

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2013.01.003

O1 群小川型霍乱弧菌单克隆抗体识别表位模拟肽的筛选鉴定

张娟¹, 吴倩², 彭辉², 何岸³, 陈维贤², 黄爱龙⁴, 郑建⁴(1. 重庆医科大学附属第二医院输血科, 重庆 400010; 2. 重庆医科大学附属第二医院检验科, 重庆 400010;
3. 重庆医科大学临床医学一系, 重庆 400016; 4. 重庆医科大学感染性疾病教育部重点实验室, 重庆 400016)

【摘要】目的:以纯化的有高度特异性的 IXiao₃G₆ 单抗为靶分子, 对噬菌体随机 7 肽库进行淘筛, 以期筛选到与 O1 群小川型霍乱弧菌单抗有高亲和力的模拟肽, 为基于表位的霍乱弧菌模拟多肽疫苗的研制奠定基础。**方法:**运用噬菌体随机 7 肽库技术, 以纯化的 IXiao₃G₆ 单抗为靶蛋白, 进行噬菌体随机肽库 3 轮筛选, 以双抗夹心 ELISA 和竞争抑制实验分析获得的噬菌体短肽与筛选配基的结合能力及特异性, 并进行阳性克隆序列测定和同源性分析。**结果:**3 轮筛选后, 阳性噬菌体得到有效富集, 夹心 ELISA 检测随机挑取的 25 个噬菌体克隆, 有 22 个噬菌体克隆为阳性, 测序表明其中 20 个阳性克隆的氨基酸序列完全一致, 均为 APAIPAS。对该序列同源性分析, 未发现有相同的已知序列。竞争抑制实验表明, O1 群小川型霍乱弧菌脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 能很好地抑制阳性克隆与 IXiao₃G₆ McAb 的结合, 抑制程度随 LPS 浓度的升高而增加, 而对照细菌的 LPS 则不具有相应的抑制作用, 进一步提示噬菌体克隆展示肽模拟了 O1 群小川型霍乱弧菌 LPS 抗原表位。**结论:**筛选到模拟 O1 群小川型霍乱弧菌 LPS 的抗原表位的模拟肽, 为基于表位的霍乱弧菌模拟多肽疫苗的开发与设计提供了实验依据。

【关键词】O1 群小川型霍乱弧菌; 单克隆抗体; 噬菌体随机肽库; 模拟肽**【中国图书分类法分类号】**R516.5**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2012-04-09

Screening and identification of eptope mimic peptide of monoclonal antibodies against vibrio cholerae O1 serotype Ogawa

ZHANG Juan¹, WU Qian², PENG Hui², HE An³, CHEN Weixian², HUANG Ailong⁴, ZHENG Jian⁴

(1. Department of Blood Transfusion, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University;

2. Department of Laboratory Medicine, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University;

3. Department of Clinical Medicine, Chongqing Medical University; 4. Key Laboratory of Infections Diseases, Ministry of Education, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To obtain the mimic peptide highly binding to cholerae O1 serotype Ogawa by using purified IXiao₃G₆ McAb to biospan in phage display random 7 peptides library and to establish the basement for further research of the mimic peptide vaccine of vibrio cholerae. **Methods:** Purified IXiao₃G₆ McAb was used to biospan in phage display random 7 peptides library and mimic epitopes were acquired after 3 rounds of biospanning. 'Double-antibody sandwich' ELISA and specific inhibition test were used to analyze the combining ability and specificity of the obtained phage short peptide and the IXiao₃G₆ McAb. DNA sequence analysis was used to analyze the sequence of the positive clones and the related bioinformatic tools were used to analyze the alignments. **Results:** After three rounds of biospanning, the positive phages were enriched effectively. Twenty-two phage clones were positive of the 25 phage clones selected randomly by 'double-antibody sandwich' ELISA. DNA sequence analysis showed that the amino acid sequences of 20 positive clones were identical completely, which was identified as APAIPAS. Alignment analysis showed no homologous known sequence. Specific inhibition test showed that the lipopolysaccharide (LPS) of cholerae O1 serotype Ogawa could inhibit the binding of the positive clones with IXiao₃G₆ McAb and the inhibitory intensity was enhanced by increment of the content of LPS, while the LPS of control bacteria did not show the corresponding inhibitory effect. These results further demonstrated phage display peptide could be mimetic to the antigen epitope of the LPS of cholerae O1 serotype Ogawa. **Conclusions:** Mimic peptide mimesis to the antigen epitope of the LPS of cholerae O1 serotype Ogawa serves as the basement for development of the mimic peptide vaccine of vibrio cholerae.

【Key words】cholerae O1 serotype Ogawa; monoclonal antibody; phage display random library; mimic peptide

作者介绍: 张娟, Email: juanm.cq@yahoo.com.cn,

研究方向: 重大传染性疾病新型疫苗研制。

基金项目: 国家“863”高科技发展计划资助项目 (编号: 2002AA215015);

重庆市医学科研计划资助项目 (编号: 2009-2-200)。

霍乱在世界范围内具有很高的发病率和死亡率,每年发病人数估计约 500 万,至少引起 14 万人死亡,而有效的霍乱控制目标在于将病死率降至 1% 以下^[1]。早期的灭活菌苗已证实对控制霍乱无效,世界卫生组织已不再推荐该疫苗的使用;目前研制的口服疫苗具有较好的安全性和免疫保护率,但仍然未能解决霍乱疫苗免疫持久性及交叉免疫性问题。发展有效的霍乱疫苗需要新思路,着眼于抗原表位的肽疫苗为研制安全高效的新型霍乱疫苗打开了思路。肽疫苗是在病原体重要表位得到确定的基础上对其进行的分子水平的优化设计,因此对抗原表位的分析和确定是肽疫苗研制的关键因素。

