

高致病性禽流感病毒血凝素蛋白广谱中和表位模拟肽的筛选与鉴定¹

宋慧娟, 罗文新*, 郑振华, 陈瑛炜, 陈毅歆, 陈自敏, 张军, 夏宁邵

(厦门大学 生命科学学院 国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心, 福建 厦门 361005)

摘要:以 H5N1 型禽流感病毒 HA 蛋白广谱中和单抗 8H5 为基础, 利用噬菌体展示肽库技术及类病毒颗粒融合表达技术研究 HA 模拟表位。ELISA 检测结果显示: 筛选获得模拟 HA 表位的模拟肽 123, 进行类病毒颗粒融合蛋白表达后, 仍具有与 8H5 单抗特异结合的能力。免疫荧光检测结果说明, 类病毒颗粒免疫小鼠后产生了能与 HA 交叉反应的抗体。禽流感病毒 HA 模拟表位的研究与性质的分析及类病毒颗粒融合蛋白的表达与活性分析、免疫原性分析, 都为研制禽流感通用表位疫苗奠定了基础。

关键词: H5N1 HA 蛋白; 噬菌体展示肽库; 模拟肽

中图分类号: R373.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8721(2008)06-00421-06

近年来, H5N1 型禽流感病毒传播呈增强趋势, 2005 到 2006 年已迅速蔓延至俄国、欧洲、非洲及中东地区^[1-2]。由于 AIV 抗原变异频繁, 机体不能有效防御病毒的侵袭, 为疫苗的研究开发提出了严峻的考验。目前虽然已有多种疫苗应用于 AIV 的防治, 如灭活疫苗、亚单位疫苗、重组活载体疫苗、核酸疫苗^[3], 但其效率均在 60%~85% 之间, 且只针对特定类型病毒株。随着生物化学、分子免疫学技术及基因工程技术的发展, 表位疫苗的出现弥补了传统疫苗的一些不足, 尤其在诱导细胞免疫方面, 减少了疫苗毒副作用, 提高了安全性, 增强了免疫针对性。天然表位或模拟表位在很多疾病, 如 HIV、HCV 的研究中都产生很好的免疫反应^[4-8]。为防止禽流感大规模爆发, 有效预防其不定向突变趋势, 加快研制可提供交叉保护性的通用表位疫苗显得尤为重要。

血凝素蛋白 (Hemagglutinin, HA) 是病毒表面的主要刺突成分, 在病毒吸附及穿膜过程中起关键作用, 其在病毒中变异速度非常快, 通过突变与抗体的结合区域的氨基酸, 或者改变表面糖链分子的分布, 会降低 HA 与抗体之间的反应^[9-11]。HA 作为病毒最重要的表面抗原, 可诱生保护性抗体及细胞

免疫^[12], 是当前流感疫苗的主要成分, 也是寻找中和性抗体的关键考虑因素^[13]。本实验室在禽流感中和性单克隆抗体研制方面积累了丰富的经验, 制备的 8H5 单克隆抗体, 对近年来 34 株 H5N1 病毒株都有血凝抑制和中和活性, 具有特异性高、反应性强、识别谱广的特点^[14]。该结果提示在 HA 上存在保守中和表位, 为通用表位疫苗的研究奠定了良好基础。

本研究采用噬菌体随机肽库技术, 选用禽流感广谱中和抗体 8H5 对随机十二肽库进行筛选; 又将表位模拟肽展示在类病毒颗粒上, 对其免疫原性及免疫反应性进行分析, 旨在为高致病性 H5N1 禽流感病毒血凝素蛋白 (HA) 模拟表位及通用表位疫苗的研究提供参考。

材料与方法

1 试剂、病毒、细胞、质粒 噬菌体随机十二肽库 (库容: 2.7×10^9 个转化子) 及 *E. coli* 2738 均购自美国 New England BioLabs 公司; 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的抗 M13 单克隆抗体购自 Pharmacia 公司; M13 ssDNA 提取试剂盒购自美国 Omega 公司; 表达禽流感 HA 蛋白的 SF21 昆虫细胞由本实验室保存; 灭活禽流感 H5N1 亚型病毒株由香港大学微生物系管轶教授惠赠; pC149-mut 质粒由本实验室构建。

