

文章编号: 1000-7423(2011)-04-0254-04

【论著】

不同的化学连接剂偶联恶性疟原虫 Pfs25 抗原和绿脓杆菌重组去毒外毒素 rEPA

钱锋

【摘要】 目的 偶联恶性疟原虫 Pfs25 抗原和绿脓杆菌重组去毒外毒素 rEPA, 并测试不同化学连接剂的偶联效果。**方法** 用化学连接剂 NAHT (DL-N-acetylhomocysteine thiolactone) 在 Pfs25 蛋白上加自由巯基, 化学连接剂 Sulfo-EMCS、EMCH、SBAP 和 Sulfo-SIAB 分别修饰载体蛋白 rEPA, 通过巯基化的 Pfs25 和经化学基团修饰的 rEPA 在一定条件下反应, 形成 Pfs25 与 rEPA 的偶联蛋白, 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 检测偶联结果。**结果** 成功地将 Pfs25 偶联到 rEPA 上, 构建了偶联蛋白 Pfs25-rEPA。对于蛋白的化学基团修饰, 伯胺基与 NHS (N-hydroxysuccinimide) 酯之间的反应效率要高于以 EDC 为桥联剂的羧基与酰肼基之间的反应; 对于偶联反应, 马来酰亚胺基与巯基之间的反应效率要高于卤素乙酰基与巯基之间的反应。**结论** 各化学连接剂都能将 Pfs25 偶联到 rEPA 上, 但偶联效率各不相同, 并形成不同样式的偶联蛋白。

【关键词】 恶性疟原虫; Pfs25; 绿脓杆菌; rEPA; 偶联

中图分类号: R382.312 文献标识码: A

Conjugation of *Plasmodium falciparum* Pfs25 to *Pseudomonas aeruginosa* ExoProtein A with Different Chemical Linkers

QIAN Feng

(Department of Rheumatology and Immunology, Changzheng Hospital, The Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

【Abstract】 Objective To conjugate *Plasmodium falciparum* Pfs25 to recombinant *Pseudomonas aeruginosa* Exo-Protein A (rEPA) and test the effect of conjugation using different chemical linkers. **Methods** The Pfs25 was thiolated by NAHT (DL-N-acetylhomocysteine thiolactone), whereas the carrier protein rEPA was modified by Sulfo-EMCS, EMCH, SBAP and Sulfo-SIAB respectively. The Pfs25-rEPA conjugates were formed by incubating the thiolated Pfs25 with modified rEPA under certain conditions. Coomassie blue stained SDS-PAGE was performed to examine the results of the conjugation. **Results** The Pfs25 was successfully conjugated to the carrier protein rEPA by the linkers used in this study. For the addition of a chemical group onto the protein, the reaction between the groups of primary amine and NHS (N-hydroxysuccinimide) ester was more efficient than the reaction between the groups of carboxyl and hydrazide with EDC as a crosslinker; for the formation of a conjugate, the reaction between the groups of maleimide and free sulfhydryl was more efficient than the reaction between the groups of haloacetyl and free sulfhydryl. **Conclusion** The Pfs25 can be conjugated to the rEPA by the chemical linkers with different conjugation efficiency and coupling proteins.

【Key words】 *Plasmodium falciparum*; Pfs25; *Pseudomonas aeruginosa*; rEPA; Conjugation

恶性疟原虫蛋白 Pfs25 是一个主要的恶性疟疾阻断疫苗候选抗原, 在疟原虫的晚期合子和动合子阶段表达, 相对分子质量(M_r)约为 25 000, 锚定在疟原虫细胞的表面^[1-3]。Pfs25 的序列相当保守, 比较恶性疟原虫 8 个实验室虫株和 34 个野生分离株的 Pfs25 序列发现, 仅有 2 个氨基酸的替换^[4,5]。将抗 Pfs25 的鼠、兔或猴免疫血清与恶性疟原虫混合, 饲喂雌性按蚊, 蚊中肠血腔壁上的卵囊生成数量可降低 90%以上,

