

DOI:10.13350/j.cjpb.260113

• 论著 •

恶性疟原虫 PfSET5 的生物信息学分析及蛋白纯化^{*}朱文菊, 李亚楠, 张俊梅, 刘娇, 谢金晶, 张欣, 董宏杰, 尹昆^{**}, 王琦^{**}

(山东省寄生虫病防治研究所, 山东第一医科大学(山东省医学科学院), 山东济宁 272033)

【摘要】 目的 PfSET5 属于 SET 家族, 是一种包含 SET 结构域的组蛋白甲基转移酶。恶性疟原虫 (*Plasmodium falciparum*) PfSET5 可以通过介导组蛋白 H3 的第 64 位赖氨酸 (H3K64) 的甲基化修饰, 影响染色质结构并参与基因表达调控。本研究通过对 PfSET5 进行生物信息学分析及重组蛋白的表达纯化, 阐明 PfSET5 蛋白的理化特性和结构特征, 为后续的功能研究和靶向药物的开发奠定基础。方法 从 NCBI 数据库获取 PfSET5 的氨基酸序列, 采用 ExPasy, TMHMM, SignalP, NetPhos3.1 等软件分析 PfSET5 的理化性质、跨膜区、信号肽、疏水性以及磷酸化位点预测。通过分子克隆构建 pET28a-MBP-PfSET5 重组蛋白, 在大肠埃希菌 BL21(DE3) 中诱导表达, 高压破碎后依次采用镍离子亲和层析、阴离子亲和层析以及分子筛排阻层析进行蛋白纯化。结果 PfSET5 蛋白共由 178 个氨基酸组成, 带正电荷, 无跨膜区, 无信号肽, 弱亲水性; 系统发育树和多序列对比分析显示 PfSET5 在进化过程中比较保守; 成功构建 pET28a-MBP-PfSET5 重组蛋白并获得大量高纯度蛋白。结论 本研究成功实现了 PfSET5 蛋白的高效表达及纯化, 为 PfSET5 蛋白甲基化分子机制的进一步研究和靶向药物开发奠定基础。

【关键词】 PfSET5; 异源表达; 重组蛋白; 蛋白纯化

【文献标识码】 A **【文章编号】** 1673-5234(2026)01-0066-07

[Journal of Pathogen Biology. 2026 Jan.; 21(01): 66-72.]

Bioinformatics analysis and protein purification of *Plasmodium falciparum* methyltransferase PfSET5

ZHU Wenju, LI Yanan, ZHANG Junmei, LIU Jiao, XIE Jinjing, ZHANG Xin, DONG Hongjie, YIN Kun, WANG Qi (Shandong Institute of Parasitic Diseases, Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences, Jining 272033, Shandong, China)^{***}

【Abstract】 **Objective** PfSET5, a member of the SET family, is a histone methyltransferase containing a SET domain. In *Plasmodium falciparum*, PfSET5 mediates the methylation of histone H3 at lysine 64 (H3K64), influencing chromatin structure and participating in gene expression regulation. This study employs bioinformatic analysis and recombinant protein expression and purification to elucidate the physicochemical properties and structural characteristics of PfSET5, thereby laying the foundation for subsequent functional studies and the development of targeted drugs. **Methods** The amino acid sequence of PfSET5 was obtained from the NCBI database. Tools including ExPasy, TMHMM, SignalP, and NetPhos3.1 were employed to analyze its physicochemical properties, transmembrane regions, signal peptides, hydrophobicity, and phosphorylation sites. A pET28a-MBP-PfSET5 recombinant plasmid was constructed using molecular cloning. The recombinant protein was expressed in *E. coli* BL21 (DE3) cells, followed by high-pressure homogenization for cell lysis. The protein was subsequently purified using a series of chromatography steps: nickel-affinity chromatography, anion-exchange chromatography, and size-exclusion chromatography. **Results** The PfSET5 protein is composed of 178 amino acids, with a positive net charge, no transmembrane regions, no signal peptide, and weak hydrophilicity. Phylogenetic tree and multiple sequence alignment analyses revealed that PfSET5 is relatively conserved throughout evolution. The pET28a-MBP-PfSET5 recombinant protein was successfully constructed, and a substantial quantity of high-purity protein was obtained. **Conclusion** This study successfully achieved the high-level expression and purification of the PfSET5 protein, laying the foundation for further investigation into its methylation molecular mechanism and the development of targeted drugs.

【Keywords】 PfSET5; heterologous expression; recombinant protein; protein purification

* **【基金项目】** 山东省医药卫生科技发展计划 (No. 202201060464); 中国博士后科学基金 (2024M753064); 济宁市重点研发计划项目 (No. 2023YXNS035); 山东省高等学校“青创团队发展计划” (No. 2022KJ194); 山东省泰山学者项目工程 (No. tsqn202103186); 山东省医学科学院医药卫生科技创新工程。

** **【通信作者】** 尹昆, E-mail: yinkun0326@163.com; 王琦, E-mail: 15963743209@163.com

【作者简介】 朱文菊 (2000-), 女, 山东人, 硕士研究生在读, 主要从事寄生虫研究。E-mail: 2571585080@qq.com

疟原虫(*Plasmodium*)是引起人类疟疾的病原体,属于原生生物界顶复门原虫。世界卫生组织统计的数据显示,2023年全球疟疾感染人数约为2.6亿^[1]。疟疾不仅严重威胁人类生命安全,更造成了巨大的经济损失。随着抗疟药物的广泛使用,疟原虫对现有药物抗药性不断增强^[2],使得疟疾防控形势日趋严峻。

