

脂多糖保守表位模拟肽的筛选与鉴定*

文维延 韩强涛 富宁**

(第一军医大学免疫教研室, 广州 510515)

摘要 用针对脂多糖保守表位的单抗 2B4 对噬菌体随机 12 肽库进行亲和筛选, 通过噬菌体 ELISA 实验及脂多糖 (LPS) 竞争抑制实验鉴定阳性克隆. 经三轮筛选后, 与抗体结合的噬菌体得到明显富集, 噬菌体 ELISA 结果显示, 阳性率达 80%. 将其中 12 个阳性噬菌体克隆做鼠伤寒杆菌和大肠杆菌 LPS 竞争抑制实验, 抑制作用非常明显, 有良好的剂量依赖关系, 证明这 12 个克隆与 LPS 具相似表位. DNA 测序并推导噬菌体展示肽的氨基酸序列为, GPPQWFFSQPQL (5/12, 41.7%), LPQYFWNTATTA (3/12, 25%), FPQNHWNVPWAT (2/12, 16.6%), HSQSFWNAPLAM 和 AHPWTHGYFPPL (1/12, 8.3%). 实验结果表明, 用 2B4 抗体筛选到的噬菌体短肽克隆可模拟保守表位, 即脂多糖的模拟肽 (位).

关键词 脂多糖, 噬菌体随机肽库, 模拟肽

学科分类号 R392-33

脂多糖 (LPS) 即内毒素, 是革兰氏阴性杆菌细菌壁的主要成分, 是致内毒素性休克的始动因子. 脂多糖结构复杂, 目前尚无理想的拮抗剂、抗体制剂或疫苗用于临床防治. 由于脂多糖存在众多的血清型, 因此由类脂 A 与核心多糖内核部分共同构成的抗原保守区域, 是开发新型广谱抗内毒素疫苗和拮抗剂的最佳靶标, 但是其胸腺非依赖性抗原性质, 极大地限制了疫苗的研制和发展. 抗脂多糖保守区域的抗独特型抗体疫苗在内毒素休克动物模型中取得一定保护效果, 提示用蛋白模拟脂多糖可能是达到上述目的的新途径.

近年来, 因广泛用于蛋白质分子间相互作用研究而被称为“万能”库 (all purpose) 的噬菌体递呈随机肽库 (phage-displayed random peptide library), 也被用在非肽类 (如糖、脂) 抗原表位的分析上. 噬菌体递呈的寡肽虽然不一定和天然抗原的结构完全相同, 但可以模拟其结合抗体的特性, 这种寡肽构成的表位称之为模拟位, 而肽称为模拟肽. 用抗多糖抗体从肽库中筛出的短肽不但具有多糖表位的抗原性, 而且可模拟多糖的功能. 目前应用噬菌体肽库对多糖或糖脂进行的研究包括: ConA 分子结合肽、肿瘤相关糖抗原 Le^y 模拟肽^[1,2]、Gal α 1.3 (galactosyl)^[3]、(神经) 糖鞘脂的模拟肽研究^[4] 及病原微生物多糖模拟肽研究. 引人注目的是病原微生物多糖模拟肽, 包括新型隐球菌荚膜多糖^[5]、链球菌荚膜多糖^[6] 的研究. 这些多糖模拟肽不仅可与特异性抗体结合, 而且可以在实验动物体内诱导出较低亲和力的抗糖抗体, 有的

还具有一定的抗细菌攻击的保护力. 但在有关革兰氏阴性菌内毒素脂多糖方面, 迄今仅见到关于志贺氏菌脂多糖的 O 抗原的模拟肽研究^[7] 以及布鲁杆菌 LPS 表位模拟肽^[8] 的报道, 而关于 LPS 保守表位模拟肽的研究, 除了我们先前的工作外, 尚未见其他的报道. 本研究在制备了可与鼠伤寒杆菌、大肠杆菌的脂多糖及绿脓杆菌菌体反应的高效价的抗脂多糖的单克隆抗体 (方法见参考文献 [9], 该抗体具交叉保护性) 的基础上, 研究脂多糖抗原保守区域的肽模拟表位, 旨在为研制新型广谱脂多糖疫苗和拮抗剂提供借鉴.

