DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.10.009
第22卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 10
940 2000年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2000

论著

文章编号:1000-5404(2000)10-0940-03

肿瘤抗原MAGE-3预测CTL表位的合成与鉴定

贾正才,吴玉章,王祥智,周 伟 (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 合成并鉴定已预测出的4个MAGE-3 HLA-A2限制性CTL表位多肽,为后续研究奠定基础。方法 采用固相合成法合成多肽,经RP-HPLC纯化、纯度分析,用质谱进行定性鉴定。结果 4个合成肽的纯度都在95%以上,经质谱分析,各肽的分子量测定值与理论值相符。结论 所得多肽为高纯度的目标肽,为后续研究提供了可靠的保证。

关键词:MAGE-3;细胞毒性T淋巴细胞表位;固相合成;鉴定
中图法分类号:R392.11;R394.3 文献标识码:A

Synthesis and identification of predicted CTL epitopes derived from the tumor antigen MAGE-3

JIA Zheng-cai, WU Yu-zhang, WANG Xiang-zhi, ZHOU Wei (Institute of Immunology PLA, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To synthesize and identify the four predicted HLA-A2-restricted CTL epitope candidates from MAGE-3. Methods The peptides were synthesized with solid phase strategies, purified with reverse-phase HPLC and identified with mass spectrometry. Their purity was determined too. Results All peptides were >95% in purity and the measured values of molecular weight were conformed to their theoretical values. Conclusion The collected products are the target peptides with high purity. This study provides reliable basis for further researches.

Key words: MAGE-3; cytotoxic T lymphocyte epitope; solid phase synthesis; identification

蛋白质抗原通过表位体现其免疫特异性[1]。因此,在表位水平上对抗原性的认识已促成这样一种趋势:基于抗原分子的免疫干预手段已不再停留于病原体或天然抗原整体分子水平而开始向表位水平过度。近年来迅速发展起来的肿瘤特异性免疫治疗基于特异性表达的肿瘤抗原,以主动免疫方式,在体激活免疫系统、诱导产生特异性细胞毒性T淋巴细胞(CTL),杀伤肿瘤细胞,而对正常组织细胞却无损害,是一种安全、有效的肿瘤治疗方法。目前该疗法的研究已集中于肿瘤抗原及其CTL表位的鉴定。肿瘤特异性抗原MAGE-3不仅表达于大部分的黑色素瘤,而且在肺癌、胃癌、肝细胞癌和骨肉瘤等多种组织类型的肿瘤细胞都有较高比例的表达,而在正常组织细胞(除睾丸外)却不表达,为肿瘤特异性抗原和肿瘤共同抗原。由于HLA-A2$^+$人群的比例最高,因此预测并鉴定MAGE-3的HLA-A2限制性CTL表位具有重要的意义。在以往CTL表位预测的基础上,本研究选用已预测出的4个MAGE-3 HLA-A2限制性CTL表位[2],采用固相合成法合成多肽;产物经反相高效液相(RP-HPLC)纯化、分析和质谱分析鉴定。

1 材料与方法

1.1 多肽序列

多肽序列选用基序方案与二级锚点相结合预测出的4个候选CTL表位[2],分别是MAGE-$3_{108-116}$(AISRKVAEL)、MAGE-$3_{174-182}$(HLYIFATCL)、MAGE-$3_{201-209}$(LLIIVLAII)和MAGE-$3_{271-279}$(FLWGPRALV)。

1.2 多肽的合成

多肽的合成在ABI 431A型多肽合成仪(美国PE公司)上进

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39900134)
作者简介:贾正才(1972—),男,四川省彭州市人,博士,助理实验师,主要从事肿瘤抗原的免疫识别方面的研究。电话:(023)68752236
收稿日期:2000-08-04;修回日期:2000-09-20

