

B 细胞表位作图研究进展

朱睿^{1,2} 李震^{2,3} 董世娟^{2,3} 于瑞嵩^{2,3*} 朱于敏^{2,3}

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

(2. 上海市农业科学院畜牧兽医研究所 上海 201106)

(3. 上海农业遗传育种重点实验室 上海 201106)

摘要: 抗原-抗体的特异性结合是由抗体表面的抗原决定簇与抗原表面的表位基序间的特异性互补识别决定的。B 细胞表位作图既包括 B 细胞抗原表位基序的鉴定(即确定抗原分子上被 B 细胞表面受体或抗体特异性识别并结合的氨基酸基序), 也包括绘制抗原蛋白的全部或接近全部的 B 细胞表位基序在其一级或高级结构上的分布图谱的过程。B 细胞表位作图是研发表位疫苗、治疗性表位抗体药物和建立疾病免疫诊断方法的重要前提。目前, 已经建立了多种 B 细胞表位鉴定或绘制抗原蛋白 B 细胞表位图谱的实验方法。基于抗原-单抗复合物晶体结构的 X-射线晶体学分析的 B 细胞表位作图和基于抗原蛋白或抗原片段的突变体库筛选技术的 B 细胞表位作图可以在氨基酸水平, 甚至原子水平上揭示抗原分子上与单抗特异性结合的关键基序; 其它 B 细胞表位作图方法(如基于 ELISA 的肽库筛选技术)常常只能获得包含 B 细胞表位的抗原性肽段, 因而, 很少用于最小表位基序的鉴定; 而改良的生物合成肽法多用于 B 细胞表位的最小基序鉴定和精细作图。鉴于每种 B 细胞作图方法都存在各自的优势与不足, B 细胞表位作图往往需要多种作图方法的有机结合。本文对目前常用的 B 细胞表位作图的实验方法及其在动物疫病防控中的应用进行综述, 以为研究者设计最佳的表位作图方案提供参考。

关键词: B 细胞表位, 表位作图, 表位鉴定

Foundation item: National Key Research and Development Program of China (No. 2016YFD0500101); National Natural Science Foundation of China (No. 31402219, 315725199); Shanghai Key Project on Agricultural Development (No. 2015-6-1-9)

***Corresponding author:** Tel: 86-21-62200389; E-mail: yursong@163.com

Received: March 22, 2017; **Accepted:** May 24, 2017; **Published online** (www.cnki.net): June 06, 2017

基金项目: 国家重点研发计划项目(No. 2016YFD0500101); 国家自然科学基金项目(No. 31402219, 315725199); 上海市科技兴农重点攻关项目(沪农科攻字(2015)第 6-1-9 号)

***通讯作者:** Tel: 86-21-62200389; E-mail: yursong@163.com

收稿日期: 2017-03-22; **接受日期:** 2017-05-24; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2017-06-06

Progresses on B cell epitope mapping

ZHU Rui^{1,2} LI Zhen^{2,3} DONG Shi-Juan^{2,3} YU Rui-Song^{2,3*} ZHU Yu-Min^{2,3}

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

(2. Institute of Animal Science and Veterinary Medicine, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China)

(3. Shanghai Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding, Shanghai 201106, China)

Abstract: The specific interaction between antigen and antibody is determined by the specific complementary recognition between antigenic determinant and epitope motif on the surfaces of antibody and antigen, respectively. B cell epitope mapping involves both the fine location of B cell epitopes (location of the specific motifs on an antigen recognized and bound by antibodies) and the depiction of the distribution of all or nearly all epitopes of an antigen on its primary or secondary structure. Mapping of B cell epitopes constitutes a primary basis for the development of epitope-based vaccines and therapeutic epitope specific antibodies and the establishment of immunological diagnostic methods. So far, a number of experimental methods have been developed to map the B cell epitopes recognized by antibodies or to depict the map of epitopes on an antigen. B cell epitope mapping methods based on X-ray crystallography of antigen-mAb (monoclonal antibody) complex and screening of the mutant libraries of an antigenic protein or its fragments can reveal the key residues of antigen specifically bound by mAb at amino acid or even atom level. Other epitope mapping methods, such as peptide library screening technology using ELISA, are seldom used to identify the minimum epitope motifs because only the antigenic fragments can be obtained by these methods. On the other hand, the improved biosynthetic peptide method is usually used for the minimal motif identification and fine mapping of B cell epitopes. It is quite common that more than one methods were employed to fine map B cell epitopes due to the respective limitations of each method. This review discusses and compares different experimental methods commonly used in B cell epitope mapping and aims to assist researchers to design the most suitable protocol to map their B cell epitopes. The applications of B cell epitope mapping in animal disease prevention and control are also reviewed.

Keywords: B cell epitope, Epitope mapping, Epitope identity

抗体,特别是中和性抗体,可以与靶抗原特异性结合并中和入侵病原,因此,抗原-抗体特异性相互作用在机体清除各种感染源的体液免疫反应中发挥关键作用。抗体特异性识别抗原分子上称为抗原性决定区或表位的特定区域^[1]。B 细胞表位就是抗原分子表面能够被抗体特异性识别结合的氨基酸簇;B 细胞表位可以被分泌的抗体或 B 细胞受体识别,诱导宿主产生细胞免疫反应和体液免疫反应^[2]。B 细胞表位鉴定具有许多重要的生物学意义,如可以深化对免疫反应和自身免疫疾病的认知,为表位疫苗的研发或疾病诊断方法的建立提供候选表位肽,有助于治疗性抗体的作用机制的揭示等^[3-4]。同时,单抗药物识别表位的鉴定也有助于自主知识产权的伸张和保护。

根据其空间结构的不同,B 细胞表位可分为线性(连续性或顺序性)B 细胞表位和构象性(非连续性或非线性)B 细胞表位。线性 B 细胞表位一般由 3-8 个抗原分子一级结构上连续的氨基酸残基构成。然而,我们在进行小反刍兽疫病毒(PPRV)核衣壳蛋白(N 蛋白)和血凝素蛋白(H 蛋白)的 B 细胞表位作图研究中也鉴定到由 9 个或 10 个氨基酸残基构成线性 B 细胞表位^[5](和作者未发表的数据)。构成构象性 B 细胞表位的氨基酸残基在抗原分子的一级结构中并不连续,它们在正确折叠的抗原蛋白的表面彼此靠近,形成能够被抗体特异性识别并结合的构象性 B 细胞表位^[6]。在天然蛋白中,构象性 B 细胞表位的正确折叠形成所需的氨基酸残基数从 20 个到 400 个不等。一般认为,大多数的 B 细胞表位并不是线性

表位, 而是具有特定空间构象的构象性表位。然而, 线性 B 细胞表位与构象性 B 细胞表位之间并不存在严格的界限^[7]。构象性 B 细胞表位常常由数量不等的、由几个连续的氨基酸残基组成的短肽构成, 而这些短肽中的有些短肽单独也可以被相应的抗体特异性识别结合(据此也可以被称为线性 B 细胞表位)。因此, 大多数目前鉴定到的线性 B 细胞表位可能只是构象性 B 细胞表位的一部分。甚至有研究者认为, 大于 70% 的构象性 B 细胞表位皆由 1-5 个包含 1-6 个氨基酸残基的线性 B 细胞表位组成^[8]。