甚至达 98%^[6,9]。但是, Pfs25 是一个低免疫原性的蛋白, 与铝佐剂结合的 Pfs25 需要很高的剂量才能在小鼠体内激发出有效水平的抗体 (未发表资料), 虽然 Pfs25 与油包水佐剂 (如 Montanide ISA51) 结合可极大提高其免疫原性, 但是临床试验显示其存在一定的不良反应^[10]。

化学偶联最早应用于病毒和细菌的多肽、多糖疫苗, 通过与载体蛋白的偶联使作为半抗原的多肽、多糖成为全抗原, 一些多糖偶联疫苗已完成临床试验,

如伤寒杆菌荚膜多糖的偶联疫苗^[11,12]。化学偶联同样可用于抗原蛋白与载体蛋白的偶联以提高被偶联抗原的免疫原性,恶性疟原虫 Pfs25 无论是与脑膜炎球菌外膜蛋白复合体 OMPC 偶联,还是与绿脓杆菌重组去毒外毒素 rEPA 偶联,甚至是自身偶联,都可极大地提升 Pfs25 在动物体内的免疫原性^[6-8],当 Pfs25 与恶性疟原虫环孢子蛋白的合成肽偶联,增强了两种偶联成分在动物体内的免疫应答^[13]。目前 Pfs25 的自身偶联疫苗 Pfs25-Pfs25 已被批准进入 I 期临床试验 (<http://clinicaltrials.gov>, NCT00977899), Pfs25 与绿脓杆菌重组去毒外毒素 rEPA 的偶联疫苗 Pfs25-rEPA 已完成临床前期的试验工作,即将进入 I 期临床试验。

本研究使用不同的化学连接剂将恶性疟原虫 Pfs25 抗原偶联到载体蛋白 rEPA 上,检测不同的化学连接剂化学反应效率,为化学连接剂的选择和偶联反应的优化提供有价值的信息。

材料与方法

1 蛋白和主要试剂

恶性疟原虫 Pfs25 蛋白和绿脓杆菌重组去毒外毒素 rEPA 分别为毕氏酵母和大肠埃希菌的表达产物,由美国国家健康研究院提供,纯化和鉴定参照文献^[8,14]进行。化学连接剂 NAHT (DL-N-acetylhomocysteine thiolactone) 购自美国 Sigma Aldrich 公司,其余化学连接剂 Sulfo-EMCS、EMCH、SBAP、Sulfo-SIAB 和 EDC 均购自美国 Thermo Scientific 公司。

2 在绿脓杆菌重组去毒外毒素 rEPA 的伯胺基上加马来酰亚胺和卤素乙酰基团

用孔径大小为相对分子质量 (M_r) 5 000 的过滤器 (美国 Millipore 公司) 将溶解 rEPA 的缓冲液转换成 PBS-乙二胺四乙酸 (EDTA) ($1\times$ PBS, 5 mmol/L EDTA, pH 7.2), 并调节蛋白浓度为 2 mg/ml。将 Sulfo-EMCS 粉末用 PBS-EDTA 溶解,加入到 rEPA 蛋白液中,终浓度为 1 mmol/L。22 °C 缓摇反应 1 h, 反应毕迅速转换缓冲液至 PBS-EDTA 中,调节蛋白浓度为 2 mg/ml。

将 Sulfo-SIAB 粉末用 PBS-EDTA 溶解,SBAP 粉末用二甲基亚砷溶解,分别加入到 rEPA 蛋白液中,终浓度均为 2 mmol/L。22 °C 避光缓摇反应 1 h, 反应毕转换缓冲液至硼酸-EDTA (50 mmol/L Borate Buffer, 5 mmol/L EDTA, pH 8.3) 中,调节蛋白浓度为 2 mg/ml。

