·实验室研究·

主要黄病毒E蛋白抗原表位分析与初步鉴定

徐晓立 杨建军 任瑞文 刘建伟 马四辈 白志军 方美玉

【摘要】 **目的** 对主要黄病毒结构蛋白的抗原表位情况进行系统分析，鉴别共同及特异性抗原表位并对可能的特异性抗原表位进行原核表达。**方法** 分别利用DNAStar及ANTHEPROT软件对登革病毒1～4型、流行性乙型脑炎（乙脑）病毒及黄热病毒E蛋白的亲水性、抗原性、可塑性、表面可及性和Garnier-Robson的二级结构进行分析，预测可能的抗原表位。在此基础上，根据表位位置和氨基酸序列的相似性，分析6种病毒的共有及特异性抗原表位，并参考GenBank中的序列信息，对预测的抗原表位进行比对，进一步分析抗原表位在不同病毒株中的保守性。然后利用pET32及pMAL-c2x系统对可能的特异性抗原表位进行高效原核表达、Western blot验证其抗原性。**结果** 经系统的生物信息学分析，共预测获得登革病毒1～4型、乙脑病毒及黄热病毒共有抗原表位15个，病毒特异性抗原表位47个。利用pET32及pMAL-c2x系统对6种病毒部分可能的特异性抗原表位进行了高效表达。Western blot结果显示登革病毒1型及2型表达抗原片段表现良好的抗原反应原性，并与试验中所用其他黄病毒及甲病毒多克隆抗体无明显的交叉反应。而所表达的登革病毒3型和4型、乙脑病毒及黄热病毒片段无抗原反应原性。**结论** 6条原核表达抗原片段经Western blot验证，获得登革病毒1型和2型特异性抗原片段。

【关键词】 黄病毒；抗原表位；原核表达

Study on E protein epitopes and primary identification of main yellow virus

XU Xiao-li, YANG Jian-jun, REN Rui-wen, LIU Jian-wei, MA Si-bei, BAI Zhi-jun, FANG Mei-yu. *Instrumental Analysis & Research Center of South China Agricultural University, Guangzhou* 510642, China

Corresponding author: REN Rui-wen, Email: renruiwen@hotmail.com

【**Abstract**】 **Objective** To analysis the E protein epitopes of dengue virus type 1–4, Japanese encephalitis virus and yellow fever virus and to distinguish the shared or specific epitopes among them. **Methods** Bioinformatic software DNAStar was used to analyze the hydrophilicity, flexibility, surface probability and antigenicity of dengue virus type 1–4, Japanese encephalitis virus and yellow fever virus E prtein amino acid sequences. The influence of secondary structure was also considered. Based on the bio-informatic analysis of E protein epitopes, 6 specific epitopes were amplified and inserted into prokaryotic expression vector pMAL-c2x. The vectors was then transferred into *E.coli* BL21 (DE3) and Rosetta (DE3). Isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG) was used to induce the expression of gene segments and SDS-PAGE were used identify the expression proteins. The antigenicity was tested, using Western blot. **Results** 15 shared epitopes and 47 specific epitopes were forecasted by bioinformatic analysis, and 6 specific epitopes from dengue virus type 1–4, Japanese encephalitis virus and yellow fever virus E protein were expressed in *E.coli* successfully. Two specific antigenic determinant from dengue virus type 1 and dengue virus type 2 were confirmed using Western blot, while the others epitopes shown no antigenic reaction property. **Conclusion** Two specific antigenic determinant were confirmed, under Western blot.

