

文章编号:1000-7423(2001)-02-0080-04

恶性疟原虫乳酸脱氢酶的表达及免疫活性鉴定

吴英松 李明 董文其 李英杰

【摘要】 目的 在大肠杆菌中表达恶性疟原虫乳酸脱氢酶(LDHp)与谷胱甘肽 S 转移酶(GST)融合蛋白,测定重组蛋白的免疫活性。方法 采用 PCR 方法特异性扩增恶性疟原虫(海南株)乳酸脱氢酶基因,经双酶切后克隆入 pGEX-4T-1 表达载体中,重组蛋白纯化后免疫小鼠制备特异性血清,并用琼脂双向扩散法检测效价,ELISA、Western-blotting 检测重组抗原的免疫活性。结果 得到了重组表达的蛋白抗原,表达产物能与兔抗恶性疟原虫血清发生反应,并能诱导小鼠产生特异性体液免疫应答,免疫琼脂扩散法抗体滴度为 1:16。结论 LDHp 在大肠杆菌中获得高效表达且表达产物具有良好的抗原性。

【关键词】 恶性疟原虫; 乳酸脱氢酶; 表达; 免疫活性

中图分类号:R382.312

文献标识码:A

Expression and Immunocompetence Characterization of *Plasmodium falciparum* Lactate Dehydrogenase

WU Ying-song, LI Ming, DONG Wen-qi, LI Ying-jie

(Institute of Tropical Medicine, The First Military Medical University, Guangzhou 510515)

【Abstract】 Objective To express lactate dehydrogenase (LDH) gene of *Plasmodium falciparum* FCCI/HN in the *E. coli* TG1 and analyse its immunocompetence. **Methods** The LDH gene of the *P. falciparum* was specifically amplified by polymerase chain reaction, and the recovered gene fragment was cloned into pGEX-4T-1 vector for expression of fusion protein with glutathione S-transferase(GST). The recombinant plasmid was transformed into the *E. coli* TG1. Four mice (Kunming strain) were immunized with purified expressed protein(antigen) and the polyclonal antibodies were collected. The immunocompetence of recombinant protein was analysed by ELISA and Western-blot. **Results** The LDH gene of *P. falciparum* was successfully expressed in the *E. coli* TG1. The expressed protein exhibited a specific reaction with immune sera obtained from rabbits immunized with *P. falciparum*. The specific humoral responses were induced in mice and the titer of the specific antibody was 1:16 by two-dimensional diffusion assay. **Conclusion** The LDH gene of *P. falciparum* has been successfully expressed in the *E. coli* TG1 and the expressed protein has high antigenicity.

【Key words】 *Plasmodium falciparum*, lactate dehydrogenase, expression, immunocompetence

Supported financially by the Medical Research Fund of PLA. (No. 96L034)

抗原捕获检测法操作简便,结果易于判定,已得到广泛的推广应用^[1]。许多疟疾研究者致力于疟原虫抗原检测的研究,以期找到一种抗原用于临床检测。近年来,人们发现疟原虫乳酸脱氢酶具有独特的生化和免疫化学特性,在疟疾诊断方面显示出重要的应用价值^[2,3]。

乳酸脱氢酶(LDH)是糖酵解途径的末端酶,疟原虫 LDH 在疟原虫的整个红内期均表达。先前的研究已经揭示了疟原虫 LDH 与宿主动物 LDH 在生化、免疫学特性和酶学方面有很大的差异。在催化乳酸生成丙酮酸的反应中,疟原虫 LDH 能够迅速地利用辅酶 I (NAD) 类似物 3'-乙酰吡啶 NAD

(APAD)作为辅酶,而红细胞 LDH(LDHr)在 APAD 存在时参与这一反应速率相对较慢^[4];此外,疟原虫 LDH 具有种、属特异性,因而是检测疟原虫理想的靶抗原^[5,6]。但是直接从恶性疟原虫提取大量的乳酸脱氢酶(LDHp)费时费力,而基因工程技术为获取大量纯度较高的抗原提供了一种有效的方法。为此,我们构建了含 LDHp 基因的重组质粒,在大肠杆菌 TG1 中进行表达,并对重组 LDHp 蛋白的免疫活性进行了研究,为制备 LDHp 单克隆抗体用于疟疾的临床检测创造条件。