3 在绿脓杆菌重组去毒外毒素 rEPA 的羧基上加马来酰亚胺基团

将 rEPA 转换至 MES-生理盐水缓冲液 (0.1 mol/L MES, 0.9% NaCl, pH 5.5) 中,调节蛋白浓度为 2 mg/ml。将 EMCH 和 EDC 粉末分别溶解在二甲基亚砷和 MES-生理盐水中,加入到 rEPA 蛋白液中,终浓度均为 4 mmol/L。4 °C 缓摇反应 2 h, 反应毕转换缓冲液至 PBS-EDTA 中,调节蛋白浓度为 2 mg/ml。

4 在重组 Pfs25 蛋白的伯胺基上加自由巯基

将 Pfs25 转换至 NaHCO₃-EDTA 缓冲液 (0.1 mol/L NaHCO₃, 5 mmol/L EDTA, pH 8.3) 中,调节蛋白浓度为 2 mg/ml。将 NAHT 粉末用 NaHCO₃-EDTA 溶解,加入到 Pfs25 蛋白液中,使终浓度为 10 mmol/L。4 °C 反应 18 h, 反应毕转换缓冲液至 PBS-EDTA 中或硼酸-EDTA 中,调节蛋白浓度为 2 mg/ml。

5 偶联反应

将巯基化的 Pfs25 与被基团修饰的 rEPA 按一定比例混合,其中巯基化的 Pfs25 适度过量加入,使被化学基团修饰的 rEPA 在反应中可完全消耗掉。除自由巯基与碘乙酰基的反应分别在 22 °C 反应 1 h、2 h, 以及在 4 °C 反应过夜外,其余偶联反应均在 22 °C 反应 1 h。自由巯基与马来酰亚胺之间的偶联反应在 PBS-EDTA 中进行,自由巯基与卤素乙酰基之间的偶联反应在硼酸-EDTA 中进行。

6 偶联产物 Pfs25-rEPA 的纯化

Pfs25-rEPA 偶联产物通过分子排阻层析去除未偶联的蛋白而获得纯化。使用 16/60 Superdex 200 分子排阻层析预装柱 (美国 GE Healthcare 公司), 以 PBS (pH 7.2) 为层析液,流速 1 ml/min。收集不同流出组分进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析。

结 果

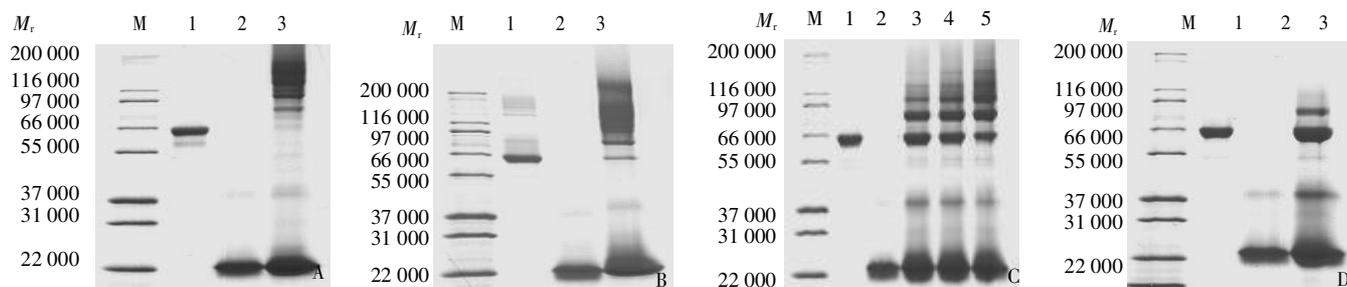
1 抗原蛋白 Pfs25 与载体蛋白 rEPA 的偶联

马来酰亚胺基团与自由巯基的反应比卤素乙酰基团与自由巯基的反应快速和有效,马来酰亚胺基团与自由巯基之间反应,在 22 °C 1 h 条件下迅速生成大量的交联偶联物 (图 1A、B), 作为反应底物的马来酰亚胺修饰的 rEPA 可被迅速耗尽 (图 1A)。而自由巯基与卤素乙酰基之间的反应缓慢,在同样的反应时间和温度下,仅小部分卤素乙酰基修饰的 rEPA 被消耗掉 (图 1C、D), 生成的产物以非交联的偶联产物为

