

## 梅毒螺旋体 Tp92 蛋白 B 细胞表位的预测与鉴定

曹龙古<sup>1,2</sup> 蔡恒玲<sup>1</sup> 欧阳丹明<sup>2</sup> 陈苏芳<sup>2</sup> 吴移谋<sup>1</sup> 曾铁兵<sup>1\*</sup>

(1. 南华大学医学院病原生物学研究所 湖南 衡阳 421001)

(2. 湘南学院预防医学与医学检验系 湖南 郴州 423000)

**摘要:**【目的】预测和鉴定梅毒螺旋体(Tp) Tp92 蛋白的 B 细胞表位, 为深入探讨这些表位在梅毒表位疫苗中的作用奠定基础。【方法】采用 Mobylye、ABCpred 和 IEDB 在线软件综合分析预测 Tp92 蛋白的 B 细胞表位, 人工合成 6 条表位多肽, 以梅毒患者/感染兔血清(同时设健康人/兔血清对照)为标本, 用间接 ELISA 法鉴定预测 Tp92 蛋白 B 细胞表位的免疫反应性。【结果】软件预测显示, Tp92 蛋白的 P1 (24-39AA)、P2 (332-347AA)、P3 (520-536AA)、P4 (575-588AA)、P5 (103-118AA)、P6 (694-712AA)氨基酸序列可能为其 B 细胞表位。间接 ELISA 分析表明, 预测的 P1、P3、P5 和 P6 均与梅毒患者/感染兔血清呈阳性反应, 而与健康人/兔血清不反应。【结论】本研究初步得出以下结论: P1、P3、P5 和 P6 均为 Tp92 蛋白潜在的特异性 B 细胞表位, 尤其是 P3 和 P6 免疫反应性最强。

**关键词:** 梅毒螺旋体, Tp92, B 细胞表位

## Prediction and identification of B-cell epitopes of outer membrane protein Tp92 on *Treponema pallidum*

CAO Long-Gu<sup>1,2</sup> CAI Heng-Ling<sup>1</sup> OUYANG Dan-Ming<sup>2</sup> CHEN Su-Fang<sup>2</sup>  
WU Yi-Mou<sup>1</sup> ZENG Tie-Bing<sup>1\*</sup>

(1. Institution of Pathogenic Biology, Medical College, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)  
(2. Department of Preventive Medicine and Medical Examination, Xiangnan University, Chenzhou, Hunan 423000, China)

**Abstract:** [Objective] To predict and identify the B-cell epitopes of outer membrane protein Tp92 on *Treponema pallidum* and provide the basis for further discussion on effects of these epitopes for the epitope-based syphilis vaccine. [Methods] The B-cell epitopes of the protein Tp92 was analyzed with comprehensive meta-analysis Mobylye, ABCpred and IEDB online softwares, and the six peptides containing predicted epitopes were artificially synthesized. The sera from syphilis patients and Tp92-immunized rabbits (normal human and normal rabbits as negative control) were used to

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (No. 81273322); Scientific Research Fund of Hunan Provincial Education Department (No. 13C876); Chenzhou Municipal Science and Technology Bureau (No.2012CJ126)

\*Corresponding author: Tel: 86-734-8282907; E-mail: nhdxtb@126.com

Received: August 18, 2015; Accepted: November 20, 2015

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 81273322); 湖南省教育厅资助科研项目(No. 13C876); 郴州市科技局资助科研项目(No. 2012CJ126)

\*通讯作者: Tel: 86-734-8282907; E-mail: nhdxtb@126.com

收稿日期: 2015-08-18; 接受日期: 2015-11-20

determine the immunoreactivity and specificity of six predicted peptides of Tp92 by indirect ELISA. **[Results]** Comprehensive meta-analysis of online softwares showed that P1 (24-39AA), P2 (332-347AA), P3 (520-536AA), P4 (575-588AA), P5 (103-118AA), and P6 (694-712AA) might be the B-cell epitopes. The result of indirect ELISA indicated that P1、P3、P5 and P6 were active with syphilis patient sera and Tp92-immunized rabbit sera but not with negative control sera. **[Conclusion]** These results indicate that P1、P3、P5 and P6 are the potential specific B-cell epitopes, and immunoreactivities of P3 and P6 are the strongest especially.

