维普资讯 http://www.cqvip.com

第16卷4期 中国病毒学 16(4):386-389
2001年12月 VIROLOGICA SINICA December 2001

应用噬菌体展示随机肽库淘筛 mAb 5H5 识别的抗原表位

李光玉,白雪帆,潘蕾,杨为松

(第四军医大学唐都医院感染病诊疗中心,陕西西安 710038)

Epitope Mapping of HTNV NP Using mAb 5H5 from a Phage-displayed Random Nonapeptide Library

LI Guang-yu, BAI Xue-fan, PAN Lei, YANG Wei-song

(*Department of Infectious disease, Tangdu hospital, Xi' an 710038, China*)

Abstract: To screen the antigenic epitope with monoclonal antibody (mAb)5H5 against Hantaan virus nucleocapsid protein from phage - displayed constrained nonapeptide library, we have completed the work as follows. (1) Purification and biotinylation of mAb 5H5. (2) Biopanning of the phage peptide library by using the mAb 5H5 as selective moleculars. (3) Identification of the epitope. The positive clones were confirmed by sandwich ELISA, competition ELISA and DNA sequencing. Amino acid sequences of 10 positive clones were compared with the nucleocapsid protein of Hantaan virus strain 76-118. The ten positive clones were selected by mAb 5H5 and the binding between the short peptide and the mAb can be inhabited by natural Hantaan virus antigen. Amino acid sequences of 10 positive clones were consensus: VRDAEEQYE, that is roughly identical with the sequence of amino acid of N-terminal of the nucleocapsid protein. These results demonstrate that the linear epitope is the antigenic epitope of Hantaan virus nucleocapsid protein and the random peptides library is helpful to identification of epitopes.

Key words: Hantaan virus; Random peptides library; Monoclonal antibodies; Epitope

摘要:本文利用噬菌体随机9肽库探索汉滩病毒(HTNV)核衣壳蛋白(NP)B细胞抗原表位。以抗HTNV NP单克隆抗体(mAb) 5H5作为筛选分子,生物淘洗噬菌体递呈的随机9肽库。阳性克隆经夹心ELISA、竞争ELISA鉴定后,随机挑取10个克隆,DNA测序,与HTNV 76~118株S基因进行同源性分析。结果显示筛选到的噬菌体能特异地与5H5结合,这种结合可被天然抗原所抑制。10个克隆的氨基酸序列相同,均为VRDAEEQYE,与76~118株NP氨基端的aa25~33一致。证实了该线性表位是mAb 5H5识别的表位,噬菌体肽库有助于病毒抗原表位的确定。

关键词:汉滩病毒;随机肽库、单克隆抗体;表位

中图分类号:R512.8 **文献标识码**:A **文章编号**:1003-5125(2001)04-0386-04

噬菌体展示随机肽库(phage display random peptide library)技术作为一种研究蛋白质分子间相互作用有效而快捷的工具,已被广泛地应用于抗原-抗体系统、细胞因子与受体活性中心的作用、小分子肽疫苗设计及蛋白质抗原表位等研究工作中[1,2]。随机噬菌体肽库被认为是配体的"万能"库,可从中直接筛选出能与某一抗体结合的表位,该表位不一定和天然的表位完全相同,但是能模拟天然表位的结合

收稿日期:2000-12-18,修回日期:2001-02-05

作者简介:李光玉(1970-),男,陕西神木籍,实验师,硕士,研究方向为肾综合征出血热诊治。

维普资讯 http://www.cqvip.com

特性。本实验用抗汉滩病毒(HTNV)单克隆抗体(mAb)5H5 淘筛噬菌体随机 9 肽库,成功地找出了该株单抗识别的抗原表位,明确了其精确的一级结构,为进一步研究抗原分子的结构与功能、抗原-抗体反应机制、多肽疫苗合理设计提供了依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 噬菌体展示随机 9 肽库(Ph. D.-9™ phage Display Peptide Library)购自美国 New England Biolabs 公司,肽库的滴度为 2×10^6pfu/mL,随机多样性 1.3×10^9,宿主菌 E. coli ER2537。测序引物:5'-CCCACGCATAACCGATATCA-3'。

