



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102043053 A

(43) 申请公布日 2011. 05. 04

(21) 申请号 200910272522. 6

(22) 申请日 2009. 10. 22

(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 管晓虹 沈继龙 李雍龙  
冯振卿 雷家慧 吴玉龙

(74) 专利代理机构 华中科技大学专利中心  
42201

代理人 夏惠忠

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/543(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

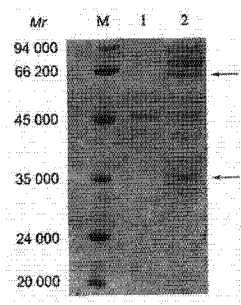
权利要求书 2 页 说明书 9 页 附图 2 页

(54) 发明名称

检测日本血吸虫循环抗原的鸡卵黄抗体-磁珠 ELISA 方法

(57) 摘要

本发明提供了抗日本血吸虫虫卵可溶性抗原的鸡卵黄免疫球蛋白 IgY 标记的纳米磁珠和检测日本血吸虫循环抗原的鸡卵黄抗体-磁珠 ELISA 方法, 本发明将日本血吸虫的特异性抗原用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, 再将多克隆 IgY 耦联在磁珠上, 以磁珠-IgY 多克隆抗体为捕获抗体, 特异性单克隆 IgG 抗体为检测抗体进行血吸虫循环抗原的检测, 既能利用磁珠和 IgY 捕获更多抗原, 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。



1. 抗日本血吸虫虫卵可溶性抗原的鸡卵黄免疫球蛋白 IgY 标记的纳米磁珠,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特异性 IgY,再将该特异性 IgY 标记在纳米磁珠上形成的。

2. 根据权利要求 1 所述的抗日本血吸虫虫卵可溶性抗原的鸡卵黄免疫球蛋白 IgY 标记的纳米磁珠,其特征在于,抗日本血吸虫虫卵可溶性抗原 SEA 的鸡卵黄免疫球蛋白 IgY 的制备方法,包括以下步骤:

步骤一、制备日本血吸虫虫卵可溶性抗原 SEA;

步骤二、用日本血吸虫虫卵可溶性抗原 SEA 免疫母鸡,并收集鸡蛋;

步骤三、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℃,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℃沉淀 48h,10000×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 免疫母鸡并收集鸡蛋的方法是: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 10d,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℃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 6000 (PEG 6000) 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℃透析 2 小时,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℃保存备用。

6. 根据权利要求 1 所述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 IgY 标记的纳米磁珠,其特征在于,将特异性 IgY 标记在纳米磁珠上的方法是:将直径 800nm 的磁珠用蒸馏水洗涤后,0.1M PBS (pH7.4, 含 1% BSA) 重新悬浮并调整磁珠浓度至 10mg/ml;取 5ml 磁珠悬液加 50mg 碳二亚胺 37℃摇 15min, PBS 洗 2 次后,制成 2.5ml 悬液,加入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 IgY 0.5ml,置 37℃摇床振荡孵育 90min;加 0.01M 甘氨酸 (pH8.2, 含 1% BSA) 缓冲液封闭过夜;PBS 溶液 5ml 复悬,4℃储存备用。

7. 一种体外检测血吸虫抗原的方法,包括以下步骤:

(1) IgY 包被磁珠 (磁珠浓度 1mg/ml, 抗体结合浓度为 10 μg IgY/mg 磁珠) 200 μl/管加入减量反应管;

(2) 1 : 2 稀释的待检血清 200  $\mu$  l / 管加入减量反应管中 ; 阴性对照为正常血清 ; 空白对照为 0.1M pH 7.4 的 PBST ( 含 0.05% Tween-20 ), 37 $^{\circ}$ C 振荡孵育 60min ;

(3) 将反应管置磁铁上吸附磁珠至上清变为澄清后, 去除上清, 用含 0.05% Tween-20 的 0.1M pH 7.4 Tris-HCl 洗涤缓冲液洗涤 3 次 ;

(4) 每管加入辣根过氧化物酶标记的 1 : 1000 稀释的单克隆抗体, 37 $^{\circ}$ C 振荡孵育 90min

(5) 按上述步骤 (3) 所述方法洗涤 ;

(6) 按 200  $\mu$  L / 管加入底物溶液 3,3',5,5' - 四甲基联苯胺, 37 $^{\circ}$ C 避光反应 25min ;

