

孔智翔, 刘 祥, 殴莎莎, 等. 奶牛乳房炎链球菌 GapC 蛋白的生物信息学分析与重组表位疫苗设计[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(4): 824-831.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2016.04.018

## 奶牛乳房炎链球菌 GapC 蛋白的生物信息学分析与重组表位疫苗设计

孔智翔, 刘 祥, 殴莎莎, 刘成艳, 同韩虎, 陈春琳, 陈 琛, 吴三桥

(陕西理工大学/中德天然产物研究所, 陕西 汉中 723001)

**摘要:** 为设计奶牛乳房炎链球菌 GapC 蛋白的多表位串联疫苗, 进一步提高 GapC 蛋白的免疫效果, 采用 DNAMAN、MEGA 软件分析 GapC 的同源性, 结果显示, 不同种类链球菌亲缘关系均较近, 尤其是与奶牛乳房炎有关的链球菌亲缘关系更近。利用在线软件预测 GapC 为亲水性蛋白, 存在多个酶切位点; 采用 SignalP 4.1 与 TMHMM Server v.2.0 软件预测 GapC 无信号肽和跨膜结构, 定位于细胞表面; SOPMA 服务器预测 GapC 二级结构中含无规则卷曲 30.36%,  $\alpha$ -螺旋 33.93%,  $\beta$ -转角 12.50%,  $\beta$ -片层 23.21%。采用 Swiss-Model 预测的 GapC 三级结构与二级结构相符。利用 ABCpred 和 BepiPred 方案, 预测 GapC 存在 5 个 B 细胞表位。运用神经网络与量化矩阵法预测 GapC 具有 1 个 CTL 表位。使用 MHC-II 类分子结合肽在线程序预测显示 GapC 具有 1 个 Th 表位。采用 DNASTAR Protean 软件重组 GapC 抗原表位, 设计获得抗原性较好的 GapC 重组表位多肽。

**关键词:** 奶牛乳房炎; 链球菌; GapC 蛋白; 蛋白结构; 细胞表位

**中图分类号:** S858.23 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2016)04-0824-08

## Bioinformatics analysis of cow mastitis *Streptococcus* GapC protein and designing of recombinant epitope vaccine

KONG Zhi-xiang, LIU Xiang, OU Sha-sha, LIU Cheng-yan, TONG Han-hu, CHEN Chun-lin, CHEN Chen, WU San-qiao

(Chinese-German Joint Institute for Natural Product Research/Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723001, China)

**Abstract:** To design multi epitopes tandem vaccine of *Streptococcus* GapC protein of cow mastitis, and enhance the immunity of GapC protein, homology and phylogenetic analyses were performed on different species of *Streptococcus* spp.. *Streptococcus* bacteria were closely related, especially for those associated with cow mastitis. GapC protein is predicted to be hydrophilic, and has multiple cleavage sites. Prediction with SignalP 4.1 and TMHMM Server v.2.0 softwares reveals that GapC has no signal peptide and transmembrane structure, and is located on cell membrane. GapC secondary structure contains random coil (30.36%), alpha helix (33.93%), beta turn (12.50%), and extended strand (23.21%) by SOPMA, and the 3D structure is close to the secondary structure by Swiss-Model program. GapC has 5 B cell epitopes predicted by ABCpred and Bepipred programs. 1 CTL epitope was predicted using quantitative matrix and artificial neural network and 1 Th epitopes was predicted using an online MHC class II peptide binding affinity server. A GapC recombinant epitope peptide was designed with better immunogenicity by DNASTAR Protean software.

收稿日期: 2015-11-16

**基金项目:** 国家大学生创新创业训练计划项目 (201510720556); 陕西省农业科技创新与攻关项目 (2016NY-088); 陕西省大学生创新创业训练计划项目 (1949); 陕西理工学院大学生创新创业训练计划项目 (UIRP15006)。

