

人肠道病毒 71 型和柯萨奇病毒 A16 型 B 细胞 线性表位的生物信息学预测

高柳莺, 祝 苗, 戎 浩, 董长征*

(宁波大学 医学院, 浙江 宁波 315211)

摘要: 发展了人肠道病毒 B 细胞线性表位(简称线性表位)的生物信息学预测算法, 系统性地预测和比较了人肠道病毒 71 型(Enterovirus 71, EV71)和柯萨奇病毒 A16 型(Coxsackievirus A16, CVA16)的线性表位. 结果显示: EV71 和 CVA16 结构蛋白(Viral Protein, VP)上都有 16 个线性表位, 2 种肠道病毒的线性表位的位置高度一致, 但氨基酸序列保守性较低, 大多数表位都存在至少 3 个氨基酸残基的差异, 提示 2 种病毒的线性表位具有血清型特异性, 这很可能是两者不能交叉反应的原因. 线性表位主要分布在 β 链之间的环上和 C-末端, 分别有 13 个(81.3%)和 2 个(12.5%)表位. 与文献报道相比较, 16 个线性表位中, 分别有 6 个(37.5%)EV71 和 12 个(75%)CVA16 的表位已被实验验证. 特别是实验研究重点关注的 VP1, 6 个预测表位中, 分别有 4 个(66.7%)EV71 的预测表位和 5 个(83.3%)CVA16 的预测表位已被实验所验证. 说明算法具有较高的预测可靠度. 线性表位的实验研究主要集中在 VP1, 预测结果提示 VP2 和 VP3 也能形成表位, 应该加以重视. 生物信息学算法通过预测和筛选潜在的线性表位, 能够大大降低实验负荷, 为包括 EV71 和 CVA16 在内的人肠道病毒的研究提供有力支持. 对肠道病毒线性表位的预测, 有助于更好地监测和预警手足口病疫情, 辅助疫苗的研发和准备.

关键词: 肠道病毒 71 型; 柯萨奇病毒 A16 型; B 细胞线性表位; 抗原表位; 生物信息学; 手足口病
中图分类号: R183 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-5132 (2019) 02-0054-07

手足口病是一种由多种人肠道病毒引起, 以发热和手、足、口腔等部位出现疱疹为主要表现的儿童常见传染病^[1]. 手足口病最常见的病原体为人肠道病毒 71 型(Enterovirus 71, EV71)和柯萨奇病毒 A 组 16 型(Coxsackievirus A16, CVA16). CVA16 感染通常只造成轻症病例, 危害较小, 而 EV71 感染不仅造成轻症病例, 还能造成重症和死亡病例^[2-3]. 成熟肠道病毒颗粒的衣壳由 60 个亚单位构成, 每个亚单位包含 4 种结构蛋白(Viral Protein, VP), 分别是 VP1~VP4. 其中 VP4 位于衣壳的内侧与病毒 RNA 相连接, VP1~VP3 组成病毒衣壳, 并暴露在病毒颗粒的表面, 因此病毒的抗原表位主要位于

VP1~VP3 上^[1].

抗原表位指抗原分子能够被 B 细胞受体、T 细胞受体或抗体特异性结合的一段多肽序列, 通常由 5~17 个氨基酸残基组成^[4]. 抗原表位根据其结构特点分为线性表位(由连续性线性排列的短肽构成, 又称顺序表位)和构象表位(由不连续的短肽或氨基酸残基在空间上形成的具有特定构象的结构). 其中, B 细胞线性表位(简称线性表位)是病毒衣壳蛋白与 B 细胞表面受体或抗体特异性结合的多肽, 通过 B 细胞介导体液免疫, 在重组疫苗和诊断试剂的研发中具有重要意义, 因此特别受研究者的重视^[5-6].

收稿日期: 2018-07-24.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://journal.lg.nbu.edu.cn/>

基金项目: 浙江省基础公益研究计划项目 (LGF18C060001); 浙江省教育厅科研项目 (Y201533182); 宁波市自然科学基金 (2018A610240); 宁波大学研究生科研创新基金; 宁波大学大学生科研创新计划 (2018SRIP1913, 2018SRIP1916).