传统的抗原表位分析方法大多困难而繁琐,效率低,成本高,获得的仅是线性表位信息。噬菌体随机肽库技术以高度多样性的随机肽库、分子之间特异性的相互作用以及敏感而独特的筛选方法作为理论基础,通过模拟天然配体的结合特性,可从库中直接筛选出与抗体结合的短肽,既可以是线性表位,亦可为构象型表位,也被用在非肽类(如糖、脂)抗原表位的分析上,筛选到模拟天然抗原结构的模拟肽。噬菌体随机肽库技术提供了一种快捷、高效的分析蛋白分子间相互作用的工具^[2-3]。

本研究以筛选到的高特异性的单抗 IXiao₃G₆ 为靶标^[4],利用噬菌体随机 7 肽库,以期筛选到与 O1 群小川型霍乱弧菌单抗有高亲和力结合的模拟肽,为进一步获得 IXiao₃G₆ 表位信息和表位疫苗免疫预防霍乱策略的实施提供重要的实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 噬菌体随机肽库试剂盒 噬菌体表面衣壳蛋白Ⅲ展示的随机 7 肽库(Ph.D.-7™ Phage Display Peptide Library);购自美国 New England Biolabs 公司。肽库的滴度 2×10^{13} pfu/ml,随机多样性 2.8×10^9 种。宿主菌 *E.coli* ER2738,携带有可被噬菌体感染的 F' 因子,具有四环素抗性,可与呈现了 7 肽的噬菌体形成 α 互补。测序引物(-96gⅢ sequencing primer)序列为:5'-CCCTCATAGTTAGCGTAACG-3'。

1.1.2 菌株 灭活的 O1 群(稻叶型和小川型),O139 群霍乱弧菌保存在生理盐水中由四川省疾病预防控制中心馈赠。大肠杆菌(ATCC 25922)、沙门氏菌(ATCC 13076)、铜绿假单胞菌(ATCC 27853)、宋内氏志贺氏菌(ATCC 25931)、金黄色葡萄球菌(ATCC 25923)、河弧菌、副溶血弧菌、嗜水气单胞菌、豚鼠气单胞菌以及奇异变形杆菌,由重庆医科大学附属第二医院检验科保存。

1.1.3 主要试剂 胰蛋白胍、酵母提取物为 OXOID 产品;琼脂糖、PEG8000、四环素、BSA、Tween20 为 SIGMA 产品;HRP-AntiM13 单抗为 Amercham Pharmacia Biotech 产品;IPTG、X-gal 为 Promega 产品;Silver Quest™ Silver Staining Kit 购自 Invitrogen 公司;TMB 显色液来自天为时代;其它试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 噬菌体滴度的测定 接种 ER2738 单菌落于 5~10 ml LB 培养基中,剧烈震荡培养至对数中期 ($A_{600nm} \approx 0.5$)。同时融化上层琼脂,分成 3 ml 等份于灭菌试管中,每个噬菌体稀释度 1 管,保存于 45 °C 备用。37 °C 预温 LB/IPTG/Xgal 平板,每个噬菌体稀释度取 1 个平板备用。在 LB 中准备 10 倍系列稀释的噬菌体,扩增的噬菌体培养物上清稀释范围为 $10^8 \sim 10^{11}$,未扩增的淘洗脱物稀释范围为 $10 \sim 10^4$ 。将达对数中期的菌体培养物分成 200 μ l 等份于 1.5 ml 离心管中,每个噬菌体稀释度 1 管,每管加入 10 μ l 不同稀释度的噬菌体,快速震荡混匀,室温温育 1~5 min。将感染细胞加入 45 °C 预温的上层琼脂培养管中,每次 1 管,快速混匀,立即倾注于 37 °C 预温的 LB/IPTG/Xgal 平板上均匀铺开。待平板冷却 5 min 后,倒置于 37 °C 培养过夜。检查平板,计数有 10^2 个平板上的蓝色噬菌体斑。然后用此数目乘以稀释因子即得到每 10 μ l 噬菌体的空斑形成单位(pfu)滴度。

1.2.2 噬菌体随机 7 肽库的生物淘洗

1.2.2.1 第 1 轮淘选 用包被液将纯化 IXiao₃G₆ 单抗浓度稀释为 100 μ g/ml,按 150 μ l/孔加入 96 孔微量板,4 °C 湿盒中振荡过夜,倒掉每板中的包被液,除去残余溶液后每孔加满封阻液,4 °C 湿盒作用至少 1 h,弃掉封阻液,Tris 盐酸吐温缓冲溶液(Tris-bugger saline with Tween-20, TBST) (TBS+0.1% [V/V] Tween-20) 缓冲液快速洗板 6 次。用 100 μ l TBST 稀释 10 μ l (2×10^{11} pfu)噬菌体原库液,加入已包被好的孔中,室温轻摇 60 min,弃掉未结合的噬菌体液,0.1% TBST 洗板 10 次,每次 6 min。加入 100 μ l 洗脱液室温摇动 10 min,将洗脱液移到 1.5 ml 离心管中,立即加入 30 μ l 中和液,混匀。取 1 μ l 洗脱液测定噬菌体滴度,剩余洗脱液加入到 20 ml ER2738 培养物中进行扩增。

