

文章编号:2095-7386(2016)03-0045-04

DOI:10.3969/j.issn.2095-7386.2016.03.008

结核分枝杆菌 Rv2986c T、B 细胞表位分析

孙妍,王心情,占卫红,雷航,陈高瞻,余晓丽
(武汉轻工大学 生物与制药工程学院,湖北 武汉 430023)

摘要: 预测并分析结核分枝杆菌 Rv2986c 的 CD4⁺T、CD8⁺T 和 B 细胞表位分布情况。方法在 NCBI 数据库上查询并获得 Rv2986c 的氨基酸序列,用 BLAST 分析其与结核分枝杆菌复合群及人类蛋白的同源性。利用 NetMHC 数据库预测并分析目的蛋白的 CD4⁺T 细胞表位的分布情况;利用 SYFPEITHI、NetMHC、BIMAS 和 IEDB 数据库预测并分析目的蛋白的 CD8⁺T 细胞表位的分布情况。然后,综合 CD4⁺T 与 CD8⁺T 细胞表位预测情况,筛选出优势 T 细胞表位肽段。利用 IEDB 和 ABCpred 数据库分析目的蛋白的 B 细胞抗原表位,筛选出优势 B 细胞表位肽段。通过预测与分析,初步筛选出 CD4⁺T 细胞的强结合候选表位 10 个,弱结合候选表位 245 个,CD8⁺T 细胞候选表位 3 个;综合 CD4⁺T 与 CD8⁺T 细胞表位预测结果,最终筛选出 1 个优势 T 细胞表位肽段。综合 IEDB 和 ABCpred 数据库分析得出 8 条优势 B 细胞抗原表位。预测出来的 T、B 细胞候选表位将为结核病的特异性诊断及新的抗结核多表位疫苗的研究奠定基础。

关键词: 结核分枝杆菌;Rv2986c;T 细胞表位;B 细胞表位

中图分类号: Q 93

文献标识码: A

Prediction and analysis of T, B cell epitopes' s distribution of the *Mycobacterium tuberculosis* Rv2986c

SUN Yan, WANG Xin-qian, ZHAN Wei-hong, LEI Hang, CHEN Gao-zhan, YU Xiao-li

(School of Biology and Pharmaceutical Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China)

Abstract: To predict and analyze the distribution of CD4⁺T cell CD8⁺T-cell and B-cell epitopes encoded by the Rv2986c of *Mycobacterium tuberculosis*. Obtaining the amino acid sequences by online NCBI database and analyzing the homology between *Mycobacterium tuberculosis* complex and human proteins by BLAST. NetMHC databases was used to predict CD4⁺T cell epitopes. Predicting the distribution of CD8⁺T cell epitopes by SYFPEITHI, NetMHC, BIMAS and IEDB databases. IEDB and ABCpred databases was used to predict B cell epitopes. After the prediction, we can select the superior epitopes. For the results, there are 10 strong and 245 weak candidates CD4⁺T cell epitopes candidates 3 CD8⁺T cell epitopes candidates. In the end, 1 superior T-cell epitope can be selected. 8 superior B-cell epitopes can be selected. Prediction of T and B cell epitopes will be the basis diagnosis of tuberculosis.

收稿日期:2016-03-20.

作者简介:孙妍(1992-),女,硕士研究生,E-mail:1928125710@qq.com.

通信作者:余晓丽(1963-),女,教授,E-mail:yxl268@126.com.

基金项目:武汉轻工大学研究生创新基金项目(2014cx019).

sis and the study of new tuberculosis vaccine.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*; Rv2986c; T-cell epitope; B-cell epitope

1 引言

结核病是一种严重危害人类身体健康的慢性传染病,由结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)感染所致^[1]。据 2015 年 WHO 报^[2],全球有 960 万新发结核病病例,其中包括 48 万耐药结核病(multiple drug resistant tuberculosis, MDR-TB)病例。我国 2014 年的新发肺结核人数为 93 万,仅次于印度(220 万)和印度尼西亚(100 万)而位居全球第三位。但是有研究发现,现在唯一用来预防结核病的疫苗——卡介苗(bacilluscalmette-guerinvaccine, BCG)只能预防婴儿和儿童肺外血源播散性结核^[3],对成年人的保护作用效力不确定(0%—80%)^[4],这说明有些人在接种卡介苗后仍然有患结核病的风险。除此之外,对多重耐药结核病而言其治疗失败率比一般敏感性结核病高出 80 倍^[5],这表明多重耐药结核病在今后的治疗中存在无药可治的风险。面对如此严峻的结核病形势我们迫切的需要寻找一种能代替 BCG 来预防结核病感染的新型疫苗。

