

猪瘟病毒糖蛋白 E^{ms}中和表位的鉴定和比较

张富强 李志华 张念祖

(云南省热带亚热带动物病毒病重点实验室 昆明 650224)

摘 要 猪瘟病毒(CSFV)囊膜结构糖蛋白 E^{ms}(gp48)是诱导机体产生中和抗体及激发保护性免疫应答的第二抗原蛋白。E2 和 E^{ms}与细胞表面受体的相互作用介导 CSFV 感染细胞的过程。E^{ms}具有 RNA 酶活性,影响病毒自身复制并涉及对病毒的中和效应。采用抗 CSFV alfort Tübingen 毒株 E^{ms}糖蛋白的 1B5, b4-22 和 24/16 单克隆中和抗体,筛选噬菌体展示的 12 肽随机肽库,进行 E^{ms}中和表位的鉴定和比较,获得分别针对 1B5、b4-22 和 24/16 单克隆抗体的 3 个主要中和表(拟)位基序 WxNxxP、DKNR(Q)G 和 A(T)CxYxKN,分别定位于 E^{ms}的 351 位~356 位或 348 位~350 位、384 位~386 及 322 位~323 位、380 位~386 位氨基酸区域。分析表(拟)位基序与单克隆抗体的免疫反应性差异。b4-22 和 24/16 单克隆抗体识别基序存在共有序列 KN,识别 E^{ms}中的相似抗原区,但其侧翼序列及免疫印迹、免疫荧光抗体抑制试验结果均存在显著差异。

关键词 猪瘟病毒, E^{ms}糖蛋白, 单克隆抗体, 表位, 鉴定

中图分类号 S855.3 文献标识码 A 文章编号 1001-6209(2005)01-0066-06

猪瘟病毒(Classical swine fever virus, CSFV)属于黄病毒科(Flaviviridae)瘟病毒属(Pestivirus)成员,与同属的牛病毒性腹泻病毒(Bovine viral diarrhea virus, BVDV)、羊边界病病毒(Border disease virus, BDV)、长颈鹿瘟病毒(Giraffe pestivirus)等,在病毒结构、抗原性和遗传特性等方面密切相关^[1]。BVDV 和 BDV 可感染牛、羊等反刍动物及猪,而 CSFV 自然宿主仅局限于猪^[2]。CSFV 囊膜内包含 E^{ms}、E1 和 E2 等 3 种糖蛋白^[3]。感染动物体内可产生针对 E^{ms}和 E2 的抗体,在自感染宿主动物体内未检测到针对 E1 的抗体^[4,5]。E2 及 E^{ms}与细胞表面受体的相互作用,介导病毒吸附和侵入细胞的过程^[6]。糖基化或部分糖基化的 E2 和 E^{ms}重组蛋白免疫动物后能刺激机体产生中和抗体^[7,8]。E2 和 E^{ms}在自然感染宿主体内能诱导保护性免疫应答^[9]。针对 CSFV E2 的抗原表位分析有大量报道^[10~15]。至今除对 E^{ms} RNA 酶活性功能域有定位报道外,尚无对其中和抗原区的精确定位结果^[16,17]。

免疫酶染色试验结果发现:抗 E^{ms}的单克隆抗体 1B5、b4-22 和 24/16 均能特异性识别 CSFV 毒株,对病毒感染具有中和作用;1B5 和 24/16 能明显抑制 E^{ms}的 RNA 酶活性^[18]。在检测的 21 株 CSFV 毒株中,1B5、b4-22 及 24/16 分别识别其中的 14 株、13

株、12 株,结果提示:1B5、b4-22 及 24/16 识别 E^{ms}中的 CSFV 特异性抗原表位,所识别的均不属于 CSFV 共有表位。

本研究采用单克隆抗体,经生物淘选噬菌体展示的 12 肽随机肽库,获得与单克隆抗体特异性结合的,携带表(拟)位基序的阳性噬菌体克隆(噬菌体拟位),对不同克隆展示的 12 肽序列进行测定,比对分析所包含的共有序列,在 CSFV E^{ms}氨基酸序列中查找与共有序列相同或相似的区域,进行表位基序定位,鉴别不同表(拟)位对单克隆抗体的免疫反应性及亲合性差异,进一步分析和验证表位定位结果。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病毒和细胞 猪瘟石门系强毒毒株,毒价为 10⁷TCID₅₀/mL 本室分离保存。猪肾传代细胞系(PK-15)本室保存。

