

·基础与应用·

人偏肺病毒多表位抗原的构建与表达

李晓燕^{1,2}, 孔梅¹, 郭丽茹¹, 杨东靖¹, 苏旭¹, 刘英华¹, 邹明¹, 吕莉琨¹

1.天津市疾病预防控制中心病原生物检测所,天津 300011; 2.天津医科大学基础医学院

摘要:目的 构建含人偏肺病毒(hMPV) B细胞和 T细胞表位的多表位抗原,并在原核系统表达,评价其免疫原性和免疫反应性。方法 以人偏肺病毒 NL1/00 不同蛋白为模板,采用在线生物信息学软件 Bepipred、ABCpred、Bcepred、LEPS 及 LBTOPE 预测 B细胞表位,以 NetMHCpan 及 NetMHC 预测 CTL 细胞表位,以 NetMHC II 预测 Th 细胞表位。综合各软件预测结果,确定候选 B 细胞及 T 细胞表位,各表位间加入间隔序列“GPGPG”和“KK”,串联为多表位抗原基因 *mea*,与 pET32a(+) 连接后转化 *E.coli* BL21 (DE3) 宿主菌,经含氨苄的 LB 平板培养基筛选、鉴定获得重组 pET32a(+)-*mea*,经 IPTG 诱导表达获得多表位抗原(MEA),以镍层析柱纯化,以 Western blot 鉴定表达蛋白,以 MEA 免疫小鼠,以 ELISA 法检测产生抗体效价,以间接免疫荧光法(IFA)检测抗体特异性。结果 共预测筛选人偏肺病毒 B 细胞表位 6 个,CTL 表位 4 个,Th 细胞表位 2 个,串联为多表位抗原基因 *mea*,经与 pET32a(+) 重组后,转化 *E.coli* BL21 (DE3) 宿主菌,经 IPTG 30 °C 诱导 5 h,上清及沉淀均有目的蛋白表达。上清经镍层析柱纯化后获得重组多表位抗原 MEA,浓度为 1 mg/ml。Western blot 检测显示,表达的 MEA 可与抗 His 抗体结合。经 MEA 免疫的 BALB/c 小鼠的抗血清经 ELISA 检测,抗体效价达 10⁵ 以上;经间接免疫荧光检测,抗血清能与感染 vero-E6 细胞的 hMPV 结合。结论 成功构建了 hMPV 多表位抗原基因,并在原核系统成功表达,获得多表位抗原 MEA。该抗原具有很好的免疫原性和免疫反应性,并可与 hMPV 病毒发生结合,具有病毒特异性。

关键词:人偏肺病毒; B 细胞表位; T 细胞表位; 多表位抗原

中图分类号: R994.6 文献标志码: A 文章编号: 1001-5914(2015)11-0977-06

Construction and expression of multi-epitope antigen of human metapneumovirus

LI Xiao-yan*, KONG Mei, GUO Li-ru, YANG Dong-jing, SU Xu, LIU Ying-hua, ZOU Ming, LÜ Li-kun

*Institute of Pathogenic Organisms Inspecting, Tianjin Centers for Disease Control and Prevention, Tianjin 300011, China

Abstract: Objectives To construct multi-epitope antigen of human metapneumovirus (hMPV) including both B cell epitopes and T cell epitopes, and to analyze its immunogenicity and immunoreactivity. **Methods** Online software Bepipred, ABCpred, Bcepred, LEPS and LBTOPE were used to predict B cell epitopes, NetMHCpan and NetMHC were used to predict CTL epitopes, NetMHC II was used to predict Th cell epitopes. All these predicted epitopes were assembled in series as well as linker GPGPG and KK were added between different epitope to generate multi-epitope antigen gene (*mea*). Recombinant pET32a (+)-*mea* were constructed and transformed to *E.coli* BL21 (DE3). Multi-epitope antigen peptide (MEA) were inducible expressed by IPTG. MEA were purified by Ni-NTA agarose and identified by Western blot. Purified MEA was used to immune BALB/c mice, anti-MEA serum titre was tested by ELISA, indirect fluorescent assay (IFA) was used to evaluate antibody specificity. **Results** Six B cell epitopes, four CTL epitopes and two Th cell epitopes were selected to construct *mea*. Both supernatant and precipitate of host bacteria after inducing had anticipated protein MEA. After purification of supernatant, 1 mg/ml of MEA were obtained. MEA could react with anti-His antibody using Western blot analysis. BALB/c mice were immunized with MEA three times, above 10⁵ antibody titer were detected by ELISA. IFA showed that anti-MEA serum could react with hMPV which indicated the serum had hMPV-specificity. **Conclusion** hMPV *mea* are developed and expressed successfully. Obtained MEA shows good immunogenicity, immunoreactivity and good hMPV-specificity.

