

羊朊毒体单抗结合表位分析

张永强^{1,2}, 吴晓东¹, 赵永刚¹, 鲍恩东², 王清华¹, 张维¹, 刘雨田¹, 王志亮¹

1 中国动物卫生与流行病学中心 国家外来动物疫病诊断中心, 青岛 266032

2 南京农业大学动物医学院, 南京 210095

摘要: 通过分段表达 PrP 核心片段和人工合成多肽, 分析 5 株羊朊毒体单抗结合表位。分段表达 PrP 核心片段, 通过 PCR 方法扩增目的片段, 经酶切、连接后, 将目的片段插入质粒 pET32a, 在大肠杆菌 BL21 中表达。将表达的系列融合蛋白与单抗进行免疫转印试验, 根据反应情况确定单抗结合的大致部位, 在此基础上设计合成多条针对性多肽, 用 ELISA 方法进一步确定 3 株单抗的结合部位; 通过与 6 段融合蛋白反应证明 5 株单抗的结合部位分别为: 2H3 在 199 aa~213 aa 之间, 4C6、5F11 和 7F11 在 139 aa~168 aa 之间, 7F1 在 214 aa~227 aa 之间, 与 3 段人工合成多肽进行 ELISA 反应进一步得到 4C6、5F11 和 7F11 抗原结合表位在 149 aa~158 aa 之间; 本研究确定了 5 株单抗在 PrP 分子上的结合部位, 为羊痒病和牛海绵状脑病的检测、发病机制的研究奠定了基础。

关键词: PrP 核心片段, 人工合成多肽, 单抗, 抗原结合表位, 融合蛋白, 羊痒病, 牛海绵状脑病

Analysis of monoclonal antibody binding sites in ovine prion protein

Yongqiang Zhang^{1,2}, Xiaodong Wu¹, Yonggang Zhao¹, Endong Bao², Qinghua Wang¹, Wei Zhang¹, Yutian Liu¹, and Zhiliang Wang¹

1 National Diagnostic Center for Exotic Animal Diseases, China Animal Health and Epidemiology Center, Qingdao 266032, China

2 College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract: Binding sites of five monoclonal antibodies were obtained by reinforceable method of overlapping recombinant prion protein and synthetic peptide. Overlapping peptides of PrP core were expressed in *Escherichia coli* by insertion of serial PCR amplicons of ovine PrP gene fragments into pET32a. The expressed fusion peptides were then tested for the binding activity to PrP monoclonal antibodies in Western blotting. The binding sites of 5 monoclonal antibodies of ovine PrP were located respectively as follows: 2H3 in 199 aa–213 aa, 4C6, 5F11 and 7F11 in 139 aa–168 aa and 7F1 in 214 aa–227 aa. There oligo peptides were synthesized and used in ELISA test for more accurate localization of the binding sites. The binding sites of 4C6, 5F11 and 7F11 were further confirmed to be in 149 aa–158 aa. This conclusion may contribute to the research for pathogenesis and diagnostic method of scrapie and bovine transmissible spongiform encephalopathy.

Keywords: binding site, monoclonal antibody, synthetic peptide, PrP core, fusion peptide, scrapie, bovine transmissible spongiform encephalopathy

Received: October 13, 2008; **Accepted:** January 12, 2009

Supported by: Key Projects in the National Science & Technology Pillar Program during the Eleventh Five-year Plan Period (No. 2006BAD06A13), the Technology System of Modern Agricultural Industry (cow) Construction (No. 2060302).

