

日本血吸虫新抗原基因的筛选、克隆、表达和免疫效果研究*

陈利玉¹⁾ 易新元^{1)**} 曾宪芳¹⁾ 蔡春¹⁾ L. McREYNOLDS²⁾

¹⁾中南大学湘雅医学院病原生物学系, 长沙 410078;

²⁾Molecular Parasitology Group, New England Biolabs, MA 01915, USA)

摘要 为了寻找日本血吸虫 (*Schistosoma japonicum*, Sj) 新的疫苗候选基因并进行免疫效果研究, 用 Sj 雌虫抗原免疫家兔制备血清, 对 Sj 成虫 cDNA 文库进行免疫筛选, 将获得的新基因(命名为 Sj-F1, GenBank 登录号为 AY261995) 克隆入原核表达载体 pTWIN1 和真核表达载体 pcDNA3, 经 PCR、限制性酶切筛选和鉴定阳性重组子. 将 pTWIN1/Sj-F1 质粒转化大肠杆菌 ER2566, 在低温和低 IPTG 浓度下诱导表达可溶性重组融合蛋白 (rSj-F1/intein2), 并经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 和蛋白质印迹 (Western blot) 分析鉴定. 将 pcDNA3/Sj-F1 质粒转化大肠杆菌 ER2502, 大量制备 DNA 疫苗. 用重组融合蛋白和 DNA 疫苗免疫小鼠, 末次免疫后 2 周用 Sj 尾蚴进行攻击感染. 感染后 42 天剖杀冲虫, 计算减虫率和减卵率. 感染前采血用 ELISA 法检测抗体. 免疫保护效果测定显示: 重组蛋白疫苗以 FCA 作佐剂经皮下免疫和以壳聚糖作佐剂经黏膜免疫分别获得了 28.07%、24.69% 的减虫率和 48.30%、46.38% 的减卵率; DNA 疫苗(pcDNA3/Sj-F1) 单独免疫获得了 18.47% 的减虫率和 35.06% 的减卵率; 用 DNA 疫苗启动免疫后用重组蛋白疫苗经皮下加强免疫, 减虫率和减卵率分别提高到了 40.42% 和 56.17%; 用 DNA 疫苗启动免疫后用重组蛋白疫苗经黏膜加强免疫, 减虫率和减卵率增高更明显, 分别提高到了 42.38% 和 62.87%. 结果表明, Sj-F1 重组蛋白疫苗及 DNA 疫苗均可诱导小鼠产生部分抗血吸虫感染的保护力, 两者联合免疫保护效果优于单一疫苗.

关键词 日本血吸虫, 免疫筛选, 雌虫, Sj-F1, 免疫

学科分类号 R383

血吸虫病是一种严重危害人类健康的螺传寄生虫病. 发展血吸虫疫苗对综合防治血吸虫病具有战略意义. 现有血吸虫疫苗中, 死疫苗的抗感染效果很差, 减毒活疫苗的抗感染效果虽好, 但大批量供应困难和潜在致病性限制了其广泛应用^[1]. 目前研究的一些分子疫苗如亚单位蛋白疫苗和 DNA 疫苗能诱导宿主产生部分保护力, 但均未能稳定地达到或超过 WHO 规定的 40% 减虫率的标准, 因此有必要寻找新的疫苗抗原, 并采用新技术、新方案, 以提高疫苗的保护效果.

血吸虫致病的主要原因是雌虫所产大量虫卵沉积于肝脏、肠壁等组织, 形成虫卵肉芽肿、组织损伤和纤维化, 同时大量虫卵排出体外可造成血吸虫病的传播和流行. 因此抑制雌虫发育和阻断雌虫产卵是血吸虫病疫苗研究的重要方面. 本研究采用日本血吸虫 (*Schistosoma japonicum*, Sj) 雌虫免疫血清对 Sj 成虫 cDNA 文库进行筛选, 以期发现新的、有效的雌虫源性疫苗候选基因. 在获得新的候选抗原基因 Sj-F1 后, 通过分子生物学技术构建成重组

蛋白疫苗和 DNA 疫苗, 并采用联合免疫方案, 进行免疫效果研究, 为了解其能否作为日本血吸虫病疫苗候选分子提供实验依据.

1 方 法

1.1 Sj 雌虫可溶性抗原的制备

给家兔感染约 2 000 条 Sj 尾蚴, 45 天后剖杀冲虫, 收集成虫, 分离出雌虫, 生理盐水洗涤 3 次, 反复冻融后冰浴超声, 10 000 r/min 离心 10 min, 上清即为 Sj 雌虫可溶性抗原.

