

## 表达猪带绦虫六钩蚴 TSOL18 抗原的重组活载体疫苗株的构建

丁军涛<sup>1,2</sup>, 陈晓宇<sup>1,3</sup>, 骆学农<sup>1</sup>, 王颖<sup>1</sup>, 张少华<sup>1</sup>, 刘斌<sup>1,3</sup>, 郑亚东<sup>1</sup>, 景志忠<sup>1</sup>, 才学鹏<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>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;

<sup>2</sup>中国农业科学院研究生院, 北京 100081; <sup>3</sup>甘肃农业大学, 兰州 730070)

**摘要:** 【目的】构建表达猪带绦虫六钩蚴 TSOL18 抗原的重组鼠伤寒沙门氏菌活载体疫苗株。【方法】克隆并改造 TSOL18 基因, 构建重组质粒 pYA3341-TSOL18, 电转入鼠伤寒沙门氏菌终宿主菌株 X4550, 体外鉴定重组菌 X4550 (pYA3341-TSOL18) 表达蛋白的免疫原性、稳定性、生长曲线、安全性和小鼠免疫试验进行评价。【结果】酶切鉴定和基因序列测定证实重组质粒构建成功; 尿素-SDS-PAGE 检测有目的蛋白条带, Western Blot 证实该抗原具有免疫原性; 重组菌株在体外营养选择压力下可稳定地携带重组质粒传代繁殖; 蛋白的表达对重组菌株的生长基本没有影响; 小鼠实验证实重组菌安全可靠, 二免后 ELISA 检测产生抗体。【结论】成功构建了能稳定表达 TSOL18 蛋白的可口服减毒鼠伤寒沙门氏菌疫苗株 X4550 (pYA3341-TSOL18)。

**关键词:** 猪带绦虫六钩蚴; TSOL18; 减毒鼠伤寒沙门氏菌; 活载体疫苗

## Construction of the Recombinant Live Vector Vaccine Strain Expressing *Taenia solium oncosphere* 18 Antigen

DING Jun-tao<sup>1,2</sup>, CHEN Xiao-yu<sup>1,3</sup>, LUO Xue-nong<sup>1</sup>, WANG Ying<sup>1</sup>, ZHANG Shao-hua<sup>1</sup>, LIU Bin<sup>1,3</sup>, ZHENG Ya-dong<sup>1</sup>, JING Zhi-zhong<sup>1</sup>, CAI Xue-peng<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Key Laboratory of Animal Parasitology of Gansu Province / State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology / Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046; <sup>2</sup>Graduate School of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081; <sup>3</sup>Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070)

**Abstract:** 【Objective】 To construct a recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* live vector strain expressing the antigen of *Taenia solium oncosphere* 18. 【Method】 The *Taenia solium oncosphere* 18 gene was cloned and reconstructed into expression vector pYA3341. The recombinant plasmid pYA3341-TSOL18 was finally electro-transformed into an attenuated *S.typhimurium* definitive host strain of X4500 and the recombinant strain of X4500 (pYA3341-TSOL18) was identified its immunogenicity of expression protein, stability, growth curve, safety *in vitro* and immunity evaluation by animal experiment in mouse. 【Result】 With restriction enzyme digestion and gene sequencing, it was showed that the recombinant plasmid has been constructed successfully. Urea-SDS-PAGE and Western blot were used to detect the new protein band and its antigenic property in *S.typhimurium* X4500 (pYA3341-TSOL18). The recombinant strain could stably propagate at noruishment selection pressure *in vitro* and its growth wasn't influenced by the expression protein on the whole and its safety and reliability were verified by mouse experiment. The destined antibody was detected by ELLISA. 【Conclusion】 Successfully constructed A recombinant attenuated *S.typhimurium* strain X4500 (pYA3341-TSOL18) was succefully constructed, an oral administration live vaccine which can express TSOL18 protein stably.

**Key words:** *Taenia solium oncosphere*; TSOL18; Attenuated *S. typhimurium*; Live vector vaccine

收稿日期: 2007-11-27; 接受日期: 2008-03-17

基金项目: 国家高科技研究发展计划“863”项目(2006AA10A207); 甘肃省重大科技专项(2GS063-A43-013)

作者简介: 丁军涛(1975—), 男, 山东威海人, 博士, 研究方向为寄生虫分子生物学与免疫学。Tel: 0931-8342716; E-mail: dingjuntao2004@126.com。通讯作者才学鹏(1958—), 黑龙江鸡西人, 研究员, 研究方向为寄生虫分子生物学与免疫学。E-mail: caixp@public.lz.gs.cn