(7) 每管加入 30  $\mu$  l 的 2M 浓硫酸终止反应 ;

(8) 反应管置磁铁上至上清变为澄清后, 每管吸取 100  $\mu$  l 反应上清吸至 96 孔酶标板中, 置 ELISA 读数仪读取  $A_{450}$  值 ;

(9) 结果判定 : 测定 A 值 / 阴性 A 值 (S/N)  $\geq$  2.1 即为阳性。

8. 根据权利要求 7 所述的一种体外检测血吸虫抗原的方法, 其特征在于所述的 IgY 包被磁珠是抗日本血吸虫虫卵可溶性抗原的鸡卵黄免疫球蛋白 IgY 标记的纳米磁珠。

9. 一种检测血吸虫抗原的试剂盒, 其特征在于, 它包含有抗日本血吸虫虫卵可溶性抗原的鸡卵黄免疫球蛋白 IgY 标记的纳米磁珠。

## 检测日本血吸虫循环抗原的鸡卵黄抗体—磁珠 ELISA 方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及日本血吸虫循环抗原的检测技术,具体涉及检测日本血吸虫循环抗原的鸡卵黄抗体—磁珠 ELISA 诊断技术。

### 背景技术

[0002] 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<sup>2</sup>,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。

[0003] 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雌雄虫合抱,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脏或结肠肠壁组织内,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。在适宜的条件下,尾蚴自螺体逸出后即可感染新的宿主,开始新一代的繁殖。

[0004] 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。但在血吸虫感染后抗体存在时间长,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和特异性都要求更高。

[0005] 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,但仍存在一些关键的技术问题。

[0006] (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。

[0007] (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,尤其是在对我国大量的轻度流行区的评估上还没有十分行之有效的方法。

[0008] (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,存在人为误差等。

[0009] 目前所用的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,甚至更长时间内仍可在血清中,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,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。

[0010] 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  $\gamma$ , 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。

[0011] IgY 由两条重链 (H) 和轻链 (L) 组成,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( $\Delta$ Fc),其 H 链为  $\nu$  ( $\Delta$ Fc)。7.8S IgY 和 5.7S IgY( $\Delta$ Fc) 可共存于同一种动物或单独存在。

[0012] 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。

[0013] IgY 和 IgY( $\Delta$ 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( $\Delta$ 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, $\Delta$ Fc Igs 的存在是具有一定的选择优势。

[0014] 用母鸡作为免疫动物和把鸡蛋作为抗体的来源有以下优势:

[0015] (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;

[0016] (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;

[0017] (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;

[0018] (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;

[0019] (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;

[0020] (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。

[0021] 20 世纪 80 年代以来 IgY 抗体开始广泛应用,Dr. C. Staak 在 1995 年首先使用 IgY 技术这一术语。1996 年,IgY 抗体的生产和应用被定义为 IgY 技术。如今,它已是一个世界性的标准化技术。不断增长的文献数目显示,IgY 技术正成为医药领域的新热点。近年来,IgY 在疾病的诊断方面得到广泛的应用,如致病性大肠杆菌(EPEC)引起的婴幼儿腹泻,人乳头状瘤 16 型感染,甚至可以特异性地诊断缺氧,但在血吸虫病的免疫诊断中尚未见报道,也未见关于制备抗血吸虫抗原的 IgY 的相关技术和产品。

[0022] 免疫磁珠技术(immunomagnetic bead techniques)是以高均一性的磁性微球为固相支持物,表面包被免疫配基如抗体等,利用特异性的免疫反应从混合液中分离检测靶物质。磁珠酶联免疫分析技术(Immunomagnetic beads Enzyme-linked Immunosorbent Assay, IMB-ELISA)是在 ELISA 原理的基础上建立的一种新型固相免疫检测技术,较常规 ELISA 敏感。IMB-ELISA 与普通 ELISA 相比具有以下主要优势:(1) 普通 ELISA 中,包被的抗体只有少数 Ig 分子的 Fab 段能与液相中的相应抗原特异性结合,多数 Fab 段因朝向固相表面或与抗原平行,难以与抗原结合;而磁珠呈球形,颗粒微小,数量多,总的表面积增多,使其表面包被的抗体分子与抗原结合的机会大大增加。(2) 包被的抗体在捕获抗原时,结合反应也主要发生在固相的界面上。而 IMB-ELISA 中抗原抗体反应可在液相中进行,提高了抗体与抗原表位的可及性,这种反应模式大大提高了反应的效率,因而较传统固相 ELISA 灵敏度高。(3) 免疫磁珠可以进行再生。再生后的免疫磁珠可以实现反复利用。(4) 免疫磁珠技术的整个反应过程 1 小时即可完成,操作简便快速,因而在免疫检测中也有巨大的应用前景。目前尚未见将免疫磁珠技术应用于血吸虫病免疫学诊断的报道及成熟试剂盒。

