

日本血吸虫 22.6 kDa 重组蛋白对小鼠的免疫保护性研究*

苏川 马磊 王荣芝 胡雪梅 陈淑贞 邵莉君
吴海玮 沈蕾 张兆松 吴观陵
南京医科大学寄生虫学教研室 南京 210029

摘要 目的: 研究日本血吸虫(中国大陆株) 22.6 kDa 抗原作为血吸虫病疫苗候选分子的潜能, 并探讨 Sj22.6/Sj26 GST 融合蛋白作为复合疫苗的可能性。方法: 用亲和层析法制备 Sj22.6/Sj26 GST 融合蛋白。将这两种蛋白分别免疫 BALB/c 小鼠后进行攻击感染试验。结果: Sj22.6 重组蛋白和 Sj22.6/Sj26 GST 融合蛋白分别可诱导小鼠产生 32.1% ($P < 0.005$) 和 34.9% ($P < 0.02$) 的成虫减虫率, 28.4% ($P < 0.02$) 和 45.1% ($P < 0.005$) 的总减卵率。结论: rSj22.6 与 Sj22.6/Sj26 GST 融合蛋白均有疫苗应用价值。

关键词 日本血吸虫 22.6 kDa 抗原 融合表达 重组蛋白 免疫保护

在探索日本血吸虫 22.6 kDa 抗原(Sj22.6) 能否作为疫苗候选分子的研究中^[1-6], 将 Sj22.6 的编码基因片段亚克隆入表达载体 pGEX-1 λ T, 以基因工程方法制备了重组 Sj22.6 蛋白(rSj22.6), 但是该蛋白与质粒本身编码的日本血吸虫 26 kDa GST (Sj26 GST) 蛋白呈分离表达, 造成重组抗原表达量低且不能用 glutathione-Sepharose 4B (GS4B) 珠以亲和层析法提纯, 影响了该重组抗原的实际应用^[5]。用切下 SDS-PAGE 的含 Sj22.6 蛋白相应条带的方法, 经初步动物实验证明该抗原分子可能具有诱导小鼠产生抗血吸虫感染的免疫保护性^[5]。该编码基因测序结果显示^[6], 在基因片段的首位起始密码子 ATG 上游第 10~12 位碱基处有一终止密码子 TAA, 以致诱导表达时重组抗原与质粒本身编码的 Sj26 GST 不能融合。对此, 将该抗原编码基因的邻近序列进行改造并获得了与质粒本身编码的 Sj26 GST 融合表达的 rSj22.6, 用于大量生产纯化 rSj22.6 蛋白。在此基础上, 本研究将 rSj22.6 蛋白用于小鼠免疫/攻击感染实验, 以验证其能否诱导小鼠产生抗血吸虫尾蚴感染的免疫保护力; 同时, 将 Sj22.6/Sj26 GST 融合蛋白以复合多价疫苗的形式用于小鼠免疫/攻击感染实验, 以探讨复合疫苗是否比单一成份的疫苗具有优越性。

材料与方法

1 实验动物

6 wk 龄雌性 BALB/c 小鼠(清洁级), 体重 18 ± 1 g, 购自南京军区总医院实验动物中心。

2 日本血吸虫尾蚴

由购自江苏省寄生虫病防治研究所的阳性钉螺

以常规方法逸得。

3 重组抗原的制备^[7]

3.1 重组克隆菌的诱导表达^[8]

挑取含 Sj22.6/pGEX-1 λ T 重组质粒的 TG2 大肠杆菌菌落一个, 入 YT 培养液扩增并以 IPTG 诱导表达。离心集菌^[9]。

3.2 纯化 Sj22.6/Sj26 GST 融合蛋白和 rSj22.6 蛋白的制备

按 Pharmacia 公司产品说明用 GS4B 以亲和层析法制备 Sj22.6/Sj26 GST 融合蛋白, 并用凝血酶(thrombin)酶切制备 rSj22.6 蛋白, 随后以聚丙烯酰胺电泳对 Sj22.6/Sj26 GST 融合蛋白和 rSj22.6 酰胺蛋白进行鉴定。

