

恶性疟原虫M SP1₁₉与 PfCMR 基因的体外重组与克隆鉴定*

李学荣 余新炳 罗树红

中山医科大学寄生虫学教研室 广州 510089

提要 目的: 构建编码恶性疟原虫复合多价保护性抗原的基因的重组质粒, 为进行基因免疫提供条件。方法: 设计一对特异引物 P1 与 P2, 采用 PCR 法扩增获取 M SP1 中 C 端 19 肽基因, 纯化后用 Sal I + Xba I 双酶切, 把含复合基因 PfCMR 的重组质粒 pWR450-1/PfCMR 用 EcoR I + Sal I 双酶切, 回收复合基因 PfCMR, 将 M SP1₁₉ 基因与 PfCMR 基因串联后与经 EcoR I + Xba I 双酶切的真核表达质粒 pDNA 3 进行重组, 转化大肠杆菌 JM 109, 经电泳初筛、双酶切鉴定及 PCR 鉴定。结果: PCR 扩增获得 363 bp 的 M SP1₁₉ 基因, 重组克隆经双酶切鉴定及 PCR 鉴定后获得正确重组克隆子 pDNA 3-PfCMR-M SP1₁₉ (命名为 pDNA 3-Pf8), Pf8 基因长度为 618 bp。结论: 成功构建编码恶性疟原虫多价保护性抗原的基因的重组质粒 pDNA 3-Pf8。

关键词 恶性疟原虫 聚合酶链式反应 核酸疫苗 克隆 主要裂殖子表面蛋白 1

疟疾是世界性危害严重的寄生虫病, 疫苗可望成为疟疾防治的重要手段, 多价疫苗的研制越来越受到重视。Knapp 等把 M SA 1 与富含色氨酸的 SERA 及富含组氨酸的 HRP 杂合表达的抗原, 在猴体可诱导保护应答^[1]。有把含多个 B 细胞及 T 细胞表位的 M SA 1 与 RESA 在小鼠中诱导明显的抗体反应及淋巴细胞增殖反应, 对约氏疟原虫 (*Plasmodium yoelii*) 有部分保护作用^[2]。由于亚单位疫苗及重组活病毒疫苗均或多或少有一些缺陷, 发展新的安全有效的疫苗是保护人类健康的迫切需要, 基因免疫接种技术的出现为疟疾疫苗的研究开辟了一条新的途径, 直接给动物接种编码抗原的外源基因可使动物获得对该抗原的免疫力^[3-5]。

本文应用 PCR 技术扩增获得 FCC-1/HN 株裂殖子表面蛋白 1 C 端 19 肽基因 (M SP1₁₉), 与人工化学合成的复合基因 PfCMR^[6] 在体外串联, 插入含 CMV (巨细胞病毒) 强启动子的真核表达质粒 pDNA 3, 构建 pDNA 3-PfCMR-M SP1₁₉ (命名为 pDNA 3-Pf8), 并对其进行了克隆鉴定, 为进一步将该重组质粒转入 HeLa 细胞内表达蛋白及直接免疫接种动物观察其诱导产生免疫应答打下基础。

材料与方 法

质粒与菌株

真核表达质粒 pDNA 3 由香港大学引进, 大肠杆菌 JM 109 为本室保存的受体菌株。

酶与主要试剂

EcoR I、Xba I 和 Sal I 为 Pharmacia 公司产品; T4 DNA 连接酶为美国 Promega 公司产品; 低

溶点琼脂糖、丙烯酰胺和 N, N 亚甲基双丙烯酰胺购自 Sigma 公司。

引物的设计

根据恶性疟原虫 M SP1₁₉ 基因序列^[7], 设计并合成一对引物 P1 与 P2, 在引物 5' 端均添加限制性内切酶识别序列。合成后的引物经 15% 聚丙烯酰胺变性胶纯化。

