

H7N7亚型禽流感病毒血凝素B细胞和Th细胞表位预测及初步鉴定

白靓¹,金宁一²,成岩¹,石毅¹,鲁会军²,南文龙²,田明尧²,赵翠青²,张金双²,关铭¹
(¹吉林大学药学院,长春130021;²军事医学科学院11所,全军基因工程重点实验室,长春130062)

摘要:预测H7N7亚型禽流感病毒血凝素(Hemagglutinin,HA)B细胞和Th细胞(T Help Cell,辅助T细胞,在免疫调节中起促进作用的T细胞亚群。)相关抗原表位,并对所获表位的抗原性进行初步鉴定。根据禽流感流行趋势,从GeneBank下载H7N7禽流感病毒HA氨基酸序列,使用生物信息学方法,对所下载序列进行预测与分析,获得H7N7亚型禽流感病毒血凝素B细胞和Th细胞相关抗原表位。通过H7亚型禽流感病毒阳性血清,初步验证所选表位抗原性。获得了5个H7N7亚型禽流感病毒候选B细胞和Th细胞表位,经过间接ELISA方法分析,其中HA₁₆₅₋₁₇₈,HA₁₈₀₋₁₉₃,HA₂₄₁₋₂₅₅表序列相对保守,与流行的H7N7亚型禽流感病毒HA相应区域具有较好的一致性,同时具有与H7型禽流感病毒阳性血清抗体结合能力,预示了其成为功能表位的可能。所筛选的表位具有成为H7N7亚型禽流感病毒HAB细胞和Th细胞相关抗原表位的可能,为H7N7亚型禽流感表位疫苗的研究奠定基础。

关键词:禽流感病毒;血凝素;H7N7;抗原表位

中图分类号:S859.79+7

文献标志码:A

论文编号:2009-2160

Prediction of the B cell/Th Cell Epitopes on HA of Avian in Fluenza Virus (H7N7) and Preliminary Evaluation.

Bai Liang¹, Jin Ningyi², Cheng Yan¹, Shi Yi¹, Lu Huijun², Nan Wenlong², Tian Mingyao², Zhao Cuiqing², Zhang Jinshuang², Guan Ming¹

(¹School of Pharmaceutical Sciences, JiLin University, Changchun 130021;

²Key Laboratory of Genetic Engineering of PLA, Academy of Military Medical Sciences, Changchun 130062)

Abstract: To predict B/Th cell epitopes on Hemagglutinin(HA) of avian influenza virus (H7N7) and evaluate antigenicity of the candidate epitopes. The HA amino acid sequences of AIV (H7N7) which were prevalent recently, were downloaded from GeneBank. The Th/B cell epitopes were predicted and analyzed by bioinformatics methods. Then, antigenicity of the candidate epitopes was identified by AIV (H7) positive serum samples. Five B/Th cell epitopes containing HA were acquired. HA₁₆₅₋₁₇₈, HA₁₈₀₋₁₉₃, HA₂₄₁₋₂₅₅ epitopes which were analyzed by indirect ELISA method were on a relatively conserved domain and a deal of AIV (H7N7) contained the sequences. Moreover, the candidate epitopes were showed with a distinct antibody combining reactivity with the H7 HA positive serum, which inferred the predicted epitopes to be functional ones. The selected epitopes are able to be functional HA B/Th cell epitopes of AIV (H7N7). Our study also establishes the foundations for the recognition of AIV (H7N7) functional epitopes and the development of epitope vaccines.

Key words: Avian influenza virus; HA; H7N7; Epitope

基金项目:国家高技术研究发展(863)计划“家禽重要病毒病基因工程疫苗研究和创新”(NO:2006AA10A205)。

第一作者简介:白靓,女,1981年出生,吉林省敦化市人,在读博士,主要从事基因工程疫苗研究。通信地址:130021 长春市富锦路1266号,吉林大学药学院, E-mail: jilinbl@126.com。

通讯作者:关铭,女,1949年出生,吉林省长春市人,教授,主要从事分子生物学与药物分析研究。通信地址:130021 长春市富锦路1266号,吉林大学药学院, Tel: 0431-85619252, E-mail: guanmtt@yahoo.com.cn。

