

恶性疟原虫乳酸脱氢酶基因克隆、可溶性表达及突变体活性分析 Cloning, Soluble Expression and Mutant Activity Analysis of Lactate Dehydrogenase Gene from *Plasmodium falciparum*

徐小玲[‡], 杨瑞仪[‡], 杨雪芹, 冯丽玲, 曾庆平*

XU Xiao-Ling[‡], YANG Rui-Yi[‡], YANG Xue-Qin, FENG Li-Ling and ZENG Qing-Ping*

广州中医药大学热带医学研究所生物技术研究室 广州 510405

Biotechnology Laboratory, Tropical Medicine Institute, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

摘 要 为了建立以代谢酶类为靶点的新型抑制剂乃至抗疟药高通量筛选和体外评价平台,从恶性疟原虫海南株 FCC1 中扩增出乳酸脱氢酶基因(*PfLDH*)。利用融合表达载体 pGEX-2TK 和 pET-29a(+) 将 *PfLDH* 基因导入大肠杆菌 BL21 和 BL21(DE3) 中高效表达,结果成功地在菌体裂解上清液中检测到高酶促活性的 PfLDH。以 pGEX-2TK 为载体的 *PfLDH* 基因主要以包涵体形式表达,以 pET-29a(+) 为载体的 *PfLDH* 基因则能大量表达可溶性 PfLDH,表明后者更适合用来大量制备重组 PfLDH。同时,根据 SDS-PAGE 图谱并结合序列分析结果,对基因扩增中随机产生的 *PfLDH* 截短序列进行了筛选和克隆,从中获得 4 个携带终止突变并分别编码 45、80、149 和 263 个氨基酸残基的“提早成熟”基因 *PfLDH-Δ271*、*-Δ236*、*-Δ167* 和 *-Δ53*。通过基因表达及酶促活性测定,评价了提前终止突变对 PfLDH 活力的影响,为探讨 PfLDH 结构与功能的关系提供了依据。

关键词 PfLDH 融合表达 终止突变 酶促活性

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)04-0593-05

Abstract To establish a platform for high throughput screening and *in vitro* evaluating novel metabolic enzyme-targeted inhibitors towards anti-malarial drugs, a lactate dehydrogenase gene of *Plasmodium falciparum* (*PfLDH*) was amplified from the Hainan isolate FCC1/HN. The fusion expression vectors, pGEX-2TK and pET-29a(+), were utilized to introduce the *PfLDH* gene into strains of *Escherichia coli*, BL21 and BL21(DE3) for over-expression. Consequently, the enzymatic activity of PfLDH was successfully detected in the suspension of lytic bacteria. The *PfLDH* gene cloned in pGEX-2TK was mainly expressed as inclusion bodies, while the same gene cloned in pET-29a(+) was nearly expressed in a soluble form of PfLDH, demonstrating the latter vehicle might be more suitable for the large-scale preparation of recombinant PfLDH. Furthermore, according to the electrophoregram of SDS-PAGE and the sequencing data, a series of truncated *PfLDH* sequences generated randomly from gene amplification were screened and cloned, from which four pre-matured genes with a terminator mutation, *PfLDH-Δ271*, *-Δ236*, *-Δ167* and *-Δ53* coding for 45, 80, 149 and 263 amino acid residues, were individually recovered. Through the gene expression and enzymatic activity measurement, the effect of pre-matured terminator mutation on the activity of PfLDH was evaluated, which should pave the way for probing the relationship between structure and function of PfLDH.

Key words PfLDH, fusion expression, terminator mutation, enzymatic activity

据 WHO 最新报告,疟疾是世界上除艾滋病以外具有明显上升趋势的传染病,它危害着热带和亚

热带地区近 20 亿人口的生命安全。恶性疟疾每年造成 5 亿人感染和至少 100 万人死亡,尤其在非洲

已成为头号杀手^[1]。目前,抗疟疾疫苗及抑制性抗体尚未研制成功,药物是治疗疟疾的唯一办法^[2]。青蒿素及其衍生物是现阶段最有效的抗疟药,它们不仅具有高效、速效和特效截杀脑型疟的特点,而且可以杀灭抗氯喹的疟原虫。然而,任何药物的长期、广泛、单一或不规范使用,终究都将诱导病原体产生抗药性,疟原虫也是这样。Jambu, *et al* (2005)已在青蒿素不受限制使用的国家和地区(如法属圭亚那)发现青蒿素抗性分离株,其 IC₅₀ 升幅在 30nmol/L 以上^[3]。更令人担忧的是,这种抗药性的获得仅仅是因为疟原虫 SERCA 基因中单个碱基的突变^[4]。这一触目惊心的事态凸显出必须刻不容缓地加大抗疟新药研发力度的重要性。