1 材料与方法

1.1 材料

噬菌体十二随机肽库: ph. D-12TM 为 New England BioLabs 公司试剂盒, 库容 1.9×10^9 . 大肠杆菌 XL-1Blue (基因型: SupE44, hsdR17, recA1, endA1, gyrA1, thi relA1, lac, F' (proAB, lacIq, Z Δ M15, Tn10tet)) 由军事医学科学院五所王海涛教授赠送.

实验用抗脂多糖交叉表位的单克隆抗体 2B4 (IgG1 亚类) 由白求恩医科大学免疫教研室制备^[9], 其特点是, 能与大肠杆菌 LPS 和鼠伤寒杆菌 LPS 反应, 并与绿脓杆菌及布氏杆菌有交叉

* 广东省自然科学基金项目 (39470658).

** 通讯联系人.

Tel: 020-85148221, E-mail: zfn@fimmu.deu.cn

收稿日期: 2000-04-24, 接受日期: 2000-06-07

反应. 大肠杆菌 O111B4 (44155-10) 及鼠伤寒杆菌 T8-61 (50220-1) 购自北京药品生物制品检定所. 大肠杆菌及鼠伤寒杆菌 LPS 用热酚提取法制备. 经紫外扫描证实其光吸收峰形及纯度均达到商品 LPS 水平, 无蛋白质和核酸污染.

1.2 方法

1.2.1 噬菌体肽库的筛选: 以 10 μg /孔 2B4 包被 ELISA 板, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 3% BSA 封闭 37 $^{\circ}\text{C}$ 2 h, 0.5% TBST 洗板, 加 10 μl 肽库原液 (1.7×10^{11} pfu), 室温缓慢振荡 1 h, 甩去液体, 0.5% TBST 洗 10 遍, 加入 100 μl 0.2 mol/L 甘氨酸盐酸缓冲液 (pH 2.2), 室温作用 10 min, 以充分洗脱结合的噬菌体, 将洗脱液吸入预加 8 μl 2 mol/L Tris 的离心管中进行中和. 取 1 μl 中和和洗脱液用 LB 培养基稀释, 测定噬菌体的滴度, 其余洗脱液投入 20 ml XL-1Blue 培养液中 (过夜菌 1:100 稀释), 37 $^{\circ}\text{C}$ 250 r/min 培养 5 h. 计算噬菌体的产量 = 洗脱噬菌体数/淘洗用噬菌体数 \times 100%. 按上述步骤再淘洗 2 次. 第 3 次淘洗的噬菌体适当稀释后感染 XL-1Blue, 做 pfu 平板. 挑取单个噬斑, 制备噬菌体原种.

1.2.2 ELISA 鉴定噬菌体阳性克隆: 2B4 1 mg/L 包被 ELISA 板, 同时以抗 HbsAg 单抗 (IgG1 亚类, 北京药品生物制品检定所产品) 同样量包被作为无关抗体阴性对照. 3% BSA 封闭, 加 50 μl 样品稀释液 (含 1% BSA、1% Tween20 TBST) 及 50 μl 噬菌体原种 (同时设噬菌体库为阴性噬菌体对照、XL-1Blue 培养上清为空白对照), 37 $^{\circ}\text{C}$ 1 h. 1% PBST 洗板, 加 1:4000 HRP-抗 M13 单抗 (Ampharmacia 产品), 37 $^{\circ}\text{C}$ 1 h. ABTS 底物显色 2 min, 于 450 nm 读取吸光度 A 值. 以 A 值高于

无关抗体对照及阴性噬菌体对照 3 倍以上者定为阳性克隆.

