

· 论 著 ·

重组恶性疟原虫红细胞结合抗原 175 功能区的制备及联合免疫

张冬梅, 潘卫庆* (第二军医大学基础医学部病原生物学教研室, 上海 200433)

[摘要] **目的:**全合成恶性疟原虫 eba-175 II f2 基因并在毕氏酵母中进行高效分泌表达, 用该重组蛋白与我室研制的疟疾疫苗候选抗原 PfCP-2.9 进行联合免疫以观察是否存在竞争性免疫抑制。**方法:**采用不对称 PCR 法拼接合成 eba-175 II f2 基因 (959 bp), 用电转化方法将合成基因导入毕氏酵母中并进行诱导表达, 采用离子交换层析和分子筛层析纯化 EBA-175 II F2 蛋白。**结果:**全合成 eba-175 II f2 基因在毕氏酵母中高效分泌表达。重组 EBA-175 II F2 和 PfCP-2.9 联合免疫后, 以 ELISA 和 IFA 检测, 针对 2 个蛋白联合免疫的抗体滴度明显高于 2 个蛋白单独免疫的滴度。**结论:**重组 EBA-175 II F2 和 PfCP-2.9 联合免疫时不存在竞争性免疫抑制, 这 2 个重要的疟疾疫苗候选抗原具有潜在联合应用前景。

[关键词] 恶性疟原虫; 175 000 红细胞结合抗原; 免疫性

[中图分类号] R 392.11

[文献标识码] A

[文章编号] 0258-879X(2004)01-0014-04

Preparing domain II F2 fragment of *Plasmodium falciparum* 175 000 erythrocyte binding antigen and its combined immunization

ZHANG Dong-Mei, PAN Wei-Qing* (Department of Etiological Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To synthesize the eba-175 II f2 gene of *Plasmodium falciparum* and express it in *Pichia pastoris* in the secreting form. The recombinant protein and PfCP-2.9 protein were used for combined immunization to see if there is antigen competition. **Methods:** Asymmetric PCR-based method was utilized to synthesize the 959bp eba-175 II f2 gene. Plasmid containing the synthetic gene was introduced into *Pichia pastoris* by electroporation for inducible expression. The recombinant EBA-175 II F2 protein was purified by ion-exchange and gel filtration chromatography. **Results:** The eba-175 II f2 gene was successfully expressed in *Pichia pastoris* in the secreting form. The antibody titers in mice immunized with the combined EBA-175 II F2 and PfCP-2.9 proteins were much higher than those with individual protein by ELISA. **Conclusion:** No antigen competition is found when using the combined EBA-175 II F2 and PfCP-2.9 immunization in mice, indicating the potential of combining the 2 antigens for vaccination.

[KEY WORDS] *Plasmodium falciparum*; 175 000 erythrocyte binding antigen; immunity

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(1):14-17]

疟疾这一古老的疾病目前仍然严重威胁着人类的健康, 全球每年有 2~3 亿人罹患疟疾, 近 300 万人死亡。疟原虫抗药性的产生和迅速扩散及抗杀虫剂蚊媒的出现和蔓延, 使得疟疾的药物防治陷入了困境, 故研制有效的疟疾疫苗以控制疟疾流行已成为当务之急^[1~6]。由本教研室研制的恶性疟原虫红细胞内期融合抗原 PfCP-2.9 是由红内期 2 个重要疫苗候选抗原的保护性免疫功能域融合而成, 在动物实验中已显示出很强的免疫原性, 现已经国家药物监督管理局批准进入临床试验^[7]。

疟原虫具有高度抗原变异性, 这给疫苗研制带来困难。克服抗原变异的途径之一是构建多价疫苗, 从多途径阻断疟原虫的生长。红细胞结合抗原 175 (EBA-175)^[19,20] 是恶性疟原虫在红内期裂体增殖时合成并在裂殖体破裂时释放入血的一种可溶性蛋白^[8,9]。该抗原第 2 区 F2 片段 (EBA-175 II F2) 能与