1.2 Sj 雌虫免疫血清的制备

于 0、2、4 周分别于家兔背部皮内和腿部肌肉多点注射 Sj 雌虫可溶性抗原 0.2 mg. 第 6 周后颈动脉采血, 常规方法分离血清, 即得 Sj 雌虫可溶性抗原免疫兔血清.

*TDR/WHO 资助项目(980268)和湖南省科技厅资助项目(00jzy2115).

** 通讯联系人.

Tel: 0731-4498311, E-mail: xinyuanyi555@yahoo.com.cn

收稿日期: 2004-11-19, 接受日期: 2004-12-28

1.3 *Sj* 成虫 cDNA 文库的筛选

Sj 成虫 cDNA 文库由澳大利亚昆士兰医学研究所 McManus 教授提供. 用 *E. coli* SURE cell 裂解液吸收 *Sj* 雌虫免疫血清, 以除去抗 *E. coli* 抗体等非特异性成分. 按文献[2]方法进行免疫筛选. 经初筛获得的阳性克隆进行复筛, 经 3 轮筛选至整板为阳性克隆. 阳性克隆在体外用 Helper phage704 进行剪切.

1.4 DNA 测序

提取阳性克隆菌质粒 DNA 进行 PCR 扩增. PCR 引物为通用引物 T7 (TAA TAG GAC TCA CTA TAG GG) 和 T3 (ATT AAC CCT CAC TAA AGG GAA). PCR 产物经 ABI PRISM™ 377XL DNA 测序仪自动测序. 通过互联网将测序结果与 GenBank 中的核苷酸序列进行同源性比较, 根据 Score 值确定是否为新基因. 用蛋白质分析软件对其编码的氨基酸序列与 GenBank 中氨基酸序列进行同源性比较, 并对其编码的蛋白质结构和功能进行预测.

1.5 原核表达质粒 pTWIN1/ *Sj*-F1 的构建及重组蛋白的表达与鉴定

从已剪切的阳性克隆菌株提取质粒 DNA, PCR 扩增 *Sj*-F1 基因, 正向引物为 5'G GAA TTC CAT ATG CAA TCG TTA AAA AAA AGC 3', 反向引物为 5'CCG GAA TTC GAG TGG CCA CTT CCA TTG ATC 3'. 扩增参数为 94℃ 4 min, 94℃ 80 s, 42℃ 80 s, 72℃ 90 s, 35 个循环后 72℃ 延伸 10 min. 用限制性内切酶 *Nde* I 和 *Eco*R I 对纯化 PCR 产物和表达载体 pTWIN1 分别进行双酶切, 经低熔点琼脂糖凝胶电泳后回收 DNA, β -Agarase I 消化琼脂糖, quick T4 DNA 连接酶连接, 将重组子转化大肠杆菌 ER2566. 将阳性重组菌接种至 LB 液体培养基 (含 100 mg/L 氨苄青霉素) 中, 37℃ 振荡培养至菌液 A_{600} =0.5 左右时, 加入 IPTG 至终浓度为 0.4 mmol/L, 于 15~20℃ 振荡培养过夜, 4℃ 4 000 r/min 离心 20 min, 收集细菌沉淀, 悬浮于缓冲液 B2(20 mmol/L Tris-HCl pH7.0, 500 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA) 中, 经反复冻融及超声破碎使细菌裂解, 4℃ 12 000 r/m 离心 15 min, 弃沉淀, 上清中含有表达的重组融合蛋白 r*Sj*-F1/intein2. 将重组融合蛋白进行分析鉴定, 观察重组融合蛋白的分子大小以及抗 CBD (chitosan binding domain) 免疫血清和 *Sj* 雌虫免疫血清对其识别情况.

1.6 真核表达质粒 pcDNA3/ *Sj*-F1 的构建及 DNA 疫苗的准备

用带有 *Kpn* I 和 *Eco*R I 酶切位点的引物同以上方法 PCR 扩增 *Sj*-F1 基因(正向引物为 5'CGG GGT ACC ATG CAA TCG TTA AAA AAA AGC 3', 反向引物为 5'CCG GAA TTC TTA GAG TGG CCA CTT CCA TTG ATC 3'). 用限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Eco*R I 对 *Sj*-F1 基因和载体 pcDNA3 分别进行双酶切, 连接后, 将 pcDNA3/ *Sj*-F1 质粒转化大肠杆菌 ER2502. 转化菌接种于 2 000 ml LB 液体培养基 (含 100 mg/L 氨苄青霉素) 中, 37℃ 快速振荡过夜, 以碱裂解法提取质粒, 以 QIAGEN-tip2500 纯化质粒, 加入异丙醇, 离心沉淀, 将沉淀物溶于生理盐水, 用紫外分光光度计测定 DNA 的浓度.

