

多聚抗原肽微阵列分析平台的建立与初步应用 *

徐小洁 张虎明 李 丁 韩锋产 张文红

郭慧芳 温冬青 罗 进 阎小君** 康 磊

(第四军医大学基因技术诊断研究所, 肿瘤生物学国家重点实验室, 西安 710032)

摘要 基于多肽设计合成技术建立了一个快速、高通量、自动化的多聚抗原肽微阵列分析平台. 选取人巨细胞病毒 (HCMV) 的包膜糖蛋白 B 和被膜碱性磷酸蛋白 PP150, 幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, Hp) 尿素酶 (Ure) β 亚基为靶蛋白, 分析筛选出优势线性表位序列, Fmoc 法固相合成上述线性表位的多聚抗原肽 (MAPs), 高效液相色谱仪 (HPLC) 纯化后, 用机器人点样仪按一定的矩阵排列形式点印至硝酸纤维素膜上, 2% 的小牛血清封闭, 塑料壳体封装制备成 MAPs 微阵列成品. 随机抽样经质控血清鉴定后用于随机人群血清试验并与 ELISA 检测结果进行比较. 筛选、合成并鉴定出 4 条 MAPs. 用该 MAPs 微阵列检测的 Hp 和 HCMV 阳性及阴性质控血清结果均与质控血清情况相符, 120 份随机血清检测结果与用重组抗原和病原微生物裂解物抗原包被的 ELISA 法检测结果相比具有较好的一致性, Ure-1、Ure-2 和 PP150 三种 MAPs 的灵敏度和特异性均大于 90%. MAPs 微阵列片间质控试验结果变异系数小于 7%, 示重复性良好. MAPs 微阵列是一种快速、高通量、自动化的分析平台, 该平台在预防性疫苗的开发和蛋白质组学的研究中具有较大的前景.

关键词 多聚抗原肽, 多肽合成, 微阵列

学科分类号 R318

微阵列技术是基因组学和蛋白质组学不可或缺的研究工具^[1], 自 1984 年 Geysen 等^[2]首次开发出微阵列技术至今, 已走过了 20 余年的发展历程, 技术思路已基本成熟. 然而, 在微阵列系统的改进工作中, 我们常遇到一些实际问题急需解决, 其中最重要的问题之一即为制备标准化的抗原原料, 这是微阵列能否提供特异、敏感生物信号的基础和前提. 以前我们采用病原微生物的裂解液和重组表达的病原微生物相关蛋白作为抗原原料^[3], 虽能达到检测和鉴定的目的, 但制备工艺复杂、具潜在感染性, 且批间差异大, 造成终产品质量欠稳定, 因而无法将微阵列的技术优势完全发挥出来.

在抗原抗体反应过程中, 真正起作用的是蛋白质分子中的表位, 现在的肽合成技术已完全可标准化生产包含这些表位的多聚抗原肽 (MAPs)^[4]. 本课程选择本所长期致力研究的幽门螺杆菌 (Hp) 和人巨细胞病毒 (HCMV) 为切入点, 通过小规模临床试验初步证实了多聚抗原肽微阵列技术的可行性, 并探讨其在病原微生物筛查、鉴定、分型以及针对病原微生物的多肽疫苗辅助设计等方面的前景.

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

制备型 HPLC 仪 (Beckman 公司), 激光解析质谱 HEWLETT (PACKARD 公司), Microplate Reader 550 酶标仪 (Bio-Rad 公司), Microgrid II 型点样仪 (Biorobotics 公司), XK 2100 型 CCD 阅读仪 (深圳欣康基因数码科技有限公司). Pac-Peg-PS 树脂、TBTU, DMAP/DMF、DMF、HoBT、DCC/NMP (ABI 公司), DIEA、TFA、BSA、人 IgG、葡萄球菌 A 蛋白、HRP-羊抗人 IgG 抗体 (Sigma 公司), 0.45 μ m 硝酸纤维素膜 (Pharmacia 公司), 氯金酸 (上海试剂一厂), TMB (华美公司), 塑料壳体 (温州毅力包装有限公司), HCMV 全病毒 II 级抗原 (Microbix 公司), Hp 重组尿素酶抗原由

*国家高技术研究发展计划(863)资助项目(2002AA232031).