1.1.2 主要试剂　链霉亲和素(SV)和生物素酯(NHS-biotin)购自 Sigma 公司,HRP-anti M13 mAb 为 Pharmacia 产品。噬菌体单链 DNA 提取试剂盒为上海华舜公司产品。鼠抗 HTNV mAb 5H5 为第四军医大学微生物学教研室制备。HTNV 鼠脑抗原(HTNV Ag)及正常鼠脑抗原为本室制备。

1.2 方法

1.2.1 mAb 5H5 的纯化和标记　采用辛酸-硫酸铵法从 mAb 5H5 腹水中提取 IgG,经 DEAE-Sepharose FF 离子交换柱纯化后标记生物素。

1.2.2 淘筛噬菌体随机肽库　1mg/mL SV 4℃过夜包被 35mm 聚苯乙烯平皿,3% BSA 封闭后,TBST(50mmol/L Tris-HCL, pH7.5, 150mmol/L NaCl, 0.5% Tween-20)振洗 6 次。同时加入生物素标记 mAb 与肽库 4℃反应过夜,室温轻摇 10min,TBST 振洗 10 次,加入 0.2mol/L 甘氨酸-盐酸(pH 2.2)洗脱液,室温轻摇 10min,收集洗脱液,加 1mol/L Tris HCL(pH9.1)中和,测定洗脱液噬菌体数,计算投入产出比:洗脱噬菌体数÷淘洗用噬菌体数。扩增噬菌体并测滴度,取一半用于下一轮淘筛[3]。按上述方法淘筛三轮,各轮 mAb 用量分别为 10μg、2μg、0.2μg。

1.2.3 夹心 ELISA 检测噬菌体　5H5(100μg/mL)包被酶联板,3% BSA 封闭后,加入第三轮淘筛扩增的噬菌体及阴性对照 9 肽库,10^{10}TU/孔,室温振摇 1h,加 HRP-anti M13 mAb,室温振摇 1h,OPD 显色,测吸光度 A_{490}值。包被时设无关 mAb 作对照,分别为 JEV mAb 2F2、单纯疱疹病毒Ⅰ型 mAb CHA9、肝细胞肝癌相关抗原 mAb A4,及无关蛋白 BSA 和 SV,包被浓度均为 100μg/mL。

1.2.4 竞争 ELISA 检测噬菌体　5H5(100μg/mL)包被酶联板,3% BSA 封闭后,加入不同浓度 HTNV Ag 与第三轮淘筛扩增的噬菌体(10^{10}TU)混合物,室温振摇 1h,加 HRP-anti M13 mAb,室温振摇 1h,OPD 显色,测吸光度 A_{490}值。阴性对照为不同浓度正常鼠脑抗原与第三轮淘筛扩增噬菌体(10^{10}TU)混合物,阳性对照为第三轮淘筛扩增的噬菌体(10^{10}TU)。

1.2.5 挑选噬菌体阳性克隆　第三轮淘筛的噬菌体 1:1000 稀释后,感染宿主菌 *E. coli* ER2537,铺制平板,37℃培养 10h。随机挑取 20 个克隆,扩大培养并测滴度,用上述夹心 ELISA 方法检测 20 个克隆与 mAb 5H5 的结合特性。

1.2.6 DNA 序列测定　从噬菌体阳性克隆中随机挑选 10 个,扩增后提取单链 DNA(按试剂盒说明操作),用 373A 型自动测序仪测序。

1.3 序列分析

应用计算机软件 pcgene 分析测序结果。

2 结果

2.1 淘筛肽库与富集效果

对三轮淘筛的富集率进行了比较,表 1 显示第二、三轮的富集率均高于前一轮。

表 1　每一轮淘筛富集率

Table 1　Yield of each round panning

Round	1	2	3
Adding	3.0×10^{10}	3.4×10^{12}	3.2×10^{12}
Eluate	1.1×10^{4}	2.9×10^{7}	6.7×10^{7}
Yield*	3.7×10^{-7}	8.5×10^{-6}	2.1×10^{-5}

Yield = Eluate/Adding

2.2 夹心 DLISA 结果

第三轮筛选到的噬菌体与 mAb 5H5 反应的 A_{490}值较与无关单抗及无关蛋白 BSA、SV 反应的 A_{490}值高 10 倍以上,而且远大于阴性对照 9 肽库与 5H5 反应的 A_{490}值;另外,无关单抗与筛选到的噬菌体及 9 肽库反应的 A_{490}值均小于 0.1,第三轮筛选到的噬菌体能够特异地与 5H5 结合,结果见图 1。

