基础研究 文章编号:0253-3626(2010)09-1317-04

FSHR 胞外区抗原的二级结构预测和 B 细胞表位预测

申子刚[1],阎 萍[2],何 畏[2],陈正琼[2],何海洋[1],张 记[1],杨 霞[1],吴玉章[1],梁志清[2],李晋涛[1]
(1.第三军医大学免疫学教研室;2.第三军医大学西南医院妇产科,重庆 400038)

【摘 要】目的:分析卵泡刺激素受体(Follicle stimulating hormone receptor,FSHR)胞外区蛋白的二级结构,在线预测 FSHR 胞外区潜在的 B 细胞表位。方法:利用 DNAStar Protein 软件对 FSHR 胞外区蛋白的二级结构和表面特性进行分析,联合在线 B 细胞表位预测,预测 FSHR 胞外区蛋白可能的抗原表位。合成预测的 B 细胞表位肽,对其抗原性进行鉴定。结果:FSHR 胞外区蛋白可能的抗原表位区域为 17~34、42~44、116~122、142~147、179~193、239~241、266~270、279~282、288~307。选择 4 个区域合成肽段表位区域能与免疫抗血清发生抗原特异性反应。结论:应用多参数成功预测了 FSHR 胞外区蛋白抗原的 B 细胞表位。

【关键词】FSHR 胞外区;B 细胞表位;二级结构;抗原性
【中国图书分类法分类号】R34 【文献标记码】A 【收稿日期】2010-03-30

Prediction of the secondary structure and the B cell epitope of the extracellular domain of FSHR

SHEN Zi-gang, et al
(*Department of Immunology, the Third Military Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To predict the secondary structure and the B cell epitope for the extracellular domain of the follicle stimulating hormone receptor (FSHR). *Methods*: The secondary structure and surface properties of the extracellular domain of FSHR, such as physical and chemical properties, hydrophilicity, accessibility, antigenicity and plasticity, were analyzed by a variety of methods. The peptide of the epitopes was synthesized and used for coating streptavidin plate. The immunogenicity of the peptides was determined. *Results*: Many distinct antigenic epitopes in the extracellular domain of FSHR were identified by computation and online prediction, the possible location of which is in the regions of 17~34、42~44、116~122、142~147、179~193、239~241、266~270、279~282、288~307. Synthesized peptides have high specificity to the polyclonal antiboby. *Conclusion*: The B cell epitope for the extracellular domain of FSHR is successfully predicted.

【Key words】Follicle stimulating hormone receptor; B cell epitope; The secondary stuctuer; Antigentic

作者介绍:申子刚(1980-),男,硕士,研究方向:病毒免疫学。
通讯作者:李晋涛,女,教授,E-mail: ljtqms@yahoo.com.cn。
基金项目:国家科技支撑计划资助项(编号:2006BAI03B12),国家自然基金资助项目(编号:30400402, 30571708)。

