

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510031216.5

[51] Int. Cl.

C07K 7/08 (2006.01)
A61K 38/10 (2006.01)
A61P 33/12 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

[43] 公开日 2006年8月9日

[11] 公开号 CN 1814618A

[22] 申请日 2005.1.31

[21] 申请号 200510031216.5

[71] 申请人 易新元

地址 410078 湖南省长沙市湘雅路湘雅学院
55号信箱

共同申请人 曾宪芳

[72] 发明人 易新元 曾宪芳 唐连飞 袁仕善

[74] 专利代理机构 长沙市融智专利事务所
代理人 颜 勇

权利要求书1页 说明书12页 附图1页

[54] 发明名称

日本血吸虫金属蛋白酶模拟多肽及其筛选方法和应用

[57] 摘要

本发明提供两种日本血吸虫金属蛋白酶模拟多肽的氨基酸序列及其对日本血吸虫的保护性免疫作用。利用日本血吸虫85kDa金属蛋白酶免疫血清筛选噬菌体十二肽库,用噬菌体ELISA、DNA测序、Western blot、酶活性中和实验等方法对所选取的克隆进行分析,并用动物实验测定其免疫保护效果。结果,随机挑选的10个克隆经ELISA鉴定均为阳性。测序后得到5种不同的氨基酸序列,用表达这5种不同氨基酸序列的噬菌体克隆免疫昆明株小鼠,其中两个克隆能诱导明显的减虫率(分别为31.0%和31.8%)和减卵率(分别为52.6%和54.9%),为研制新型的日本血吸虫疫苗奠定了基础。

1、 两种日本血吸虫金属蛋白酶模拟多肽，其氨基酸系列分别为

Ser-Asn-Pro-Pro-Gly-Met-Ala-Leu-Ser-Ala-Pro-Pro

和 Ile-Thr-Ser-His-Thr-Gly-Yyr-Leu-Gln-Leu-Arg-Leu。

2、 权利要求 1 所述的日本血吸虫金属蛋白酶模拟多肽的筛选方法：用 SDS-PAGE 从日本血吸虫呕吐物中分离金属蛋白酶，用含 85kDa 金属蛋白酶的凝胶免疫小鼠，经三次免疫后测定抗体滴度并收集血清，用饱和硫酸铵分级沉淀粗提 IgG，在 IgG 包被板中加入稀释的原始肽库，于 37℃ 慢摇以筛选与 IgG 有特异性结合力的噬菌体，洗涤除去未结合的噬菌体，再用甘氨酸-盐酸缓冲液在 pH 2.2 条件下室温洗脱，收集洗脱液并测定噬菌体滴度，随机挑选单个噬菌体克隆加入到 ER2738 菌液中，37℃ 振荡培养后用 TBS 悬浮噬菌体，将此悬浮噬菌体作为第二次筛选的起始物，共进行三轮亲和筛选，得到与 IgG 结合特异性强、亲和力高的噬菌体多肽。用噬菌体 ELISA、DNA 测序、Western blot、酶活性中和实验等方法对三轮筛选后所挑取的克隆进行分析，并用动物实验测定其免疫保护效果。

3、 权利要求 1 所述的日本血吸虫金属蛋白酶模拟多肽在抗血吸虫攻击感染方面的应用。

日本血吸虫金属蛋白酶模拟多肽及其筛选方法和应用

技术领域

本发明涉及两种日本血吸虫金属蛋白酶模拟多肽及其筛选方法和在抗日本血吸虫攻击感染方面的应用，属生物技术领域。

背景技术

血吸虫是一种严重危害人类健康的人兽共患寄生虫病，广泛流行于亚洲、非洲和拉丁美洲的 74 个国家和地区，约有 2 亿人受到感染，6 亿人受感染威胁。有五种血吸虫可以感染人并引起人体血吸虫病，在我国流行的为日本血吸虫病，该病流行于长江流域及其以南的 12 个省市自治区，给人们的身心健康和社会的经济发展带来严重危害。

