



猪流行性腹泻病毒的多表位 mRNA 疫苗设计与免疫评价

刘昕彤¹, 黄焕会^{1,2}, 舒建洪¹, 金伟波^{1,2}

(1. 浙江理工大学生命科学与医药学院, 杭州 310018; 2. 浙江理工大学绍兴生物医药研究院, 浙江绍兴 312366)

摘要: 为解决猪流行性腹泻病毒(Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) 现有疫苗保护力不足的问题, 结合免疫信息学与 mRNA 技术, 设计并构建一种基于多表位抗原(multi-epitope antigen, ME) 的新型疫苗。利用 VaxiJen 和 ANTIGENpro 抗原性预测工具, 以从 PEDV 结构蛋白中筛选的 S 蛋白(Q91AV1) 和 N 蛋白(Q07499) 为候选抗原, 分别采用 IEDB、ABCpred 和 NetMHCpan 软件预测了 25 条 B 细胞优势表位和 3 条 T 细胞优势表位, 并通过柔性连接肽将其串联整合, 引入 Foldon 三聚体结构及分泌信号肽构建 ME 序列; 采用 mRNA-LNP 递送系统制备 ME mRNA 疫苗, 并通过小鼠免疫实验评估该疫苗的免疫原性。结果显示: ME/S1 mRNA 联合免疫组在小鼠首次免疫后, 其 PEDV 特异性免疫球蛋白 G (Immunoglobulin G, IgG) 抗体水平 OD_{450 nm} 值为 1.250 ± 0.068, 显著高于 S1 mRNA 单免疫组 OD_{450 nm} 值(0.816 ± 0.074) 和传统灭活疫苗组 OD_{450 nm} 值(0.805 ± 0.065); ME/S1 mRNA 联合免疫组在小鼠加强免疫后, 联合组抗体滴度进一步提升, 其 OD_{450 nm} 值为 1.681 ± 0.100, 仍显著高于单免疫组 OD_{450 nm} 值(1.238 ± 0.074) 与传统灭活疫苗组 OD_{450 nm} 值(1.164 ± 0.114); ME 与 S1 mRNA 联合免疫的多表位设计可通过协同激发 B/T 细胞应答, 增强 PEDV 免疫效果。该文结果为 PEDV 防控提供了高效候选策略, 并为其他冠状病毒类动物疫苗的设计与开发提供了技术参考。

关键词: 猪流行性腹泻病毒; 多表位 mRNA 疫苗; 免疫信息学; 抗原表位; 免疫原性

中图分类号: S858.28

文献标志码: A

文章编号: 1673-3851(2026)03-0198-09

引文格式: 刘昕彤, 黄焕会, 舒建洪, 等. 猪流行性腹泻病毒的多表位 mRNA 疫苗设计与免疫评价[J]. 浙江理工大学学报(自然科学), 2026, 55(2): 198-206.

Reference Format: LIU Xintong, HUANG Huanhui, SHU Jianhong, et al. Design and immunological evaluation of a multi-epitope mRNA vaccine against porcine epidemic diarrhea virus[J]. Journal of Zhejiang Sci-Tech University, 2026, 55(2): 198-206.

Design and immunological evaluation of a multi-epitope mRNA vaccine against porcine epidemic diarrhea virus

LIU Xintong¹, HUANG Huanhui^{1,2}, SHU Jianhong¹, JIN Weibo^{1,2}

(1. College of Life Sciences and Medicine, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;

2. Shaoxing Academy of Biomedicine, Zhejiang Sci-Tech University, Shaoxing 312366, China)

Abstract: To address the insufficient protective efficacy of existing vaccines against porcine epidemic diarrhea virus (PEDV), we designed and constructed a novel vaccine based on a multi-epitope antigen (ME) by combining immunoinformatics with mRNA technology. Using VaxiJen and ANTIGENpro antigenicity prediction tools, we selected the S protein (Q91AV1) and N protein (Q07499) from PEDV structural proteins as candidate antigens. We then predicted 25 dominant B-cell epitopes and 3 dominant T-cell epitopes using IEDB, ABCpred, and NetMHCpan software, respectively. We linked these epitopes

收稿日期: 2025-04-07 网络出版日期: 2025-11-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(32172496)

作者简介: 刘昕彤(1999—), 女, 辽宁朝阳人, 硕士研究生, 主要从事 AI 辅助药物发现方向的研究。

通信作者: 金伟波, E-mail: jwb@zstu.edu.cn

with flexible peptides, and added a Foldon trimerization motif and a secretion signal peptide to construct the ME sequence. The ME mRNA vaccine was prepared using an mRNA-LNP delivery system, and its immunogenicity was evaluated through mouse immunization experiments. Results showed that after the primary immunization, the OD_{450nm} value of PEDV-specific immunoglobulin G (IgG) antibody in the ME/S1 mRNA co-immunization group was 1.250 ± 0.068 , significantly higher than that in the S1 mRNA single-immunization group (0.816 ± 0.074) and the traditional inactivated vaccine group (0.805 ± 0.065). After the booster immunization, the antibody titer in the co-immunization group further increased to an OD_{450nm} value of 1.681 ± 0.100 , still significantly higher than that in the single-immunization group (1.238 ± 0.074) and the traditional inactivated vaccine group (1.164 ± 0.114). The multi-epitope design of ME and S1 mRNA co-immunization can significantly enhance PEDV immune efficacy by synergistically stimulating B/T cell responses. This study provides an efficient candidate strategy for PEDV prevention and control and offers technical reference for the design and development of other coronavirus vaccines for animals.

