

文章编号:1000-5404(2013)16-1685-03

论著

嗜肺军团菌 LP1 株 MompS 抗原表位的预测与验证

许颖¹, 李晓庆¹, 王丹¹, 王建¹, 常晓松² (610500 成都, 成都医学院第一附属医院检验科¹; 610041 成都, 四川出入境检验检疫局²)

[摘要] 目的 探讨以嗜肺军团菌 LP1 株 MompS 抗原表位为基础的合成肽的免疫作用。方法 在 GenBank 中检索 LP1 株 MompS 基因信息, 利用在线生物信息学软件, 结合 DNA Star 软件的蛋白质二级结构预测理论方案, 预测其 B 表位抗原位点, 设计合成具有 LP1 血清型特异性氨基酸序列的多肽, 通过肽结合实验和动物免疫学效果评价检测合成肽对 LP1 免疫血清的结合能力。结果 筛选得到 3 条多肽 GP-15、NY-17、AA-19, 多肽肽结合实验表明 GP-15 D(450) 反应值显著高于 NY-17 和 AA-19 片段 ($P < 0.05$), 动物免疫学效果评价显示其各时间段的 IgG 抗体几何平均滴度显著高于 NY-17 和 AA-19 ($P < 0.05$)。结论 证实 3 条多肽均具备了 MompS 表位属性, GP-15 肽结合实验和动物免疫效果评价均提示其可作为嗜肺军团菌多肽疫苗的候选肽段。

[关键词] 嗜肺军团菌; B 抗原表位; 多肽疫苗

[中图分类号] R378.99; R394.3

[文献标志码] A

Prediction and confirmation of B cell epitope for MompS antigen of *Legionella pneumophila* serogroup 1

Xu Ying¹, Li Xiaqing¹, Wang Dan¹, Wang Jian¹, Chang Xiaosong² (¹Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital of Chengdu Medical College, Chengdu, Sichuan Province, 610500; ²Sichuan Provincial Bureau of Entry-exit Inspection and Quarantine, Chengdu, Sichuan Province, 610041, China)

[Abstract] **Objective** To explore the immune function of antigen epitope peptides based on MompS antigen of *Legionella pneumophila* serogroup 1 (LP1). **Methods** The genetic information of LP1 MompS antigen was retrieved in GenBank by using bioinformatics software online. Combined with the prediction scheme theory of protein secondary structure by DNA Star, the B epitope antigen sites were predicted, and then the polypeptides which have the specific amino acid sequence of LP1 were synthesized. The binding ability of the obtained polypeptides to LP1 was detected by peptides binding assay and animal immunology effect assessment. **Results** Three obtained peptides, GP-15, NY-17 and AA-19 were screened out, and the GP-15 peptide had the best immunogenic ability among 3 peptides in the peptides binding assay ($P < 0.05$) and animal immunology effect assessment ($P < 0.05$). **Conclusion** All of the 3 peptides are MompS antigen epitope peptides, and the GP-15 can be used to construct vaccine of *Legionella pneumophila*.

[Key words] *Legionella pneumophila*; B cell epitope; peptide vaccine

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81001345). Corresponding author: Chang Xiaosong, E-mail: xiaosongchang@163.com

军团菌广泛存在于天然水和土壤中, 属于兼性胞内寄生菌, 革兰染色阴性, 能侵入人类肺泡巨噬细胞及其他巨噬细胞、肺泡上皮细胞和水生环境中的原虫中并寄生(巨噬细胞和阿米巴为两种主要的相关宿主细胞), 在真核细胞内, 它能够破坏小泡传输, 产生空泡,

阻止吞噬体-溶酶体融合, 在细胞内复制, 最后, 细菌从宿主细胞中逸出, 导致宿主细胞破裂死亡^[1]。其被人体吸入后, 2.55% 的患者出现下呼吸道感染症状, 多数军团菌肺炎(80% ~ 85%) 是由嗜肺军团菌的第 1 ~ 6 种血清型引起, 其中又以血清 I 型(Lp1) 为主^[2]。

嗜肺军团菌的外膜蛋白中相对分子质量约 2.8×10^3 的主要外膜蛋白 S 基因(mompS) 为各血清型所共有, 具有种、属特异性。它是一种孔蛋白, 可聚合成穿孔素样结构, 是军团菌主要的毒力因子之一。本课题选用

[基金项目] 国家自然科学基金(81001345)

[通信作者] 常晓松, E-mail: xiaosongchang@163.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130701.0925.007.html> (2013-07-01)

