

DOI:10.13350/j.cjpb.140912

• 论著 •

## 华支睾吸虫来源极性差异化合物的高效薄层色谱免疫分析\*

杨庆利<sup>1,2</sup>, 申继清<sup>3</sup>, 蒋智华<sup>2</sup>, 陈颖丹<sup>1</sup>, 周晓农<sup>1\*\*</sup>

(1. 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, 卫生部寄生虫病原与媒介生物学重点实验室, 世界卫生组织疟疾、血吸虫病和丝虫病合作中心, 上海 200025; 2. 广西壮族自治区疾病预防控制中心, 广西南宁 530028; 3. 广西医科大学寄生虫学教研室, 广西南宁 530021)

**【摘要】** 目的 探索华支睾吸虫 ESPs、虫卵和虫体水溶性组分中生物大分子极性和抗原性的差异并寻找可行的分离方法。方法 用 HPTLC 法分离华支睾吸虫 ESPs、虫卵和虫体的水溶性组分, 同时结合免疫染色法研究极性差异组分的抗原性。结果 用有机溶剂组合可将 ESPs、虫卵和虫体水溶性组分中极性强弱差异的化合物分离开。氯仿: 甲醇: 水(11: 9: 2)溶剂组合对弱极性化合物各组分有较好的分离效果。与虫卵相比较, ESPs 和虫体的弱极性组分较复杂。不能被有机溶剂展开的强极性组分的抗原性较强, 未检测出弱极性组分的抗原性反应。通过有机溶剂提取的弱极性组分可完全在水中复溶并被有机溶剂重新展开。结论 华支睾吸虫来源的水溶性组分中的弱极性化合物成分能通过有机溶剂组合进行有效分离。这为分离华支睾吸虫来源的脂类等弱极性生物大分子以及研究其病原相关分子模式的性质奠定了基础。

**【关键词】** 华支睾吸虫; 极性; 抗原性; HPTLC; 病原相关分子模式

**【中图分类号】** R383.22 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-5234(2014)09-0816-04

[Journal of Pathogen Biology. 2014 Sep; 9(9): 816-819.]

Using high-performance thin-layer chromatographic and immunological techniques to identify compounds with varying polarities from *Clonorchis sinensis*

YANG Qing-li<sup>1,2</sup>, SHEN Ji-qing<sup>3</sup>, JIANG Zhi-hua<sup>2</sup>, CHEN Ying-dan<sup>1</sup>, ZHOU Xiao-nong<sup>1</sup> (1. National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention; Key Laboratory of Parasite and Vector Biology, MOH; WHO Collaborating Center for Malaria, Schistosomiasis, and Filariasis, Shanghai 200025, China; 2. Guangxi Zhuang Autonomous Region Center for Disease Prevention and Control, Nanning 530028, China; 3. Department of Parasitology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

**【Abstract】 Objectives** To examine the polarity and antigenicity of biological macromolecules in water-soluble components from excretory-secretory products (ESPs), eggs, and adult worms of *Clonorchis sinensis* and to explore suitable methods of separating those components. **Methods** Water-soluble components were separated from ESPs, eggs, and adult worms using high-performance thin-layer chromatography (HPTLC). Differences in the antigenicity of compounds with varying polarities were analyzed using immunostaining with mouse antiserum against *C. sinensis*. **Results** Compounds with varying polarities were separated from the water-soluble components of ESPs, eggs, and adult worms via a combination of organic solvents. A chloroform:methanol:water solvent (11: 9: 2) was rather effective at separating compounds with a weak polarity. ESPs and adult worms had a more complex composition of compounds with a weak polarity than did eggs. Components with a strong polarity could not be extracted with organic solvents but they did appear to be highly antigenic. However, components with a weak polarity did not produce an antigenic reaction. In addition, water-soluble compounds with a weak polarity were extracted with a combination of organic solvents and they were redissolved in water and extracted again using organic solvents. **Conclusion** Compounds with a weak polarity were effectively separated from the water-soluble components of *C. sinensis* using a combination of organic solvents. This finding will facilitate the separation of compounds with a weak polarity, such as lipids, and provide a basis for examination of the pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) of *C. sinensis*.