疟原虫的生活史复杂,需要经历人类及灵长类动物等中间宿主,以及雌性按蚊这一终末宿主,才能完成生长发育的多个阶段。疟原虫在按蚊体内完成有性生殖阶段后^[3],子孢子会通过蚊虫叮咬进入人体,并依次经历肝细胞内的红外期和红细胞内的红内期发育过程。在红内期,多数疟原虫会经历从环状体、滋养体、到裂殖体等阶段^[4]。其中,裂殖体增殖期为疟原虫的主要致病阶段,此时大量寄生虫在红细胞内增殖并致使红细胞破裂,释放子孢子,引发宿主产生一系列临床症状,如高热、寒战、头痛、呕吐等^[5]。在这一过程中,疟原虫通过多种表观遗传机制调控自身基因表达,从而实现对宿主红细胞的入侵及后续增殖过程。值得注意的是,在恶性疟原虫中,与致病相关的多表达基因家族(如 *var*、*rif* 家族)的表达调控高度依赖表观遗传^[6-7]。表观遗传学是指在不改变DNA核苷酸原始序列的情况下,对基因表达和功能进行的可遗传性调控,包括DNA甲基化、非编码RNA的作用、组蛋白修饰以及染色质重塑^[8]。近年来,随着质谱等高通量技术的应用发展,研究人员发现,在恶性疟原虫中组蛋白翻译后修饰广泛存在,包括甲基化、乙酰化、磷酸化等多种修饰形式^[9],这些发现为深入解析疟原虫的表观遗传调控网络提供了重要线索^[10-11]。

组蛋白是真核生物体内的一类富含碱性氨基酸的蛋白质,疟原虫组蛋白H2A、H2B、H3和H4组装形成八聚体,并与缠绕在组蛋白核心外的DNA共同构成核小体,核小体是染色质的基本结构与功能单位^[12]。有研究认为,多细胞生物的基因沉默可以通过改变染色质的结构实现,这类结构变化通常与组蛋白赖氨酸的甲基化有关^[13]。在疟原虫的红内期,组蛋白借助特定的甲基化修饰(如H3K9me3、H3K36me3和H3K64me3)调控基因表达,这些修饰通过在组蛋白的特定氨基酸残基上添加甲基基团,改变染色质结构^[14],影响转录因子与启动子的结合,从而实现基因表达的动态调控^[15]。H3K64me3是指组蛋白H3第64位赖氨酸的三甲基化修饰,这种修饰主要富集于着丝粒周围异染色质区域,与重复序列和转录抑制有关^[16]。有研究发现甲基转移酶PfSET5和PfSET4参与该位点的甲基化,在同时敲除PfSET4和PfSET5后,疟原虫的裂殖体增殖受到显著抑制^[16]。提示这两种酶在红内期疟原虫的生长发育过程中发挥重要作用,

进一步的酶活分析显示,PfSET5的催化活性显著高于PfSET4。

基于以上发现,本研究选择PfSET5作为研究对象。PfSET5是恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)体内一种含SET结构域的组蛋白赖氨酸甲基转移酶(英文全称,HKMT),可利用完整的核小体为底物,通过对H3K64me3的动态调控,介导疟原虫在红内期的发育过程。这些证据提示PfSET5可能参与染色质构象变化和关键基因的表达调控,在疟原虫生命周期中发挥重要功能,具有良好的靶点特性,为新型抗疟药物的开发提供了重要方向。

本研究通过生物信息学对PfSET5的结构和功能特征进行了深入分析,在此基础上,构建了pET28a-MBP-PfSET5重组质粒,并将其转化入大肠埃希菌BL21(DE3)感受态细胞,成功实现了PfSET5异源表达。随后依次采用镍柱亲和层析(Ni-NTA)、阴离子亲和层析(AAC)和分子筛排阻层析(GEC)得到高纯度的PfSET5蛋白,为后续PfSET5功能研究和机制探索提供了坚实的实验基础,对未来药物筛选和靶向药物的开发实验上具有重要推动作用。

材料与方法

1 材料

1.1 菌株与质粒 大肠埃希菌BL21(DE3)感受态细胞于上海唯地生物技术有限公司所采购,原核表达载体pET28a为本实验室提供。

1.2 主要仪器与试剂 Veriti 96 梯度PCR基因扩增仪购自美国ABI赛默飞世尔公司,DNA marker、LB Borth购自上海生工生物工程股份有限公司,AKTA pure蛋白纯化仪采购于美国GE,PCR扩增试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒、三色预染蛋白质分子量标准(8~180 ku)购自上海翌圣生物科技有限公司。

2 方法

2.1 PfSET5生物信息学分析

2.1.1 PfSET5多序列比对及系统进化分析 从NCBI数据库中查找PfSET5的氨基酸序列,并且选取8条不同疟原虫含有SET蛋白结构域的氨基酸序列,包括恶性疟原虫3D7株(PF3D7_1214200)、大猩猩疟原虫G1类群(PPRFG01_1240700)、越南橡树疟原虫(PFFVO_03399)、坦桑尼亚疟原虫(PFTANZ_03775)、赖氏疟原虫(PRG01_1217800)、刚果伊泰托疟原虫(PBILCG01_1214700)、加蓬疟原虫(PGABG02_1214100)、大猩猩疟原虫G2类群(PADL01_1214700)以及鸡疟原虫(PGAL8A_00528800)。随后使用Clustalx软件分析PfSET5与其它物种的序列相似性,将结果上传到EScript软件,