2 单克隆抗体 禽流感病毒 H5N1 HA 中和单抗 8H5、4D1、10F7、8G9、3G4、2F2、3C8、3D2、1G2、3CF1、7D1、6CF3、7H8、10DE2、13E7、16A12 均由本实验室制备。HEV E2 蛋白中和单抗 8C11 由本实验室制备。

3 筛选肽库 根据 NEB 公司肽库筛选操作手册进行, 简述

收稿日期: 2008-8-15; 修回日期: 2008-09-15

基金项目: 教育部科技重点项目 (108157), 科技支撑计划 (2006BAI01B06), 厦门市科技计划社会发展项目 (3502Z20073001), 福建省科技计划重点项目 (2008 Y0059)

作者简介: 宋慧娟 (1983-), 女, 硕士研究生。

通讯作者: 罗文新, E-mail: wxluo@xmu.edu.cn

如下。采用 Protein A 捕获法进行液相筛选,用 1ml 封闭缓冲液(0.1mol/L NaHCO₃ (pH 8.6), 5 mg/mL BSA, 0.02% NaN₃, 过滤除菌, 4℃ 贮存)封闭适量 Protein A-琼脂糖介质, 4℃ 孵育 60 min。取 1.5 × 10¹⁰ 个噬菌体粒子(相当于 1μl 原始文库)和适量抗体在 TBST (TBS + 0.1% [v/v] Tween-20) 缓冲液中反应 30 min; 再加入封闭好的介质, 室温反应 30 min。用 TBST(0.1%) 缓冲液淘洗混合物, 采用不洗脱方式, 重悬沉淀介质于 1ml TBS 缓冲液中。留 100μl 用于噬菌体滴定实验, 剩余筛选物扩库; 用 1/5 体积 PEG 收库, 得到噬菌体沉淀, 重悬后作为下一轮筛选的噬菌体肽库。按照以上步骤, 依次进行第二轮和第三轮的筛选。待第三轮筛选完毕, 直接用稀释一定倍数的筛选物于 LB/ IPTG/ Xgal 平板上滴定噬菌斑。

4 噬菌体克隆 ELISA 检测及 DNA 序列测定 将单克隆抗体 8H5 (1μg/mL, PB 稀释) 及对照抗体 10F7、8C11、3G4 (1μg/mL, PB 稀释) 包被 96 孔微孔板。于滴定板上随机挑取单克隆噬菌斑经扩增后, 取 100μl 上清加入包被了抗体的微孔板中, 37℃ 温育 1h, 0.1% PBST 洗板 5 次, 加入 100μl HRP 标记的抗-M13 抗体(1:3000), 37℃ 作用 0.5h, TMB (3,3',5,5'-四甲基联苯胺) 为底物, 显色 15min, 终止后测定 450nm 的吸光度值。以目标抗体 ELISA 读值高于对照抗体 ELISA 读值 2 倍及以上作为阳性标准。用 M13ssDNA 提取试剂盒提取阳性噬菌体克隆基因组, 送至上海英骏生物技术有限公司测序。

5 融合蛋白的表达、纯化及电镜观察 质粒 pC149-mut 含有 HBV core 蛋白的 1-149 氨基酸(C149)的核苷酸序列, 其中第 79、80 位氨基酸的序列被 BamHI 酶切位点代替。将 123 肽分别以一个拷贝和三个拷贝数插入到此位点, 表达出的模拟肽将展示到 HBcAg 类病毒颗粒表面上。

经 PCR 扩增出 N 端连有模拟肽序列的 C149 a. a. 81~149 DNA 片段, 经 Bgl II 和 EcoRI 酶切后回收纯化, 连接到 BamHI/ EcoRI 双酶切的 pC149-mut 载体中, 分别构建出带有一个、三个拷贝 123 肽的重组质粒 pC149-mut-123、pC149-mut-T123, 表达的融合蛋白分别称为 HBc-123、HBc-T123。重组质粒转化大肠杆菌 ER2566 进行表达, 用饱和硫酸铵沉淀蛋白的方法纯化蛋白。纯化好的类病毒颗粒融合蛋白样品用 2% 磷酸钨负染后, 直接进行电镜观察。