乳酸脱氢酶(LDH, EC1.1.1.27)广泛存在于动植物及微生物体内,它作为糖酵解的终止酶在生物厌氧代谢中具有重要的生理意义。恶性疟原虫乳酸脱氢酶(PfLDH)利用还原型辅酶 I(NADH + H⁺)将丙酮酸还原为乳酸,同时生成三磷酸腺苷(ATP),进而为疟原虫的生命活动提供能量。PfLDH 在疟原虫的厌氧代谢及生存中的重要性,已赋予它成为颇受青睐的抗疟药筛选新靶点^[5,6]。由于从感染的红细胞中提纯 PfLDH 较为困难,我们从恶性疟原虫海南株 FCC/HN 中扩增出 PfLDH 基因,并构建了含有重组 PfLDH 基因的融合表达质粒。通过在大肠杆菌中的高效表达,已获得大量纯度高且具有天然活性的可溶性重组蛋白,为体外筛选 PfLDH 活性抑制剂创造了条件。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 虫株 恶性疟原虫海南株 FCC/HN 由本所疟疾室提供。

1.1.2 菌株与质粒 大肠杆菌 DH5 α 、BL21 为本实验室保存, BL21(DE3)由暨南大学药学院郑青副教授馈赠, pTARGET 载体购于 Promega 公司, pGEX-2TK 载体购于 Amersham Biosciences 公司, pET-29a(+) 载体购自 Novagen 公司。

1.1.3 试剂 T4 连接酶、限制性内切酶、Taq DNA 聚合酶、dNTP 购自 TaKaRa 公司。电泳分子量标准购自天为时代公司和北京鼎国生物技术公司。氨苄青霉素(Amp)、卡那霉素(Kan)、异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)购于华美生物工程公司。

1.1.4 酶活性检测液 3'-乙酰吡啶烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(APAD)、黄递酶(diaphorase)、氮蓝四唑(NBT)购于 Sigma 公司, 乳酸钠购自广汕达濠公司。

1.1.5 LDH 测试盒 :含 2mmol/L 丙酮酸标准品、辅酶 I、基质缓冲液、2,4-二硝基苯肼溶液和 0.4mol/L NaOH 溶液, 购自南京建成生物工程研究所。

1.2 方法

1.2.1 恶性疟原虫基因组 DNA 的提取 :取 50 μ L 血液样品置离心管中,加入 1mL STE 缓冲液(100mmol/L NaCl, 10mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA, pH8.0),涡旋振荡数秒后,12000r/min 离心 1.5~2min,弃上清液,重复洗 1 次,再弃上清,加入 100 μ L DNA 提取液,置于烧杯中煮沸 10min,12000r/min 离心 2min,吸取上清置另一离心管,再离心一次后的上清即为基因组 DNA 的提取物。

1.2.2 PfLDH 基因的扩增与克隆 :根据 GenBank 中发表的 DNA 序列(DQ198261)设计两对引物,由赛百盛公司合成。其中第一对引物的序列为:5'-GCGGATCCATGGCACCAAAAAGCAAAAATC-3'; 5'-GTCCCGGTAAGCTAATGCCTTCATTCTC-3',下划线分别表示 BamH I 和 Sma I 酶切位点。以提取的基因组 DNA 为模板,扩增反应在 50 μ L 体系中进行,循环参数为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5min,94 $^{\circ}$ C 变性 30s,56 $^{\circ}$ C 退火 1min,72 $^{\circ}$ C 延伸 3min,30 个循环后,72 $^{\circ}$ C 再延伸 10min。第二对引物为:5'-GCGCCATGGCACCAAAA GCAAAAATCG-3', 5'-CTACTCGAGAGCTAATGCCTTCA TTCTC-3',下划线分别表示 Nco I 和 Xho I 酶切位点。循环参数为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5min,94 $^{\circ}$ C 变性 30s,52 $^{\circ}$ C 退火 30s,72 $^{\circ}$ C 延伸 90s,30 个循环后,72 $^{\circ}$ C 再延伸 10min。扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳回收,然后与 pTARGET 载体连接并测序。重组质粒 pTARGET/PfLDH 用 BamH I + Sma I 和 Nco I + Xho I 分别双酶切,并与相应酶切的 pGEX-2TK 和 pET-29a(+) 表达载体连接,然后分别转化大肠杆菌 BL21 和 BL21(DE3)。经酶切鉴定获得重组质粒 pGEX-2TK/PfLDH 和 pET/PfLDH。

