

HIV 蛋白质优势 B 细胞抗原表位的 筛选、重组表达与抗原性鉴定

杜 勇 徐 静 李敬云 侯利华 王海涛

(军事医学科学院微生物流行病学研究所 北京 100071)

摘 要 :设计了一种新的病原体蛋白质 B 细胞抗原表位的筛选和重组表达方法。不须使用抗原,而通过交替用病人血清 IgG 抗体“淘洗”(biopanning)随机肽库和用正常人血清 IgG 反向吸附,来获得特异抗原表位资料。用 HIV 病人血清的 IgG 抗体淘洗噬菌体递呈随机十二肽库,再以正常人 IgG 抗体吸附,筛选到了能和 HIV 病人血清发生特异反应的噬菌体克隆,经 ELISA、DNA 测序等,成功地筛选出了位于 HIV gp41 外膜蛋白、高亲和力、构型特异的**优势 B 细胞抗原表位**(⁶⁰²GCSGKLICTTNV⁶¹³)。用大肠杆菌硫氧还蛋白作为骨架,在其活性部位以“内融合”形式重组表达了该抗原表位,纯化的重组蛋白具有良好的抗原性,能与 HIV (+) IgG 抗体及艾滋病人血清呈特异反应,表明本技术路线可以有效地进行 HIV 蛋白质的 B 细胞抗原表位筛选和重组表达。此方法也可移植于其它病原微生物抗原或自身抗原的表位研究,继而为基于抗原表位水平的特异诊断试剂的研制、疫苗的设计提供依据。

关键词 :HIV, 抗原表位, 随机肽库, 重组表达, ELISA

中图分类号 :Q78 文献标识码 :A 文章编号 :0001-6209(2000)03-0270-76

对众多的传染性疾病、过敏性疾病及自身免疫性疾病而言,其病人血清中的特异抗体是引起免疫保护和免疫病理损伤的主要因素,从而成为能够反映病原体的致病性质和宿主的免疫状况的重要“信息库”。病原原体上的相应抗原表位也成为研制特异诊断试剂和疫苗的靶标。目前常用的分析蛋白质抗原表位的方法均需要有高纯度的抗原、或编码抗原的基因序列,这使得对那些复杂或未知病原体的表位分析工作无法进行。

新近发展的噬菌体递呈随机肽库(phage display random peptide library)技术,已被广泛用于蛋白质分子间相互作用研究,包括抗原—抗体系统。以随机肽库的高度多样性、敏感而独特的筛选方法和抗原—抗体反应的特异性作为理论基础,随机肽库相关技术可能成为诠释病人血清抗体“信息库”的一种途径。基于此,我们设计了一种新的表位分析方法,成功地从艾滋病人血清中筛选出了位于 HIV gp41 处膜蛋白的高亲和力、构型特异的 B 细胞抗原表位,并利用大肠杆菌的硫氧还蛋白作为骨架,以“内融合”的形式表达了单个抗原表位,经 ELISA 鉴定,纯化的重组蛋白具有良好的抗原性。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

噬菌体递呈随机十二肽库试剂盒(Ph. D. -12™ Phage Display Peptide Library Kit)购

作者简介:杜勇(1965-),男,江苏邳县人,军事医学科学院微生物流行病学研究所副研究员,博士,主要从事病毒学分子生物学研究

收稿日期:1998-12-21,修回日期:1999-05-17

自美国 New England BioLabs 公司,肽库的滴度为 4×10^2 pfu/mL,随机多样性为 1.9×10^9 ,受体菌为 *E. coli* ER2537;大肠杆菌表达系统 ThioFusion™ Expression System 购自美国 Invitrogen 公司。³⁵S-dATP、Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit 购自美国 Amersham 公司;HRP-兔抗 M13 抗体为本室标记(效价 1:1000)。HIV 诊断试剂盒为荷兰 Vironostika® HIV Uni-Form II plus。艾滋诊断试剂国家参比品(批号 9701)购自中国药品生物制品检定所。辣根过氧化物酶标记羊抗人 IgG 购自华美公司。

1.2 实验用 IgG 抗体

HIV(+)IgG 来自确诊的艾滋病病人血清,HIV(-)IgG 来自正常人血清,HCV(+)IgG 来自丙型肝炎病毒(HCV)阳性、HIV 阴性的病人血清。所有 IgG 均经 1 次 50%、2 次 33% 饱和硫酸铵沉淀,HIV 标准试剂双抗原夹心法检测。

