

## 抗堆型艾美耳球虫子孢子单抗对阶段特异性抗原的识别

王承民<sup>1</sup>, 秦建华<sup>2</sup>, 郑素玲<sup>1</sup>, 何宏轩<sup>3</sup>, 杭柏林<sup>1</sup>, 魏刚才<sup>1</sup>, 陈桂香<sup>1</sup> (1. 河南科技学院 细胞工程重点实验室, 河南 新乡 453003; 2. 河北农业大学 动物科技学院, 河北 保定 071001; 3. 中国科学院动物研究所 国家野生动物疫病研究中心, 北京 100080)

**摘要:** 为了用针对堆型艾美耳球虫子孢子的 5 株单抗检测各代裂殖子的反应性, 分别用甲醇、丙酮、戊二醛和自然干燥等 4 种固定方法处理裂殖子, 观察其对染色结果的影响; 并运用免疫荧光技术 (IFA), 对单抗和裂殖子进行染色。结果显示, 5 株单抗中, 单抗 Easp-3H6 和单抗 Easp-5G10 识别堆型艾美耳球虫裂殖子的抗原位于裂殖子的顶端, 单抗 5B4 对各阶段裂殖子有较弱的反应, 而单抗 Easp-3G3 和 5G7 不与堆型艾美耳球虫任何一代的裂殖子发生反应, 表明鸡堆型艾美耳球虫的侵入阶段存在共有抗原, 即种内各发育阶段的抗原。

**关键词:** 堆型艾美耳球虫; 免疫荧光; 裂殖子; 单克隆抗体

中图分类号: S852.72 文献标识码: A 文章编号: 1005-4545(2008)01-0048-03

## Stage-specific antigens identified by monoclonal antibody against *Eimeria acervulina* sporozoites

WANG Cheng-min<sup>1</sup>, QIN Jian-hua<sup>2</sup>, ZHENG Su-ling<sup>1</sup>, HE Hong-xuan<sup>3</sup>, HANG Bo-lin<sup>1</sup>, WEI Gang-cai<sup>1</sup>, CHEN Gui-xiang<sup>1</sup> (1. Cell Engineering Key Laboratory, Henan College of Science and Technology, Xinxiang, Henan 453003, China; 2. College of Animal Science and Technology, Hebei Agricultural University, Baoding, Hebei 071001, China; 3. State Research Center for Wildlife Animal Disease Control, Institute of Zoology in Chinese Academy of Science, Beijing 100080, China)

**Abstract:** To detect stage-specific antigen of merozoites by five monoclonal antibodies against sporozoites of *Eimeria acervulina*. *E. acervulina* merozoites were fixed through air-dried, acetone, methanol and glutaraldehyde, then stained by immunofluorescence assay (IFA) and the reactivity between McAbs and merozoites was observed. The results showed among the five McAbs, apical antigens recognized by the McAbs Easp-3H6 and Easp-5G10 were localized on the apical tip of merozoite from all stages of development. The McAb 5B4 reacted very weak with merozoites from all generations whereas McAb Easp-3G3 and 5G7 did not react with merozoites from any generation, suggesting that the invasive stage of *Eimeria acervulina* share the cross reactive antigens which are inter-generation-specific and might be the components of a potential recombinant vaccine.

**Key words:** *Eimeria acervulina*; immunofluorescence; merozoite; monoclonal antibody

球虫病是禽类最主要的肠道寄生性原虫病, 全球广泛流行, 给养禽业造成严重的经济损失<sup>[1,2]</sup>。1995 年英国暴发的球虫病, 造成高达 4 000 万英镑的损失<sup>[3]</sup>, 所感染艾美耳球虫有 7 个种之多<sup>[4]</sup>。这些球虫寄生在消化道内, 引起不同程度的病理变化, 产生不同的免疫原性。

目前, 球虫病仍依赖化学药物预防和控制, 但是由于开发新药的成本高, 艾美耳球虫抗药菌株出现快及活疫苗的潜在危险性等原因, 重组蛋白基因工程疫苗和禽免疫性的遗传改良成为目前研究的重点和热点。最理想的球虫疫苗应该是多种艾美耳球虫