Corresponding author: Zhiliang Wang. Tel/Fax: +86-532-87839922; E-mail: Zlwang111@yahoo.com.cn

“十一五”国家科技支撑计划(No. 2006BAD06A13), 现代农业产业(奶牛)技术体系建设(No. 2060302)资助。

传染性海绵状脑病(Transmissible spongiform encephalopathies, TSE), 又称朊毒体病, 是感染人和动物中枢神经系统的一类慢性、退化性、致死性疾病。羊痒病(Scrapie)的发现已有二百多年的历史, 是最先被认识的 TSE^[1-4]。单抗介导的抗原抗体反应是 TSE 最有效的检测方法。PrP 核心片段(Core part of prion protein, PrP27-30)的单克隆抗体既可用于 TSE 检测又可用于致病机理等研究领域。应用单抗进行 TSE 深入研究必须清楚了解单抗相关背景, 特别是单抗在 PrP 分子上的结合部位。有研究表明, PK 酶浓度不同, PrP27-30 肽链 C 端被消化的氨基酸数量也不同, 清楚了解单抗结合表位可以排除 PK 酶浓度不同引起的假阴性。Brun 等^[5]制备的单抗 2A11 能检测到 IHC 中 PK 酶(Protease K)消化后的 PrP27-30, 但检测不到未经 PK 酶消化的 PrP^{Sc} 和正常牛脑切片中的 PrP^C, 说明了此单抗的结合部位, 即牛 PrP171-179, 羊 163-171, 可能在 PrP^C 和 PrP^{Sc} 中被包裹在里面, PrP^{Sc} 经 PK 酶消化后暴露了出来, 为了解 PrP^{Sc} 的高级结构提供了思路。

国家外来动物疫病诊断中心成功制备了羊朊毒体特异性单抗并建立了羊痒病的检测方法^[6], 但是对所得单抗的抗原表位还不清楚, 无法以单抗为工具进行更深入研究。本研究旨在了解该单抗的抗原结合表位, 为我国羊痒病普查工作提供更详细数据, 以单抗为工具对羊痒病、牛传染性海绵状脑病致病机理的研究提供依据。

本实验采用分段表达羊 prion 蛋白与人工合成多肽相结合的方法, 将 prion 蛋白核心片段分为 6 段分别融合表达, 每片段间相差 15 个氨基酸, 分别与羊朊毒体单抗进行 Western blotting 反应, 根据反应情况合成针对性多肽与目标单抗进行 ELISA 反应, 确定单抗结合表位。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株和单抗

菌株 *E. coli* DH5 α 、*E. coli* BL21(DE3)、质粒 pET32a 为国家外来动物疫病诊断中心保存。小尾寒羊朊毒体鼠抗羊单克隆抗体 2H3、4C6、5F11、7F1 和 7F11 由国家外来动物疫病诊断中心研制^[6]。

1.1.2 酶、试剂和主要仪器

Taq DNA 聚合酶, T4 DNA 连接酶以及限制性内切酶均购自大连宝生物公司。DNA 纯化试剂盒 SpinPrep Gel DNA Kit、Ni⁺离子柱亲和层析纯化试剂盒、测序通用引物 T7 promoter 均为 Novagen 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 PrP 核心片段分段表达片段划分

根据用于单抗制备的 PrP 核心片段基因序列, 将核心片段 94 aa~227 aa 位氨基酸分段表达, 相邻片段间隔 15 aa, 每个片段长度为 60 aa(PrP peptide 2 除外, 为 75 aa), 分成 5 段融合表达, 和用于单抗制备的 PrP94-227 片段一起将 PrP 核心片段覆盖。6 段分别定义为: PrP peptide 1、PrP peptide 2、PrP peptide 3、PrP peptide 4、PrP peptide 5 和 PrP peptide 6(图 1)。

1.2.2 引物

用 Primer Premier 5.00 软件设计 5 对引物, 分别在基因的 5'端和 3'端引入 *Eco*R I 和 *Hind* III 位点, 见表 1。

1.2.3 分段表达质粒 PrP peptide-pET-32a 的构建

以表达 PrP 核心片段的阳性菌株为模板, PCR 扩增目的基因。标准方法分别构建表达质粒 PrP peptide 1-pET32a、PrP peptide 2-pET32a、PrP peptide 3-pET32a、PrP peptide 4-pET32a 和 PrP peptide 5-pET32a 阳性质粒。TSS 法转化 *E. coli* DH5 α 。

