

率为 20%; 缺失 P73 蛋白的肝癌细胞生长快, 在 43 例 P73 缺失的肝癌中 PCNA 高增殖指数达 79%, 而 P73 表达阳性组中 PCNA 高增殖指数的仅为 25%。P73 与以上这些肝癌的生物学特征的关系与 P53 异常相类似^[9, 10], P73 在肝癌中可能起着抑癌基因的作用。

从本组的实验结果看, P53 蛋白表达阳性组中 P73 的缺失率为 79%, P53 表达阳性组中 P73 的缺失率为 68%, 统计学上两者间无明显差异, 但是在 33 例 P53 蛋白表达异常的病例中, 伴有 P73 蛋白缺失时 PCNA 高增殖指数的病例高于 P73 蛋白无缺失组, 前者 81%, 后者 29%。可能 P53 与 P73 在调控肝癌细胞增殖方面起协同作用。尽管 P73 和 P53 都通过诱导 P21 蛋白来行使功能, 但由于受不同的信号调控, 各自的诱导方式不同, 它们在维持细胞内平衡方面可能扮演根本不同的角色, 所以在 P53 异常的情况下, P73 蛋白可能对细胞还有一定的调控作用, 从另一途径抑制细胞的增殖。

(本文图 1, 2, 3 见封 4)

参考文献:

- [1] Kaghad M, Bonnet H, Yang A, *et al.* Monoallelically expressed gene related to P53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers[J]. *Cell*, 1997, 90(4): 809.
- [2] 顾健人, 连争. 肝癌的分子生物学[A]. 见: 汤钊猷, 余业勤. 原发性肝癌[M]. 第 2 版. 上海: 上海科学技术出版社, 1999.

19~29.

- [3] Iakada N, Ozaki T, Ichimiya S, *et al.* Identification of a transcription activity in the COOH-terminal region of p73 which is impaired in the naturally occurring mutants found in human neuroblastomas[J]. *Cancer Res* 1999, 59(12): 2810.
- [4] Chi S G, Chang S G, Lee S J, *et al.* Elevated and biallelic expression of p73 is associated with progression of human bladder cancer[J]. *Cancer Res*, 1999, 59(12): 2791.
- [5] Mai M, Yokomizo A, Qian C, *et al.* Activation of p73 silent allele in lung cancer[J]. *Cancer Res*, 1998, 58(11): 2347.
- [6] Mihara M, Nimura Y, Ichimiya S, *et al.* Absence of mutation of the p73 gene localized at chromosome 1p36.3 in hepatocellular carcinoma[J]. *Br J Cancer*, 1999, 79(1): 164.
- [7] Tannapet A, Wasner M, Krause K, *et al.* Expression of p73 and its relation to histopathology and prognosis in hepatocellular carcinoma[J]. *J Natl Cancer Inst*, 1999, 91(13): 1154.
- [8] Herath N I, Kew M C, Whitehall V L, *et al.* p73 is up-regulated in a subset of hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2000, 31(3): 601.
- [9] 李锦清, 张昌卿, 张亚奇, 等. PCNA, P53 蛋白在肝癌临床中的意义[J]. *癌症*, 1996, 15(1): 45.
- [10] 林小军, 张昌卿, 李锦清, 等. P53 功能在肝癌临床中的意义[J]. *癌症*, 2000, 19(7): 687.

