

人乳头瘤病毒-6 L1 蛋白 B-细胞优势表位作为多肽疫苗的研究*

李元朝, 吕凤林**, 曹伟, 左国伟, 艾军华, 金丹, 胡承香

(第三军医大学大坪医院野战外科研究所一室, 重庆 400042)

Study on B Cell Epitope and It's Antigenicity of the L1 Capsid Protein
of Human Papilloma Virus Type 6

Li Yuan-chao, LU Feng-lin**, CAO Wei, ZUO Guo-wei, AI Jun-hua, JIN dan, HU Cheng-xiang

(Research Institute of Surgery & Daping Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstracts: We analyzed and veriflicated the B-cell epitope of the L1 capsid protein of the *Human papilloma virus* type 6, and made it the base of producing new subunit peptide vaccine. Goldkey and PC/ Gene computer program were used to colligate and analyze the B-cell epitope of HPV6 L1. These peptides were synthesised and purified by Fmoc and HPLC methods, respectively. After that the peptides were emulsified with 0.2ml adjuvant, the blood serum antibody titer of mouse immuned by 50 µg peptides were detected. We found that, the B cell epitopes of the L1 protein of HPV-6 could be located at NO.425-439 and 486-500 positions. Those synthesized peptides have the ability to raise blood serum antibody titer enormously *in vitro*, and the antibody induced by these synthesized peptides could react with the supernatant of human papilloma tissue. We conclude that NO. 425-439 and 486-500 positions are predominat B-cell epitope of HPV 6 L1 protein. More work is under way to investigate whether these antibodies could perform functions.

Key words: *Human papilloma virus* type 6; Main late protein; B cell epitope; Peptide vaccine

摘要: 本研究分析了人乳头瘤病毒-6型 L1 外壳蛋白之 B-细胞优势表位, 并拟以此为基础制作表位多肽疫苗。研究中采用 Goldkey 和 PC/Gene 软件系统综合分析 HPV6 之 L1 蛋白 B-细胞优势表位后, Fmoc 固相合成表位多肽, 通过 HPLC 纯化和毛细管电泳分析其纯度。与佐剂完全乳化后, 免疫小鼠, 进行动物水平的免疫效果评价。取免疫小鼠血清, 与 HPV-6 DNA 阳性的尖锐湿疣患者疣体组织上清液结合, 以鉴定免疫小鼠所产生抗体的特异性。发现 L1 蛋白第 425-439 位和第 486-500 位具有较高的免疫原性, 可明显诱导小鼠血清抗体滴度升高, 且该抗体与人尖锐湿疣疣体组织上清液呈阳性反应。说明所选这两个肽段为 HPV6 之 L1 蛋白的 B-细胞优势表位, 但诱导产生的抗体是否具有功能特异性, 正在做进一步研究。

关键词: 人乳头瘤病毒-6, L1 蛋白, B 细胞表位, 多肽疫苗

中图分类号: R373.9

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125 (2004) 06-0541-04

人乳头瘤病毒 (*Human papilloma virus*, HPV) 6 和 11 型感染引起主要引起人尖锐湿疣和低度宫颈上皮瘤^[1]。HPV 的 L1、L2 蛋白有较强的抗原性, 可诱导高水平的中和性抗体; 并可自行组装、形成病毒样颗粒(Virus-like particles, VLP), 早期的 HPV 疫

苗主要基于 VLPs 构建而成。完整的病毒蛋白不仅包含了 B 细胞表位, 还包括了 CTL 表位和 T 细胞表位等, 表位之间可能相互抑制, 导致抗原性消减。

蛋白质的氨基酸序列蕴涵着重要的信息, 本研究利用蛋白质序列分析软件对 HPV6 之主要外壳蛋

收稿日期: 2004-04-30, 修回日期: 2004-07-19

* 基金项目: 重庆市科技攻关课题 (01-6647); 国家自然科学基金 (30170884)

作者简介: 李元朝 (1978-), 男, 河南新蔡籍, 硕士, 目前主要从事感染与免疫的研究。

** 通讯作者。Corresponding author: LU Fenglin, Tel:023-68757451, E-mail: Lufenglin@hotmail.com

白 L1 的氨基酸序列进行分析, 筛选其 B-细胞抗原优势表位。并将此表位按 Fmoc 固相多肽合成, HPLC 方法纯化, 与完全福氏佐剂按常规方法免疫 Balb/c 小鼠, 评价其免疫效果, 期望以此为抗原制备多肽疫苗, 克服 VLP 疫苗所面临的困难。

