

鲍曼不动杆菌 TonB 蛋白多表位的构建与筛选

邓凯丽¹, 陈思遐¹, 杜兴冉², 冯旰珠^{1*}

¹南京医科大学第二附属医院呼吸科, ²感染科, 江苏 南京 210011

[摘要] 目的: 构建和筛选鲍曼不动杆菌 TonB 蛋白抗原的 B 细胞、T 细胞表位。方法: 运用生物信息学软件预测 TonB 蛋白的小鼠 B 细胞及 T 细胞表位并人工合成相应肽段; 构建重组质粒 pET28a-tonB 并原核表达、纯化获得 TonB 蛋白; 分 3 次以 TonB 蛋白在皮下免疫 BALB/c 小鼠, 5 周后收集小鼠血清并分离小鼠脾脏细胞; 间接 ELISA 法检测小鼠血清中 B 细胞表位抗体水平, 双抗体夹心 ELISA 法检测经候选 T 细胞表位体外刺激后脾细胞分泌 γ -干扰素 (IFN- γ) 量。结果: 构建候选 B 细胞和 T 细胞表位各 4 条, 分别为 PB1、PB2、PB3、PB4 和 PT1、PT2、PT3、PT4; 间接 ELISA 结果显示, PB3 及 PB4 与 TonB 蛋白免疫组小鼠血清发生反应, 其吸光度值与对照组相比显著升高 ($P < 0.05$); 双抗体夹心 ELISA 结果显示, PT2、PT3 及 PT4 刺激免疫组小鼠脾脏细胞产生的 IFN- γ 量与对照组相比显著升高 ($P < 0.05$)。结论: 成功构建并筛选出鲍曼不动杆菌 TonB 蛋白的 2 个 B 细胞表位 PB3 及 PB4, 3 个 T 细胞表位 PT2、PT3 及 PT4。

[关键词] 鲍曼不动杆菌; TonB 蛋白; 抗原表位

[中图分类号] R329.11

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)10-1345-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20181003

Construction and selection of antigen epitopes of *Acinetobacter baumannii* protein TonB

Deng Kaili¹, Chen Sixia¹, Du Xingran², Feng Ganzhu^{1*}

¹Department of Respiratory Medicine, ²Department of Infectious Disease, the Second Affiliated Hospital of NMU, Nanjing 210011, China

[Abstract] **Objective:** To screen B cell and T cell antigen epitopes of *Acinetobacter baumannii* protein TonB. **Methods:** B cell epitopes and T cell epitopes were predicted by bioinformatics methods and synthesized. Recombinant pET28a-tonB was cloned and TonB was purified to immunize mice. BALB/c mice were immunized by subcutaneous for 3 times. Five weeks later, serum was collected from each of immunized mice and then negative control were mice used to perform indirect ELISA with synthesized peptides to identify B cell epitopes. Cells of the spleen were separated from every mouse and cultured with each of synthesized peptides respectively, and then cell supernate was collected to detect IFN- γ secretion by double sandwich ELISA for T cell epitopes selection. **Results:** Construction of 4 candidate B cell and T cell epitopes was performed, including PB1, PB2, PB3, PB4, PT1, PT2, PT3, and PT4, respectively. Indirect ELISA showed that peptide PB3, PB4 reacted with immunized mice serum and the A450 nm value was significant higher than that of the negative mice ($P < 0.05$). Double sandwich ELISA showed that IFN- γ concentration that stimulated by peptide PT2, PT3, and PT4 was significant higher than its negative control group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Two B cell epitopes PB3 and PB4, 3 T cell epitopes PT2, PT3, PT4 of TonB were successfully constructed and screened.

[Key words] *Acinetobacter baumannii*; TonB antigen; epitopes

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(10): 1345-1349]

鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*, *A.b*) 是一种非发酵型革兰阴性杆菌, 属于条件致病菌, 广

泛存在于自然界中, 由于对湿热、紫外线和化学消毒剂有较强的抵抗力, 使其成为医院获得性感染及免疫缺陷患者的重要致病菌之一^[1]。据美国国家医院感染监测系统资料显示, *A.b* 经呼吸道感染后 30 d 内的病死率高达 49%^[2]。近年来, 随着抗菌药物的广泛使用, *A.b* 多耐药 (multidrug resistant, MDR) 及泛

[基金项目] 国家自然科学基金 (81670013)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: zhu1635253@163.com

