

圆形碘泡虫完整孢子 ELISA 的建立

章晋勇^{1,2}, 汪建国¹, 吴英松³, 李明³

(1. 中国科学院水生生物研究所, 湖北武汉 430072; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049; 3. 第一军医大学热带医学实验室, 广东广州 510515)

摘要:探索建立鱼类寄生圆形碘泡虫 (*Mycobolus rotundus* Nemezek, 1911, Myxosporea, Bivalvulida) 完整孢子酶联免疫吸附试验 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测的可行性, 对丙酮、戊二醛、甲醛、多聚甲醛、乙醇等几种常用固定剂应用于此方法的效果进行评价, 初步建立了针对鱼类黏孢子虫的完整孢子 ELISA 检测模式。结果显示, 同比其他几种固定剂, 2% 的多聚甲醛、0.25% 的戊二醛对圆形碘泡虫完整孢子 ELISA 有较好的效果, 经二者固定后, 最低可检出 10 个成熟的完整孢子, 这为筛选鱼类黏孢子虫孢子表面抗原分子的特异性配体, 如单克隆抗体及基因工程抗体或抗体片断, 分析其表面分子性质奠定了基础。同时, 讨论了该方法在鱼类黏孢子虫病病原检测、属种鉴定、系统发育及黏孢子虫基础生物学研究等方面的潜在应用价值。

关键词:完整孢子; ELISA; 圆形碘泡虫; 黏孢子虫

中图分类号: S941.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2005)02-0133-05

鱼类黏孢子虫种类繁多, 迄今已报道了近千种, 每一种都对其宿主鱼类产生不同程度的影响, 给渔业生产造成了较大的危害。一个多世纪来, 国内外鱼病学家、寄生虫学家对其分类、系统发育、病原生物学、免疫学及诊断与治疗做了广泛而深入的研究^[1]。圆形碘泡虫 (*Mycobolus rotundus* Nemezek, 1911) 是鱼类常见的一种寄生虫, 可广泛寄生于鲢、鳊、鲫及重口裂腹鱼等多种鱼类的不同部位^[1]。近年来, 有关其免疫学的研究开展的较多, 各种免疫学研究手段也得到广泛的应用。酶联免疫吸附法 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 以其快速、简便、高灵敏度等特点在鱼类黏孢子虫的免疫学研究中发挥了重要作用, 但大都以破碎完整孢子后制备的可溶性成分为包被抗原^[1-3]。然而, 由于圆形碘泡虫孢子壳极其坚硬, 目前裂解的方法都比较激烈^[3], 这难免引起抗原天然构象的改变, 破坏孢子的抗原性, 给实验造成人为假相。为了克服上述问题, 亟待建立针对其完整孢子表面抗原的检测方法。另外, 成熟孢子是圆形碘泡虫生活史中与宿主接触时间最长的生命形式, 其表面分子在研究宿主对其的免疫识别及寄生虫-宿主相互关系有着

极为重要的作用, 因此了解其表面分子的特性更显得尤为重要。但由于圆形碘泡虫的表面的特殊性, 完整孢子不能如普通蛋白抗原常规包被于固相载体, 如酶标板等, 更经不住严格条件的洗涤。结合医学研究中针对肿瘤靶细胞表面抗原的研究策略^[4-5]及常规免疫组织化学中的固定方法^[6], 本研究探索了针对圆形碘泡虫完整孢子的 ELISA 法, 旨在为圆形碘泡虫, 乃至所有存在成熟孢子阶段的鱼类黏孢子虫的免疫诊断、孢子表面候选保护性靶抗原的筛选及寄生虫-宿主相互关系等方面的研究提供有效的研究工具。

1 材料与方法

1.1 完整孢子的制备

所用的病鱼为二龄异育银鲫 (*Carassius auratus* L.), 系鄂州武昌鱼水产良种场收集的新鲜标本, 其体表有大量胞囊, 活体运回实验室。粗孢子的分离及孢子的纯化参照鲁义善等^[1,3]、沈关心等^[2]、吴英松等^[7]报道的方法, 孢子经冷 PBS 洗涤数次, 血细胞板计数, 调节孢子悬液浓度至 1×10^8 /mL, -20°C 保存备用。

收稿日期: 2004-04-02; 修订日期: 2004-08-30.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30271028); 中国科学院知识创新工程课题 (KSCX2-1-04).