## 0 引言

【研究意义】猪带绦虫病 (*Taeniasis solium*) 是一种世界性分布的人畜共患病, 该病不仅对畜牧业造成经济损失, 严重影响肉品的质量, 更重要的是严重危害人类的健康, 猪带绦虫病已引起了世界各国政府的普遍关注和高度重视, 如何有效地控制和消灭猪囊虫病 (*Cysticercosis cellulosae*) 是关注的焦点。目前关于囊虫病的防治还没有成熟的手段, 几种化学药物 (如苯硫咪唑、吡喹酮) 对人囊虫病的治疗曾起过重要作用, 但随着人们长期反复的使用, 药物治疗引起的副作用和食品中药物残留对人体可能造成的危害已显示出单独药物治疗的局限性。【前人研究进展】分子生物学和免疫学的迅速发展, 各种新技术的出现和应用极大地推动了新型疫苗的研究。鼠伤寒沙门氏菌是侵袭性的肠道杆菌, 是一种胞内病原, 经消化道进入机体。沙门氏菌可通过 PPs 上 M 细胞穿过小肠粘膜, 感染在肠壁细胞下层的专业的抗原递呈细胞 (APC), 从而诱导产生特异的细胞、体液和粘膜免疫应答。重组减毒细胞内细菌可作为载体将表达的蛋白抗原通过口服直接导入动物体内, 并且这些革兰氏阴性菌的脂质类物质、细菌 DNA 的未甲基化的基序 (*motif*) 和细菌 CpG 序列等还可以发挥免疫佐剂的作用, 大大增强疫苗的免疫原性, 能激发产生强大的体液和细胞免疫反应<sup>[1-2]</sup>。活载体疫苗已成为疫苗研究的一大热点, 以减毒鼠伤寒沙门氏菌作为活疫苗载体来表达递呈细菌、病毒和寄生虫等抗原在不同的动物模型上已得到实验证明能产生有效的免疫应答。Pasetti<sup>[3]</sup>等成功地用减毒鼠伤寒沙门氏菌缺失株 CVD915 携带编码破伤风毒素 C 片段的质粒 pTETnrl 5 通过鼻内接种, 发现小鼠体内产生了针对 C 片段的高滴度的 IgG1、IgG2a 和 IgG2b 抗体; Doggett<sup>[4]</sup>等将引起龋齿病的索布瑞链球菌 I/II 型抗原表面蛋白抗原 (SpaA) 基因克隆入减毒鼠伤寒沙门氏菌 X4072 中, 然后用这种细菌口服免疫小鼠, 发现小鼠血清中抗 SpaA IgG 的滴度很高, 而肠道中抗 SpaA IgG 的滴度也能检测出来, 说明减毒鼠伤寒沙门氏菌有作为预防龋齿疫苗载体的可能性; 利用减毒沙门氏菌载体表达乙肝病毒核衣壳前-s-颗粒 (HBcAg-pre-S)<sup>[5]</sup>、人类免疫缺陷性病毒表位、人类 16 型乳头瘤病毒样颗粒 (HPV 16VLPs)<sup>[6]</sup>等病毒性抗原, 也显示出较好的免疫效果; Khan<sup>[7]</sup>等将曼氏血吸虫 (*Schistosoma mansoni*, S.m) Sm28GST 基因克隆入表达载体 pTECH1, 构建 rSt-Sm28GST 疫苗并

免疫 Balb/c 鼠, 免疫后 3 周可诱导特异性抗体; Gottstein<sup>[8]</sup> 等将多房棘球绦虫 (*Echinococcus multilocularis*, E.m) 的 Em II/3-10 基因导入 S.t 减毒株 LT2MIC, 构建 rSt-Em II/3-10 疫苗, 将其采用皮下注射和口服分别免疫 C57BL/6 鼠, 发现免疫鼠脾细胞明显增殖, 抗 Em II/3-10 抗体显著升高; 在人类疾病防控中已有成功的应用 (如 *S.typhi* *Ty21a*, 已被证明能保护人类抵抗伤寒病<sup>[9]</sup>)。【本研究切入点】沙门氏菌活载体疫苗在兽医领域的应用发展也十分迅速<sup>[10-13]</sup>, 但其作为载体传递猪带绦虫六钩蚴抗原的研究尚未见报道。TSOL18 (*Taenia solium oncosphere 18*) 是具有保护性的猪带绦虫六钩蚴抗原基因, 已有的研究证明 TSOL18 抗原对宿主具有很好的保护性<sup>[14-17]</sup>。【拟解决的关键问题】本试验通过构建含 TSOL18 基因的重组表达质粒 pYA3341-TSOL18, 并转化减毒鼠伤寒沙门氏菌 X4550, 构建表达猪带绦虫六钩蚴 TSOL18 抗原的减毒鼠伤寒沙门氏菌疫苗株, 为猪囊尾蚴病口服疫苗的研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种和质粒

含有 pGEX-TSOL18 重组质粒的 BL21 菌株由家畜疫病病原生物学国家重点实验室保存; *E.coli* X6212 ( $\Delta$ asd)、*Salmonella typhimurium* X3730 ( $\Delta$ asd, Tc<sup>s</sup>, Str<sup>r</sup>,  $\Delta$ Gal)、X4550 ( $\Delta$ asd,  $\Delta$ crp, Nal<sup>r</sup>,  $\Delta$ cya) 和沙门氏菌表达载体 pYA3341 (asd<sup>+</sup>表达载体, asd<sup>-</sup>/asd<sup>+</sup>) 由广东农科院兽医研究所惠赠 (以下简称 X6212, X3730, X4550)。

