

利用免疫信息学方法设计基于表位的 淋病奈瑟菌亚单位疫苗

黄 钰, 胡 欣, 李紫玥, 张 雷*

(大理大学 a. 病原与媒介生物研究所 云南省自然疫源性疾病防控技术重点实验室; b. 基础医学院 病原生物学综合实验室; c. 金道超专家工作站, 中国云南 大理 671000)

摘 要: 在淋病奈瑟菌 (*Neisseria gonorrhoeae*, NG) 6 种保守外膜蛋白中筛选优势表位, 设计淋病奈瑟菌多表位亚单位疫苗并模拟其免疫效果。首先, 通过 C-ImmSim 在线服务器对 6 种外膜蛋白进行计算机免疫模拟, 并分别从细胞毒性 T 细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)、辅助性 T 细胞(helper T cell, Th cell)及 B 细胞免疫反应强的外膜蛋白中筛选用于构建多表位亚单位疫苗的优势 CTL 表位、Th 细胞表位和 B 细胞表位。其次, 在对各优势表位进行抗原性、致敏性和毒性分析后, 将不同排列组合的优势表位与抗菌肽及 PADRE 序列连接起来, 设计出多表位亚单位疫苗。再次, 对所设计的各种多表位亚单位疫苗进行计算机免疫模拟, 以评价其体液免疫和细胞免疫的效果。最后, 对筛选出的免疫效果较好的候选亚单位疫苗进行抗原性、致敏性、理化性质、溶解性评估以及二级结构分析, 以确保候选亚单位疫苗符合疫苗设计标准。结果显示, 筛选出符合要求的优势候选 CTL 表位 8 个、Th 细胞表位 10 个和 B 细胞表位 14 个; 共设计出 64 种多表位亚单位疫苗, 其中 3 种亚单位疫苗的免疫模拟结果最佳, 均满足抗原性强、对人体无致敏性及无细胞毒性的要求, 且均为亲水性、耐热性较好的稳定蛋白质, 同时能在大肠杆菌中实现可溶性的过表达, 与抗体的亲和性也较强, 符合疫苗设计标准。研究结果表明, 以 C-ImmSim 为主的生物信息学预测方法在多表位亚单位疫苗的反向设计及其免疫效果的高通量初步筛选方面具有良好的应用前景。本研究为淋病奈瑟菌疫苗研发提供了一种新的有效途径。

关键词: 淋病奈瑟菌(NG); 外膜蛋白; 免疫信息学; 表位; 亚单位疫苗; 免疫模拟

中图分类号: Q939.91, R378.1+6

文献标志码: A

文章编号: 1007-7847(2024)04-0348-11

Immunoinformatics Design of Epitope-based Subunit Vaccines Against *Neisseria gonorrhoeae*

HUANG Yu, HU Xin, LI Ziyue, ZHANG Lei*

(a. Institute of Pathogens and Vectors, Yunnan Provincial Key Laboratory for Zoonosis Control and Prevention; b. Laboratory of Pathogenic Biology, Basic Medical College; c. The Expert Workstation for Dao-Chao Jin, Dali University, Dali 671000, Yunnan, China)

Abstract: The dominant epitopes from six conserved outer membrane proteins of *Neisseria gonorrhoeae* (NG) were screened, multi-epitope subunit vaccines were designed, and the immune responses against them were simulated. Firstly, computer simulation of six outer membrane proteins was performed through the C-ImmSim online server, and the dominant cytotoxic T lymphocyte (CTL) epitopes, helper T (Th) cell epitopes and B cell epitopes were screened from outer membrane proteins with strong CTL, Th cell and B cell immune responses, respectively. Secondly, after the antigenicity, allergenicity, and toxicity analysis of each candidate epitope, candidate epitopes with different arrangement and combinations were connected with antimicrobial peptide and PADRE sequences to construct multi-epitope subunit vaccines. Thirdly, the designed multi-epitope subunit vaccines were simulated by computer to evaluate their abilities to induce humoral and cellular immunity.

收稿日期: 2023-10-25; 修回日期: 2023-12-09; 网络首发日期: 2024-02-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81760303)

作者简介: 黄钰(2000—), 女, 云南昭通人, 硕士研究生; 通信作者: *张雷(1972—), 男, 白族, 云南大理人, 博士, 教授, 主要从事病原生物学研究, E-mail: leigzhang@163.com。

Finally, the candidate subunit vaccines with good immune effect were screened and further evaluated for antigenicity, allergenicity, physicochemical properties, solubility, and secondary structure to ensure that the candidate subunit vaccines meet the vaccine design standards. Through these processes, eight candidate CTL epitopes, 10 Th cell epitopes, and 14 B cell epitopes were selected out, and a total of 64 multi-epitope subunit vaccines were designed. Among them, three subunit vaccines had satisfactory immune simulation results, with strong antigenicity, no allergenicity to human body, and no cytotoxicity, were all stable proteins with good hydrophobicity and heat resistance, achieved soluble overexpression in *E. coli*, and had strong affinity with antibodies, all of which met the standards for vaccine design. The results indicated that the bioinformatics prediction based mainly on C-ImmSim had a good application prospect in the reverse design of multi-epitope subunit vaccines and high-throughput preliminary screening of their immune effects. This study provided a new and effective approach for the development of *N. gonorrhoeae* vaccines.

Key words: *Neisseria gonorrhoeae* (NG); outer membrane protein; immunoinformatics; epitope; subunit vaccine; immune simulation

(*Life Science Research*, 2024, 28(4): 348–358)

淋病奈瑟菌(*Neisseria gonorrhoeae*, NG)为革兰氏阴性双球菌,是仅次于沙眼衣原体的世界上第二常见的细菌性传播疾病的病原体^[1]。人类为NG的唯一自然宿主,NG可通过黏膜感染人体生殖道、眼部、鼻咽部、肛门等部位,可导致组织侵袭、持续炎症、纤维化或局部感染并形成脓液^[2]。男性淋病可表现为尿道炎,女性可表现为宫颈炎或尿道炎^[3]。淋病并发症对女性的影响尤为严重,包括盆腔炎、异位妊娠和不孕^[4]。此外,NG感染还增加了人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)传播和感染的风险^[5]。据世界卫生组织估计,2016年全球新增NG感染病例8700万例^[6],这给全球公共卫生事业带来了巨大的挑战。由于NG的抗原变异性以及免疫逃逸机制,NG疫苗的研发一直处于临床前阶段;与此同时,由于多重耐药菌株在全球的迅速传播,抗生素治疗淋病的有效性正在下降^[7]。因此,NG疫苗的有效研发非常重要。

在过去的50年里,只有3种候选NG疫苗进入临床试验,但没有一种可提供可靠的免疫保护^[8–10]。随着新的疫苗抗原挖掘软件的不兴起,人们对在不久的将来可能研制出有效的NG疫苗越来越感到乐观^[11]。C-ImmSim是将基因组信息和免疫系统动力学模拟相结合,并使用位置特异性评分矩阵和机器学习技术来预测表位与免疫应答相互作用的免疫反应模拟器^[12]。在前期研究中,本课题组筛选出6种高度保守的外膜蛋白,分别为天青蛋白、IV型菌毛生物发生/稳定蛋白PilW、肽聚糖结合外膜蛋白RmpM、脂多糖(lipopolysaccha-

ride, LPS)组装蛋白LptD、多种药物流出转运体外膜亚基MtrE、TonB依赖性锌海盗受体TdfH,但没有一种外膜蛋白能同时在抗体诱导、淋巴细胞增殖、细胞因子产生和抗体杀菌方面达到理想效果。因此,本研究首先用C-ImmSim等生物信息软件,分别筛选出上述6种外膜蛋白的优势细胞毒性T细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)表位、辅助性T细胞(T helper cell, Th cell)表位和B细胞表位;再采用合适的连接子将各种优势抗原表位、抗菌肽序列和PADRE序列连接起来,设计出各种可能的多表位亚单位疫苗;最后,对设计出的所有亚单位疫苗进行免疫模拟以及致敏性、细胞毒性等分析,并评估其可能产生的免疫效果及对人体的安全性,以筛选出最具有开发潜力的NG多表位亚单位疫苗。

