

口蹄疫病毒株 AF72 VP3 的结构模拟与分析

陈启伟^{1,2} 王永录^{1*} 张永光¹ 潘 丽¹ 方玉珍¹ 蒋守田¹ 吕建亮¹
周 鹏¹ 张中旺¹ 张 昱¹ 张淑刚¹ 杜进鑫^{1,2} 李正丰^{1,2} 王 刚¹

(1. 中国农业科学院兰州兽医研究所 家畜疫病病原生物学国家重点实验室 农业部畜禽病毒学
重点开放实验室 甘肃 兰州 730046)
(2. 甘肃农业大学 动物医学院 甘肃 兰州 730070)

摘 要: 以口蹄疫病毒株 AF72 RNA 为模板, 反转录并扩增目的基因, PCR 纯化产物与 pGEM T-Easy 载体连接并转化 JM109 菌株, 用凝胶电泳、PCR 和 *Spe* I / *Sph* I 双酶切法鉴定为阳性的重组质粒进行测序。比对测序结果确定 AF72 VP3 的核苷酸序列, 利用同源建模的方法建立 AF72 VP3 结构蛋白的 3D 结构, 在此基础上, 综合亲水性、可塑性、抗原指数以及表面可能性等参数预测 AF72 VP3 结构蛋白的 B 细胞抗原表位。分析表明, 口蹄疫病毒 VP1、VP2、VP3 和 VP4 在核苷酸水平上的变异率是无差异的($P > 0.05$); 而它们在氨基酸水平上的变异率差异显著($P < 0.05$)。该毒株与 20 株源于 GenBank 中的 VP3 氨基酸序列比对发现其保守区主要位于第 1~24、24~35、36~42、45~56、65~122、124~172、177~210、211~219 位。AF72 VP3 结构蛋白三维空间结构可分为 A、B 和 C 3 个结构区域, 蛋白呈现较规则的空间构象, 其中 18~23、30~44、60~75、113~124、130~142、193~220 氨基酸区段是 AF72 VP3 结构蛋白可能的 B 细胞抗原表位区域, 该结果将为进一步的 FMDV 多表位疫苗研究提供更有价值的参考信息。

关键词: 口蹄疫病毒, VP3 结构蛋白, 3D 结构, B 细胞表位

Construction and Analysis of VP3 from a Foot-and-mouth Disease Virus Strain AF72

CHEN Qi-Wei^{1,2} WANG Yong-Lu^{1*} ZHANG Yong-Guang¹ PAN Li¹ FANG Yu-Zhen¹
JIANG Shou-Tian¹ LV Jian-Liang¹ ZHOU Peng¹ ZHANG Zhong-Wang¹ ZHANG Yu¹
ZHANG Shu-Gang¹ DU Jin-Xin^{1,2} LI Zheng-Feng^{1,2} WANG Gang¹

(1. Key Laboratory of Animal Virology of Agriculture, State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu 730046, China)
(2. College of Veterinary Medicine Gansu, Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China)

Abstract: RNAs isolated from the foot-and-mouth disease virus strain AF72 were used as templates for RT-PCR to amplify the target gene. The PCR products purified were cloned into the pGEM-T easy vectors and transformed into *E. coli* JM109. The positive recombinant plasmids were identified by electrophoresis, PCR, and restriction digestions with *Spe* I and *Sph* I analysis. The nucleotide sequences were confirmed by

基金项目: 国家“十一五”支撑计划项目(No. 2006BAD06A06)

* 通讯作者: Tel: 86-931-8343796; ✉ wyonglu@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-04-03; 接受日期: 2009-06-11

comparing with the full-length sequence of the other reference strains. The 3D model of structure protein VP3 of FMDV strain AF72 was obtained using homology modeling. On the basis of several parameters, such as hydrophilicity, flexibility, antigenic index, and surface probability, the B cell epitopes on VP3 were predicted. After analyzing the difference among VP1, VP2, VP3, VP4, at the nucleotide level, the mutation rates of these four encoding sequences were no difference ($P > 0.05$), however, at the amino acid level, those mutation rates were different ($P < 0.05$). The regions of 1th~24th, 24th~35th, 36th~42th, 45th~56th, 65th~122th, 124th~172th, 177th~210th, and 211th~219th in VP3 protein are most probably conservative. The 3D mold could be divided into A, B and C regions, the conformation of the VP3 of FMDV strain AF72 was regular, and the B-cell epitopes in VP3 probably exist in the following regions: 18 aa~23 aa, 30 aa~44 aa, 60 aa~75 aa, 113 aa~124 aa, 130 aa~142 aa, and 193 aa~220 aa. This result offers valuable information for design of FMDV multi-epitope vaccine against FMDV.

