

黄瓜绿斑驳花叶病毒抗原表位预测

杨洪¹, 孙立娜¹, 张 杰^{1,2*}, 任 静^{1,2}

(1. 东北农业大学, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 东北林业大学 生命学院, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要: 探索通过生物信息学方法预测黄瓜绿斑驳花叶病毒(cucumber green mottle mosaic virus, CGMMV)的抗原表位, 为基于抗原表位策略制备 CGMMV 抗血清打下基础。利用 MEGA 软件中的邻近算法对 CGMMV 进行系统进化分析, 结果显示, 不同 CGMMV 分离物可分为 2 个类群, 不同分离物间未见明显的寄主相关性和地理相关性。应用不同生物信息学软件对 CGMMV 外壳蛋白不同区域的抗原指数、蛋白二级结构进行分析, 结合外壳蛋白三级结构预测结果综合分析, CGMMV 外壳蛋白抗原表位区可能位于 N 端 3—15、80—90、90—100 位氨基酸残基附近。

关键词: 黄瓜绿斑驳花叶病毒; 抗原表位; 系统进化分析; 蛋白结构

中图分类号: S436.421.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2013)08-0067-04

Prediction of Epitopes in Coat Protein of Cucumber Green Mottle Mosaic Virus

YANG Hong-yi¹, SUN Li-na¹, ZHANG Jie^{1,2*}, REN Jing^{1,2}

(1. Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; 2. Life Science College,
Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

Abstract: In the study, the epitopes in coat protein of cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV) were predicted by several algorithms in some softwares. It was in favor of producing antiserum of CGMMV on the basis of the epitopes technique. Based on the nucleotide sequences of coat protein (CP) gene of different CGMMV isolates, phylogenetic analysis with the neighbor-joining algorithm of MEGA software showed that all isolates of CGMMV fell into 2 clades. The clades were not related with the geological origins and hosts of CGMMV. Some characteristics of CP, such as antigenic index and protein secondary structure, were analyzed with the algorithms in different softwares. Combined with predicted tertiary structure, the predicted epitopes were located in CP of amino acid position 3—15, 80—90, and 90—100, respectively.

Key words: cucumber green mottle mosaic virus; epitopes; phylogenetic analysis; protein structure

黄瓜绿斑驳花叶病毒(cucumber green mottle mosaic virus, CGMMV)是一种严重危害黄瓜生产的种传病毒^[1]。CGMMV 由 Ainsworth 于 1935 年首次报道, 目前在欧洲、日本及印度已有较多报道。在我国, CGMMV 最早(1987 年)发现于台湾, 2003 年在大陆首次报道。2006 年, 我国农业部将 CGM-

MV 确定为检疫性病害^[1]。CGMMV 是典型的种传病毒, 可通过种子和花粉传播, 汁液摩擦接种特别是嫁接也极易传播。种传是 CGMMV 主要的远距离传播方式, 种传寄主有黄瓜、西瓜、甜瓜和瓠瓜等, 黄瓜种传率为 8% 左右(野生黄瓜种传率近 50%)^[2]。尽管种传病毒的幼苗带毒率较低, 但即使

收稿日期: 2012-12-26

基金项目: 黑龙江省教育厅科研项目(11541033)

作者简介: 杨洪(1978-), 男, 吉林九台人, 副教授, 博士, 主要从事植物病理学研究。E-mail: yhyi1@sohu.com

* 通讯作者: 张 杰(1972-), 女, 黑龙江哈尔滨人, 博士, 主要从事微生物学研究。

少数植株在田间发病,经蚜虫传播、田间操作等可能使其迅速蔓延,从而造成巨大损失。

免疫学方法是检测病毒的主要方法,其中抗血清的质量是检测体系的关键。抗血清的制备一般通过提纯病毒粒子或在细菌中表达病毒外壳蛋白,然后以提纯病毒粒子或表达蛋白免疫动物,但对一些植物病毒来说,上述方法难以制备有效抗血清。免疫学最新研究显示,基于抗原表位策略可有效制备病毒抗血清^[3-5],由于其受其他与抗原表位无关的序列干扰较少,因而制备抗血清的效价较高,特异性较强。基于抗原表位策略制备病毒抗血清已在人免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)、猪戊型肝炎病毒(swine hepatitis E virus, SHEV)、丙型肝炎病毒(Hepatitis C virus, HCV)、苹果茎痘病毒(apple stem pitting virus, ASPV)等研究中有所应用^[5-7],关键在于确定病毒的抗原表位区。本研究探索通过生物信息学方法预测 CGMMV 抗原表位,为基于抗原表位策略制备 CGMMV 抗血清打下基础。

