

## 猪瘟病毒 E2 蛋白表位分析及其单克隆抗体可变区 cDNA 测序\*

张富强\*\*, 李志华, 张念祖

(云南省热带亚热带动物病毒病重点实验室, 云南昆明 650224)

## Mapping of Epitope and Determination of cDNA Sequences of Variable Region of MAbs Against E2 Protein of Classical Swine Fever Virus

ZHANG Fu-qiang, LI Zhi-hua, ZHANG Nian-zu

(Yunnan Tropical and Subtropical Animal Virus Diseases Laboratory, Kunming 650224, China)

**Abstract:** Structural and envelope glycoprotein E2 (gp55) of *Classical swine fever virus* (CSFV) is the most antigenic protein being responsible for eliciting neutralizing antibodies and conferring protective immunity. Infection of cells with CSFV is mediated by the interaction of E2 and E<sup>ms</sup> with the cell surface receptor. In this paper we report the analysis of E2 epitope by screening a 12-mer random peptide phage display library using the monoclonal antibodies (MAbs), c2410 and a18, raised against CSFV strain alfort Tübingen and reacted with the E2 structural protein. MAbs, c2410 and a18 recognized the same linear epitope, located at aa832- aa 837 (SPTTLR) of E2 protein, but showed some different reactivities with the mimotopes by ELISA and Western blot analysis. Sequencing both cDNA of light chain and heavy chain variable regions of the two MAbs from total RNA of the hybridoma cells was carried out. The results showed that MAb c2410 and MAb a18 are different monoclonal antibodies, though both MAbs derived from the same fusion and recognized the same epitope.

**Key words:** CSFV; Monoclonal antibody; Epitope; Variable region; Sequencing

**摘要:** 猪瘟病毒 (CSFV) 囊膜表面结构糖蛋白 E2 (gp55) 是诱导机体产生中和抗体及激发保护性免疫应答的主要抗原蛋白。E2 和 E<sup>ms</sup> 与细胞表面受体的相互作用介导病毒对细胞的感染过程。本文采用抗 CSFV (Alfort Tübingen 毒株) E2 结构蛋白的单克隆抗体 c2410 和 a18, 淘选噬菌体展示的 12 肽随机肽库, 对 CSFV E2 蛋白表位进行分析。研究发现: 单克隆抗体 c2410 和 a18 识别同一线性表位, 定位于 E2 蛋白的 832-837 位氨基酸 (SPTTLR), 但二者在 ELISA 和免疫印迹分析中对不同表 (拟) 位的反应性存在差异。自杂交瘤细胞中提取总 RNA, 对单克隆抗体轻链和重链可变区 cDNA 进行序列分析。结果表明: c2410 和 a18 虽然来源于同一批次融合的杂交瘤细胞系, 识别同一表位, 但仍属于不同的单克隆抗体。

**关键词:** 猪瘟病毒; 单克隆抗体; 表位; 可变区; 测序

中图分类号: S855.3

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125 (2004) 06-0591-07

猪瘟病毒 (*Classical swine fever virus*, CSFV) 为单股正链 RNA 病毒, 为黄病毒科 (*Flaviviridae*) 瘟病毒属 (*Pestivirus*) 主要成员, 与同属的牛病毒性腹泻病毒 (*Bovine viral diarrhea virus*, BVDV)、羊边界病病毒 (*Border disease virus*, BDV)、长颈鹿瘟病毒 (*Giraffe pestivirus*) 等, 在病毒结构、抗

原性和遗传特性等方面密切相关<sup>[1]</sup>。CSFV 囊膜表面结构糖蛋白 E2 (gp55) 是诱导机体产生中和抗体及激发保护性免疫应答的主要抗原蛋白, 存在 A、B、C、D 四个不同抗原区, A 区进一步划分为 A1、A2、A3 亚区, 仅针对 A1、B、C 抗原 (亚) 区的单克隆抗体对病毒具有中和作用, 其中仅 A1 亚区

收稿日期: 2004-05-11, 修回日期: 2004-06-07

\* 基金项目: 国家“九五”科技攻关项目 (96-120-10); 中、澳国际合作项目 (ACAIR/ASI/9438)

\*\* 通讯作者: 张富强 (1968-), 男, 云南省籍, 博士, 副研究员, 从事分子病毒学及免疫学研究。Corresponding author. Tel: (0871) 5016575, E-mail: zfq1968@yahoo.com.cn

