

传染性法氏囊病病毒五个抗原表位短肽的鉴定与序列分析*

王永山^{1**}, 范红结², 李 银³, 周宗安¹, 施正良¹, 王选年⁴, 张改平⁴

(1. 南京军区军事医学研究所, 江苏南京 210002; 2. 南京农业大学动物医学院, 江苏南京 210095; 3. 江苏省农业科学院兽医研究所, 江苏南京 210014; 4. 河南省农业科学院生物技术研究所, 河南郑州 450002)

Identification and Sequencing of Five Peptides Containing Epitopes of Infectious Bursal Disease Virus

WANG Yong-shan^{1**}, FAN Hong-jie², LI Yin³, ZHOU Zong-an¹, SHI Zheng-liang¹,
WANG Xuan-nian⁴, ZHANG Gai-ping⁴

(1. Military Medical Institute in Nanjing Military Area, Nanjing 210002, China; 2. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 3. Institute of Veterinary Science, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 4. Institute of Biotechnology, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: Five monoclonal antibodies to *Infectious bursal disease virus* (IBDV), HNF1, HNF7, B34, 2B1 and 2G8 were used to screen for binding peptides from peptide 12-mer phage display library. After three rounds of panning (absorption-elution-amplification), sixty positive monoclonal phages (twelve for each monoclonal antibody) were selected and the phage displayed 12-peptides were detected and identified with indirect ELISA (A value > 1.00) and competitive inhibition ELISA (inhibition rate $> 40\%$). The results indicated that 12-peptides contained epitopes of IBDV. Thirty-five positive monoclonal phages were sequenced, and the sequences of nucleotides and amino acids of the five different epitopes on IBDV were determined and analyzed. Comparison with sequences of IBDV registered in GenBank, four continuous amino acid residues Leu-Ala-Ser-Pro of 2B1 selected peptide was homology with the sequence encoded by genome fragment A from 536 to 539. But HNF1, HNF7, B34 and 2G8 selected peptides had no more than three continuous amino acid residues similarity with the sequences of IBDV. The results indicated that the epitope 2B1 was linear and the others were conformation-dependent.

Key words: *Infectious bursal disease virus* (IBDV); Epitope; Analysis

摘要: 以 5 株传染性法氏囊病病毒 (*Infectious bursal disease virus*, IBDV) 单克隆抗体 HNF1、HNF7、B34、2B1 和 2G8 作为筛选分子, 对噬菌体展示 12 肽库进行 3 轮“吸附-洗脱-扩增”淘洗, 从每株单克隆抗体筛选到的噬菌斑中随机挑取 12 个单克隆蓝色噬菌斑, 合计 60 个, 用间接 ELISA 检测, A 值大于 1.00; 用竞争抑制 ELISA 分析, 单克隆抗体和 IBDV 抗原均能竞争抑制筛选 12 肽与固相包被单克隆抗体的反应, 抑制率大于 40%, 表明在该 12 肽内含有 IBDV 抗原表位。选取 35 个单克隆噬菌斑, 测定噬菌体 gIII 部分基因的核苷酸序列, 确定了这 5 个含有不同 IBDV 抗原表位 12 肽的核苷酸和氨基酸序列。进一步将其与 GenBank 中 IBDV 基因组编码蛋白的氨基酸序列进行比较, 发现 2B1 筛选肽有 4 个连续氨基酸残基 Leu-Ala-Ser-Pro 与 IBDV 基因组 A 片段编码多聚蛋白的第 536-599 氨基酸残基一致, 推测 2B1 为线性表位; 而 HNF1、HNF7、B34 和 2G8 筛选肽均没找到有 3 个以上连续氨基酸残基与 IBDV 蛋白序列相同之处, 推测可能是构象依赖性表位。

关键词: 传染性法氏囊病病毒 (IBDV); 抗原表位; 序列分析

中图分类号: R373 文献标识码: A 文章编号: 1003-5125(2005)05-0503-04

收稿日期: 2005-03-17, 修回日期: 2005-04-11

* 基金项目: 江苏省自然科学基金 (BK2003011); 国家自然科学基金 (30571371)

