

Pla a 1 的抗原表位分析

李冰峰¹, 李鑫² (1. 南京化工职业技术学院应用化学系, 江苏南京 210048; 2. 南京林业大学化工学院, 江苏南京 210037)

摘要 [目的] 预测 Pla a 1 抗原的免疫原性及 B 细胞表位。[方法] 联合运用多种方法预测 Pla a 1 的二级结构并预测其表面特性, 如亲水性、可塑性及抗原表位。[结果] 该蛋白是一个分子量约 19 kDa, pI 值约 8.7, 主要为 α -螺旋的结构紧凑的球形蛋白。预测其亲水性区域: 32-42, 55-59, 76-78, 88-89, 92-98, 110-112, 118-127, 140-151, 157-163; 预测其可塑性区域: 28-40, 49-57, 76-80, 87-98, 109-114, 121-125, 137-139, 144-151, 154-162; 预测其蛋白质抗原表位区域: 29-42, 49-60, 75-78, 86-100, 107-114, 116-130, 134-152, 156-164; 预测其转角结构区域: 39-42, 51, 55, 88-89。[结论] Pla a 1 抗原蛋白具有较强的免疫原性; 其主要的抗原表位集中于 29-42, 49-60, 86-100, 而这些预测结果为进一步寻求梧桐花粉变态反应的防治方法提供了依据。

关键词 B 细胞表位; Pla a 1 抗原; 法国梧桐花粉; 二级结构; 表面特性

中图分类号 R341.32 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)08-03435-02

Prediction of the B Cell Epitope for Pla a 1 Antigen

LI Bing-feng et al (Department of Applied Chemistry, Nanjing College of Chemical Technology, Nanjing, Jiangsu 210048)

Abstract [Objective] To predict the immunogenicity and B cell epitopes for Pla a 1 antigen. [Method] Secondary structure and tertiary structure and surface properties of Pla a 1, such as hydrophilicity and plasticity were predicted with various methods. [Results] Pla a 1 was predicted to be a global protein with molecular weight about 19kDa and with pI value about 8.7. And it showed a predicted secondary structure characteristic of all-alpha proteins. By computation, Many hydrophilicity regions in pla a 1 were identified: 32-42, 55-59, 76-78, 88-89, 92-98, 110-112, 118-127, 140-151, 157-163; many plasticity regions in pla a 1 were identified: 29-42, 49-60, 75-78, 86-100, 107-114, 116-130, 134-152, 156-164; many antigenic epitopes in pla a 1 were identified: 29-42, 49-60, 75-78, 86-100, 107-114, 116-130, 134-152, 156-164; many turn regions in pla a 1 were identified: 39-42, 51, 55, 88-89. [Conclusion] Pla a 1 has a strong immunogenicity. And its B cell epitopes are mostly localted on 29-42, 49-60, 86-100, therefore, which can be useful for diagnosis and therapy.

Key word B cell epitope; Pla a 1 antigen; *Platanus acerifolia* polia; Secondary structure; Surface characteristics

花粉可以引起季节性过敏性鼻炎, 即通常所说的“花粉热”或“花粉症”。由于过敏性鼻炎的病因广泛且复杂, 已成为该领域研究热点之一。法国梧桐由于叶大, 遮阴效果好, 常用于行道树而广泛地种植。由法国梧桐产生的花粉, 却是引起“花粉症”的主要因素之一^[1]。因此, 越来越多的研究致力于探究法国梧桐花粉引起过敏的原因^[2-3]。2002年, Asturias JA 等从法国梧桐 (*Platanus acerifolia*) 花粉中纯化出一种分子量为 18 kDa 的抗原蛋白, 命名为 Pla a 1, 并认为其是法国梧桐花粉的主要过敏源^[4], 而后又进一步研究得到该抗原蛋白的氨基酸序列^[5]。

目前, 针对 Pla a 1 蛋白的研究主要集中于 2 个方面。其一, 通过 ELISA、immunoblot 等实验方法分析 Pla a 1 的抗原特性^[5-6]。这类研究虽可以为过敏源的诊断、防治提供一定的依据, 但不能从蛋白的结构上探讨其引起过敏的原因。其二, 从蛋白的结构出发, 分析 Pla a 1 蛋白与其他蛋白之间的相似性及进化关系^[5,7]。这类研究结果有助于进一步理解该蛋白的相关生物学信息, 如具有较强的信号转导作用, 与拟南芥的果胶(甲)酯酶抑制剂、转化毒素抑制剂有较高的相似性等, 但这些信息与其致敏性并无直接联系。

