

# 血型 A 抗原模拟肽表位分析\*

曹奎杰<sup>1</sup> 汤兆明<sup>2</sup> 方敏<sup>2</sup> 胡丽华<sup>2</sup>

**[摘要]** 目的:通过计算机辅助的氨基酸定点突变及分子对接研究血型 A 抗原模拟多肽(EYWYCGMNRTGC)中关键的氨基酸残基。方法:通过在线服务器 PEP-FOLD 构建丙氨酸突变后多肽的三维结构,通过软件 Autodock Vina 将多肽与血型 A 抗体(PDB:1jv5)进行对接,计算亲和力,通过分析亲和力的变化确定模拟多肽中的关键氨基酸残基。结果:肽 EYWYCGMNRTGC 与 1jv5 的对接最小自由能为 -6.3 kcal/mol,其中 E1、W3、T10、C12 经丙氨酸替换后与 1jv5 的亲合自由能分别增加为 -6.1 kcal/mol、-5.4 kcal/mol、-6.0 kcal/mol、-6.1 kcal/mol。结论:血型 A 抗原模拟肽 EYWYCGMNRTGC 中的关键氨基酸可能是 E1、W3、T10、C12。

**[关键词]** 血型 A 抗原;模拟多肽;计算机辅助分子对接

**[中图分类号]** R457.11 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1004-2806(2013)06-0379-03

## Epitope analysis of peptide mimic of blood group A antigen

CAO Kuijie<sup>1</sup> TANG Zhaoming<sup>2</sup> FANG Min<sup>2</sup> HU Lihua<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Department of Transfusion Medicine, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430022, China; <sup>2</sup>Department of Laboratory Medicine, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology)

Corresponding author: HU Lihua, E-mail: zhaom\_tang@hust.edu.cn

**Abstract Objective:** To investigate the key amino acids of peptide mimic (EYWYCGMNRTGC) of blood group A by computer aided molecular docking. **Method:** The peptide were substituted by alanine one by one. Web server of PEP-FOLD was used to construct the 3D structures of the original and substituted peptides. Autodock Vina software was used to predict the interaction between these peptides and monoclonal anti-A (PDB:1jv5). The affinity value were calculate by this software. **Result:** The interaction between peptide and 1jv5 had the lowest energy of -6.3 kcal/mol. After substitution of E1, W3, T10 and C12 by alanine, the energy increased to -6.1 kcal/mol, -5.4 kcal/mol, -6.0 kcal/mol and -6.1 kcal/mol respectively. **Conclusion:** The key amino acids in peptide EYWYCGMNRTGC are E1, W3, T10 and C12.

**Key words** blood group A antigen; peptide mimics; computer aided molecular dock

抗原表位也被称为抗原决定簇,是可以被免疫系统尤其是抗体(或 B 细胞)和 T 细胞识别的抗原部分。蛋白质抗原的表位通常被分为构象性抗原表位和线性抗原表位,这主要决定于其结构以及与抗体的相互作用。当前研究较多的是能被抗体特异性结合的线性抗原表位。由于研究方法比较困难,其他种类的抗原表位研究进展较慢。抗原表位的研究方法主要是:X 射线衍射与核磁共振法、计算机辅助的表位预测方法、化学切割法或酶法、合成肽库法等<sup>[1]</sup>。

为了研究血型 A 抗原表位的多肽模拟物,我们在前期的工作中通过噬菌体展示技术获得一条具有模拟血型 A 抗原作用的肽 EYWYCGMNRTGC<sup>[2]</sup>。天然的血型 A 抗原由糖蛋白构成,其中的表位是三寡糖结构成分。用多肽模拟此天然的糖抗原具有诸多优点,例如肽比较容易合成、具有比

糖抗原更好的抗原性和免疫原性等。一般认为抗体识别的抗原表位含 5~6 个氨基酸,而其中起关键作用的往往是 2~3 个氨基酸。本文中我们采用计算机分子对接,结合计算机辅助的丙氨酸扫描方法研究了肽 EYWYCGMNRTGC 中模拟血型 A 抗原的关键氨基酸。

### 1 材料与方法

#### 1.1 肽 EYWYCGMNRTGC 丙氨酸替换及三维结构的构建

依次将肽 EYWYCGMNRTGC 中的 12 个氨基酸替换成丙氨酸。通过在线的 PEP-FOLD 软件预测多肽的 3D 结构并生成 PDB 文件。PEP-FOLD 软件根据提供的多肽氨基酸序列采用隐马尔可夫模型预测结构字母表,以 4 个氨基酸重叠的方式描述蛋白,通过改进的贪婪算法将氨基酸结构字母表拼成完整的蛋白多肽结构。

#### 1.2 各突变肽与 1jv5 的分子对接

利用 Autodock Vina 软件先采用盲法对接,确定多肽分子与抗体分子整个表面中可能的对接区域。然后在此区域范围内设置 grid 参数,其中中心

\* 基金项目:国家自然科学基金资助(No:30972820)

<sup>1</sup>华中科技大学同济医学院附属协和医院输血科(武汉,430022)