## 发明内容

[0023] 本发明用日本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,再将多克隆 IgY 耦联在磁珠上,以磁珠-IgY 多克隆抗体为捕获抗体,特异性单克隆 IgG 抗体为检测抗体进行血吸虫循环抗原的检测,既能利用磁珠和 IgY 捕获更多抗原,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。这种新型的血吸虫循环抗原的检测方法——IgY-IMB-ELISA 可为血吸虫病诊断提供一种具有高灵敏度和高特异性的检测试剂盒,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。

[0024] 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 IgY 标记的纳米磁珠。

[0025] 本发明的另一个任务是提供一种体外检测血吸虫抗原的 IgY-磁珠 ELISA 法。

[0026] 本发明的又一个任务是提供一种检测血吸虫抗原的试剂盒。

[0027] 实现本发明的技术方案是:

[0028] 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 IgY 标记的纳米磁珠,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特异性 IgY,再将该特异性 IgY 标记在纳米磁珠上形成的。

[0029] 抗日本血吸虫虫卵可溶性抗原 SEA 的鸡卵黄免疫球蛋白 IgY 的制备方法,包括以下步骤:

[0030] 步骤一、制备日本血吸虫虫卵可溶性抗原 SEA;

[0031] 步骤二、用日本血吸虫虫卵可溶性抗原 SEA 免疫母鸡,并收集鸡蛋;

[0032] 步骤三、从被免疫母鸡的鸡蛋黄中提取、纯化特异性 IgY。

[0033] 上述步骤一所述的日本血吸虫虫卵可溶性抗原 SEA 的具体制备方法是:将感染日本血吸虫的钉螺在 25℃,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℃沉淀 48h,10000×g 离心 1h,吸取上清,收集分装,即为虫卵可溶性抗原 SEA。

[0034] 上述步骤二所述的用日本血吸虫虫卵可溶性抗原 SEA 免疫母鸡并收集鸡蛋的方法是: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 10d,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℃冰箱保存。

[0035] 上述步骤三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 6000 (PEG 6000) 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℃透析 2 小时,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℃保存备用。

[0036] 本发明将特异性 IgY 标记在纳米磁珠上的方法是:将直径 800nm 的磁珠用蒸馏水

洗涤后,0.1M PBS(pH7.4,含1% BSA)重新悬浮并调整磁珠浓度至10mg/ml;取5ml磁珠悬液加50mg 碳二亚胺 37℃摇15min,PBS洗2次后,制成2.5ml悬液,加入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 IgY0.5ml,置37℃摇床振荡孵育90min;加0.01M 甘氨酸(pH8.2,含1% BSA)缓冲液封闭过夜;PBS溶液5ml复悬,4℃储存备用。

[0037] 本发明提供的体外检测血吸虫抗原的 IgY-磁珠 ELISA 法,包括以下步骤:

[0038] (1) IgY 包被磁珠(磁珠浓度1mg/ml,抗体结合浓度为10 $\mu$ g IgY/mg磁珠)200 $\mu$ l/管加入减量反应管;所述的 IgY 包被磁珠可以是抗日本血吸虫虫卵可溶性抗原的鸡卵黄免疫球蛋白 IgY 标记的纳米磁珠;

[0039] (2) 1:2 稀释的待检血清 200 $\mu$ l/管加入减量反应管中;阴性对照为正常血清;空白对照为 0.1M pH 7.4 的 PBST(含 0.05% Tween-20),37℃振荡孵育 60min;

[0040] (3) 将反应管置磁铁上吸附磁珠至上清变为澄清后,去除上清,用含 0.05% Tween-20 的 0.1M pH 7.4 Tris-HCl 洗涤缓冲液洗涤 3 次;

