

DOI:10.13718/j.cnki.xsxb.2017.01.013

PRRSV 主要蛋白结构分析及其抗原表位的研究^①

曾毅仁¹, 汪名庆², 曹政², 潘玉竹², 耿毅¹, 吕凤林²

1. 四川农业大学 动物医学院, 四川 雅安 625014; 2. 重庆大学 生物工程学院, 重庆 400044

摘要:【目的】对猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)主要蛋白,即 GP5,GP4,GP3,GP2 的二级结构进行分析。【方法】在线利用 DNA Star 软件分析 GP2~GP5 蛋白的抗原表位,以指导未来的疫苗设计。【结果】:①GP2~GP5 的理论等电点 PI 值分别为 10.12,8.42,8.05,8.41,GP2 的 PI 值明显高于 GP3~GP5 的 PI 值($p < 0.05$),而在 GP3~GP5 之间没有明显差异($p > 0.05$);②GP4 蛋白和 GP5 蛋白高抗原指数的基序数量多,形成抗原表位的可能性最大,是设计疫苗的重要靶点。【结论】高致病 PRRSV JXA1 株的 GP4 蛋白和 GP5 蛋白高抗原指数的基序数量多,形成抗原表位的可能性最大,是设计疫苗的重要靶点。

关键词: PRRSV; 蛋白结构; 抗原表位

中图分类号: S855.3

文献标志码: A

文章编号: 1000-5471(2017)01-0077-04

猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus, PRRSV)危害大,主要导致猪繁殖与呼吸综合征^[1-3]。文献报道的免疫原性较强的 GP5,其免疫原性并未高于免疫原性相对较弱的 GP4,GP3 两两组合(如 GP4+GP3)的效果,提示 PRRSV 的表面蛋白之间有着某种联系,也许存在相互增强的免疫效应,但前期基础工作则需要了解这些蛋白的抗原指数。本文对 PRRSV 江西 A1 株的 GP2,GP3,GP4,GP5 蛋白予以结构分析,试图从中找到高抗原指数的序列,以指导疫苗设计和生产实践^[4-7]。

1 材料与方法

1.1 JXA1 的 GP2—GP5 氨基酸序列的获取

登陆 NCBI,在“Nucleotide”搜“JXA1”,再搜 GP2,GP3,GP4,GP5 的基因序列和蛋白序列。

1.2 GP2,GP3,GP4,GP5 蛋白序列的分析

分别应用 DNAMAN^[8],BLAST^[9]等软件分析蛋白的理化性质和结构^[11],利用 CBS 服务器分析 GP2,GP3,GP4,GP5 蛋白的二级结构,并用 ExPASy 服务器验证;最后预测 GP2~GP5 蛋白的抗原表位^[9]。

2 结果

2.1 GP2~GP5 蛋白的理化性质、二级结构分析

收索结果是 ABL60899.1 为 GP2 蛋白,ABL60900.1 为 GP3 蛋白,ABL60901.1 为 GP4 蛋白,ABL60902.1 为 GP5 蛋白。

针对 GP2~GP5 的氨基酸序列,预测 GP2 的理论等电点 PI 为 10.12;GP3 理论 PI 为 8.42;GP4 理论 PI 为 8.05;GP5 理论 PI 为 8.41。运用 PBIL LYON-GERLAND 分别对其二级结构进行分析,结果见表 1。

2.2 GP2~GP5 蛋白的抗原表位分析

有效抗原表位的数目决定其免疫原性强弱^[11]。实验中使用 DNA STAR 软件,选择 Jameson Wolf 方法

① 收稿日期:2016-05-31

作者简介:曾毅仁(1994-),男,四川内江人,本科生,主要从事动物医学研究。

中 Hoop-Woods 预测出 JXA1 株 GP2,GP3,GP4,GP5 的抗原性指数(Antigenic Index, AI)、亲水性(Hydrophilicity Plot)、柔性(Flexible Regions)、可及性(Surface Probability Plot),在此基础上再预测 GP2,GP3,GP4,GP5 的抗原表位(图 1),根据文献报道^[8],当 AI、亲水性、可及性数值均大于 0 时,蛋白形成抗原表位的可能性最大。

