

DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2017.09.004

弓形虫微线蛋白 16 抗原表位区的预测 及酵母表面展示

孙 慧¹, 李 瑾¹, 肖 婷¹, 徐 超¹, 尹 昆¹, 黄炳成¹, 雷 战², 魏庆宽¹

摘要:目的 应用生物信息学软件预测弓形虫微线蛋白 16(TgMIC16)B/T 细胞抗原表位并对抗原表位区进行酿酒酵母菌的表面展示。方法 利用 DNASTar 和 IEDB 对 TgMIC16 进行 B 细胞抗原表位预测,利用 SYFPEITHI 和 BIMAS 预测其 T 细胞抗原表位。参照预测结果,采用 pCTCON2/EBY100 展示系统对抗原表位区进行酵母表面展示,利用间接免疫荧光(IFA)和流式细胞仪检测表达情况。结果 TgMIC16 存在潜在的 B/T 细胞抗原表位且集中在 aa343-625 区域;该抗原表位区成功展示到酵母细胞表面,最佳诱导时间为 24~36 h。结论 为下一步酵母载体疫苗的研制及疗效评价奠定基础。

关键词:酵母细胞表面展示;抗原表位;微线蛋白-16

中图分类号:R382.5 文献标识码:A 文章编号:1002-2694(2017)09-0774-05

Prediction and yeast surface display of antigenic epitope region of TgMIC16 of *Toxoplasma gondii*

SUN Hui¹, LI Jin¹, XIAO Ting¹, XU Chao¹, YIN Kun¹,
HUANG Bing-cheng¹, LEI Zhan², WEI Qing-kuan¹

1. Shandong Academy of Medical Sciences, Shandong Institute of Parasitic Diseases, Jining 272033, China;
2. Shandong Academy of Medical Sciences, Shandong Laboratory Animal Center, Jinan 250000, China)

Abstract: The bioinformatics software was used to predict the B cell and T cell epitopes of *Toxoplasma gondii* microneme 16 (TgMIC16) followed by epitopes display on the yeast of *Saccharomyces cerevisiae*. B and T cell epitopes of TgMIC16 were predicted by DNASTar and IEDB, and software of SYFPEITHI and BIMAS, respectively. According to the predicted results, the antigenic epitope region was expressed with pCTCON2/EBY100 display system. The expression protein was detected by indirect immunofluorescence (IFA) and flow cytometry. Results showed that there were potential B/T cell epitopes in TgMIC16 and concentrated in the aa343-625 region. The epitope region was successfully displayed on the surface of yeast cells, and the optimal induction time was 24 hours. The study would lay the foundation for the development and efficacy evaluation of the yeast carrier vaccine in the further research.

Keywords: yeast surface display; antigen epitope; microneme protein-16

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81501770), the Shandong Natural Science Foundation (Nos. ZR2015YL051, ZR2015YL033 and ZR2016CP18), and the Innovation Project of Shandong Academy of Medical Sciences
Corresponding author: Wei Qing-kuan, Email: wqkzlj@sina.com

国家自然科学基金(No. 81501770);山东省自然科学基金(No. ZR2015YL051, No. ZR2015YL033, No ZR2016CP18);山东省医学科学院医药卫生科技创新工程

通讯作者:魏庆宽,Email:wqkzlj@sina.com

作者单位:1.山东省医学科学院,山东省寄生虫病防治研究所,济宁 272033;

2.山东省医学科学院,山东省实验动物中心,济南 250000

弓形虫可以感染所有温血动物,引起严重危害人类健康的人兽共患弓形虫病。人类误食被弓形虫卵囊污染的食物、水源或摄取含有弓形虫包囊的未煮熟的肉制品都能引起弓形虫的感染,因此,美国 and 法国已将弓形虫列为继沙门氏菌和李斯特菌后的第三大食源致死性病原^[1-2]。怀孕妇女感染弓形虫,可导致早产、流产、死胎或胎儿致畸(小脑畸形、小眼畸形等)、胎儿脑积水,严重影响新生儿人口素质^[3]。

