

文章编号 1006-8147(2022)05-0513-06

论著

梅毒螺旋体 TP17 蛋白 B 细胞表位研究

刘晶晶^{1,2}, 陈玉梅³, 潘卫东¹

(1. 郑州大学基础医学院, 郑州 450001; 2. 西华县人民医院检验科, 周口 466000; 3. 郑州大学生命科学学院, 郑州 450001)

摘要 目的: 采用生物信息学方法预测梅毒螺旋体 TP17 蛋白 B 细胞表位, 并验证 TP17 表位多肽与梅毒阳性临床血清的反应性。方法: 用 SOPMA、DNASTAR、SWISS-MODEL 及 IEDB 数据库 BepiPred-2.0 等软件预测脂蛋白 TP17 的结构及 B 细胞表位。采用间接 ELISA 方法检测 10 份梅毒螺旋体阳性患者血清样本, 与脂蛋白 TP17 及 6 段重叠多肽的反应性。结果: TP17 蛋白 6 个线性 B 细胞表位为 Thr27~Glu38、Leu53~Asp62、Thr66~Gln74、Lys75~Pro88、Leu107~Lys119 以及 Tyr132~Met145, 预测的构象表位涉及的氨基酸为: Lys34~Ala35、Ala55、Pro88、Glu99、Pro136~Pro147、Thr154, 这些抗原表位分散于 TP17 蛋白分段表达的 6 段重叠多肽(Tp17-1 Tp17-6)中的不同区域, ELISA 结果显示这 6 段多肽均与梅毒患者阳性血清样本发生特异反应, OD₄₅₀ 值在 0.59~1.45 之间, S/N>2.1。结论: 鉴定了 TP17 蛋白 6 个线性 B 细胞表位, 该表位均与梅毒患者阳性血清发生特异反应。

关键词 梅毒螺旋体; TP17 蛋白; B 细胞表位; 线性表位

中图分类号 R377⁺.1

文献标志码 A

The study on B cell epitope of *Treponema pallidum* TP17 protein

LIU Jing-jing^{1,2}, CHEN Yu-mei³, PAN Wei-dong¹

(1. School of Medical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China; 2. Xihua County People's Hospital, Zhoukou 466000, China; 3. School of Life Science, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

Abstract **Objective:** To predict the B cell epitope of TP17 protein of *Treponema pallidum* by bioinformatics method, and verify the reactivity of TP17 epitope polypeptide with syphilis positive clinical serum. **Methods:** The structure and B cell epitope of lipoprotein TP17 were predicted by SOPMA, DNASTAR, SWISS-MODEL and IEDB database BepiPred-2.0. Ten *Treponema pallidum* positive serum samples were used to detect the reactivity of recombinant protein TP17 and 6-segment overlapping polypeptide of TP17 by indirect ELISA. **Results:** The predicted six linear B cell epitopes of TP17 protein were Thr27-Glu38, Leu53-Asp62, Thr66-Gln74, Lys75-Pro88, Leu107-Lys119 and Tyr132-Met145. The predicted conformational epitopes involved amino acids were Lys34-Ala35, Ala55, Pro88, Glu99, Pro136-Pro147 and Thr154. These cell epitopes were dispersed in the 6-segment overlapping polypeptide (Tp17-1 to Tp17-6). The results of ELISA showed that the six polypeptides had specific reaction with the positive serum samples of syphilis patients, and OD₄₅₀ value was 0.59~1.45, S/N>2.1. **Conclusion:** 6 linear B cell epitopes of TP17 protein are identified, and all of which are specific to the positive serum of syphilis patients.

