

UreB蛋白 B 细胞抗原表位快速筛选与鉴定*

郭慧芳 张文红 温冬青 韩锋产 张虎明 罗 进 阎小君**

(第四军医大学全军基因诊断技术研究所, 国家肿瘤生物学重点实验室, 西安 710032)

摘要 以幽门螺旋杆菌 (*Helicobacter pylori*, Hp) 主要抗原蛋白尿素酶 B (urease B, UreB) 为靶蛋白, 建立一种新的 B 细胞抗原表位筛选与鉴定方法. 运用 Fmoc 固相肽合成法合成 11 条 Hp UreB 蛋白的单表位抗原肽片段, 在其氨基端标记 FITC 荧光素, 应用荧光偏振方法 (fluorescence polarization, FP) 快速鉴定这些肽片段的抗原性, 并通过 FP 法在大规模样品中快速筛选相应抗体滴度高、分布人群广的优势抗原表位肽. 结果表明, 合成的 11 条 UreB 蛋白线性抗原肽中, 10 条具有较强的抗原性, 其中 No.2、No.5 和 No.11 抗原肽相应的特异性抗体在感染 Hp 的人群中分布较广, 抗体滴度较高, 为 UreB 的优势抗原表位肽. 对抗原表位进行多参数综合分析与设计, 通过 FP 技术快速鉴定抗原肽, 并筛选优势抗原表位肽, 对于疾病的抗原表位谱研究具有重要的意义, 同时在疾病的诊断、分型及治疗中具有重要的应用前景.

关键词 抗原表位, 尿素酶 B, 抗原性, 鉴定, 筛选, 荧光偏振

学科分类号 R392.11

抗原表位的确定不仅可以了解抗原的结构与功能、抗原抗体反应等有关免疫反应的众多信息, 而且对诊断试剂研发、药物合成和疫苗设计等也具有指导意义. 常规确定抗原表位的方法大多操作繁琐、难度较大, 效率非常低. 目前, 生物信息学分析技术、化学合成肽技术、荧光偏振分析技术以及相应检测设备的不断发展、成熟和完善, 为大规模设计、筛选和鉴定抗原表位奠定了技术基础. 基于这些技术, 本研究提出了一种新的抗原表位快速设计和鉴定其抗原性的策略: 运用多种抗原表位分析程序, 对抗原表位进行多参数综合预测和设计^[1], 合成线性抗原肽并在其上标记 FITC 荧光素, 应用荧光偏振方法快速鉴定其抗原性并从大规模样品中快速筛选相应抗体滴度高、分布人群广的优势抗原表位序列.

1 材料和方法

1.1 材料

酶标读数仪 (Sunrise Remote Control-Reader) 为奥地利 TECAN 公司产品; Wallac Victor2 (1420 multilabel counter) 荧光偏振检测仪为美国 PerkinElmer Life Sciences 公司产品; HRP 标记的

羊抗人 IgG 二抗购自华美生物技术公司; TMB, BSA, 酶标板购于宝泰克生物工程有限公司; 幽门螺旋杆菌 IgG ELISA 检测试剂盒购自深圳博卡生物技术有限公司; UreB 的重组蛋白抗原由本所韩锋产博士惠赠; 血清样品来源于西安交通大学第一附属医院检验科和唐都医院门诊科.

1.2 方法

1.2.1 抗原表位的设计与合成. 分别采用 Garnier-Robson 方案, Chou-Fasman 方案和 Karplus-Schulz 方案^[2]预测 UreB 蛋白质二级结构中的柔性区域和可塑性区域. 以 7 个氨基酸残基为一组的方案, 按 Kyte-Doolittle^[3]的氨基酸亲水性标准, 预测其亲水性; 按 Emini 方案^[4]预测蛋白质的表面可能性; 按 Jameson-Wolf 方案^[5]预测抗原表位可能性. 根据 Kolaskar-Tongaonkar 的方法进行抗原表位预测. 对以上分析预测结果进行综合分析, 设计 11 条候选抗原表位序列. 通过 Fmoc 固相肽策略合成线性抗原表位肽, 并在其 N 端标记 FITC 荧光素.