1.2.3 竞争抑制实验 2B4 1 mg/L 包被 ELISA 板, 3% BSA 封闭, 加入不同稀释度的 LPS 与阳性克隆的混合液 100 μl , 其余步骤同前. 计算抑制率: 抑制率% = (未加 LPS A_{450} - 加 LPS A_{450}) / 未加 LPS $A_{450} \times 100\%$.

1.2.4 单链 DNA 的提取及测序: XL-Blue 过夜菌 1:100 接种于 4 ml LB 培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 6 h, 12 000 r/min 室温离心 10 min, 取上清, 再离心一次, 取 3 ml 噬菌体上清液, 用 QIA prep Spin M13 Kit (德国产品) 提取并纯化单链 DNA. 合成-96 位 gpIII 测序引物 5'-HO CCCTCATAGTTAGCGT-AACG-3', 进行全自动测序.

2 结果

2.1 2B4 抗体筛选结果

2B4 抗体经 SPA 柱亲和层析纯化后为电泳纯, 用之对肽库进行三轮筛选, 结果见表 1.

Table 1 Enrichment of positive phage clones from library by 2B4 biopanning

Rounds of panning	Phage inputted	Phage eluted	Recovery ¹⁾ / %
1	1.7×10^{10}	6.12×10^3	3.6×10^{-5}
2	2×10^{11}	4.4×10^5	2.2×10^{-4}
3	2×10^{11}	8×10^7	4×10^{-2}

¹⁾ Yield (%) = (No. of phage eluted) / (No. of phage inputted) \times 100%.

表 1 结果显示, 经 3 轮淘洗后, 与 2B4 抗体结合的噬菌体获得明显的富集, 第三轮淘洗的产率较第一轮高出 1 000 倍.

2.2 噬菌体阳性克隆的鉴定

第三轮洗脱下的噬菌体感染 XL-1Blue 菌后,

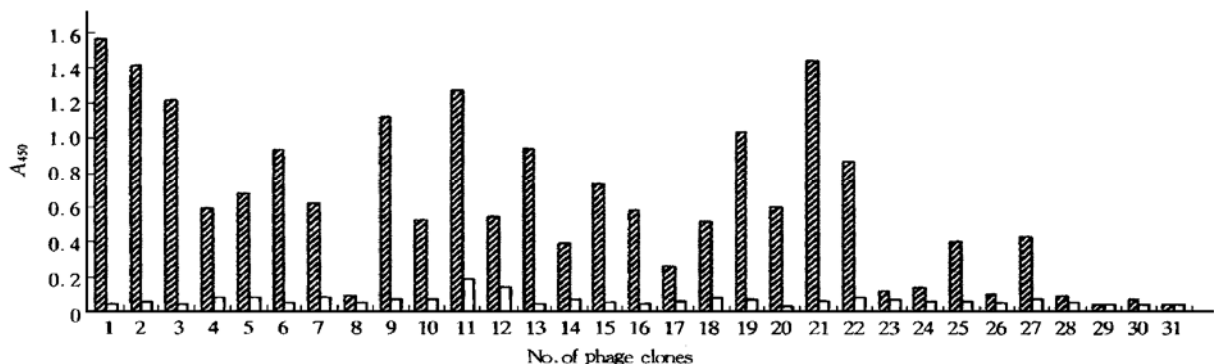


Fig. 1 Identification of bacteriophage clones

▨: 2B4 antibody; □: HBsAg antibody. No. 30: phage library; No. 31: supernatant of XL-Blue.

随机挑取 29 个噬斑, 制备噬菌体原种, 进行 ELISA 鉴定, 结果见图 1.

以高于无关抗体对照及阴性噬菌体对照 3 倍以上者定为阳性克隆. 可见有 23 个克隆为阳性, 阳性率为 80%. 并且阳性克隆对筛选抗体 2B4 呈高度特异性.

2.3 LPS 竞争抑制性实验

为了进一步鉴定阳性克隆的特异性, 用 LPS 竞争抑制其与 2B4 的结合. 挑取 12 个与 2B4 抗体反应较强的噬菌体克隆做抑制实验, 结果如表 2 所示.