在 CSFV 不同分离毒株间是保守的<sup>[2,4]</sup>。研究发现：①所有抗原区均位于 E2 蛋白靠近 N 末端的那一半区域内；②E2 蛋白 C 末端区域对 N 末端区域的蛋白空间构象无影响，也不参与组建 N 末端区域内的抗原表位；③A 区位于 E2 蛋白 766-866 位氨基酸区域内，其中 A1/A2 亚区极可能位于高度保守的 795-851 位氨基酸区域内，非保守的 A3 亚区位于 766-813 位区域内；④非保守的 B、C、D 区分别位于 691-773、691-800、766-800 位氨基酸区域内；⑤预测 E2 蛋白近 N 端区域呈二单元结构，一个单元包括 B 区和 C 区，而另一单元包括保守的 A 区和 D 区<sup>[2,3]</sup>。N 端抗原区内的 833、834 位的脯氨酸 (proline, P)、苏氨酸 (threonine, T) 对 A 区保守性抗原表位非常重要，837 位精氨酸 (arginine, R) 对 A 区表位也存在影响<sup>[3]</sup>。E2 蛋白的 C 末端区域内存在对所有瘟病毒属成员均高度保守的线性表位 YYEPR，但此表位结构未暴露在病毒粒子表面，只有在蛋白变性的条件下才能检测到<sup>[5]</sup>。经连续缺失 CSFV Alfort 毒株 E2 基因 690 至 910 氨基酸区域，精确定位能被 WH303 单克隆抗体识别的表位--TAVSPTTLR (829-837 位氨基酸)，并且此表位在猪瘟分离毒株中高度保守而对 BVDV 及 BDV 毒株存在显著差异<sup>[6]</sup>。应用大肠杆菌表面展示技术，构建猪瘟病毒 E<sup>ms</sup> 基因随机肽库，进行线性表位分析，在 E<sup>ms</sup> 基因内发现一抗原表位编码区域(191-227 位氨基酸)<sup>[7]</sup>。应用合成重叠肽，结合动物免疫及免疫细胞分析技术，发现与猪瘟病毒非结构蛋白 (NS2-3) 1446-1460 位氨基酸残基序列相关联的多肽 (KHKVRNEVMVHWFDD) 内，包含猪瘟病毒特异的辅助性 T 细胞表位和细胞毒性 T 细胞表位<sup>[8]</sup>。抗 CSFV (Alfort Tübingen 毒株) E2 蛋白的 c2410 和 a18 单克隆抗体 (均属鼠 IgG<sub>2a</sub> 亚类抗体，其轻链为 κ 型)，在免疫酶染色试验中，能识别所有已知 CSFV 分离毒株并对病毒感染具有中和作用，而与相关病毒 BVDV、BDV 不存在交叉反应<sup>[9]</sup>。在免疫印迹试验中能与变性的大肠杆菌或杆状病毒载体系统表达的 CSFV E2 重组蛋白发生特异性结合。结果提示：①c2410 和 a18 可能识别 CSFV 特异性共有表位；②此表位可能为线性或顺序性表位；③单克隆抗体与表位的结合，与构成表位的氨基酸是否糖基化无关。

本研究采用 c2410 和 a18 单克隆抗体，经生物淘选 (biopanning) 噬菌体展示的 12 肽随机肽库，对与单克隆抗体特异性结合的噬菌体所展示的 12 肽序列进行分析比对，获得共有基序，并在 CSFV

E2 蛋白氨基酸序列中查找与共有基序相同或相似的区域，进行抗原表位定位。应用 ELISA、免疫印迹分析和鉴别不同表 (拟) 位基序对单克隆抗体的免疫反应性差异，对构成表位的氨基酸残基进行分析。自单克隆抗体杂交瘤细胞系中提取总 RNA，经反转录、PCR 扩增、产物纯化及序列测定，对 c2410 和 a18 单克隆抗体轻链和重链可变区 cDNA 进行克隆和测序，分析二者互补决定区 (complementary determining region, CDR) 或超变区 (hyper variable region) 氨基酸序列的差异，从分子水平探索表位结构与其诱导产生的单克隆抗体之间的相关性。

## 1 材料与方 法

### 1.1 单克隆抗体、噬菌体展示随机肽库及其它试剂

c2410 及 a18 单克隆抗体杂交瘤细胞系，由德国联邦动物病毒病研究中心的 E. Weiland 博士惠赠，采用 CSFV Alfort Tübingen 毒株免疫小鼠后制备。M13 噬菌体展示的 12 肽随机肽库 (Ph.D.-12<sup>TM</sup> Phage Display Peptide Library)，购自美国 Beverly New England 生物实验室，随机 12 肽融合表达于丝状噬菌体 M13 外壳次要蛋白 (pIII) 的氨基末端，经 GGGS 序列与野生型 pIII 蛋白隔开，每毫升肽库包含  $2 \times 10^9$  个携带不同 12 肽序列的噬菌体克隆。辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的鼠抗 M13 抗体购自 Amersham-Pharmacia 生物技术公司；碱性磷酸酶 (AKP) 标记的羊抗鼠 IgG 抗体购自 Chemicon 公司。包被重组蛋白 G 的磁性珠购自 Dynal 有限公司。QIAquick PCR 产物纯化、RNeasy Midi 核酸提取、Omniscrypt<sup>TM</sup> RT 反转录及 QIAquick 凝胶纯化等试剂盒均购自 QIAGEN 公司，PCR Supermix 购自 Gibco BRL 公司，BioDye 末端终止测序反应试剂盒购自 PE 公司，PCR 试剂购自 Promega 公司。其余试剂无特殊要求，均采用分析纯试剂。

### 1.2 肽库容量滴定及评价

用 TBS 将待滴定肽库作  $10^{-1} \sim 10^{-12}$  稀释，取 100 μL 稀释液与 100 μL 处于对数生长期的 ER2738 大肠杆菌悬液混合，室温孵育 20 min 后，加至 3 mL 融化后处于 42°C 水浴箱保温的 Agarose Top (顶层琼脂糖营养液)，立即涂布 LB/Agar/Tet/X-gal/IPTG 平板，37°C 过夜培养，滴定噬菌体蚀斑形成单位 (Plaque forming unit, PFU)，计算噬菌体浓度。随机挑选 20 个单个蓝色蚀斑进行测序，评价 12 肽插入序列的随机性和肽库的库容量。

