

北京鸭呼肠孤病毒 σ A、 σ B 蛋白的二级结构 及 B 细胞抗原表位的预测

刘红^{1,2†}, 樊惠英^{1†}, 朱朝辉^{1,2}, 罗琼¹, 吴志新¹, 廖明¹

(1 华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642; 2 广东省农业科学院 畜牧研究所, 广东 广州 510642)

摘要:应用 SOPMA 方法和 DNASTar Protean 软件综合分析了北京鸭呼肠孤病毒分离株 DRV-GZ 株的 σ A、 σ B 蛋白的二级结构、亲水性、表面特性、柔韧性和抗原指数,并对各个蛋白的 B 细胞抗原表位进行了预测.结果表明, σ A 蛋白的 32~37,56~61,82~85,107~116,128~141,202~207,239~246,256~260,274~280,312~317,381~391 和 σ B 蛋白的 62~86,117~123,141~163,179~186,270~275,287~289,343~345 区域内或附近最有可能是 B 细胞抗原表位的优势区域.

关键词:北京鸭呼肠孤病毒; σ A 蛋白; σ B 蛋白; B 细胞表位

中图分类号:S858.32

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2009)03-0090-05

Secondary Structure and B Cell Epitopes Prediction of Protein σ A and σ B of Reovirus Strain DRV-GZ from Peking Ducks

LIU Hong^{1,2†}, FAN Hui-ying^{1†}, ZHU Chao-hui^{1,2}, LUO Qiong¹, WU Zhi-xin¹, LIAO Ming^{1,2}

(1 College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2 Institute of Animal Husbandry, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640; China)

Abstract: The secondary structures, hydrophilicity, surface probability plot and antigenic index of protein σ A and σ B of reovirus strain DRV-GZ from Peking ducks were predicted by the software of SOPMA and DNASTar Protean. Combining the results, the predominant B cell epitopes for σ A and σ B protein were predicted. The results showed that B cell epitopes of σ A exist at the sites of 32-37, 56-61, 82-85, 107-116, 128-141, 202-207, 239-246, 256-260, 274-280, 312-317, 381-391; B cell epitopes of σ B exist at the sites of 62-86, 117-123, 141-163, 179-186, 270-275, 287-289, 343-345.

Key words: reovirus strain from Peking ducks; protein σ A; protein σ B; B cell epitopes

禽呼肠孤病毒(Avian reovirus, ARV)为呼肠孤病毒科、正呼肠孤病毒属成员.该病毒可感染多种禽鸟,包括鸡、鸭、鸽、鹅、鸚鵡和其他野鸟,引起的临床症状比较复杂^[1-5].2005年广东出现了一种以肿头、软脚、流泪,拉黄绿色稀粪,肝脏出血和坏死及食道泄殖腔有溃疡和结痂为主要特征的雏北京鸭疾病.在进行病因调查时,我们分离到多种病毒,其中包括1株呼肠孤病毒 DRV-GZ 株^[6].本研究旨在对已鉴定的1株北京鸭呼肠孤病毒的 σ A、 σ B 蛋白进行二级

结构及 B 细胞抗原表位的预测,为今后进一步研究该病毒的基因工程疫苗奠定基础.

1 材料与方法

1.1 病毒

北京鸭呼肠孤病毒 DRV-GZ 株由华南农业大学兽医学院传染病教研室保存.

1.2 主要试剂和酶类

反转录酶 Reverse transcriptase XL(AMV)、Ex

收稿日期:2008-12-22

作者简介:刘红(1981—),女,硕士研究生;樊惠英(1977—),女,讲师,博士;†:对本文贡献相同;通讯作者:廖明(1968—),男,教授,博士,E-mail: mliao@scau.edu.cn

基金项目:广东省科技计划项目(2006A20301001);教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET-06-0752);广东省动物防疫检疫专项经费(粤农[2006]264号)

Taq 聚合酶、dNTPs (each 2.5 mmol/L)、DNA Marker DL2000 为宝生物工程(大连)有限公司产品.

1.3 分子生物学软件

序列分析软件 DNASTar(Version 5.07,包括 Edit-Seq, MegAlign, MapDraw, protean 等软件)为 DNASTar 公司产品. B 细胞抗原表位预测用 SOPMA 服务器 (http://npsapbil.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopma.pl).

