

巴氏杆菌 GAPDH 线性 B 细胞表位预测与鉴定

朱伟峰^{1,2,3} 陈露^{1,2,3} 谭凯^{1,2,3} 王高杰^{1,2,3} 蔡承志⁴

1. 江苏省农业科学院兽医研究所, 南京 210014; 2. 农业农村部兽用生物制品工程技术重点实验室, 南京 210014; 3. 国家兽用生物制品工程技术研究中心, 南京 210014; 4. 华中农业大学动物医学院, 武汉 430070

摘要 首先通过多序列比对分析不同血清型菌株 GAPDH 的一级结构保守性, 然后使用在线软件 Bepipred-2.0 预测巴氏杆菌 GAPDH 线性 B 细胞表位, 并通过人工化学合方式合成 GAPDH 表位对应的多肽。最后使用间接 ELISA 法检测这些多肽与巴氏杆菌 GAPDH 高免血清之间的反应, 确认预测结果。研究发现, 不同血清型菌株的 GAPDH 一级结构高度保守, 只有 D 型菌株 HN06 发生 A288T 突变。本次试验预测到巴氏杆菌 GAPDH 的 3 个表位, ELISA 检测结果表明₁₇₇HATTATQKTVDGPSAKDWRGGRGAAQNIIPSSTGA₂₁₁与 GAPDH 高免血清反应明显, 是巴氏杆菌 GAPDH 的表位。本研究鉴定到了巴氏杆菌 GAPDH 的 1 个线性 B 细胞表位, 这些表位将为以后基于巴氏杆菌 GAPDH 表位的诊断、疫苗设计及感染与免疫机制研究提供技术基础。

关键词 巴氏杆菌; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶; 保护性抗原; 表位预测; 表位鉴定

巴氏杆菌病(pasteurellosis)主要由多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*)引起, 是多种畜禽、野生动物和人类的一种传染病的总称。巴氏杆菌病呈地方流行性, 会造成动物死亡或影响其生长、降低饲料报酬, 给畜禽养殖业带来较大经济损失^[1-2]。巴氏杆菌病因发病程度和感染动物不同而有不同的病名, 如猪肺疫、猪进行性萎缩性鼻炎、禽霍乱、牛出血性败血症、兔巴氏杆菌病(兔出血性败血症)等, 其中多数疫病被中国政府列为二类动物疫病^[3]。近年来, 巴氏杆菌在多种动物中的临床分离或检出率都位居前列^[4-7]。多杀性巴氏杆菌同样可以造成人类感染发病, 是一种人兽共患病病原体^[1-2]。

根据荚膜多糖抗原性的差异可以将巴氏杆菌分为 A、B、D、E、F 等 5 个血清型, 除 E 型外其他 4 个血清型均为临床常见血清型^[8]。目前对巴氏杆菌的免疫保护机制和致病机制依然不完全清楚^[2-9], 我们前期主要针对巴氏杆菌的甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)致病作用和免疫保护作用开展了研究, 研究结果

显示巴氏杆菌的 GAPDH 分子具有黏附宿主细胞和分子的作用^[10], 同时作为抗原巴氏杆菌 GAPDH 还具有免疫保护效应^[11]。抗原表位是抗原引发免疫保护的物质基础^[12-13], 部分抗原表位既是抗体发挥作用的位点, 也是病原菌对宿主发挥作用的关键位点(即致病性表位)^[14]。因而通过鉴定巴氏杆菌 GAPDH 的 B 细胞表位有助于进一步理解 GAPDH 免疫保护效应的本质, 并为进一步研究 GAPDH 的致病作用提供条件。伴随生物信息学的发展, 不断有学者试图开发能够预测抗原表位的软件, 近年来在线软件 Bepipred-2.0 对于线性 B 细胞表位已经有了比较好的预测效果^[15]。本研究的目的是预测巴氏杆菌 GAPDH 分子的线性 B 细胞表位并进一步鉴定预测结果。

1 材料与方法

1.1 基因序列来源

本研究用于序列分析巴氏杆菌 GAPDH 氨基酸

收稿日期: 2021-07-05

基金项目: 江苏省自然科学基金青年基金项目(BK20190270); 江苏省农业科技自主创新资金项目(CX(19)3016)

