

弓形虫新基因 *wx2* 表位疫苗免疫小鼠的保护研究*

谭 逵 张 琼 范久波 谢荣华 蒋立平 吴 翔** 舒衡平**

(中南大学湘雅医学院寄生虫学教研室, 长沙 410078)

摘要 采用生物信息学方法对弓形虫新基因 *wx2* 进行表位分析预测, PCR 扩增基因中编码 2 个表位的片段 W2b 和 W2a, 成功构建新基因的单表位疫苗质粒 pcDNA3-W2b、pcDNA3-W2a 和双表位疫苗 pcDNA3-W2b2a, 接种小鼠, 观察表位疫苗的免疫保护作用. 将表位疫苗分别通过肌肉注射免疫小鼠, 对照组注射 pcDNA3 空质粒. ELISA 法检测血清 IgG 抗体水平, 取脾细胞用流式细胞仪检测 T 淋巴细胞亚群. 各组小鼠末次免疫后第 4 周每只小鼠经腹腔注射弓形虫速殖子 500 个, 观察小鼠的生存时间. 结果显示, pcDNA3-W2a2b 双表位疫苗组小鼠血清 IgG 抗体水平显著高于对照组 ($P < 0.05$), 且 pcDNA3-W2a2b 双表位疫苗组小鼠脾细胞 CD4⁺T 与 CD8⁺T 淋巴细胞比值明显低于两单表位疫苗组, pcDNA3-W2a2b 双表位疫苗组小鼠存活时间明显长于两单表位疫苗组 ($P < 0.05$). 实验结果表明, 弓形虫新基因 *wx2* 表位疫苗能够诱导小鼠产生抗弓形虫感染保护性免疫, 并且弓形虫 pcDNA3-W2b2a 双表位疫苗的免疫保护性优于 pcDNA3-W2b、pcDNA3-W2a 两单表位疫苗.

关键词 弓形虫, 表位疫苗, 重组质粒, B 细胞表位, 保护力

学科分类号 R382.5

弓形虫(*Toxoplasma gondii*)是一种分布广泛的、专性细胞内寄生的机会致病性原虫, 孕妇感染弓形虫, 可影响胎儿的发育, 严重者导致畸胎、死胎, 存活者也常有畸形及智力发育不全等后遗症, 弓形虫也是导致艾滋病患者、器官移植及恶性肿瘤患者等免疫功能受损或抑制者发生致死性病变的主要病原体之一^[1]. 由于药物防治仍存在许多问题, 探索安全有效的防治疫苗是当务之急. 弓形虫疫苗先后有减毒活疫苗、基因工程疫苗, 但效果欠佳. 目前被称之为第三代的核酸疫苗已有报道, 大多数作者选用的是编码弓形虫表位抗原、棒状体蛋白的基因, 此类基因疫苗具有一定的保护效果, 但仍不理想. 表位疫苗是一个新的发展趋势, 它直接将蛋白质的免疫功能部分(抗原决定簇)制备成疫苗, 即利用基因重组技术将一个或者多个抗原表位的编码基因连接在一起, 以提高疫苗的免疫效果, 其安全性好, 诱发的免疫应答针对性强. 表位疫苗的形式有表位肽疫苗和表位 DNA 疫苗. 简单易行的方法是通过生物信息学方法预测表位, 然后通过基因工程制备成表位 DNA 疫苗. 本文在前期建立弓形虫单克隆抗体 7C3-C3, 发现这个单抗被动转移试验对弓形虫感染的动物具有一定的保护性, 用单克隆抗体作探针免疫筛选弓形虫速殖子 cDNA 文库获得

弓形虫新基因 *wx2* 的基础上, 构建成功新基因 *wx2* 的表位疫苗质粒, 并且观察表位疫苗在小鼠中的免疫保护性, 现报告如下.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂. 质粒小量提取试剂盒, 标准分子质量 DNA marker 为天根生化公司产品; 胶回收试剂盒为 OMEGA 公司产品; RNAase A 为 Sigma 公司产品; 限制性内切酶 *Bam*H I、*Eco*R I、*Eco*R V、*Not* I 均购自 Fermentas 公司; Taq 酶及 T4DNA 连接酶购自上海生物工程公司; HRP 标记的兔抗小鼠 IgG 购自晶美公司.

1.1.2 菌株与质粒. 大肠杆菌 DH5 α 为本室保存, 7C3-C3Blue script 质粒^[2], 真核表达载体 pcDNA3 质粒为本室保存.

* 国家自然科学基金资助项目(30371260), 湖南省“十一五”重大专项(2006SK1001)和湖南省“十一五”重点学科建设经费联合资助.

** 通讯联系人.

吴翔. E-mail: wxspring@hotmail.com

舒衡平. E-mail: hengpingshu@126.com

收稿日期: 2008-03-19, 接受日期: 2008-05-14

1.1.3 弓形虫虫株与实验动物. 弓形虫 RH 株为本室传代保种. SPF 昆明小鼠, 6 周龄左右, 雌雄各半, 体重为(20±2) g, 购自中南大学实验动物中心.