Keywords: FMDV, VP3 structure protein, 3D model, B-cell epitope

口蹄疫(Foot-and-mouth disease, FMD)是由口蹄疫病毒(Foot-and-mouth disease virus, FMDV)感染偶蹄动物引起的烈性传染病。该病的暴发流行,给畜牧业生产和进出口贸易造成极大损失,因此,联合国粮农组织和国际动物卫生组织将其列为头号必须报告的动物传染病^[1]。FMDV 是已知最小的动物 RNA 病毒,无囊膜,病毒粒子由病毒基因组和衣壳组成。病毒基因组为单股正链 RNA,长约 8.5 kb, 包含一个开放阅读框(Open reading frame, ORF), ORF 分为 L、P1、P2、P3 四个区,结构蛋白 P1 分别编码 VP4(1A)、VP2(1B)、VP3(1C)和 VP1(1D) 4 个结构蛋白,这 4 种结构蛋白最终形成五聚体单位构成病毒衣壳蛋白;P2 区编码 3 种蛋白,依次为 2A、2B、2C;P3 区编码 4 种 7 个蛋白,依次为 3A、3B(VPg1)、3B(VPg2)、3B(VPg3)、3C 和 3D。研究发现 FMDV 抗原位点几乎都集中在 P1 区,VP1、VP2、VP3 位于衣壳表面,VP4 位于衣壳的内部^[2],4 种结构蛋白都具有免疫原性。

具有感染性的 FMDV 衣壳蛋白进入到易感动物血液中可以启动免疫应答,其衣壳蛋白是 FMDV 抗原性和免疫原性决定多肽,包括 VP1、VP2、VP3 和 VP4 4 种结构蛋白,其中 VP1 蛋白大部分暴露在病毒表面,是决定病毒抗原性的主要成分,其中 VP1 第 130~150 和 190~203 位氨基酸残基是 FMDV 的主要抗原位点^[3,4],且 VP1 蛋白位于病毒颗粒的顶点,对胰蛋白酶敏感,具有刺激机体产生中和抗体的能力^[5]。FMDV 的 VP1、VP2、VP3 结构蛋白位于病毒颗粒的表面,VP4 蛋白位于病毒粒子的内部^[6]。FMDV 的 VP3 蛋白同样具有多段抗原决定簇,理论

上也应该是机体免疫攻击的对象,并且也应该是影响病毒衣壳组装和分解的关键性因子。为了分析 FMDV AF72 VP3 蛋白结构和功能的关系,此研究建立在同源建模的基础上,预测 B 细胞表位,并进一步联合运用数理统计学的方法探讨 VP3 蛋白编码基因核苷酸和氨基酸序列分子进化的特点及在 A 型 FMDV 结构蛋白总体分子进化速度中的地位。这些都为研究 VP3 蛋白在整个病毒衣壳所起到的作用提供了相关的生物信息学和分子进化的参考信息。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 毒株: FMDV AF72 毒株由本实验室分离、鉴定和保存。

1.1.2 试剂: 大肠杆菌菌株 JM109 购自北京全式金生物科技有限公司;AMV 反转录酶、La Taq 酶、dNTP、限制性内切酶、Marker DL2000、质粒 DNA 提取试剂盒、DNA 小量胶回收试剂盒、IPTG、X-gal 均购自大连宝生物工程有限公司,T4 DNA 连接酶、pGEM T-Easy 克隆载体购自 Promega 公司, RNA 提取试剂盒为 Qiagen 公司产品,其他试剂均为进口分析纯。

1.1.3 引物序列: 根据 GenBank 中 A 型 FMDV 基因组序列及有关文献设计了 1 对引物,送大连宝生物工程公司合成。引物序列如下:

C1: 5'-GTGCGGAACAGATCAAGGTCTACGC-3';