1.4 S2、S3 基因的扩增和序列测定

根据 GenBank 发表的禽呼肠孤病毒 S2、S3 基因序列设计引物,引物由上海生工生物工程公司合成.参照 TRizol 按试剂使用说明书,抽提病毒 RNA,最后将 dsRNA 重悬于 DEPC 水中.应用 RT-PCR 试剂盒,采用 20 μ L 合成体系,按试剂盒使用说明书进行.用含 EB 的 0.8 kg/L 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物,并对特异性扩增产物进行测序与序列分析.本文用于 S2、S3 基因比较分析的禽呼肠孤病毒参考毒株见表 1、表 2.

表 1 用于 S2 基因比较分析的禽呼肠孤病毒参考毒株

Tab.1 Reference virus strains for analysis of S2 gene

序号	GenBank 注册号	毒株名	基因长度/bp	分离动物	分离国家
1	AY962259	S14	1 251	番鸭	中国
2	AY589090	ZJ99	1 251	番鸭	中国
3	EF076076	S12	1 251	番鸭	中国
4	DQ198857	YJL	1 251	番鸭	中国
5	AF104311	A1	1 251	鸡	中国
6	AF311322	A2	1 251	鸡	中国
7	AF059716	176	1 251	鸡	加拿大
8	DQ013346	SY2004	1 242	番鸭	中国
9	DQ013348	CX2004	1 242	番鸭	中国
10	AJ278102	89026	1 201	番鸭	法国

表 2 用于 S3 基因比较分析的禽呼肠孤病毒参考毒株

Tab.2 Reference virus strains for analysis of S3 gene

序号	GenBank 注册号	毒株名	基因长度/bp	分离动物	分离国家
1	AY444910	TX99	1 104	火鸡	美国
2	AY444910	PEMS85	1 104	火鸡	美国
3	AF059721	138	1 104	鸡	加拿大
4	AF059720	176	1 104	鸡	加拿大
5	AY008384	601	1 104	鸡	中国
6	AF208034	919	1 104	鸡	中国
7	AF004856	1733	1 104	鸡	美国
8	EF030498	B-98	1 104	鸡	中国
9	EF030496	C-98	1 104	鸡	中国
10	EF030497	G-98	1 104	鸡	中国
11	EF030499	T-98	1 104	鸡	中国
12	AF301474	1017-1	1 104	鸡	中国
13	DQ198855	YJL	1 104	番鸭	中国
14	AJ243881	89330	1 104	番鸭	法国
15	DQ643971	S12	1 104	番鸭	中国
16	DQ198856	YH	1 104	番鸭	中国
17	AJ006476	89026	1 104	番鸭	法国
18	EF100416	S14	1 104	番鸭	中国

1.5 S2、S3 蛋白的 B 细胞抗原表位的预测

用 SOPMA 法预测 σ A、 σ B 蛋白的二级结构.采用 Kyte-Doolittle 法^[7]根据序列的氨基酸组成预测蛋白质的疏水区和亲水区,用 Emini 法^[8]预测特定区域位于蛋白质表面的可能性,用 Karplus Schulz 方法分析骨架区的柔韧性,用 Jameson-Wolf 法^[9]预测蛋白的抗原指数,然后将亲水性、表面特性、柔韧性、二级结构 4 个参数联合进行 B 细胞抗原表位的综合预测.

2 结果

2.1 DRV-GZ 株 S2、S3 基因

S2 基因编码区全长 1 251 bp,编码由 417 个氨基酸组成的 σ A 蛋白, σ A 蛋白相对分子质量约为 46 050,含有 27 个强碱性氨基酸(K,R)、25 个强酸性氨基酸(D,E),151 个疏水性氨基酸(A,I,L,F,W,V)和 140 个极性氨基酸(N,C,Q,S,T,Y),等电点 7.984.核苷酸序列和氨基酸序列相似性分析表明 DRV-GZ 株与番鸭呼肠孤病毒 S12 株的相似性最高,核苷酸序列相似性达 94.8%,氨基酸序列相似性为 99.0%,6 个发生变化的氨基酸位置分别是第 22 位(R→C)、101 位(A→S)、123 位(S→T)、256 位(N→D)、348 位(S→P)和 395 位(A→U).所参照的毒株中与 DRV-GZ 株相似性最低的是分离自法国番鸭的 89026 株,核苷酸序列相似性为 39.3%,氨基酸序列相似性为 12.0%.

