

专题

基因组学时代的免疫学研究

李昊文^①, 王颖^{①②*}

① 上海交通大学医学院, 上海市免疫学研究所/医学科学研究院, 上海 200025;

② 国家人类基因组南方研究中心, 上海市-科技部共建疾病与健康基因组学重点实验室, 上海 201203

* 联系人, E-mail: ywang@sibs.ac.cn

收稿日期: 2008-10-03; 接受日期: 2008-10-08

国家高技术研究发展计划(批准号: 2006AA02A252)和上海市科学技术委员会浦江人才计划(批准号: 07pj14066)资助项目

摘要 基因组学的研究成果为现代免疫学的发展提供了新的研究思路和策略。本文概述了基础免疫学、与疾病相关的免疫病理学及免疫疫苗的设计在高通量和大规模的基因组学研究策略支撑下获得的新进展，并探讨了其未来可能的发展方向。

关键词
基因组学
免疫学
免疫病理学
疫苗设计

免疫学是一门古老而又年轻的学科，免疫学的历史是和人类抗击感染性疾病的历史相伴相随的。最早和免疫相关的历史可以追溯到中国明代隆庆年间中国人采用“鼻苗法”预防天花的案例。据确凿的记载，当时人们主要采用将天花痊愈者皮肤的痘痂制备干粉，并将干粉用银冠吸入健康人鼻腔，达到免疫从而预防天花的效果。由于采用携带天花病毒的痘痂直接进行免疫，效果和安全性并不稳定，从而推动了Jernner^[1]在18世纪末研制出了牛痘疫苗用来预防天花，使天花成为人类历史上第一个通过免疫被消灭的感染性疾病，并由此产生了现代意义上的现代免疫学。

任何一门学科的发展，离不开科学技术的革新。当20世纪中期免疫学从微生物学中独立出来后，通过与分子生物学、细胞生物学和遗传学等学科的相互交叉，得到迅速发展。在其后的几十年里，一系列免疫学的重大理论成果被诠释，其中包括，主要组织相容性复合物结构和功能的阐明，T细胞抗原受体和B细胞抗原受体结构的发现^[2]和免疫细胞识别的分子机制^[3,4]等。免疫学与上述这些学科交叉的重要作用

在于这些学科为免疫学的发展提供了新技术和新方法，并在这些学科的相互交叉中体现出了新的发展动力，使现代免疫学成为21世纪生命科学的前沿研究领域之一。现代免疫学也为上述学科发展提供了良好的研究模型。

人类基因组计划完成所开启的“组学”研究以及功能基因组学的实施为免疫学的发展提供了新的契机。人类基因组计划以及后续的大量基因组研究所产生的海量数据和对海量数据的高通量的分析和鉴定，不仅为免疫学学科发展带来新的研究思路和策略，而且对于免疫学所涉及的和疾病相关的新的诊疗手段的发现发展也提供了数据资源利用的最优化和最大化，并以此提出免疫组学(immunomics)的概念^[5]，即采用高通量的技术手段，将基因组学、蛋白组学、生物信息学等学科和免疫学及临床医学等研究领域相互融合，用于探索免疫学的机制。

1 基因组学对基础免疫学发展的影响

传统意义上的基础免疫学，既涉及对免疫分子结构、免疫细胞形态和表型的分析，还包含对免疫细

胞和免疫分子功能的研究。在对与免疫学功能相关的重要基因的多态性和突变位点等的研究中,基因组学成熟的各种研究手段为其提供了切实可行而且廉价的检测方法。由于目前已发现的参与免疫应答的免疫分子大多具有数量众多的特点,如体现在种群水平的多态性(人主要组织相容性复合物,即人白细胞抗原,HLA),或是表现在个体水平的多样性(如分泌型的细胞因子或趋化因子等,膜型的黏附分子或杀伤活化/抑制因子等)。这些分子的多态性或多样性从一定程度上反应出了机体对外界刺激反应的潜在的全能性,但也为检测这些分子增加了难度。以参与免疫应答的重要免疫分子HLA为例,该系统是迄今为止人类多态性最丰富的遗传系统,分别包括经典的I类、II类和III类基因,其中I类和II类基因中的每个基因在种群中的等位基因数量众多。由于HLA在器官移植和疾病关联性中的重要性,快速而准确的检测手段是必不可少的。从早期以细胞毒性实验为原理的血清学分型,到后来以PCR为基础的各种核酸分型方法(如PCR-SSP, PCR-SSO或PCR-RFLP等),这些方法很大程度上依赖于原有的HLA的数据结果;随着基因测序技术的成熟,以测序为基础的HLA分型方法逐步取代了上述传统的分型方法^[6]。更重要的是,通过测序可以直接检测到新的等位基因位点,不仅大大简化了研究的路径,而且提高了数据的可靠性和精确性。

