



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111089959 A

(43)申请公布日 2020.05.01

(21)申请号 202010121753.3

(22)申请日 2020.02.17

(71)申请人 西南民族大学

地址 610041 四川省成都市武侯区一环路
南四段16号

申请人 四川省动物疫病预防控制中心

(72)发明人 郝力力 郭莉 袁东波 阳爱国

(74)专利代理机构 成都天汇致远知识产权代理
事务所(普通合伙) 51264

代理人 韩晓银

(51)Int.Cl.

G01N 33/545(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

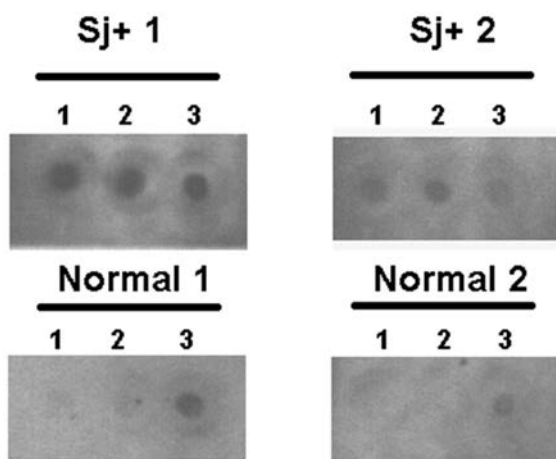
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54)发明名称

一种日本血吸虫可溶性虫卵抗原组分的分离鉴定方法

(57)摘要

本发明提供一种日本血吸虫可溶性虫卵抗原组分的分离鉴定方法,包括以下步骤:将*S. japonicum*虫卵研磨,用灭菌生理盐水配成5%悬液,置4℃浸泡3天,期间于-20℃和室温间反复冻融10次,然后超声裂解,离心取上清液备用;将上清液过葡聚糖凝胶柱,然后收集分离得到的抗原组分,-20℃保存备用;将收集的抗原组分在PVDF膜上点样,室温放置1小时,然后将膜置于1%BSA(W/V)的PBST中4℃过夜封闭,PBST洗膜3次,再与*S. japonicum*阳性病牛血清室温振荡作用1小时,PBST洗膜3次,再与羊抗牛IgG-hrp室温振荡作用1小时,PBST洗膜3次,ECL化学发光显色进行鉴定。



1. 一种日本血吸虫可溶性虫卵抗原组分的分离鉴定方法,其特征在于:包括以下步骤:

步骤1,样品制备:将*S. japonicum*虫卵研磨,用灭菌生理盐水配成5%悬液,置4℃浸泡3天,期间于-20℃和室温间反复冻融10次,然后超声裂解,12000rpm离心1小时,取上清液备用;

步骤2,样品分离:将步骤1制备的上清液过葡聚糖凝胶柱,然后收集分离得到的抗原组分,-20℃保存备用;

步骤3,样品鉴定:将收集的抗原组分在PVDF膜上点样,1μg/点,室温放置1小时,然后将膜置于1%BSA (W/V) 的PBST中4℃过夜封闭,PBST洗膜3次,每次5min,再与1:100倍稀释的*S. japonicum*阳性病牛血清室温振荡作用1小时,PBST洗膜3次,每次5min,再与1:20000倍稀释的羊抗牛IgG-hrp室温振荡作用1小时,PBST洗膜3次,每次5min,ECL化学发光显色进行鉴定。

2. 根据权利要求1所述的一种日本血吸虫可溶性虫卵抗原组分的分离鉴定方法,其特征在于:所述超声裂解的条件为:超声功率为400-500W,时间为10-30min。

3. 根据权利要求1所述的一种日本血吸虫可溶性虫卵抗原组分的分离鉴定方法,其特征在于:所述葡聚糖凝胶柱的制备方法为:称取3g葡聚糖凝胶G-200至烧杯中,加入去离子水300ml,室温过夜溶胀,次日更换去离子水,沸水浴1小时,冷却后装柱,然后用pH4.0-5.5的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液平衡过夜。

4. 根据权利要求3所述的一种日本血吸虫可溶性虫卵抗原组分的分离鉴定方法,其特征在于:所述将步骤1制备的上清液过葡聚糖凝胶柱,具体操作为:向葡聚糖凝胶柱内分多次加入步骤1制备的上清液,每次加入量为柱体积的5%,用pH4.9的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液洗脱抗原,流速为0.25ml/min。

