

封面式樣

計畫編號：DOH90-DC-1055

行政院衛生署疾病管制局九十年年度委託研究計畫

# 台灣地區日本血吸蟲病之檢驗監測

(計畫名稱)

## 委託研究成果報告

執行機構：國立陽明大學寄生蟲學研究所

研究主持人：李金木

研究人員：

執行期間：90年04月02日至90年12月31日

# 目 錄

	頁 碼
封面	
目錄	(1)
壹、中文摘要	(2)
貳、英文摘要	(3)
參、本文	
一、前言	(4-6)
二、材料與方法	(7-9)
三、結果	(10-11)
四、討論	(12-13)
五、結論與建議	(14)
六、參考文獻	(15-18)
七、圖、表	(19-26)
肆、附錄	

共 (26) 頁

行政院衛生署疾病管制局委託研究計畫原始數據資料庫

資料讀我檔案

計畫名稱：台灣地區日本血吸蟲病之檢驗監測

計畫編號：DOH90-DC-1055

執行機構：國立陽明大學寄生蟲學研究所

計畫主持人：李金木

計畫主持人服務單位：國立陽明大學寄生蟲學研究所

計畫主持人職稱：副教授兼所長

研究報告中文摘要：

本研究計畫之目的在開發專一性之日本血吸蟲病免疫診斷檢驗試劑，監控政府與對岸三通後，可能被引進的重大寄生蟲疾病。其目標在防止大陸地區之日本血吸蟲病在台灣地區的發生及流行並藉此發展高品質的防疫檢驗技術，提昇國內防疫工作的專業化及效率。本研究成功運用 RT-PCR 及雙限制酶切位技術將大陸湖北株日本血吸蟲 26KDa GST cDNA 轉殖到 pQE31 載體之 BamH1/Kpn1 限制酶切位間，並予以基因定序，確定插入表現之 cDNA 片段無誤，將此載體轉形至 M15 大腸桿菌細胞中，確認此載體可大量表現出重組蛋白。native GSTs 及 rGST 重組蛋白之免疫血清，均可清楚辨識該天然及重組蛋白 26KDa GST。兩組免疫組血清均產生與對照組具顯著差異的 IgG 抗體，且抗體力價相似。又以大陸湖北株日本血吸蟲 native GSTs 或 26KDa rGST 多次免疫小鼠後，所獲得對大陸湖北株日本血吸蟲感染之保護效果統計上亦無差別，顯示本研究成功開發之重組蛋白與天然蛋白於免疫特性上無差異。此檢測試劑能大量純化已符合作為日本血吸蟲診斷試劑之條件。

中文關鍵詞(至少三個)：日本血吸蟲病；反轉錄聚合酶連鎖反應；免疫診斷與監測

Research Data Archive, Center for Disease Control, Department of Health, Taiwan, R.O.C.  
Readme file

Project Title: The immunodiagnosis and control for schistosomiasis japonica in Taiwan

Project Number: DOH90-DC-1055

Executing Institute: National Yang-Ming University

Principal Investigator(P.I.): Kin-Mu Lee

P.I. Position Title: Associate Professor and Director

P.I. Institute: Department and Institute of Parasitology

Abstract:

This study reports the efficacy of an immuno-diagnostic antigen, the 26 KDa glutathione S-transferase ( 26 KDa GST ), obtained from a Chinese strain of *Schistosoma japonicum* . The cDNA of 26 KDa GST from the total RNA of adult worm was synthesized and amplified by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction ( RT-PCR ), followed by the subcloning and sequencing. The recombinant protein of 26 KDa GST were then expressed in *Escherichia coli* strain M15. The results showed that sera from the mice immunized with either the native GSTs or recombinant GST26 can recognize the recombinant GST26 and native GSTs. The level of anti 26 KDa GST IgG antibody in immunized mice was significant higher than in the adjuvant and normal controls. The protective immunity in mice immunized with purified native GSTs or recombinant GST26, then challenged with cercariae, both showed similar worm reduction rate. These results indicated that this antigen of potential diagnostic value can be purified in large quantities through suitable expression vector, suggesting that this protein may be a good candidate for early and accurate clinical diagnosis of schistosomiasis japonica.

Keyword: schistosomiasis japonica ; RT-PCR ; immunodiagnosis and control

## 前 言

在寄生蟲所造成的疾病中，血吸蟲病 (schistosomiasis) 為一重要的寄生蟲感染症。根據世界衛生組織(WHO)的統計，全世界約有 74 個國家，2 億的人口受到此疾病的感染。在開發中國家更有 5-6 億人口遭受到血吸蟲病的威脅 (Bergquist, 1987; Crompton, 1999)。人體常見的三種血吸蟲病為日本血吸蟲病、曼氏血吸蟲病及埃及血吸蟲病，其中以日本血吸蟲所造成的病變最嚴重。日本血吸蟲為人畜共通寄生蟲，流行於亞洲國家包括日本、印尼、菲律賓、台灣及中國大陸等地，但台灣株日本血吸蟲只感染動物，不感染人。本實驗室最近幾年陸續對台灣株日本血吸蟲做過一系列之研究，如血吸蟲對中間宿主的感染力報告 (Lee et al., 1992; Lo and Lee, 1995) 及應用 RAPD 技術 (Lee et al., 1995)、粒腺體 12S rRNA 基因定序 (Tien et al., 1995) 等方式分析台灣與大陸株日本血吸蟲間之遺傳差異。結果顯示在 DNA 的分子層次上，台灣的動物株不同於其他大陸株日本血吸蟲，彼此間具有明顯之遺傳差異。最近本實驗室運用反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR) 技術合成台灣株日本血吸蟲 26KDa GST 之 cDNA，加以選殖並定序，且於大腸桿菌中表現出其重組蛋白，經由免疫保護力實驗結果證實以蟲體純化之 GST 及重組 26KDa GST 免疫小鼠，兩組之保護力並無差異 (Lee et al., 1996)。此結果顯示 26KDa GST 為一良好之免疫抗原，能誘發良好之免疫反應。

日本血吸蟲之 26KDa GST 抗原是在研究對日本血吸蟲具天然抗性鼠 WEHI 129/J 時發現的，該小鼠能抵抗日本血吸蟲之慢性感染症 (Garcia et al., 1983)，由於這些具抗性鼠所獲得的血清經免疫沈澱分析後可辨認日本血吸蟲之一分子量為 26KDa GST 的分子 (Mitchell et al., 1984, 1985)，經序列比對及酵素活性測試，證實此 26KDa GST 的分子屬 GSTs 之同功異構酶 (Smith et al., 1986)。此外另一群研究曼氏血吸蟲的人員發現在該蟲的童蟲具有一分子量大約為 28KDa GST 的主要表面蛋白 (Balloul et al., 1985)，且利用此分子對大白鼠進行保護力測試，可獲得 67% 的保護力 (Balloul et al., 1987)。此 28KDa 之分子隨後亦經實為 GSTs 同功異構酶 (Taylor et al., 1988)。不論是曼氏或日本血吸蟲之 GSTs 實際上均包含了兩個不同分子量大小的同功異構酶。在曼氏血吸蟲 28KDa GST 雖為一良好之免疫原，但對日本血吸蟲而言，其良好的免疫原不是 28KDa GST 而是 26KDa GST。

26KDa GST 曾在不同動物模式下被測試其滅蟲率，例如應用菲律賓株日本血吸蟲 $\beta$ -galactosidase-Sj26 fusion protein 及 recombinant Sj26 在小鼠上，分別獲得 30-43% (Smith et al., 1986; Mitchell et al., 1988) 及 57% (Mitchell et al., 1988) 的滅蟲率。Liu 等人(1993)利用大陸株蟲體純化之 Sj26-28GST 及菲律賓株基因重組之 26KDa GST 免疫小鼠後感染大陸株之日本血吸蟲得到 26.2-32.5% 之保護效果。在綿羊蟲體純化 GSTs 之檢蟲率為 36% (Xu et al., 1995)。此外，用曼氏血吸蟲之研究發現，28KDa GST 除了能降低成蟲之存活率外，對雌蟲之產卵率（下降約 50%）及蟲卵孵化率（下降約 30-50%）均有影響(Boulanger et al., 1991; Xu et al., 1991, 1993)。

