

抗原表位研究方法进展

宋 帅, 李春玲*, 贾爱卿, 杨冬霞, 李 森

(广东省农业科学院兽医研究所 广东省兽医公共卫生实验室, 广东广州 510640)

摘 要: 抗原表位是抗原分子中的主要功能单位, 能有效刺激机体的细胞免疫和体液免疫。随着免疫学和生物信息学技术的不断发展, 用于研究 T 细胞表位和 B 细胞表位的方法得到了很大的提高。论文中概述了近几年用于研究 T 细胞表位的预测方法和鉴定方法, 以及在 B 细胞表位研究中所用的表位肽扫描技术、蛋白质“切割”法、噬菌体展示技术、X-衍射与核磁共振、表位预测方法等技术, 并对每种研究方法进行了比较, 为从事抗原表位研究的人员提供参考, 从而更有利于表位肽疫苗的研制和诊断方法的建立。

关键词: T 细胞表位; B 细胞表位; 预测; 鉴定

中图分类号: S852.4

文献标识码: A

文章编号: 1007-5038(2010)12-0087-05

抗原表位又称抗原决定簇, 是指抗原分子表面具有特殊结构和免疫活性的化学基团, 具有刺激机体产生抗体或致敏淋巴细胞并能够被其识别的一个免疫活性区。根据抗原表位特异性免疫应答的程度, 可将抗原表位分为免疫优势表位、亚优势表位和隐性表位。根据与抗原受体结合细胞的不同, 分为 B 细胞抗原表位和 T 细胞抗原表位; 其中 B 细胞抗原表位则往往为亲水性肽段, 一般位于抗原三维大分子的氨基酸长链折叠处^[1], 而 T 细胞抗原表位往往仅为埋藏在蛋白质空间结构内部的疏水性肽段^[2]。根据表位对机体的影响, 可分为保护性表位(免疫位)、致病性表位(变应位)和耐受性表位(耐受位)。按抗原表位结构的不同分为连续性抗原表位和非连续性抗原表位, 前者又称线型表位, 是由肽链上顺序连续的氨基酸组成, 后者又称构象型表位, 是由那些空间邻近但顺序上不连续的氨基酸组成。线型表位见于 T 细胞表位和部分 B 细胞表位, 构象型表位只见于 B 细胞表位^[3]。在机体的免疫系统中, 免疫细胞通常难以借助其表面受体识别整个蛋白质分子, 仅识别抗原分子上的抗原决定簇, 也就是说抗体的特异性是针对抗原表位而不是针对完整的抗原分子的^[4]。表位一般只占 5 个~7 个氨基酸或单糖残基的大小, 最多不超过 20 个氨基酸残基。抗原表位是蛋白质抗原性的基础, 所以深入研究蛋白质抗原表位对疾病的诊断及预后判定, 定点改造蛋白质分子以降低蛋白质药物的免疫原性, 设计无毒副作

用的人工疫苗以及免疫干预治疗等具有重要意义。

1 T 细胞表位的研究方法

T 细胞表位是抗原蛋白中经抗原递呈细胞(antigen presenting cell, APC)处理, 由主要组织相容性复合物(major histocompatibility complex, MHC)分子递呈给 T 淋巴细胞受体的多肽片段。主要涉及细胞毒性 T 细胞(cytotoxic T cell, CTL)抗原表位和辅助性 T 细胞(helper T cell, Th)抗原表位的研究, 其中 CTL 抗原表位与 MHC I 类分子亲和肽相关, Th 抗原表位与 MHC II 类分子的亲和肽相关。所以对 T 细胞表位的筛选主要基于候选肽能否和 MHC 分子结合。与 MHC I 类分子结合的多肽长度通常为 8 个~11 个氨基酸, 一般为 9 个, 在序列特定位置上有锚点存在。而 MHC II 分子亲和肽长度可达 30 个氨基酸以上, 其结合基序存在不同程度的退化^[5]。随着免疫学和生物信息学技术的不断发展, 对 T 细胞表位的研究主要有以下几种方法。