[0041] (4) 每管加入辣根过氧化物酶标记的 1:1000 稀释的单克隆抗体,37℃振荡孵育 90min

[0042] (5) 按上述步骤(3)所述方法洗涤;

[0043] (6) 按 200 $\mu$ l/管加入底物溶液 3,3',5,5'-四甲基联苯胺,37℃避光反应 25min;

[0044] (7) 每管加入 30 $\mu$ l 的 2M 浓硫酸终止反应;

[0045] (8) 反应管置磁铁上至上清变为澄清后,每管吸取 100 $\mu$ l 反应上清吸至 96 孔酶标板中,置 ELISA 读数仪读取 A<sub>450</sub> 值;

[0046] (9) 结果判定:测定 A 值/阴性 A 值(S/N)  $\geq$  2.1 即为阳性。

[0047] 实验资料

[0048] 1. 日本血吸虫 SEA 的制备

[0049] 本实验室传代的感染日本血吸虫的湖北钉螺(大陆株)在 25℃,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,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℃沉淀 48h 后,10000 $\times$ 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)。

[0050] 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 $\mu$ l 分别加到 96 孔酶标板的标准品孔中,再将样品 20 $\mu$ l 加到样品孔中,各孔加入 200 $\mu$ l 的 BCA 工作液,37℃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  $\geq$  5mg/ml。

[0051] 2. 免疫及鸡蛋收集

[0052] 将 60 $\mu$ 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 10d,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 $\mu$ g 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℃冰箱保存。

**[0053] 3. 聚乙二醇法提取和纯化 IgY**

**[0054]** 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 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。至置常规处理过的透析袋中, 蒸馏水中 4℃ 透析 2h, 其间换水 3~4 次。最后置聚乙二醇 6000 (PEG 6000) 中浓缩至原体积的 1/10, 收集分装后置 -20℃ 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。

**[0055] 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 (Westernblotting) 分析**

**[0056]** 非还原型 SDS-PAGE 检测相对分子质量 (Mr) 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 μg。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℃ 封闭过夜。一抗为免疫后的 IgY (工作浓度为 1 : 1000), 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 IgG (工作浓度为 1 : 100000)。4-氯-1-萘酚 + 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 显色。

**[0057]** 纯化后的完整的 IgY 有一条主带, 其相对分子质量 Mr 约为 130000。还原型 SDS-PAGE 的结果显示: 裂解后的 IgY 共七条带, 其中含有 Mr 为 66000 和 35000 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。

**[0058] 5. IgY 敏感性的检测**

**[0059]** ELISA 板每孔包被 50 μg 的 IgY, 5% 牛血清白蛋白 (BSA) 4℃ 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℃ 温育 1h; 同上用 PBST 洗涤 3 次后加入抗 SEA 的 IgG, 37℃ 温育 1h 后, 同法洗涤, 加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔 IgG (工作浓度为 1 : 100000) 37℃ 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 <sup>%</sup>	阴性对照 Negative control	空白对照 Blank control
1: 10	0.6577	3.08	0.2132	0.1117
<b>[0060]</b> 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		

[0061] 6. 抗日本血吸虫 SEA 的单抗 NP28-5B 的制备及标记

[0062] 4 周龄 BALB/C 小鼠, 感染 20 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。

[0063] 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℃ 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。

[0064] 7. 本发明提供的 IgY-IMB-ELISA 检测方法

[0065] 7.1 动物分组、感染及血清采集

[0066] 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。

[0067] 感染 45 天后, 2 组小鼠均采集外周静脉血并分离血清, -20℃ 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。

[0068] 7.2 IgY 结合磁珠: 直径 800nm 的磁珠 (北京博迈公司) 用蒸馏水洗涤后, 0.1M PBS (pH7.4, 含 1% BSA) 重新悬浮并调整磁珠浓度至 10mg/ml; 取 5ml 磁珠悬液加 50mg 碳二亚胺 (EDC, Sigma 公司) 37℃ 摇 15min, PBS 洗 2 次后, 制成 2.5ml 悬液, 加入 0.5ml IgY 抗体, 置 37℃ 摇床振荡孵育 90min; 加 0.01M 甘氨酸 (pH8.2, 含 1% BSA) 缓冲液封闭过夜; PBS 溶液 5ml 复悬, 4℃ 储存。

