

# 噬菌体展示技术筛选人隐孢子虫 P23 抗原表位

徐前明<sup>1,2</sup>, 李国清<sup>2</sup>

**摘要:** 目的 本研究利用噬菌体展示技术筛选人隐孢子虫 P23 抗原表位, 为研制其抗原表位疫苗奠定基础。方法 首先用人隐孢子虫重组 P23 抗原免疫动物以制备抗体, 将该抗体与噬菌体展示随机肽库结合, 通过 ELISA 和 Western-blot 方法鉴定阳性克隆, 并对阳性克隆进行增殖, 然后对其序列测定和抗原表位预测。结果 噬菌体肽库结合抗体后, 经 ELISA 方法可鉴定 10 株为阳性克隆, Western-blot 检测可发现有 67 kD 目的条带出现; 序列分析结果可发现它们中具有 3 个不同结构表位序列, 命名为 ep1, ep2, ep3, 且预测出具有良好的亲水性。结论 所得序列是具有 B 细胞抗原表位。

**关键词:** 噬菌体展示技术; 筛选; 人隐孢子虫; P23 抗原; 细胞表位

中图分类号: R382.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-2694(2013)01-0047-04

## Cell epitope screening on P23 antigen of *Cryptosporidium hominis* by phage display technique

XU Qian-ming<sup>1,2</sup>, LI Guo-qing<sup>2</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Agricultural University, Hefei 230036, China;

2. College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**ABSTRACT:** In this study, phage display peptide technology was applied to screen cell epitope with anti-P23-IgG in order to develop its epitope vaccine. The recombinant P23 antigen was applied to immune animal to obtain antibody (Ab), then the Ab was hybridized with phage display peptide library, and the positive clones were identified by indirect ELISA and Western-blot. After proliferating, the positive clones were sequenced. Finally, antigen index, hydrophilicity and secondary structure were analyzed by bio-informatics, and epitope sequences were deducted. The results indicated that 10 positive phage clones were identified by ELISA, and 67 kD proteins could be found by Western-blot. The analysis of sequence showed that three different sequences could be found, named ep1, ep2 and ep3, respectively. And the three peptides all had hydrophilicity in different degrees. It is concluded that these peptides can be considered as B cell epitope.

**KEY WORDS:** phage display peptide technology; screening; *C. hominis*; P23 antigen; cell epitope

Supported by the Natural Science Foundation for Higher Education in Anhui Province (No. KJ2009B027Z)

隐孢子虫是一种以腹泻为主要症状的人兽共患寄生虫, 主要感染人, 其次是灵长类动物<sup>[1]</sup>。自从 1912 年 Tyzzer 首次发现隐孢子虫以来, 有关该病暴发流行的报道呈渐增之势, 其危害的广泛性和严重性越来越不容忽视。目前已有 100 余种药物被试用, 但效果均不很理想, 尚无有效方法预防和治疗人和动物的隐孢子虫病。Petersen 等人从子孢子表膜及顶端复合器中鉴定、筛选出保护性抗原基因, 产生大量重组抗原, 将有助于隐孢子虫病免疫预防及

治疗<sup>[2]</sup>。Priest 等认为定位于裂殖子表膜上 P23 抗原可与阳性血清的 IgG 和 IgA 强烈反应, 具有高度免疫原性<sup>[3]</sup>。

抗原表位在蛋白质抗原大分子的结构和功能研究中具有重要的作用。目前用于研究抗原表位的方法有多种, 如利用表达的蛋白结合单抗鉴定表位<sup>[4]</sup>, 肽探针扫描技术<sup>[5]</sup>, 噬菌体展示技术等<sup>[6-7]</sup>。其中噬菌体展示技术研究抗原表位是近年来新兴的研究蛋白质结构的有力工具, 已经利用该技术成功地鉴定了多种病原微生物(包括寄生虫)的抗原表位。

本研究利用噬菌体展示技术, 以抗重组抗 P23 为靶分子, 筛选抗隐孢子虫抗原细胞表位, 为将来防治隐孢子虫病与隐孢子虫病免疫作用机理的研

安徽省高等学校自然科学基金项目(KJ2009B027Z)

作者单位: 1. 安徽农业大学, 合肥 230036;