** 通讯联系人. Tel: 029-84774771, E-mail: xiaojun_y@fmmu.edu.cn

收稿日期: 2005-11-23, 接受日期: 2006-01-27

本所韩锋产博士惠赠。

标本来源: UreB 和 HCMV 阳性质控血清各 10 份及上述两种病原体抗体均为阴性的质控血清 50 份, 为本所保存; 120 份随机血清样本, 为第四军医大学唐都医院收集所得。

1.2 方法

1.2.1 B 细胞表位序列设计. 根据 *Hp* Ure- β 亚基, HCMV 包膜糖蛋白 B 和被膜碱性磷酸蛋白 PP150 的蛋白质序列, 用 Protean 预测软件^[5], 结合 Kolaskar 和 Tongaonkar 方案^[6]筛选出抗原的线性表位序列, 其中 HCMV 包膜糖蛋白 B 的表位序列采用文献[7]报道的序列。

1.2.2 Fmoc 法固相合成线性肽对应的八分支多聚抗原肽. 取 PAC-PEG-PS 树脂于 DMF 中浸泡活化, 采用对称酸酐法将第一个赖氨酸连接到活化的树脂上, 原位活化法连接其余赖氨酸得到八分支赖氨酸骨架. 以此支架上的赖氨酸作为合成肽 C 端的一个氨基酸, 依次连接其余氨基酸, 最后得到八分支多聚抗原肽. 半制备 HPLC 纯化, 激光解析质谱鉴定合成多肽的分子质量。

1.2.3 MAPs 的 ELISA 鉴定. 将合成的 4 条 MAPs 用缓冲液稀释后包被于微孔板上, 100 μ l/孔, 4 $^{\circ}$ C 过夜. 次日洗涤 3 次, 加入质控血清 100 μ l/孔 (同时设空白对照), 37 $^{\circ}$ C 温育 1 h 后洗涤 3 次, 加入新鲜稀释 (1:1 000) 的酶标二抗, 100 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 温育 1 h 后再洗涤 3 次, 加入 TMB 显色液, 100 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 温育 10 min, 加入终止液, 50 μ l/孔, 酶标仪读取吸光度(A)值. A 值为阴性 A 值 2.1 倍以上的为阳性血清。

1.2.4 免疫金制备. 通用方法制备胶体金后, 加入 SPA, 搅拌 10 min. 再加 BSA 继续搅拌 5 min, 4 $^{\circ}$ C 12 000 g 离心 20 min, 弃上清. 将沉淀重悬于含 1% BSA 的 PBS 中, 取样用分光光度计扫描, 最大吸收峰应在 525 nm, 其对应的吸光度值应在 1.8~1.9. 制备好的免疫胶体金分装后于 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.5 多聚抗原肽微阵列的制备. 4 种 MAPs 以 1 g/L 的浓度溶于去离子水, 以 5 $\times$ 4 矩阵排列形式用 Microgrid II 型点样仪点样至硝酸纤维素膜上 (图 1), 人 IgG 以 2 g/L 的浓度点至膜上作为质控点, 每根点样针每次点样量约为 10 nl. 点样后用含 2% BSA 的 PBS 封闭膜, 洗涤后室温干燥. 在干燥后的硝酸纤维素膜下垫以高分子吸水材料并用塑料壳体固定 (图 2), 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

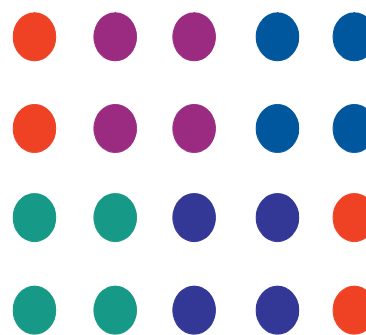


Fig. 1 Schematic representation of MAPs microarray

●: Ure-1; ●: Ure-2; ●: Gly B; ●: PP150; ●: Hu-IgG.

