

DOI:10.13350/j.cjpb.231211

• 论著 •

细粒棘球绦虫 EgG1Y162 新型多表位疫苗的设计 及其免疫特性研究^{*}

张涛¹, 郭久鹏¹, 魏来¹, 热甫克提·艾尼瓦尔¹, 努尔阿米乃姆·库杜斯¹, 于明凯², 李玉娇^{3**}

(1. 新疆医科大学第一临床学院, 新疆乌鲁木齐 830011; 2. 新疆医科大学基础医学院; 3. 新疆医科大学第一附属医院)

【摘要】 目的 应用软件和在线网络分析 EgG1Y162 的氨基酸序列, 了解其理化性质及二、三级结构特点; 预测该抗原的 T、B 细胞表位, 筛选优势表位并将其与热休克蛋白 HSP70 进行联合重组表达, 验证该新型多表位疫苗刺激机体产生的免疫反应。 **方法** 通过 NCBI 检索获取 EgG1Y162 和 HSP70 的氨基酸序列, 利用 ProtParam、NetPhos、TMHMM-2.0 等在线程序分析 EgG1Y162 蛋白的分子质量、等电点、氨基酸组成、跨膜结构域、磷酸化位点, 预测其二、三级结构及 T、B 细胞表位。结合预测结果优化确定最终的表位信息, 将优化的优势表位信息与 HSP70 分子对接, 构建重组 HSP70-EgG1Y162, 通过酶联免疫斑点试验 (ELISPOT) 检测对比分析 HSP70 蛋白、EgG1Y162 和 HSP70-EgG1Y162 诱导产生的免疫反应强度。 **结果** 预测 EgG1Y162 蛋白由 120 aa 组成, HSP70 由 762 aa 组成。在线分析 EgG1Y162 蛋白的二级结构中 α -螺旋约占 22.50%, 延长链约占 28.33%, β -转角约占 6.67%, 无规则卷曲约占 42.50%。筛选 EgG1Y162 抗原的优势 T、B 细胞表位, 然后以 HSP70 蛋白为载体与 EgG1Y162 抗原 T-B 细胞联合表位及连接蛋白 Linker-GGGS 构建 HSP70-EgG1Y162 多表位疫苗, 免疫小鼠后取脾细胞进行 ELISPOT 检测, 反应斑点的灰度值较对照组显著增高, 即 HSP70-EgG1Y162 具有免疫原性。 **结论** 生物信息学方法分析预测细粒棘球绦虫 EgG1Y162 蛋白含有丰富的 T、B 细胞表位, 筛选的优势表位与热休克蛋白 HSP70 融合后能够增强该新型包虫多表位抗原的免疫原性, ELISPOT 证实以 HSP70 蛋白和 EgG1Y162 构建的 HSP70-EgG1Y162 多表位疫苗免疫原性增强, 该设计方法有望成为设计优势疫苗的一种新方法, 为包虫病的预防提供新思路。

【关键词】 EgG1Y162; T 细胞表位; B 细胞表位; 分子对接

【中图分类号】 R383.33

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)12-1424-06

[Journal of Pathogen Biology. 2023 Dec;18(12):1424-1429,1433.]

Design and immune characteristics of a novel multi epitope vaccine against *Echinococcus granulosus* EgG1Y162

ZHANG Tao¹, GUO Jiupeng¹, WEI Lai¹, REFUKETI · ainiwaer¹, NUERAMINAIMU Kudusi¹, YU Mingkai², LI Yujiao³ (1. The First Clinical College, Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830011, China; 2. Basic Medical College; 3. First Affiliated Hospital)***

【Abstract】 Objective The purpose of this study is to analyze the amino acid sequence of the EgG1Y162 protein in order to understand its physicochemical properties and secondary and tertiary structure characteristics. Additionally, we aim to predict the T and B cell epitopes of this antigen, screen for dominant epitopes, and construct a recombinant vaccine by combining these epitopes with the heat shock protein HSP70. This will allow us to validate the immune response generated by this novel multi-epitope vaccine. **Methods** We obtained the amino acid sequences of EgG1Y162 and HSP70 from the NCBI database. We used online programs such as ProtParam, NetPhos, and TMHMM-2.0 to analyze various properties of the EgG1Y162 protein, including its molecular weight, isoelectric point, amino acid composition, transmembrane domains, and phosphorylation sites. We also predicted the secondary and tertiary structures, as well as the T and B cell epitopes of EgG1Y162. Based on our predictions, we determined the optimal epitope information and docked the optimized dominant epitopes with the HSP70 molecule to construct a recombinant HSP70-EgG1Y162 vaccine. We compared and analyzed the immune response intensities induced by HSP70 protein, EgG1Y162, and HSP70-EgG1Y162 using the enzyme-linked immunospot assay (ELISPOT). **Results** We found that EgG1Y162 is composed of 120 amino acids, while HSP70 is composed of 762 amino acids. The online analysis of the secondary structure of EgG1Y162 protein

* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(32160182);新疆维吾尔自治区科学技术厅杰出青年项目(2022D01E69),新疆医科大学大学生创新训练计划项目(CX2021009);新疆医科大学第一附属医院优秀青年人才培养专项

