

恶性疟原虫乳酸脱氢酶特异性单克隆抗体的制备

汪俊云, 包意芳, 杨玥涛, 汤林华

【摘要】 目的 制备恶性疟原虫乳酸脱氢酶特异性单克隆抗体。方法 克隆、表达恶性疟原虫乳酸脱氢酶基因, 并以表达的重组蛋白免疫 BALB/c 小鼠, 采用杂交瘤技术制备单克隆抗体, 对所制备的单克隆抗体确定其亚类和效价, 蛋白质印迹法 (Western blotting) 分析其特异性。结果 成功克隆并表达了恶性疟原虫乳酸脱氢酶基因, 以重组恶性疟原虫乳酸脱氢酶蛋白作为免疫源制备单克隆抗体, 共筛选了 15 株能高效分泌效价在 1:6 400 ~ 1:51 200 特异抗体的细胞株, 抗体亚类为 IgG₁ 或 IgG₂。所有抗体均能唯一识别恶性疟原虫同源蛋白 Mr 33 000 组分, 而与疫区非疟疾发热病人的红细胞组分无交叉反应。结论 以重组恶性疟原虫乳酸脱氢酶蛋白为免疫源成功制备了能识别天然恶性疟原虫乳酸脱氢酶蛋白的特异性单克隆抗体。

【关键词】 恶性疟原虫; 乳酸脱氢酶; 单克隆抗体

中图分类号: R532.32

文献标识码: A

Preparation of Monoclonal Antibodies Specific to Lactate Dehydrogenase of *Plasmodium falciparum*

WANG Jun-yun, BAO Yi-fang, YANG Yue-tao, TANG Lin-hua

(National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Shanghai, 200025, China)

【Abstract】 Objective To prepare monoclonal antibodies specific to lactate dehydrogenase of *Plasmodium falciparum*. **Methods** The *Plasmodium falciparum* lactate dehydrogenase (pLDH) gene was amplified from whole blood of malaria patients by PCR and cloned into expression vector pGEX-3X. Recombinant pLDH protein was expressed and purified, and used for immunizing mice to prepare monoclonal antibodies (McAbs). The McAbs were characterized by Western blotting analysis. **Results** The *Plasmodium falciparum* lactate dehydrogenase gene was amplified and cloned into expression vector pGEX-3X. The recombinant pLDH plasmid was expressed in *E. coli* BL-21 cells. 15 cell lines of McAbs with high titer against pLDH were obtained using the recombinant pLDH as immunogen. Western blotting analysis showed that these McAbs recognized a Mr 33 000 of native *Plasmodium falciparum* protein without cross-reaction with constituents of red blood cell of febrile patients from endemic area of malaria. **Conclusion** Fifteen hybridoma cell lines secreting high titer of McAb specific to *Plasmodium falciparum* LDH were established based on the recombinant pLDH.

【Key words】 *Plasmodium falciparum*; Lactate dehydrogenase; Monoclonal antibodies

Supported by the Technology Developmental Fund, Ministry of Science and Technology of China (No. 2003EG150182)

疟疾仍是世界性的严重威胁人类生命和健康的公共卫生问题, 而准确快速的诊断方法对于此病的有效控制具有重要意义。乳酸脱氢酶 (LDH) 是糖酵解途径的末端酶, 疟原虫 LDH (pLDH) 在疟原虫的整个红内期均高效表达^[1, 2]。资料表明, 4 种感染人的疟原虫均可产生独特的 pLDH 活性, 且血样中 pLDH 活性与原虫血症水平一致^[3, 4]。作为一个特殊的循环抗原, 疟原虫 LDH 与宿主 LDH 在物理与化学性质等方面有较大的差异^[4], 极具诊断价值。本研究克隆并表达了恶性疟原虫乳酸脱氢酶基因, 并以此重组蛋白制备了