长期以来人们一直在探索控制和消灭血吸虫病的有效途径。尽管目前有包括化学药物治疗在内的多种防治措施，但由于消灭钉螺及控制传染源难度极大，血吸虫病至今仍然是亟待解决的一个严重的公共卫生问题，要从根本上控制血吸虫病的流行，必须发展血吸虫病疫苗，因为在人类与疾病抗争的历史进程当中，疫苗一直是控制疾病传播的一大法宝，为人类的健康做出了巨大的贡献。

随着生物化学及分子生物学技术的发展，越来越多的血吸虫有效抗原被分离出来，它们在各种动物模型中能诱导出一定的免疫保护力。这些抗原主要为蛋白包括酶类或者糖蛋白，目前有几种被 WHO 认为血吸虫疫苗候选抗原。随着基因重组技术的出现，人们对血吸虫基因进行重组，用大肠杆菌或酵母菌等进行表达，发展了血吸虫基因工程疫苗以解决天然蛋白的来源不足的问题。随着免疫学的发

展,免疫学理论在分子水平上的不断深入,人们已经认识到有效的疫苗反应是由有免疫原性的抗原决定簇,也就是抗原表位引起的。因此利用具有强免疫原性的血吸虫抗原表位来研制血吸虫疫苗已成为血吸虫疫苗发展的重要途径。

在血吸虫体内广泛存在着各种蛋白酶,他们在血吸虫的各个发育阶段都起着重要作用。在这些蛋白酶中,金属蛋白酶有着特殊的作用,除了具有催化蛋白质降解这种一般蛋白酶所具有的功能外,它还对血吸虫入侵宿主和产生免疫逃避有着重要影响。因此,金属蛋白酶可能是一个理想的免疫靶。

噬菌体随机库肽技术不仅可以分析和确定蛋白的抗原表位,而且获得的模拟表位不需佐剂也能诱导小鼠产生免疫应答,因此,在新型疫苗研究中备受青睐。本发明就是利用抗金属蛋白酶血清筛选噬菌体随机十二肽库来分析抗金属蛋白酶血清 IgG 与金属蛋白酶抗原表位的结合特异性,分离模拟金属蛋白酶抗原表位的短肽,观察这些短肽在小鼠中诱导抗日本血吸虫感染的免疫效果,为研制新型的日本血吸虫疫苗奠定基础。

发明内容

本发明的目的在于提供两种日本血吸虫金属蛋白酶模拟多肽以及提供一种日本血吸虫金属蛋白酶模拟多肽的筛选方法。

本发明的另一目的在于提供该两种日本血吸虫金属蛋白酶模拟多肽在对日本血吸虫攻击感染的免疫保护作用。

本发明所述的两种日本血吸虫金属蛋白酶模拟多肽分别有如下氨基酸序列

Ser-Asn-Pro-Pro-Gly-Met-Ala-Leu-Ser-Ala-Pro-Pro

和 Ile-Thr-Ser-His-Thr-Gly-Yyr-Leu-Gln-Leu-Arg-Leu

本发明的筛选方法为:用 SDS-PAGE 从日本血吸虫呕吐物中分离金属蛋白

酶，用含 85kDa 金属蛋白酶的凝胶免疫小鼠，经三次免疫后测定抗体滴度并收集血清，用饱和硫酸铵分级沉淀粗提 IgG，在 IgG 包被板中加入稀释的原始肽库于 37℃ 慢摇以筛选与 IgG 有特异性结合力的噬菌体；洗涤除去未结合的噬菌体；再用甘氨酸-盐酸缓冲液（pH 2.2）室温洗脱，收集洗脱液并测定噬菌体滴度，随机挑选单个噬菌体克隆加入到 ER2738 菌液中，37℃ 振荡培养后用 TBS 悬浮噬菌体，将此悬浮噬菌体作为第二次筛选的起始物，共进行三轮亲和筛选，得到与 IgG 结合特异性强、亲和力高的噬菌体多肽；用噬菌体 ELISA、DNA 测序、Western blot、酶活性中和实验等方法对三轮筛选后所挑取的克隆进行分析，并用动物实验测定其免疫保护效果。

