

【论著】

融合基因 IFN- α 1b/CSP II 原核表达载体的构建及在大肠埃希菌中的表达

陈慧红¹, 余新炳², 高兴政¹

【摘要】 目的 构建融合基因 IFN- α 1b/CSP II 的原核表达载体并予以表达。方法 采用聚合酶链反应 (PCR) 从人基因组 DNA 中扩增出 IFN- α 1b 基因, 克隆入原核表达载体 pGEX-4T-1, 构建原核表达载体 pGEX-4T-1/IFN- α 1b。利用 PCR 法从恶性疟原虫基因组 DNA 中扩增出环孢子蛋白 II 区 (CSP II) 基因, 克隆入原核表达载体 pGEX-4T-1, 构建原核表达载体 pGEX-4T-1/CSP II。用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Eco*R I 将 IFN- α 1b 从原核重组质粒 pGEX-4T-1/IFN- α 1b 中切下, 克隆入经相同酶切的原核重组质粒 pGEX-4T-1/CSP II 中, 构建融合基因的原核表达载体 pGEX-4T-1/IFN- α 1b/CSP II。融合基因 IFN- α 1b/CSP II 经异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导, 在大肠埃希菌中进行初步表达。结果 构建的原核表达载体 pGEX-4T-1/IFN- α 1b、pGEX-4T-1/CSP II 和 pGEX-4T-1/IFN- α 1b/CSP II 经 PCR 和酶切鉴定与预期结果一致。证实融合基因 IFN- α 1b/CSP II 拼接成功并正确地克隆入原核表达载体。在大肠埃希菌中表达出融合蛋白 IFN- α 1b/CSP II, 该融合蛋白经十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析与理论预测值相符。经蛋白质印迹法 (Western blotting) 鉴定具有免疫原性。结论 构建了融合基因 IFN- α 1b/CSP II 的原核表达载体, 并在大肠埃希菌中表达了融合蛋白 IFN- α 1b/CSP II。

【关键词】 融合基因 IFN- α 1b/CSP II; 环孢子蛋白 II; 基因重组; 序列分析; 基因表达

中图分类号: R382.312; R392.11

文献标识码: A

Construction of Prokaryotic Expression Vector of the Fusion Gene IFN- α 1b/CSP II and Expression in *E. coli*

CHEN Hui-hong, YU Xin-bing, GAO Xing-zheng

(Department of Parasitology, Health and Science Center of Peking University, Beijing 100083, China)

【Abstract】 Objective To Construct the prokaryotic expression vector of the fusion gene IFN- α 1b/CSP II. **Methods** IFN- α 1b was amplified from the human genomic DNA by PCR and cloned into prokaryotic expression vector pGEX-4T-1. The recombinant plasmid pGEX-4T-1/IFN- α 1b was constructed. Circumsporozoite protein II (CSP II) was amplified from the *Plasmodium falciparum* genomic DNA by PCR and was cloned into the prokaryotic expression vector pGEX-4T-1. The recombinant plasmid pGEX-4T-1/CSP II was constructed. IFN- α 1b was cut from the recombinant plasmid pGEX-4T-1/IFN- α 1b digested with *Bam*H I and *Eco*R I and ligated with the recombinant plasmid pGEX-4T-1/CSP II also digested with *Bam*H I and *Eco*R I. The recombinant prokaryotic plasmid pGEX-4T-1/IFN- α 1b/CSP II was constructed. The fusion gene IFN- α 1b/CSP II was expressed in *E. coli* by IPTG. **Results** The prokaryotic expression vector pGEX-4T-1/IFN- α 1b, pGEX-4T-1/CSP II and pGEX-4T-1/IFN- α 1b/CSP II were identified by PCR, enzyme digestion and gene sequencing. The expressed fusion protein/IFN- α 1b/CSP II in *E. coli* was identified by SDS-PAGE and Western blot. **Conclusion** The prokaryotic expression vector of the fusion gene IFN- α 1b/CSP II was successfully constructed, which was then expressed in *E. coli*.