作者简介: 章晋勇 (1980-), 男, 博士研究生, 主要从事鱼类病原体分子生物学及免疫学研究.

通讯作者: 汪建国. Tel: 027-68780720. E-mail: wangjg@ihb.ac.cn

1.2 实验设计

1.2.1 常规完整孢子 ELISA 参照哺乳动物全细胞 ELISA 方法^[8],将圆形碘孢子用冷 PBS 稀释到 1×10^7 /mL,再指数级稀释到 1×10^1 /mL,各稀释度 100 μ L 孢子悬液加入 96 孔酶标板 (Poly Sorp, Nunc, Demark),置 4 $^{\circ}$ C 缓慢摇动 2 min 以使孢子分布均匀,立即置水平台式离心机 (Sigma),800 g,离心 3 min。小心轻微移出上清,显微镜观察孢子于酶标孔分布情况。酶标孔多余位点用 200 μ L 终浓度为 3% 的 BSA 的 PBS 液于 37 $^{\circ}$ C 封闭 30 min,冷 PBS 洗涤 3 次 (重悬、离心),其后行常规非贴壁全细胞 ELISA。

1.2.2 几种常用固定液的效果比较 1×10^6 个孢子经上述方法沉淀于 96 孔酶标板后,分别以 10% 甲醛、丙酮、95% 乙醇与 5% 冰醋酸混合液、1.5% 多聚甲醛、0.25% 戊二醛 4 $^{\circ}$ C 固定 10~20 min,冷 PBS 洗涤 3 次,其后同 1.2.1,比较不同固定剂的效果及其与未经固定液作用的对照组间的差异。

1.2.3 不同浓度多聚甲醛及戊二醛效果比较 选择 1.2.2 的效果最好的固定剂,即多聚甲醛、戊二醛进行溶度优化,孢子包被浓度及方法同上。

1.2.4 敏感性测定 以 1.2.3 优化的固定液浓度,对均匀平铺于酶标孔的指数级系列稀释的完整孢子进行固定,后按上述方法行常规非贴壁全细胞 ELISA,检测其敏感度。

以上实验,阳性血清为本实验室参照鲁义善^[1]报道的方法以完整孢子悬液制备并保存,效价达 1:25 600,用 PBS 稀释至 1:2 000 后为本实验所用。正常小鼠血清为阴性对照,冷 PBS 作空白对照,洗涤液为 PBST (0.01 mol/L PBS + 0.5% Tween),终浓度为 3% 的 BSA 的 PBS 液为封闭剂,HRP 标记的羊抗小鼠 IgG (武汉博士德) 为二抗,显色底物为 TMB,每组重复 3 次,结果取平均值 + 标准误差 ($\bar{X} \pm SE$)。OD_S/OD_N > 2 (S 为待测样本, N 为阴性对照) 记为阳性。

1.2.5 计算方法 采用 SPSS 10.0.7 软件^[1] 统计分析。

2 结果

经水平离心,孢子沉淀于酶标孔底部,行常规全细胞 ELISA,但每一步洗涤采用离心、重悬,结果见图 1。

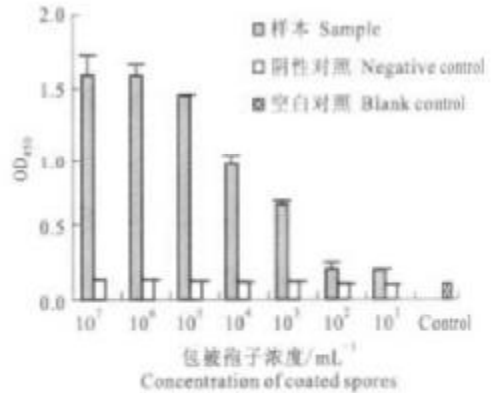


图1 常规完整孢子 ELISA 敏感性评价

Fig.1 Evaluation of sensitivity of readily enzyme-linked immunosorbent assay against intact mature *Mycobacterium rotundus* spores

