

【论著】

文章编号:1000-7423(2001)06-0336-04

日本血吸虫中国大陆株 23 kDa 膜蛋白 DNA 疫苗诱导小鼠保护性免疫的研究

任建功¹ 朱荫昌¹ D. A. Harn² 余传信¹ 殷旭仁¹ 司进¹ 何伟¹ 徐明¹ 华万全¹ 许永良¹

【摘要】 目的 研究日本血吸虫中国大陆株 23 kDa 膜蛋白(SjC23)DNA 疫苗诱导 C57BL/6 小鼠免疫保护作用。方法 将全长的 SjC23 基因克隆到真核表达载体 pcDNA3.1, 构建 DNA 疫苗 pcDNA3.1-SjC23; 制备 SjC23 及 IL-12 的两个亚单位 p35、p40 的 DNA 疫苗和对照 pcDNA3.1。48 只 C57BL/6 小鼠随机分为 A、B、C 3 组。A 组小鼠肌注 100 μg pcDNA3.1; B 组注射 100 μg pcDNA3.1-SjC23; C 组肌注 pcDNA3.1-SjC23、pcDNA3.1-p35 及 pcDNA3.1-p40 各 100 μg 的混合物。每隔 2 周各免疫 1 次, 共 3 次。第 8 周每鼠感染 45 ± 2 条/只尾蚴, 45 d 后剖杀, 计数成虫及肝内虫卵。采用免疫组化法检测 SjC23 及 p35、p40 在小鼠局部组织内的表达; 用脾细胞培养法检测经 rSjC23-HD 刺激后, 攻击前、后小鼠脾细胞 IL-2、IL-4、IL-10 和 IFN-γ 的水平。用 Western blotting 检测血清中抗 SjC23 抗体。结果 SjC23 以及 p35、p40 在免疫小鼠股四头肌细胞膜和细胞浆均获得表达。IL-2 和 IFN-γ 的水平攻击前、后在 B 组和 C 组均明显升高。Western blotting 检测抗 SjC23 抗体结果表明, 免疫后两周, B 组 8/10 份血清为阳性, C 组 9/10 份血清阳性。B 组和 C 组分别获得 26.9% 和 35.4% 的减虫率, C 组显著高于 B 组(P < 0.05); 减卵率分别为 22.2% 和 28.4%。结论 SjC23 DNA 疫苗可诱导 C57BL/6 小鼠产生部分抗血吸虫免疫作用。

【关键词】 日本血吸虫; 23 kDa 膜蛋白; DNA 疫苗; 保护性免疫

中图分类号:R383.24

文献标识码:A

Protective Immunity Induced by 23 kDa Membrane Protein DNA Vaccine of *Schistosoma japonicum* Chinese Strain in Mice

REN Jian-gong¹, ZHU Yin-chang¹, D. A. Harn², YU Chuan-xin¹, YIN Xu-ren¹,

SI Jin¹, HE Wei¹, XU Ming¹, HUA Wan-quan¹, XU Yong-liang

(1 Jiangsu Institute of Parasitic Diseases, Wuxi 214064; 2 Harvard School of Public Health, USA)

【Abstract】 Objective To develop 23 kDa membrane protein DNA vaccine of *Schistosoma japonicum* Chinese strain and test its protective efficacy in infected C57BL/6 mice. **Methods** The full length cDNA encoding SjC23 amplified from pUC19-SjC23 subcloned into pcDNA3.1. 48 female mice were divided into three groups: A, B and C. Group A (control group) was each immunized im with 100 μg of pcDNA3.1; group B (SjC23 group) was each immunized im with 100 μg of pcDNA3.1-SjC23; group C (SjC23 + IL-12) was each immunized im with a mixture of 100 μg of pcDNA3.1-SjC23, 100 μg of pcDNA3.1-p35 and 100 μg of pcDNA-p40, followed by two boosts of the same DNA once every two weeks. All the mice were challenged with 45 cercariae at week 8, killed and perfused for worms at week 14. The expression of SjC23 and p35, p40 in muscle tissue was determined by immuno-histochemical method. By the culture of spleen cells, the production of IL-2, IL-4, IL-10 and IFN-γ after the stimulation of rSjC23-HD was determined two weeks before and after challenge. Anti-SjC23 antibodies were tested by Western blotting. **Results** SjC23 and p35, p40 were all expressed on the membrane and in the plasma of muscle cells of the infected mice. Significant increase of IL-2 and IFN-γ in SjC23 and SjC23 + IL-12 groups was observed before and after challenge. Western blotting showed that after the third immunization (before challenge) 8 out of 10 sera from SjC23 group and 9 out of 10 sera from SjC23 + IL-12 group were positive. The worm reduction rate in SjC23 group and SjC23 + IL-12 group was 26.9% and 35.4%, respectively; the number of eggs in liver tissue was reduced by 22.2% and 28.4%, respectively. **Conclusion** pcDNA3.1-SjC23 DNA vaccine could induce partial protection against *Schistosoma japonicum* in C57BL/6 mice.