Key words: Human metapneumovirus; B cell epitope; T cell epitope; Multi-epitope antigen

急性呼吸道感染(acute respiratory tract infections, ARTIs)是人类发病和死亡的重要原因之一,也是引起世界范围内 5 岁以下儿童死亡的首要原因^[1]。人偏肺病毒(human metapneumovirus, hMPV)是荷兰学者于 2001 年从呼吸道感染的婴幼儿鼻咽吸物标本中分

离到的一种新病毒,属于副黏病毒科肺病毒亚科偏肺病毒属,其发现是对呼吸道感染病原谱的重要补充^[2]。目前研究证实,hMPV 是仅次于人呼吸道合胞病毒(hRSV)的引起儿童急性呼吸道感染的第 2 位病毒病原,也是老年人、免疫缺陷患者及有基础疾病人群急性呼吸道感染的重要病原体^[3-4]。以往研究显示,有 5%~15% 的急性呼吸道感染的住院儿童是由 hMPV 感染引起,在 2 岁以下婴幼儿中引起的感染最严重^[5-6]。hMPV 不能引起感染后免疫,可终身反复感染。目前尚缺乏

DOI:10.16241/j.cnki.1001-5914.2015.11.010

基金项目:中国博士后科学基金(2013M541186);天津市自然科学基金(15JCYBJC24700);天津市卫生计生委科技基金(2013KY20)

作者简介:李晓燕(1978-),女,副主任技师,博士,从事呼吸道病毒检测及致病性研究。

抗 hMPV 的有效药物, 故疫苗预防是控制疾病传播、减少损伤和影响的重要手段。近年来国内外对 hMPV 疫苗的研究逐渐兴起, 但尚无商品化 hMPV 疫苗问世。表位疫苗作为近年来新兴的一种疫苗研制技术, 逐渐受到关注。生物信息学技术的发展为多表位疫苗的快速发展奠定了基础, 同时许多免费的在线软件为研究者的设计提供了方便。笔者采用生物信息学软件预测 hMPV B 细胞、T 细胞表位, 将预测表位串联为多表位抗原, 在原核系统表达, 并利用免疫动物评价其免疫原性和免疫反应性, 以期为后期免疫应答评价、hMPV 表位疫苗研究提供基础。

1 材料与amp;方法

1.1 实验动物及毒株 SPF 级 4~6 周龄雌性 BALB/c 小鼠 12 只, 由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供, 许可证号: SCXK(军)-2012-0004。hMPV 毒株为本实验室分离、鉴定并测序分型保存。Vero-E6 细胞为本实验室保存。

1.2 主要材料及试剂 MEM 培养基、胎牛血清(GIBCO), L-谷氨酰胺(L-G)、青霉素、链霉素(美国 Sigma 公司), QIAquick PCR 产物回收试剂盒(德国 Qiagen 公司), pMD18-T 载体、Pyrobest DNA 聚合酶、Ex Taq 酶、T4 DNA ligase、DL2000 DNA Marker、蛋白分子量标准(低)、内切酶 TaKaRa(大连宝生物公司), DAB 染色试剂盒(北京天根公司), 无内毒素质粒大提试剂盒(德国 Qiagen 公司), Amp、IPTG(美国 Promega 公司), FITC 标记的羊抗鼠 IgG、辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗人 IgG、考马斯亮蓝 G-250、尿素、咪唑(北京鼎国生物工程公司), 其他化学试剂均为进口或国产分析纯。抗 hMPV 单克隆抗体 clone507(美国 Chemicon 公司), FITC-羊抗鼠 IgG(北京中杉金桥公司), HRP-羊抗鼠 IgG(美国 Santa 公司), TMB 显色液(美国 KPL 公司), Quick Antibody-mouse 5W(北京博奥龙公司)。

1.3 方法

1.3.1 B 细胞表位预测 以 NL/1/00 F 蛋白(539aa GenBank 登录号: AF371337)为模板, 采用 BepiPred^[7]、ABCpred^[8]、Bcepred^[9]、LEPS^[10]及 LBTOPE^[11]软件进行预测, 综合以上方法预测结果, 利用 blastp 分别对预测的每个 B 细胞表位肽进行氨基酸序列保守性分析, 选择 A、B 型间保守的表位, 确定 B 细胞候选表位。

1.3.2 T 细胞表位预测 分别以 hMPV A 型参考毒株 NL/1/00 的 N、M、F、G、SH、M2-1 和 M2-2 等 7 个蛋白的氨基酸序列(GenBank 登录号: AF371337)为模板, 联合 NetMHCpan 2.8 server^[12]及 NetMHC 3.4 server^[13], 预测针对小鼠 H-2d-限制性(MHC-I 限制性)的 CTL 表位; 采用 NetMHC II 2.2 server^[14-15]预测针对小鼠 H2-

IA(MHC-II)限制性 Th 表位。用 Clustal X 将筛选出的 CTL 和 Th 候选表位与 GenBank 上登录的不同型别 hMPV 进行氨基酸保守性比对, 选择 A、B 型间保守的表位, 作为 CTL 和 Th 候选表位。

1.3.3 多表位抗原构建 采用 DNASTar 软件包中的 EditSeq 软件, 将上述预测的表位串联, 同类型表位间以甘氨酸-脯氨酸-甘氨酸-脯氨酸-甘氨酸(GPGPG)作为间隔序列, 不同类型表位间用赖氨酸-赖氨酸(KK)作为间隔序列, 设计出多表位抗原(multi-epitope antigen, MEA), 氨基酸序列相对应的核苷酸序列即为多表位抗原基因 *mea*。其中 *mea* 核苷酸序列由德国 Life Technologies 公司按大肠杆菌偏爱密码子合成。

1.3.4 MEA 表达及纯化 限制性内切酶 BamH I、Hind III 双酶切人工合成的 *mea* 及 pET32a(+) 质粒, T4DNA 连接酶连接获得 pET32a-*mea* 表达重组质粒, 转化 *E.coli* BL21(DE3) 宿主菌, 经含 100 μg/ml Amp 的 LB 平板培养基筛选, 选取抗性菌落培养后, 提取重组质粒, 酶切、测序鉴定重组质粒。鉴定正确菌株用 1 mol/L IPTG 分别于 30 °C 和 37 °C 诱导表达外源蛋白, 于诱导后 2、3、4、5 h 取菌液进行 SDS-PAGE 电泳, 优化蛋白表达条件。优化表达后蛋白采用镍层析柱法进行纯化, pH 7.5、0.01 mol/L PBS 透析去除杂质, Bradford 法测定蛋白含量。用抗 His 抗体进行 Western blot 检测, 鉴定表达蛋白。

