

DOI:10.3969/cjz.j.issn.1002-2694.2013.06.019

弓形虫多价疫苗研究近况

杜海娟,田春林

摘要:弓形虫疫苗研制已经历了全虫疫苗、抗原组份疫苗、基因工程亚单位疫苗和核酸疫苗发展阶段,结果表明基因工程多价疫苗具有较大的前景。本文综述了弓形虫多价疫苗的研制中弓形虫抗原基因的筛选方法、表达载体的选择、研制方法及疫苗种类,并介绍了弓形虫多价疫苗的应用和目前存在的问题及解决策略。

关键词:弓形虫;疫苗;研究

中图分类号:R382.5

文献标识码:A

文章编号:1002-2694(2013)06-0620-05

A review of *Toxoplasma gondii* multivalent vaccine

DU Hai-juan, TIAN Chun-lin

(Department of Parasitology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

ABSTRACT: The development of *Toxoplasma gondii* vaccine has experienced the whole worm vaccines stage, antigen components vaccine stage, gene engineering subunit vaccine stage, and nucleic acid vaccine stage. The results show that genetic engineering multivalent vaccines have great prospects. In this paper, the preparation of *Toxoplasma gondii* multivalent vaccines are reviewed, including the method of selecting *Toxoplasma* antigen gene, the choice of expression vector, development of the method, and vaccines of the types. Meanwhile, it also reviews the application of *Toxoplasma gondii* multivalent vaccines and the existing problems and the solving strategy at present.

KEY WORDS: *Toxoplasma gondii*; vaccine; research

Supported by the Guangxi Scientific Research and Technology Development Projects (No. 10124001A-64)

Corresponding author: Tian Chun-lin, Email:tian-cl@163.com

弓形虫(*Toxoplasma gondii*)是一种重要的条件致病病原体,世界性分布,广泛寄生于人体及动物的有核细胞内,可引起严重的人兽共患病^[1],为免疫功能抑制或缺陷者(如器官移植、恶性肿瘤及艾滋病人)致死的主要原因之一。据估计全世界至少有1/3的人感染弓形虫,成年人大多为隐性感染。由于弓形虫生活史复杂,传播途径多样,对弓形虫病的治疗,特别是消灭弓形虫的包囊,迄今为止尚未发现理想的防治药物^[2]。因此,研制廉价、安全、有效的弓形虫病疫苗是最好的防治措施,然而目前研制的单价弓形虫疫苗效果不佳,故多价弓形虫疫苗成为近年来研究热点。

1 弓形虫多价疫苗的研制

1.1 弓形虫抗原基因及筛选方法 弓形虫多价疫

苗研制的关键之一是抗原基因的筛选。弓形虫候选多价疫苗蛋白抗原包括细胞膜、细胞质和代谢抗原,与弓形虫的侵袭性和诱导宿主产生免疫反应有关,主要有表面抗原(Surface antigen, SAG)、致密颗粒蛋白(Dense granules protein, GRA)、棒状体蛋白(Rhoptry protein, ROP)和微线体蛋白(Microneme protein, MIC)等。弓形虫主要表面抗原具有作为诊断抗原和免疫疫苗的潜在价值,其家族成员众多,且存在于弓形虫生活史的各个阶段,主要包括SAG1、SAG2、SAG3、SAG4、SAG5和BSR4等基因。目前研究较多的有SAG1、SAG2和SAG3等,其中SAG1是主要的备选疫苗抗原基因之一。研究表明,棒状体蛋白在虫体入侵和纳虫空泡的形成和修饰过程中起着重要作用,是重要的入侵和毒力作用因子^[3]。ROP蛋白有29种^[4],研究较多的是ROP1和ROP2,其中ROP2与弓形虫对宿主的穿透侵袭功能有关,具有较强的免疫原性,是主要的备选疫苗抗原基因之一。Bozena等^[5]证明除了ROP2外,

