

类猪圆环病毒因子 P1 VP2 蛋白二级结构与 B 细胞表位预测

温立斌¹,何孔旺¹,杨汉春²,王玉然³

(1. 江苏省农业科学院 兽医研究所,农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室,国家兽用生物制品工程技术研究中心,江苏 南京 210014;2. 中国农业大学 动物医学院,农业部预防兽医学重点开放实验室,北京 100094;
3. 河北省动物卫生监督所,河北 石家庄 050081)

摘要: 旨在预测类猪圆环病毒因子 P1 VP2 蛋白的 B 细胞表位。采用生物信息软件和互联网服务器,预测 VP2 的二级结构,分析 VP2 表面特性(亲水性、可塑性、可及性和抗原性),综合预测 VP2 的 B 细胞抗原表位。结果表明,P1 VP2 蛋白肽链的 6-18 和 80-92 区段为预测的 B 细胞表位优势区。多参数方案综合预测 P1 VP2 蛋白的 B 细胞抗原表位,为进一步鉴定表位及设计疫苗奠定了基础。

关键词: P1;二级结构;B 细胞表位;生物信息学;预测

中图分类号: S852.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2009)05-0045-05

Prediction of Secondary Structure and B Cell Epitope for VP2 Protein of Porcine Circovirus-like Agent P1

WEN Li-bin¹, HE Kong-wang¹, YANG Han-chun², WANG Yu-ran³

(1. Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Animal Diseases Diagnostic and Immunology, Ministry of Agriculture National, Center for Engineering Research of Veterinary Bio-products, Nanjing 210014, China; 2. Key Laboratory of Preventive Veterinary Medicine of the Ministry of Agriculture, College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China;
3. Animal Health Supervision Institute of Hebei Province, Shijiazhuang 050081, China)

Abstract: To predict the B cell epitopes for VP2 protein of porcine circovirus-like agent P1. By using biotic softwares and network servers, the secondary structure of VP2 was predicted, and the surface properties (hydrophilicity, flexibility, accessibility and antigenicity) of VP2 were analysed. Then the B cell epitopes integrated prediction were obtained. The predominant B cell epitopes predicted were probably in the region of 6-18 and 80-92. The results of B cell epitopes prediction using multiple parameters are helpful for further epitopes identification and vaccine design of P1.

Key words: P1; Secondary structure; B cell epitope; Bioinformatics; Prediction

猪圆环病毒(Porcine circovirus, PCV)最早被认为是一种猪肾细胞系的污染物,其可持续感染 PK-15 细胞,但不引起细胞病变。PCV 属于圆环病毒科,该科病毒的基本特征是病毒粒子无囊膜、基因组为单股、环状、闭合 DNA。PCV 是迄今发现的一种最小的动物病毒,根据 PCV 的致病性、抗原性及核苷酸序列,可将 PCV 分成 PCV1 和 PCV2 两种基因

型^[1,2]。其中 PCV1 无致病性,PCV2 则与近年来广泛流行世界各国的猪断奶后多系统衰竭综合征(Post-weaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)等疾病密切相关。PMWS 主要发生于 5~12 周龄的断奶仔猪,临床可表现为进行性消瘦、皮肤苍白、厌食、精神沉郁、被毛粗乱,出现以咳嗽、喷嚏、呼吸加快及呼吸困难为特征的呼吸器官障碍,猪群的死亡

收稿日期:2009-02-21

基金项目:国家“973”计划前期研究专项(2007CB116308);江苏省自然科学基金(BK2008351)

