

猪带绦虫不同阶段 45W-4BX 和 18kD 基因联合表达及保护性分析

骆学农, 郑亚东, 窦永喜, 郭爱疆, 侯俊琳, 景志忠, 才学鹏

(中国农业科学院兰州兽医研究所 / 家畜疫病病原生物学国家重点实验室 / 甘肃省动物寄生虫病重点实验室, 兰州 730046)

摘要: 【目的】获得不同发育阶段基因联合表达的具有良好免疫保护性的重组抗原, 为研制高效的猪囊虫基因工程疫苗奠定基础。【方法】PCR扩增截去 45W-4B 基因的信号肽和 C 端 17 个疏水氨基酸序列, 经 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切后与表达载体 pGEX-4T-1 连接转化 BL₂₁ 感受态细胞, 酶切及 PCR 扩增鉴定阳性克隆。测序正确的质粒经 *Eco*R I 和 *Not* I 酶切处理后与截去信号肽的 18 kD 基因连接, 构建双基因融合表达载体 pGEX-4BX/18。用 IPTG 诱导的表达产物, 进行 SDS-PAGE 电泳、Western blot 分析活性。分别用 300 μg 重组 GST-4BX、GST-4BX/18 蛋白免疫猪, 间接 ELISA 测定抗体水平。感染后 90 d 剖检计算各组的减虫率, 比较评价重组抗原的免疫保护性。【结果】4BX/18 kD 在大肠杆菌中获得高效表达, 表达产物为 50 kD 的融合蛋白, 并能被人囊虫和感染初期的猪囊虫阳性血清所识别。重组抗原免疫猪后 45 d 抗体达到峰值, 联合表达重组抗原的减虫率为 97%, GST-4BX 免疫组的减虫率为 95%。【结论】重组抗原 4BX 和 4BX/18kD 均具有较好的免疫保护效果, 有望利用它们研制出抗猪囊尾蚴病的高效疫苗。

关键词: 猪带绦虫; 45W-4BX; 18kD; 联合表达; 免疫保护性分析

Combining Expression and Protective Efficacy of 45W-4BX and 18kD from Different Stages of *Taenia solium*

LUO Xue-nong, ZHENG Ya-dong, DOU Yong-xi, GUO Ai-jiang, HOU Jun-lin, JING Zhi-zhong, CAI Xue-peng

(Key Laboratory of Veterinary Parasitology of Gansu Province / State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology Lanzhou Veterinary Research Institute / Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046)

Abstract: 【Objective】The study aimed looked at the efficacy of the recombinant antigen of co-expressed 45W-4BX and 18kD from *Taenia solium* different development stages. 【Method】Truncated 45W-4B with the signal peptide sequence deletion and C'-terminal nucleotides encoding, 17 hydrophobic amino acids were cloned into *Bam*H I and *Eco*R I pre-digested pGEX-4T-1 and transformed into competent BL₂₁. The positive transformants were determined by enzyme restriction, PCR, and sequencing. This was followed by ligating with the signal sequence. It removed the 18kD fragment and identified pGEX-4BX/18. In order to evaluate the protective efficacy of 4BX/18 and 4BX antigens, vaccination trail was performed with 300μg dose per pig. 【Result】SDS-PAGE and Western blot showed that the 50kD fusion protein was expressed at a high level in *E. coli* and recognized by sera from either cysticercosis patients or in pigs infected by *Cysticercus cellulosae*. Statistical data indicated that the efficacy of the group immunized with 4BX/18 was 97% reduction in the number of cysticerci, a little higher than that of the GST-4BX group (95%). 【Conclusion】Recombinant antigens GST-4BX and GST-4BX/18 have high protection, supporting the development of highly efficient recombinant vaccines against cysticercosis, using protective antigens from different developmental stages of the parasite.