采用 MEGA11 软件构建系统进化发育树,分析 PfSET5 蛋白在不同疟原虫的亲缘关系。

2.1.2 PfSET5 的理化性质、跨膜区、信号肽、疏水性分析及磷酸化位点预测 通过 ExPasy 软件包中的 ProtParam 和 ProtScale 程序全面分析 PfSET5 蛋白的理化性质以及亲疏水性,运用 TMHMM 软件对 PfSET5 的跨膜结构进行分析,并使用 SignalP 分析 PfSET5 的信号肽。同时通过 NetPhos3.1 预测 PfSET5 的磷酸化位点。

2.1.3 PfSET5 全长 3D 结构预测 使用 AlphaFold2 根据 PfSET5 的氨基酸序列预测其 3D 结构,并通过预测结果的置信度,用不同颜色标记 3D 结构。

2.2 pET28a-MBP-PfSET5 重组蛋白表达菌株的构建

2.2.1 引物设计与合成 为了提高 PfSET5 蛋白的可溶性,我们设计在 pET28 载体上插入麦芽糖结合蛋白(MBP)标签。获取 MBP 标签、PfSET5 基因和载体 pET28a 的特定序列信息后,设计出三对带有同源臂的特异性引物(表 1)。引物为北京六合华大基因科技有限公司合成。

表 1 PCR 扩增引物
Table 1 Primers used in PCR amplification

引物名称	引物序列(5'-3')	扩增用途
pET28a-PF	TAGctcgagcaccaccacca	上游同源臂
pET28a-PR	gctagccatattggctgccc	下游同源臂
MBP-PF	gcggcagccatattggctagcATGAAAATCG AAGAAGGTAAACTGG	上游同源臂
MBP-PR	AGAATCATggaAGTCTGCGGTCTT TCAGGGC	下游同源臂
PfSET5-PF	GCGCAGACTtccATGATTCTGTTC AACGTAAC	上游同源臂
PfSET5-PR	tgggtgggtgctgcagctaGCTGGAAACT TTCCACCAGCT	下游同源臂

2.2.2 目的基因 PfSET5、MBP 片段及线性化载体 pET28a 的扩增 以 PfSET5 合成质粒为模板,扩增 PfSET5 片段,扩增条件如下:95 °C 预变性 2 min,95 °C 变性 20 s,55 °C 退火 20 s,72 °C 延伸 20 s,共 30 个循环,72 °C 再延伸 5 min,并在相同条件下进行 MBP 片段及载体 pET28a 的扩增,其中扩增载体 pET28a 的延伸时间延长至 1 min,扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳实验,确定目标片段的大小和纯度后,切去目的条带并使用胶回收试剂盒回收。

2.2.3 pET28a-MBP-PfSET5 重组蛋白表达菌株的构建及鉴定 将目的基因 PfSET5 与 MBP 标签同时与载体 pET28a 通过无缝克隆技术结合,连接体系如下:把 PfSET5 基因、MBP 标签和载体 pET28a 以 3 : 3 : 1 的摩尔比例混合,补充 ddH₂O 至总体积 20 μL,45 °C 进行无缝连接反应,孵育 50 min。操作完成后,

取 10 μL pET28a-MBP-PfSET5 连接产物转化至 BL21(DE3)感受态细胞中,均匀涂布在含卡那抗生素的固体平板上,放置 37 °C 恒温培养箱中进行过夜培养。选取 4 个单克隆菌落接种于 1 mL 卡那抗性的液体 LB 培养基,37 °C 恒温振荡培养至 A 值达 0.6 后加入 0.8 μL(终浓度为 1 mmol/L)的蛋白表达诱导剂 IPTG,恒温诱导表达 1 h,离心弃上清,保留菌沉,并向其加入 50 μL 的 2×Loading Buffer,吹打混匀,在 95 °C 的金属浴中加热 10 min。经 SDS-PAGE 电泳筛选获得目标蛋白表达阳性的重组菌株,委托深圳华大基因股份有限公司测序。

2.3 pET28a-MBP-PfSET5 蛋白的表达纯化

2.3.1 细菌培养 取正确重组的 pET28a-MBP-PfSET5 蛋白表达菌株 5 μL 接种至 20 mL 卡那抗性的 LB 液体培养基中,37 °C 200 r/min 振荡培养过夜。以 1 : 100 的比例转接到卡那抗性 LB 液体培养基中,37 °C 200 r/min 振荡培养,直至细菌 A₆₀₀ 达到 0.6 时,16 °C 冷却 1 h,加入终浓度为 0.2 mmol/L 的 IPTG,低温诱导过夜。

2.3.2 收集菌液 将诱导过夜的菌液在离心瓶中配平,4 °C 条件下,4 200 r/min 离心 20 min。离心完成后,弃掉上清液,将 30 mL 预冷的重悬 Buffer(25 mmol/L Tris-HCl pH 8.0,50 mmol/L NaCl)加入每个离心瓶,通过涡旋振荡器将菌体和重悬 Buffer 涡旋混匀。把混匀的菌液倒入预冷的烧杯中,并加入终浓度为 0.2 mmol/L 丝氨酸蛋白酶抑制剂(Phenylmethanesulfonyl fluoride,PMSF)。

