

計畫編號：DOH95-DC-1115

行政院衛生署疾病管制局九十五年度科技研究發展計畫

日本血吸蟲分子免疫診斷試劑之開發與監測

計畫名稱

研究報告

執行機構：中臺科技大學醫學生物科技研究所

計畫主持人：李金木

研究人員：周維香、鄭柏青

執行期間：95年3月15日至95年12月31日

\*本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見\*

# 目 錄

頁 碼

封面

目 錄 (1)

壹、中文摘要 (2)

貳、英文摘要 (3)

參、本文

一、前言 (4-7)

二、材料與方法 (7-10)

三、結果 (10-13)

四、討論 (13-15)

五、結論與建議 (15-16)

六、計畫重要研究成果及具體建議 (16)

七、參考文獻 (16-20)

八、圖、表 (21-29)

肆、附錄

共 (29) 頁

## 壹、 中文摘要

日本血吸蟲為人畜共通寄生蟲，流行於印尼、菲律賓及中國大陸等亞洲國家，其中以中國大陸最為嚴重。日本血吸蟲病會導致人類及動物的各種組織性疾病，亦即在蟲卵周圍之宿主組織如肝、脾、肺、腸等器官會形成肉芽腫性的高度過敏性反應，造成肝脾腫大，最後患者往往因肝硬化、腹水形成、門靜脈血流阻塞等病症死亡。近年大陸長江流域洪水氾濫，導致地區釘螺擴散，加上三峽水庫的建造，更易造成血吸蟲病大流行。大陸衛生部在去年八、九月間連續發佈報導大陸血吸蟲病疫情明顯回升，新疫區不斷增加。此外，台灣同胞每年赴大陸地區從商、探親、觀光及求學之人數超過三百萬人次，因此感染大陸株日本血吸蟲的機會很高。現今兩岸之間走私風氣猖獗，一些不法集團可能經由走私管道將牲畜運進台灣，導致病原引進。目前金、馬地區與對岸間已進行小三通，加上台灣與大陸已同時加入 WTO，兩岸之交流勢必日趨頻繁，此舉對國內的衛生及防疫工作而言，無疑是一項重大挑戰。本研究計畫之主旨在利用分生技術開發日本血吸蟲症專一性的免疫檢測試劑，應用於此重要人畜共通傳染症的臨床診斷。本研究計畫之執行與完成，除能經由精確診斷，早期發現，迅速治療，挽救病人生命外，最大的目的在於發展高品質的防疫技術，提昇防疫工作的專業和效率，以避免此寄生蟲感染症在台灣可能發生的風險及傳播，做好國內防疫工作，減少國家醫療保健的負擔及總體經濟力的損失。

關鍵詞：日本血吸蟲病；快速檢測試劑；麩氨基硫轉移酶；酵素聯結免疫分析；專一性及靈敏度；閾值

## 貳、英文摘要

This study reports the efficacy of a immuno-diagnostic antigen, the 26 KDa glutathione S-transferase (26 KDa GST), obtained from a Chinese strain of *Schistosoma japonicum*. The cDNA of 26 KDa GST from the total RNA of adult worm was synthesized and amplified by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), followed by the subcloning and sequencing. The recombinant protein of 26 KDa GST were then expressed in *Escherichia coli* strain M15. The results showed that sera from the mice immunized with either the native GSTs or recombinant GST26 can recognize the recombinant GST26 (rGST26) and native GSTs. The level of anti 26 KDa GST IgG antibodies in infected patients was significant higher than in the normal controls. Antisera also recognized the reSjc26GST, purified from gene expression products, a 26 KDa protein on Western blot. These results suggest that the recombinant GST expressed in *E. coli* should be an effective diagnostic reagent for detection of antibody to *S. japonicum* in patients and no cross-reactivity. Due to the ease of produce, good sensitivity, and excellent specificity, the reSjc26GST described in this study are considered as a candidate protein for the immunological diagnosis of schistosomiasis.

Key words : *Schistosoma japonicum* ; glutathione S-transferase ; Immunological diagnosis

## 參、 本文

### 一、前言

血吸蟲病 (schistosomiasis) 為世界衛生組織 (WHO) 所列管的第二重大寄生蟲感染症。根據 WHO 的統計，全世界有 74 個國家，2 億的人口受到此疾病的感染。在開發中國家更有 5-6 億人口遭受到血吸蟲病的威脅 (Bergquist, 1995; Crompton, 1999)。人體常見的三種血吸蟲病為日本血吸蟲病、曼氏血吸蟲病與埃及血吸蟲病，其中以日本血吸蟲所造成的病變最嚴重。日本血吸蟲為人畜共通寄生蟲，流行於印尼、菲律賓及中國大陸等亞洲國家，其中以中國大陸最為嚴重。日本血吸蟲病會導致人類及動物的各種組織性疾病，亦即在蟲卵周圍之宿主組織如肝、脾、肺、腸等器官會形成肉芽腫性的高度過敏性反應，造成肝脾腫大，最後患者往往因肝硬化、腹水形成、門靜脈血流阻塞等病症死亡。

日本血吸蟲病現為大陸地區最嚴重之寄生蟲病之一，主要流行於長江流域沿岸及其以南的地區，目前估計至少有數百萬人受到感染，每年造成家畜死亡無法計數 (Ross et al., 1997)。台灣早年在宜蘭、彰化等地亦曾有日本血吸蟲病的流行，最近一次流行發生在 1986 年 (Wang et al., 1988)。本實驗室近年陸續對此台灣株日本血吸蟲做過一系列之研究，如血吸蟲對中間宿主的感染力報告 (Lee et al., 1992; Lo and Lee, 1995) 及應用 RAPD 技術 (Lee et al., 1995)、粒腺體 12S rRNA 基因定序 (Tien et al., 1995) 等方式分析台灣與大陸株日本血吸蟲間之遺傳差異。結果顯示在 DNA 的分子層次上，台灣的動物株不同於其他大陸株日本血吸蟲，彼此間具有明顯之遺傳差異。最近本實驗室運用反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR) 技術合成台灣株日本血吸蟲 26KDa GST 之 cDNA，加以選殖並定序，且於大腸桿菌中

表現出其重組蛋白，經由免疫保護力實驗結果證實以蟲體純化之 GST 及重組 26KDa GST 免疫小鼠，兩組之保護力並無差異 (Lee et al., 1996)。此結果顯示 26KDa GST 為一良好之免疫抗原，能誘發良好之免疫反應。

日本血吸蟲之 26KDa GST 抗原是在研究對日本血吸蟲具天然抗性鼠 WEHI 129/J 時發現的，該小鼠能抵抗日本血吸蟲之慢性感染症 (Garcia et al., 1983)，由於這些具抗性鼠所獲得的血清經免疫沈澱分析後可辨認日本血吸蟲之一分子量為 26KDa GST 的分子 (Mitchell et al., 1984, 1985)，經序列比對及酵素活性測試，證實此 26KDa GST 的分子屬 GSTs 之同功異構酶 (Smith et al., 1986)。此外另一群研究曼氏血吸蟲的人員發現在該蟲的童蟲具有一分子量大約為 28KDa GST 的主要表面蛋白 (Balloul et al., 1985)，且利用此分子對大白鼠進行保護力測試，可獲得 67% 的保護力 (Balloul et al., 1987)。此 28KDa 之分子隨後亦證實為 GSTs 同功異構酶 (Taylor et al., 1988)。不論是曼氏或日本血吸蟲之 GSTs 實際上均包含了兩個不同分子量大小的同功異構酶。在曼氏血吸蟲 28KDa GST 雖為一良好之免疫原，但對日本血吸蟲而言，其良好的免疫原不是 28KDa GST 而是 26KDa GST。

26KDa GST 曾在不同動物模式下被測試其減蟲率，例如應用菲律賓株日本血吸蟲  $\beta$ -galactosidase-Sj26 fusion protein 及 recombinant Sj26 在小鼠上，分別獲得 30-43% (Smith et al., 1986; Mitchell et al., 1988) 及 57% (Mitchell et al., 1988) 的減蟲率。Liu 等人 (1993) 利用大陸株蟲體純化之 Sj26-28GST 及菲律賓株基因重組之 26KDa GST 免疫小鼠後感染大陸株之日本血吸蟲得到 26.2-32.5% 之保護效果。在綿羊蟲體純化 GSTs 之檢蟲率為 36% (Xu et al., 1995)。此外，用曼氏血吸蟲之研究發現，28KDa GST 除了能降低成蟲之存活率外，對雌蟲之產卵率 (下降約 50%) 及蟲卵孵化率 (下