利用已有的基因组数据,采用全基因扫描和同源搜索的方法,寻找结构类似物,是发现新的免疫效应分子的重要途径。例如,哺乳动物中参与适应性免疫应答的重要模式识别受体Toll样受体(Toll-like receptors, TLRs)就是通过这个方法发现的。20世纪80年代,在果蝇中发现一组被称为Toll的分子是参与防治真菌感染的重要受体分子^[7]。随后,通过基因组数据库的比对,人们很快在哺乳动物中发现了该分子的结构同源物,并具有同样的抗感染作用,所以将其命名为TLR^[8]。目前,TLR分子及其所介导的固有免疫应答已经成为免疫学研究中的热点领域之一。

免疫系统产生免疫应答的重要特征之一在于参与免疫应答的分子和细胞是以网络形式发挥作用的,所谓“牵一发而动全身”;免疫应答的过程是快速调动免疫细胞和分子发挥免疫效应功能,从而尽快清除

入侵的病原菌感染。所以,传统的对单一分子的结构和功能的研究策略往往不能很好地诠释免疫应答的特征,而基因组学研究带来的高通量和大规模的研究手段则有利于将基础免疫学的研究提升到全局和系统的水平。目前,对不同状态下的免疫应答所涉及的细胞和分子机制的解析是免疫学研究的热点之一,而利用基因表达谱分析细胞分化阶段的基因表达特征对于阐明这些细胞的分子特征具有重要的意义。以淋巴细胞的活化和分化为例,淋巴细胞在活化过程中的分化是淋巴细胞最终发挥生物学功能的必经之路,其中研究最早的是CD4⁺ T细胞在外来抗原的刺激下向Th1或是Th2细胞的分化机制和特征;尽管目前还没有找到Th1和Th2型两种细胞特有的表面标志,但是已明确CD4⁺ T细胞在分化为Th1或是Th2细胞时,主要表现为细胞因子分泌格局的不同,前者以IFN γ 为主,后者则主要包括IL-4/IL-5/IL-13等,并通过这些细胞因子最终介导不同类型的免疫应答。人们采用转录组学研究中基因芯片筛查的方法,分析了Th1和Th2细胞分化早期基因表达格局的变化,阐明了CD4⁺ T细胞分化过程中的转录因子调控网络^[9,10]。利用相似的研究策略,人们还对树突状细胞^[11]、特别是在不同病原菌感染情况下的树突状细胞基因表达谱的变化进行了分析^[12,13],为研究树突状细胞在参与疾病状态下的免疫应答的分子机制提供了重要的线索。

2 基因组学对免疫病理学的影响

除了上述免疫学理论在基因组学研究的带动下取得的进展,和疾病相关的免疫机制的探索也是免疫学研究的重要方面,即所谓的免疫病理学。不过,不同于对疾病病理学特征的单一性研究,免疫病理学更侧重于病理特征与免疫系统之间关系的研究;以这些疾病为研究模型,研究病理状态下的免疫应答的基本特征,一方面可以拓展免疫学的基本理论,另一方面也为如何从免疫学的角度诊断和治疗这些疾病提供线索。

2.1 基因组学对肿瘤免疫学发展的影响

最早受益于基因组学研究的学科中就包括肿瘤生物学和肿瘤免疫学。肿瘤生物学主要阐述肿瘤产生的机制。肿瘤的产生是多步骤的过程,包括起始、发

展和恶化的过程。在这个多步骤的恶变过程中，往往涉及多个基因在表达调控上的异常导致的蛋白水平的变化，这些表达发生变化的蛋白一方面导致了肿瘤细胞生长分化行为的异常，其中一部分也形成了肿瘤免疫学研究范畴的“肿瘤抗原”或“肿瘤标志物”。相对于肿瘤生物学侧重于对肿瘤发生发展机制的研究，肿瘤免疫学则从机体对肿瘤细胞或肿瘤抗原产生免疫应答角度来开展研究。在这方面，无论是新肿瘤抗原和肿瘤标志物的寻找，还是对肿瘤免疫应答机制的探索，基因组学研究成果以及基因芯片、差异显示等技术和后续的差异蛋白组学的手段都得到了有效的利用^[14]。