【**Key words**】 Flavivirus; Protein epitopes; Prokaryotic expression

有研究显示，在登革病毒（DV）感染过程中，病毒E蛋白中的黄病毒共有抗原表位起感染增强作用，而DV型特异性抗原表位则起中和作用[1]。因此，鉴别DV共有抗原表位和特异性表位，对于DV致病机制及诊断试剂的研制有着重要意义。本研究使用生物信息学的方法，对DV 1～4型、黄热病毒和流行性乙型脑炎（乙脑）病毒（JEV）的E蛋白抗原表位进行了分析，并对预测获得的部分抗原表位进行初步原核表达及Westen blot验证，为进一步探讨DV的致病机制及诊断试剂的研制提供依据。

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2009.05.019

基金项目：广东省科技计划（20006B36008005）；全军医药卫生科研基金（06MA129）

作者单位：510642 广州，华南农业大学测试中心（徐晓立、马四辈）；塔里木大学动物科学学院（杨建军）；广州军区疾病预防控制中心（任瑞文、刘建伟、白志军、方美玉）

通信作者：任瑞文，Email：renruiwen@hotmail.com

材料与方法

1. 材料：实验中所用病毒：DV 1型（Hawaii株）、DV 2型（NGC株）、DV 3型（H87株）、DV 4型（H241株）、乙脑病毒（中山株）、黄热病毒（17D株），均为广州军区疾病预防控制中心疾病控制科传代保存。抗原位点保守性分析所用其他株系E蛋白序列来自GenBank。内切酶、连接酶、T载体购自大连TaKaRa生物公司。凝胶纯化回收及质粒快速提取试剂盒购自OMEGA公司。Trizol及反转录试剂购自Invitrogen公司。pET32表达载体购自Novagen公司，pMAL-c2x表达载体购自New England Biolabs公司，表达宿主菌DE3、Rosetta（DE3）由本实验室传代保存。

2. 抗原性分析：利用DNAStar protean及ANTHEPROT软件，分析以下参数：Hopp-Woods及Kyte-Doolittle的亲水性参数[2]；Jameson-Wolf的抗原性参数[3]；Karplus-Schulz的可塑性参数[4]；Emini的表面可及性参数[5]；Garnier-Robson的二级结构参数。综合分析以上各种参数，选择以上4个参数预测中有较一致性的片段，同时考虑这一区域是否含有易形成抗原表位的β转角和无规则卷曲结构。综合分析DV 1～4型、黄病毒和乙脑病毒E蛋白抗原表位，根据表位位置和氨基酸序列的相似性，鉴定以上6种病毒的共有及特异性抗原表位。

3. 抗原位点保守性分析：利用GenBank的BLAST工具，检索GenBank中所有相关代表性病毒，对预测的抗原表位进行比对，分析抗原表位区域氨基酸序列在其他株系中的保守性，比较分析，初步筛选可能的抗原性片段。

4. RNA提取及目的片段的克隆：6种病毒的抗原表位中，各选择抗原性预测得分值最高的一个病毒特异性抗原表位片段（包含DV 1型E135-141表位的区域，约120 bp）设计引物，按照Invitrogen的Trizol操作说明提取病毒RNA，采用常规方法进行RT-PCR反应，PCR反应条件：取cDNA 2 μl，10×PCR缓冲液5 μl，正向引物、反向引物各2 μl、dNTP 8 μl、LA Taq 2 U，补水至总体积50 μl进行PCR扩增。反应参数：95℃ 5 min，然后94℃ 30 s、55℃ 40 s、72℃ 90 s，共32次循环；最后72℃延伸7 min。扩增片段纯化、回收后，克隆入pMD19 T载体，由博亚生物公司测序。

5. 表达载体构建：PCR扩增片段，经酶切、纯化、回收后，DV 1型抗原表位克隆入pET32a载体，其余表位片段均克隆入pMAL-c2x载体：取载体2 μl（约200 ng），酶切目的片段2 μl（约200 ng），45℃加热5 min，立即冰浴10 s，加入T_4 DNA连接酶0.5 U，连接酶Buffer 1 μl，用灭菌四馏水补至10 μl，16℃连接8 h，取重组质粒5 μl转化感受态菌DH5α，加入无抗生素的LB液体培养基300 μl，37℃复苏45 min后，取100 μl涂抗生素平皿，37℃培养12 h。

