

猴 B 病毒囊膜蛋白 gD 的 B 细胞表位预测及鉴定

叶华虎¹, 袁菊芳¹, 刘欢¹, 范玉筠²

(1. 军事医学科学院实验动物中心, 北京 100071; 2. 北京城市学院, 北京 100094)

【摘要】 目的 鉴定猴 B 病毒囊膜蛋白 gD 的抗原表位。**方法** 利用生物信息学分析猴 B 病毒囊膜蛋白 gD 的二级结构、亲水性、表面可及性、抗原性指数以及柔韧性, 得到可能的表位肽段; 再利用合成肽与 B 病毒阳性血清进行 ELISA 验证, 评价表位肽段的特异性和敏感性。**结果** 在 gD 蛋白上预测得到 7 个表位肽段; ELISA 测定结果显示, 4 个肽段 (序列分别为⁴⁶ LPPLEQKTD⁵⁴、¹⁰⁶ RGAPEATRSDA¹¹⁶、²⁹¹ PELAPEERGTSRTPGD³⁰⁶ 和³⁶¹ AVYLVRRRGR³⁷⁰) 可与 B 病毒阳性血清发生免疫学反应, 敏感性在 40% ~ 70% 之间。**结论** B 病毒 gD 蛋白上至少存在 4 个线性化表位。

【关键词】 表位预测; ELISA; 猴 B 病毒; 囊膜蛋白 gD

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 11-0020-07

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.011.005

Prediction and identification of B-cell epitopes on monkey B virus envelope protein gD

YE Hua-hu¹, YUAN Ju-fang¹, LIU Huan¹, FAN Yu-jun²

(1. Laboratory Animal Centre, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China;

2. Beijing City University, Beijing 100094, China)

【Abstract】 Objective To Identify B-cell epitopes on monkey B virus envelope protein gD. **Methods** Base on bioinformatics software, secondary structure, hydrophilicity, surface accessibility, antigenic index and flexibility of monkey B virus envelope protein gD was analysed and some potential peptide epitopes were forecasted. Then, the interactions between synthetic peptides and BV positive sera were detected by Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). At last, The sensitivity and specificity of synthetic peptides was evaluated used 20 samples of Standard sera by ELISA. **Result** Seven epitopes were forecasted by Bioinformatics analysis. Four synthetic peptides, sequence as ⁴⁶LPPLEQKTD⁵⁴, ¹⁰⁶RGAPEATRSDA¹¹⁶, ²⁹¹PELAPEERGTSRTPGD³⁰⁶ and ³⁶¹AVYLVRRRGR³⁷⁰ could be reacted with positive sera pool. The sensitivity of 4 synthetic peptides changed form 40% to 70% and the specificity were 100% for 4 synthetic peptides. **Conclusion** There are at least four linear epitope on B virus gD protein.

【Key words】 Epitope prediction; Enzyme-linked immunosorbent assay; Monkey B virus; Envelope protein gD

表位 (epitope) 又称抗原决定簇 (antigenic determinant, AD), 是病毒、疫苗、致敏原等抗原物质刺激机体产生免疫应答的物质基础。现代免疫学

研究表明, 免疫细胞在与抗原分子的相互作用过程中, 细胞表面受体识别的不是整个抗原分子, 而是抗原分子上的特定部位 (包括线性的, 或是空间结

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (31172276; 31272514)。

[作者简介] 叶华虎 (1970 -), 男, 博士, 副研究员, 专业: 分子病毒学。Email: huahuy512@126.com。

[通讯作者] 叶华虎。

构上相互靠近的多个氨基酸残基)^[1-2]。可见,由异源蛋白活化 B 淋巴细胞产生的抗体仅针对抗原上的特异性表位。随着抗体在疾病诊断、预防、治疗等领域的广泛应用,表位鉴定已成为免疫学研究的热点。