(编辑 黄小廷)

应用噬菌体随机肽库筛选 2 型登革病毒 E 蛋白的抗原表位

魏惠永, 江丽芳, 郭辉玉

(中山大学中山医学院微生物学教研室, 广东 广州 510089)

摘要:【目的】通过型特异性单抗与噬菌体随机 12 肽库的生物淘洗, 确定 2 型登革病毒 E 蛋白分子的抗原表位。【方法】以 DEN2 型特异的 E 单克隆抗体作为筛选分子, 生物淘洗噬菌体随机 12 肽库, 将筛选的噬菌体阳性克隆进行 ELISA 检测、DNA 序列测定及展示肽的氨基酸序列推导, 通过展示肽序列与 DEN2 E 蛋白的氨基酸一级结构的对比, 确定 E 蛋白的抗原优势表位并用相应的合成肽验证。【结果】常规生物淘洗获得富含芳香族氨基酸并有 aHWbW 核心结构的克隆, 确定为非特异的塑料结合噬菌体。改进淘洗方法后, 肽库筛选的噬菌体阳性克隆有共同的结构模体 WFKKGS, 与 DEN2 E 蛋白分子的 390~397 有 3~5 个氨基酸相同。其对应的合成 10 肽能与淘洗单抗特异反应, 并可抑制噬菌体阳性克隆与该单抗结合。【结论】本实验通过噬菌体随机肽库的生物淘洗确定 DEN2 E 蛋白 390~397 氨基酸残基(WFKKSSD)存在一线性的 B 细胞抗原表位。

关键词: 登革病毒; E 蛋白; 噬菌体随机肽库; 抗原表位

中图分类号: R37.33 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2002)5S-0010-04

近年登革病毒(DEN)导致的登革热(DF)、登革出血热(DHF)及登革体克综合症(DSS)在热带与亚热带地区流行加剧, 加强其致病机制和疫苗的研究具有重要意义。E 蛋白是 DEN 病毒体上主要的包膜糖蛋白, 有人认为 E 分子上可能存在着与二次感染时 DSS/DHF 发生密切相关的免疫增强(ADE)表位^[1]。E 蛋白分子的表位图谱分析已经成为当今 DEN 的研究热点。本实验以型特异的 DEN2 E 单抗为靶分子, 用噬菌体随机肽库(RPL)进行生物淘洗, 旨在筛选确定抗原表位。

1 材料与方法

1.1 主要材料

Ph. D.-12 Phage Display Peptide Library Kit 为 NEB 公司产品, 批号 E8110S。内含 12 随机肽库、宿主菌 *E. coli* ER2738、28g III 与 96g III 测序引物。肽库的滴度为 2×10^{13} PFU/mL, 随机多样性为 2.7×10^9 。DEN1 Hawaii 株 E 单抗 D2-1F1-3/TCF、DEN2 NGC 株 E 单抗 3H5-1-21/TCF、DEN3 H-87 株 E 单抗 D6-8A1-12/TCF、DEN4 H-241 株 E 单抗

收稿日期: 2002-07-25

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(201036)

作者简介: 魏惠永(1964-), 男, 江西安远人, 助理研究员, 现在广东省人民医院中心实验室

1H10-6-7/TCF 由美国 CDC 提供。DEN2 NS1 单抗与 DEN2 多抗腹水由本室提供。HRP-酶标抗 M13 噬菌体抗体、底物 ABTS 为 Pharmacia 公司产品。IPTG、X-gal 为 Promega 公司产品。

1.2 常规生物淘洗步骤

将稀释的 DEN2 E 单抗包被 PVC 孔后置湿盒内 4 °C 过夜。10 g/L BSA-TBS 液 4 °C 封闭 1 h, 洗涤后加入 10 μL 随机肽库(2×10¹¹ PFU)结合作用 60 min。洗涤后用甘氨酸液洗脱结合噬菌体,并用 pH9.1 Tris 碱中和。吸取 1 μL 洗脱液测定噬菌体滴度,余下噬菌体洗脱液进行扩增并测定扩增后的噬菌体滴度。按上述步骤进行下一轮淘洗,加入上一轮淘洗后扩增的噬菌体肽库 2×10¹¹ PFU,通过四轮吸附-洗脱-扩增,取淘洗获得的单个噬菌斑制备原种和鉴定分析。

