

# 恶性疟原虫 TRAP/CSP 融合抗原的构建及表达

杜景伶 潘卫庆 钱锋 谢超

**【摘要】** 目的 构建恶性疟原虫红前期融合蛋白 4 (PfCP-4)。方法 通过甘氨酸-脯氨酸-甘氨酸 (GPG) 接点将恶性疟原虫 3D7 株血凝素相关匿名蛋白 (TRAP) 膜外区序列(氨基酸 26~330)和环孢子蛋白 (CSP) 19 个 4 肽重复区及其羧基末端序列(氨基酸 199~383)连接,采用不对称 PCR 法人工合成 1 577 bp PfCP-4 基因。将 PfCP-4 基因克隆在 pQE 表达质粒上,转化大肠杆菌 SG13009 后进行诱导表达,用抗 CSP 的免疫血清进行免疫印迹检测。结果 免疫印迹检测显示在 57 kDa 处出现特异的表达条带,其大小与推算的 PfCP-4 分子量一致,表明 PfCP-4 合成基因能在大肠杆菌中表达分子量为 57 kDa 的 PfCP-4 重组蛋白。结论 成功构建了 PfCP-4。

**【关键词】** 恶性疟原虫, 融合蛋白, 环孢子蛋白, 血凝素相关匿名蛋白, 基因表达

中图分类号:R382.312

文献标识码:A

## Construction and Expression of a TRAP/CSP Chimeric Protein of *Plasmodium falciparum*

DU Jing-ling, PAN Wei-qing, QIAN Feng, XIE Chao

(Department of Etiological Biology, Second Military Medical University, Shanghai 200433)

**【Abstract】 Objective** To construct a chimeric protein of *Plasmodium falciparum* pre-erythrocyte stage (named as PfCP-4). **Methods** Thrombospondin-related anonymous protein (TRAP) and circumsporozoite protein (CSP) of *Plasmodium falciparum* have been considered important candidates for pre-erythrocytic malaria vaccine. The sequences of ectodomain of TRAP (aa: 26 - 330) and (NANP)<sub>19</sub> repeat region and entire carboxy terminus of CSP were fused to generate the PfCP-4 via a hinge consisting of Gly-Pro-Gly. The 1577 bp sequence of PfCP-4 was synthesized by asymmetric PCR-based method and the synthetic gene was inserted into pQE. The resulting plasmid was transformed into *E. coli* SG13009 for inducible expression with IPTG. The expression product was detected by Western blotting. **Results** The result of Western blotting showed that the entire PfCP-4 recombinant protein was produced under IPTG induction whereas no product was detected in the cell without induction. The molecule weight of the protein was 57 kDa which was identical to the expected size, and the product was recognized by polyclonal antibodies against CSP protein. **Conclusion** A chimeric protein of *Plasmodium falciparum* pre-erythrocyte stage (named as PfCP-4) was constructed successfully.

**【Key words】** *Plasmodium falciparum*, chimeric protein, CSP, TRAP, gene expression

Supported by the National 863 Bio-Tech Program (102-07-04-04)

疟疾是严重危害人类健康的一种传染性疾病。由于疟原虫抗药性和蚊媒对杀虫剂耐药性的产生和蔓延,寻求一种安全有效的疟疾疫苗已越来越受到人们的重视。血凝素相关匿名蛋白<sup>[1]</sup> (thrombospondin related anonymous protein, TRAP) 和环孢子蛋白<sup>[2]</sup> (circumsporozoite protein, CSP) 是两个重要的红前期疟疾疫苗候选抗原<sup>2,3</sup>。这两个蛋白主要参与疟原孢子识别和入侵肝细胞的过程。用射线减毒的恶性疟原孢子孢子免疫志愿者,可诱导产生完全的保护性免疫,其诱发免疫反应的一个显著特征是产生针对 CSP 的抗体,同时产生 TRAP 特异的 CD8<sup>+</sup> CTL<sup>[4,5]</sup>。本研究选取恶性疟原虫 3D7 株 TRAP 膜外区序列(氨基酸 26~330)和 CSP 19 个 4 肽重复区及其羧基末端序列(氨基酸 199~383),将这两个片段通过甘氨酸-

脯氨酸-甘氨酸(GPG)接点连接,构成恶性疟原虫红前期融合蛋白 4(PfCP-4)氨基酸序列。采用毕氏酵母偏嗜密码子,全合成长度为 1 577 bp 的 PfCP-4 基因,该合成基因能稳定地存在于大肠杆菌中,并表达分子量为 57 kDa 的 PfCP-4 重组蛋白。