广义的 B 细胞表位作图不仅包括抗体特异性识别并结合的 B 细胞抗原表位基序的准确定位(即确定抗原分子上被 B 细胞表面受体或抗体特异性识别并结合的氨基酸残基及其在抗原蛋白初级和高级结构上的定位), 还涉及绘制出抗原蛋白的全部或接近全部 B 细胞表位基序在其初级和高级结构上的分布图谱的过程。目前, 研究抗原与抗体特异性相互作用的实验方法已从利用 ELISA 筛选线性抗原性片段的方法发展到可以鉴定构象性 B 细胞表位的突变文库筛选技术; 质谱、核磁共振、X-射线晶体学分析和冷冻电镜等现代生物物理技术与方法也被用于抗原-抗体间直接相互作用的氨基酸残基或原子的精确定位研究。根据表位作图时所采用的抗体类型的不同, 可以将 B 细胞表位作图的实验方法分为两类: (1) 利用单克隆抗体的 B 细胞表位作图, 依据所采用的具体表位作图方法的不同, 得到的抗原表位可以是线性 B 细胞表位, 也可以是构象性 B 细胞表位。(2) 利用多克隆抗体的 B 细胞表位作图, 此方法往往只能得到线性 B 细胞表位。近年来, 组学(如基因组学、蛋白组学、转录组学)研究数据的积累和表位作图实验技术的发展为 B 细胞表位数据库的建立和 B 细胞表位计算机预测方法的开发提供大量的数据基础。目前, 已建立的 B 细胞表位数据库包括多功能数据库、单病原微生物数据库等; 基于计算机软件的 B 细胞表位预测方法也得到迅速发展^[2]。虽然 B 细胞表位的计算机预测可以大大减少后续 B 细胞表位鉴定研究的工作量,

从而节约表位作图的时间、降低作图的成本, 但是已有的 B 细胞表位的预测方法常常只能预测出抗原分子中的免疫原性或表位样区域。而且, 虽然可以通过采用多个 B 细胞表位预测方法提高表位预测的准确性, B 细胞表位的预测结果仍存在相当比例的假阳性和假阴性结果, 对于构象性 B 细胞表位的预测, 其准确性更低。鉴于最近国内外研究者对 B 细胞表位的计算机预测方法和 B 细胞表位数据库进行了详细的综述^[2,9], 本文仅对目前常用的 B 细胞表位作图实验方法进行综述, 以期为研究者的 B 细胞表位作图方案的设计提供参考。

1 利用单克隆抗体的 B 细胞表位作图

1.1 生物物理技术

X-射线衍射、冷冻电镜(cryo-EM)、核磁共振(NMR)、质谱(MS)和表面等离子体共振(SPR)等生物物理技术在利用单抗的 B 细胞表位作图研究中均发挥了重要作用。利用这些技术, 不仅可以鉴定到构象性 B 细胞表位, 也可以鉴定线性 B 细胞表位。

抗原-单抗复合物的 X-射线晶体学分析是目前最准确的 B 细胞表位鉴定方法。它可以精确地确定抗原分子中与单抗发生相互作用的氨基酸残基, 甚至可以定位抗原上被单抗识别并结合的氨基酸残基的主链或侧链原子^[3]。不论被单抗识别的是构象性 B 细胞表位, 还是线性 B 细胞表位, 都可以通过抗原-单抗复合物的 X-射线晶体学分析得到解析。由于抗原-单抗复合物的 X-射线晶体学分析涉及抗原和单抗的纯化、抗原-单抗复合物的形成与纯化以及复合物的晶体学解析等, 需要专业技术和大量资金支持; 这对于一些可溶性的简单抗原来说就常常是一项难以完成的任务, 而对于许多复杂抗原(如膜蛋白)而言则更加困难。因此, 虽然目前已经鉴定到成千上万的单克隆抗体, 但只有少数 B 细胞表位通过抗原-抗体复合物的 X-射线晶体学分析方法得到解析^[10-13]。

由于需要对样品进行衍生和干燥, 电子显微镜不适于研究抗原-单抗间的相互作用^[14]。但自

2013 年冷冻电镜技术的建立使电镜技术研究抗原-单抗复合物的结构成为可能^[15-16]。由于冷冻电镜技术仅需要少量抗原-单抗复合物,不需要高纯度蛋白,也不用对复合物进行结晶,可以用于分析其它方法(如 X-射线晶体学技术)无法解析的大分子复合物的结构,因此,冷冻电镜技术在表位作图方面比 X-射线晶体学技术更具优势。目前,冷冻电镜技术常与 X-射线晶体学技术相结合应用于 B 细胞表位作图研究。单独或与 X-射线晶体学技术相结合,冷冻电镜技术已经用于 HIV、HPV 等病毒结构蛋白的 B 细胞表位作图研究^[17]。

第三种应用于利用单抗的 B 细胞表位作图研究的生物物理技术是核磁共振技术。核磁共振技术的分辨率恰好适合在原子水平解析抗原-抗体复合物中相互作用界面的结构信息,即 B 细胞表位鉴定。该方法通过分析抗原本身与抗原-单抗复合物核磁共振信号的差异,可以快速、准确地确定抗原的 B 细胞表位氨基酸基序。基于核磁共振技术的 B 细胞表位作图可以提供比突变体肽库或肽库筛选技术更详细的表位信息,同时又比 X-射线晶体学技术更加快速。但是,利用核磁共振技术解析抗原的 B 细胞表位需要首先确定抗原中每个氨基酸残基的核磁共振信号,这对于大分子抗原来说是一个很大的挑战。核磁共振技术单独或者与其他方法相结合已成功用于多种病原微生物结构蛋白的 B 细胞表位作图研究^[3,17-19]。

质谱也以其快速的优点而广泛用于 B 细胞表位的鉴定。在该方法中,首先在抗体存在或不存在条件下,以蛋白酶酶解抗原蛋白,然后利用质谱分析经分离纯化的酶切产物,从而确定被抗体保护的抗原蛋白的边界(表位区域)^[20-21]。这种 B 细胞表位作图方法的不足之处在于其只能鉴定到 30-60 个氨基酸残基的表位片段,不能进行表位的精确定位。虽然气/液交换-质谱技术提高了其表位作图的精确度^[22-23],但仍低于基于 X-射线晶体学技术和冷冻电镜技术的表位作图方法的精确度。经过 25 年的发展,随着样品处理技术的提高和先进质

谱仪的问世,基于质谱技术的 B 细胞表位作图所需的样品量更低,可以在不降低准确性的前提下分析更加复杂的抗原样品。基于质谱技术的 B 细胞表位作图方法不再仅限于利用单克隆抗体的表位鉴定,已经扩展到利用多克隆抗体的 B 细胞表位作图^[24]。