第一作者: 高柳莺 (1992-), 女, 浙江嘉兴人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 生物信息学. E-mail: 854709337@qq.com

*通信作者: 董长征 (1978-), 男, 浙江丽水人, 博士/副教授, 主要研究方向: 生物信息学. E-mail: dongchangzheng@nbu.edu.cn

线性表位的实验鉴定方法主要为肽扫描技术(Peptide Scanning)^[1,7]和表位作图(Epitope Mapping)^[1,8]。肽扫描首先合成相互重叠的覆盖整个抗原蛋白的短肽(例如每个肽段包含15个氨基酸残基,其中12个残基与相邻肽段重复),通过免疫实验寻找具有抗原性的肽段,再根据肽段之间的氨基酸残基的重叠关系来确认表位的具体位置^[1,7]。表位作图则将一系列截断的重叠肽段通过融合蛋白等形式进行表达,再通过免疫实验寻找具有抗原性的肽段^[1,8]。肽扫描和表位作图需要合成覆盖整个结构蛋白的肽库,再逐一进行免疫实验,工作量相当庞大,因此可以通过生物信息学方法预测和筛选潜在的表位,供实验进一步验证。

本文发展了一种人肠道病毒线性表位的生物信息学预测算法,并应用该算法对EV71和CVA16的线性表位进行了系统性的预测和比较。

1 材料与方法

1.1 EV71 和 CVA16 线性表位的生物信息学预测算法

线性表位预测算法分为以下4个步骤:

(1)选择EV71和CVA16的代表株,从NCBI Nucleotide数据库下载氨基酸序列,从RCSB PDB数据库下载三级结构文件。选择已经测定三级结构的病毒株EV71/Fuyang.Anhui.P.R.C/17.08/1(Accession ID: EU703812)和Ningbo.CHN/028-2/2009(Accession ID: JQ354992)分别作为EV71和CVA16的代表株。EV71代表株于2008年从安徽省阜阳市分离,基因型为C4;CVA16代表株于2009年从浙江省宁波市分离,基因型为B1a。病毒株的结构蛋白的氨基酸序列从NCBI Nucleotide数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>)下载。结构蛋白的三级结构文件(PDB ID分别为EV71: 3VBS, CVA16: 5C4W)从RCSB PDB数据库(<http://www.rcsb.org>)下载。三级结构文件中包含二级结构信息,下文将提取相关信息进行分析。

(2)计算肽段跟抗原表位密切相关的6种特征。计算肽段跟抗原表位密切相关的理化、结构和生物学特征,包括亲水性、可及性、可塑性、 β 转角、抗原倾向性和隐马尔可夫特征。亲水性:疏水性氨基酸残基一般埋在蛋白质的内部,亲水性氨基酸

残基则位于表面,因此亲水性氨基酸残基更易于形成抗原表位。可及性:反映肽段被溶剂分子接触的可能性,可及性越大,与抗体结合的可能性越高。可塑性:抗原表位所处的肽链骨架具有一定的活动性,可塑性越大越有助于与抗体结合。 β 转角:蛋白质的 β 转角是较松散的二级结构,易于发生扭曲、盘旋并突出到蛋白质表面,有利于与抗体结合。抗原倾向性:对数据库中已知结构和抗原表位的蛋白质进行统计分析,计算出每个氨基酸残基的抗原倾向性,抗原倾向性较大的肽段成为抗原表位的概率较高。隐马尔可夫特征:隐马尔可夫模型可以根据氨基酸序列分析肽段的隐马尔可夫特征。分别采用Parker亲水性算法^[9]、Emini表面可及性算法^[10]、Karplus & Schulz可塑性算法^[11]、Chou & Fasman β 转角算法^[12]、Kolaskar & Tongaonkar抗原性算法^[13]和BepiPred算法^[14]来计算这些理化、结构和生物学特征。这些算法均可通过IEDB(<http://www.iedb.org>)数据库的在线计算工具实现。计算所用的参数和阈值按照默认值设置。