### 材料与方法

#### 1 菌株

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5a 菌株及 SG13009 菌株均为本实验室保存,dNTPs 购自华美生物工程公司,Taq DNA 聚合酶为 Boehringer 公司产品,限制性内切酶为 Biolabs 公司产品,寡核苷酸链由上海生工生物工程公司合成。

#### 2 基因合成

长度为 1 577 bp 的 PfCP-4 基因分为 2 个片段进行合成,然后连接,每个片段使用 8 条寡核苷酸链进行

合成, 每条寡核苷酸链的长度为 100~130 bp。合成采用不对称 PCR 方法<sup>[6]</sup>, 8 条寡核苷酸链经 30 个 PCR 循环产生约 800 bp 的 DNA 片段, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳分离目的片段。分离的片段用适当的内切酶酶切后, 克隆在经同样酶切的 pBKS 质粒上, 转化 DH5 $\alpha$  菌株, 提取转化子的质粒, 经酶切鉴定后送上海基康公司测序。

### 3 基因表达

用氯化钙法将含有 PfCP-4 合成基因的重组表达质粒转入大肠杆菌 SG13009, 转化子用氨基青霉素和卡那霉素筛选。为检测 PfCP-4 基因的表达, 转化菌过夜培养, 经 1:100 稀释后再培养 2~3 h (OD<sub>600</sub> 约 0.7), 在表达组中加入 IPTG 至终浓度为 2 mmol/L, 诱导 4 h。收集各菌液进行 SDS-PAGE 分离, 再转移至硝酸纤维膜上进行免疫印迹反应, 第一抗体为抗 CSP 多抗兔血清, 第二抗体为碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG, 均为 1:500 稀释, 用 BCIP/NBT 显色。

## 结 果

### 1 恶性疟原虫融合抗原 PfCP-4 基因的设计和合成

1.1 PfCP-4 基因的设计 恶性疟原虫 3D7 株 TRAP 氨基酸第 26~330 位片段与 CSP 氨基酸第 199~383 位片段通过接点序列 GPG 连接, 构成融合的 PfCP-4 氨基酸序列 (图 1)。选取毕氏酵母密码子从 PfCP-4

氨基酸序列推出其 DNA 序列, 构成 PfCP-4 基因, 在基因的 5' 端和 3' 端分别加上起始和终止密码子, 由此构成的 PfCP-4 基因全长为 1 577 bp。考虑到一次合成长基因的实际困难, 先合成两个基因片段, 分别定名为 PfCP-4a 和 PfCP-4b, 再将两个片段连接成全长的 PfCP-4 基因。为使合成基因能在异源系统中产生全长蛋白, 采用计算机软件分析, 排除不利于基因转录和翻译的序列, 如内含子剪接序列、转录终止序列等, 为便于基因的拼接和克隆, 在基因内部及两端设计有多个单一酶切位点。

1.2 PfCP-4a 的合成 用不对称 PCR 方法合成 PfCP-4a 片段, 插入 pBKS 质粒, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 转化子的质粒用 *Pst*I 和 *Bam*HI 酶切鉴定。将鉴定为有插入的 6 个克隆的重组质粒进行 DNA 测序, 结果显示各重组质粒的插入片段在不同位置有碱基替换和缺失, 包括多个相邻碱基一起缺失。考虑到测序更多克隆也无法鉴定到序列完全正确的重组质粒, 我们选取了其中 3 个克隆的重组质粒, 通过酶切位点 *Hae*III 和 *Bst*E II 将正确的插入部分连接成全长的 PfCP-4a 片段 (图 2A)。拼接序列测序后发现, 其 5' 端仍有一碱基缺失, 对此重新设计一条引物, 进行 PCR 定点突变, 以纠正该碱基缺失, 经再次测序证实 PfCP-4a 基因片段序列正确。