朱伟峰, 男, 1984 年生, 博士, 助理研究员。

序列均来自已经完成基因组测序的巴氏杆菌的基因组数据: C51-17 (A 型, NZ_MAPQ01000003.1)、PMTB2.1 (B 型, NZ_CP007205)、HN06 (D 型, NC_017027)、Pm70 (F 型, NC_002663)。所有序列从自美国国立生物技术信息中心数据库 NCBI-GenBank 公共数据库中获得。

1.2 生物材料及主要试剂

鼠源巴氏杆菌 GAPDH 高免血清在以前的试验^[10]中已经制备并保存。ELISA 板购自美国 Costar 公司, HRP 鼠二抗购自 Biosharp 公司, TMB 单组分显色液购自湖州英创生物科技有限公司。

1.3 不同菌株 GAPDH 一级结构的比较

使用在线软件 Clustal Omega (<http://www.clustal.org/omega/>) 完成氨基酸序列多序列比对, 比较 1.1 中不同巴氏杆菌 GAPDH 氨基酸序之间的相似性。

1.4 巴氏杆菌 GAPDH 表位预测

使用在线软件 Bepipred-2.0 (<http://www.detaibio.com/tools/epitope-prediction-vr.html>) 分析巴氏杆菌 GAPDH 分子上各个氨基酸残基构成表位的能力。以软件默认的 0.5 为阈值, 高于此阈值且有较长连续序列的一段多肽被预测为 GAPDH 分子的线性 B 细胞表位。

1.5 表位多肽的化学合成

针对 Bepipred-2.0 所预测到的线性 B 细胞表位, 通过南京金斯瑞生物科技股份有限公司化学合成对应序列的线性多肽。合成过程简述如下, 使用固相肽合成法 (SPPS) 合成多肽, 即依次向树脂中添加氨基酸以构建肽链。当合成完成后, 首先去保护 N-端的 Fmoc 基团, 然后去保护侧链保护基团, 最后将多肽从树脂上切割下来。粗肽液样品溶解后, 注入高效液相色谱 (HPLC) 仪, 对色谱中出现的每个部分进行分子量和纯度测试, 以确认目标多肽含量。如果预测到的抗原表位长度均超过 25 个氨基酸残基, 常规合成难度较大, 则合成能够覆盖对应表位的重叠多肽以完成后续试验。

1.6 表位与 GAPDH 高免血清的反应

使用间接 ELISA 法^[16]鉴定多肽与血清的反应性, 简要叙述如下。以多肽包被 ELISA 板 (10 $\mu\text{g}/\text{孔}$, 对照组不包被任何抗原), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h。以 PBST 洗涤 5 次后, 使用 5% 脱脂乳于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下封闭 1 h。接下来孵育 1/200 稀释的巴氏杆菌 C51-17 株 GAPDH 高免血清, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下 1 h。以 PBST 洗涤 5 遍后, 孵育偶联

HRP 的羊抗鼠二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 30 min。经过 5 遍洗涤后加入 100 μL 的 TMB 单组分显色液, 反应 10 min 后加入 50 μL 终止液 (2 mol/L 硫酸)。最后在酶标仪上读取 450 nm 的吸光度。

1.7 数据处理与统计学检验

试验数据均使用平均值 (means) \pm 标准差 (SD) 来表示, 用 *t* 检验检测试验组和对照组的统计学差异, 差异显著判定标准为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 不同菌株 GAPDH 氨基酸序列的相似性

通过多序列比较发现巴氏杆菌不同血清型菌株 C51-17、PMTB2.1、HN06、Pm70 的 GAPDH 氨基酸序列高度保守, 仅 HN06 发生了 A288T 一处点突变 (未展示多序列比对结果)。

2.2 GAPDH 线性 B 细胞表位预测结果

选择巴氏杆菌 C51-17 株的 GAPDH 序列进行预测分析, 所预测的巴氏杆菌 GAPDH 线性 B 细胞表位的分布状况如图 1 所示。有多段连续序列高于软件默认的阈值 0.5, 本研究选择了最长的 3 个片段 (分别记为 PMepitope1、PMepitope2、PMepitope3, 表 1、图 2) 作为预测到的线性 B 细胞表位进行后续研究。