**Keywords:** *Treponema pallidum*, Tp92, B-cell epitope

梅毒是由梅毒螺旋体(*Treponema pallidum*, Tp)引起的一种严重危害成人和新生儿健康的性传播疾病(STD),并可明显促进艾滋病传播<sup>[1]</sup>。近年来我国梅毒发病呈迅速上升趋势<sup>[2]</sup>。应用疫苗是梅毒防控的根本措施<sup>[3-4]</sup>,但至今未获成功。

目前认为,梅毒疫苗分子主要存在于Tp的外膜蛋白(OMPs)中<sup>[3-4]</sup>。迄今为止最有可能位于Tp表面的外膜蛋白是Tp92<sup>[5]</sup>。Tp自然感染和以重组的Tp92部分片段均能诱导新西兰兔高水平的抗Tp92的调理性抗体,促进巨噬细胞吞噬Tp<sup>[6]</sup>,动物实验表明明显抗Tp攻击感染<sup>[6]</sup>。最新的研究表明,Tp92核酸疫苗能诱导兔强烈的体液和细胞免疫应答水平,获得较高的免疫保护性<sup>[7]</sup>,进一步证实该蛋白是潜在的候选疫苗分子,而且Tp92在不同的临床株间高度保守,成为最具希望的候选疫苗分子之一<sup>[4]</sup>。

联合多个具有保护作用的抗原分子是研发梅毒高效疫苗的趋势<sup>[3-4]</sup>,但在同一载体上串联多个抗原编码基因技术上存在困难,并可能引起转录干扰<sup>[8]</sup>。多价表位疫苗能克服该困扰,同时去除了蛋白分子中可能的无干扰甚至抑制表位,且可避免免疫耐受,此外还具有保护范围广、针对性强、稳定、高效、制备简单、经济安全等优点,具有广阔的应用前景<sup>[9]</sup>。本研究对Tp92蛋白保守区的B细胞表位进行筛选和鉴定,为发展梅毒多价表位疫苗奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

Tp (Nichols 株)为上海皮肤性病医院检验科顾

伟鸣馈赠,本研究所传代保存;羊抗兔HRP-IgG、羊抗人HRP-IgG购自北京康为世纪有限公司;梅毒螺旋体抗体明胶颗粒凝集试验(TPPA)试剂盒购自日本富士瑞必欧株式会社;96孔高结合力酶标板为美国Corning公司产品;确诊梅毒患者阳性血清、健康人血清标本分别来自南华大学附属第一医院检验科和健康体检中心;梅毒感染兔阳性血清、健康兔血清标本均来自南华大学实验动物中心并经TPPA确诊。

### 1.2 Tp92蛋白B细胞表位的在线软件预测、合成与纯化

获取TP92氨基酸序列(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAF61467.1>),将去除信号肽后的保守区氨基酸序列(Tp92全长第22-837位)输入在线Mobylye软件(<http://mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?#forms::antigenic>)和ABCpred软件([http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/ABC\\_submission.html](http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/ABC_submission.html)),结果按分值高低大小依次显示;应用在线预测软件IEDB([http://www.immuneepitope.org/tools/bcell/iedb\\_input](http://www.immuneepitope.org/tools/bcell/iedb_input))综合分析Tp92氨基酸序列表面可及性、亲水性、抗原性、 $\beta$ 拐角区域以及易屈性等理化因素;综合以上3种软件预测结果预测Tp92蛋白的B细胞表位。表位多肽的合成和纯化委托北京泽溪源生物科技有限公司进行;Delta 600型HPLC进行纯化和纯度分析;质谱仪测定纯化多肽的分子量;多肽纯品分装于-20℃储存备用。

### 1.3 Tp92蛋白预测B细胞表位的鉴定

分别将10 mg/L合成的B表位多肽作为抗原包被在酶标板上(100  $\mu$ L/孔),以1:100稀释血清(梅毒

病人/感染兔血清各 10 份、健康人/兔血清各 10 份)为一抗,同时设空白对照孔,每个样品做 3 个平行孔,1:10 000 稀释的羊抗兔或羊抗人 IgG-HRP 进行间接 ELISA,酶标仪测定各孔 OD 值(双波长 450 nm/630 nm),样品结果以 3 个平行孔 OD 值均值表示。实验重复 3 次。

#### 1.4 SPSS 软件统计分析

每组标本取均值,各组间进行 *t* 检验。 $P < 0.05$  代表有统计学意义。待测标本 OD 值/阴性对照 OD 值  $> 2.1$  为阳性。

## 2 结果与分析

### 2.1 Tp92 蛋白 B 细胞表位在线软件预测与合成

综合 IEDB、ABCpred 和 Mobylye 在线软件,预测出如下 6 段氨基酸序列有可能为 Tp92 蛋白的 B 细胞表位: P1 (24–39 aa)、P2 (332–347 aa)、P3 (520–536 aa)、P4 (575–588 aa)、P5 (103–118 aa)、P6 (694–712 aa) (表 1)。合成多肽纯度均大于 90%,质谱分析合成多肽分子量测定值与理论值一致,表明所合成的多肽符合要求。

