

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510033801.9

[51] Int. Cl.

C07K 14/435 (2006.01)

C07K 1/26 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2006年10月4日

[11] 公开号 CN 1840543A

[22] 申请日 2005.3.31

[21] 申请号 200510033801.9

[71] 申请人 陈晓光

地址 510515 广东省广州市南方医科大学寄
生虫学教研室

共同申请人 李 华

[72] 发明人 陈晓光 李 华

[74] 专利代理机构 广州知友专利商标代理有限公司

代理人 宣国华

权利要求书 2 页 说明书 8 页 附图 2 页

[54] 发明名称

一种广州管园线虫病的诊断抗原分子

[57] 摘要

本发明是运用广州管园线虫早期感染动物血清筛选不同发育阶段所获得的具有早期诊断潜能的优势抗原分子 32kDa(AC32)，经免疫印迹和 ELISA 证实，该抗原分子在诊断广州管园线虫病的早期诊断和流行病学调查中具有良好的效果，它不仅有高度的敏感性，也因该抗原与其他寄生虫很少有交叉抗原反应性而表现出高度的特异性。无论是从天然抗原中纯化的 AC32 还是以基因工程技术获得的重组 AC32 必将成为广州管园线虫病诊断的良好抗原分子。

1. 一种蛋白质，该蛋白是一种广州管园线虫 (*Angiostrongylus cantonensis*) 抗原，这种抗原在变性或还原条件下测定时，其具有 26—35kDa 范围的分子量。
2. 如权利 1 所要求的蛋白质，该蛋白质在其氨基末端上具有以下序列：
Leu-Phe-Ile-Gln-Ile-Lys-Leu-Leu-Thr-Ala-Gln-Ser-Leu-Thr-Lys；
或者与该序列实质上同源的序列。
3. 一种分离如权利要求 1 或 2 所限定之蛋白质或其抗原片段的方法，该方法包括：
 - (a) 从广州管园线虫所有的中间宿主和/或终末宿主，(其主要包括软体动物和鼠类) 分离获得广州管园线虫幼虫和/或成虫 (包括鼠类的脑获得广州管园线虫幼虫和肺部获得广州管园线虫成虫)；
 - (b) 在清水、生理盐水或适合的缓冲液中洗涤过的广州管园线虫幼虫或成虫，其后匀浆或超声粉碎虫体；
 - (c) 离心除去虫体细胞碎片，并获得含有可溶性细胞质蛋白的上清液；
 - (d) 对获得的液体进行分子筛分离洗脱，或对其进行聚丙烯酰胺凝胶电泳后切胶、电渗；
 - (e) 对上述 (d) 所获得的组分进行聚丙烯酰胺凝胶电泳，确认具有 26—35kDa 范围内分子量的特定蛋白质的存在；
 - (f) 对上述 (e) 所获得的蛋白质进行聚丙烯酰胺凝胶电泳后，电转移至 NC 膜或 PVDF 膜上，进行 western blotting, 鉴定所获得蛋白的免疫活性。
4. 一种检测和/或诊断广州管园线虫的方法，该方法包括：
 - (a) 使如权利要求 1 或 2 所限定的蛋白质或其抗原片段与待测样本接触。
 - (b) 检测针对广州管园线虫的抗体。

5. 如权利要求 4 所要求的方法,其中所说的样本包括血清、脑脊液、尿液、唾液等所有体液样本。
6. 用于广州管圆线虫检测和/或诊断的如权利要求 1 或 2 所限定的蛋白质或其抗原片段的用途,其检测是在体外进行的。
7. 一种用于检测和/或诊断广州管圆线虫的试剂盒,该试剂盒包含如权利要求 1 或 2 所限定的蛋白质或其抗原片段,其试剂盒可以是 ELISA 试剂盒和/或胶体金试剂盒或其他任何品种的试剂盒。
8. 一种能够在患者体内存在并引起免疫反应的组合物,该组合物包含如权利要求 1 或 2 所限定的蛋白质或抗原片段。
9. 如权利要求 8 所限定的抗原组合物,用于免疫动物获得针对如权利要求 1 或 2 所限定的蛋白质或抗原片段中的任何表位的单克隆抗体或多克隆抗体。
10. 如权利要求 9 所限定的针对如权利要求 1 或 2 所限定的蛋白质或抗原片段中的任何表位的单克隆抗体或多克隆抗体,用于构建检测和/或诊断试剂盒,用于检测广州管圆线虫病患者体内的如权利要求 1 或 2 所限定的蛋白质或抗原片段中的循环抗原。

