DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.10.003
第22卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 10
924 2000年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2000

论著

文章编号:1000-5404(2000)10-0924-03

人源多克隆抗血清识别的HBsAg模拟表位筛选

万 瑛,吴玉章,唐 艳,边 疆 (第三军医大学基础医学部全军免疫学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 获得与乙肝病毒表面抗原(HBsAg)人源抗血清特异结合的噬菌体呈现模拟多肽,加深对乙肝病毒表面抗原(HBsAg)B细胞表位的了解。方法 基于噬菌体小衣壳蛋白(gpⅢ)构建12氨基酸随机肽库。经混合多克隆人源HBsAb阳性血清的三轮筛选,阳性噬菌体经ELISA和竞争实验证实,并测定其对应呈现多肽的插入序列,分析其氨基酸序列与HBsAg的相似性。结果 两个噬菌体颗粒在ELISA实验中呈阳性,其中之一被竞争实验证实,此模拟多肽序列与$HBsAg_{135\sim146}$相似。结论 采用疾病抗原的人源多克隆抗血清筛选噬菌体随机肽库,能获得抗原的模拟表位,从而为了解被人源抗血清识别的抗原表位提供了技术手段。

关键词:丝状噬菌体呈现肽库;乙肝病毒表面抗原;表位
中图法分类号:R373.21;R392.11 文献标识码:A

Screening of a HBsAg mimotope recognized by human polyclonal antisera

WAN Ying, WU Yu-zhang, TANG Yan, BIAN Jiang (Institue of Immunology PLA, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To obtain the phage-displayed mimic peptide which had specific reactivity with human HBsAb sera for getting more knowledge on B cell epitope of HBsAg. Methods A random peptide library of 12 amino acid residues was established based on a fusion to gp Ⅲ of filamentous phage. After 3 rounds of screening with a pool of human HBsAb sera, the positive phages were tested with ELISA for their reactivity with human HBsAb sera and confirmed by competition experiments by HBsAg. The inserted sequence corresponding to the peptides were determined and the similarity between the amino acid and HBsAg were analyzed. Results Two phagotopes proved to be positive with ELISA and one of them was confirmed by competition experiments with the similarity of amino acid to $HBsAg_{135\sim146}$. Conclusion The findings reveal the potential of random peptide phage libraries for identifying antigen mimotope of disease-specific antigen with human polyclonal antisera. This approach is available in the recognition of antigen epitope by human polyclonal antisera.

Key words: filamentous phage-displayed; peptide library; HBsAg; epitope

多样性丝状噬菌体呈现肽库已被成功构建[1],并广泛用于筛选特定抗体的模拟表位[2]。这种模拟表位同原抗原一样能与相应抗体结合,根据模拟表位的序列信息可推测抗原的结合表位。由于不同动物来源的抗体识别同一抗原的表位不尽相同,故根据动物试验如鼠源单克隆抗体来推断抗原表位有着一定的局限性,而采用人源多克隆抗血清筛选模拟表位技术使我们可能直接推测人源抗体识别表位,同时也可直接获得针对人源抗体的模拟表位。乙肝病毒表面抗原(HBsAg)在乙型病毒性肝炎的发生、发展中担任重要角色,本研究采用人源乙肝病毒表面抗体阳性血清和丝状噬菌体呈现肽库筛选模拟表位,以进一步推测乙肝病毒表面抗原的人源抗体识别表位。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒 宿主菌XL1-Blue[F′proAB, lacIqZ⊿M15, Tn10(tetr)]和丝状噬菌体呈现载体M13LP67分别由本校微生物学教研室万泽生博士和本研究所王喜良博士惠赠[3]。辅助噬菌体VSAM13购于Promga。

作者简介:万 瑛(1972—),男,湖北省沙市人,博士研究生,助教,主要从事分子免疫学方面的研究,发表论文11篇。电话:(023)68752236

收稿日期:2000-08-04;修回日期:2000-09-21

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

1.1.2　酶和试剂　　*Kpn*I、*Eag*I、链球菌卵白素、生物素购于 New England Biolabs 公司, T4 连接酶及其他工具酶购于 Boehringer Mannheim 公司。寡聚核苷酸链 I: 5'-CTTTCTATTCTCACTCT (NNB) 12GGTGGAGGTTC-3', 寡聚核苷酸链 II: 5'-GGCCGAAC-CTCCA CC(VNN) 12AGAGTGAGAATAGAAAGGTAC-3', 一 96 gIII测序引物 5'-CCCTCATAGTTAGCGTA ACG-3' 由中科院上海细胞生物所合成(N=A, T, C, G; B=C, T, G; V=G, C, A)。生物素化羊抗人 IgG、辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG 购于邦定公司, 鼠抗 M13 单克隆抗体购于 Promga。