**【Key words】** *Clonorchis sinensis*; polarity; antigenicity; HPTLC; pathogen-associated molecular patterns

研究发现, 寄生虫的排泄—分泌产物(excretory-secretory products, ESPs)、虫卵和虫体等均包含具有病原相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)活性的组分。PAMPs 与病原生物的致病过程和致病机制密切相关<sup>[1]</sup>。华支睾吸虫

\* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 31260221); 广西壮族自治区自然科学基金项目(No. 2010GXNSFB013066)。

\*\* **【通讯作者】** 周晓农, E-mail: ipdzhouxn@sh163.net

**【作者简介】** 杨庆利(1973—), 男, 河北人, 副主任技师, 博士后, 主要从事病原生物分子生物学和免疫学研究。

E-mail: eyangql@sina.com

(*Clonorchis sinensis*)是引起华支睾吸虫病(*clonorchiasis*)的病原体,但目前仍缺乏对其 PAMPs 本质的认识。根据病原生物 PAMPs 的极性可能与传统蛋白质抗原性物质具有差异的推测,本实验尝试用高效薄层色谱(high-performance thin-layer chromatographic, HPTLC)技术对来源于华支睾吸虫 ESPs、虫卵和虫体水溶性组分中的极性差异化合物做初步分析,并结合免疫测定对其抗原性进行比较。实验结果将有助于进一步对目标成分进行高效分离并研究其 PAMPs 性质。

## 材料和方法

### 1 材料

**1.1 主要试剂** 小鼠抗华支睾吸虫抗体血清和健康小鼠血清,均为本实验室制备并于 $-80^{\circ}\text{C}$ 保存。HRP-山羊抗小鼠 IgG(H+L)和 TMB 显色液购自碧云天(Beyotime)生物技术研究。氯仿(分析纯)和碘(分析纯)为上海凌峰化学试剂有限公司出品;甲醇(分析纯)为国药集团化学试剂有限公司出品。

**1.2 主要材料和仪器** Vivaspin 15R 超滤浓缩离心管(2 KD MWCO)为德国 Sartorius Stedim Biotech GmbH 公司生产;TLC Silica gel 60 F<sub>254</sub> 高效薄层层析板为德国 Merck KGaA 公司生产;超声波破碎仪为美国 Qsonica 公司生产;RVC2-18 真空离心浓缩仪为德国 Christ 生产。

### 2 方法

**2.1 华支睾吸虫 ESPs、虫卵和虫体的收集和处理** 用分离的华支睾吸虫囊蚴<sup>[2]</sup>接种家猫,3 个月后收获成虫并进行体外培养。成虫用台氏培养液(含 0.8% NaCl, 0.02% CaCl<sub>2</sub>, 0.02% KCl, 0.1% NaHCO<sub>3</sub>, 0.005% NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.01% MgCl<sub>2</sub> 和 0.5% 葡萄糖)于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO<sub>2</sub> 潮湿环境下培养 8 d。每隔 2 d 收集包含排泄一分泌产物和虫卵的培养液。培养液经 3 000 g 离心 15 min,收集包含 ESPs 的上清液。沉淀中加入无菌去离子水充分悬浮,自然沉淀 30 min,收集虫卵沉淀,并用去离子水重复洗 2 次。培养结束后剔除死亡虫体,鲜活虫体用去离子水洗 2 次。ESPs、虫卵和虫体标本于 $-80^{\circ}\text{C}$ 保存。

包含 ESPs 的培养上清液用 Vivaspin 15R 超滤浓缩离心管(2 KD MWCO)于室温以 3 000 g 离心 90 min(浓缩 30 倍),浓缩物用去离子水洗涤 2 次脱盐。重复上述离心浓缩步骤。取洗涤后虫卵 0.2 g,加入去离子水 3.0 ml,用超声波破碎仪冰浴条件下完全破碎虫卵,以 12 000 g 离心 15 min,取上层水溶性组分经离心浓缩后进行分析。取成虫虫体 0.5 g,加入去离子水 5.0 ml,用匀浆器充分匀浆,静置后取上清,以

