

SARS-CoV N 蛋白抗原表位的筛选和鉴定*

黄欣¹, 高亚萍¹, 王希良², 辛忠涛¹, 董洁¹, 邵宁生¹, 柳川^{1**}

(1. 军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850; 2. 军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京 100071)

Screening and Identification of the SARS-CoV N Protein Epitopes

HUANG Xin¹, GAO Ya-ping¹, WANG Xi-liang², XIN Zhong-tao¹,
DONG Jie¹, SHAO Ning-sheng¹, LIU Chuan^{1**}

(1. Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China; 2. Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

Abstract: The epitopes of SARS-CoV were screened from a 12-mer phage display random peptide library using anti-SARS-CoV horse polyclonal antibodies as a target. The phage clones enriched in biopannings were sequenced. Two consensus sequences were obtained, DXXDP and TXTLL, which had close identity to the 341-345 aa and 392-396 aa of SARS-CoV N protein sequences, respectively. The phage clones with consensus sequences and the N protein were both recognized and bound by the antibodies in a competitive-inhibition ELISA test. The consensus sequence peptides were cloned and displayed on the bacterial flagellin. Balb/c mice were vaccinated using the reconstructed bacteria and the collected serum was shown to specifically combined with SARS-CoV N protein. This confirmed that DXXDP and TXTLL are two continuous epitopes of SARS-CoV N protein.

Key words: SARS-CoV; N protein; Phage display; Epitope

摘要: 利用噬菌体展示的线性 12 肽库从马抗 SARS-CoV IgG 筛选 SARS-CoV 的抗原表位。经生物淘洗富集的噬菌体克隆被测序。获得两个共有序列: DXXDP 和 TXTLL。它们分别与 SARS-CoV N 蛋白 341-345 和 392-396 位氨基酸序列高度同源。含共有序列的克隆在 ELISA 竞争抑制试验中与 SARS-CoV N 蛋白竞争结合马抗 SARS-CoV IgG。将两个共有序列肽通过基因重组技术成功展示到大肠杆菌鞭毛, 获得重组菌 F1 和 F2。用重组菌 F1 和 F2 免疫接种试验 Balb/c 小鼠产生的血清均能与 SARS-CoV N 蛋白特异结合。说明 DXXDP 和 TXTLL 是 SARS-CoV N 蛋白的两个连续抗原表位。

关键词: SARS-CoV; N 蛋白; 噬菌体展示; 抗原表位

中图分类号: R373

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2006)04-0314-05

SARS-CoV 为正义单链 RNA 病毒, 全长 29727 核苷酸, 含 11 个开放阅读框。其基因组 5'端约 2/3 的区域编码病毒复制酶复合蛋白, 后 1/3 区域编码病毒的结构蛋白, 分别为 S 蛋白(spike protein), E 蛋白(envelope protein), M 蛋白(membrane protein) 和 N 蛋白(nucleocapsid protein)^[1-3]。动物实验和临床观察表明: 其中 N 蛋白具有较强的免疫原性^[4, 5]。N 蛋白抗体的血清学检测已成为 SARS-CoV 感染的重要临床检测方法之一。但是目前对 SARS-CoV N 蛋

白的抗原表位分布和特性的研究主要来自生物信息学软件的分析 and 合成寡肽片段的一些工作, 这类研究主要是依据 N 蛋白的 442 个氨基酸残基的多肽链序列和构成为基础。本工作利用噬菌体展示的随机肽库从马抗 SARS-CoV IgG 中筛选和鉴定 N 蛋白的抗原表位。这种表位研究却是以哺乳动物免疫系统和天然 N 蛋白相互作用为基础的。获得的抗原表位将有助于对临床 SARS-CoV N 蛋白血清学反应的了解和认识。

收稿日期: 2005-12-05, 修回日期: 2006-01-10

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30340024)

