

# 抗原表位的研究方法及口蹄疫病毒 抗原表位的研究进展

张中旺 张永光\*

(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 兰州 730046)

**摘要:** 本文综述了近几年来用于 B 细胞表位及 T 细胞表位研究的常用方法及其在口蹄疫病毒抗原表位研究中的应用,并介绍了口蹄疫病毒抗原表位的研究进展。

**关键词:** B 细胞表位, T 细胞表位, FMDV

## Approaches for Antigen Epitope Study and the Development of Antigen Epitopes of Foot-and-mouth Disease Virus

ZHANG Zhong-Wang ZHANG Yong-Guang\*

(Key Laboratory of Animal Virology of Agriculture/State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology/Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046)

**Abstract:** This paper reviews the common approaches for B cell epitopes and T cell epitopes study in recent years, and its application in foot-and-mouth disease virus (FMDV)'s antigen epitope study. The development of antigen epitopes of FMDV are also summarized.

**Keywords:** B cell epitope, T cell epitope, FMDV

抗原表位(epitope)是指抗原分子表面具有特殊结构和免疫活性的化学基团,代表了抗原分子上的一个免疫活性区,是具有刺激机体产生抗体或致敏淋巴细胞并能够被其识别的部位,又称抗原决定簇(antigenic determination)。免疫细胞通常难以借助其表面受体识别整个蛋白质分子,而仅识别抗原肽分子上的表位,严格来说,抗体的特异性是针对表位而不是针对完整的抗原分子的。表位一般只占 5~7 个氨基酸或单糖残基的大小,最多不超过 20 个氨基酸残基,根据表位特异性免疫应答的程度,可将抗

原中的表位分为免疫优势表位、亚优势表位和隐性表位;根据表位对机体的影响,可分为保护性表位(免疫位)、致病性表位(变应位)、耐受性表位(耐受位);按与抗原受体细胞结合不同,分为 B 细胞抗原表位和 T 细胞抗原表位;按表位结构不同分为连续性抗原表位和不连续性抗原表位,前者又称线型表位,是由肽链上顺序连续的氨基酸组成,后者又称构象型抗原表位,是由那些空间邻近但顺序上不连续的氨基酸组成<sup>[1]</sup>。线型表位见于 T 细胞表位和部分 B 细胞表位,构象型表位只见于 B 细胞表位。

表位是蛋白质抗原性的基础,是抗原分子中诱生特异性免疫应答的基本结构和功能单位。因此,正确而详细地绘制抗原表位图谱对疾病的诊断及预后判定、定点改造蛋白质分子以降低蛋白质药物的免疫原性,设计无毒副作用的人工疫苗以及免疫干预治疗等有积极意义。

口蹄疫(Foot-and-Mouth Disease, FMD)是偶蹄动物的一种急性、热性、高度接触性传染病,是世界上危害最严重的家畜传染病之一。有关口蹄疫病毒(Foot-and-Mouth Disease Virus, FMDV)结构蛋白以及非结构蛋白上抗原位点或表位的结构及其基因定位,对于阐明 FMDV 的结构、功能及 FMDV 基因工程疫苗的研制、病原的检测至关重要。

## 1 抗原表位的研究方法

对于抗原表位的研究,随着单克隆抗体技术、计算机技术和固相合成肽技术的日臻成熟,已经取得了很大进展,关于细胞抗原表位的研究方法也得到了相应的发展和完善。

### 1.1 B 细胞抗原表位的研究方法

1.1.1 单克隆抗体技术:病毒抗原位点中一个表位的改变可影响该区域内相邻表位与相应单克隆抗体的反应,因此,各种病毒单抗的获得,为研究相应病毒的中和性抗原结构提供了手段,促进了中和抗原位点的研究。自从 McCullough KC 和 Butcher R<sup>[2]</sup>于 1982 年首次成功研制出抗 O 型 FMDV 单抗以来,世界上许多国家先后研制出多株 O、C、A 和 Asia 型 FMDV 的单抗,在 FMDV 抗原位点的分析和定位方面奠定了基础。其一般程序为:制备一组 FMDV 中和性单抗并测定其中和性能;将单抗同 FMDV 一起培养,筛选单抗突变株;单抗突变株血清学特性检测,即采用中和实验测定单抗突变株和单抗的反应性能;核苷酸序列测定确定抗原位点;合成肽技术验证抗原位点。谢庆阁等(1987 年)通过筛选 30 多株单抗突变株确定了 O 型 FMDV 至少有 5 个中和性抗原位点。Butchaiah G<sup>[3]</sup>等用 7 个针对 Asia 型的单克隆抗体筛选 FMDV 的中和抑制突变株,根据变种与抗体的结合及中和方式,确定了 Asia 型 FMDV 存在 4 个抗原位点。以同样的方法, Mateu<sup>[4]</sup>等实验证实了 C 型 FMDV 抗原位点主要有 4 个, Thomas<sup>[5]</sup>等实验表明在 A10 亚型中有 2 个主要位点和 2 个次要位

点, Baxt<sup>[6]</sup>等实验表明在 A12 亚型中有 1 个主要位点和 1 个次要位点, Saiz<sup>[7]</sup>等实验表明在 A5 亚型中有 2 个中和位点。

1.1.2 B 细胞抗原表位的预测法: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。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。其原理是根据 B 细胞表位的结构分析而来。以唯象理论(Phenomenological theory)为基础,通过对蛋白亚序列理化性质或二级结构的计算,利用 B 细胞表位与上述理化特性或二级结构的相关性而达到预测目的。