1.2 方法

1.2.1 目的片段的预测、选择和获取. 采用瑞士生物信息学研究所(<http://ca.expasy.org/>)提供的蛋白质分析软件: Translate、ComputeI/Mw、Scanprosite、SignalP、TMPred、TMHMM 和 SOPMA 预测蛋白质结构, 并选 B 细胞表位. 按照所选取的目的片段由上海生物工程公司设计以下 2 对引物, W2b, CGTGGATCCCCGATTGCGGAGACACATG 和 CGGGAATTCGCGTTCT TCTCTTCGG, 分别引入 *Bam*H I、*Eco*R I 酶切位点, W2a, CGGGAATTCGCGCATGCTTCTACTCCGTGCT 和 CCGGATATCGCCGTTTCTCGCGGTGTATG 分别引入 *Eco*R I、*Eco*R V 酶切位点. 分别以 7C3-C3Blue script 质粒为模板扩增 W2b、W2a. 反应体系如下: 模板 1.5 μ l、引物各 2 μ l、10 $\times$ PCR 缓冲液 10 μ l、25 mmol/L MgCl₂ 10 μ l、dNTP 1.5 μ l、双蒸水 72 μ l、Taq 酶 1 μ l, 反应总体积为 100 μ l. PCR 参数: 94℃ 预变性 4 min; 94℃ 1 min 20 s, 52℃ 1 min 20 s, 72℃ 2 min, 共进行 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 8 min. 扩增出的目的片段 1% 琼脂糖凝胶电泳后用胶回收试剂盒回收.

1.2.2 单表位疫苗的构建和鉴定. 构建过程如下: 将 pcDNA3 和 W2b 分别用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 进行双酶切过夜, 经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测后分别用凝胶回收试剂盒和 PCR 产物回收试剂盒回收酶切产物. 按片段/载体=6:1 的比例 16℃ 连接过夜, 用热休克方法转化大肠埃希菌 DH5a, 菌液涂布含氨苄 LB 平板后 37℃ 培养过夜. 将插入目的片段的质粒命名为 pcDNA3-W2b. 采用同样的策略构建 pcDNA3-W2a. 挑取平板 37℃ 培养 16 h 左右的单菌落, 增菌后取 2 μ l 作为模板, 按上述 PCR 反应条件扩增新插入的目的片段. 菌液用质粒小提试剂盒提取质粒, 经双酶切鉴定. 对酶切和 PCR 鉴定都正确的克隆委托上海生物工程公司进行测序.

1.2.3 双表位疫苗的构建和鉴定. pcDNA3-W2b2a 构建过程如下: 将 pcDNA3-W2b 和 pcDNA3-W2a 分别用 *Bam*H I 和 *Eco*R V 进行双酶切过夜, 后续步骤方法与单表位疫苗的构建和鉴定一致.

1.2.4 重组质粒的大量提取与纯化. 参照《分子克隆实验指南(第三版)》.

1.2.5 弓形虫抗原制备. 将弓形虫 RH 株速殖子注射入昆明小鼠腹腔内, 72 h 后收集腹腔中的速殖子, 超声粉碎, 然后生理盐水溶解, 用紫外分光光度计确定浓度, -20℃ 保存备用.

1.2.6 表位疫苗的免疫接种. 实验共设 5 组, 3 个重组质粒组, 1 个空质粒 pcDNA3 对照组和 1 个生理盐水对照组. 将昆明小鼠随机分组, 每组各 20 只, 雌雄各半. 将大量提取并纯化的重组质粒及空质粒分别用生理盐水稀释至 1 g/L, 选用 4 号针头, 从左后腿胫后肌下端, 以平行于肌肉纵轴的方向进针, 每次注射 100 μ l. 于初次免疫后第 2 周和第 4 周分别加强免疫, 生理盐水组注射 100 μ l 生理盐水.

1.2.7 ELISA 法测定小鼠血清 IgG. 分别于免疫前及末次免疫后第 2、4 周, 小鼠断尾法取血, 分离收集小鼠血清. 将每次所取血清样品用间接 ELISA 法检测免疫小鼠 IgG 抗体. 将弓形虫 RH 株速殖子超声粉碎, 用生理盐水溶解成为可溶性抗原(浓度为 5 g/L), 然后包被酶标板, 待测血清作 1:100 稀释, 每孔 100 μ l, 同时作空白、阳性及阴性对照. 二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG (1:15 000 稀释), 每孔 100 μ l. 加底物(TMD)和显色液(H₂O₂)各一滴, 室温(28℃)放置 20 min 后加入 H₂SO₄ 终止反应, 各孔溶液用酶标仪(波长为 450 nm)检测其 A 值, 具体方法参见文献[3].