菌落 PCR 筛选 PrP peptide-pET32a 阳性克隆、测序, 提取阳性质粒转化表达菌 *E. coli* BL21 (DE3)。

1.2.4 PrP peptides 诱导表达

分别将阳性质粒转化表达菌接种 LB 培养基(100 μ g/mL 氨苄青霉素)活化过夜后, 接种新鲜 LB 培养基(100 μ g/mL 氨苄青霉素)培养至 OD_{600} 约为 1.5, 加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L 诱导表达 4 h, 分别取诱导后菌液 15% SDS-PAGE 鉴定。

1.2.5 PrP 片段分析单抗结合表位

分别取 PrP peptide 1、PrP peptide 2、PrP peptide 3、PrP peptide 4、PrP peptide 5 和 PrP peptide 6 表达菌 15% SDS-PAGE, 半干转印至 PVDF 膜, 2% BSA 中 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜, 1:10 000 腹水单抗中室温孵育 1.5 h, 洗涤, 1:20 000 HRP 酶标羊抗鼠 IgG 二抗中室温孵育 1.5 h, 洗涤, DAB 溶液显色。

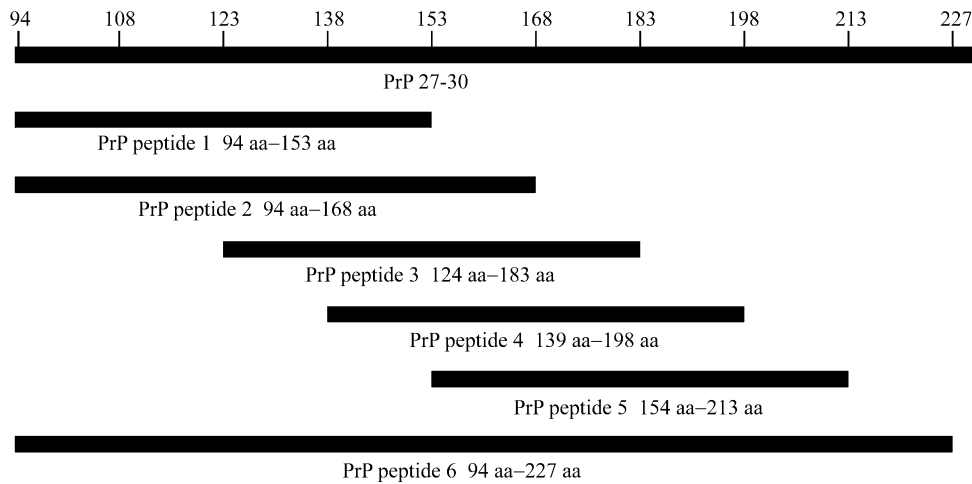


图 1 PrP 分段表达片段示意图

Fig. 1 Sketch map of overlapping recombinant prion protein.

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Restriction enzyme
PrP peptide 1	Sense: TCGGAATTCGGTCAAGGTGGTAGCC	<i>EcoR</i> I
	Antisense: GGCAAGCTTATAGTAACGGTCTCATAGTC	<i>Hind</i> III
PrP peptide 2	Sense: TCGGAATTCGGTCAAGGTGGTAGCC	<i>EcoR</i> I
	Antisense: GGCAAGCTTTGGTCTGTAGTACACTTGGT	<i>Hind</i> III
PrP peptide 3	Sense: TCGGAATTCGTGGTAGGGGGCCTT	<i>EcoR</i> I
	Antisense: GGCAAGCTTGACACAGTCATGCACAAAG	<i>Hind</i> III
PrP peptide 4	Sense: TCGGAATTCAGGCCTTATACATTTTG	<i>EcoR</i> I
	Antisense: TATAAGCTTCCCCTTGGTGGTGG	<i>Hind</i> III
PrP peptide 5	Sense: TCGGAATTCGTGAAAACATGTACCG	<i>EcoR</i> I
	Antisense: GGCAAGCTTCAACACTCGCTCCATT	<i>Hind</i> III