### 1.2 主要试剂和耗材

*EcoR* I、*Sal* I 等限制性内切酶、T4 DNA Ligase、DNA Marker DL2000 购自 TaKaRa 公司; *Taq* 酶、dNTP、Protein Molecular Weight Marker 购自 Fermentas 公司; Plasmid Extraction Kit、Agarose Gel DNA Extraction Kit 购自北京博大泰克生物基因技术有限公司; X6212、X3730、X4550 菌培养所需的二胺基庚二酸 (DAP)、萘啶酮酸 (NA) 购自 Sigma 公司; 兔抗 TSOL18 免疫血清由家畜疫病病原生物学国家重点实验室制备保存, 羊抗兔 IgG 血清购自北京拜尔迪生物技术有限公司; Balb/c 试验鼠购自兰州生物制品研究所; 其它试剂均为分析纯, 购自上海生工生物工程技术服务公司。

### 1.3 TSOL18 目的基因的制备

设计上下游引物 P1、P2, 上游引物 P1 含有 *EcoR*

I 酶切位点, 下游引物 P2 含有 *Sal* I 酶切位点, 通过设计的引物 PCR 扩增截去 TSOL18 N 端的 16 氨基酸信号肽编码序列, 利用 Graphical Codon Usage Analyser 2.0 分析 TSOL18 基因中在大肠杆菌表达中属于稀有密码子的氨基酸, 定点突变了 P1、P2 引物中的 4 个大肠杆菌稀有密码子, 但不改变其氨基酸序列。

P1: 5'-ccggaattcgagcagcgtgaccgtacattcgg-3'

*EcoR* I

P2: 5'-acgcgtcgacctacgaacggcgaccttctgt-3'

*Sal* I

以 pGEX-TSOL18 为模板进行 PCR 扩增, 扩增体系 50  $\mu$ l, 内含模板 1  $\mu$ l、引物 (20  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>) 各 0.5  $\mu$ l、Taq 酶 1  $\mu$ l、dNTP (2.5 mmol·L<sup>-1</sup>) 4  $\mu$ l、MgCl<sub>2</sub> (25 mmol·L<sup>-1</sup>) 4  $\mu$ l。扩增条件: 95 °C 预变性, 5 min; 94 °C, 50 s, 56 °C, 40 s, 72 °C, 1 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像仪下观察结果。

#### 1.4 pYA3341-TSOL18 重组质粒的构建和筛选

将琼脂糖凝胶回收的 PCR 产物和质粒载体 pYA3341 分别用 *EcoR* I、*Sal* I 双酶切 4 h 后, 胶回收约 350 bp 的 PCR 产物和 2.7 kb 的质粒载体酶切片断, 进行连接, 连接体系: 目的片段, 6  $\mu$ l; 质粒载体, 2  $\mu$ l; T4 DNA Ligase, 1  $\mu$ l; T4 DNA Ligase Buffer, 1  $\mu$ l (目的片段和质粒载体摩尔比为 5 : 1); 16 °C 连接 16 h。挑取 LB 琼脂平板 (含 50  $\mu$ g·ml<sup>-1</sup> DAP 和 20  $\mu$ g·ml<sup>-1</sup> NA) 上 X6212 单菌落, 在含 DAP 的 LB 液中振荡培养过夜, 制备电转感受态 X6212。将连接产物电转化 X6212, 电转化条件: 电压 2 500 V, 25  $\mu$ F 电容, 200  $\Omega$  电阻, 2 mm 电转杯, 放电时间 3~5 ms, 涂 LB (含 20  $\mu$ g·ml<sup>-1</sup> NA) 琼脂平板, 37 °C 培养 18~24 h。随机挑取转化平板 4 个单菌落振荡过夜, 抽提质粒后用 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切鉴定, 并将酶切鉴定正确的菌落送 TaKaRa 公司测序鉴定。

#### 1.5 重组质粒转化终宿主减毒鼠伤寒沙门氏菌 X4550

从大肠杆菌 X6212 (pYA3341-TSOL18) 中抽提质粒, CaCl<sub>2</sub> 法转化沙门氏菌中间宿主 X3730, 使重组质粒获得鼠伤寒沙门氏菌的甲基化模式, 再从 X3730 菌中分离重组质粒, 电转入 (条件同上) 终宿主疫苗株 X4550, 得到重组菌 X4550 (pYA3341-TSOL18)。同法构建空质粒菌 X4550 (pYA3341)。

#### 1.6 TSOL18 基因的表达及 Westren blotting 分析

重组菌 X4550 (pYA3341-TSOL18) 和空质粒菌 X4550 (pYA3341) 经 IPTG (终浓度 1 mmol·L<sup>-1</sup>) 诱导 6 h 后, 离心收集菌体, 加 8 mol·L<sup>-1</sup> 尿素溶液溶解作用半小时, 加 2 倍的尿素胶上样 Buffer, 煮沸 5 min, 进行尿素-SDS-PAGE。将上述尿素-SDS-PAGE 凝胶电转移至硝酸纤维素膜, 蛋白 Marker 置氨基黑染色液中浸染 3~5 min, 取出后用漂洗液脱色, 直至背景蓝色脱尽; 其余 NC 膜用 PBST 漂洗 3 次后, 用 2 % 牛血清白蛋白 37 °C 封闭 1 h 后漂洗 3 次, 加入兔抗 TSOL18 免疫血清 4 °C 过夜, 漂洗 3 次后加羊抗兔 IgG 37 °C 结合 1 h, PBST 漂洗 3 次, 将 NC 膜转移至底物溶液中, 室温避光轻摇 3 min 观察显色情况, 待出现条带时立即转入 PBST 缓冲液中室温保存。