ROP4 也很有效,甚至有着更强的免疫原性,能诱导产生更为强烈的体液免疫和细胞免疫。此外,对 ROP16 和 ROP18 也有少量研究。目前已报道的微线体蛋白不少于 15 种,包括 MIC1~MIC12、AMA1 等,报导较多的是 MIC2 和 MIC3 蛋白。其中 MIC3 基因为单拷贝,无内含子,在弓形虫的速殖子、缓殖子和子孢子期表达,被认为是弓形虫病疫苗的候选基因。Liu 等^[6]发现, MIC8 蛋白是弓形虫入侵宿主的基本因素,可在真核细胞内表达,能引发针对弓形虫的免疫反应,有着作为抗弓形虫疫苗候选因子的潜力。已报道的致密颗粒蛋白有 13 种,研究较多的有 GRA1、GRA2、GRA4 和 GRA7。除此之外,还有一些基因如 WX2、WX 基因和一些热休克蛋白如 HSP70 等。

近期报道的弓形虫相关抗原很多,如何筛选和寻找有效的抗原基因是亟待解决的问题。常用的从病原体中筛选保护性抗原基因有 3 种方法,表达文库筛选候选基因、免疫筛选法和化学分解法,前两者都已经被很好地应用在寄生虫疫苗保护性抗原基因的筛选。表达文库免疫(Expression library immunization , ELI)技术是根据病原体的所有抗原都是由相应基因编码的这个基本原理进行的。该项技术是发现免疫活性基因的最系统和客观的手段,也是发展基因疫苗的一项主要工作。将特定病原体表达文库中的基因插入到相应的表达质粒中,通过检测含病原体基因组片段质粒的混合物,以发现保护性抗原基因。表达文库免疫大致的方法是,首先用酶消化病原体基因组 DNA,使之成为保护性基因,再将酶切片段分别与真核表达载体连接,建立表达文库。用全部或者部分表达库同时给许多动物免疫接种,了解基因组或者解体病原体的多个表达蛋白中是哪一部分可以产生有效的免疫保护作用。ELI 是很好的基因疫苗候选基因筛选方法,能够系统地发现合适的抗原基因。ELI 对于具有较大基因组的弓形虫基因疫苗的发展更有决定性意义,目前应用此项技术已经发现许多弓形虫疫苗候选基因。免疫筛选法是用发病(或者接种疫苗)的动物或者人阳性血清作为探针,在病原体 cDNA 文库中筛选抗原克隆,是对那些病原体抗原成分情况了解不多,获得单一抗原成分的有效方法。在得到了抗原序列后,相应的抗原基因序列也就知道了。我们可以利用这些筛选技术筛选出更多弓形虫保护抗原基因,研制出更有效的疫苗。随着蛋白组学的发展,利用蛋白组学研究疫苗已成为研究热点,寄生虫不同发育时期的 2·D 电泳图谱联合质谱分析可用于鉴定特异性

蛋白,为弓形虫特异性抗原的寻找提供了一条新途径。

1.2 表达载体的选择

弓形虫多价疫苗研制的关键之二是表达载体的选择。表达载体有真核表达载体和原核表达载体,由于真核表达载体优于原核表达载体,故在弓形虫疫苗研制中应用真核表达载体将取代原核表达载体。目前在弓形虫多价疫苗的研制中应用较多的真核表达载体有 pEGFP-N3^[7]、pcDNA3.0^[8]、pcDNA3.1^[9]、pPICZαA^[10]、Bac-vsv-G^[11]、rPRV^[12]。而 pVAX1 是在载体 pcDNA3.1 的基础上改建而成的一种新型真核表达载体,是由美国食品和药品管理委员会(FDA)推荐的唯一可以应用于人体实验的载体质粒。迄今为止,关于 pVAX1 的研究已涉及动物和临床试验,且在弓形虫单价疫苗研制中也有应用,如高世同^[13]等成功构建了真核表达重组质粒 pVAX1-SAG2,并证明了其能在小鼠肌肉中转录表达,可诱导产生细胞免疫与体液免疫应答。故也可以将 pVAX1 应用于弓形虫多价疫苗的研制,使弓形虫疫苗向应用于人体更进一步。