**作者简介:** 孔智翔 (1992-), 男, 陕西西安人, 本科, 研究方向为生物工程制药。(Tel) 17809160879; (E-mail) 1075169420@qq.com

**通讯作者:** 刘 祥, (E-mail) liuxiang888525@163.com

**Key words:** cow mastitis; *Streptococcus* spp.; GapC protein; protein structure; cell epitope

链球菌(*Streptococcus*)是一种人畜共患病病原,在动物粪便、人鼻咽部均有分布<sup>[1-3]</sup>,可导致奶牛乳房炎疾病<sup>[4-6]</sup>,给奶牛业造成巨大经济损失,严重制约奶业发展<sup>[4]</sup>。也可引起新生儿败血症、脑膜炎等<sup>[8-9]</sup>。引起奶牛乳房炎主要感染菌株为乳房链球菌(*S. uberis*)、无乳链球菌(*S. agalactiae*)和停乳链球菌(*S. dysgalactiae*)<sup>[10]</sup>。随着抗生素的广泛使用,耐药菌株不断出现,给该菌的治疗造成一定的难度<sup>[11]</sup>,有必要研发一种安全、无耐药性的新型疫苗。GapC 蛋白为链球菌表面蛋白,具有 3-磷酸甘油醛脱氢酶活性,在细菌感染组织的过程中发挥重要的信号转导作用<sup>[12]</sup>,具有良好的免疫原性<sup>[13-14]</sup>。小鼠免疫试验证实 GapC 蛋白具有高达 70% 的保护率,优于全菌疫苗 30% 的保护率<sup>[15]</sup>。GapC 在奶牛乳房炎链球菌之间存在交叉免疫保护作用<sup>[16]</sup>。可见,GapC 是很好的疫苗候选蛋白<sup>[17]</sup>。

我们前期对 GapC 蛋白仅进行了原核表达与纯化,对 GapC 蛋白性质缺乏了解,给疫苗的研制带来一些困难。本研究拟借助生物信息学方法,采用多参数预测的方式,对 GapC 蛋白的系统进化关系、理化性质、信号肽、跨膜结构、高级结构,以及优势的 B/T 细胞表位进行预测,并设计 GapC 蛋白的重组表位疫苗分子,以期进一步提高 GapC 蛋白的免疫效果。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

依据 GenBank 公布的奶牛乳房炎感染细菌乳房链球菌 GapC 蛋白序列(登录号为 AAM73771.1),GapC 蛋白共含 336 个氨基酸。氨基酸序列信息如下: MVVKGINGFGRIGRLA FRRIQ-NVEGVEVTRINDLTDPNMLAHLKDYDTTQGRFD-GTVEVKDGGFEVNGNFIKVS AEKDPENIDWATD-GVEIVLEATGFFAKKAAAEKHLHANGAKKVIT-APGGDDVKTVVFNTNHDILDGTETVISGASCTTN-CLAPMAKALQDNFGVKQGLMTTIHAYTG DQMIL-DGPHRGDLRRARAGASNIVPNSTGA AKAIGLVI-PELNGKLDGAAQRVPVPTG SVTELVA VLEKETS V-EEINAAMKAAANDSYGYTEDPIVSSDIIGMAYGS-LF DATQTKVQTV DGNQLVKVVS WYD NEMSYTAQ-

LVRTLEYFAKIAK。后续主要依据该氨基酸序列开展生物信息学分析,以及链球菌重组表位疫苗分子的设计。

### 1.2 GapC 生物信息学分析

利用 DNAMAN、MEGA 软件对 NCBI 已公布的 GapC 蛋白氨基酸序列进行同源性与系统发生分析。GapC 蛋白生化指标、酶切位点预测网站分别为: <http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam> 和 [http://web.expasy.org/peptide\\_cutter/](http://web.expasy.org/peptide_cutter/), 亲水性预测网站为: <http://web.expasy.org/protscale/>, 信号肽、蛋白跨膜结构分别采用 Signal P4.1 软件、TMHMM Serverv.2.0 软件预测,二级结构与三维结构分别采用 SOPMA、Swiss-Model 方法预测,B 细胞抗原表位预测采用在线服务 ABCpred 与 BepiPred 方法,细胞毒性 T 细胞(CTL)抗原表位预测通过 CTLpred 程序预测,辅助 T 细胞(Th)抗原表位预测网站为 <http://www.imtech.res.in/raghava/propred/>。

