

• 论 著 •

# 恶性疟原虫红内期两个重要候选抗原的相互影响

钱 锋,张青锋,薛向阳,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:**分析恶性疟原虫红内期2个疫苗候选抗原 PfAMA-1(Ⅲ)和 PfMSP1-19 的相互关系。**方法:**用 ELISA 和竞争 ELISA 检测蛋白和抗体的反应,一些抗体用特定的蛋白进行预吸附。**结果:**PfMSP1-19 蛋白能去除恶性疟疾患者血浆对 PfAMA-1(Ⅲ)的反应,这种能力是剂量依赖的,完全去除需要高的蛋白浓度;PfMSP1-19 蛋白也能去除兔抗 PfCP-2.9 血清、兔抗 PfAMA-1(Ⅲ)血清、亲和纯化的兔抗 PfAMA-1(Ⅲ) IgG 对 PfAMA-1(Ⅲ)的反应。**结论:**酵母表达的 PfMSP1-19 重组蛋白能吸附 PfAMA-1(Ⅲ)特异抗体。

**[关键词]** 恶性疟原虫;红内期;酶联免疫吸附测定

**[中图分类号]** R 382.31 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2004)01-0018-04

## Interaction between 2 major vaccine candidates at blood-stage of *Plasmodium falciparum*

QIAN Feng, ZHANG Qing-Feng, XUE Xiang-Yang, PAN Wei-Qing\* (Department of Etiological Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To analyze the relationship between PfAMA-1(Ⅲ) and PfMSP1-19, 2 erythrocyte stage major vaccine candidates of *Plasmodium falciparum*. **Methods:** ELISA and competitive ELISA were used to examine the interaction between proteins and antibodies. Some antibodies were pre-adsorbed. **Results:** PfMSP1-19 protein had ability to alleviate the reaction of one plasma sample from a falciparum patient with PfAMA-1(Ⅲ), and it was dose-dependent and high concentration was needed for elimination of the reaction. PfMSP1-19 protein also had the ability to alleviate the reaction of rabbit anti-PfCP-2.9 serum, rabbit anti-PfAMA-1(Ⅲ) serum and affinity purified rabbit anti-PfAMA-1(Ⅲ) IgG with PfAMA-1(Ⅲ). **Conclusion:** Recombinant PfMSP1-19 produced in *Pichia pastoris* has the ability to adsorb anti-PfAMA-1(Ⅲ) antibodies.

**[KEY WORDS]** *Plasmodium falciparum*; erythrocyte stage; enzyme-linked immunosorbent assay

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(1):18-21]

恶性疟原虫裂殖子表面蛋白 1 C 末端相对分子质量为 19 000 的片段(merozoite surface protein 1 C terminal 19 000 fragment, PfMSP1-19)和裂殖子顶端膜抗原(apical membrane antigen, PfAMA-1)是疟疾红内期的 2 个重要候选抗原<sup>[1]</sup>。这 2 个蛋白免疫夜猴都获得了保护效果<sup>[2,3]</sup>;用这 2 个蛋白从恶性疟疾患者血清中亲和纯化得到的特异抗体,具有抑制恶性疟原虫体外生长的能力<sup>[4,5]</sup>。用 AMA-1 第 3 区域片段[AMA-1 domain Ⅲ, PfAMA-1(Ⅲ)]从恶性疟疾患者血清中亲和纯化得到的特异抗体,也具有抑制恶性疟原虫体外生长的能力<sup>[6]</sup>。本文探讨 PfMSP1-19 和 PfAMA-1(Ⅲ)在免疫学方面的一些作用。

### 1 材料和方法

**1.1 重组蛋白** 重组蛋白 PfAMA-1(Ⅲ)、PfMSP1-19 和 PfCP-2.9 由毕氏酵母表达,通过镍胶、疏水层析、离子交换和凝胶过滤而提纯。PfCP-2.9 是 PfAMA-1(Ⅲ)和 PfMSP1-19 通过 1 个 28 肽串联