1 材料与方法

1.1 材料来源

登录美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; 2023-01-31),在GenBank检索基因ID,获得6种蛋白质的氨基酸序列,并采用FASTA格式保存(表1)。

1.2 外膜蛋白3种优势表位的筛选

1.2.1 外膜蛋白CTL、Th细胞和B细胞免疫反应能力的分析

登录服务器C-ImmSim (<http://150.146.2.1/C-IMMSIM/index.php>; 2023-04-21),对6种外膜蛋白进行免疫模拟。其模拟体积、模拟总时长分别设

表 1 六种外膜蛋白的基本信息
Table 1 Basic information on the six outer membrane proteins

Number	Gene ID	Protein accession number	English name	Chinese name
1	3281780	WP_003688275.1	Azurin	天青蛋白
2	3291181	WP_003688950.1	Type IV pilus biogenesis/stability protein PilW	IV型菌毛生物发生/稳定蛋白 PilW
3	3281426	WP_003689500.1	Peptidoglycan-binding outer membrane protein RmpM	肽聚糖结合外膜蛋白 RmpM
4	3281158	WP_003698952.1	LPS-assembly protein LptD	LPS 组装蛋白 LptD
5	3282457	WP_010951247.1	Multidrug efflux transporter outer membrane subunit MtrE	多种药物流出转运体外膜亚基 MtrE
6	3282122	WP_003706334.1	TonB-dependent zinc piracy receptor TdfH	TonB 依赖性锌海盗受体 TdfH

置为 50 μ L、160 time step, 其中 1 time step=8 h。I 类主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)分子选择 HLA-A*02:01、HLA-A*03:01、HLA-B*07:02, MHC-II 类分子选择 HLA-DRB1*0101、HLA-DRB1*0301。免疫模拟参数中的 time step 分别设置为 1、42, 即: 每隔 14 d 免疫 1 次, 共免疫两次。

根据以上 6 种外膜蛋白免疫模拟的结果, 按下面的方法, 分别在 CTL、Th 细胞、B 细胞免疫反应能力强的蛋白质中筛选优势 CTL 表位、Th 细胞表位和 B 细胞表位。

1.2.2 优势 CTL 表位的筛选

分别应用 SYFPEITHI v1.0 (<http://www.syfpeithi.de/>; 2023-03-12)、NetMHCpan-4.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetMHCpan-4.0/>; 2023-03-12)、NetCTL-1.2 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetCTL-1.2/>; 2023-03-12)和 RANKPEP (<http://imed.med.ucm.es/Tools/rankpep.html>; 2023-03-12)分析 CTL 表位。其中, MHC-I 类分子均选择 HLA-A*02:01、HLA-A*03:01 和 HLA-B*07:02, 多肽长度选择 9 aa。综合评估 4 个软件的预测分析结果, 选取 SYFPEITHI v1.0 得分 ≥ 18 、NetMHCpan-4.0 评价为强结合或弱结合、NetCTL-1.2 综合分值 ≥ 0.75 以及 RANKPEP 评价为“binder”的表位作为优势 CTL 表位。

1.2.3 优势 Th 细胞表位的筛选

首先, 分别应用 SYFPEITHI v1.0 (<http://www.syfpeithi.de/>; 2023-04-15)和 NetMHCIIpan-4.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetMHC-IIpan-4.0/>; 2023-04-15)来分析 Th 细胞表位。其中, MHC-II 类分子均选择 HLA-DRB1*0101、HLA-DRB1*0301、HLA-DRB1*0401、HLA-DRB1*0701、HLA-DRB1*1101、HLA-DRB1*1501, 多肽长度选择 15 aa。综合评估两个软件的预测分析结果, 选取 SYFPEITHI v1.0 得分 ≥ 18 、NetMHCIIpan-4.0 评价为强结合的多肽序列为候选的优势 Th 细胞

表位。然后, 用 IFNepitope (<http://crdd.osdd.net/raghava/ifnepitope/scan.php>; 2023-04-15)进一步分析这些候选优势 Th 细胞表位诱导产生 γ 干扰素(interferon- γ , IFN- γ)的能力。最终以 IFN- γ 为阳性的表位作为优势 Th 细胞表位。

1.2.4 优势 B 细胞表位的筛选

用在线软件 ABCpred (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/abcpred/index.html>; 2023-04-14)和 BCPred (<http://ailab-projects2.ist.psu.edu/bcpred/predict.html>; 2023-04-14)预测 B 细胞表位, 表位鉴定阈值分别设置为 0.7 和 0.75, 选取得分结果均大于阈值的表位作为优势 B 细胞表位。

1.2.5 候选表位抗原性、致敏性和毒性的预测

针对上面筛选到的优势 CTL 表位、Th 细胞表位和 B 细胞表位, 应用在线软件 VaxiJen v2.0 (<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>; 2023-05-30)进行抗原性预测, 其阈值设置为 0.4; 应用 AllerTOP v2.0 (<http://www.ddg-pharmfac.net/AllerTOP>; 2023-05-30)进行致敏性预测; 应用 ToxinPred (<http://crdd.osdd.net/raghava/toxinpred/>; 2023-05-30)进行毒性预测。所有的表位都应该满足抗原性、非致敏性、无细胞毒性的要求。

1.3 多表位亚单位疫苗的设计和筛选

1.3.1 多表位亚单位疫苗的设计

将 1.2 中筛选到的各种外膜蛋白的优势 CTL 表位、Th 细胞表位和 B 细胞表位以不同的排列组合按图 1 的方式, 设计各种可能的多表位亚单位疫苗。在疫苗构建体的 N 端引入 1 个抗菌肽 caerin1.9 序列和 1 个 PADRE 序列, C 端引入 1 个 PADRE 序列。分别选取 AYY/GPGPG 和 KK 连接子(linker)连接优势 CTL、Th 细胞、B 细胞表位; 在疫苗构建体的 N 端、PADRE 序列和抗菌肽 caerin1.9 序列之间使用 EAAAK 连接子连接, 并在疫苗的 C 端添加 GGGGS 连接子(图 1)。

1.3.2 多表位亚单位疫苗的筛选

将设计出的所有多表位亚单位疫苗按 1.2.1

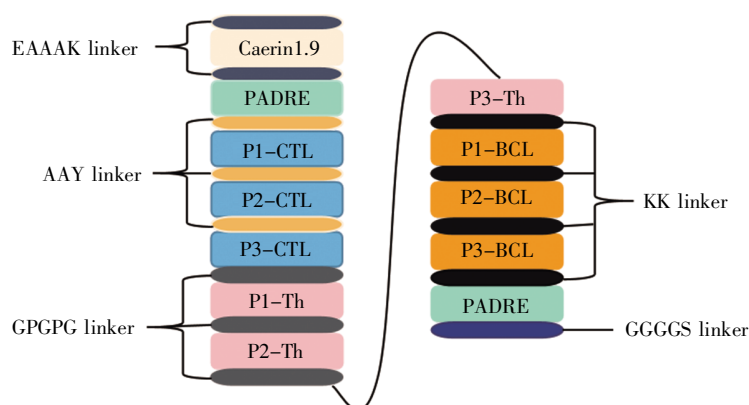


图1 多表位亚单位疫苗构建体示意图

P1/P2/P3-CTL 分别为任意3种外膜蛋白的优势 CTL 表位; P1/P2/P3-Th 分别为任意3种外膜蛋白的优势 Th 细胞表位; P1/P2/P3-BCL 分别为任意3种外膜蛋白的优势 B 细胞表位。

Fig.1 Schematic representation of the multi-epitope subunit vaccine constructs

P1/P2/P3-CTL are the predominant CTL epitopes of any three outer membrane proteins, respectively; P1/P2/P3-Th are the predominant Th cell epitopes of any three outer membrane proteins, respectively; P1/P2/P3-BCL are the predominant B cell epitopes of any three outer membrane proteins, respectively.