到目前为止,表位研究已形成了多种技术体系,如噬菌体展示肽库技术、肽段扫描技术、合成肽技术、生物信息学预测技术。相较于其他技术体系,生物信息学预测技术具有快速、廉价等明显优势^[3-5]。本实验以在我国恒河猴体内扩增的 B 病毒囊膜蛋白 gD 氨基酸序列为基础,利用生物信息学软件对其二级结构、亲水性、表面可及性、抗原性指数、柔韧性进行分析,筛选可能的表位肽段,再结合合成肽技术,利用 B 病毒阳性血清通过 ELISA 进行验证;最后,以 20 份 B 病毒标准阳性血清评价肽段的敏感性。本实验旨在为猴 B 病毒的防控研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 gD 蛋白 系从我国实验猕猴体内通过 PCR 扩增得到的 gD 基因推导而来,其氨基酸序列如下:该蛋白全长 394 个氨基酸残基,分子量约为 48×10^3 ,与 E2490 标准毒株的同源性为 97.5%。

1MGSGLAAVLL SLAVALARVP AGGGEYVPVE
RSLTRVNPGR FRGAHLPPLE QKTDPPDVRR
VYHVQPFVEN PFQTPSPVAV YYAVLERAC
RSVLLWAPTE AVQVVRGAPE ATRSDARYNL
TVAWYRTSDD CAIPILVMEY AECQYDKPLG
ACPVRNLPRW SFYDSFSATG DDDLGLLMHA
PAFETAGTYV RLVKVNGWVE VTQFIFEHRG
KGPCRYTLPL RILPAACLRA PVFEQGVTV D
AIGMLPRFIP ENQRIVAVYS LQAAGWHGPK
APFTSTLLPP EVVETANVTR PELAPEERGT
SRTPGDEPAP AVAAQLPPNW HVPEASDV TI
QGPAPAPSGH TGAUVGALAG AGLAAGVVVL
AVYLVRRRGR AAGKHVRLPE LLEEAHGPAR
RGAPY394

1.1.2 血清和抗体 B 病毒阳性血清和 B 病毒阴性血清,军事医学科学院实验动物中心保存。

1.1.3 ELISA 检测试剂 氨基酶标板购于 Nunc 公司;其他 ELISA 试剂为湖州英创生物公司产品。

1.1.4 主要仪器 脱色摇床,恒温水浴锅,酶标仪。

1.2 试验方法

1.2.1 B 病毒囊膜蛋白 gD 二级结构预测 利用 DNASTar 软件,以 Chou-Fasman 方法、Karplus-Schulz 方法和 Gamier-Robson 方法对预测 gD 蛋白的二级结构^[6]。

1.2.2 猴 B 病毒囊膜蛋白 gD 基因 B 细胞表位预测 利用 DNASTar 软件,用 Jameson-Wolf 方法对猴 B 病毒囊膜蛋白 gD 基因氨基酸序列抗原性指数区域预测^[7];用 Emini 方法猴 B 病毒囊膜蛋白 gD 基因氨基酸序列表面可及性区域预测^[8],用 Kyte-Doolittle 方法对猴 B 病毒囊膜蛋白 gD 基因氨基酸序列亲水性预测^[8-10]。综合分析将上述几种方法,兼顾各项预测参数对猴 B 病毒囊膜蛋白 gD 基因 B 细胞表位进行预测,并以吴玉章建立的抗原性指数对预测的表位进行综合评判^[11]。

