

微小隐孢子虫孢子表面蛋白 CP15/60

编码基因核酸疫苗的研究

何宏轩^{1,2}, 张西臣¹, 尹继刚¹, 李建华¹, 杨 举¹

(¹解放军军需大学军事兽医学军事预防兽医学教研室, 长春 130062; ²河南职业技术学院动物科学系, 新乡 453003)

摘要: 将编码 CP15/60 的基因插入真核表达载体 pcDNA3(+) 中构建重组质粒 pcDNA3-15/60, 然后经鼻粘膜免疫怀孕成年山羊, 观察其免疫应答的产生情况及其对后代的保护力。结果为抗 CP15/60 抗体存在于免疫山羊的血浆和初乳中。pcDNA3-15/60 经鼻粘膜免疫的怀孕山羊产生的免疫力能传给子代, 使子代对微小隐孢子虫 (*Cryptosporidium parvum*) 感染产生保护。CP15/60-DNA 免疫母羊的后代比非免疫母羊的后代排出卵囊少且排卵时间短。这就表明重组质粒 pcDNA3-15/60 可作为隐孢子虫候选核酸疫苗。

关键词: 微小隐孢子虫; CP15/60; 核酸疫苗; 鼻粘膜接种

094 A

Vaccination with pcDNA3-15/60 Naked DNA Encoding the Surface Protein of Sporozoites in *Cryptosporidium parvum*

HE Hong-xuan^{1,2}, ZHANG Xi-chen¹, YIN Ji-gang¹, LI Jian-hua¹, YANG Ju¹

(¹Department of Veterinary Preventive Medicine, Faculty of Animal Science, the Quartermaster University of

People's Liberation Army, Changchun 130062; ²Department of Animal Science, Henan Vocation-Technical College, Xinxing 453003)

Abstract: The CP15/60 gene encoding the CP15/60 surface protein of sporozoites in *Cryptosporidium parvum* was obtained by PCR so as to research the nucleic vaccine against *C. parvum*. The eukaryotic expressing vector pcDNA3-15/60 was constructed through inserting CP15/60 gene into pcDNA3(+) in *Xho* I and *Eco*R I. A vaccination protocol was the adult pregnant goats inoculated intranasally with the pcDNA3-15/60 plasmid and their offspring were infected with *C. parvum* oocysts. The results showed that the pcDNA3-15/60 plasmid can induce the immune response of goats and the vaccinated goats can transfer the immunity to offspring conferring protection against *C. parvum* infection. These suggested that the recombinant plasmid could be a DNA vaccine candidate.

Key words: *Cryptosporidium parvum*; CP15/60; Nucleic acid vaccine; Nasal immunization

核酸疫苗又称 DNA 疫苗或基因疫苗, 是指含某种蛋白质抗原编码基因的重组表达质粒, 通过肌肉注射、基因枪轰击、鼻粘膜滴入、静脉注射等途径将其接种动物后, 外源基因能在宿主细胞内表达目的蛋白并诱导免疫应答。最早在 1990 年, Wolff 等人观察到给小鼠直接肌肉注射纯化的 RNA 和 DNA 表达载体可使载体上的基因在局部肌肉组织得以表达, 这种表达至少可持续数月。随后又发现这种表达甚至可持续终身, 而没有检出注射的 DNA 与宿主

染色体整合。Williams 等随之报告输入基因在体内编码的蛋白质可诱导免疫应答。1993 年, Ulmer 等发现小鼠肌肉注射编码甲型流感病毒核蛋白的质粒载体后, 可有效地保护小鼠抵抗嗣后另一亚型流感病毒的攻击感染。迄今, 已发现 DNA 接种对许多病毒、细菌、寄生虫感染以及肿瘤的预防均有一定的效果^[1]。隐孢子虫广泛存在于动物中, 亦为人体中的重要寄生孢子虫, 可引起隐孢子虫病 (cryptosporidiosis)。寄生于人体的虫种主要是微小隐孢子虫

收稿日期: 2002-03-24

基金项目: 吉林省杰出青年基金资助项目 (2002)

作者简介: 何宏轩 (1970-), 男, 河南内乡人, 博士, 主要从事人兽共患寄生虫病分子生物学和免疫学研究。Tel: 0373-3040364; Fax: 0373-3040276;