2. 华南农业大学, 广州 510642

Email: xuqiaming2006@163.com

究奠定基础。

## 1 材料与方法

**1.1 试剂** 噬菌体展示随机肽库 Ph. D.-7<sup>TM</sup>: 购自于 NEB (New England BioLabs) 公司, 文库滴度为  $2.7 \times 10^9$  pfu/mL; 宿主菌为 *E. coli* ER2378 [基因型为 F' lacIq]; 辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG (HRP-IgG): 购自美国 ptglab 公司; 弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂: 购自 Sigma 公司; 四环素 (Tetracycline): 购自 BBI 公司。Color plus prestained protein marker 购自 New England Biolabs 公司。

**1.2 试验动物** 实验动物自南方医科大学实验动物中心, 品种为新西兰白兔, 雌性, 体重为 2.0 kg, 6 周龄, 飼养于无特定病原体环境中。

## 1.3 方法

### 1.3.1 抗体制备与纯化

**1.3.1.1 免疫** 实验动物饲养于无特定病原环境中, 1 周后对其进行初次免疫, 用 5 mg 重组表达的黏附蛋白 P23 和 1 mL 弗氏完全佐剂充分乳化, 肌肉注射; 间隔 7 d, 进行第 2 次免疫, 用 5 mg 重组表达黏附蛋白 P23 和 1 mL 弗氏不完全佐剂充分乳化; 隔 7 d, 进行第 3 次免疫, 免疫用量和用法同上, 通过 ELISA 方法检测抗体水平。

**1.3.1.2 硫酸铵法分离抗体** 参照参考文献[8]方法。

**1.3.2 噬菌体展示肽筛选人隐孢子虫 23 抗原表位**

**1.3.2.1 淘选** 第 1 轮: 用包被液将 P23 抗体浓度调为至 100 μg/mL, 每孔加入 150 μL 抗原液, 4 ℃ 过夜。弃掉包被液, 纸巾上用力拍掉残留液, 每孔加满封闭液, 4 ℃ 作用 1 h。弃掉封闭液, TBST [TBS + 0.1% (VPV) Tween-20] 洗涤 6 次。用 100 μL TBST 稀释  $12 \times 10^{11}$  的噬菌体 (即 10 μL 原始文库), 加入包被孔中, 轻轻震荡 60 min。弃未结合的噬菌体液, 去残留液。TBST 洗 6 次, 每次 5 min。加入 100 μL 洗脱液, 轻轻震荡 8 min, 将洗脱液移到 1.5 mL 离心管中, 立即加入 30 μL 中和液, 混匀。取 10 μL  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$  稀释的洗脱液进行滴度测定 (采用 LB/IPTG/Xgal 平板方法, 带四环素抗性)。

**1.3.2.2 噬菌斑的扩增** 剩余洗脱液进行扩增方法同上。第 2~3 轮: 方法同第 1 轮, 同时将 P23 浓度调为 10 μg/mL, 加入  $2 \times 10^{11}$  pfu 扩增噬菌体 TBST 中 Tween-20 的浓度提高到 0.5%。

**1.3.2.3 测序模板的快速纯化** 将 500 μL 含噬菌体上清转入至离心管中, 加 200 μL PEG/NaCl, 混

匀, 静置 10 min。12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清。沉淀物重悬于 100 μL NaI 缓冲液中, 加入 250 μL 乙醇, 室温温育 10 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清。70% 的乙醇洗涤沉淀, 真空干燥, 加入 30 μL TE (pH 8.0)。

**1.3.2.4 间接 ELISA 鉴定所筛选的噬菌斑克隆** 将经提取的靶分子包被 ELISA 板上, 每孔 100 μL, 4 ℃ 过夜。弃之, 加满封阻液, 4 ℃ 作用 2 h。甩出封阻液, 用 1×TBS/Tween-20 洗板 6 次。加入经稀释的噬菌体, 以原始的噬菌体文库为阴性对照。室温震荡作用 1 h。洗涤 6 次, 加入 1:5 000 经封阻液稀释 HRP 标记的羊抗兔抗体, 每孔 200 μL, 室温震荡作用 1 h。洗涤 6 次, 每孔加 100 μL 底物溶液, 室温作用 20 min。测定 450 nm 吸光值。

**1.3.2.5 Western blot 鉴定所筛选的噬菌斑克隆**

选取 10 个阳性克隆中的 2 克隆进行免疫印迹试验。样品经 SDS-PAGE 上样缓冲液裂解后, 进行 SDS-PAGE 电泳, 且转印至硝酸纤维素膜上, 用 0.02% Tween 封闭 2 h。加入抗 P23 抗原抗血清 (按 1:500), 室温孵育 2 h, 磷酸盐缓冲液漂洗 3 次, 再加入含 5% 脱脂奶粉的 HRP-羊抗兔酶标二抗 (按 1:2 000) 作用 1 h, 漂洗 3 次, 最后置入 DAB 溶液中 (含 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 作用 5 min。

