

基于抗原表位的抗尖吻蝮蛇毒磷脂酶 A₂ 抗体制备^{*}

朱海婷¹, 李 恒², 杨万舟¹, 张文浩¹, 余晓东¹, 和七一¹

(1. 重庆师范大学 生命科学院 教育部活性物质生物技术工程研究中心 重庆市生物活性物质工程研究中心, 重庆 401331;

2. 重庆市公安局证据鉴定中心, 重庆 400021)

摘要:为探究尖吻蝮(*Deinagkistrodon acutus*)蛇毒磷脂酶 A₂(phospholipase A₂, PLA₂)的抗原表位并制备针对该酶的特异性抗体,通过 IEDB-Bepipred 2.0 在线服务器对 PLA₂ 的氨基酸序列进行线性 B 细胞抗原表位预测,确定抗原位点氨基酸序列,并将它们连接到表达载体 pET-28a(+) 中进行原核表达获得重组蛋白。将纯化后的重组蛋白用于小鼠(*Mus musculus*)免疫以制备针对尖吻蝮蛇 PLA₂ 的抗体。通过酶联免疫吸附试验(ELISA)和蛋白质印迹法(Western blot)检测分析小鼠血清中的抗体情况,评价抗体对尖吻蝮蛇毒 PLA₂ 活性的抑制作用。成功预测了尖吻蝮蛇毒 PLA₂ 的 6 个抗原位点氨基酸序列,并表达了相应的重组蛋白,该蛋白的相对分子质量约为 16.5 kDa。ELISA 和 Western blot 检测分析结果表明小鼠血清对尖吻蝮蛇毒 PLA₂ 的抗体滴度高于 1:256,并且与尖吻蝮蛇毒中相对分子质量为 14~16 kDa 的 PLA₂ 蛋白产生强烈的结合反应。体外酶活测定实验结果表明 10 μL 重组蛋白免疫血清使 6 μg 尖吻蝮蛇毒 PLA₂ 活性由 100%降低至 62.2%。研究结果提示基于尖吻蝮蛇毒 PLA₂ 设计的抗原表位能够有效刺激小鼠产生免疫应答反应,并成功制备出可抑制尖吻蝮蛇毒 PLA₂ 活性的血清抗体。

关键词:磷脂酶 A₂; 尖吻蝮; B 细胞抗原表位; 原核表达

中图分类号:Q556;Q786

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2024)06-0054-08

在热带和亚热带地区,蛇咬伤是一大公共卫生问题。有研究指出:全球每年遭受蛇咬伤的人数约有 540 万人,其中约 13 万人死亡、超过 40 万人残疾^[1]。蛇咬伤常引发人体急性中毒,它的主要症状包括局部组织损伤、出血和神经肌肉麻痹,而且这些症状都是导致死亡和长期残疾的主要原因。目前治疗蛇咬伤最有效的方法是通过静脉注射方式将抗蛇毒血清注入患者体内,使之达到抗蛇毒的效果^[2-4]。然而,由于蛇毒成分极为复杂,且因抗蛇毒血清大多通过全毒免疫法生产而导致其中 95% 的抗体对蛇毒中所包含的毒素没有抑制作用,因此在实际治疗过程中,往往需要对患者使用大剂量的抗蛇毒血清,这将会增大蛇咬伤患者在治疗期间出现过敏症状或患血清病的风险,凸显出当前治疗方法的局限性^[5-6]。

抗原表位的特定化学基团是抗原特异性的决定因素,通常位于抗原分子表面,能与 B 细胞表面受体结合并激发机体产生特异性抗体的免疫应答^[7]。通过对蛇毒蛋白质的氨基酸序列和空间结构进行深入分析,可以预测 B 细胞抗原表位并识别其中关键的抗原位点,这将有助于减少杂蛋白和过敏源在相关抗体制备过程中的影响,进而获取更具针对性的抗蛇毒血清。

尖吻蝮(*Deinagkistrodon acutus*)又称五步蛇,主要分布在中国东南部地区;它的毒液主要含有抗凝血和抑制血小板聚集的毒素。被尖吻蝮咬伤后,患者身体会迅速表现出急性组织坏死和严重出血症状,并进而可能导致患者全身多器官功能衰竭^[8]。蛇咬伤通常发生在下肢和手部,主要表现为皮肤坏死、水肿和肌肉萎缩;严重的蛇咬伤可能引起患者肢体功能丧失甚至导致患者截肢,给患者的生理和心理造成深远的负面影响^[9]。尖吻蝮蛇毒中的主要毒素为磷脂酶 A₂(phospholipase A₂, PLA₂)。PLA₂ 具有强烈的肌毒性和出血活性,致命性极强。在 Ca²⁺ 的作用下,PLA₂ 能催化细胞膜磷脂的水解,并释放出游离脂肪酸和溶血磷脂,进一步引发细胞破裂和溶血^[10-11]。同时,分泌型 PLA₂ 还具有神经毒性,能抑制神经传导,导致肌纤维过度收缩和肌肉坏死^[12]。有研究结果显示,抑制 PLA₂ 的活性可以有效减轻蛇毒引起的出血和肌肉损伤^[13]。

^{*} 收稿日期:2024-05-05 修回日期:2024-07-08 网络出版时间:2024-12-27T13:50

资助项目:国家自然科学基金面上项目(No. 3227030453);重庆市自然科学基金面上项目(No. CSTB2022NSCQ-MSX0423)

第一作者简介:朱海婷,女,研究方向为生物化学与分子生物学,E-mail: 2022110513069@atu.cqnu.edu.cn;通信作者:和七一,男,正高级实验师,博士,E-mail:hqy7171@126.com

