

伯氏疟原虫 *pbmag-1* 基因片段克隆及原核表达优化

高宇辉, 王恒*

【摘要】 目的 克隆并表达伯氏疟原虫 *pbmag-1* 基因 cDNA 片段。方法 在 GenBank 中检索伯氏疟原虫编码基因 *pbmag-1* 部分 cDNA 序列, 设计特异引物, 经 RT-PCR 从伯氏疟原虫 ANKA 株扩增出该基因的部分 cDNA 片段。以锚定 Oligo dT 引物反转录 mRNA 获得的 cDNA 为模板, 利用已知序列设计特异引物, 通过 cDNA 末端快速扩增(RACE)技术延伸 *pbmag-1* 3'端未知的编码序列, 并将其克隆于原核表达载体后转入大肠埃希菌(*E. coli*)BL21-(DE3)-RIL 株, 经优化诱导条件, 表达了重组蛋白 PbMAg-1 并用其免疫小鼠。结果 获得 1 341 bp 具有完整 3'末端序列的 *pbmag-1* 基因片段, 其 A/T 含量为 73%。以包涵体形式表达的重组蛋白免疫小鼠, 其血清抗体经蛋白质印迹(Western blotting)分析, 能特异性地识别伯氏疟原虫感染红细胞相对分子质量约为 Mr 64 000 的蛋白。结论 获得重组蛋白 PbMAg-1 的 3'端完整的 *pbmag-1* 基因 cDNA 片段, 为研究伯氏疟原虫 PbMAg-1 蛋白在鼠疟免疫反应中的作用奠定了实验基础。

【关键词】 *pbmag-1*; 伯氏疟原虫; 基因克隆; 原核表达

中图分类号: R382.314 文献标识码: A

Cloning and Optimized Prokaryotic Expression of a *pbmag-1* cDNA Fragment from *Plasmodium berghei* ANKA

GAO Yu-hui, WANG Heng*

(Etiology Department, Institute of Basic Medical Sciences, CAMS and PUMC, Beijing 100005, China)

【Abstract】 Objective To clone and express a novel gene cDNA fragment, *pbmag-1*, from *Plasmodium berghei* ANKA strain. **Methods** The cDNA sequence of *pbmag-1* was obtained from the GenBank of *P.berghei* ANKA genomic databases, with which a pair of primers was designed and RT-PCR was used to get a cDNA fragment of the gene from the parasite. The expanded cDNA 3' fragment of the gene was obtained by 3'-RACE using the oligo dT primer and a set of specific primers. The intact cDNA 3' fragment was cloned into a prokaryotic expressional vector and transformed into the BL21-(DE3)-RIL strain of *Escherichia coli*. The recombinant protein of PbMAg-1 was expressed with an optimized strategy and used to immunize mice. **Results** The *pbmag-1* cDNA fragment obtained was 1 341 bp in length, A/T rich (73%) and with a correct 3' end sequence. By Western blot, the anti-serum of mice immunized with the recombinant protein of PbMAg-1/GST, which was expressed as inclusion bodies, specifically recognized a band with Mr 64 000 molecule from the protein extracts of *P.berghei*-infected mouse erythrocytes. **Conclusion** The *pbmag-1* cDNA sequence with intact 3' has been obtained, which will be used for further study on its role in the immune response of *P.berghei* infection.

【Key words】 *pbmag-1*; *Plasmodium berghei*; Gene cloning; Prokaryotic expression

Supported by the 863 Hi-tech Research and Development Program of China (No. 2001AA215021, No. 2004AA215232)

* Corresponding author, E-mail: hengwang@pumc.edu.cn

疟疾是危害人类的重要传染病之一。恶性疟原虫和媒介按蚊基因组测序工作的完成^[1,2], 以及正在进行的鼠疟原虫基因组测序工作^[3], 极大地促进了疟原虫分子生物学的研究, 对阐明疟原虫的致病机制, 恶性疟原虫疫苗研制及新药开发, 并最终战胜疟疾提供了

科学依据。由于疟原虫感染有严格的宿主选择性, 因此在人体以外研究恶性疟原虫基因与人体宿主之间的关系十分困难。根据基因组数据分析, 预测的恶性疟原虫 5 300 个编码基因中约有 4 500 个与鼠疟原虫基因同源^[4]; 由于哺乳动物小鼠在疟疾发生过程中的免疫反应以及病理类型与人类疟疾相似, 使鼠疟模型成为研究恶性疟原虫同源基因功能的理想材料^[5]。

恶性疟原虫红内期抗原疫苗候选 *pfmag-1* 基因, 是由本室前期工作克隆获得的 1 个新基因。初步研究

基金项目: 国家 863 高技术研究发展计划 (No. 2001AA215021, No. 2004AA215232)