### 1.3 生物淘选

参照试剂盒提供的操作手册及 Rowley 等应用

蛋白 G 包被磁性珠俘获抗体-噬菌体复合物的方法<sup>[10]</sup>, 而作部分优化<sup>[11]</sup>。50 $\mu$ L 单克隆抗体、30  $\mu$ L 噬菌体肽库 (含  $9 \times 10^{10}$  PFU) 及 120 $\mu$ L 含 2% 脱脂奶粉的 TBS (pH7.5) 混合, 室温孵育 30min, 与蛋白 G 包被磁性珠混合, 室温孵育 20min, 缓冲液洗涤, 用 100  $\mu$ L 含 1mg/mL BSA 的 0.2 mol/L HCl (pH2.2) 溶液酸洗脱结合于磁性珠上的噬菌体, 并中和至中性。对每一轮淘选获得的洗脱液, 除少量稀释后按 1.2 方法涂布平板, 其余用 ER2738 增殖、纯化后, 进行下一轮淘选。逐轮降低抗体浓度, 以增强淘选的特异性; 逐轮提高洗脱液涂布时的稀释数量级, 以保证获得孤立的噬菌体蚀斑。经 2-4 轮“淘选-扩增-淘选”, 可富集与抗体特异性结合的噬菌体。

#### 1.4 ELISA 鉴定

在第 3 轮淘选后涂布的平板上随机挑选 96 个孤立蚀斑, 增殖培养后, 经 c2410、a18 及阴性对照鼠源抗体俘获, HRP 标记的鼠抗 M13 抗体检测, TMB 底物显色, 读取 450nm OD 值。当样品针对 c2410 或 a18 的 OD 值与针对阴性抗体的 OD 值存在 2 倍或 2 倍以上差异时, 判为阳性, 当存在 3 倍以上差异时, 判为强阳性<sup>[11]</sup>。

#### 1.5 外源插入多肽序列分析

根据野生型噬菌体 pIII 基因中对所有 fd-tet 衍生载体均保守的区域, 设计引物 FUSE-U: 5'-GCAAGCTGATAAACCGATAC-3', FUSE-D: 5'-CCATGTACCGTAACACTGAG-3', PCR 扩增外源基因插入区域 (产物大小约 340bp), 扩增产物纯化后, 以 30-60 ng 为模板, 以 FUSE-U 为引物进行测序反应, 乙醇沉淀、洗涤后, 用 ABI Prism 377 DNA 全自动测序仪进行序列测定。采用 Genamics Expression 1.1000 软件包, 比对分析 12 肽序列中的共有基序。

#### 1.6 噬菌体拟位免疫印迹分析

噬菌体蛋白于变性条件下, 经 SDS-12% PAGE (Bio-Rad) 分离后, 电转印至硝酸纤维素膜上, 将转印膜用含 5% 脱脂奶的 TBST<sub>0.05%</sub> 室温 1h 或 4 $^{\circ}$ C 过夜封闭后, 经对应单克隆抗体检测、AKP 标记的抗鼠 IgG 结合、BCIP/NBT 底物显色, 进行免疫印迹分析。在对照成立的前提下, 预期位置未出现蛋白带判为阴性, 出现淡而模糊的蛋白带判为弱阳性, 出现黑而明显的蛋白带判为强阳性<sup>[11]</sup>。

#### 1.7 可变区 cDNA RT-PCR 克隆

1.7.1 细胞总 RNA 提取及 cDNA 制备: 按试剂盒提供的操作手册提取的细胞总 RNA 并经紫外分光光度计定量。按照 Omniscript 试剂盒手册中介绍的方法, 以 pd(N)<sub>6</sub> 随机引物反转录制备 cDNA<sup>[11]</sup>。

1.7.2 引物合成: 参照 Kabat 提供的鼠 IgG 抗体编码基因数据及 Jenny Walker 等报道结果<sup>[12]</sup>, 在轻链和重链可变区两端的框架区设计合成引物, 鼠源抗体轻链可变区 5' 端引物: LC1 (5' CCAGTTCGAGCTCGTTGTGACTCAGGAATCT 3'), LC2 (5' CCAGTTCGAGCTCGTGTGACGACGACCCGCC 3'), LC3 (5' CCAGTTCGAGCTCGTGCTCACCCAGTCTCCA 3'), LC4 (5' CCAGTTCGAGCTCCAGATGACCCAGTCTCCA 3'), LC5 (5' CCAGATGTGAGCTCGTGATGACCCAGACTCCA 3'), LC6 (5' CCAGATGTGAGCTCTCATGACCCAGTCTCCA 3'), LC7 (5' CCAGTTCGAGCTCGTGATGACACAGTCTCCA 3'); 鼠源抗体  $\kappa$  轻链 3' 端引物: ML $\kappa$ -3 (5' GCGCCGTCTAGAATTAACACTCATTCCTGTTGAA 3'); 鼠源抗体重链可变区 5' 端引物: HC1 (5' AGGTCCAGCTGCTCGAGTCTGG 3'), HC2 (5' AGGTCCAGCTGCTCGAGTCAGG 3'), HC3 (5' AGGTCCAGCTTCTCGAGTCTGG 3'), HC4 (5' AGGTCCAGCTTCTCGAGTCAGG 3'), HC5 (5' AGGTCCAAGCTGCTCGAGTCTGG 3'), HC6 (5' AGGTCCAAGCTGCTCGAGTCAGG 3'), HC7 (5' AGGTCCAAGCTTCTCGAGTCTGG 3'), HC8 (5' AGGTCCAAGCTTCTCGAGTCAGG 3'); 鼠源 IgG2 $\alpha$  亚类抗体重链 3' 端引物: IgG2 $\alpha$ -3 (5' GTTCTGACTAGTGGGCACTCT 3')。预计扩增产物大小 660bp。