(3)采用投票法进行线性表位预测,综合这6种肽段的属性特征,采用投票法进行预测。将3种及以上属性特征值都超过阈值的肽段预测为线性表位。

(4)筛选暴露在病毒衣壳表面的肽段作为最终预测的线性表位。通过上述步骤预测到的线性表位仍有可能位于衣壳的内部,这部分肽段作为线性表位的实际意义较弱,需进一步被剔除。通过RIVEM软件^[15]绘制病毒衣壳表面结构图,筛选暴露在病毒衣壳表面的肽段作为最终预测的线性表位。筛选标准为:至少有3个氨基酸残基暴露在衣壳表面结构图上的肽段才被认定为暴露的肽段。

1.2 预测准确性估计

通过文献检索获取已报道的实验结果,将生物信息学预测结果与已知的实验结果进行对比,可以估计预测可靠度。之前我们已总结了实验报道的EV71线性表位^[4]。

1.3 EV71 和 CVA16 结构蛋白的一级结构和二级结构比较

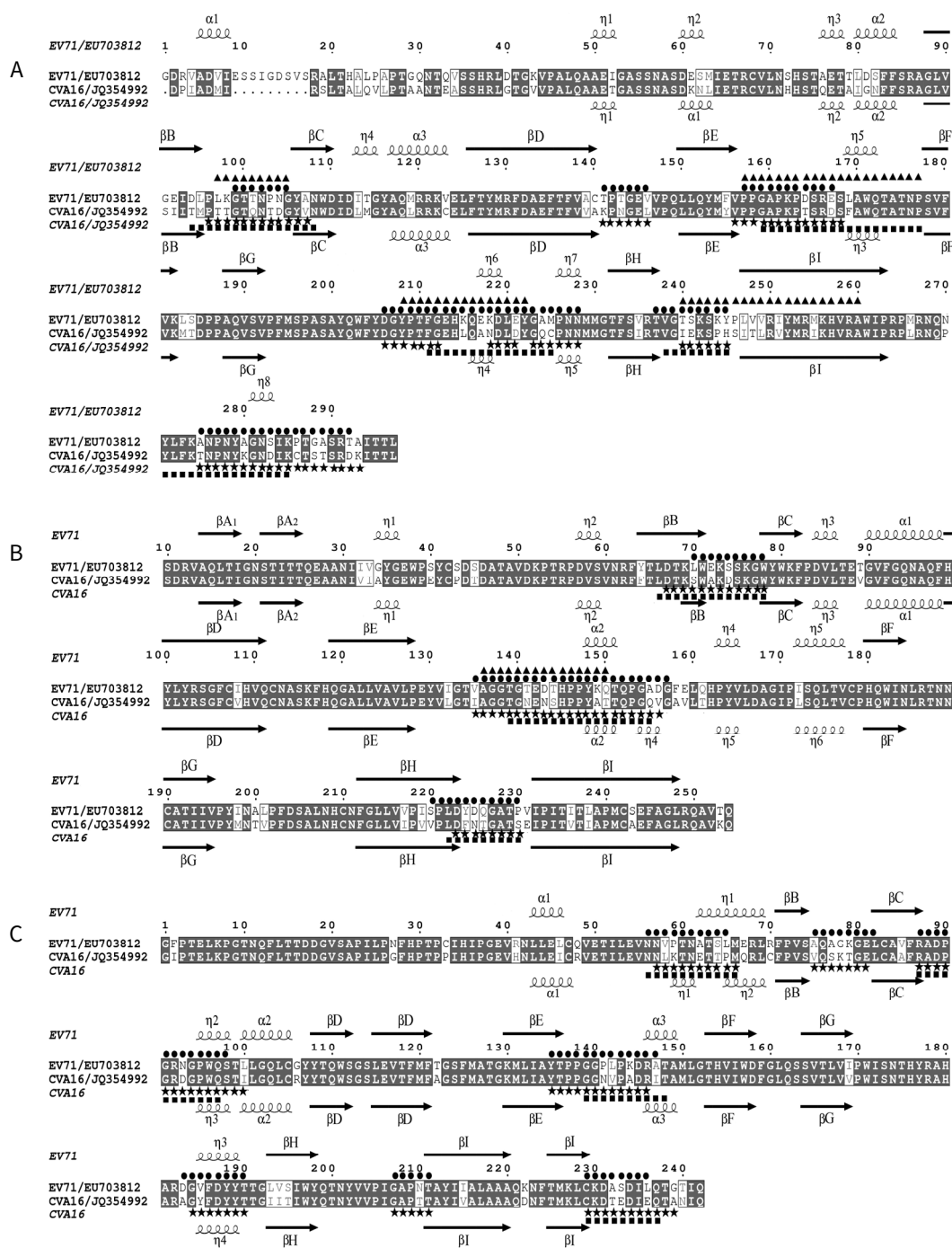
通过比较EV71和CVA16结构蛋白的一级结构和二级结构,可以确定线性表位的结构基础。利用Clustal X软件^[16]比对EV71和CVA16结构蛋白

