مقاله پژوهشی

کلون‌کردن اپیتوپ‌های خطی آنتی‌ژن Eg95 اکینوکوکوس گرانولوزوس در وکتور pEGFP وبررسی بیان آن در سلول CHO

سمیه محمدی[۱]، مجید اسمعیلی زاد[۲]*، سید عبدالحمید انگجی[۳]، محمد طهماسب[۳]، رقیه مصری[۴]، مژگان احمدزاده[۴]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم سلولی و مولکولی،دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران–ایران

[۲] استادیار ژنتیک ملکولی،بخش آزمایشگاه مرکزی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج -ایران

[۳] استادیارگروه سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی،تهران– ایران

[۴] دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم سلولی و مولکولی،دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران–ایران

نشانی نویسنده مسئول: کرج، موسسه تحقیقاتی واکسن وسرم سازی رازی، بخش آزمایشگاه مرکزی، مجید اسماعیلی زاده
E-mail: m.esmaelizad@rvsri.ac.ir

وصول:۹۳/۸/۱۶، اصلاح:۹۳/۹/۱، پذیرش:۹۳/۹/۱۶

چکیده

زمینه و هدف: کیست هیداتیک، بیماریی است که ازطریق تخم انگل اکینوکوکوس گرانولوزوس دفع‌شده از مدفوع سگ آلوده بـه انسـان و دام منتقل‌می‌شود. این انگل، یکی از کرم‌های نواری خانواده‌ی Taeniidae می‌باشد که باعث ایجـاد مشـکلات بهداشـتی گسـترده در انسـان و خسارت‌های اقتصادی به صنعت دامپروری می‌شود. بدین منظور، طراحی واکسن به‌منظور پیشگیری ازبروز این بیماری حائز اهمیت می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق، توالی‌های کدکننده‌ی اپیتوپ خطی تحریک‌کننده‌ی سلول‌های T، سنتز و در محل برش XhoI در وکتور pEGFP-N1 کلون‌شد. وکتورهای نوترکیب توسط شوک الکتریکی به سلول‌های CHO ترانسفورم‌شدند و بیان پروتئین مورد نظر به‌صورت فیوژن با پروتئین سبز فلورسنت توسط میکروسکوپ فلورسنت مورد بررسی قرارگرفت.

یافته‌ها: صحت کلونینگ باروش PCR مستقیم بر روی کلونی و درنهایت با روش توالی یابی تایید گردید. بیان پپتید فیوژن با GFP توسط میکروسکوپ فلورسنت مورد بررسی قرارگرفت.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان‌می‌دهد که اپیتوپ‌های خطی آنتی‌ژن Eg95 کلون‌شـده در وکتـور pEGFP و در سـلول CHO بیـان-گردیده‌است. در ادامه می‌بایست این سازه DNA به حیوان مدل (موش) تزریق‌شده و پاسخ ایمنی حیوان مورد بررسی قرارگیرد.

واژه‌های کلیدی: *اکینوکوکوس گرانولوزوس، کیست هیداتیک، اپیتوپ، Eg95، DNA واکسن.*

مقدمه

کیست هیداتیک، بیماری انگلی مشترک بین انسان و حیوان است که عامل آن، کرم نواری با نام «اکینوکوکوس گرانولوزوس» می‌باشد. این کرم از خانواده-ی تنیده بوده و طول آن به‌طور معمول ۳ تا٦ میلی‌متر می-باشد (۱). زندگی انگل به‌صورت چندمرحله‌ای و بیماری در انسان و نشخوارکنندگان توسط مرحله‌ی لاروی انگل(متاسستود) ایجاد می‌شود (۲, ۳). کرم بالغ در روده‌ی باریک سگ آلوده زندگی می‌کند و دارای سه بند است. در بند انتهایی، تخم‌های فراوانی وجود دارد که بعد از پاره-