表 1 GP2~GP5 二级结构分析

	理论等电点 PI	α 螺旋/%	β 转角	延伸链/%	随机卷曲/%
GP2	10.12	54.69	0	12.11	33.20
GP3	8.42	38.58	0	15.75	45.67
GP4	8.05	43.82	0	17.42	38.76
GP5	8.41	43.00	0	21.00	36.00

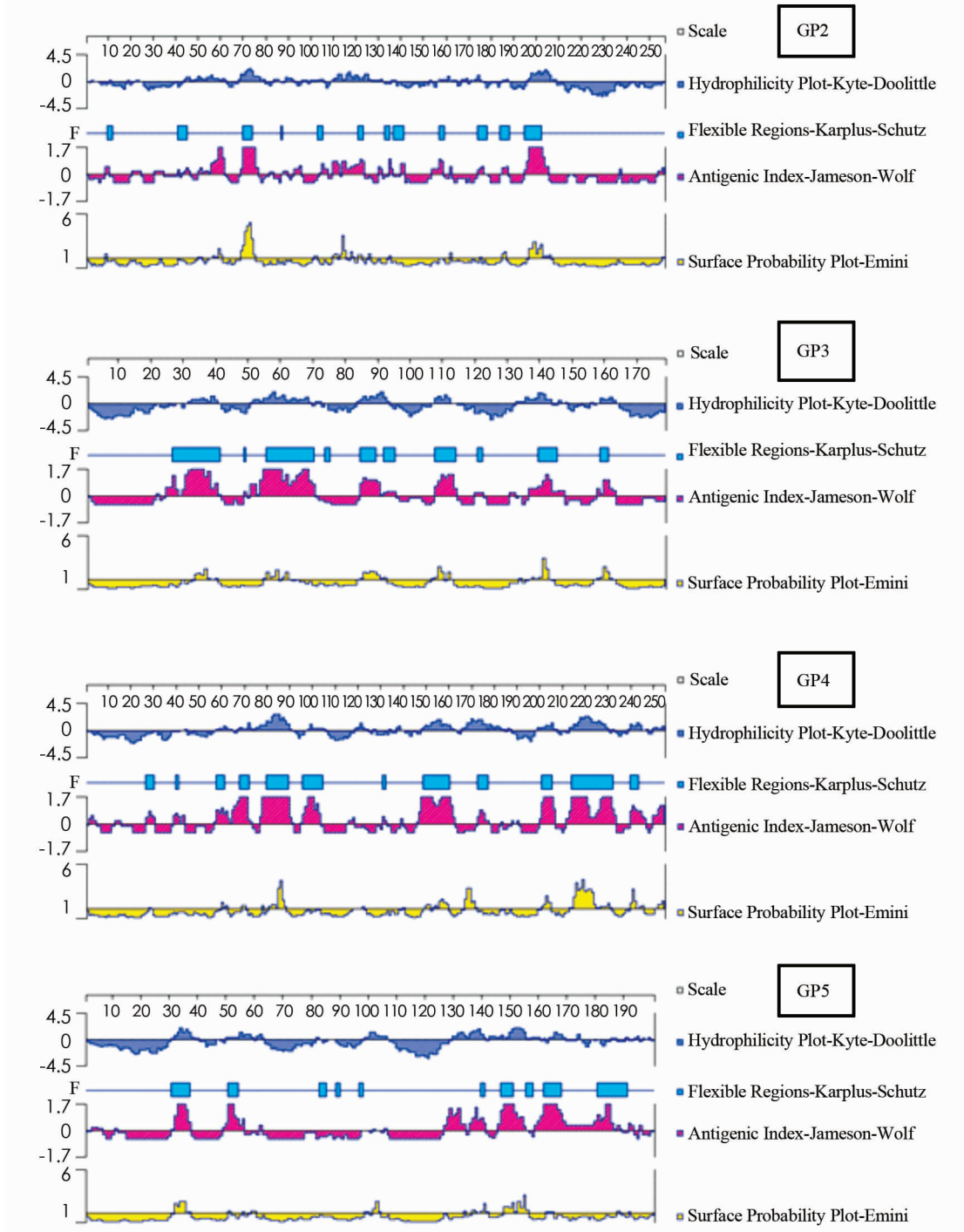


图 1 GP2,GP3,GP4,GP5 作为抗原的 AI、亲水性、柔性、可及性分析

图 1 结果发现, ①GP2 的 AI 较少, 只有第 70~78 位、第 195~205 位置 AI 较高; ②GP3 蛋白的高抗原指数数量相对 GP2 更多, 在第 25~40 位、第 35~70 位、第 105~115 位置都有较大可能形成抗原表位; ③GP4 高抗原指数数量最多, 在第 60~75 位、第 80~90 位、第 95~105 位、第 146~163 位、第 197~200 位、第 215~225 位、第 227~235 区域内形成抗原表位的可能性较大; GP5 蛋白第 32~40 位、第 50~58 位、第 130~170 区域形成抗原表位的可能性较大。

3 讨 论