表 2 合成多肽序列

Table 2 Synthetic peptide sequence

Peptide	Sequence
P1	139-RPLIHFGNDYEDRYRENMY-158
P2	144-FGNDYEDRYRENMYRYPNQ-163
P3	149-EDRYRENMYRYPNQVYYRP-168

1.2.6 人工合成多肽 ELISA 方法确定单抗结合表位

根据单抗与重组蛋白片段的反应情况, 人工合成 3 段多肽(赛百盛公司), 每个片段长度 20 aa, 涵盖 139 aa~168 aa(表 2)。将 3 个多肽以 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 分别溶于 CBS(pH 9.6), 每孔加入 100 μL 溶液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, 5%脱脂乳 4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜。包被好的 ELISA 板与 4C6、5F11、7F11 进行标准 ELISA 反应, 检测 3 株单抗结合表位。由于单抗 2H3 和 7F1 结合位点清楚, 不采用合成多肽方法鉴定。

2 结果与分析

2.1 PrP peptides 核酸序列的扩增

通过 PCR 扩增分别得到了 PrP peptide 1、PrP

peptide 3、PrP peptide 4 和 PrP peptide 5(图 2), PrP peptide 2(图 3)的基因序列。

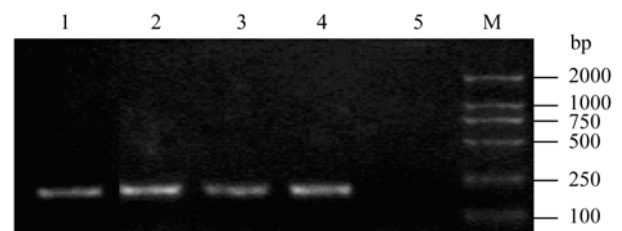


图 2 PCR 扩增 PrP peptide 1、3、4、5 基因序列

Fig. 2 PrP peptide 1,3,4,5 DNA sequences amplified by PCR. 1-4: PrP peptide 1,3,4,5 respectively; 5: negative control; M: DNA marker.

2.2 PrP peptides 阳性质粒的构建

将 PCR 产物和质粒 pET32a 酶切、连接后, 转化至 DH5 α 。取单菌落进行菌落 PCR, 同时培养、测序。证明得到了 pET32a-PrP peptide 1、pET32a-PrP peptide 2、pET32a-PrP peptide 3、pET32a-PrP peptide 4 和 pET32a-PrP peptide 5 的阳性质粒。

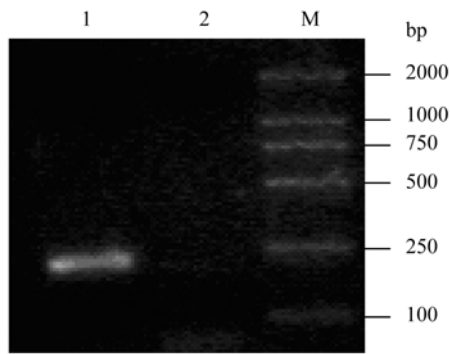


图 3 PCR 扩增 PrP peptide 2 基因序列

Fig. 3 PrP peptide2 DNA sequences amplified by PCR. 1: PrP peptide 2; 2: negative control; M: DNA marker.