日本血吸蟲病為大陸地區最嚴重之寄生蟲病之一，保守估計目前在大陸地區至少有數百萬人受到感染，每年造成家畜和家禽的死亡更是不計其數(Ross et al., 1997)。其流行區域涵蓋長江流域沿岸及其以南地區包括湖南、湖北、江西、安徽、浙江、四川、江蘇、雲南等省。最近幾年大陸長江流域洪水氾濫，導致地區釘螺擴散，加上三峽水庫的建造，往後更易造成血吸蟲病大流行。台灣同胞現每年赴大陸地區從商、探親、觀光之人數已將近三百萬人次，因此感染大陸株日本血吸蟲的機會很高。目前兩岸之間走私風氣猖獗，一些不法集團可能經由走私管道將牲畜運進台灣，導致病原引進。此外，政府近十年來陸續從印尼、泰國、菲律賓等國引進數十萬外勞，這些外勞輸入國都是日本血吸蟲病的重要流行疫區。台灣與中國大陸已同時於今年加入 WTO，兩岸間即將正式開放通商、通航，此舉對國內的衛生及防疫工作而言，無疑是一項重大挑戰。

台灣早年在宜蘭、彰化等地亦曾有日本血吸蟲病的流行，最近一次流行發生在 1986 年。雖然台灣株日本血吸蟲病截至目前為止沒有人類感染之報告，但台灣地區之釘螺(*Oncomelania hupensis*, 日本血吸蟲之中間宿主) 皆相繼被證實能感染不同地區人株(含日本、菲律賓、中國大陸)之日本血吸蟲(Lee et al., 1982; Lee and Fan 1982)。已知本省 10 縣(台北、宜蘭、花蓮、新竹、彰化、南投、嘉義、雲林、台東、高雄) 均可見釘螺之分佈。而流行於對岸中國大陸最嚴重的寄生蟲疾病-日本血吸蟲症，其傳染及致病力遠遠大於台灣本土性的日本血吸蟲症。前述流行病學上之有利因素顯示日本血吸蟲病在台灣暴發之可能性。為避免此病原一旦被引進台灣，造成人畜生命及國家經濟的嚴重損失，研發快速精確的免疫檢驗試

劑，提昇國內對此重大寄生蟲病的防疫技術，以期早期發現，迅速治療，將能達到監控此重大傳染病在國內的發生及傳播。

## 材料及方法

### 一、寄生蟲取得與實驗動物感染

大陸株日本血吸蟲來自中國湖北省（稱為大陸湖北株），在實驗室中以邱氏釘螺（*Oncomelania hupensis chiui*）或台灣釘螺（*O. h. formosana*）及 8-10 週齡 C57BL/6J 近親交配品系小鼠維持其生活史。實驗小鼠購自國科會實驗動物中心。小鼠於感染日本血吸蟲尾動幼蟲 6-8 週後將小鼠犧牲，以靜脈灌注法將成蟲沖出，並以磷酸緩衝液清洗，立即用於麩氨基硫 S-轉移酶（GST）蛋白純化或 Total RNA 的抽取。另從四川省寄生蟲病防治所獲得大陸安徽株之日本血吸蟲，同樣抽取其 Total RNA 備用。

### 二、麩氨基硫 S-轉移酶（GST）蛋白的純化

取 1,000 隻大陸湖北株日本血吸蟲雄性成蟲，以 PBS 清洗，去上清液。將蟲體加入 5ml 研磨蟲體緩衝液（PBS 溶液，內含 0.5% Triton X-100, 1mM PMSF），並予以混合，再凍入液態氮中 2-3 分鐘，移置溫水中解凍，重覆循環 3-5 次（Pearce et al., 1988）。將蟲體倒入玻璃質研磨器中研磨至蟲體粉碎，再使用超音波粉碎機使蟲體均質化，經 4°C 離心 14,000 rpm 20 分鐘，保留上清液，並通過 0.45  $\mu$ m filter（Schleicher & Schuell），移入 15 ml 離心管中，加入 2ml Glutathione agarose-beads（Sigma）混合（Smith & Johnson., 1988）。將離心管置於旋轉混合器上 20 分鐘，離心 2,000 rpm 3 分鐘，去上清液，加入 10ml PBS，再離心 2,000 rpm 3 分鐘，去上清液，加入 2-3ml PBS，移入管柱中，並續以 10ml PBS 清洗。加入 5ml elute buffer 將天然 GST（native GSTs）沖出，並收集之。天然 GST 需再以 pH7.2 之 PBS 透析，進行濃縮，測濃度，以 13.5% SDS-PAGE 進行電泳分析，檢視純化產物。

### 三、蟲體 Total RNA 的製備

利用 Trizol system（Life Technologies）進行 total RNA 製備。各取約 50 隻大陸湖北株及安徽株日本血吸蟲雄性成蟲，加入 0.2ml Trizol 試劑，在冰上以無菌之塑質研磨杵均質化後，再加入 Trizol 試劑，使總體積達 1ml，室溫靜置 5 分鐘，於 4°C 以 10,000 rpm 離心 15 分鐘，取上層液加入 200  $\mu$ l 氯仿並予混合並離心後保留上清液，以去除蛋白質及 DNA，加入 500  $\mu$ l 異丙醇（isopropanol）離心將 RNA 沉澱，再以 75% 乙醇清洗沉澱物，再離心並去上層液，以真空乾燥器乾燥後加入 30-50  $\mu$ l DEPC 水（二次水以 0.02% DEPC 處理後高壓滅菌）溶出 RNA，將溶出之 RNA 稀釋，測量其 OD<sub>260nm</sub> 之吸光度，並估算其濃度。

### 四、反轉錄-聚合酶鏈反應（RT-PCR）

各取 5  $\mu$ g 的大陸湖北株及安徽株日本血吸蟲 total RNA（柳, 1996）於 70°C 5 分鐘，再置於冰上 5 分鐘，室溫 5 分鐘後加入反轉錄聚合酶反應混合試劑內含 reverse transcriptase（MuLV）1  $\mu$ l、RNase inhibitor 1  $\mu$ l、Random hexamer 1  $\mu$ l、0.25mM dNTP、0.1M DTT 及 10X reverse transcriptase buffer 2.5  $\mu$ l，反應體積約 25  $\mu$ l，



滴入礦物油後置入 PCR 儀器中 (HYBAID Omini Gene, Hybaid) 中作用 37°C 60 分鐘、90°C 5 分鐘，然後置於冰上冷卻 5 分鐘，加入三次水 175  $\mu$ l 使總體積為 200  $\mu$ l，可凍於 -20°C 中保存或取 10  $\mu$ l 做聚合酶鏈反應。反應所用引子參考菲律賓株日本血吸蟲 26KDa GST 基因序列設計而得：PH1 5'-TAG GTA ACT TGG TCA TGT CCC CTA-3'；PH2 5'-TTT ATT TTG GAG GAT GGT CGC CAC-3' (由拜瑪仕公司合成)。取 10  $\mu$ l cDNA、1X PCR Buffer、0.25mM dNTP、10 pmole PH1 primer、10 pmole PH2 primer 及 1unit Taq polymerase，以無菌水將總體積補至 50  $\mu$ l，滴入礦物油後置於 PCR 儀器中作用。反應條件設定為：94°C 變性反應 30 秒；65°C 黏合反應 40 秒；72°C 合成反應 45 秒，經 30 次反應週期，再於 72°C 反應 10 分鐘，待溫度降至室溫後，以 2% 瓊脂凝膠電泳分析終產物。

