

文章编号: 1000-7423(2009)-06-0534-03

日本血吸虫体表蛋白 Tetraspanin 2-A 核酸疫苗的构建及其对小鼠的免疫试验

张鹏, 张薇娜, 任翠平, 刘淼, 沈际佳*

【摘要】 采用 PCR 法扩增日本血吸虫体表四跨膜家族蛋白 2-A(SjTsp2-A)基因, 构建重组质粒 pcDNA3.1(+)/SjTsp2-A, 将其转至大肠埃希菌 DH5 α 制备 DNA 疫苗 pcDNA3.1(+)/SjTsp2-A。24 只 BALB/c 小鼠均分 3 组, 每鼠于左股四头肌注射 0.5 mg/ml 盐酸布比卡因 50 μ l。次日, A 组同法注射 DNA 疫苗 pcDNA3.1(+)/SjTsp2-A, B 组注射重组质粒 pcDNA3.1(+)/SjGST, C 组注射空质粒 pcDNA3.1(+). 注射剂量均为 100 μ g/只。每隔 2 周注射 1 次, 共 3 次, 末次免疫后 2 周各组均经腹部皮下感染日本血吸虫尾蚴 40 \pm 2 条/鼠, 45 d 后剖杀, 计数减虫率和减卵率。ELISA 检测抗体效价, A 组化分析股四头肌局部组织蛋白表达情况。结果 A 组的平均检虫数和每克肝组织虫卵数均显著低于 B 组和 C 组(P 值均 <0.05), A 组的减虫率和减卵率分别为 44.4%和 28.4%。A 组血清抗体效价高达 1:25 600。A、B 两组局部组织均有特异性蛋白表达。DNA 候选疫苗 pcDNA3.1(+)/SjTsp2-A 能诱导小鼠产生一定的免疫保护作用。

【关键词】 日本血吸虫; 体表蛋白; 核酸疫苗; 免疫保护

中图分类号: R532.21

文献标识码: B

Construction of DNA Vaccine pcDNA3.1(+)/Tetraspanin 2-A against *Schistosoma japonicum* and its Immuno-protective Effect in Mice

ZHANG Peng, ZHANG Wei-na, REN Cui-ping, LIU Miao, SHEN Ji-jia*

(Department of Microbiology and Parasitology, Anhui Medical University, Hefei 230032, China)

【Abstract】 Tetraspanin 2-A (SjTsp2-A) gene was amplified by PCR. pcDNA3.1(+)/SjTsp2-A recombinant plasmids were constructed and transformed into *E. coli* DH5 α . Twenty four BALB/c mice were randomly divided into pcDNA3.1(+)/SjTsp2-A group (A), pcDNA3.1(+)/SjGST group (B) and pcDNA3.1(+) group (C). Each mouse was injected through musculus quadriceps femoris by three times (two weeks interval) respectively with 100 μ g pcDNA3.1(+)/SjTsp2-A, pcDNA3.1(+)/SjGST, or pcDNA3.1(+). At two weeks after the final inoculation, mice were each challenged by 40 \pm 2 cercariae of *S. japonicum*. Forty-five days after infection, all mice were sacrificed, the number of worms collected and eggs in liver tissue was counted. Anti-pcDNA3.1(+)/SjTsp2-A antibody was detected by ELISA and protein expression in quadriceps muscle by immunohistochemical staining. The worm reduction rate (44.4%) and egg reduction rate (28.4%) of group A was higher than those of group B and C ($P<0.05$), but no significant difference between groups B (3.9%, 19.3%) and C. Higher antibody titer (1:25 600) was detected in sera of group A. Immunohistochemistry analysis showed an expression of specific antigens in quadriceps muscles of groups A and B. The DNA candidate vaccine induces partial protective immunity against *S. japonicum* in BALB/c mice.

