗原的位置。

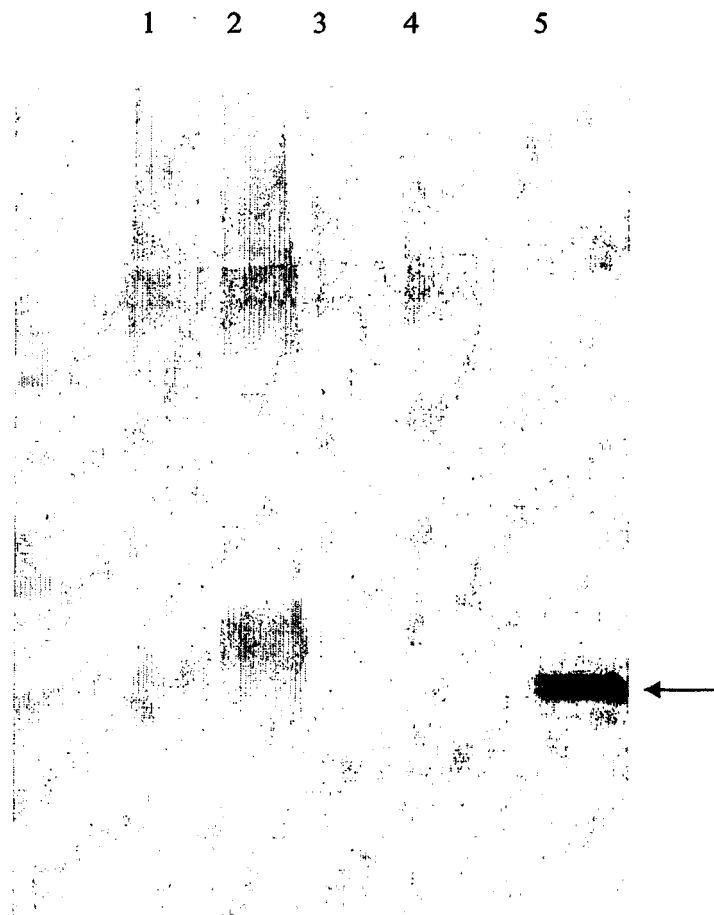


图13. Tc L3抗原的肠粘液IgG和IgA抗体滴度与抗感染保护作用的关系
(相对于对照幼虫减少的百分率)