2.3.3 高压破碎与离心 将预冷烧杯中的菌液置于高压破碎仪中,2 200 MPA 压力下破碎三次,使菌体细胞完全裂解。随后取 20 μL 裂解液和 20 μL 2×Loading Buffer 混合均匀,将其命名为 Ce(Cellular Extract)。将剩余裂解液放至离心管中,4 °C 条件下,14 000 r/min 离心 50 min。将上清液转移至预冷烧杯,取 20 μL 的上清液和同体积的 2×Loading Buffer 混合均匀,命名为 S(Soluble fraction)。

2.3.4 镍离子亲和层析柱纯化蛋白 预处理:用 Elution Buffer(25 mmol/L Tris-HCl pH 8.0,100 mmol/L NaCl,250 mmol/L 咪唑)冲洗镍离子亲和层析柱(Ni-NTA 柱),再用重悬 Buffer 冲洗 2 个柱体积,放置 4 °C 层析柜预冷。将烧杯中的上清液缓慢放入 Ni-NTA 柱,流出的液体为流穿液,取样命名为 F(Flow-through)。确认流穿完成后,用重悬 Buffer 冲洗 Ni-NTA 柱,冲洗挂柱的非目标蛋白,冲洗的液体取样并命名为 W(Wash)。冲洗完成后,将 10 mL 的 Elution Buffer 加入 Ni-NTA 柱中,洗脱结合在柱上的带有 MBP 标签的目的蛋白,洗脱的液体取样并命名

为 E(Elution)。将取样的 Ce 和 S 样品在 95 °C 金属浴中加热 10 min 后,连同 F、W、E 样品一起进行 SDS-PAGE 蛋白电泳,用于检测蛋白的表达量和纯度。

2.3.5 阴离子亲和层析柱纯化蛋白 平衡阴离子亲和层析柱,先用 QB(25 mmol/L Tris-HCl pH8.0, 1 mol/L NaCl)冲洗 5 个柱体积,再用 QA(25 mmol/L Tris-HCl pH8.0)冲洗 5 个柱体积。将经 Ni-NTA 柱 Elution Buffer 洗脱下的蛋白用 QA 稀释 10 倍后上样,随后用 QA 洗脱结合较弱的非特异性蛋白,再用 QB 洗脱挂柱的目标蛋白。

2.3.6 分子筛排阻层析纯化蛋白 平衡分子筛排阻层析柱,先用分子筛 Buffer(25 mmol/L Tris-HCl pH8.0, 100 mmol/L NaCl)冲洗 5 个柱体积,将上一步取得的蛋白浓缩至 2 mL 上样,挂柱完成后,用分子筛 Buffer 洗脱下来。

结果

1 多序列比对及系统进化分析

通过对比不同疟原虫中含 SET 蛋白结构域的氨基酸序列,获得比对结果如图 1 所示。该图表明,恶性疟原虫 3D7 株与其他疟原虫的序列存在显著同源性,提示 PfSET5 蛋白在不同疟原虫中可能发挥相似的功能,且在进化过程中相对保守。系统进化树表明恶性疟原虫 3D7 株与越南橡树疟原虫和坦桑尼亚疟原虫关系最近,其次是大猩猩疟原虫 G1 类群。赖氏疟原虫、刚果伊泰托疟原虫、加蓬疟原虫、大猩猩疟原虫 G2 类群形成一个较大分支,与恶性疟原虫 3D7 株关系较远。最后是鸡疟原虫独立构成一个分支,恶性疟原虫 3D7 株距离该分支最远。

2 PfSET5 的理化性质、跨膜区、信号肽、疏水性分析及磷酸化位点预测

PfSET5 蛋白全长共有 178 个氨基酸,其中带正电荷的氨基酸残基(Arg+Lys)24 个,带负电荷的氨基酸残基(Asp+Glu)18 个。PfSET5 蛋白共有 21 种蛋白质构成,其中亮氨酸(Ile)占比最高为 14.0%,半胱氨酸(Cys)、蛋氨酸(Met)、色氨酸(Trp)含量最低均为 1.1%。PfSET5 蛋白的理论等电点为 9.14,是一个带正电的碱性蛋白。分子质量约为 20.66 ku,化学分子式 $C_{943}H_{1477}N_{245}O_{268}S_4$ 。脂肪系数是 99.61,平均亲水系数为-0.378,说明此蛋白整体上是亲水性的,但是亲水性比较弱。

TMHMM 软件的分析结果显示,PfSET5 的跨膜螺旋数量为 0,表明无跨膜区,是非跨膜蛋白(图 2)。信号肽的预测结果表示该蛋白存在信号肽的概率为 0.0034,认定无信号肽(图 3),可以认为它是一种非分泌蛋白。此外,PfSET5 在哺乳动物细胞表达体系中

