

创伤弧菌溶细胞素 T 和 B 有效 联合表位的筛选与鉴定

王波 丁卉 谢旦立 楼永良* 肖美英 庞碧芳 严杰¹

(温州医学院检验医学院, 浙江省医学遗传学重点实验室, 温州 325035;

¹浙江大学医学院病原生物学教研室, 杭州 310031)

摘要 利用生物信息学预测技术成功筛选出含部分创伤弧菌溶细胞素(*Vibrio vulnificus* hemolysin, VvhA)基因片段的 T 细胞、B 细胞联合表位 Vvha1、Vvha2、Vvha3 和 Vvha4, 通过噬菌体展示技术成功获得四段表位多肽 M13KE-Vvha1、M13KE-Vvha2、M13KE-Vvha3、M13KE-Vvha4, 且 M13KE-Vvha2、M13KE-Vvha4 抗原反应性强于 M13KE-Vvha1、M13KE-Vvha3。将四种抗原性多肽经腹腔注射 ICR 小鼠后, 利用流式细胞仪及 ELISA 方法检测小鼠 CD4⁺ T 淋巴细胞亚群及 IL-2、IL-4、IL-6、IFN- γ 细胞因子时发现, 与 M13KE-Vvha3 相比, 经 M13KE-Vvha1、M13KE-Vvha2、M13KE-Vvha4 作用的小鼠 CD4⁺ T 淋巴细胞亚群的变化更为显著。与正常组相比, 该三组小鼠的 IL-2、IL-4、IL-6、IFN- γ 细胞因子分泌量的变化都具有统计学意义; 而经 M13KE-Vvha3 作用的小鼠仅 IL-4 的改变具有明显统计学意义。因此本研究成功筛选出含部分 VvhA 片段的 T 细胞、B 细胞联合表位 Vvha2、Vvha4, 从而为进一步研制多抗原肽(multipleantigenic peptide, MAP)疫苗打下基础。

关键词 创伤弧菌; 溶细胞素; 噬菌体展示; B 细胞表位; T 细胞表位

创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)作为一种有荚膜的革兰阴性嗜盐弧菌, 主要生长于海水、鱼类及贝母类等体内。其感染的主要对象是患有肝坏死、肾功能低下、免疫缺陷、血色素沉着病和有糖尿病病史的病人。经伤口感染是创伤弧菌感染的主要途径, 发病急、速度快、死亡率高。若病情发展到败血症程度, 死亡率常高达 50% 以上^[1]。许多研究结果表明, 创伤弧菌的多个菌体成分和代谢产物都可能作为它的毒性因子而起着重要的作用, 如细胞毒性因子、溶细胞素、弹性组织蛋白激酶、脂多糖、荚膜多糖和金属蛋白激酶等^[2]。其中创伤弧菌溶细胞素(*Vibrio vulnificus* hemolysin, VvhA)作为创伤弧菌唯一分泌至胞外, 具有创伤弧菌种属特征性的外毒素, 因其具有溶细胞、诱导细胞凋亡、促进肥大细胞组胺释放等作用而被认为是创伤弧菌的主要致病因素之一, 受到各国学者的广泛关注。

通常仅由一种抗原肽制备的疫苗, 其诱导免疫保护作用较弱。而由多种抗原表位组成的多抗原肽(multipleantigenic peptide, MAP)研究策略^[3,4], 为增强诱导免疫保护作用提供了一种新的方式和思维。此外通过对抗原表位进行研究, 也可深层次地揭示蛋白抗原分子诱导免疫应答的分子机制。而研制 MAP 的关键步骤就是寻找有效的抗原表位。本研究拟鉴定

和筛选出 VvhA 的 T 细胞和 B 细胞的有效抗原联合表位多肽, 观察和评估多肽的免疫诱导保护作用, 从而为研制抗创伤弧菌的 MAP 疫苗打下基础, 以期对创伤弧菌的感染起到预防和治疗作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 菌株 *E.coli* 2738 购自 NEB 公司; 质粒 M13KE 由浙江大学医学院病原生物学实验室友情提供; 质粒 pET28a(+)-vvhA^[5] 由本实验室构建及保存。

