

# 用日本血吸虫部分 cDNA 表达质粒文库免疫小鼠产生的保护性效果

冯新港\* 林娇娇 朱建国 张 亮 苑纯秀 蔡幼民

(中国农科院上海家畜寄生虫病研究所,农业部动物寄生虫学重点开放实验室,上海 200232)

关键词 日本血吸虫,部分 cDNA,表达文库免疫

中图分类号 R392.11 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)02-0231-04

寻找保护性效果更好的抗原分子一直是抗血吸虫病疫苗研发领域的热点和难点。国内外筛选日本血吸虫(*Schistosoma japonicum*)保护性抗原分子采取的主要策略有 2 种:一是通过构建血吸虫某一生活史 cDNA 文库,采用探针(核酸或抗体)从文库或文库表达产物中筛选出特异性抗原基因,再逐一评估其保护性效果。该策略的主要缺陷是筛选操作费时费力,且效率不高。另一途径则是根据已知的曼氏血吸虫或其它种(株)保护性抗原基因序列,通过 PCR 或核酸探针等技术筛选与之同源的相应抗原分子,这一方法(尤其是 PCR 方法)尽管针对靶分子操作比较方便,但要求已知的基因序列可资利用,因而受到一定的限制。

Barry M A 等人报道,用肺支原体(*Mycoplasma pulmonis*)基因组 DNA 文库直接免疫小鼠,筛选获得了具有较高保护效果的子文库,阐明了基因组表达文库免疫(Expression library immunization, ELI)策略用于筛选原核病原生物候选疫苗的可行性<sup>[1]</sup>。尽管这一策略较之常规方法有其独特的优点,但一般认为,基因组表达文库直接免疫方法很难应用于更为复杂的寄生虫疫苗候选基因的筛选,因为寄生虫基因组都较大,在原初的表达文库中,由于保护性抗原出现的量极少,很难提呈到宿主的免疫系统中。1999 年 Piedrafita D 等人证实<sup>[2]</sup>,用该策略筛选细胞内寄生的硕大利什曼原虫的保护性抗原基因同样行之有效。他们通过将总基因组文库细分成几个亚文库的方法,在体内选择具有保护性效果的文库,认为可以通过这一过程富集保护性基因片段的集合或基因片段。为探索表达文库免疫策略应用于筛选日本血吸虫保护性候选抗原分子的可行性,我们构建了日本血吸虫部分 cDNA 表达质粒文库,并在小鼠模型中评价了表达质粒文库经肌注途径导入机体后抗攻击感染的保护性效果,进一步完善这一新策略。

## 1 材料和方法

### 1 材料

1.1.1 cDNA 文库:日本血吸虫(中国大陆株)成虫 cDNA 文

库由本所构建、保存,该文库系将目的 cDNA 片段构建于  $\lambda$ ZipLox/Y109C(ZL)系统中,雌、雄文库库容量分别为  $3.74 \times 10^6$ 、 $3.28 \times 10^6$ ,重组率均在 96% 以上,插入片段长度多在 0.5 ~ 2 kb 之间<sup>[3]</sup>。

1.1.2 菌株与质粒:大肠杆菌 DH5 $\alpha$ :基因型为 F<sup>-</sup> endA1, hsdR17(rk<sup>-</sup> mk<sup>+</sup>), supE44, thi-1,  $\lambda^-$ , recA1, gyr96, relA1,  $\Delta$ (argF-LacZya), UI69,  $\Phi$ 80,  $\Delta$ lacZ $\Delta$ M15, 由本室保存。

质粒 pCMV-GH:为含 CMV 强启动子并含人生长激素基因的真核表达载体。全长约 6.01 kb,有氨苄青霉素抗性筛选标记。由美国得克萨斯西南医学中心大学 Stephen Albert Johnston 博士惠赠。

1.1.3 主要试剂:PCR 试剂盒、DNA 分子量标准购自宝生物工程公司,限制酶为 Biolabs 产品,T4 DNA 连接酶为 NEB 产品,质粒抽提、回收试剂盒与 PCR 产物回收试剂盒、超感受态细胞等购自上海博彩生物公司,辣根过氧化物标记的羊抗小鼠 IgG 购自华美生物工程公司。