P1 5' ⁻GGTTCGACA TGAACA TTTCA CAACACCAATGC-3'
Sal I

P2 5' ⁻GC TCTAGA TTAATA TGAAACTGTA TAA TA TTAACA-3'
Xba I

PCR 扩增 M SP1₁₉ 基因

反应体积为 100 μl, 其中 10 倍 PCR 缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L KCl, 2.0 mmol/L MgCl₂, 0.1 mg/ml BSA, pH 8.3) 10 μl; 2 mmol/L dNTP 10 μl; 引物 P1 及 P2 各 1 μl, 50 pmol; PfDNA 1.5 μg; H₂O 75.5 μl, 混匀后 95 变性 5 min 后, 再加入 Taq DNA 酶 1 μl (2 U)。进入下列循环: 94 变性 45 s, 60 退火 45 s, 72 延伸 90 s, 共进行 30 个循环, 最后一个循环 72 延伸 7 min。扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

M SP1₁₉、PfCMR 基因的重组克隆

M SP1₁₉、PfCMR 基因的重组克隆参方法照文献^[8]。

1 目的 DNA 片段的制备

1.1 pDNA 3 质粒 DNA 的制备 用碱裂解法少量提取质粒 pDNA 3, 溶于 20 μl TE (10 mmol/L

* 国家“九五”攻关项目基金、广东省自然科学基金资助基金和国家教育部博士点基金资助

Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0) 中, 取10 μ l 质粒, 用 EcoR I + Xba I 对其进行双酶切, 反应体系为25 μ l, 酶解完全后, 用0.8%的低熔点琼脂糖对目标DNA大片段进行回收。

1.2 PfCMR 基因的制备 碱裂解法提取重组质粒 pWR450-1/PfCMR^[9], EcoR I + Sal I 对其进行双酶切, 5%聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)分离回收目的片段 PfCMR。

1.3 MSP1₉ 基因的制备 把纯化后的 PCR 产物, 用 Sal I + Xba I 双酶切, 酶解完全后, 用酚/氯仿抽提, 乙醇沉淀后溶于 ddH₂O 中备用。

2 MSP1₉ 与 PfCMR 串联定向克隆 将上述3个片段混合在一起, 在0.5 ml 离心管中进行连接反应, 15 μ l 反应体积中: 含 T4DNA 连接酶0.5 μ l (3U/ μ l), 10倍 T4DNA 连接酶缓冲液 (200 mmol/L Tris-HCl, pH 7.6, 50 mmol/L MgCl₂, 50 mmol/L 二硫苏糖醇) 1.5 μ l, ATP (10 mmol/L) 1 μ l, 目的基因与载体质粒摩尔之比为5:1, 加 ddH₂O 至15 μ l, 16 $^{\circ}$ C 保温8 h。

3 感受态细胞的制备 参照文献^[8]并加以改进。大肠杆菌 JM 109 在新鲜 LB 平板37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 挑取单菌落于5 ml LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜, 然后取50 μ l 菌液于5 ml LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 振荡4 h, 取出菌液置冰浴10 min, 于4 $^{\circ}$ C 以4 000 g 离心10 min, 弃上清, 加0.1 mol/L 的 CaCl₂ 0.75 ml 重悬沉淀, 置冰浴30 min, 同法离心10 min, 弃上清, 加冰预冷的0.1 mol/L CaCl₂ 75 μ l 重悬细胞沉淀, 置冰浴30 min, 即可用于转化。

4 转化 取连接反应物3 μ l 加入感受态细胞中, 轻轻旋转内容物, 冰浴30 min, 42 $^{\circ}$ C 热冲击90 s, 快速移至冰浴中2 min。每管加 LB 培养基250 μ l, 37 $^{\circ}$ C 低速振荡45 min, 取150 μ l 涂到含氨苄青霉素的 LB 平皿上(氨苄青霉素浓度为100 μ g/ml), 37 $^{\circ}$ C 倒置培养过夜。同时设立2组对照, 一组为加入已知标准超螺旋质粒 pDNA 3 制品的感受态细胞, 一组为不加质粒 DNA 的感受态细胞。