1.2.3 肽段合成 将预测的肽段送南京金斯瑞生物技术有限公司合成。

1.2.4 肽段 ELIS 条件优化 首先以文献报道的已知表位肽(AVYLVRRRGR)为基础进行 ELISA 条件优化,过程简述如下:将合成肽段用灭菌的 PBS 稀释成 1 mg/mL,再用碳酸盐缓冲液(pH 9.6)稀释成不同浓度,稀释液用于包被氨基板;将包被过夜的 ELISA 板用 PBS 洗涤 3 次,加 100 μ L 封闭液(博迈德生物技术公司)于 37 $^{\circ}$ C 封闭 30 min;将 5 份标准阳性血清混合物和 3 份标准阴性血清混合物分别作 5、10、20 倍稀释,加入酶标板,在 37 $^{\circ}$ C 反应 35 min;5 $\times$ 3 min 洗涤;再加入 100 μ L 二抗反应液(用封闭液稀释 HRP 标记的兔抗猴 IgG 到 30000 倍),37 $^{\circ}$ C 反应 35 min;5 $\times$ 3 min 洗涤;再加入 TMB 显色液 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 反应,8 min;最后加入 50 μ L 的 2N H₂SO₄ 终止显色;酶标仪上测定 450 nm 下的 OD 值。比较不同条件(包被量和血清稀释倍数)下的信噪比(P/N 值),确定 ELISA 的包被量和血清稀释比例。

1.2.5 gD 表位鉴定 将 7 个预测得到表位肽段按优化确定的结果进行稀释和包被,并以上述血清进行 ELISA 初步鉴定,ELISA 结果判定:以阴性血清的 OD 值的 2 倍作为阳性判定结果。

1.2.6 不同表位的敏感性和特异性评价 对于初步鉴定为表位的肽段,用 20 份 B 病毒标准阳性血清和 10 份 B 病毒阴性血清评价其敏感性和特异性。

2 结果

2.1 B 病毒囊膜糖蛋白 gD 基因二级结构预测

利用 G Gamier-Robson 法和 Chou-Fasman 法分别对猴 B 病毒囊膜糖蛋白 gD 基因的 α -螺旋区域、 β -折叠区域、转角区域和柔性结构区域进行预测(图 1 ~ 图 4)。综合分析比较两种方法的预测结果,得出最优效果。

2.2 猴 B 病毒囊膜糖蛋白 gD 基因 B 细胞表位预测

利用 Jameson-Wolf 方法对猴 B 病毒囊膜糖蛋白 gD 基因抗原性指数(抗原性指数 ≥ 0)进行预测(图

5);利用 Emini 方法对猴 B 病毒囊膜糖蛋白 gD 基因表面可及性区域(表面可及性指数 ≥ 1)进行预测(图 6);利用 Kyte-Doolittle 方法对猴 B 病毒囊膜糖蛋白 gD 基因亲水性区域(亲水性指数 ≥ 0)进行预测(图 7)。

筛选出具有较好抗原性指数、表面可及性和亲水性且在二级结构上含有易形成不规则卷曲结构和抗原表位转角的区段,这些区段极有可能成为 B 细胞表位。结果显示猴 B 病毒囊膜糖蛋白 gD 基因 N 端第 26-34、46-54、106-116、122-130、203-214、291-306、361-370 区段的抗原性指数最高,提示在这些区段是 B 细胞表位的可能性最大(表 1)。