弓形虫入侵宿主细胞是多种蛋白协调作用的结果,在其黏附入侵过程中,伴随着细胞器(微线体、棒状体和致密颗粒)蛋白的顺序释放^[4];微线蛋白(Microneme protein, MIC)是首先释放的蛋白,在虫体和宿主细胞间形成移动链接,抑制微线蛋白的表达会严重影响虫体的附着和入侵。以 TgMIC1、TgMIC3、TgMIC4 和 TgMIC6 作为候选抗原的 DNA 疫苗、重组亚单位疫苗已有报道^[5-8],制备的各类型的疫苗能激发一定的特异性细胞免疫和体液免疫,在抗弓形虫感染试验中,各种疫苗虽然仅能提供部分免疫保护、延迟攻虫小鼠的死亡,但仍然为弓形虫的免疫预防提供了新方向。TgMIC16 是近年来新发现的一种微线蛋白,以其作为候选抗原的基因工程疫苗未见报道。

筛选合适的疫苗递送系统对基因工程疫苗的制备显得尤为重要,酵母菌具有天然的抗菌、抗炎症和中和毒素的功能,能够刺激机体的天然免疫;酵母载体疫苗在抗菌、抗病毒的防治研究中具有良好的应用前景^[9]。目前,酵母载体疫苗在弓形虫的免疫预防中未见报道。本研究基于酵母表面展示系统,筛选 TgMIC16 的 B/T 细胞抗原表位并对该功能区进行酵母表达,间接免疫荧光和流式细胞仪检测表明该功能区蛋白成功表达,为下一步酵母载体疫苗的研制及疗效评价奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 载体与菌株 酵母展示质粒 pCTCON2 和酿酒酵母株 EBY100 [MATa GAL1-AGA1::URA3 *ura3-52 trp1 leu2Δ1 his3Δ200 pep4:: HIS2 prb1Δ1.6R can1 GAL*]由山东农业大学赵孝民教授馈赠;大肠杆菌(E. coli)感受态细胞 TOP10 由本实验室保存。

1.2 主要试剂 限制性内切酶(*NheI/BamHI*)、T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司;胶回收试剂盒、质粒 DNA 提取试剂盒购自北京全式金有限公司;FITC 标记羊抗兔 IgG (H+L)购自北京博森生物科技有限公司;兔源 TgMIC16 多抗由本实验室制备。

1.3 B/T 细胞抗原表位预测 利用 DNASTar 和 IEDB (<http://tools.iedb.org/bcell/>) 预测 TgMIC16 的 B 细胞抗原表位,利用 BIMAS (<https://www-bimas.cit.nih.gov>) 和 SYFPEITHI (<http://www.syfpeithi.de/bin/MHCServer.dll/EpitopePrediction.htm>) 预测其 T 细胞抗原表位。

1.4 TgMIC16 抗原表位区的 PCR 扩增 以前期

构建的 pET28a-TgMIC16 为模板^[10], P1: 5'-CCCGCTAGCCGTTTCTGTCCC-3' 和 P2: 5'-CCCGGATCCGCTTTCTTCGCA-3' 为引物进行 PCR 扩增,目的片段为 855bp,下划线部分为 *NheI* 和 *BamHI* 酶切位点。

1.5 酵母表达载体 pCTCON2-TgMIC16T 的构建 将纯化的 PCR 产物和酵母表达载体 pCTCON2 分别进行 *NheI/BamHI* 双酶切,于 16 °C 连接 1.5 h 后转化 TOP10 感受态细胞。筛选阳性克隆命名为 pCTCON2-TgMIC16T。

1.6 酵母细胞的转化 利用醋酸锂法进行酵母转化,挑取 EBY100 单菌落于 3 mL YPD 液体培养基 30 °C 过夜培养;按照 1:100 的比例接种于 10 mL 新鲜 YPD 液体中,30 °C 培养至 OD₆₀₀ 约 0.5 左右,回收菌体;分别用 2 mL 灭菌水、1 mL 1.1×TE/LiAC 洗菌体 1 遍,离心 5 min;300 μL 1.1×TE/LiAC 重悬沉淀,分装 50 μL/管,即为酵母菌感受态;每管感受态分别加入 5 μL pCTCON2-TgMIC16T 和 pCTCON2,轻轻混匀,30 °C 孵育 30 min;每管加入 1 mL 40% PEG3350,42 °C 水浴中,热激 15 min;离心弃上清;加入 1 mL YPD 液体培养基,30 °C 孵育 2 h,涂布于 SD/-Trp 筛选平板,30 °C 培养 2~3 d。