1.7.3 PCR 扩增: 采用 PCR Supermix 进行 PCR 扩增。对每个样品按照不同引物组合, 设置 15 个不同 PCR 反应。PCR 反应总体积 25 $\mu$ L, 组成如下: PCR supermix 22 $\mu$ L、5' 端引物 (LC1~LC7 或 HC1~HC7 其中之一) (20nmol/L) 1 $\mu$ L、3' 端引物 (ML $\kappa$  3' 或 IgG2 $\alpha$ -3) (20nmol/L) 1 $\mu$ L、cDNA 1 $\mu$ L。反应程序: 94 $^{\circ}$ C、2min, (94 $^{\circ}$ C、30s, 55 $^{\circ}$ C、30s, 72 $^{\circ}$ C、1min) x 40 循环, 72 $^{\circ}$ C、7min, 4 $^{\circ}$ C 或 -20 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶 (含 0.5-1 $\mu$ g/mL 溴化乙锭, EB) 进行电泳检测, 产物大小约为 660bp<sup>[11]</sup>。

#### 1.8 PCR 产物的纯化及测序

按试剂盒提供的操作手册凝胶纯化 PCR 产物, 电泳检测后, 以 30~60 ng 为模板, 以 ML $\kappa$ -3 或 IgG2 $\alpha$ -3 为引物进行测序反应, 乙醇沉淀、洗涤后, 用 ABI Prism 377 DNA 全自动测序仪进行序列测定。采用 Genamics Expression 1.1000 软件包进行序列分析、比较。

## 2 结果

### 2.1 噬菌体展示随机肽库的库容量评价

肽库噬菌体浓度为  $3 \times 10^{12}$  PFU /mL。随机挑选 20 个克隆的序列比对分析结果发现：20 个噬菌体克隆中有 2 个无插入序列，其余 18 个克隆展示的

12 肽序列各不相同，且序列与序列之间无相同(似) (或共有) 序列(表 1)。

表 1 淘选前后噬菌体展示序列及瘟病毒部分序列比较

Table 1 Peptide sequences displayed by phages before or after panning and comparison of partial sequences among the pestiviruses

Amino acid sequences of peptides displayed by random selected phages before panning	Amino acid sequences of peptides displayed by ELISA positive phages after 3 <sup>rd</sup> panning by mAb c2410		Amino acid sequences of peptides displayed by ELISA positive phages after 3 <sup>rd</sup> panning by mAb a18		Comparison of aa824-aa842** sequences of E2 protein between the pestiviruses		
	Peptides sequence motif	F <sup>#</sup>	Peptides sequence motif	F	Virus	Strain	aa824-aa842 sequences
IAQTHITGGDS*	<u>MC</u> <u>SPTAL</u> RCQAH	4/20	<u>MC</u> <u>SPTAL</u> RCQAH	1/20	CSFV	Bres	GVIECTAV <u>SPTTLR</u> TEVVK
AQPTHSVTEVRS	HL <u>SPTMLR</u> WEQF	2/20	EL <u>SPTNLR</u> RSFV	1/20		Ald	GVIECTAV <u>SPTTLR</u> TEVVK
LTGSPYTPLAAL	IHW <u>SPTMLR</u> RHQS	1/20	DMQYRS <u>SPTGL</u> ST	1/20		Wey	GVIECTAV <u>SPTTLR</u> TEVVK
YNVPPYLPSTAN	KALY <u>SPTNLR</u> RVQ	1/20	NPHS <u>SPTGL</u> KSV	1/20		ChinaC	GVIECTAV <u>SPTTLR</u> TEVVK
VTNAVWPQGAF	SIS <u>SPTS</u> LRWEY	1/20	SSWV <u>SPTGL</u> TRT	1/20			
QPSHPITHKTHK	FGINC <u>SPTYLR</u> C	1/20	LPTML <u>SPTGL</u> SR	1/20	BVDV	NADL	GTVSCTSFNMD <u>TL</u> ATTVVR
HTTSLKPESIIH	TKSQLP <u>SPTGLR</u>	1/20	FGT <u>SPTGL</u> KLAP	1/20		SD1	GTVSCMLANRD <u>TL</u> DTAVVR
QDQPWLTPPPAR	L <u>P</u> <u>SPTGLR</u> TNSW	1/20	LQ <u>SPTGL</u> TNYFL	1/20		C24V	GTVSCMLANRD <u>TL</u> DTAVVR
STNLILPPSNSG	HTVL <u>SPTGLR</u> YS	1/20	ATIS <u>SPTGL</u> VYQT	1/20			
TIHVGNKSKQTI	HYPM <u>SPTGL</u> SRW	1/20	VV <u>SPTGL</u> SKHAP	1/20			
KPPFSNPAFYLM	LQYKPL <u>SPTGLS</u>	1/20	<u>ISPTOL</u> YAQVRA	1/20	BDV	X8181	GRVECTTV <u>SKSTL</u> ATEVVK
LITPYKTGSMVM	AYS <u>SPTGL</u> VWHPG	1/20	EW <u>SPTKLL</u> WFHS	1/20			
QTNLIGTLGPVA	WW <u>SPTML</u> TQSKE	1/20	QGVF <u>SPTML</u> SYQ	1/20	Giraffe pestivirus	H138	GTIECTLVNTD <u>TL</u> ATTVVK
TQMNRSLPLLSA	ANLL <u>SPTRL</u> AAL	1/20	YTS <u>SPT</u> FPNFFLS	1/20			
ILNKQTSSTWFR	LPL <u>SPT</u> RTLHHP	1/20	IYTS <u>SPT</u> FPPTAH	1/20			
NTNHLARPAMIP	VPL <u>SPT</u> MEFMRK	1/20	<u>SPT</u> FPFLTSSAL	1/20			
HSEALTVAFNTR			YMS <u>SPT</u> -RVMTTQ	1/20			
TDELEAIVYPLL			KSYD <u>SPTQ</u> TAL	1/20	Reindeer pestivirus	V60 -Krefeld	GRVECTAV <u>STSTL</u> ATEVIK
			GAYK <u>SPT</u> GFLRG	1/20			
			HD <u>SPT</u> IRYVEAY	1/20			
	Consensus <u>SPTxLR</u>		Consensus <u>SPTxL</u>				CSFV Consensus <u>SPTTLR</u>