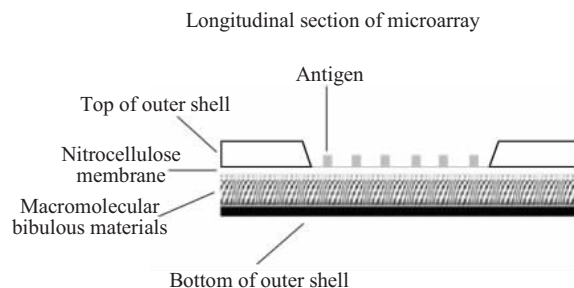


Fig. 2 The assembling model of MAPs microarray

1.2.6 多聚抗原肽微阵列 Cutoff 值的确定. 用 MAPs 微阵列对 50 份阴性血清进行检测以确定其 Cutoff 值. 将血清样本稀释后加入微阵列膜表面, 待血清完全下渗后洗涤液洗去未结合抗体, 再加入免疫胶体金标记, 完全渗过后洗去未结合的免疫胶体金. CCD 阅读仪检测矩阵上各点的相对灰度值, 计算每种多聚抗原肽 50 份样本的均值和标准差, 均数加上 2 个标准差定为判断样本阴性或阳性的 Cutoff 值, 大于或等于该值判为阳性, 小于该值则判为阴性. 将人 IgG 稀释为 0.01 g/L、0.5 g/L、0.75 g/L、1 g/L、1.5 g/L、2 g/L 6 个浓度按上述方法单独制备成微阵列, CCD 阅读仪读取其相对灰度值, EXCEL 进行回归分析, 结果用于绘制渗滤反应 - 剂量依赖曲线。

1.2.7 多聚抗原肽微阵列的质控实验. 随机抽取同一批次制备的 MAPs 微阵列 20 个, 分别用尿素酶和人巨细胞病毒阳性质控血清各 5 份, 阴性质控血清各 5 份结合 4 条 MAPs 各自的检测限鉴定检测结果与质控血清的吻合度. 再随机抽取 20 个 MAPs 微阵列, 其中 10 个用于同一份 Ure 阳性血清的检测, 10 个用于同一份 HCMV 阳性血清的检测, 相对灰度值用于分析 MAPs 微阵列间的变异系数。

1.2.8 多聚抗原肽微阵列和 ELISA 的对比实验. 收集 120 份随机血清用于和 ELISA 实验的对比. MAPs 微阵列检测法同 1.2.6, ELISA 检测所用的包被抗原为商品化 HCMV 全病毒 II 级抗原和重组 *Hp* Ure 抗原, 检测方法同 1.2.3. 检测数据结果进行配对 χ^2 分析, $P < 0.05$ 有统计学差异. 微阵列的灵敏度按共同阳性数 / (共同阳性数 + MAPs 微阵列阴性而 ELISA 阳性数) 计算, 特异度按共同阴性数 / (MAPs 微阵列阳性而 ELISA 法阴性数 + 共同阴性数) 计算.

2 结 果

2.1 抗原性表位分析结果

用 Protean 软件, 结合 Kolaskar 和 Tongaonkar 方案对 4 种蛋白质的序列进行了 B 细胞表位预测, 从中挑选出 4 个序列(表 1), 其中人巨细胞病毒包膜糖蛋白 B 的表位直接引用文献报道序列并对其作相应的抗原性分析. 经 BLAST 检索与其他致病微生物无同源性序列.

