

FMDV OA/58 病毒株 VP1 蛋白结构构建与 B 细胞抗原表位的预测

周建华, 丛国正, 高闪电, 常惠芸

(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, 国家口蹄疫参考实验室, 甘肃 兰州 730046)

摘要:以口蹄疫病毒株 OA/58 RNA 为模板, 反转录并扩增目的 cDNA, 然后与 pGEM-T easy 载体连接并转化 JM109 菌株, 提取的重组质粒用凝胶电泳、PCR 和 *EcoR* I 酶切法鉴定。运用同源模建得到 OA/58 VP1 蛋白 3D 结构, 并结合理化性质、亲水性、可塑性和免疫原性进行分析, 预测 OA/58 VP1 的抗原表位。结果 OA/58 VP1 存在多个潜在的抗原表位位点, 可能的蛋白质抗原表位区域: 2~11, 15~35, 38~50, 77~88, 90~107, 121~125, 131~135, 140~149, 154~163, 169~175, 178~189, 197~213。应用同源模建得到的 OA/58 VP1 蛋白 3D 模型来预测其 B 细胞表位, 为进一步研究 OA/58 VP1 功能, 构建突变体和选择表达新型 OA/58 VP1 蛋白分子提供有参考价值的信息。

关键词: 口蹄疫病毒; VP1 蛋白; B 细胞抗原表位

中图分类号: S852.65 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2007)04-0176-04

Construction of VP1 Protein and Prediction of B Cell Epitopes in VP1 from a Foot-and-mouth Disease Virus Strain OA/58

ZHOU Jian-hua, CONG Guo-zheng, GAO Shan-dian, CHANG Hui-yun

(Chinese Academy of Agriculture Science, State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Key Laboratory of Animal Virology of Ministry of Agriculture, National FMD Reference Laboratory, Lanzhou 730046, China)

Abstract: Foot-and-mouth disease virus strain OA/58 RNAs were used as templates for RT-PCR. The amplified cDNA products were cloned into pGEM-T easy vectors and transformed into JM109. The recombinant plasmids were identified by electrophoresis, PCR, and *EcoR* I cleavage. By means of homology modeling the FMDV strain OA/58 VP1 protein, the 3D mold was obtained. In order to find out B cell epitopes of OA/58 VP1, several methods were analyzed including physical and chemical characters, hydrophilicity, antigenicity. Many distinct antigenic epitopes in FMDV OA/58 VP1 were identified by computation: 2-11, 15-35, 38-50, 77-88, 90-107, 121-125, 131-135, 140-149, 154-163, 169-175, 178-189, 197-213. Application of homology molding OA/58 VP1 to predict B cell epitopes is reasonable. This method offers reasonable information for researching function of OA/58 VP1, constructing its variant body and selecting new expression forms of OA/58 VP1.

Key words: Foot-and-mouth disease virus; VP1 protein; B cell epitope

口蹄疫是由口蹄疫病毒(Foot-and-mouth disease virus, FMDV)引起的一种急性、烈性、高度接触传染性和可快速远距离传播的动物疾病。口蹄疫的暴发给当地带来严重的经济损失, 疫区乃至整个国家的畜产品出口受到封锁。这使得口蹄疫成为家畜疾病

中的头号“经济病”^[1]。FMDV 属于微 RNA 病毒科, 口疮病毒属, 其基因组为正链单股 RNA, 它既是转录中的 mRNA, 又是负链合成的模板, 长度约为 8 500 个核苷酸。此种病毒有 7 个血清型, 分别是 A, O, C, Asia1 和南非 1, 2, 3 型^[2]。FMDV 的蛋白衣壳由 60

收稿日期: 2007-06-03
基金项目: 国家重点基础研究发展计划国家“973”项目(2005CB523201)
作者简介: 周建华(1981-), 男, 内蒙古呼和浩特人, 硕士, 主要从事病毒基因工程研究
通讯作者: 常惠芸(1965-), 女, 河南许昌人, 博士, 研究员, 主要从事病毒基因工程的研究工作。

个亚单位构成,每个亚单位由 4 个结构蛋白组成。Eric 等^[3]指出 FMDV 蛋白衣壳表面由 VP1、VP2 和 VP3 构成,而 VP4 是隐藏在衣壳内部。与大多数病毒一样,FMDV 的吸附和侵入依赖于敏感细胞膜上的病毒特异性受体,而且由这些特异性受体决定了 FMDV 的细胞嗜性。人们发现 VP1 中有一柔性 loop 结构,被称为 G-H loop,它突出于 FMDV 粒子表面,是与特定细胞受体结合的主要配体,并且是机体抗击 FMDV 侵染的中和抗体作用位点。为了分析 FMDV OA/58VP1 蛋白结构和功能的关系,了解其 3D 结构和表面特性,此项研究在同源模建的基础上,联合运用多种预测 FMDV OA/58 VP1 蛋白抗原表位的算法。为研究和开发 VP1 基因工程疫苗提供线索。