6 融合蛋白活性检测及特异性分析 将纯化好的类病毒颗粒融合蛋白以 10μg/mL 的浓度包被 96 孔板, 与 8H5 单抗 37℃ 孵育 1h 后, PBST 洗板 5 次, 再加入二抗 GAM-HRP(1:10000), 37℃ 孵育 30 min。PBST 洗板 5 次, 加入显色液显色 10 min, 终止液终止, 酶标仪读值。用 13 株针对禽流感病毒(AIV)血凝蛋白(HA)的单抗作对照来检测类病毒颗粒融合蛋白与 8H5 单抗结合的特异性。

7 竞争 ELISA 实验 病毒稀释至同一活性比值(即和 8H5 单抗的 ELISA 反应活性均在 1.0 左右)。在包被 8H5 (1μg/mL) 单克隆抗体的孔中, 同时加入 50μl 融合蛋白(0.1μg/μl) 和 50μl 病毒, 二者竞争结合 8H5 单抗, 同时以 HBcAg

蛋白作为阴性对照。以抗 HA 酶标抗体 2F2-HRP(1:500) 为二抗。竞争率计算公式:

$$\text{竞争率} = (1 - \text{竞争后 OD 值} / \text{竞争前 OD 值}) \times 100\%$$

8 免疫小鼠 将纯化的融合蛋白与等体积的福氏佐剂混合(初次免疫时与完全福氏佐剂混合, 加强免疫时与不完全福氏佐剂混合), 以肌肉多点注射的方式, 免疫 BALB/c 小鼠, 每只小鼠的免疫量为 100μg 蛋白, 3~4 只小鼠为一组。初次免疫后, 每隔一周加强免疫一次, 同时采取眼球血, 存放于-20℃ 备用。

9 免疫血清与多肽反应性 ELISA 检测 以本实验室制备的含 123 多肽的 239-123 融合蛋白作为固相包被抗原(1μg/孔), HRP 标记的羊抗鼠 IgG 作为酶标二抗, 用间接 ELISA 法检测鼠血清中抗 123 多肽的抗体滴度。

10 免疫荧光检测 通过昆虫细胞-杆状病毒表达系统, 将禽流感病毒 HA 蛋白表达在 SF21 细胞表面。用 4% 多聚甲醛固定细胞, 山羊多抗血清封闭, 与 1:20 稀释的 HBc-T123 免疫鼠血清室温孵育 1h, 以 8H5 单抗作为阳性对照, HBcAg 蛋白免疫鼠血清作为阴性对照。荧光标记的羊抗鼠抗体(Sigma, St. Louis, MO, USA) 为二抗, 室温反应半小时, 取 DAPI(Sigma, St. Louis, MO, USA) 染细胞核, 室温 10min, 然后在正置荧光显微镜(Nikon) 下观察。

结果与分析

1 模拟肽的筛选及序列获得

选用 NEB 公司的噬菌体十二肽库, 针对广谱中和抗体 8H5 进行三轮筛选。随机挑取 96 个噬菌体克隆, 用 ELISA 法检测, 结果得到 60 个阳性克隆。经测序分析得到相应的氨基酸序列, 即为噬菌体表面展示的十二肽序列。60 个克隆共编码五种不同十二肽序列(表 1), 五种噬菌体克隆对 8H5 抗体的 ELISA 读值均高于对照抗体读值两倍以上(图 1)。BLAST 分析表明, 五种肽的氨基酸序列与 H5N1 血凝素蛋白的氨基酸序列无同源性。其中 123 模拟肽出现的频率高达 48%, 且展示 123 的噬菌体肽与 8H5 的反应最强、特异性最好, 故选取 123 模拟肽做进一步研究。

表 1 模拟肽氨基酸序列

Peptide No.	Amino acid sequence	Frequency of isolation (%)
123	E T P L T E T A L K W H	48
130	H L Q D G S P P S S P H	10
134	A P V P P T A W W H L S	8
135	F N G S H I Y S P F H P	11
136	Q W N L T P R Q S L Q L	7