Key words: porcine epidemic diarrhea virus; multi-epitope mRNA vaccine; immunoinformatics; antigenic epitope; immunogenicity

0 引言

猪流行性腹泻 (Porcine epidemic diarrhea, PED) 是由猪流行性腹泻病毒 (Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) 感染引起的一种高度接触性肠道传染病, 临床上表现为水样腹泻、呕吐以及肠绒毛萎缩, 在哺乳期仔猪中致死率可达 $80\% \sim 100\%$ ^[1-2], 对全球养猪业造成严重威胁。目前, 疫苗接种仍是 PEDV 防控的最有效手段, 已开发的疫苗类型包括灭活疫苗、减毒活疫苗以及亚单位疫苗等^[3]。灭活疫苗安全性较高, 但因无法诱导有效的细胞免疫应答, 保护效果有限。减毒活疫苗可激发较强免疫反应, 但存在毒力返祖风险, 且对异源毒株的交叉保护力不足^[4]。

亚单位疫苗是一类以病原体中的关键抗原蛋白或抗原表位为基础, 通过重组表达获得特定免疫元件的疫苗形式, 具有安全性高、可控性强、适用于大规模标准化生产等优势, 近年来在动物疫病防控中得到了广泛应用^[5-6]。在 PEDV 疫苗研究中, 由于刺突糖蛋白 (Spike protein, S 蛋白) 在介导病毒与宿主受体结合及膜融合过程中的关键作用, 它成为亚单位疫苗设计的主要靶点^[7-8]。PEDV 基因组突变频繁引起传统疫苗及单一抗原亚单位疫苗的保护效果显著下降, 难以覆盖变异毒株带来的抗原多样性, 并且蛋白疫苗的生产周期较长, 缺乏快速响应突发疫情的能力^[9]。

近年来, 免疫信息学的发展为疫苗设计提供了新的技术支撑, 通过整合抗原预测、B/T 细胞表位识别、结构建模与分子对接等技术, 研究者可以系统鉴定病毒蛋白中的高免疫原性表位, 并基于多表位

协同效应实现对疫苗的精准构建^[10-11]。为实现这类多表位抗原的高效表达与快速递送, mRNA 疫苗平台因其可编程性、无感染风险及快速响应变异等优势成为理想载体, 在新型冠状病毒感染疫情防控中已验证其应用潜力^[12]。相比传统蛋白疫苗, mRNA 疫苗的设计周期短, 仅需数周即可完成抗原构建并进行体内表达, 适用于应对 PEDV 高度变异性病毒病的快速防控需求^[13-14]。

为了解决当前 PEDV 疫苗保护效果有限、难以快速应对毒株变异等问题, 本文探索了一种基于多表位设计的新型 mRNA 疫苗策略。采用免疫信息学方法从 PEDV 结构蛋白中筛选出具有高免疫原性的候选抗原, 通过对 B、T 细胞优势表位的预测与优化, 构建了可协同激活体液与细胞免疫的多表位抗原 (Multi-epitope antigen, ME); 在疫苗设计中, 整合了分泌信号肽与 Foldon 三聚体结构, 以增强抗原表达效率与稳定性, 并采用 mRNA 平台实现高效表达; 通过结构验证与分子对接的方法, 证实构象合理性及免疫激活潜力, 并通过动物实验进一步验证疫苗的免疫原性, 以期为 PEDV 疫苗的研发提供理论参考, 并为其他高变异率动物病毒的防控提供创新性技术路径。

1 材料与与方法

1.1 材料与试剂

小鼠: 选择体重为 20 g 的 6 周龄 BALB/c 雌鼠 (杭斯生物科技有限公司), 小鼠随机分为 3 组, 每组 5 只, 在温度 (22 ± 2) °C、相对湿度约 70%、光照 12 h 和黑暗 12 h 周期的普通洁净动物房中饲养。所有动物实验均按照动物保护指导方针进行, 并经浙

江理工大学动物实验伦理委员会批准。

主要试剂: EndoFree Plasmid Mini Kit I (Omega Bio-tek)、氨苄西林(北京索莱宝科技有限公司)、*EcoR* I 限制性内切酶(宝日医生物技术(北京)有限公司)、DNA 纯化试剂盒(苏州优逸兰迪生物科技有限公司)、LiCl(上海阿拉丁生化科技股份有限公司)、EasyCap T7 Co-transcription Kit with CAG Trimer mRNA Kit(南京诺维赞生物科技股份有限公司)、mRNA 体内转染试剂盒(杭州琿信生物科技有限公司)和 PEDV-IgG 酶联免疫试剂盒(上海谷研实业有限公司)。

1.2 数据检索及抗原筛选

从 ExPASy 的 Viralzone 数据库 (<https://viralzone.expasy.org/>) 检索猪流行性腹泻病毒(CV777)的完整蛋白质组序列,并存储为 FASTA 格式文件,具体方法参考文献[15]。对上述检索到蛋白质条目通过 Vaxijen (<https://ddg-pharmfac.net/vaxijen>) 和 ANTIGENpro (<https://scratch.proteomics.ics.uci.edu/>) 工具预测抗原一致性,以确定其在引发免疫反应中的整体可能性。

1.3 候选抗原蛋白的理化性质

使用 ExPASy 提供的 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 在线工具分析候选抗原的蛋白质分子量、氨基酸组成和亲水性等理化性质,具体方法参考文献[16],并采用 AllerCatPro (<https://allercatpro.bii.a-star.edu.sg/>) 工具对候选抗原蛋白致敏性进行预测分析,具体方法参考文献[17]。

