

SARS冠状病毒 S 蛋白 S1 区多肽与 SARS 病人血清的免疫反应

张嘉杰¹, 吴少瑜¹, 徐伟¹, 侯金林², 王战会², 姜世勃³, 吴曙光¹ (第一军医大学¹ 药物研究所,² 南方医院传染科, 广东广州 510515;³ 美国纽约血液中心)

摘要:目的 测定根据计算机预测的 SARS 冠状病毒 S 蛋白 S1 区的抗原表位多肽与 SARS 病人血清的免疫反应, 以寻找和确定 SARS 相关冠状病毒的中和抗原表位。方法 采用多肽合成仪合成 SARS 冠状病毒 S 蛋白 S1 区的多肽, 并用 ELISA 方法检测合成的多肽与 SARS 病人血清的免疫反应。结果 合成的 8 个多肽与 SARS 病人血清免疫反应的光密度值是其与正常人血清免疫反应的光密度值的 1.5~2.6 倍。结论 合成的多肽与 SARS 病人血清的免疫反应较低, 提示这些多肽是否为 SARS 冠状病毒的抗原表位还要进一步研究。

关键词: 冠状病毒, SARS; 表位; 多肽疫苗; 免疫反应

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 1000-2588(2004)07-0789-02

Immunological reaction between the peptides from S1 domain of SARS coronavirus S-protein and the serum from SARS patients

ZHANG Jia-jie¹, WU Shao-yu¹, XU Wei¹, HOU Jin-lin², WANG Zhan-hui², JIANG Shi-bo³, WU Shu-guang¹

¹Institute of Pharmaceutics Science, ²Department of Infectious Diseases, Nanfang Hhospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China; ³New York Blood Center, 310E.67th Street, New York, USA

Abstract: Objective To examine the immunological reactions between the peptides of SARS coronavirus (SARS-Cov) S-protein and the serum of SARS patients for identifying the SARS-Cov epitope. **Methods** The peptides from S1 domain of SARS-Cov S-protein were synthesized by peptide synthesizer, and the immunological reaction of the peptides with the serum of SARS patients were examined by means of ELISA. **Results** The optical density value of the immunological reaction of synthesized 8 peptides with SARS patient serum was 1.5-2.6 times higher than that with normal serum. **Conclusion** The 8 peptides from S1 domain of S protein appear to have low immunogenicity to the serum of SARS patients, indicating that these peptides may not be the epitope of the SARS-Cov.

Key words: coronavirus, severe acute respiratory syndrome; epitope; peptide vaccine; immune reaction

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。虽然目前国内外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

收稿日期: 2003-11-18

基金项目: 广东省科技厅科研攻关项目 SARS 专项基金

Supported by SARS-special Foundation of Science Research Item of Guangdong Sci & Tech Bureau

作者简介: 张嘉杰 (1967-), 男, 1996 年毕业于华南师范大学, 现为第一军医大学在读博士研究生, 电话: 020-61648167, E-mail: jydyys@fimmu.com

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	KPTTFMLKYDENGTTDAVDC	2 362.7	1 181.3	1 182.3
S-12	SNFRVVPVSGDVVRFNPITNLC	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(λ)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(λ)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(λ)比值

Tab.2 Ratio of SARS patients' to the normal person's serum D(λ) 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

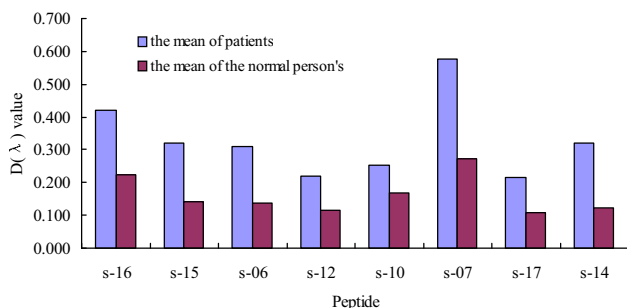


图 1 合成的抗原表位肽与 SARS 病人血清的反应

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、1:1 000 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。

(下转 797 页)

另外,目的基因转染组术后 7 d 皮瓣成活面积显著高于对照组,说明成活率有显著性提高,也证实了目的基因转染的效果。pcDNA₃ 组与对照水组在各种实验数据中无显著性差异,说明利用质粒脂质体复合物转染不会导致炎症反应,血栓形成等副作用。

在我们的这个实验中,是以缺血任意皮瓣作为研究对象。实际上,在临床工作中,如各种厚度皮片的移植,各种缺血组织的再植,还有各种组织工程再造组织或器官的植入等,都离不开它们的中心环节,即血管的增生和血管的长入。本实验所得的结果将为其他相关的 VEGF 基因治疗用于创伤修复实验提供依据。

参考文献:

- [1] Inzer JM, Robert AP, Richard B, *et al.* Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischemic limb [J]. *Lancet*, 1996, 10348(9024): 370-4.
- [2] Losordo DW, Vale PR, Symes JF, *et al.* Gene therapy for myocardial angiogenesis initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia [J]. *Circulation*, 1998, 98(25): 2800-4.
- [3] Takayanagi S, Ogawa Y. Effects of pentoxifylline on flap survival [J]. *Plast Reconstr Surg*, 1980, 65: 763-72.
- [4] Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, *et al.* Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability and angiogenesis [J]. *Am J Pathol*, 1995, 146(5): 1029-39.
- [5] Zhang F, Oswald T, Lin S, *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and the effect of exogenous VEGF on survival of a random flap in the rat [J]. *Br J Plast Surg*, 2003, 56(7): 653-9.
- [6] Terman BI, Dougher-Vermazen M. Biological properties of VEGF/VPF receptors [J]. *Cancer Metastasis Rev* 1996, 15(2):159-63.
- [7] Jeschke MG, Barrow RE, Hawkins HK, *et al.* Biodistribution and feasibility of non-viral IGF-I gene transfers in thermally injured skin [J]. *Lab Invest*, 2000, 80(2): 151-8.
- [8] Turumi Y, Takeshita S, Chen D, *et al.* Direct intramuscular gene transfer of naked DNA encoding vascular endothelial growth factor augments collateral development and tissue perfusion [J]. *Circulation*, 1996, 94(12): 3281-90.
- [9] Miller CR, Bondurant B, Mclean SD, *et al.* Liposome-cell interactions in-vitro: Effect of liposome surface charge on the binding and endocytosis of conventional and sterically stabilized liposomes [J]. *Biochemistry*, 1998, 37(37): 12875-83.
- [10] Brogi E, Schattman G, Wu T, *et al.* Hypoxia-induced paracrine regulation of VEGF receptor expression [J]. *J Clin Invest*, 1996, 97(2): 469-76.
- [11] Namiki A, Brogi E, Keaney M, *et al.* Hypoxia induced vascular endothelial growth factor in cultured human endothelial cells [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(52): 31189-95.
- [12] Yang Y, Nunes FA, Berencsi K, *et al.* Cellular immunity to viral antigens limits EI-deleted adenoviruses for gene therapy [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(10): 4407-11.
- [13] 熊 兵, 易传勋, 过健俐, 等. 血管内皮生长因子基因改善大鼠腹壁下动脉皮瓣成活的实验研究 [J]. *中华整形外科杂志*, 2003, 19(3): 211-3.

Xiong B Yi CX, Guo JL, *et al.* An expression study on the survival of the anterior abdominal skin flap after VEGF cDNA administration [J]. *J Plast Surg*, 2003, 19(3): 211-3.

(上接 790 页)

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是否具有中和 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。

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.

(责任编辑:杨金星)