红细胞表面血型糖蛋白特异结合, 推测该片段是介导疟原虫裂殖子入侵红细胞的功能域。免疫学实验表明针对该片段的抗体能抑制疟原虫入侵。本研究选用毕氏酵母系统表达产生 EBA-175 II F2。为此我们选用毕氏酵母密码子使用频率, 全合成了该片段, 并在毕氏酵母中高效分泌表达了 EBA-175 II F2 重组蛋白, 并与重组 PfCP-2.9 联合免疫, 探讨这种多抗原联合免疫是否出现抗原间竞争性免疫抑制现象。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂 大肠杆菌 (*Escherichia coli*)

[基金项目] 世界卫生组织专项基金 (IDA 20198); 国家杰出青年科学基金 (30225041); 国家高新技术发展规划 (“863”计划) 课题 (2001AA215021)。

[作者简介] 张冬梅 (1969-), 女 (汉族), 讲师, 博士。

* Corresponding author. E-mail: malaria@guomai.sh.cn

DH5 α 、质粒 pBluescript KS/+ 为本教研室保存; 毕氏酵母 (*Pichia pastoris*) SMD1168 和质粒 pPIC9、pPIC9K 等购自 Invitrogen 公司; 分子生物学试剂购自 Promega、MBI、NewEngland Biolabs、Boeringer Mannheim、QIAGEN 等公司; 免疫学试剂购自美国 South Biotechnology Associates 公司及华美生物工程公司; BALB/c 和 C57 小鼠购自中国科学院实验动物中心; 恶性疟原虫 3D7 株由本室保存和培养。

1.2 DNA 序列和寡核苷酸链的设计 由于合成的 eba-175 II f2 基因将在毕氏酵母 (*Pichia pastoris*) 系统中进行表达, 故依照恶性疟原虫 3D7 株 EBA-175 II F2 的氨基酸序列, 选用毕氏酵母密码子使用频率, 将该序列进行重新设计。为使新设计的 eba-175 II f2 基因能在异源系统中表达, 我们采用计算机软件分析并排除在该基因序列中存在的可能不利于基因转录及翻译的任何序列, 如转录终止序列、内含子剪接位点序列、长的反向重复序列等。尽管毕氏酵母糖基化产生的寡糖链长度大大低于酿酒酵母, 但仍需避免大量糖基化对该抗原的免疫原性可能产生的影响, 我们对在该蛋白中存在的一个潜在的糖基化位点进行突变, 用谷氨酰胺替换天冬酰胺, 从而排除了这个糖基化位点。此外, 在新设计的 eba-175 II f2 基因的 5' 和 3' 端分别增设 *Xho* I 和 *Eco*R I 酶切位点, 以便能与表达载体连接。同时在该基因的 5' 端加上酿酒酵母 α -因子信号肽前导序列的部分序列, 包括信号肽切割识别氨基酸 Lys、Arg、Glu、Ala、Glu、Ala 的密码子序列, 使之能分泌表达, 并在 3' 端增设编码 6 个组氨酸的序列, 以便使用 Ni-NTA 柱纯化, 由此产生的 DNA 序列长 959 bp, 并定名为 eba-175 II f2。将 eba-175 II f2 合成基因序列分成 12 条寡核苷酸链, 从 5' 到 3' 依次命名为 eba-175 II f2-1 至 eba-175 II f2-12, 相邻 2 个寡核苷酸链之间有约 16~20 碱基的重叠部分。采用基因软件分析相邻寡核苷酸链间重叠部分序列, 以排除不利于寡核苷酸链拼接的序列, 如发夹结构等。

1.3 基因合成、拼接、克隆与表达 12 条寡核苷酸链参照文献^[10]的方法进行拼接, 产生 eba-175 II f2 全长基因。基因克隆、质粒抽提、酶切、片段回收、连接、转化、琼脂糖电泳、核酸序列分析等均参照《分子克隆实验指南》手册或相应试剂盒说明书进行。重组质粒转化入酵母细胞及鉴定参照文献^[11]进行(图 1)。目的基因的表达参照文献^[12]进行。