** **【通讯作者】** 李玉娇, E-mail: liyujiao1987@sina.com

【作者简介】 张涛(2002-),男,新疆人,本科在读。研究方向:寄生虫免疫。E-mail:2816867877@qq.com

showed that approximately 22.50% were α -helices, approximately 28.33% were extended chains, approximately 6.67% were β -turns, and approximately 42.50% were irregular coils. We screened the dominant T and B cell epitopes of the EgG1Y162 antigen and used the HSP70 protein as a carrier to construct the HSP70-EgG1Y162 multi-epitope vaccine by combining the T-B cell epitopes of the EgG1Y162 antigen and a connecting protein linker-GGGS. ELISPOT analysis of spleen cells from immunized mice showed a significant increase in the grayscale value of the reaction spots compared to the control group, indicating the immunogenicity of HSP70-EgG1Y162. **Conclusion** Through the use of bioinformatics methods, we analyzed and predicted that the EgG1Y162 protein of *Echinococcus granulosus* contains abundant T and B cell epitopes. By fusing the screened dominant epitopes with the heat shock protein HSP70, we were able to enhance the immunogenicity of this novel multi-epitope antigen against cystic echinococcosis. The ELISPOT analysis confirmed that the HSP70-EgG1Y162 multi-epitope vaccine constructed using HSP70 protein and EgG1Y162 exhibits increased immunogenicity. This design method shows promise as a new approach to designing superior vaccines and provides new insights into the prevention of cystic echinococcosis.

【Key words】 EgG1Y162; T cell epitope; B cell epitope; molecular docking

包虫病又称为棘球蚴病,其中细粒棘球蚴病是由细粒棘球绦虫(*Echinococcus granulosus*, Eg)通过粪-口途径为主感染宿主,寄生在人体、畜体组织所导致的人兽共患慢性寄生虫病,犬、狐、狼、豺等野生食肉动物都可为其终末宿主^[1]。我国有细粒棘球蚴病分布,偏远农牧地区为主要流行区,如甘肃、宁夏、青海、新疆北部、内蒙、四川西部等主畜牧地区^[2]。

目前,表位疫苗的研究在抗细菌、病毒感染和抗肿瘤等领域取得重大进展,在寄生虫疫苗的研究中也取得了突破性的进展。表位疫苗具有诸多优点,如可靠性高、安全性稳定、无毒、分子结构简单等,而且可以通过直接刺激机体产生特异性免疫,不易产生自身免疫抑制或免疫反应^[3]。利用包虫抗原进行多表位疫苗的构建,有利于充分发挥原有的免疫效应。当寄生虫感染宿主时,机体会处在一个应激状态。由于热休克蛋白拥有高度保守性,寄生虫热休克蛋白与宿主体内热休克蛋白的部分基因序列同源,因此寄生虫可能逃脱宿主机体的免疫防御机制,助力寄生虫快速适应机体环境,从而促进寄生虫虫体的分化过程,增强对宿主机体产生的危害。除此之外,宿主和寄生虫的热休克蛋白部分基因序列也有差别,这种差别可引起宿主对寄生虫热休克蛋白的免疫应答。因此,热休克蛋白作为主要的抗原蛋白能够使机体产生抗虫体热休克蛋白的抗体,从而达到免疫并杀伤寄生虫的作用效果^[4]。樊新丽等^[5]将 HSP70(Heat Shock Protein70)作为模拟蛋白观察了棘球蚴病患者自身抗原同源的包虫抗原的免疫活性,结果表明 HSP70 在部分包虫病患者体内参与了免疫反应的发生,即具有免疫原性,同时也证实该蛋白诱导产生的抗体不会与患者自身的 HSP70 起免疫反应。以上结果表明 HSP70 可辅佐抗原提呈细胞加工提呈抗原,参与自身免疫以及免疫细胞的发育、分化和激活。

借助 HSP70 的免疫原性,叠加 EgG1Y162 抗原

优势表位,进行重组蛋白以增强其免疫原性,观察重组蛋白刺激机体产生的免疫效果,以此利用 HSP70-EgG1Y162 重组疫苗预防棘球蚴病的发生。

材料与方法

1 EgG1Y162 的氨基酸序列

利用 NCBI (GenBank: AB458259)^[6] (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) 的在线数据库获取细粒棘球绦虫 EgG1Y162 蛋白的氨基酸序列^[7]和热休克蛋白 HSP70 序列。其中 EgG1Y162 氨基酸序列(GenBank 登录号: AB458259)全长 120 个氨基酸: VDPELMAKLTKELKTTLPEHFRWIHVGSRSLEL GWNATGLANLHADHIKLTANLYTTYVTFKYR NVPIERQKLTLEGLKPSTFYEVVVQAFKGGSQV FKYTGFIRTLAPGEDGADRASGF。HSP70 蛋白序列(GenBank 登录号: GQ375900.1)全长 762 个氨基酸 ATGACGGCGTTGATAAAGCGGAATACGAC GATTCCGACGAAGCAGACGCAGACGTTTCACGACGTATTCGGACAATCAGCCGTGTGTGTTGATC CAGGTGTACGAGGGTGAGCGTGCGATGGCGC GCGACAACAATTTGTCTGGGGAAGTTTGAGTT GTCGGGTATCCCACCGGCGCCACGTGGTGTGC CTCAGATAGAGGTGACATTCGACATAGACGCC AACGGCATCTGAATGTGTCTGGCGGTGGACAA GTCGACGGGTAAGCAGAACAAAGATAACCATA ACGAACGACAAGGGTTCGTTTGTCTGAAGGAGG AGATAGAGCGGATGGTGAACGACGCGGAGAA GTTCAAGCAGGAGGATGAGAAGCAGAGAGAT CGGGTGGCGGCGAAGAATGGATTGGAGAGTTA TGCGTTCACATGAAGTCGACGGTGGAGGATG AGAAGGTGAAGGAGAAGATAGGAGAGTCGGA TCGGAGGAGGATAATGGAGAAGTGTGAGGAG ACGGTAAAGTGGTTGGATGGCAATCAGCAGG

