

## 约氏疟原虫 *Pys25* 和 *Pys48* 抗原的表达与产物活性初步研究

李伟杰<sup>1</sup>, 盛稳稳<sup>1</sup>, 陈剑清<sup>1</sup>, 于威<sup>1</sup>, 吴祥甫<sup>1</sup>, 崔立旺<sup>3</sup>, 张耀洲<sup>1,2,4</sup>, 舒特俊<sup>1</sup>

(1. 浙江理工大学生命科学学院生物化学研究所, 杭州 310018; 2. 天津国际生物医药联合研究院, 天津 300457;  
3. 美国宾夕法尼亚州立大学昆虫系, 美国; 4. 天津大学, 天津 300192)

**摘要:** 通过家蚕杆状病毒表面展示技术获得约氏疟原虫有性阶段候选抗原 *Pys25* (217AA) 和 *Pys48* (455AA), 以期建立一种新的鼠疟模型。首先利用大肠杆菌原核表达系统表达这两种抗原, 免疫 Balb/c 小鼠制备多克隆抗体, 同时利用家蚕杆状病毒表面展示技术, 并改造 pFastBac Dual 载体, 在其 *Ph* 启动子前端加入哺乳动物启动子 *CMV*, 并将目的蛋白基因与杆状病毒囊膜蛋白 *gp64* 基因片段融合表达, 融合蛋白展示在病毒粒子表面。用其免疫 Balb/c 小鼠, 在小鼠体内, *CMV* 启动子启动融合蛋白表达, 共同刺激小鼠产生多克隆抗体。通过间接 ELISA 检测, 两种抗原抗体效价均能达到 1:12 800。本实验为后期免疫阻断效应研究、多时期多价疫苗的构建及鼠疟模型的建立提供了实验基础。

**关键词:** *Pys25* 和 *Pys48*; 家蚕杆状病毒表面展示技术; *CMV* 启动子; 疫苗

**中图分类号:** Q786 **文献标志码:** A

### 0 引言

疟疾疫苗的研制和开发一直是控制疟疾传播的重要策略之一, 抗疟原虫有性阶段的传播阻断疫苗 (TBV) 能有效阻止疟原虫从感染者到未感染者的传播, 且其他抗疟药物联合使用时, 能极大地提高其他药物的疗效, 具有很高的经济社会效益<sup>[1-3]</sup>。现阶段, 将不同时期的候选疫苗融合表达制备的多时期多价疫苗, 由于具有高效抗疟作用, 已成为疟疾疫苗研制的热点之一<sup>[4-6]</sup>。

约氏疟原虫宿主为鼠, 其疫苗可以直接免疫鼠检测疗效, 因此常作为模型用于其他疟疾的免疫研究<sup>[7-8]</sup>。本研究选取约氏疟原虫动合子时期候选抗原 *Pys25*<sup>[9-10]</sup> 和配子体时期的候选抗原 *Pys48*<sup>[11]</sup>, 通过家蚕杆状病毒表面展示技术<sup>[12-15]</sup>, 构建重组病

毒表达 *Pys25* 和 *Pys48* 蛋白, 制备多克隆抗体, 以期作为一种新的鼠疟模型的建立及将 *Pys25* 和 *Pys48* 蛋白融合表达制备多时期多价疫苗提供理论依据。

### 1 试验

#### 1.1 材料和方法

##### 1.1.1 材料、菌种和主要试剂

目的基因 *Pys25* 和 *Pys48* 为美国宾夕法尼亚州立大学崔立旺教授友情馈赠, 实验用菌株 *E. coli* TG1、*E. coli* BL21、*E. coli* Rosseta、*E. coli* DH10Bac 和载体 pGEX-4T-1、pET32a、pFastBac Dual 及家蚕卵巢上皮细胞 BmN 均为本实验室保存; *CMV-Ph-SP-TM* 基因及引物由江苏金唯智生物技术有限公司合成; 其他实验用酶、试剂等均为本实验室常备。

收稿日期: 2014-01-04

基金项目: 国家高技术研究发展技术“863”项目 (No. 2011AA100603)

作者简介: 李伟杰 (1986-), 男, 湖北省仙桃人, 硕士研究生, 研究方向为生物制药。

通信作者: 舒特俊, E-mail: peter-shu@126.com

### 1.1.2 生物信息学分析

通过 DNASTar 软件中的 EditSeq 和 NCBI→BLAST 等对目的基因进行翻译、预测分子量及等电点等;通过 ProtScale tool 对目的蛋白进行疏水性分析;通过 TMHMM 服务器进行跨膜分析;通过 SignalP4.0 Server 进行信号肽预测;通过 PROSITE tools 进行功能区预测。

