

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790( 2007 )21-1937-03

## 单纯疱疹病毒 II 型 gD 模拟抗原表位的筛选及分析

焦凤萍<sup>1</sup>, 于爱莲<sup>1</sup>, 王玉<sup>1</sup>, 洪源<sup>2</sup>, 成军<sup>2</sup>, 于广福<sup>1</sup>( <sup>1</sup>泰山医学院基础部病原学教研室, 山东泰安 271000, <sup>2</sup>北京地坛医院传染病研究所, 北京 100011 )

### Screening and bioinformatics analysis of antigenic mimotope of herpes simplex virus type II glycoprotein D

JIAO Feng-Ping<sup>1</sup>, YU Ai-Lian<sup>1</sup>, WANG Yu<sup>1</sup>, HONG Yuan<sup>2</sup>, CHENG Jun<sup>2</sup>, YU Guang-Fu<sup>1</sup><sup>1</sup>Department of Etiology, Taishan Medical College, Tai'an 271000, China, <sup>2</sup>Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011, China

**【Abstract】** AIM: To screen antigenic mimotope of herpes simplex virus type II glycoprotein D ( HSV-2gD ) by the monoclonal antibodies against HSV-2gD using a 12-mer Phage display peptide library. **METHODS:** A 12-mer phage peptide library was biopanned for 4 rounds with the monoclonal antibodies against HSV-2gD. Specific phage clones of the HSV-2gD were identified by ELISA. ssDNA of positive clones were extracted and purified for sequencing and confirmed by computer assistant analysis. **RESULTS:** After 4 rounds of effective biopanning, we got specific phage clones. Analysis with computer demonstrated that the PYH-H and the P-PLW were the main amino-acid motif. **CONCLUSION:** The PYH-H and the P-PLW are mimotope of HSV-2gD and may be a substitute antigen of gD. This strategy provides the potential for preparing more effective epitope vaccine.

**【Keywords】** phage peptide library, herpes simplex virus, mimotope

**【摘要】**目的: 用抗-HSV-2gD 单克隆抗体( mAb )从噬菌体随机 12 肽库中筛选 HSV-2gD 抗原模拟表位序列。方法: 利用 HSV-2gD McAb 淘筛噬菌体随机 12 肽库, 经四轮富集筛选, 随机挑取阳性克隆扩增后进行 ELISA 鉴定, 同时提取其基因组 DNA 进行序列测定, 并利用生物信息学软件对包膜糖蛋白 D ( gD )进行 B 细胞抗原表位分析。结果: 经四轮生物淘筛后, 特异性噬菌体克隆得到了富集。通过对阳性克隆携带的随机 12 肽序列进行综合生物信息学分析, 得到了 PYH-H 和 P-PLW 两个模拟 HSV-2gD 抗原表位的主要氨基酸基序。结论: 用噬

菌体随机 12 肽库成功筛选到了两个模拟 HSV-2gD 抗原表位的主要氨基酸基序, 可模拟 McAb 针对的抗原表位, 可能是 HSV 的替代抗原。该研究方法为研制更有效及更广谱的 HSV 基因疫苗提供了依据。

**【关键词】** 噬菌体随机肽库, 单纯疱疹病毒, 模拟表位

**【中图分类号】** R37 **【文献标识码】** A

## 0 引言

单纯疱疹病毒( herpes simplex virus, HSV )是世界范围内流行的疱疹性疾病的病原体<sup>[1]</sup>, 现已发现的 HSV 包膜上的糖蛋白有 11 种, 它们是 HSV 主要的免疫原, 能诱导体液和细胞免疫, 产生高滴度中和抗体, 激发迟发型超敏反应( delayed type hypersensitivity, DTH )及 T 细胞增殖反应, 以 HSV 包膜糖蛋白 D ( glycoprotein D, gD )免疫作用最强<sup>[2]</sup>。gD 是极为保守的免疫原性蛋白, 其在病毒复制和刺激中和抗体的产生中起重要作用, 也是宿主细胞免疫和体液免疫反应的主要靶标之一<sup>[3]</sup>。噬菌体展示技术( phage display )是近年来发展的一项新的分子生物学技术, 是研究抗原抗体相互作用的有力工具, 可以从随机肽库中直接筛选能和抗体结合的模拟抗原表位, 而这些表位不必预先确定蛋白质的氨基酸残基序列<sup>[4]</sup>。本研究利用抗-HSV-2gD 单克隆抗体( mAb )从噬菌体肽库中筛选 HSV-2gD 抗原模拟表位, 为进一步研发防治 HSV 感染的新型疫苗奠定基础。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 噬菌体随机 12 肽库试剂盒, 滴度为  $1.8 \times 10^9$  pfu/ $\mu$ L ( 美国 NEB 公司 ); 特异性抗-HSV-2gD mAb, 属于 IgG1, M13 DNA 抽提试剂盒( 北京博菲康生物技术有限公司 ); *E. coli* ER2738 宿主菌, 为 F<sup>+</sup> 四环素抗性转基因组株( 北京地坛医院传染病研究所提供 ); 其余试剂均由北京地坛医院传染病研究所提供。