作者单位: 中国医学科学院中国协和医科大学基础医学研究所病原系分子寄生虫学实验室, 北京 100005

* 通讯作者, E-mail: hengwang@pumc.edu.cn

表明,由 *pfmag-1* 编码基因表达的重组蛋白免疫新西兰大白兔,产生的抗体可以在体外有效地抑制恶性疟原虫生长。为了进一步研究 *pfmag-1* 基因在恶性疟原虫感染宿主过程中的作用,作者采用生物信息学方法,在 GenBank 中检索到 1 条与 *pfmag-1* 基因高度同源的伯氏疟原虫 cDNA 基因编码序列(登陆号为 XP_678342.1),命名为 *pbmag-1* 基因,并进行了克隆和原核优化表达。

材料与方 法

1 材 料

1.1 虫株 伯氏疟原虫 ANKA 株由第二军医大学潘卫庆教授惠赠,本室液氮冻存保种。

1.2 实验动物 雌性 BALB/c 小鼠,清洁级,6~8 周龄,体重 20 g,购自中国医学科学院实验动物研究所。

1.3 菌株与质粒 *E. coli* BL21-(DE3)-RIL 株,购自美国 Stratagene 公司, DH5 α 株为本室保存。原核表达载体 pGEX-4T-1 为瑞典 Amersham Biosciences 公司产品。载体 pGEM-T 购自美国 Promega 公司。

1.4 主要试剂、酶类及抗体 纤维素 CF11 购自英国 Whatman 公司,总 RNA 提取试剂 Trizol 为美国 Invitrogen 公司产品,一步法 RT-PCR 试剂盒、*Taq* 酶、核酸内切酶及 T₄ DNA 连接酶均为宝生物工程(大连)有限公司产品,辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG (IgG-HRP) 购自北京中杉金桥生物技术有限公司。小鼠抗谷胱甘肽 S-转移酶 (GST) 单克隆抗体,由本所免疫学教研室提供。抗伯氏疟原虫热休克蛋白 70 (anti-PbHSP70/GST) 小鼠免疫血清,由本室制备保存。细胞分离液 Percoll 为瑞典 Pharmacia 公司产品。中等相对分子质量蛋白质标志物为立陶宛 Fermentas 公司产品。其余化学试剂均为国产分析纯。

1.5 引物及测序 根据美国国立生物技术信息中心 (NCBI) 的 *pbmag-1* cDNA 预测序列(登陆号为 XP_678342.1) 设计引物 11603 及 11604,用于 cDNA 模板的扩增。引物 11603: CCGGATCCGCTTCTATGT ATTACTTCAG,引物 11604: CGCTCGAGTTAGGAAA TTGTTTTTCTC,下划线为 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点。锚定 Oligo dT 引物 (InvAMV-RT): GCTGTCAA CGATACGCTACGTAACGGCATGACAGTGTTTTTTTTTT TTTTTTTTTTMM (末端简并碱基 M=A、C 或 G; N=A、G、C 或 T) 用于 3' 端 cDNA 末端快速扩增 (RACE) 技术合成 cDNA 第 1 链。引物对 1 (GSP1: ATGGGAGAGTG GTTCTTATGCTTCTTATGC 和 InvRacer3': GCTGTCAA CGATACGCTACGTAACG) 用于巢式 PCR 第一轮扩增,引物对 2 (GSPN: ACATACCTATACTGAACATCCAGAG 和

InvRacer3' Nest CGCTACGTAACGGCATGACAGTG) 用于巢式 PCR 第二轮扩增;引物对 3 (11603 和引物 Ter: GCCTCGAGTTAATCATTAGAGTTTCTTG) 用于将 *pbmag-1* 编码基因亚克隆于表达载体。引物由上海英俊生物技术有限公司合成,测序由上海生工生物工程有限公司完成。

2 方 法

2.1 伯氏疟原虫感染红细胞 (PRBC) 的制备 液氮冻存的伯氏疟原虫 ANKA 株复苏后,取 1 \times 10⁶ 个 PRBC 腹腔注射接种 BALB/c 小鼠。尾静脉采血涂片, Giemsa 染色,监测小鼠红细胞疟原虫感染率,达 20% 左右摘眼球取血,肝素抗凝, 1 \times 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤 1 次,通过自制的纤维素 CF11 柱除去白细胞(即:在一次性 5 ml 注射器套管下端垫入玻璃纤维网,加入 50% CF11/PBS 悬液, 300 \times g 离心 5 min。在纤维素基质上端加入 3 ml 鼠感染红细胞悬液, 300 \times g 离心 5 min, PBS 洗涤后收集感染红细胞备用)。

2.2 *pbmag-1* 基因片段扩增 用 Trizol 试剂抽提红内期 ANKA 株伯氏疟原虫总 RNA,用一步法 RT-PCR 试剂盒合成 cDNA,并以此为模板扩增 *pbmag-1* cDNA。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 50 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,回收目的片段并进行纯化。