** 通讯作者: 王永山 (1963 -), 男, 山东省籍, 研究员, 博士, 主要从事动物病毒学与分子生物学研究。

Corresponding author. Tel: 025-86050698; E-mail: wangyongshan2001@yahoo.com.cn

传染性法氏囊病 (IBD) 是由传染性法氏囊病病毒 (*Infectious bursal disease virus*, IBDV) 所致, 以侵害雏禽淋巴组织尤其是中枢免疫器官——法氏囊为主要特征的传染病。

IBDV 属双 RNA 病毒科, 基因组包括大 (A) 小 (B) 两个片段, 有五种病毒蛋白: VP1、VP2、VP3、VP4 和 VP5。VP1 由 B 片段编码, 为病毒自身编码的依赖 RNA 的 RNA 聚合酶。其它四种病毒蛋白由 A 片段编码的多聚蛋白加工而成, VP2 和 VP3 是病毒的主要结构蛋白, 构成病毒衣壳, VP2 相对含量较多, 中和抗原表位主要存在于 VP2 上, 且多为构象依赖性, 用构象依赖性中和抗原表位诱导的中和抗体能被动地保护宿主不受 IBDV 感染, VP4 为病毒自身蛋白酶, VP5 的功能尚不明确^[1,2]。大肠杆菌表达的 VP2 免疫原性较差, 表明 VP2 的后加工过程对 VP2 的结构形成至关重要^[3]。

对 IBDV 的抗原表位分析已有进展。目前, 在 VP2 上至少已经发现了 3 个构象依赖性中和抗原表位, 在 VP3 上也发现了 1 个线性中和抗原表位^[4-6], 更多的表位有待进一步分析。

本研究旨在运用国内建立的 5 株 IBDV 单克隆抗体 (mAb), 从噬菌体展示随机 12 肽库中筛选含有 IBDV 抗原表位的短肽, 分析其序列, 为 IBD 多表位疫苗的研制奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 单克隆抗体

IBDV 单克隆抗体 HNF1 和 HNF7 由河南省农业科学院生物技术研究所制备; B34 由中国兽药监察所陈光华研究员惠赠; 2B1 和 2G8 由本课题组制备; B34 和 2G8 对 IBDV 具有中和作用^[15,16]; 单克隆抗体腹水经盐析和 DEAE 纤维素纯化。HRP-羊抗 M13 单克隆抗体为 Amersham Pharmacia Biotech 公司产品。

1.2 随机肽库

噬菌体展示随机 12 肽库试剂盒 (Ph. D.-12TM Phage Display Peptide Library Kit) 购自美国 NEW ENGLAND BioLabs 公司。随机肽库噬菌体滴度 1.5×10^{13} pfu/mL, 随机多样性 2.7×10^9 转化子, 受体菌 *E. coli* ER2738, 测序引物 (-96 gIII sequencing primer): 5'-CCCTCA TAGTTA GCGTAACG 3'。

1.3 肽库的生物淘洗

所用溶液无菌处理, 并在空气净化条件下进行。分别用纯化单克隆抗体 HNF1、HNF7、B34、2B1 和

2G8 包被微孔板, 浓度 $100 \mu\text{g/mL}$, $150 \mu\text{L/孔}$, 4 过液, 用 1% 牛血清白蛋白 (BSA) 封闭, PBST (含 0.1% Tween-20) 洗涤 6 遍, 加入含 2×10^{10} pfu 噬菌体的肽库原液, 室温置 1h; PBST 洗涤 10 遍; 用 $100 \mu\text{L}$ 0.2 mol/L Gly-HCl (pH 2.2) 洗脱 8min; 加入 $15 \mu\text{L}$ 1 mol/L Tris-HCl (pH 9.1) 中和洗脱液。用常规方法滴定洗脱液中的噬菌体, 计算噬菌体的产出率: 产出率 (%) = 洗脱噬菌体数 (Output) / 淘洗用噬菌体数 (Input) $\times 100\%$ 。将洗脱液接种到 20mL 新鲜培养的 *E. coli* ER2738 培养液中, 37 振荡培养 4.5h, $4 \times 10^4 \text{ r/min}$ 离心 10min, 收集上清液, 加入 1/6 体积的 PEG/NaCl 溶液 (含 20% PEG₈₀₀₀ 和 2.5 mol/L NaCl), 4 过液, $4 \times 10^4 \text{ r/min}$ 离心 15min, 用 1mL TBS 重悬沉淀, 按照上述方法用 PEG/NaCl 再次沉淀, 最终用 $200 \mu\text{L}$ TBS 重悬沉淀, 滴后置 4 保存。将单克隆抗体的包被浓度降低至 $50 \mu\text{g/mL}$, 洗涤用的 PBST 中 Tween-20 的浓度提高到 0.5%, 按上述步骤再淘洗 2 次。经过 3 次淘洗后, 从每株单克隆抗体筛出的噬菌斑中随机挑取单克隆蓝色噬菌斑 12 个, 5 株单克隆抗体合计 60 个 (12 个单克隆噬菌斑 $\times 5$ 株单克隆抗体), 扩增。用免疫学方法分析筛选肽与 IBDV 抗原表位的相关性。

