

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2005)09-0821-03

抗 IgE 中和抗体表位的筛选和鉴定

高琳¹, 余春艳¹, 沈柱¹, 张英起², 颜真²(¹ 第四军医大学唐都医院皮肤科, 陕西 西安 710038, ² 第四军医大学药理学系生物技术中心, 陕西 西安 710033)Screening and identification of epitopes on human immunoglobulin E from 7TM phage display peptide libraryGAO Lin¹, YU Chun-Yan¹, SHEN Zhu¹, ZHANG Ying-Qi², YAN Zhen²¹Department of Dermatology, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China, ²Biotechnology Center, School of Pharmacy, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

【Abstract】 AIM: To identify and characterize epitopes of human immunoglobulin E screened from 7TM phage display peptide library. **METHODS:** The epitopes of human immunoglobulin E were screened from 7TM phage display peptide library by using anti-IgE antibody as target protein and were identified by sandwich ELISA. **RESULTS:** After 3 rounds of screening, 15 of the 48 phage clones were identified as positive clones, which could bind to anti-human IgE antibody. The amino acid sequences of the positive clones were DHIDMGL, DHMWLGL, DHQDAGF and DHMDQNL. Competitive ELISA results demonstrated the competitive binding of the 4 sequences and IgG to anti-IgE mAb. Multiple antigenic peptides dot blot displayed that the screened multi-peptides could specifically bind to anti-IgE antibody. **CONCLUSION:** The screened epitopes are similar in their framework, and of extensive amino acid homology with IgE-CH3 region. These phage display peptides can bind specifically to anti-IgE antibody, providing a basis for further research on IgG related multi-peptide vaccine.

【Keywords】 human immunoglobulin E; bacteriophages; epitope

【摘要】 目的: 对噬菌体线性 7 肽库进行筛选, 得到诱发机体产生抗 IgE 中和抗体的 IgE 表位肽。方法: 以抗 IgE 抗体为靶, 筛选噬菌体线性 7 肽库, 双夹心 ELISA 鉴定阳性克隆。

收稿日期 2004-11-08; 修回日期 2005-03-01

通讯作者 颜真. Tel. (029) 83374774 Email. swjs_112@163.com

作者简介 高琳 (1979-), 女 (汉族), 山东省嘉祥县人. 硕士生 (导师 余春艳, 张英起, 颜真). Tel. (029) 83373490 Ext. 316 Email. gaolin@fmmu.edu.cn

结果: ELISA 鉴定随机挑选的经 3 轮筛选后所得 48 个噬菌体克隆, 其中 15 个克隆显示与抗 IgE 抗体有较强的结合能力, 序列测定得到氨基酸序列为: DHIDMGL; DHMWLGL; DHQDAGF; DHMDQNL. 竞争性 ELISA 结果显示 4 个序列均能与 IgE 竞争性结合抗 IgE mAb, MAP 点杂交结果显示筛选得到的多肽能与抗 IgE 抗体特异性结合. 结论: 经筛选得到的 7 肽序列具有相似的骨架区, 并与 IgE 的 CH3 区高度同源. 初步验证这些噬菌体展示肽能与抗 IgE 中和抗体特异性结合, 为 IgE 相关多肽疫苗的研究提供了依据.

【关键词】 免疫球蛋白 E 噬菌体 表位

【中图分类号】 R373.9 **【文献标识码】** A

0 引言

IgE 是介导 I 型变态反应的主要介质, mAb Oligumab 可与 IgE 结合, 使 IgE 不能附着于肥大细胞, 该抗体已进入治疗哮喘等过敏性疾病的临床试验^[1,2]. 这些结果提示, 如果发现产生人自身 IgE 中和抗体的表位肽, 不仅可以减少应用 mAb 的高额费用, 同时也可降低其临床应用的副作用和危险性. 我们利用噬菌体肽库技术筛选可结合并可诱导机体产生抗 IgE 抗体的寡肽, 为研制易于合成、安全低廉的小分子 IgE 拮抗药物提供实验依据.

1 材料和方法

1.1 材料 噬菌体线性 7 肽库 (库容 2×10^{16} PFU/L), 受体菌 ER2738、测序引物-96primer (New England BoiLabs 公司); 抗人 IgE mAb (荷兰 Sanquin 公司); human IgE (E&E 公司); HRP-抗 M13 mAb (Amersham Biosciences 公司); 羊抗小鼠 IgG-HRP (中山公司); 点杂交显色系统 (ProtoBlot II AP System with Stabstrate, Mouse, Promega 公司); BALB/c 小鼠 40 只, 雄性, 体质量 14 ~ 15 g (第四军医大学实验动物中心).

