

间日疟原虫 MSP1-19 基因的克隆与表达

李光友¹ 陈 勇¹ 夏 惠² 方 强² 刘 丹² 买月琴¹ 贺文欣¹

[摘要]目的:构建间日疟原虫 MSP1-19(*Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1-19, *Pv* MSP1-19) 基因克隆及表达的载体。方法:将 MSP1-19 基因克隆入原核表达载体 pET28a 中,构建重组表达载体。以重组载体转化大肠埃希菌 BL21,在 IPTG 诱导下表达重组 *Pv* MSP1-19 蛋白。采用亲和层析纯化重组蛋白,应用 SDS-PAGE 电泳和 Western blot 对表达产物进行鉴定和分析。结果:成功构建了质粒 pET28a/*Pv* MSP1-19,并在大肠埃希菌中诱导可溶性表达的目的蛋白。表达的蛋白能与间日疟患者血清发生特异性结合反应。结论:成功地原核表达出 *Pv* MSP1-19 目的蛋白,为间日疟的疫苗研制提供了实验基础。

[关键词] 间日疟; MSP1-19 基因; 原核表达; 基因表达

[中国图书资料分类法分类号] R 531.31 [文献标识码] A

Cloning and expression of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1-19 geneLI Guang-you¹, CHEN Yong¹, XIA Hui², FANG Qiang², LIU Dan², MAI Yue-qin¹, HE Wen-xin¹

(1. Department of Immunology, 2. Department of Microbiology and Parasitology, Bengbu Medical College, Bengbu, Anhui 233030, China)

[Abstract] **Objective:** To construct a vector which clone and express *Plasmodium vivax* MSP1-19 Gene (*Pv* MSP1-19). **Methods:** The *Pv* MSP1-19 was cloned into the expression vector pET28a. The recombinant expression vector was transformed into *E. coli* μ and the *Pv* MSP1-19 protein was expressed under IPTG induction. The recombinant protein was purified by affinity chromatography and the fusion protein was characterized by SDS-PAGE and Western blot. **Results:** The *Pv* MSP1-19 gene in plasmid pET28a was expressed in *E. coli* as a fusion protein. The fusion protein could be reacted specifically with *Plasmodium vivax* patient serum. **Conclusions:** The *Pv* MSP1-19 gene was expressed successfully in *E. coli*, which provides the necessary basis for preparing vaccine in human.

[Key words] *Plasmodium vivax*; merozoite surface protein-1-19; gene prokaryotic expression; gene expression

疟疾是严重危害人类健康的寄生虫病,其中心日疟是流行最广泛的疟疾之一,危害性仅次于恶性疟^[1]。我国中部沿黄淮流域地区疫情回升势头虽得以遏制,但疟疾发病仍处较高水平^[2],因此研制

有效防治疟疾疫苗受到越来越多研究者的重视。由于在间日疟生活史中,唯有红内期原虫能使人体致病甚至危及生命,所以研制针对红内期的疫苗对降低间日疟的发病率和病死率具有重要意义。疟原虫裂殖子主要蛋白 1 (merozoite surface protein-1, MSP1) 是一种表达于裂殖子表面的蛋白,由于其位于裂殖子表面,所以认为它可能参与裂殖子的入侵,是重要疫苗候选分子之一^[3-4]。它含有保护性免疫功能域,可以产生特异性保护性抗体,这些抗体可以阻止疟原虫入侵红细胞。本研究以间日疟原虫 MSP1 羧基端 19 kDa 片段 (*Pv* MSP1-19) 进行克隆与表达,以期获得 MSP1-19 重组蛋白,制备抗原和为

[收稿日期] 2010-12-01

[基金项目] 卫生部寄生虫病预防与控制技术重点实验室开放课题资助项目(WK008-04)

[作者单位] 蚌埠医学院 1. 免疫学教研室 2. 病原生物学教研室 安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 李光友(1982-),男,硕士研究生。

[通讯作者] 夏 惠,硕士研究生导师,教授。E-mail: xiahui912@hotmail.com.

[3] Li X, Li C. Inhibitor of growth 4 induces growth suppression and apoptosis in glioma U87MG [J]. Pathobiology, 2009, 76 (4): 181-192.

[4] Colla S, Tagliaferri S, Morandi F, et al. The new tumor-suppressor gene inhibitor of growth family member 4 regulates the production of proangiogenic molecules by myeloma cells and suppresses hypoxia-inducible factor-1 alpha activity: involvement in myeloma-induced angiogenesis [J]. Blood, 2007, 110 (13): 4464-4475.