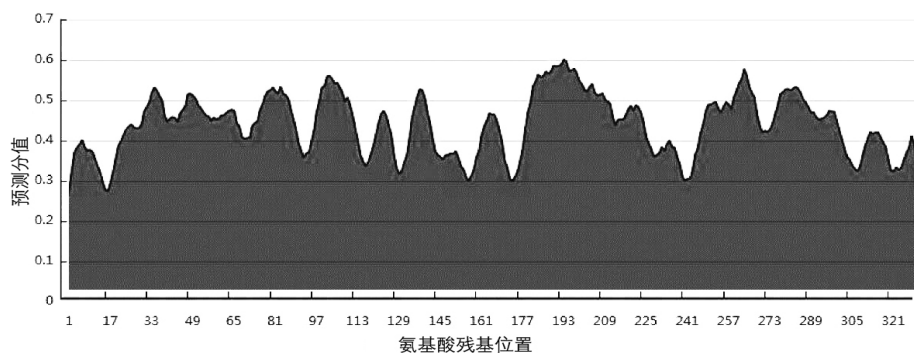
2.3 表位对应多肽与 GAPDH 高免血清的反应

以人工化学合成方式制备所预测表位 PMepitope1、PMepitope2、PMepitope3 对应的多肽 (分别标记为 PMG-1、PMG-2 (A-D)、PMG-3) (表 1)。由于 PMG-2C 结构特殊, 经过反复和尝试都没有成功合成, 所以本次试验没有使用该条多肽。

巴氏杆菌 GAPDH 的抗原表位 PMepitope2 对应的合成多肽 PMG-2 (A、B、D) 均能够与巴氏杆菌 GAPDH 高免血清发生明显的反应 ($P < 0.05$), 但是 PMepitope1 和 PMepitope3 对应的合成多肽 (PMG-1、PMG-3) 则不能与巴氏杆菌 GAPDH 高免血清发生反应 ($P > 0.05$)。该结果证实所预测到的 PMepitope2 是巴氏杆菌 GAPDH 的抗原表位, 但 PMepitope1 和 PMepitope3 则不是巴氏杆菌 GAPDH 的抗原表位。

3 讨论

BepiPred-2.0 是通过随机森林算法学习来自于抗体-抗原复合物结构的表位数据进而建立起的一种表位预测工具, 它对于线性 B 细胞表位的预测能



注:使用在线软件Bepipred-2.0(<http://www.detaibio.com/tools/epitope-prediction-vr.html>),所分析的序列为C51-17株的GAPDH序列。

图1 巴氏杆菌 GAPDH 各氨基酸残基构成表位能力及线性 B 细胞表位预测结果

表 1 巴氏杆菌和 GAPDH 线性 B 细胞表位预测结果及对应多肽合成情况

片段名称	序列	对应的合成多肽(序列)
PMepitope1 74_VTAERDPANLKWNEIGV ₉₀		PMG-1(VTAERDPANLKWNEIGV)
PMepitope2 177_HATTATQKTVDGPSAKD- WRGGRGAAQNIPSSSTA ₂₁₁		PMG-2A(HATTATQKTVDGPSAKDWRGGRGA) PMG-2B(TQKTVDGPSAKDWRGGRGAAQNI- IP) PMG-2C (DGPSAKDWRGGRGAAQNIPSSSTG) PMG-2C (KDWGRGAAQNIPSSSTA)
PMepitope3 278_AVVSTDFNGCAL ₂₈₉		PMG-3(AVVSTDFNGCAL)

```

1  MAIKIGINGFRIGRIVFRAAQHRDDIEVVGINDLIDVEYMAFMLKYDSTHGRFDGTVEV 60
61  KDGNLVVGKTIIRVTAERDPANLKWNEIGVEIAVEATGLFLDDATARKHITAGAKKVVLT 120
121 GPSKDATPMFVSGVNFDTYAGQDIVSNASCTTNCLAPLAKVINDKFGIKDGLMTTVHATT 180
181 ATQKTVDGPSAKDWRGGRGAAQNIIPSSSTAAGAVGKVI PALNGKLTGMAFRVPTPNVSV 240
241 VDLTVNLEKPATYAEICAEIKRASENEMKGVLYTEDAVVSTDFNGCALTSVFDAAGIA 300
301 LTDTFVKLVSWYDNETGYSNKVLDLVAHVYNYKG 334
    
```