Key words *treponema pallidum*; TP17 protein; B cell epitope; linear epitopes

梅毒(Syphilis)是由梅毒密螺旋体苍白亚种(*Treponema pallidum*, TP)感染引起的一种性传播疾病,在全世界广泛流行^[1]。梅毒螺旋体具有免疫逃逸机制,潜伏期长,且潜伏期也具有传染性,感染期通常在 10 年以上,按照疾病过程分为初级、次级、潜伏三级阶段^[2-3]。在我国梅毒属于法定乙类传染病,2014—2019 年,我国梅毒发病率由 30.93/10 万增长至 38.37/10 万,年均增长 4.41%^[4]。国家卫生健康委网站数据显示,2021 年我国共报告梅毒发病 39 586 例,死亡 5 例^[5]。

TP 基因组全长 1 138 006 bp, 含 1 041 个开放阅

读框,毒力因子包括 12 个膜蛋白家族和一些溶血素^[6]。膜蛋白是 TP 的主要抗原蛋白,对 TP 的免疫学诊断和疫苗研究具有重要意义,主要包括 TP47(TP0574)、TP15(TP0171)、TP17(TP0435)、TP34(TP0971)及 GlpQ(TP0257)等^[7]。TP47(TP0574)是第一个被证明是脂质修饰的 TP 膜蛋白,是一种青霉素结合蛋白^[8]。TP17 蛋白位于 TP 细胞外膜,是一种分子量为 16.5 kD 的膜脂蛋白,约占 TP 可溶性蛋白的 2%,具有较强的免疫原性^[9-10]。有研究显示,以 TP17 蛋白为抗原的免疫学诊断试剂敏感性可以达到 98%,特异性达到 99%,在梅毒感染的血清学诊断中具有重要的价值^[11-12]。TP17 蛋白是梅毒的主要抗原蛋白,关于 TP17 蛋白抗原表位的研究报道较少,确定 TP17 蛋白 B 细胞表位,对 TP 的免疫学诊断和疫苗

基金项目 郑州市重大科技专项(2020YJGGG0001)

作者简介 刘晶晶(1988-),女,主管检验师,硕士在读,研究方向:临床免疫学检验;通信作者:潘卫东, E-mail: panwd@zzu.edu.cn。

设计具有重要意义。本研究提出通过生物信息学技术对 TP17 蛋白的结构、免疫学特征和 B 细胞表位等进行预测,建立 TP17 多肽的酶联免疫吸附实验(ELISA)检测法,评价多肽与临床 TP 阳性血清的反应性,验证 TP17 蛋白抗原 B 细胞表位预测的准确性及表位多肽用于梅毒临床检验的可行性。

1 材料和方法

1.1 实验材料 梅毒阳性病例血清样品 10 份(西华县人民医院),梅毒螺旋体抗体诊断试剂盒-酶联免疫法(厦门英科新创公司),重组 TP17 蛋白(中国近岸生物公司),TP17 多肽(委托上海生工公司合成),HRP 标记的羊抗人 IgG(英国 Abcam 公司),BCA 蛋白浓度测定试剂盒(美国 Thermo 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 TP17 蛋白生物学特征分析 从美国国家生物信息中心(National Center for Biotechnology Information,NCBI)蛋白质数据库中获得 TP17 蛋白的氨基酸序列(Genebank No. ADR64315.1),以 SignalP-5.0 及 TMHMM Server v.2.0 软件预测蛋白信号肽及跨膜区氨基酸序列;利用 NetNGlyc-1.0、NetOGlyc

4.0 预测 TP17 蛋白 N 型和 O 型糖基化位点;利用 ExPASy 数据库预测蛋白分子量和等电点,见表 1。

1.2.2 TP17 蛋白线性 B 细胞表位预测用 DNAS-TAR 的 Protean 软件及在线预测软件 SOPMA 预测 TP17 蛋白的二级结构(Secondary structure),分析 α 螺旋、 β 折叠、转角及无规卷曲等二级结构元件的分布情况^[13-14]。综合利用 IEDB 数据库 B 细胞表位相关分析软件(BepiPred-2.0、BepiPred 等)、SOPMA 以及 DNASTAR 等软件对 TP17 蛋白进行系统性分析,预测其抗原性(antigenicity)、表面可及性(accessibility)、可塑性(flexibility)、亲水性(hydrophilicity)等特征,预测线性 B 细胞表位^[15-16]。采用 SWISS-MODEL 同源建模分析 TP17 蛋白的三维结构及 B 细胞表位在三维结构中的定位,结合 IEDB 数据库 Disco-Tope:Structure-based Antibody Prediction 软件分析 TP17 蛋白的构象型 B 细胞表位^[17],见表 1。

