

## 日本血吸虫天然抗原分子的柱层析分离纯化与鉴定

彭先楚, 汪世平\*, 周松华, 姜孝新, 吕志跃, 徐绍锐, 肖小芹,

曾少华, 余俊龙, 戴 橄, 李文凯, 吴仕筠

(中南大学湘雅基础医学院病原生物学系血吸虫病研究室, 长沙 410078)

**【摘要】** 目的 分离纯化日本血吸虫成虫(AWA)和未成熟虫卵(SIEA)可溶性抗原中的单一蛋白,为血吸虫病免疫诊断、预防提供新的抗原分子。方法 柱层析分离纯化成虫和未成熟虫卵可溶性抗原,SDS-PAGE及银染色进行分析鉴定。结果 得到了三种不同大小血吸虫分子抗原 AWA18 000u, SIEA42 000u, SIEA130 000u。结论 实验证明柱层析法是一种快速分离纯化血吸虫单一组分抗原简单而有效的方法。

**【关键词】** 日本血吸虫; 未成熟虫卵; 抗原; 柱层析; 纯化

中图分类号 R383.24

文献标识码 A

## Purification and Identification of Different Molecular Weight Antigen from *Schistosoma japonicum* by Column Chromatography

PENG Xian-chu, WANG Shi-ping, ZHOU Song-hua, Jiang Xiao-xin, LÜ Zhi-yue, XU Shao-rui,

XIA Xiao-qing, ZENG Shao-hua, YU Jun-long, DAI Gan, LI Wen-kai, WU Shi-yun

(Department of Pathogenic Organisms, Xiangya Medical School,

Central South University, Changsha 410078, China)

**【Abstract】 Objective** To obtain the single molecular weight proteins from *Schistosoma japonicum* adult worm and immature egg soluble antigens for immunodiagnosis and prevention of schistosomiasis. **Methods** AWA and SIEA were fractionated (purified) by column chromatography, the fractions were analyzed and identified using SDS-PAGE and silver staining. **Results** Three different protein antigens, AWA18 000u, SIEA42 000u, SIEA130 000u, were obtained after the fractionation through column chromatography. **Conclusion** Above results showed the column chromatography is a simple and effective method for the isolation and purification of some antigens of *Schistosoma japonicum*.

**【Key words】** *Schistosoma japonicum*; immature egg; antigen; column chromatography purification

血吸虫抗原成分复杂,来自血吸虫不同发育阶段的单一抗原组分的分离纯化及其鉴定,不仅有助于阐明血吸虫的免疫发病机制,而且对血吸虫病免疫诊断及疫苗的研制也具有十分重要的意义。许多学者对血吸虫抗原的纯化做了大量的工作,且应用于血吸虫病的诊断和预防取得了很好的效果<sup>[1~6]</sup>。本文用不同分子筛介质进行柱层析对日本血吸虫

成虫、未成熟虫卵进行分离纯化,结果获得了几种纯天然抗原分子,现报道如下。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

1.1.1 主要试剂 超凝胶 Ultrogel ACA44 购自瑞典 LKB 公司;葡聚糖凝胶 Sephadex G-200 购自美国 Sigma 公司;丙烯酰胺,甲叉双丙烯酰胺,十二烷基磺酸钠,购自 Amesco 公司;低分子量标准蛋白购自中科院上海生化所,中分子量标准蛋白为 MBI 公司产品;辣根过氧化物酶联葡萄球菌 A 蛋白(HRP-SPA)购自上海科欣生物技术研究所以;其他试剂均为国产分析纯。

#### 1.1.2 仪器设备

1.1.2.1 柱层析系统 BSZ-100 自动部分收集

基金项目:国家“十五”重大科技专项资助项目(No. 2002AA2Z3343);“863”国家血防重大专项(No. 2004AA2Z3530);教育部“985 行动计划”(No. 03-985-3);湖南省“十五”重点学科建设专项经费(No. 2001-207)。