شدن توسط مدفوع سگ در محیط پراکنده می‌شوند و باعث آلودگی آب و سبزی‌ها می‌گردد، این تخم‌ها، بعد از خورده‌شدن توسط میزبانانِ واسطه از دیواره‌ی روده باریک آنها عبورکرده و ازطریق رگ‌های خونی به سایر نقاط بدن همچون کبد و ریه و غیره می‌روند و در آنجا شروع به رشدکرده، کیسه‌ی پر از مایع شفاف را که حاوی لاروهای متعدد است، ایجاد می‌کنند (٤). علایم بیماری باتوجه به محل کیست، متفاوت‌بوده و باعث نقص عضو و گاهی موجب مرگ بیمار می‌شود (٥). این انگل، شیوع جهانی دارد و مناطق ایران، دارای شیوع بالایی می‌باشند. از آنجایی‌که درمان‌های دارویی، پاسخگوی این بیماری نیستند و در مراحل پیشرفته نیاز به جراحی و برداشتن کیست می‌باشد، تولید واکسنی که بتواند علیه این بیماری ایمنی ایجادکند، بسیار حائز اهمیت می‌باشد (٦).

آنتی‌ژن Eg95، یکی از کاندیدهای مهم تولید واکسن علیه این بیماری می‌باشد. پروتئین نوترکیب این آنتی‌ژن، باعث ٩٦ تا ٩٨ درصد حفاظت در برابر انگل و در سروتیپ G1 شده است (٧)، اما این انگل دارای ده سروتیپ(G1-G1)می‌باشد و این امر باعث ناکارآمد بودن واکسن نوترکیب Eg95 می‌باشد که همین امر، ضرورت تولید واکسنی بر پایه‌ی اپیتوپ‌های مختلف را ایجاب‌می‌کند(٨). DNA واکسن‌ها، پلاسمیدهای بیانی حاوی قطعه‌ی مورد نظر می‌باشند که نسل جدید واکسن ها را ایجادکرده‌اند. این واکسن‌ها، در سلول‌های بدن میزبان بیان‌می‌شوند و باعث تحریک هر دو نوع ایمنی سلولی و همورال می‌گردند(٩). در این نوع از واکسن‌ها، می‌توان چندین آنتی‌ژن یا اپیتوپ‌های مختلف آنتی‌ژن‌ها را کلون‌کرد تا پاسخ ایمنی مناسب‌تری ایجادشود، به‌همین‌دلیل، استفاده از DNA واکسن‌ها نسبت به سایر واکسن‌ها، کارآیی بیشتری دارد.

هدف از این کار، طراحی و ساخت مدل DNA واکسن جهت مبارزه علیه کیست هیداتیک می‌باشد. به این منظور، توالی کدکننده اپیتوپ‌های خطی آنتی‌ژن EG95 در وکتورpEGFP کلون‌گردید و بیان آن در سلول CHO مورد بررسی قرارگرفت. وکتورpEGFP دارای توالی کدکننده پروتئین سبز فلورسنت به‌عنوان ژن گزارشگر می‌باشد که به‌صورت فیوز شده به پرتئین مورد نظر بیان می‌شود و به این صورت می‌توان با میکروسکوپ فلئورسنت بیان آنها را مورد ردیابی قرارداد.

مواد و روش‌ها

سنتز و تکثیر: در ابتدا اپیتوپ‌های آنتی‌ژن Eg95 توسط پایگاه اطلاعاتی IEDB پیش‌بینی‌شدند. این توالی‌ها، شامل چهار پپتید بودند که به‌وسیله‌ی لینکرهایی از فورین به همدیگر متصل‌گردیدند. سپس پرایمرهای متناسب با ژن سنتزشده که دارای جایگاه برش آنزیم XhoI بودند، توسط نرم‌افزار Oligo ورژن ٥ طراحی شد.