【Key words】 *Schistosoma japonicum*; Surface membrane protein; DNA vaccine; Protective immunity

Supported by the Natural Science Fund of Anhui Province (No.050430805) and Educational Fund of Anhui Province (No.2006KJ359B)

* Corresponding author, E-mail: shenjijia@hotmail.com

血吸虫病严重威胁着人类健康。Waine 等^[1]认为核酸疫苗的发展应该构建外源性抗原表位或蛋白片段导入受试对象以诱发保护性免疫反应。Braschi 等^[2]发现曼氏血吸虫四跨膜家族蛋

白(SmTsp2), Tran 等^[3]用 SmTsp2 蛋白免疫小鼠获得 57%减虫率和 64%减卵率, 认为 SmTsp2 蛋白可能是潜在的疫苗分子。王阳阳等^[4]克隆表达并鉴定日本血吸虫体表四跨膜超家族蛋白(SjTsp2)时, 从 cDNA 文库中扩增出 3 个不同的 SjTsp2 基因(SjTsp2-A、B、C), 三者核酸及氨基酸序列同源性皆约 90%, 推测可能为 3 个不同亚型。本实验通过 PCR 扩增日本血吸虫体表四跨膜家族蛋白 2-A(SjTsp2-A)基因构建核酸疫苗, 并检

基金项目: 安徽省自然科学基金 (No. 050430805); 安徽省教育厅基金 (No. 2006KJ3586)

作者单位: 安徽医科大学病原生物学教研室, 合肥 230032

* 通讯作者, E-mail: shenjijia@hotmail.com

测其抗日本血吸虫感染的免疫效果。

1 材料与方 法

1.1 主要材料与实验动物 质粒 pET28(a)/SjTsp2-A 由王阳阳等^[4]构建, 质粒 pcDNA3.1(+)及 pcDNA3.1(+)/SjGST 由本室保存。T 载体购自日本 TaKaRa 公司, 大肠埃希菌(*E. coli*)DH5 α 由本室保存。限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I, *Taq* DNA 连接酶和 *T₄* 连接酶均购自日本 TaKaRa 公司, 质粒提取试剂盒及 DNA 凝胶回收试剂盒购自北京道普生物科技有限公司, SjTsp2-A 血清蛋白为本实验室制备(用 Tsp2-A 蛋白免疫小鼠获得), 链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法(streptavidin-peroxidase, SP 法)试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司, 其余试剂均为国产分析纯。6~8 周龄雌性 BALB/c 小鼠 24 只, 体重 20 \pm 2 g/只, 购自安徽省实验动物中心。

1.2 核酸疫苗 pcDNA3.1(+)/SjTsp2-A 的构建 根据 SjTsp2-A 的基因序列^[4]设计 P1 和 P2 两条引物, 分别在其 5' 端引入 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点(下划线)。P1: 5'-GGATCCATG-GAAAAGCCGAAGATG-3', P2: 5'-CTCGAGCTAGTCTTT-TAGTCAG-3'。以质粒 pET28(a)/SjTsp2-A 为模板, 进行 PCR 扩增, 条件为 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 45 s, 54 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。用 1% 琼脂糖凝胶电泳观察分析结果, PCR 产物 SjTsp2-A 按试剂盒说明进行回收。

回收的 PCR 产物 SjTsp2-A 与 T 载体于 4 $^{\circ}$ C 连接, 过夜, 转化感受态细菌 *E. coli* DH5 α , 涂于含 100 μ g/ml 氨苄青霉素 LB 固体平皿。挑取单一菌落提取质粒 SjTsp2-A-VT, 用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切, 将目的片段和空质粒 pcDNA3.1(+) 于 4 $^{\circ}$ C 连接, 过夜, 转化感受态细菌 *E. coli* DH5 α , 涂于含 100 μ g/ml 氨苄青霉素 LB 固体平皿。挑取单一菌落提取重组质粒 pcDNA3.1(+)/SjTsp2-A, 经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切、测序鉴定。

按照质粒提取试剂盒说明大量制备重组质粒 pcDNA3.1(+)/SjTsp2-A、pcDNA3.1(+)/SjGST, 以及空质粒 pcDNA3.1(+), 并通过紫外分光光度计测定其纯度和浓度。

