

• 论 著 •

弓形虫 SAG1、ROP18 真核表达载体的构建及在诱导小鼠保护性免疫中的作用研究*

吴腊梅¹, 彭天丽¹, 何雁鸿¹, 董成林², 杨慧健^{2△}

1. 上海市嘉定区安亭医院检验科, 上海 201800; 2. 上海中冶医院检验科, 上海 200941

摘要:目的 观察弓形虫速殖子表面抗原 1(SAG1)、棒状体蛋白 18(ROP18)真核表达载体单独及联合使用诱导 BALB/c 小鼠的保护性免疫作用。方法 制备重组真核表达质粒 p3×FLAG-Myc-CMVTM-24-SAG1, p3×FLAG-Myc-CMVTM-24-ROP18 及空质粒 p3×FLAG-Myc-CMVTM-24(空载体), 以磷酸盐缓冲液(PBS)稀释至 1 μg/μL。将 102 只 BALB/c 小鼠随机分成 6 组, 每组 17 只, 前 4 组分别注射 PBS(PBS 对照组)、空载体(空载体对照组)、SAG1 载体(SAG1 组)、ROP18 载体(ROP18 组)各 100 μL, 其余两组均注射 SAG1 与 ROP18 对半混合载体, 分别注射量为 200 μL(全量混合组)、100 μL(半量混合组), 每组间隔 2 周免疫 1 次, 共免疫 3 次。末次免疫 4 周后, 各组随机取 7 只小鼠, 无菌条件下取脾, 流式细胞术检测小鼠脾脏 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞亚群分布, 荧光定量 PCR 分析各组小鼠脾细胞中细胞因子白细胞介素(IL)-4、IL-12、干扰素 γ(IFN-γ)的表达; 每组其余 10 只小鼠腹腔接种 1×10³ 个弓形虫速殖子, 观察各组小鼠的生存时间。结果 各组小鼠脾脏 CD4⁺ T 细胞比例差异无统计学意义($P>0.05$); 与 PBS 对照组比较, SAG1 组、ROP18 组、全量混合组、半量混合组、空载体对照组 CD8⁺ T 细胞比例明显升高($P<0.01$), 半量混合组较其他组更高($P<0.05$)。半量混合组、全量混合组 CD4⁺/CD8⁺ 较两对照组(PBS 对照组和空载体对照组)降低, 差异有统计学意义($P<0.05$)。全量混合组、半量混合组小鼠脾细胞中 IL-12、IFN-γ 相对表达水平与两对照组比较, 差异有统计学意义($P<0.05$), 且半量混合组 IFN-γ 相对表达水平与 ROP18 组比较, 差异有统计学意义($P<0.05$), 但各组间 IL-4 相对表达水平差异无统计学意义($P>0.05$)。弓形虫速殖子攻击感染小鼠试验中两单基因疫苗组(SAG1 组和 ROP18 组)、全量混合组、半量混合组均较两对照组生存时间延长($P<0.05$), 且半量混合组较全量混合组生存时间也显著延长($P<0.01$), 但全量混合组与两单基因疫苗组差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 弓形虫 DNA 重组载体能诱导 BALB/c 小鼠产生特异性细胞免疫应答及部分抗虫免疫保护作用, 且构建的两种真核载体在合适浓度联合免疫能诱导小鼠产生更强的免疫保护作用。

关键词:刚地弓形虫; 速殖子表面抗原 1; 棒状体蛋白 18; DNA 疫苗

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2023.19.012

中图法分类号:R382.5; R446.6

文章编号:1673-4130(2023)19-2365-05

文献标志码:A

Construction of eukaryotic expression vectors of *Toxoplasma gondii* SAG1 and ROP18 and their role in inducing protective immunity in mice*