2.3 PrP peptides 融合表达

将分段表达的 5 个阳性质粒分别转化至大肠杆菌 BL21, 诱导表达得到分子量 25~30 kD 的融合蛋白

白: PrP peptide 1、PrP peptide 2、PrP peptide 3、PrP peptide 4 和 PrP peptide 5(图 4)。

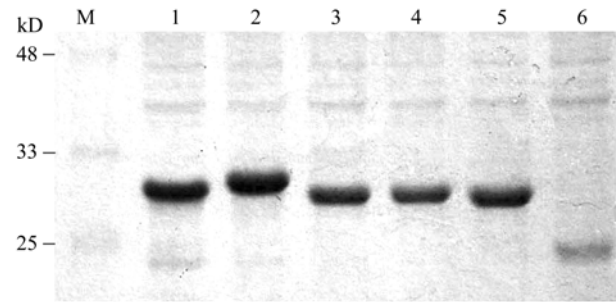


图 4 15% SDS-PAGE PrP peptide1-5 融合蛋白

Fig. 4 Isolation of recombinant PrP peptide1-5 protein by 15% SDS-PAGE. M: protein marker; 1-5: PrP peptide 1, PrP peptide 2, PrP peptide 3, PrP peptide 4, and PrP peptide 5 respectively; 6: BL21 control.