### 2.2 Tp92 蛋白预测 B 细胞表位对人的免疫反应性

间接 ELISA 结果显示, P1、P3、P5 和 P6 表位多肽与梅毒患者阳性血清反应的 OD 值与健康人对对照组之比均大于 2.1,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ ) (表 2),表明预测的 P1、P3、P5 和 P6 表位多肽为 Tp92 蛋白的优势 B 细胞表位。

表 1 预测的 Tp92 蛋白的 B 细胞表位  
Table 1 The predicted B-cell epitopes of Tp92

| No. | Amino acid sequence of peptide | Amino acid location |
|-----|--------------------------------|---------------------|
| P1  | NDNWYEGKPISAI SFE              | 24–39               |
| P2  | LNKEEHRDTAEKTL SF              | 332–347             |
| P3  | NGLPHPYTSREQWASS P             | 520–536             |
| P4  | DFRVVKNFYDKDNN                 | 575–588             |
| P5  | KERPSVKGIKMGVNSQ               | 103–118             |
| P6  | GKGNGVRS GALVIDGVLVG           | 694–712             |

### 2.3 Tp92 蛋白预测 B 细胞表位对兔的免疫反应性

间接 ELISA 结果(表 3)显示, P1、P3、P5 和 P6 表位多肽与梅毒感染兔阳性血清反应的 OD 值与健康兔对照组之比均大于 2.1,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ ),进一步表明预测的 P1、P3、P5 和 P6 表位多肽为 Tp92 蛋白的优势 B 细胞表位。

## 3 讨论

疫苗的使用是预防和控制传染病发生的主要措施。各种类型疫苗均基于表位(抗原决定簇)发挥作用。B 细胞表位是抗原分子中能被 BCR/抗体特异性识别的基本单位。在抗 Tp 感染中, B 细胞分泌特异性抗体介导的体液免疫应答发挥着重要作用,主要方式包括阻断 Tp 粘附、促进巨噬细胞的吞噬(调理作用)、激活补体溶菌作用等<sup>[3-4]</sup>。表位疫

表 2 ELISA 检测 TP92 预测表位多肽与人血清免疫反应性  
Table 2 Immunoreactivity of predicted Tp92 epitopes with human sera by ELISA ( $OD_{450}/OD_{630}$ )

| 组别 Group              | <i>n</i> | P1          | P2          | P3          | P4          | P5          | P6          |
|-----------------------|----------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 梅毒患者<br>Syphilitic    | 10       | 0.622±0.067 | 0.699±0.099 | 1.407±0.235 | 0.891±0.104 | 0.539±0.126 | 1.549±0.185 |
| 健康人<br>Healthy people | 10       | 0.045±0.012 | 0.646±0.084 | 0.039±0.011 | 0.912±0.098 | 0.033±0.007 | 0.039±0.009 |
| <i>t</i>              |          | 26.578      | 1.292       | 18.339      | -0.465      | 12.648      | 25.693      |
| <i>P</i>              |          | <0.01       | >0.05       | <0.01       | >0.05       | <0.01       | <0.01       |

表3 ELISA 检测 TP92 预测表位多肽与兔血清免疫反应性  
Table 3 Immunoreactivity of predicted Tp92 epitopes with rabbit sera by ELISA ( $OD_{450}/OD_{630}$ )

| 组别Group                 | n  | P1          | P2          | P3          | P4          | P5          | P6          |
|-------------------------|----|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 感染兔<br>Infected rabbits | 10 | 0.716±0.145 | 0.745±0.114 | 1.151±0.200 | 0.644±0.072 | 0.525±0.100 | 1.385±0.210 |
| 健康兔<br>Healthy rabbit   | 10 | 0.057±0.015 | 0.694±0.093 | 0.043±0.012 | 0.676±0.061 | 0.023±0.005 | 0.035±0.005 |
| t                       |    | 14.318      | 1.109       | 17.416      | -0.034      | 15.727      | 20.316      |
| P                       |    | <0.01       | >0.05       | <0.01       | >0.05       | <0.01       | <0.01       |

苗具有高效、安全、无毒、稳定、低成本的特点，符合未来疫苗的发展方向，尤其符合 Tp 这样容易通过抗原变异而免疫逃避形成慢性感染<sup>[8]</sup>的病原体。本研究预测鉴定 Tp92 蛋白的 B 细胞表位，为构建多价表位疫苗奠定基础。