的方法进行免疫模拟,其中总时长设置为1050 time step,疫苗3次注射的 time step 分别为1、84和170(即间隔28 d 免疫1次,共免疫3次),分别分析其诱导产生的免疫反应和免疫记忆的维持能力,以筛选出最佳多表位亚单位候选疫苗。随后,按1.2.5的方法对筛选到的最佳多表位亚单位候选疫苗进行抗原性、致敏性和毒性分析。

1.4 优势亚单位候选疫苗的理化性质分析及溶解性评估

采用在线软件 ExPASy ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>; 2023-06-02)进行理化性质分析,包括氨基酸数目、理论等电点、亲水性、脂肪指数、稳定性和半衰期。应用在线软件 SCRATCH Protein Predictor (<http://scratch.proteomics.ics.uci.edu>; 2023-06-02)中的 SOLpro 板块,预测优势多表位亚单位候选疫苗在大肠杆菌宿主菌中过表达时的溶解度。

1.5 优势亚单位候选疫苗的二级结构预测

运用软件 SOPMA (https://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html; 2023-06-10)预测优势亚单位候选疫苗的二级结构。

2 结果

2.1 优势 CTL、Th 细胞和 B 细胞表位

2.1.1 外膜蛋白的 CTL、Th 细胞和 B 细胞免疫反应能力

经免疫模拟发现,外膜蛋白 WP_003698952.1、WP_003689500.1、WP_003706334.1 和 WP_

003688275.1 为 CTL 免疫反应较强的蛋白质,在初次免疫和再次免疫4种蛋白质后,CTL 的浓度均显著增加,且 CTL 的峰值均较高(图2A~D);外膜蛋白 WP_003688275.1、WP_003689500.1、WP_003698952.1 和 WP_010951247.1 为 Th 细胞免疫反应较强的蛋白质,在初次免疫和再次免疫后,活化的 Th 细胞浓度均显著增加,且活化的 Th 细胞的峰值均较高(图2E~H);外膜蛋白 WP_010951247.1、WP_003688275.1、WP_003698952.1、WP_003706334.1 为 B 细胞免疫反应较强的蛋白质,在初次免疫和再次免疫后,其所诱导产生的不同类型抗体的滴度均增加,且再次免疫应答中各种类型抗体的滴度显著增加,抗原清除所需时间更短(图2I~L)。

2.1.2 优势 CTL 表位

综合 SYFPEITHI v1.0、NetMHCpan-4.0、Net-CTL-1.2 及 RANKPEP 4个软件的分析结果,在蛋白质 WP_003698952.1 中筛选出4个优势 CTL 表位,在蛋白质 WP_003689500.1 中筛选出2个优势 CTL 表位,在蛋白质 WP_003706334.1 和 WP_003688275.1 中各筛选出1个优势 CTL 表位,即共筛选出8个可用作多表位亚单位疫苗设计的优势 CTL 表位(表2)。

2.1.3 优势 Th 细胞表位

综合 SYFPEITHI v1.0、NetMHCIIpan-4.0 及 IFNepitope 3个软件的分析结果,在蛋白质 WP_003688275.1 和 WP_003689500.1 中各筛选出1个优势 Th 细胞表位,在蛋白质 WP_003698952.1

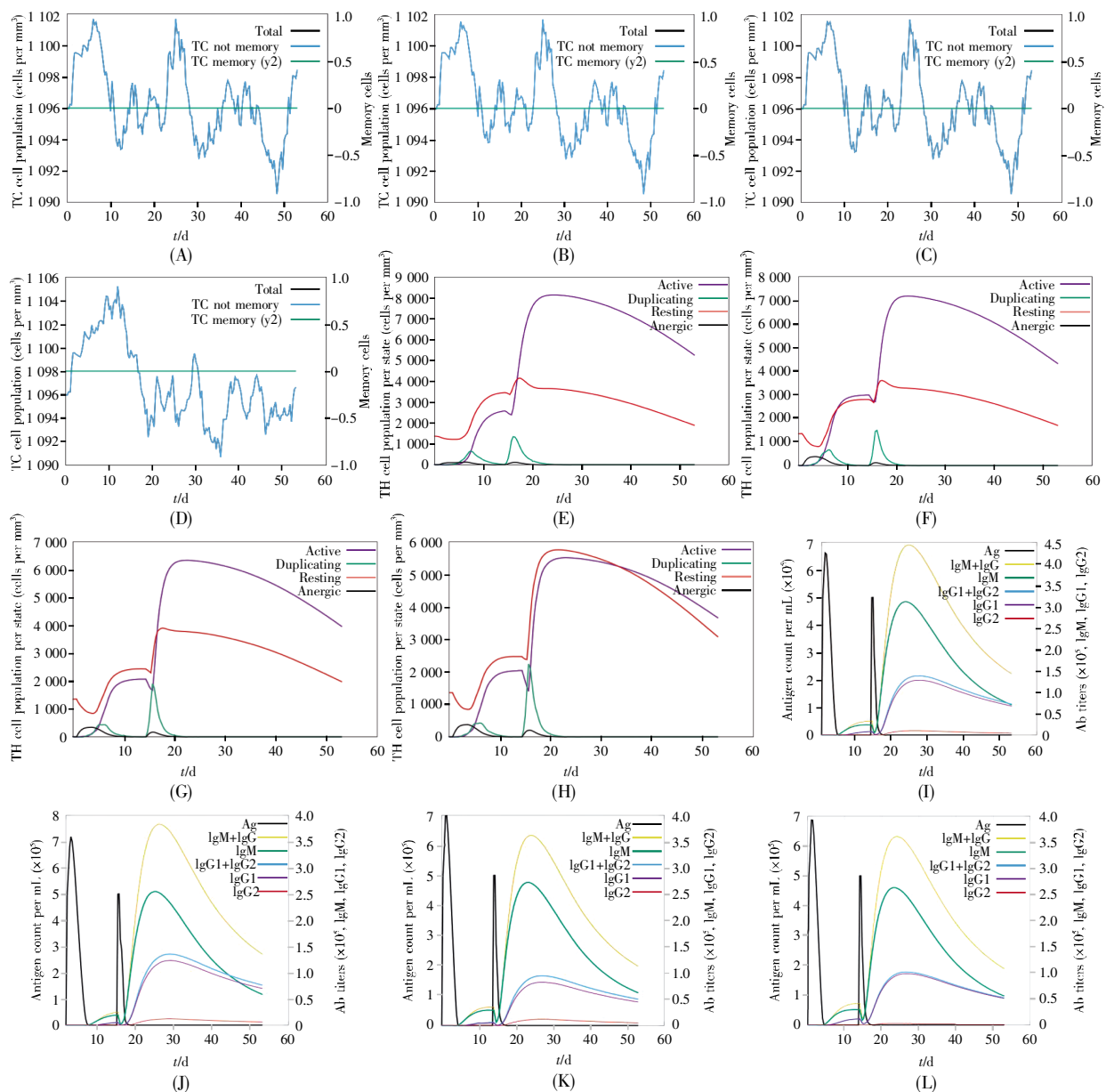


图 2 六种外膜蛋白的 CTL、Th 细胞和 B 细胞免疫反应分析结果

(A~D) 依次为蛋白质 WP_003698952.1、WP_003689500.1、WP_003706334.1 和 WP_003688275.1 的 CTL 免疫反应能力；(E~H) 依次为蛋白质 WP_003688275.1、WP_003689500.1、WP_003698952.1 和 WP_010951247.1 的 Th 细胞免疫反应能力；(I~L) 依次为蛋白质 WP_010951247.1、WP_003688275.1、WP_003698952.1 和 WP_003706334.1 的 B 细胞免疫反应能力。

Fig.2 Results of the CTL, Th cell, and B cell immune responses to the six outer membrane proteins

(A~D) CTL immune responses to proteins WP_003698952.1, WP_003689500.1, WP_003706334.1 and WP_003688275.1, respectively; (E~H) Th cell immune responses to proteins WP_003688275.1, WP_003689500.1, WP_003698952.1 and WP_010951247.1, respectively; (I~L) B cell immune responses to proteins WP_010951247.1, WP_003688275.1, WP_003698952.1 and WP_003706334.1, respectively.