对传统疫苗来说,我们往往是将病原微生物或者完整的外源物质作为抗原来激发机体的免疫应答。但实际上仅仅只是外源物的一小段区域(抗原表位)在发挥免疫应答作用。由此可见在表位水平筛选特定的优势 B 细胞表位与 T 细胞表位,对设计开发新型表位疫苗和抗体,和对疾病的预防和诊断有重要意义。目前尚未有关于 Rv2986c 的研究报道,旨在分析 Rv2986c 作为免疫标志物对结核病的诊断检测方面作用的可行性。

2 材料与方法

2.1 材料

通过 NCBI 数据库获得 MTB 的 Rv2986c 蛋白序列(Gene ID: 888166;214aa)。

2.2 同源性分析

通过 NCBI 数据库中的 BLAST(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)程序,将 Rv2986c 蛋白序列与结核分枝杆菌复合群蛋白序列和人类蛋白序列分别进行同源比对。

2.3 CD4⁺T 细胞表位预测

用在线软件 NetMHC II pan3. 1 Server ([http://](http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC-IIpan/)

www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC-IIpan/)对目的蛋白的 CD4⁺T 细胞表位进行预测,设定表位多肽长度为 15 个氨基酸残基,选取经典人白细胞抗原 II 类基因(HLA-DP、HLA-DQ、HLA-DR,包括 A、B 两个基因座)中的 HLA-DRB1-0101、0301、0401、0701、0802、0901、1101、1302、1501 亚型为限定条件^[6],表位多肽与等位基因的结合性能评价值设定为 50 nm,预测结果以结合值由强到弱次序排列输出(强结合亲和值 < 50 nm, 50 nm < 弱结合亲和值 < 500 nm)。

2.4 CD8⁺T 细胞表位预测

2.4.1 SYFPEITHI 对目的蛋白 CD8⁺T 细胞表位预测

用在线软件 SYFPEITHI([http://www.syfpeithi.de/bin/MHCServer.dll/Epitope Prediction.htm](http://www.syfpeithi.de/bin/MHCServer.dll/EpitopePrediction.htm))对目的蛋白的 CD8⁺T 细胞表位进行预测,选取经典人白细胞抗原 I 类基因(HLA-A、HLA-B、HLA-C)HLA-A*02:01 和 HLA-A*03:01 等位基因作为限定条件,设定表位多肽长度为 9 个氨基酸残基,选取前 2% 的氨基酸表位进行分析^[7]。

2.4.2 NetMHC 对目的蛋白 CD8⁺T 细胞表位预测

用在线软件 NetMHC(<http://www.cbs.dtu.dk/service/NetMHC/>)对目的蛋白的 CD8⁺T 细胞表位进行预测。选取人类可能性最大的 HLA-A 02:01(A2)和 HLA-A0301(A3)等位基因作为预测表位肽段的限定条件^[8],设定表位多肽长度为 9 个氨基酸残基,结果以结合值由强到弱次序排列输出(强结合亲和值 < 50 nm, 50 nm < 弱结合亲和值 < 500 nm)。

2.4.3 BIMAS 对目的蛋白 CD8⁺T 细胞表位预测

用在线软件 BIMAS(http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/)对目的蛋白的蛋白的 CD8⁺T 细胞表位进行预测。选取 HLA-A_0201 及 A3 作为限定条件,设定表位多肽长度为 9 个氨基酸残基。

2.4.4 IEBD 对目的蛋白 CD8⁺T 细胞表位预测

用在线软件 IEBD(<http://tools.iedb.org/mhci/>)对目的蛋白的 CD8⁺T 细胞表位进行预测。选取 HLA-0201、HLA-0301 亚型作为限定条件,设定表位多肽长度为 9 个氨基酸残基。选定亲和值为 0—500 nm 的序列进行分析。

2.5 B 细胞表位预测

2.5.1 IEDB 对目的蛋白 B 细胞表位预测

用在线软件 IEBD (http://tools.immuneepitope.org/tools/bcell/iedb_input) 对目的蛋白进行 B 细胞抗原表位预测。分别用 IEBD 提供的五种参数方案(亲水性方案、表面可及性方案、柔韧性方案、抗原性方案、二级结构预测方案)进行抗原表位预测。