1.1.2 试剂和仪器 1B5, b4-22 和 24/16 单克隆抗体由德国联邦动物病毒病研究中心的 E. Weiland 博士惠赠^[7]。Ph. D. -12™ Phage Display Peptide Library 购自美国 Beverly New England 生物实验室,辣根过氧化物酶(HRP)标记的鼠抗 M13 抗体购自 Amersham-Pharmacia 公司,碱性磷酸酶(AKP)或异硫氰酸荧光

基金项目 国家“九五”科技攻关项目(96-120-10);中澳国际合作项目(ACAIR/ASI/9438)

作者简介 张富强(1968-),男,云南省曲靖市人,副研究员,博士,主要从事分子病毒学及免疫学研究。Tel:86-871-5016575;Fax:86-871-5010721;E-mail:zfq1968@yahoo.com.cn

收稿日期 2004-04-26,修回日期 2004-06-21

素(FITC)标记的羊抗鼠 IgG 抗体购自 Chemicon 公司,包被重组蛋白 G 的磁性珠购自澳大利亚 Dynal 有限公司, QIAquickPCR 产物纯化试剂盒购自 QIAGEN 公司, BigDye 末端终止循环测序反应试剂盒购自 PE 公司, PCR 试剂购自 Promega 公司。

PCR 扩增采用 P. E. 9600 基因扩增仪, DNA 序列分析采用 ABI Prism 377 DNA 全自动测序仪, ELISA OD 值测定采用 EMVA/220 酶标分析仪进行。

1.2 肽库容量滴定和评价

用 TBS 将待滴定肽库作 $10^{-1} \sim 10^{-12}$ 稀释, 取 100 μ L 稀释液与 100 μ L 处于对数生长期的大肠杆菌 (*Escherichia coli*) ER2738 菌株悬液混合, 室温孵育 20min 后, 加至 3mL 融化后处于 42 $^{\circ}$ C 水浴箱保温的 Agarose Top(顶层琼脂糖营养液), 立即涂布 LB/Agar/Tet/X-gal/IPTG 平板, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养, 滴定噬菌体蚀斑形成单位(Plaque forming unit, PFU), 计算噬菌体浓度。随机挑选 20 个孤立的蓝色蚀斑进行测序, 评价 12 肽插入序列的随机性和肽库的库容量。

1.3 生物淘选

参照试剂盒提供的操作手册及 Rowley 等^[19]应用蛋白 G 包被磁性珠俘获抗体-噬菌体复合物的方法, 作部分优化。50 μ L 单克隆抗体、30 μ L 噬菌体肽库(含 9×10^{10} PFU)及 120 μ L 含 2% 脱脂奶粉的 TBS (pH7.5)混合, 室温孵育 30min, 与蛋白 G 包被磁性珠混合, 室温孵育 20min, 缓冲液洗涤, 用 100 μ L 含 1mg/mL BSA 的 0.2 mol/L HCl (pH2.2)溶液酸洗脱结合于磁性珠上的噬菌体, 并中和至中性。对每一轮淘选获得的洗脱液, 除取 5 ~ 10 μ L 稀释后按 1.2 方法涂布平板, 其余用 ER2738 增殖、纯化后, 进行下一轮淘选。逐轮降低抗体浓度, 以增强淘选的特异性, 逐轮提高洗脱液涂布时的稀释数量级, 以保证获得孤立的噬菌体蚀斑。经 2 ~ 4 轮“淘选—扩增—淘选”, 可富集与抗体特异性结合的噬菌体。

1.4 ELISA 鉴定

在第 2 轮淘选后涂布平板上随机挑选 96 个孤立蚀斑, 增殖培养后, 经 1B5, b4-22 或 24/16 及阴性对照鼠源抗体俘获, HRP 标记的鼠抗 M13 抗体检测, TMB 底物显色, 读取 OD₄₅₀ 值。当样品针对 1B5, b4-22 或 24/16 的 OD₄₅₀ 值与针对阴性抗体的 OD₄₅₀ 值存在 1.5 ~ 2.5 倍差异时, 判为阳性, 2.5 倍以上差异时, 判为强阳性。

1.5 外源插入多肽序列分析

根据野生型噬菌体 p_{III} 基因保守区域, 设计引物 FUSE-U: 5'-GCAAGCTGATAAACCGATAC-3',

FUSE-D: 5'-CCATGTACCGTAACACTGAG-3', PCR 扩增外源基因插入区域(产物大小约 340bp), 扩增产物纯化后, 以 30 ~ 60ng 为模板, 以 FUSE-U 为引物进行测序反应, 乙醇沉淀、洗涤后进行序列测定。采用 Genamics Expression 1.1000 软件包, 比对分析外源 12 肽插入序列中的共有基序。