1.3.5 MEA 动物免疫 将 SPF 级 BALB/c 小鼠 6 只, 按 MEA 20 μg+Quickantibody5W 50 μl/只进行肌肉免疫, 另设 PBS 肌肉注射组(6 只小鼠)作为对照。于初次免疫后 3 周加强免疫 1 次, 末次免疫后 2 周采血进行蛋白抗体效价测定, 免疫荧光法进行特异性检测。

1.3.6 间接免疫荧光法(IFA)检测抗 MEA 血清 将本实验室分离保存的 hMPV 病毒株接种于 vero-E6 细胞, 细胞病变达+++~++++时收集细胞, 制备抗原片, 1:10 起倍比稀释小鼠抗 MEA 血清, 滴于抗原片上, 抗 hMPV 单克隆抗体作为阳性对照, 37 °C 孵育 1 h, 洗涤后滴加 1:100 稀释的 FITC-羊抗鼠 IgG 抗血清, 37 °C 0.5 h, 洗涤后封片, 镜检。以能观察到明显特异性荧光反应(>"+")最高血清稀释度的倒数作为荧光抗体效价。

1.3.7 ELISA 法检测小鼠抗 MEA 抗体 2 μg/ml 纯化 MEA 包被反应孔, 加入 10 倍系列稀释小鼠抗 MEA 血清, 100 μl/孔, 37 °C 孵育 1 h, 洗涤后加入 1:5 000 稀释的 HRP-羊抗鼠 IgG 抗体 100 μl/孔, 37 °C 1 h, 洗涤后加入 100 μl/孔 TMB 显色液, 37 °C 孵育 15 min, 加入 100 μl/孔终止液, 酶标仪读取 OD_{450 nm/630 nm}。OD 值大于未免疫小鼠血清(阴性对照组)OD 值的 2.1 倍, 即 P/N>2.1 判定为阳性, 出现阳性的最高稀释度的倒数为血清抗体效价。

2 结果

条肽段作为 B 细胞表位, 见表 1。

2.1 表位预测 综合 5 种软件预测结果, 选择以下 6

经预测及文献报道, 选择以下 4 条肽段作为 CTL 细胞表位, 见表 2。

表 1 HMPV F 蛋白 B 细胞表位预测结果

蛋白	序列	氨基酸位置	ABCpred 值 ^a	Bcepred 值 ^b	Bepired 值 ^c	LEPS ^d	LBTOPE ^e
F	PSCSGKKGNY	290~299	0.70	Y	0.604~1.412	0.403	60.25
F	QLAREEQIENPRQSR	88~102	0.88	Y	0.475~1.418	0.336	90.27
F	CQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHF	311~333		Y	0.410~1.161	0.326	63.24
F	CNINISTTNYPCKVSTGRHP	350~369	0.84	Y	0.503~0.749	0.218	60.16
F	SKVEGEQHVIVK	428~438	0.78	Y	0.283~0.593	0.241	51.16
F	YITNQDADTVTI	409~420	0.86	Y	0.440~1.168	0.283	50.66

注:^a 阈值 0.51;^b 阈值 2.38;^c 阈值 0.35;^d 高抗原性片段 Diff 值;^e 阈值>50%。Y 表示经 Bcepred 预测为 B 细胞表位。

表 2 HMPV 小鼠 H-2-Kd 限制性 CTL 细胞表位

蛋白	序列	氨基酸位置	NetMHC3.4 结合力值 ^b	NetMHCpan2.8 结合力值 ^b
N	SPKAGLLSL	307~315 ^a		
M2-2	CYLENIEIH	56~64 ^a		
M2-1	GYIDNQSI	81~89 ^a		
SH	NYIKVENNL	51~59	0.723 (SB)	0.563 (SB)

注:^a 文献报道^[6];^b 阈值 0.426。

经预测, 选择以下 2 条肽段作为 Th 细胞表位, 见表 3。

2.2 MEA 抗原构建 将综合性分析获得的 B、T 细胞

表位肽串联在一起, B 细胞表位和 T 细胞表位相互间用间隔序列 GPGPG 分开, B 细胞表位间及 T 细胞表位间用间隔序列 KK 分开, 保持各表位相对独立。整个多表位抗原全长 209 aa, 其相应的核苷酸序列全长 627 bp, 串联获得氨基酸序列, 按大肠杆菌偏爱密码子优化核苷酸序列, 见图 1。

表 3 HMPV 小鼠 H-2-Iab 限制性 Th 表位

蛋白	序列	氨基酸位置	NetMHCII.2 结合力值 ^a
F	ARAVSNMPTSAGQIK	228~242	0.653
M	FPLFQANTPPAVLLD	36~50	0.653

