

DOI:10.13350/j.cjpb.230702

• 论著 •

EB病毒潜伏膜蛋白 LMP1 疫苗的预测及验证*

李昆芳¹, 张隽宁¹, 丁一¹, 公博傲¹, 王然¹, 屈艳琳^{2**}

(1. 济宁医学院基础医学院, 山东济宁 272067; 2. 济宁医学院形态学实验室)

【摘要】 **目的** 采用生物信息学方法分析 EB 病毒潜伏膜蛋白 LMP1, 为疫苗的研发提供理论依据。 **方法** 在 NCBI 数据库中获取 LMP1 蛋白的基因组序列和氨基酸序列, 采用生物信息学分析工具 ProtParam、SOPMA、SWISS-MODEL、SignalP、TMHMM、Cell-PLoc 2.0、NetNGly、NetPhos-3.1、Conserved domains、IEDB、BLAST、Immunomedicine Group、UniProt 预测 LMP1 蛋白的理化性质、二、三级结构、信号肽和跨膜区域、亚细胞定位、糖基化位点和磷酸化位点、保守结构域、B、T 细胞表位、同源性、抗原决定簇以及相互作用蛋白。构建重组质粒 LMP1-pMV261 以及重组卡介苗, 并通过检测 LMP1 分子及蛋白表达水平探究构建疫苗的基本条件。 **结果** LMP1 蛋白分子式为 $C_{1901}H_{2877}N_{493}O_{562}S_{11}$, 氨基酸数为 386, 相对分子质量为 41.98238×10^3 , 原子总数为 5 844。LMP1 蛋白为稳定亲水蛋白, 二级结构主要为无规则卷曲(Cc), 占 49.48%, 易与抗体嵌合。该蛋白无信号肽, 具有 6 个跨膜区, 亚细胞定位在宿主细胞膜, 无糖基化位点, 有 27 个磷酸化位点, 7 个相互作用蛋白。实时荧光定量 PCR 及 Western blot 检测该蛋白基因及蛋白表达均稳定。 **结论** 生物信息学分析 LMP1 蛋白为稳定亲水蛋白, 含有丰富的 B、T 细胞表位, 构建的重组卡介苗蛋白表达稳定, 可作为 EB 病毒的候选疫苗。

【关键词】 LMP1; EB 病毒; 生物信息学分析

【中图分类号】 R373

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)07-0750-09

[Journal of Pathogen Biology. 2023 Jul;18(7):750-758.]

Prediction and Verification of Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein LMP1 Vaccine

LI Kunfang¹, ZHANG Junning¹, DING Yi¹, GONG Boao¹, WANG Ran¹, QU Yanlin² (1. School of Basic Medical, Jining Medical University, Jining 272067, Shandong, China; 2. Laboratory of Morphology, Jining Medical University)***

【Abstract】 **Objective** To analyze the latent membrane protein LMP1 of Epstein-Barr virus by bioinformatics method, so as to provide theoretical basis for vaccine research and development. **Methods** The genome sequence and amino acid sequence of LMP1 protein were obtained from NCBI database. Bioinformatics analysis tools ProtParam, SOPMA, SWISS-MODEL, SignalP, TMHMM, Cell PLoc 2.0, NetNGly, NetPhos-3.1, Conserved domains, IEDB, BLAST, Immunomedicine Group and UniProt predict the physicochemical properties, secondary and tertiary structures, signal peptides and transmembrane regions, subcellular localization, glycosylation sites and phosphorylation sites, conserved domains, B and T cell epitopes, homology, antigenic determinants, and interacting proteins of LMP1 proteins. The recombinant plasmid LMP1-PMV261 and recombinant BCG vaccine were constructed, and the LMP1 molecular and protein expression levels were detected by real-time quantitative PCR and Western blot, so as to explore the basic conditions of vaccine construction. **Results** The molecular formula of LMP1 protein is $C_{1901}H_{2877}N_{493}O_{562}S_{11}$, the number of amino acids is 386, the relative molecular weight is 41.98238×10^3 , and the total number of atoms is 5 844. LMP1 protein is a stable hydrophilic protein with α helix (36.79%), β folding (7.77%), β Angle (5.96%) and random curling (49.48%) in the secondary structure, which is easy to integrate with antibody. This protein is a transmembrane protein with 6 transmembrane regions and no signal peptide. Subcellular localization in the host cell membrane, no glycosylation sites, there are 27 phosphorylation sites, including 7 phosphorylated threonine sites, 20 phosphorylated serine sites. 7 interacting proteins had 13 dominant T cell epitopes, including 5 restricted CTL epitopes and 8 restricted Th cell epitopes. Real-time quantitative PCR and Western blot detection of the protein gene and protein expression were stable. **Conclusion** Bioinformatics analysis showed that LMP1 protein was a stable hydrophilic protein with abundant B and T cell epitopes. The constructed recombinant BCG vaccine protein expressed stably and could be used as a candidate vaccine for Epstein-Barr virus.

* **【基金项目】** 山东省重点研发计划项目(No. 2018GSF118137); 济宁市重点研发计划项目(No. 2019SMNS020); 贺林院士工作站重点项目(No. JYHL2019ZD03); 济宁医学院大学生创新训练计划项目(No. cx2021093, cx2023001z)。

** **【通讯作者】** 屈艳琳, E-mail: 2753167672@qq.com

【作者简介】 李昆芳(2001-), 女, 山东济宁人, 临床医学专业本科在读, 主要研究方向: 微生物与肿瘤。E-mail: 1905369271@qq.com

【Key words】 Epstein-Barr virus latent membrane protein 1; Epstein-Barr virus; bioinformatics analysis

EB病毒(Epstein-Barr virus, EBV)直径150~170nm,基因组由170kb的双链DNA组成^[1],且编码的开放阅读框超过80个^[2]。EBV主要通过唾液传播^[3],人类全球感染率为95%,但大部分人为无症状感染^[4]。EBV的生命周期包括潜伏性感染和裂解性复制两个阶段^[5],其中在潜伏感染的细胞中病毒呈环状,可整合到细胞染色体中^[2];处于裂解期的EBV与许多恶性肿瘤的发生有关,如伯基特淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤、鼻咽癌、胃癌等^[6]。原发性和继发性免疫缺陷有利于EBV活化^[7]。

EBV潜伏膜蛋白LMP1(Epstein-Barr virus latent membrane protein 1, LMP1)是肿瘤坏死因子受体(Tumor Necrosis Factor Receptor, TNFR)超家族的一员^[8],在多种人类恶性肿瘤中表达^[9],被认为是EBV的主要致瘤蛋白^[10],通过来自其跨膜结构域的信号负调控增殖,在一定程度上起到组成型活性肿瘤坏死因子受体类似物的作用^[11],对B淋巴细胞的恶性转化至关重要^[2],可作为一个重要的治疗靶点^[12],根据LMP1蛋白在EBV致病机制中的作用研发疫苗预防EBV感染和治疗EBV相关疾病具有临床指导意义。

