

恶性疟原虫多抗原表位基因的融合与表达

袁清安 石成华 曹 诚 张京生 马清钧

(军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)

摘要 以霍乱毒素 B 亚基(CTB)基因为载体,构建了含不同抗原表位的恶性疟原虫的融合基因 CTB/ATE 和 CTB/AWTE。前者除含有恶性疟原虫裂殖子表面主要抗原表位杂合多肽基因 SPf66 外,还含有很强的 T 辅助细胞表位 CST3 和 Tc 细胞表位;后者在此基础上将我国发现的 B 细胞表位 NKND 基因经 8 次串联后融合其中。两种形式的融合基因经测序正确后转入大肠杆菌 TK1046 中,产量分别为 10mg/L 及 5mg/L。表达产物 CTB/AWTE 经亲和层析纯化双抗夹心 ELISA 测定表明,该融合蛋白在保留了与抗 CTB 抗体结合的同时,与抗 NKND 单抗的结合效价达 1:8000。

关键词 恶性疟原虫,抗原表位,霍乱毒素 B 亚基,融合基因,抗原性

疟疾是世界性的严重寄生虫病,WHO 估计全球每年疟疾发病人数高于 4 亿,死于恶性疟疾的病人约有 300 万。我国疟疾每年患病人数为 10 万左右,死亡约 1 万^[1]。恶性疟原虫是最主要的病原体,其重要的抗原包括环孢子蛋白(CSP)^[2],裂殖子表面抗原前体(PMMSA)^[3],环状体感染红细胞表面抗原(RESA)^[4]等;比较有效的表位有:CSP 的 B 细胞表位 NANP^[5],NKND^[6],T 细胞表位 CSTE 即 CSP(368-397)^[7,8];PMMSA 的 SPf35.1,SPf55.1,SPf83.1^[9];RESA 的 5'-重复区和 3'-重复区^[10,11]。

Partarroyo M E 采用化学合成法获得杂合多肽 SPf66^[9],它包含了子孢子蛋白中的两个 NANP 和裂殖子抗原 PMMSA 的上述三个表位。以 SPf66 为单体进行 30 次串联后产生的抗原具有较好的安全性、免疫原性、有效性和保护作用;场地试验表明,SPf66 对恶性疟和间日疟的有效性分别达 82.3% 和 60.6%^[12]。

我们采取基因融合的途径,以霍乱毒素 B 亚基(CTB)^[13]基因作为载体,选择抗原表位 SPf66、CSTE、NKND,将它们分别进行基因合成,以不同的方式组合后融合在 CTB 基因的 3'-端,构成两种形式的融合基因:CTB/SPf66/CSTE/及 CTB/SPf66/(NKND)n/CSTE。研究了它们在大肠杆菌中的表达及抗原性。

1 材料和方法

1.1 材料

重组噬菌体 M13mp18-HPFGA2 为本室构建,含有恶性疟原虫杂合多肽 SPf66 的编

本研究为“863”课题资助项目 863-102-10-9。

本文于 1995 年 2 月 7 日收到。

码基因。质粒 pMC-HPFGB21 为本室构建,含有霍乱毒素 B 亚基(CTB)基因。质粒 pBV220 为中国预防医学科学院病毒所惠赠。复制型 M13mp18 购自华美公司。大肠杆菌 JM101、RRI、TK1046、CAG626、CAG597、DH5 α 均为本室保存菌株;抗 NKNDD 单抗为中国医学科学院基础所提供。限制酶、T4 噬菌体连接酶、DNA 聚合酶大片段均为 Promega 公司产品,核酸序列分析试剂及 Sepharose 4B 为 Pharmacia 公司产品,同位素购自亚辉公司。其他试剂为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 DNA 重组、SDS-PAGE 按文献[14]进行。序列分析采用双脱氧链终止法。

1.2.2 表达菌株的培养:重组质粒主要在大肠杆菌 TK1046 中表达,以玉米浆为培养基培养。培养步骤是:菌种接种至 5ml LB 中,37 $^{\circ}$ C 过夜培养;全部转入 100ml(含 100 μ g/L 的氨苄青霉素,Ap)的玉米浆培养基中,180r/min,37 $^{\circ}$ C 培养 6.0h;全部培养物转至 400ml(含 100 μ g/L 的 Ap)的玉米浆培养基中,继续培养 36h。中止培养,浓 HCl 调 pH 至 7.4,5000r/min 离心 10min,收集上清。

