

· 实验研究 ·

用噬菌体肽库筛选 SARS 病原体的模拟抗原表位

吴万敏 王晓娟 朱慧芬 沈关心

【摘要】 目的 筛选 SARS 病原体的模拟抗原表位。**方法** 以混合 SARS 患者恢复期血清 Ig 作为筛选分子,从噬菌体肽库中筛选出能与患者血清 Ig 结合的模拟抗原表位,并研究其抗原特性。**结果** 得到 2 个能与 SARS 患者恢复期血清 Ig 特异性结合的阳性克隆;DNA 测序结果显示这 2 个模拟抗原表位与 SARS 抗原无同源性。**结论** 用噬菌体肽库成功筛选得到 SARS 的模拟表位,为开展用 SARS 模拟抗原表位探索 SARS 的防治研究创造了条件。

【关键词】 严重急性呼吸综合征;噬菌体肽库;模拟抗原表位

Study on the mimic epitopes screening program severe acute respiratory syndromes antigen with random phage peptide library WU Wan-min*, WANG Xiao-juan, ZHU Hui-fen, SHEN Guan-xin.
*Department of General Surgery, Affiliated Hospital of Neimenggu Medical College, Huhehaote 010050, China

Corresponding author: WU Wan-min, Email: wwmys@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To screen the severe acute respiratory syndromes (SARS) mimotopes with random phage peptide library and to investigate their immunogenicity. **Methods** Using SARS sera as selective molecule, a 12 mer phage peptide library was biopanned and positive clones containing the mimic epitopes were selected. The immuno-characterization of the epitopes were then investigated. **Results** 2 positive clones that having specific affinity to SARS sera were obtained. The DNA sequencing data showed no homology between the sequences of the deduced amino acid of the two mimic antigen peptides and the sequence of SARS. **Conclusion** SARS mimotopes were obtained by phage peptide library screening. This method might provide a new approach for SARS therapy and vaccine development.

【Key words】 Severe acute respiratory syndromes; Phage peptide library; Mimic antigen epitope

严重急性呼吸综合征(SARS)2003 年在我国及全世界 33 个国家流行,该病目前尚无理想的诊断和防治手段。根据免疫应答的理论基础,病原微生物进入机体后,可诱导机体产生抗病原微生物的特异性抗体,抗原依靠其表位与相应抗体发生特异结合而发生体液免疫。通过噬菌体肽库筛选能与抗 SARS 病毒的抗体特异结合的 SARS 病原体的抗原表位,在体外可与 SARS 患者血清中 IgM(IgG)类抗体特异性结合,可以与佐剂联合使用作为 SARS 病毒抗原诱导机体产生抗 SARS 病毒的细胞免疫应答

和体液免疫应答,此特性使其可作为疫苗进行特异性主动免疫预防。本研究用 SARS 患者恢复期血清筛选噬菌体肽库,同时用正常人血清做负筛选,获得 SARS 病原体的 2 个模拟抗原表位。

材料与方法

1. 材料:噬菌体随机 12 肽库购于 New England Biolabs 公司,受体菌为 *E. coli* ER2537;辣根过氧化物酶(HRP)标记的鼠抗 M13 单克隆抗体购自 Pharmacia 公司;昆明小鼠 6 只,由华中科技大学同济医学院动物中心提供。

2. 标本来源:27 例 SARS 患者恢复期血清来源于内蒙古医学院附属医院及内蒙古 SARS 救治中心;27 名正常人血清来源于内蒙古医学院附属医院健康体检者。

3. 方法:

(1)肽库筛选:分别以混合 SARS 患者血清 Ig

基金项目:内蒙古自治区卫生厅自然科学基金资助项目(20035028)

作者单位:010050 呼和浩特,内蒙古医学院附属医院普外科(吴万敏);内蒙古医学院免疫教研室(王晓娟);华中科技大学同济医学院免疫学系(朱慧芬、沈关心)