从 80 年代 Hopp 和 Wood 提出亲水性参数对抗原表位预测的方法以来<sup>[8]</sup>,已有许多参数、算法发表,对 B 细胞蛋白抗原表位研究起到巨大的推动作用。现已被大众认可并具有较好预测效果的方法主要有(1)亲水性方案(Hydrophilicity)<sup>[9]</sup>:即认为蛋白质抗原各氨基酸残基可分为亲水残基和疏水残基两类。在机体内,疏水性残基一般埋在蛋白内部,而亲水性残基位于表面,因此蛋白的亲水部位与蛋白抗原表位有密切的联系。(2)可及性方案(Accessibility)<sup>[10]</sup>:指蛋白质抗原中氨基酸残基被溶剂分子接触的可能性。它反映了蛋白质抗原内、外各层残基的分布情况。(3)抗原性方案(Antigenicity)<sup>[11]</sup>:每个氨基酸用出现在抗原区的频率描述,此频率除以各氨基酸在所有蛋白质中的频率就可推出抗原性刻度值。(4)可塑性方案(Flexibility)<sup>[12]</sup>:认为蛋白抗原的多肽骨架有一定程度的活动性,这种局部的活动性与其部位的抗原性密切相关,活动性强即柔韧性大的氨基酸残基容易形成抗原表位。(5)电荷分布方案(Charge distribution)<sup>[13]</sup>:认为对碱性抗原特异的抗体多趋于酸性,对酸性抗原特异的抗体多趋于碱性。(6)二级结构预测方案(Secondary structure)<sup>[14]</sup>:认为 $\beta$ 转角结构为凸出结构,多出现在蛋白质抗原表面,利于与抗体嵌合,较可能成为抗原表位。而 $\alpha$ 螺旋、 $\beta$ 片层结构规则不易形变,较难嵌和抗体,一般不作为抗原表位。对上述各种参数的预测比较表明,各种方案预测的正确率均不高。所以一般将上述多种方案综合考虑,尤以可及性方案、可塑性方案、抗原性方案及二级结构预测为重要。如国内的吴氏法、万氏法<sup>[15-17]</sup>等。由此也产生了

PREDITOP<sup>[18]</sup>、ADEPT<sup>[19]</sup>、PEOPLE<sup>[15]</sup>等B细胞表位预测软件。概括而言,作为B细胞蛋白抗原的表位首先应位于或易于移动于蛋白质抗原表面,有利于与抗体结合。另外,具有一定柔韧性,因为抗原与抗体结合时蛋白构象有一定的变化。现已有很多应用这些参数综合预测FMDVB细胞表位的成功报道,如云涛<sup>[20]</sup>等采用Garnier-Robson法、Chou-Fasman法和Karplus-Schulz法预测了FMDVOLZ02株结构蛋白的二级结构,用Kyte-Doolittle法分析了各结构蛋白的亲水性,Emmini法预测了各结构蛋白的表面可能性,Jameson-Wolf法预测了各蛋白的抗原指数,综合评价了FMDV结构蛋白的B细胞抗原表位。周建华<sup>[21]</sup>等运用同源建模得到OA/58VP1蛋白的三维结构,并结合理化性质、亲水性、可塑性和免疫原性进行分析,预测了OA/58VP1上可能的抗原表位。

但细胞表位预测研究仍存在一些问题。目前几乎所有的B细胞表位预测的算法和程序都是预测连续氨基酸残基构成的线性表位,而较少涉及大多数的构象型细胞表位的研究<sup>[22]</sup>。另外对B细胞表位预测结果也缺少标准的评估方法<sup>[23]</sup>,预测的准确率一般在40%~80%,而且存在许多争议。所以,从软件预测出的抗原表位须用实验来进一步验证,即根据预测结果,人工合成表位肽段,或利用PCR扩增预测表位的编码片段后,用表达载体表达相应的表位,纯化后获得目的肽,再利用Western blot或ELISA等方法对其进行鉴定。

**1.1.3 化学“切割”法或酶法:**有2种方法:(1)利用某种化学试剂或蛋白酶将纯化的蛋白质多肽切割成若干小片段,用SDS-PAGE、凝胶过滤或离子交换等方法将其分开,然后通过Western-blot、ELISA等检测手段检测它们与不同单克隆抗体或高免血清是否有反应,从而确定蛋白质的抗原表位<sup>[24,25]</sup>。该法对蛋白质的一级结构不作要求,但测定结果只能是抗原的线型表位。Strohmaier<sup>[26]</sup>等用不同种类的肽链内断酶和化学试剂CNBr切割FMDVO1K株纯化的VP1蛋白,经过实验检测,从而确定了其上具有免疫原性的氨基酸片段在138~154和200~213位。Bachrach<sup>[27,28]</sup>等用CNBr处理FMDVA<sub>12</sub>株VP1蛋白得到一个13 kD大小的片段(55 aa~179 aa),用胰蛋白酶处理得到一个大小为16 kD的片段(1 aa~144 aa),实

验证二者均具有免疫原性,能诱导免疫保护。(2)水解抗原-抗体复合物,又称Protein footprinting,是根据抗原-抗体复合物的结合部位能抵抗蛋白酶的水解的原理直接进行线型及构象型抗原表位研究的方法。

采用化学“切割”法或酶法研究抗原表位过程比较复杂,抗原-抗体结合的条件,酶解的条件,解离后的片段是否能有效分离,解离的完全程度,酶解片段的大小等都会对结果产生影响。