1.3 免疫动物及攻击感染 24 只小鼠均分 3 组, 即免疫组(A 组)、重组质粒对照组(B 组)及空质粒对照组(C 组)。每鼠于左股四头肌注射 0.5 mg/ml 盐酸布比卡因 50 μ l, 次日, A 组经股四头肌注射 DNA 疫苗 pcDNA3.1(+)/SjTsp2-A 100 μ g/只, B 组同法注射重组质粒 pcDNA3.1(+)/SjGST 100 μ g/只, C 组同法注射空质粒 pcDNA3.1(+), 100 μ g/只。每隔 2 周免疫 1 次, 共 3 次, 末次免疫后 2 周各组均经腹部皮下感染日本血吸虫尾蚴 40 \pm 2 条/鼠, 45 d 后剖杀取肝称重, 于 37 $^{\circ}$ C 5% KOH 消化过夜, 计数各组减虫率和减卵率。

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 (%)=[(对照组平均每鼠肝虫卵数-实验组平均每鼠肝虫卵数)/对照组平均每鼠肝虫卵数] \times 100%

1.4 抗体效价检测及局部组织蛋白表达情况 取日本血吸虫成虫约 100 条, 研磨后反复冻融 3 次, 超声离心, 取上清即为成虫粗抗原。3 组小鼠, 以免疫前尾静脉取血、末次免疫后 10 d 眼球取血分离血清为一抗, 辣根过氧化物酶(HRP) 标记的羊抗

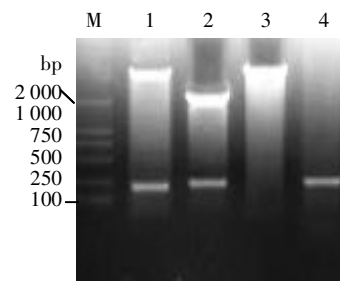
鼠 IgG (稀释度为 1:80 000) 为二抗。ELISA 检测免疫后各组血清抗体效价。取免疫部位股四头肌制作冰冻切片, 观察局部组织蛋白表达情况。分别取 A 组和 B 组免疫血清为一抗, 按照 SP 法说明书观察两者在股四头肌中的表达情况。

1.5 统计学分析 用 SPSS13.0 软件分析各组平均虫数和每克肝组织虫卵数以($\bar{x}\pm s$)表示, 对各组间差异进行 *t* 检验。

2 结果

2.1 SjTsp2-A 基因扩增和 T 载体的连接 以质粒 pET28(a)/SjTsp2-A 为模板, 用引物 P1、P2 进行扩增, 其扩增产物再经琼脂糖电泳, 获得相对分子质量约为 228 bp 的单一 DNA 条带, 与 T 载体连接后酶切亦获得此条带(图 1)。

2.2 核酸疫苗 pcDNA3.1(+)/SjTsp2-A 的鉴定 重组质粒 pcDNA3.1(+)/SjTsp2-A 经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切, 以及 PCR 扩增产物目的片段 SjTsp2-A 的电泳结果, 均出现约 228 bp 特异性条带, 测序结果亦显示插入片段 SjTsp2-A 与 GenBank 中已知基因测序同源率为 100%, 表明重组质粒 pcDNA3.1(+)/SjTsp2-A 构建成功(图 1)。



M: DNA 标志物, 1: A 组 (pcDNA3.1 (+)/SjTsp2-A), 2: SjTsp2-A-VT, 3: C 组 (pcDNA3.1(+))空质粒, 4: PCR 产物 SjTsp2-A。

图 1 重组质粒 pcDNA3.1(+)/SjTsp2-A 限制性内切酶酶切鉴定

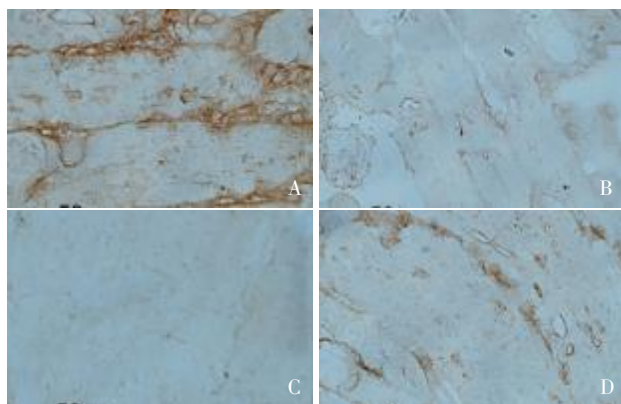
2.3 抗体水平检测 末次免疫后 10 d, ELISA 检测各组免疫小鼠血清抗成虫粗抗原抗体效价, A 组为 1:25 600, B 组为 1:6 400, C 组为 1:1 600(免疫前为 1:800)。