1.1 合成肽法

在机体的免疫系统中, T 细胞主要识别抗原分子上的线型表位。所以根据抗原蛋白质分子的氨基酸序列随机合成或连续合成一个或几个重叠氨基酸的一系列肽段, 然后通过多肽活性的检测实验进一步确定 T 细胞表位。此方法鉴定的 T 细胞表位较可靠, 且能发现一些不符合多肽结合基序(motif)的 MHC 结合抗原肽。Gerner W 等^[6]将口蹄疫病毒结

收稿日期: 2010-05-18

基金项目: 广东省农业攻关项目(2007A020300005-11)

作者简介: 宋 帅(1982—), 男, 河南汝州人, 研究实习生, 硕士, 主要从事动物疫病及综合防控技术研究。* 通讯作者

构蛋白分成442段肽段进行了淋巴细胞功能检测,最终确定了在VP1上第66位~第80位氨基酸组成的肽段为特异性T细胞表位。但这种方法工作量大、费用高,而且重叠区之间的表位有可能被忽略,所以不能够鉴定出目的蛋白上所有的T细胞表位。

1.2 免疫信息学预测法

T细胞表位的预测研究始于对Th表位的预测,但对CTL表位预测的探索进展最快,研究最深入,预测最成功^[7]。目前,T细胞表位的预测方法主要有分子建模法、结合基序法、定量矩阵法和机器学习法等。分子建模法可以揭示分子内部相互作用的机制,但不适合高通量的数据处理。结合基序法简单易行,特别适合于可利用的试验数据不够多的MHC等位基因结合肽的预测。定量矩阵法采用线性处理方法,依据的假设是肽序列残基对MHC结合的贡献是独立的,忽略了总体肽结构对结合的影响,且预测模型不容易加入新获得的试验数据,使得预测的通用性受到影响。机器学习法可解决如何寻找核心结合基序问题,并能整合结合肽残基间相互作用的信息,提高预测的特异性、准确性和适用性^[8]。

对CTL表位的预测已不仅仅局限于单纯的MHC分子亲和肽预测法,而是已经进入融合蛋白酶裂解位点预测、抗原处理相关转运蛋白(transporter associated with antigen processing, TAP)预测和MHC I类分子亲和肽预测为一体的系统建模阶段,所用的预测软件有NetCTL软件和EpiJen软件等^[9-10],这种综合预测方法明显优于单个预测方法,大大提高了预测的准确度,据报道EpiJen软件预测表位的正确率可达85%。徐云升等^[11]采用超模体、多项式和量化模体方案相结合的方法,对人乳头瘤病毒E7抗原上的限制性CTL表位进行了预测,结果预测出了16个、10个和3个九肽表位,合成并鉴定了其中5个九肽表位。

对Th细胞表位预测的方法仅限于MHC分子亲和肽预测法。机器学习法是预测Th细胞表位的较先进的方法,它的使用大大提高了预测的特异性、准确性和适用性。机器学习法主要包括人工神经网络、支持向量机和隐马尔可夫模型等。Zarour HM等^[12]运用人工神经网络算法预测了黑色素瘤相应抗原上的Th细胞表位。胡磊等^[13]用支持向量机器法对人类白细胞抗原上的MHC II分子结合多肽进行了预测,预测的准确率达到77.62%,与支持向量机器法相比,支持向量机器法是一种更新的模

式识别和分类工具。其优势在于无需用特定方法确定网络结构,因此支持向量机器法的算法也较简单。Ryuji IK等^[14]在隐马尔可夫模型方法的基础上构建了隐马尔可夫模型,该模型不需要非结合肽序列数据,且预测准确度有所提高。除了上述方法外,Le DJ等^[15]已证明可以利用噬菌体肽库展示技术,在噬菌体表面表达功能性肽-MHC复合体,并直接用T细胞筛选T细胞表位的可能性。

1.3 多肽活性的鉴定

目前,对于T细胞抗原表位多肽活性的鉴定主要有T淋巴细胞增殖试验、酶联免疫斑点试验、四氮唑化物比色法等^[16-18]。其中T淋巴细胞增殖试验是利用合成的多肽来诱导细胞活化增殖,再通过^[3H]-胸腺嘧啶掺入到脱氧核苷酸链中而得到反映,但该方法只能反映整体细胞的增殖状态,不能反映单个细胞的增殖状态。酶联免疫斑点试验通过检测抗原诱导细胞因子的分泌来判定多肽的免疫活性,本法不但可以检测特异性细胞抗原表位,而且可以定量,因此自建立以来,得到了广泛应用。四氮唑化物比色法测定是通过测定靶细胞代谢活性的减少来反映效应细胞所致靶细胞的死亡,本法简便,无需预标靶细胞,但由于微生物污染导致本法假阳性结果的可能性。除以上几种鉴定方法外还有体外抗原递呈试验、流式细胞仪分析法等,但在实际应用中应根据具体情况选择最合适的方法。

