

文章编号:1000-7423(2004)-02-0094-04

## 恶性疟原虫谷氨酸脱氢酶在大肠埃希菌中的可溶性表达、纯化和鉴定

李妍 宁云山 董文其 李明

**【摘要】** 目的 在大肠埃希菌(*E. coli*)中尝试非融合蛋白技术可溶性表达恶性疟原虫谷氨酸脱氢酶(GDH),以获得具有相对完整空间表位的重组非融合 GDH。方法 将恶性疟原虫 GDH 基因克隆到 pET-23(a)表达载体中,转化 *E. coli* BL21 菌株,异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷诱导表达,菌体反复冻融后,通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析表达产物的存在形式,可溶性表达产物经 Source-Q 及 Source-S 层析纯化并用 SDS-PAGE 分析纯度。通过蛋白质印迹试验鉴定表达和纯化产物的免疫学活性。结果 可溶性重组 GDH 分子占宿主蛋白 15% 左右,相对分子质量为 52 000。经过阴离子和阳离子交换层析纯化后,GDH 纯度达 90% 以上。该蛋白质具有良好的抗原性。结论 通过 *E. coli* 表达系统和柱层析分离技术可获得高纯度、具有相对完整空间表位的重组 GDH 分子。

**【关键词】** 恶性疟原虫;谷氨酸脱氢酶;基因表达;蛋白质印迹试验

中图分类号:R383.312

文献标识码:A

### Soluble Expression of *Plasmodium falciparum* Glutamate Dehydrogenase in *Escherichia coli*, and its Purification and Identification

LI Yan, NING Yun-shan, DONG Wen-qi, LI Ming

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

**【Abstract】 Objective** To make soluble expression of *Plasmodium falciparum* (FCC1/HN) glutamate dehydrogenase (GDH) in *Escherichia coli*, purification and immunocompetence identification of the recombinant non-fusion GDH. **Methods** The GDH gene was cloned into prokaryotic expression vector pET23(a) to form recombinant expression vector pET23(a)/GDH. pET23(a)/GDH was transformed into *E. coli* BL21(DE3). Induced by IPTG(isopropyl-beta D-thiogalactoside), GDH was highly expressed in the supernatant after sonication. The soluble recombinant GDH was purified by Source-Q and Source-S chromatography. Enzyme-linked immunosorbent assay and Western blotting were carried out to identify the immunocompetence of the purified product. **Results** SDS-PAGE analysis showed that the soluble GDH protein accounted for approximately 15% of the total bacterial protein. By two-step ion-exchange chromatography, the purity of GDH reached more than 90% and the GDH possessed high antigenicity. **Conclusion** The soluble expression of GDH results in an integral three-dimensional structure epitope with high biological activity.

**【Key words】** *Plasmodium falciparum*; glutamate dehydrogenase; gene expression; Western blotting

Supported by the Science and Technology Project of Guangzhou City (2002E3-E4012)

谷氨酸脱氢酶(GDH)是恶性疟原虫能量代谢十分重要的功能分子,在疟原虫红内期各发育阶段均能表达,已知宿主红细胞内无此酶<sup>[1]</sup>。序列分析结果表明,恶性疟原虫海南株(FCC1/HN)GDH同泰国(Thailand)株GDH同源性高达99%,但与其他生物、特别是人的GDH同源性较低。从进化角度看,恶性疟原虫GDH同间日疟原虫的GDH可能存在非常高的同源性,该酶可能有望成为对恶性疟和间日疟快速诊断抗原的新型候选分子。虽然利用大肠埃希菌(*E. coli*)生产蛋白抗原比较经济,但是重组蛋白在*E. coli*高效表达的同时常常形成包涵体,这对抗原分子的天然结构和抗原活性造成很大的破坏。采用融合蛋白表达技术可提高目标蛋白的可溶性程度,但在进行单克隆抗体

制备时将大大增加杂交瘤细胞筛选的工作量。本研究尝试非融合蛋白技术可溶性表达重组GDH分子,为制备高质量的单克隆抗体奠定基础。

### 材料与方法

#### 1 材料

*E. coli*BL21(DE2)/pGEX-4T-1/GDH由本室自行构建并保存<sup>[2]</sup>,*E. coli*BL21(DE3)和DH5 $\alpha$ 由本室保存,表达载体质粒系宁云山博士馈赠,限制性内切酶、工具酶为大连TaKaRa公司产品,异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)为美国Sigma公司产品。红内期恶性疟原虫海南株由本室培养。