表面等离子共振技术近年来迅速发展并应用到生物分子相互作用的研究领域。该技术不仅具有无需标记、特异性强、灵敏度高、样品用量小的优点,而且可实现在线连续实时检测^[25-26]。基于表面等离子共振技术的 B 细胞表位作图类似于 ELISA 技术,虽然其 B 细胞表位作图的分辨率低于基于 X-射线晶体学技术和冷冻电镜技术的表位作图方法的分辨率,但其可以快速、高通量地进行系列抗原突变体或片段与单抗的结合能力的分析。表面等离子共振技术单独或与噬菌体展示技术等其它 B 细胞表位作图技术结合已经用于多种抗原分子的 B 细胞表位作图研究^[27-29]。

综上所述,基于生物物理技术的利用单抗的 B 细胞表位作图虽然都可以进行 B 细胞表位鉴定,但 these 方法都需要昂贵的仪器,有的还需要抗原-抗体复合物的晶体结构信息或者需要专业技术人员的辅助才能完成。因此,X-射线晶体学技术、冷冻电镜技术和核磁共振技术更多地用于重要病原的中和性单抗识别的 B 细胞表位鉴定,它们都是 B 细胞表位作图方法的重要组成部分。

1.2 生物化学技术

与基于生物物理技术的利用单抗的 B 细胞作图需要昂贵的仪器不同,基于生物化学技术的利用单抗的 B 细胞表位作图几乎可以在所有从事生物学研究的实验室进行。利用生物化学技术的 B 细胞表位作图一般通过分析生物或化学合成的抗原片段、随机肽片段(包括与各种高通量抗原展示技术结合)与单抗的结合能力来确定 B 细胞表位。抗原肽通常被固定在固体支持物上,然后以斑点杂交、Western blot 或 ELISA 方法检测其与单抗的结合能力。B 细胞表位作图的生物化学技术大多可以定量分析抗原-单抗的结合能力,从而确定 B 细胞

表位中每个氨基酸残基对结合力的贡献^[1]。根据所采用的具体生物化学技术的不同,得到的B细胞表位可以是构象性B细胞表位,也可以是线性B细胞表位。大部分的生物化学技术可以同时鉴定到线性B细胞表位和构象性B细胞表位。

在利用单抗的B细胞表位作图的常规生物化学技术方法中,斑点杂交由于需要将纯化的抗原或多肽固定到杂交膜上,主要用于抗原-单抗结合能力的定性或半定量检测^[18]。Western blot (WB)具有方法简单、可靠、灵敏的优点,且不需要事先对抗原肽进行纯化;因此,非常适合分析各种重组表达系列截短抗原肽与单抗的结合能力,以确定相应的B细胞表位。WB可以用于包括病毒、细菌、真菌、寄生虫在内的各种病原微生物结构蛋白的B细胞表位作图。虽然WB主要用于线性B细胞表位的鉴定,但也可以用于部分空间表位的鉴定^[30-31]。WB在B细胞表位鉴定的独特作用还在于其能够经济有效地鉴定线性B细胞表位的最小基序。ELISA由于需要以纯化的抗原或多肽包被96孔ELISA板,通常用于利用化学合成多肽的B细胞表位作图,以发挥其高通量的优势。以纯化的重组表达的系列抗原截短肽包被ELISA板,也可以用于包含B细胞表位的抗原片段的初步鉴定。

现代生物技术,特别是新一代高密度蛋白芯片的出现大大提高了基于ELISA的B细胞表位作图的效率,也克服了合成肽法只能用于线性B细胞表位鉴定的缺点。目前,利用商业化的蛋白芯片可以迅速、准确地进行线性B细胞表位或构象性B细胞表位作图的研究(<https://www.pepscan.com/precision-epitope-mapping>)。利用高密度蛋白芯片的B细胞表位作图技术具有高通量和所需样品量小的优点。但是,该技术需要高纯度的多肽,特别是高纯度的具有天然空间构象的多肽;另外,多肽在固体介质上的定位有时会屏蔽单抗的结合部位,从而造成表位的遗漏。

提高利用单抗的B细胞表位作图的效率和通量

的另一项技术是抗原突变体库技术与抗原(肽)表面展示技术的有机结合。突变体库分析作为一种快速的B细胞表位作图方法,其原理是抗原分子中组成抗原表位的关键氨基酸残基(常为 Trp、Arg 或 Tyr)的替换会导致其抗体结合能力的减弱或丧失^[32]。蛋白突变库可以是随机突变体库或定点突变体库,而饱和突变技术将特定位置的氨基酸残基替换为20种天然氨基酸中的任意一种氨基酸残基,以确定该氨基酸残基对表位抗体结合能力的贡献^[18];在丙氨酸扫描突变法中每次将一个非丙氨酸残基替换为丙氨酸(导致其侧链截短为1个 β 碳,却不影响蛋白骨架的灵活性)以确定每一个残基的侧链对其与抗体结合能力的贡献^[33]。组合突变则通过对非连续抗原性区域进行随机组合并对突变残基分组(初级序列的连续性),最大可能地分析邻近氨基酸残基的组合效应^[34-35]。最近报道的鸟枪突变技术(Shotgun mutagenesis)中,每个细胞克隆表达一个正确折叠的、包含一个确定的氨基酸残基突变(如丙氨酸替换)的重组抗原;该技术能以每月20个表位的速度同时鉴定到单抗识别并结合的线性B细胞表位和构象性B细胞表位^[4]。

展示技术(如噬菌体展示和酵母展示)成功解决了化学合成肽法和生物芯片法B细胞表位作图成本高的难题,为利用单抗的B细胞表位作图提供一个有力的平台。展示技术B细胞表位作图的原理是以单克隆抗体筛选一系列展示在宿主细胞(噬菌体、细菌、哺乳动物、昆虫或酵母细胞)表面的多肽,然后通过测序确定具有目标单克隆抗体结合能力的B细胞表位基序。B细胞表位作图最常使用的展示技术是噬菌体展示技术。随机肽噬菌体展示库和基因片段或基因组片段噬菌体库常用于B细胞表位作图^[36]。展示技术与其他B细胞表位作图技术(如突变体库技术)的有机结合大大提高了单抗B细胞表位作图的效率^[3]。由于相对便宜且快速,展示技术在B细胞表位作图方面的应用日益广泛^[18]。

2 多克隆抗体的线性B细胞表位作图

B细胞抗原表位作图研究的另一个重要领域是

利用多克隆抗体(免疫或感染康复血清)的线性 B 细胞表位作图。与利用单克隆抗体的 B 细胞表位作图可以同时鉴定到构象性 B 细胞表位和线性 B 细胞表位不同,多克隆抗体更多地用于线性 B 细胞作图研究,特别是抗原蛋白的全部的线性 B 细胞表位(IgG 表位组)的鉴定。除了现在已几乎不用的化学切割法或部分酶解法之外,上述用于单抗 B 细胞表位作图的生物化学方法也可以用于利用多克隆抗体的线性 B 细胞表位作图研究,因此下文重点对化学合成肽法和最近建立的改良生物合成肽法进行介绍。