1.1.2 主要试剂及耗材 鼠源性 CD4⁺/CD8⁺ T 淋巴细胞荧光标记抗体、ELISA 试剂盒、CCK-8 试剂盒、PCR 反应体系均购自上海晶美生物技术有限公司; T4 DNA 连接酶、DNA marker 购自大连 TaKaRa 公司; X-gal、IPTG、PEG8000 及限制性内切酶 Acc65I 和 *EagI* 均购自上海生工生物工程技术服务有限公司; 羊抗鼠 HRP-IgG 抗体、预染蛋白 marker 购自杭州碧云天生物技术有限公司; ICR 小鼠及日本大

收稿日期: 2009-10-13 接收日期: 2010-01-04

浙江省自然科学基金(No. Y2090468)和浙江省科技计划(No. 84008012)资助

* 通讯作者。Tel: 0577-86699200, E-mail: lyl@wzmc.net

耳兔由温州医学院实验动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 VvhA 的 T 细胞和 B 细胞表位的预测 采用 Propred HLA-DR binding peptide prediction-ProPred 预测服务器(<http://www.imtech.res.in/raghava/propred/>)以及 EMBOSS 软件包中 ANTIGENIC 程序(<http://bioinfo.hku.hk/EMBOSS/>)分别预测 VvhA 的 T 和 B 细胞表位, 结合 VvhA 的二级结构并根据 Swiss-model 提供的信息分析 VvhA 的 B 细胞表位的空间结构, 从而选取联合的 T 细胞、B 细胞表位进行研究。

1.2.2 引物的设计 依据 *vvhA* 基因序列(M34670, gi:155311), 结合噬菌体展示系统特点, 设计含 M13 噬菌体 PIII 蛋白先导肽和柔性肽编码序列及酶切位点(Acc65I, *EagI*)的引物, 引物由上海生物工程技术有限公司合成。见表 1。

1.2.3 表位基因片段的获得 以质粒 pET28a(+)-*vvhA* 为模板, 按照引物(表 1)分别扩增表位基因片段 *vvha1*、*vvha2*、*vvha3*、*vvha4*。反应条件: 94 °C, 5 min; 94 °C, 30 s; 55 °C, 30 s; 72 °C, 30 s, 共 30 个循环, 最后 72 °C, 5 min。扩增结束后, 取 4 μl 反应液进行琼脂糖凝胶电泳, 根据 DL600 DNA marker 标识, 确认反应产物。

1.2.4 M13 噬菌体展示肽系统的构建及鉴定 将纯化的表位基因片段与 M13 噬菌体连接构成重组噬菌体, 经 PCR 和双酶切鉴定。重组噬菌体转化感受态细胞 *E.coli* 2738。以重组噬菌体为模板, 利用 M13KE 试剂盒所附带的检测引物以及各个表位片段的克隆引物, 进行重组噬菌体 PCR 和测序鉴定。

1.2.5 目的重组噬菌体的培养和纯化 将重组质粒转化感受态细胞 *E.coli* 2738 培养, 离心取上清液。上清液经 PEG8000 沉淀、TBS 洗涤纯化并按参照 Day^[6]介绍的方法噬菌体数/ml=($A_{269}-A_{320}$) $\times 6 \times 10^{16}$ /噬菌体碱基数来计算提纯的目的重组噬菌体浓度。重

组噬菌体溶于 TBS, -20 °C 保存。

1.2.6 重组创伤弧菌溶细胞素的提纯及兔抗血清的制备 诱导 *E.coli* DE3(含 pET28a(+)-*vvhA* 质粒)表达重组创伤弧菌溶细胞素(recombinant *Vibrio vulnificus* hemolysin, rVvhA), Ni²⁺-NTA 亲和层析纯化 rVvhA。rVvhA 与等体积完全弗氏佐剂充分混匀, 皮下多点免疫日本大耳兔(200 μg/只)。两周后, 等量 rVvhA 与等体积不完全弗氏佐剂充分混匀, 皮下多点进行加强免疫(100 μg/只), 共 3 次, 每次间隔 10 天。末次免疫后一周心脏采血, 分离血清, ELISA 检测抗体效价。利用硫酸铵盐析和 Sephadex G25 提纯抗体, 经 Western 印迹鉴定。

