

恶性疟 P190 抗原基因的表达式 及免疫学研究

潘卫庆 杨树桐 邓海琳 陆德如*

(第二军医大学医学生物技术和分子遗传研究所, 上海 200433)

摘要 克隆了我国海南省 FCC1/HN 株 P190 抗原三肽重复区基因, 定名为 P190TR。该基因片段经 DNA 序列分析鉴定后连接到改建的 pGEX-2T 表达载体 BamHI 和 XbaI 位点中, 经鉴定的重组质粒转化感受态 JM109 (DE3) 大肠杆菌进行表达。结果显示: 该基因得到高效融合表达, 经一步亲和纯化后就取得高纯度的重组蛋白。用纯化的表达蛋白免疫动物亦产生 P190TR 特异性抗体。

关键词 恶性疟原虫, P190 抗原, 重复序列

发展疟疾疫苗是人类控制疟疾的重要途径。P190 抗原是当今最有希望的疫苗候选抗原之一^[1,2]。由于该抗原是由 1700 个氨基酸组成的蛋白^[3], 因此用基因工程方法表达完整的蛋白非常困难。这严重阻碍了 P190 疫苗的发展。如果能鉴定到该抗原的保护性免疫功能域, 我们就可以用它来替代完整蛋白用作疫苗。疟原虫抗原的一个显著特征是存在连续的重复序列。并且许多抗原中的重复序列区是保护性免疫功能域。在 P190 抗原的 N 端亦存在一个三肽重复区。该区是否具有类似的免疫保护功能, 这已引起普遍的关注。本研究克隆和表达了 P190 抗原三肽重复区的基因, 纯化表达产物, 并进行表达产物免疫原性的研究。

1 材料与方 法

1.1 材 料

限制酶 BamHI, XbaI, EcoRI, T4 DNA 连接酶, JM109 (DE3) 大肠杆菌及聚丙烯酰胺凝胶电泳试剂均购自 Promega 公司。pGEX-2T 质粒及 Sepharose 4B 谷胱甘肽层析柱购自 Pharmacia 公司。序列分析及 PCR 试剂盒购自 Cetus 公司。

1.2 方 法

1.2.1 恶性疟原虫基因组 DNA 制备; 恶性疟原虫 FCC1/HN 海南株按改进的 Trager-Jensen 氏^[4]方法进行体外培养^[5]。待原虫率达 10% 并以裂殖体为主时收虫。培养物经溶解宿主细胞和融虫处理后, 抽提基因组 DNA, 并保存 TE 溶液中备用。

1.2.2 寡核苷酸引物的合成: 我们已鉴定了恶性疟 FCC1/HN 海南株为 MAD20 变异型^[5]。根据该型序列, 设计了一对引物, 用固相亚磷酸酰胺法在 ABI391 型 DNA 合成仪

联合国开发计划署—世界银行—世界卫生组织热带病研究培训特别规划处基金资助项目。

* 联系人。

本文于 1993 年 7 月 13 日收到。

上自动合成。合成的引物经氨解后用 HPLC 纯化, 并溶于 TE 中置 -20°C 保存。

1.2.3 PCR 扩增 P190 三肽重复区 (P190TR) 基因片段: 以恶性疟基因组 DNA 为模板进行 PCR 反应。100 μl 反应体积中每个引物的浓度为 0.8 $\mu\text{mol/L}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 终浓度为 4 mmol/L , 模板 DNA 约 0.5 μg 。模板引物经 94°C 变性 7 分钟后, 于 80°C 加反应混合液, 共进行 25 个循环, 扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.4 基因片段的分离、纯化和克隆: 扩增的基因片段用低熔点胶电泳控块法分离。分离的胶经融化后用酚与氯仿抽提、乙醇沉淀。质粒 pUC18 和纯化的基因片段均用 BamHI 和 XbaI 双酶切, 分别产生两个粘性末端进行定向连接。在连接反应体系中含 0.1 μg 载体 DNA, 约 10ng 目的基因和 1.5 uT4 DNA 连接酶等, 置 12°C 连接过夜。重组质粒转化 JM109 菌。

1.2.5 DNA 序列分析: 在双链质粒上进行。方法按照 Cetus 公司序列分析试剂盒说明书进行。双链质粒 DNA 的变性: 取约 4 μg DNA, 加水至 18 μl , 加入 2 μl 2 mol/L NaOH, 2 mmol/L EDTA 溶液置室温 5 分钟。再加入 3 μl 3 mol/L NaAc 和 7 μl 水进行中和反应, 并用无水乙醇沉淀。