注:^a 阈值 0.426。

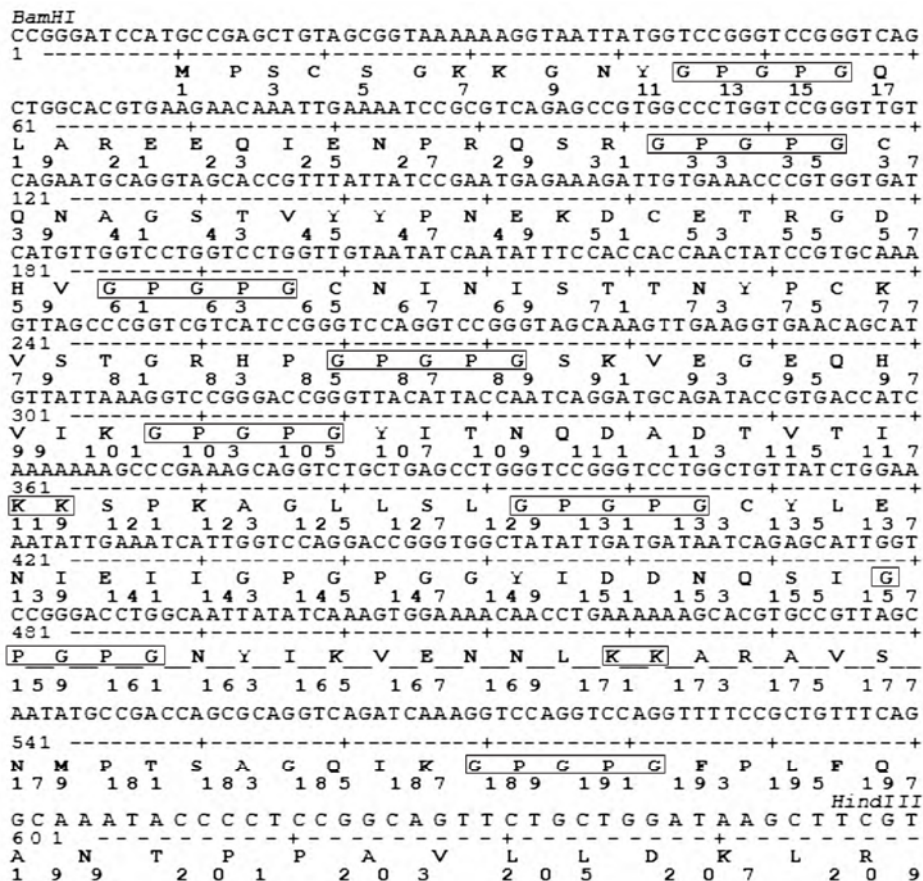
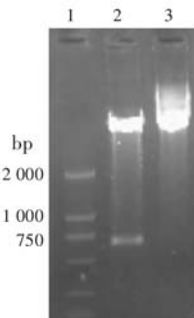


图 1 hMPV 多表位抗原氨基酸及核苷酸序列

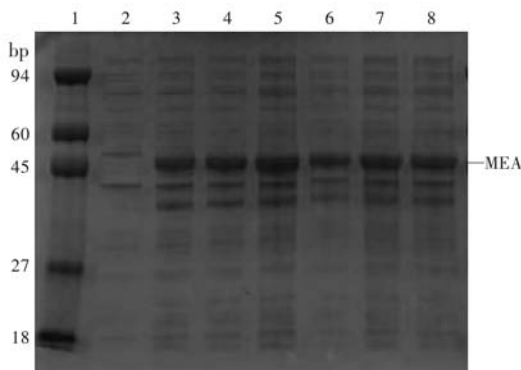
2.3 MEA 表达及纯化 构建的重组表达质粒 pET32a-mea 经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切获得载体片段约为 5 900 bp, 外源插入片段约为 627 bp。同时用 pET32a (+) 测序引物进行序列测定。酶切鉴定结果表明, *mea* 基因已正确插入 pET-32a(+) 载体中(图 2), 并已成功转入宿主菌株 *E.coli* BL21 (DE3) 中。重组表达质粒 pET32a-mea 测序结果表明, 插入基因 *mea* 的序列正确, 未改变读码框架, 无碱基和序列片段发生改变, 重组后 ORF 长度为 1 158 bp, 编码氨基酸长度为 385 aa, 预测分子量为 40.55 kD, pI 为 6.21。命名多表位抗原基因 *mea* 的表达菌株为 *E.coli* BL21/pET32a-mea。



注: 1: DL2000 Marker; 2: pET32a(+) -mea 双酶切后; 3: pET32a(+) -mea 未酶切。

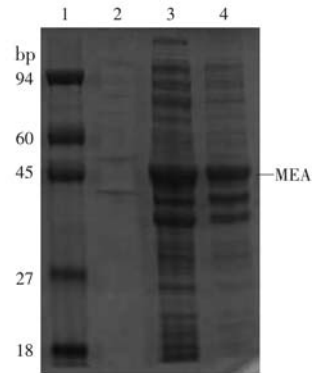
图 2 pET32a(+) -mea 酶切结果

将表达菌株 *E.coli* BL21/pET32a-mea 在 30℃ 和 37℃ 分别进行诱导表达, 于诱导后 3、4、5 h 分别收集菌体进行超声碎菌, 取上清和沉淀进行 SDS-PAGE, 结果见图 3。以空 pET32a 质粒转化的 *E.coli* BL21 (DE3) 未诱导产物为对照, 重组目的表达产物位于 45 kD 附近, 超声后上清及沉淀中均存在(图 4), 表明表达产物在细胞内既有可溶性表达, 也有包涵体形式表达。30℃ 表达量多于 37℃, 诱导后 5 h 表达量最多。上清经镍层析柱纯化, 测定蛋白浓度为 1.0 mg/ml。



注: 1: 蛋白分子量 Marker; 2: pET32a(+) 未诱导; 3~5: pET32a(+) -mea 30℃ 诱导 3、4、5 h; 6~8: pET32a(+) -mea 37℃ 诱导 3、4、5 h。

