

• 实验研究 •

恶性疟原虫体外抑制实验方法的改进

曲莉, 张晓莉, 潘卫庆*

(第二军医大学基础医学部病原生物学教研室, 上海 200433)

[摘要] 以恶性疟原虫融合抗原 PfCP-2.9 免疫兔血清为待测血清, 将起始原虫率从 1% 降至 0.2%~0.5%, 采用 2 种方法作对比, 即一组每 24 h 更换培养液、加入免疫血清, 另一组 72 h 内不更换培养液也不加免疫血清试验方法。培养至 72 h, 涂片, 油镜下计数, 计算原虫感染率和抑制率。结果 2 组的抑制率相近, 经统计分析无显著差异。测定不同剂量抗原免疫血清的抑制率, 结果显示抑制率与免疫血清中特异抗体滴度呈正相关, 2 种方法的结果无显著差异。研究表明通过降低起始原虫率可将常规体外抑制实验由需每天换液改为 72 h 不换液。

[关键词] 恶性疟原虫; 体外抑制试验; 方法

[中图分类号] R 382.31 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2004)01-0061-02

Modification of inhibition assay for *Plasmodium falciparum* in vitro

QU Li, ZHANG Xiao-Li, PAN Wei-Qing* (Department of Etiological Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] This paper is to modify growth inhibition assay for *Plasmodium falciparum* in vitro. Sera of rabbits immunized with *P. falciparum* chimeric protein PfCP-2.9 were detected for inhibition of parasite growth using 2 methods: refreshing culture medium at 24 h interval and 72 h interval. The initial parasitemia for the 2 methods was decreased from 1% to 0.2%-0.5%. After 72 h of cultivation, thin blood films were prepared to count parasites within 3 000 RBC. The inhibition rates obtained from 2 methods were not significantly different ($P>0.05$). A panel of immune sera with various doses of specific antibodies were detected by the modified method and the inhibition was positively correlated to antibody level of the sera, and no significant difference of inhibition rates ($P>0.05$) were found between 2 methods. A modified in vitro inhibition assay without refreshing medium during a period of 72 h is established by reduction of initial parasitemia from 1% to 0.2%-0.5%.

[KEY WORDS] *Plasmodium falciparum*; inhibition assay in vitro; methods

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(1): 61-62]

1976 年, Trager 等^[1]成功建立了恶性疟原虫体外连续培养方法。该方法已广泛应用于人体疟原虫分子生物学及免疫学研究领域。疟原虫体外抑制实验是评价抗疟原虫化学和生物制剂效果的一种体外方法。由于人疟原虫缺乏合适的动物模型, 体外抑制实验常用来评价疟疾疫苗或疟原虫抗原免疫效力。本实验室在疟疾疫苗研究和开发过程中, 按国外文献报道建立了恶性疟原虫体外抑制实验方法^[2]。但实践中, 我们发现此方法仍存在不足, 如血清耗量大、工作量大且极易污染等。本文对该方法进行改进, 使之更加简单、易行、结果稳定并进行了实际应用。

1 材料和方法

1.1 材料和仪器 PfCP-2.9 融合抗原由本室构建和纯化^[2]。新西兰兔, 4~6 月龄, 体质量 2.0~2.6 kg, 购自海军医学研究实验动物中心。佐剂 Montanide ISA 720, 购自法国 Seppic 公司。酶标仪 ELX800 为 BIO-TEK 仪器公司生产。

1.2 血清的制备 将已鉴定和纯化的恶性疟原虫融合抗原 PfCP-2.9 及 Montanide ISA72 佐剂^[3]按一定比例充分混匀乳化后, 注射免疫新西兰兔后肢肌肉, 每只兔 1 ml, 对照组注射 PBS, 每组 3 只兔子。每次免疫间隔 3 周, 共免疫 4 次。分别于免疫前和每次免疫后第 10 天心脏取血。待兔血清析出

后, 离心 3 000 r/min, 分离血清, 置 -20℃ 备用。临用前取出, 进行过滤除菌后置 56℃ 水浴中灭活 30 min。本次实验所采用血清为第 3 次免疫后兔血清。

1.3 抗体滴度的检测 用 ELISA 法, 抗原包被质量浓度为 0.33 μg/ml, 4℃ 过夜。一抗为抗血清, 二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔的二抗, 100 μl/孔, 每步 37℃ 温箱反应 1 h, 各步间用 PBST 洗 3 次, TMB 显色后, 用 50 μl 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应。测 450 nm 处光密度值。

1.4 虫株与培养 以本室保存的恶性疟原虫 FCC1/HN 株作为虫源。参照 Trager 等^[1]方法, 在 25 ml 三角烧瓶内培养, 内含培养物 5 ml, 红细胞压积为 3%, 兔血清含量为 15%。置 37℃, 5% CO₂ 培养箱内进行常规培养。

1.5 同步处理 按 Lambros 等^[4]方法进行同步处理。将培养物离心去上清, 加入 5 倍量的 5% 山梨醇溶液, 充分混匀, 置 37℃ 温箱 15 min, 离心 2 000 r/min 去上清, 加入 5 ml 培养液继续培养, 40 h 后重复 1 次。