1.4 候选抗原蛋白的结构分析

使用 TMHMM Server v. 2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 和 SignalP 5.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/>) 在线工具分别对候选抗原蛋白的跨膜区及信号肽(Signal peptide, SP) 进行预测分析。

1.5 细胞表位预测

采用 ABCpred (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/abcpred/>) (选择得分 > 0.8) 和 IEDB (<https://www.iedb.org/>) 在线工具预测分析候选抗原蛋白的 B 细胞表位,将两者预测结果重合的片段作为候选表位,结果中优先选择片段较长的序列,具体方法参考文献[18]。使用 NetMHCpan 4.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetMHCpan-4.1/>) 在线工具预测候选抗原蛋白的

T 细胞表位,分子结合肽选择猪 SLA-1:0101、SLA-1:0401 和 SLA-1:080。

1.6 PEDV 多表位 mRNA 疫苗的序列设计

将表位筛选得到的来自 PEDV S 蛋白(Q91AV1) 的 20 条 B 细胞表位和 2 条 T 细胞表位,以及来自 N 蛋白(Q07499) 的 5 条 B 细胞表位和 1 条 T 细胞表位,通过柔性连接肽(linker) 得到多表位氨基酸序列,采用 linker-KK 连接 B 细胞表位,linker-AAAY 连接 T 细胞表位,具体方法参考文献[19]。为 C 端添加信号肽序列,N 端添加 T4 噬菌体的纤维蛋白三聚体化结构域(Foldon) 序列,其中 Foldon 序列与多表位序列之间使用 2 个连续的柔性连接肽(GGGGS) 连接,以保证两者的蛋白表达不会相互干扰。

1.7 PEDV 多表位 mRNA 疫苗的结构预测和评估

使用 SOPMA (https://npsa.lyon.inserm.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html) 在线工具分析 PEDV 多表位 mRNA 疫苗的二级结构,并应用 Swiss-Model (<https://swissmodel.expasy.org/>) 在线工具对多表位 mRNA 疫苗的三级结构进行预测及模型评估。通过在线工具 HDOCK 预测多表位 mRNA 疫苗与 Toll 样受体 3(Toll-like Receptor 3, TLR3) (<https://www.rcsb.org/>, PDB ID: 2A0Z) 的分子对接,具体方法参考文献[20]。

1.8 PEDV 多表位 mRNA 疫苗的制备

采用 GenSmartTM Codon Optimization 对编码 PEDV 多表位抗原的 cDNA 序列进行密码子优化,并委托九天基因科技有限公司合成。通过常规分子克隆技术将合成片段连接至 pUC19 载体,并转化至 TOP10 感受态细胞,挑取单克隆菌落接种于含氨苄西林(质量浓度 0.1 mg/mL) 的 LB 液体培养基,于 37 °C 振荡培养 12~16 h,参考 EndoFree Plasmid Mini Kit I 按说明书操作提取质粒。取 10 μg 质粒于 37 °C 水浴 2 h 进行 *EcoR* I 酶切,并通过 DNA 纯化试剂盒回收线性化片段,采用 EasyCap T7 Co-transcription Kit with CAG Trimer mRNA Kit 进行体外转录,反应体系含 1 μg 模板 DNA,于 37 °C 孵育 4 h,并用 7.5 mol/L LiCl 沉淀法纯化转录产物,并采用紫外分光光度计测定其质量浓度(ng/μL) 和纯度(A₂₆₀/A₂₈₀ 比值)。纯化后的 mRNA 与体内转染试剂按 1:1 比例混合,室温孵育 15 min 制备为 mRNA-LNP 疫苗。

1.9 小鼠免疫试验及抗体检测

取 mRNA-LNP 疫苗,通过对小鼠后腿肌肉注

射(30 μg 的 mRNA/只)进行免疫,并分别于首次免疫和加强免疫 14 d 采集小鼠血液。使用采血针对小鼠进行颌下采血,将采集血液置于洁净 1.5 mL 离心管内,并于室温下静置 2 h,以 4 $^{\circ}\text{C}$ 、3000 r/min 离心 20 min,离心后吸取上层血清并分装,使血清保存于零下 20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中;将血清稀释 10 倍,参照小鼠流行性腹泻病毒抗体免疫球蛋白 G (Immunoglobulin G, IgG) 酶联免疫分析试剂盒说明书进行抗体检测。

1.10 统计学分析

酶联免疫吸附试验 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 数据采用 GraphPad Prism 9 软件进行分析及可视化,结果以均值士标准差表示,组间统计学差异通过单因素方差分析(One-way ANOVA)进行评估,显著性水平设为 $P < 0.001$ 。

2 结果与分析

2.1 候选抗原的筛选

为了从 PEDV 编码蛋白中识别抗原性强、致敏

性低的抗原序列,从 ExPASy 的 Viralzone 数据库检索 PEDV(CV777 株)的 7 条带注释 UniProtKB 蛋白质条目,采用基于理化性质的线性表位预测工具 VaxiJen^[21] 和整合序列、结构及功能的构象表位识别工具 ANTIGENpro,以设定阈值 0.4 对其抗原性进行预测,结果见表 1 所示。从表 1 可以看出:7 条蛋白质的 VaxiJen 评分均高于阈值(0.4),依次为非结构蛋白 P0C6V6(0.46)、非结构蛋白 P0C6Y4(0.46)、包膜蛋白 Q84706(0.56)、S 蛋白 Q91AV1(0.43)、核衣壳蛋白(Nucleocapsid Protein, N 蛋白)Q07499(0.61)、膜蛋白 P59771(0.62)、非结构蛋白 Q91AV0(0.61);ANTIGENpro 评分结果中,非结构蛋白 P0C6V6(0.27)、P0C6Y4(0.27)、包膜蛋白 Q84706(0.11)、膜蛋白 P59771(0.22)及非结构蛋白 Q91AV0(0.13)的 ANTIGENpro 评分均低于阈值(0.4),说明其构象表位介导有效免疫应答的潜能较弱,S 蛋白 Q91AV1(0.53)、N 蛋白 Q07499(0.92)的 ANTIGENpro 评分则高于阈值。综上所述,Q91AV1 和 P59771 表现出更均衡的抗原性潜能,本文将其作为候选抗原开展后续分析。

