

应用噬菌体随机肽库技术筛选丙肝病毒 NS3 抗原模拟表位*

钟彦伟, 成 军, 陈新华, 王 刚, 洪 源, 王 琳, 李 莉, 张玲霞, 陈菊梅
(解放军第三〇二医院传染病研究所基因治疗研究中心、感染四科, 北京 100039)

Epitope Mapping of Hepatitis C Virus NS3 Antigen from a Phage Peptide Library by Using Immobilized Specific Monoclonal Antibody

ZHONG Yan-wei, CHENG Jun, CHEN Xin-hua, WANG Gang, HONG Yuan, WANG Lin,
LI Li, ZHANG Ling-xia, CHEN Ju-mei

(Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China)

Abstract: Using HCV NS3 monoclonal antibody as selective molecule, a 12 mer phage peptide library was biopanned and positive clones were selected by ELISA, competition assay and DNA sequencing. Eleven positive clones were chosen for DNA sequencing. From the experiment and sequencing comparison results, one epitope was confirmed as mimotope of HCV NS3. HCV NS3 mimotope was obtained by phage peptide library screening. The result provides a new approach for HCV therapy and vaccine development.

Key words: Hepatitis C virus; NS3; Mimotopes; Phage peptide library

摘要: 以抗-HCV NS3 的单克隆抗体作为固相筛选分子, 对人工合成的噬菌体随机 12 肽库进行 5 轮“吸附-洗脱-扩增”的筛选过程, 随机挑取 42 个克隆, 经噬菌体酶联免疫吸附法(ELISA)鉴定并进行交叉反应实验以及竞争抑制性结合实验, 最后对所选克隆进行 DNA 序列分析, 以确定 HCV NS3 抗原的模拟表位。经噬菌体富集后, 从随机筛选的 42 个克隆中得到 11 个阳性克隆, 确定氨基酸序列 XXIXXXXMSNXX 为 HCV NS3 的模拟表位。我们用噬菌体 12 肽库成功筛选得到 HCV NS3 的模拟表位, 为开展用 HCV 模拟表位探索 HCV 的防治研究创造了条件。

关键词: 丙型肝炎病毒; 非结构蛋白 NS3; 模拟表位; 噬菌体肽库

中图分类号: R512.62 **文章标识码:** A **文章编号:** 1003-5125(2002)03-0202-04

丙型肝炎病毒(HCV)感染严重危害人类健康^[1]。由于 HCV 抗原高度变异和以准种形式存在, 目前对丙型肝炎仍缺乏特效治疗方法和有效的预防手段。所以, 探索新的有效治疗途径和寻找广谱疫苗是当前急待解决的问题。

噬菌体随机短肽库技术是近年来出现的一种研究 HCV 抗原表位的新技术。利用该技术既可以筛选出与原始抗原序列完全相同的线性表位(liner epitope)抗原, 又可以筛选出与原始抗原序列不同但功能相似的构象表位(conformational epitope)抗原, 即模拟表位(mimotope)抗原^[2,3]。从噬菌体短肽库中筛选得到的模拟表位抗原, 可同时诱导体液免疫

和细胞免疫; 而且诱导产生的中和抗体既可以识别原始抗原又可以识别突变体, 可望解决 HCV 变异逃逸宿主免疫监视、形成慢性感染的问题, 为丙型肝炎的治疗和预防提供有效的方法。本实验采用丙肝病毒非结构蛋白(HCV NS3)单克隆抗体筛选噬菌体随机 12 肽库, 进行 HCV NS3 模拟表位的研究。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

噬菌体随机 12 肽库购于美国 New England Biolabs 公司, 受体菌为大肠杆菌(*E. coli* ER2537); HCV NS3 单克隆抗体购于美国 Virostat 公司; 辣根

收稿日期: 2001-11-20, 修回日期: 2002-01-04

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39900130)

