

EBV 编码潜伏膜蛋白 2A 抗原表位的串联表达及其免疫原性分析

曹清¹, 唐小军², 李文杰¹, 熊四平², 毛园³, 熊林⁴, 刘玉⁵, 王长军⁵, 冯振卿², 陈仁杰^{1*}

(¹南京医科大学第二附属医院耳鼻咽喉科, 江苏 南京 210011; ²南京医科大学卫生部抗体技术重点实验室, 江苏 南京 210029; ³江苏省省级机关医院耳鼻咽喉科, 江苏 南京 210024; ⁴南京医科大学第二附属医院病理科, 江苏 南京 210011; ⁵南京军区军事医学研究所, 江苏 南京 210002)

[摘要] 目的: 制备具有免疫原性的 EB 病毒潜伏膜蛋白 2A (latent membrane protein 2A, LMP2A) 的表位串联蛋白并分析其免疫学特性。方法: 用 DNASTAR 软件分析 LMP2A 的抗原表位, 将预测的免疫原性较强的两个表位通过基因合成串联在一起, 克隆到原核表达载体 pET28a 中, 经大肠杆菌 BL21 表达并纯化。制备的含 LMP2A 表位重组蛋白经 SDS-PAGE、Western blot 鉴定后, 免疫小鼠制备多克隆抗体, 以 ELISA 检测抗体的效价, 免疫组织化学法检测该抗体对天然 LMP2A 的特异性。结果: 通过原核表达与纯化, 获得高纯度的表位融合蛋白, 经小鼠免疫并制备效价高且特异性的小鼠抗 LMP2A 的多克隆抗体, 该抗体可用于 ELISA 和免疫组织化学分析。结论: 本研究制备的表位融合蛋白, 具有天然抗原的免疫原性, 可制备能特异性识别天然 LMP2A 分子的多克隆抗体, 为利用表位融合蛋白筛选全人源基因工程抗体奠定了基础。

[关键词] 鼻咽癌; EB 病毒; 潜伏膜蛋白 2A; 多克隆抗体; 重组基因

[中图分类号] R392.11

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)05-593-05

doi:10.7655/NYDXBNS20130506

Preparation and immunogenicity characteristics analysis of a epitope fusion protein of Epstein-Bar virus encoded latent membrane protein 2A

Cao Qing¹, Tang Xiaojun², Li Wenjie¹, Xiong Siping², Mao Yuan³, Xiong Lin⁴, Liu Yu⁵, Wang Changjun⁵, Feng Zhenqing², Chen Renjie^{1*}

(¹Department of Otolaryngology, the Second Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210011; ²Key Laboratory of Antibody Technique of Ministry of Health, NJMU, Nanjing 210029; ³Department of Otolaryngology, Provincial Authority Hospital of Jiangsu Province, Nanjing 210024; ⁴Department of Pathology, the Second Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210011; ⁵PLA Nanjing Military Area Command, Nanjing 210002, China)

[Abstract] Objective: To prepare a immunogenic epitope tandem of latent membrane protein 2A (LMP2A) of Epstein-Barr virus and analyze its characteristics of immunology. **Methods:** LMP2A epitopes were analyzed by using DNASTAR software, and two immunogenic epitopes were selected due to stronger immunogenicity. The genes of these two epitopes were integrated through gene synthesis, and then cloned into prokaryotic expression vector pET28a. The recombinant epitopes were expressed and purified by *E.coli* BL21, and then the protein was utilized to immunize mouse to prepare anti-epitope fusion protein polyclonal antibody after the analysis of SDS-PAGE and Western blot assay. The titer of the antibody was assessed by ELISA and the immunohistochemical experiment was performed to test the specificity of the polyclonal antibody for natural LAMP2A. **Results:** Through prokaryotic expression and purification, high purity fusion protein was obtained. By mouse immunization, anti-LMP2A polyclonal antibody of high titer and specificity was prepared, which can be applied to ELISA and immunohistochemical analysis. **Conclusion:** An epitope fusion protein, which shares the natural antigen immunogenicity, can be used to prepare the polyclonal antibody specific for LMP2A. This study has laid a solid foundation for screening whole humanized genetic engineering antibody by epitope fusion protein.