4 BALB/c 小鼠免疫保护性试验

共设 3 组: A 组(rSj22.6 免疫组) 17 只, 注射 rSj22.6 和福氏完全佐剂及生理盐水的乳化物; B 组(Sj22.6/Sj26 GST 融合蛋白免疫组) 12 只, 注射 Sj22.6/Sj26 GST 融合蛋白和福氏完全佐剂及生理盐水的乳化物; C 组(佐剂对照组) 13 只, 注射福氏完全佐剂和生理盐水的乳化物(以 Bio-Rad 公司的 GelDoc 1000 分析系统对抗原进行定量)。于第 0、2、4 wk 各免疫 1 次, 共 3 次, 均采用背部皮下多点注射, 每次每鼠注射相应的纯化抗原各 $10 \mu\text{g}$ 。于第 5 wk 每鼠用 40 ± 1 条尾蚴贴腹攻击感染, 第 10 wk 剖杀小鼠, 门静脉灌注法结合肝肠玻板压片法收集成虫进行成虫计数; 取肝脏以 5% KOH 消化后^[10] 进行虫卵计数并按以下公式计算减虫率和减卵率。

* 总理预备金血防专项基金资助项目(94-Y-23)

$$\text{减虫率}(\%) = \frac{\text{对照组平均虫数} - \text{免疫组平均虫数}}{\text{对照组平均虫数}} \times 100\%$$

$$\text{减卵率}(\%) = \frac{\text{对照组平均肝内虫卵数} - \text{免疫组平均肝内虫卵数}}{\text{对照组平均肝内虫卵数}} \times 100\%$$

5 ELISA^[11]

小鼠于免疫前及攻击感染前各采血 1 次, 分离血清进行 ELISA 试验, 具体步骤为: 包板: A 组与 C 组用 Sj22 6 纯化抗原以 pH9.6 的碳酸盐缓冲液稀释到 2 μg/ml 后包被酶标板(100 μl/孔), B 组用 Sj22 6/Sj26 GST 融合蛋白包被, 抗原浓度同上, 4 过夜。封闭: 甩去包被液, 以 pH7.4 的磷酸盐-吐温 20 缓冲液(PBS-T)洗 3 次, 每次 5 min, 加 4% 脱脂奶粉溶液 150 μl/孔封闭, 4 过夜。加血清: 甩去封闭液, 以 PBS-T 洗 3 次, 每次 5 min, 加入以 PBS-T 1:100 稀释的待检小鼠血清 100 μl/孔, 4 过夜。加酶标二抗: 甩去血清稀释液, 用 PBS-T 洗 3 次, 每次 10 min, 加入用 PBS-T 1:800 稀释的辣根过氧化物酶标记的绵羊抗小鼠 IgG 100 μl/孔, 37 反应 1 h。甩去酶标抗体液, PBS-T 洗 4 次, 每次 10 min, 加底物(3,3',5,5'-四甲基联苯胺溶液, TMB) 100 μl/孔, 37 反应 10 min。加 2 mol/L H₂SO₄ 50 μl/孔终止反应。DG3022 酶联免疫检测仪(华东电子管厂产品)450 nm 下, 以空白孔调零读取各孔 OD 值。

在 ELISA 试验中, 为减少板间差异, 每份血样检测 3 个复孔且分别位于 3 块酶标板的不同位置, 所得的 3 个 OD 值中取其接近的两个 OD 值的均数作为该份血样的 OD 值。

结果

1 纯化 Sj22 6/Sj26 GST 融合蛋白和 rSj22 6 蛋白的制备和鉴定结果 见图 1。



图 1 重组抗原的 SDS-PAGE 鉴定结果

1 标准蛋白质分子量 2 Thrombin 切下的 rSj22 6 重组抗原 3 Sj22 6/Sj26 GST 重组融合蛋白 4 融合蛋白被 thrombin 酶切成单独的 Sj22 6 和 Sj26 GST 两条蛋白带 5 日本血吸虫可溶性成虫抗原

Fig 1 Results of SDS-PAGE for characterization of the Sj22 6/Sj26 GST and rSj22 6 purified with GS4B and thrombin 1 Protein molecular weight standard 2 rSj22 6 purified with thrombin 3 Sj22 6/Sj26 GST fusion protein purified with GS4B 4 Digest of the Sj22 6/Sj26 GST fusion protein cut with thrombin 5 Soluble adult worm antigen of *S. japonicum*

2 免疫鼠血清特异性 IgG 抗体 ELISA 检测结果 见表 1。

表 1 免疫鼠血清 ELISA 试验结果
Table 1 ELISA-detected antibody levels of sera from the mice immunized with Sj22 6/Sj26 GST and rSj22 6

组别 Group	鼠数 (只) No. of mice	免疫前血样平均 OD 值 Average OD value of serum taken before immunization $\bar{X} \pm S$	攻击感染前血样平均 OD 值 Average OD value of serum taken before challenge $\bar{X} \pm S$
A	17	0.156 ± 0.020	1.120 ± 0.037
B	12	0.121 ± 0.019	1.065 ± 0.044
C	13	0.106 ± 0.020	0.139 ± 0.035