1.2.8 脾细胞 CD4⁺ T 与 CD8⁺ T 淋巴细胞比值测定. 小鼠末次免疫 2 周后, 在进行攻击实验前, 无菌取脾. 将 1 ml 脾细胞悬液(密度为 1.0 $\times$ 10⁶~1.9 $\times$ 10⁶个/ml)置于 BD 公司专用试管中, 每只小鼠设 2 管. 1 500 r/min 离心 5 min, 吸取 900 μ l 上清. 加 PE-CD8 α 、FITC-CD4 (每种单抗浓度已调整为 0.05 g/L)单抗各 5 μ l, 用旋涡振荡器混匀 10 s, 室温避光放置 30 min. 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清. 每管加入 2 ml PBS 溶液, 用旋涡振荡器混匀 10 s, 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清. 重复用 PBS 洗涤一次. 加 1% 多聚甲醛 100 μ l, 用旋涡振荡器混匀 10 s, 4℃ 保存. 在美国 BD 公司产 FACSCalibur 流式细胞仪上用 CELLQuest 软件获取 CD4⁺ T、CD8⁺ T 细胞数量, 计算 CD4⁺ T 与 CD8⁺ T 比值.

1.2.9 免疫小鼠抗攻击感染实验. 末次免疫后 4 周, 以弓形虫 RH 株速殖子腹腔注射免疫组和对照组小鼠(500 个/只), 观察记录小鼠的感染发病情况和死亡时间.

1.2.10 统计分析. 统计数据采用统计软件

SPSS11.5 非参数 Kruskal-Wallis 检验, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 表格采用 EXCEL 制作.

2 结 果

2.1 表位选择

对亲水性、可及性、柔韧性和抗原性参数进行统计分析(<http://ca.expasy.org/>), 推测新基因 *wx2* 中 B 表位之一位于肽链 32~45 位, 编码基因为 GTCGAAAAAAAAAAAAAAAAAACTCGAGAGATCTTTTGAGC, 共 42 个 bp, 为便于肽链折叠和操作, 均对预测表位进行放大, 取包含此序列的

331 bp DNA 片段用于构建表位疫苗, 命名为 W2a. B 表位之二为位于肽链 1~80 位, 编码基因为 ATGTATATCTGTATAGAAGGTACGCAAAAAGGTAGGATCACAGACGCGCATGCAAAAACACATTCTCACAGACGCGATGGCGTCCTGCACCTGCAGTGCCGCTTCTTCATTACCGATTACATGACATTTTCTTCGACCGGAGAGACGAAAACATCCGTAAAGCGGTGAGTGTCGTTCTACGTATCGCCTCTCGTCGCCGAAGAGAAGAAATT, 共 216 个 bp. 同样取包含此序列的 226 bp DNA 片段用于构建表位疫苗, 命名为 W2b (图 1).

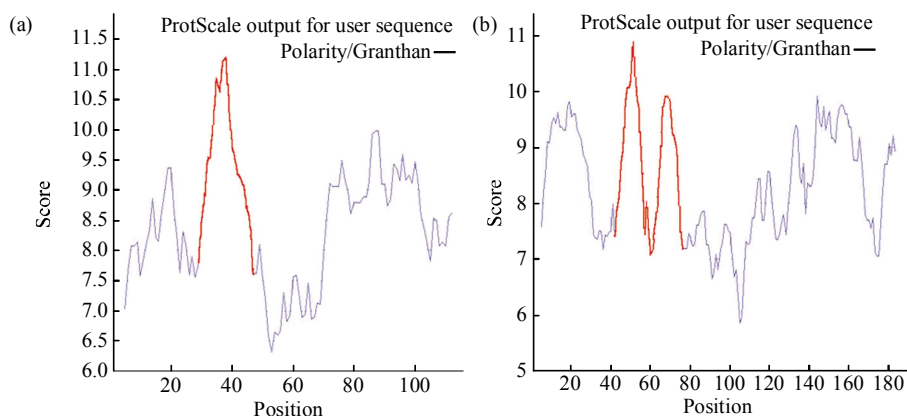


Fig. 1 Prediction and selection of epitope

(a) Epi-position of gene *wx2* ORF1 at 31~42aa (W2a). (b) Epi-position of gene *wx2* ORF2 at 25~70aa (W2b).

2.2 PCR 扩增

以新基因 *wx2* 为模板扩增出 W2b、W2a 片段, 大小与预期值相符(图 2).

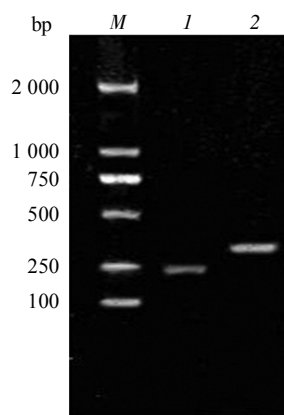


Fig. 2 PCR products of *wx2*

M: DNA marker; 1: W2a, product of *wx2*; 2: W2b, product of *wx2*.

2.3 表位重组质粒的酶切、PCR 鉴定和测序结果

将单表位疫苗质粒 pcDNA3-W2b、pcDNA3-W2a 和双表位疫苗质粒 pcDNA3-W2b2a 用酶切和

PCR 鉴定, 结果表明片段插入正确(图 3, 4). 将测定序列同 GenBank 中的相应序列进行比对, 证明插入序列正确.