#### 1.7 重组菌 X4550 (pYA3341/TSOL18) 的体外稳定性

重组菌株的稳定性实验参照 Meacock 的方法进行。将 37 °C 振荡培养过夜的菌体按 10% 接种于含 DAP 的 LB 培养基中, 继续培养 12 h, 将上述培养物再按 10% 量接种于含 DAP 的 LB 液体中培养 12 h, 如此连续培养 4 代至 50 h, 相当于菌体传代 100 代。将培养物稀释 10<sup>6</sup> 倍, 取 100  $\mu$ l 稀释液涂含 DAP 的 LB 琼脂平板, 过夜培养后, 随机挑选 100 个单菌落, 转种在 DAP 的 LB 琼脂平板上, 如果质粒丢失, 细菌不会在 DAP 的 LB 琼脂平板上生长, 以此测定重组质粒的稳定性。随机挑取 20 个菌落进行抗原的表达, 以确定外源基因在鼠伤寒沙门氏菌宿主表达的稳定性。

#### 1.8 重组菌生长曲线的测定

挑取单克隆 X4550 (pYA3341-TSOL18) 和 X4550 (pYA3341) 分别接种于 LB 液体培养基中, 37 °C 振荡培养 10 h 后, 取 50  $\mu$ l 接种于 5 ml LB 液体培养基中, 37 °C 振荡培养, 每隔 1 h 测定 OD<sub>600</sub> 值, 绘制两种菌的生长曲线。

#### 1.9 重组菌的安全性及小鼠免疫实验

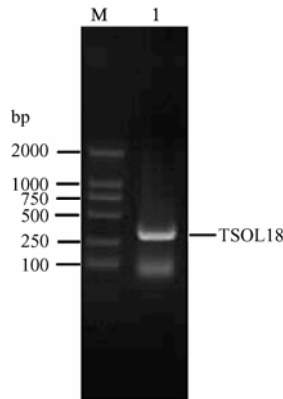
重组菌的安全性, 通过昆明系小鼠口服测定半数致死量来确定。

小鼠免疫试验, 18~20g Balb/c 小鼠 30 只随机分成 3 组, 分别为 X4550 (pYA3341-TSOL18) 免疫组、X4550 (pYA3341) 免疫组和非免疫对照组, 各免疫两次, 两次免疫间隔 2 周, 1.9~2.5 $\times$ 10<sup>9</sup> 菌体/次, 一、二次免疫前及二免后 2 周、4 周断尾采血, 用 ELISA 法测定抗体水平。

## 2 结果与分析

### 2.1 TSOL18 目的基因的制备

1.0%琼脂糖凝胶电泳显示目的条带与预期的大小吻合，约为 350 bp (图 1)。



M: DNA marker DL2000; 1: TSOL18 PCR product

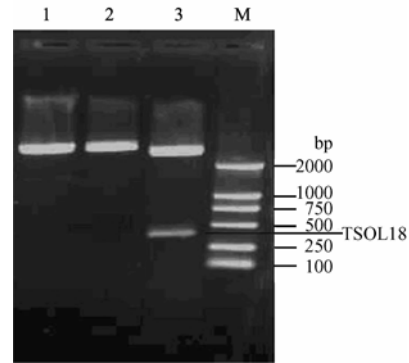
图 1 TSOL18 目的基因的凝胶电泳

Fig. 1 Gel electrophoresis of TSOL18 gene

2.2 pYA3341/TSOL18 重组质粒的构建和鉴定

随机挑取 LB 平板 (含 20 μg·ml<sup>-1</sup> NA) 上 4 个菌落摇菌培养后提取质粒，分别经 *EcoR* I、*Sal* I 单酶切和 *EcoR* I/*Sal* I 双酶切后，1.0%琼脂糖凝胶电泳双

酶切重组质粒得到约 350 bp 和 2.7 kb 两条带 (图 2)，与预期相符，质粒的测序结果与原始序列的核苷酸同源率为 97% (图 3)。除通过引物设计突变 4 个碱基外 (加粗碱基为设计的突变碱基)，另在 156 位碱基由 t 突变为 c，177 位碱基由 a 突变为 c，210 位由 a 突变为 g，但氨基酸没有改变。



1: pYA3341-TSOL18/*Sal* I ; 2: pYA3341-TSOL18/*EcoR* I ; 3: pYA3341-TSOL18/*Sal* I +*EcoR* I ; M: DNA marker DL2000

图 2 重组质粒 pYA3341-TSOL18 的酶切鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid pYA3341-TSOL18 by enzyme digestion

