

朱伟峰,陈露,谭凯,等.猪丹毒丝菌 GAPDH 线性 B 细胞表位预测与鉴定[J].江苏农业科学,2021,49(22):171-174.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.22.031

猪丹毒丝菌 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, 江苏南京 210014; 2. 农业农村部兽用生物制品工程技术重点实验室, 江苏南京 210014;

3. 国家兽用生物制品工程技术研究中心, 江苏南京 210014; 4. 华中农业大学动物医学院, 湖北武汉 430070)

摘要:为预测并鉴定猪丹毒丝菌甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)分子线性 B 细胞表位,首先通过多序列比分析已经全基因组测序的 10 株菌株的 GAPDH 一级结构保守性;然后使用在线软件 Bepipred-2.0 预测猪丹毒丝菌 GAPDH 线性 B 细胞表位,接下来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 法检测这些多肽与猪丹毒丝菌 GAPDH 高免血清之间的反应。研究发现已经完成全基因组测序的 10 株菌株的 GAPDH 一级结构高度保守。通过软件预测,找到了猪丹毒丝菌 GAPDH 的 3 个潜在的表位。ELISA 检测结果表明,₇₄VLSEDPKLNLPWKELGV₉₀和₁₇₈HAYTNDQNTLDGPHAKGDLRRGRAAAQSIIPNSTGA₂₁₃与 GAPDH 高免血清反应明显,是猪丹毒丝菌 GAPDH 的表位。成功预测并鉴定到 2 个猪丹毒丝菌的抗原表位,这些表位将为以后基于猪丹毒丝菌 GAPDH 表位的诊断、疫苗设计及致病机制研究提供技术基础。

关键词:猪丹毒丝菌;甘油醛-3-磷酸脱氢酶;保护性抗原;表位预测;表位鉴定

中图分类号:S858.28 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2021)22-0171-04

猪丹毒丝菌(*Erysipelothrix rhusiopathiae*, 又称红斑丹毒丝菌、猪丹毒杆菌)是造成猪丹毒的病原^[1]。猪丹毒是世界范围内危害养猪业的主要细菌性疫病之一,在我国猪丹毒和猪肺疫、猪瘟曾并称为猪场三大疫病。近年来猪丹毒的危害虽然有所降低,但其临床分离或检出率依然位居前列,依然是猪场主要细菌性疫病^[2-3]。猪丹毒丝菌同样可以造成人类感染发病(类丹毒),是一种人兽共患病病原^[4]。

目前猪丹毒的免疫保护机制和致病机制依然不完全清楚^[4]。我们的前期工作针对猪丹毒丝菌

甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)分子的免疫保护作用 and 致病作用开展了研究。结果显示,猪丹毒丝菌的 GAPDH 分子既可以作为抗原发挥免疫保护作用,也可以作为毒力因子发挥黏附作用^[5-6]。

抗原表位是抗原引发免疫保护的物质基础^[7-8]。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)^[9]。因而通过鉴定猪丹毒丝菌 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^[10]。本研究的目的是预测猪丹毒丝菌 GAPDH 分子的线性 B 细胞表位,并进一步鉴定预测结果。

收稿日期:2021-04-01

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

作者简介:朱伟峰(1984—),男,河北石家庄人,博士,助理研究员,主要从事新型疫苗设计与动物疫病防控基础研究。E-mail: zhuweifeng8@126.com。

[10] 薛媚,庄林林,戴鼎震,等. 鸽疱疹病毒 PCR 检测方法的建立及试剂盒的研制[J]. 现代农业科技, 2013(12): 229-230, 232.

[11] 蒋文明,侯广宇,李金平,等. 鸽疱疹病毒与腺病毒感染的 PCR 检测方法的建立[J]. 动物医学进展, 2009, 30(8): 63-65.

[12] 兰世捷,陈亮,苗艳,等. 一例鸽圆环病毒和鸽疱疹病毒混合感染的诊治[J]. 现代畜牧科技, 2021(1): 11-13, 167.

[13] Ketterer P, Timmins B, Prior H, et al. Inclusion body hepatitis associated with an adenovirus in racing pigeons in Australia[J]. Australian Veterinary Journal, 1992, 69(4): 90-91.

