

· 研究报告 ·

弓形虫核酸(DNA)免疫系列研究

陈观今, 郑焕钦, 周永安, 郭虹, 陈海峰

(中山大学中山医学院寄生虫学教研室, 广东 广州 510080)

摘要: 本系列研究筛选了弓形虫(*Toxoplasma*)速殖子表膜主要抗原(SAG1 或 P30)及分泌排泄抗原棒状体蛋白基因(ROP1), 并将二者拼接构建复合基因(SAG1/ROP1), 对其进行扩增、克隆、表达, 制备真核表达质粒, 接种小鼠, 研究其免疫保护效应, 为弓形虫核酸疫苗的研制提供有积极意义的科学根据。

关键词: 弓形体属/遗传学; 弓形体属/免疫学; SAG1/ROP1; 疫苗

中图分类号: R382.5

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)01-0001-03

Serial Studies on DNA Immunity of *Toxoplasma gondii*

CHEN Guan-jin, ZHENG Huan-qin, ZHOU Yong-an, GUO Hong, CHEN Hai-feng

(Department of Parasitology, Zhongshan Medical College, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: The series studies combining the tachyzoite antigen encoding gene (SAG1 or P30) and rhopty protein gene (ROP1) of *Toxoplasma gondii* to construct the combine SAG1/ROP1 gene. DNA fragments encoding SAG1 and ROP1 were amplified and cloned into enkaryotic expression plasmids. Then we inoculated the plasmids into mice to examine the immune response elicited by SAG1 and ROP1 encoding plasmids and assess the protective effect of the DNA constructs vaccination against toxoplasmosis. The studies of DNA immunity will lay foundation for the development of toxoplasmosis vaccine.

Key words: *Toxoplasma*/genetics; *Toxoplasma*/immunology; SAG1/ROP1; Vaccine

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(1):1-3]

刚地弓形虫是一种机会性致病原虫, 寄生于宿主的细胞内, 在机体免疫力下降时, 弓形虫大量增殖, 可导致组织器官的损伤, 引起弓形虫病(toxoplasmosis)。该病呈世界性分布, 是严重危害人畜健康的寄生虫病之一。孕妇感染弓形虫后可导致早产、流产、死产、胎儿发育畸形。弓形虫病也是免疫功能严重低下患者(如 AIDS 病人等)的主要死亡原因。核酸免疫原理是将保护性抗原基因重组到真核表达质粒, 通过不同的途径接种到机体内, 使得保护性抗原在宿主细胞内进行表达, 诱导机体的免疫拮抗病原, 预防发病。核酸免疫对疫苗研制有积极意义。

1 保护性抗原基因的选择及体外扩增

SAG1 是弓形虫候选抗原基因, 其相对分子质

量 $M_r = 30 \times 10^3$, 用 SAG1 抗原免疫小鼠, 可获得对抗急慢性感染的保护性免疫反应; 而 ROP1 属于分泌抗原, 基因全长约 2.1 kb, 有增强弓形虫入侵宿主细胞的作用, 具有很强的免疫原性。本研究根据弓形虫 RH 株基因序列设计两对引物, 采用聚合酶链反应技术(PCR)扩增 SAG1 及 ROP1 基因片段。SAG1 基因扩增片段为 1 025 bp, ROP1 基因片段为 756 bp。通过比较弓形虫 RH 株、ZS1、ZS2、及 GT1 株扩增片段大小, 发现 4 个分离株的 SAG1 及 ROP1 扩增片段大小一致^[1,3]。

2 SAG1、ROP1 及复合 SAG1/ROP1 基因的克隆与表达

采用亚克隆的技术将 SAG1 和 ROP1 基因分别克隆到 pET28aR T7 启动子的下游, 成功构建 pET28-SAG1/ROP1 复合基因质粒, 并在大肠杆菌

收稿日期: 2005-07-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39970668); 广东省“211”重点学科建设基金资助项目(201053-1104)