*国家高技术研究发展计划资助项目(863)(2002AA 232031).

** 通讯联系人. Tel: 029-83374771, E-mail: xiaojun_y@fmmu.edu.cn

收稿日期: 2005-07-12, 接受日期: 2005-09-07

1.2.2 标准抗体样品的制备. 用幽门螺旋杆菌 IgG ELISA 检测试剂盒分析 293 份血清样品, 筛选 *Hp* 阳性及阴性血清样品. 按照试剂盒说明书进行实验操作. 以 ELISA 方法用 UreB 重组蛋白抗原检测上步筛选的 178 例 *Hp* 阳性血清样品, 其中重组蛋白抗原的包被浓度为 1 mg/L, *Hp* 阳性血清样品或 *Hp* 阴性血清样品用抗体稀释液按 1:100 稀释, 设空白及阴性血清样品对照, 羊抗人 HRP 标记二抗按 1:1 000 稀释, TMB 显色, 酶标仪检测 450 nm 的 A 值. A 值大于阴性 A 值 2.1 倍以上的样品判断为阳性血清样品.

随机取其中 10 份 UreB 抗体阳性 *Hp* 血清样品制备 UreB 抗体阳性标准 *Hp* 血清样品, 另取 10 份幽门螺旋杆菌 IgG ELISA 检测试剂盒检测为 *Hp* 阴性, 同时 UreB 重组蛋白抗原 ELISA 法验证也为阴性的血清样品, 等体积比混匀, 制备得到 UreB 抗体阴性标准血清样品.

1.2.3 抗原肽的抗原性鉴定. 对每种 FITC 标记的 UreB 线性抗原肽, 分别取 10 μ l UreB 抗体阳性标准血清样品和 10 μ l UreB 抗体阴性标准血清样品, 各加入 FITC 标记的 UreB 线性抗原肽 1.0 nmol/L, PBS 补足 80 μ l, 混匀, 避光静置 30 min. 将样品加于 384 微孔板中, 每种样品各加于 3 个孔中, 每孔 25 μ l^[6]. 分析样品的荧光偏振值. 重复分析 3 次. 根据荧光偏振值分析每种抗原肽的抗原性.

1.2.4 UreB 优势抗原表位肽的筛选. 应用 FP 方法^[9] 分别分析 159 份 UreB 抗体阳性的血清样品中 10 种 UreB 抗原肽的特异性抗体, 方法如 1.2.3 所述, 根据 FP 检测结果, 分别分析 10 种 UreB 抗原肽抗体检出率和 FP 值变化水平, 根据分析结果筛选 UreB 的优势抗原表位肽.

2 结 果

2.1 UreB 蛋白的抗原表位预测分析结果

综合分析以上 UreB 蛋白质序列的亲水性指数、蛋白质表面可能性指数等抗原表位参数以及抗原表位指数预测结果, 如果某一氨基酸区段中, 抗原指数 ≥ 1.0076 、亲水性指数 ≥ 0 、氨基酸的表面可能性指数 ≥ 1 , 同时其内部或附近又具有柔性结构, 则这一区段为抗原表位的可能性较大. 我们从符合这些条件的氨基酸区段中筛选出 11 个区段, 并对氨基酸长度适当修改后作为备用的抗原表位. 序列见表 1.

Table 1 The epitope sequences of the UreB

No.	Epitope sequences	Amino location
1	VSLAQLFS	560 ~ 567
2	ITFVSQAA	491 ~ 498
3	KVADLVL	429 ~ 435
4	ERQVLPVKNC	510 ~ 519
5	SIKEDVQFAD	327 ~ 336
6	APDIKVA	283 ~ 290
7	DNEAGCV	252 ~ 258
8	DKYDVQVAIH	239 ~ 248
9	HHHFISPQQ	136 ~ 144
10	GEGLIVTAG	123 ~ 131
11	TNALIVDYGTGI	71 ~ 81

2.2 UreB 抗体阳性 *Hp* 血清样品

用幽门螺旋杆菌 IgG ELISA 检测试剂盒, 从 293 份血清样品中, 筛选得到 178 份 *Hp* 阳性血清样品. 用 UreB 的重组蛋白抗原, 通过 ELISA 方法, 从 178 份 *Hp* 阳性血清样品中筛查得到 159 份 UreB 抗体阳性血清样品. 从该血清样品中随机抽取 10 例等体积比混匀得到 UreB 抗体阳性标准血清样品.