网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/50.1165.n.20241225.1007.004

基于上述背景,本研究利用抗原表位预测技术对尖吻蝮蛇毒 PLA₂ 的氨基酸序列进行了深入分析,并设计出 PLA₂ 的关键抗原位点,然后采用原核表达系统来生产这些关键蛋白片段,最后通过动物免疫方法诱导产生了针对性较强的抗体,从而为未来针对尖吻蝮蛇毒中其他毒素抗原表位抗体的制备和开发提供实验基础和理论支持。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验用体质量范围为 18~22 g 的雌性昆明小鼠(*Mus musculus*)购于重庆恩斯维尔实验动物销售有限公司,具体饲养条件为:环境相对湿度控制在 50%~70%,环境温度保持在 25~26 °C,光照周期为 12 h 光照:12 h 黑暗,同时提供充足的饲料和无菌水。所有与动物有关的实验参照美国《实验动物管理和使用指南》中规定的报告标准进行。

1.2 试剂与仪器

研究所用主要试剂有:BL21(DE3)感受态细胞购自北京擎科生物科技股份有限公司,卡那霉素购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司,LB 液体培养基(干粉)、异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)、咪唑和磷酸缓冲液(PBS)购自北京索莱宝科技有限公司;尖吻蝮蛇毒 PLA₂ 由重庆师范大学动物毒素与新药及保健食品研究实验室保存;Ni²⁺亲和层析柱、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶配制试剂盒、15~120 kDa 彩色预染蛋白相对分子质量标准(Marker)、费氏完全佐剂、费氏不完全佐剂、聚偏二氟乙烯(PVDF)膜、脱脂奶粉、辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗鼠二抗、增强型化学发光(ECL)试剂盒、牛血清白蛋白(BSA)和 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)均购自上海碧云天生物技术股份有限公司;抗尖吻蝮蛇毒血清购于上海赛伦生物技术股份有限公司。其他化学试剂均为分析纯级。

研究所用主要仪器与设备有:四川蜀科仪器有限公司生产的 TGL-20 型高速冷冻离心机、北京博医康实验仪器公司生产的 FD-1A-50 型冻干机、上海闪谱生物科技有限公司生产的 SP-Max 2300A2 型光吸收型全波长酶标仪、杭州聚莱仪器有限公司生产的 HWS-150B 型恒温恒湿培养箱,上海智城分析仪器制造有限公司生产的 ZHWY-100D 型恒温培养振荡器、美国 Bio-Rad 公司出品的 Mini-PROTEAN 小型垂直电泳仪,广东美的厨房电器制造有限公司生产的 M1-211A 型微波炉、北京市六一仪器厂生产的胶片观察灯、英国 UVITEC 公司出品的 Alliance Q9 型化学发光成像分析仪。

1.3 抗原表位设计

通过 BLAST 软件检索 GenBank 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中尖吻蝮蛇毒 PLA₂ 的 mRNA 序列。从 Uniprot 数据库(<https://www.uniprot.org/>)下载 FASTA 格式的氨基酸序列,在去除信号肽部分的氨基酸序列后,将成熟肽部分的氨基酸序列使用 IEDB-Bepipred 2.0 在线服务器(<http://tools.iedb.org/bcell/>)基于随机森林回归算法来预测线性 B 细胞抗原表位(抗原表位一般由连续的 12~15 个氨基酸残基组成)^[14],并基于单个氨基酸残基使用 Chou-Fasman 算法^[15]预测二级结构、基于 Emini 方案^[16]预测表面可及性、基于 Karplus-Schulz 方法^[17]预测可折叠性、基于 Kolaskar-Tongaonkar 方法^[18]预测抗原性以及进行 Parker 亲水性预测^[19]。使用 KK 连接子将抗原表位氨基酸序列串联起来,并在 5'端加入 BamH I 酶切位点,3'端加入 Hind III 酶切位点,经密码子优化后送往擎科生物科技股份有限公司进行人工合成,并克隆至 pET28-a(+)载体的 BamH I/Hind III 酶切位点之间。

1.4 重组蛋白的表达与纯化

将合成的 pET28a-EpiPLA 质粒转化至 BL21(DE3)感受态细胞,再将后者在含有 50 μg·mL⁻¹ 卡那霉素的 LB 平板中于 37 °C 下过夜培养后,挑取阳性单克隆于液体 LB 培养基中进行扩大培养。取新鲜菌液进行 IPTG 诱导表达(IPTG 的终浓度为 1 mmol·L⁻¹),在 37 °C 下摇床培养 4~5 h。取表达后的菌液以 5 000 r·min⁻¹ 离心 20 min 后收集沉淀,将沉淀保存于-80 °C 条件下。

按照每 1 L 表达菌液中加入 80 mL 变性裂解液重悬菌液沉淀,液氮冻融 3 次,冰浴超声破碎 15~20 min,以 4 °C、10 000 r·min⁻¹ 离心 20 min 后收集细菌裂解液上清。使用 Ni²⁺亲和层析柱对重组蛋白进行纯化,用浓度为 5、10 mmol·L⁻¹ 的咪唑溶液多次洗涤,最后使用浓度为 250 mmol·L⁻¹ 的咪唑溶液洗脱重组蛋白。通过 SDS-PAGE(ω_{丙烯酰胺}=12.5%)检测蛋白洗脱情况。最后采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒确定重组蛋白的质量浓

