论著

文章编号:1000-5404(2008)04-0292-03

脂多糖结合蛋白的B细胞抗原表位预测及其效应初步分析

冯起甲[1],徐 智[1],吴国明[1],胡川闽[2],徐顺贵[1],陈维中[1],郭芮伶[1] (第三军医大学:[1]新桥医院全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室,重庆 400037,[2]医学检验系临床生物化学教研室,重庆 400038)

摘 要:目的 预测人脂多糖结合蛋白(LBP)的B细胞抗原表位。**方法** 采用生物信息软件和互联网服务器,预测LBP的二级结构和分析LBP表面特性(亲水性、可塑性、可及性和抗原性),再计算平均抗原指数(AI),预测LBP的B细胞抗原表位。**结果** LBP存在多个潜在的抗原表位,247~260序列(FKGEIFHRNHRSPV)的AI(0.040 7)明显高于其他片段,370~379序列(LPSSSKEPVF)和303~325序列(ITDDMIPPDSNIRLTTKSFRPFV)的AI分别是0.033 6和0.029 5。247~260序列是LBP潜在的B细胞优势抗原表位。**结论** 应用多参数预测到LBP的B细胞抗原表位。

关键词: LBP抗原;表位;B细胞;生物信息学

中图法分类号: R318.04;R392.1;R392.2 **文献标识码:** A

Prediction of B-cell antigen epitope on lipopolysaccharide-binding protein

FENG Qi-jia[1], XU Zhi[1], WU Guo-ming[1], HU Chuan-min[2], XU Shun-gui[1], CHEN Wei-zhong[1], GUO Rui-ling[1] ([1]Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Chongqing 400037, [2]Department of Clinical Biochemistry, College of Medical Laboratory, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To predict the B-cell epitope for lipopolysaccharide-binding protein (LBP) antigen. **Methods** Using biotic software and network servers, the secondary structure of LBP was predicted, and the surface properties of LBP, such as hydrophilicity, flexibility, accessibility and antigenicity, were analyzed. Then the average antigen index (AI) was calculated by using Wu's method. **Results** Many distinct antigenic epitopes on LBP were identified: AI of sequence 247-260 (FKGEIFHRNHRSPV) on LBP was 0.040 7, significantly higher than that of other sequences. AI of sequence 370-379 (LPSSSKEPVF) and sequence 303-325 (ITDDMIPPDSNIRLTTKSFRPFV) was 0.033 6 and 0.029 5, respectively. Sequence 247-260 was the prevalent antigen epitope of B-cell on LBP. **Conclusion** The B-cell epitopes of LBP is predicted successfully.

Key words: LBP antigen; B cell; epitope; bioinformatics

内毒素性急性肺损伤的发病机制复杂,病情凶险,病死率高,是临床上常见的危重症[1]。内毒素(endotoxin)是革兰阴性菌细胞壁成分脂多糖(LPS),可激活多形核白细胞(polymorphonuclear leukocyte, PMN)、单核巨噬细胞、肺毛细血管内皮细胞(pulmonary capillary endothelial cell, PCEC)等效应细胞,使其释放肿瘤坏死因子-α(TNF-α)等多种炎症介质并形成复杂的"炎症因子网络",导致全身炎症反应综合征(SIRS),最终损伤肺泡毛细血管膜,引发急性肺损伤[2]。研究显示,脂多糖结合蛋白(LBP)与LPS有高度亲和力,主要介导LPS的信号传导并增敏LPS的作用,在LPS致炎过程中起着非常重要的作用[3]。LBP抗体可阻断LBP对LPS的增敏作用,降低LPS诱导的单核/巨噬细胞产生TNF-α,降低实验小鼠的死亡率。目前,LBP抗体只有少数生物公司生产,其价格昂贵,而且抗体的抗原表位不明确,限制了其进一步研究应用。本研究拟采用生物信息分析软件和互联网络服务器,分析人LBP的氨基酸序列,预测LBP的B细胞抗原表位,为LBP特异性抗体的制备提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 LBP多肽序列