2.3 竞争 ELISA 结果

根据 A_{490}值,计算竞争抑制百分率,绘制竞争曲线。竞争抑制百分率=(阳性孔 A 值—被抑制孔 A 值)/阳性孔 A 值×100%。从图 2 可以看出,正常鼠脑抗原对筛选到的噬菌体与 5H5 的结合几乎无竞争抑制作用,而 HTNV Ag 对二者的结合有竞争抑制作用,竞争抑制率高达 92%。

2.4 挑选噬菌体阳性克隆

随机挑取的 20 个克隆经夹心 ELISA 测定均为

维普资讯 http://www.cqvip.com

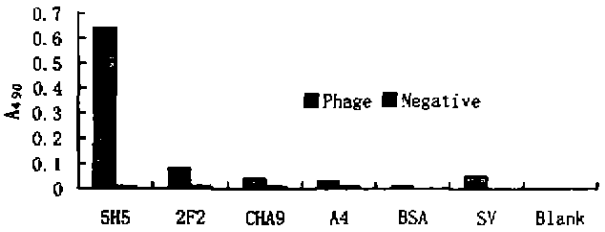

图1 夹心ELISA结果

Fig.1 The result of sandwich ELISA

The control are mAb 2F2, CHA9 and respectively; The negative is 9-mer library before biopanning.

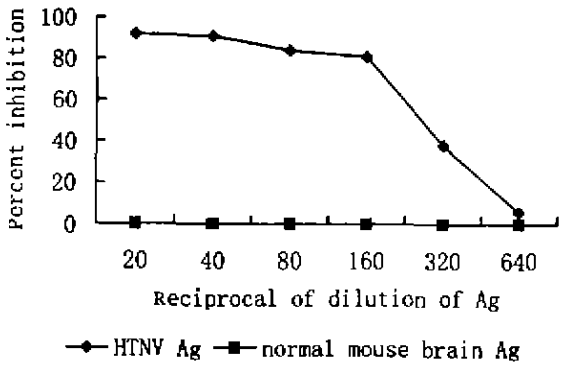

图2 竞争ELISA结果

Fig.2 The result of competition ELISA

阳性。

2.5 测序结果与分析

10个噬菌体克隆展示外源肽的序列完全一致，均为—VRDAEEQYE。将此氨基酸序列与HTNV NP序列进行同源性分析，在NP氨基端有一个同源性很高的序列(图3)，位于第25~33aa的区域。

图3 同源分析结果

Fig.3 The result of homology analysis

3 讨论

阐明病毒抗原表位的结构和功能，不仅是病毒分子生物学和病毒性疾病发病机理研究的重要内容，而且也可为诊断抗原和疫苗的研制提供重要资料。传统分析抗原表位的方法是利用抗体筛选大量的重叠合成肽，但是由于合成肽成本高，且必须事先明确蛋白质的氨基酸序列，故限制了此方法的广泛应用。噬菌体展示随机肽库技术的创立和应用，使迅速确定蛋白质抗原表位成为可能，弥补了合成肽筛选的不足[4~6]。利用噬菌体随机肽库寻找抗体表位，能否成功取决于三个方面：1)获得库容量大、结构多样性全的肽库；2)筛选方法及验证方法的可靠与准确；3)合适的抗体[7]。本研究采用的随机9肽库有足够大的库容量(3.2×10^{12}TU/mL)，能保证对靶分子筛选的需要。此外，选取了特异性强的mAb 5H5(抗HTNV型)作为筛选分子进行生物淘选，避免了非特异噬菌体的"富集"，极大地提高了筛选的特异性和敏感性。夹心ELISA和竞争ELISA结果表明，经三轮亲和淘筛后得到的噬菌体阳性率达100%，并能够特异地与mAb 5H5结合，这种结合可被天然抗原所抑制，竞争抑制率高达92%，结合阳性克隆的核苷酸序列测定及分析结果，可以确定筛选到的噬菌体递呈了能与mAb 5H5决定簇互补区(CDR)相结合的短肽，此短肽即为mAb 5H5识别的表位。

