泌尿外科学专题 文章编号:0253-3626(2009)09-1148-03

基于抗原表位预测的 MUC1 模拟肽表位筛选

王祥卫,叶 钢,张远宁,易善红,金欢胜,方针强,贾维胜,周 铮
(第三军医大学新桥医院泌尿外科,重庆 400037)

【摘 要】目的:预测粘蛋白 1(Mucin1,MUC1)抗原的 B 细胞表位,从噬菌体随机多肽文库筛选及鉴定 MUC1 抗原的模拟表位。方法:对 MUC1 的二级结构及免疫原性进行分析,预测 MUC1 的抗原表位。利用纯化获得的 Ma695 抗体筛选噬菌体随机 12 肽库,夹心 ELISA 分析噬菌体克隆,测定阳性克隆 DNA 序列,竞争性抑制实验鉴定阳性噬菌体克隆。结果:MUC1 存在有 17 个潜在的抗原表位区域。经 3 轮筛选,获得了 14 个阳性克隆,DNA 序列分析并推导出其氨基酸序列:KHYDPFHHRMPQ,QADTARSVALAG,VPSKPDLHVRSI 及 MTPIHYWNHNRV;4 个噬菌体展示肽克隆抑制率均在 50%以上。结论:预测 MUC1 抗原 B 细胞表位,为进一步研究 MUC1 结构和功能奠定了基础。所得序列 KHYDPFHHRMPQ,QADTARSVALAG,VPSKPDLHVRSI 及 MTPIHYWN HNRV 能模拟 MUC1 抗原表位。

【关键词】MUC1 抗原;模拟表位;噬菌体随机 12 肽库;
【中国图书分类法分类号】R737.14 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-08-11

Screening of mimic epitope for MUC1 based on prediction of the antigenic epitope

WANG Xiang-wei, et al
(*Department of Urology, Xinqiao Hospital, the Third Military Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To predict the B cell epitope for MUC1 antigene and screen the mimic epitope of MUC1 from random phage dispay peptide library. *Methods*: In order to predict the B cell epitope for MUC1 antigen, the secondary structure and antigenicity was analysed with various methods. The purified Ma695 Ab was used to screen in phage random 12 peptide library. The positive clones were identified by sandwich ELISA and competitive inhibiton assay. *Results*: 17 distinct antigenic epitope regions in MUC1 were identified by computation. 14 positive clones were acquired after 3 rounds of screening. Amino acid sequences deduced from DNA sequences showed four different sequences: KHYDPFHHRMPQ, QADTARSVALAG, VPSKPDLHVRSI and MTPIHYWNHNRV. The inhibitory assay showed that the 4 mimic epitope peptides displaying on the phage surface could effectively inhibit the combination of antibody with antigen and the inhibitory rates of each mimic epitope were 50% higher than that in the controls. *Conclusion*: Prediction of the B cell epitope for MUC1 can provide a basic clues for studies on structure and function of MUC1. The results indicated that KHYDPFHHRMPQ, QADTARSVALAG, VPSKPDLHVRSI and MTPIHYWNHNRV are the mimotopes which could mimic the epitope of MUC1.

【Key words】Mucin 1; Mimic epitope; Phage display random 12 peptide library

粘蛋白 1(Mucin 1,MUC1)在人膀胱癌、乳腺癌、卵巢癌等多种上皮来源的恶性肿瘤中异常表达,是肿瘤免疫治疗的理想靶标。目前,MUC1 疫苗多针对其分子肽链表位,以 MUC1 糖链表位为靶标的研究较少。分子模拟理论和技术的发展使多肽模拟糖链抗原表位成为可能,多肽模拟表位,作为一种异源分子,一方面其免疫原性增强,另一方面可减少诱发自身免疫的机会。为研发人膀胱肿瘤疫苗,我们应用 MUC1 糖链抗体筛选噬菌体随机 12 肽库获得了 MUC1 模拟表位,报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料 Ph.D.-12TM 肽库(NEW ENGLAND Biolabs)为展示在噬菌体 pⅢ蛋白 N 端的 12 肽库,库滴度为 4×10^{12}