[基金项目] 南京医科大学科技发展基金重点项目(NY2005 D2D13); 江苏省自然科学基金(BK2008481); 江苏省科技厅社会发展支撑计划项目(BE2009152)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: renjiechenent@yahoo.com.cn

[Key words] nasopharyngeal carcinoma; Epstein-Barr virus; latent membrane protein 2A; polyclonal antibody; recombinant gene

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(5): 593-597]

鼻咽癌是来源于鼻咽上皮的高度恶性肿瘤,肿瘤进展极易侵犯颅底等重要结构,并较早发生颈部淋巴结转移和远处转移。在初诊的患者中,Ⅲ、Ⅳ期鼻咽癌约占总病例的70%左右。放疗在过去很长一段时间都是鼻咽癌的标准治疗方法,但单纯放疗鼻咽癌的5年生存率仅50%左右,而晚期鼻咽癌(Ⅲ、Ⅳ期)的5年生存率更低,约10%~40%,治疗失败的主要原因是局部复发和远处转移^[1]。鼻咽癌在世界的某些地区,例如东南亚和非洲发病率较高,主要是由于环境、遗传因素和EB病毒感染等综合因素的影响,其中EB病毒的潜伏感染在鼻咽癌的发生发展的过程中扮演着非常重要的角色。

EB病毒感染存在于所有未分化鼻咽癌患者中,并且以潜伏感染存在,主要表达潜伏膜蛋白1(latent membrane protein 1, LMP1)、潜伏膜蛋白2(latent membrane protein 2, LMP2)等^[2-4]。检测到有潜伏膜蛋白2A(latent membrane protein 2A, LMP2A)表达的鼻咽癌患者的生存率相对于其他鼻咽癌患者更低^[5]。研究表明LMP2A能够增强鼻咽癌细胞的转移侵袭能力,诱导鼻咽癌细胞由上皮细胞向间质细胞转化,并且大大上调侧群细胞^[6],但是具体作用机制未明。为了更深入研究LMP2A的功能,制备特异性的抗LMP2A基因工程抗体,本研究设计了LMP2A的双表位融合蛋白,并构建了原核表达质粒,同时利用表达的重组蛋白制备小鼠的多克隆抗体,通过ELISA分析和免疫组织化学检测,分析其免疫学特性。

1 材料与方法

1.1 材料

原核表达质粒pET28a、大肠杆菌BL21由南京医科大学卫生部抗体重点实验室保存。BALB/c小鼠(6~8周龄)由扬州大学动物中心提供。弗氏完全佐剂、不完全佐剂购自美国Gibco公司。大鼠抗LMP2A抗体购自美国AbD Serotec公司,HRP标记的抗大鼠的二抗购自美国Jackson Immuno Research公司。纯化所用层析柱及填料购自美国GE公司, TMB底物和硝酸纤维素膜购自美国Pierce公司, SP免疫组化试剂盒购自上海泽迈生物技术有限公司。鼻咽癌患者肿瘤组织石蜡标本由南京医科大学第二

附属医院病理科提供。

1.2 方法

1.2.1 表位融合蛋白的设计及表达载体的构建

根据Genebank中的LMP2A基因序列和文献报道,选择LMP2A的表位基因序列。LMP2A第2胞外区基因为:5'-TGTCTGACGT-GGCGTATTGAAGACCCGCGTTTTAACAGCCTGCTGTTTGGCCTGCTGGCAGCAGCCGGT-3', LMP2A第5胞外区基因为:5'-GGCGGCAGCATTCTGCAAACCAACTTCAAAGCC-TGAGCAGCACCGAATTCATCCCCAACCTGTTT-3'。优化表位融合蛋白的基因序列,设计LMP2A第2、5胞外区重复串联基因,分别在5'端和3'端设置酶切位点BamHI和XhoI,克隆于pET28a表达载体中,构建LMP2A表位融合蛋白的表达载体。