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

行。采用标准 Fmoc 方案, 略加修改, 精氨酸采用两次偶联。起始选用 0.25 mmol HMP 树脂(美国 PE 公司), 按照多肽序列使肽链从羧基端逐个向氨基端延伸。氨基酸(美国 PE 公司)的量为 1.0 mmol, 即氨基酸∶树脂= 4∶1。各种氨基酸的保护基团分别是: 各氨基酸的 α-氨基为 Fmoc 基团保护; 其余侧链保护基团为 Lys(Boc)、Ser(tBu)、Glu(OtBu)、Arg(Pmc)、His(Trt)、Cys(Trt)、Thr(tBu)和 Tyr(tBu)。第一个氨基酸连接到树脂上用 DMAP, 氨基酸的活化用 HOBt 和 DCC, 偶联后用 20%哌啶溶液去除 Fmoc 保护基团。多肽合成后, 将冰浴后合成物加入处于冰浴条件下的 10 ml 切割液中。MAGE-$3_{108-116}$和 MAGE-$3_{271-279}$的切割选用切割液 B, 其成分为结晶苯酚 0.75 g、EDT 0.25 ml、苯甲硫醚 0.5 ml、去离子水 0.5 ml、TFA 10 ml; MAGE-$3_{174-182}$的切割选用切割液 C, 其成分为 EDT 0.25 ml、去离子水 0.25 ml、TFA 9.5 ml; MAGE-$3_{201-209}$的切割选用切割液 A, 其成分为去离子水 0.5 ml、TFA 9.5 ml。待切割混合液温度上升至室温后, 室温条件下持续搅拌, 反应 1.5 h, 使肽链从树脂上裂解下来, 同时去除多种保护基团。将反应后的混合液经 G4 玻砂漏斗过滤以滤掉树脂, 先后用约 1 ml TFA、5~10 ml DCM 冲洗反应瓶、树脂和漏斗。将滤液在常温下低压蒸发至 1~2 ml, 加入至少 50 ml 预冷后的乙醚沉淀多肽, 4 ℃放置过夜, 经 G6 玻砂漏斗过滤, 真空抽干至少 3 h, 所得便是多肽粗产品。－20 ℃储存、备用。

1.3　多肽的纯化、分析、鉴定

1.3.1　RP-HPLC 纯化、分析　　将各多肽用 DMSO 溶解, 浓度为 20 mg/ml, 经 0.22 μm 纤维滤膜过滤后, 在 Delta 600 型 HPLC(美国 Waters 公司)上纯化、纯度分析, 流动相选用乙氰溶液(含 0.1%TFA)。MAGE-$3_{108-116}$、MAGE-$3_{174-182}$和 MAGE-$3_{271-279}$的纯化选用 C_8 制备柱(美国 Waters 公司, 7 μm, 100Å, 7.8 mm× 150 mm), MAGE-$3_{201-209}$的纯化选用 C_4 制备柱(美国 Waters 公司, 15 μm, 100Å, 8 mm× 150 mm)。MAGE-$3_{108-116}$的纯化: 10%~25%的乙氰溶液梯度洗脱 15 min; MAGE-$3_{174-182}$和 MAGE-$3_{271-279}$的纯化: 20%~60%的乙氰溶液梯度洗脱 20 min; MAGE-$3_{201-209}$的纯化: 40%~90%的乙氰溶液梯度洗脱 20 min。流动相的流速为 2.0 ml/min。少量多次纯化, 收集主峰。MAGE-$3_{108-116}$、MAGE-$3_{174-182}$和 MAGE-$3_{271-279}$的纯度分析选用 C_{18} 分析柱(美国 Waters 公司, 5 μm, 100Å, 3.9 mm× 150 mm)。MAGE-$3_{108-116}$用 10%~25%的乙氰溶液梯度洗脱 15 min; MAGE-$3_{174-182}$和 MAGE-$3_{271-279}$用 20%~60%的乙氰溶液梯度洗脱 20 min; MAGE-$3_{201-209}$的分析选用 C4 分析柱(美国 Waters 公司, 5 μm, 100Å, 3.9 mm× 150 mm), 40%~90%的乙氰溶液梯度洗脱 20 min。流动相流速为 1.0 ml/min。

1.3.2　质谱分析　　各纯化后多肽的分子量测定在 API 2000 型质谱仪(美国 Waters 公司)上进行。

1.3.3　多肽产品的收集　　纯化收集液在常温下低压蒸发至完全干燥, 或蒸发至 1~2 ml 后用至少 50 ml 预冷后乙醚沉淀、G6 玻砂漏斗过滤收集沉淀、真空干燥, 所得便是多肽纯品。－20 ℃储存、备用。

2　结果

2.1　RP-HPLC 分析结果

经积分运算, 各肽主峰面积占所有峰面积的百分数都达到了 95%以上, 分别为 MAGE-$3_{108-116}$ 100%、MAGE-$3_{174-182}$ 98.97%、MAGE-$3_{201-209}$ 99.25%和 MAGE-$3_{271-279}$ 98.86%。