### 1.1.3 目的基因的原核表达纯化及多克隆抗体制备

原核表达纯化蛋白及制备多克隆抗体,为后期真核蛋白的检测鉴定提供抗体。

#### (1) 重组质粒的构建和鉴定

利用 Primer Premier 5 软件设计目的基因引物,其上下游分别引入 *EcoRI* 和 *XhoI* 酶切位点,以目的基因为模板进行 PCR 扩增,PCR 产物和载体 pGEX-4T-1、pET-32a 均用 *EcoRI* 和 *XhoI* 进行双酶切,*Pys25* 基因连接 pGEX-4T-1,*Pys48* 基因连接 pET-32a,转化 *E. coli* TG1 后筛选阳性克隆,进行 PCR 和双酶切鉴定及测序。

引物序列如下:

*Pys25*-F 5'-CGGAATTCATGAACACATACTAC-3' *EcoRI*

*Pys25*-R 5'-CCCTCGAGTTAGATGATGTG-3' *XhoI*

*Pys48*-F 5'-GGAATTCATGTTGAGCTTCTTTGGC-3' *EcoRI*

*Pys48*-R 5'-CCCTCGAGTTACAGCCACATGAAG-3' *XhoI*

PCR 程序为:

94℃预变性 5 min,94℃变性 1 min,53℃退火 45 s,72℃延伸(*Pys25* 为 45 s,*Pys48* 为 1 min 20 s),循环 30 次后 72℃延伸 10 min。反应完成后 4℃保存。

#### (2) 目的蛋白的表达纯化及抗体制备

将测序正确的重组质粒 pET-32a-*Pys48* 和 pGEX-4T-1-*Pys25*,分别转化 *E. coli* Rosseta 和 *E. coli* BL21,并加 IPTG(终浓度为 0.5 mM)诱导表达目的蛋白,SDS-PAGE 电泳检测,分别用 His 柱和 GST 亲和层析柱纯化融合蛋白,免疫 Balb/c 小鼠制备抗体,并用间接 ELISA 法测定抗体效价。

### 1.1.4 重组病毒的获得与鉴定

#### (1) 重组载体和重组质粒的构建

以合成的 CMV-Ph-SP-TM 基因为模板,设计引物,PCR 扩增基因并将其连接 pFastBac Dual 载体构建重组载体 pFastBac Dual-CMV-Ph-SP-TM,

同时设计 *Pys25* 和 *Pys48* 目的基因下游不含终止子的引物,扩增目的片段,将其插入 SP 和 TM 之间,构建重组质粒 pFastBac Dual-CMV-Ph-SP-*Pys25*-TM 和 pFastBac Dual-CMV-Ph-SP-*Pys48*-TM。

设计的引物序列为:

CMV-F 5'-CCCGGTACCTAGTTATTAATAG-3' *KpnI*

TM-R 5'-CCCAAGCTTTTAATATTGTCTAC-3' *HindIII*

*Pys25*-R1 5'-GGAATTCATGTTGAGCTTCTTTGGC-3' *XhoI*

*Pys48*-R1 5'-CCCTCGAGTTACAGCCACATGAAG-3' *XhoI*

CMV-Ph-SP-TM 基因 PCR 程序为:94℃预变性 5 min,94℃变性 1 min,56℃退火 45 s,72℃延伸 1 min,循环 30 次后 72℃延伸 10 min。反应完成后 4℃保存。

#### (2) 重组病毒的获得与鉴定

将重组质粒转化 DH10 感受态细胞,通过蓝白斑筛选,挑选阳性菌落,提 Bacmid,通过脂质体介导法转染家蚕 BmN 细胞,待细胞发病后收集病毒液,提取病毒基因组,进行目的基因引物和 M13 引物交叉 PCR 鉴定。

M13 引物序列如下:

M13-F 5'-GTTTTTCCCAGTCACGAC-3'