1.7 酵母表面展示 TgMIC16 挑取单菌落 EBY100/pCTCON2-TgMIC16T 和 EBY100/pCTCON2 于 10 mL SDCAA 培养基(0.67% YNB, 0.5% Casein acids Hydrolysate, 2% 葡萄糖)中 30 °C 培养至 OD₆₀₀ 约 2 左右,收集菌体转移至 50 mL SGCAA 培养基(0.67% YNB, 0.5% Casein acids Hydrolysate, 2% 半乳糖)中,调整菌液浓度 OD₆₀₀ 约为 0.8 左右,于 28 °C 诱导至 72 h,分别于诱导后 12 h、24 h、36 h、48 h 吸取 1.0 mL 菌液,离心后-80 °C 保存备用。

1.8 间接免疫荧光(IFA)鉴定 预冷 PBS 洗涤菌体;2% BSA37 °C 封闭 30 min;100 μL 1:800 稀释的兔源 TgMIC16 多抗,4 °C 孵育 2 h;PBS 洗涤后,100 μL 1:200 稀释的 FITC 标记的羊抗兔 IgG (G+L),避光孵育 1 h;1 mL 预冷 PBS 洗涤菌体 2 遍,荧光显微镜观察。

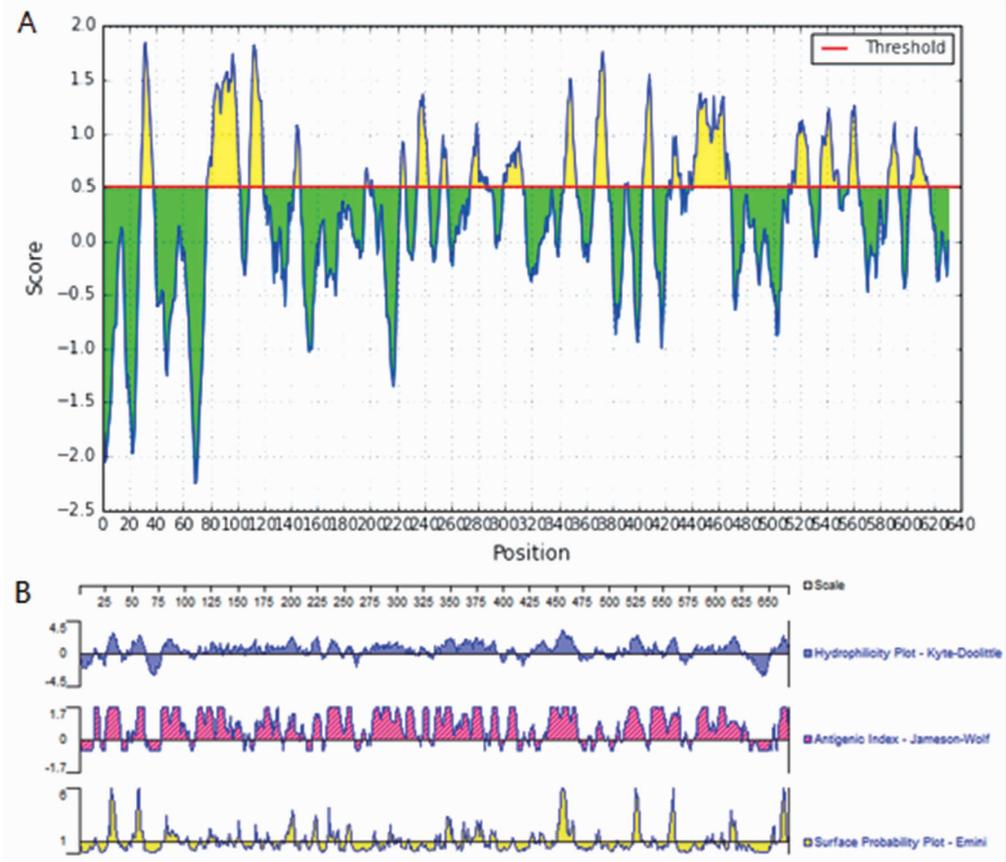
1.9 流式细胞仪检测 将免疫荧光染色的 EBY100/pCTCON2-TgMIC16T 和 EBY100/pCTCON2 细胞,用 300 μL PBS 重悬,300 目筛网过滤后,进行流式细胞仪检测。

2 结 果

2.1 B 细胞抗原表位预测结果 采用 IEDB 在线

预测 B 细胞线性表位,我们将阈值上调至 0.5,由图 1A 可见,线性表位区集中在 aa340~580 之间,采用 DNASStar 对 TgMIC16 的亲水区、蛋白表面可能性