具有属特异性的嗜肺军团菌 MompS 作为疫苗的候选抗原,以探讨其多肽表位在疫苗研制中的应用前景。

表位疫苗^[3] (epitope vaccine) 是根据抗原表位氨基酸序列制备而成的疫苗,包括合成肽疫苗 (synthetic peptide vaccine)、重组表位疫苗 (recombinant epitope-based vaccine) 及表位核酸疫苗 (epitope DNA vaccine, minigenes/epigenes) 等,是目前研制抗感染性疾病、恶性肿瘤、寄生虫病疫苗的有效手段。表位疫苗具有以下特点^[4]:①表位疫苗安全、无毒、稳定,可以直接刺激机体产生特异性免疫反应,其分子结构小而简单,不会引起自身免疫反应或免疫抑制;②表位肽疫苗可对抗原表位进行精确的定位,可对 T、B 细胞抗原表位进行不同组合,制成针对多种病原体的疫苗;③选用微生物中无突变的小片段作合成肽疫苗,可规避病原体因自身快速基因突变所形成的免疫逃避作用,如流感病毒、SARS、HIV 等可通过快速而高频的突变逃避宿主免疫系统的攻击。据此,课题组运用表位分析软件对 MompS 蛋白进行表位分析,合成相应肽段后,体内外实验检测合成肽免疫效果。

1 材料与方法

1.1 多肽预测

多肽预测使用 http://tools.immuneepitope.org/tools/bcell/iedb_input 在线分析,同时,依据 DNA Star 软件包中的抗原性指数进行预测,结合亲疏水性、二级结构^[5] 确定最终入选片段。

1.2 候选表位多肽的合成

由北京华大蛋白质研发中心有限公司合成,纯度大于 95%。

1.3 多肽验证

1.3.1 多肽结合实验 多肽通过氨基与 BSA 发生共轭反应,形成多肽与 BSA 的复合物。用 pH 9.6 包被缓冲液将样品稀释至蛋白质含量为 2 μg/mL。在每个聚苯乙烯板的反应孔中加 0.1 mL,4 °C 过夜 (12 ~ 16 h)。用 PBS-T 洗涤缓冲液洗 3 次,100 μL/孔加含 1% BSA 的封闭液,37 °C 孵育 2 h,洗涤 3 ~ 4 次,每孔加入用 PBS 稀释 LP1 兔抗血清 100 μL,置 37 °C 孵育 1 h,每样本加 3 复孔,并设一阴性对照孔,37 °C 封闭 1 h 然后 PBS-T 洗涤 5 次。用 PBS 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG (工作浓度为 1:3 000) 100 μL/孔,37 °C 孵育 1 h, PBS-T 洗涤 5 次。于各反应孔中加入临时配制的 TMB 底物溶液 0.1 mL,37 °C 避光显色 15 min,反应孔中加入 50 μL 2 mol/L 硫酸 0.05 mL 终止反应。嗜肺军团菌裂解液作为阳性对照, PBS 液作为阴性对照,以待测样本/阴性值结果进行比较。

1.3.2 多肽动物免疫学效果评价 实验采用健康 BALB/c 小鼠,雌性,6 ~ 7 周龄,偶联各多肽于 KLH 后进行免疫,免疫剂量为 50 μg/只,每组免疫 15 只小鼠,弗氏完全佐剂免疫小鼠 3 只,于 0、2、4 周共注射 3 次,表位肽与弗氏完全佐剂按

100 μg:1 mL 完全乳化,在小鼠腋下、腹股沟及腹腔多点肌注。首次免疫后第 1、3、5、7、9 周,眼眶取血制备血清。间接 ELISA 法测定血清抗体滴度,将各多肽偶联 BSA 后包被酶联板 (0.2 μg/孔),血清抗体按照 1:200 进行倍比稀释,酶标二抗为羊抗鼠 IgG,底物为四甲基联苯胺 (Sigma 公司, USA)。用酶标仪 (thermolab systemsmultiskan spectrum, USA) 于 450 nm 测定光密度值,多肽免疫小鼠 $D(450)$ 值/正常 BALB/c 小鼠 $D(450)$ 值大于 2 为结果阳性,结果以双复孔光密度值均值表示。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计学软件,对光密度值进行单因素方差分析和两两比较,对几何平均滴度进行重复测量方差分析。