2.1 化学合成肽芯片扫描法

与利用单克隆抗体的 B 细胞表位作图方法相似,化学合成肽芯片扫描法线性 B 细胞表位作图的第一步是化学合成覆盖目标抗原序列全长的一系列彼此重叠一定长度的多肽片段,并将这些肽段固定到芯片上,或者直接在芯片上合成设计的多肽;然后以抗原免疫血清(或多抗)与芯片上的多肽进行反应;最后通过荧光、化学发光或 ELISA 法对反应结果进行检测,从而确定能够与多抗发生特异性结合的多肽,即线性 B 细胞表位^[3,17]。化学合成肽芯片扫描法 B 细胞表位作图具有灵敏度高、通量高的优势,可以快速鉴定到多个抗原表位^[37]。但该方法需要合成大量的多肽片段或购买多肽芯片,其昂贵的费用限制了它在线性 B 细胞表位作图中的广泛应用。

2.2 改良的生物合成肽法

徐万祥课题组首先建立了线性 B 细胞表位作图和最小表位基序鉴定的“改良生物合成肽法”^[38],并用此方法和抗重组蛋白多抗绘制出了人乳头瘤病毒 58 型(HPV58)三个结构蛋白的全部且精细的线性 B 细胞表位图谱^[39]。该方法的特点包括:(1) 选用截断 GST188 蛋白作为短肽重组表达的融合标签,从而使表达的融合多肽片段大小在 21.5–22.5 kD,便于 SDS-PAGE 和随后 WB 分析鉴定,也很容易与表达宿主-大肠杆菌自身蛋白条带区分。(2) 根据线性 B 细胞表位一般包含 3–8 个氨基酸残基的特点,首先将抗原蛋白分为彼

此重叠 8 个氨基酸残基的 16 肽,可以基本完全地初步筛选到所有包含 B 细胞表位的 16 肽。(3) 利用彼此重叠 7 个氨基酸残基的系列 8 肽鉴定每个阳性 16 肽,可以准确鉴定每个线性 B 细胞表位的最小表位基序。对于少数表位基序大于 8 个氨基酸残基的表位的最小基序则采用系列 N-端和 C-端截短肽法进行鉴定,可以鉴定到每个线性 B 细胞表位的最小基序。(4) 对于序列比对发现的特异性表位,可以通过点突变技术构建系列表位基序的突变体,然后验证其与抗原免疫血清的反应性,从而鉴定出真正的株/型特异性的线性 B 细胞表位。改良的生物合成肽法线性 B 细胞作图流程如图 1 所示。

自 2012 年起,作者实验室利用改良的生物合成肽法开展了小反刍兽疫病毒(PPRV) N 蛋白和 H 蛋白的线性 B 细胞表位作图的研究。利用抗重组 N 蛋白兔血清,鉴定到 19 个线性 B 细胞表位(包括 10 个保守性 B 细胞表位)以及它们的最小表位基序,绘制出 PPRV N 蛋白线性 B 细胞表位图谱^[5],如图 2 所示。

相似地,利用抗 PPRV H 蛋白多抗血清,我们最近绘制出 H 蛋白的 13 个线性 B 细胞表位(包括两个保守性 B 细胞表位)在 H 蛋白上的分布图(作者未发表的数据)。与 19 个包含 N 蛋白线性 B 细胞表位的多肽都可以被 PPRV 弱毒疫苗免疫羊血清识别不同,13 个包含 H 蛋白线性 B 细胞表位最小基序的 8 肽中只有 9 个可以被 PPRV 弱毒疫苗免疫羊血清识别。这表明将改良生物合成肽法 B 细胞表位作图得到线性 B 细胞表位用于多表位疫苗设计或疫苗检测抗原时需谨慎选择,需要对获得的表位进行疫苗免疫或感染康复血清可及性验证,或者直接利用疫苗免疫或感染康复血清进行线性 B 细胞表位作图。

改良的生物合成肽法具有操作简单(无需纯化表达的系列短肽融合蛋白)、经济(短肽生物合成费用约是化学合成费用的 1/20)、结果可靠和无需特殊仪器的优点,适合在普通生物学实验室开展线性 B 细胞表位最小基序鉴定和线性 B 细胞表位精细作图研究。

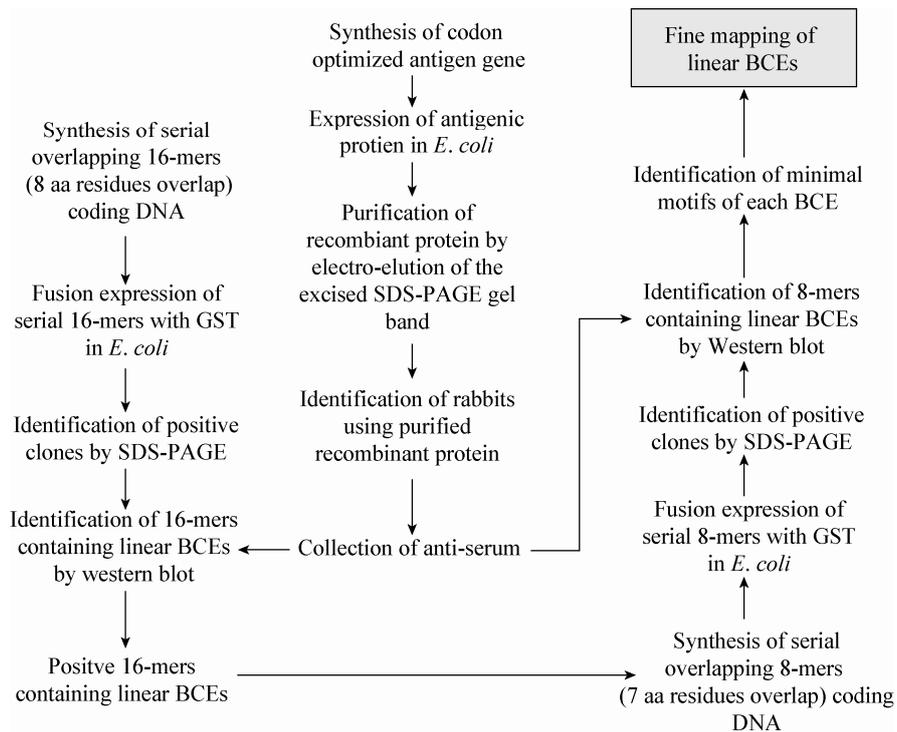
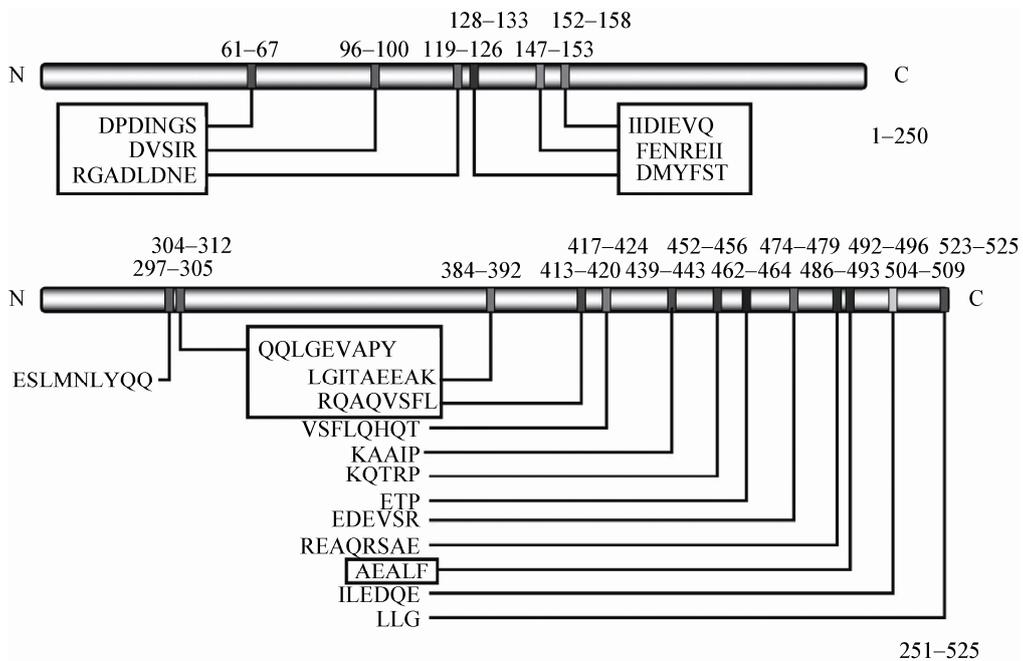