和 WP_010951247.1 中各筛选出 4 个优势 Th 细胞表位, 即共筛选出 10 个可用作多表位亚单位疫苗设计的优势 Th 细胞表位(表 2)。

2.1.4 优势 B 细胞表位

综合 ABCpred 和 BCPred 两个软件的分析结果, 在蛋白质 WP_010951247.1 中筛选出 1 个优势 B 细胞表位, 在蛋白质 WP_003688275.1 中筛选出

3 个优势 B 细胞表位, 在蛋白质 WP_003698952.1 和 WP_003706334.1 中各筛选出 5 个优势 B 细胞表位, 即共筛选出 14 个可用作多表位亚单位疫苗设计的优势 B 细胞表位(表 2)。

2.1.5 候选表位的抗原性、致敏性和毒性预测

经 VaxiJen v2.0、AllerTOP v2.0 和 ToxinPred 软件分析, 上述筛选出的优势表位均满足抗原性

表 2 构建 NG 多表位亚单位疫苗的候选表位
Table 2 The epitopes selected for NG subunit vaccine construction

Epitope class	Protein	Start position	Dominant epitope
CTL epitopes	WP_003698952.1	759	AVFFSLQLK
		609	VMLDGSVGK
		6	SLKPLVLAL
		477	GLHATYYSL
	WP_003689500.1	6	KLSALFVAL
		115	KVLAQRLSR
	WP_003706334.1	112	TMVDGITQT
	WP_003688275.1	7	LISAAVIGL
	Th cell epitopes	WP_003688275.1	DARVVAHTKLIGGGE
		WP_003689500.1	QAPQYVDETISLSAK
B cell epitopes	WP_003698952.1	658	GAGYRPAPGKVLNAR
		622	RSDWVAFASGGIGGR
		208	AGWYVKAASVEADRG
		479	HATYYSLDSFGGKAS
	WP_010951247.1	274	SSEVLLDRPDIRAAE
		330	TGVWAFAPSITLPIF
		332	VWAFAPSITLPIFTW
		225	KADYAHAARSREQAR
	WP_010951247.1	230	HAARSREQARN
		WP_003688275.1	FKDGVGA
		84	EFTITLKHTGTQPKAS
		118	DGVGAADTDYVKPDDA
	WP_003698952.1	586	DGATGEERFRAGI
		321	PHDKKSGRNNRYQ
		127	DQSGDTVTVGDRF
		349	GVDFNQ
	WP_003706334.1	63	SNESGSPERTEAAVQ
		128	AGRAGGSSQ
		260	VQEGGLKFNAGSGK
		793	AEERYIDGTNGGNTSNVRQL
		192	GLTGTNSTKGNAMAI
		120	TFYSTSTDAGRAGGSS

强、对人体无致敏性及无细胞毒性的要求。

2.2 多表位亚单位疫苗筛选成功

根据上述筛选出的各种外膜蛋白的 CTL 优势表位、Th 细胞优势表位和 B 细胞优势表位,以及 1.3.1 的方法,共设计出 64 种多表位亚单位疫苗,分别命名为 NV-1、NV-2、NV-3、……、NV-64。通过免疫模拟从体液免疫反应、细胞免疫反应和免疫记忆等方面综合评价后,筛选出 3 种(NV-17、NV-20 和 NV-29)具有最佳免疫应答潜力的优势亚单位候选疫苗(表 3)。

体液免疫反应的模拟结果显示,3 种疫苗在体液免疫的再次免疫应答中显示出更高的抗体水平(IgM+IgG、IgG1+IgG2)和更快速的抗原清除效率(图 3A、图 4A、图 5A);同时,几种 B 细胞同种型的长期存在,意味着潜在的抗体类别转换和记忆 B 细胞已经产生(图 3B、图 4B、图 5B)。这一结果说明,在连续受到疫苗抗原刺激后,随着抗体类别

转换、抗体亲合力成熟以及免疫记忆细胞的发育,抗体对抗原的中和作用增强。细胞免疫反应的模拟结果显示,免疫 3 种疫苗后 Th 细胞和 CTL 的数量明显增加,且细胞的峰值均较高(图 3C~D、图 4C~D、图 5C~D);同时,作为抗原呈递细胞的巨噬细胞,其活性和参与度均较初次免疫显著增加(图 3E、图 4E、图 5E)。此外,在细胞因子诱生的免疫模拟中,3 种亚单位疫苗均可诱导产生多种高浓度的细胞因子,其中最显著的是白细胞介素(interleukin, IL)-2 及 IFN- γ (图 3F、图 4F、图 5F)。值得注意的是,在长达 350 d 后,记忆 B 细胞和记忆 Th 细胞仍维持在较高水平(图 3B~C、图 4B~C、图 5B~C)。

以上结果显示,在分别接受 NV-17、NV-20 和 NV-29 疫苗刺激后,与初级免疫反应相比,随后的两次免疫刺激表现出更强大的体液免疫反应和细胞免疫反应,且免疫记忆维持时间长。

此外,经抗原性、细胞毒性和致敏性检测,3

表 3 三种优势亚单位候选疫苗的氨基酸序列
Table 3 Amino acid sequences of the three dominant subunit vaccine candidates

Name of vaccine	Vaccine construct
NG vaccine-17 (NV-17)	EAAAK GLFGVLGSI AKHVLPHV VPVIAEK EAAAK AKFVAAWTLKAAAA AY LISAAVIGL AA YAVFFSLQL KA AY VMLDGSVG KA AYSLKPLVL ALA AYGLHATYYS LA AYKLSALF VALA AYKVLAQRLSR GP PGDARVVAHTKLIG GGEG PG PGSSEVLLDRPDIRAAEG PG PGTGVWAFAPSITLPIF GP PGVWAFAPSITLPIFTW GP PGPKADY AHA ARSREQAR GP PGQAPQYVDETISLAK KK HAARSREQARN KK EFTITLKHTGTQPKAS KK FKDGVGA KK DGVG AADTDYVKPDDA KK DGATGEERFRAGI KK PHDKKSGRNRYQ KK DQSGDVTVGDRF KK GVDFNQ KK SNESGS PERTEAAVQ KK AKFVAAWTLKAAA GGGGS
NG vaccine-20 (NV-20)	EAAAK GLFGVLGSI AKHVLPHV VPVIAEK EAAAK AKFVAAWTLKAAAA AY LISAAVIGL AA YAVFFSLQL KA AY VMLDGSVG KA AYSLKPLVL ALA AYGLHATYYS LA AYTMVDGITQ TG PGPGDARVVAHTKLIGGEG PG PGSSEV LLDRPDIRAAEG PG PGTGVWAFAPSITLPIF GP PGVWAFAPSITLPIFTW GP PGPKADY AHA ARSREQAR GP PG QAPQYVDETISLAK KK HAARSREQARN KK EFTITLKHTGTQPKAS KK FKDGVGA KK DGVGAADTDYVKPDDA KK DGATGEERFRAGI KK PHDKKSGRNRYQ KK DQSGDVTVGDRF KK GVDFNQ KK SNESGSPERTEAAVQ KK AKFVAAWTLKAAA GGGGS
NG vaccine-29 (NV-29)	EAAAK GLFGVLGSI AKHVLPHV VPVIAEK EAAAK AKFVAAWTLKAAAA AY LISAAVIGL AA YAVFFSLQL KA AY VMLDGSVG KA AYSLKPLVL ALA AYGLHATYYS LA AYKLSALF VALA AYKVLAQRLSR GP PGDARVVAHTKLIG GGEG PG PGSSEVLLDRPDIRAAEG PG PGTGVWAFAPSITLPIF GP PGVWAFAPSITLPIFTW GP PGPKADY AHA ARSREQAR GP PGGAGYRPAPGKVLNARG PG PGRSWDVAFASGGIGCR GP PGGACWYVKAASVEADRG GP PG PGHATYYSLSDFGKAS KK HAARSREQARN KK EFTITLKHTGTQPKAS KK FKDGVGA KK DGVGAADTDYVKPD DA KK DGATGEERFRAGI KK PHDKKSGRNRYQ KK DQSGDVTVGDRF KK GVDFNQ KK SNESGSPERTEAAVQ KK AKFVAAWTLKAAA GGGGS

注: 黑体字母表示连接器。

Note: The bold letters indicate the linkers.

