

研究报告

传染性支气管炎病毒 N 蛋白 CTL 表位与 BF2*15 鸡 MHC I 基序的相互作用

鲁梅^{1,2} 黄庆华¹ 崔宁¹ 许传田^{1*}

(1. 山东省农业科学院畜牧兽医研究所 山东省畜禽疫病防治与繁育重点实验室 山东 济南 250100)

(2. 山东潍坊工程职业学院 山东 青州 262500)

摘要:【目的】近年来鸡传染性支气管炎病毒在国内鸡群呈现流行趋势,尤其是变异毒株的出现,加剧了对鸡群的危害。鸡主要组织相容复合体蛋白(MHC I)通过特定的基序结合抗原表位多肽,进而识别感染病毒的细胞并引起免疫反应,达到清除病毒的效果。鉴定 BF2*15 鸡主要组织相容复合体(MHC I)的结合基序。【方法】采用同源建模、分子动力学和分子对接等计算方法,构建了传染性支气管炎病毒(IBV) N 蛋白表位多肽和鸡 MHC I BF2*15 之间的复合物结构,来探索 BF2*15 识别抗原表位多肽的潜在结合基序。【结果】通过对该复合物的相互作用关系分析,鉴定出 BF2*15 鸡主要组织相容复合体(MHC I)的一条潜在结合基序“x-Arg-x-x-x-Arg”。【结论】解释了传染性支气管炎病毒 N 蛋白 CTL 表位与 BF2*15 鸡 MHC I 基序的相互作用原理,该研究结果对了解传染性支气管炎病毒免疫机制以及基于特定基序筛选和设计通用疫苗具有借鉴意义。

关键词: 传染性支气管炎, MHC I 结合基序, CTL 表位

Interactions of the major histocompatibility complex class I BF2*15 and cytotoxic T lymphocyte epitopes from nucleoprotein of avian infectious bronchitis virus

LU Mei^{1,2} HUANG Qing-Hua¹ CUI Ning¹ XU Chuan-Tian^{1*}

(1. Institute of Animal Science and Veterinary Medicine Shandong Academy of Agricultural Sciences, Shandong Key Laboratory of Animal Disease Control and Breeding, Jinan, Shandong 250100, China)

(2. Weifang Engineering Vocational College, Qingzhou, Shandong 262500, China)

Abstract: [Objective] In recent years, the epidemic of infectious bronchitis virus in China has become a popular trend in domestic flocks, especially the emergence of mutant strains, which

Foundation item: Modern Agro-industry Technology Research System (No. CARS-41-Z10); Agricultural Scientific and Technological Innovation Project of Shandong Academy of Agricultural Sciences (No. CXGC2016A10)

*Corresponding author: E-mail: xcctaian2002@163.com

Received: June 10, 2017; Accepted: August 15, 2017; Published online (www.cnki.net): August 16, 2017

基金项目: 现代农业产业技术体系(No. CARS-41-Z10); 山东省农业科学院农业科技创新工程(No. CXGC2016A10)

*通讯作者: E-mail: xcctaian2002@163.com

收稿日期: 2017-06-10; 接受日期: 2017-08-15; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-08-16

aggravate the harm to the flocks. Major histocompatibility complex (MHC I) class I is able to bind antigens containing certain motif and further recognize and eradicate cells affected by virus. Identification of the binding motif of the complex of chicken MHC I protein BF2*15. **[Methods]** The complex of chicken MHC I protein BF2*15 and Nucleoprotein of infectious bronchitis virus (IBV) octapeptide were constructed by computational method, including homology modeling, molecular dynamics simulation and molecular docking. **[Results]** According to the interaction relationship of BF2*15 and IBV Nucleoprotein peptide, we conclude that “x-Arg-x-x-x-Arg” may represent a potential binding motif of BF2*15. **[Conclusion]** Interactions of the major histocompatibility complex class I BF2*15 and cytotoxic T lymphocyte epitopes from nucleoprotein of avian infectious bronchitis virus was illuminated in this study, and the results may shed light on the understanding of immune mechanism of IBV and research towards universal IBV vaccine.