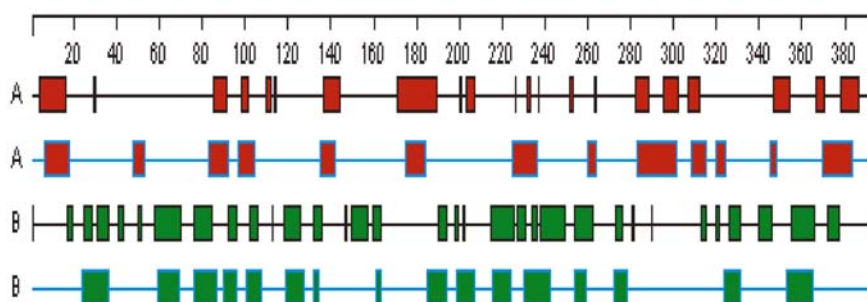


图 1 猴 B 病毒囊膜糖蛋白 gD α -螺旋和 β -折叠区域预测结果

Fig.1 Prediction α -helix and β -sheet Monkey B Virus Glycoprotein D

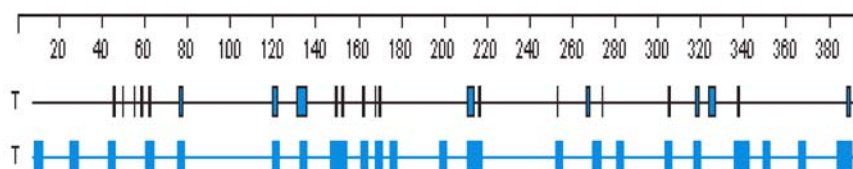


图 2 猴 B 病毒囊膜糖蛋白 gD 转角区域预测结果

Fig.2 Prediction of turn Monkey B Virus Glycoprotein D

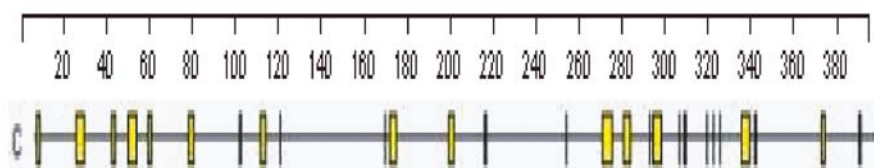


图 3 猴 B 病毒囊膜糖蛋白 gD 无规则卷曲区域预测结果

Fig.3 Prediction of coil Monkey B Virus Glycoprotein D

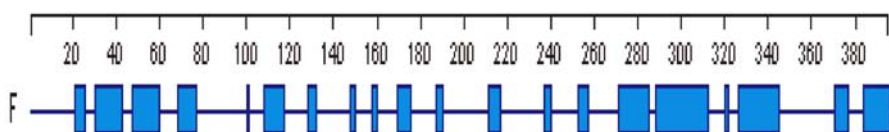


图 4 猴 B 病毒囊膜糖蛋白 gD 柔性区域预测结果

Fig.4 Prediction of flexible region Monkey B Virus Glycoprotein D

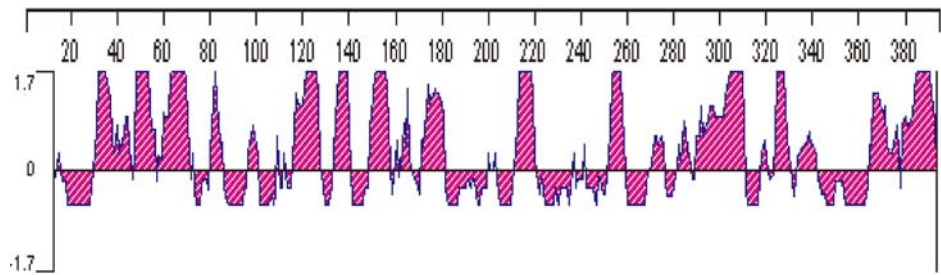


图 5 猴 B 病毒囊膜糖蛋白 gD 抗原性指数预测结果

Fig. 5 Prediction of Antigenic index Monkey B Virus Glycoprotein D

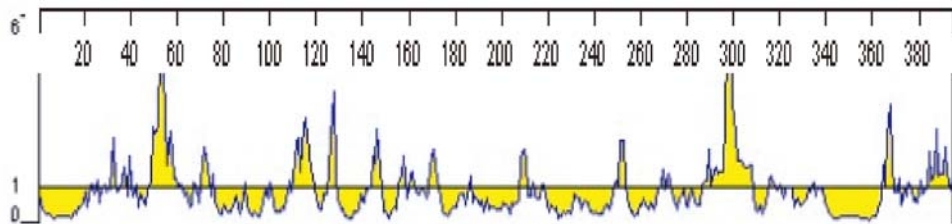


图 6 猴 B 病毒囊膜糖蛋白 gD 表面可及性预测结果

Fig. 6 Prediction of Surface accessibility region Monkey B Virus Glycoprotein D

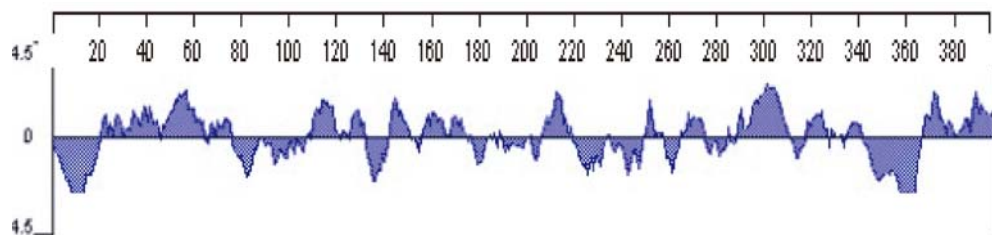


图 7 猴 B 病毒囊膜糖蛋白 gD 亲水性预测结果

Fig. 7 Prediction of Hydrophilic analysis Monkey B Virus Glycoprotein D

表 1 猴 B 病毒囊膜糖蛋白 gD 的表位预测结果

Tab.1 Prediction of B-cell epitopes on Monkey B virus envelope protein gD

B 细胞表位区域	氨基酸序列
Domains of B-cell epitope	Amino acid sequences of epitopes
26-34	YVPVERSLT
46-54	LPPLQKTD
106-116	RGAPETRSDA
122-130	VAWYRTSDD
203-214	QFIFEHRKGPC
291-306	PELAPEERGTSRTPGD
361-370	AVYLVRRRGR

2.3 合成肽的 ELISA 检测方法建立