1.2.3 PfLDH 基因的表达 :重组质粒接种于 2 \times YT 液体培养基(pGEX-2TK/PfLDH 加 Amp 100 μ g/ μ L, pET/PfLDH 加 Kan 25 μ g/ μ L)中培养过夜,按 1% 比例转入新鲜的 2 \times YT 培养基(含 Amp 100 μ g/ μ L 或 Kan 25 μ g/ μ L)中,37 $^{\circ}$ C 振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.8~1.0 时,加 IPTG 至终浓度为 0.1mmol/L 时转至 30 $^{\circ}$ C 摇床进行诱导,继续培养 3~6h,离心收集菌体。加入预冷的 PBS 溶液重悬菌体,再加入溶菌酶(0.1mg/mL)和 DNase I (0.1 μ g/mL),-20 $^{\circ}$ C 反复冻融直至细胞完全裂解。离心分别收集上清和沉淀,进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.4 PfLDH 酶活性测定 :方法一:以重组菌诱导表达后的裂解上清作为检测样品,空载体菌诱导表

达后的上清作为阴性对照。取上清 270 μ L 置于 1cm 光径的比色杯中,加入 2mL 酶活性检测液(3mg APAD、10u Diaphorase、8mg NBT 溶于 10mL 0.1mmol/L Tris-HCl, pH7.5 中,再加 70 μ L 乳酸钠混匀,新鲜配制)立即用分光光度计在 650nm 处测 OD 值,以计算 APAD 的减少量,每 min 测一次,共测 15min,由此计算酶活性。方法二:以重组菌和空载体菌诱导表达后的裂解上清为测定管,丙酮酸标准品为标准管,测定管及标准管均设空白对照。按厂家说明书操作取 0.03mL 裂解上清于测定管中,加入基质缓冲液 0.25mL 辅酶 I 溶液 0.05mL,测定空白管不加辅酶 I 溶液;取 0.03mL 丙酮酸标准品于标准管中,加入基质缓冲液 0.25mL,0.05mL 蒸馏水,标准空白管中不加丙酮酸标准品。混匀置 37 $^{\circ}$ C 水浴箱中保温 15min 后加入 2,4-二硝基苯肼溶液 0.25mL,再次置 37 $^{\circ}$ C 水浴保温 15min 后,加入 NaOH 溶液 2.5mL,室温放置 3min,用分光光度计在 440nm 处测 OD(λ) 值。根据公式:LDH 活力(u/L)=(测定管 OD 值 - 测定空白管 OD 值) / (标准管 OD 值 - 标准空白管 OD 值) \times 标准管浓度(2 μ mol/mL) \times 1000mL \times 测试前样品稀释倍数,算出 LDH 活力。

2 结果

2.1 *PfLDH* 基因的扩增与克隆

PfLDH 基因的 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳显示为一条 957bp 的特异扩增带(Fig. 1),这与 *PfLDH* 基因的预期大小相吻合。

将 PCR 产物克隆到 pTARGET 载体上,分别用 *Bam*H I + *Sma* I 和 *Nco* I + *Xho* I 双酶切重组质粒 pTARGET/*PfLDH*,并将酶切产物定向连接到经 *Bam*H I + *Sma* I 酶切的 pGEX-2TK 载体和经 *Nco* I + *Xho* I 酶切的 pET-29a(+)载体中。pGEX-2TK/*PfLDH* 用 *Bam*H I + *Sma* I 酶切可产生两条带,其预期大小为 4969bp 和 957bp;pET/*PfLDH* 经 *Nco* I + *Xho* I 酶切可产生两条带(预期为 5371bp + 957bp)(Fig. 2)

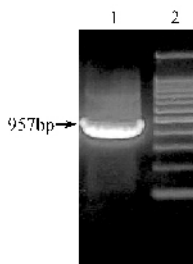


图1 *PfLDH* 基因的 PCR 产物

Fig.1 PCR product of *PfLDH* on agarose gel

1: PCR product of *PfLDH* 2: 200bp ladder.