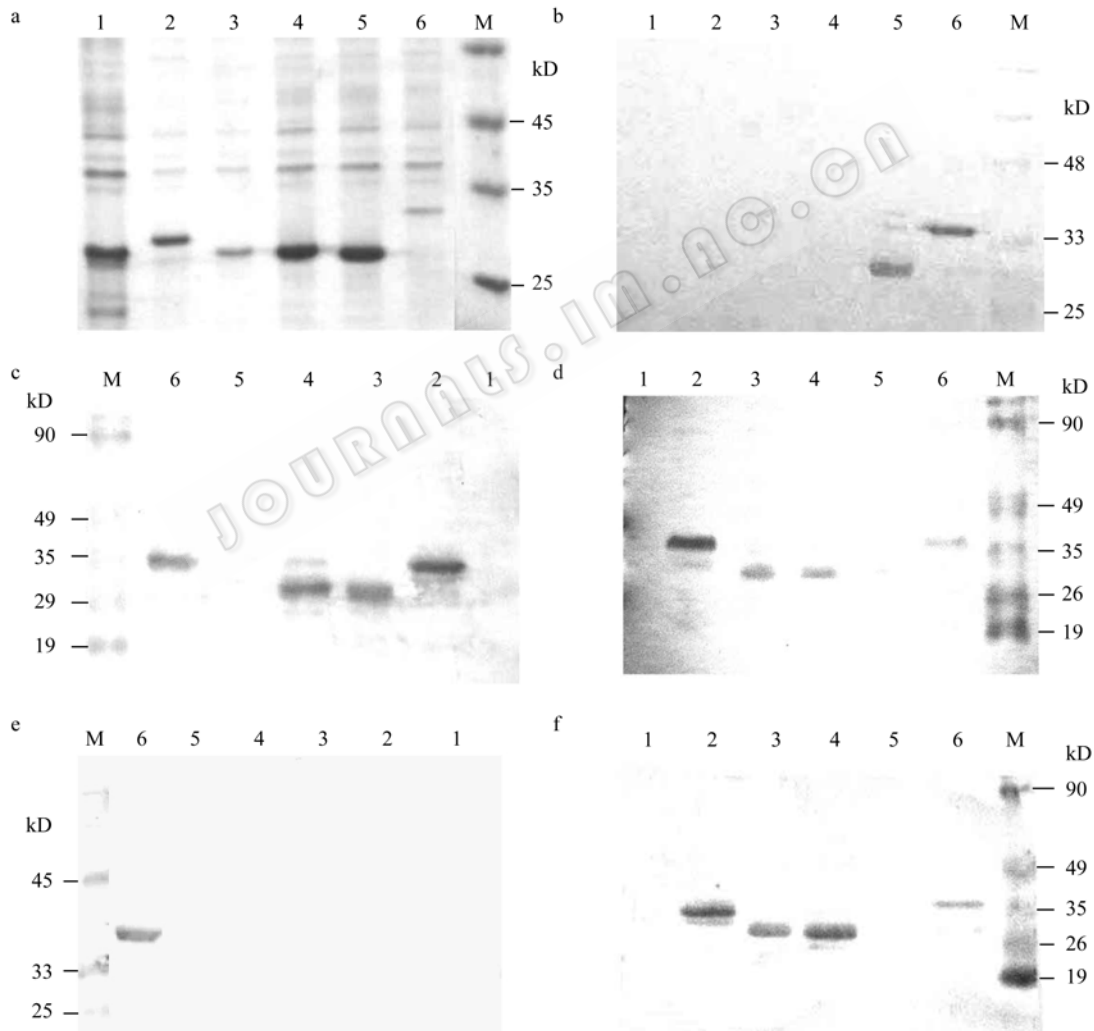


图 5 PrP peptide1-6 鉴定羊痒病单抗抗原表位

Fig. 5 Identification of binding site of scrapie mAbs with PrP peptide1-6. (a) Isolation of PrP peptide 1-6 by 15% SDS PAGE. (b) Identification of binding site of mAb 2H3 by Western blotting. (c) Identification of binding site of mAb 4C6 by Western blotting. (d) Identification of binding site of mAb 5F11 by Western blotting. (e) Identification of binding site of mAb 7F1 by Western blotting. (f) Identification of binding site of mAb 7F11 by Western blotting. 1-6: PrP peptide 1, PrP peptide 2, PrP peptide 3, PrP peptide 4, PrP peptide 5 and PrP peptide 6; M: protein marker.

表3 Western blotting 鉴定羊痒病单抗结合位点

Table 3 Identification of binding site of mAbs by Western blotting

PrP peptide	7F1	2H3	4C6	5F11	7F11
PrP peptide 1	-	-	-	-	-
PrP peptide 2	-	-	+	+	+
PrP peptide 3	-	-	+	+	+
PrP peptide 4	-	-	+	+	+
PrP peptide 5	-	+	-	-	-
PrP peptide 6	+	+	+	+	+
Binding site	214-227	199-213	139-168	139-168	139-168

2.4 初步鉴定单抗结合表位

5 个分段表达 PrP 核心片段融合蛋白和用于单抗制备的 PrP 核心片段共 6 个蛋白分别与羊朊毒体单抗 2H3、4C6、5F11、7F1 和 7F11 进行 Western blotting 反应, 鉴定单抗结合表位的结果如图 5 和表 3 所示。

按照图 5 的 SDS-PAGE 泳道标号, 将 6 段 PrP 蛋白片段分别与 5 株单抗进行 Western blotting。2H3 与 PrP peptide 5 和 PrP peptide 6 反应, 说明结合表位在片段 5、6 的重复部位, 但在片段 4 内, 得出 2H3 结合位点在 199 aa~213 aa 之间, 即 E N F T E T D I K I M E R V V 内(图 5-6b); 7F1 只与片段 6 反应, 结合表位在 214 aa~227 aa, 即 E Q M C I T Q Y Q R E S Q A 内(图 5e); 4C6、5F11 和 7F11 与片段 2、3、4、6 发生反应(图 5c,d,f), 与片段 1 和片段 5 不发生反应, 结合表位在 30 aa (139 aa~168 aa) 以内, 即在 R P L I H F G N D Y E D R Y Y R E N M Y R Y P N Q V Y Y R P 内, 需要合成针对性多肽进一步进行确定。

2.5 三株单抗与合成多肽 ELISA 反应结果

三株单抗分别与合成多肽的 ELISA(表 4)结果显示, 单抗 4C6、5F11 和 7F11 与 3 个合成多肽均能发生 ELISA 反应, 单抗 7F1 作为阴性对照不能与任一多肽发生 ELISA 反应, 空白对照和阴性对照说明实验结果成立。得出 4C6、5F11 和 7F11 结合表位在 E D R Y Y R E N M Y 内, 即 149 aa~158 aa 之间。

表4 单抗与合成多肽的 ELISA 结果

Table 4 ELISA analysis of mAbs with three synthetic peptides

Peptide	4C6	5F11	7F11	PBS (Negative control)
P1	0.302	0.241	0.296	0.049
P2	0.410	0.330	0.301	0.051
P3	0.353	0.292	0.287	0.049