WU Lamei¹, PENG Tianli¹, HE Yanhong¹, DONG Chenglin², YANG Huijian^{2△}

1. Department of Clinical Laboratory, Anting Hospital, Jiading District, Shanghai 201800, China;

2. Department of Clinical Laboratory, Shanghai Zhongye Hospital, Shanghai 200941, China

Abstract: **Objective** To observe the protective immunity function of BALB/c mice induced by the eukaryotic expression vectors of SAG1 and ROP18 of *Toxoplasma gondii* alone or in combination. **Methods** Recombinant eukaryotic expression plasmid p3×FLAG-Myc-CMVTM-24-SAG1, p3×FLAG-Myc-CMVTM-24-ROP18 and empty plasmid p3×FLAG-Myc-CMVTM-24 (empty vector) were prepared and diluted to 1 μg/μL with phosphate buffer solution (PBS). A total of 102 BALB/c mice were randomly divided into six groups, with 17 mice per group. The first four groups were injected with 100 μL of PBS (PBS control group), empty vector (empty vector control group), SAG1 vector (SAG1 group) and ROP18 vector (ROP18 group) respectively, and another two groups were injected with the half-mixed vector of SAG1 and ROP18, and the injection dose were 200 μL (full mixed group) and 100 μL (half mixed group) respectively. Each group was immunized once

* 基金项目:上海市卫生和健康委员会青年基金项目(20184Y0087);上海市嘉定区自然科学基金项目(JDKW-2022-0052)。

作者简介:吴腊梅,女,主管技师,主要从事分子、微生物、免疫学方面的研究。△ 通信作者, E-mail: shikong6600@163.com。

two weeks, three times in total. Four weeks after the final immunization, 7 mice were randomly selected from each group, and their spleen was taken aseptically. The distribution of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cell subsets in the spleen of mice was detected by flow cytometry, and the mRNA expression of cytokines interleukin (IL)-4, IL-12 and interferon γ (IFN- γ) in each group was analyzed by fluorescence quantitative PCR. The remaining ten mice in each group were intraperitoneally inoculated with 1×10^3 *Toxoplasma gondii* tachyzoites, and the survival time of each group was observed. **Results** There was no significant difference in the proportion of $CD4^+$ T cells in spleen among all groups ($P > 0.05$). Compared with PBS group, the proportion of $CD8^+$ T cells in SAG1 group, ROP18 group, full mixed group, half mixed group and empty vector control group significantly increased ($P < 0.01$), and the proportion of $CD8^+$ T cells in half mixed group was higher than that in other groups ($P < 0.05$). In the half mixed group and the full mixed group, the $CD4^+/CD8^+$ was lower than those of the two control groups, which were PBS control group and empty vector control group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The relative expression levels of IL-12 and IFN- γ in spleen cells of mice in full mixed group and half mixed group were significantly different from those in the two control groups ($P < 0.05$), and the relative expression levels of IFN- γ in half mixed group were significantly different from those in ROP18 group ($P < 0.05$). There was no significant difference in the relative expression level of IL-4 among all groups ($P > 0.05$). In the experiment of *Toxoplasma gondii* tachyzoites attacking infected mice, the survival time of the two single-gene vaccine groups (SAG1 group and ROP18 group), the full mixed group and the half-dose mixed group was significantly longer than those of the two control groups ($P < 0.05$), and the survival time of the half-dose mixed group was also significantly longer than that of the full dose mixed group ($P < 0.01$), but there was no statistical significance between the full dose mixed group and the two single-gene vaccine groups ($P > 0.05$). **Conclusion** The *Toxoplasma gondii* DNA recombinant vector of could induce specific cellular immune response and partial anti-insect immune protection in BALB/c mice, and the combination of the two eukaryotic vectors could induce stronger immune protection in mice at appropriate concentrations.

Key words: *Toxoplasma gondii*; surface antigen 1; rhoptry protein 18; DNA vaccines

弓形虫是一种专性细胞内寄生的原虫,能够感染大多数温血哺乳动物,可引起人兽共患弓形虫病^[1]。弓形虫病也是常见的机会性致病寄生虫病^[2],在肿瘤患者、人类免疫缺陷病毒(HIV)感染者及艾滋病(AIDS)人群中弓形虫抗体阳性率分别高达 63.0%、44.8%和 95.0%^[3]。弓形虫感染人体后可侵犯人体的各个组织及脏器,并可通过母婴垂直传播造成胎儿神经系统发育障碍、胎儿畸形,引起流产甚至是死胎。家畜弓形虫病的传播和流行,不仅给畜牧业的生产带来严重的损失,更是人类感染弓形虫的重要传染源^[4-5]。目前弓形虫病的药物治疗效果不很理想,疫苗接种可能是预防弓形虫病的最佳策略^[6]。