1.2.2 表位融合蛋白LMP2A的表达和纯化

重组表达载体经测序确认正确后转化至大肠杆菌BL21,选择单克隆菌落,过夜培养后经IPTG诱导表达,详细方法参照文献^[7]进行。表达产物经镍亲和层析柱纯化,复性后SDS-PAGE电泳、考马斯亮蓝染色后脱色。

1.2.3 重组表位融合蛋白的鉴定

用Western blot鉴定纯化的重组LMP2A表位融合蛋白,将纯化的重组表位融合蛋白和未转质粒的BL21空菌进行SDS-PAGE后转移至硝酸纤维素膜上,5%的脱脂奶粉封闭,37℃孵育2h;加入1:2 000稀释的大鼠抗LMP2A抗体,37℃孵育1h;PBST洗3次,加入HRP标记的抗大鼠IgG抗体孵育,化学发光方法显色。

1.2.4 重组表位融合蛋白的免疫原性分析

用纯化的LMP2A重组表位融合蛋白作为抗原免疫小鼠。初次免疫每只小鼠用30~50 μg抗原加弗氏完全佐剂进行背部皮下多点和后脚掌皮下注射。初次免疫4周后,进行第1次加强免疫,每只小鼠用30~50 μg抗原加弗氏不完全佐剂进行背部皮下多点注射。以后每隔2周进行1次加强免疫,共4次。

1.2.5 抗LMP2A表位融合蛋白多克隆抗体的特性分析

ELISA检测抗血清效价:将LMP2A抗原稀释至1.0 mg/L包被酶标板,每孔100 μl,4℃过夜;5%的脱脂奶粉封闭过夜;洗涤3次后,以不同稀释度的抗

血清作为一抗,未经免疫的正常小鼠作为阴性对照,每孔 100 μ l,37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h;PBST 洗涤 3 次后每孔入 1:2 000 稀释的 HRP-标记的兔抗小鼠 IgG 100 μ l,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h;PBST 洗涤 6 次,TMB 显色,用酶标仪测定 450 nm 的吸光度值。

免疫组织化学分析抗体的特异性:患者肿瘤组织切片标本经 40 g/L 中性甲醛固定、石蜡包埋、制成 3~4 μ m 切片,组织切片脱蜡至水,枸橼酸钠缓冲液微波处理 15 min;3% 双氧水室温 10 min;正常小牛血清室温封闭 30 min;加 1:500 稀释的小鼠抗血清,4 $^{\circ}$ C 过夜,同时设立大鼠抗 LMP2A 抗体为一抗的阳性对照;然后加生物素化二抗工作液;洗涤后加 HRP 标记链霉亲和素工作液;DAB 显色,常规脱水、透明及中性树脂封片,阳性染色为棕黄色。

2 结果

2.1 核酸序列分析

经核酸序列分析证实,LMP2A 第 2、5 胞外区重复串联的基因序列为:5'-GGATCCTGTCTGACGTGGCGTATTGAAGACCCGCCGTTAACAGCCTGCTG-TTTGCCCTGCTGGCAGCAGCCGGTGGCGGCAGCA-TTCTGCAAACCAACTTCAAAAGCCTGAGCAGCAC-CGAATTCATCCCGAACCTGTTTTGCCTGACCTGGC-GCATCGAAGATCCGCCATTCAATAGCCTGCTGTTC-GCGCTGCTGGCCGCAGCAGGTGGTGGTAGCATCC-TGCAGACCAATTTCAAGAGCCTGAGCAGCACGGA-GTTCATTCCAAATCTGTTTTGACTCGAG-3',该序列与设计的目的蛋白基因序列一致。