1.3 随机肽库的淘洗与吸附

1.3.1 噬菌体的生物淘洗(Biopanning)将制备的 HIV 病人血清 IgG 多克隆抗体稀释至 $150 \mu\text{g/mL}$,每孔 $150 \mu\text{L}$ 包被聚苯乙烯微孔,4℃ 过夜,3% BSA 封闭 1h。用 $300 \mu\text{L}$ TBST (50mmol/L Tris-HCl, pH7.5, 150mmol/L NaCl, 0.5% Tween-20)缓冲液稀释 $10 \mu\text{L}$ 肽库原液,按 $100 \mu\text{L}/\text{孔}$ 加到微孔内,室温缓慢摇荡 1h,去掉液体,TBST 洗涤 10 次。每孔加入 $100 \mu\text{L}$ 0.2mol/L 甘氨酸—盐酸(pH2.2),室温孵育 10min,洗脱结合的噬菌体。

1.3.2 非特异噬菌体的反向吸附:将上述洗脱的噬菌体加到用正常人 IgG 抗体($150 \mu\text{g/mL}$)包被的微孔内,室温慢摇 1h 以吸附非特异噬菌体。将吸附后的洗脱液加到 20mL *E. coli* ER257 培养液($OD_{550} = 1.0$)中,37℃ 250r/min 培养 5h,12000g 离心 10min,收集上清,加入 4% PEG8 000、3% NaCl,冰浴 1h,12 000g 离心 15min,沉淀的噬菌体悬浮于 1mL TBST。

1.3.3 特异噬菌体的筛选与 ELISA 鉴定:按上述步骤,将制备的噬菌体再淘洗—吸附 2 次。第三次淘洗的噬菌体 1:1000 稀释后,感染 *E. coli* ER2537,铺制平板,37℃ 培养 10h。挑取单个噬斑,按常规方法制备原种。将原种倍比稀释后,ELISA 检测其和 HIV 病人血清 IgG 抗体和正常人 IgG 抗体的反应,仅和前者抗体反应,而和正常人血清 IgG 抗体无反应的噬菌体原种即为阳性克隆。按说明书操作程序,对阳性克隆提取单链 DNA, Sanger 双脱氧链终止法测序。

1.4 重组表达质粒的构建

人工合成编码抗原表位的寡聚核苷酸序列 p1(54bp):5' TAC GCG GCT CGGGCT GCT CTG GGA AAC TCA TCT GCA CCA CTT GCG GTC CGC TAC 3' 和互补链 p2(54bp) 5' GTA GCG GAC CGC AAG TGG TGC AGA TGA GTT TCC CAG AGC AGC CCG GAC CGC GTA 3'(下划线为抗原表位编码序列),序列的两端各加 *Rsr* II 酶切位点和保护碱基。两个序列样品用纯水稀释后以等摩尔数混合,95℃ 变性 3min,缓慢降至室温,使之退火形成双链。加入内切酶 *Rsr* II,37℃ 酶切 16h,生成带粘性末端的 DNA 片段。大肠杆菌表达质粒 pTrx 经 *Rsr* II 酶切、CIAP 去磷酸化,与上述 DNA 片段连接。连接物转化大肠杆菌 GI724,挑取单菌落,经 PCR 及酶切鉴定阳性克隆和插入片段的方向。

1.5 重组蛋白的诱导表达与纯化

1.5.1 重组蛋白的诱导表达:挑取单个菌落接种于 RM 培养基,30℃ 250r/min 培养过

夜。按 1:20 接种于新鲜的诱导培养基,继续在 30℃ 振荡培养到 $OD_{550} = 0.5$,加入色氨酸至终浓度为 100mg/L,诱导培养 5h,离心集菌。

1.5.2 重组蛋白的纯化与鉴定:PBS 缓冲液悬浮菌体,超声波粉碎后,12 000g 离心 15min 沉淀包含体,再以含 0.5% Triton X-100、2mol/L 尿素的 PBS 洗涤包含体 2 次。用 8mol/L 尿素溶解包含体,然后逐步降低尿素浓度,使蛋白自然复性。SDS-PAGE 电泳后,免疫印迹(Western Blot)鉴定其抗原性,第一抗体为 1:50 稀释的 HIV 感染者血清,第二抗体为辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG 抗体(1:200),底物为 DAB。