1.2.7 重组噬菌体 PIII 蛋白(recombinant PIII, rPIII)的表达及鉴定 含不同 rPIII 的噬菌体经 SDS-PAGE 分离, 考马斯亮蓝染色后观察各 rPIII 表达情况。以 rVvhA 兔抗血清为一抗, 用 Western 印迹对上述表位肽进行鉴定。以无任何插入片段的等量野生型噬菌体作为对照。

1.2.8 重组噬菌体最佳刺激浓度的确定 无菌条件下, 提取正常小鼠脾细胞, 调整细胞数为 2×10^6 个/ml, 加至 96 孔培养板, 每孔 100 μl, 分别加 5、10、15、20 μg/ml 重组噬菌, 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 66 h, 同时设空白、阴性对照。每孔加 10 μl CCK-8 试剂混匀, 37 °C 水浴 3.5 h, 测量 450 nm 处的 A 值(各浓度组设 3 个复孔)。

1.2.9 噬菌体表位肽抗体效价测定 将纯化的重组噬菌体及野生型噬菌体分别腹腔注射 ICR 小鼠(100 μg/只), 每次间隔 1 周, 共免疫 4 次。重组噬菌体按 10 μg/ml 浓度包被酶标板, 重组噬菌体抗体和正常阴性对照血清按 1:50、1:100、1:200、1:400、1:800、1:1 600、1:3 200、1:6 400、1:12 800、1:25 600、1:51 200、1:102 400、1:204 800 等浓度倍比稀释, 正常

Table 1 Primers of four combined epitopes of VvhA for PCR

| Primers | Sequences |
|--------------|--|
| <i>vvha1</i> | F: 5'-CATGCCCGGGT ACCTTTCTATTCTCACTCTTTTACTTACA ACTACTCGAAAA-3' R: 5'-CATGTTT CGGCCGAGCCGCC CAGTGATGAGCGGTTGTTGATGCGAT-3' |
| <i>vvha2</i> | F: 5'-CATGCCCGGGT ACCTTTCTATTCTCACTCTAATCATCCACTGTTTGA AGCGG-3' R: 5'-CATGTTT CGGCCGAGCCGCC GAGATCGTTGTTGCTCAGTGATTGTA-3' |
| <i>vvha3</i> | F: 5'-CATGCCCGGGT ACCTTTCTATTCTCACTCTTATCGTGCACGCTTTGGT ACGG-3' R: 5'-CATGTTT CGGCCGAGCCGCC CGCAGAACCATAAACTGAGAAGAGTG-3' |
| <i>vvha4</i> | F: 5'-CATGCCCGGGT ACCTTTCTATTCTCACTCTCCATCGATGTT CGCGTCAATG-3' R: 5'-CATGTTT CGGCCGAGCCGCC CTGACGTTGCCGATTGCACCGAGCGCA-3' |
| Detection | F: 5'-GAGATTTTCAACGTGAAAAAATTATT-3' R: 5'-TGAATTTTCTGTATGGGATTTTGCTA-3' |

F: forward primers; R: reverse primers. Extrabold areas indicate the endonuclease sites. The sequences in italic letters are responsible for encoding leader peptides. The underlined areas indicate the flexible sequences.

小鼠血清作对照。ELISA 法检测抗体效价。

1.2.10 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞及其比值分析

小鼠脾细胞经重组噬菌体最佳刺激浓度及等量野生型噬菌体体外刺激培养 66 h 后, 用 FITC/PE 标记的 CD4⁺/CD8⁺ T 淋巴细胞抗体结合流式细胞仪检测小鼠的 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞及 CD4⁺/CD8⁺ 变化。

1.2.11 细胞因子 IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-6 的检测

采用 ELISA 方法检测小鼠脾细胞经最佳浓度重组噬菌体刺激后, 上清液中的 IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-6 浓度变化。

1.2.12 统计学分析 采用 SPSS13.0 软件进行数据处理分析。

2 结果

2.1 VvhA 的 T 细胞和 B 细胞表位预测结果及其选择

根据生物软件评分分数及 T 细胞和 B 细胞表位重叠情况(表 2), 结合 VvhA 的二级结构选择 *vvha1*

(194~217)、*vvha2* (332~352)、*vvha3* (295~314)、*vvha4* (62~80) 四个表位。Swiss-model 显示四个表位均位于 VvhA 分子表面。