耐药 (pandrug resistant, PDR) 菌株的检出率呈逐年上升趋势,使得 *A.b* 感染成为临床抗感染治疗中的一大难题^[3]。因此,亟需寻求包括疫苗在内的新型干预措施来对抗这种细菌。

TonB 蛋白是 *A.b* 细胞内的一种重要周质蛋白,主要参与细菌能量转运、铁离子等微量元素的获取以及细菌黏附等重要生命活动^[4-5]。TonB 蛋白的结构包括起固定作用的氨基端结构域、柔韧可变的脯氨酸富集的中间结构域及与 TonB 依赖性转运体 (Ton B-dependent transporters, TBDTs) 相互作用的羧基端结构域^[6],这一特殊的蛋白高级结构使得有关 TonB 蛋白发挥免疫效应结构域的研究引起广泛关注。

本研究运用生物信息学方法,对该蛋白抗原的 B 细胞及 T 细胞表位进行预测与筛选,并在小鼠体内进行免疫验证,报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料

鲍曼不动杆菌标准菌株为本室保存,限制性内切酶、*Taq* 酶、dNTP、T4 连接酶等购自美国 Biolab 公司; Ni-NTA Agarose 为德国 Novagen 公司产品; HRP 标记山羊抗鼠 IgG 购自美国 Sigma 公司。小鼠抗体检测试剂及小鼠 γ -干扰素 (IFN- γ) 预包被 ELISA 试剂盒购自美国 R & D 公司,实验用 SPF 级别 BALB/c 雌性小鼠,6~8 周龄,购自南京医科大学实验动物中心,其使用通过相关伦理委员会审查符合要求。

1.2 方法

1.2.1 TonB 蛋白抗原表位的预测

B 细胞表位的预测使用 OptimumAntigen™ Design Tool 软件,该软件由金斯瑞生物科技有限公司开发研制。将 TonB 蛋白氨基酸序列输入 OptimumAntigen™ Design Tool 网站工作区 (<http://www.genscript.com/antigen-design.html>),该软件以蛋白的物理化学性质为基础,根据 B 细胞表位的二级结构、表面可及性、亲水性、柔韧性、抗原指数等特性综合分析后筛选出 4 个 B 细胞候选表位。预测 T 细胞表位时采用 IEDB (Immune Epitope Database Analysis Resource) 数据库针对小鼠 MHC-II 类基因的 A、E 两个亚区进行分析预测^[9],将 TonB 蛋白氨基酸序列输入 IEDB 网站工作区 (<http://www.iedb.org/>) 后选择种属 mouse,基因型为 H2-IAb、H2-IAd、H2-IEd,预测其 MHC-II 类分子结合肽,选取积分较高且不重叠的 4 个序列作为 T 细胞候选表位。

1.2.2 重组质粒 pET-28a-tonB 的构建、表达、纯化及定量

根据编码 TonB 蛋白的 tonB 基因序列设计特异性 PCR 引物,上游引物:5'-TAGCATGACTGGTGGA-CAG-3',下游引物:5'-GGTGGTGGTGGTGGTGCTC-3'。PCR 的反应条件为:96 °C 预变性 3 min;95 °C 变性 10 s、58 °C 退火 10 s、72 °C 延伸 20 s,共 30 个循环,72 °C 延伸 30 min。以限制性核酸内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III 分别双切目的基因和空质粒,连接后转化感受态细胞 *E.coli* BL21 (DE3),挑取菌落,提取质粒,酶切鉴定。用 IPTG 诱导细菌表达重组蛋白,使用 10% SDS-PAGE 分析目的蛋白的表达,以 Ni-NTA 亲和层析法提纯目的重组蛋白,去除重组蛋白溶液中的内毒素后用二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白定量试剂盒测定 TonB 蛋白浓度。

1.2.3 表位多肽的合成

候选表位肽段由南京金斯瑞生物科技有限公司人工合成,纯度达 85% 以上,因预测所得表位多肽较短,为确保表位多肽能与 ELISA 平板包被结合,在每条表位短肽的 C 端耦合牛血清白蛋白 (albumin from bovine serum, BSA) 分子。

