

# FMDV Asia1/ HeB 病毒株结构蛋白基因的克隆测序及 B 细胞抗原表位预测

张中旺, 张永光, 王永录, 潘 丽, 方玉珍, 刘力宽, 蒋守田,  
吕建亮, 周 鹏, 张 昱, 张淑刚, 杜进鑫, 李正丰

(中国农业科学院 兰州兽医研究所, 家畜疫病病原生物学国家重点实验室, 农业部畜禽病毒学重点开放实验室, 甘肃 兰州 730046)

**摘要:** 对口蹄疫病毒 Asia1/ HeB 株 P1 结构蛋白基因进行了扩增、克隆及序列测定。采用 DNASTar Protean 软件对 P1 蛋白的二级结构、可塑性、亲水性、表面可及性及抗原指数等参数进行分析, 综合预测其 B 细胞表位分布。结果表明, FMDV Asia1/ HeB 株 P1 基因长 2 199 bp, 包含完整的开放阅读框, 编码 733 个氨基酸, 其中 VP1 长 633 bp, 编码 211 个氨基酸, VP2 长 654 bp, 编码 218 个氨基酸, VP3 长 657 bp, 编码 219 个氨基酸, VP4 长 255 bp, 编码 85 个氨基酸。P1 结构蛋白的二级结构较为复杂, 含有较多的  $\beta$  片层结构和转角结构, VP1、VP2 和 VP3 上均有多个区域为 B 细胞优势表位, VP4 上也有少量的潜在 B 细胞表位。与已鉴定的 B 细胞表位相比较, 该方法预测的结果有较高的准确度。为试验确定 FMDV Asia1/ HeB 株 P1 结构蛋白的 B 细胞表位和反向疫苗学设计提供了理论基础。

**关键词:** 口蹄疫病毒; 结构蛋白; 测序; B 细胞表位

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000- 7091(2009)04- 0057- 07

## Cloning, Sequencing and B Cell Epitopes Prediction of Structural Protein Gene of a Foot-and-Mouth Disease Virus Strain Asia1/ HeB

ZHANG Zhong-wang, ZHANG Yong-guang, WANG Yong-lu, PAN Li,  
FANG Yu-zhen, LIU Li-kuan, JIANG Shou-tian, LU Jian-liang, ZHOU Peng,  
ZHANG Yu, ZHANG Shu-gang, DU Jin-xin, LI Zheng-feng

(Key Laboratory of Animal Virology of Ministry of Agriculture, State Key  
Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Lanzhou Veterinary Research Institute,  
Chinese Academy of Agriculture Sciences, Lanzhou 730046, China)

**Abstract:** The DNA of P1 gene of Foot-and-mouth disease virus Asia1/HeB was amplified and cloned, and then sequenced. Amino acid sequence of P1 on secondary structure, flexibility, hydrophilicity, accessibility and antigenicity were analyzed using DNASTar Protean software, with the B cell epitopes to be predicted. The results showed that the P1 region of FMDV Asia1/HeB is 2 199 bp in length and codes for a polypeptide of 733 amino acids, including complete open reading frame. The structural protein of VP1, VP2, VP3, VP4 gene consists of 633, 654, 657, 255 bp and codes for 211, 218, 219, 85 amino acids respectively. The secondary structure of P1 region was relatively complicated consisting of more  $\beta$  sheet regions and turn regions. There were predominant B cell epitopes in VP1, VP2, VP3 and a small amounts in VP4. Comparing with the epitopes that have been published, the predict results have a high reliability. This study would be helpful for identification of B cell epitopes for structural protein of FMDV Asia1/HeB strain using experimental methods and research of reverse vaccine of FMDV.

**Key words:** Foot-and-mouth disease virus; Structural protein; Sequencing; B cell epitopes

口蹄疫(Foot-and-mouth disease, FMD)是由口蹄  
疫病毒(Foot-and-mouth disease virus, FMDV)感染偶蹄

动物引起的烈性传染病。该病的暴发流行, 给畜牧  
业生产和进出口贸易造成极大损失, 因此, 联合国粮

收稿日期: 2009- 03- 06

基金项目: 国家支撑计划项目(2006BAD06A06)

作者简介: 张中旺(1983- ), 女, 甘肃临洮人, 在读硕士, 主要从事动物病毒分子免疫学研究。

通讯作者: 张永光(1962- ), 男, 甘肃临洮人, 研究员, 主要从事动物病毒分子生物学研究。

农组织和国际动物卫生组织将其列为头号必须报告的动物传染病<sup>[1]</sup>。

FMDV 是已知最小的动物 RNA 病毒,无囊膜,病毒粒子由病毒基因组和衣壳组成。病毒基因组为单股正链 RNA,长约 8.5 kb,包含一个开放阅读框(Open reading frame, ORF), ORF 分为 L、P1、P2、P3 四个区,结构蛋白 P1 分别编码 VP4(1A)、VP2(1B)、VP3(1C)和 VP1(1D)4 个结构蛋白,这四种结构蛋白最终形成五聚体单位构成病毒衣壳蛋白;P2 区编码 3 种蛋白,依次为 2A、2B、2C;P3 区编码 4 种 7 个蛋白,依次为 3A、3B(VPg1)、3B(VPg2)、3B(VPg3)、3C 和 3D。研究发现 FMDV 抗原位点几乎都集中在 P1 区,VP1、VP2、VP3 位于衣壳表面,VP4 位于衣壳的内部<sup>[2]</sup>,四种结构蛋白都具有免疫原性。