2.2 联合表位片段及其与 M13 噬菌体重组后的扩增

以质粒 pET28a(+)-*vvha* 为模板 PCR 扩增得到预期大小的四个表位基因片段: *vvha1* (122 bp)、*vvha2* (113 bp)、*vvha3* (110 bp)、*vvha4* (107 bp), 见图 1A。以重组噬菌斑为模板, 利用 M13KE 检测引物进行 PCR 扩增得到预期大小的四个表位基因片段, 说明重组噬菌体构建成功。重组噬菌体分子量分别为 186、177、174、171 bp, 见图 1B。该四个重组联合表位基因经测序进一步被证实为目的片段。

2.3 rPIII 表达及鉴定结果

SDS-PAGE 结果(图 2A)显示, 重组噬菌体 M13KE-Vvha1、M13KE-Vvha2、M13KE-Vvha3、M13KE-Vvha4 纯化效果好。Western 印迹结果(图 2B)表明重组噬菌体表位肽均与 rVvhA 兔抗血清反应,

Table 2 The results of prediction of four combined epitopes of VvhA

| Epitope positions | Scores | Sequences |
|------------------------|--|--|
| <i>vvha1</i> (194~217) | 1.105 /2.24&0.53 | <u>F</u> TYNYSK <u>T</u> IVFDTKD <u>Y</u> RINRSSL |
| <i>vvha2</i> (332~352) | 1.132 & 1.171 /0.8 | NHPLFEAEAHVT <u>L</u> OSLSNND <u>I</u> |
| <i>vvha3</i> (295~314) | 1.145 /0.55&0.59 | <u>Y</u> RAR FGTVIPS <u>A</u> LSVYVGS <u>A</u> |
| <i>vvha4</i> (62~80) | 1.125 & 1.079 /0.94&0.45 | SID <u>V</u> RVNVAQMR <u>S</u> VOS <u>A</u> T <u>S</u> |

Scores: the extrabold numbers mean B cell epitope; the italic numbers represent T cell epitope; Sequences: the underlined areas indicate B cell epitope; the squared sequences mean T cell epitope.

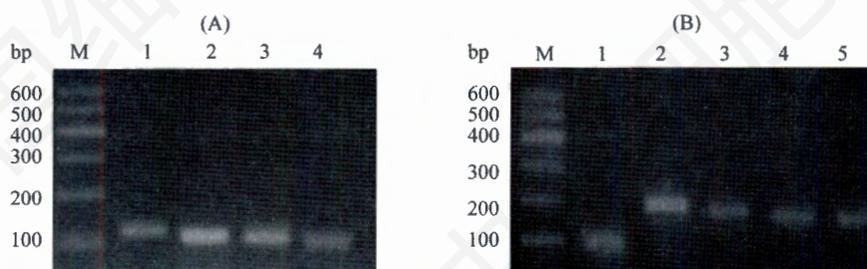


Fig.1 Amplification fragments of combined epitopes before and after recombination with M13 phase

A: amplification fragments of combined epitopes sequences. M: marker; 1: *vvha1* (122 bp); 2: *vvha2* (113 bp); 3: *vvha3* (110 bp); 4: *vvha4* (107 bp). B: amplification fragments of combined epitopes sequences after recombination with M13 phase. M: marker; 1: M13KE (114 bp); 2: M13KE-*vvha1* (186 bp); 3: M13KE-*vvha2* (177 bp); 4: M13KE-*vvha3* (174 bp); 5: M13KE-*vvha4* (171 bp).



Fig.2 Results of expression and identification of rPIII by SDS-PAGE and Western blot

A: results of SDS-PAGE. M: marker; 1: M13KE; 2: M13KE-Vvha1; 3: M13KE-Vvha2; 4: M13KE-Vvha3; 5: M13KE-Vvha4. B: results of Western blot. 1: M13KE-Vvha1; 2: M13KE-Vvha2; 3: M13KE-Vvha3; 4: M13KE-Vvha4; 5: M13KE.