#### 五、大陸湖北及安徽株日本血吸蟲 26KDa GST cDNA 基因序列分析

將前項 PCR 產物以 ABI PRISM 337-96 DNA Sequencer (Perkin-Elmer, CA, USA) 進行 DNA 序列分析。

#### 六、pQE/SjCH26GST 表現載體之建構

為了表現所選殖之大陸湖北株日本血吸蟲 26KDa 麩氨基硫 S-轉移酶 (SjCH26KDa GST)，我們選用 QIAexpress System (Qiagen Inc.) 中的 pQE31 質體作為蛋白表現載體。為了能使 SjCH26KDa 的 GST 成功的轉殖入 pQE31 質體，我們利用具有 *Bma*HI、*Kpn*I 兩種限制酵素切位之引子：PH1.2 5'-CGG GAT CCC GTC ATG TCC CCT ATA CTA GGT TAT-3' (底線處為 *Bma*HI 限制酵素切位)；PH2.2 5'-GGG GTA CCC CTT TAT TTT GGA GGA TGG TCG CCA-3' (底線處為 *Kpn*I 限制酵素切位) (由拜瑪仕公司合成)，以步驟三所獲得之大陸湖北株日本血吸蟲 26KDa GST cDNA 片段作為聚合酶鏈反應之模板 (反應條件同 PH1、PH2 primer)，所得的聚合酶鏈反應產物與 pQE31 載體分別以 *Bma*HI 及 *Kpn*I 限制 (New England BioLabs, Inc.) 作用後，以酒精沉澱法進行 DNA 片段之純化，並經分光光度計測定 DNA 的濃度後，以插入基因：載體=3：1 的比例，並加入  $T_4$  DNA ligase (New England BioLabs, Inc.)，置於 16°C 隔夜以進行接合反應，再轉形至大腸桿菌株 M15[pREP4]細胞中，取 100  $\mu$ l 菌液均勻塗抹於的 LB 培養盤 (內含 kanamycin 25  $\mu$ g/ml 及 ampicillin 100  $\mu$ g/ml) 中，於 37°C 培養隔夜。第二天挑選長出的菌落，以引子 PH1.2 及 PH2.2 做聚合酶鏈反應，檢查是否含有插入基因。挑選有插入基因的菌落進行增菌，以 ABI PRISM 337-96 DNA Sequencer 進行 DNA 序列分析，確認無誤後即可進行重組蛋白之表現。

#### 七、SjCH26KDa rGST 蛋白純化

挑取含有 pQE31/SjCH26 GST 載體的 M15[pREP4]大腸桿菌菌落，以 1：10 的稀釋比例，加入預先配製好的 LB 培養基中 (內含 kanamycin 及 ampicillin) 於 37°C、170rpm 劇烈搖動培養至 A600 吸光度到達 0.7-0. 之間，加入 IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside) 至濃度為 1mM，以誘導重組蛋白的產生，經四小時的培養，將菌液倒入離心管中，以 10,000rpm 於 4°C 離心 20 分鐘，去上清液，

加入 10ml 磷酸緩衝液重新混合成懸浮菌液，以超音波細胞粉碎機將細菌打破，再於 4 °C 以 14,000rpm 離心 15 分鐘，取上清液以 His-Bind Resin (Novagen) 親合性管柱純化重組 26KDa GST 蛋白。純化後所得產物以磷酸緩衝液進行透析，測定蛋白濃度，並以 13.5 % SDS-PAGE 進行電泳，以 0.1% comassie blue 染色，檢視純化產物。

#### 八、實驗動物之免疫及免疫保護力實驗

以 8 週齡雄性 C57BL/6J 品系小鼠作為實驗動物模式，分為免疫組 A、B 兩組及佐劑控制組及正常小鼠組，每組各 16 隻小鼠。免疫 A 組：於第 0 週時每隻小鼠以 25  $\mu$ g 純化之大陸湖北株日本血吸蟲 26KDa rGST 重組蛋白作為免疫原，混合等體積之弗氏完全佐劑 (Freund's Complete Adjuvant)，混合均勻做腹腔注射，第三週及第六週時每隻小鼠再以 15  $\mu$ g 純化之 26KDa rGST 蛋白，混合等體積之弗氏不完全佐劑 (Freund's Incomplete Adjuvant)，分別以皮下及腹腔注射方式做追加免疫，第 8 週時任選 8 隻小鼠作保護力實驗，每隻小鼠感染 30 隻日本血吸蟲尾幼，經 6-8 週後將小鼠犧牲，以靜脈灌流法將成蟲沖出，應用以下公式計算減蟲率% =  $(1 - \text{免疫組之平均蟲數} \div \text{佐劑控制組之平均蟲數}) \times 100\%$ ；其餘 8 隻小鼠則於第 8 週時犧牲採取血清，取得之血清，用來進行 ELISA 以及 Western Immunoblotting 試驗，以測定抗體之效價及專一性反應程度。B 組以及佐劑控制組及正常小鼠組免疫過程同 A 組，不同處為 B 組使用 native GSTs 作為免疫原；佐劑控制組則以磷酸緩衝液取代免疫原，正常小鼠組則不給予任何免疫程序。

## 結 果

### 一、大陸湖北株日本血吸蟲 native GSTs (26~28 KDa) 蛋白之製備

取約 1000 隻大陸湖北株日本血吸蟲雄性成蟲，經液態氮反覆凍溶解及玻璃研磨器均質化後製成蟲體可溶蛋白，再經由麩氨基硫瓊脂微粒親和性管柱萃取天然 GSTs，以透析膜於磷酸緩衝液中透析，去除雜質，再經濃縮後，測其濃度為 350  $\mu\text{g/ml}$ ，純化之蛋白經 13.5% SDS-PAGE 進行電泳，再以 0.1% comassie blue 染色後，可檢視出分子量約為 26 及 28KDa 之產物 (圖一)。

### 二、大陸湖北及安徽株日本血吸蟲 26KDa GST cDNA 之製備

各取 50 隻大陸株日本血吸蟲雄性成蟲，利用 Trizol system kit 進行 total RNA 製備，經分光光度計 (Pharmacia Biotech.) 測定估算濃度，大陸湖北株日本血吸蟲濃度為 2.42mg/ml、安徽株日本血吸蟲濃度為 1.86mg/ml，各取 5  $\mu\text{g}$  total RNA 作 RT-PCR 反應，反應終了以 2% 瓊脂電泳，均能觀察到一條接近 700bp 的 cDNA 產物 (圖二)。將前項 PCR 產物進行 DNA 序列分析，兩種蟲株 GST 基因定序均為 672bp。大陸安徽株日本血吸蟲 26KDa GST 基因序列與大陸湖北株比較相似度為 99%。安徽株日本血吸蟲 26KDa GST 第 434 個鹼基為鳥糞嘌呤 (guanine)，而湖北株日本血吸蟲為腺嘌呤 (adenine)，但兩者編碼的氨基酸不變。定序分析結果顯示此核酸片段包括一完整的轉錄區 (translation region)，可編碼 218 個氨基酸 (圖三)。

### 三、大陸湖北株日本血吸蟲 26KDa rGST 重組蛋白之表現及純化

利用已確定核酸序列之 SjCH26KDa GST cDNA 作為模板，為能使該段 DNA 能成功的轉殖入 pQE31 質體內，我們利用具有 *Bma*HI、*Kpn*I 兩種限制酵素切位之 PH1.2 及 PH2.2 兩段引子進行聚合酶鏈反應，所得之產物與 pQE31 載體分別以 *Bma*HI 及 *Kpn*I 限制酶作用後，以酒精沉澱法進行 DNA 片段之純化經過接合作用將聚合酶鏈反應產物接入 pQE31 載體之 *Bma*HI 及 *Kpn*I 限制位之間完成 pQE31/SjCHGST26 載體之建構 (圖四)，再轉形至大腸桿菌株 M15[pREP4]細胞中，以含有 kanamycin 及 ampicillin 之 LB medium 進行篩選，任意挑取六個單一菌落以引子 PH1.2 及 PH2.2 做聚合酶鏈反應，發現均有插入 pQE31/SjCHGST26 載體 (圖五)，並將菌液以 ABI PRISM 337-96 DNA Sequencer 進行 DNA 序列分析，更確認其中一個菌落已插入正確之基因序列。將該含有 pQE31/SjCH26 GST 載體的 M15[pREP4]大腸桿菌菌落以 LB 培養基增菌培養，並經 IPTG 誘導重組蛋白的表現，因該重組蛋白具有六個組氨酸 (分子量約為 0.85KDa)，使用 His-Bind Resin 純化後，大陸湖北株日本血吸蟲 26KDa rGST 蛋白測定濃度為 1,000  $\mu\text{g/ml}$ 。純化之蛋白經 13.5% SDS-PAGE 進行電泳，再以 0.1% comassie blue 染色後，可檢視出分子量約為 27KDa (26 KDa rGST+0.85 KDa His) 之產物 (圖一)。