1.2.3 TP17 重叠多肽的分段合成 将 TP17 蛋白分成 6 段(Tp17-1~Tp17-6),临近两条多肽之间设置 10 个氨基酸的重复(表 2)。委托上海生工公司合成多肽小分子并进行 HPLC-MS 鉴定。

表 1 生物信息学数据库及分析工具

Tab 1 Bioinformatics database and analysis tools

名称	网址	说明
SignalP-5.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/	信号肽预测
TMHMM	https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0	跨膜区预测
ExPASy	https://web.expasy.org/compute_pi/	等电点/分子量预测
NetNGlyc-1.0	https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetNGlyc-1.0	N 糖基化位点预测
NetOGlyc 4.0	https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetOGlyc-4.0	O 糖基化位点预测
BepiPred	http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred	B 细胞表位预测
IEDB tools	http://tools.iedb.org/main/bcell/	B 细胞表位预测
NCBI	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/	蛋白数据库
SOPMA	https://npsa-prabi.ibcp.fr/	蛋白二级结构预测

表 2 T17 蛋白重叠多肽氨基酸序列

Tab 2 Amino acid sequence of overlapping polypeptide of T17 protein

多肽名称	氨基酸序列
Tp17-1(21-50)	LCVSCITVCPHAGKAKAEKVECALKGIFR
Tp17-2(41-70)	ECALKGIFRGTLPAAADCPGIDTTVTFNAD
Tp17-3(61-90)	IDTTVTFNADGTAQKVELALEKKSAPSPLT
Tp17-4(81-110)	EKKSAPSPLTYRGTWMVREDGIVELSLVSS
Tp17-5(101-130)	GIVELSLVSSSEQSKAPHEKELYELIDNSNV
Tp17-6(121-156)	LYELIDNSNVRYMGAPGAGKPSKEMAPFYVLKTKK

1.2.4 TP17 重叠多肽的耦联 参考文献^[19]方法,采用碳二亚胺法(EDC)分别将 6 段多肽与 BSA 耦联,制备包被抗原,采用 SDS-PAGE 鉴定多肽耦联效果。

1.2.5 TP17 蛋白抗原性检测 采用 ELSIA 测定

TP17 蛋白的抗原性。以碳酸盐缓冲液(CBS,PH 9.0)稀释 TP17 蛋白至 2 μ g/mL,加入 96 孔 ELISA 板,50 μ L/孔,4℃静置 16 h;以含 0.05%吐温-20 的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution-twain, PBST)洗涤 3 次,加入 5%的脱脂奶 300 μ L/孔,37℃静置 2 h;再以 PBST 洗涤 6 次,随后向检测孔中加入 1:200 稀释的梅毒螺旋体阳性患者血清样本,对照孔分别加入 1:500 稀释的阳性或阴性标准血清。37℃温箱孵育 30 min,以 PBST 洗涤 6 次,再加入 1:2 000 稀释的 HRP 标记的羊抗人 IgG,孵育 30 min。PBST 洗涤 6 次后加入显色液,以 2 mol/L H₂SO₄ 反应终止反应,读取 OD₄₅₀ 值。结果判定:S/N>2.1 判为阳性,其中++++为 OD₄₅₀>0.59,+++为 OD₄₅₀>0.4,++为