M13-R 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

### 1.1.5 重组病毒在家蚕细胞中的表达与鉴定

将第 3 代病毒接种 BmN 细胞,待细胞约 80% 发病漂浮时,收集细胞,以原核制备的多克隆鼠抗为一抗,以 HRP 标记的羊抗鼠(1:10 000)为二抗进行 SDS-PAGE 和 Western blotting 鉴定;同时,将第 3 代病毒接种生长良好的铺有载玻片的细胞小碟中,待细胞出现漂浮时,将其固定,以原核制备的多克隆鼠抗为一抗,以 FITC 标记的羊抗鼠为二抗(1:500),进行免疫荧光检测,并在激光共聚焦显微镜下观察固定在载玻片上的细胞,FITC 染料激发波长为 520 nm,DAPI 激发波长为 353 nm。

### 1.1.6 重组病毒粒子的纯化及多克隆抗体的制备

将病毒大量接种家蚕细胞,待细胞发病破裂后,收集病毒液,经 15 000 r/min 高速离心 30 min 收集上清,50 000 r/min 超速离心 40 min 收集沉淀,此时,绝大部分病毒粒子都在沉淀中,将其用 PBS 溶解,BCA 蛋白定量后稀释到 1 mg/mL,腹腔注射

收集发病细胞,提病毒基因组,并以提取的病毒基因组为模板,以目的基因上下游及 M13 上下游为引物,交叉 PCR 鉴定,结果均有明显条带,表明重组

病毒构建成功,如图5。

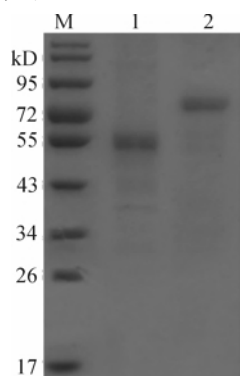


图4 融合蛋白 *Pys25* 和 *Pys48* 纯化电泳结果  
M: 蛋白分子量标准; 1: *Pys25* 纯化; 2: *Pys48* 纯化

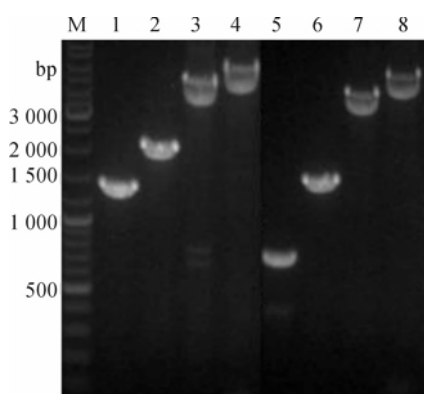


图5 重组病毒基因组 PCR 鉴定

M: DNA Marker; 1: *Pys48*-F、*Pys48*-R1 为引物 PCR; 2: *Pys48*-F、M13-R 为引物 PCR; 3: *Pys48*-R1、M13-F 为引物 PCR; 4: M13-F、M13-R 为引物 PCR; 5: *Pys25*-F、*Pys25*-R1 为引物 PCR; 6: *Pys25*-F、M13-R 为引物 PCR; 7: *Pys25*-R1、M13-F 为引物 PCR; 8: M13-F、M13-R 为引物 PCR

## 2.4 重组病毒的表达鉴定

收集病毒细胞,进行 SDS-PAGE 和 Western Blot 检测,结果, *Pys25* 重组蛋白在目的大小处(TM 序列约 5 kD, *Pys25* 约 24 kD)有明显弥散条带, *Pys48* 在目的大小(5 kD+52 kD)处也有明显条带(分子量大的条带可能为目的融合蛋白经真核修饰后的产物),表明重组蛋白在细胞中均成功表达,同时也说明原核制备的多克隆抗体具有良好的特异性。如图6和图7。

## 2.5 重组蛋白的免疫荧光鉴定

将病毒接种生长良好的铺有盖玻片的细胞小碟中,30 h 后,细胞已有少量发病漂浮,将细胞用固定液固定,进行免疫荧光实验,实验完成后,将盖玻片取出,并固定在载玻片上,在激光共聚焦显微镜下观察细胞,结果显示目的蛋白均展示在细胞表面和杆状病毒囊膜上,如图8和图9。