结果表明,尽管圆形碘孢子的表面结构与哺乳动物细胞等存在极大差别,但通过机械作用固定后,常规全细胞 ELISA 依然可以发挥作用,最低可检测 100 个左右完整孢子,且结果可靠,重复性好。为进一步提高检测灵敏度,用不同固定剂对平铺于酶标孔的孢子进行固定后,行常规细胞 ELISA,发现多聚甲醛及戊二醛的固定效果优于其他几种固定液,与未固定的对照组差异显著 ($P < 0.01$),而其他几种固定剂效果不明显 ($P > 0.05$) (图 2),尤其是丙酮,严重损坏酶标板,不宜用于此实验。

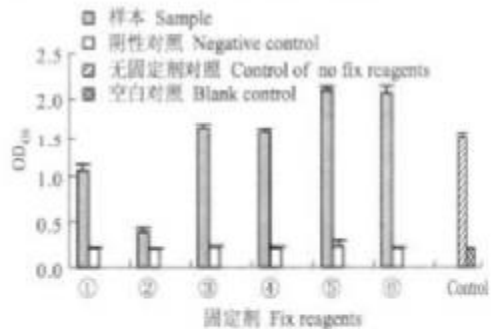


图2 不同固定剂的效果比较

(包被孢子浓度为 1×10^6 /mL)

①甲醛, 10%; ②丙酮, 10%; ③乙醇 95% + 冰醋酸 5%; ④无水乙醇; ⑤多聚甲醛, 1.5%; ⑥戊二醛, 0.25%

Fig.2 Comparative study of effect of six different readily fix reagents on intact spore in ELISA

(Concentration of coated spores is 1×10^6 /mL)

①Methanol, 10%; ②Dimethylketone, 10%; ③Ethanol 95% + Ice acetic acid 5%; ④Dimethylketone; ⑤Parformaldehyde, 1.5%; ⑥Glutaraldehyde, 0.25%.

分别进一步优化多聚甲醛及戊二醛最佳固定浓度,结果显示2%的多聚甲醛的效果最好,与未经固定的对照组比较,效果显著($P < 0.05$),而戊二醛在

浓度为0.25%时效果最佳($P < 0.05$),分布于此刻度两边的浓度都不及此浓度效果,与未经固定的对照组无显著差异($P > 0.05$)(图3、4)。

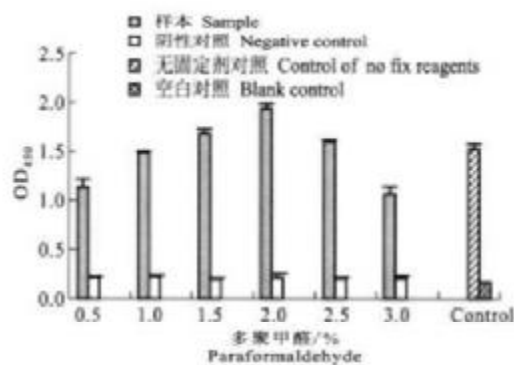


图3 不同浓度多聚甲醛效果比较

Fig.3 Comparative fix effect of different concentration of paraformaldehyde on intact myxosporean spores in ELISA

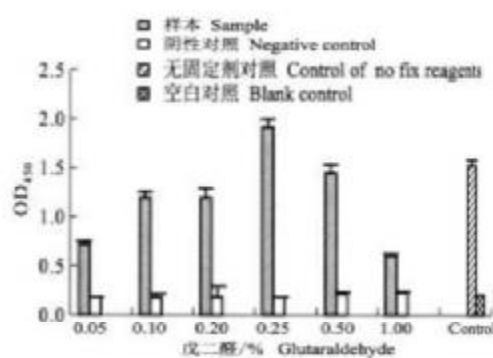


图4 不同浓度戊二醛的固定效果比较

Fig.4 Comparative fix effect of different concentration of glutaraldehyde on intact myxosporean spores in ELISA