1 材料和方法

1.1 病毒核苷酸序列信息

在 GenBank 中获取 CGMMV 不同分离物外壳蛋白基因序列信息,18 个分离物的地理起源、寄主等相关信息见表 1。

表 1 CGMMV 不同分离物的寄主、地理起源

GenBank 登录号	分离物	寄主	地理起源
J04322	MCG30KP	西瓜	日本
EU016086	NW-1	西瓜	韩国
EU016087	SJ01	西瓜	韩国
EU016088	NW-2	黄瓜	韩国
EU016089	KC1-2	黄瓜	韩国
JF432067	Wh1	—	中国
JF432068	Wh2	西瓜	中国
JF432069	Wh3	南瓜	中国
JF838188	Byungchun	黄瓜	韩国
JN605349	GD-LZ	西瓜	中国
JN605350	GD-GZ	黄瓜	中国
JN605351	GD-LF	黄瓜	中国
AF417243	KOM	甜瓜	韩国
DQ767631	Delhi	葫芦	印度
EF611826	Liaoning	西瓜	中国
GQ411361	Alm08	黄瓜	西班牙
HQ692886	CGMMV11	葫芦	中国
AF417242	KW	西瓜	韩国

1.2 分子变异分析

分别利用软件 CLUSTAL X 1.83、MEGA 进行多序列比对(multiple sequence alignment)和系统进化分析。利用软件 Recombination Detection Program (RDP) 3.4 进行序列重组分析。

1.3 抗原表位预测

利用软件 Epiplot 1.0、Goldkey 1.10 和 DNASTar 预测 CGMMV 抗原表位。分别利用不同算法进行亲水性分析、 α 螺旋和 β 转角预测、抗原指数分析、蛋白表面可及性(surface probability)和蛋白可塑性(flexible)分析、 β 片层和卷曲结构预测。

1.4 外壳蛋白三级结构预测

利用 Swiss-model 网络服务器(<http://swiss-model.expasy.org>),基于同源建模策略预测 CGMMV 外壳蛋白三级结构,结果利用 Chem3D Ultra 11.0 软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 多序列比对及同源性分析结果

CGMMV 外壳蛋白基因的核苷酸序列共 486 nt。利用软件 CLUSTAL X 对 18 个 CGMMV 分离物的外壳蛋白基因核苷酸、氨基酸序列分别进行多序列比对,结果显示,不同分离物外壳蛋白基因核苷酸序列同源性为 97.2%~100%,其中分离物 KC1-2 和 Wh1 的同源性最低,为 97.2%。不同 CGMMV 分离物外壳蛋白氨基酸序列同源性较高,多在 99% 以上。

2.2 系统进化及序列重组分析结果

利用 MEGA 软件中的邻近算法对 CGMMV 进行系统进化分析,结果显示,不同 CGMMV 分离物可分为 2 个大的类群(图 1)。其中一个类群由西班牙分离物与日本分离物组成,二者亲缘关系较近;其他分离物形成另外一个类群。不同 CGMMV 分离物间未见明显的寄主相关性和地理相关性,可能是 CGMMV 侵染寄主较多,促进了其复杂变异的发生。

利用 RDP 3.4 软件对 18 个 CGMMV 分离物的外壳蛋白基因序列进行了重组分析,未发现 CGMMV 的重组个体。

2.3 抗原表位预测结果

DNASTar 软件中的 Protean 程序可对病毒外壳蛋白抗原指数、无规则卷曲、蛋白疏水性、 α 螺旋、 β 片层、 β 转角结构和蛋白表面可及性进行有效分析,再综合分析各项参数的特点,如抗原表位区亲水性和表面可及性参数较高,抗原表位一般不分布在 α 螺旋区,多分布在 β 转角结构和无规则卷曲区域,即

可对病毒外壳蛋白抗原表位进行预测。图 2 为利用 Protean 程序对 CGMMV 外壳蛋白抗原表位预测的结果,综合分析显示,CGMMV 外壳蛋白抗原表位区可能位于 N 端 3—15、38—48、55—65、80—90、90—100 位氨基酸残基附近。根据 CGMMV 氨基酸多序列比对结果,CGMMV 上述区域的氨基酸序列较保守。