1.2.4 纯化的 TonB 蛋白免疫小鼠

将 6~8 周龄 SPF 级的雌性 BALB/c 小鼠随机分为免疫组和对照组 2 组,每组 6 只。免疫组为 TonB 蛋白 (100 μ g/只) 与等体积弗氏完全佐剂的充分乳化获得溶液 166 μ L,对照组为 PBS 溶液与等体积弗氏完全佐剂的乳化液 166 μ L。分别于小鼠股四头肌和背部进行皮下注射免疫小鼠,隔 2 周免疫 1 次,共免疫 3 次。其中第 3 次免疫,免疫组使用 100 μ g/只 TonB 蛋白溶液与等体积弗氏不完全佐剂乳化,对照组使用等体积 PBS 溶液与等体积弗氏不完全佐剂充分乳化。

1.2.5 间接 ELISA 法筛选 B 细胞表位

末次免疫 1 周后,摘小鼠眼球取血,分离得到血清,于 -20 °C 冰箱保存待用。分为 TonB 蛋白组、B 细胞表位 (PB1、PB2、PB3、PB4) 组、PBS 组和 BSA 组,其中, TonB 组每孔使用 100 μ g TonB 蛋白溶液包被 ELISA 平板, B 细胞表位组每孔使用 20 μ g 表位肽段溶液,均加入 100 μ L 包被缓冲液, PBS 组每孔使用等体积 PBS 溶液, BSA 组每孔使用等体积 1% BSA 溶液,4 °C 冰箱过夜,洗涤,封闭,再洗涤后加入小鼠血清。TonB 蛋白组加入用 1% BSA 倍比稀释后的免疫组小鼠血清和对照组小鼠血清, B 细胞表位组、PBS 组、BSA 组均加入 1:500 稀释后的免疫组小鼠血清

和对照组小鼠血清。37℃孵育2h,洗涤后加入1:10 000稀释的HRP标记的山羊抗小鼠IgG,之后进行显色、终止,使用酶标仪在450nm读数。

1.2.6 脾脏细胞的分离与培养及双抗体夹心ELISA法筛选T细胞表位

末次免疫1周后处死小鼠,无菌分离小鼠脾脏研磨后得脾脏细胞悬液,12孔板培养细胞,每孔加细胞悬液1mL(2×10^6 个/mL),每组设3个复孔。每只小鼠脾脏细胞分为表位肽刺激组、TonB蛋白刺激组和PBS组。表位肽刺激组每孔加入20μg T细胞表位肽溶液,TonB蛋白刺激组每孔加入100μg TonB蛋白,PBS组每孔加入等体积PBS溶液,将细胞置于温度为37℃,CO₂浓度为5%的培养箱中培养3d后收集细胞上清进行双抗体夹心ELISA检测IFN-γ,根据绘制的标准曲线算得IFN-γ浓度。

1.3 统计学方法

数据采用SPSS 24.0统计学软件进行分析处理,两样本间比较采用*t*检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 生物信息学方法预测TonB蛋白表面抗原表位

使用OptimumAntigen™ Design Tool软件预测TonB蛋白B细胞表位,根据TonB蛋白抗原氨基酸的性质,进一步整合、分析各预测结果后筛选出4条B细胞表位PB1、PB2、PB3、PB4作为候选肽段。预测T细胞表位时采用IEDB软件,根据预测软件评分,筛选出分数Score > 10分的肽段PT1、PT2、PT3、PT4作为候选T细胞表位,其位置及氨基酸序列见表1。

表1 TonB蛋白候选细胞表位位点及序列

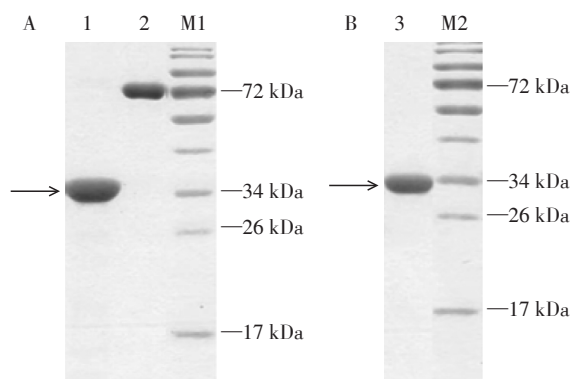
Table 1 Locations and sequence of epitopes of TonB

表位	位置	氨基酸序列
PB1	213~227	IPSLDDKVVRAVRS
PB2	175~182	RLTVSPKD
PB3	133~156	TEKVVEKPKPVVQEAPKAQPAPDP
PB4	83~108	VKEVKVVEKPVTPPKKVEKIQQVKKA
PT1	83~94	VKEVKVVEKPV
PT2	136~147	VVEKPKPVVQE
PT3	176~187	LTVSPKDLQGE
PT4	216~227	LDDKVVRAVRS