主, 碘乙酰基与溴乙酰基相比, 碘乙酰基与自由巯基的反应要强于溴乙酰基。随着反应时间的延续, 碘乙酰基与自由巯基的反应在不断继续, 偶联产物在不断增加, 但仍然以非交联的偶联产物增加为主(图1C)。

在对载体蛋白 rEPA 进行马来酰亚胺基团修饰时, 伯胺基与 NHS (N-hydroxysuccinimide) 酯之间的反应效率高于以 EDC 为桥联剂的羧基与酰肼基团之

间的反应, 因为在 rEPA 修饰时 EMCH 的使用浓度高于 Sulfo-EMCS, 但是由 Sulfo-EMCS 修饰的 rEPA 在与巯基化 Pfs25 反应过程中几乎可被全部消耗掉(图1A), 而由 EMCH 修饰的 rEPA 在与巯基化 Pfs25 反应过程中仍然有一些残余(图 1B), 这些 rEPA 残余显然是未被马来酰亚胺基团修饰的 rEPA, 因为在反应中巯基化 Pfs25 都是适度过量加入的。



M: 蛋白质标志物; 1: 马来酰亚胺 rEPA (A 和 B)、碘乙酰 rEPA (C)、溴乙酰 rEPA (D); 2: 巯基化 Pfs25; 3: 在 22 °C 1 h 反应条件下产生的偶联混合物; 4: 在 22 °C 2 h 反应条件下产生的偶联混合物; 5: 在 4 °C 过夜反应条件下产生的偶联混合物。

A: 巯基化 Pfs25 与用 Sulfo-EMCS 修饰的马来酰亚胺 rEPA 之间的偶联; B: 巯基化 Pfs25 与用 EMCH 修饰的马来酰亚胺 rEPA 之间的偶联; C: 巯基化 Pfs25 与用 Sulfo-SIAB 修饰的碘乙酰 rEPA 之间的偶联; D: 巯基化 Pfs25 与用 SBAP 修饰的溴乙酰 rEPA 之间的偶联。

M: Protein marker; 1: Maleimide-rEPA (A and B), Iodoacetyl-rEPA (C), Bromoacetyl-rEPA (D); 2: Thiolated Pfs25; 3: Conjugation mixture produced at 22 °C for 1 h; 4: Conjugation mixture produced at 22 °C for 2 h; 5: Conjugation mixture produced at 4 °C overnight.

A: Conjugation between thiolated Pfs25 and maleimide-rEPA modified by Sulfo-EMCS; B: Conjugation between thiolated Pfs25 and maleimide-rEPA modified by EMCH; C: Conjugation between thiolated Pfs25 and iodoacetyl-rEPA modified by Sulfo-SIAB; D: Conjugation between thiolated Pfs25 and bromoacetyl-rEPA modified by SBAP.

图 1 偶联产物的考马斯亮蓝染色 SDS-PAGE 分析

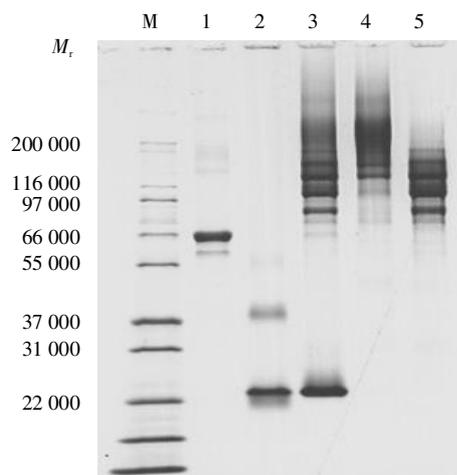
Fig. 1 Coomassie blue stained SDS-PAGE analysis of conjugation products