### 四、免疫小鼠血清 IgG 抗體力價及專一性分析

因大陸湖北與安徽株日本血吸蟲兩者 GST 基因所編碼之氨基酸相同，故我們僅以湖

北株之 26KDa rGST 進行各項 *in vitro* 及 *in vivo* 之免疫反應試驗。經由免疫轉漬法 (Western Immunoblotting test) 發現, 以大陸湖北株日本血吸蟲 rGST26 及 native GSTs 免疫組小鼠之抗血清均可辨認大陸湖北株日本血吸蟲 26KDa native GST 蛋白及 26KDa rGST 蛋白。native GSTs 免疫組小鼠之抗血清對 28KDa GST 蛋白無法明顯辨識, 而佐劑對照組小鼠血清對所有 GST 蛋白均無法辨認 (圖六)。進一步以大陸湖北株日本血吸蟲 rGST26 作為抗原進行酵素免疫分析實驗 (圖七), 其結果顯示經大陸湖北株日本血吸蟲 native GSTs 或 rGST26 抗原免疫之兩組小鼠, 血清中均有明顯的 IgG 抗體產生, 且兩組之抗體效價相似, 實驗組血清稀釋至 1:20,480 倍時, IgG 抗體效價仍明顯高於佐劑對照組及正常小鼠血清, 以上之結果顯示, 以天然 GSTs 或 rGST26 抗原免疫小鼠, 均能有效的誘發出高效價的抗 26KDa GST 之抗體產生。

##### 五、大陸湖北株日本血吸蟲 26KDa rGST 蛋白與 native GSTs 蛋白之免疫保護能力評估

大陸湖北株日本血吸蟲 26KDa rGST 蛋白與 native GSTs 蛋白免疫實驗組、佐劑控制組及正常小鼠組分別經免疫程序, 於最後一次補強注射後兩週, 同時感染 30 隻大陸湖北株日本血吸蟲尾幼, 經 6-8 週後將小鼠犧牲, 以靜脈灌流法將成蟲沖出。所得之蟲數於佐劑對照組為  $11.4 \pm 1.4$  (Mean  $\pm$  SD) 隻, 26KDa native GST 蛋白免疫組為所獲蟲數為  $6.6 \pm 2.5$  隻, 減蟲效果為 42.1%, 26KDa rGST 蛋白免疫組所獲蟲數為  $7 \pm 1.9$  隻, 減蟲效果為 38.6% (表一), 而不經任何免疫程序之正常小鼠組所獲之蟲數為  $14.6 \pm 1.4$  隻, 依據實驗所得結果顯示小鼠經大陸湖北株日本血吸蟲 26KDa native GST 蛋白或 26KDa rGST 蛋白免疫後, 均可獲得良好之保護效果。

## 討 論

Smith 等人 (1986) 以半乳糖-26KDa GST 融合蛋白免疫兔子及 WEHI129/J 小鼠經免疫沉澱分析可獲得辨識天然生成 26KDa GST 之專一性抗體。Davern 等人 (1987) 亦以半乳糖-26KDa GST 及接近天然生成 26KDa GST 免疫不同品系之小鼠，結果顯示除了 Balb/c 鼠外，其餘如 WEHI129/J、C57BL/6、CBA/H 等小鼠均可產生辨識天然生成 26KDa GST 之專一性抗體。本實驗室於先前研究利用 RT-PCR 技術將台灣株日本血吸蟲 26KDa GST cDNA 選殖出來，將該基因建構於 M15 [pREP4] 大腸桿菌中表現出其重組蛋白，經由體內及體外免疫反應實驗結果顯示 26KDa GST 為一良好之免疫原。有鑑於中國大陸地區日本血吸蟲病流行、氾濫，為嚴防此病原被引進國內，危害國人及家畜健康，造成國家經濟的損失，本研究進一步利用此生物技術，開發大陸株日本血吸蟲 26KDa GST 之重組蛋白，並評估此重組蛋白作為大陸人畜共通株日本血吸蟲診斷試劑之可行性。

將大陸湖北株日本血吸蟲成蟲，於低溫均質化製備成蟲可溶性蛋白，經 glutathione agarose-beads 親合性管柱純化後得到天然 GSTs，此蛋白產物可在 SDS-PAGE 電泳膠片上清楚的觀察到 26KDa 及 28KDa 兩個蛋白條帶，此結果與 Davern 等人 (1987) 在菲律賓日本血吸蟲及本實驗室 (Lee et al., 1996) 於台灣株日本血吸蟲研究所獲結果相似，利用此天然蛋白免疫小鼠可誘發抗體，以該抗血清進行免疫轉漬法分析可辨識 26KDa GST，而對 28KDa GST 無法辨別，顯示大陸湖北株日本血吸蟲 26KDa GST 為一良好之免疫原，可誘發專一性抗體之產生，而 28KDa GST 則不具有良好之免疫能力，此與曼氏血吸蟲 Sm 28KDa GST 為良好免疫原，而 Sm 26KDa GST 不具良好免疫性之結果有所差異 (Balloul et al., 1987)。

本實驗室選擇以 QIAexpress 系統中之 pQE31 作為大陸湖北株日本血吸蟲 26KDa rGST 之表現載體，可於所表現之蛋白前端加上六個組氨酸 (分子量約 0.85KDa)，對於所表現之蛋白之結構及免疫性質並不至造成太大的影響，且可利用 His-Bind Resin 親合性管柱純化獲得未變性之重組 26KDa GST 蛋白。參考台灣株日本血吸蟲 26KDa rGST/pQE31 系統之建構，我們成功的運用 RT-PCR 及雙限制酶切位技術將大陸湖北株日本血吸蟲 26KDa GST cDNA 轉殖到 pQE31 載體之 *Bam*H1/*Kpn*I 限制酶切位間，並予以基因定序，確定插入表現之 cDNA 片段無誤，將此載體送入 M15 大腸桿菌細胞中，並以 1mM IPTG 誘發後發現此載體可大量表現出重組蛋白，於 13.5% 之 SDS-PAGE 電泳膠片可清楚觀察到分子量約為 27KDa (26KDa+0.85KDa) 之重組蛋白。以此重組蛋白免疫小鼠所獲得之抗血清，以免疫轉漬法分析，可清楚辨識該重組蛋白及大陸湖北株日本血吸蟲 26KDa native GST。再以 26KDa rGST 作為酵素免疫分析法之抗原，可發現經由 native GSTs 或 26KDa rGST 免疫之小鼠抗血清，均可有效誘發 IgG 抗體，且效價相似，又以大陸湖北株日本血吸蟲 native GSTs 或 26KDa rGST 多次免疫小鼠後，所獲得對大陸湖北株日本血吸蟲感染之保護效果統計上亦無差別。綜觀前述結果可印證我們所製造之 26KDa rGST

蛋白與 native 26KDa GST 蛋白之序列結構及免疫特性是幾乎相同的。

本研究中將中國大陸長江流域湖北省及安徽省兩大血吸蟲流行疫區取得之蟲株進行 26KDa GST cDNA 基因序列分析，其結果並與台灣株及菲律賓株日本血吸蟲 26KDa GST 基因序列 (Smith et al., 1986) 進行相似度及所編碼蛋白質異同之比對，四株日本血吸蟲之 26KDa GST 基因序列雖略有差異，但其可編碼之氨基酸數目均為 218 個，且序列完全相同，顯見日本血吸蟲 26KDa GST 之基因遺傳變異性極小，均位於遺傳密碼組之第三鹼基，故抗原蛋白結構完全相同，故本研究所完成之檢驗試劑重組蛋白抗原能適用於上述各不同地域株之日本血吸蟲病篩檢。台灣株、菲律賓株、大陸安徽及湖北等四株日本血吸蟲蟲體之 26KDa GST 蛋白氨基酸序列雖完全相同，但於核酸層次之比較下，彼此間仍有易於辨識之差異。故有必要再取得大陸其他重要疫區 (四川、福建、雲南、廣西) 之日本血吸蟲蟲株，建立其 26KDa GST cDNA 基因序列資料庫，以瞭解現階段所開發之診斷試劑是否適用於大陸地區各種不同地域株日本血吸蟲感染之檢測。未來對於來源不明之日本血吸蟲疫情，亦可藉由 RT-PCR 與日本血吸蟲 26KDa GST cDNA 定序技術加以比對鑑定，提供流行病學之調查與參考。