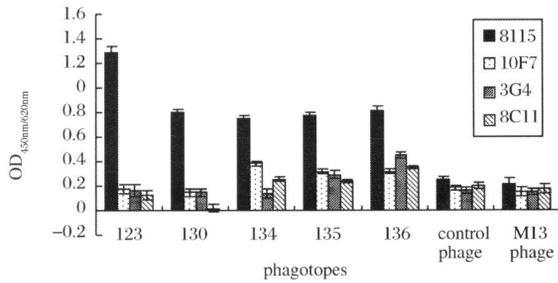


图 1 ELISA 检测噬菌体肽与单抗的反应性

Figure 1 Detection of reactivity of phagotopes to monoclonal antibodies by ELISA

2 模拟肽与 HBcAg aa1 ~ 149 融合蛋白的表达及结合活性分析

HBVcore 蛋白的 1 ~ 149 个氨基酸可组装成类病毒颗粒,其中第 79、80 位氨基酸可被替换成外源蛋白而不影响类病毒颗粒形成^[15]。因此 HBcAg 作为一种很好的外源表位载体已引起研究者的兴趣^[16]。本实验室构建了一个含 HBcAg aa1 ~ 149 的表达载体,本研究将得到的模拟肽插入其第 79 ~ 80 位氨基酸处,表达融合蛋白。

将模拟肽分别以一个和三个拷贝与 HBcAgaal ~ 149 融合,得到的融合蛋白相应称为 HBc-123、HBc-T123。在 ER2566 菌中表达融合蛋白并加以纯化,ELISA 检测融合蛋白与 8H5 抗体的结合活性。实验结果显示(图 2):融合蛋白 HBc-T123 与 8H5 抗体有很强的结合活性,而 HBc-123 融合蛋白没有结合活性。

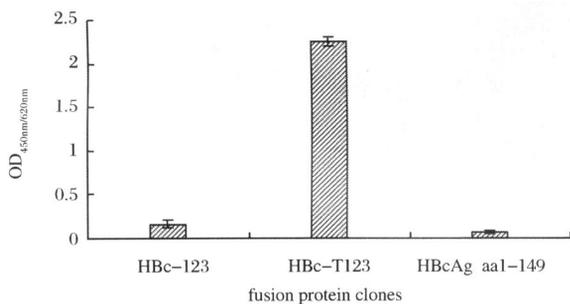


图 2 模拟肽融合蛋白与 8H5 抗体的反应性

Figure 2 The reactivity of recombinant protein with 8H5 detected by ELISA

3 类病毒颗粒的电镜观察

HBc-T123 融合蛋白样品经磷酸钨负染后,于电镜下观察。如图 3 所示,HBc-T123 可组装成完整的类病毒颗粒,颗粒呈空心球形,直径约 30nm 左右。

4 HBc-T123 融合蛋白与 8H5 的反应特异性分析

进一步对 HBc-T123 融合蛋白与 8H5 单抗结

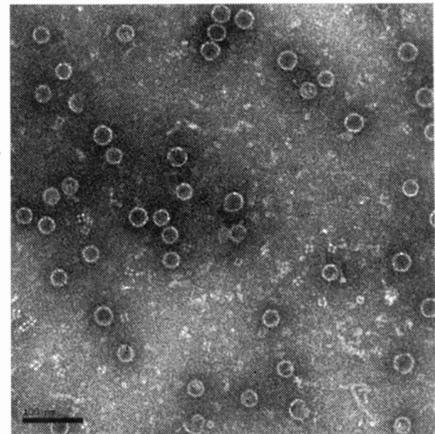


图 3 HBc-T123 组成的类病毒颗粒 (电镜负染,标尺为 100nm)

Figure 3 Virus-like particle assembled from recombinant protein HBc-T123

合的特异性进行分析。包被 HBc-T123 融合蛋白,分别与 14 种禽流感病毒单克隆抗体进行反应。结果显示(图 4),HBc-T123 融合蛋白只和 8H5 单抗有很好的反应性,与其他单抗均无反应,且阴性对照 HBcAg 的反应读值均很低,说明 HBc-T123 融合蛋白与 8H5 单克隆抗体有好的结合特异性。

