

生物科学

恶性疟原虫复合多表位基因的原核表达 和多克隆抗体制备

沈 燕 赵 亚 黄豫晓 梁 姣 刘忠湘 李英辉*

(第四军医大学微生物学与病原生物学教研室, 西安 710032)

摘要 原核表达恶性疟原虫多期多表位基因并制备其多克隆抗体。在前期构建恶性疟原虫复合多期多表位重组真核表达载体的基础上, 将测序正确的 AMAMEG 基因克隆入原核表达载体 pGEX4T-1 并诱导表达。采用包涵体洗涤的方式纯化目的蛋白, 以 AMA-1 抗体对纯化蛋白进行 Western-blot 分析。将纯化的融合蛋白免疫小鼠制备多克隆抗体。通过 PCR 成功获得长度为 1 000 bp 的恶性疟原虫 AMA-1 胞外域基因片段, 获得了与多表位基因连接后的 AMAMEG 基因。通过诱导表达, 显示在相对分子量约 95 000 处有预计大小的特异性条带, 表明成功表达出融合蛋白。经此纯化的融合蛋白免疫的小鼠能产生特异性抗体, 其滴度达到 1:10⁵。纯化的融合蛋白和多克隆抗体为研究新型疟疾疫苗奠定一定的理论和实践基础。

关键词 恶性疟原虫 疫苗 多表位基因

中图法分类号 Q959.115.4; **文献标志码** B

疟疾是危害人类健康的严重传染病。最新数据表明, 全球有约 35% 的人口(约 23.7 亿人)生活在有一定感染疟疾风险的环境中, 全球有 10 亿人生活在疟疾发病高危地区。全球疟疾形势的恶化, 迫切需要采用新技术研创新的疟疾防治方法以控制其流行。目前在研的方法包括研制不同作用机制的新型抗疟药和能抵抗疟原虫感染的转基因蚊虫以及疟疾疫苗等。研究者普遍认为, 研制安全、有效的疟疾疫苗是人类控制乃至根除疟疾的重要途径。因此, 世界各国对疟疾疫苗研究给予了前所未有的关注和支持: 疟疾、爱滋病和结核疫苗一起成为全球优先发展的三大疫苗。但是, 由于疟原虫具有复杂的生活史、抗原高度变异等特点, 有效疫苗的研制仍旧面临极大困难。至今尚无有效疫苗应用于临床实践, 作为目前免疫保护效果最好的 RTS,S 疫苗研究耗时 20 余年, 在 III 期临床试验中对低

龄婴儿的保护率仅为 53% 左右^[1], 但已属疟疾疫苗研究领域非常重大的突破。本研究在前期构建恶性疟原虫复合多期多表位重组真核表达载体的基础上, 构建恶性疟原虫复合多期多表位重组原核表达载体, 并表达蛋白和进行抗体制备, 该工作可能对研究有效的恶性疟原虫预防/治疗性疫苗提供重要的理论和实践基础。

1 材料和方法

1.1 材料

大肠埃希菌 BL21 (DE3)、DH5 α 为本室保存。Balb/C 小鼠购自第四军医大学实验动物中心。pGEX4T-1 原核表达质粒为瑞典 Pharmacia 公司产品。兔抗谷胱甘肽转移酶 (GST) IgG (Cat. 10000-0-AP) 辣根过氧化物酶 HRP 标记的抗兔 IgG (Cat. 00001-2) 为 Proteintech 公司产品。HRP 标记的抗小鼠 IgG (Cat. HD003-1) 购自北京鼎国生物公司。化学发光 HRP 底物 Immobilon Western 为 Millipore 公司产品 (Cat. WBKLSO-100)。T-AMA-1 和 T-MEG 均为本教研室制备, 其余化学试剂均为国产分析纯。

2012 年 4 月 25 收到 国家自然科学基金项目(30901370)资助
第一作者简介: 沈 燕(1981—), 女, 陕西西安人, 助教, 理学硕士, 研究方向: 分子寄生虫学。

* 通信作者简介: 李英辉。

1.2 方法

1.2.1 pGEX4T—1/AMAMEG 重组表达载体的构建

用 *Bam*HI 和 *Nde*I 双酶切 T-AMA-1, 获得 AMA—1 基因片段; 以 *Nde*I 和 *Sal*I 双酶切 T-MEG, 获得 MEG 片段, 将 AMA—1、MEG 和经 *Bam*HI 和 *Sal*I 双酶切的原核载体 pGEX4T—1 用 *T*₄DNA 连接酶连接, 转化 DH5 α 。重组质粒 pGEX4T—1 / AMAMEG 的鉴定采用双酶切鉴定, 酶切鉴定得到的阳性克隆, 送 TaKaRa 公司进行核苷酸序列测定。