**1.1.4 肽探针扫描技术(交叠合成多肽的方法):**是根据已知病毒蛋白基因序列,合成连续的重叠短肽,与相应的单抗或多抗反应,分析检测结果,以确定阳性反应片段。这一技术要求有明确的抗原一级结构,并且检测结果为抗原线型表位,对构象型表位则无从获知。基本思路有:其一,根据已知蛋白基因序列,设计多个引物,用PCR方法得到一系列具有部分相互重叠的基因片段,并克隆至表达载体,在宿主中表达,产物纯化后用特异抗体检测,根据阳性反应肽段的相应编码基因片段进行表位推测。利用此法,SunTao<sup>[29]</sup>等筛选到了FMDV非结构蛋白3ABC上高结合力、保守的感染相关线型表位,分别位于3ABC蛋白上第106~155和156~190位氨基酸。其二,通过人工合成多肽片段,这些片段覆盖了整个结构蛋白序列并且部分重叠,然后利用单抗或多抗来检测能起阳性反应的片段,以获取抗原表位。Yang Ming<sup>[30]</sup>等利用固相多肽合成技术人工合成了92段覆盖FMDV3D蛋白全长的多肽片段,然后用15株牛抗FMDV血清进行ELISA检测,最终确定了位于FMDV-3D上第16~30位氨基酸的一个抗原表位。其三,利用Bal31外切酶具有选择性从3'末端切除核苷酸的活性,来消化编码区DNA,并将不同消化时间的产物分别插入适当载体,经表达得到一系列长度不等的同源性多肽,有抗原性的多肽经免疫反应筛选出来,再测定相应的DNA序列,即可知道表位图谱。

**1.1.5 噬菌体展示技术:**噬菌体展示技术是Smith GP<sup>[31]</sup>于1985年开创的。它是研究抗原表位及其配体受体相互作用位点的强有力的工具,从随机肽库中可以直接筛选出能和抗体结合的表位,这些表位既可以是线型表位,也可以是模拟的构象型表位,而且这种方法不必预先确定蛋白质的氨基酸序列。

其基本原理是将外源蛋白或多肽的基因与噬菌体外壳蛋白基因融合,以融合蛋白的形式,在噬菌体表面表达出多肽序列,并保持特定的空间构象,利用特异性亲和作用来筛选特异性蛋白或多肽的一项新技术。这是一种表型与基因型的统一,通过表型筛选就可以获得其编码基因。基本技术流程是:以单克隆抗体(mAb)作为固相筛选分子,加入噬菌体随机多肽库,使其与单抗充分反应,经数轮“吸附—洗脱—扩增”的筛选过程,且每次增加筛选强度,用最后一次淘洗的噬菌体感染宿主菌,铺制平板,随机挑选克隆,经噬菌体ELISA鉴定并进行交叉反应实验和竞争抑制性实验,对所选的阳性克隆通过DNA序列分析,就可以知道该噬菌体所携带的外源肽序列,从而得知该单抗针对的特异性抗原表位。

采用噬菌体展示肽结合Western blot,是目前国际上确定抗原表位的经典方法<sup>[32]</sup>,其最大的优点是可以获得构象型表位,而且诸多研究显示所筛选的模拟表位具有良好的免疫原性。Scala G等<sup>[33]</sup>应用噬菌体展示技术成功筛选到不连续的与原始抗原没有同源性的人类免疫缺陷病毒(HIV)的模拟表位序列。何玉龙等<sup>[34]</sup>利用噬菌体随机 12 肽库探索了FMDV非结构蛋白(NSP)3ABC上的抗原表位。

**1.1.6 X-衍射与核磁共振(NMR)分析:** 抗原-抗体复合物的X射线衍射被认为是唯一真正能反映抗原、抗体相互识别的一种技术。该技术是研究抗原抗体相互作用时抗原中氨基酸的参与识别情况以及表位类型(线型或构象型),精确揭示构象依赖型表位和独特型-抗独特型复合物的三维结构。人工合成C型FMDVVP1的15肽与中和单抗Fab复合体的X射线晶体学研究证明该15肽中RGD基序直接参与抗体分子的几个CDR(互补决定区)之间的相互作用。但该技术价格昂贵、耗时,对蛋白纯度要求极高,并只有在得到抗原-抗体复合物的适合晶体的情况下才能应用。虽然NMR方法可以分析液态下的肽链结构,绕过了结晶、X-射线衍射成像分析等难点,可直接分析自然状态下的蛋白质结构<sup>[35]</sup>,但其所用样品量很大且不能分析分子量很大的复合物(大于40 kD),而且需要特殊的仪器设备,所以该技术在一般实验室的应用受到限制。

此外,还有一些其他的方法用于蛋白质抗原表位的研究,如抗原表位中个别氨基酸的定点突变技

术、表面等离子共振技术(Surface plasmon resonance, SPR)等,如Gomes P<sup>[36]</sup>等于1999年运用表面等离子共振法,对FMDV肽抗原与其固定的单克隆抗体的相互作用进行了动力学分析,积累了FMDV主要抗原位点结构的资料。

在实际研究蛋白质B细胞抗原表位时,应根据具体情况选择合适的方法,可以单独使用其中的一种方法,也可以将几种方法结合起来使用。

## 1.2 T细胞抗原表位的研究方法

T细胞表位就是抗原蛋白中经抗原提呈细胞(APC)处理,由MHC分子提呈给T淋巴细胞受体的多肽片段。确定T细胞表位,对于研究细胞的免疫机理、过程及研制针对病毒的亚单位多肽疫苗和基因疫苗具有重要的意义。