速殖子表面抗原 1(SAG1)是最早被克隆表达的蛋白,弓形虫 SAG1 抗原作为弓形虫速殖子表面的主要抗原之一,是诱导宿主免疫应答的主要靶抗原,也是迄今应用最多的弓形虫疫苗候选抗原^[7-8]。棒状体蛋白 18(ROP18)定位于纳虫泡中^[9],是丝氨酸-苏氨酸激酶,是重要的毒力因子。ROP18 可改变其感染的宿主细胞的信号传导,使感染细胞的基因表达发生变化,阻止宿主细胞发生凋亡。当弓形虫进入宿主细胞时,会生成一层保护膜将自身包裹起来,ROP18 的作

用则是让宿主细胞的某些蛋白失效而无法破坏这层保护膜^[10]。弓形虫的生活史较为复杂,抗原成分种类多,每种抗原在体内诱导的免疫反应有所不同,单个抗原的免疫效果不很理想,联合基因疫苗诱导的各项免疫指标显著优于单价疫苗^[11-13],能够克服单基因抗原作为候选疫苗诱导主动免疫的不足。因此,本研究拟在构建真核表达质粒 p3×FLAG-Myc-CMVTM-24-SAG1、p3×FLAG-Myc-CMVTM-24-ROP18 的基础上分别单独或联合免疫小鼠,并初步研究判断其免疫保护效果。

1 材料与方法

1.1 实验动物 纯种 BALB/c 鼠 102 只,4~6 周龄,雌性,体重(20±2)g,由扬州大学实验动物中心提供。

1.2 弓形虫虫株与质粒 弓形虫 RH 株速殖子为本实验室保种,p3×FLAG-Myc-CMVTM-24 真核表达载体由江苏大学医学院龚爱华副教授惠赠,重组真核表达质粒 p3×FLAG-Myc-CMVTM-24-SAG1 和 p3×FLAG-Myc-CMVTM-24-ROP18 由本课题组构建。

1.3 主要试剂及仪器 AxyPrep 质粒大量试剂盒购于 AxyGEN 公司,RNA 提取试剂 Trizol、逆转录试剂盒 HiScriptTM Reverse Transcriptase、荧光定量试剂

AceQ qPCR SYBR Green Master Mix(不含 ROX 染料)均购于南京诺唯赞(Vazyme)公司,异硫氰酸荧光素(FITC)anti-mouse CD4(L3T4)、藻红蛋白(PE)、anti-mouse CD8a(Ly-2)购于联科生物,RPMI 1640 培养液购于赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司,胎牛血清购于杭州四季青公司。荧光定量 PCR 扩增仪购于美国 Bio-Rad 公司,流式细胞仪购于美国 BD 公司,CO₂ 培养箱(Forma series II)购于美国 Thermo 公司。

1.4 重组质粒的大量提取与表达鉴定 按照质粒大量提取试剂盒制备重组真核表达质粒 p3×FLAG-Myc-CMVTM-24-SAG1、3×FLAG-Myc-CMVTM-24-ROP18 及对照质粒 p3×FLAG-Myc-CMVTM-24,各质粒经 DNA 转染试剂盒(RonfectTM DNA transfection reagent)导入 HEK-293T 细胞内,加入含胎牛血清的 DMEM 培养基,在含 5% CO₂, 37 °C 孵育箱培养 48 h 后,收集细胞并提取蛋白,通过 Western blotting 法鉴定质粒表达情况。紫外分光光度计测定吸光度(A)值 A₂₆₀ 及 A₂₈₀ 并计算其比值,确定质粒的浓度和纯度。质粒转染过程按照试剂说明书操作。

1.5 DNA 疫苗免疫接种 将 BALB/c 系小鼠随机分成 6 组,每组 17 只,将提取的空载体 p3×FLAG-Myc-CMVTM-24 及重组质粒 p3×FLAG-Myc-CMVTM-24-SAG1、p3×FLAG-Myc-CMVTM-24-ROP18 以磷酸盐缓冲液(PBS)稀释至 1 μg/μL。注射选用 4 号针头,经小鼠左后腿或右后腿胫后下端,以平行于肌肉纵轴的方向进针。第 1 组为 PBS 对照组(以下简称 PBS 组),第 2 组为空载体对照组(p3×FLAG-Myc-CMVTM-24)(以下简称空载体组),第 3 组为 p3×FLAG-Myc-CMVTM-24-SAG1(SAG1 组),第 4 组为 p3×FLAG-Myc-CMVTM-24-ROP18(ROP18 组),以上 4 组每次注射 100 μL;第 5、6 组为 p3×FLAG-Myc-CMVTM-24-SAG1 和 p3×FLAG-Myc-CMVTM-24-ROP18 均量混合组(全量混合组、半量混合组),每次分别注射 200 μL 和 100 μL。初次免疫后于第 2、4 周加强免疫,末次免疫 4 周后做检测。