材料与方法

1 材料与试剂

1.1 主要试剂 IPTG、丙烯酰胺、亚甲基丙烯酰胺及硝酸纤维素膜购自 Sigma 公司,核酸电泳分子量

基金项目:全军医药卫生科研基金资助项目(No. 96L034)
作者单位:第一军医大学热带医学研究所,广州 510515

标志物购自 Sigma 公司及宝生公司,蛋白质分子量标志物购自上海丽珠东风生物技术有限公司,限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶及 dNTPs 购自 Promega 公司。

1.2 虫株及抗体 红内期恶性疟原虫海南株 FCC1/HN 由本室培养,间日疟原虫采自云南省勐腊县。HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体和 HRP 标记的兔抗鼠 IgG 抗体购自天象人公司;鼠抗恶性疟原虫全虫抗原血清由本实验室制备。

1.3 质粒和菌株 pGEX-4T-1 为 Pharmacia 公司产品,大肠杆菌 TG-1 由本实验室保存。

1.4 寡核苷酸引物 根据恶性疟原虫(Honduras-1 株)LDH 基因序列^[7]设计一对引物,LDH-P₁:5'-CCCTCGAATTCATGGCACCAAAAAGCAAAAATCGT-3', LDH-P₂:5'-CCCTGTCGACTTAAGCTAATGCCTTCAT TCTCT-3',由中国科学院上海生物工程研究中心合成。

2 方法

2.1 恶性疟原虫基因组 DNA 及 pGEX-4T-1 质粒 DNA 的提取 基因组 DNA 的提取按文献[8]报道;质粒的提取按 Qiapre Minprep Kit 说明书进行。

2.2 表达重组质粒的构建 以恶性疟原虫基因组 DNA 为模板 PCR 法扩增目的片段,反应在 50 μl 体系中进行,循环参数为 93℃ 变性 5 min, 93℃ 50 s, 55℃ 45 s, 72℃ 60 s, 共 30 个循环, 72℃ 延伸 5 min。扩增产物用 0.9% 琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 产物用 *EcoRI* + *SalI* 双酶切后,用低熔点琼脂糖电泳回收,与经相应内切酶酶解的 pGEX-4T-1 表达质粒连接,取 30 μl 连接液转化 TG1 感受态细胞,涂于含氨苄的 LB 平板,37℃ 培养过夜。

2.3 阳性克隆的筛选及鉴定

2.3.1 PCR 鉴定 从 Amp-LB 平皿上挑取单个菌落,分别在 Amp-LB 培养基中扩增。取 1 ml 菌液离心,菌体用 0.5 ml ddH₂O 重悬,沸水浴破菌,取 1 μl 进行 PCR。筛选出阳性的重组克隆。

2.3.2 酶切鉴定 取阳性重组克隆,提取质粒 DNA,用 *EcoRI* + *SalI* 双酶切鉴定 pGEX-LDH 重组子,同时设 pGEX-4T-1 质粒作对照。用 0.9% 琼脂糖凝胶电泳检测酶切片段大小。

2.3.3 DNA 序列测定 以重组质粒 DNA 为测序模板,根据 Sanger 双脱氧链终止法的原理,在 ABI-CE1 荧光自动测序仪上进行测序,测序引物为载体 pGEX-4T-1 的测序引物。

2.4 表达产物分析 重组表达质粒接种于 Amp-LB 中培养过夜,按 1% 比例转入新鲜的 Amp-LB 培养基中,37℃ 摇床培养至 OD₅₉₀ 值达 0.7 时,加 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L 进行诱导,继续培养 4 h 收菌。

2.4.1 SDS-PAGE 按文献[9]方法进行,浓缩胶和分离胶浓度分别为 5% 和 10%。

2.4.2 ELISA 诱导菌体经超声波仪破菌后,离心后的沉淀用 8 mol/L 尿素溶解作为抗原,以兔抗恶性疟原虫抗体进行 ELISA。

2.4.3 Western-blotting 按文献[9]方法进行。一抗工作浓度为 1:100,酶标二抗工作浓度为 1:250。

2.5 表达产物的纯化 包涵体经 3 mol/L 尿素多次洗涤,SDS-PAGE 电泳后,切下一小条用考马斯亮蓝染色,与原来的胶条对齐,切下目的胶条,装入透析袋,于水平电泳槽中 50 V 电泳洗脱过夜,次日升至 100 V 电泳 1 h,然后翻转电极电泳 5 min,吸出透析袋内液体,进行蔗糖包埋浓缩,PBS 透析,SDS-PAGE 鉴定。