1.2.6 重组质粒的构建: 经序列鉴定为正确的基因片段, 用 BamHI 和 XbaI 从 pUC18 重组质粒中切出, 并与 pGEX-2T 载体连接, 转化感受态 JM109 (DE3) 大肠杆菌。用双酶切和 DNA 序列分析鉴定重组表达质粒。将插入 P190TR 片段的质粒定名为 pGEX-2T-P190TR。

1.2.7 目的基因的高效表达: 50ml 过夜菌接种到 500ml (含 100 $\mu\text{g/ml}$ 氨苄青霉素) 新鲜 LB 培养液中, 37°C 生长 90 分钟后, 加入异丙基硫代 β -D-半乳糖甙 (IPTG) 至终浓度为 1 mmol/L 进行诱导表达。 37°C 表达 4 小时, 收集菌体, 并混悬于 10ml PBS (pH 7.5, 含 1% Triton X-100)。超声破碎细菌。在 4°C 10 000g 离心 10 分钟, 取 20 μl 上清用于 0.1% SDS-12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 其余上清用于亲和纯化。

1.2.8 表达产物的纯化: Sepharose 4B 谷胱甘肽亲和层析柱 1.5ml 用 10ml PBS 洗, 加入 5ml 表达的上清液, 用 20ml PBS 洗柱, 毕后用 10ml 5 mmol/L 谷胱甘肽溶液 (50 mmol/L Tris-HCl, 终 pH 7.5) 洗脱表达产物。

1.2.9 免疫印迹法检测表达产物: 在 SDS-PAGE 电泳结束前 30 分钟, 将 1 张硝酸醋酸混合纤维膜及若干滤纸泡入转移缓冲液。终止电泳, 取出凝胶, 并与滤膜一起装入转移装置, 室温 200mA 恒流 2 小时。然后取出滤膜并按以下步骤进行检测: 用缓冲液洗 3 次 \rightarrow 1% 小牛血清白蛋白封闭 1 小时 \rightarrow 加疟疾病人血清 (1:100 稀释, 经大肠杆菌抽提液吸附) 反应 1 小时 \rightarrow 缓冲液洗 4 次 \rightarrow 与碱性磷酸酶标记抗 IgG 抗体反应 1 小时 \rightarrow 洗涤同前 \rightarrow 与 NBT/BCIP 底物反应 2 至 20 分钟, 并用水冲洗以终止反应。

1.2.10 免疫动物: 1.2mg 纯化的表达蛋白与等容积福氏完全佐剂混匀, 皮内多点注射约 2.5kg 重的新西兰株兔子。第 7 及 14 天皮下注入 500 μg 表达蛋白与等体积福氏不完全佐剂的混合物。第 21 天, 耳沿静脉注射 100 μg 表达蛋白。第 28 天放血, 制备抗血清。

1.2.11 间接荧光抗体试验 (IFA): 体外培养的疟原虫经 pH 7.2 PBS 洗涤 3 次后, 制备亚厚的抗原片。以疟疾病人血清为阳性对照, 以生理盐水及谷胱甘肽-S-转移酶 (GST) 免疫的兔血清为阴性对照。将待测抗血清用 PBS 稀释并按常规进行 IFA。

2 结 果

2.1 基因扩增引物的设计与合成

按照文献〔3〕和〔6〕的基因序列,我们设计了图1的引物。在每个引物的5'端均设有酶切位点 BamHI 或 XbaI 序列,并在切点前设有 GC 保护性碱基。合成的寡核苷酸引物经纯化后在凝胶电泳上均为单一条带。

P1 GC GGATCC TATAGTTTATTTCAAAAG
P2 GC TCTAGA ATGTTTTAAATCAGCGTA

图 1 寡核苷酸引物的设计

Fig. 1 Design for oligonucleotide primers

p1: 5'-terminal primer; p2: 3'-terminal primer; —: Restriction endonuclease sequences

2.2 P190TR 基因的扩增与克隆

用 PCR 方法有效扩增了 P190TR 片段,长度为 207bp,位于氨基酸第 56 至 124 位。经琼脂糖凝胶电泳初步鉴定,扩增片段大小与实际长度一致。该片段经 BamHI 与 XbaI 双酶切后,连接 pGEM-4Z 质粒相应位点,并转化大肠杆菌,共鉴定了 3 个重组质粒克隆,用于 DNA 序列分析的重复实验。

