

表位水平研究病毒流行病学的方法探讨*

来大志 杜 勇¹ 杜桂鑫 陈 薇 王海涛

(北京微生物流行病学研究所 北京 100071)

摘 要 应用噬菌体随机展示肽库和硫氧还蛋白表面展示技术,建立了在表位水平研究病毒流行病学的方法,并以丙型肝炎病毒核心区蛋白做了初步验证,证明该方法高效可行。

关键词 表位,流行病学,肽库,噬菌体,硫氧还蛋白,表面展示

中图分类号:R373 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2002)03-0331-04

病毒一直是人类健康的巨大威胁,如艾滋病病毒、甲型到戊型肝炎病毒、流行性出血热病毒、流行性乙型脑炎病毒、登革病毒等每天都在吞噬着人类的生命。人们曾花费了巨大的人力物力财力筛选抗病毒的药物,但迄今为止还没有选到任何令人满意的药物。由于病毒一般仅由蛋白和核酸组成,在细胞外以无生命的形式存在,使得传统以阻断物质代谢而发挥杀伤作用的药物对它们无可奈何。而一些阻断病毒胞内复制的药物,如 RNA 或 DNA 类似物、碱基类似物(如临床上用于治疗艾滋病的 AZT)、DNA 聚合酶抑制物等势必也会对细胞的正常生命活动造成影响,从而在临床上表现为巨大的毒副作用。现在人们越来越把注意力投向人类自身的免疫系统,通过免疫接种、非特异性增强机体免疫能力或特异性加强免疫系统对病毒的识别和杀伤来达到预防和治疗病毒性疾病的目的。到目前为止,免疫接种是防制病毒性疾病最为有效的手段。我国已经开发了多种基因工程重组疫苗、减毒活疫苗和灭活疫苗,为病毒性疾病的预防作出了巨大的贡献。不过,以上疫苗也有不尽人意的地方,实际上病毒颗粒真正能刺激机体产生保护性抗体的表位是有限的,由于没有有效的深入到表位水平的研究方法,无法把大多无用表位除去,使得疫苗的造价较高,同时还会引起一些副作用。另外有些病毒很难开发出有效的疫苗,要么是由于免疫原性差,要么是由于毒株易变异,如艾滋病病毒和丙型肝炎病毒。如果能结合人群的各种特征(病毒健康携带者、发病期、恢复期、愈后、病程迁延等等),对各变异株的各个表位在人群中的分布进行统计学分析,就可以得到大量有用的信息,例如哪些表位的相应抗体与病毒消除有关、哪些表位在受染人群中分布最广等,从而为表位疫苗的设计和诊断试剂的开发以及疾病流行趋势的评估提供有力的根据。基于以上认识,我们利用现在已经比较成熟的噬菌体随机肽库展示技术和硫氧还蛋白分子表面展示表达系统(Invitrogen, USA),创建了筛选表位和分析表位的方法,为在表位水平了解病毒的流行病学特征提供了一种手段。本文以丙型肝炎病毒核心区(C区)基因为代表,对此方法作了初步的验证,现介绍如下。

* 本课题受国家自然科学基金(39630020)资助

¹ 并列第一作者。参加工作的还有:侯利华,陈万荣,刘树铃,翁少洁

作者简介 来大志(1976-)男,黑龙江拜泉人,在读博士生,主要从事分子病毒学和生物工程学方面的研究。

收稿日期 2001-07-09,修回日期 2001-10-17

1 材料和方法

1.1 用噬菌体随机七肽库筛选 HCV 核心区(C 区)多肽抗原表位^[1]

1.1.1 HCV 核心区基因的克隆 根据文献介绍的方法^[2],从一丙型肝炎慢性携带者血清中提取总 RNA,以随机引物反转录成 cDNA,用做 PCR 反应的模板。根据已发表的序列^[3],设计针对丙型肝炎病毒 C 区基因特异的半套式 PCR 引物如下:正向引物 P α (78 ~ 97nt):TCTAGCCATGGGGTTAGTAT;正向引物 P β (341 ~ 360nt):ATGAGCAC(G/A)AATC-CTAAACC;反向引物 P γ (896 ~ 913nt)(A/G)GCGGAAGCTGGG(A/G)TGGT。Pfu DNA 聚合酶两轮 PCR 扩增,得到 HCV 核心区基因,序列测定加以验证。

1.1.2 HCV 核心蛋白的表达和纯化 上述基因克隆进表达载体 pQE30(QIAGEN),转化宿主菌 M15,挑选阳性克隆, IPTG 诱导表达, Ni-NTA 树脂亲和层析纯化表达产物。以上纯化和复性过程均按 QIAGEN 的试剂说明书操作。