作者介绍:王祥卫(1969-),男,副教授,博士后,研究方向:泌尿系肿瘤免疫治疗。
通讯作者:叶 钢,男,教授,E-mail:gangye@cta.cq.cn。
基金项目:国家 863 课题资助(课题号:2002AA214111)。

pfu/ml,所用受体菌为 XL1-blue (tetr),均由北京军事医学科学院张立新博士惠赠。-96 g Ⅲ测序引物 5'-CCCTCATAG TTAGCGTAACG-3',由大连 TaKaRa 公司合成。MUC1 抗体 Ma695 由本室纯化制备;4D 抗体为正常组织 MUC1 抗体(张立新博士惠赠)。

1.1.2 二级结构预测 应用 DNAStar Protean 软件提供的模块进行,采用 Chou & Fasman 提出的预测方案和 Garnier[1]法方案。

1.1.3 抗原性指数分析 采用 DNAStar Protean 软件提供的抗原指数分析模块,对 MUC1 的抗原表位进行预测。该模块采用 Jameson-Wolf[2]方法。

1.2 方法

1.2.1 噬菌体滴度的测定 噬菌体滴度 = 蓝斑数 × 稀释度 × 10^2 (pfu/ml)。

1.2.2 Ph.D.-12 肽库的生物淘洗 第 1 轮:用包被液将 Ma695 抗体浓度调为 100 μg/ml,每孔加入 150 μl 抗原液,4℃湿盒中过夜。封闭液,4℃放置 1 h。加入 10 μl(4×10^{10} pfu)噬菌体库液,常温轻摇 60 min。洗脱液漂洗后,立即加入 30 μl 中和液,混匀。取洗脱液测滴度。剩余洗脱液进行扩增。第 2~3 轮:方法同第 1 轮,Ma695 浓度调为 10 μg/ml,加入 2×10^{11} pfu 扩增噬菌体,TBST 中 Tween-20 的浓度提高到 0.5%(V/V)。

1.2.3 噬菌斑的扩增 用枪头挑取单个第 3 轮扩增后测定滴度后的蓝斑,接种培养基,37℃,260 r/min,4.5 h。离心取 80%上清,4℃保存或加入甘油至终浓度 50%后,-20℃保存。

1.2.4 噬菌体克隆的 ELISA 分析及 DNA 测序将 Ma695 抗体用包被液稀释成 10 μg/ml,包被双条可拆酶标板,4℃过夜。加入扩增后的噬菌体,同时取 2 μl 原库 +200 μl TBST 作为对照,加入 HRP/AntiM13 单抗后,测定 OD_{450}。扩增噬菌斑。提取 DNA,送测序。

1.2.5 竞争抑制实验 将人 MUC1 蛋白包被微孔,BSA 封闭,阳性噬菌体克隆与 Ma695 抗体室温共孵育 2 h 后,加入微孔,37℃孵育 1 h 后,缓冲液洗涤,加入 HRP 标记的羊抗鼠抗体,TMB 显色。测 OD_{450} 值。计算抑制率:抑制率 =(抑制前 OD_{450} - 抑制后 OD_{450})/ 抑制前 $OD_{450} \times 100\%$ 。

2 结 果

2.1 MUC1 的二级结构预测

MUC1 属于一种混合型蛋白,α-螺旋占 11%,β-片层占 47%,Turn(转角)占 12%,Coil(无规则卷曲)占 30%。

2.2 MUC1 抗原表位预测

MUC1 存在有 17 个潜在的抗原表位区域:1-10,24-54,65-77,84-91,108-134,140-156,159-174,179-196,199-210,220-233,237-265,270-299,316-337,351-362,369-396,411-420,445-502。