Key words: *Taenia solium*; 45W-4BX; 18kD; Combining expression; Protective efficacy

收稿日期: 2005-09-20; 接受日期: 2006-09-26

基金项目: 国家重大基础研究发展规划“973”项目(G1999011906)

作者简介: 骆学农(1969-), 男, 甘肃永登人, 博士, 研究方向为寄生虫分子生物学和免疫学。Tel: 0931-8342716; E-mail: xuenongluo@yahoo.com.cn。
通讯作者才学鹏(1958-), 男, 黑龙江鸡西人, 研究员, 博士, 研究方向为寄生虫分子生物学。Tel: 0931-8342535; E-mail: caixp@public.lz.gs.cn

0 引言

【研究意义】猪带绦虫 (*Taenia solium*) 是重要的人兽共患寄生虫, 人是其唯一的终末宿主。当中间宿主人或猪吞食了绦虫节片或虫卵后, 在消化液的作用下六钩蚴逸出卵壳, 随血流到达各组织, 最后主要在肌肉组织中发育为囊尾蚴。人吃了生的或未煮熟的含猪囊尾蚴的猪肉后发育成猪带绦虫。人囊尾蚴病和绦虫病在中国大部分地区是一个重要的公共卫生问题, 对人健康危害很大。猪囊尾蚴感染率也较高, 每年造成的经济损失达 20 亿元。囊尾蚴病的传统防治方法以药物为主, 但肉品中药物残留及对环境安全的威胁, 使人们把目光重新投向研制和开发安全、有效的疫苗。传统疫苗所用抗原有全囊虫抗原、分泌代谢 (ES) 抗原、异源抗原以及六钩蚴抗原, 这些疫苗都能对猪囊尾蚴病起到很好的预防作用。但由于绦虫不能在体外培养中增殖, 因而抗原来源很有限。随着分子生物学技术在寄生虫研究领域的应用, 通过寻找免疫相关基因, 在体外克隆并表达, 用表达产物作为免疫原无疑是一个新的研究方向和热点。【前人研究进展】澳大利亚学者 Johnson^[1] 用基因工程方法克隆并表达了羊绦虫 (*Taenia ovis*) 六钩蚴 45W 抗原, 用其制成的疫苗对羊的保护率达 94%。这一突破性成功标志着用基因工程的方法研制猪囊虫疫苗是切实可行的。疫苗研究的另一策略是鉴定并克隆宿主保护性抗原基因的同源序列。分子生物学方法使这一策略可以快速实现, 而且在牛囊虫证明是非常有效的。【本研究切入点】笔者根据 45W 基因的保守区序列, 设计特异引物扩增出猪带绦虫 45W 基因 A、B、C 3 个转录本, 比较发现 45W 基因在猪带绦虫和羊绦虫间具有很高同源性, 有作为疫苗预防猪带绦虫感染的潜力。18 kD 基因是猪囊尾蚴阶段的重要基因, 其所含有的 7 kD 的核心骨架在 10 kD、14 kD 等基因中都存在, 仅仅因不同的糖基化修饰而形成不同大小的蛋白分子^[2]。【拟解决的关键问题】将猪带绦虫不同发育阶段的 45W-4BX 与 18 kD 基因融合表达, 以提高 45W-4BX 基因的免疫原性, 获得既能在六钩蚴阶段又能在囊尾蚴阶段发挥作用的重组基因工程疫苗, 用于猪囊虫病的免疫预防。

1 材料与方法

1.1 菌种和试剂

JM109、BL₂₁ 菌株、pGEX-4T-1 购自 INVITROGEN; T₄ DNA 连接酶、EcoRI、BamHI、NotI 限制

性内切酶、Taq 酶均购自 Promega 公司; 引物、PCR 试剂盒均来自大连宝生物工程公司; Agarose Gel DNA Extraction Kit、核酸 Markers 购自经科公司; 猪带绦虫虫卵和人囊虫阳性血清由吉林农业大学囊虫病研究所提供; 猪囊尾蚴阳性血清、辣根过氧化物酶标记兔抗猪 IgG、羊抗人 IgG 由甘肃省动物寄生虫重点实验室收集保存; 其它常规试剂均由国内生产。

1.2 4BX 和 18kD 序列的 PCR 扩增

根据笔者已克隆的猪带绦虫六钩蚴 45W-4B 和猪囊虫 18 kD 的完整阅读框 (ORF), 截去两者的 N 端信号肽和 4B 基因的 C 端 17 个疏水氨基酸, 设计如下两对引物:

FB: 5'-CG GGATCC GAC TAC AGA GAA TCC ATC AGC-3'

RB: 5'-CG GAATTC ACC AGA TCC ACT AGT CGT C-3'

F18: 5'-CG GAATTC CGA GAG TGA CAA AAG CAT C-3'