1.6 ELISA

用表达的抗原表位重组蛋白($2\mu\text{g}/\text{mL}$)包被微孔板,检测其和不同 IgG 抗体、HIV (+) (-)血清、艾滋诊断试剂国家参比血清的反应。实验程序为常规 ELISA 方法。

1.7 DNA 序列测定

将重组表达质粒上的插入 DNA 片段亚克隆到 pBluescript II SK(+) 中,转化大肠杆菌 *E. coli* XL1-Blue,挑取阳性菌落,提取质粒,用 373A 型自动测序仪测序。

2 结果

2.1 HIV 病人血清特异 IgG 抗体滴度测定

为保证淘洗和吸附过程的特异性,首先用双抗原夹心法检测了所制备的 HIV (+) 和 HIV (-) 血清抗体,结果显示,高稀释度的 HIV (+) 抗体仍可以和 HIV 抗原发生反应,即使总抗体浓度稀释至 $1\mu\text{g}/\text{mL}$,其 OD_{490} 还远高于临界值(0.152),说明总抗体中存在着高滴度的抗 HIV 抗体,这确保了淘洗的敏感性。HIV (-) 抗体和 HIV 抗原之间无明显反应,这保证了吸附过程中,不至于吸附掉目的噬菌体克隆。

2.2 阳性噬菌体克隆的筛选

用 HIV (+) IgG 和 HIV (-) IgG 检测第三轮淘洗—吸附后的噬菌体克隆,共检测 96 个样品,其中与 HIV (+) IgG 结合、而与 HIV (-) IgG 不结合的有 20 个,阳性率为 10.4% (20/96)(图 1)。

2.3 阳性噬菌体递呈肽的氨基酸序列特征

对 ELISA 检测阳性的 13 个噬菌体克隆进行 DNA 序列测定,其编码氨基酸的密码子

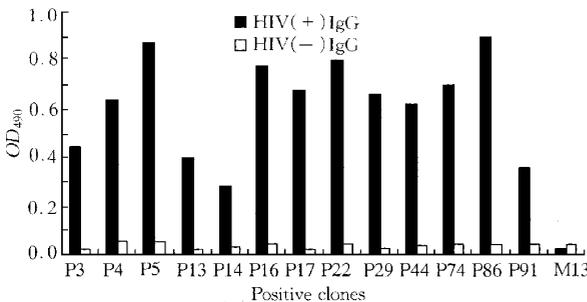


图 1 阳性噬菌体与 HIV (+) /HIV (-) IgG 的免疫反应

Fig. 1 Immunoreactivity of positive clones with HIV (+) /HIV (-) IgG by ELISA M13 negative control

均为 NNK(N = G or A or T or C;K = G or T),这和构建随机肽库所用的寡核苷酸序列特征一致,说明所测序列确为随机肽库的递呈片段。这 13 个序列中,出现了完全相同的序列。推导上述 DNA 序列所编码的氨基酸,即为阳性噬菌体递呈肽的氨基酸序列(图 2)。13 个阳性递呈肽可分为五组,分析这五组氨基酸序列,可以发现每组序列都有间隔 5 个氨基酸残基的两个半胱氨酸,经用 CLUSTALW 软件比较五组递呈肽与

HIV-1 所编码的氨基酸序列,在 HIV-1 gp41 蛋白上找到了位于 602~613aa 的同源序列 (602^GC^SG^SK^LI^CT^TN^V613^I),这些资料说明在此处有一个优势抗原表位。

HIV gp41 (aa602-613)	G	C	S	G	K	I	C	I	I	N	V	
P16/P29	T	H	Q	L	G	K	L	Q	G	V		
P4	S	P	K	L	G	K	L	F	A	F		
P3/P22/P74/P86	S	S	S	A	K	L	T	C	I	I	Q	I
P5/P13/P17/P44	K	S	D	A	R	F	M	C	S	V		
P14/P91	D	C	L	K	Q	W	A	C	E	W	S	R