2.2 免疫用TonB蛋白的获得

根据TonB蛋白的编码基因tonB设计特异性引物,经PCR扩增后得到分子量在700~1 000 bp间特

异性条带,并将其克隆至pET-28a质粒载体。重组质粒pET-28a-tonB经PCR和双酶切鉴定为阳性,测序结果显示tonB基因ORF完整地按设计插入质粒相应位点,经IPTG诱导后,融合蛋白TonB以可溶性形式表达,纯化后测得的分子量符合目的蛋白分子量大小(图1A),蛋白定量电泳测得TonB蛋白最终浓度为1.2 mg/mL。用Western blot法检测纯化后带有His标签的TonB蛋白表达情况(图1B)。



A: SDS-PAGE; M1: 蛋白Marker; 1: TonB蛋白; 2: BSA标准品; B: Western blot; M2: 蛋白Marker; 3: 带His标签的TonB蛋白; 一抗: 鼠源抗His单克隆抗体。

图1 TonB蛋白的表达和纯化

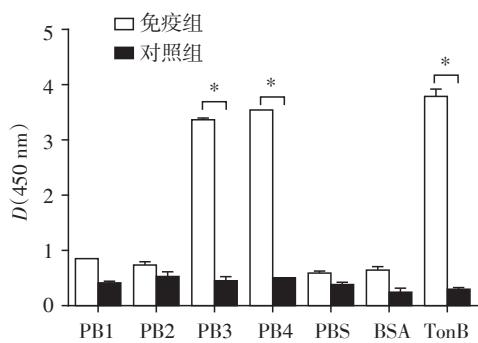
Figure 1 Expression and purification of TonB

2.3 间接ELISA测定小鼠血清抗体效价及B细胞表位筛选结果

TonB可诱导BALB/c小鼠产生特异性抗体,其血清特异性抗体效价为1:32 000。在PB1、PB2、PB3及PB4 4个B细胞候选表位中,PB3、PB4能与免疫组小鼠血清发生抗原抗体反应,其450 nm处吸光度值较相应对照组显著升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$,图2);TonB蛋白组、PBS组及BSA对照组均符合预期设计,确认TonB蛋白抗原的B细胞表位PB3、PB4为有效表位,其氨基酸序列分别为TEKV-VEKPKPVVQEAPKAQPAPDP及VKEVKVVEK-PVTPPKKVEKIQQVKKA。

2.4 双抗体夹心ELISA测定小鼠血清IFN-γ量及T细胞表位筛选

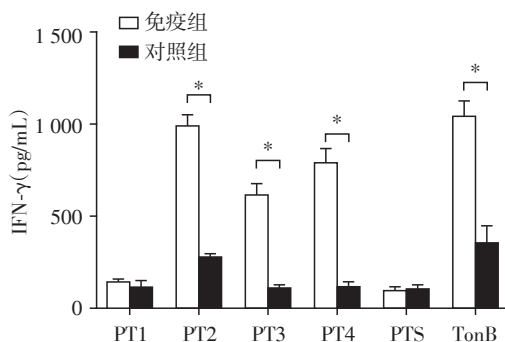
收集每组3孔细胞上清进行ELISA检测,绘制标准曲线后确定每孔细胞上清IFN-γ浓度后取平均值。PT2、PT3、PT4刺激组和TonB蛋白刺激组脾脏细胞产生的IFN-γ浓度平均值分别为:983.45、607.68、783.21及1 042.53 pg/mL,较相应对照组均显著升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$,图3)。初步确认筛选的TonB蛋白抗原的T细胞表位PT2、



PB3、PB4表位肽与免疫组血清发生抗原抗体反应,与对照组相比具有明显差异,差异具有统计学意义(* $P < 0.05$, $n=6$)。TonB为阳性对照, PBS和BSA为阴性对照。

图2 各表位肽段与小鼠血清间接ELISA结果

Figure 2 Indirect ELISA result of each epitopes react with mouse serum



免疫组脾脏细胞上清经PT2、PT3和PT4表位肽体外刺激后IFN- γ 明显升高,与对照组相比具有明显差异,差异具有统计学意义(* $P < 0.05$, $n=6$)。TonB为阳性对照, PBS为阴性对照。

