

## ELISPOT 检测 HLA-A\*0201 转基因小鼠对恶性疟原虫红前期候选抗原的 CTL 应答

钱锋, 张青锋, 沈璐辉, 潘卫庆\*

**【摘要】** 用恶性疟原虫红前期多表位候选抗原 PfCP-3<sup>rd</sup>(含有 1 个 HLA A\*0201 限制的 CTL 表位 YLNKIQNSL)免疫人白细胞抗原复合体(HLA)A\*0201(HLA-A\*0201)转基因小鼠,再用鼠  $\gamma$  干扰素(IFN- $\gamma$ )酶联免疫吸附斑点法(ELISPOT)检测该转基因小鼠特异性 CTL 应答,尝试在转基因实验动物中建立评价恶性疟原虫红前期候选抗原 CTL 应答的方法。结果显示该候选抗原中含有的 CTL 表位在转基因小鼠体内激发了特异性的 CTL 应答,表明该 CTL 表位在转基因小鼠体内能够正确地加工和递呈。

**【关键词】** 疫苗; 恶性疟; 红细胞前期; 细胞毒 T 淋巴细胞; ELISPOT 检测

中图分类号: R382.312, R392.11

文献标识码: B

## CTL Response to Pre-erythrocytic Stage Vaccine Candidate of *Plasmodium falciparum* in HLA-A\*0201 Transgenic Mice Detected by ELISPOT Assay

QIAN Feng, ZHANG Qing-feng, SHEN Lu-hui, PAN Wei-qing\*

(Department of Etiological Biology, the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**【Abstract】** The importance of cytotoxic T-lymphocyte (CTL) against malaria parasite in pre-erythrocytic stage has been presented in relevant researches. In order to investigate whether one CTL epitope (YLNKIQNSL) involved in a chimeric pre-erythrocytic stage vaccine candidate of *Plasmodium falciparum* which was expressed and purified in the laboratory can stimulate *in vivo* CTL response, HLA-A\*0201 transgenic mice were immunized with this vaccine candidate. Enzyme-linked immunosorbent spot (ELISPOT) assay was performed on the splenocytes from the immunized transgenic mice. Positive result indicated that this CTL epitope can be *in vivo* processed and correctly presented.

**【Key words】** *Plasmodium falciparum*; Vaccine; Pre-erythrocytic stage; CTL; ELISPOT assay

Supported by the UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR) (ID A20198)

\* Corresponding author, E-mail: wqpan0912@yahoo.com.cn

疫苗是控制乃至消灭传染性疾病的有效手段。很多实验表明红前期疟原虫抗原具有免疫保护作用,理想的红前期疟原虫疫苗应能同时激发出宿主的体液免疫、CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞以及 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞应答<sup>[1]</sup>,尤其是 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞应答对于免疫保护作用至关重要<sup>[2]</sup>。因此,红前期疟原虫候选抗原能否激发出特异性的由 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞介导的细胞毒 T 淋巴细胞(CTL)应答,是评价这种抗原的一项重要指标。但是在免疫应答过程中,CTL 与抗原递呈细胞以及靶细胞之间的相互作用受到主要组织相容性复合体(MHC)多态性的限制,所以无法用普通实验动物来评价人 MHC 限制的 CTL 表位能否在体内激发出特异性的 CTL 应答。本研究用本室构建的一种恶性疟原虫红前期多表位候选抗原,免疫转基因 C57BL/6 小鼠[转有人白细胞抗原复合体(HLA)A\*0201(HLA-A\*0201 基因)],用鼠  $\gamma$  干扰素(IFN- $\gamma$ )酶联免疫吸附斑点法(ELISPOT)检测试剂盒检测转基因小鼠的特异性 CTL 应答,尝试建立一种评价恶性疟原虫红

前期候选抗原的实验方法。

### 1 材料与方法

1.1 免疫用重组蛋白 重组蛋白 PfCP-3<sup>rd</sup>是由本室构建和纯化的多表位红前期恶性疟原虫候选抗原,包括恶性疟原虫红前期 3 个重要候选抗原环孢子蛋白(CSP)、血小板相关粘附蛋白(TRAP)、肝期抗原 1(LSA1)的多个重要 T、B 细胞表位。全基因合成后在毕氏酵母表达系统中表达,通过阳离子交换层析和脱盐处理而获得纯化。其中含有 1 个 HLA A\*0201 限制的 CTL 表位 YLNKIQNSL<sup>[3]</sup>。