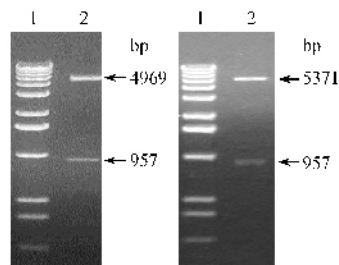


图2 重组质粒 pGEX-2TK/*PfLDH* 和 pET/*PfLDH* 的双酶切
Fig.2 Double digestion of pGEX-2TK/*PfLDH* and pET/*PfLDH*
A.1 :DNA marker 2 :double digestion of pGEX/*PfLDH* with *Bam*H I + *Sma* I . B.1 :DNA marker 2 :double digestion of pET/*PfLDH* with *Nco* I + *Xho* I .

经 BLAST 检索,本研究所测定的 FCC/HN 株的 *PfLDH* 基因与 GenBank 收录的 K1 株 *PfLDH* 基因(DQ198261)比较,同源率为 99.79%,仅第 407、563 位处存在 T-C 差异。本次测序结果已被 GenBank 收录(DQ825436)。

2.2 *PfLDH* 基因的表达——以 pGEX-2TK 为载体

将携带 pGEX/*PfLDH* 重组质粒的阳性菌及 BL21 菌分别进行诱导表达,根据 SDS-PAGE 电泳检测结果(Fig. 3)在 BL21(*pGEX/PfLDH*)裂解液(3 泳道)中

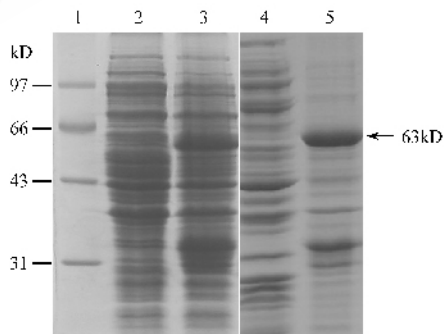


图3 BL21(*pGEX/PfLDH*)表达的融合蛋白的 SDS-PAGE 分析
Fig.3 SDS-PAGE analysis of the fusion protein expressed by BL21(*pGEX/PfLDH*)

1: protein marker ; 2: total proteins of BL21 ; 3: total proteins of BL21 (*pGEX/PfLDH*) ; 4: supernatant of BL21 (*pGEX/PfLDH*) ; 5: precipitation of BL21(*pGEX/PfLDH*).

出现一条 BL21 裂解液(2 泳道)所没有的 63kD 新蛋白带,其中谷胱甘肽硫转移酶(GST)的预期分子量约为 29kD,目的蛋白的预期分子量约为 34kD。同时发现,该新蛋白带仅存在于沉淀中(5 泳道),而不出现于上清中(4 泳道),说明融合蛋白主要以包涵体形式存在。

2.3 *PfLDH* 基因的表达——以 pET-29a(+)为载体

将不同批次重扩增的 *PfLDH* 基因克隆至 pET-29a(+)表达载体,分别转化大肠杆菌 BL21(DE3)。经诱导表达后发现,全部融合蛋白均分布在菌体裂解上清中,表明 pET/*PfLDH* 中的 *PfLDH* 基因在 BL21

(DE3)中为可溶性表达(Fig.4)。

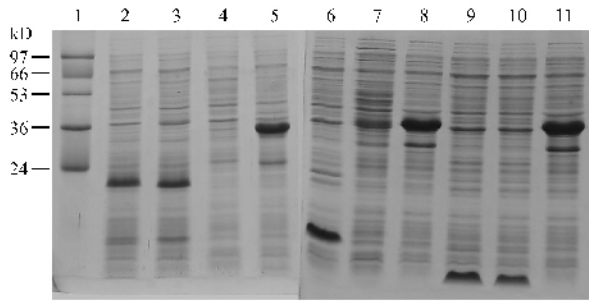


图4 BL21(DE3) pET/PfLDH表达产物的SDS-PAGE分析

Fig.4 SDS-PAGE analysis of expressed products by BL21(DE3) pET/PfLDH

1: protein marker; 2~5: truncated PfLDH proteins; 7, 8, 11: natural PfLDH proteins; 6, 9, 10: truncated proteins.