注:氨基酸序列为巴氏杆菌 C51-17 株 GAPDH 的一级结构,本研究预测到的抗原表位已经用下划线标出。

图 2 所预测到的表位在巴氏杆菌 GAPDH 分子上的位置

力尤为突出^[15]。所以本研究选择了该软件预测巴氏杆菌 GAPDH 的表位。依照软件使用方法,预测分值高于 0.5 且长度较长的多肽构成表位的可能性较大,所以本研究选择了长度最长的 3 段片段来作为预测到的表位进行研究。通过合成多肽与 GAPDH 高免血清的反应进一步确认了其中 1 个是表位。研究结果证实 BepiPred-2.0 具有较好的表位预测能力,特别是当所预测表位较长时效果良好。

通过 ELISA 验证,本研究最终确认 PMepitope2 分别是巴氏杆菌 GAPDH 和巴氏杆菌 GAPDH 的线性 B 细胞表位。该表位的序列及其在 GAPDH 分子上的位置与之前研究所鉴定到的 GAPDH 表位^[17-18]都不同,是新的表位。之前的文献报道显示 GAPDH 表位在抗原提呈、调理吞噬等方面发挥作用,本研究所鉴定到的表位可能也具有类似的免疫学效应,以后

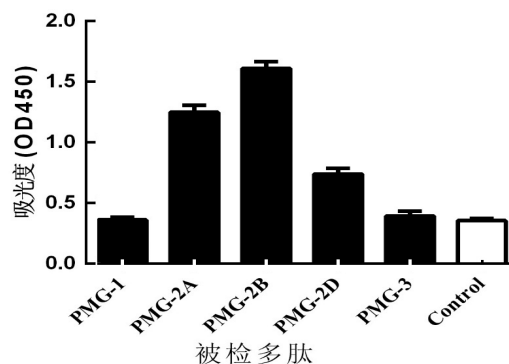


图 3 间接 ELISA 法检测多肽与高免血清之间反应的结果

应进一步研究,并在疫苗设计中加以利用。

我们的研究结果显示 GAPDH 具有高度保守的特点。巴氏杆菌不同血清型菌株的 GAPDH 一级结构高度相似,仅有 1 个点突变,本研究所鉴定到的表位所在位点序列完全相同。最近已经有研究显示细菌保守

蛋白的表位可以用于建立特异性的诊断方法^[16],因而将来还可以以本研究所鉴定到的表位(PMepitope2)为基础建立巴氏杆菌感染的特异性诊断方法。我们的前期工作表明,GAPDH是巴氏杆菌的黏附因子,某些氨基酸位点可能发挥关键作用^[19]。其他学者的研究则表明有的抗原表位同时也是病原和宿主相互作用的关键位点^[20-22],因而本研究所鉴定到的表位可为研究巴氏杆菌与宿主相互作用提供新的线索。

本研究成功预测并鉴定到1个巴氏杆菌的抗原表位,该表位将为以后的巴氏杆菌GAPDH免疫保护机制、致病机制研究提供新的线索,并为基于GAPDH抗原表位的疫苗设计和诊断试剂开发提供技术基础。