【Key words】 Fusion gene IFN- α 1b/CSP II; Circumsporozoite protein II (CSP II); Recombinant DNA; Sequence analysis; Gene expression

治疗乙型肝炎常用药物干扰素 α (IFN- α) 临床上有很严重的毒副作用^[1]。恶性疟原虫环孢子蛋白 II (circumsporozoite protein, CSP II) 作为一个导向分子, 能与肝细胞发生特异性结合^[2]。本研究拟将 CSP II 与 IFN- α 连接, 以提高药物作用的靶向性, 达到导向性治疗的效果, 从而提高 IFN- α 疗效、降低

毒副作用。通过聚合酶链反应 (PCR) 获得的目的基因 IFN- α 1b 和 CSP II 进行拼接, 构建融合基因 IFN- α 1b/CSP II 的原核表达载体, 并在大肠埃希菌中表达, 为进一步研究其功能奠定实验基础。

材料与方法

1 菌株和质粒

大肠埃希菌 JM109 与原核表达载体 pGEX-4T-1

为本室保种。

2 工具酶和主要试剂

限制性内切酶 *Bam*H I、*Eco*R I 和 *Xho* I 购自广州华美生物工程公司。T4 DNA 连接酶购自美国 Promega 公司。Taq DNA 聚合酶和脱氧核苷三磷酸 (dNTP) 购自上海生工生物工程技术有限公司。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。IPTG (异丙基-β-D-硫代半乳糖苷)、SDS (十二烷基磺酸钠)、丙烯酰胺 (acrylamide, Arc)、亚甲双丙烯酰胺 (N, N-methylene bisacrylamide Bis)、TEMED (N, N, N', N'-四甲基乙二胺)、过硫酸胺、甘氨酸、Tris 碱及 β-巯基乙醇购自上海生工生物工程技术有限公司。辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔 IgG、联苯二胺 (DAB) 及考马斯亮蓝 R-250 购自广州华美生物工程公司。

3 方法

3.1 人基因组 DNA 的提取 按常规方法提取^[3]。

3.2 IFN-α1b 基因的 PCR 扩增 根据 IFN-α1b 的基因序列,按文献 [4] 方法设计合成 1 对引物:

P1 :5'-GC GGA TCC ATG TGT GAT CTC CCT GAG-3'

*Bam*H I

P2 :5'-GC GAA TTC AGA GCT TTC CTT CCT CCT TAAT-3'

*Eco*R I

PCR 反应条件为 95 °C 预变性 5 min, 94 °C 50 s, 57 °C 50 s, 72 °C 1 min 20 s, 共 32 个循环。最后一轮反应为 72 °C 7 min, 置于 4 °C 保存。

3.3 原核表达载体 IFN-α1b/pGEX-4T-1 的构建 IFN-α1b 的 PCR 产物经凝胶回收试剂盒纯化后,用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切后,与经 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切的原核表达载体 pGEX-4T-1 在 T4 DNA 连接酶的作用下过夜连接,其连接产物转化感受态细菌 JM109,经 PCR 和酶切鉴定出阳性重组质粒 pGEX-4T-1/IFN-α1b。该质粒经基因测序进一步证实。

3.4 恶性疟原虫体外培养及基因组 DNA 的提取 分别按文献 [5] 及 [6] 方法进行。

3.5 CSP II 基因的扩增 根据恶性疟原虫 CSP 基因的已知序列按文献 [7] 方法设计合成下列引物:

P1 :5'-GC GAA TTC ATG ACT GAA TGG TCC CC-3'

*Eco*R I

P2 :5'-GG CTC GAG TTA ATT AAG GAA CAA GAAG-3'

Xho I

以恶性疟原虫基因组 DNA 为模板,于 Ependorf

管中依次加入灭菌双蒸水 36 μl、10 × PCR 缓冲液 5 μl、dNTP 3 μl、P1 1 μl、P2 1 μl、模板 DNA 1 μl、Taq DNA 聚合酶 3 μl,反应总体积为 50 μl。

PCR 反应条件:95 °C 预变性 5 min 后,94 °C 50 s,56 °C 50 s,72 °C 1 min 30 s 进行 32 个循环,72 °C 延伸 7 min,置于 4 °C 保存。

3.6 pGEX-4T-1/CSP II 载体以及重组质粒 pGEX-4T-1/IFN-α1b/CSP II 的构建 pGEX-4T-1 用限制性内切酶 *Eco*R I 和 *Xho* I 双酶切,酶切产物与经相同酶切的 CSP II 基因在 T4 DNA 连接酶的作用下过夜连接。连接产物经常规氯化钙法转化大肠埃希菌感受态细菌 (JM109)。阳性重组质粒 pGEX-4T-1/CSP II 经 PCR、酶切和基因测序进行鉴定。