因此, 从蛋白结构的角度, 探索花粉致敏抗原的抗原特性, 特别是对其进行免疫原性分析及 B 细胞表位的预测有助于进一步理解其生化功能、蛋白结构与过敏活性之间的关系, 进而为治疗法国梧桐花粉过敏症提供准确的生物信息学依据。笔者通过分析 Pla a 1 的二级和三级结构预测其免疫原性, 并分析其表面特性, 如理化性质、亲水性、可塑性来预

测 Pla a 1 抗原的 B 细胞表位。

1 材料与方法

1.1 Pla a 1 的序列 蛋白质的序列来源于文献[5], 可检自美国国立生物技术信息中心 (www.ncbi.nlm.nih.gov) 所提供的蛋白质数据库。

1.2 二级结构预测 应用 DNASTar Protean 软件提供的模块进行, 采用 Garnier 法^[8]。

1.3 亲水性参数 用 DNASTar Protean 软件进行, 采用 Hopp-Woods^[9-10] 方案。

1.4 可塑性预测 用 DNASTar Protean 软件进行, 采用 Karplus-Schultz^[11] 方案。

1.5 抗原性指数分析 用 DNASTar Protean 软件提供的抗原指数分析模块和方法对 Pla a 1 的抗原表位进行预测。该模块采用 Jameson-Wolf^[12] 的方法, 为 4 参数联立的综合预测方法, 包括: 亲水性、表面特性、可塑性、二级结构预测方案。

2 结果与分析

2.1 Pla a 1 的序列分析 蛋白质的序列检自美国国立生物技术信息中心 (www.ncbi.nlm.nih.gov) 所提供的蛋白质数据库, 其序列如下: MKLSFSLCFFNLLLLLQAVISADIVQGTC-KVAQRSPNVNYDFCVKSLGADPKSHTADLQGLGVISANLAIQ-HGSKIQTFIGRILKSKVDPALKKYLNDVGLYADAK-SSVQEA-IADFKSKDYASANVKMSAALDSDVTCEDGFKEKKGI-VSPVT-KENKDYVQLTAISLAITKLLGA

Pla a 1 含 179 个氨基酸, 不含色氨酸, 分子量 19281.41, pI = 8.69; 酸性氨基酸 (DE) 17 个, 占 9.5%; 碱性氨基酸 (KR) 22 个, 占 12.29%; 极性氨基酸 (NCQSTR) 49 个, 占 27.37%; 疏水性氨基酸 (AILFWV) 73 个, 占 40.78%。

2.2 Pla a 1 的二级结构预测 二级结构预测的结果表明 (图 1): Pla a 1 属于一种混合型蛋白, 其中 α -螺旋占 60%,

基金项目 江苏省青蓝工程资助。

作者简介 李冰峰 (1977 -), 男, 江苏泰州人, 硕士, 讲师, 从事生物技术研究。

收稿日期 2008-12-31

β-折叠占32%, Turn (转角) 占5%, Coil (无规则卷曲) 占2%。

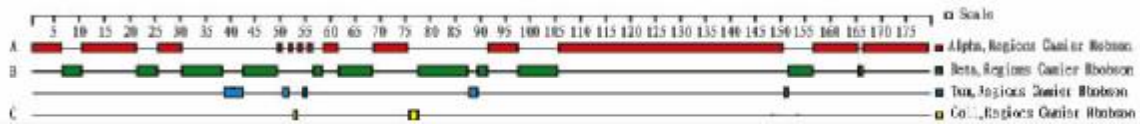


图1 Pla a 1 的二级结构分析 (DNASar Protean)

Fig.1 Prediction of the secondary structure of Pla a 1 by DNASar Protean

2.3 Pla a 1 的亲水性预测 亲水性预测表明(图2), Pla a 1 亲水性区域的分布不均匀, 中部分布较为密集, 可能的亲水性区域为: 32- 42、55-59、76-78、88-89、92-98、110-112、118-127、140-151、157-163。