1.7 免疫动物

昆明小鼠随机分成 8 组: A 组皮下注射 FCA 与 PBS 等体积混合物; B 组肌肉注射 pcDNA3 空质粒 100 μ g; C 组用壳聚糖滴鼻(50 μ g); D 组皮下注射重组 *Sj*-F1 (100 μ g) + FCA (等体积混合); E 组用重组 *Sj*-F1 (100 μ g) + 壳聚糖 (50 μ g) 滴鼻; F 组肌肉注射 pcDNA3/*Sj*-F1(100 μ g); G 组前二次肌肉注射 pcDNA3/*Sj*-F1(100 μ g), 最后一次皮下注射重组 *Sj*-F1 蛋白(100 μ g); H 组前二次肌肉注射 pcDNA3/*Sj*-F1 (100 μ g), 最后一次用重组 *Sj*-F1 (100 μ g) 滴鼻. 各组注射体积均为 100 μ l/ 次, 滴鼻体积为 40 μ l/ 次. 免疫方案为 0、2、6 周. 末次免疫 2 周后, 每组小鼠攻击感染 (40 $\pm$ 1) 条 *Sj* 尾蚴, 感染后第 42 天剖杀冲虫, 计算减虫率及减卵率. 用 SPSS 统计软件进行数据 ANOVA 分析保护效果, $P<0.05$ 表示差异有显著性.

2 结 果

2.1 新基因 *Sj*-F1 的分离和鉴定

用 *Sj* 雌虫抗原免疫血清对 6×10^5 个噬菌斑进行初筛后再经 3 轮复筛, 共获 26 个持续阳性反应克隆. 核苷酸序列分析显示, 7 号克隆所测序列与其他已知基因序列无显著同源性(Score 值 <50), 确认为新基因, 命名为 *Sj*-F1, GenBank 登录号为 AY261995. *Sj*-F1 基因全长 489 bp, 开放阅读框 (ORF) 分析含有一个完整的阅读框, 其起始密码子 ATG 位于第 66~68 位核苷酸, -3 位为 G, +4 位为 C, -15~-18 位处有 TATA 盒, 属 Kozak 序列, 提示该起始密码子与其旁侧序列组成为强核糖体结合位点, 形成蛋白质合成的起始密码. *Sj*-F1 基因带有

终止密码子 TAA，位于第 411~413 位核苷酸，3' 端有较长的 polyA 尾 (图 1)。

```
1 CGGCCGCGTCGACATTAGCTATTTTACTTTCTACCAAGCTACTCTTTATAGGTGCATAA
61 AAGCC170CAATCGTTAAAAAAGCACTTTACTTACTGGATTGCTGTTTCTAAAAATC
   M Q S L K K S T L L T G L P V S K N P
121 CTCATATTATTTTAACGTCAGTGTACAACCGTATACTCGAAGTGTGGCTGTCATGCCTG
   H I I L T S L Y N R I L E V L A V M P E
181 AAGAATCTAGTTATCGTAGGCATACAAATGAAATAATACAGTCTAGATTAAATGCTGTGC
   E S S Y R R H T N E I I Q S R L N A V Q
241 AAAAGATCTCAGATGTCCTCCACTCTCGAGTCTACTATCGACTGTGGTCAAATAGAAGAAG
   K I S D V P T L E S T I D C G Q I E E V
301 TTATCTACAGGCGGAAGGGAAATATGATTGGCAGCAATATGCTCAAATGGAACCAT
   I L Q A R R E Y D L A R N M L K W K P W
361 GGAACAACCTTGTTGAAGAGGCTCTCATGATCAATGGAAGTGCCACTCT171ATTAAT
   E Q L V E E A P H D Q W K W P L *
421 TCTTAATATTTTAGTATACACAGCACAATATATTGTAGATATTCATTCTAAAAA
481 AAAAAA
```

Fig.1 The nucleotide and deduced amino acid sequence of S_j-F1
The initiation codon and termination codon are in italic.