CGGAGAAGGAGGAGTACGAGCACAGACAGAA
GGAGTTGGAGAGTGTGTGCAACCCATAATCG
CGAAGATGTACCAGGAGGCAGGTGGTGTGGGT
GGAATGCCGGGTGGCATGCCGGGAGGTGGAAT
GCCGGGTGGCATGCCAGGAGGTGGAATGCCAG
GCGGCATGGCTGGTGGTATGAGTGGTGTATGCA
AGCTCTGGAGGCCGTGGTCCCACCATTGAAGAG
GTGGAC。

2 EgG1Y162 蛋白的生物信息学分析

2.1 理化性质预测 使用在线软件 ProtParam (<http://web.expasy.org/ProtParam/>) 分析 EgG1Y162 的理化性质参数^[8], 包括原子组成、分子质量、氨基酸组成、理论等电点(pI)、带电极性、稳定性、疏水性等。

2.2 跨膜结构域和信号肽预测 使用在线服务器 TMHMM-2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 和 SignalP-5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-5.0/>) 分别对 EgG1Y162 蛋白跨膜结构域和信号肽进行预测分析。

2.3 磷酸化位点预测 使用在线服务器 NetPhos3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 分析蛋白 EgG1Y162 的磷酸化位点。

2.4 二级结构预测 使用软件 SOPMA (https://npsaprabhi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 分析 EgG1Y162 蛋白的二级结构, 预测结果包括 α 螺旋、 β 折叠、无规则卷曲、延伸链。

2.5 三级结构预测 使用在线软件 SWISS MODEL (<https://www.swissmodel.expasy.org/interactive>) 找到和 EgG1Y162 蛋白的高同源性模型并进行准确预测^[9], 同时使用 DS 软件查看三级结构, 绘制 Ramachandran plot (拉式图) 用于描述蛋白质结构中氨基酸残基二面角 ψ 和 φ 是否在合理区域, 同时也可反映出该蛋白质的构象合理与否。

2.6 T、B 细胞表位预测及鉴定 使用在线软件 IEDB (<http://tools.iedb.org/main/tcell/>) 分析 EgG1Y162 蛋白的 T 细胞表位并筛选出优势表位氨基酸片段序列^[10]。HLA-DRB1 * 0701 是我国新疆地区的高频 HLA 等位基因, 因此选择 HLA-DRB1 * 0701 进行 EgG1Y162 蛋白的 T 细胞表位预测^[11]。利用在线软件 IEDB (<http://tools.iedb.org/main/bcell/>) 分析筛选优势 B 细胞表位及氨基酸片段序列。最后确定优势表位。

3 分子对接

从 PDB 蛋白结构数据库 (<https://www.rcsb.org/structure/6BIV>) 获取 HLA-DRB1 分子的蛋白晶体结构, 其 ID 编号是 6BIV。使用 Discover studio 结构编辑软件去除隐含的氢分子和水分子, 得到 HLA-

DRB1 的单体结构, 将其用于与 CD4⁺ T 细胞表位肽的分子对接 (molecular docking, MD)。使用在线服务器 LZerD Web Server (<https://lzerd.kiharalab.org/upload/upload/>) 进行了分子对接, HLA-DRB1 被定义为受体, 5 个 CD4⁺ T 细胞表位肽被定义为配体, 最后输出 5 个表位肽 HLA-DRB1 对接复合体, 选择最佳的对接结果进行多表位疫苗构建。

4 多表位疫苗的构建

将 HSP70 和 EgG1Y162 的 CD4⁺ T 细胞表位和 B 细胞表位通过 Linker 逐个连接后筛选出两个优化的 CD4⁺ T 细胞表位以增大免疫原性而达到刺激机体产生最强的免疫系统应答。最后将热休克蛋白 HSP70 通过 Linker-GGGS 与 CD4⁺ T 表位和 B 细胞表位构建形成 HSP70-EgG1Y162。

结 果

1 EgG1Y162 蛋白的理化性质

预测 EgG1Y162 的原子总数为 1918, 氨基酸数 120 个, 分子质量 13.51549ku, 理论 pI 值为 9.22。其中, 带负电荷残基的总数 (Asp+Glu) 为 12 个, 带正电荷的残基总数 (Arg+Lys) 15 个。蛋白的不稳定性指数 (II) 为 29.98 (当 ≤ 40 时, 蛋白质是稳定的), 为稳定蛋白质; 脂肪族指数为 85.33, 亲水性总均值为 -0.263, 属于亲水性蛋白。

2 EgG1Y162 蛋白的跨膜结构域和信号肽

跨膜结构域和信号肽预测显示, EgG1Y162 蛋白序列长度为 120 aa, 跨膜螺旋氨基酸残基数量的期望值为 0.0115, 跨膜螺旋数量为 0, 位于膜细胞质侧的总概率为 0.09875, 蛋白质前 60 个氨基酸中跨膜螺旋的氨基酸数量期望值为 0.00899。

3 EgG1Y162 蛋白的磷酸化位点

在线服务器 NetPhos3.1 分析显示, EgG1Y162 具有 5 个丝氨酸和 12 个苏氨酸和 5 个酪氨酸磷酸化位点, 该蛋白的主要磷酸化位点是蛋白激酶 C (PKC) 和蛋白激酶 A (PKA) (图 1)。