本研究采用生物信息学方法预测LMP1蛋白的理化性质、结构、信号肽、跨膜区域、亚细胞定位、糖基化位点、磷酸化位点、保守结构域、B细胞及T细胞抗原表位、抗原决定簇、相互作用蛋白及同源性比对,并构建重组质粒LMP1-pMV261以及重组卡介苗,通过检测LMP1分子及蛋白表达水平探究构建疫苗的基本条件,为EBV的防控与相关疫苗的研发提供新思路。

材料与方法

1 LMP1氨基酸序列及其编码基因序列的获取

在NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)数据库中获取LMP1蛋白的基因组序列(ID:3783750)和氨基酸序列,查询出LMP1蛋白由386个氨基酸组成,氨基酸序列为MEHDLERGPPGPRRPPRGPPLS
SSLGLALLLLLLALLFWLYIVMSDWTGGALLVL
YSFALMLIIHIIIFIFRRDLLCPLGALCILLMITLL
LIALWNLHGQALFLGIVLFIFGCLLVLGIWIYLL
EMLWRLGATIWQLLAFFLAFFLDLILLIALLYLQ
QNWWTLLVDLLWLLFLAILIWMYYHGQRHS
DEHHHDDSLPHPQQATDDSGHESDSNSNEGRH
HLLVSGAGDGPPPLCSQNLGAPGGGPDNGPQDP
DNTDDNGPQDPDNTDDNGPHDPLPQDPDNTDD

NGPQDPDNTDDNGPHDPLPHSPSDSAGNDGGPP
QLTEEVENKGGDQGPPLMTDGGGGHSHDSGH
GGGDPHLPTLLLGS SSGSGGDDDDPHGPVQLSY
YD。

2 LMP1蛋白的生物信息学分析

采用ProtParam(<https://web.expasy.org/prot-param/>)分析LMP1蛋白的理化性质;

采用在线分析软件SOPMA(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa%20_sopma.html)分析LMP1蛋白的二级结构;采用UniProt数据库(<https://www.uniprot.org/>)和SWISS MODEL(<https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/P03230?csm=1E19446E857DB8A3>)综合分析LMP1蛋白的三级结构;采用SignalP(<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0>)分析信号肽;采用TM-HMM软件(<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>)分析跨膜区域;采用软件Cell-PLoc 2.0(<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/>)和UniProt数据库(<https://www.uniprot.org/>)综合预测LMP1蛋白在宿主和病毒感染细胞内的亚细胞定位;采用NetNGly(<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetNGlyc-1.0>)预测糖基化位点;采用NetPhos-3.1(<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetPhos-3.1>)软件预测磷酸化位点;采用Conserved domains(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)分析保守结构域;采用IEDB软件(https://www.iedb.org/home_v3.php)综合预测B细胞表位;采用IEDB软件(https://www.iedb.org/home_v3.php)预测T细胞表位;采用BLAST(<https://web.expasy.org/blast/>)对LMP1蛋白的氨基酸序列与人类蛋白的同源性进行分析;采用Immunomedicine Group(<http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.pl>)预测LMP1蛋白的抗原决定簇;采用UniProt数据库(<https://www.uniprot.org/>)预测LMP1的相互作用蛋白。

3 LMP1-pMV261重组质粒的构建

3.1 LMP基因片段的扩增 由上海生物信息公司(青岛分公司)设计并合成引物。LMP1-F:5'-CGG-GATCCatggaacacgaccttgagaggg-3'(引入酶切位点BamH1);LMP1-R:5'-TGGCTGCAGttagtcatagtagct-tagctgaactggg-3'(引入酶切位点Pst1)。PCR扩增LMP1基因片段的反应体系(25 μ L):Buffer 5 μ L,

dNTP 2 μ L, PrimeSTAR GXL DNA Polymerase 1 μ L, 上、下游引物各 0.1 μ L, 模板 0.5 μ L, 水 16.8 μ L。反应条件: 98 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 98 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 66 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 70 s, 共 34 个循环; 72 $^{\circ}$ C 再延伸 5 min。取 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收并送测序。

3.2 LMP1 基因片段与载体的连接 将纯化的目的基因片段及载体分别双酶切出粘性末端。目的基因片段的酶切体系为 20 μ L, 其中 LMP1 10 μ L, Buffer2 μ L, BamH1 1 μ L, Pst1 1 μ L, 无离子水 6 μ L; 载体的酶切体系为 20 μ L, 其中载体 (PMV261) 10 μ L, BamH1 1 μ L, Pst1 1 μ L, Buffer 2 μ L, 无离子水 6 μ L。以上体系均置于 30 $^{\circ}$ C 水浴锅过夜酶切, 酶切 pMV261 和 LMP1 基因片段通过 1% 琼脂糖凝胶电泳后回收提纯。

连接酶切后的 LMP1 基因片段和载体 pMV261 片段, 反应体系为 40 μ L: LMP1 片段 25 μ L, pMV261 5 μ L (即 LMP1 基因片段与 pMV261 比例为 5 : 1), T4 连接酶 5 μ L, Buffer 5 μ L。连接体系混匀后置 16 $^{\circ}$ C 金属浴中过夜。

3.3 重组质粒的转化 取 1 μ L 连接质粒与 30 μ L DH5 α 感受态细胞于冰上融化; 将混合体系冰浴 30 min, 42 $^{\circ}$ C 热击 90 s, 再冰浴 10 min; 加入 800 μ L LB 培养基, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 1 h, 5 000 r/min (离心半径 6 cm) 离心 3 min, 去上清, 留 100 μ L 液体, 混匀后移至卡那固体 LB 培养基上涂匀, 放入生化培养箱 37 $^{\circ}$ C 下培养 48 h。

3.4 重组大肠埃希菌的扩增及重组 质粒提取 用接菌环挑取菌落形态较好的单菌落, 移至含卡那霉素的 LB 液体培养基中培养 16 h。质粒小提试剂盒 (天根) 提取重组质粒, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

3.5 重组质粒的鉴定 采用 PCR 及双酶切方法验证重组质粒。以重组质粒 LMP1-pMV261 为模板进行 PCR 扩增, PCR 反应体系 50 μ L, 其中 Buffer 10 μ L, dNTP 4 μ L, 酶 1 μ L, 上、下游引物各 0.2 μ L, 模板 1 μ L, 水 33.6 μ L。反应条件: 98 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 98 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 66 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 70 s, 共 34 个循环; 72 $^{\circ}$ C 再延伸 5 min。取 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 按 DNA 回收试剂盒说明进行回收并测序。双酶切体系为 20 μ L, 其中 LMP1 基因片段 10 μ L, BamH1 1 μ L, Pst1 1 μ L, buffer 2 μ L, ddH₂O 6 μ L。双酶切体系放入 30 $^{\circ}$ C 水浴锅过夜, 酶切产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 回收 DNA 片段并测序。