以及表面抗原指数进行预测,分值较高的区域集中在 aa450~625(图 1B)。



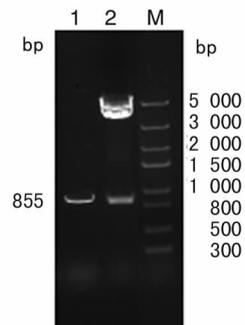
A. Prediction of IEDB, B. Prediction of DNASStar

图 1 IEDB 和 DNASStar 预测 B 细胞表位结果

Fig. 1 Prediction of B cell epitope using IEDB and DNASStar

2.2 T 细胞抗原表位预测结果 采用在线软件 BIMAS 和 SYFPEITHI 对 TgMIC16 进行 T 细胞表位预测,分别选取了两者预测结果中分值较高的 17 个抗原表位(表 1,2),统计两个软件高分值的相同区域共计 7 个(aa13~21、aa61~69、aa315~323、aa413~421、aa415~423、aa467~475、aa485~493),其中,有 4 个 T 细胞抗原表位(aa413~421、aa415~423、aa467~475、aa485~493)存在于 B 细胞抗原表位集中区域。基于 B/T 细胞抗原表位区预测结果和保持 TSR 功能区的完整性考虑,我们选取 aa343~625 进行下一步的蛋白表达。

2.3 TgMIC16T 的 PCR 扩增及 pCTCON2-TgMIC16T 酶切鉴定结果 PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测得到约 1 000 bp 的条带,与预期的 855 bp 的理论值相符(图 2)。利用 *Nhe*I/*Bam*HI 双酶切鉴定 pCTCON2-TgMIC16T,电泳结果表明,重组质粒 pCTCON2-TgMIC16T 构建成功(图 2)。



1:PCR product of TgMIC16T 2:pCTCON2-TgMIC16T digested with *Nhe*I and *Bam*HI M:Trans 5K DNA marker

图 2 TgMIC16T 的 PCR 扩增及 pCTCON2-TgMIC16T 酶切结果

Fig. 2 Amplification of TgMIC16T and digestion identification of pCTCON2-TgMIC16T

表 1 BIMAS 预测的 T 细胞表位

Tab. 1 Prediction of T cell epitope using BIMAS

| Rank | Start position | Subsequence residue listing | Score (Estimate of half time of disassociation of a molecule containing this subsequence) |
|------|----------------|-----------------------------|---|
| 1 | 38 | KVYAPVFTC | 64.948 |
| 2 | 413 | VLWISGDVL | 60.556 |
| 3 | 155 | MQMGECQNV | 44.356 |
| 4 | 467 | NVLSPLQWI | 42.727 |
| 5 | 485 | TLTRSELDL | 21.362 |
| 6 | 472 | LQWISVTPC | 16.347 |
| 7 | 48 | RQFLYEKYT | 15.375 |
| 8 | 211 | NSYLYFSWV | 15.182 |
| 9 | 66 | LVALCVIFT | 14.022 |
| 10 | 206 | AQALDNSYL | 11.913 |
| 11 | 5 | CLCTAMSSA | 11.426 |
| 12 | 62 | TLGGLVALC | 11.426 |
| 13 | 495 | MNPSAMCWV | 9.764 |
| 14 | 13 | ALSQRNCIL | 8.759 |
| 15 | 315 | DVCPNLWEV | 7.874 |
| 16 | 415 | WISGDVLSM | 7.227 |
| 17 | 476 | SVTPCASNV | 6.086 |