从电泳图谱上还可见到几个分子量较小的融合蛋白(2~6和9、10泳道),仅7、8、11泳道的融合蛋白符合预期大小(34kD+3kD)。为了查明上述小分子量PfLDH形成的原因,我们对其编码基因进行了全序列测定,结果表明这些小分子量蛋白质都是基因缺失、插入或替换形成的提前终止突变的翻译产物,其中PfLDH- Δ 271缺失271个氨基酸残基,即编码45个氨基酸后提前终止(对应于9、10泳道);PfLDH- Δ 236缺失236个氨基酸残基,即编码80个氨

基酸后提前终止(对应于6泳道);PfLDH- Δ 167缺失167个氨基酸残基,即编码149个氨基酸后提前终止,发生了3个碱基的置换和1个缺失(对应于2、3泳道);PfLDH- Δ 53缺失53个氨基酸残基,即编码263个氨基酸后提前终止,发生了4个碱基置换和1个缺失(对应于4、5泳道)。

2.4 PfLDH酶活性测定

采用方法一进行测定,pGEX/PfLDH重组菌上清酶活性比阴性对照(pGEX-2TK转化菌)上清酶活性高约2倍;pET/PfLDH重组菌上清酶活性比阴性对照(pET-29a(+))转化菌)上清酶活性高约7倍(Fig.5)。

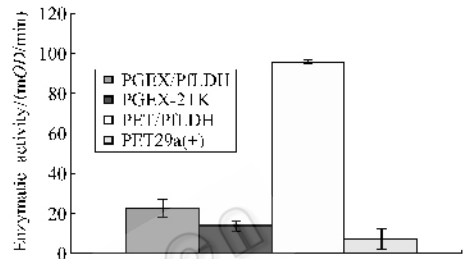


图5 PfLDH重组菌裂解上清的酶活性

Fig.5 Enzymatic activity of recombinant PfLDH in bacterial suspension

采用方法二测定PfLDH重组菌裂解上清的酶活力,结果见表1。

表1 PfLDH重组菌裂解上清的酶活力(u/L)

Table 1 Enzymatic activity (u/L) of PfLDH in suspension

Strain	BL21		BL21(DE3)					
	pGEX/PfLDH	pET/PfLDH	pET/PfLDH- Δ 271	pET/PfLDH- Δ 236	pET/PfLDH- Δ 167	pET/PfLDH- Δ 53		
Activity (\bar{X})	77.4	1359.8	165.8	5147.9	113.4	154.4	247.8	613.8
SD	34.8	224.2	80.3	1147.4	48.5	22.7	62.0	185.6

由表中数据可见,以pET-29a(+))为载体表达的PfLDH比以pGEX-2TK为载体表达的PfLDH活力高4倍左右。有趣的是,羧基末端截短53个氨基酸的PfLDH- Δ 53仍具有一定的酶活性,而分别只有45个氨基酸残基的PfLDH- Δ 271和80个氨基酸残基的PfLDH- Δ 236基本检测不到酶活力。

3 讨论

PfLDH不仅已被用来筛选新抗疟药^[7,8],而且还被用于原虫血症^[9]和药物敏感性^[10,11]的测定。历史上曾作为避孕药(杀精剂)开发的棉酚早就被发现可用于抗疟疾,并已了解其作用机理是通过特异性抑制PfLDH活性而阻断疟原虫体内的能源供应,可惜因其毒副作用太大,至今也未能开发成抗疟新药^[12,13]。在当今抗多药抗性疟疾肆虐的严峻形势下,仅仅依赖青蒿素作为抗疟疾的最后一道防线具