4 重组卡介苗的构建及目的蛋白的表达

4.1 感受态卡介苗的制备 将卡介苗置于苏通结核杆菌液体培养基, 37 $^{\circ}$ C 恒温振荡器培养至菌对数期,

菌液冰浴 90 min, 4 $^{\circ}$ C、4 000 r/min 离心 8 min, 去上清液, 用预冷的 10% 丙三醇悬浮细菌沉淀, 4 $^{\circ}$ C、4 000 r/min 离心 8 min。重复 3 次, 获取卡介苗感受态细胞, 置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

4.2 电转化 取出 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存的电转杯, 用无离子水清洗后置 70% 乙醇中浸泡 5 min, 超净台紫外照射 15 min; 电转杯冰上预冷, 加入感受态卡介苗 100 μ L 和重组质粒 10 μ L, 混匀, 冰浴 15 min 后将混合物移至电转杯中, 选择 2 300 V 电转电压, 放电后将苏通液体培养基 1 mL 注入电转杯中, 再用微量移液器吸取培养基和电转产物的混合物至 10 mL 含卡那霉素苏通液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 恒温振荡器过夜, 4 000 r/min 离心 8 min, 去上清液, 剩余物混合接种至含卡那的苏通固体培养基, 于 37 $^{\circ}$ C 生化培养箱培养 3 周。

4.3 目的基因的表达检测

4.3.1 RNA 的提取 提取对数生长期的 BCG 和 rBCG 的 RNA: 于研钵中倒入酒精烧 10 min, 放 -20 $^{\circ}$ C 冷冻, 加液氮预冷, 待挥发完全后再加入液氮, 将 BCG 迅速转移至研钵中用研杵研磨, 并在研磨过程中及时缓慢补充液氮至研磨完全; 将菌液转移至新离心管中, 加入 1 mL Trizol, 室温孵育 5 min; 加 200 μ L 氯仿用力摇动 15 s, 室温孵育 3 min, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 15 min, 取上层液至新离心管; 加 500 μ L 异丙醇, 室温孵育 10 min, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min, 去上清; 加入 -20 $^{\circ}$ C 预冷的 75% 乙醇 (DEPC 水配制) 1 mL, 震荡混匀, 4 $^{\circ}$ C、7 500 r/min 离心 5 min, 去上清, 干燥 RNA 颗粒; 加入 20 μ L DEPC 水溶解, 用紫外分光光度计检测 RNA 浓度, 采用天根公司生产的逆转录试剂盒合成 cDNA。

4.3.2 实时荧光定量 PCR 检测 反应体系为 10 μ L, 包括 cDNA 2 μ L, 上、下游引物各 0.5 μ L, 2 $\times$ Ac0Q qPCR SYBR Green 5 μ L, ddH₂O 2 μ L (每个样品设置 3 个重复孔)。引物 LMP1-F: CTCCTTTG-GCTCCTCCTGTTTCTG; LMP1-R: GGAGT-CATCGTGGTGGTGTTCATC。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 40 个循环。溶解段为 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 60 s, 95 $^{\circ}$ C 15 s。

4.4 目的蛋白表达检测 挑取含卡那苏通固体培养基的菌落接种至苏通液体培养基中 37 $^{\circ}$ C 培养 1 周; 取 2 mL 菌液 45 $^{\circ}$ C 培养 30 min, 诱导目的蛋白的表达。用细菌裂解液裂解重组卡介苗, 300 W 冰浴超声 10 s, 间隔 15 s, 总共持续 30 min 破壁, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, Western blot 检测 LMP1 的表达。

结 果

1 LMP1 蛋白的生物信息学分析

1.1 理化性质 LMP1 蛋白分子式为 $C_{1901}H_{2877}N_{493}O_{562}S_{11}$, 氨基酸数为 386, 由 20 种氨基酸组成, 其中天冬氨酸占 10.9%, 亮氨酸占 18.9%, 甘氨酸占 11.9%, 不含吡咯赖氨酸和硒代半胱氨酸。该蛋白相对分子质量为 41.98238×10^3 , 原子总数为 5 844, 理论等电点 pI 为 4.24。LMP1 的不稳定性指数为 38.77, 为稳定蛋白(小于 40 为稳定蛋白, 大于 40 为不稳定蛋白)。LMP1 的脂肪族系数为 105.13, 亲水性的大平均值(GRAVY)为 -0058, 小于 0, 为亲水蛋白。LMP1 带负电荷的残基总数(Asp 天冬氨酸 + Glu 谷氨酸)为 51, 带正电荷的残基总数(Arg 精氨酸 + Lys 赖氨酸)为 10。LMP1 的 N 端为 Met 时, 该蛋白在哺乳动物网织红细胞中的半衰期为 30 h, 在酵母体内大于 20 h, 在大肠埃希菌体内大于 10 h。

1.2 空间结构 采用 SOPMA 分析 LMP1 蛋白的二级结构, α 螺旋(Hh)占 36.79%, β 折叠(Ee)占 7.77%, β 转角(Tt)占 5.96%。无规则卷曲(Cc)占 49.48%。该蛋白具有较高的不规则卷曲, 更易于抗体嵌合(图 1)。利用 Uniprot 和 SWISS MODEL 预测 LMP1 蛋白的三级结构, 构建三维立体结构模型, 结果如图 2。

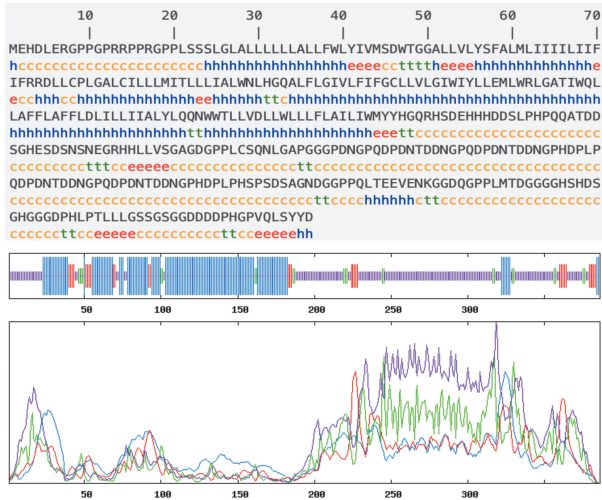


图 1 LMP1 蛋白的二级结构
Fig.1 The secondary structure of LMP1

1.3 LMP1 蛋白的信号肽、跨膜区域预测及亚细胞定位 SignalP 预测 LMP1 蛋白无信号肽(图 3)。TM-HMM 分析 LMP1 可能存在 6 个跨膜螺旋, 跨膜中的预期氨基酸数量为 134.93778, 提示该蛋白为跨膜蛋白(图 4)。利用软件 Cell-PLoc 2.0 和 Uniprot 综合预测 LMP1 蛋白在宿主和病毒感染细胞内的亚细胞定位为宿主细胞膜(图 5)。