Keywords: Infectious bronchitis virus, MHC I binding motif, Cytotoxic T lymphocyte epitope

表位疫苗是近年来发展起来的新型疫苗,其免疫效力在动物实验中得到验证,表位疫苗主要选取保护性抗原基因中决定抗原特异性的簇团。Zhou 等研究表明,用转基因植物表达的 IBV S1 蛋白免疫后,雏鸡可以对致病性 IBV 产生血清中和抗体,其脾脏可在体外分泌 IL-2 并发生 T 淋巴细胞增殖反应^[1]。通过迟发型超敏反应(Delayed type hypersensitivity, DTH)研究进一步发现, S1 蛋白的亚单位免疫可诱导产生强烈的 DTH 反应,这充分证实了细胞介导免疫在 IBV 感染后的免疫保护中起着重要作用^[2-3]。

T 细胞识别的 MHC 复合体是细胞免疫的先决条件,通过识别 MHC I 类分子与表位肽复合物的 CTL 能够杀死感染病毒的细胞并能清除病毒^[4-6]。因此,识别 CTL 抗原表位对于制造疫苗和理解病毒感染清除的免疫机制至关重要^[7]。近年来在病原蛋白序列方面发展了基于特定的 MHC I 蛋白结构,预测 CTL 抗原表位的一系列计算方法^[8-10],以及可以识别在特殊抗原表位发生高于预期频率氨基酸的稳定性矩阵算法或人工神经网络(ANNAs)^[11-15]。Liu 等报道了鸡 MHC I (BF2*15)四聚体^[16],表明了 IBV 52 株传染性支气管炎病毒 N 蛋白细胞表位(WRRQARYK)能与 B15 单倍体结合,并能诱导免疫应答^[17],但是该研究并没有对该细胞表位和 MHC I 结合的作用机理做

进一步解释。

本研究是在已经鉴定 IBV N 蛋白的细胞表位基础之上,进一步用同源建模、分子动力学和分子对接的计算方法,通过探究 IBV N 蛋白 T 细胞表位多肽和 BF2*15 之间的关系,并最终确定 BF2*15 结合序列,并且用流式细胞术证明 IBV N 蛋白的细胞表位(WRRQARYK)能在体外诱导活化的鸡淋巴细胞产生 CTL 表位。

1 材料与方法

1.1 BF2*15 和 Ch β -2M 序列

从 GenBank 上获取 BF2*15 和 Ch β -2M 编码区序列(登录号:L28958, M84767)。此外,蛋白序列特征来源于 UniProtKB 的信息(登录号:Q9GIP6, P21611)。Ch β -2M 是组成主要组织相容性复合体(MHC) I 类分子复合体的轻链分子,对于 MHC I 类分子在细胞表面稳定表达和有效递呈抗原肽必不可少。

1.2 同源建模、分子动力模拟和蛋白对接

首先通过 BLAST,从 PDB 数据库(Protein data bank)中寻找与目标序列相似的模板结构。使用 Modeler 9v6 程序包,选择序列相似性比较高的一个蛋白结构作为模板进行同源建模。然后利用 NAMD 2.7 程序包,在 CHARMM 力场下完成分子动力模拟^[18],模拟前,蛋白/多肽需要先溶解在一个立方体水盒子中,并确保水盒边界距离蛋白的最小距离不

小于 $10 \text{ \AA}^{[19]}$, 在模拟中使用周期性边界条件。非键作用力的截断值设为 10 \AA 。蛋白对接由 ZDOCK 软件包完成, 通过刚性对接的方式, 模拟两个蛋白或者一条多肽与一个蛋白之间所有可能的相互作用模式, 然后对每个作用模型打分, 根据分值来评估最合理的相互作用模式。

1.3 BF2*15 与 WRRQARYK 八肽相互作用关系分析

WRRQARYK 八肽来自传染性支气管炎病毒 (IBV) N 蛋白, 八肽由 Discovery Studio Visualizer 的 Build and Edit Protein 模块直接产生, 并通过分子动力学模拟软件对结构进行优化。蛋白对接使用 ZDOCK 软件包完成, 经过蛋白对接后, 共获得了 2 000 个不同的构象。选择 ZDOCK Score 打分高于 14 分的 103 个构象, 使用 RDOCK 进一步优化。经过 RDOCK 优化后, 选择了 8 个属于不同聚类的蛋白构象, 并对 RDOCK Score 打分比较高的构象进行下一步的分析, 通过分析确定八肽与 BF2*15 的结合序列。“WRRQARYK”、无关多肽 NPaa₈₉₋₉₇ 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.4 CD8⁺ T 淋巴细胞的增殖试验