JM 109 转化菌中阳性重组克隆的筛选与鉴定

转化菌落先经氨苄青霉素初步筛选, 从 LB 平皿上随机挑出氨苄青霉素抗性的菌落, 接种培养后进行进一步的鉴定。

1 电泳初步鉴定 采用碱裂解法抽提质粒 DNA, 在1.0%琼脂糖凝胶上电泳, 与对照质粒 pDNA 3 比较迁移率, 重组质粒 DNA 比对照迁移率慢的作进一步鉴定。

2 酶切鉴定阳性重组子 将电泳迁移率慢的重组质粒, 进一步用 EcoR I + Xba I 双酶切, 对照分子量, 1.0%琼脂糖凝胶上电泳, 以鉴别插入片段的大小。

3 PCR 鉴定 以双酶切鉴定正确的重组质粒 DNA 为模板, 用 P1、P2 为引物进行 PCR 扩增(用于鉴定 MSP1₉ 基因), 反应体系为50 μ l, 两引物各50 pmol/L, dNTP 各0.2 mmol/L, 10 \times PCR 缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L KCl, 2.0 mmol/L MgCl₂, 0.1 mg/ml BSA, pH 8.3) 5 μ l, 重组质粒 DNA 1 μ l, Taq DNA 聚合酶 IU; 在94 $^{\circ}$ C 45 s, 60 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s 的循环条件下进行30个循环。1.0%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。同时以 F1、F8 为引物^[6](用于鉴定 PfCMR 基因), 按照上述条件进行 PCR 扩增鉴定。

结 果

1 PCR 扩增结果

恶性疟原虫 FCC-1/HN 株基因组 DNA, 经 PCR 扩增后, 扩增产物经1.0%琼脂糖凝胶电泳在363 bp 处出现一特异条带, 而伯氏疟原虫及未加模板的空白对照均无扩增条带出现(图1)。

2 重组质粒的构建

用 EcoR I + Sal I 双酶切质粒 pWR450-1/PfCMR, 回收 PfCMR 基因(图2)。纯化后的 PCR 产物经 Sal I + Xba I 双酶切, 回收 MSP1₉ 基因, 把 PfCMR 基因、MSP1₉ 基因与经过 EcoR I + Xba I 双酶切并回收的质粒 pDNA 3 重组, 构建重组表达质粒 pDNA 3-Pf8。

3 重组质粒的筛选与鉴定

用改良后的制备细胞感受态方法, 把重组质粒 pDNA 3-Pf8 转化入大肠杆菌 JM 109, 在氨苄青霉素平板上得到一批菌落, 分别接种与扩增后, 提取转化子 DNA 进行鉴定。

3.1 重组质粒的电泳鉴定 在1.0%的琼脂糖凝胶电泳中, 可见从 JM 109 中抽提的质粒2号、5号、7号及8号比对照质粒 pDNA 3 迁移率慢(图3)。

3.2 重组质粒的酶切鉴定 取迁移率慢的重组质粒进一步作酶切鉴定, 用 EcoR I + Xba I 双酶切重组质粒, 电泳可见切出一长度约618 bp 片段(图4), 与 Pf8 基因相符。

3.3 重组质粒的 PCR 鉴定 对酶切出正确片段的重组质粒进一步用 P1、P2、F1、F8 两对引物分别进行 PCR 鉴定, 分别扩增出约为363 bp 及274 bp 长

www.cnki.net

图1 PCR 扩增恶性疟原虫MSP1₉基因片段(1.0% 琼脂糖电泳) M: PCR 标志物 1: 伯氏疟原虫 2, 3: 恶性疟原虫(箭头: 363 bp) 4: 蒸馏水 图2 重组质粒 pWR450-1/PfCMR 双酶切分析(1.0% 琼脂糖电泳) M: PCR 标志物 1: pWR450-1-PfCMR EcoR I /Sal I 双酶切 图3 1.0% 琼脂糖凝胶电泳初步筛选阳性克隆 1: pDNA3对照 2~ 9: 重组 pDNA3克隆 图4 重组质粒 pDNA3-Pf8的酶切鉴定 M: PCR 标志物 1, 2: pDNA3-Pf8用 EcoR I /Xba I 双酶切 图5 重组质粒 pDNA3-Pf8的PCR 鉴定 M: PCR 标志物 1, 2: F1与 F8的扩增产物 3, 4: P1与 P2的扩增产物