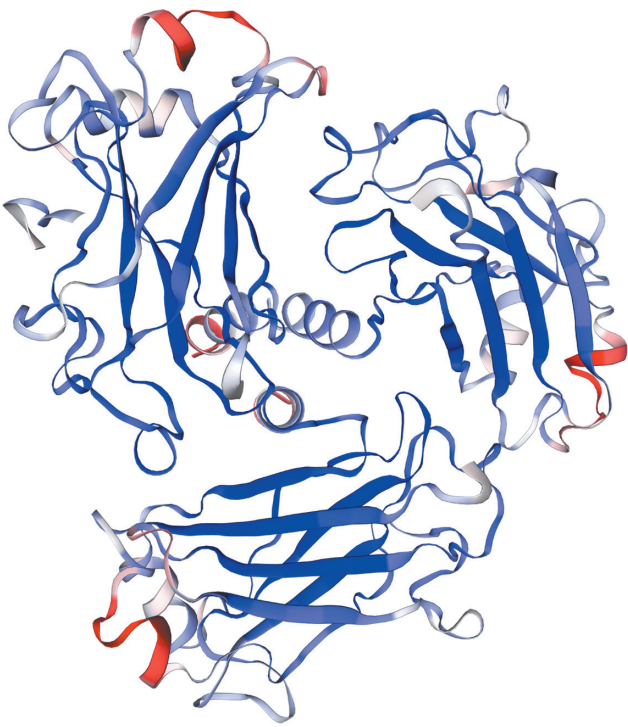


图 2 LMP1 蛋白的三级结构
Fig.2 The predicted tertiary structure of LMP1 protein

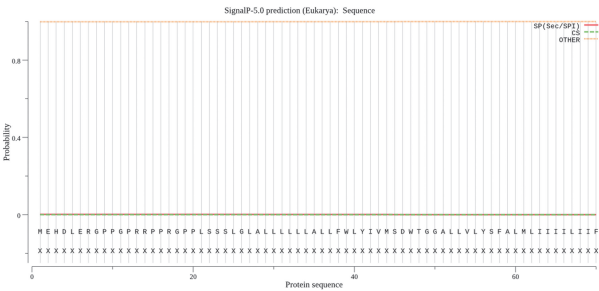


图 3 LMP1 蛋白信号肽预测
Fig.3 LMP1 protein signal peptide prediction

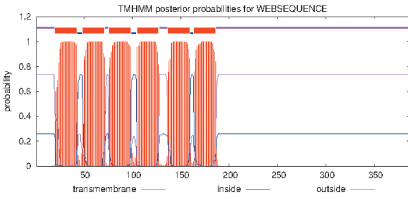


图 4 LMP1 跨膜结构预测
Fig.4 Prediction of LMP1 transmembrane structure

1.4 糖基化与磷酸化位点及保守结构域分析 Net-Phos-3.1 磷酸化分析软件预测 LMP1 蛋白总共 27 个磷酸位点(图 6), 其中包括 7 个磷酸化苏氨酸位点, 分别在 136、208、259、270、286、297、324 位氨基酸; 20 个磷酸化丝氨酸位点, 分别在 22、23、24、45、192、200、211、215、217、219、229、239、309、311、313、347、350、367、369、383 位氨基酸。无磷酸化酪氨酸位点。Net-NGly 预测 LMP1 蛋白无糖基化位点(图 7)。Con-

served domains 分析 LMP1 氨基酸序列与特定命中的保守结构域疱疹-LMP1 的关联具有高置信度,属于疱疹_LMP1 超家族蛋白(图 8)。

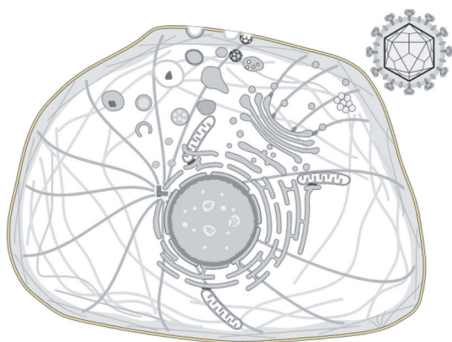


图 5 LMP1 蛋白的亚细胞定位
Fig. 5 Subcellular Localization

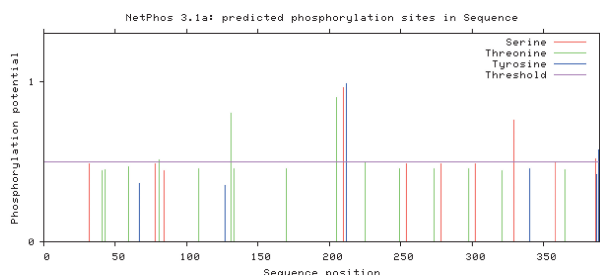


图 6 LMP1 蛋白磷酸化位点分析
Fig. 6 Analysis of LMP1 protein phosphorylation sites

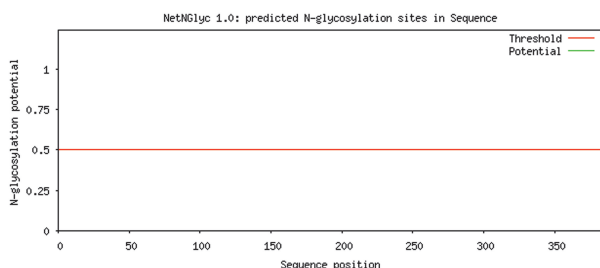


图 7 LMP1 糖基化位点分析
Fig. 7 Predicted glycosylation sites of LMP1 protein

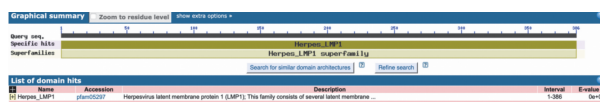


图 8 LMP1 蛋白的保守结构域分析
Fig. 8 Conserved domain analysis

1.5 B 细胞表位预测 IEDB 软件分析 LMP1 蛋白的柔韧性、表面可及性、线性表位、 β -转角、亲水性、抗原性,结果如图 9。黄色区域为高概率抗原表位区,应位于蛋白质表面,利于与抗体结合。柔韧性越强,越有利于抗原与抗体结合时蛋白构象的变化。综合分析筛选出 B 细胞优势表位^[13],分别在 4-19、189-222、250-275、277-302 位氨基酸(表 1)。