【Key words】 *Schistosoma japonicum*, 23 kDa membrane protein, DNA vaccine, protective immunity

Supported by the UNDP/World Bank/WHO Special Program for Research and Training in Tropical Disease (TDR) (No. 981051) and partial by Jiangsu Provincial Bureau of Health (No. H9918)

目前我国仍有 108 个县有血吸虫病流行, 69.5 万人感染血吸虫病, 并且随着近年来长江洪水泛滥和退耕还湖又有重新升高的趋势^[1]。多年来, 控制血吸虫

病以化疗为主, 辅以易感地带灭螺的综合性防治措施, 取得较好的效果。但由于在流行区化疗停止后再感染迅速出现和长期、反复、大规模使用吡喹酮化疗, 血吸虫对吡喹酮的潜在耐药性, 迫切需要发展血吸虫疫苗以补充血吸虫病的防治措施^[2]。血吸虫 23 kDa 膜蛋白是具有一定保护作用的疫苗候选分子, 在曼氏血吸虫它可诱导小鼠产生 40% ~ 50% 的保护力, 是世

基金项目: 获世界卫生组织/世界银行/热带病研究和培训特别规划署 (TDR) 资助 (No. 981051) 以及江苏省卫生厅科教处 (No. H9918) 和科技厅应用基础基金的部分资助 (No. BJ98034)

作者单位: 1 江苏省血吸虫病防治研究所, 无锡 214064; 2 美国哈佛大学公共卫生学院

界卫生组织推荐的 6 个血吸虫候选疫苗分子之一^[3]。国内施福恢等用日本血吸虫 23 kDa 膜蛋白大亲水区重组蛋白 r-Sj23-HD 免疫羊, 获得 59% 的减虫率^[4], 表明日本血吸虫 23 kDa 膜蛋白也是一种有潜力的疫苗候选分子。DNA 疫苗作为一种新型的疫苗, 已在包括寄生虫感染在内的多个领域内开展了广泛研究^[5]。本试验试图把日本血吸虫中国大陆株 23 kDa 基因克隆入真核表达载体 pcDNA3.1 构建 DNA 疫苗, 研究其对 C57BL/6 小鼠的免疫保护作用。

材料与方法

1 材料

1.1 工具酶与试剂 DNA 聚合酶、*Bam*HI 和 *Xho*I、T4DNA 连接酶、TaqDNA 聚合酶(Promega 公司)、羊抗鼠 IgG-HRP、羊抗兔 IgG-HRP 和 ConA 均购自上海华美生物工程公司; Endogen IL-2、IL-4、IL-10 和 IFN- γ ELISA 试剂盒购自深圳晶美生物工程公司; 大规模质粒制备试剂盒 Qiagen-2500 (Qiagen 公司)、山羊抗鼠 p35 抗体与 p40 抗体(Santa Cruz 公司)购自上海基因公司。

1.2 质粒与菌种 真核表达载体 pcDNA3.1 (CMV), XLI-blue 受体菌和小鼠 IL-12-pcDNA1.1 由 Dr Ham 提供。

1.3 细胞因子鼠 IL-12 亚单位 DNA 疫苗 pcDNA3.1-p35 及 pcDNA3.1-p40 由本室引进构建^[6]、日本血吸虫 23 kDa 膜蛋白亲水区大片段融合蛋白 GST-HD 由本室余传信博士提供^[7]。

