

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

廣東血線蟲幼成蟲 cDNA 庫中完整基因特性之研究

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2314-B-002-295-

執行期間：93年08月01日至94年07月31日

執行單位：國立臺灣大學醫學院寄生蟲學科

計畫主持人：蘇霽靄

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 94 年 10 月 27 日

摘要

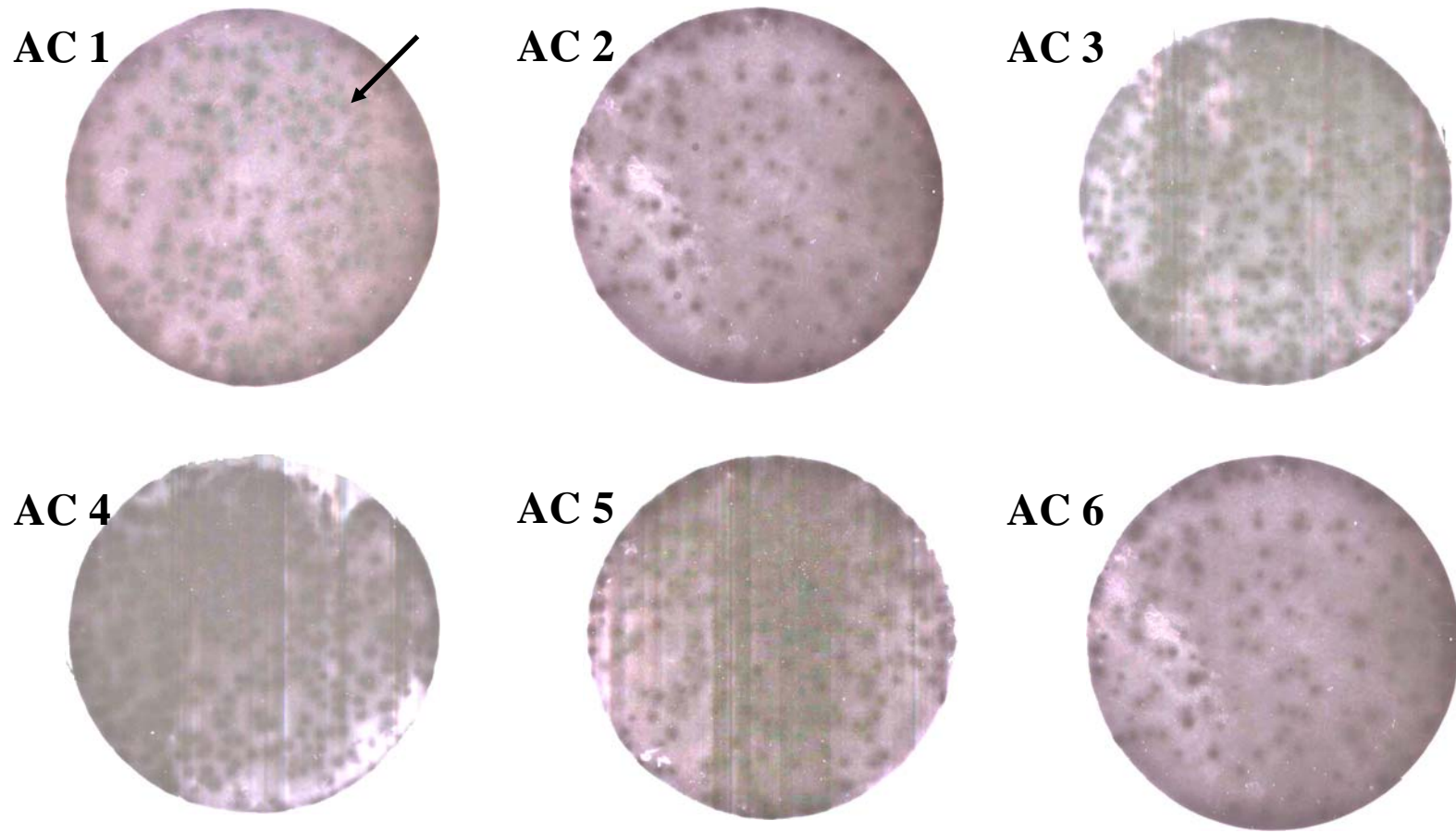
世界上第一個廣東血線蟲的人體病例是 1945 年在台灣發現的，目前廣東血線蟲也是在台灣造成嗜酸性腦膜腦炎的主要原因之一。本實驗以受廣東血線蟲感染之雄性紐西蘭白兔血清免疫篩選已建立互補去氧核糖核酸基因庫 (cDNA library)，找出與兔血清內的抗廣東血線蟲抗體有陽性反應之抗原。得到兩個 cDNA clones 分別送入表現載體中將蛋白質表現並分別命名為 AC 4 與 AC 5。AC 4 之 cDNA 片段經核苷酸序列分析長度為 483 bp，約為 160 個氨基酸，胺基酸序列經由 BLAST 軟體搜尋比對後與線蟲 *Caenorhabditis elegans* 之 apyrase 具有 70% 相似度；AC 5 之 cDNA 片段經核苷酸序列分析長度為 507 bp，約為 168 個氨基酸，胺基酸序列經由 BLAST 軟體搜尋比對後與線蟲 *C. elegans* 之 Ras associated protein (Rab) family 中的 Rab2 具有 98% 相似度。將廣東血線蟲重組蛋白 AC 4 及 AC 5 與正常或是被廣東血線蟲感染之鼯鼠脾細胞共同進行體外培養，再以酵素免疫吸附法偵測細胞激素表現之情形，發現在 AC 4 及 AC 5 刺激後，IL-4、IL-5、IL-13 等 Th2 細胞激素與對照組比較後並無顯著差異，但 IFN- γ 則有顯著增加的情形，故推測 AC 4 及 AC 5 在感染廣東血線蟲後，主要是幫助 Th1 細胞激素的表現。