C2: 5'-GCGTCTTTGGACTTGTGTCTCACCA-3'。

1.2 方法

1.2.1 病毒 RNA 的提取: 参考 Qiagen 公司 RNA 提取试剂盒直接从细胞毒株中提取 RNA。

<http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>

1.2.2 RT-PCR: 参照 AMV 反转录试剂盒说明书的方法, 用下游引物 C2 对所提取的 RNA 进行反转录合成 cDNA, 然后以 cDNA 为模板进行扩增, PCR 反应体系为: 10×PCR Buffer(含 Mg^{2+}) 10 μ L, dNTPs 6 μ L, 模板 6 μ L, 引物 P1、P2 各 1 μ L, La Taq 酶 1 μ L, 用超纯水补至 100 μ L。反应程序为 95°C 5 min; 94°C 1 min, 56°C 90 s, 72°C 1 min, 30 个循环; 72°C 10 min。1%的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

1.2.3 目的基因的克隆: 经 PCR 获得的目的基因用胶回收试剂盒回收后, 直接连入 pGEM T-Easy 载体并转化 JM109 大肠杆菌。经蓝白斑筛选挑选白斑, 小量制备质粒, 以酶切和 PCR 方法鉴定阳性克隆。

1.2.4 VP3 基因的核苷酸序列测定及比较分析: 将鉴定为阳性的克隆菌送上海生物工程有限公司进行测序。用 DNASTar 软件分析测序得到的序列。从 GenBank 中找出了 20 株 A 型 FMDV 全基因序列(序列号: X74812、FJ623456、AY593764、AY593763、AY593762、AJ251474、AY593791、AF204108、EF494486、EF117837、FJ617248、M20717、X20717、V01130、M72587、DQ296555、DQ296551、EU552209、DQ404165、DQ404160), 并且利用 DNASTar 软件分别对比了这 20 株 FMDV 基因组中的 VP1、VP2、VP3、VP4 蛋白编码区基因及其编码产物的氨基酸序列。通过将上述 4 种蛋白的核苷酸或氨基酸的突变个数与其对应的蛋白质核苷酸或氨基酸总数相比, 从而求得这 4 种蛋白的核苷酸和氨基酸的变异率。利用 SPSS 11.5 软件包进行单因素方差分析和 Duncan 法进行多重比较来分析 VP3 蛋白编码基因和氨基酸序列的分子变异在这 4 种结构蛋白中所处于的状态。

1.2.5 VP3 蛋白保守区域的确定: 利用 DNASTar 软件的 Megalign 计算模块对比分析 AF72 VP3 的氨基酸序列与 1.2.4 中所提及的 20 株 A 型 FMDV VP3 氨基酸序列的共同区域, 从而确定 FMDV AF72 VP3 蛋白氨基酸序列的保守区。

1.2.6 搜索 PDB 数据库及 AF72 VP3 蛋白 3D 模型的模拟: 用 NCBI 的 Blast 程序分析 AF72 VP3 蛋白在蛋白质数据库(PDB)中的同源蛋白, 并以与 FMDV AF72 VP3 蛋白氨基酸序列一致性超过 60% 的氨基酸序列为模板进行结构模拟。

1.2.7 VP3 蛋白抗原表位分析: 采用 DNASTar 软件提供的 Protean 模块对 FMDV AF72 株 VP3 结构蛋

白的 B 细胞抗原表位进行预测。分别以 Garnier-Robson 法、Chou-Fasman 法预测其二级结构, 以 Karplus-Schulz 法预测其柔性区域, 以 Kyte-Doolittle 方法进行亲水性区域分析, 以 Emini 方案进行氨基酸位于分子表面可能性分析, 以 Jameson-Wolf 法进行抗原指数分析^[7]。

2 结果

2.1 FMDV AF72 VP3 基因 RT-PCR 和转化结果
凝胶电泳显示 PCR 扩增产物约 800 bp, 这与预期的扩增长度相符(图 1)。从培养 JM109 转化菌的平皿中挑取单克隆扩增, 培养制备质粒, 经琼脂糖凝胶电泳、PCR 和 *Spe* I / *Sph* I 双酶切鉴定, 目的片段长约 800 bp, 证明所克隆的 cDNA 为 VP3 基因。

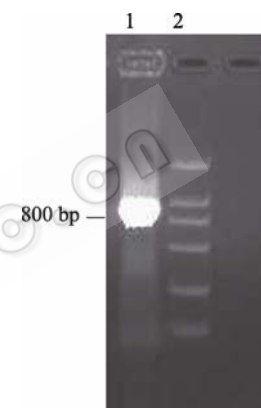


图 1 VP3 基因 PCR 扩增电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of amplified VP3 gene

Note: 1: PCR product of VP3; 2: DL 2000 marker.