dase inhibitor screen[J]. Biochemistry, 2008, 47(38): 10058-10068.
[4] Kuntz D A, Zhong W, Guo J, et al. The molecular basis of inhibition of Golgi alpha-mannosidase Ⅱ by mannostatin A[J]. Chembiochem, 2009, 10(2): 268-277.
[5] Crispin M, Chang V T, Harvey D J, et al. A human embryonic kidney 293T cell line mutated at the Golgi alpha-mannosidase Ⅱ locus[J]. J Biol Chem, 2009, 284(32): 21684-21695.
[6] Sun J Y, Yang H, Miao S, et al. Suppressive effects of swainsonine on C6 glioma cell in vitro and in vivo[J]. Phytomedicine, 2009, 16(11): 1070-1074.
[7] Hamaguchi J, Nakagawa H, Takahashi M, et al. Swainsonine reduces 5-fluorouracil tolerance in the multistage resistance of colorectal cancer cell lines[J]. Mol Cancer, 2007, 6: 58.
[8] Lazăr D, Tăban S, Ardeleanu C, et al. The immunohistochemical expression of E-cadherin in gastric cancer; correlations with clinicopathological factors and patients' survival[J]. Rom J Morphol Embryol, 2008, 49(4): 459-467.
[9] 冉俊涛,周永宁,唐承薇,等.塞来昔布术前干预对人胃癌组织 E 钙粘蛋白表达的影响[J].癌症, 2009, 28(4): 361-365.
[10] 陈双玲,时 岩,朱立平,等.6A8a-甘露糖苷酶表达减弱和表达正常鼻咽癌细胞间的差异基因表达[J].中国医学科学院学报, 2005, 27(3): 305-310.
[11] Wang Y, Nangia-Makker P, Tait L, et al. Regulation of prostate cancer progression by galectin-3[J]. Am J Pathol, 2009, 174(4): 1515-1523.
[12] 石 菲,彭贵勇,孙永刚,等.Galectin-3 在食管鳞癌中的表达及其临床意义[J].第三军医大学学报, 2008, 30(11): 1062-1065.
[13] Suzuki O, Abe M. Cell surface N-glycosylation and sialylation regulate galectin-3-induced apoptosis in human diffuse large B cell lymphoma[J]. Oncol Rep, 2008, 19(3): 743-748.

(责任编辑:冉明会)

卵泡刺激素（Follicle stimulating hormone，FSH）是腺垂体分泌的一种糖蛋白激素，通过与其受体（Follicle stimulating hormone receptor，FSHR）特异性结合而促进和维持两性正常的性腺发育和生殖功能[1]。FSHR 属于 G 蛋白偶联受体家族，特异性表达于男性睾丸 Sertoli cell 细胞表面，与 FSH 结合后启动青春期的生精和维持成年期的精子发生。FSHR 的激素结合位点局限在细胞外域，存在多个参与激素受体相互作用的区域[3,4]。研究发现用重组胞外区 1~134 氨基酸片段免疫成年雄猴，能抑制其生育能力，具有可逆性并且未出现自身免疫性疾病[5]。因此 FSHR 胞外区可作为男性避孕疫苗的靶抗原。本研究运用信息学技术分析胞外区的二级结构，结合在线 B 细胞表位预测，为合理选择 B 细胞优势表位，进而研制安全、高效的表位肽疫苗奠定基础。

1　材料与方法

1.1　材料

山羊抗小鼠酶标二抗为美国 SBA 公司产品；小鼠抗 FSHR 抗血清自制；TMB 显色液为天根生物技术有限公司产品。

1.2　FSHR 胞外区氨基酸序列选择

选取人的 FSHR 胞外区氨基酸序列，检索自瑞士生物信息研究所提供的 Swiss-Prot 蛋白质数据库（P23945），去除起始的含有 17 个氨基酸的信号肽，共有 349 个氨基酸残基，其序列如下：

CHHRICHCSNRVFLCQESKVTEIPSDLPRNAVELRFVL
TKLRVIQKGAFSGFGDLEKIEISQNDVLEVIEADVFSSLPKL
HEIRIEKANNLLNINPEAFQNLPNLRYLLISNTGIKHLPDVH
KIHSFQKVLLDIQDNINIHTIERNSFVGLSFESVILWLNKNG
IQEIHNCAFNGTQLDELNLSDNNNLEELPNDVFHGASGPVI
LDISRTRIHSLPSYGLENLKKLRARSTYNLKKLPSLEKLVAL
MEASLTYPSHCCAFANWRRQISELHPICNKSILRQEVDYM
TQARGRRASLAEDNEPGYSRGFDMMYSEFDYDLCNEVAD
VTCSPKPDAFNPCEDIMGYNILR。