本试验对 FMDV Asia1/HeB 株 P1 结构蛋白的编码基因进行了克隆测序,并对其氨基酸序列进行了 B 细胞表位预测,旨在为进一步试验确定 P1 蛋白的 B 细胞表位和构建多表位疫苗奠定理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 毒株 FMDV Asia1/HeB 毒株由本实验室分离、鉴定和保存。参考毒株为 Asia 1/Jiangsu/China/2005(EF149009)、Asia1/YNBS/58(AY390432)、Asia1/IND/63/72(AY304994)。

1.1.2 试剂 大肠杆菌菌株 JM109 为本实验室保存;AMV 反转录酶、La Taq 酶、dNTP、限制性内切酶、Marker DL2000 和 DL15000、质粒 DNA 提取试剂盒、DNA 小量胶回收试剂盒、IPTG、X-gal 均购自大连宝生物工程有限公司,T4DNA 连接酶、pGEM-T easy 克隆载体购自 Promega 公司, RNA 提取试剂盒为 QIAGEN 公司产品,其他试剂均为进口分析纯。

1.1.3 引物序列 根据 GenBank 中 AsiaI 型 FMDV 基因组序列及有关文献设计了 1 对引物,送大连宝生物工程公司合成。引物序列如下:

P1: 5'-ACCTCCAACGGGTGGTACGG-3'

P2: 5'-GACATGTCTCCTGCATCF-3'。

### 1.2 方法

1.2.1 病毒 RNA 的提取 参考 QIAGEN 公司 RNA 提取试剂盒直接从小鼠组织毒中提取 RNA。

1.2.2 RT-PCR 参照 AMV 反转录试剂盒说明书的方法,用下游引物 P2 对所提取的 RNA 进行反转录合成 cDNA,然后以 cDNA 为模板进行扩增,PCR 反应体系为:10×PCR Buffer(含  $Mg^{2+}$ ) 10 μL, dNTPs 6 μL,模板 6 μL,引物 P1、P2 各 1 μL,La Taq 酶 1 μL,

用超纯水补至 100 μL。反应程序为 95℃ 10 min, 94℃ 1 min, 56℃ 90 s, 72℃ 3 min, 30 个循环,最后, 72℃ 10 min。1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

1.2.3 目的基因的克隆 经 PCR 获得的目的基因用胶回收试剂盒回收后,直接连入 pGEM-T easy 载体并转化 JM109 大肠杆菌。经蓝白斑筛选挑选白斑,小量制备质粒,以酶切和 PCR 方法鉴定阳性克隆。

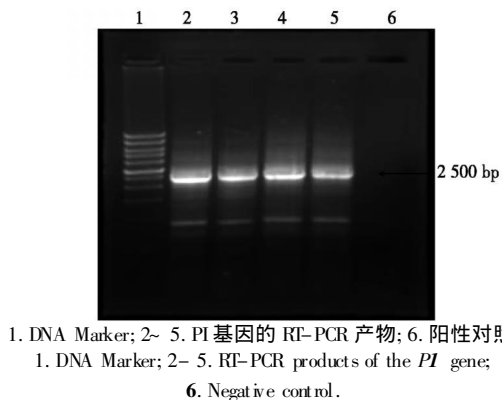
1.2.4 P1 基因的核苷酸序列测定及比较分析 将鉴定为阳性的克隆菌送宝生物工程(大连)有限公司进行测序。用 DNASTar 软件分析测序得到的序列。

1.2.5 P1 蛋白抗原表位分析 采用 DNASTar 软件提供的 Protean 模块对 FMDV Asia1/HeB 株 P1 结构蛋白的 B 细胞抗原表位进行预测。分别以 Garnier-Robson 法、Chou-Fasman 法预测其二级结构,以 Karplus-Schulz 法预测其柔性区域,以 Kyte-Doolittle 方法进行亲水性区域分析,以 Emini 方案进行氨基酸位于分子表面可能性分析,以 Jameson-Wolf 法进行抗原指数分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 P1 基因的 RT-PCR 扩增

PCR 扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测,显示扩增片段约 2 500 bp,与预期结果相符,且特异性和重复性较好(图 1)。



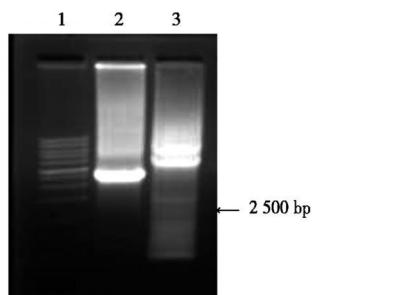
1. DNA Marker; 2~ 5. P1 基因的 RT-PCR 产物; 6. 阳性对照。  
1. DNA Marker; 2~ 5. RT-PCR products of the P1 gene;  
6. Negative control.