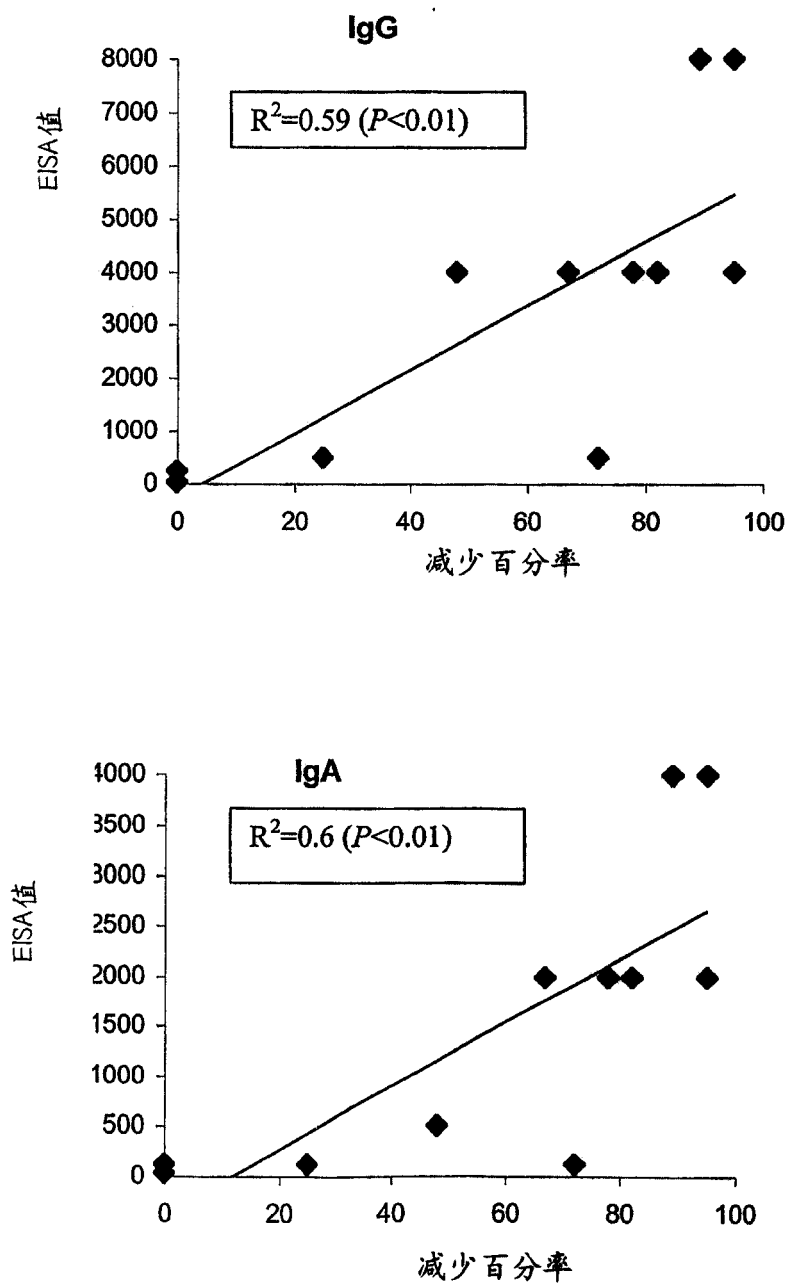


图14. 在给予羊加强剂量的L3后的第3、16和37天，对截短感染的羊进行活体组织检测所测得的粘液样品中的抗体滴度

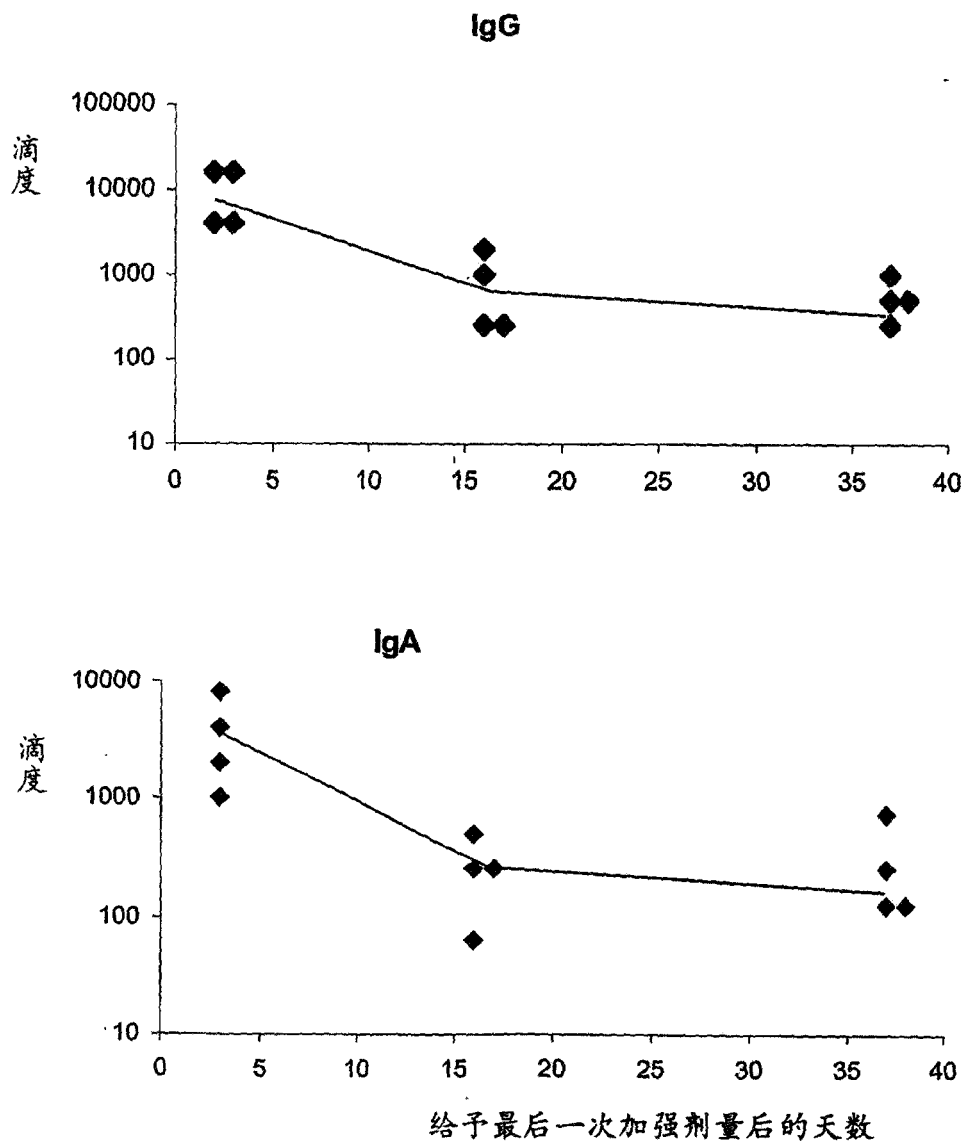


图15. 上图：与免疫的（左图）或未感染（右图）的粘液反应后经过RAS/IgG-FITC的出鞘的Tc L3；下图：在感染并与免疫粘液反应后第5天收集的经过RAS/IgG-FITC检测的Tc幼虫（下图），左图是在UV下的视图，右图是在白光下的同一幻灯片的视图。



L3 + 免疫粘液

L3 + 未感染的粘液



幼虫 + 免疫粘液的第5天

图16. 在与未感染的 (A) 或免疫的 (B) 粘液反应后出鞘的Tc L3经过RAS/IgG金标记的电子显微照片。图C、D、E、F是在感染并与免疫的粘液反应后第2、3、4或5天收集的经RAS/IgG金标记的Tc幼虫。箭头表示金标记的表面位置。

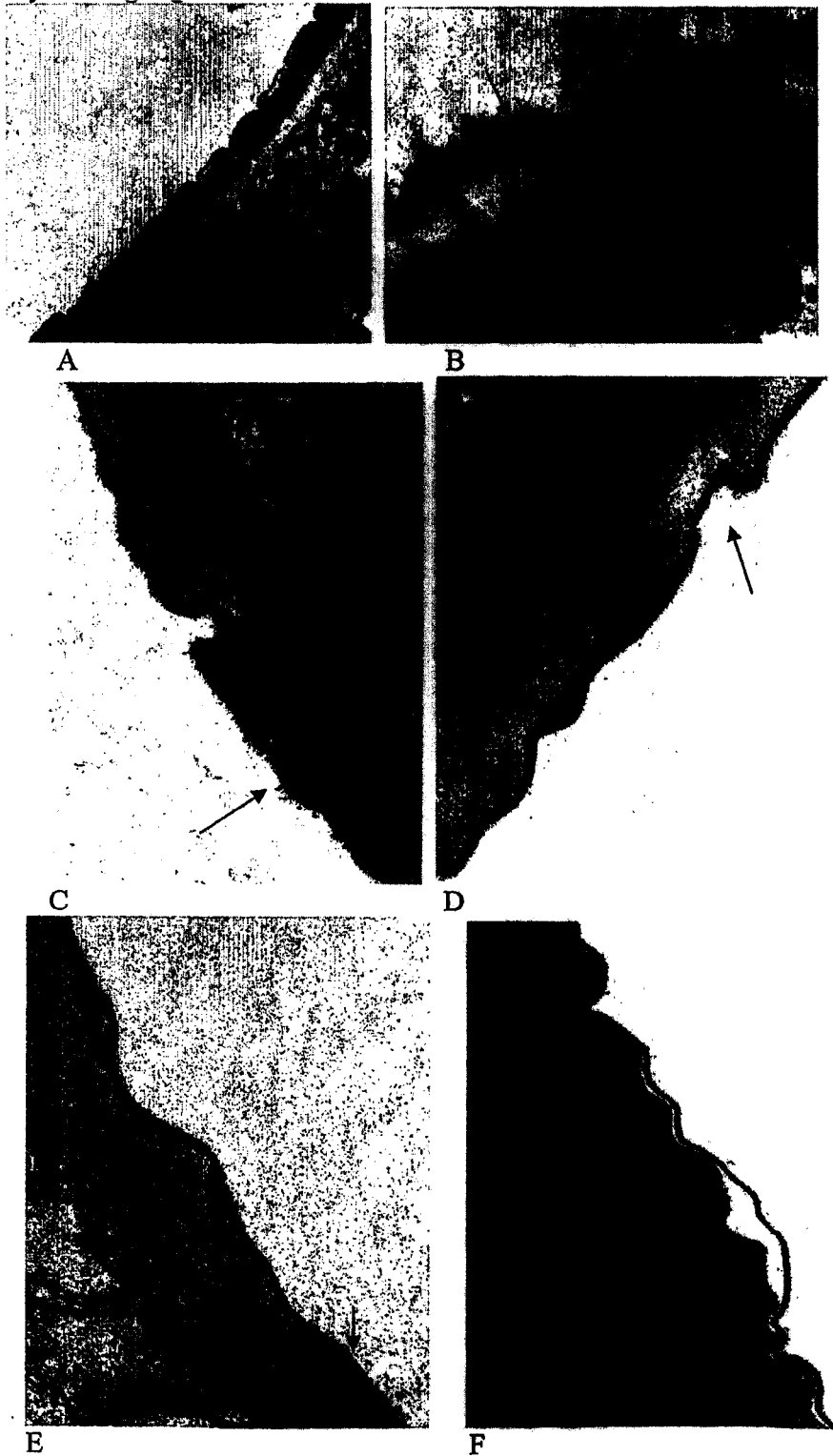


图17. Tc卵、幼虫和成虫的抽提物的SDS PAGE和免疫印迹分析的结果。
 图A、C和D与免疫粘液反应，图B是银染色蛋白。图A和B：第1道，Tc卵；
 第2、3、4道，在体外生长1、3和7天的幼虫；第5道，卵；第6-14道，
 在体外生长1-9天的幼虫。图C：第1道，卵；第2、3、4道，在体外生
 长1、3和5天的幼虫；第5道，在8℃下生长6个月的L3；第6道，L4（感
 染后第14天）；第7-9道，成虫。图D：第1和2道，出鞘的l3；第3和5
 道，鞘；第6和7道，L4（感染后第14天）；第8-13道，成虫。

