

· 实验研究 ·

细粒棘球绦虫磷酸丙糖异构酶抗原表位预测与分析*



彭文军¹, 李超群¹, 张耀刚², 姜博璠¹, 刘佳¹, 曹得萍^{1,2}

【摘要】目的 利用生物信息学的方法对细粒棘球绦虫 EgTPI B、T 细胞表位进行预测, 为细粒棘球绦虫诊断抗原的筛选提供分子生物学依据。**方法** 采用 ExPasy 中的 protparam 数据库推测 EgTPI 的理化性质; 利用 IEDB、ABCpred 软件分析 B 细胞抗原表位。AMPHI 法预测 Th 细胞的抗原表位; 使用 Jpred 4 软件和 SWISS-MODEL 构建 TPI 的二、三级结构; 应用 MEGA 4.0 软件比对细粒棘球绦虫 TPI 和人类 TPI、日本血吸虫 TPI、肝片吸虫 TPI 等 7 种生物的序列。**结果** 通过分析得出 EgTPI 二级结构中直链结构占 15.6%、 α 螺旋占 38.9%、转角结构占 12.0%、其他结构占 42.2%; 经多序列比对, 人类 TPI 与细粒棘球绦虫 TPI 一致度仅为 40.08%, 较大的差异更有利于形成抗原表位。预测可能的 T 细胞表位有 16-30、71-85、98-119、142-154、178-200; 可能的 B 细胞表位有 28-39、50-60、70-80、131-139、150-159、213-231。**结论** EgTPI 可能形成 T 细胞表位区域有 5 个, B 细胞表位的区域有 6 个, EgTPI 抗原表位预测分析为疾病诊断的候选分子筛选奠定分子生物学理论依据。

【关键词】 细粒棘球绦虫; 磷酸丙糖异构酶 (TPI); 抗原表位; 生物信息学

中图分类号: R 383.3.3 文献标志码: A 文章编号: 1001-0580(2019)02-0268-04 DOI: 10.11847/zgggws1120953

B- and T-cell epitope of triosephosphate isomerase of *Echinococcus granulosus*: bioinformatics prediction and analysis

PENG Wen-jun*, LI Chao-qun, ZHANG Yao-gang, et al (*Department of Clinical Medicine, Medical College, Qinghai University, Xining, Qinghai Province 810001, China)

【Abstract】 Objective To predict B- and T-cell epitopes and their structure of triosephosphate isomerase (TPI) of *Echinococcus granulosus* (Eg TPI) using bioinformatics method and to provide evidences for screening Eg antigens in diagnosis of cystic echinococcosis. **Methods** Physicochemical properties of Eg TPI were predicted using protparam database of ExPasy system. B-cell epitopes of Eg TPI were analyzed with the ABCpred and IEDB software and T-cell epitopes of Eg TPI were predicted with AMPHI method. The secondary structure and tertiary structure of EgTPI were constructed using Jpred 4 online software and SWISS-MODEL website. Sequence comparison among 7 TPI of Eg, human, *Schistosoma japonicum*, and *Fasciola hepatica* were performed using MEGA 4 software. **Results** The proportion of Eg TPI secondary structure were 15.6% for strand, 38.9% for alpha helix, 12.00% for turn, and 42.2% for other structures, respectively. The consistency between human TPI and Eg TPI was only 40.08% and the disparity is in favour of epitope formation. The predicted T-cell epitopes are 16 – 30, 71 – 85, 98 – 119, 142 – 154, and 178 – 200 and the predicted B-cell epitopes are 28 – 39, 50 – 60, 70 – 80, 131 – 139, 150 – 159, and 213 – 231. **Conclusion** Six regions in EgTPI may be considered as B-cell epitopes and 5 regions as dominant T-cell epitopes. These epitopes could be used as the targets for immunological diagnosis and drug therapy.