2.3 DNA 序列测定

P190 片段用双脱氧末端终止法进行 DNA 序列分析。结果显示,该序列与 MAD20 序列比较,除有 5 个碱基变换外,其余序列与 MAD20 完全一致(图 2)。5 个变换的碱基均引起氨基酸的变异。

301 GGAACAAGTGGAAACAGCTGTTACAAGTAGT ACACCTGGTTCAGGTGGTTCAGTTACTTCA
56 Gly Thr Ser Gly Thr Ala Val Thr Thr Ser Thr Pro Gly Ser Gly Gly Ser Val Thr Ser
361 GGTGGTTCAGGTGGTTCAGTTGCTTCAGTT GCTTCAGGTGGTTCAGGTGGCTCAGTTGCT
76 Gly Gly Ser Gly Gly Ser Val Ala Ser Val Ala Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Val Ala
421 TCAGGTGGTTCAGGTAATTCAAGACGTACA AATCCTTCAGATAAATTCAGTGATTTCAGAT
96 Ser Gly Gly Ser Gly Asn Ser Arg Arg Thr Asn Pro Ser Asp Asn Ser Ser Asp Ser Asp
481 GCTAAAACCTTACGCTGATTTAAAACAT
116 Ala Lys Thr Tyr Ala Asp Leu Lys His

图 2 P190TR 基因序列和推断的氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide sequence of the P190TR and its deduced amino acid sequence

Substituted bases; — Tripeptide repeat sequences

2.4 重组质粒的构建

pGEX-2T 质粒无 XbaI 位点。按照图 3 左侧途径改建,产生该切点序列。目的基因插入至 GST 基因的 3'端。重组质粒经酶切及序列分析鉴定均为正确插入。

2.5 基因表达及其产物的纯化

pGEX-2T 是个融合表达载体,其产物为 GST 融合蛋白。GST 分子量为 26kDa。GST-P190TR 融合蛋白分子量为 34.7kDa。表达产物电泳结果显示,含有 P190TR 重组质粒