[14] 冯冠裕,田丽平,鲁会军,等. 腺病毒诊断方法的研究进展[J]. 中国病原生物学杂志, 2021, 16(2): 241-244, 250.

[15] 赵盼盼. 野鸽疱疹病毒的分离鉴定及 UI27 基因生物信息学分析[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2016.

1 材料与方法

1.1 基因序列来源

本研究用于序列分析的猪丹毒丝菌 GAPDH 氨基酸序列均来自已经完成基因组测序的猪丹毒丝菌,基因组数据:SE38 (NZ_CP011861.1)、G4T10 (NZ_CP011860.1)、SY1027 (NC_021354.1)、ZJ (NZ_CP041995.1)、ML10 1 (NZ_CP029804.1)、WH13013 (NZ_CP017116.1)、GXBY - 1 (NZ_CP014861.1)、Fujisawa (NC_015601.1)、NCTC8163 (NZ_LR134439.1)、KC - Sb - R1 (NZ_CP033601.1)。所有序列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

鼠源猪丹毒丝菌 GAPDH 高免血清在前期试验^[5-6]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 氨基酸序列的比较

使用在线软件 Clustal Omega (<http://www.clustal.org/omega/>)完成多序列比对,比较“1.1”节中不同猪丹毒丝菌 GAPDH 氨基酸序之间的相似性。

1.4 猪丹毒丝菌 GAPDH 表位预测

使用在线软件 Bepipred - 2.0 (<http://www.detaibio.com/tools/epitope-prediction-vr.html>)分析猪丹毒丝菌 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,首先去除保护 N - 端的 Fmoc 基团,然后去除保护侧链的保护基团,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^[11]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 μg/孔,对照组不包被任何抗原),37 ℃ 孵育 2 h。以 PBST 洗涤 5 次以后,使用 5% 的脱脂乳于 37 ℃ 下封闭 1 h。孵育 1:200 稀释的猪丹毒丝菌 SE38 株 GAPDH 高免血清,37 ℃ 下 1 h。以 PBST 洗涤 5 次后,孵育偶联 HRP 的羊抗鼠二抗,37 ℃ 下孵育 30 min。经过 5 次洗涤后加入 100 μL 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 处的吸光度值。

1.7 数据处理与统计学检验

数据均使用平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)来表示。用 *t* 检验检测统计学差异,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猪丹毒丝菌 SE38、G4T10、SY1027、ZJ、ML10 1、WH13013、GXBY - 1、Fujisawa、NCTC8163、KC - Sb - R1 的 GAPDH 氨基酸序列完全相同(Identity = 100%,故未展示多序列比对结果),显示出 GAPDH 具有高度保守的特点。

2.2 GAPDH 线性 B 细胞表位预测结果

选择猪丹毒丝菌 SE38 株的 GAPDH 序列进行预测分析,所预测的猪丹毒丝菌 GAPDH 线性 B 细胞表位的分布状况见图 1。有多段连续序列高于软件默认的阈值 0.5,选择最长的 3 个片段(分别记为 ERepitope1、ERepitope2、ERepitope3,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成功获取了所预测表位对应的多肽[分别标记为 ERG - 1、ERG - 2(A ~ D)、ERG - 3](表 1)。

ELISA 检测结果见图 3。猪丹毒丝菌 GAPDH 的 2 个表位 ERepitope1 和 ERepitope2 对应的合成多肽[ERG - 1、ERG - 2(A - D)]均能够与猪丹毒丝菌 GAPDH 高免血清发生明显的反应($P < 0.05$),但是 ERepitope3 对应的合成多肽(ERG - 3)不能与猪丹毒丝菌 GAPDH 高免血清发生反应($P > 0.05$)。该结果证实所预测到的 ERepitope1 和 ERepitope2 是猪丹毒丝菌 GAPDH 的抗原表位,但 ERepitope3