1.4 实验动物和尾蚴 5~6 周龄雌性 C57BL/6 小鼠购自中国科学院上海实验动物中心, 日本血吸虫(中国大陆株)尾蚴由本所血防科钉螺室提供。

2 DNA 疫苗 pcDNA3.1-SjC23 的构建

2.1 引物的设计与合成 根据 SjC23 的基因序列设计两条引物 P1 和 P2, 分别在 P1 和 P2 的 5' 端引入 *Bam*HI 和 *Xho*I 的酶切位点, 由上海生工生物工程公司合成。

P1: 5'-GCGGATCCATGGCGACTTTGGGTACTG-3'
BamHI

P2: 5'-GCCTCGAGTAAACATTCTGATAATCG-3'
XhoI

2.2 SjC23 亚克隆入 pcDNA3.1 小量制备 pUC19-SjC23, 以 pUC19-SjC23 模板进行 PCR 扩增, PCR 产物 SjC23 及 pcDNA3.1 的酶切、连接、质粒的转化及重组

子的筛选均按文献^[8]进行。重组质粒经酶切鉴定, 作 DNA 测序进一步确认。

2.3 DNA 疫苗 pcDNA3.1, pcDNA3.1-SjC23, pcDNA3.1-p35, pcDNA3.1-p40 的制备 按说明书用大规模质粒纯化试剂盒 Qiagen2500 大量制备, 制得的质粒 DNA 溶解于无菌的生理盐水(0.9%)中, 在核酸蛋白测定仪上测定 OD 值, 计算 DNA 浓度。

3 动物保护性试验

将 48 只 C57BL/6 小鼠随机分为 A、B、C 3 组, 每组 16 只。A 组 (pcDNA3.1 组) 经小鼠股四头肌注射 100 μ g pcDNA3.1 质粒 DNA; B 组 (SjC23 组) 注射 100 μ g pcDNA3.1-SjC23 质粒 DNA; C 组 (SjC23 + IL-12 注射 pcDNA3.1-SjC23, pcDNA3.1-p35 及 pcDNA3.1-p40 各 100 μ g 的质粒 DNA 混合物。分别于第 0、2、4 周各免疫接种一次(剂量和方法相同), 于第 8 周每鼠以 45 \pm 2 条/只尾蚴用腹部贴片法攻击感染, 攻击后 45 d 剖杀小鼠。收集成虫计数, 取出肝脏称重后用 5% KOH 37 $^{\circ}$ C 消化过夜, 进行虫卵计数。按公式: 减虫率 = (对照组平均每鼠成虫数 - 实验组平均每鼠成虫数) / 对照组平均每鼠成虫数 \times 100%, 减卵率 = (对照组平均每鼠虫卵数 - 实验组平均每鼠虫卵数) / 对照组平均每鼠虫卵数 \times 100%, 计算减虫率及减卵率。

4 SjC23 及 p35、p40 在小鼠局部肌肉组织内的表达

每组各取 2 只小鼠在第一次免疫后 10 d 再以同剂量加强免疫一次, 4 d 后剖杀小鼠, 取两腿股四头肌做冰冻切片, SjC23 的组化检测首先在每张冰冻切片上加入日本血吸虫重感染兔血清, 4 $^{\circ}$ C 过夜后加二抗羊抗兔 IgG-HRP 反应后经 DAB 显色, 显微镜下观测结果; P35、P40 的检测取 3 组切片, 首先在切片上加入一抗羊抗鼠 P35 和 P40 抗体, 4 $^{\circ}$ C 反应过夜, 用抗羊 ABC 染色系统显色; 显微镜下观测结果。

5 细胞因子检测

分别于攻击前后 2 周每组各取 2 只小鼠拉颈处死, 取出脾脏, 常规法制备单个脾细胞悬液。用 10% FCS RPMI 1640 完全培养液调整细胞浓度为 6×10^5 个/ml, 每孔加入 100 μ l 脾细胞。每组分别用 100 U ConA (10 μ g/ml) 和 GST-HD (10 μ g/ml) 进行刺激。空白孔加入 100 μ l 10% FCS RPMI 1640, 于 5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C 培养 72 h, 离心收集上清进行细胞因子检测。细胞因子检测按说明书采用双抗体夹心法。