Table 1 Prediction of epitope peptide sequences

Peptide	Sequence
Ure-1	DKSIKEDVQF
Ure-2	SVEVGKVADL
Gly B	VTSGSTKD
PP150	NSPWAPTAPL

2.2 多聚抗原肽合成及活性鉴定结果

Fmoc 法合成了八分支 MAPs(图 3). 经 HPLC 纯化和质谱鉴定, 分子质量大小与预期一致, 纯度高于 95%, 其包被的微孔板用质控血清鉴定结果显示, 4 种 MAPs 均能较好地分辨阴性及阳性质控血清, 阴性平均 *A* 值为 0.114, 最高为 0.150, 而阳性血清检测的 *A* 值均在 0.5 以上, 平均 *A* 值为 0.966, 远大于阴性平均 *A* 值的 2.1 倍, 最高值达到 1.366, 因此可以考虑进入微阵列制备阶段.

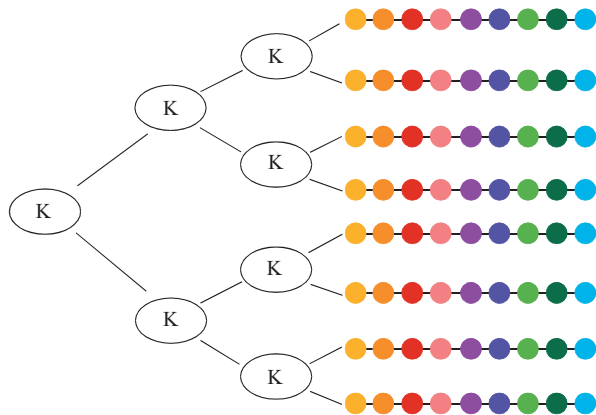


Fig. 3 Schematic representation of MAPs

2.3 多聚抗原肽微阵列的 Cutoff 值和剂量依赖曲线

MAPs 微阵列对 50 份阴性血清进行了检测, 计算出每种 MAPs 的 Cutoff 值(表 2). 人 IgG 单独制备的微阵列显示: 剂量依赖曲线决定系数($R^2 = 0.99$)接近 1, 说明剂量依赖曲线各因数相关效果较好(图 4).

Table 2 Average value and standard deviation of each MAPs and their Cutoff value

Ure-1			Ure-2			Gly B			PP150		
<i>AV</i>	<i>s</i>	Cutoff	<i>AV</i>	<i>s</i>	Cutoff	<i>AV</i>	<i>s</i>	Cutoff	<i>AV</i>	<i>s</i>	Cutoff
0.85	0.18	1.20	0.82	0.49	1.80	0.79	0.36	1.50	1.87	0.36	3.60

AV: Average value; *s*: Standard deviation.

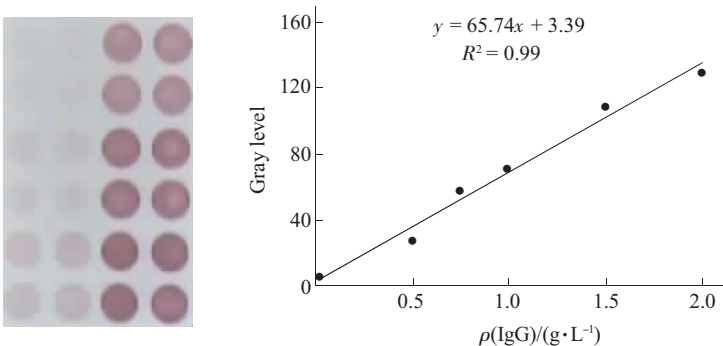


Fig. 4 Linear dose-response curves of microarray

Different concentration of IgG corresponds to different gray level.

2.4 多聚抗原肽微阵列质控实验结果

在质控血清吻合度鉴定实验中，MAPs 微阵列能很好地分辨阳性和阴性质控血清(图 5)，吻合度

为 100%；在随机抽取的 20 个多聚抗原肽微阵列进行微阵列间变异分析实验中，4 条 MAPs 均获得了小于 7%的变异系数，说明重复性较好(表 3).