敏感性检测显示,2%的多聚甲醛和0.25%的戊二醛的检出率相近,最低均可检出低至10个左右完整的成熟孢子,比未经固定的对照组敏感性要高

出一个数量级,说明经两者固定后所建立的ELISA敏感性均较好(图5、6)。

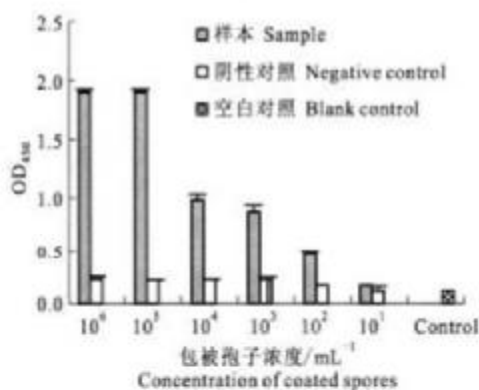


图5 2%多聚甲醛的灵敏度评价

Fig.5 Evaluation of sensitivity of 2% paraformaldehyde in the intact spores ELISA

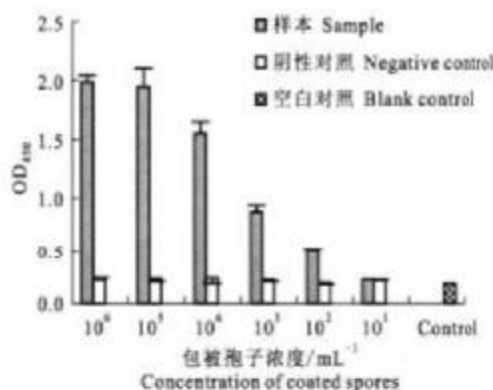


图6 0.25%戊二醛的灵敏度评价

Fig.6 Evaluation of sensitivity of 0.25% glutaraldehyde as fix reagent in the intact spores ELISA

3 讨论

黏孢子虫的免疫学研究已越来越受到寄生虫学家、鱼病学家等的重视^[14],国内对圆形碘泡虫的免疫学研究已做了许多工作^[1,3,12]。先前的工作大都基于成熟孢子破碎后的可溶性蛋白为包被抗原,但

存在两个问题:①由于破碎方法较激烈,许多孢子表面分子将失去天然活性,这可能造成检测或鉴定结果产生人为误差;②孢子发育研究认为孢子壳瓣与孢子内部结构是由生活史中同一孢子母细胞的不同分化细胞发育而成,对两者免疫原性差异的研究应将两者对应抗原分开研究而不是混合起来。另外,

宿主对寄生虫的免疫抵御首先是通过其免疫系统对寄生虫表面抗原分子的识别^[9],大部分黏孢子虫的孢子是其生活史中寄生虫与宿主接触时间最长的生命形式,对其表面结构的研究及鉴定在黏孢子虫免疫诊断、防治中有着重要的意义。国外报道了许多鱼类黏孢子虫的感染可能是始于放射孢子虫而并非成熟黏孢子虫,但迄今在生活史研究中发现存在放射孢子虫阶段的种类仍屈指可数,尚不能排除某些属种直接感染的可能性。若直接感染存在,那么孢子在寡毛类等的消化道中适当环境释放极丝(孢原质)启动感染开始,孢子表面的某些分子很可能就是宿主识别的靶分子(受体)而参与极丝的释放。当然,也可能存在类似微孢子虫通过离子通道释放极丝的机制^[10]。但是,两种极丝释放机制都与孢子表面的结构分子有必然的关系。再之,由于黏孢子虫种类及其繁多,相近种之间的形态学差异有时非常小,种特异性或属特异抗原分子的存在为病原鉴定及分类学、系统发育学研究奠定了基础。Chase^[11]等运用斑点免疫印记(dot-blot),用制备的高效价兔抗成熟 *Kudoa thyrsites* (Myxozoa: Myxosporae) 孢子多抗血清,从患病鱼肌肉中最低可检出 10 个左右的完整成熟孢子。基于以上原因,认为黏孢子虫的表面结构的研究对黏孢子虫的免疫诊断、防治是十分必要的,且对黏孢子虫分类及系统发育学研究也有一定的辅助意义。作者以圆形碘孢虫为例,初步探索了鱼类黏孢子虫完整孢子 ELISA 的可行性,建立了针对圆形碘孢虫孢子表面抗原分子的 ELISA 方法,最低可检出 10 个左右的成熟孢子。可望为圆形碘孢虫孢子表面结构及其他相关问题的研究提供可行的工具,并应用于所有存在成熟孢子期的鱼类黏孢子虫的研究。实验结果显示,经戊二醛和多聚甲醛固定后,敏感性要高于常规完整孢子 ELISA 一个数量级,这可能是由于孢子壳瓣的特殊性质引起的。孢子壳瓣含有大量的几丁质成分^[13],这些成分可能封闭了一些表面抗原表位,而经固定剂处理后,恰恰暴露了这些表位。然而,固定剂也是一把双刃剑,某些固定剂能导致孢子表面抗原表位的破坏,而使结果不理想,如丙酮、甲醛等。戊二醛和多聚甲醛的浓度变化产生了不同的实验结果也说明了这点。另外,由于孢子表面不同部位抗原物质的不尽相同^[1,7,12,14],如果孢子以单一朝向平铺于酶标孔表面,也将影响 ELISA 的效果,但本实验中离心孢子后,镜检发现孢子并不是以单一朝向覆盖于酶标孔