1.3 PfCP-4b 的合成 将合成的 PfCP-4b 片段插入到 pBKS 质粒并转化到大肠杆菌, 转化子的质粒用 *Pst*I 和 *Cla*I 酶切鉴定。将鉴定为有插入的 6 个克隆的重组质粒进行 DNA 测序, 结果显示各重组质粒的插入片段在不同位置有碱基替换和缺失, 尤其是在 4 肽重复区, 碱基替换和缺失更为严重, 包括大段的碱基缺失 (图 2B)。从已经测序的各重组质粒中切取序列正确的插入片段区域, 即: 利用 *Pst*I 和 *Bsu*361 切点从 3 号克隆的重组质粒中切取 120 bp 片段, 从 4 号克隆的重组质粒中利用 *Sty*I 和 *Mva*I 切取 219 bp 片段, 从 5 号克隆的重组质粒中利用 *Mva*I 和 *Cla*I 切取 139 bp 片段。但由于 *Mva*I 在 PfCP-4b 片段不是单一的酶切位点, 需先将 4、5 号两个克隆分别用 *Sty*I 和 *Cla*I 酶切回收后, 再用 *Mva*I 单酶切, 回收相应片段。核苷酸第 121~431 位间区域 (即 *Bsu*361/*Sty*I 片段) 为 CSP 4 肽重复区, 该区域碱基错误率很高, 没有序列正确的重组质粒, 且无合适的酶切位点用于拼接。对此重新合成了 4 条寡核苷酸链 T17~T20, 以合成 *Bsu*361/*Sty*I 片段, 在该片段 5' 端增设了 *Xho*I 位点, 3' 端为 *Sty*I 位点。将该片段插入 pF4 质粒 (改建的 pBKS 质粒) 的 *Xho*I 和 *Sty*I 位点, 选取序列正确的重组质粒, 经 *Bsu*361 和 *Sty*I 双酶切后回收该片段。上述所切取或

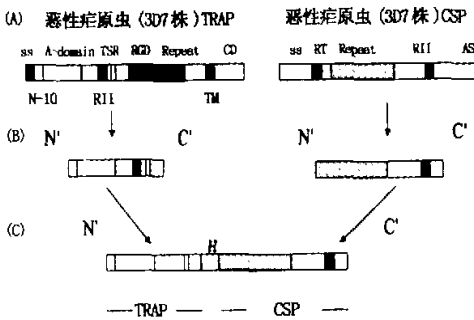
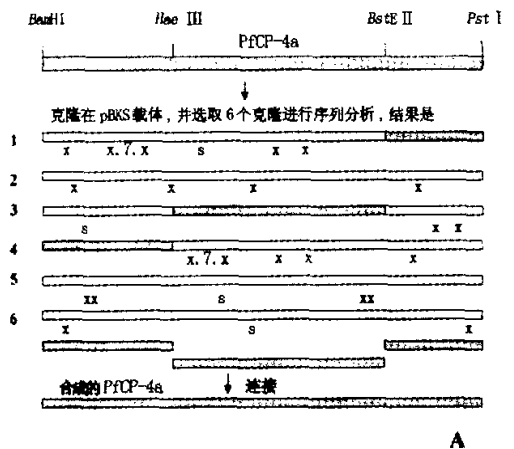


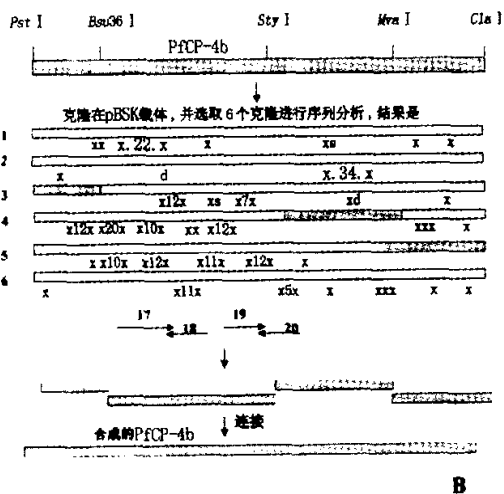
图 1 恶性疟原虫融合蛋白 PfCP-4 的设计 (A) 恶性疟原虫 TRAP 和 CSP 蛋白的结构模式图 ss 信号序列 TSR 血小板反应蛋白相关模体 RGD 三肽模体 TM 跨膜区 CD 胞内区 AS 锚序列 (B) 用于构建 PfCP-4 的 TRAP 和 CSP 相关区域 (C) PfCP-4 的结构模式图 H GPG 铰链

Fig. 1 Design of *Plasmodium falciparum* chimeric protein PfCP-4 (A) Schematic representation of the structural features of the TRAP and CSP ss signal sequence TSR thrombospondin-related motif RGD tripeptide motif TM transmembrane domain CD cytoplasmic domain AS anchor sequence (B) Regions selected for construction of PfCP-4 (C) Schematic representation of the structural features of the PfCP-4 H GPG hinge