1.2 方法

1.2.1 噬菌体七肽库的筛选 将 200 μ L 抗人 IgE mAb 溶液以每孔 100 mg/L 铺入 96 孔酶联板, 4 $^{\circ}$ C 轻摇孵育过夜. 倾去液体, 加入封闭液 (5 mg/L BSA, 0.1 mol/L NaHCO₃, pH 8.6) 于 4 $^{\circ}$ C 孵育 1 h. 倾去封闭液, TBST (1 mL/L Tween20, TBS) 洗 6 次; 加入噬

菌体肽库 100 μL (原库按 1:100 用 TBST 稀释, 约含噬菌体 2×10^{15} PFU/L) 室温轻摇孵育 2 h. TBST 洗 10 次, 洗去未结合的噬菌体; 加入 100 μL 洗脱液 (0.2 mol/L Glycine-HCl, pH 2.2, 10 g/L BSA) 洗脱, 室温轻摇 8 min, 洗出液体并迅速加入中和液 (1 mol/L Tris-HCl, pH 9.1); 取 2 μL 测滴度, 余下的液体扩增后进行下一轮筛选. 第二轮和第三轮筛选保持原包被浓度, 加入上一轮扩增纯化的噬菌体 10 μL , 洗涤液为 TBSI (5 mL/L Tween20 in TBS) 3 次筛选后随机挑选 48 个分隔良好的阳性克隆于 *E. coli* ER2738 进行扩增、纯化, 用于噬菌体 ELISA.

1.2.2 抗人 IgE 结合噬菌体克隆的鉴定 ELISA 以抗人 IgE mAb, 抗人 TNF α (IgG2b) mAb 包被 96 孔酶联板 (100 mg/L, 每孔 100 μL), 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜后, 加入封闭液 (5 mg/L BSA, 0.1 mol/L NaHCO $_3$, pH 8.6) 4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h. 然后每孔加入上步纯化的噬菌体 1×10^9 PFU, 室温孵育 2 h. TBST 洗 6 次后, 每孔加入 HRP 标记的小鼠抗 M13 噬菌体抗体 (1:5000) 100 μL , 室温孵育 1 h. TBST 洗 6 次, ABTS 显色, 测定 $A_{405 \text{ nm}}$ 值. 以 $A_{405 \text{ nm}}$ 值高于阴性对照 2 倍以上, 且阴性对照值低于 0.1 者为阳性克隆.

1.2.3 噬菌体克隆 DNA 序列测定 通过对抗人 IgE mAb 结合噬菌体克隆的鉴定, 扩增结合活性高的前 15 位噬菌体克隆, 以 PEG/NaCl 纯化噬菌体克隆, 抽提送上海生工公司测序.

1.2.4 IgE 竞争抑制试验 取 1 mg/L 抗人 IgE mAb 100 μL /孔包被酶联板, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 加入封闭液 (5 mg/L BSA, 0.1 mol/L NaHCO $_3$, pH 8.6) 4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h. 然后每孔分别加入不同稀释度的 IgE 标准品 100 μL /孔, 室温轻摇 1.5 h. TBST 洗 6 次后每孔加入噬菌体 1×10^{10} PFU, 室温轻摇 1.5 h. 最后每孔加入 HRP 标记的小鼠抗 M13 噬菌体抗体 (1:5000) 100 μL , 室温孵育 1 h. TBST 洗 6 次, ABTS 显色, 测定 $A_{405 \text{ nm}}$ 值.

1.2.5 MAP (multiple antigenic peptides) 点杂交 根据之前的实验结果, 选 3 号肽 DHQDAGF 合成八个分支的 MAP (华辰公司合成). 取硝酸纤维素膜 (NC), 做好加样格并标记. MAP 及 humanIgE (阳性对照) 分别以 1 g/L 为起始浓度, 10 倍倍比稀释 5 个梯度后各取 2 μL 点膜, 干燥后加入封闭液 (1 g/L BSA), 室温震荡封闭 1 h, TBST 洗 3 次, 每次 10 min, 加入抗 IgE mAb (1 g/L, 1:5000 倍稀释), 室温 1 h, TBST 洗 3 次, 加入 1:50 稀释的羊抗小鼠 IgG-AP, 室温轻摇 30 min, TBST 及 TBS 各洗 3 次, 点杂交显色系统显色 3 min.

