DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.07.019
第24卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 7
796 2002年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2002

# 论著

文章编号:1000-5404(2002)07-0796-03

## 多价精子抗原表位肽的设计与免疫效应研究

何 畏[1],梁志清[1],吴玉章[2],李玉清[1],贾正才[2],周 伟[2],史常旭[1] (第三军医大学:[1]附属西南医院妇产科;[2]全军免疫学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 开发可供两性使用的多价合成嵌合肽疫苗。方法 选择小鼠精子/睾丸特异性抗原SP17、Cyritestin中特异性氨基酸序列与牛核糖核酸酶非限制性T细胞表位作为骨架,按一定连接方式设计、合成新抗原35肽,并与弗氏佐剂混悬后免疫雌性BALB/C小鼠。结果 在430A固相自动肽合成仪上成功地合成35肽,并经HPLC纯化、质谱鉴定证实其纯度达95%以上;免疫后小鼠血清特异性IgG抗体滴度最高达1∶6 000,阴道粘膜冲洗液中特异性IgA抗体滴度最高达1∶300;小鼠脾脏淋巴细胞增殖率达50%左右,淋巴细胞分泌的INF-γ和IL-4分别为60、108 μg/ml;实验组BALB/C雌鼠妊娠率平均降至60%,每胎产仔数平均降低58%~71%。结论 含有两种特异性精子抗原中特异性氨基酸序列的新抗原可激发小鼠产生较理想的特异性体液免疫和粘膜免疫,并使小鼠受孕率下降,为研制适宜于两性的多价抗生育疫苗提供了实验基础。

关键词:肽疫苗;避孕;精子;免疫
中图法分类号:R169.41,R392.13 文献标识码:A

## Design of an epitope peptide from sperm specific antigen and its immune effect

HE Wei, LIANG Zhi-qing, WU Yu-zhang, LI Yu-qing, JIA Zheng-cai, ZHOU Wei, SHI Chang-xu (Department of Obstetrics and Gynecology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract:** Objective To develop an anti-procreation chimeric peptide vaccine for both sexes by multivalent synthesis. Methods According to the amino acid sequence of specific antigen SP17 and Cyritestin in mouse, as well as the T lymphocyte cell epitope in bovine ribonuclease (RNase), the new antigen with 35 amino acid residues was designed, synthesized and immunized female BALB/C mice after mixed with the Freund's adjuvant. Results The chimeric peptide with 35 amino acid residues was synthesized successfully. Its purity was above 95% after purification. From the immunized mice, the highest specific IgG titer in serum was 1∶6 000, while the IgA titre in the washing of vaginal mucous membrane was 1∶300. The proliferation rate of lymphocytes in the spleen was about 50%, the concentrations of INF-γ and IL-4 secreted by lymphocytes were 60 and 108 μg/ml, respectively. The average rate of pregnancy in the experimental mice was decreased to 60%, and the number of birth per labor decreased to 58%~71%. Conclusion The synthesized chimeric peptide can stimulate powerfully humoral and mucosal immunity and decrease the rate of pregnancy in mice. This study provides the experimental bases for contraception vaccine for both sexes.

**Key words:** peptide vaccine; contraception; sperm; immune

限制人口过度增长是一项全球性的难题。虽然目前已有多种抗生育的措施,包括药物、工具及手术等,但仍然存在许多未解决的问题。随着对受精过程中的关键分子认识的逐渐深入,人们发现参与受精的这些分子不仅数量众多,而且作用在不同的环节,因而单一应用时往往获得的免疫避孕效应不尽人意。合成肽技术的问世为多种关键分子的联合应用提供了可能。本研究旨在设计合成具有多种精子/睾丸特异性抗原表位的嵌合肽,研究其激发的免疫效应,进而探讨其用于免疫性避孕的可能性。