1 材料和方法

1.1 材料

FMDV OA/58 株由国家口蹄疫参考实验室种毒保藏中心保存。主要试剂分别购自大连宝生物公司、博大泰克公司和 Promega 公司。上游引物和下游引物是参考其他 FMDV 毒株 VP1 基因两端保守区设计的。上游引物:5'-TAGTGC GGTAAAGCTTTG-3';下游引物:5'-GACATGTCCTCCTGCATCTG-3'。

1.2 目的基因扩增

病变组织经研磨后,按照提毒试剂盒说明书提取病毒总 RNA。参考《分子克隆》方法进行反转录和扩增。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳纯化和琼脂糖凝胶 DNA 提取试剂盒回收。

1.3 克隆与测序

按照 pGEM-T easy 载体试剂盒说明书进行 PCR 产物与载体的连接,并用 JM109 菌株进行连接产物的转化和克隆。然后提取质粒,进行凝胶电泳、PCR 和 *Eco*RI 酶切鉴定,样品送上海生工测序。

1.4 搜索 PDB 数据库及 OA/58 VP1 蛋白 3D 模型的模拟

用 NCBI 的 BLAST 程序分析 OA/58 VP1 蛋白在蛋白质数据库(PDB)中的同源蛋白,并以与 FMDV OA/58 VP1 蛋白氨基酸序列一致性最高的蛋白质为模板进行结构模拟。

1.5 OA/58 VP1 蛋白亲水性参数

利用 DNASTAR 软件提供的 protparam 模块分析,采用 Kyte-Poolittle 方案。

1.6 OA/58 VP1 蛋白可塑性分析

利用 DNASTAR 软件提供的 protparam 模块分析,采用 Karplus-Schultz 方案^[4]。

1.7 OA/58 VP1 蛋白抗原性指数分析

利用 DNASTAR 软件提供的 protparam 模块中的 Jameson-Wolf 算法^[5]分析 FMDV OA/58 VP1 蛋白抗原表位。

2 结果与分析

2.1 FMDV OA/58 VP1 基因 TR-PCR 和转化结果

凝胶电泳显示 PCR 扩增产物约 700 bp,这与预期的扩增长度一致(图 1)。从培养 JM109 转化菌的平皿中挑取单克隆扩增培养后提取质粒后经琼脂糖凝胶电泳、PCR 和 *Eco*RI 酶切鉴定,目的片段长约 700 bp,证明所克隆的 cDNA 为 VP1 基因。

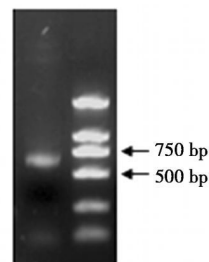


图 1 OA/58 VP1 基因 PCR 电泳图

Fig.1 The electrophoresis of VP1 gene from OA/58

2.2 FMDV OA/58 VP1 蛋白核苷酸序列和氨基酸推导序列

FMDV OA/58 VP1 核苷酸序列和推导氨基酸序列(图 2)。其全长为 639 个核苷酸,由 213 个氨基酸组成。

核苷酸序列(Nucleotide sequence):
ACCACCTCACCGGGTGAGTCAGCTGACCCCGTGACCGCTACCGTTGAAAACCTACGGTG
GCGAGACACAGGTCAGAGGCGCCACACACGACGCTCTCATACATTTTGGACAGATT
TGTGAAAGTGACACCAAAAGACCAAATTAATGTGTGGACCTGATGACAGATCCCTGCT
CACACTCTGGTGGGAGCGCTCCTTCGCACCGCTACTTACTACTCTGCTGATTAGAAGT
GGCAGTGAAACATAAAGGAAACCTCAATGGTCCCGAACGGGGCCCCGAGACAGC
ATTGGACAACACCAACCAATCCAACAGCTACCAAGGACCACTTACACGGCTTGCC
CTTCCTTACACGGCCCCACACCGCGTGTGGGCACTGTTTACAACGGGAATTGCAAGT
ATGGCGTTGGCCCGGTGACCAAGTAAGAGGTGACCTTCAAGTGTGGCTCAGAAGG
CGGCGGATCGCTGCCTACCTCCTTCAATTACGGTGCCATCAAAGCAACTGGGGTGAC
TGAACGTGCTTTACCGCATGAAAGGGGTGAACATACCTGCCCTGGCCTCTTTGGCCA
TCCACCGAGTGGCGCCAGACAAACAAAGATTGTGGCACTGGAAGAACGGCTTT
TG
氨基酸序列(Amino acid sequence):
TTPSGESADPVTATVENYGGETQVQRQHTDVSYLDRFVKVTPKQDINVLDLQIPAHTL
VGALLRTATYYFADLEVAVKHGKLNKWPVNGAPETALDNTNPTAYHKAPLTRLALPYTA
PHRVLTGVYNGNCKYGVGPVTKVRGDLQVLAQKAARSLPTSFNYGAIKATRVTELLYRM
KRAETCYCPRLAIHPHSAARHKQKIVAPGRLL