### 1.3 GapC 重组表位疫苗的设计

将预测获得的 B 细胞和 T 细胞表位进行选择性地拼接,每个表位之间以甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸(GGGG)短肽隔开,以免影响各表位间的抗原性。采用 DNASTAR Protean 软件分析串联表位的排列方式,以各表位相对独立且具有较好抗原性参数的连接方式,作为重组表位疫苗的氨基酸序列,再翻译为核酸序列,最终获得重组表位疫苗基因序列。

## 2 结果与分析

### 2.1 GapC 蛋白氨基酸序列的同源性与系统发生分析

利用 DNAMAN 软件对 NCBI 已公布的 GapC 蛋白氨基酸序列进行同源性分析。结果(图 1)发现:不同细菌的 GapC 蛋白具有较高的同源性;与奶牛乳房炎有关的乳房链球菌、无乳链球菌、停乳链球菌,序列一致性强,具有很高的同源性。通过 MEGA 软件对 GapC 蛋白序列进行系统发生分析,结果(图 2)显示:不同种类的链球菌在进化分支上位置较近,亲缘关系相对于其他细菌更近。因而,GapC 蛋白免疫动物产生的特异性抗体,有可能抵御不同种类链球菌感染,表明 GapC 蛋白可能为不同种类细菌感染提供交叉免疫保护作用。