R18: 5'-ATTT GCGGCCGC TGC GTA CTT TCA ACT GTT C-3'

FB、RB 引物分别加入 BamHI 和 EcoRI 酶切位点及保护性碱基, 扩增片段为 351 bp 的中间片段。F18、R18 引物分别引入 EcoRI 和 NotI 酶切位点, 扩增片段大小为 252 bp。取重组质粒 pGEM-4B、pGEM-18 kD 各 1 μl 于 PCR 反应管中, 分别加入 4BX 和 18 kD 上、下游引物各 1 μl (50 pmol)、4 μl dNTP (2.5 mmol) 和 0.5 μl Taq 酶 (5U·μl⁻¹)。按如下程序进行 PCR 扩增: 95℃ 预变性 5 min, 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 45 s, 35 个循环, 在 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖电泳观察。琼脂糖电泳回收目的片段 (按 Takara 回收试剂盒说明进行)。

1.3 pGEX-4BX 表达载体的构建

取 30 μl PCR 回收产物, 加入内切酶 EcoRI 和 BamHI 各 2.5 μl, 在 50 μl 反应体系中 37℃ 消化过夜。补水至 200 μl, 加入 20 μl 醋酸钠 (3 mol·L⁻¹) 和 500 μl 无水乙醇, 置 -20℃ 沉淀 30 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 70% 乙醇洗涤, 置真空干燥仪干燥, 加入 10 μl 灭菌水溶解。取上述酶切产物 6 μl 与 3 μl 经相同酶切处理的 pGEX-4T-1 表达载体、1 μl T₄ DNA 连接酶 (3 U·μl⁻¹) 混合, 在 16℃ 连接过夜。取 10 μl 连接产物无菌条件下加入已放置 12~24 h 用 TSS 法制备的 BL₂₁ 感受态细胞中, 冰浴放置 30 min。42℃ 热激 90 s, 冰浴冷却后加入 800 μl 预热的 SOC 培养液, 37℃ 150 r/min

振荡培养 1 h, 5 000 r/min 离心 5 min, 细胞沉淀均匀涂布于含氨苄青霉素 ($100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) 的 LB 琼脂平板上。倒置平皿于 37°C 培养箱培养 12~16 h, 挑取 10 个单菌落于 3 ml $2\times\text{YT}$ 培养液中, 振荡培养过夜, 碱裂解法提取质粒。用 *EcoR* I 和 *Bam* H I 酶切消化过夜, 酶切鉴定的阳性质粒 1 : 10 稀释后, 用 4BX 特异引物进行 PCR 扩增鉴定。鉴定正确的质粒送上海生工用 pGEX5' 端引物测序。

1.4 pGEX-4BX/18 双基因表达载体的构建

取 4BX 定向插入且编码框正确的 pGEX-4BX 载体用 *Eco* RI 和 *Not* I 酶切过夜, 与经相同酶切处理的 18 kD 片段连接, 转化 BL21 感受态细胞。提取质粒用 *Bam* HI 和 *Not* I 酶切鉴定, 阳性质粒再用 FB 和 R18 进行 PCR 扩增。两者鉴定均为阳性的质粒送大连宝生物公司测序验证。

1.5 重组质粒 pGEX-4BX/18 的表达及表达产物检测

将测序正确的 pGEX-4BX 和 pGEX-4BX/18 重组菌各 30 μl 分别接种至 3 ml $2\times\text{YT}$ 培养液 (含 $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Amp) 中, 37°C 振荡过夜。取过夜培养物 300 μl 接种于 30 ml $2\times\text{YT}$ 培养液中, 剧烈振荡至 OD_{600} 为 0.8 时, 加入 IPTG 至终浓度 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 37°C 诱导表达, 分别在 3、4、5 h 各收集 1.5 ml 菌液, 用 12% 分离胶进行聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析, 筛选出表达量高的菌株, 同时用含 pGEX 空载体的菌液作为阴性对照。表达量高的重组菌株大量诱导表达, 5 000 r/min 离心收集菌体, 加入细胞裂解液反复冻融几次后, 超声波处理 2 min, 5 000 r/min 离心 15 min, 未处理的菌液以及处理后的上清和沉淀分别进行 SDS-PAGE 电泳, 分析表达产物是可溶性还是包涵体形式表达。

