

文章编号: 1000-1336(2007)02-0101-04

免疫蛋白质组学及疫苗靶位筛选

潘建义 彭宣宪

(厦门大学生命科学学院, 厦门 361005)

摘要: 蛋白质组学自建立起即向生命科学的其他研究领域渗透, 形成了多样的交叉学科。免疫蛋白质组学即由蛋白质组学与蛋白质免疫印迹技术相结合而产生的一个新研究方向, 在免疫原性蛋白质研究及疫苗靶位筛选中展示出广泛的应用前景。该文就免疫蛋白质组学的形成、主要研究技术体系及其进展、在免疫原性蛋白质鉴定、新型高效候选疫苗靶位发现等方面进行概述。

关键词: 免疫蛋白质组学; 免疫原性蛋白质; 疫苗筛选; 双向凝胶电泳; 多维层析; 蛋白质芯片

中图分类号: Q51, Q5-3

自澳大利亚学者 Wilkins 和 Williams 提出蛋白质组这一概念之后, 蛋白质的研究得到飞速发展, 并随即形成了蛋白质组学这一新兴学科。蛋白质组学是从整体水平上来研究一个机体或一个细胞的蛋白质的组成及其活动规律, 其内容包括鉴定蛋白质的表达存在方式(修饰形式)、结构功能和相互作用等。生命科学的研究重点已转到了一个以蛋白质组为研究对象的新的研究领域。

蛋白质组学自形成开始即向其他学科领域渗透, 目前几乎渗透到生命科学各个领域, 形成了非常多样的交叉研究领域, 如糖蛋白质组学、磷酸化蛋白质组学, 免疫蛋白质组学等。免疫蛋白质组学由蛋白质组学与免疫学相结合而产生^[1-3], 它在病原微生物及肿瘤的免疫原性蛋白质及候选疫苗靶位筛选中展示出广泛的应用前景, 成为微生物学家及医学研究人员的研究热点。本文介绍免疫蛋白质组学的形成、主要研究技术体系及其在微生物及肿瘤免疫原性蛋白质及候选疫苗靶位的筛选等。

1. 免疫蛋白质组学

蛋白质组学是一个旨在大规模、高通量、高效率地分离和鉴定构成生物体的蛋白质及其功能的新研究领域。蛋白质组学技术非常适用于免疫原及疫苗候选成分的筛选等方面的研究。疫苗是生物体抵抗病原微生物的最佳武器, 而具有保护

作用的免疫原往往是理想的疫苗候选靶位。但传统研究方法存在低效、费时及不经济等诸多不利原因, 使高效疫苗靶位的发现进程受到限制。在这种情形下, 免疫蛋白质组学(immunoproteomics)随着蛋白质组学的出现也应运而生。

免疫蛋白质组学将蛋白质组学技术鉴定蛋白质的高通量性与免疫学技术鉴定免疫原的可靠性有机地结合起来, 在病原微生物以及肿瘤免疫原和疫苗候选靶位的研究中有着重要应用, 已经成为该研究领域中最具生命力的技术手段。免疫蛋白质组学的关键研究技术包括双向凝胶电泳(2-DE)、多维液相层析(MD-LC)、生物质谱技术(MALDI-TOF/ESI MS)、蛋白质芯片、生物信息学以及蛋白质免疫印迹技术等。这些研究技术将随着蛋白质组学及免疫学的发展而不断的改进和完善, 而且新发展的研究方法也将进一步完善免疫蛋白质组学的技术体系。

2. 免疫蛋白质组学的技术体系

2.1 基于 2-DE 的免疫蛋白质组学的技术体系

双向凝胶电泳(2-DE)技术是第一种能将近千个蛋白质同时分离并清晰展示的实验技术^[4], 也是免疫蛋白质组学分析的关键技术之一。基于 2-DE 的免疫蛋白质组学研究技术体系流程为: 首先制备蛋白质样品, 同时获得该样品的抗血清; 通过 2-DE 对蛋白质样品进行分离, 经电转印将分离的蛋白质转到硝酸纤维素膜(NC)或聚偏乙烯氟化物膜(PVDF)等固相载体上; 然后利用上述抗血清通过 Western 印迹对分离的蛋白质进行免疫学检测, 获得阳性反应点; 从对应的 2-DE 胶上取阳性蛋白质点, 经胶内酶切后进行质谱分析获得肽