表 1 PEDV 潜在抗原蛋白的抗原性概率分析表

蛋白序号	UniProt 知识库 蛋白编号	蛋白名称	抗原性概率	
			VaxiJen	ANTIGENpro
1	P0C6V6	Replicase polyprotein 1a	0.46	0.27
2	P0C6Y4	Replicase polyprotein 1ab	0.46	0.27
3	Q84706	Envelope small membrane protein	0.56	0.11
4	Q91AV1	Spike glycoprotein	0.43	0.53
5	Q07499	Nucleoprotein	0.61	0.92
6	P59771	Membrane protein	0.62	0.22
7	Q91AV0	Non-structural protein 3	0.61	0.13

2.2 候选抗原蛋白的理化性质

利用 ProtParam 在线工具,对上述发现的 2 个候选抗原(Q91AV1 和 P59771)的理化性质进行分析,结果如表 2 所示。从表 2 可以看出:S 蛋白的不稳定指数低于 40,说明该蛋白稳定性良好,脂肪族指数为 93.21,说明蛋白富含丙氨酸(Ala)、缬氨酸(Val)等脂肪族氨基酸,可通过疏水相互作用维

持蛋白核心结构的紧密性;S 蛋白的亲水性平均值(GRAVY)大于 0,说明其整体呈疏水性特征;N 蛋白的不稳定指数高于 40,且脂肪族指数仅为 58.39,低于 S 蛋白,N 蛋白缺乏脂肪族氨基酸的疏水堆积作用,空间结构松散,结构稳定性较弱,表明了 Q91AV1 与 Q07499 均无致敏性,满足疫苗候选抗原的安全性要求。

表 2 PEDV 候选抗原蛋白理化性质表

UniProt 知识库 蛋白编号	蛋白名称	分子量/kDa	理论 pI 值	不稳定指数	脂肪族 氨基酸指数	亲水性总平均值
Q91AV1	Spike glycoprotein	151.35	5.11	32.60	93.21	0.123
Q07499	Nucleoprotein	48.97	9.90	41.01	58.39	-1.104

2.3 候选抗原蛋白的结构分析

采用 TMHMM 与 SignalP 5.0 工具,分别对

S 蛋白和 N 蛋白的跨膜螺旋数量及信号肽进行预测,结果如图 1 所示。图 1 表明:Q91AV1 存

在1个跨膜区,Q07499无跨膜区;Q91AV1含信号肽,属于分泌型蛋白,Q07499无信号肽,与理化性质分析结果一致,S蛋白N端信号肽及跨膜

结构域含强疏水区域,整体呈疏水性特征,后续表位预测过程中对信号肽序列进行去除并避开跨膜区域。

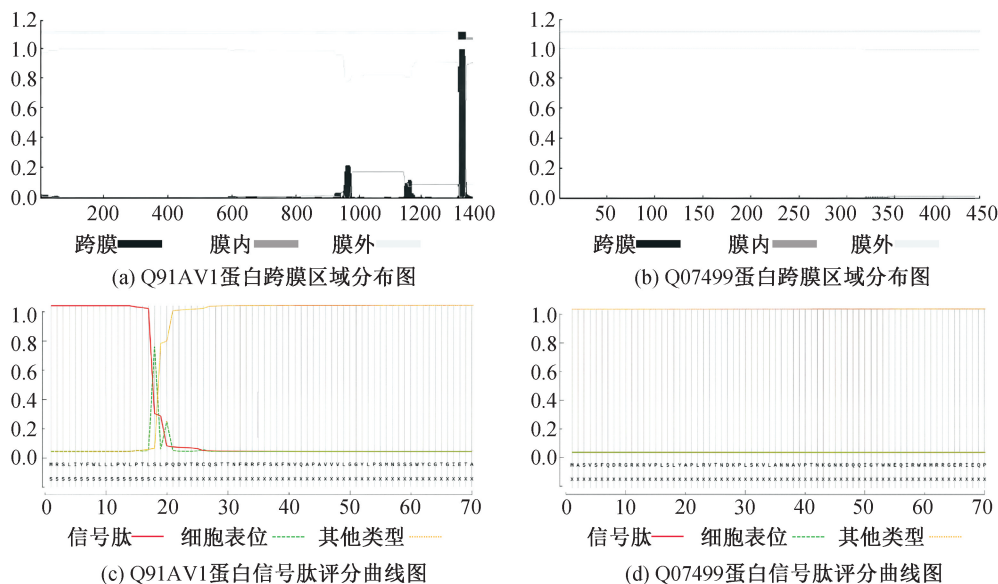


图1 候选抗原蛋白跨膜结构和信号肽预测图

2.4 B细胞表位预测

为筛选能有效激活体液免疫的B细胞抗原表位,利用ABCpred、IEDB工具进行抗原表位预测。ABCpred为基于递归神经网络的模型,其侧重序列模式识别,对长表位序列(≥ 16 aa)更为敏感,以阈值0.8筛选高置信结果;IEDB则整合Parker亲水性、Emini表面可及性等多维度参数,仅过滤长度大于5aa的序列,以覆盖更多潜在表位,两者预测重叠区域可信度高,提示此类表位兼具序列特征与理化暴露性^[22]。经ABCpred工具筛选,Q91AV1蛋白共获得55条B淋巴细胞线性表位,Q07499蛋白共获得22条;经IEDB工具筛选,Q91AV1蛋白共获得31条B淋巴细胞线性表位,Q07499蛋白共获得9条(见表3)。选取二者预测得到的高度重合区域,结合候选抗原蛋白的二级结构分析结果,综合评估筛选后得到25条候选线性B细胞表位,并通过Vaxijen工具验证抗原性,所有候选表位均高于默认阈值0.4。