$OD_{450} > 0.3$; + 为 $S/N > 2.1$ 但 $OD_{450} \leq 0.3$

1.2.6 TP17 重叠多肽抗原性检测 采用 ELSIA 方法检测 6 条 BSA 耦联的 TP17 多肽与 10 份梅毒阳性患者血清的反应性。以 CBS 缓冲液稀释耦联多肽抗原至终浓度为 $2 \mu\text{g/mL}$ 进行抗原包被,以 1:500 稀释的血清样品为一抗,1:2 000 稀释的 HRP 标记的羊抗人 IgG 为二抗,进行 ELSIA 检测,检测及结果判定方法同 1.2.4。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件对本实验相关数据进行统计分析,组间两两比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异显著具有统计学意义。

2 结果

2.1 TP17 蛋白的生物学特征与二级结构预测 TP17 蛋白全长 156 个氨基酸残基,分子量约 16.5 kD,理论等电点(pI)8.62;经 SignalP-5.0 分析 TP17 蛋白 N 端 22 个 aa 为信号肽,信号肽切割位点在 Cys22~Val23 之间;TMHMM 2.0 预测 TP17 蛋白存在 2 个潜在的 N-糖基化位点 Asn68 和 Asn128 和 4 个 O-糖基化位点 Thr13、Thr17、Thr19 及 Thr21。同源进化分析结果显示,TP17 蛋白与大肠杆菌的铜抗性脂蛋白 NlpE 具有 20% 的序列同源性,属于同一进化分支(图 1)。

SOMPA 分析结果显示 TP17 蛋白二级结构无规卷曲(Random coil,c)约占 42.31%、 α 螺旋(Alpha helix,h)占 25.64%、延伸链(Extended strand,e)24.36%、 β 转角 (Beta turn,t)7.69% (图 2);DNASTAR 中 Garnier-Robson 方法和 Chou-Fasman 方法预测的

TP17 蛋白二级结构中 α 螺旋、 β 折叠、转角及无规卷曲区域略有差异(图 2),其中 SOMPA 预测的无规卷曲部分与 DNASTAR 软件中的转向 (Turn,Regions)和卷曲(Coil,Regions)部分有重复的区域主要位于: Cys29~Ala35、Gly51~Cys58、Lys82~Thr94、Ser109~Lys119、Gly134~Ala146。

2.2 TP17 蛋白的线性 B 细胞表位预测 DNASTAR 和 IEDB 综合分析预测 TP17 蛋白的抗原性、柔韧性、亲水性、表面易接近性等(图 3)与 B 细胞表位密切相关的结构信息,采用 Bepipred 预测 TP17 蛋白的线性 B 细胞表位,Bepipred Linear Epitope Prediction Results 2.0(阈值=0.50),获得 4 条线性 B 细胞表位: Thr27~Gly47、Gln74~Pro88、Ile102~Ile125、Ala135~Lys152,Bepipred Linear Epitope Prediction Results(阈值=0.35)共获得 7 条线性 B 细胞表位: Pro30~Glu38、Leu53~Asp62、Thr64、Thr66~Glu74、Lys82~Tyr91、Ser110~Lys119、Tyr132~Met145。

2.3 TP17 蛋白三级结构同源建模及 B 细胞表位定位 采用 SWISS-MODEL,基于参考模型(PDB: 4u3q)生成完整 TP17 蛋白三维结构(图 4)。结果显示,TP17 蛋白富含 8 个 β -折叠和 2 个 β -螺旋结构,其 β -转角与二级结构预测结果有一定符合度,最终预测表位区 Thr27~Glu38、Leu53~Asp62、Thr66~Gln74、Lys75~Pro88、Leu107~Lys119 以及 Tyr132~Met145 展示在 TP17 蛋白分子表面(图 4),主要位于无规卷曲区和 β -折叠片的转折区域。