收稿日期: 2007-01-15

973 计划(No. 2006CB101807)资助项目

作者简介: 潘建义(1977—), 男, 博士生, E-mail: panny_21cn@yahoo.com; 彭宣宪(1954—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 联系作者, E-mail: wangpeng@xmu.edu.cn

指纹图或肽序列标签, 通过蛋白质数据库搜索对蛋白质进行鉴定。目前, 基于 2-DE 的技术体系 (2-DE-Western blotting-MS) 已成为免疫蛋白质组学分析的经典途径, 大多数研究均利用该技术体系来完成。

随着蛋白质组学研究工作的深入, 2-DE 技术也在不断的改进和完善。Pharmacia 公司已推出 2-DE-MS 自动化系统, 还发展了 6~12 块胶在第二向电泳中同时电泳的高通量的 Ettan 系统。Covert 等^[5] 将 2-DE 改为二维液相电泳 (2-D LPE) 来进行大规模蛋白质的分析。Zoom 胶、极窄胶等新技术也用于 2-DE 分析来提高其分辨率与灵敏度。随着这些革新技术的产生以及 2-DE 的分辨率、灵敏度和重复性的提高, 基于 2-DE 的技术体系的免疫蛋白质组学将得到更好的应用。

2.2 基于多维液相层析的免疫蛋白质组学技术体系

Opitck 等^[6] 于 1997 年首次运用多维液相层析 (MD-LC) 结合质谱技术分析蛋白质混合物, 从而开创了非凝胶电泳的免疫蛋白质组学研究技术。多维液相层析技术作为与 2-DE 互补的技术, 在大规模蛋白质组研究中已发挥了重要作用。基于 MD-LC 的免疫蛋白质组学的技术体系流程为: 首先将制备的液相蛋白质样品注入多维层析分析仪进行分离, 再将分离得到的液相蛋白质组分进行 SDS-PAGE, 然后进行 Western 印迹分析或分离组分不经电泳直接进行斑点印迹 (dot blotting) 分析。根据 Western 印迹和斑点印迹分析结果, 从凝胶上取对应的阳性反应蛋白质点进行质谱分析, 用于蛋白质的鉴定。如果二维层析分离后的蛋白质组分较多, 可以先取一维分离的组分进行斑点印迹和 Western 印迹分析, 对目标抗原进行大致的定位, 再将具有免疫应答的一维组分进行二维分离, 得到的二维蛋白质组分再按上述过程进行分析鉴定。

离子交换层析、反相-HPLC、分子排阻层析和亲和层析等层析模式都可用来组合多维液相层析。目前, 以一维离子交换层析与二维反相-HPLC 相结合的模式最为常用^[7]。多维层析技术能弥补 2-DE 的一些技术缺陷, 如能对低丰度、疏水性及难溶性蛋白质进行分离分析, 而且在分离蛋白质时, 蛋白质样品可不经变性处理。此外, 液相层析与质谱联用实现了蛋白质分离鉴定的自动化操作^[8]。多维液相层析技术因其分辨率高、应用范围广、自动化程度高等优势已成为免疫蛋白

质组学研究的关键技术。多维层析技术以及近年出现的液相层析-毛细管电泳 (LC-CE) 和二维毛细管电泳 (2D-CE) 等新型分离技术, 都有取代 2-DE 在免疫蛋白质组学研究中的主导地位之势^[4]。

2.3 基于蛋白质芯片的免疫蛋白质组学技术体系

蛋白质芯片是高通量、微型化和自动化的蛋白质分析技术, 也是在用于免疫蛋白质组学研究相关技术中最具发展潜力的一种技术^[9]。Hess 等^[10] 于 2005 年提出了蛋白质芯片与质谱分析相结合的免疫蛋白质组学方法。该方法分为 3 个步骤: (1) 抗体固定: 将抗血清与抗原捕获转移试剂 (ACTR) 培育, 通过抗体的 Fc 区与 ACTR 特异性作用而将抗体固定; (2) 抗原捕获: 将含抗原的样品与固定的抗体混合培育, 固定的抗体通过与抗原相互作用, 从而将抗原捕获; (3) 将抗原-抗体复合体转移到蛋白质芯片上进行 SELDI-TOF 质谱分析, 对捕获的抗原进行鉴定。