S3 编码区全长 1 104 bp,编码由 368 个氨基酸组成的 σ B 蛋白, σ B 蛋白相对分子质量为 41 465,含有 39 个强碱性氨基酸(K,R)和 43 个强酸性氨基酸(D,E),111 个疏水性氨基酸(A,I,L,F,W,V)和 102 个极性氨基酸(N,C,Q,S,T,Y),等电点 6.718.核苷酸序列和氨基酸序列相似性分析表明,DRV-GZ 株的 S3 基因与美国火鸡呼肠孤病毒 TX99 株的核苷酸序列相似性为 61.8%.与中国番鸭呼肠孤病毒 S14 株的核苷酸序列相似性为 61.1%、与法国番鸭呼肠孤病毒 89330 株和中国鸡呼肠孤病毒 G-98 株和中国番鸭呼肠孤病毒 S12 的核苷酸序列相似性为 60.9%.与法国番鸭呼肠孤病毒 89026 株的相似性为 21.7%.另外从氨基酸序列相似性结果来看,DRV-GZ 株的 S3 基因与法国番鸭呼肠孤病毒 89330 株氨基酸序列相似性为 68.2%,与美国火鸡呼肠孤病毒 TX99 株的氨基酸序列相似性为 67.9%,中国番鸭呼肠孤病毒 S14 株的氨基酸序列相似性为 67.7%.与法国番鸭呼肠孤病毒 89026 株的氨基酸序列相似性为 10.6%.表 2 中选择的 18 个参考株中,除了法国番鸭呼肠孤病毒 89026 株,与 DRV-GZ 株相似性均为 66.0%~68.2%.

2.2 σA 蛋白二级结构和 B 细胞抗原表位的预测

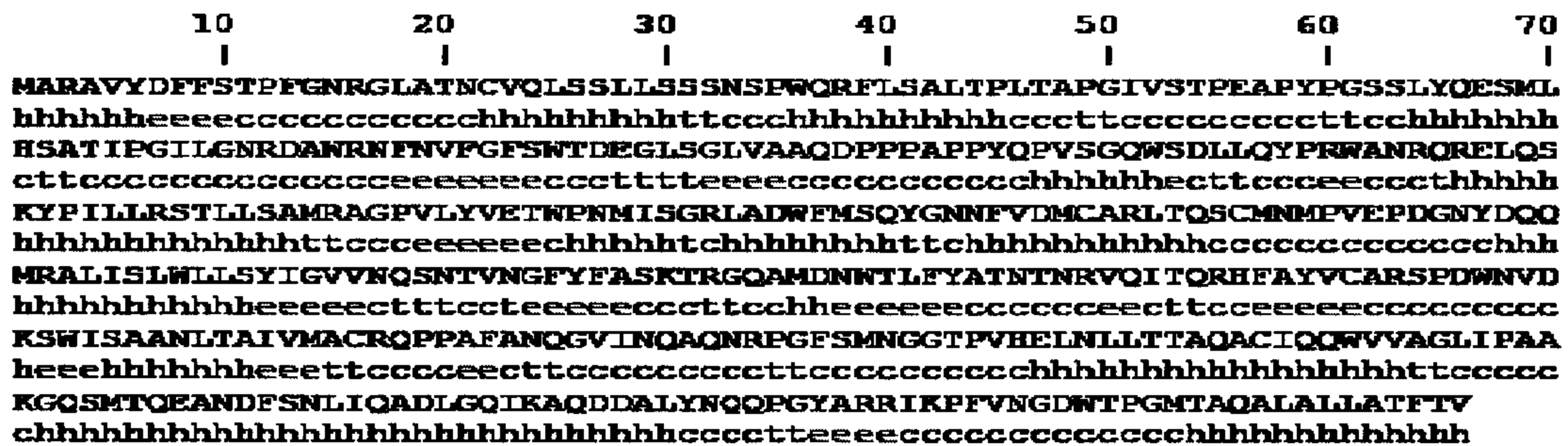
2.2.1 σA 蛋白二级结构的预测 应用 SOPMA 方法对 σA 蛋白进行预测,结果显示 α-螺旋结构占整个多肽的 39.18%,β-折叠结构占 14.18%,无规则卷曲占 37.50%,β-转角占 9.13%(图 1).