2.3 3'-RACE 及 PCR 参照 cDNA 末端快速扩增试剂盒 (GeneRacerTM Kit, 美国 Invitrogen 公司) 说明书进行操作。用锚定 Oligo dT 引物 InvAMV-RT 合成 cDNA 第 1 链,以此为模板,使用引物对 1 (GSP1/InvRacer 3') 进行第 1 次扩增。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min 后进入循环, 94 $^{\circ}$ C 1 min, 64 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共 30 个循环。最后 72 $^{\circ}$ C 充分延伸 7 min。产物回收纯化后作为模板,使用引物对 2 (InvRacer 3' Nest/GSPN1) 进行第 2 次扩增。

2.4 基因的 T/A 克隆、鉴定及序列拼接 按 pGEM-T 载体试剂盒说明书进行操作。将纯化的目的片段与 T 载体连接,转化感受态细菌 DH5 α ,在 LB (含 100 μ g/ml 氨苄青霉素) 平板上挑取数个白斑,阳性克隆送上海生工生物工程有限公司测序。利用克隆序列内的单一酶切位点 *Nhe* I 拼接 3' 端下游序列。引物对 3 (11603/ter) 用于全部 1 341 bp 序列的扩增。

2.5 表达质粒 *pbmag-1*/pGEX 的构建与鉴定 测序鉴定后的阳性 T/A 克隆质粒经 *Bam*H I /*Xho* I 双酶切后进行琼脂糖凝胶电泳,回收 1 341 bp 目的片段,并与经酶切消化的 pGEX-4T-1 载体连接。将连接产物转化感受态细菌 DH5 α ,阳性克隆送上海生工生物工程

有限公司测序。

2.6 重组蛋白的诱导表达及原核表达条件的优化

2.6.1 常规诱导 将重组质粒 *pbmag-1/pGEX* 转化感受态菌 BL21-(DE3)-RIL, 挑取阳性转化子接种于 LB 液体培养基(含有 100 $\mu\text{g/ml}$ 氨苄青霉素和 50 $\mu\text{g/ml}$ 氯霉素, 下同), 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡过夜。以 1 : 250 稀释于 3 瓶 500 ml LB 培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 振荡培养, 当其吸光度(A_{600} 值)达到 0.6 时, 3 000 $\times g$ 离心 15 min, 收集菌体, 重悬于新鲜的 500 ml LB 培养基, 添加异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG) 分别至终浓度 0.1、0.5 及 1.0 mmol/L, 继续振荡培养 4~8 h, 收集菌液, 裂菌, 经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 检测表达产物。

2.6.2 温和诱导 过夜培养的转化菌, 以 1 : 250 比例转接于 500 ml LB 培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 振荡培养。 A_{600} 达到 1.8 时, 离心收集菌体, 重悬于 3 瓶预先保温 30 $^{\circ}\text{C}$ 或者 20 $^{\circ}\text{C}$ 新鲜的、每瓶 500 ml LB 培养基中, 分别添加 IPTG 至终浓度为 0.1、0.5 及 1.0 mmol/L, 继续振荡培养 10 h。诱导前、后取样, 裂菌, SDS-PAGE 检测表达产物。

2.7 重组蛋白的可溶性分析及检测 诱导结束后离心收集菌体, PBS 重悬、冰浴超声裂菌, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心, 上清和沉淀分别经 SDS-PAGE, 用抗-GST 单抗进行蛋白质印迹(Western blotting)分析确定重组蛋白在上清和沉淀中的分布, 按文献[6]方法操作, 转印硝酸纤维素膜 (NC 膜) 封闭后, 依次加入 1 : 1 000 抗-GST 单抗, 1 : 2 000 的 IgG-HRP, 加入 3,3-二氨基联苯胺(DAB) 显色液 100 ml [配方: 10 mmol/L pH7.6 Tris·HCl, 0.03% 氯化镍 (NiCl), 50 mg DAB。临用前加 100 μl 30% H_2O_2] 显色, 观察拍照。

2.8 PbMAG-1/GST 包涵体的洗涤与小鼠免疫血清的制备

2.8.1 包涵体洗涤 包涵体分别用含 1.5% 的曲拉通 X-100 (Triton X-100) 和 4 mol/L 尿素-PBS 液洗涤 3 次, 12 000 $\times g$ 离心 10 min。取沉淀, 用 8 mol/L 尿素-PBS 液室温搅拌 30 min 溶解, 12 000 $\times g$ 离心 10 min, 弃沉淀。10% SDS-PAGE, 经薄层凝胶灰度扫描分析, 纯度为 67%。

2.8.2 小鼠抗血清的制备 经制备型 (1.5 mm) SDS-PAGE 分离, 用 0.25 mol/L KCl 染色, 切取目的凝胶条, 加液氮研磨成粉末, 用适量的 8 mol/L 尿素-PBS 溶解, 离心后收集上清, 按 BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (BCA protein assay reagent kit, 美国 Pierce 公司) 操作说明测定蛋白质含量。重组蛋白与福氏完全佐剂充分混匀, 按 50 $\mu\text{g/只}$, 经皮下注射 BALB/c 小鼠, 4 周后