1.3 研制方法

弓形虫多价疫苗研制的关键之三是研制方法的选择。目前常用的多表位重组技术方法有重叠区扩增基因拼接法。非病毒载体的活体基因导入方法有直接注射法、脂质体法、基因枪法、电穿孔法等。

重叠延伸 PCR 技术由于采用具有互补末端的引物,使 PCR 产物形成了重叠链,从而在随后的扩增反应中通过重叠链的延伸,将不同来源的扩增片段重叠拼接起来。此技术利用 PCR 技术能够在体外进行有效的基因重组,而且不需要内切酶消化和连接酶处理,可利用这一技术很快获得其它依靠限制性内切酶消化的方法难以得到的产物^[14]。如王平在 2009 年利用重叠区扩增基因拼接法进行多表位重组技术,构建出了中国人群 HLA 特异的 HC-MV 串联表位腺病毒核酸疫苗。而在弓形虫多价疫苗研制方面,张清国等利用此项技术成功构建了弓形虫 P30-ROP2-HSP70 复合基因核酸疫苗。

直接注射法可将外源基因直接注射到靶位点或血管中,但此种方法不适合以肌肉作为靶器官,它的外源基因表达效率极低,仅为电穿孔法的百分之一。

脂质体法活体基因转移法中脂质体法更适宜较大面积组织的基因导入,但无法避免 DNA 浓度变低,在出血的情况下会使本来不高的 DNA 浓度更加降低,往往造成基因导入效率低。

基因枪法适合于 DNA 较易接触到的质地较坚

韧的组织如皮肤,而视网膜、胚胎和禽类的胚盘等组织会由于机械刺激和出血造成器质性损伤或发育停滞,因而不能用基因枪法完成。DNA 包裹的金属颗粒从基因枪发出到达组织表面大多只几百微米的距离,较深层的组织不易操作,表达效率也较低。

电穿孔法转基因是将外源基因通过电场作用,导入动物目标组织或器官的技术。电穿孔法基因导入和表达效率较高,器官的选择面广,对导入的外源基因片段的大小没有限制,此外活体电穿孔法操作简单快速,电穿孔的时间只有几秒钟,而且 DNA 片段不需要特殊的纯化操作。但电穿孔法也存在一些缺点:首先,外源基因表达持续的时间很短,虽然外源基因导入后最快可在 215 h 有表达,但大多 1~2 月后表达量降至很低。外源基因表达的时间主要由于所构建的表达载体和基因导入的靶细胞组织器官不同而存在巨大差异。吕远栋^[15]等用电穿孔法成功将质粒 pG 转染 32DP210 细胞,并证明了电穿孔法是最佳的转染方法。

1.4 疫苗种类

弓形虫疫苗研制的关键之四是疫苗种类的选择。多价基因工程疫苗和核酸疫苗是近几年来国内外研究的热点。因弓形虫生活史复杂,形态多样性,入侵宿主的广泛性,造成不同性质抗原的免疫特性及致病分子的机制均不同,而多价疫苗具有解决这些问题的潜力。

为了增强疫苗的免疫效果,有学者发现^[17]数种弓形虫蛋白联合使用能尽可能多地提供弓形虫抗原表位,用其制成的混合多表位疫苗,能同时诱导机体产生高水平的保护性体液免疫和细胞免疫,如将 P35、P29、P30 蛋白作为混合抗原,用 Rec-ELISA 方法检测速殖子感染者血清 IgG,其敏感度、特异性和符合率分别达到 98.4%、95.7% 和 97.2%;P35、P29 和 P66 联用检测速殖子感染者血清 IgM,其敏感度、特异性和符合率也分别达到 93.1%、95.0% 和 94.5%。复合多价疫苗是将不同抗原分子设计成联合抗原或将编码不同抗原分子的功能性表位氨基酸的基因片段连接起来,通过原核或真核表达系统表达出联合表位肽段制成的疫苗。这种人工改造的抗原制成的疫苗在接种后能刺激机体产生针对不同种株或(和)不同生活史时期的弓形虫均起作用的特异性免疫反应,使疫苗具有多用性和可靠的保护性。目前研究发展了几种类型的复合抗原疫苗:①用重组体或多肽同靶受体随意结合形成一种新抗原;②用能在体外表达原虫不同抗原的质粒 DNA;③克隆能表达弓形虫抗原的媒介载体;④用重组蛋白与能增强保护性免疫反应的佐剂结合物。由于复