### 1.2 方法

**1.2.1 淘筛 HSV-2gD 的模拟抗原表位** 第一轮淘筛时, 取 HSV-2gD mAb 包板, 轻摇 4℃ 过夜, 弃去包被液, 加满封闭液 4℃ 4 h, 用洗涤液 TBST ( 50 mmol/

收稿日期 2007-05-18; 接受日期 2007-08-31

基金项目: 山东省卫生厅资助项目( HZ149 )

通讯作者: 于爱莲, Tel ( 0538 ) 6222123 Email: alyu@tsmc.edu.cn

作者简介: 焦凤萍, 硕士生( 导师于爱莲 ), Tel ( 0538 ) 6222493

Email: fpjiao@tsmc.edu.cn

L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 1 mL/L Tween20)快速洗板6次,取原噬菌体肽库 2.22 μL(4 × 10<sup>10</sup>噬菌体)加入 100 μL TBST 包被孔中,室温轻缓摇动 60 min, TBST 洗涤去除未结合的噬菌体. 用 TBST 洗涤 10 次,加入 100 μL 非特异洗脱缓冲液(0.2 mol/L 的甘氨酸-盐酸, 1 g/L BSA, pH 2.2)轻摇 10 min,将洗脱物转入微量离心管中,加入 15 μL 1 mol/L Tris-HCl (pH 9.1)中和,取 114 μL 洗脱液加入 1:100 稀释的 11 mL 的 ER2738 培养物中,37℃ 振摇 4.5 h,扩增噬菌体. 按相同的方法共进行四轮淘筛,在进行第四轮淘筛时,洗涤时提高吐温 20(Tween 20)的浓度至 3 mL/L.

1.2.2 阳性克隆鉴定 随机挑取第四轮筛选中得到的 30 个噬菌体克隆做双抗夹心 ELISA 检测,待检克隆与阴性对照吸光度值之比大于 2.1 判定为阳性. 具体操作步骤严格按照《应用噬菌体表面展示肽库快速筛选肽配体》使用手册进行.

1.2.3 DNA 序列测定 用 M13 DNA 抽提试剂盒(QIAprep M13 Kit)提取噬菌体单链 DNA,由北京奥珂测序公司测序. 推导相应外源氨基酸序列,并进行同源性比较.

1.2.4 生物信息学分析 把淘筛所得到的 12 肽序列融合入 M13 噬菌体的 pIII 序列内,处于开放阅读框(ORF)的第 19 到 30 个氨基酸位点,应用 DNASTar Protean 软件提供的模块进行表面可能性、亲水性和抗原指数的分析,以此对两个可能的模拟抗原表位序列进行蛋白二级结构与 B 细胞抗原识别位点预测.

## 2 结果

2.1 肽库筛选 共进行了四轮筛选. 第一轮筛选投入量为 4 × 10<sup>10</sup> pfu(噬斑形成单位),产出量为 2 × 10<sup>3</sup> pfu,第二轮筛选投入量为 1 × 10<sup>11</sup> pfu,产出量为 2 × 10<sup>4</sup> pfu,第三轮筛选投入量为 1 × 10<sup>11</sup> pfu,产出量为 5 × 10<sup>6</sup> pfu,第四轮筛选投入量为 2 × 10<sup>11</sup> pfu,产出量为 2 × 10<sup>5</sup> pfu.