图 1 P1 基因扩增产物

Fig.1 RT-PCR products of the P1 gene

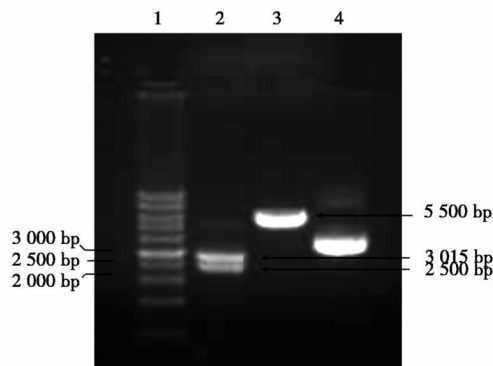
### 2.2 阳性克隆质粒的 PCR 和酶切鉴定

分别以 P1/P2 为引物,以阳性质粒为模板进行 PCR 扩增,结果扩增出了预期目的条带,片段大小约为 2 500 bp(图 2)。用 Spe I 和 Sph I 对阳性质粒进行双酶切鉴定,所切出的片段大小分别为 3 015 bp 和 2 500 bp;用 Spe I 对阳性质粒进行单酶切鉴定,所切出的片段大小约为 5 500 bp,片段大小符合预期的位置(图 3)。



1. DNA Marker; 2. 重组质粒 PCR 鉴定; 3. 阴性对照。  
1. DNA Marker; 2. PCR product of P1 recombinant plasmid;  
3. Negative control.

图 2 重组质粒的 PCR 鉴定结果  
Fig. 2 The identification results of P1 recombinant plasmid by PCR



1. DNA Marker; 2. *Spe* I/*Sph* I 双酶切产物; 3. *Spe* I 切产物; 4. P. 重组质粒。  
1. DNA Marker; 2. Products of digestion with *Spe* I + *Sph* I;  
3. Products of digestion with *Spe* I; 4. P1 recombinant plasmid.

图 3 重组质粒的酶切鉴定结果  
Fig. 3 The identification results of P1 recombinant plasmid by RE digestion 2. 3 *PI* 基因的序列测定及比较分析

测序结果显示, *P1* 基因全长为 2 199 bp, 编码 733 个氨基酸, 包括 *P1* 基因的完整阅读框。其中 VP1 长 633 bp, 编码 211 个氨基酸; VP2 长 654 bp, 编码 218 个氨基酸; VP3 长 657 bp, 编码 219 个氨基酸; VP4 长 255 bp, 编码 85 个氨基酸。与 GenBank 上的

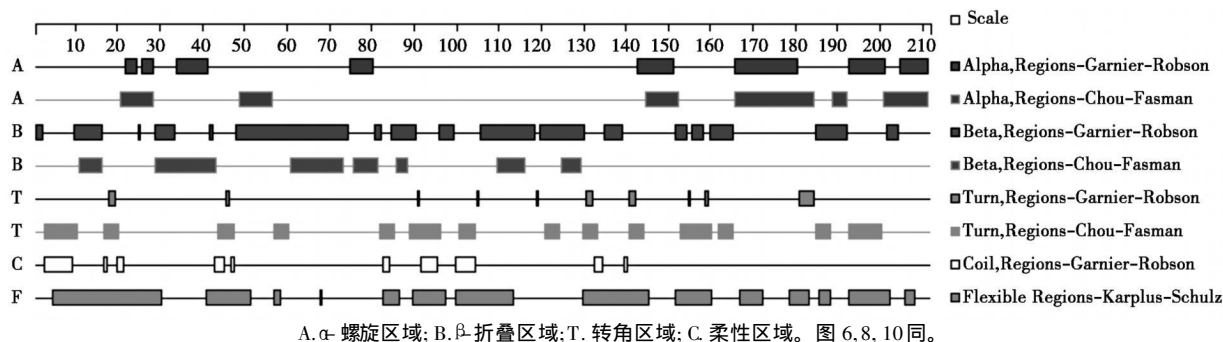
Asia1/ Jiangsu/ China/ 2005 ( EF149009)、Asia1/ YNBS/ 58( AY390432)、Asia1/ IND/ 63/ 72( AY304994) 相应蛋白基因的序列进行了同源性对比分析。结果显示, FMDV Asia1/ HeB 毒株 P1 基因的核苷酸序列与 Asia1/ Jiangsu/ China/ 2005 株对应基因的同源性为 99. 4%, 与 Asia1/ YNBS/ 58 株对应基因的同源性为 88. 0%, 与 Asia1/ IND/ 63/ 72 株对应基因的同源性为 90. 0%; 相应氨基酸序列的同源性分别为 99. 3%, 93. 7%, 94. 7%。