**1.2.1 合成重叠肽法:** 是根据抗原蛋白的氨基酸序列随机合成或连续合成一个或几个重叠氨基酸的一系列肽段,然后通过淋巴细胞功能实验确定可被T细胞识别的肽段,即T细胞表位。对于FMDV,T细胞表位的确定研究大多使用此法:Collen<sup>[37]</sup>等在1991年确定VP1的21~40位存在T细胞表位;Blanco E<sup>[38,39]</sup>等在2000年确定在VP4的20~34位存在T细胞表位,在2001年确定在3A的21~35位存在T细胞表位;以同样的方法,Garcia-Briones MM<sup>[40]</sup>等在2004年确定在3D上也存在着Th1亚群的细胞表位;Jerner W<sup>[41]</sup>等对覆盖FMDV蛋白全长的442段十五肽进行了淋巴细胞功能检测,最终确定了位于VP1上第66~80位氨基酸的一个牛MHC特异的T细胞表位。这种方法的优点是,鉴定的T细胞表位较可靠,且能发现一些不符合多肽结合基序(motif)的MHC结合抗原肽。但这种方法也有其局限性,不但工作量大、费用高,而且重叠区之间的表位有可能被忽略,所以不能够鉴定出目的蛋白上所有的T细胞表位。

**1.2.2 T细胞表位预测法:** 此法较之合成重叠肽法省时、省钱,在经费有限的情况下成为确定T细胞抗原表位的首选方法。

对于T细胞表位的预测大都基于IBS(independent binding of side chain)假说,即假定肽段中每个残基都相互独立地以一定结合能影响肽段与MHC分子的亲和力,肽段与MHC分子结合是其每个位置上残基结合能的综合。T细胞表位的预测研究始于对Th表位的预测,但对CTL表位预测的探索进展最快,

研究最深入, 预测最成功<sup>[42]</sup>。其方法是根据T细胞表位的特征, 先预测表位, 再合成肽段, 以T细胞功能实验如T淋巴细胞增殖实验、体外抗原提呈实验、MTT还原法以及ELISPOT实验等方法进行鉴定。现在已经有T细胞表位预测的计算机软件。如: Barfoed AM<sup>[43]</sup>等综合运用两种不同的计算机算法预测了FMDV中最为保守的蛋白之一的2C蛋白上一个位于氨基末端的序列为KYKDAKEWL的H<sub>2</sub>-kD限制性的CTL细胞表位, 并通过一系列实验方法进行了证实进而探讨了其在抗FMDV交叉免疫保护中潜在的作用。但目前T细胞表位预测尚存在明显的局限性, 仅限于抗原肽与MHC分子有效结合这一环节。因此, 要精确地预测T细胞表位还有待于对抗原加工、TCR库、免疫显性规律等进行深入研究, 以进一步提高预测的合理性和有效性。

此外, 除了上述两种方法外, Le Doussal等<sup>[44]</sup>已证明可以利用噬菌体肽库展示技术, 在噬菌体表面表达功能性肽-MHC复合体, 并直接用T细胞筛选T细胞表位的可能性。

## 2 FMDV 抗原表位的研究进展

抗原表位的分析是FMDV研究领域中的一个热点, 近年来, 随着细胞抗原表位研究方法的不断发展和完善, 关于FMDV抗原结构的认识也得到了不断深化, 从而推动了新型FMD疫苗的研制以及在监测病毒抗原变异及分子流行病学研究方面都起到了重要作用。

### 2.1 FMDV的抗原位点

FMDV 抗原位点多位于衣壳蛋白的环结构上, 如VP1的B-C环, VP2的B-C、E-F环, VP3的B-B结节等, 其中, 形态表位多, 保守, 有型特异性。线型表位少, 易变, 毒株特异性极强, 很少存在于其他分离病毒表面。在FMDV不同分离株、血清型上发现的抗原位点和决定簇各不相同。

**2.1.1 O型FMDV的抗原位点:** 关于FMDV抗原位点研究最多的就是O型FMDV, 现已发现O型FMDV至少有5个中和抗原位点, 抗原位点1由VP1上G-H环的133~157和C端200~213位氨基酸残基的线型表位组成, 是FMDV最重要的抗原位点, 也是抗原变异的关键所在, 其关键氨基酸144(V)、148(L)、

154(K)和208(P)的改变会导致抗原位点1和单克隆抗体反应性的改变。位于其中的B细胞表位为顺序决定簇, 而另外4个抗原位点均由构象决定簇组成。位点2位于病毒表面VP2上B-C环的70-78和E-F环的131~134位氨基酸残基上, 在三重轴附近, 由4个表位构成, 其上的关键氨基酸在70、71、72、75、77和131位。位点3位于病毒粒子表面五重轴附近VP1的B-C环上40~60位, 其上的关键氨基酸在43、44、45和48位。位点4位于五重轴附近VP3的B-B结节上, 其上的关键氨基酸在56、57和58位。位点5位于VP1G-H环内135~167位氨基酸残基上, 其上的关键氨基酸在149位, 与位点1的决定簇在一个拓扑异构位点内有部分重叠, 但在功能上是彼此独立的<sup>[45,46]</sup>。

**2.1.2 A型FMDV的抗原位点:** 对A型FMDV抗原位点的研究, 由于应用的A型株系不同而有不同的研究结果, 主要集中在A5、A10、A12、A22等亚型的研究上。Saiz<sup>[7]</sup>等报道FMDVA5亚型有2个中和抗原位点, 一个位于VP1的C-末端, 是一个线型表位, 其上的关键氨基酸在第198位, 另一个位点在VP2的B-C环上, 由2个形态表位组成, 包括第72位和第79位氨基酸。Thomas<sup>[5]</sup>等发现FMDVA10有2个主要抗原位点和2个次要抗原位点, 2个主要位点中一个是位于VP1的G-H环上140~160位的胰酶敏感的位点, 另一个主要位点是非胰酶敏感性的, 包括VP3上的部分残基; 2个次要位点分别位于接近VP1的169位和VP1的C末端。Baxt<sup>[6]</sup>等在FMDVA12亚型上发现了3~4个功能上独立的位点, 突变分别位于VP1的G-H环、H-I环和其羧基端或者VP3的G-H环。Bolwell<sup>[47]</sup>等通过筛选单抗突变株以及合成多肽技术确定了FMDVA22亚型中有2个位点, 位点1至少由3个重叠的线型中和表位构成, 其位置分别在VP1序列145~154、147~154、137~152位氨基酸, 位点2是由形态表位构成, 但具体位置还未确定。