## 1 材料和方法

### 1.1 合成肽的设计与合成

选择小鼠精子/睾丸特异性蛋白SP17的线性B细胞表位序列(118-127)、Cyritestin中干扰受精的特异性氨基酸9肽序列以及牛核糖核酸酶非选择性T细胞表位序列(94-104)作为基础,利用Goldenkey软件、蛋白质二级结构预测方案等进行亲水性、保守性及其天然结构构成抗原表位的某些关键氨基酸等原则分析,获得新抗原-35肽序列。在430A自动肽合成仪(美国PE公司)上由固定羧基向氨基端递增合成。所得产物经氟化氢法切除保护基团和树脂、抽干后反复萃取获得粗品;粗品溶解后行高压液相分析(HPLC,美国PE公司),计算主峰面积;收集HPLC中的最大峰,经冷冻真空抽干后纯化合成肽;纯化后的肽行质谱(美国PE公司)鉴定,计算其质荷比,并与预测的理论分子量大小比较。

### 1.2 动物实验

所用实验动物均购自解放军军事医学科学院实验动物中心,小鼠周龄为6~8周。取35肽经0.1 mol/L磷酸盐缓冲液(PBS,pH=7.2)稀释后(1 mg/ml),与等量的完全弗氏佐剂(美国Sigmal公司)超声混悬,于雌性BALB/C纯系小鼠的双后肢足垫部位行皮下注射,各30 μl;初次免疫后2、4、6周时同上法加强免疫,但佐剂改为不完全弗氏佐剂。免疫结束后10 d左右雌、雄鼠合笼喂养(1∶1)。每日两次观察雌鼠阴道口有无白色阴道栓出现,一旦发现即将雌雄分笼,并统计各个雌鼠的妊娠和产仔情况。对照组和空白组分别单用弗氏佐剂和生理盐水同上法免疫。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30000183)
作者简介:何 畏(1970-),女,四川省蓬溪县人,博士研究生,主治医师,主要从事避孕疫苗、妇科肿瘤方面研究,发表论文7篇。电话:(023)68754000-73145,E-mail:heyil1996@yahoo.com
收稿日期:2001-06-12;修回日期:2001-10-24

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

在免疫前及全程免疫结束后 1 周分别取阴道冲洗液, 离心去沉淀后, 贮于－ 70 ℃; 免疫前及免疫开始后每周取小鼠眼动脉血直至 20 周, 取上清, 贮于－ 70 ℃。

### 1.3　酶联免疫吸附实验

0. 1 mol/ L PBS 稀释肽、包被后, 以不同稀释浓度的小鼠血清或阴道冲洗液为一抗, HRP-山羊抗小鼠 IgG(中山公司)和 HRP-山羊抗小鼠 IgA(晶美公司)为二抗, OPD 为底物, 在酶联仪(美国 Bio-Rad 公司)上读出 $A_{450}$。当 $A$ 值大于阴性对照的 3 倍时定为阳性, 一抗反复稀释以测出最大稀释度(效价)。

### 1.4　淋巴细胞增殖实验

全程免疫结束后 1 周, 分离小鼠脾脏淋巴细胞, 用含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养液调整浓度为(2～5)× $10^6$/ ml, 每分标本分 3 组, 分别为空白组、合成肽组和 Con A 组(2. 5 mg/ ml)。培养 3 d 后离心取上清备检, 另加 150 μl 培养液及 50 μl MTT, 继续培养 4 h 后离心弃上清, 加入 DMSO, 震荡后测定 $A_{60}$, 计算增殖率。

增殖率=(实验组 $A$ 值-空白组 $A$ 值)/(Con A 组 $A$ 值－空白组 $A$ 值)× 100%

### 1.5　细胞因子检测

按试剂说明书(晶美公司), 测定 1. 4 脾脏淋巴细胞培养上清中的 IL-4 和 INF-γ 的含量。

## 2　结果

### 2.1　合成肽的设计、合成与鉴定

根据亲水性方案、抗原指数方案、蛋白质二级结构预测等结果, 获得 35 肽, 序列为:

$NH_2$-KNAETTKYACNGGGDDVKAGWEAGGGEPFDCEDKS-COOH。

合成后的 35 肽粗品, 经 HPLC 积分计算主峰面积占总面积的 35. 579 3%; 而纯化后的 35 肽其面积大于 95%(纯度); 质谱分析显示其荷质比为 1 202. 7 和 902. 1(分别带 3 和 4 个电荷), 与理论分子量相吻合。

### 2.2　合成肽的免疫效应

纯化后的 35 肽与弗氏佐剂混悬后免疫雌性小鼠, 4 周后血清中出现特异性 IgG, 此后效价逐渐升高, 于 10 周左右达最高(1∶6 000), 持续 3 周左右; 阴道粘膜冲洗液中的特异性 IgA 于 5 周后出现, 14 周达最高(1∶300), 持续 1 周左右, 见图 1、2。

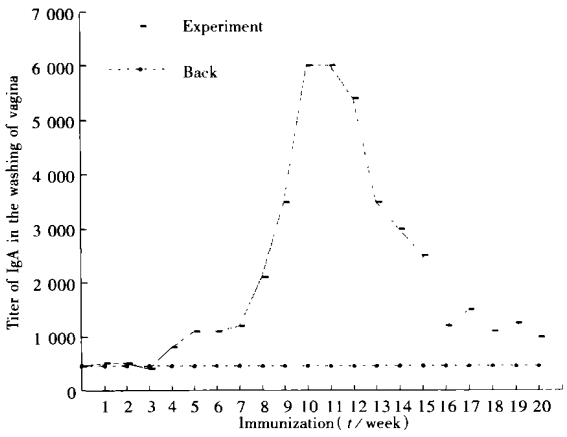



图 1　小鼠免疫后血清 IgG 抗体滴度变化

**Fig 1　Alteration of IgG titer in the serum of the mice after the peptide immunization**

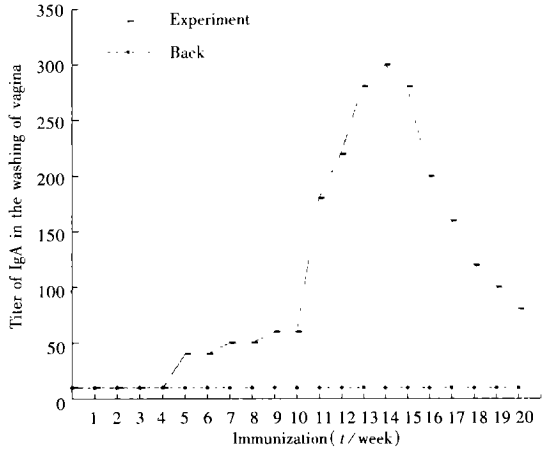



图 2　小鼠免疫后阴道分泌物抗重组抗原 IgA 抗体滴度变化

**Fig 2　Alteration of IgA titer in the washing of viginal mucous membrane of the mice after the peptide immunization**

### 2.3　脾脏淋巴细胞增殖率及分泌细胞因子的检测

以 MTT 法检测免疫后 1 周小鼠脾脏淋巴细胞在多肽刺激下, 增殖率 50%左右, 而未受刺激的对照组淋巴细胞大多数出现变形、死亡; 同时, 免疫组小鼠脾脏淋巴细胞分泌的 INF-γ 和 IL-4 分别为 60、108 μg/ ml, 而对照组未能测出。

### 2.4　避孕效应

实验组小鼠的受孕率为 61. 11%(11/ 18)明显降低于对照组小鼠(83. 33%, 15/ 18)和空白组(90. 00%, 18/ 20); 实验组小鼠平均每胎产仔数为(4. 3)少于对照组(6. 3)和空白组(8. 1)。