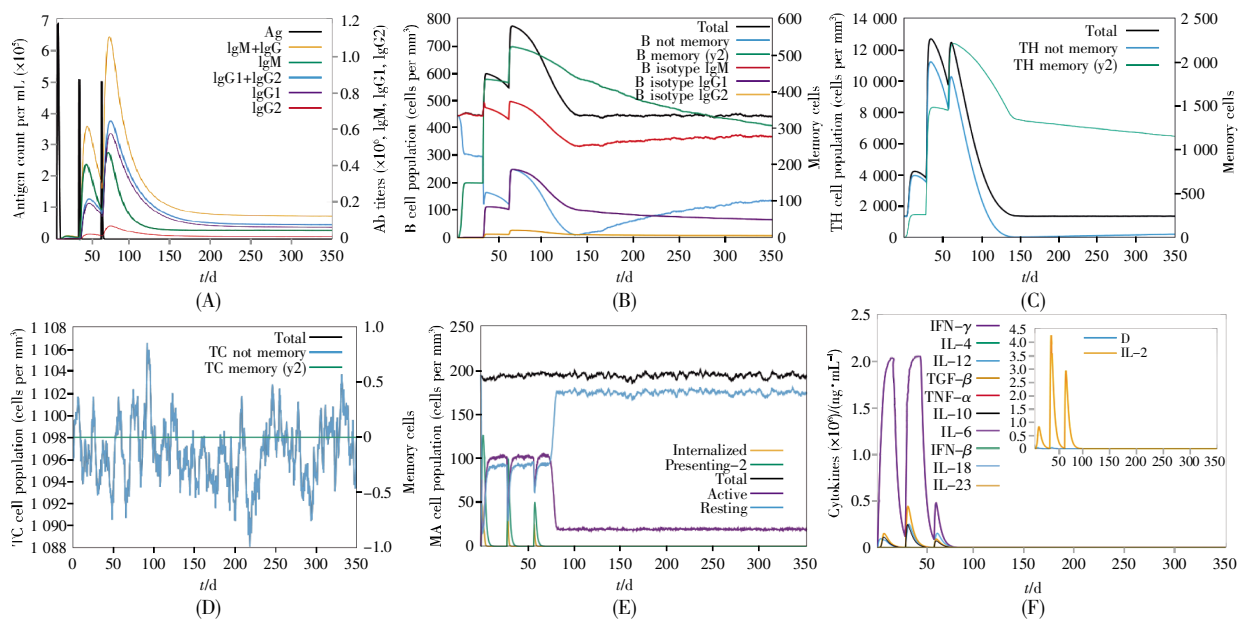


图 3 NV-17 计算机免疫模拟的 C-ImmSim 演示

(A) 抗体的滴度和抗原的浓度; (B) B 细胞数量; (C) Th 细胞数量; (D) CTL 数量; (E) 不同状态巨噬细胞数量; (F) 细胞因子的产生和辛普森指数 D。

Fig.3 C-ImmSim presentation of an *in silico* immune simulation with NV-17

(A) Antibody titer and antigen concentration; (B) B cell population; (C) Th cell population; (D) CTL population; (E) Different states of macrophage (MA) population; (F) Cytokine production and Simpson index D.

种亚单位疫苗均满足抗原性强、对人体无细胞毒性和致敏性的要求。

2.3 优势亚单位候选疫苗的理化性质及溶解性

NV-17、NV-20 和 NV-29 的理论等电点均大于 7, 表明其均为碱性蛋白质; 亲水值都为负值,

表明其均为亲水性蛋白质; 脂肪指数都大于 70, 表明三者均具有良好的耐热性; 稳定指数均小于 40, 反映 3 种疫苗构建体均较稳定。3 种疫苗构建体在大肠杆菌的半衰期均大于 10 h, 提示 3 种疫苗可在大肠杆菌中稳定表达; 经溶解性评估, 3 种

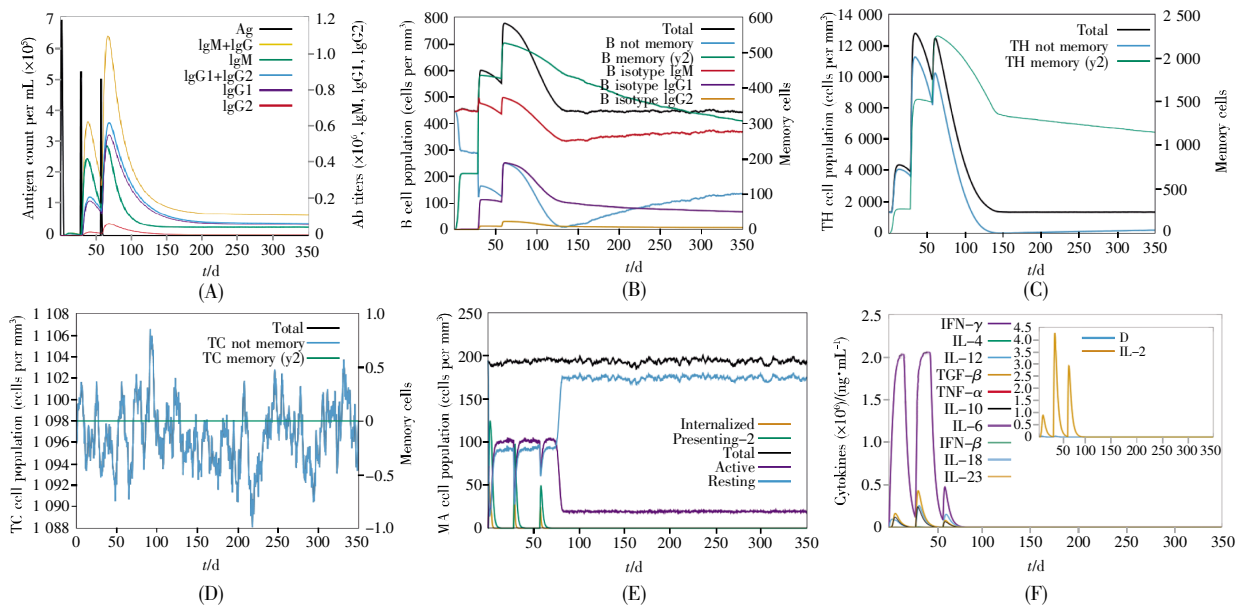


图4 NV-20 计算机免疫模拟的 C-ImmSim 演示

(A) 抗体的滴度和抗原的浓度; (B) B 细胞数量; (C) Th 细胞数量; (D) CTL 数量; (E) 不同状态巨噬细胞数量; (F) 细胞因子的产生和辛普森指数 D。

Fig.4 C-ImmSim presentation of an *in silico* immune simulation with NV-20

(A) Antibody titer and antigen concentration; (B) B cell population; (C) Th cell population; (D) CTL population; (E) Different states of macrophage (MA) population; (F) Cytokine production and Simpson index D.