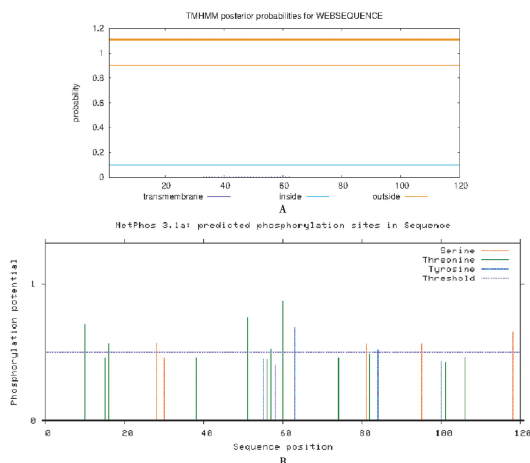
4 EgG1Y162 蛋白的二级结构

在线软件 SOPMA 分析显示, EgG1Y162 蛋白的二级结构中 α 螺旋占 22.5%, 延伸链占 28.33%, β 折叠占 6.67%, 无规则卷曲占 42.50% (图 2)。

5 EgG1Y162 蛋白的三级结构

运用在线软件 Swiss-Model 的同源性模型构建蛋白质的三级结构, 结果如图 3A, 可清晰判断出 EgG1Y162 蛋白构象的合理性。其中绿色区域表示其合理性区域, 点状表示氨基酸且所包含于绿色区域即为合理。实际模型表示为一颗红星, Normalized QMEAN4 Score 介于 0.5~1 之间表明其预期质量较

好。QMEANDisCo Global 为 0.64 ± 0.09 <https://swissmodel.expasy.org/docs/help-qmean>, 而 GMQE 和 QMEANDisCo global 给出了 0 到 1 之间的整体模型质量测量值, 数字越高表示预期质量越高。QMEAN4 评估待测蛋白和模板蛋白的匹配度, 数值越大表示匹配越好。用绘制的拉氏图评估蛋白二级结构的合理性, 结果如图 3B, 可见该蛋白质的预期分析结果质量良好, 可以确认为良好的优势抗原。图 3C 的 X 轴代表蛋白质结构的长度, Y 轴则是这些特性的计分, 图中的每一个点都代表 PDB 数据库的一个结构, 而红星就是我们的模型, 最深色的部分代表了 Z-Score 的绝对值小于 1 的结构表明模型可靠, 可以理解正态分布中平均值的一个标准差之内, GMQE 和 QMEANDisCo global 给出了 0 到 1 之间的整体模型质量测量值, 数字越高表示预期质量越高。试验结果 EgG1Y162 蛋白 PDB 结构与非冗余集比较 QMEANDisCo Global: 0.64 ± 0.09 , 位于标准差之内, 表明该模型可靠。图 3DEgG1Y162 蛋白蛋白局部质量评估链 A, X 轴代表蛋白质结构的长度, Y 轴代表模型的可靠性, 如果该值小于 4, 说明该模型的质量可靠性较差, 但试验结果表明该模型质量可靠, 匹配程度较好。



Transmembrane:跨膜结构域, inside:膜内, outside:膜外, Sequence position:序列位置, Serine:丝氨酸, Threonine:苏氨酸, Tyrosine:酪氨酸, Threshold:阈值、临界点 A 网页序列(EgG1Y162 氨基酸序列)的 TMHMM 验后概率 B NetPhos 3.1a:序列中预测的磷酸化位点

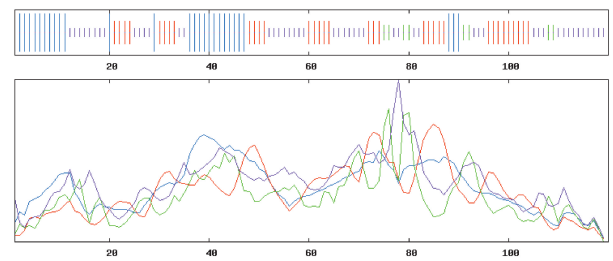
图 1 EgG1Y162 蛋白的磷酸化位点预测

A TMHMM posterior probabilities for WEBSEQUENCE B NetPhos 3.1a: predicted phosphorylation sites in Sequence

Fig. 1 Phosphorylation site prediction of the EgG1Y162 proteins

6 EgG1Y162 T 细胞表位

利用在线软件 IEDB 分析 EgG1Y162 的 T 细胞表位。Select length(s) 筛选长度为 15, 参数选择 HLA-DRB1 * 0701 进行筛选并由此其确定优势 T 细胞表位, 结果见表 1, 表位图见图 4。

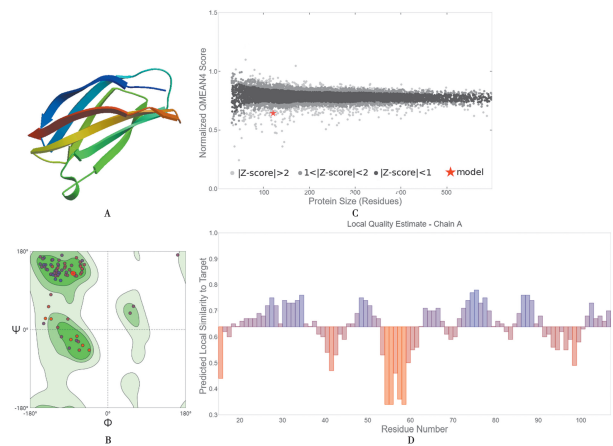


注: 蓝色为 α 螺旋; 紫色为无规则卷曲; 红色为延伸链; 绿色为 β 折叠。

图 2 EgG1Y162 蛋白的二级结构预测

Note: Blue is α helix; purple is irregular coil; red is extended chain; green is β fold.