1.1.3　仪器　　电转化仪型号 Gene Pulser II System, 酶标仪型号 Bio-Rad450 均为美国 Bio-Rad 公司产品。自动 DNA 测序仪型号 PRISM^{TM}377, 为美国 ABI 公司产品。

1.2　方法

1.2.1　噬菌体随机肽库的构建　　编码 12 肽的两条随机 DNA 片段(引物 I 和引物 II)经 95 ℃变性 5 min, 缓慢降温至 15 ℃后, 与 *Kpn*I 和 *Eag*I 酶切回收的噬菌体 M13LP67 (45 ng/μl) 15 ℃连接 16 h (总体积 100 μl), 经酚/氯仿抽提、无水乙醇沉淀, 重溶于 10 μl 三蒸水。采用 0.2 mm 电穿孔杯, 电转化感受态菌 XL1-Blue, 参数为: 脉冲电压为 2 500 V, 电容为 25 μF, 并行电阻为 200 Ω。转化后立即加入 LB 细菌培养基培养 1 h, 然后采用常规聚乙二醇 8000(PEG8000)纯化丝状噬菌体颗粒[4]。

1.2.2　筛选丝状噬菌体呈现肽库　　临床采集、混合 20 人份 HBsAb 阳性血清(经 ELISA 证实)和 HBsAb 阴性正常血清。10 μl HBsAb 阴性血清与紫外灭活的辅助噬菌体 VSAM13 颗粒(10^{12} pfu) 4 ℃共浴过夜, 加入噬菌体肽库 10 μl(0.9×10^{8} pfu) 4 ℃共浴 8 h, 然后加入生物素标记的羊抗人 IgG, 4 ℃孵浴过夜后, 经包被链球菌卵白素的 ELISA 板捕获非特异性结合的噬菌体颗粒, 重复吸附 3 次后收集上清, 从而获得正常血清 IgG 吸附后的丝状噬菌体呈现肽库。10 μl HBsAb 阳性血清与紫外灭活的辅助噬菌体 VSAM13 颗粒(10^{12} pfu) 4 ℃共浴过夜后, 然后采用常规聚乙二醇 8000(PEG8000)沉淀辅助噬菌体颗粒, 收集上清与吸附后的丝状噬菌体呈现肽库 4 ℃共浴 8 h, 然后加入生物素标记羊抗人 IgG 4 ℃孵浴过夜, 在包被链球菌卵白素的 ELISA 板上捕获结合人源 HBsAb 的噬菌体颗粒, 生物素竞争洗脱的丝状噬菌体颗粒, 然后加入 XL1-Blue 扩增, 常规 PEG8000 沉淀纯化后, 重复上述筛选过程 2 次。

1.2.3　ELISA 鉴定抗体识别噬菌体及竞争抑制试验　　经 3 轮筛选, 随机挑选 20 个噬菌斑加入 XL1-Blue 扩增, PEG8000 纯化。1∶100 PBS 稀释人源 HBsAb 阳性血清和 HBsAb 阴性血清, 4 ℃包被过夜, 5 mg/ml BSA 37 ℃封闭 1 h, 加入纯化的丝状噬菌体颗粒 37 ℃共浴 1 h, 竞争抑制试验则加入 HBsAg(4 μg/ml)共浴, 经 PBS/0.02%Tween-20 冲洗 3 次, 加入鼠抗 M13 单克隆抗体(1∶1 000)37 ℃结合 30 min, 同样冲洗 3 次, 加入辣根化物酶标记羊抗鼠 IgG(1∶2 000)37 ℃共浴 30 min 后显色。*Aa*—*An* > 0.2 为阳性噬菌体(*Aa* 和 *An* 分别是 HBsAb 阳性血清和 HBsAb 阴性血清的吸光度)。

1.2.4　测定丝状噬菌体呈现序列　　阳性克隆扩增上清经 PEG8000 沉淀, 酚抽提纯化单链 DNA, 采用一 96 g III测序引物自动测序。

1.2.5　模拟表位序列的分析　　采用 ANTHEPROT V2.9g[5] 软件包中 Clustalw 程序将呈现多肽序列和 HBsAg 对齐, 打分矩阵选用 PAM250。