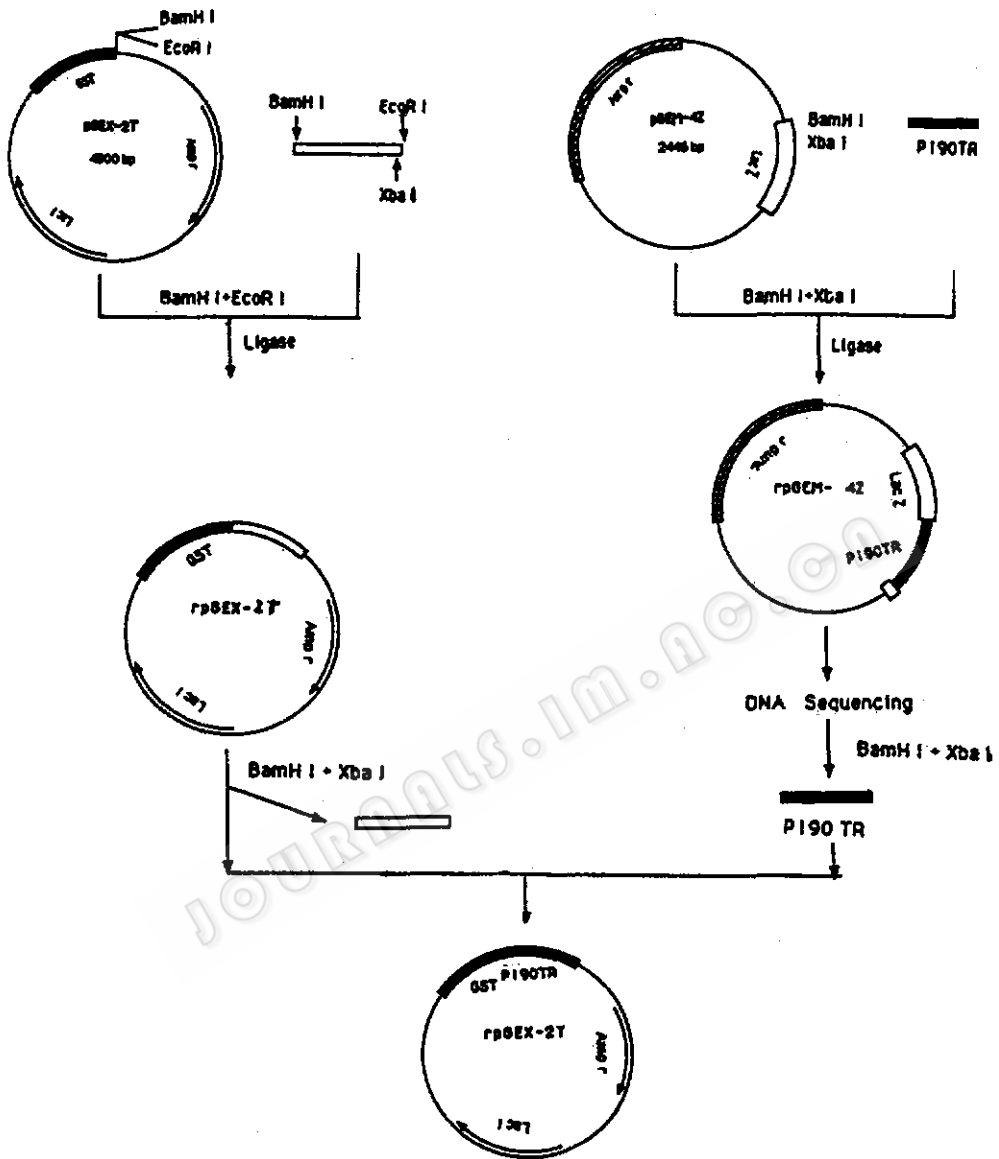


图 3 P190TR 重组质粒的构建

Fig. 3 Construction of P190TR recombinant plasmid

的表达菌在 34kDa 处出现一条中带(图 4-C), 而 pGEX-2T (图 4-B) 表达带出现在 26kDa 处(图 4-B), 与实际大小一致。表达产物经 Sepharose 4B-谷胱甘肽亲和层析柱一次纯化后就得到高纯度 34kDa 融合蛋白, 在 SDS-PAGE 电泳上出现单一条带(图 4-D)。

2.6 免疫印迹检测表达蛋白

从云南孟腊县收集 4 份恶性疟疾病人血清, 按等比例混匀后, 用含 GST 的大肠杆菌抽提液吸附过夜。该血清经 100 倍稀释后用于检测表达产物。结果显示, 在 34kDa 处出现一条阳性条带(图略), 表明表达的融合蛋白中含有正确的 P190TR 抗原。

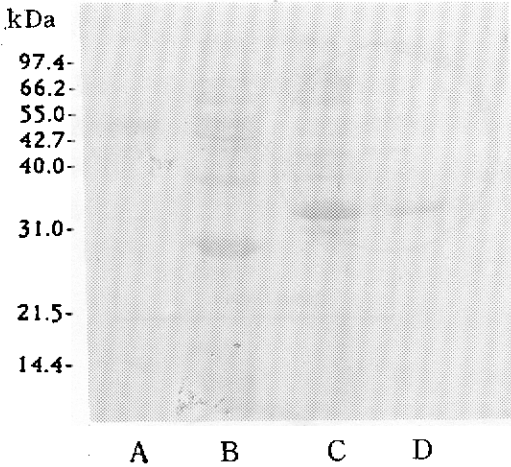


图 4 GST/P190TR 融合蛋白的表达与纯化
Fig. 4 Expression and purification of GST/P190TR fusion protein

A: Protein marker, B: pGEX-2T,
C: pGEX-2T-P190TR, D: Purified fusion protein

2.7 IFA

FCCI/HN 株恶性疟原虫对 GST-P190TR 免疫血清产生强荧光反应 (图 5-A)。免疫血清经 1:320 倍稀释后仍出现阳性反应, 而阴性对照不出现荧光 (图 5-B)。

3 讨 论

恶性疟原虫 P190 抗原是裂殖子表面抗原。目前有许多实验证据表明了它的重要免疫保护作用。因此, P190 已成为当今最有希望的疟疾疫苗候选抗原之一。鉴定该抗原保护性免疫功能域对 P190 疟疾疫苗的发展至关重要。疟原虫作为较高等的真核寄生虫, 在蛋白抗原中具有连续的重复序列。目前已发表的 30 个疟原虫抗原序列中, 29 个具有这种特征。这类重复区往往是宿主体液免疫系统识别的抗原表位。其中有些重复序列具有