## 2. 4 P1 蛋白的二级结构分析及 B 细胞表位预测

### 2. 4. 1 VP1 蛋白的二级结构分析及 B 细胞表位预测

2. 4. 1. 1 VP1 蛋白的二级结构预测 分别以不同的方法预测 VP1 蛋白的二级结构, 均可看出其上含有较多的  $\beta$  折叠区域,  $\alpha$  螺旋区域以及转角, 结构较为复杂。用 Karplus-Schulz 法预测其柔性区域结果显示 VP1 蛋白上含有大量的柔性区段, 其中最大的一个柔性区域位于 N 末端的第 5~ 30 区段( 图 4)。

2. 4. 1. 2 VP1 蛋白的 B 细胞表位预测 按照 Kyte-Doolittle 的氨基酸亲水性标准, VP1 蛋白具有较高的亲水性, 主要包括第 1~ 30、41~ 51、91~ 113、120~ 145、151~ 167、177~ 186、194~ 211 区段; 根据 Emini 原则分析表面可及性, 结果显示 VP1 蛋白中表面可及性较高的区域主要分布在第 18~ 28、43~ 49、100~ 112、131~ 143、178~ 181、194~ 201、207~ 211 区段, 而且这些区段都位于 VP1 区段的亲水性区域; Jameson-Wolf 法预测 VP1 抗原指数的结果显示, VP1 蛋白的大多数区域的抗原指数都比较高, 其中第 2~ 11、15~ 30、43~ 50、90~ 113、131~ 160、165~ 171、177~ 187 和 194~ 211 区段最为显著( 图 5)。综合预测结果, VP1 蛋白上位于蛋白分子表面的区段都有可能是 B 细胞表位的优势区段。



A.  $\alpha$ -螺旋区域; B.  $\beta$ -折叠区域; T. 转角区域; C. 柔性区域。图 6, 8, 10 同。  
A.  $\alpha$ -Spiral region; B.  $\beta$ -Collapse region; T. Comer of the region; C. Random-coil region. The same as Tab. 6, 8, 10.

图 4 不同方法预测 VP1 蛋白的二级结构  
Fig. 4 Secondary structures of VP1 protein predicted by different methods

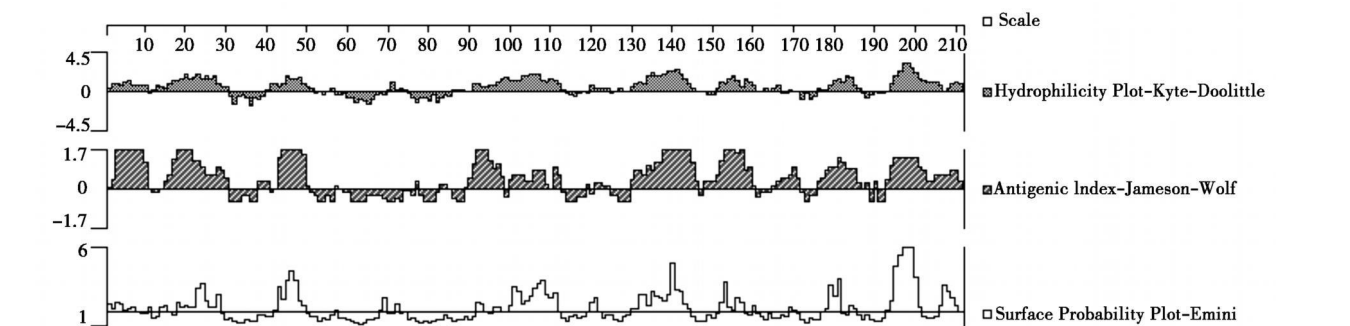


图 5 VP1 蛋白的亲水性、抗原指数及表面可及性分析

Fig. 5 Hydrophilicity plot, Surface probability plot and Antigenicity index for VP1 protein

2.4.2 VP2 蛋白的二级结构分析及 B 细胞表位预测

2.4.2.1 VP2 蛋白的二级结构预测 从预测结果(图 6)可以看出 VP2 上含有较多的  $\beta$  折叠区域,用 Garnier-Robson 和 Chou-Fasman 两种方法预测共有的  $\alpha$  螺旋区域在第 5~14、55~64、125~132 位;共有的  $\beta$  折叠区域在第 23~25、30~32、52~54、107~111、138~142、157~165、180~185、188~189、196~199、208~211 区段;两种方法预测的转角结果差异很大,共有的转角在 18~20、72~73、103~104、113~115、117~119、145、151、176 区段。Karplus-Schulz 法预测其柔性区域结果显示,VP2 上存在较多的柔性区域,但大多较短,仅在 VP2 蛋白的 N 端有 2 个稍