的,从而有利于对分布于孢子不同部位的抗原进行研究。尽管本研究报道的方法在种属鉴定或病原诊断方面与 Chase 等^[11]报道的斑点免疫印记法敏感性相当,但操作要相对简单,且 Chase 等的方法只能用于检测或鉴定,而本实验的方法既能辅助种属鉴定或病原检测,也可用于黏孢子虫成熟孢子表面结构及组成的研究,如筛选与黏孢子虫孢子表面分子的特异性配体,进而绘制其表面分子抗原谱,探索孢子表面分子在宿主免疫识别或逃避宿主免疫监视中的作用等。

为避免固定剂的不利因素,受抗体酶标记的启发^[8],本实验尝试通过戊二醛的交联作用将孢子与 BSA 交联起来,从而利用 BSA 将孢子包被于酶标孔,但镜检发现,戊二醛并不能将孢子与 BSA 交联,这也说明了孢子壳瓣结构的特殊性质,抗原物质并不完全是裸露于表面的。同时,根据 Kim^[16]等利用多聚赖氨酸成功包被 *Glugea plecoglossi* (Microspora) 孢子于酶标板而行常规 ELISA 的报道,作者也尝试这种方法包被圆形碘孢虫孢子,但结果不甚理想,主要表现为包被的孢子经不住严格条件的洗涤。故而认为,采用多聚甲醛或戊二醛尽管有其缺陷,但只要针对所检测的特定虫种摸索适宜的浓度,还是可以取得理想的结果。

参考文献:

- [1] 鲁义善. 圆形碘孢虫病和我国黏孢子虫部分属种的系统分类[D]. 武汉: 中国科学院水生生物研究所, 2003.
- [2] 沈关心, 周改麟. 现代免疫学实验技术[M]. 武汉: 湖北科学出版社, 2002.
- [3] 鲁义善, 吴英松, 汪建国. 圆形碘孢虫的分离纯化与繁殖[J]. 水生生物学报, 2002, 25(4): 431-432.
- [4] Muniberria R, Hoogenboom H R, Linden E van der, et al. Model systems to study the parameters determining the successful phage antibody selections on complex antigens[J]. J Immunol Methods, 1999, 231: 65-81.
- [5] Wong C, Waibel R, Sheets M, et al. Human scFv antibody fragments specific for the epithelial tumour marker MUC-1, selected by phage display on living cells[J]. Cancer Immunol Immun, 2001, 50: 93-101.
- [6] 王世中. 免疫化学技术[M]. 北京: 科学出版社, 1980.
- [7] 吴英松, 汪建国. 圆形碘孢虫免疫原性的研究[J]. 水生生物学报, 2000, 24(3): 246-251.
- [8] 董志伟, 王 斌. 抗体工程[M]. 北京: 北京医科大学出版社, 2001.
- [9] Picchiotti S, Terrilli F R, Mastrolia L, et al. Expression of lymphocyte antigenic determinants in developing gut-associated lym-