2.2.2 σA 蛋白 B 细胞抗原表位的预测 应用 Kyte-Doolittle 方法分析 σA 蛋白的亲水性,发现 σA 蛋白 N 端的 31~38,56~70,81~90,108~141,200~212,229~269,274~286,300~303,308~326,353~364,371~403 区段为高亲水性区域,这些区域暴露于表面的几率较大,作为抗原表位的可能性也最大

(图 2A).

应用 Emini 法预测结果显示,32~37,53~61,82~85,107~117,128~141,202~212,238~244,239~246,254~261,273~280,310~317,352~362,375~391 区段出现在蛋白质表面可能性较大(≥ 1),其他部位展示的可能性较小或表现为负值(图 2B).

应用 Karplus Schulz 方法分析 σA 蛋白骨架区的柔韧性区域,表明该蛋白肽段的柔韧性较大,发生扭曲、折叠的几率较高,能形成丰富的二级结构(图 2C).



h: α-螺旋;e: β-折叠;t: β-转角;c: 无规则卷曲

图 1 应用 SOPMA 方法预测 σA 蛋白二级结构

Fig. 1 Secondary structure prediction of protein σA by SOPMA

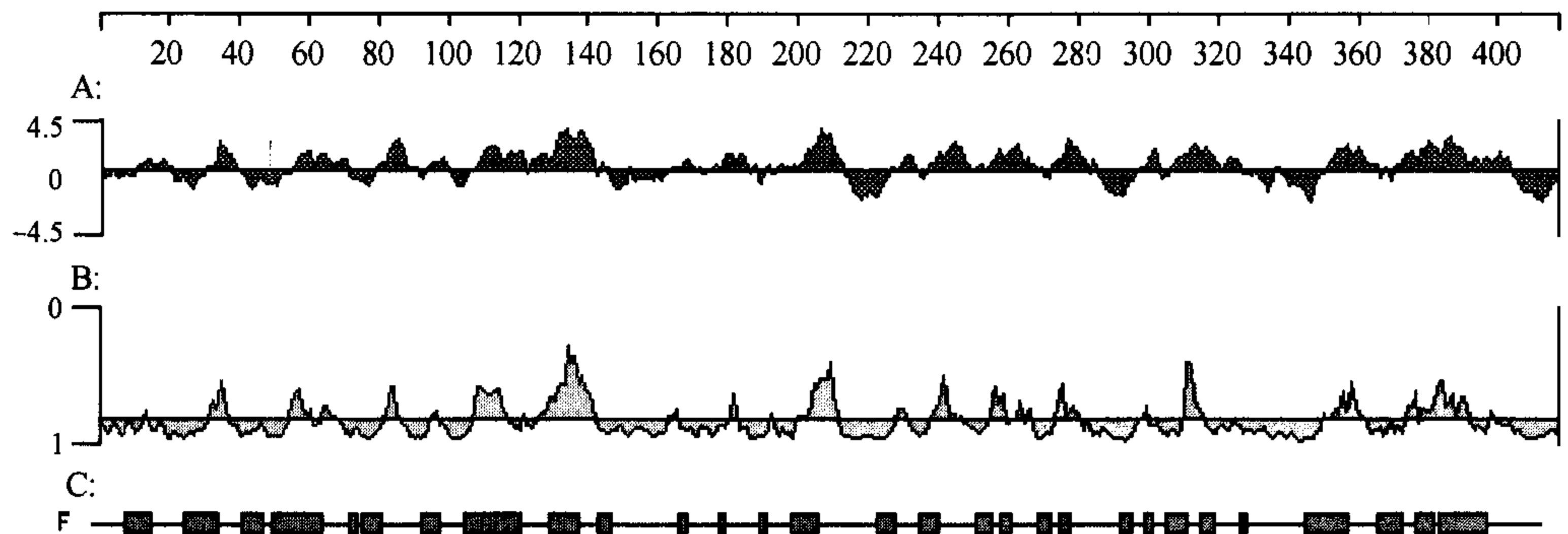


图 2 σA 蛋白的亲水性(A)、表面可能性(B)和骨架区的柔韧性分析(C)

Fig. 2 Hydrophilic(A), surface probability(B) and flexible regions(C) analysis of protein σA

应用 Jameson-Wolf 法预测 σA 蛋白抗原指数的结果显示,σA 蛋白的大多数区域的抗原指数都比较高,其中以 11~19,30~37,54~65,79~87,96~103,107~116,128~142,169~173,180~183,193~

196,200~212,229~231,239~247,256~263,273~283,297~301,312~323,350~364,373~403 区域的抗原指数最为显著(图 3).