1.3　FSHR 胞外区蛋白的二级结构预测

应用 DNAStar Protein 软件提供的模块，采用 Gamier-Robson、Chou-Fasman 和 Karplus-Schulz 3 种方法预测 FSHR 胞外区蛋白的二级结构。

1.4　FSHR 胞外区蛋白的 B 细胞表位预测

按 Hopp-Woods 方法的氨基酸亲水性标准，预测其亲水性；采用 AntheProt 软件提供蛋白质溶剂及可及性（Solvent accessibility）方案；按 Karplus-Schultz 方案预测其可塑性；按 Jameson-Wolf 预测抗原性指数。并兼顾各项预测参数推断 FSHR 胞外区蛋白的 B 细胞表位。

1.5　FSHR 胞外区 B 细胞表位的在线预测

利用 B 细胞表位在线预测（http://www.imtech.res.in/raghava/bcepred/），从亲水性、可及性、转角、极性和抗原性对 FSHR 胞外区进行在线分析。

1.6　FSHR 胞外区蛋白的 B 细胞表位抗原肽的合成

针对预测的抗原区域，采用标准 Fmoc 方案合成多肽，N 端封闭，多肽经制备性高压液相层析纯化，纯度达到 85%以上（上海吉尔生化有限公司）。

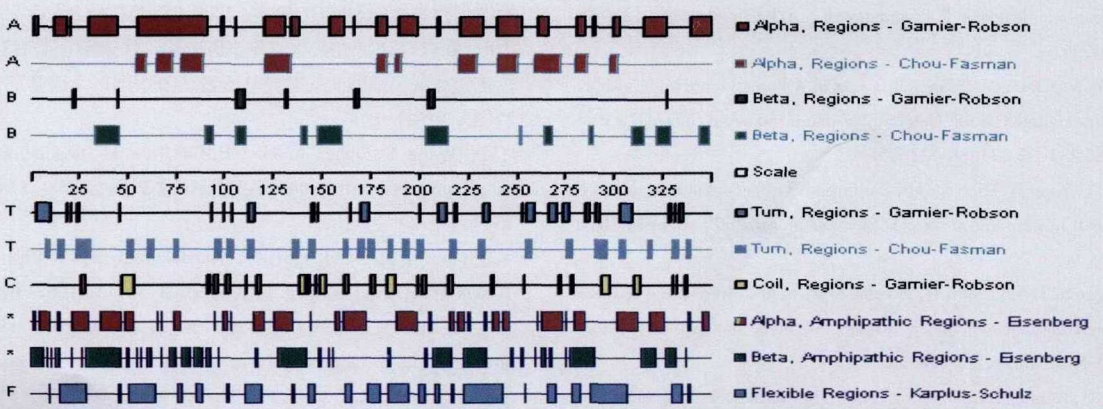
1.7　肽结合实验对免疫原性进行检测

采用链亲和素预包被板，包被稀释液溶解肽至终浓度 100 ng/ml，取 100 μl 加入包被板孔中，以空白孔（不包被）为对照 4℃过夜，PBST 洗涤 3 次，每次 5 min，加入抗血清（1∶1 000），37 ℃水浴锅孵育 60 min，PBST 洗涤 3 次，每次 5 min，加入 TMB 显色液，避光显色 10 min，酶标监测仪 D_{490} 读数记录。

2　结　果

2.1　FSHR 胞外区蛋白的二级结构分析结果

采用 DNAStarProtein 软件的 Gamier-Robson、Chou-Fasman 和 Karplus-Schulz 法进行分析，计算结果表明：FSHR 胞外区蛋白相对分子质量为 39 925.56 Da，等电点为 5.93。Gamier-Robson 和 Chou-Fasman 方法共同预测的区域形成 α－螺旋、



