# 抗日本血吸虫 pVAX1/ SjHGPRT·SDISP 多价疫苗的构建方法探讨 *

罗四维[1] 汪世平[2]

(1 永州职业技术学院基础医学系 湖南 永州 425000;2 中南大学湘雅医学系寄生虫学系 湖南 长沙 410078)

**摘要** 目的：探讨抗日本血吸虫生殖产卵编码基因多价疫苗 pVAX1/ SjHGPRT·SDISP 的构建方法并从基因与蛋白水平验证该构建方法是否成功。方法：分别以 pcDNA3.0/SjHGPRT、pcDNA3.0/SjSDISP 为模板，设计引物扩增 SjHGPRT、SjSDISP，采用 overlap 方法扩增全长 SjHGPRT·SDISP。将纯化后的产物 SjHGPRT·SDISP 以及 pVax1 质粒采用 *Kpn* I 和 *Xba* I 双酶切，1%低熔点胶回收目的 DNA 片段以及酶切后 Pvax1 载体片段双胶连。连接产物转化至 DH5α 细胞。挑选阳性克隆采用双酶切以及测序方法从基因水平鉴定是否构建成功。将构建产物免疫观察动物，采用免疫组化方法从蛋白水平鉴定疫苗 pVAX1/ SjHGPRT·SDISP 是否构建成功。结果：酶切方法以及测序结果均显示重组质粒的插入序列分别与目的基因完全一致，昆明小鼠肌肉组织酶免疫组织化学染色显示免疫组小鼠肌细胞中呈现较强的棕黄色颗粒，而阴性对照组肌细胞呈阴性。结论：真核重组质粒 pVAX1/SjHG- PRT·SDISP 构建成功，且在昆明鼠肌肉细胞内能够获得良好的表达。

**关键词**：血吸虫；pVAX1/ SjHGPRT·SDISP；多价疫苗；构建

**中图分类号**：R383.24 **文献标识码**：A **文章编号**：1673-6273(2011)19-3629-03

# Construction Method of Multivalent DNA Vaccine pVAX1/ SjHGPRT · SDISP Against Schistosoma Japonicum*

*LUO Si-wei[1], WANG Shi-ping[2]*

*(1 Basic medicine department, Yongzhou vocational technical college, Yongzhou, Hunan province, 425000China.*

*2 Department of Parasitology, Xiangya school of medicine, central south university, Changsha 410078, China)*

ABSTRACT Objective: To explore the method to construct the multivalent DNA vaccine pVAX1/ SjHGPRT·SDIS and certify whether this method was successful at both gene and protein level. Methods: SjHGPRT and SjSDISP were amplified with the templates of pcDNA3.0/SjHGPRT and pcDNA3.0/SjSDISP. Full-length SjHGPRT·SDISP were amplified by overlap method. The purified products SjHGPRT·SDISP and plasmid pVax1 were digested with *Kpn* I and *Xba* I. 1% low melting Gel was used to collect the fragments of DNA and make the carriers' fragments of Pvax1 glue together after digestion. The ligated product was transformed into DH5α cell. Positive clones were screened to confirm whether the construction is successful at gene level with the method of digestion and sequencing. Use the products of construction to immune and observe animals and confirm whether the construction of vaccine pVAX1/ SjHGPRT·SDISP was successful with the method of immunohistochemical staining. Results: Restriction enzyme digestion and sequencing results showed that the inserted sequence of the recombinant plasmid is completely the same with the target gene. Result of immunohistochemistry showed intense brown particles appeared in the muscle cells of Kunming mise immuned with the multivalent vaccine, while no specific fluorescence or brown particles appeared in muscle of the control groups. Conclusions: The pVAX1/ SjHGPRT·SDISP was successfully constructed, which may be well expressed in the muscle of vaccined mice.