由于合成肽可能与重组蛋白不完全一致。实验先用被证实是 B 病毒表位肽段的 AVYLVRRRGR (位于 gD 蛋白的 361-370) 为对象,分别用浓度 100、150 和 300 ng 每孔包板,并以 5 份标准 B 病毒阳性血清的混合物和 3 份标准阴性血清进行检测(3 次重复)。其中血清稀释倍数分别为 1:5、1:10 和 1:20,兔抗猴 IgG-HRP 的稀释浓度为 1:30000。

ELISA 的 OD 值阈值为 3 份阴性血清平均 OD 的 2 倍。

结果显示:肽段以 150 ng 每孔包被,血清稀释比例为 1:5 的反应条件最好,此时信噪比最高,且结果重复性好(表 2)。

2.4 gD 表位鉴定

将 7 个肽段(表 1)按照 150 ng 每孔包板,对 5 份阳性血清的混合物和 3 份阴性血清进行 ELISA 检测,血清稀释比例为 1:5,兔抗猴 IgG-HRP 工作浓度为 1:30000,OD 值阈值为 3 份阴性样本的平均 OD 值乘以 2 倍。结果显示,gD 蛋白上的 4 个肽段(⁴⁶ LPPLQKTD⁵⁴、¹⁰⁶ RGAPETRSDA¹¹⁶、²⁹¹ PELAPEERGTSRTPGD³⁰⁶和³⁶¹ AVYLVRRRGR³⁷⁰)都能与 B 病毒阳性血清反应反应,且 OD 值均显示为阳性(表 3)。其余肽段均为阴性,即使将这些肽段的包被量提高到 300 ng 每孔,在其他 ELISA 参数不变的情况下,结果仍为阴性。表明这些肽段不是 B 病毒的表位。

表 2 肽段 ELISA 参数的优化

Tab. 2 Optimization of parameters of ELISA with identified B virus peptides AVYLVRRRGR on gD

肽包被量 Amount of peptide	血清稀释比例 Sera dilution	阳性血清的平均 OD 值 OD of positive sera ($\bar{x} \pm SD$)	阴性血清的平均 OD 值 OD of negative sera ($\bar{x} \pm SD$)	信噪比 Signal to noise (P/N)
100 ng	1: 5	0. 385 $\pm$ 0. 052	0. 096 $\pm$ 0. 018	4. 01
	1: 10	0. 287 $\pm$ 0. 068	0. 075 $\pm$ 0. 025	3. 83
	1: 20	0. 186 $\pm$ 0. 042	0. 063 $\pm$ 0. 012	2. 95
150 ng	1: 5	0. 421 $\pm$ 0. 060	0. 075 $\pm$ 0. 016	5. 61
	1: 10	0. 368 $\pm$ 0. 054	0. 078 $\pm$ 0. 022	4. 72
	1: 20	0. 208 $\pm$ 0. 072	0. 053 $\pm$ 0. 020	3. 30
300 ng	1: 5	0. 436 $\pm$ 0. 093	0. 108 $\pm$ 0. 021	4. 04
	1: 10	0. 397 $\pm$ 0. 079	0. 103 $\pm$ 0. 018	3. 85
	1: 20	0. 212 $\pm$ 0. 056	0. 074 $\pm$ 0. 016	2. 86