降約 30-50%) 均有影響 (Boulanger et al., 1991 ; Xu et al., 1991, 1993)。

雖然台灣株日本血吸蟲病截至目前為止沒有人類感染之報告，但台灣地區之釘螺 (*Oncomelania hupensis*, 日本血吸蟲之中間宿主) 皆相繼被證實能感染不同地區人株 (含日本、菲律賓、中國大陸) 之日本血吸蟲 (Lee et al., 1982 ; Lee and Fan 1982)。已知本省 10 縣 (台北、宜蘭、花蓮、新竹、彰化、南投、嘉義、雲林、台東、高雄) 均可見釘螺之分佈。而流行於對岸中國大陸最嚴重的寄生蟲疾病—日本血吸蟲症，其傳染及致病力遠大於台灣本土性的日本血吸蟲症。前述流行病學上之有利因素顯示日本血吸蟲病在台灣暴發之可能性。

近年大陸長江流域洪水氾濫，導致地區釘螺擴散，加上三峽水庫的建造，將更易造成血吸蟲病大流行。大陸衛生部在去年八、九月間連續發佈報導大陸血吸蟲病疫情明顯回升，新疫區不斷增加，防治血吸蟲病形勢異常嚴峻。此外，台灣同胞每年赴大陸地區從商、探親、觀光及求學之人數超過三百萬人次，因此感染大陸株日本血吸蟲的機會很高。1992 年，根據高雄醫學院附設醫院及台北榮民總醫院臨床發現，八位赴大陸感染疾病患者中，有四人感染日本血吸蟲；1999 年底，高雄醫學院亦報導了國人因赴大陸旅遊而感染日本血吸蟲之病例。現今兩岸之間走私風氣猖獗，一些不法集團可能經由走私管道將牲畜運進台灣，導致病原引進。目前金、馬地區與對岸間已進行小三通，加上台灣與大陸已同時加入 WTO，兩岸之交流勢必日趨頻繁，此舉對國內的衛生及防疫工作而言，無疑是一項重大挑戰。

有鑑於此，政府相關部門有必要對此重大寄生蟲傳染病可能發生的風險嚴加監控，事先做好防疫工作，以避免此病原一旦被引進台灣，造成人畜

生命及國家經濟的嚴重損失。本研究計劃之主旨在利用分生技術開發日本血吸蟲專一性的免疫檢測試劑，應用於此重要人畜共通傳染症的臨床診斷，提昇國內對此重大寄生蟲病的防疫技術。以期能迅速確切地診斷出此寄生蟲感染症，早期發現，迅速治療，達到監控此重大寄生蟲病在國內的發生及傳播，維護國內防疫安全，減少國家經濟之損失。

## 二、材料與方法

### (一) GST 重組蛋白之大量表現與純化

#### 麩氨基硫 S-轉移酶 (GST) 蛋白的純化

取 1,000 隻大陸湖北株日本血吸蟲雄性成蟲，以 PBS 清洗，去上清液。將蟲體加入 5ml 研磨蟲體緩衝液 (PBS 溶液，內含 0.5% Triton X-100, 1mM PMSF)，並予以混合，再凍入液態氮中 2~3 分鐘，移置溫水中解凍，重覆循環 3~5 次 (Pearce et al.,1988)。將蟲體倒入玻璃質研磨器中研磨至蟲體粉碎，再使用超音波粉碎機使蟲體均質化，經 4°C 離心 14,000 rpm 20 分鐘，保留上清液，並通過 0.45  $\mu$ m filter (Schleicher & Schuell)，移入 15 ml 離心管中，加入 2ml Glutathione agarose-beads (Sigma) 混合 (Smith & Johnson.,1988)。將離心管置於旋轉混合器上 20 分鐘，離心 2,000 rpm 3 分鐘，去上清液，加入 10ml PBS，再離心 2,000 rpm 3 分鐘，去上清液，加入 2~3ml PBS，移入管柱中，並續以 10ml PBS 清洗。加入 5ml elute buffer 將天然 GST (native GSTs) 沖出，並收集之。天然 GST 需再以 pH7.2 之 PBS 透析，進行濃縮，測濃度，以 13.5% SDS-PAGE 進行電泳分析，檢視純化產物。

## (二) GST 重組蛋白之大量表現與純化

### 1. 大陸株日本血吸蟲 26KDa GST cDNA 之製備

取約 100mg 的日本血吸蟲雄性成蟲，利用 Trizol system kit 進行 total RNA 製備，經分光光度計 (Pharmacia Biotech.) 測定估算濃度，大陸株日本血吸蟲 total RNA 濃度為 2.42mg/ml，取 5 $\mu$ g total RNA 作 RT-PCR 反應，反應終了以 2%瓊脂電泳，可觀察到一條接近 700bp 的 cDNA 產物。將前項 PCR 產物進行 DNA 序列分析定序，具有 672 個鹼基。此核酸片段包括一完整的轉錄區 (translation region)，可編碼 218 個氨基酸。

### 2. 大陸株日本血吸蟲 26KDa rGST 重組蛋白之表現及純化

利用已確定核酸序列之 SjCH26KDa GST cDNA 作為模板，為能使該段 DNA 能成功的轉殖入 pQE31 質體內，我們利用具有 *Bma*HI、*Kpn*I 兩種限制酵素切位之 PH1.2 及 PH2.2 兩段引子進行聚合酶鏈反應，所得之產物與 pQE31 載體分別以 *Bma*HI 及 *Kpn*I 限制酶作用後，以酒精沉澱法進行 DNA 片段之純化經過接合作用將聚合酶鏈反應產物接入 pQE31 載體之 *Bma*HI 及 *Kpn*I 限制位之間完成 pQE31/SjCHGST26 載體之建構，再轉形至大腸桿菌株 M15[pREP<sub>4</sub>]細胞中，以含有 kanamycin 及 ampicillin 之 LB medium 進行篩選，任意挑取六個單一菌落以引子 PH1.2 及 PH2.2 做聚合酶鏈反應，發現均有插入 pQE31/SjCHGST26 載體，並將菌液以 ABI PRISM 337-96 DNA Sequencer 進行 DNA 序列分析，更確認其中一個菌落已插入正確之基因序列。將該含有 pQE31/SjCH26 GST 載體的 M15[pREP<sub>4</sub>]大腸桿菌菌落以 LB 培養基增菌培養，並經 IPTG 誘導重組蛋白的表現，因該重組蛋白具有六個組氨酸 (分子量約為 0.85KDa)，使用 His-Bind Resin (Novagen) 純化後，測定大陸株日本血吸蟲 26KDa rGST 之蛋白濃度。每次純化時間約 3-4 天，每次可純化 1-2ml rGST。純化之蛋白經 13.5%SDS-PAGE 進行電泳，

再以 0.1%commassie blue 染色後，可檢視出分子量約為 27KDa (26KDa rGST+0.85KDa His) 之產物。

### (三) 檢驗診斷試劑臨床專一性及靈敏度之評估

赴大陸疫區，與中國疾病預防控制中心寄生蟲病預防控制所、湖南省血吸蟲病防治研究所及華中科技大學同濟醫學院合作，採取當地臨床血吸蟲病患之血清，進行檢驗測試，瞭解此免疫檢測試劑在臨床上之專一性及靈敏度。罹病病人之血清區分成急性病人、慢性病人與晚期病人共三種。另病患中已接受藥物治療者之血清亦予以收集。對照組之血清則將分別對疫區正常人與非疫區正常人之血清加以採樣，以提供實驗上的分析與比較。另外，其他寄生蟲病患（非血吸蟲病）之血清亦將分別收集採樣。以上各種檢體進行 ELISA 及 Western Immunoblotting 試驗分析，以精確對照出此檢測試劑臨床應用上之專一性。

#### 1. 酵素聯結免疫分析試驗(Enzyme Liked Immunosorbent Assay; ELISA)

於 96 孔平底微量分析盤中，每孔加入現配之 100 $\mu$ l coating buffer(含有 5 $\mu$ g/ml 日本血吸蟲 26KDa rGST)，4 $^{\circ}$ C 靜置隔夜使抗原吸附於分析盤上。次日將液體傾棄，再以 200 $\mu$ l/well 0.05%PBST buffer (Tween 20 + PBS) 清洗三次，洗去未吸附上的抗原。加入以 PBS 配製之 1%脫脂牛奶 200  $\mu$ l/well，於 37 $^{\circ}$ C 下半小時以填滿無抗原附著之空白部分。加入病人血清 100 $\mu$ l/well (以 PBS buffer 做 1:100 稀釋) 作用 1 小時後，以 0.05%PBST buffer 清洗三次，加入 100 $\mu$ l/well 以 PBS buffer 稀釋 1,000 倍之結合 Horse radish peroxidase (HRP) 的 Goat anti-human IgG 二次抗體(Zymed)，作用半小時後，以 0.05%PBST buffer 清洗六次，加入 OPD (o-Phenylenediamine) /0.1 M citrate-phosphate buffer, pH 5.0 containing

0.03% hydrogen peroxide (Zymed) 溶液 200 $\mu$ l/well，避光半小時後，在 OD<sub>490nm</sub> 下測定吸光值。