1.3 噬菌体滴度测定与扩增

每一轮均吸取 1 μL 噬菌体洗脱液用 LB 系列稀释,与 *E. coli* ER2738 200 μL 混合,再加入到 3 mL 55 °C 保温的顶层琼脂糖液中,快速混匀后倒入 LB/IPTG/X-gal 平板,轻振混匀后置温箱内 37 °C 过夜培养。第 2 天计算蓝色噬菌斑数,再乘以其稀释倍数即得到噬菌体滴度。

将噬菌体洗脱液加入 20 mL 含 *E. coli* ER2738 的 LB 液中,37 °C 250 r/min 振荡培养约 5 h,离心后吸上清用 1/6 体积的 PEG/氯化钠沉淀过夜,离心收集的沉淀用 TBS 重悬,再加 PEG/氯化钠冰浴,TBS 溶液小心重悬离心沉淀,吸取 1 μL 液体用 LB 作系列稀释以测定噬菌体滴度。

1.4 生物淘洗的改进

提高 DEN2 E 单抗包被浓度,封闭液用 TBS-20 g/L 脱脂奶粉,洗涤液为 TBS-1 g/L 脱脂奶粉,用重组的 DEN2 包膜糖蛋白(rEgp)作竞争洗脱,包被、封闭、洗涤、结合、洗脱、噬菌体的扩增与滴度测定等方法基本同前述,3 轮淘洗后进行噬菌体结合克隆的鉴定。

1.5 噬菌体结合克隆的鉴定

1.5.1 噬菌体原种制备 用灭菌牙签挑取单个蓝色噬菌斑,转入 1 mL LB-*E. coli* ER2738 液,37 °C 250 r/min 振荡培养约 5 h,离心取上清即为噬菌体原种,置 4 °C 保存。

1.5.2 噬菌体克隆的 ELISA E 单抗稀释包被过夜,封闭作用后洗涤,加入 10¹² PFU 的各噬菌体克隆扩增液,室温作用 60 min。洗涤后加入 1:1 000 稀释的酶标抗 M13 噬菌体抗体,再与底物 ABTS 反应后测定其吸光值(A₄₁₀)。取 ELISA 阳性的噬菌体克隆用 TBS 作 4 倍系列稀释,测定其不同稀释度的 ELISA 方法同上。

1.6 序列测定与对比分析

PEG/氯化钠离心沉淀噬菌体单链 DNA,用碘液和乙醇洗涤,真空干燥后用 30 μL 的 TE 溶液小心溶解。序列测定由上海博亚生物技术有限公司完成,使用 ABI 377 自动序列分析仪,测序引物为-96g III。测序后找出噬菌体 gp III 前导序列与后导序列间插入的 36 核苷酸顺序,依据碱基配对原则获得其对应序列,并推导展示肽的氨基酸排列。汇集噬菌体克隆展示肽的氨基酸排列结果,找出其核心序列,与发表的 DEN2 NGC 全长 E 蛋白的一级结构用软件包进行分析。

1.7 肽的合成及其结合试验

根据噬菌体克隆的展示肽核心序列,委托深圳翰宇生物公司合成一相应的 10 肽(E10),其氨基酸排列为 WFKKGSSIGQ,对应于 E 蛋白的 390~399 位氨基酸残基。用 ELISA 检测 E10 肽与 DEN 1~4 型 E 单抗、DEN2NS1 单抗、DEN2 多抗腹水结合的特异性,并将 DEN2 E 单抗稀释进行肽结合的敏感性试验。在竞争抑制试验中,将合成肽与各噬菌体克隆加入包被 DEN2 E 单抗的反应孔中进行 ELISA,并计算其抑制率= A_{410,抑制后}/A_{410,抑制前}×100%。