1.2 实验小鼠 转有人的 HLA A\*0201 基因的 C57BL/6 小鼠,购自第三军医大学免疫研究所。该小鼠由美国斯坦福大学 Ai-Xuan T. Le 博士通过向 C57BL/6 小鼠受精卵中微注射含 HLA A\*0201 全基因的 DNA 而构建<sup>[4]</sup>,能在脾脏、骨髓、胸腺来源的小鼠细胞表达人 HLA A\*0201 分子。

1.3 T2 细胞系 购自第三军医大学免疫研究所。HLA A\*0201 限制的 CTL 表位肽与 T2 细胞的 HLA A\*0201 分子结合形成 MHC 复合物,呈现于细胞表面,作为 CTL 应答检测的靶细胞<sup>[3]</sup>。

**基金项目:** 世界卫生组织热带病研究和培训计划项目 (No. A20198)

**作者单位:** 第二军医大学病原生物学教研室,上海 200433

\* 通讯作者, E-mail: wqpan0912@yahoo.com.cn

1.4 寡肽、ELISPOT 试剂盒及实验试剂 HLA A\*0201 限制性 CTL 表位肽 YLNKIQNSL 由上海高科联合生物技术研发有限公司合成(称为 Q1 肽)。鼠 IFN- $\gamma$  ELISPOT 检测试剂盒为美国 R&D System 公司产品(Cat#: EL485), 实验按照操作指南进行。 $\beta$ -2-微球蛋白、非必需氨基酸、丙酮酸钠、人重组 IL-2 为美国 Sigma 公司产品。佐剂 Montanide ISA720 为法国 Seppic 公司产品。其他试剂为实验室常规试剂。

1.5 动物免疫流程 HLA A\*0201 转基因小鼠分成两组: ① 免疫组, 7 只小鼠, 腹腔注射 Montanide ISA720 佐剂与 PfcP-3<sup>rd</sup> 蛋白的乳剂共 2 次, 间隔 4 周, 每鼠每次注射 20  $\mu$ g 蛋白; ② 安慰剂组, 5 只小鼠, 同法注射 Montanide ISA720 佐剂与 PBS 缓冲液的乳剂。于第 2 次免疫后的第 2 周, 无菌条件下取小鼠脾脏。

#### 1.6 CTL 应答检测

1.6.1 靶细胞及对照靶细胞的制备 T2 细胞用 DMEM 完全培养基在 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 用 DMEM 不完全培养基离心洗涤, 沉淀重悬于含 2  $\mu$ g/ml  $\beta$ -2-微球蛋白的 DMEM 不完全培养基中。细胞计数后加入 Q1 肽, 使其终浓度为 10  $\mu$ g/ml。于 37  $^{\circ}$ C 反应 1 h, 每 15 min 轻摇 1 次。反应毕, 用 DMEM 不完全培养基离心洗涤, 最后用 DMEM 反应培养基(DMEM 完全培养基中含 1% 非必需氨基酸、1 mmol/L 丙酮酸钠、10 U/ml 人重组 IL-2) 离心洗涤, 重悬于 DMEM 反应培养基中, 使细胞数为  $2 \times 10^6$ /ml。平行制备 1 份不加 Q1 肽的 T2 细胞, 作为对照靶细胞。

1.6.2 效应细胞的制备 无菌条件下取免疫小鼠的脾脏, 用 100 目筛网, 研磨、洗涤, 制成脾细胞悬液, 加入红细胞破解液(20.6% Tris, 74.7% NH<sub>4</sub>Cl) 破解红细胞, 离心洗涤后用 DMEM 反应培养基调整脾细胞数至  $2 \times 10^6$ /ml。

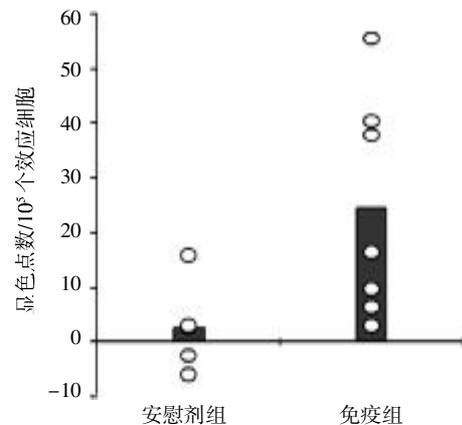
1.6.3 CTL 应答检测 于 ELISPOT 96 孔板上, 每孔注入 200  $\mu$ l DMEM 反应培养基, 室温下预置 20 min。弃液后分为 2 组: ① 实验组, 1 式 3 孔, 每孔加入效应细胞和靶细胞各 50  $\mu$ l, 于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 24 h, 其余步骤按照试剂盒说明进行; ② 对照组, 1 式 3 孔, 每孔加入效应细胞和对照靶细胞各 50  $\mu$ l, 与实验组同法操作。