由表 1 可见, 以 Sj22 6 重组蛋白和 Sj22 6/Sj26 GST 融合蛋白免疫 BALB/c 小鼠后均能明显刺激相应的 IgG 抗体的产生(A 组和 B 组的 P 值均 < 0.001)。

3 rSj22 6 和 Sj22 6/Sj26 GST 融合蛋白抗原诱导小鼠抗血吸虫感染的保护作用 见表 2。

表 2 rSj22 6 和 Sj22 6/Sj26 GST 融合蛋白诱导小鼠抗血吸虫感染的保护性试验结果
Table 2 Result of anti-*S. japonicum* infection in mice induced with Sj22 6/Sj26 GST and rSj22 6

组别 Group	鼠数 (只) No. of mice	平均每鼠成虫数 (条) Worm burden /mouse $\bar{X} \pm S$	平均每鼠肝内虫卵数(个) No. of eggs per mouse liver $\bar{X} \pm S$	平均每对成虫产卵数(个) No. of eggs per worm pair $\bar{X} \pm S$	成虫减虫率 (%) Worm reduction rate (%)	总体减卵率 (%) Total egg reduction rate (%)	平均每对成虫减卵率(%) Egg reduction rate per worm pair (%)
A	17	14.4 ± 4.5	44.529 ± 21.086	6.179 ± 1.906	32.1% (P < 0.005)	28.4% (P < 0.02)	-5.0% (P > 0.05)
B	12	13.8 ± 7.0	34.166 ± 23.790	4.969 ± 5.911	34.9% (P < 0.02)	45.1% (P < 0.005)	15.5% (P > 0.05)
C	13	21.2 ± 7.2	62.230 ± 17.044	5.883 ± 1.896			

从表 2 可以看出, 以 Sj22 6 重组抗原和 Sj22 6/Sj26 GST 融合蛋白抗原免疫 BALB/c 小鼠均可获得抗血吸虫感染的部分保护力(成虫减虫

率): A 组与 C 组相比较, rSj22 6 可诱导小鼠 32.1% 的成虫减虫率(P < 0.005); B 组与 C 组相比较, Sj22 6/Sj26 GST 可诱导小鼠 34.9% 的成虫减

虫率 ($P < 0.02$)。

小鼠肝内减卵率: A 组与 C 组相比较, rSj22 6 可减少 28.4% ($P < 0.02$); B 组与 C 组相比较, Sj22 6/Sj26 GST 可减少 45.1% ($P < 0.005$)。

小鼠体内平均每对成虫产卵数, rSj22 6 未能诱导出减卵率: A 组与 C 组相比较, 无显著差异 ($P > 0.05$); 而 B 组与 C 组相比较, Sj22 6/Sj26 GST 可使每对成虫减卵率达 15.5% ($P > 0.05$)。

A 组与 B 组相比较, Sj22 6/Sj26 GST 作为复合疫苗, 其诱导小鼠产生的成虫减虫率较单一 rSj22 6 疫苗略高, 而诱导小鼠产生的总体减卵率和平均每对成虫减卵率的绝对数值均较单一 rSj22 6 疫苗为高。

讨 论

重组疫苗的研制工作, 早期主要针对曼氏血吸虫病。经过多年研究, 目前已选定的 6 个抗原分子作为曼氏血吸虫病疫苗候选抗原分子^[12]为: 谷胱甘肽转移酶 (Sm28GST)、磷酸丙糖异构酶 (TPI)、副肌球蛋白 (paramyosin)、23 kDa 膜抗原 (Sm23)、肌球蛋白的 62 kDa 肽段 (IrV-5) 和 Sm14。日本血吸虫病疫苗抗原分子的研究工作起步较晚, 多为借鉴于曼氏血吸虫病研究工作经验。日本血吸虫与曼氏血吸虫的致病机制和免疫反应等方面不尽相同, 因此研制日本血吸虫病疫苗候选抗原分子很有必要。血吸虫感染后保护性免疫机制复杂多样。不同抗原分子产生的保护性免疫机制不同, 其免疫保护力也高低不一。单一分子很难对宿主体内各期虫体产生完全保护力, 因而, 需要利用不同的抗原分子的协同作用, 即用不同分子的不同抗原表位的不同免疫作用, 尽可能地提高免疫保护力。我们认为继续筛选和发现新的有希望的抗原分子, 研制“鸡尾酒”型复合疫苗有效地控制血吸虫病是十分必要的。