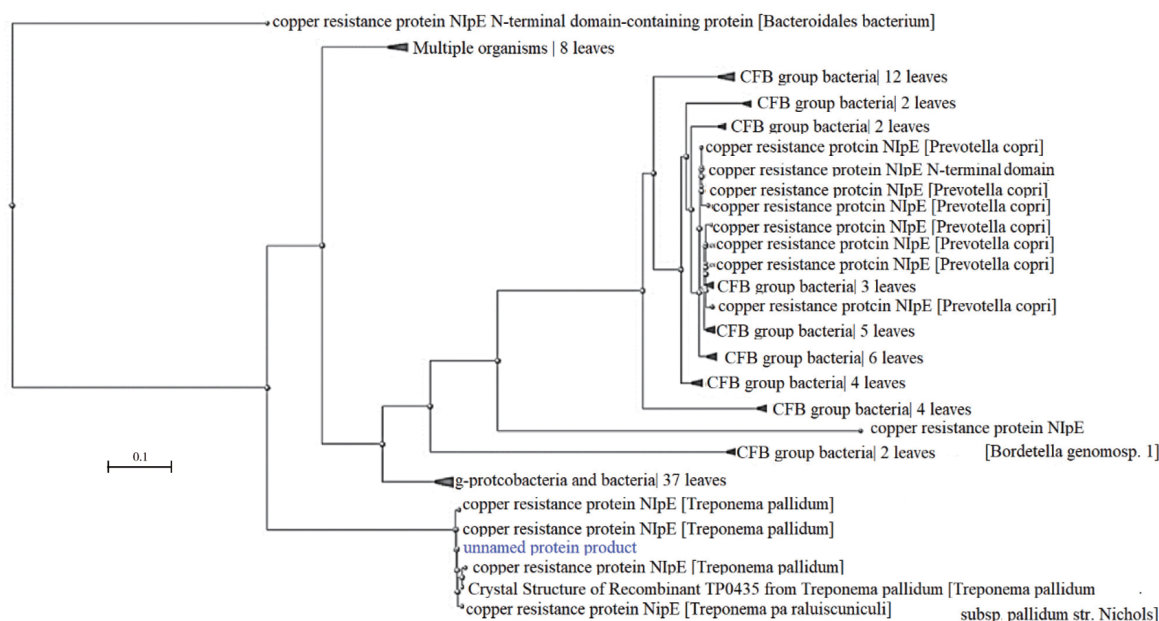
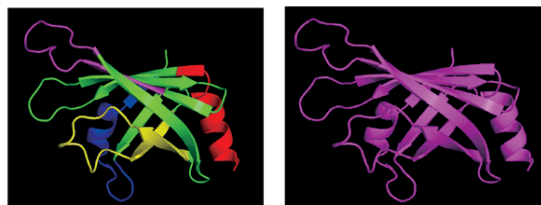