图 1 改良的生物合成肽法线性 B 细胞表位作图示意图

Figure 1 Diagram of linear B cell epitope mapping using modified biosynthetic peptides method

图 2 19 个 BCEs 最小基序在 PPRV N 蛋白上的分布^[5]Figure 2 Distribution of 19 BCEs minimal motifs on the PPRV N protein^[5]

3 B 细胞表位作图在动物疫病防控中的应用

B 细胞表位作图已广泛应用于疫病检测方法的建立以及表位抗体药物和新型表位疫苗的研发等领域。抗体药物已成为目前最有前途的生物药物之一,在 2015 和 2016 年全球销售前 10 名的药物中,单抗药物占了一半以上(<http://www.chyxx.com/industry/201611/471204.html>; <http://health.sohu.com/20161214/n475881159.shtml>)。在动物疫病防控领域,B 细胞表位作图被广泛应用于动物疾病的诊断、鉴别诊断方法的建立和多表位疫苗的研发等方面。

3.1 动物疾病诊断

与利用完整重组蛋白建立的疾病诊断方法相比,基于多表位肽的诊断方法由于组合了来自病原微生物的多个抗原蛋白的优势性 B 细胞表位基序而具有更高的检测灵敏度,从而提高了感染临界值血清的检出率,它可以在疫病感染早期及时发现感染动物,以防止疫病的大规模暴发。马凡舒等^[40]用水貂阿留申病病毒(AMDV) NS1 蛋白的强 B 细胞表位肽(302-321 aa)建立了 AMD 间接 ELISA 检测方法,利用此方法可以检测出传统血清检测方法检测呈阴性的早期感染动物的血样。张小丽等^[41]选取口蹄疫病毒(FMDV) 2C 蛋白 N-端和 C-端的主要 B 细胞表位区和完整的 3AB 蛋白组合后作为抗原,建立了 FMDV 非结构蛋白抗体的 ELISA 检测方法。用此法对疫区的羊血清样品的检测结果表明:2C'3AB-ELISA 方法检测的敏感性高于现有的 3ABC-ELISA 方法,提高了对可疑血清的检出率,这对于筛查隐性感染动物和持续感染动物以及早期发现 FMD 疫情有非常重要的意义。

B 细胞表位作图在动物疾病诊断中的另一个重要应用是鉴别诊断方法的建立。这既包括区分自然感染带毒动物和疫苗免疫动物的鉴别诊断,也包括症状相似不同疾病的鉴别诊断。病毒反向遗传学技术的建立为病毒表位缺失/插入标记疫苗的构建提供了可能,这种标记疫苗与对应基于缺失/

插入表位的检测方法相结合可以进行自然感染带毒动物和疫苗免疫动物的鉴别诊断。Muniraju 等^[42]利用上述策略构建了 PPRV C77 单抗表位缺失的弱毒疫苗,该表位缺失疫苗具有与缺失前疫苗相同的免疫效力;与商品化基于 C77 单抗的间接 ELISA 试剂盒相结合,实现了 PPRV 自然感染动物与疫苗免疫动物的鉴别诊断。Choi 等^[43]利用牛瘟病毒(RPV) N 蛋白的 C-端线性 B 细胞表位肽⁴⁷⁹PEADTDPL⁴⁸⁶建立鉴别 RPV 的 ELISA 检测方法可以检测 RPV 血清,而与同属的 PPRV 血清没有交叉反应。相似地,Dechamma 等^[44]在 PPRV N 蛋白的 C-端鉴定到一个 PPRV 特异性线性 B 细胞表位(454-472 aa),并利用抗此表位的抗体建立了鉴别 PPRV 和 RPV 的间接 ELISA 检测方法。

3.2 多表位疫苗研发

多表位疫苗(Multi-epitopes vaccine)是将优势 B 细胞抗原表位,特别是中和性 B 细胞表位以一定的方式串联构成的一种新型疫苗,它常同时携带来自于多个抗原的 B 细胞表位和辅助 T 细胞表位^[45]。与弱毒疫苗和灭活疫苗相比,多表位疫苗免疫所产生的抗体针对靶病原的特异性更强。由于去除了对宿主有害而不影响免疫原性的非必需序列,多表位疫苗更加安全可靠。同时,同弱毒疫苗相比,多表位疫苗对温度不敏感,便于规模化生产^[46-47]。目前,多表位疫苗的研究日益受到关注。用于动物疫病防控的表位疫苗主要包括 3 个方面:病毒表位疫苗、细菌表位疫苗、寄生虫表位疫苗。

3.2.1 病毒表位疫苗:将病毒抗原的 T、B 细胞表位直接连接获得的联合多表位肽作为候选疫苗免疫动物,可诱导高水平的 T 细胞免疫应答及抗体的产生。动物病毒性疾病的表位疫苗研究最早和最多的是口蹄疫(FMD)表位疫苗。国内外研究者对 FMD 合成肽疫苗、多表位疫苗、病毒样颗粒展示多表位疫苗、以自身蛋白质分子为载体的多表位疫苗的免疫原性以及改善 FMD 表位疫苗免疫原性

的策略进行了大量的研究与探索,以期研制出高效、安全、多价的新型 FMD 表位疫苗^[47-48]。随着对 FMDV 及表位疫苗研究的深入,相信目前 FMD 表位疫苗研究中所暴露出的问题会逐步得到解决, FMD 表位疫苗一定会在未来 FMD 的防控与净化中发挥更加积极的作用。另外,其他重要动物病毒性疾病(如流感、猪繁殖与呼吸综合征、鸡传染性支气管炎等)的表位疫苗的研究也取得了一定的进展,并正在逐渐向临床应用阶段发展^[49-51]。