Query	49	AGCGGTGACCGAACATTCGGCGACGATATTTTCGTGCCATACCTTCGCTGCTTCGCCCTT	108
Sbjct	386	AGCGGTGACCGTACATTCGGCGACGATATTTTCGTGCCATACCTTCGCTGCTTCGCCCTT	327
Query	109	AGCGCTACCGAAATGGGGTGTTTTGGGATGCTGGAGAGATGGTTGCCATGGCGTAGAG	168
Sbjct	326	AGCGCTACCGAAATGGGGTGTTTTGGGATGCTGGAGAGATGGTTGCCATGGCGTAGAG	267
Query	169	GAGATCAAAGTGAAAGTAGAAAAAGCAATACACCCATACAAGATCTGGAATGCAACAGTC	228
Sbjct	266	GAGATCAAAGTGAAAGTAGAAAAAGCAATACACCCACACAAGATCTGGAATGCAACCGTC	207
Query	229	AGCGCGAACAAATGGAAGTCAATCATCAGAGACTTGAAGCGAAGACAATTTACAGAGTG	288
Sbjct	206	AGCGCGAACAAATGGAAGTCAATCATCAGGACTTGAAGCGAAGACAATTTACAGAGTG	147
Query	289	GACGTAGACGGTTATCGAAACGAAATCATGGTGTGGTTTCGACGCTTCGCGACAACA	348
Sbjct	146	GACGTAGACGGTTATCGAAACGAAATCATGGTGTGGTTTCGACGCTTCGCGACAACA	87
Query	349	CTTCGAAAAAGCAGATCAAGCACAGAAGGTCGAAGATCGTAG	393
Sbjct	86	CTTCGAAAAAGCAGATCAAGCACAGAAGGTCGCGCTTCGTAG	42

图 3 TSOL18 基因测序结果和原始序列比对

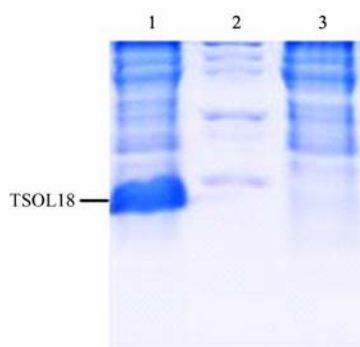
Fig. 3 The blasting result of TSOL18 sequencing and primitive sequence

2.3 TSOL18 基因的表达及 Westren blotting 分析

尿素-SDS-PAGE 电泳显示 TSOL18 在 *S.typhimurium* X4550 中有较高水平的表达，有目的蛋白条带出现，

分子质量约为 12.7 kD，与预期的蛋白分子量一致 (图 4)。

Western blot 结果显示，在 12.7 kD 处位置上有相

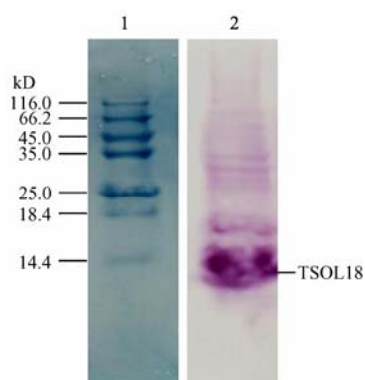


1: X4550 (pYA3341-TsOL18); 2: Marker; 3: X4550 (pYA3341)

图 4 X4550 (pYA3341-TSOL18) 和 X4550 (pYA3341) 尿素-SDS-PAGE 分析

Fig. 4 X4550 (pYA3341-TSOL18) and X4550 (pYA3341) Urea-SDS-PAGE analysis

应的显色条带(图 5)。初步说明 *S.typhimurium* X4550 (pYA3341-TSOL18) 中表达的 TSOL18 抗原蛋白具有抗原性, 能与抗 TSOL18 的多抗反应。



1: Marker; 2: X4550 (pYA3341-TsOL18)

图 5 X4550 (pYA3341-TSOL18) Western blot 分析

Fig. 5 X4550 (pYA3341-TSOL18) Western blot analysis

## 2.4 重组菌 X4550 (pYA3341/TSOL18) 的体外稳定性

重组菌 X4550 (pYA3341-TSOL18) 在没有选择压力的情况下培养约 100 代, 随机挑选 100 个菌落转移至 DAP 平板, 100 个菌落全部都能生长。对随机挑取的 20 个单克隆进行诱导表达, 均有目的抗原表达, 表明重组质粒 pYA3341-TSOL18 能在减毒宿主菌 X4550 中至少稳定传代 100 代。

## 2.5 重组菌生长曲线的测定

从图 6 可以看出 X4550 (pYA3341) 和 X4550 (pYA3341-TSOL18) 两种菌的生长状态基本一致, 即表示在减毒沙门氏菌中转入重组质粒, 基本不影响该菌的生长。

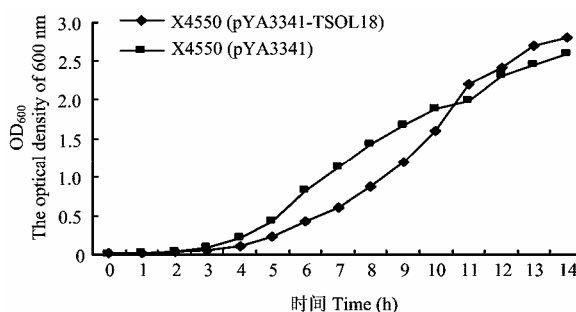


图 6 X4550 (pYA3341) 和 X4550 (pYA3341-TSOL18) 的生长曲线

Fig. 6 The growing curve of X4550 (pYA3341) and X4550 (pYA3341-TSOL18)