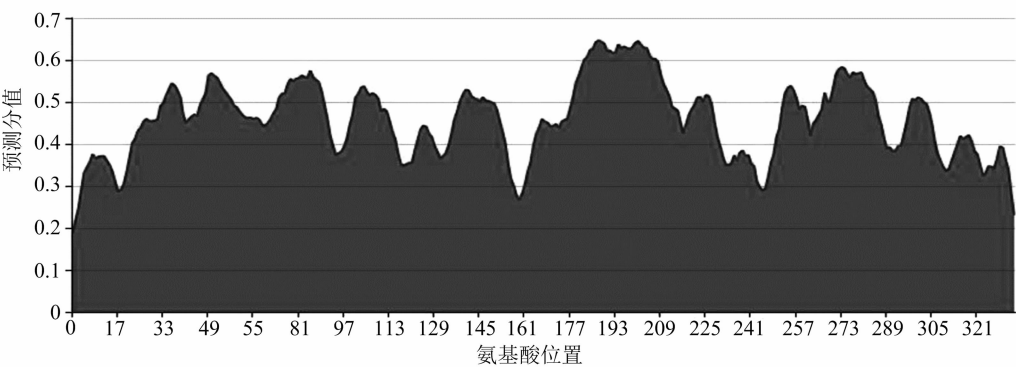


图1 猪丹毒丝菌 GAPDH 各氨基酸残基构成表位能力及线性B细胞表位预测结果

表 1 猪丹毒丝菌 GAPDH 线性 B 细胞表位预测结果及对应多肽合成情况

表位名称	序列	对应的合成多肽(序列)
ER - epitope1	⁷⁴ VLSE ⁹⁰ RDPKNLPWKELGV ₉₀	ERG - 1 (VLSE ⁹⁰ RDPKNLPWKELGV)
ER - epitope2	¹⁷⁸ HAYTNDQNTLDGPHAKG - DLRRG ²¹³ RAAAQSIHPNSTGA ₂₁₃	ERG - 2A (HAYTNDQNTLDGPHAKGDLRRG ²¹³ RAA) ; ERG - 2B (DQNTLDGPHAKGDLRRG ²¹³ RAAAQSII) ; ERG - 2C (DGPHAKGDLRRG ²¹³ RAAAQSIHPNSTG) ;ERG - 2D(KGDLRRG ²¹³ RAAAQSIHPNSTGA)
ER - epitope3	²⁷⁶ QLVSTDIIGMSY ₂₈₇	ERG - 3(QLVSTDIIGMSY)

1	MTVKVAINGFGRIGRLATRLLTGSKDMEIVAINDLTDAATLAHLLKYDSAQGRFEHDI EV	60
61	KDGA ¹²⁰ FV IDGHEIKVLSE ¹⁸⁰ RD ²⁴⁰ PKNLPWKELGVDV ³⁰⁰ VI ECTGFF ³³⁴ TTEEKAGMHLEAGARKV ³³⁴ II S	120
121	APATGDIKTVVYNTNHEILDGSETVISGASCTNCLAPMAAVLNDKYGIISGTMTT IHAY	180
181	TNDQNTLDGPHAKGDLRRG ²⁴⁰ RAAAQSIIPNSTGA ³⁰⁰ AKAIGLVIPELQ ³³⁴ GKLDGGAHRVPVITG	240
241	SITELVAVVEKATSVVEEVNAAMKAAANESFGYTEEQ ³⁰⁰ LVSTDIIGMSY ³³⁴ GS ³³⁴ SLFDATQTKVSS	300
301	IGGVNLVKVASWYDNEASYTNQLVRTAHYVASKF	334