一种广州管圆线虫病的诊断抗原分子

技术领域

本发明涉及一种广州管圆线虫 (*Angiostrongylus cantonensis*) 新诊断抗原或其抗原片段, 这种抗原或其抗原片段在检测广州管圆线虫中的用途、包含它们的试剂盒、包含这种抗原或其抗原片段的疫苗以及这种抗原的分离方法。

背景技术

广州管圆线虫 1935 年由我国陈心陶教授首先发现, 1945 年在台湾发现首例人体广州管圆线虫病, 我国大陆 1984 年才发现首例广州管圆线虫病, 1997 年浙江温州发生了首次广州管圆线虫病爆发流行, 发病人数达 60 多例。根据 1980-2000 年的流行病学调查, 我国广东、广西、海南、云南、浙江、福建和辽宁等省均发现有本虫分布。广州管圆线虫的终宿主为啮齿类动物, 主要为鼠类; 中间宿主主要为软体动物, 约有 56 种, 自然感染率各地从 17.2% 到 88.5% 不等。随着市场经济的发展, 南货北运普遍, 从而造成广州管圆线虫感染源的扩散。此外, 近年来人们的膳食结构发生了很大改变, 一些螺、蜗牛等也成了食物来源, 如褐云玛瑙螺已被大量养殖, 畅销全国各地供人们食用, 与之相伴随的是广州管圆线虫病的流行呈上升的趋势。在世界上, 广州管圆线虫病也呈不断扩散的趋势, 已从东南亚传播到南太平洋、非洲、印度、菲律宾。近来还有报道通过货船仓里的老鼠等将本病传播到了澳大利亚、北美洲等地。广州管圆线虫病作为一种新发的传染病已越来越引起人们的关注。

广州管圆线虫对人体的损害主要是由于虫体侵犯中枢神经系统而引起嗜酸性粒细胞增多性脑膜炎、脑膜脑炎或脊神经根炎, 部分病例还可侵犯肺脏和眼睛。儿童感染该虫, 如不及时治疗, 常可致死。在临床上, 本病需与其他原因所致的脑炎或神经系统疾病, 如化脓性脑膜炎、结核性脑膜炎、流行性脑膜炎相鉴别。传统的病原诊断主要靠从患者脑脊液或受累组织和器官中查找到虫体而确诊, 其敏感性很低, 容易漏诊和误诊。绝大多数病例需根据临床症状、实验室检查和病

史而作出临床诊断，其中免疫学检查对诊断具有重要的参考价值。目前国内外虽已有一些学者对广州管圆线虫病的免疫学检查进行了研究探讨，但尚缺乏敏感特异、快捷使用的标准化诊断试剂盒。

广州管圆线虫抗原与其他寄生虫抗原存在交叉反应性，单一组分抗原可以提高检测的特异性。国外学者纯化的雌童虫 29kDa、幼虫 204kDa、成虫 31kDa 和 31.5kDa 等抗原均提高了对广州管圆线虫检测的敏感性和特异性。

发明内容

本发明是从不同发育阶段的广州管圆线虫抗原中，经一系列的免疫筛选后所获得的一个在广州管圆线虫病诊断中具有高度敏感性和特异性的抗原分子（AC32）。该抗原分子将在广州管圆线虫病的诊断和流行病学调查中发挥重要作用。

这样，在第一个方面，本发明提供了为广州管圆线虫抗原的蛋白质，在变性和还原条件下测定时，其分子量范围在 26—35kDa 范围内。

适合地，所述抗原蛋白质在其氨基端末端上具有以下序列：

Leu-Phe-Ile-Gln-Ile-Lys-Leu-Leu-Thr-Ala-Gln-Ser-Leu-Thr-Lys；

或者与该序列实质上同源的序列。在氨基酸水平上，如果大量重要的氨基酸序列显示同源性，可以看作蛋白质序列和另一个蛋白质序列实质上同源。随着优先等级的增加，至少 40%，50%，60%，70%，80%90%，95%，甚至 99% 的氨基酸可以是同源的。