图 1 TP17 蛋白同源进化分析

Fig 1 Homologous evolution analysis of TP17 protein

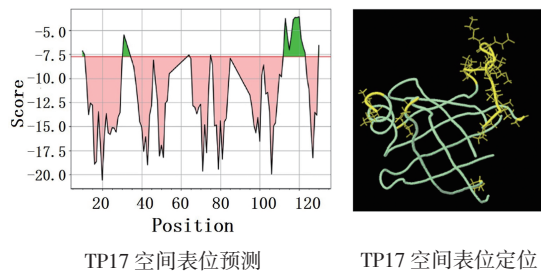


TP17 蛋白的三级结构预测 TP17 蛋白预测表位的空间定位

图 4 TP17 蛋白的三级结构预测

Fig 4 Prediction of three dimensional structure of TP17 protein

2.4 TP17 蛋白构象 B 细胞表位预测分析结果 如图 5 所示,TP17 蛋白的氨基酸区域为:Lys34~Ala35、Ala55、Pro88、Glu99、Pro136~Pro147、Thr154,分布于三维结构外侧以黄色区域标注。



TP17 空间表位预测

TP17 空间表位定位

图 5 TP17 蛋白的构象型 B 细胞表位预测

Fig 5 Prediction of conformational B cell epitopes of TP17 protein

2.5 TP17 蛋白及其分段多肽的合成及鉴定 SDS-PAGE 鉴定结果表明,TP17 蛋白的纯度约为 95%,浓度为 2 g/L,HPLC-MS 检测结果显示成功合成的多肽 Tp17-1 分子量为 3.12 kD、Tp17-2 为 3.05 kD、Tp17-3 为 3.25 kD、Tp17-4 为 3.44 kD、Tp17-5 为 3.41 kD、Tp17-6 为 3.68 kD。6 段多肽与 BSA 耦联后进行鉴定,SDS-PAGE(图 6)结果显示 6 段多肽均耦联成功。

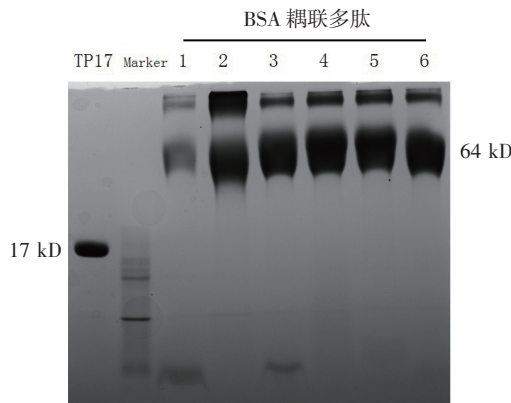
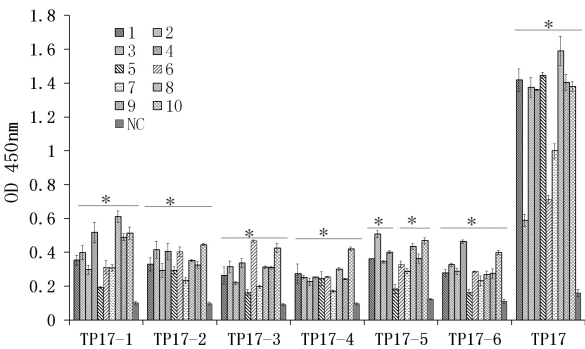


图 6 重组表达蛋白 TP17 及重叠多肽耦联物的 SDS-PAGE 鉴定

Fig 6 Identification of recombinant protein TP17 and overlapping polypeptide conjugates by SDS-PAGE

2.6 临床阳性血清样品与 TP17 蛋白及多肽的反应 ELISA 检测结果 10 份梅毒阳性的临床血清均

与 TP17 蛋白具有良好反应性,OD₄₅₀ 值在 0.59~1.45;而不同阳性血清与 TP17 蛋白的重叠多肽的反应情况存在一定差异,其中 10 份临床阳性血清样品与 Tp17-1、Tp17-2、Tp17-3、Tp17-4 及 Tp17-6 均可发生特异性反应,且与阴性对照相比差异显著($P<0.05$);有 9 份临床阳性血清样品与 Tp17-5 均可发生特异性反应,且与阴性对照相比差异显著($P<0.05$),仅第 5 份阳性血清与 Tp17-5 多肽反应性较差,与阴性对照相比差异不显著($P=0.058$)。以检测品 OD 值(S)/阴性血清 OD 值(N)大于 2.1 为判断标准,所有多肽与临床阳性血清检测结果均可判断为阳性($S/N>2.1$)。见图 7、表 3。



注:1~10:梅毒螺旋体抗体及 TRUST 双阳性的临床血清样品; NC:梅毒螺旋体抗体阴性临床血清样品

图 7 临床阳性血清样品与 TP17 蛋白及重叠多肽的反应性分析

Fig 7 Reactivity analysis of clinical positive serum samples with TP17 protein and overlapping polypeptides