表 1 LMP1 蛋白的优势 B 细胞表位
Table 1 Dominant B cell epitopes

序号 No	起始氨基酸位置 Epitope starting position	终止氨基酸位置 Epitope ending position	氨基酸序列 Epitope sequence	长度 (单位) Length
1	4	19	DLERGPGRPRPRGP	16
2	189	222	QRHSDEHHHDDSLPHPQQTDDSGHESD-	34
3	250	275	SNSNEG	26
4	277	302	DNGPQDPDNTDDNGPQDPDNTDDNGP	26



图 9 LMP1 蛋白的 B 细胞表位预测
Fig. 9 B cell epitopes of LMP1 protein

1.6 T 细胞表位预测 T 细胞表位需要经过抗原递呈细胞加工后与主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)结合成为复合物才能被 T 细胞受体识别。IEDB 预测分析 LMP1 蛋白可能存在 49 个 T 细胞表位,根据识别度和响应频率(图 10)与 IEDB 数据库比对,筛选出 13 个优势表位,其中限制性 CTL 细胞表位有 5 个(表 2),限制性 Th 细胞表位有 8 个(表 3),共同氨基酸区段为 181-197、43-53 位氨基酸。

表 2 LMP1 蛋白 CTL 细胞表位分析
Table 2 LMP1 protein CTL cell epitope analysis

序号 No.	MHC I 类分子亚型 MHC class I molecular subtype	氨基酸序列 Epitope sequence	起始氨基酸位置 Epitope starting position	终止氨基酸位置 Epitope ending position
1	HLA class I	LWMYHGRHSDEHHH	181	197
2	HLA class I	ALYLQNNWW	157	165
3	HLA class I	VMSDWTGGALL	43	53
4	HLA-A2	ALLVLYSFA	51	59
5	HLA-A*02:06	IIILILFI	63	71

1.7 同源性比对与抗原决定簇 对 LMP1 蛋白的氨基酸序列与人类蛋白的同源性进行 BLAST 比对。其

中氨基酸序列比对显示不与人类蛋白同源;碱基序列比对显示两者的同源性较低,不易发生免疫交叉反应,符合潜在候选疫苗基本条件(图 11,12)。Immuno-medicine Group 网站预测 LMP1 蛋白的氨基酸序列有 11 个抗原决定簇,分别在 17-44、49-99、101-129、131-161、165-188、197-205、223-229、233-241、303-310、356-365、376-382 位氨基酸,平均抗原倾向为 1.0347,抗原倾向指数高(表 4,图 13)。

表 3 LMP1 蛋白 Th 细胞表位分析
Table 3 LMP1 protein Th cell epitope analysis

序号 No.	MHC I 类分子亚型 MHC class I molecular subtype	氨基酸序列 Epitope sequence	起始氨基酸位置 Epitope starting position	终止氨基酸位置 Epitope ending position
1	HLA-DR15	YLQQNWWTLLVDLLWLL	159	175
2	HLA-DR9	YLQQNWWTLLVDLLWLL	159	175
3	HLA-DR53	YLQQNWWTLLVDLLWLL	159	175
4	HLA class II	LJWMYYHGQRHSDEHHH	181	197
5	HLA class II	TDDSGHESDSNSNEGRH	208	224
6	HLA class II	VMSDWTGGALL	43	53
7	HLA class II	WNLHGQALFL	98	107
8	HLA-DQ2	ESDSNSNEG	214	222

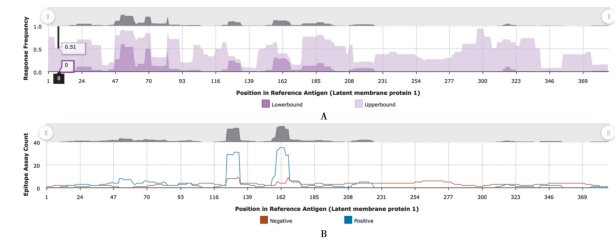


图 10 LMP1 蛋白的响应频率(A)及表位测定计数(B)
Fig. 10 Response frequency and Epitope assay counts

表 4 LMP1 蛋白氨基酸序列的 11 个抗原决定簇
Table 4 11 antigenic determinants of the amino acid sequence of LMP1 protein

序号 No.	起始氨基酸 位置 Epitope starting position	氨基酸序列 Epitope sequence	结束氨基酸 位置 Epitope ending position
1	17	RGPLSSSLGLALLLLALLFWLYIVM	44
2	49	GGALLVLYSFALMLIIIFIFRRDLLCP LGALCILLMITLLIALWN	99
3	101	HGQALFLGHVLFIFGCLLVIGIWIYLLM	129
4	131	WRLGATWQLLAFFLAFFLDLILLIA- LYLQ	161
5	165	WTLVDLLWLLFLAILWMYHYG	188
6	197	HDDSLPHPQ	205
7	223	RHHLLVS	229
8	233	DGPPLCSQN	241
9	303	HDPLPHSP	310
10	356	DPHLPTLLLG	365
11	376	PHGPVQL	382

1.8 相互作用蛋白 Uniprot 数据库预测 7 种人体蛋白与 LMP1 蛋白存在相互作用,其中 UBC9、TRADD、ZMY11、TNIK、IRF7 蛋白主要参与相关致

病信号通路(图 14)。研究表明,UBC9 蛋白是抗癌治疗候选靶点,LMP1-CTAR3 结构域参与 LMP1-UBC9 相互作用,有助于与 LMP1 的致癌潜力相关的表型变化,但 LMP1 只与具有酶活性的 UBC9 相互作用,无活性 UBC9 表达会抑制 LMP1-UBC9 相互作用,减少细胞迁移^[14]。ZMY11 蛋白可能为抗病毒治疗候选靶点,通过取代 LMP1 的 TRADD 来负调节 LMP1 介导的 NF-κB 活化^[15]。TRADD 蛋白是 LMP1 蛋白的重要信号传导介质,介导 IKKβ 与 CTAR2 的相互作用,在细胞肿瘤坏死因子受体 1(TNFR1)信号通路中促进细胞凋亡^[16]。TNIK 介导 EBV 转化 B 细胞的增殖与存活^[17]。LMP1 主要通过 CTAR2 结构域激活 IRF7,影响细胞的生长^[18]。

SIB BLAST+ Network Service

Program: BLASTP (version 2.10.1+)
Database: UniProtKB Homo sapiens database (release 2021_04 of 29-Sep-2021)
Query sequence: » Show
Query sequence length: 386

