

SARS冠状病毒S蛋白S1区多肽与SARS病人血清的免疫反应

研究抗SARS冠状病毒的多肽疫苗的关键问题是首先寻找和鉴定出SARS冠状病毒的特异性抗原表位肽。虽然目前国内许多实验室都在寻找SARS冠状病毒的免疫抗原表位,但由于SARS冠状病毒结构复杂,至今未能取得成功。我们根据人SARS冠状病毒的S蛋白(spike protein)S1区基因序列[1],用计算机方法预测并设计出抗原表位肽[2]。本研究根据上述设计的抗原表位肽,采用多肽合成仪合成了8个多肽,并观察这些合成的多肽与恢复期SARS病人血清的免疫反应。

1 材料与方法

1.1 SARS冠状病毒抗原多肽的合成

1.1.1 仪器与试剂 433A多肽合成仪,API-2000液质联用仪(美国ABI公司),高效液相色谱仪(HPLC,美国Waters公司Alliance 2695型),冷冻干燥机(美国Labcount公司),Fmoc-氨基酸(吉尔生化有限公司),溶剂N-甲基吡咯酮、二氯甲烷等(NMP,美国ABI公司)。

1.1.2 方法 采用Antigenic peptides prediction 软件[3]预测S蛋白S1区的抗原表位,设计抗原表位多肽。按Fmoc-butyl固相多肽合成保护策略,在多肽合成仪上合成设计的抗原表位肽[4]。合成的粗肽采用HPLC法进行纯化,并于液质联用仪上进行质谱分析,纯化后的抗原肽冷冻干燥后备用。

1.2 ELISA方法

1.2.1 试剂 ELISA包被液为0.05 mol/L碳酸盐缓冲液(pH9.6);洗涤液(PBS-Tween20)为含0.05% Tween-20的0.02 mol/L的PBS(pH7.4);待测的血清及抗体稀释液为含0.5%牛血清白蛋白(BSA)的PBS-Tween20,封闭液为含10%马血清的洗涤液,AP标记的羊抗人IgG(Sigma公司产品),对硝基苯磷酸盐(pNPP, Sigma公司产品)。

1.2.2 方法 采用间接ELISA法测定SARS相关冠状病毒抗原表位肽与SARS病人血清中抗体的反应。高效液相(HPLC)检测纯度为95%以上的抗原表位肽用于包被,按100 μ l/孔包被96孔酶联板(Corning产品),浓度20 μ g/ml,4 $^{\circ}$ C过夜。次日洗涤3次,用封闭液封闭60 min,洗涤3次。分别加入按1:20稀释的SARS病人血清100 μ l,正常人血清为阴性对照,37 $^{\circ}$ C孵育60 min。洗涤3次,加入羊抗人IgG-AP 100 μ l,37 $^{\circ}$ C孵育60 min,加入对硝基苯磷酸盐底物,37 $^{\circ}$ C孵育10 min,终止反应。酶标仪(Bio-Rad公司)于450 nm测定D(λ)值。

1.2.3 血清 临床确诊恢复期SARS病人血清由南方医院传染科提供,正常人血清由本所提供,血清最终稀释比例为1:20。

2 结果

2.1 SARS冠状病毒S蛋白S1区的抗原表位多肽

如表1所示,根据SARS冠状病毒S蛋白S1区合成的8个抗原表位肽均由20个左右的氨基酸构成。用质谱仪测得的实际相对分子质量与理论值均一致,表明合成抗原表位肽的结构正确。

表 1 模拟合成的抗原表位肽的氨基酸序列与结构

Tab.1 Amino acid sequence and structure of the peptides from S1 domain of S protein