2.2 FMDV AF72 VP3 蛋白核苷酸序列和氨基酸推导序列

FMDV AF72 VP3 基因序列和其氨基酸序列(图 2)。其全长为 663 个核苷酸, 221 个氨基酸组成。

2.3 VP3 基因序列分析

核苷酸突变率单因素方差分析 ANOVA 结果显示(表 1), 4 个结构蛋白(VP1、VP2、VP3、VP4) 编码区的核苷酸变异率差异不显著($P > 0.05$)。这表明, A 型 FMDV 结构蛋白编码区的核苷酸序列在 3D 蛋白酶(3D pol)的转录过程中并没有特异性地在某个编码区突变率增高, 即 A 型 FMDV 4 种结构蛋白核苷酸序列的突变是随机性的, 这是 A 型 FMDV 进化衍变的“原动力”, 但不是促使 A 型 FMDV 免于被“自然选择”所淘汰的直接动力。

Nucleotide sequence:
GGGATTGTCCCGTTGTCATGTTTCGGATGGTTATGGCGGCTTGGTGACGAC 50
GGACCCGAAGACAGCTGACCCCATTTACGGTATGGTGTACAACCCGCCCA 100
GGACCAACTACCCCGGGCGGTTACAAATCTGTTGGACGTGGCAGAGGCC 150
TGCCCCACCTTTCTTTGTTTCGACGATGGGAAACCATACTGTTGTGACGAG 200
AGCGGACGGACAGCGCCTCCTGGCCAAGTTTGACGTCTCCCTTGCTGCAA 250
AGCACATGTCAAACACCTACCTTTTCAGGGATAGCCCACTACTACGCACAG 300
TACTCTGGCACCATCAACCTGCACTTCATGTTCACTGGCCCCACTGATTC 350
AAAAGCCCCGTACATGGTTGCATATGTCCCGCCCGGCATGGAGACGCCGC 400
CGGACACACCTGAGGAAGCTGCTCACTGTATCCACGCCGAGTGGGACACA 450
GGACTGAACTCCAAATTCACCTTTTCTATCCCGTACGTGTCTGCCGAGA 500
TTACGCATACACCGCGTCTGACGTGGCAGAGACAACAAACGTACAGGGAT 550
GGGTCTGCATCTACCAGATCACACACGGGAAGGCTGGAGACGACACTTTG 600
GTCGTGTCGCTTAGCGCTGGCAAGGATTTTGAAGTGCCTCCCGATTGA 650
CCCCCGCTCACA 663

Amino acid sequence:
GIVPVACSDGYGGLVTTDPKTADPIYGMVY 30
NPPRTNYPGRFTNLLDVAEACPTFLCFDDG 60
KPYVVTRADGQRLAKFDVSLAAKHMSNTY 90
LSGIAQYYAQYSGTINLHFMFTGPTDSKAR 120
YMVAYVPPGMETPPDTPEEAHCHIAEWDT 150
GLNSKFTFSIPYVSAADYAYTASDVAETTN 180
VQGMVCIYQITHGKAGDDTLVVSLSAGKDF 210
ELRLPIDPRSQ 221

图 2 AF72 VP3 基因核苷酸序列和氨基酸推导序列
Fig. 2 The nucleotide and amino acid sequence of VP1from FMDV strain AF72

表 1 A 型 FMDV 编码基因的核苷酸变异率 Table 1 The mutation rate of VP1, VP2, VP3		
基因名称 Gene	核苷酸数 The number of nucleotides	核苷酸变异率(%) The mutation rate of nucleotides
Vp4	255	4.8169 ± 1.21738
Vp3	663	5.2815 ± 1.57289
Vp2	654	4.6148 ± 1.43743
Vp1	639	6.8991 ± 1.79856

注: 表中数据为平均值 ± 标准误。
Note: The mutation rate of nucleotides: the mean ± standard error.

