

• 论 著 •

恶性疟原虫红前期多表位融合抗原基因的构建及其高效表达

张青锋, 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:** 构建一个恶性疟原虫红前期多表位融合抗原基因(*PfCP-TCL*), 并在毕氏酵母中进行高效分泌表达。 **方法:** 选取了疟原虫红前期疫苗候选抗原 CSP、TRAP 和 LSA-1 中的一些重要 T、B 细胞表位, 按一定的次序加以串联连接, 并全合成该融合基因。在毕氏酵母中进行分泌表达, 并纯化表达产物。 **结果:** 合成的基因在毕氏酵母中高水平分泌表达, 产量达 1 g/L 以上。经离子交换和凝胶过滤 2 步纯化过程, 获得纯度在 95% 以上的重组蛋白。 **结论:** 全合成的多表位融合抗原基因能在毕氏酵母中高水平分泌表达, 并产生一种工艺简易的纯化方法。大量获得该重组蛋白为探讨其免疫学功能及作为多价联合疫苗的成分提供了基础。

[关键词] 恶性疟原虫; 红前期; 多表位融合抗原; 基因表达

[中图分类号] Q 781; Q 786 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2004)01-0022-03

Constructing a pre-erythrocytic multi-epitope chimeric antigen of *Plasmodium falciparum* and its expression in *Pichia pastoris*

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

[ABSTRACT] **Objective:** To construct a pre-erythrocytic multi-epitope antigen of *Plasmodium falciparum* (designated as *PfCP-TCL*) and express it in *Pichia pastoris* in secreting form. **Methods:** Some important T and B epitopes from pre-erythrocytic antigen candidates such as CSP, TRAP and LSA-1 were selected and joined in tandem to generate the chimeric gene. The gene was expressed in *Pichia pastoris* and its product was purified by chromatography. **Results:** *PfCP-TCL* gene was synthesized and expressed at high level of more than 1 g/L. The product was purified by ion-exchange and gel filter chromatography with a purity of >95%. **Conclusion:** The synthetic *PfCP-TCL* gene is expressed in *Pichia pastoris* and a method of easy purification is developed. The recombinant PfCP-TCL protein provides a base for investigating its immune function and potential as a component of combined malaria vaccine.

[KEY WORDS] *Plasmodium falciparum*; pre-erythrocytic; multi-epitope antigen; gene expression

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(1): 22-24]

由于疟原虫生活史复杂、抗原成分多且存在期特异性和高度变异以及不同人群 MHC 限制性, 使得以往研制的一些亚单位疫苗在体内试验中的效果难以令人满意^[1]。现在普遍认为一个有效的疟疾疫苗应由疟原虫不同的生活史阶段包括子孢子、无性红内期原虫甚至配子体的抗原或 T、B 细胞表位组成^[2]。恶性疟原虫环子孢子蛋白(CSP)、血凝素相关匿名蛋白(TRAP)和肝期特异性抗原 1(LSA-1)是重要的红前期疟疾疫苗候选抗原^[3-7]。现已从这 3 个抗原中鉴定到一些重要的保护性 T、B 细胞表位^[8,9], 本研究将这些表位串联连接, 产生一个多表位融合蛋白(定名为 PfCP-TCL), 通过密码子选择对该基因进行重新设计和全合成, 并在毕氏酵母中进行高水平表达。

1 材料和方法

1.1 质粒、菌株和试剂 pPIC9 质粒、pPIC9K 质

粒、GS115 毕氏酵母购自 Invitrogen 公司; pBlue-script II KS 质粒(简称 pKS), 大肠杆菌 DH5 α 由本实验室保存。BamH I、EcoR I 等工具酶均购自上海生工生物技术公司, 胶回收试剂盒和质粒抽提纯化试剂盒购自上海华舜生物工程公司; 碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG 等免疫学试剂购自华美生物工程公司。S-sepharose、Q-sepharose 和 Sephacryl 等填料购自瑞典 Pharmacia 公司。兔抗恶性疟原虫 CSP 蛋白多抗购自美国 MR4 公司。