的一级结构,即氨基酸序列;再将序列比对结果和三级结构文件一起上传到在线工具 ESPrpt (<http://esprpt.ibcp.fr>),展示 EV71 和 CVA16 结构蛋白的一级结构和二级结构的比较结果。所有参数均采用默认设置。

2 结果

2.1 EV71 和 CVA16 结构蛋白的一级结构和二级结构的基本特征

图 1 注释了 EV71 和 CVA16 结构蛋白的一级



A、B 和 C 分别注释了结构蛋白 VP1、VP2 和 VP3; → 代表 β-片层, 箭头之间的区域为环; S 代表螺旋; 圆形和三角形分别代表 EV71 的预测表位和实验表位, 五角星和正方形分别代表 CVA16 的预测表位和实验表位。

图 1 EV71 和 CVA16 线性表位的一级结构和二级结构比较

结构和二级结构. 从图 1 可知, EV71 和 CVA16 结构蛋白的核心二级结构是由 8 条反向平行排列的 β 链(β strand, 分别是 β B- β I)组成的 β 片层结构(β sheet). β 片层进一步折叠成的结构域(Motif)称为 β 桶(β barrel), 构成了结构蛋白三级结构的基本框架. β 链之间的区域称为环(Loop), 分别为 BC 环、CD 环等. 结构蛋白上还散在分布着许多较短的螺旋结构. VP2 在 N-端还有额外的 β A.

EV71 和 CVA16 的二级结构几乎完全相同, 尤其是 β 链和环的长度几乎完全相等. EV71 和 CVA16 的一级结构保守性(氨基酸序列同源性)与其所在的二级结构密切相关. β 链的保守性较高, VP1~VP3 的同源性分别达到 81.4%、84.9%和 88.7%; 环的保守性较低, 同源性分别只有 74.1%、79.7%和 83.5%. 正因为如此, 环是最容易出现线性表位的二级结构.

2.2 EV71 和 CVA16 线性表位的预测结果

EV71 和 CVA16 线性表位的预测结果见表 1

表 1 EV71 和 CVA16 线性表位的预测结果

结构蛋白	生物信息学预测结果		二级结构	文献报道的实验结果	
	EV71 ^a	CVA16		EV71 ^b	CVA16
VP1	99~105	96~107	BC 环	SP32 ^[17-18]	PEP32 ^[23-24]
	141~146	141~146	DE 环		
	157~167	156~168	EF 环	SP55 ^[7]	PEP55 ^[23]
		206~212			
	206~228	218~221	GH 环	SP70 ^[7,19-20]	PEP71 ^[23-24]
		223~228			
	237~245	240~245	HI 环	4E8 ^[21]	VP11 ^[24]
VP2	275~292	275~293	C-末端		PEP91 ^[23-24]
	70~78	67~78	BC 环		VP2B ^[24]
	135~157	135~156	EF 环	VP2-28 ^[19,22]	VP2C ^[24-26]
VP3	220~230	223~230	HI 环		VP2D ^[24]
	56~65	57~66	N-末端		VP3B ^[24]
	75~82	75~81	BC 环		
	87~98	87~100	CD 环		VP3C ^[24]
	135~147	135~146	EF 环		VP3D ^[24]
	183~190	184~190	GH 环		
	207~211	207~211	HI 环		
	229~236	229~239	C-末端		VP3E ^[24]

注: ^a 线性表位预测结果用肽段在结构蛋白上的位置指示; ^b4E8 为文献中的抗体名称, 其余均为文献命名的表位名称.