<sup>2</sup>华中科技大学同济医学院附属协和医院检验科

通信作者:胡丽华, E-mail: zhaom\_tang@hust.edu.cn

位点为  $x = -1, y = -41, z = 56$ , grid 大小为  $x = 40, y = 40, z = 40$ 。将多肽与抗体分子进行精确对接。

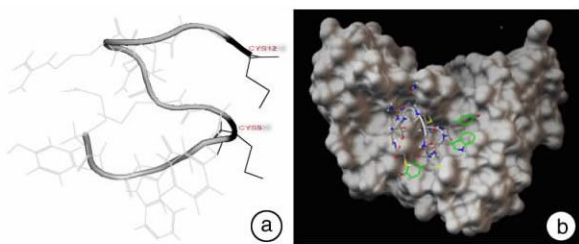
2 结果

2.1 肽 EYWYCGMNRRTGC 的三维结构

此肽中的第 5 位和第 12 位氨基酸均为半胱氨酸(CYS),此两氨基酸通常被认为可以形成分子内二硫键,如图 1a 中,此两氨基酸形成二硫键后可使整个短肽形成较大的扭曲结构。

2.2 肽 EYWYCGMNRRTGC 与抗体的分子对接

首先利用 Autodock Vina 将原始肽与 1jv5 进行对接,从图 1b 中可见此肽被对接于抗体分子的一个较大凹槽内。



a:图中深色部分显示的是两个半胱氨酸残基 5 和 12 位;b:肽 EYWYCGMNRRTGC 与抗体 1jv5 的对接抗体分子以 surface 形式显示,肽以 cartoon 和 lines 形式显示。

图 1 原始肽 EYWYCGMNRRTGC

2.3 突变多肽与抗体 1jv5 分子的对接

Autodock Vina 将各个短肽分子与 1jv5 的对接结果进行分别评分排序,每一种肽与 1jv5 的最佳对接结果(对接后复合物的最小自由能)见表 1。其中 E1、W3、T10、C12 经丙氨酸替换后与 1jv5 的亲合自由能分别增加为  $-6.1 \text{ kcal/mol}$ 、 $-5.4 \text{ kcal/mol}$ 、 $-6.0 \text{ kcal/mol}$ 、 $-6.1 \text{ kcal/mol}$ 。Y2、G6、G11 经丙氨酸替换后对接的自由能分别为  $-7.2 \text{ kcal/mol}$ 、 $-7.4 \text{ kcal/mol}$ 、 $-7.0 \text{ kcal/mol}$ 。

表 1 原始肽及各突变肽与 1jv5 的对接结果

氨基酸序列	亲合力/(kcal·mol <sup>-1</sup> )
EYWYCGMNRRTGC	-6.3
AYWYCGMNRRTGC	-6.1
EAWYCGMNRRTGC	-7.2
EYAYCGMNRRTGC	-5.4
EYWACGMNRRTGC	-6.4
EYWYAGMNRRTGC	-6.6
EYWYCAMNRRTGC	-7.4
EYWYCGANRTGC	-6.5
EYWYCGMARTGC	-6.9
EYWYCGMNRATGC	-6.9
EYWYCGMNRAGC	-6.0
EYWYCGMNRRTAC	-7.0
EYWYCGMNRRTGA	-6.1

3 讨论

蛋白质与小分子的计算机对接是研究分子间相互作用的重要手段。通过分子对接可以初步确定两个相互作用分子中的关键位点。本研究尝试了将前期研究中获得的一个血型 A 抗原模拟肽 EYWYCGMNRRTGC 进行逐步丙氨酸替换后与血型 A 抗体进行分子对接,结果发现 E1、W3、T10、C12 是肽 EYWYCGMNRRTGC 模拟血型 A 抗原关键氨基酸,其中 W3 对血型 A 抗原的模拟作用最为关键。

PEP-FOLD 是一款在线的短肽三维结构模建服务站,PEP-FOLD 首先通过结构字母表推测短肽的结构字母表特征,然后利用贪婪算法组合这些推测的短片段得到短肽最可能的结构<sup>[3-4]</sup>。PEP-FOLD 能够对含 9~36 个氨基酸的短肽进行较好的 3D 结构模建。Akhoon 等<sup>[5]</sup>通过 PEP-FOLD 将可能与 HER-2 分子中关键位点结合的短肽进行模建后,成功找到可与 HER-2 结合的短肽分子,为短肽代替抗体治疗乳腺癌提供了可能。本研究中将丙氨酸替换前后的 13 个不同短肽进行了三维结构的模建,通过模建发现不同的氨基酸残基对整个肽三维结构的影响大小不一。

