

研究报告

恶性疟原虫红内期cDNA库的组建及克隆的筛选

程 勤 沈翊珩 强伯勤 余曙华
吴宁华 陈菊凤 樊汝恭 程小款
李文淦 毛映红 刘尔翔

(中国医学科学院基础医学研究所, 中国协和医科大学基础医学部, 北京)

从体外培养的恶性疟原虫中分离纯化总mRNA, 将其逆转录为 cDNA, 组入表达型载体 λ gt11, 建立了恶性疟原虫中国海南岛分离株FCC1/HN 红内期 cDNA库。经大肠杆菌表达后用抑制性单克隆抗体M26-32、F6-C2、F6-D3筛选。杭有27个克隆与M26-32作用、34个克隆与M26-32和 F6-C2 都反应。对筛选结果进行了分析。这些阳性克隆的表达产物有可能作为疟疾疫苗的组成部分。

关键词 恶性疟原虫; 红内期; cDNA库; 单克隆抗体

用基因工程法大量生产保护性抗原是制备疟疾疫苗的重要手段。Kemp^[1]和 Enca^[2] 先后建立了恶性疟原虫红内期和子孢子期的 cDNA 库, 分别表达各时期抗原。用抗体筛选后, 阳性克隆产物有希望作为疫苗成分。为了生产我国自己的疫苗, 我们分离纯化了恶性疟原虫中国海南岛分离株FCC1/HN 的 mRNA, 逆转录为 cDNA, 用 λ gt11为载体组建了红内期cDNA库, 并以抑制性单克隆抗体为探针筛选相应的抗原基因。

材料与方 法

(一) 材料

1. 恶性疟原虫培养: 海南岛分离的恶性疟原虫 *Plasmodium falciparum* FCC1/HN 株, 引自军事医学科学院, 参照 Trager^[3] 的方法, 在 CO₂ 孵箱中培养。

2. 三株单克隆 抗体 M26-32, F6-C2, F6-D3: 由本室制备并鉴定^[4-6], 简

称为32, C2, D3。

(二) 方法

1. cDNA库的建立

(1) 疟原虫mRNA的分离纯化: 先使用异硫氰酸胍裂解液裂解细胞后加于 5.7mol/L 氯化铯 (BRL超纯化试剂) 液上, 150,000 × g离心12h分离总 RNA, 再用Oligo(dT) 纤维素柱 (P.L. Biochemicals, Type 7) 提纯 mRNA, 方法详见文献 [7]。mRNA 纯化中各种试剂 (除 BRL 超纯试剂外) 和器皿均经0.1%二乙基焦碳酸酯 (SIGMA)处理或高温干烤后使用。

(2) 双链 cDNA 的合成: 以上述 Oligo(dT) 柱纯化的 mRNA 为模板, 在 pH8.3 乙酸盐缓冲体系中, 以 100 μ g/ml Oligo(dT)12—18 (P.L. Biochemicals) 为引物, 含四种脱氧核苷三磷酸各1mmol/L, AMV 逆转录酶 (Life Science) 880u/ml 经 37℃保温90min 后获得 mRNA-cDNA

本文于1988年3月3日收到。

杂交双链。

mRNA-cDNA 杂交双链在pH7.5的乙酸盐缓冲体系中, 0.15mol/L NAD 和各 125 μ mol/L 四种脱氧核苷三磷酸存在下, 用RNaseH 0.6u/ μ g cDNA (Pharmacia), DNA 聚合酶 I 300u/ml (Pharmacia)和*E. coli* DNA连接酶30u/ml(NEB)在14℃和22℃ 各保温 1h 后获得双链cDNA。

(3) 建立cDNA库: 双链 cDNA 用EcoRI甲基化酶修饰, 接 8、10和12mer 三种不同长度的EcoRI 连接子(Linker, NEB公司), 再用EcoRI彻底水解。把含 EcoRI粘性末端的cDNA 片段经 Sepharose CL-6B 柱层析收集大于 500bp 部分与 λ gt11 EcoRI和碱性磷酸酶处理后的两臂重组。重组的噬菌体 DNA 进行体外包装(自制包装蛋白, 2 $\times 10^8$ pfu/ μ g DNA)得到的重组噬菌体颗粒悬浮于 SM 缓冲液中, 加少许氯仿, 于 4℃ 保存(操作详见文献[8])。

2. 单克隆抗体筛选cDNA 库

(1) 感染: 接种大肠杆菌Y1090 于LB培养基中(含10mmol/L MgSO₄ 和氨基胍青霉素50 μ g/ml及麦芽糖0.2%), 过夜培养。次日用10mmol/L MgSO₄悬浮, 调A_{600nm}为2.0。取0.2ml菌液与10 μ l (6 $\times 10^8$ pfu) 重组了疟原虫 cDNA 片段的 λ gt11噬菌体在37℃ 孵育20min。再与42℃ 0.6%琼脂糖(含氨基胍青霉素50 μ g/ml)混合, 铺在LB 培养基平皿中, 置42℃ 孵箱中培养4h。