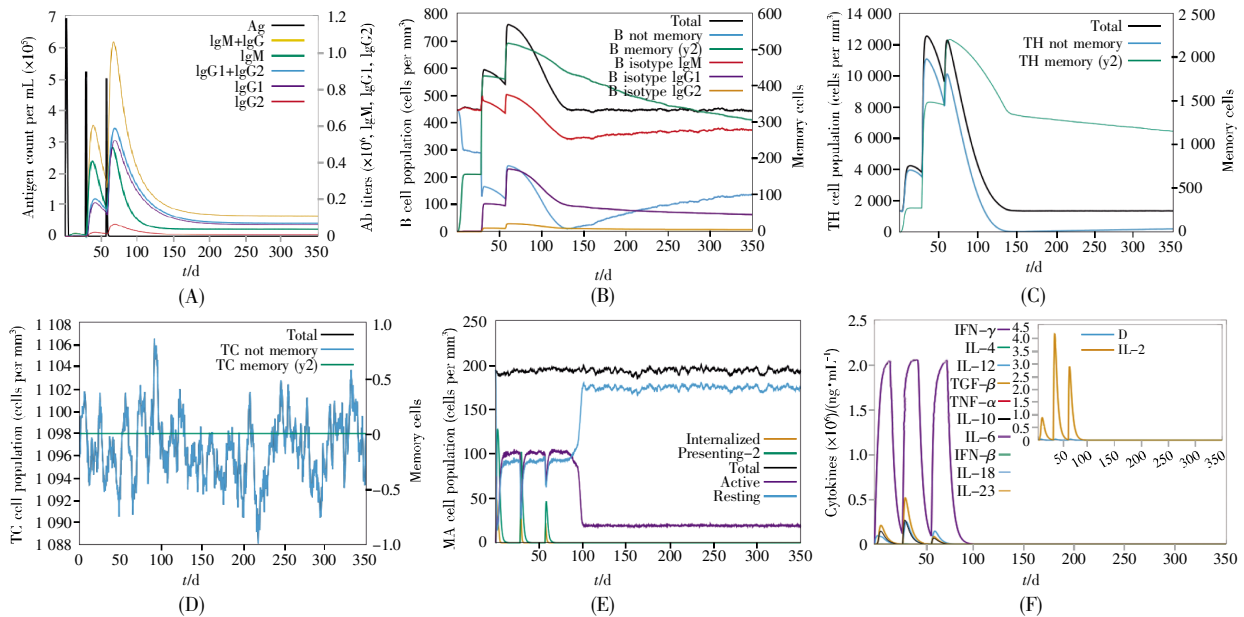


图5 NV-29 计算机免疫模拟的 C-ImmSim 演示

(A) 抗体的滴度和抗原的浓度; (B) B 细胞数量; (C) Th 细胞数量; (D) CTL 数量; (E) 不同状态巨噬细胞数量; (F) 细胞因子的产生和辛普森指数 D。

Fig.5 C-ImmSim presentation of an *in silico* immune simulation with NV-29

(A) Antibody titer and antigen concentration; (B) B cell population; (C) Th cell population; (D) CTL population; (E) Different states macrophage (MA) population; (F) Cytokine production and Simpson index D.

疫苗在大肠杆菌中过表达时都是可溶的(表 4)。上述结果表明, 3 种疫苗构建体均为亲水性、耐热性较好的稳定蛋白质, 有在大肠杆菌中实现可溶性过表达的潜能, 便于表达和纯化。

2.4 优势亚单位候选疫苗的二级结构

SOPMA 软件的预测结果显示, 3 种亚单位疫苗的 β 转角和无规卷曲结构占比分别为 44.00%、46.13%、49.13% (图 6), 说明 3 种亚单位疫苗与相

表 4 三种优势亚单位疫苗的理化性质和溶解度

Table 4 Physicochemical properties and solubility of the three dominant subunit vaccines

Name of vaccine	Number of amino acid	Isoelectric point	Grand average of hydropathicity	Aliphatic index	Instability index	Half-life in <i>E. coli</i> cell culture system	Solubility
NV-17	400	9.92	-0.245	77.78	16.15	>10 h	0.926
NV-20	388	9.92	-0.290	74.12	15.26	>10 h	0.924
NV-29	460	9.99	-0.272	72.33	16.70	>10 h	0.905

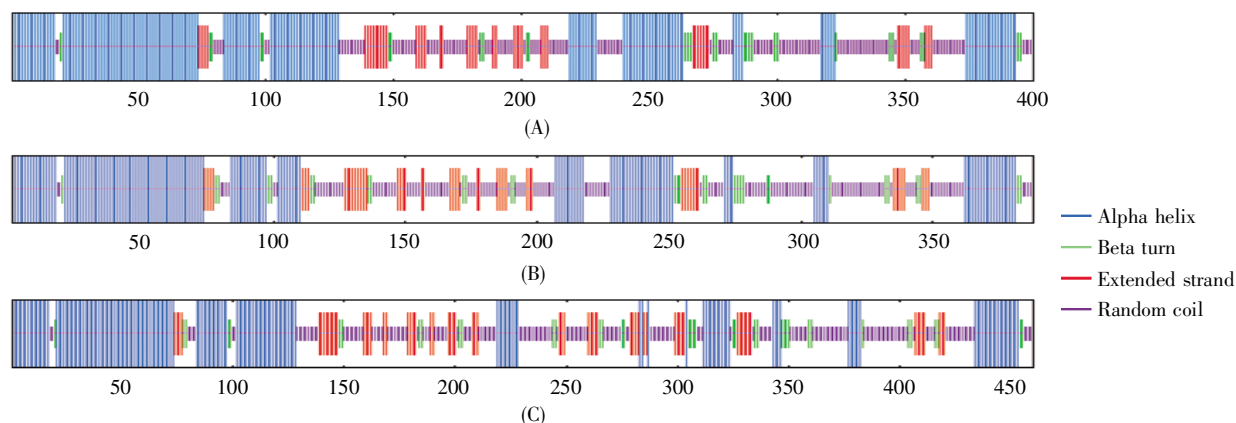


图 6 优势亚单位候选疫苗的二级结构预测

(A) NV-17 的二级结构组成; (B) NV-20 的二级结构组成; (C) NV-29 的二级结构组成。

Fig.6 Secondary structure prediction of the dominant subunit vaccine candidates

(A) Secondary structure composition of NV-17; (B) Secondary structure composition of NV-20; (C) Secondary structure composition of NV-29.

应抗体的亲和力较强,可更好激发免疫应答。

3 讨论

淋病是由 NG 引起的性传播感染性疾病,世界卫生组织已将 NG 列为全球应对抗微生物药物耐药性(antimicrobial resistance, AMR)的“高度优先”病原体^[13]。近年来,淋病的发病率呈持续上升趋势,NG 对抗菌药物的耐药性也不断增强。因此,如何预防和控制淋病的发生显得尤为重要,而有效的 NG 疫苗是预防和控制淋病的关键因素^[14]。然而几十年来,NG 疫苗研发进展缓慢,目前仅有 NG 的外膜囊泡疫苗、脂寡糖表位和纯化蛋白质亚单位疫苗正处在临床前开发阶段,尚未进入人体临床试验^[15]。迄今为止,还没有一种能预防 NG 感染的有效疫苗^[16]。因此,积极开展 NG 疫苗研究是实现淋病有效防控的重要措施。

表位疫苗只含有能够诱导细胞免疫反应和体液免疫反应的 T 细胞与 B 细胞的优势抗原表位,它通过可诱导高度靶向免疫反应的短肽片段来激发机体的保护性免疫应答。与天然蛋白质抗原相比较,表位疫苗仅由若干优势表位的短肽组成,从而减少了疫苗的致敏性或不良性反应^[17]。表位