\*: Single letter codes are used for the amino acids; F<sup>#</sup>: F gives the frequency when the sequence was found in more than one clone; \*\*: CSFV E2 protein stars at the amino acid 690 of the predicted ORF; The highlighted and underlined areas were consensus sequence among the 12-mers peptides

2.2 单克隆抗体 c2410、a18 淘选结果

c2410、a18 第 3 轮淘选获得的噬菌体洗脱液，经稀释涂布培养后，随机挑选 96 个蚀斑增殖培养后，ELISA 鉴定结果均为阳性。挑选 20 个克隆分析其所展示的 12 肽序列，比对结果发现：c2410 淘选获得的 20 个克隆展示的 12 肽均含有 SPT 序列 (20/20)，其中 18 个克隆含有 SPTxL 序列 (18/20)，6 个克隆含有 SPTGL 序列 (6/20)，13 个克隆含有 SPTxLR 基序 (13/20)，其中 x 可为 G (甘氨酸)、A (丙氨酸)、M (蛋氨酸)、N (天冬酰胺)、S (丝氨酸)、R (精氨酸)、Y (酪氨酸)，没有规律性。有 4 个克隆序列完全相同，均为 (MCSPTALRCQ RH)。有 2 个克隆序列完全相同，均为 (HLSPTMLRWEQ) (表 1)。不同基序对单克隆抗体的亲合性存在差异。a18 淘选获得 20 个克隆也含有 SPT 序列 (20/20)，其中 13 个克隆含有 SPTxL 序列 (13/20)，8 个克隆含有 SPTGL 序列 (8/20)，2 个克隆含有 SPTxLR 基序 (2/20)，其中 x 可为 G (甘氨酸)、A (丙氨酸)、M (蛋氨酸)、N (天冬酰胺)、Q (谷氨酰胺)、K (赖氨酸)，没有规律性 (表 1)。不同基序对单克

隆抗体的亲合性存在差异。与 ELISA 结果对比分析发现：不同基序对单克隆抗体的亲合性，基本按 SPT→SPTxL→SPTxLR 顺序逐渐递增。分析 CSFV Alfort 毒株 E2 蛋白氨基酸序列发现：其 832-837 位氨基酸序列为 SPTTLR (表 1)，除第四位苏氨酸(T)外，与 c2410、a18 淘选肽库获得的共有基序 SPTxLR 一致。结果表明：E2 蛋白 832-837 位氨基酸序列构成一个线性表位，能被 c2410、a18 单克隆抗体特异性识别。

2.3 瘟病毒属不同分离毒株 E2 蛋白 824-841 位氨基酸序列比较

分析比较瘟病毒对应 824-841 位氨基酸序列发现：SPTTLR 基序在 CSFV 不同分离毒株中是高度保守和特异的，BVDV、BDV 对应区域的序列存在显著差异。在构成表位的氨基酸序列 SPTTLR 中，第四位、第五位氨基酸残基在瘟病毒中是保守的，均为 TL，BDV X8181 毒株、驯鹿瘟病毒 V60-Krefeld 毒株的第一位氨基酸残基也为 S，其余氨基酸残基及其组合均不相同 (表 1)。

2.4 噬菌体拟位 ELISA、免疫印迹分析

结果发现: 噬菌体外壳次要蛋白 (pIII) 展示的表 (拟) 位基序, 可与单克隆抗体发生特异性结合。单克隆抗体对不同表 (拟) 位基序的亲合性存在差异: c2410、a18 对仅含有 SPT 序列的拟位均呈弱阳性; c2410 对含有 SPTxLR 基序拟位的亲合性大于 a18 对其的亲合性, 而 a18 对仅含有 SPTxL (如 SPTGL) 基序拟位的亲合性大于 c2410 对其的亲合性; a18 对 2 个含有 SPTFP 基序的拟位呈强阳性, 而 c2410 且呈弱阳性 (部分结果见图 1)。ELISA 与免疫印迹结果一致。

2.5 细胞总 RNA 定量结果

自 c2410、a18 单克隆抗体杂交瘤细胞 (起始细胞数量  $3 \times 10^7$ ) 分别提取和纯化细胞总 RNA, 经紫外分光光度计定量, c2410、a18 总 RNA 浓度分别为: 235.1 $\mu$ g/mL、228.8 $\mu$ g/mL。

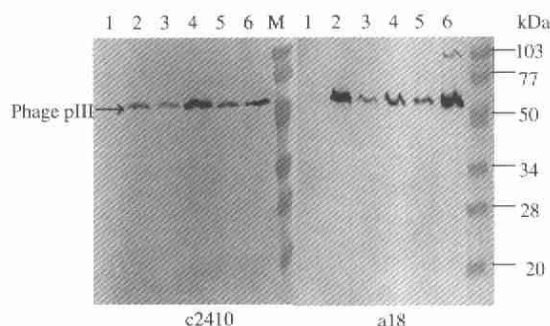


图 1 噬菌体拟位与 c2410、a18 单克隆抗体结合特性的免疫印迹分析

Fig.1 Analysis of binding reactivities between phage mimotopes to the MAbs, c2410 and a18 by western blot

1, Phage01 (Negative control, mimotope motif: AQSYPDPQTLK); 2, Phage02 (YTSPTFPNFFLS); 3, Phage03 (LPLSPTRTLHHP); 4, Phage04 (HLSPTMLRWEQF); 5, Phage05 (VPLSPTMEFMRK); 6, Phage06 (VVSPTGLSKHAP). M: Prestained protein molecular weight standards (from top band to the bottom band (kDa): 103, 77, 50, 34, 28, 20, Bio-Red)