1.6.4 计数 在立体解剖镜下计数 ELISPOT 96 孔板每孔显色点数(即 spot 数), 取 1 式 3 孔均值。该值对应于效应细胞中分泌 IFN- $\gamma$  的 CTL 数。每一个转基因小鼠 CTL 应答水平 (spot 数/ $10^5$  效应细胞) = 实验组 spot 数/ $10^5$  效应细胞 - 对照组 spot 数/ $10^5$  效应细胞。免疫组小鼠与安慰剂组小鼠之间 CTL 应答水平的差异用 Mann-Whitney Test 进行统计检验。

## 2 结果与讨论

两组小鼠 CTL 应答结果见图 1。免疫组有 3 只小鼠显示出对 PfcP-3<sup>rd</sup> 中含有的 1 个 CTL 表位 YLNKIQNSL 特异性的 CTL 应答, 其中 1 只小鼠 spot 数为  $56/10^5$  个效应细胞, 是安慰剂组最大 spot 数的 3 倍; 另 2 只小鼠 spot 数为安慰剂组最大 spot 数的 2 倍。Mann-Whitney 统计检验显示, 免疫组小鼠的 spot 平均数 ( $24.3/10^5$  个效应细胞) 显著高于安慰剂组的 ( $2.6/10^5$  个效应细胞) ( $P < 0.05$ )。据此初步结果判断, 重组蛋白 PfcP-3<sup>rd</sup>

中含有的 CTL 表位能够在转基因小鼠体内激发出特异性的 CTL 应答, 即: 这一表位在其体内能被正确识别、加工和递呈。



○ 两组小鼠的显色点数, ■ 两组小鼠显色点数均值。

图 1 转基因小鼠 CTL 应答水平

免疫组仅有 3 只小鼠显示出一定水平的特异性 CTL 应答, 其余 4 只则无明显应答。原因是小鼠个体间的差异所致。以重组蛋白 PfcP-3<sup>rd</sup> 为包被抗原, ELISA 检测免疫小鼠血清抗体, 结果表明针对重组蛋白 PfcP-3<sup>rd</sup> 的特异性抗体高低不一, 同样有 4 只小鼠的血清未呈现出强的或是明显的抗体反应。可见在转基因小鼠的不同个体之间确实存在着对重组蛋白 PfcP-3<sup>rd</sup> 的免疫应答差异。虽然前者检测的是细胞免疫应答, 后者为体液免疫应答。不同遗传背景的小鼠, 个体间差异程度不同, 作者曾用重组蛋白 PfcP-3<sup>rd</sup> 以同样的免疫流程免疫普通的 BALA/c 小鼠, 以重组蛋白 PfcP-3<sup>rd</sup> 为包被抗原, ELISA 检测免疫小鼠血清抗体, 结果所有的 BALA/c 小鼠都呈现出强烈的抗体应答。

免疫组转基因小鼠显示的针对 CTL 表位的特异性 CTL 应答并不强烈, 其免疫流程可能是原因之一。文献报道, 用 Montanide ISA720 佐剂与恶性疟原虫孢子蛋白片段的乳剂免疫志愿者, 结果在志愿者中激发出特异性的 CTL 应答<sup>[5]</sup>。

本研究采用类似的方法免疫转基因小鼠, 如果在免疫流程中采用增强细胞免疫应答的方法, 如致敏-增强 (prime-boost) 的免疫策略, 即首先以重组 DNA 或重组减毒病毒载体致敏转基因小鼠, 再以蛋白乳剂增强免疫, 在有效激发体液免疫应答的同时, 可能会更易诱导出有效的细胞免疫应答。不同的免疫接种方式也可诱导不同强度和不同形式的免疫应答。此外, 改进检测方法, 如延长效应细胞与靶细胞的反应时间, 进行多轮体外刺激, 或许可提高阳性反应水平, 加大免疫组与安慰剂组之间的差异。

在免疫应答过程中, CTL 与抗原递呈细胞之间的相互作用(抗原递呈), 以及 CTL 对靶细胞的杀伤作用, 都必须在识别抗原分子的同时, 识别出细胞表面的自身成分, 即 MHC 分子, 否则反应不会发生。这种在免疫应答中, 细胞的相互作用受到 MHC 控制的现象称为 MHC 限制性。由于人和动物的 MHC I 类分子的差异, 使得在普通实验动物中无法评价人 MHC 限制的 CTL 应答。转有人 MHC I 类分子的转基因小鼠动物模型的建立, 使在实验动物中实施这一评价工作得以可能。IFN- $\gamma$

ELISPOT检测试剂盒用于在单个细胞基础上检测分泌 IFN- $\gamma$  的细胞数,可获得 IFN- $\gamma$  分泌细胞的频数,ELISPOT 检测适用于免疫应答的监控,如定量检测抗原特异的 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞和 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞的应答,尤其是 CTL 应答,具有敏感、特异、操作简便以及无放射污染等优点。

参 考 文 献

[ 1 ] Wang R, Epstein J, Charoenvit Y, *et al.* Induction in humans of CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>T cell and antibody responses by sequential immunization with malaria DNA and recombinant protein[J]. J Immunol, 2004, 172: 5561-5569.