1.1.3 人抗 HCV 核心蛋白多克隆抗体的纯化 把 5g 纯化的 HCV 核心蛋白交联到 1g 溴化氰活化的 Sepharose 4B 层析介质(PHARMACIA)上,交联过程按说明书操作,并填装成柱。取 50 份抗 HCV 抗体阳性血清(成都医院提供)各 10mL 混合,50% 饱和硫酸铵沉淀,10000g₄°C 离心 20min,沉淀重溶于 50mL PBS 中,并对 1L PBS 透析过夜,中间换液三次,得到人粗纯抗体。此粗纯抗体通过上述亲和层析柱,PBS 充分洗涤,以 0.1mol/L Gly-HCl(pH2.5)缓冲液洗脱,对 PBS 透析,即得到抗 HCV 核心蛋白的多抗。

1.1.4 噬菌体随机肽库的筛选和 HCV 核心区模拟表位序列的获得 上述纯化的多克隆抗体用 0.05mol/L 碳酸盐缓冲液(pH9.6)稀释到 150 μ g/mL,包被酶联板(NUNK),并用淘洗噬菌体随机七肽库(Ph. D.™ Phage Peptide Library, NEW ENGLAND BIOLABS)。经结合→洗涤→洗脱→扩增→再结合反复淘洗三个循环后,得到经过特异性富集的噬菌体库。平板稀释法^[4]获得单个克隆,每个克隆的噬菌体均扩增和纯化,用上述纯化的抗 HCV 多抗和 HRP 标记抗 M13 噬菌体单抗(本室制备)双抗夹心法检测每个克隆对多抗的反应性。挑取反应性最强的 31 个噬菌体克隆提取单链 DNA 进行测序,得到模拟表位的基因序列。

1.2 模拟表位的硫氧还蛋白展示

根据序列测定结果,人工合成两端含限制型内切酶 *Rsr* II 作用位点的模拟表位基因,将其克隆进硫氧还蛋白表达载体 PTrx(Invitrogen, USA)中,按 Invitrogen 的 ThioFusion™ Expression System 说明书操作,以色氨酸诱导模拟表位-硫氧还蛋白融合蛋白的表达,渗透压法初步纯化。初步纯化的融合蛋白真空冻干浓缩,重溶于 8mL PBS 中,上凝胶过滤柱 HiPrep 26/60 Sephacryl S-200 HR(PHARMACIA),PBS 作为载液,流速 10cm/h,分布收集,SDS-PAGE 检测各组分,紫外分光光度法定量。

1.3 模拟表位与血清的反应

展示在硫氧还蛋白表面的模拟表位纯化后,用 0.05mol/L 碳酸盐缓冲液(pH9.6)稀释到 5 μ g/mL,4°C 包被酶联板过夜,每孔包被 100 μ L。5% 脱脂奶粉/PBS 室温封闭 2h。配制稀释液如下:1mL Tween-20,5g 脱脂奶粉溶于 100mL PBS 中,现用现配。待测血清用稀释液稀释 10 倍,取 100 μ L 加入上述酶联板孔中,37°C 反应 1h,0.1% Tween-20/PBS 洗涤三次,加入用稀释液稀释 1 万倍的 HRP 标记羊抗人二抗,37°C 反应 1h,0.1% Tween-20/PBS 洗涤三

次,加入 TMB 显色,并读取 A_{450} 的值。

2 结果

2.1 HCV 核心蛋白模拟表位的测序结果和结果分析¹¹

根据筛选到的噬菌体克隆测序结果,推导出相应模拟表位的氨基酸序列(图 1)。依据氨基酸序列的特征分为 5 个类型。在 31 个序列中,有 24 个属于第一类,它们具有 XQXV(I)XFP 基序特征,与 HCV 核心蛋白第 19~25 位氨基酸高度同源,说明该蛋白在第 19~25 位存在一个优势的线性表位,这种表位占总表位数的 77%(24/31)。第二类的基序是 SXXXXQYV,占 10%(3/31)。第三类的两个表位完全相同,为 WYQLPLR,占 6%(2/31)。第四类和第五类均只有一个,分别是 HQSLRWA 和 ANSLIT,各占 3%(1/31)。后四种类型的表位与 HCV 核心蛋白没有明显的同源性,它们可能是构象型表位的模拟表位。



图 1 噬菌体 7 肽库筛选到的 HCV 核心区蛋白表位
Fig.1 Epitopes of HCV peptide obtained by screening phage random 7 peptide library

The sequences of screened peptides are laid out here in 5 groups, they should be read from top to bottom (N terminal to C terminal). Above the sequences are clone numbers. C-line printed in bold is a short sequence in HCV C gene. Bold letters show similarity between them.