表 3 多肽对应的 B 细胞表位及阳性血清 ELISA 反应结果

Tab 3 Peptide corresponding B cell epitope and positive serum ELISA results

名称	预测表位	与 10 份阳性血清反应情况
TP17(21-156)	All	10 份++++
Tp17-1(21-50)	Thr27~Glu38、Lys34~Ala35	1 份++++/4 份+++/4 份++/ 1 份+
Tp17-2(41-70)	Leu53~Asp62、Ala55	4 份+++/5 份++/1 份+
Tp17-3(61-90)	Thr66~Gln74、Lys75~Pro88、Pro88	2 份+++/5 份++/3 份+
Tp17-4(81-110)	Glu81~Pro88、Pro88、Glu99	1 份+++/2 份++/7 份+
Tp17-5(101-130)	Leu107~Lys119	5 份+++/4 份++/1 份+
Tp17-6(121-156)	Tyr132~Met145、Pro136~Pro147、 Thr154	2 份+++/6 份++/2 份+

3 讨论

TP17 是一种附着于梅毒螺旋体外膜内小叶的脂蛋白,约占 TP 可溶性蛋白的 2%,具有良好的抗原性和免疫原性。B 细胞表位是抗体在抗原表面的识别位点,在临床诊断和疫苗设计中起着重要作用,关于 TP17 蛋白 B 细胞表位的研究较少。随着蛋白质结构和抗原表位研究的发展,生物信息学预测 B 细胞表位的准确性也逐步提升。通常情况下, β 转

角为凸出结构,多出现在蛋白质抗原表面,含有5个以上的氨基酸残基的转角又常称为环(loop),而loop区利于抗体的结合,因此表位多含有环状结构,而螺旋和折叠结构比较少见,很多蛋白质的C端具有较好的亲水性、表面可及性和柔性,所以是很好的抗原决定簇区域^[9]。本研究通过DNASTAR Pro-tein及SOPMA预测分析TP17蛋白的二级结构,分析其 α 螺旋、 β 折叠、转角及无规卷曲等二级结构元件的分布情况,结果显示无规卷曲(42.31%)和 β 转角(7.69%)在TP17蛋白的二级结构中占比较高,结合IEDB数据库软件BepiPred、SOPMA以及DNASTAR等对TP17蛋白进行B细胞表位分析,采用Hopp-Woods和Kyte-Doolittle方案、Karplus-Schultz和Emini方案、Jameson-Wolf方案等预测TP17蛋白亲水性、柔韧性、表面可及性、可塑性特征,综合预测TP17蛋白的7个B细胞线性表位Pro30~Glu38、Leu53~Asp62、Thr64、Thr66~Gln74、Lys82~Tyr91、Ser110~Lys119、Tyr132~Met145。为了增加表位预测的准确性,本研究基于SWISS-MODEL同源建模构建TP17蛋白的三维结构,结合IEDB数据库预测分析TP17蛋白的构象表位区域:Lys34~Ala35、Ala55、Pro88、Glu99、Pro136~Pro147、Thr154。结合已解析的TP17蛋白三维结构数据(4u3q)和同源建模结果,将前述7个线性B细胞表位进行定位分析,修正后获得6个TP17蛋白的线性B细胞表位:Thr27~Glu38、Leu53~Asp62、Thr66~Gln74、Lys75~Pro88、Leu107~Lys119以及Tyr132~Met145。

为了验证表位预测的准确性,本研究分段合成了TP17蛋白多肽(表3),覆盖蛋白所有氨基酸序列并进行了交叉重叠。选择10份梅毒螺旋体抗体及TRUST双阳性的临床血清样本与TP17蛋白及Tp17-1~Tp17-6这6段多肽进行ELISA检测,结果发现,TP17蛋白与临床阳性血清样本具有良好反应性,而不同阳性血清与6段多肽均能发生特异性反应,但反应情况存在一定差异,与阴性血清均不反应,表明这6段多肽均含有B细胞表位,也验证了本研究预测的抗原表位信息具有较高准确性。本研究分析了TP17蛋白的B细胞抗原表位,揭示了TP17蛋白良好抗原性的分子基础,为梅毒螺旋体的抗体检测和疫苗设计提供了理论依据。