和图 1. 图 1 中氨基酸序列上方的圆和下方的五角星分别代表了 EV71 和 CVA16 的预测结果(预测表位). 16 个预测表位中, 6 个分布在 VP1 上, 7 个分布在 VP3 上, 只有 3 个分布在 VP2 上. 进一步对比 EV71 和 CVA16 的线性表位可以发现, 线性表位的分布具有 2 个重要特征: (1)首先线性表位的分布具有二级结构偏好性, 大多数的线性表位都分布在环上(13/16, 81.3%); 其次是 C-末端(2/16, 12.5%)和 N-端(1/16, 6.3%); 也可以反过来理解, 超过半数环都能够成为表位(13/21, 61.9%), 3 个 C-末端中有 2 个(VP1 和 VP3)分布了表位, 而没有分布表位的 VP2 几乎没有 C-末端; N-末端未暴露在衣壳表面, 所以相对不易形成表位. (2)绝大多数 EV71 的线性表位在结构蛋白上的位置与 CVA16 高度一致, 但肽段的保守性(VP1、VP2 和 VP3 分别为 66.7%、67.4%和 76.1%)比环的保守性还低. 16 个预测表位中, 没有 1 个表位完全保守, 其中 12 个(75%)表位含有至少 3 个氨基酸突变, 这提示大多数的表位可能具有血清型特异性.

2.3 EV71 和 CVA16 线性表位的预测准确性

将已报道的线性表位的实验结果(实验表位)也标注在图 1 上. 氨基酸序列上方的三角形代表 EV71 的实验表位, 下方的正方形代表 CVA16 的实验表位. 对比预测表位和实验表位, 可发现很多预测表位都被实验表位所验证, 16 个 EV71 的预测表位, 其中 6 个(37.5%)已被实验表位所验证^[7,17-22], 16 个 CVA16 的预测表位, 则大部分(12/16, 75%)已被实验表位所验证^[23-26]. 特别是实验研究重点关注的 VP1, 6 个预测表位中分别有 4 个(66.7%)EV71 预测表位和 5 个(83.3%)CVA16 预测表位已被实验所验证, 说明算法具有较高的预测可靠度. 未被预测到的 3 个 EV71 实验表位, 全部位于 VP1 的 N-端, 埋在蛋白质的内部, 并未暴露在衣壳表面, 因此被预测算法所排除. Gong 等^[27]和 Lyu 等^[28]利用人工表达系统构建 EV71 和 CVA16 的病毒样颗粒(Virus-like Particles, VLP), 测定其三维结构, 发现大多数实验表位确实都暴露在 VLP 的衣壳表面, 这也提示这些线性表位的理化和结构学特征支持它们发挥抗原表位的作用. 在预测结果中, 表位 VP1-206-228(EV71)就是 EV71 已经被公认并广泛应用的线性表位 SP70^[7,19-20]. 另外, VP1-99-105

(EV71)就是已知的线性表位 SP32^[17-18], VP2-135-157(EV71)就是已知的线性表位 VP2-28^[19,22], 而 VP1-157-167(EV71)与已知的线性表位SP55部分重叠^[7]. 而EV71较少研究的VP2和VP3,也有不少预测表位被CVA16实验表位所验证,特别是与EV71表位VP2-28相对应的VP2C也得到广泛验证^[24-26],这提示应该更加重视传统上常被抗原表位研究所忽略的VP2和VP3.

3 讨论

肠道病毒的线性表位易于合成和编辑,通过诸如融合蛋白^[5]和腺病毒^[6]之类的载体表达后,能够用于制作重组疫苗和诊断试剂.例如,Huang等^[5]以日本脑炎病毒(Japanese Encephalitis Virus, JEV)为载体构建SP70重组疫苗,发现其具有JEV和EV71的双重保护作用.传统的线性表位实验鉴定方法都需要合成覆盖整个结构蛋白的肽库,再逐一进行免疫实验,工作量相当庞大^[7].生物信息学算法根据肽段的理化、结构和生物学等特征,预测潜在的线性表位,供实验进一步验证,能够大大降低实验负荷.