本发明的日本血吸虫金属蛋白酶模拟多肽可应用于抗血吸虫攻击感染方面。

本发明提供的日本血吸虫金属蛋白酶模拟多肽具有对日本血吸虫的保护性免疫作用，即用氨基酸序列分别为

Ser-Asn-Pro-Pro-Gly-Met-Ala-Leu-Ser-Ala-Pro-Pro

和 **Ile-Thr-Ser-His-Thr-Gly-Yyr-Leu-Gln-Leu-Arg-Leu** 的两种噬菌体克隆免疫昆明小鼠，能诱导明显的减虫率（分别为 31.0% 和 31.8%）和减卵率（分别为 52.6% 和 54.9%）。

通过对金属蛋白酶模拟多肽的筛选，克服了通过自然途径无法获得或难以获得的金属蛋白酶抗原表位的缺点，使大量获取有效血吸虫抗原成为可能，而且所获得的多肽结构清楚、组成清晰，为人工合成多肽疫苗奠定了基础。

附图说明

图 1 为阳性噬菌体克隆的鉴定图

图 2 为 2 号和 3 号噬菌体克隆的 Western bolt 分析

从左至右依次为：M13、2 号克隆、3 号克隆、Marker

图 3 为以明胶为底物的金属蛋白酶活性电泳分析图

C：正常对照组，孵育液为 0.1M pH9.0 的 Tris-HCl 缓冲液；

2：与 2 号噬菌体免疫血清孵育过的凝胶；

- 3: 与 3 号噬菌体免疫血清孵育过的凝胶;
- E: EDTA, 金属蛋白酶抑制剂, 孵育液中加入 1.0mM 的 EDTA;
- S: 与金属蛋白酶免疫血清孵育过的凝胶;
- M13: 与 M13 免疫血清孵育过的凝胶。

具体实施方式

1、主要材料及其来源:

- (1) 噬菌体随机十二肽库 (Ph.D-12™ Phage Display Peptide Library, 含 1.5×10^{13} pfu/ml) 和宿主菌 ER2738 系新英格兰生物实验所 (New England Biolabs Inc.) 产品。
- (2) 辣根过氧化物酶标记的抗 M13 抗体 (HRP-M13 Ab) 购自 Pharmacia 公司, 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 为 Promega 公司产品。
- (3) 十二烷基硫酸钠系 Serva 公司进口分装, 甲叉双丙烯酰胺系 Fluka 公司进口分装, 丙烯酰胺系 Amresco 公司进口分装, 标准分子量预染蛋白 Marker 系新英格兰生物实验所 (New England Biolabs Inc.) 产品;
- (4) 弗氏完全佐剂系美国 Sigma 公司产品; 电泳仪系美国 Bio-Rad 公司产品, E960 酶标仪系 ERMIC 公司产品。
- (5) 实验动物和尾蚴 用于逸放尾蚴的阳性钉螺从江苏省寄生虫病防治研究所购买, 雌性昆明小鼠由中南大学实验动物学部提供
- (6) EDTA 储存液的配制 溶解 2.92 克 EDTA 于 10ml 蒸馏水中, 调 pH 值至 8.0, 1ml 分装置 -20°C 。使用时, 稀释至工作浓度。
- (7) 台式高速离心机、低温高速离心机系湖南仪器仪表总厂产品。其它试剂系国产分析纯。

