

B-S3-16

弓形虫重组粘附蛋白复合体 MIC2-M2AP 的制备、鉴定及免疫保护效应

谢彬彬, 章庆伟, 白炳君, 陈亲芬; 指导教师: 梁韶晖, 刘文权

温州医科大学 2010 级临床医学

【立论依据】 弓形虫微线体分泌的粘附蛋白 MIC2 与 M2AP(MIC2 相关蛋白)以 1:1 的比例形成 MIC2-M2AP 六聚复合体,转移到弓形虫顶端与宿主细胞膜之间形成的连接区域,协助虫体进入宿主细胞。

【设计思路】 制备弓形虫重组粘附蛋白复合体 MIC2-M2AP,鉴定其免疫原性和免疫反应性及其在抗弓形虫入侵宿主细胞中的作用,为筛选 MIC2-M2AP 作为弓形虫疫苗候选抗原的研究奠定基础。

【实验内容】 RT-PCR 扩增弓形虫 MIC2 和 M2AP 基因,克隆至组成型表达的毕赤酵母表达载体 pGAPZ α A 中,构建重组真核表达质粒 pGAPZ α A-MIC2 和 pGAPZ α A-M2AP,利用同源重组的方法将 MIC2 和 M2AP 基因整合到同一毕赤酵母细胞 X33 的基因组中进行发酵表达获得重组 MIC2-M2AP 复合体,His 标签 Ni-NTA 柱亲和层析纯化后免疫小鼠,采用免疫小鼠血清和弓形虫感染鼠血清进行蛋白质印迹鉴定重组 MIC2-M2AP 复合体的免疫原性和免疫反应性,免疫小鼠抗重组 MIC2-M2AP 复合体多抗血清体外中和实验观察阻断弓形虫入侵宿主细胞效应,重组 MIC2-M2AP 复合体免疫小鼠的抗弓形虫感染效应。

【材料】 弓形虫 RH 株速殖子,毕赤酵母表达载体 pGAPZ α A。

【可行性】 国外文献已经证实 MIC2-M2AP 复合体在协助虫体的滑移运动和侵入细胞中发挥重要的作用,敲除 MIC1 基因后,弓形虫株对宿主细胞的入侵率下降 50%,敲除 MIC2 的结合蛋白 M2AP 后,弓形虫株对宿主细胞的入侵率下降 80%以上,因此重组 MIC2-M2AP 复合体有可能作为弓形虫疫苗候选抗原。目前我们已成功构建了重组真核表达载体 pGAPZ α A-MIC2 和 pGAPZ α A-M2AP,其核苷酸序列与 GenBank 中的序列同源性为 100%。

【创新性】 国内外在弓形虫疫苗候选抗原筛选研究中,目前报道较多的是弓形虫表面抗原(SAG)、棒状体蛋白(ROP)、致密颗粒抗原(GRA)等可能作为弓形虫疫苗候选抗原的研究,而关于微线体蛋白(MIC)尤其是 MIC2-M2AP 复合体可作为弓形虫疫苗候选抗原的研究未见报道,而根据已报道的微线体蛋白相关研究成果,我们推测重组 MIC2-M2AP 复合体免疫会产生较强的免疫保护效果。

关键词: 刚地弓形虫;MIC2;M2AP;免疫保护

B-S3-17

新型疟疾传播阻断疫苗候选抗原的确定及其效应研究

李思涵¹, 张心尧¹, 陈晓枫¹, 罗强², 刘啸白¹; 指导教师: 曹雅明

1. 中国医科大学四年级临床医学七年制

2. 中国医科大学四年级临床医学五年制

【立论依据】 疟疾作为重要的全球性公共卫生问题之一,其防控已被写入联合国千年发展目标。我国也正式提出到 2020 年实现消除疟疾这一宏伟目标。“疟原虫发育阶段机理及其在疟疾传播阻断上的应用的研究”被国际疟疾消除专家委员会定位为今后疟疾研究的重点方向,由此提示切断疟原虫在人与媒介按蚊之间的传播是人类彻底消除疟疾的根本策略。

【设计思路】 鉴于疟原虫有性发育阶段的配子体是由人类至媒介按蚊传播的唯一形式,同时,目前研究的疟疾传播阻断疫苗(TBV)候选抗原 P230、P48/45、P25/28 均难以产生完全的传播阻断效应,因此,进一步拓展和深