1.4 噬菌体短肽的 ELISA 检测

分别以 5 株单克隆抗体 HNF1、HNF7、B34、2B1 和 2G8 包被 ELISA 板, 包被浓度 $5 \mu\text{g/mL}$, 1% BSA 封闭, 加入对应单克隆抗体筛出的单克隆噬菌体扩增培养物, 室温放置 60min, 洗涤, 加入 HRP-羊抗 M13 单克隆抗体, 进行间接 ELISA。检测在筛选 12 肽内是否存在 IBDV 单克隆抗体结合位点。

1.5 单克隆抗体竞争抑制检测

为验证筛选肽的特异性, 分别以 5 株单克隆抗体包被 ELISA 板, 以对应游离的单克隆抗体作为竞争抑制物, 分别与对应单克隆抗体筛出的噬菌体培养物共同反应 60min, 洗涤, 加入 HRP-羊抗 M13 单克隆抗体, 进行竞争抑制 ELISA。计算抑制率, 分析筛选 12 肽与单克隆抗体结合的特异性。

1.6 IBDV 竞争抑制检测

与上述单克隆抗体竞争抑制检测相似, 只是以游离的 IBDV 作为竞争抑制物, 分别与对应单克隆抗体筛出的噬菌体培养物共同反应。计算抑制率, 进一步验证筛选 12 肽内的 IBDV 抗原表位。

1.7 序列分析

根据 ELISA 和竞争抑制试验分析结果, 从每株单克隆抗体挑出的 12 个单克隆蓝色噬菌斑中选定

7个,5株单克隆抗体合计35个(7个单克隆噬菌斑 \times 5株单克隆抗体),制备单链DNA模板,测序,分析。进一步将其与GenBank注册的IBDV基因组编码蛋白的氨基酸序列^[14]进行比较。测序由上海博亚公司完成。

2 结果

2.1 肽库的生物淘洗

分别以HNF1、HNF7、B34、2B1和2G8作为筛选分子,对噬菌体12肽库进行3轮“吸附-洗脱-扩增”淘洗。3轮淘洗的产出率呈指数增加,从第3轮淘洗得到的噬菌斑中随机挑取12个,合计60个(12个单克隆噬菌斑 \times 5株单克隆抗体),扩增,扩增后的噬菌体滴度均在 10^{20} pfu/mL以上。5株单克隆抗体在肽库的生物淘洗过程中没有明显的差异(表1)。

表1 用IBDV单抗对噬菌体展示12肽库的生物淘洗

Table 1 Bio-panning of phage display 12-peptide library by monoclonal antibody to IBDV

Times of panning	1 st round	2 nd round	3 rd round
Input	# 2 $\times 10^{11}$	2 $\times 10^{11}$	2 $\times 10^{11}$
Output	3 $\times 10^3$	3 $\times 10^6$	3 $\times 10^9$
Productivity	1.5 $\times 10^{-8}$	1.5 $\times 10^{-5}$	1.5 $\times 10^{-2}$

Approximately (Unit: pfu). Without evident diversity in the panning for five monoclonal antibody HNF1, HNF7, B34, 2B1 and 2G8.