2.5.2 ABCpred 对目的蛋白 B 细胞表位预测

在线软件 ABCpred (http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/ABC_submis-sio n.html) 是通过递归神经网络训练得到的分数对目的蛋白的 B 细胞表位进行预测。提交目的蛋白序列,设定临界值为 0.51,选定表位肽段长度为 16 个氨基酸序列。

3 结果

3.1 同源性分析结果

通过同源比对发现目的蛋白与 MTB 复合群(人型 MTB、牛型 MTB、非洲分枝杆菌和田鼠分枝杆菌和减毒牛分枝杆菌菌株,BCG)的同源性均为 100%,与非 MTB 的同源性有所降低(80%—60%,平均 70%),与其他细菌的同源性更低(最高 80%,平均 65%),抗原序列与人类蛋白无同源性,该蛋白具有特异性抗原的潜质,并不会出现与人类自身蛋白交叉感染的情况,具有较高的安全性^[9]。

3.2 CD4⁺T 细胞表位预测结果

利用在线数据库 NetMHC II pan Server 对目的蛋白表位进行预测,预测结果见表 1。从预测结果发现,不同等位基因所结合的短肽数目相差比较显著。其中目的蛋白仅在 DRB1-0101 和 DRB1-1101 等位基因处有强结合位点,分别为 7 个和 3 个。预

测结果中,9 个 HLA-DRB1 等位基因处均有弱结合位点,其中 DRB1-1101 结合位点最多,DRB1-1302 结合位点最少。与 CD8⁺T 细胞表位预测方法相比,CD4⁺T 细胞表位预测更为复杂一些,NetMHC II pan Server 是目前预测效果较好的在线工具。将 NetMHC II pan Server 预测出来的 15 个氨基酸的表位肽与 CD8⁺T 细胞的表位肽综合起来分析才能找到更可靠的表位肽段,然后再合成验证。

3.3 CD8⁺T 细胞表位预测结果

综合 4 个不同的在线预测工具(SYFPEITHI、NetMHC、BIMAS 和 IEBD)对目的蛋白的 CD8⁺T 细胞表位进行预测,结果见表 2。综合 4 种工具预测出来结合能力都较强的九肽共 3 条,其表位氨基酸序列起始位点为 94—102、105—113 和 113—121。

表 1 Rv2986c 抗原 CD4⁺T 细胞表位分布情况

HLA 分子亚型	Rv2986c 的总肽段数为 199	
	强结合肽段数	弱结合肽段数
DRB1-0101	7	62
DRB1-0301	0	16
DRB1-0401	0	6
DRB1-0701	0	31
DRB1-0802	0	33
DRB1-0901	0	23
DRB1-1101	3	63
DRB1-1302	0	4
DRB1-1501	0	7
总计	10	245

表 2 Rv2986c 抗原 CD8⁺T 细胞表位的综合分析结果

氨基酸位点	氨基酸序列	SYFPEITHI	NetMHC		BIMAS	IEDB
		得分	亲和值	结合区强弱	得分	亲和值
94—102	RLPAEGPAV	22	156.2	弱结合	69.552	175.00
105—113	GVGASAAKK	28	294.74	弱结合	6.000	151.00
113—121	KVAKKAPAK	29	23.16	强结合	6.000	38.00

注:亲和值越低表明结合能力越强;得分越高表示结合能力越强。

3.4 CD4⁺T 和 CD8⁺T 细胞表位综合分析结果

将在线软件预测得到的 CD4⁺T 和 CD8⁺T 细胞表位进行整理分析。将预测得到的 8 条 CD4⁺T 细胞抗原和 3 条 CD8⁺T 细胞抗原综合分析根据 CD4⁺T 细胞表位 15 肽覆盖 CD8⁺T 细胞表位的 9 肽筛选出共同的优势肽段(表 3)。通过综合分析共得到 1 条优势抗原肽段,其起始位点为 105—113,