1 材料方法

1.1 B 细胞优势表位的计算机分析

HPV-6 之 L1 外壳蛋白的氨基酸序列摘自 GenBank (AF335604)。采用 Goldkey 软件系统和 PC/Gene 软件系统(Bairoch A 等, University of Geneva, Switzerland)分析软件, 亲水性分析采用 Kyte Doolittle 标准^[1,2], 以 7 个氨基酸残基为一组。将 GoldKey 和 PC/Gene 预测结果进行比较后, 用抗原性指数(AI, antigenicity index)综合评判 L1 蛋白的 B 细胞优势表位。

1.2 表位多肽的合成、纯化、纯度鉴定

1.2.1 多肽的合成: Fmoc 固相合成法, 在 ABI-431A 多肽合成仪上进行; HMP-树脂作为固相载体, 浓度为 0.25mmol/L; 成肽反应用 DCC/HOBt 法, 每步缩合都加入 HOBt/DCC 活化保护氨基酸的羧基; 肽链从 C 端向 N 端延伸。

1.2.2 切割与脱保护: 取合成肽 1.0g 于圆底烧瓶内冰浴 15-20min, 加入反应液。反应液组成: 0.25mL EDT、0.25mL 去离子水、9.5mLTFA。搅拌 1.5h, 过 G4 漏斗真空抽滤, 用 1.0mL TFA 清洗树脂。用 10mL DCM 清洗, 旋转蒸发器蒸发至 1.5mL 时加入 50mL 冷乙醚。过 G6 漏斗真空抽滤。用玻璃漏斗和乙醚将肽链与树脂及保护基团分离, 冷冻干燥, 得到粗肽产物; 将此粗肽溶于 50%乙酸中, 上 Sephadex G-25 柱, 以 0.2 mol/L 乙酸洗脱, 进行脱盐。

1.2.3 HPLC 纯化: HPLC 纯化后再用 C8 柱和乙腈梯度洗脱, 收集最大峰, 冷冻干燥。将纯化的 L2 用去离子水溶解, 过 0.2 μ m 纤维滤膜后, 采用区带电泳法进行分析, 毛细管孔径 25 μ m, 长度 46cm, pH 为 2.8 的磷酸盐缓冲液, 恒定电压 10kV, 电泳方向从正极到负极。

1.2.4 氨基酸组分分析: 取 10mg 纯化的多肽, 经 6N 的盐酸消化水解后, 在自动氨基酸组分分析仪(美国, BECKMAN-3000 型)上完成。

1.3 表位多肽免疫效果评价

健康 Balb/c 小鼠(第三军医大学实验动物中心提供) 23 只, 雌性, 6~8 周龄, 10~16g, 随机分为 3 组。2 条候选多肽疫苗分别分在 I、II 组, 每组 10 只, 正常对照组 3 只。将实验组以 CFA 为佐剂,

于第 0、2、4 周注射。抗原剂量为 50 μ g/鼠, 与 0.2mL 佐剂完全乳化后, 在腋下、腹股沟及腹腔多点注射。首次免疫后第 1、3、5 周, 每周每组取 2 只小鼠, 眶静脉放血, 收集血液, 分离血清, 并冻存于-20 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

间接 ELISA 法测定血清抗体滴度, 分别以合成表位肽和疣体上清包被酶联免疫反应板后, 加稀释的免疫小鼠血清, 酶标二抗为羊抗小鼠 IgG, 底物为 OPD (邻苯二胺<盐酸盐>)(Sigma 公司, USA)。用酶标仪 (Thermolab systems multiskan spectrum, USA)于 492nm 测定吸光度 A 值, 以正常小鼠血清作阴性对照。结果以双复孔 A 值均值表示。

1.4 统计方法

每组标本取均值, 各组间进行 T 检验; 待测标本 OD_{492nm} 值/阴性对照 OD 值>2.1 为阳性。

2 结果

2.1 亲水性/疏水性分析

采用 Kyte & Doolittle 方案时, 发现 HPV16 之 L1 蛋白的高亲水性区域主要集中在第 118-140 位、第 159-175、第 302-317、第 349-365 位、第 422-439 位、第 481-500 位。而 Hopp & Woods 方案的分析结果是: 在第 50-60 位、第 117-140 位、第 163-178 位、第 205-220 位、第 236-260 位、第 262-280 位、第 278-290 位、第 328-340 位、第 351-365 位、第 421-439 位、第 443-459 位、第 480-500 位。对比后发现: 虽然两种方案基于的原理和算法不完全同, 但均预测下列区域为 HPV16 之 L1 蛋白的高亲水性区域: 第 118-140 位、第 163-178 位、第 351-365 位、第 422-439 位、第 481-500 位。由于亲水性是反映蛋白质局域序列片段的结构倾向性指标之一, 能够在一定程度上指示蛋白质抗原表位以及抗原-抗体、配体-受体作用位点, 故上述这些片断很有可能为 HPV16 之 L1 蛋白的 B 细胞表位^[2,3]。