هر واکنش PCR، حاوی ١ میکروگرم DNA، ١٠ پیکومول از پرایمرهای رفت 5'-TG CTCGAGGAATTCATGGAAGCAGCAGC-3 و برگشت CTCGAGGCTAAACACAAAGCCCGC AAT C-3، ١میکرولیتر dNTP، ٢/. میکرو لیتر TaqDNA polymerase (شرکت فرمنتاز)،٤ میکرو لیتر buffer و 10x PCR به‌وسیله‌ی آبِ دوبار تقطیر به ٤٠ میکرو لیتر رسانده می‌شود و واکنش PCR در ترموسیکل (ساخت شرکت eppendorf) به شرح ذیل انجام گردید: Denaturation اولیه در دماهای ٩٤°C به‌مدت ٣ دقیقه به‌همراه٣٥ سیکل تکرار، ٩٥°C به‌مدت ١ دقیقه، اتصال ٥٥°C به‌مدت ١٥ ثانیه و ٧٢°C به‌مدت ١٥ثانیه انجام‌شد. مرحله‌ی گسترش نهایی (Extension Final) به‌مدت ٧ دقیقه در دمای ٧٢ درجه سانتی‌گراد انجام گردید .٥ میکرولیتر از محصول روی ژل آگارز ٢درصد الکتروفورز شد.

کلونینگ و توالی‌یابی: محصولات حاصل از PCR توسط آنزیم XhoI، برش‌خورده و توسط کیت تخلیص محصول PCR شرکت فرمنتاز، تخلیص‌شدند.

وکتورهای pEGFP با استفاده از روش سمبروک(۱۰)، تخلیص و توسط آنزیم XhoI هضم انجام‌شدند. جهت تأیید صحت هضم، وکتور هضم‌شده در ژل ۱ درصد آگازر الکتروفورز گردیدند. اتصال قطعه‌ی موردنظر به وکتور pEGFP-N1 توسط آنزیم T4 DNA Ligase در دمای ۲۲C° به‌مدت ۱۶ ساعت انجام گردید. جهت ترانسفورماسیون سلول E.Coli(DH5α) با استفاده از کلریدکلسیم به حالت مستعدّ درآمدند. سپس با روش شوک حرارتی، محصولات حاصل از لیگاسیون به سلول-های میزبان، منتقل و سلول‌ها در محیط کشت LB آگار حاوی کانامایسین در دمای ۳۷°C به‌مدت ۲۴ ساعت کشت‌داده‌شدند. کلونی‌های مقاوم به کانامایسین که حاوی ناقل نوترکیب می‌باشند، بر روی محیط کشت رشدکردند. جهت انتخاب کلونی‌های مثبت حاوی وکتور نوترکیب به-طور مستقیم بر روی کلونی‌ها با استفاده از پرایمرهای رفت و برگشت قطعه‌ی مورد نظر PCR انجام‌گردید. وکتورهای نوترکیب باروش سمبروک تخلیص‌شدند و توالی‌یابی آنها توسط شرکت ماکرو ژن کره انجام‌گرفت.

بیان ژن سنتزشده: سلول رده‌ی CHO از بانک سلول بخش بیوتکنولوژی موسسه‌ی تحقیقاتی واکسن وسرم-سازی رازی تهیه‌شد. جهت کشت سلولی ازمحیط RPMI حاوی ۱۰٪FBS و ۱٪ پنی‌سیلین و استرپتومایسن در انکوباتور محتوای۵٪CO2 در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد استفاده‌شد. تعداد سلول مورد استفاده جهت ترنسفکشن ۵×۱۰^۶cell\ml می‌باشد که بعد از چند بار شست‌وشو توسط PBS، ۱۰ میکروگرم پلاسمید به آن اضافه‌گردید و حجم نهایی آنها با محیط کشت بدون سرم به ۸۰۰ میکرولیتر رسانده شدند. ترانسفورماسیون به‌روش شوک الکتریکی توسط دستگاه Gene Pulser (ساخت شرکت BIO RAD) انجام‌گردید. سلول‌ها تحت شرایط مذکور به‌مدت ۴۸ ساعت کشت‌داده‌شدند و از سلول‌های مورد نظر لام تهیه و جهت بررسی بیان و ردیابی پروتئین سبز فلئورسنت از میکروسکوپ فلئورسنت استفاده گردید.