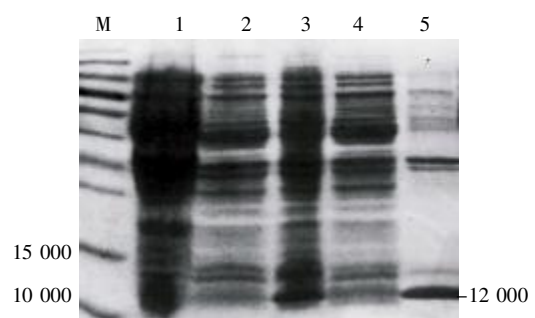
2.2 表位融合蛋白在大肠杆菌中的表达和纯化

阳性克隆经 IPTG 诱导表达,培养 8 h 后的细菌经处理后进行 10% SDS-PAGE 分析。结果显示,在相应区域出现一条蛋白条带,与预期大小相吻合,约为 12 000,而在未转质粒 BL21 空菌处未出现明显条带,表明插入的外源基因在大肠杆菌中表达成功(图 1),但融合蛋白大部分为包涵体,存在于超声沉淀中,通过蛋白变性和镍亲和层析纯化,复性后再经 SDS-PAGE 鉴定,表明纯化后的重组蛋白纯度较高(图 2)。

2.3 表位融合蛋白 LMP2A 的特性分析

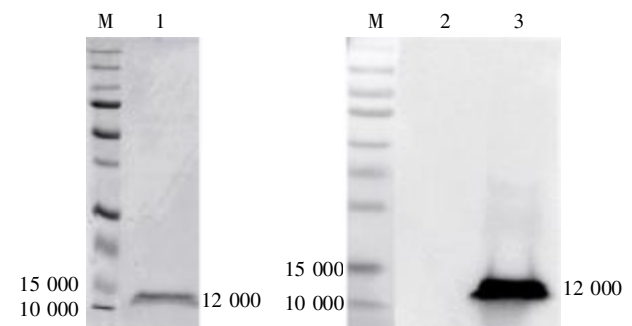
用 Western blot 方法检测复性后 LMP2A 的抗原性。结果显示,复性后的 LMP2A 泳道约 12 000 处有明显的显色条带,而对照泳道未见相应条带。结果表明,纯化复性后的表位融合蛋白具有 LMP2A 天然蛋白的免疫特性(图 2)。

2.4 多克隆抗体活性的鉴定



M:Marker;1:BL21 空菌;2:转入重组质粒未诱导的 BL21;3:转入重组质粒的 BL21 经 IPTG 诱导后的全菌;4:诱导后重组菌的超声上清;5:诱导后重组菌的超声沉淀。

图 1 LMP2A 表位融合蛋白在大肠杆菌 BL21 中的表达
Figure 1 SDS-PAGE assay showing expression of LMP2A in *E.coli* BL21



M:Marker;1:镍柱纯化的 LMP2A 表位融合蛋白;2:BL21 空菌;3:纯化复性后的 LMP2A 表位融合蛋白。

图 2 LMP2A 表位融合蛋白纯化和鉴定结果
Figure 2 SDS-PAGE assay of purified recombinant protein LMP2A and Western blot analysis for identification of recombinant protein LMP2A

用表达的融合蛋白免疫小鼠制备的多克隆抗体,经间接 ELISA 分析,结果显示,吸光度值与抗体浓度相关,当抗体稀释至 1:256 000 时,其吸光度值小于 0.2,其效价达 1:256 000(图 3)。免疫组织化学分析结果显示,该抗体与商品化的大鼠抗 LMP2A 抗体具有相同的特性,能够识别鼻咽癌患者肿瘤组织切片中的 LMP2A 蛋白(图 4)。以上结果表明,本研究所制备的多克隆抗体有较高的特异性,同时证实实验用所制备的表位融合蛋白具有天然的免疫原性,可以用于人源抗 LMP2A 的基因工程抗体的制备。