在第二个方面，一种分离如权利要求 1 或 2 所限定之蛋白质的方法，该方法包括：

- (a) 从广州管圆线虫所有的中间宿主和/或终末宿主，（其主要包括软体动物和鼠类）分离获得广州管圆线虫幼虫和/或成虫（包括鼠类的脑获得广州管圆线虫幼虫和肺部获得广州管圆线虫成虫）；
- (b) 在清水、生理盐水或适合的缓冲液中洗涤过的广州管圆线虫幼虫

或成虫，其后匀浆或超声粉碎虫体；

- (c) 离心除去虫体细胞碎片，并获得含有可溶性细胞质蛋白的上清液；
- (d) 对获得的液体进行分子筛分离洗脱，或对其进行聚丙烯酰胺凝胶电泳后切胶、电渗；
- (e) 对上述(d)所获得的组分进行聚丙烯酰胺凝胶电泳，确认具有26-35kDa范围内分子量的特定蛋白质的存在；

对上述(e)所获得的蛋白质进行聚丙烯酰胺凝胶电泳后，电转移至NC膜或PVDF膜上，进行western blotting,鉴定所获得蛋白的免疫活性。

在第三个方面，本发明提供了一种能用于广州管园线虫(病)的检测和/或诊断方法。该方法包括：

- (a) 使如权利要求1或2所限定的蛋白质或抗原片段与待测样本接触。
- (b) 检测针对广州管园线虫的抗体。

特别是，可以利用本发明的蛋白质或其抗原片段、或其抗原片段组合物检测IgG抗体和/或IgM抗体。适合地，待测样本是生物样品，例如人和动物的血清、脑脊液、尿液、唾液等所有体液样本。

在第四个方面，本发明提供了用于广州管园线虫检测和/或诊断的如权利要求1或2所限定的蛋白质或其抗原片段的用途。此种检测是在体外进行的。

本发明的蛋白抗原或抗原组分可作为广州管园线虫病检测和/或诊断试剂盒的一部分，这样，在第五个方面，一种用于检测和/或诊断广州管园线虫的试剂盒，该试剂盒包含如权利要求1或2所限定的蛋白质或其抗原片段，其试剂盒可以是ELISA试剂盒和/或胶体金试剂盒或其他任何品种的试剂盒。

此外，还可以用本发明的蛋白抗原或其抗原片段诱导广州管园线虫的免疫反应。这样在另一方面，本发明提供了一种能够利用如权利要求1或2所限定的蛋白质或其抗原片段免疫动物制备单克隆抗体或多克隆抗体，用此单克隆抗体或多克隆抗体组建检测广州管园线虫病患者体内的针对如权利要求1或2所限定的蛋白质或其抗原片段的抗原表位(循环抗原)。

与已有技术相比有如下优点:

(1) 广州管圆线虫病的研究是目前寄生虫病研究的一个全新的领域, 迄今没有成型的诊断试剂盒及诊断体系。以往的研究仅仅以该虫的成虫粗抗原来检测感染动物的或人血清抗体。但人作为该虫的非正常宿主, 感染后主要以幼虫阶段寄生于脑部, 引起脑和神经系统的一系列症状, 因此, 从幼虫阶段获得抗原诊断该病更有实际应用价值。本发明选取了成虫和幼虫均高峰度表达的 AC32, 既能用于该病的早期诊断, 有可用于其流行病学调查。

(2) 成虫粗抗原成分复杂, 与其他寄生虫抗体阳性血清具有广泛的交叉阳性反应, 特别是与旋毛虫抗原交叉反应明显。而 Western blotting 结果显示这些反应带均在 30kDa 以下和 35kDa 以上的区域, AC32 恰好避开了这些非特异性反应带, 因而用 AC32 诊断广州管圆线虫病大大提高了特异性。

附图说明

图 1. 不同发育阶段广州管圆线虫蛋白的 SDS-PAGE 分析;

图中 1 感染前幼虫, 即 3 期幼虫; 2 感染后 1 周大鼠脑部雌雄虫; 3 感染后 2 周大鼠脑部雌雄虫; 4 感染后 3 周大鼠脑部雌雄虫; 5 感染后 4 周大鼠肺部雄虫; 6 感染后 4 周大鼠肺部雌虫; 7 感染后 5 周大鼠肺部雄虫; 8 感染后 5 周大鼠肺部雌虫; 9 感染后 6 周大鼠肺部雄虫; 10 感染后 6 周大鼠肺部雌虫; 11 感染后 2 个月大鼠肺部雌雄虫; 12 感染后 5 个月大鼠肺部雄虫; 13 感染后 5 个月大鼠肺部雌虫; 14 感染后 4 周大鼠脑部雌雄虫; 15 感染后 4 周大鼠肺部雌虫; M 标准分子量蛋白。