2 B细胞表位的研究方法

2.1 表位肽扫描技术

是根据已知蛋白质抗原分子的基因序列,合成或表达连续的重叠短肽,与相应的单抗或多抗反应,分析检测结果,以确定相应的抗原表位。这一技术要求有明确的抗原一级结构,并且检测结果为抗原线型表位,对构象型表位则无从获知。基本方法有:①根据蛋白质抗原分子的基因序列合成多肽片段,这些片段覆盖了整个蛋白质抗原分子序列并且部分重叠,然后利用单抗或多抗来检测能起阳性反应的片段,以获取抗原表位。②设计相应的引物将蛋白质抗原分子进行分段表达,表达产物纯化后用特异性抗体进行检测,根据阳性反应肽段的相应编码基因片段进行表位推测。周艳君等^[19]将猪繁殖与呼吸综合征病毒M蛋白进行一系列的氨基酸截短表达,通过蛋白质免疫印迹试验证实了M蛋白第117位~第129位氨基酸序列可与猪繁殖与呼吸综合征的阳性血清进行特异性反应,从而确定出相应的B细胞抗原表位。③利用某些核酸外切酶具有选择性从3'末端切除核苷酸的活性,来消化编码区核苷酸

序列,并将不同消化时间的产物分别插入适当载体,经表达得到一系列长度不等的同源性多肽,有抗原性的多肽经免疫反应筛选出来,再测定相应的 DNA 序列,即可知道表位图谱。

2.2 蛋白质“切割”法

此法是在获得蛋白质抗原分子的基础上用某种化学试剂或蛋白酶将纯化的蛋白质切割成若干小片段的多肽,用聚丙烯酰胺凝胶电泳、凝胶过滤和离子交换等方法将其分开,然后通过蛋白质免疫印迹、酶联免疫吸附试验等检测手段检测他们与不同单克隆抗体或高免血清是否有反应,从而确定蛋白质的抗原表位^[20]。或者是将蛋白质抗原和抗体先进行反应,然后利用蛋白酶进行水解,蛋白质上与抗体结合的部位将不被蛋白酶所作用,从而推测出相应的抗原表位。

2.3 噬菌体展示技术

此技术从随机肽库中可以直接筛选出能和抗体结合的表位,这些表位既可以是线型表位,也可以是模拟的构象型表位,而且这种方法不必预先确定蛋白质的氨基酸序列^[21]。其基本原理是将外源蛋白或多肽的基因与噬菌体外壳蛋白基因融合,以融合蛋白的形式在噬菌体表面表达出多肽序列,并保持特定的空间构象,利用特异性亲和作用来筛选特异性蛋白或多肽的一项新技术。基本技术流程如下:将单克隆抗体包被聚乙烯平皿后,加入噬菌体肽库,使其充分与单克隆抗体反应后,洗去未结合的游离噬菌体,再用洗脱液将结合状态的噬菌体洗脱下来。将其浸染宿主大肠埃希菌扩增后回收,再次与已包被单克隆抗体反应进行下一轮筛选。通常经过 3、4 轮的筛选,并且每次增加筛选强度,这样就可获得与单克隆抗体结合较紧密的噬菌体克隆。通过核苷酸序列分析,就能知道该噬菌体克隆所携带的外源肽序列,从而得知该单克隆抗体针对的特异性抗原表位。徐和敏等^[22]采用噬菌体展示技术,构建了猪瘟病毒石门株和疫苗株 E2 基因噬菌体展示多肽库。并利用 7 株猪瘟单克隆抗体和 1 株猪瘟高免血清分别对构建的石门株 E2 库和疫苗株 E2 库进行抗原表位筛选,得到了 5 条与 E2 蛋白高度同源的多肽序列。