疟原虫乳酸脱氢酶特异性单克隆抗体, 为研制快速诊断疟疾的免疫层析试条奠定了基础。

材料与方法

1 PCR 扩增 pLDH 基因

引物: 根据文献 [5] 设计 1 对引物, 用于扩增恶性疟原虫 LDH 全长编码基因。P1: 5'-ATGGCAC-CAAAAGCAAAAATCGT-3', P2: 5'-TTAAGCTAATGC-CTTCATCTCT-3', 均由上海申能博彩生物技术有限公司合成。模板: 以采自云南恶性疟患者 (经两位疟疾学专家鉴定确诊) 肝素抗凝全血, 按文献 [6] 方法处理作为 PCR 扩增模板。取 20 μ l 全血加 200 μ l 裂解液 [50 mmol/L NaCl, 0.015% 皂素, 1 mmol/L 乙二胺四乙酸 (EDTA)] 震荡混匀, 室温置 10 min 以充分溶解红细胞, 10 000 \times g 室温离心 10 min, 再用 250 μ l

基金项目: 科技部科研院所技术开发研究专项资金资助 (No. 2003EG150182)

作者单位: 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, 世界卫生组织疟疾、血吸虫病和丝虫病合作中心, 上海 200025

缓冲液 [10 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷 (Tris) -HCl , pH8.3 , 50 mmol/L KCl , 1.5 mmol/L MgCl₂ , 0.01% 明胶] 将沉淀物洗 2 次 , 所得沉淀物即作为 PCR 扩增模板。PCR : 高保真聚合酶 Pfu PCR 扩增试剂盒 (购自上海申能博彩生物技术有限公司) , 按 50 μ l 反应体积在上述沉淀物中加 49.5 μ l PCR 反应液 (含 200 μ mol/L dATP/dTTP/dGTP/dCTP , 200 pmol/L 引物) , 加封石蜡油 50 μ l 后置沸水煮沸 10 min , 立即置已热启动的 PCR 仪进行扩增。条件为 : 94 $^{\circ}$ C 变性 3 min , 此时加 0.5 μ l Pfu 聚合酶 (5 U/ μ l) , 再按 94 $^{\circ}$ C 30 s , 60 $^{\circ}$ C 45 s , 72 $^{\circ}$ C 1 min 的条件循环 35 次 , 随后 72 $^{\circ}$ C 再延长 10 min。反应结束后取 5 μ l 反应液用 1% 琼脂糖凝胶电泳检查。

2 PCR 产物的克隆、测序及重组质粒的表达和重组蛋白纯化

扩增的 PCR 产物按 DNA 纯化试剂盒 (上海申能博彩生物技术有限公司) 说明纯化后用平端方法与经 *Sma* I 酶切的 pGEX-3X 表达载体 (丹麦 Amersham 公司) DNA 连接 , 连接物转化大肠埃希菌 DH5a 感受态细胞 , 在选择平板上挑取白色菌落接种 LB 培养基进行培养 , 收集菌体 , 用碱裂解法抽提质粒并进行酶切鉴定 , 大小符合的重组质粒进行测序 (上海申能博彩生物技术有限公司) 。序列符合且克隆方向正确的重组质粒再转化大肠埃希菌 BL-21 细胞 , 转化的细胞接种于 LB 液体培养基 , 28 $^{\circ}$ C 下用终浓度为 1 mmol/L 的异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导重组质粒表达。收集细菌 , 用 10% 胶对重组蛋白进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)^[7] 分析。取经 SDS-PAGE 鉴定证明能正确表达重组蛋白的 BL21 细菌按上述方法进行大量培养并进行诱导表达。诱导表达结束后 , 3 000 \times g 离心 20 min , 收集细菌 , 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗 3 次。按沉淀物压积体积 20 倍的数量加入 PBS 重悬菌体并超声裂解。超声处理后加入 Triton 100 至终浓度 1% , 置冰上搅拌 1 h。随后 4 $^{\circ}$ C , 12 000 \times g 离心 30 min , 取上清按试剂盒说明用 Glutathione Sepharose 4B 柱 (丹麦 Amersham 公司) 亲和纯化回收表达的融合蛋白 , 并进行 SDS-PAGE 分析和蛋白含量测定。

3 单克隆抗体的制备与初步分析

3.1 免疫 按文献 [8] 方法 , 每只 BALB/c 小鼠首次

腹腔注射 100 μ g 上述纯化的重组融合蛋白 + 福氏完全佐剂的混悬液 , 以后每隔 1 月注射 100 μ g 纯化的重组融合蛋白 + 福氏不完全佐剂的混悬液 1 次 , 共 2 次 , 并于杀鼠取脾进行细胞融合的前 3 d 经尾静脉直接注射抗原加强免疫 1 次。