2.2 模拟表位在人群中的分布

分别选择线性模拟表位 1 个(E18)和构象型模拟表位 1 个(E39)作为代表,人工合成其基因,克隆进硫氧还蛋白,纯化后,与 55 份经试剂盒检测抗 HCV 阳性的血清和 5 份抗 HCV 阴性的血清反应,结果如图 2。两个表位与抗 HCV 阴性血清均无反应。在 55 份抗 HCV 阳性血清中,表位 E39 阴性的血清是 7、14、24、30、35、36、38、41、42、44、47、51、53、56、57 共 15 份,故该表位在已测血清中的阳性率是 72.7%(40/55)。表位 E18 阴性的血清 6、7、9、14、16、25、26、31、32、39、40、41、42、57、58、60 共 16 份,故此表位在血清中的阳性率是

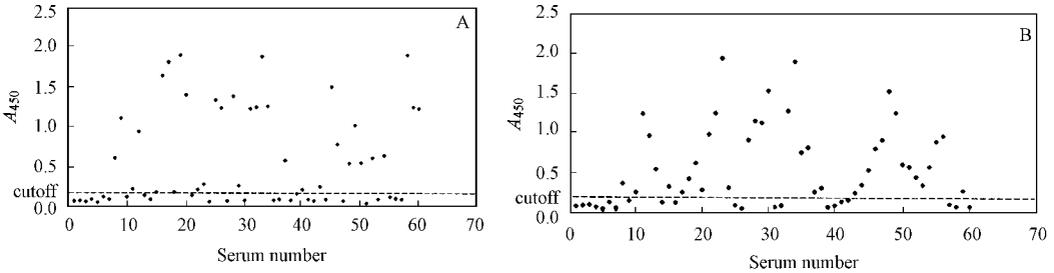


图 2 模拟表位和血清的反应

Fig.2 Interaction between epitopes and sera

A Interaction between conformational epitope E39 and sera. 40 sera out of 50 are positive. Serum1~5 are negative controls, cut-off value is calculated by plus their mean value with two times their standard deviation.

B Interaction between linear epitope E18 and sera. 39 sera out of 55 are positive. Serum1~5 are negative controls, cut-off value is calculated by plus their mean value with two times their standard deviation.

70.9%(39/55)。两表位均阴性的血清是 7、14、41、42、57 共 5 份,占总血清数的 9.1%。以上结果表明,所选择的两个表位的抗体在抗 HCV 阳性的血清中均有广泛的分布,对表位 E18 或表位 E39 有反应的血清占总血清数的 90.9%。

3 讨论

由于人体通过接触大肠杆菌而接触噬菌体的机会很多,所以人血清内存在针对 M13 噬菌体的抗体。应用展示在 M13 表面的表位直接筛选血清时,背景太高而无法应用。而硫氧还蛋白分子是人体内正常存在的分子,与血清几乎没有交叉反应,加上其自身的结构特点,使它成为表位研究的理想展示载体。该分子呈球形, C₃₂、C₃₃、P₃₄、C₃₅ 四个氨基酸是其活性位点,突出在蛋白的表面, C₃₂ 和 C₃₅ 之间形成一对二硫键,更把这种突出结构固定。G₃₃、P₃₄ 的密码子本身恰好是 DNA 限制性内切酶 R_SI 的作用位点,可以用来把模拟表位插入到硫氧还蛋白中,并且展示在分子表面,两端的半胱氨酸以二硫键的形式把模拟表位牢牢固定,有利于保持表位的稳定性。

本实验有限的的数据暗示,仅用 E18 和 E39 两个模拟表位,对抗 HCV 阳性血清的检出率就可以达到 90.9%,这可能为新型诊断试剂的研制提供了一种新的方法。本实验作为一种方法的验证,没有追踪各个血清提供者的特征,也没有验证其它的模拟表位,所以无法得到更多的资料,也无法对已得到的资料做更进一步深入的分析。此外,这种方法还能提供表位的强弱、表位之间的交互作用等其它大量的统计信息,为正确认识表位和利用表位提供了研究手段。

参 考 文 献

- [1] 杜 勇,王海涛.中华微生物学和免疫学杂志,1999,19(1):4~8.
- [2] Castillo I, Bartolome J, Quiroga J A, et al. J Med Virol, 1992, 38:71~79.
- [3] 毕胜利.病毒学报,1993,9:115~125.
- [4] 萨姆布鲁克 J,弗里奇 E F,曼尼阿蒂斯 (金冬雁,黎孟枫译).分子克隆实验指南.第二版.北京:科学出版社,1992.

Study on the Methods for Virus Epidemiology in Epitope Level^{*}

Lai Dazhi Du Yong Du Guixin Chen Wei Wang Haitao
(Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing 100071, China)

Abstract: A method for studying virus epidemiology in epitope level was established via phage random peptide library and thioredoxin surface display technique and the method was proved by test with core protein of HCV.

Key words: Epitope, Epidemiology, Peptide library, Phage, Thioredoxin, Surface display