作者简介: 黄欣(1978-), 女, 湖南长沙籍, 博士生, 研究专业为分子生物学和细胞生物学。

** 通讯作者. Corresponding author. Tel: 010-66932313, Email: liuchuan777@hotmail.com

1 材料和方法

1.1 实验材料

噬菌体表面衣壳蛋白 III 展示的 12 肽库 (Ph.D.-12 Phage Peptide Library) 试剂盒购自美国 New England Biolabs 公司。肽库的滴度 2×10^{13} pfu/mL, 随机多样性 3.7×10^9 ; 受体菌 E.coli ER2738 基因型为 F⁺lac^q Δ(lacZ)M15ZZf: Tn10(Tet^R) proA⁺B⁺fhuA2 supE thi Δ(lac-proAB) Δ(hsdMS-mcrB)5(rk⁻mk⁻McrBC⁻)。DNA 全自动测序引物 (-96gIII sequencing primer): CCCTCATAGTTAGCG TAACG。马抗 SARS-CoV IgG 由王希良教授提供。原核表达 SARS-CoV N 蛋白由本院放射医学研究所王升启教授馈赠。质粒 pFliTrx 和宿主菌 GI826 (F⁻, lacI^q, ampC⁺: P_{trp}cl, ΔfliC, ΔmotB, eda⁺: Tn10) 购自美国 Invitrogen 公司。HRP 标记抗 M13 噬菌体 IgG 购自瑞典 Pharmacia 公司。

1.2 噬菌体随机肽库的筛选

实验操作按试剂盒指导手册进行, 简述如下。实验孔包被马抗 SARS-CoV IgG, 10 μg/100 μL/孔; 阴性对照孔等量包被正常马血清 IgG。经过封闭、噬菌体结合、清洗、洗脱、中和、噬菌体滴度测定和扩增完成一轮生物淘洗。将扩增后的实验孔洗脱噬菌体投入下一轮生物淘洗。实验孔和对照孔洗脱液滴度测定的比值记作 P/N。当 P/N 大于 50 时, 表明结合噬菌体获得明显富集, 终止生物淘洗。挑取噬菌体单克隆扩增进行 ELISA 分析, 阳性者提取单链 DNA 测序。

1.3 富集噬菌体克隆的 ELISA 分析及测序

按常规 ELISA 方法操作, 简述如下。包被马抗 SARS-CoV IgG, 5 μg/100 μL/孔, 4°C 过夜; 5% 脱脂奶粉封闭, 37°C 1h; 洗涤后加入扩增的富集噬菌体克隆 (10^9 pfu/mL) 100 μL/孔, 37°C 1h; 洗涤后加入 1:5000 稀释的 HRP 标记抗 M13 噬菌体 IgG, 100 μL/孔, 37°C 30min; 然后 TMB 底物显色系统显色, 终止后测定 OD₄₅₀ 值。对照孔结合时加入等量扩增的原库克隆。

按试剂盒指导手册介绍的碘化钠法提取噬菌体单链 DNA, 用 M13 反向-96 位测序引物在 DNA 自动测序仪上完成测序。

1.4 共有序列肽的竞争 ELISA 分析

包被、封闭同 1.3, 洗涤后加入含共有序列的噬菌体克隆 (10^9 pfu/mL) 和不同浓度的 N 蛋白(0、1、3、9 μg/mL), 100 μL/孔, 37°C 1h。后续步骤同 1.3 对照为等量不含共有序列的无关噬菌体克隆。

1.5 展示共有序列肽重组质粒的构建与表达

合成两条带有相应酶切粘末端的编码共有序列 FDAYDPTPSRWS 和 FSKDMSSTLLS 的 DNA 片段及其互补片段, 分别对应退火后插入 FliTriX 载体多克隆位点 Apa I 和 Xho I 区间。重组质粒电转化感受态 GI826 宿主菌, 电转参数为: 0.2mm 电转杯; 25 μF、2.5kV、200 Ω; 电击 4ms。重组克隆扩增后, 提取质粒酶切和测序鉴定。分别获得阳性菌 F1 和 F2, 以及同样条件下空质粒转化菌 F0。重组菌培养过夜后色氨酸 (100 μg/mL) 诱导表达 6h 收集菌液。超声破碎后取上清作常规 SDS-PAGE 分析。