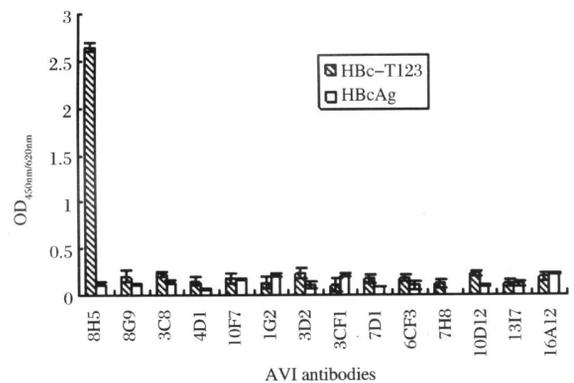


图 4 HBc-T123 融合蛋白与抗体反应的特异性分析

Figure 4 Analysis of specific binding of HBc-T123 to 8H5

5 HBc-T123 融合蛋白与禽流感病毒竞争结合 8H5 单抗

包被 8H5 单抗,将 HBc-T123 融合蛋白分别与 7 株 H5N1 型病毒混合加入,二者竞争结合 8H5 单抗,再以禽流感病毒 HA 特异酶标抗体(2F2-HRP)来检测病毒。由图 5 可知,HBc-T123 融合蛋白与禽流感病毒竞争的百分比达到 50% ~ 62%,说明 HBc-T123 融合蛋白与 8H5 单抗的结合力和病毒相近,进而说明 123 模拟肽较好的模拟了 HA 蛋白

上与 8H5 单抗结合的中和表位。

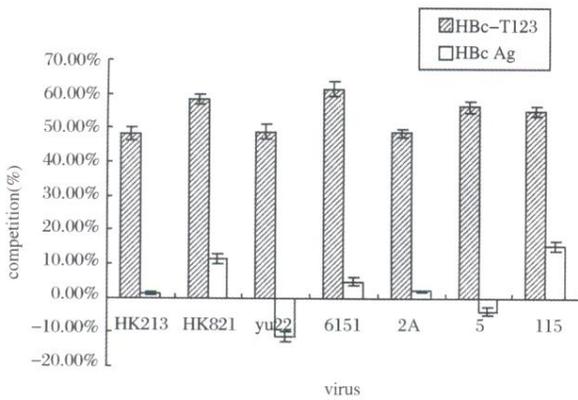


图 5 ELISA 检测 HBc-T123 融合蛋白与 H5N1 病毒竞争结合 8H5 抗体

Figure 5 Detection of HBc-T123 competing with H5N1 viruses for 8H5 by ELISA test

6 HBc-T123 融合蛋白的免疫原性分析

用 HBc-T123 融合蛋白免疫 BALB/c 小鼠,隔周加强,ELISA 检测抗模拟肽抗体产生情况。本实验室已制备出一种 239-123 融合蛋白,即 123 模拟肽融合于 239 蛋白的 C 端,239 为 HEV E2 蛋白的 239 个氨基酸的序列。239-123 融合蛋白亦具有与 8H5 单抗结合活性。以纯化的 239-123 包板,ELISA 检测抗模拟肽抗体的产生。结果如图 6 所示,HBc-T123 融合蛋白免疫小鼠后产生了很高的针对 123 肽的抗体滴度;4 周后滴度均达到 1 120 000。

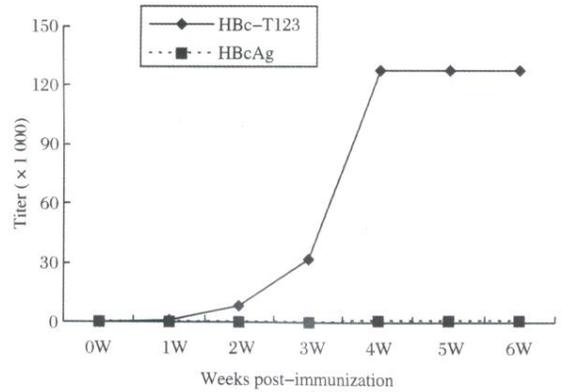


图 6 HBc-T123 融合蛋白免疫鼠血清中抗 123 肽的抗体滴度变化

Figure 6 The titer of anti-123 antibody in serum from mice immunized with HBc-T123 protein