2.4 X 射线衍射与核磁共振分析

抗原-抗体复合物的 X-射线衍射被认为是惟一真正能反映抗原、抗体相互识别的一种技术。该技术是研究抗原抗体相互作用时抗原中氨基酸的参与识别情况以及表位类型(线型或构象型),精确揭示构象依赖型表位和独特型-抗独特型复合物的三维

结构。但该技术价格昂贵、耗时,对蛋白质纯度要求极高,并只有在得到抗原-抗体复合物的适合晶体的情况下才能应用。虽然核磁共振方法可以分析液态下的肽链结构,绕过了结晶、X-射线衍射成像分析等难点,可直接分析自然状态下的蛋白质结构^[23],但其所用样品量很大且不能分析分子质量很大的复合物(大于 40 ku),而且需要特殊的仪器设备,所以该技术在一般实验室的应用受到限制。

2.5 B 细胞抗原表位的预测法

通过应用计算机软件分析和网络资源对 B 细胞抗原表位进行预测是近年来建立起的一种较为先进的表位研究方法。该法适用于已知一级结构的蛋白质或多肽抗原的线性表位的预测。其原理是根据 B 细胞表位的结构分析而来。以惟象理论(phenomenological theory)为基础,通过对蛋白亚序列理化性质或二级结构的计算,利用 B 细胞表位与上述理化特性或二级结构的相关性而达到预测目的。从 20 世纪 80 年代 Hoop J P 等^[24]提出以亲水性参数对抗原表位预测的方法以来,已有许多参数和算法发表,对 B 细胞线性表位研究起到了巨大的推动作用。现被公认具有较好预测效果的方法有亲水性方案、可及性方案、抗原性方案、可塑性方案、电荷分布方案和二级结构预测方案 6 种。对上述各种参数的预测比较表明,各种方案预测的正确率均不高。研究人员正在不断改进新的预测方法和加入新的计算方法,一些新的分析软件也被相继开发使用,如吴氏法、万氏法和 ABCpred 软件等^[25]。

以往合成的序列肽仅模拟蛋白质的线性表位,这无疑会遗漏众多的构象型表位信息。近几年来,随着生物信息学和分子生物学技术的飞速发展,采用计算机预测和试验相结合的方法进行构象型表位分析和定位得到了迅速发展,一些可用的基于网络的预测软件和服务算法已经公布,这类算法试验基础扎实,预测结果更为可靠^[26-27]。其主要局限在于只能预测出确定的单克隆抗体亲和表位。

此外,还有一些其他方法用于 B 细胞抗原表位的研究,如抗原表位中个别氨基酸的定点突变技术、表面胞质团共振技术(surface plasmon resonance, SPR)等,但在实际研究中应根据具体情况选择合适的方法。

3 结语

抗原表位是免疫原抗原性的物质基础,开展对抗原表位的研究将对病原的诊断以及分子疫苗的设计等具有重要的意义。对抗原表位的研究人们探讨出了很多方法,但一方面由于机体内免疫应答机制

的复杂性,试验中所鉴定的抗原表位还不能完全反应体内的实际情况;另一方面许多研究方法还存在明显的局限性,给抗原表位的研究带来了许多不便。只有将各种研究方法和实验室工作更加紧密地结合起来才能不断补充新的试验数据,完善现有的研究方法和创建更加先进准确的研究方法。相信随着各学科的不断发 展,对抗原表位的研究将取得突破性进展。

参考文献:

- [1] Jiang L, Zhou J M, Yue Y, et al. Selection and identification of B-cell epitope on NS1 protein of dengue virus type 2[J]. *Virus Res*, 2010, 150(1):49-55.
- [2] Malhotra U, Nolin J, Horton H, et al. Functional properties and epitope characteristics of T-cells recognizing natural HIV-1 variants[J]. *Vaccine*, 2009, 27(48): 6678-6687.
- [3] 王艳华,张德林,殷宏,等. 抗原表位预测方法的研究进展[J]. *中国兽医科学*, 2009, 39(10): 938-940.
- [4] Cesar P R, Claudia C N, Rafael S, et al. Variable epitope library-based vaccines: Shooting moving targets[J]. *Mol Immunol*, 2009, 47(2): 270-282.
- [5] Brusic V, Bajic V B, Petrovsk Y N. Computational methods for prediction of T-cell epitopes; a framework for modelling, testing, and applications[J]. *Methods*, 2004, 34(4): 436-443.
- [6] Gerner W, Carr B V, Wiesmiller K H, et al. Identification of a novel foot-and-mouth disease virus specific T-cell epitope with immunodominant characteristics in cattle with MHC serotype A31[J]. *Vet Res*, 2007, 38(4): 565-572.
- [7] Doytchinova I A, Guan P, Flower D R. EpiJen; a server for multistep T cell epitope prediction[J]. *BMC Bioinformatics*, 2006, 7(3):131-141.
- [8] 邵东华,冯新港. 辅助 T 细胞表位预测及其在抗寄生虫疫苗研发中的应用[J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2008, 26(3): 2282-33.
- [9] Larsen M V, Lundegaard C, Lamberth K, et al. An integrative approach to CTL epitope prediction; a combined algorithm integrating MHC class I binding, TAP transport efficiency, and protease cleavage predictions[J]. *Eur J Immunol*, 2005, 35(8):2295-2303.
- [10] Donnes P, Kohlbacher O. Integrated modeling of the major events in the MHC class I antigen processing pathway[J]. *Protein Sci*, 2005, 14(8): 2132-2140.
- [11] 徐云升,郝飞,吴玉章,等. HPV16E7 抗原 HLA-A2 限制性 CTL 表位预测及其合成[J]. *免疫学杂志*, 2003, 19(2): 97-100.
- [12] Zarour H M, Kirkwood J M, Kierstead L S, et al. Melan-A/MART-1(51-73) represents an immunogenic HLA-DR4-restricted epitope recognized by melanoma-reactive CD4 (+) T cells[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2000, 97(1):400-405.
- [13] 胡磊,乔立安,公衍道,等. 利用支持向量机预测 II 类 MHC 分子结合多肽[J]. *生物物理学报*, 2001, 17(4): 669-675.
- [14] Ryuj I K, Hideki N, Hiroyuki H, et al. Hidden Markov model-based approach as the first screening of binding peptides that interact with MHC class II molecules[J]. *Enzyme Microb Tech*, 2003, 33(4):472-481.
- [15] Le D J, Piqueras B, Doğan I, et al. Phage display of peptide/major histocompatibility complex[J]. *J Immunol Methods*, 2000, 241(1-2): 147-158.
- [16] Hiroya K, Esteban C. Peptide epitope identification for tumor-reactive CD4 T cells[J]. *Cur Opin Immunol*, 2008, 20(2): 221-227.
- [17] Olivia R R, Cludia M, Marta S C, et al. Identification of regulatory T cells during experimental *Leishmania infantum* infection[J]. *Immunobiology*, 2009, 214(2): 101-111.
- [18] Monica M M, Mitali B, Judy A B, et al. Identification of an immunodominant CD4⁺ T cell epitope in the VP6 protein of rotavirus following intranasal immunization of BALB/C mice [J]. *Virology*, 2007, 363(2): 410-418.
- [19] 周艳君,田志军,刘金霞,等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒 M 蛋白 B 细胞抗原表位的鉴定[J]. *中国预防兽医学报*, 2009, 31(4):251-255.
- [20] Manpreet K, Hema C, Harpreet S, et al. Identification and characterization of immunodominant B-cell epitope of the C-terminus of protective antigen of *Bacillus anthracis* [J]. *Mol Immunol*, 2009, 46(10): 2107-2115.
- [21] Yu X L, Olga B, Mark B, et al. Identification of measles virus epitopes using an ultra-fast method of panning phage-displayed random peptide libraries[J]. *J Viro Metho*, 2009, 156(1-2): 169-173.
- [22] 徐和敏,王琴,徐璐,等. 猪瘟疫毒 E2 基因噬菌体展示多肽库的构建及表位鉴定[J]. *畜牧兽医学报*, 2010, 41(1): 71-76.
- [23] Saul F A, Alzari P M. Crystallographic studies of antigen-antibody interactions[J]. *Meth Mol Biol*, 1996, 66:11.
- [24] Hoop J P, Wood K R. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences [J]. *Immunology*, 1981, 78(6): 3824-3828.
- [25] Saha S, Raghava G P S. Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network[J]. *Proteins*, 2006, 65(1):40-48.
- [26] Castrignan T, Demeo P D O, Carrabino D, et al. The MEPS server for identifying protein conformational epitopes [J]. *BMC Bioinformatics*, 2007, 8(1): 6-10.
- [27] Huang J, Gutteridge A, Honda W, et al. MIMOX; a web tool for phage display based epitope mapping[J]. *BMC Bioinformatics*, 2006, 7(10): 451-460.