良好之檢驗試劑抗原除應具備取得容易、成本低廉及性質穩定等條件外，檢驗結果之專一性及靈敏度之斟酌與閾值 (cut-off value) 設定，降低偽陽性或偽陰性檢驗結果之發生，更是該檢驗試劑能成功使用必備之條件。本年度研究計畫已完成大陸湖北株日本血吸蟲 26KDa GST 重組蛋白之製造及抗原性質之分析比較，試劑抗原已能大量製造與運用，未來將蒐集日本血吸蟲罹病病患及健康對照血清，以該重組蛋白作為檢驗試劑以進一步確認此檢驗試劑用於診斷感染時之專一性及靈敏度，另一方面，建立檢驗分析結果資料庫，期能達到實用之目標。

## 討論與建議

本研究已依據計畫原訂目標，利用 RT-PCR 技術完成大陸湖北株日本血吸蟲 26KDa GST 重組蛋白之製造及抗原性質之分析比較，證實該重組蛋白抗原已具備取得容易、成本低廉及性質穩定等成為良好之檢驗試劑抗原之必要條件。為使該抗原能成功運用於日本血吸蟲病之診斷，未來應蒐集日本血吸蟲罹病病患及健康對照血清，使用該重組蛋白作為酵素免疫分析法之檢驗試劑，進一步確認其專一性及靈敏度，藉以建立檢驗結果之判讀閾值 (cut-off value)，降低偽陽性或偽陰性檢驗結果誤判情事之發生，使能達到實用之目標。

## 參考文獻

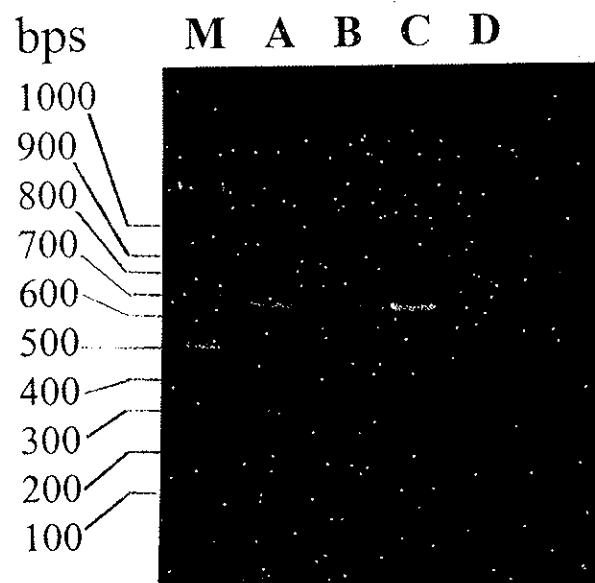
1. Balloul, J. M., R. J. Pierce, J. M. Grzych, and A. Capron. 1985. *In vitro* synthesis of a 28 kilodalton antigen present on the surface of the schistosomulum of *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **17** : 105-114.
2. Balloul, J. M., P. Sondermeyer, D. Dreyer, M. Capron, J. M. Gyzych, R. J. Pierce, D. Carvallo, J. P. Lecocq, and A. Capron. 1987. Molecular cloning of a protective antigen of schistosomes. *Nature* **326** : 149-153.
3. Bergquist, R. 1987. Schistosomiasis. In: Tropical disease research, a global partnership. Eighth programme report of the UNDP / World Bank / WHO special programme for research and training in tropical disease. World Health Organization, Geneva.
4. Bergquist, N. R. 1995. Controlling Schistosomiasis by vaccination : A realistic option? *Parasitology Today* **11** : 191-194.
5. Boulanger, D., G. D. Reid, R. F. Sturrock, I. Wolowczuk, J. M. Balloul, D. Grezel, R. J. Pierce, M. F. Otieno, S. Guerret, J. A. Grimaud, A. E. Butterworth, and A. Capron. 1991. Immunization of mice and baboons with the recombinant Sm28GST affects both worm viability and fecundity after experimental infection with *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunology* **13** : 473-490.
6. Crompton, D. W. T. 1999. How much human helminthiasis is there in the world? *J. Parasitol.* **85** : 397-403.
7. Doherty, P. J., M. H. Contreras, H. M. Dosch, and S. Pant. 1989. Rapid amplification of complementary DNA from small amounts of unfractionated RNA. *Analytical Biochemistry* **177** : 7-10.
8. Garcia, E. G., W. U. Tiu, and G. F. Mitchell. 1983. Innate resistance to *Schistosoma japonicum* in a proportion of 129/J mice. *Journal of Parasitology* **69** : 613-615.
9. Hsu, H. F., S. Y. Li Hsu, and L. S. Ritchie. 1955. Epidemiological study on schistosomiasis japonica in Formosa. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **4** : 1042-1048.
10. Lee, K. M., Fan, P. C. and Wu, C. C. 1982. Further studies on the susceptibility of new Taiwan foci of *Oncomelania hupensis* to geographic strains of *Schistosoma japonicum*. *Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Hlth.* **13**:91.



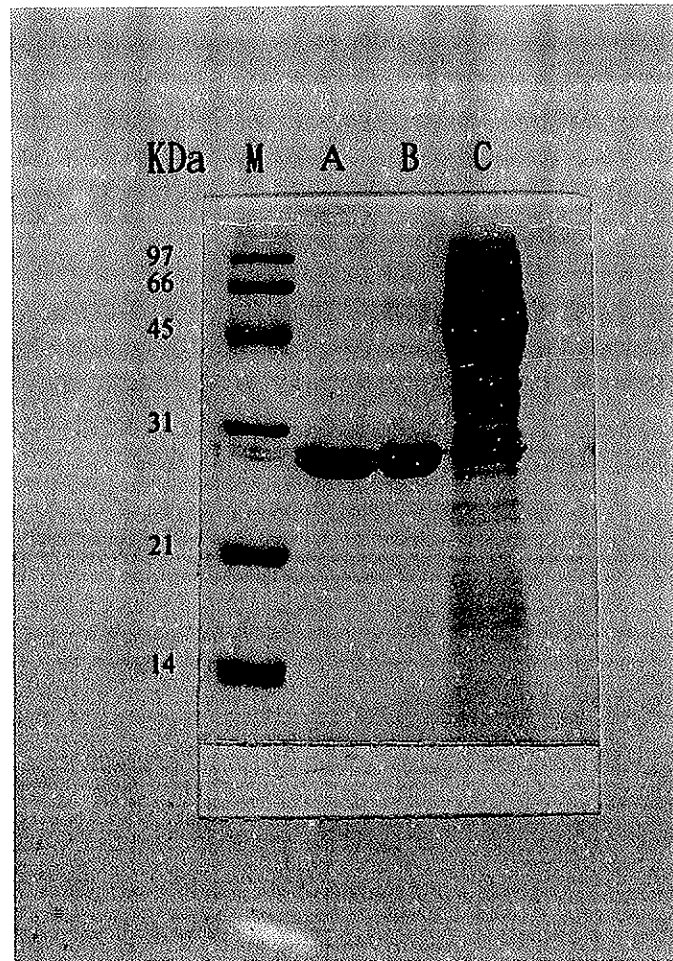
11. Lee, K. M. and Fan, P. C. 1982. Studies on the susceptibility of new Taiwan foci of *Oncomelania hupensis* to Ilan and Japanese strains of *Schistosoma japonicum*. Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Hlth. **13**:580.
12. Lee, K. M., C. T. Lo, P. C. Fan, and C. K. Chung. 1992. Susceptibility of *Oncomelania hupensis* subspecies to infection with Chinese, Taiwan and Japanese strains of *Schistosoma japonicum*. Chinese Journal of Parasitology **5** : 67-71.
13. Lee, K. M., L. C. Shen, C. T. Lo, M. J. Pan, and C. L. Yu. 1995. Genetic variation of the nuclear genomes of *Schistosoma japonicum* from Taiwan and mainland China by random amplified polymorphic DNA (RAPD) . In Joint Meeting of the American Society of Parasitologists and The American Association of Veterinary Parasitologists **pp.** 108-109.
14. Lee, K. M., Liu, S. H., Lo, C. T., and Pan, M. J. 1996. Molecular cloning of the glutathione S-transferases antigen of the Taiwanese strain of *Schistosoma japonicum*. The 14<sup>th</sup> International Congress for Tropical Medicine and Malaria. Abstracts **pp.** 253.
15. Lee, K. M., Lu, C. W., Lo, C. T. and Yu, C. L. 1998. Dynamic analysis of cytokine gene expression and protein production in a zoophilic *schistosomiasis japonica*. The IXth International Congress of Parasitology. **pp.**246.
16. Liu, S. X., G. C. Song, L. Y. Ding, Y. X. Xu, Z. H. Cai, and G. Z. Wu. 1994. Comparative study on antigenicity and immunogenicity of 26-28 KDa antigen and recombinant Sj26 (RSJ26) of *Schistosoma japonicum*. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Hygiene **24** : 65-69.
17. Lo, C. T., and K. M. Lee. 1995. *Schistosoma japonicum*, zoophilic strain, in *Oncomelania hupensis chiui* and *O. h. formosana* : miracidial penetration and comparative histology. Journal of Parasitology **81** : 708-713.
18. Mitchell, G. F., K. M. Cruise, E. G. Garcia, and W. U. Tiu. 1984. Anti-worm antibody specificities in 129/J mice resistant to infection with *Schistosoma japonicum*. Journal of Parasitology **70** : 983-985.
19. Mitchell, G. F., J. A. Beall, K. M. Cruise, W. U. Tiu, and E. G. Garcia. 1985. Antibody responses to the antigen Sj26 of *Schistosoma japonicum* worms that is recognized by genetically resistant 129/J mice. Parasite Immunology **7** : 165-178.
20. Mitchell, G. F., E. G. Garcia, K. M. Davern, W. U. Tiu, and D. B. Smith. 1988. Sensitization against the parasite antigen Sj26 is not sufficient for consistent expression of *Schistosoma japonicum* in mice. Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene **82** : 885-889.
21. Pearce, E. J., S. L. James, S. Hiney, D. E. Lanar, A. Sher. 1988. Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by accination with schistosome paramyosin