## 2.6 重组菌的安全性试验

Balb/c 小鼠口服重组菌株的安全性试验结果见表 2。口服重组菌株 X4550 (pYA3341-TSOL18)。

$2.0 \times 10^{12}$  cfu 30 d 后, 存活率仍为 100%, 而据已有研究报道 C57BL/6 小鼠口服野生株 X3181  $1 \times 10^7$  cfu 后, 在 5 d 内全部死亡<sup>[18]</sup>, 这也证明重组菌株是安全的。

表 1 X4550 (pYA3341) 和 X4550 (pYA3341-TSOL18) 培养不同时间的 OD<sub>600</sub> 值

Table 1 The OD<sub>600</sub> of X4550 (pYA3341) and X4550 (pYA3341-TSOL18) in different culture times

菌株 Strains	时间 Time (h)														
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
X4550 (pYA3341-TSOL18)	0.010	0.014	0.029	0.052	0.107	0.238	0.426	0.605	0.877	1.181	1.602	2.205	2.409	2.691	2.810
X4550 (pYA3341)	0.006	0.014	0.037	0.082	0.215	0.429	0.810	1.124	1.417	1.674	1.876	1.980	2.310	2.448	2.593

表 2 小鼠口服重组鼠伤寒沙门氏菌后的存活率

Table 2 Survival rate of mice after oral inoculation with recombinant *S.typhimurium* strains

菌株 Strains	相关基因型 Relate genotype	口服剂量(cfu) Oral dose (cfu)	观察周期 Observe time (d)	存活率 Survival rate
X4550(pYA3341-TSOL18)	$\Delta crp, \Delta cya, TSOL18^+$	$1.0 \times 10^7$	30	5/5
		$1.0 \times 10^9$	30	5/5
		$1.0 \times 10^{10}$	30	5/5
		$2.0 \times 10^{12}$	30	5/5

## 2.7 小鼠免疫试验

小鼠口服免疫后各组抗体水平结果统计分析见表 3, 图 7 显示 X4550 (pYA3341-TSOL18) 免疫组抗体

水平有明显的升高, 而 X4550 (pYA3341) 免疫对照组和非免疫对照组的抗体水平没有明显的变化, 证明 X4550 (pYA3341-TSOL18) 疫苗株能诱导动物体产

表 3 小鼠口服重组活载体疫苗后血清中抗体水平的测定

Table 3 The results of antibody level in sera after oral inoculation of mice

	OD <sub>492</sub> ( $\bar{X} \pm S$ )			
	免疫前 Preimmune	二免前 Ahead of second immune	二免后 2 周 Two weeks after second immune	二免后 4 周 Four weeks after second immune
X4550 (pYA3341-TSOL18)组 X4550 (pYA3341-TSOL18) group	0.021±0.001a	0.089±0.007a	0.277±0.008a	0.645±0.025a
X4550 (pYA3341)组 X4550 (pYA3341) group	0.021±0.002b	0.021±0.001b	0.024±0.002b	0.024±0.004b
非免疫对照组 Nonimmune control group	0.022±0.001b	0.021±0.002b	0.024±0.003b	0.023±0.004b

同列字母不同组表示差异极显著 ( $P < 0.01$ ); 字母相同组表示差异不显著 ( $P > 0.05$ )

Values with different letters in the same column means significant difference ( $P < 0.01$ ); Values with identical letters in the same column means nonsignificant difference ( $P > 0.05$ )

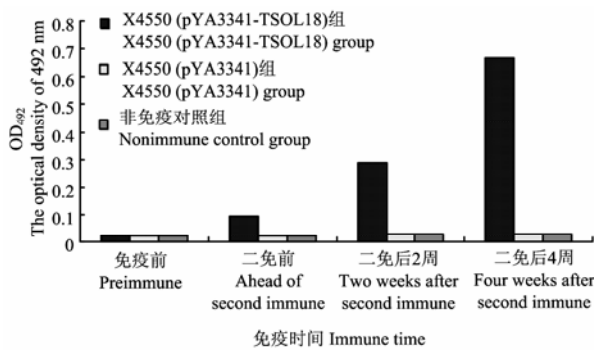


图 7 各免疫组小鼠不同时期抗体水平柱状图

Fig. 7 The column figure of mouse antibody level in different immunity classes at different times