E-mail: hongxuanhe@sohu.com. 张西臣为通讯作者

(*Cryptosporidium parvum*), 该虫是机会致病原虫, 但也是一种重要的腹泻病原。本病在国外的研究报道日趋增多, 国内近几年也逐渐引起人们的注意。大多数研究认为隐孢子虫孢子表面蛋白是产生免疫保护的主要因素^[2], 本研究用隐孢子虫孢子表面蛋白 CP15/60 基因构建重组真核表达质粒, 经鼻粘膜免疫怀孕山羊, 观察其诱导的免疫反应及其对后代的保护力, 为隐孢子虫病防治研究奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 卵囊纯化

C. parvum 卵囊来自感染黑白花奶牛, 并按常规方法经新生犊牛传代。粪样在 4℃ 下保存于 2.5% 重铬酸钾溶液中, 待分离纯化, 方法参考文献^[3]。

1.2 构建表达载体

编码 *C. parvum* 孢子表面抗原 CP15/60 的基因通过 PCR 扩增后, 插入到 pcDNA3(+) 表达载体的下游。PCR 上游引物为:

5' GAATTCATGGGTAACITGAAATCCTGTGT3', 下游引物为:

5' CTCGAGTTAGTTAAAGTTTGGTTTTGAATTT3', 包含人工 *Xho* I 和 *Eco*R I 位点。5 × 10⁶ 个纯化卵囊悬浮于裂解液 (10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl pH 8.0, 0.1 mmol·L⁻¹ EDTA, 0.5% SDS), 反复冻融 5 次后煮沸 15 min。卵囊裂解物作为模板, 50 μl 反应混合物包括 20 mmol·L⁻¹ Tris-HCl pH 8.8, 10 mmol·L⁻¹ KCl, 10 mmol·L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 2 mmol·L⁻¹ MgSO₄, 0.1% Triton-X-100, 200 mmol·L⁻¹ dNTP, 0.1 μmol·L⁻¹ 引物, 1 单位 Taq DNA 聚合酶。模板先变性 99℃ 10 min, 然后 94℃ 1 min, 48℃ 1 min, 75℃ 1 min 经 30 个循环, 终循环为 94℃ 1 min, 48℃ 1 min, 72℃ 5 min。接着 10 μl PCR 产物在 1.2% 琼脂糖凝胶上电泳。

PCR 产品克隆到 pMD18-T 载体上, 构建成重组载体 pMD18-T-15/60。用 *Xho* I 和 *Eco*R I 消化, 和 CP15/60-DNA 一致的 456 bp 片段插入到 pcDNA3(+) 对应酶切位点上, 形成重组质粒, pcDNA3-15/60, 用限定酶切图谱和核酸序列证实 CP15/60 基因插入在正确位置。

质粒 pcDNA3-15/60 和 pcDNA3(+)(阴性对照) 在 *E. coli* DH5α 中培养, 用阴离子交换柱 (AX2000, Macherey Nagel) 纯化, 重新溶解在灭菌 PBS 液中。质粒 DNA 纯度用 UV 分光光度计检测。(光密度 260/280 nm)。纯化后进行琼脂糖凝胶电泳。

1.3 CP15/60 融合蛋白的表达和纯化

将 pMD18-T-15/60 用 *Xho* I 和 *Eco*R I 消化, 然后插入到 pET28a(+) 载体上, 构建原核表达载体 pET28a-15/60, 经酶切鉴定正确的在 BL21(DE3) 中按常规方法诱导表达, 提取包涵体, 并用 SDS-PAGE 和 Western blotting 进行鉴定。

1.4 免疫程序

在妊娠 3 个月或 4 个月时, 用质粒 DNA 免疫怀孕的东北山羊。试验组用 200 μg pcDNA3-15/60 和司本甘油溶液 (司本 4.5%, 甘油 1%) 以 1:5 比例混合试剂一起于 0.14、29 d 时进行免疫。对照组山羊用没有插入片段 pcDNA3(+) 注入。DNA 和司本甘油溶液轻轻混合, 室温下孵育 45 min, 以形成质粒混合物。混合物经鼻接种 (滴注 2 个鼻孔)。每组有 3 只羊, 试验组山羊编号为 A、B、C, 对照组编号为 D、E、F。