作者简介: 钟彦伟(1965-), 吉林通化籍, 副研究员, 硕士, 主要从事传染病基础研究工作。

过氧化物酶(HRP)标记的抗 M13 单克隆抗体购自 Pharmacia 公司;单链 DNA 提取试剂盒购自德国 QIAGEN 公司,其它试剂均为国产分析纯。

1.2 肽库的生物淘洗

将 HCV NS3 单克隆抗体(100 μ g/mL)包被微孔板,2%牛血清白蛋白(BSA)封闭,4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜。将肽库原液 1:10 稀释后加入微孔中,室温振摇 30min,37 $^{\circ}$ C 静置 1h, TBST(0.5% Tween-20)洗涤 10 遍,弃去未结合的噬菌体;加入 0.2mol/L 甘氨酸-盐酸缓冲液(pH2.2)100 μ L,室温振摇 10min,洗脱结合的噬菌体;加入 1mol/L Tris-HCL(pH 9.1)15 μ L 中和洗脱液。将大肠杆菌 ER2537 的过夜培养液用 LB 培养基 1:20 稀释,将噬菌体液接种到 20mL 上述稀释后的细菌培养物中,37 $^{\circ}$ C 振荡培养 4.5h,4 $^{\circ}$ C 5 000r/min 离心 15min,将上清转移至另一个离心管中,加入 3mL 聚乙二醇(PEG)/NaCl(20% PEG8000,2.5mol/L NaCl)溶液,颠倒混匀,4 $^{\circ}$ C 沉淀过夜。4 $^{\circ}$ C 10 000r/min 离心 25min,弃上清,用 1mL TBS 重悬沉淀,将噬菌体悬浮液短暂离心,上清用 170 μ L PEG/NaCl 混匀,冰上重新沉淀 60min,4 $^{\circ}$ C 10 000r/min 再离心 15min,弃上清,用 200 μ L TBS 重悬沉淀。4 $^{\circ}$ C 10 000r/min 再离心 1min,4 $^{\circ}$ C 保存上清。滴定洗脱液中噬菌体的数量。按上述步骤再淘洗 4 次。第五次淘洗噬菌体感染大肠杆菌 ER2537 后铺制 LB/IPTG/X-gal 平板,随机挑取 42 个噬斑,分别接种于 1:100 稀释的大肠杆菌 ER2537 的过夜培养液中,37 $^{\circ}$ C 振摇 4.5h,12 000r/min 离心 2min,收集上清噬菌体液,4 $^{\circ}$ C 保存。

1.3 噬菌体克隆抗原性鉴定

HCV NS3 单克隆抗体(0.6 μ g/mL)包被微孔板,2% BSA 封闭,4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜。预先将纯化的噬菌体上清 50 μ L 及 50 μ L 2% 的 BSA 混合后,加入微孔板,37 $^{\circ}$ C 1h 后, PBST(0.5% Tween-20)洗 5 次,每次 1 min,加入 1:5000 稀释的 HRP-鼠抗 M13 抗体 100 μ L,以 TMB(3,3,5,5-四甲基联苯胺)为底物,测定 A_{450nm} 的吸光度值。由于筛选中用牛血清白蛋白封闭,为避免筛选到牛血清白蛋白特异性的噬菌体多肽,以牛血清白蛋白作为包被抗原,结合交叉反应情况,最后确定 11 株被 HCV NS3 单克隆抗体识别的特异性克隆。

1.4 DNA 序列测定

将 11 株噬菌体克隆分别 37 $^{\circ}$ C 摇床培养 5~6h,取 3mL,菌液室温 5 000r/min 离心 15min,将噬菌体

上清液移入新的反应管,每 mL 上清加入 10 μ L 缓冲液 MP,涡旋振荡,室温孵育 2min,取 750 μ L 上述混合物于 QIAprep 螺旋管中,8 000r/min 离心 15s,弃去过滤液,加入 700 μ L 的缓冲液 ML B 入螺旋管,8 000r/min 离心 15s,以裂解噬菌体。加入 700 μ L 的缓冲液 PE,8 000r/min 离心 15s,弃去过滤液,再以 8 000r/min 离心 15s,弃去剩余的过滤液。最后加入 100 μ L EB(100 mM Tris.Cl)入螺旋管膜的中心,孵育 10min。8 000r/min 离心 30s,所得噬菌体单链 DNA 由上海博亚生物工程有限公司测序。