采用软件 Epiplot、Goldkey 的分析结果与上述结果类似。综合 3 种软件的分析结果,预测 CGMMV 外壳蛋白抗原表位区可能位于 N 端 3—15、38—48、55—65、80—90、90—100 位氨基酸残基附近。

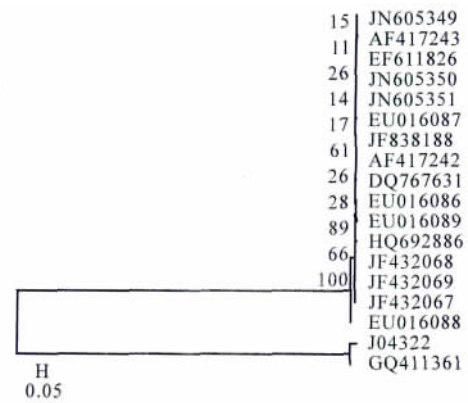
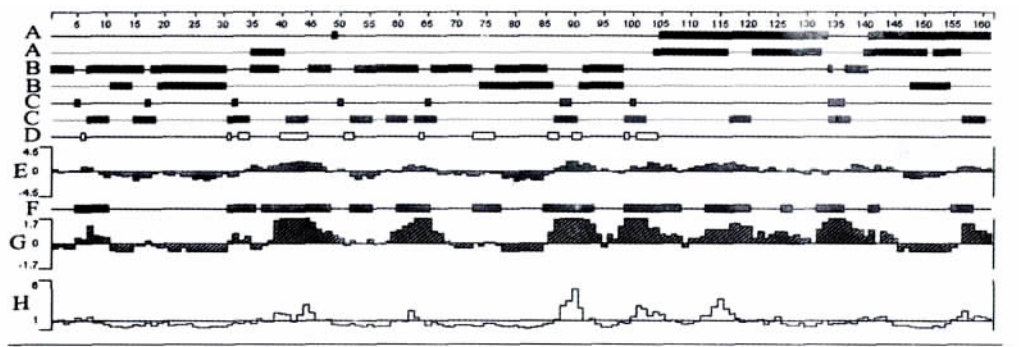


图 1 基于 CGMMV 外壳蛋白基因核苷酸序列的系统进化树



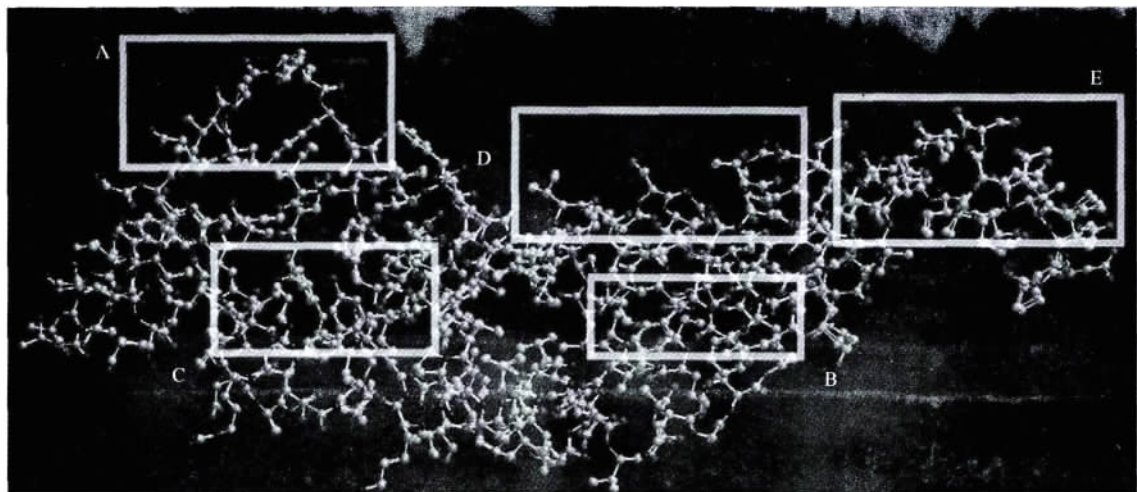
A. α 螺旋; B. β 片层; C. β 转角; D. 卷曲结构; E. 亲水性; F. 可塑性; G. 抗原指数; H. 表面可及性