通讯作者:吴万敏,Email:wwmys@yahoo.com.cn

和混合正常人血清 Ig 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 包被进口细胞培养板, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜, PBS 洗板 3 次, 以含 2% BSA 的 PBS(MPBS) 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h。先在含 SARS 患者血清 Ig 培养板中加肽库噬菌体 1 μl , 37 $^{\circ}\text{C}$ 放置 30 min, 室温 1.5 h, 用含 0.05% Tween-20 的 PBS(PBST) 洗板 10 次, 三乙胺洗脱, 加 Tris-HCl 快速中和, 吸取洗脱液加入含正常人 Ig 的培养板中, 室温放置 2 h, 用 LB 培养基将 *E. coli* ER2537 的过夜培养液 1:20 稀释, 将噬菌体液接种到 20 ml 上述稀释后的细菌培养物中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 4.5 h, 4 $^{\circ}\text{C}$ 5000 r/min 离心 15 min, 上清转移至另一个离心管中, 加入 3 ml 聚乙二醇(PEG)/NaCl (20% PEG 8000, 2.5 mol/L NaCl) 沉淀过夜。4 $^{\circ}\text{C}$ 10 000 r/min 离心 25 min, 用 1 ml TBS 重悬沉淀, 将噬菌体悬浮液离心 30 s, 上清用 170 μl PEG/NaCl 重新沉淀 60 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 10 000 r/min 离心 15 min, 用 200 μl TBS 重悬沉淀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 10 000 r/min 离心 1 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存上清, 滴定洗脱液中噬菌体的数量。按上述步骤再淘洗 4 次。第 5 次淘洗噬菌体感染 *E. coli* ER2537 后铺制 LB/IPTG/X-gal 平板, 随机挑取 20 个噬斑, 分别接种于 1:100 稀释的 *E. coli* ER2537 的过夜培养液中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡 4.5 h, 12 000 r/min 离心 2 min, 收集上清噬菌体液, 加入 1/5 PEG/NaCl 沉淀噬菌体, 16 000 r/min 离心 30 min, 沉淀物重悬于 200 μl TBS (0.02% NaN_3), 离心 1 min, 沉淀任何残余的不溶物, 上清进行检测、鉴定。

(2) 单克隆噬菌体酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测: 分别以终浓度为 50 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 的 SARS 和正常人 Ig 100 μl 包被 96 孔酶标板, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 次日用 PBS 洗 3 次, 加入含 8% 脱脂奶粉的 PBS 4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h, 弃去封闭液, 直接加第 5 轮筛选后经 PEG/NaCl 沉淀浓缩的单克隆噬菌体, 每孔 100 μl , 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 1.5 h, PBST 洗 6 次, 加入 1:500 HRP 标记的鼠抗 M13 单抗, 每孔 100 μl , 37 $^{\circ}\text{C}$ 1.5 h, PBST 洗 6 次, TMB 显色, 测定其吸光度 (A_{492})。

(3) DNA 序列测定: 将 ELISA 检测结果阳性的 6 株噬菌体克隆分别取 1000 μl 上清, 加 400 μl PEG/NaCl, 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 10 min, 10 000 r/min 离心 10 min, 将沉淀溶于 100 μl 碘缓冲液中, 加入 250 μl 无水乙醇, 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 10 min, 10 000 r/min 离心 10 min, 将沉淀溶于 30 μl 超纯水中。所提的噬菌体单链 DNA 送上海博亚生物工程有限公司测序。

(4) SARS 模拟抗原表位的免疫原性分析: 每种

表位取 10^{12} pfu 的阳性噬菌体与完全福氏佐剂混合免疫 6 只昆明小鼠, 2 周后用不完全福氏佐剂和噬菌体加强免疫 1 次, 第 5 周眶静脉采血分离血清。将含有两种表位的阳性噬菌体进行 12% 的 SDS-PAGE 电泳, 转膜, 分别加入 100 μl 免疫鼠血清、SARS 患者血清、正常人血清在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下结合过夜, 用含 0.1% Tween-20 的 PBS 洗脱, 加入 HRP 标记的抗人 IgG, TMB 显色。

结 果

1. 噬菌体阳性克隆的获得: 用 SARS 患者血清包被酶标板筛选 12 肽噬菌体肽库, 同时用正常人血清进行负筛选, 对洗脱后可能含有抗原表位的噬菌体进行 5 轮重复扩增筛选, 第 5 轮筛选得到的噬菌体经铺含 IPTG/X-gal 的 LB 平板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 生长过夜后长出的噬菌斑全为蓝色阳性重组斑, 随机挑选其中 20 个独立的阳性斑作进一步分析。

2. 单克隆 ELISA 测定: 经 5 轮筛选后, 随机挑选 20 个噬斑, 其中有 6 个单克隆菌落与 SARS 血清 Ig 结合, 其中 2 个 (3 号和 4 号) ELISA 测定的平均 A 值明显高于与正常人 Ig 结合的 A 值 (图 1)。

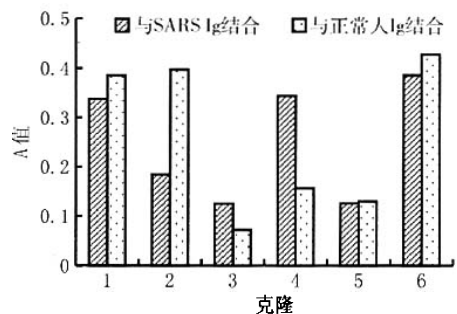
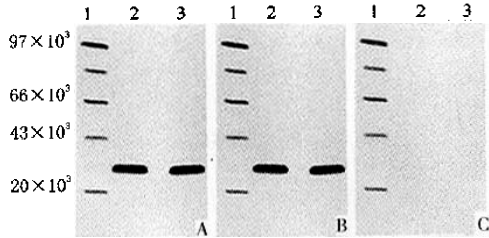