氨基酸变异率单因素方差分析 ANOVA 结果显示, 这 4 种结构蛋白的氨基酸序列突变率有显著的差异($P < 0.05$), 这表明 A 型 FMDV 结构蛋白在氨基酸水平上的变异速率是有明显差异的。利用 Duncan 法多重比较(表 2), 其中 VP2 蛋白的变异率最高, 且其与 VP3 和 VP4 的氨基酸变异率差异显著; VP1 蛋白氨基酸变异率处于一种“过渡状态”, 并不是突变率十分高的; VP3 和 VP4 的变异率之间无差异, 且都保持了较低的变异率。

2.4 VP3 基因核苷酸序列系统进化树分析

根据 VP3 基因核苷酸序列构建系统进化树(图 3), 所分析的毒株中, A/F/11/1972 病毒与 A/IND/69/2001 亲缘关系最近, 同源性约为 96.5%。通过与其他各型口蹄疫病毒株序列分析比较说明, 各型 VP3 的核苷酸序列变异率并不是十分高的, 而是具有一

表 2 A 型 FMDV 编码产物氨基酸变异率的分析 Table 2 The analysis of mutation rate of amino acid sequences in A serotype FMDV		
结构蛋白 Structure protein	氨基酸数 The number of amino acids	氨基酸序列变异(%) The mutation rate of amino acids
Vp4	85	1.273 ± 0.468b
Vp3	221	1.686 ± 0.323b
Vp2	218	5.289 ± 1.376a
Vp1	213	3.769 ± 1.158ab

注: 表中氨基酸序列变异率数据为平均值 ± 标准误; 字母不同表示两者之间差异显著。
Note: The mutation rate of amino acid: the mean ± standard error. The different alphabets showed significant difference each other.

定的随机性, 如 A/HKN/7/85 和 Asia1/IND/63/72。

2.5 VP3 蛋白氨基酸序列的保守区

通过 DNASTar 软件的多序列比较, 我们将 AF72 VP3 与 1.2.4 涉及到的 20 株 A 型 FMDV 的 VP3 蛋白氨基酸序列进行比较, 发现 FMDV AF72 VP3 毒株 VP3 氨基酸序列的保守区主要位于第 1~24、24~35、36~42、45~56、65~122、124~172、177~210 和 211~219 位。

2.6 VP3 蛋白 3D 模型

通过 PDB 数据库的 Blast 查询结果显示 PDB 代号为 1FOD 的 FMDV 结构蛋白中的亚基氨基酸序列一致性大于 80%, 以 1FOD 作为同源建模的模板来构建 AF72 VP3 蛋白的空间结构。通过 Swiss2 pdb

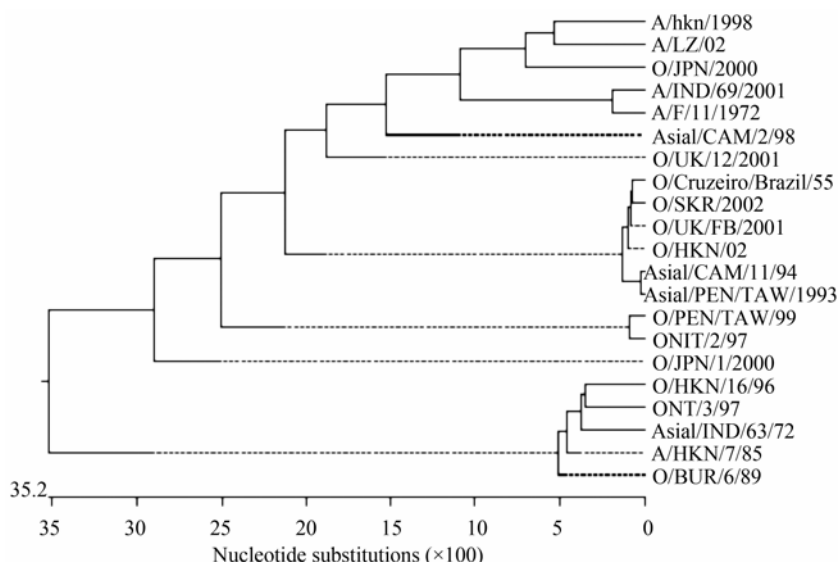


图3 20株 FMDV VP3 基因核苷酸序列系统进化树分析
Fig. 3 Phylogenetic tree analysis of VP3 gene among 20 FMDV strains

Viewer 蛋白质分析软件计算得到 FMDV AF72 VP3 蛋白 3D 模型。其 VP3 蛋白的三维空间结构主要由 β -折叠片和无规卷曲组成, 可被划分为 A、B 和 C 3 个功能区。图 4 所示, A 区为 VP3 蛋白 N 端的一段由 45 个氨基酸组成并游离于环境中的多肽链; B 区由 6 个反向 β -折叠片、无规卷曲和 β -转角组成了一个 β -折叠桶的结构, β -折叠在 VP3 结构蛋白的 3D 结构中是主要的存在方式, 埋藏在蛋白结构内侧的 β -折叠由连续的疏水残基组成, 而一侧暴露的 β -折叠则以亲水-疏水的两残基重复模式出现, 这些疏水侧