A. α－螺旋区域；B. β－折叠区域；T. 转角区域；C. 无规则卷曲区域；F. 柔性区域

图 1　Chou Fasman 方案和 Garmier Robson 法分析 FSHR 胞外区蛋白的二级结构

β－折叠和转角的可能性大(图 1)。β－折叠比较少，α－螺旋分布的比较均匀，在各 β－折叠单元之间存在长短不一的转角，共有的 β－折叠是 105~111，204~209。图 1 表明，FSHR 胞外区蛋白的二级结构中≥5 个氨基酸片段的柔性区域位于第 15~31、51~65、112~121、174~182、184~195、223~245、266~270、278~283、288~308 和 330~335 区段，这些区域可能具有一定的柔韧性，形成表位的可能性大。

2.2 FSHR 胞外区蛋白的表位预测结果

经抗原性指数、亲水性指数和蛋白质表面可及性指数筛选出的氨基酸区段中(抗原性指数 >>0，亲水性指数 >>0，以及氨基酸的表面可及性指数 >>1)，如果其内部或附近具有柔性结构，则可能是 B 细胞表位。综合以上分析，FSHR 胞外区蛋白第 17~34、42~67、113~122、142~147、179~193、225~241、266~270、279~310 和 329~336 可能是 B 细胞表位(图 2~4)。

2.3 FSHR B 细胞表位的在线预测

通过在线预测，可看到在 FSHR 胞外区：①亲水性较高的区域位于 16~22、174~180、182~191、288~308 和 328~334；②可及性区域散布于：16~35、40~46、56~63、76~90、95~106、123~129、141~147、161~167、174~180、183~196、209~215、220~243、261~271、276~308、312~319、328~338；③多个潜在的抗原表位主要分布在：1~20、32~44、63~70、102~112、115~136、147~162、202~210、213~221、239~245、252~259、269~280 和 318~333。由此推测前的 B 细胞表位可能位于 16~35、32~44、116~129、239~245、263~282、288~307 和 312~328。

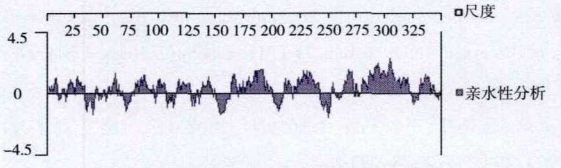


图 2 FSHR 胞外区蛋白的亲水性分析

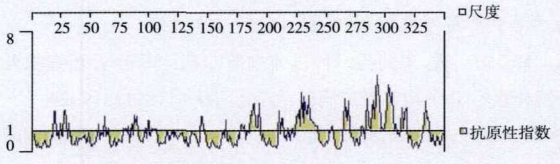


图 4 FSHR 胞外区蛋白的抗原性指数

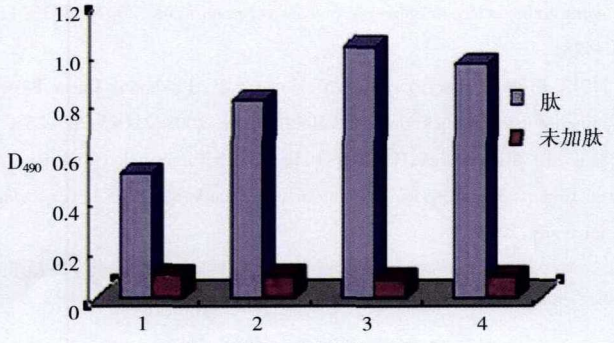


图 5 肽 ELISA 结合实验

2.4 FSHR 胞外区蛋白的 B 细胞表位抗原肽的合成

综合 2.2 和 2.3 的结果，分析 FSHR 胞外区可能的 B 细胞表位位于 17~34、42~44、116~122、142~147、179~193、239~241、266~270、279~282、288~307。我们选择了 4 个肽段(29~38、32~44、269~280、285~300，与泛 Dr 辅助 T 细胞表位联合以增强免疫原性。融合肽经高压液相层析纯化，获得的多肽纯度均达到 85%以上(表 1)。