**2.1.3 C型FMDV的抗原位点:** 对于C型FMDV抗原位点的研究结果比较一致, 目前已确定在C型FMDV中有4个抗原位点, 位点A位于VP1的G-H环上(138 aa~150 aa), 包括一个高度保守RGD基序, 由多个重叠连续的表位组成, 其上的关键氨基酸在146(H)位<sup>[4]</sup>。位点C位于VP1羧基端的195~206位, 是一个小的独立的抗原位点。位点D位于衣壳三重

轴附近的一个不连续的抗原区上, 是一个主要的抗原位点, 交叉中和实验确定存在D1、D2、D3三个突变的、功能上独立的位点, 但在抗体竞争实验中发现只存在一个单一的拓扑异构位点D, 包括VP1羧基端的起始处(位点D1)、VP2的B-C环(位点D2)以及VP3的B-B结节(位点D3), 其中位点D1上的关键氨基酸在193位, 位点D2上的关键氨基酸在72、74和79位, 位点D3上的关键氨基酸在58位。位点D与位点C和可变的G-H环在空间上均不重叠<sup>[48]</sup>。另一个独立的抗原位点接近于衣壳的五重轴, 由VP1的B-C环(43~48)和H-I环(170附近)构成, 与O型FMDV中的位点3相似。

**2.1.4 Asia I型FMDV的抗原表位** Butchaiah<sup>[3]</sup>等分析确定了Asia I型FMDV存在4个抗原位点: 位点1在140S、12S和VP1上, 位点2和位点3位于140S完整的病毒粒子上, 位点4位于140S病毒粒子上和12S蛋白亚单位上, 其中, 位点1和位点4是属于非构象依赖型的, 位点2和位点3是属于构象依赖型的。Marquardt O<sup>[49]</sup>等发现有3个抗原位点, 分别位于VP1的G-H环上, VP2的B-C环上, VP3的B-B结节上或者VP2的N末端。Santina Graziolideng<sup>[50]</sup>进一步确定Asia I型FMDV存在四个中和性抗原表位: 位点1位于VP1的G-H环, 包括RGD基序, 其上的关键氨基酸在142位; 位点2位于VP2的B-C环上, 包括多位氨基酸(67~79), 其上的关键氨基酸在67、72、74、77、79位; 位点3位于VP3的B-B结节上, 其上的关键氨基酸在58、59位; 位点4位于VP3的C-末端, 作为一个新发现的独立位点被首次提出, 其上的关键氨基酸在218位。

**2.1.5 T淋巴细胞抗原表位:** T淋巴细胞识别的抗原表位在FMDV蛋白上呈分散性排布, 结构蛋白和非结构蛋白上都存在。实验发现在VP1的41~209位氨基酸残基上至少存在11个不同的T细胞表位<sup>[51]</sup>; Collen<sup>[37]</sup>等在1991年确定VP1的21~40位存在T细胞表位。Zamorano P<sup>[52]</sup>确定在VP1的135~144和150~160位氨基酸残基上存在两个T细胞表位。Filgueira<sup>[53]</sup>等还最先研究了结构蛋白VP2、VP3和VP4上的T细胞位点, 在FMDVO1C株的结构蛋白VP2、VP3和VP4上至少存在10个T细胞表位, 其中VP2上49~68位、113~132位、179~198位, VP3上81~100位、129~148位, VP4上17~36位, 都具有

明显有效的Th刺激功能。另外, Blanco E<sup>[38,39]</sup>等在2000年确定在VP4的20~34位存在T细胞表位, 在2001年确定在3A的21~35位存在T细胞表位。确定FMDVT细胞表位对于理解由淋巴细胞介导的抗病保护性免疫以及FMD新型疫苗的研制都是至关重要的。

## 2.2 FMDV抗原表位的应用

**2.2.1 基于表位的疫苗研究:** 表位疫苗作为一种独特的疫苗设计思路, 已逐步成为口蹄疫新型疫苗研究中的一大热点, FMDV粒子上抗原表位的不断确定为构建表位疫苗打好了坚实的第一步, 现国内外很多学者都致力于此项研究, 并已取得了一定的进展, 如: Du Yijun<sup>[54]</sup>等将O型FMDVVP1上抗原表位21 aa~60 aa, 141 aa~160 aa和200 aa~213 aa串联起来构成多表位基因VPe, 并将其与猪干扰素基因融合, 构建重组腺病毒表达载体(rAd-pIFN $\alpha$ -VPe), 动物实验证实其能在小鼠体内引起FMDV特异的体液和细胞免疫应答, 对豚鼠和猪具有完全保护作用, 是一种很有前景的候选疫苗。Zhang Q<sup>[55]</sup>等将FMDV Asia I型VP1上133 aa~158 aa与VP4上20 aa~34 aa串联起来表达融合蛋白, 虽然攻毒实验未能获得完全保护, 但免疫豚鼠时产生了中和抗体, 为FMDV Asia I型表位疫苗的研制提供了可参考的实验依据。刘明秋<sup>[56]</sup>等将A型FMDVVP1上21~40位和137~160位氨基酸对应的基因序列组成137~160-21~40-137~160的串连结构, 并以大肠杆菌 $\beta$ -半乳糖苷酶为大分子载体, 构建重组质粒pLM99, 在大肠杆菌中表达融合蛋白, 体外免疫原性检测表明该融合蛋白具有免疫反应性, 动物实验表明其在豚鼠体内能诱导产生中和抗体, 并使70%的豚鼠能抵抗病毒的攻击。马鸣潇、金宁一等<sup>[57]</sup>以O型、A型FMDV结构蛋白VP1全基因和Asia I型FMDV两个基因拓扑型的结构蛋白VP1基因上的5个抗原表位基因作为主要免疫原基因, 非结构蛋白3ABC上的2个Th2细胞表位基因及结构蛋白VP4上的1个Th2细胞表位基因作为辅助基因, 构建了口蹄疫病毒复合多表位基因工程疫苗表达盒OAAT, 并将其与猪IL-18基因相结合, 构建出OAAT和猪IL-18基因共表达的重组鸡痘病毒rF-PV-OAAT-IL18, 从而为新型FMDV活载体疫苗的研究奠定了基础。不断的科研成果证实FMD表位疫苗作为一种新型的