A	
c2410LC	CCCCCCCCCAAATGTGAGCTCGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCCTGCCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCACCTC 80
a18LC	CCCCCCCCCAAATGTGAGCTCGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCCTGCCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCACCTC 80
c2410LC	TTGCAGATGTAGTCAGAGCTGTTGTACGCAGTAAATGGAAACACCAATTTACATTGGTACCTGCAGAAAGCCAGGCCAGTCTC 160
a18LC	TTGCAGATCCAGTCAGAGCCTGTGATACAGTAAATGGAAACACCAATTTACATTGGTACCTGCAGAAAGCCAGGCCAGTCTC 160
c2410LC	CAAAACTCCTGATCTATAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGAT 240
a18LC	CAAAACTCCTGATCTATAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGAT 240
c2410LC	TTCACTCAAGATCAACAGAGTCGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAAGTACACATGTTCCGTACAC 320
a18LC	TTCACTCAAGATCAACAGAGTCGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAAGTACACATGTTCCGTACAC 320
c2410LC	GTTCGGAGGGGGACCAAGCTGGAATAAAACGGGCT 357
a18LC	GTTCGGAGGGGGACCAAGCTGGAATAAAACGGGCT 357
B	
c2410HC	CAGGTCCAGCTGCAGCAGTPTTTTGTACCTTCGTGTGACCGCTGGGGCTTCAGTGTTCGCTGTCTGCAGGGCTTCGGGCTA 80
a18HC	CAGGTCCAGCTGCAGCAGTPTTTTGTGACCTTCGTGTGACCGCTGGGGCTTCAGTGTTCGCTGTCTGCAGGGCTTCGGGCTA 80
c2410HC	CACATTTACTGACATGAAATGCACCTGGGTGAAGCAAAACCTGTGCGTGGCTGGAATGGATTGAACTATTATCCTG 160
a18HC	CACATTTACTGACATGAAATGCACCTGGGTGAAGCAAAACCTGTGCGTGGCTGGAATGGATTGCCCTTTTATCCTG 160
c2410HC	AACTGGGGGTTCGGCTACAATCAAAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGCACAAACAAATTTCCAGCATAGCCTAC 240
a18HC	AACTGGGGGTACTGGCTACAATCAAAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGCACAAACAAATTTCCAGCATAGCCTAC 240
c2410HC	ATGGAAGTCCGCACCCCTGACATCTGAGGACTCTGCCGTTTATTACTGCACAAAAAATTAAGTTGCCGGTGGTATATGC 320
a18HC	ATGGAAGTCCGCACCCCTGACATCTGCCGACTCTGCCGTTTATTACTGCACAAAAAATTAAGTTGCCGGTGGTATATGC 320
c2410HC	TATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTTTCC 360
a18HC	TATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTTTCC 360
C	
c2410LC	PPPKCELVMTQTPLSLPVSLSLGDQASISCRCSQSQSVVRSNGNTNLH <sup>W</sup> Y <sup>L</sup> QKPGQSPKLLI <sup>Y</sup> KVSNRFS <sup>G</sup> V <sup>P</sup> DRFSGSGSGTD 80
a18LC	PPPKCELVMTQTPLSLPVSLSLGDQASISCRSSQSLVYSNGNTHL <sup>H</sup> W <sup>Y</sup> LQKPGQSPKLLI <sup>Y</sup> KISNRF <sup>S</sup> G <sup>V</sup> PDRFSGSGSGTD 80
c2410LC	FTLKI <sup>T</sup> RVEAEDLG <sup>V</sup> YFC <sup>S</sup> QSTHVPY <sup>T</sup> FGGGTKLEIKRA 119
a18LC	FTLKI <sup>S</sup> RVBAEDLG <sup>V</sup> YFC <sup>S</sup> QSTHVPY <sup>T</sup> FGGGTKLEIKRA 119
D	
c2410HC	QVQLQQFFDL <sup>L</sup> WTPGASVSLSCRAS <sup>G</sup> YTF <sup>T</sup> DIEMH <sup>W</sup> VVKQTPV <sup>R</sup> GLEWIE <sup>P</sup> IY <sup>P</sup> ETGGS <sup>A</sup> YNQKFKGKATLTANKFSS <sup>T</sup> AY 80
a18HC	QVQLQQFFAEL <sup>L</sup> WTPGASMTLSCRAS <sup>G</sup> YTF <sup>S</sup> DC <sup>E</sup> IH <sup>W</sup> VVKQTPV <sup>R</sup> GLEWIE <sup>P</sup> PFY <sup>P</sup> ETGGS <sup>A</sup> YNQKFKGKATLTANKFSS <sup>I</sup> AY 80
c2410HC	MEV <sup>R</sup> TLT <sup>S</sup> EDSAVYYCTK <sup>N</sup> YCGV <sup>V</sup> YAM <sup>D</sup> YWGQ <sup>T</sup> SVT <sup>V</sup> S 129
a18HC	MEV <sup>R</sup> TLT <sup>S</sup> ADSAVYYCTK <sup>N</sup> YCFV <sup>G</sup> YAM <sup>D</sup> YWGQ <sup>T</sup> SVT <sup>V</sup> S 129

图 2 c2410、a18 单克隆抗体轻链及重链可变区 cDNA 序列比较

Fig. 2 Comparison of cDNA sequences of variable regions of light and heavy chains between MAbs, c2410 and a18

A, The cDNA nucleotide sequences of light chain variable regions; B, The cDNA nucleotide sequences of heavy chain variable regions; C, The deduced amino acid sequences of light chain variable regions; D, The deduced amino acid sequences of heavy chain variable regions. The differences between the two MAbs were high lighted. CDRs were labeled according to the Kabat scheme.