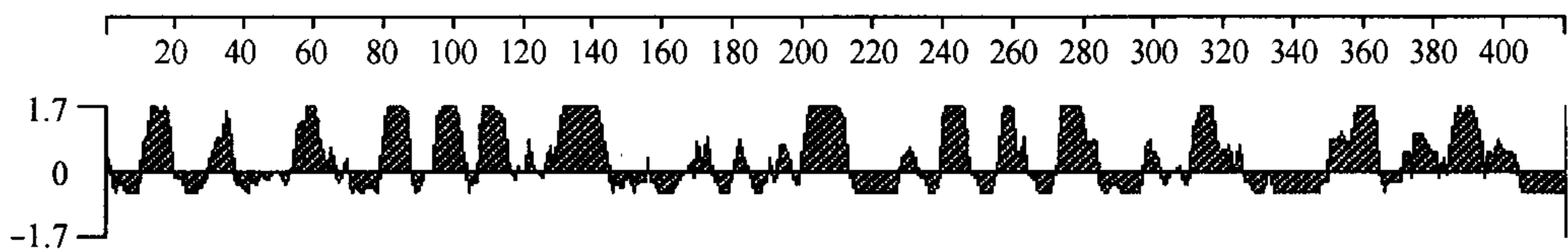


图 3 σA 蛋白抗原表位的预测性分析

Fig. 3 Analysis of antigenic index of protein σA

综合预测结果,σA 蛋白在 32~37,56~61,82~85,107~116,128~141,202~207,239~246,256~

260,274~280,312~317,381~391 区域有较好的亲水性、表面可能性和较高的抗原指数,并在二级结构

上含有易形成抗原表位的无规则卷曲和 β -转角,因此 B 细胞表位可能在这些区域内或附近.

2.3 σ B 蛋白二级结构和 B 细胞抗原表位的预测

2.3.1 σ B 蛋白二级结构预测 应用 SOPMA 方法

预测 σ B 蛋白二级结构的主要特点如下: α -螺旋结构占整个多肽的 32.15%, β -折叠结构占 16.89%,无规则卷曲占 32.15%, β -转角占 6.81%(图 4).