(2) 吸印: 当培养基表面出现肉眼可见噬斑时, 将已在 10mmol/L IPTG (SIGMA)中浸湿的硝酸纤维膜(S & S产品 ϕ 85mm) 贴在培养基表面, 使其与噬斑接触, 一并移入37℃, 培养 3—4h。当噬斑直径达 1—1.5mm时, 取下硝酸纤维膜

做酶标抗体染色。

(3) 酶标抗体染色: 将硝酸纤维膜浸入含 5%低脂奶粉(万年青牌, 北京南郊乳品厂)的 Tris-HCl 缓冲液中进行封闭(室温1h)。第一轮筛选时将膜浸入三种单克隆抗体混合溶液中(各抗体滴度均为1:50), 第二或第三轮筛选时, 将膜一分为三, 分别浸入三种 1:50 抗体溶液中(抗体用 2.5% 奶粉 Tris-HCl 稀释), 4℃ 过夜。用2.5%奶粉 Tris-HCl 缓冲液洗去多余抗体(5min \times 4次)。32单抗作用后再加兔抗小鼠IgM 孵育、清洗。换入辣根过氧化物酶(HRP)标记的 1:100 兔抗小鼠IgG, 或1:80的HRP-Protein A 溶液(2.5%奶粉Tris-HCl 稀释), 室温孵育1h。(所用第一抗体和第二抗体均经 λ gt11感染的Y1089溶源菌菌体裂解液预吸收)。经 PBS-Tween20 漂洗后, 加底物 DAB 进行显色。显色后再漂洗, 干燥保存。

(4) 重复筛选: 按酶标结果, 从平皿中挑出阳性噬斑, 进行 2—3 轮筛选, 直至阳性噬斑数达100%。

结 果

(一) cDNA库的组建

1. 疟原虫mRNA的鉴定: 本实验中用异硫氰酸胍做为强变性剂, 不需加RNase抑制剂, 用 CsCl 超速离心和Oligo(dT)-纤维素柱层析即可获得 Poly A⁺ RNA。以 A_{260nm} 1u为40 μ g RNA 计算产率。恶性疟原虫 mRNA 产率为 41.7 μ g/6ml压积疟原虫, 其纯度经220—300nm紫外扫描呈现以 258nm 为峰顶的对称峰 A_{260nm}/A_{280nm} 以及 A_{260nm}/A_{230nm} 均接近 2。经兔网织裂解系统鉴定纯化的 mRNA具有蛋白质合成的模板活性。

2. cDNA 合成: 本实验中进行第一和第二链 cDNA 合成全部在乙酸盐系统中进行, 不需外加 RNA 酶抑制剂, 使用高质量的逆转录酶 (见材料与方法), 可使第一链产率稳定在50%左右, 最高时达70%。第二链合成时我们还研究了 RNA-seH 的用量和大肠杆菌DNA连接酶的使用等问题, 确定了前述最佳反应条件, 使第二链产率提高到90%以上。

使用这一反应体系不仅高效而经济, 在构建cDNA库时, 仅使用 Oligo(dT)-纤维素纯化的总PolyA⁺ RNA14μg可以构建成为足够丰度的cDNA库。

3. cDNA 库丰度及重组效率: 本实验中重组效率以mRNA丰度计算, 平均为 0.8×10^5 pfu/μg mRNA, 以噬菌体臂计算平均为 1.9×10^5 pfu/μg DNA。噬菌体臂的自身联接率平均为6.7%。在 cDNA 库构建中, 共获得 1.1×10^6 pfu。按一般真核细胞中mRNA丰度计算, 若重组体数目超过 1.7×10^5 时, 获得极低拷贝mRNA的可能性将达到99%。由于成熟的人红细胞中不具有活跃的蛋白质生物合成, 因此在疟原虫感染的人红细胞中mRNA的新合成基本上取决于疟原虫自身。因此, 本实验所构建的 cDNA 库按理论计算已能包括全部疟原虫和宿主细胞中的各种mRNA。

(二) 用单克隆抗体筛选 cDNA 库

λgt11 为表达型载体, cDNA 库可用抗体筛选。用三种单克隆抗体 32、C2 和 D3对P.f cDNA 库进行筛选。以硝酸纤维素膜上出现和噬斑同样大小的棕红圈为阳性结果。阴性对照选用没有重组 P.f cDNA 的λgt11感染Y1090所形成的噬斑。筛选结果见表1。两次筛选所使用的库容量为 2.78×10^5 pfu, 其中可以为32识别的克隆27个; 可以与32、C2两种单抗都反应的克隆34个。阳性率分别为0.097%, 0.122%。

