

# 基于 MgPa 模拟表位的 MAP 的制备、纯化与鉴定

曾焱华,余敏君,唐双阳,游晓星,朱有葱

(南华大学病原生物学研究所,湖南 衡阳 421001)

**摘要:** **目的** 制备含有生殖支原体黏附蛋白(MgPa)模拟表位的多抗原肽(MAP),为研制基于模拟表位的 MAP 用于 Mg 的诊断与预防提供前期实验基础。 **方法** 以多聚赖氨酸为核心基质,采用 Fmoc 方法合成含有 Mg-Pa 模拟表位的八分枝 MAP,反向高效液相色谱(RP-HPLC)分析 MAP 的纯度,质谱分析法测定 MAP 的分子量以期对其进行鉴定。 **结果** 分别制备了含有 MgPa 3 个模拟表位的 MAP,RP-HPLC 分析的结果表明合成的 3 个 MAP 的纯度都在 90% 以上,质谱分析的结果说明所合成的 MAP 的分子量与预期的理论分子量相符。 **结论** 成功制备、纯化并鉴定了 3 个含有 MgPa 模拟表位的 MAP。

**关键词:** 生殖支原体; 黏附蛋白; 模拟表位; 多抗原肽

**中图分类号:** R375.3 **文献标识码:** A

## Preparation, Purification and Identification of the MAP Based on the Mimic Epitope of the Adhesion Protein of *Mycoplasma Genitalium*

ZENG Yanhua, YU Minjun, TANG Shuangyang, et al

(Institute of Pathobiology, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

**Abstract:** **Objective** The multiple antigen peptides (MAP) containing the mimic epitope of the adhesion protein of *Mycoplasma genitalium* (MgPa) were prepared in order to provide the preliminary experimental basis for the development of mimotopes-based MAP used for the diagnosis and prevention of *M. genitalium*. **Methods** The eight branches MAPs containing the mimic epitope of MgPa were prepared by the Fmoc method using poly-lysine as the core matrix. The purity of MAPs were analyzed by reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). The molecular weights of MAPs were characterized by Mass Spectrometry. **Results** Three kinds of MAP containing the mimic epitopes of MgPa were successfully prepared. And the results of RP-HPLC showed that the purity of MAPs are above 90%. The molecular weight of MAPs are consistent with the expected theoretical molecular weight. **Conclusion** The 3 kinds of MAP, containing the mimic epitopes of MgPa, were successfully prepared, purified and identified.

**Key words:** *Mycoplasma genitalium*; Adhesin protein; Mimic epitope; Multiple antigen peptides

生殖支原体(*Mycoplasma genitalium*, Mg)是基因组最小的能自我复制的原核细胞型微生物,在男性主要引起急性非淋菌性尿道炎<sup>[1]</sup>;在女性则引起慢性盆腔感染性疾病,并可导致不育<sup>[2]</sup>;新生儿则经母亲生殖道分娩时感染引起结膜炎和肺炎<sup>[3]</sup>。Mg 细胞膜

上的黏附素蛋白(*Mycoplasma genitalium* protein of adhesion, MgPa)对 Mg 尖形结构的形成和 Mg 黏附到宿主细胞至关重要<sup>[4]</sup>。已有研究表明 MgPa 的 C 端(第 1 248 ~ 1 364 aa)具有较强的免疫原性<sup>[5]</sup>。因此, Mg-Pa 是一种重要的诊断和疫苗候选抗原。

课题组在前期的研究中制备并纯化了 MgPa 的多克隆抗体,以此抗体为靶分子,利用噬菌体展示肽库技术成功筛选到 MgPa 的 3 个模拟表位<sup>[6-8]</sup>。本研究拟以多聚赖氨酸为核心基质,制备含有 MgPa 3 个模拟表位的多抗原肽(multiple antigenic peptide, MAP),并用反向高效液相色谱(reverse phase high

收稿日期:2013-06-14

基金项目:国家自然科学基金项目(30801064,31370207);湖南省高校科技创新团队(湘教通 2010-212 号);湖南省研究生科研创新项目(CX2010B381)。

作者简介:曾焱华,博士,副教授,硕士生导师,研究方向:性病病原体的致病机制、诊断与预防, E-mail: zengyihua21cn@126.com.