将重组蛋白与福氏不完全佐剂充分混匀, 按 25 $\mu\text{g/只}$, 经皮下注射加强免疫, 2 周后重复注射 1 次, 之后第 10 天尾静脉采血测定抗体效价, 待达到 1 : 10⁶ 以上时摘眼球采血, 收集血清, 备用。

2.9 小鼠免疫血清效价测定 采用 ELISA 法测定效价。用含有 4 mol/L 尿素的包被缓冲液稀释重组蛋白, 每孔用 100 ng 包被 ELISA 板, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。用 PBST (PBS 含 0.1% 吐温-20) 洗涤 5 次, 每次 1 min。加入 2% 羊血清封闭液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h, PBST 洗涤 5 次, 分别加入 1 : 10²~1 : 10⁶ 稀释的抗血清, 检测 3 个复孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, PBST 洗涤后加入 1 : 10 000 稀释的 IgG-HRP, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, PBST 洗涤, 加入 100 μl 四甲基联苯胺(TMB)显色液, 室温避光显色 10 min, 2 mol/L 硫酸终止反应, 检测吸光度(A_{450} 值)。

2.10 天然 PbMAG-1 蛋白在红内期伯氏疟原虫体内的表达

2.10.1 Percoll 密度梯度离心法富集感染 ANKA 株伯氏疟原虫的红细胞 接种 ANKA 的 BALB/c 小鼠, 红细胞感染率达 20% 左右摘眼球取血。参照文献[7]方法操作。取离心管, 先装入 2.5 ml 60% Percoll 细胞分离液(配方: 60 ml Percoll, 7 ml 10 \times PBS, 33 ml 1 \times PBS), 在其表层轻轻加入 2 ml 上述收集处理的感染血样, 于室温, 水平式离心机 1 500 $\times g$ 离心 15 min, 吸取棕色的、感染大滋养体和裂殖体的红细胞层, 室温下 PBS 洗涤 3 次, 每次 1 500 $\times g$ 离心 5 min。

2.10.2 皂素裂解感染红细胞 在沉淀中加入含 0.1% 皂素的 PBS, 重悬细胞, 置于冰上裂解 10 min。4 $^{\circ}\text{C}$ 4 000 $\times g$ 离心 5 min, 收集疟原虫, PBS 洗涤 3 次, 加入 1 \times SDS 凝胶加样缓冲液(配制: 50 mmol/L pH 6.8 Tris·HCl, 100 mmol/L 二硫代苏糖醇, 2% SDS, 0.1% 溴酚蓝, 10% 丙三醇)煮沸 5 min, 进行 SDS-PAGE, 凝胶浓度为 10%。

2.10.3 Western blotting 分析识别天然 PbMAG-1 蛋白 伯氏疟原虫感染红细胞抽提蛋白经过 SDS-PAGE 分离后转印 NC 膜, 用含 5% 脱脂奶粉的 PBS 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜, PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min。由 GST 融合蛋白免疫小鼠制备的免疫血清, 预先均经过 GST 蛋白充分吸收 (即: 将小鼠免疫血清与 1 mg/ml GST 溶液混合, 室温放置 30 min, 12 000 $\times g$ 离心 10 min, 回收上清, 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 备用)。洗涤后的 NC 膜加入经上述处理的 1 : 2 000 小鼠抗 PbMAG-1/GST 免疫血清 (以 1 : 2 000 稀释的健康小鼠血清, 1 : 2 000 抗 GST 小鼠免疫血清, 以及 1 : 4 000 抗 PbHSP70/GST 小鼠免疫血清作为对照), 室温孵育 2 h, 洗涤后加入 1 : 15 000 稀释的 IgG-HRP, 室温孵育 1 h, 洗涤。加入化学发光

辣根过氧化物酶底物液 (ECL), 在暗室进行 X 光片曝光, 显影和定影后观察结果。

结 果

1 *pbmag-1* cDNA 片段克隆及序列修正

利用 GenBank 数据资料使用局部相似性基本查询工具(Blast)比对, 检索到 1 条与 PfMAG-1 氨基酸序列同源性高达 75%的伯氏疟原虫 cDNA 基因编码序列(登陆号为 XP_678342.1)。基因组数据注释表明, 该 cDNA 序列只包含了部分 5'端编码序列。对该 cDNA 片段克隆的测序结果与 GenBank 公布的 cDNA 序列比对, 均在 1 089 bp 后有 1 个碱基 A“插入”, 导致下游预测的氨基酸序列以及终止密码子的位置发生变化。为了获得正确的 3'端编码序列, 遂采用 RACE 技术重新对下游进行克隆。经过序列拼接, 修正后的 cDNA 片段为 1 341 bp (前 1 089 bp 与 GenBank 公布数据一致), 编码 446 个氨基酸(图 1), 预测相对分子质量为 M_r 52 700。

```

1 ..... 1080
1081 AAA ATG ATT AAA GAA ATG TAT GCC GAA AAA 1100
361 K M I K E M Y A E K
1101 AAT AGT TAC GAA GAT ATC CCA AAG AGA AAA 1130
      N S Y E D I P K R K
1131 AAC AAT TTC CTA AAT GAT ATA TTA CTA GAA 1160
      N N F L N D I L L E
1161 AAT TCT TCT ACT AGT ATG GTA GAT ACA GCG 1190
      N C S T S M V D T A
1191 AAC GAA TCT TTG AAA GAT GAA ATC GTC GAA 1220
      N E S L K D E I V E
1221 TCA AAA TTA GAC AAA GAA ATA GAT ATA CTA 1250
      S K L D K E I D I L
1251 AGT GGG ACA TCC ACG GAT GCA CTA ATA GAA 1280
      S G T S T D A L I E
1281 GCA ATG TGG AAC AAA GAA CCA GGA ATA AAA 1310
      A M W N K E P G I K
1311 CAA GAA ACT CTA AAT GAT TAA 1341
      Q E T L N D * 447
    
```