關鍵詞：廣東血線蟲、幼成蟲、cDNA clones

Abstract

The first human case of angiostrongylosis was reported from Taiwan in 1945. At present, *Angiostrongylus cantonensis* is the main cause of eosinophilic meningoencephalitis in Taiwan. In this study, serum obtained from rabbit hyperinfection with *A. cantonensis* was used to screen the cDNA library constructed in our laboratory. Two selected clones (AC 4 and AC 5) which showed strong positive reaction with anti-*A. cantonensis* antibody were selected for further study. Sequencing analysis revealed that the cDNA fragment for AC 4 is 483bp (160 a.a) length. BLAST search revealed that it exhibits 70% homology to apyrase from *Caenorhabditis elegans*. The other cDNA fragment for AC 5 is 507bp (168 a.a) long. BLAST search revealed that it exhibits 98% homology to Rab2 family (Ras associated protein) family from *C.elegans*. Cytokine production in spleen cell from normal and *A. cantonensis*-infected mice in culture supernatants with *A. cantonensis* recombinant protein AC 4 or AC 5 were assessed by the commercial ELISA kit. The results revealed that the amount of cytokines IL-4, IL-5 and IL-13 were not significantly elevated after stimulation with AC 4 or AC 5. But the production of IFN- γ have significantly increased when compare with control. The increase in IFN- γ suggest that AC 4 and AC 5 may help stimulating Th1 cytokine production.