2.4 股四头肌局部组织的表达 免疫组化分析结果显示, A 组和 B 组股四头肌肌细胞胞浆和包膜均有特异性棕黄褐色颗粒物质, 而 C 组则无。表明重组质粒中的目的基因能在小鼠肌细胞内表达相应的抗原蛋白(图 2)。

2.5 免疫保护 结果显示, A 组的平均检虫数和每克肝组织虫卵数均显著低于 B 组和 C 组(*P* 值均 $<$ 0.05), A 组的减虫率和减卵率分别为 44.4% 和 28.4%。B 组和 C 组的平均减虫数和每克肝组织虫卵数差异均无统计学意义(*P* 值均 $>$ 0.05)(表 1)。

表 1 pcDNA3.1(+)/SjTsp2-A 和 pcDNA3.1(+)/SjGST 免疫诱导的减虫率及减卵率($n=8$)

组别	成虫			虫卵		
	平均检虫数($\bar{x}\pm s$)	减虫率 (%)	<i>P</i> 值	每克肝组织虫卵数($\bar{x}\pm s$)	减卵率 (%)	<i>P</i> 值
A 组	14.2 \pm 4.8	44.4	$<$ 0.05	27 067 \pm 6 634	28.4	$<$ 0.05
B 组	24.6 \pm 4.1	3.9	$>$ 0.05	30 510 \pm 10 254	19.3	$>$ 0.05
C 组	25.6 \pm 5.2			37 822 \pm 6 741		



A: A 组, B: C 组, 一抗为 pcDNA3.1(+)/SjTsp2-A 免疫血清, C: C 组, 一抗为 pcDNA3.1(+)/SjGST 免疫血清, D: B 组。

图 2 重组质粒 pcDNA3.1(+)/SjTsp2-A 小鼠股四头肌免疫组化结果(×200)

3 讨论

血吸虫表膜为一合胞体,参与虫体营养、渗透调节、免疫逃避及侵袭^[5]。国内外有关血吸虫核酸疫苗较多,但结果均不理想^[6],其效果和作用机制需进一步研究论证^[7]。

Tran 等^[3]用 SmTsp1 和 SmTsp2 表达出体表蛋白,免疫 CBA/CaH 小鼠,结果 SmTsp1 的减虫率和减卵率分别为 52% 和 34%,SmTsp2 则分别为 57% 和 64%。本实验 SjTsp2-A 对 BALB/c 小鼠有较好的免疫保护效果,其减虫率及减卵率均显著高于 pcDNA3.1(+)/SjGST 及空质粒 pcDNA3.1(+).ELISA 结果表明免疫后血清抗体效价明显增高。免疫组化分析结果表明,用 SjTsp2-A 免疫 BALB/c 小鼠股四头肌,在其细胞浆和胞膜中获得表达。

SjGST 是 WHO 推荐的候选疫苗分子,但本实验的免疫效果并不理想。Liu 等^[8]研究表明 SjGST 的免疫效果亦不理想,ELISA 测定效价并不高。Mitchell 等^[9,10]假设血吸虫在受到宿主免疫攻击时会释放 GST 和抗 GST 抗体,两者在中和过程中会修复一些酶以及增加免疫攻击引起的危害,且其他免疫系统起初就引起损害,因此单独的抗 GST 抗体在体内不能引起持久的免疫保护。Tran 等^[3]用 SmTsp2 对感染小鼠进行免疫,其血清主要是 IgG3 和 IgG1 反应,SmTsp2 蛋白能与主要组织相容性复合物 II (MHC II)α 重链结合^[11]逃避宿主免疫攻击^[3],而抗体体表蛋白将封闭两者间的作用,使虫体受到宿主的攻击而导致死亡。本研究 ELISA 结果显示,SjTsp2-A 免疫后血清抗体效价增高,提示可进一步检测其何种抗体分子类型在免疫反应中起主要作用,抑或是各种类型的抗体共同起作用。