1.6 噬菌体拟位免疫印迹分析

噬菌体蛋白于变性条件下, 经 12% SDS-PAGE (Bio-Red)分离后, 电转印至硝酸纤维素膜上, 将转印膜封闭后, 经对应单克隆抗体检测、AKP 标记的抗鼠 IgG 结合、BCIP/NBT 底物显色, 进行免疫印迹分析。在对照成立的前提下, 预期位置未出现蛋白带判为阴性, 出现淡而模糊的蛋白带判为弱阳性, 出现黑而明显的蛋白带判为强阳性。

1.7 噬菌体拟位竞争性抑制免疫荧光抗体试验

将单克隆抗体与携带不同拟位序列的噬菌体(含有 5×10^{10} PFU)预先混合, 孵育 1h 后, 滴加在 CSFV 感染的单层细胞表面, 孵育 1h, 浸洗, 滴加抗鼠 IgG-FITC 偶联物, 孵育 1h, 浸洗, 封片后在荧光显微镜下观察结果, 细胞内观察到特异性荧光判为阴性(单克隆抗体与猪瘟病毒抗原结合未受阻断或抑制), 细胞内未观察到特异性荧光判为阳性(噬菌体拟位阻断或抑制单克隆抗体与病毒抗原的结合), 部分阻断判为阳性, 完全阻断判为强阳性。设置阳性、阴性及空白对照, 同步进行。分析不同拟位序列, 对单克隆抗体与病毒抗原蛋白结合的抑制特性。

2 结果

2.1 噬菌体展示随机肽库的库容量评价

肽库噬菌体浓度为 3×10^{12} PFU/mL。随机挑选 20 个克隆的序列比对分析结果发现, 20 个噬菌体克隆中有 2 个无插入序列, 其余 18 个克隆展示的 12 肽序列各不相同, 且序列与序列之间无相同(相似或共有)序列(表 1)。

2.2 单克隆抗体淘选获得噬菌体克隆的 ELISA

在 1B5, b4-22 和 24/16 单克隆抗体第 2 轮淘选后获得洗脱液涂布平板上, 分别随机挑取 96 个孤立的蓝色噬菌体蚀斑, 增殖培养后, 用 ELISA 鉴定与单克隆抗体特异性结合的噬菌体克隆。结果发现: 在 1B5 淘选获得的 96 个噬菌体克隆中, 7 个克隆 ELISA 阳性; 在 b4-22 淘选获得的 96 个克隆中, 34 个阳性; 在 24/16 淘选获得的 96 个克隆中, 24 个阳性。

2.3 DNA 测序及推导 12 肽氨基酸序列比对分析

对 1B5 及 24/16 单克隆抗体筛选获得的所有阳

表 1 淘选前后噬菌体展示的 12 肽氨基酸序列比对分析

Table 1 Alignment of peptide sequences displayed by phages before or after panning