یافته‌ها

توالی نوکلئوتیدی اپیتوپ‌های Eg95 توسط شرکت Genscript و پرایمرهای طراحی‌شده جهت تکثیر قطعه‌ی مورد نظر توسط شرکت فزا پژوه سنتزشدند (شکل ۱).

محصولات PCR در ژل ۲ درصد الکتروفورز شدند. باند مشاهده‌شده با سایز مارکر، مقایسه‌شد که دارای وزن ۳۰۰ جفت باز بوده که با سایز قطعه مورد نظر مطابقت دارد (شکل۲).

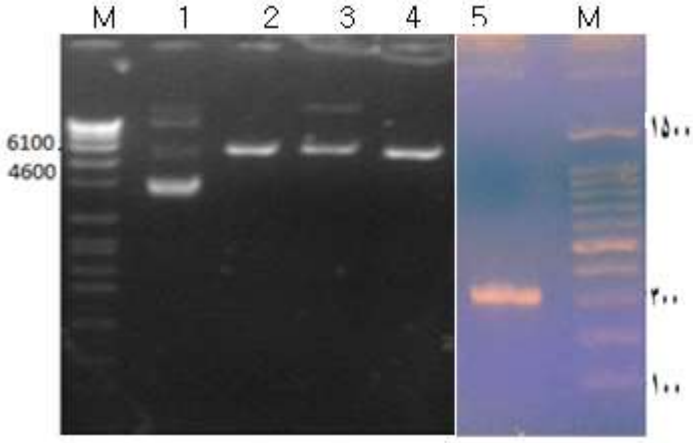
وکتورpEGFP بعد از هضم‌شدن توسط آنزیم XhoI به‌صورت خطی در آمدند و سایز آنها با سایز مارکر تایید گردید (شکل۲).

وکتورهای نوترکیب توالی‌یابی‌شدند و نتایج حاصل از توالی‌یابی با توالی قطعه‌ی مورد نظر مطابقت داشتند و صحت کلونینگ را تاییدکردند. در این مطالعه، انتظارمی‌رفت که با قرارگرفتن توالی کدکننده Eg95 و ژن GFP در یک قالب خواندن، بتوان آن را ردیابی‌کرد. طی بررسی‌های انجام‌شده با میکروسکوپ فلورسنت پروتئین مورد نظر به‌صورت فیوز با پروتئین سبز فلورسنت بیان-گردید (شکل۳).

بحث

کیست هیداتید، از بیماری‌های انگلی شایع در جهان است و تولید واکسنی علیه این بیماری از اهداف بسیاری از محققان می‌باشد. پیشرفته‌های جدید در زمینه‌ی بیوتکنولوژی، باعث ایجاد تحول در زمینه‌ی تولید واکسن و ایجاد نسل جدیدی از واکسن‌ها با نام «واکسن‌های ژنی» شده‌اند(۱۱). این واکسن‌ها، پلاسمیدهای حاوی ترادف نوکلئوتیدی کدکننده آنتی‌ژن مورد نظر هستند که مستقیماً به بافت موجود زنده تزریق می‌شوند. واکسن‌های نوترکیب، دارای پیچیدگی‌هایی در مراحل تولید و خالص-سازی می‌باشد که باعث افزایش هزینه‌های تولید در این نوع واکسن‌ها می‌شود. یکی دیگر از مشکلات واکسن-

شکل ۱: توالی DNA سنتزشده وپپتیدهای پروتئین Eg95



شکل ۲: قطعه DNA تکثیر شده از اپیتوپهای Eg95 در واکنش PCR و هضم آنزیمی وکتور pEGFP با آنزیم XhoI