而成的融合蛋白<sup>[7]</sup>。重组蛋白 PfAMA-1B 是由大肠杆菌表达的 AMA-1 胞外区片段,包含 AMA-1 的第 1~3 区域(domain I~Ⅲ),通过镍柱、氧化重折叠、离子交换和凝胶过滤而提纯。

**1.2 抗血清** 1 份采集自海南疟疾流行区的恶性疟疾患者血浆;由 PfCP-2.9 蛋白免疫家兔而获得的兔抗 PfCP-2.9 抗血清,含有针对 PfMSP1-19 和 PfAMA-1(Ⅲ)两部分的抗体;由 PfAMA-1(Ⅲ)蛋白免疫家兔而获得的兔抗 PfAMA-1(Ⅲ)抗血清。

**1.3 特异性抗 PfAMA-1(Ⅲ) IgG** 以 PfAMA-1B 制备亲和层析柱,从兔抗 PfCP-2.9 抗血清中亲和纯化特异性抗 PfAMA-1(Ⅲ) IgG。

**1.4 ELISA** 重组蛋白以 2 μg/ml 包被 ELISA 板,4℃包被过夜。第 1 抗体用 PBS-脱脂奶粉以一定比例稀释后加入 ELISA 板,37℃反应 1h;辣根过氧

**[基金项目]** 世界卫生组织专项基金(ID 980948);国家高新技术发展规划(“863”计划)课题(2001AA215021)。

**[作者简介]** 钱 锋(1963-),男(汉族),博士,副教授。

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

化酶标记的第 2 抗体(羊抗人 IgG 或羊抗兔 IgG)用 PBS-脱脂奶粉作 1 : 1 000 稀释后加入 ELISA 板, 37℃ 反应 1h。每一步骤之间用 PBS-吐温 20 洗涤 ELISA 板。加入 TMB 显色 10 min 后以硫酸终止反应, 读  $D_{450}$  值。

1.5 ELISA 反应中第 1 抗体预吸附 (1) 将一定量的蛋白偶联到镍胶上, 第 1 抗体以一定比例稀释后与偶联有蛋白的镍胶相混, 4℃ 缓慢旋转过夜, 以吸附掉第 1 抗体中针对偶联蛋白的抗体, 过过夜后 4 000 r/min 10 min 离心, 取上清作为经过预吸附的第 1 抗体。(2) 将蛋白直接加入到稀释后的第 1 抗体中, 使蛋白的终浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 4℃ 缓慢旋转过夜, 此蛋白抗体混合液作为经过预吸附的第 1 抗体。

1.6 竞争 ELISA 建立作为抑制剂的蛋白的浓度梯度, 各浓度梯度的抑制蛋白与以一定比例稀释的第 1 抗体相混, 在 4℃ 缓慢旋转过夜后作为第 1 抗体使用。其余同 ELISA。

1.7 亲和层析 使用 Pharmacia 公司的溴化氰激活的 Sepharose 4B 亲和层析柱, 蛋白偶联和 IgG 提纯按照该公司的操作指南进行。

## 2 结 果

2.1 PfMSP1-19 吸附恶性疟患者血浆中抗 PfAMA-1(III) 抗体成分 恶性疟患者的血浆能识别重组蛋白 PfAMA-1(III)、PfMSP1-19、PfCP-2.9 和 PfAMA-1B(图 1A)。该血浆用终浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的重组 PfMSP1-19 蛋白吸附过过夜, 则预吸附血浆除丧失与 PfMSP1-19 的反应能力外, 同时也丧失与 PfAMA-1(III) 和 PfCP-2.9 的反应能力, 但仍可与 PfAMA-1B 反应(图 1B)。该血浆用终浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的重组 PfAMA-1(III) 蛋白吸附过过夜, 预吸附血浆仅丧失与 PfAMA-1(III) 反应的能力, 仍可与 PfCP-2.9 和 PfAMA-1B 反应, 与 PfMSP1-19 的反应在血浆吸附前后没有明显的改变(图 1C)。用偶联在镍胶上的 PfMSP1-19 对该血浆进行吸附, 吸附后离心去沉淀, 上清对 4 种重组蛋白反应所获结果与图 1 B 一致(图 1D)。