1.1.4 实验动物:人工感染日本血吸虫的阳性湖北钉螺(*Oncomelania hupensis*)由本所钉螺室提供。4 周龄昆明系清洁级小鼠由本所实验动物室提供。

### 1.2 方法

1.2.1 日本血吸虫部分 cDNA 表达质粒文库的构建:

(1)目的 cDNA 片段的扩增:选择邻近目的 cDNA 片段的  $\lambda$ ZipLox/Y109C(ZL)文库中的 5' 与 3' 区域的 T7 与 SP6 处为引物,为便于将目的片段定向克隆于真核表达载体相应的酶切位点,在 T7 的 5' 端加入了 1 个 Bgl II 酶切位点和 2 个保护性碱基。以混合文库为模板进行目的片段的 PCR 扩增。条件与循环参数分别是:引物各 0.5  $\mu$ L, dNTP 4  $\mu$ L, 反应 Buffer 5  $\mu$ L, 模板 10  $\mu$ L, 高保真 Taq DNA 聚合酶 0.5  $\mu$ L, 加灭菌 ddH<sub>2</sub>O 至 50  $\mu$ L, 94 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min 进行 30 个循环,循环结束后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min 终止。扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定。

(2)部分 cDNA 表达质粒文库的构建:质粒 pCMV-GH 的提取按试剂盒说明操作,用 Bgl II 和 Hind III 37 $^{\circ}$ C 酶切 4 h,

0.8% 琼脂糖凝胶电泳分离,再用试剂盒回收,PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳分离后,用 Golden Beads DNA 试剂盒回收 500~2500 bp 的 DNA 片段,回收片段用 *Bgl* II 和 *Hind* III 37℃ 酶切过夜,次日加入 *Bgl* II 和 *Hind* III 37℃ 继续酶切 4 h,酶切后的产物用 Golden Beads PCR 试剂盒回收。然后将载体与目的基因按 1:3 摩尔比例混合,加适量 T4 DNA 连接酶 16℃ 连接过夜,将 20 mL 超感受态细胞 DH5 $\alpha$  分装成 200 $\mu$ L,每管加入 10 $\mu$ L 连接液,按标准方法转化、铺板,计算转化子数。转化子按文献报道的方法收集、保存<sup>[21]</sup>。全部转化子命名为 L-CMV-GH-SjR,并将其等分为 3 个亚文库,分别命名为 L-CMV-GH-SjR<sub>1</sub>、L-CMV-GH-SjR<sub>2</sub>、L-CMV-GH-SjR<sub>3</sub>。

(3) 部分转化子的鉴定:随机挑取 87 个菌落,提取质粒后作酶切鉴定;14 个作部分序列测定,由上海基康(GeneCore)生物技术公司完成,测序结果用 Blast<sup>[41]</sup>、Genescan<sup>[51]</sup> 等程序分析。随机挑取的全部质粒命名为 L-CMV-GH-SjRs。

### 1.2.2 表达质粒文库免疫昆明(KM)小鼠实验:

(1) 质粒 DNA 制备及免疫的方法:质粒 DNA 制备:参照文献[6],碱裂解法大量制备表达文库质粒 DNA,并用旋转柱质粒回收试剂盒纯化,分光光度计测定纯度与含量,用生理盐水稀释至 1 $\mu$ g/ $\mu$ L。质粒 DNA 免疫小鼠分组:1)生理盐水(NS)对照;2)pCMV-GH 空质粒对照;3)L-CMV-GH-SjR;4)L-CMV-GH-SjR<sub>1</sub>;5)L-CMV-GH-SjR<sub>2</sub>;6)L-CMV-GH-SjR<sub>3</sub>;7)L-CMV-GH-SjRs。每组鼠数 10 只。免疫途径与方法:采用肌肉注射法,每只鼠左后腿肌肉注射质粒 DNA 约 25 $\mu$ g,第 1 次免疫后 14d 同剂量进行第 2 次免疫,75d 同剂量进行第 3 次免疫。分别于加强免疫后 20d、35d、110d 每组每次取 3 只小鼠眼眶取血,分离血清,用于 IgG 抗体的检测。