2.5 体外结合实验结果

根据合成肽段与免疫血清 ELISA 结合实验分析，以候选肽的 D_{490} 值 3 倍于无关肽作为阳性，所合成的 4 条肽分子均能与免疫血清发生不同强弱的结合反应，其中，32~44、29~38、285~300 区域的抗原性相对较强反应(图 5)。证实所预测的抗原表位基本有效，并证明进行抗原蛋白分子的二级结构分析和在线 B 细胞表位预测是一种行之有效的方法。

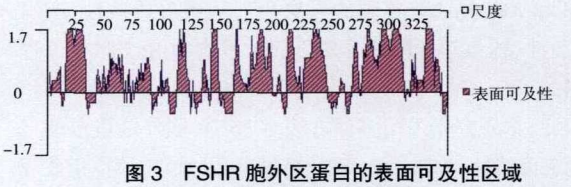


图 3 FSHR 胞外区蛋白的表面可及性区域

表 1 合成的 4 个 B 细胞表位肽序列

肽	Pan DR 表位	表位肽序列	在 hFSHR ECD 中的位置
1	aKXVAAWTLKAAaZ	SELHPICNKSIL	269~280
2	aKXVAAWTLKAAaZ	IELRFVLTKLRVI	32~44
3	aKXVAAWTLKAAaZ	RNAIELRFVL	29~38
4	aKXVAAWTLKAAaZ	DYMTQARGQRSSLAED	285~300

3 讨 论

用于制备避孕疫苗的靶抗原应满足两个条件：①只存在生殖系统的特异抗原，其他组织不出现；②抗原具有与生殖相关的功能，可被抗体阻断或位于表面能为抗体，从而阻断生殖过程。研究表明 FSHR 满足这种需要并且可能成为一个理想的靶标[7]。FSHR 存在于人和动物睾丸的支持细胞、卵巢颗粒细胞，通过介导 FSH 的信号影响雄性青春期生精的启动、成年期生精过程的维持及雌性卵细胞各阶段的发育。Rao 等[6]运用噬菌体表达手段重组 FSHR 胞外区抗原接种 4 只成年雄猴。结果发现，4 只成年雄猴血清中均出现了高滴度抗体，且都不能使雌猴受孕，并不影响雄激素的分泌和性功能，亦未见副作用。此结果表明 FSHR 胞外区可作为男性避孕疫苗的靶抗原之一。国内外采用天然抗原，无论是 DNA 疫苗还是重组蛋白疫苗均不理想。主要原因是容易产生免疫耐受。而多肽疫苗是抗原的一个或多个表位，具有相应的抗原特异

性。这种免疫抗原分子小、生产方法简单,周期短,成本低廉,特异性高,易于合成并形成较高的工作浓度,且可去除有害抗原表位,毒副作用小,可以代替全长的蛋白疫苗。就避孕疫苗而言,理想的疫苗应该选择具有中和效力的优势 B 细胞表位。Hopp-Woods 亲水性分析合并蛋白质二级结构预测,因其准确性较高,已被广泛应用于分子设计和蛋白质抗原表位分析的研究。随着对蛋白质二级结构和理化性质的研究,B 细胞表位预测得到了进一步的发展。吴玉章等[7]建立了蛋白抗原 B 细胞表位的抗原性指数,发现亲水性氨基酸残基和赖氨酸、精氨酸、谷氨酸等较容易出现在蛋白表面。李伍举等[8]应用计算机技术,对亲水性、可及性、柔韧性、抗原性参数等进行统计分析,开发了 BioSun B 细胞表位预测软件。且章辉等[9]利用 BioSun 软件对日本血吸虫抗原分子进行 B 细胞表位预测分析,发现准确率为 37.5%。

