

恶性疟原虫肝期抗原 1 基因 3' 端的克隆及序列分析

单志新, 余新炳, 李学荣, 马长玲, 徐 劲, 陈守义

(中山医科大学寄生虫学教研室, 广东 广州 510089)

摘 要: 【目的】克隆并测定恶性疟原虫海南株(FCC1/HN)肝期抗原 1 基因(*LSA-1*) 3' 端序列, 比较 FCC1/HN 株与国外分离株 *LSA-1* 3' 端序列的差异。【方法】应用 PCR 技术从 FCC1/HN 株基因组 DNA 中扩增 *LSA-1* 3' 端序列, 用 T-A 克隆法将其克隆入 pMD18-T 载体。阳性克隆的重组质粒经酶切及 PCR 扩增鉴定后, 用双脱氧链末端终止法进行基因序列测定。应用 DNASTAR 软件进行不同分离株 *LSA-1* 3' 端序列的同源性分析。【结果】PCR 扩增得到特异的 FCC1/HN *LSA-1* 3' 端序列。酶切及 PCR 鉴定获得了正确的 pT-*LSA-1* 重组质粒。测序表明, 所克隆的 *LSA-1* 3' 端大小为 795 bp, 编码 264 个氨基酸。序列分析表明, 我国恶性疟原虫 FCC1/HN 株与国外的 NF54、T9/96、KEN、PNG 及 BRA 株 *LSA-1* 3' 端编码的氨基酸序列只在 3 个位点存在不同。【结论】克隆了恶性疟原虫 FCC1/HN *LSA-1* 3' 端片段。序列测定及同源性分析表明, FCC1/HN *LSA-1* 3' 端序列与其它分离株有高度的同源性。

关键词: 疟原虫, 恶性; *LSA-1*; 基因扩增; 序列分析

中图分类号: R382.3

文献标识码: A

文章编号: 1000-257X(2001)06-0410-04

Cloning and Sequence Analysis of 3' Region of Liver Stage Antigen 1 Gene of *Plasmodium Falciparum* Isolate FCC1/HN

SHAN Zhi-xin, YU Xin-bing, LI Xue-rong, MA Chang-ling, XU Jin, CHEN Shou-yi

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

Abstract: 【Objective】To clone and determine the nucleotide sequence of the 3' region of liver stage antigen gene (*LSA-1*) of *Plasmodium falciparum* isolate FCC1/HN, and to compare the differences of sequences of *LSA-1* between isolate FCC1/HN and the ones abroad. 【Methods】The 3' region of *LSA-1* was amplified by PCR from genomic DNA of isolate FCC1/HN. Then it was cloned into pMD18-T vector by T-A cloning method. The positive clones were screened and identified by agarose gel electrophoresis and endonuclease digestion and PCR technique. The correct recombinant plasmid was used as template, and the nucleotide sequence of the 3' region of *LSA-1* was determined by the dideoxy chain termination method. The DNASTAR software was used to analyze the homology of 3' regions sequence of *LSA-1* among different *P. falciparum* isolates. 【Results】The 3' region of *LSA-1* of isolate FCC1/HN was specifically amplified, and the correct recombinant plasmid pT-*LSA-1* was constructed. The result of nucleotides sequencing showed that the 3' region of *LSA-1* of isolate FCC1/HN was 795 base pairs in length, encoding 264 amino acids. Only 3 sites of alternative amino acids were found in the deduced amino acids of the 3' regions of *LSA-1* among *P. falciparum* isolates FCC1/HN, NF54, T9/96, KEN, PNG and BRA. 【Conclusion】The 3' region of *LSA-1* of *P. falciparum* isolates FCC1/HN was successfully cloned and sequenced. The deduced amino acids of the 3' regions of *LSA-1* of isolates FCC1/HN and other ones share quite high homology.

收稿日期: 2001-08-02

基金项目: 中山医科大学“211”重点学科建设课题基金资助项目(98169); 广东省自然科学基金资助项目(980089); 教育部博士点基金资助项目(93-186)

作者简介: 单志新(1972-), 男, 黑龙江方正人, 博士, 现在广东省人民医院心血管病研究所分子药理室工作(广州, 510080).