收稿日期:2009-10-20, **修回日期:**2009-12-10。

0 引言

禽流感病毒感染导致世界上每年有30万~50万禽类死亡,并且禽流感病毒跨越物种属感染人类造成流感的大流行并令感染者死亡,给整个社会造成极大的损失^[1]。到目前为止,已证实的感染人类的禽流感病毒主要有H1N1、H5N1、H7N7、H7N2、H7N7等亚型。2003年荷兰爆发H7N7亚型禽流感不仅经济损失惨重,而且发现人类感染死亡^[2]。由于流感病毒的高度变异性及抗原漂移特征使流感病毒逃过人体免疫系统的识别,传统的减毒活疫苗提供长期的保护作用将会变得很困难。随着分子生物学、免疫学的发展,人们渴望寻求新的疫苗技术来解决这一问题。表位疫苗是亚单位疫苗的一种,在设计上突破了以整个基因为目的片段的局限,而是通过表位多肽刺激机体产生保护性免疫应答。表位疫苗设计的关键就是确定可以引起机体细胞和体液免疫的特异性表位序列^[3]。目前,表位疫苗已经应用于HIV、HCV、肿瘤的研究中,并取得了一些良好的效果,但是在应用于禽流感的研究中还知之甚少^[4-5]。此研究采用生物信息学方法,分析H7N7亚型禽流感病毒血凝素(Hemagglutinin, HA)的氨基酸序列,预测HA的Th和B细胞相关抗原表位,并通过间接ELISA方法验证其抗原性,为研究H7N7亚型禽流感病毒表位疫苗打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

表位预测用服务器来源于互联网。辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗鸡IgY购自Promega公司。表位多肽由上海华大天元生物技术开发公司合成,纯度大于90%,并与BSA偶联。H7亚型禽流感标准抗原及血清购自哈尔滨维科生物技术开发公司。健康SPF鸡血清由实验室采集保存。从GeneBank下载的H7N7亚型的禽流感病毒的HA氨基酸序列,登录号AAR02636。

1.2 HA蛋白二级结构的预测与分析

采用SOPMA(<http://pbil.ibcp.fr>)蛋白质结构预测服务器预测H7N7HA蛋白质二级结构,对预测结果进行分析,排除二级结构中位于 α -螺旋和 β -折叠内不易形成表位的序列。

1.3 B细胞表位的预测与分析

使用Bcepred B细胞表位预测服务器(<http://www.imtech.res.in/raghava/bcepred/>)预测B细胞表位,结合二级结构预测结果,选取亲水性好、可塑性好、抗原性强、分子极性强的片段作为候选表位,待进一步分析。目前大部分B细胞表位预测都是从抗原蛋白的氨基酸

一级结构出发,以线性为主,综合氨基酸序列中的氨基酸柔性、亲水性、抗原性并且排除二级结构位于 α -螺旋和 β -折叠内不易形成表位的序列。

1.4 Th表位综合预测与分析

选取上一步得到的候选表位序列,通过网络服务器SYFPEITHI(<http://www.syfpeithi.de/>)、MULTIPRED(<http://antigen.i2r.a-star.edu.sg/multipred/>)分别预测HLA-DRB1*04Th表位,综合参考其评分筛选出结果。其中SYFPEITHI预测基于氨基酸的基本序列进行预测,方法简单,但预测精度不是很高。MULTIPRED的算法包括人工神经网络法、隐马尔科夫过程,这些算法能够揭示数据中的复杂非线性关系,弥补SYFPEITHI的不足^[6]。以上筛选表位序列同时具有B细胞表位与Th表位的特征。

1.5 候选表位抗原性分析

人工合成表位多肽,并与BSA交联。每个待预测表位分3组进行反应性分析,每组15个样品,分别为禽流感H7型标准阳性血清组、SPF鸡源阴性血清组、空白对照组。根据文献采用间接ELISA方法^[7]。BSA偶联多肽(20 μ g/mL) 4 $^{\circ}$ C过夜包被ELISA板,次日置于含5%脱脂乳的Tris盐缓冲液中封闭1 h。每孔加入禽流感H7亚型标准阳性血清(1:40倍稀释)、SPF鸡源阴性血清(1:40倍稀释),37 $^{\circ}$ C温育1.5 h。PBS洗涤5次后,加入HRP标记羊抗鸡IgY(1:1000倍稀释),37 $^{\circ}$ C温育1.5 h。PBS洗涤5次后,加入OPD显色液,37 $^{\circ}$ C避光显色15 min后终止,492 nm处测定各孔吸光值。计算阳性血清与阴性血清OD比值,组间差异统计用SPSS15.0软件进行单因素方差分析。 P/N 值=(被检血清OD值-空白对照OD值)/(阴性血清OD值-空白对照OD值)。由于表位多肽分子较小,缺乏空间构型的分子基础,不能与ELISA板有效结合,会对结果判定产生直接的影响。所以将合成的表位多肽与分子量较大的蛋白载体(如BSA)交联,可以有效地解决这样的问题^[8]。