基因工程疫苗,具有广阔的开发前景。

**2.2.2 基于表位的检测研究:**将表位用于检测目的,一般采取两种策略,一是使用高度保守的优势表位,二是将多个表位联合使用。关于FMDV基于表位的检测研究的报道不是很多,但也有一些进展。如:胡大利<sup>[58]</sup>等利用自行构建表达的O型口蹄疫病毒VP1表位肽重组蛋白(VP1<sub>epi</sub>)作为包被抗原,来检测FMDV感染后的动物血清中的特异性抗体,实验结果证明VP1<sub>epi</sub>重组蛋白可以替代FMDV颗粒用于建立检测抗FMDV抗体的ELISA试剂盒。Oem JK<sup>[59]</sup>等建立了基于FMDV非结构蛋白3B上B细胞表位中的核心重复基序QKPLKDE的表位阻断ELISA,用于区分感染动物与注苗动物,结果证明其在FMD控制与根除方面具有非常大的应用价值。Höhlich BJ<sup>[60]</sup>和Sun Tao<sup>[61]</sup>等都进行了类似的基于表位的检测研究,为更好的区分感染动物与注苗动物提供了实验依据。

### 3 结语

表位是蛋白质抗原性的物质基础,开展对表位的研究对疾病的诊断以及分子疫苗的设计等具有重要的意义。弄清FMDV抗原位点的结构,不仅可以全面地了解FMDV的抗原结构,而且在推动新型FMD疫苗的研制、检测病毒抗原变异及分子流行病学的研究方面都起着重要作用。相信随着各种科学技术的不断发展,对蛋白质抗原表位的研究方法将不断丰富和完善,对FMDV抗原表位的认识也将不断深入。

### 参 考 文 献

- [1] Barlow DJ, Edwards MS, Thornton JM. Continuous and discontinuous protein antigenic determinants. *Nature*, 1986, **322**(6081): 747.
- [2] McCullough KC, Butcher R. Monoclonal antibodies against foot-and-mouth disease virus 146S and 12S particles. *Arch Virol*, 1982, **74**(1): 1-9.
- [3] Butchaiah G, Morgan DO. Neutralization antigenic sites on type Asia-1 foot-and-mouth disease virus defined by monoclonal antibody-resistant variants. *Virus Research*, 1997, **52**(2): 183-194.
- [4] Mateu MG, Martinez MA, Capucci L, et al. A single amino acid substitution affects multiple overlapping epi-

- topes in the major antigenic site of foot-and-mouth disease virus of serotype C. *Journal of General Virology*, 1990, **71**: 629-637.
- [5] Thomas AAM, Woortmeijer RJ, Puijk W, et al. Antigenic sites on Foot-and-mouth disease virus type A10. *J Virol*, 1988, **62**: 2782-2789.
- [6] Baxt B, Vakharia V, Moore DM, et al. Analysis of neutralizing antigenic sites on the surface of type A12 foot-and-mouth disease virus. *J Virol*, 1989, **63**(5): 2143-2151.
- [7] Saiz JC, Gonzalez MJ, Borca MV, et al. Identification of neutralizing antigenic sites on VP1 and VP2 of type A5 Foot-and-mouth disease virus, defined by neutralization-resistant variants. *J Virol*, 1991, **65**: 2518-2524.
- [8] Hoop JP, Wood KR. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Immunology*, 1981, **78**(6): 3824.
- [9] Kyte J, Doolittle RF. A Simple method for displaying hydropathic character of a protein. *J Mol Biol*, 1983, **157**(1): 105.
- [10] Tsche H. Modern methods in protein and nucleic acid research. 1st ed. New York: Walter de Gruyter Berlin, 1990, p.231.
- [11] Welling GW, Weijer WJ, Vander ZR, et al. Prediction of sequential antigenic regions in proteins. *FEBS Lett*, 1985, **188**(2): 215.
- [12] Karplus PA, Schultz GE. Prediction of chain flexibility in proteins. *Immunology*, 1985, **72** (2): 212.
- [13] Gershoni JM, Stem B, Venisova G. Combinatorial libraries, epitope structure and the prediction of conformations. *Immunol Today*, 1997, **18**(5): 108.
- [14] 来鲁华. 蛋白质的结构预测与分子设计. 第一版. 北京: 北京大学出版社, 1993, p.49.
- [15] Alix AJ. Predictive estimation of protein linear epitopes by using the program PEOPLE. *Vaccine*, 1999, **18**(324): 311-314.
- [16] Wu YZ, Zhu XH. A new approach for B-cell epitope prediction in viral proteins. *Chinese Science Bulletin*, 1995, **40**(9): 761-763.
- [17] 万涛, 孙涛, 吴家金. 蛋白顺序性抗原决定簇的多参数综合预测. 中国免疫学杂志, 1997, **13**(6): 329-333.
- [18] Pellequer JL, Westhof E. PREDITOP: a program for antigenicity prediction. *J Mol Graph*, 1993, **11**(3): 204-210, 191-192.
- [19] Makyutov AZ, Zagrebelnaya ES. ADEPT: a computer program for prediction of protein antigenic determinants. *Comput Appl Biosci*, 1993, **9**(3): 291-297.
- [20] 云涛, 刘光请, 冷清文, 等. 口蹄疫病毒结构蛋白的二级结构及其B细胞抗原表位的预测. 中国兽医科技, 2004, **34**(7): 23-29.

