

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C12Q 1/00 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200410033282.1

[45] 授权公告日 2006年3月29日

[11] 授权公告号 CN 1247795C

[22] 申请日 2004.4.14

[21] 申请号 200410033282.1

[71] 专利权人 厦门大学

地址 361005 福建省厦门市思明南路422号

[72] 发明人 彭宣宪 徐常新 彭博 王三英

审查员 孙春梅

[74] 专利代理机构 厦门南强之路专利事务所

代理人 马应森

权利要求书1页 说明书6页 附图2页

[54] 发明名称

微生物交叉抗原的筛选与鉴定方法

[57] 摘要

微生物交叉抗原的筛选与鉴定方法，涉及一种高通量筛选和鉴定微生物交叉抗原的方法。用双向电泳法分离微生物蛋白质，再免疫转印，多种抗血清作为第一抗体，酶标抗体为第二抗体，显色后检查其阳性；分析免疫原的交叉程度和范围；免疫原的定性，确定抗原的蛋白质种类。建立了一种采用多种抗血清作为第一抗体的免疫蛋白质组学技术，用于高通量筛选具有交叉免疫原性的蛋白质以作为多价疫苗的候选靶位。根据免疫原的交叉程度和范围，可以确定其作为交叉免疫原的可能性及其作用范围。可迅速确定某种微生物的具有交叉免疫原性的全部蛋白质，高效、快速、经济、实用。其方法具有普遍性，不仅可用于细菌，而且还可用于真菌和病毒等微生物交叉抗原的鉴定。

1、微生物交叉抗原的筛选与鉴定方法，其特征在于其步骤如下：

1) 用双向电泳法分离微生物蛋白质：将微生物收集后，按质量比微生物：超声缓冲液=1：2~4 加入超声缓冲液，超声波破碎，然后进行双向电泳，超声缓冲液选自 Tris-HCl 或 乙二胺四醋酸盐。

2) 双向电泳后，进行免疫转印，分别采用多种抗血清作为第一抗体，酶标抗体为第二抗体，用联苯二胺或电化学发光试剂显色，当作为第一抗体的抗血清有 2 种以上为阳性时，该点即为具有交叉免疫原性的蛋白质；