3.2 杂交瘤细胞的产生与筛选 SP2/0 瘤细胞与免疫鼠脾细胞的融合及杂交瘤细胞的克隆按本实验室常规方法进行^[8]。以上述纯化的重组融合蛋白和谷胱甘肽-S-转移酶 (GST) 蛋白分别包板对杂交瘤细胞培养上清进行常规 ELISA 检测抗体分泌以筛选杂交瘤细胞株 , 对 GST 和重组融合蛋白均反应的克隆其分泌的抗体视为针对 GST , 所以只选择保留仅对重组融合蛋白反应的克隆。

3.3 单克隆抗体 (McAb) 免疫球蛋白亚类鉴定 经浓缩的杂交瘤细胞培养上清液与羊抗鼠 IgG、IgM、IgA、IgG₁、IgG_{2a}、IgG_{2b} 和 IgG₃ 在 1% 生理盐水琼脂板上进行免疫双扩散以鉴定 McAb 免疫球蛋白亚类。

3.4 腹水生产与腹水效价决定 每只 BALB/c 小鼠腹腔注射 5×10^6 杂交瘤细胞 , 1 周后随时观察并取腹水。以纯化的重组融合蛋白包被酶标板 , 腹水进行倍比稀释 , 第 1 稀释度为 1:1 000 , 用常规 ELISA 法确定腹水效价。

3.5 免疫印迹实验 取培养纯化的恶性疟原虫和 10 份云南发热病人红细胞经处理后进行 SDS-PAGE 电泳 , 而后转移至硝酸纤维素膜上。转移完毕后硝酸纤维素膜用含 5% 脱脂奶粉的 PBS 溶液室温封闭 1 h , 用 PBS 0.5% Triton-100 (PBS-T) 洗涤 3 次 , 按 1:20 000 稀释度加入单克隆抗体 , 4 $^{\circ}$ C 过夜 , 用 PBS-T 洗涤 3 次 , 加入用 PBS 稀释 (1:5 000) 的辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠抗体室温摇 2 h , 同法洗涤 3 次 , 再用 PBS 洗涤 1 次 , 用二氨基联苯胺 (DAB) 底物系统 (DAB 50 mg , PBS 100 ml , 30% H₂O₂ 10 μ l) 显色。

结 果

1 目的基因的扩增与克隆

以本研究设计的引物从云南恶性疟患者全血扩增出一约 1 kb 的单一片段 , 经酶切鉴定该扩增片段成功克隆入 pGEX-3X 表达载体 , 对重组质粒进行测序确定该扩增片段长为 951 bp (末端含一终止密码子) (图 1) , 推导编码 316 个氨基酸残基。经从 GenBank 搜索 , 显示本研究扩增的序列与恶性疟原虫洪都拉斯株 LDH 基因全序列 (进入号 M93720) 完全相同。

1 ATGGCACCAAAAAGCAAAAATCGTTTTAGTTGGCTCAGGTATGATGGAGGAGTAATGGCT 60
 61 ACCTTAATTGTTTCAGAAAAATTTAGGAGATGTAGTTTTGTTCCGATATTGTAAGAACATG 120
 121 CCACATGAAAAAGCTTTAGATACATCTACTAATGTTATGGCATATTCAAATTCGAAA 180
 181 GTAAGTGGTTCAAAACACTTATGACGATTTGGCTGGAGCAGATGTAGTAATAGTAACAGCT 240
 241 GGATTTACCAAGGCCCCAGGAAAAGAGTGACAAAGAATGGAATAGAGATGATTTATTACCA 300
 301 TTAACAACAAGATTATGATTGAAATTTGGTGGTCATATTAAGAAGAATTTGTCCAAATGCT 360
 361 TTTATTATTGTTGTAACAAACCAGTAGATGTTATGTTGACAATTATTACATCAACATTCA 420
 421 GGTGTTCTAAAAACAAGATTATTGGTTTAGTGGTGTATTAGATACATCAAGATTGAAG 480
 481 TATTACATATCTCAGAAAATTAATGTATGCCCAAGAGATGTAATGCACACATTGTAGT 540
 541 GCTCATGAAAATAAAATGGTCTCTTTAAAAAGATACATTACTGTAGTGGTATCCCTTTA 600
 601 CAAGAATTTAATAACAAGTTAATTTCTGATGCTGAATAGAAAGCTATATTGATAGATA 660
 661 ACTGTTAATCTGCAATTAGAAAATGTAACCTTACATGCATCACCATATGTTGCACCAGCT 720
 721 GCTGCTATTATCGAAAATGGCTGAATCCTACTTAAAAGATTTGAAAAAAGTATTAATTTGC 780
 781 TCAACCTTTGTTAGAAGGACAATATGGACACTCCGATATATTCGGTGTACACCTGTTGTT 840
 841 TTAGTGCTAATGTGTGTTGAACAAGTTATCGAATTACAATTAATAGTGAGGAAAAAGCT 900
 901 AAATTTGATGAAGCCATAGCTGAAACTAAGAGAATGAAGGCATTAGCTTAA 951