1.2.3 亲和层析纯化:在已中和的上清中加入抗 CTB 抗体偶联的 Sephrose-4B 30ml,室温温和搅拌 1.0h;抽滤,PBS 多次洗涤凝胶,最后用 30ml 的 PBS 悬浮,加到相应体积的层析柱上,PBS 平衡。调好洗脱液速度为 60ml/h;平衡后以解离液(pH2.8 的甘氨酸缓冲液)代替 PBS 解离,收集洗脱峰,洗脱液立刻用 Na₂CO₃(0.3mol/L)中和至 pH7.4;测定 280nm 及 260nm 的紫外吸收值,计算蛋白浓度。蛋白溶液装于透析袋中吹干至 2ml 左右,浸于 10mmol/L PBS 中多次换液透析除盐。所得蛋白溶液于 -20 $^{\circ}$ C 贮存。

1.2.4 抗原性检测:将 NKNDD 单抗以包被液(0.05mol/L 碳酸盐缓冲液,pH9.6)稀释 1000 倍后继续倍比稀释按 100 μ l/孔包被,4 $^{\circ}$ C 过夜;PBST(PBS + 1% Tween-20)400 μ l/孔洗涤 4 次,加封闭液(3% 小牛血清)200 μ l,室温封闭 4.0h;PBST 洗涤 4 次;抗原 CTB/AWTE(1.5mg/ml)作 100 倍稀释后 100 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C 结合 1.0h,PBST 洗涤 4 次;辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗 CTB 抗体稀释到适当(1:1000)浓度,100 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C,1.0h,PBST 洗涤 4 次;底物液(邻苯二胺 6mg + 10ml 底物溶液 + 4 μ l 的 H₂O₂ 原液)100 μ l/孔,显色 10min 后用 2mol/L 的 H₂SO₄ 中止,测 OD 值。

2 结果与讨论

2.1 抗原决定簇基因的合成

2.1.1 SPf66 基因:其序列由第一军医大学寄生虫教研室合成,本室已将其克隆至重组噬菌体 M13mp18,获得 M13mp18-HPFGA2。

2.1.2 CSTE 编码基因的设计及合成:根据 SPf66 基因 3'-端结构特点及融合要求,参照恶性疟原虫子孢子蛋白 CSP(368~397)的基因序列,并对 SPf66 基因的 3'-端进行重新设计,合成互补区为 20bp、两条长度均为 71 个寡核苷酸的片段 A:5'-CG GGT CCC GGG AAA CCT AAA GAC GAA TTA GAT TAT GAA GAT ATT GAA AAG AAG ATC GCT AAG ATG GAA AAG-3' 及 B:5'-GC GGA TCC TTA TCA TGG TAAC CAC AAC GTT GAA AAC ACT GCT AGC CTT TTC CAT CTT AGC GAT CTT CTT TTC-3'。

2.1.3 NKNDD 编码基因:由中国医学科学院基础医学研究所分子生物学研究室合成的

F1、F2 两条 15 核苷酸、配对区为 9bp 的序列。F1:5'-AAC AAG AAC GAT GAT-3'; F2:5'-CTT GTT ATC ATC GTT-3'。F1、F2 配对后粘端达 6bp, 可定向连接成串联体。

2.2 合成片段的克隆与测序

以 CTB 为载体, 拟构建的两种融合蛋白 CTB/ATE、CTB/AWTE 的组成如下(见图版 I-A)。CTB 基因将从本室构建的质粒 pMC05-HPFGB21 中获得, ATE 和 AWTE 分别组装并测序。

以单链 M13mp18-HPFGA2 为模板、以公用引物 P1201 和 P1212 进行 PCR 扩增获得 SPf66, 分别以 BstUI、EcoRI 酶切, 回收; A、B 经退火、补平, BamHI 酶切, 回收得到 CSTE 基因; M13mp18(RF) 以 EcoRI、BamHI 双酶切并回收。三片段等分子比连接, 构建成载体 M13mp18-ATE。将此载体转化大肠杆菌 JM101, 挑选重组噬斑, 抽提 DNA 单链模板, 经测序证实构建正确(图版 I-B)。