## 2. 西方墨點法 (Western blotting)

日本血吸蟲 26KDa rGST 經 13.5%SDS-PAGE 進行電泳，結束後取下電泳膠，利用 Trans-Blot<sup>®</sup> (Bio-Rad) 轉印至 PVDF membrane 上。以 0.1%PBST 配製 5%脫脂奶粉，於 4 $^{\circ}$ C 下浸搖半小時，再以 0.1%PBST buffer 清洗三次，每次 10 分鐘。分別將病人血清以 PBS buffer 稀釋 1：200 倍，與轉印膜於 37 $^{\circ}$ C 下浸搖作用 1.5 小時，以 0.1%PBST buffer 清洗三次，每次 10 分鐘，再以 PBS buffer 做 4,500 倍稀釋的 Goat anti-human IgG 結合 Horse radish peroxidase 的二次抗體 (Zymed)，於室溫下浸搖作用半小時，以 0.1%PBST buffer 清洗三次，每次 10 分鐘，再加入 TMB 呈色液，直到蛋白條帶顯現後，換浸入二次水中終止呈色。

## 3. 閾值 (Cut-off value) 及偽性檢驗結果之判定

評估感染陽性及對照血清檢體之酵素免疫分析吸光值，以決定其檢驗閾值，並進一步以 *Student t'* test 做比較分析。西方墨點法實驗所獲得之結果可作為酵素免疫分析法檢驗陽性檢體之再確認步驟。

# 三、結果

## (一) 日本血吸蟲 native GSTs (26~28 KDa) 蛋白之製備

取約 1000 隻大陸湖北株日本血吸蟲雄性成蟲，經液態氮反覆凍溶解及玻璃研磨器均質化後製成蟲體可溶蛋白，再經由麩氨基硫瓊脂微粒親和性管柱萃取天然 GSTs，以透析膜於磷酸緩衝液中透析，去除雜質，再經濃縮

後，測其濃度為 350  $\mu$ g/ml，純化之蛋白經 13.5% SDS-PAGE 進行電泳，再以 0.1% commassie blue 染色後，可檢視出分子量約為 26 及 28KDa 之產物（圖一）。

## （二）rGST 重組蛋白之大量表現與純化

以 200ml LB 培養液培養含有 pQE31/SjCHGST26 表現載體（圖二）之 M15[pREP4]大腸桿菌菌液，經 1mM IPTG 誘導重組蛋白表現，然後以 His-Bind Resin(Novagen)親和性管柱純化出 rGST26，純化出之 26KDa rGST 以 protein assay kit（Bio-Rad）測定蛋白濃度，得到之濃度大約介於 20-31mg/ml。之後使用 0.75% SDS-PAGE 之電泳分析，可於電泳膠看到有一分子量為 26KDa 之條帶（圖一）。

## （三）免疫小鼠血清 IgG 抗體對日本血吸蟲 native GSTs 和 26KDa rGST 重組蛋白之專一性分析

經由免疫轉漬法（Western Immunoblotting test）發現，以日本血吸蟲 rGST26 及 native GSTs 免疫組小鼠之抗血清均可辨認日本血吸蟲 26KDa native GST 蛋白及 26KDa rGST 蛋白，而佐劑對照組小鼠血清對所有 GST 蛋白均無法辨認（圖三）。

## （四）檢驗診斷試劑臨床專一性及靈敏度之評估

本年度計劃中，我們赴大陸地區取得實驗所需血清樣本約 300 份：疫區血吸蟲病患之血清，分為急性病人、慢性病人、晚期病人及經過藥物治療共四類，作為實驗組；以疫區正常人與非疫區正常人之血清作為對照組；其他寄生蟲病患（非血吸蟲病）則收集有肺吸蟲病患、肝吸蟲病患、蛔蟲病患和鉤蟲病患之血清，用以測試 26KDa rGST 蛋白之專一性。

## 1. 酵素聯結免疫分析試驗 (ELISA)

在 ELISA 實驗中，96 孔平底微量分析盤每孔含有 5 $\mu$ g/ml 日本血吸蟲 26KDa rGST，所有血經樣本皆進行試驗分析。各組血清樣本所得數據如圖四所示。經數次實驗分析後，所得結果顯示急性病患組的 OD<sub>490nm</sub> 值為 0.3228 $\pm$ 0.1087 (Mean  $\pm$  SD)，遠高於疫區正常人血清組的 cut-off 值 0.1193 + 0.0850 (Mean + 2SD) (圖五；表一)，以 *Student t'* test 分析數據顯示兩組數值有顯著差異 ( $p < 0.001$ )；急性病患組的 OD<sub>490nm</sub> 值亦高於非疫區正常人組 cut-off 值 0.1606 + 0.0404 (Mean + 2SD) (圖六；表二)，經統計後兩組數據間有明顯差異 ( $p < 0.001$ )。在慢性病人方面，實驗所得 OD<sub>490nm</sub> 值為 0.1873 $\pm$ 0.0997，高於疫區正常人血清組與非疫區正常人組的 cut-off 值 ( $p < 0.001$ ； $p < 0.05$ )。由圖五、六及表一可知，治療半年病人組的 OD<sub>490nm</sub> 值為 0.3271 $\pm$ 0.1095，明顯高於疫區正常人血清組與非疫區正常人組的 cut-off 值 ( $p < 0.001$ ； $p < 0.001$ )。因此可確認本重組蛋白用於日本血吸蟲感染症診斷上的效用。

其他寄生蟲感染症方面，肺吸蟲病患組所得 OD<sub>490nm</sub> 值為 0.1419 $\pm$ 0.0575，高於疫區正常人血清組的 cut-off 值 0.1193 + 0.0850 ( $p < 0.05$ ) (圖五；表一)。肝吸蟲病患組 OD<sub>490nm</sub> 值 0.1829 $\pm$ 0.1116 與疫區正常人血清組的 cut-off 值有明顯差異 ( $p < 0.05$ )。測量鈎蟲病患組得到 OD<sub>490nm</sub> 值 0.1523 $\pm$ 0.0733，高於疫區正常人血清組的 cut-off 值 ( $p < 0.05$ )。蛔蟲病患組 OD<sub>490nm</sub> 值 0.1244 $\pm$ 0.0443，經由 *t'* test 檢定分析顯示，與非疫區正常人組的 cut-off 值 0.1606 + 0.0404 有明顯差異 ( $p < 0.001$ ) (圖六；表二)。

進一步，將日本血吸蟲病患與其他寄生蟲病患之血清樣本進行交叉反應的測試，並以 *Student t'* test 分析其相關度。實驗結果顯示如圖四一六，血吸

蟲感染症急性病患組的  $OD_{490nm}$  值  $0.3228 \pm 0.1087$ ，遠高於其他四種寄生蟲病患組的吸光值；經分析後顯示，血吸蟲症急性病人組與肺吸蟲病患組、肝吸蟲病患組、鈎蟲病患組以及蛔蟲病患組均差異顯著 ( $p < 0.001$ ) (表三)。血吸蟲症慢性病患組所得  $OD_{490nm}$  值為  $0.1873 \pm 0.0997$ ，高於肺吸蟲病患組、鈎蟲病患組和蛔蟲病患組 (圖四一六)；分析後如表四所示，血吸蟲症慢性病患組與肺吸蟲病患組 ( $p < 0.05$ )、鈎蟲病患組 ( $p < 0.05$ ) 與蛔蟲病患組 ( $p < 0.001$ ) 有明顯差異。由此試驗可確認，26KDa rGST 重組蛋白與血吸蟲病患血清具高度專一性，以此重組蛋白作為免疫檢測試劑可以明確辨識其他寄生蟲病患的血清，在臨床診斷上無交叉反應現象。

## 2. 西方墨點法 (Western blotting)

進一步以西方墨點法檢測此免疫檢驗試劑診斷日本血吸蟲感染症上之專一性，每片 13.5% SDS-PAGE 均加入日本血吸蟲 26KDa rGST 蛋白 250 $\mu$ g 進行實驗。由圖七 A、B 顯示日本血吸蟲病患的血清與 26KDa rGST 重組蛋白有明顯反應出現，而疫區正常人的血清 (編號 1-15 與 18-23) 與 rGST 重組蛋白作用無顯性反應 (編號 24-26)，以及僅出現非常微弱的反應痕跡 (編號 17 和 18)，均與實驗組有明顯差異 (圖七 B)。

## 四、討論

日本血吸蟲病為典型的人畜共通傳染病，本研究計劃最重要的目的在開發一快速有效的檢測試劑，應用於人畜間之檢驗，避免並預防台灣地區居民間之感染與罹病，以因應兩岸交流防疫上的把關。

