

麻疹病毒血凝素蛋白抗原表位的预测与分析

冯燕 钟淑玲 徐昌平 卢亦愚

【摘要】 目的 探讨麻疹病毒(MeV)流行株血凝素蛋白(H)抗原表位上氨基酸(aa)变异对病毒抗原性的可能影响。方法 利用生物信息学软件预测MeV H蛋白上B细胞线性表位,设计并合成来源于疫苗株和流行株表位以及同一区域非表位上的多肽对。间接ELISA法检测合成多肽的免疫原性,并制备多肽免疫血清。采用交叉ELISA法分析两条多肽间的抗原性差异,计算抗原比。结果 合成的多肽均能与MeV免疫血清结合,其中设计在表位区的多肽对CW23/CW22(273~282 aa)结合能力最强,而非表位区多肽对CW150/CW151(418~427 aa)结合能力最弱。多肽对中来来源不同两条多肽间抗原性差异较大,其中CW23(疫苗株来源)与CW22(流行株来源)间抗原比为16,CW123(疫苗株来源)与CW124(流行株来源)(236~246 aa)间的抗原比为 2.877 ± 0.583 。非表位多肽对中,CW125与CW126(356~364 aa)间抗原比为 1.631 ± 0.481 ,而CW150与CW151间抗原比为 10.367 ± 1.617 。结论 麻疹流行株上仍存在保守的抗原表位,但预测的抗原表位及非表位区上的部分aa变异导致疫苗株与流行株间抗原性存在差异。

【关键词】 麻疹病毒;血凝素蛋白;抗原表位;多肽;抗原特异性

Prediction and analysis of epitopes of hemagglutinin of measles virus Feng Yan, Zhong Shuling, Xu Changping, Lu Yiyu. Key Laboratory of Emergency Detection for Public Health of Zhejiang Province, Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou 310051, China
Corresponding author: Lu Yiyu, Email: luyiyuzjh@163.com

This work was supported by a grant from the Zhejiang Provincial Medical Key Subject Group (No. XKQ-009-003).

【Abstract】 Objective To discuss the antigenic change caused by the mutation of amino acid on the epitopes of the hemagglutinin of measles virus. **Methods** The B cell linear epitopes in the hemagglutinin were predicted with bioinformatics software. Peptide pairs, which located on the same region but originated from measles vaccine and wild-type virus respectively, were designed and synthesized. After detecting the immunogenicity of peptides with indirect ELISA assay, sera against each peptide was prepared. Antigenic specificity between the two peptides within each peptide pair were tested by using cross ELISA assay, and then antigen ratios were calculated. **Results** All the synthesized peptides could bind with immune sera against measles virus, of which the peptide pair CW23/CW22 designed on the epitope region (273-282 aa) possessed the highest binding ability, while the peptide pair CW150/CW151 designed on the non-epitope region (418-427 aa) showed the lowest binding ability. The difference in antigenic specificity between the two peptides from different sources was significant. The antigenic ratio was up to 16 between CW23 (vaccine-originated) and CW22 (wild-type originated), and 2.877 ± 0.583 between CW123 (vaccine-originated) and CW124 (wild-type originated) (236-246 aa). On the non-epitope regions, the antigenic ratios was only 1.631 ± 0.481 between peptide pair CW125 and CW126 (356-364 aa), but reached to 10.367 ± 1.617 between CW150 and CW151. **Conclusion** Although there were several conservative epitopes, specific amino acid mutation on the predicted epitope or non-epitope regions might cause the antigenic change of wild-type measles virus.

【Key words】 Measles virus; Hemagglutinin; Epitope; Peptide; Antigenic specificity

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2015.09.016

基金项目:浙江省医学重点学科群(XKQ-009-003)

作者单位:310051 杭州,浙江省疾病预防控制中心 浙江省公共卫生应急检测关键技术重点实验室

通信作者:卢亦愚, Email: luyiyuzjh@163.com

抗原表位(epitope)是抗原分子上能够刺激机体产生抗体或致敏淋巴细胞并被其识别的区域,通常由数个或数十个氨基酸(aa)残基组成,决定着抗原的特异性^[1-2]。病毒变异一旦出现或影响到抗原表位,就可能使抗体与抗原分子无法结合或结合能力降低,从而导致抗原性改变。麻疹病毒(MeV)流行株与疫苗株在基因和抗原性上的差异已引起广泛关注^[3-4],但流行株的aa变异是否影响病毒抗原性尚不清楚。本研究采用生物信息学软件预测 MeV H 蛋白上的 B 细胞抗原表位,并合成多肽对。通过分析不同来源(疫苗株来源与流行株来源)同一区域的多肽与相应多肽免疫血清结合能力的差异,探讨流行株与疫苗株在 H 蛋白上 aa 差异对病毒抗原性的可能影响。