Key words: Schistosoma japonicum; PVAX1/ SjHGPRT·SDISP; Multivalent vaccine; Construction

Chinese Library Classification: R-332, R322.61 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2011)19-3629-03

## 前言

血吸虫病是一种具有流行范围广、危害大、具有较高的传染效能的人畜共患的寄生虫病。目前，在亚、非、拉丁美洲等 76 个国家与地区均有着广泛的发病。全球的发病人群数量达到 2 亿，每年造成上百万患者的死亡。在我国，血吸虫主要分布在长江流域及其以南的 12 个省、市、自治区[1-2]。长期以来，大规模的人畜同步化疗以及易感地带灭螺使得我国的血吸虫防治工作取得了较好的成效。但是，由于血吸虫的宿主种类多样，且长期化疗药物的使用伴随的耐药现象的发生，使得我国的血吸虫防治工作进入了一个徘徊阶段。针对血吸虫的自身特点，设计特异性的疫苗被认为是有效控制和阻断血吸虫传播的最有效策略之一[3-5]。近十年来，有关血吸虫疫苗的研究也已经成为我国防治血吸虫相关科学研究工作的重点内容之一。本研究是前期研究的进一步深入，前期研究我们借助蛋白质组学等方法，鉴定出 10 个与血吸虫免疫相关的抗原分子，其中两个相关抗原

* 基金项目：国家重点基础研究发展(973)计划(No. 2007CB513108)；国家科技支撑计划(No. 2009BAI78B05)；湖南省血吸虫病免疫与传播控制重点实验室、湖南省重点学科建设专项经费(No. 07-985-2)

作者简介：罗四维(1979-)，女，硕士研究生，从事病原生物及免疫学教学

(收稿日期：2011-05-18 接受日期：2011-06-12)

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

被分别证明与次黄嘌呤 - 鸟嘌呤磷酸核糖转移酶 (HGPRT) 和琥珀酸脱氢酶铁硫蛋白 (SDISP) 相关。研究发现 HGPRT 是一种在血吸虫体内有很高活性、与血吸虫的生长发育密切相关，且与嘌呤核苷酸合成替代途径中起重要作用的关键酶。SDISP 作为细胞三羧酸循环限速酶 (琥珀酸脱氢酶) 的亚单位成份，主要参与血吸虫能量代谢过程[6-7]。虽然已经明确上述两种酶与血吸虫的生理代谢关系密切，但是由于从虫体获取足够的日本血吸虫 SjHGPRT 和 SjSDISP 天然成分作为研究材料十分困难，不可避免地制约了其在实际中的应用。因此，通过基因工程的方法，将 SjHGPRT、SjSDISP 的编码基因以 " 串联 " 方式插入到同一人用载体 pVAX1 上，构建多价共表达 DNA 疫苗 pVAX1/ SjHGPRT·SDISP 具有及其的研究价值。本研究旨在前期研究的基础上，探讨构建共表达的 DNA 疫苗的方法，并通过基因与蛋白水平验证构建方式的合理性，为进一步开发相关铲平提供前期研究基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒与菌株

pcDNA3.0/SjHGPRT、pcDNA3.0/SjSDISP、真核表达载体 pcDNA3.0、宿主菌 E.coli DH5α 均由湖南省血吸虫病免疫与传播控制重点实验室保存。真核表达载体 pVAX1 由军事医学科学院基础研究所于继云研究员惠赠。