生相应的抗体, 具有免疫效果。

## 3 讨论

3.1 猪囊尾蚴病呈全球性分布, 主要流行于亚、非、拉等一些国家和地区, 其中以中非、南非、中南美等

最为严重。在囊虫病的免疫防治中, 传统疫苗所用抗原原有全囊虫抗原、分泌代谢 (ES) 抗原、异源抗原以及六钩蚴抗原, 这些疫苗都能对绦虫病起到很好的预防作用, 但都不能在体外大量制备, 因而抗原来源非常有限。棘球蚴和羊囊虫基因工程重组抗原疫苗的问世, 为其它绦虫新型疫苗的研究提供了典范<sup>[19]</sup>, 在此基础上相继开展了抗囊尾蚴基因工程重组疫苗、核酸疫苗和多肽疫苗等的研究。TSOL18 是猪带绦虫六钩蚴阶段特异性表达抗原<sup>[20]</sup>, 主要作用于六钩蚴感染后的早期, 在不同地理分离株的猪带绦虫六钩蚴中, TSOL18 相当保守, 这也表明 TSOL18 在猪带绦虫六钩蚴的发育阶段是至关重要的<sup>[21]</sup>。六钩蚴是抗体介导为主的免疫应答作用的靶标, 用六钩蚴阶段的抗原基因研制疫苗有较好的前景。已有的研究证明无论是 TSOL18 重组抗原还是抗整体六钩蚴的免疫血清均能在体外试验中杀死六钩蚴<sup>[22]</sup>, TSOL18 抗原成为预防猪囊尾蚴病的重要的疫苗候选抗原之一。

3.2 减毒鼠伤寒沙门氏菌能靶向感染树突状细胞等专职抗原递呈细胞 (APC), 是目前较常用的口服疫

苗载体<sup>[23]</sup>, 具有安全、无副作用、易于给药且具有长时间保护作用的特点。作为工程菌能直接在肠壁表达目的抗原(使所需表达的蛋白无需在体外产生、分离、纯化和鉴定), 而且表达的蛋白可直接通过肠壁微褶细胞传递给抗原提呈细胞, 有效避免目的蛋白的降解。六钩蚴通过肠道入侵, 而 TSOL18 是六钩蚴阶段的重要抗原分子, 可能与六钩蚴的入侵有关。通过口服重组沙门氏菌, 可以阻断六钩蚴通过小肠粘膜入侵宿主, 从而达到保护宿主的目的。根据上述设想, 本研究将猪带绦虫六钩蚴 TSOL18 的基因克隆改造并成功构建了携带 TSOL18 基因的沙门氏菌原核重组表达载体 X4550 (pYA3341/TSOL18), 并通过体外诱导表达和 Western blot 证实重组菌能表达 TSOL18 蛋白。在减毒沙门菌株的选择上, 使用 *cya*、*cry* 双基因突变的减毒株 X4550, 该株染色体上 *asd* 基因缺失 (*asd*-突变株), 而用于表达外源基因的表达质粒 pYA3341 携带 *asd* 基因。因此, 在无 DAP 时, *asd*<sup>-</sup>突变株携带表达外源基因的 *asd*<sup>+</sup>质粒可稳定存活并表达外源蛋白, 此 *asd*<sup>-</sup>突变株和 *asd*<sup>+</sup>质粒所构成的平衡致死体系能保证重组菌的稳定传代和表达。

#### 4 结 论

本试验首次成功地在猪囊尾蚴疫苗研制上利用减毒鼠伤寒沙门氏菌作为疫苗的活载体, 证实了该菌株能稳定的携带表达载体在体内外连续传代, 表达的蛋白具有免疫原性, 并能诱导机体产生相应抗体, 为猪囊尾蚴病的防治和进一步直接应用减毒鼠伤寒沙门氏菌作为活菌苗载体的研究奠定了基础。