且表位肽M13KE-Vvha2和M13KE-Vvha4反应强度高于M13KE-Vvha1和M13KE-Vvha3。

2.4 重组噬菌体的最佳刺激浓度

四种重组噬菌体体外刺激培养小鼠脾细胞后,与对照组比较,10 $\mu\text{g/ml}$ 的重组噬菌体刺激后 A_{450} 值显著增加,约为对照组的两倍,故10 $\mu\text{g/ml}$ 作为重组噬菌体的最佳刺激浓度(图3)。

2.5 重组噬菌体抗体的效价

ELISA 检测结果(图4)显示,重组噬菌体 M13KE-

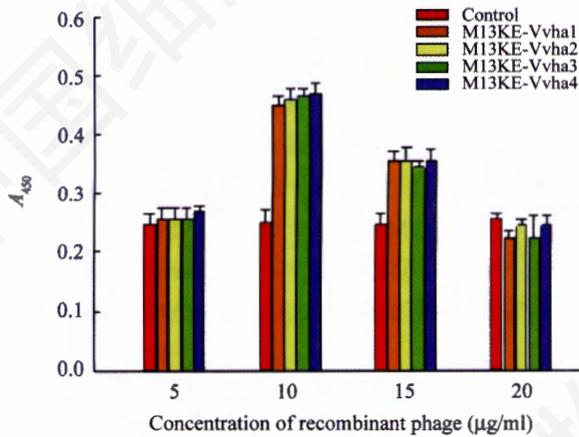


Fig. 3 Values of A_{450} after splenocytes were stimulated by different concentration of M13KE-Vvha

Vvha1、M13KE-Vvha2的抗体效价是1:51 200;M13KE-Vvha3、M13KE-Vvha4的抗体效价是1:102 400。

2.6 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ T 淋巴细胞及其比值

利用流式细胞仪检测了重组噬菌体免疫后小鼠的T淋巴细胞亚群的变化,结果见图5。从表3可知,与对照组相比,表位肽M13KE-Vvha1、M13KE-Vvha2、M13KE-Vvha4刺激小鼠后, $CD4^+$ T淋巴细胞亚群的变化更加显著,并且具有明显统计学意义($P < 0.01$)。其中M13KE-Vvha1、M13KE-Vvha2刺激小鼠后, $CD4^+/CD8^+$ 比值的变化的变化具有统计学意义($P < 0.05$)。