用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切重组质粒 pGEX-4T-1/IFN-α1b,获得目的基因 IFN-α1b。将 IFN-α1b 和经 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切的重组质粒 pGEX-4T-1/CSP II 在 T4 DNA 连接酶的作用下过夜连接,并将连接产物转化 JM109,阳性重组质粒 pGEX-4T-1/IFN-α1b/CSP II 经酶切,PCR 和基因测序鉴定证实。

3.7 融合基因 IFN-α1b/CSP II 的序列测定 通过双脱氧链末端终止法,对融合基因 IFN-α1b/CSP II 进行序列测定。

3.8 重组质粒 pGEX-4T-1/IFN-α1b/CSP II 工程菌的诱导和表达 将含有重组质粒 pGEX-4T-1/IFN-α1b/CSP II 的甘油菌 BL21/(DE3)划线于含有氨苄青霉素的 LB 培养基平板上,37 °C 温箱过夜培养。次日,挑取菌落接种于 5 ml 的含有氨苄青霉素的 LB 培养基,于 37 °C 振荡过夜。取过夜培养物以 1:50 稀释接种于含有氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,37 °C 剧烈振荡培养 4 h,使之达到对数生长期。将 IPTG 加入到对数生长期的培养物中,使其终浓度为 1 mmol/L,继续 37 °C 振荡培养 4~5 h,收集培养的细菌,用于 SDS-PAGE 分析。

3.9 表达蛋白的 SDS-PAGE 分析及蛋白质印迹法 (Western blotting) 检测 取 1 ml 上述菌液,8 000 × g 离心 5 min,弃上清,加入 50 μl 2 × SDS 加样缓冲液 (50 mmol/L Tris · HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% 丙三醇, 5% β-巯基乙醇, 0.1% 溴酚蓝),水浴煮沸 5 min,取 10 μl 进行 SDS-PAGE。所用分离胶浓度为 8%,浓缩胶为 5%。开始电压为 50 V,进入分离胶后电压为 80 V。考马斯亮蓝染色。

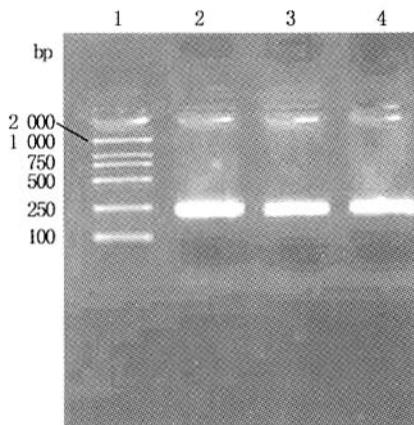
将上述电泳后的凝胶置于转移装置中,将蛋白质转移到硝酸纤维素膜 (NC 膜),200 mA 4 °C 电转移 2 h。转移膜用氨基黑染色,洗膜检查转移效果。将转

印后的硝酸纤维素膜放在平皿中，加封闭液，室温下轻轻振荡 2 h。用封闭液稀释兔抗人 IFN- α 1b 的单抗。用 TTBS(Tris 缓冲盐溶液中含有 0.1% 聚山梨酸 20)洗 3 次，每次 10 min，再加入兔抗人 IFN- α 1b 单抗稀释液，室温下轻轻振荡 2 h。弃去反应液，用 TTBS 洗 3 次，每次 10 min。用封闭液稀释 HRP 标记的羊抗兔 IgG，加入二抗 HRP 标记的羊抗兔 IgG，室温下轻轻振荡 1 h。弃去反应液，用 TTBS 洗 3 次，每次 10 min。取 6 mg DAB 溶于 9 ml 0.01 mol/L Tris · HCl (pH 7.6)中，加 10 μ l 30% H₂O₂充分混匀，将膜浸入上述显色液中，室温下轻轻摇动。观察显色反应，当条带达所需深度时，立刻用水洗膜，再将膜转入 PBS 中。

结 果

1 CSP II 基因的扩增

以恶性疟原虫基因组 DNA 为模板，经 PCR 扩增出 CSP II 基因。其 PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测，扩增片段长度为 225 bp，与理论预测值相符 (图 1)。



1 :DL2000 标志物， 2 ~ 4 : 恶性疟原虫 FCC1/HN CSP II 基因的 PCR 产物。

1 :DL2000 marker , 2 - 4 : PCR products of CSP II gene of *Plasmodium falciparum* FCC1/HN.