#### 2 方法

2.1 质粒pGEX-4T-1/GDH和pET23(a)的小量快速制备 按文献[3]进行。

基金项目:广州市科技计划项目(2002E3-E4012)

作者单位:第一军医大学热带医学研究所,广州 510515

2.2 感受态细胞的制备和酶切、回收、连接、转化、筛选 按文献[3]和酶产品说明书进行。

2.3 pGDH 重组表达质粒的构建 pGEX-4T-1/GDH 质粒经过 *Sal*I 和 *Eco*RI 酶切,回收大约 1 400 bp 片段。pET-23(a) 质粒同样经 *Sal*I 和 *Eco*RI 酶切,回收大约 3 600 bp 片段。两片段进行连接,转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态,在含有氨苄青霉素(Amp)的培养平板上挑选菌落进行筛选、酶切鉴定和 PCR 鉴定,获得 pET-23(a)/GDH 重组质粒。

2.4 发酵 将 pET-23(a)/GDH 质粒转化至 *E. coli* BL21(DE3),挑取单菌落接种于 LB 液体培养基(含氨苄青霉素 100  $\mu$ g/ml),25  $^{\circ}$ C 摇床培养过夜。次日,以 1% 扩大培养于发酵罐中,25  $^{\circ}$ C,当  $A_{600} = 1.0$  时,加入 IPTG 至终浓度 0.5 mmol/L,继续诱导培养 6 h 后,10 000 g 离心 10 min,收集菌体。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析。

2.5 破菌 菌体经过反复冻融后(含 1 mg/g 溶菌酶),用 50 mmol/L Tris-HCl,1 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA)洗涤,冰浴超声破菌,离心后分别收集上清和沉淀,SDS-PAGE 分析。

2.6 纯化

2.6.1 Source-Q 柱层析纯化 Source-Q 层析柱(1.0 cm  $\times$  10 cm),用 20 mmol/L Tris-HCl,1 mmol/L EDTA, pH 8.0 平衡,将超声处理、离心过滤后的上清液以 2 ml/min 上样,用平衡液洗去未结合的蛋白,再分别用 0.25、0.5 及 1 mol/L NaCl 缓冲液分段洗脱,收集各蛋白峰进行 SDS-PAGE 分析。

2.6.2 Source-S 柱层析纯化 Source-S 层析柱(1.6 cm  $\times$  20 cm),用 20 mmol/L NaAc/HAc, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0 平衡液平衡。将 Source-Q 洗脱的 GDH 目标蛋白峰按 1:10 稀释平衡缓冲液后上样,再用同样平衡液洗平基线。用含 0.25、0.5 及 1 mol/L NaCl 平衡液分段洗脱,收集各蛋白峰作 SDS-PAGE 分析。

2.7 免疫活性测定

2.7.1 抗血清制备 BALB/c 小鼠购自本校实验动物中心,雌性,10 周龄。免疫方法:首次用弗氏完全佐剂与纯化的 GDH 抗原乳化皮下多点注射,50  $\mu$ g/只,共 5 只,第 3 周后以弗氏不完全佐剂与抗原乳化后腹腔注射进行第 2 次免疫,50  $\mu$ g/只,然后每隔 2~3 wk 以弗氏不完全佐剂与抗原乳化后腹腔注射加强免疫两次,尾静脉采血测定抗体效价,抗血清效价达到 1:8 000 后眼眶采血,离心收集抗血清。

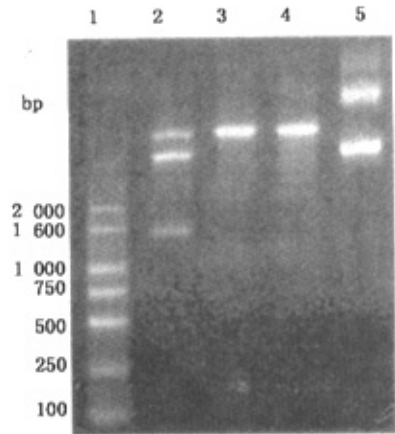
2.7.2 蛋白质印迹试验(Western blotting) 将已纯化的 GDH 和培养浓缩后的疟原虫培养液上清进行 SDS-PAGE,结束后转移至硝酸纤维素膜并用 5% 脱脂奶粉/