LBP多肽序列来自NCBI网站中的GenBank(http://www.ncbi.nlm.nih.gov)。

1.2 计算机分析软件及服务器

采用生物信息分析软件DNAStar和SOPMA服务器(http://npsa-pbil.ibcp.fr/NPSA/npsa_sopma.html)。

基金项目: 国家自然科学基金(30500230)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30500230)

作者简介: 冯起甲,男,陕西省韩城市人,博士研究生,副主任医师,主要从事急性肺损伤方面的研究。E-mail: fqjly@sohu.com

通信作者: 徐 智, E-mail: xuzhi1973@sohu.com
吴国明, E-mail: wu-guoming@yahoo.com

收稿日期: 2007-05-11;**修回日期:** 2007-09-26

1.3　二级结构预测及分析

人 LBP 一级结构:人 LBP 由 418 个氨基酸组成,其中含 44 个强酸性氨基酸,48 个强酸性氨基酸,187 个疏水性氨基酸,126 个极性氨基酸,相对分子质量是 53 382.74。

应用 DNAStar 软件提供的模块,采用 Chou-Fasman 预测方案和 Garnier-Robson 法及 SOPMA 服务器预测 LBP 的二级结构。

1.4　单参数预测

应用 DNAstar 软件, 采用 Kyte-Doolittle 等方案预测其亲疏水性(hydrophilicity),Emini 法预测表面可及性(accessibility),采用 Karplus-Schulz 方案预测其可塑性(flexibility),Jameson-Wolf 法预测抗原性(antigenicity)。

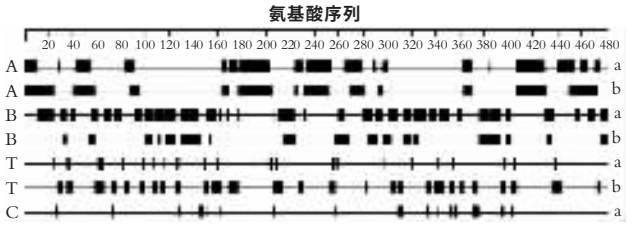
1.5　细胞表位的确定

依据 LBP 亲水性、表面可及性、可塑性及抗原性预测结果进行汇总,筛选出亲水性好、可及性高、可塑性和抗原性强的表位;再根据预测的 LBP 二级结构,排除位于 α-螺旋和 β-片层不易形成表位的序列,将位于转角、无规则卷曲处序列确定为 LBP 的候选 B 细胞表位。结合吴氏方法计算平均抗原指数(AI),最后把 AI 最高值对应的序列确定为 LBP 的 B 细胞优势表位[4]。

2　结果

2.1　LBP 的二级结构预测

采用 DNAStar 软件的 Chou-Fasman 和 Garnier-Robson 法进行二级结构预测(图 1)。结果表明 LBP 属于一种混合型蛋白,其中 α-螺旋占 37.4%,β-片层占 47.4%,转角(Turn)占 7.7%,无规则卷曲(Coil)占 7.5%。采用 SOPMA 服务器预测的 LBP 二级结构见图 2。



A: α-螺旋; B:β-片层; T:转角; C:无规则卷曲

图 1　Chou-Fasman 方案(a)和 Garnier-Robson 法(b)预测的 LBP 二级结构

2.2　LBP 的亲水性预测

LBP 的亲水性预测结果见表 1。LBP 亲水性区域的分布不均匀,中部分布较为密集,为亲水性较高区域。

2.3　LBP 的可及性预测

LBP 的可及性分析曲线近似于亲水性方案分析曲线(表 1)。可及性较高区域位于 LBP 分子表面,可及性较低区域,即埋藏于分子内部的区域。

2.4　LBP 的可塑性预测

LBP 的可塑性预测结果见表 1。这些区域可能具有一定的柔韧性,形成表位的可能性较大,容易与抗体进行嵌合。

2.5　LBP 的抗原性预测

应用 DNAstar 软件,采用 Jameson-Wolf 方法对 LBP 的抗原性进行预测(表 2),LBP 存在多个潜在的抗原表位位点和可能的蛋白质抗原表位区。