1.6 表达产物的活性分析

将经过电泳的表达蛋白用 180 mA 电流转移至 NC 膜上, 3% BSA 4°C 封闭过夜, 分别用 1 : 100 稀释的人囊虫阳性血清和人工感染猪带绦虫卵 21 d 的猪血清为一抗, 37°C 摇床孵育 2.0 h, 用 1 : 400 稀释的羊抗人 IgG-HRP 和兔抗猪 IgG-HRP 为二抗, 37°C 结合 1.5 h 后, 用 30 ml 含 15 mg DAB、9 mg $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、10 μl H_2O_2 底物溶液显色。待出现反应条带后用水终止反应。

1.7 表达产物对猪的免疫保护试验

重组菌株大量诱导表达后, 收集的菌体沉淀用 Solution A ($50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris HCl, $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{ml}^{-1}$ EDTA, $50 \text{ mmol}\cdot\text{ml}^{-1}$ NaCl, 5% 甘油) 悬浮, 加入 1/10 体积的

溶菌酶反复冻溶、超声波处理后分别收集上清和沉淀。用谷胱甘肽 Sepharose 4B 柱纯化可溶性产物 GST 和 GST-4B。GST-4BX/18 包涵体沉淀用脱氧胆酸 (DOC) 洗涤后, 加入十二烷基肌氨酸钠 (SKL) 溶解包涵体, 收集离心后的上清, 用 Solution A 透析复性, PEG8000 浓缩后即为纯化的 GST-4BX/18 重组蛋白。将 40 日龄小家猪随机分成未免疫对照组、GST 免疫组、GST-4BX 免疫组、GST-4BX/18 免疫组, 每组 3 头猪, 除第 1 组不进行任何免疫外, 其余各组每头猪取 300 μg 抗原与等体积 206 佐剂乳化制成疫苗后颈部肌肉注射, 21 d 后每头猪经口感染 25 000 枚成熟的猪带绦虫虫卵。免疫前和免疫后每隔 15 d 采血分离血清, 用纯化的 45W-4BX 作为包被抗原, 间接 ELISA 检测免疫猪的血清抗体, 绘制抗体随免疫或感染时间变化的关系图。感染后 3 个月剖检动物, 计数每头猪的囊虫数及各组的平均囊虫数和减虫率, 评价重组抗原对猪的免疫保护性。

2 结果与分析

2.1 45W-4B 和 18kD 基因的 PCR 扩增

PCR 产物电泳出现 351 bp 和 252 bp 左右的条带, 与预期的扩增结果相一致 (图 1)。

2.2 表达载体的构建

重组质粒 pGEX-4BX 经酶切及 PCR 扩增后出现 351 bp 大小的片段。用 5' pGEX 测序引物测序证明,



1: DL2 000 DNA 标准分子; 2: 4BX 扩增产物; 3: 18kD 扩增产物
1. DL2 000 markers; 2. PCR products of 45W-4BX; 3. PCR products of 18kD

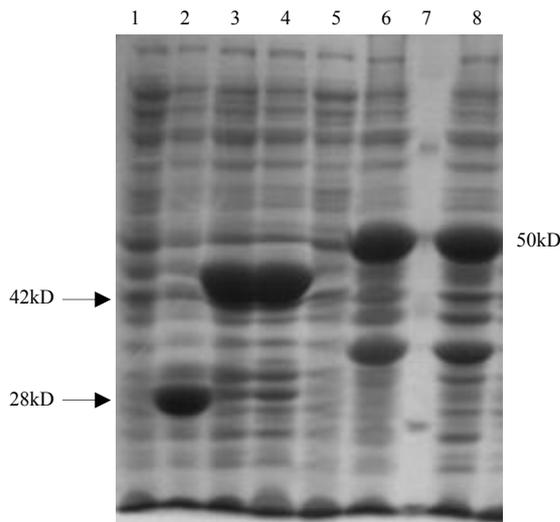
图 1 重组 pGEX-4BX/18 表达载体的 PCR 鉴定

Fig. 1 Identification of PCR of recombinant plasmid pGEX-4BX/18

45W-4BX 已定向插入 GST 基因的下游，共编码 117 个氨基酸 (aa)。pGEX-4BX/18 重组质粒酶切和 PCR 均出现 603 bp 左右的条带，测序证明两基因以正确的阅读框相连而插入 tac 启动子的下游。