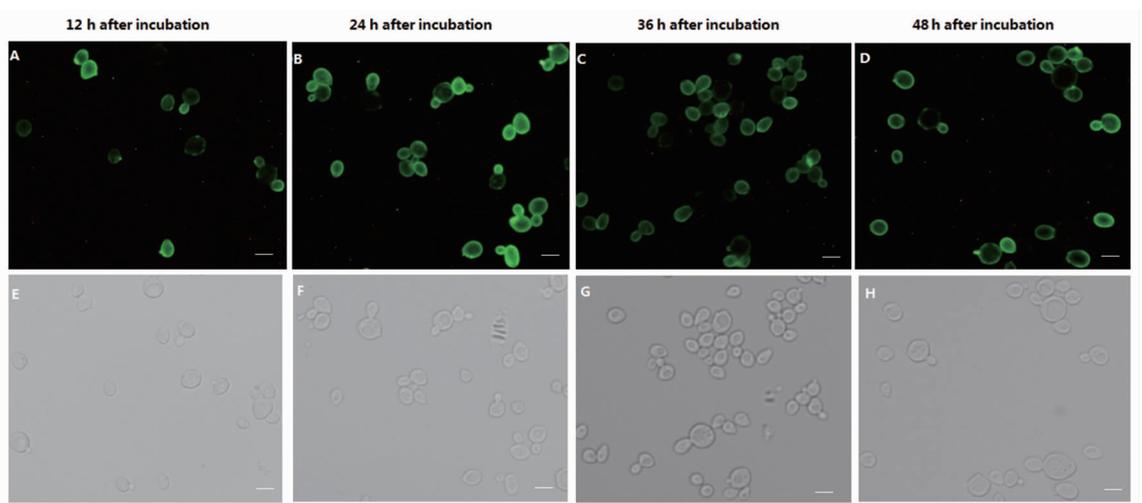
表 2 SYFPEITHI 预测的 T 细胞表位

Tab. 2 Prediction of T cell epitope using SYFPEITHI

| Rank | Start Position | Subsequence residue listing | Score |
|------|----------------|-----------------------------|-------|
| 1 | 61 | TTLGGLVAL | 27 |
| 2 | 13 | ALSQRNCIL | 22 |
| 3 | 413 | VLWISGDVL | 22 |
| 4 | 315 | DVCPNLWEV | 21 |
| 5 | 415 | WISGDVLSM | 21 |
| 6 | 485 | TLTRSELDL | 20 |
| 7 | 62 | TLGGLVALC | 19 |
| 8 | 90 | SDLSPPATV | 19 |
| 9 | 138 | IRFPNQASV | 19 |
| 10 | 243 | DVEDCLVDV | 19 |
| 11 | 467 | NVLSPLQWI | 19 |
| 12 | 566 | FVSCGTGCV | 19 |
| 13 | 55 | YTRRRCTTL | 18 |
| 14 | 162 | NVYWGKKEL | 18 |
| 15 | 289 | GVKGRFREL | 18 |
| 16 | 397 | ILNPLHACP | 18 |
| 17 | 546 | SCASSEVSL | 18 |

2.4 IFA 鉴定结果 从蛋白诱导表达开始每隔 12 h 取样进行 IFA 鉴定。结果表明,EBY100/pCT-CON2-TgMIC16T 诱导 12 h 后有点状绿色荧光散

在出现,24~36 h 整个酵母细胞表面呈亮绿色荧光(图 3),此后,随着表达时间的延长,荧光的强度逐渐减弱。



A-D: EBY100/pCTCON2-TgMIC16T under FITC filter from 12 h to 72 h after induced expression

E-H: EBY100/pCTCON2-TgMIC16T under normal white light from 12 h to 72h after induced expression

图 3 EBY100/pCTCON2-TgMIC16T 的 IFA 鉴定结果

Fig. 3 Indirect immunofluorescence detection of EBY100/pCTCON2-TgMIC16T

2.5 流式细胞仪鉴定结果 利用流式细胞仪进一步检测 EBY100/pCTCON2-TgMIC16T 的表达。结果显示,在诱导表达后 24 h 和 36 h 的展示效率高于 12 h 和 48 h,与 IFA 鉴定结果一致。

3 讨论

抗原表位,又称抗原决定基或抗原决定簇(antigenic determinant, AD)指抗原分子中决定抗原特异性的特殊化学基团^[11]。抗原通过抗原表位与相应的抗体或淋巴细胞表面的抗原受体结合,从而引起免疫应答。表位既然是蛋白抗原可产生免疫性的最小区域,因此在疫苗制备中为提高蛋白的免疫原性往往需要筛选候选抗原的抗原表位。随着生物信息学的发展和结构数据库的不断更新,计算机虚拟预测筛选抗原表位逐渐代替了传统的表位筛选^[12]。

细胞表面展示技术是指利用 DNA 重组技术将外源蛋白定位表达于细胞表面。多数的生物技术都经历了从原核生物到真核生物的发展应用,该技术从噬菌体表面展示发展到细菌表面展示、再到现在的酵母菌表面展示,经历了一系列的技术变革^[13]。酵母菌被公认为是安全的且广泛应用于食品制造业和制药业,抗体可以识别酵母表面表达的外源抗原表位并与其特异地结合^[14],能有效地诱导抗原特异性的免疫应答;本研究将筛选的 TgMIC16 抗原表位区展示在酵母菌表面,IFA 和流式细胞仪检测表明,外源蛋白从诱导 12 h 后开始表达,诱导 24 h 和 36 h 的表达效率高于 12 h 和 72 h。本研究为后续构建抗原表位疫苗及免疫诊断奠定实验基础。