2.6 多抗的制备及鉴定 将提纯的表达产物与福氏佐剂混合,多次接种昆明种小鼠,用免疫琼脂扩散法检测抗体滴度,当滴度达到 1:8 时,提取血清。用 ELISA、Western-blotting 鉴定多抗与恶性疟原虫、间日疟原虫及红细胞的反应。

结 果

1 表达载体的构建及鉴定

用 LDH_p 基因特异性引物进行 PCR,产物为约 951 bp 的单一片段。PCR 产物经酚-氯仿抽提,乙醇沉淀后用 *EcoRI* + *SalI* 进行双酶切,载体 pGEX-4T-1 经 *EcoRI* + *SalI* 双酶切后回收大片段,将 PCR 扩增后的酶切产物定向连接到载体中,转化大肠杆菌 TG1。从转化平板上挑取单菌落,分别培养后,小量提取质粒分别进行 PCR 及 *EcoRI* + *SalI* 双酶切鉴定,阳性重组克隆能扩增出 951 bp 的目的片段,用 *EcoRI* + *SalI* 双酶切后可产生 4 900 bp 及 951 bp 两条带,而空载体酶切后只有 4 900 bp 的一条带(图 1),表明融合表达载体构建成功。在 ABI-CE1 型自动核酸序列分析仪上测定了 LDH_p 基因的全编码区序列(图 2),长度为 951 bp,GenBank 登录号为 AF323520,BLAST 结果表明,恶性疟原虫海南株 LDH 基因与 Honduras 株 LDH 基因^[7]比较显示,同源性达 99.47%,仅在第 85、133、259、451 和 560 位处分别发生 C-G、C-A、C-G、C-G、G-T 点突变。

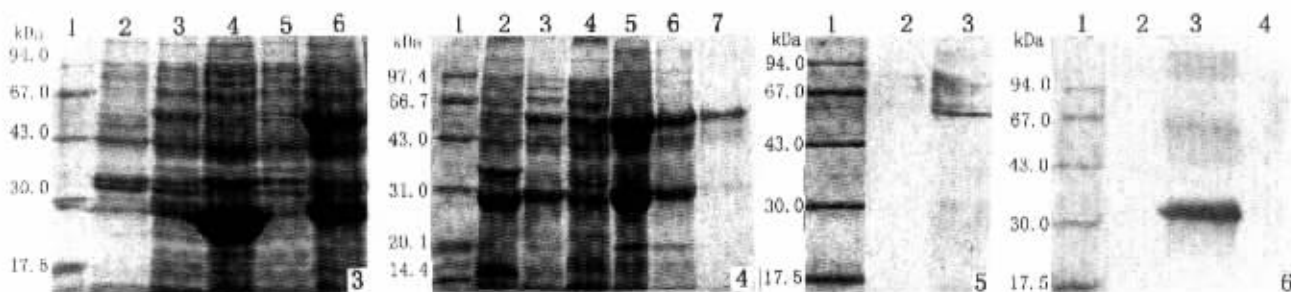


图 3 重组蛋白的 SDS-PAGE 分析 1 标志物 2 TGI 3 未诱导的 pGEX-4T-1/TGI 4 1 mmol/L IPTG 诱导后的 pGEX-4T-1/TGI 5 未诱导的 pGEX-LDH/TGI 6 1 mmol/L IPTG 诱导的 pGEX-LDH/TGI **图 4 包涵体的 SDS-PAGE 分析** 1 标志物 2 pGEX-4T-1/TGI 3 pGEX-LDH/TGI 4 重组菌 pGEX-LDH/TGI 超声后的上清 5 重组菌 pGEX-LDH/TGI 超声后的沉淀 6 经 3 mol/L 尿素洗后的包涵体 7 纯化蛋白 **图 5 重组蛋白的 Western-blot 分析** 1 标志物 2 pGEX-4T-1/TGI 3 pGEX-LDH/TGI **图 6 多抗的 Western-blot 分析** 1 标志物 2 间日疟原虫 3 恶性疟原虫 4 正常人红细胞