## 2.6 RT-PCR 扩增及产物纯化

引物对 LC5、ML $\kappa$ -3 和 LC7、ML $\kappa$ -3 对 c2410、a18 单克隆抗体轻链可变区 cDNA 扩增结果均为强阳性, 引物对 HC4、IgG2 $\alpha$ -3 对重链可变区 cDNA 扩增结果均为强阳性, 引物对 LC4、ML $\kappa$ -3 或 HC5、IgG2 $\alpha$ -3 对轻链或重链可变区 cDNA 扩增结果为弱阳性, 产物大小约为 660bp。其余引物对扩增结果均为阴性。PCR 产物经凝胶纯化后, 电泳检测获得单一 DNA 电泳带。

## 2.7 可变区 cDNA 序列分析

在 a18、c2410 轻链可变区 cDNA 核酸序列中有 14 个核苷酸存在差异, 推导氨基酸序列中有 6 个氨基酸存在差异, 其中 5 个氨基酸位于轻链可变区内的互补决定区 (CDR), CDR1 有 4 个氨基酸存在差异, CDR2 有 1 个氨基酸存在差异, 而 CDR3 完全相同。不同核苷酸或氨基酸残基用阴影部标识 (图 2A, 图 2C)。

在 a18、c2410 重链可变区 cDNA 核酸序列中有 26 个核苷酸存在差异, 推导氨基酸序列中有 15 个氨基酸存在差异, 其中 7 个氨基酸位于重链可变区内的互补决定区 (CDR), CDR1 有 3 个氨基酸存在差异, CDR2、CDR3 均有 2 个氨基酸存在差异。不同核苷酸或氨基酸残基用阴影部标识 (图 2B, 图 2D)。

## 3 讨论

目前关于 CSFV 表位的研究报告, 大多采用的研究方法是筛选或构建病毒单克隆抗体逃逸株, 分析其基因序列差异并以此间接推测抗原表位分布区域及构成表位的关键性氨基酸残基, 由于研究思路和试验方法的局限性, 难以或无法对表位基序进行精确定位分析。此领域的最新进展是加拿大科学家 Lin M 等, 2000 年 12 月报道获得能被 WH303 单克隆抗体识别的表位----TAVSPTTLR (829-837 位氨基酸)<sup>[6]</sup>, 但未对构成表位的九个氨基酸残基的功能作进一步研究。

噬菌体表面展示肽库为分子病毒学研究及常规实验室诊断技术、新药及疫苗开发提供有效的手段和工具。库容量 (包容不同 12 肽序列的噬菌体数量) 是评价肽库优劣的关键性技术指标, 采用大库容量肽库, 最大限度的模拟所有可能的表位基序, 是采用抗体经生物淘选进行表位分析成功的首要条件。自肽库随机挑选 20 个噬菌体克隆, 其所展示的 12 肽序列各不相同, 未发现任何共有 (或相似) 序列, 表明噬菌体展示的 12 肽序列有很高

的随机性, 肽库具有较大的库容量。

单克隆抗体淘选肽库获得的 ELISA 阳性噬菌体, 所展示的 12 肽序列分析比对结果表明: c2410、a18 特异性地识别 SPTxLR 基序 (表 1)。ELISA 和免疫印迹结果发现: 噬菌体展示的表(拟)位基序与单克隆抗体发生特异性结合; 不同基序对单克隆抗体的亲合性存在差异, 基本按 SPT→SPTxL→SPTxLR 顺序逐渐递增。结果提示: 在 c2410、a18 识别的 SPTxLR 基序中, 最为关键性的氨基酸为第 1-3 位的 SPT, 其次为第 5 位的 L, 再次为第 6 位的 R, 而第 4 位氨基酸可为 G、A、S、M、N、R、Y、Q 或 K, 没有规律性, 为抗体识别的非必需氨基酸位点。CSFV E2 蛋白的 832-837 位氨基酸序列为 SPTTLR, 除第四位苏氨酸 (T) 外, 与 c2410、a18 淘选肽库获得的共有序列 SPTxLR 一致。此序列在 CSFV 分离毒株中是高度保守和特异的, BVDV、BDV 对应区域的序列存在显著差异 (表 1), 并且单克隆抗体与噬菌体表 (拟) 位基序的结合能被病毒天然抗原特异性抑制或阻断<sup>[11]</sup>。以上研究表明: E2 蛋白的 832-837 位氨基酸残基构成 CSFV 特异性线性表位, 第 1-3 位的 SPT 是构成表位的关键性氨基酸残基, 第 5 位的 L, 第 6 位决定表位与抗体的高亲合性结合。与 van Rijn<sup>[2-4]</sup>, Lin M<sup>[6]</sup>及 Kosmidou A<sup>[9]</sup>报道结果是吻合的, 且在 Lin M<sup>[6]</sup> 所报道 829-837 位氨基酸 (TAVSPTTLR) 基序中, 829-831 位氨基酸 (TAV) 及 835 位氨基酸 (T) 不是构成表位的关键性或必需氨基酸。