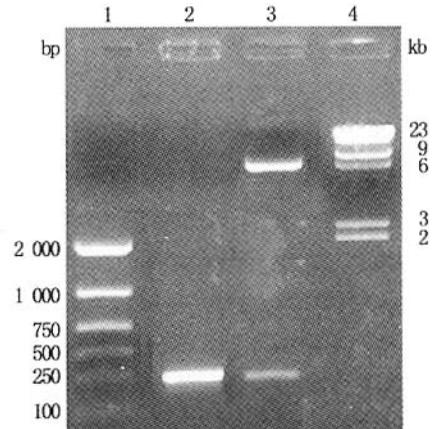
图 1 恶性疟原虫 FCC1/HN 株 CSP II 基因 PCR 产物

Fig. 1 PCR products of CSP II gene of *Plasmodium falciparum* FCC1/HN

2 重组质粒 pGEX-4T-1/CSP II 的鉴定

以重组质粒 pGEX-4T-1/CSP II 为模板，以 CSP II 的 P1 和 P2 引物进行 PCR 扩增。经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳显示 PCR 扩增产物为 225 bp，与 CSP II 理论预测值相符。对经 PCR 初步鉴定的阳性重组质粒进一步用 *Eco*R I 和 *Xho* I 双酶切鉴定。共切出 2 条带，1 条带为载体 pGEX-4T-1，另 1 条带分子量为 225 bp 的 CSP II 基因，与 PCR 产物在同一水平线上。经 PCR 和

酶切鉴定初步证实 pGEX-4T-1/CSP II 构建成功 (图 2)。



1 :DL2000 标志物， 2 :以 pGEX-4T-1/CSP II 为模板 PCR 产物， 3 :重组质粒 pGEX-4T-1/CSP II 经 *Eco*R I 和 *Xho* I 双酶切， 4 : λ DNA/*Hind* III 标志物。

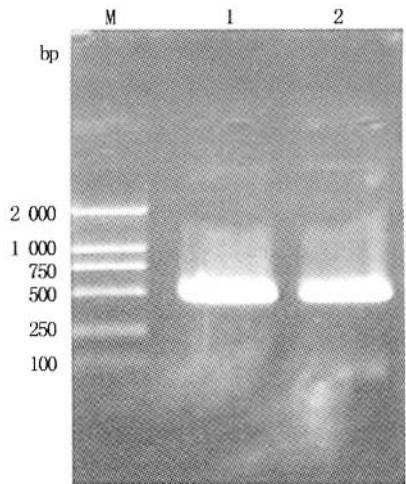
1 :DL2000 marker , 2 :PCR product of pGEX-4T-1/CSP II , 3 :The recombinant plasmid pGEX-4T-1/CSP II digested with *Eco*R I and *Xho* I , 4 : λ DNA/*Hind* III marker.

图 2 重组质粒 pGEX-4T-1/CSP II 的鉴定

Fig. 2 Identification of the recombinant plasmid pGEX-4T-1/CSP II

3 IFN- α 1b 基因的扩增

以提取的人基因组 DNA 为模板，以人的 IFN- α 1b 基因 (HuIFN- α 1b 基因) 序列设计的 P1 和 P2 为引物，进行 PCR 扩增，产物经 1.1% 琼脂糖凝胶电泳，结果显示扩增出的基因片段为 519 bp，与理论预测值相符 (图 3)。



M :DL2000 标志物， 1,2 :HuIFN- α 1b 基因的 PCR 产物。

M :DL2000 marker , 1 2 :PCR products of the HuIFN- α 1b.