3) 再分析这些免疫原的交叉程度和范围，阳性抗血清越多，交叉反应范围越大；阳性显色越强，交叉反应程度越好；

4) 免疫原的定性：取出具有交叉免疫原性的全部蛋白质，按常规质谱样品处理方法进行样品制备，然后进行质谱和生物信息分析，以确定抗原的蛋白质种类。

2、如权利要求 1 所述的微生物交叉抗原的筛选与鉴定方法，其特征在于所说的微生物为细菌，真菌，病毒。

3、如权利要求 1 所述的微生物交叉抗原的筛选与鉴定方法，其特征在于超声破碎时每次 10~20 秒，间隔 20~40 秒，超声 2~4 次。

4、如权利要求 1 所述的微生物交叉抗原的筛选与鉴定方法，其特征在于所说的多种抗血清选用抗同种微生物和异种微生物的特异性抗血清。

微生物交叉抗原的筛选与鉴定方法

技术领域

本发明涉及一种高通量筛选和鉴定微生物交叉抗原的方法。

背景技术

业已证明，采用疫苗接种是预防微生物性疾病的有效途径。由于病原菌较多，对所有病原菌逐一进行接种具有一定困难。这在养殖动物微生物性疾病的预防上，表现得极为突出。因为在实际生产中，如针对养殖动物的所有常见致病菌逐一进行免疫在经济上和操作上是不可行的。因此，研制新型疫苗，以控制有关疾病，特别是养殖动物病害是一项紧迫任务。有学者发现不同细菌间的脂多糖(LPS)和核心抗原具有交叉保护作用。新近，我们发现嗜水气单胞菌和温和气单胞菌之间具有明显的交叉保护作用，并采用蛋白质组学结合免疫保护攻毒技术从嗜水气单胞菌的外膜蛋白质中发现了2个多价疫苗靶位。这些结果说明，细菌间存在交叉中和原性基因。因此，研制基因工程多价疫苗将成为今后疫苗发展的最重要方面。多价疫苗靶位来自具有交叉反应的免疫原，但采用常规方法从全部微生物蛋白质中鉴定所有具有交叉免疫原性的蛋白质十分困难。目前对交叉免疫原的发现往往是从一种偶然观察到的交叉免疫现象中认定，或者是对单个基因的确证，因此，效率不高。蛋白质组学(proteomics)是一种高通量筛选的技术，是功能基因组研究的重要平台，通过由蛋白质组学与免疫印迹(Western blotting)技术相结合而发展起来的免疫蛋白质组学(immunoproteomics)技术，已在患者血清中鉴定了白色链球菌(*Candida albicans*)和砂眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*)的免疫原性蛋白质。这些免疫性抗原可作为监测疾病进展的一种指标，将成为研制新疫苗的对象，有助于摆脱传统疫苗研制的束缚，加快新疫苗的研制。但现有的免疫蛋白质组学技术仅能确定具有免疫原性的蛋白质，而无法确定该蛋白质是否具有交叉免疫原性。

发明内容

本发明旨在提供一种高通量筛选和鉴定微生物交叉抗原的方法，其技术方案是利用双向电泳(2-DE)技术使微生物蛋白质展示在一个平面上，再采用多种抗血清(同种抗血清和异种抗血清)的免疫蛋白质组学技术，确定具有交叉免疫原性的蛋白质，最后采用质谱技术分析和鉴定这些免疫原。

本发明所说的微生物交叉抗原的筛选和鉴定方法的具体步骤如下：

1) 用双向电泳法分离微生物蛋白质：将微生物收集后，按质量比微生物：超声缓冲液=1：2~4 加入超声缓冲液，超声波破碎，然后进行双向电泳。

2) 双向电泳后，进行免疫转印，分别采用多种抗血清作为第一抗体，酶标抗体为第二抗体，用联苯二胺(DAB)或电化学发光试剂(ECL)显色，当作为第一抗体的抗血清有2种以上为阳性时，该点即为具有交叉免疫原性的蛋白质。

3) 再分析这些免疫原的交叉程度和范围，阳性抗血清越多，交叉反应范围越大；阳性显色越强，交叉反应程度越好。

4) 免疫原的定性：取出具有交叉免疫原性的全部蛋白质，按常规质谱样品处理方法进行样品制备，然后进行质谱和生物信息分析，以确定抗原的蛋白质种类。

所说的微生物为细菌，真菌，病毒。

所说的超声缓冲液可选用 Tris-HCl 或乙二胺四醋酸盐(EDTA)等。

超声破碎时所采用的输出功率、时间、次数和时间间隔等可按研究对象进行调整，一般可采用每次 10~20 秒，间隔 20~40 秒，超声 2~4 次。

所说的多种抗血清选用抗同种微生物和异种微生物的特异性抗血清。

本发明先利用双向电泳技术使细菌或病毒蛋白质展示在一个平面上，再采用同种和异种血清的 Western blotting 以确定具有免疫原性的蛋白质，最后利用质谱技术和生物信息分析确定这些交叉免疫原性蛋白质的种类。从而建立了一种采用多种抗血清作为第一抗体的免疫蛋白质组学技术，用于高通量筛选具有交叉免疫原性的蛋白质以作为多价疫苗的候选靶位。根据免疫原的交叉程度和范围，可以确定其作为交叉免疫原的可能性及其作用范围。本发明可迅速确定某种微生物的具有交叉免疫原性的全部蛋白质，从而达到高效、快速、经济、实用的优选交叉免疫原的目的。本发明能够高通量筛选具有交叉原性的疫苗候选位点，为确定作为多价疫苗靶位的基因奠定了坚实基础，提高了制备多价疫苗靶点的效率。由于所有微生物作为抗原免疫动物后，机体均会产生针对其抗原的特异性抗体，这些抗体均可以作为第一抗体进行 Western blotting 试验，用于筛选交叉免疫原。故本发明的原理与方法具有普遍性，不仅可以用于细菌，而且还可以用于真菌和病毒等微生物交叉抗原的鉴定。