1.2.2 重组蛋白的诱导表达

将重组质粒 pGEX4T—1/AMAMEG 转化入感受态细菌 BL21 (DE3), 挑取阳性克隆接种于 5 mL 含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 37℃, 220 r/min 震荡培养 16 h—20 h, 次日以 1: 100 比例转接种于 100 mL 含氨苄青霉素的 LB 培养液中, 37℃, 220 r/min。

震荡培养, 当吸光度(OD 值)达到 0.6 时添加终浓度为 0.1 mmol 的异丙基— β -D 硫代半乳糖苷 (IPTG), 20℃, 220 r/min 震荡培养 5 h, 4 000 r/min 离心 10 min 后弃上清, 收集沉淀菌体, -80℃ 保存备用。同时诱导前后取样各 1 mL, 离心收集菌体, 少量 PBS 重悬后加入等体积 2 × Loading Buffer, 100℃ 煮沸 5 min, 离心取上清进行 SDS-PAGE 电泳及 Western Blotting 检测表达产物。

1.2.3 AMAMEG/GST 包涵体重组蛋白的纯化

将菌体沉淀用适量 PBS 重悬, 超声裂解菌体, 4℃, 10 000 g 离心 25 min, 分别取上清和沉淀少量进行 SDS-PAGE 电泳检测表达产物。将包涵体沉淀分别用含有 1.5% TritonX—100 和 2 mol 尿素的 PBS 溶液洗涤, 12 000 g 离心 10 min, 各重复三次, 将沉淀用 8 mol 尿素/PBS 溶液室温搅拌溶解 2 h, 12 000 g 离心 10 min, 分别对各洗涤液上清和沉淀取样进行 SDS-PAGE 电泳和 Western Blotting 检测表达产物。检测正确后经 10% SDS-PAGE 电泳分离后, 考马斯亮蓝染色, 切取目的条带, 液氮速冷后研磨成粉, 用适量 8 mol 尿素/PBS 溶液溶解, 离心后取上清, 按照试剂盒操作测定蛋白含量, -80℃ 保存蛋白备用。

1.2.4 重组蛋白免疫小鼠

选取 Balb/C 小鼠 6 只, 雌性, 体重 18—20 g, 将重组蛋白与弗氏完全佐剂等体积充分混匀, 按 10 μ g 蛋白/只小鼠 (200 μ L) 经腹腔注射, 2 周后将重组蛋白与弗氏不完全佐剂等体积充分混匀, 按 10 μ g/只小鼠 (200 μ L) 经腹腔注射, 2 周后再次加强免疫, 之后第十天摘眼球取血, 收集血清, 进行 ELISA 和 Western Blotting 检测抗体效价及特异性。

1.2.5 ELISA 检测抗体效价

用抗原包被液将重组蛋白稀释至 10 μ g/mL, 每孔加 100 μ L, 4℃ 过夜, 次日用 PBST 清洗 2 次, 拍干后用 100 μ L/孔 5% 脱脂牛奶/PBS 溶液封闭 1 h, 将待测小鼠血清以 10⁻¹—10⁻⁶ 倍比稀释至各孔, 37℃ 孵育 2 h, PBST 清洗 3 次, 加新鲜稀释的酶标抗体 100 μ L/孔, 37℃ 孵育 1 h, PBST 清洗 3 次, 加入 TMB 底物溶液 100 μ L/孔, 37℃ 显色 15 min, 加入 2 mol 硫酸 50 μ L/孔终止显色, 用酶标仪进行测定。

1.2.6 Western Blotting 检测抗体特异性

纯化后的重组蛋白加入 5 × Loading Buffer 煮沸 5 min, 10% SDS-PAGE 电泳, 转印 PVDF 膜 40 V 恒压 1 h。用 5% 脱脂牛奶/PBS 溶液封闭转印膜 1 h, 以 1:500 稀释小鼠血清孵育转印膜, 4℃ 过夜, 次日用 PBST 清洗 10 min 重复 3 次, 加入 HRP 标记的抗小鼠 IgG, 室温孵育 1 h, PBST 清洗 10 min 3 次, Western 显色剂进行显影。

2 结果

2.1 pGEX4T-1/AMAMEG 重组载体的酶切鉴定

经 *Bam*HI 和 *Sal*I 双酶切 pGEX4T-1/AMAMEG, 得到 1 400 bp 左右的片段(图 1), 与预期片段大小一致, 测序分析显示序列与原始设计序列完全一致。