2.2 蛋白质结构与功能预测

S_j-F1 基因编码 115 个氨基酸，理论分子质量为 13.45 ku，等电点为 6.29，功能预测为可溶性蛋白。氨基酸序列同源性分析显示，S_j-F1 与其他已知蛋白质没有同源性。SOPMA 二级结构分析含 60.87% α 螺旋和 28.70% 随机卷曲。Scanprosite 分析 S_j-F1 蛋白含 2 个蛋白激酶 C 磷酸化位点 (3~5 位和 42~44 位氨基酸)，2 个 cAMP 和 cGMP 依赖蛋白激酶磷酸化位点 (5~8 和 44~47 位氨基酸)，1 个酪氨酸激酶 II 磷酸化位点 (69~72 位氨基酸) 和 1 个豆蔻酸位点 (12~17 位氨基酸)。

2.3 重组 S_j-F1 质粒的构建及鉴定

将构建的重组质粒 pTWIN1/S_j-F1 和 pcDNA3/S_j-F1 经 PCR 扩增均能得到与目的基因片

段大小一致的产物；分别以限制性内切酶 *Nde* I 和 *Eco*R I 及 *Kpn* I 和 *Eco*R I 双酶切后，经 1% 琼脂糖凝胶电泳均能检测到插入子，大小也与酶切后插入子片段相符，表明已成功构建 S_j-F1 的重组蛋白疫苗和 DNA 疫苗。SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 显示 rS_j-F1/intein2 融合蛋白表达的高效性，并证实其分子质量为 37.5 ku，与预测的分子质量 (S_j-F1 13.5 ku+intein 2 24 ku) 一致 (图 2)。蛋白质印迹 (Western blot) 分析表明，rS_j-F1/intein2 融合蛋白能被抗 CBD 免疫血清和 S_j 抗雌血清特异性识别，但不被正常血清识别 (图 3)。

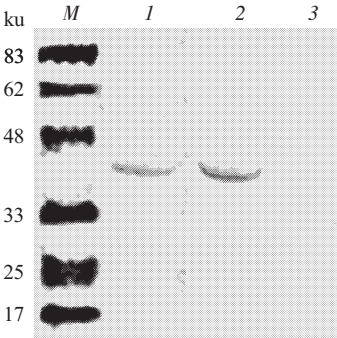


Fig.3 Western blot analysis of rS_j-F1
M: protein molecular mass standards; 1: incubated with sera from mice immunized with S_j female worm antigen; 2: incubated with anti-CBD serum; 3: incubated with normal mouse serum.

2.4 血清及唾液中的抗体水平

ELISA 法检测免疫前和免疫后各组小鼠血清 IgG、IgA 及唾液 SIgA 抗体水平。结果显示：与对照组比较，各免疫组小鼠血清 IgG 抗体水平均明显增高，其中重组蛋白皮下免疫组和联合免疫组抗体滴度高达 1:12 800，但 DNA 疫苗免疫组 IgG 抗体滴度较低 (1:1 600)。重组蛋白黏膜免疫组小鼠唾液中 SIgA 和血清 IgA 水平亦明显增高，分别为 1:640 和 1:3 200 (图 4)。

2.5 免疫保护效果

免疫保护性实验结果显示，rS_j-F1 蛋白皮下免疫、黏膜免疫和裸 DNA 疫苗 (pcDNA3/S_j-F1) 单独免疫分别获得了 28.07%、24.69% 和 18.47% 的减虫率及 48.30%、46.38% 和 35.06% 的减卵率，与对照组比较，差异有显著性。用裸 DNA 疫苗和重组蛋白疫苗经皮下注射联合免疫，减虫率和减卵率分别提高到了 40.42% 和 56.17%。用 DNA 疫苗和重组蛋白疫苗经滴鼻联合免疫，减虫率和减卵率分别提高到了 42.38% 和 62.87% (表 1 和表 2)。

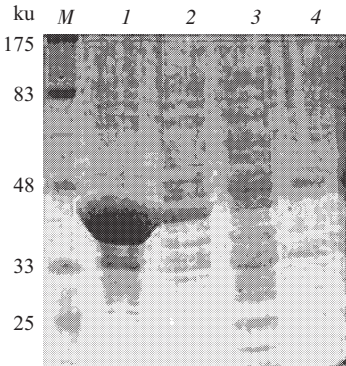


Fig.2 SDS-PAGE analysis of rS_j-F1
M: protein molecular mass standards; 1: supernatant of bacterial lysate induced by IPTG; 2: pellet of bacterial lysate induced by IPTG; 3: pellet of bacterial lysate uninduced by IPTG; 4: supernatant of bacterial lysate uninduced by IPTG.

