

文章编号: 1004-0374(2009)02-0316-04

B 细胞表位定位的研究进展

王洪林¹, 陈明亮¹, 刘文毅¹, 杨帆¹, 胡晓丰¹, 杨斌¹, 李晋涛^{2*}

(1 第三军医大学大坪医院训练队, 重庆 400042; 2 第三军医大学基础部全军免疫学研究所, 重庆 400038)

摘要: B 细胞抗原表位的研究对免疫原性多肽和新型疫苗分子的设计都起着指导作用, 同时也有利于诊断试剂的开发以及临床疾病的诊断。本文综述了近年来实验确定和理论预测 B 细胞蛋白质抗原表位的常用方法, 以及 B 细胞抗原表位分析的研究方法。

关键词: B 细胞表位定位; 细胞表面展示技术; 肽扫描

中图分类号: R392.12 **文献标识码:** A

Advances in mapping of B cell epitope

WANG Hong-lin¹, CHEN Ming-liang¹, LIU Wen-yi¹, YANG Fan¹, HU Xiao-feng¹, YANG Bin¹, LI Jin-tao^{2*}

(1 Training Team, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China;

2 Institute of Immunology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Mapping of B-cell epitope plays a guiding role on the design of immunogenic peptides and new molecular vaccine. At the same time, it is also conducive to the development of diagnostic reagents and clinical disease diagnosis. Both of the present common methods of experimental determination and theoretical prediction of B cell antigen epitope and the methods of B cell epitope analysis were summarized in this paper.

Key words: mapping of B cell epitope; cell surface display technology; pepscan

1 研究背景

表位是蛋白质抗原性的基础。正确而详细地绘制抗原表位图谱, 对疾病的诊断、蛋白质分子的定点改造发挥作用, 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。基于免疫学理论、基因工程、蛋白质工程的发展和固相多肽合成技术、生物物理技术、免疫检测技术以及计算机技术的广泛应用, 使蛋白质抗原表位的研究方法和思维方法有了新的进展, 发现了适应于蛋白质抗原表位研究的实验检测和理论预测方法。

2 研究方法

由于 B 细胞表位存在线性表位和空间表位两种形式, 我们将从不同的角度对这两种类型的 B 细胞表位的定位方法加以详尽地阐述。

2.1 线性表位的预测方法

B 细胞表位预测的原理是以蛋白质的理化性质和氨基酸结构上的特点为理论基础, 据 B 细胞表位

的结构分析而来的。通过 X-射线晶体衍射的手段对空间构象型表位的研究能准确地定位出抗原决定簇, 肉毒杆菌神经毒素与唾液神经节甙酯的结合位点就是通过这种办法确定的^[1,2]。通过测定蜂毒液中透明质酸酶(hyal)与鼠单克隆抗hyal中IgG1抗体复合物的晶体结构, 为合理设计低致敏活性的hyal衍生物提供了理论依据, 因而可用于开发安全的具有过敏原特异性的免疫治疗^[3]。然而, 这种方法非常复杂, 所以, 目前绝大多数研究者都把研究方向转向连续氨基酸构成的线性 B 细胞表位, 并且大多数 B 细胞表位预测的方法也是针对线性 B 细胞表位而设计的。

收稿日期: 2008-10-07; 修回日期: 2008-11-24

基金项目: 国家科技支撑计划(2006BA I03B12); 国家自然科学基金(30571708); 第三军医大学基础部学员创新基金

*通讯作者: ljtqms@yahoo.com.cn

2.1.1 抗原表位的预测法

蛋白质抗原表位的预测主要亲水性方案、可及性方案、抗原性方案、可塑性方案、电荷分布方案、二级结构预测方案等六种方法。上述各种方法都具有较大的误差, 因此联合多个方案进行预测, 以提高抗原表位定位的精确度已成为一种新的定位方法。

2.1.2 化学“切割”法或酶法

化学“切割”法或酶法主要有两种方式: (1) 用化学试剂或酶将抗原断裂成许多片段, 分离这些抗原肽段, 然后研究它们与不同的单克隆抗体的相互作用, 从而确定蛋白质的抗原表位^[4]。肌醇激酶、肌细胞增强蛋白、乙酰胆碱酯酶、玻璃体结合蛋白、髓磷脂基质蛋白等的抗原表位就是用该法确定的。(2) 抗原-抗体复合物的结合部位能抵抗蛋白酶的水解, 因此水解抗原-抗体复合物^[5, 6]能够直接地确定线性及构象性抗原表位。细胞色素 C、胃泌素释放肽(GRP)、脂碱性磷酸酶(PLAP)等的抗原表位就是用该法确定的。