2.5 T细胞表位预测

为增强疫苗激活细胞免疫应答的能力,使用NetMHCpan工具预测T细胞表位,该算法基于人工神经网络构建,可精准评估肽段与主要组织相容性复合体I类(Major histocompatibility complex class I,MHC I)分子的结合亲和力。鉴于猪源疫苗需适配宿主免疫特性,选择覆盖度较高的猪白细胞抗原(SLA-1)等位基因SLA-1:0101、SLA-1:0401

及SLA-1:080作为分子结合靶点^[23]。经预测,从候选抗原Q91AV1和Q07499中筛选出3条高亲和力CTL表位(见表4),其%Rank值均低于或等于0.5,符合强结合标准,且经VaxiJen验证抗原性得分均高于0.4。这些表位通过MHC I分子呈递后可激活CD8⁺T细胞,对清除PEDV感染的宿主细胞至关重要,与B细胞表位协同增强疫苗的保护效能^[24]。

2.6 PEDV多表位mRNA疫苗的抗原性评估和结构预测

使用柔性linker KK和AAY将上述筛选得到的25个优势B细胞表位和3个优势T细胞表位进行串联,并在C端添加分泌信号肽引导抗原蛋白分泌表达^[25],N端引入T4噬菌体Foldon三聚体化结构域增强稳定性^[26],获得PEDV多表位氨基酸序列,共包含480个氨基酸,将该氨基酸序列命名为ME。通过Vaxijen在线工具预测了ME的抗原性为0.7178,表明ME蛋白具有强免疫原性潜力,串联的25个B细胞表位和3个T细胞表位的协同作用可能是高评分的主要原因。经AllerCatPro 2.0过敏性预测,发现该ME序列无致敏性。ProtParam分析了ME的理化性质,其分子式为C₂₃₁₁H₃₇₉₇N₇₁₇O₆₉₅S₁₅,分子质量为53.23 kDa,分子量大小适合mRNA-LNP递送。理论等电点为10.20,脂肪指数为61.6,亲水性总平均值(GRAVY)为-0.929,表明该蛋白亲水性较好。

表 3 候选抗原的 B 细胞表位预测表

蛋白	氨基酸区段	B 细胞表位	氨基酸长度	抗原性得分
Q91AV1	89~100	IGISQEPFDPSG	12	1.0643
	127~140	NKTLGPTVNDVTTG	14	1.1492
	185~200	DWSRVATRCYNRRSCA	16	0.8362
	298~304	HTMDGVC	7	1.2654
	319~328	NINDTSVILA	10	1.1576
	475~481	FDLDDGF	7	1.4431
	519~528	GGLSSANLVA	10	0.9018
	562~577	SKSQDSNCPFTLQSVN	16	1.2581
	632~641	LEGITDVSFM	10	0.8992
	759~773	IGYVPSQYGQVKIAP	15	1.2734
	799~806	TPVSVDCA	8	0.8794
	836~845	LSARLESVEV	10	1.2277
	963~978	ITAAAALPFSYAVQAR	16	1.0222
	Q07499	1~16	MASVSFQDRGRKRVPL	16
39~52		VPTNKGKNDQQIGY	14	1.1900
56~65		QIRWRMRRGE	10	1.2671
84~91		GDLRYRTR	8	2.4876
101~116		EGAKTEPTNLGVRKAS	16	1.0772
141~154		PASRANSRSRSGN	14	1.1122
165~178		NRGNNQSRGNSQNR	14	1.0166
182~197		QGRGASQNRGGNNNNN	16	0.7912
232~248		SLGIGENPDRHKQQQKP	17	0.8143
264~279		NKSRATSKERDLKDIP	16	1.0176
341~356		RELADSYEITYNYKMT	16	0.9320
306~315	DAEFVEKGVD	10	1.5719	

表 4 候选抗原的 T 细胞表位预测表

蛋白	氨基酸区段	CTL 表位	氨基酸长度	抗原性得分
Q91AV1	1063~1071	SIDDIYSRL	9	0.4900
	1142~1150	QAAPQGLLF	9	0.4270
Q07499	343~351	LADSYEITY	9	0.7472

使用 SOPMA 在线工具分析 PEDV ME 的二级结构, PEDV ME 由 103 个氨基酸构成了 α 螺旋, 占总氨基酸的 21.46%, 55 个氨基酸组成伸展链, 占总氨基酸的 11.46%, 27 个氨基酸构成 β 转角, 占总氨基酸的 5.62%, 295 个氨基酸构成无规卷曲, 占总氨基酸的 61.46% (见图 2(a))。高柔性区域有利于表位暴露, 增强抗原可及性。

应用 Swiss-Model 在线工具对 PEDV ME 序列进行三维建模, 其结构表位暴露较好, 容易与抗体结合 (见图 2(b))。

图 2(c) 为拉氏图 (Ramachandran plot) 对模型主链构象的评估结果, 图中深绿色部分代表主链二面角的允许构象区, 浅黄色部分为最大允许区, 空白区域则对应不合理的构象, 模型中绝大多数残基的二面角数据点均位于允许区与最大允许区范围内,