1.2 *PfCP-TCL* 基因的合成

该基因含有 13 个表位, 其中 CTL 表位 7 个, B 细胞表位 3 个及辅助性 T 细胞表位 3 个。这些表位前后串联组合, 产生

[基金项目] 世界卫生组织专项基金(ID980261); 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] 张青锋(1976-), 男(汉族), 硕士生。

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

一个含 220 个氨基酸残基的融合蛋白基因。对该基因进行的设计包括: 选用酵母使用频率密码子; 去除 1 个潜在的糖基化位点; 排除一些不利于基因转录和翻译的位点等。采用不对称 PCR 方法^[10]合成该基因, 经 *Xho* I 和 *Eco* R I 酶切后克隆到 pKS 载体上, DNA 序列分析后再克隆到 pPIC9 质粒上, 然后经 *Bam* H I 和 *Eco* R I 酶切连接到表达载体 pPIC9K 上, 产生 *PfCP-TCL*/pPIC9K 重组表达质粒(图 1)。

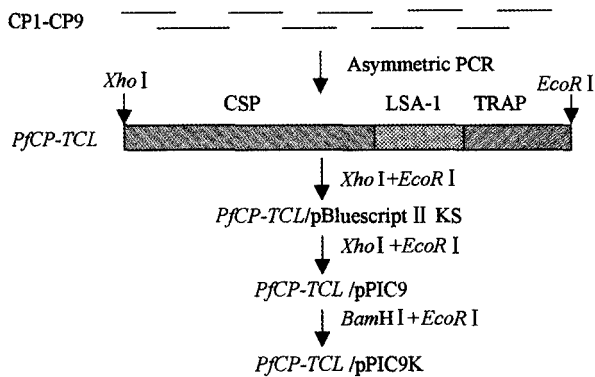


图 1 *PfCP-TCL* 基因构建示意图

Fig 1 Schematic outline of *PfCP-TCL* gene construction

1.3 基因的表达 用 *Bgl* II 内切酶线性化重组质粒后, 通过电转化方法将其整合到 GS115 毕氏酵母染色体中。先在组氨酸缺陷的平板(RDB)上筛选转化子, 然后用 G418 抗性平板进一步筛选出高拷贝插入克隆。将该菌株在摇瓶和 15 L 发酵罐中进行甲

醇诱导表达, 在不同的时间点进行取样, 分离上清, 然后进行 SDS-PAGE 电泳分析。具体方法和操作见 Intrivogen 实验手册。

1.4 蛋白质印迹分析 适量(每个泳道 2~5 μg)样品经 SDS-PAGE 电泳后, 电转移至硝酸纤维素膜上, 用含 30 g/L 脱脂奶粉的 1×TBS 室温封闭 30 min, 一抗(用封闭液按 1:200 稀释)反应 1 h, TBS 洗 3 次, 二抗(用封闭液按 1:500 稀释)反应 1 h, TBS 洗涤 3 次, 显色缓冲液荡洗 1 次, 最后根据二抗的标记物选择相应的显色底物进行显色反应。目的条带出现后用水冲洗, 终止反应。

1.5 蛋白质的纯化 将发酵液上清在平衡液(50 mmol/L 磷酸缓冲液, pH 7.2)中 4℃ 透析过夜。平衡 S-sepharose 阳离子柱, 上样。用平衡液洗柱, 然后将洗涤液中的盐浓度从 0~1 mol/L 进行线性洗脱, 收集样品进行 SDS-PAGE 分析。再将样品在平衡液(50 mmol/L 磷酸缓冲液, pH 7.2)中 4℃ 透析过夜, 平衡凝胶过滤柱, 上样, 用 1 ml/min 流速的平衡液洗柱, 待出峰后, 分部收集样品进行 SDS-PAGE 分析。

2 结果

2.1 *PfCP-TCL* 基因的设计与合成 按照设计的基因序列, 合成 9 条寡核苷酸链, 按不对称 PCR 方法扩增产生 *PfCP-TCL* 基因, 扩增出的 DNA 片段大小与预期大小一致(图 2)。