本发明进一步发展了免疫蛋白质组学技术，即建立一种采用多种抗血清作为第一抗体的免疫蛋白质组学技术，从而可以确定与一种以上抗血清发生免疫反应的蛋白质。由于这一设计是基于高通量筛选的蛋白质组学技术，故不仅可以快速确定某种微生物中所具有的交叉免疫原，而且可以得知这些免疫原的交叉范围。根据这些免疫原的交叉程度和范围，

可以确定作为多价疫苗靶位的可能性和作用范围。

附图说明

图1为副溶血弧菌的双向电泳及其自身和异种抗血清的免疫转印结果。其中，A、副溶血弧菌外膜蛋白质的2-DE图谱；B、副溶血弧菌抗血清与副溶血弧菌外膜蛋白质的2-DE Western-blot结果；C、嗜水气单胞菌抗血清与副溶血弧菌外膜蛋白质的2-DE Western-blot结果；D、河弧菌抗血清与副溶血弧菌外膜蛋白质的2-DE Western-blot结果；E、溶藻弧菌抗血清与副溶血弧菌外膜的2-DE Western-blot结果。

图2为大肠杆菌的2-DE及其自身和异种抗血清的Western blotting结果。其中，A、大肠杆菌外膜蛋白质的2-DE图谱；B、温和气单胞菌抗血清与大肠杆菌外膜蛋白质的2-DE Western-blot结果；C、大肠杆菌抗血清与大肠杆菌外膜蛋白质的2-DE Western-blot结果；D、副溶血弧菌抗血清与大肠杆菌外膜蛋白质的2-DE Western-blot结果；E、河弧菌抗血清与大肠杆菌外膜蛋白质的2-DE Western-blot结果。

具体实施方式

以下实施例将结合附图对本发明的工艺步骤及其突出效果作进一步说明。

实施例1

1、细菌培养、计数、收集和破碎：微生物采用副溶血弧菌，为本室保存菌种。将副溶血弧菌接种于LB培养基，28℃摇床培养18h，作为种子菌。而后以1:50（菌液：培养基）（体积比）比例接种于上述同种培养基，28℃摇床培养18h。培养结束后，取2mL菌液进行平板菌落计数。其余培养液于4000rpm离心10min，收集菌体，用生理盐水洗涤菌体3次，称菌体重，再用以1:3（质量比）的比例加入超声破碎缓冲液（50mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA）。用超声细胞破碎仪超声破碎。超声破碎采用输出功率40%，每次10~20秒，间隔20~40秒，超声2~4次。

2、抗病原菌抗血清的制备：培养18h的副溶血弧菌、溶藻酸弧菌、嗜水气单胞菌、河弧菌，4000rpm离心10min；用0.65%生理盐水悬浮，血球计数板计数，将菌液稀释至 1×10^8 个/mL；分别注射小鼠，每只0.1mL，对照组注射生理盐水；每隔1周注射1次；第3周免疫后的第10天处死小鼠取血，静置；4000rpm离心10min，取出血清，分装，-20℃保存。

3、外膜蛋白的提取：超声破碎后的副溶血弧菌液，2500g，4℃离心10min，收集上清。上清液100,000g，4℃离心40min。弃上清，沉淀用2%月桂酰基氨基酸钠（配于50mmol/L Tris-HCl, pH7.4）洗涤，室温放置20min。100,000g，4℃离心40min。沉淀溶于一定体积超

声缓冲液中。用 Bradford 法测定样品中蛋白质浓度。

4、双向电泳法操作步骤：第一向预电泳 200V 15min, 300V 30min, 400V 2h, 上样（样品为副溶血弧菌液）后电压 400V, 18h 等电聚焦后迅速取出胶条，平衡后移至 10%十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)胶上继续电泳，其一端外侧加上标准蛋白质，1%琼脂糖封固。电泳结束后用考马斯亮蓝 R-250 染色，扫描，输出照片。参见图 1-A，结果显示，比较清楚的蛋白点 40 余个。