目前,许多蛋白质二级结构预测的算法都是基于序列比对的,但是不同方法预测的准确率随蛋白质的类型不同而变化。Internet 上对蛋白质 B 细胞表位预测提供了众多的基于不同算法的工具,为蛋白质 B 细胞表位的分析筛选提供了多种的选择。在线 B 细胞表位预测利用多种理化性质而不是通过单一特性对线性 B 细胞表位进行预测[10],常采用有 AAP、BCPred 和 ABCPred 等不同的方法[11~13],从蛋白质极性、亲水性、可及性、转角和抗原性等多方面对可能的 B 细胞表位进行预测。

因此,本研究先采用多种方法对 FSHR 胞外区蛋白的二级结构表面特性,如亲水性、理化特性、可及性、抗原性指数等方面进行了分析,在此基础上再联合 B 细胞表位,综合 2 种方法的结果,最终我们预测 FSHR 胞外区的优势 B 细胞表位可能位于 17~34、42~44、116~122、142~147、179~193、239~241、266~270、279~282、288~307。为了确认预测的 B 细胞表位是否具有免疫原性,我们人工合成 4 条多肽(29~38、32~44、269~280、285~300)。体外实验发现其中 32~44、29~38、285~300 区域的抗原性相对较强,为进一步制备 FSHR 的多肽男性避孕疫苗奠定了基础。

参 考 文 献

[1] Coss D, Jacobs S B, Bender C E, et al. A novel AP-1 site is critical for maximal induction of the FSHbeta gene by GnRH[J]. J Biol Chen, 2004, 279 (1): 152-162.

[2] Gromoll J, Pekel E, Nieschlag E. The structure and organization of the human follicle stimulating hormone receptor (FSHR) gene [J].Genomics, 1996, 35 (2): 308-311.

[3] Fan Q R, Hendrickson W A. Assembly and structural characterization of an authentic complex between human follicle stimulating hormone and a hormone-binding ectodomain of its receptor[J].Mol Cell Endocrinol, 2006, 260-262: 73-82.

[4] Kene P S, Nalavadi V C, Dighe R R, et al. Identification of the structural and functional determinants of the extracellular domain of the human follicle stimulating hormone receptor[J].J Endocrinol, 2004, 182(3): 501-508.

[5] Moudgal N R, Krishnamurthy H N, Sridhar S, et al. Immunization of male bonnet monkeys (M. radiata) with a recombinant FSH receptor preparation affects testicular function and fertility[J].Endocrinology, 1997, 1389 (7): 3065-3068.

[6] Rao A J, Ramachandra S G, Ramesh V, et al. Induction of infertility in adult male bonnet monkeys by immunization with phage-expressed peptides of the extracellular domain of FSH receptor[J].Reprod Biomed Online, 2004, 8(4): 385-391.

[7] 吴玉章, 朱锡华. 一种病毒 B 细胞表位预测方法的建立[J]. 科学通报, 1994, 39 (24): 2275-2279.

[8] 李伍举, 应晓敏. BioSun: 计算机辅助分子生物学实验设计的软件系[J]. 军事医学科学院院刊, 2004, 10(5): 401-404.

[9] 章 辉, 司 进, 朱荫昌, 等. EI 本血吸虫病诊断分子 B 细胞表位的预测和鉴定[J].中国血吸虫病防治杂志, 2006, 18(1): 19-24.

[10] Saha S, Raghava G P.Artificial immune systems, third international conference (ICARIS), LNCS[C], USA: Lowa state unversity, 2004.

[11] Chen J, Liu J, Zhang W, et al. Prediction of linear B-cell epitopes using amino acid pair antigenicity scale[J].Amino Acids, 2007, 33(3): 423-428.

[12] El-Manzalawy Y, Dobbs D, Honavar V. Predicting linear B-cell epitopes using string kernels[J]. J Mol Recognit, 2008, 21(4): 243-255.

[13] El-ManzalawyY, Dobbs D, Honavar V.7th International Conference on Computational Systems Bioinformatics, Stanford[C], USA: Lowa state unversity, 2008.

(责任编辑:关蕴良)