我們已開發出日本血吸蟲 26KDa GST 之重組蛋白，此檢測試劑能大

量純化已符合作為日本血吸蟲診斷試劑之基本條件。此重組蛋白通過實驗小鼠各項 *in vitro* 及 *in vivo* 免疫反應試驗，確定其可產生高效價且具專一性之抗體，且此重組蛋白亦證明對宿主具顯著的保護免疫力。本實驗室已應用小鼠模式完成檢驗試劑專一性及靈敏度之分析，然此檢測試劑之開發旨在避免人體的感染與罹病，因此臨床病患血清之蒐集及測試為研發此檢驗試劑成功與否之關鍵，以進一步確認此檢測試劑在臨床之專一性及靈敏度。

這次經由中國疾病預防控制中心寄生蟲病預防控制所、湖南省血吸蟲病防治研究所及華中科技大學同濟醫學院協助，已收集臨床血吸蟲病患之血清（包含急性病人、慢性病人、晚期病人及經過藥物治療的病人）及其他寄生蟲感染病患（包含肺吸蟲病患、肝吸蟲病患、蛔蟲病患和鉤蟲病患）之血清約 300 份，進行檢驗測試，瞭解此免疫檢測試劑在臨床之專一性及靈敏度。分別收集疫區正常人與非疫區正常人之血清作為對照組之血清，共約 50 份。上述各種檢體皆已進行 ELISA 試驗分析，進一步選取日本血吸蟲慢性期病人之血清與疫區正常人之血清進行 Western Immunoblotting 檢測。

分析其實際應用檢驗之靈敏度及專一性，從本研究實驗結果可推論若來自疫區的人血清檢體以 26KDa rGST 做檢測，其血清 OD<sub>490nm</sub> 值若高於疫區正常人血清組的 cut-off 值  $0.119 + 0.085$  (Mean + 2SD)，則顯示此人已受到日本血吸蟲之感染；若來自非疫區的人血清檢體，其血清 OD<sub>490nm</sub> 值若高於非疫區正常人組 cut-off 值  $0.161 + 0.040$  (Mean + 2SD)，則顯示此個體可能曾赴疫區接觸過感染源而感染上日本血吸蟲。

本研究計劃除要決定用於日本血吸蟲病檢測時確診之檢驗閾值(cut-off value)外，最終目標在發展一種快速診斷日本血吸蟲感染症之分子免疫檢測試劑套組，實際應用在防疫檢疫工作。在 ELISA 分析中，26KDa rGST 重組蛋白對急性期病人血清的效價不但遠超過對照組的疫區正常人血清（效價比高達 2.7 倍），對非疫區正常人血清的效價比亦達 2 倍；慢性期病人血清的效價高於疫區正常人的血清效價達 1.5 倍，亦高於非疫區正常人的血清效價；經過藥物治療病人的血清效價遠高於疫區正常人血清效價高達 2.7 倍，對非疫區正常人血清的效價比亦達 2 倍。同時以西方墨點法分析亦證實感染日本血吸蟲之臨床病患血清確實辨認到 26KDa 的 rGST 重組蛋白，且與疫區正常人血清有明顯差異，兩組間可以有詳細的區別。以上結果顯示，此重組蛋白作為診斷檢測試劑具有相當高的靈敏度及專一性，發展作為快速診斷日本血吸蟲感染症之免疫檢測試劑套組具有極高的可行性。

本研究計畫之執行與完成，除能經由精確診斷，早期發現，迅速治療，挽救病人生命外，最大的目的在於發展高品質的防疫技術，提昇防疫工作的專業和效率，以避免此寄生蟲感染症在台灣可能發生的風險及傳播，做好國內防疫工作，減少國家醫療保健的負擔及總體經濟力的損失。

## 五、結論與建議

本研究計劃除要決定用於日本血吸蟲病檢測時確診之檢驗閾值(cut-off value)外，最終目標在發展一種快速診斷日本血吸蟲感染症之分子免疫檢測試劑套組，實際應用在防疫檢疫工作。實驗結果顯示，以酵素聯結免疫試驗和西方墨點法分析 26KDa rGST 重組蛋白，此重組蛋白作為診斷檢測試劑具有相當高的靈敏度及專一性，發展作為快速診斷日本血吸蟲感染症之免疫檢測試劑套組具有極高的可行性。分析其實際應用檢驗之靈敏度及專一

性，可推論若來自疫區的人血清檢體以 26KDa rGST 做檢測，其血清 OD<sub>490nm</sub> 值若高於疫區正常人血清組的 cut-off 值  $0.1193 + 0.0850$  (Mean + 2SD)，則顯示此人已受到日本血吸蟲之感染；若來自非疫區的人血清檢體，其血清 OD<sub>490nm</sub> 值若高於非疫區正常人組 cut-off 值  $0.1606 + 0.0404$  (Mean + 2SD)，則顯示此個體可能曾赴疫區接觸過感染源而感染上日本血吸蟲。

## 六、計畫重要研究成果及具體建議

本研究已依據計劃原定目標完成，以 26KDa rGST 蛋白作為免疫診斷試劑應用在人體血清檢驗上的效果，結果確認此檢測試劑在臨床診斷上具有相當高的靈敏度及專一性。從本研究實驗結果分析其實際應用檢驗之靈敏度及專一性，可推論若來自疫區的人血清檢體以 26KDa rGST 做檢測，其血清 OD<sub>490nm</sub> 值若高於疫區正常人血清組的 cut-off 值  $0.1193 + 0.0850$  (Mean + 2SD)，則顯示此人已受到日本血吸蟲之感染；若來自非疫區的人血清檢體，其血清 OD<sub>490nm</sub> 值若高於非疫區正常人組 cut-off 值  $0.1606 + 0.0404$  (Mean + 2SD)，則顯示此個體可能曾赴疫區接觸過感染源而感染上日本血吸蟲。日本血吸蟲病為典型的人畜共通傳染病，本研究計劃最重要的目的在開發一快速有效的檢測試劑，應用於人畜間之檢驗，避免並預防台灣地區居民間之感染與罹病，以因應兩岸交流防疫上的把關。

## 七、參考文獻

1. Balloul JM, Pierce RJ, Grzych JM, Capron A : *In vitro* synthesis of a 28 kilodalton antigen present on the surface of the schistosomulum of *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 1985 ; 17 : 105-114.

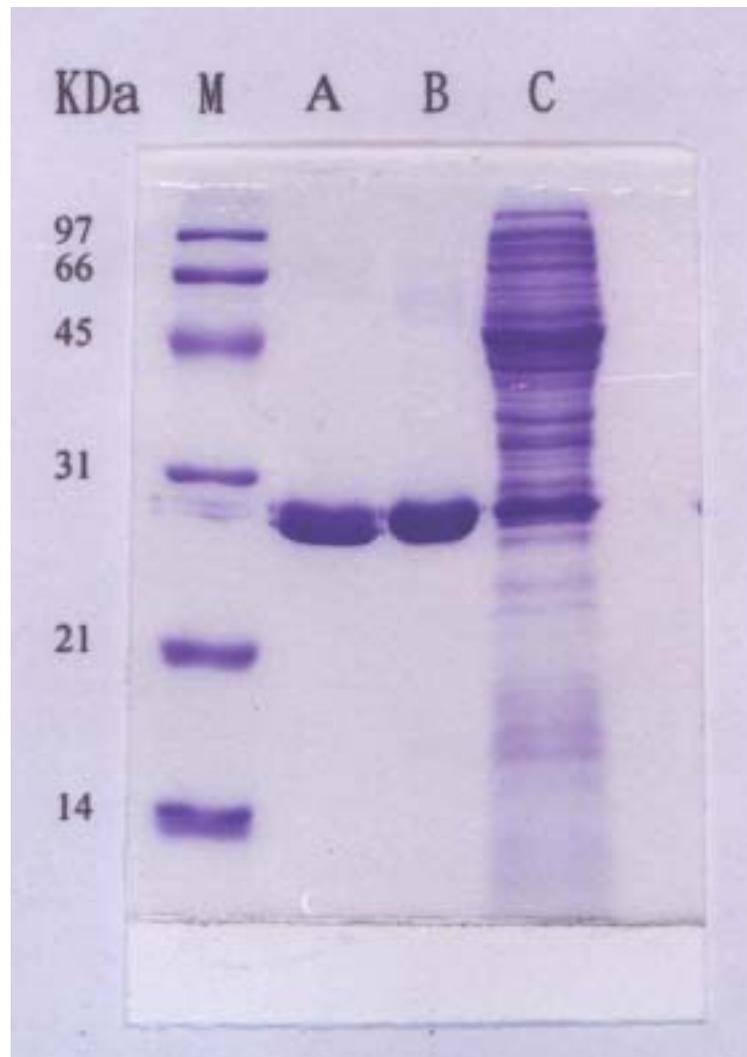
2. Balloul JM, Sondermeyer P, Dreyer D, Capron M, Gyzych JM, Pierce RJ, Carvallo D, Lecocq JP, Capron A : Molecular cloning of a protective antigen of schistosomes. *Nature* 1987 ; 326 : 149-153.
3. Bergquist NR : Controlling Schistosomiasis by vaccination : A realistic option? *Parasitology Today* 1995 ; 11 : 191-194.
4. Boulanger D, Reid GD, Sturrock RF, Wolowczuk I, Balloul JM, Grezel D, Pierce RJ, Otieno MF, Guerret S, Grimaud JA, Butterworth AE, Capron A : Immunization of mice and baboons with the recombinant Sm28GST affects both worm viability and fecundity after experimental infection with *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunology* 1991 ; 13 : 473-490.
5. Doherty PJ, Contreras MH, Dosch HM, Pant S : Rapid amplification of complementary DNA from small amounts of unfractionated RNA. *Analytical Biochemistry* 1989 ; 177 : 7-10.
6. Garcia EG, Tiu WU, Mitchell GF : Innate resistance to *Schistosoma japonicum* in a proportion of 129/J mice. *Journal of Parasitology* 1983 ; 69 : 613-615.
7. Hsu HF, Li Hsu SY, Ritchie LS : Epidemiological study on *schistosomiasis japonica* in Formosa. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1955 ; 4 : 1042-1048.
8. Lee KM, Lo CT, Fan PC, Chung CK : Susceptibility of *Oncomelania hupensis* subspecies to infection with Chinese, Taiwan and Japanese strains of *Schistosoma japonicum*. *Chinese Journal of Parasitology* 1992 ; 5 : 67-71.
9. Lee KM, Shen LC, Lo CT, Pan MJ, Yu CL : Genetic variation of the nuclear genomes of *Schistosoma japonicum* from Taiwan and mainland China by random amplified polymorphic DNA (RAPD) . In Joint Meeting of the American Society of Parasitologists and The American Association of