- [21] 周建华, 从国正, 高闪电, 等. FMDV OA/58病毒株VP1蛋白结构构建与B细胞抗原表位的预测. 华北农学报, 2007, **22**: 176–179.
- [22] 吴玉章, 刘茂昌, 贾正才, 等. 新型免疫原的设计、合成及免疫原性研究. 第三军医大学学报, 2000, **22**(10): 919–923.
- [23] Kolaskar AS, Kulkarni Kale U. Prediction of three dimensional structure and mapping of conformational epitopes of envelope glycoprotein of Japanese encephalitis virus. *Virology*, 1999, **261**(1): 31–42.
- [24] Mazzoni MR, Artemyev ND, Hamm HE. Proteolytic fragmentation for epitope mapping. *Methods in Molecular Biology*, 1996, **66**: 109.
- [25] Morris GE. Epitope mapping by chemical fragment. *Methods in Molecular Biology*, 1996, **66**: 121.
- [26] Strohmaier K, Franze R, Adam KH. Location and characterization of the antigenic portion of the FMDV immunizing protein. *Journal of General Virology*, 1982, **59**: 295–306.
- [27] Bachrach HL, Morgan DO, Moore DM. Foot-and-mouth disease virus immunogenic capsid protein VPT:N-terminal sequences and immunogenic peptides obtained by CNBr and tryptic cleavages. *Intervirology*, 1979, **12**(2): 65–72.
- [28] Robertson BH, Moore DM, Grubman MJ, *et al.* Identification of an exposed region of the immunogenic capsid polypeptide VP1 on foot-and-mouth disease virus. *Virology*, 1996, **218**: 311–316.
- [29] Sun Tao, Lu Ping, Wang Xin An. Applicable method for mapping epitopes on viral protein. *Prog Biochem Biophys*, 2004, **31**(3): 255–258.
- [30] Yang Ming, Alfonso Clavijo, Li Mingyi, *et al.* Identification of a major antibody binding epitope in the non-structural protein 3D of foot-and-mouth disease virus in cattle and the development of a monoclonal antibody with diagnostic applications. *Journal of Immunological Methods*, 2007, **321**: 174–181.
- [31] Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, 1985, **228**(2): 1315–1317.
- [32] Wang LF, Yu M. Epitope identification and discovery using phage display libraries: applications in vaccine development and diagnostics. *Curr Drug Targets*, 2004, **5**(1): 1–15.
- [33] Scala G, Chen X, Liu W. Selection of HIV-specific immunogenic epitopes by screening random peptide libraries with HIV-1-positive sera. *J Immunol*, 1999, **162**(10): 6155–6161.
- [34] 何玉龙, 伍晓雄, 赵娜, 等. 猪O型口蹄疫病毒非结构蛋白3ABC抗原模拟表位的筛选. 畜牧兽医学报, 2006, **37**(8): 793–798.
- [35] Saul FA, Alzari PM. Crystallographic studies of antigen-antibody interactions. *Methods in Molecular Biology*, 1996, **66**: 11.
- [36] Gomes P, Giralt E, Andreu D. Surface plasmon resonance screening of synthetic peptides mimicking the immunodominant region of C-S8c1 foot-and-mouth disease virus. *Vaccine*, 1999, **18**(3–4): 362–370.
- [37] Collen T, Dimarchi R, Doel TR. AT cell epitope in VP1 of foot-and-mouth disease virus is immunodominant for vaccinated cattle. *Immunol*, 1991, **146**(2): 749–755.
- [38] Blanco E, McCullough K, Summerfield A. Interspecies major histocompatibility complex-restricted Th cell epitope on foot-and-mouth disease virus capsid protein VP4. *Virology*, 2000, **274**(10): 4902–4907.
- [39] Blanco E, Garcia-Briones M, Sanz-Parra A, *et al.* Identification of T-cell epitopes in nonstructural proteins of foot-and-mouth disease virus. *Virology*, 2001, **275**(7): 3164–3174.
- [40] Garcia-Briones MM, Blanco E, Chiva C, *et al.* Immunogenicity and T cell recognition in swine of foot-and-mouth disease virus polymerase 3D. *Virology*, 2004, **322**(2): 264–275.
- [41] Gerner W, Carr BV, Wiesmüller KH, *et al.* Identification of a novel foot-and-mouth disease virus specific T-cell epitope with immunodominant characteristics in cattle with MHC serotype A31. *Vet Res*, 2007, **38**(4): 565–572.
- [42] Dovtchinova IA, Guan P, Flower DR. EpiJen: a server for multistep T cell epitope prediction. *BMC Bioinformatics*, 2006, **7**: 131–141.
- [43] Barfoed AM, Rodriguez F, Therrien D, *et al.* DNA immunization with 2C FMDV non-structural protein reveals the presence of an immunodominant CD8<sup>+</sup>, CTL epitope for Balb/c mice. *Antiviral Res*, 2006, **72**(3): 178–189.
- [44] Le Doussal J, Piqueras B, Doqan I, *et al.* Phage display of peptide/major histocompatibility complex. *J Immunol Methods*, 2000, **241**(1–2): 147–158.
- [45] Barnett PV, Ouldrige EJ, Rowlands DJ, *et al.* Neutralizing epitopes of type O foot-and-mouth disease virus. I. Identification and characterization of three functionally independent conformational sites. *Gen Virology*, 1989, **70**: 1483–1491.
- [46] Crowther JR, Farias S, Carpenter WC, *et al.* Identification of a fifth neutralizable site on type O foot-and-mouth disease virus following characterization of single and quintuple monoclonal antibody escape mutants. *Gen Virology*, 1993, **74**: 1547–1553.
- [47] Bolwell C, Clarke BE, Parry NR. Epitope mapping of foot-and-mouth disease virus with neutralizing monoclonal antibodies. *Journal of general Virology*, 1989, **70**: 59–68.