链形成了一个封闭的疏水核心区域, 有利于 AF72 VP3 蛋白高级结构的稳定; C 区是与 VP3 蛋白与 VP1、VP2 相互作用于有关的区域, 这一区域的氨基酸侧链可以与 VP1、VP2 的相关结构通过氢键和配位键来实现 FMDV 蛋白衣壳的形成。除此之外, 无规则卷曲的存在, 增加了蛋白的表面柔性, 由于在整个病毒的结构中, VP3 位于病毒粒子表面, 这些具有柔性的无规则卷曲在蛋白的其他结构没有明显改变时, 会采取不同的构象, 表现为物理上的可动性和生化上的多功能性, 这在很大程度上增加了病毒的抗原性。

2.7 VP3 蛋白的二级结构分析及 B 细胞表位预测

2.7.1 VP3 蛋白的二级结构预测: 预测结果(图 5)显示, VP3 蛋白上含有较多的 β -折叠区域和相对较少的 α -螺旋区域, 二者呈交叉分布, 且在羧基端形成 α 螺旋的能力较强。柔性预测结果显示 VP3 上散在性分布着较多的柔性区域, 其中最密集的一个柔性区域位于第 8~40 区段。这些柔性区域含有较多甘氨酸、丝氨酸等柔性氨基酸而具有极高的柔韧性, 在空间结构中表现为物理上的灵活性, 形成 B 细胞抗原表位的可能性较大, 易于与抗体进行嵌合。

2.7.2 VP3 蛋白的 B 细胞表位预测: 根据 Kyte-Doolittle 亲水性方案预测的结果显示, VP3 蛋白亲水性指数普遍较低, 主要存在于第 15~43、60~75、130~142、145~155、113~122、193~220 区段; 相对应于 VP3 蛋白的亲水性区段, 其抗原指数

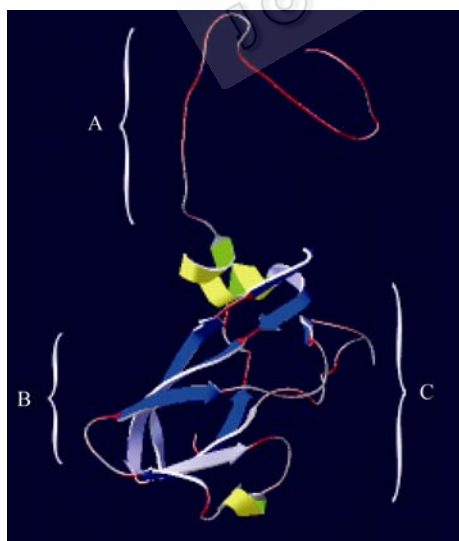


图4 AF72 VP3 结构蛋白的 3D 模型
Fig. 4 The 3D model of VP3 structure protein from FMDV strain

也呈现一定的正性分布, 氨基酸区段的抗原指数较高(≥ 0), 形成抗原表位的可能性大。Emini 法预测的 VP3 表面可及性结果显示 VP3 蛋白展示于蛋白表面的区段并不多, 主要分布在 18~23、30~36、96~100、113~118、132~137 和 216~220 等氨基酸区段的表面

可能性较大(≥ 1), 即这些区段极有可能位于蛋白表面, 且易被溶剂分子接触。可能是 B 细胞表位优势区域(图 6)。综上所述, AF72 VP3 结构蛋白最具表位优势区域主要存在于 18~23、30~44、60~75、113~124、130~142 和 193~220。

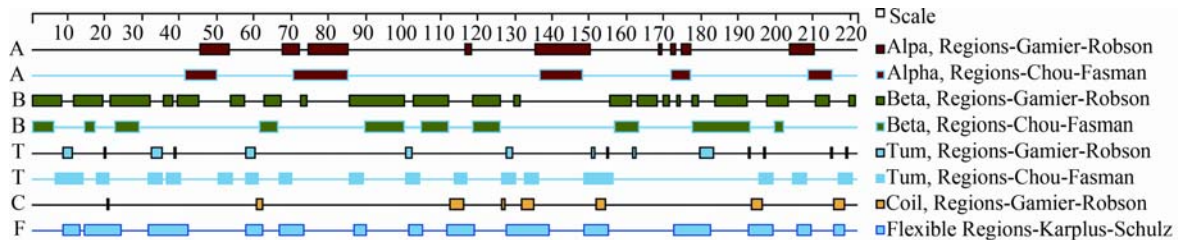


图 5 不同方法预测 VP3 蛋白的二级结构

Fig. 5 Secondary structures of VP3 protein predicted by different methods

Note: A: α -Spiral region; B: β -Collapse region; C: Random-coil region; T: Corner of the region.