参 考 文 献

- [1] 姚金水. 巴氏杆菌病[M]// 陈怀涛, 赵德明. 兽医病理学. 北京: 中国农业出版社, 2012: 297-606.
- [2] WILSON B A, HO M. *Pasteurella multocida*: from zoonosis to cellular microbiology[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2013, 26(3): 631-655.
- [3] 萧索. 农业部公告《一、二、三类动物疫病病种名录》[J]. 农业知识, 2009(6): 9.
- [4] ZHU W, WU C, KANG C, et al. Development of a duplex PCR for rapid detection and differentiation of *Erysipelothrix rhusiopathiae* vaccine strains and wild type strains[J]. *Veterinary microbiology*, 2017, 199: 108-110.
- [5] 陈露, 朱伟峰, 魏后军, 等. 多杀性巴氏杆菌OmpH2对宿主Fn和Plg黏附作用的研究[J]. 中国动物传染病学报, 2019, 27(6): 10-15.
- [6] 邬琴, 张星星, 顾晓晓, 等. 牛源多杀性巴氏杆菌血清分型及毒力相关基因的检测研究[J]. 中国畜牧兽医, 2020, 47(6): 1910-1920.
- [7] 陈国权, 张旭, 阎朝华, 等. 鸭源多杀性巴氏杆菌的分离鉴定及耐药性分析[J]. 中国畜牧兽医, 2020, 47(2): 620-628.
- [8] 陈溥言. 巴氏杆菌病[M]. 陈溥言. 兽医传染病学. 北京: 中国农业出版社, 2006.
- [9] WANG Q, CHANG B J, RILEY T V. *Erysipelothrix rhusiopathiae*[J]. *Vet Microbiol*, 2010, 140(3/4): 405-417.
- [10] ZHU W, WEI H, CHEN L, et al. Characterization of host plasminogen exploitation of *Pasteurella multocida*[J]. *Microbial pathogenesis*, 2019, 129: 74-77.
- [11] 朱伟峰, 陈露, 王芳, 等. 巴氏杆菌糖酵解酶的免疫保护效应研究[J]. 中国畜牧兽医, 2021, 48(6): 2188-2195.
- [12] 朱瑞良. 抗原[M]// 崔治中. 兽医免疫学. 北京: 中国农业出版社, 2015.
- [13] 郭鑫. 抗原[M]// 杨汉春. 动物免疫学. 北京: 中国农业大学出版社, 2003.
- [14] 金明兰, 南文龙, 韩松, 等. 抗原表位及多表位疫苗研究进展[C]. 中国畜牧兽医学动物传染病学分会(Branch of Animal Infectious Diseases, CAAV). 中国畜牧兽医学学会家畜传染病学分会第七届全国会员代表大会暨第十三次学术研讨会论文集(上册). 中国畜牧兽医学动物传染病学分会(Branch of Animal Infectious Diseases, CAAV): 中国畜牧兽医学, 2009: 4.
- [15] JESPERSEN M C, PETERS B, NIELSEN M, et al. BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes[J]. *Nucleic acids research*, 2017, 45(W1): W24-W29.
- [16] PYCLIK M, GÓRSKA S, BRZOZOWSKA E, et al. Epitope mapping of streptococcus agalactiae elongation factor tu protein recognized by human sera[J]. *Frontiers in microbiology*, 2018, 9: 125.
- [17] CALDERON-GONZALEZ R, TOBES R, TERAN-NAVARRO H, et al. Epitopes for multivalent vaccines against *Listeria*, *Mycobacterium* and *Streptococcus* spp: a novel role for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase[J]. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2020, 10: 573348.
- [18] 王梦瑶. 金黄色葡萄球菌GapC蛋白B细胞表位的鉴定与分析[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2018.
- [19] ZHU W, WANG Y, CAI C, et al. *Erysipelothrix rhusiopathiae* recruit host plasminogen via the major protective antigen SpaA[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2017, 364(5): x36.
- [20] SONG Y, WANG F, FAN Z, et al. Identification of novel rabbit hemorrhagic disease virus B-cell epitopes and their interaction with host histo-blood group antigens[J]. *Journal of general virology*, 2015, 97(2): 356-365.
- [21] RAJAM G, PHILLIPS D J, WHITE E, et al. A functional epitope of the pneumococcal surface adhesin A activates nasopharyngeal cells and increases bacterial internalization[J]. *Microbial pathogenesis*, 2008, 44(3): 186-196.
- [22] POON A Y, VANCE D J, RONG Y, et al. A supercluster of neutralizing epitopes at the interface of ricin's enzymatic (RTA) and binding (RTB) subunits[J]. *Toxins (Basel)*, 2017, 9(12): 378.

【责任编辑: 胡 敏】