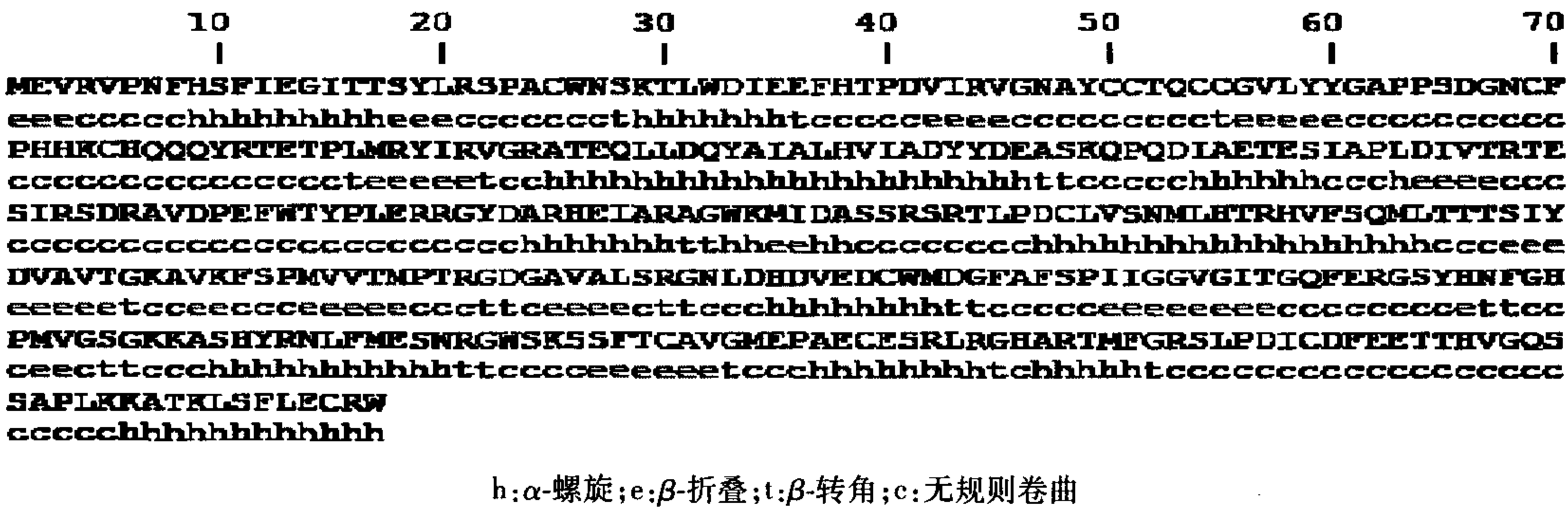


图 4 应用 SOPMA 方法预测 σ B 蛋白二级结构

Fig. 4 Secondary structure prediction of protein σ B by SOPMA

2.3.2 σ B 蛋白 B 细胞抗原表位预测 应用 Kyte-Doolittle 方法分析 σ B 蛋白的亲水性,其中 N 端的 22 ~ 41,62 ~ 89,115 ~ 127,141 ~ 171,179 ~ 187,241 ~ 252,270 ~ 308,317 ~ 359 区段为高亲水性区域,这些区域暴露于表面的几率较大,作为抗原表位的可能性也最大(图 5A).

Emini 法预测结果显示 76 ~ 86,113 ~ 124,138 ~

150,154 ~ 166,179 ~ 186,271 ~ 276,287 ~ 294,343 ~ 345,355 ~ 360 区段出现在蛋白质表面可能性较大 (≥ 1),其他部位展示的可能性较小或表现为负值(图 5B).

σ B 蛋白骨架区含有较多的柔韧性区域,且分布比较均匀,提示该蛋白肽段的柔韧性较大,发生扭曲、折叠的几率较高,能形成丰富的二级结构(图 5C).