有很大的风险,因此有必要建立基于PfLDH等各种分子靶点的高通量抗疟新药筛选平台。

自第一个PfLDH基因于1985年被克隆后^[14],国外学者已在大肠杆菌中成功表达PfLDH基因^[15,16]。国内学者也先后报道了PfLDH基因在大肠杆菌中表达获得的融合蛋白^[17,18],但这些研究都以制备多克隆或单克隆抗体为目的,并未涉及重组PfLDH的酶活性测定,其是否具有催化能力至今未见报道。为了建立基于PfLDH的新型抑制剂乃至抗疟药的体外筛选平台,首先必须实现PfLDH基因的可溶性及高活力表达。为此,我们尝试采用2种不同的融合表达载体——pGEX-2TK和pET-29a(+))分别表达PfLDH基因,并从融合蛋白的存在状态及酶促活性两方面进行评价。结果表明,pGEX/PfLDH主要表达为不溶性蛋白(存在于包涵体内),在裂解上清液中的活力较低,仅略高于空菌(BL21);而

pET/PfLDH 主要表达为可溶性蛋白,在裂解上清液中的活力较高,比 pGEX/PfLDH 高出 4 倍左右。造成裂解上清液中融合蛋白可溶性与不溶性差异的原因可能是“担体”大小与性质对融合蛋白构象及存在状态的影响^[19]。pGEX/PfLDH 的担体是 GST,其分子量达 29kD,相反,pET/PfLDH 的担体仅由 27 个氨基酸残基组成(约 3kD)。显然,担体过大可能阻碍融合蛋白折叠形成正确的空间构象,从而以不溶性蛋白存在于包涵体中^[20]。由此可见,对于本研究而言,pET-29a(+)可能是一种更适合 PfLDH 基因表达的融合载体。

Makler *et al*(1993)^[9]发明了一种可消除人 LDH 干扰的 PfLDH 活性特异性检测方法,它用对 PfLDH 具有高度亲和力的 APAD 代替 NAD 作为辅酶,在乳酸钠存在的情况下,PfLDH 将 APAD 变成 APADH,而 APADH 又将无色的 NBT 还原成蓝色化合物并再生 APAD。不过,本实验中应用的大肠杆菌表达系统不存在人 LDH 的干扰,而且未见细菌 LDH 干扰 PfLDH 测定的报道,可试用人 LDH 专用试剂盒测定大肠杆菌表达的 PfLDH 的酶促活性。为此,我们采用上述 2 种方法对菌体裂解上清液中的重组 PfLDH 活性进行了测定。结果表明,虽然这 2 种方法衡量酶活性的方式不同,但测定结果基本上可以相互比较。例如,用 2 种方法测定的 pET 载体表达的 PfLDH 都比 pGEX 载体表达的 PfLDH 的酶活性高。不过,抗人 LDH 干扰的酶活性测定系统必须现配现用,而且其价格远高于人 LDH 专用试剂盒,尤其是前者在测定的稳定性及可重复性等方面都不如后者。

本研究中还获得 4 种截短序列的 PfLDH(来自克隆的 PfLDH 基因重扩增),它们应该是扩增过程中随机突变形成为终止密码所致。值得注意的是,缺失羧基末端 53 个氨基酸残基的截短型 PfLDH 尚保留一定的酶活性,暗示其空间构象尚能允许底物结合并发生相对较低效率的催化反应。Read *et al*(1999)从 PfLDH 中鉴定出底物的结合“口袋”,即由 102-108 位氨基酸残基组成的活性位点^[21]。显然,仅有 45 个氨基酸残基的 PfLDH-Δ271 和 80 个氨基酸残基的 PfLDH-Δ236 因缺乏活性位点而没有活力。

利用本研究建立的基于 PfLDH 活性测定的抗疟药筛选及评价技术,不仅可以快速筛选 PfLDH 抑制剂,而且将来有可能发展成为原虫血症及药物敏感性的评价系统。

REFERENCES(参考文献)

[1] Snow RW ,Guerra CA ,Noor AM ,*et al*. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 2005 , 434 : 214 - 216.

[2] Persson KEM , Lee CT , Marsh K , *et al*. Development and optimization of high-throughput methods to measure *Plasmodium falciparum*-specific growth inhibitory antibodies. *J Clin Microbiol* , 2006 44 : 1665 - 1673.

[3] Uhlemann AC ,Cameron A ,Eckstein-Ludwig U ,*et al*. A single amino acid residue can determine the sensitivity of SERCAs to artemisinins. *Nat Struct Mol Biol* 2005 12 : 628 - 629.