- Veterinary Parasitologists. 1995 ; pp. 108-109.
10. Lee KM, Liu SH, Lo CT., Pan MJ : Molecular cloning of the glutathione S-transferases antigen of the Taiwanese strain of *Schistosoma japonicum*. The 14<sup>th</sup> International Congress for Tropical Medicine and Malaria. Abstracts 1996 ; pp.253.
  11. Lee KM, Lu CW, Lo CT, and Yu CL : Dynamic analysis of cytokine gene expression and protein production in a zoophilic *schistosmiasis japonica*. The IXth International Congress of Parasitology. 1998 ; pp. 246.
  12. Liu SX, Song GC, Ding LY, Xu YX, Cai ZH, Wu GZ : Comparative study on antigenicity and immunogenicity of 26-28 KDa antigen and recombinant Sj26(RSJ26) of *Schistosoma japonicum*. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Hygiene* 1994 ; 24 : 65-69.
  13. Lo CT, Lee KM : *Schistosoma japonicum*, zoophilic strain, in *Oncomelania hupensis chiui* and *O. h. formosana* : miracidial penetration and comparative histology. *Journal of Parasitology* 1995 ; 81 : 708-713.
  14. Mitchell GF, Cruise KM, Garcia EG, Tiu WU : Anti-worm antibody specificities in 129/J mice resistant to infection with *Schistosoma japonicum*. *Journal of Parasitology* 1984 ; 70 : 983-985.
  15. Mitchell GF, Beall JA, Cruise KM, Tiu WU, Garcia EG : Antibody responses to the antigen Sj26 of *Schistosoma japonicum* worms that is recognized by genetically resistant 129/J mice. *Parasite Immunology* 1985 ; 7 : 165-178.
  16. Mitchell GF, Garcia EG, Davern KM, Tiu WU, Smith DB : Sensitization against the parasite antigen Sj26 is not sufficient for consistent expression of *Schistosoma japonicum* in mice. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1988 ; 82 : 885-889.

17. Ross A GP, Li YD, Sleigh AC, Mcmanus DP : Schistosomiasis control in the People's Republic of China. *Parasitology Today* 1997 ; 13: 152-155.
18. Smith DB, Davern KM, Board PG, Tiu WU, Garcia EG, Mitchell GF : Mr 26000 antigen of *Schistosoma japonicum* recognized by resistant WEHI 129/J mice is a parasite glutathione S-transferase. *Proceeding of National Academy of Science USA*. 1986 ; 83 : 8703-8707.
19. Smither SR : Improving prospects for a schistosomiasis vaccine. *Nature* 1986 ; 323: 205.
20. Smith DB, Rubira R, Simpson RJ, Davern KM, Tiu WU, Board PG, Mitchell GF : Expression of an enzymatically active parasite molecule in *Escherichia coli* : *Schistosoma japonicum* glutathione S-transferase. *Molecular and Biochemical Parasitology* 1988a ; 27 : 249-256.
21. Taylor JB, Vidal A, Torpier G, Meyer DJ, Roitsch C, Balloul JM, Southan C, Sondermeyer P, Pemble S, Lecocq JP, Capron A, Keyyerer B : The glutathione transferase activity and tissue distribution of a cloned Mr28K protective antigen of *Schistosoma mansoni*. *The EMBO Journal* 1988 ; 7 : 465-472.
22. Tien N: Mitochondrial DNA studies of Taiwan and mainland China strains of *Schistosoma japonicum*. Master thesis. 1995.
23. Tiu WU, Davern KM, Wright MD, Borad PG, Mitchell GF : Molecular and serological characteristics of the glutathione S-transferases of *Schistosoma japonicum* and *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunology* 1988 ; 10 : 693-706.
24. Trottein F, Kieny MP, Verwaerde C, Torpier G, Pierce RJ, Balloul JM, Schmitt D, Lecocq JP, Capron A : Molecular cloning and tissue distribution of a 26-kilodalton *Schistosoma mansoni* glutathione S-transferase.

- Molecular and Biochemical Parasitology* 1990 ; 41 : 35-44.
25. Trottein F, Gordin C, Pierce RJ, Sellin B, Taylor MG, Gorillot I, Silva MS, Lecocq JP, Capron A : Inter-species variation of schistosome 28-KDa glutathione S-transferases. *Molecular and Biochemical Parasitology* 1992 ; 54 : 63-72.
  26. Wang AM, Mark DF : Quantitative PCR. In PCR Protocols. Academic Press Inc. 1990 ; pp. 70-75.
  27. Wang JS, Wu FM, Tung KC, Chan JP : An outbreak and epidemiology of bovine *schistosomiasis japonica* in changhua county of Taiwan. *Journal of Chinese Society of Veterinary Science* 1988 ; 14 : 298-296.
  28. Xu CB, Verwaerde C, Grzych JM, Fontaine J, Capron A : A monoclonal antibody blocking the *Schistosoma mansoni* 28KDa glutathione S-transferase activity reduces female worm fecundity and egg viability. *Europe Journal of Immunology* 1991 ; 21 : 1801-1807.
  29. Xu CB, Verwaerde C, Masse GH, Fontaine J, Bossus M, Trottein F, Wolowczuk I, Tartar A, Capron A : *Schistosoma mansoni* 28KDa glutathione S-transferase and immunity against parasite fecundity and egg viability : Role of the amino- and carboxyl-terminal domains. *Journal of Immunology* 1993 ; 150 : 940-949.
  30. Xu S, Shi F, Shen W, Lin J, Wang Y, Ye P, Tian E, Qian C, Lin B, Shi Y, Zhang Z : Vaccination of sheep against *Schistosoma japonicum* with either glutathione S-transferase, keyhole limpet haemocyanin or freeze/thaw schistosomula/BCG vaccine. *Veterinary Parasitology* 1995 ; 58 : 301-312.