预计的半衰期为 30 h,不稳定指数 II 为 35.22,表明该蛋白比较稳定。亲/疏水性结果表明,PfSET5 序列中亲水性最强的氨基酸是第 103 位谷氨酸,亲水值是-2.889,疏水性最强的氨基酸是第 46 位的亮氨酸,疏水值为 1.822,总亲水值为-124.444,总疏水值为 64.455,即 PfSET5 是一个亲水蛋白(图 4)。磷酸化位点预测显示 PfSET5 共有 14 个可能的磷酸化位点(图 5),分别是 9 个丝氨酸(Ser)位点,4 个酪氨酸(Tyr)位点和 1 个苏氨酸(Thr)位点,能被 PKG(蛋白激酶 G)、ATM(共济失调毛细血管扩张突变蛋白激酶)、INSR(胰岛素受体)、PKA(蛋白激酶 A)、CKI(蛋白激酶抑制剂)、CKII(蛋白激酶 II)、PKC(蛋白激酶 C)激酶磷酸化。

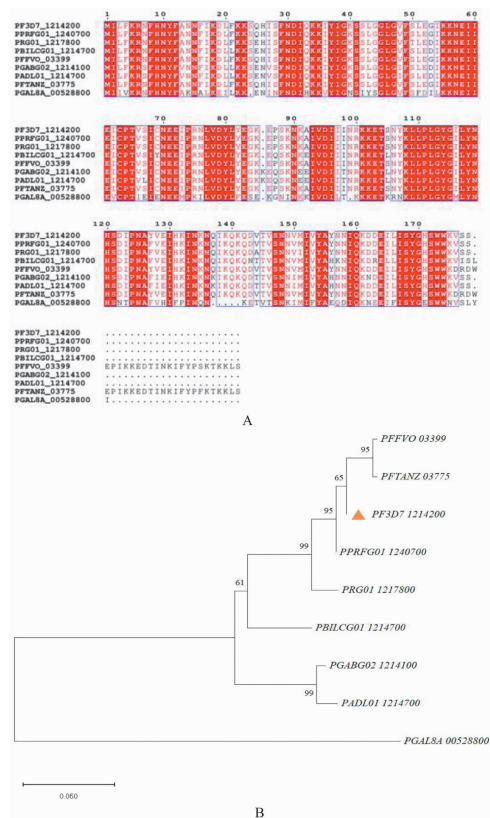


图 1 不同物种 SET 蛋白序列比对及系统进化分析
Fig. 1 Multiple sequence alignment and phylogenetic analysis of SET in different species

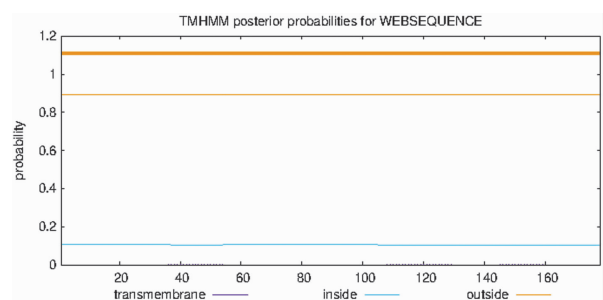


图 2 PfSET5 蛋白跨膜区分析
Fig. 2 Transmembrane domain analysis of PfSET5

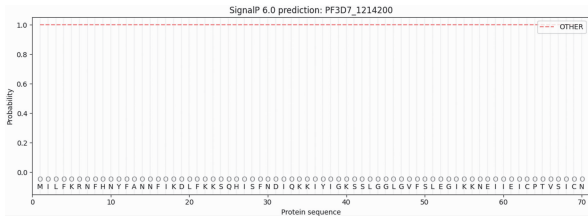


图 3 PfSET5 蛋白信号肽分析
Fig. 3 Signal peptide analysis of PfSET5

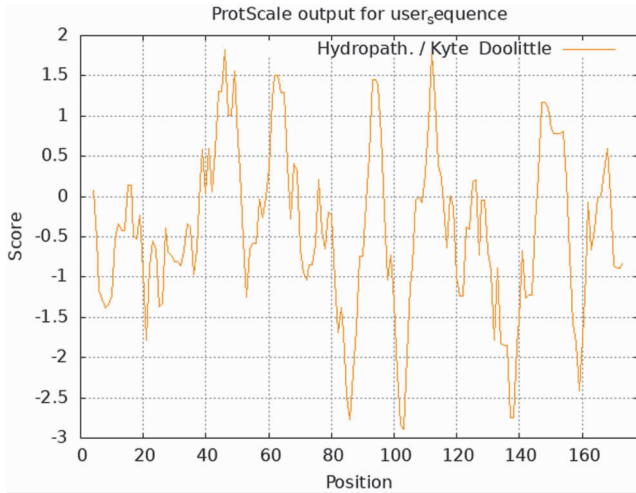


图 4 PfSET5 蛋白疏水性分析
Fig. 4 Hydrophobicity analysis of PfSET5

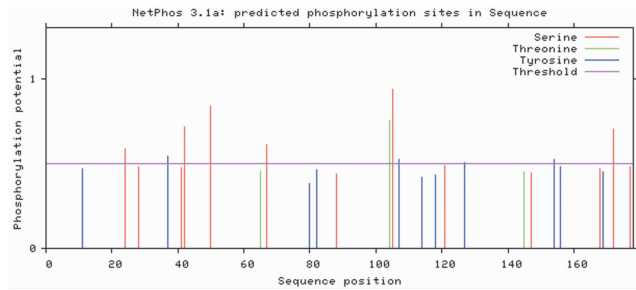


图 5 PfSET5 蛋白磷酸化位点预测
Fig. 5 Phosphorylation site prediction of PfSET5

3 PfSET5 结构预测结果

通过 AlphaFold2 预测 PfSET5 的三维结构,得到一个详细的结构模型,该模型采用不同颜色来表示其各区域的预测置信度(图 6)。模型中的深蓝色部分表示结构预测的置信度非常高($pLDDT > 90$),说明这些区域的结构有可能与实际的天然构象相似度较高。浅蓝色区域显示预测结果置信度略低于深蓝色部分,但是置信度较高($90 > pLDDT > 70$),说明这些区域的结构预测比较可靠。黄色区域的置信度较低($70 > pLDDT > 50$),提示这些部分与实际的结构差异大,橙色区域则代表着预测结果的置信度非常低($pLDDT < 50$),可能是孤立的非结构化区域。