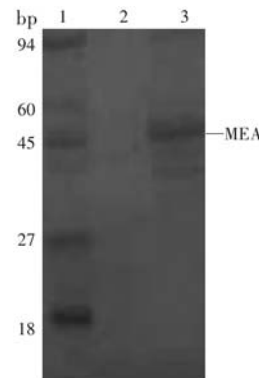
图 3 pET32a(+) -mea 在不同温度及时间诱导的表达产物 SDS-PAGE 分析



注: 1: 蛋白分子量 Marker; 2: pET32a(+) 未诱导; 3: pET32a(+) -mea 诱导后上清; 4: pET32a(+) -mea 诱导后沉淀。

图 4 pET32a(+) -mea 30℃ 诱导表达 5 h 后产物 SDS-PAGE 分析

2.4 Western blot 鉴定表达的 MEA 抗 His 单克隆抗体作为一抗, 与经 SDS-PAGE 转膜的 MEA 反应, HRP-羊抗鼠 IgG 为二抗进行 Western blot, 在 45 kD 附近见特异条带(图 5), 表明抗 His 抗体可与表达的 MEA 发生结合。



注: 1: 蛋白分子量 Marker; 2: pET32a(+) 未诱导; 3: pET32a(+) -mea 诱导后。

图 5 pET32a(+) -mea 诱导表达产物 Western blot 分析

2.5 MEA 抗体特异性检测 经 IFA 检测, MEA 免疫后血清与 hMPV 可发生特异性结合, 荧光抗体效价均为 160。见封三图 6。

2.6 MEA 免疫原性、免疫反应性分析 经 ELISA 检测, 6 只免疫小鼠抗 MEA 血清 IgG 抗体效价几何均数为 1.48×10^5 。

3 讨论

hMPV 为副黏病毒科肺病毒亚科偏肺病毒属病毒, 由于该病毒科病毒在免疫机制上的复杂性, 使得其疫苗的发展遇到很大困难。研究表明 hMPV 甲醛灭活疫苗免疫动物后能使再次感染时疾病加重^[7]。

表位疫苗具有安全、无毒、稳定、容易生产、可根据需要自由组合等优点, 是最具开发前景的新型疫苗

之一。表位包括 T 细胞表位和 B 细胞表位。目前关于 hMPV 表位的研究报道较少,多集中于细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)表位^[18-20]。尚有许多 hMPV 表位有待确定。

Herd 等^[18]用来源于 hMPV 的 N 和 SH 蛋白的表位制备了小鼠 MHC-I 限制性的 CTL 表位疫苗,证实该疫苗激发了 CTL 反应和 Th1 型细胞免疫反应,降低了 hMPV 感染小鼠肺内的病毒滴度和肺组织病理损伤程度。随后,该研究小组又对 hMPV 感染患者体内的 CTL 免疫反应进行评价,发现 hMPV 感染者体内 CTL 反应明显,并用生物信息学软件首次在 hMPV 的保守蛋白 M、F、M2-1 及 N 蛋白上预测并确定了 7 个人 CTL 表位,其中 5 个表位在 A、B 两型 hMPV 中保守^[19]。Rock 等^[20]将 4 种表位预测算法结合,对 hMPV T 细胞表位进行大范围预测,并通过验证实验对预测的表位进行了确认。

目前常用的表位筛选方法有化学或生物法、肽探针扫描技术、随机肽库技术及人工预测法等。前三者有操作繁琐、工作量大、耗时长、成本高、特异性抗体制备困难等缺点,使用受到一定限制。近年来,研究者开发了大量的算法和软件来预测 T 和 B 细胞表位,有效性及准确率等方面有了很大提高。每种软件的预测均有其局限性,将多种计算方法和软件综合运用,可使抗原表位预测的有效性和准确率大大提高。

T 细胞表位为取决于氨基酸一级结构的线性表位,必须经过抗原递呈细胞将其处理为短肽后才能发挥作用,故 T 细胞表位预测不用考虑构象问题。T 细胞表位预测方法包括直接预测和间接预测两种。直接预测法又包括结合基序法(binding motif)、矩阵法(matrix),矩阵法的预测精度明显高于结合基序法。基于矩阵法开发的软件有 SYFPEITHI、BIMAS。间接预测法是围绕矩阵(matrix)、人工神经网络(artificial neural network, ANN)和支持向量机(support vector machine, SVM)这 3 种基本算法进行的。NetMHCpan、NetMHC 和 NetCTL 是基于 ANN 和矩阵法开发的在线服务软件。经实验比较发现,NetMHCpan 在预测 CTL 表位、NetMHC II pan 及 NetMHC II 在预测 Th 表位准确率方面优于其他预测软件,并且可用于预测任何动物 MHC I、II 类分子结合的多肽表位^[21]。

因 hMPV 的 L 蛋白较大(约 2 000 aa),不适于表位预测,参照 hRSV 的研究,P 蛋白无 CTL 表位,故本研究选取 hMPV 的 N、M、F、M2-1、M2-2、SH 和 G 等 7 个蛋白进行 CTL 和 Th 表位预测。本研究采用 NetMHCpan 及 NetMHC 两种软件预测了 4 个小鼠 MHC-I 限制性的 CTL 细胞表位,采用 NetMHCII2.2 预测了 2 个小鼠 MHC-II 限制性的 Th 细胞表位。