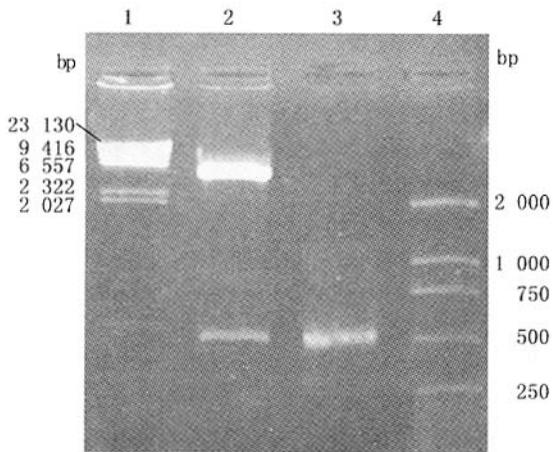
图 3 HuIFN- α 1b 基因的 PCR 产物

Fig. 3 PCR products of the HuIFN- α 1b gene

4 重组质粒 pGEX-4T-1/IFN- α 1b 的鉴定

以重组质粒 pGEX-4T-1/IFN- α 1b 为模板，以 IFN- α 1b 基因序列设计的 P1 和 P2 为引物进行 PCR 扩增，

经 1.1% 琼脂糖凝胶电泳,显示扩增出 519 bp 片段,与 IFN- α 1b 的理论预测值相符。经 PCR 产物初步鉴定的重组质粒 pGEX-4T-1/IFN- α 1b 用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切,结果显示,1 条带为载体 pGEX-4T-1,另 1 条带为 IFN- α 1b 片段,其片段长度与 PCR 产物在同一水平线上,与理论预测值相符(图 4)。



1: λ DNA/*Hind* III 标志物, 2: 重组质粒 pGEX-4T-1/IFN- α 1b 经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切, 3: 以重组质粒 pGEX-4T-1/IFN- α 1b 为模板的 PCR 产物, 4: DL2000 标志物。

1: λ DNA/*Hind* III marker, 2: Recombinant plasmid pGEX-4T-1/IFN- α 1b digested with *Bam*H I and *Xho* I, 3: PCR products of the recombinant plasmid pGEX-4T-1/IFN- α 1b, 4: DL 2000 marker.

图 4 重组质粒 pGEX-4T-1/IFN- α 1b 的鉴定

Fig. 4 Identification of the recombinant plasmid pGEX-4T-1/IFN- α 1b

5 重组质粒 pGEX-4T-1/IFN- α 1b/CSP II 的鉴定

以重组质粒 pGEX-4T-1/IFN- α 1b/CSP II 为模板,分别以 IFN- α 1b 和 CSP II 的 P1、P2 为引物,进行 PCR 扩增,经 1% 琼脂糖凝胶电泳,显示 IFN- α 1b 和 CSP II 的基因片段长度分别为 225 bp 和 519 bp,均与理论预测值相符。

将重组质粒 pGEX-4T-1/IFN- α 1b/CSP II 分别进行双酶切,再经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分析。结果表明,经 *Eco*R I 和 *Xho* I 双酶切切出两条带,其中 1 条为载体 pGEX-4T-1,另 1 条为 CSP II (225 bp)。经 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切切出两条带,1 条为 pGEX-4T-1,另 1 条为 IFN- α 1b (519 bp)。经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切切出两条带,1 条为 pGEX-4T-1,另 1 条为 IFN- α 1b/CSP II (738 bp)。以上基因片段长度均与理论预测值相符。

6 融合基因测序

用双脱氧链末端终止法对融合基因 IFN- α 1b/CSP II 进行测序。结果,其中 GGATCC 为 IFN- α 1b 上游引物 P1 中引入的 *Bam*H I 的酶切位点,ATG 为引入的

起始密码子。AGCTCT 为 IFN- α 1b 下游引物 P2 中引入的丝氨酸连接臂,GAATTC 是 IFN- α 1b 下游引物 P2 和 CSP II 基因上游引物 P1 中引入的 *Eco*R I 的酶切位点。CTCGAG 是 CSP II 基因下游引物 P2 中引入的限制性内切酶 *Xho* I 的酶切位点。测序结果显示,融合基因 IFN- α 1b/CSP II 拼接成功,重组质粒 pGEX-4T-1/IFN- α 1b/CSP II 构建成功(图 5)。

```
TCTGGTCCCGGT GGATCC ATG TGT GAT CTC CCT GAG ACC CAC AGC CTG GAT AAC
AGG AGG ACC TTG ATG CTC CTG GCA CAA ATG AGC AGA ATC TCT CCT TCC TCC
TGT CTG ATG GAC AGA CAT GAC TTT GGA TTT CCC CAG GAG GAG TTT GAT GGC
AAC CCG TTC CAG AAG GCT CCA GCC ATC TCT GTT CTC CAT GAG CTG ATC CAG
CAG ATC TTC AAC CTC TTT ACC ACA AAA GAT TCA TCT GCT GCT TGG GAT GAG
GAC CTC CTA GAC AAA TTC TGC ACC GAA CTC TAC CAG CAG CTG AAT GAC TTG
GAA GCC TGT GTG ATG CAG GAG GAG AGG GTG GGA GAA ACT CCC CTG ATG AAT
GCG GAC TCC ATC TTG GCT GTG AAG AAG TAC TTC CGA AGA ATC ACT CTC TAT
CTG ACA GAG AAG AAA TAC AGC CCT TGT GCC TGG GAG GTC GTC AGA GCA GAA
ATC ATG AGA TCC CCC TCT TTA TCA ACA AAC TTG CAA GAA AGA TTA AGG AGG
AAG GAA AGC TCT GAA TTG ATG ACT GAA TGG TCC CCA TGT AGT GTA ACT TGT
GGA AAT GGT ATT CAA GTT AGA ATA AAG CCT GGC TCT GCT AAT AAA CCT AAA
GAC GAA TTA GAT TAT GAA AAT GAT ATT GAA AAA AAA ATT TGT AAA ATG GAA
AAA TGT TCC AGT GTG TTT AGT GTC GTA AAT AGT TCA ATA GGA TTA ATA ATG
GTA TTA TCC TTC TTG TTC CTT AAT TAA CTCGAG
CGGCCGCATCGTGACTGACTGACGATCTGCCTCGCGCTTTCGGTGTAT
```