[ 2 ] Meraldi V, Romero JF, Kensil C, *et al.* A strong CD8<sup>+</sup>T cell response is elicited using the synthetic polypeptide from the C-terminus of the circumsporozoite protein of *Plasmodium berghei* together with the adjuvant QS-21: quantitative and

phenotypic comparison with the vaccine model of irradiated sporozoites[J].Vaccine, 2005, 23:2801-2812.

[ 3 ] Bonelo A, Valmori D, Triponez F, *et al.* Generation and characterization of malaria-specific human CD8<sup>+</sup> lymphocyte clones: effect of natural polymorphism on T cell recognition and endogenous cognate antigen presentation by liver cells[J]. Eur J Immunol, 2000, 30:3079-3088.

[ 4 ] Le AX, Bernhard EJ, Holterman MJ, *et al.* Cytotoxic T cell response in HLA-A2.1 transgenic mice. Recognition of HLA allo-antigens and utilization of HLA-A2.1 as a restriction element [J]. J Immunol, 1989, 142: 1366-1371.

[ 5 ] Lopez JA, Weilenman C, Audran R, *et al.* A synthetic malaria vaccine elicits a potent CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>T lymphocyte immune response in humans. Implications for vaccination strategies[J]. Eur J Immunol, 2001, 31: 1989-1998.

(收稿日期:2005-08-29 编辑:富秀兰)

《实验动物与比较医学》征稿征订启事

【消息】

《实验动物与比较医学》(原《上海实验动物科学》),是我国实验动物科技领域第一本专业性刊物。创刊 25 年来发表实验动物与比较医学各个方面的论文近 3 000 篇,刊载了企事业单位和个人的大量宣传资料和信息,读者、作者遍及全国各地。

近年来本刊先后被美国《化学文摘》、《中国学术期刊(光盘版)》、《中国生物学文摘》、中文科技期刊数据库、中国生物医学文献数据库、中国生物医学数据库、中文电子期刊服务资料库收录,是中国学术期刊综合评价数据库来源期刊、《中国期刊网》和“万方数据-数字化期刊群”入网期刊。2006 年起进入《中国科技论文统计源期刊》(中国科技核心期刊)。

本刊是从事实验医学研究、药理毒理研究、实验动物饲养管理、遗传育种、监测技术研究等领域的科技工作者交流的园地和良师益友,欢迎赐稿和订阅。本刊为季刊,每期 64 页大 16 开全铜板纸精印,季末出版,每期定价 10 元,全年 40 元(含邮费),邮发代号 4-789。

地址:上海市市南斜土路 2140 号, 邮编:200032, 电话:021-64438154。

E-mail: dwbjb@sippr.stc.sh.cn; qhfu.6402@yahoo.com.cn

(Continued from outside back cover)

SHORT COMMUNICATIONS

Study on the relationship between the degree of periportal fibrosis, hepatic parenchymatous fibrosis and diameter of portal vein in *Schistosoma japonicum* infection

..... FU Xiao, LUO Xin-song, HOU Xun-ya, *et al* (265)

The current prevalence of intestinal parasites in Beijing ..... JIA Lei, WANG Xiao-mei, MA Xiao-yan, *et al* (313)

A searching system of parasite pictures and relevant information

..... CHEN Hai-ning, HAO Zhi-ming, ZHU Xian-yin (315)

CTL response to pre-erythrocytic stage vaccine candidate of *Plasmodium falciparum* in HLA-A\*0201

transgenic mice detected by ELISPOT assay ..... QIAN Feng, ZHANG Qing-feng, SHEN Lu-hui, *et al* (319)

CASE REPORTS

Intestinal amebiasis and amebic liver abscess in a case of HIV carrier

..... CHENG Dan-ying, HAN Ning, ZHAO Hong-xin (246)

*Psychoda* larvae in urine of a woman ..... WANG Xin-cai, LIU Run-fang (256)

Infection of *Sparganum mansoni* through wounded skin

..... ZHANG Yong-nian, CHEN Shao-hong, CHANG Zheng-shan, *et al* (317)

Heavy infection of *Hymenolepis diminuta* in an infant ..... ZANG Ping, YAO Rong-cheng, ZHOU Ben-jiang (318)