疫苗以其特异性高、安全性和稳定性好、易于生产和储存等优点,在疫苗开发领域引起了越来越多的关注。近些年来,生物信息学发展迅速,其中,免疫信息学方面涌现出许多新技术和新应用,为多表位疫苗的研究提供了便捷高效的途径。比如,在刚地弓形虫^[18]、登革病毒^[19]和冠状病毒^[20]等多表位疫苗的研究中,表位预测与结构分析的相关技术发挥了重要的作用。有学者通过对 B 群链球菌中多达 11 种高度保守的蛋白质进行免疫信息学分析,设计了一种针对所有 B 群链球菌血清型的多表位疫苗;并通过实验研究发现,这种疫苗可为小鼠提供强大的免疫保护,免疫该疫苗后的小鼠在攻毒实验中存活率高达 100%^[21]。C-Imm-Sim 在线服务器是一种近年来新兴的免疫应答模拟技术。其可通过计算机模拟 Th 细胞、CTL、B 细胞、浆细胞、巨噬细胞和树突状细胞等主要细胞类别,检测抗原刺激免疫细胞所产生的免疫应答能力;可借助通用接触潜力来估计 T 细胞受体与抗原呈递细胞、感染细胞或恶性(肿瘤)细胞呈递的肽之间的亲和力;可用于描述免疫系统对抗原的识别和反应过程的不同阶段,能够表征疫苗的免疫原性和免疫应答特性^[12, 22]。因此,相较于传统疫苗

的开发方式,应用基于计算机的免疫信息学相关技术来设计多表位疫苗,并模拟和预评估其免疫效果,可在节约成本和时间的同时,高通量地筛选潜在表位和多表位疫苗,尤其是在结核分枝杆菌和NG这些容易产生耐药性的苛养菌的多表位疫苗研发方面,更具有优势^[23-25]。

在本研究中,多表位亚单位疫苗构建体的设计引入了PADRE序列和caerin1.9序列,前者可提高疫苗的CTL免疫应答^[26-27],后者可作为佐剂增强疫苗的免疫应答,同时caerin1.9序列对常驻乳酸杆菌的毒性较小且具有选择性抑制NG生长的潜能^[28];此外,在不同表位序列间使用了合适的连接子(EAAAK、AYY、GPGPG、KK、GGGS),它们可改善融合蛋白结构的稳定性、生物活性和表达水平^[22, 29]。在优势表位的筛选和多表位疫苗免疫效果的预测方面,本研究主要基于C-ImmSim等免疫信息学技术,通过筛选优势表位来构建NG多表位亚单位疫苗,并通过计算机模拟免疫应答来进一步评估这些疫苗的潜在免疫效果。在显著减少疫苗开发的时间与成本的情况下,本研究从NG的6种保守外膜蛋白中筛选出优势表位,设计了64种多表位不同组合的亚单位疫苗,并筛选出了3种最具有疫苗开发潜力的候选亚单位疫苗构建体——NV-17、NV-20和NV-29。经抗原性、致敏性、理化性质、溶解性评估以及二级结构分析,3种候选亚单位疫苗均符合疫苗的设计标准。需要指出的是,NV-17与NV-20在体液免疫、细胞免疫和诱导产生细胞因子方面显示出极大的相似性。通过对比分析发现,在氨基酸序列方面,二者的一致性高达94.5%;在表位组成方面,二者仅存在3个CTL表位的不同,因而这两种疫苗在免疫效果上具有高度相似性也是可以理解的。

参考文献(References):

- [1] World Health Organization. Report on global sexually transmitted infection surveillance 2018[EB/OL]. [2023-12-02]. <https://www.who.int/publications/item/9789241565691>.
- [2] MAHAPURE K, SINGH A. A review of recent advances in our understanding of *Neisseria gonorrhoeae*[J]. Cureus, 2023, 15(8): e43464.
- [3] UNEMO M, SEIFERT H S, HOOK E W, et al. Gonorrhoea[J]. Nature Reviews Disease Primers, 2019, 5: 79.
- [4] BOWEN V B, JOHNSON S D, WESTON E J, et al. Gonorrhea[J]. Current Epidemiology Reports, 2017, 4(1): 1-10.
- [5] GUVENC F, KAUL R, GRAY-OWEN S D. Intimate relations: molecular and immunologic interactions between *Neisseria gonorrhoeae* and HIV-1[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 1299.
- [6] ROWLEY J, VANDER HOORN S, KORENROMP E, et al. Chlamydia, gonorrhoea, trichomoniasis and syphilis: global prevalence and incidence estimates, 2016[J]. Bulletin of the World Health Organization, 2019, 97(8): 548-562P.
- [7] OMEERSHFFUDIN U N M, KUMAR S. Antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: broad-spectrum drug target identification using subtractive genomics[J]. Genomics & Informatics, 2023, 21(1): e5.
- [8] BOSLEGO J W, TRAMONT E C, CHUNG R C, et al. Efficacy trial of a parenteral gonococcal pilus vaccine in men[J]. Vaccine, 1991, 9(3): 154-162.
- [9] GREENBERG L, DIENA B B, ASHTON F A, et al. Gonococcal vaccine studies in Inuvik[J]. Canadian Journal of Public Health, 1974, 65(1): 29-33.
- [10] TRAMONT E C. Gonococcal vaccines[J]. Clinical Microbiology Reviews, 1989, 2(Suppl.): S74-S77.
- [11] JEFFERSON A, SMITH A, FASINU P S, et al. Sexually transmitted *Neisseria gonorrhoeae* infections—update on drug treatment and vaccine development[J]. Medicines, 2021, 8(2): 11.
- [12] RAPIN N, LUND O, BERNASCHI M, et al. Computational immunology meets bioinformatics: the use of prediction tools for molecular binding in the simulation of the immune system[J]. PLoS One, 2010, 5(4): e9862.
- [13] TACCONELLI E, CARRARA E, SAVOLDI A, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis[J]. The Lancet Infectious Diseases, 2018, 18(3): 318-327.
- [14] RUBIN D H F, ROSS J D C, GRAD Y H. The frontiers of addressing antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae*[J]. Translational Research, 2020, 220: 122-137.
- [15] GOTTLIEB S L, JERSE A E, DELANY-MORETLWE S, et al. Advancing vaccine development for gonorrhoea and the Global STI Vaccine Roadmap[J]. Sexual Health, 2019, 16(5): 426-432.
- [16] MAURAKIS S A, CORNELISSEN C N. Recent progress towards a gonococcal vaccine[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2022, 12: 881392.
- [17] HAMLEY I W. Peptides for vaccine development[J]. ACS Applied Bio Materials, 2022, 5(3): 905-944.
- [18] FOROUHARMEHR A. Engineering an efficient poly-epitope vaccine against *Toxoplasma gondii* infection: a computational vaccinology study[J]. Microbial Pathogenesis, 2021, 152: 104646.
- [19] KAUSHIK V, SUNIL KRISHNAN G, GUPTA L R, et al. Immunoinformatics aided design and *in-vivo* validation of a cross-reactive peptide based multi-epitope vaccine targeting multiple serotypes of dengue virus[J]. Frontiers in Immunology, 2022, 13: 865180.
- [20] PRAKASH S, DHANUSHKODI N R, ZAYOU L, et al. Cross-protection induced by highly conserved human B, CD4⁺, and CD8⁺ T cell epitopes-based coronavirus vaccine against severe infection, disease, and death caused by multiple SARS-CoV-2 variants of concern[J/OL]. bioRxiv, 2023 [2023-12-06]. <https://doi.org/10.1101/2023.05.24.541850>.
- [21] ZHANG Y M, LIANG S, ZHANG S Y, et al. Development and evaluation of a multi-epitope subunit vaccine against group B *Streptococcus* infection[J]. Emerging Microbes and Infections, 2022, 11(1): 2371-2382.
- [22] SARKAR B, ULLAH M A, ARAF Y, et al. Designing novel epitope-based polyvalent vaccines against herpes simplex virus-1 and 2 exploiting the immunoinformatics approach[J]. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 2021, 39(17): 6585-6605.