作者简介:彭先楚(1969~),男,湖南人,硕士研究生。

\*通讯作者:汪世平,男,教授,博士生导师,主要从事血吸虫病疫苗研究工作。

器购自上海沪西分析仪器厂; HD-21-88 核酸蛋白检测仪为上海琪特分析仪器有限公司产品; HL-2 恒流泵购自上海新波无线电厂; XWT-S 小型台式记录仪为上海自动化仪表厂产品。

1.1.2.2 电泳系统 双面垂直板型电泳槽为 Bio-Rad 公司产品, 电泳仪为瑞典 LKB 公司产品。

1.1.2.3 其它设备 JY92-II 超声波细胞粉碎仪为宁波新芝科器研究所生产; SPECTRUM 752 型紫外分光光度计为上海光谱仪器有限公司生产; 台式冷冻干燥机购自北京博医康公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 抗原的制备

1.2.1.1 成虫可溶性抗原(AWA) 人工感染家兔 1500~2000 条尾蚴, 32d 后剖杀, 肝门冲虫法收集日本血吸虫成虫, 生理盐水洗涤 3 次, 参考文献<sup>[7]</sup>的方法冰浴匀浆处理, 超声粉碎后 14500r/min 离心 20min, 取上清部分过  $\phi 0.45\mu\text{m}$  滤膜即为层析用原抗。

1.2.1.2 未成熟虫卵可溶性抗原(SIEA) 将尾蚴感染 32d 的兔肝用组织捣碎器捣碎, 经不同目的绢筛后, 于 4℃, 5000r/min 反复离心, 每次 5min, 分离纯化未成熟虫卵。将纯净虫卵在冰浴条件下充分磨碎, 超声粉碎后反复冻融数次, 同上离心、过滤供层析用。抗原蛋白定量采用 SPECTRUM 752 型紫外分光光度计测定。

1.2.2 葡聚糖凝胶 G-200 柱层析 分离方法参照 Chappell 等<sup>[8]</sup>进行并稍加修改。取适量葡聚糖凝胶 G-200 用 0.2M pH4.9 柠檬酸缓冲液浸泡洗涤数次, 装柱 2.6cm×50cm, 用上述缓冲液平衡洗脱。控制流速为 15ml/h, 待平衡后上样 AWA, 每次上样 3.5ml (< 1/10 床体积), 以每管 3ml 收集, 共收集 100 管。用 32d 感染兔血清作 ELISA 检测层析后抗原活性, 并将数批各对应管合并, 经 752 型紫外分光光度计检测 OD 值, 并计算其蛋白浓度, 用 Excel 软件绘制蛋白峰型图。将活性管用双蒸水 4℃ 充分透析、台式冷冻干燥机冻干, SDS-PAGE 后进行银染色, 鉴定抗原纯度。

1.2.3 超凝胶 ACA44 柱层析 按上述同样的方法, 取适量超凝胶 ACA44, 装柱 2.6cm×50cm, 平衡洗脱。控制流速为 20ml/h, 待平衡后上样 SIEA, 每次上样 3.5ml (< 1/10 床体积), 以每管 2ml 收集。紫外检测仪 A280nm 示踪, 自动记录描图。同上检测层析后抗原活性, 根据分离峰型, 将数批层析后各对应管分别集中, 取第 2 分部活性管及第 1 峰各管,

按 1.2.2 方法透析、冻干, 电泳银染检测抗原的纯度。

1.2.4 分离纯化抗原的分子量测定 参考李允鹤<sup>[9]</sup>的方法测定标准蛋白和目的蛋白的相对电泳迁移率  $R_f$ , 以各标准蛋白质样品的相对迁移率为横坐标, 其相对分子质量的对数为纵坐标, 于半对数坐标纸上作出标准曲线, 根据分离蛋白相对迁移率数值, 直接从标准曲线上查得蛋白质的分子量。