图 1 修正后的 *pbmag-1* 3'端 cDNA 序列
(**A** 为 GenBank 数据错误之处)

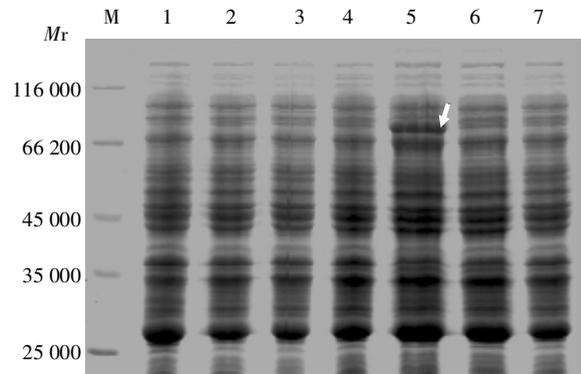
Fig.1 Corrected 3'cDNA sequence of *pbmag-1* with predicted amino acids

(Pane frame indicates the leave out base by mistake in GenBank data)

2 原核表达条件的优化及重组蛋白可溶性检测

在 *E. coli* 表达系统中, 37 °C 常规诱导, 未见预测 M_r 71 800 的 PbMAG-1/GST 融合蛋白表达, 而 pGEX-4T-1 空载体转化菌使用 0.1 mmol/L IPTG 诱导 4 h 即可表达出大量的 GST 蛋白。通过调整诱导温度及 IPTG 浓度, 在 *E. coli* 对数生长后期($A_{600}=1.8$)开始诱导, 经 SDS-PAGE 分析, 在 20 °C 0.1 mmol/L IPTG 诱导下, 表达出目的蛋白(图 2)。Western blotting 分析证实重组蛋白主要存在于包涵体沉淀中(图 3)。

3 重组蛋白小鼠免疫血清的制备以及 Western blotting 分析识别天然 PbMAG-1 蛋白

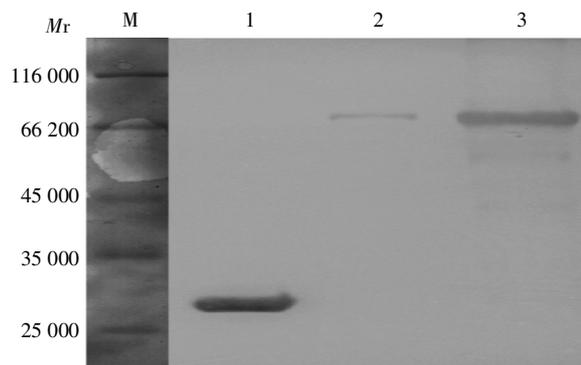


M: 蛋白质标志物, 1: 重组质粒转化菌诱导前, 2~4: 于 30 °C 诱导, 5~7: 于 20 °C 诱导 (2、5: 加入 0.1 mmol/L IPTG, 3、6: 加入 0.5 mmol/L IPTG, 4、7: 加入 1 mmol/L IPTG), 5: 箭头所指为重组蛋白表达。

M: Protein marker, 1: *pbmag-1*-pGEX/BL21-(DE3)-RIL before induction, 2-4: *pbmag-1*-pGEX/BL21-(DE3)-RIL induced under 30 °C by 0.1, 0.5, 1 mmol/L IPTG respectively, 5-7: *pbmag-1*-pGEX/BL21-(DE3)-RIL induced under 20 °C by 0.1, 0.5, 1 mmol/L IPTG respectively. Arrow head indicates the predicted recombinant protein.