B 细胞表位预测多是基于氨基酸的亲水性、可塑

性、表面可及性、抗原性指数、电荷分布及二级结构预测等参数^[22]。现已开发的在线服务工具或软件有:分析预测蛋白二级结构的 SOPMA Server,分析蛋白跨膜序列的 TMHMM Server 2.0,综合分析氨基酸亲水性、可塑性、表面可及性、抗原性指数、电荷分布等参数的软件 DNASTar、BcePred^[9]、BepiPred^[7]、ABCpred^[18]及 LEPS^[10]。已有诸多研究证实,副黏病毒科病毒的 F 蛋白是主要的保护性抗原,可刺激机体产生保护性中和抗体。对 hMPV 的 3 个表面糖蛋白 F、SH 和 G 蛋白的研究亦证实,F 蛋白是 hMPV 的主要保护性抗原^[23],且 hMPV F 蛋白相对保守(A、B 型间同源性约为 94%),可对所有型别 hMPV 有交叉免疫,故本研究选取 F 蛋白进行 B 细胞表位预测。本研究采用 6 种软件同时进行 B 细胞表位预测,综合考虑每种软件预测结果,预测得到了 6 个 B 细胞表位。

一个理想的病毒疫苗不仅要能激发体液免疫,产生特异性的中和抗体,还应该能激活 CTL 免疫来清除病毒^[24]。而辅助性 T 细胞(Th)既参与细胞免疫,也参与体液免疫。目前尚未见将 hMPV B 细胞表位和 CTL、Th 表位修饰串联构建为多表位抗原的报道。

表位直接串联是设计表位疫苗最简单的方法,但在 2 个表位连接处可能形成一个新的接合表位,从而掩盖对原有表位的免疫应答^[25]。因此,有学者主张在表位之间加入适当的间隔序列,以便各个表位独立发挥免疫效应,并避免产生新的表位。有学者在 T 细胞表位和 B 细胞表位间加入 2 个赖氨酸(KK)间隔序列,以增强表位的免疫原性^[26]。KK 是 MHC-II 抗原提呈的重要蛋白酶,各表位间通过 KK 连接有利于蛋白酶在各表位间进行适当切割,使各表位独立发挥效应,并避免在连接区产生新的表位。Livingston 等^[27]设计了通用的间隔序列(GPGPG),用此间隔序列连接几个表位,可以避免新的接合表位产生。

本研究预测得到 6 个 B 细胞表位、4 个 CTL 细胞表位和 2 个 Th 细胞表位,并加入间隔序列“GPGPG”和“KK”将上述预测表位串联设计为多表位抗原,经密码子优化后在原核细胞表达,表达产物免疫动物后获得高滴度特异性抗体(抗体效价达 10^5 以上),并能与 hMPV 特异性结合(间接免疫荧光结果),表明构建的 MEA 表达正确,能够刺激机体产生特异性的体液免疫,也能与病毒特异性结合。

综上所述,本研究构建了既含 B 细胞表位也包含 CTL 细胞表位和 Th 细胞表位的人偏肺病毒多表位抗原,免疫动物产生了特异性抗体,产生的抗体能与 hMPV 特异性结合。该多表位抗原可为今后进一步开展其抗血清中和作用、动物攻毒保护实验及人偏肺病毒表位疫苗研究提供基础。