7 免疫荧光检测模拟肽抗血清与 HA 的反应性

本实验室利用昆虫细胞-杆状病毒表达系统,将禽流感 YU22 病毒的 HA 蛋白表达在 SF21 细胞表面。因此可以用免疫荧光来检测模拟肽抗血清与 HA 的反应性,其中以 8H5 单抗作为阳性对照,以 HBcAg aa1~149 抗血清为阴性对照。由图 7 的结果可知,HBc-T123 免疫的鼠血清能特异地与 SF21 细胞反应,表明 HBc-T123 免疫小鼠产生了 HA 交叉反应性抗体,也进一步说明 123 肽较好的模拟了 HA 蛋白的抗原表位。

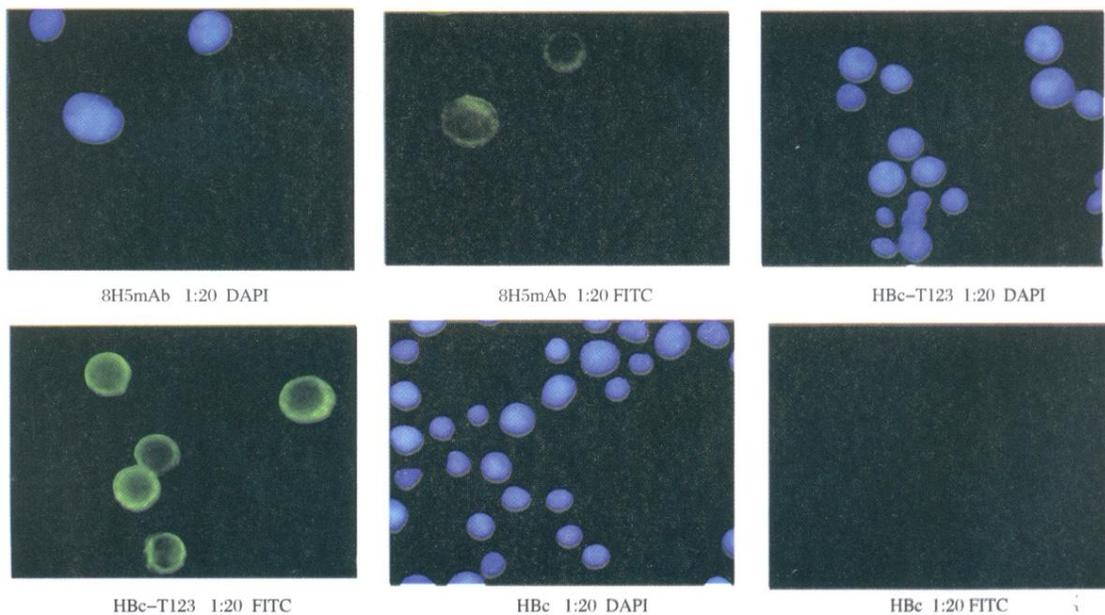


图 7 免疫荧光检测抗血清与 SF21 细胞表达 HA 的结合反应

Figure 7 Detection of binding reactivity of serum to HA expressed on SF21 cells by immunofluorescence assay

讨 论

禽流感病毒 HA 基因是 AIV 最主要的保护性抗原基因,是研制疫苗的理想靶基因。本研究以 H5N1 型禽流感病毒 HA 蛋白广谱中和单抗 8H5 为基础,利用噬菌体肽库技术筛选获得模拟 HA 表位的模拟肽,进行通用表位疫苗的初步研究。为了增强免疫原性,将筛选出的 123 模拟肽与 HBcAg aa1-149 蛋白融合,使模拟肽展示在 HBV 类病毒颗粒上。ELISA 检测结果显示,融合蛋白后的 123 肽仍具有与 8H5 单抗特异结合的能力。免疫荧光检测结果说明,类病毒颗粒免疫小鼠后产生了 HA 交叉反应性抗体。