(2) 免疫鼠血清特异性抗体的测定:待测血清均作 1:50 稀释。ELISA 法按文献[7]进行,各组均数间的比较用 *t* 检验。

1.2.3 免疫鼠抗攻击感染实验:免疫小鼠分组同 1.2.2 中(1)所述,于末次免疫后 35d 进行尾蚴攻击,每只小鼠经腹部皮肤感染日本血吸虫尾蚴 45 条,于攻击感染后 30d 后处死小鼠,行门静脉灌注冲洗收集成虫计数,公式:减虫率 = (1 - 观察组检获成虫均数/对照组检获成虫均数)  $\times$  100%。

## 2 结 果

### 2.1 日本血吸虫部分 cDNA 表达质粒文库的构建

2.1.1 目的 cDNA 片段的扩增:以日本血吸虫雌、雄成虫混合文库  $\lambda$ ZipLox/Y1090(ZL)为模板,用通用引物对 T7 与 SP6 经 PCR 方法扩增出大小约 400~2000bp 的 DNA 弥散带段,与预期结果相符合(图 1)。

2.1.2 部分 cDNA 表达质粒文库的构建:构建方案如图 2 所示。按标准方法转化、铺板后,得到约 10<sup>5</sup> 个转化子,符合进一步实验的要求。

2.1.3 部分转化子的鉴定:随机挑取的 87 个菌落,提取质粒后用 *Bgl* II 和 *Hind* III 作酶切鉴定,结果有 68 个均切出大小不等的插入片段,图 3A、3B 所示为其中的 10 个转化子的酶切结果。

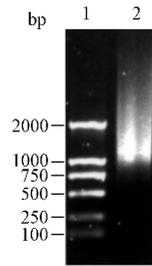


图 1 PCR 产物电泳分析

Fig. 1 The analysis of PCR products by 1% agarose gel electrophoresis

1. DNA marker (DL200); 2. PCR products

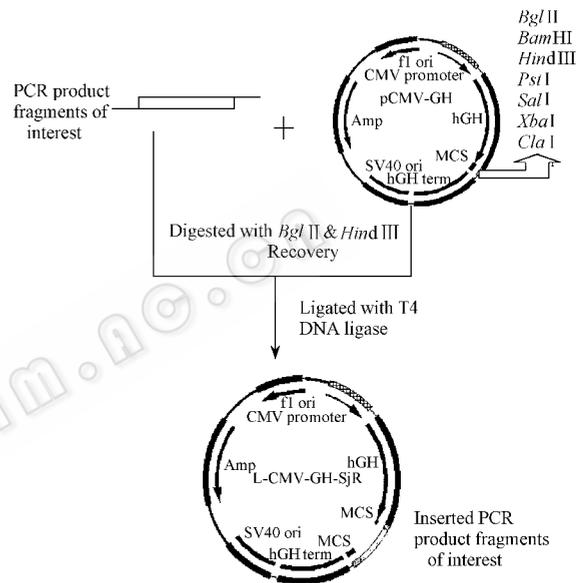


图 2 日本血吸虫部分 cDNA 表达质粒文库构建

Fig. 2 Construction of an expression library containing partial cDNA of *S. japonicum*

对其中的 14 个作部分序列测定,结果读出 12 个序列。Blast 分析发现:1 个为空载质粒,1 个与已知的血吸虫甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因相匹配,其余的则与已知的血吸虫基因不匹配,但与其它种属的已登录在数据库中的某些基因部分片段相匹配(见表 1)。

用 Genescan 程序分析显示,所测序列的 A + T 含量在 55.9%~66.7% 之间;序列的傅立叶谱峰图在频率为 1/3 处的信号噪声比 *P* 值大多大于 4,仅 1 条序列的 *P* 值小于 4。

### 2.2 表达质粒文库免疫 KM 小鼠实验

2.2.1 免疫鼠特异性抗体检测结果:检测结果如图 4,免疫组血清特异性 IgG 抗体 OD<sub>492</sub> 的均值与 NS 及空质粒对照组无显著性差异 (*P* > 0.05)。