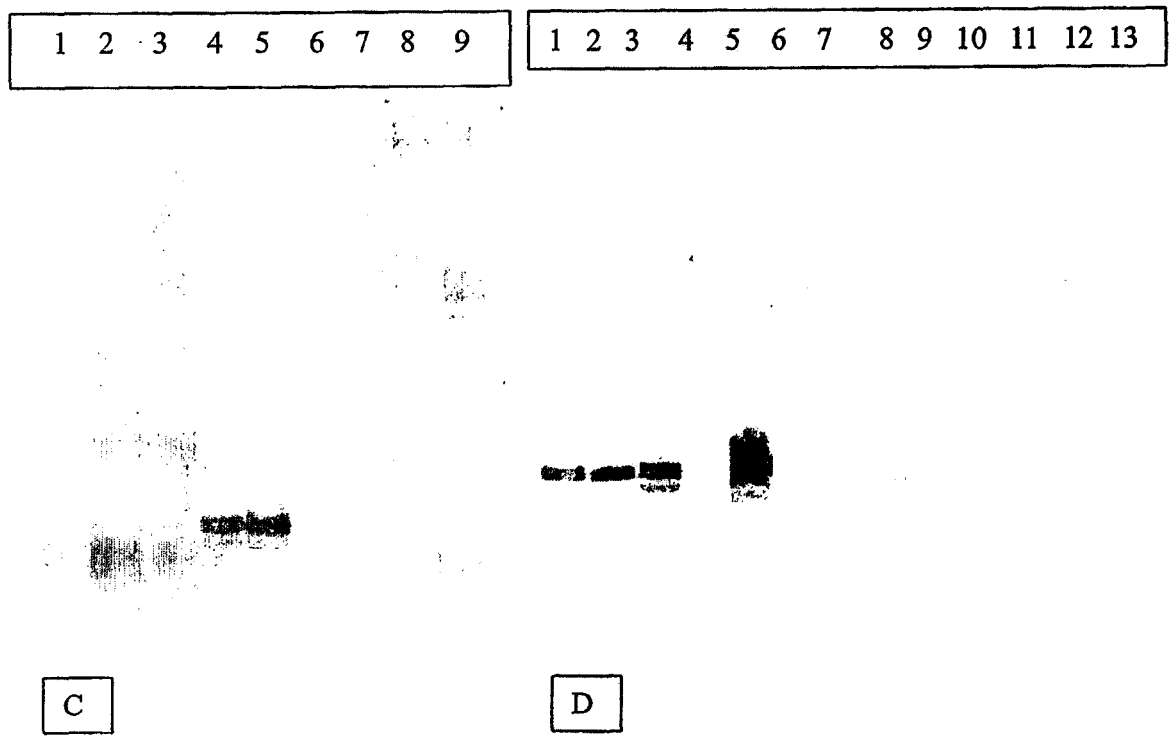
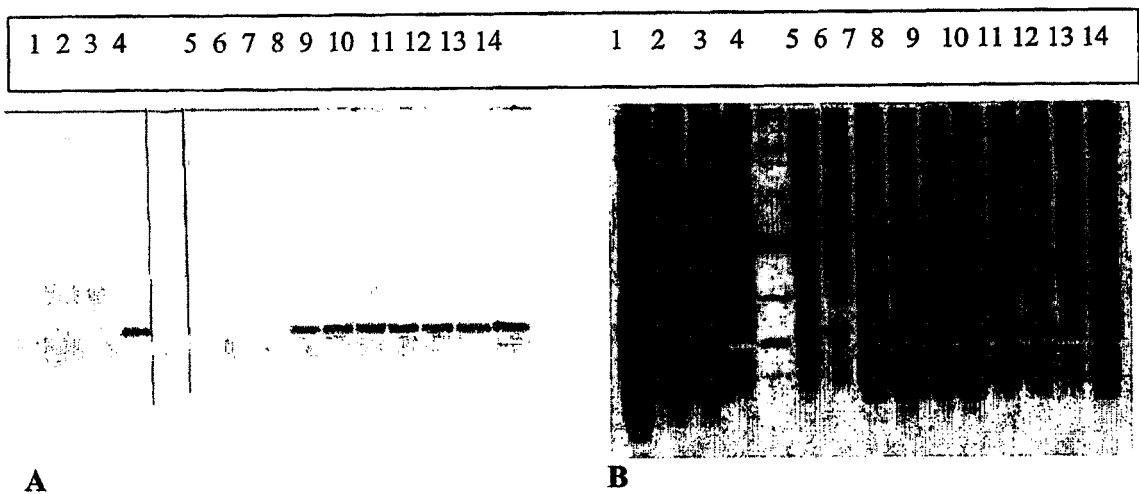


图18. 感染前和感染后不同时间的Tc L3的SDS PAGE和免疫印迹分析结果。
图A: 第1和7道, 第1天的幼虫; 第2和8道: 第2天的幼虫; 第3和9道: 第3天的幼虫; 第4和10道, 第4天的幼虫; 第5和11道, 第5天的幼虫; 第6和12道, 第14天的幼虫。
图B: 第1和5道, 感染前的L3; 第2和6道, 第5天的幼虫; 第3和7道, 第6天的幼虫; 第4和8道, 感染后第7天的幼虫。

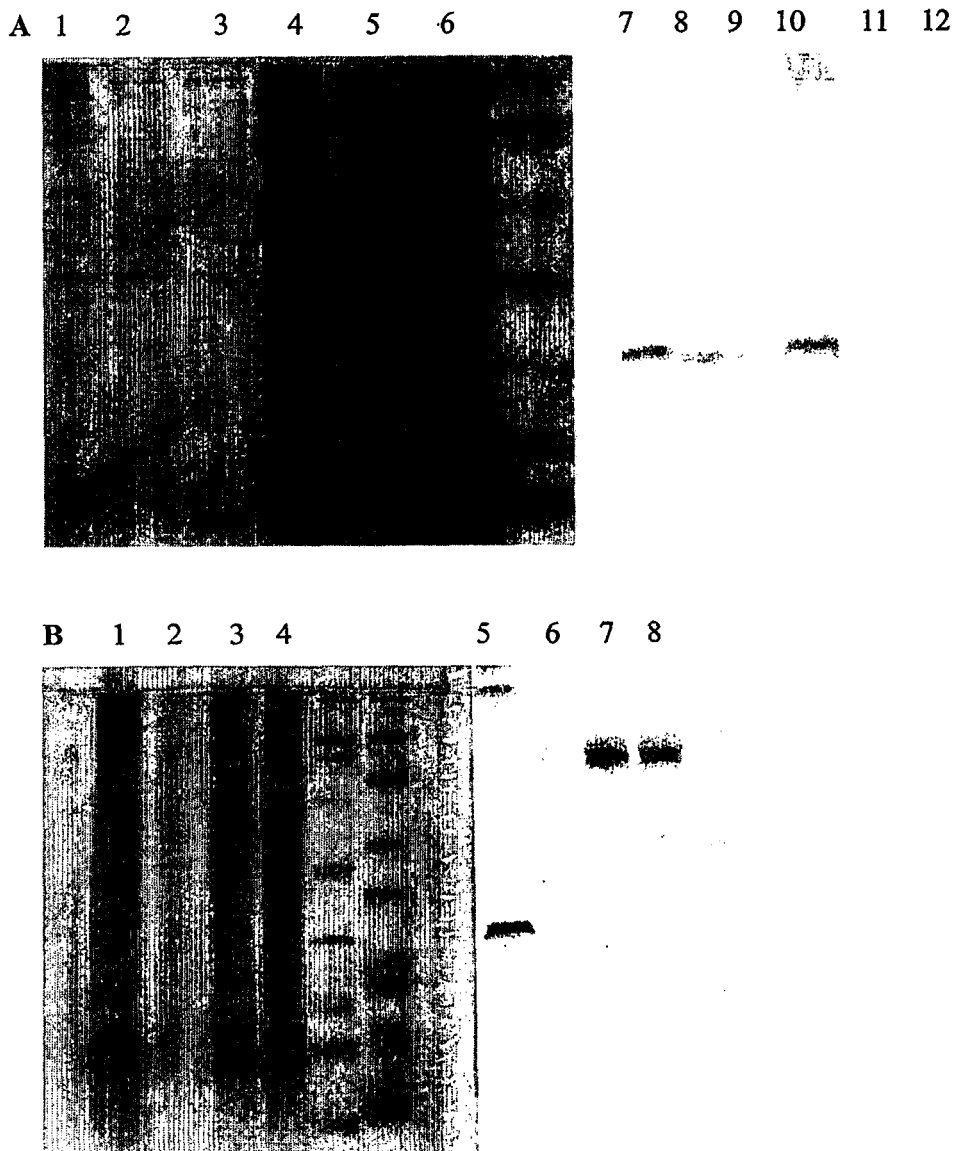
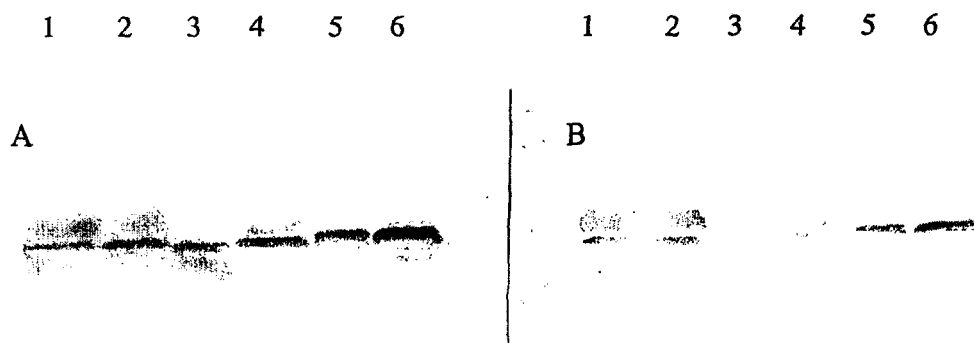