一种日本血吸虫可溶性虫卵抗原组分的分离鉴定方法

技术领域

[0001] 本发明属于蛋白质分离鉴定技术领域,具体涉及一种日本血吸虫可溶性虫卵抗原组分的分离鉴定方法。

背景技术

[0002] 血吸虫病(Schistosomiasis)是一种危害严重的人畜共患寄生虫病,全球血吸虫病人在2亿以上,受威胁的流行区人口为7亿多。日本血吸虫(*Schistosoma japonicum*)是导致血吸虫病的三种病原体之一。建国初期,日本血吸虫病曾在我国12个省(江苏、浙江、安徽等)的454个县、市、区广泛流行,给人民健康和畜禽生产带来严重危害和巨大损失,经过多年来的不懈努力,我国血吸虫病的防治工作取得举世瞩目的成就,血吸虫病人从解放初期的1100多万下降至41.3万,家畜感染率也由3.60%(2005年)下降至1.08%(2010年),据估计血吸虫病家畜约1.5万(其中病牛占80.04%),钉螺面积也降低至37.2亿平方米。然而,*S. japonicum*易感宿主广泛(涉及40多种哺乳动物),传染源和中间宿主尚不能有效根除,日本血吸虫病仍面临着随环境气候变化而死灰复燃的可能性,其诊断和防治工作仍然不能松懈。快速有效诊断是血吸虫病及时防治的前提,日本血吸虫病诊断方法可概括为病原形态学、分子生物学和免疫学三大类。其中,病原形态学诊断是最为经典,但费时、费力,漏检率较高,不适合家畜血吸虫病的普查,而分子生物学方法因操作复杂且需要昂贵设备仅限于实验室使用;免疫学诊断方法是目前家畜血吸虫病普查最常用的方法,其诊断抗原通常为*S. japonicum*可溶性虫卵抗原(soluble egg antigen,SEA),这与虫卵能够诱导宿主产生高水平TH2型免疫应答和特异性抗体密切相关。然而,SEA组分复杂,在实际应用时易与其他寄生虫抗原发生交叉反应而降低其特异度。因此,深入分析并鉴定*S. japonicum*特别是SEA组分的免疫特异性,是获取特异性诊断抗原并对其基因进行克隆、表达的前提工作。但目前,尚未有对日本血吸虫SEA组分进行分离鉴定的研究报道。

发明内容

[0003] 针对现有技术存在的问题,本发明提供一种日本血吸虫可溶性虫卵抗原组分的分离鉴定方法。本发明的技术方案为:

一种日本血吸虫可溶性虫卵抗原组分的分离鉴定方法,包括以下步骤:

步骤1,样品制备:将*S. japonicum*虫卵研磨,用灭菌生理盐水配成5%悬液,置4℃浸泡3天,期间于-20℃和室温间反复冻融10次,然后超声裂解,12000rpm离心1小时,取上清液备用;

步骤2,样品分离:将步骤1制备的上清液过葡聚糖凝胶柱,然后收集分离得到的抗原组分,-20℃保存备用;

步骤3,样品鉴定:将收集的抗原组分在PVDF膜上点样,1μg/点,室温放置1小时,然后将膜置于1%BSA(W/V)的PBST中4℃过夜封闭,PBST洗膜3次,每次5min,再与1:100倍稀释的*S. japonicum*阳性病牛血清室温振荡作用1小时,PBST洗膜3次,每次5min,再与1:20000倍稀释

的羊抗牛IgG-hrp室温振荡作用1小时,PBST洗膜3次,每次5min,ECL化学发光显色进行鉴定。

[0004] 进一步的,所述超声裂解的条件为:超声功率为400-500W,时间为10-30min。

[0005] 进一步的,所述葡聚糖凝胶柱的制备方法为:称取3g葡聚糖凝胶G-200至烧杯中,加入去离子水300ml,室温过夜溶胀,次日更换去离子水,沸水浴1小时,冷却后装柱,然后用pH4.0-5.5的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液平衡过夜。