作者简介:温立斌(1967-),男,河北宣化人,博士,高级兽医师,主要从事动物分子病毒学与免疫学研究。

率增加,体表淋巴结,特别是腹股沟浅淋巴结肿大。目前,已成为危害我国乃至世界养猪生产的重要免疫抑制性疫病之一^[3,4]。PCV2 基因组全长为 1 767 或 1 768 个核苷酸,现已证实了 3 个开放阅读框(ORF),ORF1 编码与病毒复制有关的复制酶^[5],ORF2 编码病毒的衣壳蛋白^[6],ORF3 编码不是病毒复制所必需的但具有凋亡活性的蛋白^[7,8]。我们在诊断 PCV2 过程中,不仅证实 PCV2 具有多种基因型^[9],而且,从患 PMWS 的猪血清中还分离到 2 株类 PCV2 因子(P1 和 P2),它们也都具有环状 DNA 基因组,全长分别为 648 和 993 个核苷酸,部分与 PCV2 ORF2 高度同源,为了得到纯净的病原来进一步研究它们的生物学特性,我们构建了它们单拷贝和双拷贝串联分子克隆,并证实它们的双拷贝串联分子克隆在体外具有感染性,不仅可在转染的 PK15 细胞中形成胞浆和胞核包涵体,还可导致转染细胞凋亡;用长梅猪和广西巴马小型猪等建立的动物模型,结果表明,P1 的双拷贝串联分子克隆具有感染性,感染猪不仅临床上出现类似 PMWS 症状,即部分感染猪出现消瘦和皮肤苍白等现象,而且出现病毒血症、部分组织存在病毒核酸以及免疫器官细胞发生凋亡^[10-15]。因此,P1 感染有可能成为危害我国养猪业的又一重要疾病。P1 具有与 PCV2 一样的环状 DNA 基因组,全长为 648 个核苷酸,除 5 端的前 16 个核苷酸外,从第 17 个核苷酸起到第 648 个核苷酸止,与 PCV2 反向互补序列的 107~739 核苷酸同源率为 98.89%,但 P1 的 371 位缺失了对应于 PCV2 反向互补序列 461 位的碱基 A。尽管前期在 P1 生物学特性、PCR 鉴别检测等方面的研究取得了一定进展,但对其基因编码的蛋白质结构与功能尚不清楚。近年来,通过生物信息学及序列分析软件的预测,可获得蛋白质所包含的重要信息,如与抗原表位相关的信息^[16]。软件分析 P1 具有 3 个 ORF,其中 ORF2 (154-496nt)编码的蛋白与 PCV2 ORF2 编码的有一定的同源性,推测为 P1 的结构蛋白。本研究应用生物信息技术对 P1 VP2 蛋白基因推导的肽链首次进

行蛋白质二级结构和 B 细胞表位的预测分析,旨在为 P1 VP2 蛋白功能的研究、抗体的制备及分子疫苗的设计等提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 VP2 蛋白的多肽序列

来自 GenBank 上的 VP2 蛋白基因,利用 DNAMAN 软件和服务器推导核衣壳蛋白的氨基酸序列并推测其分子量、等电点及一些理化特性。

1.2 VP2 蛋白二级结构分析

应用 DNASTar 软件提供的 Protean 模块,用 Chou-Fasman 法、Garnier-Robson 法以及 SOPMA 服务器预测 VP2 的二级结构。其中各参数的意义见文献[17,18]。

1.3 VP2 蛋白 B 细胞抗原表位预测

应用 DNASTar 软件中的 Protein 模块分析,采用 Kyte-Doolittle 方法预测蛋白的亲水区(Hydrophilicity);用 Emini 方法预测特定区域于蛋白质表面的可能性(Accessibility);以 Karplus-Schulz 方法预测蛋白质骨架的柔韧性(Flexibility)。用 Jameson-Wolf 方法和网络服务器预测蛋白的抗原性(Antigenicity)。综合上述预测结果,筛选出亲水性好,可及性高,可塑性和抗原性强的表位;再根据预测的 VP2 二级结构,排除位于 α -螺旋和 β -片层不易形成表位的序列,将位于转角、无规则卷曲处序列确定为 VP2 的候选 B 细胞表位优势区。其中各方法参数的意义见文献[19-21]。

2 结果与分析

2.1 VP2 蛋白序列分析

从图 1 可见,经 DNAMAN 软件分析,P1 VP2 蛋白基因编码 114 个氨基酸,其理论分子量为 12.58 kDa,理论等电点 pI 为 7.35,没有跨膜区域。服务器预测该蛋白有蛋白激酶 C 磷酸化位点、酪蛋白激酶 II 磷酸化位点和 N-豆蔻酰化位点。

1 MMRFNIDFV PPEGGTNKIS IPFEYRIRK VKVEFWPCSP ITQGDGRVGT TAVILDDNFV
61 PKATAQTYDP YVTTPPAIQS PNPSPPTTPVT SHPNLFLTPL LITSNQITKG ISFG

图 1 P1 VP2 蛋白氨基酸序列

Fig. 1 The deduced amino acid sequence from VP2 gene of P1

2.2 VP2 蛋白二级结构分析

采用 DNASTar 软件的 Chou-Fasman 法和 Garnier-Robson 法以及 SOPMA 服务器进行 P1 VP2 蛋白二级结构预测的结果见图 2。

由于 Garnier-Robson 方法是通过计算特定氨基酸残基在特定结构内部的可能性来预测蛋白质的二

级结构的,而 Chou-Fasman 方法是通过序列氨基酸残基的晶体结构来预测二级结构的,因此两种方法预测的结果有所不同。从图 2 发现,Garnier-Robson 法显示 VP2 蛋白没有 α -螺旋结构形成,有 11 个 β -折叠区域、10 个 β -转角区域和 6 个无规则卷曲区域,其中 β -片层占 74.56%,转角占 14.91%,无规则卷