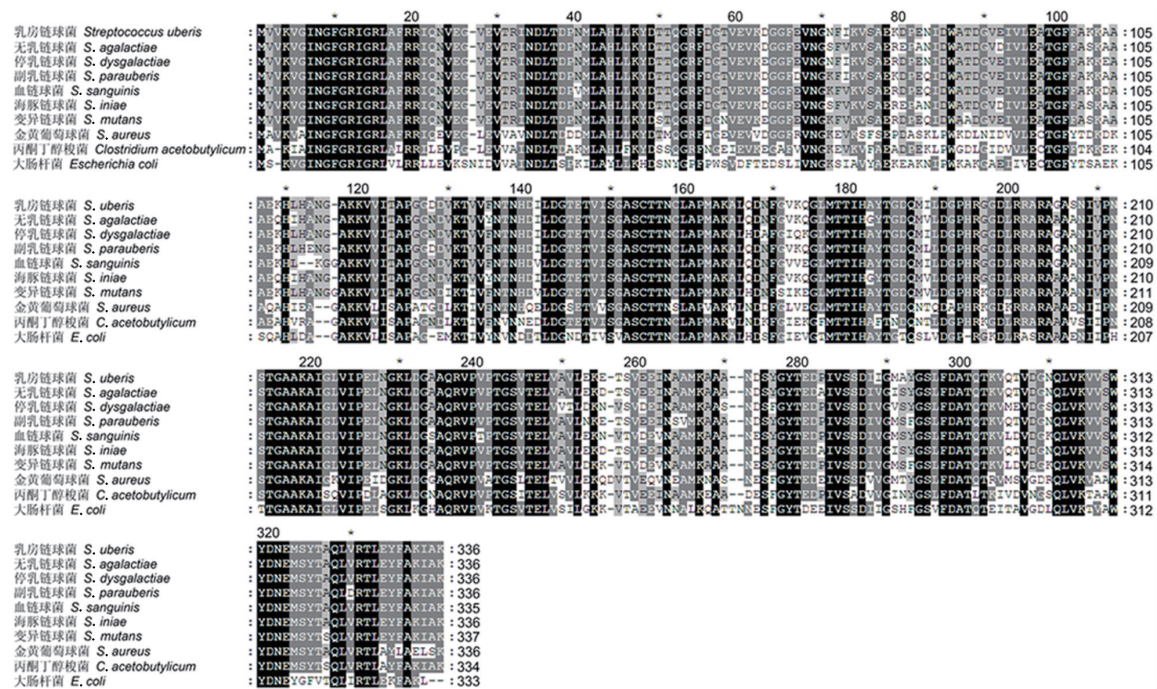


图1 GapC 蛋白氨基酸序列的多重比对

Fig.1 Multiple alignment of amino acid sequences of GapC protein

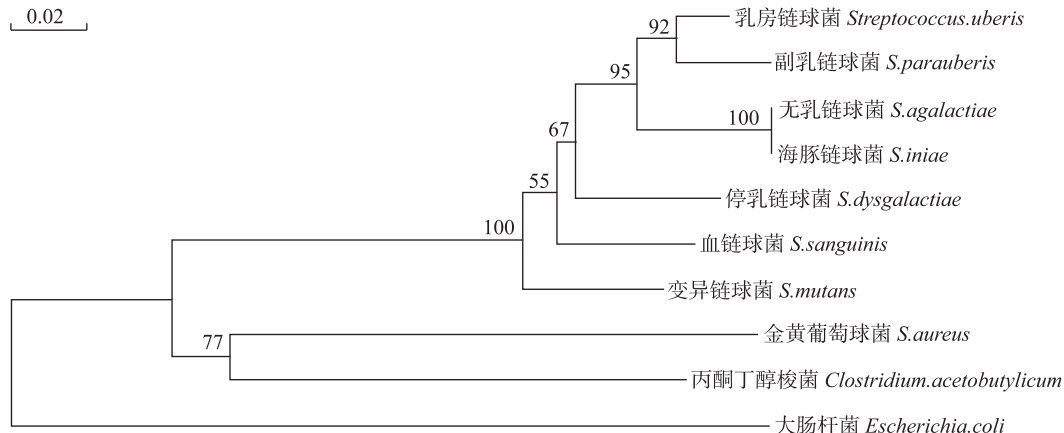


图2 MEGA 软件构建的 GapC 氨基酸序列系统进化

Fig.2 Phylogenetic tree based on GapC amino acid sequences using MEGA

## 2.2 GapC 蛋白生物化学特性预测

将 GapC 蛋白序列通过网站 <http://web.expasy.org/protparam/> 进行预测,结果显示,GapC 分子量为 35 906,等电点为 5.25,脂溶性指数为 78.53,总平均疏水性指数为-0.125,表明 GapC 蛋白为亲水性蛋白。利用在线网站 <http://www.expasy.org/protscale/> 预测 GapC 的氨基酸中疏水性最强的分值为 2.0,最弱为-2.2(图 3)。将 GapC 氨基酸序列通

过网站 [http://web.expasy.org/peptide\\_cutter/](http://web.expasy.org/peptide_cutter/) 分析酶切位点,结果显示 GapC 蛋白存在多个酶切位点,其中蛋白酶 K 酶切位点有 179 个,嗜热菌蛋白酶酶切位点 109 个,胃蛋白酶(pH>2)酶切位点 69 个,低特异性糜蛋白酶酶切位点 56 个。

## 2.3 GapC 蛋白信号肽与跨膜结构预测

将 GapC 氨基酸序列利用软件 SignalP 4.1 分析,预测结果(图 4)显示 GapC 蛋白没有信号肽序





图5 链球菌 GapC 蛋白跨膜区预测

—:C-值; —:S-值; —:Y-值

**Fig.4** Signal peptide prediction for *Streptococcus* GapC protein

c:无规则卷曲,e: $\beta$ -片层,h: $\alpha$ -螺旋,t: $\beta$ -转角。

**Fig.6 Prediction of the secondary structure of *Streptococcus* GapC protein**

列,获得 GapC 可能的 B 细胞表位氨基酸区段为: 57~66,75~88,121~128,191~206,266~279。

## 2.6 GapC 蛋白 T 细胞表位预测

2.6.1 GapC 蛋白 CTL 表位预测 CTL(细胞毒性 T 淋巴细胞)表位预测采用 nHLAPred 方案,分别预测 HLA-A2、HLA-A \* 0201、HLA-A \* 0202、HLA-A \* 0203、HLA-A \* 0205 的分子结合肽,运用神经网络与量化矩阵法(ANN+QM),阈值设为 0.5,综合预测的 5 种分子结合肽重叠序列,获得 GapC 的 CTL 抗原表位为:320~328 位的 YTAQLVRTL(表 3)。

2.6.2 GapC 蛋白 Th 表位预测 Th(T 辅助细胞)表位使用 ProPred 在线程序进行预测,预测类型选择 DRB1-0101、DRB1-0102 和 DRB1-0301 结合肽,综合预测的 3 种结合肽重叠序列,获得 GapC 蛋白可能的 Th 抗原表位为:197~205 位的 LRRARAGAS(表 4)。