- [48] Lea S, Hernández J, Blakemore W, *et al.* The structure and antigenicity of a type C foot-and-mouth disease virus. *Structure*, 1994, **2**(2): 123–139.
- [49] Marquardt O, Rahman MM, Freiberg B. Genetic and antigenic variance of foot-and-mouth disease virus Asia- I. *Arch Virol*, 2000, **145**: 149–157.
- [50] Santina Grazioli, Francesca Fallacara, Emiliana Brocchi. Mapping of neutralising sites on FMD virus type Asia1 and relationships with sites described in other serotypes. *Report of the Session of the Research Group of the Standing Committee of the European Commission of Foot and Mouth Disease*, 2003, Appendix **44**: 277–287.
- [51] Rodriguez A, Saiz JC, Novella ZS, *et al.* Antigenic specificity of porcine T cell response against foot-and- mouth disease virus structural proteins : identification of T helper epitopes in VP1. *Virology*, 1994, **205**: 24–33.
- [52] Zamorano P, Wigdorovitz A, Chaher MT, *et al.* Recognition of B and T cell epitopes by cattle immunized with a synthetic peptide containing the major immunogenic site of VP1 FMDV O1 Campos. *Virology*, 1994, **201**(2): 383–387.
- [53] Filgueira MP, Wigdorovitz A, Romera A, *et al.* Detection and characterization of functional T-Cell epitopes on the structural proteins V2,VP3, and VP4 of foot and mouth disease virus O1Campos. *Virology*, 2000, **271**: 234–239.
- [54] Du Y, Li Y, He H, *et al.* Enhanced immunogenicity of multiple-epitopes of foot-and-mouth disease virus fused with porcine interferon alpha in mice and protective efficacy in guinea pigs and swine. *J Virol Methods*, 2008, **20**: 1–9.
- [55] Zhang Q, Yang YQ, Zhang ZY, *et al.* Immunogenicity of a recombinant fusion protein of tandem repeat epitopes of Foot-and-mouth disease virus type Asia1 for guinea pigs. *Acta Virol*, 2002, **46**(1): 1–9.
- [56] 刘明秋, 张 骏, 陈维灶, 等. 抗 A5 型口蹄疫病毒重组多肽疫苗的研究. 复旦学报(自然科学版), 2005, **44**(6): 1037–1041.
- [57] 马鸣潇, 金宁一, 刘慧娟, 等. 口蹄疫三价重组鸡痘病毒疫苗分子设计及其构建. 高技术通讯, 2007, **17**(3): 288–294.
- [58] 胡大利, 冯 宇, 张培因, 等. 建立一种用重组蛋白检测抗口蹄疫病毒抗体的间接 ELISA 方法. 中国免疫学杂志, 2007, **23**(4): 345–348.
- [59] Oem JK, Chang BS, Joo HD, *et al.* Development of an epitope-blocking-enzyme-linked immunosorbent assay to differentiate between animals infected with and vaccinated against foot-and-mouth disease virus. *J Virol Methods*, 2007, **142**(1–2): 174–181.
- [60] Höhlich BJ, Wiesmüller KH, Schlapp T, *et al.* Identification of foot-and-mouth disease virus-specific linear B-cell epitopes to differentiate between infected and vaccinated cattle. *J Virol*, 2003, **77**(16): 8633–8639.
- [61] Sun Tao, Lu Ping, Wang Xin, *et al.* Localization of infection-related epitopes on the non-structural protein 3ABC of foot-and-mouth disease virus and the application of tandem epitopes. *Virology Methods*, 2004, **119**(2): 79–86.

## 新辟栏目介绍

### 教学科研单位及成果展示

为了更好地宣传我国生命科学领域取得的成绩, 总结和交流我国微生物学研究和开发的新成果, 增强学术刊物与科研、教学和开发等各界同仁的广泛合作与联系, 共谋发展, 决定开设“教学科研单位及成果展示”栏目, 现诚邀有关单位参加。具体安排如下:

- 1、在《微生物学通报》显著位置开辟精美彩色专版, 刊登科研、开发、教学单位介绍, 展示科研成果、学科建设成就、生物技术新产品等, 图文并茂, 生动活泼, 每页内容要求: 图片 2~5 张, 文字 1000 字以内。
- 2、参加单位将获赠刊有本单位宣传内容的本期《微生物学通报》刊物 5 本; 获赠《微生物学通报》杂志全文检索数据光盘版 (1974–2006) 1 张。
- 3、参加单位提供的简介、科研及教学成果、学科建设成就、新产品新技术展示、招生信息、人才引进及招聘启事、优秀人才推介等内容均可在本刊网站的“科研单位成果展示”等栏目免费发布一年, 并可将主页网址与我刊友情链接。
- 4、参加单位应保证宣传材料真实客观、数据翔实、文责自负, 来稿请加盖公章, 以示负责。
- 5、本栏目将适当收取版面制作及网页维护费。
- 6、本栏目联系方式:

电话/传真: (010)64117524

联系人: 李 平 胡 丹

E-mail: wswxtb@163.com