1.2.2.2 噬菌体的扩增与纯化 取 100 μ l 洗脱物加入到 20 ml ER2738 培养物中进行扩增(菌体应当处于对数前期),37 °C 剧烈摇动培养 4.5 h。将培养物转入一离心管中,4 °C,10 000 r/min 离心 10 min,上清液转入另一离心管中,再离心。将上清的上部 80% 转入一新鲜管中,加入 1/6 体积的聚乙二醇(polyethylene glycol,PEG)/NaCl,于 4 °C 过夜沉淀。4 °C,10 000 r/min 离心 PEG 沉淀 15 min,倒掉上清液,再短暂离心,吸去残留上清液。加入 1 ml TBS 重悬沉淀,悬液转入 1.5 ml 离心管中,4 °C 离心 5 min 使残余细胞沉淀。上清转入另一新鲜微量离心管,用 1/6 体积的 PEG/NaCl 再沉淀,冰上孵育 60 min。4 °C,10 000 r/min 离心 10 min,弃上清,再短暂离心,吸去残余上清。沉淀物重悬于 200 μ l TBS(0.02% NaN_3)中,离心 1 min,沉淀残余的不溶物。上清转入新鲜管中,此即为扩增后

的洗脱物。测定滴度,准备第 2 轮淘选。

1.2.2.3 第 2 轮淘选 方法同第 1 轮,IXiao₃G₆ 单抗浓度调为 10 μg/ml,用第 1 轮淘选扩增的洗脱物中 2×10¹¹ pfu 的噬菌体量扩增噬菌体,TBST 中 Tween-20 的浓度提高到 0.5% (V/V),在 LB/IPTG/Xgal 平板上测定第 2 轮淘选所得洗脱物扩增后的滴度。

1.2.2.4 第 3 轮淘选 用第 2 轮淘选扩增的洗脱物中 2×10¹¹ pfu 的噬菌体量,其余方法同第 2 轮,第 3 轮淘选洗脱液不用扩增,直接测定滴度。

1.2.3 第 3 轮淘选后噬菌体的扩增 用 LB 液体培养基按 1:100 稀释过夜培养的 ER2738 菌,分装 2 ml/管。用灭菌牙签从第 3 轮测定滴度的平板上随机挑取 25 个蓝色噬菌斑接种到菌液中,37 ℃摇床培养 4.5~5 h。培养物转入 1.5 ml 离心管中,4 ℃,10 000 r/min 离心 30 s。上清转入另一离心管中,再次离心,取 80%上清,既为噬菌体扩增上清,4 ℃保存或加入甘油至终浓度 50%后,-20 ℃保存。

1.2.4 噬菌体克隆单链 DNA 的提取 按上述方法进行噬菌斑扩增,在第 1 步离心后,将 500 μl 含噬菌体上清转入 1 新鲜离心管。加 200 μl PEG/NaCl,颠倒混匀,室温放置 10 min。于 4 ℃,10 000 r/min 离心 10 min,弃上清液。再次离心片刻,吸掉剩余上清。沉淀物彻底重悬于 100 μl 碘化物缓冲液中,加入 250 μl 乙醇,室温温育 10 min。4 ℃,10 000 r/min 离心 10 min,弃上清,用 70%的乙醇洗沉淀,短暂真空干燥。沉淀重悬于 30 μl TE 中,琼脂糖电泳鉴定 DNA 条带。保存于-20 ℃,备用于 DNA 测序。

1.2.5 噬菌体克隆鉴定

1.2.5.1 夹心 ELISA 鉴定阳性噬菌体克隆 用包被液将纯化 IXiao₃G₆ 单抗稀释为 10 μg/ml 包被 96 孔酶标板,取噬菌体扩增上清 50 μl+150 μl TBST,混匀,加入孔中,同时取 2 μl 原库+200 μl TBST 作为阴性对照(negative control,NC),37 ℃作用 1 h。0.5% TBST 洗板 8 次,每孔加入用封闭液(含 1 mg/ml BSA)1:5 000 稀释的 HRP-AntiM13 单抗 100 μl,室温作用 1 h。0.5% TBST 洗板 8 次,拍干后,每孔加入 100 μl TMB 显色液,37 ℃,10~15 min。加入 50 μl 0.5mol/L H₂SO₄ 终止反应,测定 A_{450 nm}。阳性结果判定:待测克隆与 NC A_{450 nm} 值之比>2.1。

1.2.5.2 阳性噬菌体克隆 DNA 序列测定 将阳性噬菌体克隆的噬菌体单链 DNA 交由重庆医科大学病毒性肝炎研究所感染性疾病教育部重点实验室测序,用 M13 反向-96 gⅢ测序引物在 DNA 自动测序仪上完成。

1.2.6 噬菌体展示模拟肽的亲和力及特异性鉴定 通过抗 O1 群小川型霍乱弧菌单克隆抗体 IXiao₃G₆ 抑制试验验证:以 10 μg/ml 纯化 IXiao₃G₆ 单抗包被 96 孔酶标板,依次加入不同稀释度(100、50、25、12.5、6.25 μg/ml 及 3.125 μg/ml)的纯化 IXiao₃G₆ 单抗 50 μl/孔,同时设抗 O1 群稻叶型霍乱弧菌单克隆抗体 Dao₂H₈ 及 O139 群霍乱弧菌单克隆抗体 O4D7 作无关抗体对照,设不加单抗孔作阳性对照,37 ℃孵育 10 min。

每孔加入 50 μl 阳性噬菌体克隆扩增上清(1.0×10¹² pfu/L),37 ℃孵育 50 min。0.5% TBST 洗板 8 次,每孔加入用封闭液(含 1 mg/ml BSA)1:5 000 稀释的 HRP-AntiM13 单抗 100 μl,室温作用 1 h。0.5% TBST 洗板后 TMB 显色,加入 50 μl 0.5 mol/L H₂SO₄ 终止反应,测定 A_{450 nm}。计算抑制率(%):抑制率(%)=(未加单抗的 A 值-加单抗的 A 值)/未加单抗的 A 值×100%。