## 3　讨论

开发多价疫苗是疫苗提高抗原性, 增强免疫效应的重要措施, 尤其适用于以精子抗原(抗原性弱小的自身抗原)为靶抗原进行避孕疫苗的研究[1]。睾丸/精子特异性抗原 SP17、Cyritestin 均属参与受精的关键分子[2～5]。在以往的研究中, 我们通过适当的选择和联合, 成功构建了含两种睾丸/精子特异性蛋白的关键性表位及牛核糖核酸酶非限制性 T 细胞表位的 35 肽, 并证实其激发的特异性抗血清可识别小鼠睾丸组织蛋白提取物中相应分子量大小的蛋白质, 提示以关键表位的氨基酸序列合成的多肽是可能识别其天然完全抗原的, 且适当的序列选择可避免造成非预测表位或其他优势表位的出现[6]。本研究对其免疫效应作了进一步研究。

实验结果表明, 纯化后的多肽免疫小鼠后, 小鼠血清、阴道粘膜冲洗液中有较高滴度的特异性抗体生成; 免疫结束后 1 周、体外受多肽刺激后, 小鼠脾脏淋巴细胞增殖率可达 50%。提示新抗原不仅具有较强的激发体液和粘膜免疫的功能, 同时还有激发细胞免疫的功能。对细胞因子的检测表明在多肽刺激下, 脾脏淋巴细胞可分泌 INF-γ 和 IL-4, 尤其以后者更明显, 提示多肽具有促进 Th2 细胞极化, 有利于抗体生成的作用。因而, 它可能是一种合适的免疫原。

应用新抗原行体内抗生育实验结果显示, 经合成肽免疫的雌性 BALB/C 小鼠受孕率明显低于对照组,

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

每胎产仔数量也明显减少，说明它具有一定的抗生育作用。然而结果并不令人满意，说明特异性抗体抑制精卵结合的作用不完全，可能与抗体效价不高，或持续时间不长有关。另外，与机体的体液免疫相比，生殖道的粘膜免疫水平对生育的影响更为重要，粘膜免疫水平不够高也与抗生育不强有一定关系。为提高粘膜免疫水平，我们将在免疫佐剂方面进行改动(另行总结)。

参考文献：

[1] Naz R, Menge A C. Antisperm antibodies origin, regulation and sperm reactivity in human infertility[J]. Fertil Steril, 1994, 61(5): 1 001—1 013.
[2] Kong M, Richardson R T, Widgren E E, *et al*. Sequence and localization of the mouse sperm autoantigenic protein, SP17[J]. Boil Reprod, 1995, 53(3): 579—590.
[3] Wen Y, Richardson R T, O'Rand MG: Processing of the sperm protein Sp17 during the acrosome reaction and characterization as a calmodulin binding protein[J]. Dev Biol, 1999, 206(2): 113—122.
[4] Linder B, Bammer S, Heinlein U A O. Delayed translation and posttranslational processing of cyritestin, an integral transmembrane protein of the mouse acrosome[J]. Exp Cell Res, 1995, 221(1): 66—72.
[5] Shamsadin R, Adham I M, Nayernia K, *et al*. Male mice deficient for germ-cell cyritestin are infertile[J]. Biol Reprod, 1999, 61(6): 1 445—1 451.
[6] He Wei, Liang Zhi-qing, Shi Chang-xu *et al*. A novel contraceptive vaccine: design and synthesis of the chimeric peptide containing multivalent sperm-specific epitopes[J]. Reproduction contraception, 2001, 12(3): 147.

(编辑 陈聪连)

# 个案与短篇

文章编号：1000-5404(2002)07-0798-01

## 消除血 HCG 酶联免疫检测后带现象方法的初探

## Method for attenuating "Postzone Phenomenon" during ELISA for serum HCG

曹红卫，赵静怡，杨昌松 (第三军医大学附属西南医院中心实验室，重庆 400038)

我们采用的磁性微粒分离酶联免疫技术检测人绒毛膜促性腺激素(HCG)灵敏度高，结果可靠，且无放射性污染。但在部分绒癌患者血清中 HCG 浓度极高，检测时抗原浓度远远大于抗体，即抗原抗体反应中的后带现象，导致血清标本定量检测结果远远低于实际浓度。我们采用抗原稀释法将血清样本稀释后，后带现象消除，为 HCG 检测提供了可靠报告。