图 2 OA/58 VP1 核苷酸序列和推导的氨基酸序列

Fig.2 The nucleotide and amino acid sequence of VP1 from FMDV strain OA/58

2.3 OA/58 VP1 蛋白 3D 模型和蛋白表面

通过 NCBI 的 BLAST 查询结果显示 PDB 代号为 1FOD 的 FMDV 结构蛋白中的亚基氨基酸序列一致性为 83.3%,以 1FOD 作为同源模建的模板来构建 OA/58VP1 蛋白的 3D 结构。通过 Swiss-pdbViewer 蛋白质分析软件计算得到 OA/58 VP1 蛋白 3D 模型和表面模型(图 3, 4)。由图 3 可知,OA/58 VP1 蛋白的立体结构主要由β-折叠片、无规卷曲和 1 个由非极性氨基酸残基(LVGAIL)构成的疏水螺旋组成(图 3)。

其中,有6个反向 β -折叠片组成了一个类似于 β -折叠桶的结构(图3),并且 β -折叠桶内部聚集着大量的非极性氨基酸残基侧链而其外部分布着众多的亲水性侧链集团,它和疏水螺旋组成了一个封闭的疏水核心区域,有利于OA/58 VP1 蛋白高级结构的稳定。OA/58 VP1 蛋白中的无规卷曲和 β -转角组成的结构以松散的形式充分与周围的极性环境相接触,这使得它们成为抗原表位的几率大大增加。

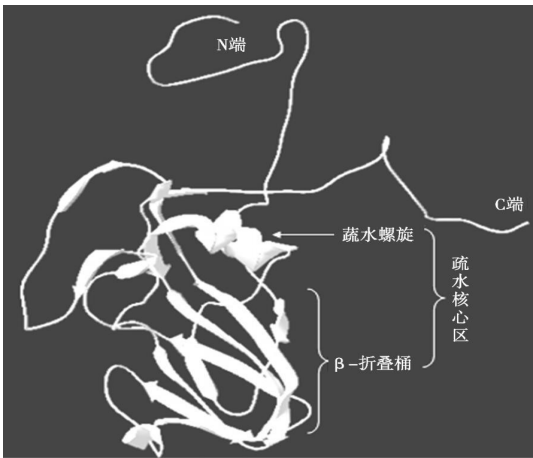


图3 OA/58 VP1 蛋白 3D 模型

Fig. 3 The 3D model of VP1 protein from FMDV strain OA/58

2.4 OA/58 VP1 蛋白亲水性

结果见图5,OA/58 VP1 蛋白亲水性区域的分

布较为分散,N 端和 C 端处亲水性氨基酸残基亲水性较强,分布较密集。亲水性较高区域:1~10,15~31,41~49,81~112,131~136,178~188,197~207。

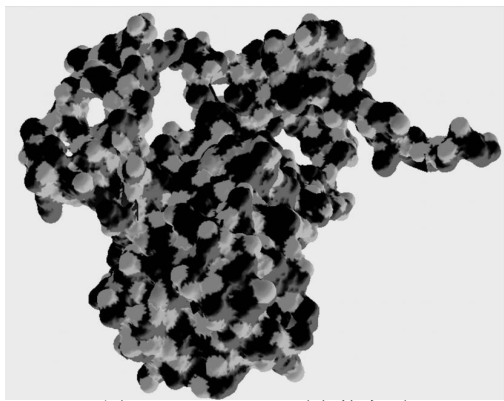


图4 OA/58 VP1 蛋白的表面

Fig. 4 The surface representation of VP1 protein from FMDV strain OA/58

2.5 OA/58 VP1 可塑性

OA/58 VP1 可塑性较高区域(图6):5~12,17~32,42~48,82~87,89~106,130~135,139~148,157~163,170~175,181~186,188~191,201~205,207~211,这些区域可能具有一定的柔韧性,其中一些区域(下划线标出)含有柔性氨基酸,即甘氨酸。这些区域形成B淋巴细胞抗原表位的可能性较大,容易与抗体进行嵌合。