12 000 g 离心 15 min,取中层水溶性组分进行分析。

**2.2 HPTLC 分析** 分别取 ESPs、虫卵和虫体的水溶性组分 2.0  $\mu\text{l}$ ,手工点样于高效薄层层析板,点样直径 2~3 mm,距离底边 1.5 cm,距离侧边 1.0 mm,自然干燥。在平底层析缸中分别以下列不同极性有机溶剂混合物为展开剂展开,展开距离自底边计 9.0 cm。使用的展开剂极性由弱至强顺序为:氯仿:甲醇:水(90:10:1),氯仿:甲醇:水(80:20:2),氯仿:甲醇:水(65:25:4),氯仿:甲醇:水(10:10:1),氯仿:甲醇:水(11:9:2),氯仿:甲醇:水(30:60:8)和氯仿:甲醇:水(1:7:2)。展开完成后取出薄层层析板自然干燥。将干燥后的层析板置于密闭的碘蒸气<sup>[3]</sup>中显色 5 min,显色后斑点用扫描仪记录结果。

**2.3 HPTLC 免疫测定** ESPs、虫卵和虫体的水溶性组分点样后用氯仿:甲醇:水(11:9:2)展开。干燥后的层析板于室温下浸渍于含 2.0% BSA 的 PBS(pH7.4)溶液中 2 h 以封闭硅胶表面的活性硅羟基;吸除封闭液,薄层板分别浸渍于 1:100 稀释的小鼠华支睾吸虫抗血清中,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育,用 PBS(pH7.4)洗 5 min $\times$ 3 次;层析板分别浸入 1:2 000 稀释的 HRP 标记山羊抗小鼠 IgG(H+L)中,室温下孵育 1 h,用 PBS(pH7.4)洗涤 5 min $\times$ 4 次;层析板稍干后滴加 TMB 溶液,室温下避光显色 5 min。展开后的层析板同时用稀释后的健康小鼠血清孵育作为阴性对照。斑点显色并干燥后用扫描仪记录结果。

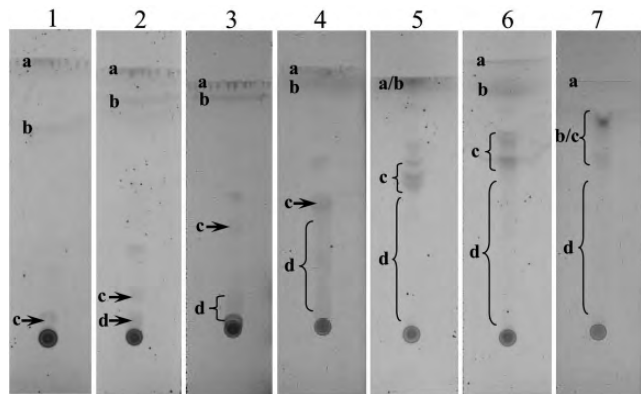
**2.4 弱极性组分的提取和分析** 将水溶性组分离心浓缩干燥,然后加入氯仿:甲醇:水(11:9:2)反复震荡溶解,以 12 000 g 离心 5 min,取上层溶解物经离心浓缩干燥,分别用去离子水和氯仿:甲醇:水(11:9:2)复溶,溶解后组分点样于薄层层析板,用氯仿:甲醇:水(11:9:2)展开后用碘蒸气染色,观察并记录结果。

## 结 果

### 1 华支睾吸虫来源水溶性高分子化合物的极性分析

分别用极性由弱至强的 7 种有机溶剂混合物对华支睾吸虫 ESPs、虫卵和虫体中水溶性组分进行展开。结果显示,水溶性组分中包含极性强弱各异的复杂化合物。按照极性由弱到强的分离顺序,将 ESPs 组分分为 a、b、c 和 d 4 组。极性由弱至强的 7 种有机溶剂混合物均能够将 4 组成分不同程度地展开。极性较弱的氯仿:甲醇:水(90:10:1)、氯仿:甲醇:水(80:20:2)和氯仿:甲醇:水(65:25:4)对 a 和 b 组分的展开效果较好,中等极性的氯仿:甲醇:水(10:10:1)、氯仿:甲醇:水(11:9:2)和氯

仿：甲醇：水(30 : 60 : 8)对 a、b、c 和 d 4 组成分均有较好的展开效果,极性较大的氯仿：甲醇：水(1 : 7 : 2)对 d 组成分具有较好的展开效果(图 1)。



