

恶性疟原虫 74 肽抗原基因在减毒鼠伤寒沙门氏菌的表达和家兔免疫应答

黄建生 王昌才 任大明* 李全贞** 钟雄林

(第一军医大学分子生物学研究所 广州 510515)

利用减毒鼠伤寒沙门氏菌来表达外源抗原并制备口服活疫苗,是疫苗研究的一个新的突破。作者已在减毒鼠伤寒沙门氏菌 SL3261 以 β -半乳糖苷酶(GZ)融合蛋白的形式表达了人工合成的恶性疟原虫 74 肽基因 HGFC^[1]。现报道用活菌 SL3261(pWRC)(C 组)、SL3261(pWR450-1)(R 组)分别免疫新西兰家兔,研究其在家兔体内免疫应答的结果。

1 材料和方法

1.1 菌株

减毒鼠伤寒沙门氏菌 SL3261 系美国 Stanford 大学 Stocker 教授及何笑松博士所惠赠;SL3261(pWRC)、SL3261(pWR450-1)系本研究所所转化的疫苗菌株^[1]。

1.2 试剂

兔抗 GZ-C 血清、恶性疟原虫抗原(Pf Ag)系第一军医大学热带医学研究所制备^[2];BSA、辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔抗体、 β -半乳糖苷酶(GZ)均购自华美生物工程公司。

1.3 动物

雄性新西兰家兔(约 2.0kg)购自第一军医大学实验动物中心。

1.4 仪器

酶标仪 Mode 450 为美国 BIO-RAD 公司产品。

1.5 免疫方法

分别接种过夜菌 SL3261(pWRC)、SL3261(pWR450-1)于 50ml 的 LB 培养基中,摇至 OD₅₉₀ 约为 0.55,即 1ml 菌液的菌落数约为 10^8 cfu(colony form units)^[3]。2000r/min 离心 10min 收集菌体,用 20ml 的 PBS 洗涤两次,菌体用 10ml 的 PBS 悬浮(约 5×10^8 cfu/ml PBS),并在给菌前 30min 先给予 5%NaHCO₃15ml 以中和胃酸,按 2×10^9 cfu 量免疫,隔周连续免疫四次。其中 C 组家兔两只(C1、C2),R 组及空白对照组(0 组)各一只。

1.6 肠道寄生菌试验

于首次免疫的前三天分别挑取家兔粪便于含氨基青霉素(Ap)的 LB 培养基中培养 2h 后,吸取 20 μ l 涂 Ap LB 平板,培养过夜,再挑取单菌落培养,小量抽提质粒 DNA,以鉴定是否有质粒 pWRC 或 pWR450-1 的存在。

1.7 ELISA 法测定抗体滴度

1.7.1 抗原 GZ-C 的纯化:参照文献[4]。

1.7.2 抗血清的制备:于每次免疫后一周,自家兔的耳静脉采血约 0.5ml,4 $^{\circ}$ C 放置 1~3h,然后 3000r/min 离心 10min,取上清,即为所要抗血清。

* 复旦大学遗传所国家重点实验室,上海 200433。

** 第一军医大学热带医学研究所,广州 510515。

本文于 1995 年 3 月 24 日收到。

1.7.3 用 ELISA 法检测抗体: 参照文献[3]。包被抗原用上述纯化的 GZ-C 或试剂纯 GZ(均配成 1.0mg/ml)或 Pf Ag, 以 1:32 稀释。

1.8 迟发性超敏反应(DTH)

把家兔的背部毛剪去直径约 10cm 的圆形区, 分别用 50μl GZ-C、100μl Pf Ag 及 100μl PBS 以等边三角形注射于家兔皮下。

2 结果

2.1 肠道寄生试验结果

C 组前三天单菌落中含有质粒 pWRC 的比例分别为 4/4、5/12、3/12, R 组(含有 pWR450-1)则分别为 4/5、5/12、4/12, 0 组未见有质粒 pWRC 或 pWR450-1 的存在。

2.2 ELISA 结果

不同抗原包被的 ELISA 滴度值如表 1(滴度值以其倒数表示)。

表 1 重组活菌苗在家兔中免疫应答的 ELISA 滴度

t/week	GZ-C Ag				GZ Ag				Pf Ag			
	C1	C2	R	O	C1	C2	R	O	C1	C2	R	O
1	320	320	320	0	640	1280	640	20	-	-	-	-
2	640	640	640	0	320	640	640	0	-	-	-	-
3	640	640	320	0	640	640	1280	0	-	-	-	-
4	640	640	640	20	160	320	1280	0	-	-	-	-
5	320	320	320	0	160	320	320	0	640	1280	20	0
6	640	1280	640	20	80	320	160	0	640	1280	20	0

注: - 未做。

2.3 迟发性超敏反应结果

疫苗组家兔于注射 Pf Ag 或 GZ-C、载体组家兔于注射 GZ-C 后第一天即出现注射部位红、肿、局部发热等 DTH 反应的体征, 该反应第二天最显著, 反应区直径约 1~2cm, 此后逐渐消退。注射 PBS 处及空白对照组均未见阳性反应。