5、Western-blotting 操作步骤：双向电泳结束后，进行电转，恒压 40V 电转过夜；电转结束后，用丽春红染色检测电转的效果；洗去丽春红，加封闭液（脱脂奶粉用 TTBS 配制为 5%终浓度）封闭，室温孵育 1h；三羟甲基氨基甲烷-盐酸-吐温 20 缓冲液(TTBS)洗膜，3 次，每次 5min；分别加入鼠抗副溶血弧菌、溶藻酸弧菌、嗜水气单胞菌、河弧菌抗血清（用封闭液配制），室温孵育 1h；取出膜，TTBS 洗膜 3 次，每次 10min；加入辣根过氧标记的山羊抗鼠抗体(用封闭液配制)，室温孵育 1h；取出膜，TTBS 洗膜 3 次，每次 10min；50mmol/L pH7.4 Tris-HCl 洗膜 5min；DAB 显色；终止反应，扫描，封好膜，保存。Western-blotting 分析，结果有 8 个抗原出现明显的交叉结合反应（见图 1-B-E），分别编号为 1-8。

6、质谱样品的制备：用一干净解剖刀切下目的蛋白点，从无蛋白质污染区切下一块大致相同的胶块为对照，把胶块切成约 1mm^3 大小，置于 0.5ml 试管中，接着按以下步骤进行：用 50%乙腈(ACN)洗胶块以脱掉考马斯亮蓝（2~3 次 \times 15 min），弃 50%ACN；100%ACN 覆盖胶块至白色，弃 ACN；接着用 0.1 mol/L NH_4HCO_3 泡胀，然后反复用 ACN /0.1 mol/L NH_4HCO_3 洗至无色，真空离心干燥。用 10mmol/L 二硫苏糖醇(DTT)/0.1 mol/L NH_4HCO_3 于 56°C 还原 45 min 后，再用新鲜配置的 55 mmol/L 碘乙酰胺/0.1 mol/L NH_4HCO_3 烷基化，避光 30 min。重复上述步骤至脱色干净。真空离心干燥后加入胰酶(Trypsin)(12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 冰上孵育 45 min, 吸掉多余酶液后加入无酶消化液， 37°C 过夜。依次用 5%三氟乙酸(TFA)和 50%ACN /2.5%TFA 反复抽提 1~2 次，合并上清液，真空离心干燥。点样前加 1~2 μL 0.1% TFA 溶解样品。

7、肽质量指纹图谱样品的分析和数据库查询：质谱样品使用德国 BRUKER 公司的基质辅助激光解析电离(ReFlexTM III MALDI-TOF)质谱仪进行分析，反射模式，离子源加速电压 1 为 20 kv, 加速电压 2 为 23kv, N_2 激光波长 337 nm, 脉冲宽度为 3 ns, 离子延迟提取 2000ns, 真空度 1.4×10^{-7} Torr, 质谱信号单次扫描累加 50 次，并用标准蛋白分子峰作为外标校正质谱峰，正离子谱测定，获得肽质量指纹图谱。

通过 Mascot (<http://www.matrixscience.com>) 数据库选择 NCBI, 种属选择 other

proteobacteria. Peptident(<http://www.expasy.org/tools/peptident.html>), 数据库选择 Swiss-prot, 种属选择其它细菌(other bacteria).用 ExPASy Molecular Biology Server 网站提供的 Peptident 软件(<http://www.expasy.org/tools/peptident.html>) 进行查询。查询条件: 肽质量指纹图谱中的肽片段质量控制在 800~3500, 表观分子量的误差范围为 $\pm 20\%$, 对表观 pI 值未作要求, 肽片段分子量最大容许误差范围为 $\pm 0.5\text{Da}$, 每个肽允许有 2 个不完全裂解位点, 物种来源选择细菌, 离子选择 $[M+H]^+$ (数据库中的选项, 无中文名) 和单一同位素(monoisotopic), 最少匹配肽片段数规定为 4, 半胱氨酸为碘乙酰胺处理。鉴定结果见表 1。