2 Pfs25-rEPA 偶联产物的纯化

当载体蛋白 rEPA 在偶联反应中被完全消耗掉后, 未被偶联的 Pfs25 由于与偶联蛋白有较大的相对分子质量差异, 可通过分子排阻层析一步去除。由 Sulfo-EMCS 修饰的 rEPA 与巯基化 Pfs25 反应生成 Pfs25-rEPA 偶联混合物, 经过分子排阻层析后, 未被偶联的 Pfs25 被完全去除干净, 从而得到完全的 Pfs25-rEPA 偶联蛋白。通过合并不同的分子排阻层析收集管, 可将 Pfs25-rEPA 偶联蛋白按照相对分子质量大小分成不同的组分(图 2)。

讨 论

蛋白分子上一些基团可被用来进行偶联反应, 如伯胺基和羧基, 通过化学连接剂可将不同的蛋白分子连接成一个分子。从所获得的结果来看, 通过 NHS 酯对蛋白伯胺基的修饰比通过酰肼基对蛋白羧基的修饰效率高, 且不需要其他的化学桥联剂参与, 因此在选择蛋白修饰的方法时, 应首先考虑对伯胺基进行修



M: 蛋白质标志物; 1: 用 Sulfo-EMCS 修饰的马来酰亚胺 rEPA; 2: 巯基化 Pfs25; 3: 偶联混合物; 4: 纯化的偶联产物 Pfs25-rEPA 组分 1; 5: 纯化的偶联产物 Pfs25-rEPA 组分 2。

M: Protein marker; 1: Maleimide-rEPA modified by Sulfo-EMCS; 2: Thiolated Pfs25; 3: Conjugation mixture; 4: Purified Pfs25-rEPA conjugate fraction 1; 5: Purified Pfs25-rEPA conjugate fraction 2.

图 2 纯化的偶联产物考马斯亮蓝染色 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 Coomassie blue stained SDS-PAGE analysis of purified conjugation product

饰, 除非有特别原因要对蛋白的羧基进行修饰。自由巯基与马来酰亚胺基团的反应效率远高于自由巯基与卤素乙酰基团之间的反应, 因此在制备偶联蛋白时一般考虑采用前一种反应, 但前一种反应的产物以交联的偶联产物为主, 而后者主要是非交联的偶联产物, 如果希望得到以非交联产物为主的偶联产物, 可考虑自由巯基与碘乙酰基的反应, 但需适当延长反应时间以增大反应得率。

本研究中 Pfs25 的巯基化是通过化学连接剂 NAHT 对蛋白伯胺基的修饰来实现的, 除 NAHT 外, SATA 也是一个常用的使蛋白巯基化的化学连接剂, SATA 通过 NHS 酯对蛋白伯胺基的反应将受酰基化保护的巯基加到蛋白上, 然后通过盐酸羟胺去保护从而获得自由巯基, 对巯基进行保护的目的是为了防止巯基化过程中因氧化而形成二硫键。SATA 和 NAHT 都是通过对伯胺基的反应来对蛋白进行巯基化, 并且反应类型均为亲核反应, 但是 SATA 的反应效率远高于 NAHT。本研究中使用 NAHT, 是因在用 NAHT 对 Pfs25 进行巯基化的过程中并未出现严重的氧化现象, 仅仅有时有轻微的聚合物形成, 如果在反应中用氮气驱赶掉反应缓冲液中的氧气, 并在反应面上覆盖氮气可在很大程度上抑制氧化的发生; 通过延长 NAHT 的反应时间同样可获得所需量的巯基化 Pfs25 产物; 可省去一步 SATA 所需要的去保护化学反应。