[0006] 进一步的,所述将步骤1制备的上清液过葡聚糖凝胶柱,具体操作为:向葡聚糖凝胶柱内分多次加入步骤1制备的上清液,每次加入量为柱体积的5%,用pH4.9的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液洗脱抗原,流速为0.25ml/min。

[0007] 本发明的有益效果为:通过本发明,可以大量制备并鉴别出日本血吸虫SEA特异性抗原成分,对深入分析并鉴定*S. japonicum*特别是SEA组分的免疫特异性,以及对其基因进行克隆、表达提供了重要的前提保障。

[0008]

附图说明

[0009] 图1为本发明实施例1中日本血吸虫虫卵可溶性抗原葡聚糖凝胶G-200柱层析分离图,其中横坐标表示分离时间(单位为分钟);纵坐标表示蛋白在280nm紫外光时的光吸收值;mAU光吸收值单位。

[0010] 图2为本发明实施例1中日本血吸虫虫卵可溶性葡聚糖凝胶G-200柱层析抗原Dot-ELISA鉴定图,其中斑点1、2和3所用抗原分别为I峰、峰间和II峰抗原,Sj+1、Sj+2和Sj+3表示一抗反应血清为日本血吸虫阳性血清,Normal 1、Normal 2和Normal 3表示一抗反应血清为阴性对照血清。

[0011] 图3为本发明实施例1中日本血吸虫虫卵葡聚糖凝胶G-200柱层析II峰抗原Dot-ELISA鉴定图,其中斑点1、2和3所用抗原分别为II峰、II峰上清和II峰沉淀抗原,Sj+1和Sj+2表示一抗反应血清为日本血吸虫阳性血清,Normal 1和Normal 2表示一抗反应血清为阴性对照血清。

[0012]

具体实施方式

[0013] 本发明实施例采用的*S. japonicum*虫卵购自安徽医科大学。

[0014] 本发明实施例采用的感染*S. japonicum*第45天的阳性病牛血清来自上海市国家动物医学研究所赠。

[0015] 本发明实施例采用的健康牛血清来自富阳市屠宰场。

[0016] 本发明实施例采用的兔抗牛IgG-hrp,ELISA工作浓度1:20000~40000,购自北京博奥生物技术有限公司。

[0017] 本发明实施例采用的增强型ECL发光试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司。

[0018] 本发明实施例采用的WHATMAN硝酸纤维素(NC)膜购自上海索莱宝生物技术有限公司。

[0019] 本发明实施例采用的Pharmac葡聚糖凝胶G-200购自上海索莱宝生物技术有限公司。

[0020] 本发明实施例采用的蛋白质电泳和转印成套设备型号为BIO-RAD,美国。

[0021] 本发明实施例采用的蛋白质层析系统型号为GE Healthcare,美国。

[0022] 此外,在本发明的描述中,需要说明的是,实施例中未注明具体条件者,按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市售购买获得的常规产品。

[0023] 下面结合附图和具体的实施例对本发明做进一步详细说明,所述是对本发明的解释而不是限定。

[0024] 实施例1

本实施例提供一种日本血吸虫可溶性虫卵抗原组分的分离鉴定方法,包括以下步骤:

步骤1,样品制备:称取*S. japonicum*虫卵1克,玻璃匀浆器研磨30min,用灭菌生理盐水配成5%悬液,置4℃浸泡3天,期间于-20℃和室温间反复冻融10次,然后超声裂解30min(400W),12000rpm离心1小时,取上清备用。

[0025] 步骤2,样品分离:称取3g葡聚糖凝胶G-200至烧杯中,加入去离子水300ml,室温过夜溶胀,次日更换去离子水,沸水浴1小时,冷却后装柱,然后用柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH4.9)平衡过夜,向已平衡好的柱内加入步骤1制备的上清,每次2ml,约为柱体积的5%,柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH4.9)洗脱抗原,流速为0.25ml/min,分别收集I峰、峰间和II峰抗原组分,-20℃保存备用。

[0026] 步骤3,样品鉴定:将步骤2中制备的I峰、峰间和II峰抗原样品在PVDF膜上分别点样,1μg/点,室温放置1小时,然后将膜置于1%BSA-PBST中4℃过夜封闭,PBST洗膜3次,每次5min,与1:100倍稀释的*S. japonicum*阳性病牛血清室温振荡作用1小时,PBST洗膜3次,每次5min,与1:20000倍稀释的羊抗牛IgG-hrp室温振荡作用1小时,PBST洗膜3次,每次5min,ECL化学发光显色。