【Key words】 *Echinococcus granulosus*; triosephosphate isomerase; epitope; bioinformatics

囊型包虫病是由细粒棘球绦虫 (*Echinococcus granulosus*, Eg) 的幼虫引起的一种慢性的、世界性和危害严重的人畜共患寄生虫病。棘球蚴病的治疗目前仍然面临很多困难, 因为手术不能满足所有患者的需要, 而药物治疗可能导致严重的不良事件和耐药^[1]。为了应对当前的挑战, 迫切需要筛选与新的抗包虫病药物相互作用的靶蛋白质。包虫病的快速诊断和高效低毒抗包虫病药物的筛选防治包虫病的 2 个研究方向。目前包虫病免疫学诊断所用的抗原是通过粗提原头节、囊液蛋白而获得, 虽具有较高的敏感性和特异性^[2-3], 但抗原成分复杂, 不适用于大规模生产, 限制了其在临床上的运

用。目前, 利用生物信息学技术对筛选抗原进行生物学性质, 抗原表位等进行预测, 可提高特异性抗原筛选的效率^[4]。本研究正是在这样的基础上借助生物信息学方法对磷酸丙糖异构酶 (triosephosphate isomerase, TPI) 进行抗原表位的分析预测, 以期对此酶后续的研究起到指导作用。

1 材料与方法

1.1 EgTPI 序列 查询 GenBank 并经 blast 比对得到 EgTPI 氨基酸序列 (No.: EUB56511.1)。

1.2 预测理化性质 利用 ExPasy 系统的 protparam 数据库 (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) 推

* 基金项目: 国家自然科学基金 (81360255); 青海省科技厅重大专项 (2016-SF-A5)

作者单位: 1. 青海大学医学院临床医学系, 青海 西宁 810001; 2. 青海大学附属医院青海省包虫病重点实验室

作者简介: 彭文军 (1970 -), 男, 湖南人, 讲师, 本科, 研究方向: 包虫病药物治疗。

通信作者: 曹得萍, E-mail: qhmccdp@163.com

数字出版日期: 2018 - 11 - 06 18:30

数字出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20181106.1829.006.html>

测 *Eg*TPI 理化性质。

1.3 预测二、三级结构 使用 Jpred4 软件: (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred/>) 和 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 预测 *Eg*TPI 分子的二级和三级结构。

1.4 B/T 细胞表位预测 利用 ABCpred 在线软件 (<http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/>) 及 IEDB 软件 (http://tools.immuneepitope.org/main/html/tcell_tools.html) 预测细粒棘球绦虫 TPI 抗原 B 细胞表位, 选取 2 种方法预测中可能形成 B 细胞表位的相同部分。利用 AMPHI 法预测 T 细胞抗原表位、Rothbard-Taylor 法对含特定基序 T 淋巴细胞抗原表位进行预测, 结合 2 种推测方法结果分析优势性 T 细胞表位。

1.5 亚细胞定位预测 使用 PSORT II Prediction

(<https://psort.hgc.jp/cgi-bin/runpsort.pl>) 程序。

1.6 氨基酸序列保守性分析 通过 GeneBank 下载多房棘球绦虫 (*Echinococcus multilocularis*, CDS36-936.1)、小口膜壳绦虫 (*Hymenolepis microstoma*, CDS29962.1)、刺猬绦虫 (*Spirometra erinaceieuropaei*, AFX72997.1)、肝片吸虫 (*Fasciola hepatica*, AGJ837-62.1)、日本血吸虫 (*Schistosoma japonicum*, U57557.1)、人类 (*Homo sapiens*, AAB51316.1) TPI 序列, 使用 MEGA 4.0 软件进行多序列比对, 分析 TPI 的保守性。