本研究构建了 pcDNA3.1(+)/SjTsp2-A 真核表达重组质粒,免疫小鼠能诱导产生一定的保护性免疫。已知 SjTsp2-B 及 SjTsp2-C 两类分子,与 SjTsp2-A 同源性为 90% 左右^[4],其免疫

效果值得进一步研究。目前认为蛋白质疫苗和 DNA 疫苗联合应用是较理想的方式,即用 DNA 疫苗初次免疫,再以蛋白质疫苗加强免疫,可望获得较好的免疫效果^[12,13]。

参 考 文 献

[1] Waine GJ, Alarcon JB, Qiu C, et al. Genetic immunization of mice with DNA encoding the 23 kDa transmembrane surface protein of *Schistosoma japonicum* (Sj23) induces antigen-specific immunoglobulin G antibodies[J]. Parasit Immunol, 1999, 21(7): 377-381.

[2] Braschi S, Wilson RA. Proteins exposed at the adult schistosome surface revealed by biotinylation[J]. Mol Cell Proteom, 2006, 5(2): 347-356.

[3] Tran MH, Pearson MS, Bethony JM, et al. Tetraspanins on the surface of *Schistosoma mansoni* are protective antigens against schistosomiasis[J]. Nat Med, 2006, 12(7): 835-840.

[4] Wang YY, Liu M, Zhu SC, et al. Cloning, expression and identification of membrane protein tetraspanin 2-A of *Schistosoma japonicum*[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2008, 26(1): 21-24. (in Chinese)
(王阳阳, 刘森, 朱绍春, 等. 日本血吸虫表膜蛋白 Tetraspanin 2-A 基因的克隆、表达与鉴定[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2008, 26(1): 21-24.)

[5] Jones MK, Gobert GN, Zhang L, et al. The cytoskeleton and motor proteins of human schistosomes and their roles in surface maintenance and host-parasite interactions[J]. Bioessays, 2004, 26(7): 752-765.

[6] Luo YH, Yi XY. Progress on improving protective efficacy of the schistosome vaccine[J]. Foreign Med Sci Parasit Dis, 2004, 31(3): 112-116. (in Chinese)
(罗永慧, 易新元. 提高血吸虫疫苗保护性效果的研究进展[J]. 国外医学寄生虫病分册, 2004, 31(3): 112-116.)

[7] Denis-Mize KS, Dupuis M, Singh M, et al. Mechanisms of increased immunogenicity for DNA-based vaccines adsorbed onto cationic microparticles[J]. Cell Immunol, 2003, 225(1): 12-20.

[8] Liu SX, Song GC, Xu YX, et al. Immunization of mice with recombinant Sj26GST induces a pronounced anti-fecundity effect after experimental infection with Chinese *Schistosoma japonicum* [J]. Vaccine, 1995, 13(6): 603-607.

[9] Mitchell GF. Glutathione S-transferases-potential components of anti-schistosome vaccines[J]. Parasitol Today, 1989, 5(2): 34-37.

[10] Mitchell GF, Davern K, Wood SM, et al. Attempts to induce resistance in mice to *Schistosoma japonicum* and *Schistosoma mansoni* by exposure to crude schistosome antigens plus cloned glutathione-S-transferase[J]. Immunol Cell Biol, 1990, 68(6): 377-385.

[11] Levy S, Shoham T. The tetraspanin web modulates immuno-signaling complexes[J]. Nat Rev Immunol, 2005, 5(2): 136-148.

[12] Rothel JS, Boyle DB, Both GW, et al. Sequential nucleic acid and recombinant adenovirus vaccination induces host-protective immune responses against *Taenia ovis* infection in sheep[J]. Parasit Immunol, 1997, 19(5): 221-227.

[13] Grange MP, Armand MA, Audoly G, et al. Induction of neutralizing antibodies against HTLV-1 envelope proteins after combined genetic and protein immunizations in mice[J]. DNA Cell Biol, 1997, 16(12): 1439-1448.

(收稿日期: 2008-12-05 编辑: 富秀兰)