2.2 pGEX4T-1/AMAMEG 重组蛋白的原核表达及鉴定

IPTG 诱导后在相对分子量约为 95 kD 处可见明显蛋白条带, 与预测相符, SDS-PAGE 电泳结果显示, 该融合蛋白少量为水溶性, 大部分以包涵体形式存在裂解后的菌体沉淀中(图 2)。

2.3 包涵体纯化和鉴定

包涵体沉淀先用 2 mol 尿素/PBS 溶液清洗, 只有少量目的蛋白包涵体被溶解, 随后连续两次用 8M

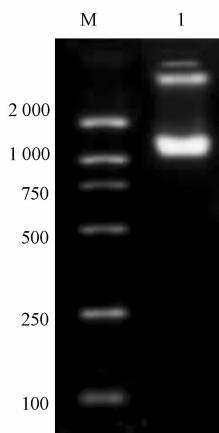


图 1 pGEX4T-1/AMAMEG 重组载体的酶切鉴定

M—DL 2000 Marker;

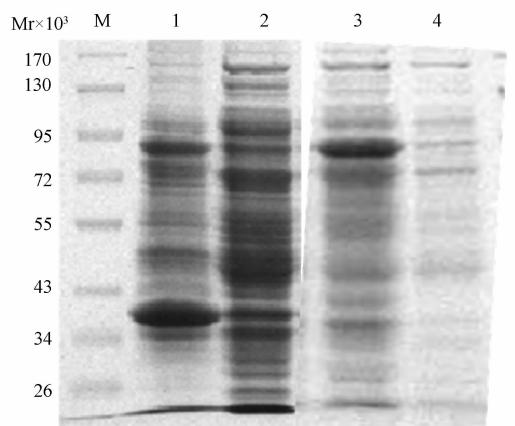
1—*Bam*HI 和 *Nde*I pGEX4T-1/AMAMEG
digested by *Bam*HI and *Nde*I

图 2 GST/AMAMEG 重组蛋白的诱导表达

M—protein marker, 1—The precipitate of induced expression, 2—The supernatant of induced expression, 3—Induced expression, 4—Uninduced expression

尿素/PBS 溶液溶解, 第一次即可达到较理想的溶解效果, 大部分包涵体已被溶解。变性后的沉淀中基本不含有包涵体(图 3)。10% SDS-PAGE 电泳考马斯亮蓝染色后切取目的蛋白条带, 重新用少量 8 mol 尿素/PBS 溶液溶解后 BCA 试剂盒测定蛋白浓度达到 0.15 mg/mL, 后经 Western Blotting 鉴定后确定该蛋白即为重组蛋白 GST / AMAMEG(图 4)。

2.4 重组蛋白免疫小鼠血清的制备以及抗体效价和特异性的检测

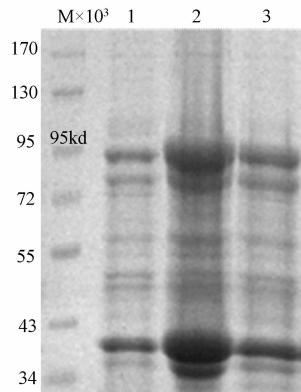


图 3 包涵体蛋白的纯化

M—protein marker, 1—Elution of 2 mol Urea/PBS,

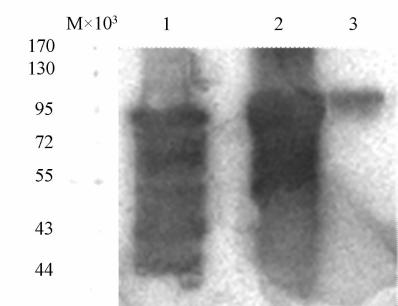
2—Elution of 8 mol Urea/PBS (first time), 3—Elution
of 8 mol Urea/PBS (second time)

图 4 GST/AMAMEG 重组蛋白的鉴定

M—protein marker, 1—Purified inclusion body with denaturation, 2—Proteins from resolution of gel

将取得的蛋白测定浓度后免疫 Balb/C 小鼠, 两次加强免疫后 ELISA 测定抗血清效价达到 1: 10⁵。以纯化后的重组蛋白 GST / AMAMEG 为蛋白样品进行 10% SDS-PAGE 电泳, 转膜后将小鼠抗血清以 1: 500 稀释后 Western Blotting 检测小鼠血清抗体, 如图 5, 免疫小鼠后获得的抗血清具有较好的特异性。