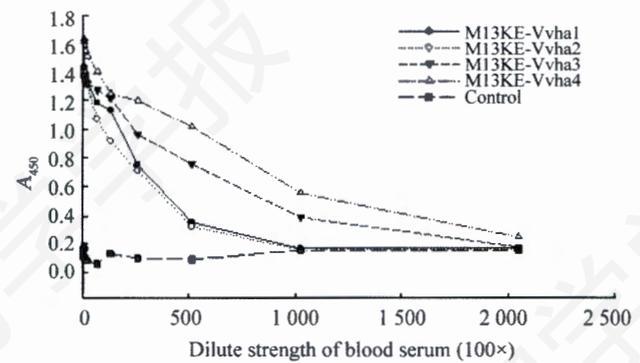


Fig.4 The valence of antibody of M13KE-Vvha

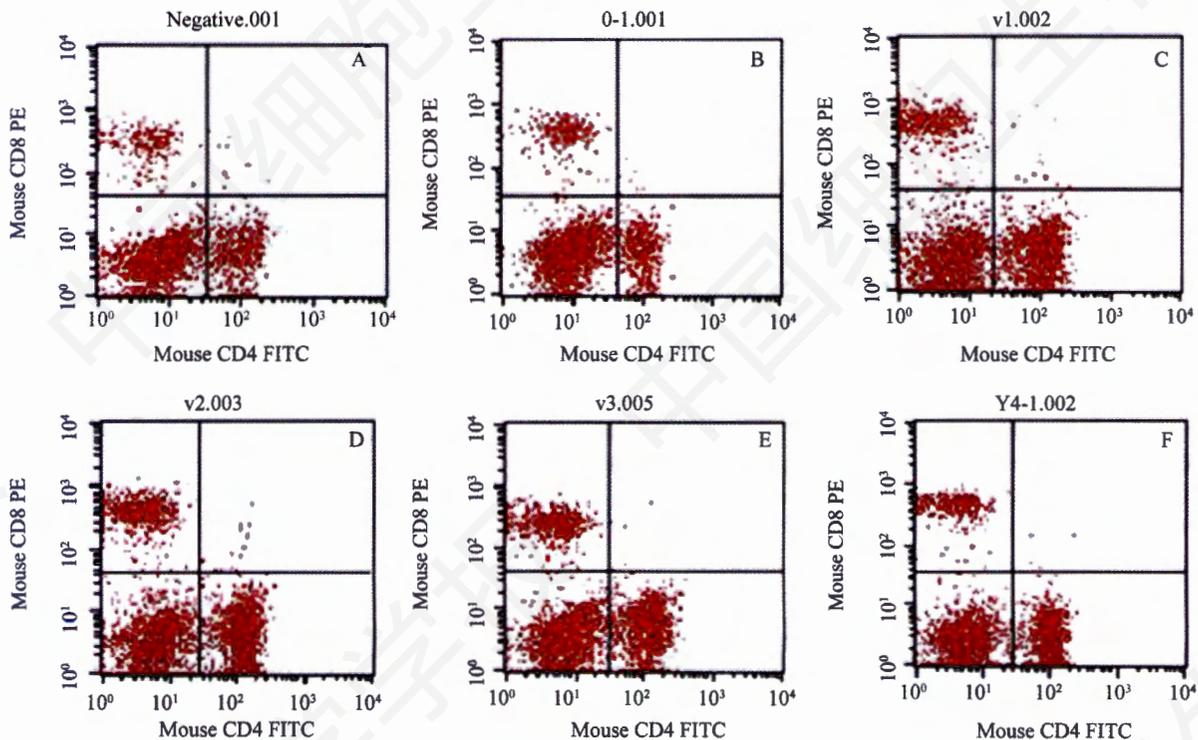


Fig.5 Changes of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells of mice which were injected intraperitoneally with M13KE-Vvha

A: control; B: M13KE; C: M13KE-Vvha1; D: M13KE-Vvha2; E: M13KE-Vvha3; F: M13KE-Vvha4.

Table 3 Changes of T lympholeukocyte subgroup of mice injected intraperitoneally with M13KE-Vvha ($\bar{x} \pm s, n=3$)

| Group | CD4 ⁺ (%) | CD8 ⁺ (%) | CD4 ⁺ /CD8 ⁺ |
|-------------|-------------------------|-------------------------|------------------------------------|
| M13KE-Vvha1 | 37.64±0.98 ^a | 15.43±0.40 ^a | 2.43±0.01 ^b |
| M13KE-Vvha2 | 39.22±3.89 ^a | 16.33±2.08 | 2.40±0.09 ^b |
| M13KE-Vvha3 | 35.35±6.49 | 13.23±0.97 | 2.65±0.36 |
| M13KE-Vvha4 | 35.71±0.99 ^a | 16.59±2.01 | 2.15±0.21 |
| M13KE | 19.04±1.04 | 10.04±1.05 | 1.90±0.18 |
| Control | 19.00±1.08 | 10.06±1.03 | 1.89±0.19 |

a: $P < 0.01$ vs control; b: $P < 0.05$ vs control.

Table 4 Changes of cytokines in mice injected intraperitoneally with M13KE-Vvha (pg/ml) ($\bar{x} \pm s, n=3$)

| Cytokine | M13KE-Vvha1 | M13KE-Vvha2 | M13KE-Vvha3 | M13KE-Vvha4 | Control |
|---------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|-------------|
| IL-2 | 64.83±13.10 ^b | 69.63±8.37 ^a | 48.03±1.57 | 50.77±1.02 ^b | 38.42±10.28 |
| IL-4 | 173.22±0.75 ^a | 174.69±2.79 ^a | 130.58±3.07 ^a | 109.42±3.44 ^a | 47.76±1.22 |
| IL-6 | 327.20±13.53 ^a | 511.13±0.60 ^a | 145.95±27.64 | 310.95±0.82 ^a | 127.52±7.94 |
| IFN- γ | 131.51±5.05 ^a | 138.22±1.03 ^a | 155.08±15.73 | 260.57±10.00 ^a | 92.46±0.82 |

a: $P < 0.01$ vs control; b: $P < 0.05$ vs control.