采用化学“切割”法或酶法研究抗原表位过程比较复杂, 抗原-抗体结合的条件、酶解的条件、解离后的片段是否能有效分离、解离的完全程度、酶解片段的大小等对结果都会有影响。

2.1.3 合成肽库的方法

2.1.3.1 有机合成法 有机合成法是直接利用固相肽合成技术, 合成含有各种可能序列的短肽, 通过这种合成能保证各种序列的多肽等机率出现。每个载体上只含有一种序列的短肽, 其优点是构建方法简单、迅速; 缺点是不能扩增, 筛选比较麻烦, 需进行荧光标记或 ELISA, 在显微镜下操作工作量比较大。在研究构象性表位时的 Minotopes 方法即采用类似的方法^[7], 通常从二肽开始合成并逐渐增加肽链长度及置换氨基酸种类, 直到与抗体的最大结合为止。

2.1.3.2 噬菌体展示随机多肽库 王欣之和傅志强等^[8]详细介绍了噬菌体展示随机肽库及其在抗原表位研究上的应用, 其主要内容如下: 噬菌体随机肽库是以噬菌体外壳蛋白 PII 或 PVIII 基因为载体, 插入一段编码外源短肽的基因片段。插入这段外源短肽基因后, 噬菌体的浸染能力不受影响, 而外源肽亦可在噬菌体表面 PII 或 PVIII 蛋白 N 末端形成一定的空间构象。

从噬菌体随机肽库中筛选抗原表位的基本原理

是生物淘洗。以单克隆抗体筛选蛋白质抗原表位为例, 其基本技术流程如下: 将单抗包被聚乙烯平皿后, 再加入噬菌体肽库, 使其充分与单抗反应后, 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。将其浸染宿主大肠杆菌扩增后回收, 再次与已包被单抗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, 这样就可获得与单抗结合较紧密的噬菌体克隆。通过 DNA 序列分析, 就能知道该噬菌体克隆所携带的外源肽序列, 从而得知该单抗所针对的抗原表位。

虽然, 噬菌体随机肽库具有容量大、体积小、筛选简便、制备成本低、可多次扩增等突出优点, 但是它也有自身的不足。首先, 目前所建的肽库只能达到 10^9 , 构建大片段的肽库很困难; 其次, 肽的多样性问题; 第三, 少数肽或者由于过于疏水, 或者由于影响外膜蛋白的折叠而不能在噬菌体外正确表达。作为一种新技术, 类似的具体问题还很多。但随着制备技术及筛选技术的完善, 噬菌体随机肽库在蛋白质的抗原表位研究中, 将会起到越来越重要的作用。

2.1.4 基因工程法

对于已获得抗原表位片段的这类蛋白, 可用抗原表位中的个别氨基酸的定点突变技术来研究其中每个氨基酸对表位的贡献。将表达该抗原的核苷酸片段中表达某个氨基酸的密码子敲出获得突变后的核苷酸片段, 将这些基因产物在合适的载体系统, 如酵母、大肠杆菌或噬菌体中表达, 将免疫检测为阴性的个体再测序分析以确定表位相关的氨基酸。

基因工程的方法不失为一个定位抗原表位的好方法, 但也面临着如何制备大量的基因敲出后的核苷酸片段以及使其成功表达的问题。相信随着生物技术的迅猛发展, 这些问题也将迎刃而解, 运用基因工程法大规模地定位 B 细胞表位将成为可能。

2.1.5 表位作图法

表位作图方法的原理是将蛋白质抗原降解成小片段, 经测序后确定抗体结合的位点, 但是要确定某一抗原的全部表位需要大量的时间, 称为表位作图方法进展的“瓶颈”。分子克隆技术和肽链合成方法的进展极大地促进了表位作图方法的改进。现已可以通过诱变、蛋白质合成或蛋白竞争结合方法鉴定其表位。在免疫印迹反应中, 抗体能够识别耐蛋白降解的表位, 他们在蛋白抗原上的结合位点能够被精确的定位, 直到很小的肽链片段。而构象表

位的精确定位极为困难, 竞争性试验可用来确定两个或两个以上的抗体是否识别相同的蛋白质抗原空间不连续表位或重叠位点。大分子蛋白质常含有50—100个氨基酸组成的不连续折叠构象, 利用重组DNA技术, 可以定位那些构象性表位, 至少可以确定其肽链片段^[9]。

2.2 构象表位的预测法

近年来, 随着计算机技术在生物科学的广泛应用, B细胞构象表位的定位已成为可能。常用的成熟的构象表位的预测法有噬菌体展示随机多肽库技术、基因工程法、酵母表面展示技术、肽扫描(pepscan)技术、噬菌体展示随机多肽库技术。