## 2 结果

### 2.1 日本血吸虫成虫(AWA)的层析

AWA 经葡聚糖凝胶 G-200 柱层析后, 可见到 3 个蛋白峰。经 ELISA 检测血清学抗原活性, 主要位于第 2 小峰内, 相当于第 21~32 管之内 (图 1)。

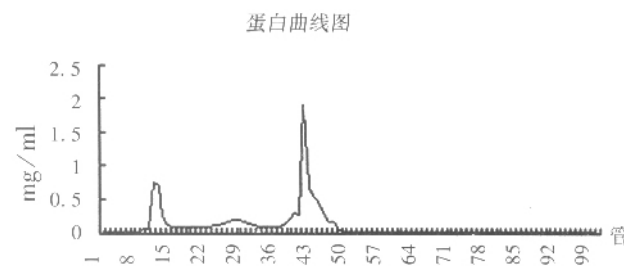


图 1 AWA 葡聚糖凝胶 G-200 柱层析

Fig. 1 AWA components isolated by sephadex G-200 column chromatography

### 2.2 日本血吸虫未成熟虫卵可溶性抗原(SIEA)的层析

SIEA 经超凝胶 ACA44 柱层析后, 可见 2 个蛋白峰, 活性管主要位于第 2 峰及紧接的低波峰区间。从图中可以看出第 1 峰小而尖, 第 2 峰高而宽 (图 2)。

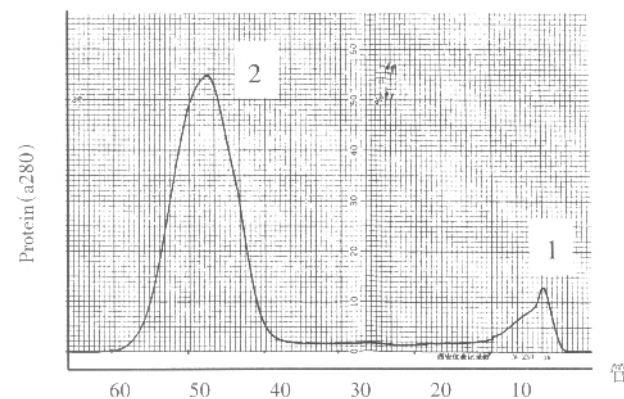


图 2 SIEA 超凝胶 ACA44 柱层析

Fig. 2 SIEA components isolated by ultrogel ACA44 column chromatography

### 2.3 SDS-PAGE 及银染色结果

葡聚糖凝胶 G-200: 柱层析后 ELISA 活性管作 SDS-PAGE 及银染色, 从图3中可以看出分离的蛋白经银染显示一条带, 而且与 AWA 中相应的蛋白位置一致, 根据标准分子量计算, 该蛋白分子量为 18 000u。

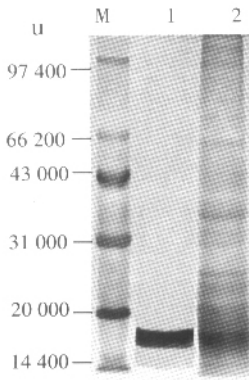


图3 分离后 18 000u 蛋白电泳图

Fig.3 SDS-PAGE of fractionated 18 000u

M Marker; 1: 18 000u; 2: AWA.

超凝胶 ACA44 柱层析后取第 2 活性峰及第 1 峰电泳银染得到单一蛋白条带, 测定其蛋白分子量分别为 42 000u、130 000u; 从图 4 可以看出二者与 SIEA 相应位置蛋白一致。

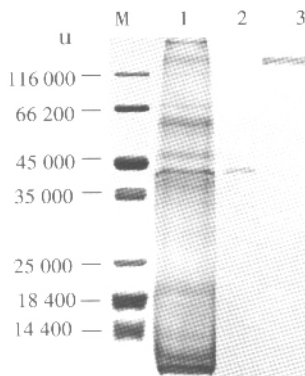


图4 分离后 42 000u、130 000u 蛋白电泳图

Fig.4 SDS-PAGE of fractionated

M Marker; 1: SIEA; 2: 42 000u; 3: 130 000u.