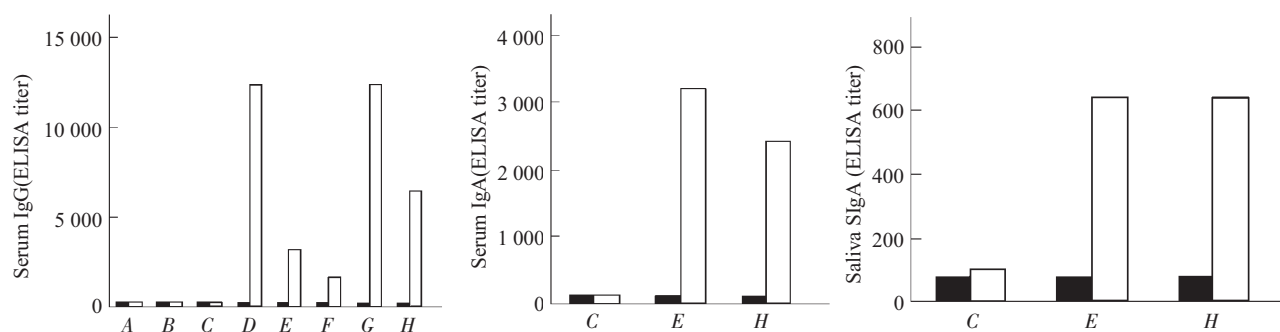


Fig. 4 Levels of IgG, IgA in serum and SIgA in saliva

A: FCA-PBS control; B: empty plasmid control; C: chitosan control; D: rSj-F1 immunization subcutaneously; E: rSj-F1 immunization intranasally; F: DNA vaccine immunization; G: DNA immunization at Prime, rSj-F1 protein immunization subcutaneously at boost; H: DNA immunization at Prime, rSj-F1 protein immunization intranasally at boost. ■: before immunization; □: after immunization.

Table 1 Worm reduction efficacy in mice immunized with recombinant protein vaccine and DNA vaccine of Sj-F1¹⁾

Groups	No. of mice	No. of worms ($\bar{x} \pm s$)	Worm reduction rate/%	P
A	8	29.50±4.57	—	—
B	10	28.70±4.47	—	—
C	10	28.15±4.66	—	—
D	9	21.22±5.17	28.07	<0.01(vs A)
E	10	21.20±6.02	24.69	<0.01(vs C)
F	10	23.40±4.92	18.47	<0.05(vs B)
G	10	17.10±6.15	40.42	<0.001(vs B)
H	10	16.22±5.81	42.38	<0.001(vs C)

G vs F, $P < 0.01$; G vs D, $P > 0.05$; H vs F, $P < 0.01$; H vs E, $P < 0.05$. ¹⁾A: FCA-PBS control; B: empty plasmid control; C: chitosan control; D: rSj-F1 immunization subcutaneously; E: rSj-F1 immunization intranasally; F: DNA vaccine immunization; G: DNA immunization at Prime, rSj-F1 protein immunization subcutaneously at boost; H: DNA immunization at Prime, rSj-F1 protein immunization intranasally at boost.

Table 2 Egg reduction efficacy in mice immunized with recombinant protein vaccine and DNA vaccine of Sj-F1¹⁾

Groups	No. of mice	LEPG ($\bar{x} \pm s, \times 10^3$)	LEPG reduction rate/%	P
A	8	21.90±1.74	—	—
B	10	22.38±2.22	—	—
C	10	20.03±1.96	—	—
D	9	11.32±1.68	48.30	<0.001(vs A)
E	10	10.74±2.61	46.38	<0.001(vs C)
F	10	14.54±2.06	35.06	<0.01(vs B)
G	10	9.81±1.59	56.17	<0.001(vs B)
H	10	7.57±2.35	62.87	<0.001(vs C)

G vs F, $P < 0.01$; G vs D, $P > 0.05$; H vs F, $P < 0.01$; H vs E, $P < 0.05$. ¹⁾A: FCA-PBS control; B: empty plasmid control; C: chitosan control; D: rSj-F1 immunization subcutaneously; E: rSj-F1 immunization intranasally; F: DNA vaccine immunization; G: DNA immunization at Prime, rSj-F1 protein immunization subcutaneously at boost; H: DNA immunization at Prime, rSj-F1 protein immunization intranasally at boost.

3 讨 论

筛选 cDNA 文库是一种获得新疫苗候选基因的有效方法. 通过对血吸虫 cDNA 文库进行筛选, 获得了多种血吸虫的疫苗候选分子, 如 GST^[3]、副肌球蛋白 (Sm97)^[4]、TPI^[5]、23 ku 膜相关抗原 (Sm23)^[6] 及 FABP (Sm14)^[7] 等, 对血吸虫感染均具有部分保护作用. 本研究用 *Sj* 雌虫抗原免疫血清对 *Sj* 成虫 cDNA 文库进行筛选, 发现了 GenBank 未报道的新基因 *Sj*-F1. *Sj*-F1 编码的蛋白质分子质量为 13.45 ku, 富含 α 螺旋和随机卷曲, 含多个蛋白酶磷酸化位点、1 个酪氨酸激酶 II 磷酸化位点和 1 个豆蔻酸位点, 提示其可能为一重要的信号传递分子.