- (Sm97) , a nonsurface18.Ross, A. G. P., Y. D. Li., A. C. Sleight, and D. P. Mcmanus. 1997. Schistosomiasis control in the People's Republic of China. *Parasitology Today* **13**: 152-155.
- 22.Ross, A.G.P., Y.D. Li, A.C. Sleight, and D.P. Mcmanus. 1997. Schistosomiasis control in the People's Republic of China. *Parasitology Today* **13**: 152-155.
- 23.Smith, D. B., K. M. Davern, P. G. Board, W. U. Tiu, E. G. Garcia, and G. F. Mitchell. 1986. Mr 26000 antigen of *Schistosoma japonicum* recognized by resistant WEHI 129/J mice is a parasite glutathione S-transferase. *Proceeding of National Academy of Science USA*. **83** : 8703-8707.
- 24.Smith, S. R. 1986. Improving prospects for a schistosomiasis vaccine. *Nature* **323** : 205
- 25.Smith, D. B., R. Rubira, R. J. Simpson, K. M. Davern, W. U. Tiu, P. G. Board, and G. F. Mitchell. 1988a. Expression of an enzymatically active parasite molecule in *Escherichia coli* : *Schistosoma japonicum* glutathione S-transferase. *Molecular and Biochemical Parasitology* **27** : 249-256.
- 26.Smith, D. B., and K. S. Johnson. 1988b. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67** : 31-40.
- 27.Taylor, J. B., A. Vidal, G. Torpier, D. J. Meyer, C. Roitsch, J. M. Balloul, C. Southan, P. Sondermeyer, S. Pemble, J. P. Lecocq, A. Capron, and B. Keyyerer. 1988. The glutathione transferase activity and tissue distribution of a cloned Mr28K protective antigen of *Schistosoma mansoni*. *The EMBO Journal* **7** : 465-472.
- 28.Tien, N. 1995. Mitochondrial DNA studies of Taiwan and mainland China strains of *Schistosoma japonicum*. Master thesis.
- 29.Tiu, W. U., K. M. Davern, M. D. Wright, P. G. Borad, and G. F. Mitchell. 1988. Molecular and serological characteristics of the glutathione S-transferases of *Schistosoma japonicum* and *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunology* **10** : 693-706.
- 30.Trottein, F., M. P. Kieny, C. Verwaerde, G. Torpier, R. J. Pierce, J. M. Balloul, D. Schmitt, J. P. Lecocq, and A. Capron. 1990. Molecular cloning and tissue distribution of a 26-kilodalton *Schistosoma mansoni* glutathione S-transferase. *Molecular and Biochemical Parasitology* **41** : 35-44.
- 31.Trottein, F., C. Gordin, R. J. Pierce, B. Sellin, M. G. Taylor, I. Gorillot, M. S. Silva, J. P. Lecocq, and A. Capron. 1992. Inter-species variation of schistosome 28-KDa glutathione S-transferases. *Molecular and Biochemical Parasitology* **54** : 63-72.
- 32.Wang, A. M., and D. F. Mark. 1990. Quantitative PCR. In *PCR Protocols*. Academic Press Inc. pp. 70-75.

33. Wang, J. S., F. M. Wu, K. C. Tung, and J. P. Chan. 1988. An outbreak and epidemiology of bovine schistosomiasis japonica in changhua county of Taiwan. *Journal of Chinese Society of Veterinary Science* **14** : 298-296.
34. Xu, C. B., C. Verwaerde, J. M. Grzych, J. Fontaine, and A. Capron. 1991. A monoclonal antibody blocking the *Schistosoma mansoni* 28KDa glutathione S-transferase activity reduces female worm fecundity and egg viability. *Europe Journal of Immunology* **21** : 1801-1807.
35. Xu, C. B., C. Verwaerde, H. G. Masse, J. Fontaine, M. Bossus, F. Trottein, I. Wolowczuk, A. Tartar, and A. Capron. 1993. *Schistosoma mansoni* 28KDa glutathione S-transferase and immunity against parasite fecundity and egg viability : Role of the amino- and carboxyl-terminal domains. *Journal of Immunology* **150** : 940-949.
36. Xu, S., F. Shi, W. Shen, J. Lin, Y. Wang, P. Ye, E. Tian, C. Qian, B. Lin, Y. Shi, and Z. Zhang. 1995. Vaccination of sheep against *Schistosoma japonicum* with either glutathione S-transferase, keyhole limpet haemocyanin or freeze/thaw schistosomula/BCG vaccine. *Veterinary Parasitology* **58** : 301-3



圖二、大陸株日本血吸蟲 Total RNA 經 RT-PCR 反應之結果。  
 M. 100-2000bps DNA Marker  
 A-C. 分別為 RT-PCR 反應試管 1-3 之產物  
 D. Negative control



圖一：大陸湖北株日本血吸蟲天然 GSTs (26~28 KDa) 蛋白及重組 26KDa GST 蛋白於 13.5% SDS-PAGE 分析圖。

M. Bio Rad® Low molecular weight marker

A. 經 G-SH agarose 親和性柱所純化之 native GSTs，具有 26KDa 及 28KDa 兩種異構酶存在。

B. 經純化後所得的 rGST26，其分子量大小約為 27KDa。

C. 由含有 pQE/SjCH GST26 表現載體之大腸桿菌 M15[pREP<sub>4</sub>] 經 IPTG 激發後所表現之可溶性蛋白。

M.S.P.I.L.G.Y.W.K.I.K.G.L.V.Q.<sup>59</sup>  
SjCH taggtaacttggatcatgtcccctatactaggttattggaaaattaagggcrttgtgcaa  
SjCA \*\*\*\*\*  
SjPH \*\*\*\*\*  
SjT \*\*\*\*\*