2 结果

2.1 *Eg*TPI 基因与氨基酸序列 (图 1) 基因序列长 978 bp, 包括 5 个外显子和 4 个内含子, 共编码 250 个氨基酸。

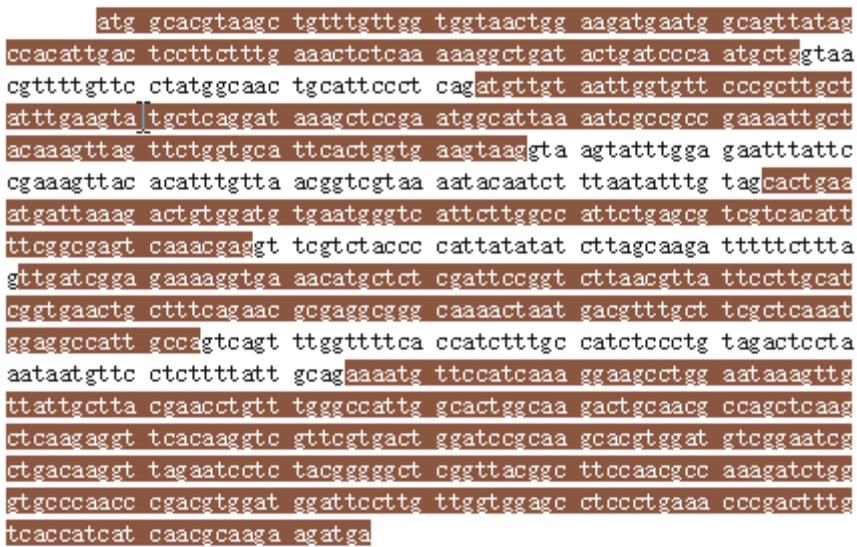


图 1 *Eg*TPI 基因序列

2.2 理化性质的预测结果 *Eg*TPI 相对分子质量为 27.12 kDa, 等电点 *pI* 为 6.60, 半衰期为 30 h, 不稳定指数为 22.14, *Eg*TPI 为稳定蛋白。

2.3 亚细胞定位预测 PSORT II 程序预测结果显示 *Eg*TPI 位于细胞质。

2.4 B 细胞表位预测 借助 ABCpred 和 IEDB 软件分别对 B 细胞表位进行预测, 然后分析 2 种方法

预测可能形成的共同 B 细胞线性表位共 6 个氨基酸序列, 分别是: 28-39、50-60、70-80、131-139、150-159、213-231。

2.5 T 细胞表位预测 (图 2) DNA star 软件 AMPHI 和 Rothbard-Taylor2 种算法得到可能的 T 细胞表位为: 16-30、71-85、98-119、142-154、178-205 个区域。

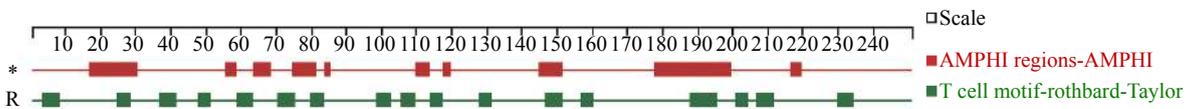


图 2 AMPHI 和 Rothbard-Taylor 预测 T 细胞表位

2.6 二、三级结构预测结果 (图 3、4) Jpred 4 在线软件预测的 *Eg*TPI 的二级结构中直链结构占 15.6%、 α 螺旋占 38.9%、转角结构占 12.0%、其他结构占 42.2%, 具体包括 1 个 β 折叠 (beta sheet)、7 个 β - α - β 基序 (beta-alpha-beta motifs)、8 个直链

(strand)、14 个螺旋 (helix)、19 个螺旋-螺旋交互结构 (helix-helix interaction)、13 个 β 转角 (beta turn)、3 个 γ 转角 (gamma turn) 结构, SWISS-MODEL 网站预测的 *Eg*TPI 的三级结构。