20 只 6 周龄 SPF 鸡平均分成 2 组, 实验组通过滴鼻免疫 IBV 52 疫苗, 另一组滴鼻等量的 PBS 缓冲液作为空白对照。免疫后 3 周, 无菌取实验组鸡的脾脏, 置于平皿中, 用 Hanks 洗涤 3 次, 加入 2 mL RPMI-1640 培养液。粗剪成小块, 用无菌的注射器芯管轻轻碾碎, 200 目筛网过滤到 25 mL 试管内。1 000 r/min 离心 3 min, 弃上清, 再用 Hanks 清洗 3 次, 每次 800 r/min 离心 3 min。将细胞悬于含 10% 胎牛血清的 1640 培养液中。取细胞悬液, 小心加入到等体积的细胞分离液面上。收集淋巴细胞层放入含细胞洗涤液的试管中, 充分混匀后, 1 200 r/min 离心 20 min, 弃上清留沉淀。将细胞重悬, 重复洗涤 2 次即得淋巴细胞。取 9 μL 重悬细胞液, 加入 1 μL 的 0.4% 台盼蓝染色液, 染色 3–5 min, 计数

活细胞后, 用 RPMI-1640 完全培养液调整细胞浓度为 1×10^6 个/mL。将接种于 24 孔板, 每孔 1 mL, 分别加入 WRRQARYK 合成肽刺激物及不相关多肽 NPaa₈₉₋₉₇, 终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。同时设置正常的脾淋巴细胞为空白对照组。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养 3 d。取出培 3 d 后的脾脏淋巴细胞, 将 1×10^6 个/mL 的细胞放入 1.5 mL 的 EP 管中, 3 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入 100 μL PBS 悬浮细胞。加入封闭抗体 mouse-IgG ($1 \times 10^6/\mu\text{L}$), 室温 15 min。加入荧光抗体 Mouse Anti-Chicken CD8-PE (0.2 $\mu\text{g}/10^6$ cell), 4 $^{\circ}\text{C}$, 避光, 30 min。加入 350 μL PBS 轻轻混匀, 3 000 r/min 离心 5 min, 弃上清。重复洗涤 2 次, 最后将细胞重悬于 500 μL PBS 中, 用流式细胞仪进行检测。

2 结果与分析

2.1 BF2*15 MHC I 结构预测

目前已经获得鸡的 MHC I 结构有 12 个, 分别来自 B2、B4、B14 和 B21^[20-22]。本研究使用 2 个 BF2*21 结构(3BEV 和 3BEW)作为模板来构建 BF2*15 构型。B21 和 B15 序列相似性和一致性分别为 95.4%和 93.2%。3BEV 和 3BEW 的分辨率都比较高, 分别为 2.1 \AA 和 2.6 \AA , 因此采用 3BEV 和 3BEW 作为模板进行同源建模是合理的。构建的 BF2*15 结构与鸡的其它 MHC I 蛋白十分相似(图 1A)。接下来利用分子动力学模拟, 利用 NAMD 软件包, 在显式水模型下, 对构建完成的 MHC I 分子进行分子动力学模拟。模拟了 3 条轨迹, 每条轨迹 30 ns。对模拟轨迹中 RMSD 的变化和能量变化进行了分析, 如图 1B 和图 1C 所示。最终得到的最低能量结构通过拉氏构象图分析确认了其结构是合理的(图 2)。BF2*15 与 3BEV 和 3BEW 的均方根偏差(RMSD)分别为 0.684 \AA 和 0.649 \AA (图 1B), 说明该结构与其他单倍型 MHC I 的结构是非常相似的。筛选出具有最低势能的 BF2*15 结构构象(图 1D)。