3 讨论

EB 病毒编码的潜伏膜蛋白在鼻咽上皮细胞转化及鼻咽癌的形成中起着重要作用。据研究表明只有 65% 的 EB 病毒感染的鼻咽癌患者可检测到

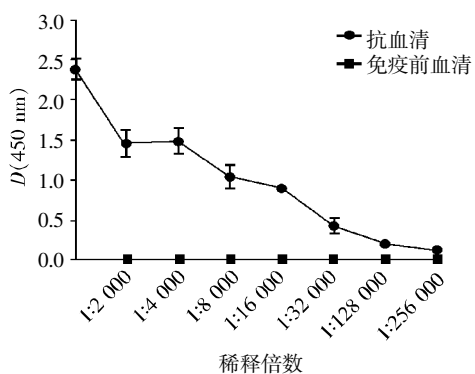
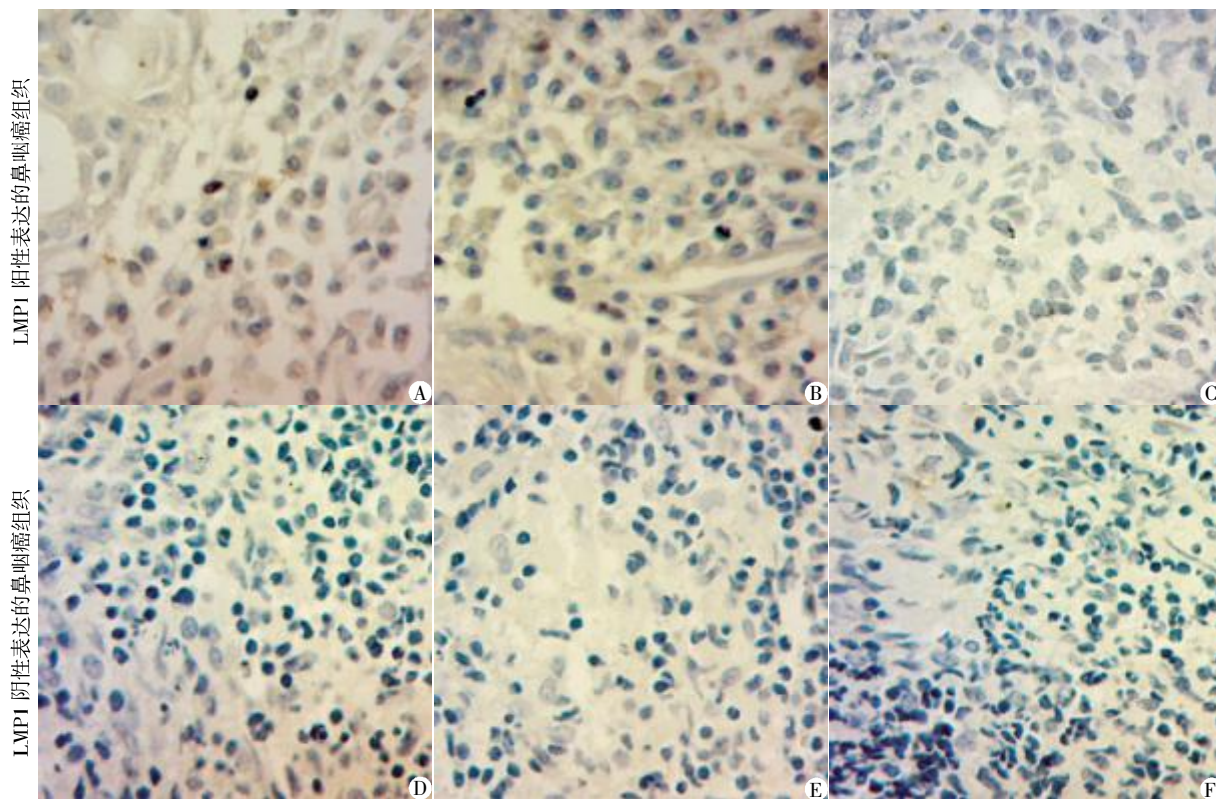