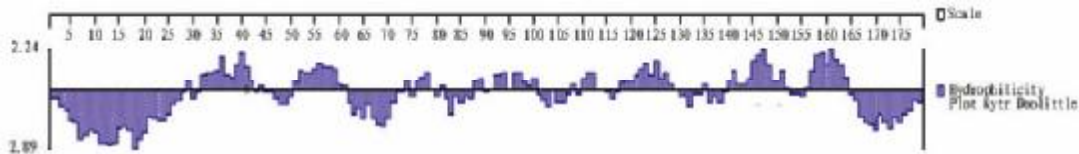


图2 Pla a 1 亲水性分析 (DNASar Protean)

Fig.2 Analysis of hydrophilicity of Pla a 1 by DNASar Protean

2.4 可塑性预测 可塑性预测表明(图3), 可能的可塑性区域为: 28- 40、49-57、76-80、87-98、109-114、121-125、137-139、144-151、154-162。这些区域可能具有一定的柔韧性, 形成表位的可能性较大, 容易与抗体进行嵌合。

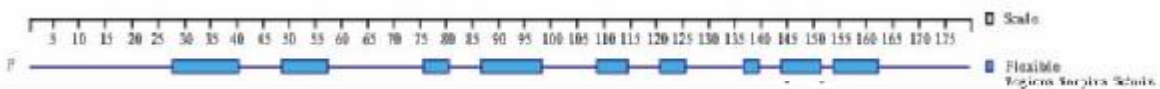


图3 Pla a 1 的可塑性分析

Fig.3 Analysis of flexible regions of Pla a 1

2.5 抗原性指数分析 对 Pla a 1 的抗原表位进行预测的结果表明(图4), Pla a 1 存在有多个潜在的抗原表位点, 可能的蛋白质抗原表位区域为: 29- 42、49-60、75-78、86-100、107-114、116-130、134-152、156-164。

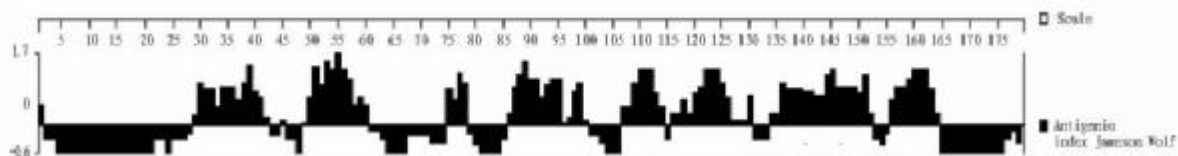


图4 Pla a 1 的抗原性指数分析 (DNASar Protean)

Fig.4 Analysis of the antigenic index of Pla a 1 by DNASar Protean

3 结论与讨论

抗原分子的理化特性是影响抗原免疫应答的因素^[13], 以上对 Pla a 1 抗原性指数的分析表明, 该蛋白有较强的免疫原性。这也进一步证实了文献[4]的结论, 即 Pla a 1 是法国梧桐花粉的主要过敏源。

文献[5]开发出一种方法来大量表达 Pla a 1 蛋白, 希望通过该重组蛋白用于法国梧桐花粉过敏的特定诊断中, 大大节约了特定诊断的成本。然而为了使诊断及治疗更有针对性, 还必须研究过敏源的抗原表位。图4 得出了该蛋白的抗原指数分析结果, 表明有 8 个集中的抗原表位区域, 但这 8 个表位区域中寻找活性较强的, 并能够表现其活力的区域还需要综合分析其结构、亲水性及可塑性等因素。蛋白抗原表位一般存在于 β 转角结构, 故倾向于参与构成转角结构氨基酸残基常出现在抗原表位, α 螺旋、β 片层结构规则, 不易变形, 较难嵌合抗体, 一般不作为抗原位点^[14-15]。在机体内, 疏水性残基一般埋在蛋白内部, 而亲水性残基位于表面, 因此蛋白的亲水部位与蛋白的抗原位点有密切的联系。典型的水溶性球蛋白的表面由亲水性残基组成, 蛋白质表位常处于表面电荷极性最大的区域。可塑性区域可能具有一定的柔韧性, 形成表位的可能性较大, 容易与抗体进行嵌合。二级结构预测表明 Pla a 1 的转角结构(图1) 只占5%。这些位