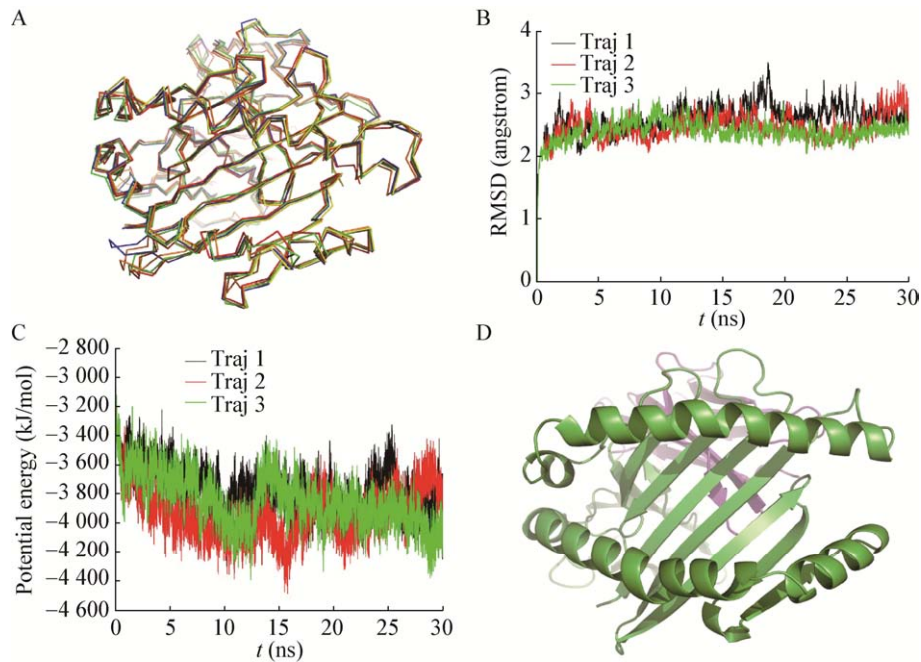


图 1 BF2*15 MHC I 最低能量的结构选择

Figure 1 The lowest energy structure choice of BF2*15

注：A：B15、B2 (4CVX)、B4 (4E0R)、B14 (4CW1)和 B21 (3BEV)结构对比，B15 以绿色 Ribbon 显示，B2、B4、B14 和 B21 分别以蓝色、橙色、黄色和红色 Ribbon 显示；B：BF2*15 MHC 结构分子模拟轨迹的 RMSD 分析，3 条轨迹分别以黑色、红色和绿色标出；C：BF2*15 MHC I 结构分子模拟轨迹的势能分析，3 条轨迹分别以黑色、红色和绿色标出；D：BF2*15 最低能量构象，绿色卡通和紫色卡通分别表示 MHC I 分子和 β -2M 分子。

Note: A: The comparison of constructed B15, B2 (4CVX), B4 (4E0R), B14 (4CW1) and B21 (3BEV); All these proteins are shown as ribbon, and are colored green (B15), blue (B2), orange (B4), yellow (B14) and red (B21). B: The RMSD analysis of BF2*15 simulation trajectories, the RMSD analysis of BF2*15 simulation trajectories, and colored with black (trajectory 1), red (trajectory 2) and green (trajectory 3), respectively. C: The potential analysis of BF2*15 simulation trajectories, colored with black (trajectory 1), red (trajectory 2) and green (trajectory 3), respectively. D: The top view of lowest potential energy conformation of BF2*15, green and purple cartoon indicate BF2*15 and β -2M, respectively.

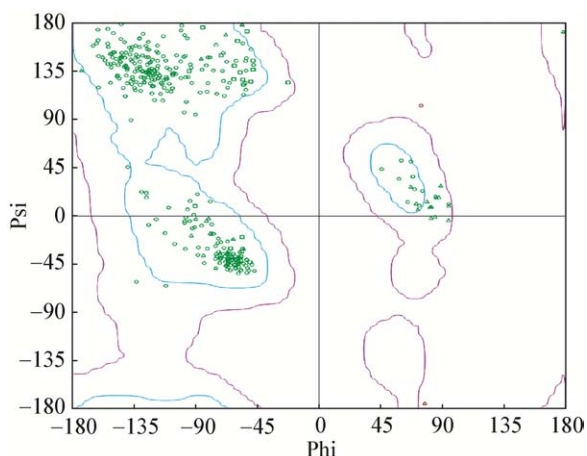


图 2 BF2*15 最低能量构象的拉氏构象图分析
Figure 2 The Ramachandran plot analysis of the BF2*15 lowest potential energy conformation

2.2 IBV N 蛋白多肽 WRRQARYK 结构特征分析

首先利用 Discovery Studio Visualizer 构建未经折叠的 IBV 八肽结构，该结构呈直线形。然后通过分子动力学模拟对八肽结构进行充分的优化，以探索其在溶液中的折叠构象。分子动力学模拟进行了 4 条轨迹，每条轨迹的模拟时间为 50 ns。在所有的模拟轨迹中，选择势能最低的八肽结构作为溶液中的折叠构象进行分子对接(图 3)。结构分析显示，由于存在 4 个正电残基，同时缺少负电残基，IBV 多肽整体是带正电荷。此外，氨基端的游离氨基也对正电势有贡献。Lys8 的游离羧基与 Arg3 的侧链相互作用，中和部分正电荷，产生八肽的环状构象。