图 2 不同发育阶段虫体抗原与广州管圆线虫感染大鼠血清的免疫印迹分析;

A 感染 2w 大鼠血清; B 感染 3w 大鼠血清; C 感染 5w 大鼠血清;

1 感染后 2 周雌雄虫; 2 感染后 3 周雌雄虫; 3 感染后 4 雄虫; 4 (感染后 4 周雌虫; 5 感染后 5 周雄虫; 6 感染后 5 周雌虫

图 3. 纯化 AC32 与广州管圆线虫粗抗原的凝胶电泳;

1 切胶纯化的 AC32 抗原；2 广州管园线虫粗抗原；3 标准分子量蛋白

图 4 纯化 AC32 和广州管园线虫粗抗原与感染大鼠血清的免疫印迹；

1 切胶纯化的 AC32 抗原；2 广州管园线虫粗抗原；3 标准分子量蛋白

图 5 AC32 与不同血清的免疫印迹结果；

1 健康人；2 正常大鼠；3.4 广州管园线虫感染大鼠；5 广州管园线虫病人；
6 旋毛虫免疫兔；7 血吸虫感染兔；8 弓形虫免疫兔；9 囊虫病人；10 裂头蚴病人。

图 6 广州管园线虫虫体粗抗原与不同血清的免疫印迹结果；

1 广州管园线虫感染大鼠；2. 正常大鼠；3. 健康人；4. 弓形虫免疫兔；5. 旋毛虫免疫兔；6. 血吸虫感染兔；7. 广州管园线虫病人；8. 囊虫病人；9. 裂头蚴病人。

图 7 胶体金方法检测广州管园线虫 IgG 抗体结果图。

C 质控区； T 检测区

具体实施方式

实施例一. 不同发育阶段广州管圆线虫的获得

1. 从广州管圆线虫病流行区采集褐云玛瑙螺，去壳、剁碎后，用人工消化液（HCl 7ml，胃蛋白酶 1.5g，加水至 1000ml）室温消化 4~6h，40 目筛网过滤，滤液自然沉淀 2~3 次后，取沉渣在解剖镜下分离 3 期幼虫，并用无菌生理盐水洗涤 3 次。
2. 取活的 3 期幼虫，显微镜下计数，用注射器从腹腔接种 SD 大鼠（每只 50 条），分别在接种后第 1、2、3、4、5、6 周、2 月和 5 月处死大鼠，收集血清并解剖大鼠的脑和肺，在解剖镜下分离并计数虫体，所获虫体用生理盐水洗涤 3 次。

实施例二. 不同发育阶段广州管圆线虫蛋白谱分析

聚丙烯酰胺凝胶电泳：取上述虫体，加入虫体 2 倍体积的 10 mmol/L pH 7.2

的磷酸盐缓冲液(PBS),冰浴下匀浆 5 min 后,等量加入 2 倍浓度的电泳缓冲液,进行电泳。

结果广州管圆线虫 3 期幼虫、感染后 1~6 周、2 月和 5 月的虫体蛋白经 10% 的 SDS-PAGE 后,进行银染。结果:不同虫龄期的蛋白质谱大致相同;3 期幼虫及感染后 1 周幼虫在大分子区段除 Mr249 000 外,其它条带不明显。Mr33 000 蛋白条带在 3 期幼虫中缺失,在感染 1 周的幼虫蛋白中开始出现,在感染 2 周后的虫体蛋白中成为主带。雌虫的蛋白条带较雄虫多,并在 169 000 处出现雄虫所没有的主带(见图 1)。

实施例三. 不同发育阶段广州管圆线虫抗原谱分析

按实施二方法将上述抗原进行电泳后,电转移至 PVDF 膜上,进行免疫印迹(Western blotting)分析。即用感染后不同时期的大鼠和正常大鼠血清与之结合,经洗涤后用 HRP 标记的羊抗大鼠 IgG 与之结合,经洗涤后用 DAB 显色,不同发育阶段的虫体蛋白经 12% 的 SDS-PAGE 后,电转移至 PVDF 膜上,分别与感染后 1~6 周、2 月和 5 月的大鼠血清及正常大鼠血清进行 Western blotting。