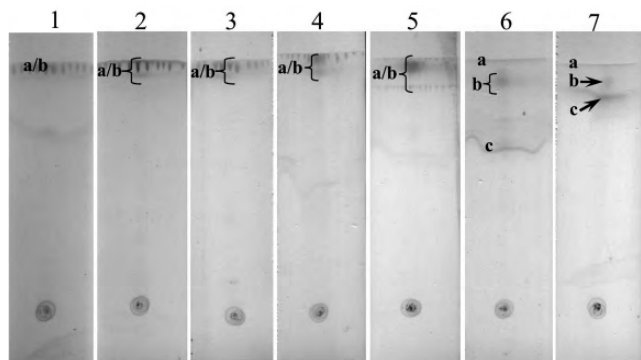
1~7 虫体水溶性组分分别用氯仿：甲醇：水(90 : 10 : 1/80 : 20 : 2/65 : 25 : 4/10 : 10 : 1/11 : 9 : 2/30 : 60 : 8/1 : 7 : 2)溶剂组合展开

图 1 华支睾吸虫 ESPs 水溶性组分的 HPTLC 分析

1—7 Spreading with combined organic solvents, chloroform : methanol : water (90 : 10 : 1/80 : 20 : 2/65 : 25 : 4/10 : 10 : 1/11 : 9 : 2/30 : 60 : 8/1 : 7 : 2) respectively

Fig. 1 Separation of water-soluble components of ESPs from *C. sinensis* by HPTLC

按照极性由弱到强的分离顺序,将虫卵组分为 a、b 和 c 等 3 组。其中,前 5 组极性较小的有机溶剂能够将 a 和 b 组分展开;后 2 组极性较大的有机溶剂可将 c 组展开(图 2)。



1~7 虫体水溶性组分分别用氯仿：甲醇：水(90 : 10 : 1/80 : 20 : 2/65 : 25 : 4/10 : 10 : 1/11 : 9 : 2/30 : 60 : 8/1 : 7 : 2)溶剂组合展开

图 2 华支睾吸虫虫卵水溶性组分的 HPTLC 分析

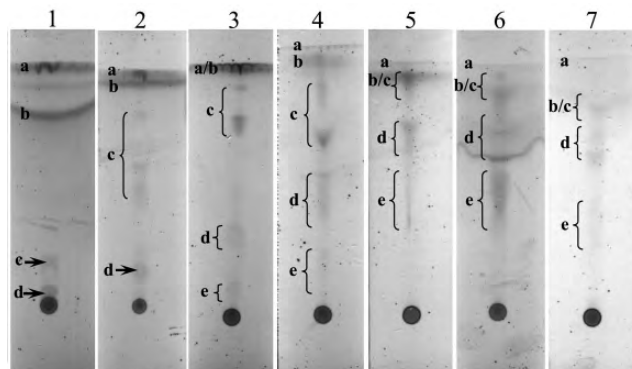
1—7 Spreading with combined organic solvents, chloroform : methanol : water (90 : 10 : 1/80 : 20 : 2/65 : 25 : 4/10 : 10 : 1/11 : 9 : 2/30 : 60 : 8/1 : 7 : 2) respectively

Fig. 2 Separation of water-soluble components of eggs from *C. sinensis* by HPTLC

虫体水溶性组分根据其极性由弱到强分为 a、b、c、d 和 e 等 5 组。随溶剂极性增加,5 组组分依次展开。其中,氯仿：甲醇：水(65 : 25 : 4)、氯仿：甲醇：水(10 : 10 : 1)、氯仿：甲醇：水(11 : 9 : 2)和氯仿：甲醇：水(30 : 60 : 8)有机溶剂组合对 5 组组分的展开效果均较好(图 3)。

华支睾吸虫来源的水溶性组分的极性复杂,其极性区间表现为连续性和非连续性特性。比较发现,

ESPs 和虫体组分较复杂,虫卵和虫体中极性小的 a 和 b 组分所占比例较高(图 1~3)。



1~7 虫体水溶性组分分别用氯仿：甲醇：水(90 : 10 : 1/80 : 20 : 2/65 : 25 : 4/10 : 10 : 1/11 : 9 : 2/30 : 60 : 8/1 : 7 : 2)溶剂组合展开