2.3.4 VP2 抗原性预测 应用 DNASTar 软件,采用 Jameson-Wolf 方法对 VP2 蛋白的抗原性进行预测,从图 6 分析可见,VP2 存在有多个潜在的抗原表位点,具有较高抗原指数的区域在 5 - 18、26 - 33、37 -

50、55 - 64、69 - 72、77 - 87 和 103 - 109 区段上;应用服务器 (<http://bio.dfci.harvard.edu/Tools/>) 预测,VP2 蛋白的抗原表位主要分布在 6 - 12、19 - 40、49 - 57、67 - 81 和 85 - 103 区段上。

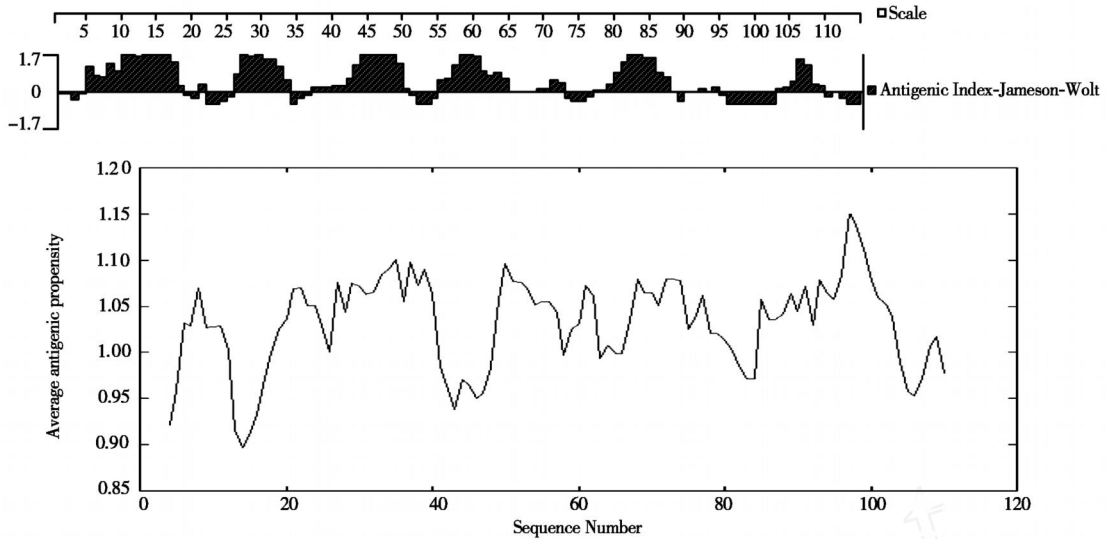


图 6 VP2 蛋白抗原指数分析

Fig. 6 The analysis of antigenic index of VP2

2.4 VP2 蛋白 B 细胞抗原表位综合预测

经不同方案预测,得到的 VP2 蛋白 B 细胞抗原表位的个数和所在区域有所不同,但在 VP2 蛋白肽链的第 6 - 18 和 80 - 92 区段上,各种方案预测的结果基本一致,均具有较好的亲水性、表面可及性和较高的抗原指数,且在蛋白二级结构上含有较易形成抗原表位的转角和无规则卷曲结构。因此,VP2 蛋白的 B 细胞抗原表位可能在其区域内或附近。

3 讨论

表位是抗原分子激发动物机体产生免疫应答的最基本结构和功能单位,表位生物学的研究,有助于新型疫苗的研究与开发、疫病的预防与诊断等,也有助于病原微生物致病机理和免疫机制的探索与阐明。B 细胞识别蛋白抗原时,是以其表面的 B 细胞抗原受体与蛋白抗原表位结合。作为 B 细胞的抗原表位,应具备一定的二级结构。蛋白质的二级结构包括螺旋区段、折叠区段、转角区域和无规则卷曲区域等,对抗原表位的分布有很大影响。螺旋区段和折叠区段的化学键能较高,主要维持蛋白的高级结构,且经常位于蛋白质内部,很难较好地与抗体嵌合,不易形成抗原表位;而转角区域和无规则卷曲区域的结构是比较松散的结构,易于发生扭曲、盘旋,并多位于蛋白质分子表面,有利于与抗体嵌合,成为抗原表位的可能性较大。因此,通常将蛋白质的二