1.6 小鼠脾脏 T 淋巴细胞亚群的测定 末次免疫后 4 周,各组随机挑选 7 只小鼠,无菌条件下取脾,将脾制成脾细胞悬液,用 Hanks 液洗 3 次,每次 1 000 r/min,离心 10 min,然后将细胞悬浮于 PBS 中,调整细胞浓度至 1×10⁶/mL。取 100 μL 悬液,加抗 CD4⁺、CD8⁺ T 单抗,避光 40 min,用流式细胞仪检测 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞比例。其中,检测 CD4 的单抗为 FITC 标记的小鼠 IgG2b,检测 CD8 的单抗为 PE 标记的 IgG2a,二者均配以阴性对照。

1.7 白细胞介素(IL)-4、IL-12、干扰素 γ(IFN-γ)细胞因子检测 实时荧光定量法检测各组小鼠脾细胞

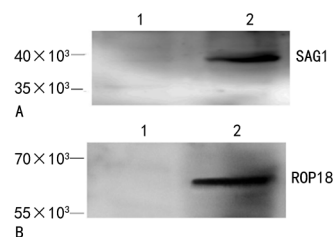
中细胞因子 IL-4、IL-12、IFN-γ mRNA 表达水平。收集剩余的脾细胞悬液 1 000 r/min 离心 10 min 后弃除上清,加入 Trizol 试剂,按照试剂使用说明书提取脾脏细胞总 RNA,并确定其纯度和浓度,以总的 RNA 为模板,用逆转录试剂盒将其逆转录成 cDNA。根据 GenBank 中小鼠 IL-4、IL-12、IFN-γ、β-actin 的基因序列设计引物。IL-4:上游引物为 5'-GGTCTCAAC-CCCCAGCTAGT-3',下游引物为 5'-GCCGAT-GATCTCTCTCAAGTGAT-3'。IL-12:上游引物为 5'-TGACATGGTGAAGACGGC-3',下游引物为 5'-GCCTGGAAGTCTGTCTGGTA-3'。IFN-γ:上游引物为 5'-GCTTTGCAGCTCTTCCTCAT-3',下游引物为 5'-TCTTCCACATCTATGCCACTTG-3'。内参 β-actin:上游引物为 5'-TGGAATCCTGTG-GCATCCATGAAAC-3',下游引物为 5'-TAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3'。采用 10 μL 体系进行荧光定量 PCR 反应,PCR 反应热循环参数为:预变性 95 °C 5 min,然后 95 °C 变性 30 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,共 35 个循环,最后设定 57~95 °C 溶解温度区间每 5 s 上升 0.5 °C。利用公式 2^{-ΔΔC_t} 对数据进行相对定量。

1.8 免疫小鼠抗攻击感染试验 末次免疫后 4 周,各组小鼠随机抽取 10 只,每只小鼠腹腔注射弓形虫 RH 株速殖子 1 000 个,每天观察小鼠的变化和死亡时间。

1.9 统计学处理 所有数据均使用 SPSS22.0 软件分析,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,经方差齐性检验后使用单因素方差分析或非参数检验,生存曲线分析采用对数秩检验(Log-rank 检验)。以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 重组质粒的鉴定结果及提取 真核表达质粒 p3×FLAG-Myc-CMVTM-24-SAG1、3×FLAG-Myc-CMVTM-24-ROP18 及对照质粒 p3×FLAG-Myc-CMVTM-24 在 HEK-293T 中蛋白表达条带清晰,即 SAG1 蛋白相对分子质量介于 35×10³~40×10³,ROP18 蛋白相对分子质量介于 55×10³~70×10³。见图 1。经紫外分光光度计测得扩增质粒的 A₂₆₀/A₂₈₀ 为 1.8~2.0,采用 PBS 将质粒稀释至 1 μg/μL。