图 2 利用 DNASTar 软件中的 Protean 程序预测 CGMMV 外壳蛋白抗原表位结果

2.4 外壳蛋白三级结构预测结果

利用 Swiss-model 网络服务器 (<http://swiss-model.expasy.org>), 基于同源建模策略预测 CGMMV 外壳蛋白三级结构, 结果见图 3。在此结构中, N 端、C 端倾向于突出在蛋白表面。预测的 5 个抗原表位区中, A、D、E 3 个区域 (N 端 3—15、

80—90、90—100 位氨基酸残基) 倾向于突出在蛋白表面, 总体上倾向于形成一个突出结构, 从三级结构上看, 此区域可能包含蛋白的抗原表位区; 而 B、C 抗原表位区 (N 端 38—48、55—65 位氨基酸残基) 倾向于包埋在蛋白内部, 可能为蛋白的非抗原表位区。



A—E 分别为 5 个预测的抗原表位区, 对应外壳蛋白 N 端 3—15、38—48、55—65、80—90、90—100 位氨基酸残基

图 3 CGMMV 外壳蛋白氨基酸三级结构预测结果

3 结论与讨论

世界范围内黄瓜种质资源的交流极为广泛,利于不同 CGGMV 分离物的重组及传播。重组是病毒发生变异的一种主要方式^[8],但本研究中未发现典型的重组事件,可能由于研究中仅选择了外壳蛋白基因区域,该区域并非重组热点,也可能 CGGMV 重组发生率较低。

抗原表位定位主要通过肽探针扫描技术或噬菌体随机肽库技术分析进行,此外,一些基于 X 射线衍射、核磁共振分析等的生物物理方法应用也较多^[4-5]。近年来,随着鉴定的抗原表位陆续增多,通过分析已定位抗原表位与蛋白质氨基酸序列及蛋白质某些结构特征的关系,一些生物信息学算法被开发应用于抗原表位预测,其准确率在 40% 以上^[9]。随着蛋白三级结构预测的发展,一些研究也开始探索结合蛋白三级结构来预测抗原表位,尽管预测时可参照的模板较少,同时预测的软件、算法尚不成熟,但在一些抗原表位预测研究中已发挥了巨大作用^[7]。在本研究中,蛋白三级结构的预测结果显示,CGMMV 外壳蛋白 N 端 3—15、80—90、90—100 位氨基酸残基倾向于突出在蛋白表面,可能包含蛋白的抗原表位区,而 38—48、55—65 位氨基酸残基倾向于包埋在蛋白内部,可能为非蛋白抗原表位区,显示蛋白三级结构对预测抗原表位具有一定的辅助作用。

参考文献:

- [1] 陈京,李明福. 新入侵的有害生物——黄瓜绿斑驳花叶病毒[J]. 植物检疫,2007(21):294-296.

- [2] Kim S M, Nam S H, Lee J M. Destruction of cucumber green mottle mosaic virus by heat treatment and rapid detection of virus inactivation by RT-PCR [J]. Mol Cell, 2003, 16: 338-342.
- [3] Keller H, Pomp R, Bakker J, *et al.* Epitope identification and in silico prediction of the specificity of antibodies binding to the coat proteins of potato virus Y strains[J]. European Journal of Plant Pathology, 2005, 111: 391-397.
- [4] Denisova G F, Denisov D A, Yeung J, *et al.* A novel computer algorithm improves antibody epitope prediction using affinity-selected mimotopes; A case study using monoclonal antibodies against the West Nile virus E protein[J]. Molecular Immunology, 2008, 46: 125-134.
- [5] Tian H J, Xia Y, Zhu M, *et al.* HIV epitope-peptides in aluminum adjuvant induced high levels of epitope-specific antibodies[J]. International Immunopharmacology, 2001, 4: 763-768.
- [6] 张中旺, 张永光, 王永录, 等. FMDV Asia1/HeB 病毒株结构蛋白基因的克隆测序及 B 细胞抗原表位预测[J]. 华北农学报, 2009, 24(4): 57-63.
- [7] 李丽丽, 杨洪一, 董雅凤, 等. 基于抗原表位策略的苹果茎痘病毒抗血清的制备[J]. 植物病理学报, 2010, 40: 357-363.
- [8] 刘金亮. 四种马铃薯 Y 病毒属病毒的分子变异及 HC-Pro 结构对抑制 RNA 沉默的影响[D]. 泰安: 山东农业大学, 2007.
- [9] Denisova G F, Denisov D A, Bramson J L. Applying bioinformatics for antibody epitope prediction using affinity-selected mimotopes-relevance for vaccine design [J]. Immunome Research, 2010, 6(Suppl 2): S6.