1.2.7 O1 群小川型霍乱弧菌对阳性噬菌体与 IXiao₃G₆ 单抗结合的抑制作用 以 10 μg/ml 纯化 IXiao₃G₆ 单抗包被 96 孔酶标板,将 O1 群小川型霍乱弧菌菌液用 PBS 依次稀释至 10、5、2.5、1.25、0.62、0.31 μg/ml;将 O1 群稻叶型、O139 群霍乱弧菌及大肠埃希菌、伤寒沙门氏菌、宋内氏志贺氏菌、河弧菌、豚鼠气单胞菌菌液同样稀释作对照,50 μl/孔加入 96 孔板,37 ℃孵育 10 min。按 50 μl/孔加入纯化阳性噬菌体,同时设原库为阴性对照,设不加菌液孔作阳性对照,混匀,37 ℃孵育 50 min。0.5% TBST 洗板后,加入 1:5 000 稀释的 HRP-AntiM13 单抗 100 μl,室温 1 h。TMB 显色,0.5 mol/L H₂SO₄ 终止反应,测定 A_{450 nm} 值,计算抑制率。

1.2.8 O1 群小川型霍乱弧菌 LPS 对阳性噬菌体与 IXiao₃G₆ 单抗结合的抑制作用

1.2.8.1 单抗 IXiao₃G₆ 脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)表位分析 依据 Westphal 酚-硫酸法,经 Carlson 等^[6]及 Carrion 等^[9]修改后的方法为主要萃取依据,提取 O1 群稻叶型、小川型及 O139 群霍乱弧菌、大肠埃希菌、伤寒沙门氏菌、宋内氏志贺氏菌、河弧菌、豚鼠气单胞菌的 LPS。间接 ELISA 试验确定抗原位点:用提取的各细菌的 LPS 分别包被酶标板,一抗分别为 IXiao₃G₆、IXiao₁D₉ 2 株腹水单抗(1:1 000 稀释),二抗为 HRP 标记的羊抗鼠 IgG(1:10 000 稀释),TMB 显色后于波长 450 nm 测定 A 值,初步判断 McAb 所针对的抗原成份。对所提 LPS 做 SDS-PAGE 银染分析配制 12% SDS-PAGE 分离胶和 5%的积层胶,用所提各的 LPS 进行 SDS-PAGE 电泳,电泳完毕行 LPS 银染。对所提 LPS 做 Western blot 分析:配制 12% SDS-PAGE 分离胶和 5%的积层胶,用所提各细菌的 LPS 进行 SDS-PAGE 电泳;电泳完毕于 4 ℃ 20 V 条件下转膜过夜;NC 膜以封闭液室温封闭 2 h;PBS 洗膜后分别加入单抗腹水(1:1 000 稀释)于密封带中 4 ℃结合过夜;PBS 洗膜后加 HRP-羊抗鼠 IgG 抗体(1:10 000 稀释)在密封带中室温结合 2 h,DAB 显色,扫描保存。

1.2.8.2 与 IXiao₃G₆ 单抗结合的抑制作用 以 10 μg/ml 纯化 IXiao₃G₆ 单抗包被 96 孔酶标板,将 O1 群小川型霍乱弧菌 LPS 用 PBS 依次稀释至 10、5、2.5、1.25、0.62、0.31 μg/ml;将 O1 群稻叶型、O139 群霍乱弧菌及大肠埃希菌、伤寒沙门氏菌、宋内氏志贺氏菌、河弧菌、豚鼠气单胞菌 LPS 同样稀释作对照,50 μl/孔加入 96 孔板,37 ℃孵育 10 min。按 50 μl/孔加入纯化阳性噬菌体,同时设原库对照,设不加菌液孔作阳性对照,混匀,37 ℃孵育 50 min。0.5% TBST 洗板后,加入 1:5 000 稀释的 HRP-AntiM13 单抗 100 μl,室温 1 h。TMB 显色,0.5 mol/L H₂SO₄ 终止反应,测定 A_{450 nm} 值,计算抑制率。

2 结果

2.1 噬菌体随机 7 肽库筛选结果

以纯化的 IXiao₃G₆ 单抗为靶分子进行 3 轮亲和筛选后,测定每轮洗脱的噬菌体滴度并计算投入产出比,结果表明,第 3 轮和第 1 轮筛选相比,富集率达 118 倍,噬菌体克隆获得有效的富集,见表 1。

表 1 噬菌体随机 7 肽库的亲和筛选结果
Tab.1 Affinity screening of phage display random
7 peptides library

筛选次数	输入噬菌体量 (pfu)	洗脱噬菌体量 (pfu)	回收率 (%)
第 1 轮	2×10^{11}	3.1×10^5	1.6×10^{-4}
第 2 轮	2×10^{11}	5.6×10^6	2.8×10^{-3}
第 3 轮	2×10^{11}	3.8×10^7	1.9×10^{-2}

回收率(%) = 洗脱噬菌体量/输入噬菌体量 $\times 100\%$

2.2 噬菌体阳性克隆的鉴定

第 3 轮筛选后,随机挑取 25 个蓝斑进行扩增,以夹心 ELISA 检测噬菌体克隆与 IXiao₃G₆ 单抗的结合活性。结果显示,所挑选的 25 个克隆中,有 22 个克隆的 $A_{450\text{nm}}$ 值与 NC $A_{450\text{nm}}$ 值之比 >2.1 ,确定为阳性克隆,表明这 22 个克隆有与 IXiao₃G₆ 单抗的结合活性,见图 1。