作者简介: 陈观今(1937-), 男, 广东五华人, 教授, 博士生导师, E-mail: cheng@gzsums.edu.cn

DH5a 中表达, SDS-PAGE 及 Western blotting 显示 SAG1/ROP1 复合基因表达产物相对分子质量 $M_r = 66 \times 10^3$, 且表达产物具有免疫活性。而 ROP1 基因片段则被插入原核质粒 pBV220 多克隆位点, 并转入大肠杆菌进行高效表达, SDS-PAGE 及免疫印迹实验显示表达蛋白相对分子质量 $M_r = 43 \times 10^3$, 表达产量占菌体总蛋白的 13.23%^[4,5]。

分别构建 pcDNA3-SAG1、pGFP-N3-SAG1、pGFP-N3-ROP1、pGFP-N3-SAG1/ROP1 重组真核表达质粒, 以脂质体介导转染 NIH3T3 细胞, 转染 7 h, 荧光显微镜下观察到转染细胞有绿色荧光; 提取细胞 RNA 作 RT-PCR 能扩增出 1 020 bp SAG1 及 760 bp ROP1 的基因片段; 结果表明目的基因在转染细胞中得到转录、表达。SDS-PAGE 及 Western blot 结果显示 pGFP-N3-SAG1/ROP1 瞬时表达产物条带相对分子质量 $M_r = (58 \sim 76) \times 10^3$, 能够被免疫鼠血清所识别^[4-6,12]。

SAG1、ROP1 抗原基因不仅在体外于大肠杆菌及真核细胞中能够表达, 同时其真核表达质粒在小鼠体内也得到有效表达。本研究将所构建的 pcDNA3-SAG1 肌肉注射免疫小鼠, 3 周后, 采用原位分子杂交在免疫接种的小鼠骨骼肌中检测到紫蓝色的阳性杂交信号, 提示 SAG1 基因在局部肌肉组织中有 mRNA 转录的发生; 免疫组化的结果显示 SAG1 在免疫小鼠的骨骼肌中表达, 并分泌到肌肉间隙。pcDNA3-ROP1 肌肉接种小鼠后, 免疫组化检测发现 ROP1 重组抗原同样能在局部肌肉中表达; 在免疫后 10 周, 提取外周血基因组 DNA, 采用 PCR 法及核酸探针杂交的方法检测, 未发现接种质粒 DNA 整合到小鼠基因组中去^[6,13-15]。

3 SAG1、ROP1 及 SAG1/ROP1 真核表达质粒 DNA 免疫小鼠后的免疫效应

以 50 μg 重组质粒肌肉免疫 BALB/c 小鼠, 每隔 3 周接种 1 次, 共 3 次。用 MTT 法对脾脏 NK 细胞杀伤率和淋巴转化率进行测定, 以免疫荧光法测定 CD4⁺和 CD8⁺亚群, 结果表明: NK 杀伤细胞的活性显著提高 ($P < 0.01$); T 细胞亚群动态显示, 随着感染时间的延长, CD8⁺细胞的数量逐渐上升, CD4⁺/CD8⁺的比率逐渐下降, 实验组与对照组相比差异显著 ($P < 0.05$)。免疫后同时能够诱导 IgG 抗体的产生。弓形虫攻击保护实验表明, 免疫组小鼠

存活时间较对照组显著延长 ($P < 0.05$)^[2,6,10]。

大量制备质粒, 以 100 μg 作肌肉注射接种小鼠, 2 周后加强免疫 1 次。研究结果表明: 用 pcDNA3-ROP1 质粒免疫小鼠 30 d 后, 脾脏显著增大; 免疫组脾淋巴细胞增殖活性明显高于生理盐水及空质粒对照组; NK 细胞杀伤活性 3 次测定结果免疫组均高于对照组。T 细胞亚群中, CD8⁺细胞数量显著增高; 血清抗体 IgG 滴度 70 d 检测结果, 与对照组相比无明显提高, 而免疫后 90 d 则显著增高, 抗体滴度 1 100, 皮下及肌肉不同的免疫途径血清均显示阳性。免疫小鼠血清细胞因子 IFN- γ 、IL-2 及 NO 的测定结果其含量均高于对照组, 30、50 与 70 d 测定结果有随免疫时间延长而增高的趋势^[9, 15, 11]。