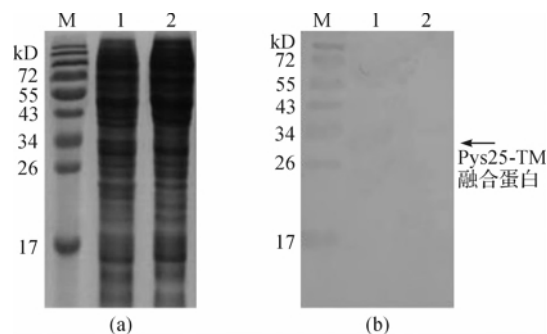


图6 *Pys25* 融合蛋白在家蚕细胞中的表达鉴定  
(a) *Pys25* 融合蛋白 SDS-PAGE 鉴定; (b) *Pys25* 融合蛋白 Western Blot 鉴定; M: 蛋白分子量标准; A1、B1. 接种 vBm*Pys25* 病毒 72h 的细胞样品; A2、B2. 正常细胞样品

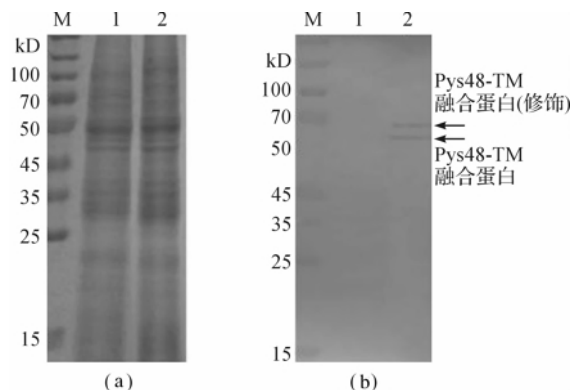


图7 *Pys48* 蛋白在家蚕细胞中的表达鉴定

(a) *Pys48* 融合蛋白 SDS-PAGE 鉴定; (b) *Pys48* 融合蛋白 Western Blot 鉴定; M: 蛋白分子量标准; A1、B1. 正常细胞样品 A2、B2. 接种 vBm*Pys48* 病毒 96 h 的细胞样品