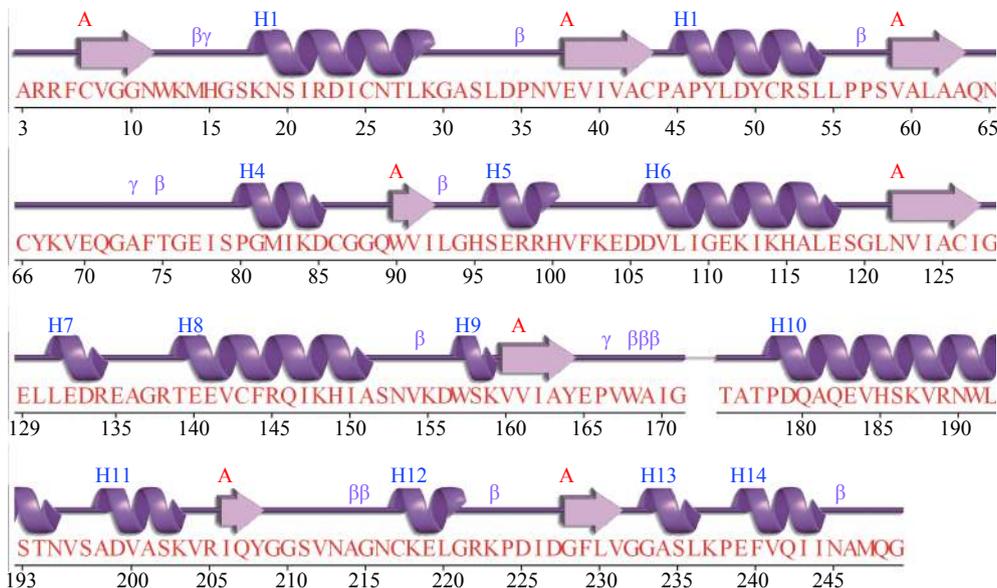


图3 Jpred 4软件预测的EgTPI二级结构

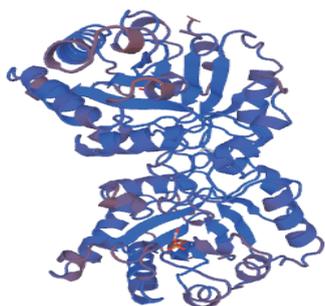


图4 SWISS-MODEL网站构建的EgTPI三级结构

2.7 多序列比对结果 (图5) 经MEGA 4.0软件比对结构显示,所有序列平均一致度为68.25%,经比对所有序列中共有234个变异位点(variable sites)、64简约性信息位点(parsimony-informative site)、168单态突变位点(singleton variable)。人类TPI与细粒棘球绦虫TPI一致度仅为40.08%,较大的差异更有利于形成抗原表位,同时也可设计药物靶点提供基础。

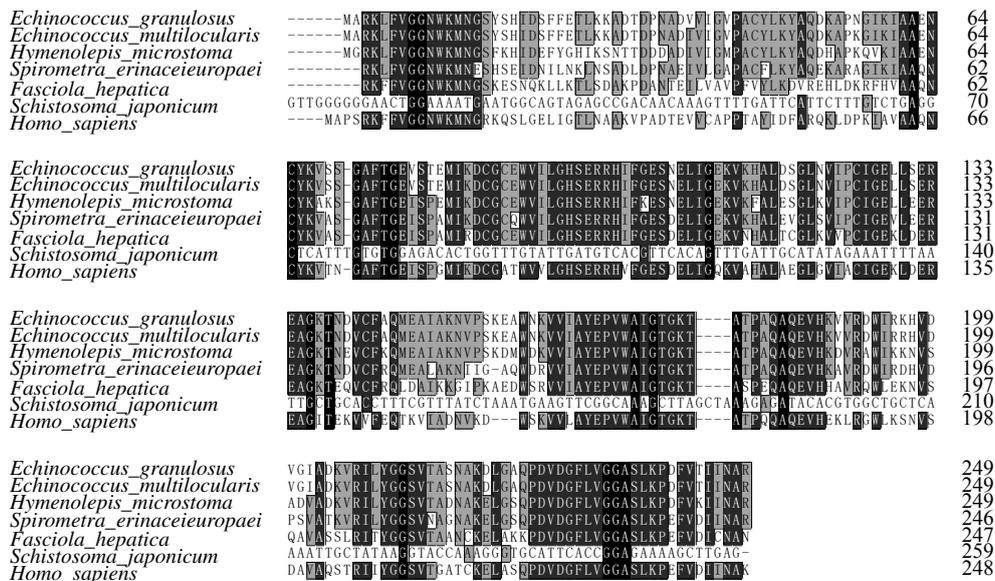


图5 TPI多序列比对结果

3 讨论

磷酸丙糖异构酶(TPI)在糖酵解中有重要作用,而血吸虫磷酸丙糖异构酶对于血吸虫感染具有显著的免疫保护作用,发现重组TPI蛋白具有较好

的抗损伤和感染能力[5]。研究者对猪带绦虫TPI[6]和弓形虫TPI[7]分别进行了克隆表达和免疫保护性研究,发现TPI可激活实验动物免疫反应具有一定的免疫保护作用。还有研究发现奥美拉唑能够通