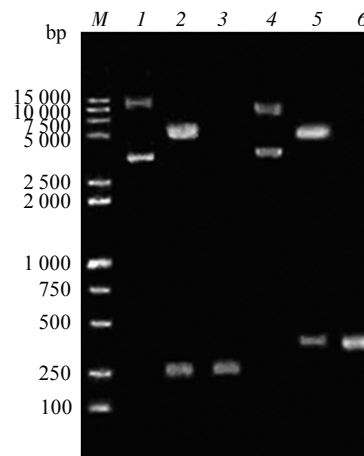


Fig. 3 Restriction digestion of recombinant plasmid and identification by PCR

M: DL15 000+D2 000 marker; 1: Recombinant plasmid pcDNA3-W2b; 2: pcDNA3-W2b plasmid digested by *BamH* I and *EcoR* I; 3: PCR products of pcDNA3-W2b; 4: Recombinant plasmid pcDNA3-W2a; 5: pcDNA3-W2a plasmid digested by *EcoR* I and *EcoR* V; 6: PCR products of pcDNA3-W2a.

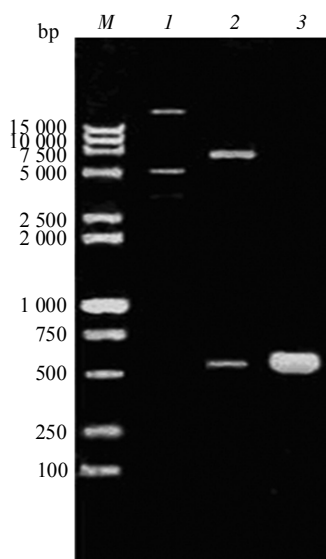


Fig. 4 Restriction digestion of recombinant plasmid and identification by PCR

M: DL 15000+ D2000 marker; *1*: Recombinant plasmid pcDNA3-W2b2a; *2*: pcDNA3-W2b2a plasmid digested by *EcoRI* and *EcoRV*; *3*: PCR products of pcDNA3-W2b2a.

2.4 抗体应答 ELISA 结果

间接 ELISA 法实验结果表明, 两单表位疫苗 pcDNA3-W2b、pcDNA3-W2a 和双表位疫苗 pcDNA3-W2b2a 组均能诱导产生特异性 IgG 抗体, 且均于 3 次免疫后第 4 周达到最高值, 此时 *A* 值大于免疫前 *A* 值的 2 倍, 表明 IgG 抗体为阳性。此次血清中新基因的表位疫苗组抗体 *A* 值均高于

pcDNA3 和 NS 对照组, 尤其是 pcDNA3-W2b2a 组显著高于对照组 ($P < 0.05$)。结果见表 1。

Table 1 Detection of IgG in serum of mice by ELISA

Groups	Before immunization 0wk(A)	The time after last immunization 2wk(A)	The time after last immunization 4wk(A)
NS	0.121±0.056	0.124±0.045	0.127±0.029
pcDNA3	0.132±0.039	0.145±0.065	0.154±0.035
pcDNA3-W2a	0.126±0.025	0.182±0.028	0.256±0.015 ¹⁾
pcDNA3-W2b	0.131±0.085	0.186±0.065	0.263±0.059 ¹⁾
pcDNA-W2b2a	0.129±0.072	0.187±0.058	0.297±0.074 ¹⁾

¹⁾As compared with the control group, $P < 0.05$.

2.5 脾细胞 CD4⁺ T 与 CD8⁺ T 淋巴细胞亚群的变化

小鼠末次免疫后第 4 周, 取小鼠脾细胞进行 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞亚群测定。结果显示, pcDNA3-W2b、pcDNA3-W2a 和 pcDNA3-W2b2a 组 CD4⁺/CD8⁺ T 淋巴细胞比例上升, 并且 CD8⁺ T 淋巴细胞比例上升更加显著, CD4⁺/CD8⁺ T 淋巴细胞比值明显低于 pcDNA3、NS 对照组 ($P < 0.05$), 且 pcDNA3-W2b2a 组 CD4⁺/CD8⁺ T 淋巴细胞比值显著低于两单表位疫苗组。结果见表 2 和图 5。

Table 2 Detection of T lymphocyte subsets of mouse splenocytes

Groups	CD4 ⁺ (%) CD4 ⁺ subset	CD8 ⁺ (%) CD8 ⁺ subset	CD4 ⁺ /CD8 ⁺ Ratio of CD4 ⁺ /CD8 ⁺ subsets
NS	36.36	14.10	2.58
pcDNA3	38.65	15.51	2.49
pcDNA3-W2b	42.14	22.32	1.89 ¹⁾
pcDNA3-W2a	40.77	20.81	1.96 ¹⁾
pcDNA-W2b2a	45.07	31.90	1.41 ¹⁾²⁾

¹⁾As compared with the control group, $P < 0.05$. ²⁾As compared with single epitope vaccine group, $P < 0.05$.