大的柔性区域,其位置分别在第 16~30、41~59 位区段。

2.4.2.2 VP2 蛋白的 B 细胞表位预测 从预测结果(图 7)可以看出 Kyte-Doolittle 方法预测的 VP2 蛋白亲水区域主要在第 1~10、16~28、43~69、78~90、99~107、130~142、147~156、163~176、190~200、213~218 区段;Emini 方法预测的 VP2 蛋白表面可及性较高区域仅存在于 4 个区段:第 1~6、128~139、166~176 和 215~218 区段;其他区域的表面可及性指数较低,甚至呈现负值,这四个区段均位于蛋白亲水区域和抗原指数较高区域,因此推测此四个区段成为 B 细胞优势表位的可能性较大。

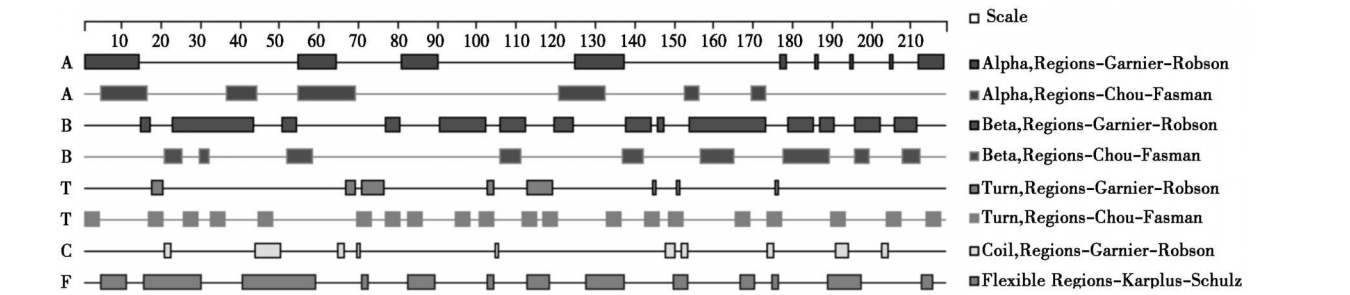


图 6 不同方法预测 VP2 蛋白的二级结构

Fig. 6 Secondary structures of VP2 protein predicted by different methods

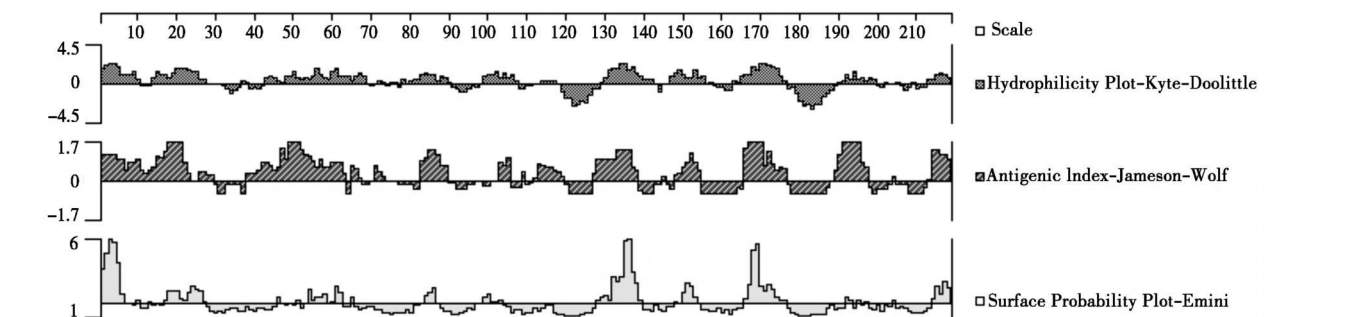


图 7 VP2 蛋白的亲水性、抗原指数及表面可及性分析

Fig. 7 Hydrophilicity plot, Surface probability plot and Antigenicity index for VP2 protein

2.4.3 VP3 蛋白的二级结构分析及 B 细胞表位预测

2.4.3.1 VP3 蛋白的二级结构预测 预测结果(图

8) 显示,VP3 蛋白上含有较多的  $\beta$  折叠区域和相对较少的  $\alpha$  螺旋区域,二者呈交叉分布,且在羧基端形成  $\alpha$  螺旋的能力较强。柔性预测结果显示 VP3 上散