6. 多克隆抗体制备：黄病毒属乙脑病毒、黄热病毒、DV 1～4型及甲病毒属基孔肯雅、辛德毕斯、西门利克、马雅罗、罗斯河、鹭山和盖塔病毒10^{-2}倍稀释后，按200 μl/只分别接种3日龄乳鼠，待发病后解剖取乳鼠脑磨碎、离心，取上清10倍稀释并加入等量佐剂乳化后，分别多点注射免疫6～8周龄昆明鼠（300 μl/只），4次免疫后腹腔注射S180细胞，3～5 d后收集腹水即为13种病毒的多克隆抗体。

7. 诱导表达及Western blot：克隆菌株经PCR鉴定为阳性后，送博亚公司测序，确定读码框架准确无误后，转化BL21（DE3）表达宿主菌，IPTG诱导表达，SDS-PAGE电泳检测，分别用上述多克隆抗体Western blot分析所表达片段抗原性。

结　果

1. 抗原性分析：通过对6种病毒的疏水性、抗原性、可及性及可塑性分析，并参考GenBank中的序列信息，4种参数预测结果较为一致的抗原表位为：DV 1型病毒15个、DV 2型病毒17个、DV 3型病毒17个、DV 4型病毒16个、乙脑病毒11个、黄热病毒17个。根据表位位置和氨基酸序列的相似性及保守性分析，鉴定了6种病毒共有表位15个，病毒特异性抗原表位47个（表1）。

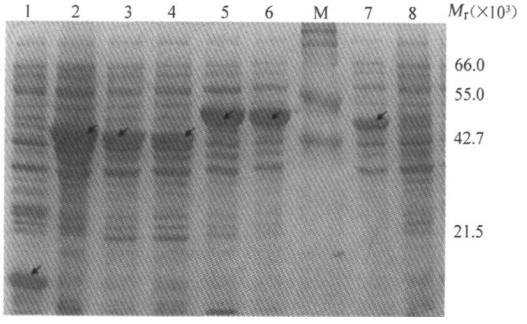
2. 表达载体构建：6种病毒的抗原表位中，各选择抗原性预测得分值最高的一个病毒特异性抗原表位片段（约120 bp），经PCR扩增、酶切，利用不同的载体，共构建了6个表达载体（其中DV 1型抗原表位克隆入pET32a载体，其余抗原表位片段均克隆入pMAL-c2x载体），经测序证实读码框架准确无误。

3. 诱导表达及Western blot结果：诱导表达结果显示，与阴性对照菌比较于相对分子质量（M_r）40×10^3左右出现一特异性带，表达量在40%以上，与预期结果相符（图1）。Western blot结果显示，DV 1型及2型表达抗原片段表现良好的抗原反应原性（图2），并与试验中所用黄病毒及甲病毒多克隆抗体无明显的交叉反应。DV 3型、DV 4型、乙脑病毒及黄热病毒原核表达片段则无抗原反应原性。

表1 主要黄病毒E蛋白抗原表位

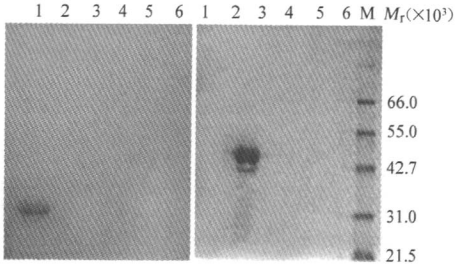
抗原表位在E蛋白中位置	具该表位的病毒	氨基酸序列
共有抗原表位		
E36-44	DV1~4,JEV	MAKDKPTLD
E46-54	DV1~4	ELLKTEVTN
E46-54	DV1~4	ELLKTEVTN
E69-81	DV1,DV2	TTTDSRCPTQGE
E86-91	DV1~3,YF	EEQDTN
E147-151	DV1,DV3,DV4	TGDQHQ
E203-208	DV1,DV2,DV4	MKKKSW
E153-161	DV1,DV2	VGETTEHG
E245-251	DV1~4	AHAKKQE
E308-319	DV1,DV3,DV4	FKLEKEVAETQH
E327-334	DV1,DV3	KYEGTDAP
E361-367	DV1~3	TDKEKPV
E470-476	DV1~4,YF	LNSRSTS
E309-316[a]	YF,JEV	NPTDTGHG
E393-398[b]	DV4,YF	RKGSSI
特异性抗原表位		
E135-141,E227-235,E340-349	DV1	-
E123-128,E131-135,E143-149,E340-347,E223-229,E286-294,E383-387,E391-398	DV2	-
E184-190,E269-274,E222-231,E336-346,E357-364,E366-375,E389-396	DV3	-
E165-171,E233-238,E270-275,E223-229,E340-347,E74-88,E357-364	DV4	-
E25-30,E35-41,E52-57,E70-79,E93-101,E128-134,E198-202,E206-211,E264-273,E294-297,E147-155,E357-362,E397-385	YF	-
E81-88,E94-102,E129-137,E233-238,E328-334,E386-392,E475-481,E285-299,E146-154	JEV	-