Keywords: *Angiostrongylus cantonensis*, young adults, cDNA clones



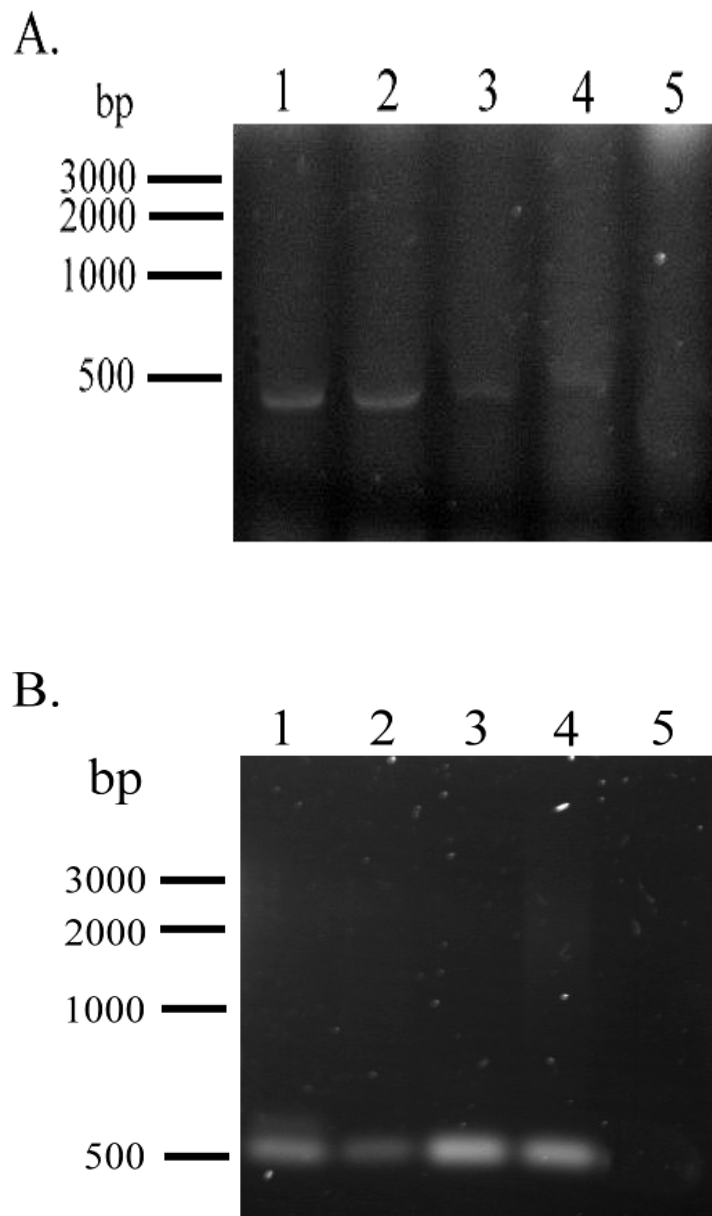
圖一、cDNA基因庫中對廣東血線蟲抗血清產生強烈免疫反應之菌株。

C. elegans apyrase : 1 MWIKVISGSGEVKSCNWKYIYKRLKAVNLGCGAYLTHEAAQWSSIHQKWFFLPRKESN 60
 MW+K +S G V NWK +YR++A+ GY+ HEA QWS+IH+KWFFLPR+ SN
 AC 4 : 197 MWVKHVSAGAVHHENWKDVYIRVRRAGIEYPG-YMIHEAVQWSAIHRKWFFLPRRMSN 255
C. elegans apyrase : 61 ETHNETVDEQKGTNLLLIGNPNLTEVDVVRIGNLTHPERGFSAFEPETNDTLIVALKS 120
 E ++E DE +GTN+L+IGN LT++ VVR+G++ RGF+AF+F+P T+ LIVA+KS
 AC 4 : 256 EKYSAEEDENRGTNVLVIGNEELTDFEVVRVGSENNKS RGF+AF+F+P T+ LIVA+KS 315
C. elegans apyrase : 121 EEVKG NATKSYITVFNISGHVLLDDQLEDDYKFEGIYF 159
 EE G SY+ VF+I G+V+LD+ L YK+ EGI F
 AC 4 : 316 EEKDGKPVASYASVFDIHGNVILDEYLLHGPYKYEGIAF 354

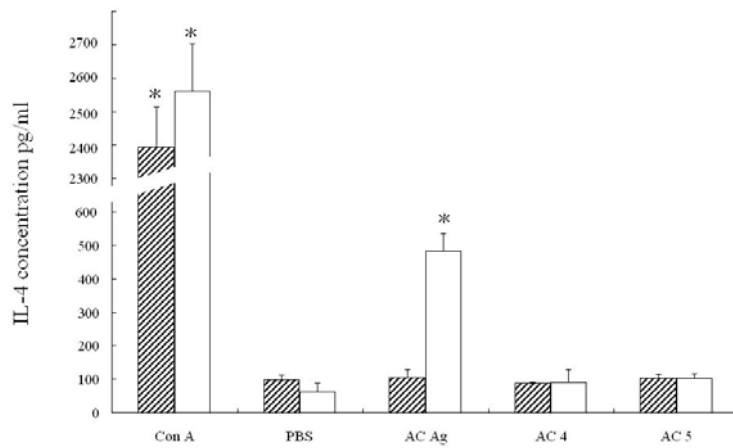
圖三、AC 4 的氨基酸序列，經由 BLAST 軟體比對後之結果，與 *C. elegans* 之 apyrase 具有 70%相似度。