Fig. 2 Secondary structure prediction of the EgG1Y162 protein



A EgG1Y162 蛋白三维模式图 B EgG1Y162 蛋白拉式图 C EgG1Y162 蛋白的 PDB 结构与非冗余集比较 D EgG1Y162 蛋白的局部质量评估链 A

图 3 EgG1Y162 蛋白三级结构预测

(QMEANDisCo Global: 0.64 ± 0.090)

A A three D pattern diagram of the EgG1Y162 protein B The ramachandran plot of the EgG1Y162 protein C EgG1Y162 protein: Comparison with Non-redundant Set of PDB Structures D EgG1Y162protein: Local Quality Estimate-Chain A.

Fig. 3 The EgG1Y162 protein tertiary structure prediction (QMEANDisCo Global: 0.64 ± 0.090)

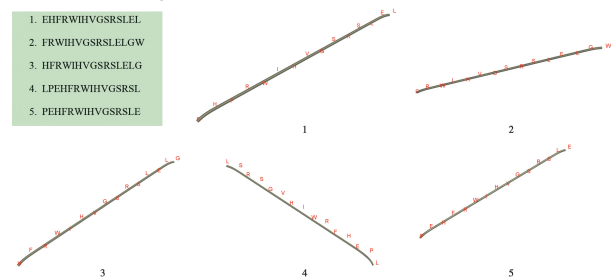


图 4 Linear epitope prediction of CD4⁺ T cells

Fig. 4 Linear epitope prediction of CD4⁺ T cells

7 EgG1Y162B 细胞表位

通过在线软件 IEDB 分析 EgG1Y162 的 B 细胞表位, 分别位于 14-28 位氨基酸 (序列为 KTTLP EHFWRHVGSRSL, 长度为 15)、38-43 位氨基酸 (序列为 TGLANL, 长度为 6)、55-75 位氨基酸 (序列为 YTTYVTFKYRNP IERQKLTL, 长度为 21) 和

105-107 位氨基酸(序列为 RTLAPGEDGADRA, 长度为 13)(图 5)。具体分析结果见图 7, 黄色区域即为 B

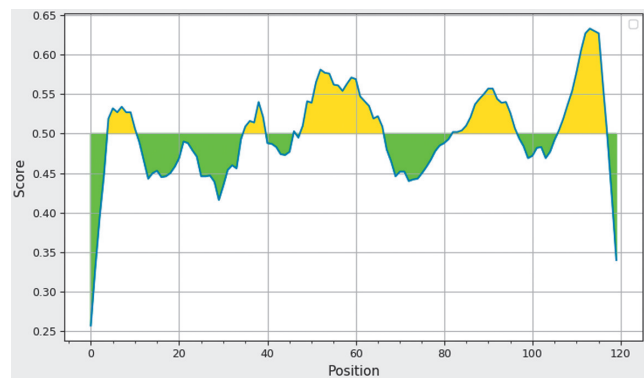
细胞表位。曲线峰值越高即易形成 B 细胞表位。

表 1 EgG1Y162 蛋白 T 细胞表位预测
Table 1 EgG1Y162 protein T cell epitope prediction

Allele 等位基因	#	Start 开始	End 结束	Length 长度	Method used 使用方法	Peptide 基因序列	Percentile Rank 百分数	Adjusted rank 调整后排名
HLA-DRB1 * 07:01	1	19	33	15	Consensus (comb. lib. / smm/nn)	EHFRWIHVGSRSLEL	0.64	0.64
HLA-DRB1 * 07:01	1	21	35	15	Consensus (comb. lib. / smm/nn)	FRWIHVGSRSLELGW	0.70	0.70
HLA-DRB1 * 07:01	1	20	34	15	Consensus (comb. lib. / smm/nn)	HFRWIHVGSRSLELG	0.70	0.70
HLA-DRB1 * 07:01	1	17	31	15	Consensus (comb. lib. / smm/nn)	LPEHFRWIHVGSRSLE	0.76	0.76
HLA-DRB1 * 07:01	1	18	32	15	Consensus (comb. lib. / smm/nn)	PEHFRWIHVGSRSLE	0.88	0.88

注:低调整排名=良好的粘合剂

Notice: Low adjusted-rank = good binders.



注:中心位置:4; 阈值:0.500; 平均值:0.499; 最小值:0.252; 最大值:0.650

图 5 EgG1Y162 B 细胞表位可行性区域

Notes: Center position: 4; Threshold: 0.500; Average: 0.499; Minimum: 0.252; Maximum: 0.650

Fig. 5 Map of the feasibility region of the EgG1Y162 B cell epitope

8 分子对接

选择 $CD4^+$ T 细胞表位与 HLA-DRB1 通过 LZerD Web Server 软件进行分子对接, 参与对接的 $CD4^+$ T 细胞表位包括 EgG1Y162 的 19-33、21-35、20-34、17-31 和 18-32 位氨基酸, 最后输出 5 个表位肽-HLA-DRB1 对接复合体(图 6)。