表 1 McAbs筛选P.f cDNA库获得的阳性克隆数

Table 1 The number of positive clones in P.f cDNA library screened by McAbs

筛 选 Screening experiment	单克隆抗体 McAbs used			
	32 ⁺	C ₂ ⁺	D ₃ ⁺	C ₂ ⁺ + D ₃ ⁺
1	13	0	0	8
2	14	0	0	26
Total	27	0	0	34

没有发现任何可以单独与C2或D3反应的阳性克隆。图版I-1-3示筛选结果。

讨 论

我们以体外培养法获得大量恶性疟原虫, 从中提取 mRNA, 再将其逆转录为 cDNA, 重组到λgt11噬菌体中, 转染大肠杆菌建成了恶性疟原虫 FCC1/HN 株的 cDNA 库。

筛选cDNA库所使用的三株单克隆抗体32、C2和D3在体外实验中均可以阻断裂殖子侵入新红细胞, 并可在不同程度上抑制恶性疟原虫的生长^[5,6]。因此, 用抑制性单抗筛选的克隆所表达的疟原虫蛋白, 将是制备疟疾疫苗的有希望的抗原。

D3识别裂殖子表面185kd抗原。在已筛过的 cDNA 库容量中未见有表达D3所识别的抗原决定簇的克隆。Lyon等^[9] (1987) 用单抗分析裂殖子表面195kd蛋白结构, 发现一个单抗7H10与该蛋白C末端由45kd蛋白与45kd糖蛋白二者形成的立体结构起免疫反应。因此, 该单抗只与195kd抗原起阳性反应, 而对195kd的降解产物均为阴性, 此结果与D3对 FCC1/HN 株疟原虫免疫沉淀的结果相同^[6]。说明D3的相应抗原可能含有糖蛋白。重组大

肠杆菌不能表达糖蛋白产物, 故用 D3 筛选cDNA 库未能获得阳性克隆。

免疫荧光结果表明 C2 识别位于裂殖子内棒状体抗原, 而32则可以和血内期的各个时期原虫反应。在cDNA 库中有34个克隆既与32也与 C2 反应, 说明这些克隆可以表达两个单克隆抗体所针对的抗原决定簇。我们设想在红内期原虫发育成熟时, 即成熟裂殖体时, 32和C2抗原源于同一mRNA分子, 而在裂殖体成熟后, 裂殖子重新钻入红细胞形成环状体和滋养体期, 棒状体消失, 此时编码棒状体蛋白的DNA 不再转录相应的mRNA信息, 就只

有编码 32 抗原的 mRNA。由于组建cDNA库, mRNA 的来源是 FCC1/HN 体外培养, 此时恶性疟原虫是不同步的, 即疟原虫各时期都存在, 由此cDNA 库预料既可选出单纯与32结合的抗原, 也可选出与 32 及 C2 同时结合的抗原。这样可以说明本实验的筛选结果。现正对不同克隆进行重组疟原虫 DNA 及表达蛋白的分析, 以进一步证实我们的设想。

通过实验, 我们认为只有大肠杆菌的cDNA 库是不够的, 不能表达含有糖蛋白的抗原, 有必要建立其他载体的cDNA 库, 如酵母或哺乳动物细胞等。

参 考 文 献

- [1] Kemp, D. J. et al: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 80:3789—3791, 1983.
- [2] Enea, V. et al: *Science*, 225:628—630, 1984.
- [3] Trager, W. and Jensen, J.B.: *Science*, 193:673—675, 1976.
- [4] 李文禄等: 寄生虫学与寄生虫病杂志, 2(2):83—86, 1984.
- [5] 刘尔翔等: 生物工程学报, 2(1):31—36, 1986.
- [6] 李文禄等: 中国医学科学院学报, 8(6):430—434, 1986.
- [7] 沈瑞珩等: 生物化学与生物物理进展, 6:62—65, 1986.
- [8] 强伯勤等: 待发表.
- [9] Lyon, J. A. et al: *J. Immunol.*, 138:859—901, 1987.