表 3 ELISA 方法鉴定的表位肽段

Tab. 3 Epitopes on B virus glycoprotein D identified by ELISA

序列位置 Position of epitopes	序列 Sequences of epitopes	长度 Length of epitopes
46-54	LPPLEQKTD	9
106-116	RGAPEATRSDA	11
291-306	PELAPEERGTSTRTPGD	16
361-370	AVYLVRRRGR	10

2. 5 不同表位的敏感性和特异性评价

将上述表位肽段按 150 ng 每孔包被,分别用 20 份 B 病毒标准阳性血清和 10 份标准阴性血清鉴定各表位的敏感性和特异性。其中,血清稀释比例为 1: 5,兔抗猴 IgG-HRP 工作浓度为 1: 30000,OD 值阈值为 3 份阴性样本的平均 OD 值乘以 2 倍。结果显示,各个肽段都不与阴性血清发生反应,特异性为 100%;但就敏感性而言,不同表位肽段各不相同,¹⁰⁶RGAPEATRSDA¹¹⁶肽段的敏感性最低,仅能与 20 份阳性血清的 8 份(40.0%)发生反应,而³⁶¹AVYLVRRRGR³⁷⁰能与 20 份阳性血清中的 14 份(70.0%)发生反应,其他肽段的敏感性位于二者之间。

比较 7 个表位肽段与 20 份阳性血清的反应性发现,有些表位肽段的阳性样本完全一致,有些表位肽段的阳性样本只是其他表位的一部分,也有一

些表位的阳性样本之间有交叉,但也有一些阳性样本在所有表位中均呈阴性表现(图 8)。

3 讨论

对于抗原表位的研究策略,人们已建立和发展了多种方法,如噬菌体展示肽库技术、但克隆抗体筛选技术、肽探针扫描技术和基于生物信息学的表位预测技术等^[1-5]。其中表位预测因其简单和廉价而越来越受到研究者重视,该方法既克服了肽探针扫描需要大量肽段合成所带来的高成本,也避免了化学和生物学方法以及噬菌体随机肽库展示技术所要求单克隆抗体。同时该方法也是当前广泛采用的,并被证明是行之有效的表位研究技术^[3-5]。

表位预测主要依据蛋白质的二级结构、亲水性、表面可及性、抗原性指数以及柔韧性等参数,预测抗原的表位序列。目前开发的分析软件正是基于不同参数组合形成的数据库,因而预测的结果可能有较大差异,且都存在预测失误(包括漏测和错测)等缺陷。有研究者统计,目前建立的表位预测技术,准确率通常在 15%~75%之间^[12-13]。

我们分别利用了在线预测软件,如 ABCpred(ABCpred 采用人工神经网络来预测线性表位,从 Bcipep 和 SwissProt 数据库中提取非冗余的表位肽和非表位肽作为训练集,采用 5-折交叉验证,预测

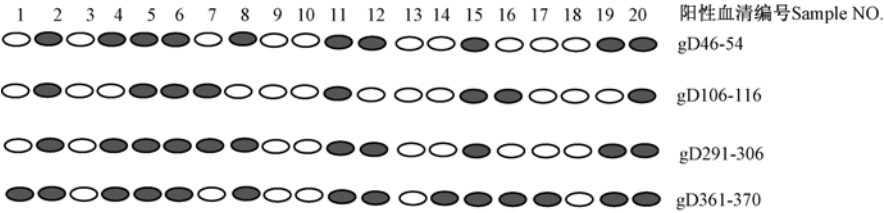


图 8 表位肽与 20 份阳性血清的 ELISA 检测结果(红色表示阳性,白色表示阴性)