6 抗体检测

攻击前 2 周各组分别取 10 份血清、攻击后各组取 5 份血清,用 Western blotting 法检测血清中抗 SjC23 抗体。

7 数据处理

用 *t* 检验进行统计学处理。

结 果

1 重组质粒 pcDNA3.1-SjC23 的鉴定及 DNA 疫苗的制备

挑取阳性克隆用试剂盒提取质粒,与载体对照 pcDNA3.1 一起经 *Bam*HI 和 *Xho*I 双酶切,1% 琼脂糖凝胶电泳,可见重组质粒 pcDNA3.1-SjC23 经酶切后被分成两条带,较小的分子量为 600~700 bp 与 SjC23 分子量相符,另一条带与 pcDNA3.1 经双酶切后条带一致(图 1)。核苷酸序列测定结果表明,重组质粒构建成功。

用 Qiagen-2500 制备的 pcDNA3.1、pcDNA3.1-SjC23、pcDNA3.1-p35、pcDNA3.1-p40 质粒 DNA, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 为 1.8~2.0。

2 SjC23 及 p35、p40 在小鼠骨骼肌中的表达

3 组冰冻切片与血吸虫重感染兔血清反应后,经免疫酶染色后在 SjC23 组及 SjC23 + IL-12 组细胞膜上及细胞浆内可见特异性棕黄色染色,而对照组则无(图 2,3),表明 SjC23 在 SjC23 组和 SjC23 + IL-12 组小鼠局部肌细胞获得表达;3 组冰冻切片与抗 p35、p40 抗体反应后,用抗羊 ABC 染色系统显色后镜检,可见 SjC23 + IL-12 组肌细胞细胞膜及细胞浆特异性棕黄色,而对照组和 SjC23 组均无。表明 p35、p40 在 SjC23 + IL-12 组小鼠局部肌细胞得到表达(图 4~6)。

3 细胞因子检测

经 ConA 和 HD 刺激,3 组 IL-4 在攻击前后均未测出;IL-10 在攻击前、后各组间无明显差异。但 IL-2 和 IFN- γ 水平在攻击前、后,SjC23 组和 SjC23 + IL-12 组与对照组相比有明显升高。经特异性抗原 GST-HD 刺激后,攻击前,IL-2 含量从对照组的 2.1 pg/ml 分别上升到 SjC23 组的 34.8 pg/ml 和 SjC23 + IL-12 组的 65.2 pg/ml;IFN- γ 的含量从对照组的 1 028.7 pg/ml 分别上升到 SjC23 组的 1 451.6 pg/ml 和 SjC23

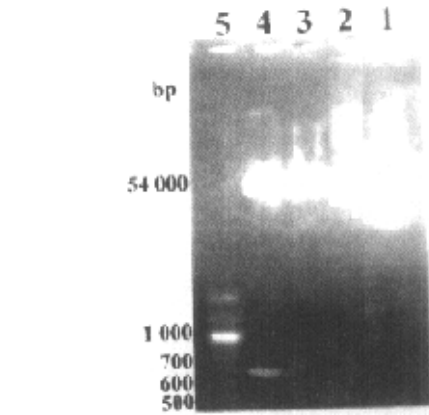


图 1 重组质粒 pcDNA3.1-SjC23 的酶切鉴定 1 质粒 pcDNA3.1 2 重组质粒 pcDNA3.1-SjC23 3 *Bam*HI、*Xho*I 双酶切质粒 pcDNA3.1 4 *Bam*HI、*Xho*I 双酶切重组质粒 pcDNA3.1-SjC23 5 DNA 标准分子量

Fig. 1 Restriction analysis of recombinant plasmid pcDNA3.1-SjC23 1 pcDNA3.1 plasmid 2 Recombinant pcDNA3.1-SjC23 plasmid 3 Restriction analysis of pcDNA3.1 4 Restriction analysis of pcDNA3.1-SjC23 5 DNA standard marker