[5] 王金志, 缪竞诚, 盛伟华, 等. ING4 基因真核表达载体的构建及其功能 [J]. 解剖学杂志, 2005, 28 (4): 383-386.

[6] 吴胤瑛, 李恩孝. VEGF 在恶性肿瘤中的研究进展 [J]. 现代肿瘤医学, 2005, 13 (5): 18-20.

[7] Garkavtsev I, Kozin SV, Chernova L, et al. The candidate tumour suppressor protein ING4 regulates brain tumour growth and angiogenesis [J]. Nature, 2004, 428 (5): 328-332.

[8] Xie YF, Zhang HF, Sheng WH, et al. Adenovirus-mediated ING4 expression suppresses lung carcinoma cell growth via induction of cell cycle alteration and apoptosis and inhibition of tumor invasion and angiogenesis [J]. Cancer Letters, 2008, 271 (1): 105-116.

(本文编辑 马启)

间日疟疫苗的研制提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料 IPTG、DNA Marker、Taq 多聚酶和 PCP 试剂均为宝生物公司(大连)产品。蛋白 Marker 购自 Fermentas 公司。质粒小提试剂盒和凝胶回收试剂盒为天根生化科技有限公司产品,引物由上海生物工程技术有限公司合成。*E. coli* B21、DH5 α 及 pET-28a 均为本实验室保存。NC 膜购自 Millipore 公司。Ni 离子亲和柱购自 GE 公司。羊抗人 IgG-HRP 购于 Sigma 公司,DAB 底物显色系统购于武汉博士德公司。间日疟患者血清及压积血为本实验室保存。其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 MSP1-19 基因扩增 根据 Gene bank 间日疟 MSP1-19 基因序列设计引物。上游引物 P1: 5'-CGG GAT CCA ATG TGC AAA CTC AGT TAT TAA C-3'; 下游引物 P2: 5'-CCG CTC GAG GCT GGA GGA GCT ACA GAA AAC-3'。以间日疟患者压积血获取 DNA 为模板,以 P1 和 P2 为引物,扩增 MSP1-19 基因片段。扩增参数: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 2 min, 共 32 个循环; 再于 72 °C 延伸 7 min。取 PCR 扩增产物 4 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳鉴定。按照天根生化科技有限公司 DNA 回收试剂盒说明书进行操作,自凝胶中回收 MSP1-19 片段。

1.2.2 MSP1-19 重组表达载体构建及鉴定 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切 pET28a 载体和 PCR 扩增片段, T4 DNA 连接酶连接两个片段并转化 DH5 α 感受态细胞,涂 LB 琼脂平板并挑单菌落进行 PCR 扩增和双酶切鉴定,阳性克隆经测序验证后保持菌种。

1.2.3 MSP1-19 重组蛋白的诱导表达 将重组表达质粒 pET28a/MSP1-19 转化大肠埃希菌表达宿主 BL21 后,挑取阳性克隆于含 10 mg/L 卡那霉素的 LB 培养基中,37 °C 过夜培养,次日按 1:100 稀释扩种,至 A600 约为 0.6 时,在菌液中加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L,在 30 °C 诱导表达 6 h。分别于诱导后 1、2、3、4、5 和 6 h 各取样 1 ml 收集并裂解菌体,加入 1 \times SDS 样品缓冲液进行 SDS-PAGE 电泳分析表达蛋白。

1.2.4 表达产物的纯化 离心收集菌体,用 1/10 培养基体积的贮存液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 2 mmol/L EDTA)重悬,加入溶菌酶至终浓度 100 μ g/ml,再加 1/10 体积 1% 的 Triton X-100,

30 °C 温育 30 min,置冰浴中超声处理,超声破碎后离心,留取上清。参照 Ni 离子亲和层析柱说明,将收集的上清以 15 ~ 20 ml/h 流速过柱,再分别用含咪唑 80、500 mmol/L 溶液洗柱并收集洗脱液。

1.2.5 Western blot 检测表达产物 将重组蛋白 MSP1-19 样品经 SDS-PAGE 分离后,再电转移至硝酸纤维素膜上。以 50 g/L 脱脂奶粉封闭 2 h,依次与 1:100 稀释的间日疟患者血清(室温 2 h、PBS 洗 3 次)以及 1:1 000 稀释的羊抗人 IgG-HRP(室温反应 1 h、PBS 洗涤 3 次)进行反应,最后加底物 DAB 显色并拍照。