2.2 表位分析

表位分析是 Goldkey 软件提供的蛋白质分析组件之一, 综合考虑了各区域的亲水/疏水性、可及性以及氨基酸残基侧链的影响, 并进行评分, 以横坐标为氨基酸残基位点, 纵坐标为相应分值绘制曲线。本研究以 7 个氨基酸为一组, 选取 Goldkey 表位分析模块对 HPV6 之 L1 蛋白进行表位分析, 结果发现: 第 117-140, 第 345-364, 第 425-439, 第 443-459 位、第 486-500 等区域表位评分较高, 可能是 B-细胞优势表位。

2.3 HPV-6 之外壳蛋白 L1 蛋白高亲水性区域的抗

原性指数

蛋白抗原的抗原性指数 (AI) 是综合考虑了蛋白质片段的活性、结构、构象和氨基酸侧链的排列等许多性质, 而建立的病毒蛋白的各区域抗原性量化分析法^[4,5]。AI 值越高抗原性越强, 构成蛋白质表位的可能性越大。由上表可见: 在 HPV6 之 L1 蛋白中, 第 117-140 位、第 351-364 位、第 425-439、第 486-500 氨基酸具有较高的抗原性指数, 结果见表 1。

表 1 HPV-6 之 L1 外壳蛋白高亲水性区域的抗原性指数
Table 1 Antigenicity index of HPV-6 L1 protein high hydrophilicity motif

Position	Amino acid Sequence	Antigenicity index
NO.51-61	IKRANKTVVVK	AI=0.03618
NO.117-128	HPFL NKYDDVEN	AI=0.03917
NO.117-140	HPFLNKYDDVENS GSGGNPGQDNR	AI=0.00054
NO.159-175	PPLGEHWGKQCTNTP	AI=-0.00506
NO.163-178	EHWGKQCTNTPVQA	AI=-0.02556
NO.205-217	NFADLQTNKSDVP	AI=0.01169
NO.236-259	DPYGDRLFLLRKEQMFARHFFNR	AI=-0.01117
NO.262-280	EVGEPVPTLIIKSGNRT	AI=0.01079
NO.278-290	NRTSVGSSIVNT	AI=-0.00946
NO.302-317	LFNKPYWLQKAQGHNN	AI=-0.01956
NO.328-340	TVVDTRSTNMTL	AI=0.01131
NO.345-364	TTSSTYTNSDYKEYMRHVEE	AI=0.00725
NO.349-364	TYTNSDYKEYMRHVEE	AI=0.01669
NO.351-365	TNSDYKEYMRHVEEY	AI=0.01553
NO.421-439	ITCQKPTPEK EKPDPYKNL	AI=0.03716
NO.422-439	TCQKPTPEKEKPDYKPNL	AI=0.03972
NO.425-439	KPTPEKEKPDYKPNL	AI=0.06473
NO.443-459	EVNLKEKFSSELDQYPL	AI=0.02653
NO.479-500	VKRPAVSKASAAPKRKRAKTKR	AI=0.03941
NO.480-500	KRPAVSKASAAPKRKRAKTKR	AI=0.04100
NO.486-500	KASAAPKRKRAKTKR	AI=0.04213

Note: The amino acids are represented by SINGLE LETTERS; AI=antigenicity index

综合以上结果可见: HPV6 之 L1 蛋白的第 425-439 位 (KPTPEKEKPDYKPNL) 和第 486-500 (KASAAPKRKRAKTYR) 两个区域无论是在亲水 / 疏水性还是在 B 细胞抗原分析结果上都明显优于其他区域, 故我们选择这两个区域, 进行下一步的研究。

2.4 合成 B-细胞表位肽段的纯度和分子量质谱分析

ABI-431A 多肽合成仪上按 Fmoc 固相合成法合成所选肽段, 经切割与脱保护、HPLC 法纯化后, 使用 BECKMAN-3000 型自动氨基酸组分分析仪进行合成肽段的组分分析。