### 1.2 引物

扩增 SjHGPRT 编码基因引物：上游引物为 Hp1：5'GCGGTACCATGTCTGGTGTTATGAAAAG 3'KpnI，下游引物为 Hp2：5'TCGGGCCCTTAAACTGATTTCGGCACAC 3'ApaI，扩增 SjSDISP 编码基因引物：上游引物 Sp1：5'GCGGTACCATGCTGAAGTCTCTATCTAC 3'KpnI，下游引物 Sp2：5'TAGGGCCCTCAGTCAGTTCTTGTCTCCG 3'ApaI，扩增 SjHGPRT·SDISP 编码基因引物：LINKER F：5' ACCTTGTGTGCCGAAATCAGTTATGCTGAAGTCTCTATCTACTTTGCA 3'，LINKE R：5'TGGAACACACGGCTTTAGTCAATACGACTTCAGAGATAGATGAAACGT 3'，HGPRT F：5' CGGGGTACCATGTCTGGTG TTATGA 3' KpnI；SDISP R：5' TGCTCTAGATCAGACAGTTCTTGTCTC 3' XbaI；HGPRT R：5' TGCTCTAGATTAAACTGATTTCGGCACACAAGG 3' XbaI；SDISP F：5' CGGGGTACCATGCTGAAGTCTCTATCTACTT 3' KpnI。

### 1.3 采用 overlap 法扩增全长 SjHGPRT·SDISP

分别使用 Linker F 引物和 HGPRT R 引物扩增出 HGPRT 基因，使用 Linker R 引物和 SDISP R 引物扩增出 SDISP 基因。通过使用等量的两个基因的作模板，以 HGPRT -F 和 SDISP-R 引物扩增全长。扩增条件：95℃ 预变性 5min；94℃ 变性 20s，62℃ 退火 30s，72℃ 延伸 1min；共 30 个循环；72℃，10min，4℃保存。采用 Takara 回收试剂盒回收目的片段。

### 1.4 pVAX1/ SjHGPRT·SDISP 重组质粒构建

提取质粒 pVAX1，纯化后与 SjHGPRT·SDISP 采用 Kpn I 和 Xba I 双酶切，纯化。1%低熔点胶回收目的 DNA 片段以及酶切后 Pvax1 载体片段双胶连。载体与目的基因在 T4 连酶作用下 16℃连接过夜，取感受态细胞转化。挑选阳性克隆 37℃摇菌过夜，进行 PCR 和双酶切鉴定。并通过测序鉴定。

### 1.5 免疫组化鉴定

9 只昆明小鼠分为 3 组，A 组 pVAX1/SjHGPRT·SDISP 多价疫苗组；B 组为为 pVAX1 对照组；C 组为生理盐水。每组注射相应质粒 / 生理盐水各 100μg/100μL，注射部位为左后腿股四头肌。2 周后取注射部位肌肉组织，4%中性甲醛 4℃固定过夜，石蜡包埋、切片，然后进行酶免疫组织化学检测，除一抗为本室自备的日本血吸虫感染兔抗血清 (1:500，37℃ 2h) 外，其他操作均按试剂盒说明书或常规方法进行。

## 2 结果

### 2.1 SjHGPRT 和 SjSDISP 的拼接与 SjHGPRT·SDISP 的扩增

SjHGPRT、SjSDISP 拼接后扩增，1.0%琼脂糖凝胶电泳分析可见大小约 1533bp 的 PCR 扩增带 (图 1) 。

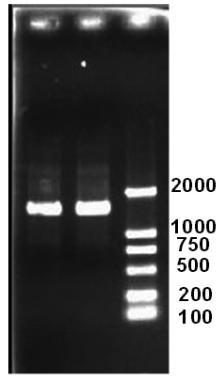



图 1 SjHGPRT·SDISP 的拼接及扩增 (SOE-PCR)

Fig.1 SOE -PCR of SjHGPRT·SDISP

M：DNA marker；1, 2：SOE-PCR products of SjHGPRT·SDIS

### 2.2 重组质粒的构建与鉴定

纯化后的 SjHGPRToSDISP 基因定向克隆入载体，构建重组质粒。以重组质粒进行目的基因扩增，获得的基因片段与预设一致。pVAX1/SjHGPRT·SDISP 经限制性核酸内切酶 *Kpn* I 和 *Xba* I 双酶切，在 1533bp 处可见清晰的条带 (图 2) 。测序结果显示，预期目的基因经 NCBI 在线比对后显示插入片段与目的基因 SjHGPRT 和 SjSDISP ORF 完全一致，其同源性分别达到 100%和 99%，证明 pVAX1/SjHGPRT·SDISP 重组质粒构建成功。