- phoid tissue of the sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) [J]. *Anat Embryol*, 1997, 196: 457-463.
- [10] Kim J, Ogawa K, Wakabayashi H. Lectin-reactive components of the microsporidian *Glugea plecoglossi* and their relation to spore phagocytosis by head kidney macrophages of ayu *Plecoglossus altivelis* [J]. *Dis Aquat Organ*, 1999, 39: 59-63.
- [11] Chase J C, Booy M H, Dawson-Contes J A, et al. Immunological detection of *Kudoa thyxites* spores in muscle tissues of farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L. [J]. *J Fish Dis*, 2003, 26: 427-431.
- [12] Lu Y S, Nie P, Sun B J. Detection of *Myxobolus rotundus* (Myxozoa: Myxosporae) in skin mucus of naturally infected crucian carp *Carassius auratus auratus* by using monoclonal antibody [J]. *Dis Aquat Organ*, 2003, 54: 171-173.
- [13] 鲁义善, 汪建国. 黏孢子虫(黏体动物门: 黏孢子虫纲)的研究现状[J]. 中国水产科学, 2000, 7(1): 103-106.
- [14] 汪建国, 吴英松, 鲁义善. 黏孢子虫免疫学研究进展[J]. 水生生物学报, 2003, 27(5): 539-541.
- [15] Lu Y S, Li M, Wu Y S, et al. Antigenic study of *Myxobolus rotundus* (Myxozoa: Myxosporae) using monoclonal antibody [J]. *J Fish Dis*, 2002, 25: 307-310.
- [16] Kim J H, Yokoyama H, Ogawa K, et al. Humoral immune response of Ayu, *Plecoglossus altivelis* to *Glugea plecoglossi* (Protozoa: Microspora) [J]. *Fish Pathol*, 1996, 31(4): 215-220.

Establishment of an ELISA against mature intact *Myxobolus rotundus* spores

ZHANG Jin-yong^{1,2}, WANG Jian-guo¹, WU Ying-song³, LI Ming³

(1. Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 2. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Institute of Tropical Medicine, The First Military Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract: The importance of surface molecules of intact mature myxosporeans spores has been increasingly recognized in recent years. For further understanding the characterization of them, selecting the specific ligands, e. g. monoclonal antibody or antibody fragments against them and mapping candidate antigens of diagnostic and protective interest and exploring the significance of them in the relationship of parasite-host, it is need to establish a rapid and simple practical method for detecting and selecting mature intact spores. In present work, we explored the feasibility of ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) against intact mature *Myxobolus rotundus* spores and evaluated the effect of several readily fixed reagents, including acetone, formaldehyde, ethanol, glutaraldehyde and paraformaldehyde, on the ELISA, derived from the strategy of characterizing target molecular (receptor) of cell surface of tumours in medicine and the normal fixing methods in immunohistochemistry. The results showed that 0. 25% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde had preferred effect than unfixed control and the other fixed reagents under investigation in present work and represented almost equal sensitivity which they could detect as low as 10 intact mature spores. The steady and reproductive of the way was demonstrated by the statistic analysis. So a simple, rapid and sensitive ELISA method were preliminarily established for detecting mature intact *M. rotundus* spores and the specific ligands of the surface molecules of them were selected. The tool would be able to apply to all fish parasitic myxosporean species with mature spore stage. The potential implication of the method in diagnosis of pathogen, assisting determination of specific species, phylogeny, screening the specific antigen molecules of diagnosis and protective interest, and other basic biology of fish myxosporae were also discussed.

Key words: intact spore; ELISA; *Myxobolus rotundus*; myxosporae

Corresponding author: WANG Jian-guo. E-mail: wangjg@ihb. ac. cn

* This research was supported by the grants from National Science Foundation of China (30271028) and the Programme for Knowledge Innovation of the Chinese Academy Sciences (KSCX 2-1-04).