材料与方法

1. BALB/c 小鼠:用于制备动物免疫血清的 BALB/c 小鼠(SPF 级,4~6 周龄,雌性)由浙江省中医学实验动物中心提供。

2. 麻疹流行株 H 基因 aa 序列:33 株 H1 基因型 MeV 流行株^[5]及麻疹疫苗株 H 基因序列由 GenBank 下载,采用 BioEdit 软件进行流行株与疫苗株的序列比对。

3. 多肽的预测与合成:根据 MeV 流行株与疫苗株 H 基因 aa 序列比对结果,采用生物信息学软件 DNASTar 的 Protean 模块和在线软件 EXPASY,进行 B 细胞线性表位预测。以亲水性、表面可及性、柔韧性以及二级结构为筛选标准,设计长度为 9~11 个 aa 的多肽。设计的多肽由上海强耀生物科技有限公司合成,并偶联匙孔血蓝蛋白(Keyhole limpet hemocyanin, KLH)增加免疫原性。多肽抗原指数(Antigenicity index, AI)的分析参照文献^[6]进行。

4. 免疫血清的制备:参照多克隆抗体制备技术^[7],将浙江省麻疹流行株 MVi/Zhejiang.CHN/

18.10/5^[5]与合成多肽,分别免疫 4~6 周龄 BALB/c 小鼠,制备得到 MeV 免疫血清与各种多肽免疫血清。

5. 合成多肽免疫原性的检测:将合成多肽稀释为 20 μg/ml 包被酶标板,间接 ELISA 法检测各多肽与 MeV 免疫血清的结合能力,测定 A₄₅₀ 值。通过计算 P/N 值,即(阳性对照 A 值-空白对照 A 值)/(阴性对照 A 值-空白对照 A 值),判断各多肽的免疫原性。

6. 多肽对中不同来源的两条多肽与相应两种免疫血清的结合能力测定:参考文献^[8],将多肽对中两条不同来源的多肽与相应多肽制备的免疫血清进行交叉 ELISA 试验。以多肽对 CW23/CW22 为例,具体步骤:分别以 20 μg/ml 的疫苗多肽 CW23 和流行株多肽 CW22 稀释液 100 μl 包被酶标板,再分别与两倍系列稀释的 CW23 和 CW22 多肽免疫血清进行 ELISA 反应,测定 A₄₅₀ 值。以抗体阳性的血清最高稀释度为抗体滴度,计算多肽对中疫苗株来源与流行株来源的两条多肽间的抗原比^[8]。

结果

1. 抗原表位的预测与多肽合成:综合二级结构、亲水性、表面可及性以及柔韧性,MeV H 基因上第 123~134、140~151、235~247、277~283、367~379、487~495 以及 608~613 位 aa 为预测的 B 细胞线性表位区。结合流行株与疫苗株 H 基因 aa 序列比对结果,以流行株存在 2~3 个稳定变异位点为选择依据,在预测的抗原表位区、非表位区分别设计两对多肽,在保守的表位区设计两条多肽。多肽序列、位置、来源等信息见表 1。

抗原指数计算显示,除非表位区多肽对 CW125/CW126 外,其他多肽抗原指数均>0,保守区表位多肽 CW148 和 CW149 抗原指数较高,分别为 0.047 和 0.065。表位区多肽对中,疫苗株多肽的抗原指数高于流行株多肽,如 CW23 和 CW123 抗原指数分别为 0.021 和 0.049,而流行株多肽 CW22 和 CW124 抗原

表 1 MeV H 蛋白上合成多肽信息

区域	编号	名称	序列	aa 位置	抗原指数	分子量(Da)	变异数	序列来源
表位(变异区)	1	CW23	TNYLEQPVSN	273~282	0.021	1 164.25	3	疫苗株
		CW22	TNYFEQPISK		0.012	1 226.36		流行株
	2	CW123	KPNLSSKRSEL	236~246	0.049	1 258.45		疫苗株
		CW124	KPNLNSKGSEL		0.024	1 186.34		流行株
非表位区	1	CW125	GVIADNQAK	356~364	-0.026	915.02	2	疫苗株
		CW126	GVITDNQAN		-0.023	930.98		流行株
	2	CW150	SLTVELKIKI	418~427	0.031 4	1 143.44		疫苗株
		CW151	SLAAEPKIKI		0.030 6	1 069.32		流行株
表位(非变异区)	1	CW148	KFLNPDREYD	123~132	0.047	1 296.41	0	流行株与疫苗株一致
	2	CW149	PTTRTDDKLR	368~377	0.065	1 202.34		