注:A 为 SAG1 蛋白表达,1 为空载体,2 为 SAG1;B 为 ROP18 蛋白表达,1 为空载体,2 为 ROP18。

图 1 SAG1 和 ROP18 真核表达载体在 HEK-293T 细胞中的蛋白表达

2.2 小鼠脾淋巴细胞 T 细胞亚群的测定 小鼠脾 CD4⁺ T 细胞在各组间分布差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 而两单基因疫苗组 (SAG1 组和 ROP18 组)、全量混合组、半量混合组与两对照组 (PBS 组和空载体组) CD8⁺ T 细胞比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 且全量混合组与单基因 ROP18 组 CD8⁺ T 细胞比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 半量混合组与全量混合组、两单基因疫苗组 CD8⁺ T 细胞比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。同时研究结果发现, CD4⁺/CD8⁺ 比值降低, 半量混合组、全量混合组, 两单基因疫苗组与两对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 半量混合组、全量混合组, 两单基因疫苗组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

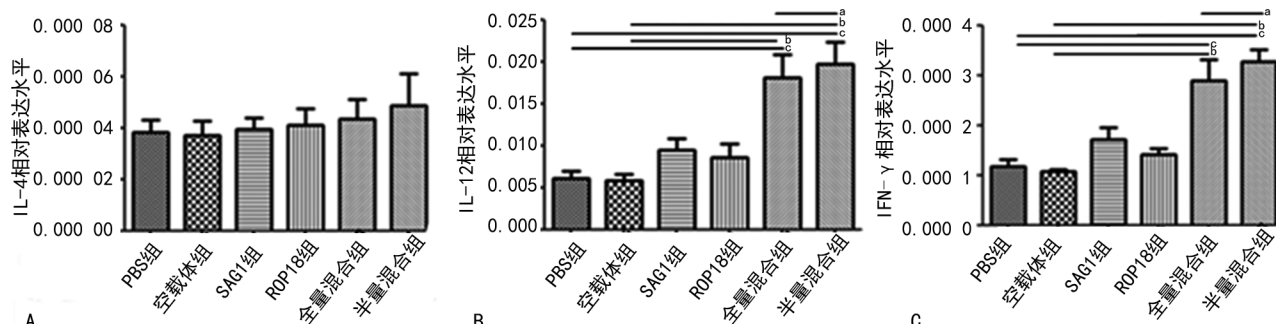
2.3 IL-4、IL-12、IFN- γ 细胞因子的检测 各组小鼠

脾细胞 IL-4 相对表达水平比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 但相比 IL-4, 不论单载体组还是混合载体组, IL-12 与 IFN- γ 的相对表达水平均高于两对照组 ($P < 0.05$), 且半量混合组混合二者的表达水平升高更显著, 明显高于全量混合组 ($P < 0.05$)。见图 2。

表 1 小鼠脾淋巴细胞 T 细胞亚群测定结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
PBS 组	33.3 ± 2.60	11.8 ± 0.42	2.99 ± 0.14
空载体组	34.6 ± 2.10	13.1 ± 0.47	2.62 ± 0.09
SAG1 组	43.6 ± 6.15	16.9 ± 0.50 ^a	2.26 ± 0.07 ^a
ROP18 组	33.7 ± 2.20	16.0 ± 0.66 ^a	2.20 ± 0.03 ^a
全量混合组	38.2 ± 0.48	17.9 ± 0.42 ^a	2.13 ± 0.06 ^a
半量混合组	40.5 ± 1.93	19.2 ± 0.48 ^{ab}	2.09 ± 0.09 ^a

注: 与 PBS 组和空载体组相比, ^a $P < 0.05$; 与两单基因疫苗组和全量混合组相比, ^b $P < 0.05$ 。



注: A 为 IL-4 mRNA 表达; B 为 IL-12 mRNA 表达; C 为 IFN- γ mRNA 表达; 与全量混合组比较, ^a $P < 0.05$; 与空载体组比较, ^b $P < 0.05$; 与 PBS 组比较, ^c $P < 0.05$ 。

图 2 各组小鼠脾细胞中细胞因子 IL-4、IL-12、IFN- γ 水平比较

2.4 免疫小鼠抗攻击感染试验结果 对 BALB/c 小鼠腹腔注射约 1 000 个弓形虫速殖子行攻击感染, 试验结果发现各组小鼠均未能耐受感染且均在感染后 15 d 内死亡。其存活的时间分别为: PBS 组 (6.42 ± 0.07) d, 空载体组 (6.38 ± 0.63) d, SAG1 组 (7.07 ± 0.11) d, ROP18 组 (6.95 ± 1.10) d, 全量混合组 (6.95 ± 1.11) d, 半量混合组 (9.53 ± 0.89) d。两单基因疫苗组、全量混合组、半量混合组较两对照组的生存时间均有延长 ($P < 0.05$), 且半量混合组较全量混合组的生存时间也延长 ($P < 0.01$)。见图 3。