1.2.6 噬菌体免疫小鼠及抗血清的检定 噬菌体以 5×10^{15} PFU/L, 免疫 BALB/c 小鼠. 免疫方法为前 3 次分点皮下注射, 最后 1 次腹腔注射. 每次注射总量为 1 mL, 隔 2 wk 注射 1 次. 点杂交的方法初步了解有无抗人 IgE mAb 的产生, 取 800 μg /L 人 IgE 2 μL 点于 NC 膜上, 微干后置于 1 g/L BSA 的 TBST 中浸泡封闭, 室温轻摇 1 h, TBST 溶液冲洗 3 次后分别加入用 TBST 10 倍稀释的抗血清, 室温轻摇孵育 1 h. TBST 溶液冲洗 3 次, 加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG (1:1000 稀释) 室温轻摇 30 min, DAB 显色.

2 结果

2.1 噬菌体 7 肽库的筛选和 ELISA 鉴定 在以抗人 IgE mAb 为靶对噬菌体线性 7 肽库进行的 3 轮筛选中, 包被抗人 IgE mAb 浓度不变, 但每一轮噬菌体的回收率逐步上升, 分别为 $5.0 \times 10^{-8}\%$, $1.01 \times 10^{-6}\%$ 和 $9.0 \times 10^{-3}\%$, 说明筛选得到的特异性噬菌体富集效果明显. 将第 3 轮洗脱下来的噬菌体转染宿主菌 ER2738 并铺板过夜, 随机挑取 IPTG/Xgal 琼脂板上分隔良好的 48 个噬斑. 经 ELISA 阳性克隆及阴性克隆的双向选择鉴定, 其中 39 个噬菌体显示其与抗人 IgE mAb 的结合力较强, 通过结合力强弱排序取前 15 个噬菌体 (Fig 1).

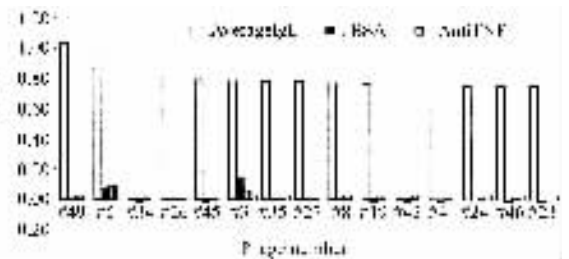


Fig 1 Result of the binding of phage clones and recombinant anti-hIgE antibody

图 1 噬菌体克隆与抗人 IgE mAb 的结合

2.2 噬菌体克隆 DNA 序列测定与分析 对鉴定得出的前 15 个噬菌体克隆进行 DNA 序列测定. 结果显示 15 个噬菌体克隆包含了 4 个序列, 其中 11 个克隆的氨基酸序列为 DHIDMGL (一号序列); 1 个克隆序列为 DHMWLGL (二号序列); 2 个克隆序列为 DHQDAGF (三号序列); 1 个克隆序列为 DHMDQNL (四号序列). 网上蛋白 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 未发现有已知的相同序列. 用多序列比对程序 CLUSTALW 和 DNAMAN 进行序列比对及与 IgE 的比较, 发现筛得的 7 肽序列有相似的骨架区和同源性, 并与 IgE 的 CH3 区有较高同源性.

2.3 竞争性 ELISA 分析 随着 IgE 浓度逐渐降低, 其对固相包被的抗人 IgE mAb 与噬菌体克隆结合的抑制作用亦随之降低, 提示噬菌体克隆能够模拟 IgE 表位并与抗人 IgE mAb 结合, 并且一号与三号克隆结合力更强 (Fig 2).

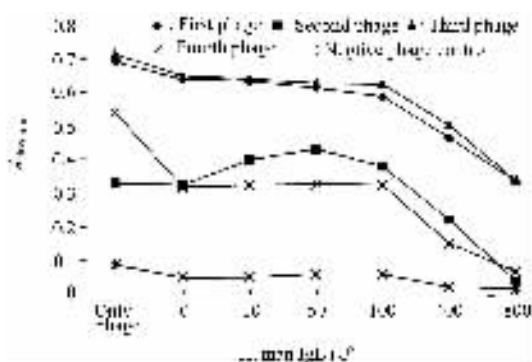


Fig 2 Competitive ELISA assay between human IgE and phage clones

图2 Human IgE 与噬菌体克隆竞争性 ELISA

2.4 MAP 点杂交实验结果 与阳性对照相比, 合成的 MAP 和 mAb 结合力较弱, 但有浓度依赖性, 说明筛选出的多肽能与抗 IgE mAb 进行特异性结合 (Fig 3).

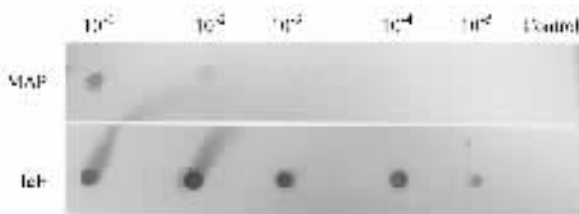


Fig 3 Result of dot-blot with MAP

图3 MAP 点杂交实验结果

2.5 噬菌体免疫小鼠抗血清鉴定 筛选出来的噬菌体克隆免疫动物后, 产生了抗 IgE 抗体, 其中一号与三号最为明显 (Fig 4).