参考文献:

[1] Saouros S, Dou Z, Henry M, et al. Microneme protein 5 regulates the activity of *Toxoplasma* subtilisin 1 by mimicking a subtilisin prodomain [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(43): 36029-36040. DOI: 10.1074/jbc.M112.389825

[2] Wang T, Tang ZH. Toxoplasmosis; the spread of tachyzoites, cysts and oocysts[J]. *Chin J Zoonoses*, 2012, 28(11): 1133-1136. (in Chinese)

汪涛,汤自豪. 弓形虫病:速殖子、包囊和卵囊的传播[J]. *中国人兽共患病学报*, 2012, (11):1133-1136.

[3] Torrey EF, Bartko JJ, Yolken RH. *Toxoplasma gondii* and other risk factors for schizophrenia: an update[J]. *Schizophr*

Bull, 2012, 38(3): 642-647. DOI: 10.1093/schbul/sbs043

[4] Hoff EF, Cook SH, Sherman GD, et al. *Toxoplasma gondii*: molecular cloning and characterization of a novel 18-kDa secretory antigen, TgMIC10 [J]. *Exp Parasitol*, 2001, 97(2): 77-88. DOI:10.1006/expr.2000.4585

[5] Lourenco EV, Bernardes ES, Silva NM, et al. Immunization with MIC1 and MIC4 induces protective immunity against *Toxoplasma gondii* [J]. *Microbes Infect*, 2006, 8: 1244-1251. DOI:10.1016/j.micinf.2005.11.013

[6] Fang R, Nie H, Wang ZS, et al. Protective immune response in BALB/c mice induced by a suicidal DNA vaccine of the MIC3 gene of *Toxoplasma gondii* [J]. *Vet Parasitol*, 2009, 164: 134-140. DOI: 10.1016/j.vetpar.2009.06.012

[7] Peng GH, Yuan ZG, Zhou DH, et al. *Toxoplasma gondii* microneme protein 6 (MIC6) is a potential vaccine candidate against toxoplasmosis in mice[J]. *Vaccine*, 2009, 27: 6570-6574. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.08.043

[8] Liu MM, Yuan ZG, Peng GH, et al. *Toxoplasma gondii* microneme protein 8 (MIC8) is a potential vaccine candidate against toxoplasmosis[J]. *Parasitol Res*, 2010, 106: 1079-1084. DOI: 10.1007/s00436-010-1742-0

[9] Shin MK, Yoo HS. Animal vaccines based on orally presented yeast recombinants[J]. *Vaccine*, 2013, 31(40): 4287-4292. DOI: 10.1016/j.vaccine.2013.07.029

[10] Li J, Cui Y, Yin K, et al. Prokaryotic expression, purification and immunological characterization of micronemal protein 16 of *toxoplasma gondii* [J]. *Chin J Parasitol Parasit Dis*, 2016, 34(3): 198-202. (in Chinese)

李瑾,崔勇,尹昆,等. 刚地弓形虫微线蛋白 16 基因片段原核表达、纯化及免疫反应性分析[J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2016, 34(3):198-202.

[11] Li YJ, Wang J, Zhao H, et al. Bioinformatics prediction on eg95 antigen epitopes of *Echinococcus granulosus* [J]. *Chin J Zoonoses*, 2011, 27(10): 892-896, 900. (in Chinese)

李玉娟,王晶,赵慧,等. 细粒棘球绦虫 Eg95 抗原表位的生物信息学预测[J]. *中国人兽共患病学报*, 2011, (10):892-896,900.

[12] He SW, Wei XX. Prediction of epitopes of the myophilin protein from *Echinococcus granulosus* [J]. *J Pathog Biol*, 2017, 12(1): 42-45,50. (in Chinese)

何顺伟,魏晓星. 细粒棘球绦虫 myophilin 的抗原表位预测 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2017, (01):42-45,50.

[13] Lee SY, Choi JH, Xu Z. Microbial cell-surface display[J]. *Trends Biotechnol*, 2003, 21(1): 45-52. DOI: 10.1016/S0167-7799(02)00006-9

[14] Boder ET, Witttrup KD. Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries [J]. *Nat Biotechnol*, 1997, 15: 553-557. DOI: 10.1038/nbt0697-553