1.6 展示共有序列肽重组菌的动物免疫试验

4 周龄的 Balb/c 鼠, 18 只, 随机分为 3 组, 6 只/组。对照组用空质粒转化的诱导表达菌 F0 免疫; 实验组分别用 F1、F2 诱导表达菌免疫动物。均采用腹腔注射接种, 首次量 2×10^8 cell/只, 三周后加强, 剂量减半。加强两次后 7 天采血, 取血清进行常规 ELISA 和 Western-blot 分析。ELISA 试验中各血清 1:200 稀释; Western-blot 试验中选 ELISA 效价高的血清 1:100 稀释。

2 结果

2.1 噬菌体克隆的富集与 ELISA 分析

通过三轮生物淘洗, P/N 值已大于 200, 表明抗体结合噬菌体克隆已被富集, 见图 1。从第三轮富集的噬菌体中随机挑取噬菌斑, 分别扩增后检测与多抗的结合。以正常马 IgG 为对照, 数值均为两平行孔的平均值。部分 ELISA 结果见图 2。OD₄₅₀ 值大于对照值 2 倍以上者判定为阳性。共挑取 67 个克隆, ELISA 结果显示 55 个为阳性。遂提取阳性克隆单链 DNA 进行测序。

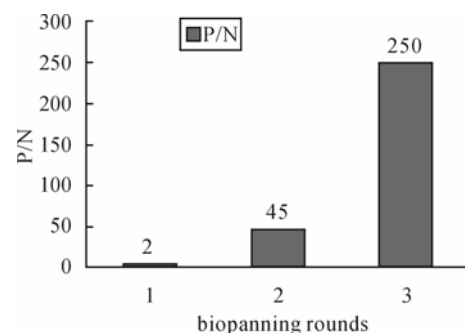


图 1 噬菌体克隆的富集

Fig.1 Enrichment of the phage clones

P/N: titer of the phages eluted from test well/titer of the phages eluted from negative well

2.2 测序结果提示可能获得 N 蛋白连续表位

测序共获得 46 个阳性克隆序列, 经对照比较

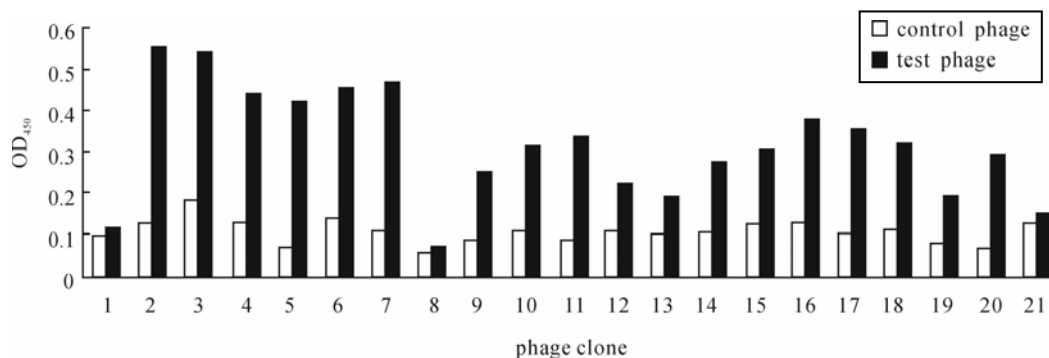


图 2 富集噬菌体克隆的 ELISA
Fig.2 ELISA of the enriched phage clones
Test phage: enriched phage clones in biopanning; control phage: M13 phage

得到两组共有序列，分别为：DAXDP 和 SXTLL，见表 1、表 2。将共有序列与 GeneBank 中已公布的 N 蛋白序列作对比分析发现：共有序列分别与 N 蛋白 341-345 位：DDKDP 和 392-396 位：TVTLL 氨基酸高度同源。因为在表位肽序列中氨基酸残基的理化性质及空间结构相似功能也相似，通常认为 D 与 N、S 与 T 为可替换氨基酸残基。序列分析显示两个共有序列可能分别是两个 N 蛋白连续表位。它们的氨基酸序列为 DXXDP 和 TXTLL。