重新合成的 4 个片段按图 4 连接,产生完整的 PfCP-4b 片段。



A



B

图 2 PfCP-4a(A)和 PfCP-4b(B)合成中错误碱基的纠正 x 碱基缺失 s 碱基替代 d 碱基插入

Fig. 2 Correction of errors in synthesis of PfCP-4a (A) and PfCP-4b (B) x Base deletion s Base substitution d Base insertion

1.4 PfCP-4 的合成 序列正确的 PfCP-4a 和 PfCP-4b 基因片段分别酶切回收后,与经相应酶切的 pBKS 质粒连接,转化大肠杆菌,转化子的重组质粒经酶切后进行琼脂糖凝胶电泳,结果见图 3,切出的 1.6 kb、

795 bp 和 788 bp 的条带分别是 PfCP-4、PfCP-4a 和 PfCP-4b。将鉴定有全长 PfCP-4 插入的重组质粒进行序列测定,结果显示 PfCP-4 序列完全正确。含插入有 PfCP-4 重组质粒的菌株,经多次接种培养,再提取质粒进行测序,未发现 PfCP-4 有任何突变和缺失,表明该合成基因能在大肠杆菌中稳定存在。

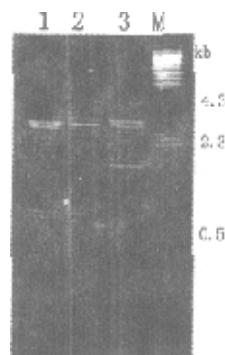


图 3 合成基因的酶切鉴定 M 分子量标志物 1 质粒 pBKS/PfCP-4a BamHI 和 PstI 双酶切 2 质粒 pBKS/PfCP-4b PstI 和 ClaI 双酶切 3 质粒 pBKS/PfCP-4 BamHI 和 ClaI 双酶切

Fig. 3 Restriction enzyme analysis of synthetic gene M Marker Lane 1 pBKS/PfCP-4a digested with BamHI and PstI Lane 2 pBKS/PfCP-4b digested with PstI and ClaI Lane 3 pBKS/PfCP-4 digested with BamHI and ClaI

## 2 PfCP-4 基因的表达

为检测全合成 PfCP-4 基因能否进行有效表达,先在大肠杆菌系统中进行该基因的诱导表达。将 PfCP-4 用 BamHI 和 ClaI 从 pBKS 重组质粒中切出,亚克隆到表达质粒 pQE 上,构建成重组质粒 pQE/PfCP-4。图 4 为重组质粒 BamHI 和 ClaI 双酶切的琼脂糖凝

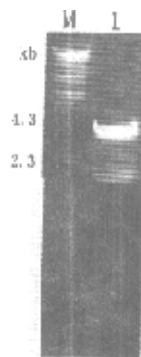


图 4 pQE/PfCP-4 表达质粒的酶切鉴定 M 分子量标志物 1 质粒 pQE/PfCP-4 BamHI 和 ClaI 双酶切

Fig. 4 Restriction enzyme analysis of pQE/PfCP-4 M Marker Lane 1 pQE/PfCP-4 digested with BamHI and ClaI

胶电泳图。将重组质粒 pQF/PfCP-4 转化大肠杆菌 SG13009, 转化子用 IPTG 进行诱导, 表达产物用免疫印迹法检测。图 5 显示, 在阴性对照组及未诱导组中未检测到表达条带, 而诱导组在 57 kDa 处出现一条特异性反应带, 其大小与 PfCP-4 的理论分子量一致, 表明全长 PfCP-4 重组蛋白能在大肠杆菌中产生。

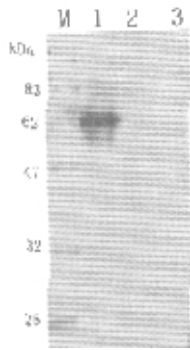


图 5 免疫印迹法检测 PfCP-4 基因在大肠杆菌 SG13009 中的表达 M 分子标志物 1 IPTG 诱导 2 未诱导 3 大肠杆菌 SG13009/pQE 对照

Fig. 5 Western blotting analysis of expression of PfCP-4 gene in *E. coli* SG13009 M Marker Lane 1 IPTG-induced Lane 2 Uninduced Lane 3 SG13009/pQE as control

