

重组日本血吸虫 26 kDa GST 抗原免疫家兔后抗体动态观察*

徐裕信 宋光承 刘述先

中国预防医学科学院寄生虫病研究所** 上海 200025

提要 目的: 探讨重组日本血吸虫 26 kDa GST 抗原免疫家兔后抗体水平动态变化。方法: 家兔随机分为免疫组与佐剂对照组, 免疫组用纯化重组日本血吸虫 26 kDa GST 抗原加福氏佐剂免疫; 佐剂对照组用 0.85% 盐水加福氏佐剂免疫。免疫后, 每兔逐周取耳静脉血, 采用酶联免疫吸附试验(ELISA) 检测血清中特异性抗体水平。结果: 免疫组家兔从免疫后第 4 wk 起血清中特异性抗 GST 抗体升高, 且维持在较高的水平达 65 wk。结论: 重组日本血吸虫 26 kDa GST 抗原免疫家兔后, 特异性抗 GST 抗体水平较对照组明显升高, 且至少能维持 1 年。

关键词 日本血吸虫 重组抗原 谷胱甘肽-S-转移酶 酶联免疫吸附试验

曼氏血吸虫 28 kDa 谷胱甘肽-S-转移酶(GST), 已被公认为曼氏血吸虫一种保护性抗原, 现已被 WHO 列入血吸虫疫苗的主要候选抗原之一。我们通过一系列实验研究证明 26 kDa GST 是日本血吸虫大陆株疫苗的主要候选抗原, 在解决编码日本血吸虫大陆株 26 kDa GST 抗原基因的克隆和高效表达后, 用重组日本血吸虫大陆株 26 kDa GST 作抗原免疫小鼠及家畜(猪、牛)的体内试验。结果均表明, 免疫后不仅减轻小鼠、猪、牛对攻击感染的虫负荷, 还可产生明显的抗生殖免疫作用^[1~4]。为了进一步观察日本血吸虫大陆株 26 kDa GST 抗原免疫后的免疫持效作用, 以确立该种疫苗免疫接种的正确免疫方案, 作者主要观察以重组日本血吸虫大陆株 26 kDa GST 抗原免疫家兔后特异性抗 GST 抗体动态变化状况。

材料与方 法

1 重组日本血吸虫大陆株 26 kDa GST 抗原制备

含日本血吸虫大陆株 26 kDa GST 抗原基因的工程菌(DH5 α)温控表达后, 超声粉碎, 应用亲和层析法纯化出 26 kDa GST。经 SDS-PAGE, GST 酶活性测定, 标准血清 GST-ELISA, GST-Western blotting 鉴定合格后, 存-55 $^{\circ}$ C 冰箱备用^[5]。

2 试验动物分组及方案 选用上海万祥医用实验动物饲养场繁殖, 经卫生部上海实验动物监测中心检验合格的新西兰家兔, 体重 2.0 kg~2.5 kg 18 只, 随机分为 GST 抗原免疫组和佐剂对照组。以重组 GST 抗原 50 μ g 加 FCA 皮下多点免疫每只家兔, 2 wk 后再以重组 GST 抗原 50 μ g 加 IFCA 皮下免疫 1 次, 2 wk 后 iv 加强免疫 1 次。佐剂对照组免疫方案同免疫组, 仅以 0.85 生理盐水替代重组

GST 抗原。

3 特异性抗体水平的检测(GST-ELISA)

3.1 抗原 重组日本血吸虫 26 kDa GST 抗原。

3.2 血清 每只家兔在免疫前及免疫后逐周自耳静脉采血, 分离血清置-20 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

3.3 GST-ELISA ELISA 方法见《寄生虫病免疫学与免疫诊断》免疫酶测定技术^[6], 稍作修改。

以重组日本血吸虫大陆株 26 kDa GST 抗原蛋白经 0.05 mol/L 碳酸氢钠缓冲液 pH 9.6 稀释至蛋白浓度 1 μ g/100 μ l, ELISA 试验时以 100 μ l 包板。每次检测均设参考阳性与参考阴性对照, 待检各周兔血清均作 1:200 稀释, 辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG(华美生物医学工程公司), 批号(R-2350), 工作浓度 1:1000 稀释。观察结果时用 Bio-Rad 450 型酶标仪测定, 读取 492 nm 波长的消光值。

结 果

免疫组与对照组家兔在免疫前及免疫后, 均逐只逐周自耳静脉采血进行特异性抗 GST 抗体动态水平观察。每次实验时, 每只兔血清分别用 GST-ELISA 检测, 每次实验均设参阴、参阳。每批试验结果均以当批参阳兔血清 OD 值为标准, 来校正免疫组及对照组每只兔所测得的 OD 值, 再计算各组所测得的 OD 值均数及标准差。结果见图 1。