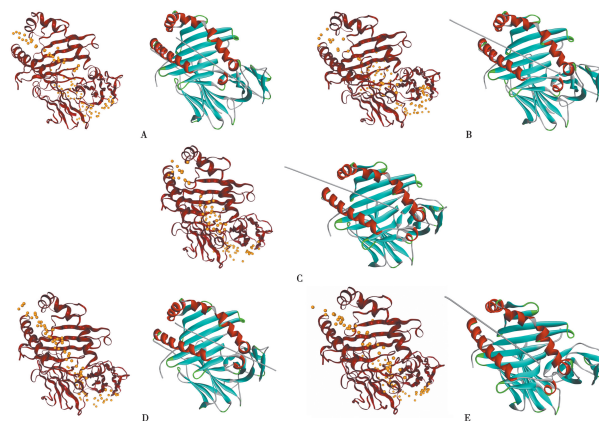
9 多表位疫苗的构建

成功通过多参数筛选出的 EgG1Y162 抗原的 T 细胞表位和 B 细胞的表位预测结果, 以 HSP70 蛋白为载体与 EgG1Y162 抗原 T-B 细胞联合表位通过连接蛋白 Linker-GGGS 进行连接, 并成功构建出 HSP70-EgG1Y162 多表位疫苗。

10 HSP70-EgG1Y162 疫苗诱导的特异性细胞免疫应答

两组小鼠完成 4 次免疫后的第二周, 获取小鼠的脾脏淋巴细胞用 HSP70-EgG1Y162 和 pET30a-EgG1Y162 进行抗原特异性刺激, ELISPOT 实验结果(图 7)显示 HSP70-EgG162 疫苗与刺激免疫小鼠的脾淋巴细胞产生较强的反应且显著高于阴性对照组和

pET30a-EgG1Y162 疫苗组, 统计学分析 $P < 0.01$, 验证了 HSP70-EgG1Y162 多表位疫苗的免疫原性在表位的构建中得到增强。



A 19-33 位氨基酸与 HLA-DRB1 分子的分子对接图 B 21-35 位氨基酸与 HLA-DRB1 分子的分子对接图 C 20-34 位氨基酸与 HLA-DRB1 分子的分子对接图 D 17-31 位氨基酸与 HLA-DRB1 分子的分子对接图 E 18-32 位氨基酸与 HLA-DRB1 分子的分子对接图

图 6 $CD4^+$ T 细胞表位与 HLA-DRB1 的分子对接

A Molecular docking of amino acids positions 19-33 to the HLA-DRB1 molecule Fig. B Molecular docking of amino acids 21-35 to the HLA-DRB1 molecule Fig. C Molecular docking of amino acids at positions 20-34 to the HLA-DRB1 molecule Fig. D Molecular docking of amino acids at positions 17-31 to the HLA-DRB1 molecule Fig. E Molecular docking of amino acids at positions 18-32 to HLA-DRB1 molecule Fig.

Fig. 6 Molecular docking of the $CD4^+$ T cell epitope to HLA-DRB1

讨论

包虫病主要通过外科手术进行治疗, 虽然可行性较高, 但是创伤较大, 而且后期还存在复发的可能, 所以包虫病应以预防为主, 其中多价复合疫苗的研究及应用倍受关注[12], 免疫信息学的运用以及表位预测也是近几年的研究热点[13]。本研究通过生信学方法分析将表位进行筛选优化, 构建联合表位以达到提高免疫原性的作用。表位疫苗的研究也是目前分子疫苗研究的热点[14], 利用 HSP70 的免疫原性与 T-B 细胞联合表位对接构建 HSP70-EgG1Y162 重组疫苗, 通

过机体识别抗原,能够成功诱导产生细胞免疫^[15]。

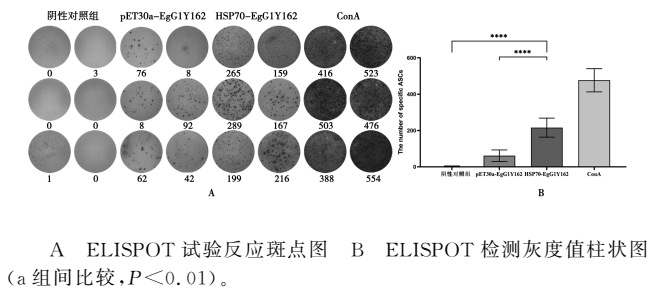


图 7 ELISPOT 检测免疫前后的 B 细胞反应性
A The representative ELISPOT plot of specific B-cell response
B ELISPOT Bar graph of detecting gray-scale values(A Comparison between the groups, $P < 0.01$).

Fig. 7 ELISPOT B cell reactivity before and after immunization

前期针对 Hsp70 的研究发现它与多条信号通路关联,参与到了大量生命活动中。其最主要的功能是发挥分子伴侣的作用,在蛋白质的折叠、修饰和转运过程中都发挥重要功能^[16]。EgHsp70 作为特异虫源性蛋白,本身即可作为抗原诱导机体产生免疫应答,生成大量的抗体,本研究选用该抗原作为骨架将 EgG1Y162 优势表位构建在其之上,旨在进一步增强进入机体抗原的免疫原性,这一创新工作对构建包虫表位疫苗具有重要意义,将会使包虫疫苗的免疫原性增强,用该疫苗进行免疫预防,不仅会减少包虫宿主的感染率,还会减轻包虫感染的症状。

对于细粒棘球蚴病,细胞免疫具有重要作用^[17]。本研究采用 T 细胞表位和 B 细胞表位联合的方法,使目的蛋白即 T-B 细胞联合表位具有更强的免疫反应性。生物信息学分析表明 EgG1Y162 理化性质稳定,不含跨膜结构域,这可能有助于抗原提呈细胞、效应 T 细胞和 B 细胞的充分接触,引起强烈的免疫反应。SignalP-5.0 分析显示, EgG1Y162 无信号肽,因此可以使用整个氨基酸序列对表位进行预测。蛋白质磷酸化位点分析显示 EgG1Y162 含有 5 个丝氨酸和 12 个苏氨酸和 5 个酪氨酸磷酸化位点,其主要磷酸化位点为蛋白激酶 C(PKC)和蛋白激酶 A(PKA),主要用于控制和调节蛋白质的功能和活力,同时多蛋白复合体和酪氨酸磷酸化的形成组成了细胞信号转导的基本机制,而且该机制也用于激活细胞、刺激细胞生长。因此在疾病的产生和发展中酪氨酸激酶和蛋白质酪氨酸磷酸化也起到至关重要的作用。