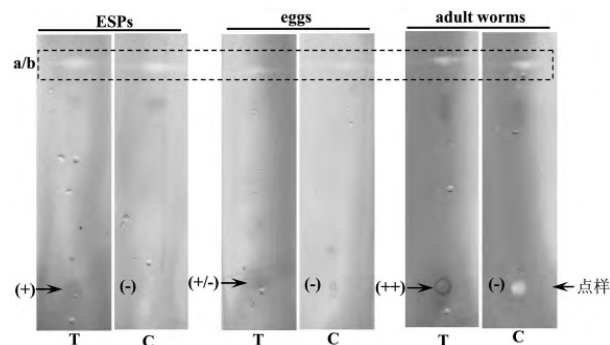
图 3 华支睾吸虫成虫匀浆中水溶性组分的 HPTLC 分析

1—7 Spreading with combined organic solvents, chloroform : methanol : water (90 : 10 : 1/80 : 20 : 2/65 : 25 : 4/10 : 10 : 1/11 : 9 : 2/30 : 60 : 8/1 : 7 : 2) respectively

Fig. 3 Separation of water-soluble components of adult worms homogenates from *C. sinensis* by HPTLC

## 2 水溶性组分的抗原性分析

用中等极性的氯仿：甲醇：水(11 : 9 : 2)分别将华支睾吸虫 ESPs、虫卵和虫体中水溶性组分展开,分别以小鼠抗华支睾吸虫血清为一抗,以健康小鼠血清为对照进行抗原性检测。结果显示与阴性对照相比,ESPs、虫卵和虫体未被展开的强极性组分均显示出不同程度的抗原性,其中虫体的极性组分抗原性最强,弱极性部分均未显示出明显的抗原性。极性最弱的 a 或/和 b 组分则表现为较强的疏水性,不能与免疫检测体系结合(图 4)。



a/b a 和 b 组分 (-) 阴性反应 (+/-) 疑似阳性反应 (+)/(++) 阳性反应 T 阳性血清 C 阴性对照

图 4 华支睾吸虫来源高分子化合物的 HPTLC 免疫分析

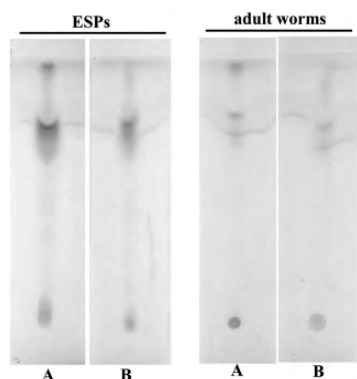
a/b Component a and b (-) Negative response (+/-) Suspected response (+)/(++) Positive response T Test using positive serum C Negative control

Fig. 4 Analysis of high-molecular compounds from *C. sinensis* by HPTLC and immunological methods

## 3 ESPs 和虫体弱极性组分的分离

ESPs 和虫体的水溶性组分经浓缩干燥后用氯仿：甲醇：水(11 : 9 : 2)有机溶剂溶解,分离复溶后的弱极性组分并分析。结果显示,复溶在氯仿：甲醇

:水(11:9:2)中的弱极性组分同时也能够在水中复溶,并重新被有机溶剂分离展开。HPTLC分析表明,被二者复溶后的弱极性组分被有机溶剂组合展开后的带型相同(图5)。