图 5 融合基因 IFN- α 1b/CSP II 序列图

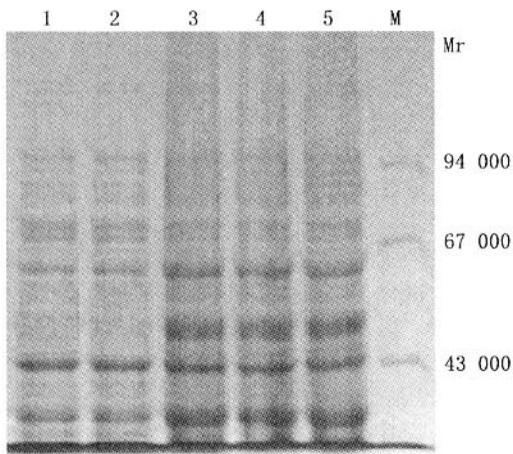
Fig. 5 Sequencing map of the fusion gene IFN- α 1b/CSP II

7 表达融合蛋白的 SDS-PAGE 分析

用 1 mmol/L IPTG 进行诱导表达,经 8% SDS-PAGE 分析结果表明,含重组质粒 pGEX-4T-1/IFN- α 1b/CSP II 的大肠埃希菌 BL21/ (DE3) 在约 Mr 53 000 处出现 1 条特异蛋白带,分子量与理论预测值相符。经 IPTG 诱导的 pGEX-4T-1/BL21/ (DE3) 与未经 IPTG 诱导的 pGEX-4T-1/IFN- α 1b/CSP II 的大肠埃希菌 BL21/ (DE3) 在相应位置均未见明显表达蛋白带(图 6)。

8 融合蛋白的 Western blotting 分析

将经 IPTG 诱导表达的菌体蛋白经 SDS-PAGE 后,转移到 NC 膜上,用兔抗人 IFN- α 1b 单克隆抗体对表达产物进行 Western blotting 检测。结果显示,经诱导的 pGEX-4T-1/IFN- α 1b/CSP II 在约 Mr 53 000 处出现单一条带,而未经诱导的对照质粒 pGEX-4T-1/IFN- α 1b/CSP II 无特异性条带。表明表达的融合蛋白 IFN- α 1b/CSP II 可为单克隆抗体 IFN- α 1b 所识别(图 7)。

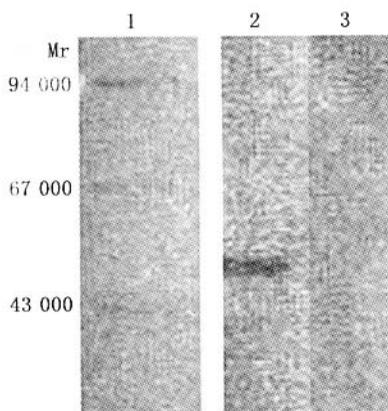


1: 经 IPTG 诱导的 pGEX-4T-1/BL21/(DE3), 2: 未经 IPTG 诱导的 pGEX-4T-1/IFN- α 1b/CSP II/BL21/(DE3), 3~5: 经 IPTG 诱导的 pGEX-4T-1/IFN- α 1b/CSP II/BL21/(DE3), M: 蛋白质标志物。

1: pGEX-4T-1/BL21/(DE3) induced by IPTG, 2: pGEX-4T-1/IFN- α 1b/CSP II/BL21/(DE3) before induction, 3-5: pGEX-4T-1/IFN- α 1b/CSP II/BL21/(DE3) induced by IPTG, M: Protein marker.

