文章编号:1000-5404(2007)19-1831-03

论著

抗志贺毒素ⅡB亚单位单克隆抗体识别表位的初步鉴定

陈洪章*,曾 浩*,毛旭虎,罗 萍,余 抒,邹全明 (第三军医大学医学检验系临床微生物学及免疫学教研室,重庆市生物制药工程技术研究中心,重庆 400038)

提 要:目的 初步确定抗志贺毒素ⅡB亚单位(Stx2B)单克隆抗体(McAb)$1H_9$、$1H_{10}$、$3E_5$识别的抗原表位。**方法** 运用DNAstar Protean软件,对Stx2B(1~72 aa)全抗原进行表位预测;采用截短法分段构建重组质粒Stx2B50(23~72 aa),Stx2B54(1~54 aa)。用IPTG诱导表达融合蛋白。对表达产物进行SDS-PAGE蛋白电泳及Western blot分析。**结果** $1H_9$、$1H_{10}$能够识别Stx2B和Stx2B50;$3E_5$能够识别Stx2B、Stx2B50和Stx2B54。**结论** McAb $1H_9$、$1H_{10}$识别的抗原表位位于55~72 aa,McAb $3E_5$识别的抗原表位位于23~54 aa。

关键词: 志贺毒素ⅡB亚基;抗原表位;鉴定
中图法分类号: R392.12; R394-33 **文献标识码:** A

Elementary characterization on epitopes of anti-shiga toxin Ⅱ B subunit monoclonal antibody

CHEN Hong-zhang, ZENG Hao, MAO Xu-hu, LUO Ping, YU Shu, ZOU Quan-ming (Department of Clinical Microbiology and Immunology, College of Medical Laboratory, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To identify the epitope domain of monoclonal antibody $1H_9$, $1H_{10}$, and $3E_5$ against shiga toxin Ⅱ B subunit (Stx2B). **Methods** The epitopes of Stx2B (1-72 aa) were predicted by the DNAstar Protean software. The recombinant plasmids of Stx2B50 (23-72 aa), Stx2B54 (1-54 aa) were constructed and then transformed to *E. coli* BL21 (DE3) for expression under IPTG induction. The proteins were identified by SDS-PAGE and Western blotting. **Results** The monoclonal antibody $1H_9$ and $1H_{10}$ recognized antigen of Stx2B and Stx2B 50, while $3E_5$ recognized Stx2B, Stx2B50, and Stx2B54. **Conclusion** The epitope of monoclonal antibody $1H_9$ and $1H_{10}$ is located at 55-72 aa and the epitope of $3E_5$ is located at 23-54 aa.

Key words: shiga toxin Ⅱ B subunit; epitope; identification

志贺毒素Ⅱ(shiga toxin Ⅱ,Stx2)是由肠出血性大肠杆菌(*Enterohemorrhagic Escherichia coli*, EHEC)O157:H7产生的一种具有细胞毒作用的蛋白毒素,AB_5结构。B亚基与细胞膜受体球丙糖酰基鞘氨醇Gb3特异性结合后,A亚基进入细胞内发挥细胞毒作用[1],使细胞蛋白质合成终止,最终导致细胞死亡。

人类感染EHEC O157:H7后,可引发血性腹泻、出血性大肠炎、溶血性尿毒综合征(hemolytic uremic syndrome, HUS)以及中枢神经系统症状,其中溶血性尿毒综合征对人体危害最大,而Stx2是导致HUS发生的最主要因素。EHEC O157:H7在国内外多次暴发,严重威胁人们的健康[2,3]。

目前,临床对于Stx2的危害缺乏有效的治疗手段。研究表明Gb3类似物竞争Stx2与靶细胞的结合[4],或用Stx2类毒素免疫机体使其获得针对Stx2的免疫[5],而抗Stx2特异的McAb能很好的发挥作用,达到治疗目的[6]。本室成功克隆纯化了Stx2A[7],并开始对Stx2B的探讨。本研究在成功构建Stx2B并获得McAb的基础上,欲通过截短法初步筛选出$1H_9$、$1H_{10}$、$3E_5$ 3株McAb所识别的抗原表位区域,为进一步研究其功能以及分析抗原抗体相互作用的构效关系提供有利的依据。