磷酸缓冲盐溶液(PBS)封闭,4  $^{\circ}$ C 过夜,用洗膜液[0.1% Tween-20/PBS]洗膜 3 次,每次 5 min,加入抗 GDH 蛋白免疫小鼠血清(1:200 稀释),并用正常鼠血清作对照,37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h,洗膜 3 次,每次 5 min,加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗小鼠 IgG(IgG-HRP)(1:1 000),37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h,洗膜 3 次,每次 5 min,加入二氨基联苯胺(DAB)显色,至反应带出现后终止,拍照。

## 结 果

### 1 重组表达质粒的构建与鉴定

重组 pET23(a)/GDH 质粒转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 抽提转化子 DNA 进行双酶切鉴定,结果重组子切出约 1 400 bp 和 3 600 bp 片段,证实重组成功(图 1)。



1 DNA 标志物(DL2000) 2 *Eco*RI + *Sal*I 酶切 3 *Eco*RI 酶切 4 *Sal*I 酶切 5 重组 pET23(a)-GDH 质粒

1 DNA marker(DL2000) 2 *Eco*RI + *Sal*I digestion 3 *Eco*RI digestion 4 *Sal*I digestion 5 Recombinant pET23(a)-GDH plasmid

图 1 重组质粒 pET23(a)-GDH 的酶切鉴定

Fig. 1 Identification of pET23(a)-GDH recombinant plasmid by restriction enzyme digestion

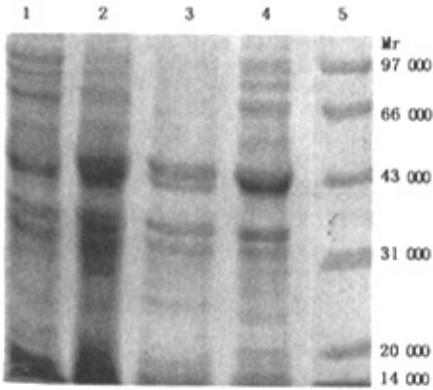
### 2 重组质粒在 *E. coli* 中的表达

工程菌发酵后收获量为 6.2 g/L,经 SDS-PAGE 光密度扫描,GDH 重组蛋白表达量为 20%,蛋白质相对分子质量(Mr)约为 52 000,诱导表达的菌体超声破菌后分别取上清和沉淀电泳。结果重组蛋白主要存在于上清中,并以可溶性形式表达(图 2)。

### 3 纯化

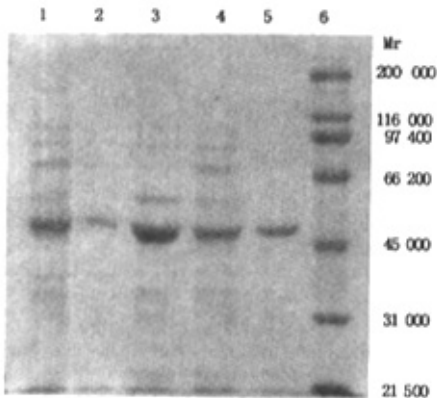
破菌后上清进行 Source-Q 柱层析,分段洗脱后收集 3 个蛋白峰,经 SDS-PAGE 分析,GDH 目标蛋白主要分布在 II 峰,纯度仅为 65%,将此蛋白峰经 Source-S

柱层析进一步纯化, GDH 主要存在于 0.25 mol/L NaCl 洗脱峰中, SDS-PAGE 分析表明 GDH 的纯度 >90%, 纯化全过程总回收率为 31% (图 3)。



1 诱导前 GDH 2 诱导后 GDH 3 破菌后沉淀 4 破菌后上清 5 蛋白质标志物  
 1 GDH before induction 2 GDH after induction 3 Ultrasonic precipitate 4 Ultrasonic supernatant 5 Protein marker