图 6 大肠埃希菌蛋白表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of *E. coli* protein induced with IPTG



1: 蛋白质标志物, 2: 经 IPTG 诱导的 pGEX-4T-1/IFN- α 1b/CSP II, 3: 未经 IPTG 诱导的 pGEX-4T-1/IFN- α 1b/CSP II。

1: Protein marker, 2: pGEX-4T-1/IFN- α 1b/CSP II induced by IPTG, 3: pGEX-4T-1/IFN- α 1b/CSP II before induction.

图 7 大肠埃希菌表达产物的 Western blotting 分析

Fig. 7 Western blot analysis of *E. coli* protein induced with IPTG

讨 论

恶性疟原虫环孢子蛋白 CSP 成熟区的基因, 由 I 区、中央重复区及 II 区等组成。研究结果表明 CSP II 能作为配体与肝细胞受体结合, 并且 CSP 基因的 COOH 末端与 CSP 入侵肝细胞有关^[2]。

IFN- α 1b 是比较理想的治疗乙型肝炎药物, 本研

究将其与导向分子 CSP II 相连, 以期达到导向性治疗和预防乙型肝炎的目的^[1,8]。IFN- α 1b 基因由 5' 端非编码区、信号肽编码区、成熟肽编码区和 3' 端非编码区构成^[4]。本研究克隆了其成熟肽区的序列, 其成熟肽编码区编码 166 个氨基酸 (基因片段为 498 bp)。由于其成熟肽编码区无内含子, 本研究直接以人基因组 DNA 为模板扩增 IFN- α 1b。为使 IFN- α 1b 和 CSP II 基因拼接后仍保持原各自空间构象和功能, 采用丝氨酸连接臂将其连接^[9]。为提高拼接效率, 先将两个基因分别克隆入原核表达载体, 再进行拼接。构建的融合基因的原核重组质粒经双脱氧链末端法测序得到证实, 而且是正向插入原核表达载体 pGEX-4T-1 中。通过 ExPasy 网站相关软件对融合蛋白 IFN- α 1b/CSP II 的氨基酸序列分析, 表明该融合蛋白中的 IFN- α 1b 和 CSP II 仍保持原有的特征性序列、基元和功能域。

本研究使用的原核表达载体是 pGEX-4T-1, 属于融合型表达载体。表达效率高, 产生的融合蛋白比天然蛋白稳定, 易于鉴定纯化。本研究结果为进一步研究其功能奠定了实验基础。

参 考 文 献

- [1] 高寿征, 田庚善, 崔振宇, 等. 病毒性肝炎防治研究 [M]. 北京: 北京出版社, 1992. 351-358.
- [2] Rich KA, George FW, Law JL, et al. Cell adhesive motif in region II of malarial circumsporozoite protein [J]. Science, 1990, 249: 1547-1577.
- [3] J 萨姆布鲁克, EF 弗里奇, T 曼尼阿蒂斯, 著. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 分子克隆实验指南 [M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1992. 19-22.
- [4] 吴梧桐, 丁锡申, 刘景晶, 等. 基因工程药物基础与临床 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996. 154-155.
- [5] Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture [J]. Science, 1976, 193: 673-675.
- [6] 罗树红, 余新炳, 李学荣, 等. 恶性疟原虫传播阻断抗原 Pfs25 和 Pfs48/45 基因编码序列的体外扩增 [J]. 中国人兽共患病杂志, 1998, 14(1): 3-6.
- [7] Dame JB, Williams JL, McCutchan TF, et al. Structure of the gene encoding the immunodominant surface antigen on the sporozoite of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* [J]. Science, 1984, 225: 593.
- [8] 徐东平, 王福生, 施红, 等. IFN- α /HBV Pre S2 融合基因表达载体的构建和表达 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2000, 16: 225-228.
- [9] 陈章国, 马大龙, 张颖妹, 等. 白细胞介素 2-乙型肝炎病毒前 S 抗原融合蛋白的免疫原性研究 [J]. 中华医学杂志, 1996, 76: 34-37.

(收稿日期: 2004-06-16 编辑: 富秀兰)