- [23] KHALID K, POH C L. The promising potential of reverse vaccinology-based next-generation vaccine development over conventional vaccines against antibiotic-resistant bacteria[J]. *Vaccines*, 2023, 11(7): 1264.
- [24] BIBI S, ULLAH I, ZHU B D, *et al.* *In silico* analysis of epitope-based vaccine candidate against tuberculosis using reverse vaccinology[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11: 1249.
- [25] SHAWAN M M A K, SHARMA A R, HALDER S K, *et al.* Advances in computational and bioinformatics tools and databases for designing and developing a multi-epitope-based peptide vaccine[J]. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 2023, 29(4): 60.
- [26] WU C Y, MONIE A, PANG X W, *et al.* Improving therapeutic HPV peptide-based vaccine potency by enhancing CD4⁺ T help and dendritic cell activation[J]. *Journal of Biomedical Science*, 2010, 17: 88.
- [27] SARKAR B, ULLAH M A, ARAF Y. A systematic and reverse vaccinology approach to design novel subunit vaccines against dengue virus type-1 (DENV-1) and human papillomavirus-16 (HPV-16)[J]. *Informatics in Medicine Unlocked*, 2020, 19: 100343.
- [28] ROLLINS-SMITH L A, SMITH P B, LEDECZI A M, *et al.* Cae-
rin 1 antimicrobial peptides that inhibit HIV and *Neisseria* may spare protective lactobacilli[J]. *Antibiotics*, 2020, 9(10): 661.
- [29] CHEN X Y, ZARO J L, SHEN W C. Fusion protein linkers: property, design and functionality[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2013, 65(10): 1357-1369.

(上接第 326 页)

- [48] DOLLINS A B, KROCK L P, STORM W F, *et al.* L-Tyrosine ameliorates some effects of lower body negative pressure stress[J]. *Physiology & Behavior*, 1995, 57(2): 223-230.
- [49] 蔡燕珊, 薛雄燕, 邓德金, 等. 中枢神经递质与内分泌激素联合检测在抑郁症诊疗中的应用[J]. *中国实用乡村医生杂志* (CAI Yanshan, XUE Xiongyan, DENG Dejin, *et al.* Application of combined detection of central neurotransmitters and endocrine hormones in diagnosis and therapy of depression[J]. *Chinese Practical Journal of Rural Doctor*), 2024, 31(2): 55-58.
- [50] WANG X Y, VILLAR V A M, ARMANDO I, *et al.* Dopamine, kidney, and hypertension: studies in dopamine receptor knock-out mice[J]. *Pediatric Nephrology*, 2008, 23(12): 2131-2146.
- [51] 郑胜辉. 儿茶酚胺代谢途径在蝙蝠冬眠中的分子变化机制[D]. 上海: 华东师范大学(ZHENG Shenghui. Molecular Mechanism of Catabolic Changes of Catecholamines in Bat Hibernation[D]. Shanghai: East China Normal University), 2018.
- [52] 潘祥福. 酪氨酸、儿茶酚胺与应激[J]. *中国公共卫生* (PAN Xiang-fu. Tyrosine, catecholamines, and stress[J]. *Chinese Journal of Public Health*), 1998, 14(3): 185-186.
- [53] 董懿, 康馨月, 王春生. 哺乳动物黑色素生物合成及其调控机制研究进展[J]. *生命科学* (DONG Yi, KANG Xinyue, WANG Chunsheng. Progress on the research of biosynthesis and regulation of mammalian melanin[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*), 2022, 34(8): 990-1000.
- [54] 季立才. 黑色素[J]. *生命的化学* (JI Licai. Melanin[J]. *Chemistry of Life*), 1991, 11(1): 3-5.
- [55] 黎观红, 游金明, 瞿明仁, 等. 日粮酪氨酸水平对泰和乌骨鸡生产性能及组织黑色素含量的影响[J]. *中国兽医学报* (LI Guan-hong, YOU Jinming, QU Mingren, *et al.* Effects of dietary tyrosine levels on performance and melanin contents in tissues of Taihe silky fowls aged from 5 to 12 weeks of age[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*), 2009, 29(11): 1481-1484.
- [56] 王鑫磊. 豫粉 1 号蛋鸡 H 系羽色相关基因鉴定及酪氨酸对其表达调控研究[D]. 郑州: 河南农业大学(WANG Xinlei. Identification of the Plumage Color Related Gene in Line H of Yufen 1 Egg-laying Chicken and Study on the Regulation of Tyrosine on the Expression of These Genes[D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University), 2019.
- [57] 江彦, 刘青, 王琤. 酪氨酸对泰和乌骨鸡黑色素合成的影响[J]. *中国家禽* (JIANG Yan, LIU Qing, WANG Cheng. Effects of tyrosine on melanin synthesis in silky fowl[J]. *China Poultry*), 2017, 39(23): 47-50.
- [58] 肖红. 酪氨酸影响泰和乌骨鸡黑色素生成的细胞学机理[D]. 南昌: 江西农业大学(XIAO Hong. The Cytological Mechanism of Melanogenesis by Tyrosine in Taihe Black-bone Silky Fowl[D]. Nanchang: Jiangxi Agricultural University), 2013.
- [59] 张倩云, 王鹏飞, 从光雷, 等. 硒与酪氨酸对凌云乌鸡抗氧化功能、免疫球蛋白、酪氨酸酶活性和黑色素含量的影响[J]. *饲料工业* (ZHANG Qianyun, WANG Pengfei, CONG Guanglei, *et al.* Effects of selenium and tyrosine on antioxidant function, immuno globulin, tyrosinase active and melanin deposition of Lingyun black bone chicken[J]. *Feed Industry*), 2021, 42(14): 20-27.
- [60] 赵红如, 李雪敏. 酪胺对小鼠三叉神经节神经元离子通道和兴奋性的调节[C]//中华医学会疼痛学分会第十一届学术年会论文集. 北京: 中华医学会疼痛学分会(ZHAO Hongru, LI Xue-min. Regulation of ion channels and excitability in mouse trigeminal ganglion neurons by tyramine[C]//Proceedings of the 11th Academic Annual Conference of the Pain Branch of the Chinese Medical Association. Beijing: Chinese Association for the Study of Pain), 2014: 53.
- [61] 李雪敏, 陶金, 赵红如. 酪胺对小鼠三叉神经节神经元 A 型钾通道的影响[J]. *中国疼痛医学杂志* (LI Xue-min, TAO Jin, ZHAO Hongru. Effects of tyramine on A-type potassium currents in trigeminal ganglion neurons in mice[J]. *Chinese Journal of Pain Medicine*), 2016, 22(1): 17-22.
- [62] 霍文婕. 高谷物日粮改变山羊瘤胃代谢的微生物学机制研究[D]. 南京: 南京农业大学(HUO Wenjie. Microbiologic Mechanism of High Grain Diet Alter Ruminant Metabolism in Goat[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University), 2014.
- [63] 李赵志, 曹阳, 李静, 等. 朝鲜牛尿酸酶基因的遗传多样性分析[J]. *安徽农业科学* (LI Zhaozhi, CAO Yang, LI Jing, *et al.* Genetic diversity analysis on homogentisicase gene from Korean cattle[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*), 2009, 37(32): 15701-15702, 15733.
- [64] 肖楚丽, 李金成, 李碧蓉, 等. 对香豆酸对急性应激诱导小鼠记忆提取障碍的改善作用[J]. *中国药理学通报* (XIAO Chuli, LI Jincheng, LI Birong, *et al.* *p*-Coumaric acid ameliorates acute stress induced memory retrieval deficit[J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*), 2020, 36(9): 1248-1253.