图 7 链球菌 GapC 蛋白三级结构预测

Fig. 7 Prediction of tertiary structure of *Streptococcus* GapC protein

表 1 ABCpred 方法预测链球菌 GapC 蛋白 B 细胞表位

Table 1 Prediction of B cell epitopes for *Streptococcus* GapC protein by ABCpred method

分析指标	分析结果							
肽段位置	191~206	281~296	73~88	57~72	117~132	266~281	139~154	124~139
分值	0.91	0.90	0.89	0.89	0.89	0.88	0.88	0.86

表 2 BepiPred 方法预测链球菌 GapC 蛋白 B 细胞表位

Table 2 Prediction of B cell epitopes for *Streptococcus* GapC protein by BepiPred method

预测方法	肽段位置
BepiPred	49~66 75~88 121~128 190~215 227~243 264~279 296~303

## 2.7 GapC 蛋白重组抗原表位的设计

依据预测获得的 GapC 蛋白的 B 细胞和 T 细胞表位,进行不同组合排列,并以 GGGG 氨基酸作为多肽间接头连接。采用 DNASTAR Protean 软件,将 B 细胞表位设置为 epitope1~epitope5,CTL 表位设置为 epitope6,Th 表位设为 epitope7,分析线性表位的各种排列方式,结果发现:epitope3-epitope1-epitope6-epitope7-epitope2-epitope4-epitope5 排列的重组多表位间相对独立,抗原性参数较好(图 8)。设计的表位疫苗多肽序列为:TAPGGDDVGGGGT-VEVKDGGFEGGGGYTAQLVRTLGGGGLRRARAG-ASGGGSAEKDPENIDWATDGGGPPHRGGDLRR-ARAGASNGGGGAANDSYGYTEDPIV(下划线为柔性肽序列)。翻译为核酸序列,即获得的 GapC 蛋白

表 3 链球菌 GapC 蛋白 CTL 抗原表位预测

Table 3 Prediction of CTL epitopes for *Streptococcus* GapC protein

等位基因	多肽排序	肽段位置	多肽序列
HLA-A2	1	283~291	IIGMAYGSL
	2	314~319	YDNEMS
	3	320~328	YTAQLVRTL
HLA-A * 0201	1	228~236	KLDGAAQRV
	1	156~164	CLAPMAKAL
HLA-A * 0202	2	228~236	KLDGAAQRV
	3	306~314	QLVKVVSWEY
HLA-A * 0203	1	320~328	YTAQLVRTL
	1	37~45	DPNMLAHL
	2	120~128	ITAPGGDDV
HLA-A * 0205	3	132~140	VFNTNHDIL
	4	156~164	CLAPMAKAL
	5	233~241	AQRVPVPTG
	6	242~250	SVTELVAVL
	7	320~328	YTAQLVRTL

重组表位序列:ACAGCTCCTGGTGGAGATGATGTT

表 4 链球菌 GapC 蛋白 Th 抗原表位预测

Table 4 Prediction for Th epitopes of *Streptococcus* GapC protein

类型	多肽排序	肽段位置	肽段序列
DRB1-0101	1	21~29	IQNVEGVEV
	2	131~139	VVFNTNHDI
	3	197~205	LRRARAGAS
	4	299~307	VQTVDSGNL
DRB1-0102	1	21~29	IQNVEGVEV
	2	110~118	LHANGAKKV
	3	131~139	VVFNTNHDI
	4	197~205	LRRARAGAS
	5	284~292	IGMAYGSLF
	6	299~307	VQTVDSGNL
DRB1-0301	1	2~10	VVKVINGF
	2	45~53	LKYDTTQGR
	3	92~100	IVLEATGFF
	4	189~194	MILDGPHRG
	5	197~205	LRRARAGAS
	6	207~215	IVPNSTGAA
	7	278~287	IVSSDIHGMA

GGTGGCGGTGGCACAGTTGAAGTTAAAGATGGT-  
GGATTCGAAGGTGGCGGTGGCTACACTGCACAA-  
CTTGTTCTGACTCTTGGTGGCGGTGGCCTTCGTC-  
GTGCTCGTGCTGGTCCAAGCGGTGGCGGTGGCT-  
CTGCTGAAAAAGATCCAGAAAACATTGACTGGG-  
CAACTGACGGTGGCGGTGGCCCACACCGTGCTG-  
GTGACCTTCGTCGTGCTCGTGCTGGTGAAGCAA-