A 用氯仿:甲醇:水(11:9:2)溶解的 ESPs 和虫体弱极性组分 B 用水溶解的 ESPs 和虫体弱极性组分

图5 ESPs 和虫体弱极性组分的分离

A Dissolved in chloroform: methanol: water (11:9:2) B Dissolved in water

Fig. 5 Separation of weak-polar components

## 讨论

本实验采用极性梯度有机溶剂组合,通过HPTLC法分离华支睾吸虫来源的生物大分子。结果显示,ESPs、虫卵和虫体的水溶性组分中包含相当比例的弱极性生物大分子。其中,ESPs和虫体中分离出的弱极性组分较多且组成复杂。虫卵的水溶性组分中也包含较大比例的弱极性组分,但其组成较单一。ESPs、虫卵和虫体的水溶性组分中仍有大部分强极性组分不能被极性梯度有机溶剂分离。这些强极性组分具有较强的反应原性,而弱极性组分无明显免疫反应,尤其是极性最小的a或/和b组分不能与免疫检测系统反应。一般认为,来源于生物组织的脂类极性很弱,只能被非极性有机溶剂溶解<sup>[4]</sup>。然而,有研究发现芽孢杆菌中包含的极性脂类组分可被较弱极性有机溶剂组合溶解并展开<sup>[5]</sup>。本次实验从华支睾吸虫水溶性组分中分离到的弱极性组分也具有明显的脂类特征。但这些生物大分子的性质还有待进一步鉴定。

研究发现,寄生虫来源的蛋白质和脂类等复杂生物大分子中包含具有PAMPs性质的组分,它们可通过与免疫活性细胞的模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)相互识别,活化细胞内级联式信号转导途径,活化NF- $\kappa$ B等转录因子,促进细胞因子和其他免疫调控分子表达<sup>[6-8]</sup>。目前,对于华支睾吸

虫来源的极性蛋白类生物大分子的研究较多,这些蛋白类生物大分子多来自ESPs,具有较强的抗原性<sup>[9-11]</sup>。本实验结果表明,华支睾吸虫ESPs、虫卵和虫体的水溶性组分中含有弱极性、弱反应原性组分,这些成分具有脂类特征。这为研究华支睾吸虫的PAMPs和致病机制奠定了基础。

## 【参考文献】

- [1] 杨庆利,申继清. 寄生虫的病原相关分子模式研究进展[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2013, 3(3): 81-4.
- [2] 杨庆利,申继清,蒋智华,等. 基于核糖体DNA ITS区和COX1基因鉴别华支睾吸虫囊蚴[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2014, 32(3): 217-20.
- [3] 方海顺,周远华,苏广海. 薄层色谱法快速检测注射用脂溶性维生素(I)[J]. 中国医药工业杂志, 2013, 44(5): 483-6.
- [4] 王秀莉,姜鹏,董春光. 生物组织中脂肪鉴定方法的探索与比较[J]. 生物学通报, 2012, 47(11): 48-9.
- [5] 郭爱玲,方呈祥,邱玉斌,等. 芽孢杆菌模式菌株细胞极性脂组分的分析[J]. 分析科学学报, 2002, 18(2): 127-9.
- [6] Goodridge HS, Marshall FA, Else KJ, et al. Immunomodulation via novel use of TLR4 by the filarial nematode phosphorylcholine-containing secreted product, ES-62[J]. J Immunol, 2005, 174: 284-93.
- [7] Van der Kleij D, Latz E, Brouwers JF, et al. A novel host-parasite lipid cross-talk Schistosomal lyso-phosphatidylserine activates toll-like receptor 2 and affects immune polarization[J]. J Biol Chem, 2002, 277: 48122-9.
- [8] Retra K, Van Riet E, Adegnik AA, et al. Immunologic activity of schistosomal and bacterial TLR2 ligands in Gabonese children[J]. Parasite Immunol, 2008, 30(1): 39-46.
- [9] Ju JW, Joo HN, Lee MR, et al. Identification of a serodiagnostic antigen, legumain, by immunoproteomic analysis of excretory-secretory products of *Clonorchis sinensis* adult worms[J]. Proteomics, 2009, 9: 3066-78.
- [10] Huang Y, Zheng Y, Li Y, et al. Expression, immunolocalization, and serological reactivity of a novel sphingomyelin phosphodiesterase-like protein, an excretory/secretory antigen from *Clonorchis sinensis* [J]. Parasitol Res, 2013, 112(6): 2197-206.
- [11] Zheng M, Hu K, Liu W, et al. Proteomic analysis of different period excretory secretory products from *Clonorchis sinensis* adult worms: molecular characterization, immunolocalization, and serological reactivity of two excretory secretory antigens -methionine aminopeptidase 2 and acid phosphatase[J]. Parasitol Res, 2013, 112: 1287-97.

【收稿日期】 2014-07-18 【修回日期】 2014-09-12