P.T.R.L.L.L.E.Y.L.E.E.K.Y.E.E.H.L.Y.E.R.<sup>119</sup>  
SjCH cccactcgcacttcttttggataatcttgaagaaaaatagaagacatttggatgagcgc  
SjCA \*\*\*\*\*  
SjPH \*\*\*\*\*  
SjT \*\*\*\*\*

D.E.G.D.K.W.R.N.K.K.F.E.L.G.L.E.F.P.N.L.<sup>179</sup>  
SjCH gatgaaggtgataaatggcgaacaaaagttagaattgggttggagtttcccattt  
SjCA \*\*\*\*\*  
SjPH \*\*\*\*\*  
SjT \*\*\*\*\*

P.Y.Y.I.D.G.D.V.K.L.T.Q.S.M.A.I.I.R.Y.I.<sup>239</sup>  
SjCH ccttattatattgtaggggatgttaaattaacacagtcctatggccatcatacgttata  
SjCA \*\*\*\*\*  
SjPH \*\*\*\*\*  
SjT \*\*\*\*\*

A.D.K.H.N.M.L.G.G.C.P.K.E.R.A.E.I.S.M.L.<sup>299</sup>  
SjCH gctgacaagcacaacatgttgggtggttgcctcaaaagagcgtgcagagatttcaatgctt  
SjCA \*\*\*\*\*  
SjPH \*\*\*\*\*  
SjT \*\*\*\*\*

E.G.A.V.L.D.I.R.Y.G.V.S.R.I.A.Y.S.K.D.F.<sup>359</sup>  
SjCH gaaggagcggtttggatattagatacgggttccgagaattgcataatagtaagacittt  
SjCA \*\*\*\*\*  
SjPH \*\*\*\*\*  
SjT \*\*\*\*\*

E.T.L.K.V.D.F.L.S.K.L.P.E.M.L.K.M.F.E.D.<sup>419</sup>  
SjCH gaaactctcaagttgatitcttagcaagctacctgaaatgctgaaaatgttccaagat  
SjCA \*\*\*\*\*  
SjPH \*\*\*\*\*  
SjT \*\*\*\*\*

R.L.C.H.K.T.Y.L.N.G.D.H.V.T.H.P.D.F.M.L.<sup>479</sup>  
SjCH cgtttatgtcataaagacatatttaaatggatcatgtaaccatcctgacttcatgtt  
SjCA \*\*\*\*\*  
SjPH \*\*\*\*\*  
SjT \*\*\*\*\*

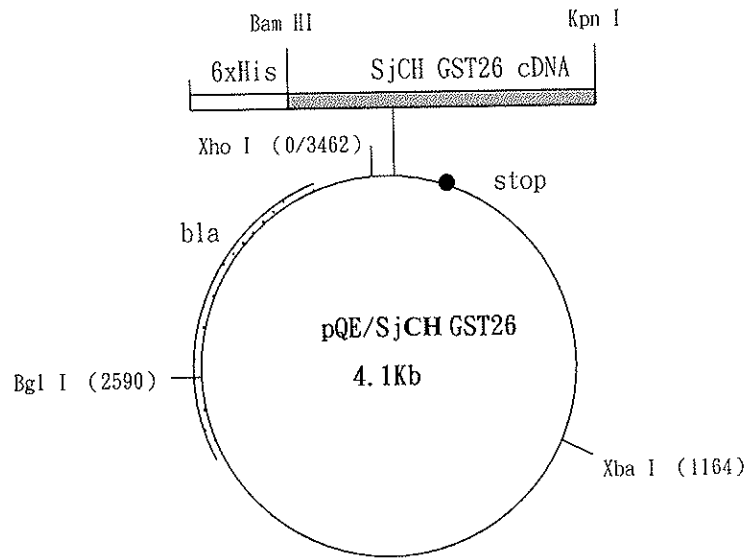
Y.D.A.L.D.V.V.L.Y.M.D.P.M.C.L.D.A.F.P.K.<sup>539</sup>  
SjCH tatgagcctcttgaatgttlltatacatggaccnaatgtgcctggatgcttcccnaaa  
SjCA \*\*\*\*\*  
SjPH \*\*\*\*\*  
SjT \*\*\*\*\*

L.V.C.F.K.K.R.I.E.A.I.P.Q.I.D.K.Y.L.K.S.<sup>599</sup>  
SjCH ttagtittgttttaaaaacgtattgaagctatcccacaaattgataagctacttgaatcc  
SjCA \*\*\*\*\*  
SjPH \*\*\*\*\*  
SjT \*\*\*\*\*

S.K.Y.I.A.W.P.L.Q.G.W.Q.A.T.F.G.G.G.D.H.<sup>659</sup>  
SjCH agcaagtatatagcatggccttggcaggcctggcaagccacgttgggtggcgcacat  
SjCA \*\*\*\*\*  
SjPH \*\*\*\*\*  
SjT \*\*\*\*\*

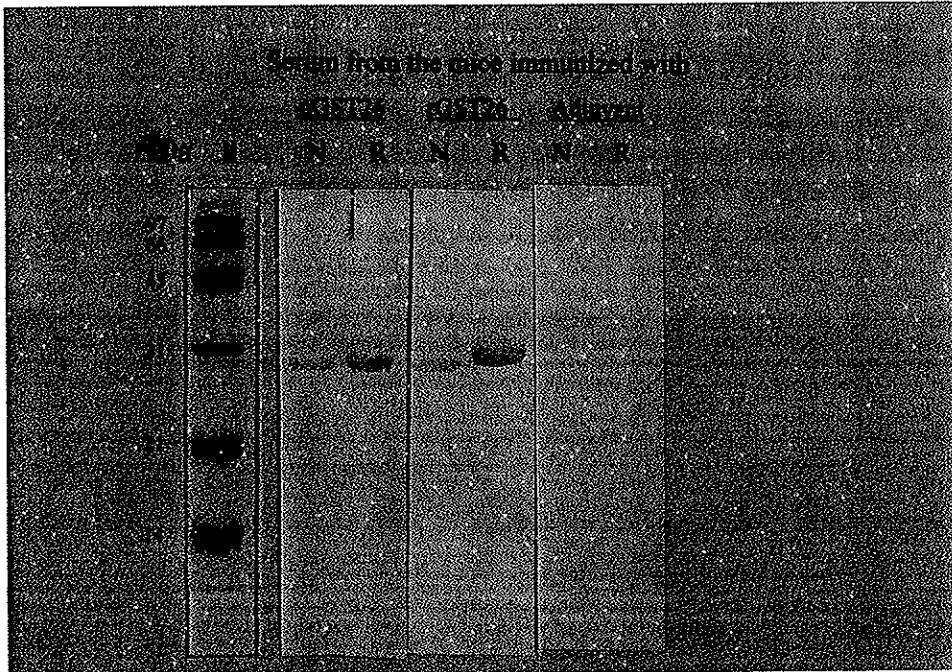
P.P.K.<sup>672</sup>  
SjCH cctccaaaataaa  
SjCA \*\*\*\*\*  
SjPH \*\*\*\*\*  
SjT \*\*\*\*\*

圖三:大陸湖北株 (SjCH)、大陸安徽株 (SjCA)、菲律賓株 (SjPH) 及台灣株 (SjT) 日本血吸蟲 26KDa GST 之基因序列 (小寫英文字母) 及其推演出之氨基酸序列 (大寫英文字母)。大陸安徽株日本血吸蟲 26KDa GST 基因序列與大陸湖北株比較相似度為 99%。安徽株日本血吸蟲 26KDa GST 第 434 個鹼基為鳥糞嘌呤 (guanine), 而湖北株日本血吸蟲為腺嘌呤 (adenine), 但兩者編碼的氨基酸不變。定序分析結果顯示此核酸片段包括一完整的轉錄區 (translation region), 可編碼 218 個氨基酸。