2.3 pGEX-4BX/18 表达和检测

重组菌株诱导后 3 h 即可检测出表达产物，5 h 表达量达最高。表达产物为分子量 50 kD 的融合蛋白。4BX 与 GST 融合表达的产物为 41 kD，表达产物为可溶性蛋白。而与猪囊虫 18 kD 基因联合后，表达产物主要存在于超声波处理的沉淀中，目的蛋白主要以包涵体形式存在 (图 2)。免疫印迹结果表明 4BX-18 可被人囊虫和感染初期的猪囊虫血清所识别 (图 3)，说明表达产物具有反应活性，并可能作为抗原抵抗猪带绦虫虫卵的攻击感染。



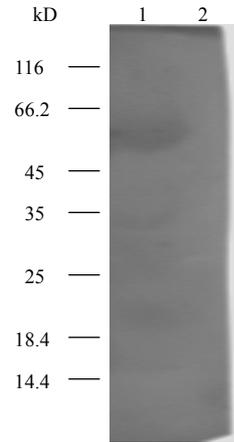
1. 未诱导的 BL21; 2. pGEX/BL21 诱导表达产物; 3, 4. pGEX-4BX/BL21 表达产物; 5. 超声波处理的 pGEX-4BX/BL21 上清; 6, 8. pGEX-4BX/18/BL21 表达产物; 7. 低分子量标准蛋白分子
1. Uninduced BL21; 2. Induced pGEX/BL21; 3,4. Induced pGEX- 4BX/18/BL21; 5. Supernatant after sonication; 6,8. Sediment after sonication; 7. Low weight protein markers

图 2 pGEX-4BX 和 pGEX-4BX/18 表达产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳

Fig. 2 SDS-PAGE of pGEX-4BX and pGEX-4BX/18

2.4 重组抗原对猪的免疫保护分析

重组蛋白免疫猪后 45 d 血清抗体即达到最大值，3 个月后仍然保持比较高的抗体水平 (图 4)。未免疫对照组在感染后也出现一定滴度的抗 4BX 抗体，说明 45W-4B 在六钩蚴阶段表达。动物免疫实验证明



1. 重组 4BX/18 蛋白; 2. GST 蛋白对照
1. Recombinant 4BX/18 protein; 2. GST protein

图 3 表达产物的 Westernblot 分析

Fig. 3 Westernblot of recombinant 4BX/18

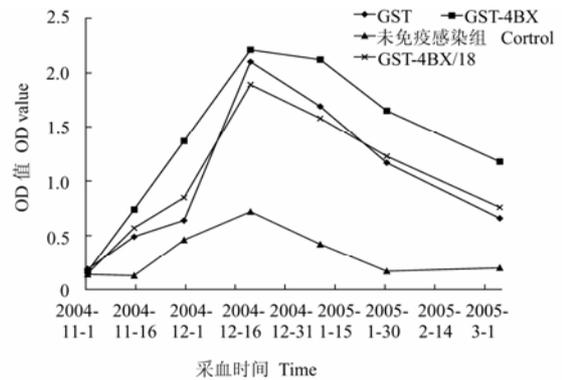


图 4 重组抗原免疫猪后血清抗体的变化曲线

Fig. 4 Changes of antibodies from pigs immunized with recombinant antigens

GST-4BX、GST-4BX/18 免疫组较未免疫感染组虫体负荷分别降低 95%和 97% (表)。说明 45W-4BX 与 18kD 基因融合表达后，不但没有影响 45W-4BX 的免疫原性，而且还可能增强 GST-4BX 重组抗原的免疫保护效果，证明本试验达到了预期的设计要求，对猪具有较好的免疫保护。

3 讨论

羊带绦虫 (*T.ovis*) 45W 基因在大肠杆菌中以 GST 形式表达的 45W-GST 重组抗原疫苗对自然感染或试验攻击感染猪的保护率都在 90% 以上。随后的研究也证明羊 45W-GST 重组蛋白可交叉保护猪带绦虫的感