参考文献:

- [1] GRASSI VMT, RAMOS M C, GRASSI L T, et al. Analysis of DNA extraction methods for detection of *Treponema pallidum*: a comparison of three methods[J]. J Microbiol Methods, 2021, 192: 106383.
- [2] PEELING R W, MABEY D, KAMB M L, et al. Syphilis[J]. Nat Rev

- Microbiol, 2017, 2(6): 448-449.
- [3] WANG C, HU Z, ZHENG X, et al. A new specimen for Syphilis diagnosis: evidence by high loads of *treponema pallidum* DNA in saliva[J]. Clin Infect Dis, 2021, 73(9): e3250-e3258.
- [4] 岳晓丽, 龚向东, 李婧, 等. 2014-2019年中国梅毒流行趋势与特征分析[J]. 中华皮肤科杂志, 2021, 54(8): 5.
- [5] 国家卫生健康委网站数据, 2021年10月全国法定传染病疫情概况, 2021.10. <http://www.nhcgov.cn/kj/s3578/202111/9e1250cce8bf430b8717e524c6ac7975shtml>.
- [6] FRASER C M, NORRIS S J, WEINSTOCK G M, et al. Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete[J]. Science, 1998, 281(5375): 375-388.
- [7] RADOLF J D, KUMAR S. The *treponema pallidum* outer membrane[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2018, 415: 1-38.
- [8] ANAND A, LEDOYT M, KARANIAN C, et al. Bipartite topology of *treponema pallidum* repeat proteins c/d and i: outer membrane insertion, trimerization, and porin function require a c-terminal β -barrel domain[J]. J Biol Chem, 2015, 290: 12313-12331.
- [9] RADOLF J D, DEKA R K, ANAND A, et al. *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete: making a living as a stealth pathogen[J]. Nat Rev Microbiol, 2016, 14(12): 744-759.
- [10] BRAUTIGAM C A, DEKA R K, LIU W Z, et al. Insights into the potential function and membrane organization of the TP0435 (Tp17) lipoprotein from *Treponema pallidum* derived from structural and biophysical analyses[J]. Protein Sci, 2015, 24(1): 11-19.
- [11] SMITH B C, YVONNE S, MORSHED M G, et al. New proteins for a new perspective on syphilis diagnosis[J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(1): 105.
- [12] BRAUTIGAM C A, DEKA R K, NORGARD M V. Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of TP0435 (Tp17) from the syphilis spirochete *Treponema pallidum*[J]. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun, 2013, 69(Pt 4): 453-455.
- [13] CHOU P Y, FASMAN G D. Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence[J]. Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol, 1978, 47: 45-148.
- [14] KARPLUS P A, SCHULZ G E. Prediction of chain flexibility in proteins[J]. Sci Nat, 1985, 72(4): 212-213.
- [15] KRINGELUM J V, LUNDEGAARD C, LUND O, et al. Reliable B cell epitope predictions: impacts of method development and improved benchmarking[J]. PLoS Comput Biol, 2012, 8(12): e1002829.
- [16] JESPERSEN M C, PETERS B, NIELSEN M, et al. BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes[J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(W1): W24-W29.
- [17] HASTE ANDERSEN P, NIELSEN M, LUND O. Prediction of residues in discontinuous B-cell epitopes using protein 3D structures[J]. Protein Sci, 2006, 15(11): 2558-2567.
- [18] LIU Y, WANG J, CHEN Y, et al. Identification of a dominant linear epitope on the VP2 capsid protein of porcine parvovirus and characterization of two monoclonal antibodies with neutralizing abilities[J]. Int J Biol Macromol, 2020, 15(163): 2013-2022.
- [19] LIU T, SHI K, LI W. Deep learning methods improve linear B-cell epitope prediction[J]. BioData Mining, 2020, 13(1): 1-13.

(2021-12-16 收稿)