1.5 保护性试验

试验组和对照组山羊产出一日龄羔羊在吃奶前, 每只口服接种 1 × 10⁶ 个卵囊。然后每天检查羔羊的腹泻及其它临床症状。从接种后连续 3 周每天收集粪便以便用来检查隐孢子虫卵囊。每只羊取 0.25 g 粪便和 750 μl 水混匀, 加入 4 ml Sheather 蔗糖液, 然后激烈振荡。用血细胞计数板进行卵囊计数。考虑稀释度, 每克粪便卵囊数为计数所得卵囊数乘以 2 × 10⁵。当不能查到卵囊时, 用 Sheather 蔗糖液漂浮检查。

1.6 样品收集

试验组于每次免疫前, 分娩时, 分娩后采集静脉血样, 于分娩时, 分娩后 12、24 和 36 h 采集初乳。两组山羊每个乳头采集等量初乳并分开保存以备免疫学分析。血清和初乳保存于 -20℃ 下。

1.7 抗体反应

用 1 μg·ml⁻¹ 纯化融合蛋白包被反应板 37℃ 作用 4 h, 然后 4℃ 过夜。反应板用 10 mmol·L⁻¹ PBS (pH 7.4) 冲洗 3 次, 用 10% 小牛血清封闭后, 加入待检样品, 37℃ 作用 1 h。对于 IgG, 反应板 PBS 洗 3 次, 然后加入兔抗羊 IgG 碱性磷酸酶结合物; 对于 IgA, 用兔抗山羊 IgA 碱性磷酸酶结合物, 37℃ 作用 1 h。反应板洗 3 次。加入 OPD-H₂O₂ 反应 20 min 后, 用 2 mol·L⁻¹ H₂SO₄ 终止反应, 用酶标仪在 490 nm 下检测每个样品的 OD 值。

1.8 统计分析

用 student test 进行分析。

2 结果与分析

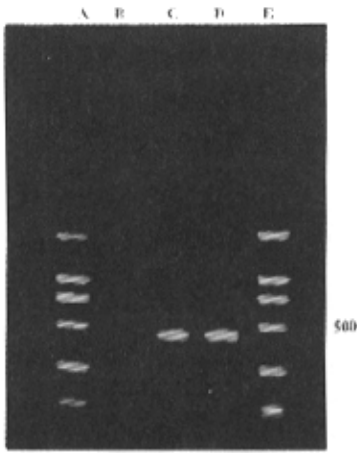
2.1 真核表达载体的构建

琼脂糖凝胶电泳(图 1)分析扩增了 456 bp 的 CP15/60 基因,与预期的片段相一致。图 2 显示构建的 pcDNA3-15/60 经 *Hind* III 酶切后, B、C、D 道质

粒产生 5.6 kb 和 270 bp 的 2 个预期带,因为在 CP15/60 基因的 172 位有一个 *Hind* III 位点,表明 CP15/60 是正向插入载体,所以获得了重组真核表达载体 pcDNA3-15/60。

2.2 原核表达载体的构建及表达

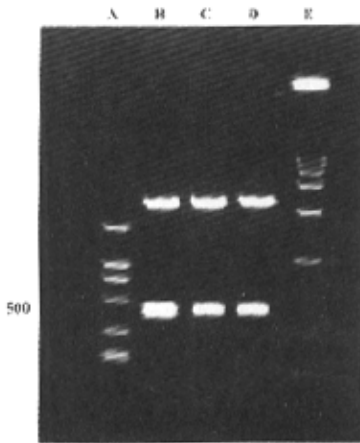
载体构建后,经 *Hind* III 酶切鉴定得到 284 bp 片段的 B、C 号质粒为阳性。含 pET-28a-15/60 的 *E. coli* BL21(DE3)经 IPTG 诱导后用 15% SDS-PAGE 检测其重组蛋白表达,电泳显示在分子量约 16 kD 处表达了 1 条蛋白带,这条带在对照菌中没有出现(图 3)。薄层扫描显示这一新出现的蛋白占菌体总蛋白的 42%左右。经免疫印迹分析,表达的 CP15/60 重组蛋白与特异的抗 *C. parvum* 多克隆抗体在约 16kD 处有清晰的染色带,证明该克隆表达的重组蛋白为 CP15/60 融合蛋白,结果见图 4。