3 讨论

I 型超敏反应又称速发型超敏反应, 其主要特征为: 发病快, 机体出现生理功能性紊乱, 有明显个体差异和遗传背景, 但尚缺乏有效的治疗手段. 现今抗 IgE 疗法为过敏性疾病患者提供了极为有效的治疗手段. 动物试验表明, 抗 IgE 抗体可与 IgE 结合, 其位点与高亲和力受体的结合位点相同, 从而使 IgE 不能附着于肥大细胞, 无法释放炎性介质^[3]. 目前已研制成功供人体应用的重组人单克隆抗 IgE 抗体 E25 (rhuMAb-E25) 即 Xolair 作为新型 IgE 抗体阻断剂于 2003 年获得 FDA 的批准^[4,5], 但售价昂贵且患者平

均每月要接受 1~2 次注射.

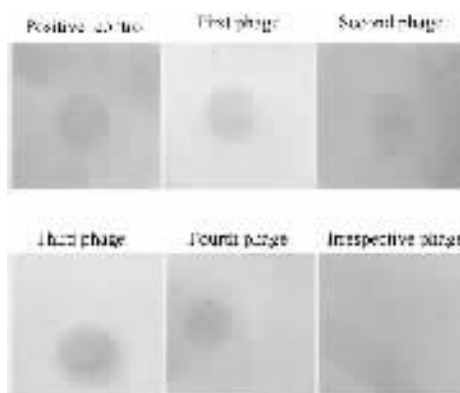


Fig 4 Result of dot-blot with anti-human IgE mAb

图4 抗人 IgE mAb 点杂交结果

噬菌体展示是表达已融合到噬菌体外壳蛋白的重组蛋白或多肽. 该技术将基因型和表型连在一起, 将识别抗原和进行再扩增的能力结合起来, 不经人体免疫, 绕过杂交瘤, 仅仅通过几轮“吸附-洗脱-扩增”的筛选富集过程^[6,7]. 我们应用噬菌体呈现 7 肽库 (BioLabs) 进行表位筛选, 得到了诱发机体产生抗 IgE 中和抗体的 IgE 表位肽 DHIDMGL, DHMWLGL, DHQDAGF 和 DHMDQNL. 初步得到的表位肽能与抗 IgE 抗体作用, 从而为用目的多肽免疫动物所制备多肽疫苗打下坚实基础. 疫苗只需少量注射就可以诱发自身产生抗体, 并可克服抗 IgE 抗体及可溶性受体药物用量大、需长期反复使用、易引起超敏反应的缺陷, 既节省资金又提高安全性. 这将对 I 型变态反应的多肽生物治疗打下一定基础.

【参考文献】

- [1] Umetsu DT, DeKruyff RH. Editorial overview: Novel concepts in the pathogenesis and therapy of allergy and asthma [J]. *Springer Semin Immunopathol*, 2004 25(3-4): 231-236.
- [2] Targowski T, From S. Role of monoclonal anti-IgE antibodies (rhuMAb) in the treatment of allergic bronchial asthma [J]. *Pol Merkuriusz Lek*, 2003 14(79): 65-68.
- [3] Drewe E, Powell R. Clinically useful monoclonal antibodies in treatment [J]. *Clin Pathol*, 2002 55(2): 81-85.
- [4] Omalizumab: Anti-IgE monoclonal antibody E25, E25, humanised anti-IgE mAb, IGE 025, monoclonal antibody E25, Olizumab, Xolair, rhuMAb-E25 [J]. *BioDrugs*, 2002 16(5): 380-386.
- [5] Bang LM, Plosker GL. Omalizumab: A review of its use in the management of allergic asthma [J]. *Treat Respir Med*, 2004 3(3): 183-199.
- [6] George Smith. Filamentous fusion phage; novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface [J]. *Science*, 1985 228(4705): 1315-1317.
- [7] Wiesehan K, Willbold D. Mirror-image phage display: Aiming at the mirror [J]. *Chembiochem* 2003 4(9): 811-815.