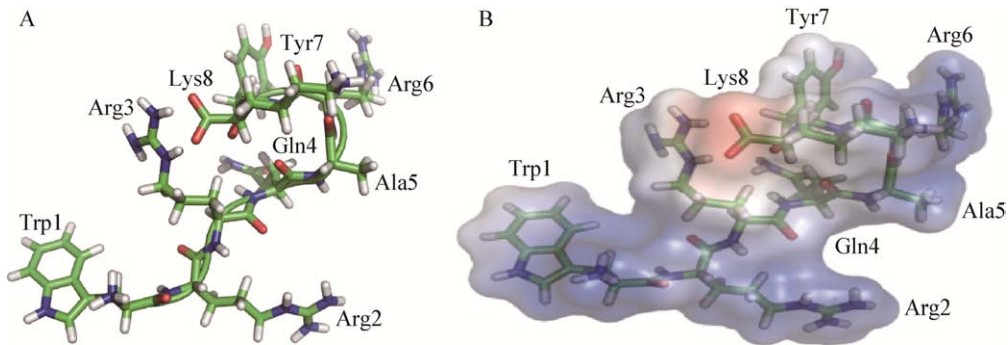


图 3 最低势能的 IBV 八肽结构

Figure 3 The lowest potential energy conformation of IBV octapeptide

注: 最低势能的 IBV 八肽结构由带颜色的条棍(A)和静电势面(B)表示。绿色、红色、蓝色和白色条棍分别表示碳原子、氧原子、氮原子和氢原子。蓝色表示正电性比较强区域, 红色表示负电性比较强的区域。

Note: The lowest potential energy conformation of IBV octapeptide, shown by colored sticks (A) and electrostatic potential surface (B). Green, red, blue and white sticks indicate carbon, oxygen, nitrogen and hydrogen atoms, respectively. Blue and red surface indicate positive charge and negative charged electrostatic potential, respectively.

2.3 BF2*15 和 IBV 多肽的相互作用

利用 ZDOCK 把 BF2*15 和 IBV N 蛋白多肽进行对接, 在对接结果中选出 ZDOCK 评分高的 8 个构象进一步分析相互作用的可能构象(图 4)。经过模拟后, 只有 1 个构象在 116 ns 模拟中始终能够紧密结合在 MHC I 的沟槽中, 且逐渐发生构象变化, 最终形成一个伸展的构象, 这表明八肽通过这个构象与 BF2*15 紧密结合(图 5)。在相互作用构象中, Arg2 和 Arg6 定向到结合部位并分别与 Asp24/Asp73 和 Asp73/Asp113 形成盐桥。此外, Trp1 的游离氨基与 BF2*15 的 Glu62 形成静电相互作用, 主链则与 Tyr7 侧链氧形成氢键。最后, 八肽中的 Arg3、Ala5 以及 Gln4 与 BF2*15 的 Tyr149、Tyr97 以及 Thr64 分别形成复杂的氢键网络, 这些氢键大大稳定了八肽和 MHC I 间的相互作用。

分析发现最重要的相互作用力可能来自 P2 和 P6 两个位置的 Arg, 这两个 Arg 均指向沟槽内部, 且都通过侧链与 MHC I 形成了两个静电相互作用力。而其它氨基酸, 要么没有形成稳定的相互作用, 比如八肽的 Tyr7, 要么是以主链原子与 MHC I 相互作用, 比如八肽的 Trp1、Gln4、Ala5。八肽的 Lys8 虽然通过侧链与 Asp148 形成了静电相互作用, 但是这一静电作用力位于沟槽外侧, 暴露在水溶液

中, 因此稳定性不如 Arg2 和 Arg6 在沟槽内部与 MHC I 形成的静电相互作用力。Arg3 的侧链氨基、Ala5 主链羰基以及 BF2*15 的 Tyr149 侧链羟基形成了氢键网络, 这一氢键网络对于多肽的结合也是有很大贡献的, 但是 Arg3 的侧链指向沟槽的侧面, 并非锚定氨基酸, 因此重要性要低于 Arg2 和 Arg6, 由此我们推测 B15 鸡 MHC I 结合序列是“x-Arg-x-x-x-Arg-x-x”, 其中 P3 位置也比较倾向于正电氨基酸, 如 Arg 或者 Lys。

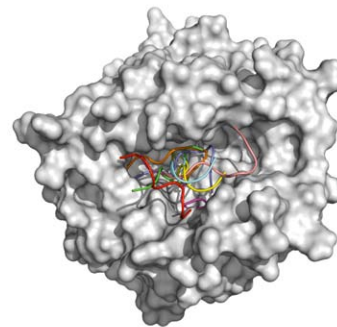


图 4 BF2*15 与 WRRQARYK 八肽可能的相互作用模式示意图

Figure 4 Possible interactions between BF2*15 and IBV octapeptide

注: 白色表面展示的是 BF2*15 分子, 而对接后的多肽以不同颜色的卡通展示。

Note: BF2*15 was displayed as with surface, and IBV octapeptide are shown as cartoon by different colors.