PfMSP1-19 吸附恶性疟患者血浆中抗 PfAMA-1(III) 抗体成分是剂量依赖的。以 PfMSP1-19 为抑制剂进行的竞争 ELISA 显示, 随着作为抑制剂的 PfMSP1-19 浓度的加大, 血浆中抗 PfAMA-1(III) 抗体成分被去除的量不断加大(图 2), 但要完全吸附掉血浆中抗 PfAMA-1(III) 抗体需要较高的

抑制剂浓度。

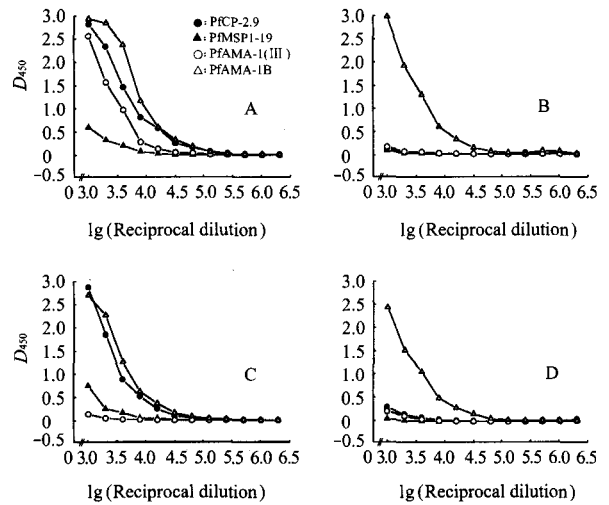


图 1 PfMSP1-19 吸附恶性疟患者血浆中抗 PfAMA-1(III) 抗体的 ELISA 结果

Fig 1 ELISA of PfMSP1-19 adsorbing anti-PfAMA-1(III) antibodies from one plasma sample of a falciparum patient

A: Plasma sample; B: pre-adsorbed plasma sample by PfMSP1-19; C: pre-adsorbed plasma sample by PfAMA-1(III); D: pre-adsorbed plasma sample by Ni-NTA/PfMSP1-19 were used as primary antibody, respectively

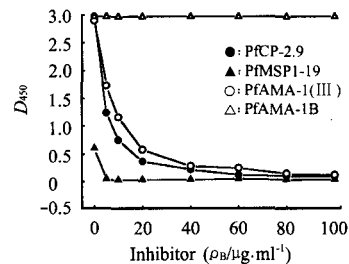


图 2 以 PfMSP1-19 为抑制剂的竞争 ELISA  
Fig 2 Competition ELISA using PfMSP1-19 as inhibitor

Plasma sample was used as primary antibody at 1 : 1 000 dilution

2.2 PfMSP1-19 吸附兔免疫血清中抗 PfAMA-1(III) 抗体成分 用重组蛋白 PfCP-2.9 免疫家兔获得的兔抗血清, 含有抗 PfAMA-1(III) 和 PfMSP1-19 两种抗体成分, 可同时识别 4 个重组蛋白(图 3A)。当该兔抗血清用终浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的重组 PfMSP1-19 蛋白吸附过过夜, 丧失与所有 4 个重组蛋白反应的能力(图 3B)。用重组蛋白 PfAMA-1(III) 吸附仅能吸附掉抗 PfAMA-1(III) 抗体成分(图 3C)。