1.4 动物免疫及 ELISA 抗体测定 BALB/c、C57 小鼠, 雌性, 体质量 18~20g, 随机分为 4 组, 分别为

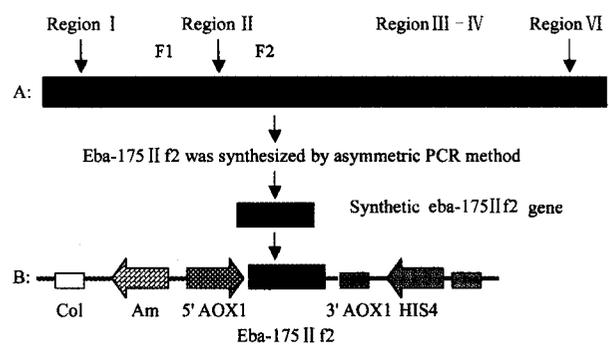


图 1 eba-175 II f2 基因的合成及克隆示意图

Fig 1 Schematic outline of eba-175 II f2 gene synthesis and clone

A: Schematic outline of eba-175 gene;

B: Construction of pPIC9K/eba175-II f2 plasmid and insertion of plasmid into vector

EBA-175 II F2 单独免疫组、PfCP-2.9 单独免疫组、EBA-175 II F2 和 PfCP-2.9 联合免疫组、佐剂对照组, 每组 5 只, 免疫组均以 Montanide ISA720 为佐剂与各抗原乳化后皮下注射免疫 3 次, 免疫剂量为 20 μ g/200 μ l/只, 间隔时间为 3 周, 佐剂对照组每次免疫时只加佐剂及 PBS; 自第 2 次免疫始, 每次免疫 2 周后经尾静脉采血, 末次(第 78 天)眶内取血处死。用 ELISA 法检测抗体反应: 包被抗原分别为经纯化的 EBA-175 II F2 和 PfCP-2.9, 包被浓度为 1 μ g/ml; 洗涤液为含 0.05% 吐温-20 的 PBS (PBST, pH 7.4), 加样液为含 3% 脱脂奶粉的 PBST; 二抗为 HRP 标记的羊抗鼠 IgG (华美生物工程公司), 工作浓度为 1:1000, 每孔加样量均为 100 μ l。ELISA 操作按常规进行, 以免疫前小鼠血清平均 *D* 值加 3 倍标准误为阳性阈值。

1.5 间接荧光抗体试验 (IFA) 当体外培养的恶性疟原虫率达 5% 以上且以裂殖体为主时, 制备抗原片。每张抗原片分别加入 20 μ l 阳性对照、实验组 1:20、1:40、1:60、1:180、1:540、1:1620、1:4860、1:14500、1:43740、1:131220 等 10 个稀释度的血清、阴性对照的免疫血清, 按 IFA 常规操作, 沥干后置荧光显微镜下观察。

2 结果

2.1 eba-175 II f2 基因的设计与合成 合成 eba-175 II f2 基因经 *Xho* I 和 *Eco*R I 酶切克隆至 pBluescript KS 载体。经酶切鉴定为阳性的转化子, 再进行全序列分析以排除合成时的错误碱基。用 *Xho* I 和 *Eco*R I 将序列正确基因转入酵母表达载体, 并进行酶切鉴定。

2.2 eba-175 II f2 基因的表达及重组蛋白的纯化
重组表达质粒经 *Bgl* II 酶切线性化后电穿孔转入毕氏酵母 SMD1168 菌株中。经 PCR 鉴定,对有 eba-175 II f2 基因整合的阳性酵母转化子进行甲醇诱导表达。培养上清经 SDS-PAGE 电泳分析,分泌于酵母培养上清中的表达产物为相对分子质量约 35 000 的单一一条带,相对分子质量与理论相对分子质量接近。用疟疾患者的血清进行免疫印迹反应,该蛋白能与病人血清产生强的结合反应。此外,N 端氨基酸序列分析显示,表达产物 N 末端序列与设计序列一致。质谱分析也显示该蛋白的实际相对分子质量为 35 000,与理论值相符。