Amino acid sequences of peptides displayed by random selected phages before panning	Amino acid sequences of peptides displayed by ELISA positive phages after 2 nd panning by MAb 1B5		Amino acid sequences of peptides displayed by ELISA positive phages after 2 nd panning by MAb b4-22		Amino acid sequences of peptides displayed by ELISA positive phages after 2 nd panning by MAb 24/16	
	Peptides sequence motif	F #	Peptides sequence motif	F	Peptides sequence motif	F
* * IAQTHITGDS	YPYSM <u>W</u> <u>K</u> <u>N</u> <u>LW</u> <u>P</u> <u>S</u>	5/7	SVLF <u>DKNRG</u> QEI	17/24	QA <u>C</u> <u>Q</u> <u>NN</u> D <u>TC</u> PRL	14/24
AQPTHSVTEVRS	PW <u>W</u> <u>F</u> <u>N</u> KYLF <u>P</u> <u>PI</u>	1/7	QPY <u>DKNRG</u> PTLN	1/24	T <u>C</u> R <u>NN</u> D <u>TC</u> RAPD	1/24
LTCSPYPLAAL	ANSF <u>W</u> <u>V</u> <u>N</u> <u>H</u> <u>P</u> TIT	1/7	SLY <u>DKNRG</u> QFGS	1/24	KA <u>C</u> <u>S</u> <u>NN</u> S <u>TC</u> FN	1/24
YNVPPYLPSTAN			QTCC <u>DKNQG</u> IFM	2/24		
VTNANVWPGQAF			VL <u>D</u> <u>W</u> <u>K</u> T <u>RG</u> KDLP	1/24	PQP <u>YDKN</u> RGPTLN	1/24
QSPHPITHKTHK					SLY <u>DKN</u> RGQFGS	1/24
HTTSLKPESIIH					SFF <u>DKN</u> SAHWSP	1/24
QDQPWLTPPPAR					HSW <u>DKN</u> SSIWWP	1/24
STNLILPPSNSG					TWW <u>DKN</u> SATVAW	1/24
TIHVGNSKSQTI					Y <u>Y</u> N <u>KN</u> NASYHSS	1/24
KPPFSNPAFYLM					AMG <u>Y</u> N <u>KN</u> NDSLL	1/24
LITPYKTGSVMV					DLPRWPGWY <u>KN</u> R	1/24
QTNLIGTLGPVA						
TQMNRSLPLLSA						
ILNKQTSSTWFR						
NTNHLARPAMIP						
HSEALTVAFNTR						
TDELEAIVYPLL						
Consensus	<u>W</u> x <u>N</u> xx <u>P</u>		<u>DKNRC</u> <u>Q</u> <u>G</u>		<u>C</u> x <u>NN</u> x <u>TC</u> <u>YDKN</u>	
CSFV Alfort	KHG <u>W</u> <u>C</u> <u>NW</u> <u>Y</u> <u>N</u> ID <u>P</u> WIQLMNRIT	345 *	364	375	393	375
				ELKEI <u>RG</u> MMDASE		
				317	329	

* * : Single letter codes are used for the amino acids ; # : F gives the frequency when the sequence was found in more than one clone ; * : CSFV E^{ms} stars at the amino acid 268 of the predicted ORF.

性噬菌体克隆及 b4-22 单克隆抗体筛选获得的 24 个阳性克隆的 DNA 插入序列进行测定,推导展示于噬菌体表面的 12 肽氨基酸序列,进行比对分析。

2.3.1 1B5 单克隆抗体: 1B5 筛选获得的 7 个阳性克隆中,5 个克隆展示的 12 肽氨基酸序列均为: YPYSMWKNLWPS, 其余两个克隆展示序列分别为: PWWFNKYLFPPI 和 ANSFWVNHPTIT 序列,其共有基序为 WxxNxxP, 与 CSFV Alford 毒株 E^{ms} 氨基酸序列比较,发现此基序与 E^{ms} 的 351 位 ~ 356 位 (WYNIDP) 或 348 位 ~ 350 位 (WCN) 区域的氨基酸序列相似(表 1)。

2.3.2 b4-22 单克隆抗体: b4-22 筛选获得的 24 个阳性克隆中,17 个克隆展示的 12 肽氨基酸序列均为: SVLFDDKNRGQEI; 2 个克隆的展示序列均为: QTCCDKNQGIFM; 有 3 个克隆的展示序列分别为: QPYDKNRGPTLN、SLYDKNRGQFGS、VLDWKTRG KDLP; 其余 2 个克隆未发现任何相似序列。共有基序为 DKNR(Q)G, 其中 DKN 序列与 E^{ms} 的 384 位 ~

386 位氨基酸序列一致, R(Q)G 序列与 322 位 ~ 323 位氨基酸序列一致(表 1), 此二区域在 E^{ms} 中相隔 60 个氨基酸。

2.3.3 24/16 单克隆抗体: 24/16 筛选获得的 24 个阳性克隆中,包含 11 种不同的 12 肽序列,可划分为两群,共有基序分别为 CxNNxTC (有 16 个克隆包含此基序) 和 YxKN (有 8 个克隆包含此基序)。第一群的主要拟位氨基酸序列为: QACQNNDTCPRL, 16 个克隆中有 14 个展示该序列,其余两个克隆包含 CxNNDTC、CxNNSTC 基序,但其侧翼序列不同。除以 TC 替代 CT 外, NNDTC 与反向排列的 E^{ms} 380 ~ 386 位氨基酸序列(TCRYDKN)相似。第二群共有基序包含 b4-22 识别表位的部分序列 KN (表 1)。