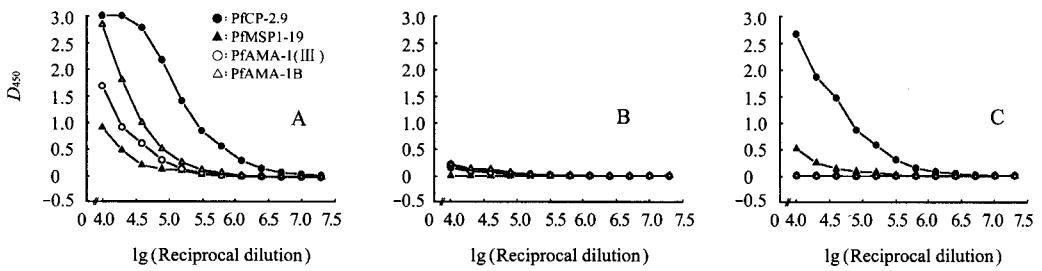


图3 PfMSP1-19 吸附 PfCP-2.9 兔免疫血清中抗 PfAMA-1(Ⅲ) 抗体的 ELISA 结果

Fig 3 ELISA of PfMSP1-19 adsorbing anti-PfAMA-1(Ⅲ) antibodies from rabbit serum immunized with PfCP-2.9

Rabbit anti-PfCP-2.9 serum(A), pre-adsorbed rabbit anti-PfCP-2.9 serum by PfMSP1-19(B), pre-adsorbed rabbit anti-PfCP-2.9 serum by PfAMA-1(Ⅲ)(C) were used as first antibody, respectively

用重组蛋白 PfAMA-1(Ⅲ) 免疫家兔获得的兔抗血清仅微弱识别 PfMSP1-19(可能是酵母蛋白的作用), 但可较为强烈地与其他 3 个蛋白反应(图 4A), 当用终浓度为 100 μg/ml 的重组 PfMSP1-19 蛋白吸附过夜后, 失去了与所有蛋白的反应(图 4B)。

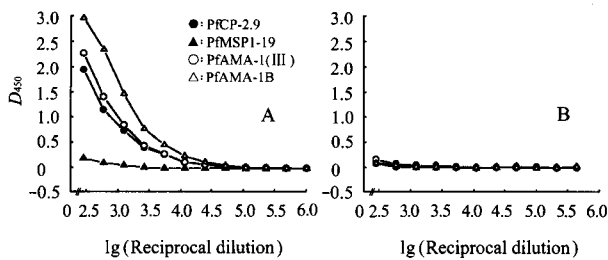


图4 PfMSP1-19 吸附 PfAMA-1(Ⅲ) 兔免疫血清中特异抗体的 ELISA 结果

Fig 4 ELISA of PfMSP1-19 adsorbing anti-PfAMA-1(Ⅲ) antibodies from rabbit serum immunized with PfAMA-1(Ⅲ)

Rabbit anti-PfAMA-1(Ⅲ) serum(A), pre-adsorbed rabbit anti-PfAMA-1(Ⅲ) serum by PfMSP1-19(B) were used as primary antibody, respectively

用重组蛋白 PfAMA-1B 从 PfCP-2.9 免疫兔抗血清中亲和纯化特异性的抗 PfAMA-1(Ⅲ) IgG, 该 IgG 能识别除 PfMSP1-19 以外的其他 3 个蛋白(图 5A), 用终浓度为 100 μg/ml 的重组 PfMSP1-19 蛋白吸附后与 3 个蛋白的反应急剧下降(图 5B)。

3 讨论

恶性疟原虫 MSP1 是一个前体蛋白, 在原虫的发育过程中被加工 2 次。首次加工发生在裂殖体成熟、红细胞破裂释放入血液中之前, 从 N 端至 C 端加工片段的相对分子质量依次为 83 000、28 000~30 000、36 000~38 000 和 42 000<sup>[8]</sup>; 第 2 次加工发生在裂殖子侵入红细胞前, C 末端的 42 000 片段