图3 各组小鼠脾脏细胞上清液中IFN- γ 含量

Figure 3 Levels of IFN- γ in the supernatant of splenocyte culture

PT3及PT4为有效表位,其氨基酸序列分别为VVE-KPKPVVQE、LTVSPKDLQGE及LDDKVVRVRS。

3 讨论

*A.b*广泛存在于医院环境中,能够引起包括肺炎、脓毒血症、软组织感染、尿路感染、脑膜炎等多种感染^[7]。近年来,由于新型有效抗菌药物的研发迟滞,针对*A.b*的亚单位疫苗研制成为研究热点。亚单位疫苗,即通过化学分解或有控制性的蛋白质水解方法,提取细菌等病原体的特殊蛋白质结构,筛选出具有免疫活性的片段制成的疫苗^[8]。*A.b*本身存在多种结构蛋白,这些蛋白与*A.b*定植、侵袭宿主细胞密切相关,因此,研究这些结构蛋白免疫原性,对于寻找潜在的临床治疗靶标极具意义。

*A.b*表面的TBDTs负责转运铁离子、维生素B₁₂、

镍离子螯合物和糖类营养物质,这种外膜转运体本身不能利用三磷酸腺苷(ATP),需与TonB系统相互作用方可获取能量^[9]。TonB系统是TonB蛋白与锚定在内膜上的ExbB-ExbD结构组成的多聚体复合物, TonB蛋白是*A.b*胞内的一种周质蛋白,包含251个氨基酸,在各血清型*A.b*中呈高度保守性^[10]。研究表明^[11], TonB蛋白在参与*A.b*重要营养物质的转运过程中至关重要, TonB基因敲除后可使*A.b*在铁限制环境中的生存能力明显降低;此外有研究发现^[12], *A.b*野生株与TonB基因敲除株等量攻击大蜡螟幼虫后,基因敲除组的死亡率降低30%,表明TonB是一种毒性蛋白;另有研究发现^[13], TonB基因敲除株对A549细胞黏附率较野生株下降30%,提示TonB在*A.b*侵袭宿主细胞的过程中起重要作用。TonB蛋白既是参与*A.b*代谢过程的关键蛋白,又具有较强的毒性,若单独以TonB蛋白作为疫苗抗原免疫宿主将会存在一定的危险。因此,针对TonB蛋白特有的高级结构进行抗原表位预测、筛选,在保留蛋白的免疫原性的基础上剔除蛋白的毒性结构,研制*A.b*亚单位疫苗成为优先考虑策略。

本研究利用生物信息学技术分析TonB蛋白的结构特征,并进行TonB蛋白抗原表位预测及免疫原性筛选。OptimumAntigen™ Design Tool是由金斯瑞生物科技有限公司提供的B细胞抗原表位预测软件,是与MacVector™、DNASar™和PC-Gene™等合作开发的一款预测细胞表位的专门软件。每一个抗原表位都经过多数据库筛选,选择具有高度抗原性、表面可及性、亲水性的肽段作为B细胞表位; T细胞表位预测系统IEDB是由美国国家过敏和传染病研究所NIH资助建立的一个免费生物资源数据库,提供包括人类、灵长类、啮齿类等动物相关的抗体和T细胞表位数据,是目前研究T细胞表位数据最齐全的数据库。本研究预测所得B细胞表位中, PB3和PB4能与蛋白免疫组小鼠血清中的抗体特异性结合,表明这两者是TonB蛋白的B细胞表位。双夹心ELISA法检测经蛋白免疫后小鼠脾脏细胞再次被候选T细胞表位刺激后产生的IFN- γ 水平, IFN- γ 是一种水溶性二聚体细胞因子,只由活化T细胞和自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)产生,其水平增高可以作为细胞免疫增强和细胞毒性T细胞活化的标志^[14]。脾脏是机体最大的免疫器官,脾细胞中除淋巴细胞、巨噬细胞外还存在能产生IFN- γ 的NK细胞,但NK细胞数总量在脾细胞中占大约4%^[15]。本实验经TonB蛋白免疫后, BALB/c小鼠脾细胞在

候选T细胞表位刺激下IFN- γ 生成较对照组小鼠成数倍增加,而对照组小鼠的脾细胞用相应的抗原肽刺激所产生的IFN- γ 水平远低于免疫组小鼠的脾细胞,提示经TonB蛋白免疫后小鼠体内产生了对该蛋白敏感的T淋巴细胞群,当候选T细胞表位肽再次刺激脾细胞后,大量处于致敏状态的T淋巴细胞介导了免疫应答,产生高水平的IFN- γ ,这表明筛选的PT2、PT3及PT4是该蛋白的有效T细胞表位。