3 讨论

对于恶性疟原虫红前期免疫作用的靶点有两个: 子孢子和受染肝细胞。针对子孢子的疫苗, 需要达到 100% 的保护效力, 否则难以预防感染。这是因为疟原虫抗原有期特异性, 子孢子疫苗只对子孢子有保护作用, 而对其他各期原虫均无效。这

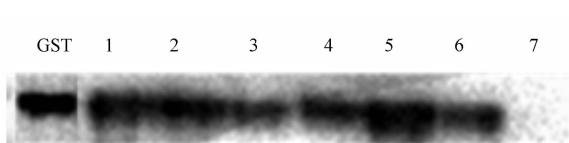


图 5 小鼠抗血清特异性检测

GST—GST antibody (dilution 1: 500) ,1—6— immune mouse antiserum (dilution 1: 500) , 7—Nomal mouse antiserum (dilution 1: 500)

样,只要有少数子孢子逃避疫苗的作用,它们即可通过肝内及红细胞内繁殖产生大量原虫,造成感染并使机体致病。所以,该期疫苗不仅要诱导高效价的抗子孢子抗体,还要诱导稳定而高效的 CTL 杀伤受染肝细胞。为了达到该预期目的,本研究筛选改造恶性疟原虫红前期抗原的隐性表位,即修饰恶性疟原虫环子孢子蛋白(CSP)、血凝素相关匿名蛋白(TRA P) 和肝期特异性抗原 1(L SA 21) 这些重要的红前期疟疾疫苗候选抗原中^[2-6]的隐性表位,使其诱导稳定而持久的针对原隐性表位 CTL^[7-9],从而可能避免优势表位抗原变异而发生免疫逃避。同时,现今的疫苗设计更倾向于多表位的参与,直接诱导出针对多表位的广泛的 CTL 应答也显得十分重要,感染者可能从多特异性 CTL 应答中受益。

恶性疟原虫裂殖子顶端膜抗原 AMA—1 是红内期重要的保护性抗原,用纯化的天然抗原或重组蛋白在小鼠和猴体模型中均可诱导出对疟原虫攻击的有效保护,对众多 AMA—1 等位基因型的分析表明,人群中的保护性免疫主要针对该蛋白的胞外结构域。我室研究人员使用 AMA—1 胞外域的多种形式^[10-12]联合免疫,较好的诱导了小鼠体内的免疫应答。选择 AMA—1 胞外域联合前述抗原表位,兼顾到体液免疫和细胞免疫,以期较好的诱导小鼠体内的免疫应答,可能对研究有效的恶性疟原虫预防/治疗性疫苗提供重要的理论和实践基础。

将前述方法得到的表达重组恶性疟原虫多期多表位原核表达载体在大肠杆菌 BL21 中进行诱导表达,特异地表达了相对分子量约为 95 KD 的抗原,并对其进行纯化后,免疫小鼠制备了多克隆抗体,研究结果表明,纯化后得到了纯度较高的 AMAMEG 融合蛋白并得到具有较高效价的小鼠抗血清,为疫苗研究奠定基础,进一步的功能实验正