HNF1	CCT AAG ACT CAT AAT TCT GGT CGT TCT AAT GTG GAT Pro Lys Thr His Asn Ser Gly Arg Ser Asn Val Asp
HNF7	ACG CTT CAT CTG CCG CAT TTG TGG CGG CCT CTT TCT Thr Leu His Leu Pro His Leu Trp Arg Pro Leu Ser
B34	CAT AAT GCG AAG TAT GTG TCG GCT GAG TCT TGG GGG His Asn Ala Lys Tyr Val Ser Ala Glu Ser Trp Gly
2B1	CAT CCG GAT AGT ATT CAT CCG TTT CTG GCG TCT CCT His Pro Asp Ser Ile His Pro Phe Leu Ala Ser Pro
2G8	GAT ACT CTT CAT GGG CAT GGT TTT ACT AAT TGG TTT Asp Thr Leu His Gly His Gly Phe Thr Asn Trp Phe

将上述5个12肽的氨基酸序列分别与GenBank中IBDV基因组A片段(GenBank登录号:AF443294, AF362776, AF454945)和B片段(AF362774, AF455136)编码蛋白的氨基酸序列进行比较,发现2B1筛选肽有4个连续氨基酸残基Leu-Ala-Ser-Pro与IBDV基因组A片段编码多聚蛋白的第536-599氨基酸残基一致,推测2B1为线性表位;而HNF1、HNF7、B34和2G8筛选肽均没找到有3个以上连续氨基酸残基与IBDV基因组编码蛋白氨基酸残基相同之处,推测可能是构象依赖性表位。

2.2 噬菌体短肽的ELISA检测

用5株单克隆抗体作为筛选分子,分别从第3轮淘洗得到的噬菌斑中随机挑取12个扩增,合计60个单克隆噬菌斑(12个单克隆噬菌斑 \times 5株单克隆抗体),用间接ELISA检测,A值均大于1.00。表明,在5个筛选12肽内均含有单克隆抗体结合位点。

2.3 单克隆抗体竞争抑制检测

5株单克隆抗体在试验中的抑制率均可达到40%。表明,游离单克隆抗体可以竞争抑制筛选肽与固相包被单克隆抗体的反应。由此证明:在5个筛选12肽内均含有单克隆抗体特异结合位点。

2.4 IBDV竞争抑制检测

IBDV抗原在试验中的抑制率达到40%以上。表明,游离IBDV也可以竞争抑制筛选12肽与固相包被单克隆抗体的反应。进一步证明:在5个筛选12肽内均含有IBDV抗原表位。

2.5 序列分析

将测定的35个单克隆噬菌体(7个单克隆噬菌体 \times 5株单克隆抗体)gIII基因部分核苷酸序列用生物信息学软件DNASIS(DNASIS for Windows V2.5, Hitachi Software Engineering Co., Ltd.)分析并进一步推导筛选12肽的氨基酸序列。5个含有不同IBDV抗原表位12肽的序列分别如下:

3 讨论

IBD是危害养鸡业的主要传染病之一,变异株和超强毒株的出现使该病的防控难度加大,目前虽然研制了多种商品化的弱毒疫苗和灭活疫苗,但其安全性和制造工艺尚有不尽人意之处,如为抵抗超强毒的攻击,使用中强毒力的毒株研制活疫苗,给IBD的防控带来极大的隐患,灭活疫苗存在着抗原制备的困难。因此,国内外学者一直在探索免疫原性好且安全性高的新型疫苗,从重组亚单位疫苗^[3,7,8]

到病毒载体疫苗^[9-11]和核酸疫苗^[12],均存在着表达量低、保护率低、免疫程序复杂以及难以工业化生产等缺点。

蛋白质分子上的抗原表位(亦称抗原决定簇)是蛋白质抗原性的物质基础。近年来研究发现的模拟抗原表位,本质上是构象依赖性表位,虽然模拟表位的氨基酸顺序与蛋白质分子一级结构的氨基酸顺序截然不同,却可以引起特异性的免疫反应,因此,在免疫应答中的地位极为重要。用常规基因克隆表达方法研制的重组亚单位疫苗,尽管人们采用多种方法进行复性,仍然难以完全恢复到天然的构象,导致部分构象依赖性抗原表位丢失,其中可能是中和抗原表位,从而影响到机体产生完全有效的保护性免疫应答,这是影响其免疫效果的重要原因。

噬菌体展示技术已经广泛用于病毒的抗原表位分析,随着对病毒抗原表位研究的进展,已经发现在一些分子量较大的病毒保护性免疫原中除与免疫保护有关的中和表位外,还有非中和表位、抑制性表位甚至是毒性表位,这些表位会影响疫苗的免疫效果。已有实验^[13]显示,单一中和表位的免疫原性较弱且保护活性不完全,串联的抗原表位可以增强抗原的免疫原性,因此发展多表位疫苗有利于提供更完全和更有针对性的免疫保护。但并不是拷贝数越多越好,只有串联适量的拷贝数,才能够刺激机体产生大量的中和抗体。此外,抗原表位、连接方法以及表达系统等都会影响到多表位疫苗的免疫效力,表位的加工效率也是影响多表位疫苗免疫原性的重要变量。待这些问题解决后,该技术将成为研制基因工程疫苗的新方法。