指数为0.012和0.024。

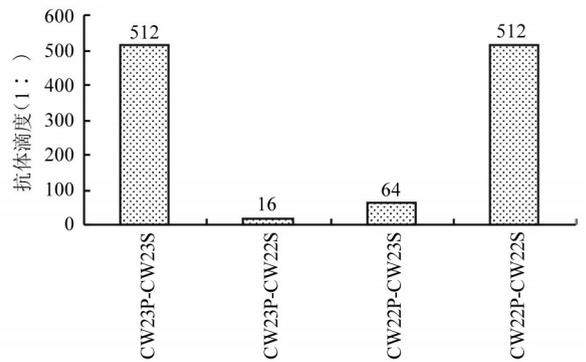
2. 合成多肽的免疫原性:采用间接ELISA测定各多肽与MeV免疫血清间的结合能力,分析多肽免疫原性。与阴性对照比较,合成的各多肽均能与MeV免疫血清结合。其中,表位区多肽对CW23/CW22与MeV免疫血清的结合能力最强,P/N值分别高8.540和10.263;非表位区多肽对CW150/CW151与MeV免疫血清结合最弱,P/N值为3.385和2.733;保守区多肽CW148和CW149免疫原性介于上述二者之间,P/N值分别为4.458和5.966,见表2。

表2 MeV合成多肽的免疫原性

A ₄₅₀	免疫血清($\bar{x} \pm s$)	阴性对照($\bar{x} \pm s$)	P/N
CW23	0.632±0.032	0.074±0.016	8.540
CW22	0.585±0.037	0.057±0.007	10.263
CW123	0.420±0.078	0.056±0.016	7.500
CW124	0.450±0.014	0.065±0.010	6.923
CW125	0.682±0.013	0.174±0.029	3.920
CW126	0.675±0.038	0.164±0.033	4.116
CW150	0.440±0.046	0.130±0.031	3.385
CW151	0.328±0.019	0.120±0.063	2.733
CW148	0.526±0.011	0.118±0.014	4.458
CW149	0.692±0.047	0.116±0.015	5.966

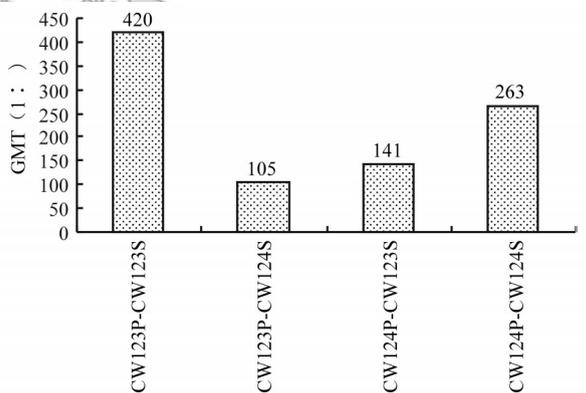
3. 多肽对中不同来源的两条多肽间抗原性差异:将合成的多肽分别免疫小鼠(每条多肽免疫7只),获得免疫血清。抗原表位多肽对中,不同来源的两条多肽与相应多肽免疫血清进行交叉ELISA试验后,抗体滴度见图1。CW23/CW22多肽对中,CW23免疫血清对CW23的抗体滴度为1:512,对流行株多肽CW22的抗体滴度为1:64;流行株多肽CW22免疫血清对CW23的抗体滴度为1:16,对CW22的抗体滴度为1:512,见图1。CW123/CW124多肽对中,CW123免疫血清对CW123的抗体几何平均滴度(GMT)为1:420,对流行株多肽CW124的GMT值为1:141;流行株多肽CW124免疫血清对CW123的GMT值为1:105,对CW124的GMT值为1:263,见图2。

非表位多肽对CW125/CW126中,疫苗多肽CW125血清对疫苗多肽CW125的GMT值为1:420,对流行株多肽CW126的GMT值为1:232;流行株多肽CW126免疫血清对CW125的GMT值为1:156,对CW126的GMT值为1:210,见图3。CW150/CW151肽对中,疫苗多肽CW150血清对疫苗多肽CW150的GMT值为1:64,而对流行株多肽CW151的GMT值为1:3;流行株多肽CW151免疫血清对CW150的GMT值为1:9,而对CW151的GMT值为