现有的生物信息学预测算法过于粗糙,只是简单地根据某个或若干个氨基酸的理化特征进行建模^[29-30],忽略了肠道病毒的生物特征,预测的效果必然不够理想.本文发展的算法具有以下几个特点:(1)通过投票法全面整合了肽段的6种理化、结构和生物学特征,算法所利用的信息量更大.(2)只有充分暴露在衣壳表面的线性表位才具有较强的抗原性,更具有实际意义,算法根据这个重要生物特征进行肽段的筛选.(3)将具有亲缘关系的2种肠道病毒的预测表位进行比较,分析其基本特征,可以利用这种进化关系来排除潜在的假阳性结果.由于肠道病毒线性表位的研究开展较少,也没有真阳性和真阴性的金标准,因此本文采用与实验表位相对比的方法来估计预测可靠度.从比较结果来看,生物信息学算法具有较高的预测可靠度,特别是实验研究关注较多的VP1,预测表位与实验表位高度相符.人肠道病毒之间具有高度的亲缘性,其一级结构、二级结构和三级结构也都比较相似,因此算法也能够应用到其他人肠道病毒的线性表位预测中.本研究发现EV71和CVA16的线性

表位具有2个重要分布特征:(1)2种肠道病毒的线性表位具有相似的分布规律;(2)线性表位和构象表位的分布存在密切的联系,几乎所有重要的线性表位都是构象表位的一部分(本文未涉及到这部分内容).这2个特征可用于改进预测算法,提高预测结果的特异性.

传统观念认为VP1在衣壳上比VP2和VP3更加暴露,更可能形成抗原表位^[7].因此,大多数的实验研究和生物信息学预测都集中在VP1,这在表1中也得到了体现.本研究表明,不只是VP1上的肽段,VP2和VP3上的肽段也都有可能成为线性表位.实际上,VP2-28就是VP2上一个重要表位,其紧邻核心表位SP70,共同形成了抗原表位簇.这提示应该更加重视对VP2和VP3上的线性表位进行实验研究.

EV71和CVA16的氨基酸序列的一致性达到80%,但是单克隆抗体均不能交叉反应^[31-32],而且EV71疫苗也不能交叉保护CVA16的感染^[2-3].通过一级结构和二级结构的比较,我们发现EV71和CVA16线性表位的位置分布高度一致,但序列保守性较低,大多数的表位之间存在至少3个氨基酸突变,提示EV71和CVA16的线性表位具有血清型特异性,影响了交叉反应的发生.这也提示,通过寻找2种肠道病毒的交叉表位来发展同时保护EV71和CVA16的疫苗,这种策略可能非常困难,更合理的策略是发展串联各自线性表位的重组疫苗.另外,目前尚无证据提示抗原表位与肠道病毒感染的临床病情(例如重症或轻症)直接相关.但抗体与抗原表位的结合会影响受体与病毒衣壳的结合,可能干扰了病毒感染的人体组织部位,从而影响病情,这方面需要进一步探索.

综上,本文发展了一种人肠道病毒线性表位的生物信息学预测算法,能够为肠道病毒线性表位的研究提供有力的支持.

参考文献:

- [1] 刘志芳, 桂娟娟, 华启航, 等. 人肠道病毒71型与手足口病的分子流行病学及其分子进化[J]. 遗传, 2015, 37(5):426-435.
- [2] Li R, Liu L, Mo Z, et al. An inactivated enterovirus 71 vaccine in healthy children[J]. New England Journal of Medicine, 2014, 370(9):829-837.