2　结果

2.1　噬菌体随机肽库的构建

化学合成的两条寡核苷酸链经变性退火, 形成编码 12 个随机氨基酸的 DNA 双链, 与载体 M13LP67 连接后, 电转化 XL1-Blue, 37 ℃恢复培养 1 h 后, 取 1 μl 培养菌梯度稀释, 与 XL1-Blue 混合后涂布平板, 根据噬菌斑推算随机肽库的库容为 0.9×10^{8}。

2.2　筛选丝状噬菌体呈现肽库

0.9×10^{8} 个噬菌体肽库颗粒经三轮筛选、扩增和纯化, 每轮筛选前、洗脱后的噬菌体颗粒数见表 1。

表 1　人源 **HBsAb** 阳性血清的筛选过程

Tab 1　Bioscreening with the Human HBsAb postive serum

Input	Eluate	Recovered phages(%)
0.9×10^{8}	8×10^{3}	8.9×10^{-5}
1.4×10^{10}	2×10^{7}	1.4×10^{-3}
5.1×10^{9}	4×10^{7}	7.8×10^{-3}

2.3　ELISA 鉴定抗体识别噬菌体及竞争抑制试验

随机挑选 20 个噬菌斑扩增纯化后, 经 ELISA 发现有两个噬菌体克隆 A_1、A_2 呈阳性反应, 见图 1, 竞争抑制实验显示 A_2 可与 HBsAg 竞争人源 HBsAb 结合, 见图 2。

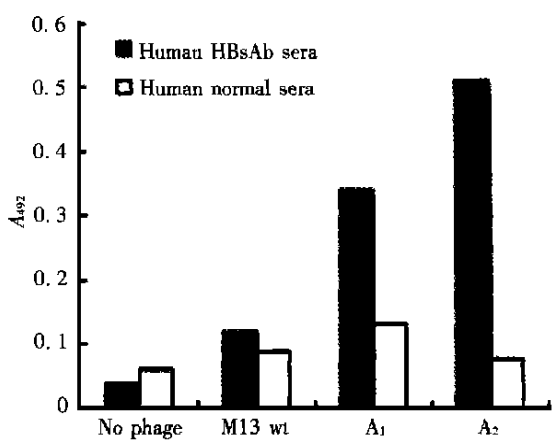


图 1　筛选的模拟表位与人源 **HBsAb** 血清的 **ELISA** 反应

Fig 1　Reactivity of selected mimotopes with human HBsAb sera in sandwich ELISA

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

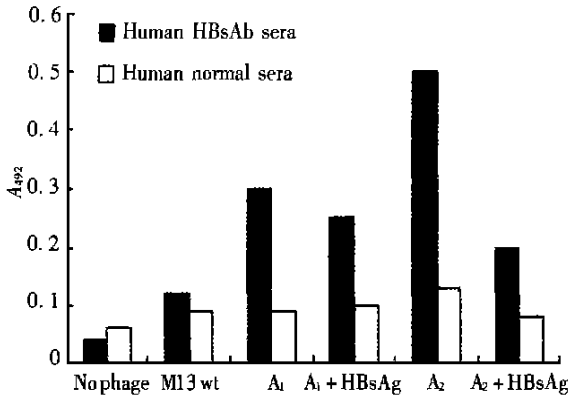


图 2 筛选的模拟表位 A_2 与 HBsAg 竞争抑制试验

Fig 2 Competition experiment between HBsAg and mimotope A_2

2.4 丝状噬菌体呈现序列的测定与分析

A_2 噬菌体外源核酸序列为: ACTGCTAAT GGTTTTTATAG-GCTGCCTTCTGGTTCG。其相应多肽序列为: TANGFYRLPSGS, ANTHEPROT V2.9 分析显示此序列与 $HBsAg_{135\sim146}$ 相似:

HBsAg ^{134}DPRVRALY - LPAGGS

Mimotope TANGFYRLPS _ GS

3 讨论

本研究将随机 DNA 片段克隆进噬菌体载体 M13LP67, 使随机 DNA 片段编码的随机多肽可与 gp Ⅲ融合表达于噬菌体表面, 构成一个可筛选、扩增的肽库。编码区设计成 NNB(N 是 A, T, C, G; B 是 C, G, T), 这样密码子总数仅为 48 个, 而终止密码子只有一个(TAG), 且此终止密码子可被宿主菌的琥珀突变所抑制, 这样部分克服了由于终止密码子的出现而使融合蛋白不能整表达的现象。