3.2.2 细菌表位疫苗:表位疫苗在动物细菌性疾病防控方面的应用也比较广泛。将病原菌的优势 B 细胞表位在体外进行重组拼接,然后在合适的宿主细胞中重组表达获得重组细菌多表位肽疫苗。陈建国等^[52]构建并在真核细胞中表达了铜绿假单胞菌的 MyD88 蛋白多表位疫苗。小鼠免疫试验显示:该多表位疫苗可以刺激小鼠产生高度特异性的中和性抗体,疫苗气管接种后,攻毒小鼠肺组织匀浆中的细菌数明显低于阴性对照组。刘祥等^[53]选取奶牛乳房炎 3 种主要致病菌的候选疫苗蛋白:金黄色葡萄球菌的 Ebps 与 Clfa 蛋白、大肠埃希菌的 OmpA 与 OmpC 蛋白和链球菌的 SIP 与 PGK 蛋白,获得每种蛋白的两个优势 B 细胞表位,设计拼接出了抗原性较好的三联表位疫苗的氨基酸序列,为下一步合成多表位肽疫苗的研究奠定了基础。

3.2.3 寄生虫表位疫苗:寄生虫表位疫苗的研究相对较少,但关于寄生虫表位疫苗的研究和应用已经展开。目前,已经有一些寄生虫亚单位疫苗投入了临床使用。邓小昭等^[54]将猪囊虫 B 细胞表位 n1 和 n2 插入乙肝病毒核心蛋白(HBc)序列的第 78 位和第 79 位之间,将猪囊虫 B 细胞表位 n3 接在第 149 位之后,利用大肠杆菌表达获得了猪囊虫多表位疫苗。免疫小鼠后通过 ELISA 检测到高滴度的抗体, WB 结果表明在免疫鼠体内诱导出这 3 个表位的特异性抗体。以绦虫卵攻击免疫小鼠,试验结果表明:该多表位疫苗的相对保护率为

89%,具有良好的免疫效果。于钦磊^[55]选择隐孢子虫的主要表面蛋白 CP12 和 CP21 构建多表位核酸疫苗;小鼠免疫和攻毒试验表明:与阴性对照组相比,免疫组排卵囊数明显减少,排卵囊持续时间平均缩短 3-4 d,最佳卵囊减少率达到 84.1%。妊娠山羊免疫试验显示:母羊 IgG 和 IgA 抗体滴度逐渐增加,攻虫后卵囊排出量减少、排出时间缩短;而且母羊能够将免疫保护力传给后代。

4 展望

B 细胞表位作图经历了一系列演变和发展。生物物理方法用于 B 细胞表位作图早于生物化学方法,而生物化学方法目前更广泛地应用到 B 细胞表位作图研究中。各种 B 细胞表位作图方法仍存在不同程度的成本高、耗时、费力等问题,且并不能鉴定到全部的 B 细胞表位。因此,在实际应用中应根据不同的研究目的灵活选用,而且利用一种方法得到 B 细胞表位往往需要另外的方法进行功能验证或突变分析验证,以增加结果的可靠性。

近年来,制备单克隆抗体,特别是中和性单克隆抗体日益受到研究者的关注。大量的动物重要病原微生物的中和性单抗也相继得到分离鉴定。高通量的 B 细胞表位作图平台的建立为快速、有效地鉴定这些单抗识别并结合的线性 B 细胞表位和/或构象性 B 细胞表位提供了可能。然而,这些平台所依赖的突变体库的昂贵建库成本限制了其在动物病原微生物结构蛋白的 B 细胞表位作图中应用。目前,高通量 B 细胞表位作图仍面临以下挑战:(1) 构象性表位鉴定;(2) 表位基序中关键氨基酸残基定位以及残基中与抗体相互作用的原子或基团鉴定;(3) 构象复杂抗原(如膜蛋白、翻译后修饰或多聚化的蛋白)的 B 细胞表位作图。

B 细胞表位作图虽然是建立特异性疾病诊断方法的最重要的一步,但它只是开发高效表位疫苗的第一步。由于游离抗体的结构与 B 细胞表面受体的结构并不总是一致,因此体外鉴定到可以与抗体发生相互作用的表位不一定会与体内的 B 细胞特异性

受体结合,因此鉴定到中和抗体识别的 B 细胞表位免疫后有时并不能诱导机体产生中和抗体。另外,有些抗体在体外具有中和病原微生物的活性,而在体内并不具有中和活性^[14-15]。因此,在分析各种方法获得表位信息时需要仔细斟酌。在设计多表位疫苗时,除了包含优势 B 细胞表位外,往往还需要包含一个或几个 T 细胞表位^[17],以增强其免疫保护效力。由于表位的合理优化和排列组合规律目前仍不清晰,在设计表位疫苗时还需摸索其最佳组合连接方式。如何选择安全高效的免疫佐剂也是设计高效多表位疫苗需要考虑的问题。相信随着科学技术的不断进步,这些问题都会逐步得到解决。多表位疫苗是未来疫苗研究的发展方向,将具有更加广阔的应用前景。