2 结果

2.1 多肽预测分析结果

采用 DNA Star 软件的 Chou Fasman 方案和 Gamier Robson 法进行分析,计算结果表明:编码蛋白相对分子质量为 61 983.66,等电点为 9.03,二级结构预测属于一种以 β 片层为主的混合型蛋白,其中 α 螺旋主要分布区域为:72 ~ 91,186 ~ 196,204 ~ 215,220 ~ 222,276 ~ 278,307 ~ 314,318 ~ 319,341 ~ 345,379 ~ 390,486 ~ 487,β 片层主要分布区域为:8 ~ 12,22 ~ 27,31 ~ 42,53 ~ 62,110 ~ 111,121 ~ 128,198 ~ 203,227 ~ 234,270 ~ 273,279 ~ 284,293 ~ 297,326 ~ 327,333 ~ 337,345 ~ 352,367 ~ 376,396 ~ 405,412 ~ 417,422 ~ 426,438 ~ 443,455 ~ 465,477 ~ 480,510 ~ 514,522 ~ 528。

2.2 SOSUI 胞外区

抗原表位多分布于胞外区域,MompS 氨基酸片段胞内区和跨膜区为 401 aa ~ 469 aa。

2.3 在线分析结果

利用 http://tools.immuneepitope.org/tools/bcell/iedb_input 进行在线分析,根据抗原性分析结果,共预测了 23 条肽段,结合抗原二级结构、胞外区分布,以及亲水性、溶剂可及性和可塑性分析^[5],抗原表位预测如下:选择区域分别为:GP-15、NY-17、AA-19 (表 1)。

表 1 预测多肽序列

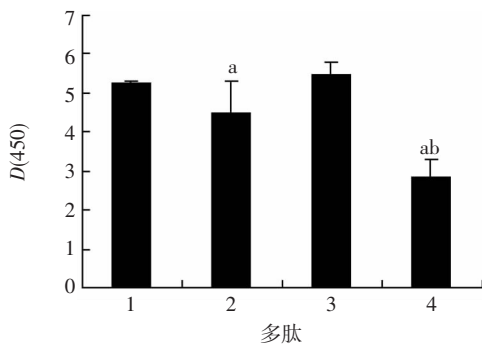
名称	简称	序列
Momps-B-pep1	GP-15	GTMGPVCTPGNVTVTP
Momps-B-pep2	NY-17	NTATNGLETDFAAASGPY
Momps-B-pep3	AA-19	AQGDLTLDVGYMWFNYFNA

2.4 多肽结合实验

如图 1 所示,嗜肺军团菌裂解液作为阳性对照,具有良好的阳性对照效果,3 段多肽均偶联至 KLH,GP-15 多肽比其他 2 个多肽的光密度反应值高 ($P < 0.05$),提示 GP-15 多肽 B 细胞表位优势更好。

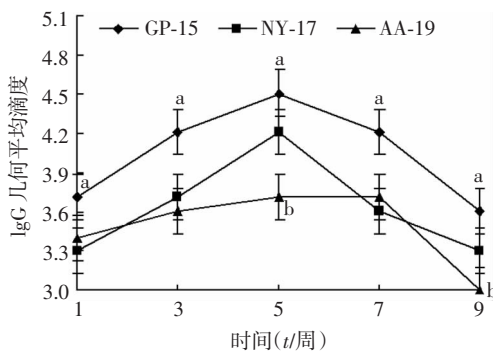
2.5 多肽动物免疫学效果评价

如图 2 所示,3 段多肽免疫小鼠后,抗体滴度均在 5 周达到最大峰值,其中,GP-15 在免疫小鼠后,其各时间段的几何平均滴度显著高于 NY-17 和 AA-19 ($P < 0.05$)。



1: 阳性对照 (40 μg/mL); 2: NY-17 (2 μg/mL); 3: GP-15 (2 μg/mL); 4: AA-19 (2 μg/mL)
a: $P < 0.05$, 与阳性对照和 GP-15 比较; b: $P < 0.05$, 与 NY-17 比较