- [3] Zhu F, Xu W, Xia J, et al. Efficacy, safety, and immunogenicity of an enterovirus 71 vaccine in China[J]. *New England Journal of Medicine*, 2014, 370(9):818-828.
- [4] 祝苗, 张添方, 高柳莺, 等. 人肠道病毒 71 型抗原表位的研究进展[J]. *中国细胞生物学学报*, 2017, 39(9): 1243-1250.
- [5] Huang Y, Liao J, Yen L, et al. Japanese encephalitis virus replicon-based vaccine expressing enterovirus-71 epitope confers dual protection from lethal challenges[EB/OL]. [2018-05-10]. <https://jbiomedsci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12929-015-0181-8>.
- [6] Xue C, Tian X, Li X, et al. Construction and characterization of a recombinant human adenovirus type 3 vector containing two foreign neutralizing epitopes in hexon[J]. *Virus Research*, 2014, 183(7):67-74.
- [7] Foo D G, Alonso S, Phoon M C, et al. Identification of neutralizing linear epitopes from the VP1 capsid protein of enterovirus 71 using synthetic peptides[J]. *Virus Research*, 2007, 125(1):61-68.
- [8] Lim X, Jia Q, Khong W, et al. Characterization of an isotype-dependent monoclonal antibody against linear neutralizing epitope effective for prophylaxis of enterovirus 71 infection[EB/OL]. [2018-05-10]. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pon.0029751>.
- [9] Parker J M, Guo D, Hodges R S. New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: Correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites[J]. *Biochemistry*, 1986, 25(19):5425-5432.
- [10] Emini E A, Hughes J V, Perlow D S, et al. Induction of hepatitis a virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide[J]. *Journal of Virology*, 1985, 55(3): 836-839.
- [11] Karplus P A, Schulz G E. Prediction of chain flexibility in proteins[J]. *Naturwissenschaften*, 1985, 72(4):212-213.
- [12] Chou P Y, Fasman G D. Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence[J]. *Advances in Enzymology & Related Areas of Molecular Biology*, 1978, 47(6):45-148.
- [13] Kolaskar A S, Tongaonkar P C. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens[J]. *FEBS Letters*, 1990, 276(1):172-174.
- [14] Larsen J E, Lund O, Nielsen M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes[EB/OL]. [2018-05-10]. <https://immunome-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/1745-7580-2-2>.
- [15] Xiao C, Rossmann M G. Interpretation of electron density with stereographic roadmap projections[J]. *Journal of Structural Biology*, 2007, 158(2):182-187.
- [16] Larkin M A, Blackshields G, Brown N P, et al. Clustal W and clustal X version 2.0[J]. *Bioinformatics*, 2007, 23(21): 2947-2948.
- [17] Foo D G, Ang R X, Alonso S, et al. Identification of immunodominant VP1 linear epitope of enterovirus 71 (EV71) using synthetic peptides for detecting human anti-EV71 IgG antibodies in western blots[J]. *Clinical Microbiology & Infection*, 2008, 14(3):286-288.
- [18] Zhang J, Dong M, Jiang B, et al. Antigenic characteristics of the complete and truncated capsid protein VP1 of enterovirus 71[J]. *Virus Research*, 2012, 167(2):337-342.
- [19] Liu C, Chou A, Lien S, et al. Identification and characterization of a cross-neutralization epitope of enterovirus 71[J]. *Vaccine*, 2011, 29(26):4362-4372.
- [20] Ku Z, Ye X, Shi J, et al. Single neutralizing monoclonal antibodies targeting the VP1 GH loop of enterovirus 71 inhibit both virus attachment and internalization during viral entry[J]. *Journal of Virology*, 2015, 89(23):12084-12095.
- [21] Chang G, Luo Y, Wu X, et al. Monoclonal antibody induced with inactivated EV71-Hn2 virus protects mice against lethal EV71-Hn2 virus infection[EB/OL]. [2018-05-10]. <https://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-422X-7-106>.
- [22] Xu L, He D, Li Z, et al. Protection against lethal enterovirus 71 challenge in mice by a recombinant vaccine candidate containing a broadly cross-neutralizing epitope within the VP2 EF loop[J]. *Theranostics*, 2014, 4(5):498-513.
- [23] Shi J, Huang X, Liu Q, et al. Identification of conserved neutralizing linear epitopes within the VP1 protein of coxsackievirus A16[J]. *Vaccine*, 2013, 31(17):2130-2136.
- [24] 高孟, 倪红霞, 朱莲, 等. 柯萨奇病毒 A16 型衣壳蛋白 VP1-VP3 的 B 淋巴细胞线性抗原表位预测与确定[J]. *中华临床感染病杂志*, 2015, 8(6):543-548.
- [25] Kiener T K, Jia Q, Lim X, et al. Characterization and specificity of the linear epitope of the enterovirus 71 VP2 protein[EB/OL]. [2018-05-10]. <https://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-422X-9-55>.
- [26] Xu L, He D, Yang L, et al. A broadly cross-protective vaccine presenting the neighboring epitopes within the VP1 GH loop and VP2 EF loop of enterovirus 71[EB/OL]. [2018-05-10]. <https://www.nature.com/articles/srep12973>.