图 1 中国云南恶性疟原虫乳酸脱氢酶基因序列
 Fig.1 Sequence of lactate dehydrogenase gene of *Plasmodium falciparum* from Yunnan, China

2 重组基因的表达

将含有目的基因片段的 pGEX-3X 重组质粒转化大肠埃希菌 BL-21 细胞,经 IPTG 诱导表达了一表观分子量约为 Mr 59 000 的蛋白,表达蛋白的分子量与预计值相符。

3 单克隆抗体的制备与初步鉴定

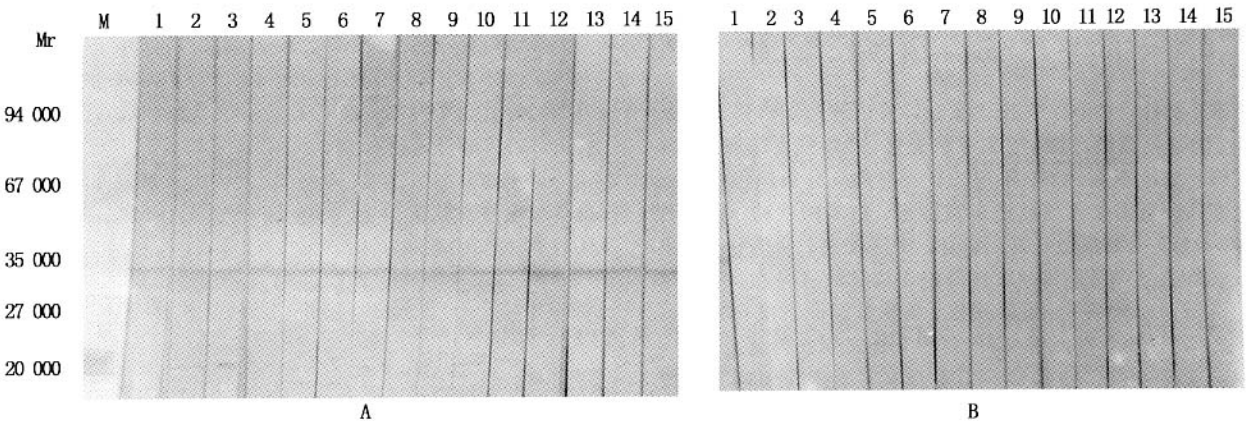
以表达的重组蛋白免疫小鼠,取免疫小鼠的脾细胞与 SP2/0 瘤细胞融合,经筛选获得 15 株高效分泌

针对重组蛋白单克隆抗体的杂交瘤,用杂交瘤培养上清对相应的单克隆抗体的亚类进行了鉴定(表 1),将这些杂交瘤接种小鼠腹腔均获得了含高效价单克隆抗体的腹水(表 1)。

表 1 单克隆抗体特性
 Table 1 Characteristics of monoclonal antibodies

编号 Numbers	单克隆抗体 McAb	ELISA 效价 Titer of ELISA	免疫球蛋白亚类 Subclass of immunoglobulin
1	A7B8	1:51 200	IgG ₂
2	A7F4	1:51 200	IgG ₂
3	B2G10	1:51 200	IgG ₁
4	B7B5	1:51 200	IgG ₂
5	B8A3	1:12 800	IgG ₁
6	B8H8	1:51 200	IgG ₁
7	D6A7	1:51 200	IgG ₁
8	D6C7	1:25 600	IgG ₁
9	D8F2	1:51 200	IgG ₁
10	D8F7	1:51 200	IgG ₁
11	F1C11	1:6 400	IgG ₁
12	F4A5	1:12 800	IgG ₁
13	F4H12	1:6 400	IgG ₁
14	G4C9	1:51 200	IgG ₂
15	H5F6	1:3 200	IgG ₂