performance liquid chromatography, HPLC) 分析 MAP 的纯度,用质谱分析法测定其分子量以对 MAP 进行鉴定,以便为进一步研究基于 MgPa 模拟表位的 MAP 用于 Mg 的临床诊断与预防提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 八分枝 MAP 的制备

分别合成含有参考文献[8]中 P2、P30 和 P42 所对应的多肽序列的八分枝 MAP,为了使多肽序列与 MgPa 模拟表位的序列(P-S-A-A/V-X-R-F/W-E/S-L-S-P)中的第 7 位和第 10 位氨基酸一致,故将 P2 多肽序列中第 7 位的 A 改为 R,第 10 位的 K 改为 L。具体合成的序列如下所示:WP:(WPSAAERFSLSP)8-K4K2KG;AS:(AKITRTLSPFS)8-K4K2KG 和 KH:(KSLSRHDHIIHH)8-K4K2KG。

多肽的合成选用对称八分枝 MAP 树脂,采用标准的 Fmoc 方法<sup>[9]</sup>合成。选用 Fmoc-Lys (Fmoc)-OH 为核心基质,2 个 Fmoc 去掉以后暴露出 2 个氨基,分别都往下延伸。采取在一个 Gly 上接一个 Lys,然后利用 Lys 的两个氨基再接 2 个 Lys,再接 4 个 Lys,然后在这 4 个 Lys 上的 8 个氨基上各接一条多肽,

使其合成为八分枝 MAP。

1.2 八分枝 MAP 的纯化

将合成好的八分枝 MAP 粗品溶解,经 0.45 μm 的纤维素膜过滤后,经 Sephadex G-25 凝胶渗透色谱法仔细纯化,冻干。最终产物用反相高效液相色谱仪(日本 Shimadzu)鉴定其纯度,分析柱采用 PLRP-S 100A 为填料,流动相为含有 0.1% 三氟乙酸的乙腈溶液,流速为 1 mL/min,波长为 220 nm。

1.3 八分枝 MAP 的鉴定

为进一步验证合成的八分枝 MAP 是否确实与预期一致,委托上海吉尔生化有限公司对经 RP-HPLC 鉴定纯度后的八分枝 MAP 进行质谱分析,以确定其相对分子质量。

2 结 果

2.1 八分枝 MAP 的合成

利用标准的 Fmoc 方法,选用 Fmoc-Lys(Fmoc)-OH 为基质,以甘氨酸为肽和树脂间的连接物,首先合成寡聚赖氨酸基质,然后在寡聚赖氨酸基质上用固相逐步接肽法成功合成了 3 个含有模拟表位的八分枝 MAP,具体合成的序列及结构如图 1 所示。

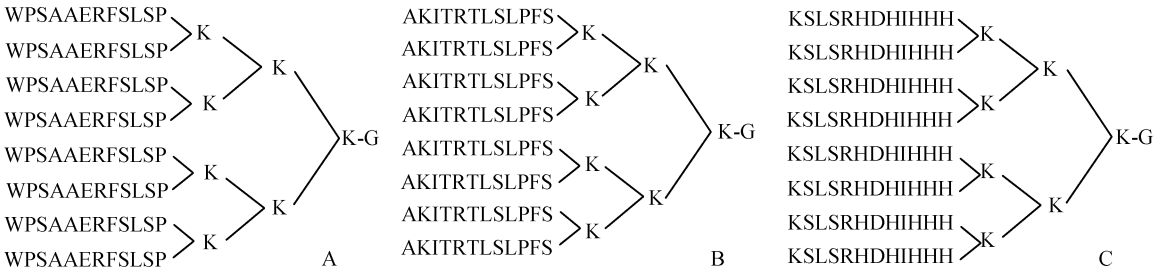


图 1 合成八分枝 MAP 的结构 A:含 WP12 的 MAP;B:含 AS12 的 MAP;C:含 KH12 的 MAP

2.2 八分枝 MAP 的 RP-HPLC 纯化

合成好的八分枝 MAP 粗品经过滤后,用 RP-HPLC 分析并进行纯化,结果表明:WP12 的主峰出现在保留时间为 13.662 min 处,其峰的面积占整个面积的 91.850 1%,即其相对浓度约为 91.850 1%(图 2A)。AS12 的主峰出现在保留时间为 15.072 min 处,其峰的面积占整个面积的 93.348 1%,说明其相对浓度约为 93.348 1%(图 2B)。而 KH12 的主峰出现在保留时间为 7.163 min 处,其峰的面积占整个面积的 94.526 5%,其相对浓度约为 94.526 5%(图 2C),以上这些结果说明所合成的 MAP 得到