图 2 阳性噬菌体递呈肽氨基酸序列比较

Fig.2 Comparison of amino acid sequences of positive phage clones

2.4 HIV 优势抗原表位在 *E. coli* 中的表达与纯化

人工合成编码上述优势抗原表位的 DNA 序列,插入到大肠杆菌硫氧还蛋白基因的 *Rsr* II 切点处,构建了“内融合”型表达质粒 pTrxHIVp。携此质粒的 *E. coli* GI724 经色氨酸诱导后,表达了相对分子量为 12kD 的重组蛋白,表达量占细菌总蛋白的 20%。可溶性分析表明此蛋白在细菌内以包含体形式存在。经包含体的提取、洗涤、变性与复性,获得了纯度较高的表达蛋白(图 3)。Western Blot 分析,表达的蛋白可以和 HIV 感染者血清发生反应,表明其具有良好的抗原性。将此重组表达蛋白命名为 P12。

2.5 重组蛋白 P12 与不同 IgG 抗体的反应

以重组蛋白 P12 作为抗原,分析其与 HIV(+)IgG、HIV(-)IgG 和 HCV(+)IgG 的免疫反应。结果 P12 仅与 HIV(+)IgG 有特异反应,且反应强度与抗体浓度有剂量反应关系,而与其它两种抗体无明显反应(图 4)。

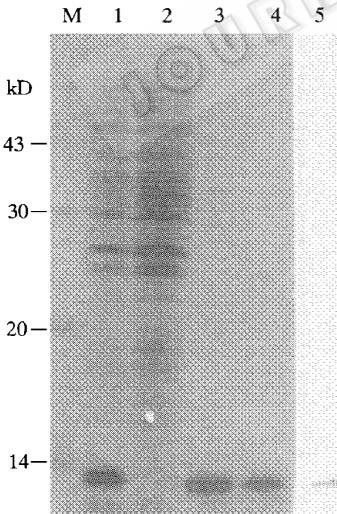


图 3 表位重组蛋白 P12 的 SDS-PAGE 和 Western Blot 分析

Fig.3 SDS-PAGE and Western blot analysis of recombinant P12 expression in *E. coli* GI724

M. marker; 1. induced *E. coli*GI724/pTrxHIVp; 2. *E. coli* GI724/pTrxHIVp before induction; 3, 4. purified recombinant P12; 5. Western blot of P12.

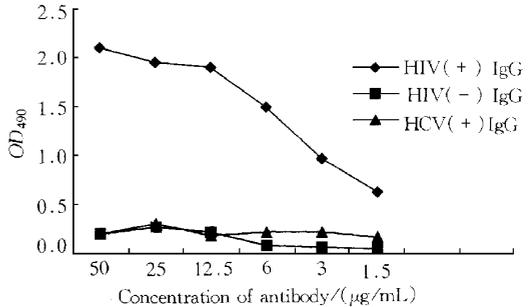


图 4 重组 P12 蛋白与不同 IgG 抗体的反应

Fig.4 Immunoreactivity of recombinant P12 with three kinds of IgGs by ELISA

2.6 重组蛋白 P12 与艾滋病病人血清的反应

以重组蛋白 P12 作为抗原,分别检测艾滋病病人血清 13 份、正常人血清 9 份(图 5),结果与艾滋病病人血清的反应呈强阳性,OD₄₉₀ 范围在 0.4~1.6 之间,平均为 1.18;与正常人血清的反应很弱,OD₄₉₀ 范围在 0.085~0.232 之间,平均为 0.13。这些数据说明 P12 可以特

异地与艾滋病病人血清反应 ;同时也说明 ,用作重组蛋白骨架的大肠杆菌硫氧还蛋白与人的血清抗体无明显的交叉反应 ,这为实际应用硫氧还蛋白作为抗原表位载体奠定了基础。

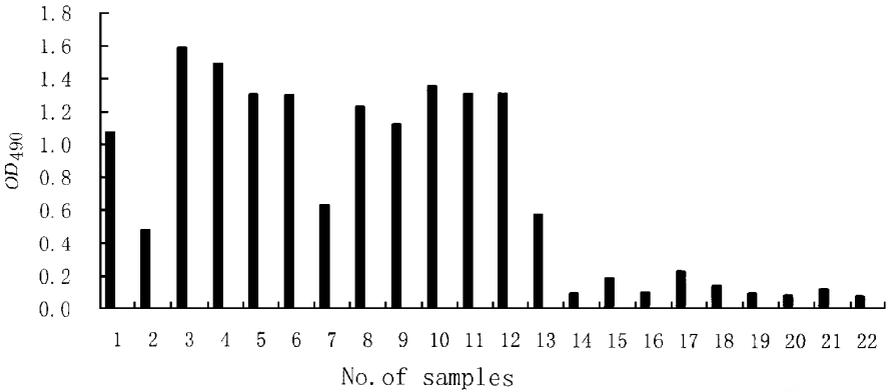


图5 重组 P12 蛋白与 HIV (+) (-) 血清的 ELISA 反应

Fig. 5 Immunoreactivity of P12 with HIV (+) (-) sera by ELISA 1~13 sera of AIDS ;14~22 sera of non-AIDS