度,将重组蛋白冻干后于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件保存。

1.5 免疫及血清制备

取 12 只 42~56 日龄的雌性昆明小鼠分为处理组和对照组,每组 6 只。使用 pH 为 7.2 的灭菌 PBS 将纯化的重组蛋白质量浓度调整至 $1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,再用等体积的佐剂乳化,然后以皮下多点注射方式给处理组小鼠接种重组蛋白,每只小鼠接种剂量为 $100\text{ }\mu\text{L}$;采用相同注射方式给对照组小鼠注入相同剂量的不含重组蛋白的 PBS。然后每 14 d 对 2 组实验小鼠进行 1 次免疫,整个实验中每只实验小鼠均接受免疫 3 次,其中首次免疫使用弗氏完全佐剂,后续 2 次免疫使用弗氏不完全佐剂。在每次免疫完成 7 d 后通过小鼠眼球取血,以 $4\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min 获得 PBS 免疫血清(即对照组小鼠血清)和重组蛋白免疫血清(即处理组小鼠血清)。将 3 次免疫后获得的小鼠血清均保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下。

1.6 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测抗体效价

参照文献[20]采用 ELISA 对血清中抗体效价进行测定。首先,使用包被液将纯化后的重组蛋白质量浓度调整为 $0.5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,尖吻蝮蛇毒 PLA_2 质量浓度调整为 $0.2\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,于酶标板每孔中加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 含上述物质的包被液,在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下包被 16 h 后用含吐温-20 的磷酸盐缓冲液(PBST)洗板 3 次。然后向酶标板每孔中加入 $200\text{ }\mu\text{L}$ 含 BSA 的封闭液($w_{\text{BSA}}=3\%$),在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下封闭 2 h 后用 PBST 洗板。之后向酶标板每孔中加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 按一定比例稀释后的小鼠血清,在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下结合 2 h 后用 PBST 洗板。接着再向酶标板每孔中加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 抗体滴度为 1:250 的 HRP 标记羊抗鼠二抗,在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下结合 1 h 后用 PBST 洗板。最后向酶标板每孔中加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ TMB 显色液,室温避光反应 20 min 后每孔加入 $50\text{ }\mu\text{L}$ 硫酸溶液($c_{\text{硫酸}}=2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)终止显色反应,用酶标仪检测溶液在光波长为 450 nm 处的吸光度(OD_{450})。

1.7 蛋白质印迹法(Western Blot)分析

首先,在还原条件下用 SDS-PAGE($w_{\text{丙烯酰胺}}=12.5\%$)分离尖吻蝮蛇粗毒和重组蛋白,并通过电转方式将它们转移至 PVDF 膜上,接着使用加入脱脂奶粉($w_{\text{脱脂奶粉}}=5\%$)的含吐温-20 的 Tris-盐酸缓冲液(TBST)于室温条件下摇动封闭 1 h。然后,加入稀释后的一抗小鼠血清,于室温条件下摇动孵育 2 h 后用 TBST 洗膜 3 次。再加入稀释后抗体滴度为 1:5 000 的 HRP 标记羊抗鼠二抗,于室温条件下摇动孵育 1 h 后用 TBST 洗膜 3 次。最后,于避光条件下使用 ECL 发光液滴加到 PVDF 膜上,随后将该膜夹在保鲜膜中间,置于化学发光成像系统内进行观察。

1.8 尖吻蝮蛇毒 PLA_2 活性测定

尖吻蝮蛇毒 PLA_2 活性的测定按照文献[21-22]中的琼脂平板法进行,具体步骤如下:在 20 mL 乙酸钠溶液(pH 为 7.5, $c_{\text{乙酸钠}}=0.05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)中加入 0.2 g 琼脂糖粉,并在微波炉中加热至琼脂糖完全溶解,待溶液温度冷却至 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,再加入 $800\text{ }\mu\text{L}$ 蛋黄液和 $400\text{ }\mu\text{L}$ 氯化钙溶液($c_{\text{氯化钙}}=0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$);蛋黄液的制备方法则为将鸡蛋黄与氯化钠溶液($w_{\text{氯化钠}}=0.85\%$)按 1:3 的体积比混合,经 $4\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min 后取上清液即为蛋黄液。将上述溶液混合均匀后,将它倒入玻璃培养皿,待整个琼脂平板凝固后用打孔器在其中打出多个直径为 4 mm 的小孔。每孔加入 $10\text{ }\mu\text{L}$ 的尖吻蝮蛇毒 PLA_2 溶液,置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 环境下孵育过夜。 PLA_2 通过水解琼脂平板中的卵磷脂在凝胶孔周围形成透明圈,通过测量透明圈的直径来确定最小 PLA_2 剂量(MPD)。本研究中 MPD 定义为诱导形成直径为 16 mm 透明圈所需的最小尖吻蝮蛇毒 PLA_2 剂量。将剂量达到 MPD 的尖吻蝮蛇毒 PLA_2 分别与 $10\text{ }\mu\text{L}$ 的 PBS 免疫血清、重组蛋白免疫血清和抗尖吻蝮蛇毒血清混合,在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下孵育 40 min。瞬时离心后取 $10\text{ }\mu\text{L}$ 上清液加入琼脂平板的小孔内,在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下继续孵育 12 h,观察结果并使用 ImageJ 软件(<https://imagej.net/ij/>)计算其中形成的透明圈面积。

1.9 数据分析

使用 GraphPad Prism 9 软件(<https://www.graphpad.com/>)对实验数据进行单因素方差分析和多重比较(Dunnett 法),当 $p<0.05$ 时结果具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 表位设计结果

从 Uniprot 数据库中共下载到 3 条尖吻蝮蛇毒 PLA_2 氨基酸序列,登录号分别为 O57385(AJ223188)、Q1ZY03(X77649)和 Q7SID6(X77648),其中:登录号为 O57385 的 PLA_2 具有很强的溶血活性,登录号为