2.2.2 免疫鼠抗攻击感染实验:结果表明,表达文库 L-CMV-GH-SjR 组及亚文库 L-CMV-GH-SjR<sub>1</sub> 和 L-CMV-GH-SjR<sub>2</sub> 组与空质粒对照组比较有显著性差异 (*P* < 0.05),亚文库 L-CMV-GH-SjR<sub>3</sub> 及随机挑取的转化子质粒组 L-CMV-GH-SjRs 和空载质粒 pCMV-GH 对照组比较则无显著性差异 (*P* > 0.05)。

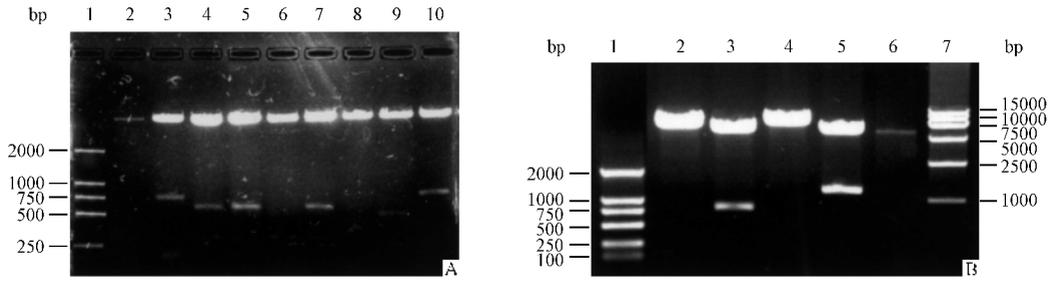


图 3 部分转化子的酶切鉴定

Fig.3 Identification of recombinant constructs from the library by restriction analysis

A :1. DNA marker( DL200 ); 2. pCMV-GH vector digested with *Bgl* II and *Hind* III ; 3~ 10. Eight recombinant constructs were digested with *Bgl* II and *Hind* III

B :1. DNA marker( DL200 ); 2. 25<sup>#</sup> recombinant plasmid digested with *Bgl* II ; 3. 25<sup>#</sup> recombinant plasmid digested with *Bgl* II and *Hind* III ; 4. 54<sup>#</sup> recombinant plasmid digested with *Hind* III ; 5. 54<sup>#</sup> recombinant plasmid digested with *Bgl* II and *Hind* III ; 6. pCMV-GH vector digested with *Bgl* II and *Hind* III

表 1 重组子测序鉴定分析

Table 1 Sequence analysis of recombinant constructs containing *S. japonicum* genes

Sequences No.	Identification	Blast search			Genescan analysis*	
		Accession	Length ( aa )	Identity/ %	A + T ( % )	P = S ( 1/3 ) / S
SJEST0009	1700001L19 PIK protein	Q9DAR0	113	43	66.5	11.96
SJEST0028	Putative tata binding protein( interacting protein0	Q9P3A8	52	36	63.5	15.37
SJEST0074	Cofilin	COFL_SCHPO	137	37	63.5	6.05
SJEST0083	60S acidic ribosomal protein p2( allergen asp f8 )	RLA2-ASPFU	115	43	56.7	11.5
SJEST0099	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Q27776	216	96	58.1	21.40
SJEST0404	cDNA FLJ21867 FIS ,CLONE HEP02419	Q9H6U3	125	48	64.3	4.25
SJEST0421	Tyra protein	Q9KQ59	105	50	61.6	6.93
SJEST0471	Beta-adaptin 3A( AP-3 complex beta3a subunit )	Q9Z1T1	46	34	66.7	1.54
SJEST0469	CG7073 protein	Q9VD29	191	71	55.9	5.1
SJEST0476	CK2 alpha subunit	Q9NL95	109	77%	61.9	18.74
SJEST0577	Complement component 1 , Q subcomponent binding protein	Q9CSV8	196	27	61.4	12.5

\* The % content of A + T of *Schistosoma* DNA is more than 60% ; DNA sequence may be protein-coding if P > 4