2、方法与结果

(1) 菌体肽库的亲筛选

用 SDS-PAGE 从日本血吸虫呕吐物中分离金属蛋白酶。用含 85kDa 金属蛋白酶的凝胶免疫小鼠, 经三次免疫后测定抗体滴度并收集血清, 用饱和硫酸铵分级沉淀粗提纯 IgG, 测定浓度。用 $100 \mu\text{l}$ 含 $10 \mu\text{g}$ IgG 的包被液 (0.1MNaHCO_3 , pH8.5) 包板, 4°C 湿盒中过液, 5% 脱脂牛奶 (溶于 TBS [50mMTris , 150mM NaCl ,

pH7.5])室温封闭 2h,然后加入 100 μ l 稀释的原肽库(含 10^{11} 个噬菌斑形成单位)于 37 $^{\circ}$ C 慢摇 1h。用 TBS-T (含 0.5%V/V Tween-20 的 TBS)洗涤 8 次,以除去未结合的噬菌体。再用 0.2M 的甘氨酸-盐酸缓冲液 (pH2.2) 每孔 100 μ l 室温洗脱 8 分钟。每孔加入 15 μ l 中和液(1MTris-HCl, pH9.1)中和后,收集洗脱液并测定噬菌体滴度。将随机挑选的单个噬菌体克隆加入到培养至 OD₅₉₅ \approx 0.5 的 ER2738 菌液中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 4.5h 后 10,000rpm 离心 15min, 收集上清, 加入 1/6 体积的 PEG/NaCl (20%W/V PEG8000, 2.5MNaCl) 4 $^{\circ}$ C 沉淀 2h 以上。室温 10,000rpm 离心 15min 沉淀噬菌体, 去上清, 用 1ml TBS 悬浮噬菌体, 置 4 $^{\circ}$ C 备用。将此悬浮噬菌体作为第二次筛选的起始物进行下一轮的筛选, 共进行三轮亲和筛选。经三轮筛选后, 特异性噬菌体得到了近 700 倍的富集。第一轮洗脱液的滴度为 2.6×10^3 pfu/ml, 到第三轮时达 1.8×10^6 pfu/ml (表 1)

表 1 各轮筛选中噬菌体的富集效果

筛选轮数	加入的噬菌体滴度 (pfu/ml)	洗脱的噬菌体滴度 (pfu/ml)
1	2×10^{11}	2.6×10^3
2	2×10^{11}	4.5×10^5
3	2×10^{11}	1.8×10^6

(2) 菌体 ELISA 鉴定阳性克隆

用金属蛋白酶免疫血清 IgG 包被 ELISA 条板 (10 μ g/孔), 4 $^{\circ}$ C 过夜, 5%脱脂牛奶室温封闭 2h。每孔加入 10^{12} 噬菌体颗粒, 室温放置 2h。用 TBS-T 洗涤 3 次后加入 HRP 标记的抗 M13 抗体, TMB 显色, 595nm 测定吸光度。用噬菌体 ELISA 检测了 10 个从第三轮洗脱液所铺平板中随机挑选的单个噬菌体克隆与抗体 IgG 的结合特异性, 以原始肽库作为阴性对照 (NC)。当 OD 值大于或等于阴性对照两倍时, 判为噬菌体与抗体 IgG 发生特异性结合, 即鉴定为阳性。结果显示, 10 个随机挑选的单个噬菌体克隆的 OD 值与阴性对照相比, 均大于 2.0, 都是阳性克隆

(图 1)

(3) 菌体中插入短肽氨基酸序列的测定

提取噬菌体单链 DNA, 用-96¹¹¹ 噬菌体测序引物: 5' -^{H⁰}CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG-3'经 ABI100 自动测序仪测序。所得序列用 Expassy 软件分析。经过对 10 个阳性噬菌体克隆的 DNA 序列分析, 推导出以下 5 种不同的氨基酸序列