EBA-175 II F2 表达菌株的发酵上清在 4 C 经磷

酸缓冲液充分透析后用高效液相层析分析系统进行纯化,先用 SP-sephrose 离子交换层析,用 0~1 mol/L NaCl 线性梯度进行洗脱,纯化蛋白组分进一步用 Superdex75 凝胶过滤(分子筛)以 20 mmol/L 磷酸缓冲液做溶剂进行纯化,经两步纯化,重组 EBA-175 II F2 蛋白的纯度可达 95% 以上。

2.3 重组 EBA-175 II F2 和 PfCP-2.9 联合免疫
结果表明,无论是 BALB/c 小鼠还是 C57 小鼠,EBA-175 II F2 与 PfCP-2.9 重组蛋白联合免疫之后,针对 2 个蛋白的抗体滴度都远远高于 2 个蛋白单独免疫的滴度(图 2A、2B)。IFA 的结果亦显示:2 个重组蛋白联合免疫后血清间接荧光抗体的滴度上升(图 2C)。

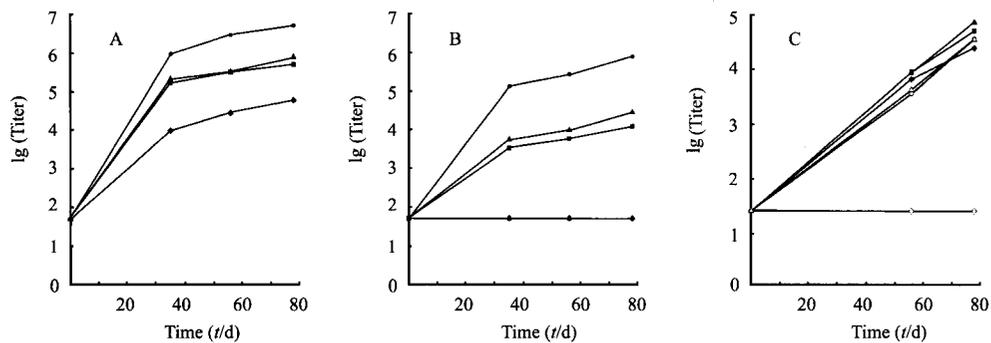


图 2 单个或联合免疫 BALB/c 小鼠(A)、C57 小鼠(B)ELISA 抗体滴度和 IFA 抗体滴度(C)

Fig 2 Comparison of antibody titers in BALB/c (A) and C57 mice (B)

immunized with combined antigens or individuals by ELISA and IFA(C)

A,B: ◆: I F2, individual antigen; ■: I F2,combined antigen; ▲: PfCP-2.9 individual antigen; ●: PfCP-2.9,combined antigen;
C: ◆: Individual I F2 antigen, BALB/c; ■: Individual PfCP-2.9 antigen, BALB/c; ▲: Combined antigen, BALB/c;
◇: Individual I F2 antigen,C57; □: Individual PfCP-2.9 antigen,C57; △: Combined antigen,C57

3 讨论

疟疾在热带地区特别是经济欠发达、医疗手段落后的地区已成为最主要的死亡原因,而疟疾的流行肆虐又使这些地区的经济状况雪上加霜,形成恶性循环^[13],所以研制价廉、有效的疟疾疫苗以实现世界卫生组织(WHO)提出的 2010 年疟疾发病率和死亡率下降 50% 的目标十分必要。

重组蛋白 PfCP-2.9 具有很强的免疫原性,免疫血清能有效抑制疟原虫的体外生长,且该重组蛋白表达产量高,纯化工艺较简单,极具应用前景。但由于疟原虫生活史的复杂性和抗原的高度变异性,有效的疟疾疫苗应是多价或多期多价的疫苗。而作为联合免疫成分的候选抗原,一个先决条件就是与 PfCP-2.9 联合免疫时不产生竞争性免疫抑制。在本研究中,EBA175-II F2 重组蛋白与 PfCP-2.9 联合免疫时不仅没有出现抑制现象,反而使 2 个重组蛋