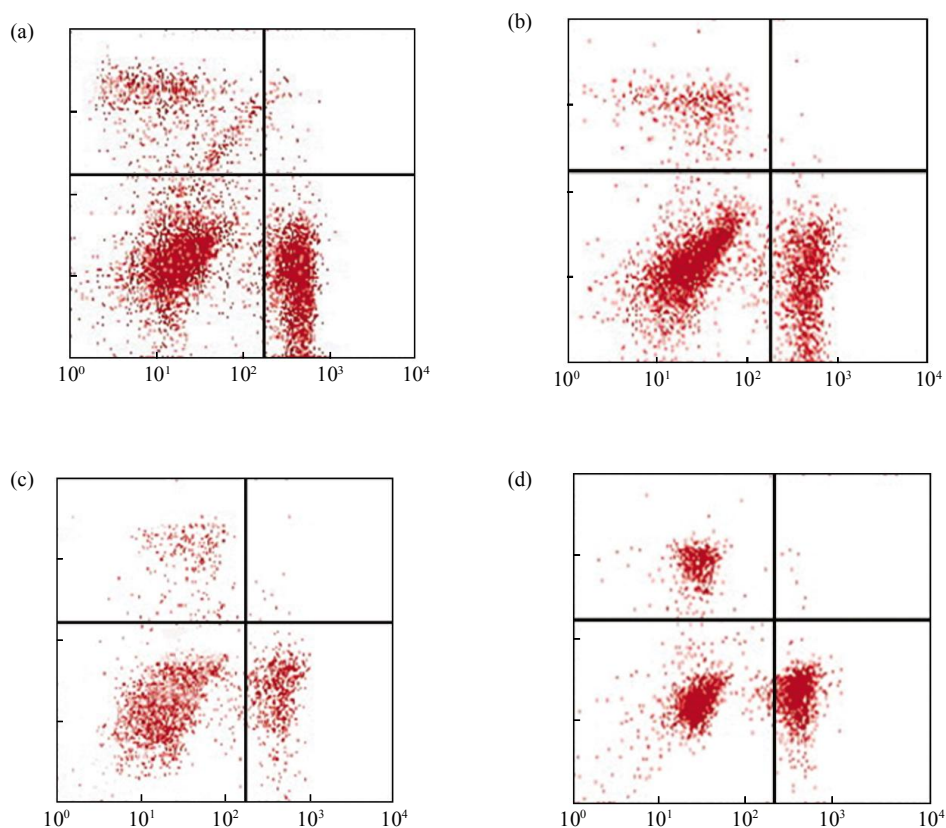


Fig. 5 T lymphocyte subsets was analyzed by FCM

(a) Immunized CD8⁺. (b) Immunized CD4⁺. (c) Control CD8⁺. (d) Control CD4⁺. The representative CD8⁺, CD4⁺ T lymphocytes test results of pcDNA-W2b2a group and NS control group were selected.

2.6 抗攻击感染的免疫保护作用

免疫后第4周每只小鼠经腹腔注射500个速殖子, 实验小鼠均未能耐受攻击感染。新基因的表位疫苗组小鼠存活时间明显长于pcDNA3组及NS组 ($P < 0.05$), 且双表位疫苗 pcDNA3-W2b2a 组小鼠

存活时间明显长于 pcDNA3-W2a 组 ($P < 0.05$), 说明3种新基因的表位疫苗均能产生一定的保护效应, 使实验小鼠的存活时间明显延长, 且双表位疫苗优于单表位疫苗(表3, 图6, 7)。

Table 3 The survival time of mice in different groups after challenged with tachyzoite

Groups	No. of mice	No. of mice in different time								Mean survival time/h
		144	168	192	216	240	264	288	312	
NS	15	10	0	0	0	0	0	0	0	150±8
pcDNA3	15	14	2	0	0	0	0	0	0	166±10
pcDNA3-W2b	15	15	10	8	3	2	1	1	1	217±41 ¹⁾
pcDNA3-W2a	15	15	9	6	2	1	1	1	0	194±27 ¹⁾
pcDNA3-W2b2a	15	15	14	10	6	3	2	1	1	235±35 ¹⁾²⁾

¹⁾As compared with plasmid group and the saline group, $P < 0.05$. ²⁾As compared with pcDNA3-W2a group, $P < 0.05$.

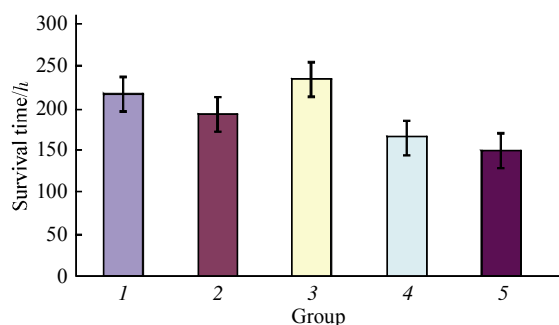


Fig. 6 The means of survival time in different groups of immunized mice after challenged with tachyzoite

1: pcDNA3-W2b; 2: pcDNA3-W2a; 3: pcDNA3-W2b2a; 4: pcDNA3; 5: NS.