- [27] Gong M, Zhu H, Zhou J, et al. Cryo-electron microscopy study of insect cell-expressed enterovirus 71 and coxsackievirus A16 virus-like particles provides a structural basis for vaccine development[J]. *Journal of Virology*, 2014, 88(11):6444-6452.
- [28] Lyu K, He Y, Li H, et al. Crystal structures of yeast-produced enterovirus 71 and enterovirus 71/coxsackievirus A16 chimeric virus-like particles provide the structural basis for novel vaccine design against hand-foot-and-mouth disease[J]. *Journal of Virology*, 2015, 89(12):6196-6208.
- [29] 蒋建平, 王来, 李宜川, 等. 肠道病毒 71 型 VP1 外壳蛋白二级结构及 B 细胞表位预测[J]. *山东医药*, 2009, 49(35):10-12.
- [30] 俞海洋, 陈伟, 倪德群, 等. 肠道病毒 71 型六安地区分离株 VP1 基因的生物信息学分析及 B 细胞表位预测[J]. *安徽医科大学学报*, 2012, 47(3):233-240.
- [31] Chen Y, Li C, He D, et al. Antigenic analysis of divergent genotypes human enterovirus 71 viruses by a panel of neutralizing monoclonal antibodies: Current genotyping of EV71 does not reflect their antigenicity[J]. *Vaccine*, 2013, 31(2):425-430.
- [32] Ye X, Ku Z, Liu Q, et al. Chimeric virus-like particle vaccines displaying conserved enterovirus 71 epitopes elicit protective neutralizing antibodies in mice through divergent mechanisms[J]. *Journal of Virology*, 2014, 88(1):72-81.

A bioinformatics method for prediction of B cellular linear epitopes for human enterovirus 71 and Coxsackievirus A16

GAO Liu-ying, ZHU Miao, RONG Hao, DONG Chang-zheng*
(Medical School, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: A bioinformatics method was developed to predict the B cellular linear epitopes for human enteroviruses. The linear epitopes of enterovirus 71 (EV71) and coxsackievirus A16 (CVA16) were systematically predicted and compared. The results show that both EV71 and CVA16 had 16 linear epitopes in structural proteins (VPs). Although the positions of the epitopes were highly accordant, the homologies of the amino acid sequences were less conservative and there were at least three mutations for the majority of the epitopes. This implied that the epitopes were serotype-specific and caused the low titers of cross-reactivity. The loops between the β strands (13/16, 81.3%) and the C-terminals (2/16, 12.5%) were discovered as being enrichment of the epitopes. Among 16 epitopes, 6 (37.5%) of EV71 epitopes and 12 (75%) of CVA16 epitopes had been verified by the previously reported experiments. According to 6 predicted epitopes in VP1, 4 of EV71 (66.7%) and 5 of CVA16 (83.3%) had been verified respectively. The evidences showed that the bioinformatics prediction method was reliable. Since most of previous studies focused on the epitopes of VP1, the current studies suggested that more studies should focus on VP2 and VP3. The bioinformatics method could predict and filter the potential epitopes that would reduce the strength of the experiments. It may help the studies on human enteroviruses including EV71 and CVA16. Furthermore, the prediction of the linear epitopes of the enteroviruses could also support the surveillance and the early warning of the breaks of the hand, foot and mouth disease as well as the R&D and preparation of vaccines.

Key words: enterovirus 71 (EV71); Coxsackievirus A16 (CVA16); B cellular linear epitopes; antigenic epitopes; bioinformatics; hand, foot and mouth disease

(责任编辑 史小丽)