一个蛋白的 N 端氨基以及赖氨酸残基的氨基均为伯胺基, 而一个蛋白的 C 端和天冬氨酸、谷氨酸残基都含有羧基, 所以在一个蛋白上常含有多个伯胺基和羧基, 在通过伯胺基和羧基对蛋白进行修饰时, 一般很难得到均一的被修饰蛋白, 最终的偶联产物是含有多种比例甚至是交联的偶联产物混合物。如果在偶联反应中, 载体蛋白 rEPA 不能被完全耗尽, 则因其相对分子质量与 1:1 的 Pfs25-rEPA 偶联产物相近, 通过分子排阻层析很难将两者完全分离开来, 如果需要彻底去除未被偶联的载体蛋白 rEPA, 则需损耗一定量的 1:1 比例甚至 2:1 比例的 Pfs25-rEPA 偶联产物, 或者增加一步其他类型的纯化步骤^[8]。

参 考 文 献

- [1] Kaslow DC, Quakyi IA, Syin C, *et al.* A vaccine candidate from the sexual stage of human malaria that contains EGF-like domains [J]. *Nature*, 1988, 333(6168): 74-76.
- [2] Stowers A, Carter R. Current developments in malaria transmission-blocking vaccines[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2001, 1(4): 619-628.
- [3] Saul A. Mosquito stage, transmission blocking vaccines for malaria[J]. *Curr Opin Infect Dis*, 2007, 20(5): 476-481.
- [4] Kaslow DC, Quakyi IA, Keister DB. Minimal variation in a vaccine candidate from the sexual stage of *Plasmodium falciparum* [J]. *Mol Biochem Parasitol*, 1989, 32(1): 101-103.
- [5] Shi YP, Alpers MP, Pova MM, *et al.* Single amino acid variation in the ookinete vaccine antigen from field isolates of *Plasmodium falciparum* [J]. *Mol Biochem Parasitol*, 1992, 50(1): 179-180.
- [6] Wu Y, Przysiecki C, Flanagan E, *et al.* Sustained high-titer antibody responses induced by conjugating a malarial vaccine candidate to outer-membrane protein complex[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(48): 18243-18248.
- [7] Kubler-Kielb J, Majadly F, Wu Y, *et al.* Long-lasting and transmission-blocking activity of antibodies to *Plasmodium falciparum* elicited in mice by protein conjugates of Pfs25[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(1): 293-298.
- [8] Qian F, Wu Y, Muratova O, *et al.* Conjugating recombinant proteins to *Pseudomonas aeruginosa* ExoProtein A: a strategy for enhancing immunogenicity of malaria vaccine candidates[J]. *Vaccine*, 2007, 25(20): 3923-3933.
- [9] Qian F, Rausch KM, Muratova O, *et al.* Addition of CpG ODN to recombinant *Pseudomonas aeruginosa* ExoProtein A conjugates of AMA1 and Pfs25 greatly increases the number of responders[J]. *Vaccine*, 2008, 26(20): 2521-2527.
- [10] Wu Y, Ellis RD, Shaffer D, *et al.* Phase 1 trial of malaria transmission blocking vaccine candidates Pfs25 and Pvs25 formulated with montanide ISA 51[J/OL]. *PLoS One*, 2008, 3(7): e2636. <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0002636>
- [11] Lin FY, Ho VA, Khiem HB, *et al.* The efficacy of a *Salmonella typhi* Vi conjugate vaccine in two-to-five-year-old children [J]. *N Engl J Med*, 2001, 344(17): 1263-1269.
- [12] Mai NL, Phan VB, Vo AH, *et al.* Persistent efficacy of Vi conjugate vaccine against typhoid fever in young children[J]. *N Engl J Med*, 2003, 349(14): 1390-1391.
- [13] Kubler-Kielb J, Majadly F, Biesova Z, *et al.* A bicomponent *Plasmodium falciparum* investigational vaccine composed of protein-peptide conjugates[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(3): 1172-1177.
- [14] Tsai CW, Duggan PF, Shimp Jr RL, *et al.* Overproduction of *Pichia pastoris* or *Plasmodium falciparum* protein disulfide isomerase affects expression, folding and O-linked glycosylation of a malaria vaccine candidate expressed in *P. pastoris* [J]. *J Biotechnol*, 2006, 121(4): 458-470.

(收稿日期: 2010-11-12 编辑: 衣凤芸)