Q1ZY03 的 PLA₂ 抑制乙酰胆碱释放来抑制神经肌肉传递表现出肌毒性,而登录号为 Q7SID6 的 PLA₂ 具有可抑制二磷酸腺苷诱导的血小板聚集活性和溶血活性^[23-24]。通过 IEDB-Bepipred 2.0 在线服务器使用随机森林回归算法,从晶体结构的表位数据对 3 条 PLA₂ 氨基酸序列进行预测,得分高于阈值(默认值为 0.5)的残基被预测为表位的一部分。通过分析并筛选在 3 条 PLA₂ 氨基酸序列中共得到 P-1、P-2、P-3、P-4、P-5 和 P-6 共 6 个抗原位点(图 1a~c),经 KK 连接子连接后的 EpiPLA 序列全长为 324 bp(图 1d);将该序列克隆至 pET28-a(+)质粒的多克隆位点后,使用 ExPASy ProtParam 在线服务器(<https://web.expasy.org/protparam/>)对表达后的重组蛋白进行相对分子质量预估,结果显示它的相对分子质量在 16.5 kDa 左右。

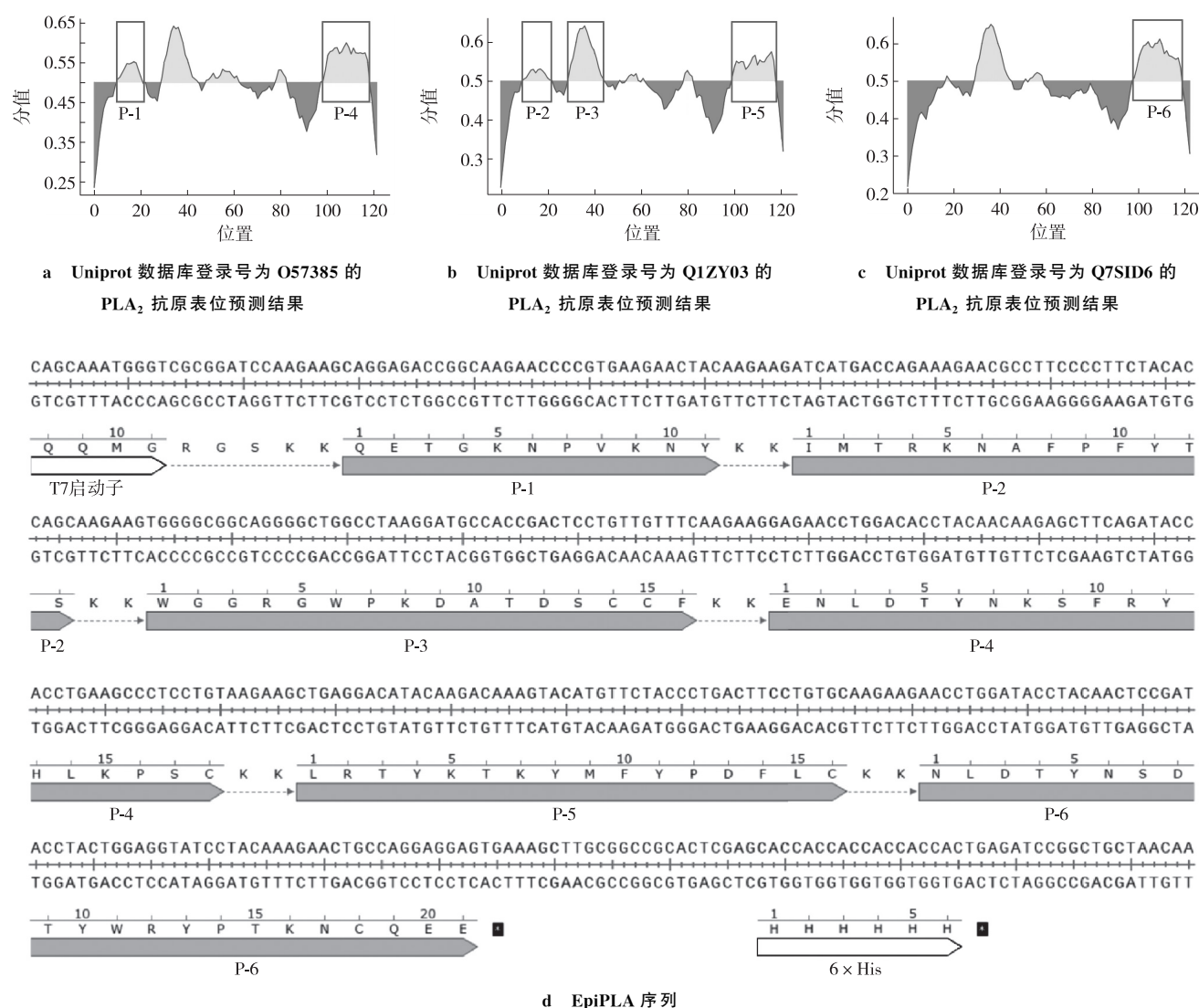


图 1 IEDB-Bepipred-2.0 表位预测结果与 EpiPLA 序列

Fig. 1 Results of IEDB-Bepipred-2.0 epitope prediction and EpiPLA sequence

2.2 重组蛋白表达与纯化结果

阳性菌经 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 IPTG 溶液诱导表达 4 h 后,菌液表达出带有 $6 \times \text{His}$ 标签的重组蛋白^[25]。使用 Ni^{2+} 亲和层析柱对重组蛋白进行纯化,经不同浓度的咪唑溶液多次洗涤以去除非特异性结合的杂蛋白,最后得到单一条带重组蛋白,它的相对分子质量在 15~17 kDa 范围内,与 ExPASy ProtParam 在线服务器的预测结果一致(图 2)。纯化后的重组蛋白溶液经过超滤浓缩后用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测得其中重组蛋白的质量浓度为 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.3 ELISA 检测效价结果