由于缺乏天然蛋白的三维结构,表位模拟肽的分子小,免疫原性差,半衰期短,使机体无法产生免疫反应,还可能引起免疫耐受。因此增加免疫原性与稳定性是近年来表位疫苗的研究热点。表位展示载体这一方法,在国内外已经取得了不少令人欣喜的研究成果,噬菌体、蛋白分子载体、脂肽等都可以作为表位的载体。本研究曾选用噬菌体和 HEV E2 的一段蛋白 239 作为载体,实验结果证实免疫小鼠后产生抗体滴度较低,而且产生抗体的周期较长,效果不够理想。而类病毒颗粒是一种较为理想的载体,可以用于展示表位模拟肽的类病毒颗粒包括 HBV-VLP^[17]、HCV-VLP^[18]、HPV-VLP^[19] 等多种形式。本研究将模拟肽表达在 HBV 类病毒颗粒上,是由于其含有 T 辅助细胞表位,可以大大提高融合蛋白的抗原性和免疫原性;同时类病毒颗粒容易被机体内的抗原递呈细胞吞噬,从而可以更快的激起机体的免疫应答。展示模拟肽的 HBV 类病毒颗粒免疫小鼠一周后,血清中抗体滴度即可达到 1 000,四周后血清中抗体滴度可达 1 120 000。

氨基酸序列分析表明 123 模拟肽与 HA 在一级序列上并没有相似性,却与 8H5 单抗有很好的特异结合活性,说明此十二肽是在空间结构上模拟了 HA 的表位。当一个拷贝的模拟肽融合表达在 HBV 类病毒颗粒上,可能影响了其特定的空间结构,失去了与 8H5 特异的结合活性;而中间通过连接肽 GGGGS 串联的三个拷贝模拟肽,展示在 HBV 类病毒颗粒上,就维持了十二肽自身的构象,保持了活性。以上结果说明,虽然 123 模拟肽是从线性十二肽库中筛选出来的,但是仍具有一定的构象性以

维持其活性。GGGGS 的空间结构具有高度易变性和灵活性,广泛用于蛋白质或肽之间的连接^[20],本实验用其作为表位之间的连接,目的是使多个抗原表位在空间上互不干扰,提高模拟肽的分子量、增强其免疫原性。

用 HBc-T123 类病毒颗粒与 7 株 H5N1 亚型禽流感病毒竞争结合 8H5 单抗,这 7 株 H5N1 型的病毒是不同年份的代表毒株。HBc-T123 类病毒颗粒与病毒的竞争抑制率均达到 50%~62%,说明 HBc-T123 类病毒颗粒与 8H5 单抗的结合能力与病毒相近,进而说明 123 模拟肽较好的模拟了多种毒株共同的 HA 蛋白抗原表位保守区域。本研究结果可为高致病性禽流感病毒通用表位疫苗的研究提供参考。

(致谢:特别感谢香港大学微生物系新发传染病国家重点实验室管轶教授和陈鸿霖教授惠赠灭活禽流感病毒株。)

参考文献:

- [1] Sims L D, Domenech J, Benigno C, et al. Origin and evolution of highly pathogenic H5N1 avian influenza in Asia[DB]. PubMed. Vet Rec, 2005, 157: 159-164.
- [2] World Health Organization. H5N1 influenza . timeline [DB]. <http://www.who.int/csr/disease/avian-influenza/timeline.pdf> (accessed Oct 2006).
- [3] 王利, 李康生. 禽流感病毒的免疫原性及其疫苗的研究进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2006, 34(2): 55-59.
- [4] Boss C N, Grunebach F, Brauer K, et al. Identification and characterization of T-cell epitopes deduced from RGS5, a novel broadly expressed tumor antigen[J]. Clin Cancer Res. 2007, 13: 3347-3355.
- [5] Chen X, Scala G, Quinto I, et al. Protection of rhesus macaques against disease progression from pathogenic SHIV-89.6PD by vaccination with phage-displayed HIV-1 epitopes[J]. Nat Med, 2001, 7: 1225-1231.
- [6] Khurana S, Needham J, Mathieson B, et al. Human Immunodeficiency Virus (HIV) Vaccine Trials: a Novel Assay for Differential Diagnosis of HIV Infections in the Face of Vaccine-Generated Antibodies[J]. J Virol, 2006, 80: 2092-2099.
- [7] Steward M W. The Development of a Mimotope-based Synthetic Peptide Vaccine Against Respiratory Syncytial Virus[J]. Biologicals, 2001: 215-219.
- [8] Torresi J, Stock O M, Fischer A E, et al. A Self-Adjuvanting Multiepitope Immunogen That Induces a Broadly Cross-Reactive Antibody to Hepatitis C Virus[J]. Hepatology, 2007, 45: 911-920.
- [9] Nicholson K G, Wood J M, Zambon M. Influenza[J]. Lancet, 2003, 362(9397): 1733-1745.