染。用猪带绦虫六钩蚴 (TSO) 抗原 0.1 ml 和 3 种羊带绦虫重组抗原 45WB/X-GST、18k-GST、16K-GST 各 200 μ g 免疫猪, TSO 抗原诱导 83% 的保护, 而重组抗原诱导 93% 的保护。说明用 45WB/X 和 18 kD 重组抗原能诱导猪产生坚强的免疫力^[3]。猪带绦虫 45W (TSOL45) 基因可通过轮换剪切形成 A、B、C 3 型转录本^[4]。Flisser A 等^[5]用 TSOL45-1A 重组抗原免疫猪可获得 100% 的保护, 说明猪带绦虫 45W 能诱导猪产生坚强的保护力, 可作为疫苗候选抗原用于猪囊尾蚴病的免疫预防。在 45W 3 种转录本中, B 型转录本含量最高, 而 4B 在 B 型转录本中的同源性最低^[6], 因此选择 45W-4B 作为疫苗抗原基因之一。猪囊虫 18 kD 蛋白基因与国外报导的 18 kD 蛋白基因的同源性为 85.8%。说明 18 kD 蛋白基因不是很保守, 在进化的过程中产生一定的变异。许多研究已证明 18 kD 蛋白能用于猪囊虫病和人神经脑囊虫病的特异性诊断, 但该蛋白是否能刺激机体产生免疫保护目前尚未见报道。本研究将来自猪带绦虫六钩蚴阶段的 45W-4BX 基因与囊尾蚴阶段的 18 kD 抗原基因联合表达, 从而获得对猪带绦虫不同发育阶段都起免疫保护作用的重

组抗原。

羊带绦虫 45W-GST 重组蛋白很不稳定, 大多以降解形式存在。Lightowler 等^[6]研究认为当羊带绦虫 45W 基因缺失 N 端 19 氨基酸时, 以包涵体形式存在的重组蛋白稳定性大大增加, 可在 2~8 $^{\circ}$ C 稳定保存 18 个月, 而且经尿素变性和复性的蛋白仍然产生很高的保护。不管是重组 *T. ovis* 45W 蛋白还是六钩蚴自身的 45W 蛋白, 用尿素或 SDS 等强变性剂处理后, 免疫原性仍然良好, 提示 45W 天然的抗原决定簇可能呈线性。试验结果表明, 当猪带绦虫 45W-4B 同时缺失 N 端信号肽和 C 端 19 个疏水氨基酸时, 仍然保留 45W 的抗原表位, 表达产物为稳定的可溶性蛋白。说明 C 端的疏水氨基酸对重组蛋白的溶解性影响很大。pGEX-4BX/18 在大肠杆菌中主要以包涵体存在, 可能是因为 18 kD 基因与 45W-4BX 联合表达后改变了融合蛋白 N 端氨基酸组成, 使融合蛋白的溶解性降低。因为分析发现在 18 kD 蛋白的 87 个氨基酸中, 有 37 个疏水性氨基酸, 而疏水性氨基酸多少将直接影响重组蛋白的溶解性, 使 GST-4BX/18 重组蛋白主要以包含体形式表达。

表 试验猪剖检后各组囊尾蚴数

Table Cysticerci number in experimental pigs

组别 Group	佐剂 Adjuvant	每头猪的囊尾蚴数 No. per pig	每组平均囊尾蚴数 Average No. per group	每组的减虫率(%) Protection
未免疫对照组 Control	-	17, 78, 97	64	0
GST	ISA206	138, 5, 306	150	-
GST-4BX	ISA206	4, 0, 6	3.3	95
GST-4BX/18	ISA206	0, 0, 6	2	97

减虫率 = (未免疫对照组囊尾蚴数 - 免疫组平均囊尾蚴数) / 未免疫对照组囊尾蚴数

Protection = (Average no. of the control - Average no. of an immunized group) / Average no. of the control

重组抗原免疫猪后 15 d 抗体水平即呈阳性, 45 d 达到峰值, 以后逐渐下降, 保持阳性水平达 3 个月以上。说明重组抗原可刺激机体产生抗体应答。该结果与徐政用猪囊尾蚴匀浆抗原免疫猪两次后的结果相一致, 即 10 d 后抗体阳性率达 75%~100%, 48 d 抗体滴度达到峰值。但本试验自感染后 1 个月开始用粗制囊尾蚴抗原检测猪囊尾蚴抗体, 抗体水平均呈现低水平, 3 个月时的 ELISA 检测结果和剖检囊尾蚴数量的分析也表明, 虫体负荷与囊尾蚴抗体之间无相关性, 即猪体的囊尾蚴数量多而囊尾蚴抗体却不高。原因之一可能是囊尾蚴抗体在感染 3~5 个月后才可检测到或者检测囊尾蚴抗体的方法本身敏感性较低, 而检测循环抗原的方法相对比较敏感, 理论上可检测出一个