图 2 PbMAG-1 重组蛋白优化表达条件检测

Fig.2 Analysis on the expression pattern of PbMAG-1 recombinant protein with optimized strategy



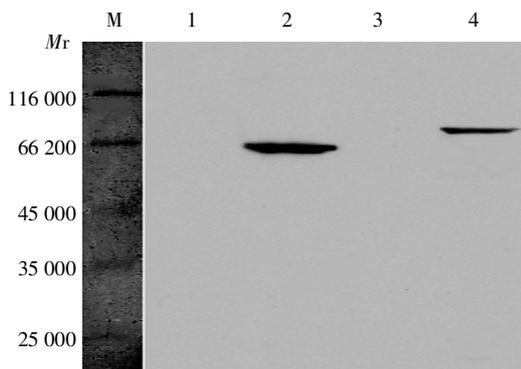
M: 蛋白质标志物, 1: GST 表达菌, 2: 重组质粒诱导菌裂解上清, 3: 重组质粒诱导菌裂解沉淀。

M: Protein maker, 1: pGEX/BL21-(DE3)-RIL induced, 2: Supernatant of recombinant protein ultrasonication, 3: Pellet of recombinant protein ultrasonication.

图 3 使用小鼠抗-GST 单抗 Western blotting 检测重组蛋白在诱导菌超声裂解上清和沉淀中的分布

Fig.3 Western blotting assay using mouse anti-GST to detect distribution of the recombinant protein after ultrasonication

用重组蛋白 PbMAG-1/GST 包涵体免疫 BALB/c 小鼠, ELISA 结果显示, 抗血清效价达到 1 : 10⁶ 以上。Western blotting 分析结果表明, 重组蛋白 PbMAG-1/GST 小鼠免疫血清能特异性识别分子量约 M_r 64 000 的条带, 该条带即 ANKA 株伯氏疟原虫感染红细胞抽提蛋白(图 4)。对照组重组蛋白抗 PbHSP70/GST 小鼠免疫血清能识别约 M_r 70 000 的 ANKA 株感染红细胞抽提蛋白; 健康小鼠血清以及抗 GST 小鼠免疫血清均不能识别感染红细胞抽提蛋白。



M: 蛋白质标志物, 1: 健康小鼠血清, 2: PbMAg-1/GST 抗血清, 3: 小鼠抗-GST 血清, 4: 小鼠抗 PbHSP70/GST 血清。

M: Protein marker, 1: Normal mouse serum, 2: Anti-PbMAg-1/GST mouse serum, 3: Anti-GST mouse serum, 4: Anti-PbHSP70/GST mouse serum.

图 4 PbMAg-1/GST 重组蛋白小鼠免疫血清 Western blotting 分析特异性地识别 Mr 64 000 的伯氏疟原虫感染红细胞蛋白

Fig. 4 Mouse anti-PbMAg-1/GST specifically recognizes Mr 64 000 molecule from the protein extracts of *Plasmodium berghei*-infected mouse erythrocytes by Western blotting

讨 论

与恶性疟原虫基因组相似, 鼠疟原虫编码基因 A/T 含量达到 70%~80%^[3], 给测序工作带来困难。目前鼠疟原虫基因组测序工作尚未完成, 大部分数据只是 DNA 序列重叠群 (contig), 尚未进行全面的复核和修正。在 GenBank 中检索到的 PbMAg-1 蛋白 cDNA 序列只包括部分 5' 端序列。本研究在克隆该 cDNA 片段过程中, 发现 GenBank 发布的序列有错误, 作者分别进行 3 次提取 RNA 模板以及 RT-PCR 实验, 排除了克隆过程可能引入的错误以及测序的误差。在进行 3'-RACE 实验后, 获得了该 cDNA 序列正确的 3' 末端。

恶性疟原虫和鼠疟原虫基因组序列中富含 A/T 的特性, 使疟原虫基因很难在外源表达系统中进行表达^[8-10]。原核表达系统 *E. coli* 由于易于培养, 费用低廉, 表达高效而应用广泛。本研究采用的 *E. coli* 表达宿主为 BL21-(DE3)-RIL, 这种工程菌含有高拷贝的 *argenine*^U、*leucine*^W 和 *isoleucine*^Y tRNA 基因, 适用于富含 A/T 的外源基因表达。由于 *pbmag-1* 编码基因的 A/T 含量高达 73%, 在常规培养条件下(37 °C)采用该工程菌仍不能诱导表达目的蛋白。经优化诱导条件, 以高浓度 *E. coli* 起始诱导, 在低温(20 °C)和低 IPTG(0.1 mmol/L)条件下, 成功地诱导了目的蛋白的表达。分析其原因是: *E. coli* 在对数生长后期达到很高的密度, 氧气及养分供应不足, 代谢变缓慢; 原核表达载体 tac 启动子的效率在低温时显著降低^[11], 使被诱导的外源基因转录产物大大减少, 缓解了稀有密码

子氨酰-tRNA 不足的情况; 同时 mRNA 有充分的时间打开复杂的二级结构, 使核糖体正确识别和结合在起始位点上, 顺利合成多肽链。但因 *E. coli* 在低温时的整体代谢水平降低, 如增加诱导前细菌的浓度, 则可补偿外源蛋白表达量的不足。