2.7 细胞因子检测结果

表4中统计结果显示,各个表位肽刺激后上清液中的细胞因子浓度均有增加,但是与正常组相比,表位肽 M13KE-Vvha1、M13KE-Vvha2 刺激小鼠后各细胞因子的变化都具有统计学意义($P < 0.05$),而 M13KE-Vvha3 刺激小鼠后只有 IL-4 的改变具有统计学意义($P < 0.01$)。

3 讨论

计算机预测抗原表位具有简单、直观、快速等优点,被广泛应用于疫苗研究。ProPred 为一种有效的 T 细胞预测程序^[7]。ANTIGENIC 为一种 B 细胞抗原表位预测程序,准确性大约 75%^[8]。到目前为止,国内外还没有 VvhA 抗原表位预测的相关报道。抗原表位是位于抗原分子表面,能特异性诱导机体产生抗体的一段序列,机体受到外界抗原刺激时首先诱发的是 B 细胞介导的体液免疫反应,但是 T 细胞对 B 细胞介导的体液免疫反应起着重要的辅助作用。为了产生更有效的免疫反应,本实验采用 ProPred 和 ANTIGENIC 程序对 VvhA 的 T 细胞和 B 细胞表位均进行了预测及分析,选取了四个 VvhA 主要 T 细胞和 B 细胞联合表位。并对其进行重组、表达及免疫原性的初步分析。

基因工程疫苗研制最重要的一点是选择的抗原性(多)肽是否可以引起机体产生有效的免疫应答,即是否具有足够的免疫原性,而后者很大程度上取决于抗原的空间构象。噬菌体展示技术形成的融合蛋白表达在噬菌体颗粒的表面,在不影响和干扰噬菌体的生活周期的同时,保持了外源基因天然构象。利用

噬菌体展示技术结合 Western 印迹也是目前国际上确定抗原表位的经典方法^[9]。在本实验中, SDS-PAGE 结果也显示该法成功表达了预测的四个含部分 VvhA 片段的 B 细胞和 T 细胞抗原表位,重组噬菌体纯度较高,除目的条带外没有杂蛋白带,产量也较多。Western 印迹结果显示重组噬菌体表位肽均与 rVvhA 兔抗血清反应,但 M13KE-Vvha2、M13KE-Vvha4 抗原反应性强于 M13KE-Vvha1、M13KE-Vvha3。

基因工程疫苗应既具备诱导机体 B 细胞产生中和抗体的能力,又能诱导机体产生细胞介导的免疫反应,产生细胞因子如白介素、干扰素的能力。本实验通过构建的噬菌体表位免疫 ICR 小鼠,对 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞及比值的变化和 IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-6 细胞因子分泌量的变化进行了分析,结果显示四个联合表位均有不同程度的免疫原性,但 M13KE-Vvha1、M13KE-Vvha2 和 M13KE-Vvha4 的免疫原性较好。综上所述, Vvha2、Vvha4 是其中两个有效的联合表位。

一个疫苗的免疫原性和反应原性除了与抗原的构象有关外,还和抗原的种类、分子量,实验小鼠的生理状态,疫苗接种的途径、方法、剂量等相关。通过改造目的基因也可以获得免疫效果较好的疫苗。此外,表位重组多肽可以引起更有效的免疫反应,在一定程度上起到保护性作用^[10-12]。因此 M13KE-Vvha1、M13KE-Vvha3 的免疫原性通过相关条件的优化也许会得以改善。同时筛选出的 M13KE-Vvha2 和 M13KE-Vvha4 两个有效联合表位肽还可以对其进行动物保护实验。这些都有待于进一步的研究。

参考文献(References)