A,E. DL2000 marker; B. 阴性对照; C,D. PCR 扩增产物
A,E. DL2000 marker; B. negative control; C,D. PCR products

图 1 CP15/60 基因 PCR 扩增产物电泳结果

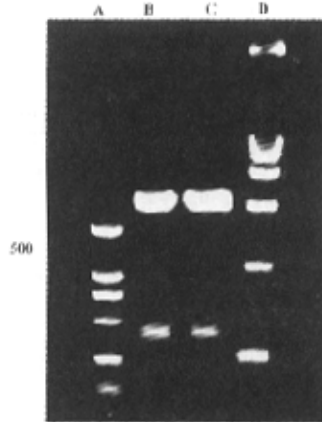
Fig.1 PCR amplification of CP15/60 gene from *Cryptosporidium parvum*



A. DL2000 DNA marker; B,C,D. pcDNA3-15/60 经 *Hind* III 酶切结果;
E. DL15000 DNA marker
A. DL2000 marker; B,C,D. recombinant plasmid digested by *Hind* III; E.
DL15000 marker

图 2 重组真核表达载体 pcDNA3-15/60 酶切鉴定图谱

Fig.2 Identification of recombinant plasmid digested by restriction endonucleases



A. DL2000 DNA marker; B,C. 质粒 pET-28a-15/60 经 *Bgl* II 和 *Hind* III 酶切; D. DL15000 DNA Marker

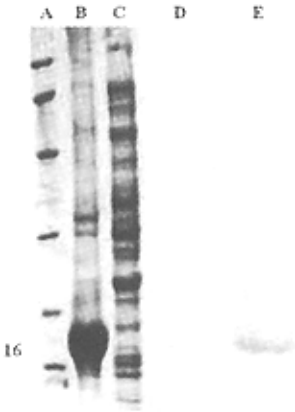
A. DL2000 marker; B,C. recombinant plasmid digested by *Bgl* II and *Hind* III; D. DL15000 marker

图 3 重组质粒 pET28a-15/60 的酶切鉴定结果

Fig.3 Restriction endonuclease digestive identification of pET-28a-15/60

2.3 母畜的血浆和初乳反应

用在大肠杆菌系统表达的重组融合蛋白,通过 ELISA 方法对血浆和初乳中 IgG 和 IgA 变化情况进行研究。pCR3.1-15/60 免疫后明显提高了与 CP15/60 融合蛋白反应,因为母羊经过第 1 次、第 2 次强化免疫后,抗体滴度明显升高(表)。说明 pCR3.1-15/60 能同时激起系统免疫和粘膜免疫。



A. marker; B. BL21(DE3)(pET-28a-15/60); C. BL21(DE3)[pET-28a(+)]; D. BL21(DE3)[pET-28a(+)]; E. BL21(DE3)(pET-28a-15/60)

图 4 表达产物 SDS-PAGE 和 Western blotting 结果

Fig.4 SDS-PAGE and Western blotting analysis of CP15/60 recombinant protein expressed in bacteria

表 山羊特异性抗体滴度变化情况

Table Comparison of IgG and IgA titers in serum and colostrum between experiment and control groups

分组 Groups		免疫前 Before immunization	首免 The first immunization	二免 The second immunization	三免 The third immunization	初乳 Colostrum
试验组 Experiment	IgG	0.18 ± 0.06	0.21 ± 0.05	0.50 ± 0.06	0.72 ± 0.05	0.84 ± 0.05
	IgA	0.05 ± 0.02	0.19 ± 0.04	0.38 ± 0.05	0.68 ± 0.10	0.82 ± 0.07
对照组 Control	IgG	0.17 ± 0.03	0.16 ± 0.03	0.17 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.33 ± 0.02
	IgA	0.07 ± 0.02	0.10 ± 0.04	0.07 ± 0.02	0.08 ± 0.01	0.34 ± 0.03