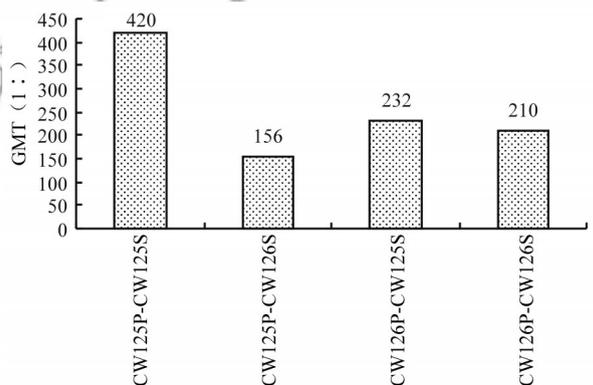
注: CW23P指CW23多肽, CW23S指CW23多肽血清; CW22P指CW22多肽, CW22S指CW22多肽血清

图1 MeV CW23/CW22多肽对与CW23/CW22免疫血清交叉ELISA结果



注: CW123P指CW123多肽, CW123S指CW123多肽血清; CW124P指CW124多肽, CW124S指CW124多肽血清

图2 MeV CW123/CW124多肽对与CW123/CW124免疫血清交叉ELISA结果

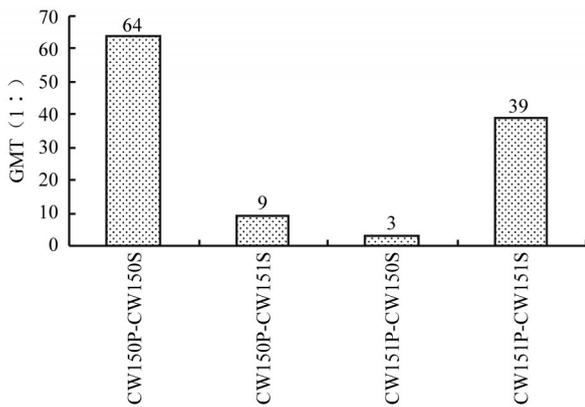


注: CW125P指CW125多肽, CW125S指CW125免疫血清; CW126P指CW126多肽, CW126S指CW126免疫血清

图3 MeV CW125/CW126多肽对与CW125/CW126免疫血清交叉ELISA结果

1:39,见图4。

4. 多肽对中不同来源两条多肽的抗原比:利用交叉ELISA测定的抗体GMT值,计算多肽对中两条多肽的抗原比,见表3和图5。表位多肽对CW23/



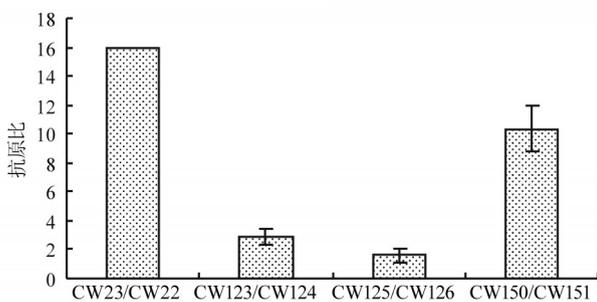
注: CW150P 指 CW150 多肽, CW150S 指 CW150 免疫血清; CW151P 指 CW151 多肽, CW151S 指 CW151 免疫血清

图 4 MeV CW150/CW151 多肽对与 CW150/CW151 免疫血清交叉 ELISA 结果

表 3 MeV H 蛋白各多肽间抗原比

血清编号	CW23/ CW22	CW123/ CW124	CW125/ CW126	CW150/ CW151
1		2.828	1.000	8.000
2		4.000	1.000	8.000
3		2.828	2.000	11.314
4	16.000	2.828	2.000	11.314
5		2.000	1.414	11.314
6		2.828	2.000	11.314
7		2.828	2.000	11.314
$\bar{x} \pm s$	-	2.877 ± 0.583	1.631 ± 0.481	10.367 ± 1.617