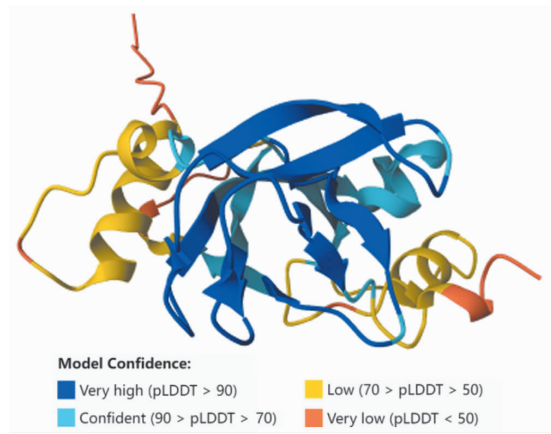
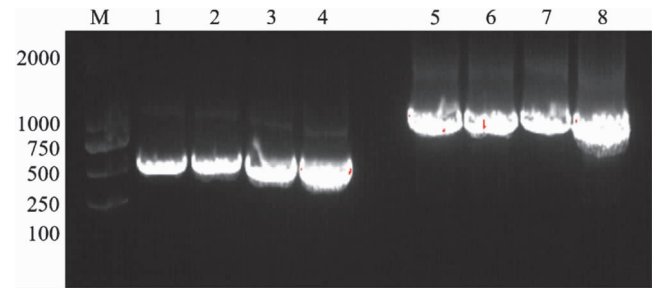


图 6 PfSET5 蛋白结构预测
Fig. 6 Structure prediction of PfSET5

4 扩增目的基因

PfSET5 片段的理论长度是 534 bp。琼脂糖凝胶电泳实验结果(图 7)表明在 500 bp 左右的位置,有清晰的条带。MBP 的理论长度为 1 101 bp,在图中 1 000 bp 左右的位置,有明亮的条带。这表明我们的目的基因扩增成功,得到了理想的 DNA 片段。



M DNA 标志物 1~4 PfSET5 扩增产物 5~8 MBP 标签扩增产物

图 7 PfSET5 基因 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳分析
Fig. 7 Analysis of the PCR amplification product of the PfSET5 gene using agarose gel electrophoresis

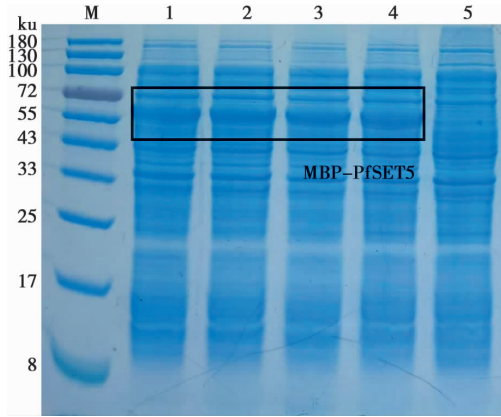
5 重组蛋白表达菌株的鉴定

从转化的 pET28a-MBP-PfSET5 的固体培养基上挑选生长的单克隆菌落,通过 SDS-PAGE 电泳观察蛋白表达情况。在 55 ku 和 72 ku 之间出现一条明显的特异性条带(图 8),其分子量大于 PfSET5(分子量约为 20.66 ku),这一结果与预期相符,因为重组蛋白含有 MBP 标签(约 40 ku),理论分子量约 60.66 ku。结合 DNA 测序结果表明 MBP-PfSET5 基因成功插入 pET28a 载体,无移码突变现象,认为 pET28a-MBP-PfSET5 重组菌株成功构建。

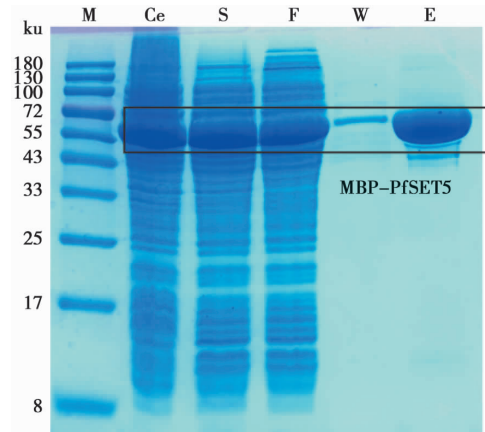
6 MBP-PfSET5 蛋白纯化

将重组的 MBP-PfSET5 进行 Ni-NTA 亲和层析,并采用 SDS-PAGE 观察纯化结果(图 9),纯化出的 MBP-PfSET5 仍有部分杂带,为了进一步提高蛋白的纯度,进行阴离子亲和层析实验,洗脱曲线呈现单一主