C. elegans RAB-2 : 1 MVTIDGKQIKLQIWDTAGQESFRSITRSYYRGAAGALLVYDITRRDTFNHLTSWLEDARQ 60
 MVTIDGKQIKLQIWDTAGQESFRSITRSYYRGAAGALLVYDITRRDTFNHLTSWLEDARQ
 AC 5 : 27 MVTIDGKQIKLQIWDTAGQESFRSITRSYYRGAAGALLVYDITRRDTFNHLTSWLEDARQ 86
C. elegans RAB-2 : 61 HSNSNMVIMLIGNKSDLEARREVKREEGEAFAREHGLVFMETSAKTAANVEGAFIDTAKE 120
 HSNSNMVIMLIGNKSDLEARREVKREEGEAFAREHGLVFMETSAKTAANVE AFIDTAKE
 AC 5 : 87 HSNSNMVIMLIGNKSDLEARREVKREEGEAFAREHGLVFMETSAKTAANVEEAFIDTAKE 146
C. elegans RAB-2 : 121 IYRKIQEGVLDINNEANGIKLGPQH 145
 IYRKIQEGVLDINNEANGIKLGPQH
 AC 5 : 147 IYRKIQEGVLDINNEANGIKLGPQH 171

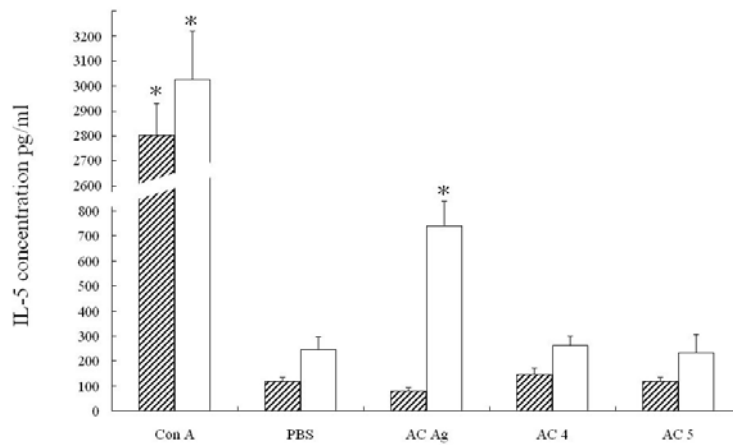
圖四、AC 5 的氨基酸序列，經由 BLAST 軟體比對之結果，與 *C. elegans* 之 RAB family (RAB-2) 具有 98%相似度。



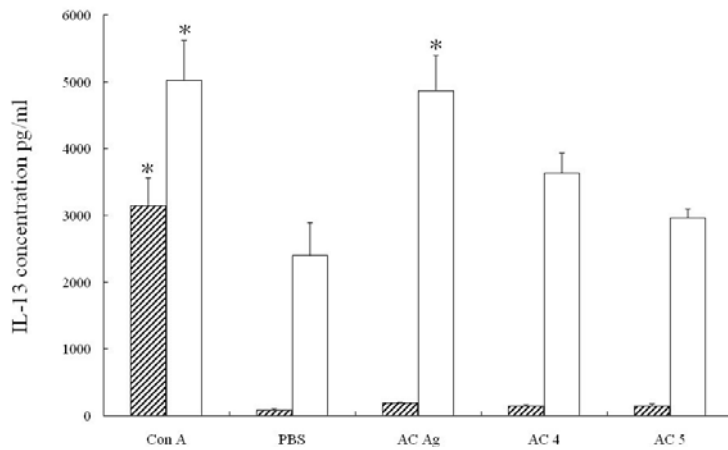
圖五、AC 4 與 AC 5 引子對不同線蟲的 RNA 進行 RT-PCR 後，以 0.8% 之瓊脂糖膠電泳進行分析之結果。Lane 1：廣東血線蟲之 RNA；Lane 2：豬蛔蟲之 RNA；Lane 3：海獸胃線蟲之 RNA；Lane 4：犬蛔蟲之 RNA；Lane 5：大腸桿菌之 RNA。