2 结果与分析

2.1 H7N7HA蛋白二级结构

SOPMA服务器分析结果显示,HA α -螺旋占32.7%多集中在N端,无规则卷曲占38.1%,其柔性区域即功能区主要分布于N端第2~29, 50~78, 91~110, 126~150, 165~196, 204~243, 271~308, 325~337, 355~373区段(图1)。

2.2 B细胞表位的预测与分析

使用Bcepred网络服务器对B细胞表位进行综合预测。通过联合亲水性、柔韧性、表面可及性、及抗原

```

QILVFAVVAIIPNADKICLGHHAVSNGTKVNTLTERGVEVVMATETVERTNVPRICSKGKRTVDLGQCG
hheeeeeeeeecccccteeeeeeccccccccchhhhhhhhtttceeechhhhhhcccccccccccccccccccc
LLGTITGPPQCDQFLEFSADLIERREGSDVCYPGKFWNEEALRQILRESGGIDKETMGFTYSGIRTNGA
eeeeeecccttccccccccchheeeeccccccccccccccccccccchhhhhhhhhhtttcccchcccccccccccc
TSACRRSGSSFYAEMKWLNSNTDNAAFPQMTKSYKNTRKDPALIVWGIHHSGSTTEQTKLYGSGNKLITV
ccccccccchhhhhhhheectttttcccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccc
GSSNYQQSFVPSGARPOVNGQSGRIDFHWLILNPNDTVTFSFNGAFIAPDRASFLRGKSMGIQSEVQVD
cccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccc
ANCEGDCYHSGGTIISNLPFQINNSRAVVKCPRYVKQESLLLATGMKNVPEIPKRRRRGLFGAIAAGFIEN
cccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccc
GWGLIDGWYGFRRHQAQEGTAADYKSTQSAIDQITGKLNRLIEKTNQQFELIDNEFTEVEKQIGNVIN
tccttecccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccc
WTRDSMTEVWSYNAELLVAMENQHTIDLADSEMKNLYERVKRQLRENAEEDGTGCFEIFHKCDDDCMASI
hhhhhhheehhhhhheehhtttceehhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
RNNTYDHSKYREEAIQNRIQIDPVKLSSGYKDVILWFSFGASCFILLAIAMGLVFCVKNGNMRCIT
htccccccccchhhhhhhhhhhcccccccccttchheeeeehhhhhhhhhhhhhhhhhhheehhtttcccccccc

```

c: 无规则卷曲; e: β -折叠; h: α -螺旋; t: 转角区域

图1 SOPMA 服务器分析结果

倾向性, 结果显示在 24~40, 54~61, 78~85, 165~179, 226~246, 305~317, 区段内或附近存在抗原表位。结合二级结构, 在 30~37, 110~120, 150~158, 326~335 区段主要是作为骨架起稳定作用的 α -螺旋结构, 这些区

域形成表位的可能性很小。综合比较后发现, 18~32, 165~178, 180~193, 241~255, 305~319 区段符合亲水性好, 可塑性好, 抗原性强, 分子极性等特点, 有可能成为 H7N7 禽流感亚型 HA 蛋白优势 B 细胞表位。(表 1)。

表 1 HA B 细胞表位 Bcepred 分析及综合分析结果

预测内容	预测表位										
亲水性	24~30	43~52	57~65	76~81	96~103	125~149	161~166	171~181	190~204	211~216	223~234
表面可及性	12~17	24~40	42~66	68~182	193~202	312~319	329~339	374~380			
柔韧性	24~28	54~61	93~97	141~147	170~178	189~195	208~213	226~333	264~270	330~337	
抗原性	19~22	53~59	63~75	78~85	99~107	186~192	198~221	235~246	311~319		
二级结构	2~29	50~78	91~110	126~150	165~196	204~243	297~308	325~337	355~373		
综合分析	18~32	165~178	180~193	241~255	305~319						