为了进一步探索 *Sj*-F1 作为日本血吸虫疫苗候选分子的潜力, 本研究对 *Sj*-F1 基因进行了克隆、表达、DNA 疫苗构建及联合免疫效果观察. 结果显示, r*Sj*-F1 蛋白以 FCA 作佐剂经皮下免疫小鼠获得减虫率及减卵率分别为 28.07% 与 48.30%. 用重组的裸 DNA 疫苗经腿部肌肉注射免疫小鼠, 获得了 18.47% 的减虫率与 35.06% 的减卵率, 表明 *Sj*-F1 重组蛋白疫苗及 DNA 疫苗均可诱导小鼠产生部分抗血吸虫感染的保护力.

鼻内或口服等黏膜表面疫苗接种, 不仅具有给药途径安全、简便、无创伤等优点, 而且既能诱导产生全身免疫力, 又能诱导产生黏膜局部免疫力. 然而, 蛋白质和多肽疫苗黏膜接种免疫原性弱, 并能诱导免疫耐受, 因此成功的黏膜免疫在很大程度上依赖于有效的黏膜递送系统和免疫调节剂. 近年来, 用于黏膜免疫的疫苗递送系统如微粒、壳聚糖、脂质体、免疫刺激复合物、减毒活载体等均显示出能提高黏膜免疫效果^[8,9]. 其中壳聚糖在黏膜疫苗递送系统中展现出了广阔的应用前景. 本研究在制备重组抗原分子时, 选用 pTWIN1 为载体, 该载体含有两个分枝杆菌基因编码的 intein, intein 上有壳聚糖结合位点 (CBD), 因此该载体表达的融合蛋白可与壳聚糖结合. 壳聚糖是一类带正电的直链多糖, 具有多种生物学活性, 不仅是一种良好的免疫促进剂, 而且能有效地促进药物和疫苗通过黏膜上皮细胞吸收. Westerink 等^[10]以壳聚糖作佐剂, 研究破伤风类毒素滴鼻免疫效果, 发现小鼠鼻腔和肺部的灌洗液中特异性 SIgA 和血中 IgG 均明显增高. Le Buanec 等^[11]将含 HIV Tat 蛋白的壳聚糖纳米颗粒经口腔或鼻内途径免疫小鼠亦检测到了明显的

IgA 和 IgG 抗体水平. 本研究利用重组融合蛋白的 intein2 含有 CBD 结合位点, 使 r*Sj*-F1 与壳聚糖结合, 观察 r*Sj*-F1 黏膜免疫对小鼠抗血吸虫感染的保护性免疫效果. 结果发现 r*Sj*-F1 与壳聚糖结合后经滴鼻免疫, 小鼠唾液中 SIgA 和血中 IgG 和 IgA 均有明显增高, 并获得了 24.69% 的减虫率和 46.38% 的减卵率, 表明壳聚糖具有明显的免疫增效作用, 是一种良好的黏膜免疫佐剂.

多种动物模型证明, 在诱导特异性细胞免疫应答抵抗病原体感染方面联合免疫是一种行之有效的免疫方案^[12]. 在这些研究中, 启动免疫应答的免疫原大部分是 DNA 载体, 但其他免疫原如蛋白质、多肽、病毒样颗粒和减毒病毒载体等也有应用. Gherardi 等^[13]研究显示, 用重组流感病毒载体进行初次免疫, 然后用表达 HIV-1 的 Env 抗原痘病毒载体作加强免疫, 能诱发脾脏和生殖道 - 直肠引流淋巴结的细胞免疫应答. Anderson 等^[14]用表达疟原虫环孢子蛋白 (PbCS) 的禽痘病毒和痘苗病毒安哥拉适应株疫苗采用联合免疫方案免疫动物, 诱生了强烈的特异性 CD8⁺T 细胞应答和保护性免疫力. Coban 等^[15]用表达恶性疟原虫 25 ku 的表面蛋白 (Pfs25) 的 DNA 疫苗免疫猕猴后, 用重组 Pfs25 蛋白进行加强免疫, 结果发现诱生的抗体水平比单纯用 DNA 疫苗免疫高 3 倍, 且能阻断恶性疟原虫配子体和按蚊之间的传播. Siddiqui 等^[16]研究表明, 用 DNA 疫苗进行初次免疫再用蛋白 (Sm80) 疫苗加强免疫获得了对曼氏血吸虫感染的保护性免疫. 本研究用 pcDNA3/ *Sj*-F1 DNA 疫苗进行初次免疫后, 用重组 *Sj*-F1 蛋白疫苗进行加强免疫, 结果使减虫率和减卵率分别提高到了 40.42% 和 56.17%. 用 DNA 疫苗和重组蛋白疫苗经滴鼻联合免疫, 减虫率和减卵率分别提高到了 42.38% 和 62.87%, 表明 DNA 疫苗与重组蛋白疫苗联合应用免疫效果较好.