基金项目:国家高技术研究发展"863"计划(2006AA02Z405)
Supported by the National "863" High-Tech Development Plan of China(2006AA02Z405)
作者简介:陈洪章(1975-),男,四川省仪陇县人,硕士,主管技师,主要从事抗体工程方面的研究。电话:(023)68753591,E-mail:18chz969@sohu.com
*:同等贡献者
通讯作者:邹全明,电话:(023)68752315,E-mail:qmzou@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2007-04-12;修回日期:2007-06-20

1 材料与方法

1.1 主要试剂和材料

抗 Stx2B 单抗 $1H_9$、$1H_{10}$、$3E_5$ 由本室制备；重组 Stx2B 和重组蛋白 EspA 由本室构建；DH5α *E. coli*、表达载体 pET-22b 及宿主菌 BL21(DE3) 由本室保存；限制性内切酶 *Nco* Ⅰ、*Xho* Ⅰ、*Ex-Taq* DNA 聚合酶、dNTP、pMD18-T 载体均购自大连 TaKaRa 公司；DNA 标准、蛋白标准购自北京天为时代有限公司；DNA 电泳胶回收、质粒抽提试剂盒购自 Omega 公司；T_4 DNA 连接酶购自华美公司；HPR 标记的羊抗鼠 IgG 二抗购自武汉博士德公司；引物合成由上海生工完成；DNA 测序由上海英骏生物技术有限公司完成；其他化学试剂均为分析纯。

1.2 Stx2B B 细胞表位预测

运用 DNAstar Protean 软件，对 Stx2B(1～72 aa)全抗原进行分析，预测其二级结构、亲水性、可及性、可塑性，综合 4 项参数，采用 Jameson 和 Wolf[8] 的方法分析其抗原性指数，拟定表位所在的氨基酸区域。

1.3 引物序列

分段构建 Stx2B50(23～72 aa)、Stx2B54(1～54 aa)重组质粒。

Stx2B50：上游引物 5′-CGCCCATGGTGAAGGTTGACGGGAAAG-3′；下游引物 5′-GCCCTCGAGCTAGTCATTATTAAACTGCAC-3′，产物长度为 150 bp；Stx2B54：上游引物 5′-GAACCATGGCGGCGGATTGTGCT-3′，下游引物 5′-GGCCTCGAGCTATTTGATTGTGACAGTCATTCCT-3′，产物长度为 162 bp。两者上游引物引入 *Nco* Ⅰ 酶切位点，下游引物引入 *Xho* Ⅰ 酶切位点。

1.4 重组克隆及 DNA 序列分析

以 *E. coli* O157：H7 总 DNA 为模板，按常规 PCR 条件进行扩增；质粒抽提、酶切反应、电泳鉴定、DNA 片段回收、连接反应及细菌转化等均参照《精编分子生物学实验指南》[9] 方法操作，酶切正确的质粒送上海英骏生物技术有限公司测序。

1.5 诱导表达及表达后的 SDS-PAGE 分析

经酶切及测序鉴定正确的 Stx2B50、Stx2B54 基因表达载体 Stx2B50/pET22b，Stx2B54/pET22b 转化相应宿主细胞 BL21(DE3)后，37 ℃摇床培养吸光度值[$D(600)$]达到 0.8 时，加入终浓度为 1 mmol/L IPTG 诱导，于诱导 4 h 后取样，同时用空载体菌做对照，表达产物用 16% Tricine-SDS-PA 分析。

1.6 表达产物的免疫印迹分析

诱导表达产物经 SDS-PAGE 后，电转移至硝酸纤维素膜上，2 g/L 丽春红染色后，标记蛋白标准，漂洗干净后，用含 5 g/L脱脂奶粉的 TBS 液 4 ℃封闭过夜。封闭后的 NC 膜置于 1∶1 000稀释的 $1H_9$、$1H_{10}$、$3E_5$ 腹水中，37 ℃摇床反应 1 h。TTBS 液洗膜后，用 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 作为二抗，37 ℃摇床反应1 h，最后 DAB 显色至目的条带清晰时终止反应，进行免疫印迹分析。

2 结果

2.1 DNAstar Protean 软件预测结果

Stx2B 的潜在 B 细胞表位位于氨基酸残基：4～22 aa、23～36 aa 和 53～66 aa(图 1)。构建 Stx2B 片段 Stx2B50 和 Stx2B54 避免了截断 Stx2B 潜在 B 细胞表位的风险。

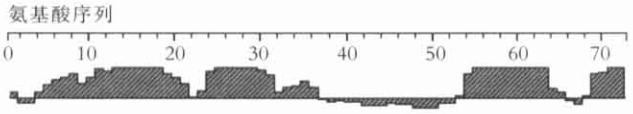
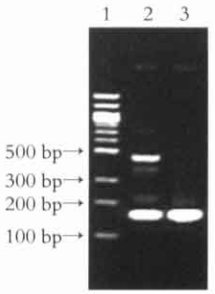