CGGTGGCGGTGGCGCTGCAAACGATTCATACGG-  
ATACACTGAAGACCCAATCGTA(下划线为柔性肽  
的核酸序列)。

### 3 讨论

利用生物信息学方法,可实现对蛋白质理化性质、高级结构、抗原表位的预测,在抗原表位疫苗的设计上起到积极作用,可有效减少试验的盲目性。从而实现针对性地人工合成多肽表位类疫苗,在疫苗研制上应用广泛<sup>[18-19]</sup>。

本研究通过生物信息学方法,对 GapC 氨基酸序列进行同源性与系统发生分析,揭示了不同种类链球菌亲缘关系均较近,尤其是与奶牛乳房炎有关的链球菌亲缘关系更近。表明 GapC 可为不同种类链球菌感染诱发的奶牛乳房炎提供一种交叉免疫保护作用,这为蛋白多肽疫苗的研制奠定了基础。预测发现 GapC 蛋白无信号肽和跨膜结构,表明 GapC 可能是一种细菌表面蛋白。此外,二级结构预测显示 GapC 主要为无规则卷曲结构。无规则卷曲易于产生盘旋、扭曲,暴露于蛋白外层,常含有优势的抗原表位<sup>[20]</sup>,表明 GapC 可能存在较多的候选抗原表位。

本研究对于 B 细胞表位预测主要采用 BepiPred 和 ABCpred 方案。BepiPred 可较好预测蛋白线性表位,原理是利用氨基酸的性质,如亲水性、柔韧性、可及性、极性、暴露表面、转角等,以及隐形马尔可夫模型<sup>[21]</sup>;ABCpred 主要是基于人工神经网络方法,对抗原表位预测的准确率可达 65.9%<sup>[22]</sup>。将这两种

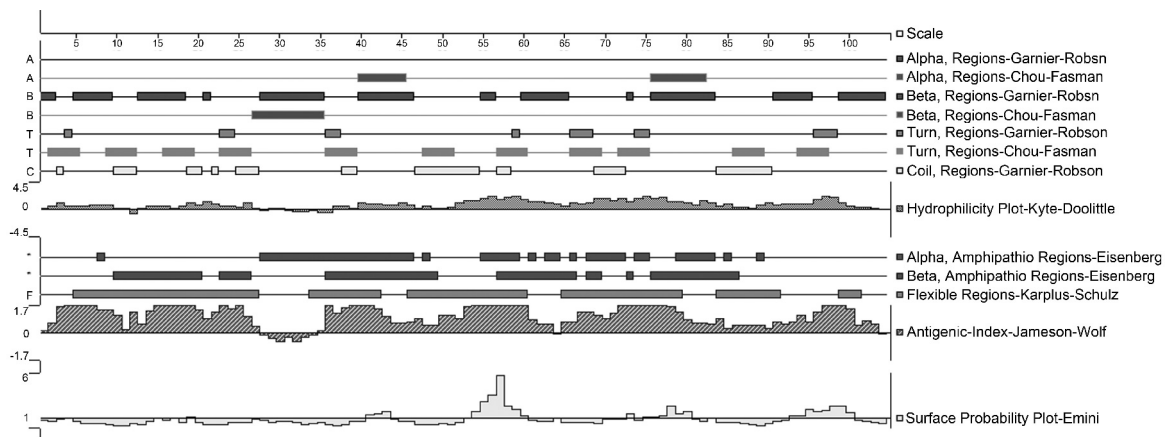


图 8 重组多表位分子的抗原性分析

Fig.8 Antigenicity analysis of recombinant multi-epitopes molecule

方法结合使用,可进一步提高 B 细胞表位预测的准确性。本研究通过 BepiPred 和 ABCpred 方法,确定 GapC 的 B 细胞抗原表位氨基酸区段为:57~66,75~88,121~128,191~206,266~279,为多肽表位疫苗拼接重组奠定了基础。