[0027] 葡聚糖凝胶层析是对具不同大小蛋白进行快速大量分离的一种方法,且不影响所分离蛋白质的活性。葡聚糖凝胶G-200柱层析对SEA分离结果显示,SEA在分离过程中出现了2个非常明显的蛋白质高峰值,分别命名为I峰(时间为4-10分钟)和II峰(时间为20-30分钟)(图1),根据I峰和II峰出现时间的早晚判断,I峰为SEA大分子量蛋白组分,II峰为SEA小分子量蛋白组分,对所分离到的SEAI峰、峰间和II峰蛋白组分Dot-ELISA鉴定结果显示,I峰、峰间和II峰蛋白与日本血吸虫阳性血清均出现了较强的反应,反应斑点明显,但I峰和峰间蛋白与阴性对照血清间也存在不同程度的反应,而II峰蛋白未与阴性对照血清出现可见反应(图2)。上述结果表明,II峰蛋白是血吸虫SEA的特异性抗原,由于所分离到的II峰蛋白存在一定的浑浊度,我们通过高速离心对其进行了分离,并对其离心后的蛋白组分进行了深入鉴定,Dot-ELISA鉴定结果显示,II峰离心沉淀蛋白组分是非特异性蛋白组分(图3),在制备II峰抗原时可通过离心办法将其去掉。

[0028] 实施例2

本实施例提供一种日本血吸虫可溶性虫卵抗原组分的分离鉴定方法,与实施例1的区别在于:步骤1中没有“于-20℃和室温间反复冻融10次”的步骤,而是直接进行超声裂解,实验结果为:葡聚糖凝胶G-200柱层析分离SEA产生的I峰和II峰不明显,除了I峰和II峰外,还

出现了多个小的杂峰。

[0029] 实施例3

本实施例提供一种日本血吸虫可溶性虫卵抗原组分的分离鉴定方法,与实施例1的区别在于:步骤1中超声裂解的控制参数为:300W,1h,实验结果为:葡聚糖凝胶G-200柱层析分离SEA产生的I峰和II峰峰值较低,收集到的I峰和II峰蛋白浓度较低。

[0030] 实施例4

本实施例提供一种日本血吸虫可溶性虫卵抗原组分的分离鉴定方法,与实施例1的区别在于:步骤1中超声裂解的控制参数为:300W,30min,实验结果为:葡聚糖凝胶G-200柱层析分离SEA产生的I峰和II峰峰值较低,收集到的I峰和II峰蛋白浓度较低。

[0031] 实施例5

本实施例提供一种日本血吸虫可溶性虫卵抗原组分的分离鉴定方法,与实施例1的区别在于:步骤1中超声裂解的控制参数为:600W,30min,实验结果为:葡聚糖凝胶G-200柱层析分离SEA产生的I峰和II峰蛋白量较多,但峰间和杂峰蛋白增多。

[0032] 实施例6

本实施例提供一种日本血吸虫可溶性虫卵抗原组分的分离鉴定方法,与实施例1的区别在于:步骤2中样品分离采用G-52柱,实验结果为:不能够将SEA有效分离,没有蛋白峰出现。

[0033] 实施例7

本实施例提供一种日本血吸虫可溶性虫卵抗原组分的分离鉴定方法,与实施例1的区别在于:步骤2中样品分离采用G-300柱,实验结果为:葡聚糖凝胶G-200柱层析分离SEA产生数量众多的蛋白量小峰。

[0034] 综上,上述结果表明,采用本发明能够将包含SEA小分子量的II峰蛋白分离并鉴定出来,II峰蛋白是日本血吸虫的特异性天然蛋白。

[0035] 尽管上面已经示出和描述了本发明的实施例,可以理解的是,上述实施例是示例性的,不能理解为对本发明的限制,本领域的普通技术人员在本发明的范围内可以对上述实施例进行变化、修改、替换和变型。