图 2 GDH 在大肠埃希菌中的表达  
 Fig. 2 Expression of GDH in *E. coli*

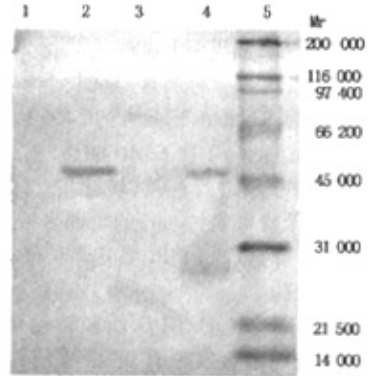


1 表达产物 2 Source-Q I 峰 3 Source-Q II 峰 4 Source-Q III 峰 5 目标蛋白峰 6 蛋白质标志物  
 1 Expression product 2 Source-Q I peak 3 Source-Q II peak 4 Source-Q III peak 5 Target protein peak 6 Protein marker

图 3 纯化的 GDH 的 SDS-PAGE 分析  
 Fig. 3 SDS-PAGE analysis of purified GDH

#### 4 蛋白质印迹试验

经纯化的 GDH 重组蛋白与免疫小鼠血清在 Mr 52 000 处有明显的反应条带, 同时培养的疟原虫上清在同一位置也见明显的反应条带, 而正常小鼠血清则无 (图 4)。



1 正常小鼠血清与纯化的 GDH 反应 2 抗 GDH 小鼠血清与纯化的 GDH 反应 3 正常小鼠血清与培养的恶性疟原虫上清反应 4 抗 GDH 小鼠血清与培养的恶性疟原虫上清反应 5 生物素标记的蛋白质标志物

1 Normal mouse serum reacting with purified GDH 2 Anti-GDH mouse serum reacting with purified GDH 3 Normal mouse serum reacting with cultured *P. falciparum* supernatant 4 Anti-GDH mouse serum reacting with cultured *P. falciparum* supernatant 5 Protein marker

图 4 纯化的 GDH 的 Western blotting 分析  
 Fig. 4 Identification of purified GDH by Western blotting

### 讨 论

本项研究的最终目标是制备同时对恶性疟原虫和间日疟原虫具有高亲和力、高特异性的单克隆抗体, 建立以单克隆抗体为基础的新型疟疾诊断技术, 为此, 制备具有完整空间表位的重组 GDH 抗原分子是本研究首要解决的问题。

许多外源基因均可在大肠埃希菌中获得高效表达, 但表达产物常常以非可溶性、无空间构象的包涵体形式存在, 包涵体的表达产物通过相对简单的纯化工艺, 其纯度虽可达到 80% 以上, 但其变性/复性过程费时、效率低, 大部分表达产物最终只形成无活性的聚集体。虽然通过种种尝试可获得一定量、一定纯度的目标蛋白, 但该蛋白中存在一定量的空间构象不能完全恢复到其天然构象和可溶性的聚集体<sup>[4,5]</sup>, 它将影响相应单克隆抗体与其天然抗原的结合能力。目前, 提高重组蛋白可溶性表达主要通过: ① 采用融合蛋白技术, 如目标蛋白的 N 端融合谷胱甘肽 S-转移酶 (GST) 或硫氧还蛋白 (Trx); ② 降低诱导温度, 改变细菌生长环境等; ③ 尝试不同的表达载体。然而, 对于制备单克隆抗体, 融合蛋白的存在 (尤其是目标蛋白 N 端融合 Mr 较大的融合蛋白) 将大大增加后续单克隆抗体的筛选程序 (例如, 作者在研究中发现一次细胞融合将有 90% 以上的阳性克隆是针对融合蛋白)。因此, 在本研究中采用 N 端只融合 8 个肽的 pET23a 质粒作为表达载体, 同时为增加表达产物的可

溶性程度,将培养和诱导温度调整为 25 ℃,结果表明可溶性 GDH 的比例较 30 ℃ 时提高 5%~10%。在粗提过程中,为了减少宿主蛋白给后续纯化造成的不便,将表达产物在溶菌酶作用后反复冻融,使细胞碎片、可溶性目标蛋白及包涵体可通过离心方法得到粗分离,最终使目标蛋白的纯度提高到 40% 左右;在精细纯化过程中,作者采用先阴离子交换、后阳离子交换的纯化方法,GDH 理论预测等电点约为 5,而宿主蛋白的等电点多为 6~9。因此,在 pH 8.0 进行纯化,使大量宿主蛋白不能结合阴离子介质或结合不强,通过此法,目标蛋白纯度提高到 60%,随后于 pH 4.0 条件下进行纯化,宿主蛋白与阴离子介质结合较强,而目标蛋白结合较弱,这样通过不同盐离子浓度控制目标蛋白和宿主蛋白从层析介质解离的强弱,使目标蛋白纯度达到 90% 以上。为了确定已纯化的 GDH 具有良好的免疫