表明预测结构的主链几何参数符合物理化学规律, 模型整体质量可信。

图 2(d) 为 Z 分数图, 表示整个模型的质量, 多表位 mRNA 疫苗序列的 Z 分数为 0.67, 表示其在天然蛋白质的特征范围内, 该三级结构模型质量较好且可信度大。

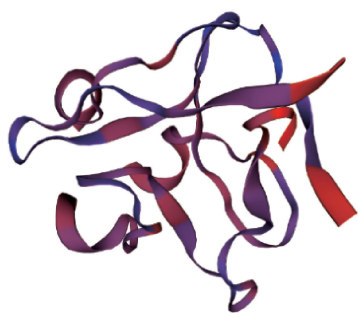
图 2(e) 为 PEDV 多表位 mRNA 疫苗与 TLR3 分子对接复合体模型, 图中 A 为 TLR3 受体的配体结合口袋, B 为 PEDV 多表位 mRNA 疫苗的表位核心区域; 该模型显示, 所制疫苗通过 B 区域的柔性肽段嵌入 TLR3 的 A 区域结合口袋。在 HDOCK 工具生成的 10 个对接模型中, 该模型 Docking 分数最低, 为 -314.34; 其置信度为 0.9640, 提示该模型具有较高可信度。通过以上数据表明, 该复合体结构为最优构象, 支持 ME 抗原通过 TLR3 激活先天免疫应答的理论假设。

```

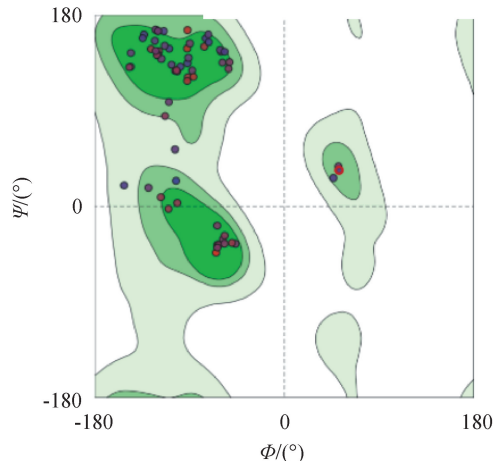
10      20      30      40      50      60      70      80      90      100     110     120     130     140
MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPSQEIHARFRRLKIGISQEPFDPSPGKKNKTLGPTVNDVTTGKKDWSRVATRCYNRRSCAKKHTMDGVCKKNINDTSVILAKKFDLDDGFKKGLSSANLVAKKSKSQDSNCPFTLQSVN
hhhhhhhhhhheeeettceeeccchhhccccccccceeecccccccccccccecttccccccccchhhhhhhhhccccccccchheeeccccctthheeechhhhtttcccttcchhhhhhhccccccccceeeehhh
KKLEGITDVSFMKIGYVPSQYQVKIAPKKTVPVSDCAKKSARLESVEVKKITAAALPFSYAVQARKKMASVFDGRGKRVPLKVKVPTNKGNDQQIGYKKQIRWRMRREKKGDLRYRTRKKEGAKTEPTNLGVR
hhhtccccccchtttccccctteeeccccccccceehhhhtttccccccccchhhhhhhhhccccccccchhhcccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccc
KASKKPASTRANSRSRSRGNKKNRGNNSQRGNSQNRKQKRGASQNRGGNNNNKKSLSLGIENPDRHQQQKPKKNKSRATSKERDLKDIPKKRELADSYEITYNYKMTKKADEFVEKGVDAAYSIDDYSLRAAYQAAAPQ
cccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccc
GLLFAAYLADSYEITYLEGGGGSGGGGSGGYIPEAPRDQAYVRKDGEWLLSTFLGRS
tccccccchttchhhhhhtccccccchttccccchhhhtccccchhhhtcccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccc

```

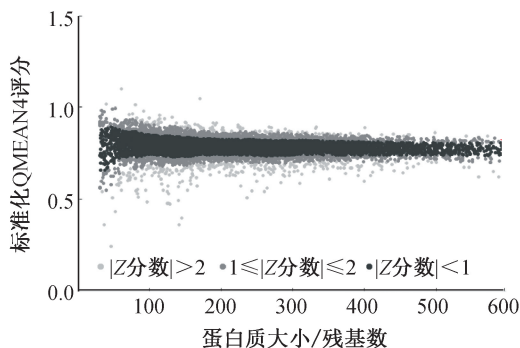
(a) PEDV多表位mRNA疫苗二级结构图



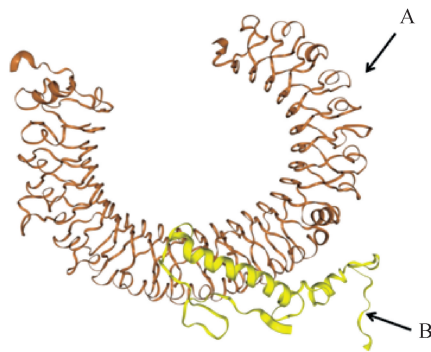
(b) PEDV多表位mRNA疫苗三维结构模型



(c) 拉氏图



(d) Z分数图



(e) PEDV多表位mRNA疫苗与TLR3分子对接模型

图2 PEDV多表位 mRNA疫苗结构预测及模型评估

2.7 小鼠体液免疫应答评价

为评估疫苗诱导的体液免疫应答,将制备的疫苗对小鼠后腿肌肉注射,分别于首次免疫和加强免疫后第14 d采集小鼠血清,以血清10倍稀释度通过酶联免疫吸附试验检测 PEDV-IgG 特异性抗体水平,结果如图3所示。从图3可以看出:首次免疫后,空白对照组抗体水平最低,OD_{450 nm} 值为 0.141 ± 0.020, PEDV-S1 mRNA 疫苗单独免疫组和商业灭活疫苗组均诱导产生特异性抗体,OD_{450 nm} 值分别为 0.816 ± 0.074 和 0.805 ± 0.065,但二者显著低于 PEDV-ME/S1 mRNA 联合免疫组 (1.250 ± 0.068),表明初免阶段联合疫苗即可激发更强的体