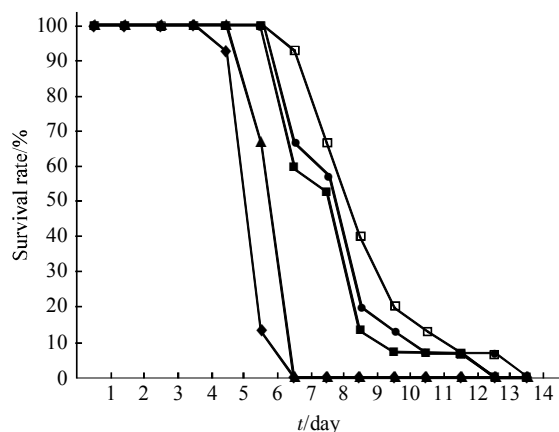


Fig. 7 The survival rate of mice in different groups after challenged with tachyzoite

●—●: pcDNA3-W2b; ■—■: pcDNA3-W2a; □—□: pcDNA3-W2b2a; ▲—▲: pcDNA3; ◆—◆: NS.

3 讨 论

表位疫苗是一种全新的高效免疫方法,具有制备简便,保存和运输容易,使用安全且不需在体外表达和进行蛋白质的纯化,能长期诱导机体产生CTL和体液免疫反应应答等优点.大量CTL表位和B淋巴细胞表位得以鉴定,这样表位基因构建表位疫苗成为可能^[4~6].表位疫苗将直接编码表位的基因片段进行适当的组合并构建到真核表达载体上,可除去抗原中起负向调节作用以及多变异区域,已在感染性疾病^[7,8]、寄生虫^[9]和肿瘤^[10]疫苗的研究中获得满意的免疫效果.目前常用的是取多个靶抗原表位或者辅助表位,制备成单表位或者复合表位疫苗,这样诱导的免疫应答将具有更强的特异性和更高的免疫效果,是疫苗研究的热点之一^[10].并且与其他DNA疫苗相比有如下特点,首先,由

于MHC分子存在群体差异,一个特定表位只能被一部分群体MHC分子结合并递呈给T细胞,而表位疫苗理论上能被多种遗传背景的MHC分子识别,从而扩大了免疫范围^[11].其次,表位疫苗能剔除免疫反应中的某些不利因素,如负性调节的基因及非特异性成分,以及可以避免完整抗原与宿主同源性而引起的自身免疫反应等危害.表位疫苗通过选择适当的免疫方式,能诱导机体很强的细胞免疫,这对细胞内寄生虫尤其重要.

本课题组已经通过杂交瘤技术制备的单克隆抗体筛选弓形虫cDNA文库获得弓形虫新基因 $wx2$,并在GenBank登录(登录号为AY238892).通过双色免疫荧光定位和体外表达以及生物信息学分析对其进行鉴定,证明其为弓形虫的含有信号肽的一个膜分子新基因,编码蛋白的分子质量为49 ku^[12].

本研究中采用瑞士生物信息学研究所(<http://ca.expasy.org/>)提供的蛋白质分析软件对新基因 $wx2$ 的抗原表位进行了预测,其有2个B细胞表位富集区.表位编码区碱基太少,在动物体内半衰期短、降解快会削弱抗原递呈作用,表位的碱基数太少不便于PCR扩增及酶切鉴定等,且B细胞表位预测结果缺少标准的评估方法,对同一段序列,应用不同方法、不同预测参数预测出的抗原表位略有差异^[13],表位预测的准确率一般为40%~60%^[14].考虑到上述影响因素,在构建真核表达质粒时均对表位编码区进行了放大,以确保表位的完整.

在免疫反应中,细胞内寄生的病原体主要刺激机体的细胞免疫应答.Gazzinelli等^[15]研究表明,CD8⁺T细胞是宿主对抗弓形虫感染的主要细胞亚群.在IFN- γ 的调节协同作用下,CD8⁺T细胞的分化成熟,进而对弓形虫速殖子感染的靶细胞产生细胞毒作用^[16].本研究显示,单表位疫苗pcDNA3-W2b、pcDNA3-W2a和双表位疫苗pcDNA3-W2b2a组,均能诱导产生特异性IgG抗体,且均于3次免疫后第4周达到最高值.此次血清中新基因的表位疫苗组抗体A值均高于pcDNA3和NS对照组,pcDNA3-W2b2a组显著高于对照组.末次免疫后4周,小鼠脾淋巴细胞中,免疫鼠的CD4⁺与CD8⁺T淋巴细胞数量较对照组都升高,并且CD8⁺T淋巴细胞数量呈上升趋势更显著,CD4⁺/CD8⁺T比值显著下降,实验组和对照组之间有显著差异,且双表位疫苗组也与单表位疫苗组有显著差异,说明接种新基因 $wx2$ 的表位疫苗可以模拟弓形虫感染,其能