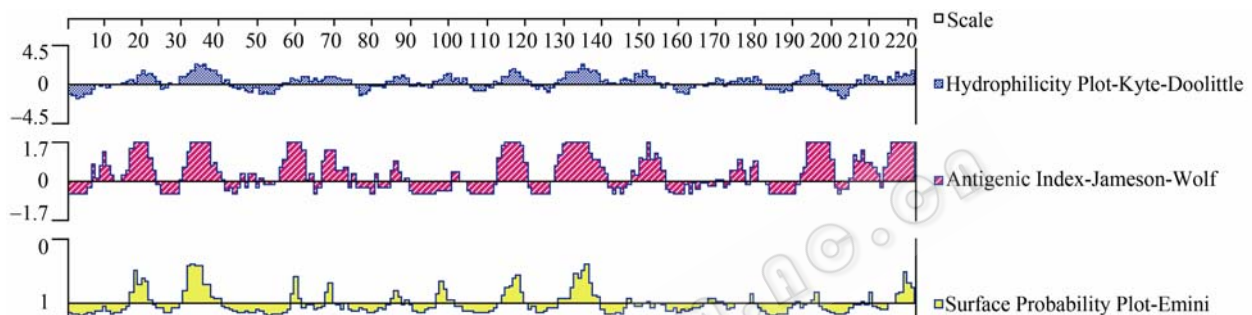


图 6 VP3 蛋白的亲水性、抗原指数及表面可及性分析

Fig. 6 Hydrophilicity plot, surface probability plot and antigenicity index for VP3 protein

3 讨论

迄今为止, 通过应用计算机软件分析和网络资源对细胞抗原表位进行预测是近年来建立起来的一种较为先进的表位研究方法^[8]。该法适用于已知一级结构的蛋白质或多肽抗原的线性表位的预测。但目前, 口蹄疫亚单位疫苗的研究热点以 VP1 蛋白为主, 其接种动物后均可在一定程度上抵抗 FMDV 的攻击, 但 VP1 蛋白无法刺激机体的免疫反应水平像全病毒所诱导的反应一样强。这可能是由于 VP1 蛋白自身无法诱导机体产生如同由完整的衣壳蛋白所诱导机体产生的“健全的”免疫应答。疫苗接种是特异性预防 FMD 的可靠和有效手段, 安全有效的疫苗是成功地预防、控制乃至最终消灭 FMD 的先决条件。FMD 弱毒疫苗和灭活疫苗等常规疫苗都具有良好的免疫原性, 在预防和控制 FMD 的过程中发挥着重要作用^[9], 但由于病毒毒力返祖、病毒灭活不彻

底、活病毒逃逸、疫苗加工厂不安全等因素, 世界上一些地区 FMD 的暴发似乎与灭活疫苗中残存的活病毒有关, 促使人们寻求一种更加安全有效的 FMD 疫苗。近年来, 随着分子生物学技术的飞速发展, FMDV 基因工程疫苗如亚单位疫苗、可饲疫苗、合成肽疫苗、蛋白质载体疫苗、基因缺失疫苗、活载体疫苗、核酸疫苗等不断涌现。其中表位疫苗利用定位精确、氨基酸序列较短的抗原表位, 既能够有效地被免疫系统识别、递呈, 又能诱发机体产生特异性体液和细胞免疫应答; 同时较短的序列很容易合成, 对载体的克隆能力要求较低, 易于在载体中插入多个表位构建基因工程多表位疫苗, 对于 FMDV 这样具有高度变异性的病毒, 应用的疫苗株可能因与当前的流行株不匹配而不能提供有效的免疫保护, 然而基于多表位疫苗含有广谱的表位信息, 可以避免因病毒变异而造成的疫苗免疫失败^[10]。设计表位疫苗的关键是要确定可被免疫细胞识别的特