**1.3.2.6 序列测定与表位序列分析** 将上述提取 DNA 送至上海生物工程有限公司进行测序, 所得结果参照 Ph. D.-7<sup>TM</sup> 说明书确定结合序列。同时登陆网站, 输入所得序列进行抗原表位分析, 并采用 DNASTar 软件对所得序列的抗原性、亲水性等特点进行分析。

## 2 结果与分析

**2.1 抗体制备及纯化结果** 由图 1 可见, 1 和 2 在 67 kD 左右明显可见目的条带, 此为 IgG 重链; 在 29 kD 和 20 kD 之间也存在一条目的条带, 为 IgG 轻链, 大小为 25 kD (箭头所示)。同时运用培清 JS-680D 成像系统软件分析, 其浓度可达 3 mg/mL, 其纯度可达 98.2%。

**2.2 增值噬菌体单链 DNA 提取结果** 从图 2 可知, 1~15 为所提取的噬菌体单链 DNA 分子, 电泳检测表明它们大小均在 4 000 bp 左右, 与噬菌体单链 DNA 分子实际大小相符合。从图 2 可知, 筛选后的噬菌体经碘化钠方法提取的基因组大小 4 000 bp 左右, 与预期结果一致。

**2.3 ELISA 鉴定结果** 从结果来看, 所挑选 15 个噬菌体经 ELISA 鉴定后, 10 个为阳性克隆, 其 P/N

均大于 2.0(图 3)。而对 2,8,12,13,14 克隆鉴定时,其 P/N 分别为 1.30,1.42,1.18,1.17 和 1.44,均小于 2.0,故为阴性克隆。

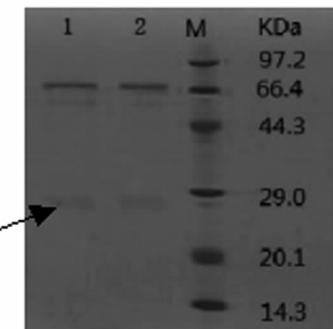


图 1 SDS-PAGE 电泳检测抗重组抗原 P23 的 IgG

Fig. 1 Determination on IgG of anti-P23 by SDS-PAGE

M: Protein molecular weight; 1, 2: Purified IgG

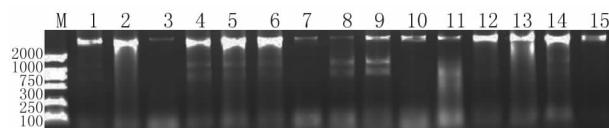


图 2 筛选后的噬菌体单链 DNA 提取结果

Fig. 2 Extraction on single strand DNA of phage after screening

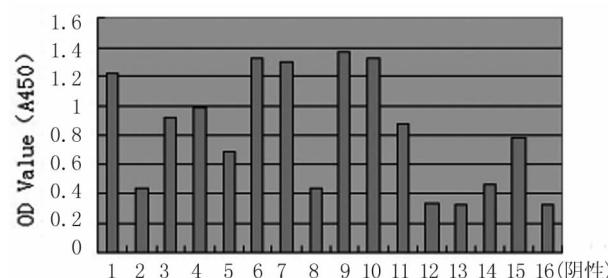


图 3 ELISA 方法鉴定噬菌斑的结果

Fig. 3 Identification of phage plaques by ELISA

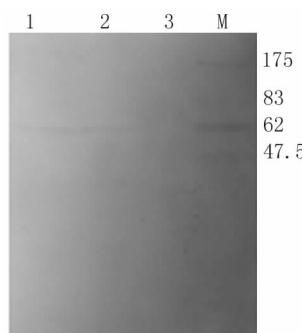


图 4 免疫印迹鉴定所筛选的噬菌斑

Fig. 4 Identification of phage plaques by western blot

M: Prestained protein marker; 1 and 2: Positive phage plaques identified by ELISA; 3: Negative control

## 2.4 Western blot 检测结果 从图 4 可知,阳性克

隆经 Western blot 经有目的条带出现,大小为 67 kD 左右。

从图 4 可见,阳性噬菌斑克隆产物 Western blot 检测后,在 62 kD 左右处明显有目的条带出现,与预期结果一致,而阴性对照无目的条带出现。

## 2.5 测序结果与分析 以下为测序得到的靶序列:

1. CGA CTG CGA CAC ATG CGG CCC, 命名为 ep1; 2. ATT CAG CGT AGT AAG CTG ATT, 命名为 ep2; 3. ATG ACG CGG ATA AAT AGC ATG, 命名为 ep3。