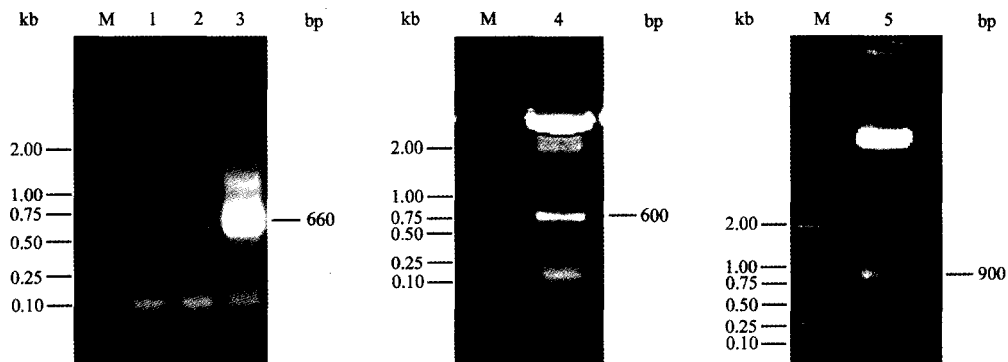


图 2 *PfCP-TCL* 基因的合成和克隆

Fig 2 Synthesis and cloning of *PfCP-TCL* gene

M: DGL2000 DNA marker; 1-3: PCR product of *PfCP-TCL* gene; 4: *PfCP-TCL*/pKS digested with *Xho* I and *Eco* R I; 5: *PfCP-TCL*/pPIC9K digested with *Bam* H I and *Eco* R I

2.2 *PfCP-TCL* 基因的表达 将 15 L 发酵罐表达上清进行 SDS-PAGE 电泳分析, 结果显示: 在相对分子质量 25 000 处出现表达条带, 该条带是在诱导后产生, 并随表达时间延长表达产物逐渐增加, 最终产量可达 1 g/L 以上(图 3A)。免疫印迹分析结果表

明: *PfCP-TCL* 基因在毕氏酵母中的表达产物以 2 条带形式存在(图 3B)。

2.3 表达产物的纯化 通过计算机软件分析, 融合蛋白 *PfCP-TCL* 的理论等电点为 8.57, 高于酵母本身表达的大多数杂蛋白的等电点。SDS-PAGE 分析

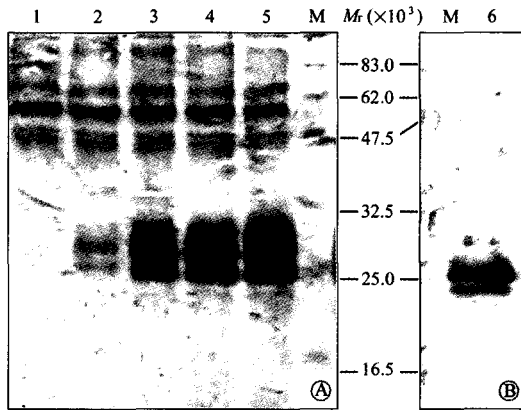


图3 *PfCP-TCL* 蛋白的 SDS-PAGE 和蛋白印迹电泳
Fig 3 SDS-PAGE(A) and Western-blot(B)
analysis of *PfCP-TCL* protein

M: Pre-stained protein markers; 1: 0 h(Pre-induced);
2-5: 5,16,28,40 h after inducement; 6: *PfCP-TCL* protein

结果表明:经一步离子交换后,目的蛋白能够与大多数杂蛋白分离开,纯度得到极大提高。再将含目的蛋白的洗脱组分进行凝胶过滤,即可得到纯度在 95% 以上的融合抗原。

3 讨论

由于疟原虫生活史的复杂性和抗原期特异性及宿主的 MHC 限制性,以单一抗原进行免疫获得的保护效果难以令人满意。特别是不同人群遗传背景的差异,造成免疫保护效果的极大不同。如化学合成的疟疾亚单位疫苗 SPf66,在动物及部分人群中产生了较好的免疫应答,但在随后的大规模人体试验中,该疫苗对多数个体不能产生有效的应答反应,这可能与不同人群的 MHC 限制性相关^[11]。而 *PfCP-TCL* 含有的表位至少涉及 4 种 MHC 类型,还包括一些广谱性的 T 辅助细胞表位。构建这种多反应表位抗原的目的是能激发大多数人群的应答反应。