[4] Jambou R ,Legrand E ,Niang M ,*et al*. Resistance of *Plasmodium falciparum* field isolates to *in vitro* artemether and point mutations of the SERCA-type PfATPase6. *Lancet* 2005 366 : 1960 - 1963.

[5] Sessions RB ,Dewar V ,Clarke AR ,*et al*. A model of *Plasmodium falciparum* lactate dehydrogenase and its implications for the design of improved antimalarials and the enhanced detection of parasitaemia. *Protein Eng* ,1997 10 : 301 - 306.

[6] Vivas L ,Easton A ,Kendrick H ,*et al*. *Plasmodium falciparum* : stage specific effects of a selective inhibitor of lactate dehydrogenase. *Exp Parasitol* 2005 111 : 105 - 114.

[7] Dunn CR ,Banfield MJ ,Barker JJ ,*et al*. The structure of lactate dehydrogenase from *Plasmodium falciparum* reveals a new target for anti-malarial design. *Nat Struct Biol* ,1996 3 : 912 - 915.

[8] Cameron A ,Read J ,Tranter R ,*et al*. Identification and activity of a series ofazole-based compounds with lactate dehydrogenase-directed anti-malarial activity. *J Biol Chem* 2004 279 : 31429 - 31439.

[9] Makler MT ,Hinrichs DJ. Measurement of the lactate dehydrogenase activity of *Plasmodium falciparum* as an assessment of parasitemia. *Am J Trop Med Hyg* ,1993 48 : 739 - 741.

[10] Basco LK ,Marquet F ,Makler MM ,*et al*. *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* : lactate dehydrogenase activity and its application for *in vitro* drug susceptibility assay. *Exp Parasitol* , 1995 80 : 260 - 271.

[11] Piper R ,Lebras J ,Wentworth L ,*et al*. Immunocapture diagnostic assays for malaria using *Plasmodium* lactate dehydrogenase (pLDH). *Am J Trop Med Hyg* ,1999 60 : 109 - 118.

[12] Royer RE ,Deck LM ,Campos NM ,*et al*. Biologically active derivatives of gossypol : synthesis and antimalarial activities of peracylated gossypol nitriles. *J Med Chem* ,1986 29 : 1799 - 1801.

[13] Razakantoanina V ,Nguyen Kim PP ,Jaureguiberry G. Antimalarial activity of new gossypol derivatives. *Parasitol Res* 2000 86 : 665 - 668.

[14] Simmons DL ,Hyde JE ,Mackay M ,*et al*. Cloning studies on the gene coding for L(+)lactate dehydrogenase of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* ,1985 15 : 231 - 243.

[15] Bizk DJ ,Fox BA ,Gonyer K. Expression of *Plasmodium falciparum* lactate dehydrogenase in *Escherichia coli*. *Mol Biochem Parasitol* , 1993 59 : 155 - 166.

[16] Turgut-Balik D ,Shoemark DK ,Moreton KM ,*et al*. Over-production of lactate dehydrogenase from *Plasmodium falciparum* opens a route to new antimalarials. *Biotechnol Lett* 2001 23 : 917 - 921.

[17] Wu YS(吴英松) ,Li M(李明) ,Dong WQ(董文其) ,*et al*. Expression and immunocompetence characterization of *Plasmodium falciparum* lactate dehydrogenase. *Chinese Journal of Parasitology and Parasite Diseases*(中国寄生虫学与寄生虫病杂志) ,2001 , 19 : 80 - 83.

[18] Wang JY(汪俊云) ,Bao YF(包意芳) ,Yang T(杨涛) ,*et al*. Preparation of monoclonal antibodies specific to lactate dehydrogenase of *Plasmodium falciparum*. *Chinese Journal of Parasitology and Parasite Diseases*(中国寄生虫学与寄生虫病杂志) 2005 23 : 213 - 216.

[19] Baneyx F ,Mujacic M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* 2004 , 22 : 1399 - 1408.

[20] Tsumoto K ,Ejima D ,Kumagai I ,*et al*. Practical consideration in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expr Purif* ,2003 , 28 : 1 - 8.

[21] Read JA ,Wilkinson KW ,Tranter R ,*et al*. Chloroquine binds in the cofactor binding site of *Plasmodium falciparum* lactate dehydrogenase. *J Biol Chem* ,1999 274 : 10213 - 10218.