4 核酸免疫中 FN- 及 IL-2 的基因佐剂作用

蛋白或多肽抗原疫苗在免疫接种过程中, 常常采用适当的免疫佐剂来增强疫苗的免疫原性及免疫应答的效果, 但采用 FN- 及 IL-2 的基因佐剂用于抗弓形虫感染的核酸免疫的研究, 尚未见报道。本研究构建了 FN- 基因的真核表达质粒 pclFN-, 并与 pcDNA3-ROP1 共同免疫接种小鼠, 结果显示: pclFN- 与 pcDNA3-ROP1 组 IFN- γ 、IL-2 及 NO 的水平显著高于单独的 pcDNA3-ROP1 组 ($P < 0.01$); 而对 IgG 抗体的滴度无显著影响 ($P < 0.05$)。采用 IL-2 基因佐剂与 pcDNA3-SAG1 共同核酸免疫小鼠后, 则不仅能够显著增强细胞因子 IFN- γ 分泌, 同时提高 IgG2a 亚型的水平。弓形虫感染攻击实验表明, 采用 IL-2 基因佐剂组小鼠存活时间较单独接种 pcDNA3-SAG1 组延长, 与空质粒及生理盐水对照组相比, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$)^[8,7,16,17]。

5 SAG1 和 ROP1 复合或混合基因表达质粒接种小鼠诱导产生拮抗致死性弓形虫感染的保护性免疫

当肌肉注射 pESAG1+pEROP1 或 pGFP-N3-SAG1/ROP1 真核表达质粒, 加一定比例的基因佐剂, 小鼠血清显示 IgG2a/IgG1OD450 比值高于单 pESAG1 和 pEROP1 质粒组; IFN- γ 和 IL-2 水平高于单基因质粒; CD4⁺/CD8⁺比例显著高于对照组。在致死量攻击感染试验显示免疫组小鼠存活

率增高, 存活时间比对照组显著延长 1~2 倍^[18]。

本研究立足于生命科学研究的的前沿, 对弓形虫感染的核酸免疫进行了一系列研究。本项目首先筛选出弓形虫 SAG1 和 ROP1 基因作为研究的靶基因, 成功构建了 SAG1、ROP1、SAG/ROP1 复合抗原基因的原核及真核表达质粒, 在体外原核和真核细胞系统中成功表达及识别鉴定的基础上, 将重组真核表达质粒接种小鼠, 重组抗原在小鼠骨骼肌肉中得到有效表达; 经重复试验和统计学处理发现所构建的 SAG1、ROP1 及 SAG/ROP1 复合抗原真核表达质粒能够同时激发机体体液免疫和细胞免疫应答, 诱导免疫动物产生高浓度的 IgG 抗体, 显著提高 IFN- γ 、IL-2 及 NO 的水平, NK 杀伤细胞活性显著提高, CD8⁺ 细胞显著增高 ($P < 0.01$), 提高了 IgG2a 亚型水平, 有助于拮抗弓形虫的感染; 通过对免疫小鼠基因组的检测, 未发现免疫质粒基因整合到小鼠的基因组中; 采用一定的比例的基因佐剂 IL-2、IFN- γ 与 SAG1、ROP1 重组质粒协同的免疫小鼠, IgG2a/IgG1 比值增高, 有效地加强了免疫效果 ($P < 0.05$)。值得重视的是, 在弓形虫感染攻击实验中, 所构建的重组质粒 pGFP-N3-SAG1+ROP1 及 pGFP-N3-SAG1/ROP1 核酸免疫小鼠后能够明显延长小鼠的存活时间和提高存活率 ($P < 0.01$)。

参考文献:

- [1] 周永安, 陈观今, 郭虹, 等. 弓形虫 ZS2 株抗原基因的扩增及克隆[J]. 中国人兽共患病杂志, 1998, 14(5): 14-16.
- [2] 周永安, 陈观今, 郭虹, 等. 弓形虫 P30 基因 DNA 免疫小鼠诱导的细胞免疫应答[J]. 中国人兽共患病杂志, 1999, 15(3):11-13.
- [3] 郭虹, 陈观今, 郑焕钦, 等. 弓形虫不同分离株 ROP1 和 P30 基因的体外扩增[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 1999, 12(2):102-104.
- [4] 郭虹, 陈观今, 郑焕钦, 等. 弓形虫 ROP1 基因真核重组表达质粒 DNA 免疫小鼠的研究 I. pcDNA3-ROP1 真核表达重组质粒的构建[J]. 中国人兽共患病杂志, 1999, 15(1):3-5.
- [5] 郭虹, 陈观今, 郑焕钦, 等. 编码弓形虫 ROP1 蛋白基因的体外扩增、克隆及在 E.coli 中的表达[J]. 中国人兽共患病杂志, 1999, 15(2):15-18.
- [6] 郭虹, 陈观今, 郑焕钦, 等. 含弓形虫 ROP1 基因真核表达重组质粒 DNA 免疫小鼠的研究 I 免疫小鼠肌肉组织表达产物免疫酶法定位及血清 IgG 抗体测定[J]. 中国人兽共患病杂志, 1999, 15(6):11-13.
- [7] 郭虹, 陈观今, 郑焕钦. 含弓形虫 ROP1 基因真核表达重组质粒 DNA 免疫小鼠的研究 V. IFN- γ 基因真核表达重组质粒的构建及其在 DNA 免疫中基因佐剂的作用[J]. 中国人兽共患病杂志, 1999, 15(6):14-17.
- [8] 郭虹, 陈观今, 郑焕钦. 含弓形虫 ROP1 基因真核表达重组质粒 DNA 免疫小鼠的研究 IV 免疫鼠血清细胞因子 IFN- γ 、IL-2 及 NO 的测定[J]. 中国人兽共患病杂志, 2000, 16(4):18-20.
- [9] 郭虹, 陈观今, 郑焕钦, 等. 弓形虫 ROP1 基因真核表达重组质粒免疫小鼠后的免疫应答[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1999, 17(6):334-337.
- [10] 周永安, 陈观今, 郑焕钦, 等. 弓形虫 P30 基因 DNA 免疫小鼠诱导小鼠体免疫应答及保护性研究[J]. 中国人兽共患病杂志, 1999, 15(5): 41-43.
- [11] GUO H, CHEN G J, ZHENG H Q, et al. Immunity induced by DNA vaccine of plasmid encoding the rhostry protein 1 gene combined with the genetic adjuvant of pcIFN- γ against *Toxoplasma gondii* in mice [J]. Chin Med J, 2002, 114(3): 317-320.
- [12] CHEN G J, GUO H, ZHENG H Q, et al. Construction of a recombinant plasmid harbouring the rhostry protein 1 gene of *Toxoplasma gondii* and preliminary observations on DNA immunity [J]. Chin Med J, 2001, 114(8): 837-840.
- [13] 陈海峰, 陈观今, 郭虹, 等. 弓形虫复合抗原基因 SAG1/ROP1 在大肠杆菌中表达的初步研究[J]. 中国人兽共患病杂志, 2001, 17(2): 8-10.
- [14] 陈海峰, 陈观今, 郑焕钦, 等. 应用核酸原位分子杂交法检测弓形虫 SAG1 抗原基因在免疫小鼠体内的表达[J]. 中国人兽共患病杂志, 2001, 17(3): 13-15.
- [15] 陈海峰, 陈观今, 郑焕钦, 等. 弓形虫表面抗原蛋白基因 SAG1 在骨骼肌中的表达 [J]. 中国人兽共患病杂志, 2001, 17(6):89-91.
- [16] CHEN G J, CHEN H F, ZHENG H Q, et al. Protective effect of DNA-mediated immunization with a combination of SAG1 and IL-2 gene adjuvant against infection of *Toxoplasma gondii* in mice [J]. Chin Med J, 2002, 115(10): 1448-1452.
- [17] CHEN H F, CHEN G J, ZHENG H Q, et al. Induction of immune responses in mice by vaccination with Liposome entrapped DNA complexes encoding *Toxoplasma gondii* SAG1 and ROP1 genes [J]. Chin Med J, 2003, 116(10): 1561-1566.
- [18] 陈海峰, 郑焕钦, 陈观今, 等. SAG1 和 ROP1 混合基因真核表达质粒接种小鼠诱导产生拮抗致死性弓形虫感染的保护性免疫[J]. 热带医学杂志, 2003, 3(1): 15-18.

(编辑 张敏瑞)