Peptide	Amino acid sequence	M_r	m/z (calculated)	m/z (detected)
S-06	CTFEYISDAFSLDVSEKSGNFK	2 487.7	1 244.9	1 244.4
S-07	CGGFLYVYKGYQPIDVVRDL	2 305.7	1 153.8	1 152.9
S-10	KPTTFMLKYDENGTTITDAVDC	2 362.7	1 181.3	1 182.3
S-12	SNFRVVPSPGDVVRFPNITNLC	2 334.7	1 168.4	1 167.8
S-13	CPFGVFNATKFPSVYA	1 877.1	939.6	939.5
S-14	CVADYSVLYNSTFFSTFK	2 092.4	1 047.2	1 046.7
S-15	CFSNVYADSFVVKGDDVR	2 021.2	1 010.6	1 010.7
S-16	GQTGVIADYNYKLPDDFMGC	2 207.5	1 104.7	1 104.3

m: Molecular mass; z: Electric charge of the molecule

2.2 合成的抗原表位多肽与SARS病人血清的免疫反应

实验共观察了合成的8个抗原表位肽分别与5例恢复期SARS病人血清和正常人血清的免疫反应，结果见图1。从图中可见，合成的抗原表位肽均能与恢复期SARS病人血清发生反应，其 $D(\lambda)$ 值明显高于正常对照组。在所测定的8个抗原表位肽中，SARS病人血清与正常人血清的 $D(\lambda)$ 比值为1.5~2.6，在不同SARS病人之间的差异不大，其中以S-14多肽的比值最高(表2)。

表 2 不同 SARS 病人血清与正常人血清 $D(\lambda)$ 比值

Tab.2 Ratio of SARS patients' to the normal person's serum $D(\lambda)$ value

Patient No.	Ratio							
	S-16	S-15	S-06	S-12	S-10	S-07	S-17	S-14
1	1.857	2.260	2.218	1.846	1.494	2.099	1.938	2.646
2	1.908	2.347	2.295	1.944	1.537	2.153	2.026	2.619
3	1.827	2.142	2.143	1.835	1.403	2.116	1.906	2.472
4	1.858	2.311	2.229	1.943	1.454	2.107	1.996	2.565
5	1.867	2.318	2.222	1.946	1.603	2.105	2.000	2.568

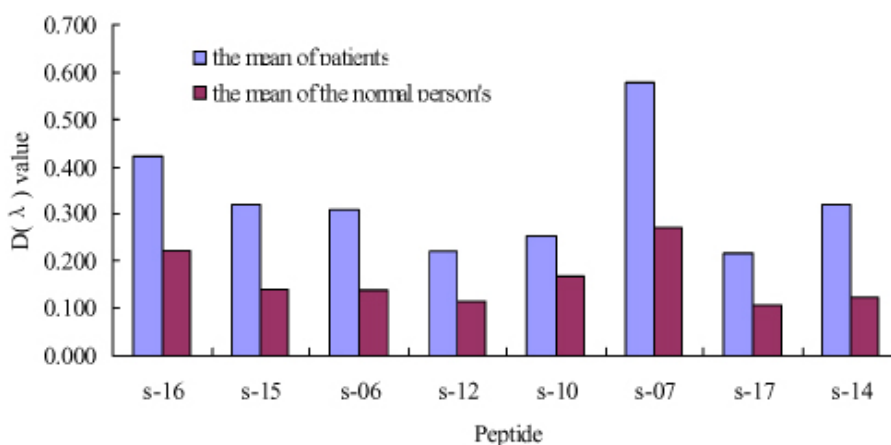


图1 合成的抗原表位肽与SARS病人血清的反应

Fig.1 Immune reaction of peptides with the serum of SARS patients

3 讨论

本研究合成了根据计算机预测的SARS相关冠状病毒S蛋白S1区的抗原表位肽,并测定了这些多肽与恢复期SARS病人血清的免疫反应。结果表明这些由20个左右氨基酸组成的多肽与SARS病人血清的免疫学反应较低。由图1可知,在所测定的8个抗原表位肽中,SARS病人血清与正常人血清的平均D(λ)比值较低,在1.6~2.5之间,在不同SARS病人之间的差异不大。一方面,由于实验合成的8个多肽虽然是经计算机预测而设计的抗原多肽,但实际上与SARS病人血清中的抗体反应低,这说明计算机预测的抗原表位肽不一定准确。另一方面,由于本实验所用的血清按1:20稀释,如果将血清按1:100、1:1000稀释时,则测不出合成的抗原表位肽与SARS病人血清中抗体的反应,也提示恢复期SARS病人血清的抗体滴度较低 [5][6]。因此,需采用更多的病人血清和更多抗原表位肽来证实。