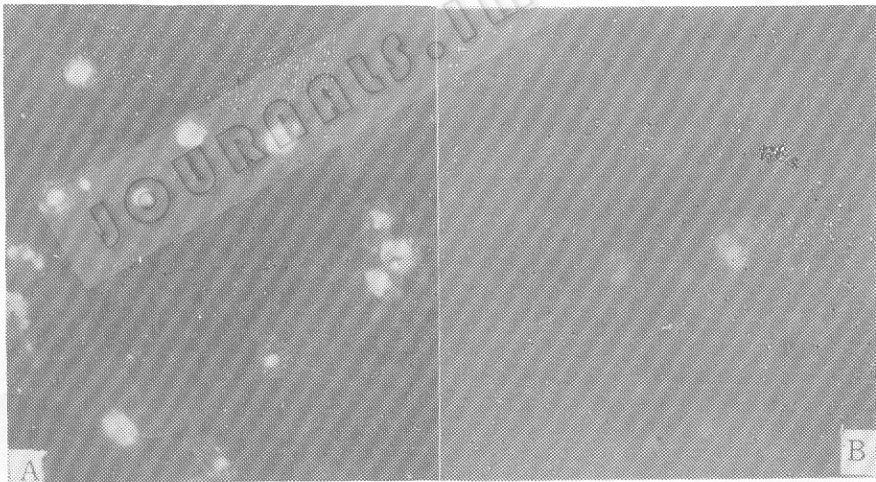


图 5 GST/P190TR 免疫血清与恶性疟原虫 IFA 反应

Fig. 5 Indirect immunofluorescence reactivity of the antisera against GST/P190TR with the cultured *Plasmodium falciparum*

A: Positive reactivity, B: Negative control

很强的免疫保护作用, 为了解该重复序列是否具有同样的免疫保护作用, 我们克隆该区的基因片段, 表达和纯化了重组蛋白, 并在动物免疫中产生了特异性抗体。

用 PCR 方法克隆基因, 有时会因 DNA Taq 酶的错误复制而引起扩增基因的变异。为排除本克隆基因的碱基变换是由于 DNA Taq 酶的错误复制所致, 我们对该基因片段序列分析重复 3 次, 每次的模板 DNA 均来自不同的转化克隆。此外, 我们用通用和反向

引物系统进行双向测定, 这进一步提高本报道序列的准确性。本文报道的重组蛋白不仅能与疟疾病人血清产生强阳性反应, 而且在动物免疫中产生了特异性抗体, 表明该区具有较强的免疫原性。

参 考 文 献

- [1] Siddiqui W A *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1987, **84** (9): 3014.
- [2] Holder A A *et al.* Nature, 1981, **294**: 361.
- [3] Holder A A *et al.* Nature, 1985, **317**: 270.
- [4] Trager W *et al.* Science, 1976, **193**: 673.
- [5] 潘卫庆. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1986, **4**: 71.
- [6] 潘卫庆. 中国科学 (B 辑), 1993, **22** (10): 1070.
- [7] Schofield L *et al.* Bull WHO, 1990, **68**: 68.

Expression and Immunogenicity of a Repeated Tripeptide Region of P190 Antigen in *Plasmodium falciparum*

Pan Weiqing Yang Shutong Deng Hailin Lu Deru

(Institute of Medical Biotechnology and molecular Genetics, Shanghai 200433)

Abstract A DNA fragment, designated as P190TR, encoding amino acid residues of the tripeptide region of the P190 antigen was amplified by Polymerase Chain Reaction from genomic DNA of FCCL/HN *Plasmodium falciparum* isolated from Hainan province, China. Upon comparison with the nucleotide sequences of MAD20 strain, It was found that there were five bases substitution in the P190TR. The DNA fragment sequenced were ligated to BamHI-digested pGEX-2T vector. Competent *E. coli* JM109 (DE3) were transformed with either parental or recombinant pGEX-2T for expression. Analysis of the soluble cellular proteins revealed the high level expression of GST-P190TR as fusion protein. Affinity purification of the fusion protein under nondenaturing condition resulted in the removal of almost all other *E. coli* protein. The purified GST-P190TR was used as an immunogen in rabbits. The antibodies against the recombinant protein was raised and the highest titer as measured by IFA was 1 : 320.

Key words *Plasmodium falciparum*, P190 antigen, genetic engineering