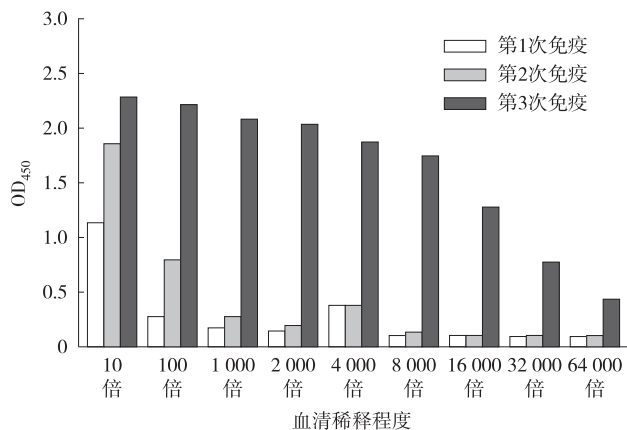
2.3.1 重组蛋白免疫血清抗体滴度检测

在每次免疫完成 7 d 后经实验小鼠眼眶获取血清,用 ELISA 测定抗体效价;判定阳性反应的标准为重组蛋

白免疫血清与 PBS 免疫血清的 OD_{450} 比值不低于 $2.1^{[26]}$ 。如图 3 所示,首次免疫后的小鼠血清在稀释到 $1:100$ 时就不再具有阳性反应,而通过 3 次免疫后,小鼠血清中抗体效价明显升高。在第 3 次免疫完成 7 d 后将小鼠血清稀释到 $1:64\ 000$ 时, PBS 免疫血清 OD_{450} 值为 0.13 ,重组蛋白免疫血清 OD_{450} 值为 0.43 ,因此判定小鼠血清中对重组蛋白的抗体滴度高于 $1:64\ 000$ 。

2.3.2 小鼠血清对尖吻蝮蛇毒 PLA_2 的效价检测

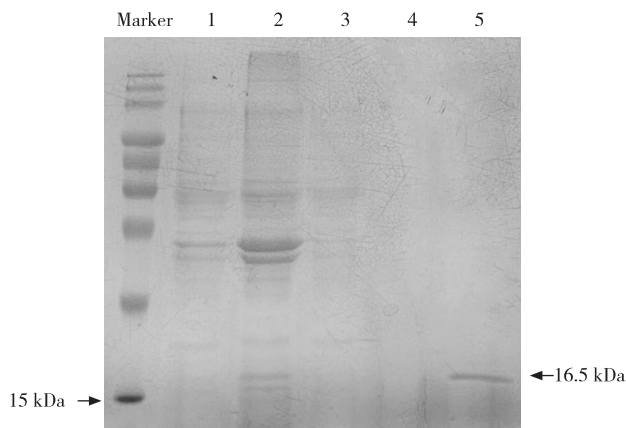
图 4 显示:在第 3 次免疫完成 7 d 后获取的小鼠血清被稀释到 $1:256$ 时, PBS 免疫血清 OD_{450} 值为 0.17 ,重组蛋白免疫血清 OD_{450} 值为 0.40 ,因此判定小鼠血清中对尖吻蝮蛇毒 PLA_2 的抗体滴度高于 $1:256$ 。使用尖吻蝮蛇毒 PLA_2 作为抗原包被酶标板,以重组蛋白免疫的血清作为一抗并结合 HRP 标记羊抗鼠二抗来检测重组蛋白免疫血清与蛇毒 PLA_2 结合的抗体滴度。根据 ELISA 检测结果,本研究通过生物信息学方法筛选出了 PLA_2 抗原表位,旨在中和引起出血和肌肉损伤的尖吻蝮蛇毒 PLA_2 ;而这与目前市售的商品化抗蛇毒血清在免疫原和针对毒素的抗体种类方面存在差异。



注:以 $0.5\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的重组蛋白作为抗原,分别对每次免疫完成 7 d 后的小鼠血清进行抗体滴度检测。

图 3 小鼠血清抗体效价的 ELISA 检测

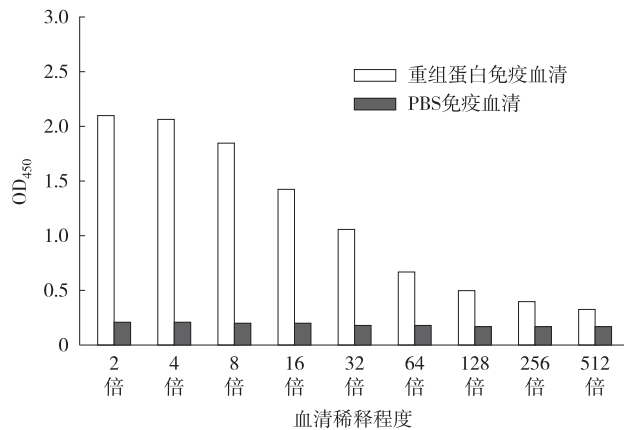
Fig. 3 ELISA test of mouse serum antibody titers



注:泳道 1~5 分别为 pET-28a/BL21、pET-28a-Epi PLA_2 /BL21、 $5\ \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 咪唑洗涤液、 $10\ \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 咪唑洗涤液、 $250\ \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 咪唑洗脱液。