结果:各阶段虫体蛋白与感染大鼠血清在 Mr32 000、40 000、50 000、66 000 和 80 000 处出现反应带,且大多数反应带随着感染时间的延长而增强,但这些区带与感染 1 周大鼠和健康大鼠血清也出现反应带。感染 2 周的大鼠血清与 2~3 周幼虫的 Mr104 000 出现强反应,但与 4 周~5 月虫体蛋白中的 Mr104 000 反应较弱;所有虫体蛋白的 Mr104 000 与感染 5 周大鼠血清及健康大鼠血清均未出现明显反应带。雌虫 Mr32 000 和 33 000 抗原与感染后 2 周血清开始出现反应带,所有虫体的 Mr32 000 与感染 3 周以上的大鼠血清均出现强反应带,与正常大鼠血清均未见明显的反应条带(见图 2)。

实施例四. 广州管圆线虫 32 kDa 抗原的分离纯化

将上述粗抗原进行 12% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳后,浸入预冷的 10 mMol/L 的 KCl 溶液,4℃放置 10min 后,根据标准分子量蛋白准确切取 Mr32 000 蛋白带,

将含目的蛋白的胶块装入孔径 M_r 14 000 的透析袋，加 0.5 倍 Tris-甘氨酸电泳缓冲液（不含 SDS），于水平电泳槽 200v 电渗 1h，反转电极电渗 1min，袋内渗液经 $12\ 000 \times g$ 4°C 离心 15 min，取上清对 pH 7.2 10mMol/L PBS 透析，袋内液体即为纯化的 AC32。

实施例五. 广州管圆线虫 32 kDa 抗原（AC32）的纯度及免疫活性鉴定

纯化的 AC32 按上述条件进行 SDS-PAGE，并电转印到 PVDF 膜上，进行免疫印迹。其中，感染后不同时期的大鼠和正常大鼠血清的最终稀释度为 1: 200，HRP 标记的羊抗大鼠 IgG 最终稀释度为 1: 10 000。

结果切胶纯化的 AC32 经 SDS-PAGE，银染后在 M_r 32 000 处可见单一条带，而成虫抗原出现多条蛋白条带（图 3）。

AC32 和成虫抗原经 SDS-PAGE 后转印至 PVDF 膜，与广州管圆线虫感染大鼠血清进行 western blotting，结果 AC32 仅在 M_r 32 000 处出现单一反应带，而成虫抗原与感染大鼠血清出现多条反应条带（图 4）

实施例六. 广州管圆线虫 32 kDa 抗原（AC32）的交叉反应性测定

AC32 和成虫抗原经 SDS-PAGE 后转印至 PVDF 膜，与广州管圆线虫感染大鼠血清进行 western blotting，结果 AC32 仅在 M_r 32 000 处出现单一反应带，而成虫抗原与感染大鼠血清出现多条反应条带（图 4）。AC32 与广州管圆线虫感染 3w 和 6w 大鼠血清均在 M_r 32 000 处出现单一反应带，与健康人血清、正常大鼠血清、旋毛虫免疫兔血清、血吸虫感染兔血清、弓形虫免疫兔血清、囊虫病人血清和裂头蚴病人血清均未见明显的反应带（图 5）。成虫抗原与感染大鼠血清和广州管圆线虫病人血清除在 M_r 32 000 处出现反应带外，在 M_r 30 000 以下和 M_r 35 000 以上都出现了一些反应带；除正常大鼠外，成虫抗原与健康人血清、旋毛虫免疫兔血清、血吸虫感染兔血清、弓形虫免疫兔血清、囊虫病人血清和裂头蚴病人血清在 M_r 30 000 以下和 M_r 35 000 以上的分子质量范围内也出现了一定的反应带（图 6）。

实施例七. 广州管圆线虫 32 kDa 抗原（AC32）的临床检测效果评价

用 pH9.6 0.1Mol/L 碳酸盐缓冲液稀释广州管圆线虫成虫抗原和 AC32，按预

试验的最佳包被浓度(分别为 15 μ g/ml 和 5 μ g/ml)每孔加 100 μ l 包被 ELISA 反应板, 用常规 ELISA 方法进行血清检测。其中大鼠血清的最终稀释度为 1: 200, 人血清的最终稀释度为 1: 100, HRP 标记的羊抗大鼠 IgG、羊抗人 IgG 和羊抗兔 IgG 的最终稀释度均为 1: 10 000。