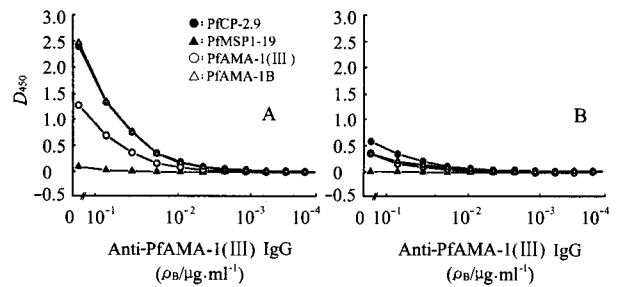


图5 PfMSP1-19 吸附亲和纯化的抗 PfAMA-1(Ⅲ) IgG 的 ELISA 结果

Fig 5 ELISA of PfMSP1-19 adsorbing anti-PfAMA-1(Ⅲ) IgG affinity purified by PfAMA-1B from rabbit serum immunized with PfCP-2.9

Specific anti-PfAMA-1(Ⅲ) IgG(A), pre-adsorbed specific anti-PfAMA-1(Ⅲ) IgG by PfMSP1-19(B) were used as primary antibody, respectively

(PfMSP1-42)再被加工成 33 000 和 19 000 两个片段, 仅 C 末端的 19 000 片段(PfMSP1-19)随裂殖子进入红细胞, 33 000 片段与其他 MSP1 降解片段以非共价的形式释入周围环境中<sup>[9]</sup>。

AMA-1 同样是一个前体蛋白, 相对分子质量为 80 000, 在裂体增殖的后期合成, 当裂殖体成熟时合成量达到高峰。随后前体蛋白通过 N 端切割而加工成为相对分子质量为 66 000 的片段。裂殖体裂解前, 前体蛋白和加工蛋白均位于棒状体的颈部, 裂殖体裂解裂殖子释放后, 仅加工的 66 000 片段移至裂殖子表面。一旦裂殖子侵入红细胞形成环状体, AMA-1 即消失<sup>[10]</sup>。恶性疟原虫 AMA-1 是一个跨膜蛋白, 胞外区有 16 个保守的半胱氨酸, 可形成 8 对二硫键, 将 AMA-1 胞外区分为 I、II、III 三个区域<sup>[11]</sup>。

从 MSP1 和 AMA-1 的行为来看, 这 2 个蛋白质似乎是与裂殖子入侵红细胞有关; 并且当用基因敲

除法剔除其中的任何1个都使疟原虫不能成活,所以这2个蛋白都是疟原虫完成其生活史所必须。但至今尚不能确定这2个蛋白在疟原虫生活史中的确切功能,也不清楚这2个蛋白的相互关系。

从实验的结果来看,酵母表达的PfMSP1-19重组蛋白能吸附恶性疟患者血浆和兔抗血清中的PfAMA-1(Ⅲ)特异性抗体,并且这种吸附依赖高浓度的PfMSP1-19蛋白的存在。尽管根据现有的知识尚很难理解这一现象,但我们的实验从多个角度确实显示了这一现象的存在。我们推测这一现象可能与这2个蛋白都能位于疟原虫裂殖子表面并相互作用有关。进一步的求证工作还有待进行,力争能获得PfMSP1-19蛋白与抗PfAMA-1(Ⅲ)抗体相结合的直接证据。此外,PfMSP1-19蛋白是否能吸附抗AMA-1其他区域的抗体,MSP1第2次加工前的PfMSP1-42是否也具有PfMSP1-19表现出的吸附能力,都将是我们关注的问题。目前仍不清楚的是上述结果会具有怎样的生理意义,是否是在疟原虫裂殖子表面能积聚起高浓度的MSP1-19,在起到其本身的功能外还担负着保护AMA-1第3区域不受宿主免疫系统攻击的作用,如若如此,则AMA-1第3区域在裂殖子入侵红细胞的过程中起到一个核心的作用。

(致谢:本室周爱国、邢金花提供了本工作所需的一些蛋白和兔抗血清)