噬菌体短肽库技术可以提供大量的含有各种不同序列的短肽, 为表位图谱分析提供了一种有效的方法。传统上这种表位分析常选用鼠源单克隆抗体为靶分子, 近年来采用多克隆抗血清筛选模拟表位技术趋于成熟[6~8], 如已用于从风湿病人血清中筛选未知致病原的模拟表位[9]。本研究采用人源 HBsAb 阳性血清筛选 12 肽丝状噬菌体肽库, 经三轮筛选, 在随机挑选 20 个噬菌体克隆扩增纯化, ELISA 证实有两个克隆呈阳性反应, 但在竞争抑制试验中只有 A_2 能与 HBsAg 特异性竞争结合, 可见 A_2 是 HBsAg 的模拟表位。序列对齐分析可见模拟表位 A_2 与 $HBsAg_{135\sim146}$ 相似性较高, 而 HBsAg 的这个区域被认为是一个公认的抗原表位[9]。

不同来源的抗体识别同一抗原的表位不尽相同, 根据动物试验如鼠源单克隆抗体来推断抗原表位有着一定的局限性。如 Motti 等[10] 以鼠源 HBsAg 单克隆抗体为靶分子筛选丝状噬菌体肽库, 发现一些获得的 HBsAg 模拟表位不能与人源 HBsAb 阳性血清结合。近年来发现筛选的模拟表位具有原抗原一样的免疫原性, 并且直接以效应分子特异抗体筛选获得模拟表位有可能具有比原抗原更强的免疫原性, 加之丝状噬菌体本身是强抗原, 是有效的免疫佐剂, 表达于其表面的短肽具有很强的免疫原性, 从而为疫苗的筛选和设计提供了新手段[11,12]。所以本研究采用人源 HBsAb 筛选获得模拟表位将有利于进一步高效廉价疫苗的研究。

参考文献:

[1] Rodi D J, Makowski L. Phage-display technologyfinding a needle in a vast molecular haystack[J]. Curr Opin Biotechnol, 1999, 10(1): 87—93.

[2] Zwick M B, Shen J, Scott J K. Phage-displayed peptide libraries[J]. Curr Opin Biotechnol, 1998, 9(2): 427—436.

[3] Devlin J J, Panganiban L C, Devlin P E, *et al*. Random peptide Libraries: A source of specific protein binding molecules[J]. Science, 1990, 249(4): 404—405.

[4] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1992. 330—336.

[5] Geourjon C, Deleage G. ANTHEPROT 2.0: A three-dimensional module fully coupled with protein sequence analysis methods[J]. J Mol Graph, 1995, 13(3): 209—212.

[6] Dybwad A, Forre O, Kjeldsen-Kragh J, *et al*. Identification of new B cell epitopes in the sera of rheumatoid arthritis patients using a random nanopeptide phage library[J]. Eur J Immunol, 1993, 23(12): 3 189—3 193.

[7] Osman A A, Uhlig H, Thamm B, *et al*. Use of the phage display technique for detection of epitopes recognized by polyclonal rabbit gliadin antibodies[J]. FEBS Lett, 1998, 433(1—2): 103—107.

[8] Williams S C, Badley R A, Davis P J, *et al*. Identification of epitopes within beta lactoglobulin recognised by polyclonal antibodies using phage display and PEPSCAN[J]. J Immunol Methods, 1998, 213(1): 1—17.

[9] Waters J A, Brown S E, Steward M W, *et al*. Analysis of the antigenic epitopes of heptitis B surface antigen involved in the induction of a protective antibody response[J]. Virus Res, 1992, 22(1): 1—12.

[10] Motti T, Nuzzo M, Meola A, *et al*. Recognition by human sera and immunogenicity of HBsAg mimotopes selected from an M13 display library[J]. Gene, 1994, 146(2): 191—198.

[11] Magliani W, Polonelli I, Conti S, *et al*. Neonatal mouse immunity against B streptococcal infection by maternal vaccination with recombinant anti-idiotypes[J]. Nat Med, 1998, 4(4): 705—709.

[12] Manoutcharian K, Terrazas L I, Gevorkian G, *et al*. Phage-displayed T-cell epitope grafted into immunoglobulin heavy-chain complementarity-determining regions: an effective vaccine design tested in murine cysticercosis[J]. Infect Immunol, 1999, 67(9): 4 764—4 770.

(编辑 汪勤俭)

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