Jankovic 等^[17]用 B 细胞缺陷和 IFN- γ 基因剔除小鼠研究曼氏血吸虫感染发现, 抗血吸虫的有效免疫接种有赖于同时诱导体液免疫和细胞免疫应答. Hoffman 等^[18]认为产生高度极化应答的抗血吸虫疫苗并不能诱导最佳保护性免疫力, 要产生最佳保护性免疫力需同时诱导 Th1 型和 Th2 型免疫应答. 一般认为亚单位蛋白疫苗主要通过 MHC II 类分子经胞内体途径递呈, 诱导产生较强的 Th2 型体液免疫应答, 而以肌肉内接种的 DNA 疫苗诱导的免疫类型以 Th1 型为主, 包括激活 CD8⁺CTL、CD4⁺Th1 及产生 IgG2a 为主的 B 淋巴细胞^[19]. 本实

验用 DNA 疫苗和重组蛋白疫苗联合免疫获得了较好的免疫效果,可能是由于 DNA 疫苗产生较强的细胞免疫和重组蛋白疫苗产生较强的体液免疫协同作用的结果。

参 考 文 献

- 1 Richter D, Incani R N, Harn D A. Isotype responses to candidate vaccine antigens in protective sera obtained from mice vaccinated with irradiated cercariae of *Schistosoma mansoni*. *Infect Immun*, 1993, **61** (7): 3003~3011
- 2 Zhou J C, Yi X Y, Zeng X F, *et al.* Immunoscreening of *Schistosoma japonicum* egg cDNA library. *Chin J Parasitol Parasitic Dis*, 1998, **16** (2): 176~180
- 3 Rao K V, He Y X, Kalyanasundaram R. Expression of a 28-kilodalton glutathione S-transferase antigen of *Schistosoma mansoni* on the surface of filamentous phages and evaluation of its vaccine potential. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2003, **10** (4): 536~541
- 4 McManus D P, Wong J Y, Zhou J, *et al.* Recombinant paramyosin (rec-Sj-97) tested for immunogenicity and vaccine efficacy against *Schistosoma japonicum* in mice and water buffaloes. *Vaccine*, 2001, **20** (5~6): 870~878
- 5 R Zhu Y, Si J, Ham D A, *et al.* The protective immunity produced in infected C57BL/6 mice of a DNA vaccine encoding *Schistosoma japonicum* Chinese strain triose-phosphate isomerase. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 2002, **33** (2): 207~213
- 6 Da'dara A A, Skelly P J, Wang M M, *et al.* Immunization with plasmid DNA encoding the integral membrane protein, Sm23, elicits a protective immune response against schistosome infection in mice. *Vaccine*, 2001, **20** (3~4): 359~369
- 7 Ramos C R, Figueredo R C, Pertinhez T A, *et al.* Gene structure and M20T polymorphism of the *Schistosoma mansoni* Sm14 fatty acid-binding protein. molecular, function, and immunoprotection analysis. *J Biol Chem*, 2003, **278** (15): 12745~12751
- 8 Yuki Y, Kiyono H. New generation of mucosal adjuvants for the induction of protective immunity. *Rev Med Virol*, 2003, **13** (5): 293~310
- 9 van der Lubber I M, Verhoef J C, Borchard G, *et al.* Chitosan and its derivatives in mucosal drug and vaccine delivery. *Eur J Pharm Sci*, 2001, **14** (3): 201~207
- 10 Westerink M A, Smithson S L, Srivastava N, *et al.* ProJuvant (Pluronic F127/chitosan) enhances the immune response to intranasally administered tetanus toxoid. *Vaccine*, 2001, **20** (5~6): 711~723
- 11 Le Buanec H, Vetu C, Lachgar A, *et al.* Induction in mice of anti-Tat mucosal immunity by the intranasal and oral routes. *Biomed Pharmacother*, 2001, **55** (6): 316~320
- 12 in C T, Hung C F, Juang J, *et al.* Boosting with recombinant vaccinia increases HPV-16 E7-Specific T cell precursor frequencies and antitumor effects of HPV-16 E7-expressing Sindbis virus replicon particles. *Mol Ther*, 2003, **8** (4): 559~566
- 13 Gherardi M M, Nájera J L, Pérez-Jiménez E, *et al.* Prime-boost immunization schedules based on influenza virus and vaccinia virus vectors potentiate cellular immune responses against human immunodeficiency virus Env protein systemically and in the genitoretal draining lymph nodes. *J Virol*, 2003, **77** (12): 7048~7057
- 14 Anderson R J, Hannan C M, Gilbert S C, *et al.* Enhanced CD8⁺ T cell immune responses and protection elicited against *Plasmodium berghei* malaria by prime boost immunization regimens using a novel attenuated fowlpox virus. *J Immunol*, 2004, **172** (5): 3094~3100
- 15 Coban C, Philipp M T, Purcell J E, *et al.* Induction of *Plasmodium falciparum* transmission-blocking antibodies in nonhuman primates by a combination of DNA and protein immunizations. *Infect Immun*, 2004, **72** (1): 253~259
- 16 Siddiqui A A, Phillips T, Charest H, *et al.* Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* via DNA priming and boosting with the large subunit of calpain (Sm-p80): adjuvant effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-4. *Infect Immun*, 2003, **71** (7): 3844~3851
- 17 Jankovic D, Wynn T A, Kullberg M C, *et al.* Optimal vaccination against *Schistosoma mansoni* requires the induction of both B cell and IFN- γ -dependent effect mechanism. *J Immunol*, 1999, **162** (1): 345~351
- 18 Hoffman K F, James S L, Cheever A W, *et al.* Studies with double cytokine deficient mice reveal that highly polarized Th1 and Th2-type cytokine and antibody responses contribute equally to vaccine-induced immunity to *Schistosoma mansoni*. *J Immunol*, 1999, **163** (2): 927~938
- 19 Ayash-Rashkovsky M, Weisman Z, Zlotnikov S, *et al.* Induction of antigen-specific Th1-biased immune responses by plasmid DNA in schistosoma-infected mice with a preexistent dominant Th2 immune profile. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, **282** (5): 1169~1176