图 2 重组蛋白的 SDS-PAGE 电泳结果

Fig. 2 SDS-PAGE results of recombinant protein



注:以 $0.2\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的尖吻蝮蛇毒 PLA_2 作为抗原,分别对第 3 次免疫完成 7 d 后的小鼠血清进行抗体滴度检测。

图 4 小鼠血清对尖吻蝮蛇毒 PLA_2 效价的 ELISA 检测

Fig. 4 ELISA test of mouse serum antibody detection by PLA_2 from *D. acutus* venom

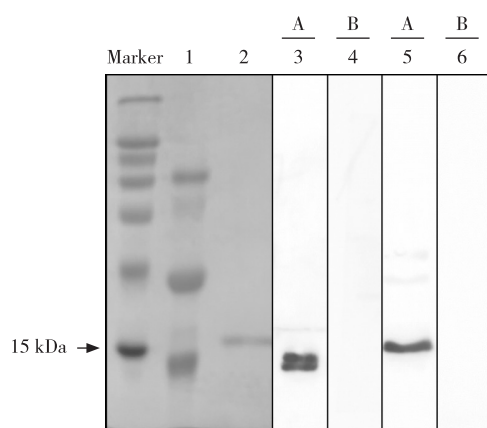
2.4 Western Blot 分析结果

尖吻蝮蛇粗毒和重组蛋白分别取 $30\ \mu\text{g}$ 和 $20\ \mu\text{g}$ 进行上样、电泳、转膜,然后分别与重组蛋白免疫血清与 PBS 免疫血清进行杂交反应。从图 5 可以看出:尖吻蝮蛇粗毒与重组蛋白免疫血清反应后在小于 $15\ \text{kDa}$ 处有 2 个明显的条带,这与尖吻蝮蛇毒 PLA_2 的相对分子质量相符,而尖吻蝮蛇粗毒与 PBS 免疫血清无反应;重组蛋白与重组蛋白免疫血清反应后有 1 个明显的条带,而重组蛋白与 PBS 免疫血清无反应。Western Blot 分析结果进一步说明通过生物信息学方法来制备抗尖吻蝮蛇毒 PLA_2 血清可行且有效。

2.5 血清对尖吻蝮蛇毒 PLA_2 活性的抑制作用

尖吻蝮蛇毒 PLA_2 主要通过水解作用破坏细胞膜的稳定性,引起溶血、局部炎症反应和肌肉坏死。使用 PBS

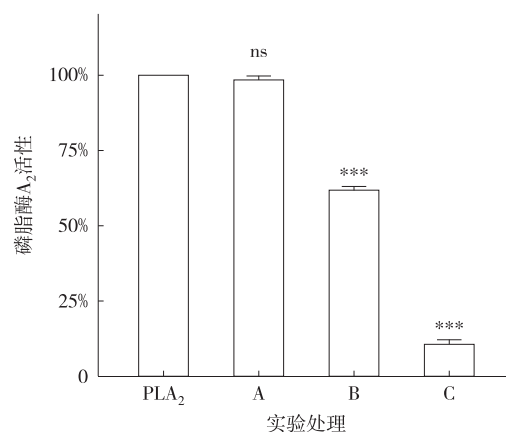
将尖吻蝮蛇毒 PLA₂ 浓度进行梯度稀释,经过测量确定了它的 MPD 为 6 μ g。将 6 μ g 尖吻蝮蛇毒 PLA₂ 在琼脂平板上形成的透明圈大小定义为 100%活性,由此计算出不同血清对 PLA₂ 活性的抑制作用。经过 40 min 的孵育,尖吻蝮蛇毒 PLA₂ 活性被 10 μ L 的重组蛋白血清和抗尖吻蝮蛇毒血清不同程度地抑制:前者让尖吻蝮蛇毒 PLA₂ 活性由 100%降低至 62.2%而后者让该酶活性由 100%降低至 10.9%;此外 PBS 免疫血清对 PLA₂ 活性没有抑制作用(图 6)。



注:泳道 1、3、4 为 30 μ g 尖吻蝮蛇粗毒上样,泳道 2、5、6 为 20 μ g 重组蛋白上样;A 为重组蛋白免疫血清,B 为 PBS 免疫血清,均在使用前进行了 5 000 倍稀释。

图 5 小鼠血清与尖吻蝮蛇粗毒或重组蛋白反应的 Western Blot 分析结果

Fig. 5 Analytic results of Western Blot on reaction between mouse serum and *D. acutus* crude venom or recombinant protein



注:PLA₂ 表示不加入任何血清的 6 μ g 尖吻蝮蛇毒 PLA₂,A、B 和 C 为在 6 μ g 尖吻蝮蛇毒 PLA₂ 中分别加入 10 μ L 的 PBS 免疫血清、重组蛋白免疫血清和抗尖吻蝮蛇毒血清。ns 表示与 PLA₂ 组相比数据差异无统计学意义,“***”表示与 PLA₂ 组相比数据差异在 $p < 0.001$ 水平具有统计学意义。