刺激 B 淋巴细胞的增殖、分化, 分泌特异性的抗虫抗体, 发挥抗弓形虫感染的免疫保护作用, 其诱导的细胞免疫是以促进产生 CD8⁺T 细胞亚群为主, 并且刺激 CD4⁺T 形成 Th1 细胞, 促进 T_{TDH} 和 T_C 细胞的增殖分化与成熟, 在细胞介导的免疫应答中发挥作用。

目前研制的弓形虫 DNA 疫苗虽能诱导一定的细胞免疫和体液免疫, 但由于其抗原成分大多采用单个弓形虫基因片段, 因而其含有的淋巴细胞结合位点少、受 MHC 限制性比较大, 因而目前研制的核酸疫苗效果仍不理想, 只能起到部分保护作用, 尤其对弓形虫强毒株只能延缓小鼠死亡时间^[17]。魏庆宽^[18]、占国清^[19]、孙怡^[20]和杨婷婷^[21]等作者报道的 DNA 疫苗, 其存活时间分别为 201.8 h、7.89 天、174 h 和 9.5 天。本研究中 pcDNA3-W2b、pcDNA3-W2a 和 pcDNA3-W2b2a 表位质粒免疫小鼠后, 再经 RH 株弓形虫速殖子攻击, 其小鼠平均存活时间分别为 235 h、217 h 和 194 h, 高于 pcDNA3 组和 NS 对照组, 尤其是 pcDNA3-W2b2a 双表位疫苗组与对照组有显著差异, 对弓形虫强毒株的保护效果略优于上述报道的 DNA 疫苗。说明新基因 *wx2* 的 pcDNA3-W2b、pcDNA3-W2a 两个单表位疫苗, 尤其是 pcDNA3-W2b2a 双表位疫苗免疫小鼠所诱导的免疫保护作用, 可降低弓形虫感染所导致的死亡, 是一种较理想的弓形虫疫苗。

参 考 文 献

- 1 Israelski D M, Remington J S. Toxoplasmosis in patients with cancer. Clin Infect Dis, 1993, 15: 211
- 2 范久波, 吴翔, 谭逵, 等. 弓形虫新基因表位疫苗质粒的构建及鉴定. 中国病原生物学杂志, 2007, 2(2): 118~121
Fan J B, Wu X, Tan K, et al. Chin J Parasitic Disease Control, 2007, 2(2): 118~121
- 3 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术. 第 2 版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999. 161~163
Lu S D. Modern Techniques of Molecular Biology Experiments. Version 2. Beijing: Peking Union Medical College Press. 1999. 161~163
- 4 Velders M P, Weijzen S, Eiben G L, et al. Defined flanking spacers and enhanced proteolysis is essential for eradication of established tumors by an epitope string DNA vaccine. J Immunol, 2001, 166(9): 5366~5373
- 5 Bazhan S L, Belavin P A, Seregin S V, et al. Designing and engineering of DNA-vaccine construction encoding multiple CTL-epitopes of major HIV-1 antigens. Vaccine, 2004, 22(13~14): 1672~1682
- 6 Wilson C C, McKinney D, Anders M, et al. Development of a DNA vaccine designed to induce cytotoxic T lymphocyte responses to HIV-1. J Immunol, 2003, 171(10): 5611~5623
- 7 Ishioka G Y, Fikes J, Hermanson G, et al. Utilization of MHC class I transgenic mice for development of minigene DNA vaccines encoding multiple HLA-restricted CTL epitopes. J Immunol, 1999, 162(7): 3915
- 8 史霖, 刘珊, 胜利, 等. 丙型肝炎病毒多表位多细胞毒性 T 淋巴细胞表位 DNA 疫苗诱导特异性细胞毒性 T 淋巴细胞反应. 中华肝病杂志, 2006, 14(5): 385~386
Shi L, Liu S, Shen L, et al. Chin J Hepatology, 2006, 14(5): 385~386
- 9 王晓婷, 朱荫昌, 管晓虹, 等. 日本血吸虫多价 DNA 疫苗免疫保护作用的研究. 中国血吸虫病防治杂志, 2006, 18(1): 1~5
Wang X T, Zhu Y C, Guan X H, et al. Chin J Schistosomiasis Control, 2006, 18(1): 1~5
- 10 Tymciu S, Durieux-Alexandre C, Wijkhuizen A, et al. Enhancement of antibody responses in DNA vaccination using a vector encoding a universal T-helper cell epitope. DNA Cell Biol, 2004, 23(6): 395~402
- 11 Meyer D, Torres J V. Hypervariable epitope construct: a synthetic immunogen that overcomes MHC restriction of antigen presentation. Mol Immunol, 1999, 36(10): 631~637
- 12 Wu X, Zhang Q, Tan K, et al. Characterization of a new gene *WX2* in *Toxoplasma gondii*. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2007
- 13 陈兴, 王更银, 丛爱丽. 人 DAO 氨基酸序列片段 B 细胞表位的多参数预测. 免疫学杂志, 2000, 16(3): 232~234
Chen X, Wang G Y, Cong A L. Immunological J, 2000, 16(3): 232~234
- 14 万涛, 孙涛, 吴加金. 蛋白顺序性抗原决定簇的多参数综合预测. 中国免疫学杂志, 1997, 13(3): 329~333
Wan T, Sun T, Wu J J. Chin J Immunology, 1997, 13(3): 329~333
- 15 Gazzinelli R T, Hakim F T, Hieny S, et al. Synergistic role of CD4⁺ and cd8⁺T lymphocytes in IFN- γ production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. J Immunol, 1991, 146(1): 286~292
- 16 詹希美. 人体寄生虫学. 北京: 人民卫生出版社, 2005. 93~94
Zhan X M. Human Parasitology. Beijing: People's Medical Publishing House, 2005. 93~94
- 17 陈海峰, 郑焕钦, 徐劲, 等. SAG1 和 ROP1 混合基因真核表达质粒接种小鼠诱导产生拮抗致死性弓形虫感染的保护性免疫. 热带医学杂志, 2003, 3(1): 15~18
Chen H F, Zheng H Q, Xu J, et al. Journal of Tropical medicine, 2003, 3(1): 15~18
- 18 魏庆宽, 李瑾, 傅婷霞, 等. 弓形虫 ROP2 核酸疫苗免疫保护作用的研究. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2006, 24(2): 337~341
Wei Q K, Li J, Fu T X, et al. Chin J Parasitology and Parasitic Diseases, 2006, 24(2): 337~341
- 19 占国清, 吴少庭, 高世同, 等. 弓形虫 DNA 疫苗联合诱导 BALB/c 小鼠保护性免疫力的研究. 中华微生物学和免疫学杂志, 2006, 26(2): 136
Zhan G Q, Wu S T, Gao S T, et al. Chin J Microbiology and Immunology, 2006, 26(2): 136