采用在线软件 SOPMA 分析 EgG1Y162 的二级结构,其中 β 折叠占 6.67%,无规则卷曲占 42.50%。这两种结构主要分布在蛋白质表面,有利于达到嵌合,形成表位的几率较大。三级结构预测中拉式图反映出该蛋白质的构象合理,表明在 EgG1Y162 的这些区域中抗原表位容易诱导产生特异性反应。为了更加确定表位的区域,利用软件 IEDB 分析 EgG1Y162 T 细胞

和 B 细胞的优势表位。

分子对接是通过优化受体化合物的位置、构象等,以寻找最佳构象,通过预测其亲和力和结合方式,最后通过预测值选择出最佳的配体。分子对接这一方法可实现基于蛋白结构进行药物设计,其主要优势在于可从整体上考虑分子对接的效果,能够较好地减少局部作用以及整体结合欠佳的状况。

HLA-DRB1 分子与 $CD4^+$ Tcell 表位结合的姿态,较小的 Ranksum Score 值表明分子匹配最佳,最后筛选的 $CD4^+$ T 表位为 B/C/D。综合 EgG1Y162 抗原表位的预测结果,重组构建以 HSP70 为载体与 EgG1Y162 抗原 T-B 细胞联合表位进行蛋白重组,构建形成 HSP70-EgG1Y162,以达到增强其免疫原性的作用。

通过 ELISPOT 检测免疫前后的 B 细胞反应性,验证了 HSP70-EgG1Y162 多表位疫苗的免疫原性, HSP70-EgG1Y162 疫苗与免疫小鼠的脾淋巴细胞产生较强的反应,反应斑点的灰度值显著高于阴性对照组,且 HSP70-EgG1Y162 的反应原性高于 pET30a-EgG1Y162 疫苗,表明 HSP70-EgG1Y162 多表位疫苗的免疫原性增强。

研究表明,经生物信息学分析并进行序列优化后将细粒棘球蚴 EgG1Y162 抗原与 HSP70 重组构建多表位疫苗,能提高其在体外的诱导表达,具有良好的免疫应答效应^[18],这为优质疫苗的研制以及包虫病的防控奠定了一定基础,为多价表位疫苗的研究提供了新思路。

【参考文献】

- [1] 刘光辉,杨金煜,唐明杰.人肝细粒棘球蚴致病的研究进展[J]. 中国人兽共患病学报,2021,37(2):165-170.
- [2] 李涛,王翔,张伟,等.脑泡型棘球蚴病的诊疗研究进展[J]. 四川医学,2022,43(7):726-729.
- [3] 郑佳,张东军,赵商岐,等.基于接头序列“GSGGSG”的细粒棘球蚴病重组多表位疫苗 EgG1Y162-2(4)的制备及鉴定[J]. 中国血吸虫病防治杂志,2022,34(04):378-382+416.
- [4] 路鹏霏,田梦潇,齐洪志等.细粒棘球蚴虫表面抗原热休克蛋白抗体在免疫组化中的应用 J/OL. 中国人兽共患病学报:1-9[2023-05-18].
- [5] 樊新丽,宋瑞其,呼尔查,等.牛环形泰勒虫 HSP70 基因的克隆表达、特性分析及互作蛋白网络构建[J]. 中国畜牧兽医,2021,48(1):1-11.
- [6] Zhou Y, Zhao S, Li Y, et al. Design and functional preliminary investigation of recombinant antigen EgG1Y162-EgG1Y162 against *Echinococcus granulosus*[J]. Open Life Sci,2023,18(1): 20220558.
- [7] 李文桂,李用国.囊型棘球蚴病的免疫预防现状[J]. 临床内科杂志,2022,39(4):227-231.