图1 3条多肽结合能力比较



a: $P < 0.05$, 与 NY-17、AA-19 比较; b: $P < 0.05$, 与 NY-17 比较

图2 免疫后小鼠 IgG 抗体几何平均滴度

3 讨论

军团菌疫苗的研制已有近 20 年历史,经历了灭活全菌疫苗、减毒活疫苗、蛋白亚单位疫苗,但目前为止,尚无安全有效的疫苗投入临床使用。最早报道的为嗜肺军团菌无毒突变株和热休克株,豚鼠经腹腔免疫后,能够产生免疫效应和保护性免疫。嗜肺军团菌的菌膜免疫豚鼠后,能够产生极强的保护性免疫^[6-8]。相对于全菌体疫苗,运用多肽设计疫苗具有更好的前景。现代保护性免疫理论认为,蛋白质抗原并非通过其完整分子发挥功能,而是通过其表位体现其特异性,蛋白质抗原不仅包含 B 细胞、Th 细胞及 CTL 等与免疫识别密切相关的表位,还含有毒性或抑制性表位、优势非中和性表位、病理与自身抗原交叉反应性表位等,它们可引起免疫偏移、免疫颠覆等不利的免疫反应而导致免疫耐受。因此,必须对相关表位进行预测和筛选,才能得到适用于临床的疫苗候选多肽片段。

生物信息学方法为抗原表位的预测提供了有效手段,目前已有许多抗原表位在线预测网址和预测软件,本研究采用了 http://tools.immuneepitope.org/tools/bcell/iedb_input 和 DNA Star 软件进行分析,体内外实验结果表明,预测得到的肽片段具有良好的免疫原性。

通过在线网址预测,其显示的表位片段较多,据统计 MompS 表位就有 23 条多肽片段,课题组在筛选过程中主要遵循以下原则:①位于 N 端或 C 端;②具有较好的亲水性;③抗原指数较高;④无 α 螺旋结构,易于变形;⑤序列长度在 8 ~ 20 个氨基酸。本课题组在前期研究中^[5]通过对预测表位的分析,将抗原表位大致分为 3 个区域进行了片段的克隆表达,用克隆蛋白进行了体外接合实验,结果表明,3 个片段均能在体外结合血清抗体,由于 3 个片段长度均较长,可能引入了二级结构和毒性片段,为尽量缩短肽段长度的同时保证高效的结合能力,本研究对肽段进行了重新的筛选和优化。通过综合考虑多肽片段抗原指数、胞外区、肽段长度等因素,筛选得到 3 段多肽序列。多肽结合实验表明 GP-15 多肽具有更好的结合能力, MompS 蛋白二级结构显示,该肽段不属于 α 螺旋结构,其位于 MompS N 端胞外区,且抗原指数、亲水性及溶剂可及性均较高。多肽动物免疫学效果评价结果表明,GP-15 具有较高的免疫原性,能够诱导小鼠产生高滴度特异性的抗体。但 GP-15 是否具有功能性免疫特异性,尚需进一步研究。本研究为预测软件和在线预测工具应用于抗原表位研究提供了实验依据,为基于 MompS 蛋白的抗原多肽疫苗的研发奠定了实验基础。

参考文献:

- [1] Richards A M, Von-Dwingelo J E, Price C T, et al. Cellular microbiology and molecular ecology of Legionella-amoeba interaction [J]. Virulence, 2013, 4(4): 307-314.
- [2] Kucharczyk P, Jahnz-Rozyk K. Today's threat of legionellosis [J]. Pol Merkur Lekarski, 2012, 33(197): 274-278.
- [3] Ben-Yedidia T, Arnon R. Towards an epitope-based human vaccine for influenza [J]. Hum Vaccin, 2005, 1(3): 95-101.
- [4] 李健, 余传信. 表位疫苗的研究进展 [J]. 中国热带医学, 2007, 7(9): 1681-1684.
- [5] 许颖, 陈建平, 关望, 等. 嗜肺军团菌 MompS 抗原二级结构分析及表位预测 [J]. 热带医学杂志, 2010, 10(5): 570-573.
- [6] Eisenstein T K, Tamada R, Meissler J, et al. Vaccination against Legionella pneumophila: serum antibody correlates with protection induced by heat-killed or acetone-killed cells against intraperitoneal but not aerosol infection in guinea pigs [J]. Infect Immun, 1984, 45(3): 685-691.
- [7] Blander S J, Breiman R F, Horwitz M A. A live avirulent mutant Legionella pneumophila vaccine induces protective immunity against lethal aerosol challenge [J]. J Clin Invest, 1989, 83(3): 810-815.
- [8] Blander S J, Horwitz M A. Vaccination with Legionella pneumophila membranes induces cell-mediated and protective immunity in a guinea pig model of Legionnaires' disease. Protective immunity independent of the major secretory proteins of Legionella pneumophila [J]. J Clin Invest, 1991, 87(3): 1054-1059.

(收稿:2013-04-23;修回:2013-05-31)

(编辑 邓强庭)