图19. 用mAB PAB-1(A)或免疫羊粘液 (B) 探查的蛋白酶K消化的Tc L3抽提物 (第1-4道) 和Tc L3抽提物 (第5和6道) 的免疫印迹分析结果, 用RAM/IgG-HRP(A)或RAS/IgG-HRP检测抗体。



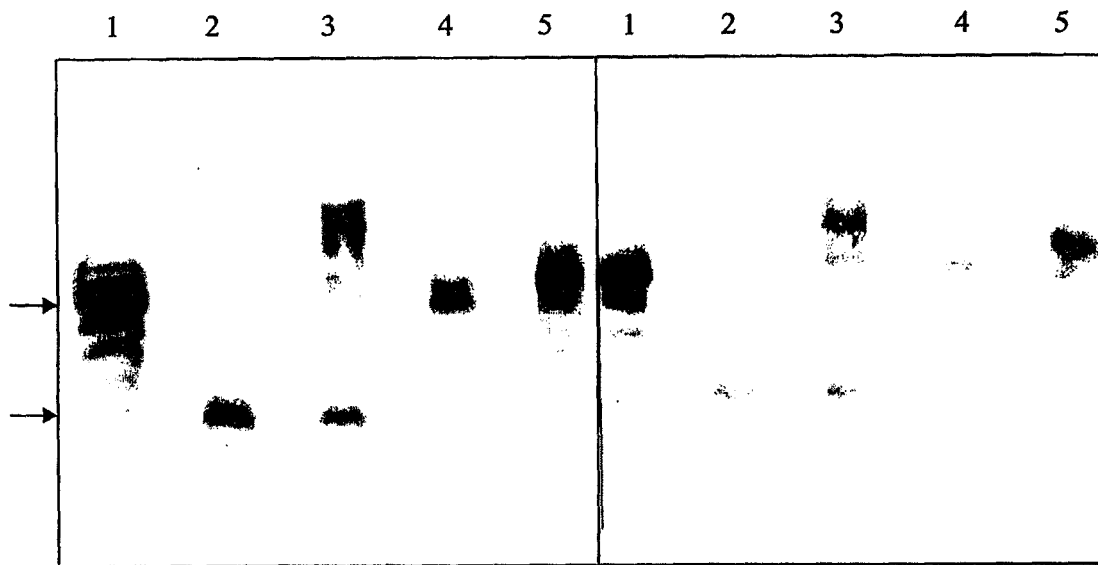


图20. 用mAb PAB-1探查后通过RAM/IgG-HRP对L3抽提物（左图）和蛋白酶K消化的L3抽提物（右图）进行的印迹分析结果。箭头是35和22kDa。

第1道：蛇形毛圆线虫

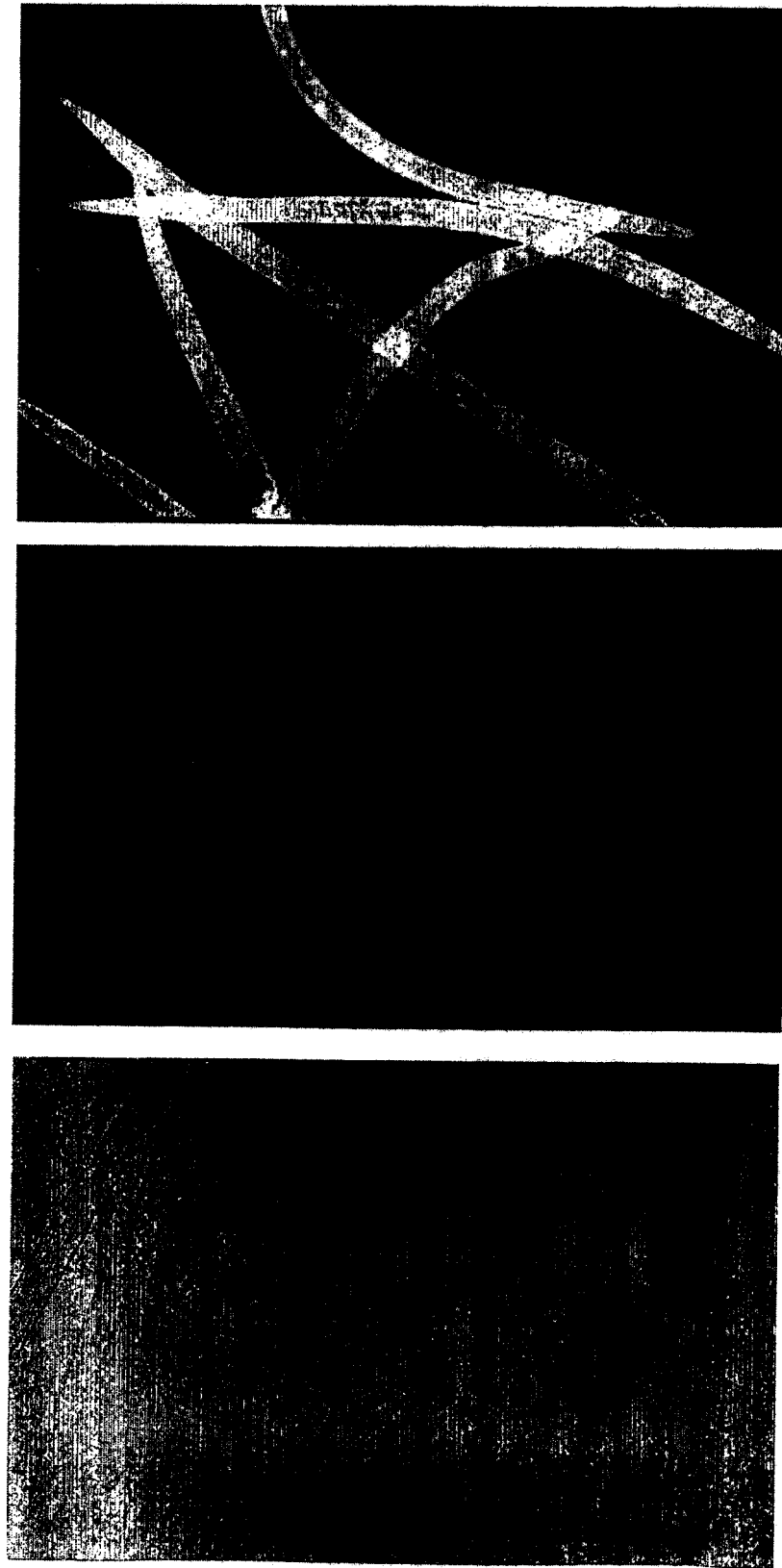
第2道：匙状细颈毛样线虫

第3道：古巴毛样线虫

第4道：捻转血矛线虫

第5道：环颈奥斯他胃虫

图21. 用单克隆抗体对Tc L3进行的免疫荧光着色。左边和中间的图与对照单克隆抗体PG-G8-D10-E6 (对抗绵羊IL-4的一种IgG3亚种抗体)反应。左图是在白光下的视图，中间的图是在UV光下的同一幻灯片视图。右图与单克隆抗体PAB-1反应。上述两幻灯片都与RAM/IgG-FITC反应。