- 布及药敏分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2021, 16(9): 1064-1068.
- [3] 窦维龙, 曾昊, 吴永新, 等. 2017—2018年解放军第九四六医院普外科Ⅰ类切口手术围术期预防用抗菌药物的合理性分析[J]. 现代药物与临床, 2019, 34(9): 2833-2836.
- [4] 韩建成. 普外科预防性应用抗菌药物对切口感染的临床分析[J]. 中国合理用药探索, 2017, 14(9): 64-70.
- [5] 应小俊, 孙永宁. 某医院普外科大肠埃希菌的临床分布及耐药特点[J]. 中国卫生检验杂志, 2020, 30(11): 1310-1313.
- [6] 马静宇. 手术切口分类和愈合等级界定[J]. 中国现代医生, 2008, 46(1): 145-146.
- [7] 国家抗微生物治疗指南[M]. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 2017: 1-342.
- [8] 张莺, 喻武, 程文夫, 等. 2018-2019年某院普外科术后切口感染病原学及其危险因素[J]. 中华医院感染学杂志, 2021, 31(16): 2477-2480.
- [9] 王甜甜, 杨小华. PDCA循环在规范妇科Ⅰ类切口手术预防使用抗菌药物中的应用[J]. 山西医药杂志, 2022, 51(17): 2002-2004.
- [10] 崔朴梅, 陈太方, 陈超, 等. 云南某医院2016年至2019年抗菌药物使用与常见细菌耐药性的相关性分析[J]. 昆明医科大学学报, 2021, 42(11): 140-147.
- [11] 宋勤, 包芳芳, 金妙景, 等. 以麻醉药房为载体的预防用抗菌药物信息化管理平台的构建和应用[J]. 中华医院感染学杂志, 2021, 31(24): 3822-3826.
- [12] 陈猛, 舒志兵, 周月红. 某“三甲”综合性医院腹腔镜手术围术期抗菌药物预防使用情况调查及合理性评价[J]. 中国药房, 2018, 29(8): 1065-1068.
- [13] 盛巍, 陈进好, 周洪, 等. 浙江省金华市第二医院住院患者头孢菌素类药物不合理用药情况分析及其干预[J]. 中国医药导报, 2022, 19(36): 194-196.
- [14] 王术, 郑旭婷, 田素飞, 等. 社区获得性化脓性肝脓肿的单中心回顾性临床流行病学研究[J]. 中华传染病杂志, 2020, 38(5): 288-293.
- [15] 余鲜花, 张春俏. 某三甲医院围手术期预防性使用抗菌药物调查分析[J]. 中国药物与临床, 2021, 21(9): 1473-1475.
- [16] 张小亮, 李芳斌, 袁小龙, 等. 抗菌药物联合用药增加医院感染发生风险的研究[J]. 中国消毒学杂志, 2022, 39(7): 513-517.
- [17] 周莹丽, 薛巧云, 王鹏, 等. 某三甲医院神经外科颅脑Ⅰ类切口手术部位感染分析[J]. 中国消毒学杂志, 2021, 38(08): 607-610.
- [18] 郑涛, 王革非, 顾国胜, 等. 头孢菌素联合吗啡硝唑预防肠外瘘手术部位感染的临床价值[J]. 中华消化外科杂志, 2021, 20(11): 1206-1211.
- [19] 郭琪, 陈超, 王雨. 577例Ⅱ类切口围术期预防性应用抗菌药物的合理性分析[J]. 现代药物与临床, 2020, 35(9): 1914-1918.
- [20] 周晓丽, 王江华, 尹东锋. 上尿路结石腔内碎石术术前及围术期抗菌药物临床应用评价标准的建立与应用[J]. 中国药师, 2021, 24(5): 893-897.
- [21] 任林, 宋惠珠, 黄元, 等. 路径化管控对消化内科抗菌药物使用的干预成效[J]. 中国药物应用与监测, 2022, 19(5): 339-343.
- [22] 高一强, 魏俊吉, 张波, 等. 临床药师在神经外科开展抗菌药物管理的效果分析[J]. 临床药物治疗杂志, 2022, 20(6): 72-75.
- [22] 董蕊, 宋智慧, 徐姗姗, 等. 慢性化脓性中耳炎围术期抗菌药物预防应用临床路径对抗菌药物合理使用的影响[J]. 实用药物与临床, 2021, 24(10): 944-946.

【收稿日期】 2023-08-14 【修回日期】 2023-10-27

(上接 1429 页)

- [8] 钱炳硕, 张婷婷, 王明霞, 等. 细粒棘球绦虫蛋白 Actin-binding LIM protein 1 的生物信息学分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2023, 18(3): 297-302.
- [9] Kong H, Zhao S, Zheng J, et al. Cloning and identification of the CTLA-4IgV gene and functional application of vaccine in Xinjiang sheep[J]. Open Life Sci, 2022, 17(1): 1555-1567.
- [10] 孙报增, 秦聪聪, 张俊琦, 等. 汉滩病毒糖蛋白 Gn 的 T 细胞表位预测及跨种属验证[J/OL]. 解放军医学杂志, 1-17[2023-05-18].
- [11] Yu MK, Zhu YJ, Li YJ, et al. Design of a novel multi-epitope vaccine against *Echinococcus granulosus* in immunoinformatics[J]. Front Immunol, 2021, 12: 668492.
- [12] 张杰, 李玉娇, 张峰波, 等. 细粒棘球绦虫多价 EgA31-EgG1Y162 抗原序列优化分析[J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(1): 19-25. DOI: 10.3969/j.issn.1000-484X.2020.01.004.
- [13] 廖鹏. 多房棘球绦虫角化蛋白鉴定、表达及组织定位研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2022.
- [14] 陈路娟, 程喆, 王彦海, 等. 多房棘球绦虫钙网蛋白的真核表达及其 T、B 细胞表位预测[J]. 中国病原生物学杂志, 2020, 15(12): 1397-1403.
- [15] 郭伟, 湛孝东, 蒋峰, 等. 杨絮热休克蛋白 70(HSP70)结构域蛋白的生物信息学分析、原核表达及生物学活性鉴定[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2021, 37(8): 710-715.
- [16] 路鹏霏. 干扰 EgHsp70、Egp38 对放射线杀伤包虫病的增敏机制研究[D]. 新疆: 新疆医科大学, 2022: 9-10.
- [17] Xu T, Liu L, Shi C, et al. A recombinant rabies virus expressing *Echinococcus granulosus* EG95 induces protective immunity in mice[J]. Transbound Emerg Dis, 2022, 69(4): e254-e266.
- [18] 赵商岐, 孔慧芳, 周彦霞, 等. 细粒棘球绦虫 EgG1Y162-2 与 CTLA-4IgV-EgG1Y162-2 蛋白结构预测及表位分析比较[J]. 中国病原生物学杂志, 2021, 16(5): 546-551.

【收稿日期】 2023-07-05 【修回日期】 2023-10-02