表 1 富集噬菌体克隆的共有序列 I

Table1 The consensus sequences I of enriched phage clones

Sequencing Results	Appearance Frequency
WDAVDPSPTLLG	2
WDAYDPEQEMSV	3
SDAYDPSVPRSW	1
SDAFDPWERSMK	2
QDAYDPYGRSYR	3
YNAHDPSPSFSL	3
HDAHDPTELRN	1

Consensus sequence I: D(N)AXDP (X is an optional amino acid residue). Sequencing results clearly show that all of the 15 sequences contain the consensus elements, D(N)AXDP(highlight). It is high homological with the 341-345 residues of SARS-CoV N protein.

表 2 富集噬菌体克隆的共有序列 II

Table2 The consensus sequences II of enriched phage clones

Sequencing Results	Appearance Frequency
WDAVDPSPTLLG	2
FSFKDMSSTLLS	3
FYSPPRFSENTLL	1

Consensus sequence II: SXTLL (X is an optional amino acid residue). Sequencing results clearly show that all of the 6 sequences contain the consensus elements, SXTLL(highlight). It was high homological with the 392-396 residues of SARS-CoV N protein.

2.3 共有序列肽与 N 蛋白竞争结合马抗 SARS-CoV IgG

选择测序结果中出现频率较高、ELISA 结果显示亲和力较高的两个分别含有序列 FDAYDPTPSR

WS 和 FSFKDMSSTLLS 的噬菌体克隆。N 蛋白浓度选择 0、1、3、9 μ g/mL。平行孔 OD₄₅₀ 均值作图，见图 3。竞争抑制试验观察到：随着 N 蛋白浓度的增加两个噬菌体克隆均与 SARS 多抗的结合明显减弱，而无关噬菌体不存在这种剂量依赖性的结合改变。提示两个共有序列分别与 N 蛋白竞争结合 SARS 多抗，进一步证明它们可能是 N 蛋白的两个抗原表位。

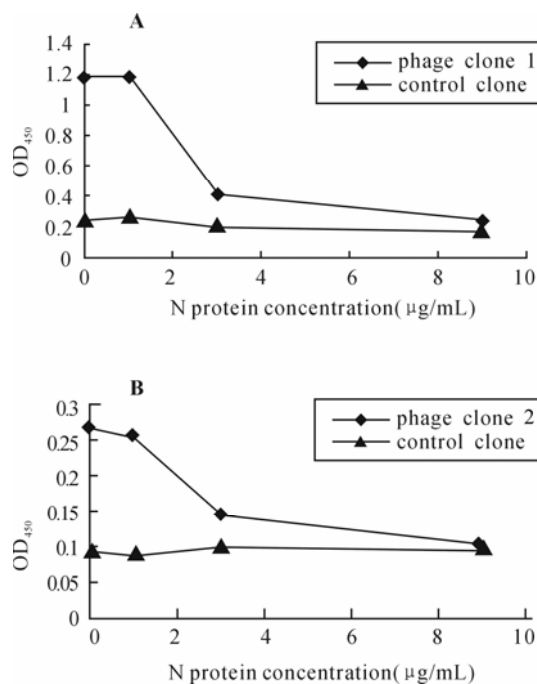


图 3 噬菌体克隆的竞争抑制试验

Fig.3 Competitive inhibition assay of the phages
phage clone1: clone of displaying FDAYDPTPSRWS sequence in N terminal of pIII proteins; phage clone2: clone of displaying FSFKDMSSTLLS sequence in N terminal of pIII proteins; control clone: M13 phage