2.7 重组蛋白 P12 与艾滋诊断参比血清的反应

以重组蛋白 P12 作为抗原 ,检测艾滋诊断试剂国家参比血清 45 份 ,其中阳性血清 30 份 ,阴性血清 15 份。在保证特异性 100% 的情况下 ,P12 可以检测出阳性血清中的 27 份 ,阳性率为 90% (图 6) 。说明本实验所筛选的抗原表位确是优势表位 ,在绝大多数 (90%) HIV 感染者血清中高水平表达 ,仅在少部分病人中呈低水平表达。

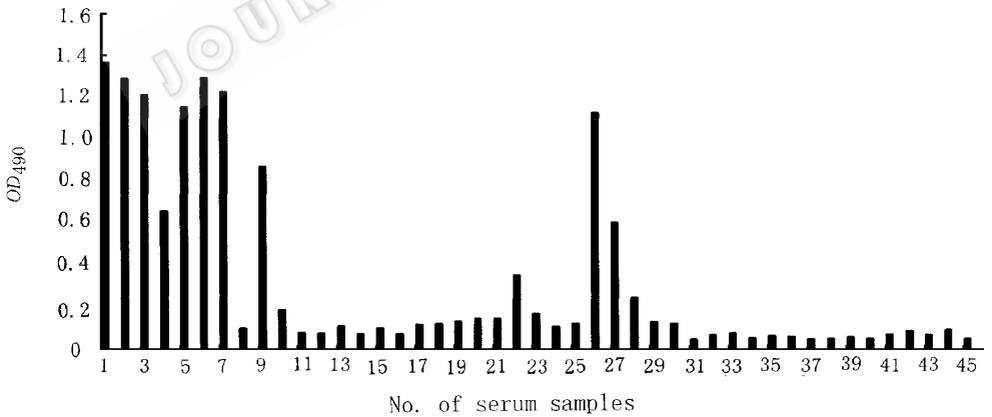


图6 重组 P12 蛋白与艾滋参比血清的反应

Fig. 6 Immunoreactivity of recombinant P12 with reference sera panel of HIV 1~13. HIV (+) sera ;32~45. HIV (-) sera The value of cut-off is 0.1.

3 讨论

近年来 ,因广泛用于蛋白质分子间相互作用研究而被称为“ 万能 ”库 (all purpose) 的噬菌体呈递随机肽库 ,也被用在蛋白质抗原 B 细胞表位的分析上 [1~5] 。为拓宽噬菌体随机

肽库在抗原表位分析中的应用 我们设计了一种新的抗原表位筛选方法: 不须使用抗原, 而通过交替用病人血清 IgG 抗体“淘洗”(biopanning) 随机肽库和用正常人血清 IgG 反向吸附的方法。我们用 HIV 病人血清的 IgG 抗体淘洗噬菌体递呈随机十二肽库, 再以正常人 IgG 抗体吸附, 筛选到了能和 HIV 病人血清发生特异反应的噬菌体克隆, 经 ELISA、DNA 测序等分析, 表明在 HIV gp41 外膜蛋白上, 存在着高亲和力、构型特异的 B 细胞抗原表位(602 GCSGKLICTTNV 613)。这和 Joseph 等^[6]利用具有中和病毒活性的人单克隆抗体所筛选的优势抗原表位相符。此序列的两个半胱氨酸可以通过二硫键而形成环状结构, 从而成为强的抗原表位。