表 2 活菌苗诱发家兔 DTH 反应结果

组别	Pf Ag	GZ-C	PBS
C1	+	+	-
C2	+	++	-
R	-	+	-
O	-	-	-

3 讨论

减毒鼠伤寒沙门氏菌口服活菌苗主要通过粘膜免疫来刺激粘膜表面下的淋巴组织中的免疫细胞产生相应的体液免疫及细胞免疫, 其刺激产生抗体的水平有可能远大于注射途径, 而且某一粘膜部位被激活的免疫细胞可移行到较远部位, 并在局部及远处产生相应的 IgA 抗体。这种活菌苗的最大优点在于可以把编码其它病原体抗原的基因装配到减毒菌中, 并诱导对载体及其携带抗原的保护性应答, 以提供对多种病原体如肠道致病菌、病毒、原虫、寄生虫等的免疫力, 该方法已经被许多实验证实是安全、方便、可靠的免疫手段^[5-8]。

作者所使用的减毒鼠伤寒沙门氏菌 SL3261 是一种 aroA 基因缺失的减毒株, 是预防沙门氏菌病的极好口服菌苗。作者以 β-半乳糖苷酶融合蛋白的形式在 SL3261 中较好地表达了人工合成的含有恶性

疟原虫多个表位的基因 HGFC, 并已初步证实其具有抗原性^[1]。

活菌苗免疫家兔后发现, 用不同的抗原包被时, 于免疫后第一周即可诱发一定滴度的抗体水平, 并在加强免疫一次后有所升高, 但继续加强免疫两次则未见滴度升度, 滴度最高可达 1:1280, 其中载体组与疫苗组滴度无显著差异, 可能由于融合蛋白中 GZ 所占的比例极大 (>90%), 抗体水平主要是针对 GZ 所诱发的缘故。免疫后的兔血清可特异识别 Pf Ag, 疫苗菌免疫家兔后可产生针对 Pf Ag 及 GZ-C 的 DTH 反应, 表明作者所表达的融合抗原含有针对恶性疟原虫的表位。研究表明活菌苗可特异地刺激家兔产生特异的体液免疫及细胞免疫。

肠道寄生试验表明, 该活菌苗可在体内寄生, 但随着时间的延长而减少, 这是由于该活菌苗为营养缺陷型, 在活体内很难获得充足的赖以生存的养分而继续存活。另一个原因是在体内无抗生素的选择压力, 重组质粒可分离出减毒株而导致重组菌株的不稳定, 尽管在体外培养发现其相当稳定。免疫后未见家兔有腹泻、厌食等症状, 在第六周处死家兔解剖后, 也未见肝、脾、肾及肠系膜淋巴结肿大, 表明了该活菌苗的安全性。

至于抗血清滴度水平并不太高, 可能与抗原刺激家兔的免疫系统较弱, 活菌苗在体内寄生的时间较短等有关。目前作者正在使用分泌型的表达载体来表达该基因, 以期获得更好的免疫效果。

参 考 文 献

- [1] 黄建生, 李全贞, 王昌才, 等. 寄生虫学与医学昆虫学报, 1995, 2(3): 129~135.
- [2] 李全贞, 李英杰, 欧阳明辉, 等. 免疫学杂志, 1990, 6(4): 284~286.
- [3] 黄建生, 王昌才, 任大明. 中国人兽共患病杂志, 1995, 11(4): 19~23.
- [4] 陈仕荣, 王昌才, 钟雄林, 等. 中国寄生虫病防治杂志, 1994, 7(1): 10~13.
- [5] Brown A, Hormaeche C E, Hormaeche R D *et al.* *J Inf Dis*, 1987, 155: 86~92.
- [6] Scodel F, Milich D R, Will H. *J Immunol*, 1990, 145(12): 4317~4321.
- [7] Newton S C, Kotb M, Poirier T P *et al.* *Inf Immunity*. 1991, 59: 2158~2165.
- [8] Elzbicita K, Jagusztyn K, Josephine E *et al.* *Inf Immunity*, 1993, 61(3): 1004~1015.

IMMUNOGENICITY OF RECOMBINANT *S. TYPHIMURIUM* EXPRESSING A HYBRID ANTIGEN OF *PLASMODIUM FALCIPARUM*

Huang Jiansheng Wang Changcai Ren Daming Li Quanzhen Zhong Xionglin

(Institute of Molecular Biology, First Military Medical University, Guangzhou 510515)

Abstract We have expressed a 74-peptide hybrid *Plasmodium falciparum* antigen as fusion protein in attenuated *Salmonella typhimurium* SL3261. Live organisms were orally immunized Rabbits with a dose of 2×10^9 cfu. Specific anti-serum were detected by ELISA after immunization. Obvious Delayed type hypersensitivity (DTH) could be induced by Pf Ag and GZ-C antigen. The recombinant vaccine had no evident side-effects to the hosts. Our studies indicate that attenuated *Salmonella typhimurium* SL3261 can express synthetic *P. falciparum* antigen with several epitopes and live organisms can activate special cell-mediated immunity and humoral immunity.

Key words Attenuated *Salmonella typhimurium*, *Plasmodium falciparum*, Oral live vaccine, Immune response