[0069] 7.3 本发明 IgY-IMB-ELISA 法的建立

[0070] (1) IgY 包被磁珠 (磁珠浓度 1mg/ml, 抗体结合浓度为 10  $\mu$ g IgY/mg 磁珠) 200  $\mu$ l/管加入减量反应管, 所述的 IgY 包被磁珠是抗日本血吸虫虫卵可溶性抗原的鸡卵黄免疫球蛋白 IgY 标记的纳米磁珠;

[0071] (2) 1 : 2 稀释的待检血清 200  $\mu$ l/管加入减量反应管中; 阴性对照为正常血清; 空白对照为 0.1M pH 7.4 的 PBST (含 0.05% Tween-20)。37℃ 振荡孵育 60min。

[0072] (3) 将反应管置磁铁上吸附磁珠至上清变为澄清后, 去除上清。用含 0.05% Tween-20 的 0.1M pH 7.4 Tris-HCl 洗涤缓冲液洗涤 3 次。

[0073] (4) 每管加入 200  $\mu$ l 的 HRP-NP28 (工作浓度 1 : 6000), 37℃ 振荡孵育 90min。

[0074] (5) 洗涤同 3。

[0075] (6) 按 200  $\mu$ l/管加入底物溶液 3,3',5,5' - 四甲基联苯胺 (TMB), 37℃ 避光反应 25min。

[0076] (7) 每管加入 30  $\mu$ l 的 2M 浓硫酸终止反应。

[0077] (8) 反应管置磁铁上至上清变为澄清后, 每管吸取 100  $\mu$ l 反应上清吸至 96 孔酶标板中, 置 ELISA 读数仪 (Multiskan Ascent 354, 芬兰 Labsystems 公司) 读取 A<sub>450</sub> 值。

[0078] (9) 结果判定: 测定 A 值 / 阴性 A 值 (S/N)  $\geq$  2.1 为阳性。

## [0079] 7. 4IgY-IMB-ELISA 临床小样本检测结果

	检测对象	检测例数	检测结果	
			阳性例数	阳性率 (%)
	慢性血吸虫病患者	107	99	92.5
[0080]	急性血吸虫病患者	40	40	100
	肺吸虫病患者	20	0	0
	肝吸虫病患者	30	1	3.3
	正常人	49	0	0

[0081] 注：慢性血吸虫病患者血清来自武汉市 CDC 血吸虫病研究所；急性血吸虫病患者血清来自华中科技大学同济医学院寄生虫病检测中心；均为粪检血吸虫虫卵阳性。肺吸虫患者和肝吸虫患者血清分别来自广西和广州的流行区；正常人血清来自非血吸虫流行区山东的健康者。

[0082] 本发明结果显示：本发明制备了稳定、特异的抗日本血吸虫 SEA 的 IgY 抗体，并用此抗体包被纳米级的磁珠，建立了基于这种 IgY 的免疫磁珠 ELISA 诊断方法。该方法可用于检测血吸虫循环抗原，其临床诊断特异性达 100%，敏感性达 90% 以上。

[0083] 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 的免疫磁珠 ELISA 技术用包被在纳米磁珠上的 IgY 作为捕获抗体，结合了磁珠和 IgY 所共有的检测高敏感性；同时，用单克隆抗体作为检测抗体又保证了检测的特异性。这些都是目前常用的检测手段所没有的优势。

## 附图说明

[0084] 图 1 为 IgY 与 IgG 结构模式图。

[0085] 图 2 为 IgY 的 SDS-PAGE 分析，A 图为 IgY 的非还原型 SDS-PAGE 分析，图中 1 处为免疫后经过提纯的 IgY，图中 2 处为免疫后未提纯的 IgY；B 图为 IgY 的还原型 SDS-PAGE 分析，图中 1 处为未免疫卵黄提纯的 IgY，图中 2 处为免疫后卵黄提纯的 IgY。

[0086] 图 3 为 IgY 的 Western blotting 分析，图中 1 处为与未免疫卵黄提纯的 IgY 反应；图中 2 处为与免疫后卵黄提纯的 IgY 反应。

## 具体实施方式

[0087] 实施例 1 将特异性 IgY 标记在纳米磁珠上的方法

[0088] 本发明将特异性 IgY 标记在纳米磁珠上的方法是：将直径 800nm 的磁珠用蒸馏水洗涤后，0.1M PBS (pH7.4, 含 1% BSA) 重新悬浮并调整磁珠浓度至 10mg/ml；取 5ml 磁珠悬液加 50mg 碳二亚胺 37℃ 摇 15min, PBS 洗 2 次后，制成 2.5ml 悬液，加入抗日本血吸虫虫卵