液免疫应答;加强免疫后,各组抗体水平均较初免时显著提升,但组间差异趋势与初免一致,空白对照组仍最低,OD_{450 nm} 值为 0.152 ± 0.059; S1 mRNA 疫苗单免疫组 and 灭活疫苗组抗体水平虽有上升,分别为 1.238 ± 0.074、1.164 ± 0.114,但仍显著低于 PEDV-ME/S1 mRNA 联合免疫组 OD_{450 nm} 值 (1.681 ± 0.100),联合组初免建立的高抗体基线使其最终水平仍显著高于灭活组。上述结果表明, PEDV-ME 多表位疫苗与 S1 mRNA 疫苗的联合免疫策略具有协同增效作用,初免阶段即可诱导强于单独 S1 疫苗及商业灭活疫苗的体液免疫应答,这为后续探索新型疫苗组合的免疫机制提供了直接实验依据。

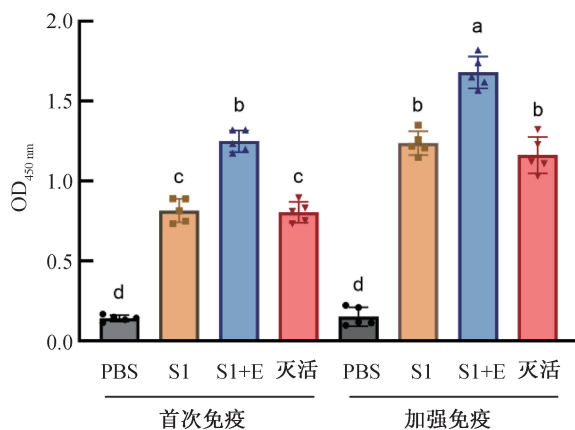


图 3 小鼠血清 PEDV-IgG 特异性抗体水平柱状图

注:PBS为磷酸缓冲液,作为空白对照组;S1表示 PEDV-S1 mRNA 疫苗单独免疫组;S1+E表示 PEDV-ME/S1 mRNA 联合免疫组;灭活表示商业灭活疫苗组;a、b、c、d 为分组标识,不同字母表示组间差异显著($P < 0.001$)。

3 结论

本文结合免疫信息学与 mRNA 疫苗技术,以 PEDV S 蛋白(Q91AV1)和 N 蛋白(Q07499)为核心抗原,通过表位预测与优化构建多表位抗原,并基于 mRNA-LNP 递送系统制备疫苗,经结构验证与动物实验评估其免疫原性,主要结果如下:

a) 通过 VaxiJen 和 ANTIGENpro 工具筛选出抗原性评分高于 0.5 的 S 蛋白与 N 蛋白,利用 IEDB、ABCpred 和 NetMHCpan 工具预测并串联 25 条 B 细胞表位及 3 条 T 细胞表位,引入 Foldon 三聚体结构与分泌信号肽,显著提升了表位暴露率与免疫原性。

b) ME 三级结构模型的拉氏图显示,其模型中残基的数据点总体处于允许区内,符合天然蛋白特征;ME 与 TLR3 进行了分子对接,其对接分数为 -314.34,证实 ME 具有强结合能力,可有效激活先天免疫应答,为疫苗免疫效果提供结构学支撑。

c) ME/S1 mRNA 联合免疫组在小鼠首次免疫后,PEDV 特异性 IgG 抗体 OD_{450nm} 值达 1.250 ± 0.068 ,显著高于 S1 mRNA 单免组(0.816 ± 0.074)和灭活疫苗组(0.805 ± 0.065);加强免疫后联合组抗体水平进一步升至 1.681 ± 0.100 ,持续保持最高滴度($P < 0.001$),验证了多表位协同设计的增效作用。

本文研究结果表明,基于免疫信息学设计的 PEDV 多表位 mRNA 疫苗通过 B 细胞与 T 细胞表位协同与 mRNA-LNP 高效递送,可显著增强特异性抗体应答,为 PEDV 防控提供了新型候选疫苗策

略。未来需进一步评估疫苗对不同 PEDV 变异株的交叉保护力及细胞免疫应答水平,以优化其实际应用效果。

参考文献:

- [1] Zhang H, Zou C C, Ouyang P, et al. Global dynamics of porcine enteric coronavirus PEDV epidemiology, evolution, and transmission[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2023, 40(3): msad052.
- [2] 张洋,欧云文,马春霞,等. 猪流行性腹泻疫苗研究进展[J]. *中国畜牧兽医*, 2024,51(11):5004-5013.
- [3] Kong F, Jia H, Xiao Q, et al. Prevention and control of swine enteric coronaviruses in China: A review of vaccine development and application[J]. *Vaccines*, 2024, 12(1):11.
- [4] Li Z, Ma Z, Li Y, et al. Porcine epidemic diarrhea virus: Molecular mechanisms of attenuation and vaccines[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2020, 149:104553.
- [5] Kirchdoerfer R N, Bhandari M, Martini O, et al. Structure and immune recognition of the porcine epidemic diarrhea virus spike protein[J]. *Structure*, 2021, 29(4):385-392.
- [6] Lin F, Zhang H, Li L, et al. PEDV: Insights and advances into types, function, structure, and receptor recognition [J]. *Viruses*, 2022, 14(8):1744.
- [7] Zhao Y, Fan B, Song X, et al. PEDV-spike-protein-expressing mRNA vaccine protects piglets against PEDV challenge [J]. *mBio*, 2024, 15(2): e0295823.
- [8] Song X, Li Y, Wang C, et al. Efficacy evaluation of a bivalent subunit vaccine against epidemic PEDV heterologous strains with low cross-protection[J]. *Journal of Virology*, 2024, 98(10): e0130924.
- [9] Yang D, Su M, Li C, et al. Isolation and characterization of a variant subgroup GII-a porcine epidemic diarrhea virus strain in China[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2020, 140:103922.
- [10] Wei Y, Qiu T, Ai Y, et al. Advances of computational methods enhance the development of multi-epitope vaccines [J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2024, 26(1): bbaf055.
- [11] De Groot AS, Moise L, Terry F, et al. Better epitope discovery, precision immune engineering, and accelerated vaccine design using immunoinformatics tools[J]. *Frontiers in Immunology*, 2020, 11:442.
- [12] Qin Y, Tu K, Teng Q, et al. Identification of novel T-Cell epitopes on infectious bronchitis virus N protein and development of a multi-epitope vaccine [J]. *Journal of Virology*, 2021, 95(17): e0066721.
- [13] Lamb Y N. BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine: First approval[J]. *Drugs*, 2021, 81(4):495-501.
- [14] Gote V, Bolla P K, Kommineni N, et al. A comprehensive review of mRNA vaccines [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(3):2700.
- [15] Jain R, Jain A, Verma S K. Prediction of epitope based

- peptides for vaccine development from complete proteome of novel corona virus (SARS-COV-2) using immunoinformatics [J]. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 2021, 27(3):1729-1740.
- [16] Wilkins M R, Gasteiger E, Bairoch A, et al. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server [J]. *Methods in Molecular Biology*, 1999, 112:531-552.
- [17] Dimitrov I, Bangov I, Flower D R, et al. AllerTOP v. 2: A server for in silico prediction of allergens [J]. *Journal of Molecular Modeling*, 2014, 20(6):2278.
- [18] Ye M, Li S, Luo P, et al. Genetic variation of E6, E7, and L1 genes of human papillomavirus 51 from Central China [J]. *Journal of Medical Virology*, 2022, 94(6):2811-2823.
- [19] Aiman S, Alhamhoom Y, Ali F, et al. Multi-epitope chimeric vaccine design against emerging monkeypox virus via reverse vaccinology techniques-a bioinformatics and immunoinformatics approach [J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13:985450.
- [20] 李世念, 刘婉宁, 陈亚萍, 等. 基于免疫信息学方法设计针对猪急性腹泻综合征冠状病毒 S、M 及 E 蛋白的多表位疫苗 [J]. *中国畜牧兽医*, 2022, 49(3):1057-1066.
- [21] Doytchinova I A, Flower D R. VaxiJen: A server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines [J]. *BMC Bioinformatics*, 2007, 8:4.
- [22] Yan Z, Kim K, Kim H, et al. Next-generation IEDB tools: A platform for epitope prediction and analysis [J]. *Nucleic Acids Research*, 2024, 52(W1):W526-W532.
- [23] Luo T, Xin C, Liu H, et al. Potential SLA Hp-4.0 haplotype-restricted CTL epitopes identified from the membrane protein of PRRSV induce cell immune responses [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2024, 15:1404558.
- [24] Rasmussen M, Fenoy E, Harndahl M, et al. Pan-Specific prediction of Peptide-MHC class I complex stability, a correlate of T cell immunogenicity [J]. *The Journal of Immunology*, 2016, 197(4):1517-1524.
- [25] Zhang Y, Zhai S, Huang H, et al. Efficient signal sequence of mRNA vaccines enhances the antigen expression to expand the immune protection against viral infection [J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2024, 22(1):295.
- [26] Papanikolopoulou K, Teixeira S, Belrhali H, et al. Adenovirus fibre shaft sequences fold into the native triple beta-spiral fold when N-terminally fused to the bacteriophage T4 fibritin foldon trimerisation motif [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2004, 342(1):219-227.

团队介绍

金伟波教授团队专注于核酸药物的分子设计以及递送系统的开发和优化等研究。团队包括教授 1 名, 副教授 1 名, 讲师 1 名, 硕士研究生 10 余名。金伟波, 博士, 教授, 浙江理工大学“521 青年拔尖人才”, 嘉兴市科技创新创业领军人才, 浙江省生物化学与分子生物学学会理事。吴方丽, 副教授, 2008 年 6 月获西北农林科技大学微生物专业博士学位, 2023 年 10 月—2024 年 10 月任英国伍斯特大学科学与环境学院访问学者。团队承担国家自然科学基金 4 项、浙江省自然科学基金项目 4 项、企业合作项目 5 项; 发表 SCI 论文 30 余篇, 获授权发明专利 13 项。团队建立了 RNA 药物的生物信息学设计分析平台和应用技术平台, 近期在 RNA 纳米载体领域取得了突破性进展, 开发了多种新型 RNA 纳米递送载体, 并成功应用于动物疫苗、动物抗病毒以及植物病害防治领域, 相关研究水平处于国际前列。

(责任编辑: 张会巍)