### 1 材料和方法

#### 1.1 仪器及试剂

仪器为美国 SEROZYME-Ⅱ型内分泌定量测定系统，试剂是加拿大 Biochem Immunosystems 公司生产(北京倍爱康公司提供)的磁分离酶联免疫 HCG 试剂。

#### 1.2 标本来源

妇产科门诊及住院部待测 HCG 血液标本，其中有 4 份绒癌患者待测血标本。标本采集后室温静置数小时，用 1 500～2 000 r/min 离心 15 min，取血清待检。4 份绒癌患者血清分别梯度稀释到 10 000 倍。

#### 1.3 检测方法

按试剂说明取标准品及血清标本各 30 μl，按步骤加入酶标单克隆抗体和荧光素标抗体的混合液、磁性微粒结合的抗荧光素标抗体、基质液、终止液，用空白管在 630 nm 波长较零，在 550、490 nm 读取各管的吸光度。

### 2 结果

标准曲线线形良好，阳性质控 24，阴性质控小于 1，在实验要求内，其他标本结果与临床相符，但 4 份绒癌患者血清标本与其稀释后的结果见表 1。

表 1 绒癌患者血清标本稀释前后的结果

| 标本 | 原浓度 | | 稀释 10 倍 | | 稀释 100 倍 | | 稀释 1 000 倍 | | 稀释 10 000 倍 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 吸光度 | 测定值 | 吸光度 | 测定值 | 吸光度 | 测定值 | 吸光度 | 测定值 | 吸光度 | 测定值 |
| 1 | 5.151 | 474 | 6.693 | >500 | 7.052 | >500 | 6.329 | >500 | 2.357 | 123 |
| 2 | 5.221 | 499 | 6.710 | >500 | 6.916 | >500 | 6.012 | >500 | 2.212 | 107 |
| 3 | 3.992 | 266 | 5.572 | >500 | 6.788 | >500 | 5.220 | >500 | 1.098 | 42 |
| 4 | 4.891 | 426 | 6.242 | >500 | 6.852 | >500 | 6.009 | >500 | 2.223 | 108 |

### 3 讨论

在本项磁性分离的酶联免疫方法检测血 HCG 方法中，反应生成颜色的强度在测定范围内应与标本中 HCG 的浓度成正比，但当加入的抗原浓度过大时，其原浓度检测所测的吸光度低于稀释以后的吸光度数，当稀释至一定程度时，吸光度才回到正常的线性关系上，而相应的原浓度的测定值远远低于实际血清浓度。此现象的出现主要是免疫反应中抗原抗体比例关系的问题。在抗原抗体特异性反应时，抗原与抗体二者之间遵循一定的量比关系，只有当它们的分子比例合适时才会出现最强的反应。HCG 为多价抗原，其与抗 HCG 单克隆抗体和荧光素标抗体混合液在等价带结合时，可相互交联形成具有立体结构的巨大的网格状聚合体[1]。当 HCG 抗原过剩时，其与抗体结合价不能饱和，这样结合了的抗原抗体只能形成小网络格状聚合物，同时还存在有较多游离抗原，造成反应形成的颜色减弱，不再是吸光度与抗原浓度的正比关系。

临床检测血清 HCG 浓度时，若患者可疑有绒癌，且其血清(未稀释)检测结果为低浓度时，不能仅按原浓度检测的值报告结果，而应采取抗原稀释法而使抗原抗体达到最佳配比，以免给临床提供错误的报告。

关键词：HCG；酶联免疫；后带现象；
中图法分类号：R446.61 文献标识码：B

参考文献：

[1] 陶义训. 免疫学和免疫学检验[M]. 第 2 版，北京：人民卫生出版社，1999. 9.

(编辑 张大春)

作者简介：曹红卫(1970—)，女，湖南省长沙市人，主管技师，主要从事分子生物学实验技术方面的研究。电话：(023)68754437

收稿日期：2001-11-15；修回日期：2002-03-01

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net