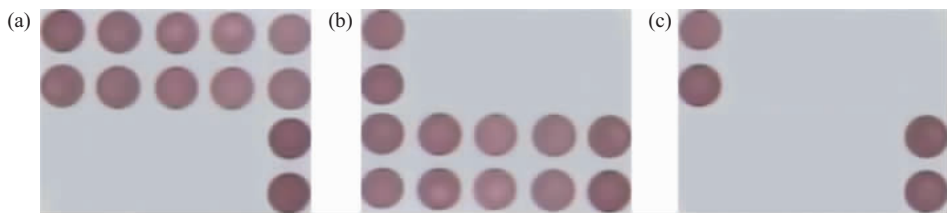


Fig. 5 Identification of positive and negative serum by microarrays
Hp positive serum in (a), HCMV positive serum in (b), both negative serum in (c).

Table 3 The coefficient of variation (CV) between microarray

	Urease		Cytomegalovirus	
	Ure-1	Ure-2	Gly B	PP150
CV between microarray	2.3%	5.4%	4.1%	6.6%

2.5 多聚抗原肽微阵列和 ELISA 实验对比

MAPs 微阵列与 ELISA 检测 120 份随机血清样本结果显示，Ure-1、Ure-2 和 PP150 三种多聚抗原肽与 ELISA 实验相比在检测结果上无显著性差异，Gly B 多聚抗原肽检测结果与人巨细胞病毒 ELISA 实验结果有差异(表 4). 与 ELISA 检测法相比，除 GlyB 外，其他 3 条 MAPs 的灵敏度和特异度均大于 90%(表 4).

Table 4 The comparison of assay results between MAPs microarray with ELISA

	ELISA			ELISA			ELISA			ELISA		
	Ure-1		Sum	Ure-2		Sum	GlyB		Sum	PP150		Sum
	+	-		+	-		+	-		+	-	
Microarray												
+	36	2	38	32	4	36	30	2	32	28	7	35
-	2	80	82	3	81	84	7	81	88	2	83	85
Sum	38	82	120	35	84	120	37	83	120	30	90	120
Sensitivity		94.7%			91.4%			81.1%			93.3%	
Spfecity		97.5%			96.4%			92.1%			97.6%	
χ^2		0.167			0.250			10.316			1.778	
P		0.688			0.625			0.001			0.180	

3 讨 论

抗原性表位分析是多聚抗原肽的核心内容，对于现在所使用的分析预测方案所考虑的因素大致相似，预测的准确率也都比较高，像 Kolaskar 和 Tongaonkar 预测方案在实验中的准确率在 75%左右. 本实验采用了 Kolaskar 和 Tongaonkar 的设计方案，它通过分析每个氨基酸残基的物理化学特性和它们在过去实验确定的抗原性表位中出现的频率，

估算出每一个重叠 7 肽的平均抗原性趋势和整个蛋白质的平均趋势，若整个蛋白质的平均值高于 1，所有平均值高于 1 的残基都具有潜在的抗原性，若整个蛋白质的平均值低于 1，所有高于蛋白质平均值的残基都具有潜在的抗原性. 为了提高设计的准确性，我们还结合采用了 Protean 预测软件. 该方案结合了 Hopp-Woods 的亲水性方案(H)^[8]，Emini 等^[9]的表面可能性方案(S)，Karplus-Schulz 的顺应性方案(F)^[10]，Chou-Fasman^[11](CF)和 Garnier-Robson^[12]

(GR)的二级结构预测方案, 并给上述指标分配不同的权重, 以 $0.3 H + 0.15 S + 0.15 F + 0.2 CF + 0.2 GR$ 这个公式来计算抗原性指数, 抗原性指数越高则该区域成为抗原性表位的可能性越大. 此外, 我们还将预测表位的长度限制在能高效合成 MAPs 的长度范围以内, 即 10 个氨基酸左右. 一般, 这个长度可覆盖大部分的线性表位. 在 MAPs 中, 其分支状结构在硝酸纤维素膜上减少了抗原性表位肽与抗体反应的空间位阻, 增强了 MAPs 在膜上的固化能力. 我们曾将相同序列的线性肽点样到硝酸纤维素膜上进行同样的实验, 结果发现: 在同等实验条件下, 线性肽微阵列对质控血清分辨能力较差, 丽春红染色后发现膜上固化的肽量远小于 MAPs, 考虑为硝酸纤维素膜对小分子质量线性肽的吸附能力差, 因此放弃了将线性肽用于此微阵列实验.