在性分布着较多的柔性区域, 其中最大的一个柔性区域位于第 16~ 41 区段。

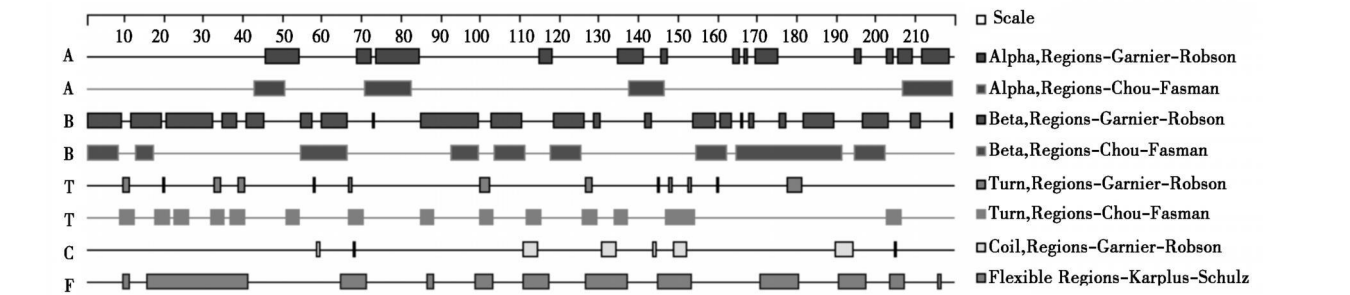


图 8 不同方法预测 VP3 蛋白的二级结构

Fig. 8 Secondary structures of VP3 protein predicted by different methods

2. 4. 3. 2 VP3 蛋白的 B 细胞表位预测 根据 Kyke-Doolittle 亲水性方案预测的结果显示, VP3 蛋白亲水性指数普遍较低, 主要存在于第 13~ 43、95~ 104、113~ 120、128~ 151、189~ 196、206~ 219 区段; 相对应于 VP3 蛋白的亲水性区段, 其抗原指数也呈现一

定的正性分布, Emini 法预测的 VP3 表面可及性结果显示 VP3 蛋白展示于蛋白表面的区段并不多, 主要分布在 18~ 23、30~ 35、96~ 100、113~ 118、128~ 137 和 216~ 219 区段, 可能是 B 细胞表位优势区域 (图 9)。

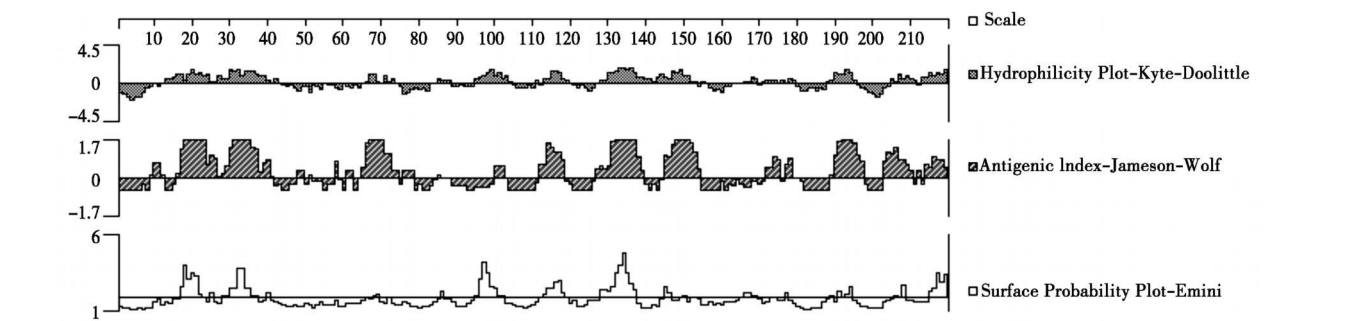


图 9 VP3 蛋白的亲水性、抗原指数及表面可及性分析

Fig. 9 Hydrophilicity plot, Surface probability plot and Antigenicity index for VP3 protein

2. 4. 4 VP4 蛋白的二级结构分析及 B 细胞表位预测

2. 4. 4. 1 VP4 蛋白的二级结构预测 根据预测结果(图 10), VP4 蛋白几乎不形成  $\alpha$  螺旋,  $\beta$  折叠区域也很少, 二级结构比较简单, 但存在较多转角区域和

无规则卷曲, 且多集中在 VP4 蛋白的氨基端。与其他 3 个结构蛋白明显不同的是, VP4 蛋白上的柔性区域数量很少, 仅有 3 个, 但所占的区域比较大, 分别为第 5~ 20、30~ 40 和 43~ 67 区段。

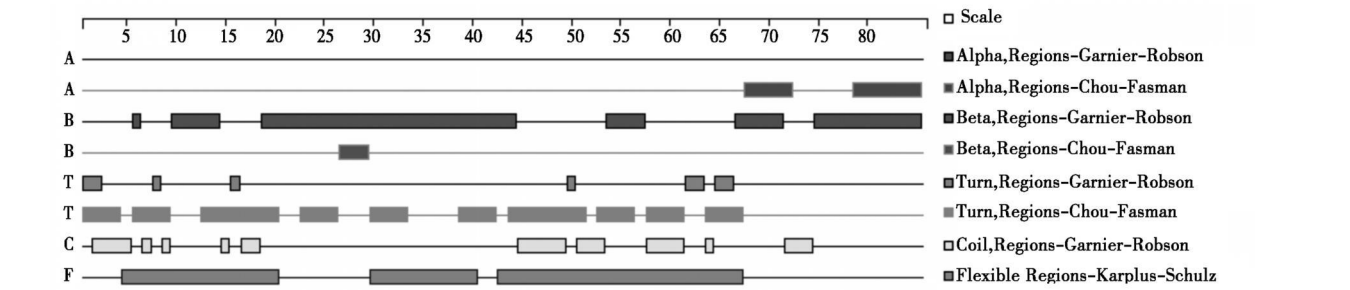


图 10 不同方法预测 VP4 蛋白的二级结构

Fig. 10 Secondary structures of VP4 protein predicted by different methods

2. 4. 4. 2 VP4 蛋白的 B 细胞表位预测 根据 Kyke-Doolittle 亲水性方案预测结果, VP4 蛋白亲水性较高的区域位于 1~ 17、24~ 41、43~ 70 区段, 跨度较其他三种结构蛋白大; 根据 Emini 法预测的表面可及性结果显示, 蛋白中具有较高可及性的区域有 10~