2.3 合成抗原肽的抗原性

11 种 FITC 标记的 UreB 线性抗原肽与 UreB 抗体阴性标准血清样品混匀后, 测得的荧光偏振值在 140 ~ 170 mP 之间, 与 UreB 抗体阳性标准血清样品反应后, 有 10 种抗原肽 (No.1 ~ No.5, No.7 ~

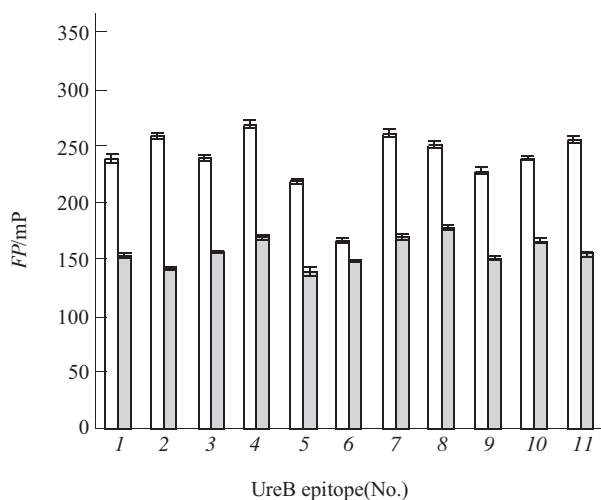


Fig. 1 The FP of the standard antibody using 11 antigen epitopes to analyse

□: positive sample; ■: negative control.

No.11) 的荧光偏振值大于 200 mP, 比阴性标准血清的荧光偏振值升高了 80 ~100 mP. 仅有一种抗原肽 (No.6) 的荧光偏振值未见明显增大 (图 1), 表明除了 No.6 抗原肽无明显的抗原性外, 其余 10 种抗原肽均有较强的抗原性.

2.4 UreB 的优势抗原表位肽

通过 FP 方法, 用 10 种 UreB 抗原肽检测 159 份 UreB 抗体阳性的血清样品中相应抗原肽的特异性抗体, 对于每种抗原肽, 分别用每个样品的 FP 值减去阴性对照的 FP 值, 得到样品检测结果的 FP 值增加量 (ΔFP), 将 ΔFP 分为 $\Delta FP \leq 25$ mP、 $25 \text{ mP} < \Delta FP \leq 50$ mP、 $50 \text{ mP} < \Delta FP \leq 100$ mP 和 $\Delta FP > 100$ mP 四个区间, 分别统计每个区间的样品数目, 并计算 ΔFP 的平均值. 10 种 UreB 抗原肽的分析结果见表 2.

Table 2 The results of using ten UreB antigen epitopes to detect the 159 serum samples

UreB epitope (No.)	Number of the samples (n=159)				Mean ΔFP
	$\Delta FP \leq 25$ mP	$25 \text{ mP} < \Delta FP \leq 50$ mP	$50 \text{ mP} < \Delta FP \leq 100$ mP	$\Delta FP > 100$ mP	
1	29	42	79	9	67
2	5	11	90	53	129
3	19	36	88	16	73
4	13	21	83	42	111
5	3	12	114	30	93
7	10	21	87	41	107
8	13	26	77	34	92
9	25	29	83	22	86
10	17	16	90	36	89
11	9	13	89	48	121

从表 2 可以发现, UreB 的 No.2、No.4、No.7 和 No.11 抗原肽的平均 ΔFP 值较高, 均大于 100 mP, 其余抗原肽的平均 ΔFP 值则较低. No.4 和 No.7 抗原肽的 ΔFP 在 $\Delta FP \leq 50$ mP 区间的样品数目较多, 而 No.5 抗原肽虽然平均 ΔFP 值为 93 mP, 但在大多数样品的 ΔFP 值均大于 50 mP. 因而, 我们选择 No.2、No.5 和 No.11 抗原肽为 UreB 的优势抗原表位肽.