圖六、鼯鼠之脾細胞經不同抗原刺激後，IL-4 細胞激素表現之情況。▨：未感染廣東血線蟲之鼯鼠脾細胞；□：感染廣東血線蟲的鼯鼠脾細胞；Con A：陽性對照組；PBS：陰性對照組；AC Ag：廣東血線蟲幼成蟲抗原；AC 4 及AC 5：廣東血線蟲重組蛋白 (*, $P < 0.01$)。

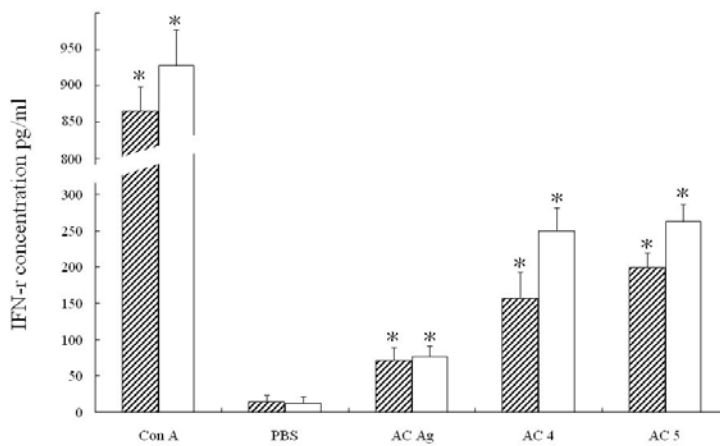


圖七、鼯鼠之脾細胞經不同抗原刺激後，IL-5 細胞激素表現之情況。▨：未感染廣東血線蟲之鼯鼠脾細胞；□：感染廣東血線蟲的鼯鼠脾細胞；Con A：陽性對照組；PBS：陰性對照組；AC Ag：廣東血線蟲幼成蟲抗原；AC 4 及AC 5：廣東血線蟲重組蛋白 (*, $P < 0.01$)。



圖八、鼯鼠之脾細胞經不同抗原刺激後，IL-13 細胞激素表現之情況。

▨：未感染廣東血線蟲之鼯鼠脾細胞；□：感染廣東血線蟲的鼯鼠脾細胞；Con A：陽性對照組；PBS：陰性對照組；AC Ag：廣東血線蟲幼成蟲抗原；AC 4 及 AC 5：廣東血線蟲重組蛋白 (*, $P < 0.01$)。



圖九、鼯鼠之脾細胞經不同抗原刺激後，IFN- γ 細胞激素表現之情況。▨：未感染廣東血線蟲之鼯鼠脾細胞；□：感染廣東血線蟲的鼯鼠脾細胞；Con A：陽性對照組；PBS：陰性對照組；AC Ag：廣東血線蟲幼成蟲抗原；AC 4 及 AC 5：廣東血線蟲重組蛋白 (*, $P < 0.01$)。

表一、鼯鼠脾細胞經廣東血線蟲抗原或重組蛋白刺激後，以酵素免疫吸附法測定細胞激素表現濃度(pg/ml)之比較。

Treatment /(pg / ml)	Con A		PBS		AC Ag		AC 4		AC 5	
	N	AC	N	AC	N	AC	N	AC	N	AC
IL-4	2378±362*	2587±423*	96±16	62±25	104±24	481±54 ^{*,a}	88±4	92±37	101± 2	102±13
IL-5	2758±317*	3015±482*	116±16	244±53 ^a	81±12	741±98 ^{*,a}	145±25	262±37 ^a	118±15	232±75 ^a
IL-13	3146±413*	5024±598*	85±27	2404±483 ^a	186±17*	4869±519 ^{*,a}	140±24	3629±307 ^a	137±39	2965±134 ^a
IFN- γ	830 ± 67*	955±58*	14±8	12±8	71±17*	76±14 ^{*,a}	157±36*	249±31*	199±20*	262±23*

※每組包括六隻鼯鼠，測定時皆進行二重複試驗。

AC：經口感染 35 隻廣東血線蟲之鼯鼠脾細胞，於 21 天後取出脾細胞進行培養。

N：同年齡之未感染廣東血線蟲鼯鼠脾細胞。

^a：感染廣東血線蟲之鼯鼠與正常鼯鼠比較有顯著差異 ($p < 0.01$)

*：實驗組與對照組比較有顯著差異 ($p < 0.01$)