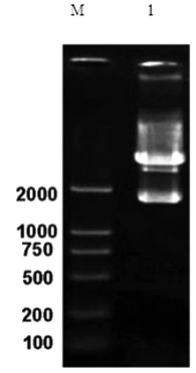



图 2 重组质粒 pVAX1/SjHGPRT·SDISP 双酶切鉴定

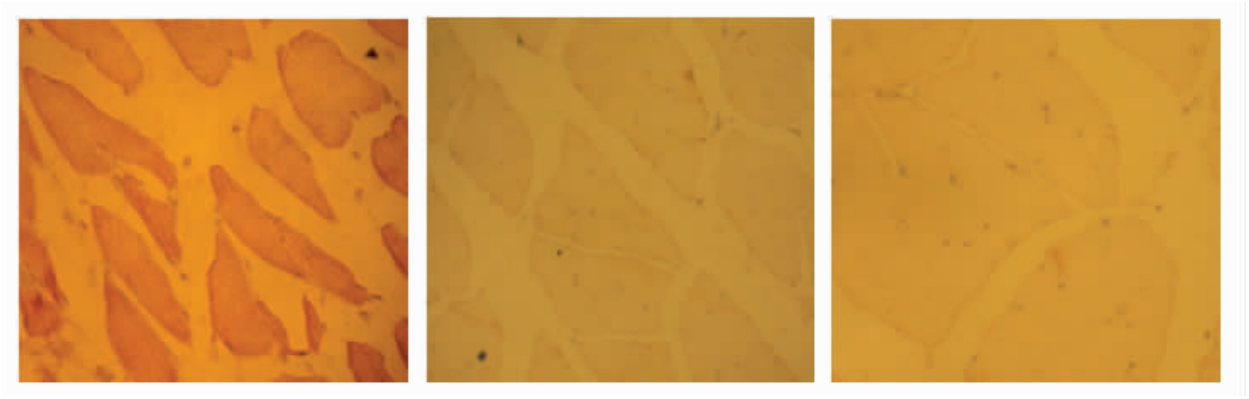
Fig.2 The digestions identification of recombinant plasmid pVAX1/SjHGPRT·SDISP

M：DNA marker 1：pVAX1/SjHGPRT·SDISP

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.3 免疫组化结果

取免疫动物的相应肌肉组织切片进行免疫组化结果显示，疫苗处理小鼠的肌细胞中呈现较强的棕黄色科里，对照组呈阴性反应（图 3）。



A：pVAX1/SjHGPRT 组　　B 空质粒 pVAX1 组　　C 生理盐水组；

图 3 pVAX1/SjHGPRT·SDISP 在小鼠肌肉细胞的表达（酶免疫组织化学染色,X100）

Fig.3 The expression of pVAX1/SjHGPRT·SDISP in muscle cells of mice (enzyme immunohistochemical staiing,X100)

## 3 讨论

近期的研究发现，血吸虫缺乏嘌呤核苷酸的从头合成所需要的多种酶类。因此，其体内的嘌呤核苷酸的合成主要通过替代途径来间接完成。参与嘌呤核苷酸的替代合成途径中，HGPRT 是一种具有高度保守性，且作用关键的合成酶。以上的研究结果提示，HGPRT 在血吸虫的核苷酸循环以及后续的生长发育过程中具有举足轻重的作用。介于以上的背景信息，我们有理由香型 HGPRT 是一种血吸虫疫苗研发过程中具有及其重要价值的候选分子。琥珀酸脱氢酶铁硫蛋白（SDISP）的功能明确其在细胞的能量代谢过程中发挥重要的作用。我们知道，血吸虫的童虫阶段各方面均表现较为脆弱，此时的段琥珀酸脱氢酶铁硫蛋白表达水平虽然有所下降，但降幅理应不是很大；加上转型期虫体各方面平衡还未完全建立，是疫苗应用的最好时期。因此，构建 pVAX1/SjHGPRT·SDISP 具有及其重要的理论价值以及推广应用前景[8]。