2.6　LBP 抗原表位的综合预测

LBP 的亲水性、可及性、可塑性及抗原性预测结果汇总成表 1,加粗字体为亲水性好、可及性高、可塑性和抗原性强的表位;排除二级结构位于 α-螺旋和 β-片层的序列,根据吴氏方法计算各可能抗原表位的 AI,结果见表 2。247 ~ 260 表位的 AI 值最高,含有 β-转角结构,对应的序列被确定为 LBP 的 B 细胞优势表位。

表 1　LBP 表面特性的单参数预测结果汇总

表面特性	表位
亲水性	22 ~ 25, 36 ~ 44, **63 ~ 81**, **94 ~ 98**, **109 ~ 124**, **147 ~ 155**, **182 ~ 195**, 198 ~ 200, 203 ~ 208, 210 ~ 214, **250 ~ 259**, 269 ~ 276,291 ~ 299, **306 ~ 323**, 330 ~ 338, 356 ~ 359, **373 ~ 378**, 406 ~ 414, **437 ~ 446**, 476 ~ 479
可及性	37 ~ 39, **73 ~ 77**, **92 ~ 96**, **113 ~ 119**, **148 ~ 153**, 184 ~ 189, 208 ~ 212, 235 ~ 239, **252 ~ 258**, 269 ~ 275, 294 ~ 297, **307 ~ 312**, **319 ~ 321**, 331 ~ 335, 360 ~ 362, **372 ~ 337**, 410 ~ 414, **436 ~ 444**
可塑性	18 ~ 22, 27 ~ 29, 35 ~ 38, 51 ~ 54, 60 ~ 66, **72 ~ 75**, 94 ~ 101, **105 ~ 121**, 125 ~ 128, **144 ~ 162**, 184 ~ 196, 203 ~ 212, 218 ~ 224, 235 ~ 238, **255 ~ 260**, 270 ~ 274, 304 ~ 306, **309 ~ 314**, **317 ~ 323**, 340 ~ 346, 352 ~ 356, **370 ~ 377**, 394 ~ 400, 402 ~ 408, 411 ~ 416, **438 ~ 444**
抗原性	24 ~ 28, 34 ~ 40, 53 ~ 55, 58 ~ 68, **70 ~ 78**, **96 ~ 98**, **105 ~ 121**, 125 ~ 133, **145 ~ 172**, 185 ~ 212, 220 ~ 224, 226 ~ 230, 234 ~ 239,**251 ~ 260**, 269 ~ 275, **303 ~ 325**, 332 ~ 335, 339 ~ 346, 352 ~ 358, **370 ~ 379**, 394 ~ 397, 402 ~ 416, **438 ~ 446**

加粗字体为亲水性好、可及性高、可塑性和抗原性强的表位

序列: MGALARALPSILLALLLTSTPEALGANPGLVARITDKGLQYAAQEGLLALQSELLRITLPDFTGDLRIPH
结构: hhhhhhhhhhhhhhhhhccchhhtcctteeeehhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhecccccccceeeeee
序列: VGRGRYEFHSLNIHSCELLHSALRPVPGQGLSLSISDSSIRVQGRWKVRKSFFKLQGSFDVSVKGISISV
结构: ecccceeeeeeeeeccccccccceeecttcceeeeeccccceeeeeccccccceeeeecttcceeeetteeeee
序列: NLLLGSESSGRPTVTASSCSSDIADVEVDMSGDLGWLLNLFHNQIESKFQKVLESRICEMIQKSVSSDLQ
结构: eeeeccttcccceeeeeccccccchhheeeehhtchhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
序列: PYLQTLPVTTEIDSFADIDYSLVEAPRATAQMLEVMFKGEIFHRNHRSPVTLLAAVMSLPEEHNKMVYFA
结构: hhhhhcccehhhccheeccceeeeeccccchhhhhhhhhttceeeeccccccccccccccccccccheeeee
序列: ISDYVFNTASLVYHEEGYLNFSITDDMIPPDSNIRLTTKSFRPFVPRLARLYPNMNLELQGSVPSAPLLN
结构: echhhhhhhhhhhhhttceeeeeeccccccccccceeechhhcchhhhhhhhhhcttcchheeeeccccccceee
序列: FSPGNLSVDPYMEIDAFVLLPSSSKEPVFRLSVATNVSATLTFNTSKITGFLKPGKVKVELKESKVGLFN
结构: ccccccceecchhhheeeeeccccccccceeeeeehhhhheeeeeccchheeeccttceeeeeeccttcccch
序列: AELLEALLNYYILNTFYPKFNDKLAEGFPLPLLKRVQLYDLGLQIHKDFLFLGANVQYMRV
结构: hhhhhhhhhhhhhhtcchhhhhhhhhttcccccccceeeehhhhhhcttteeeeeccheeeee