白的免疫原性都得到增强,这极大鼓舞了两者联合免疫的进一步实验包括大动物实验。

EBA-175 抗原在恶性疟原虫的生活史中可能是一个很重要的功能蛋白^[14,15]。它由 616 个氨基酸残基组成,N 端富含半胱氨酸的 II 区是 EBA-175 与红细胞以唾液酸依赖的方式结合的功能区。II 区由 2 个重复片段 F1 和 F2 片段组成,F2 片段是其与红细胞结合的区域,它与红细胞结合的方式与全长 EBA-175 蛋白相同^[16]。入侵红细胞对恶性疟原虫的生存至关重要,而具有红细胞结合功能的 EBA-175 II F2 蛋白势必参与恶性疟原虫入侵这一重要的生命活动。很多学者的研究和我们未发表的数据亦显示,该蛋白亦具有较强的免疫原性,其免疫血清可在体外抑制疟原虫的生长^[17]。而近年发现 EBA-175 抗原在红细胞前期疟原虫阶段也表达^[18],使得这一疟疾疫苗候选抗原备受研究者关注。重组 EBA-175 II F2 和 PfCP2-2.9 联合免疫未出现 2 个蛋白因竞

竞争性抑制而影响免疫效果,相反尚有一定的协同作用,因此,这 2 个均具希望的疟疾疫苗候选抗原联合免疫是极有应用前景的。

[参考文献]

- [1] Taylor-Robinson AW, Smith EG. A role for cytokines in potentiation of malaria vaccines through immunological modulation of blood stage infection[J]. *Immunol Rev*, 1999, 171: 105-123.
- [2] Good MF, Doolan DL. Immune effector mechanisms in malaria[J]. *Curr Opin Immunol*, 1999, 11(4): 412-419.
- [3] Holder AA. Malaria vaccines[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(4): 1167-1169.
- [4] Miller LH. Vaccine against the blood stages of falciparum malaria[J]. *Adv Exp Med*, 1998, 452: 193-205.
- [5] Good MF, Kaslow DC, Miller LH. Pathways and strategies for developing a malaria blood-stage vaccine[J]. *Annu Rev Immunol*, 1998, 16: 57-87.
- [6] WHO Report. State of the world's vaccines and immunization. Geneva: World Health Org, 1996.
- [7] Pan WQ, Wang DQ, Zhang QF, et al. Fusion of two malaria vaccine candidate antigens enhances product yield, immunogenicity and antibody mediated inhibition of parasite growth in vitro[J]. *J Immunology*, 2004(in press).
- [8] Blackman MJ, Holder AA. Secondary processing of the *Plasmodium falciparum* merozoite membrane bound serine protease; shedding of MSP133 as a noncovalently associated complex with other fragments of the MSP1[J]. *Mol Biochem Parasitol*, 1992, 50(2): 307-315.
- [9] Adams JH, Sim BK, Ddan SA, et al. A family of erythrocyte binding proteins of malaria parasites[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(15): 7085-7089.
- [10] 张冬梅, 潘卫庆, 陆德如, 等. 恶性疟原虫 3D7 株主要裂殖子表面抗原 C-末端基因的全合成及其表达[J]. *中华医学杂志*, 2002, 82(3): 198-202.
Zhang DM, Pan WQ, Lu DR, et al. Synthesis and expression of 42 kD C-terminal region of the major merozoite surface protein (MSP1-42) of *Plasmodium falciparum* 3D7 strain in *Pichia pastoris*[J]. *Zhonghua Yixue Zazhi (Natl Med J Chin)*, 2002,

82(3): 198-202.