2.4 瘟病毒不同分离毒株 E^{ms} 糖蛋白表(拟)位区域氨基酸序列分析比较

选择有代表性瘟病毒(CSFV、BVDV、BDV)不同分离毒株,对 E^{ms} WxNxxP, DKNR(Q)G 和 A(T)CxYxKN 区域附近的氨基酸序列进行比较,结果发

现 CSFV 不同分离毒株 E^{ms} 348 ~ 360 位、322 ~ 323 位、383 ~ 386 位氨基酸序列分别为 WCNWY(或 H)

NIDPWIQL RG 或 QG、YDKN 或 YDKD。与 BVDV、BDV 相应区域氨基酸序列存在差异(表 2)

表 2 瘟病毒 E^{ms} Wx Nxx P RG 或 QG 和 YDKN 区域氨基酸序列比较

Table 2 Comparison of pestivirus E^{ms} amino acid sequences around the Wx Nxx P , RG or QG and YDKN regions

Virus	Strain	Sequence around Wx Nxx P region*	Sequence around RG or QG region	Sequence around YDKN region
CSFV	Alfort	345 KHGWCN <u>W</u> Y <u>N</u> ID <u>P</u> WIQLMNRT 364	317 ELKEI <u>RG</u> MMDASE 329	375 KECAVTCR <u>YDKN</u> TDVN 391
	BresciaQ.....A.I.
	ChineseH.....Q.....DA.I.
	ShimenQ.....DA.I.
	LPC/AHRIH.....Q.....A.I.
	79-60R.....DA.I.
	85-12AR.....DA.I.
	90-YLIT.R.....
	83-s106I.R.....A...
BVDV	NADLE...LV...	...T.H.....	R.....RAS.L.
	SD-1E...LI...	...T.H.....	R.....RDS.L.
	ILLNCE...L...K.	...A.H.....	R.....RDS.L.
BDV	C413FH.E...W.....V.....	R.....E AEL.

* Some amino acid sequences were obtained from GenBank database.

2.5 免疫印迹检测

1B5、b4-22、24/16 单克隆抗体对各自筛选获得阳性克隆,在免疫印迹分析中均呈强阳性反应,分别特异性的识别 WxNxxP、DKNR(Q)G、YDKN 及 CxNNxTC 基序,免疫印迹与 ELISA 结果一致,展示此基序的噬菌体构成针对各自单克隆抗体的噬菌体拟位(Phage mimotope)。1B5 与 b4-22、24/16 识别的基序明显不同,彼此不存在交叉反应(图 1)。b4-22、24/16 识别的基序存在共有序列 KN。基序中 R(Q)G 序列是与 b4-22 发生强阳性反应的关键序列,但对 24/16 则不然。基序中仅包含 DKN (or NKN)序列部分

丧失与 b4-22 的结合能力,呈弱阳性反应,但对 24/16 仍呈强阳性反应。NND(S)TC 基序能被 24/16 特异性识别,呈强阳性反应,但对 b4-22 呈阴性(表 3)

2.6 免疫荧光抗体抑制试验

将 1B5 与 b4-22、24/16 单克隆抗体预先与待测噬菌体拟位结合后,进行免疫荧光抗体抑制试验。结果发现:1B513、B450、B452、24161st50、24162nd60、24162nd74 和 24162nd84 分别完全(100%)阻断 1B5、b4-22、24/16 与病毒抗原的结合,在 CSFV 感染细胞内未观察到荧光,而阴性及缓冲液对照组感染细胞内均有明亮的特异性荧光(部分结果见图 2)。1B573 和 B473 分别部分(50%)阻断 1B5、b4-22 与病毒抗原的结合,试验组产生微弱的特异性荧光。24161st50、24162nd23、24162nd24 虽然在 ELISA 和免疫印迹中对 24/16 呈强阳性反应,但不能阻断单克隆抗体与病毒抗原的结合(表 3)

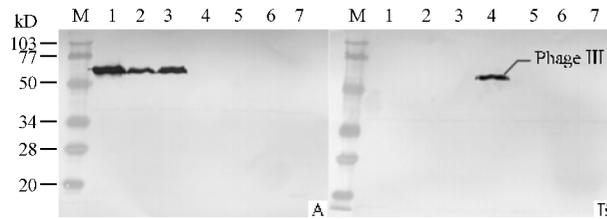


图 1 b4-22、1B5 单克隆抗体淘选获得噬菌体拟位的免疫印迹分析

Fig.1 Western blot analysis of phage mimotopes selected by MAb b4-22 or 1B5

A b4-22 ; B :1B5. M. Prestained protein molecular weight standards ; 1. B450 phage(carried peptide sequence SVLFDKNRGQEI); 2. B452 (QTCCDKNQGIFM); 3. B473 (VLDWKTRGKDLP); 4. 1B513 (YPYSMWKNLWPS); 5. A1814(YMSPTXRVMITQ); 6. 2456 (AYSPTGLVWHPG); 7. 10C607(AQSYPDPQPQTLK).