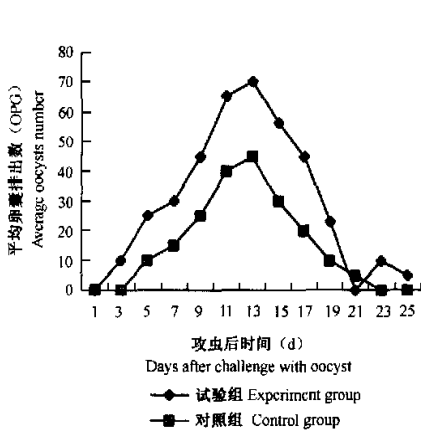


图 5 *C. parvum* 卵囊感染羔羊后卵囊排出情况

Fig.5 Shedding results of oocysts after challenge with *C. parvum* oocysts

两组羊腹泻持续时间也进行检测见图 6。对照组比试验组水性腹泻发生更多。试验组羔羊有 1 个没有发生腹泻,其它几只也只有短暂的腹泻,持续 1

2.4 保护性试验

为了评定疫苗的功效,在出生后 24 h 用 1×10^6 个卵囊感染 试验组和对照组的后代,连续 4 周检测羔羊主要临床症状如腹泻的持续期、排出卵囊强度和持续期以及体重。

两组羔羊在感染后 4~5 d 开始排卵囊,12~15 d 达到高峰。试验组山羊的后代(共 4 只)和对照组后代(3 只)攻虫后主要区别是卵囊排出情况不同(图 5)。与对照组相比,试验组山羊的后代每天排出卵囊数量明显减少,排卵持续时间较短(试验组 15.5 ± 1.29 d,对照组 19.4 ± 2 d)。试验组的后代排卵持续时间平均为 4~7 d,而对照组后代为 7~12 d。对照组羔羊在攻虫后 5~8 d 平均卵囊数开始增加,一直持续到 15 d,而试验组羔羊在攻虫后 4~5 d 平均卵囊数稍微有所增加,9 d 排卵停止。在 8 d 时,对照组后代排出卵囊数量最多,平均每只羊排出的卵囊数为试验组后代的 13 倍。

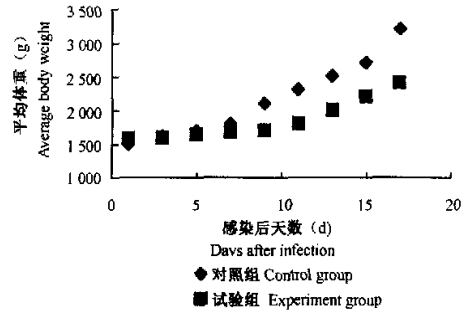


图 6 羔羊平均体重变化情况

Fig.6 Dynamic of body weight after infected between experiment and control groups

~3 d,平均 1.5 ± 1.29 d。对照组羔羊腹泻持续时间长,达 5~7 d,平均 6 ± 1 d。

隐孢子虫病通常导致幼畜食欲减退,增重缓慢。因此,攻虫后 3 周内每天称重,检测卵囊排出前、中、后期羔羊的生长情况(图 6)。在 3~5 d 间,两组羔羊平均体重相似,这表明感染早期寄生虫对宿主的

影响较小。不过,从 5 d 起,试验组增重较快,对照组羔羊生长较慢,这可能与其腹泻持续时间长,排出卵囊多有关。这些结果清楚表明试验组羔羊从母体获得了免疫保护,而对照组羔羊则没有获得保护。

3 讨论

本研究用针对 *C. parvum* 孢子表面蛋白 CP15/60 的基因构建了真核表达载体,并经鼻粘膜免疫怀孕山羊,对试验组和对照组的免疫指标和保护情况进行了检测,结果产生了系统和粘膜免疫应答,说明经鼻免疫可有效诱导系统和粘膜免疫,证实了共同粘膜免疫系统的存在,同时说明鼻粘膜是一个敏感有效、简便安全的免疫途径。由于鼻粘膜相关淋巴组织中地址素和粘附分子的表达同时具有粘膜淋巴组织和外周淋巴结的特性,使滴鼻免疫后效应细胞有效的归巢到不同粘膜部位和外周免疫部位,从而同时诱导明显的粘膜和系统免疫反应。动物保护实验表明实验组受到了一定的保护,实验组羔羊卵囊的排出数量和排出周期都缩短。