人与疟原虫有性发育密切相关的分子生物学和免疫学等综合基础性研究无疑是确立有效的传播阻断策略的必需依据。

【实验内容】 (1)采用生物信息学筛选、确定 TBV 候选蛋白。(2)提取疟原虫基因组 DNA,PCR 扩增目的基因,利用原核和无细胞表达系统表达及纯化重组蛋白。(3)实验动物免疫,收集抗血清,ELISA 检测特异性抗体滴度,蛋白质印迹检测重组蛋白活性和特异性,IFA 确定候选蛋白在疟原虫不同发育阶段的表达特点。(4)通过动合子体外培养和直接蚊喂养实验,评价传播阻断活性。(5)利用双交叉重组的遗传学分析技术建立敲除和标记候选基因反应体系,进一步评估候选蛋白的传播阻断效应。

【材料】 伯氏疟原虫(Pb ANKA)、BALB/c 小鼠和媒介按蚊。

【可行性】 (1)课题组成员具备较扎实的理论基础和熟练的实验操作技术。(2)拥有鼠疟—媒介按蚊实验系统。

【创新性】 从切断疟原虫传播的根本环节出发,聚焦于新型疟疾传播阻断疫苗候选抗原的确定是本课题的创新之处。

关键词: 疟原虫;有性阶段;候选抗原;传播阻断效应

B-S3-18

HBV 特异性 T 细胞过继疗法治疗慢性乙肝的初步探究

肖学文,肖斯悦,赵逸明;指导教师:黎明

中南大学 2011 级临床医学五年制

【立论依据】 克隆选择学说认为,T 细胞识别抗原的多样性在胸腺发育时形成。胚胎期或新生儿期,自身抗原在胸腺中表达时,相应 T 细胞克隆识别、发生凋亡,形成机体对自身抗原的免疫耐受,从而使未发生凋亡的 T 细胞只能识别非自身抗原,并活化增殖,诱导特异性免疫应答,若此时在胸腺中表达了非自身抗原,则识别它的细胞将发生凋亡,使机体形成病理性耐受。在我国,50%的慢性乙肝患者在宫内或幼年时期即感染乙肝病毒(HBV),此时,机体免疫系统处于胸腺发育阶段,胸腺表达 HBV 抗原,导致识别 HBV 特异性 T 细胞被清除,造成对 HBV 的病理性耐受。因此我们拟将 HBV 特异性 T 细胞从胸腺中“拯救”出来,以治疗通过垂直传播而感染 HBV 的患者。

【设计思路】 为打破对 HBV 抗原的病理性免疫耐受,我们拟从胸腺提取 HBV 特异性 T 细胞,体外培养、增殖,再回输体内,不仅提高机体特异性清除 HBV 的免疫应答能力,同时避免了机体的免疫排斥反应。

【实验内容】 (1)建模:DHBV(鸭乙肝病毒)感染出壳 24 h 的幼鸭,以诱导免疫耐受;(2)获得 DHBV 致敏树突状细胞(DC):分离外周血中 DC,用 DHBV 冲击致敏 DC,并用绿色荧光蛋白(GFP)标记 DC;(3)分离 DHBV 特异性 T 细胞:取建模成功的 3~4 周龄鸭的胸腺组织,制成悬液,以致敏 DC 为标记,采用流式细胞术分选目标细胞;(4)质量控制:将目标细胞与感染、未感染 DHBV 的肝细胞共培养,检测其活性及安全性;(5)细胞因子体外刺激目标细胞增殖,腹腔回输。(6)检测鸭肝功能指标。

【材料】 DHBV、DHBsAb/DHBcAb、胰酶、RPMI 1640、rhGM-CSF、rhIL-4、rhTNF α 、LPs 等。

【可行性】 (1)过继免疫疗法技术成熟,已试用于临床,排斥反应少,疗效显著,使本研究具有实验可行性。(2)构建幼龄鸭 DHBV 免疫耐受模型已有文献基础,为本研究提供了实验材料。

【创新性】 (1)以克隆选择学说为理论基础,提出一种全新的过继疗法的细胞来源和操作思路,将为其他免疫耐受性疾病及病毒感染的治疗提供研究策略;(2)采用自体 T 细胞免疫疗法,实现特异性清除体内乙肝病毒目的,较传统疗法更具特异性和靶向性。

关键词: 克隆选择学说;免疫耐受;慢性乙肝;HBV 特异性 T 细胞;过继疗法