## 八、圖、表



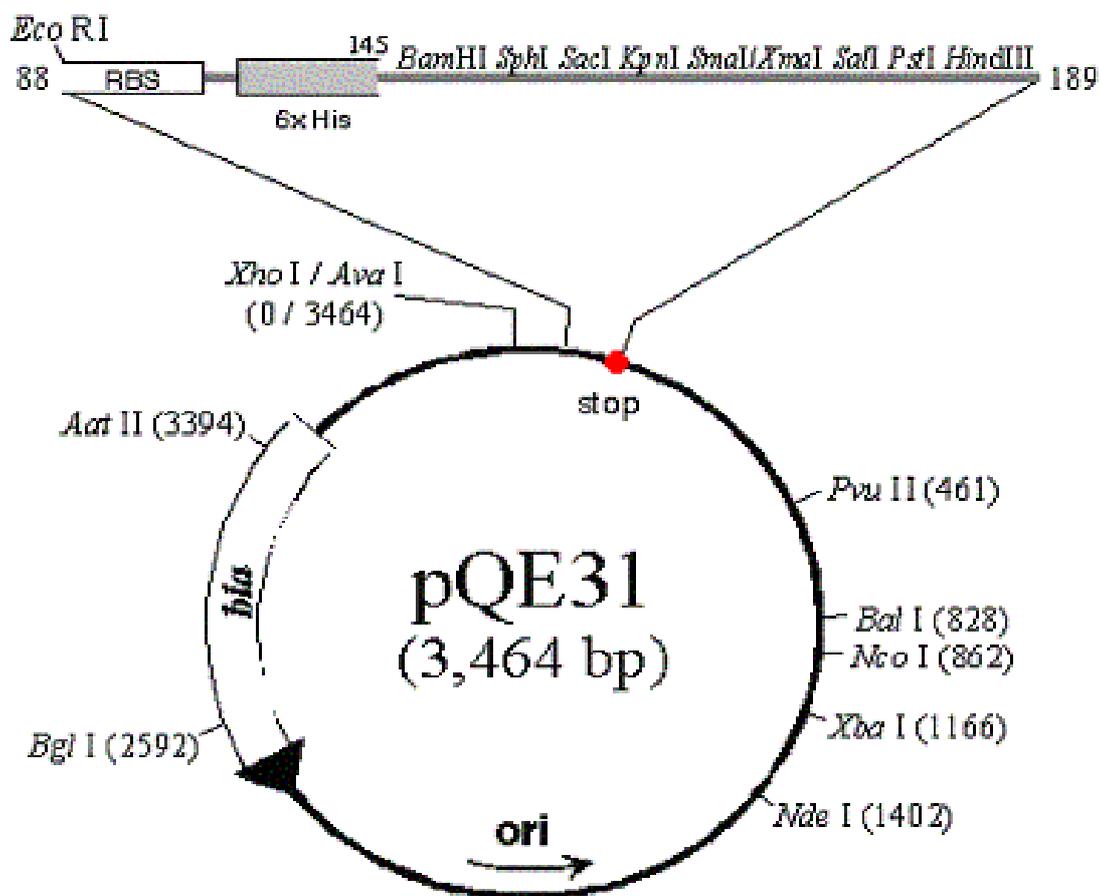
圖一、大陸湖北株日本血吸蟲天然 GSTs (26~28 KDa) 蛋白及重組 26KDa GST 蛋白於 13.5% SDS-PAGE 分析圖。

M. Bio Rad<sup>®</sup> Low molecular weight marker

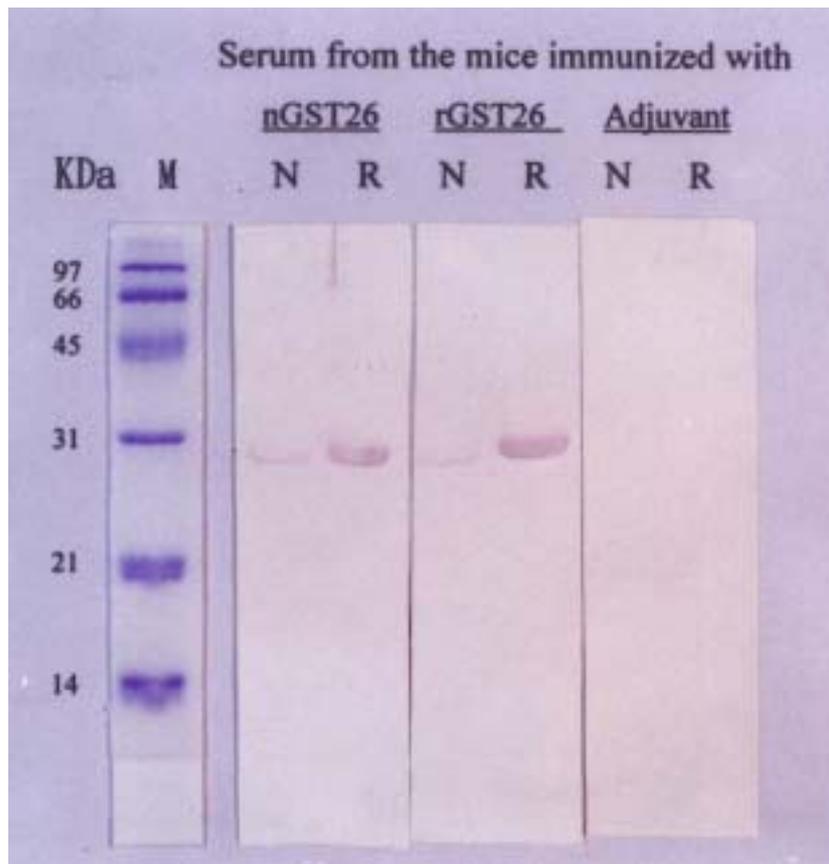
A. 經 G-SH agarose 親和性柱所純化之 native GSTs，具有 26KDa 及 28KDa 兩種異構酶存在。

B. 經純化後所得的 rGST26，其分子量大小約為 27KDa。

C. 由含有 pQE/SjCH GST26 表現載體之大腸桿菌 M15[pREP<sub>4</sub>] 經 IPTG 激發後所表現之可溶性蛋白。



圖二、含有 pQE31/SjCHGST26 之表現載體。

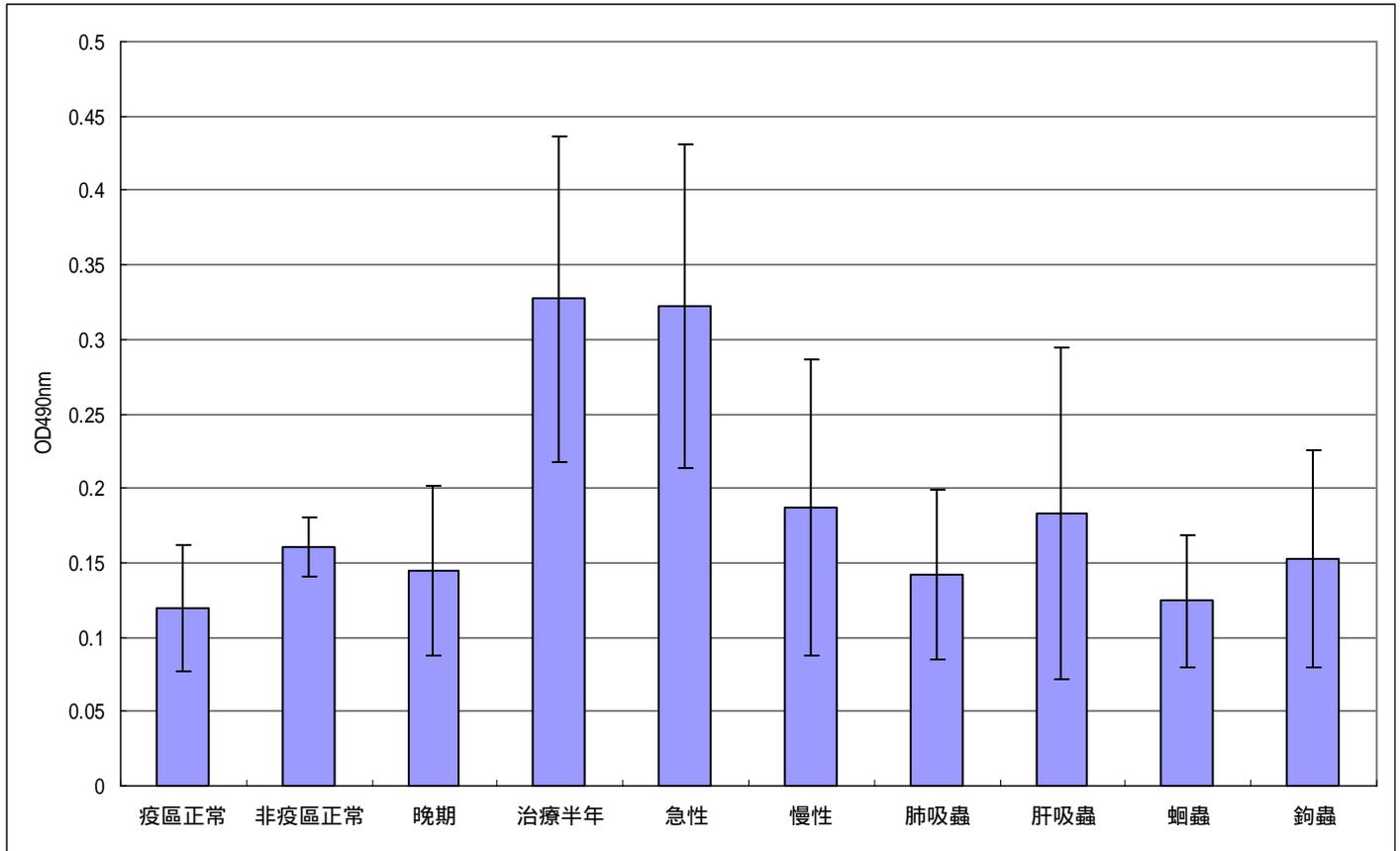


圖三、以 native GSTs、rGST26 免疫及 adjuvant 對照組之小鼠抗血清進行免疫轉漬法所得結果。蛋白經 13.5% SDS-PAGE 電泳後轉印至 N-C paper 上分成三部分進行實驗。第一部份以小鼠抗日本血吸蟲 native GSTs 血清 (1:5,000 稀釋) 作用，第二部分以小鼠抗日本血吸蟲 rGST26 (1:5,000 稀釋) 作用，第三部分以 Adjuvant 對照組血清 (1:250) 作用。由圖中可明顯看出小鼠不論以 native GSTs 或 rGST26 免疫時，產生之抗體均可同時認識日本血吸蟲天然生成及重組 26KDa GST 蛋白，而在 adjuvant 對照組免疫之小鼠血清，則無法辨識該抗原。