图3 纯化后抗体的效价检测

Figure 3 The titer of the anti-LMP2A antibody analyzed by ELISA

LMP1 mRNA 表达阳性, 其中只有 35% 的患者可检测到 LMP1 蛋白表达。而 95% 的 EB 病毒感染的鼻咽癌患者可检测到 LMP2A mRNA 的表达, 且其中 50% 的患者可检测到 LMP2A 蛋白阳性表达。因此相比 LMP1, LMP2A 在鼻咽癌中的作用可能更大^[8-10]。LMP2A 分子量为 54 000, 由 496 个氨基酸组成。它是磷酸化的膜蛋白, 位于胞浆内的 N 端有 8 个酪氨酸。LMP2A 介导的 IL-6 抑制是 NF-kappaB 抑制的结果, 提示 LMP2A 通过调节癌细胞中 STAT 和 NF-kappaB 两个关键转录因子途径, 在 EB 病毒相关肿瘤的发病机制中发挥重要作用^[11-12]。同时最新的报道显示, LMP2A 参与了上皮细胞向间质细胞转化的



A: 阳性对照(LMP1 阳性表达的鼻咽癌组织, 一抗为商品化大鼠抗 LMP2A 抗体); B: 实验组(同一患者的鼻咽癌组织, 一抗为小鼠的 LMP2A 抗血清); C: 阴性对照(同一患者的鼻咽癌组织, 一抗为未免疫的正常小鼠血清); D: 阴性对照(LMP1 阴性表达的鼻咽癌组织, 一抗为商品化大鼠抗 LMP2A 抗体); E: 实验组(同一患者的鼻咽癌组织, 一抗为小鼠的 LMP2A 抗血清); F: 阴性对照(同一患者的鼻咽癌组织, 一抗为未免疫的正常小鼠血清)。

图4 小鼠抗 LMP2A 多克隆抗体的免疫组织化学分析(SP 法, ×400)

Figure 4 Analysis of specificity of mouse polyclonal antibody against LMP2A by immunohistochemistry (SP method, ×400)

过程, 大大上调其侧群细胞, 提示 LMP2A 可能参与鼻咽癌细胞的转移和复发^[6], 但其具体作用机制暂不清楚。

制备特异性抗体对疾病的病理研究、诊断和治疗都有重要意义^[13]。本研究为了获得具有较强免疫原性的 EB 病毒 LMP2A 的表位融合蛋白, 运用

DNASTAR 软件分析并预测免疫原性较强的 LMP2A 第 2 和第 5 两个表位。通过基因工程方法制备 LMP2A 双表位融合基因, 原核表达后, 经变性复性纯化获得较高纯度的 LMP2A 双表位融合蛋白, 免疫 BALB/c 小鼠获得抗 LMP2A 的多克隆抗体。ELISA 和免疫组化验证了制备的多克隆抗体具有较高的效

价和特异性。表明通过此方法制备 LMP2A 表位融合蛋白是可行的,同时也证明了制备的该蛋白具有天然的免疫原性可用于全人源基因工程抗体的制备和血清学检查,而且制备的小鼠抗 LMP2A 多克隆抗体可以用于免疫组织化学检测 LMP2A 在鼻咽癌患者肿瘤组织中的表达。

[参考文献]

[1] 王雪峰,付 宁,曹建国. 鼻咽癌的临床进展[J]. 江西中医药,2010,41(3):78-80

[2] Lin JC,Cherng JM,Lin HJ,et al. Amino acid changes in functional domains of latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma of southern China and Taiwan;prevalence of an HLA A2-restricted' epitope-loss variant' [J]. J Gen Virol,2004,85(Pt 7): 2023-2034