2.4 CD8⁺ T 淋巴细胞的增殖试验结果

用 Mouse Anti-Chicken CD8-PE 对淋巴细胞标记, 经流式细胞仪分群计数: 发现经多肽 WRRQARYK 刺激后 CD8⁺ T 细胞有 33.7% 的增殖,

不相关多肽 NPaa₈₉₋₉₇ 刺激的 CD8⁺ T 细胞略有增殖 (2.3%), 空白对照 CD8⁺ T 细胞增殖为 0 (图 6)。这表明多肽 WRRQARYK 能有效刺激活化 CD8⁺ T 淋巴细胞增殖。

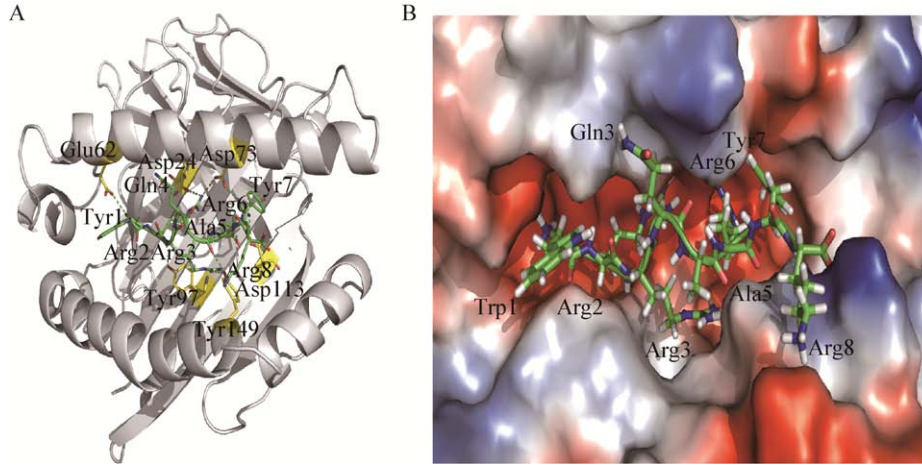


图 5 最低势能构象的 BF2*15-IBV 八肽复合物

Figure 5 The lowest potential energy conformation of BF2*15-IBV octapeptide complex

注: BF2*15 与 WRRQARYK 八肽经过分子动力学模拟之后的最低势能结构卡通图(A)和表面图(B)。A: 白色卡通表示 BF2*15, 绿色卡通表示 WRRQARYK 八肽; B: 蓝色和红色分别表示正电性和负电性比较强的区域。WRRQARYK 八肽以及参与相互作用的关键氨基酸以彩色条棍表示, 绿色、红色、蓝色和白色条棍分别表示碳原子、氧原子、氮原子和氢原子。

Note: The lowest potential energy conformation of BF2*15-IBV octapeptide complex, shown as electrostatic potential surface (B) and sticks as well as cartoons (A). A: Green and white cartoon indicate WRRQARYK and BF2*15, respectively. B: Blue and red surface indicate positive charge and negative charged electrostatic potential, respectively. Green, red, blue and white sticks indicate carbon, oxygen, nitrogen and hydrogen atoms, respectively.

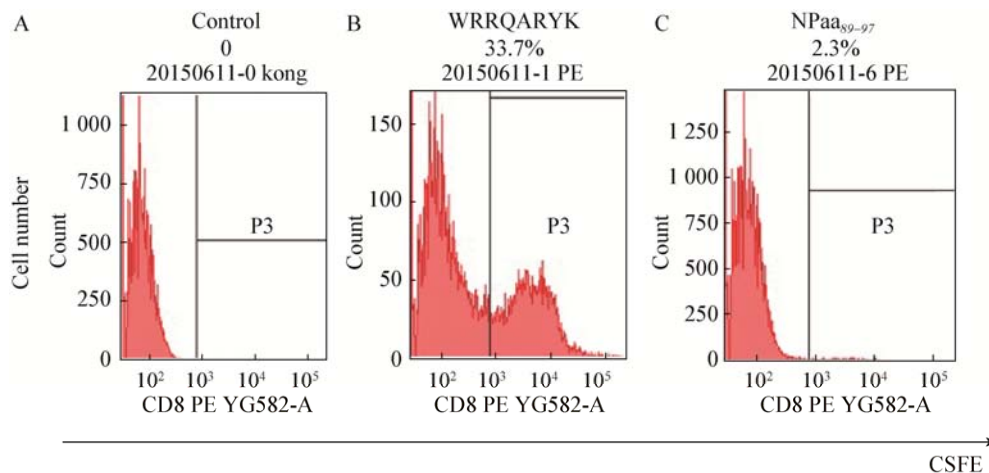


图 6 不同肽刺激后 CD8⁺ T 细胞增殖流式检测结果

Figure 6 CD8⁺ T cell proliferation after stimulation

注: A: 正常脾细胞, 作为对照; B: 用 WRRQARYK 刺激后的脾细胞; C: 用不相关多肽 NPaa₈₉₋₉₇ 刺激的脾细胞。

Note: A: The control was normal spleen lymphocytes; B: The group was spleen lymphocytes stimulated with WRRQARYK; C: The group was spleen lymphocytes stimulated with NPaa₈₉₋₉₇.