Table 2 Competitive inhibition of binding between 2B4 and positive phage displayed peptides by *S. typhi*. LPS

No. Of phage clones	Percentage of inhibition/ %		
	10 mg/L ¹⁾	1 mg/L	0.1 mg/L
1	93.9	90.6	50.6
2	91.8	90.0	30.7
3	95.0	86.4	43.4
6	93.5	93.0	57.8
7	87.2	68.0	13.1
9	93.5	92.5	12.1
11	88.9	73.5	0
13	91.6	86.8	25.6
15	94.2	92.4	85.0
19	94.8	90.4	25.8
21	93.3	87.5	2.0
22	94.5	87.9	49.2

¹⁾ concentration of *S. typhi*. LPS.

从表 2 中可见, 鼠伤寒杆菌 LPS 能非常好地抑制 2B4 抗体与阳性克隆的结合, 少至 0.1 mg/L 的 LPS 即能起到抑制作用. 由于 2B4 为针对脂多糖保守表位的单抗, 它不仅与鼠伤寒杆菌 LPS 结合而且能与大肠杆菌 LPS 结合, 我们进一步用大肠杆菌 LPS 来竞争抑制 2B4 与噬菌体短肽的结合, 同样得到了很好的抑制结果, 结果见表 3.

2.4 DNA 测序及短肽氨基酸序列分析

我们对上述 12 个阳性噬菌体克隆进行了 DNA 测序, 其编码展示肽部分的氨基酸密码子均为 NNK (N= G 或 A 或 T 或 C; K= G 或 T), 这和构建随机肽库所用的寡核苷酸序列特征一致, 说明所测序列确为随机肽库的展示片段. 这 12 个序列中, 出现了完全相同的序列. 推导上述 DNA 序列

所编码的氨基酸, 即为阳性噬菌体展示肽的氨基酸序列. 共得到五种短肽, 序列见表 4.

Table 3 Competitive inhibition of binding between 2B4 and positive phage displayed peptides by *E. coli* LPS

No. Of phage clones	Percentage of inhibition/ %		
	10 mg/L ¹⁾	1 mg/L	0.1 mg/L
1	97.1	69.0	36.3
2	96.8	86.4	65.4
3	97.1	60.8	18.0
6	97.7	66.8	42.8
7	97.0	85.4	80.0
9	97.5	71.3	63.2
11	96.0	52.2	45.9
13	ND		
15	96.7	70.9	64.0
19	97.0	58.7	52
21	ND		
22	96.8	63.1	57.0

¹⁾ concentration of *E. coli* LPS.

ND: not detected.

Table 4 Amino acid sequences of peptide displayed by positive phage clones

No. of phage clones	Peptide sequence	Frequency
1, 9, 19, 21, 22	GPPQWFFSQPQL	41.7%
2, 11, 15	LPQYFWNTATTA	25%
6, 13	FPQNHWNVPWAT	16.6%
3	HSQSFWNAPLAM	8.3%
7	AHPWTHGYFPPL	8.3%

可以看出, 2B4 筛选到的阳性肽序列具有高度保守性.

在 NCBI PDB 蛋白质数据库中查找具有与这五种阳性 12 肽氨基酸序列同源或结构相似的蛋白质, 结果显示, 无任何具有同源性的蛋白质.

3 讨 论

我们用针对脂多糖保守表位的抗体 2B4 对库容达 1.9×10^9 的 New England Biolab 公司的噬菌体随机 12 肽库进行了筛选. 三轮筛选后, 与抗体结合的噬菌体得到明显富集, 达 1 000 倍. 并且 12 个阳性噬菌体克隆表现出高度的特异性, 不仅能与筛选抗体特异性反应, 而且能被浓度低达