### 2.5.1 抗原表位位点预测

n	Start Position	Sequence	End Position
1	1	SKLJRV	7

n	Start Position	Sequence	End Position
1	1	PTATHA	6

n	Start Position	Sequence	End Position
1	1	FSLSCYL	7

对上述序列预测结果来看,3 个获得序列均有抗原表位,其中两个包含了 7 个氨基酸,另一个包含了 6 个氨基酸,且它们氨基酸序列是存在差异性的。

2.5.2 预测抗原指数、亲水性和二级结构 运用 DNASTar 软件预测,ep1 抗原指数较高,最大值高达 1.7,而且整个预测序列抗原指数都大于 0。该序列中采用 Gaimer-Robson 和 Chou-Fasman 两种方法均可预测其存在  $\beta$  折叠,而转角只能通过 Chou-Fasman 方法预测到一段转角区域,无卷曲结构,推测该结构成为抗原表位的可能性比较大。ep2 抗原指数较高,最大值可达 1.7,而且整个预测序列抗原指数都大于 0。采用 Gaimer-Robson 和 Chou-Fasman 两种方法均可预测其存在转角结构,Gaimer-Robson 方法可预测到卷曲结构,推测该结构成为抗原表位可能性的比较大。ep3 有 3 段区域抗原指数大于 0,且该序列中采用 Gaimer-Robson 和 Chou-Fasman 两种方法均可预测到该序列中  $\beta$  折叠存在,但无卷曲和转角结构。

## 3 讨 论

噬菌体展示技术在寄生虫抗原功能研究方面得到广泛应用,如 Lauterbach 等<sup>[9]</sup>, Lanzillotti 等<sup>[10]</sup>, Gnanasekar 等<sup>[11]</sup>, Ellis 等<sup>[12]</sup>开展了相关的研究。噬菌体展示技术可使大量随机多肽与其 DNA 编码序列之间建立直接联系,从而使各种靶分子(抗体、酶、细胞表面受体等)的多肽配体通过一种被称为淘

选的体外选择程序得以快速鉴定。本试验中采用 Ph. D.-7 噬菌体展示肽库筛选隐孢子虫 P23 抗原细胞表位,该肽库将随机七肽融合到 M13 噬菌体次要衣壳蛋白(pIII)上,是一个组合文库,含有  $2.8 \times 10^9$  个电转化序列,文库序列具有广泛的多样性,无明显的残基位置偏嗜。从这个意义上来说,该文库电转化序列含量大,有利于筛选更多的表位序列,而电转化序列的拷贝数多,容易造成筛选表位序列重复性较大,如需得到多个表位序列,应对多个克隆进行测序方可获得目的肽片段。

利用亲和富集的方法对噬菌体肽库进行有效的筛选,在筛选过程中必须考虑严谨性和特异性问题。调节筛选或洗脱的严谨性对于获得共有的结合序列是十分重要的。在结合和洗涤缓冲液中 Tween-20 的存在,能减少噬菌体和抗体的非特异性结合。筛选严谨性与选择条件是紧密相连的,高适合度肽较低适合度肽被优先筛选出来,产量是存活下来的有一定适合度的噬菌体颗粒。因此噬菌体展示过程中,须考虑筛选的严谨性与产量的关系。此外,由于蛋白之间结合的亲和性和特异性可能并不一致,筛选严谨性过高可能会使低亲和性、高特异性的序列丢失,而筛选严谨性过低又易得到高亲和性、特异性低的序列。因此,采用适当的筛选严谨性或者淘选条件是高通量筛选成功与否的关键。影响筛选严谨性的参数有很多,如靶标浓度、结合温度、结合时间、洗涤强度、洗脱时间、淘选轮数等。降低靶标浓度能够使大量噬菌体竞争少数靶标而提高筛选严谨性。基于以上考虑,本试验采用每轮筛选略提高 Tween-20 和降低包被靶标抗体的浓度来平衡严谨性和特异性关系,并对噬菌体和靶标结合时间作了一定的缩减,目的在于提高筛选的特异性。同时试验中采用 3 轮淘选,一方面能够保证试验中结合特异性,也可保证筛选的噬菌体克隆在单位平板中生产数不超过 200 个,可较好地挑选且未出现交叉污染。