2.2 ELISA 检测结果 通过双抗夹心 ELISA 法,共有 11 个克隆与阴性对照吸光度值之比大于 2.1,为阳性克隆. 阳性克隆率为 37%. 将此 11 个阳性克隆命名为 P1 ~ P11.

2.3 序列测定和同源性比较 测定 11 个阳性克隆所携带的外源序列并推导出相应的氨基酸序列. 其中 7 个序列的同源性较高, P6 和 P7 有共同的序列,可见有两个主要氨基酸基序可能为 HSV-2gD 的模拟抗原表位序列即 PYH-H 和 P-PLW. 7 个阳性噬菌体克隆的氨基酸序列见表 1.

表 1 阳性噬菌体克隆及与 HSV-2gD 氨基酸序列比较

克隆	氨基酸序列													
P2	Q	Y	K	<u>P</u>	Y	<u>P</u>	<u>L</u>	<u>W</u>	H	G	M	A		
P3	A	R	L	N	<u>P</u>	Y	<u>P</u>	<u>L</u>	<u>W</u>	A	F	F		
P4	S	Y	E	<u>P</u>	T	<u>P</u>	<u>L</u>	<u>W</u>	A	T	S	L		
P6		S	<u>P</u>	<u>Y</u>	<u>H</u>	V	T	<u>H</u>	H	N	S	L	S	
P7		S	<u>P</u>	<u>Y</u>	<u>H</u>	V	T	<u>H</u>	H	N	S	L	S	
P8	F	<u>P</u>	<u>Y</u>	<u>H</u>	Q	M	<u>H</u>	V	P	N	E	F		
P10	F	<u>P</u>	F	H	T	Q	<u>H</u>	L	P	S	A	V		
gD	D	V	A	<u>P</u>	H	<u>H</u>	A	P	A	A	P	S	N	P

P 代表所筛选出来的阳性克隆,为了实验及描述的方便,特按 P1 到 P11 命名.

2.4 生物信息学分析 由表 1 可见,所筛选的 11 个阳性克隆有两个模拟抗原表位序列即 P-PLW 和 PYH-H. P2, P3 和 P4 有共有序列 P-PLW,经过初步分析 P3 的氨基酸序列更具有形成 HSV-2gD 模拟抗原表位的可能性. P6, P7 和 P8 有共有序列 PYH-H,而且 P6 和 P7 的序列完全相同, P6 和 P7 的氨基酸序列形成 HSV-2gD 模拟抗原表位的可能性更大. 应用 DNASTar 生物分析软件分析了 P3 与 P6 的氨基酸序列.

2.4.1 蛋白二级结构 ①PYH-H. 以 P6 为代表, Gamier-Robson 法与 Chou-Fasman 法预测结果显示 P6 蛋白无 α-螺旋中心. Gamier-Robson 法预测结果显示 P6 蛋白有 1 个 β-折叠区段, 2 个转角区域, 2 个无规则卷曲区域. Chou-Fasman 法预测结果显示 P6 蛋白有 3 个转角区域. ②P-PLW. 以 P3 为代表, Gamier-Robson 法与 Chou-Fasman 法预测结果显示 P3 蛋白无 α-螺旋中心. Gamier-Robson 法预测结果显示 P3 蛋白有 2 个转角区域, 2 个无规则卷曲区域, 2 个 β-折叠区段. Chou-Fasman 法预测结果显示 P3 蛋白有 1 个转角区域, 2 个 β-折叠区段.

2.4.2 B 细胞抗原表位预测结果 ①PYH-H. 结果表明,所筛选的 HSV-2gD 模拟表位 PYH-H 的位置位于抗原指数、亲水性以及表面可能性强的肽段相对集中区域(第 19 ~ 30 个氨基酸位点)(图 1).

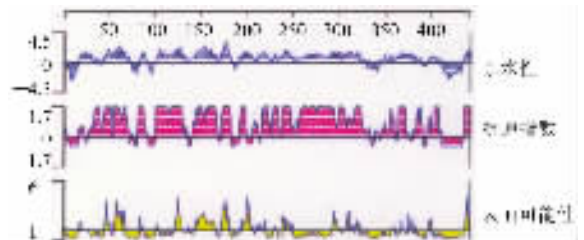


图 1 P6 克隆的亲水性、抗原指数和表面可能性分析

②P-PLW. 结果表明, 所筛选的 HSV-2gD 模拟表位 P-PLW 位于抗原指数、亲水性以及表面可能性强的肽段相对集中区域(第 19~30 个氨基酸位置, 图 2).