结果:AC32 和广州管圆线虫成虫抗原均以各自的最佳浓度包被, 以常规 ELISA 检测血清中的 IgG 抗体, 结果: AC32 和成虫抗原与 40 份广州管圆线虫感染 3w 大鼠血清和 21 份感染 4-6w 大鼠血清全部阳性, 一例临床确诊的广州管圆线虫病人血清呈强阳性反应。AC32 与 5 例正常大鼠血清和 50 例献血员血清未出现假阴性反应, 与 20 例急性血吸虫病人血清、1 例旋毛虫免疫兔血清、5 例华支睾吸虫病人血清、11 例弓形虫病人血清、6 例裂头蚴病患者血清和 3 例囊虫病人血清均未出现交叉阳性反应; 而成虫抗原除华支睾吸虫病人血清外, 与健康人血清和其他寄生虫抗体阳性患者血清均出现了一定的假阳性或交叉阳性反应。另外, 用 AC32 和成虫抗原检测 40 例嗜酸粒细胞增多患者血清, 分别有 4 例 (10%) 和 7 例 (17.5%) 出现阳性 (表 1)。

血清来源	例数	AC32		成虫抗原	
		阳性数	阳性 (%)	阳性数	阳性率 (%)
广州管圆线虫病	1	1	100	1	100
嗜酸粒细胞增多	40	4	10	7	17.5
献血员	50	0	0	2	4
华支睾吸虫病	5	0	0	0	0
肺吸虫病	5	0	0	1	20
急性血吸虫病	20	0	0	2	10
裂头蚴病	6	0	0	1	16.7
弓形虫病	11	0	0	1	9
囊虫病	3	0	0	1	33.3
广州管圆线虫感染 3 周大鼠	40	40	100	40	100
广州管圆线虫感染 4-6 周大鼠	21	21	100	21	100
正常大鼠	5	0	0	1	20
旋毛虫免疫兔血清	1	0	0	1	100