其序列为 GVGASAAKK。

表 3 Rv2986c 抗原 CD4⁺T 和 CD8⁺T 表位综合分析结果

蛋白	序列	
	CD8 ⁺ T 表位肽段	CD4 ⁺ T 表位肽段
103-117	GVGASAAKK	KRGVGASAAKKVAKK

注:表中划线部分即为优势抗原表位。

3.5 B 细胞表位预测结果

综合两种在线软件分析共筛选出 8 条优势 B 细胞抗原表位,见表 4。由于 B 细胞处理抗原时不需要抗原提呈细胞(APC)处理,其抗原表位为构象型表位具有一定的空间构象,B 抗原表位是由那些空间上邻近但实际上不连续的氨基酸组成,因此其表位肽段长度不一。

表 4 B 细胞优势表位

氨基酸起始位点	表位肽序列
29—44	DTIVRAVHKGDSVTIT
60—65	ARNPRT
84—95	QFKAVVSGAQRL
97—109	AEGPAVKRGVGAS
111—118	AKKVAKKA
117—123	KAPAKKA
161—168	TKSPAKKV
193—200	AAAKRPAT

4 讨论

研究表明人体在对抗结核分枝杆菌的过程中主要依赖于特异性免疫和非特异性免疫反应^[10-12]。但是结核分枝杆菌与其他革兰氏阳性菌不同,存在宿主逃逸现象^[13]。这给我们利用结核分枝杆菌自身抗原来作为免疫标志物诱导其产生特异性免疫反应以及新型疫苗的开发带来挑战。在机体特异性免疫应答过程中主要是 T、B 两类淋巴细胞参与免疫应答,因此对 T、B 细胞表位的分析筛选显得尤为重要。

具体来说,CD4⁺T 细胞结合 MHC-I 类分子提呈的抗原表位,有辅助型和调节型两类,主要产生 IFN- γ , IL-2, IL-12, TNF- β/α 这几类细胞因子^[14],研究发现 CD4⁺T 细胞产生的 IFN- γ 不仅在控制结核分枝杆菌感染也在诱导强大 CD8⁺T 细胞方面发挥作用^[15]。CD8⁺T 细胞结合 MHC-II 类分子提呈的抗原表位,主要产生 IFN- γ 和 TNF- α 等细胞因子^[16]。有研究报道,由于基因缺失无 CD8⁺T 细胞功能的小鼠更容易感染结核分枝杆菌^[17]。且有研究发现少量的记忆 CD8⁺T 细胞也能发挥强大的免疫作用,分泌 IFN- γ 的 CD8⁺T 细胞在对抗结核分枝杆菌的过程中发挥重要作用^[18]。B 细胞表面的抗原表位能识别和辅助呈递抗原,且其在免疫过程中能产生抗体杀灭细菌。

本研究利用生物信息学方法,通过表位分析数

据库对 MTB 的 Rv2986c 蛋白抗原的 CD4⁺T、CD8⁺T 细胞以及 B 细胞进行表位预测分析,找出与等位基因结合比较强的优势肽段。通过对比 4 种在线预测工具预测的结果,得出了抗原指数和表位较强的优势抗原集中区 103—117。通过 B 细胞抗原表位分析筛选出了 8 条优势抗原表位。通过预测结果说明用 Rv2986c 蛋白作为抗体可以刺激机体产生免疫应答,可作为免疫标志物用于结核病的诊断,也可以与现有已知的诊断抗原组合使用,从而提高对结核病人的检测敏感性。

参考文献:

- [1] 张贺秋,赵雁林. 现代结核病诊断技术[M]. 北京:人民卫生出版社. 2013:5-6.
- [2] MarioRaviglione. Global tuberculosis report 2015[J]. Global Tuberculosis Report,2015.
- [3] Trunz BB, Fine P, Dye C. Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and miliary tuberculosis worldwide: a meta-analysis and assessment of cost- effectiveness[J]. Lancet, 2006,367(9517):1173-1180.
- [4] Black GF, Weir RE, Floyd S, et al. BCG- induced increase in interferon- gamma response to mycobacterial antigens and efficacy of BCG vaccination in Malawi and the UK: two randomised-controlled studies [J]. Lancet, 2002, 359 (9315):1393-1401.
- [5] 沈洪波,王洪海. 治疗性结核病疫苗研究进展[J]. 微生物与感染,2010(02):111-116.
- [6] 叶娟,张舒林,刘文第. 结核分枝杆菌 RD12 区 T 细胞表位分布情况预测及分析[J]. 上海交通大学学报(医学版),2014,01:7-12.
- [7] 吴祖建,高芳奎,沈建国. 生物信息学分析实践[M]. 北京:科学出版社,2010:147-148.
- [8] Gordon SV, Brosch R, Billault A, et al. Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays[J]. Mol Microbiol, 1999, 32(3): 643-655.
- [9] Mommaas B, Kamp J, Drijfhout JW, et al. Identification of a novel HLA-B60-restricted T cell epitope of the minor histocompatibility antigen HA-1 locus [J]. J Immunol, 2002, 169 (6):3131-3136.