Fig 1 MSP1₉ gene fragment amplified by PCR (1.0% agarose gel electrophoresis) Lane M: PCR markers Lane 1: Plasmodium berghei Lanes 2, 3: Plasmodium falciparum (arrow: 363 bp) Lane 4: ddH₂O Fig 2 Restriction analysis of the recombinant plasmid pWR450-1-PfCMR (1.0% agarose gel electrophoresis) Lane M: PCR markers Lane 1: pWR450-1/PfCMR digested with EcoR I /Sal I Fig 3 Preliminary screening and identification of positive clones by 1.0% agarose gel electrophoresis Lane 1: pDNA3 (control) Lanes 2~ 9: Clones of recombinant pDNA3 Fig 4 Restriction analysis of recombinant plasmids pDNA3-Pf8 Lane M: PCR markers Lanes 1, 2: pDNA3-Pf8 digested by EcoR I /Xba I Fig 5 Identification of recombinant plasmids pDNA3-PfCMR-MSP1₉ by PCR technique Lane M: PCR markers Lanes 1, 2: Amplified products of F1 and F8 Lanes 3, 4: Amplified products of P1 and P2

度的片段(图5), 与预期大小相一致。

讨 论

从研制疫苗角度出发, 选择有保护作用的保守区的表位具有重要价值, 一般情况下, 保守区的表位比较稳定, 不易在免疫选择压力下发生变异。此外, 表达产物的正确构型对表达产物的活性具有相当大的重要性, 与原核表达系统比较, 真核细胞表达外源基因具有许多明显的优点, 如它能识别蛋白合成, 加工及分泌信号, 其表达的蛋白质在高级结构, 理化性质和生物学功能上接近于天然蛋白。用 PCR 技术在从整个基因组中获取所需的基因, 具有高效、特异及简便等优点, 可避免传统方法(如从基因组或 cDNA 文库中筛选目的基因)的繁琐过程。本文将用 PCR 技术获取的疟疾疫苗重要候选抗原 MSP1 C 端保守区 19 肽基因与人工化学合成的含恶性疟原虫不同发育期抗原的 6 个 T/B 细胞表位 PfCMR 进行串

联重组, 插入真核表达质粒 pDNA 3, 目的是表达复合多价疫苗抗原, 探讨能否刺激机体产生针对疟原虫生活史不同发育时期均起免疫作用的抗原, 多个 T/B 细胞表位的引入, 有可能克服 MHC 限制。

基因免疫接种技术的出现导致了基因疫苗的诞生, 它既有重组亚单位疫苗的安全性, 又具有减毒活疫苗诱导全方位免疫应答的高效力^[10, 11]。我们用于构建 DNA 疫苗的质粒 pDNA 3 是一种带有 CMV 强启动子的真核表达载体, 由 CMV 启动子、多克隆位点、氨苄抗性基因及乙酰霉素抗性基因等组成。CMV 强启动子下游的多克隆位点可供插入外源基因, 在读框正确下可表达出外源蛋白质。MSP1₉ 与 PfCMR 串联后与 pDNA 3 进行重组, 阳性克隆经用琼脂糖电泳初筛后, 用双酶切和 PCR 对其进行检测验证, 得到正确重组子 pDNA 3-Pf8。与常用筛选方法分子杂交相比, PCR 法具有快速及简便, 同样具有高敏性, 且不需要用同位素^[12]。目前我们已将构建好