合多价疫苗需要制备两种或两种以上的抗原,再联合进行免疫,因此操作相对繁琐,而且较难得到纯度高的融合蛋白,目前对复合多价疫苗的研究还较薄弱,尚未见到此类疫苗应用于人体的报道。将弓形虫表面抗原与细胞因子或佐剂联合制成的混合多价疫苗,也是在复合多价疫苗的基础上发展起来的一个重要的研究方向。多种抗原基因重组、针对不同生活史发育阶段的重组 DNA 核酸疫苗也将成为弓形虫疫苗的一个重要的发展方向。

2 弓形虫多价疫苗的应用

目前弓形虫疫苗的应用仅局限于动物实验,尚未见应用于人体的报道。近年来常见的动物实验有疫苗免疫动物后测免疫指标和疫苗对动物的免疫保护性。而弓形虫疫苗免疫动物后主要测得免疫指标有弓形虫血清抗体、免疫细胞及一些细胞因子。弓形虫血清抗体有 IgM 和 IgG,免疫细胞有 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞。细胞因子包括白细胞介素-2(IL-2)、IL-4、γ 干扰素(IFN-γ)等。杨婷婷等^[18]通过小鼠实验来比较 P30 单价抗原和 P30-ROP2 复合多价抗原疫苗在诱导小鼠抗体水平的差异显示,来自弓形虫不同生活阶段的复合抗原免疫效果要优于单价抗原。国外的 Igarashi M 等^[19]将 rROP2、rGRA5 和 rGRA7 蛋白制成复合多价重组疫苗,发现能较好的保护 BALB/c 小鼠脑中弓形虫包囊的形成。国内的张佃波等^[20]用 ROP2-P30 复合重组蛋白疫苗免疫的 BALA/c 小鼠,能诱导机体产生大量的 IgM、IgG 抗体和 IFN-γ、IL-2 及 IL-4 细胞因子,从而发生高水平的体液和细胞免疫应答。陈海峰等^[21]用构建的 SAG1 和 ROP1 复合基因真核表达质粒接种小鼠,发现 SAG1 和 ROP1 复合基因疫苗诱导小鼠产生了很强的体液免疫和细胞免疫,小鼠的存活时间与空白对照组相比延长 4 d,证实了接种该疫苗对于毒性株弓形虫感染攻击具有免疫保护作用。周永安^[22]等用脂质体介导弓形虫 SAG1 与 SAG3 复合编码基因质粒接种小鼠能明显诱导体液和细胞免疫应答。李瑾^[8]等研究 pcDNA3-P30-ROP2-HSP70 复合核酸疫苗的免疫保护作用,证明了该复合核酸疫苗具有较强的免疫原性,能产生良好的免疫保护作用。黄金贵^[23]等研究弓形虫亲环蛋白亚单位疫苗的免疫保护性,证明了其具有较强的免疫原性,能产生良好的免疫保护作用。

3 弓形虫多价疫苗研制存在的问题与解决策略

弓形虫多价疫苗的研制主要存在两大问题:疫

苗的免疫保护效果和在人体的安全应用。已有研究表明,多价疫苗免疫保护性好于单价疫苗,但仍难以达到理想的效果。首先,由于各备选抗原缺乏免疫保护性的横向比较,这让多价疫苗的抗原蛋白选择缺少证据,如能在未来的研究中将这些抗原蛋白免疫原性和进行横向比较,将使多价疫苗的研制更加具高的免疫原性和免疫保护性。其次,为增强疫苗的免疫效果,须探索研究采用免疫佐剂,合适的的免疫途径和方法。