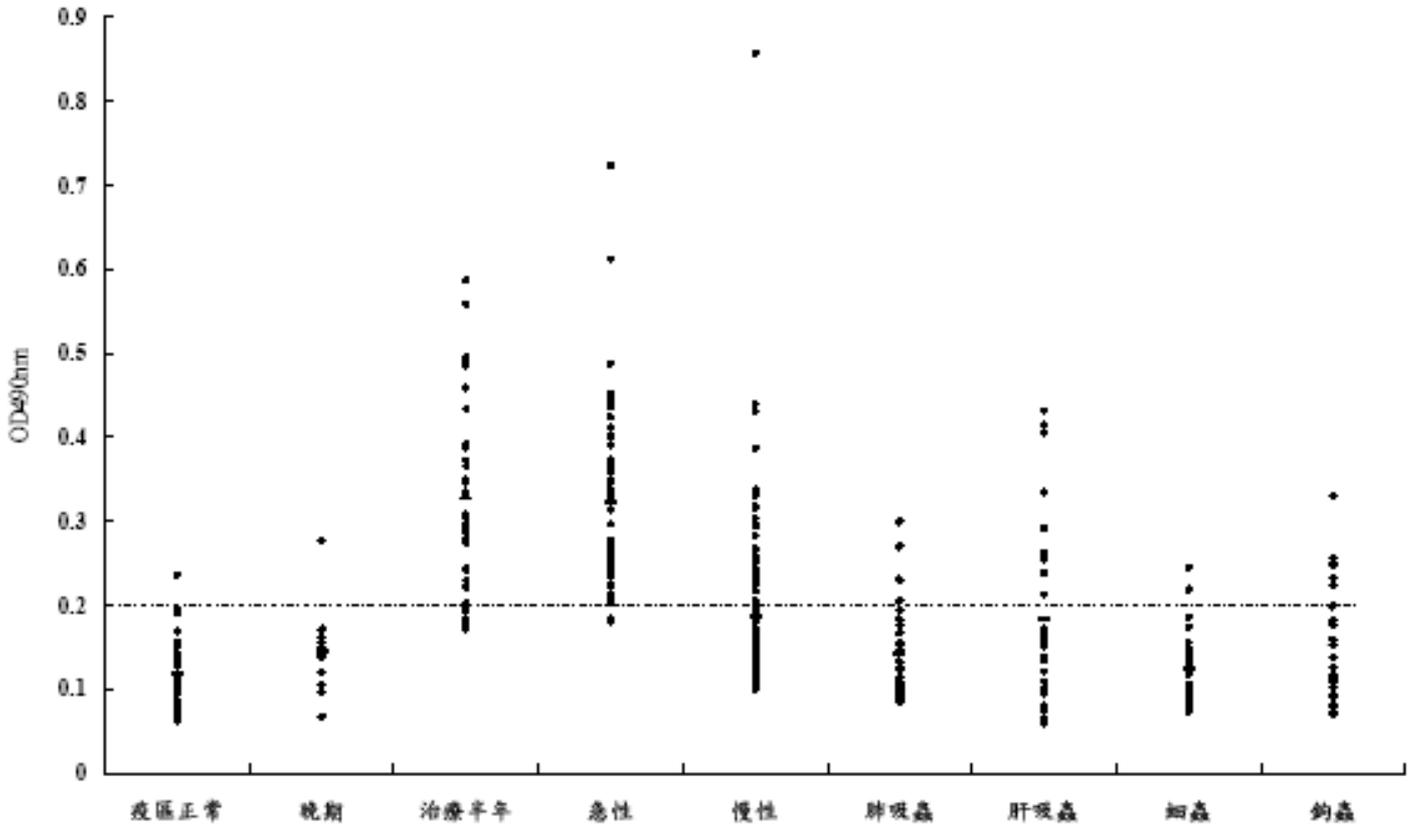
M. Bio Rad<sup>®</sup> Low molecular weight marker。