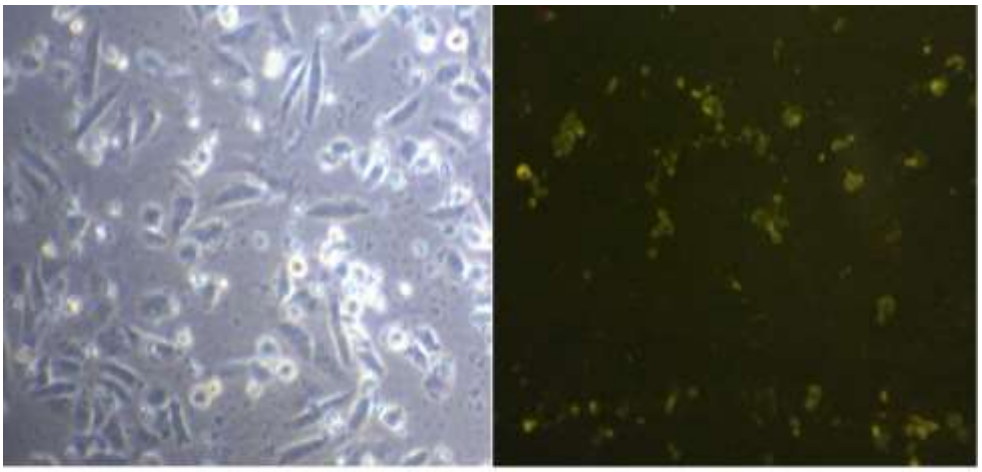
ستون ۱. وکتور pEGFP تخلیص شده ، ستون های ۲،۳ ، ٤ وکتور هضم شده با آنزیم XhoI ، M نشانگر DNA شماره هفت شرکت Roch

ستون ٥. قطعه DNA تکثیر شده از اپیتوپهای Eg95 در واکنش PCR، M نشانگر DNA ۱۰۰ جفت بازی شرکت سیناژن

های نوترکیب، نداشتن ساختمان طبیعی پروتئین، به‌علت عدم انجام کامل Glycosylation وfolding نادرست درمراحل تخلیص نهایی می‌باشد(۱۲)، اما در واکسن‌های DNA به علت بیان پروتئین توسط سیستم بیانی میزبان شکل فضایی صحیح پروتیئن حفظشده و برحسب اپیتوپ‌های موجود باعث تحریک هر دو نوع ایمنی سلولی و هومورال می‌شود (۱۳). بر اساس مطالعات انجام-شده، استفاده از DNA واکسن سبب تحریک سیستم ایمنی Th1، تولید اینترفرون گاما، و در نتیجه کاهش سنتز IgE و همچنین ممانعت از فعالیت سلول‌های Th2 می-شوند (١٤) استفاده از واکسن‌های ژنی در مقابله با انگل-ها، کآرایی بیشتری نسبت به سایر انواع واکسن ها دارد.

دو بیماری مالاریا و لشمانیا، از بیماری‌های عفونی شایعی هستند که تاکنون واکسن مناسبی علیه آنها تولید نشده است. هرچند درچند سال گذشته تحقیقات گسترده-ای در زمینه‌ی تهیه‌ی واکسن‌ژنی علیه آنها صورت گرفته-است (۱۵, ١٦). طبق تحقیقات انجام‌شده، بیمارانی که تحت درمان با داروی آلبندازول قرارگرفتند، سایتوکین‌های Th1 را بیشتر از سایتوکین‌های Th2 القامی‌کنند و نتایج نشان‌می‌دهد که پاسخ Th1 بیشتر در کشتن انگل و ازبین-بردن بیماری نقش‌دارد. تغییر در پاسخ سایتوکین‌ها به-سمت الگوی بیان Th1 در انسان و موش رشد انگل راکاهش‌می‌دهد (۱۷). ازاین‌رو، انتظارمی‌رود تا استفاده از DNA واکسن‌ها باعث افزایش پاسخ ایمنی علیه انگل شود.