不同基因型的弓形虫感染诱导的免疫应答结局不同,基因型 I(例如 RH 株)和基因型 III 的弓形虫感染宿主,主要诱导 M2(替代途径活化的巨噬细胞)优势应答,这种免疫应答不利于宿主杀灭细胞内的弓形虫,不利于宿主的抗虫免疫;而基因型 II(例如 PRU 株)感染宿主后,主要诱导 M1(经典途径活化的巨噬细胞)优势应答,其结果是大大增强了巨噬细胞的 NO 和 iNOS 的分泌,宿主细胞杀伤力增强,表现为宿主强力的抗虫免疫。同样,不同的基因型会激活宿主细胞不同的信号通路,弓形虫 3 个基因型都可以诱导 STAT3/6 的快速磷酸化(感染后 1 h),I 和 III 型还能保持 STAT3/6 的持续激活,并抑制巨噬细胞产生 IL-12^[24]。I 型 RH 株接种小鼠可诱导炎症性单核细胞和大量中性粒细胞的募集,III 型虫株能引起单核细胞的快速募集^[25]。加上不同抗原分子是否诱导交叉免疫应答尚待研究,这就给弓形虫多价疫苗的研究增加难度。

多价疫苗的研究迄今为止仅进行了动物实验,尚未见到应用于人体的报道。这就要求我们之后的研究要向应用于人体发展,不仅要考虑到疫苗的免疫原性和免疫保护性,还要考虑到多价疫苗应用人体的安全性。解决多价疫苗的免疫保护性和安全性可用真核表达载体代替原核表达载体,如真核表达载体 pVAX1 是由美国食品和药品管理委员会(FDA)推荐的唯一可以应用于人体实验的载体质粒,我们可将其应用于弓形虫多价疫苗的研制中。

4 结语

弓形虫多价疫苗的研制将成为弓形虫病的防治的重点,这就要求我们要从弓形虫多价疫苗的有效性和安全性着手。选择免疫原性及免疫保护性更强的弓形虫抗原,选择更适用于人体的真核质粒及合适的佐剂,研制出多种抗原基因重组、针对不同生活史及发育阶段的弓形虫多价疫苗。

参考文献:

- [1] Yu ES. Toxoplasmosis[M]. Fuzhou: Fujian Science and Technology Press, 1992: 125-157. (in Chinese)
- [2] McLeod R, Boyer K, Garrison T, et al. Outcome of treatment for congenital Toxoplasmosis, 1981-2004: the National Collaborative Chicago-based, Congenital Toxoplasmosis Study[J]. Clin Infect Dis, 2006, 42(10): 1383-1394. DOI: 10.1086/501360
- [3] Liu HK, Peng GH, Yuan ZG, et al. Anti-toxoplasmosis DNA vaccine progress[J]. Chin J Zoonoses, 2009, 25(10): 1004-1007. (in Chinese)
- [4]刘海阔,彭高辉,袁子国,等.抗弓形虫病核酸疫苗的研究进展[J].中国人兽共患病学报,2009,25(10): 1004-1007.
- [5] Boothroyd JC, Dubremetz JF. Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma rhoptries*[J]. Nat Rev Microbiol, 2008, 6(1): 79-88. DOI: 10.1038/nrmicro1800
- [6] Dziadek B, Gatkowska J, Brzostek A, et al. *Toxoplasma gondii*: the immunogenic and protective efficacy of recombinant ROP2 and ROP4 rhoptry proteins in murine experimental toxoplasmosis[J]. Exp Parasitol, 2009, 123(1): 81-89. DOI: 10.1016/j.exppara.2009.06.002
- [7] Liu MM, Yuan ZG, Peng GH, et al. *Toxoplasma gondii* microneme protein 8(MIC8) is a potential vaccine candidate against toxoplasmosis[J]. Parasitol Res, 2010, 106(5): 1079-1084. DOI: 10.1007/s00436-010-1742-0
- [8] Li W, Liu Y, Liu B, et al. Immune responses in mice vaccinated with recombinant plasmid pcDNA3 containing SAG1 and ROP1 gene from *Toxoplasma gondii*[J]. J Beihua Univ (Nat Sci), 2008, 9(8): 314-316. DOI: 1009-4822(2008)04-0314-03 (in Chinese)
- [9] 李薇,刘玉,刘波等.弓形虫 SAG1,ROP1 基因及其复合抗原基因的核酸免疫研究[J].北华大学学报,2008,9(8):314-316.
- [10] Li J, Xiao T, Huang BC, et al. Immune protection effect on recombinant DNA vaccine of pc-DNA3-P30-ROP2-HSP70 from *Toxoplasma gondii*[J]. Chin J Zoonoses, 2012, 28(1): 56-62. DOI: 1002-2694(2012)01-0056-06 (in Chinese)
- [11] 李瑾,肖婷,黄炳成,等.弓形虫 pcDNA3-P30-ROP2-HSP30 复合核酸疫苗免疫保护性的研[J].中国人兽共患病学报,2012,28(1):56-62.
- [12] Zhang J, He SY, Jiang H, et al. Evaluation of the immune response induced by multiantigenic DNA vaccine encoding SAG1 and ROP2 of *Toxoplasma gondii* and the adjuvant properties of murine interleukin-12 plasmid in BALB/c mice[J]. Parasitol Res, 2007, 101(2): 331-338. DOI: 10.1007/s00436-007-0465-3
- [13] Lau YL, Thiruvengadam G, Lee WW, et al. Immunogenic characterization of the chimeric surface antigen 1 and 2 (SAG1/2) of *Toxoplasma gondii* expressed in the yeast Pichia pastoris [J]. Parasitol Res, 2011, 109(3): 871-878. DOI: 10.1007/s00436-011-2315-6
- [14] Fang R, Feng HL, Nie N, et al. Construction and immunogenicity of pseudotype baculovirus expressing *Toxoplasma gondii* SAG1 protein in BALB/c mice model[J]. Vaccine, 2010, 28