级结构预测作为确定抗原表位的一种辅助手段。此外,蛋白质分子的亲水性、表面可及性、柔韧性和抗原性等也与其抗原表位构成有密切的联系。

近年来,随着生物信息学的迅速发展,多参数和多种计算方法的应用对 B 细胞表位的预测起到了巨大的推动作用,本研究应用多软件、多参数对类猪圆环病毒因子 P1 VP2 蛋白的二级结构及其潜在的 B 细胞抗原表位进行了预测,发现在预测的众多 B 细胞抗原表位中,VP2 蛋白肽链的第 6 - 18 和 80 - 92 区段的各种预测参数最为显著,提示这个区段及其附近区域可能是 P1 VP2 蛋白的 B 细胞抗原表位优势区。虽然,B 细胞抗原表位,特别是其构象表位,主要是通过三维结构来体现其抗原性,而生物信息学分析软件主要是根据氨基酸序列及其二级结构来进行预测。因此,本试验的预测结果只能作为鉴定 P1 VP2 蛋白潜在表位的参考,预测结果正确与否还有待进一步研究证实。尽管如此,上述预测结果为以后制备相应的抗体、发展特异性的检测与诊断系统等研究提供了重要信息和奠定了理论基础。

参考文献:

- [1] Meehan B, McNeilly F, Todd D, *et al.* Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs[J]. J Gen Virol, 1998, 79: 2171 - 2179.
- [2] Allan G M, Meehan B, Todd D, *et al.* Novel porcine circovirus from pigs with wasting disease syndromes[J]. Vet

- Rec, 1998, 142: 467 - 468.
- [3] Segales J, Allan GM, Domingo M. Porcine circovirus diseases [J]. Anim Health Res Rev, 2005, 6: 119 - 142.
- [4] 杨汉春. 猪免疫抑制性疾病的流行特点与控制对策 [J]. 中国畜牧兽医, 2004, 31(5): 41 - 43.
- [5] Mankertz A, Mankertz J, Wolf K, *et al.* Identification of a protein essential for replication of porcine circovirus [J]. J Gen Virol, 1998, 79 (Pt 2): 381 - 384.
- [6] Nawagitgul P, Morozov I, Bolin S R, *et al.* Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein [J]. J Gen Virol, 2000, 81: 2281 - 2287.
- [7] Liu J, Chen I, Du Q, *et al.* The ORF3 protein of porcine circovirus type 2 is involved in viral pathogenesis in vivo [J]. J Virol, 2006, 80: 5065 - 5073.
- [8] Liu J, Chen I, Kvang J. Characterization of a previously unidentified viral protein in porcine circovirus type 2-infected cells and its role in virus-induced apoptosis [J]. J Virol, 2005, 79: 8262 - 8274.
- [9] Wen L, Guo X, Yang H. Genotyping of porcine circovirus type 2 from a variety of clinical conditions in China [J]. Vet Microbiol, 2005, 110: 141 - 146.
- [10] 温立斌, 何孔旺, 杨汉春. 类猪圆环病毒 2 型因子 P1 与 P2 株全长基因组 DNA 分子克隆的构建 [J]. 江苏农业学报, 2007, 23: 579 - 582.
- [11] Wen L B, He K W, Yang H C, *et al.* Complete nucleotide sequence of a novel porcine circovirus-like agent and its infectivity in vitro [J]. SCI China ser C, 2008, 51(5): 453 - 458.
- [12] 温立斌, 何孔旺, 杨汉春, 等. 一株新的类猪圆环病毒因子的核苷酸全序列和体外感染性 [J]. 中国科学 C 辑, 2008, 38(5): 430 - 435.
- [13] 温立斌, 何孔旺, 杨汉春. P1 因子分子克隆的体外感染性分析 [J]. 畜牧兽医学报, 2008, 39: 941 - 944.
- [14] 温立斌, 何孔旺, 杨汉春, 等. 类猪圆环病毒 2 型因子 P1 和 P2 诱导 PK15 细胞凋亡的研究 [J]. 华北农学报, 2008, 23(6): 84 - 86.
- [15] 温立斌, 何孔旺, 杨汉春, 等. TUNEL 法检测类猪圆环病毒 2 型因子 P1 诱导猪免疫器官细胞凋亡研究 [J]. 华北农学报, 2008, 23(增刊): 88 - 91.
- [16] Sette A, Fikes J. Epitope-based vaccine: an update on epitope identification, vaccine design and delivery [J]. Curr Opin Immunol, 2003, 15: 461 - 470.
- [17] Chou P Y, Fasman GD. Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence [J]. Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol, 1978, 47: 45 - 148.
- [18] Garnier J, Osguthorpe DJ, Robson B. Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins [J]. J Mol Biol, 1978, 120: 97 - 120.
- [19] Kyte J, Doolittle R F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein [J]. J Mol Biol, 1982, 157: 105 - 132.
- [20] 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]. J Virol, 1985, 55: 836 - 839.
- [21] Jameson B A, Wolf H. The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants [J]. Comput Appl Biosci, 1988, 4: 181 - 186.