A New Antigen Gene of *Schistosoma japonicum*: Screening, Cloning, Expression and Immunization in Mice*

CHEN Li-Yu¹⁾, YI Xin-Yuan^{1)**}, ZENG Xian-Fang¹⁾, CAI Chun¹⁾, L.McREYNOLDS²⁾

¹⁾Faculty of Pathogenic Biology, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, China;

²⁾Molecular Parasitology Group, New England Biolabs, Inc., MA 01915, USA)

Abstract In order to search for new effective *Schistosoma japonicum* vaccine candidate genes and study its immune protection against challenge infection in mice, *S. japonicum* adult worm cDNA library was screened with sera from rabbits immunized with *S. japonicum* female worm antigen. The novel gene (designated Sj-F1, GenBank accession number are AY261995) was cloned into the prokaryotic expression vector pTWIN1 and the eukaryotic expression vector pcDNA3 respectively. The positive recombinants were identified by PCR and restriction enzyme digestion. The plasmid pTWIN1/Sj-F1 was transformed into *E.coli* ER2566. The soluble recombinant fusion protein (rSj-F1/intein2) was expressed in *E. coli* under low IPTG concentration and low temperature, then analyzed by SDS-PAGE and Western blot. The plasmid pcDNA3/Sj-F1 was transformed into *E.coli* ER2502 for preparing DNA vaccine. Mice were immunized with rSj-F1 protein or/and pcDNA3/Sj-F1 DNA vaccine. Two weeks after the third vaccination, a challenge infection was carried out with *S. japonicum* cercariae. Worms and eggs collected from the livers of mice were counted 42 days after challenge infection. Levels of specific antibody were detected by ELISA before infection. Immunization experiment showed the recombinant Sj-F1 protein with FCA adjuvant or with chitosan adjuvant provided 28.07%, 24.69% worm reduction rates and 48.30%, 46.38% egg reduction rates in mice respectively. The naked pcDNA/Sj-F1 provided 18.47% worm reduction rate and 35.06% egg reduction rate. The worm and egg reduction rates were increased to 40.42%, 42.38% and 56.17%, 62.87% respectively when mice were immunized with the pcDNA/Sj-F1 at priming and with rSj-F1 by subcutaneously or intranasally at booster. The results suggest that both recombinant Sj-F1 protein and naked DNA can induced partial protection immunity against *S. japonicum* infection and the protection can be enhanced via DNA priming and rSj-F1 boosting.

Key words *Schistosoma japonicum*, immunoscreening, female adult worm, Sj-F1, immunization

*This work was supported by grants from WHO/TDR (980268) and Bureau of Science and Technology of Hunan Province, China (00jzy2115).

**Corresponding author. Tel: 86-731-4498311, E-mail: xinyuanyi555@yahoo.com.cn

Received: November 19, 2004 Accepted: December 28, 2004