[基金项目] 世界卫生组织专项基金 (IDA 00265); 国家高新技术发展规划 (“863”计划) 课题 (2001AA215021)。

[作者简介] 曲莉 (1968-), 女 (汉族), 实验师。

* Corresponding author. E-mail: malaria@guomai.sh.cn

1.6 体外抑制实验 同步处理后 24h 的培养物,2 000 r/min 离心 5 min,去上清,涂片,计数,计算感染率。用 50% 的红细胞悬液稀释,使其起始感染率为 0.2%~0.5%,红细胞压积为 2%。分别加至 96 孔培养板内,每孔内加 170 μl 培养物,同时加入 30 μl 免疫血清。每组做 10 个复孔,以免疫前血清为阴性对照。实验分 2 组,一组(方法 1)采用每 24 h 更换培养液和加入免疫血清;另一组(方法 2,为改良方法),即 72 h 不换液,也不加入免疫血清。培养至 72 h,吸弃上清,取红细胞涂片,甲醇固定 5 min,吉姆萨染色,油镜下计数 3 000 个红细胞,算出原虫率。按下面公式^[5]计算(A:原虫率;B:起始感染率):抑制率(%)=[(A-B)_{对照组}-(A-B)_{实验组}]/(A-B)_{对照组}×100%。不同剂量免疫组同时采用 2 种方法(方法 1 和 2),每组做 3 个复孔,实验操作方法同上。

1.7 统计学处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 χ^2 、*t* 检验及相关分析。

2 结果

2.1 原虫率和抑制率比较 见表 1。2 种方法无显著差异。

表 1 2 种方法的疟原虫感染率和抑制率比较
Tab 1 Comparison of parasitemia rate and inhibition rate of immune sera on parasite growth with 2 inhibition methods
(*n*=10, $\bar{x} \pm s$, %)

Group	Immune sera ^a	Preimmune sera ^a
Method 1	0.38±0.15(97.34±0.52)	5.13±0.21(0.18±0.05)
Method 2	0.41±0.10(95.56±0.38)	7.67±0.19(0.34±0.14)

^a: Inhibition data are in brackets

2.2 不同免疫血清的抑制率 见表 2。

表 2 2 种方法检测不同抗体滴度及抑制率比较
Tab 2 Antibody titers and inhibition rate of various doses of antigen with 2 methods

Dose antigen (m/μg)	Rabbit No.	Antibody titers	Inhibition rate(%)	
			Method 1	Method 2
0	01	>50	0	0
	02	>50	0	0
50	03	80 000	17.72	15.69
	04	104 000	19.24	18.32
100	05	120 000	45.00	43.68
	06	188 000	66.67	64.75
200	07	4 820 000	98.94	97.00
	08	2 100 000	85.91	87.14
400	09	4 300 000	97.42	98.32
	10	3 600 000	95.95	94.01
800	11	396 000	48.03	46.00
	12	470 000	64.09	66.41

不同剂量抗原组的免疫血清,其 PfCP-2.9 抗体滴度差异明显。采用 72 h 不换液法测定各组免疫血清的抑制率,结

果显示 200 μg 和 400 μg 组免疫血清的抑制率明显高于其他各组,其中方法 2 组中 50~400 μg 免疫剂量组抑制率与血清滴度呈正相关 $r=0.944 5, P<0.001$,从而证明了 PfCP-2 融合蛋白较好的免疫保护效果与其体外免疫剂量有关。800 μg 组抗体滴度及体外抑制率明显下降,可能与免疫耐受有关。2 种方法测定的抑制率无显著差异($P>0.05$)。

3 讨论

常规恶性疟原虫体外培养方法是每 24 h 换液 1 次,与此相应的疟原虫体外抑制实验同样需要每天换液。我们在疟原虫培养过程中观察到:当起始原虫率降低时可延长至 3 d 换液 1 次,并建立了一种改良的疟原虫体外培养方法^[6]。将常规起始原虫率从 1% 降至 0.2%~0.5%,结果表明,72 h 不换液的原虫率和抑制率与每 24 h 换液结果一致,经统计分析无显著差异。本实验对一组不同抗体水平的免疫血清进行了测定,结果表明采用这 2 种方法测得的结果无显著差异。提示这种方法可适用于不同水平抑制效率免疫血清的测定。72 h 不换液恶性疟原虫体外抑制实验方法的建立无疑可克服每天换液法的诸多弊端,如费时费力、容易污染、结果不稳定等。本方法的最主要优点是血清用量少,特别适用于血清来源困难的实验。

[参考文献]

[1] Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture[J]. *Science*, 1976, 193:673-675.

[2] 张青锋,潘卫庆,曲莉,等. N 端 9 个氨基酸缺失对恶性疟融合抗原免疫原性的影响[J]. *生物化学与生物物理学报*, 2003, 35(4):345-349.
Zhang QF, Pan WQ, Qu L, et al. Influence of deleting 9 amino acid residues at N-terminus on immunogenicity of a *Plasmodium falciparum* chimeric protein [J]. *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Xuebao (Acta Biochimica et Biophysica Sinica)*, 2003, 35(4):345-349.

[3] 张晓莉,黄大庆,徐卫华,等. 不同佐剂对恶性疟融合蛋白 PfCP-2 免疫反应的影响[J]. *中国免疫学杂志*, 2001, 17(11):4-6.
Zhang XL, Huang DQ, Xu WH, et al. The influences of different adjuvants on immune responses during immunizing with *Plasmodium falciparum* chimeric protein PfCP-2 [J]. *Zhongguo Miyanixue Zazhi*, 2001, 17(11):4-6.

[4] Lambros C, Vanderberg JP. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture [J]. *J Parasitol*, 1979, 65(3):418-420.

[5] Chang SP, Gibson HL, Lee-Ng CT, et al. A carboxyl-terminal fragment of *Plasmodium falciparum* gp195 expressed by a recombinant baculovirus induces antibodies that completely inhibit parasite growth [J]. *J Immunol*, 1992, 149(2):548-555.

[6] 潘卫庆. 一种省时的恶性疟原虫体外培养方法[J]. *寄生虫学与寄生虫病杂志*, 1986, 4(1):71.

[收稿日期] 2003-09-17

[修回日期] 2003-11-07

[本文编辑] 尹茶