+ IL-12 组的 2 196.6 pg/ml。攻击后,IL-2 的含量从对照组的 0 pg/ml 分别上升到 SjC23 组的 58.2 pg/ml 和 SjC23 + IL-12 组的 23.1 pg/ml;IFN- γ 的含量从对照组的 0 pg/ml 分别上升到 SjC23 组的 6.8 pg/ml 和 SjC23 + IL-12 组的 782.0 pg/ml。

4 抗体水平

经 Western blotting 检测,免疫后两周,对照组均为阴性,SjC23 组 10 份血清中有 8 份为阳性,SjC23 + IL-12 组 10 份血清中有 9 份为阳性;攻击后两周,3 组被检血清均为阳性。但 ELISA 法只检测到少数小鼠在免疫后两周有较低的抗体滴度。

5 免疫保护作用

A、B、C 3 组平均检获的成虫数及虫卵数见表 1。

经 *t* 检验,B、C 两组的减虫率和减卵率均显著地高于对照组(A 组)($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);同时 C 组减虫率亦显著高于 B 组($P < 0.05$),但 C 组减卵率与 B 组相比差异无显著性意义($P > 0.05$)

讨 论

本实验将日本血吸虫中国大陆株 23 kl)a 基因亚克隆入真核表达载体 pcDNA3.1 中构建 DNA 疫苗 pcDNA3.1-SjC23,通过肌注免疫 C57BL/6 小鼠,获得 26.9% 的减虫率和 22.2% 的减卵率;表明核

表1 SJC23 DNA疫苗免疫 C57BL/6 小鼠后保护效果
Table 1 Protection of SJC23 DNA vaccine in C57BL/6 mice

组别 Group	小鼠数 No. of mice	平均成虫数 Mean No. of adult worms	减虫率 Worm reduction rate (%)	P	每鼠虫卵数 Mean No. of eggs per mouse	减卵率 Egg reduction rate (%)	P
A组 Group A (pcDNA3.1)	10	30.8 ± 5.9	-		157.333 ± 31.480	-	
B组 Group B (pcDNA3.1-SJC23)	6*	22.5 ± 1.9	26.9	<0.01	122.445 ± 30.085	22.2	<0.05
C组 Group C (pcDNA3.1-SJC23 + IL12)	10	19.9 ± 1.3	35.4	<0.01	112.700 ± 33.027	28.4	<0.01

* 部分小鼠在试验过程中死亡

* Part of tested mice died during the experiment

酸疫苗 pcDNA3.1-SJC23 具有部分抗血吸虫感染作用。加入 IL-12 共同免疫,减虫率由 26.9% 增加至 35.4% ($P < 0.05$),减卵率也增加至 28.4%;似表明 IL-12 具有促进 DNA 疫苗 pcDNA3.1-SJC23 的免疫保护作用。IL-12 作为 DNA 疫苗佐剂,可诱导 NK 细胞分泌 IFN- γ ,促进 Th0 细胞向 Th1 分化,诱导 Th1 优势应答,同时可功能性激活 CTL^[9]。本实验结果也表明 SJC23 + IL-12 组 IFN- γ 的水平与 SJC23 组相比在攻击前后均有明显升高,表明 IL-12 有促进 DNA 疫苗 pcDNA3.1-SJC23 诱导 Th1 型细胞免疫的效果。根据 MHC-II 类分子限制性 CD4⁺ Th 细胞分泌细胞因子的不同,CD4⁺ Th 细胞被分为 Th1 和 Th2 两个亚群。CD4⁺ Th1 细胞主要分泌 IL-2 和 IFN- γ ;而 CD4⁺ Th2 细胞主要分泌 IL-4、IL-5 和 IL-10 等^[10]。DNA 疫苗诱导的 CD4⁺ Th 细胞反应主要是以 Th1 型免疫反应为主^[11],而 Th1 型细胞免疫反应又被认为是小鼠抗血吸虫感染的优势免疫应答方式^[12]。本实验结果显示,在攻击前、后 SJC23 组和 SJC23 + IL-12 组 IL-2 和 IFN- γ 的水平与对照组相比,有明显的升高,而 IL-4 和 IL-10 则无明显变化,表明 pcDNA3.1-SJC23 免疫 C57BL/6 小鼠后,诱导以 CD4⁺ Th1 型细胞为主的免疫反应,从而发挥抗血吸虫感染作用。