#### [参考文献]

- [1] Anders RF, Saul A. Malaria vaccines [J]. *Parasitol Today*, 2000,16(10):444-447.
  - [2] Egan AF, Blackman MJ, Kaslow DC. Vaccine efficacy of recombinant *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 in malaria-naive, -exposed, and/or-rechallenged Aotus vociferans monkeys[J]. *Infect Immun*, 2000,68(3):1418-1427.
  - [3] Stowers AW, Kennedy MC, Keegan BP, et al. Vaccination of monkeys with recombinant *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 confers protection against blood-stage malaria[J]. *Infect Immun*, 2002,70(12):6961-6967.
  - [4] Egan AF, Burghaus P, Druilhe P, et al. Human antibodies to the 19 kDa C-terminal fragment of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 inhibit parasite growth *in vitro*[J]. *Parasite Immunol*, 1999,21(3):133-139.
  - [5] Hodder AN, Crewther PE, Anders RF. Specificity of the protective antibody response to apical membrane antigen 1[J]. *Infect Immun*, 2001,69(5):3286-3294.
  - [6] Nair M, Hinds MG, Coley AM, et al. Structure of domain Ⅲ of the blood-stage malaria vaccine candidate, *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 (AMA1)[J]. *J Mol Biol*, 2002,322(4):741-753.
  - [7] 张青锋,潘卫庆,曲莉,等. N端9个氨基酸缺失对恶性疟融合抗原免疫原性的影响[J]. *生物化学与生物物理学报*, 2003,35(4):345-349.  
Zhang QF, Pan WQ, Qu L, et al. Influence of deleting 9 amino acid residues at N-terminus on immunogenicity of a *Plasmodium falciparum* chimeric protein [J]. *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Xuebao (Acta Biochemical et Biophysica Sinica)*, 2003,35(4):345-349.
  - [8] Holder AA, Sandhu JS, Hillman Y, et al. Processing of the precursor to the major merozoite surface antigens of *Plasmodium falciparum*[J]. *Parasitology*, 1987,94(Pt 2):199-208.
  - [9] Blackman MJ, Heidrich HG, Donachie S, et al. A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies[J]. *J Exp Med*, 1990,172(1):379-382.
  - [10] Peterson MG, Marshall VM, Smythe JA, et al. Integral membrane protein located in the apical complex of *Plasmodium falciparum*[J]. *Mol Cell Biol*, 1989,9(7):3151-3154.
  - [11] Hodder AN, Crewther PE, Matthew ML, et al. The disulfide bond structure of *Plasmodium* apical membrane antigen-1[J]. *J Biol Chem*, 1996,271(46):29446-29452.
- [收稿日期] 2003-09-17 [修回日期] 2003-12-02  
[本文编辑] 尹 茶

(上接第17页)

HPIIH因其临床少见及早期症状轻,易被医生和患者忽视而未得到及时、正确的治疗,导致不良后果。因此,医生和患者都要重视其严重性,及早就诊,合理治疗,以得到理想的康复。

#### [参考文献]

- [1] Neal NC, Burke FD. High-pressure injection injuries [J]. *Injury*, 1991,22(5):467-470.
  - [2] Ramos H, Posch JL, Lie KK. High-pressure injection injuries of the hand[J]. *Plast Reconstr Surg*, 1970,45(2):221-226.
  - [3] Schoo MJ, Scott FA, Boswick JA Jr. High-pressure injection injuries of the hand[J]. *J Trauma*, 1980,20(4):229-238.
  - [4] O'Sullivan ST, Beausang E, O'Donoghue JM, et al. The importance of open wound management in high-pressure injection injuries of the upper limb[J]. *J Hand Surg*, 1997,22B(4):542-543.
  - [5] Pinto MR, Turkula-Pinto LD, Coony WP, et al. High-pressure injection injuries of the hand; review of 25 patients treated by open wound technique[J]. *J Hand Surg*, 1993,18A(1):125-130.
- [收稿日期] 2003-05-01 [修回日期] 2003-09-12  
[本文编辑] 孙 岩