由于本实验研究的8个计算机预测的SARS冠状病毒S1区的抗原多肽与恢复期SARS病人血清产生较低的反应,因此不能确定这些抗原多肽就是SARS相关冠状病毒的特异性抗原决定簇[7]。关键是要看这些多肽免疫动物后所产生的抗体能否具有中和SARS相关冠状病毒的作用。目前国内也有计算机预测SARS冠状病毒的抗原多肽的报道[8][9],这些通过计算机预测的多肽是否为SARS冠状病毒的抗原多肽,需要进一步的研究。

(责任编辑:杨金星)

参考文献:

- [1] Marra MA, Jones SJM, Astell CR, et al. The genome sequence of the SARS-associated coronavirus[EB/OL]. <http://www.sciencexpress.org/cgi/content/full/300/5624/1399>.
- [2] Gregory A. Grant, synthetic peptides (second edition)[M]. New York: Oxford University Press Inc, 2002. 93-219.
- [3] Kolaskar AS, Tongaonkar PC. Antigenic peptides prediction[EB/OL]. <http://mif.dfci.harvard.edu>.
- [4] Chan WC, White PD. Solid phase peptide synthesis[M]. New York: Oxford university press Inc, 2000. 41-73.
- [5] King CR. Starting to build vaccine[A]. In: Approaches to vaccines and drug development adenovirus vector technologies for vaccines[C]. A New York Academy of Sciences Conference. 2003-05-17.
- [6] Monath T. Some approaches to vaccine development[A]. In: Approaches to vaccines and drug development adenovirus vector technologies for vaccines[C]. A New York Academy of Sciences Conference. 2003-05-17.
- [7] Berzofsky JA, Ahlers JD, Belyakov IM. Strategies for designing and optimizing new generation vaccines[J]. Nat Rev Immunol, 2001,1(3): 209-19.
- [8] 李伍举,刘涛. SARS病毒抗原表位预测[J]. 解放军医学杂志(Med J Chin PLA), 2003, 28(Suppl): S9-10.
- [9] 凌世淦,宋晓国,胡巍,等. SARS病毒多表位免疫原的研究[J]. 解放军医学杂志(Med J Chin PLA), 2003, 28(Suppl): S6-8.

参考文献:

- [1] Marra MA, Jones SJM, Astell CR, et al. The genome sequence of the SARS-associated coronavirus[EB/OL]. <http://www.sciencexpress.org/cgi/content/full/300/5624/1399>.
- [2] Gregory A. Grant, synthetic peptides (second edition)[M]. New York: Oxford University Press Inc, 2002. 93-219.
- [3] Kolaskar AS, Tongaonkar PC. Antigenic peptides prediction[EB/OL]. <http://mif.dfci.harvard.edu>.
- [4] Chan WC, White PD. Solid phase peptide synthesis[M]. New York: Oxford university press

Inc, 2000. 41-73.

[5] King CR. Starting to build vaccine[A]. In: Approaches to vaccines and drug development adenovirus vector technologies for vaccines[C]. A New York Academy of Sciences Conference. 2003-05-17.

[6] Monath T. Some approaches to vaccine development[A]. In: Approaches to vaccines and drug development adenovirus vector technologies for vaccines[C]. A New York Academy of Sciences Conference. 2003-05-17.

[7] Berzofsky JA, Ahlers JD, Belyakov IM. Strategies for designing and optimizing new generation vaccines[J]. Nat Rev Immunol, 2001,1(3): 209-19.

[8] 李伍举, 刘 涛. SARS病毒抗原表位预测[J]. 解放军医学杂志(Med J Chin PLA), 2003, 28(Suppl): S9-10.

[9] 凌世淦, 宋晓国, 胡 巍, 等. SARS病毒多表位免疫原的研究[J]. 解放军医学杂志(Med J Chin PLA), 2003, 28(Suppl): S6-8.

[回结果列表](#)