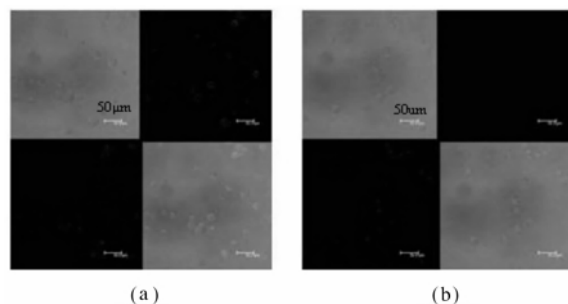


图8 融合蛋白 *Pys25* 在家蚕 BmN 细胞中的表面展示鉴定  
(a) 接种 vBm*Pys25* 病毒细胞; (b) 正常家蚕细胞

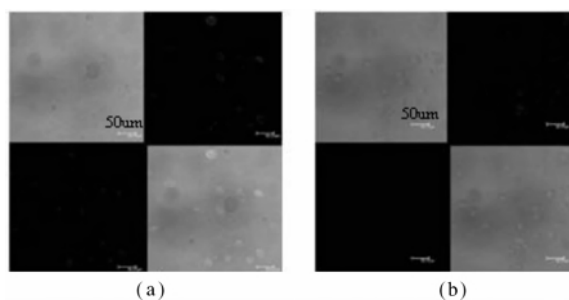


图9 融合蛋白 *Pys48* 在家蚕 BmN 细胞中的表面展示鉴定  
(a) 接种 vBm*Pys48* 病毒细胞; (b) 正常家蚕细胞

## 2.6 多克隆抗体效价检测

通过间接 ELISA 法测定抗体效价,以表面展示

有目的蛋白的病毒粒子为抗原进行包被,结果表明,两种抗体效价均能达到 1 : 12 800,如图 10。

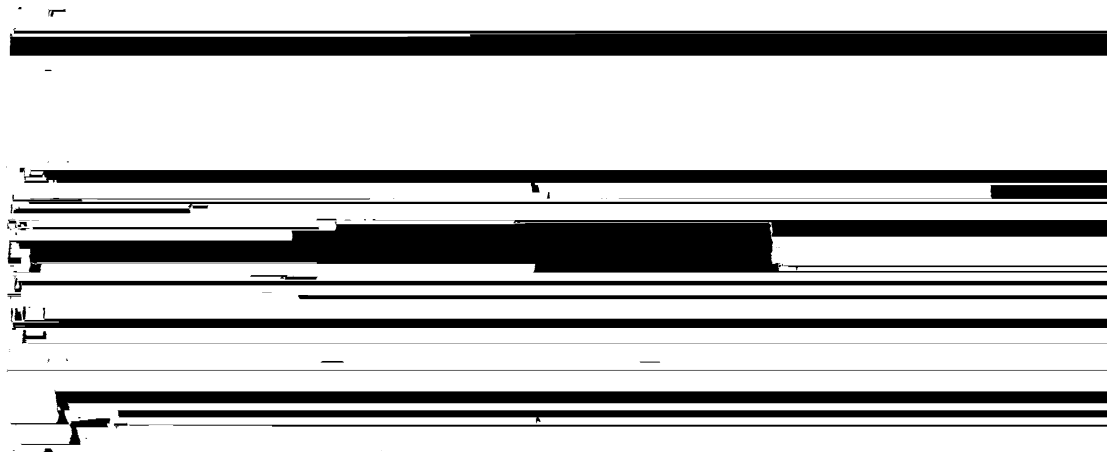


图 10 间接 ELISA 法测定抗体效价

## 3 讨 论

疫苗候选抗原的免疫原性决定着疫苗的有效性,而真核表达系统与原核表达系统相比,表达的蛋白在空间结构上与其天然结构更为相似;家蚕表面展示系统作为一种真核表达系统,具有高效、经济、安全等诸多优点,已被广泛的用于新型疫苗的研制。

选取约氏疟原虫有性阶段的表面抗原 *Pys25* 和 *Pys48*,通过原核表达目的蛋白,制备多克隆抗体,其一可以用于真核表达蛋白的检测,其二可以在后期的传播阻断实验中,比较其与真核抗体的阻断效应。

接着,利用家蚕杆状病毒表面展示技术,真核表达目的蛋白。我们在 pFastBac Dual 载体 Ph 启动子前加入 CMV 启动子<sup>[16-18]</sup>,并将目的基因与杆状病毒囊膜糖蛋白 gp64 的 N 端信号肽核酸序列片段 SP 和 C 端膜锚定序列 TM 基因片段融合,成功构建重组病毒 vBm*Pys25* 和 vBm*Pys48*,这样,在家蚕细胞中,Ph 启动子启动融合蛋白表达,融合蛋白展示于病毒粒子囊膜表面;其免疫小鼠后,在小鼠体内,CMV 启动子启动融合蛋白表达,共同刺激机体产生抗体,经间接 ELISA 检测,两种抗体效价均能达到 1 : 12 800。

通过两种抗体的制备,为后期的传播阻断实验提供了实验基础;若两种抗体均有明显传播阻断效果,可以将其融合表达,制备多时期多价疫苗;同时,约氏疟为鼠疟,和其他疟疾的 P25 蛋白及 P48 蛋白具有较高的同源性,故可以作为鼠疟模型,为其他疟疾的研究提供参考。

## 参考文献:

- [1] Carter R, Kumar N, Quakyi I, et al. Immunity to sexual stages of malaria parasites[J]. Progress in Allergy, 1988, 4: 193-214.
- [2] 王又红. 疟疾传播阻断疫苗的研究现状和应用前景[J]. 国外医学: 寄生虫病分册, 1998, 25(6): 245-249.
- [3] Kaslow DC, Shiloach J. Production, purification and immunogenicity of a malaria transmission-blocking vaccine candidate: TBV25H expressed in yeast and purified using nickel-NTA agarose[J]. Nature Biotechnology, 1994, 12(5): 494-499.
- [4] Tine J A, Lanar D E, Smith D M, et al. NYVAC-Pf7: a poxvirus-vectored, multiantigen, multistage vaccine candidate for Plasmodium falciparum malaria[J]. Infection and Immunity, 1996, 64(9): 3833-3844.
- [5] 马长玲. 疟原虫复合多价疫苗研究进展[J]. 中国热带医学, 2001, 1(1): 41-43.
- [6] 郭鑫, 潘卫庆, 张冬梅. 恶性疟疾多价疫苗的构建及表达[J]. 中国热带医学, 2012, 12(8): 913-915.
- [7] Landau I, Michel J C, Adam J P, et al. The life cycle of Plasmodium vinckei lentum subsp. nov. in the laboratory; comments on the nomenclature of the murine malaria parasites[J]. Ann. trop. Med. Parasit., 1970, 64(3): 315-23.
- [8] 黄文洲, 张家坝, 叶秀玉, 等. 约氏疟原虫—斯氏按蚊系统鼠疟模型及用作筛选杀组织期抗疟药的研究[J]. 中国医学科学院学报, 1982(4): 17.
- [9] 刘英杰, 崔洋, 陈光, 等. 疟疾传播阻断疫苗 *Pys25* 重组蛋白免疫活性的实验研究[J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 2007, 14(2): 76-79.
- [10] Tsuboi T, Cao Y M, Hitsumoto Y, et al. Two antigens on zygotes and ookinetes of Plasmodium yoelii and