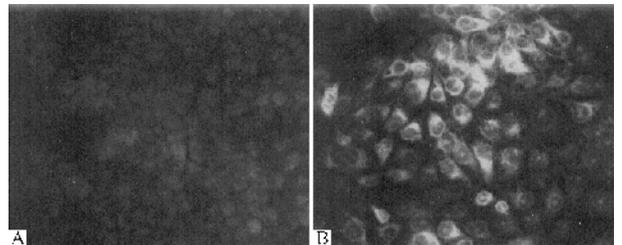


图 2 噬菌体拟位抑制免疫荧光抗体分析

Fig.2 Analysis of inhibition of immunofluorescent antibody by mimotopes A : mAb b4-22 mixed with B450 phage (carried peptide sequence SVLFDKNRGQEI);B : mAb b4-22 mixed with 10C607 phage (carried peptide sequence AQSYPDPQPQTLK).

表 3 噬菌体拟位与 1B5, b4-22, 24/16 在免疫印迹及荧光抗体抑制试验中结合特性分析

Table 3 Analysis of the binding reactivities of selected phage mimotopes among the MAbs, 1B5, b4-22 or 24/16 in Western blot and inhibition of immunofluorescent antibody assay (IFAA)

Phage number	Peptide sequence motif of phage	Western blot*			IFAA inhibition**		
		1B5	b4-22	24/16	1B5	b4-22	24/16
B450	SVLF <u>DKNRC</u> QEI	-	+++	+++	-	+++	-
B452	QTCC <u>DKNQC</u> IFM	-	+++	+	-	+++	-
B473	VL <u>D</u> W <u>K</u> T <u>RC</u> KDLP	-	+++	-	-	+	-
2416 ST 38	HSW <u>DKN</u> SSIWWP	-	+	+++	-	+	-
24161 ST 50	SLY <u>DKNRC</u> QFGS	-	+++	+++	-	+++	-
24162 ND 23	AMG <u>Y</u> N <u>KN</u> NDSLL	-	+	+++	-	-	-
24162 ND 24	Y <u>Y</u> N <u>KN</u> NASYHSS	-	+	+++	-	-	-
24162 ND 60	KA <u>C</u> S <u>NN</u> S <u>TC</u> FNP	-	-	+++	-	-	+++
24162 ND 74	QA <u>C</u> Q <u>NN</u> D <u>TC</u> PRL	-	-	+++	-	-	+++
24162 ND 84	T <u>C</u> R <u>NN</u> D <u>TC</u> RAPD	-	-	+++	-	-	+++
1B513	YPYSM <u>W</u> K <u>N</u> LW <u>P</u> S	+++	-	-	+++	-	-
1B584	PW <u>W</u> F <u>N</u> KYLF <u>P</u> PI	+++	-	-	+	-	-
2456	AYSPTGLVWHPQ	-	-	-	-	-	-
10C607	AQSYDPQPQTLK	-	-	-	-	-	-
Buffer					-	-	-

* : +++ Strong positive, + Weak positive, - Negative; ** : +++ 100% inhibition, + Nearly 50% inhibition, - No inhibition.

3 讨论

1B5、b4-22、24/16 单克隆中和抗体在 ELISA 和免疫印迹分析中,分别特异性的识别 WxNxxP、DKNR(Q)G、YDKN 或 CxNNxTC 基序,并且 WxNxxP、DKNR(Q)G、CxNNxTC 基序在免疫荧光抗体抑制试验中,能特异性的完全阻断单克隆抗体与病毒抗原的结合。结果表明:WxNxxP、DKNR(Q)G、CxNNxTC 基序和病毒天然抗原表位识别各自单克隆抗体中的同一抗原结合部位。结果证实: E^{ms} 的 348~350 或 351~356 位、322~323 位和 383~386 位、380~386 位氨基酸区域构成 3 个分别针对 1B5、b4-22、24/16 的 CSFV 特异性中和表位:WxNxxP、DKNR(Q)G 和 AC(T)CxYxKN 表位基序在 CSFV 不同分离毒株间存在差异,不属于 CSFV 共有表位。b4-22 识别的共有基序由 E^{ms} 中相隔 60 个氨基酸的两个区域构成,表明 b4-22 针对 E^{ms} 中的构象型表位。