表达载体启动子的强弱也可能影响疟原虫基因的外源表达。将 *pbmag-1* 基因分别克隆在 pET30a、pET42a、PET32a、pET23a 及 pET43.1a 载体上, 并未能在上述任何条件下表达出目的蛋白。在另一试验中, 高度同源的恶性疟原虫 *pfmag-1* 基因分别克隆在上述 pET 载体上, 也未能表达目的蛋白, 而克隆于 pMAL-c2X 载体(美国 New England Biolabs, Inc.) 同样是在 *E. coli* 对数生长后期(20 °C, 0.1 mmol/L IPTG)诱导时却表达出目的蛋白。作者认为这不是由于外源蛋白的毒性作用造成的, 可能是由于上述 pET 载体使用的是较强的 T7 启动子, 而 pGEX-4T-1 和 pMAL-C2X 表达载体使用的是相对较弱的 tac 启动子^[12], 两者诱导后表达强度有差异, pET 载体在 IPTG 诱导后, 转录产物迅速积累, 造成翻译过程稀有密码子氨酰-tRNA 相对不足, 导致表达困难。

本实验表达的重组蛋白主要以包涵体形式存在。影响原核表达蛋白可溶性的因素很多^[13], 如 pH、温度及氨基酸的组成等, 有必要通过进一步优化条件以促进可溶性重组蛋白的表达。

作者认为, 成功表达疟原虫 A/T-rich 基因的关键因素是要降低宿主表达系统的蛋白质翻译速度, 缓解稀有密码子氨酰-tRNA 不足这一瓶颈问题。

本研究克隆了包括完整 3' 末端的 *pbmag-1* 的 cDNA 片段, 通过优化诱导条件, 在 *E. coli* 中表达了重组蛋白。融合蛋白包涵体免疫小鼠获得的抗血清, 能特异性地识别伯氏鼠疟原虫 ANKA 株感染红细胞蛋白 Mr 64 000。该结果为进一步研究 *pbmag-1* 在疟原虫感染与宿主免疫反应之间的作用奠定了实验基础。

参 考 文 献

[1] Gardner MJ, Hall N, Fung E, et al. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*[J]. Nature, 2002, 419(6906): 498-511.
 [2] Holt RA, Subramanian GM, Halpern A, et al. The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* [J]. Science, 2002, 298(5591): 129-149.
 [3] Carlton JM, Angiuoli SV, Suh BB, et al. Genome sequence and comparative analysis of the model rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii yoelii* [J]. Nature, 2002, 419(6906): 512-519.
 [4] Hall N, Karras M, Raine JD, et al. A comprehensive survey of the *Plasmodium* life cycle by genomic, transcriptomic, and proteomic analyses [J]. Science, 2005, 307(5706): 82-86.
 [5] Li C, Seixas E, Langhorne J. Rodent malaria: the mouse as a model for understanding immune responses and pathology induced by the erythrocytic stages of the parasite [J]. Med Microbiol Immunol, 2001, 189(3): 115-126.

- [6] Sambrook J, Frisch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 880-897.
- [7] Wahlgren M, Berzins K, Perlmann P, et al. Characterization of the humoral immune response in *Plasmodium falciparum* malaria. I. Estimation of antibodies to *P. falciparum* or human erythrocytes by means of micro-ELISA [J]. Clin Exp Immunol, 1983, 54: 127-134.
- [8] Kurland CG. Codon bias and gene expression [J]. FEBS Lett, 1991, 285: 165-169.
- [9] Kane JF. Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli* [J]. Curr Opin Biotechnol, 1995, 6: 494-500.
- [10] Mehlin C, Boni E, Buckner FS, et al. Heterologous expression of proteins from *Plasmodium falciparum*: results from 1000 genes [J]. Mol Biochem Parasitol, 2006, 148: 144-160.
- [11] Vasin JA, Baneyx F. Expression of aggregation-prone recombinant proteins at low temperatures: a comparative study of the *Escherichia coli* cspA and tac promoter system [J]. Protein Expr Purif, 1997, 9: 211-218.
- [12] Terpe K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2006, 2: 211-222.
- [13] Peter EV. *E. coli* Gene Expression Protocols [M]. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc, 2003. 1-338.

(收稿日期: 2007-04-02 编辑: 富秀兰)

文章编号: 1000-7423(2007)-04-0319-01

【病例报告】

猪带绦虫病和猪囊尾蚴病 3 例报告

张榕燕*, 李莉莎, 林金祥

福建省仙游县猪带绦虫和猪囊尾蚴感染率居全省之首^[1]。2004 年有一家 3 人先后发病, 报告如下。

1 病例

病例 1, 男, 37 岁, 司机。住仙游县榜头镇。平时喜食货郎担叫卖的肉包、云吞。半年后粪便中见有能伸缩活动的虫体节片。2004 年 3 月, 自觉肛门周围间断性异物感, 前来福建省疾病预防控制中心就诊。粪检发现猪带绦虫卵及节片, 诊断为猪带绦虫病。给予口服槟榔、南瓜籽驱虫, 排出虫体 1 条。此后未再排出虫体节片, 1 个月后粪检虫卵转阴, 治愈。