图 1 6 个单克隆菌落与 Ig 结合 ELISA 检测结果

3. 测序结果: 通过测序, 我们发现第 3 号克隆和 4 号克隆的插入序列相同, 而其他 4 个克隆序列也相同, 即 ELISA 结果阳性的 6 个克隆中实际包含有两种抗原表位, 根据 DNA 序列演绎的氨基酸序列如下: S-G-V-P-A-L-P-I-S-K-M-C-V-A-R 和 L-I-R-S-P-L-P-Q-G-V-L-G-N-W-A。将这两种序列与 SARS 的氨基酸序列相比较, 未发现有同源性, 说明这两种抗原表位可能为 SARS 抗原空间构型的模拟表位。

4. 免疫原性分析结果: 将两种含模拟表位的阳性噬菌体进行 SDS-PAGE 电泳, 蛋白条带转移至硝酸纤维素膜上, 分别用免疫鼠血清、SARS 患者血

清、正常人血清进行识别,结果发现两种抗原表位既可识别 SARS 患者血清又能识别免疫鼠血清,均在同一位置处出现条带(相对分子质量 20×10^3 与 43×10^3 之间),而正常血清未出现此条带,表明免疫血清中含有针对 SARS 的抗体存在(图 2)。



1. 蛋白质分子量标志物; 2. 模拟表位 1; 3. 模拟表位 2
A. SARS 患者血清; B. 模拟表位免疫鼠血清; C. 正常人血清

图2 Western blot 分析结果

讨 论

病原体的蛋白质抗原表位分析既是研究抗原分子的结构和功能、抗原-抗体反应机制的基础,又可为多肽疫苗研制、药物筛选以及特异血清学诊断方法的建立提供重要的线索和依据^[1]。多肽分子文库技术的建立与完善为研究抗原表位提供了有效的工具,多肽文库中应用最为广泛的是噬菌体肽库。噬菌体展示肽库技术高库容、高效、方便、灵活等特点使其在蛋白抗原表位的研究中占有重要地位。从随机肽库中可以直接筛选出能和抗体结合的表位,这些表位既可以是线性表位,也可以是模拟的构象型表位,而且这种方法不必预先确定蛋白质的氨基酸序列,因此在抗原与抗体相互识别的研究、新型疫苗的研制以及药物的开发等方面具有广泛应用前景。目前,国外学者已成功筛选到不连续的与原始抗原没有同源性的甲肝病毒(HAV)^[2]、乙肝病毒(HBV)^[3]、人类免疫缺陷病毒(HIV)^[4]的模拟表位序列,这些序列均具有很强的免疫原性,不需添加任何佐剂,所激发的抗体既能识别模拟表位抗原也能

识别原始抗原。除此之外,这些模拟表位抗原可以避免完整抗原的毒性作用,并可以避免产生不需要的非中和抗体,因此该技术是目前研究 SARS 未知表位序列的最佳选择之一。

在本实验中,ELISA 及 Western blot 实验结果显示,我们得到的两个噬菌体克隆与 SARS 患者血清具有较强的结合活性和特异性,而且发现两种抗原表位既可识别 SARS 患者血清又能识别免疫鼠血清,却不能识别正常血清,表明免疫血清中含有针对 SARS 的抗体存在,这充分说明噬菌体克隆所递呈的氨基酸序列为 SARS 的抗原模拟表位。如能利用噬菌体肽库筛选的模拟抗原表位建立高敏感性和特异性的 SARS 病毒抗体间接 ELISA 检测试剂盒,不仅可以避免灭活过程中可能出现的风险,而且可以排除使用灭活 SARS 病毒全抗原时与其他冠状病毒可能出现的交叉反应,在血清流行病学监测方面有着广泛的应用前景,对于 SARS 的实验室确诊和 SARS 疫情控制具有重要的实际应用价值,同时也为今后 SARS 病毒疫苗研究提供了有力的实验手段和科学基础。

参 考 文 献

- 1 Cui JH, Krueger U, Henne-Bruns D, et al. Orthotopic transplantation model of human gastrointestinal cancer and detection of micrometastases. *World J Gastroenterol*, 2001, 7: 381-386.
- 2 黄小琴, 练幼辉, 王庆龄, 等. 甲型肝炎减毒活疫苗 H-2 株在猴体内传代的实验. *中华预防医学杂志*, 1997, 31: 260-262.
- 3 Wang FS, Xing LH, Liu MX, et al. Dysfunction of peripheral blood dendritic cells from patients with chronic hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol*, 2001, 7: 537-541.
- 4 Scala G, Chen X, Liu W. Selection of HIV-specific immunogenic epitopes by screening random peptide libraries with HIV-1 positive sera. *J Immunol*, 1999, 162: 6155-6161.

(收稿日期: 2004-11-19)

(本文编辑: 孙强正)