- 1 Haq SM, Dayal HH. Chronic liver disease and consumption of raw oysters: a potentially lethal combination a review of *Vibrio vulnificus* septicemia. *Am J Gastroenterol* 2005; 100(5): 1195-9.
- 2 Muldrew KL, Miller RR, Kressin M, Tang YW, Stratton C. Necrotizing fasciitis from *Vibrio vulnificus* in a patient with undiagnosed hepatitis and cirrhosis. *J Clin Microbiol* 2007; 45(3): 1058-62.
- 3 Wang LF, Yu M. Epitope identification and discovery using phage display libraries: applications in vaccine development and bdiagnostics. *Curr Drug Targets* 2004; 5(1): 1-15.
- 4 Argiro L, Henri S, Dessein H, Kouriba B, Dessein AJ, Bourgois A. Induction of a protection against *S. mansoni* with a MAP containing epitopes of Sm37-GAPDH and Sm10-DLC. Effect of coadsorption with GM-CSF on alum. *Vaccine* 2000; 18(19): 2033-8.
- 5 李桂军, 桂 静, 肖美英, 楼永良. 创伤弧菌溶细胞素 vvha 基因在大肠杆菌中的表达及其对应激因子的调控. *中华微生物学与免疫学杂志* 2008; 28(1): 24-8.
- 6 Day LA. Conformations of single-stranded DNA and coat protein in fd bacteriophage as revealed by ultraviolet absorption spectroscopy. *J Mol Biol* 1969; 39(2): 265-77.
- 7 Martin Vr, Adam OW, Hewinson RG. Recognition of mycobacterial epitopes by T cells across mammalian species and use of a program that predicts human HLA-DR binding peptides to predict bovine epitopes. *Infect Immun* 2003; 71(4): 1980-7.
- 8 Kolaskar AS, Tongankar PC. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Lett* 1990; 276(1-2): 172-4.
- 9 Tarr AW, Qwsianka AM, Timms JM. Characterization of the hepatitis C virus E2 epitope defined by the broadly neutralizing monoclonal antibody AP33. *Hepatology* 2006; 43(3): 592-601.
- 10 Dakappagari NK, Douglas DB, Triozzi PL, Stevens VC, Kaumaya PT. Prevention of mammary tumors with a chimeric HER-2 B-cell epitope peptide vaccine. *Cancer Res* 2000; 60(14): 3782-9.
- 11 Olive C, Clair T, Yarwood P, Good MR. Protection of mice from group A streptococcal infection by intranasal immunization with a peptide vaccine that contains a conserved M protein B cell epitope and lacks a T cell autoepitope. *Vaccine* 2002; 20(21-22): 2816-25.
- 12 Dakappagari NK, Pyles J, Parihar R, Carson WE, Young DC, Kaumaya PT. A chimeric multi-human epidermal growth factor receptor-2 B cell epitope peptide vaccine mediates superior antitumor responses. *J Immunol* 2003; 170(8): 4242-53.

Screening and Identification of Efficient T and B Combined Epitopes of *Vibrio vulnificus* Hemolysin Based on Phage Display Technique

Bo Wang, Hui Ding, Dan-Li Xie, Yong-Liang Lou*, Mei-Ying Xiao, Bi-Fang Pang, Jie Yan¹

(Zhejiang Provincial Key Laboratory of Medical Genetics, School of Medical Lab Science, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China; ¹Department of Medical Microbiology and Parasitology, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China)

Abstract The epitopes of T and B cells in *Vibrio vulnificus* hemolysin (VvhA) were predicted and analyzed by bioinformatics technique. We discovered four major T and B combined epitopes, named Vvha1, Vvha2, Vvha3 and Vvha4, respectively. The four recombinant epitopes were successfully expressed by phase display system, named M13KE-Vvha1, M13KE-Vvha2, M13KE-Vvha3, M13KE-Vvha4, and the antigenicities of M13KE-Vvha2 and M13KE-Vvha4 were better than that of M13KE-Vvha1 and M13KE-Vvha3 through Western blot. The immunogenicities of combined epitopes were further confirmed by flow cytometry and ELISA according to the changes of CD4⁺, CD8⁺ T cells and cytokines, such as IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ . The subgroup of CD4⁺ T cells of ICR mice which were injected intraperitoneally with M13KE-Vvha1, M13KE-Vvha2 and M13KE-Vvha4 changed apparently, and the cytokines also had a significant change compared with cytokines of control groups. But when mice were intraperitoneally injected with M13KE-Vvha3, only IL-4 changed significantly. In conclusion, we had discovered and screened two efficient combined epitopes successfully, Vvha2 and Vvha4, and they could be as candidates of multipleantigenic peptide vaccine.

Key words *Vibrio vulnificus*; *Vibrio vulnificus* hemolysin; phage display; B cell epitope; T cell epitope

Received: October 13, 2009 Accepted: January 4, 2010

The work was supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No.Y2090468) and the Science and Technology Program of Zhejiang Province (No.84008012)

*Corresponding author. Tel: 86-577-86699200, E-mail: lyl@wzmc.net