NP是HTNV的主要结构蛋白，大小约为45~50kD，由428~433个氨基酸组成，具有很强的抗原性和免疫原性，既可诱导强烈的体液免疫反应，又可诱导细胞免疫反应[8,9]。汉坦病毒(HV)属多种血清型病毒NP之间具有共同的抗原位点。徐志凯、梁米芳等[10,11]利用抗NP mAb研究发现，HV NP上含有多个组特异性、型特异性抗原表位，并且这些表位多为线性表位。Vapalahti等[12]根据HV PUU型stokamo株NP的氨基酸序列，从N端至C端合成了141个连续交错重叠的14肽，经免疫酶染色发现了6个多肽抗原表位，几乎均位于NP氨基酸序列的亲水区。白雪帆等[6,13]构建了HTNV S基因-肽噬菌体文库，并应用12株抗HTNV mAb对肽库进行了淘筛，确定了NP氨基端的一个主要B细胞表位(1~6aa)，并推断其核心序列位于15~66aa，再此基础上，又应用PEPSCAN(肽扫描)技术，在活化的纤维素基膜上每间隔2个或1个氨基酸分别合成15肽和8肽阵列，经免疫酶染色确定了两个与mAb L13F3反应的最小抗原多肽，一个为5肽，一个为3肽，为探求别的抗HTNV NP mAb的更小的抗原表位提供了依据。

本实验应用型特异性mAb 5H5淘筛噬菌体随机9肽库，找到了该株mAb识别的较小的多肽表位。并证实了HTNV N端1~86aa的范围为该病毒的一个主要线性表位，从分子水平上加深了对HTNV NP表位的认识，为免疫诊断和小分子多肽疫苗的合理设计提供了有益资料。该研究结果也进一步证明，噬菌体随机肽库是筛选病毒抗原表位的有效

维普资讯 http://www.cqvip.com

和可靠的工具。

参考文献

[1] Scott J K, Smith G P. Searching for peptide ligands with an epitope library[J]. Science, 1990, 249: 386 - 390.

[2] Phizicky E M, Fields S. Protein-protein interaction: methods for detection and analysis[J]. Microbiological Rev, 1995, 59(1): 94 - 104.

[3] Parmley S F, Smith G P. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purfication of target genes[J]. Gene, 1988, 73: 305 - 318.

[4] Folgori A, Tafi R, Meola A, *et al*. A general strategy to identify mimotopes of pathologyical antigens using only random peptide libraries and human sera[J]. EMBO J, 1994, 13(9): 2236 - 2243.

[5] Daniels D A, Lane D P. Phage peptide libraries[J]. Mehtods Enzymol, 1996, 9: 494 - 507.

[6] 白雪帆,汪毅,潘蕾,等.汉滩病毒核衣壳蛋白主要 B 细胞表位的识别及其基因定位[J].中华传染病杂志. 1999, 17(4): 245 - 249.

[7] 杨子义,王鑫,董家新,等.噬菌体显示技术用于抗体表位的筛选[J].生物化学与生物物理进展. 1999, 26: 176 - 179.

[8] Schmaljohn C S, Hasty S E, Dalrymaple JM, *et al*. Antigenic and properties of viruses linked to hemorrhagic fever with renal syndrome[J]. Science, 1985, 227: 1041 - 1044.

[9] 黄长形,李光玉,扬为松,等.原核细胞表达的肾综合征出血热病毒核蛋白免疫原性及免疫保护作用的研究[J].中国病毒学, 1996, 11(3): 225 - 229.

[10] 徐志凯,安献禄,汪美先.用单克隆抗体分析肾综合征出血热病毒抗原性的研究[J].中华微生物学和免疫学杂志, 1986, 6: 34 - 37.

[11] 梁米芳,宋干,杭长寿,等.用单克隆抗体分析流行性出血热病毒的核蛋白抗原表位[J].病毒学报, 1989, 5: 24 - 30.

[12] Vapalahti O, Kallio - Kokko H, Narvanen A, *et al*. Human B - cell epitopes of Puumalavirus nucleocapsid protein, the major antigen in early serological response[J]. J Med Virol, 1995, 46: 293 - 303.

[13] 白雪帆,张英,汪毅,等.应用 PEPSCAN 技术研究单克隆抗体 L13F3 识别的抗原表位[J]第四军医大学学报, 2000, 21(7): 850 - 852.