图 1 Stx2B 抗原性指数分析(DNAstar Protean)

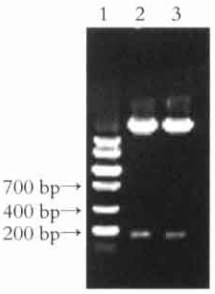
2.2 重组质粒的克隆构建与 DNA 序列分析

以 *E. coli* 总 DNA 为模板，进行 PCR 扩增，所获 PCR 产物以 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析。得到大小分别为 150、162 bp 的分段基因的扩增产物，与预期相符(图 2)。构建到表达载体 pET22b，*Nco* Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ 酶切鉴定后，片段大小与设计一致(图 3)。序列分析结果表明，Stx2B50 和 Stx2B54 的碱基测序与 GenBank 上已公布的 Stx2B 编码基因的序列进行比对分析，一致性为 100% 和 98%。Stx2B54 在第 87 位核苷酸发生无义突变(A 突变为 G)。



1：DNA 标准；2：Stx2B50 PCR 产物；3：Stx2B54 PCR 产物

图 2 琼脂糖凝胶电泳检测 Stx2B50、Stx2B54 片段基因 PCR 扩增产物



1：DNA 标准；2：Stx2B50/pET22b/*Nco* Ⅰ + *Xho* Ⅰ；3：Stx2B54/pET22b/*Nco* Ⅰ + *Xho* Ⅰ

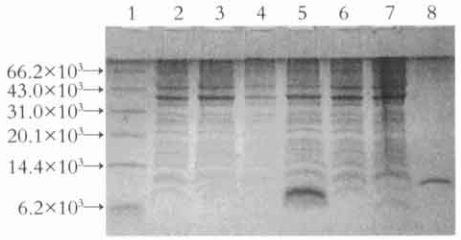
图 3 pET22b-Stx2B50、pET22b-Stx2B54 质粒的酶切鉴定

2.3 Stx2B50、Stx2B54 基因的表达

测序鉴定后的 pET22b-Stx2B50、pET22b-Stx2B54 表达菌株用终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 在 37 ℃条件下诱导表达，收集诱导后 0、2、4、6 h 菌体，用 16% Tricine 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析结果。表达菌株 pET22b-Stx2B50、pET22b-Stx2B54 分别表达了与预期融合基因表达蛋白大小一致的外源蛋白质表达带，相对分子质量分别约为 5.7×10^3、6.2×10^3。空载体转化菌 pET22b/BL21 诱导后在相应位置未出现相应的蛋白带(图 4)。

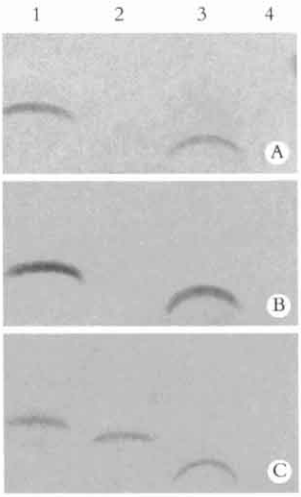
2.4　pET22b-Stx2B50、pET22b-Stx2B54 表达蛋白的免疫印迹分析

用单抗 $1H_9$、$1H_{10}$、$3E_5$ 作一抗，HPR 标记的羊抗鼠 IgG 作二抗，Stx2B 抗原作为阳性对照，重组 EspA 作为阴性对照。结果 $1H_9$、$1H_{10}$ 能够识别 Stx2B 和 Stx2B50；$3E_5$ 能够识别 Stx2B、Stx2B50 和 Stx2B54（图 5）。



1：蛋白标准；2、3：pET22b 空载体菌诱导 0、4 h 的表达；4、5：重组蛋白 Stx2B54 诱导 0、4 h 的表达；6、7：重组蛋白 Stx2B50 诱导 0、4 h 的表达；8：全蛋白 Stx2B

图 4　重组蛋白 pET22b-Stx2B50、pET22b-Stx2B54 的 SDS-PAGE 分析



1：阳性对照 Stx2B 抗原；2：重组蛋白 Stx2B54；3：重组蛋白 Stx2B50；4：阴性对照重组蛋白 EspA

A：单抗 $1H_9$ 与 4 种蛋白的 Western blot；B：单抗 $1H_{10}$ 与 4 种蛋白的 Western blot；C：单抗 $3E_5$ 与 4 种蛋白的 Western blot