Hess 等发现, 在激光能量低于 8000 amu 情况下, 不能激发 ACTR 及抗体-ACTR, 观察不到质谱峰, 但能促使抗原从抗原抗体复合体中解离、在质谱仪中飞行从而测定抗原, 而且激发抗原解离所需的能量根据抗原与抗体间亲和力的不同而变化, 因而可以对抗原抗体复合体中的抗原进行定量分析。该方法不受样品体积的限制, 在体积大、浓度小的情况下仍能捕获抗原, 而且能对捕获到的不同比率的抗原抗体复合体进行比较分析。这种将抗体俘获的特异性和质谱分析的精确性相结合的分析方法, 同传统的免疫沉淀和 2-DE 分析等方法相比, 具有快速、高灵敏度、自动化和微型化等优点, 是免疫蛋白质组学的重要研究技术, 也可能是其未来的发展方向。

3. 免疫蛋白质组学在疫苗候选靶位筛选中的应用

免疫蛋白质组学是在发现和鉴定病原微生物的免疫原作为疫苗候选靶位的研究过程中而逐渐形成的, 现被广泛应用于微生物及肿瘤的免疫原的鉴定。

2-DE-Western 印迹-MS 是免疫蛋白质组学分析的经典技术体系, 其应用也最为广泛。嘎氏疏螺旋体 (*Borrelia garini*) 为最早通过此技术体系研究的细菌。Jungblut 等^[11] 利用感染嘎氏疏螺旋体的早期和晚期病人的血清对其免疫原性蛋白质进行了研究, 发现了 2 种免疫原性蛋白质, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶和寡肽 ABC 转运蛋白 (通透酶); 另外还发现了一些疾病不同阶段的特异性

抗原。Shin 等^[12] 分别以牛 IgM、IgE、IgA 和 IgG 与从犬新孢子虫 (*Neospora caninum*) 中提取的经 2-DE 分离的蛋白质进行免疫分析, 分别筛选到了 132、84、4 和 40 种抗原性蛋白质, 其中的 16 种蛋白质经 MALDI-TOF/MS 分析而得到鉴定, 这些蛋白质都与寄生虫的入侵、增殖及发病有关。而其中的 HSP70、肌动蛋白、NTP 酶、HSP60、丙酮酸激酶、烯醇化酶、核糖体蛋白 S2、NCDG-1 和 GRA2 等 9 种蛋白质有望研究开发成为疾病诊断的分子标记和候选疫苗。目前, 利用该技术体系还鉴定了白色链球菌 (*Candida albicans*)、砂眼衣原体 (*Chlamydia trachomatis*) 和幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*) 中的多种免疫原。

Blade 等^[13] 在研究肾癌细胞 (RCC) 中提出血清蛋白质组分析法 (serological proteome analysis, SERPA), 也称为 SPEAR (serological and proteomic evaluation of antibody responses)。SERPA 是将 2-DE-Western 印迹技术与病人血清鉴定的抗原相结合发展而来。利用该方法鉴定了碳酸酐酶 I 和平滑肌蛋白 22- 两种肾细胞癌 (RCC) 特异性抗原, 它们通过特异性诱导 IgG 进行免疫应答。Unwin 等^[14] 应用该方法从 RCC 细胞中筛选到了膜联蛋白 (annexin) I/IV、胸苷磷酸化酶、碳酸酐酶 I、Mn- 超氧化物歧化酶、MVP 等 6 种抗原性蛋白质。这些研究为构建和筛选 RCC 细胞特异性疫苗提供了借鉴和参考。除了肾细胞癌外, 目前利用 SERPA- 免疫蛋白质组学技术还对肺癌、乳腺癌、神经母细胞瘤和肝癌等多种肿瘤进行了研究, 并筛选到一些潜在的具有生物标记意义的蛋白质。SERPA 法也可以用来筛选细菌中的疫苗候选抗原。Vytvytska 等^[15] 通过用亚蛋白质组学手段富集表面蛋白质, 利用该方法从金黄色葡萄球菌中筛选到了 15 种免疫原性蛋白质, 包括 SdrD 和一种新的由 309 氨基酸残基组成的脂蛋白。SERPA 法是一种强有力的鉴定新抗原的免疫蛋白质组学分析方法, 为构建和筛选新高效疫苗奠定了基础。