## 讨 论

由于疟原虫生活史复杂和抗原变异性, 一个有效的疟疾疫苗应由多个抗原组成<sup>[7]</sup>。将多个不同抗原混合免疫会影响各抗原的免疫原性, 构建融合的多价疫苗是克服多抗原混合疫苗免疫原性低下的一个重要替代途径。恶性疟原虫 CSP 和 TRAP 蛋白是当前疟原虫红前期疫苗的重要候选抗原, CSP 的 4 肽重复区及整个 C 末端区和 TRAP 的膜外区是这两个抗原的主要保护性免疫区域<sup>[8,9]</sup>。我们选取恶性疟原虫 3D7 株 CSP 和 TRAP 这两个区域, 通过 GPG 接点构成 PfCP-4 融合蛋白序列, 通过基因设计、序列优化成功地合成了全长的 PfCP-4 基因, 该基因能稳定存在于异源系统中, 并能在大肠杆菌中表达全长的 PfCP-4 重组蛋白。该基因在毕氏酵母中的表达目前正在进行之中。PfCP-4 重组蛋白的成功表达为研究该融合抗原的免疫原性和免疫保护作用提供基础。

在设计 PfCP-4 基因时, 在基因内和基因两端设计有多个单一酶切位点, 以便于基因的拼接和能够插入多种质粒。为确保该基因能在异源系统中转录和翻

译, 采用计算机程序对该基因序列进行优化处理, 消除任何影响转录和翻译的序列, 从而使该基因能在大肠杆菌等异源系统中获得成功表达。

由于 CSP 存在 19 个 4 肽重复序列, 这给基因拼接带来困难。为解决这一问题, 在序列设计时尽可能在寡核苷酸链的拼接处形成特异序列, 使两条链能正确配对, 并采用较高的 PCR 退火温度, 以减少错误配对。尽管合成该区域片段获得成功, 但测序结果显示, 该区域错误率仍然较高。通过重新合成寡核苷酸链, 获得了序列正确的 4 肽重复区片段, 第二次合成片段的错误率明显少于第一次, 这可能是由于第二次寡核苷酸链长度比第一次大为缩短所致。

## 参 考 文 献

- [1] Robson KJ, Hall JR, Jennings MW, *et al.* A highly conserved amino-acid sequence in thrombospondin, properdin and in proteins from sporozoites and blood stages of a human malaria parasite[J]. *Nature*, 1988, 335:79-82.
- [2] Nussenzweig V, Nussenzweig RS. Rationale for the development of an engineered sporozoite malaria vaccine[J]. *Adv Immunol*, 1989, 45:283-334.
- [3] Nardin EH, Nussenzweig RS. T cell responses to pre-erythrocytic stages of malaria; role in protection and vaccine development against pre-erythrocytic stages[J]. *Ann Rev Immunol*, 1993, 11:687-727.
- [4] Wizel B, Houghton R, Church P, *et al.* HLA-A2-restricted cytotoxic T lymphocyte responses to multiple *Plasmodium falciparum* sporozoite surface protein 2 epitopes in sporozoite-immunized volunteers[J]. *J Immunol*, 1995, 155:766-775.
- [5] Hoffman SL, Franke ED, Hollingdale MR, *et al.* Attacking the infected hepatocyte[A]. In: Hoffman SL, ed. *Malaria vaccine Development: A multi-immune Response Approach*[M]. Washington DC: American Society for Microbiology Press, 1996:35-76.
- [6] Pan W, Ravot E, Tolle R, *et al.* Vaccine candidate MSP-1 from *Plasmodium falciparum*: a redesigned 4917 bp polynucleotide enables synthesis and isolation of full-length protein from *Escherichia coli* and mammalian cells[J]. *Nucl Acid Res*, 1999, 27:1094-1103.
- [7] 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*, 1999, 96:1615-1620.
- [8] 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, 225:593-599.
- [9] Muller HM, Reckmann I, Hollingdale MR, *et al.* Thrombospondin related anonymous protein (TRAP) of *Plasmodium falciparum* binds specifically to sulfated glycoconjugates and to HepG2 hepatoma cells suggesting a role for this molecule in sporozoite invasion of hepatocytes[J]. *EMBO*, 1993, 12:2881-2889.

(收稿日期:2002-04-05 编辑:富秀兰)