抗原及其不同阶段的共有抗原<sup>[1]</sup>, 尤其与宿主细胞识别和侵入有关的那些抗原<sup>[5]</sup>。要达到这一目的, 必须先制备抗球虫的单抗, 鉴定免疫保护性抗原。但是, 目前制备的多数是孢子单抗或裂殖子单抗, 如能制备出既可识别孢子也可以识别裂殖子的单抗, 找出孢子和裂殖子的共有抗原, 即可制备出针对球虫侵入阶段的基因工程重组蛋白。本试验就近 2 年建立的堆型艾美耳球虫子孢子的单抗, 能否识别堆型艾美耳球虫的各代裂殖子进行了研究。

### 1 材料与方法

**1.1 单克隆抗体细胞株及实验动物** 5 株抗鸡堆型艾美耳球虫子孢子的单克隆抗体杂交瘤细胞为 5B4、5G7<sup>[6]</sup>、Easp-3G3、Easp-5G10 和 Easp-3H6, 其中

收稿日期: 2006-03-13

基金项目: 河南科技学院重点资助项目(200313)

作者简介: 王承民(1978), 男, 硕士。

5B4 和 5G7 是河北农业大学动物科技学院秦建华教授惠赠并经过针对孢子的鉴定; Easp-3G3、Easp-5G10、Easp-3H6 由本实验室制备, 这 3 株抗体是用孢子为抗原直接免疫动物, 通过杂交瘤技术筛选出来的。试验用 27 日龄的小公鸡(Hyline), 无球虫环境饲养。

**1.2 主要试剂** 羊抗鼠的荧光二抗购于华美生物公司; 其他常规试剂均购于华美生物公司; DEAE-52 纤维素(Whatman); 培养基(0.25% 胰蛋白酶, 1% 牛胆酸盐, 于 HBSS 中调 pH 值至 7.4)。

**1.3 主要仪器设备** 高速低温台式离心机(3K-18, Sigma); 紫外分光光度计(国产); 荧光显微镜(日本)。

**1.4 单抗的纯化和质量浓度测定** 应用 A 蛋白亲和层析法纯化单克隆抗体<sup>[7]</sup>。纯化的抗体采用紫外分光光度计进行质量浓度测定, 抗体质量浓度为 0.93 mg/L。

**1.5 裂殖子的制备** 将孢子化的堆型艾美耳球虫卵囊口服接种于 27 日龄的小公鸡(Hyline), 分别以 3 个剂量接种即  $1 \times 10^8$ 、 $2 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^6$  个/mL。感染后 48 h 折颈杀鸡, 获取第 1 代和第 2 代裂殖子; 感染后 72 h, 获取第 2 代和第 3 代裂殖子; 感染后 85 h, 获取第 3 代和第 4 代裂殖子。裂殖子的制备具体过程是: 快速切开小肠, 用冷的 PBS 冲洗 2 次, 将肠壁切成  $4 \text{ mm} \times 4 \text{ mm}$  的小块, 放到培养基中, 在  $41^\circ\text{C}$  的水浴中培养 30 min, 边培养边轻微震荡。培养后的混合物用棉纱布过滤, 快速离心,  $5^\circ\text{C}$   $700 \times g$  离心 2 min, 以除去大碎片。裂殖子通过 DEAE-52 纤维素柱进行纯化。

### 1.6 裂殖子的固定方法

**1.6.1 甲醇固定** 将裂殖子涂于洁净的载玻片上, 用冷的甲醇固定 2 min, PBS 冲洗 3 次后干燥。

**1.6.2 丙酮固定** 用丙酮固定 5 min, PBS 冲洗 3 次后干燥。

**1.6.3 戊二醛固定** 用含 2% 戊二醛的 PBS 固定 15 min, PBS 冲洗 2 次干燥。

**1.6.4 空气干燥** 于室温干燥。

将不同方法固定了的带有裂殖子的玻璃片放置  $-20^\circ\text{C}$  备用。

**1.7 间接免疫荧光染色** 将不同方法固定的带有裂殖子的载玻片于湿盒中, 与 100  $\mu\text{L}$  单抗抚育, 室温 40 min 或  $4^\circ\text{C}$  过夜; PBS 冲洗 3 次, 再与 100  $\mu\text{L}$  荧光二抗(1:1 000, 1% 的 BSA/PBS) 分别作用 40 min 或 4 h; 用 PBS 冲洗 3 次, 立即于荧光显微镜下观察。健康非免疫鼠的血清作为阴性对照。