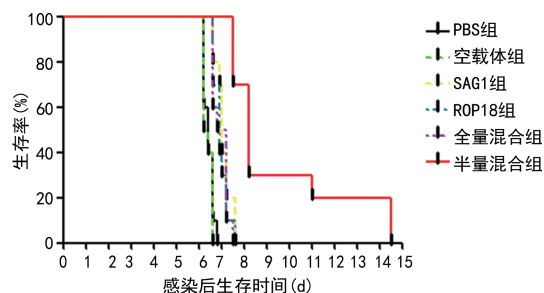


图 3 弓形虫 RH 株速殖子攻击感染后小鼠生存曲线

3 讨论

DNA 疫苗又称核酸疫苗或基因疫苗, 是编码免

疫原或与免疫原相关的真核表达质粒 DNA (有时也可是 RNA), 它可经一定途径进入动物体内, 被宿主细胞摄取后转录和翻译表达出抗原蛋白, 此抗原蛋白不仅能刺激机体产生体液免疫应答, 而且还可诱导机体产生强烈持久的细胞免疫应答, 从而起到免疫保护作用^[14-15]。然而, 单基因疫苗免疫原性较弱, 联合使用编码不同功能构成蛋白的 DNA 疫苗将是其强化诱导主动免疫的思路之一。本研究将构建好的真核表达载体 p3 × FLAG-Myc-CMVTM-24-SAG1 和 p3 × FLAG-Myc-CMVTM-24-ROP18 联合免疫小鼠, 并通过检测小鼠免疫细胞、主要细胞因子的方法监测不同方案小鼠免疫功能状态, 通过观察小鼠生存时间的方法判断最佳免疫效果。

本实验结果显示, 末次免疫的后 4 周, 半量混合组小鼠脾细胞 CD8⁺ T 的分布频率最高而 CD4⁺ T 细胞在各组间分布差异不明显, 原因可能与 CD8⁺ T 参与了清除寄生虫及感染细胞的细胞毒性反应相关^[12]。同时, 对主要由 Th1 分泌的 IL-12、IFN- γ 和 Th2 来源的 IL-4 mRNA 表达水平的检测发现, 在混合组 IFN- γ 、IL-12 的表达水平明显升高且半量混合组更高 ($P < 0.05$), IL-4 水平则在 6 组间表达水平差异无统

计学意义($P>0.05$)。这一结果表明在针对寄生虫的免疫活动中 Th1 与 Th2 的动态平衡的打破及细胞免疫的优势地位,因为很可能是 Th1 亚群分泌 IFN- γ 、IL-12 等多种细胞因子诱导了细胞免疫及增强吞噬细胞介导的抗感染免疫,特别是抗胞内病原体的感染。因此,本课题组认为合适的抗原量混合免疫 BALB/c 小鼠能刺激机体产生更强烈的细胞免疫应答。这与 XUE 等^[16]的研究结果相符。

为观察所构建的单基因质粒单独或联合使用对弓形虫感染的实际免疫诱导保护效果,本研究用高剂量弓形虫强毒株攻击感染 BALB/c 小鼠,结果显示,半量混合组小鼠的平均存活时间较全量混合组和单基因疫苗组显著延长($P<0.05$),说明联合疫苗相比于单基因疫苗能更好地产生免疫保护作用,且合适的抗原量能更好地刺激机体产生免疫保护反应。

在本研究中各组小鼠均未能存活,可能与用于攻击感染试验的弓形虫数量远高于自然感染量有关^[16],也可能与小鼠的种类及载体的选择有关^[17]。在自然环境中,弓形虫主要是通过消化道感染包囊、卵囊等感染中间宿主,因为消化道具有屏障保护的作用,如果通过口服或鼻黏膜免疫弓形虫来模仿弓形虫的自然感染途径,则可较客观地评价此疫苗的免疫保护效果,此研究有待进一步进行探索。