Fig.3 SDS-PAGE analysis of the recombinant protein 1 Marker 2 *E. coli* strain TGI 3 pGEX-4T-1/TGI without induction 4 pGEX-4T-1/TGI after induction with 1 mmol/L IPTG 5 pGEX-LDH/TGI without induction 6 pGEX-LDH/TGI after induction with 1 mmol/L IPTG **Fig.4 SDS-PAGE analysis of the inclusion body** 1 Marker 2 pGEX-4T-1/TGI after induction 3 pGEX-LDH/TGI after induction 4 pGEX-LDH/TGI supernatant after sonication 5 pGEX-LDH/TGI precipitate after sonication 6 Inclusion body after washing by 3 mol/L urea 7 Purified protein **Fig.5 Western-blot analysis of recombinant protein** 1 Marker 2 pGEX-4T-1/TGI 3 pGEX-LDH/TGI **Fig.6 Western-blot analysis of polyclonal antibody** 1 Marker 2 *Plasmodium vivax* 3 *Plasmodium falciparum* 4 Normal human red blood cell

用兔抗恶性疟原虫免疫血清对表达产物进行 Western-blotting 分析, 特异性区带出现在 60 kDa 处, 表明该蛋白确实是所要表达的 GST 融合蛋白。我们用纯化的重组融合蛋白免疫小鼠制备多抗, 该多抗能与 33 kDa 的恶性疟原虫、间日疟原虫虫源蛋白起反应, 而在未感染的红细胞中无此反应, 表明重组蛋白具有抗原活性。同样, 用诺氏疟原虫 LDH 制备的抗血清能与诺氏疟原虫不同株(H、P、W1 株)和恶性疟原虫、间日疟原虫、食蟹猴疟原虫、伯氏疟原虫、约氏疟原虫反应, 而与哺乳动物的三种同工酶(鼠肝脏 LDH A4, 鼠心脏 LDH B4 和牛精子 LDH C4)以及其它原虫、蠕虫的 LDH 无交叉反应, 表明抗疟原虫 LDH 抗体具有属特异性^[5]。这一结果为 LDH_p 可以作为疟疾免疫诊断的靶抗原提供了依据。我们可以利用融合蛋白制备种、属特异性单抗, 结合免疫色谱技术进行疟疾的诊断。由于间日疟原虫 LDH 基因至今尚未有报道, 我们可以根据疟原虫 LDH 具有属特异性抗原出发, 构建间日疟原虫 cDNA 表达文库, 筛选出间日疟原虫 LDH 基因, 以利于疟原虫虫种的鉴别诊断。

参 考 文 献

[1] Makler MT, Palmer CJ, Agar AL. A review of practical techniques for the diagnosis of malaria. *Ann Trop Med Parasitol*, 1998, 92:419-433.

[2] Makler MT, Hinrichs DJ. Measurement of the lactate dehydrogenase activity of *Plasmodium falciparum* as an assessment of parasitemia. *Am J Trop Med Hyg*, 1993, 48: 205-210.

[3] Palmer CJ, Lindo JF, Klaskala WL. Evaluation of the Optimal test for rapid diagnosis of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* malaria. *J Clin Microbiol*, 1998, 36:203-206.

[4] Makler MT, Ries JM, Williams JA, et al. Parasite lactate dehydrogenase as an assay for *Plasmodium falciparum* drug sensitivity. *Am J Trop Med Hyg*, 1993, 48: 739-741.

[5] Kaushal DC, Watts R, Haider S, et al. Antibodies to lactate dehydrogenase of *Plasmodium knowlesi* are specific to *Plasmodium* species. *Immun Invest*, 1988, 17: 507-516.

[6] Kaushal DC, Kaushal NA, Kaushal DC. Amino acid sequence of the NH₂-terminus of *Plasmodium knowlesi* lactate dehydrogenase. *Mol Biochem Parasitol*, 1993, 59:167-170.

[7] Baik TJ, Fox BA, Gonyer K. Expression of *Plasmodium falciparum* lactate dehydrogenase in *Escherichia coli*. *Mol Biochem Parasitol*, 1993, 59:155-166.

[8] Luo SH, Yu XB, Li XR, et al. Amplification of the genes coding for the transmission blocking target antigen pfs25 and pfs48/45 of *Plasmodium falciparum*. *Chin J Zoonoses*, 1998, 14:3-6.

[9] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, et al. *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, New York, 1989: 880-898.

(收稿日期: 2000-10-20 编辑: 庄兆农)