大量实验已经表明,在疟疾红前期免疫中,T 细胞免疫特别是 CTL 反应起了关键作用^[12]。因此我们在设计 *PfCP-TCL* 基因时,以 CTL 表位为主,同时辅以 Th 表位和重要的 B 细胞表位,而且这些表位来自孢子期和肝内期的不同抗原。这样,*PfCP-TCL* 可能克服以往亚单位疫苗存在的一些缺陷。

通过密码子选择和序列优化,我们取得了 *PfCP-TCL* 在毕氏酵母中的高水平分泌表达,产量达 1 g/L,这为获得大量重组蛋白进行功能研究,特别是作为本室构建多价联合疫苗成分的研究提供了重要基础。我们注意到表达产物在电泳凝胶上表现为 2 条带,出现这种情况可能原因有:表达产物的部

分降解;不同糖基化或出现不同构象等。我们对这 2 条带 N 末端的 10 个氨基酸残基分别进行测定,结果 N 末端序列与设计序列一致,均未发现任何氨基酸的缺失。因条件限制,未能进行 C 末端的氨基酸序列测定。对此,我们采用以下 2 种方法对该基因进行改建:去除 C 末端的最后 2 个表位序列和对 C 末端潜在的蛋白降解位点进行定点突变。将改建后的基因按前述方法重新进行表达,结果发现,新基因的表达产物在电泳凝胶上仍为 2 条带。另外,尽管我们已经对潜在的糖基化位点进行缺失,但 *PfCP-TCL* 是否仍发生糖基化有待于进一步探讨。

【参考文献】

- [1] Soares IS, Rodrigues MM. Malaria vaccine: roadblocks and possible solutions[J]. *Braz J Med Biol Res*,1998,31(3):317-332.
- [2] Engers HD, Godal T. Malaria vaccine development: current status[J]. *Parasitol Today*,1998,14(2):56-64.
- [3] Roggero MA, Meraldi V, López JA, et al. The synthetic, oxidized C-terminal fragment of the *Plasmodium berghei* circumsporozoite protein elicits a high protective response[J]. *Eur J Immunol*,2000,30(9):2679-2685.
- [4] Stoute JA, Slaoui M, Heppner DG, et al. A preliminary evaluation of a recombinant circumsporozoite protein vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria[J]. *N Engl J Med*,1997,336(2):86-91.
- [5] Wengelnik K, Spaccapelo R, Naitza S, et al. The A-domain and the thrombospondin-related motif of *Plasmodium falciparum* TRAP are implicated in the invasion process of mosquito salivary glands[J]. *EMBO J*,1999,18(19):5195-5204.
- [6] Sultan AA, Thathy V, Frevert U, et al. TRAP is necessary for gliding motility and infectivity of *Plasmodium* sporozoites[J]. *Cell*,1997,90(3):511-522.
- [7] Perlaza BL, Arevalo-Herrera M, Brahimi K, et al. Immunogenicity of four *Plasmodium falciparum* preerythrocytic antigens in *Aotus lemurinus* monkeys[J]. *Infect Immun*,1998,66(7):3423-3428.
- [8] Shi YP, Hasnain SE, Sacchi JB, et al. Immunogenicity and *in vitro* protective efficacy of a recombinant multistage *Plasmodium falciparum* candidate vaccine[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,1999,96(4):1615-1620.
- [9] Gilbert SC, Plebanski M, Harris SJ, et al. A protein particle vaccine containing multiple malaria epitopes[J]. *Nat Biotechnol*,1997,15(12):1280-1284.
- [10] Shi YP, Das P, Holloway B, et al. Development, expression, and murine testing of a multistage *Plasmodium falciparum* malaria vaccine candidate[J]. *Vaccine*,2000,18(25):2902-2914.
- [11] Riley E. Malaria vaccine trials; SPf66 and all that[J]. *Curr Opin Immunol*,1995,7(5):612-616.
- [12] Oliveira-Ferreira J, Daniel-Ribeiro CT. Protective CD8⁺ T cell response against the pre-erythrocytic stages of malaria parasites; an overview[J]. *Mem Inst Oswaldo Cruz*,2001,96(2):221-227.

【收稿日期】 2003-11-27

【修回日期】 2003-12-16

【本文编辑】 尹 茶