#### References

- [1] Gentschev I, Dietrich G, Spreng S, Kolb-Mäurer A, Daniels J, Hess J, Kaufmann S H, Goebel W. Delivery of protein antigens and DNA by virulence-attenuated strains of *Salmonella typhimurium* and listeria monocytogenes. *Journal of Biotechnology*, 2000, 83(1-2): 19-26.
- [2] Darji A, Guzmán C A, Gerstel B, Wachholz P, Timmis K N, Wehland J, Chakraborty T, Weiss S. Oral somatic transgene vaccination using attenuated *S. typhimurium*. *Cell*, 1997, 91(6): 765-775.
- [3] Pasetti M F, Anderson R J, Noriega F R, Levine M M, Szein M B. Attenuated *deltaguaba* *Salmonella typhi* vaccine strain CVD 915 as a live vector utilizing prokaryotic or eukaryotic expression systems to deliver foreign antigens and elicit immune responses. *Clinical Immunology*, 1999, 92(1): 76-89.
- [4] Doggett T A, Jagusztyn-Krynicka E K, Curtiss R 3rd. Immune responses to *Streptococcus sobrinus* surface protein antigen A expressed by recombinant *Salmonella typhimurium*. *Infection and Immunity*, 1993, (5): 1859-1866.
- [5] Schodel F, Sandra M, Kelly, Darrell L, Peterson. Hybrid hepatitis B virus Core-Pre-S protein synthesized in avirulent *Salmonella typhimurium* and *Salmonella typhi* for oral vaccination. *Infection and Immunity*, 1994, 62(5): 1669-1676.
- [6] Benyacoub J, Hopkins S, Potts A, Kelly S, Kraehenbuhl J P, Curtiss R 3rd, De Grandi P, Nardelli-Haeffliger D. The nature of the attenuation of *Salmonella typhimurium* strain expressing human Papillomavirus type 16 virus-like particles determines the systemic and mucosal antibody responses in nasally immunized mice. *Infection and Immunity*, 1999, 67(7): 3674-3679.
- [7] Khan C M, Villarreal-Ramos B, Pierce R J, Demarco de Hormaeche R, McNeill H, Ali T, Chatfield S, Capron A, Dougan G, Hormaeche C E. Construction, expression, and immunogenicity of multiple tandem copies of the *Schistosoma mansoni* peptide 115-131 of the P28 glutathione S-transferase expressed as C-terminal fusions to tetanus toxin fragment C in a live aro-attenuated vaccine strain of *Salmonella*. *Journal of Immunology*, 1994, 153(12): 5634-5642.
- [8] Gottstein B, Müller N, Jr Cryz S J, Vogel M, Tanner I, Seebeck T. Humoral and cellular immune response in mice and dogs induced by a recombinant *Echinococcus multilocularis* antigen produced by a *Salmonella typhimurium* vaccine strain. *Parasite Immunology*, 1990, 12(2): 163-174.
- [9] Levine M M, Ferreccio C, Abrego P, Martin O S, Ortiz E, Cryz S. Duration of efficacy of Ty21a, attenuated *Salmonella typhi* live oral vaccine. *Vaccine*, 1999, 17(Suppl. 2): 22-27.
- [10] Holt P S, Gast R K, Kelly-Aehle S. Use of a live attenuated *Salmonella typhimurium* vaccine to protect hens against *Salmonella enteritidis* infection while undergoing molt. *Avian Diseases*, 2003, 47(3): 656-661.
- [11] Davies R, Breslin M. Effects of vaccination and other preventive methods for *Salmonella enteritidis* on commercial laying chicken farms. *The Veterinary Record*, 2003, 153(22): 673-637.
- [12] Babu U, Dalloul R A, Okamura M, Lillehoj H S, Xie H, Raybourne R B, Gaines D, Heckert R A. *Salmonella enteritidis* clearance and immune responses in chickens following *Salmonella* vaccination and challenge. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2004, 101(3-4): 251-257. -764.
- [13] Gahan M E, Webster D E, Wesselingh S L, Strugnell R A. Impact of plasmid stability on oral DNA delivery by *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Vaccine*, 2007, 25(8): 1476-1483.



- [14] Gauci C G, Flisser A, Lightowlers M W. A *Taenia solium* oncosphere protein homologous to host-protective *Taenia ovis* and *Taenia saginata* 18 kDa antigens. *International Journal for Parasitology*, 1998, 28(5): 757-760.
- [15] Flisser A, Gauci C G, Zoli A, Martinez-Ocaña J, Garza-Rodriguez A, Dominguez-Alpizar J L, Maravilla P, Rodriguez-Canul R, Avila G, Aguilar-Vega L, Kyngdon C, Geerts S, Lightowlers M W. Induction of protection against porcine cysticercosis by vaccination with recombinant oncosphere antigens. *Infection and Immunity*, 2004, 72(9): 5292-5297.
- [16] Verastegui M, Gilman R H, Gonzales A, Garcia H H, Gavidia C, Falcon N, Bernal T, Arana Y, Tsang V C. Cysticercosis working group in Peru. *Taenia solium* oncosphere antigens induce immunity in pigs against experimental cysticercosis. *Veterinary Parasitology*, 2002, 108(1): 49-62.
- [17] 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(4): 643-647.
- [18] 白 杨, 张亚历, 王继德, 张兆山, 周殿元. 表达幽门螺杆菌过氧化氢酶的无抗性减毒鼠伤寒沙门氏菌株的构建. 第一军医大学学报, 2003, 23(2): 101-105.
- Bai Y, Zhang Y L, Wang J D, Zhang Z S, Zhou D Y. Construction of the non-resistant attenuated *Salmonella typhimurium* strain expressing *Helicobacter pylori* catalase. *Journal First Military Medical University*, 2003, 23(2): 101-105. (in Chinese)
- [19] Dalton J P, Grace M. Parasite vaccines-a reality? *Veterinary Parasitology*, 2001, 98(1-3): 149-167.
- [20] Gauci C G, Verástegui M R, Gilman R H, Lightowlers M W. *Taenia solium* and *Taenia ovis*: stage-specific expression of the vaccine antigen genes, TSOL18, TSOL16, and homologues, in oncospheres. *Experimental Parasitology*, 2006, 113(4): 272-275.
- [21] Gauci C G, Ito A, Lightowlers M W. Conservation of the vaccine antigen gene, TSOL18, among genetically variant isolates of *Taenia solium*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2006, 146(1): 101-104.
- [22] Kyngdon C T, Gauci C G, Rolfe R A, Velásquez Guzmán J C, Farfán Salazar M J, Verástegui Pimentel M R, Gonzalez A E, Garcia H H, Gilman R H, Strugnell R A, Lightowlers M W. *In vitro* oncosphere killing assays to determine immunity to the larvae of *Taenia pisiformis*, *Taenia ovis*, *Taenia saginata* and *Taenia solium*. *The Journal of Parasitology*, 2006, 92(2): 273-281.
- [23] Sirard J C, Niedergang F, Kraehenbuhl J P. Live attenuated *salmonella*: a paradigm of mucosal vaccines. *Immunological Reviews*, 1999, 171: 5-26.

(责任编辑 张云霞, 林鉴非)