利用机体免疫系统对肿瘤细胞产生免疫应答是发现和寻找新的肿瘤抗原的重要手段。在人类中发现的第一个肿瘤特异性抗原MAGE就是根据肿瘤患者中存在的特异性CTL细胞通过筛选肿瘤抗原表达文库获得的^[15]。根据肿瘤患者外周血中存在大量高滴度的自身抗体的现象，通过构建cDNA表达文库，利用肿瘤患者自体或混合的外周血清，筛选cDNA表达文库后也可以获得新的肿瘤抗原候选分子^[16]。在寻找和确定这些候选分子和肿瘤的关系的时候，往往首先开展它们与肿瘤相关性的研究，这种研究或者可以直接在已有的基因组数据库中寻找候选分子在组织或是肿瘤中的基因表达谱，还可以采用芯片技术加以筛查，所以大大加快了研究进度。目前，通过上述CTL或是自身抗体识别的肿瘤抗原谱数量已经达到2000多种。利用生物信息学结构比对、功能预测等方法将这些抗原进行分类，并在正常组织和肿瘤组织中进行筛查，结合对其功能的研究，就可以获得能使机体产生免疫应答(细胞或是体液免疫应答)的肿瘤抗原谱，为设计有效的肿瘤疫苗奠定基础。对于采用血清学方法获得肿瘤患者外周血的自身抗体谱在临床上的真正意义则还有待于进一步深入研究；包括这些抗体的产生与肿瘤的病理分类和病理阶段、肿瘤的早期诊断和疾病跟踪、肿瘤的转移、肿瘤患者的术后生存率和死亡率、以及与现在常用的用于监测肿瘤的标志物之间的关系等等诸多问题。而一旦在上述某些问题的研究中有所突破，那么，根据肿瘤的特异性体液免疫应答，在体外利用抗体芯片等基因组技术，获得大量相应的免疫特异性应答信息，也可

作为诊断、监控和治疗肿瘤的新方法。

2.2 基因组学技术在感染免疫学中的作用

抗感染免疫是指外来病原体侵入后，机体免疫系统产生一系列的免疫防御应答。所以，免疫防御应答的结局受病原体和机体两方面基因型及其相互作用的影响：病原菌如果能够逃脱免疫系统产生的免疫效应，则造成感染患者组织受损甚至死亡；如果机体产生有效的抗感染免疫应答，控制感染，则感染就会逐渐消退。对上述两种免疫应答结局的免疫学机制的探讨现在已经采用很多来自于基因组学相关的研究手段加以分析。

除了通过开展对不同致病效应的病原体的基因组序列进行比对分析，寻找毒力因子和可能的致病机理外，在宿主方面，则可以利用基因组学研究中单核苷酸多态性(即SNP)检测手段来首先寻找机体中和免疫应答相关的基因与疾病易感性/抵抗性的关系。在30亿碱基对构成的人类基因组中99.9%在个体水平是共有的，仅有0.1%产生变异，而SNPs约占85%，属于人类可遗传的变异中最常见的一种。在基因组学时代，各大生物信息数据库存在的基因组全序列信息为SNPs的研究提供了极大的便利。一方面通过再测序手段对SNPs的存在及频率信息进行确定，对不同人群进行SNPs的基因分型都更加便利可行。同时，针对SNPs进行连锁分析、单体型构建以及标签SNPs寻找的生物信息软件也不断推出。而且，功能基因组学的发展甚至开始尝试对SNPs进行功能学预测，比如预测启动子SNPs位点与转录因子结合的改变，编码区SNPs对蛋白质的空间结构和生物功能的影响等。这些研究成果对我们选择潜在功能性的SNPs位点进行研究具有极大的帮助。将SNPs作为复杂性疾病的遗传标记开展关联性研究对于疾病的临床诊断和治疗具有潜在的应用前景；而对和感染免疫应答相关基因的SNP与疾病的关系的研究也已有报道。例如，干扰素及其下游转导通路在抗HCV感染免疫中具有重要作用，通过在感染人群中对与该信号通路中相关分子SNP分析发现，干扰素调节因子1(IRF-1)基因中有4个位点的SNP突变和HCV感染有关^[17]；细胞因子IL-1基因SNP与幽门螺旋杆菌感染有关^[18]，TLR基因的SNP与脓毒症有关^[19]等等。由

于对上述这些免疫应答相关基因SNP的研究只是涉及到这些基因的形态学特征,那么这些位点的变化和其发挥免疫学功效上的关系还需进一步通过功能实验加以说明。但是,由于目前研究的SNP变化位点或者是位于编码区,或者是位于基因表达调控的启动子区,这些位点的变化都可能会影响到这些基因的表达和调控,如果能够明确这些疾病相关免疫应答分子基因SNPs与免疫应答效应的关系,那么这些分子的SNPs可能会成为免疫应答预判和干预的重要指标之一。

3 基因组学对免疫治疗中疫苗设计的影响

无论是在肿瘤或是传染性疾病的防治中,选择可诱导高特异性、高免疫应答强度和具有持续免疫记忆性的疫苗候选抗原是主要的研究目标之一。基因组学发展至今,除了用于阐明生物学的一些基本规律外,其最终目的也是为人类战胜各种疾病服务的。自然,基因组学研究所获得的海量的基因序列和衍生出的生物信息学在新型免疫防治的疫苗设计中也正在发挥越来越重要的作用。