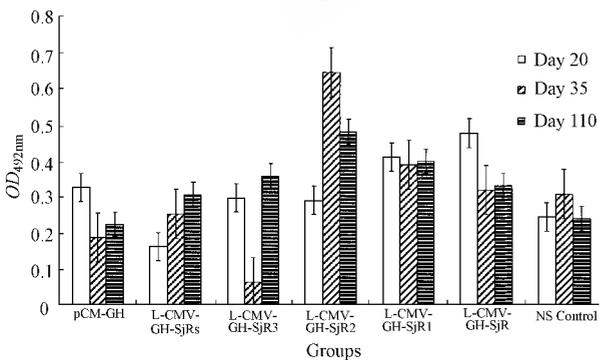


图 4 表达文库免疫小鼠后不同时间血清 IgG 抗体 ELISA 检测结果

Fig.4 The results of IgG antibodies detection in sera from the mice immunized with cDNA expression libraries of *S. japonicum* after different days by ELISA

表 2 日本血吸虫部分表达文库质粒 DNA 肌注免疫小鼠后抗攻击感染效果

Table 2 The protective effect of mice vaccinated with partial cDNA expression libraries of *S. japonicum* through i. m. against challenge infection

Groups	Recovery mean worm burden( X ± S )	Worm reduction rate/ %	P-value
L-CMV-GH-SjR	20.57 ± 6.70	31.43	0.013
L-CMV-GH-SjR <sub>1</sub>	21.00 ± 5.68	30.00	0.026
L-CMV-GH-SjR <sub>2</sub>	21.71 ± 5.82	27.63	0.042
L-CMV-GH-SjR <sub>3</sub>	23.00 ± 6.32	23.33	0.087
L-CMV-GH-SjRs	24.50 ± 5.21	18.33	0.172
pCMV-GH control	30.00 ± 8.39	-	-
NS control	31.50 ± 7.56	-	-

可与目前已报道的血吸虫候选抗原分子的保护性效果相当<sup>[8]</sup>。值得注意的是,从文库中随机挑取的 87 个转化子 DNA 直接免疫小鼠,抗攻击感染的效果则较低,减虫率为 18.33%,可能其中包含的保护性片段或表位较少,也可能产生较高保护性效果的表位未出现在这些转化子中。揭示应用这一方法时,初始文库应尽可能全面地涵盖表达的基因。本

### 3 讨论

用所构建的质粒表达文库直接免疫小鼠试验结果表明:质粒文库注射后,能诱导机体产生保护性的免疫应答,免疫小鼠抗攻击感染减虫率为 23.33% ~ 31.43%。这一结果至少

研究中,我们只选取了部分成虫 cDNA 构建初始文库,并将其等分为 3 个子文库,初始文库 L-CMV-GH-SjR 和子文库 L-CMV-GH-SjR<sub>1</sub> 及 L-CMV-GH-SjR<sub>2</sub> 免疫后,抗攻击感染的减虫率与对照组比较存在显著性差异,而子文库 L-CMV-GH-SjR<sub>3</sub> 免疫后的保护性效果则不明显。Piedrafita D 等人报道<sup>[2]</sup>,他们应用该方法筛选硕大利什曼原虫保护性基因时,也发现某些子文库的保护性效果不显著。所以,细分文库可能使筛选的范围缩小,但初始文库应尽量涵盖全部的基因。对血吸虫来说,理想的方案是选择生活史各期的 cDNA 构建初始文库,再将其细分进行筛选试验,可能会获得更好的效果。

文献报道 DNA 免疫动物后,有的能诱导产生较高水平的特异性抗体,有的则较低<sup>[9,10]</sup>。从血吸虫单剂量辐照减毒疫苗的试验证实:抗体水平的高低并非与免疫保护力正相关<sup>[11]</sup>。我们的结果也显示,文库免疫后小鼠 IgG 抗体水平低,但小鼠获得了抗攻击感染的保护性。这种保护力是否主要与细胞免疫相关或与其它类型的抗体有关,尚有待深入研究。

致 谢 本研究得到农业部动物寄生虫学重点实验室宋斌、孟秀珍老师及本课题组陈永军、朱传刚、李浩、倪振亚等同志的帮助,一并致谢!