参 考 文 献

- [1] Morris GE. Epitope mapping: B-cell epitopes[A]//eLS[M]. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2007: 1-3
- [2] Potocnakova L, Bhide M, Pulzova LB. An introduction to B-cell epitope mapping and *in silico* epitope prediction[J]. Journal of Immunology Research, 2016: 6760830
- [3] Abbott WM, Damschroder MM, Lowe DC. Current approaches to fine mapping of antigen-antibody interactions[J]. Immunology, 2014, 142(4): 526-535
- [4] Davidson E, Doranz BJ. A high-throughput shotgun mutagenesis approach to mapping B-cell antibody epitopes[J]. Immunology, 2014, 143(1): 13-20
- [5] Yu RS, Fan XM, Xu WX, et al. Fine mapping and conservation analysis of linear B-cell epitopes of peste des petits ruminants virus nucleoprotein[J]. Veterinary Microbiology, 2015, 175(1): 132-138
- [6] Barlow DJ, Edwards MS, Thornton JM. Continuous and discontinuous protein antigenic determinants[J]. Nature, 1986, 322(6081): 747-748
- [7] van Regenmortel MHV. What is a B-cell epitope?[A]//Schutkowski M, Reineke U, eds. Epitope Mapping Protocols[M]. New York: Humana Press, 2009: 3-20
- [8] Rubinstein ND, Mayrose I, Halperin D, et al. Computational characterization of B-cell epitopes[J]. Molecular Immunology, 2008, 45(12): 3477-3489
- [9] 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
- [10] Atkinson SC, Armistead JS, Mathias DK, et al. The *Anopheles*-midgut APN1 structure reveals a new malaria transmission-blocking vaccine epitope[J]. Nature Structural & Molecular Biology, 2015, 22(7): 532-539
- [11] Bannwarth L, Girerd-Chambaz Y, Arteni A, et al. Mapping of the epitopes of poliovirus type 2 in complex with antibodies[J]. Molecular Immunology, 2015, 67(2): 233-239
- [12] Costa MA, Rodrigues FT, Chagas BC, et al. Preliminary crystallographic studies of a schistosoma mansoni antigen (Sm21.7) dynein light-chain (DLC) domain[J]. Acta Crystallographica, 2014, 70(6): 803-807
- [13] Tahara M, Bürckert JP, Kanou K, et al. Measles virus hemagglutinin protein epitopes: the basis of antigenic stability[J]. Viruses, 2016, 8(8): 216
- [14] Bai XC, McMullan G, Scheres SHW. How cryo-EM is revolutionizing structural biology[J]. Trends in Biochemistry Sciences, 2015, 40(1): 49-57
- [15] Cheng YF. Single-particle cryo-EM at crystallographic resolution[J]. Cell, 2015, 161(3): 450-457
- [16] Jackson RN, McCoy AJ, Terwilliger TC, et al. X-ray structure determination using low-resolution electron microscopy maps for molecular replacement[J]. Nature Protocols, 2015, 10(9): 1275-1284
- [17] Ahmad TA, Eweida AE, Sheweita SA. B-cell epitope mapping for the design of vaccines and effective diagnostics[J]. Trials in Vaccinology, 2016, 5: 71-83
- [18] Gershoni JM, Roitburd-Berman A, Siman-Tov DD, et al. Epitope mapping: the first step in developing epitope-based vaccines[J]. BioDrugs, 2007, 21(3): 145-156
- [19] Ladner RC. Mapping the epitopes of antibodies[J]. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 2007, 24(1): 1-30
- [20] Suckau D, Köhl J, Karwath G, et al. Molecular epitope identification by limited proteolysis of an immobilized antigen-antibody complex and mass spectrometric peptide mapping[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1990, 87(24): 9848-9852
- [21] Temporini C, Bavaro T, Tengattini S, et al. Liquid chromatography-mass spectrometry structural characterization of *neo* glycoproteins aiding the rational design and synthesis of a novel glycovaccine for protection against tuberculosis[J]. Journal of Chromatography A, 2014, 1367: 57-67
- [22] Coales SJ, Tuske SJ, Tomasso JC, et al. Epitope mapping by amide hydrogen/deuterium exchange coupled with immobilization of antibody, on-line proteolysis, liquid chromatography and mass spectrometry[J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2009, 23(5): 639-647
- [23] Sevy AM, Healey JF, Deng W, et al. Epitope mapping of inhibitory antibodies targeting the C2 domain of coagulation factor VIII by hydrogen-deuterium exchange mass spectrometry[J]. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2013, 11(12): 2128-2136
- [24] Opuni KFM, Al-Majdoub M, Yefremova Y, et al. Mass spectrometric epitope mapping[J]. Mass Spectrometry Review, 2016. DOI: 10.1002/mas.21516
- [25] Säfsten P. Epitope Mapping by surface plasmon resonance[A]//Schutkowski M, Reineke U, eds. Epitope Mapping Protocols[M]. New York: Humana Press, 2009, 524: 67-76
- [26] Yang Y, Dai Z, Zou XY. Investigation of protein-protein interactions by surface plasmon resonance[J]. Journal of Instrumental Analysis, 2009, 28(11): 1344-1350 (in Chinese)
杨彦, 戴宗, 邹小勇. 表面等离子体共振技术在蛋白质-蛋白质相互作用研究中的应用[J]. 分析测试学报, 2009, 28(11): 1344-1350
- [27] Gozalbo-Rovira R, Rodriguez-Díaz J, Saus J, et al. Precise

- mapping of the good pasture epitope(s) using phage display, site-directed mutagenesis, and surface plasmon resonance[J]. *Kidney International*, 2013, 83(3): 438-445
- [28] O'Hara JM, Kasten-Jolly JC, Reynolds CE, et al. Localization of non-linear neutralizing B cell epitopes on ricin toxin's enzymatic subunit (RTA)[J]. *Immunology Letters*, 2014, 158(1/2): 7-13
- [29] Nguyen PC, Lewis KB, Ettinger RA, et al. High-resolution mapping of epitopes on the C2 domain of factor VIII by analysis of point mutants using surface plasmon resonance[J]. *Blood*, 2014, 123(17): 2732-2739
- [30] Kang W, Xie C, Zhang JN, et al. The identification and characterization of two novel epitopes on the nucleocapsid protein of the porcine epidemic diarrhea virus[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 39010
- [31] Zhang ZB, Chen JF, Shi HY, et al. Identification of a conserved linear B-cell epitope in the M protein of porcine epidemic diarrhea virus[J]. *Virology Journal*, 2012, 9: 225
- [32] Bogdan JA Jr, Apicella MA. Mapping of a surface-exposed, conformational epitope of the P6 protein of *Haemophilus influenzae*[J]. *Infection & Immunity*, 1995, 63(11): 4395-4401
- [33] Cunningham BC, Wells JA. High-resolution epitope mapping of hGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis[J]. *Science*, 1989, 244(4908): 1081-1085
- [34] Infante YC, Pupo A, Rojas G. A combinatorial mutagenesis approach for functional epitope mapping on phage-displayed target antigen[J]. *Mabs*, 2014, 6(3): 637-648
- [35] Verma D, Grigoryan G, Baileykelllogg C. Structure-based design of combinatorial mutagenesis libraries[J]. *Protein Science*, 2015, 24(5): 895-908
- [36] Wang LF, Yu M. Epitope identification and discovery using phage display libraries: applications in vaccine development and diagnostics[J]. *Current Drug Targets*, 2004, 5(1): 1-15
- [37] Guo CY, Zhao XR, Hu J. Research and application of B cell epitope[J]. *Letters in Biotechnology*, 2013, 24(2): 266-270 (in Chinese)
郭春艳, 赵向绒, 胡军. B 细胞抗原表位的研究进展及其应用[J]. *生物技术通讯*, 2013, 24(2): 266-270
- [38] Xu WX, He YP, Tang HP, et al. Minimal motif mapping of a known epitope on human zona pellucida protein-4 using a peptide biosynthesis strategy[J]. *Journal of Reproductive Immunology*, 2009, 81(1): 9-16
- [39] Xu WX, Wang J, Tang HP, et al. Epitomics: IgG-epitome decoding of E6, E7 and L1 proteins from oncogenic human papillomavirus type 58[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 34686
- [40] Ma FS, Zhang L, Wang Y, et al. Analysis and identification of B-cell epitopes on Aleutian mink disease virus NS1 protein[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2016, 46(2): 210-216 (in Chinese)
马凡舒, 张蕾, 王洋, 等. 水貂阿留申病病毒 NS1 蛋白 B 细胞抗原表位的分析与鉴定[J]. *中国兽医科学*, 2016, 46(2): 210-216
- [41] Zhang XL, Tian MN, Lu ZJ, et al. Prokaryotic expression and bioreactivity analysis of a major epitope region of 2C with 3AB within non-structural protein of foot-and-mouth disease virus[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2009, 25(1): 10-15 (in Chinese)
张小丽, 田美娜, 卢曾军, 等. FMDV 非结构蛋白 2C 主要表位区与 3AB 基因的组表达与活性分析[J]. *生物工程学报*, 2009, 25(1): 10-15
- [42] Muniraju M, Mahapatra M, Buczkowski H, et al. Rescue of a vaccine strain of peste des petits ruminants virus: *in vivo* evaluation and comparison with standard vaccine[J]. *Vaccine*, 2015, 33(3): 465-471
- [43] Choi KS, Nah JJ, Ko YJ, et al. Characterization of immunodominant linear B-cell epitopes on the carboxy terminus of the rinderpest virus nucleocapsid protein[J]. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2004, 11(4): 658-664
- [44] Dechamma HJ, Dighe V, Kumar CA, et al. Identification of T-helper and linear B epitope in the hypervariable region of nucleocapsid protein of PPRV and its use in the development of specific antibodies to detect viral antigen[J]. *Veterinary Microbiology*, 2006, 118(3/4): 201-211
- [45] Zhang YF, Wang HN, Huang Y, et al. Construction strategy for multiepitope vaccine and its application in animal vaccine[J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2008, 10(2): 29-33 (in Chinese)
张有峰, 王红宁, 黄勇, 等. 多表位疫苗的构建策略及其在动物疫苗中的应用[J]. *中国农业科技导报*, 2008, 10(2): 29-33
- [46] Yang ZJ, Lin Y, Li GJ, et al. Recombinant vaccine containing both B cell and T cell epitopes induces guinea pig in immune responses against type O foot-and-mouth disease virus[J]. *Journal of Fudan University (Natural Science)*, 2000, 39(5): 564-568 (in Chinese)
杨志军, 林焱, 李光金, 等. 含 T 细胞表位和 B 细胞表位的抗 O 型 FMDV 基因工程疫苗诱导豚鼠产生免疫反应[J]. *复旦学报: 自然科学版*, 2000, 39(5): 564-568
- [47] Zhang ZW, Zhang YG. Advance in FMD epitope vaccines[J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2008, 24(6): 570-573 (in Chinese)
张中旺, 张永光. 口蹄疫表位疫苗的研究进展[J]. *中国人兽共患病学报*, 2008, 24(6): 570-573
- [48] Li SF, Shao JJ, Chang HY. Research progress on the epitope-based vaccine against foot and mouth disease[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2017, 44: 396-401 (in Chinese)
李世芳, 邵建军, 常惠芸. 口蹄疫表位疫苗的研究进展[J]. *中国畜牧兽医*, 2017, 44: 396-401
- [49] Gottlieb T, Ben-Yedidia T. Epitope-based approaches to a universal influenza vaccine[J]. *Journal of Autoimmunity*, 2014, 54: 15-20
- [50] He L, Chen RA, Luo ML, et al. Advance in epitope vaccine[J]. *Guangdong Journal of Animal and Veterinary Science*, 2011, 36(2): 3-5 (in Chinese)
何玲, 陈瑞爱, 罗满林, 等. 多表位基因工程疫苗的研究进展[J]. *广东畜牧兽医科技*, 2011, 36(2): 3-5
- [51] Kodihalli S, Sivanandan V, Nagaraja KV, et al. A type-specific avian influenza virus subunit vaccine for turkeys: induction of protective immunity to challenge infection[J]. *Vaccine*, 1994, 12(15): 1467-1472
- [52] Chen JG, Su ZL, Liu YZ, et al. Construction of MyD88-*Pseudomonas aeruginosa* epitope DNA vaccine and its expression in eukaryotic cells[J]. *Chinese Journal of Cellular & Molecular Immunology*, 2009, 25(3): 193-195 (in Chinese)
陈建国, 苏兆亮, 柳迎昭, 等. MyD88-铜绿假单胞菌表位核酸