注: 因 CW23/CW22 免疫后 7 只小鼠血清混合, 仅计算一次抗原比



注: CW23/CW22 免疫后 7 只小鼠血清混合, 无标准差描述; 其余多肽柱状图均为 $\bar{x} \pm s$

图 5 MeV 各多肽对中不同来源两条多肽间的抗原比

CW22 间抗原性差异最大, 抗原比为 16; 而 CW123/CW124 间抗原比平均为 2.877 ± 0.583 。非表位多肽对中, CW125/CW126 间抗原比最小, 平均为 1.631 ± 0.481 ; 而 CW150 与 CW151 间抗原比为 $8.000 \sim 11.314$, 平均为 10.367 ± 1.617 。

讨 论

本研究根据 Jameson 和 Wolf^[9] 提出的综合预测

方案, 筛选出 MeV H 蛋白上高亲水性、高表面可及性、柔韧性好的 β 转角和不规则卷曲区域作为抗原表位。为了提高预测准确性, 同时采用 Expasy 和 DNASTar 两种软件 4 种预测方案, 最终获得 H 蛋白具有成为 B 细胞线性表位可能的 7 个区域。

根据预测结果, 在 H 蛋白保守的抗原表位区设计合成的多肽 CW148 (123 ~ 132 aa) 和 CW149 (368 ~ 377 aa) 抗原指数较高, 其中 CW149 抗原指数为 0.065, 说明 H 蛋白两区域抗原性较强, 而强抗原性可能是导致该区域稳定不易发生变异的原因之一。同时, CW148 和 CW149 均具有与 MeV 免疫血清结合的能力, 提示麻疹流行株 H 蛋白存在保守的抗原表位, 可能是麻疹疫苗抗体中和各基因型流行株的重要原因。

在合成的表位多肽对 CW23/22 (273 ~ 282 aa) 与 CW123/124 (236 ~ 246 aa) 中, 疫苗株多肽 CW23 和 CW123 抗原指数高于来源于流行株同一位置的多肽 CW22 和 CW124, 提示流行株 aa 的突变可能会降低疫苗株原有表位的抗原性。在合成多肽对中, CW23/CW22 与 MeV 免疫血清的结合力最强, 提示免疫原性强, 可能为 B 细胞优势表位区。目前, B 细胞抗原表位已广泛用于基础免疫学研究和抗体的制备, 如烟草花叶病毒外壳蛋白长度为 6 个 aa 的多肽免疫家兔后诱生的抗体能够阻断该病毒感染^[10]。本研究筛选得到的 CW23/CW22 多肽, 是否能作为抗原用于 MeV 抗体的制备或多肽疫苗的研究, 值得进一步探讨。

抗原性差异分析结果表明, 同一多肽对中, 疫苗株来源的多肽与自身免疫血清结合能力高于与相应流行株多肽免疫血清的结合能力, 与全病毒的交叉中和试验结果相符^[11]。根据抗原比的定义, 即抗原比在 1.5 ~ 2.0 时, 两者间抗原性有小的差异, 而抗原比越大, 差异越大^[8], CW23 和 CW22 间抗原性差异较大 (抗原比为 16), 提示该抗原表位区由于 3 个 aa 的变异可能导致流行株抗原性较大程度的改变。CW123 和 CW124 虽为早期研究认定的中和抗体表位, 且与阻止病毒细胞融合有关的线性表位 H244 ~ 250 aa^[12] 存在部分重叠, 但该区由 2 个 aa 变异引起的抗原性差异小于 CW23/CW22, 即该区域中 aa 变异对病毒抗原性作用程度小于 CW23/CW22 区。

由于生物信息学对表位的预测准确性无法达到 100%, 所谓非表位区仅能作为抗原表位研究的参考。因此, 本研究在预测的非表位区合成两对多肽, 用于验证 aa 突变对病毒抗原性的影响。虽然 2

个多肽对也具有与 MeV 免疫血清结合的能力,但免疫原性低于表位多肽。CW125 和 CW126 的抗原指数 <0 , 两者间抗原比仅为 1.631 ± 0.481 , 提示该区为非表位区的可能性大, 发生在该区的 aa 突变对流行株的抗原性影响不明显。但是, 多肽对 CW150/CW151 间抗原比为 10.367 ± 1.617 , 说明部分预测的非表位区上 aa 改变也与病毒抗原性的改变密切相关。