2.1　质谱鉴定结果

质谱分析, 见图 1~4, 各多肽的分子量测定值分别为 MAGE-$3_{108-116}$ 987.1、MAGE-$3_{174-182}$ 1 080.5、MAGE-$3_{201-209}$ 980.8 和 MAGE$3_{271-279}$ 1 058.8。各多肽的分子量理论值分别为 MAGE-$3_{108-116}$ 986.3、MAGE-$3_{174-182}$ 1 080.45、MAGE-$3_{201-209}$ 980.5 和 MAGE-$3_{271-279}$ 1 058.42。测定值与理论值相符。

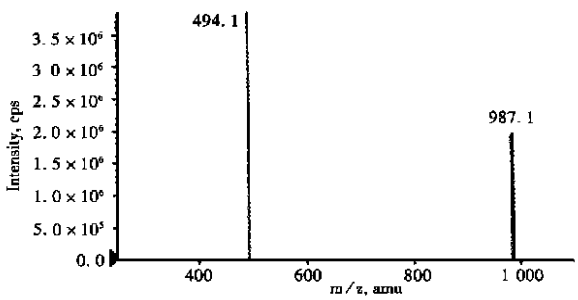


图 1　MAGE-$3_{108-116}$的质谱分析

Fig 1　MS analysis of MAGE-$3_{108-116}$

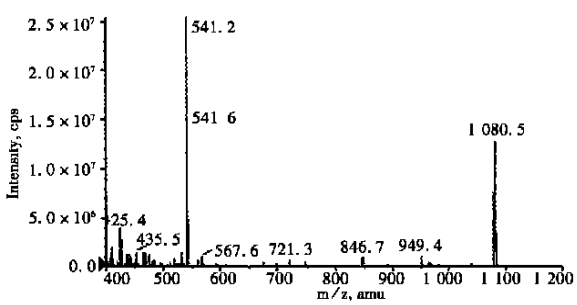


图 2　MAGE-$3_{174-182}$的质谱分析

Fig 2　MS analysis of MAGE-$3_{174-182}$

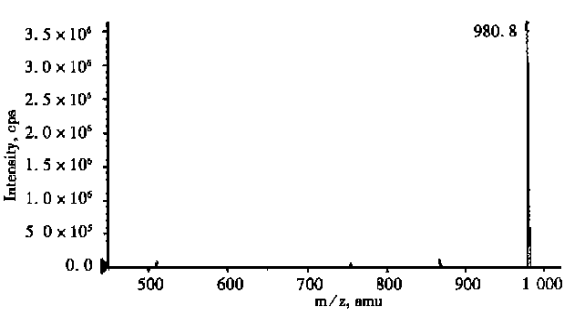


图 3　MAGE-$3_{201-209}$的质谱分析

Fig 3　MS analysis of MAGE-$3_{201-209}$

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

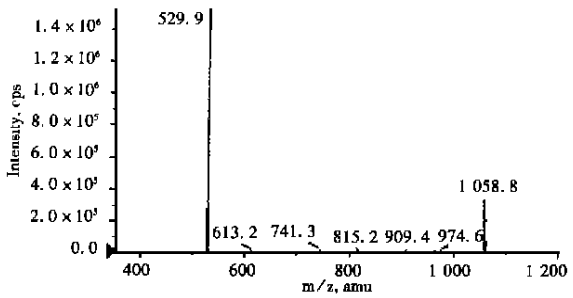


图4 MAGE-$3_{271-279}$的质谱分析

Fig 4 MS analysis of MAGE-$3_{271-279}$

3 讨论

采用Fmoc方案合成的多肽的切割、去除侧链保护基团一般选用酸性溶液，如TFA溶液。用TFA溶液切割多肽时，氨基酸的侧链保护基团如果有Boc或tBu，则会产生阳离子和三氟乙酸叔丁酯，使色氨酸、蛋氨酸叔丁酯化，加入能捕获阳离子的清除剂则可尽可能减少色氨酸、蛋氨酸的叔丁酯化，如EDT、结晶苯酚等。EDT捕获三氟乙酸叔丁酯的能力最强，但单独使用时不能完全阻止色氨酸的叔丁酯化，还需加入其它清除剂，如结晶苯酚等。当多肽链中含有Cys(Trt)时，单纯用95%TFA切割，切下的Trt基团容易再次连接到Cys的自由巯基上，EDT则可阻止这种情况的发生。如用无水TFA切割同时含Arg(Pmc)、色氨酸和酪氨酸的多肽，切下的Pmc基团有可能转移到色氨酸或酪氨酸的侧链上，使其烷化，加入水可避免，而加入5% 结晶苯酚、5% 苯甲硫醚、2.5% EDT和5% H_2O则可使副反应降至最低。因此本研究根据多肽链氨基酸组成及其侧链保护基团的不同选用不同的切割溶液，力求最大限度地降低副反应的发生。