- 疫苗的构建及其真核表达[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2009, 25(3): 193-195
- [53] Liu X, Kong ZX, Yin SP, et al. Epitope analysis of cow mastitis important vaccine candidate proteins and design of amino acid sequence of triple recombinant epitope vaccine[J]. Acta Agriculture Universities Zhejiangensis, 2016, 28(9): 1476-1484 (in Chinese)
刘祥, 孔智翔, 殷书平, 等. 奶牛乳房炎重要候选疫苗蛋白的抗原表位分析及三联重组表位疫苗的氨基酸序列设计[J]. 浙江农业学报, 2016, 28(9): 1476-1484
- [54] Deng XZ, Zhou ZA, Diao ZY, et al. Construction and immune research of a new chimeric protein vaccine containing epitopes of taenia solium cysticercus[J]. China Journal of Veterinary Science, 2006, 26(3): 288-291 (in Chinese)
邓小昭, 周宗安, 刁振宇, 等. 携带猪囊虫表位的嵌合蛋白疫苗的构建及其免疫学研究[J]. 中国兽医学报, 2006, 26(3): 288-291
- [55] Yu QL. Development and application of bivalent nucleic acid vaccine for *Cryptosporidium parvum* CP12/CP21 in animals[D]. Changchun: Master's Thesis of Jilin University, 2008 (in Chinese)
于钦磊. 隐孢子虫 CP12/CP21 双价核酸疫苗的研究[D]. 长春: 吉林大学硕士学位论文, 2008

征 稿 简 则

1 刊物简介与栏目设置

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 工业微生物学、海洋微生物学、环境微生物学、基础微生物学、农业微生物学、食品微生物学、兽医微生物学、药物微生物学、医学微生物学、病毒学、酶工程、发酵工程、代谢工程等领域的最新研究成果, 产业化新技术和新进展, 以及微生物学教学研究和改革等。设置的栏目有: 研究报告、专论与综述、生物实验室、高校教改纵横、显微世界、专栏、书讯、会讯等。

2 投稿方式

投稿时请登陆我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>, 点击作者投稿区, 第一次投稿请先注册, 获得用户名和密码, 然后依照提示提交稿件, 详见主页“投稿须知”。

3 写作要求

来稿要求论点明确, 数据可靠, 简明通顺, 重点突出。

3.1 参考文献

参考文献按文内引用的先后顺序排序编码, 未公开发表的资料请勿引用。我刊参考文献需要注明著者(文献作者不超过 3 人时全部列出, 多于 3 人时列出前 3 人, 后加“等”或“et al.”, 作者姓前、名后, 名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名必须写完整, 不用缩写, 不用斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

- [1] Marcella C, Claudia E, Pier GR, et al. Oxidation of cystine to cysteic acid in proteins by peroxyacids as monitored by immobilized pH gradients[J]. Electrophoresis, 1991, 12(5): 376-377
- [2] Wang BJ, Liu SJ. Perspectives on the cultivability of environmental microorganisms[J]. Microbiology China, 2013, 40(1): 6-17 (in Chinese)
王保军, 刘双江. 环境微生物培养新技术的研究进展[J]. 微生物学通报, 2013, 40(1): 6-17
- [3] Shen T, Wang JY. Biochemistry[M]. Beijing: Higher Education Press, 1990: 87 (in Chinese)
沈同, 王镜岩. 生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1990: 87
- [4] Liu X. Diversity and temporal-spatial variability of sediment bacterial communities in Jiaozhou Bay[D]. Qingdao: Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2010 (in Chinese)
刘欣. 胶州湾沉积物细菌多样性及菌群时空分布规律[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所博士学位论文, 2010

3.2 脚注(正文首页下方)

Foundation item:

*Corresponding author: Tel: ; Fax: ; E-mail:

Received: January 01, 20xx; Accepted: March 01, 20xx; Published online (www.cnki.net): March 31, 20xx

基金项目: 基金项目(No.)

*通讯作者: Tel: ; Fax: ; E-mail:

收稿日期: 20xx-00-00; 接受日期: 20xx-00-00; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 20xx-00-00

(下转 p.2200)