List of the matches

***** No hits found *****

图 11 氨基酸序列同源性比对分析
Fig. 11 Results of amino acid sequence homology alignment

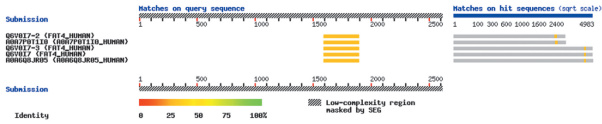


图 12 碱基序列同源性比对分析
Fig. 12 Base sequence homology alignment results

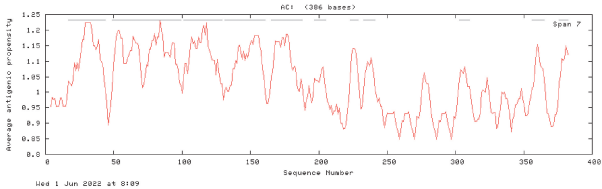


图 13 LMP1 蛋白的抗原决定簇
Fig. 13 Prediction of LMP1 protein epitopes

2 LMP1 基因片段的获取及质粒鉴定

PCR 扩增基因 LMP1 基因片段,大小为 1161bp (图 15),与预期一致。双酶切鉴定质粒,获得的目的基因和载体质粒片段大小(图 16)与预期一致。

3 实时荧光定量 PCR 检测 LMP1 基因表达水平

以 BCG 提取的 cDNA 作为内参,采用实时荧光定量 PCR 检测 rBCG LMP1 基因,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 rBCG LMP1 基因的相对表达量。结果显示,rBCG 的 LMP1 基因相对表达量与空载体比较差异有统计学意义($P<0.05$)(图 17)。

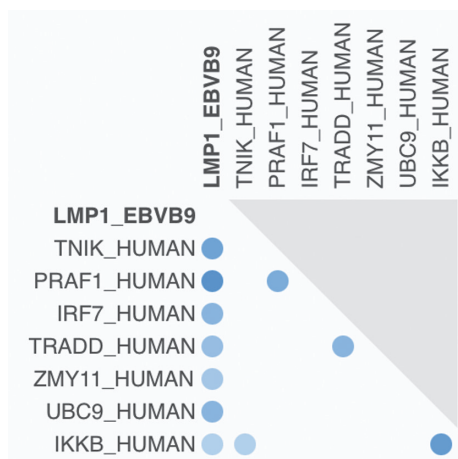
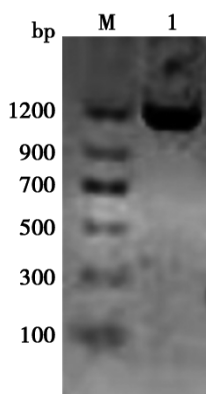


图 14 LMP1 相互作用蛋白
Fig. 14 Interacting protein

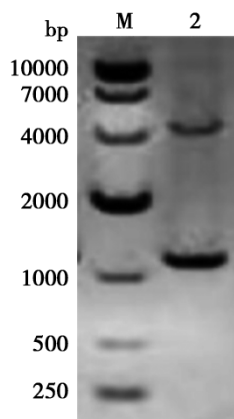


M DNA 标志物(DL2000) 1 LMP1 基因 PCR 产物

图 15 LMP1 基因 PCR 产物 1%琼脂糖凝胶电泳分析

M DNA marker(DL2000) 1 Amplification of LMP1 product

Fig. 15 Agarose gel electrophoresis diagram



M DNA 标志物 2 重组质粒双酶切

图 16 重组质粒双酶切鉴定

M DNA marker 2 Double digestion product

Fig. 16 Double digestion validation diagram

4 LMP1 蛋白表达检测

45℃诱导蛋白表达后,提取重组卡介苗的总蛋白,经 SDS-PAGE 电泳后转膜,以 LMP1 蛋白抗体为一抗,以过氧化物酶(HRP)标记山羊抗鼠抗体为二抗进

行 Western blot,滴加超敏 ECL 化学发光试剂,覆盖全膜曝光,结果如图 18。

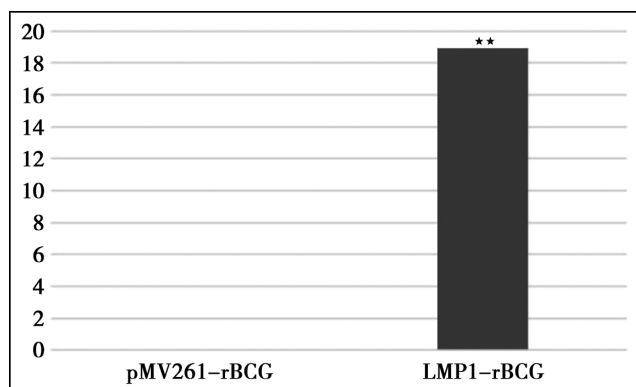
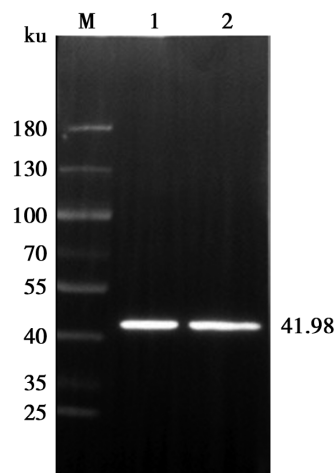


图 17 LMP1-rBCG 的 LMP1 基因表达水平

Fig. 17 Expression of LMP1 at molecular level of LMP1-RBCG



M 蛋白质分子质量标准 1、2 重组卡介苗表达的 LMP1 蛋白与相应抗体反应条带

图 18 重组卡介苗表达 LMP1 蛋白的 Western blot 检测

M Protein molecular weight standard 1,2 Expression of target protein LMP1 in recombinant BCG vaccine

Fig. 18 Western blot detection of LMP1 expression

讨论

随着生物信息学技术的迅速发展,利用生物信息学工具进行基因组学和蛋白组学的综合分析能够充分利用大数据的优势,涵盖内容广泛,具有一定前瞻性和更高的精确性,在医学研究中发挥重要作用,为实验研究与临床治疗提供了理论依据与方法指导。利用生物信息学方法可以对基因及蛋白进行分析预测,可为探究疾病的发生机制、疫苗的研发及诊断治疗提供新思路^[19]。

EBV 以潜伏或溶解的形式感染宿主细胞^[20],主要感染人类淋巴细胞和口咽上皮细胞,在淋巴细胞中长期潜伏,表达各种潜伏基因,潜伏基因和癌基因相互作用会导致宿主细胞周期紊乱,促进相关肿瘤形成^[1];EBV 在口咽上皮细胞中通常进行溶解复制,与鼻咽癌