- (7):1803-1807. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.12.005
- [12]Shang LM, Liu Q, Liu WS, et al. Protection in mice immunized with a heterologous prime-boost regime using DNA and recombinant pseudorabies expressing TgSAG1 against *Toxoplasma gondii* challenge[J]. Vaccine, 2010, 27: 2741-2745. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.03.013
- [13]Gao ST, Wu ST, Long CH, et al. Construction of PVAX1-SAG2 plasmid encoding the SAG2 protein of *Toxoplasma Gondii* and the immune responses induced in mice[J]. Chin J Zoonoses, 2004, 20(8): 658-661. DOI: 1002-2694(2004)08-0658-04 (in Chinese)
- 高世同,吴少庭,龙彩虹,等.弓形虫 pVAX1 - SAG2 真核表达质粒的构建及其诱导的小鼠免疫应答[J].中国人兽共患病杂志,2004, 20(8):658-661.
- [14]Luo SP, Leng XG. PCR-based site-directed mutagenesis[J]. Biomed Engineer Foreign Med Sci, 2005, 28 (3): 188-192. DOI: 1001-1110(2005)03-0188-05. (in Chinese)
- 罗师平,冷希岗.基于PCR的体外诱变技术[J].国外医学生物医学工程分册,2005,28(3):188-192.
- [15]Lv YD, Wang YZ, Xu WH, et al. Investigation on optimal parameters of electroporation-mediated transfection in 32DP210 [J]. Chin J Health Lab Technol, 2012, 22 (04): 755-758. DOI: 1004-8685(2012)04-755-03. (in Chinese)
- 吕远栋,王雅珍,徐伟红,等.探讨电穿孔法介导转染 32DP210 细胞的参数[J].中国卫生检验杂志,2012,22(04):755-758.
- [16]Morales-Sainz L, Escobar-Ramirez A, Cruz-Torres V, et al. The polypeptides COX2A and COX2B are essential components of the mitochondrial cytochrome c oxidase of *Toxoplasma gondii*[J]. Biochim Biophys Acta, 2008, 1777(2): 202-210. DOI: 10.1016/j.bbabi.2007.10.013
- [17]Aubert D, Maine GT, Villena I, et al. Recombinant antigens to detect *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin G and immunoglobulin M in human sera by enzyme immunoassay[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(3): 1144-1150.
- [18]Yang TT, He SY, Jiang H, et al. Construction of monovalent and compoubd nucleic acid vaccines against *Toxoplasma gondii* with gene encoding P30[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2005, 23(1): 14-17. DOI: 1000-7423(2005)-01-0014-04 (in Chinese)
- 杨婷婷,何深一,蒋华,等.弓形虫主要表面抗原 P30 单价及复合基因疫苗的构建[J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2005, 23(1): 14-17.
- [19]Igarashi M, Kano F, Tamekuni K, et al. *Toxoplasma gondii* evaluation of an intranasal vaccine using recombinant proteins against brain cyst formation in BALB/c mice[J]. Exp Parasitol, 2008, 118(3): 386-392. DOI: 10.1016/j.exppara.2007.10.002
- [20]Zhang XB, Zhou LT, Wang HF, et al. Protective effect of multiple recombinant antigens against to toxoplasmosis in mice [J]. J Parasit Biol, 2008, 3(10): 763-767. DOI: 1673-5234 (2008)10-0763-05 (in Chinese)
- 张佃波,周林涛,王海防,等.刚地弓形虫 ROP-P30 复合重组蛋白疫苗对 BLAB/c 小鼠免疫保护性的研究[J].中国病原生物学杂志,2008, 3(10): 763-767.
- [21]Chen HF, Zheng HQ, Xu J, et al. A cocktail candidate DNA vaccine against *Toxoplasma gondii* with genes encoding SAG1 and ROPI induces protective immunity against lethal challenge in mice[J]. J Trop Med, 2003, 3(1): 15-18. (in Chinese)
- 陈海峰,郑焕钦,徐劲,等. SAG1 和 ROPI 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.
- [22]Zhou YA, Yu XB, Chen HF, et al. Induction of immune responses in mice by vaccination with liposome-entrapped DNA complexes encoding *Toxoplasma gondii* SAG1 and SAG3 genes [J]. Chin J Microbiol Immunol, 2006, 26(7): 647-653. (in Chinese)
- 周永安,余新炳,陈海峰,等.脂质体介导弓形虫 SAG1 与 SAG3 复合基因诱导小鼠免疫应答研究[J].中国微生物和免疫学杂志,2006,26(7):647-653.
- [23]Huang JG, Li YN, Gong PT, et al. Studies on immuno-protection from a *Toxoplasma gondii* infection provided by a TgCyP subunit vaccine[J]. J Pathog Biol, 2011, 6(7): 517-520. (in Chinese)
- 黄金贵,李运娜,宫鹏涛,等.弓形虫亲环蛋白亚单位疫苗的免疫保护性研究[J].中国病原生物学杂志,2011,6(7):517-520.
- [24]Pollard AM, Knoll LJ, Mordue DG. The role of specific *Toxoplasma gondii* molecules in manipulation of innate immunity [J]. Trends Parasitol, 2009, 25 (11): 491-494. DOI: 10.1016/j.pt.2009.07.009
- [25]Jin QE, Gu JC. The relationship between monocyte phenotype and *Toxoplasma* genotype[J]. J Pathog Biol, 2011, 6(7): 553-554. DOI: 1673-5234(2011)07-0553-02 (in Chinese)
- 靳庆娥,谷俊朝.单核细胞表型与弓形体基因型关系概述[J].中国病原生物学杂志,2011,6(7):553-554.

收稿日期:2012-09-09;修回日期:2013-01-18