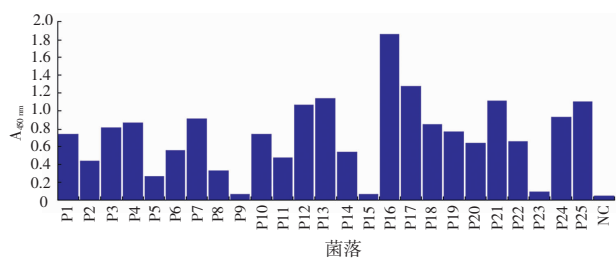


图 1 噬菌体克隆的夹心 ELISA 分析结果

Fig.1 Sandwich ELISA results of phage clones

2.3 阳性噬菌体克隆 DNA 序列测定和分析

经序列测定表明,第 3 轮洗脱物中鉴定阳性的 22 个噬菌体克隆中,有 20 个阳性克隆的氨基酸序列完全一致,均为 APAIPAS;其碱基序列为 GCACCTGCTATTCGGCTTCT,对应的氨基酸为 Ala、Pro、Ala、Ile、Pro、Ala、Ser。网上蛋白 BLAST 未发现相同的已知序列,结合第 2 部分对抗原表位的初步分析结果,该短肽可能模拟了 O1 群小川型霍乱弧菌的 LPS 抗原表位。所测 22 个克隆中 20 个序列完全相同,进一步证实淘洗过程具有较高的富集效应。

2.4 噬菌体展示模拟肽的亲力和特异性鉴定

前面的测序表明,噬菌体展示模拟肽的氨基酸序列完全一致。为鉴定模拟肽与抗 O1 群小川型霍乱弧菌单克隆抗体 IXiao₃G₆ 的特异性结合及结合强度,随机挑取 20 个序列一致的阳性克隆中的 1 个(P12),以游离的 IXiao₃G₆ McAb 抑制 P12 克隆与包被的 IXiao₃G₆ McAb 的结合,同时设定抗 O1

群稻叶型霍乱弧菌单克隆抗体 Dao₃H₈ 及 O139 群霍乱弧菌单克隆抗体 O4D7 作对照,计算抑制率(%).结果显示,游离的 IXiao₃G₆ McAb 抑制了 P12 克隆与包被的 IXiao₃G₆ McAb 的结合,且抑制程度与游离的 IXiao₃G₆ McAb 的浓度呈正相关,提示阳性噬菌体克隆展示的短肽模拟了 O1 群小川型霍乱弧菌的抗原表位,见图 2。

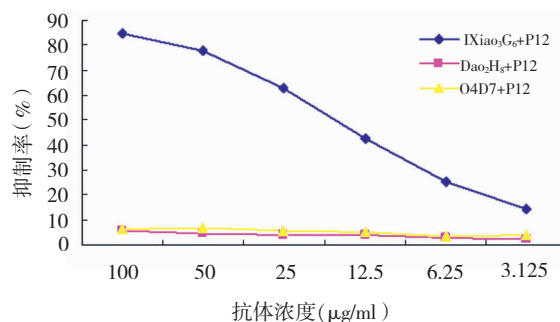


图 2 游离 IXiao₃G₆ McAb 对 P12 克隆与包被的 IXiao₃G₆ McAb 结合的抑制作用

Fig.2 Inhibition of free IXiao₃G₆ McAb on binding between phage clones P12 and coated IXiao₃G₆ McAb

2.5 O1 群小川型霍乱弧菌对阳性噬菌体与 IXiao₃G₆ 单抗结合的抑制

随机挑取 1 个测序一致的阳性克隆 P16,以 O1 群小川型霍乱弧菌菌液抑制 P16 克隆与包被的 IXiao₃G₆ McAb 的结合,观察 O1 群小川型霍乱弧菌对噬菌体克隆与单抗结合的阻断作用,同时设 O1 群稻叶型、O139 群霍乱弧菌及大肠埃希菌、伤寒沙门氏菌、宋内氏志贺氏菌、河弧菌,豚鼠气单胞菌菌液作对照。结果显示,O1 群小川型霍乱弧菌能很好地抑制阳性克隆 P16 与 IXiao₃G₆ McAb 的结合,抑制程度 O1 群小川型霍乱弧菌菌液浓度的升高而增加,而同时进行试验的 O1 群稻叶型、O139 群霍乱弧菌及大肠埃希菌、伤寒沙门氏菌、宋内氏志贺氏菌、河弧菌、豚鼠气单胞菌则不具有相应的抑制作用,进一步表明噬菌体克隆展示肽特异性地模拟 O1 群小川型霍乱弧菌抗原表位。见图 3。

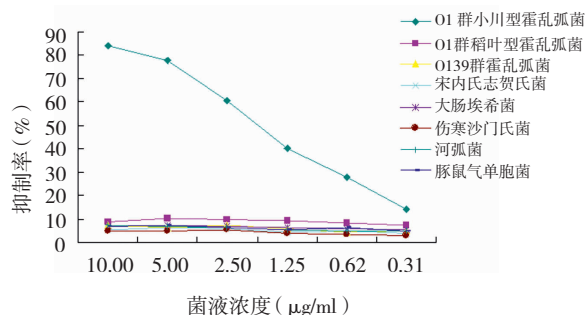
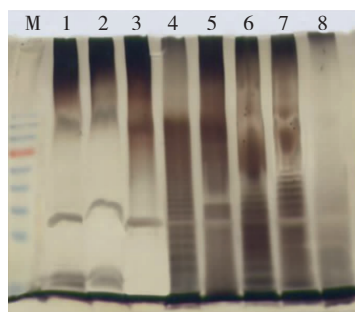