1.5 竞争抑制实验

以 HCV NS3 单克隆抗体(0.6 μ g/mL)包被微孔板,2% BSA 封闭,4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜,加入 50 μ L 噬菌体与 50 μ L HCV NS3 单克隆抗体(6 μ g/mL)混合液,37 $^{\circ}$ C 1h, PBST(0.5% Tween-20)洗 5 次,每次 1 min,再加入 1:5000 稀释的 HRP-鼠抗 M13 抗体 100 μ L,检测 A_{450nm} 吸光度值。抑制率计算公式:抑制率 = (未抑制 A_{450nm} - 抑制后 A_{450nm})/未抑制 A_{450nm} × 100%。

2 结果

2.1 阳性克隆的筛选和鉴定

以固相化的 HCV NS3 单克隆抗体作为筛选分子,对噬菌体 12 肽库进行 5 轮“吸附-洗脱-扩增”的筛选。从第 5 轮筛选后得到的噬斑中随机挑选 42 个克隆,用 ELISA 法测定上清液中噬菌体与 HCV NS3 抗体结合活性。其中有 17 株 ELISA 的吸光度值较高。对这些噬菌体进行与 BSA 的交叉反应试验后,确定有 11 株与 BSA 蛋白质的交叉反应较弱,如图 1 所示。

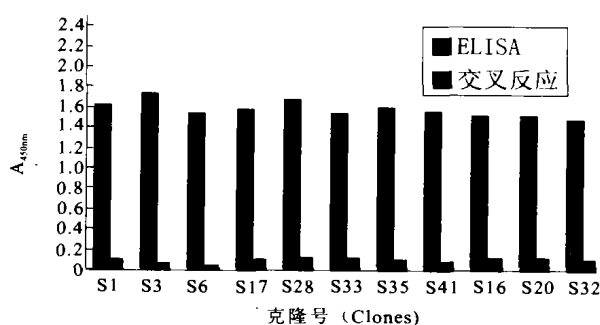


图 1 11 个阳性克隆 ELISA 吸光度以及 BSA 交叉反应吸光度值的比较

Fig.1 Detection of 11 positive clones with BSA cross by ELISA

2.2 阳性克隆株 DNA 序列测定及编码氨基酸序列分析

从筛选得到的阳性克隆菌株提取单链 DNA, 进行 DNA 序列测定并推导这些 DNA 序列编码的氨基酸残基, 即为噬菌体递呈的 12 肽序列。依据氨基酸序列特征, 可以将 11 个阳性噬菌体递呈的 12 肽序列分为两种类型: 第一种类型 S1、S3、S6、S17、S28、S33、S35、S41 噬菌体克隆递呈的十二肽序列, 氨基酸顺序为 XXIXRXPM SNII, 占总数的 72%。与 HCV NS3 原始抗原序列比较, 第三、八、九和十位置上的氨基酸残基和 HCV NS3(109-121) 位氨基酸序列(PNIEEIAMSN TG) 有较高的同源性。说明 12 肽序列中第三、八、九和十位置上的氨基酸残基高度保守, 决定了抗原表位的性质, 是该抗原表位的骨架结构。第二种类型是 S16、S20、S32 克隆所呈现的氨基酸序列 QTRLMQMMKRKR、QIRPRRRLPML、MMMTMRIMKHRQ, 与 HCV NS3 蛋白的一级结构没有明显的同源性, 结果如图 2 所示。