病例 2, 女, 38 岁, 家庭妇女。2004 年 9 月, 先后在腹、背部和颈部皮下发现数个圆形活动结节, 母指大。10 月, 在仙游县医院手术切除腹部结节, 病理诊断为猪囊尾蚴结节, 前来福建省疾病预防控制中心就诊。囊尾蚴血清抗体检测阳性, 诊断为皮下肌肉囊尾蚴病。即用吡喹酮治疗, 50 mg/(kg·d), 10 d 为 1 疗程。治后结节先是肿大, 后逐渐缩小、消失。间隔 2 个月后同法再治疗 1 个疗程。半年后随访复查, 皮下结节全部消失, 血清抗体检测阴性。

病例 3, 女, 14 岁, 学生。2005 年 9 月突然神志不清, 右上肢抽搐, 眼球上翻, 持续 1 个多小时后出现恶心、呕吐伴头晕、头痛和全身酸痛。即送仙游县医院, 诊断为癫痫病。给予对症治疗, 症状、体征缓解。但 8 h 后再次发作, 即转莆田市某医院诊治。磁共振 (MRI) 检查提示脑脓肿, 给予降颅压、抗感染治疗, 未见好转。第 5 天再转省级医院诊治, MRI 检查, 仍诊断为脑脓肿伴脑膜炎, 给予罗氏芬 0.5 g、胞磷胆碱 0.5 g 静脉点滴, 1 次/d; 20% 甘露醇 250 ml/d×2 次, 17 d 为 1 疗程。治后癫痫发作频繁, 转福建医科大学附属医院诊治。2005 年 10 月经专家会诊疑为囊尾蚴病, 血清送福建省疾病预防控制中心检测, 呈强阳性, 诊断为脑囊尾蚴病。给予吡喹酮治疗, 60 mg/(kg·d), 20 d 为 1 疗程, 同时静滴甘露醇 250 ml/d×2 次, 地塞米松 5 mg/d×1 次、10% 葡萄糖酸钙 20 ml/d×1 次。治

后症状明显好转, 脑 MRI 复查, 左侧顶叶结节灶和周围指状水肿影缩小。患者癫痫发作间隔时间延长、每次发作持续时间缩短。2006 年 2 月进行第 2 疗程治疗, 方法、剂量同前。疗程结束后 5 个月随访, 癫痫不再发作, 临床治愈。

2 讨论

猪囊尾蚴病与猪带绦虫病, 是由猪带绦虫不同发育期虫体所致的疾病。猪带绦虫病, 是由于吃了生或未煮熟的含囊尾蚴的猪肉, 囊尾蚴逸出后在小肠内发育为成虫所致。如果人吞食猪带绦虫卵, 即可能患猪囊尾蚴病; 或者本身即是猪带绦虫病患者, 在呕 (胃) 酸时将小肠内的猪带绦虫成虫孕节呕至胃, 虫卵经胃液消化后六钩蚴逸出, 进入消化道血管至全身各部位寄生, 即可导致猪囊尾蚴病。如: 皮下肌肉囊尾蚴病、脑囊尾蚴病等。

本文表明猪囊尾蚴病与猪带绦虫病具有家庭聚集性特点, 病例 1 (丈夫) 患猪带绦虫病。根据其病史, 可能与喜食街上叫卖零售的肉包、云吞的饮食习惯有关。据悉, 当地个体养猪, 猪囊尾蚴病发病率较高, 屠宰后即私下卖给饮食摊点制作肉馅, 造成人的猪带绦虫病不断传播^[2]。病例 2 (妻子) 和病例 3 (女儿), 患猪囊尾蚴病。根据病史, 平时喜食用自家粪肥浇灌的生芫荽和生葱。其病例 1 患猪带绦虫病, 排出的粪便未经无害化处理即用于施肥, 其中的虫卵很容易污染芫荽和生葱, 被母女吞食后而感染囊尾蚴病。

参 考 文 献

- [1] Yin HZ, Lin JX, Xu XR, et al. Epidemiological investigation on taeniasis and cysticercosis in Xianyou County [J]. Chin J Zoonoses, 1993, 9 (4): 77-78. (in Chinese)
(尹怀志, 林金祥, 许贤让, 等. 仙游县猪带绦虫病和囊尾蚴病流行病学调查研究 [J]. 中国人兽共患病杂志, 1993, 9 (4): 77-78.)
- [2] Zhang RY, Chen BJ, Cheng YZ, et al. Serological survey on cysticercosis in Xianyou County [J]. Strait J Prev Med, 2004, 10 (6): 3. (in Chinese)
(张榕燕, 陈宝健, 程由注, 等. 仙游县囊尾蚴病血清流行病学调查 [J]. 海峡预防医学杂志, 2004, 10 (6): 3.)

(收稿日期: 2007-05-31 编辑: 富秀兰)

作者单位: 福建省疾病预防控制中心, 福州 350001

* 通讯作者, E-mail: fjcdczy@sina.com