2 结果

2.1 生物淘洗的产出率

依据噬菌体系列稀释所产生的蓝色噬菌斑,计算各轮生物淘洗获得的结合噬菌体滴度及其产出率,发现常规淘洗法第 2 轮比第 1 轮提高 3×10²,第 3 轮比第 2 轮又提高 0.3×10²,而第 4 轮比第 3 轮仅提高 5 倍。改进淘洗方法后得到各轮未扩增噬菌体的滴度分别为 8.3×10²,5.9×10⁴,4.4×10⁶,淘洗产出率第 2 轮比第 1 轮提高 2.4×10²,第 3 轮比第 2 轮又提高 22 倍(表 1)。

表 1 噬菌体随机 12 肽库的淘洗产量

淘洗 轮次	常规淘洗法			改进淘洗法		
	肽库加入	结合 phage	产出率	肽库加入	结合 phage	产出率
1	2×10 ¹¹	2.4×10 ³	1.2×10 ⁻⁸	2×10 ¹¹	8.3×10 ²	4.1×10 ⁻⁹
2	2×10 ¹¹	7.4×10 ⁵	3.7×10 ⁻⁶	5.8×10 ¹⁰	5.9×10 ⁴	1.0×10 ⁻⁶
3	2×10 ¹¹	1.8×10 ⁷	0.9×10 ⁻⁴	2×10 ¹¹	4.4×10 ⁶	2.2×10 ⁻⁵
4	1×10 ¹¹	5.0×10 ⁷	5.0×10 ⁻⁴			

2.2 噬菌体结合克隆的鉴定

2.2.1 常规生物淘洗法 取 18 个获得的噬菌体结合克隆进行 ELISA, DEN2 E 抗体用 1:10 包被,各噬菌体扩增液的加入均为 10¹²PFU,15 个噬菌体克隆其 A₄₁₀≥0.2 判定为阳性,另 3 个噬菌体克隆其 A₄₁₀<0.2 判定为阴性结果(图 1)。

2.2.2 改进生物淘洗法 将第 3 轮淘洗获得的 15 个噬菌体结合克隆进行扩增,取 10¹² PFU 的各噬菌体扩增液与包

被的 DEN2 E 抗体进行 ELISA,11 个噬菌体克隆其 A₄₁₀≥0.2 判定为阳性,另 4 个噬菌体克隆其 A₄₁₀<0.2 判定为阴性结果(图 2)。

2.3 噬菌体克隆测序与推导的肽序列

2.3.1 常规淘洗法 将 ELISA 阳性的 15 个噬菌体克隆单链 DNA 用-96g III 引物进行测序,有 3 个克隆测序不成功,其余 12 个噬菌体克隆获得其 36 bp 插入序列和反密码序列。

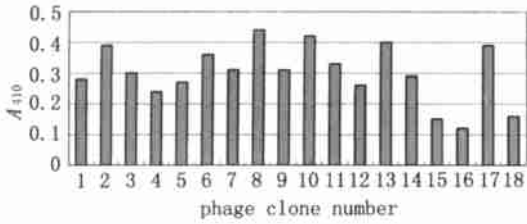


图1 4轮生物淘洗获得的18个噬菌体结合克隆的ELISA

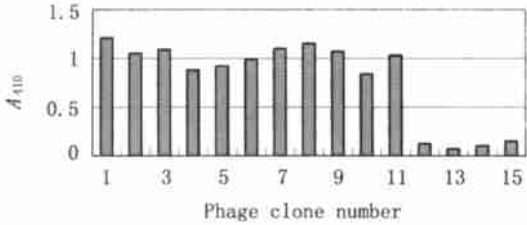


图2 E单抗3轮生物淘洗获得的15个噬菌体结合克隆ELISA

12个噬菌体克隆表面的推导展示肽有相似的结构 aHWbW (a= W/F, b= S/P, 斜线代表 or), 且富含色氨酸(W), 组氨酸(H), 苯丙氨酸(F), 酪氨酸(Y)等芳香族氨基酸, 与 DEN2 NGC 株 E 蛋白的氨基酸一级结构进行计算机分析对比未见相似的结构模体, 确定为非特异的塑料结合噬菌体(表 2)。