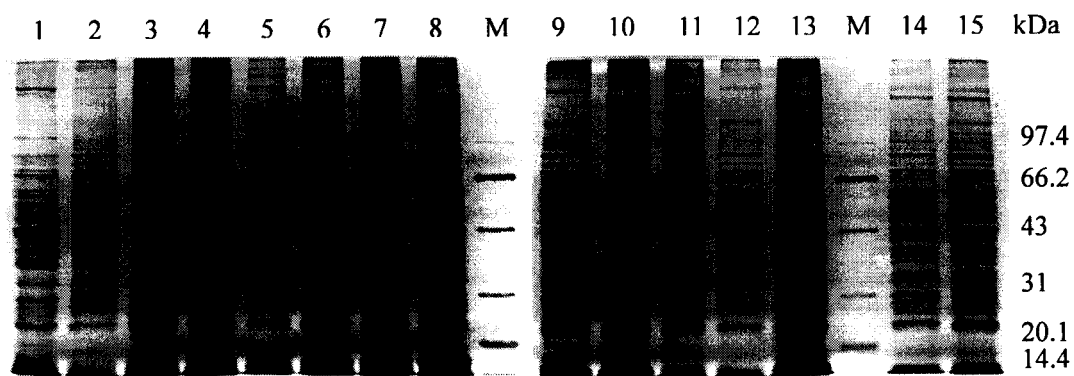


图 1

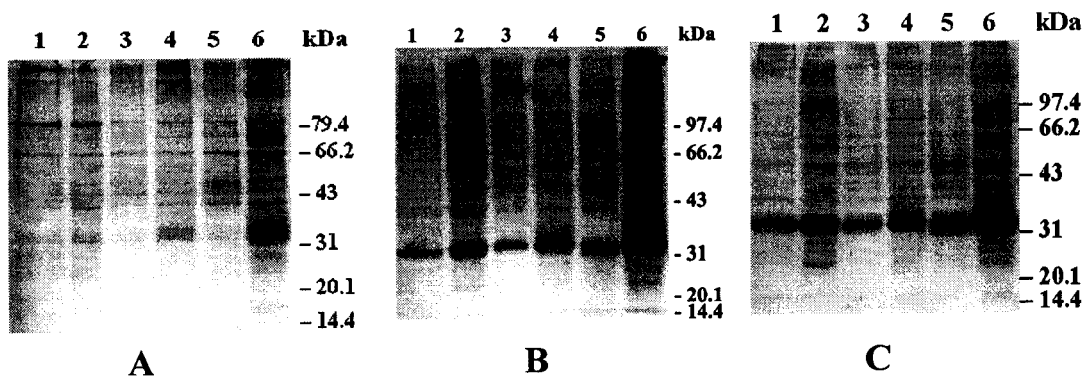


图 2

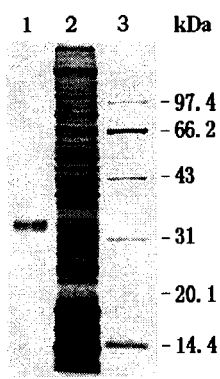


图 3

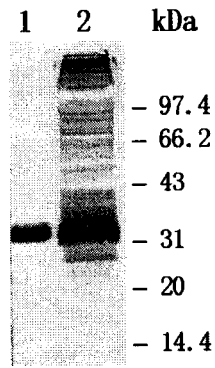


图 4

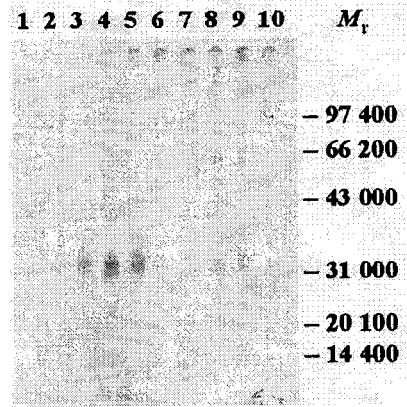


图 5

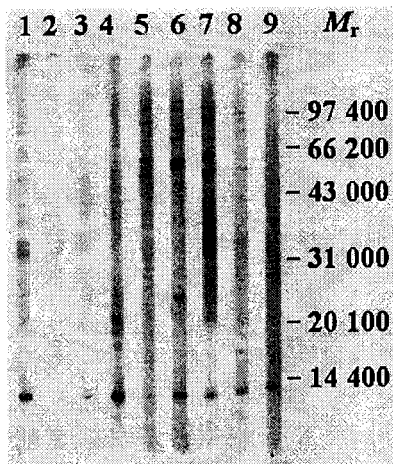
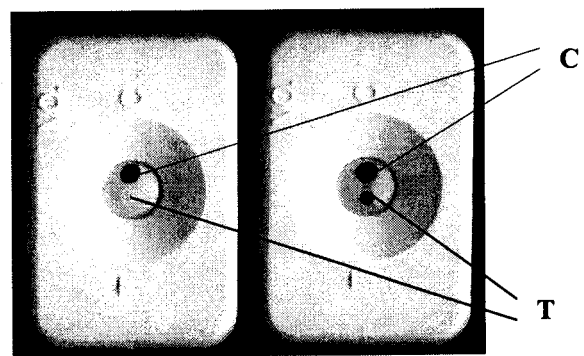


图 6



阴性

阳性

图 7

专利名称(译)	一种广州管园线虫病的诊断抗原分子		
公开(公告)号	CN1840543A	公开(公告)日	2006-10-04
申请号	CN200510033801.9	申请日	2005-03-31
[标]申请(专利权)人(译)	陈小光 李华		
申请(专利权)人(译)	陈晓光 李华		
当前申请(专利权)人(译)	陈晓光 李华		
[标]发明人	陈晓光 李华		
发明人	陈晓光 李华		
IPC分类号	C07K14/435 C07K1/26 G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明是运用广州管园线虫早期感染动物血清筛选不同发育阶段所获得的具有早期诊断潜能的优势抗原分子32kDa(AC32)，经免疫印迹和ELISA证实，该抗原分子在诊断广州管园线虫病的早期诊断和流行病学调查中具有良好的效果，它不仅有高度的敏感性，也因该抗原与其他寄生虫很少有交叉抗原反应性而表现出高度的特异性。无论是从天然抗原中纯化的AC32还是以基因工程技术获得的重组AC32必将成为广州管园线虫病诊断的良好抗原分子。