piggyBac 转座子应用研究进展

杨欢欢^{1,2}, 魏峰², 刘全^{1*}

(1. 中国人民解放军军事医学科学院军事兽医研究所, 吉林省人兽共患病预防与控制重点实验室, 吉林长春 130062;
2. 吉林农业大学生命科学学院, 吉林长春 130118)

摘要: piggyBac 转座子是来源于鳞翅目昆虫粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*) 的 DNA 型转座子。目前 piggyBac 转座子已成为在昆虫中应用最广泛的转座子之一。近年来国内外研究者更将其应用领域拓宽到了鱼类, 寄生虫和哺乳动物等转基因研究中。随着对 piggyBac 转座子功能和分布的深入认识, piggyBac 转座子将更多应用于基因功能研究, 基因治疗, 转座子介导的细胞系基因诱变及基因工程蛋白表达等基础研究和应用研究中。

关键词: piggyBac 转座子; 转基因; 应用

中图分类号: Q782

文献标识码: A

文章编号: 1007-5038(2010)12-0091-04

转座子是一类能在宿主基因组中变更插入位置的可移动遗传因子, 其变更插入位置的过程被称为转座。自 1951 年美国 Mcclintock B 在玉米中发现了第一个转座子以来, 转座子被发现存在于大多数的微生物和动植物类型中, 从噬菌体到线虫、到昆虫和人, 再到玉米和水稻, 这些生物的基因组中都留下了转座子的足迹。利用转座子特有的转座功能, 将带有标记的转座子插入目的基因或基因组, 产生了转座子标签技术、转座子定点杂交技术、转座子基因打靶技术和非病毒载体基因增补技术等, 早已使转座子成为了各种生物基因分析的有效工具^[1]。随着基因工程和功能基因组学的发展, 转座子正逐渐成为

研究热点。其中尤以 piggyBac 转座子具有转座时携带目的基因不受大小限制, 目的基因能够在基因组中表达, 而且表达具有遗传性, 遵循孟德尔遗传规律, 能够被稳定地转移到下一代等特点而受到重视和关注。

1 piggyBac 转座子的基本结构

piggyBac 转座子是来源于鳞翅目昆虫的 DNA 型转座子, 病毒遗传学家 Fraser M J 和同事们在杆状病毒 (Baculovirus) 侵染粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*) TN-368 细胞株系时首次分离得到最早被称为 IFP2 的转座子^[2]。现在越来越多的研

收稿日期: 2010-05-19

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30972178); 国家科技支撑计划项目 (2010BAD04B01)

作者简介: 杨欢欢 (1980-), 女, 浙江德清人, 硕士研究生, 主要从事分子寄生虫学研究。* 通讯作者

Progress on Approaches for Antigen Epitope Study

SONG Shuai, LI Chun-ling, JIA Ai-qing, YANG Dong-xia, LI Miao

(Guangdong Open Laboratory of Veterinary Public Health, Institute of Veterinary Medicine,

Guangdong Academy of Agricultural Science, Guangzhou, Guangdong, 510640, China)

Abstract: Antigenic epitopes which are the major functional units can effectively stimulate the host's cellular and humoral immunity. The approaches of B and T cell epitopes study had been greatly improved with the advanced immunology and bioinformatics technology. This paper reviewed the prediction and identification methods for the T cell epitope study in recent years, and the approach for B cell epitope study using the epitope peptide scanning, proteolytic fragmentation, phage display epitope libraries, X-ray diffraction, nuclear magnetic resonance, epitope prediction methods, et al. the approaches for every epitope study were compared, in order to provide references for the researchers in the field of antigen epitopes, then facilitate the development of epitope vaccines and diagnostic method.

Key words: T cell epitope; B cell epitope; predication; identification