参考文献

- [1] Alonso WJ, Laranjeira BJ, Pereira SA, et al. Comparative dynamics, morbidity and mortality burden of pediatric viral respiratory infections in an equatorial city [J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2012, 31:9–14.
- [2] Hoogen BG, Jong JC, Groen J, et al. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease [J]. *Nat Med*, 2001, 7:719–724.
- [3] Defrasnes C, Hamelin M, Boivin G, et al. Human metapneumovirus [J]. *Semin Respir Crit Care Med*, 2007, 28:213–221.
- [4] Feuillet F, Lina B, Rosa–Calatrava M, et al. Ten years of human metapneumovirus research [J]. *J Clin Virol*, 2012, 53:97–105.
- [5] Li XY, Chen JY, Kong M, et al. Prevalence of human metapneumovirus in hospitalized children with respiratory tract infections in Tianjin, China [J]. *Arch Virol*, 2009, 154:1831–1836.
- [6] 李晓燕, 谢彤, 陈锦英, 等. 人偏肺病毒感染住院儿童的临床特征及病毒基因特性分析 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2010, 30(4): 318–323.
- [7] Larsen JE, Lund O, Nielsen M. Improved method for predicting linear B–cell epitopes [J]. *Immunome Res*, 2006, 2:2.
- [8] Saha S, Raghava GP. Prediction of continuous B–cell epitopes in an antigen using recurrent neural network [J]. *Proteins*, 2006, 65:40–48.
- [9] Saha S, Raghava GP. BcePred: prediction of continuous B–cell epitopes in antigenic sequences using physico–chemical properties [J]. *Lecture Notes Computer Sci*, 2004, 3239: 197–204.
- [10] Wang HW, Lin YC, Pai TW, et al. Prediction of B–cell linear epitopes with a combination of support vector machine classification and amino acid propensity identification [J]. *J Biomed Biotechnol*, 2011, 432:830.
- [11] Singh H, Ansari HR, Raghava GP. Improved method for linear B–cell epitope prediction using antigen’s primary sequence [J]. *PLoS One*, 2013, 8:62216.
- [12] Hoof I, Peters B, Sidney J, et al. NetMHCpan, a method for MHC class I binding prediction beyond humans [J]. *Immunogenetics*, 2009, 61:1–13.
- [13] Lundegaard C, Lamberth K, Harndahl M, et al. NetMHC–3.0: accurate web accessible predictions of human, mouse and monkey MHC class I affinities for peptides of length 8–11 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36:509–512.
- [14] Nielsen M, Lund O. An artificial neural network–based alignment algorithm for MHC class II peptide binding prediction [J]. *BMC Bioinformatics*, 2009, 10:296.
- [15] Nielsen M, Lundegaard C, Lund O. Prediction of MHC class II binding affinity using SMM–align, a novel stabilization matrix alignment method [J]. *BMC Bioinformatics*, 2007, 8:238.
- [16] Melendi GA, Zavala F, Buchholz UJ, et al. Mapping and characterization of the primary and anamnestic H–2 (d)–restricted cytotoxic T–lymphocyte response in mice against human metapneumovirus [J]. *J Virol*, 2007, 81:11461–11467.
- [17] Feuillet F, Lina B, Rosa–Calatrava M, et al. Ten years of human metapneumovirus research [J]. *J Clin Virol*, 2012, 53:97–105.
- [18] Herd KA, Mahalingam S, Mackay IM, et al. Cytotoxic T–lymphocyte epitope vaccination protects against human metapneumovirus infection and disease in mice [J]. *J Virol*, 2006, 80:2034–2044.
- [19] Herd KA, Nissen MD, Hopkins PM, et al. Major histocompatibility complex class I cytotoxic T lymphocyte immunity to human metapneumovirus (hMPV) in individuals with previous hMPV infection and respiratory disease [J]. *J Infect Dis*, 2008, 197:584–592.
- [20] Rock MT, McKinney BA, Yoder SM, et al. Identification of potential human respiratory syncytial virus and metapneumovirus T cell epitopes using computational prediction and MHC binding assays [J]. *J Immunol Methods*, 2011, 374:13–17.
- [21] Karosiene E, Lundegaard C, Lund O, et al. NetMHCcons: a consensus method for the major histocompatibility complex class I predictions [J]. *Immunogenetics*, 2012, 64:177–186.
- [22] 杨东靖, 陈锦英, 苏旭, 等. 汉坦病毒 G2 糖蛋白多表位抗原基因的设计与构建 [J]. *环境与健康杂志*, 2010, 27(1): 38–40.
- [23] Skiadopoulos MH, Biacchesi S, Buchholz UJ, et al. Individual contributions of the human metapneumovirus F, G, and SH surface glycoproteins to the induction of neutralizing antibodies and protective immunity [J]. *Virology*, 2006, 345:492–501.
- [24] Li S, Peng L, Zhao W, et al. Synthetic peptides containing B– and T–cell epitope of dengue virus–2 E domain III provoked B– and T–cell responses [J]. *Vaccine*, 2011, 29: 3695–3702.
- [25] 董林, 王艳萍, 苗立中, 等. 表位疫苗设计、优化策略及在动物疫苗研究中的应用 [J]. *畜牧与兽医*, 2011, 43(6): 95–98.
- [26] Yano A, Onozuka A, Asahi–Ozaki Y, et al. An ingenious design for peptide vaccines [J]. *Vaccine*, 2005, 23:2322–2326.
- [27] Livingston B, Crimi C, Newman M, et al. A rational strategy to design multi-epitope immunogens based on multiple Th lymphocyte epitopes [J]. *J Immunol*, 2002, 168:5499–5506.