的诱发有密切联系^[20],免疫缺陷人群中的EBV感染,增加了其他病毒、细菌、真菌的感染几率,及并发症的风险^[4]。EBV感染可加剧认知功能障碍^[8],可能是诱发老年人认知功能恶化发展为阿尔茨海默症的危险因素^[21]。EBV对人类健康的影响不可忽视,因此研发疫苗来防控EBV传染及治疗EBV相关疾病非常必要。

LMP1蛋白是EBV的主要致癌蛋白,触发多种细胞信号通路促进细胞增殖、转化、免疫逃逸、侵袭、表观遗传修饰和代谢重编程,其信号区域包含3个位点:CTAR1、CTAR2和CTAR3。LMP1-CTAR1具有独特的诱导表达表皮生长因子受体(The epidermal growth factor receptor, EGFR)和肿瘤坏死因子受体相关因子1(tumor necrosis factor-associated factor 1, TRAF1)的能力,参与NF- κ B信号转导、激活AKT和MEK/ERK通路,破坏细胞周期调控机制,降低感染细胞对凋亡刺激的敏感性^[6];LMP1-CTAR2参与JNK和NF- κ B通路,从而引发肿瘤的发生与转移^[22];LMP1-CTAR3还激活SUMO化途径以控制迁移和促进潜伏期^[23]。此外,LMP1与NF- κ B、JNK、CDK2和Rb等细胞周期相关分子相互作用,从而促进G1/S期转换,破坏精确的细胞周期机制,提高抗凋亡能力^[1]。

本研究预测LMP1蛋白为稳定亲水蛋白,制备成疫苗时有利于抵抗各种因素的影响,保持其生物活力。LMP1的脂肪族系数为105.13,热稳定性好,制备成疫苗后便于储存。LMP1蛋白的二级结构中无规则卷曲(Cc)占49.48%,易与抗体嵌合,容易形成潜在抗体表位。LMP1蛋白无信号肽,具有6个跨膜区,亚细胞定位在宿主细胞膜上,无糖基化位点。预测该蛋白有27个磷酸化位点,其中有7个苏氨酸位点,20个丝氨酸位点,无酪氨酸位点。LMP1蛋白可能通过磷酸化调节基因表达、代谢、细胞周期、分化和细胞凋亡等多种生物过程^[23],通过磷酸化和脱磷酸化参与信息传递,在大多数信号通路中发挥重要作用^[24]。

从LMP1蛋白的柔韧性、表面可及性、线性表位、 β -转角、亲水性、抗原性六方面综合预测优势B细胞表位在4-19、189-222、250-275、277-302位氨基酸。B细胞通过产生特异性抗体来抵抗EBV的入侵,从而给机体提供更高效率的免疫保护,因此研制疫苗时应着重关注相关B细胞优势表位,利于疫苗免疫原性的提高^[13]。预测LMP1蛋白存在13个优势T细胞表位,其中限制性CTL细胞表位5个,限制性Th细胞表位8个,二者共同氨基酸区段为181-197、43-53位氨基酸,此两区段氨基酸作为优势表位的概率更大,可引起较强的T细胞反应。LMP1蛋白与人类同源性较低,

具有良好的免疫原性,不易引起免疫交叉反应;LMP1有11个抗原决定簇,抗原倾向指数较高,能刺激产生多种抗体,容易发生免疫应答反应,可以作为潜在候选疫苗蛋白。

预测LMP1蛋白与7种蛋白质有相互作用,其中UBC9、TRADD、ZMY11、TNF κ 1、IRF7蛋白主要参与LMP1相关致病信号通路。LMP1-UBC9相互作用有助于与LMP1的致癌潜力相关的表型变化^[14],ZMY11蛋白与LMP1蛋白相互作用可对NF- κ B激活进行负调节^[15],ZMY11蛋白的寡聚化是LMP1激活JNK通路的前提条件^[25]。TRADD蛋白是LMP1蛋白的重要信号传导介质,在TNFR1信号通路中促进细胞凋亡^[16],TNF κ 1在LMP1下游的JNK通路和NF- κ B信号通路中均起关键作用,介导EBV转化B细胞的增殖和存活^[17]。LMP1主要通过CTAR2结构域激活干扰素调节因子7(Interferon regulatory factor 7, IRF7),进而可能改变细胞基因转录,影响细胞生长^[18]。有研究提示LMP1蛋白通过与相互蛋白作用来介导相关疾病的发展,LMP1蛋白可作为一个重要的诊断与治疗靶点,通过研发疫苗来防控及治疗EBV感染。

疫苗研发是EBV感染防控最有效的手段,预防EBV相关疾病的发生,并改善其预后。EBV疫苗的研究主要有两种:一种疫苗含有gp350亚单位抗原,但该疫苗的效力还需要大量实验验证;另一种疫苗含有CD8+T细胞肽表位,无法激活更多类型的免疫细胞进行应答,免疫原性较差。以上两种疫苗均具有局限性^[26]。本研究运用生物信息学工具多方面分析了LMP1蛋白的结构、功能与免疫原性,根据预测的结果谨慎选择疫苗的制备方法和类型,从而激发更好的免疫反应。

本研究通过生物信息学预测了LMP1蛋白作为EB疫苗的理论可行性,并构建了LMP1蛋白的重组卡介苗,该重组卡介苗(rBCG)中LMP1分子及蛋白水平均稳定表达,为EBV疫苗的研发奠定了实验基础。

【参考文献】

- [1] Yin H, Qu J, Peng Q, et al. Molecular mechanisms of BV-driven cell cycle progression and oncogenesis[J]. Med Microbiol Immunol, 2019, 208(5): 573-583.
- [2] Kanda T, Yajima M, Ikuta K. Epstein-Barr virus strain variation and cancer[J]. Cancer Sci, 2019, 110(4): 1132-1139.
- [3] Houen G, Trier NH. Epstein-Barr virus and systemic autoimmune diseases[J]. Front Immunol, 2021(11): 587380.
- [4] Lupo J, Truffot A, Andreani J, et al. Virological Markers in Epstein-Barr Virus-Associated Diseases[J]. Viruses, 2023 Feb 28; 15(3): 656.