h: α-螺旋;e: β-片层;t: 转角;c: 无规则卷曲

图 2　LBP 氨基酸序列和 SOPMA 预测的二级结构

表 2 LBP 的 B 细胞优势表位的确定

表位	氨基酸序列	抗原指数
63 ~ 81	TGDLRIPHVGRGRYEFHSL	0.025 1
92 ~ 98	ALRPVPG	0.028 9
105 ~ 124	ISDSSIRVQGRWKVRKSFFK	0.014 6
144 ~ 172	LGSESSGRPTVTASSCSSDIADVEVDMSG	-0.006 1
247 ~ 260[a]	FKGEIFHRNHRSPV	0.040 7
303 ~ 325	ITDDMIPPDSNIRLTTKSFRPFV	0.029 5
370 ~ 379	LPSSSKEPVF	0.033 6
438 ~ 448	PKFNDKLAEGF	0.002 6

a：LBP 的 B 细胞优势抗原表位

3 讨论

LBP 属于Ⅰ型急性期反应蛋白，主要在肝脏合成。正常人和多种动物的血中均含有 LBP。当发生脓毒症或其他严重炎症时，LBP 的浓度可升高 50 ~ 100 倍[5]。在内毒素血症早期，LBP 可与极少量的 LPS 结合，形成 LPS/LBP 复合物，再与 mCD14 或 sCD14 结合后，可刺激单核细胞和血管内皮细胞等，引起一系列病理生理反应。LBP 对 LPS 具有增敏作用，可显著加重炎症反应[6]。目前，关于 LBP 的作用及对其如何进行人为地控制，已成为抗内毒素治疗研究的重要领域[7-9]。

研究发现，蛋白质抗原并非通过其完整分子发挥功能，而是通过其表位体现其特异性。由于许多天然抗原引发的免疫反应不能满足预防感染或治疗的需要，为了提高蛋白质抗原的保护性，有必要在表位水平上做出选择、改造。B 细胞识别蛋白抗原时，是以其表面的 B 细胞抗原受体与蛋白抗原表位（抗原决定簇）结合，此过程与抗原抗体的结合基本相同。19 世纪 80 年代 Hopp 等提出亲水性参数概念，并对 B 细胞蛋白抗原表位进行预测，取得了一定的效果。近年来，随着生物信息学的迅速发展，生物学家设计了许多分子生物学软件用于蛋白质的分析。目前被认可有效的预测 B 细胞抗原表位的方法主要有[10-12]：二级结构方案、亲水性方案、可及性方案、可塑性方案、抗原性方案、电荷分布方案。虽然以上几种方案对预测蛋白质 B 细胞抗原表位有一定效果，但单参数预测的准确性并不高，在进行蛋白质 B 细胞抗原表位预测时，一般采用上述几种方案综合考虑、多种参数综合分析的方法。研究表明，在进行 B 细胞抗原表位预测时，运用生物信息软件和互联网服务器，采用多种方案综合分析可提高实验的成功率，增强实验的目的性[10,13]。另外，近年来也出现了一些通过分子模拟与同源建模等方法进行蛋白质 B 细胞表位预测的研究，方法正在探索之中。