了较好的纯化,其纯度都达到 90% 以上。

2.3 八分枝 MAP 的质谱分析

用质谱分析仪对经 RP-HPLC 分析纯化后的八分枝 MAP 进行鉴定,结果显示:WP12 的 Mr 约为 11 880 (图 3A),AS12 的 Mr 约为 10 532 (图 3B),KH12 的 Mr 约为 12 848 (图 3C),与理论预算值相符合。

3 讨 论

为了有效的预防 Mg 的感染,必须研制出能诱导产生中和抗体的疫苗。研究表明诱导机体产生中

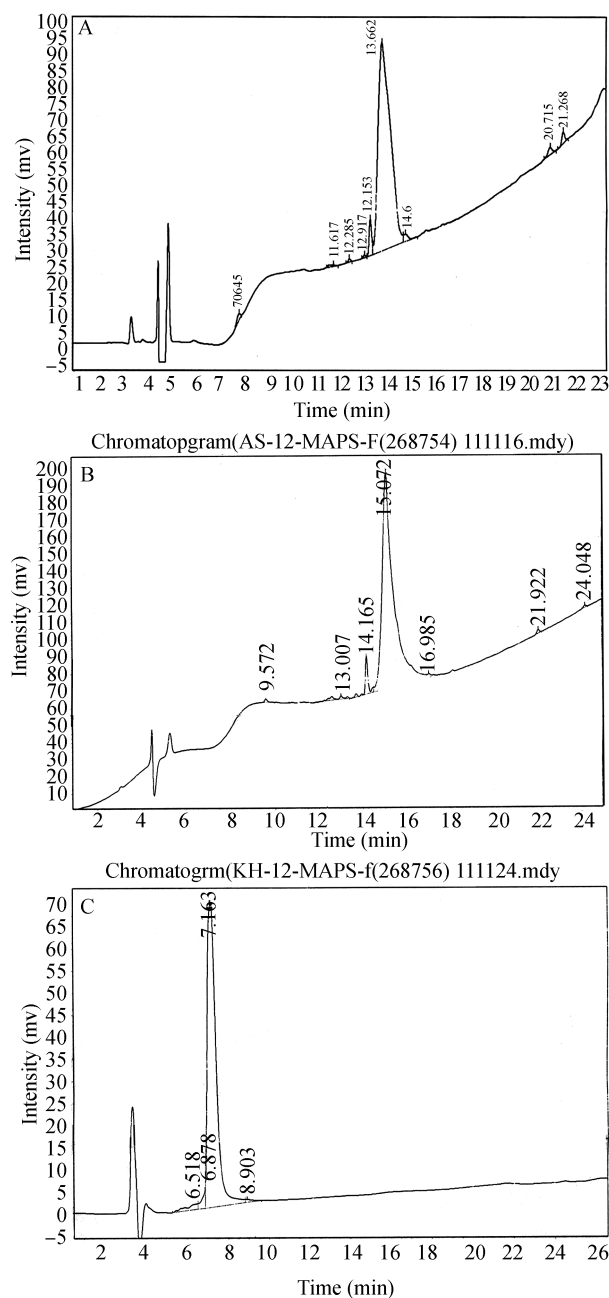


图 2 用 RP-HPLC 分析 3 个 MAP 的纯度 A: RP-HPLC 分析 WP12 的纯度; B: RP-HPLC 分析 AS12 的纯度; C: RP-HPLC 分析 KH12 的纯度

和抗体的表位多为构象表位,因此,不能通过抗原分子所具有的原始氨基酸序列进行预测。而鉴定构象表位的模拟表位是解决这一难题的方法之一。Geyssen 把模拟表位定义为:一个能与抗体分子的抗原结合位点结合,未必与诱导该抗体的表位相同,但可模拟该表位基本特征分子<sup>[10]</sup>。一个表位和其相应的模拟表位有相同的抗原性,其中可能的原因有如下两点:①两者结合于抗体同一互补位中不同抗