点位于预测的抗原表位位点中。将预测的亲水性、可塑性、潜在抗原表位、转角区域进行比较分析表明(表1), Pla a 1 重要的抗原表位为: 29- 42、49-60、86-100。

表1 亲水性、可塑性、潜在抗原表位、转角区域比较

Table 1 Comparison among hydrophilicity flexible regions, potenti epitope and turn region

区域 Region	位点 Locus
亲水性区域	32- 42、55-59、76-78、88-89、92-98、110-112、118-127、140-151、157-163
可塑性区域	28- 40、49-57、76-80、87-98、109-114、121-125、137-139、144-151、154-162
抗原性区域	29- 42、49-60、75-78、86-100、107-114、116-130、134-152、156-164
转角区域	39- 42、51、55、88-89

研究表明, Pla a 1 蛋白主要的潜在抗原表位集中于 29- 42、49-60、86-100 区域。而对这些区域的预测为进一步研究 Pla a 1 的结构和功能, 寻求法国梧桐花粉变态反应的防治方法提供了依据。

该研究仅对 Pla a 1 蛋白进行理论预测, 抗原位点也只是基于 Jameson-Wolf 方法进行模拟计算推测得到。这些数据还需要进一步加以实验验证。

参考文献

[1] SUBIZA J, CABRERA M, VALDIVIESO R, et al. Seasonal asthma caused by airborne *Platanus* pollen [J]. Clin Exp Allergy, 1994, 24: 1123 - 1129.

中杂交种 DNA 不含有亲本 DNA 的互补带,即为假种子。

1.2.4 纯度鉴定。用各自的亲本作对照,通过 PCR 扩增、琼脂糖凝胶电泳、成像,用引物 P₃₅、P₁₉和 P₆₈分别检测杂交水稻种中优 88、协优 88 和全丰优 88 的 DNA,观察成像谱带。如谱带中杂交种 DNA 谱带含有双亲的互补带,则为该杂交种;相反,如果杂交种 DNA 带谱中不含亲本 DNA 的互补带,即为杂株。然后统计杂株数,计算出品种纯度,并将该纯度结

果与田间纯度鉴定结果相比较。

2 结果与分析

2.1 3 份杂交种的真伪鉴定 以亲本作对照,通过 PCR 扩增、琼脂糖凝胶电泳、成像,分别检测杂交水稻种中优 88、协优 88 和全丰优 88 的 DNA,再用数字统计出带谱上的条带情况(其中,表 1 为鉴定中优 88 的统计结果)。

表 1 中优 88 真伪鉴定结果统计

Table 1 The statistics of identification test results of Zhongyou 88

材料 Material	P ₁	P ₃	P ₅	P ₆	P ₉	P ₁₄	P ₁₈	P ₁₉	P ₂₀	P ₂₆	P ₂₉	P ₃₅	P ₃₆
万恢 88	010	010	010	010	010	010	010	010	010	010	010	010	010
中九 A	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
中优 88	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111

材料 Material	P ₄₁	P ₄₃	P ₄₉	P ₅₀	P ₅₅	P ₆₁	P ₆₈	P ₇₉	P ₉₁	P ₉₂	P ₉₄	P ₉₇
万恢 88	010	010	010	010	010	010	010	010	010	010	010	010
中九 A	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
中优 88	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111

注:“1”表示有谱带,“0”表示无谱带。

Note:“1”ineicates there is spectral band,“0”indicates no spectral band.

从谱带统计结果可以看出,25 对引物对中优 88 检测的结果中,杂交种中优 88 的 DNA 谱带中均含有亲本万恢 88 和中九 A 的互补带,说明杂交种中优 88 为真种子。用同样方法鉴定出协优 88 和全丰优 88 均为真种子。

2.2 3 份杂交种的纯度鉴定 用各自的亲本作对照,通过 PCR 扩增、琼脂糖凝胶电泳、成像,用引物 P₃₅、P₁₉和 P₆₈分别检测杂交水稻种中优 88、协优 88 和全丰优 88 的 DNA,从成像谱带中统计出杂株数量,然后计算出纯度,结果见表 2。