S1	R K I R R H P M S N I I
S3	I I I P R R P M S N I I
S6	R K I R R H P M S N I I
S17	R K I R R H P M S N I I
S28	R K I R R H P M S N I I
S33	R K I R R H P M S N I I
S35	R K I R R H P M S N I I
S41	R K I R R H P M S N I I
S16	Q T R L M Q M M K R K R
S20	Q I R P R P R R L P M L
S32	M M M T M R I M K H R Q
NS3	P N I E E I A M S N T G

图 2 阳性噬菌体递呈的 12 肽氨基酸序列

Fig. 2 The sequences of positive clones

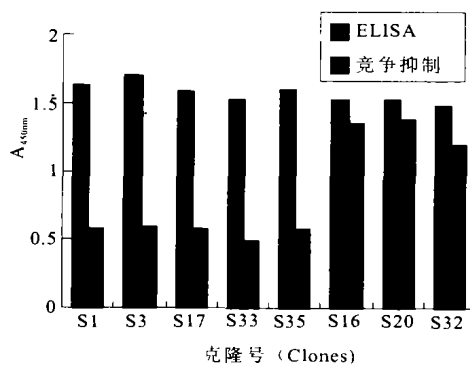


图 3 HCV NS3 阳性噬菌体的竞争抑制实验结果

Fig. 3 Competition assay of HCV NS3 positive clones

2.3 竞争抑制实验

用 HCV NS3 蛋白和第一种类型的阳性噬菌体克隆 S1、S3、S6、S17、S28、S33、S35、S41 同 HCV NS3 抗体进行竞争抑制实验, 均具有较高的抑制率。抑制率在 63.8% ~ 65.4% 之间, 如图 3 所示。第二种类型噬菌体克隆 S16、S20、S32 的抑制率较低。

3 讨论

HCV 感染治疗和预防的研究, 是目前国内外学者关注的焦点, 但进展不大。其原因首先是尚不完全清楚能激发保护免疫的 HCV 抗原位点; 其次是目前已研究的抗 HCV 抗体的广谱性不强。

HCV NS3 是 HCV 基因组编码的一种最为重要的具有多种生物学活性的非结构蛋白质。其丝氨酸蛋白酶的生物学作用在 HCV 蛋白的成熟过程中具有重要作用^[4-6], 而且还推测与肝细胞内原癌基因的裂解激活有关。HCV NS3 蛋白还具有 RNA 解旋酶 (helicase) 的生物学活性, 因此在 RNA 的复制过程中具有十分重要的作用。除此之外, NS3 蛋白在 HCV 的致病过程中也是重要的调节因素, 最近发现 NS3 在肝细胞恶性转化中起重要作用。因此, 抗 HCV 治疗研究中 HCV NS3 的研究具有十分重要的意义。

病原体的蛋白质抗原表位分析既是研究抗原分子的结构和功能、抗原-抗体反应机制的基础, 又可为多肽疫苗研制、药物筛选以及特异血清学诊断方法的建立提供重要的线索和依据。分析抗原表位的传统方法主要是利用抗血清筛选重叠 (overlapping) 合成肽, 但此方法存在几方面的缺陷, 首先是合成肽的成本高; 其次是该方法的应用必须先确定蛋白质的氨基酸序列, 才能合成相应的肽, 而在实际研究中, 许多蛋白质的序列并不清楚, 故限制了此方法的应用; 更主要的是, 完整蛋白质的抗原表位中, 90% 是构象型表位, 只有 10% 为线性抗原表位, 无疑会丢失众多的构象型表位信息^[7]。

噬菌体展示技术是近年来出现的一种新技术, 它是将外源蛋白通过与丝状噬菌体外壳蛋白融合而将外源蛋白表达在噬菌体颗粒的表面。该技术已广泛应用于筛选能与特定的靶分子相结合的特异性短肽。由于特异的噬菌体短肽是通过其对固相“靶分子”的亲和力来筛选的, 因而该方法可在不需要预先知道任何肽类结构信息的情况下, 对噬菌体短肽库