表 2 SYFPEITHI 与 MULTIPRED 分析结果

	SYFPEITHI	MULTIPRED
HA ₁₈₋₃₂	25	7.45
HA ₁₆₅₋₁₇₈	22	8.28
HA ₁₈₀₋₁₉₃	18	8.06
HA ₂₄₁₋₂₅₅	20	7.86
HA ₃₀₅₋₃₁₉	19	8.14

注: SYFPEITHI 大于 20 说明该表位能与 MHC 分子更好的结合。MULTIPRED 评分结果位于 8~9 说明该表位能与 MHC 分子有较高的结合能力, 6~7 结合能力中等, 4~5 较低的结合能力, 3~4 说明不能结合。

2.3 Th 细胞表位的预测结果

选取含有 B 细胞表位的区段 5 条, 使用 SYPEITHI 和 MULTIPRED 进行综合预测。预测显示 5 条表位得分较高(表 2)。说明可与 HLA-DRB1*0104 限制性分子有较好的结合能力, 且能被 HLA-DRB1*0104 限制性分子递呈, 具有成为 Th 细胞表位的可能。

2.4 候选表位抗原性分析

通过间接 ELISA 方法, 评价候选表位与血清反应

的特异性。以阴性对照平均值的两倍($P/N=2$)作为临界值, 其中 HA₁₈₋₃₂($P/N=1.14$)与 HA₃₀₅₋₃₁₉($P/N=1.23$)与阴性对照相比, $P>0.05$, 说明 HA₁₈₋₃₂, HA₃₀₅₋₃₁₉ 并未表现出与阳性血清抗体显著的结合能力。与阴性血清相比, HA₁₆₅₋₁₇₈($P/N=3.42$)、HA₁₈₀₋₁₉₃(3.33)、HA₂₄₁₋₂₅₅(3.93)表现出与阳性血清抗体显著的结合能力($P<0.01$), 且 HA₂₄₁₋₂₅₅ 与抗体的结合能力强于 HA₁₆₅₋₁₇₈ 与 HA₁₈₀₋₁₉₃。结果证实, H7 型标准阳性血清中存在着可与表位多肽结合的抗体组分, 所筛选的表位具有成为功能表位的潜能(表 3)。

3 讨论

理想的抗原表位最好能兼有 B 细胞表位与 Th 细胞表位的功能^[9]。即可以通过刺激 B 细胞产生针对抗原的特异性抗体, 直接与病毒结合。同时又可以与 MHC II 类分子结合, 递呈到抗原递呈细胞表面, 引发 Th 细胞的活化, 产生获得性免疫应答并能为 B 细胞产生抗体提供帮助。Th 细胞有能力分泌一系列细胞因子, 这些细胞因子可以参与免疫调节或者对入侵的微

表3 血清反应分析H7 HA B细胞表位与Th表位(±s)

	ELISA 校价(OD ₄₉₂)				
	HA ₁₈₋₃₂	HA ₁₆₅₋₁₇₈ *	HA ₁₈₀₋₁₉₃ *	HA ₂₄₁₋₂₅₅ *	HA ₃₀₅₋₃₁₉
阳性	0.24±0.03	0.89±0.02	0.80±0.04	1.18±0.02	0.27±0.04
阴性	0.21±0.08	0.26±0.10	0.24±0.09	0.30±0.08	0.22±0.06
P/N(OD ₄₉₂)	1.14	3.42	3.33	3.93	1.22