本次实验中我们还将 MAPs 微阵列与传统的 ELISA 检测法进行了对比. 在 ELISA 试验中采用的包被抗原为重组幽门螺杆菌尿素酶蛋白和人巨细胞病毒全病毒裂解物, 其中前者为本所开发的幽门螺杆菌抗体谱微阵列所用的抗原, 该微阵列已获得国内的生产批号 (S20020025), 后者为加拿大 Microbix 公司生产的全病毒裂解抗原, 为国际上很多知名 ELISA 检测试剂公司所采用, 因此, 在检测效果上具有较强的说服力. 通过对比, 我们的 MAPs 微阵列表现出了较好的一致性, 尤其是 Ure-1、Ure-2 和 PP150 三种多聚抗原肽, 均表现出了高于 90% 的灵敏度和特异度. 直接引用相关文献的 Gly B 多聚抗原肽的特异性较高但灵敏度较低, 可能与表位本身的抗原性有关. 在采用 Kolaskar 和 Tongaonkar 设计方案对 GlyB 序列进行表位分析时, 发现该序列的抗原性值正好位于两个抗原性值较高的肽序列之间的波谷处, 而在 Protean 预测软件分析中也发现该序列的抗原指数不是很高, 仅位于一段较长抗原性区域的边缘, 因此可能无法成为检测相关抗体的优势表位. 通过对同一致病微生物上不同蛋白质抗原性表位的分别设计, 也提示了微阵列具有致病微生物分型的潜力.

MAPs 微阵列检测平台具有传统的 ELISA 检测法无法比拟的优势, 除了微阵列检测形式固有的检测通量高、能进行平行分析等特点外, 抗原制备上的优势尤为明显: 首先, 多肽合成工艺容易形成标准, 质量可控, 制备规模灵活, 批间活性差异远小于重组抗原和病原体裂解物. 其次, 由于 MAPs 呈现出的仅仅是致病微生物的单个或数个特异性表

位, 因此检测背景要比重组抗原和病原体裂解物低得多. 采用免疫金渗滤试验大部分样本用肉眼就可清晰地判别结果, 不需特殊的检测设备, 操作简单, 检测时间短, 仅为传统 ELISA 方法的 $1/3 \sim 1/4$. 另外, MAPs 微阵列分析平台的建立比较容易, 研发周期短, 只要抓好核心的表位设计, 很快就能付诸实践进行验证. 相比之下, 采用重组蛋白和病原体裂解物作为抗原的检测体系则要麻烦得多. 首先是重组蛋白的表达对技术要求高, 不一定能表达出目的蛋白; 其次, 致病微生物的培养也需要较高的技术条件, 在制备中虽经过裂解灭活处理但仍具有潜在的生物危害性. 而采用 MAPs 作为抗原则可免除这方面的担忧. MAPs 微阵列分析平台本身具有很大的灵活性, 在实际工作中的作用不光体现在抗原 - 抗体、受体 - 配体、酶 - 底物等的平行分析上, 在预防性疫苗的开发, 蛋白质分子中抗原性表位序列的筛查、鉴定以及蛋白质组学研究工作中也可望是一种便利的工具. 本课题初步建立了 MAPs 微阵列分析平台并结合临床实验证实了该分析平台的可行性, 与传统的 ELISA 分析手段相比优势明显.