本研究中通过生物信息学分析,结果表明所得 3 个序列均存在一个抗原表位结构。采用 DNASTar 软件分析抗原指数和亲水性等参数,发现 3 个序列的抗原指数均为正值,满足抗原表位基本要求,并且 ep1 和 ep2 的抗原表位指数达 1.7。在二级结构方面,所得 ep1 和 ep2 也存在转角和折叠结构。Apostolopoulos 等人为蛋白质的二级结构如转角和无规则卷曲多处于蛋白质的表面,这有利于与抗体的嵌合,成为抗原表位的可能性大<sup>[5]</sup>。蛋白质亲水性被认为是蛋白的亲水部位与蛋白的抗原位点有密切的联系,蛋白质表位常处于表面电荷及极性最大的区

域。从本试验对所得序列预测结果来看,三个表位序列中均含有一定水平亲水性、较高的抗原指数等,推测所得序列与 B 表位序列有关,至于是否具有免疫原性有待于进一步证实。

## 参考文献:

- [1] Xu QM, Li GQ, Ye YJ, et al. Development of RT-PCR-ELISA assay for detecting *Cryptosporidium hominis*[J]. Chin J Zoonoses, 2010, 26 (2):150-153. (in Chinese)
- 徐前明,李国清,程家林 等.人隐孢子虫 RT-PCR-ELISA 检测方法的建立[J].中国人兽共患病学报,2010, 26 (2):150-153.
- [2] Petersen C, Gut J, Doyle PS, et al. Characterization of a>900,000-Mr *Cryptosporidium parvum* sporozoite glycoprotein recognized by protective hyperimmune bovine colostral immunoglobulin[J]. Infect Immun, 1992, 60 (12): 5132-5138.
- [3] Priest JW, Kwon JP, Moss DM, et al. Detection by enzyme immunoassay of serum immunoglobulin G antibodies that recognize specific *Cryptosporidium parvum* antigens[J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(5): 1385-1392.
- [4] Perrier V, Solassol J, Crozet C, et al. Anti-PrP antibodies block PrPSc replication in prion-infected cell cultures by accelerating PrPc degradation[J]. J Neurochem, 2004, 89 (2): 454-463. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2004.02356.x
- [5] Apostolopoulos V, Yu M, Corper AL, et al. Crystal structure of a non-canonical low-affinity peptide complexed with MHC class I: a new approach for vaccine design[J]. J Mol Biol, 2002, 318(5): 1293-1305. DOI: 10.1016/S0022-2836(02)00196-1
- [6] Naik RR, Brott LL, Clarson SJ, et al. Silica-precipitating peptides isolated from a combinatorial phage display peptide library [J]. J Nanosci Nanotechnol, 2002, 2(1): 95-100.
- [7] Mullen LM, Nair SP, Ward JM, et al. Phage display in the study of infectious diseases[J]. Trends Microbiol, 2006, 14(3): 141-147. DOI: 10.1016/j.tim.2006.01.006
- [8] Li F, Wang ZX, Qin WB. Comparison of purification of rabbit anti-H9N2 subtype avian influenza virus serum by three methods [J]. China Anim Husbandry Vet Med, 2011, 38(10): 211-213. (in Chinese)
- 李芳,王泽雄,亓文宝.3 种方法纯化兔抗 H9N2 亚型禽流感病毒血清的比较[J].中国畜牧兽医,2011,38(10):211-213.
- [9] Lauterbach SB, Lanzillotti R, Coetzer TL. Construction and use of *Plasmodium falciparum* phage display libraries to identify host parasite interactions[J]. Malar J, 2003, 2: 47. DOI: 10.1186/1475-2875-2-47
- [10] Lanzillotti R, Coetzer TL. Phage display: a useful tool for malaria research[J]. Trends Parasitol, 2008, 24(1): 18-23.
- [11] Gnanasekar M, Rao KV, He YX, et al. Novel phage display-based subtractive screening to identify vaccine candidates of *Brugia malayi*[J]. Infect Immun, 2004, 72(8): 4707-4715. DOI: 10.1128/IAI.72.8.4707-4715.2004
- [12] Ellis SE, Newlands GF, Nisbet AJ, et al. Phage-display library biopanning as a novel approach to identifying nematode vaccine antigens[J]. Parasite Immunol, 2012, 34(5): 285-295. DOI: 10.1111/j.1365-3024.2011.01317.x