1. acg tcg ttt ggt agt atg ctt agt aag tgg cag aag
Thr-Ser-Fhe-Gly-Ser-Met-Leu-Ser-Lys-Trp-Gln-Lys
2. agt aat cct ccg ggg atg gct ctt tcg gct ccg cct
Ser-Asn-Pro-Pro-Gly-Met-Ala-Leu-Ser-Ala-Pro-Pro
3. att acg tcg cat acg ggg tat ctg cag ctt cgt ttg
Ile-Thr-Ser-His-Thr-Gly-Tyr-Leu-Gln-Leu-Arg-Leu
4. act ctt gct cat act agt cag att ggg ctt acg gct
Thr-Leu-Ala-His-Thr-Ser-Gln-Ile-Gly-Leu-Thr-Ala
5. atg gag gct tct cat acg cat gcg cgt ccg gcg cct
Met-Glu-Ala-Ser-His-Thr-His-Ala-Arg-Pro-Ala-Pro

(4) 日本血吸虫攻击感染的免疫保护性 (动物免疫实验)

70 只 4 周龄昆明小鼠随机分为 7 组, 其中 5 组在皮下分别注射五种不同序列的噬菌体。注射剂量为 10^{12} 噬菌体颗粒, 分三点注射, 对照组注射原始肽库或 TBS。免疫三次。第三次免疫后两周每鼠经腹部皮肤感染尾蚴 40 ± 1 条。感染后 42 天剖杀成虫, 计算虫荷和每克肝卵数 (表 2)。用 SPSS8.0 版本数据统计软件进行统计分析。数据表示为平均值 \pm 标准差。当 $P \leq 0.05$ 时, 认为有显著性。

表 2-1 免疫后各组的减虫率

组别	小鼠数	获虫数	减虫率	P
1	10	23.6±1.6733	10.6	0.055
2	10	18.2±1.9235	31.0	0.001*
3	10	18.0±1.4142	31.8	0.001*
4	10	25.2±1.7889	4.5	0.48
5	10	24.2±2.2804	8.3	0.073
原始肽库	10	24.4±1.8166	7.5	0.318
TBS	10	26.4±1.9494	-	-

*P 值≤0.05, 有显著性

表 2-2 免疫后各组的肝脏减卵率

组别	小鼠数	获虫数	减卵率	P
1	10	99.36±7.28	18.5	0.009*
2	10	57.75±3.62	52.6	0.001*
3	10	54.94±3.64	54.9	0.001*
4	10	106.3±3.84	12.8	0.145
5	10	102.4±2.35	16.0	0.055
原始肽库	10	108.8±3.46	10.7	0.200
TBS	10	121.86±3.47	-	-

*P 值≤0.05, 有显著性

从动物免疫实验证明, 2 号和 3 号噬菌体克隆能诱导产生显著的减虫率(分别为 31%和 31.8%)和较高的减卵率(分别达到 52.6%和 54.9%)。

(5) 免疫印迹分析

将经扩增后的噬菌体克隆(含 10^{12} 噬菌体颗粒)与 SDS 上样缓冲液混合,

置沸水中煮 3min 后,在非还原条件下进行 10%的 SDS-PAGE 电泳并转印至硝酸纤维膜上。用 5%的脱脂奶粉将膜封闭 2h, PBS-T 漂洗 3 次。以金属蛋白酶免疫血清为一抗,HRP 标记的羊抗鼠 IgG 为二抗, DAB 显色。结果显示, 2 号和 3 号噬菌体克隆经 SDS-PAGE 电泳分离并转移至硝酸纤维素膜后, 其含有插入短肽的基因 III 蛋白能被日本血吸虫感染小鼠血清 (IMS) 识别, 在 67kDa 处出现条带, 而野生型 M13 未被识别。结果表明, 2 号和 3 号克隆具有良好的抗原性 (图 2)。