图 6 不同血清对 PLA₂ 活性的抑制作用

Fig. 6 The inhibitory effect of different sera on PLA₂ activity

3 讨论

近些年来,蛇咬伤已被列为容易被忽视的热带病之一。抗蛇毒血清虽为目前治疗蛇咬伤的最有效手段,但它在生产过程中存在批次差异的问题不容忽视。这些差异可能与免疫动物自身以及生活环境因素差异有关,由此导致血清中特异性成分含量下降,并增加了不良反应的风险^[27]。此外,传统抗蛇毒血清的生产首先涉及从野外或圈养毒蛇体内获取毒液,而不同生长环境和毒蛇种群间的差异会导致毒液成分存在变异^[28],这对抗蛇毒血清的有效性也构成了挑战。相比之下,利用蛋白质重组技术,尤其是大肠杆菌(*Escherichia coli*)系统来表达重组毒素,可以有效解决上述问题。这些重组毒素在通过纯化处理后可作为免疫原来制备血清。此外,抗原表位预测技术在设计高效抗体方面显示出了巨大的潜力,例如:张志晓等人^[29]通过分析尖吻蝮蛇毒金属蛋白酶的 cDNA 序列,确定了 6 个关键的抗原位点。基于这些位点的 DNA 免疫策略,在小鼠产生的免疫血清中展现出很高的保护效果,并有效抑制了皮下出血现象。同样,吴梦等人^[25]的研究表明,通过 DNA 序列表达的蛋白免疫小鼠后生成的血清能够中和尖吻蝮蛇毒的毒性。

本研究使用了 EDB-Bepipred 2.0 在线服务器来预测尖吻蝮蛇毒 PLA₂ 的抗原表位,在考虑了疏水性、二级结构、表面可及性等方面的基础上,最终成功筛选和预测了尖吻蝮蛇毒 PLA₂ 的 6 个抗原位点氨基酸序列。在本研究中,ELISA 检测结果显示小鼠血清中的抗体效价与免疫周期密切相关。将经过多达 3 次免疫后的小鼠血清稀释 256 倍时,仍能与尖吻蝮蛇毒 PLA₂ 结合。此外,Western Blot 分析结果证实了重组蛋白免疫血清与尖吻蝮蛇毒 PLA₂ 之间的特异性结合作用。本研究还进一步研究了血清对 PLA₂ 酶活性的抑制作用,发现在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 40 min 后,重组蛋白免疫血清能够使 6 μ g 的尖吻蝮蛇毒 PLA₂ 的活性由 100%降低至 62.2%。本研究结果表明,基于抗原表位预测策略制备的小鼠血清能够有效结合尖吻蝮蛇毒 PLA₂,并对它的活性具有一定的抑制作用。然而,本研究制备的小鼠血清对蛇毒出血和致死活性的抑制效果仍有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] KASTURIRATNE A, WICKREMASINGHE A R, De SILVA N, et al. The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths[J]. PLoS Medicine, 2008, 5(11): e218.
- [2] MEYER W P, HABIB A G, ONAYADE A A, et al. First clinical experiences with a new ovine Fab *Echis ocellatus* snake bite antivenom in Nigeria: randomized comparative trial with Institute Pasteur Serum (Ipser) Africa antivenom[J]. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 1997, 56(3): 291-300.
- [3] BOCHNER R. Paths to the discovery of antivenom serotherapy in France[J]. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases, 2016, 22: 20.
- [4] GUTIÉRREZ J M, CALVETE J J, HABIB A G, et al. Snakebite envenoming[J]. Nature Reviews Disease Primers, 2017, 3: 17063.
- [5] HARRISON R A, COOK D A, RENJIFO C, et al. Research strategies to improve snakebite treatment: challenges and progress [J]. Journal of Proteomics, 2011, 74(9): 1768-1780.
- [6] MALASIT P, WARRELL D A, CHANTHAVANICH P, et al. Prediction, prevention, and mechanism of early (anaphylactic) antivenom reactions in victims of snake bites[J]. British Medical Journal, 1986, 292(6512): 17-20.
- [7] SANCHEZ-TRINCADO J L, GOMEZ-PEROSANZ M, RECHE P A. Fundamentals and methods for T- and B-Cell epitope prediction[J]. Journal of Immunology Research, 2017, 2017: 2680160.
- [8] WU C J, LIAW G W, CHEN C K, et al. Immunoprofiling of equine plasma against *Deinagkistrodon acutus* in Taiwan: key to understanding differential neutralization potency in immunized horses[J]. Tropical Medicine and Infectious Disease, 2023, 8(1): 51.
- [9] HERNÁNDEZ R, CABALCETA C, SARAIVA-OTTEN P, et al. Poor regenerative outcome after skeletal muscle necrosis induced by *Bothrops asper* venom: alterations in microvasculature and nerves[J]. PloS One, 2011, 6(5): e19834.
- [10] KHAN S A, ILIES M A. The phospholipase A2 superfamily: structure, isozymes, catalysis, physiologic and pathologic roles[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(2): 1353.
- [11] 曹宇亮. 基于抗原组学技术筛选与鉴定尖吻蝮蛇蛇毒保护性抗原[D]. 重庆: 第三军医大学, 2014.
- CAO Y L. Screening and identification of *Deinagkistrodon acutus* protective antigen based on antigenome technology [D]. Chongqing: Third Military Medical University of Chinese PLA, 2014.
- [12] ARIAS S P, REY-SUÁREZ P, PEREÁÑEZ J A, et al. Isolation and functional characterization of an acidic myotoxic phospholipase A₂ from Colombian *Bothrops asper* venom[J]. Toxins, 2017, 9(11): 342.
- [13] XIAO H X, LI H R, ZHANG D H, et al. Inactivation of venom PLA₂ alleviates myonecrosis and facilitates muscle regeneration in envenomed mice: a time course observation[J]. Molecules, 2018, 23(8): 1911.
- [14] JESPERSEN M C, PETERS B, NIELSEN M, et al. BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes[J]. Nucleic Acids Research, 2017, 45(W1): W24-W29.
- [15] CHOU P Y, FASMAN G D. Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence[J]. Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology, 1978, 47: 45-148.
- [16] EMINI E A, HUGHES J V, PERLOW D S, et al. Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide[J]. Journal of Virology, 1985, 55(3): 836-839.
- [17] KARPLUS, P A, SCHULZ G E. Prediction of chain flexibility in proteins[J]. Naturwissenschaften, 1985, 72: 212-213.
- [18] KOLASKAR A S, TONGAONKAR P C. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens [J]. FEBS Letters, 1990, 276(1/2): 172-174.
- [19] PARKER J M, GUO D, HODGES R S. New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites[J]. Biochemistry, 1986, 25(19): 5425-5432.
- [20] LIU J H, HE Q Y, WANG W W, et al. Preparation and neutralization efficacy of IgY antibodies raised against *Deinagkistrodon acutus* venom[J]. The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases, 2017, 23: 22.
- [21] GUTIÉRREZ J M, AVILA C, ROJAS E, et al. An alternative *in vitro* method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica[J]. Toxicon, 1988, 26(4): 411-413.
- [22] MENALDO D L, JACOB-FERREIRA A L, BERNARDES C P, et al. Purification procedure for the isolation of a P-I metalloprotease and an acidic phospholipase A₂ from *Bothrops atrox* snake venom[J]. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases, 2015, 21: 28.
- [23] HUANG Q Q, ZHU X Y, LI N, et al. Characterization, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of