3 结论与讨论

传染性支气管炎病毒(IBV)是威胁养禽行业的主要病原之一,各种日龄的鸡均易感^[23]。IBV 不断出现新的血清型和基因型^[24],而且同血清型或毒株间缺乏交叉保护或保护性差^[25],因此 IBV 仍然流行不断,给养殖行业造成了巨大的经济损失。因此,研制更加高效、安全的 IB 疫苗已成为兽医科研的重点。研究表明细胞免疫可能在清除病毒方面起着重要作用^[26]。因此,研发抗病毒的 T 细胞免疫疫苗更加值得关注。

研发 T 细胞免疫疫苗首先要解决的问题是鉴定正确的 T 细胞表位多肽,在本研究中,我们尝试利用蛋白对接配合分子动力学模拟的手段来预测 BF2*15 与 WRRQARYK 八肽的相互作用关系;然后通过分析 BF2*15 沟槽的化学特征、结构特征以及与抗原表位肽的结合模式,来推测其所识别的抗原表位肽 Motif。由于实验手段的限制,利用现有的实验条件,除了直接解析蛋白结构之外,比较难以确定 BF2*15 与 WRRQARYK 八肽的相互作用关系。然而结构的解析需要消耗大量的人力、财力和时间。

本研究利用分子建模、蛋白对接和 MD 模拟等技术描述了 IBV 八肽(WRRQARYK)与 B15 鸡 MHC I 蛋白之间的相互作用过程,从蛋白分子结构水平上鉴定了 IBV N 蛋白的 T 细胞表位八肽(WRRQARYK)是鸡 BF2*15 单倍体的一个潜在的 CTL 表位,并且预测了 B15 鸡 MHC I 的一条潜在的结合序列“x-Arg-x-x-x-Arg”,当然这个基序需要通过进一步的分子生物学实验来验证,本研究仅仅是提出了一种假设。值得注意的是,这个基序与先前 Wallny 等^[21]研究的基序有所不同,这说明 BF2*15 可以结合不同的基序。

淋巴细胞增殖试验结果显示:多肽(WRRQARYK)刺激活化 T 细胞后,CD8⁺ T 细胞增殖 33.7%,表明多肽(WRRQARYK)能够诱导 CTL 反应,是 IBV N 蛋白潜在的 T 细胞表位。

本研究为快速预测其它家禽病毒的 CTL 表位提供了一条思路,该研究结果也有助于对家禽病毒免疫机制更深层次的理解。

参 考 文 献

- [1] Zhou JY, Cheng LQ, Zheng XJ, et al. Generation of the transgenic potato expressing full-length spike protein of infectious bronchitis virus[J]. *Journal of Biotechnology*, 2004, 111(2): 121-130
- [2] Chen BY, Itakura C. Cytopathology of chick renal epithelial cells experimentally infected with avian infectious bronchitis virus[J]. *Avian Pathology*, 1996, 25(4): 675-690
- [3] Tian ZC, Sun YK, Wang YF, et al. The immunological efficacies of recombinant fowlpox virus expressing the S1 gene of LX4 strain of infectious bronchitis virus in specific-pathogen-free (SPF) chickens[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2006, 37(6): 580-586 (in Chinese)
田占成, 孙永科, 王云峰, 等. 表达鸡传染性支气管炎病毒 S1 基因重组鸡痘病毒对 SPF 鸡的免疫保护作用[J]. *畜牧兽医学报*, 2006, 37(6): 580-586
- [4] Travers P, Walport M, Shlomchik M, et al. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*[M]. 5th Edition. New York: Taylor & Francis, Inc., 2001
- [5] Sette A, Peters B. Immune epitope mapping in the post-genomic era: lessons for vaccine development[J]. *Current Opinion in Immunology*, 2007, 19(1): 106-110
- [6] Sette A, Fleri W, Peters B, et al. A roadmap for the immunomics of category A-C pathogens[J]. *Immunity*, 2005, 22(2): 155-161
- [7] Bui HH, Sidney J, Dinh K, et al. Predicting population coverage of T-cell epitope-based diagnostics and vaccines[J]. *BMC Bioinformatics*, 2006, 7: 153
- [8] Rammensee H, Bachmann J, Emmerich NPN, et al. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs[J]. *Immunogenetics*, 1999, 50(3/4): 213-219
- [9] Parker KC, Bednarek MA, Coligan JE. Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains[J]. *The Journal of Immunology*, 1994, 152(1): 163-175
- [10] Zhang GL, Srinivasan KN, Veeramani A, et al. PREDBALB/c: a system for the prediction of peptide binding to H2d molecules, a haplotype of the BALB/c mouse[J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(S2): W180-W183
- [11] Nielsen M, Lundegaard C, Worning P, et al. Improved prediction of MHC class I and class II epitopes using a novel Gibbs sampling approach[J]. *Bioinformatics*, 2004, 20(9): 1388-1397
- [12] Bui HH, Sidney J, Peters B, et al. Automated generation and evaluation of specific MHC binding predictive tools: ARB matrix applications[J]. *Immunogenetics*, 2005, 57(5): 304-314
- [13] Peters B, Sette A. Generating quantitative models describing the sequence specificity of biological processes with the stabilized matrix method[J]. *BMC Bioinformatics*, 2005, 6: 132
- [14] Larsen MV, Lundegaard C, Lamberth K, et al. An integrative approach to CTL epitope prediction: a combined algorithm