Key words: *Plasmodium falciparum*; liver stage antigen-1; gene amplification; sequence analysis

全世界每年疟疾发病人数达3~5亿,研制有效的疟疾疫苗是解决公众健康问题的优先研究项目。为设计有效的疟疾疫苗,需要明确能引起机体保护性免疫反应的抗原片段或表位。肝期是疟原虫侵入人体的最初发育阶段,本文研究的肝期抗原1(liver stage antigen 1, LSA-1)便是疟原虫在这一阶段的表达抗原之一。恶性疟原虫 LSA-1 基因(LSA-1)编码区长5730 bp,编码蛋白相对分子质量约为200,这种抗原存在于肝期疟原虫的纳虫空泡中^[1~3]。LSA-1蛋白由大片段中间17肽(E/G/Q/QSDLEQERLAKEKLQ)重复区和N-,C-端的氨基酸非重复区构成^[4]。研究表明,LSA-1编码的蛋白的C-端包含对疟疾感染起免疫保护作用的T、B细胞表位,是疟疾疫苗的重要候选分子^[3,5]。本文作者克隆、测定了FCC1/HN LSA-1 3'端序列,探讨了LSA-1编码的氨基酸序列在不同地理分离株间的差异。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 虫株,菌株和载体 恶性疟原虫海南株(FCC1/HN),*E. coli* DH5 α 为本室保存。pMD18-T载体购自TaKaRa(大连)公司。

1.1.2 PCR引物 据非洲NF54株LSA-1序列^[4],用PCGENE软件辅助设计一对引物,由上海生工生物工程公司合成。上游引物为5'-GAT GTA TTA GCA GAG GAT T-3',下游引物为5'-CTA TAG TTT CAT AAA ATA TTT AGT-3'。

1.1.3 主要试剂 *Taq* DNA聚合酶及dNTP为TaKaRa(大连)公司产品;限制性内切酶*Bam*HI,*Xho*I及 λ DNA标准,PCR标准为华美公司产品;蛋白酶K及琼脂糖购自Sigma公司;PCR产物胶回收试剂盒购自QiaGene公司。

1.2 方法

1.2.1 恶性疟原虫基因组DNA的提取 参照Trager和Jensen方法^[7],对FCC1/HN恶性疟原虫进行连续培养。待原虫密度达5%~10%时,收集虫血,2000 \times g离心(Sigma, 3K30)5 min,去上清,加等量的0.15 g/L皂素溶解红细胞。12000 \times g离心5 min收集虫体,用STE溶液洗涤后,沉淀加入10倍体积的溶虫液(STE中含20 g/L SDS,

0.2 g/L蛋白酶K),37 $^{\circ}$ C水浴过夜。用酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)抽提,乙醇沉淀DNA,TE(pH8.0)溶解,置-20 $^{\circ}$ C贮存备用。

1.2.2 LSA-1 3'端的PCR扩增 以提取的基因组DNA为模板,进行常规PCR扩增。PCR反应条件为:预变性,97 $^{\circ}$ C 5 min;变性94 $^{\circ}$ C 1 min;退火,52 $^{\circ}$ C 1 min;复性72 $^{\circ}$ C 2 min,共30个循环。最后一个循环在72 $^{\circ}$ C延伸7 min。取5 μ L扩增产物于12 g/L琼脂糖凝胶电泳鉴定。用uvp-GDS8000凝胶分析仪观察和记录结果。

1.2.3 LSA-1 3'端的克隆和鉴定 用胶回收试剂盒纯化扩增的LSA-1 3'端序列。用T-A克隆法将纯化的LSA-1 3'端克隆入pMD18-T载体,构建重组质粒pT-LSA-1。转化*E. coli* DH5 α 感受态细胞。快速酚法提取阳性克隆质粒DNA,电泳粗筛阳性克隆;对可能的重组质粒经*Bam*HI,*Hind*III单、双酶切,PCR扩增,10 g/L琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.4 LSA-1 3'端的序列测定及分析 用pMD18-T载体多克隆位点上,下游的RV-M和M13-47序列为测序引物,以重组质粒pT-LSA-1为模板,用ABI PRISMTM377XL型测序仪测序和读序,测序工作由TaKaRa(大连)公司进行。将获得的FCC1/HN LSA-1 3'端核苷酸序列及编码氨基酸序列资料输入GenBank;用DNASTAR软件分析FCC1/HN株与NF54、T9/96、KEN、PNG和BRA株LSA-1 3'端编码的氨基酸序列的同源性。

2 结果

2.1 LSA-1 3'端的扩增

用所设计合成的一对引物从FCC1/HN株基因组DNA中扩增出特异的LSA-1 3'端片段。根据引物的理论扩增值,LSA-1 3'端的PCR产物约为795 bp,经12 g/L琼脂糖凝胶电泳,扩增产物泳动速率与理论值大小基本相符(图1)。

2.2 LSA-1 3'端的克隆

提取筛选到的阳性克隆质粒DNA,分别用*Bam*HI和*Hind*III单酶切后,电泳条带的迁移率略慢于空载质粒。用*Bam*HI+*Hind*III双酶切,获得大小约为750~1000 bp之间,该片段与LSA-1 3'端PCR扩增片段大小一致;以重组质粒