或几个虫体。另一原因可能是只有感染的囊尾蚴达到一定数量, 抗体水平与囊尾蚴数才存在一定的相关性。

从剖检结果可以看出, 重组抗原 GST-4BX 免疫组的减虫率为 95%, 与粗制囊尾蚴抗原免疫组的减虫率相当, 而 GST-4BX/18 免疫组的减虫率达 97%, 完全保护率也达 2/3, 免疫效果优于粗制囊尾蚴抗原和 GST-4BX 抗原。本试验 GST 免疫组的虫体负荷明显高于未免疫对照组, 可能主要有以下两个原因: 一是日本血吸虫的谷胱甘肽 S 转移酶 (GST) 与猪囊尾蚴的 GST 间无交叉保护性^[7]。二是试验猪之间存在年龄、遗传背景和个体方面的差异, 即使同一免疫组不同个体之间的虫体负荷也可能相差很大。尽管本试验免疫猪的完全保护率低, 但仍然可作为疫苗抗原应用。因

为即使疫苗的减虫率在 50%，免疫接种后也会大大降低囊尾蚴发育成绦虫的数量，从而降低猪囊尾蚴病的流行^[8]。

4 结 论

本研究利用 45W-4BX 作为主要免疫原基因，目的是在入侵阶段将六钩蚴杀灭。同时考虑到当感染量较大时可能还有未被杀灭的六钩蚴发育至囊尾蚴，而 18 kD 抗原基因是囊尾蚴阶段的重要基因，它编码的蛋白可能对囊尾蚴感染具有免疫原性。研究结果证明，将不同发育阶段的基因联合表达，没有造成彼此之间抗原性的影响，反而提高了 45W-4BX 的免疫保护效果，说明不同发育阶段的基因的联合表达或多个抗原表位的联合将大大提高单一抗原的免疫保护效果，是寄生虫等抗原成份复杂的病原体疫苗研究的主要方向。

References

- [1] Johnson K S, Harrison G B L, Lightowlers M W, O'Hoy K L, Coughle W G, Dempster R P, Lawrence S B, Vinton J G, Heath D D. Vaccination against ovine cysticercosis using a defined recombinant antigen. *Nature*, 1989, 338: 585-567.
- [2] Hancock K, Khan A, Williams F B, Yushak M L, Patabhi S, Noh J, Tsang V C. Characterization of the 8-kilodalton antigens of *Taenia solium* metacestodes and evaluation of their use in an enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis. *Journal Clinical Microbiology*, 2003, 41: 2577-2586.
- [3] Plancarte A, Flisser A, Gauci C G, Lightowlers M W. Vaccination against *Taenia solium* cysticercosis in pigs using native and recombinant oncosphere antigens. *International Journal for Parasitology*, 1999, 29: 643-647.
- [4] Gauci C G, Lightowlers M W. Alternative splicing and sequence diversity of transcripts from the oncosphere stage of *Taenia solium* with homology to the 45W antigen of *Taenia ovis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2001, 112: 173-181.
- [5] Flisser A, Gauci C G, Zoli A, Adriana-Ocana J, Garza-Rodriguez A, Dominguez-Alpizar J L, Maravilla P, Rodriguez-Canul R, Avila G, Aguilar-Vega L, Kyngdon C, Greets S, Lightowlers M W. Induction of protection against porcine cysticercosis by vaccination with recombinant oncosphere antigens. *Infection and Immunity*, 2004, 72: 5292-5297.
- [6] Lightowlers M W, Waterkeyn J G, Rothe J S, Gauci C G, Harrison G B L. Host-protective fragments and antibody binding epitopes of the *Taenia ovis* 45W recombinant antigen. *Parasite Immunology*, 1996, 18: 507-513.
- [7] Vibanco P N, Jimenez L, Merchant N T, Landa A. Characterization of glutathione S-transferase of *Taenia solium*. *Journal Parasitology*, 1999, 85: 448-453.
- [8] Lightowlers M W. Vaccines for prevention of cysticercosis. *Acta Tropica*, 2003, 87(1): 129-135.

(责任编辑 林鉴非)