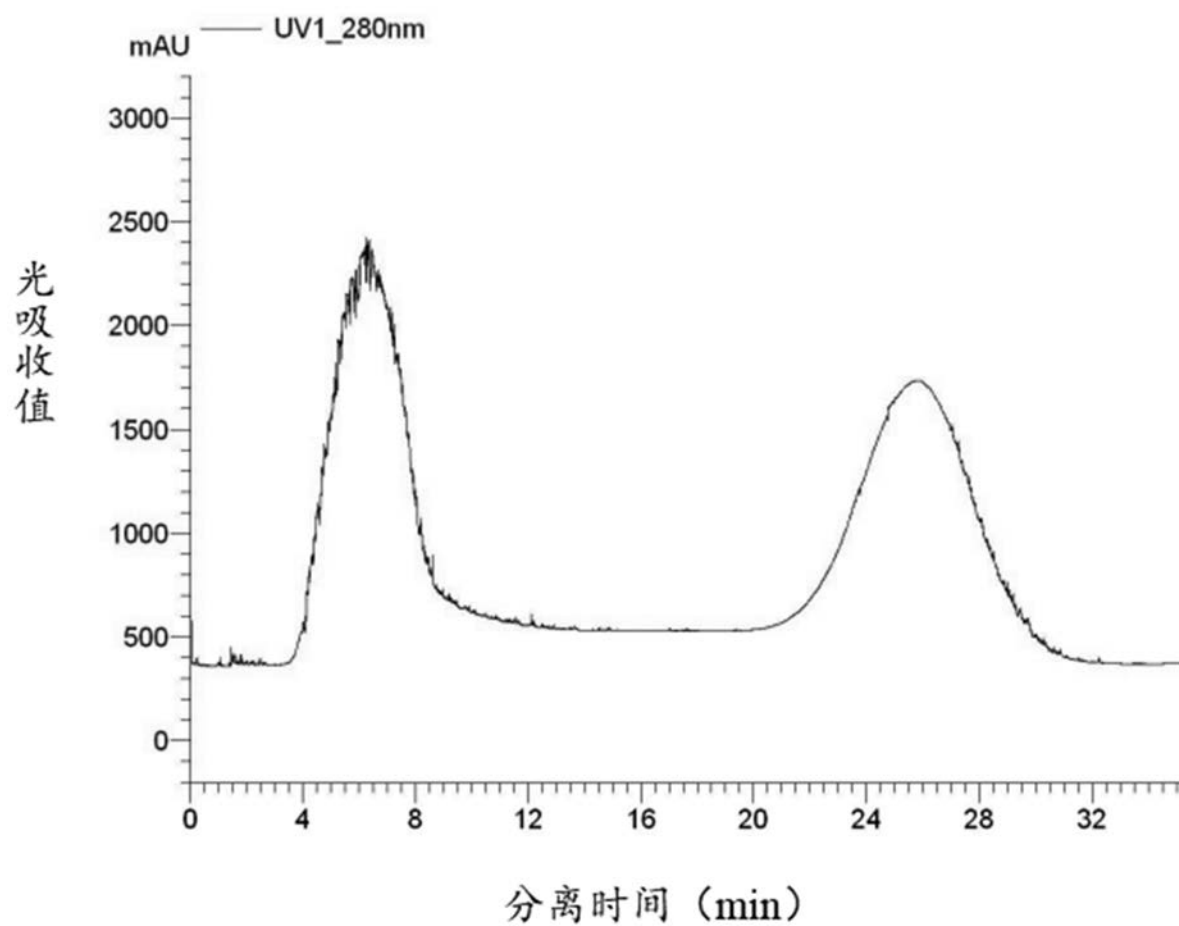


图1

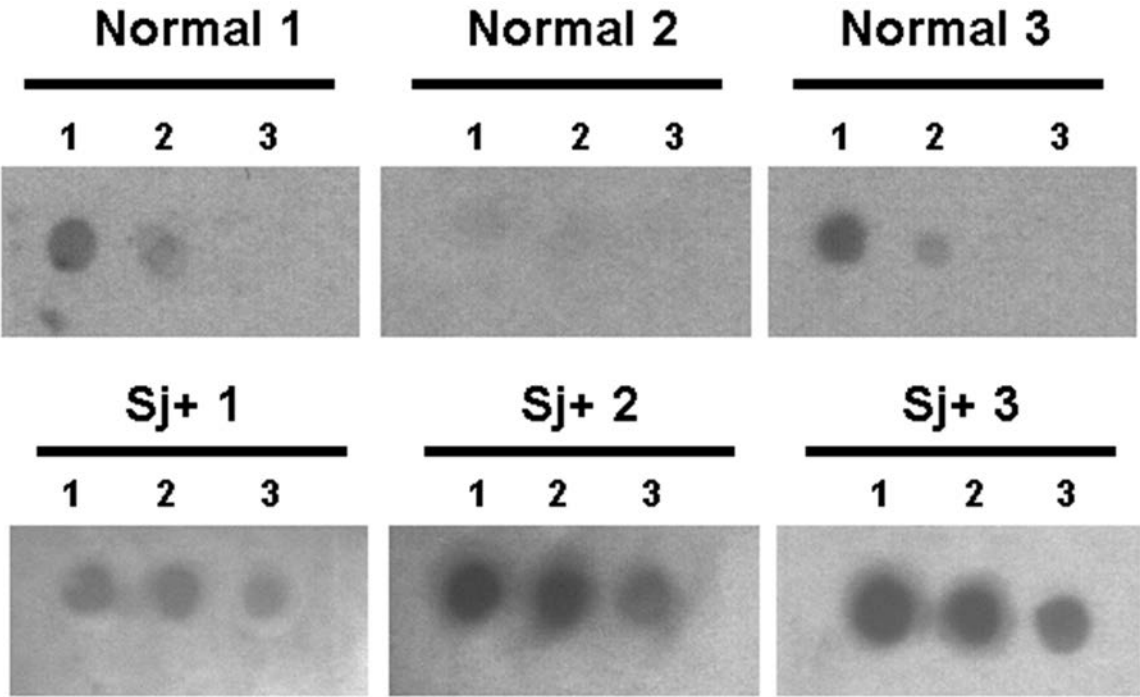