可溶性抗原 (soluble egg antigens, SEA) 的鸡卵黄免疫球蛋白 IgY 0.5ml, 置 37°C 摇床振荡孵育 90min; 加 0.01M 甘氨酸 (pH8.2, 含 1% BSA) 缓冲液封闭过夜; PBS 溶液 5ml 复悬, 4°C 储存备用。

[0089] 实施例 2

[0090] 本发明 IgY-IMB-ELISA 法的临床小样本检测应用及结果

[0091]	检测对象	检测例数	检测结果	
			阳性例数	阳性率 (%)
	慢性血吸虫病患者	107	99	92.5
	急性血吸虫病患者	40	40	100
[0092]	肺吸虫病患者	20	0	0
	肝吸虫病患者	30	1	3.3
	正常人	49	0	0

[0093] 注:慢性血吸虫病患者血清来自武汉市 CDC 血吸虫病研究所;急性血吸虫病患者血清来自华中科技大学同济医学院寄生虫病检测中心;均为粪检血吸虫虫卵阳性。肺吸虫患者和肝吸虫患者血清分别来自广西和广州的流行区;正常人血清来自非血吸虫流行区山东的健康者。

[0094] 实施例 3

[0095] 本发明提供的检测血吸虫抗原的试剂盒,包括:

[0096] (1) 抗日本血吸虫虫卵可溶性抗原的鸡卵黄免疫球蛋白 IgY 标记的纳米磁珠 25ml;

[0097] (2) 标准品(冻干品)1瓶;临用前以双蒸水稀释至 1ml,临用前 15 分钟内配制;

[0098] (3) 样品稀释液 1 瓶:25ml;

[0099] (4) 检测用抗体 1 瓶:50ml;

[0100] (5) 洗涤液 1 瓶:500ml;

[0101] (6) 底物溶液 1 瓶:20ml;

[0102] (7) 终止液 1 瓶:20ml;

[0103] (8) 使用说明书一份。

[0104] 本发明提供的检测血吸虫抗原的试剂盒的使用说明:各试剂在使用前平衡至室温。每次反应均应设标准管 2 管和待测样品管。IgY 包被磁珠 200  $\mu$  l/管加入减量反应管,再分别加稀释的标准品或待测样品 200  $\mu$  l,轻轻混匀,37°C 振荡孵育 60 分钟。将反应管置磁铁上吸附磁珠至上清变为澄清后,弃去液体,洗涤液洗 3 次。每孔加检测用抗体 200  $\mu$  l,37°C 振荡孵育 90min。同上法洗涤 3 次。每管加底物溶液 200  $\mu$  l,37°C 避光显色 25min。每管加终止溶液 30  $\mu$  l,终止反应。反应管置磁铁上至上清变为澄清后,每管吸取 100  $\mu$  l 反应上清吸至 96 孔酶标板中,置 ELISA 读数仪读取 A450 值。