### 3 讨论

抗原的分离纯化为血吸虫病诊断及疫苗的进一步研究与应用提供了重要的手段。目前分离纯化血吸虫抗原常采用电泳切胶加电渗洗脱, 但得量较

柱层析法少<sup>[3]</sup>, 而免疫亲和层析需首先制备纯度较高的单抗, 高效液相色谱由于价格昂贵而不易在普通实验室使用。电泳层析与分子筛柱层析相比, 电泳过程中的抗原经变性处理, 不适于酶的分离纯化。汪世平等采用 ACA54 超凝胶柱层析结合超滤、透析、沉淀等方法分离纯化日本血吸虫成虫 31 000/32 000u; 其主要蛋白峰与本文结果基本一致, 此纯化抗原用于血吸虫的诊断敏感性高, 特异性好<sup>[2]</sup>。随后, 1995 年应用超凝胶柱层析方法分离日本血吸虫未成熟虫卵可溶性抗原 26 000/28 000u 获得成功<sup>[3]</sup>; 该抗原被证明有很高的抗生殖产卵和抗卵胚发育的作用<sup>[4]</sup>。本文用葡聚糖凝胶 G-200 超凝胶 ACA44 柱层析分离纯化日本血吸虫成虫的 18 000u, 未成熟虫卵中 42 000u、130 000u 三种不同大小电泳纯蛋白分子。本研究进一步证实, 通过改变不同型号凝胶, 柱的长短和直径, 选择合适的流速等, 可以得到不同分子量的单一组分抗原, 为纯化抗原生物学特性的进一步分析、鉴定及应用提供了快速、简便的途径。目前, 本文所获得的这几种纯化抗原的免疫生化特征及其诊断价值或作为疫苗的潜能正在研究中。

### [参 考 文 献]

- [1] Ramirez BL, Kartis JD, Wiest PM, et al. Paramyosin 'a candidate vaccine antigen *Schistosoma japonicum* [J]. Parasite Immunol, 1996, 18(1): 49-52.
- [2] Wang S, Zeng X, Yi X. Purification of 31 000/32 000u proteins of adult *Schistosoma japonicum* as antigens (Sj31/32) for ELISA and IHA [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 1995, 13(1): 25-31.
- [3] 汪世平, 周汨波, 李 华, 等. 日本血吸虫未成熟虫卵 26 000-28 000u 抗原的分离与纯化 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 1996, 8(5): 270-273.
- [4] 汪世平, 周汨波, 沈国励, 等. 日本血吸虫未成熟虫卵 26 000/28 000u 抗原诱导抗雌虫生殖和抗卵胚发育免疫的研究 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1997, 15(6): 79-83.
- [5] 夏超明, 陈家旭, 李允鹤, 等. 日本血吸虫组分蛋白的大量纯化、收集和鉴定 [J]. 苏州医学院学报, 1998, 18(12): 1223-1225.
- [6] 汪世平, 吴朝阳, 沈国励, 等. 日本血吸虫分子诊断抗原压电免疫传感器的研究 [J]. 中国人畜共患病杂志, 2000, 16(1): 15-17.
- [7] 汪世平, 曾宪芳, 易新元. 用 ACA54 超凝胶柱层析纯化日本血吸虫抗原 [J]. 中国人畜共患病杂志, 1992, 8(6): 14-16.
- [8] Chappell CL, Dresden MH. Purification of cysteine proteinases from adult *Schistosoma mansoni* [J]. Arch Biochem Biophys, 1987, 256(2): 560-568.
- [9] 李允鹤. 寄生虫免疫学及免疫诊断 [M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 1991: 410-417.

(收稿日期 2004-10-18, 修回日期 2004-11-29)