CP15/60 蛋白是隐孢子虫孢子表面蛋白,具有高度的免疫原性和反应原性,被认为是一种很有前途的疫苗候选抗原。笔者研究证实 CP15/60 表面蛋白具有很好的免疫原性。*C. parvum* 的 CP15/60 表面蛋白是肠道免疫反应的主要目标抗原^[4,5]。因此本研究用对 *C. parvum* 敏感的幼畜进行试验,以此来评定 DNA 鼻腔接种的功效。当前研究表明 DNA 免疫可使新生幼畜抵抗 *C. parvum* 感染,这免疫模式得到一致认可。许多研究也说明牛或羊高免初乳能够使鼠、犊牛、羔羊和人对 *C. parvum* 感染产生保护。这就证实了高免初乳中含有保护性抗体,是成年家畜感染 *C. parvum* 之前体内所不存在的。

疫苗减少卵囊排出和腹泻发生的机制仍不清楚。初乳中抗 CP15/60 抗体可能是循环时流经鼻粘膜的淋巴细胞产生的,或者是在别处合成,然后转移到乳腺。也可能是在鼻腔免疫后, DNA 转染细胞随血流迁移时接触乳腺中的抗体分泌细胞产生。肌肉免疫后,固定的肌细胞和循环中的树状细胞可能成为 DNA 转染细胞。鼻粘膜组织中的树状细胞是抗原提呈细胞^[1]。

笔者研究表明这种疫苗能诱导母畜产生免疫力,并将保护性免疫力传给后代。经鼻腔免疫接种以前仅用于啮齿动物,现在看来这种方法也适用于大动物。对于大家畜的其它病原体也可用这种方法

来免疫。笔者研究中抗 *C. parvum* 感染的保护水平和以前用冻干卵囊免疫新生幼畜的结果相似。不过,以前的研究是用一周龄犊牛进行感染试验,年龄是影响感染的重要因素,因为一周龄的动物与刚出生的动物相比,它们的非特异性和特异性防御机制已趋成熟,对病原体具有较强的抵抗力。所以,获得的保护不能单独归功于疫苗的功效。在笔者研究中,幼畜是在出生 24 h 前进行感染试验,获得的保护就可能与母畜的免疫有关^[6-8]。

幼畜被认为是造成环境污染和人类水源性爆发疾病的传染源。该疫苗能使感染 *C. parvum* 的幼畜少发生腹泻和排出少量卵囊,这不仅能减少由于隐孢子虫病对家畜造成的直接经济损失,而且还可以减少环境污染,对公共卫生具有重要意义。

References

- [1] 王世若,王兴龙,韩文瑜. 现代动物免疫学. 长春:吉林科学出版社,2001.
Wang S R, Wang X L, Han W Y. *Modern Animal Immunology*. Changchun: Jilin Science and Technology Press, 2001. (in Chinese)
- [2] 蒋金书. 动物原虫病学. 北京:中国农业大学出版社,2000:245-257.
Jiang J S. *Protozoology of Animal*. Beijing: China Agricultural University Press, 2000: 245-257. (in Chinese)
- [3] Serge S, Dominique B G, Sophie I. Protection of kids against infection after immunization of dams with CP15-DNA. *Vaccine*, 1999; 2: 346-355.
- [4] 尹继刚,李德昌,张西臣,阎中堂. 小球隐孢子虫诱导的小鼠肠粘膜免疫应答. 中国兽医学报, 1998, 18(3): 254-256.
Yin J G, Li D C, Zhang X C, Yan Z T. Mucosal immune responses in small intestine of Balb/c mice induced by *Cryptosporidium parvum*. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 1998, 18(3): 254-256. (in Chinese)
- [5] Jenkins M C. Cloning and expression of a cDNA encoding epitopes shared by 15 and 60 kDa proteins of *Cryptosporidium parvum* sporozoites. *Infectivity Immunology*, 1993, 61: 2377-2382.
- [6] Sagodira S, Iochmann S, Mevelec M N, Dimier-Poisson I, Bont D. Nasal immunization of mice with *Cryptosporidium parvum* DNA induces systemic and intestinal immune responses. *Parasitol Immunology*, 1997, 35: 217-238.
- [7] Perryman L E, Kapil S J, Jones M L, Hunt E L. Protection of calves against cryptosporidiosis with immune bovine colostrum induced by a *Cryptosporidium parvum* recombinant protein. *Vaccine*, 1999, 17: 2149.
- [8] Hill B D, Blweet A M, Dawson S W. Analysis of the kinetics isotype and specificity of serum and copro antibody in lambs infected with *Cryptosporidium*. *Research of Veterinary Science*, 1990, 48: 76-81.