(6) 以明胶为底物的金属蛋白酶活性分析

收集日本血吸虫呕吐物, 分离 85kDa 金属蛋白酶。制备含 0.1%明胶的 10%的 SDS-PAGE 分离胶, 浓缩胶为 3.9%。呕吐物与未加 DTT 的非还原样品缓冲液混合后不经煮沸上样电泳, 电泳条件为 4℃, 恒流 18mA。电泳完毕后, 用 2.5%的 TritonX-100 100ml 洗涤凝胶 10 分钟, 洗涤 3 次, 以除去凝胶中的 SDS。用 0.1M pH9.0 的 Tris-HCl 缓冲液洗涤 5 分钟后, 将凝胶纵向切成 6 小条并做好标记。一条置于 0.1M pH9.0 的 Tris-HCl 缓冲液中孵育过夜, 一条置 0.1M pH9.0 Tris-HCl+1.0mM EDTA 的缓冲液中孵育过夜。另外 4 条在放到 0.1M pH9.0 Tris-HCl 缓冲液中之前, 先分别与 2 号、3 号、M13 噬菌体免疫血清以及金属蛋白酶免疫血清 (1: 50 稀释) 于 37℃孵育 2h。用 0.1%的考马斯亮兰 (0.1%的考马斯亮兰 (0.1g 考马斯亮兰溶于甲醇: 醋酸: 水为 30: 10: 60 的溶液中, 过滤保存) 染色 2h, 脱色后, 观察结果 (图 3)

结果显示, 2 号和 3 号噬菌体免疫小鼠后, 所产生的抗体与金属蛋白酶免疫血清一样具有中和 85kDa 金属蛋白酶活性的作用。图 3 中 2、3 和 S (金属蛋白酶免疫血清) 条凝胶表明, 85kDa 金属蛋白酶分别经 2 号、3 号噬菌体免疫血清或金属蛋白酶免疫血清中和后, 失去水解明胶的能力, 从而不能出现水解条带, 而 M13 免疫血清不能中和 85kDa 金属蛋白酶的活性, 出现水解条带 (图 3 中 M13)。结果表明, 2 号和 3 号噬菌体短肽具有 85kDa 金属蛋白酶表位的免疫原特性。

序 列 表

<110> 易新元, 曾宪芳

<120> 日本血吸虫金属蛋白酶模拟多肽及其筛选方法和应用

<160> 10

<210> 1

<211> 36

<212> DNA

<213> 噬菌体 (Phage)

<220>

<400> 1

acg tcg ttg ggt agt atg ctt agt aag tgg cag aag 36

Thr Ser Phe Gly Ser Met Leu Ser Lys Trp Gln Lys

1 5 10

<210> 2

<211> 36

<212> DNA

<213> 噬菌体 (Phage)

<220>

<400> 2 *

agt aat cct ccg ggg atg gct ctt tcg gct ccg cct 36

Ser Asn Pro Pro Gly Met Ala Leu Ser Ala Pro Pro

1 5 10

<210> 3

<211> 36

<212> DNA

<213> 噬菌体 (Phage)

<220>

<400> 3

att acg tcg cat acg ggg tat ctg cag ctt cgt ttg 36

Ile Thr Ser His Thr Gly Tyr Leu Gln Leu Arg Leu

1 5 10

<210> 4

<211> 36

<212> DNA

<213> 噬菌体 (Phage)

<220>

<400> 4

act ctt gct cat act agt cag att ggg ctt acg gct 36

Thr Leu Ala His Thr Ser Gln Ile Gly Leu Thr Ala

1 5 10

<210> 5

<211> 36

<212> DNA

<213> 噬菌体 (Phage)

<220>

<400> 5

atg gag gct tct cat acg cat gcg cgt ccg gcg cct 36

Met Glu Ala Ser His Thr His Ala Arg Pro Ala Pro

1 5 10

<210> 6

<211> 12

<212> PRT

<213> 噬菌体 (Phage)

<220>

<400> 6

Thr Ser Fhe Gly Ser Met Leu Ser Lys Trp Gln Lys

1 5 10

<210> 7

<211> 12

<212> PRT

<213> 噬菌体 (Phage)

<220>

<400> 7

Ser Asn Pro Pro Gly Met Ala Leu Ser Ala Pro Pro

1 5 10

<210> 8

<211> 12

<212> PRT

<213> 噬菌体 (Phage)