واکسن‌هایی که تاکنون علیه اکینوکوکوس گرانولوزوس طراحی شدند، براساس پروتئین‌های نوترکیب بوده‌اند، اما این انگل دارای ده سروتیپ متفاوت G1–G10 می‌باشد که هرکدام میزبان اختصاصی خاصی دارند و این باعث کاهش کارآیی این نوع از واکسن می-



شکل ۳: بررسی بیان پروتئین

A) مشاهده سلول های ترانسفورم شده با نور مرئی با بزرگنمایی ٤٠x B) مشاهده سلول های ترانسفورم شده با نور فلئورسنت با بزرگنمایی ١٠x

شود. آنتی‌ژن Eg95 ، یکی از کاندیدهای مناسب جهت تهیه‌ی واکسن است. زیرا پروتئین نوترکیب آن حفاظت بالایی را در مقابله با انگل نشان‌داده‌است. این آنتی‌ژن، متعلق به خانواده‌ای چند ژنی است که هر کدام از ژن‌ها در مرحله‌ی خاصی از زندگی انگل بیان می‌شوند که این امر، ضرورت استفاده از اپیتوپ‌های این آنتی‌ژن را مطرح‌می‌کند. وکتور مورد استفاده در این تحقیق، pEGFP است که دارای ژن گزارشگر GFP می‌باشد که بعد از انتقال به سلول‌های یوکاریوتی و درصورت صحیح بودن قالب خواندن بیان می‌شوند و در انتهای N پروتئین مورد نظر قرار می‌گیرد و به سادگی با میکروسکوپ فلورسنت مورد ردیابی قرار می‌گیرد. این مطالعه نشان‌داد که اپیتوپ‌های غالب Eg95 کلون‌شده در وکتور pEGFP به‌طور فیوژن با پروتئین gfp در سلول‌های جانوری CHO بیان‌شدند که در ادامه، می‌بایست بررسی پاسخ ایمنی در حیوان مدل و در میزبان های انگل مورد بررسی قراربگیرد.

تشکر و قدردانی

مطالعه‌ی فوق بخشی از طرح تحقیقاتی موسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی می‌باشد. بدین وسیله از کلیه‌ی همکاران محترم بخش بیوتکنولوژی مؤسسه‌ی تحقیقاتی واکسن و سرم‌سازی رازی کرج به خاطر همکاری صمیمانه در انجام این تحقیق، تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1. McManus DP, Zhang W, Li J, Bartley PB. Echinococcosis. Lancet. 2003;362(9392):1295-304.
2. Moro P, Schantz PM. Echinococcosis: a review. Int JInfect Dis. 2009;13(2):125-33.
3. Jabbar A, Narankhajid M, Nolan MJ, Jex AR, Campbell BE, Gasser RB. A first insight into the genotypes of< i> Echinococcus granulosus</i> from humans in Mongolia. Mol Cell Probes. 2011;25(1):49-54.
4. Siracusano A, Delunardo F, Teggi A, Ortona E. Host-parasite relationship in cystic echinococcosis: an evolving story. Clin Dev Immunol. 2012;2012.
5. Bekçi TT. Diagnosis and Treatment of Human Hydatid Disease. Eur J Gen Med. 2012;9(Suppl 1):15-20.
6. Sarvi S, Dalimi A, Ghafarifar F. Molecular Cloning and Expression of EG95 Gene of Iranian Isolates of Echinococcus granulosus. Iran J Parasitol. 2012;7(2):1.
7. Lightowlers MW, Lawrence SB, Gauci CG, Young J, Ralston MJ, Maas D, et al. Vaccination against hydatidosis using a defined recombinant antigen. Parasite Immunol. 1996;18(9):457-62.
8. Chow C, Gauci CG, Vural G, Jenkins DJ, Heath DD, Rosenzvit MC, et al. Echinococcus granulosus: Variability of the host-protective EG95 vaccine antigen in G6 and G7 genotypic variants. Exp Parasitol. 2008;119(4):499-505.
9. Coban C, Kobiyama K, Aoshi T, Takeshita F, Horii T, Akira S, et al. Novel strategies to improve DNA