表2 肽库淘洗分离的塑料结合噬菌体

克隆	推导的12肽序列	特殊的氨基酸比例
EP-1	FHRPWSFWLAG	F 2/12, H 1/12 W 2/12
EP-2	FHWPWLLPMQQP	F 1/12, H 1/12 W 2/12
EP-3	WHWSWIQNAAPN	H 1/12, W 3/12
EP-4	FHWSWYTPSRPS	F 1/12, H 1/12 W 2/12, Y1/12
EP-5	HSW WWNASLPAV	H 1/12, W 3/12
EP-6	FHWRYPLPLPGN	F 1/12, H 1/12 W 1/12, Y1/12
EP-7	WHWSWNQNAAPN	H 1/12, W 3/12
EP-8	WHWSWNQNAAPN	H 1/12, W 3/12
EP-10	LHRSWWAAPQVT	H 1/12, W 2/12
EP-13	WHWRFPMPPTDWP	F 1/12, H 1/12 W 3/12
EP-14	WHRTASFSWYYP	F 1/12, H 1/12 W 2/12, Y2/12
EP-17	WHWQWTPWSIQP	H 1/12, W 3/12

2.3.2 改进的生物淘洗法 11个克隆测序后推导的噬菌体展示肽有相似的结构模体 WFKKGS 计算机分析对比发现它们与 DEN2 NGC 株 E 蛋白第 390~397 位氨基酸序列有 3~5 个氨基酸相同, 表明 E 蛋白该区为单抗结合表位。

2.4 合成肽的结合试验

2.4.1 特异性试验 DEN2 E 单抗 3H-1-21、DEN2 多抗腹水与合成肽 E10 的 ELISA 呈阳性, DEN1、3、4 型 E 单抗与 DEN2 NS1 单抗为阴性结果, 表明该合成肽可与对应抗体特异结合。

2.4.2 敏感性试验 不同包被量的肽与 DEN2 E 单抗不同稀释度进行 ELISA, 两组结果无差别, 与合成肽结合阳性的 DEN2 E 单抗的最低稀释度 10⁻³ (图 3)。

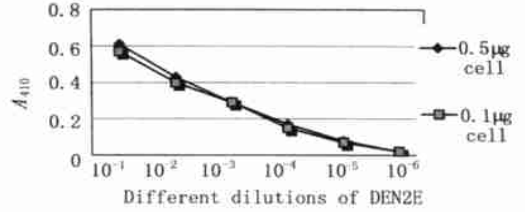


图3 合成肽与 DEN2 E 单抗不同稀释度的 ELISA

2.4.3 竞争抑制试验 合成肽 E10 对 11 个噬菌体克隆结合 DEN2 单抗的抑制率在 63%~82% 之间, 竞争抑制试验为阳性, 表明合成肽 E10 与噬菌体克隆竞争结合 DEN2 E 单抗的同一位点。

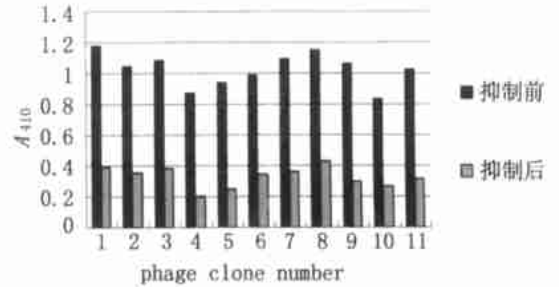


图4 合成肽对噬菌体结合克隆的竞争抑制试验

3 讨论

既往研究资料显示 E 蛋白由 3 个非重叠的抗原决定簇 A、B、C 组成, 这 3 个抗原决定簇至少构成 16 个不同的抗原表位^[2]。早期有人^[3]曾用重叠的重组 E 蛋白片段进行抗原表位分析, 因表达片段较大而难于精确定位, 改用合成肽结合 McAb 虽确定多个位点, 但合成肽仅能模拟蛋白质的线性序列从而筛选出优势线性表位, 不能模仿靶分子构象, 丢失了主要的依赖表位。Lin 等^[4]用单抗中和和逃逸试验发现单一的 E 表位, 但该方法需对变异株进行全序列分析, 其确定的表位多为单一散在分布。