图 5　重组蛋白的 Western blot 分析

3　讨论

志贺毒素Ⅱ（Stx2）通过 B 亚基与机体细胞的 Gb3 受体偶联，被内涵蛋白小体内吞，进入细胞，然后被转移至高尔基体，在弗林蛋白酶（一种钙敏感的丝氨酸蛋白酶）作用下 A 亚基被裂解为 A_1 和 A_2 两个片段；当 Stx2 到达内质网后 A_1 片段进入细胞质作用于核糖体 60S 亚基，导致真核细胞蛋白质合成的终止[1,10]。从而可知，阻止 B 亚基与机体细胞结合，可以达到治疗和预防 Stx2 的毒素危害。

不同的 McAb，其功能表现不尽相同[11]，这可能是因为不同的 McAb 识别的抗原表位不同所致。表位的确定不仅可以了解有关抗原抗体相互作用的诸多信息，为进一步分析蛋白的构效关系奠定基础，而且对抗体的基因工程改造及药物设计等研究工作也具有指导意义。

Nakao 等[12]制备的 McAb VTm1.1 能够阻止 Stx2 与细胞的接合，防止 Stx2 对细胞的毒素作用，并确定了其抗原识别表位位于 B 亚基的第 56 位氨基酸。我们初步确定的抗原表位与其报道的基本相符（$1H_9$、$1H_{10}$ 单抗识别的抗原表位位于 Stx2B 的 55 ~ 72 aa），并且还初步确定了新的表位（$3E_5$ 识别的抗原表位位于 Stx2B 的 23 ~ 54 aa）。该研究为抗原表位的精确定位以及对 McAb $1H_9$、$1H_{10}$、$3E_5$ 进一步的功能研究提供了有利的线索，同时为以后针对 Stx2 的表位疫苗奠定了实验基础。

参考文献：

[1] Sandvig K. Shiga toxins[J]. Toxicon, 2001, 39(11): 1629 - 1635.

[2] Mead S P, Slutsker L, Dietz V, *et al*. Food-related illness and death in the United States[J]. Emerg Infect Dis, 1999, 5(5): 607 - 625.

[3] 邹全明. 肠出血性大肠杆菌 O157 感染防治研究进展[J]. 微生物学杂志, 2004, 24(5): 96 - 98.

[4] Watanabe M, Matsuoka K, Kita E, *et al*. Oral Therapeutic agents with highly clustered globotriose for treatment of Shiga toxigenic Escherichia coli infections[J]. J Infect Dis, 2004, 189(3): 360 - 368.

[5] Smith M J, Teel L D, Carvalho H M, *et al*. Development of a hybrid Shiga holotoxoid vaccine to elicit heterologous protection against Shiga toxins types 1 and 2[J]. Vaccine, 2006, 24(19): 4122 - 4129.

[6] Tzipori S, Sheoran A, Akiyoshi D, *et al*. Antibody therapy in the management of Shiga toxin-induced hemolytic uremic syndrome[J]. Clin Microbiol Rev, 2004, 17(4): 926 - 941.

[7] 马　颖，毛旭虎，邹全明，等. 肠出血大肠杆菌 O157: H7志贺样毒素Ⅱ毒素亚单位 Stx2A 的表达与纯化[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(15): 1582 - 1584.

[8] Jameson B A, Wolf H. The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants[J]. Comput Appl Biosci, 1988, 4(1): 181 - 186.

[9] 奥斯伯 F M，金斯顿 R E，塞德曼 J G，等. 精编分子生物学实验指南[M]. 马学军，舒跃龙，译. 第 4 版. 北京：科学出版社，2005：19 - 105.

[10] O'Loughlin E V, Robins-Browne R M. Effect of Shiga toxin and Shiga-like toxins on eukaryotic cells[J]. Microbes Infect, 2001, 3(6): 493 - 507.

[11] Ausiello C M, Urbani F, Lande R, *et al*. Functional topography of discrete domains of human CD38[J]. Tissue Antigens, 2000, 56(6): 539 - 547.

[12] Nakao H, Kiyokawa N, Fujimoto J, *et al*. Monoclonal antibody to Shiga toxin 2 which blocks receptor binding and neutralizes cytotoxicity[J]. Infect Immun, 1999, 67(11): 5717 - 5722.

（编辑　邓强庭）