CTL 抗原表位是与 MHC-I 类分子结合,最终诱发 CTL 免疫应答的短肽,对 CTL 特异性细胞毒作用具有决定性<sup>[23]</sup>。CTL 表位预测的方法较为成熟,目前,已经通过 BIMAS、SYFPEITHI 和 RANKPEP 等方法对 CTL 表位成功进行预测<sup>[19,24]</sup>。王光祥等通过在线服务软件,采用量化矩阵,结合人工神经网络法预测羊口疮病毒 F1L 蛋白 CTL 表位<sup>[23]</sup>;刘祥等也通过该方法对绿脓杆菌 OprF 蛋白进行了 CTL 表位预测<sup>[24]</sup>。本研究利用人工神经网络与量化矩阵法,预测获得 GapC 蛋白的 CTL 表位为:320~328 位的 YTAQLVRTL。

Th 表位通过与 MHC-II 类分子结合,可被相应的 CD4<sup>+</sup>T 细胞识别,从而激活 Th 细胞活性,以辅助 B 细胞产生抗体<sup>[25]</sup>。Th 表位预测方法已经在病毒蛋白、细菌蛋白<sup>[23]</sup>等研究中获得很好的应用。本研究预测获得了 GapC 蛋白的 Th 表位为 197~205 位的 LRRARAGAS。这些 Th 表位可能通过抗原呈递作用,最终激活 Th 细胞活性。

在多肽疫苗接头的选择上,要求构建的蛋白多肽具有一定的分子刚性,各表位间相对独立,并且抗原参数要趋于完美。常用的接头氨基酸序列有 AAY、GGGG、GGGGS、KK 等<sup>[26-28]</sup>。本研究采用 GGGG 氨基酸接头,对 GapC 预测获得的 B 细胞/T 细胞表位进行优化组合,最终获得抗原性较好的重组多肽。然而,新获得的重组多肽需要进一步的试验,验证其免疫保护功能。

## 参考文献:

- [1] 胡巧云,袁小宁,熊毅,等. 2 型猪链球菌 SspA 基因序列及其免疫原性分析[J]. 南方农业学报,2015,46(7):1310-1314.
- [2] NOURIKYAN J, KJOS M, MERCY C, et al. Autophosphorylation of the bacterial tyrosine-kinase CpsD connects capsule synthesis with the cell cycle in *Streptococcus pneumoniae* [J]. PLoS Genet, 2015, 11(9):e1005518.
- [3] 王海丽,徐公义,赵德明. 多重 PCR 检测猪链球菌种及主要致病血清型[J]. 江苏农业科学,2014,42(8):212-213,221.
- [4] ATHEY T B, AUGER J P, TEATERO S, et al. Complex population structure and virulence differences among serotype 2 *Streptococcus suis* strains belonging to sequence type 28 [J]. PLoS One, 2015, 10(9):e0137760.
- [5] 锡林高娃,杜长智,吴金花,等. 科尔沁牛乳腺炎无乳链球菌菌毛岛屿 AP2 基因部分片段克隆及其抗原性预测[J]. 南方农业学报,2015,46(12):2185-2190.
- [6] 李娟,刘丽娜,胡丹,等. 2 型猪链球菌 MocR 家族转录调控因子 SSU0562 基因敲除突变体的构建及毒力分析[J]. 中国生物工程杂志,2015,35(7):8-14.
- [7] 布日额,吴金花,王金良. 奶牛乳腺炎无乳链球菌 sip 与 pgk 双基因主要抗原区域的融合表达[J]. 中国兽医学报,2015,35(8):1228-1231.
- [8] CHEN M, WANG R, LUO F G, et al. *Streptococcus agalactiae* isolates of serotypes Ia, III and V from human and cow are able to infect tilapia [J]. Vet Microbiol, 2015, 180(1):129-35.
- [9] MILLER E W, DANGER J L, RAMALINGA A B, et al. Regulatory rewiring confers serotype-specific hyper-virulence in the human pathogen group A *Streptococcus* [J]. Mol Microbiol, 2015, 98(3):473-489.
- [10] 肖敏,杨峰,王旭荣,等. 奶牛乳房炎无乳链球菌活菌数与吸光度之间相关性研究[J]. 中国畜牧兽医,2014,41(5):271-274.
- [11] 吴金花,布日额,锡林高娃,等. 牛乳腺炎无乳链球菌表面免疫相关蛋白及磷酸甘油酸激酶对奶牛的免疫保护作用[J]. 中国生物制品学杂志,2014,27(8):994-996.
- [12] NAGARAJAN R, PONNURAJ K. Cloning, expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus agalactiae* NEM316 [J]. Acta Crystallogr F Struct Biol Commun, 2014, 70(7):938-941.
- [13] 杜海燕,张霞,程振涛,等. 基于 GapC 基因链球菌 DNA 疫苗构建及其免疫效果[J]. 动物医学进展,2011,32(4):32-35.
- [14] 王凤,汤德元,宋立. 种奶牛乳房炎链球菌的 gapC 基因原核表达及其免疫原性研究[J]. 养殖与饲料,2013(6):10-15.
- [15] 张辉,陈伟. 奶牛乳房炎性乳房链球菌 GapC 重组蛋白的免疫保护性研究[J]. 中国预防兽医学报,2014,36(10):810-812.
- [16] YU L, FAN Z, MA J, et al. Cross-protective effect of a novel multi-antigen-chimeric vaccine against *Streptococcus* and *Staphylococcus aureus* infection in mice [J]. J Med Microbiol, 2014, 63(12):1732-1740.
- [17] 王鹤,梁宏儒,胡旭,等. 无乳链球菌 GapC 蛋白和鼠伤寒沙门菌鞭毛蛋白的融合表达及纯化[J]. 中国生物制品学杂志,2013,26(2):171-175.
- [18] AMAT-UR-RASOOL H, SAGHIR A, IDREES M. Computational prediction and analysis of envelop glycoprotein epitopes of DENV-2 and DENV-3 pakistani isolates: a first step towards dengue vaccine development [J]. PLoS One, 2015, 10(3):e0119854.
- [19] 胡晓波,朱乃硕. 狂犬病毒 MHC 限制性 CTL 与 Th 表位的预测与鉴定[J]. 中国免疫学杂志,2013,29(7):736-740.