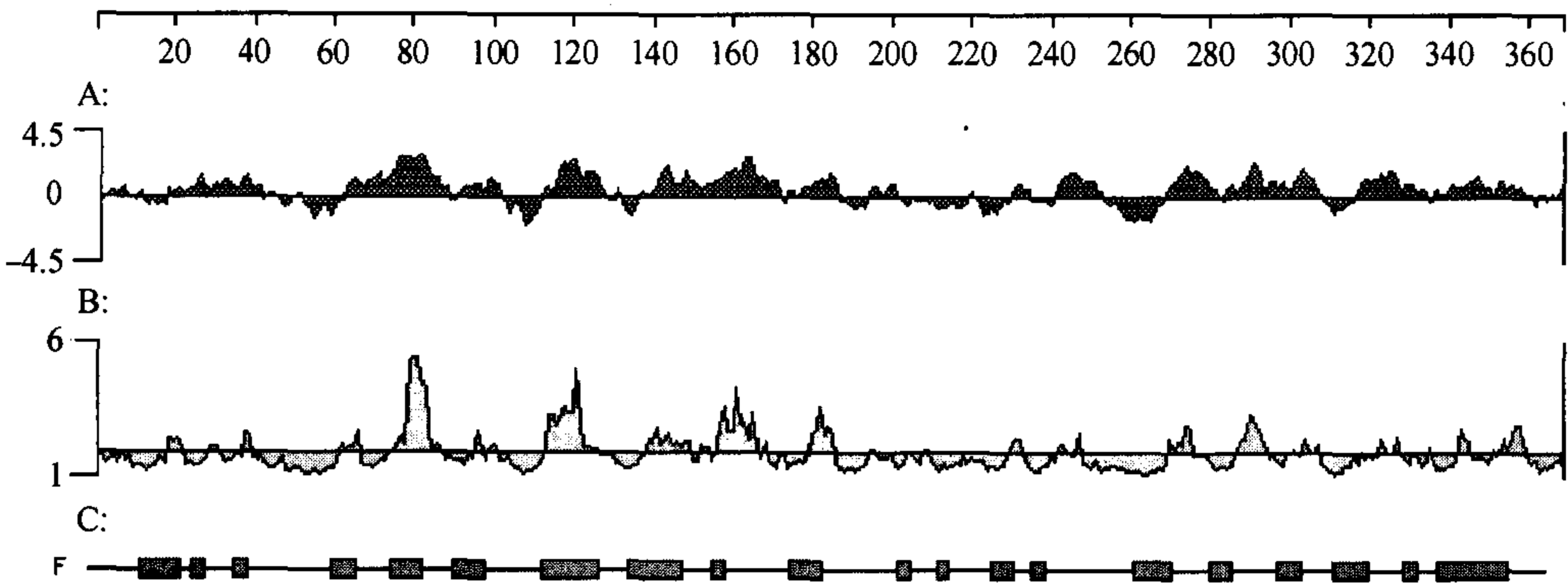


图 5 σ B 结构蛋白亲水性(A)、表面可能性(B)和骨架区的柔韧性分析(C)

Fig. 5 Hydrophilic(A), surface probability(B) and flexible regions(C) analysis of protein σ B

Jameson-Wolf 法预测 σ B 蛋白抗原指数的结果 显示, σ B 蛋白的大多数区域的抗原指数都比较高,其中以 1 ~ 9,23 ~ 45,60 ~ 88,95 ~ 100,113 ~ 130,

136 ~ 174,177 ~ 190,229 ~ 236,241 ~ 253,270 ~ 278, 286 ~ 292,303 ~ 308,316 ~ 328,331 ~ 360 区域抗原指数显著(图 6).

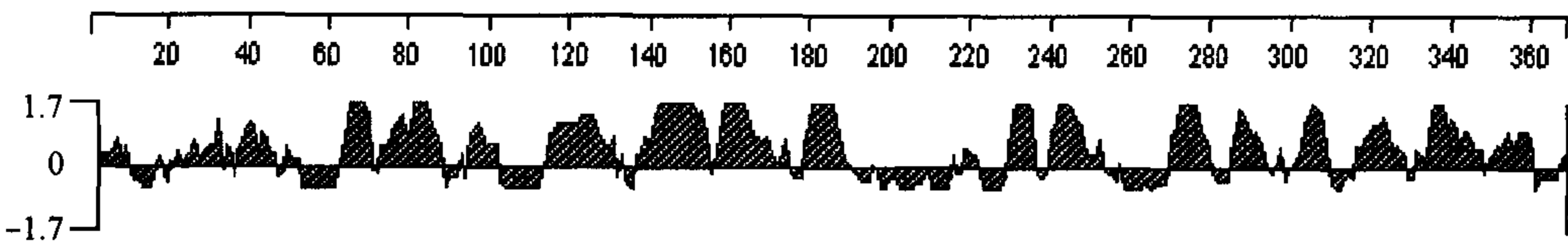


图 6 σ B 蛋白抗原表位的预测性分析

Fig. 6 Analysis of antigenic index of protein σ B

综合预测结果, σ B 蛋白在 62~86,117~123,141~163,179~186,270~275,287~289,343~345 区域有较好的亲水性、表面可能性和较高的抗原指数,并在二级结构上含有易形成抗原表位的无规则卷曲和 β -转角,因此 B 细胞表位可能在这些区域内或附近。

3 讨论

禽呼肠孤病毒能感染多种禽鸟,包括鸡、鸭、鸽、鹅、鸚鵡和其他野鸟。本研究根据 GenBank 上发表的鸡、番鸭、鹅呼肠孤病毒的 S2、S3 基因序列,设计引物,从北京鸭病料中扩增得到 S2、S3 基因片段。