注:[a]在黄病毒E蛋白中的位置;[b]在DV 4型E蛋白中的位置;其余共有抗原表位为在DV 1型E蛋白中的位置;病毒特异性抗原表位为在各自E蛋白中的位置



注:M:分子质量标准;1:DV 1型;2:DV 2型[因pMAL-c2x双酶切后切掉了约8×10³(M_r)的载体蛋白,而本研究中插入的外源蛋白仅40 Aa,约4×10³(M_r)左右,所以表达后重组蛋白反而比空载体表达蛋白分子质量小];3、4:分别为DV 3型、DV 4型;5:乙脑病毒;6:黄热病毒;7:pMAL-c2x空载体对照;8:未诱导对照

图1 主要黄病毒特异性抗原片段的原核表达



注:1~4:DV 1、2、3、4型;5:乙脑病毒;6:黄热病毒;M:分子质量标准;左图为DV 1型多克隆抗体杂交结果;右图为DV 2型多克隆抗体杂交结果

图2 Western blot结果

讨 论

对病毒结构蛋白进行系统的生物信息学分析,可以大致确定可能的抗原区域,从而大大减少实验筛选工作。目前,关于抗原表位预测一般可参考6个参数:亲水性、可及性、抗原性、可塑性、二级结构预测和电荷分布。在这些参数中,亲水性和可及性是形成抗原表位的首要条件,但抗原性的有无还与序列中特定氨基酸的出现、片段的活动性及二级结构的构象有关,单独应用各种方案预测的准确率均不高,但是将上述各参数综合考虑,预测成功率则很高,已经在HIV、人DAO氨基酸序列、恶性疟原虫裂殖子表面蛋白MSP-2的抗原表位分析、新城疫La Sota株和V4株F蛋白、黑色素瘤特异性蛋白抗原等的研究中取得成功。并在癌症、自身免疫病中已得

到初步应用[6,7]。在本研究中，预测结果表明，DV 1型E蛋白有15个抗原表位，与即往研究的DV E蛋白上约有16个抗原表位的预测结果基本相符[8]。Wu等[9]发现DV 2型E蛋白有中和抗原表位E380-389，这也与本研究预测的抗原表位E383-387相符，位置的差异可能是菌株不同所造成。国内有研究用噬菌体展示肽库筛选DV 2型E蛋白的抗原表位，初步确定E蛋白的抗原表位E390-398(WFKKGSSIGQ)[10]，与本研究预测抗原表位E391-398(WFKKGSSSI)相符；Thaweesak等[11]利用合成多肽及单克隆抗体证明E386-397为E蛋白的线性中和抗原表位，也与预测的抗原表位相符。说明采用生物信息学预测的方法，基本可以覆盖绝大部分抗原表位，在此基础上进一步用实验方法对预测抗原表位进行验证，可以提高抗原表位筛选的效率。