注: *与阴性对照组相比 $P < 0.01$

生物发挥直接效应。

定位B细胞表位最直接的方法就是分析抗原蛋白-单克隆抗体的结晶复合物,但试验耗时长,成本高,而且结晶复合物的制备困难。而Th细胞表位属于线性表位,并呈现很多组合,目前的试验技术很难得到所需的表位。利用生物信息学辅助方法,可以使发现新表位的效率提高10~20倍,减少95%的工作量,节约研究经费^[10]。蛋白质二级结构预测是B细胞表位预测的基础和辅助,通过SOPMA网络服务器的预测方案,综合各个参数预测的结果,发现N端第24~40, 54~61, 78~85, 165~179, 226~246, 305~317区段主要是无规则卷曲结构,通常突出在蛋白的表面,从而构成蛋白质的功能区,这些区段具有好的亲水性、可及性、柔韧性、和抗原性指数,具有成为B细胞表位的潜能。另外还发现N端30~37, 110~120, 150~158, 326~335区段主要是作为骨架起稳定作用的 α -螺旋结构,由于 α -螺旋二级机构化学键能较高,这些区域形成表位的可能性很小。B细胞表位的预测上,综合各单项的预测结果并以蛋白质二级结构预测作为参考,来提高预测的准确性,在使用Bcepred服务器选取表位结果时,要选取综合评分较高序列的作为候选表位,不能因为某项分数稍低就将其淘汰。Th表位预测使用SYPEITHI和MULTIPRED进行综合评价,在HLA限制类型上,选择具有421个抗原数的HLA-DRB1*04^[11]。

目前,含有多抗原表位串联疫苗已经在乙肝疫苗、艾滋病疫苗、肿瘤疫苗均获得了良好的免疫效果。将抗原表位疫苗应用于流感的疫苗研发,是流感疫苗研究有新方向。此研究对H7亚型禽流感病毒HAB细胞表位Th表位进行预测,并对预测的表位抗原性进行了初步的分析,其结果为H7N7亚型禽流感新型表位疫苗的设计和应用打下了基础。

此项研究获得5条B细胞和Th表位HA₁₈₋₃₂, HA₁₆₅₋₁₇₈, HA₁₈₀₋₁₉₃, HA₂₄₁₋₂₅₅和HA₃₀₅₋₃₁₉,并以H7亚型禽流感病毒血清进行了候选表位的抗原性分析。分析结

果提示HA₁₆₅₋₁₇₈, HA₁₈₀₋₁₉₃, HA₂₄₁₋₂₅₅有成为功能表位的可能。HA₁₈₋₃₂, HA₃₀₅₋₃₁₉虽然在网络服务器预测中评分较高,但是这2个表位与血清结合能力较低,成为表位疫苗抗原的可能性需要进一步验证。

参考文献

- [1] World Health Organization H5N1 influenzatimeline.http://www.who.int/csr/disease/Avian_Influenza/timeline.pdf(accessed Oct 2006).
- [2] Malik Peiris JS. Avian influenza viruses in humans[J]. Rev Sci Tech. 2009, 28(1):161-173.
- [3] Ben Yedidia T, Arnon R. Towards an epitope based human vaccine for influenza[J]. Hum Vaccin, 2005, 1(3):95-101.
- [4] Yang W, Jackson D C, Zeng Q, et al. Multi-epitope schistosome vaccine candidate tested for protective immunogenicity in mice[J]. Vaccine, 2001, 19(1):103-113.
- [5] Hanke T, Neumann V C, Blanchard T K, et al. Effective induction of HIV-specific CTL by multiepitope using gene gun in a combined vaccination regime[J]. Vaccine, 1999, 17(6):589-596.
- [6] Doychinov I A, Flower D R. Quantitative approaches to computational vaccinology[J]. Immunol Cell Biol, 2002, 80(3): 270-279.
- [7] 南文龙,金宁一,鲁会军.H5N1亚型禽流感病毒血凝素Th和B细胞表位预测及抗原性分析[J].中国免疫学杂志,2009,7(25): 630-637.
- [8] Hirsch V M, Fuerst T R, Sutter G, et al. Patterns of viral replication correlate with outcome in simian immunodeficiency virus (SIV)-infected macaques: effect of prior immunization with a trivalent SIV vaccine in modified vaccinia virus Ankara[J]. J Virol, 1996, 70(6):3741-3752.
- [9] Parida R, Shaila M S, Mukherjee S. Computational analysis of proteome of H5N1 avian influenza virus to define T cell epitopes with vaccine potential[J]. Vaccine, 2007, 25(43):7530-7539.
- [10] De Groot, A S Sbai H. Aubin. Immunoinformatics: Mining genomes for vaccine components[J]. Immunol Cell Biol, 2002, 80:255-269.
- [11] 张伯伟,赵磊,郭如华,等.DNA基因芯片在中华骨髓库HLA组织配型检测中的应用价值[J].中国卫生工程学,2006,5(4):231-232.