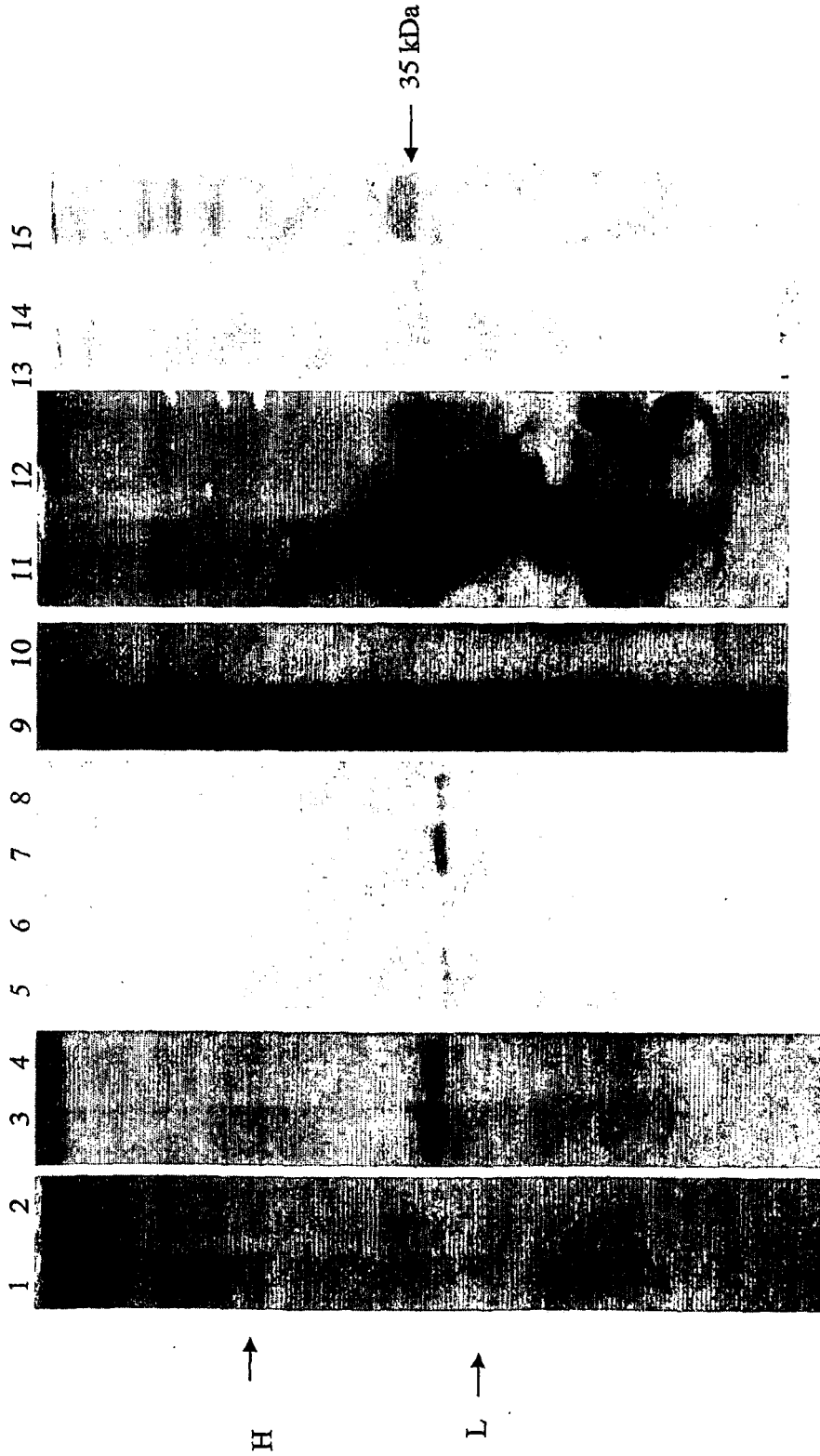


图22. Tc幼虫表面抗原的分析结果, 该抗原用与G-琼脂糖结合的单克隆抗体PAB-1进行免疫亲和色谱来纯化。第1和2道: 从mAb柱洗脱的抗原, 针对蛋白(第3和4道)银染色; 第5-8道: 从mAb柱洗脱的抗原, 用免疫羊粘液的抗体探查; 第9和12道: Tc L3抽提物, 针对蛋白(9)或糖(12)银染色; 第10和11道: 从mAb柱洗脱的抗原的胶抽提物, 针对蛋白(10)或糖(11)银染色; 第13和15道, 用生物素-酰肼原位标记的Tc L3抽提物; 第14道: 从mAb柱洗脱的抗原的胶抽提物。箭头指示Ig重链和轻链或35kDa表明抗原的位置。

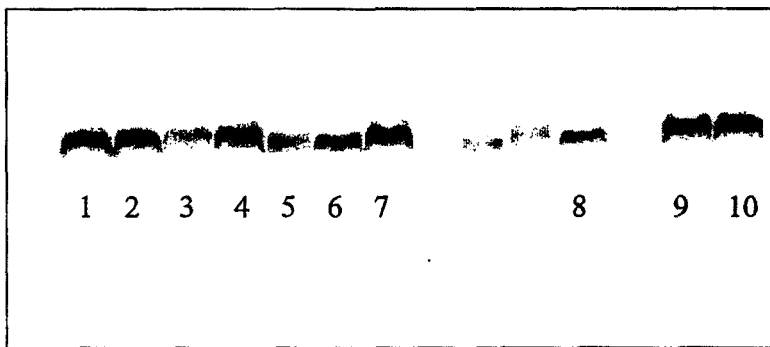


图23. 经过不同处理的Tc L3抗原的免疫印迹: 第1道: 未处理的对照; 第2和10道: 37°C下加热18h; 第3道: 37°C下高碘酸氧化24h; 第4道: 37°C下链霉蛋白酶消化22h; 第5道: 37°C下脂酶消化22h; 第6、7、8、9道: 用TCA、丙酮、氯仿甲醇或己烷-异丙醇处理后的沉淀抗原。

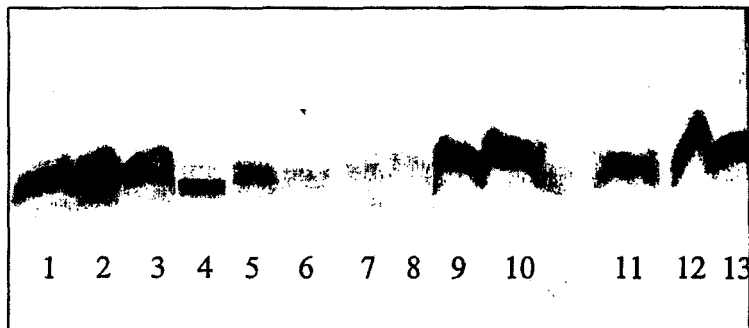


图24. 37°C下与下列物质共孵育22h后Tc L3抗原的免疫印迹, 第1道: 仅缓冲液; 第2道: 胰岛素; 第3道: 胃蛋白酶; 第4道: 链霉蛋白酶; 第5道: 蛋白酶K; 第6道: 木瓜蛋白酶; 第7道: 谷草杆菌蛋白酶; 第8道: 裂解酶; 第9道: 脂肪酶; 第10道: 溶菌酶; 第11道: 磷脂酶A2; 第12道: 磷酸肌醇-磷脂酶C; 第13道: 磷脂酶D。

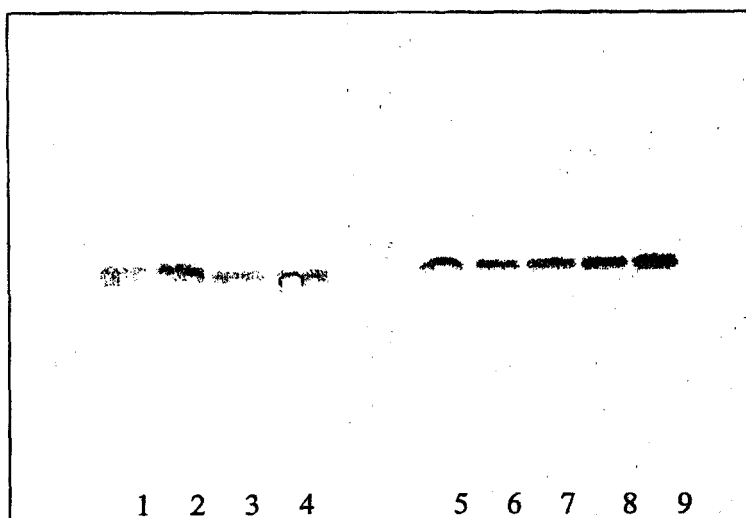


图25. 与下列物质37°C孵育3h后Tc L3抗原的免疫印迹:

第1道: 胰蛋白酶E; 第2道: 胶原酶; 第3道: 蛋白酶K+SDS;

第4道: 蛋白酶K, 无SDS。

Tc L3抗原与下列物质在50°C下共孵育18h:

第5道: 仅缓冲液; 第6道: 蛋白酶K+SDS、DTT和EDTA; 第7道:

蛋白酶K+SDS和DETA; 第8道: 蛋白酶K+SDS、DTT和Ca⁺⁺; 第9

道: 蛋白酶K+SDS和Ca⁺⁺。

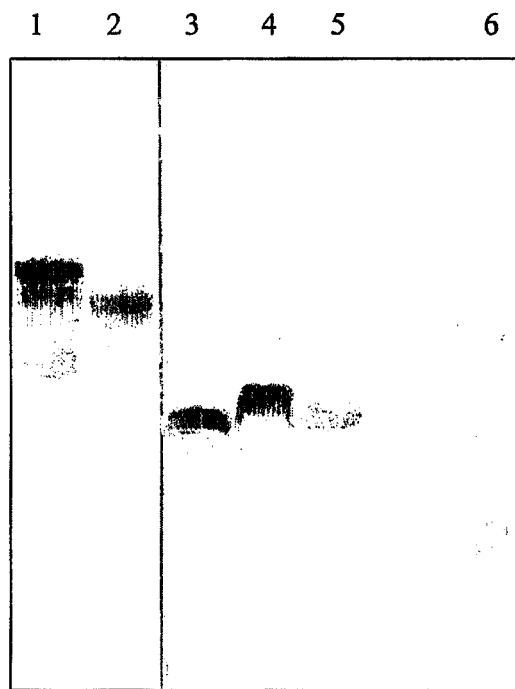


图26.在37℃与N-糖苷酶共孵育22h后，Tc L3抗原和胎球蛋白对照糖蛋白的免疫印迹分析结果。

第1道：未处理的胎球蛋白

第2道：胎球蛋白+N-糖苷酶F

第3和5道：Tc L3抗原

第4道：Tc L3抗原+N-糖苷酶F

通过与地高辛标记的植物凝聚素SNA反应后与抗地高辛-HRP反应，检测印迹上的胎球蛋白。用免疫粘液和RAS/IgG-HRP检测Tc抗原。

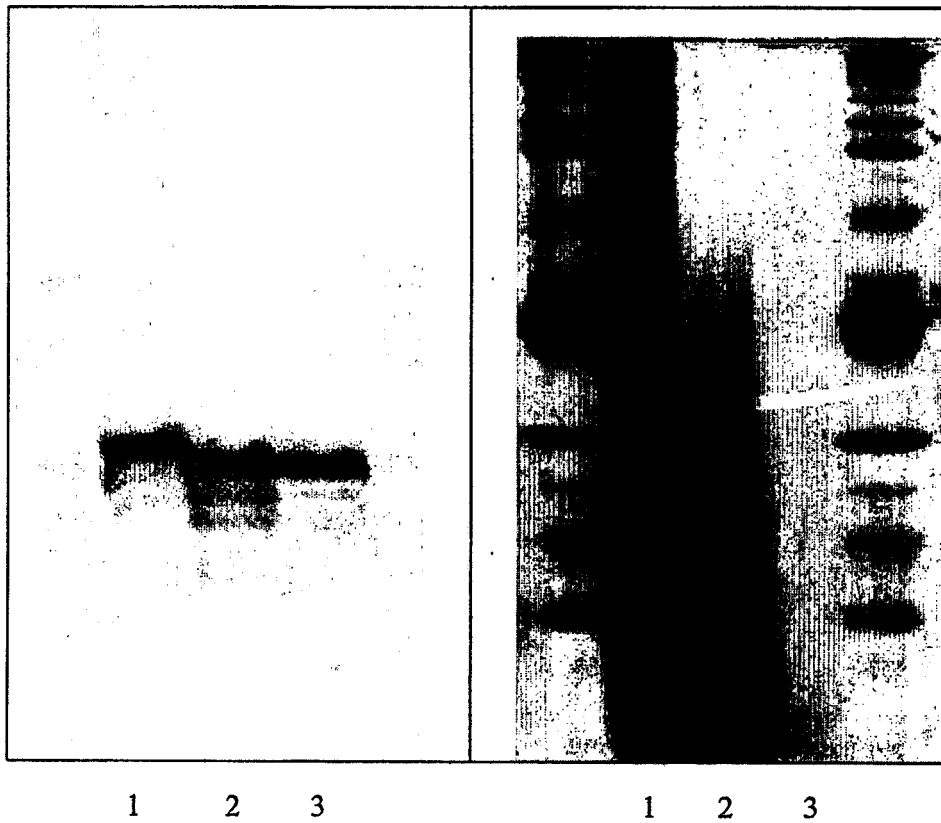


图27. Tc L3抗原在60℃下碱降解18h。
第1道：抗原对照（仅加热）；第2道：抗原+1 M NaOH；
第3道：抗原+1 M NaOH和8 M NaBH₄。
左图：用免疫羊粘液的抗原探查和RAS/IgG-HRP的印迹
右图：银染色

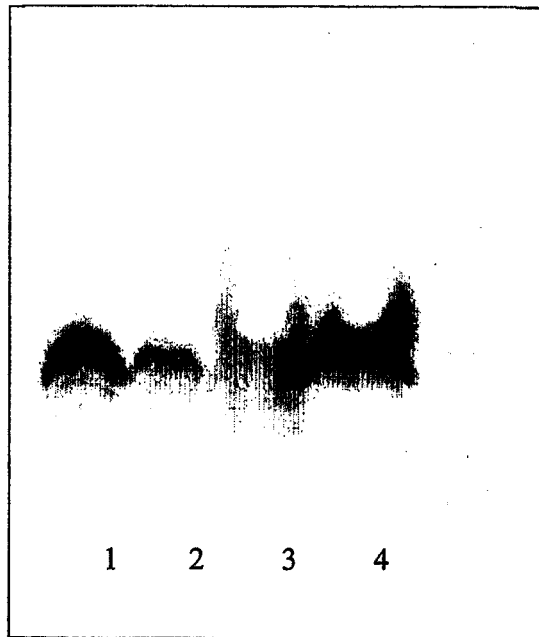


图28. 如下处理后Tc L3抗原的免疫印迹分析结果, 第1道: 仅在缓冲液中100°C处理16h; 第2道: 4°C下氢氟酸处理48h; 第3道: 100°C胍处理16h; 第4道: 20°C胍处理1h。

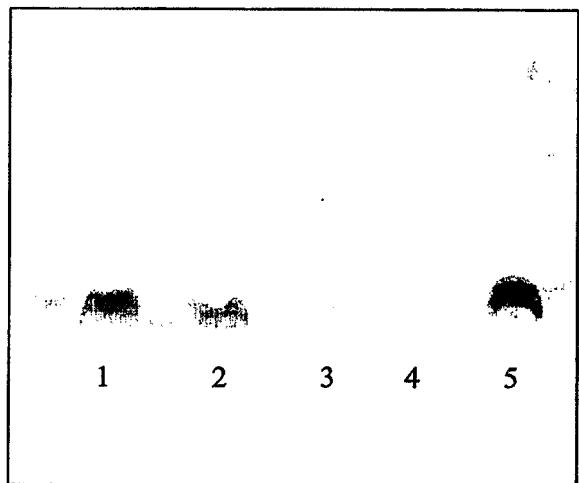


图29. 如下处理后Tc L3抗原的免疫印迹分析结果, 第1道: 100°C下胍处理7天; 第2道: 4°C下胍处理14天; 第3和4道: 三氟乙酸处理4h或16h; 第5道: 未处理对照。