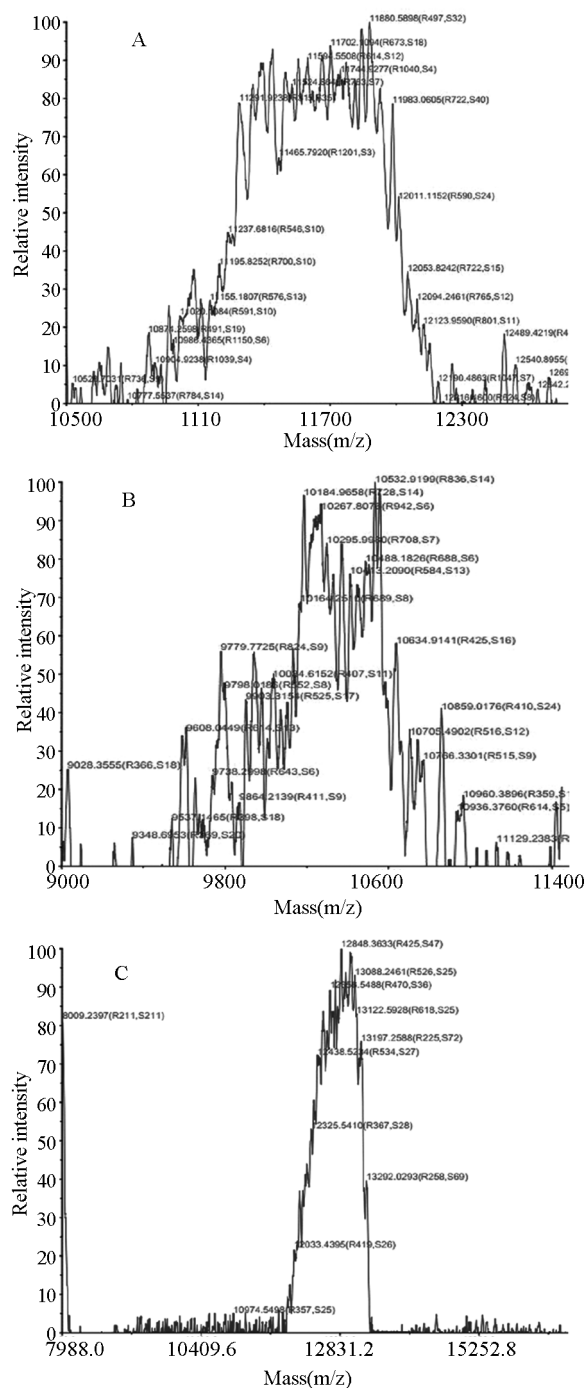


图 3 质谱分析法鉴定制备的 3 种 MAP A:含 WP12 序列的 MAP; B:含 AS12 序列的 MAP; C:含 KH12 序列的 MAP

原结合位点;②两者具有相同的原子。课题组在前期研究中利用噬菌体展示肽库技术筛选到 MgPa 的 3 个模拟表位,含有这些模拟表位的噬菌体能和 MgPa 的多克隆抗体特异性结合。

一般来说,免疫细胞识别、递呈抗原时仅需要十几个氨基酸,与抗体结合则仅需要几个关键的氨基

酸<sup>[11]</sup>。因此,表位肽疫苗利用含较短氨基酸序列的免疫优势抗原表位,即可有效地被免疫系统识别和被 APC 递呈,具有针对性强、能去除抑制性表位和避免因病原体发生抗原变异而引起的免疫逃逸等优点。但在实际应用中,由于表位肽疫苗在结构方面存在一定缺陷,并不能有效的诱导体内的免疫反应,必须对其构型进行改建以增添分子修饰才能提高其免疫原性及其在体内的稳定性。Tam 等<sup>[12]</sup>采用具有  $\alpha$  和  $\varepsilon$  两个氨基、分子量小、且免疫原性弱的赖氨酸为核心基质,将 4 条或 8 条抗原表位相同或不同的单体肽偶联在一起,形成树枝状结构,称之为 MAP。与线性多肽相比,MAP 具有以下优点:①能提供更多的抗原表位,因而能与抗体多价结合;②能很好的模拟天然表位的构象,诱导机体产生更多的保护性抗体,且能减少氨基酸变异的影响;③能更好地提供抗原表位与抗体结合的空间,增强肽的表位结合能力,提高了 APC 对抗原肽的识别、处理和提呈效率;④相对分子质量较大,由于抗原表位的重新搭配和组合能提高其免疫原性,因此,无需分子修饰或偶联载体蛋白。因此,MAP 已用于 HIV<sup>[13]</sup>、流感病毒<sup>[14]</sup>等病原体的新型诊断抗原和疫苗研究,显示出其独特的优越性。吴玉章等<sup>[15]</sup>在实验中发现,合成的含有 Pre-S2 序列的 MAP 肽诱发的免疫反应明显高于对照的线性肽,说明 MAP 肽的结构能明显提高抗原肽的免疫原性,从而间接说明分枝肽结构可能部分恢复其大分子特征。