2.3 Ph.D.-12 肽库的生物淘洗

按上述方法所述,进行 3 轮生物淘洗,噬菌体克隆获得有效的富集,达 110 倍。

2.4 噬菌体克隆的 ELISA 分析及 DNA 序列测定

挑选 MUC1 OD_{450} /4D OD_{450}>2.0 的噬菌体克隆,共获得 14 个阳性克隆。根据测序结果的比较,将其分为两种类型,第一类为相同序列模式:KHYDPF HHRMPQ (t1,3,4,6,7,17,16,10,9,8,11);第二类为单一序列模式:QADTARSVALAG (t2),VPSKPDL HVRSI (t5),MTPIHYWNHNRV (t13)。依据其氨基酸序列同源程度,未发现获得其同源性基序。所得序列与 MUC1 序列比对,亦未发现同源性序列,说明筛选得到的表位是 MUC1 的模拟表位。

2.5 噬菌体克隆的竞争抑制实验

与 Ma695 特异性结合的噬菌体克隆做竞争抑制试验,结果显示 4 个噬菌体展示肽克隆抑制率均在 50%以上(分别为 79.34%,64.71%,73.57%及 51.96%),能较大程度地特异性抑制抗原抗体结合,提示这些阳性克隆的外源肽具有一定的 MUC1 抗原模拟功能。

3 讨 论

对许多上皮性肿瘤如膀胱癌、乳腺癌、直肠癌和卵巢癌的研究发现,肿瘤细胞可以改变其表面粘蛋白如 MUC1 的表达,这些粘蛋白分子的表达改变有助于肿瘤细胞逃避机体的免疫监视。粘蛋白分子覆盖在肿瘤细胞的表面,阻碍免疫细胞和抗体与肿瘤抗原的接触,使抗体依赖细胞细胞毒性作用和免疫效应细胞不能激活。粘蛋白分子还可以保护肿瘤细胞不受细胞毒 T 淋巴细胞和自然杀伤细胞的细胞毒作用。另外,肿瘤细胞表面蛋白糖基化的异常,也可以使蛋白抗原决定簇被封闭或者改变肿瘤细胞的生物学活性,有助于免疫逃避。正是由于上述原因,肿瘤细胞无法有效激活自身 T 淋巴细胞,并可导致 T 细胞耐受或缺失的出现。应用肿瘤疫苗的目的是为了有效激活自身 T 淋巴细胞,打破原有的免疫耐受局面[3-5]。

近年来,噬菌体文库展示技术因其简单方便已在研究抗原决定簇中得到广泛应用[6]。目前研究显示,筛选配基中能与多肽结合的位点仅有数个,更

重要的是,这些位点通常都是筛选配基与其配体的结合部位或活性位点。因此,通过筛选所获得的结合肽具有一定的特异性和亲和力[7-9]。亲和筛选中,即使经过多轮筛选,也不能排除非特异性噬菌体克隆的存在,因而进一步挑取单个克隆,确定它与筛选配基的特异性吸附是实验必不可少的步骤。其中,ELISA 能半定量测定筛选配基与噬菌体克隆间的结合常数,是最为常用的方法。实验中,我们应用该方法筛选阳性克隆,采用不相关抗体 4D(识别正常 MUC1 蛋白的抗体)作为阴性对照,以 Ma695 OD_{450}/4D OD_{450}>2.0 作为阳性结果判定标准,避免了由于噬菌体用量过大所可能造成的假阳性,所获得的实验结果较为可靠。

由于抗原与抗体结合的位点一般由几个氨基酸残基组成,随机肽库中就有部分多肽可以模拟或组成抗原表位而与抗体结合,通过对筛选获得的多肽进行序列和结构分析,就可得到一系列不同的短肽,其中许多序列可能具有共同的或者相似的序列,称为基序(Motif),这种序列极有可能为蛋白分子上的抗原表位。带有基序的噬菌体克隆或根据基序化学合成的多肽若能竞争性的阻断抗体与抗原的结合,表明该基序在一定程度上模拟了蛋白质的表位。蛋白质抗原与抗体的结合表位长度约 3~5 个氨基酸,许多抗体的结合表位已被确定[10,11]。因此,可用噬菌体随机肽库筛选抗原模拟表位。