(下转第 55 页)

- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015.
- [11] 梁学清,李丹丹,黄忠诚. 茯苓药理作用研究进展[J]. 河南科技大学学报,2012,30(2):154-156.
- [12] 刁铁成. 茯苓药理作用的初步研究[J]. 中医临床研究,2015,7(8):23-24.
- [13] Shu S H, Chen B, Zhou M C, et al. De novo sequencing and transcriptome analysis of *Wolfiporia cocos* to reveal genes related to biosynthesis of triterpenoids [J]. PLoS One, 2013, 8(2):e71350-71352.
- [14] Haller F, Kulle B, Schwager S, et al. Equivalence test in quantitative reverse transcription polymerase chain reaction: confirmation of reference genes suitable for normalization [J]. Analytical Biochemistry, 2004, 335(1):1-9.
- [15] 杨怡妹,孙晓娜,王小利,等. 实时荧光定量 PCR 技术的操作实践[J]. 实验室研究与探索,2011,30(7):15-19.
- [16] Woo T H, Patel B K, Cinco M, et al. Identification of *Leptospira biflexa* by real-time homogeneous detection of rapid cycle PCR product [J]. Journal of Microbiological Methods, 1999, 35(1):23-30.
- [17] Navidshad B, Liang J B, Jahromi M F. Correlation Coefficients Between Different Methods of Expressing Bacterial Quantification Using Real Time PCR [J]. International Journal Molecular Science, 2012, 13(2):2119-2132.
- [18] 孙炳剑,陈清清,袁虹霞,等. SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测小麦纹枯病菌体系的建立和应用[J]. 中国农业科学,2015,48(1):55-62.
- [19] 陈海一,迟德富,姚大彬,等. SYBR Green I 法洋虫 β -action 基因实时荧光定量 RT-PCR 体系的建立[J]. 中国农学通报,2013,29(12):157-163.
- [20] Chris H, Philippa L, Severine T, et al. Melting curve analysis of feline calicivirus isolates detected by real-time reverse transcription PCR [J]. Journal of Virological Methods, 2002, 106(2):241-244.
- [21] 周晓丽,朱国坡,李雪华,等. 实时荧光定量 PCR 技术原理与应用[J]. 中国畜牧兽医,2010,37(2):87-89.

(上接第 48 页)

- [10] Kashion S S, Vallerskog T, Martens G, et al. Initiation of acquired immunity in the lungs of mice lacking lymph nodes after infection with aerosolized *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Am J Pathol, 2010, 176(1):198-204.
- [11] Van Crevel R, Ottenhoff T H, Van der Meer J W, Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Clin Microbiol Rev, 2002, 15(2):294-309.
- [12] Leuillet C, Martinon F, Perez C, et al. *Mycobacterium tuberculosis* subverts innate immunity to evade specific effectors [J]. J Immunol, 2006, 177(9):6245-6255.
- [13] Cambier C J, Stanley Falkow, Latita Ramakrishnam. Host evasion and exploitation schemes of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Cell. 2014, 159:1497-1509.
- [14] 卢佳丽,杨晓明. 结核分枝杆菌的免疫学研究进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2010(01):74-78.
- [15] Flynn JL. Lessons from experimental *Mycobacterium tuberculosis* infections [J]. Microbes Infect, 2006, 8(4):1179-1188.
- [16] 董毅,吴利先. T 细胞免疫在抗结核杆菌感染中的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2014, 18:3593-3595.
- [17] O'Garra A, Redford P S, McNab F W, et al. The Immune Response in Tuberculosis [J]. Annu Rev Immunol, 2013, 31:475-527.
- [18] Sud D, Bigbee C, Flynn JL, et al. Contribution of CD8 + T cells to control of *Mycobacterium tuberculosis* infection [J]. The Journal of Immunology, 2006, 176(7):4296-4314.