进行筛选和富集。目前,国外学者已成功地筛选到不连续的与原始抗原没有同源性的甲肝病毒(HAV)、乙肝病毒(HBV)^[8]、人类免疫缺陷病毒(HIV)^[9]的模拟表位序列,这些序列均具有很强的免疫原性,不需添加任何佐剂,所激发的抗体既能识别模拟表位抗原也能识别原始抗原。除此之外,这些模拟表位抗原可以避免完整抗原的毒性作用并可以避免产生不需要的非中和抗体。HBV 实验研究表明,展示在噬菌体上的模拟表位抗原免疫原性是最好的。因此该技术是目前研究 HCV 未知表位序列的最佳选择之一。

在本实验中,ELISA 及竞争抑制实验结果显示,S1、S3、S6、S17、S28、S33、S35、S41 噬菌体克隆与 HCV NS3 抗体具有较强的结合活性和特异性,抑制率较高;S16、S20、S32 噬菌体克隆抑制率较低,表明 S1、S3、S6、S17、S28、S33、S35、S41 噬菌体克隆所递呈的氨基酸序列 XXIXXXXMSNXX 为 HCV NS3 的模拟表位,S16、S20、S32 噬菌体克隆可能是因为在筛选过程中由于蛋白质的非特异性结合而未被洗脱所致。在以前的工作中,我们采用噬菌体随机肽库筛选技术,筛选获得了 HCV E2、NS4、NS5 核心的模拟表位,我们下一步的工作是将这些模拟表位直接免疫或串联起来构建 DNA 重组表达载体,观察其体液和细胞免疫应答,这方面的工作目前国内外还没有文献报道。而研究这些模拟表位及这些模拟表位串联重组后的应用,不仅有助于弄清编码激发宿主有效免疫反应的较佳目的抗原序列,而

且有助于新的治疗方法的探索,因而是十分重要的。我们的工作为基于此的 HCV 疫苗的研制奠定了基础。

参考文献

- [1] 钟彦伟,成军,施双双,等. 丙型肝炎病毒核心蛋白人源单链抗体的筛选与鉴定[J]. 中华肝病杂志,2001,9:217-219.
- [2] Caroline D, Sylvie R, Pedro MA, *et al.* Phage-displayed mimotopes elicit monoclonal antibodies specific for a malaria vaccine candidate[J]. *Biol Chem*, 1998,379:65-70.
- [3] Annalisa M, Paola D, Paolo M, *et al.* Derivation of vaccines from mimotopes immunologic properties of human hepatitis B virus surface antigen mimotopes displayed on filamentous phage [J]. *J Immunol*, 1995,154:3162-3172.
- [4] 钟彦伟,成军,刘妍,等. HCV 非结构蛋白 NS3 人源单链抗体的筛选与鉴定[J]. 中华传染病杂志,2000,18:84-87.
- [5] 钟彦伟,成军,刘妍,等. 丙型肝炎病毒 NS3 蛋白人源基因工程单链抗体的高效表达[J]. 中华肝病杂志,2000,8:171-173.
- [6] 钟彦伟,王松山,赵景民,等. 抗丙肝病毒非结构蛋白 NS3 单链抗体的制备及免疫组织化学研究[J]. 中华实验与临床病毒学杂志,2001,15:186-188.
- [7] 王细文,梁平,韩本立. 应用噬菌体随机肽库研究蛋白质抗原表位的进展[J]. 免疫学杂志,2000,16:313-314.
- [8] D'Mello F, Partidos CD, Steward MW, *et al.* Definition of the primary structure of hepatitis B virus (HBV) pre-S hepatocyte binding domain using random peptide libraries [J]. *Virology*, 1997,237:319-326.
- [9] Scala G, Chen X, Liu W, *et al.* Selection of HIV-specific immunogenic epitopes by screening random peptide libraries with HIV-1-positive sera [J]. *J Immunol*, 1999,162:6155-6161.