传统筛选鉴定表位的方法主要有合成重叠肽法<sup>[10]</sup>、噬菌体肽库展示法<sup>[11]</sup>、水解法<sup>[12]</sup>、生物学或化学方法<sup>[13]</sup>等，其优点是能较全面筛选抗原蛋白可能表位，但工作难度大，耗时长。应用计算机软件分析筛选抗原表位，可减少盲目筛选的庞大工作量，大大提高了发现新表位的效率<sup>[14]</sup>。目前几乎所有 B 细胞表位预测软件均以唯象理论为基础，即通过计算蛋白亚序列二级结构或者理化性质，再利用 B 细胞表位与其相关性来预测。为提高预测的准确性，通常需综合多种方案来分析<sup>[15]</sup>，本文运用 IEDB 在线软件中提供多种方案分析亲水性、抗原性、易屈性、表面可及性与  $\beta$ -转角，再结合 ABCpred 和 Mobyly 在线软件总结得出 6 条 Tp92 蛋白最有可能的 B 细胞表位多肽。由于在线软件均基于现有的表位数据模拟和推测待预测氨基酸序列，存在一定风险和偏差，需鉴定所预测的表位。

鉴定 B 细胞表位的常用方法为 ELISA 和免疫印迹法。由于人工合成的表位多肽较短，一般只有十几个氨基酸，无法采用免疫印迹法进行鉴定。人/兔感染 Tp 后，外膜蛋白 Tp92 会刺激机体产生针对该蛋白各种表位的抗体或致敏的 T 淋巴细胞，因免疫反应的特异性，产生的抗体应该能够与其所对应的 B 细胞表位特异结合。本研究中应用间接

ELISA 对软件预测的 B 细胞表位进行鉴定。结果显示，以梅毒患者阳性血清为已知抗体，可与 P1、P3、P5 和 P6 合成表位多肽发生阳性反应，而与健康人血清不反应；同时，进一步以梅毒感染兔阳性血清为已知抗体，同样可与 P1、P3、P5 和 P6 合成表位多肽发生阳性反应，而与健康兔血清不反应。结果表明，预测 P1、P3、P5 和 P6 合成表位多肽与人源及兔源性梅毒阳性血清均具有良好的免疫反应性，为 Tp92 蛋白潜在的 B 细胞表位，尤其是 P3 和 P6 免疫反应性极强，极可能是 Tp92 蛋白的优势 B 细胞表位，可作为梅毒多价表位疫苗优先考虑的疫苗分子。

本研究首次筛选出 Tp92 的优势 B 细胞表位，为进一步构建多表位梅毒疫苗奠定了基础，但其是否具有免疫保护性、通过何种方式发挥抗 Tp 感染作用以及表位多肽突变检验等方面有待深入研究。

## 参 考 文 献

- [1] Douglas JM. Penicillin treatment of syphilis: clearing away the shadow on the land[J]. The Journal of the American Medical Association, 2009, 301(7): 769-771
- [2] Tucker JD, Cohen MS. China's syphilis epidemic: epidemiology, proximate determinants of spread, and control responses[J]. Current Opinion Infectious Diseases, 2011, 24(1): 50-55
- [3] Cameron CE, Lukehart SA. Current status of syphilis vaccine development: need, challenges, prospects[J]. Vaccine, 2014, 32(14): 1602-1609
- [4] Cullen PA, Cameron CE. Progress towards an effective syphilis vaccine: the past, present and future[J]. Expert Review of Vaccines, 2006, 5(1): 67-80
- [5] Desrosiers DC, Anand A, Luthra A, et al. TP0326, a *Treponema pallidum*  $\beta$ -barrel assembly machinery A (BamA) orthologue and rare outer membrane protein[J]. Molecular Microbiology, 2011, 80(6): 1496-1515
- [6] Cameron CE, Lukehart SA, Castro C, et al. Opsonic potential, protective capacity, and sequence conservation of the *Treponema pallidum* subspecies *pallidum* Tp92[J]. The Journal of Infectious Diseases, 2000, 181(4): 1401-1413