- acutohaemolysin, a haemolytic toxin from *Agkistrodon acutus* venom [J]. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 2000, 56(7): 907-911.
- [24] WANG Y M, WANG J H, TSAI I H. Molecular cloning and deduced primary structures of acidic and basic phospholipases A₂ from the venom of *Deinagkistrodon acutus* [J]. Toxicon, 1996, 34(10): 1191-1196.
- [25] 吴梦, 叶锋平, 张志晓, 等. 尖吻蝮蛇毒金属蛋白酶多表位抗原肽的原核表达和免疫原性研究 [J]. 免疫学杂志, 2013, 29(9): 749-754.
- WU M, YE F P, ZHANG Z X, et al. Prokaryotic expression and immunogenicity research of multiepitope peptide of *Deinagkistrodon acutus* metalloproteinases [J]. Immunological Journal, 2013, 29(9): 749-754.
- [26] 曹宇亮, 张雷, 刘明华. 尖吻蝮蛇毒多克隆抗体纯化及生物活性研究 [J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(9): 932-936.
- CAO Y L, ZHANG L, LIU M H. Purification and biological activity of polyclonal antibodies against *Deinagkistrodon acutus* venoms [J]. Journal of Third Military Medical University, 2014, 36(9): 932-936.
- [27] RATHORE A S, KUMAR R, TIWARI O S. Recent advancements in snake antivenom production [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 240: 124478.
- [28] NIE X K, CHEN Q Z, WANG C, et al. Venom variation of neonate and adult Chinese cobras in captivity concerning their foraging strategies [J]. Toxins, 2022, 14(9): 598.
- [29] 张志晓, 杨彦, 叶锋平, 等. 尖吻蝮蛇毒金属蛋白酶 cDNA 序列抗原位点分析及免疫保护效果观察 [J]. 第二军医大学学报, 2010, 31(4): 364-368.
- ZHANG Z X, YANG Y, YE F P, et al. Epitope analysis of cDNA sequences of *Deinagkistrodon acutus* snake venom metalloproteinases and observation of their immune protective effects [J]. Academic Journal of Second Military Medical University, 2010, 31(4): 364-368.

Molecular Biology and Bioinformatics

Preparation of Antibody of Phospholipase A₂ from *Deinagkistrodon acutus* Vemon Based on Antigenic Epitope

ZHU Haiting¹, LI Heng², YANG Wanzhou¹, ZHANG Wenhao¹, YU Xiaodong¹, HE Qiyi¹

- (1. Chongqing Engineering Research Center of Bioactive Substance, Ministry of Education Engineering Research Center of Active Substance and Biotechnology, College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 401331;
2. Chongqing Public Security Bureau Evidence Identification Center, Chongqing 400021, China)

Abstract: To investigate the antigenic epitopes of phospholipase A₂ (PLA₂) from *Deinagkistrodon acutus* venom and to prepare specific antibodies against this enzyme, the amino acid sequence of PLA₂ was analyzed using the IEDB-Bepipred 2.0 online server for linear B-cell epitope prediction. The identified antigenic epitopes were cloned into the expression vector pET-28a(+) for prokaryotic expression, and the resulting recombinant protein was purified. The purified recombinant protein was used to immunize mice (*Mus musculus*) for antibody production. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Western blot were employed to evaluate the antibody titers in mouse sera and their binding activity against PLA₂ from *D. acutus* venom, as well as to assess the inhibitory effect of the antibodies on PLA₂ enzymatic activity. Six antigenic epitope sequences of PLA₂ were successfully predicted, and the corresponding recombinant protein, with a relative molecular weight of approximately 16.5 kDa, was expressed. ELISA and Western blot analyses showed that mouse sera exhibited antibody titers exceeding 1 : 256 and strongly bound to PLA₂ proteins with relative molecular weights of 14 ~ 16 kDa in *D. acutus* venom. In vitro enzymatic activity assays demonstrated that 10 μL of immunized serum reduced the activity of 6 μg PLA₂ from 100% to 62.2%. These findings indicate that the antigenic epitopes designed based on *D. acutus* venom PLA₂ effectively stimulated an immune response in mice, resulting in the successful preparation of serum antibodies capable of neutralizing PLA₂ from *D. acutus* venom.

Keywords: phospholipase A₂; *Deinagkistrodon acutus*; B-cell epitope; prokaryotic expression

(责任编辑 方 兴)