图 3 O1 群小川型霍乱弧菌对噬菌体克隆与 IXiao₃G₆ McAb 结合的抑制作用

Fig.3 Inhibition of vibrio cholerae O1 serotype Ogawa on binding between phage clones and IXiao₃G₆ McAb

2.6 O1 群小川型霍乱弧菌 LPS 对阳性噬菌体与 IXiao₃G₆ 单抗结合的抑制

提取了 LPS, 银染结果见图 4, 结果显示 O1 群霍乱弧菌的 LPS 呈梯型带, 与文献报告的电泳结果相一致。间接 ELISA 结果显示, IXiao₃G₆ 与 O1 群霍乱弧菌 LPS 特异结合了, Western blot 结果(图 5)显示 IXiao₃G₆ 出现的条带位置和银染的第 1 条一致, 进一步证实该株单抗为针对 O1 群霍乱弧菌 LPS 的抗体。同样, 挑取测序一致的阳性克隆中的 P17, 以 O1 群小川型霍乱弧菌 LPS 抑制 P17 克隆与包被的 IXiao₃G₆ McAb 的结合, 观察 O1 群小川型霍乱弧菌 LPS 对噬菌体克隆与单抗结合的阻断作用, 同时设 O1 群稻叶型、O139 群霍乱弧菌及大肠埃希菌、伤寒沙门氏菌、宋内氏志贺氏菌、河弧菌、豚鼠气单胞菌 LPS 作对照。结果显示, O1 群小川型霍乱弧菌 LPS 能很好地抑制阳性克隆 P17 与 IXiao₃G₆ McAb 的结合, 抑制程度随 LPS 浓度的升高而增加, 而对照细菌的 LPS 则不具有相应的抑制作用, 提示噬菌体克隆展示肽能够模拟 O1 群小川型霍乱弧菌 LPS 抗原表位, 见图 6。



M. Marker; 1. O1 群小川型霍乱弧菌; 2. O1 群稻叶型霍乱弧菌; 3. O139 群霍乱弧菌; 4. 大肠埃希菌; 5. 伤寒沙门氏菌; 6. 宋内氏志贺氏菌; 7. 河弧菌; 8. 豚鼠气单胞菌

图 4 O1 群小川型霍乱弧菌及其它细菌的 LPS 的 SDS-PAGE 银染结果

Fig.4 Silver staining of SDS-PAGE with LPS from vibrio cholerae O1 serotype Ogawa and other gram-negative organisms



M. Marker; 1. O1 群小川型霍乱弧菌; 2. O1 群稻叶型霍乱弧菌; 3. O139 群霍乱弧菌; 4. 大肠埃希菌; 5. 伤寒沙门氏菌; 6. 宋内氏志贺氏菌; 7. 河弧菌; 8. 豚鼠气单胞菌

图 5 O1 群小川型霍乱弧菌及其它细菌的 LPS 与 IXiao₃G₆ 单抗的 Western blot 分析

Fig.5 Western blot analysis of IXiao₃G₆ McAb against LPS from vibrio cholerae O1 serotype Ogawa and other gram-negative organisms

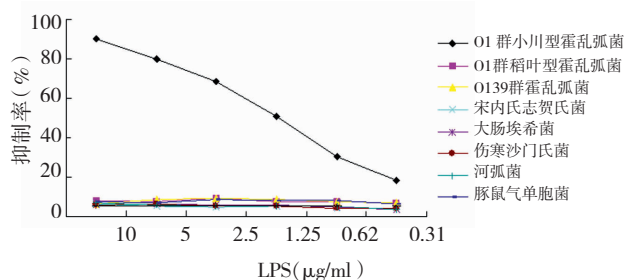


图 6 O1 群小川型霍乱弧菌 LPS 对噬菌体克隆与 IXiao₃G₆ McAb 结合的抑制作用

Fig.6 Inhibition of vibrio cholerae O1 serotype Ogawa LPS on binding between phage clones and IXiao₃G₆ McAb

3 讨论

抗原表位是抗原分子上具有刺激机体产生抗体或致敏 T 淋巴细胞并能够与抗体或细胞识别的部位。肽疫苗的成败严重依赖于它所包含的抗原结构信息, 特别是抗原表位的信息, 因此对抗原表位的分析和确定成为发展表位疫苗重要的基础性研究工作。早期的抗原表位分析是在抗原已知的基础上, 运用抗原缺失突变、合成肽段扫描、抗原酶解等技术, 分析抗体识别的抗原片段, 它们在实际应用中因操作复杂、效率低、成本高等原因得不到广泛应用^[7-9]。而绝大多数蛋白质分子活性处于立体结构状态, 它们的抗原表位有相当一部分是空间立体表位, 即构象型表位。另外, 有些病原体是高度变异的, 有些有效抗原成分为糖基化蛋白或是非肽类(如糖、脂)等, 因此从蛋白质一级结构分析来预测抗原表位的方法受到很大程度的限制。噬菌体展示随机肽库技术弥补了传统方法的不足。

Parmley 等^[10]于 1985 年建立了噬菌体展示技术, 他们构建了一种表达载体, 能将外源性短肽表达并展现在噬菌体表面, 这样既不影响噬菌体的感染特性, 同时又保留外源基因产物的结构和生物学功能的性质。在此基础上 Devlin 等^[11]建立了噬菌体展示随机肽库技术。目前, 该技术已在蛋白质结构研究、细胞因子拮抗剂的研制、人源抗体制备、分离鉴定新的生物活性肽、抗原表位的筛选和鉴定非肽配体的肽模拟物等研究中广泛应用, 为发展疫苗和诊断试剂、设计多肽药物提供了全新的思路。