3 讨 论

确定抗原表位常用的方法有: 还原法、蛋白质印迹法、肽扫描、肽库和突变分析等, 这些方法需

要通过实验鉴定所有的抗原表位, 工作量巨大, 困难而繁琐. 根据抗原表位的特征, 应用软件分析筛选抗原表位, 在此基础上设计并合成单表位抗原肽, 以实验工作确认, 是一种省时、省力和经济的方法, 可以提高实验结果的预见性和成功率.

选择蛋白质氨基酸序列的抗原表位, 除利用适当的计算机分析软件, 还需要综合考虑选定序列片段的亲水性、屈曲性、转角结构、电荷数等情况. 序列以 7~15 个氨基酸为宜, 序列中应避免出现 4 个以上连续相邻的疏水性残基, 疏水性残基数目不超过 6 个, 序列中带电荷的氨基酸越多越好, 并且序列中最好含有该蛋白质的功能活性位点. 由于软件是基于单个氨基酸的性质来分析预测抗原表位, 因而所设计的抗原表位均为线性抗原表位, 构象依赖型抗原表位目前难以通过软件进行预测设计.

根据软件预测分析得到的候选抗原表位, 可以通过化学合成方法快速得到抗原肽, 抗原肽的抗原性需要通过实验来确认. 抗原性鉴定目前主要为基于膜相的免疫渗滤或免疫印迹以及基于聚乙烯类介质的 ELISA 等方法, 由于线性肽的短小和弱疏水性, 使其吸附固相膜及聚乙烯类介质的能力很弱, 尤其是缺少疏水基团侧链的表位肽, 当线性肽连接到固相介质时, 肽的有效抗原反应位点的朝向也变得比较零乱, 影响了反应的特异性和灵敏性, 因而应用这些方法来鉴定肽抗原的抗原性效果非常差.

荧光物质被平面偏振光激发时, 会在固定的平面发射出偏振荧光, 这种现象被称为荧光偏振 (fluorescence polarization, FP). 如果荧光物质的分子质量 (M) 较小, 其在溶液中自由旋转的速度会较快, 向各个方向发出均等的发射光, FP 值就会比较小; 当荧光物质的分子质量较大时, 其旋转速度会减慢, 在特定时间内向同一方向发出的发射光将会较多, FP 值会增大. 荧光物质的分子质量在一定范围内时, FP 值与荧光素的分子质量几乎成正比关系^[6]. FP 技术可以方便快速地分析溶液中荧光标记小分子物质与大分子物质之间的相互作用^[7,8]. 单表位合成肽抗原的分子质量较小, 可以完全满足 FP 分析的要求. 因而通过 FP 技术, 可以筛选鉴定抗体的抗原表位, 相反, 应用已知的合成肽抗原, 通过 FP 技术也可以检测未知样品中是否存在特异性的抗体.

在应用 FP 技术筛选抗原表位时, 若同时对大量抗原表位肽和大规模样品进行筛选, 则筛选到的抗原表位可以反映大量样品中相应的抗体水平及滴

度,因而可以很容易分析得到优势抗原表位序列.本研究用 159 份 UreB 抗体阳性的血清样品,从 10 种 UreB 抗原肽中筛选优势抗原表位,筛选结果表明, No.2、No.5 和 No.11 抗原肽的特异性抗体在感染 *Hp* 的人群中分布较广,抗体的滴度较高,为 UreB 的优势抗原表位肽.

应用 FP 技术分析合成抗原肽的抗原性,同时具有抗原抗体反应的高度特异性和 FP 检测的高度敏感性.此外,与其他方法相比,FP 还具有以下优势: a. 无需放射性物质,检测限低,可达亚纳摩尔级.对于待测样品的浓度变化不敏感,具有极高的灵敏度、特异度和稳定性. b. 属于均相反应,抗原-抗体反应在没有固相支持的溶液中进行,结合的和未结合的抗原或抗体不需物理分离过程即可直接测定,无需 ELISA 等固相法的反复多次洗涤步骤,简化了操作过程,同时降低了污染的可能性. c. 反应速度快,仅需将样品混匀孵育 10 min 左右即可测定 FP 值.检测可以实时进行,易于实现自动化控制. d. 由于方法简单,所需试剂量少,因而检测成本低.这些优势将使 FP 技术成为鉴定合成抗原肽抗原性的一种有力工具.