对合成肽段 KPTPEKEKPDYKPNL 的质谱分析中, 可见吸收峰对应的肽段分子量为 1784.9, 纯度分析中峰值下覆盖面积 67722830 (总 90526440),

百分比 74.81%; 合成肽段 KASAAPKRKRAKTYR 的质谱分析中吸收峰对应的肽段分子量为 1733.0, 纯度分析中峰值下覆盖面积 14642182 (总 20380662), 百分比 71.84%。两合成肽段分子量均与理论分子量相吻合, 而纯度均大于 70%, 足以进行动物免疫效果评价。

2.5 表位多肽免疫效果评价

候选表位肽免疫健康 Balb/c 小鼠, 收集血液, 分离血清, 间接 ELISA 法测定血清抗体滴度, 酶联板分为两组, 分别以合成的 B 细胞表位多肽和疣体上清包被, 均以正常小鼠血清作阴性对照。吸光度 A 值乃使用酶标仪于吸光度于波长 $\lambda=492\text{nm}$ 时测得。首次免疫的第一周, 血清抗体呈阴性, 第三周出现阳性, 在测定的时间内, 抗体水平随免疫次数和时间而升高。结果如图 1 所示:

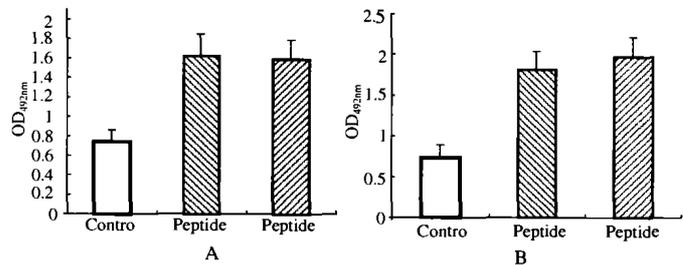


图 1 免疫后小鼠血清抗体与抗原的 ELISA 分析结果
Fig.1 The result of ELISA analysis of serum antibody from immunized mouse and its antigens

A: The plate was coated by synthesized peptides; B: The plate was coated by supernatant of papilloma tissue Peptide 1: KPTPEKEKPDYKPNL; Peptide 2: KASAAPKRKRAKTYR(the amino acids are represented by SINGLE LETTERS).

由图 1 可见, B 细胞表位多肽 (序列分别是 KPTPEKEKPDYKPNL; KASAAPKRKRAKTYR) 包被酶联板, 其 $OD_{492\text{nm}}$ 值均高于对照组, 分别为: 1.62、1.82 和 0.65。以疣体上清包被酶联板, 其 $OD_{492\text{nm}}$ 值均高于对照组, 分别为: 1.82、1.98 和 0.73。据统计, $OD_{492\text{nm}}$ 值均比对照组有显著的提高 ($P<0.01$)。

3 讨论

人乳头状瘤病毒 DNA 能整合入宿主细胞基因组中并促使宿主细胞转化增殖。目前已知三分之一以上的 HPV 型别可引起男女生殖器部位感染, 有些型别的 HPV 为亚临床或无症状感染, 所以在人群中流行广泛, 危害极大, 有些可母婴垂直传播^[6]。HPV-6、-11 的 L1 外壳蛋白受胰蛋白酶作用后产生的亚单位肽段仍保留其免疫原性, 免疫血清的抗体

滴度约 10^5 - 10^6 ，因此 HPV 外壳蛋白可望作为防治 HPV 相关疾病有效的疫苗^[7]。这些信息提示：可诱导机体特异性抗 HPV L1、L2 蛋白的抗体来中和这两种蛋白以控制 HPV 病毒的转录。Matsumoto 等^[8]将 HPV-6 主要外壳蛋白 L1 的基因亚克隆在含有巨细胞病毒启动子的质粒中，用基因枪皮下免疫 BALB/c 小鼠，每隔 2 周免疫一次，共 3 次，发现小鼠能产生抗-L1 抗体，并能识别构象性表位，呈型特异性。Christensen 等^[9]用 HPV-6 L1 病毒样颗粒(VLPs)免疫小鼠，得到 13 株单克隆抗体，并采用 ELISA 方法筛选能与 HPV-6 和 HPV-11 L1 VLPs 特异性反应的抗体，检测对 HPV-11 感染的中和作用，有 4 株单抗能与 HPV-6 L1 VLPs 的构象表位反应，并呈交叉反应性和型别特异性，其余 9 株能与 HPV-6 和 HPV-11 L1 的 VLPs 呈交叉反应，其中的 4 株还能中和 HPV-11 的 L1 蛋白，在这 4 株中有 3 株针对表面的构象性位点，1 株针对表面线性表位；但文章未讨论能否中和 HPV-6 L1 蛋白。Hong 等^[10]从尖锐湿疣患者上皮组织中分离得到湿疣浸润淋巴细胞 (wart-infiltrating lymphocytes WIL)，能特异识别 HPV-6 L1 蛋白第 311-330 位、第 411-430 位的多肽，也能识别 HPV-6 E7 蛋白，由 WIL 识别的表位与外周血 T-淋巴细胞识别的表位略有差异。