利用现代的生命科学理论及计算机技术模拟蛋白质分子与其配体分子的相互作用有利于降低实验成本及劳动量。Autodock、Dock、FlexX 是当前比较成熟的几款蛋白质分子对接软件<sup>[6]</sup>。各种不同的软件都是基于不同的算法对两个分子间可能的亲和作用进行评分,根据相互结合后总能量最低的原则确定实际比较可能的分子间相互作用方式。Autodock Vina 是 Autodock 开发团队研发的改进型。Vina 的操作更为简单且对接更加准确、快速<sup>[7]</sup>。Chang 等<sup>[8]</sup>的研究提示 Vina 在进行较大分子的对接时结果较 Autodock 更为准确。本研究采用 Vina 软件将肽 EYWYCGMNRRTGC 与血型 A 单克隆抗体进行对接的结果与前期报道的比较一致<sup>[9]</sup>。进而将此肽中的氨基酸分别替换成丙氨酸后,先构建 3D 结构,然后与抗体进行对接。其对接后的计分结果提示第 3 位的氨基酸 W 以及 E1、T10、C12 是模拟血型 A 抗原比较关键的氨基酸。

本研究发现前期工作中获得的血型 A 抗原模拟肽 EYWYCGMNRRTGC 中的 W3 以及 E1、T10、C12 是比较关键的氨基酸残基,可能决定了此肽对血型 A 抗原的模拟作用。当然必须注意到的是目前计算机生物信息学技术还不是很完善,本研究中的预测结果均需要实验室的进一步验证。

参考文献

[1] GERSHONI J M,ROITBURD-BERMAN A,SIMANTOV D D,et al. Epitope mapping:the first step in de-

困难及溶血性输血不良反应的主要原因<sup>[1-2]</sup>。本研究初步得出我市红细胞血型不规则抗体检出率和特异性抗体分布规律,进一步支持了对于拟输血患者例行检查红细胞血型不规则抗体的必要性。但本文没有对多次接受输血治疗患者以及妊娠和未妊娠女性的红细胞血型不规则抗体进行调查和分析,有待进一步观察。

#### 参考文献

- [1] 杨世明,潘晓莉,张勇萍,等.红细胞血型不规则抗体筛选及其特异性鉴定[J].细胞与分子免疫学杂志,2010,26(4):396-398.
- [2] 吴勇,吴远军,陈宝婵,等.红细胞血型不规则抗体的检测和分析[J].临床输血与检验,2010,12(4):343-346.
- [3] 吴远军,刘彦慧,刘兴玲,等.汉族患者(30800例)及孕妇(4200例)红细胞血型不规则抗体分布的调查[J].第四军医大学学报,2007,28(10):922-924.
- [4] WU K H, CHU S L, CHANG J G, et al. Haemolytic disease of the new-born due to maternal irregular antibodies in the Chinese population in Taiwan[J]. Transfus Med, 2003, 13: 311-314.
- [5] LEE C K, MA E S, TANG M, et al. Prevalence and specificity of clinically significant red cell allo antibodies in Chinese women during pregnancy: a review of cases from 1997 to 2001[J]. Transfus Med, 2003, 13: 227-231.
- [6] WU K H, CHU S L, CHANG J G, et al. Haemolytic disease of the new-born due to maternal irregular antibodies in the Chinese population in Taiwan[J]. Transfus Med, 2003, 13: 311-314.
- [7] WITTKOPF D, GRUNDMANN A, SIBROWSKI W, et al. Analysis of irregular antibodies at the department of transfusion medicine of the Hamburg Eppendorf university hospital 1984-1988[J]. Infusionstherapie, 1990, 17: 280-282.
- [8] JUNGBAUER C. Routine use of DNA testing for red cell antigens in blood centres[J]. Transfusion and Apheresis Science, 2011, 45: 61-68.
- (收稿日期:2012-11-19)
- 
- (上接第380页)
- veloping epitope-based vaccines[J]. Bio Drugs, 2007, 21: 145-156.
- [2] 汤兆明,胡丽华,李一荣,等.应用噬菌体展示技术筛选血型A抗原表位的模拟多肽[J].中华检验医学杂志,2008,31(4):440-445.
- [3] MAUPETIT J, DERREUMAUX P, TUFFERY P. PEP-FOLD: an online resource for de novo peptide structure prediction[J]. Nucleic Acids Res, 2009, 37: W498-503.
- [4] THEVENET P, SHEN Y, MAUPETIT J, et al. PEP-FOLD: an updated de novo structure prediction server for both linear and disulfide bonded cyclic peptides[J]. Nucleic Acids Res, 2012, 40: W288-293.
- [5] AKHOON B A, GUPTA S K, VERMA V, et al. In silico designing and optimization of anti-breast cancer antibody mimetic oligopeptide targeting HER-2 in women[J]. J Mol Graph Model, 2010, 28: 664-669.
- [6] CLARK R D, STRIZHEV A, LEONARD J M, et al. Consensus scoring for ligand/protein interactions[J]. J Mol Graph Model, 2002, 20: 281-295.
- [7] TROTT O, OLSON A J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading[J]. J Comput Chem, 2010, 31: 455-461.
- [8] CHANG M W, AYENI C, BREUER S, et al. Virtual screening for HIV protease inhibitors: a comparison of AutoDock 4 and Vina[J]. PLoS One, 2010, 5: e11955-e11955.
- [9] 汤兆明,王琳,胡丽华.血型A抗原模拟多肽与抗A抗体的分子对接[J].临床血液学杂志:输血与检验,2010,23(10):577-579.
- (收稿日期:2012-12-12)