- [20] MANZANO-ROMÁN R, DÍAZ-MARTÍN V, OLEAGA A, et al. Identification of protective linear B-cell epitopes on the subolesin/akirin orthologues of *Ornithodoros* spp. soft ticks [J]. Vaccine, 2015, 33(8):1046-1055.
- [21] CHEN H, YANG H W, WEI J F, et al. In silico prediction of the T-cell and IgE-binding epitopes of Pera 6 and Blag 6 allergens in cockroaches [J]. Mol Med Rep, 2014, 10(4):2130-2136.
- [22] SAHA S, RAGHAVA G P. Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network [J]. Proteins, 2006, 65(1):40-48.
- [23] 白雪娟, 赵亚静, 梁 艳, 等. 结核潜伏感染蛋白 Rv1737c B 细胞、CTL 及 Th 表位预测与分析 [J]. 实用临床医药杂志, 2015, 19(3):5-9.
- [24] 刘 祥. 绿脓杆菌外膜蛋白 OprF 的生物信息学分析 [J]. 生物技术, 2015, 25(1):343-348.
- [25] LEROUX L P, DASANAYAKE D, ROMMEREIM L M, et al. Secreted *Toxoplasma gondii* molecules interfere with expression of MHC-II in interferon gamma-activated macrophages [J]. Int J Parasitol, 2015, 45(5):319-332.
- [26] 季晶晶, 李瑾年. 拟态弧菌 OmpU 抗原表位的预测与多表位疫苗分子的设计 [J]. 水生态学杂志, 2008, 1(1):75-79.
- [27] 石晓妮, 窦永喜, 张海瑞, 等. 小反刍兽疫病毒 H 和 F 蛋白多抗原表位的表达及其反应原性 [J]. 中国兽医科学, 2011, 41(5):474-478.
- [28] 董 林, 王艳萍, 沈志强, 等. 猪圆环病毒 2 型多表位串联体诱导表达及其免疫活性 [J]. 中国兽医学报, 2014, 34(11):1716-1720.

(责任编辑:陈海霞)