c2410、a18 淘选获得阳性噬菌体, 所展示的 12 肽序列比对结果存在差异: 在相同试验条件下, c2410 淘选获得含有 SPTxL 和 SPTxLR 基序克隆的比例 (18/20、13/20) 大于 a18 淘选比例 (13/20、2/20), 而 a18 淘选获得含有 SPTGL 基序克隆在含有 SPTxL 基序克隆中的比例 (8/13) 大于 c2410 淘选比例 (6/18) (表 1)。在 ELISA 和免疫印迹分析中, c2410、a18 对含有 SPTFP、SPTxL 及 SPTxLR 基序克隆的亲合性存在差异 (图 1)。结果提示: 构成表位的第 6 位精氨酸 (R) 决定表位与 c2410 之间的高亲合性结合, 而对 a18 则不然; c2410 识别的表位基序包容 a18 识别的表位基序; c2410 和 a18 虽然来源于同一批次融合的杂交瘤细胞系, 识别同一表位, 但可能属于不同的单克隆抗体。

c2410 轻链可变区的互补决定区 (CDR1-CDR3) 氨基酸序列为: RCSQS $\nu$ VRSNGNTNLH、YK $\nu$ SN RFS、SQSTHVPYT, a18 轻链可变区的 CDR1-CDR3

氨基酸序列分别为: RSSQSLVYSNGNTHLH、YKISNRFS、SQSTHVPYT。二者 CDR1 中 16 个氨基酸, 4 个存在差异, CDR2 中的 7 个氨基酸, 1 个存在差异, CDR3 完全相同。c2410 重链可变区的 CDR1-CDR3 氨基酸序列分别为: GYTFIDIEMH、PIYPETGGSA、NYGCGVYAMD, a18 重链可变区 CDR1-CDR3 氨基酸序列分别为: GYTFSDCEIH、PFYPETGGTA、NYGCPVGYAMD。二者 CDR1 中 10 个氨基酸, 3 个存在差异, CDR2 中的 10 个氨基酸, 2 个存在差异, CDR3 中的 11 个氨基酸, 2 个存在差异。结果表明: c2410 和 a18 属于不同的单克隆抗体。鉴于在抗原抗体反应中, 抗体轻链中的 CDR3 全部氨基酸可能都参与抗原结合, 而 CDR1 和 CDR2 仅有部分氨基酸参与抗原结合。虽然 c2410 与 a18 的 CDR1、CDR2 氨基酸序列存在差异, 由于其轻链 CDR3 完全相同、重链 CDR3 有 2 个氨基酸存在差异, 导致其表现的生物学及免疫学特性基本相同。研究结果提示: 同一表位在动物体内诱导产生的单克隆抗体不是唯一的(也就是说针对同一表位的单克隆抗体不是唯一的), 或 CSFV SPTTLR 基序构成 2 个或 2 个以上重叠表位。有待进一步研究分析。

**致谢:** 本研究得到澳大利亚动物卫生实验室(AAHL) 王林发博士和郁萌博士的协助和指导, 谨致谢意!

## 参考文献

- [1] Becher P, Avalos Ramirez R, Orlich M, *et al.* Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification[J]. *Virology*, 2003, 311(1): 96-104.
- [2] van Rijn P A, van Gennip R G P, de Meijer E J, *et al.* A preliminary map of epitopes on envelope glycoprotein E1 of HCV strain Brescia[J]. *Vet. Microbiol*, 1992, 33: 221-230.
- [3] van Rijn P A, Miedema G K W, Wensvoort G, *et al.* Antigenic structure of envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus[J]. *J Virol*, 1994, 68: 3934-3942.
- [4] van Rijn P A, Bossers A, Wensvoort G, *et al.* Classical swine fever virus (CSFV) envelope glycoprotein E2 containing one structural antigenic unit protects pigs from lethal CSFV challenge[J]. *J Gen Virol*, 1996, 77 ( Pt 11): 2737-2745.
- [5] Yu M, Wang L F, Shiell B J, *et al.* Fine mapping of a C-terminal linear epitope highly conserved among the major envelope glycoprotein E2 (gp51 to gp54) of different pestiviruses[J]. *Virology*, 1996, 222: 289-292.
- [6] Lin M, Lin F, Mallory M, *et al.* Deletions of structural glycoprotein E2 of classical swine fever virus strain Alfort/187 resolve a linear epitope of monoclonal antibody WH303 and the minimal N-terminal domain essential for binding immunoglobulin G antibodies of a pig hyperimmune serum[J]. *J Virol*, 2000, 74 ( 24): 11619 - 11625.
- [7] Christmann A, Wentzel A, Meyers G, *et al.* Epitope mapping and affinity purification of monospecific antibodies by Escherichia coli cell surface display of gene-derived random peptide libraries [J]. *J Immunol Methods*, 2001, 257 ( 1-2): 163 - 173.
- [8] Armengol E, Wiesmuller K H, Wienhold D, *et al.* Identification of T-cell epitopes in the structural and non-structural proteins of classical swine fever virus [J]. *J Gen Virol*, 2002, 83: 551-560.
- [9] Kosmidou A, Kosmidou A, Ahl R, *et al.* Differentiation of classical swine fever virus (CSFV) strains using monoclonal antibodies against structural glycoproteins[J]. *Vet Microbiol*. 1995, 47(1-2): 111-118.
- [10] Rowley M J, Seealy M, Whisstock J C, *et al.* Prediction of the immunodominant epitope of the pyruvate dehydrogenase complex E2 in primary biliary cirrhosis using phage display[J]. *J Immunol*. 2000, 15, 164(6): 3413-3419.
- [11] 张富强. 应用噬菌体展示技术进行猪瘟病毒结构糖蛋白 E2 和 E<sup>m</sup> 中和抗原表位鉴定和比较[D]. 吉林长春: 中国人民解放军军需大学, 2002.
- [12] Walker J, Banting G. Production of phage-display antibodies for epitope mapping [M]. *Methods in molecular biology*, vol. 66: Epitope mapping protocols. Humana press Inc., Totowa, NJ, 1996. 391-405.