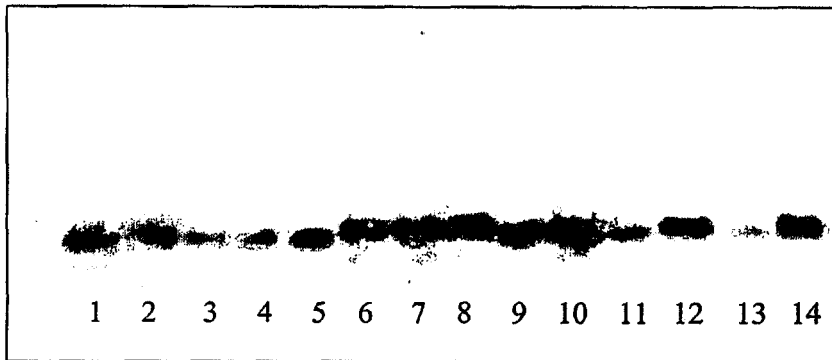


图30. 用下列步骤处理后的 L3抽提物的免疫印迹分析结果：
第1和2道：蛋白酶K+SDS在50°C下处理4小时或20小时；
第3和6道：1.0M NaOH在37°C下处理18小时；
第4道：90°C下加热20min，然后1.0M NaOH在37°C下处理18小时；
第5和9道：对照抗原在37°C下处理18小时；
第7道：0.5M NaOH在37°C下处理18小时；
第8道：0.1M NaOH在37°C下处理18小时；
第10道：37°C下用胰蛋白酶消化22小时；
第11道：对照抗原在50°C下处理22小时；
第12道：蛋白酶K+SDS+DTT在50°C下处理22小时；
第13道：90°C下加热20min，然后37°C下加热18h；
第14道：90°C下加热20min，然后胰蛋白酶消化18小时。
用免疫粘液探测印迹然后经过RAS/IgG-HRP。

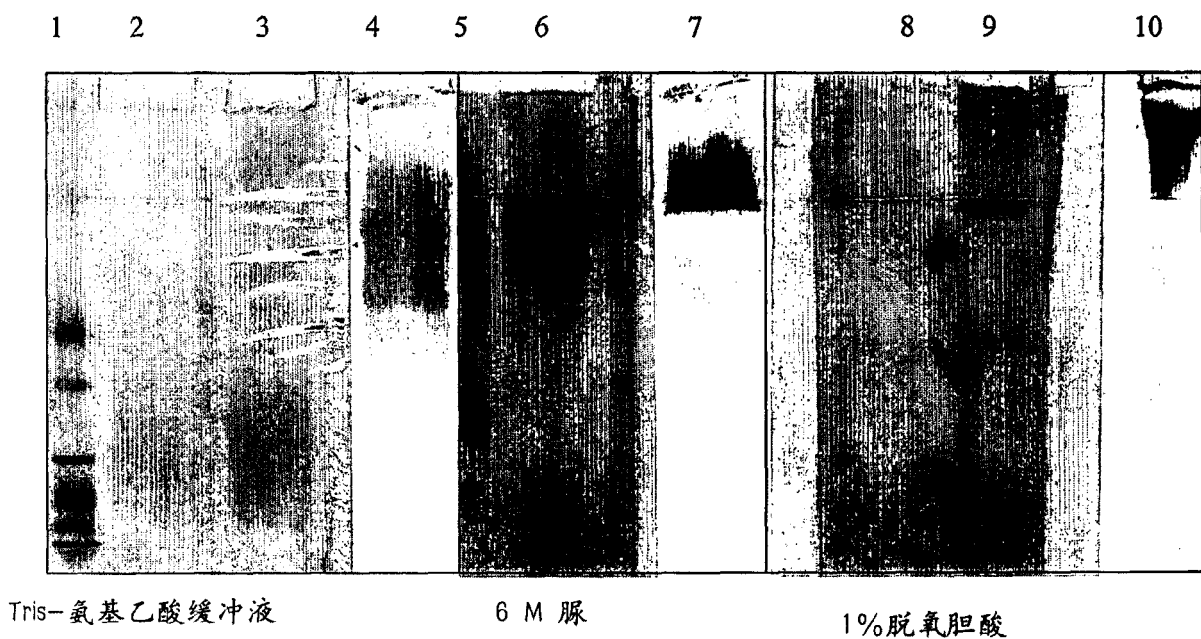


图31. 在仅缓冲液（左图）、6M脲（中间图）或1%脱氧胆酸钠（右图）中溶解并电泳的Tc L3凝胶电泳和免疫印迹分析。胶用Coomassie蓝着色，印迹用免疫粘液探测后经过RAS/IgG-HRP。