3 讨论

比较分析 5 株单抗抗原结合表位, 其中 3 株, 即 4C6、5F11 和 7F11 在 149 aa~158 aa 之间, 2H3 和 7F1 在 199 aa~227 aa 之间。Silke Harmeyer 等^[7]人工合成羊 PrP^c16 段小肽, 利用淋巴细胞杂交瘤技术筛选单抗, 分别得到针对 89~104、145~163、209~228 肽段的单抗, 说明这 3 个位置比较容易刺激机体引起机体体液免疫应答。本研究结果与 Silke Harmeyer 等的结果基本吻合。

国外文献报道^[8], 针对 PrP139 aa~153 aa 的单抗能够阻止 PrP 向异常形式转变, 对于治疗人的 CJD 有一定研究价值。Enari 等^[9]用结合部位在 144 aa~152 aa 的抗体 6H4 对 N2a/Bos2 细胞系治疗, N2a/Bos2 细胞系用 0.1% 的痒病脑匀浆液进行长期感染和即时感染, 结果细胞与 6H4 共孵育 2 周后检测不到耐 PK 酶消化的 PrP。Ve'ronique Perrier 等^[10]也找到与 6H4 具有相似结合表位的一株单抗能够降低 N2a 细胞的 PrP^c(The cellular prion protein)和 PrP^{Sc}水平。本研究中的单抗 4C6、5F11 和 7F11 抗原结合表位在 149 aa~158 aa 之间, 与上述位置临近, 为进行 TSE 治疗方面研究提供了思路。有证据表明 PK 酶浓度变化会引起 PrP27-30 C 端氨基酸的变化, 但是对 N 端的影响目前还没有报道, 单抗 2H3 和 7F1 结合表位在成熟 PrP 蛋白 N 末端, 2 株单抗结合表位的发现为研究物理、化学作用对 PrP27-30 N 末端的影响提供了手段。

目前, 确定单抗结合表位的经典方法是人工合成多肽与待测单抗反应。但是如果不确定结合位点的大致部位, 需要合成大量多肽, 成本非常高^[11], 不适用于一般单抗的鉴定。近年来, 国内有人采用

噬菌体 7 肽库或 12 肽库筛选单抗结合表位, 取得了一定的效果^[12-14], 本实验室曾用 NEB 公司的 7 肽库筛选结合表位, 但只确定了部分单抗的结合表位。同时, 得到的结果与抗原氨基酸序列往往不能完全一致, 因此此方法不适合最终确定单抗结合位点。本研究用分段表达的抗原片段将单抗 2H3 和 7F1 抗原结合位点确定在 15 个氨基酸以内, 4C6、5F11 和 7F11 的抗原结合位点确定在 30 个氨基酸以内, 人工合成针对性的少量多肽, 将 4C6、5F11 和 7F11 的抗原结合位点确定在 10 个氨基酸左右。以较少的费用, 比较详细地确定了单抗的抗原结合表位。

另外, 本实验中 PrP peptide 2 最初设计为 109 aa~168 aa, 长度 60 个氨基酸。但将核酸片段插入 pET32a 诱导表达后, 融合蛋白小于 pET32a 空质粒诱导的阴性对照, 在 pET28a 上出现同样结果。对 109 aa~168 aa 的基因序列分析后发现, 5'端是 AAAA, 初步分析可能是 AAAA 导致了蛋白表达提前终止, 但确切的原因还需要进一步验证。

4 结论

本研究通过分段表达和人工合成多肽相结合的方法对羊朊毒体单抗的抗原结合表位进行了较为详细的定位, 对以此单抗为核心试剂建立的羊痒病免疫组化检测方法提供了更为详细的背景信息, 增强了我国羊痒病普查工作的可信度。对羊 prion 蛋白序列的抗原性进行相关分析, 得到了 prion 蛋白序列中较容易产生抗体的肽段, 为羊 prion 蛋白的免疫原性研究提供了参考。