Kyte 和 Doolittle 建立了“疏水/亲水性”方案，以此来反映蛋白质局域序列片段的结构倾向性，这对蛋白质抗原表位分析以及抗原—抗体、配体—受体作用位点的研究都有一定的参考价值。随后，他们和 Hopp、Woods 提出了氨基酸残基的亲水性参数，因此便有了亲水性方案对 B 细胞表位进行预测，但该方案不能解决个别亲水性部位与表位无很好一致性、高亲水部位不一定是表位、表位不一定是高亲水性部位等问题^[11]。吴玉章等根据蛋白抗原表位已有的高分辨率研究结果，建立了蛋白抗原 B 细胞表位的抗原性指数，该指数主要用于病毒蛋白的表位的分析，综合考虑了蛋白质的许多性质，如片段的活性、结构、构象和氨基酸侧链的排列等^[4,5]。对 HBV 之 Pre-S(2)蛋白 3 个 B 细胞表位作抗原性指数实测，已证明了该方法的可靠性。

本文在分析 HPV-6 之 L1 蛋白的亲水性、抗原

性的基础上，引入氨基酸抗原性指数，综合评估其 B 细胞表位。基于这些分析结果，合成纯化了 HPV-6 之 L1 蛋白的优势 B 细胞表位，并在动物试验发现：HPV-6 之 L1 蛋白 425-439 位和第 486-500 具有较高的免疫原性，能诱导小鼠产生特异性抗体，该抗体具有针对人的疣体组织上清液的结合反应，但这两条肽段是否具有功能特异性，尚需进一步研究。本研究为基于 HPV-6 之 L1 蛋白 B 细胞表位的多肽疫苗的进一步研制奠定基础。

参考文献

- [1] 蔡红, 姚莹, 陈伟丽, 等. 多聚酶链反应检测宫颈癌 HPV 感染及分型的研究[J]. 中国病毒学, 1994, 9: 291-296.
- [2] Kyte J, Doolittle R F. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein[J]. J Mol Biol, 1982, 157:105-109.
- [3] 吕凤林, 朱锡华. 人 C5a (CD88) 序列结构分析及其 B 细胞表位预测[J]. 免疫学杂志, 1998, 14:153-156.
- [4] Wu Y, Zhu X. A new approach for B-cell epitope prediction in viral protein[J]. Chinese Science Bulletin, 1995, 40: 761-763.
- [5] 吴玉章, 朱锡华. 蛋白质抗原表位的研究[J]. 科学, 1994, 185: 93-94.
- [6] Lowy D R; Schiller J T. Papillomaviruses: prophylactic vaccine prospects[J]. Biochim-Biophys-Acta, 1999, 1423: M1-8.
- [7] Caparros W W, Savage N, Hill P M, et al. Intratype sequence variation among clinical isolates of the human papillomavirus type 6 L1 ORF: clustering of mutations and identification of a frequent amino acid sequence variant[J]. J Gen Virol, 1999, 80:1025-1033.
- [8] Matsumoto K, Kawana K, Yoshikawa H, et al. DNA vaccination of mice with plasmid expressing human papillomavirus 6 major capsid protein L1 elicits type-specific antibodies neutralizing pseudovirions constructed in vitro[J]. J Med Virol, 2000, 60:200-204.
- [9] Christensen N D, Reed C A, Cladel N M, et al. Monoclonal antibodies to HPV-6 L1 virus-like particles identify conformational and linear neutralizing epitopes on HPV-11 in addition to type-specific epitopes on HPV-6[J]. Virology, 1996, 224:477-486.
- [10] Hong K, Greer C E, Ketter N, et al. Isolation and characterization of human papillomavirus type 6-specific T cells infiltrating genital warts[J]. J Virol, 1997, 71:6427-6432.
- [11] 吴玉章, 朱锡华. 一种病毒蛋白 B 细胞表位预测方法的建立[J]. 科学通报, 1994, 24: 2275-2279.