过灭活贾第鞭毛虫的磷酸丙糖异构酶活性达到抑制贾第鞭毛虫滋养体生长的作用^[8]。TPI 在蠕虫和原虫中都有一定的保护作用,但是 TPI 在棘球绦虫中的研究还未见报道。

本研究通过理化特性预测发现 TPI 为一种稳定存在的蛋白质,半衰期较长,寄生虫疫苗研制的一个难点就是由于大多数寄生虫要经历数个生长阶段,各个阶段差异较大,很难找到在各个阶段都能稳定表达且能引起机体强烈免疫反应的分子,而由于需要从宿主摄取营养,与代谢有关的酶类分子通常需要各个生活史阶段都需要表达,因此稳定的分子更有可能成为疫苗设计的靶点。

通过 Jpred 4 在线软件预测 *EgTPI* 二级结构中直链结构占 15.6%、 α 螺旋占 38.9%、转角结构占 12.00%,认为 β 转角、无规则卷曲结构疏松有利于形成 B 细胞抗原表位,而 α 螺旋结构不易变形,通常不作为抗原表位^[9]。*EgTPI* 二级结构中转角结构包括 13 个 β 转角、3 个 γ 转角结构,这些区域有望形成抗原表位。从 *EgTPI* 的三级空间结构发现有较多的无规则卷曲,无规则卷曲结构疏松,利于与抗体分子结合,这也为形成 B 细胞线性表位提供了可能。

综上所述,通过各种在线软件预测 *EgTPI* 理化性质, T、B 细胞表位,得到 6 个可能形成 B 细胞表位的区域、5 个优势 T 细胞表位区域,提示 *EgTPI* 基因有可能成为免疫诊断和药物治疗的靶点,本研究

也将为后续 *EgTPI* 的研究提供实验基础。

参考文献

- [1] Wang F, Ye B. Bioinformatics analysis and construction of phylogenetic tree of aquaporins from *Echinococcus granulosus*[J]. *Parasitology Research*, 2016, 115(9): 3499 – 3511.
- [2] Zhang W, Wang S, McManus DP. *Echinococcus granulosus* genomics: a new dawn for improved diagnosis, treatment, and control of echinococcosis[J]. *Parasite*, 2014, 21: 66.
- [3] Ma X, Zhou X, Zhu Y, et al. The prediction of T- and B-combined epitope and tertiary structure of the Eg95 antigen of *Echinococcus granulosus*[J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2013, 6(3): 657 – 662.
- [4] Saha S, Raghava GPS. Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network[J]. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics*, 2006, 65(1): 40 – 48.
- [5] Alahuhta M, Wierenga RK. Atomic resolution crystallography of a complex of triosephosphate isomerase with a reaction-intermediate analog: new insight in the proton transfer reaction mechanism[J]. *Proteins*, 2010, 78(8): 1878 – 1888.
- [6] 汪世平, 陈秀春, 高冬梅. 我国血吸虫疫苗研究进展及应用前景[J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2009, 5: 402 – 410.
- [7] 司进, 朱荫昌, Harn DA, et al. 日本血吸虫(中国大陆株)磷酸丙糖异构酶 DNA 疫苗研制及其保护性免疫的研究[J]. *中国血吸虫病防治杂志*, 2000, 12(6): 324 – 329.
- [8] Jiménez L, Vibanco-Pérez N, Navarro L, et al. Cloning, expression and characterisation of a recombinant triosephosphate isomerase from *Taenia solium*[J]. *International Journal for Parasitology*, 2000, 30(9): 1007 – 1012.
- [9] Reyes-Vivas H, de la Mora-de la Mora I, Castillo-Villanueva A, et al. Giardial triosephosphate isomerase as possible target of the cytotoxic effect of omeprazole in *Giardia lamblia*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 58(12): 7072 – 7082.

收稿日期: 2018 - 08 - 20

(吴少慧编校)