2.4 成功获得鞭毛展示共有序列肽的重组菌

两个重组质粒经酶切和测序证实插入正确。色氨酸诱导表达的两个重组菌菌液上清的电泳图见

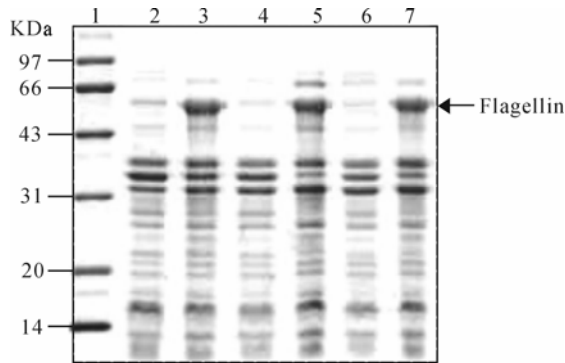


图4 重组菌诱导表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig.4 SDS-PAGE of induced expression of the recombinant bacteria

Lane 1, Protein maker; 2/4/6, Non-induced bacteria F0,F1,F2; 3/5/7, Induced bacteria F0, F1 and F2. (Bacteria F0 had no any external sequence; F1 displayed an external FDAYDPTPSRWS sequence in flagellin; F2 displayed an external FSFKDMSSTLLS sequence in flagellin.)

图 4。电泳结果表明：诱导后鞭毛蛋白获得高效表达。进一步的 ELISA 检测结果显示两个重组菌 F1、F2 均与 SARS 多抗结合，提示共有序列在重组菌鞭毛上得到展示。

2.5 免疫接种动物血清特异识别、结合 N 蛋白

采集免疫动物血清进行 ELISA 分析。血清样品共 4 组：F1、F2、F0 和正常未免疫接种的 Balb/c 鼠血清 C。结果表明：重组菌 F1、F2 免疫血清与 SARS-CoV N 蛋白结合的 OD_{450} 值明显高于 F0 和 C 组，见图 5。F1、F2 值分别与 F0 经统计学成组 T 检验比较，结果分别为差别非常显著 ($P < 0.01$) 和差别显著 ($P < 0.05$)。说明将共有序列肽构建免疫原接种动物产生的抗体可以特异识别和结合 N 蛋白。Western-blot 结果表明两种血清均能识别和结合 SDS-PAGE 电泳后膜转移状态下的 N 蛋白，而不能识别和结合同样状态的无关蛋白，见图 6。进一步证明：两个共有序列分别是 SARS-CoV N 蛋白上的两个连续性抗原表位。

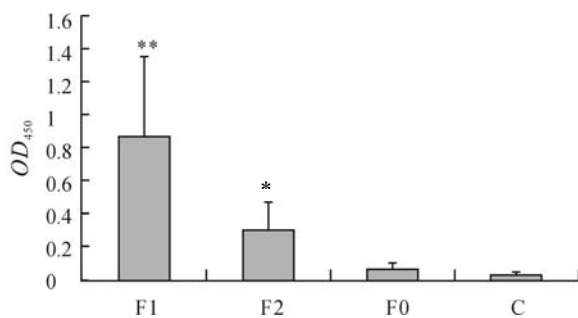


图5 免疫鼠血清与 N 蛋白的 ELISA 分析

Fig.5 ELISA of the immunized mice serum and N protein
F1: F1 immune serum; F2: F2 immune serum; F0: F0 immune serum; C: normal mice serum * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 6$.

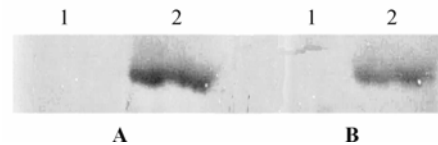


图6 免疫鼠血清与 N 蛋白的 Western-blot 分析

Fig.6 Western-blot of the immunized mice serum and N protein

A: F1 immune serum; B: F2 immune serum. Lane 1: control protein (bovine serum albumin); 2: N protein.