许多作者报道了用识别连续抗原表位的单抗从噬菌体随机肽库中筛选出与相应抗原没有同源性的序列,推测该抗体可能识别一种不连续的或结构上的新型表位[12]。还可以用识别不连续抗原表位的抗体从噬菌体随机肽库中筛选模拟抗原表位的短肽,大多数情况下筛选得到的短肽与抗原表位在一级结构上没有任何相似之处,但这些短肽能阻断抗体与抗原结合,表明它们与抗体分子识别的是同一个或者非常接近的位点。

由于糖链抗体识别的是肿瘤细胞表面抗原分子上的糖链,所以本研究筛选到的表位只能是模拟表位,是用多肽来模拟多糖抗原与糖链抗体的结合。此种模拟表位的鉴定与蛋白抗原线性表位的鉴定不同,蛋白抗原线性表位的鉴定可以通过噬菌体表面呈现的多肽序列与天然抗原的氨基酸序列的同源性比较来确定筛选到的表位是否正确。而模拟表位的鉴定无法进行同源性比较,只能通过功能分析来判断该多肽是否为抗原的模拟表位。本实验采用了 ELISA 方法和竞争抑制实验来鉴定糖链抗体的模拟表位,结果提示这些阳性克隆的外源肽具有一定的 MUC1 抗原模拟功能。

本研究在获得 MUC1 模拟表位肽序列的同时,亦获得了展示在噬菌体表面的 4 个 MUC1 糖链抗原模拟表位阳性噬菌体克隆,该模拟表位以融合蛋白形式展示在噬菌体表面,因此利用这些阳性噬菌体克隆,可作为携带该模拟表位的免疫载体,用于免疫小鼠有可能激发机体的体液免疫反应,产生针对 MUC1 的体液和细胞免疫应答。

参 考 文 献

[1] Chou and Fasman, Chou PY, GD Fasman. Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence[J]. Adv Enzymol, 1978,47:45-148.

[2] Hopp T P. Protein surface analysis: Methods for identifying antigenic determinants and other interaction sites[J]. J Immunol Methods,1986,88:1-18.

[3] Kohzoh I, Toshiaki H, Takamaro S, et al. MUC1 as a human tumor marker[J]. International Congress Series,2001,1223:125-133.

[4] Hidenobu I,Takuya T,Satoshi W,et al. Inhibition of tumor growth with antiangiogenic cancer vaccine using epitope peptides derived from human vascular endothelial growth factor receptor 1[J]. Clin. Cancer Res., 2006, 12: 5841-5849.

[5] Carr B V, Markovic D, Ferrer K,et al. Immunity to murine breast cancer cells modified to express MUC-1, a human breast cancer antigen, in transgenic mice tolerant to human MUC-1[J]. Cancer Res,2000,60(9):2435-2443.

[6] Moniaux N, Escande F, Porchet N, et al.Structural organization and classification of the human mucin genes[J]. Front Biosci,2001,6:1192-1206.

[7] Ring D. What makes a binding site[J]? Curr Opin Struct Biol, 1995,5:825-829.

[8] Sheu T J, Schwarz E M, Martinez D A,et al.A phage display technique identifies a novel regulator of cell differentiation[J]. J Biol Chem, 2003,278(1):438-443.

[9] Wells J A.Binding in the growth hormone receptor complex[J]. Proc Natl Acd Sci USA,1996,93:1-6.

[10] Gnanasekar M,Rao K V, He Y X,et al.Novel phage display-based subtractive screening to identify vaccine candidates of Brugia malayi[J]. Infect Immun,2004,72(8):4707-4715.

[11] Houshmand H,Bergqvist A.Interaction of hepatitis C virus NS5A with La protein revealed by T7 phage display[J]. Biochem Biophys Res Commun,2003,309(3):695-701.

[12] Dente L,Cesareni G,Micheli G,et al.Monoclonal antibodies that recognize filamentous phage: tools for phage display technology[J]. Gene, 1994,148:7-13.

(责任编辑:关蕴良)