本研究中以纯化的有高度特异性的 IXiao₃G₆ 单抗为靶分子, 对噬菌体随机 7 肽库进行了淘筛。所采用的随机 7 肽库滴度为 2×10^{13} pfu/ml, 随机多样

性为 2.8×10^9 , 能保证对靶分子筛选的需要。如何从庞大的文库中筛选出能与特定抗体相结合的噬菌体克隆, 阳性克隆的有效富集是关键。对有高度特异性的 IXiao₃G₆ 单抗先用盐析初提, 再用 Protein-A 亲和层析纯化, 大大降低了非特异噬菌体的吸附和富集, 提高了生物筛选的特异性和敏感性。在每轮的筛选中均以回收率(洗脱噬菌体克隆与上 1 轮洗脱液的噬菌体克隆数之百分比)进行富集倍数的监测。本研究也对不同的实验条件进行了摸索, 通过逐轮降低靶蛋白(IXiao₃G₆ 单抗)用量和增加洗涤强度, 进行高亲和力噬菌体克隆的筛选。经过 3 轮筛选, 噬菌体克隆富集达 118 倍, 噬菌体克隆获得有效的富集。

亲和筛选中即使经过多轮筛选, 也不能排除非特异性噬菌体克隆的存在, 因而进一步挑取单个克隆, 确定它与筛选配基的特异性吸附是实验必不可少的步骤^[12]。筛选出的阳性克隆中含有与抗体结合的立体空间表位, 通过序列和结构分析, 得到一系列不同的基因序列, 这些序列可能完全相同也可能部分相同, 相同部分的序列极有可能为蛋白分子上的抗原表位或模拟抗原表位。具有相同序列的噬菌体克隆或根据相同序列化学合成的多肽与抗体的结合若能被天然抗原竞争性地阻断, 表明该相同序列在一定程度上模拟了蛋白质的表位^[13]。

本研究第 3 轮筛选后, 随机挑取 25 个噬菌体克隆进行了夹心 ELISA 检测, 有 22 个克隆是阳性克隆, 测序表明有 20 个阳性克隆的氨基酸序列完全一致, 均为 APAIPAS。用识别连续抗原表位的单抗进行筛选时, 往往能够从随机肽库中得到许多与抗原表位的同源性很高的表位, 对本单抗, 因为是经过大量配对筛选而得到的高特异性的单抗, 它识别的是一个抗原决定簇, 其与抗原的结合位点具有高度的亲和力, 因此筛出的克隆序列高度一致, 是线性抗原表位。对该序列同源性分析, 未发现有相同的已知序列。

确立抗体识别的抗原表位不仅可了解抗原的结构与功能、抗原抗体相互作用等有关免疫反应的众多信息, 而且对设计基于表位的安全有效的疫苗以及开发基于表位的诊断试剂有重要意义^[14]。LPS 是革兰阴性菌细胞壁外膜的重要成分之一, 具有广泛的生物学作用, 在细菌感染的发病机制中起重要作用^[15]。霍乱弧菌的致病性是由霍乱弧菌黏附、定居及致病因子协同作用的结果。霍乱弧菌在肠黏膜的黏

附和定居是它致病的前提和关键, 其中涉及众多分子及细胞表面结构如 LPS 的 O 抗原、毒素协同菌毛、外膜蛋白等。人群受到霍乱弧菌侵袭后能获得较强的免疫力, 人们认为这是抗毒免疫与抗菌免疫协同作用的结果^[16]。研究表明 LPS 是霍乱弧菌细胞壁的主要成分, 具有高度的免疫原性, 可诱导产生主要的杀弧菌抗体。因此, 筛选到霍乱弧菌 LPS 模拟表位对制备霍乱新型肽疫苗有重要意义。

本研究通过提取脂多糖对 IXiao₃G₆ 单抗识别的抗原表位进行了初步研究: 经间接 ELISA 和 Western blot 实验证实 IXiao₃G₆ 针对 O1 群小川型霍乱弧菌 LPS。竞争抑制实验表明, 阳性噬菌体克隆与靶分子特异结合, O1 群小川型霍乱弧菌 LPS 能很好地抑制阳性克隆与 IXiao₃G₆ McAb 的结合, 抑制程度随 LPS 浓度的升高而增加, 而对照细菌的 LPS 则不具有相应的抑制作用, 提示噬菌体克隆展示肽模拟了 O1 群小川型霍乱弧菌 LPS 抗原表位。

天然多糖的免疫原性较弱, 属于胸腺非依赖抗原, 无记忆 B 细胞产生, 不能诱导加强免疫应答, 制成的疫苗存在效力不高问题, 应用噬菌体展示随机肽库技术得到模拟抗原的方法就可使胸腺非依赖抗原转变为胸腺依赖抗原, 从而可增强特异性抗原的免疫原性, 并诱导机体产生有效的再次免疫应答, 这在许多实验室得到证实^[17-19]。本研究结果对下一步基于表位的霍乱弧菌模拟多肽疫苗的应用研究提供了重要的实验依据。

参 考 文 献

- [1] World Health Organization. Cholera 2005[J]. Wkly Epidemiol Rec, 2006, 81(31): 297-307.
- [2] Pande J, Szewczyk M M, Grover A K. Phage display: concept, innovations, applications and future[J]. Biotechnol Adv, 2010, 28(6): 849-858.
- [3] Zancanato S, Minervini G, Poli I, et al. Selection dynamic of Escherichia coli host in M13 combinatorial peptide phage display libraries[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2011, 75(4): 812-815.
- [4] 张 娟, 张 君, 余晓林, 等. O1 群小川型霍乱弧菌单克隆抗体的制备与鉴定[J]. 免疫学杂志, 2006, 22(4): 436-439.
- Zhang J, Zhang J, Yu X L, et al. Preparation and characterization of monoclonal antibodies against Vibrio cholerae O1 serotype Ogawa[J]. Immunological Journal, 2006, 22(4): 436-439.
- [5] Carlson R W, Kalembsa S, Turowski D, et al. Characterization of the lipopolysaccharide from a Rhizobium phaseoli mutant that is defective in infection thread development[J]. J Bacteriol, 1987, 169(11): 4923-4928.