初步动物实验表明, 日本血吸虫 22.6 kDa 抗原可能具有一定的免疫保护性^[5], 然而, 由于原先存在着分离表达的问题^[1-6], 很难对这一表达量少且呈分离表达的 Sj22 6 蛋白进行纯化。因此, 在初步动物实验中, 只能采用从 SDS-PAGE 的聚丙烯酰胺凝胶上切带分离该蛋白^[3-5], 在免疫动物时, 将抗原蛋白连同凝胶一起注射入小鼠体内。为此, 对该基因序列进行改造再亚克隆入表达载体 pGEX-1AT, 得到了与载体序列本身编码的 Sj26 GST 融合表达的 Sj22 6 重组抗原蛋白^[7]。该融合蛋白的表达量比以前分离表达时大大提高, 并能较方便地用还原型谷

胱甘肽琼脂糖亲和层析法将其从诱导表达的克隆菌超声粉碎混合物中纯化出来。更为方便的是, 应用 thrombin 酶切, 可以方便地从融合蛋白中切出纯度很高的单一的 rSj22 6 蛋白。

大量获得纯化的 rSj22 6 和 Sj22 6/Sj26 GST 融合蛋白后, 我们已有条件作进一步的研究, 验证该抗原分子及其与 Sj26 GST 的融合蛋白在抗血吸虫感染或抗病免疫中可能起到的作用。用这两种重组蛋白作为疫苗对 BALB/c 小鼠进行免疫/攻击感染实验, 结果, 与佐剂对照组相比较, rSj22 6 能诱导小鼠产生 32.1% ($P < 0.005$) 的成虫减虫率和 28.4% ($P < 0.02$) 的总体减卵率, 但平均每对成虫产卵数却未见减少 ($P > 0.05$), 表明此总体减卵率很可能是由于成虫减少所致, 即 rSj22 6 抗原所诱导的免疫效应对成虫的生殖能力可能没有起到抑制作用, 该实验结果与先前单独用 rSj22 6 对昆明鼠进行的免疫/攻击感染实验获得的结果相近^[5]。与佐剂对照组相比较, Sj22 6/Sj26 GST 融合蛋白能诱导小鼠产生 34.9% ($P < 0.02$) 的成虫减虫率和 45.1% ($P < 0.02$) 的总体减卵率, 平均每对成虫产卵数减少了 15.5% ($P > 0.05$), 此绝对数值表明融合蛋白可能具有一定的抑制成虫生殖能力的作用, 由于单一 rSj22 6 蛋白未能使每对成虫产卵量减少, 因此有理由推论此抑制作用可能与融合蛋白中含有 Sj26 GST 成份有关, 即 Sj26 GST 成份在融合蛋白所诱导的平均每对成虫减卵率中起了关键作用, 这一结果与其它有关 Sj26 GST 减卵的报道相印证^[13-14]。而且, 从本次实验所得到的减虫及减卵率数值上看, Sj22 6/Sj26 GST 融合蛋白疫苗中的两种抗原成份通过不同机制, 各自都起到了相应的保护性作用, 即 rSj22 6 成份主要诱导抗感染免疫, 而 Sj26 GST 成份则主要诱导减卵作用, 提示融合蛋白作为复合疫苗可能优于单一蛋白成份的疫苗, 从而为研制“鸡尾酒”型复合疫苗用于血吸虫病防治提供了依据。

参 考 文 献

- 1 张桂筠, 张兆松, 沈一平, 等. 日本血吸虫重组抗原基因的高效表达和特性鉴定. 中国人兽共患病杂志 1996; 12(5): 30~33
- 2 张桂筠, 张兆松, 陈淑贞, 等. 日本血吸虫中国大陆株基因重组抗原 Sj22 6 kDa 基因克隆与表达的研究. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志 1997; 15: 326~330
- 3 张桂筠, 张兆松, 沈一平, 等. 日本血吸虫重组抗原的免疫原性鉴定. 中国人兽共患病杂志 1997; 13(5): 28~30
- 4 张桂筠, 张兆松, 沈一平, 等. 日本血吸虫中国大陆株基因重组抗原 Sj22 6 kDa 的免疫学活性鉴定. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志 1998; 16: 6~10
- 5 苏川, 沈蕾, 赵巍, 等. 日本血吸虫(中国大陆株) 22.6 kDa 重组