REFERENCES

- [1] Aguzzi A, Polymenidou M. Mammalian prion biology: one century of evolving concepts. *Cell*, 2004, **116**(2): 313-327.
- [2] van Keulen LJ, Bossers A, van Zijderveld F. TSE pathogenesis in cattle and sheep. *Vet Res*, 2008, **39**(4): 24.
- [3] Cosseddu GM, Aqrini U, Pinto J, et al. Advances in scrapie research. *Rev Sci Tech*, 2007, **26**(3): 657-668.
- [4] Liberske PP. Prion diseases: ariddle wrapped in a mystery inside an enigma. *Folia Neuropathol*, 2008, **46**(2): 93-116.
- [5] Brun A, Castilla J, Ramirez MA, et al. Proteinase K enhanced immunoreactivity of the prion protein-specific monoclonal antibody 2A11. *Neurosci Res*, 2004, **48**(1): 75-83.
- [6] Zhang YQ, Wu XD, Liu YT, et al. Establishment of the method of immunohistochemistry assay for the detection of scrapie by monoclonal antibody. *Sci Agr Sin*, 2006, **39**(4): 819-824.
张永强, 吴晓东, 刘雨田, 等. 小尾寒羊痒痒病单抗制备及免疫组化检测方法的初步建立. *中国农业科学*, 2006, **39**(4): 819-824.
- [7] Harmeyer S, Pfaff E, Martin H. Groschup. Synthetic peptide vaccines yield monoclonal antibodies to cellular and pathological prion proteins of ruminants. *J Gen Virol*, 1998, **79**(Pt 4): 937-945.
- [8] Blanquet-Grossard F, Thielens NM, Vendrely C, et al. Complement protein C1q recognizes a conformationally modified form of the prion protein. *Biochemistry*, 2005, **44**(11): 4349-4356.
- [9] Enari M, Flechsig E, Weissmann C. Scrapie prion protein accumulation by scrapie-infected neuroblastoma cells abrogated by exposure to a prion protein antibody. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**(16): 9295-9299.
- [10] Perrier V, Solassol J, Crozet C, et al. Anti-PrP antibodies block PrPSc replication in prion-infected cell cultures by accelerating PrPc degradation. *J neurochem*, 2004, **89**(2): 454-463.
- [11] Htackray AM, Madec JY, Wong E, et al. Detection of bovine spongiform encephalopathy, ovine scrapie prion-related protein(PrP^{Sc}) and normal PrP^C by monoclonal antibodies raised to copper-refolded prion protein. *Biochem J*, 2003, **370**(Pt 1): 81-90.
- [12] Tang ZM, Guo YJ, Zhuo XF, et al. Selection of antigenic mimics of hepatitis C virus by phage display peptide library. *Immunol J*, 2005, **21**(4): 341-344.
汤兆明, 郭永建, 卓孝福, 等. 用噬菌体展示随机 12 肽库筛选 HCV B 细胞抗原表位. *免疫学杂志*, 2005, **21**(4): 341-344.
- [13] Wu WM, Wang XJ, Zhu HF, et al. Study on the mimic binding sites screening program severe acute respiratory syndromes antigen with random phage peptide library. *Chin J Epidemiol*, 2006, **26**(11): 904-906.
吴万敏, 王晓娟, 朱慧芬, 等. 用噬菌体随机肽库筛选 SARS 病原体的模拟抗原表位. *中华流行病学杂志*, 2006, **26**(11): 904-906.
- [14] Yang QH, Wang XW, Jin Y, et al. Identification and screening of mimic binding site of MUC1. *Acta Academiae Med Milit Tert*, 2005, **27**(13): 1332-1334.
杨清浩, 王祥卫, 金燕, 等. 噬菌体随机肽库筛选 MUC1 抗原模拟表位. *第三军医大学学报*, 2005, **27**(13): 1332-1334.