#### REFERENCES(参考文献)

- [ 1 ] Barry M A , Lai W C , Johnston S T . Protection against mycoplasma infection using expression library immunization . *Nature* , 1995 , **377** ( 6550 ) : 632 ~ 635
- [ 2 ] Piedrafita D , Xu D , Hunter D *et al.* . Protective immune responses

induced by vaccination with an expression genomic library of *Leishmania major* . *J Immunol* , 1999 , **163** ( 3 ) : 1467 ~ 147

- [ 3 ] YUAN C X(苑纯秀) , LI M(李铭) , CHEN Y J(陈永军) *et al.* . Construction of cDNA libraries from mature female and male worm of *Schistosoma japonicum* Chinese main land strain . *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报) 2000 , **16** ( 6 ) : 727 ~ 730
- [ 4 ] Blast program on URL <http://www.ebi.ac.uk/blastall/>
- [ 5 ] Genescan program on World Wide Web of NLD-LAB School of Physical Sciences URL <http://202.41.10.146/GS.html>
- [ 6 ] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T . *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* . 2<sup>nd</sup> ed , New York : Cold Spring harbor Laboratory Press , 1989
- [ 7 ] MAO S B(毛守白主编) . *Schistosome biology and schistosomiasis control*(血吸虫生物学与血吸虫病的防治) , Beijing : Publishing House of People's Health , 1990
- [ 8 ] Bergquist N R , Hall B F . Schistosomiasis vaccine development . *The Immunologist* , 1994 , **2** ( 4 ) : 131 ~ 134
- [ 9 ] Dupre L , Poluain G O , Ban E *et al.* . Intradermal immunization of rats with plasmid DNA encoding *Schistosoma mansoni* 28 kDa glutathione S-transferase . *Parasitol Immunol* , 1997 , **19** ( 11 ) : 505 ~ 513
- [ 10 ] Kang Y , Calvo P A , Daly T M *et al.* . Comparison of humoral immune responses elicited by DNA and protein vaccines based on merozoite surface protein-1 from *Plasmodium yoelii* , a rodent malaria parasite . *J Immunol* , 1998 , **161** ( 8 ) : 4211 ~ 4219
- [ 11 ] Coulson P S . The radiation-attenuated vaccine against schistosomes in animal models : paradigm for a human vaccine ? *Adv Parasitol* , 1997 , **39** : 271 ~ 336

## Protective Effect Induced by Vaccination with a Partial cDNA Expression Library of *Schistosoma japonicum* in Mice

FENG Xin-Gang\* LIN Jiao-Jiao ZHU Jian-Guo ZHANG Liang YUAN Chun-Xiu CAI You-Min

( Shanghai Institute of Animal Parasitology , Chinese Academy of Agricultural Sciences , Key Laboratory of Animal Parasitology , Ministry of Agriculture of China , Shanghai 200232 , China )

**Abstract** The cDNA fragments of interest were amplified using *Sj*λ ZipLox library as the templates by PCR and then cloned into a eukaryotic expression vector p-CMV-GH ; A small number of DNA fragments inserted in the recombinants was identified by restriction cleavage , EST sequencing and bioinformatical analysis ; mice were injected intramuscularly with the expression library ( L-CMV-SjR ) or sublibraries ( L-CMV-SjR<sub>1</sub> , L-CMV-SjR<sub>2</sub> and L-CMV-SjR<sub>3</sub> ) , immunized mice were challenged with *Schistosoma japonicum* cercariae on day 35 , the levels of IgG antibodies in sera from the immunized mice were detected by ELISA . The results demonstrated that a partial cDNA expression library of *S. j* , with ~ 10<sup>5</sup> transformants , was constructed , most of the recombinants contained the insert DNA fragments of interest , and these fragments had the features of protein-coding sequences for *Schistosome* . There were no significant differences for the levels of IgG antibodies in sera from all of the immunized groups . Mice immunized with L-CMV-SjR , L-CMV-SjR<sub>1</sub> and L-CMV-SjR<sub>2</sub> developed significant protective effect against *Sj* infection compared to control mice injected with the empty plasmid , the rate of worm reduction was about 30% .

**Key words** *Schistosoma japonicum* , partial cDNA , expression library immunization( ELI )

Received 09-21-2001

This work was supported by grants from China Postdoctoral Science Foundation and the State 863 High Technology R & D Project of China ( No. 863-102-07-04-03 ) .

\* Corresponding author . Tel 86-21-54082675 ; Fax 86-21-54080044 ; E-mail [cg62@163.com](mailto:cg62@163.com) 上海生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>