- Plasmodium berghei that are distinct targets of transmission-blocking immunity[J]. Infection and Immunity, 1997, 65(6): 2260-2264.
- [11] 单颖, 刘英杰, 郑丽, 等. 约氏疟原虫 *Pys48* 核酸疫苗传播阻断效应的实验研究[J]. 微生物学杂志, 2012, 31(6): 19-22.
- [12] Boublik Y, Di Bonito P, Jones I M. Eukaryotic virus display: engineering the major surface glycoprotein of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) for the presentation of foreign proteins on the virus surface[J]. Nature Biotechnology, 1995, 13(10): 1079-1084.
- [13] 沈佳, 吕正兵, 陈健, 等. 杆状病毒表面展示系统研究进展[J]. 微生物学通报, 2008, 35(3): 421-425.
- [14] Valdes V J, Sampieri A, Sepulveda J, et al. Using double-stranded RNA to prevent in vitro and in vivo viral infections by recombinant baculovirus[J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(21): 19317-19324.
- [15] Lindley K M, Su J L, Hodges P K, et al. Production of monoclonal antibodies using recombinant baculovirus displaying gp64-fusion proteins[J]. Journal of Immunological Methods, 2000, 234(1): 123-135.
- [16] Volkman L E, Goldsmith P A. In vitro survey of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus interaction with nontarget vertebrate host cells[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1983, 45(3): 1085-1093.
- [17] Pan Y, Zhao Q, Fang L, et al. Efficient gene delivery into mammalian cells by recombinant baculovirus containing a hybrid cytomegalovirus promoter/Semliki Forest virus replicon[J]. The Journal of Gene Medicine, 2009, 11(11): 1030-1038.
- [18] Gröner A, Granados R R, Burand J P. Interaction of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus with two nonpermissive cell lines[J]. Intervirology, 1984, 21(4): 203-209.
- [19] 张浩. 杆状病毒介导的针对 DLL4 蛋白的肿瘤疫苗的研究[D]. 杭州: 浙江理工大学, 2013.

## Preliminary Study on Expression and Product Activity of *Pys25* and *Pys48* Antigens of *Plasmodium Yoelii*

LI Wei-jie<sup>1</sup>, SHENG Wen-wen<sup>1</sup>, CHEN Jian-qing<sup>1\*</sup>, YU Wei<sup>1</sup>,  
WU Xiang-fu<sup>1</sup>, CUI Li-wang<sup>3</sup>, ZHANG Yao-zhou<sup>1,2,4</sup>, SHU Te-jun<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Biochemistry, School of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China; 2. Tianjin International Joint Academy of Biotechnology and Medicine, Tianjin 300457, China; 3. Department of Insect, Pennsylvania State University, USA; 4. Tianjin University, Tianjin 300192, China)

**Abstract:** This study obtains candidate antigens *Pys25* (217AA) and *Pys48* (455AA) of *Plasmodium yoelii* in perfect stage through silkworm baculovirus surface display technology so as to establish a new rodent model. It first uses *Escherichia coli* pronucleus expression system to express both antigens and uses immune Balb/c mice to prepare polyclonal antibody, meanwhile uses silkworm baculovirus surface display technology and transforms pFastBac Dual carrier, adds mammal promoter CMV at the front end of its Ph promoter and conducts fusion expression of target protein gene and baculovirus envelope protein gp64 gene segment. Fusion protein is displayed on the surface of virus particle and used to immunize Balb/c mice. In the body of mice, CMV promoter activates fusion protein expression and jointly stimulates mice to produce polyclonal antibody. According to indirect ELISA detection, the valence of antibody of both antigens can reach 1:12800. This experiment provides an experimental basis for later study on immune blocking effect and the establishment of multi-period polyvalent vaccine and plague model.

**Key words:** *Pys25* and *Pys48*; silkworm baculovirus surface display technology, CMV promoter; vaccine

(责任编辑: 许惠儿)