异性多肽,因此表位的鉴定是构建表位疫苗的第一步,VP3蛋白作为FMDV衣壳中的关键蛋白应该引起研究人员的足够重视,其A区的游离多肽链和B区的 β -折叠桶均可以成为机体产生的多克隆抗体攻击的靶标。

从对20株A型FMDV 4种结构蛋白核苷酸和氨基酸变异率的数理统计分析来看,结构蛋白在核苷酸水平上的变异率无差异($P > 0.05$),但其在氨基酸水平的变异率是有差异的($P < 0.05$)。从A型FMDV结构蛋白氨基酸的突变率来看,VP2蛋白的氨基酸突变率比VP1、VP3、VP4这3种结构蛋白的变异率高,这可能暗示了VP2基因在不同宿主细胞中会随着核苷酸变异痕迹的不断加深而使A型FMDV更能够适应,这也符合病毒所携带遗传物质以“集约型”为原则的事实。在A型FMDV结构蛋白分子衍化的研究中,数理统计方法的引入有效地推动了A型FMDV进化,尤其是其分子进化方面的研究,填补了人们对A型FMDV结构蛋白分子进化,即微观进化认识上的空白,推动进化论的研究进入分子水平,并建立了一套依赖于核酸、蛋白质序列信息的理论方法。结果表明,A型FMDV自身RNA转录变异只是A型FMDV结构蛋白变异的初始动力,而病毒和宿主细胞对病毒蛋白自身所行使功能的选择压力才是推动A型FMDV变异的直接动因。

此外,X射线晶体学方法是至今为止研究蛋白质结构最有效的方法,但是由于对样品的需要量大、纯度要求高等原因,此法也受到很大限制。因而,迫切需要一种不依赖晶体培养、迅速、简便易行的测定蛋白质结构的方法。随着生物信息学的发展,研究人员可以利用蛋白质数据库中的资源,以计算机为辅助手段来模拟所要研究的蛋白质,从而得到一些对于今后试验有参考价值的信息。

总之,作为B细胞蛋白抗原表位首先应位于或容易移动到蛋白抗原表面,有利于与B细胞抗原受

体或抗体结合。此外,要有一定柔韧性,因为抗原与抗原受体或抗体结合有一个识别和结合的过程。VP3蛋白抗原能引起免疫应答的抗原表位主要位于暴露于极性环境中的肽段区域, β -折叠桶形成的疏水核心区域由于空间位阻,成为其抗原表位的几率较表面区域的小。同源建模的方法来分析AF72 VP3蛋白的高级结构,为AF72 VP3抗原表位的确定提供了直观的分子模型,这将大大增加AF72 VP3蛋白抗原表位预测的可靠性,为口蹄疫多表位疫苗的研究提供参考依据。

参 考 文 献

- [1] ereira HG. Foot-and-mouth Disease. In: Gibbs EP. Virus Diseases of Foot Animals. London: Academic Press Inc. 1981, pp.333-363.
- [2] 谢庆阁. 口蹄疫. 北京: 中国农业出版社, 2004, pp.30-31.
- [3] Strohmaier K, Frazee R, Adam KH, *et al.* Location and characterization of antigenic protein of the FMDV immunizing protein. *J Gen Virol*, 1982, **59**: 295-306.
- [4] Geysem HM, Meloem RH, Barteling SJ, *et al.* Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid. *Proc Natl Acad Sci*, 1984, **81**: 3998-4002.
- [5] Jackson T, Stuart DJ, Fry E. Structure and receptor binding. *Virus*, 2003, **91**: 33-46.
- [6] Mason PW, Grubman MJ, Baxt B. Molecular basis of patho-genesis of FMDV. *Virus Research*, 2003, **91**: 9-32.
- [7] Mahler M, Bluthner M, Pollard KM. Advances in B-cell epitope analysis of autoantigens in connective tissue disease. *Clin Immunol*, 2003, **107** (2): 65-79.
- [8] 丁达夫, 汤海旭, 张保红, 等. 同源蛋白质三级结构的预测. 理论物理与生命科学, 上海: 上海科学技术出版社, 1997, pp.119-148.
- [9] Doel TR. FMD vaccines. *Virus Res*, 2003, **91**(1): 81-99.
- [10] Rob HM, Langeveld PM, Wim MM, *et al.* Synthetic peptide vaccines: unexpected fulfillment of discarded hope. *Biologicals*, 2001, **29**(3-4): 233-236.