表 1 副溶血弧菌与自身和异种抗血清的交叉反应蛋白质的 MALDI-TOF/MS 鉴定

| 蛋白点 | 抗副溶血血清 | 抗溶藻酸血清 | 抗嗜水气血清 | 抗河弧菌 | 鉴定结果 |
|-----|--------|--------|--------|------|--|
| 1 | + | + | + | + | 表面抗原 (Surface antigen) |
| 2 | | + | + | + | 外膜蛋白 TolC (Outer membrane protein TolC) |
| 3 | + | | | | 长链脂肪酸转移蛋白 (long-chain fatty acid transport protein) |
| 4 | + | + | + | + | 外膜蛋白 A (Outer membrane protein A) |
| 5 | + | | | | 假定蛋白 VP1475 (hypothetical protein VP1475) |
| 6 | + | + | + | + | 外膜蛋白 A (Outer membrane protein A) |
| 7 | + | + | + | + | 肽聚糖相关脂蛋白 (peptidoglycan-associated lipoprotein) |
| 8 | + | + | | + | 脂蛋白 (Lipoprotein) |

实施例 2 除细菌改为大肠杆菌外, 其余均与实施例 1 相同。结果如下:

1、大肠杆菌细胞外膜的 2-DE 图谱

采用 2-DE 技术, 对大肠杆菌的细胞外膜进行分析, 结果发现约 40 个蛋白点, 见图 2-A。

2、免疫原性蛋白确定

采用 Western blotting 技术, 分别以鼠抗温和气单胞菌、大肠杆菌、副溶血弧菌、河弧菌抗血清和 HRP-兔抗小鼠为第一和第二抗体, 按试验程序进行 Western blotting 分析, 结果有 6 个抗原出现明显的结合反应, 分别编号为 1~6。大肠杆菌细胞外膜的 Western blotting

的结果见图 2-B~E。

3、MALDI-TOF 肽质量指纹谱分析

采用生物质谱对 6 个具有交叉免疫原性的蛋白点进行分析，分别得到各自的肽质量指纹图谱。

根据获得的肽指纹谱数据和分子量范围及其他一些参数，通过 Peptident 软件查询 SWISS-PROT 数据库中与之匹配的蛋白质，搜索结果如表 2 所示。

表 2. 大肠杆菌与自身和异种抗血清的交叉反应蛋白质的 MALDI-TOF/MS 鉴定

| 蛋白点 | 抗大肠杆菌 | 抗温和气单胞菌 | 抗河弧菌 | 抗副溶血弧菌 | 鉴定结果 |
|-----|-------|---------|------|--------|---|
| 1 | + | | + | + | 粘肽糖脂蛋白 (Murein lipoprotein) |
| 2 | + | + | + | + | 外膜蛋白 X (Outer membrane protein X) |
| 3 | + | + | | | 饥饿条件的调节子 (global regulator, starvation conditions) |
| 4 | + | + | | + | 外膜蛋白 A (Outer membrane protein A) |
| 5 | + | | + | + | 外膜蛋白 3a (Outer membrane protein 3a) |
| 6 | + | + | + | + | 外膜蛋白 tolC 前体 (Outer membrane protein tolC precursor) |