近年来噬菌体表面展示技术 (PDT)^[5]在蛋白质结构与抗原表位的研究发展迅速, 有成功应用 RPL 筛选 HCV、HIV 等^[6,7]抗原表位的报道, 也有学者^[8,9]用 RPL 确定了 DEN1 的 NS1 线性表位和 DEN4E 蛋白的单抗结合表位。多数学者在 RPL 常规生物淘洗时用 BSA 封闭, TBS 洗液中加入一定浓度的吐温 20, 并随着淘洗轮次增加而提高抗体的稀释度。本实验用 RPL 结合 DEN 型特异 E 单抗时, 4 轮淘洗后获得了展示肽富含芳香氨基酸的噬菌体, 其结构模体为 aH-WbW。参考有关学者的报道^[10]及 NEB 公司的手册, 确定为非特异的塑料结合噬菌体, 其原因可能是该单抗为多年前生产, 效价偏低, 而 12 肽库的结合需要的抗体活性较高。经改用脱脂奶粉洗涤与封闭, 并提高 E 单抗包被浓度, 实验结果显示非特异的塑料结合噬菌体被抑制, 从而筛选出需要的抗原表位。

除固定靶分子的特性外, 肽库的特性 (包括库容、肽分子长短) 对抗原表位的研究起决定作用。库容是指肽库内不同氨基酸随机排列组合的种类及其构象所形成的各种展示肽分子总数, 应确保各种展示肽分子的均匀存在且有足够的拷

贝数。较短的展示肽分子淘洗时易获得较强结合力的众多位点,其表位较小而构象受限,难以满足构象依赖表位的研究需要,也较难筛选出较长的弱结合位点。虽然较长的展示肽库构建困难(所需的库容与肽长度呈指数递增),但它增加氨基酸排列组合的随机性,也有利于其形成空间构象,从而筛选出多个较长和较弱的结合位点,并确定蛋白分子中的占优势地位的构象依赖表位。因此,最初多用的5~7肽库现有被长肽库取代的趋势。本实验采用NEB公司的随机12肽库对DEN2抗原表位进行研究,其库容为 1.5×10^{13} PFU/mL,库内含有 2.7×10^9 的随机排列肽分子,能确保筛选出与靶分子结合的各种特异肽,为DEN的构象依赖表位或较长的弱结合位点的筛选提供了可能。

目前国外应用噬菌体展示肽库对DEN E蛋白分子抗原表位的研究刚起步,而国内尚未见相关的报道,本试验用RPL成功筛选出E蛋白的一线性B细胞表位,为E蛋白功能表位的深入研究提供了基础条件。

参考文献:

[1] Halstead S B. Dengue virus and mononuclear phagocytes infected enhancement by non-neutralizing antibody [J]. J Exp Med. 1997, 146(1): 210.
 [2] 闻玉梅. 现代医学微生物学[M]. 上海:上海医科大学出版社 1999. 1180~1221.
 [3] Megret F, Hurgnot P, Deubel V, et al. Use of recombinant fusion