- 抗原对小鼠免疫保护性的初步研究 中国人兽共患病杂志 1998; 14(2) 11~ 14
- 6 张桂筠, 张兆松, 沈一平, 等 日本血吸虫中国大陆株基因重组抗原 Sjc22.6 kDa 的核苷酸序列分析 中国寄生虫学与寄生虫病杂志 1998; 16 105~ 107
- 7 苏川, 马磊, 吴海玮, 等 日本血吸虫 22.6 kDa 重组抗原的高效融合表达及特性鉴定 中国寄生虫学与寄生虫病杂志 1999; 17 205~ 208
- 8 萨姆布鲁克等著 金冬雁 黎孟枫 等译: 分子克隆实验指南 第 2 版, 科学出版社, 1993 28~ 69
- 9 Forsell A. The World of Pharmacia Biotech'95 Uppsala, Sweden 1995 199
- 10 Yang W, Waine GJ, McManus DP, et al Antibodies to *Schistosoma japonicum* (Asian bloodfluke) paramyosin induced by nucleic acid vaccination. Biochem Biophys Res Commun 1995; 212 1029~ 1039
- 11 苏川, 张兆松, Huggins MC, 等 日本血吸虫 32 kDa 重组抗原的进一步研究 中国人兽共患病杂志 1997; 13(6) 3~ 6
- 12 Bergquist NR. Controlling schistosomiasis by vaccination: a realistic option? Parasitol Today 1995; 11 191~ 193
- 13 Walker J, Crowley D. Biochemical properties of cloned glutathione S-transferases from *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. Mol Biochem Parasitol 1993; 61 255~ 264
- 14 Liu SX, Song GC, Xu YX, et al Immunization of mice with recombinant Sjc26 GST induces a pronounced antifecundity effect after experimental infection with Chinese *Schistosoma japonicum*. Vaccine 1995; 13 603~ 607
- 1998 年 11 月 23 日收稿 1999 年 5 月 11 日修回
(编辑: 富秀兰)

STUDIES ON IMMUNOPROTECTION IN MICE AFTER IMMUNIZATION WITH SCHISTOSOMA JAPONICUM 22.6 kDa RECOMBINANT PROTEIN*

SU Chuan, MA Lei, WANG Rongzhi, HU Xuemei, CHEN Shuzhen, SHAO Lijun, WU Haiwei, SHEN Lei, ZHANG Zhao song, WU Guanling

Department of Parasitology, Nanjing Medical University, Nanjing 210029

ABSTRACT

AM: To evaluate the immunoprotective effect of *Schistosoma japonicum* recombinant 22.6 kDa (rSj22.6) and Sj22.6/Sj26 GST fusion protein. **METHODS:** The Sj22.6/Sj26 GST fusion protein was prepared by affinity chromatography using glutathione Sepharose 4B. The purified rSj22.6 could be cleaved easily from the fusion protein with Thrombin. 17 and 12 mice immunized with rSj22.6 and Sj22.6/Sj26 GST separately were each challenged with 40 ± 1 *S. japonicum* cercariae. **RESULTS:** In BALB/c mice, the rSj22.6 and Sj22.6/Sj26 GST could induce 32.1% ($P < 0.005$) and 34.9% ($P < 0.02$) worm reduction, respectively, as well as 28.4% ($P < 0.02$) and 45.1% ($P < 0.005$) total egg reduction, respectively. **CONCLUSION:** Both rSj22.6 and Sj22.6/Sj26 GST fusion protein are partially effective against *S. japonicum*.

Key words: *Schistosoma japonicum*, 22.6 kDa antigen, fusion expression, recombinant protein, immunoprotection

* Supported by Premier Fund for the development of vaccine against schistosomiasis japonica (94-Y-23)

(Continued from outside back cover)

- Survey of *Taenia saginata* infection in students in Harbin City
..... YN Yanshuang, GUAN Jingyan, ZHAO Xiumei et al (301)
- Detection of *Cysticercus bovis* in a calf injected intravenously with *Taenia saginata* hexacanth
..... KANG Jinfeng, WU Lanu, MAMUTI, AKITA Ito (314)
- Survey and treatment of clonorchiasis in Fushan City
..... WU De'e, HU Rushen, WEI Guangqun (316)
- Survey of *Toxoplasma* infection in fertile-age women and children in Urumqi City
..... OU YANG Xiaomei, DENG Xidong (317)
- Relationship between hygienic habit and parasitic infection
..... HUANG Desheng, CA ILI, MA Xingbao et al (318)
- Analysis of 5 cases with cysticercosis of the occipital cisterna major
..... ZHANG Jiadong, CHU Gongren, YN Dali et al (273)
- Clinical analysis of 450 cases with liver and abdominal hydatid disease
..... LI Jizhong (319)
- 33 children with cerebral paragonimiasis
..... SONG Chaozhen, TAN Anping (320)