活性,将已纯化的 GDH 作为抗原制备了抗血清,该抗血清既能与重组的 GDH 分子反应,也能同天然的恶性疟原虫反应。本研究获得了纯度高、可溶性的重组 GDH 分子,为下一步获得同时能针对恶性疟原虫/间日疟原虫的单克隆抗体奠定了基础。

### 参 考 文 献

- [1] Krauth-Siegel RL, Muller JG, Lottspeich F, et al. Glutathione reductase and glutamate dehydrogenase of *Plasmodium falciparum*, the causative agent of tropical malaria[J]. Eur J Biochem, 1996,235:345-350.
- [2] 李林海,李明,吴英松,等. 恶性疟原虫谷氨酸脱氢酶的表达及免疫活性鉴定[J]. 第一军医大学学报,2002,22:883-887.
- [3] J 萨姆布鲁克, DW 拉塞尔著. 分子克隆实验指南[M]. 第 3 版. 黄培堂等译. 北京:科学出版社,2002.27-28, 96-99.
- [4] 李妍,宁云山,郝文波,等. 恶性疟原虫谷氨酸脱氢酶融合蛋白复性及纯化的研究[J]. 第一军医大学学报,2003,23:1273-1276.
- [5] 宁云山,李妍,王小牛. 包含体蛋白质的复性研究进展[J]. 生物技术通讯,2001,12:237-240.

(收稿日期:2003-09-18 编辑:富秀兰)

文章编号:1000-7423(2004)02-0097-01

## 【简报】

### 孝昌县四个试点村近九年疟疾发病及防治简况

钟玉叶

中图分类号:R531.3

文献标识码:B

湖北省孝昌县自 1995 年疟疾(间日疟)发病率逐年上升,1997~1998 年则形成点状暴发,发病率高居全省首位。为了控制疫情,湖北省疾病预防控制中心把本县定为重点疟防县,4 个村(各自分散村)为试点村进行疟疾综合防治,至 2003 年 4 村的疟疾发病率均降为 0。现将 1995~2003 年该 4 村疟疾发病及其防治简况报告如下。

#### 1 疟疾发病和分布

1995~2003 年 4 个试点村疟疾发病率均未超过 10%,但各年间存在较大幅度波动。发病最高的 1998 年 236 例,最低为 2003 年 0 例(表 1)。与上一年比较,1997 年上升幅度最大,为 464.1%;2000 年下降幅度最大,为 88.6%。9 年中 4 个村共发生疟疾 713 例,各月均有分布,5~9 月 582 例,占总病例的 81.6%。

病例主要集中在卫店镇的两个村,占总病例数的 71.1%,

其中团山村(1998 年暴发村)304 例,占 42.6%;1995 年首发病例的清泉村 203 例,占 28.4%。

#### 2 防治情况

9 年间 4 个试点村共血检 2 081 人次(占总人口的 36.2%),检出阳性 395 例,阳性率 19.0%。此外,对 2 971 流动人口登记造册,发放预防药物,宣传防护措施,对回归人员及时血检,规范治疗。凡血检和临床明确诊断的疟疾现症病人均采用氯、伯八天疗法。在流行季节前对有疟史者亦采用氯、伯八天疗法。9 年间 4 个试点村全程足量治疗现症病人 713 例,对有疟史者治疗 1 264 人,全民服药治疗 1 896 人。在疟疾流行季节,对疫点周围及其他受威胁人群采用氯、伯四天疗法,集体预防服药 3 568 人。对发生疟疾病例的疫点,进行室内外灭蚊,同时宣传防病、治病知识。

表 1 孝昌县 4 个试点村 1995~2003 年疟疾病例分布表

村名	总人口数	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	合计
桥店村	1328	0	0	23	29	13	6	4	2	0	77
红星村	1558	2	29	31	39	18	8	1	1	0	129
团山村	1085	0	8	87	107	97	4	1	0	0	304
清泉村	1782	1	2	79	61	57	3	0	0	0	203
合计	5753	3	39	220	236	185	21	6	3	0	713

(收稿日期:2003-12-29 编辑:庄兆安)