从图中可看出, 免疫组与对照组在免疫前, 免疫后 1 wk、2 wk、3 wk OD 值非常接近, 个体差异不明显, 表明免疫组与对照组在特异性抗体没有产生之

* 国家科委 863 高技术计划资助项目

** 1 世界卫生组织疟疾、血吸虫病和丝虫病合作中心

2 卫生部寄生虫病学重点实验室

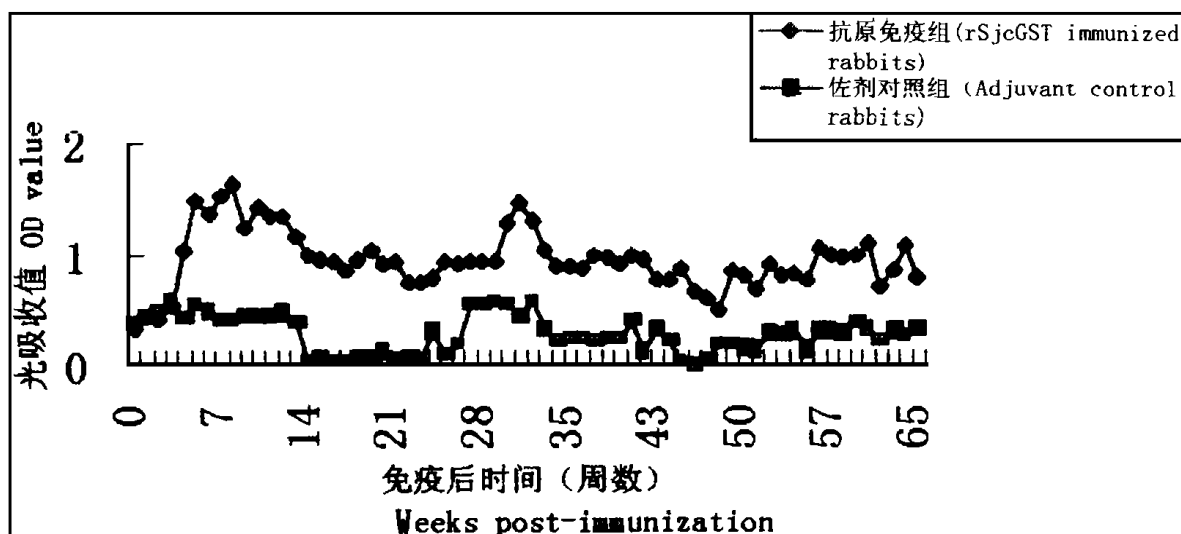


图1 重组日本血吸虫 26 kDa GST 抗原免疫家兔后特异性抗 GST 抗体水平
Fig 1 Specific anti-rGST antibody levels in sera from rabbits immunized with recombinant 26 kDa GST of *Schistosoma japonicum* (rSjc26 GST)

前OD 值变化不大。免疫组家兔在第2次免疫后,即产生了针对 GST 的抗体免疫应答,第4wk 免疫组抗 GST 抗体与对照组相比开始升高,免疫组OD 值 1.03 ± 0.46 ,佐剂对照组OD 值 0.42 ± 0.04 。在加强免疫结束后,免疫组OD 明显升高,至第8wk 达到了最高峰OD 值 1.63 ± 0.67 ,佐剂对照组OD 值 0.39 ± 0.18 。然后逐周下降至15wk 后维持在一较高水平,在29wk 两组OD 值相对较接近,免疫组OD 值 0.93 ± 0.05 ,对照组OD 值 0.56 ± 0.06 ,经统计学处理 $P < 0.001$ 。到31wk 抗 GST 抗体出现了第二个高峰免疫组OD 值 1.47 ± 0.11 ,对照组为 0.44 ± 0.05 。以后逐渐下降至48wk 产生第二低点,免疫组OD 值 0.50 ± 0.27 ,对照组 0.19 ± 0.03 , ($P < 0.05$)。一直到65wk 观察期结束, GST 抗原免疫组抗体平均OD 值为 0.94 ± 0.26 ,佐剂对照组为 0.29 ± 0.16 ($P < 0.001$)。

讨 论

作者报告了以纯化的重组日本血吸虫 26 kDa GST 抗原免疫家兔后,采用 GST-ELISA 逐周检测兔血清中特异性抗 GST 抗体,持续观察时间长达65wk,这样长时间不间断地对 GST 免疫动物进行抗体水平动态变化的观察尚未见报道。在以往免疫实验动物(如小鼠、大鼠、兔等)及家畜(如猪、羊、牛等)的实验研究过程中,应用重组日本血吸虫大陆株 26 kDa GST 抗原免疫动物,用 GST-ELISA 检测,

均发现血清中产生明显特异性抗 26 kDa GST 抗体,而且,上述动物经攻击感染后都可产生不同程度的减虫率(小鼠为 23.7%~26.4%,猪 25.2%~28.5%,水牛为 22.3%)和减卵率(小鼠 55.5%~72.8%,猪 53.5%~71.8%,水牛为 47.9%),其免疫保护作用是比较肯定的^[2-4]。但以上实验仅仅同一个体免疫前后的比较,或是重组 GST 抗原免疫后攻击感染前、后免疫组和对照组的比较,观察时间局限且不连续,最长的连续观察时间为免疫后 12wk。