本研究将计算机表位预测方法应用于研究*A.b*疫苗领域,可以极大降低寻找抗原的盲目性,具有方便、快速与节约成本之优点,但预测方法可能在一定程度上存在假阳性结果,尚需通过经典的免疫学方法进行验证确认。此前,在相关研究中预测并筛选了*A.b*外膜蛋白OMP33-36的B细胞和T细胞的有效抗原表位,本次则选择周质蛋白TonB作为筛选新抗原表位的全长序列,从不同结构角度探讨*A.b*的免疫原性,为今后优化重组该菌的新型DNA疫苗奠定基础,以期为长时间使用多种抗菌药物、入住ICU、中心静脉插管、机械通气等住院的易感人群患者提供有效的免疫保护,从而降低*A.b*的预期感染率。

[参考文献]

- [1] Mortensen BL, Skaar EP. Host-microbe interactions that shape the pathogenesis of *Acinetobacter baumannii* infection[J]. *Cell Microbiol*, 2012, 14(9): 1336-1344
- [2] Harris G, Kuo LR, Lam CK, et al. A mouse model of *Acinetobacter baumannii*-associated pneumonia using a clinically isolated hypervirulent strain[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57(8): 3601-3613
- [3] Chen W. Current advances and challenges in the development of *Acinetobacter* vaccines[J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2015, 11(10): 2495-2500
- [4] Moynie L, Luscher A, Rolo D, et al. Structure and function of the PiuA and PirA siderophore-drug receptors from *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2017, 61(4): e02531-16
- [5] Penwell WF, Arivett BA, Actis LA. The *Acinetobacter baumannii* entA gene located outside the acinetobactin cluster is critical for siderophore production, iron acquisition and virulence[J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e36493
- [6] Noinaj N, Guillier M, Barnard TJ, et al. TonB-dependent transporters: regulation, structure, and function[J]. *Annu Rev Microbiol*, 2010, 64(1): 43-60
- [7] Rumbo C, Tomas M, Fernandez ME, et al. The *Acinetobacter baumannii* Omp33-36 porin is a virulence factor that induces apoptosis and modulates autophagy in human cells[J]. *Infect Immun*, 2014, 82(11): 4666-4680
- [8] Hosseingholi EZ, Rasooli I, Gargari SL. In silico analysis of *Acinetobacter baumannii* phospholipase D as a subunit vaccine candidate[J]. *Acta Biotheor*, 2014, 62(4): 455-478
- [9] Zimblar DL, Penwell WF, Gaddy JA, et al. Iron acquisition functions expressed by the human pathogen *Acinetobacter baumannii*[J]. *Biometals*, 2009, 22(1): 23-32
- [10] Wang X, Zhang Z, Hao Q, et al. Complete genome sequence of *Acinetobacter baumannii* ZW85-1 [J]. *Genome Announc*, 2014, 2(1): e01083-13
- [11] Dorsey CW, Tolmasky ME, Crosa JH, et al. Genetic organization of an *Acinetobacter baumannii* chromosomal region harbouring genes related to siderophore biosynthesis and transport [J]. *Microbiology*, 2003, 149(Pt 5): 1227-1238
- [12] Gaddy JA, Arivett BA, McConnell MJ, et al. Role of acinetobactin-mediated iron acquisition functions in the interaction of *Acinetobacter baumannii* strain ATCC 19606T with human lung epithelial cells, *Galleria mellonella* caterpillars, and mice[J]. *Infect Immun*, 2012, 80(3): 1015-1024
- [13] Zimblar DL, Arivett BA, Beckett AC, et al. Functional features of TonB energy transduction systems of *Acinetobacter baumannii* [J]. *Infect Immun*, 2013, 81(9): 3382-3394
- [14] Xu L, Ding W, Stohl LL, et al. Regulation of T helper cell responses during antigen presentation by norepinephrine-exposed endothelial cells [J]. *Immunology*, 2018, 154(1): 104-121
- [15] Yasmin T, Akter S, Debnath M, et al. In silico proposition to predict cluster of B- and T-cell epitopes for the usefulness of vaccine design from invasive, virulent and membrane associated proteins of *C. jejuni* [J]. *In Silico Pharmacol*, 2016, 4(1): 5

[收稿日期] 2018-02-26