[3] 徐丽娜,郑 军,李 姣,等. 高通量组织微阵列研究 Wnt5a 和 LMP1 在鼻咽癌癌变中的作用[J]. 中南大学学报:医学版,2012,37(9):865-870

[4] Dawson CW,Port RJ,Young LS. The role of the EBV-encoded latent membrane proteins LMP1 and LMP2 in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma (NPC) [J]. Semin Cancer Biol,2012,22(2):144-153

[5] Pegtel DM,Subramanian A,Sheen TS,et al. Epstein-Barr-virus-encoded LMP2A induces primary epithelial cell migration and invasion;possible role in nasopharyngeal carcinoma metastasis[J]. J Virol,2005,79 (24):15430-15442

[6] Kong QL,Hu LJ,Cao JY,et al. Epstein-Barr virus-encoded LMP2A induces an epithelial-mesenchymal transition and increases the number of side population stem-like

cancer cells in nasopharyngeal carcinoma[J]. PLoS Pathog,2010,6(6):e1000940

[7] 温 爽,刘 媛,王家伟,等. 抗伊维菌素 scFv 蛋白质的变复性及纯化[J]. 江苏农业学报,2011,27(3):682-684

[8] Brooks L,Yao QY,Rickinson AB,et al. Epstein-Barr virus latent gene transcription in nasopharyngeal carcinoma cells;coexpression of EBNA1,LMP1,and LMP2 transcripts [J]. J Virol,1992,66(5):2689-2697

[9] Niedobitek G,Young LS,Sam CK,et al. Expression of Epstein-Barr virus genes and of lymphocyte activation molecules in undifferentiated nasopharyngeal carcinomas [J]. Am J Pathol,1992,140(4):879-887

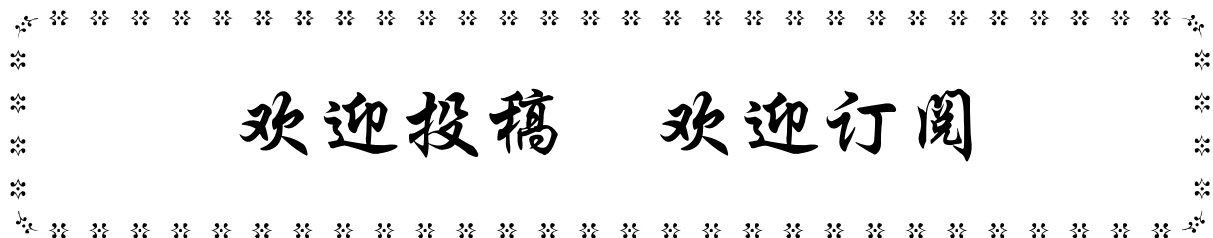
[10] Heussinger N,Buttner M,Ott G,et al. Expression of the Epstein-Barr virus (EBV)-encoded latent membrane protein 2A(LMP2A) in EBV-associated nasopharyngeal carcinoma[J]. J Pathol,2004,203(2):696-699

[11] Buettner M,Heussinger N,Niedobitek G. Expression of Epstein-Barr virus(EBV)-encoded latent membrane proteins and STAT3 activation in nasopharyngeal carcinoma [J]. Virchows Arch,2006,449(5):513-519

[12] Stewart S,Dawson CW,Takada K,et al. Epstein-Barr virus-encoded LMP2A regulates viral and cellular gene expression by modulation of the NF-kappaB transcription factor pathway[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2004,101 (44):15730-15735

[13] 韩海勃,蓝林祥,张志谦,等. 小鼠抗人 Myosin+Va 多克隆抗体的制备和鉴定[J]. 细胞与免疫分子学杂志,2009,25(5):451-453

[收稿日期] 2013-01-06



欢迎投稿 欢迎订阅