参考文献

- 1 Khan A S. Genomics and microarray for detection and diagnostics. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 2004, **51**(4): 463~467
- 2 Geysen H M, Meloen R H, Barteling S J. Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, **81** (13): 3998~4002
- 3 韩锋产, 阎小君, 侯瑜, 等. 胶体金免疫层析法检测抗幽门螺杆菌细胞毒素相关蛋白 A 抗体. *世界华人消化杂志*, 1999, **43**(3): 347~352
Han F C, Yan X J, Hou Y, *et al.* *World Chinese Journal of Digestology*, 1999, **7** (9): 743~745
- 4 Huang H Q, Li S C, Qin Z H. Synthesis and bioactivities of two multiple antigen peptides as potential vaccine against schistosoma. *Bioorg Med Chem Lett*, 2005, **15** (9): 2415~2419
- 5 Kuma S, Zeephongsekul P, Balasubramanian S. Modelling and analysis of a software system with improvements in the testing phase. *Mathematical and Computer Modelling*, 1995, **22**(10~12): 183~191
- 6 Kolaskar A S, Tongaonkar P C. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Lett*, 1990, **276** (1~2): 172~174
- 7 Silvestri M, Sundqvist V A, Ruden U, *et al.* Characterization of a major antigenic region on gp55 of human cytomegalovirus. *J Gen Virol*, 1991, **72** (12): 3017~3023
- 8 Hopp T P, Woods K R. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, **78** (6):

- 3824~3828
- 9 Emini E A, Hughes J V, Perlow D S, *et al.* Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. *J Virol*, 1985, **55** (3): 836~839
- 10 Karplus P A, Schulz G E. Prediction of chain flexibility in proteins. *Naturwissenschaften*, 1985, **72**: 212~213
- 11 Chou P Y, Fasman G D. Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 1978, **47**: 45~148
- 12 Garnier J, Osguthorpe D J, Robson B. Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. *J Mol Biol*, 1978, **120** (1): 97~120

The Development and Preliminary Application of Multiple Antigenic Peptide Microarray Platform*

XU Xiao-Jie, ZHANG Hu-Ming, LI Ding, HAN Feng-Chan, ZHANG Wen-Hong,
GUO Hui-Fang, WEN Dong-Qing, LUO Jin, YAN Xiao-Jun**, KANG Lei

(Institute of Genetic Diagnosis of Chinese PLA, The Fourth Military Medical University,

State Key Laboratory of Cancer Biology, Xi'an 710032, China)

Abstract A fast, high-throughput, automated multiple antigenic peptides microarray platform was established based on multiple peptide design and synthesis technology. Human cytomegalovirus (HCMV) glycoprotein B, phosphoprotein pp150 and *Helicobacter pylori* (*Hp*) urease (Ure) beta subunit were chosen as target protein. The advantageous linear epitope of these proteins was analyzed and screened. The multiple antigenic peptides (MAPs) containing the selected sequence were synthesized by Fmoc solid phase method, purified through high performance liquid chromatography (HPLC) and printed on nitrocellulose membrane in microarrays by computer-controlled high-speed robotics. The nitrocellulose membrane was blocked with 2% bovine serum albumin solution. The MAPs microarray was finished by assembling the membrane with plastic outer shell. Some microarrays were selected at random for quality control identified by control sera and compared with ELISA method. 4 MAPs were screened out, synthesized and identified. The result of positive and negative sera of *Hp* and HCMV detected by MAPs microarray were consistent with the control sera. In the clinical trial of 120 random sera, the microarray performed almost equally with ELISA method using recombinant antigen and microbial lysate antigen. The sensitivity and specificity of Ure-1, Ure-2 and PP150 MAPs were higher than 90%. The CV were lower than 7% among microarrays showing a good repeatability. It can be concluded that a MAPs microarray analytical platform which has a vast application prospect in assistant design of peptide vaccine was primarily established.

Key words multiple antigenic peptides (MAPs), peptide synthesis, microarray

*This work was supported by a grant from Hi-Tech Research and Development Program of China.

**Corresponding author. Tel: 86-29-84774771, E-mail: xiaojun_y@fmmu.edu.cn

Received: November 23, 2005 Accepted: January 27, 2006