R. 為純化的大陸株日本血吸蟲之重組 GST26。

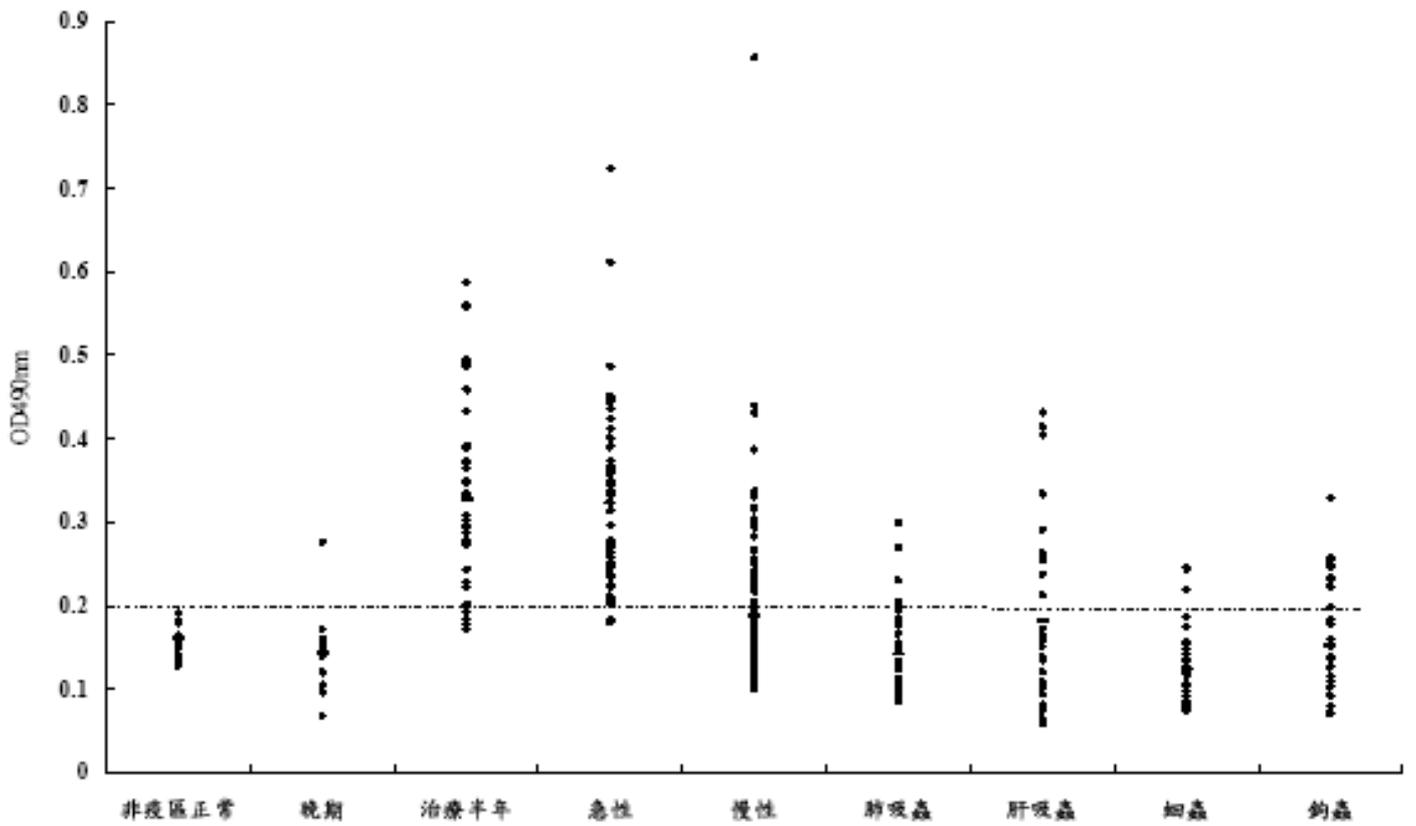
N. 為純化的大陸株日本血吸蟲之天然 GSTs。



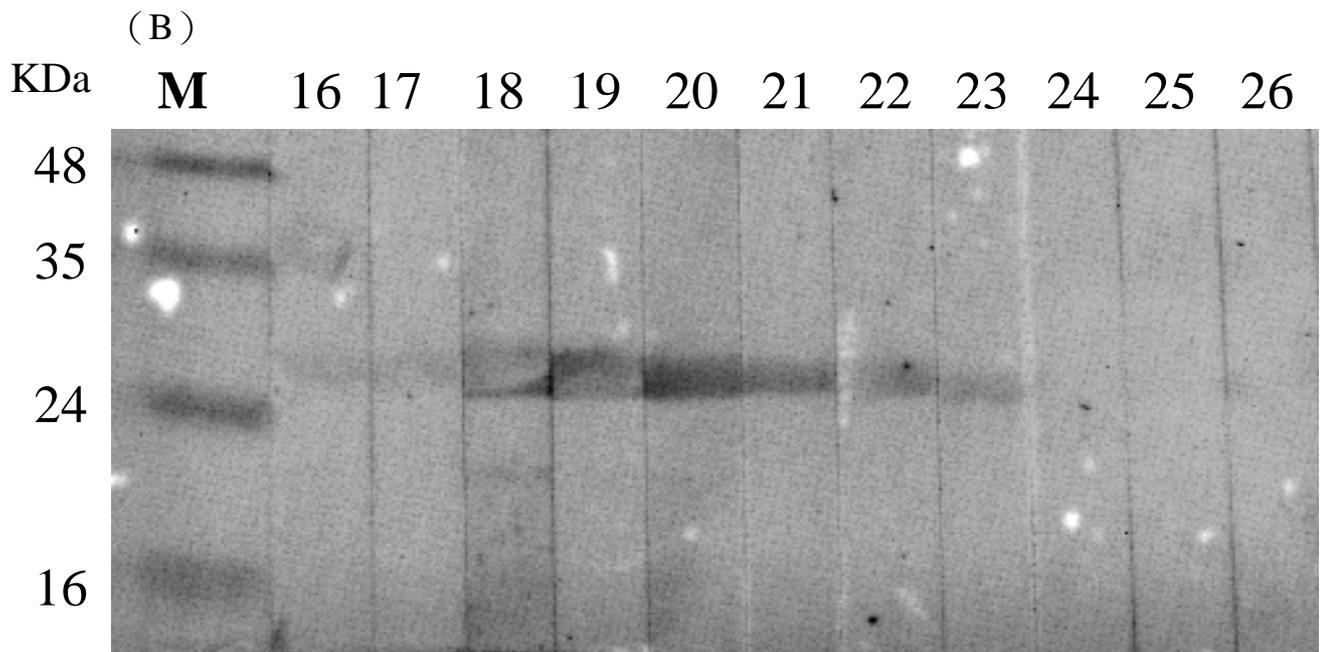
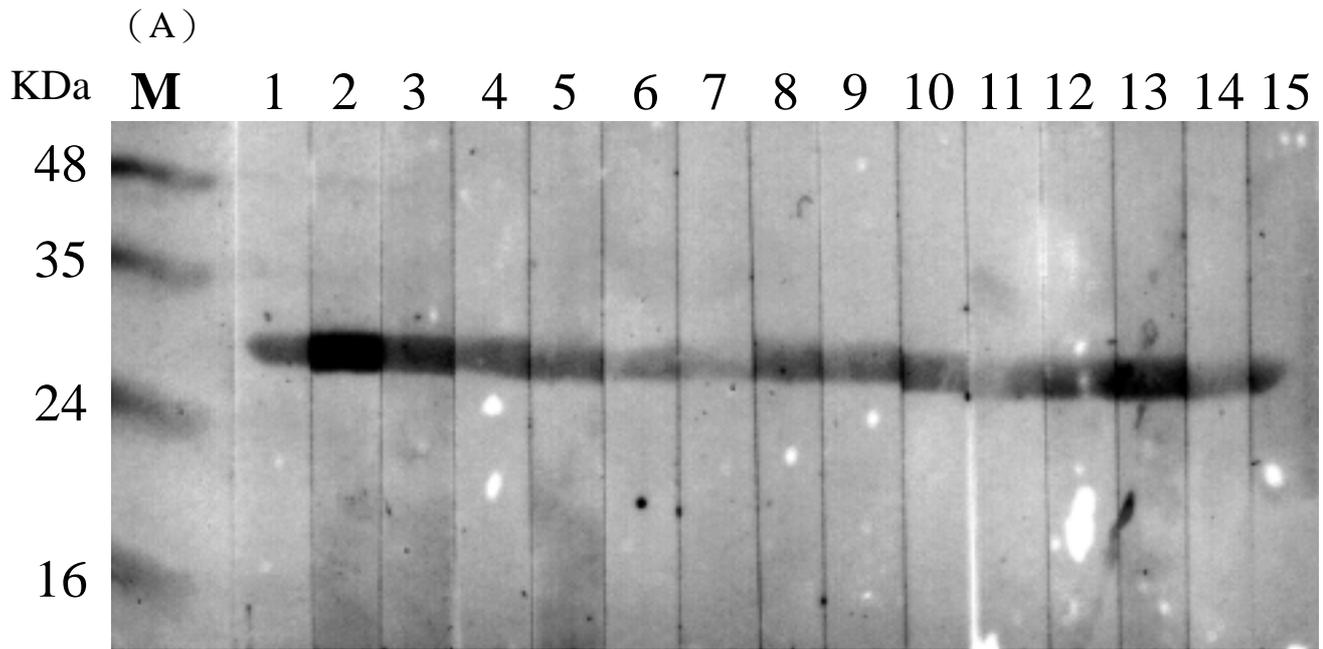
圖四、利用酵素聯結免疫分析試驗方法及 Excel 分析日本血吸蟲 rGST 26KDa 蛋白與各種血清樣本反應之關係。



圖五、「疫區正常人組」與其他血清樣本之酵素聯結免疫分析試驗結果的分析比較。以「疫區正常人組」作為對照組，Cut-off 值定為「疫區正常人組」血清之平均值加上兩個標準差 (Mean+2SD)。



圖六、「非疫區正常人組」與其他血清樣本之酵素聯結免疫分析試驗結果的分析比較。以「非疫區正常人組」作為對照組，Cut-off 值定為「非疫區正常人組」血清之平均值加上兩個標準差 (Mean+2SD)。



圖七、利用西方墨點法檢測日本血吸蟲感染症慢性病患與疫區正常人之血清。編號 1—15 和 18—23 為日本血吸蟲症慢性病患之血清樣本，編號 16—17 和 24—26 為疫區正常人之血清樣本。

表一、以「疫區正常人組」作為對照組進行 *Student' t test* 統計分析

實驗組別	實驗數值 (平均值 ± 標準差)	<i>Student' t test</i>
疫區正常	0.1193 ± 0.0425	
急性	0.3228 ± 0.1087	$p < 0.001$
慢性	0.1873 ± 0.0997	$p < 0.001$
晚期	0.1441 ± 0.0568	—
治療半年	0.3271 ± 0.1095	$p < 0.001$
肺吸蟲	0.1419 ± 0.0575	$p < 0.05$
肝吸蟲	0.1829 ± 0.1116	$p < 0.05$
蛔蟲	0.1244 ± 0.0443	—
鉤蟲	0.1523 ± 0.0733	$p < 0.05$

表二、以「非疫區正常人組」作為對照組進行 *Student' t test* 統計分析

實驗組別	實驗數值 (平均值 ± 標準差)	<i>Student' t test</i>
非疫區正常	0.1606 ± 0.0202	
急性	0.3228 ± 0.1087	$p < 0.001$
慢性	0.1873 ± 0.0997	$p < 0.05$
晚期	0.1441 ± 0.0568	—
治療半年	0.3271 ± 0.1095	$p < 0.001$
肺吸蟲	0.1419 ± 0.0575	—
肝吸蟲	0.1829 ± 0.1116	—
蛔蟲	0.1244 ± 0.0443	$p < 0.001$
鉤蟲	0.1523 ± 0.0733	—

表三、以「日本血吸蟲症急性病人組」作為對照組與其他寄生蟲病患組進行 *Student' t test* 統計分析

實驗組別	實驗數值 (平均值 ± 標準差)	<i>Student' t test</i>
急性	0.3228 ± 0.1087	
肺吸蟲	0.1419 ± 0.0575	$p < 0.001$
肝吸蟲	0.1829 ± 0.1116	$p < 0.001$
蛔蟲	0.1244 ± 0.0443	$p < 0.001$
鈎蟲	0.1523 ± 0.0733	$p < 0.001$

表四、以「日本血吸蟲症慢性病人組」作為對照組與其他寄生蟲病患組進行 *Student' t test* 統計分析

實驗組別	實驗數值 (平均值 ± 標準差)	<i>Student' t test</i>
慢性	0.1873 ± 0.0997	
肺吸蟲	0.1419 ± 0.0575	$p < 0.05$
肝吸蟲	0.1829 ± 0.1116	—
蛔蟲	0.1244 ± 0.0443	$p < 0.001$
鈎蟲	0.1523 ± 0.0733	$p < 0.05$