## 2 结果

各种抗体与堆型艾美耳球虫裂殖子在不同固定方法处理中的反应情况见表 1。单抗 Easp-5G10 和单抗 Easp-3H6 可以识别用不同固定方法处理的各代裂殖子, 这 2 株抗体所识别的抗原位于裂殖子的顶端。总的来说, 单抗 Easp-5G10 比 Easp-3H6 的染色信号要强。在所有被单抗所识别的裂殖子中, 感染后 72 h 收集的要比 48 h 和 85 h 收集的染色信号强。这一现象的真正原因目前还不清楚。裂殖子的染色强度与孢子的染色强度极为相关, 在这 3 种抗体即 Easp-5G10、Easp-3H6、5B4 中, Easp-5G10 着色强度最大, 其次是 Easp-3H6 和 5B4, 这表明它们所识别的抗原共同存在于裂殖子和孢子上, 这种抗原最可能是在侵入过程中具有相同的功能。

表 1 不同固定方法处理的堆型艾美耳球虫裂殖子与不同抗体反应情况

单抗	自然干燥	甲醇固定	丙酮固定	戊二醛固定
5B4	-/+	-/+	-/+	-
5G7	-	-	-	-
Easp-3G3	-	-	-	-
Easp-5G10	+	+	+	-
Easp-3H6	+	+	+	-

注: + 为强染色信号; -/+ 为弱染色信号; - 为无染色信号

不论用哪种固定方法固定的裂殖子, 单抗 5G7 和 Easp-3G3 都没有出现任何染色信号。而用戊二醛固定的裂殖子, 不论是哪种抗体也没有出现染色信号, 原因可能是戊二醛破坏了抗体所识别的裂殖子抗原表位。

## 3 讨论

因为艾美耳球虫在细胞内的发育不是同步的, 即裂殖生殖阶段互相重叠<sup>[8-10]</sup>。当鸡感染大量的球虫卵囊后, 孢子侵入后会延迟发育, 研究证明已在感染后的至少 60 h 在组织切片中观察到了未发育或发育的孢子<sup>[8, 10]</sup>。所以在选择获取裂殖子的时间点上, 本试验充分考虑到堆型艾美耳球虫的生活史中出现的重叠裂殖生殖阶段, 分别在感染后 45、72、85 h 这 3 个不同时间点收集虫体, 可以认为所收集的虫体中已经包含了各代的裂殖子。

本试验结果表明, 自然干燥的裂殖子染色最强, 其次是丙酮和甲醇固定的裂殖子, 这表明抗体对裂殖子抗原识别的敏感性受固定液的影响, 尤其是甲

醇。Augustine 等<sup>[11]</sup>研究表明, 甲醇处理的堆型艾美耳球虫的子孢子与抗体的反应性会降低。抗原抗体反应的敏感性降低, 有机溶剂也许是一个原因, 但是, 目前我们还未能通过实验手段, 如蛋白质杂交方法检测出他们的相对分子质量或通过免疫电镜技术将其在子孢子内准确定位。戊二醛固定的虫体没有任何染色, 原因可能是戊二醛与抗原交联形成的分子桥不允许抗体接近。Augustine 等<sup>[12]</sup>用鼠抗体和戊二醛处理的艾美耳球虫孢子反应的实验中也观察到了这一现象, 还发现自然干燥的子孢子染色和戊二醛固定的子孢子染色结果是截然不同的, 原因是戊二醛可能破坏了子孢子的抗原表位。