- [11] 张冬梅, 潘卫庆, 陆德如. 恶性疟裂殖子表面蛋白 1 合成基因在毕氏酵母中的表达[J]. *生物工程学报*, 2000, 16(6): 723-726.
Zhang DM, Pan WQ, Lu DR. Production of the major merozoite surface protein (MSP1) of *Plasmodium falciparum* in *Pichia pastoris* [J]. *Shengwu Gongcheng Xuebao (Chin J Biotechnol)*, 2000, 16(6): 723-726.
- [12] 张冬梅, 潘卫庆, 陆德如. 重组裂殖子表面蛋白质 1 特异性抗体有效抑制恶性疟原虫体外生长[J]. *生物化学与生物物理学报*, 2002, 34(3): 318-322.
Zhang DM, Pan WQ, Lu DR. Specific antibodies against recombinant MSP1 of *Plasmodium falciparum* strongly inhibit the parasite growth in vitro[J]. *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Xuebao (Acta Biochimica et Biophysica Sinica)*, 2002, 34(3): 318-322.
- [13] Sachs J, Malaney P. The economic and social burden of malaria[J]. *Nature*, 2002, 415(6872): 680-685.
- [14] Toure FS, Mavoungou E, Ndong JM, et al. Erythrocyte binding antigen (EBA-175) of *Plasmodium falciparum*: improved genotype determination by nested polymerase chain reaction[J]. *Trop Med Int Health*, 2001, 6(10): 767-769.
- [15] Liang H, Narum DL, Fuhrmann SR, et al. A recombinant baculovirus-expressed *Plasmodium falciparum* receptor-binding domain of erythrocyte binding protein EBA-175 biologically mimics native protein[J]. *Infect Immun*, 2000, 68(6): 3564-3568.
- [16] Sim BK, Chitnis CE, Wasniowska K, et al. Receptor and ligand domains for invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum*[J]. *Science*, 1994, 264(5167): 1941-1944.
- [17] Duraisingh MT, Maier AG, Triglia T, et al. Erythrocyte-binding antigen 175 mediates invasion in *Plasmodium falciparum* utilizing sialic acid-dependent and -independent pathways[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(8): 4796-801.
- [18] Gruner AC, Brahimi K, Letourneur F, et al. Expression of the erythrocyte-binding antigen 175 in sporozoites and in liver stages of *Plasmodium falciparum*[J]. *J Infect Dis*, 2001, 184(7): 892-897.

[收稿日期] 2003-11-27

[修回日期] 2003-12-16

[本文编辑] 尹 茶

(上接第 13 页)

柴油注入右手中指,最终导致截指,从此,HPIIH 被认为是毁损性外伤。

HPIIH 的喷射物主要有涂料、稀料、汽油、柴油、润滑油、水、氯化物及丁烷气体等,除水外,其余物质均有很强的毒性,侵害局部神经血管及软组织,导致血管栓塞、组织变性坏死。因此,虽然高压冲击致局部损伤,但其主要损害是由于注入物的毒性所致^[4]。HPIIH 早期临床症状较轻,主要表现为局部细小创口,轻度肿胀及疼痛;若未接受早期正确的治疗,后期明显红肿、疼痛,局部皮温高,活动受限。受伤部位多为示、中指掌面,其次是手掌部,前臂及手背少见。临床上多见的喷射物是化学涂料及稀料,患者多为油漆工人。

HPIIH 及时正确的治疗,对预后至关重要。采用广泛清创、引流、开放创口、重复扩创及二期闭合创口等治疗方法,临床效果理想。若注入物为油脂类,需尽可能彻底清除,减少其毒性作用。Pinto 等^[5]应用该方法治疗 HPIIH,伤指存活率为 84%,64% 的患者恢复了正常的手功能。我科收治的 2 例油脂类 HPIIH 患者,手指均存活,功能恢复良好。

早期物理治疗及康复锻炼是手功能恢复的关键。物理治疗可减轻组织水肿及毒性反应;为防止肌腱粘连及关节僵直,须尽早行主动功能锻炼,由于患肢(指)疼痛,患者往往拒绝活动,医生应说明其重要性并亲自指导,必要时可给予适量的镇痛药物。

(下转第 21 页)