复制型的 M13mp18-ATE 以 SmaI 酶切, 去磷酸化, 回收; 寡核苷酸片段 F1 和 F2 经退火、串联连接、补平, 得到 NKNDD 串联体基因。按外源分子: 载体 = 5:1 进行混合连接。转化大肠杆菌 JM101, 以 F2 为探针, 噬斑杂交法筛选阳性重组体。抽提阳性斑对应的 DNA 单链, 经自动测序仪测序, 证实插入的 NKNDD 单体有 8 次串联且序列正确。

2.3 重组表达质粒的构建

用 EcoRI、BamHI 分别双酶切复制型 M13mp18-ATE 和 M13mp18-AWTE, 回收 ATE 基因及 AWTE 基因; 将 pMC05-HPFGB21 用 PstI、BamHI 双酶切回收 4.11kb 片段; 用 PstI、EcoRI 酶切回收包含 CTB 基因的 1.07kb 片段, 按等分子比连接, 分别转化大肠杆菌 RRI, 在抗性平板上挑菌落抽提质粒 pMC05-ATE 和 pMC05-AWTE, 以 EcoRI、BamHI 双酶切鉴定(图版 I-C)。

2.4 融合基因的表达及纯化

以玉米浆培养基分别进行培养, 上清经亲和层析一步纯化, 即获得融合蛋白 CTB/ATE, CTB/AWTE。以培养物离心后的上清进行免疫单扩散, 测得 CTB/ATE 及 CTB/AWTE 的表达产量分别为 10mg/L 和 5mg/L。

为测定融合蛋白的分子量, 纯化产物进行 SDS-PAGE 电泳(图版 I-D)。CTB/ATE 和 CTB/AWTE 的理论大小分别为 20、25kDa。从图谱来看, CTB/ATE 在 14kDa 处有一较明显的蛋白带; CTB/AWTE 则出现 25、22、19、17、15kDa 等几种大小的条带。

表 1 单抗 M26-39 与融合蛋白 CTB/AWTE 的酶联免疫检测结果(OD 值)

Table1 The ELISA result of McAb M26-39 with CTB/AWTE (OD-value)

Dilution rate	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000
M26-39	0.58	0.55	0.53	0.34
Negative	0.15	0.16	0.17	0.16

2.5 融合蛋白的抗原性

用双抗夹心 ELISA 法检测测定融合蛋白 CTB/AWTE 与 NKNDD 单抗及 CTB 抗体的反应性。CTB/ATE 的完整形式很少且无相应的抗体, 因此没有测其抗原性。M26-39 系海南岛分

离株疟原虫的鼠单抗。实验按“抗原性方法检测”进行。结果表明, 融合蛋白在保持与抗 CTB 抗体结合的同时, 与 NKNDD 单抗也发生较强的反应。单抗 M26-39 与融合抗原 CTB/AWTE 的结合效价达 1:8000(表 1)。

2.6 融合蛋白的稳定性

本研究通过 DNA 合成及基因克隆将恶性疟原虫的多个抗原决定簇基因进行了融合,并在和 CTB 基因连接后在大肠杆菌 TK1046 中获得了分泌表达的产物。双抗夹心 ELISA 法结果显示:抗原 CTB/AWTE 与抗 CTB 抗体结合的同时,其中疟原虫 B 细胞表位串联体(NKNDD)8 与单抗 M26-39 有很强的结合,结合效价可达 1:8000,说明 NKNDD 串联体在融合分子中得到充分的暴露而且保持了较好的抗体结合的能力。这说明:外源抗原决定簇基因与 CTB 基因融合后,融合蛋白中的 CTB 保持了原来的抗原性,外源表位 NKNDD 亦表现了很高的抗原性。

在 CTB 分泌表达系统中,外源抗原决定簇基因可融合于 CTB 基因的 5'-端或 3'-端。借助于 CTB 的分泌表达,通过亲和层析一步纯化即可获得较纯的抗原。已用来表达乙肝病毒的 PreS2 抗原表位^[15],丙肝病毒的外壳蛋白抗原决定簇 CP9^[16],疟原虫子孢子蛋白 B 细胞表位 NANP^[17]等。