峰伴少量肩峰(图 10),说明目标蛋白 MBP-PfSET5 的纯度可能较高但仍携带少量杂质,SDS-PAGE 结果显示 MBP-PfSET5 与阴离子亲和层析柱结合能力较好,洗脱的蛋白样品仍可见少量杂带。随后利用分子筛排阻层析去除残留杂蛋白,洗脱曲线(图 11)结果呈单一对称峰,经 SDS-PAGE 验证,MBP-PfSET5 纯度较高。



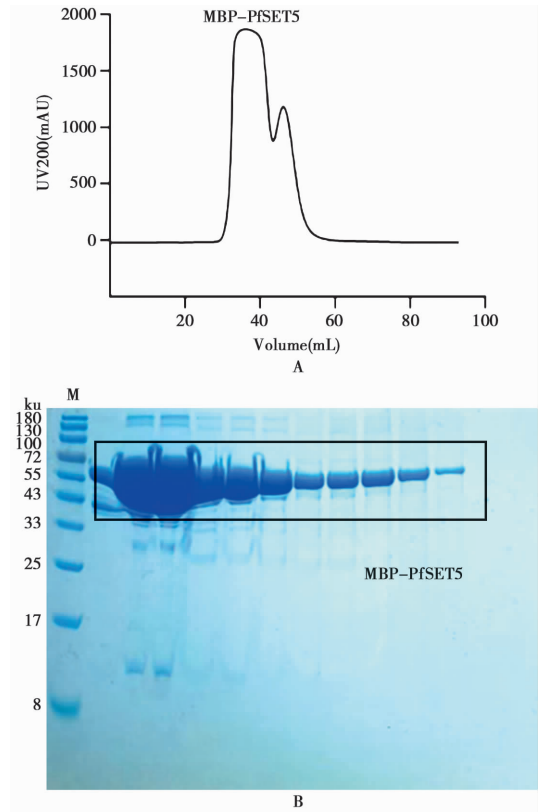
M 蛋白分子量标准 1~4 PfSET5 5 阴性对照
图 8 PfSET5 重组菌株表达产物 SDS-PAGE 电泳分析
Fig. 8 The result of recombinants



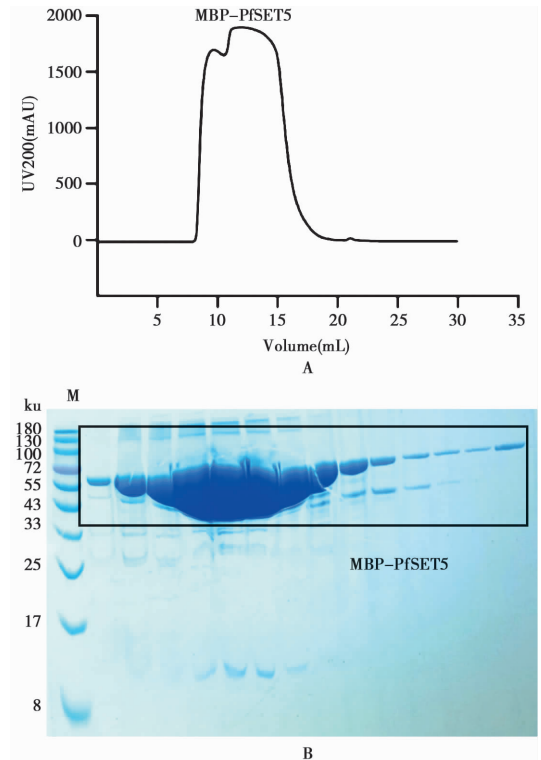
M 蛋白分子量标准 Ce 全菌蛋白样品 S 高压破碎后的上清液 F 流穿液 W 冲洗液 E 洗脱液
图 9 MBP-PfSET5 融合蛋白 Ni-NTA 亲和层析
Fig. 9 MBP-PfSET5 fusion protein Ni-NTA Affinity chromatography

讨论

组蛋白是核小体的重要组成部分,与 DNA 共同组成染色质的基本结构单位。组蛋白修饰是指在特定酶的作用下发生的一系列翻译后修饰过程,包括但不限于甲基化,乙酰化,乳酸化等^[18]。其中,组蛋白甲基化是指在甲基转移酶的作用下,对组蛋白特定的氨基酸残基添加甲基基团的过程。这种修饰虽不直接影响组蛋白与 DNA 的结合,但可以通过改变染色质的结构和状态,调控特定基因的表达^[15]。PfSET5 是一种属于 SET 家族的甲基转移酶,该家族成员具有组蛋白



A MBP-PfSET5 融合蛋白阴离子亲和层析 B 纯度鉴定
图 10 MBP-PfSET5 融合蛋白阴离子亲和层析以及纯度鉴定
Fig. 10 MBP-PfSET5 fusion protein anion affinity chromatography and purity determination



A MBP-PfSET5 融合蛋白分子筛排阻层析 B 纯度鉴定
图 11 MBP-PfSET5 融合蛋白分子筛排阻层析以及纯度鉴定
Fig. 11 MBP-PfSET5 fusion protein size-exclusion chromatography and purity determination