目前大多利用合成肽来研究抗原表位, 但在应用中, 合成寡肽存在着不正确折叠、固相化时的“空间位阻”及价格昂贵等不利因素。为此, 我们利用大肠杆菌硫氧还蛋白作为骨架, 重组表达了“内融合”型抗原表位。大肠杆菌硫氧还蛋白的第 32、35 位氨基酸为半胱氨酸, 这两个半胱氨酸结成二硫键, 使在蛋白质的表面形成一个凸出的环(loop), 作为抗原时, 此环状结构易被免疫系统所识别。理论上, 若在此环内插入一个短肽, 则短肽可能被提呈在融合蛋白表面而成为良好的免疫原。另外, 编码环的基因序列内恰有一个限制性内切酶 Rsr II 的切点, 这为基因重组提供了基础。本实验中, 我们人工合成了编码 HIV 蛋白质优势 B 细胞抗原表位的 DNA 片段, 并重组入硫氧还蛋白的基因内, 构建了重组表达质粒 pTrxHIVp, 诱导表达和纯化了重组蛋白, 经 ELISA 鉴定, 此蛋白和正常人、丙型肝炎病人的 IgG 和血清无明显的反应, 而和 HIV(+) IgG 及艾滋病人血清有很强的免疫反应, 这些结果证明了所设计方法的可行性, 也为抗原表位在特异诊断试剂和疫苗研制中的实际应用提供了一条新的途径。

HIV-1 gp41 是病毒的跨膜蛋白, 序列相对保守, 含有多个 B 细胞抗原表位^[7], 抗 gp41 的抗体出现早, 且可在较长时间内保持较高水平, 检测 HIV 抗体的初筛试剂大多数是根据人体对 gp41 的抗体反应而设计的, 因此, gp41 可以用作免疫诊断或免疫预防/治疗的靶标, 我们的实验结果支持这一结论, 并可能为设计表位水平的高度特异、敏感诊断试剂提供有益的线索。

参 考 文 献

- [1] Daniels D A. *Methods Enzymol*, 1996, **9**: 494~507.
- [2] Folgori A, Tafi R, Meola A, et al. *EMBO J*, 1994, **13**(9): 2236~2243.
- [3] Dybwad A, Bogen B, Natvig J B, et al. *Clin Exp Immunol*, 1995, **102**: 438~442.
- [4] Germaschewski V, Murray K. *J Virol Methods*, 1996, **58**: 21~32.
- [5] Prezzi C, Nuzzo M, Meola A, et al. *J Immunol*, 1996, **156**(11): 4504~4513.
- [6] Cotropia J, Ugen K E, Kliks S, et al. *J Acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology*, 1996, **12**: 221~232.
- [7] D'Souza M P, Geyer S J, Hanson C V, et al. *AIDS*, 1994, **8**: 169~181.

SELECTION AND RECOMBINANT EXPRESSION OF AN IMMUNODOMINANT B CELL EPITOPE OF HIV GP41

Du Yong Xu Jing Li Jingyun Hou Lihua Wang Haitao

(*Department of Applied Molecular Biology, Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing 100071*)

Abstract : A novel method was designed for disease-specific B cell epitope mapping and epitope expression in *E. coli*. A phage library displaying random dodecamers was biopanned first with human total IgG antibodies against HIV-1, and then non-specific phages were subtracted by HIV(-) polyclonal antibodies. After three rounds of screening, the positive phages were tested in an ELISA for their reactivity with HIV(+) IgG and HIV(-) IgG antibodies. Phages that showed positive reactivity with HIV(+) IgG, but negative to HIV(-) IgG, were selected and their displayed peptides were determined by DNA sequencing. All the 13 positive clones sequenced displayed five kinds of peptides (SPKCLGKLLCAF, THQCLGKLQCGV, SCSAKFTCTTQI, KSDCSARFMCSV, DCLKQWACEWSR) that have homology to the HIV-1 gp41(602 GCSGKLICTTNV613), demonstrating there is a dominant epitope in the region.

Key words : HIV, Epitope mapping, Random peptide library, Recombinant expression, ELISA

《微生物学报》第七届编辑委员会名单

The Seventh Editorial Board of Acta Microbiologica Sinica

顾 问	张树政					
主 编	李季伦					
副主编	陆德如	朱关福	李阜棣	王敖全	谭华荣	
编 委	王修垣	邓子新	田 波	刘志恒	朱庆裴	孙志浩
	李焕姿	陈世平	陈永青	杨苏声	周培瑾	范云六
	范孝用	钱新民	钱世钧	诸葛健	徐怀恕	翟中和
编 辑	戈苏国	刘玉方				