参考文献

- 1 Hoop J P, Wood K R. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Immunology*, 1981, **78** (6): 3824
- 2 来鲁华. 蛋白质的结构预测与分子设计. 第 1 版. 北京: 北京大学出版社, 1993. 49
Lai L H. Structure Prediction and Molecule Design of Protein. 1st. Beijing: Peking University Press, 1993. 49
- 3 Kyte J, Doolittle R F. A Simple method for displaying hydropathic character of a protein. *J Mol Biol*, 1983, **157** (1): 105
- 4 Tsche H. Modern Methods in Protein and Nucleic Acid Research. 1st. New York: WalterdeGrugerBerlin, 1990. 231
- 5 Welling G W, Weijer W J, Vander Z R, *et al.* Prediction of sequential antigenic regions in proteins. *FEBS Lett*, 1985, **188**(2): 215
- 6 张文红, 王 琰, 郭慧芳, 等. 用单表位合成肽抗原荧光偏振免疫法检测幽门螺旋杆菌尿素酶的抗体. *细胞与分子免疫学*, 2005, **26** (3): 370~374
Zhang W H, Wang Y, Guo H F, *et al.* *J Cell Mol Immunol*, 2005, **26** (3): 370~374
- 7 Dandliker W B, Kelly R J, Dandliker J, *et al.* Fluorescence polarization immunoassay. Theory and experimental method. *Immunochemistry*, 1973, **10** (4): 219~227
- 8 Mel'nichenko O A, Eremin S A, Egorov A M, *et al.* Polarized immunofluorescent analysis of the herbicide isoproturon. *Vopr Med Khim*, 1995, **41** (2): 60~62

Rapid Screening and Identification of Dominant B Cell Epitopes of UreB Protein by Fluorescence Polarization Assay*

GUO Hui-Fang, ZHANG Wen-Hong, WEN Dong-Qing, HAN Feng-Chan,
ZHANG Hu-Ming, LUO Jin, YAN Xiao-Jun**

(Institute of Gentice Diagnosis of Chinese PLA, The Fourth Military Medical University,
State Key Laboratory of Cancer Biology, Xi'an 710032, China)

Abstract In order to develop a new method for screening and identification of dominant B cell epitopes using UreB protein as a target antigen 11 amino acid fragments from UreB protein of *Helicobacter pylori* (*Hp*) were synthesized by Fmoc solid phase peptide synthesis strategy, and fluorescein FITC was labeled to the N-terminals of all peptides respectively. The antigenicity of synthetic peptides is determined by analyzing the recognition and combination between peptides and standard antibody samples by fluorescence polarization (FP) immunoassay. In order to screen the dominant antigenic peptides, the FP assays were carried out to investigate the antibodies against 10 UreB synthetic peptides respectively in 159 UreB antibody-positive antiserum samples. There are 10 of 11 UreB synthetic peptides have distinct antigenicity by FP assay. The results showed that 3 out of the 10 antigenic peptides may be immunodominant, for the antibodies against them existed more widely among the samples and the antibody titers were higher than those of other peptides's. The methods for predicting and identifying epitopes are useful for epitope mapping, and the fluorescence polarized method for antibody immunoassay can be widely used in the diagnosis, typing and therapy of diseases in clinic in the future.

Key words antigen epitope, Urease B (UreB), antigenicity, identification, screening, fluorescence polarization (FP)

*This work was supported by a grant from Hi-Tech Research and Development Program of China (2002AA 232031).

**Corresponding author. Tel: 86-29-83374771, E-mail: xiaojun y@fmmu.edu.cn

Received: July 12, 2005 Accepted: September 7, 2005