Lin 等^[16] 采用比较免疫蛋白质组学 (comparative immunoproteomics) 方法, 研究了胃癌和十二指肠溃疡病人的血清与幽门螺旋杆菌蛋白质组的免疫应答, 从该菌中发现了一种新的致癌因子——胃癌相关蛋白 GroES。GroES 可引起炎症并促使分子结构改变来引发细胞增殖, 从而导致胃癌的发生。因而, GroES 可作为鉴定胃癌的生物标记及发展为疫苗靶位。Shin 等^[17] 也采用比较免

疫蛋白质组学方法, 对包被和非包被的乳球菌的免疫原进行了研究, 这两种菌株中的 3-磷酸甘油醛脱氢酶、磷酸甘油酸激酶、精氨酸脱氨酶和鸟氨酸氨甲基转移酶等蛋白质与兔血清均有强的免疫应答, 表明这些免疫原有可能发展成抗乳球菌的疫苗候选成分。近年来, 该方面的研究进展较快, 在此不一一例举。

本研究室近年来采用亚蛋白质组学手段对细菌外膜进行了系列研究, 其中发展了一种快速、高效发现中和原和交叉中和原的技术路线, 获得 2 项国家发明专利, 并在嗜水气单胞菌外膜蛋白中和原和痢疾杆菌免疫原等的研究中成功应用^[18,19] (其技术路线见图 1)。该技术可分为 3 个步骤:



图 1 以免疫蛋白质组学方法鉴定具保护性免疫原性蛋白质的示意图^[19]

(1) 利用基于 2-DE 的免疫蛋白质组学技术筛选和鉴定外膜中显性免疫原; (2) 通过免疫攻毒鉴定这些显性免疫原的免疫保护性; (3) 通过对免疫原中和能力的比较来评价最佳疫苗候选靶位。通过这种高通量的免疫蛋白质组学方法, 我们从嗜水气单胞菌外膜蛋白中成功地筛选到 8 种免疫原性外膜蛋白, 其中 3 种外膜蛋白 P2、P4 和 P6 经免疫攻毒实验证实具有保护性, 其相对免疫保护率分别为 62.5%、57.1% 和 71.4%。这是迄今为止首次利用免疫蛋白质组学技术筛选获得的中和原。该方法同样适用于细菌其他组分的免疫原性蛋白

质的研究, 如我们利用免疫小鼠制备得到的血清从福氏志贺菌 2a 中筛选到 13 种免疫原性蛋白质, 其中 7 种为外膜蛋白, 其余 6 种为可溶性蛋白质^[3]。

一些细菌外膜蛋白 (OMP) 具有良好的免疫原性, 因而被认为是理想的疫苗候选成分。对一个细菌的 OMP 集合来说, 不是所有的 OMP 都具有免疫原性, 而且具有免疫原性的 OMP 也不是都可以刺激宿主产生中和反应。实际上, 只有部分 OMP 具有中和保护作用, 且只有其中的高效中和原才可以用作为理想的疫苗候选成分。以 OMP 为依据选择优势免疫保护原和通过构建多价融合性 OMP 菌株来研制 OMP 亚单位疫苗具有广阔的前景。但迄今为止只有少数 OMP 得到鉴定, 大部分 OMP 的生物学功能仍未明了。免疫蛋白质组学及微阵列等技术的飞速发展将大大推动 OMP 的大规模鉴定和分析工作, 使其成为抗菌药物和多价疫苗的理想靶标。

作为 2-DE 技术的补充, 基于多维层析技术的免疫蛋白质组学技术在免疫原研究中也取得较大进展。Yan 等^[20] 利用该方法对前列腺癌细胞中的免疫原进行了研究, 发现了 3 种与病人血清有特异反应的抗原: 核 RNA-DNA 结合蛋白、肌氨酸激酶和另一种尚未鉴定出的蛋白质组分 B6, 这些免疫原可用于前列腺癌诊断的分子标记及疫苗候选成分。此外研究还发现, 利用该方法可将翻译后修饰的蛋白质作为抗原来检测免疫应答。Falisse-Poirrier 等^[21] 采用了 2DLC-SERP 方法对微生物的免疫原进行了研究。