收稿日期: 2015–09–06 责任编辑: 黄丽媛

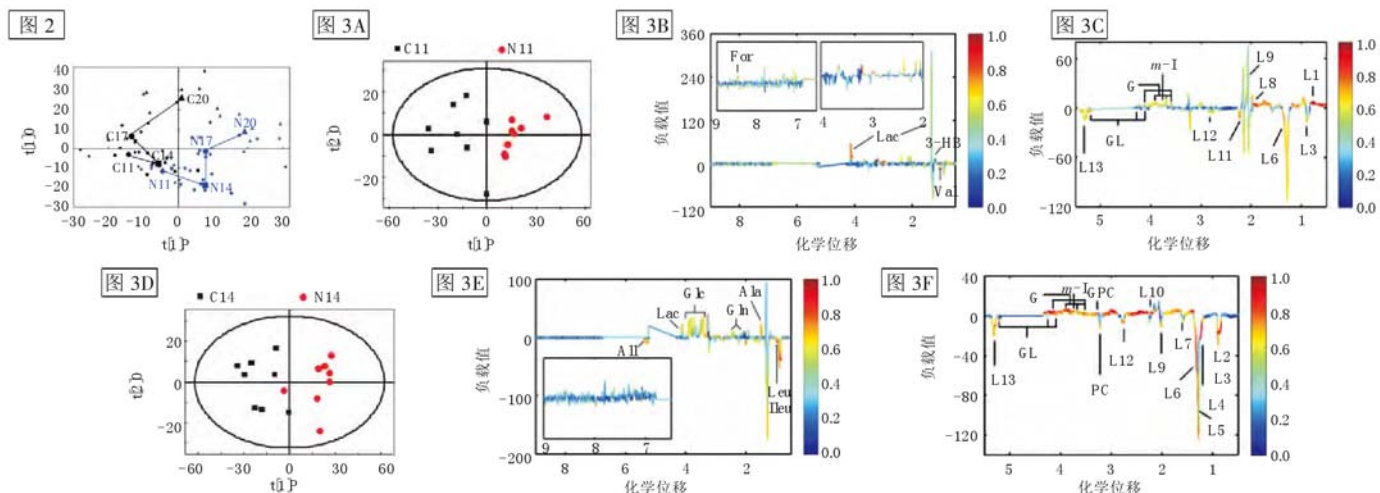


图 2 为不同时间点孕鼠血浆代谢物的 OPLS-DA 得分图;其中, $t[1]P$ 为第一主成分, $t[1]O$ 为第一正交成分, $R^2X=76.8\%$, $Q^2=0.331$; C11 (◆孕 11 d)、C14 (■孕 14 d)、C17 (●孕 17 d) 和 C20 (▲孕 20 d) 分别为对照组孕期不同时间点; N11 (◆孕 11 d)、N14 (■孕 14 d)、N17 (●孕 17 d) 和 N20 (▲孕 20 d) 分别为尼古丁组孕期不同时间点。图 3 为尼古丁处理后不同时间点孕鼠血浆代谢物 OPLS-DA 得分图及相关系数图;其中,图 3A 为孕 11 d 的 OPLS-DA 得分图, $R^2X=53.8\%$, $Q^2=0.217$;图 3B 为孕 11 d 的 CPMG 谱相关系数图;图 3C 为孕 11 d 的 LED 谱相关系数图;图 3D 为孕 14 d 的 OPLS-DA 得分图, $R^2X=60.0\%$, $Q^2=0.146$;图 3E 为孕 14 d 的 CPMG 谱相关系数图;图 3F 为孕 14 d 的 LED 谱相关系数图;图 3A 和图 3D 中 $t[1]P$ 为第一主成分, $t[1]O$ 为第一正交成分, ■为对照组, ●为尼古丁组;图 3B、3C、3E、3F 为各代谢物质变化,正向峰表示尼古丁组含量升高的代谢物,负向峰表示尼古丁组含量降低的代谢物;颜色越红表示对组间区分贡献越大,颜色越蓝表示对组间区分贡献越小;图中标注的代谢物见正文表 1 和表 2

张露露,等. 亚砷酸钠致大鼠肝纤维化的实验观察

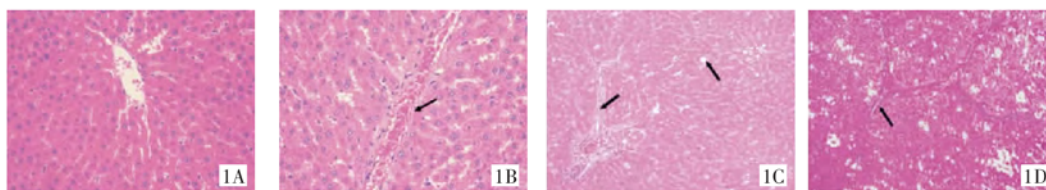


图 1A[对照组(去离子水), $\times 200$]、B(0.68 mg/kg 组, $\times 200$)、C(1.36 mg/kg 组, $\times 200$)、D(2.73 mg/kg 组, $\times 100$) 分别为不同剂量亚砷酸钠染毒大鼠肝脏病理损伤情况(HE)

汤艳,等. 十溴联苯醚亚慢性染毒对成年大鼠海马胆碱能系统和 γ -氨基丁酸的影响

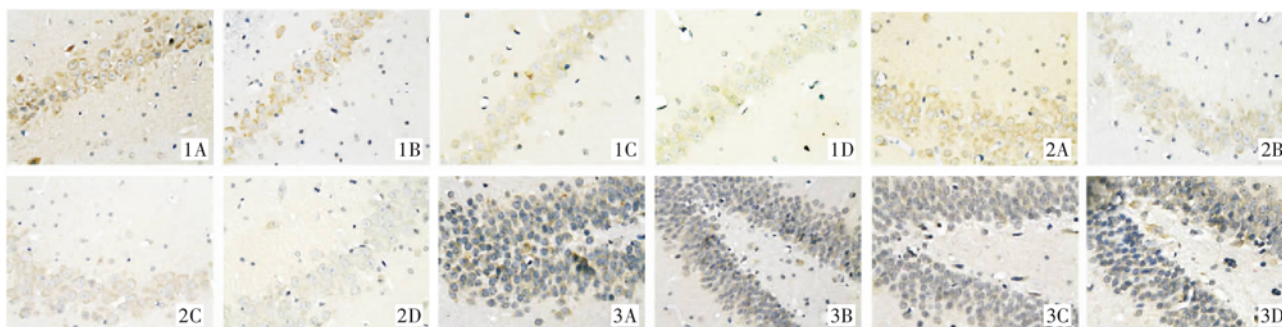


图 1A(溶剂对照)、B(250 mg/kg)、C(500 mg/kg)、D(1 000 mg/kg) 分别为 BDE-209 染毒大鼠海马组织 CA1 区内 GABA 的表达(免疫组化 $\times 400$);图 2、3(字母序号与剂量对应同图 D)分别为 CA3、DG 区内 GABA 的表达(免疫组化 $\times 400$)

李晓燕,等. 人偏肺病毒多表位抗原的构建与表达

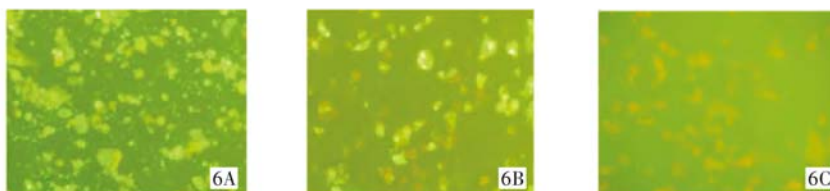


图 6A(MEA 免疫组)、B(阳性对照组)、C(阴性对照组) 分别为 MEA 抗血清 IFA 检测结果