目前, 全球使用的麻疹疫苗均为 A 基因型 MeV 减毒株, 且沿用至今已超过 60 年^[13]。在中国, 即使在实施两剂次麻疹疫苗接种的免疫策略后, 免疫覆盖率大大增加, 但麻疹的暴发和散发病例仍时有发生^[14]。国内学者在分析麻疹流行的原因时, 对当前流行株的基因变异, 以及血清抗体对疫苗株与流行株中和能力的不同分别进行了阐述^[5, 11, 15]。本研究阐明了 H 蛋白的某些 aa 变异与病毒免疫原性改变及其程度之间的关系, 为进一步分析麻疹流行的原因以及流行株变异对疫苗效果的影响提供了基础数据。

参 考 文 献

- [1] Pedroza-Roldan C, Charles-Niño C, Saavedra R, et al. Variable epitope library-based vaccines: shooting moving targets [J]. *Mol Immunol*, 2009, 47(2/3): 270-282.
- [2] Song S, Li CL, Jia AQ, et al. Progress on approaches for antigen epitope study [J]. *Progr Veterin Med*, 2010, 31(2): 87-91. (in Chinese)
宋帅, 李春玲, 贾爱卿, 等. 抗原表位研究方法进展 [J]. *动物医学进展*, 2010, 31(2): 87-91.
- [3] Rota JS, Hummel KB, Rota PA, et al. Genetic variability of the glycoprotein genes of current wild-type measles isolates [J]. *Virology*, 1992, 188(1): 135-142.
- [4] Tamin A, Rota PA, Wang ZD, et al. Antigenic analysis of current wild type and vaccine strains of measles virus [J]. *J Infect Dis*, 1994, 170(4): 795-801.
- [5] Feng Y, Zhong SL, Xu CP, et al. Variations on hemagglutinin gene of Zhejiang measles virus strains and differences with measles strains circulated both at home and abroad [J]. *Chin J Prev Med*, 2013, 47(7): 616-621. (in Chinese)
冯燕, 钟淑玲, 徐昌平, 等. 浙江省麻疹病毒流行株血凝素基因的变异及其与国内外流行株的差异 [J]. *中华预防医学杂志*, 2013, 47(7): 616-621.
- [6] Wu YZ, Zhu XH. A new approach for B-cell epitope prediction in viral proteins [J]. *Chin Sci Bull*, 1995, 40(9): 761-767.
- [7] Coligan JE, Bierer BE, Margulies DH, et al. *Current protocols in immunology* [M]. New York, USA: John Wiley & Sons, 1991.
- [8] Guo YJ, Cheng XW. *Influenza virus and its experimental techniques* [M]. Beijing: Chinese Three Gorges Publishing House, 1997: 102-106. (in Chinese)
郭元吉, 程小雯. *流行性感病毒及其实验技术* [M]. 北京: 中国三峡出版社, 1997: 102-106.
- [9] Jameson BA, Wolf H. The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants [J]. *Comput Appl Biosci*, 1988, 4(1): 181-186.
- [10] Briand JP, Al Moudallal Z, van Regenmortel MH. Serological differentiation of tobamoviruses by means of monoclonal antibodies [J]. *J Virol Methods*, 1982, 5(5/6): 293-300.
- [11] Feng Y, Lu YY, Yan JY, et al. Study on the neutralization capacity of different types of human measles virus vaccine and the epidemic strains [J]. *Chin J Epidemiol*, 2007, 28(11): 1123-1126. (in Chinese)
冯燕, 卢亦愚, 严菊英, 等. 不同人群血清对麻疹疫苗株与流行株的中和能力比较 [J]. *中华流行病学杂志*, 2007, 28(11): 1123-1126.
- [12] Fournier P, Brons NH, Berbers GA, et al. Antibodies to a new linear site at the topographical or functional interface between the haemagglutinin and fusion proteins protect against measles encephalitis [J]. *J Gen Virol*, 1997, 78(Pt 6): 1295-1302.
- [13] WHO. Measles vaccines [J]. *Wkly Epidemiol Rec*, 2009, 84(35): 349-360.
- [14] He H, Chen EF, Li Q, et al. Waning immunity to measles in young adults and booster effects of revaccination in secondary school students [J]. *Vaccine*, 2013; 31(3): 533-537.
- [15] Zhou JH, Chen C, Liu GY, et al. Comparison of H protein and antigenicity of Chinese measles virus strain with Japanese strains [J]. *Chin J Vacc Immun*, 2003, 9(2): 105-108. (in Chinese)
周剑慧, 陈超, 刘桂艳, 等. 麻疹病毒中国株与日本株的 H 蛋白及抗原性比较 [J]. *中国计划免疫*, 2003, 9(2): 105-108.

(收稿日期: 2015-01-30)

(本文编辑: 万玉立)