用含单克隆抗体的腹水对培养的恶性疟原虫和云南非疟疾发热病人的红细胞组分进行免疫印迹分析。结果显示,所有 15 株单克隆抗体均能唯一识别恶性疟原虫一约 Mr 33 000 的条带,而对 10 份非疟疾发热病人的红细胞组分无交叉反应(图 2)。



A: 表 1 所列 15 株单抗对恶性疟原虫源蛋白, B: 表 1 所列 15 株单抗对非疟疾发热病人红细胞组分。编号同表 1。
 A: 15 cell lines of McAbs listed in table 1 against proteins of cultured *Plasmodium falciparum*, B: 15 cell lines of McAbs listed in table 1 against red blood cell from febrile patients without malaria. Numbers are identical to those listed in table 1.

图 2 单克隆抗体 Western blotting 分析
 Fig.2 Western blotting analysis of monoclonal antibodies

讨 论

疟疾快速诊断,大多采用特异单克隆抗体捕获抗原的方法^[9]。制备并筛选出一特异单克隆抗体是研

制疟疾快速诊断产品的关键。疟原虫乳酸脱氢酶是理想的检测靶分子,制备疟原虫乳酸脱氢酶特异性单克隆抗体当以天然蛋白为免疫源为最理想,但疟原虫

乳酸脱氢酶的分离纯化十分复杂,得量又少^[10]。为此本研究对我国恶性疟原虫乳酸脱氢酶全基因进行了克隆表达,并以重组蛋白免疫小鼠制备单克隆抗体。重组质粒转化大肠埃希菌 BL-21 细胞后,经 IPTG 诱导表达了一表观 Mr 59 000 的蛋白,其分子量与预计值相符(克隆的目的片段预计编码 316 个氨基酸残基,分子量 Mr 33 000,而 pGEX-3X 载体含有编码 Mr 26 000 谷胱甘肽转移酶的基因,表达的重组蛋白是含谷胱甘肽转移酶的融合蛋白,因此融合蛋白推导的分子量约为 Mr 59 000)。Menting 等^[11]用重组恶性疟原虫乳酸脱氢酶融合蛋白免疫,所获多抗血清能识别 Mr 33 000 的恶性疟原虫虫源蛋白,经测序表明多抗血清所识别的蛋白即为恶性疟原虫 LDH 蛋白。在本研究以重组 LDH 制备的单克隆抗体也能唯一识别 Mr 33 000 的恶性疟原虫蛋白,而与发热患者的红细胞组分无交叉反应,说明以重组 LDH 蛋白为免疫源成功制备了能识别疟原虫天然 LDH 的单克隆抗体,为开发鉴别诊断恶性疟原虫的产品奠定了基础。

经序列比较证明从我国恶性疟患者血样扩增的恶性疟原虫乳酸脱氢酶基因序列与恶性疟原虫洪都拉斯株乳酸脱氢酶基因序列完全相同,说明恶性疟原虫乳酸脱氢酶基因在不同地理株间同源性极高,

这为基于疟原虫乳酸脱氢酶所开发的诊断产品适用于不同的现场提供了依据。

参 考 文 献

[1] Vander Jagt DL , Hunsaker LA , Campos NM , et al . D-lactate production in erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum* [J] . Mol Biochem Parasitol , 1990 A2 277-284 .

[2] Sherman IW . Biochemistry of *Plasmodium* (malarial parasites) [J] . Microbiol Rev , 1979 A3 453-495 .

[3] Markler MT , Ries JM , Williams JA , et al . Parasite lactate dehydrogenase as an assay for *Plasmodium falciparum* drug sensitivity [J] . Am J Trop Med Hyg , 1993 A8 739-741 .

[4] Markler MT , Hinrichs DJ . Measurement of the lactate dehydrogenase activity of *Plasmodium falciparum* as an assessment of parasitemia [J] . Am J Trop Med Hyg , 1993 A8 205-210 .

[5] Bzik DJ , Fox BA , Gonyer K . Expression of *Plasmodium falciparum* lactate dehydrogenase in *Escherichia coli* [J] . Mol Biochem Parasitol , 1993 , 59 :155-166 .