2 结果

2.1 MSP1-19 基因扩增 PCR 扩增获得约 400 bp 条带,同预计的 MSP1-19 基因片段的大小相符(见图 1)。

2.2 MSP1-19 重组表达载体的鉴定 MSP1-19 PCR 产物与 pET-28a 载体分别经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切后连接,转化 DH5 α 。挑选单菌落进行双酶切鉴定,得到约为 400 bp 酶切产物(见图 2)。

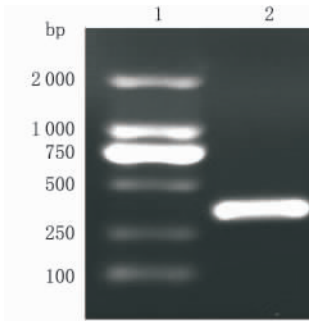
2.3 MSP1-19 的诱导及表达 在蛋白 Marker 约为 19 000 处出现 1 条新生的蛋白带(见图 3),同预期的 MSP1-19 蛋白相符合。

2.4 Western blot 分析 MSP1-19 表达 将纯化后的重组蛋白进行 Western blot 分析显示,在间日疟条带上出现一条与羊抗人 IgG-HRP 血清起反应的条带(见图 4)。

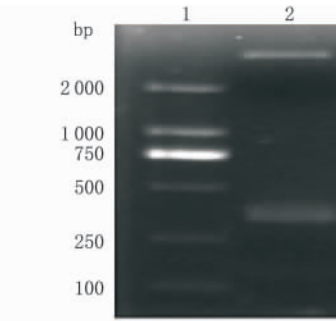
3 讨论

间日疟原虫寄生于人体红细胞内,其裂殖子周期性大量增殖导致红细胞破裂,引起机体发病。因此,只要能够抑制裂殖子入侵红细胞,就可以有效的降低疟疾的临床发病。DNA 疫苗能够较为全面的诱导体液和细胞免疫应答,且具有操作简单和造价低廉等特点^[5-9]。研制 DNA 重组疫苗已成为抗疟疾疫苗的重要途径之一。

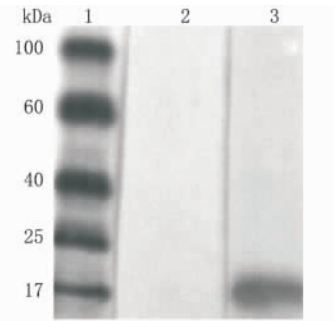
MSP1 是疟原虫在裂体增殖的过程中合成的,是一种被覆于裂殖子表面的糖蛋白。间日疟原虫的 MSP1 基因没有内含子,编码 1 726 个氨基酸,相对分子质量约 200 000, MSP1 在裂体增殖的后期,分解为小的蛋白多肽片段^[10-11],其中相对分子质量为 19 000 的羧基端片段,被携带进入红细胞内。研究^[12-13]表明,在猴和鼠疟疾模型中,以 MSP1-19 和



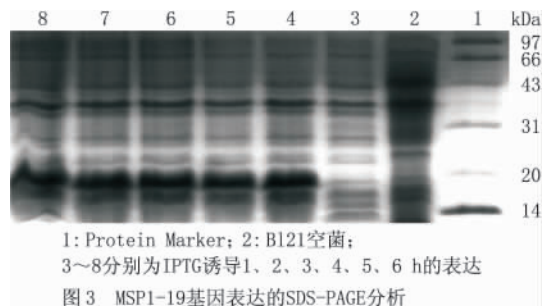
1: DNA Marker; 2: MSP1-19基因PCR产物
图1 MSP1-19基因PCR扩增产物的琼脂糖凝胶电泳鉴定



1: DNA Marker; 2: *Bam*H I和*Xho* I双酶产物
图2 重组载体pET-28a-MSP1-19的酶切鉴定



1: Marker; 2: 正常对照; 3: 间日疟
图4 MSP1-19表达的Western blot分析



1: Protein Marker; 2: B121空菌;
3~8分别为IPTG诱导1、2、3、4、5、6 h的表达
图3 MSP1-19基因表达的SDS-PAGE分析