3 讨论

本工作利用噬菌体展示随机肽库从马抗 SARS-CoV IgG 筛选获得富集克隆的两个共有序列：DXXDP 和 TXTLL。经序列对比、与 N 蛋白的竞争抑制试验和构建免疫原接种动物实验等证明它们确实是 SARS-CoV N 蛋白的两个抗原表位，而且均是连续表位。因为它们的共有氨基酸序列在 N 蛋白一级结构中是连续排列的；用它们构建的免疫原接种动物产生的抗体在 Western-blot 分析中结合线性的 N 蛋白。两个表位分别位于 N 蛋白序列的 341-345 和 392-396 位，均在近羧基端。这一结果与文献^[6-8]报道的 N 蛋白主要抗原表位可能位于接近羧基端的区段相一致。

实验的初衷希望也获得其它 SARS-CoV 结构蛋白尤其是 S 蛋白的抗原表位，但是反复多次筛选未能如愿。大多数情况下，总是富集到基本相同的序列。在抗原表位筛选中，靶分子为单克隆抗体还是多克隆抗体难度明显不同。前者的抗原抗体反应是单一性的，亲和力一致，较易获得噬菌体克隆的富集；后者不同，可能存在多达几十种抗体，它们各自与抗原的亲和力不同、在血清中的含量也不同，较难获得噬菌体克隆的富集。其富集过程可能存在潜在的规律。上述结果提示：在从多克隆抗体筛选抗原表位时可能处于优势的抗原表位总是优先被富集。因此处于劣势的抗原表位很难获得富集。N 蛋白的抗原表位比其它结构蛋白的处于优势，或者说在抗 SARS-CoV 多克隆抗体中抗 N 蛋白的抗体占有优势，所以在亲和筛选中总是获得 N 蛋白抗原表位也就不足为奇了。起初也认为可能会获得 N 蛋白的非连续表位，但是同样未能如愿。合理的解释应该是：所用的多克隆抗体中上述两个连续表位相对其它表位，包括非连续表位处于优势地位。以上分析说明：在从多抗筛选抗原表位的工作中多抗的质量或各克隆抗体的亲和力高低、含量的多寡是影响筛选结果的重要因素。

虽然马是哺乳动物，但是它们对 SARS-CoV 的

免疫反应可能与人存在一定差别。DXXDP 和 TXTLL 是否也是感染病人血清中抗体所识别的 N 蛋白表位, 需要收集病人血清作进一步的实验验证。

致谢: 本工作曾获得军事医学科学院微生物流行病学研究所祝庆余教授、放射医学研究所王升启教授的热情支持和无私帮助, 在此表示衷心感谢。

References

- [1] Huang P T, Wang H G (黄培堂, 王宏广). Severe Acute Respiratory Syndrome (严重急性呼吸系统综合症) [M]. Beijing: Military Medical Science Press, 2003, p35-76.
- [2] He F C, (贺福初). Severe Acute Respiratory Syndrome (严重急性呼吸系统综合症) [M]. Beijing: Science Press, 2003, p72-85.
- [3] Kvsiazek T G, Erdman D, Goldsmith C S, *et al.* A novel Coronavirus Associated with Severe Acute Respiratory Syndrome [J]. N Eng J Med, 2003, 348: 1947-1957.
- [4] Mau-sun Chang, Yen-ta Lu, Shin-tsung Ho, *et al.* Antibodies detection of SARS-CoV spike and nucleocapsid protein [J]. BBRC, 2004, 314: 931-936.
- [5] Zhao P, Cao J, Zhao L J, *et al.* Immune responses against SARS-coronavirus nucleocapsid protein induced by DNA vaccine [J]. Virology, 2005, 86: 211-215.
- [6] Guozhen Liu, Shaohui Hu, Yongwu Hu, *et al.* The C-Terminal Portion of the Nucleocapsid Protein Demonstrates SARS-CoV Antigenicity [J]. Geno., Prot. & Bioinfo, 2003, 1: 193-197.
- [7] Qiu L W, Pan Y X, Che X Y, (丘立文, 潘玉先, 车小燕) *et al.* Epitopes recognized by the monoclonal antibody of SARS-CoV N protein [J]. Chinese Journal of Microbiology and Immunology (中华微生物学和免疫学杂志), 2004, 24: 839-840.
- [8] Carattoli A, Bonito P D, Grasso F, *et al.* Recombinant Protein-Based ELISA and Immuno-Cytochemical Assay for the Diagnosis of SARS [J]. J Med Virol, 2005, 76: 137-142.