proteins and monoclonal antibodies to define linear and discontinuous antigenic sites on dengue virus envelope glycoprotein [J]. Virology, 1992, 187(2): 480.
 [4] Lin B, Parrish C R, Murray J M, et al. Localization of a neutralizing epitope on the envelope protein of dengue virus type 2 [J]. Virology, 1994, 202(4): 885.
 [5] Smith G P, Scott J K. Libraries of peptides and protein display on filamentous phage [J]. Methods Enzymol. 1993, 217(2): 228.
 [6] Wang L F, Plessis D H, White J R, et al. Use of a gene-targeted phage display random epitope library to map an antigenic determinant on the bluetongue virus outer capsid protein VP5 [J]. J Immunol Methods. 1995, 178(1): 1.
 [7] Pereboeva L A, Pereboev A V, Wang L F, et al. Hepatitis C epitopes from phagedisplayed cDNA diagnosis with a chimeric antigen [J]. J Med Virology, 2000, 60(2): 144.
 [8] Wu H C, Huang Y L, Chao T T, et al. Identification of B-cell epitope of dengue virus type 1 and its application in diagnosis of patients [J]. J Clin Microbiol. 2001, 39(3): 977.
 [9] Thullier P, Demangel C, Bedouelle H. Mapping of a dengue virus neutralizing epitope critical for the infectivity of all serotypes: insight into the neutralization mechanism [J]. J Gen Virol. 2001, 82(5): 1885.
 [10] Adey N B, Mataragnon A H, Rider J E. Characterization of phage that bind plastic from phage-displayed random peptide libraries [J]. Gene, 1995, 156(1): 27.

(编辑 张敏瑞)

高效分离屠宰成年猪肝细胞用于生物人工肝方法的建立

巴明臣¹, 周晓东², 陈积圣¹, 刘丽²

(1. 中山大学附属第二医院普外科 2. 林佰欣医学研究中心, 广东广州 510120)

摘要:【目的】探讨氧合 dispase 及胶原酶组酶消化法从屠宰成年猪肝脏高效分离肝细胞的方法及分离肝细胞的生物活性。【方法】部分肝叶逆行灌注、氧合组酶 dispase 及胶原酶消化、密度梯度离心法分离、纯化肝细胞, 并对其生物活性进行检测。【结果】肝组织细胞的收获量达 10×10^6 个/g, 细胞平均存活率可达 92.5%, 且无泡状变性的发生, 原代培养生物活性与原代培养鼠肝细胞一致, 随着时间的延长而减退。【结论】氧合组酶 dispase 及胶原酶消化、密度梯度离心法自屠宰成年猪分离肝细胞产量高、且保持着良好的生物活性, 可作为生物人工肝的理想肝细胞源用于肝脏终末性疾患的治疗。

关键词: 肝细胞学; 细胞分离; 细胞培养, 肝; 人工

中图分类号: R657.4 文献标识码: A 文献编号: 1000-257X(2002)5S-0013-02

国内外学者已对肝细胞移植及肝细胞生物人工肝体外支持系统治疗肝脏终末性疾进行了系统研究, 积累了丰富的临床经验。生物人工肝体外支持系统制作技术的发展使对高分化具有代谢机能的原代肝细胞供应的要求不断增加, 屠宰猪肝已成为满足这一要求极具潜力的来源^[1, 2]。本课题拟对从屠宰成年猪肝脏有效获取大量高活性肝细胞的方法进行简要探讨。

1 材料与方 法

刚屠宰的成年猪肝脏 15 个, 切取质量相等、肝静脉易于插管的左外或右后叶随机分成 5 组, 将硅胶管直接插入肝静脉并固定, 37℃恒温下恒流泵逆行持续灌注, 灌注液回收循环利用。1~4 组为实验对照组, 1 组肝脏仅用 50 g/L 的胶原酶灌注; 2~4 组分别使用 10^4 pU/L, 5×10^5 pU/L 或 10^6 pU/L dispase 消化液及 50 g/L 的胶原酶组酶消化, 各消化灌流液体均不做氧合处理; 5 组为实验组, 使用氧合的 5×10^5

收稿日期: 2002-07-01

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(001358); 广东省重大科技攻关基金资助项目(2KM 05402S)

作者简介: 巴明臣(1969-), 男, 河南郸城人, 博士, 主治医师