表达的两种融合蛋白有不同程度的降解。降解与多种因素如外源抗原决定簇氨基酸残基的特性以及表达方式有关。根据一般的经验,融合于 CTB 基因 3'-端的外源部分在 120bp 以下(约 40 氨基酸残基)时,整个融合蛋白的较少被降解;然而,融合蛋白 CTB/AWTE 中由于有(NKNDD)8 的插入而比 CTB/ATE 稳定。这个串联体全部是极性氨基酸残基,其中带 24 个电荷,说明融合蛋白的稳定性很大程度上与所融合的外源抗原决定簇的氨基酸残基的组成有关,带电荷氨基酸及极性氨基酸含量较高时则融合蛋白较稳定。这种关系已有类似的报道^[18]。

为解决降解问题,做了不同的尝试。大肠杆菌的两个基因产物 lon 和 htpR 与多数外源蛋白的降解有关。当以两株蛋白酶缺陷菌株(hptR⁻, lon⁻)作表达受体菌时没有克服降解;由于包涵体能避免蛋白酶的作用,企图以包涵体形式表达。但去掉 CTB/AWTE 的信号肽部分,全基因转入 pBV220 中未见表达。可能是 CTB 对自己的启动子有依赖性。在玉米浆培养基中加入 EDTA 对降解有一定的抑制作用,可提高完整形式的量,但仍有降解(图版 I-D, lane III)。

本研究探索了恶性疟原虫无性期疫苗的研制方案,为提供有效的基因工程多肽疫苗奠定了基础。

参 考 文 献

- [1]Alonso P L, Smith T, Schellenberg J R *et al.* The Lancet, 1994, 344:1175~1181.
- [2]Dame J B, Williams J L, McCutchan T F *et al.* Science, 1984, 225:593~559.
- [3]Holder A A, Lockyer M J, Odink K G *et al.* Nature, 1985, 317:270~273.
- [4]Favaloro J M, Coppel R L, Corcoran L M *et al.* Nucleic Acids Res, 1986, 14(21):8265~8276.
- [5]Mitchell G H. Parasitol, 1989, 98:S29~47.
- [6]Qin Cheng, Blackett P R, Wang C S *et al.* Mol Biochem Parasitol, 1991, 49:73~82.
- [7]Sinigaglia F, Guttinger M, Matile H *et al.* Bull World Health Organ, 1990, 68(suppl):94~98.
- [8]Kummar S, Miller L H, Quakyi I A *et al.* Nature, 1988, 334:258~260.
- [9]Patarroyo M E, Amador R, Clavijo P *et al.* Nature, 1987, 328:629~631.
- [10]Wahlin B, Wahgren M, Perlmann H *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1984, 81(24):7912~7916.