圖四：pQE31/SjCH GST26 表現載體的建構。

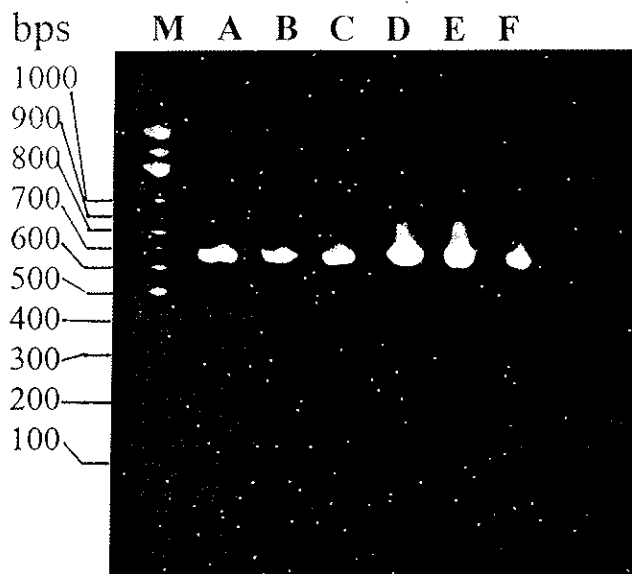
以 PH1.2、PH2.2 引子進行聚合酶鏈反應所獲之 SjGST26 cDNA (約 0.67Kb) 產物，由 *Bam*HI 及 *Kpn*I 間之切位插入 pQE31 載體 (經 *Bam*HI 及 *Kpn*I 酵素處理，大小約為 3.44Kb) 中，構成 pQE31/SjCH GST26 之表現載體。當以 IPTG 誘導時，重組蛋白將以包含 6 個 Histidine 接上 Sj26KDa GST 蛋白的形式表現於 ME15 大腸桿菌中。



圖六 . 以 native GSTs、rGST26 免疫及 adjuvant 對照組之小鼠抗血清進行免疫轉漬法所得結果。蛋白經 13.5%SDS-PAGE 電泳後轉印至 N-C paper 上分成三部分進行實驗。第一部份以小鼠抗大陸株日本血吸蟲 native GSTs 血清 (1:5,000 稀釋) 作用，第二部分以小鼠抗大陸株日本血吸蟲 rGST26 (1:5,000 稀釋) 作用，第三部分以 Adjuvant 對照組血清 (1:250) 作用。由圖中可明顯看出小鼠不論以 native GSTs 或 rGST26 免疫時，產生之抗體均可同時認識日本血吸蟲天然生成及重組 26KDa GST 蛋白，而在 adjuvant 對照組免疫之小鼠血清，則無法辨識該抗原。

- M. Bio Rad<sup>®</sup> Low molecular weight marker。
- R. 為純化的大陸株日本血吸蟲之重組 GST26。
- N. 為純化的大陸株日本血吸蟲之天然 GSTs。

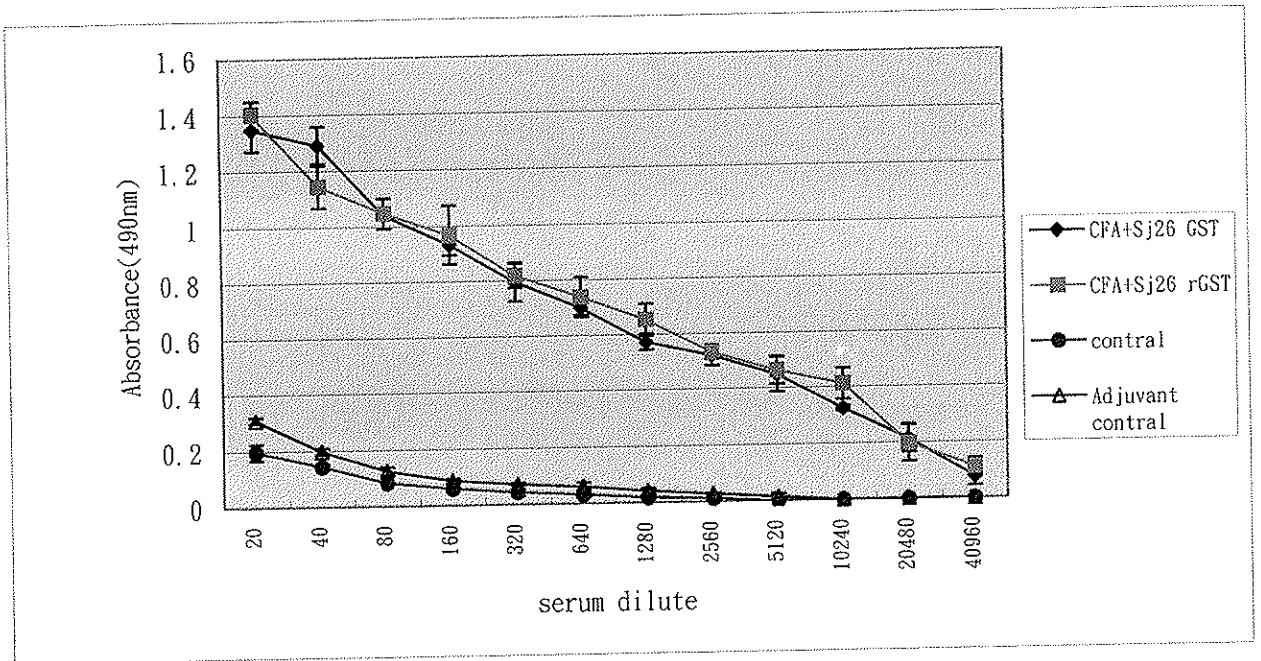




圖五：將 26KDa GST cDNA 接入 pQE31 載體之 *Bma*HI 及 *Kpn*I 限制位之間完成 pQE31/SjCH GST26 載體之建構，轉形至 ME15 大腸桿菌，任意挑取六個單一菌落以引子 PH1.2 及 PH2.2 做聚合酶鏈反應，發現均有插入 pQE31/SjCH GST26 載體，並進行 DNA 序列分析，確認已插入正確之基因序列。

M. 100-2000bps DNA Marker

A-F. 分別為 PCR 反應試管之產物，其中菌落 C 經確認已插入正確之 26KDa GST cDNA 基因序列。



圖七：以 SjCH rGST26 作為抗原，利用 ELISA 分析 SjCH GSTs、SjCH rGST26 免疫組、佐劑控制組及正常小鼠血清之 IgG 抗體效價結果。

96 孔微量盤中，每孔覆以  $0.1 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$  純化的 SjCH rGST26 抗原，小鼠血清則由 1:20 之稀釋比例起做連續二倍稀釋，至 1:40,960 倍稀釋止。由圖可見以 SjCH GSTs 或 SjCH rGST26 抗原免疫之兩組小鼠，血清中有明顯的 IgG 抗體產生，且抗體效價相似，兩組小鼠血清以 1:20,480 倍稀釋時，IgG 抗體效價仍明顯高於佐劑控制組及正常小鼠血清。

表一：以大陸湖北株日本血吸蟲天然及重組 26KDa GST 蛋白免疫小鼠，所獲得減蟲結果

Mouse strain *	Injection	Infection	No. of mice	Worm counts	
				Mean ( $\pm$ SD)	Worm burden reduction (%)
C57BL/6	CFA+rSjCH 26kDa	SjCH	8	7 $\pm$ 1.9	38.6
C57BL/6	CFA+SjCH 26kDa	SjCH	8	6.6 $\pm$ 2.5	42.1
C57BL/6	CFA+PBS control <sup>c</sup>	SjCH	8	11.4 $\pm$ 1.4	-
C57BL/6	Control <sup>d</sup>	SjCH	8	14.6 $\pm$ 1.4	-

\*使用 6~8 週齡雄性小鼠。

- a. 第 0 週時以 25  $\mu$ g rGST+CFA 腹腔免疫注射，第 3 週及第 6 週時分別以 15  $\mu$ g rGST+FIA 皮下及腹腔注射補強。
- b. 第 0 週時以 25  $\mu$ g GSTs+CFA 腹腔免疫注射，第 3 週及第 6 週時分別以 15  $\mu$ g GSTs+FIA 皮下及腹腔注射補強。
- c. 第 0 週時以 PBS buffer+CFA 腹腔免疫注射，第 3 週及第 6 週時分別以 PBS buffer +FIA 皮下及腹腔注射補強。
- d. 該組之小鼠不給予任何免疫程序，直接感染大陸株日本血吸蟲尾幼，並於八週後灌流沖蟲。