第1、5和8道：蛋白标记

其它的道：含有溶于合适样品缓冲液重点Tc L3抽提物。

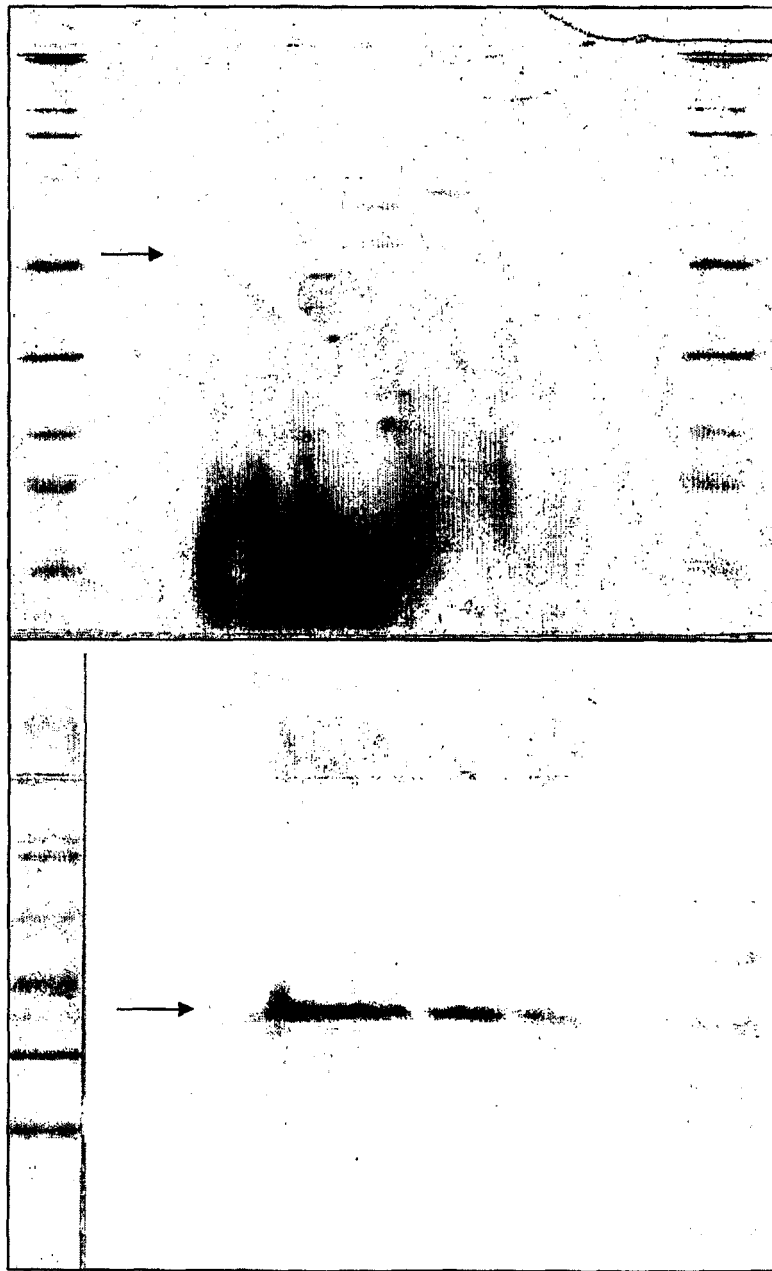


图32. 用Coomassie蓝着色（上图）或用免疫粘液和RAS/IgG-HRP探查的Tc L3豚抽提物的二维电泳。箭头表示35kDa抗原的位置。

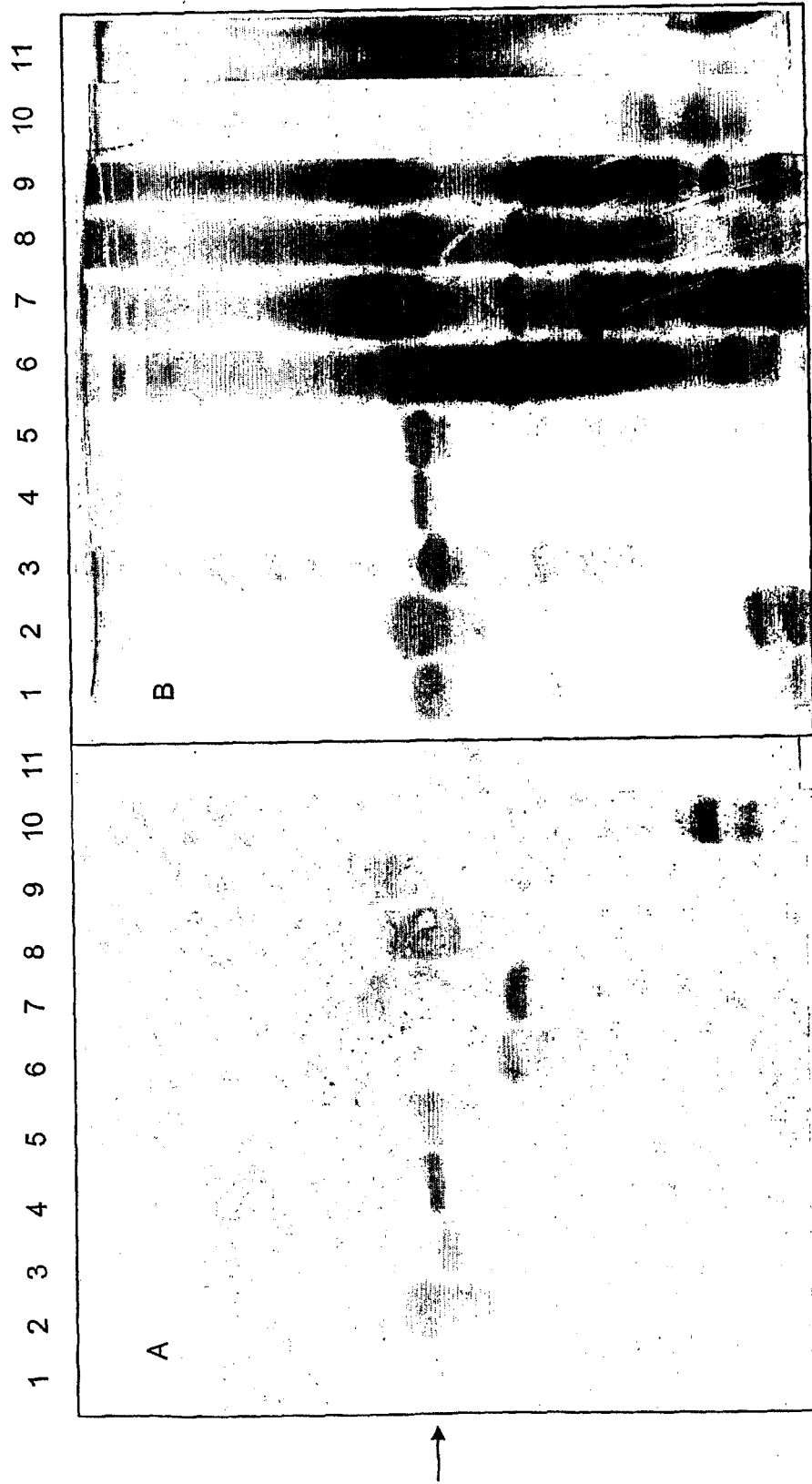


图33. 10个寄生性线虫L3的1M NaOH抽提物的免疫印迹分析和糖染色结果。图A印迹与Tc免疫羊的肠粘液反应后与抗羊IgG-HRP反应；图B胶用糖类染色着色。第1道：Hc，第2道：Oc，第3道：Ta，第4道：Tc第5道：Tv，第6道：Ns，第7道：Cc，第8道：Oo，第9道：Co，第10道：Nb，第11道：De。箭头表示35kDa抗原的位置。

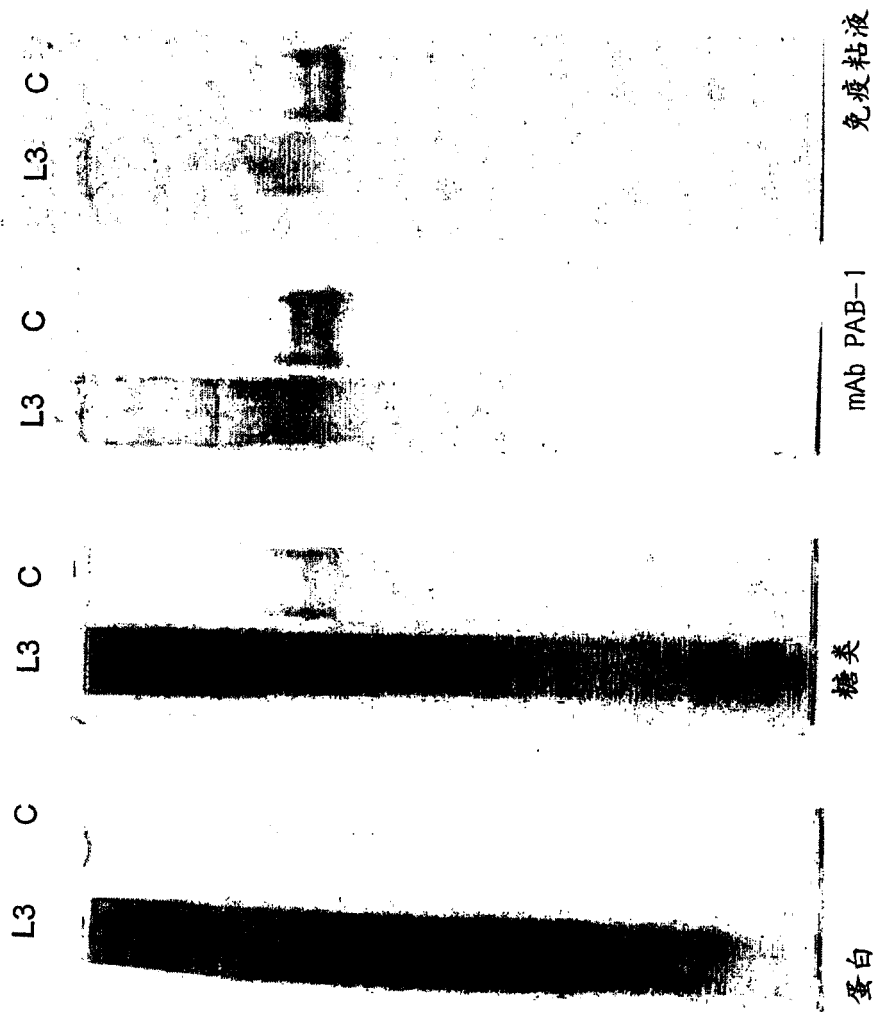


图34. Tc L3抽提物 (L3) 和在非变性条件下 (无去污剂或还原剂) 电泳纯化的糖基幼虫抗原 (C) 的凝胶电泳 (8% PAGE) 和免疫印迹分析结果。针对蛋白或糖对膜进行染色。印迹与mAb PAB-1反应后与兔抗鼠Ig-HRP结合, 或者与羊粘液反应后与兔抗鼠Ig-HRP结合。

专利名称(译)	新的单克隆抗体和线虫幼虫抗原		
公开(公告)号	CN1625567A	公开(公告)日	2005-06-08
申请号	CN03802969.3	申请日	2003-01-30
[标]申请(专利权)人(译)	奥维塔有限公司		
申请(专利权)人(译)	奥维塔有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	奥维塔有限公司		
[标]发明人	加文伯纳德李尔哈里森 韦恩罗伯特海恩 休道格拉斯普尔福德 查理比克斯舒梅克		
发明人	加文·伯纳德·李尔·哈里森 韦恩·罗伯特·海恩 休·道格拉斯·普尔福德 查理·比克斯·舒梅克		
IPC分类号	A61K39/00 A61P33/00 C07K14/435 C07K16/18 G01N33/53		
CPC分类号	A61K39/0003 A61K2039/505 C07K14/4354 C07K16/18		
优先权	2002PS0214 2002-01-30 AU		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及到分离的单克隆抗体mAb PAB - 1, 该抗体于2002年1月24保藏于ATCC, 登记号为PTA - 4005, 其能与线虫L3的表面抗原结合。本发明还涉及到能与该单克隆抗体结合的抗原以及该单克隆抗体和抗原在诊断和治疗或预防线虫感染方面的应用。