- 20 孙 怡, 何深一, 丛 华, 等. 弓形虫 SAG1-SAG2 复合 DNA 疫苗免疫小鼠诱导的免疫保护性. 国际医学寄生虫病杂志, 2006, **33** (1): 2~5
Sun Y, He S Y, Cong H, *et al.* International J Medical Parasitic Diseases, 2006, **33**(1): 2~5
- 21 杨婷婷, 何深一, 张加勤, 等. 弓形虫 SAG1 单基因疫苗与 SAG1-ROP2 复合基因疫苗的免疫效果观察. 中国人兽共患病杂志, 2005, **21**(5): 410~413
Yang T T, He S Y, Zhang J Q, *et al.* Chin J Zoonoses, 2005, **21**(5): 410~413

The Protective Efficacy Induced by The Epitope Vaccines From New Gene *wx2* of *Toxoplasma gondii* in Mice*

TAN Kui, ZHANG Qiong, FAN Jiu-Bo, XIE Rong-Hua, JIANG Li-Ping, WU Xiang**, SHU Heng-Ping**

(Department of Parasitology, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract Epitope prediction of a new gene *wx2* in *Toxoplasma gondii* was analyzed by bioinformatics. The epitope encoding fragments W2b and W2a were amplified from new gene by PCR, respectively. The single-epitope vaccines pcDNA3-W2b, pcDNA3-W2a and double-epitope vaccine pcDNA3-W2b2a were successfully constructed. Mice in group pcDNA3-W2b, pcDNA3-W2a, pcDNA3-W2b2a and two control groups, pcDNA3 and NS, were injected intramuscularly with pcDNA3-W2b, pcDNA3-W2a and pcDNA3-W2b2a epitope vaccines, respectively. As controls, mice were inoculated with NS or empty plasmid pcDNA3. The induced immune responses were tested by ELISA detecting IgG, and flow cytometry sorting the subsets of T lymphocyte. All mice were challenged with highly virulent RH tachyzoites to observe the survival time. Results display that the level of IgG in sera of mice inoculated with pcDNA3-W2b2a was significantly higher than those in pcDNA3 and NS control group, CD4⁺T/CD8⁺ T cell proportion of immunized mice was significantly lower than those in control group. After challenged with highly virulent tachyzoites, the mean survival time of immunized mice in pcDNA3-W2b2a group was significantly longer than groups pcDNA3-W2b, pcDNA3-W2a and control group, indicating that the epitope vaccine from new gene *wx2* can induce protective immunity in mice. and the protective efficacy of pcDNA3-W2b2a double epitope vaccine elicits better immunoprotectivity than pcDNA3-W2b, pcDNA3-W2a single-epitope vaccine.

Key words *Toxoplasma gondii*, epitope vaccine, recombinant plasmid, B lymphocyte epitope, protective efficacy

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30371260), Hunan Province "Eleventh Five-Year Plan" Important Special Program (2006SK1001) and Hunan Province "Eleventh Five-Year Key Xueke Plan".

**Corresponding author.

WU Xiang. E-mail: wxspring@hotmail.com

SHU Heng-Ping. E-mail: hengpingshu@126.com

Received: March 19, 2008 Accepted: May 14, 2008