为模板, 用两条引物进行 PCR 鉴定, 获得与从基因组扩增的 LSA-1 3' 端片段大小一致的特异扩增条带, 以上结果证明已获得正确的 pT-LSA-1 重组质粒(图 2)。



图 1 PCR 扩增 LSA-1 3' 端的 12 g/L 琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 PCR amplification of 3' region of LSA-1 (12 g/L agarose gel electrophoresis)

Lane M: DL 2 000 DNA marker; Lane 1, 2, 3: Amplified product of 3' region of LSA-1



图 2 pT-LSA-1 重组质粒的酶切和 PCR 鉴定 (10 g/L 琼脂糖电泳)

Fig. 2 Restriction analysis and PCR identification of recombinant plasmid pT-LSA-1 (10 g/L agarose gel electrophoresis)

Lane 1: lambda DNA/ EcoRI + HindIII marker; Lane 2: pUC18 digested by BamHI; Lane 3: pT-LSA-1 digested by BamHI; Lane 4: pT-LSA-1 digested by HindIII; Lane 5: pT-LSA-1 digested by BamHI + HindIII; Lane 6: PCR identification of the 3' region of LSA-1 from recombinant plasmid; Lane 7: PCR product of the 3' region of LSA-1 from P. falciparum genome; Lane 8: DL2 000 DNA marker

2.3 LSA-1 3' 端序列测定和分析

所克隆的 FCC1/HN LSA-1 3' 端序列长 795 bp, 推测编码 264 个氨基酸(图 3)。FCC1/HN 株 LSA-1 3' 端序列已被 GenBank 登录, 登录号: AF246996。借助 DNASTAR 软件对不同分离株的 LSA-1 序列进行同源性分析。结果表明, FCC1/HN 与 NF54、KEN、PNG 株 LSA-1 3' 端编码的 264 个氨基酸残基完全相同; 与其它分离株相比, T9/

96 株第 2 位氨基酸残基 V -> I 替代; BRA 株第 15 位氨基酸残基 A -> V 替代, 第 222 位氨基酸残基 D -> V 替代(图 4)。

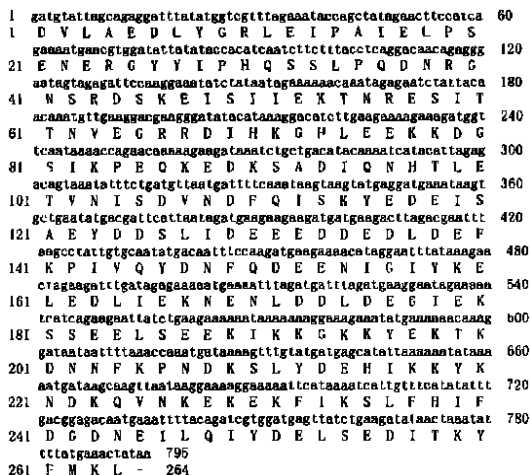


图 3 恶性疟原虫 FCC1/HN 株 LSA-1 3' 端序列

Fig. 3 Sequence of the 3' region of LSA-1 of P. falciparum isolate FCC1/HN

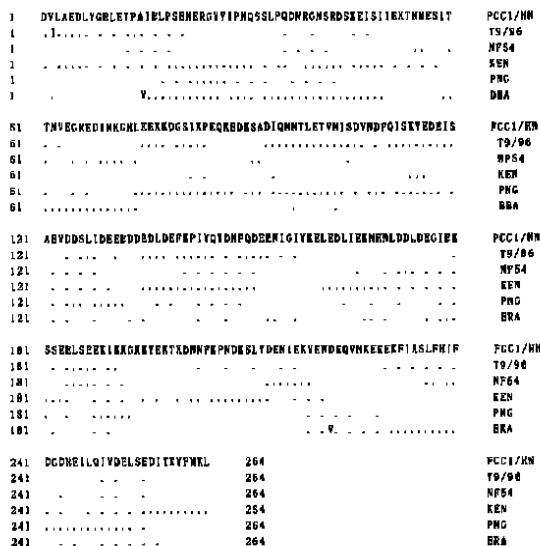


图 4 恶性疟原虫不同分离株 LSA-1 3' 端编码的氨基酸序列的同源性比较

Fig. 4 Comparison of homology of amino acids encoded by the 3' regions of LSA-1 of different P. falciparum isolates

3 讨论

Zhu 和 Hollingdale^[4] 首先报道了恶性疟非洲 NF54 LSA-1 基因编码区序列及编码的氨基酸序列。Fidock 等^[3] 比较了泰国 T9/96 株与非洲 NF54 LSA-1 抗原 N-和 C-端序列差异, 发现两株 LSA-1 抗原序列是高度保守的。Yang 等^[6] 分析了