本文在线利用 DNAMAN 等分析软件^[10], 通过生物信息学分析, 对江西株 A1(JXA1)之 GP2~GP5 蛋白的结构和功能进行研究, 笔者发现, PRRSV 病毒有结构蛋白和非结构蛋白之分, 有的发生糖基化, 而有的不会发生糖基化, 其中 GP3, GP5 蛋白由于其编码基因具有很强的变异性, 所以蛋白也会随之存在变异性, 提示我们不能通过 PRRSV 某种单一蛋白的编码基因来推测整个病毒的遗传方向和病毒特性。本试验系统地分析了高致病 JXA1 株的 GP2, GP3, GP4, GP5 蛋白, 进一步预测了 GP2~GP5 的抗原性大小, 为克隆试验和免疫学试验提供了参考。

蛋白质的二级结构特别是 α 螺旋、 β 折叠可以支撑整个蛋白的结构和稳定, 卷曲结构存在于蛋白表面, 柔韧性较好, 易形成表位^[9]; 蛋白的可及性、亲水性、抗原指数等共同决定其免疫原性, 亲水性基序大多在蛋白质表面, 容易与细胞膜受体识别, 也容易与抗体直接发生结合, 这些都是在抗原表位预测中必须参考的数据^[10-13]。本试验结果表明, JXA1 株 GP2, GP3, GP4, GP5 蛋白上均具有不同数量的抗原位点, 特别是 GP4 第 60~75 位值得关注, 可以通过多肽合成的办法进行免疫学试验, GP5 的抗原位点分布较广, 所以拥有较好的抗原活性, 尤其是第 130~170 区域形成抗原表位的可能性较大。

参考文献:

- [1] CAO Zheng, LV Feng-lin. The Virosome as a Novel Concept for High Pathogenic Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (HP-PRRSV) Vaccines [J]. Journal of Integrative Agriculture(农业科学学报(英文版)), 2013, 12(7): 1215-1224.
- [2] WANG F X, WEN Y J, YANG B C, et al. Role of Non-Structural Protein 2 in the Regulation of the Replication of the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in MARC-145 Cells: Effect of Gene silencing and Over Expression [J]. Veterinary microbiology, 2012, 161(1/2): 58-65.
- [3] FAN B, LIU X, BAI J, et al. The Amino Acid Residues at 102 and 104 in GP5 of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus regulate Viral Neutralization Susceptibility to the Porcine Serum Neutralizing Antibody [J]. Virus Res, 2015; 204: 21-30.
- [4] 王 倩. 猪繁殖与呼吸综合征病毒 M 蛋白 B 细胞线性表位的鉴定及其与宿主蛋白相互作用 [D]. 北京: 中国农业大学.
- [5] 文雪霞, 陈化兰, 熊永忠, 等. 抗原表位鉴定方法的研究进展 [J]. 中国畜牧兽医, 2012, 39(7): 66-70.
- [6] HE Y, HUA R, ZHOU Y, et al. Interference of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Replication on MARC-145 Cells using DNA-Based Short Interfering RNAs [J]. Antiviral Research, 2007, 74(2): 83-91.
- [7] SPILMAN M S, WELBON C, NELSON E, et al. Cryo-Electron Tomography of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus: Organization of the Nucleocapsid [J]. The Journal of General Virology, 2009, 90(3): 527-535.
- [8] YU Z Q, ZHANG B L, NI H B, et al. Hyperacetylation of Histone H3K9 Involved in the Promotion of Abnormally High Transcription of the Gdnf Gene in Glioma Cells [J]. Molecular Neurobiology, 2014, 50(3): 914-922.
- [9] 吴玉章, 朱锡华. 一种病毒蛋白 B 细胞表位预测方法的建立 [J]. 科学通报, 1994, 39(24): 2275-2279.
- [10] 吕凤林, 朱锡华. 人 C5aR(CD88)序列结构分析及其 B 细胞表位预测 [J]. 免疫学杂志, 1998, 14(3): 153-156.
- [11] 曾 桥, 万志刚, 肖建华, 等. SARS 病毒 S 蛋白部分片段 B-细胞表位的多参数预测 [J]. 南华大学学报(医学版), 2003, 31(4): 373-378.

- [12] 宋 蓉, 李元朝, 吕凤林, 等. 人新型 C5a 受体 C5L2 结合域的信息学及其结合力的初步研究 [J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(6): 467—470.
- [13] 吕燕波, 万 瑛, 吴玉章. SARS 病毒 S 蛋白的 B 细胞表位预测 [J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(2): 101—103.

On Main Protein Structure Analysis and Research of Antigen Epitope of PRRSV

ZENG Yi-ren¹, WANG Ming-qing², CAO Zheng²,
PAN Yu-zhu², GENG Yi¹, LV Feng-lin²

1. Veterinary Medicine College of Sichuan Agriculture University, Ya'an Sichuan 625014, China;

2. Bioengineering College of Chongqing University, Chongqing 400044, China

Abstract: To analyze porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) protein structure mainly GP2, GP3, GP4, and GP5, secondary structure and the possible existence of antigen epitope, studies have been done to lay the foundation for effective vaccine design; By landing NCBI, search term "PRRSV JXA1" has been entered, and respectively, DNAMAN, BLAST software has been used to analyze the target protein primary structure, with the DTU CBS and SIB ExpASy server etc. Protein secondary structure has been analyzed; and then DNA Star software has been used for GP2—GP5 protein antigen epitope and the homologous differences between different gene subtype analysis. It is concluded that, ① theoretical isoelectric point of GP2—GP5 *PI* value is 10.12, 8.42, 8.05, 8.41; *PI* value of GP2 is obviously higher than that of GP3—GP5 ($p < 0.05$). There is no difference between GP3—GP5 ($p > 0.05$); ② JXA1 strains GP2, GP3, GP4, and GP5 protein from domestic seedlings is very close to each other, and in North America and North America classical VR2332 strains and strain Resp-PRRSMLV distance is relatively far, which suggests that highly pathogenic PRRSV JXA1 strains separated from domestic most of the strains are both belong to the American strain range; ③ GP4 high protein and GP5 protein antigen index of the base sequence number, form the greatest risk of antigen epitope, is one of the important targets for vaccine design. Conclusion, the highly pathogenic PRRSV JXA1 strains belong to American strains, GP4 high protein and GP5 protein antigen index of the base sequence number, form the greatest risk of antigen epitope, is one of the important targets for vaccine design.

Key words: PRRSV; protein structure; antigen epitope

责任编辑 夏 娟