16、25~ 34、49~ 67 区段; Jameson-Wolf 法预测 VP4 抗原指数, 较高的区域为 1~ 20、30~ 67, 因此, 综合判定结果表明第 10~ 16、49~ 67 区段可能为 VP4 上的 B 细胞表位优势区段(图 11)。

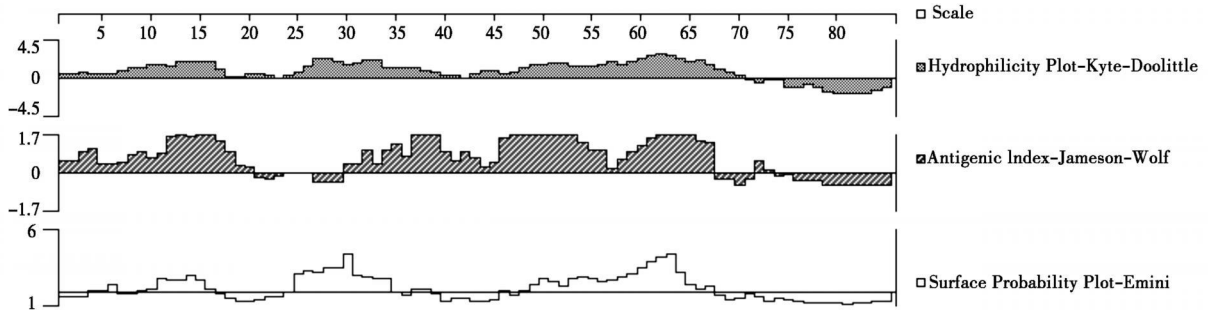


图 11 VP4 蛋白的亲水性、抗原指数及表面可及性分析

Fig. 11 Hydrophilicity plot, surface probability plot and antigenicity index for VP4 protein

### 3 讨论

通过应用计算机软件分析和网络资源对细胞抗原表位进行预测是近年来建立起来的一种较为先进的表位研究方法。该法适用于已知一级结构的蛋白质或多肽抗原的线性表位的预测。其原理是根据 B 细胞表位的结构分析而来。以唯象理论 (Phenomenological theory) 为基础,通过对蛋白亚序列理化性质或二级结构的计算,利用 B 细胞表位与上述理化特性或二级结构的相关性而达到预测目的。从 80 年代 Hopp 和 Wood<sup>[3]</sup> 提出亲水性参数对抗原表位预测的方法以来,已有许多参数、算法发表,对 B 细胞蛋白抗原表位研究起到巨大的推动作用。现已被大众认可并具有较好预测效果的方法主要有 (1) 亲水性方案<sup>[4]</sup>、可及性方案<sup>[5]</sup>、抗原性方案<sup>[6]</sup>、可塑性方案<sup>[7]</sup>、电荷分布方案<sup>[8]</sup>、二级结构预测方案<sup>[9]</sup>。一般将上述多种方案综合考虑,尤以可及性方案、可塑性方案、抗原性方案及二级结构预测为重要。概括而言,作为 B 细胞蛋白抗原的表位首先应位于或易于移动于蛋白质抗原表面,有利于与抗体结合。另外,具有一定柔韧性,因为抗原与抗体结合时蛋白构象有一定的变化。此外,吴玉章<sup>[10]</sup> 根据蛋白抗原 B 细胞表位的抗原性指数,发现 B 细胞表位中 Leu、Thr、Pro、Asp、Asn、Glu、His、Lys 和 Arg 比一般蛋白质中常见; Gly、Ala、Val、Ile、Cys、Met、Gln、Phe、Tyr 和 Trp 正相反, Ser 则与一般蛋白质中发现频率相等。这种氨基酸组成上的差异可能与蛋白质的抗原性有关,亲水性残基更易出现在蛋白质表面,因此某些氨基酸残基在表位中出现的频率高其抗原性指数就更大。

疫苗接种是特异性预防 FMD 的可靠和有效手段,安全有效的疫苗是成功地预防、控制乃至最终消灭 FMD 的先决条件。FMD 弱毒疫苗和灭活疫苗等常规疫苗都具有良好的免疫原性,在预防和控制 FMD 的过程中发挥着重要作用<sup>[11]</sup>,但由于病毒毒力返强、病毒灭活不彻底、活病毒逃逸、疫苗加工厂不