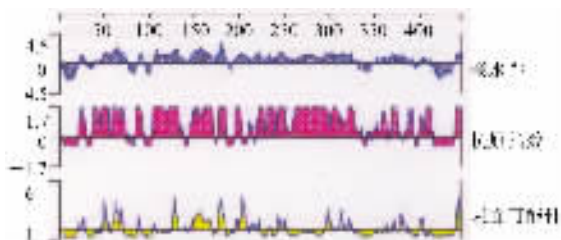


图 2 P3 克隆的亲水性、抗原指数和表面可能性分析

### 3 讨论

近年来, 利用噬菌体随机肽库技术对模拟抗原表位的研究越来越深入, 所谓模拟抗原表位是指噬菌体表达的线型多肽, 不仅可以和大分子抗原空间依赖性表位一样引起特异性的强免疫反应, 而且可以模拟糖基化表位, 可以代替大片段抗原用作疫苗和标准化诊断试剂的研究, 因此, 确定模拟抗原表位就显得尤其重要. 本实验在国内较早筛选出了 HSV-2gD 的模拟抗原表位, 并且加以科学的生物信息学分析, 为实验结果的准确性提供了有力的理论依据.

$\beta$  转角和无规则卷曲多处于蛋白质的表面, 利于与抗体嵌合, 成为抗原表位的可能性大<sup>[5]</sup>. 我们选用 DNASTar 软件对融合两个模拟抗原表位序列的成熟多肽进行分析, 二级结构分析时, 可以确定 PYH-H 和 P-PLW 形成抗原表位的可能性都较大. B 细胞抗原表位的分析采用 3 种指标即: Plot-Kyte-Doolittle 亲水性, Plot-Emini 表面可能性, Jameson-Wolf 抗原指数 3 个参数综合预测. 蛋白质亲水性分析结果认为蛋白的亲水部位与蛋白的抗原位点有密切的联系, 蛋白质表位常处于表面电荷及极性最大的区域. 本研究中所得到的两个抗原模拟表位都具有一定的亲水性, 亲

水性部位与表位并无很好的一致性, 疏水性氨基酸也经常出现在表位中. 表面可能性方案也是一种亲水性分析, 指蛋白抗原中氨基酸残基与溶剂分子接触的可能性, 它反映了蛋白抗原内外各层各残基的分布组成. 现代免疫学理论认为, 1 个表位中起关键作用的氨基酸可能只有 2~3 个, 其余的则起辅助作用<sup>[6]</sup>. 综合以上分析结果, 可以确定 PYH-H 和 P-PLW 都可能是 HSV-2gD 的抗原模拟表位基序, 但是否能作为糖蛋白的替代抗原尚需对其免疫原性进一步做动物实验加以验证. 筛选结果中有 4 个克隆同源性不高或游离于基序之外, 可能是弱结合能力的克隆, 也可能是操作过程中造成的非特异性结合. 由于 gD 糖蛋白较大, 很难将 6~7 种糖蛋白序列均导入一个基因工程载体中. 本研究筛选到的序列通过深入研究其抗原性, 可以作为 HSV 包膜糖蛋白替代抗原, 则有可能将多个抗原基因导入同一基因工程载体中, 可为 HSV 基因工程疫苗特别是核酸重组疫苗的研究提供依据.

### 【参考文献】

- [1] Aurelian L. Herpes simplex virus Type 2 vaccines: New ground for optimism [J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2004, 11: 437-445.
- [2] 陈爱荣. 单纯疱疹病毒的研究现状与展望 [J]. 微生物学免疫学进展, 2003, 31(2): 62-63.
- [3] 孟祥俊. 单纯疱疹病毒糖蛋白的特性及其临床意义 [J]. 国外医学 病毒学分册, 2002, 9(6): 184-185.
- [4] Wang LF, Yu M. Epitope identification and discovery using phage display libraries: Application in vaccine development and diagnostics [J]. Curr Drug Targets, 2004, 5(1): 1215-1219.
- [5] Apostolopoulos V, Yu M, Corper AL, et al. Crystal structure of a noncanonical low-affinity peptide complexed with MHC class I: A new approach for vaccine design [J]. J Mol Biol, 2002, 318(5): 1293-1305.
- [6] 杨乔欣, 马文煜, 余颖. 单纯疱疹病毒糖蛋白模拟位的研究 [J]. 免疫学杂志, 2002, 18(2): 146-148.

编辑 杨湘华