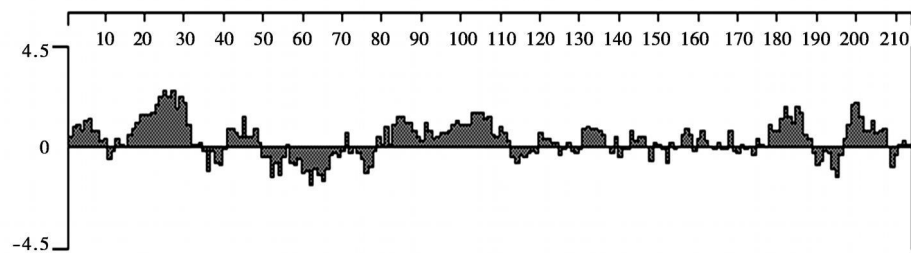


图5 OA/58 VP1 蛋白亲水性分析

Fig. 5 Analysis of hydrophilicity of OA/58 VP1

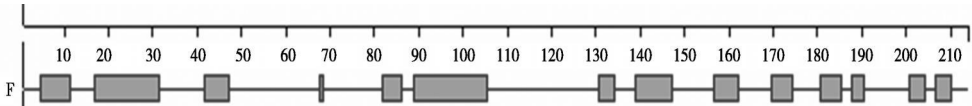


图6 OA/58 VP1 可塑性分析

Fig. 6 Analysis of flexible regions of OA/58 VP1

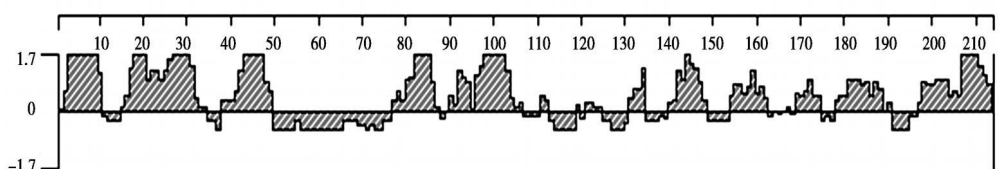


图7 OA/58 VP1 蛋白的抗原性指数分析

Fig. 7 Analysis of the antigenic index of OA/58 VP1

2.6 OA/58 VP1 蛋白抗原表位预测

应用 DNASTar 软件,采用 Jameson-Wolf 方案对 OA/58 VP1 的抗原表位进行预测(图7),可发现 OA/

58 VP1 存在多个潜在的抗原表位位点。OA/58 VP1 抗原表位可能位于 2~11,15~35,38~50,77~88,90~107,121~125,131~135,140~149,154~163,

169~175, 178~189, 197~213。根据抗原的加工和递呈机制,可知 MHC II 类分子的肽结合槽(peptide-binding cleft)约可容纳 15 个氨基酸残基的肽段,而抗原递呈细胞能将外源抗原处理为长度在 13~18 个氨基酸的肽段,而 OA/58 VP1 抗原表位区域中有两段,即,15~35, 90~107。通过结合图 3 可知,2~11, 15~35, 90~107, 154~163, 178~189, 197~213 位于 OA/58 VP1 的无规卷曲和 β -转角中,这都增加了这些区域成为抗原表位的几率。

3 讨论

在口蹄疫爆发期间,虽然用灭活苗免疫动物可有效防治口蹄疫,但这种疫苗在无口蹄疫国家不被准许生产,这主要是出于安全考虑,以免病毒从疫苗生产地散播或在化学灭活疫苗中残留活病毒,所以多年来人们致力于安全高效的口蹄疫基因工程疫苗的研究。目前大部分口蹄疫亚单位疫苗接种动物后均可在一定程度上抵抗 FMDV 的攻击,但免疫动物对 FMDV 的保护性并不成正比^[9],这种现象究竟是多肽或 VP1 无法刺激机体的免疫反应水平像全病毒所诱导的反应一样强,还是原核系统表达的 VP1 构象未达到天然状态,无法将一些敏感的抗原表位通过抗原递呈细胞加工成正确的肽段,使 B 淋巴细胞无法分泌有效的抗体来封闭 VP1 上的活性位点。