MSP1-42 免疫分别诱导出对攻击感染的保护作用。然而 MSP1-19 更加引人注目, 因为其在不同疟原虫株中高度保守。因此 MSP1-19 抗原为疟疾防治的重要疫苗候选分子之一。

体外蛋白表达一般分为原核和真核两大类, 真核表达具有天然构象和活性等优点, 但其表达水平较低, 培养条件严格, 操作复杂, 成本高, 不利于大规模生产。与其相比, 原核表达量高, 条件简单, 成本低^[14]。我们选用大肠埃希菌作为宿主菌, 成功的表达出可溶性的 pET-28a/MSP1-19 重组蛋白, 然后经 Ni 离子层析柱纯化, 经 SDS-PAGE 电泳表明, pET-28a/MSP1-19 重组蛋白大小约为 19 kDa, 与理论大小基本相符。Western blot 印迹分析显示, 表达的重组蛋白能够被间日疟患者血清所识别, 而与正常人血清不反应, 表明所表达的重组蛋白具有一定的免疫活性, 为进一步的疟原虫疫苗的研究提供必要的基础。

【参 考 文 献】

[1] Mueller I, Galinski MR, Baird JK *et al.* Key gaps in knowledge of *Plasmodium vivax* a neglected human malaria parasite [J]. *Lancet Infect Dis* 2009 9(9): 555-566.
[2] 周水森, 王漪, 汤林华. 2008 年全国疟疾形势 [J]. *中国寄生虫学与寄生虫病学杂志* 2009 27(6): 455-457.
[3] John CC, O'Donnell RA, Sumba PO *et al.* Evidence that invasion-inhibitory antibodies specific for the 19 kDa fragment of merozoite surface protein-1 (MSP1-19) can play a protective role against blood-stage *Plasmodium falciparum* infection in individuals in a

malaria endemic area of africa [J]. *Immunol* 2004, 173(1): 666-672.
[4] Nudenzweig RS, Long CA. Malaria vaccines: multiple targets [J]. *Science* 1994 265(5177): 1381-1385.
[5] Marcell UF, Weber LR, Angela PT *et al.* Sequence diversity and evolution of the malaria vaccine candidate merozoite surface protein-1 (MSP1) of *Plasmodium falciparum* [J]. *Gene* 2003 30(4): 65-75.
[6] Rainczuk A, Smooker PM, Kedzierski L *et al.* The protective efficacy of MSP4/5 against lethal *Plasmodium chabaudi* adami challenge is dependent on the type of DNA vaccine vector and vaccination protocol [J]. *Vaccine* 2003 21(21): 3030-3042.
[7] Zakeri S, Djadid ND, Zeinali S. Sequence heterogeneity of the merozoite surface protein-1 gene (MSP1) of *Plasmodium vivax* wild isolated in southeastern Iran [J]. *Acta Tropica* 2003 88(1): 91-97.
[8] Vargas-Serrato E, Corredor V, Galinski MR. Phylogenetic analysis of CSP and MSP-9 gene sequences demonstrates the close relationship of *Plasmodium coatneyi* to *Plasmodium knowlesi* [J]. *Infect Gen Evolution* 2003 3(1): 67-73.
[9] Severini C, Menegon M, Gradoni L *et al.* Use of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 gene sequence analysis in the investigation of an introduced malaria case in Italy [J]. *Acta Tropica* 2002 84(2): 151-157.
[10] Del Portillo HA, Longacre S, Khouri E *et al.* Primary structure of the merozoite surface antigen 1 of *Plasmodium vivax* reveals sequences conserved between different plasmodium species [J]. *Proc Natl Acad Sci* 1991 88(9): 4030-4034.
[11] Del Portillo HA, Gysin J, Mattei DM *et al.* *Plasmodium vivax*: cloning and expression of a major blood-stage surface antigen [J]. *Exp Parasitol* 1988 67(2): 346-363.
[12] Tian JH, Kumar S, Kaslow DC *et al.* Comparison of protection induced by immunization with recombinant proteins from different regions of merozoite surface protein 1 of *Plasmodium yoelii* [J]. *Infect Immun* 1997 65(8): 3032-3036.
[13] Good MF, Kaslow DC, Miller LH. Pathways and strategies for developing a malaria blood-stage vaccine [J]. *Annu Rev Immunol* 1998 16(4): 57-87.
[14] Graslund S, Nordlund P, Weigelt J *et al.* Protein production and purification [J]. *Nat Methods* 2008 5(2): 135-146.