DV隶属黄病毒科，包括1～4个血清型。登革热是仅次于疟疾的重要热带病，成为流行区国家重要的公共卫生问题并造成沉重的疾病负担[12]。其防制的关键在于敏感、特异、适合临床应用的诊断手段和高保护力疫苗的研制，目前这两方面的研究进展不大。疫苗的研制主要困难在于其复杂的免疫机制，一般认为，DV表面存在群特异性和型特异性抗原表位，群特异性抗原表位为黄病毒所共有，其产生的抗体对DV感染有较强的增强作用，称为增强性抗体；型特异性抗原表位产生的抗体具有较强的中和作用，称为中和抗体，能中和同一型DV的再感染，对异型病毒也有一定中和能力。二次感染时，如血清中增强性抗体活性弱，而中和抗体活性强，则病毒血症迅速被消除；反之，则形成病毒抗体复合物，并结合到单核细胞系表面，随着吞噬作用进入细胞内繁殖，进而导致弥漫性出血、休克等一系列病理过程，即所谓的抗体依赖性感染增强现象[13]。因此，任何安全、有效的DV疫苗都必须是四价的，并要剔除增强性抗原表位。在DV的血清学诊断方面，由于不同黄病毒之间存在严重的血清学交叉反应，在那些存在多种黄病毒流行的区域，由于混合感染，患者体内存在交叉抗体，使得免疫学诊断及鉴别诊断十分困难[14]。因此，有必要对DV抗原表位进行深入细致的研究，为特异性诊断试剂及进一步疫苗的研制提供依据。

本研究中，对6种常见黄病毒的共有及特异性抗原表位进行了系统分析，初步预测获得共有抗原表位15个，特异性抗原表位47个，并对部分抗原表位的免疫学特性进行了研究，为DV致病机制及诊断试剂的深入研究提供了线索。

参 考 文 献

[1] De Paula SO, Fonseca BA. Dengue: a review of the laboratory tests a clinician must know to achieve a correct diagnosis. Braz J Infect Dis, 2004, 8(6): 390-398.

[2] Kyte J, Doolittle RF. A simple method for displaying hydrophablic character of a protein. J Mol Biol, 1983, 157(1): 105-132.

[3] Jameson BA, Wolf H. The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants. Comput Appl Biosci, 1988, 4(1): 181-186.

[4] Karplus PA, Schultz GE. Prediction of chain flexibility in proteins. Immunology, 1985, 72(2): 212-215.

[5] Emini EA, Hughes J, Perlow D, et al. Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. J Virol, 1985, 55(3): 836-839.

[6] Bhattacharya-Chatterjee M, Chatterjee SK, Foon KA. Anti-idiotype vaccine against cancer. Immunol Lett, 2000, 74(1): 51.

[7] Falcioni F, Ito K, Vidovic D, et al. Peptidomimetic compounds that inhibit antigen presentation by autoimmune disease-associated class Ⅱ major histocompatibility molecules. Nat Biotechnol, 1999, 17: 562.

[8] John TR, Richard A, Bolin RG, et al. Monoclonal antibody mapping of the envelope glycoprotein of the dengue 2 virus. Jamaica, 1998, 246(2): 317-328.

[9] Wu SJ, Grouard V, Sun W, et al. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. Nature Med, 2000, 6(7): 816-820.

[10] 魏惠永，江丽芳，方丹云，等. 登革2型病毒E蛋白免疫优势表位的筛选鉴定. 中华微生物学和免疫学杂志，2003，23(7)：498-501.

[11] Thaweesak T, Bala C, Robert P, et al. Mapping of a region of dengue virus type-2 glycoprotein required for binding by a neutralizing monoclonal antibody. Gene, 1992, 2(15): 135-190.

[12] Guilarde AO, Turchi MD, Jr JB, et al. Dengue and dengue hemorrhagic fever among adults: clinical outcomes related to viremia, serotypes, and antibody response. J Infect Dis, 2008, 197(6): 817-824.

[13] Beaumier CM, Mathew A, Bashyam HS, et al. Cross-reactive memory CD_8 (+) T cells alter the immune response to heterologous secondary dengue virus infections in mice in a sequence-specific manner. J Infect Dis, 2008, 197(4): 608-617.

[14] Lazaro-Olán L, Mellado-Sánchez G, García-Cordero J, et al. Analysis of antibody response in human dengue patients from the mexican coast using recombinant antigens. Vector Borne Zoonotic Dis, 2008, 8(1): 69-80.

(收稿日期：2008-10-04)

(本文编辑：尹廉)