X 射线晶体学技术和多维核磁共振技术是当前人们认识蛋白高级结构的主要手段,但这两种技术并不能满足不断被发现的蛋白质结构和功能的鉴定。前者要求必需得到高标准的蛋白晶体,后者对分子量大于 3×10^4 Da 的大蛋白不能测定,因此理论模拟和结构预测显得十分重要。

随着生物信息学的发展,研究人员设计了许多分子生物学软件用于蛋白质的分析。B 细胞识别外源蛋白抗原时,是以前表面的抗原受体(BCR)与加工完毕的外源蛋白抗原表位结合。B 细胞蛋白抗原表位的预测自从 20 世纪 80 年代 Hopp 等提出亲水性参数对抗原表位预测的方法以来,已有许多参数和算法发表,对 B 细胞蛋白抗原表位研究具有指导性。现已被众多学者认可并具有较好预测效果的方法,主要有 5 种:(1)亲水性方案,Hopp 认为蛋白抗原各氨基酸残基可分为亲水残基和疏水残基两类。在机体内,疏水性残基一般埋在蛋白内部,而亲水性残基位于表面,因此蛋白的亲水部位与蛋白的抗原位点有密切的联系。典型的水溶性球蛋白的表面由亲水性残基组成,

蛋白质表位常处于表面电荷极性最大的区域。Hopp 亲水性方案以残基由有机相环境转移到水相环境的自由能为依据,计算各个氨基酸的亲水性,以预测蛋白质的表位。(2)可塑性方案,指蛋白抗原构象不是刚性不变的,其多肽骨架有一定程度的活动性。(3)抗原性方案,认为除亲水性氨基酸残基外,疏水性氨基酸残基也经常出现在表位中,各残基在蛋白抗原位点中的相对出现率对抗原表位的定位预测有一定意义。许多蛋白抗原表位研究已证实,疏水性氨基酸残基对表位形成亦有贡献。(4)可及性方案,指蛋白抗原中氨基酸残基被溶剂分子接触的可能性,它反映了蛋白抗原内、外各层各残基的分布组成。预测 B 细胞蛋白抗原表位一般以上述多种方案综合考虑。(5)二级结构分析法。蛋白质二级结构与蛋白质表位的分布关系密切, α -螺旋、 β -折叠片结构规则,形态固定,常处于蛋白质的内部或疏水区域,难以与抗体嵌合;而 β 转角和无规卷曲常处于蛋白质的表面,结构突出,亲水性强,有利于与抗体嵌合,成为抗原表位的可能性大^[7]。

总之,作为 B 细胞蛋白抗原表位首先应位于容易移动到蛋白抗原表面,有利于与 B 细胞抗原受体或抗体结合。此外,要有一定柔韧性,因为抗原与抗原受体或抗体结合有一个识别和结合的过程。VP1 抗原能引起免疫应答的抗原表位主要位于氮、碳端的结构松散区,疏水核心区域由于空间位阻,成为其抗原表位的几率较氮、碳端的小。本研究采用同源模建的方法来分析 OA/58 VP1 的高级结构,这为 OA/58 VP1 抗原表位的确定提供了直观的分子模型。这将增大 OA/58 VP1 抗原表位预测的可靠性。

参考文献:

- [1] Grubman M J, Baxt B. Foot and mouth disease [J]. Clin Microbiol Rev, 2004, 17: 465—493.
- [2] Knowles N J, Samuel P R. Molecular epidemiology of foot and mouth disease virus [J]. Virus 2003, 91: 65—80.
- [3] Eric B, Camen 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.
- [4] Karplus P A, Schultz G E. Prediction of chain flexibility in proteins [J]. Naturwissenschaften, 1985, 72: 212—213.
- [5] Jameson B A, Wolf H. The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants [J]. Comput Appl Biosci, 1988, 4(1): 181—186.
- [6] Petit M C, Benkirane N, Guichard G, *et al.* Solution structure of a retro-inverso peptide analogue mimicking the foot-and-mouth disease virus major antigen site structural basis for its antigenic cross-reactivity with the parent peptide [J]. J Biol Chem, 1999, 274: 3686—3692.
- [7] Apostolopoulos V, Yu M, Corper A L, *et al.* Crystal structure of a noncanonical low affinity peptide complexed with MHC class I: a new approach for vaccine design [J]. J Mol Biol 2002, 318 (5): 1293—1305.