图2

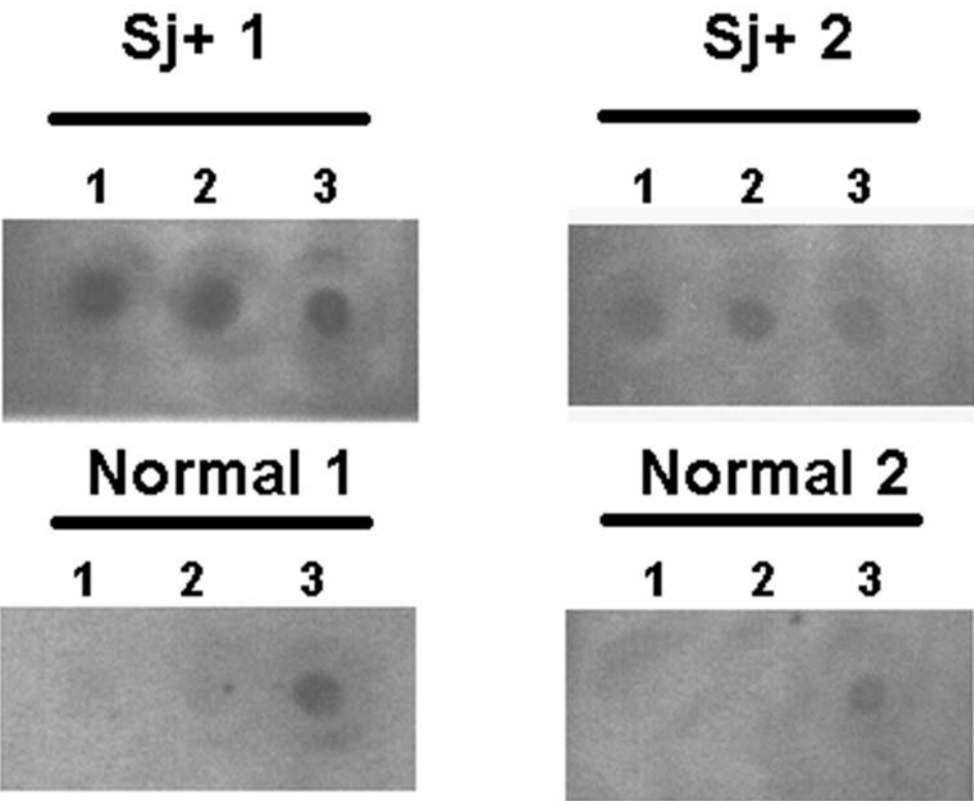


图3