一定纯度多肽产物的获得是其后续研究的基础。多肽的纯化一般是通过反相高效液相(RP-HPLC)进行[3~5]。为了达到好的分离效果，RP-HPLC的技术关键是流动相的选择。由于本研究所用多肽的疏水性各不相同，对流动相的选择也就各异。通过实验我们发现用乙氰作为流动相具有很好的分离效果，对于疏水性不同的多肽，选用不同浓度的乙氰不仅能达到有效的分离而且分离时间较短。由于MAGE-$3_{201-209}$的疏水性强，因而需要较高浓度的乙氰溶液(40%~90%)；而MAGE-$3_{108-116}$的亲水性好，只需相当低的乙氰浓度(10%~25%)便可得到理想的分离效果。其它影响因素还有温度、流速、分离柱的选择等。温度较低时，样品与固定相的作用较弱，容易被洗脱下来，因而保留时间较短，但分离效果却会降低；提高温度，样品易于与固定相作用，不易被洗脱下来，尽管保留时间有所延长，但分离效果却提高了。特别是对于较难分离的强疏水性多肽，适当地提高温度可达到较好的分离效果。提高流速有利于缩短分离时间，但同时分离效果就有所下降。

在合成多肽的分析、鉴定上，国内外常用的多只是对其进行纯度分析[3~6]，个别研究进行了氨基酸组分分析[7]。由于有的氨基酸残基在进行氨基酸组分分析时无法检测到，用该法鉴定多肽受到了一定的限制，且准确性不高。近年来，有报道用质谱进行合成多肽的定性鉴定[8]。本研究所合成、纯化的多肽，经RP-HPLC分析，其纯度均在95%以上，经质谱测定分子量，所得测定值与理论值相符。可确定所收集多肽即为高纯度的目标肽，这为后续研究提供了可靠的实验数据和保证。

参考文献：

[1] 吴玉章，朱锡华. 蛋白质抗原的研究[J]. 科学，1994，185：93－95.

[2] 贾正才，吴玉章. 肿瘤抗原MAGE-3 HLA-A2限制性CTL表位的预测[J]. 免疫学杂志，2000，16(3)：221－222.

[3] Fujie T，Tahara K，Tanaka F，*et al*. A MAGE-1-encoded HLA-A24-binding synthetic peptide induces specific anti-tumor cytotoxic T lymphocytes[J]. Int J Cancer，1999，80(2)：169－172.

[4] Tanaka F，Fujie T，Tahara K，*et al*. Induction of antitumor cytotoxic T lymphocytes with a MAGE-3-encoded synthetic peptide presented by human leukocytes antigen-A24[J]. Cancer Res，1997，57(20)：4 465－4 468.

[5] Oiso M，Eura M，Katsura F，*et al*. A newly identified MAGE-3-derived epitope recognized by HLA-A24-restricted cytotoxic T lymphocytes[J]. Int J Cancer，1999，81(3)：387－394.

[6] Bristol J A，Schlom J，Abrams S I. Development of a murine mutant ras $CD8^+$ CTL peptide epitope variant that possesses enhanced MHC class Ⅰ binding and immunogenic properties[J]. J Immunol，1998，160(5)：2 433－2 441.

[7] Tourdot S，Oukka M，Manuguerra J C，*et al*. Chimeric peptides：a new approach to enhancing the immunogenicity of peptides with low MHC classⅠ affinity[J]. J Immunol，1997，159(5)：2 391－2 398.

[8] Manici S，Sturniolo T，Imro M A，*et al*. Melanoma cells present a MAGE-3 epitope to $CD4^+$ cytotoxic T cells in association with histocompatibility leukocyte antigen DR11[J]. J Exp Med，1999，189(5)：871－876.

(编辑 谢义霞)

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