表 2 杂交水稻中优 88、协优 88 和全丰 88 的纯度鉴定结果

Table 2 The purity test results of Zhongyou 88, Xieyou 88 and Quan-feng 88

杂交种 Hybrid seed	试验鉴定方法 Test method	群体数株 Colony no.	杂株株 Mixed plants	杂株率 % Mixed rate	种子纯度 % Seed purity
中优 88	SSR 分子标记	350	9	2.57	97.43
	田间鉴定	1 000	24	2.40	97.60
协优 88	SSR 分子标记	350	7	2.00	98.00
	田间鉴定	1 000	19	1.90	98.10
全丰优 88	SSR 分子标记	350	13	3.71	96.29
	田间鉴定	1 000	34	3.40	96.60

从表 2 可以看出,中优 88 的 SSR 分子标记和田间鉴定的纯度分别为 97.43% 和 97.60%; 协优 88 的 SSR 分子标记和田间鉴定的纯度分别为 98.00% 和 98.10%; 全丰优 88 的 SSR 分子标记和田间鉴定的纯度分别为 96.29% 和 96.60%。3 个杂交种的 SSR 分子标记鉴定和田间鉴定的结果基本上一致,没有明显的差异,说明用 SSR 检测杂交水稻种子纯度是完全可行的^[8]。

3 讨论

从上述试验结果可以看出, DNA 分子标记结果与田间鉴定的结果一致,说明了 DNA 分子标记的结果是可靠的,

利用分子标记鉴定杂交水稻的真伪和纯度是完全可行的。此外,DNA 分子标记鉴定纯度的方法与田间鉴定法相比,具有较多优点:首先,其操作极其简单。只要具有初中文化的人员,再由技术人员演示并教几次即能掌握基本操作。其次是用时少。从发芽开始,熟练人员只需要 1 周左右就可鉴定出结果了,而田间鉴定至少要 3~4 个月才能得到结果,可能会错过很多有利的机会。再次是准确度高。从该试验可以看出,用 DNA 分子标记鉴定纯度准确度较田间高(人为统计可能有漏统计等)。还有,DNA 分子标记不太受环境和人为因素的影响。DNA 的遗传特点比较稳定,很少受到环境和人为因素的影响,而田间鉴定可能会受到自然灾害、病虫害等影响,导致结果的误差较大,甚至结果不可用。综上所述,利用 SSR 分子标记应是快速有效鉴定杂交水稻种子真伪与纯度的重要方法之一,有着广阔的应用前景^[9]。

参考文献

[1] 刘之熙,陈祖武,朱克永,等. 利用 SSR 分子标记快速鉴定杂交水稻种子纯度技术体系的优化[J]. 杂交水稻,2008,23(1):60-63.
 [2] 李召华,朱克永,陈祖武,等. SSR 分子标记技术在杂交水稻种子纯度鉴定中的应用[J]. 杂交水稻,2006,21(4):11-14.
 [3] 辛景树,郭景伦,张软斌. 几种常用分子标记技术在种子纯度和品种真实性鉴定方面的比较与分析[J]. 种子,2005,24(1):58-60.
 [4] 陈红旗,陈宗祥,倪深,等. 利用分子标记技术聚合 3 个稻瘟病基因改良金 23B 的稻瘟病抗性[J]. 中国水稻科学,2008,22(1):23-27.
 [5] 方宜钧,刘思衡,江树业. 品种纯度和真伪的 DNA 分子标记及其应用[J]. 农业生物技术学报,2000(2):106-110.
 [6] 威华雄,杨蜀兰,王斌,等. 用聚合酶链式反应技术鉴定杂交水稻种子纯度的初步研究[J]. 湖北农业科学,1999(1):12-14.
 [7] 郑成超,温平江. DNA 分子标记技术与作物品种纯度鉴定[J]. 山东农业大学学报,1997,28(4):499-505.
 [8] 彭锁堂,庄杰云,颜启传,等. 我国主要杂交水稻组合及其亲本 SSR 标记和纯度鉴定[J]. 中国水稻科学,2003,17(1):1-5.
 [9] 吕桂兰,丁芬,沈枫,等. SSR 标记技术在水稻遗传育种中的应用[J]. 北京水稻,2007(3):23-26.