b4-22 和 24/16 识别表位基序间存在共有序列 KN,识别 E^{ms} 中的相似抗原区,但其侧翼序列及免疫反应性存在显著差异,不属于同一表位。表位基序中的 R(Q)G 序列是与 b4-22 发生强结合的关键序列,但对 24/16 则不然。NND(S)TC 基序能被 24/16 特异性识别,但对 b4-22 呈阴性。结果表明:b4-22 识别的表位包容 24/16 识别表位的关键性氨基酸残基,反之则不然。

1B573、B473 分别部分阻断 1B5、b4-22 与病毒抗原的结合,可能是病毒抗原对抗体的亲合性较表

(拟)位基序对抗体亲合性强,在抗原、抗体动态反应过程中,优先竞争性与抗体结合所致。24161st50、24162nd23、24162nd24 虽然在 ELISA 和免疫印迹中对 24/16 呈强阳性反应,但不能阻断单克隆抗体与病毒抗原的结合,可能存在两种原因(1)拟位基序和病毒抗原对抗体亲合性存在差异(2)拟位基序和病毒抗原与抗体结合部位不同。

E^{ms} 的两个 RNA 酶功能域定位于 295~302 位、342~350 位氨基酸区域(包含 NK、WxN 序列)。1B5、24/16 能明显抑制 E^{ms} 的 RNA 酶活性,而 b4-22 且不能。24/16 筛选获得含有 NK 序列的噬菌体拟位,在免疫印迹分析中对 24/16 呈强阳性反应,而对 b4-22 为弱阳性;1B5 筛选获得共有基序 WxNxxK 定位于 E^{ms} 的 348 位~350 或 351~356 位氨基酸区域,与 342 位~350 位 RNA 酶功能域重叠或紧密相连。结果提示:1B5、24/16 通过与 RNA 酶功能域结合而导致其丧失 RNA 酶活性,可能是单克隆抗体抑制 RNA 酶活性的作用机制。

致谢 本研究得到澳大利亚动物卫生实验室(AAHL)王林发博士和郁萌博士的协助和指导,谨致谢意!