- [10] Tsuchiya E, Sugawara K, Hongo S, et al. Effect of addition of new oligosaccharide chains to the globular head of influenza A/ H2N2 virus haemagglutinin on the intracellular transport and biological activities of the molecule[J]. *J Gen Virol*, 2002, 83: 1137-1146.
- [11] Fleury D, Wharton S A, Skehel J J, et al. Antigen distortion allows influenza virus to escape neutralization [J]. *Nat Struct Biol*, 1998, 5: 119-123.
- [12] World Health Organization. Cumulative number of confirmed human cases of avian influenza A/ (H5N1) reported to WHO. 16 October 2006.
- [13] David M. Knipe, Peter M. Howley, Diane E. Griffin. *Fields Virology*, 4th Edition, ed[M]. *Fundamental Virology*, 4th Edition, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
- [14] Chen Y X, Luo H F, Ge S X, et al. Development and characterization of MAb against haemagglutinin of highly pathogenic H5 avian influenza virus. *Chinese Journal of Virology [J]*. 2005, 21(6): 421-427.
- [15] Borisova G, Borschukova Wanst O, Mezule G, et al. Spatial structure and insertion capacity of immunodominant region of hepatitis B core antigen[J]. *Intervirology*, 1996, 39: 16-22.
- [16] Milich D R, Peterson D L, Zheng J, et al. The hepatitis nucleocapsid as a vaccine carrier moiety[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1995, 754: 187-201.
- [17] Zhang Y, Song S. Generation of chimeric HBc proteins with epitopes in *E. coli*: Formation of virus-like particles and a potent inducer of antigen-specific cytotoxic immune response and anti-tumor effect in vivo. [J]. *Cell Immunol*, 2007, 247(1): 18-27.
- [18] Marija Mihailova. Recombinant virus-like particles as a carrier of B- and T-cell epitopes of hepatitis C virus (HCV) [J]. *Vaccine*, 2006, 24: 4369-4377.
- [19] Da Silva D M, Fausch S C. Uptake of human papillomavirus virus-like particles by dendritic cells is mediated by Fcγ receptors and contributes to acquisition of T cell immunity[J]. *Immunol*, 2007, 15: 178(12): 7587-7597.
- [20] Hou Y, Gu X X. Development of peptide mimotopes of lipooligosaccharide from nontypeable haemophilus influenzae as vaccine candidates [J]. *Immunol*, 2003, 170: 4373-4379.

Identification of Peptide Mimotopes of an Broad-spectrum Neutralizing Epitope of Highly Pathogenic Avian Influenza Hemagglutinin

SONG Hui-juan, LUO Wen-xin, ZHENG Zhen-hua, CHEN Ying-wei,
CHEN Yi-xin, CHEN Zi-min, ZHANG Jun, XIA Ning-shao

(*National Institute of Diagnostics and Vaccine Development in Infectious Diseases and School of Life Sciences,
Xiamen University, Xiamen 361005, China*)

Abstract: A monoclonal antibody (8H5), which showed strong neutralization activity against 33 strains of H5N1 viruses isolated from hosts at various regions from 2002 to 2006, was characterized in our lab recently. This result indicated the presence of highly conserved neutralizing site on hemagglutinin (HA) of various H5N1 subtypes. In the present study, the peptide phage display technique was applied to generate mimotope of the conserved neutralizing epitope recognized by 8H5 mAb. Five peptides displayed on phage were identified to specifically bind to 8H5 mAb. One of the five peptides, 123, was further displayed on the virus-like particle assembled from aa 1-149 fragment of HBcAg. The chimeric particle HBc-T123 conserved the specific binding to 8H5 mAb, and competed with H5N1 viruses for 8H5 mAb. The antiserum induced by HBc-T123 intensively stained on SF21 cells infected by recombinant baculovirus containing HA gene of YU22 virus, indicating the production of cross-reactive antibody to H5N1 HA.

Key words: H5N1 HA; phage display peptide library; mimotope

Corresponding author: LUO Wen-xin, e-mail: wxluo@xmu.edu.cn