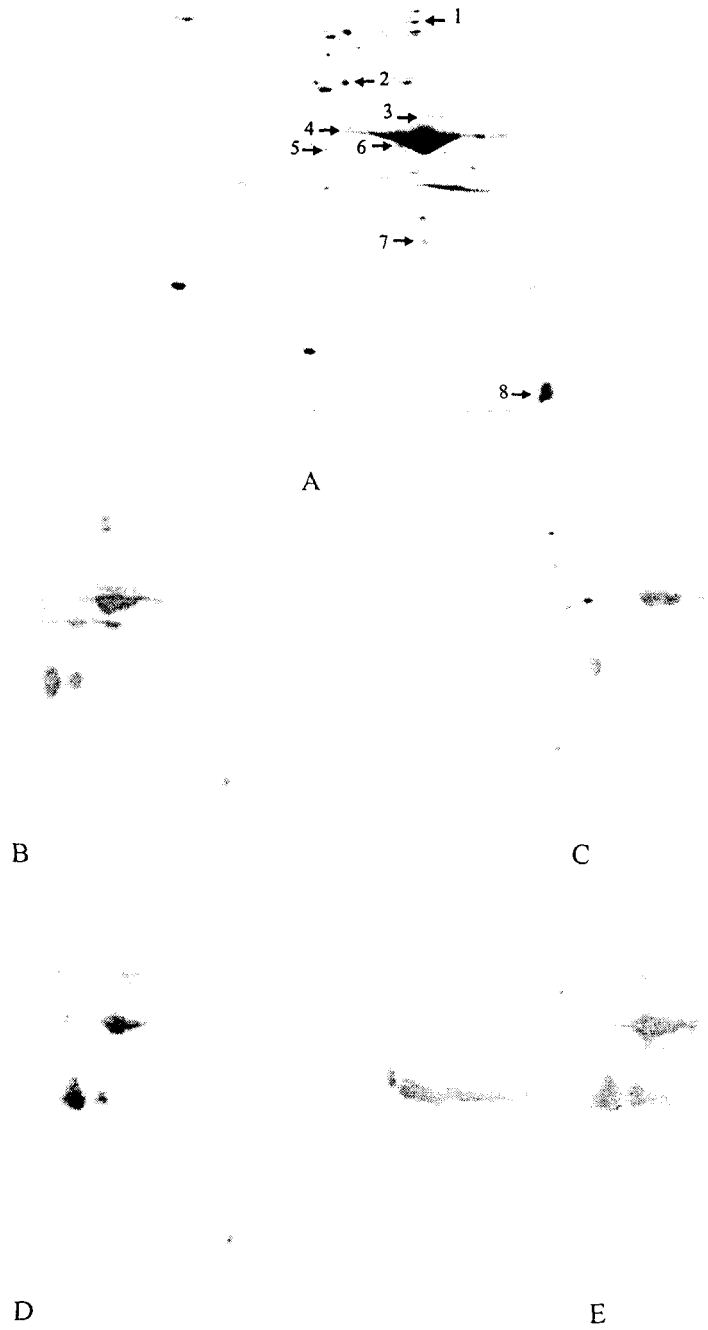
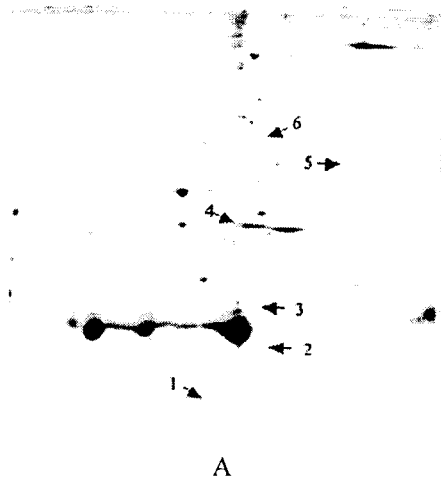


图 1



B

C

D

E

图 2

| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 微生物交叉抗原的筛选与鉴定方法 | | |
| 公开(公告)号 | CN1247795C | 公开(公告)日 | 2006-03-29 |
| 申请号 | CN200410033282.1 | 申请日 | 2004-04-14 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 厦门大学 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 厦门大学 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 厦门大学 | | |
| [标]发明人 | 彭宣宪 徐常新 彭博 王三英 | | |
| 发明人 | 彭宣宪 徐常新 彭博 王三英 | | |
| IPC分类号 | C12Q1/00 G01N33/53 G01N21/76 G01N30/88 G01N33/547 G01N33/561 G01N33/569 | | |
| 其他公开文献 | CN1563982A | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

微生物交叉抗原的筛选与鉴定方法，涉及一种高通量筛选和鉴定微生物交叉抗原的方法。用双向电泳法分离微生物蛋白质，再免疫转印，多种抗血清作为第一抗体，酶标抗体为第二抗体，显色后检查其阳性；分析免疫原的交叉程度和范围；免疫原的定性，确定抗原的蛋白质种类。建立了一种采用多种抗血清作为第一抗体的免疫蛋白质组学技术，用于高通量筛选具有交叉免疫原性的蛋白质以作为多价疫苗的候选靶位。根据免疫原的交叉程度和范围，可以确定其作为交叉免疫原的可能性及其作用范围。可迅速确定某种微生物的具有交叉免疫原性的全部蛋白质，高效、快速、经济、实用。其方法具有普遍性，不仅可用于细菌，而且还用于真菌和病毒等微生物交叉抗原的鉴定。