2.2.1 肽扫描技术

目前操作手段与技术比较成熟的就是肽扫描技术。它不仅可用于构象表位的定位, 而且对于线性表位的定位也同样适用。

肽扫描技术, 我们就不得不谈到CLIPS(chemically linked peptides on scaffolds)技术。肽并不是有功能活性的蛋白质(只有一定空间结构的肽才是具有功能活性的蛋白质)。抗原(antigen)和线性多肽(linear peptides)具有相同的氨基酸序列, 然而抗原(antigen)因为有一定的空间结构能与抗体(antibody)以高亲和力结合在一起, 而不具有特定空间构象的线性多肽则不能与抗体结合在一块。CLIPS技术则能够提高合成肽的生物学功能。它是通过细小的化学“骨架”将一个或者是多个肽链连接成一个空间结构固定的分子。相比线性多肽(linear peptides), 新的分子的空间构象更接近于抗原的结构域, 因而能发挥特有的生物学功能。

构象表位的某一结构域不能与相应抗体识别的原因在于它们之间的亲和力低, 因此只有在构象表位各个不同的结构域结合在一块的情况下, 它才能以高亲和力与抗体结合。肽扫描技术是通过计算机模拟出抗原肽的各个结构域, 并将它们构成一个矩阵, 同时通过计算机模拟出相应抗体的空间结构, 从而使得它们紧密结合。通过CLIPS技术, 将一个或者多个结构域组合成一个空间结构一定的结构肽, 然后将所有可能的结构肽构成一个扫描矩阵, 通过扫描该矩阵与抗体的结构而得出可能的构象表位。人体内生长激素(GH)、催乳素(PRL)、白细胞介素-2、白细胞介素-6是I型细胞因子受体家族成员, 它们具有相似的序列WSXWS或F(Y)GEFS。Belloc等^[10]通过肽扫描技术合成了一个含有21个氨

基酸的短肽。用该短肽诱导小鼠产生的多克隆抗体能抑制生长激素结合于人体具有催乳作用的肝特异性受体。为此, 该肽可作为免疫原以生产抗体, 在某些病理情况(如高生长激素症等)下, 作为激素或细胞因子拮抗剂治疗这一类型疾病。

2.2.2 酵母表面展示技术

噬菌体表面展示在抗原表位分析、抗体筛选、抗体酶和蛋白酶抑制剂研究等方面得到广泛、成功的应用, 但是它利用原核表达系统, 不能展示出需糖基化、二硫键异构化等翻译后修饰才表现功能活性的复杂真核蛋白。酵母表面展示系统弥补了噬菌体展示技术的此项不足, 不仅能使复杂真核蛋白得到展示, 同时还保留了噬菌体表面展示技术便于筛选、扩增的优点。

酵母表面展示系统利用酿酒酵母的 α -凝集素、外源蛋白并借助它在细胞表面的作用得到展示^[11]。 α -凝集素由核心亚单位(Aga1)和结合亚单位(Aga2)两部分组成, Aga1与酵母细胞壁的 β -葡聚糖共价连接, Aga2通过两个二硫键与Aga1结合, 表达于酵母细胞表面^[12]。Aga2的N端部分参与二硫键的形成, 外源蛋白通过与Aga2的C端融合可展示于酵母细胞表面^[11]。酵母展示系统继承了噬菌体展示的表现型与基因型一致和易于扩增的特性, 可根据编码蛋白的特性对目的基因进行筛选。它不但可以应用传统的生物淘洗方法进行筛选, 另外由于酵母细胞体积较大, 从而决定了它在筛选方法上具有特殊优势, 可用流式细胞仪(fluorescence activated cell sorter, FACS)进行筛选^[11]。FACS能从亲和力相差仅2—3倍文库中筛选到目的克隆^[11, 13, 14], 同时单步分离阳性克隆比例可达125—600倍^[11, 15]。因此, FACS筛选酵母文库能大大提高检测的灵敏度和阳性克隆富集比率, 简便高效这一优越性更是显而易见。哈维氏弧菌编码的溶血素成为限制海水养殖业的重要因素, 随着抗菌物质的使用, 哈维氏弧菌已产生耐药性, 使用常规的抗菌物质已经无效。Zhu等^[16]首次报道利用酵母细胞展示溶血素作为海洋鱼类潜在的活疫苗, 这将为海洋生物养殖带来新的突破。

3 B细胞表位预测的应用与讨论

B细胞表位的定位在基础、临床医学等各方面研究都有着重要意义。

在基础研究中, B细胞表位定位的原理可以应用于酶与底物结合部位的定位、受体与配体识别部

位的定位等研究中,了解它们的作用机制能简便快速地获得与靶分子具有强亲和力和特异性的肽或新型蛋白,作为候选药物开发。目前该技术已广泛用于癌症、艾滋病、心血管病、组织器官移植、神经性疾病等领域药物的研究和开发,并已筛选出大量的受体拮抗物、酶抑制剂等。