在积极进行中。

参 考 文 献

- 1 The RTS,S Clinical Trials Partnership. First results of phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African children. *N Engl J Med* 2011; 365:1863—1875
- 2) Roggero M A, M eraldi V, López J A, et al. The synthetic, oxidized C-terminal fragment of the lasm od ium berg hei circum – sporozoite protein elicits a high protective response. *Eur J Immunol*, 2000; 30 (9):2679—2685
- 3 Stoute J A , Slaoui M , Heppner D G, et al. A preliminary evaluation of a recombinant circum sporozoite protein vaccine against Plasmodium falciparum malaria. *N Engl J Med* , 1997; 336(2) : 86—91
- 4 Wengelnik K, Spaccapelo R, Naitza S, et al. The A-domain and the thrombo spondinrelated motif of Plasmodium falciparum TRAP are implicated in the invasion process of mosquito Salivary glands. *EMBO J*, 1999; 18 (19) : 5195—5204
- 5 Sultan A A, Thaty V, F revert U, et al. TRAP is necessary for gliding motility an infectivity of Plasmodium sporozoites . *Cell*, 1997; 90 (3) : 511—522
- 6 Perlaza BL, Herrera M, Brahimi K, et al. Immunogenicity of four Plasm odiumfalciparum preerythrocytic antigens in Aotuslemurinus monkeys . *Infect Immun*, 1998; 66 (7):3423—3428
- 7 Tourdot S, Scardino A, Saloustro E, et al. A general strategy to enhance immunogenicity of low-affinity HLA-A2.1-associated peptides: implication in the identification of cryptic tumor epitopes . *Eur J Immunol*, 2000; 30(12) :3411—3421
- 8 Gross DA, Graff Dubois S, Opolon P, et al. High vaccination efficiency of low-affinity epitopes in antitumor immunotherapy. *J Clin Invest*, 2004; 113 (3) : 425 — 433
- 9 Valmori D, Fonteneau J F, Lizana C M, et al. Enhanced generation of specific tumor-reactive CTL in vitro by selected MelanAPMART-1 immunodominant peptide analogues. *J Immunol*, 1998; 160 (4) : 1750 —1758
- 10 李 瑞,薛采芳,缪 军,等. 恶性疟原虫 AMA1 不同类型疫苗组合免疫接种研究. 中华微生物学和免疫学杂志, 2005;25(11) : 923—926
- 11 李淑梅,李 瑞,薛采芳,等. 恶性疟原虫裂殖子表面蛋白 1 DNA 与改良痘苗病毒组合疫苗诱导小鼠抗体应答. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2005;23(2) :93—96
- 12 Miao J, Li X, Liu Z, et al. Immune responses in mice induced by prime – boost schemes of the Plasmodium falciparum apical membrane antigen 1 (PfAMA1)-based DNA, protein and recombinant modified vaccinia Ankara vaccines. *Vaccine*, 2006; 24 (37—39) : 6187—6198

学校学报. 2002;19(4):45—52

业科技, 2009; 30(6):217—222

12 周胜男, 陆 宁. 马铃薯中多酚类物质提取方法的研究. 食品工

Extraction of Polyphenol from Chinese Dates in North of Shaanxi with Ultrasonic Wave

LI Xiao¹, CAO Yan-ping², GAO Li-guo¹, MA Xiang-rong¹, GAO Xin¹, ZHOU Miao-miao¹

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Yulin University¹, Yulin 719000, P. R. China;

Northwest University of Politics and Law, Xi'an 710063, P. R. China)

[Abstract] To study the best method to extract polyphenol from Chinese Dates in north of Shaanxi with ultrasonic wave. (1) select the best method and solvent; (2) The effect of single factor on the extract rate of polyphenol was observed from extract time, alcohol concentration, feed liquid ratio and an orthogonal experiment L₉(3³) were conducted on the base of the single factor experiment. It is resulted: (1) The extraction rate by supersonic > traditional reflux > soxhlet extraction > dipped in solvent and extracted at room temperature, the best solvent was alcohol. (2) The best technology for the extraction of the polyphenol from Chinese Dates was the alcohol concentration was 70% (V/V), the feed liquid ratio was 1:40, 30min for three times with ultrasonic wave. The content of polyphenol from Chinese Dates in north of Shaanxi is 444.6 mg/100g. It is concluded that: extraction of polyphenol by ultrasonic wave is much better than the other method as it has shorter extraction time and lower temperature, so polyphenol would not be decomposed and can got it easily.

[Key words] chinese dates polyphenol ultrasonic wave extraction

(上接第 5441 页)

Expression and Preparing Antibody of Fusion Multiepitope Gene of *Plasmodium falciparum*

SHEN Yan, ZHAO Ya, HUANG Yu-xiao, LIANG Jiao, LIU Zhong-xiang, LI Ying-hui*

(Department of Microbiology and Parasitology Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, P. R. China)

[Abstract] To express and purify Plasmodium falciparum fusion multiepitope gene in *E. coli* and to prepare polyclonal antibody, with the plasmid containing the gene coding AMA—1 of *P. f.* YN and the gene coding cryptic epitopes by amino modified acid substitution were inserted into pGEX4T—1, obtained the recombinant plasmid pGEX4T—1/AMAMEG. The recombinant vector was transformed into BL21 (DE3). After induction, induced fusion protein was purified by purified inclusion bodies washing. The purified protein was injected into the Balb/C mice. And the titer of the mice's anti-serum was measured by ELISA. The results show that recombinant plasmid pGEX4T—1/ AMAMEG coding multi-CTL epitope gene and AMA—1 gene is obtained successfully. The GST/AMAMEG fusion protein is successfully purified and the anti-serum with high titer is obtained. The preparation of GST/AMAMEG fusion protein and polyclonal antibody can be used for further investigation.

[Key words] *plasmodium falciparum* vaccine fusion multiepitope gene