本研究首先采用 DNAStar 软件和 SOPMA 服务器预测了 LBP 的二级结构，结果显示 LBP 属于一种混合型蛋白结构，含有 α-螺旋、β-片层、β-转角和无规则卷曲，其 β-转角和无规则卷曲区域可能形成抗原表位。进一步用分子生物学软件分析 LBP 的亲水性、可塑性、可及性和抗原性，结合 LBP 的二级结构综合预测提示，LBP 存在多个潜在的 B 细胞抗原表位，分别是序列 63 ~ 81、92 ~ 98、105 ~ 124、144 ~ 172、247 ~ 260、303 ~ 325、370 ~ 379、438 ~ 448。最后根据 AI 确定 B 细胞优势抗原表位，序列 247 ~ 260 的 AI 明显高于其他序列，该序列区域具有较高的亲水性、柔韧性和可及性，且二级结构上含有 1 个 β-转角，有利于抗原表位的形成，是 LBP 潜在的 B 细胞优势抗原表位。

本研究基于 LBP 已知的氨基酸序列，分析和预测了 LBP 的二级结构和 B 细胞表位，得到了 LBP 潜在的 B 细胞优势抗原表位，为进一步研究 LBP 的蛋白特征及其单克隆抗体的制备奠定了基础。

参考文献：

[1] Rance M. Kinetic therapy positively influences oxygenation in patients with ALI/ARDS[J]. Nurs Crit Care, 2005, 10(1): 35 - 41.

[2] Lomas-Neira J, Chung C S, Perl M, *et al*. Role of alveolar macrophage and migrating neutrophils in hemorrhage-induced priming for ALI subsequent to septic challenge[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2006, 290(1): L51 - L58.

[3] Kitchens R L, Thompson P A. Modulatory effects of sCD14 and LBP on LPS-host cell interactions[J]. J Endotoxin Res, 2005, 11(4): 225 - 229.

[4] Wu Y Z, Zhu X H. A new approach for B-cell epitope prediction in viral proteins[J]. J Chin Sci Bull, 1995, 40(9): 761 - 763.

[5] Vreugdenhil A C, Rousseau C H, Hartung T, *et al*. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein mediates LPS detoxification by chylomicrons[J]. J Immunol, 2003, 170 (3): 1399 - 1405.

[6] Le-Roy D, Di-Padova F, Adachi Y, *et al*. Critical role of lipopolysaccharide-binding protein and CD14 in immune responses against gram-negative bacteria[J]. J Immunol, 2001, 167(5): 2759 - 2765.

[7] Zweigner J, Schumann R R, Weber J R. The role of lipopolysaccharide-binding protein in modulating the innate immune response[J]. Microbes Infect, 2006, 8(3): 946 - 952.

[8] 冯起甲，徐 智，吴国明，等. 脂多糖结合蛋白与 CD14 结合位点模拟肽的初步筛选[J]. 第三军医大学学报，2007，29(16)：1572 - 1575.

[9] 张德明，邓青南，李永旺，等. 脂多糖结合蛋白多抗对大鼠肺泡巨噬细胞内毒素耐受性及 Toll 样受体 4 表达的影响[J]. 第三军医大学学报，2006，28 (2)：140 - 143.

[10] Maeda K, Mizukoshi F, Hamano M, *et al*. Development of an equine herpesvirus type 4-specific enzyme-linked immunosorbent assay using a B-cell epitope as an antigen[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(3): 1095 - 1098.

[11] 吕燕波，万 瑛，吴玉章. SARS 病毒基因组所编码的 E 蛋白的二级结构和 B 细胞表位预测[J]. 免疫学杂志，2003，19(6)：407 - 410.

[12] Mahler M, Bluthner M, Pollard K M. Advances in B-cell epitope analysis of autoantigens in connective tissue diseases[J]. Clin Immunol, 2003, 107(2): 65 - 79.

[13] Anandarao R, Swaminathan S, Khanna N. The identification of immunodominant linear epitopes of dengue type 2 *virus* capsid and NS4a proteins using pin-bound peptides[J]. Virus Res, 2005, 112 (1 - 2): 60 - 68.

（编辑 王 红）