安全等因素,世界上一些地区 FMD 的暴发似乎与灭活疫苗中残存的活病毒有关,促使人们寻求一种更加安全有效的 FMD 疫苗。近年来,随着分子生物学技术的飞速发展, FMDV 基因工程疫苗如亚单位疫苗、可饲疫苗、合成肽疫苗、蛋白质载体疫苗、基因缺失疫苗、活载体疫苗、核酸疫苗等不断涌现。其中表位疫苗利用定位精确、氨基酸序列较短的抗原表位,既能够有效地被免疫系统识别、递呈,又能诱发机体产生特异性体液和细胞免疫应答;同时较短的序列很容易合成,对载体的克隆能力要求较低,易于在载体中插入多个表位构建基因工程多表位疫苗,对于 FMDV 这样具有高度变异性的病毒,应用的疫苗株可能因与当前的流行株不匹配而不能提供有效的免疫保护,然而基于多表位疫苗含有广谱的表位信息,可以避免因病毒变异而造成的疫苗免疫失败<sup>[12]</sup>。设计表位疫苗的关键是要确定可被免疫细胞识别的特异性多肽。因此表位的鉴定是构建表位疫苗的第一步。对于 Asia1 型 FMDV 抗原表位的研究报导目前还不多,所以开展针对 Asia1 型 FMDV 抗原表位的研究具有非常重要的意义。本研究成功对 FMDV Asia1/HeB 株 P1 结构蛋白基因进行了扩增、克隆及序列测定,并且采用生物信息软件预测了 FMDV Asia1/HeB 株 P1 结构蛋白的二级结构,分析其亲水性、可塑性、可及性和抗原性等表面特性。以 P1 表面特性单因素预测为基础,进行综合分析 P1 蛋白的 B 细胞表位,再以二级结构进行表位筛选,最后确定优势抗原表位。结果显示, P1 全长 2 199 bp, 编码 733 个氨基酸,蛋白二级结构属于一种混合型蛋白,含有  $\alpha$  螺旋、 $\beta$  折叠、转角和无规则卷曲结构。四种结构蛋白上 (VP1、VP2、VP3、VP4) 都存在多个潜在的抗原表位。

本研究采用多参数综合预测的方案在一定程度上提高了预测的准确性,但由于目前几乎所有的 B 细胞表位预测的算法和程序都是预测连续氨基酸残基构成的线性表位,而较少涉及大多数的构象型细胞表位的研究<sup>[13]</sup>。另外对 B 细胞表位预测结果也

缺少标准的评估方法<sup>[14]</sup>。因此, 本试验的预测结果只能作为鉴定 P1 结构蛋白潜在表位的参考, 预测结果正确与否有待进一步试验证实。

### 参考文献:

- [1] Pereira H G. Foot-and-mouth Disease[M]//Gibbs E P J. Virus Diseases of Foot Animals. London: Academic Press Inc, 1981: 333– 363.
- [2] Eric B, Carmen M, Ruiz-Jarabo, *et al.* Foot-and-mouth Disease Virus Lacking the VP1 G-H loop: The Mutant Spectrum Uncovers Interactions among Antigenic Site for Fitness Gain [J]. Virology, 2001, 288: 192– 202.
- [3] Hoop J P, Wood K R. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences[J]. Immunology, 1981, 78 (6): 3824.
- [4] Kyte J, Doolittle R F. A Simple method for displaying hydrophobic character of a protein[J]. J Mol Biol, 1983, 57(1): 105.
- [5] Tsche H. Modern methods in protein and nucleic acid research[M]. 1th ed. New York: Walter de Gruyter Berlin, 1990, 231.
- [6] Welling G W, Weijer W J, Vander Z R, *et al.* Prediction of sequential antigenic regions in proteins[J]. FEBS Lett, 1985, 188(2): 215.
- [7] Kaplus P A, Schultz G E. Prediction of chain flexibility in proteins[J]. Immunology, 1985, 72(2): 212.
- [8] Gershoni J M, Stem B, Venisova G. Combinatorial libraries, epitope structure and the prediction of conformations[J]. Immunol Today, 1997, 18(5): 108.
- [9] 来鲁华. 蛋白质的结构预测与分子设计[M]. 第 1 版. 北京: 北京大学出版社, 1993: 49.
- [10] 吴玉章, 朱锡华. 一种病毒蛋白 B 细胞表位预测方法的建立[J]. 科学通报, 1994, 39(24): 2275– 2279.
- [11] Doel T R. FMD vaccines[J]. Virus Res, 2003, 91(1): 81– 99.
- [12] Rob H M, Langeveld P M, Win M M, *et al.* Synthetic peptide vaccines: unexpected fulfillment of discarded Hope[J]. Biologicals, 2001, 29(3– 4): 233– 236.
- [13] 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.
- [14] Kolaskar A S, Kulkarni Kale U. Prediction of three dimensional structure and mapping of conformational epitopes of envelope glycoprotein of Japanese encephalitis virus[J]. Virology, 1999, 261(1): 31– 42.