以生物信息学为基础的 B 细胞表位预测是近年来建立起来的一种较先进的抗原表位研究方法。应用生物信息学技术和分子生物学软件对 σ A、 σ B 蛋白质的二级结构和 B 细胞抗原表位进行预测分析,结果表明 σ A 蛋白在 32~37,56~61,82~85,107~116,128~141,202~207,239~246,256~260,274~280,312~317,381~391 区域,而 σ B 蛋白在 62~86,117~123,141~163,179~186,270~275,287~289,343~345 区域有较好的亲水性、表面可能性和较高的抗原指数。在二级结构上两者均含有易形成抗原表位的无规则卷曲和 β -转角,因此 B 细胞表位可能在这些区域内或附近。另外对本分离株蛋白的氨基酸组成与 α -螺旋的形成关系上研究发现 σ A 蛋白中 Pro 出现的频率是 6.97%,Gly 出现的频率是 6.49%, σ B 蛋白中 Pro 出现的频率是 5.18%,Gly 出现的频率是 7.80%。另外,如果肽链中酸性或碱性氨基酸集中在某些区域,由于同电相斥,也不利于螺旋的形成。由于 σ A、 σ B 蛋白中酸、碱性氨基酸是随机分布的,没有相对集中的区域,因而有利于 α -螺旋的形成。

现有的禽呼肠孤病毒疫苗有活病毒疫苗、灭活疫苗、完全减毒疫苗等。各类疫苗都有各自的优点,但也存在着散毒、对雏鸡毒力强或干扰马立克疫苗效果的缺点^[10]。而基因工程疫苗可有效避免上述疫苗的缺点,并且同时具备活疫苗和死疫苗的优点,对载体病毒或细菌以及插入基因相关病毒的侵染均有保护力。那么预测或者筛选有针对性的抗原表位对基因工程疫苗研制就尤为重要。

禽呼肠孤病毒 S2 基因编码 σ A 蛋白,是病毒内壳的重要组成部分^[11]。而 S3 基因编码 σ B 蛋白,该蛋白是病毒的外壳蛋白之一,携带有群特异性中和抗原决定簇^[12]。

因此笔者对北京鸭呼肠孤病毒分离株 DRV-GZ 株的 σ A、 σ B 蛋白的二级结构和 B 细胞抗原表位的预测,为今后进一步研究该病毒的基因工程疫苗奠定了基础。

参考文献:

- [1] ROBERTSON M D, WILCOX G E. Avian reovirus [J]. Vet Bull, 1986, 56(1): 160-174.
- [2] VAN DER HEIDE L. The history of avian reovirus [J]. Avian Dis, 2000, 44(3): 638-641.
- [3] HEFFELS R U, MÜLLER H, KALETA E F, et al. Structural and biological characteristics of reoviruses isolated from Muscovy ducks (*Cairina moschata*) [J]. Avian Pathol, 1992, 21(3): 481-491.
- [4] DOCHERTY D E, CONVERSE K A, HANSEN W R, et al. American woodcock (*Scolopax minor*) mortality associated with a reovirus [J]. Avi Dis, 1994, 38(4): 899-904.
- [5] TUULA H J, CHRISTIAN F, MIKAEL K, et al. Isolation and characterization of a reovirus from common eiders (*Somateria mollissima*) from Finland [J]. Avi Dis, 2002, 46(2): 478-484.
- [6] 刘红, 吴志新, 郁宏伟, 等. 一种新病毒性鸭病的初步研究 [J]. 养禽与禽病防治, 2007(6): 2-4.
- [7] KYTE J, DOOLITTLE R F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein [J]. J Mol Biol, 1982, 157(1): 105-132.
- [8] EMINI E A, HUGHES J, PERLOW D, et al. Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide [J]. J Virol, 1985, 55(3): 836-839.
- [9] JAMESON B A, WOLF H. The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants [J]. CABIOS, 1988, 4(1): 181-186.
- [10] 张云, 郝雪, 耿宏伟, 等. 禽呼肠孤病毒 99G 株 σ B 编码基因的克隆及其在大肠杆菌中的高效表达 [J]. 中国兽医科学, 2008(5): 2-4.
- [11] TOURÍS-OTERO F, MARTÍNEZ-COSTAS J, VAKHARIA H, et al. Characterization of the nucleic acid-binding activity of the avian reovirus nonstructural protein σ NS [J]. Gen Virol, 2005, 86(4): 1159-1169.
- [12] LIU Hung-jin, LEE Long-huw, HSU Hsiao-wei, et al. Molecular evolution of avian reovirus: evidence for genetic diversity and reassortment of the S-class genome segment and multiple cocirculating lineages [J]. Virology, 2003, 314(1): 334-336.

【责任编辑 柴 焰】