目前, 基于蛋白质芯片的免疫蛋白质组学方法主要应用于抗体免疫应答的监控^[10]、抗原的定量、信号肽的磷酸化分析, 以及细胞因子的探测等研究领域^[22]。

4. 展望

免疫蛋白质组学作为一门新兴的交叉学科, 在免疫原研究和疫苗靶位筛选等生物学领域取得了一些可喜的研究成果, 为疫苗的研制和开发探索了新路, 成为生命科学研究的新方向。免疫蛋白质组学方法与传统疫苗研究方法相比, 具有快速、准确、高通量和高效率等优势, 而且该方法可以对抗原抗体复合体中的特异性抗原定量, 因而采用免疫蛋白质组学来研究免疫机制和进行疫苗筛选有助于摆脱传统的疫苗研制的束缚, 加快新疫苗的研制。

本研究室在运用免疫蛋白质组学筛选免疫原的研究基础上, 提出了抗原组 (antigeome) 和抗原组学 (antigeomics) 这一全新概念^[19]。抗原组, 即特定条件下靶细胞中的全部抗原。理论上, 所有的蛋白质都具有免疫原性, 但由于抗原表位的强弱, 即所谓的显性和非显性免疫原的缘故, 使一些蛋白质的免疫原特性在特定时间无法表现出来。实际上, 当带有成千个蛋白质的微生物入侵宿主时, 宿主的免疫系统只对少数蛋白质产生应答。这些使宿主应答的蛋白质为显性免疫原 (dominant immunogens), 其他蛋白质则为非显性免疫原 (less dominant immunogens)。显性免疫原和非显性免疫原是相对的, 从非显性免疫原中仍可以筛选到显性免疫原。用这种方法可以评估和比较一个微生物的全部蛋白质的免疫原显性情况。抗原组学的研究目标就是对一个集合的所有蛋白质, 依据其刺激机体发生免疫应答的能力即免疫原性的强弱进行评估, 筛选其中具有高保护性的中和原作为疫苗候选靶位。毫无疑问, 运用抗原组学将会使疫苗研究获得长足的进步和发展。

参 考 文 献

- [1] Klade CS. *Curr Opin Mol Ther*, 2002, 4: 216-223
- [2] Haas G et al. *Proteomics*, 2002, 2(3): 313-324
- [3] Peng X et al. *Vaccine*, 2004, 22: 2750-2756
- [4] Steel LF et al. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2005, 815: 275-284
- [5] Covert BA et al. *Proteomics*, 2001, 1(4): 574-586
- [6] Opiteck GJ et al. *Anal Biochem*, 1998, 258 (2): 349-361
- [7] Walters DA et al. *Anal Chem*, 2001, 73(23): 5683-5690
- [8] Fields S. *Science*, 2001, 291(2): 1221-1224
- [9] MacBeath G. *Science*, 2000, 278: 1760-1763
- [10] Hess JL et al. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2005, 815: 65-75
- [11] Jungblut PR et al. *Electrophoresis*, 1999, 20(18): 3611-3622
- [12] Shin YS et al. *Proteomics*, 2004, 4: 3600-3609
- [13] Klade CS et al. *Proteomics*, 2001, 1(7): 890-898
- [14] Unwin RD et al. *Proteomics*, 2003, 3: 45-55
- [15] Vytvtska O et al. *Proteomics*, 2002, 2(5): 580-590
- [16] Lin YF et al. *Mol Cell Proteomics*, 2006, 5: 1484-1496
- [17] Shin GW et al. *Vet Microbiol*, 2007, 119: 205-212
- [18] Chen Z et al. *Proteomics*, 2004, 4: 3203-3213
- [19] Peng X. *BioForum Europe*, 2005, (3): 30-31
- [20] Yan F et al. *Proteomics*, 2003, 3: 1228-1235
- [21] Falisse-Poirrier N et al. *J Microbiol Methods*, 2006, 67: 593-596
- [22] Boyle MD et al. *Methods*, 2006, 38(4): 342-350