本试验用5株IBDV单克隆抗体从噬菌体展示随机12肽库中获得了5个含有IBDV抗原表位的短肽,其中1个线性表位,4个构象依赖性表位,佐证了有学者认同的在病毒抗原中存在着大量的构象依赖性表位。

参考文献

- [1] Fahey K J, McWaters P, Brown M A, *et al*, Virus-neutralizing and passively protective monoclonal antibodies to infectious bursal disease virus of chickens [J]. *Avian Dis*, 1991, 35:365-373.
- [2] Mundt E, Beyer J, Muller H. Identification of a novel viral protein in infectious bursal disease virus-infected cells [J]. *J Gen Virol*, 1995, 76:437-443.
- [3] Azad A A, Fahey K J, Barrett S A, *et al*, Expression in *Escherichia coli* of cDNA fragments encoding the gene for the host-protective antigen of infectious bursal disease virus [J]. *Virology*, 1986, 149(2):190-198.
- [4] Yamaguchi T, Lwata K, Kobayashi M, *et al*, Epitope mapping of capsid proteins VP2 and VP3 of infectious bursal disease virus [J]. *Arch Virol*, 1996, 141(8):1493-1507.
- [5] Cui X, Nagesha H S, Holmes I H. Mapping of conformational epitopes on capsid protein VP2 of infectious bursal disease virus by fd-tet phage display [J]. *J Virol Methods*, 2003, 114(1):109-112.
- [6] Cui X, Nagesha H S, Holmes I H. Identification of crucial residues of conformational epitopes on VP2 protein of infectious bursal disease virus by phage display [J]. *J Virol Methods*, 2003, 109(1):75-83.
- [7] Macreadie I G, Vaughan P R, Chapman A J, *et al*, Passive protection against infectious bursal disease virus by viral VP2 expressed in yeast [J]. *Vaccine*, 1990, 8(6):549-552.
- [8] Snyder D B, Vakharia V N, Mengel-Wheratt S A, *et al*, Active cross-protection induced by a recombinant baculovirus expressing chimeric infectious bursal disease virus structural proteins [J]. *Avian Dis*, 1994, 38(4):701-707.
- [9] Shaw I, Davison T F. Protection from IBDV-induced bursal damage by a recombinant fowlpox vaccine, fpIBD1, is dependent on the titre of challenge virus and chicken genotype [J]. *Vaccine*, 2000, 18(28):3230-3241.
- [10] Darteil R, Bublot M, Laplace E, *et al*, Herpesvirus of turkey recombinant viruses expressing infectious bursal disease virus (IBDV) VP2 immunogen induce protection against an IBDV virulent challenge in chickens [J]. *Virology*, 1995, 211(2):481-490.
- [11] Tsukamoto K, Kojima C, Komori Y, *et al*, Protection of chickens against very virulent infectious bursal disease virus (IBDV) and Marek's disease virus (MDV) with a recombinant MDV expressing IBDV VP2 [J]. *Virology*, 1999, 257(2):352-362.
- [12] Fodor I, Horvath E, Fodor N, *et al*, Induction of protective immunity in chickens immunized with plasmid DNA encoding infectious bursal disease virus antigens [J]. *Acta Vet Hung*, 1999, 47(4):481-492.
- [13] Broekhuijsen M P, Blom T, van Rijn J, *et al*, Synthesis of fusion proteins with multiple copies of an antigenic determinant of foot-and-mouth disease virus [J]. *Gene*, 1986, 49(2):189-197.
- [14] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=nucleotide>
- [15] 陈光华,蒋桃珍,董琳琳,等. 鸡传染性法氏囊病病毒单克隆抗体的研究[J]. *中国兽药杂志*, 2000, 34(3):9-13.
- [16] 王军,李银,范红结,等. 传染性法氏囊病病毒抗原表位分析-单克隆抗体的制备与鉴定[J]. *中国预防兽医学报*, 2005, 27(3):171-174.