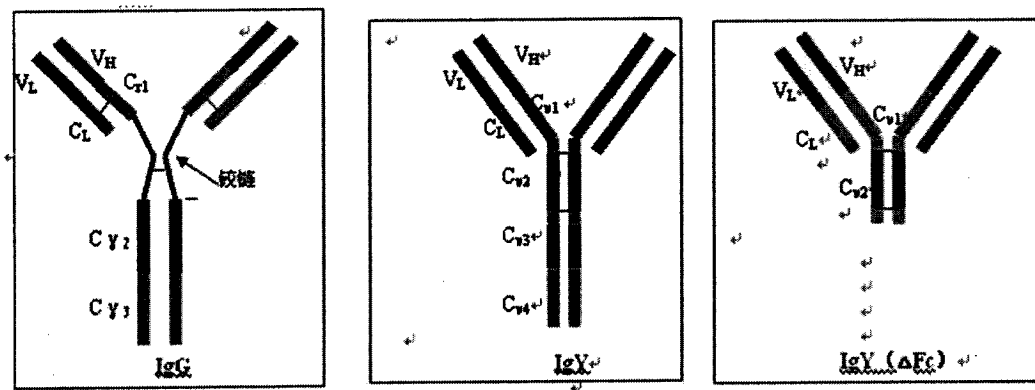


图 1

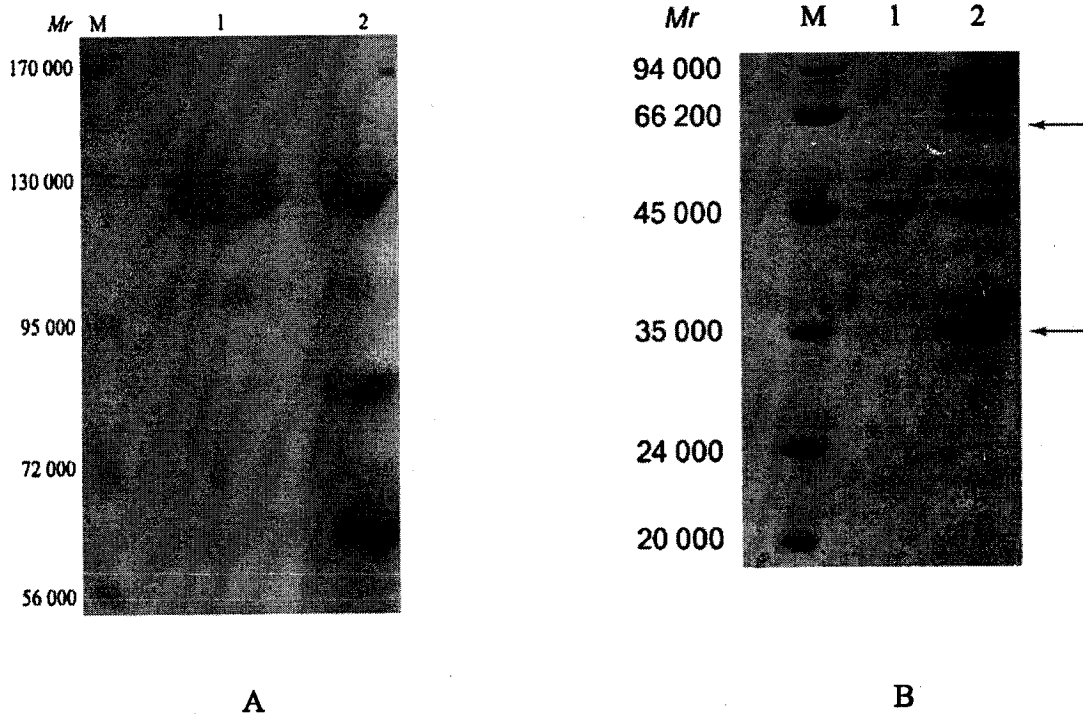


图 2

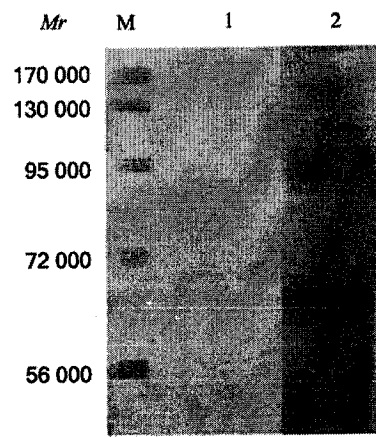


图 3

专利名称(译)	检测日本血吸虫循环抗原的鸡卵黄抗体-磁珠ELISA方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN102043053A</a>	公开(公告)日	2011-05-04
申请号	CN200910272522.6	申请日	2009-10-22
[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)	作者：华中科技大学		
[标]发明人	刘文琪 管晓虹 沈继龙 李雍龙 冯振卿 雷家慧 吴玉龙		
发明人	刘文琪 管晓虹 沈继龙 李雍龙 冯振卿 雷家慧 吴玉龙		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/543 G01N33/531		
代理人(译)	夏惠忠		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供了抗日本血吸虫卵可溶性抗原的鸡卵黄免疫球蛋白IgY标记的纳米磁珠和检测日本血吸虫循环抗原的鸡卵黄抗体-磁珠ELISA方法，本发明将日本血吸虫的特异性抗原用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，再将多克隆IgY耦联在磁珠上，以磁珠-IgY多克隆抗体为捕获抗体，特异性单克隆IgG抗体为检测抗体进行血吸虫循环抗原的检测，既能利用磁珠和IgY捕获更多抗原，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。