和非组蛋白甲基转移酶活性^[19],在基因转录调控和个体生长发育中发挥重要作用。SET 家族的一个重要的特征是其成员普遍含有一个高度保守的 SET 结构域,此结构域包含催化活性位点,可结合甲基供体 S-腺苷甲硫氨酸,并将其转移至底物蛋白的特定氨基酸残基(通常为赖氨酸)上,从而完成甲基化修饰^[20]。研究表明,PfSET5 可催化组蛋白 H3 第 64 位赖氨酸残基(H3K64)的甲基化修饰来影响基因转录^[17]。在疟原虫中,PfSET5 酶的缺失会影响其生长和繁殖,提示该蛋白可能成为新型抗疟药物的潜在靶点。

本研究利用生物信息学工具揭示了 PfSET5 蛋白的理化特征及其潜在的生物学意义。PfSET5 共由 178 个氨基酸组成,分子量约为 20.66 ku,等电点为 9.14,是一种带正电荷的碱性蛋白质,不存在跨膜结构,无信号肽,推测定位在细胞核或胞内的其他细胞器上。蛋白稳定性评估显示,PfSET5 在哺乳动物细胞表达体系中的半衰期较长,不稳定指数为 35.22,属于稳定蛋白,能在较长时间内维持其功能。亲/疏水性的结果表明,PfSET5 是亲水蛋白(平均亲水系数为-0.378),推测 PfSET5 蛋白表面的氨基酸可通过与水分子形成氢键,保持其结构的稳定性。

此外,本研究设计构建了 pET28a-MBP-PfSET5 重组蛋白表达菌株,并通过 Ni-NTA 亲和层析、阴离子亲和层析以及分子筛排阻层析成功纯化出大量高纯度的 PfSET5 蛋白为揭示 PfSET5 蛋白的基本特性提供了重要依据,为后续 PfSET5 蛋白的结构解析、分子机制研究及靶向小分子抑制剂的开发应用奠定了基础。

【参考文献】

- [1] World Health Organization. World malaria report 2023 [R]. Geneva: WHO, 2024.
- [2] 叶升玉,成依依,李曼,等. 我国恶性疟原虫主要药物抗性研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2020,38(5):631-636.
- [3] Meibalan E, Marti M. Biology of Malaria transmission[J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2017, 7(3): a025452.
- [4] Arora G, Hart GT, Manzella-Lapeira J, et al. NK cells inhibit *Plasmodium falciparum* growth in red blood cells via antibody-dependent cellular cytotoxicity[J]. Elife, 2018, 7: e36806.
- [5] Shahbodaghi SD, Rathjen NA. Malaria: Prevention, diagnosis, and treatment[J]. Am Fam Physician, 2022, 106(3): 270-278.
- [6] 张旭. 恶性疟原虫表观遗传修饰对 var 基因转录调控的研究[D]. 吉林大学, 2014.
- [7] 徐少杰,陈坤波,陈军虎. 恶性疟原虫重复散布家族基因转录调控的研究进展[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2023, 41(3): 374-379.
- [8] Hollin T, Chahine Z, Le Roch KG. Epigenetic regulation and chromatin remodeling in malaria parasites [J]. Annu Rev Microbiol, 2023, 77: 255-276.
- [9] 杜婷婷,黄秋花. 组蛋白赖氨酸甲基化在表观遗传调控中的作用[J]. 遗传, 2007(4): 387-392.
- [10] Shrestha S, Lucky AB, Brashear AM, et al. Distinct histone post-translational modifications during *Plasmodium falciparum* gametocyte development [J]. J Proteome Res, 2022, 21(8): 1857-1867.
- [11] Trelle MB, Salcedo-Amaya AM, Cohen AM, et al. Global histone analysis by mass spectrometry reveals a high content of acetylated lysine residues in the malaria parasite *Plasmodium falciparum* [J]. J Proteome Res, 2009, 8(7): 3439-3450.
- [12] Mateu-Arrom L, Puig L. Genetic and epigenetic mechanisms of psoriasis [J]. Genes (Basel), 2023, 14(8): 1619.
- [13] Shilatifard A. Chromatin modifications by methylation and ubiquitination; Implications in the regulation of gene expression [J]. Annu Rev Biochem, 2006, 75: 243-269.
- [14] Daujat S, Weiss T, Mohn F, et al. H3K64 trimethylation marks heterochromatin and is dynamically remodeled during developmental reprogramming [J]. Nat Struct Mol Biol, 2018, 25(8): 743.
- [15] 石明丽,肖波,江陆斌. 恶性疟原虫 var 基因的表达调控机制研究进展[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2021, 39(6): 719-724.
- [16] Lange UC, Siebert S, Wossidlo M, et al. Dissecting the role of H3K64me3 in mouse pericentromeric heterochromatin [J]. Nat Commun, 2013, 4: 2233.
- [17] Jabeena CA, Govindaraju G, Rawat M, et al. Dynamic association of the H3K64 trimethylation mark with genes encoding exported proteins in *Plasmodium falciparum* [J]. J Biol Chem, 2021, 296: 100614.
- [18] HE W, LI Q, LI X. Acetyl-CoA regulates lipid metabolism and histone acetylation modification in cancer [J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2023, 1878(1): 188837.
- [19] Dillon SC, Zhang X, Trievel RC, et al. The SET-domain protein superfamily: protein lysine methyltransferases [J]. Genome Biol, 2005, 6(8): 227.
- [20] Trievel RC, Beach BM, Dirk LMA, et al. Structure and catalytic mechanism of a SET domain protein methyltransferase [J]. Cell, 2002, 111(1): 91-103.

【收稿日期】 2025-07-03 【修回日期】 2025-10-01