本研究用 Fmoc 法合成了前期研究中筛选并经鉴定的 MgPa 的 3 个模拟表位的 MAP,RP-HPLC 分析的结果表明,合成的 3 种 MAP 的纯度均达到了 90% 以上,然后用质谱分析对其进行了鉴定,3 种 MAP 的分子量与预期分子量相符,说明成功的合成了含有 3 个模拟表位的 MAP。下一步将把这些经鉴定的 MAP 分别免疫小鼠,检测其诱导小鼠产生特异性体液免疫与细胞免疫应答的水平,以便研究基于模拟表位的 MAP 在临床诊断和疫苗研究中的应用价值。

#### 参考文献:

- [1] Manhas A, Sethi S, Sharma M, et al. Association of genital mycoplasmas including *Mycoplasma genitalium* in HIV infected men with nongonococcal urethritis attending STD & HIV clinics[J]. Indian J Med Res, 2009, 129(3): 305-310.
- [2] Bjartling C, Osser S, Persson K. *Mycoplasma genitalium* in cervicitis and pelvic inflammatory disease among women

- at a gynecologic outpatient service [J]. Am J Obstet Gynecol, 2012, 206(6): 476. e1-476. e8.
- [3] Patel KK, Salva PS, Webley WC. Colonization of paediatric lower respiratory tract with genital *Mycoplasma* species [J]. Respirology, 2011, 16(7): 1081-1087.
- [4] Burgos R, Pich OQ, Ferrer-Navarro M, et al. *Mycoplasma genitalium* P140 and P110 cytoadhesins are reciprocally stabilized and required for cell adhesion and terminal-organelle development [J]. J Bacteriol, 2006, 188(24): 8627-8637.
- [5] Svenstrup HF, Jensen JS, Gevaert K, et al. Identification and characterization of immunogenic proteins of *Mycoplasma genitalium* [J]. Clin Vaccine Immunol, 2006, 13(8): 913-922.
- [6] 曾焱华, 吴移谋, 游晓星, 等. 生殖支原体粘附素蛋白 MgPa 的表达及其多克隆抗体的制备与纯化[J]. 中国免疫学杂志, 2010, 26(11): 1011-1015.
- [7] 曾焱华, 游晓星, 何军, 等. 应用噬菌体展示肽库筛选生殖支原体黏附蛋白的模拟表位[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2012, 32(1): 84-90.
- [8] Zeng YH, Liu LZ, He J, et al. Screening and identification of the mimic epitope of the adhesion protein of *Mycoplasma genitalium* [J]. Can J Microbiol, 2012, 58(7): 898-908.
- [9] Loffet A. Synthesis of a pentapeptide by the Merrifield method [J]. Experientia, 1967, 23(5): 406-407.
- [10] Geysen HM, Barteling SJ, Meloen RH. Small peptides induce antibodies with a sequence and structural requirement for binding antigen comparable to antibodies raised against the native protein[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1985, 82(1): 178-182.
- [11] Boris T, Shmuel C, Meir W. The epitopes for natural polyclonal antibodies are rich in proline [J]. Immunology, 1997, 94: 6335-6339.
- [12] Tam JP, Zavala F. Multiple antigen peptide: a novel approach to increase detection sensitivity of synthetic peptides in solid-phase immunoassays[J]. J Immunol Methods, 1989, 124(1): 53-61.
- [13] Hashimoto C, Nomura W, Ohya A, et al. Evaluation of a synthetic C34 trimer of HIV-1 gp41 as AIDS vaccines [J]. Bioorg Med Chem, 2012, 20(10): 3287-3291.
- [14] Vergara-Alert J, Argilagué JM, Busquets N, et al. Conserved synthetic peptides from the hemagglutinin of influenza viruses induce broad humoral and T-cell responses in a pig model[J]. PLoS One, 2012, 7(7): e40524.
- [15] 吴玉章, 刘茂昌, 贾正才, 等. HBV 新型免疫原的设计、合成及免疫原性研究[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(10): 919-923.

(此文编辑: 蒋湘莲)