参 考 文 献

- [1] Becher P, Avalos Ramirez R, Orlich M, et al. Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification. *Virology*. 2003, 311(1): 96-104
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- [2] Carbrey E A , Stewart , W C , Kresse J L , *et al.* M. L. Natural infection of pigs with bovine diarrhoea virus and its differential diagnosis from hog cholera. *J Am Vet Med Assoc* , 1976 , **169** : 1217 - 1219.
- [3] Thiel H J , Stark R , Weiland E , *et al.* Hog cholera virus : molecular composition of virions from a pestivirus. *J Virol* , 1991 , **65** : 4705 - 4712.
- [4] Kwang J , Littledike E , Donis R , *et al.* Recombinant polypeptide from the gp48 region of the bovine viral diarrhoea virus (BVDV) detects serum antibodies in vaccinated and infected cattle. *Vet Microbiol* , 1992 , **32** : 281 - 292.
- [5] Wensvoort G , Boonstra J , Bodzinga B. Immuno-affinity purification of envelope protein E1 of hog cholera virus. *J Gen Virol* , 1990 , **71** : 531 - 540.
- [6] Hulst M M , Moormann R J M. Inhibition of pestivirus infection in cell culture by envelope proteins E^{ms} and E2 of classical swine fever virus : E^{ms} and E2 interact with different receptors. *J Gen Virol* , 1997 , **78** : 2779 - 2787.
- [7] Weiland E , Ahl R , Stark R , *et al.* A second envelope glycoprotein mediates neutralization of a pestivirus , hog cholera virus. *J Virol* , 1992 , **66** : 3677 - 3682.
- [8] Weiland E , Stark R , Haas B , *et al.* Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide-linked heterodimer. *J Virol* , 1990 , **64** : 3563 - 3569.
- [9] K nig M , Lengsfeld T , Pauly T , *et al.* Classical swine fever virus : independent induction of protective immunity by two structural proteins. *J Virol* , 1995 , **69** : 6479 - 6486.
- [10] van Rijn P A , van Gennip R G P , de Meijer E J , *et al.* A preliminary map of epitopes on envelope glycoprotein E1 of HCV strain Brescia. *Vet Microbiol* . 1992 , **33** : 221 - 230.
- [11] van Rijn P A , van Gennip H G P , de Meijer E J , *et al.* Epitope mapping of envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus strain Brescia. *J Gen Virol* , 1993 , **74** : 2053 - 2060.
- [12] van Rijn P A , Miedema G K W , Wensvoort G , *et al.* Antigenic structure of envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus. *J Virol* . 1994 , **68** : 3934 - 3942.
- [13] Wensvoort G. Topographical and functional mapping of epitopes on hog cholera virus with monoclonal antibodies]. *J Gen Virol* , 1989 , **70** : 2865 - 2876.
- [14] Lin M , Lin F , Mallory M , *et al.* Deletions of structural glycoprotein E2 of classical swine fever virus strain Alfort/187 resolve a linear epitope of monoclonal antibody WH303 and the minimal N-terminal domain essential for binding immunoglobulin G antibodies of a pig hyperimmune serum. *J Virol* , 2000 , **74** (24) : 11619 - 11625.
- [15] Yu M , Wang LF , Shiell B J , *et al.* Fine mapping of a C-terminal linear epitope highly conserved among the major envelope glycoprotein E2 (gp51 to gp54) of different pestiviruses. *Virology* , 1996 , **222** : 289 - 292.
- [16] Hulst M M , Himes G , Newbiggin E , *et al.* Glycoprotein E2 of classical swine fever virus : expression in insect cells and identification as a ribonuclease. *Virology* , 1994 , **200** : 558 - 565.
- [17] Schneider R , Unger G , Stark R , *et al.* Identification of a structural glycoprotein of an RNA virus as a ribonuclease. *Science* , 1993 , **261** : 1169 - 1171.
- [18] Kosmidou A , Ahl R , Thiel H J , *et al.* Differentiation of classical swine fever virus (CSFV) strains using monoclonal antibodies against structural glycoproteins. *Vet Microbiol* , 1995 , **47** (1 - 2) : 111 - 118.
- [19] Rowley M J , Scealy M , Whisstock J C , *et al.* Prediction of the immunodominant epitope of the pyruvate dehydrogenase complex E2 in primary biliary cirrhosis using phage display. *J Immunol* , 2000 , **15** , **164** (6) : 3413 - 3419.

Identification and comparison of neutralizing epitopes of glycoprotein E^{ms} of Classical swine fever virus

ZHANG Fu-qiang* LI Zhi-hua ZHANG Nian-zu

(Yunnan Tropical and Subtropical Animal Virus Diseases Laboratory , Kunming 650224 , China)

Abstract : Structural and envelope glycoprotein E^{ms}(gp48) of classical swine fever virus (CSFV) is the second antigenic protein being responsible for eliciting neutralizing antibodies and conferring protective immunity. Infection of cells with CSFV is mediated by the interaction of glycoprotein E^{ms} and E2 with the cell surface receptors. The glycoprotein E^{ms} has been shown to contain RNase activity , which plays a role in the viral life cycle and is also involved in virus neutralization. Neutralizing epitopes of glycoprotein E^{ms} had been mapped by screening a 12-mer random peptide phage display library using the neutralizing monoclonal antibodies (MAb) 1B5 , b4-22 and 24/16 , raised against CSFV strain alfort T bingen and reacted with glycoprotein E^{ms} . Three major epitope (mimotope) motifs WxNxxP , DKNR(Q)G and A(T)CxYxKN (around amino acid position aa351 ~ aa356 or aa348 ~ aa350 , aa384 ~ aa386 and aa322 ~ aa323 , aa380 ~ aa386 of glycoprotein E^{ms} of CSFV) were identified respectively and characterized immunologically by the MABs , 1b5 , b4-22 and 24/16. MABs b4-22 and 24/16 shared a part of binding motif sequence KN , and recognized the similar antigenic domain on the glycoprotein E^{ms} but showed a distinct pattern of flank sequence and reactivities with the mimotopes by Western blot and inhibition of immunofluorescent antibody analysis.

Key words : CSFV , Glycoprotein E^{ms} , Monoclonal antibody , Epitope , Identification

Foundation item : The 9th Five Years Programs for Science and Technology Development of China (96-120-10) ; China-Australia International Collaborative Project (ACAIR/ASI/9438)

* Corresponding author. Tel : 86-871-5016575 ; Fax : 86-871-5010721 ; E-mail : zfq1968@yahoo.com.cn

Received date : 04-26-2004