在临床医学中,我们可以通过B细胞表位定位的手段获得表位的特定一级结构以及空间结构,为合成抗原模拟肽提供依据。人工合成的抗原模拟肽可用于临床疾病的免疫诊断,如对于自身免疫疾病,抗原模拟肽还可以与自身抗原竞争性地结合自身抗体,这样可以不用免疫抑制剂而减轻自身免疫疾病。

总的来说,B细胞表位测定原理在生命科学中有着广泛的用途。B细胞表位测定原理在开发活疫苗,开发细胞催化剂,开发细胞吸附剂,生物传感器的开发,开发用于医学诊断、工业、环境保护等的细胞受体等方面越来越占据着不可或缺的地位。

相信随着计算机技术和生物学技术的发展,越来越多的更为简便的、成熟的、精确的B细胞表位定位技术将呈现在大家面前。人们通过新的技术手段不仅能完成B细胞表位定位这一难题,而且完全可以筛选和鉴别出更多、更广的靶分子,并创造出更具有实际应用价值的模拟肽,特别是对肿瘤有诊断和治疗价值的生物活性分子,从而为新型肿瘤疫苗的开发研制以及肿瘤的治疗提供更广阔的前景。

[参 考 文 献]

- [1] Swaminathan S, Eswaramoorthy S. Structural analysis of the catalytic and binding sites of *Clostridium botulinum* neurotoxin B. *Nat Struct Biol*, 2000, 7: 693-9
- [2] Eswaramoorthy S, Kumaran D, Swaminathan S. Crystallographic evidence for doxorubicin binding to the receptor-binding site in *Clostridium botulinum* neurotoxin B. *Acta Crystallog*, 2001, 57:1743-6
- [3] Padavattan S, Schirmer T, Schmidt M, et al. Identification of a B-cell epitope of hyaluronidase, a major bee venom allergen, from its crystal structure in complex with a specific Fab. *Mol Biol*, 2007, 368(3): 742-52
- [4] Mazzoni MR, Artemyev NO, Hamm HE. Proteolytic fragmentation for epitope mapping. *Methods Mol Biol*, 1996, 66: 109-20
- [5] Jemmerson R, Paterson Y. Mapping epitopes on a protein antigen by the proteolysis of antigen-antibody complexes. *Science*, 1986, 232(4753): 1001-4
- [6] Sheshberadaran H, Payne LG. Protein antigen-monoclonal antibody contact sites investigated by limited proteolysis of monoclonal antibody-bound-antigen: protein "footprinting". *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85(1): 1-5
- [7] Appel JR, Pinilla C, Niman H, et al. Elucidation of discontinuous linear determinants in peptides. *J Immunol*, 1990, 144(3): 976-83
- [8] 王欣之, 傅志强. 噬菌体展示随机肽库及其在抗原表位研究上的应用. *中国兽医寄生虫病*, 2005, (01): 42-5
- [9] 李海侠, 毛旭虎. 蛋白质抗原表位研究进展. *微生物学免疫学进展*, 2007, (01): 54-8
- [10] Belloc CG, Longhi SA, Pena C, et al. Identification, synthesis and properties of a consensus peptide recognized by a monoclonal antibody directed to various type I cytokine receptors. *Life Sci*, 2007, 81(7): 553-9
- [11] Boder ET, Wittrup KD. Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nat Biotechnol*, 1997, 15(6): 553-7
- [12] Roy A, Lu CF, Marykwas DL, et al. The AGA1 product is involved in cell surface attachment of the *Saccharomyces cerevisiae* cell adhesion glycoprotein α -agglutinin. *Mol Cell Biol*, 1991, 11(8): 4196-206
- [13] Georgiou G, Stathopoulos C, Daugherty PS, et al. Display of heterologous proteins on the surface of microorganisms: from the screening of combinatorial libraries to live recombinant vaccines. *Nat Biotechnol*, 1997, 15(1): 29-34
- [14] Kieke MC, Cho BK, Boder ET, et al. Isolation of anti-T cell receptor scFv-mutants by yeast surface display. *Protein Eng*, 1997, 10(11): 1303-10
- [15] VanAntwerp JJ, Wittrup KD. Fine affinity discrimination by yeast surface display and flow cytometry. *Biotechnol Prog*, 2000, 16(1): 31-7
- [16] Zhu KL, Chi ZM, Li J, et al. The surface display of haemolysin from *Vibrio harveyi* on yeast cells and their potential applications as live vaccine in marine fish. *Vaccine*, 2006, 24(35-36): 6046-52