[6] John E . Protocols in molecular parasitology [M] . Humana press Inc London , 1993 . 205-211 .

[7] Laemmli UK . Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J] . Nature , 1970 , 77 :680-682 .

[8] Qu JQ , Bao YF . Dot-ELISA using monoclonal antibodies for identification of *Leishmania donovani* [J] . Chin Med J , 1987 , 100 :823-826 .

[9] Moody A . Rapid diagnostic tests for malaria parasites [J] . Clin Microbiol Rev , 2002 , 15 :66-78 .

[10] Gomez MS , Piper RC , Hunsaker L , et al . Substrate and cofactor specificity and selective inhibition of lactate dehydrogenase from the malarial parasite *P. falciparum* [J] . Mol Biochem Parasitol , 1997 , 90 :235-246 .

[11] Menting JG , Tilley L , Deady LW , et al . The antimalarial drug , chloroquine , interacts with lactate dehydrogenase from *Plasmodium falciparum* [J] . Mol Biochem Parasitol , 1997 , 89 :215-224 .

(收稿日期 : 2005-02-24 编辑 : 伯韦)

文章编号 : 1000-742X (2005) 04-0216-01

【病例报告】

夏厕蝇幼虫致人胃蝇蛆病一例

杨增茹,包东武,梁晓燕

中图分类号 : R757.9

文献标识码 : B

患者,女性,49岁,农民,汉族,河南省南阳市卧龙区张庄村人。胃部不适两月余,近来症状加重,持续性胃部胀满、恶心、嗝气、食欲不振。2004年7月9日吐出约几百条黑色活动小虫。遂将部分虫体装入玻璃瓶送本室鉴定。虫体均活动,123条,长6~13mm,呈黑褐色,腹背稍扁,中部较宽,两端窄小。虫体14节,除前1节外,每节背面及侧面均具棘状突起,愈近后端愈长,腹面有短细毛。镜下观察,各腹节腹面表皮有鳞状纹。在第8腹节的后截面中央有1对后气门,长在隆起的杆上。经郑州大学医学院寄生虫学教研室及本室鉴定为厕蝇属夏厕蝇 (*Fannia canicularis* Linnaeus, 1761) 幼虫 (图1)。

我国报道各类蝇蛆病700余例,多数为眼和皮肤蝇蛆病,胃肠蝇蛆病较少^[1]。人若误食含有蝇卵或蝇蛆的食物、水、特别是腐肉或腐烂水果等,幼虫入侵胃肠道生长发育,或在肠腔化蛹后随粪便排出,也可随呕吐物排出^[2]。

已确定肠胃蝇、夏厕蝇、元厕蝇、瘤径厕蝇、褐须亚麻蝇、宗尾别麻蝇、红尾粪麻蝇、肉食麻蝇、厩螯蝇、红头丽蝇、丝光绿蝇与鼓翅蝇等的幼虫均可引起胃肠道蝇蛆病。其中,以夏厕蝇及瘤径厕蝇较为重要^[3]。本例患者卫生习惯差,

水果不洗即吃,喜食猪及羊肝、心、肺等熟食。本次患病可能食入被蝇卵污染的上述食物所致。患者自吐出大量虫体后,胃部不适症状消失,随访两月未见异常。

近年来,小型餐馆、肉食加工点、水果摊遍布城乡。在蝇出没季节应注意饮食卫生,不食腐烂水果,肉食品熟食应充分加热消毒,防止感染。

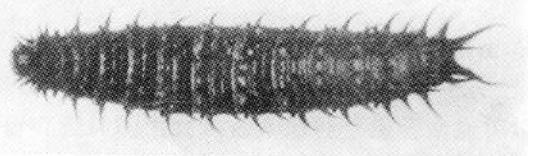


图1 夏厕蝇幼虫

参 考 文 献

[1] 蒋次鹏 . 我国蝇蛆病现况 [J] . 地方病通报 , 1995 , 10 :108-111 .

[2] 赵慰先 , 主编 . 人体寄生虫学 [M] . 第 2 版 . 北京 : 人民卫生出版社 , 1994 . 1208-1209 .

[3] 姚永政 , 许先典 . 实用医学昆虫学 [M] . 北京 : 人民卫生出版社 , 1980 . 251-254 .

(收稿日期 : 2005-01-11 编辑 : 富秀兰)