氨基酸序列为巴氏杆菌 C51-17 株 GAPDH 的一级结构；下划线部分为本研究所预测到的抗原表位

图2 所预测到的表位在猪丹毒丝菌 GAPDH 分子上的位置

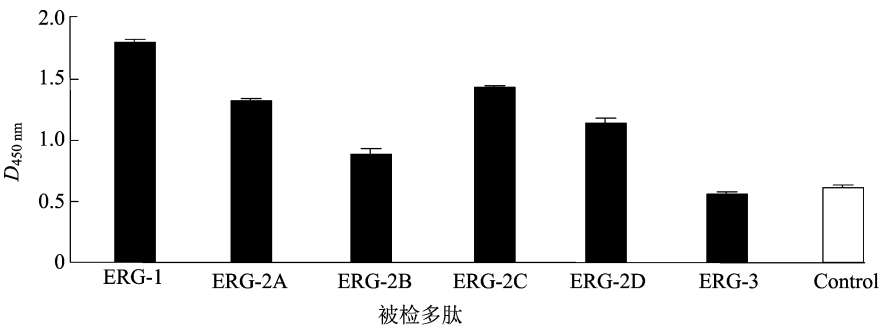


图3 间接ELISA法检测多肽与高免血清之间反应的结果

则不是猪丹毒丝菌 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 细胞表位的预测能力尤为突出^[10]。所以本研究选择了该软件预

测猪丹毒丝菌 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 2 个是表位。研究结果证实 BepiPred - 2.0 具有较好的表位预测能力。从图 1 可知,软件对于猪丹毒丝

菌 GAPDH 分子所预测到的线性表位数量远不止 3 个,因而在以后的研究中可以对所预测出的表位中的剩余部分进行进一步研究。

通过 ELISA 验证,本研究最终确认 ERepitope1 和 ERepitope2 分别是猪丹毒丝菌 GAPDH 的线性 B 细胞表位。这 2 个表位的序列及其在 GAPDH 分子上的位置与之前研究所鉴定到的 GAPDH 表位^[12-13]都不同,是新的表位。已有文献报道显示,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,以后应进一步研究,并在疫苗设计中加以利用。

研究结果显示,GAPDH 具有高度保守的特点(本研究所比较的 10 个菌株的 GAPDH 一级结构完全相同)。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^[11],因而将来还可以以本研究所鉴定到的表位(ERepitope1 或 ERepitope2)为基础建立猪丹毒丝菌感染的特异性诊断方法。

笔者前期的研究表明 GAPDH 是猪丹毒丝菌的黏附因子,某些氨基酸位点可能发挥关键作用^[6,14]。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^[15-17],因而本研究所鉴定到的表位可能为研究猪丹毒丝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 2 个猪丹毒丝菌的抗原表位,这些表位将为以后的猪丹毒丝菌 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] 甘孟侯,杨汉春. 中国猪病学[M]. 北京:中国农业出版社,2005: 251-257.
- [2] Zhu W F, 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.
- [3] 李敬涛,吴超,王雅,等. 湖北部分地区红斑丹毒丝菌分离株耐药性分析[J]. 养殖与饲料, 2015(2): 10-13.
- [4] Wang Q N, Chang B J, Riley T V. *Erysipelothrix rhusiopathiae* [J]. Veterinary Microbiology, 2010, 140(3/4): 405-417.
- [5] Zhu W F, Wu C, Kang C, et al. Evaluation of the protective efficacy of four newly identified surface proteins of *Erysipelothrix rhusiopathiae* [J]. Vaccine, 2018, 36(52): 8079-8083.
- [6] Zhu W F, Zhang Q A, Li J T, et al. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase Acts as an adhesin in *Erysipelothrix rhusiopathiae* adhesion to porcine endothelial cells and as a receptor in recruitment of host fibronectin and plasminogen[J]. Veterinary Research, 2017, 48(1): 16.
- [7] 崔治中. 兽医免疫学[M]. 2 版. 北京:中国农业出版社, 2015: 34-47.
- [8] 杨汉春. 动物免疫学[M]. 2 版. 北京:中国农业大学出版社, 2003: 9-31.
- [9] 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. 南宁, 2009: 276-279.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] Alvarez-Dominguez C, Salcines-Cuevas D, 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.
- [13] 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: 1-72.
- [14] Zhu W, Wang Y, Cai C, et al. *Erysipelothrix rhusiopathiae* recruits host plasminogen via the major protective antigen SpaA[J]. FEMS Microbiology Letters, 2017, 364(5): fnx036.
- [15] Song Y H, Wang F, Fan Z Y, 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, 2016, 97(2): 356-365.
- [16] 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.
- [17] Poon A Y, Vance D J, Rong Y H, et al. A supercluster of neutralizing epitopes at the interface of ricin's enzymatic (RTA) and binding (RTB) subunits[J]. Toxins, 2017, 9(12): 378.