DNA 疫苗的推广与应用，得益于其可持续诱导体液与细胞免疫的特点，同时具有较好的安全性。DNA 疫苗的免疫力低下一直是目前相关领域研发的瓶颈。由此，选择多价疫苗进行相关的构建方法探索，具有较强的针对性与现实价值[9-10]。本次研究选用 pVAX1 载体是一种常用的真核载体，在兼具卡那霉素抗性的同时，有效的去除了与研发目的不必要的序列，并减少了可能与人类基因同源的 DNA 序列，较好的规避了染色体整合的可能性。本次研究，旨在探讨采用 pVAX1 这一合适的载体构建 pVAX1/SjHGPRT·SDISP 的多价 DNA 疫苗方法，通过双酶切以及动物免疫的方式，观察目的疫苗的构建是否成功。结果显示本次构建的目的片段长度与预期一致，且通过测序分析进一步证明了构建方法的合理性。动物免疫的结果显示，在免疫动物的肌肉组织中，目的疫苗能够很好的表达。本次构建的成功，为后续进一步的探讨该多价疫苗在发挥预防与治疗血吸虫疾病领域奠定了坚实的基础，为后续研究铺平了道路。

参 考 文 献(References)

[1] McManus DP, Li Y, Gray DJ, et al. Conquering 'snail fever': schistosomiasis and its control in China [J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2009, 7 (4): 473-485

[2] Gray DJ, Williams GM, Li Y, et al. Transmission dynamics of Schistosoma japonicum in the lakes and marshlands of China [J]. PloS One, 2008, 3 (12): e4058

[3] Guidi A, Andolina C, Makame Ame, et al. Praziquantel efficacy and long-term appraisal of schistosomiasis control in Pemba Island [J]. Trop Med Int Health, 2010, 15 (5): 614-618

[4] Tchuente LA, Shaw DJ, Polla L, et al. Efficacy of praziquantel against Schistosoma haematobium infection in children [J]. Am J Trop Med Hyq, 2004, 71 (6): 778-782

[5] Keiser J, N'Guessan NA, Adoubryn KD, et al. Efficacy and safety of mefloquine, artesunate, mefloquine-artesunate, and praziquantel against Schistosoma haematobium: randomized, exploratory open-label trial [J]. Clin Infect Dis, 2010, 50 (9): 1205-1213

[6] Yu Jun-Long, Wang Shi-Ping, Dai Gan, et al. Construction of the Eukaryotic recombinant vector for succinate dehydrogensae iron-sulfur protein of Schistosoma japonicum Chinese strain and its protective immunity in mice [J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2007, 23 (2): 110-114

[7] Yu Jun-Long, Wang Shi-Ping, He Zhuo, et al. Construction of the eukaryotic recombinant plasmid for hypoxanthine-guanine phosphoribosyitransferase of Schistosoma japonicum Chinese strain and its immunoprotection in mice [J]. Chinese Journal of Microbiology and Immunology, 2007, 25 (6): 565-569

[8] Yu Jun-Long, Wang Shi-Ping, He Zhuo, et al. Cloning, expression and immunization of the hypoxanthine-guanine Phosphoribosyltransferase for Schistosoma japonicum Chinese Strain [J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2006, 33 (7): 665-672

[9] McManus DP, Loukas A. Current status of vaccines for schistosomasis [J]. Clin Microbiol Rev, 2008, 21 (1): 225-242

[10] Li C, Yu L, Liu Z, et al. Schistosoma japonicum: the design and experimental evaluation of a multivalent DNA vaccine [J]. Cell Mol Biol Lett, 2006, 11 (4): 449-460

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net