Fig. 8 Results of reaction between 20 monkey B virus positive sera and 7 epitope peptides.
(Red indicated positive in ELISA; White indicated negative in ELISA)

敏感性约为 67%, 特异性约为 64%^[14])、BepiPred (BepiPred 结合氨基酸的性质, 如亲水性、柔韧性、可及性、极性、暴露表面、转角和隐形马尔可夫模型来预测线性表位, 预测结果表明, 同那些仅依赖于氨基酸性质的预测方法相比, BepiPred 预测结果的准确性有一定程度的提高^[15])、APP(基于氨基酸通常成对出现在抗原表位的频率要比其出现在非表位肽段的频率高并联合支持向量机^[16]) 等算法, 同时结合国内一些学者创建的软件进行预测。综合这些软件的预测结果, 在 B 病毒囊膜 gD 上得到 7 个可能的表位肽段。其中, 预测得到的 gD 蛋白上的³⁶¹AVYLVRRRGR³⁷⁰表位, 已被实验所证实, 二者的差异仅为 1 个氨基酸残基, 即实验鉴定的表位为的³⁶²VYLVRRRGR³⁷⁰^[17]。

对 7 个肽段的鉴定结果显示, 4 个肽段都能与 B 病毒的阳性血清发生反应, 表明这 4 个片段是 B 病毒的表位。对与 B 病毒高度同源的 HSV-1 囊膜蛋白 gD 功能研究发现, 胞外区 1-32 个氨基酸残基、Y38、D215、R222、F223 是受体的结合区, 负责与受体结合; 胞外区 280-302 个氨基酸残基为柔性折叠部位, 负责维持 gD 构象; 胞外区 C 端是 gB、gL/gH 的结合部位, 负责膜融合^[18-20]。如果 B 病毒的 gD 蛋白采用与 HSV-1 相似的功能机制, 那么在本实验中鉴定的 3 个表位(分别为⁴⁶LPPLEQKTD⁵⁴、¹⁰⁶RGAPETRSDA¹¹⁶和²⁹¹PELAPEERGTSRTPGD³⁰⁶) 将与功能区重合或与功能区紧密相连。这为前期文献报道—以 gD 基因为基础的核酸疫苗能较好保护免疫动物提供了合理解释^[21-22]。

实验进一步利用 20 份 B 病毒阳性血清对 4 个表位进行了评价, 发现表位肽与血清的反应性不完全一致。其中, ¹⁰⁶RGAPETRSDA¹¹⁶肽段的敏感性最低, 仅能与 20 份阳性血清的 8 份(40.0%) 发生反应, 而已被证实的表位³⁶¹AVYLVRRRGR³⁷⁰, 敏感性为 70%, 与其他文献报道的 67% 相似^[22]。将多个具有互补作用的表位串联, 形成嵌合性多价表位蛋白/疫苗, 作为检测抗原的敏感性和/或作为疫苗的保护作用明显增强, 已在其他研究中得到证实^[23-24]。将上述表位进行联合或者重组, 是否有利于提高检测的敏感性和疫苗保护效果, 有待于进一步研究。

总之, 本实验利用生物信息学方法在 B 病毒囊膜蛋白 gD 上鉴定了 4 个表位, 这些表位的发现, 为进一步开展 B 病毒感染机制研究以及快速检测方

法的建立奠定了基础。

参考文献:

- [1] 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):145-56.
- [2] 宋帅, 李春玲, 贾爱卿, 等. 抗原表位研究方法进展[J]. *动物医学进展*, 2010, 31(12): 87-91
- [3] Zhu J, Warren JD, Danishefsky SJ. Synthetic carbohydrate-based anticancer vaccines: the Memorial Sloan-Kettering experience[J]. *Expert Rev Vaccines*. 2009, 8(10):1399-413.
- [4] Editorial. Immunoinformatics may lead to a reappraisal of the nature of B cell epitopes and of the feasibility of synthetic peptide vaccines[J]. *J. Mol. Recognit*. 2006; 19: 183-187.
- [5] Das P, Grewal JS, Mahajan B, *et al.* Comparison of cellular and humoral responses to recombinant protein and synthetic peptides of exon2 region of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein1 (PIEMP1) among malaria patients from an endemic region[J]. *Parasitology International*, 2007, 56: 51-59.
- [6] Karplus P A Schultz G. Prediction of chain flexibility in proteins [J]. *Naturwissenschaften*, 1985, 72:212-213.
- [7] Jameson B A Wolf H. The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinations [J]. *Comput Appl Biosci*, 1988, 4(1):181-186.
- [8] 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]. *J Virol*, 1985, 55(3):836-839.
- [9] Kyte J Doolittle R F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein [J]. *J Mol Biol*, 1982, 157(1):105-132.
- [10] Garnier J, Osguthorpe D J, Robson B. Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins [J]. *Journal of molecular biology*, 1978, 120(1):97-120.
- [11] 朱锡华, 吴玉章. 一种病蛋白 B 细胞表位预测方法的建立 [J]. *科学通报*, 1994, 24(2):2275-2279.
- [12] Peters B, Sette A. Integrating epitope data into the emerging web of biomedical knowledge resources [J]. *Nat Rev Immunol*. 2007 Jun;7(6):485-90.
- [13] Wee LJ, Lim SJ, Ng LF, Tong JC. Immunoinformatics: how in silico methods are re-shaping the investigation of peptide immune specificity [J]. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2012, 4:311-319.
- [14] Saha S, Raghava GP. Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural net work [J]. *Proteins*, 2006, 65(1): 40-48.
- [15] Larsen JE, Lund O, Nielsen M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes [J]. *Immunome Res*, 2006, 2: 2.
- [16] Chen J, Liu H, Yang J, *etal.* Prediction of linear B-cell epitopes using amino acid pair antigenicity scale [J]. *Amino Acids*, 2007, 33(3): 423-428.

- [17] Pereyagina L, Zurkuhlen H, Patrusheva I, *et al.* Identification of a herpes B virus - specific glycoprotein D immunodominant epitope recognized by natural and foreign hosts[J]. J Infect Dis, 2002, 186; 453 - 461.
- [18] Giovine PD, Settembre EC, Bhargava AK, *et al.* Structure of Herpes Simplex Virus Glycoprotein D Bound to the Human Receptor Nectin - 1 [J]. PLoS Pathogens, 2011, 7 (9); 489 - 502.
- [19] Karaba AH, Kopp SJ, Longnecker R. Herpesvirus entry mediator and nectin-1 mediate herpes simplex virus 1 infection of the murine cornea[J]. J Virol. 2011 Oct;85(19):10041 - 10047.
- [20] Atanasiu D, Saw WT, Cohen GH, *et al.* Cascade of events governing cell-cell fusion induced by herpes simplex virus glycoproteins gD, gH/gL, and gB[J]. J Virol. 2010 ,84(23): 12292 - 12299.
- [21] Hirano M, Nakamura S, Mitsunaga F, *et al.* Efficacy of a B virus gD DNA vaccine for induction of humoral and cellular immune responses in Japanese macaques [J]. Vaccine. 2002; 20(19 - 20); 2523 - 32.
- [22] Loomis-Huff JE, Eberle R, Lockridge KM, *et al.* Immunogenicity of a DNA vaccine against herpes B virus in mice and rhesus macaques [J]. Vaccine. 2001; 19 (32); 4865 - 4873.
- [23] Liu S, Yu X, Wang C, *et al.* Quadruple antigenic epitope peptide producing immune protection against classical swine fever virus[J]. Vaccine, 2006, 24 ;7175 - 7180.
- [24] Cairns TM, Shaner MS, ZuoY, *et al.* Epitope mapping of herpes simplex virus type 2 gH/gL defines distinct antigenic sites, including some associated with biological function[J]. J Virol, 2006, 80(6): 2596 - 2608.

[修回日期]2014-10-22