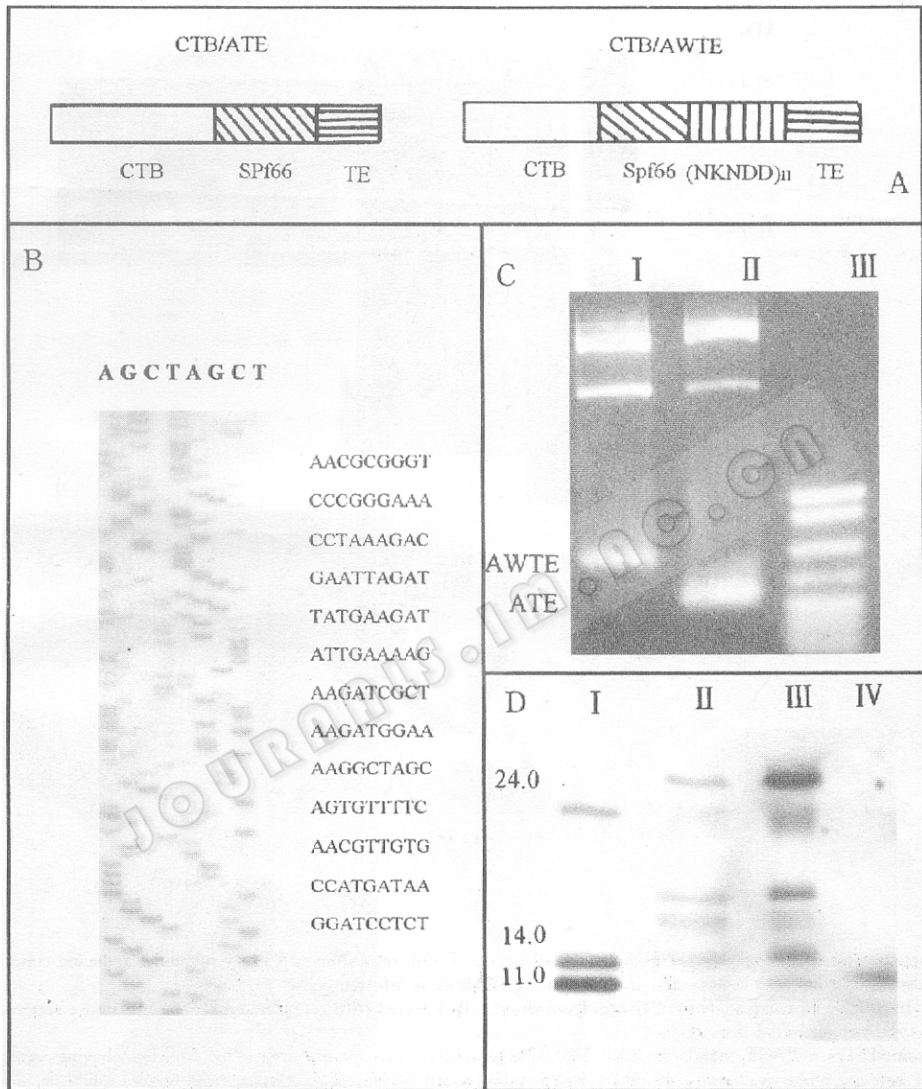
- [11] Berzins K, perlmann H, Wahlin B *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1986, **83**(4):1065~1069.
- [12] Amador R, Moreno A, Valero P *et al.* Vaccine, 1992, **10**(3):179~184.
- [13] 马清钧, 周建光, 于秀琴等. 中国科学(B辑), 1989, **32**(2):186~192.
- [14] Sambrook J, In: Molecular Cloning, 2nd ed, New York: Cold Spring Harbour Laboratory, 1989.
- [15] 朱运峰, 石成华. 生物化学杂志, 1995, **11**(2):117~121.
- [16] 曹诚, 石成华, 张京生等. 病毒学报, 1995, **11**(2):99~106.
- [17] 李杰之, 马清钧, 石成华等. 生物化学杂志, 1993, **9**(4):429~433.
- [18] Bowie J V and Sauer R T, J Biol Chem, 1989, **263**:19833~19837.

Fusion and Expression of Multiple Epitopes of Malaria *Plasmodium falciparum*

Yuan Qing'an Shi Chenghua Cao Cheng Zhang Jingsheng Ma Qingjun
(Institute of biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071)

Abstract Two fusions genes, CTB/ATE and CTB/AWTE, which contain sequences coding for multiple antigenic epitopes of malaria *Plasmodium falciparum* and cholera toxin B subunit (CTB) gene used as a carrier were constructed. The former consisted of SPf66; the chimeric epitopes of merozoitic antigens, and T cell epitopes CSTE including Th determinant CST3 and Tc determinant CSP(368-390). The later was constructed by inserting a tandem repeat of eight times of a B cell epitope, NKNDD, to the former one. These two plasmids containing the correct genes under the control of Lac promoter were transferred to bacteria *Escherichia coli*, TK1046. The expression levels were 10mg/L for CTB/ATE and 5mg/L for CTB/AWTE. CTB/AWTE was purified on affinity chromatography column and tested by enzyme linked immune absorbent assay (ELISA). It showed that this fusion protein could bind not only with monoclonal antibody (McAb) against NKNDD at a high titre of 1:8000 but also with antibody against CTB.

Key words Malaria *Plasmodium falciparum*, epitope, cholera toxin B subunit, fusion gene, antigenicity



A. The designs of the two fusion proteins CTB/ATE and CTB/AWTE.

A stands for SPf66, TE stands for CSTE, W stands for (NKND)n.

B. Gene sequence of ATE;

C. Restriction endonuclease digestion with EcoRI and BamHI of the two constructed plasmids, pMC05-AWTE (lane I) and pMC05-ATE (lane II) are indicated; lane III are pBR322/MSPI;

D. SDS-PAGE of the two fusion proteins and CTB/AWTE (lane II, lane III), CTB/ATE (lane IV), lane I are standard (kDa)