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2013.01.004

LIM 矿化蛋白-1 对间充质干细胞成骨分化影响的实验研究

徐希彦¹, 邓毅², 李修洋¹, 邓忠良¹

(1. 重庆医科大学附属第二医院骨科, 重庆 400010; 2. 重庆市中医骨科医院骨科, 重庆 400010)

【摘要】目的:构建 LIM 矿化蛋白-1(LIM mineralization protein-1, LMP-1)的真核表达质粒,并在兔骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)内表达,研究 LMP-1 对体外培养 BMSCs 成骨分化的影响。**方法:**RT-PCR 克隆 hLMP-1 和骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2),并构建 pIRES2-EGFP-LMP-1 及 pIRES2-EGFP-BMP-2 重组质粒。分离培养 BMSCs,脂质体介导下将 pIRES2-EGFP-LMP-1、pIRES2-EGFP-BMP-2 和 pIRES2-EGFP 质粒转染 BMSCs。7 d 后收集细胞,RT-PCR 比较 hLMP-1、hBMP-2 及 I 型胶原的表达,检测碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性,免疫组化染色比较骨钙素表达。**结果:**pIRES2-EGFP-LMP-1 和 pIRES2-EGFP-BMP-2 重组质粒构建成功。重组质粒成功转染 BMSCs,RT-PCR 证实表达目的基因,hLMP-1 和 hBMP-2 转染组可以明显促进细胞分泌 ALP 的活性,诱导 I 型胶原和骨钙素的表达。**结论:**LMP-1 可以促进 BMSCs 向成骨细胞分化。

【关键词】基因治疗;LIM 矿化蛋白;组织工程;间充质干细胞;成骨分化

【中国图书分类法分类号】R318.04

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-07-18

作者介绍:徐希彦,Email:xyxand@126.com,

研究方向:脊柱外科方向。

通信作者:邓忠良,Email:deng7586@gmail.com。

[6] Carrion M, Bhat U R, Reuhs B, et al. Isolation and characterization of the lipopolysaccharides from *Bradyrhizobium japonicum*[J]. J Bacteriol, 1990, 172(4): 1725-1731.

[7] Van Regenmortel M H. Structural and functional approaches to the study of protein antigenicity[J]. Immunol Today, 1989, 10(8): 266-272.

[8] Lenstra J A, Kusters J G, van der Zeijst B A. Mapping of viral epitopes with prokaryotic expression products[J]. Arch Virol, 1990, 110(1-2): 1-24.

[9] Sem D S, Baker B L, Victoria E J, et al. Structural characterization and optimization of antibody-selected phage library mimotopes of an antigen associated with autoimmune recurrent thrombosis[J]. Biochemistry, 1998, 37(46): 16069-16081.

[10] Parmley S F, Smith G P. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes[J]. Gene, 1988, 73(2): 305-318.

[11] Devlin J J, Panganiban L C, Devlin P E, et al. Random peptide library: a source of specific protein binding molecule[J]. Science, 1990, 249(4967): 404-406.

[12] Amin N, Aguilar A, Chamacho F, et al. Identification of dengue-specific B-cell epitopes by phage-display random peptide library[J]. Malays J Med Sci, 2009, 16(4): 4-14.

[13] Molek P, Strukelj B, Bratkovic T. Peptide phage display as a tool for drug discovery: targeting membrane receptors[J]. Molecules, 2011, 16

(1): 857-887.

[14] Wang L F, Yu M. Epitope identification and discovery using phage display libraries: applications in vaccine development and diagnostics[J]. Current Drug Targets, 2004, 5(1): 1-15.

[15] Di Rienzo J M, Nakamura K, Inouye M. The outer membrane proteins of gram-negative bacteria: biosynthesis, assembly, and functions[J]. Annu Rev Biochem, 1978, 47: 481-532.

[16] Levine M M, Kaper J B, Black R E, et al. New knowledge on pathogenesis of bacterial enteric infections as applied to vaccine development[J]. Microbiol Rev, 1983, 47(4): 510-550.

[17] Yuen H L, Shamala D, Thong K L. Mimotopes of heat shock proteins of *Salmonella enterica* serovar Typhi identified from phage-displayed peptide library[J]. J Infect Dev Ctries, 2008, 2(4): 313-323.

[18] 邹佳, 葛晓冬, 刘友生, 等. 人源脂多糖结合蛋白单克隆抗体的筛选及初步鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(10): 1032-1034.

Zou J, Ge X D, Liu Y S, et al. Screening and identification of phage antibodies against human lipopolysaccharide binding protein[J]. Journal of Third Military Medical University, 2006, 28(10): 1032-1034.

[19] Paulovicova E, Machova E, Hostacka A, et al. Immunological properties of complex conjugates based on *Vibrio cholerae* O1 Ogawa lipopolysaccharide antigen[J]. Clin Exp Immunol, 2006, 144(3): 521-527.

(责任编辑: 冉明会)