<220>

<400> 8

Ile Thr Ser His Thr Gly Tyr Leu Gln Leu Arg Leu

1 5 10

<210> 9

<211> 12

<212> PRT

<213> 噬菌体 (Phage)

<220>

<400> 9

Thr Leu Ala His Thr Ser Gln Ile Gly Leu Thr Ala

1 5 10

<210> 10

<211> 12

<212> PRT

<213> 噬菌体 (Phage)

<220>

<400> 10

Met Glu Ala Ser His Thr His Ala Arg Pro Ala Pro

1

5

10

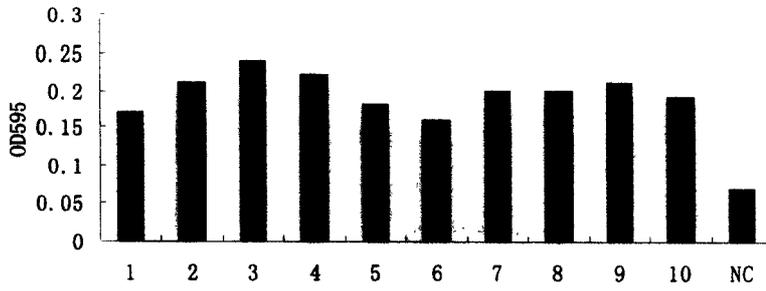


图 1

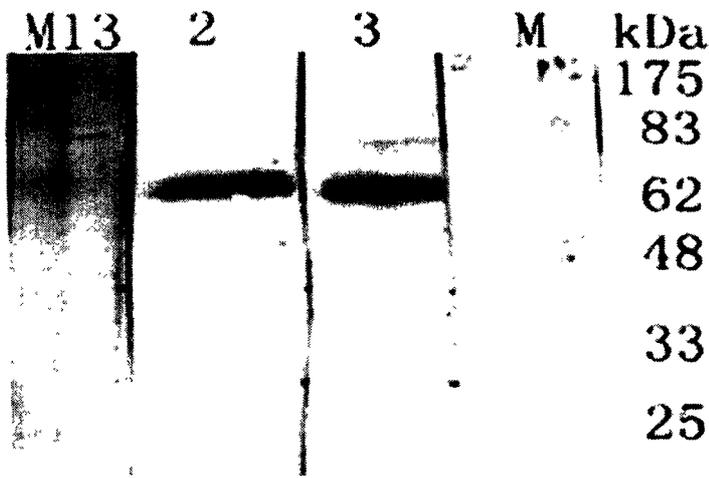


图 2



图 3

专利名称(译)	日本血吸虫金属蛋白酶模拟多肽及其筛选方法和应用		
公开(公告)号	CN1814618A	公开(公告)日	2006-08-09
申请号	CN200510031216.5	申请日	2005-01-31
[标]发明人	易新元 曾宪芳 唐连飞 袁仕善		
发明人	易新元 曾宪芳 唐连飞 袁仕善		
IPC分类号	C07K7/08 A61K38/10 A61P33/12 G01N33/53 G01N33/68		
代理人(译)	颜勇		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供两种日本血吸虫金属蛋白酶模拟多肽的氨基酸序列及其对日本血吸虫的保护性免疫作用。利用日本血吸虫85kDa金属蛋白酶免疫血清筛选噬菌体十二肽库，用噬菌体ELISA、DNA测序、Western blot、酶活性中和实验等方法对所选取的克隆进行分析，并用动物实验测定其免疫保护效果。结果，随机挑选的10个克隆经ELISA鉴定均为阳性。测序后得到5种不同的氨基酸序列，用表达这5种不同氨基酸序列的噬菌体克隆免疫昆明株小鼠，其中两个克隆能诱导明显的减虫率(分别为31.0%和31.8%)和减卵率(分别为52.6%和54.9%)，为研制新型的日本血吸虫疫苗奠定了基础。