抗 SJC23 抗体的检测表明,用 ELISA 法在免疫后 2 周 SJC23 组和 SJC23 + IL-12 组只能检出个别小鼠有轻微的抗体反应;而用 Western blotting 法在免疫后 2 周能在 SJC23 组 8/10 份及 SJC23 + IL-12 组 9/10 份血清中检测到抗体反应,表明 pcDNA3.1-SJC23 可诱导小鼠产生一定的抗体反应,但较弱。

提示 pcDNA3.1-SJC23 DNA 疫苗的作用机制可能是以细胞免疫为主。本研究提示,SJC23 DNA 疫苗具有部分抗血吸虫感染作用,值得作进一步研究以提高其保护性免疫作用。(图 2~6 见封三)

参 考 文 献

- [1] 陈贤义,姜庆五,赵根明,等. 2000 年全国血吸虫疫情通报. *中国血吸虫病防治杂志*, 2000,13:129-131.
- [2] McManus DP. A vaccine against *Asia schistosomiasis*: the story and unfolds. *Int J Parasitol*, 2000,30:265-271.
- [3] Bergquist NR, Colley DG. Schistosomiasis vaccine: Research to development. *Parasitol Today*, 1998,14:99-104.
- [4] 施福松,吴祥甫,叶菁,等. 日本血吸虫(中国大陆株)基因工程疫苗研究. *中国血吸虫病防治杂志*, 1998,10(增刊):50-58.
- [5] Ramsey AJ, Ramshaw IA, Ada GL, et al. DNA immunization. *Immunol Cell Biol*, 1997, 75:360-365.
- [6] 司进,朱荫昌, Harm DA, 等. 日本血吸虫(中国大陆株)磷酸丙糖异构酶 DNA 疫苗的研制及其诱导保护性免疫的研究. *中国血吸虫病防治杂志*, 2000,12:324-329.
- [7] 余传信,朱荫昌,殷旭仁,等. 日本血吸虫(大陆株)23 kD 分子(SJC23)大亲水片断(HD)在 pGEX-5X-1z 中表达. *实用寄生虫学杂志*, 2000,8:145-147.
- [8] 萨姆布鲁克,EF 弗里奇, T 曼尼阿蒂斯,等著. 金冬雁等译. 分子克隆实验指南,第 2 版. 北京:科学出版社,1992:34-69.
- [9] Scott P, Trinchieri G. IL-12 as an adjuvant for cell-mediated immunity. *Immunology*, 1997,9:285-291.
- [10] Brunet LR, Durne DW, Pearce EJ. Cytokine interaction and immune responses during *Schistosoma mansoni* infection. *Parasitol Today*, 1998,14:422-427.
- [11] Tighe H, Corr M, Roman M, et al. Gene vaccination: plasmid DNA is more than just a blueprint. *Immunol Today*, 1998,19:89-97.
- [12] Allen JE, Maizels RM. Th1-Th2: reliable paradigm of dangerous dogma. *Immunol Today*, 1997,18:387-392.

(收稿日期:2001-09-03 编辑:庄兆农)

感染大链壶菌后致倦库蚊幼虫血淋巴细胞的观察 Observation on hemocytes of *Culex pipiens quinquefasciatus* larvae infected by *Lagenidium giganteum*

(正文见第 330 页 For text, see p. 330)