- [5] 王中浩,张可依,丰姝,等. EB病毒潜伏性感染相关基因在其所致肿瘤中的作用机制[J]. 华西医学, 2021, 36(8): 1108-1114.
- [6] Luo X, Hong L, Cheng C, et al. DNMT1 mediates metabolic reprogramming induced by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 and reversed by grifolin in nasopharyngeal carcinoma [J]. Cell Death Dis, 2018, 9(6): 619.
- [7] Kerr JR. Epstein-Barr virus (EBV) reactivation and therapeutic inhibitors[J]. J Clin Pathol, 2019, 72(10): 651-658.
- [8] Wang L, Ning S. New look of EBV LMP1 signaling landscape [J]. Cancers (Basel), 2021, 13(21): 5451.
- [9] Wang LW, Jiang S, Gewurz BE. Epstein-Barr virus lmp1-mediated oncogenicity[J]. J Virol, 2017, 91(21): e01718-16.
- [10] Wakae K, Kondo S, Pham HT, et al. EBV-LMP1 induces APO-BEC3s and mitochondrial DNA hypermutation in nasopharyngeal cancer[J]. Cancer Med. 2020 Oct;9(20):7663-7671.
- [11] Geiger TR, Martin JM. The Epstein-Barr virus-encoded LMP-1 oncoprotein negatively affects Tyk2 phosphorylation and interferon signaling in human B cells[J]. J Virol, 2006, 80(23): 11638-11650.
- [12] Zhu J, Kamara S, Cen D, et al. Generation of novel affibody molecules targeting the EBV LMP2A N-terminal domain with inhibiting effects on the proliferation of nasopharyngeal carcinoma cells[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(4): 213.
- [13] Jespersen MC, Peters B, Nielsen M, et al. BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes [J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(W1): W24-W29.
- [14] Bentz GL, Whitehurst CB, Pagano JS. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) C-terminal-activating region 3 contributes to LMP1-mediated cellular migration via its interaction with Ubc9[J]. J Virol, 2011, 85(19): 10144-10153.
- [15] Ikeda O, Sekine Y, Mizushima A, et al. BS69 negatively regulates the canonical NF-kappaB activation induced by Epstein-Barr virus-derived LMP1[J]. FEBS Lett, 2009, 583(10): 1567-1574.
- [16] Schneider F, Neugebauer J, Griese J, et al. The viral oncoprotein LMP1 exploits TRADD for signaling by masking its apoptotic activity[J]. PLoS Biol, 2008, 6(1): e8.
- [17] Shkoda A, Town JA, Griese J, et al. The germinal center kinase TNK1 is required for canonical NF-kB and JNK signaling in B-cells by the EBV oncoprotein LMP1 and the CD40 receptor[J]. PLoS Biol, 2012, 10(8): e1001376.
- [18] Song YJ, Izumi KM, Shinnars NP, et al. IRF7 activation by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 requires localization at activation sites and TRAF6, but not TRAF2 or TRAF3[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(47): 18448-18453.
- [19] Gauthier J, Vincent AT, Charette SJ, et al. A brief history of bioinformatics[J]. Brief Bioinform, 2019, 20(6): 1981-1996.
- [20] Van Sciver N, Ohashi M, Pauly NP, et al. Hippo signaling effectors YAP and TAZ induce Epstein-Barr Virus (EBV) lytic reactivation through TEADs in epithelial cells[J]. PLoS Pathog, 2021, 17(8): e1009783.
- [21] Zhang N, Zuo Y, Jiang L, et al. Epstein-Barr Virus and Neurological Diseases[J]. Front Mol Biosci. 2022 Jan 10;8:816098.
- [22] Liu L, Yang J, Ji W, et al. Curcumin inhibits proliferation of Epstein-Barr virus-associated human nasopharyngeal carcinoma cells by inhibiting EBV nuclear antigen 1 expression[J]. Biomed Res Int, 2019(2019): 8592921.
- [23] Lee CR, Park YH, Min H, et al. Determination of protein phosphorylation by polyacrylamide gel electrophoresis[J]. J Microbiol, 2019, 57(2): 93-100.
- [24] Singh V, Ram M, Kumar R, et al. Phosphorylation: Implications in Cancer[J]. Protein J, 2017 Feb;36(1): 1-6.
- [25] Wan J, Zhang W, Wu L, et al. BS69, a specific adaptor in the latent membrane protein 1-mediated c-Jun N-terminal kinase pathway[J]. Mol Cell Biol, 2006, 26(2): 448-56.
- [26] Odumade OA, Hogquist KA, Balfour HH Jr. Progress and problems in understanding and managing primary Epstein-Barr virus infections[J]. Clin Microbiol Rev, 2011, 24(1): 193-209.
- 【收稿日期】 2023-01-16 【修回日期】 2023-03-30
-
- (上接 749 页)
- [21] Lukassen S, Chua R L, Trefzer T, et al. SARS-CoV-2 receptor ACE2 and TMPRSS2 are primarily expressed in bronchial transient secretory cells[J]. Embo J, 2020, 39(10): e105114.
- [22] van Doremalen N, Purushotham JN, Schulz JE, et al. Intranasal ChAdOx1 nCoV-19/AZD1222 vaccination reduces viral shedding after SARS-CoV-2 D614G challenge in preclinical models[J]. Sci Translat Med, 2021;13(607): eab0755.
- [23] Ku MW, Bourguin M, Authie P, et al. Intranasal vaccination with a lentiviral vector protects against SARS-CoV-2 in preclinical animal models[J]. Cell Host Microbe, 2021, 29(2): 236-249.
- [24] Hassan AO, Kafai NM, Dmitriev IP, et al. A single-dose intranasal chAd vaccine protects upper and lower respiratory tract against SARS-CoV-2[J]. Cell, 2020, 183(1): 169-184.
- [25] Madhavan M, Ritchie AJ, Aboagye J, et al. Tolerability and immunogenicity of an intranasally-administered adenovirus-vectored COVID-19 vaccine: An open-label partially-randomised ascending dose phase I trial[J]. EBioMed, 2022, 85: 104298.
- [26] Frelet-Barrand A. *Lactococcus lactis*, an attractive cell factory for the expression of functional membrane proteins[J]. Biomolecules, 2022;12(2): 180.
- [27] Morello E, Bermudez-Humaran LG, Llull D, et al. *Lactococcus lactis*, an efficient cell factory for recombinant protein production and secretion[J]. J Mol Microbiol Biotechnol, 2008, 14(1-3): 48-58.
- [28] Song AA, In L, Lim S, et al. A review on *Lactococcus lactis*: from food to factory[J]. Microbial Cell Factories, 2017, 16(1): 55.
- [29] Bosma T, Kanninga R, Neef J, et al. Novel surface display system for proteins on non-genetically modified gram-positive bacteria [J]. Appl Environ Microbiol, 2006, 72(1): 880-889.
- [30] Yam KK, Pouliot P, N'Diaye MM, et al. Innate inflammatory responses to the Gram-positive bacterium *Lactococcus lactis* [J]. Vaccine, 2008, 26(22): 2689-2699.
- 【收稿日期】 2023-01-31 【修回日期】 2023-04-20