- [7] Zhao FJ, Wu YM, Zhang XH, et al. Enhanced immune response and protective efficacy of a *Treponema pallidum* Tp92 DNA vaccine vectored by chitosan nanoparticles and adjuvanted with IL-2[J]. Human Vaccines, 2011, 7(10): 1083-1089
- [8] Sun ES, Molini BJ, Barrett LK, et al. Subfamily I *Treponema pallidum* repeat protein family: sequence variation and immunity[J]. Microbes and Infection, 2004, 6(8): 725-737
- [9] Pishraft Sabet L, Taheri T, Memarnejadian A, et al. Immunogenicity of multi-epitope DNA and peptide vaccine candidates based on core, E2, NS3 and NS5B HCV epitopes in BALB/c mice[J]. Hepatitis Monthly, 2014, 14(10): e22215
- [10] Williams KM, Bigley EC III, Raybourne RB. Identification of murine B-cell and T-cell epitopes of *Escherichia coli* outer membrane protein F with synthetic polypeptides[J]. Infection and Immunity, 2000, 68(5): 2535-2545
- [11] Freund NT, Enshell-Seijffers D, Gershoni JM. Phage display selection, analysis, and prediction of B cell epitopes[J]. Current Protocols in Immunology, 2009
- [12] Reynolds SR, Dahl CE, Ham DA. T and B epitope determination and analysis of multiple antigenic peptides for the *Schistosoma mansoni* experimental vaccine triose-phosphate isomerase[J]. The Journal of Immunology, 1994, 152(1): 193-200
- [13] Morris GE. Epitope Mapping by Chemical Fragmentation[M]/Morris GE. Epitope Mapping Protocols: Methods in Molecular Biology. Totowa, N. J.: Humana Press, 1996, 66: 121-127
- [14] Soria-Guerra RE, Nieto-Gomez R, Govea-Alonso DO, et al. An overview of bioinformatics tools for epitope prediction: implications on vaccine development[J]. Journal of Biomedical Informatics, 2015, 53: 405-414
- [15] Lian Y, Ge M, Pan XM. EPMLR: sequence-based linear B-cell epitope prediction method using multiple linear regression[J]. BMC Bioinformatics, 2014, 15(1): 414

## 2016 年中国微生物学会及各专业委员会学术活动计划表(2-2)

| 序号 | 会议名称                       | 主办/协办单位                | 时间              | 人数  | 地点   | 联系方式                 |
|----|----------------------------|------------------------|-----------------|-----|------|----------------------|
| 13 | 第七届中国微生物学大会暨生物化学与免疫学论坛     | 中国微生物学会临床微生物学专业委员会     | 9 月             | 400 | 待定   | 王苗苗<br>18758810661   |
| 14 | 2016 年全国青年病毒学者学术年会         | 中国微生物学会病毒学专业委员会        | 9 月             | 200 | 待定   | 吴莹<br>010-64807688   |
| 15 | 首届临床微生物学与医院感染论坛            | 中国微生物学会临床微生物学专业委员会     | 9 月             | 350 | 待定   | 王苗苗<br>18758810661   |
| 16 | 2016 年微生物与人类健康学术研讨会        | 中国微生物学会医学微生物学与免疫学专业委员会 | 9 月             | 200 | 上海   | 胡福泉<br>13594616136   |
| 17 | 第十一届中国微生物学会兽医微生物学专业委员会委员会议 | 中国微生物学会兽医微生物学专业委员会     | 10 月            | 400 | 待定   | 丁家波<br>13683505108   |
| 18 | 第十三届国际工业微生物遗传学大会           | 中国微生物学会                | 10 月<br>16-20 日 | 400 | 湖北武汉 | 孙雪<br>027-68756642   |
| 19 | 2016 年中国微生物学会学术年会          | 中国微生物学会                | 10 月            | 600 | 陕西西安 | 杨海花<br>010-64807200  |
| 20 | 食品酿造技术与产业发展学术报告会           | 中国微生物学会酿造分会            | 10 月            | 200 | 广东汕头 | 张秀梅<br>13503213265   |
| 21 | 第 14 届中日韩国际酶工程学术会议         | 中国微生物学会酶工程专业委员会        | 11 月            | 200 | 广西南宁 | 欧阳浩森<br>010-64807420 |
| 22 | 第十九次全国环境微生物学学术研讨会          | 中国微生物学会环境微生物学专业委员会     | 11 月            | 500 | 重庆   | 蒋建东<br>13915976780   |
| 23 | 中国微生物与白酒酿造技术研讨会            | 中国微生物学会工业微生物学专业委员会     | 12 月            | 200 | 待定   | 010-53218310         |
| 24 | 第六届全国微生物基因组学学术研讨会          | 中国微生物学会农业微生物学专业委员会     | 12 月            | 200 | 海南乐东 | 吴悦<br>027-87287254   |