0.1 mg/L 的鼠伤寒杆菌和大肠杆菌 LPS 抑制, 亲和力远高于我们原先得到的六肽和十五肽^[10, 11]. 氨基酸序列分析表明, 12 个阳性肽具有高度保守性, 分为五组, GPPQWFFSQPQL 41.7%, LPQYFWNTATTA 25%, FPQNHWNVPWAT 16.6%, HSQSFWNAPLAM 和 AHPWTHGYFPPL 占 8.3%. 在进行噬菌体阳性克隆鉴定和抑制实验时, 由于在定性实验中我们并未对投入的噬菌体进行准确定量, 而在制备噬菌体原种过程中, 由于扩增效率的不同使得原种中所含噬菌体的量有所差异, 导致在表 2 和表 3 的结果中 LPS 对相同的噬菌体克隆 (如 1, 9, 19, 21, 22 号克隆) 与抗体结合的抑制率似乎有所不同. 分析这五种短肽的氨基酸序列, 不难看出, 虽然它们的氨基酸序列不完全相同, 但都含较多的芳香簇氨基酸 (F、W)、脯氨酸 (P)、疏水性支链氨基酸 (T 或 L) 及多数短肽 (11/12) 含酰胺氨基酸 Q, 这些氨基酸组合在一起, 形成高度疏水的小肽, 具有复杂的空间结构. 这种氨基酸组成与已报道的多糖模拟肽的 motif (如, ConA 结合肽 YPY, Le^Y 糖模拟肽 PWLY) 非常相似, 也与我们前期工作得到的脂多糖 15 模拟肽 (THSHQWRHHQFPAPT) 组成相似. Hoess 等对糖模拟肽的氨基酸组成进行了分析, 认为芳香簇氨基酸的苯环可能是模拟多糖糖环的基础, 酪氨酸的羟基可能是模拟多糖亲水性的基础, 脯氨酸则使肽链结构出现转折且降低肽链的柔韧性 (flexibility)、更好地使含芳香簇氨基酸的小肽从立体构象上模拟多糖^[3]. 脂多糖的抗原保守区域由类脂 A 与核心多糖内核部分共同构成, 是一种两性分子, 兼有类脂 A 的疏水性又具有多糖的亲水性, 我们筛选到的模拟肽疏水性成分较高, 因此, 我们推测, 这些克隆所展示的肽更可能模拟了脂多糖类脂 A 部分, 大肠杆菌 LPS 和鼠伤寒杆菌 LPS 的抑制结果也支持这一推测. 类脂 A 的结构非常保守, 无菌属特异性, 是所有革兰氏阴性菌 LPS 结构中固有的成分, 它由六糖、磷酸盐和脂肪酸组成, 不同菌属的类脂 A 在结构上仅有极其细微的差别, 如, 大肠杆菌类脂 A 与鼠伤寒杆菌类脂 A 仅相差一个 12 碳的脂肪酸链. 而核心多糖在同一菌属中较为保守, 具有菌属的特异性. 2B4 抗体与噬菌体阳性克隆的结合反应能被大肠杆菌和鼠伤寒杆菌 LPS 抑制, 提示这 12 个噬菌体展示肽可

能模拟了脂多糖抗原性最为保守的类脂 A 表位, 但还有待于进一步证实. 在 NCBI PDB 蛋白质数据库中未找到具有与这五种阳性 12 肽氨基酸序列同源或结构相似的蛋白质 (包括与 LPS 结合相关的蛋白质如 CD14、LBP (LPS binding protein)), 进一步提示这五种阳性小肽在空间结构或构象上模拟脂多糖的交叉表位.

我们下一步的工作拟进行噬菌体克隆的免疫原性及相应合成肽的免疫原性和生物活性鉴定, 探讨将此模拟肽发展为抗 LPS 广谱疫苗和拮抗剂的可能性.