参考文献

- [1] ZHENG B, LOU D, DING J, et al. GRA24-based DNA vaccine prolongs survival in mice challenged with a virulent *Toxoplasma gondii* strain[J]. *Front Immunol*, 2019, 10:418.
- [2] ZHENG B, DING J, LOU D, et al. The virulence-related MYR1 protein of *Toxoplasma gondii* as a novel DNA vaccine against toxoplasmosis in mice[J]. *Front Microbiol*, 2019, 10:734.
- [3] YIN K, ZHAO G, XU C, et al. Prediction of *Toxoplasma gondii* virulence factor ROP18 competitive inhibitors by virtual screening[J]. *Parasit Vectors*, 2019, 12(1):98.
- [4] VERNAY O, SARCEY E, DETREZ V, et al. Comparative analysis of the performance of residual host cell DNA assays for viral vaccines produced in Vero cells[J]. *J Virol Methods*, 2019, 268:9-16.
- [5] MIZANI A, ALIPOUR A, SHARIF M, et al. Toxoplasmosis seroprevalence in Iranian women and risk factors of the disease: a systematic review and meta-analysis[J]. *Trop Med Health*, 2017, 45:7.
- [6] LYSÉN A, BRAATHEN R, GUDJONSSON A, et al. Dendritic cell targeted Ccl3-and Xcl1-fusion DNA vaccines differ in induced immune responses and optimal delivery site[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1):1820.
- [7] ZHANG N Z, XU Y, WANG M et al. Protective efficacy of two novel DNA vaccines expressing *Toxoplasma gondii* rhomboid 4 and rhomboid 5 proteins against acute and chronic toxoplasmosis in mice[J]. *Expert Rev Vaccines*, 2015, 14(9):1289-1297.
- [8] LUO F, ZHENG L, HU Y, et al. Induction of protective immunity against *toxoplasma gondii* in mice by nucleoside triphosphate hydrolase- II (NTPase- II) self-amplifying RNA vaccine encapsulated in lipid nanoparticle (LNP) [J]. *Front Microbiol*, 2017, 8:605.
- [9] 王燕娟, 曹建平, 孙雅雯, 等. 荧光蛋白报告载体观察刚地弓形虫 SAG1、MIC3、ROP2 鸡尾酒 DNA 疫苗的表达及其免疫原性的研究[J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2015, 33(5):368-371.
- [10] QIU W, WERNIMONT A, TANG K, et al. Novel structural and regulatory features of rhoptyr secretory kinases in *Toxoplasma gondii* [J]. *EMBO J*, 2009, 28(7):969-979.
- [11] WU X, ZHANG Q, LIU L P, et al. The location of invasion-related protein MIC3 of *Toxoplasma gondii* and protective effect of its DNA vaccine in mice[J]. *Vet Parasitol*, 2009, 166(1/2):1-7.
- [12] LAMBERT L, KINNEAR E, MCDONALD J U, et al. DNA vaccines encoding antigen targeted to MHC class II induce influenza-specific CD8(+) T cell responses, enabling faster resolution of influenza disease[J]. *Front Immunol*, 2016, 7:321.
- [13] ALIZADEH P, AHMADPOUR E, DARYANI A, et al. IL-17 and IL-22 elicited by a DNA vaccine encoding ROP13 associated with protection against *Toxoplasma gondii* in BALB/c mice[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(7):10782-10788.
- [14] GULLA S K, RAO B R, MOKU G, et al. In vivo targeting of DNA vaccines to dendritic cells using functionalized gold nanoparticles[J]. *Biomater Sci*, 2019, 7(3):773-788.
- [15] LIU X, ADAMS L J, ZENG X, Lin J. Evaluation of in ovo vaccination of DNA vaccines for *Campylobacter* control in broiler chickens[J]. *Vaccine*, 2019, 37(29):3785-3792.
- [16] XUE L J, MAO X B, LIU X B, et al. Activation of CD3⁺ T cells by *Helicobacter pylori* DNA vaccines in potential immunotherapy of gastric carcinoma[J]. *Cancer Biol Ther*, 2019, 20(6):866-876.
- [17] JAYARAJ R, KUMARASAMY C, NORBURY L, et al. Protective efficacy of liver fluke DNA vaccines: a systematic review and meta-analysis: guiding novel vaccine development[J]. *Vet Parasitol*, 2019, 267:90-98.

(收稿日期:2022-12-19 修回日期:2023-05-26)