vaccine immunogenicity. Curr Gene Ther. 2011;11(6):479-84.
10. Good NE, Winget GD, Winter W, Connolly TN, Izawa S, Singh RM. Hydrogen ion buffers for biological research. Biochemistry. 1966;5(2):467-77.
11. Liu MA. DNA vaccines: a review. J Intern Med. 2003;253(4):402-10.
12. Khan KH. DNA vaccines: roles against diseases. Germs. 2013;3(1):26-35.
13. Shedlock DJ, Weiner DB. DNA vaccination: antigen presentation and the induction of immunity. J Leukoc Biol. 2000;68(6):793-806.
14. Zhang W, Ross AG, McManus DP. Mechanisms of immunity in hydatid disease: implications for vaccine development. J Immunol. 2008;181(10):6679-85.
15. James S, Miller L. Malaria vaccine development: status report. Nature Med Spl Focus. 2000:9-13.
16. Melby PC, Yang J, Zhao W, Perez LE, Cheng J. Leishmania donovani p36 (LACK) DNA vaccine is highly immunogenic but not protective against experimental visceral leishmaniasis. Infect Immun. 2001;69(8):4719-25.
17. Rigano R, Profumo E, Bruschi F, Carulli G, Azzara A, Ioppolo S, et al. Modulation of human immune response by Echinococcus granulosus antigen B and its possible role in evading host defenses. Infect Immun. 2001;69(1):288-96.

Cloning of linear epitopes of EG95 antigen of Echinococcusgranulosus in pEGFP vector and evaluation of gfp-ChEg95 expression in CHO cells

Somayeh Mohammadi.,
Assistant Professor, PhD, Department of Central laboratory, Razi vaccine and serum research institute, Karaj- Iran
MSc Student, Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran- Iran

Majid Esmaelizad.,
Assistant Professor, PhD, Department of Central laboratory, Razi vaccine and serum research institute, Karaj- Iran

Seied Abdolhamid Angaji.,
PhD, Assistant Professor, Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran- Iran

Mohammad Tahmaseb.,
Assistant Professor, PhD, Department of Central laboratory, Razi vaccine and serum research institute, Karaj- Iran

Roghayeh Mesr.,
MSc Student, Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran- Iran

Mozhgan Ahmadzadeh.,
MSc Student, Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran- Iran

Received:07/11/2014**, Revised:**22/11/2014**, Accepted:**07/12/2014

Corresponding Author:
Majid Esmaelizad.,
Department of Central laboratory,
Razi vaccine and serum research institute, Karaj- Iran
E-mail: m.esmaelizad@rvsri.ac.ir

Abstract

Background and purpose: Hydatidosis is a parasitic disease that transmits by Echinococcusgranulosus eggs excreted from the feces of infected dogs to humans and animals. This parasite is one of the tapeworms of the family Taeniidae which causes widespread health problems amonghumans and also economic loss in animal. Therefore, designing a new generation vaccine is important to prevent the disease.

Materials and methods: In this study, the linear T-cell epitopes were selected. The coding sequence of epitopes was synthesized and cloned to pEGFP-N1vector. The recombinant vector was transfected into CHO cells by genpulser. Expression of fusion Protein was confirmed by fluorescence microscopy.

Results: The accuracy of cloning was confirmed by bothcolony PCR on the clone and the subsequent sequencing. Fluorescence microscopy showed fusion protein wasexpressed in CHO.

Conclusion: The results showed that, linear T-cell epitope of EG95 antigen was cloned correctly in pEGFP vector and its expression confirmed that this recombinant vector can be used to construct a DNA vaccine model against the Echinococcusgranulosus.

Key words: *Echinococcusgranulosus, hydatidosis,epitope, Eg95, DNA vaccine, CHO.*