参 考 文 献

- 1 Scott J K, Loganathan D, Easley R B, *et al.* A family of concanavalin A binding peptides from a hexapeptide epitope library. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89** (12): 5398~ 5402
- 2 Hoess R, Brinkmann U, Handel T, *et al.* Identification of a peptide which binds to the carbohydrate-specific monoclonal antibody B3. *Gene*, 1993, **128** (1): 43~ 49
- 3 Kooyman D L, McClellan S B, Parker W R, *et al.* Identification and characterization of a galactosyl peptide. Implications for use in removing xenoreactive anti-A Gal ar. *Transplantation*, 1996, **61** (6): 851~ 855
- 4 Taki T, Ishikawa D, Hanasaki H, *et al.* Preparation of peptides which mimic glycosphingolipids by using phage peptide library and their modulation on beta-galactosidase activity. *FEBS Lett*, 1997, **24**: 418 (1~ 2): 219~ 223
- 5 Valadon P, Nussbaum G, Boyd L F, *et al.* Peptide libraries define the fine specificity of anti-polysaccharide antibodies to *Cryptococcus neoformans*. *J Mol Biol*, 1996, **261** (1): 11~ 22
- 6 Pincus S H, Smith M J, Jennings H J, *et al.* Peptides that mimic the group B streptococcal type III capsular polysaccharide antigen. *J Immunol*, 1998, **160** (1): 293~ 298
- 7 Phalipon A, Folgori A, Arondel J, *et al.* Induction of anti-carbohydrate antibodies by phage library selected peptide mimics. *Eur J Immunol*, 1997, **27** (10): 2620~ 2625
- 8 de Bolle X, Laurent T, Tibor A, *et al.* Agtigenic properties of peptidic mimics for epitopes of the lipopolysaccharide from *Brucella*. *J Mol Biol*, 1999, **294** (1): 181~ 191
- 9 鲍永利, 富宁, 于春雷, 等. 交叉反应性抗脂多糖单克隆抗体的制备及初步鉴定. *免疫学杂志*, 1998, **14** (1): 15~ 18
Bao Y L, Fu N, Yu C L, *et al.* *Immunological Journal*, 1998, **14** (1): 15~ 18
- 10 Bao Y L, Fu N, Yang G Z, *et al.* Preparation of peptides mimicking lipid A epitope using phage display peptide library. *U. S. Chinese Journal of Microbiology and Immunology*, 1999, **1** (1): 43~ 46
- 11 文维延, 刘北一, 富宁. 从噬菌体随机十五肽库中筛选类脂 A 模拟肽的研究. *免疫学杂志*, 2000, **16** (4): 268~ 271
Wen W Y, Liu B Y, Fu N. *Immunological Journal (Chinese)*, 2000, **16** (4): 268~ 271

Screening and Identification of Mimotopes for Lipopolysaccharide Conservative Epitope from Random Phage Display Peptide Library*

WEN Wei Yan, HAN Qiang-Tao, FU Ning**

(Department of Immunology, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract To screen and identify the mimotopes for lipopolysaccharide (LPS) epitope, a random phage displayed dodecapeptide library was screened with a monoclonal antibody 2B4 specifically against LPS conservative epitope. The positive clones were identified by phage ELISA and competitive inhibition assay by either *S. typhi* T8-61 LPS or *E. coli* O111: B4 LPS. After three rounds of biopanning, the clones binding with 2B4 antibody were well enriched with positive rate of 80%. The bindings between 12 of positive phage clones and screening antibody were competitively inhibited by the two kinds of LPS, indicating that the positive clones have similar epitope with LPS. The positive peptide sequences were deduced from the corresponding DNA sequences. There were identical sequences among them. The sequences were GPPQWFFSQPQL (5/12, 41.7%), LPQYFWNTATTA (3/12, 25%), FPQNHWNVPWAT (2/12, 16.6%), HSQSFWNAPLAM and AHPWTHGYFPPL (1/12, 8.3%) respectively. The results demonstrate that the peptides screened with 2B4 antibody are mimotopes for LPS conservative epitope.

Key words lipopolysaccharide, random phage displayed peptide library, mimotope

* This work was supported by a grant from Nature Science Foundation of Guangdong Province (39470658).

** Corresponding author. Tel: 86-20-85148221, E-mail: zfn@fimmu.edu.cn

Received: April 24, 2000 Accepted: June 7, 2000