顶体复合物在虫体-宿主细胞识别, 虫体的侵入和发育起到了重要作用。改变宿主细胞对子孢子或裂殖子的识别或人为阻断子孢子和裂殖子的侵入应该可以阻止球虫感染。在鸡的艾美耳球虫病中, 子孢子感染肠黏膜细胞可以激发宿主的保护性免疫<sup>[13]</sup>, 裂殖生殖阶段也可以提高宿主的这种保护性免疫<sup>[14]</sup>。因此, 艾美耳球虫侵入阶段共有抗原的鉴定和特征研究成为各国学者研究的热点。这些共有抗原分子所激发的保护性免疫作用, 可以阻断子孢子及其的进一步侵入和发育。2株单抗 Easp-5G10 和 Easp-3H6 识别堆型艾美耳球虫裂殖子抗原。有趣的是, 被 EASP-3H6 识别的抗原正好在堆型艾美耳球虫和布什艾美耳球虫的子孢子上, 被 Easp-5G10 识别的抗原也存在于鸡的所有艾美耳球虫孢子的顶端。这样, 单抗 Easp-5G10 就与鸡的艾美耳球虫侵入阶段的保守抗原反应。单抗 5G7 和 Easp-3G3 虽与子孢子抗原反应, 但是不与任何裂殖子抗原反应, 而 5B4 对裂殖子识别较弱。用这些单抗获得的结果证明了鸡的堆型艾美耳球虫孢子的顶体复合物和各代裂殖子之间有保守的抗原表位。Danforth 等<sup>[15]</sup>和 Lillehoj 等<sup>[16]</sup>, 用鼠的抗体或鸡抗体, 也证明了这种共有抗原的存在, 这些抗原大多数位于艾美耳球虫孢子和各代裂殖子的顶端。这说明艾美耳球虫侵入阶段即子孢子和裂殖子使用共同的抗原蛋白来识别和侵入宿主细胞。这些研究结果证明了艾美耳球虫各发育阶段存在共有抗原, 因此利用这些共有抗原去开发基因工程疫苗具有广阔的应用前景。

#### 参考文献:

[1] Lillehoj H S, Lillehoj E P. Avian coccidiosis: A review of ae-

quired intestinal immunity and vaccination strategies [J]. *Avian Dis*, 2000, 44: 408-425.

[2] 刘 晶, 郑世民, 胡京友. 雏鸡感染毒害艾美耳球虫后的体液免疫[J]. *中国兽医学报*, 2006, 26(4): 373-375.

[3] Vermeulen A N, Schaap D C, Schetters T P M. Control of coccidiosis in chickens by vaccination [J]. *Vet Parasitol*, 2000, 100: 13-20.

[4] Fernando M A. *Eimeria: Infections of the Intestine* [M] // Long P L. *Coccidiosis of Man and Domestic Animals*. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1990: 63-77.

[5] Castle M D, Jenkins D, Jenkins M C, et al. Characterization of a recombinant *Eimeria acervulina* antigen expressed in sporozoite and merozoite developmental stages [J]. *J Parasitol*, 1991, 77: 384-390.

[6] 王承民, 秦建华, 赵月兰, 等. 堆型艾美耳球虫 (*E. acervulina*) 单克隆抗体细胞株的建立 [J]. *中国兽医学报*, 2004, 24(1): 26-28.

[7] 周华蕾, 吕茂民, 王 娜, 等. 应用 A 蛋白亲和层析法纯化单克隆抗体 [J]. *生物技术通报*, 2005, (5): 72-74.

[8] Long P L. Studies on *Eimeria mixati* in chickens and a comparison with *Eimeria acervulina* [J]. *J Comp Pathol*, 1967, 77: 315-324.

[9] Vetterling J M, Doran D. Schizogony and gametogony in the life cycle of the poultry coccidium, *Eimeria acervulina* [J]. *J Parasitol*, 1966, 52: 1150-1157.

[10] Warren E W, Ball S J. Schizogonous stages of *Eimeria acervulina* [J]. *Nature*, 1967, 214: 829-830.

[11] Augustine P C, Danforth H D, McAndrew S J. Monoclonal antibodies reveal antigenic differences in refractile bodies of avian *Eimeria* sporozoites [J]. *J Parasitol*, 1988, 74: 653-659.

[12] Augustine P C, danforth H D. Use of monoclonal antibodies to study surface antigens of *Eimeria* sporozoites [J]. *Proc Helminthol Soc Wash*, 1987, 54: 207-211.

[13] Jenkins M C, Augustine P C, Barta J R, et al. Development of resistance to coccidiosis in the absence of merogonic development using X-irradiated *Eimeria acervulina* oocysts [J]. *Exp Parasitol*, 1991, 72: 285-293.

[14] Jenkins M C. Progress on developing a recombinant coccidiosis vaccine [J]. *Int J Parasitol*, 1998, 28: 1111-1119.

[15] Danforth H D, McAndrew S J. Hybridoma antibody characterization of stage specific and stage-cross-reactive antigens of *Eimeria tenella* [J]. *J Parasitol*, 1987, 73: 985-992.

[16] Lillehoj H S, Sasai K, Matuda H. Development and characterization of chicken B cell hybridomas secreting monoclonal antibodies that detect sporozoite and merozoite antigens of *Eimeria* [J]. *Poult Sci*, 1994, 73: 1685-1693.