我们曾报道抗 GST 单抗介导嗜中性、嗜酸性粒细胞对日本血吸虫童虫体外杀伤效应试验(ADCC)^[7]。因此,特异性抗 GST 抗体很可能在日本血吸虫的保护性免疫力中起着重要作用。此外,已有报告曼氏血吸虫 28 kDa GST 免疫动物保护性免疫力与特异性抗体升高有关。在大鼠用重组 Sm 28 GST 抗原一次免疫,曾获得高达 59% 的对曼氏血吸虫的减虫率,而且观察到体液免疫方面除诱导特异性 IgG 外,还有高水平的 IgE 和 IgA 抗体,从而表明抗 GST 特异性抗体升高可能与其后的对再感染获得性抵抗力有着较大的相关^[8]。本实验用重组日本血吸虫大陆株 26 kDa GST 抗原免疫家兔后抗体动态变化观察还很初步,进一步实验包括重组 Sjc26 GST 免疫后抗体亚类分析,所诱导的抗生殖免疫机制与保护性免疫效果的关系,以及重组 Sjc26 GST 免疫大动物黄牛后保护性免疫效果持续时间等尚在进行中。

参 考 文 献

1 刘述先, 宋光承, 丁丽韵, 等 日本血吸虫大陆株 GST 抗原 中国寄生虫学与寄生虫病杂志 1992; 10 311~ 312

2 Liu SX, Song GC, Xu YX, et al Immunization of mice with recombinant Sj26 GST induces a pronounced anti-fecundity effect after experimental infection with Chinese *Schistosoma japonicum*. Vaccine 1995; 13 603~ 607

3 Liu SX, Song GC, Xu YX, et al Anti-fecundity immunity induced in pigs vaccinated with recombinant 26kDa GST of Chinese *Schistosoma japonicum*. Parasit Immun 1995; 17 335~ 340

4 Liu SX, He YK, Song GC, et al Anti-fecundity immunity to *Schistosoma japonicum* induced in Chinese water buffaloes (*Bos buffelus*) after vaccination with recombinant 26kDa glutathione-S-transferase (reSj26GST). Veterinary Parasitology 1997; 69 39~ 47

5 刘述先, 丁丽韵, 宋光承, 等 日本血吸虫重组 Sj26 抗原抽提、纯化及初步应用 中国寄生虫病防治杂志 1991; 4 201~ 204

6 李允鹤, 刘述先, 宋昌存, 等 寄生虫病免疫学及免疫诊断 南京: 江苏科学技术出版社, 1991 356~ 360

7 刘述先, 丁丽韵, 宋光承, 等 抗日本血吸虫蛋白质“靶抗原”单克隆抗体的研究 中国寄生虫学与寄生虫病杂志 1990; 8 88~ 91

8 许绶泰 国际血吸虫病疫苗研制最新进展 中国兽医寄生虫病 1994; 2 22~ 25

1998 年 4 月 17 日收稿 1998 年 9 月 29 日修回

(编辑: 庄兆农)

OBSERVATION ON THE DYNAMICS OF SPECIFIC ANTI-GST ANTIBODIES IN RABBITS IMMUNIZED WITH RECOMBINANT 26 kDa GST OF SCHISTOSOMA JAPONICUM *

XU Yuxin, SONG Guangcheng, LI Shuxian

Institute of Parasitic Diseases, Chinese Academy of Preventive Medicine **, Shanghai 200025

ABSTRACT

AM: To investigate the dynamics of the anti-GST antibodies in rabbits immunized with recombinant 26 kDa GST of *Schistosoma japonicum*. **METHODS:** The specific antibodies were detected weekly by GST-ELISA in rabbits vaccinated with purified recombinant 26 kDa GST antigen of *S. japonicum* plus FCA/IFCA; rabbits immunized with 0.85% saline plus FCA/IFCA served as control group. **RESULTS:** The specific anti-GST antibodies began to increase at week 4 post-immunization, the mean OD value in rabbits vaccinated with recombinant GST could reach 1.03 ± 0.46 (adjuvant control group only 0.42 ± 0.04). The experiment was completed at week 65 post-immunization when the mean OD values for specific anti-GST antibody in immunized rabbits were 0.94 ± 0.26 (0.29 ± 0.16 in the control group). **CONCLUSION:** Strong anti-GST antibody responses could be induced in rabbits vaccinated with recombinant 26 kDa GST of *S. japonicum*.

Key words: *Schistosoma japonicum*, recombinant antigen, glutathione-S-transferase, ELISA

* Supported by National 863 Bio-tech Programme

** WHO Collaborating Centre for Malaria, Schistosomiasis and Filariasis