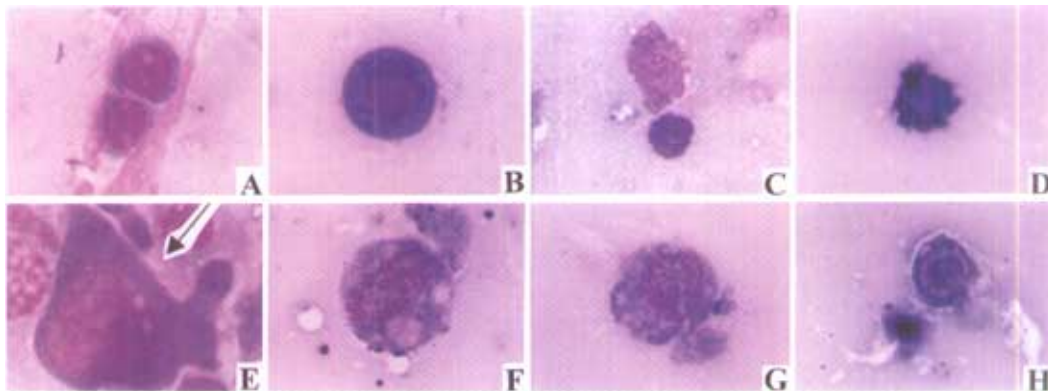


图 1 感染大链壶菌后致倦库蚊幼虫血淋巴细胞的显微观察 $\times 1000$ A 原血胞 B 浆血胞 C 粒血胞 D 珠血胞 E 类绦血胞(箭头所指) F 感染后浆血胞的空泡化 G 感染后浆血胞的外缘皱褶或扭曲 H 感染后浆血胞细胞质出现稀密不均的现象
Fig.1 Microscopic observation on the hemocytes of *Culex pipiens quinquefasciatus* larvae after *Lagenidium giganteum* infection $\times 1000$
A Prohemocyte B Plasmotocyte C Granulocyte D Spherulocyte E Oenocytoid (arrow) F Vacuolation in plasmotocyte after infection
G Contorted and rucked plasmotocyte after infection H Heterogeneity appeared in the plasma of plasmotocyte after infection

日本血吸虫中国大陸株 23 kDa 膜蛋白 DNA 疫苗诱导小鼠保护性免疫的研究 Protective immunity induced by 23 kDa membrane protein DNA vaccine of *Schistosoma japonicum* Chinese strain in mice

(正文见第 336 页 For text, see p. 336)

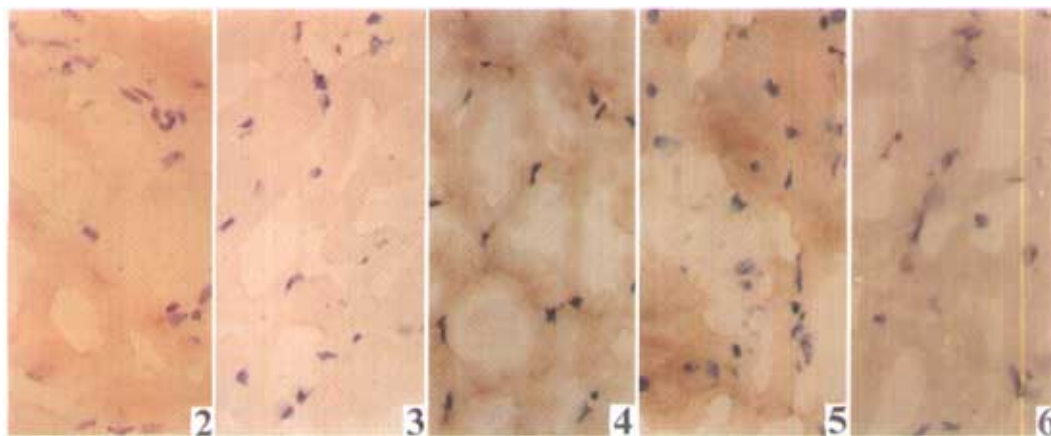


图 2 Sjc23 在免疫鼠(pcDNA3.1-Sjc23)肌细胞中的表达 图 3 Sjc23 在对照组(pcDNA3.1)小鼠肌细胞未获表达 图 4 p35 在免疫鼠(pcDNA3.1-p35 组)肌细胞膜上的表达 图 5 p40 在免疫鼠(pcDNA3.1-p40 组)肌细胞浆内的表达 图 6 p35、p40 在对照组(pcDNA3.1)小鼠肌细胞中未获表达
Fig.2 Expression of Sjc23 in the muscle cells of immunized mouse (pcDNA3.1-Sjc23) Fig.3 No expression of Sjc23 in the muscle cells of control group (pcDNA3.1) Fig.4 Expression of p35 on the membrane of muscle cells of the immunized mouse (pcDNA3.1-p35) Fig.5 Expression of p40 in the plasma of muscle cells of the immunized mouse (pcDNA3.1-p40) Fig.6 No expression of p35 and p40 in the muscle cells of control group (pcDNA3.1)