的编码含有恶性疟原虫8个保护性表位的复合抗原基因 pDNA 3 -Pf8 直接免疫接种 BALB/c 小鼠, 观察其诱导产生的体液及细胞免疫反应, 结果将另文报道。

参 考 文 献

- Knapp B, Hundt E, Enders B, et al Protection of *Aotus* monkeys from malaria infection by immunization with recombinant hybrid proteins. *Infect Immun* 1992; 60:2397
- Chauhan VS, Chatterjee S, Johar PK, et al Synthetic peptides based on conserved *Plasmodium falciparum* antigens are immunogenic and protective against *Plasmodium yoelii* malaria. *Parasite Immunol* 1993; 15:239
- Kitsis RN, Buttrick PM, McNally EM, et al Homonal modulation of a gene injected into rat heart *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:4138
- Tang DC, Devit M, Johnston SA. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 1992; 356:152
- Sedegah M, Hedstrom R, Hobart P, et al Protection against malaria by immunization with plasmid DNA encoding circumsporozoite protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:9866
- 余新炳, 徐劲, 方建民, 等 恶性疟原虫疫苗研究 II 一种新的化学拼接法重组多价保护性抗原的基因. *中国寄生虫病防治杂志* 1994; 7:255
- Blackman MJ, Ling IT, Nicholls SC, et al Proteolytic processing of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 produces a membrane-bound fragment containing two epidermal growth factor-like domains. *Mol Biochem Parasitol* 1991; 49:29
- Sanbrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* Second edition, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 徐劲, 余新炳, 罗树红, 等 恶性疟原虫疫苗研究 IV: 恶性疟原虫保护性抗原复合基因(PfCMR)的克隆与高效表达. *中国人兽共患病杂志* 1997; 13:17
- Waine GJ, Mananus DP. Nucleic acids: Vaccines of the future. *Parasitol Today* 1995; 11:113
- Fynan EF, Webster RG, Fuller DH, et al DNA vaccines: Protective immunization by parenteral, mucosal and gene-gun inoculation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:11478
- 陈仕荣, 金福军, 钟雄林, 等 化学合成恶性疟原虫杂合45肽抗原基因在大肠杆菌中的表达. *中国寄生虫病防治杂志* 1994; 7:10

1997年9月2日收稿 1998年9月7日修回

(编辑: 李雅卿)

RECOMBINATION AND CLONING OF MSP1₁₉ AND PfCMR OF PLASMODIUM FALCIPARUM

LIXuerong, YU Xinbing, LUO Shuhong

Department of Parasitology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089

ABSTRACT

AM To construct a recombinant plasmid DNA encoding multiantigens of *Plasmodium falciparum* and to provide the requirements for DNA immunization. **METHODS**: Two oligonucleotide primers were designed to amplify MSP1₁₉, the purified PCR products were digested by Sal I + Xba I, and the recombinant plasmid pWR450-1/PfCMR was digested by EcoR I + Sal I to recover PfCMR gene. PfCMR and MSP1₁₉ gene fragments were linked and recombined with mammalian expression vector pDNA3. **RESULTS**: The MSP1₁₉ gene fragment with about 363 base pairs were specifically amplified by using PCR technique. The positive recombinant pDNA3-PfCMR-MSP1₁₉ (named pDNA3-Pf8) was screened and identified by agarose gel electrophoresis, endonuclease digestion and PCR technique, the whole length of Pf8 is 618 bp. **CONCLUSION**: By specifically amplifying MSP1₁₉ gene at the C-terminal of MSP1, a recombinant plasmid pDNA3-Pf8 encoding multiantigens of *Plasmodium falciparum* was successfully constructed.

Key words: *Plasmodium falciparum*, polymerase chain reaction, nucleic acid vaccine, cloning, merozoite surface protein 1

* Supported by UNDP/World Bank/WHO Special Program for Research and Training in Tropical Diseases and the Science Foundation for Youth, Ministry of Health, China