THE CONSTRUCTION AND SCREENING OF *PLASMODIUM FALCIPARUM* cDNA LIBRARY

Cheng Qin Shen Yufei Qiang Boqin Yu Shuhua
Wu Ninghua Chen Jufeng Fan Rugong Cheng Xiaokuan
Li Wenlu Mao Yinghong Liu Erxiang

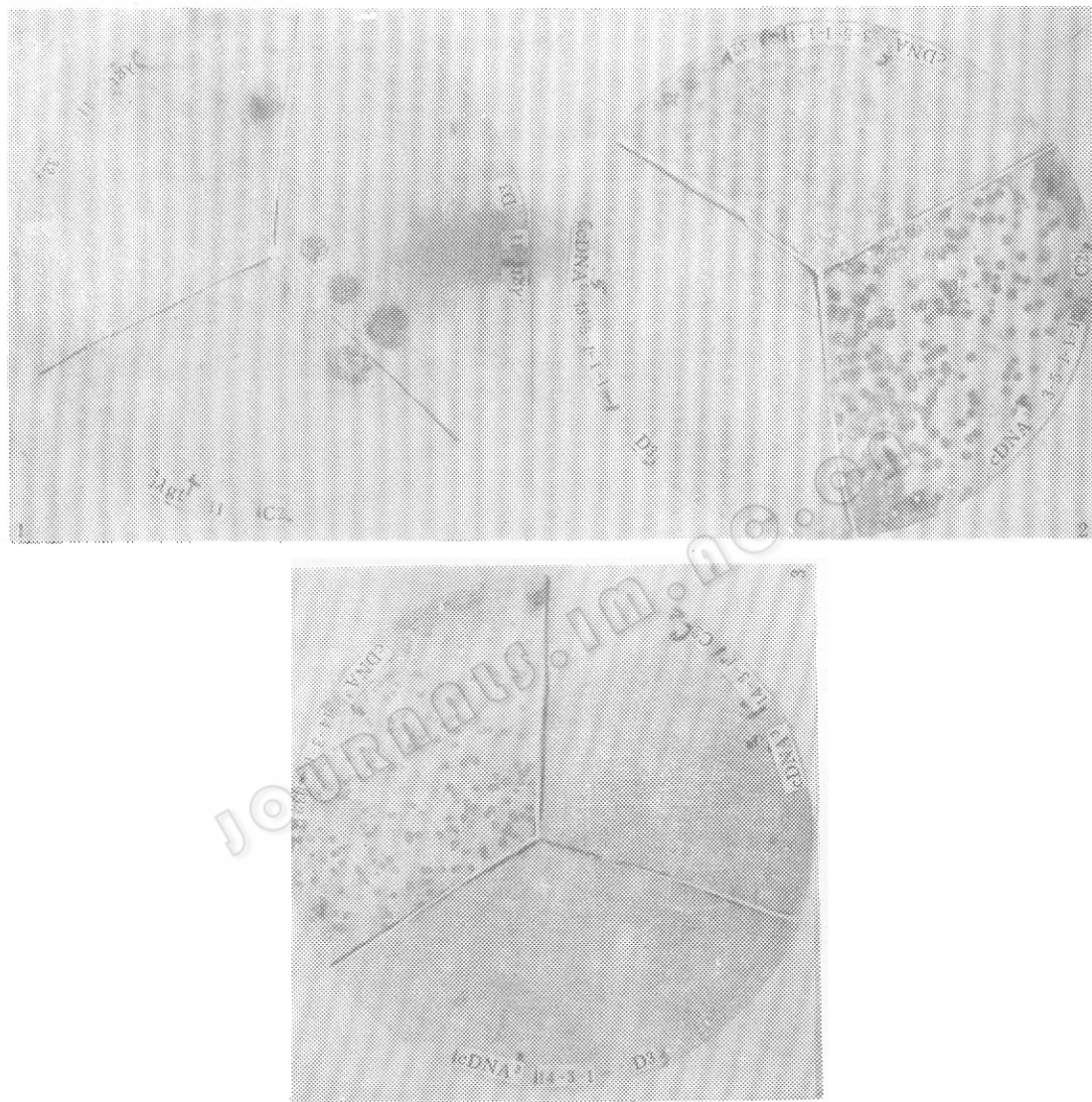
(Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of
Medical Sciences, Beijing)

Plasmodium falciparum HAINAN isolate FCC1/HN was cultured in large quantities in vitro. Total mRNA was purified from parasites and reverse transcribed into cDNA. By inserting cDNA fragments into λ gt11, a *P. falciparum* FCC1/HN erythrocytic stage cDNA library had been constructed. 3 inhibitory McAbs M26-32, F6-D3 and F6-C2 were used for screening the cDNA

library expressed in *E. coli*. So far, 27 positive clones have been found to react with M26-32 alone; and 34 clones to react with both M26-32 and F6-C2 McAbs. These expressed proteins might be used as candidates of malaria vaccine.

Key words

Plasmodium falciparum; erythrocytic stage; cDNA library; McAbs



1. 阴性和阳性对照 Negative and positive control

Negative control: Y1090 infected by λ gt11 contained no P.f gene insert, Positive control: P.f antigens

2. 表达32和C2两种单克隆抗体都可以识别的抗原决定簇的克隆

cDNA clones which express epitopes recognized by both 32 and C2

3. 只表达M26-32所识别的抗原决定簇的克隆

cDNA clones which express epitope recognized only by M26-32