肯尼亚 KEN 株, 巴布亚新几内亚 PNG 株和巴西 BRA 株恶性疟 LSA-1 抗原 N-和 C-端非重复区的序列, 结果表明上述 3 个分离株的 LSA-1 非重复区序列只有几个位点的氨基酸不同。本文测定了 FCC1/HN LSA-1 3'端序列, 推导出编码的氨基酸序列, 并对恶性疟 FCC1/HN 株与 NF54^[4], T9/96^[3], KEN, PNG, BRA^[6] 株 LSA-1 的 C-端氨基酸序列进行了同源性比较。结果表明 6 个不同分离株的 LSA-1 抗原 C-端序列只在 3 个位点有氨基酸替换。本文的结果与 Fidock^[3], Yang 等^[6] 的报道一致, 进一步证明了恶性疟不同分离株 LSA-1 3'序列的高度保守性。

LSA-1 抗原序列在不同恶性疟原虫分离株间是高度保守的, 免疫学实验表明它在诱导宿主免疫保护作用方面亦起重要作用。LSA-1 中间重复区的 17 肽单元是可被人体 B 细胞识别的表位^[2]; C-端的保守序列 KPIVQYDNF 可被能抑制危型疟的 HLA-B53 限制性的 CTL 识别^[8]。根据 LSA-1 抗原 C-端序列合成的多肽可引起广泛的免疫反应, 包括产生特异抗体, T 细胞增生, 分泌 IFN- γ 等, 这表明 LSA-1 抗原 C-端包含多个潜在的 B 和 T 细胞表位^[3, 5]。本文克隆了恶性疟 FCC1/HN LSA-1 3'端序列, 并进行了测序和序列分析, 为研究 LSA-1 抗原诱导免疫应答机制及研制肝期疟疾疫苗增添了基础资料。

参考文献:

[1] Guerin-Marchand C, Druilhe P, Galey B, *et al.* A liver-

stage specific antigen of *Plasmodium falciparum* characterized by gene cloning[J]. *Nature*, 1987, 329(6135): 164.

[2] Hollingdale M R, Aikawa M, Atkinson C T, *et al.* Non-CS preerythrocytic protective antigens[J]. *Immunol Lett*, 1990, 25(1-3): 71.

[3] Fidock D A, Gras-Masse H, Lepers J P, *et al.* *Plasmodium falciparum* liver stage antigen-1 is well conserved and contains potent B and T determinants[J]. *J Immunol*, 1994, 153(1): 190.

[4] Zhu J, Hollingdale M R. Structure of *Plasmodium falciparum* liver stage antigen-1[J]. *Mol Biochem Parasitol*, 1991, 48(2): 223.

[5] Joshi S K, Bharadwaj A, Chatterjee S, *et al.* Analysis of immune responses against T- and B-cell epitopes from *Plasmodium falciparum* liver-stage antigen 1 in rodent malaria models and malaria-exposed human subjects in India[J]. *Infect Immun*, 2000, 68(1): 11.

[6] Yang C F, Shi Y P, Udhayakumar V, *et al.* Sequence variations in the non-repetitive regions of the liver stage-specific antigen-1 (LSA-1) of *Plasmodium falciparum* from field isolates[J]. *Mol Biochem Parasitol*, 1995, 71(2): 291.

[7] Trager W, Jensen J B. Human malaria parasites in continuous culture[J]. *Science*, 1976, 193(4254): 673.

[8] Hill AV, Elvin J, Willis A C, *et al.* Molecular analysis of the association of HLA-B53 and resistance to severe malaria[J]. *Nature*, 1992, 360(6403): 434.

(编辑 张敏瑞)

(上接第 409 页)

[6] Cohen M B, Koener J F, Feyereisen R. Structure and chromosomal localization of *CYP6A1*, a cytochrome P450-encoding gene from the house fly[J]. *Gene*, 1994, 146(2): 267.

[7] Dunkov B C, Guzov V M, Mocelin G, *et al.* The *Drosophila* cytochrome P450 gene *CYP6A2*: structure, localization, heterologous expression, and induction by phenobarbital[J]. *DNA Cell Biol*, 1997, 16(11): 1345.

[8] Hung C F, Hoizmacher R, Connolly E, *et al.* Conserved

promoter elements in the *CYP6B* gene family suggest common ancestry for cytochrome P450 monooxygenases mediating furanocoumarin detoxification[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(22): 12200.

[9] Scott J G, Liu N, Wen Z, *et al.* House fly cytochrome P450 *CYP6D1*: 5' flanking sequences and comparison of alleles[J]. *Gene*, 1999, 226(2): 347.

(编辑 张敏瑞)