- integrating MHC class I binding, TAP transport efficiency, and proteasomal cleavage predictions[J]. *European Journal of Immunology*, 2005, 35(8): 2295-2303
- [15] Nielsen M, Lundegaard C, Worning P, et al. Reliable prediction of T-cell epitopes using neural networks with novel sequence representations[J]. *Protein Science*, 2003, 12(5): 1007-1017
- [16] Liu GL, Wang Q, Tong TH, et al. Construction and functional test of a chicken MHC-I (BF2*15)/peptide tetramer[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2008, 122(1/2): 1-7
- [17] Boots AM, Kusters JG, van Noort JM, et al. Localization of a T-cell epitope within the nucleocapsid protein of avian coronavirus[J]. *Immunology*, 1991, 74(1): 8-13
- [18] Brooks BR, Brooks CL, Mackerell AD, et al. CHARMM: the biomolecular simulation program[J]. *Journal of Computational Chemistry*, 2009, 30(10): 1545-1614
- [19] Vreven T, Pierce BG, Hwang H, et al. Performance of ZDOCK in CAPRI rounds 20-26[J]. *Proteins*, 2013, 81(12): 2175-2182
- [20] Kaufman J, Völk H, Wallny HJ. A "minimal essential Mhc" and an "unrecognized Mhc": two extremes in selection for polymorphism[J]. *Immunological Reviews*, 1995, 143(1): 63-88
- [21] Wallny HJ, Avila D, Hunt LG, et al. Peptide motifs of the single dominantly expressed class I molecule explain the striking MHC-determined response to Rous sarcoma virus in chickens[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(5): 1434-1439
- [22] Chappell PE, Meziane EK, Harrison M, et al. Expression levels of MHC class I molecules are inversely correlated with promiscuity of peptide binding[J]. *eLife*, 2015, 4: e05345
- [23] Bijlenga G, Cook JKA, Gelb J, et al. Development and bronchitis virus from the Netherlands as a vaccine: a review use of the H strain of avian infectious[J]. *Avian Pathology*, 2004, 33(6): 550-557
- [24] Bonnefoy L, Bouquet JF, Picault JP, et al. Characterization of IBV variant strain PL 84084 isolated in France[A]//Laude H, Vautherot JF, eds. *Coronaviruses[M]*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Boston, MA: Springer
- [25] Casais R, Dove B, Cavanagh D, et al. Recombinant avian infectious bronchitis virus expressing a heterologous spike gene demonstrates that the spike protein is a determinant of cell tropism[J]. *Journal of Virology*, 2003, 77(16): 9084-9089
- [26] Thomas PG, Keating R, Hulse-Post DJ, et al. Cell-mediated protection in influenza infection[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2006, 12(1): 48-54

稿件书写规范

专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一，主要反映国内外微生物学及相关领域学科研究最新成果和进展，其内容要求新颖丰富，观点明确，论述恰当，应包含作者自己的工作内容和见解。因此，作者在动笔之前必须明确选题，一般原则上应选择理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面，在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势，即掌握其内在的精髓，深入到专题研究的本质，论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望，提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外，作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法，辅以注释，客观而有少量评述，使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是：(1) 本刊要求作者投稿时在正文前写上主要作者专业和研究背景的简介，并指出自己的工作(已发表的文章)在综述中的体现，同时请在稿件中用不同颜色标出来。(2) 在专论与综述中引用的文献应该主要是近5年国内外正式发表的研究论文，引用文献数量不限。