从疫苗的发展历史中我们发现,疫苗的研发从灭活菌到细菌或蛋白亚单位,再到分子疫苗(包括肽疫苗或是核酸疫苗)。现在,利用基因组或是基因序列寻找和设计合适的疫苗是国际上最为常用的筛查策略,该策略也被称为“反向疫苗学”(reverse vaccinology)^[20]。在这个过程中,牵涉到两个方面的内容,一方面是寻找候选的合适的疫苗抗原,另一方面是在获得候选疫苗抗原的基础上对抗原表位的寻找。

不同于肿瘤抗原疫苗设计中肿瘤抗原分子的相对针对性,在设计针对病原菌的疫苗时,基因组学研究中获得的越来越多的病原菌的全基因序列数据使采用反向疫苗学的原理, *in silico* 筛查疫苗候选分子成为可能。其基本过程为,首先采用特定的生物信息学软件完成可读框的搜寻,然后进一步分析它们的细胞定位,分泌型或是膜型的分子更适合作为疫苗的候选分子,并且还必须和人类基因组中的基因序列没有同源性或是同源性较低。采用该方法可以大大减少疫苗的候选基因数量,为后续的功能验证节省时间和工作量,能够在时间和财力有限的情况下迅速获得候选基因。采用该方法开展反向疫苗学研究

的早期实例是在对可以诱发脓毒和脑膜炎的脑膜炎奈瑟球菌的疫苗筛选中,通过在 5 种血清型中菌体基因组序列中搜寻共同表达的荚膜蛋白候选基因,并经过大规模体外表达和体外实验验证,最终获得 7 个对多种血清型病菌具有免疫原性的候选疫苗分子^[21,22],相似的研究策略还运用在对肺炎葡萄球菌^[23,24]、假单胞绿脓杆菌^[25]等疫苗的开发中;在我国,在 Ren 等人^[26]完成对钩端螺旋体全基因组测序预测获得 4727 个可读框的基础上, Yang 等人^[27]也结合生物信息学、比较基因组学和转录组学的方法分析和预测了钩端螺旋体中 226 个具有外膜蛋白结构特征的潜在的疫苗候选基的,为研制钩端螺旋体的应用性疫苗奠定了基础。

在获得候选疫苗抗原分子的基础上,还需进一步定位(mapping)才能有效激发免疫应答的T细胞和B 细胞候选表位。T 细胞识别的是经过抗原递呈细胞加工处理后,由主要组织相容性分子 MHC 所递呈的抗原肽片段(即 T 细胞表位)。比较有意义的是,对于目前已知具有明确免疫应答效应的 MHC I 类分子和 MHC II 类分子递呈抗原肽的结构特点加以分析后可以发现, MHC I 类分子递呈的抗原肽主要为九肽,并且和特定 MHC I 类分子结合的氨基酸残基具有结构特征,已确认的抗原肽多为 9~10 个氨基酸残基; MHC II 分子结合抗原肽的特征也具有类似性。为此,可以根据这个原则,通过基因组学研究中的生物信息学手段,利用特定的软件(如 BIMAS^[28], ProPred^[29], SVMHC^[30], MHCpred 等)预测与特定 MHC 分子结合的抗原肽序列以及结合能力(亲和力分值),并通过实验手段加以确认。该预测和研究方法在设计肿瘤抗原疫苗中已有大量报道,如 MAGE1^[31], HER-2/neu^[32], OVA66^[33] 等。表 1 中即列举了一些已知的肿瘤抗原的 T 细胞抗原表位。此外,根据 MHC 和抗原肽结合的特征,还可以采用生物信息学的方法(如 QSAR^[34] 软件)对一些天然的抗原肽进行氨基酸残基的置换和结构上改造,形成所谓的“超级抗原表位肽”,这些抗原肽分子在具有更好的与 MHC 结合能力的基础上,发挥同样的免疫应答,从而在诱导特异性的抗肿瘤细胞免疫应答中发挥着重要的作用。

表1 一些肿瘤抗原的T细胞表位

	MHC	类分子限制性	MHC	类限制性
	HLA 位点	抗原肽序列	HLA 位点	抗原肽序列
MAGE-A1	A1	EADPTGHSY	DRB1*1301	LLKYRAREPVTKAE
	A3	SLFRAVITK		
	A24	NYKHCPEI		
	B37	REPVTKAEML		
	Cw2	SAFPPTINF		
NY-ESO-1	A2	SLLMWITQC	DRB4*0101	VLLKEFTVSG
	B*3501	MPFATPMEA		
Gp100	A2	KTWGQYWQV	DRB1*0401	WNRQLYPEWTEAQRLD
	A2	AMLGTHTMEV	DRB1*0701	TGRAMLGHTMEVTVYH
	A3	LIYRRRLMK		
	A24	VYFFLPDHL		
	B*3501	VPLDCVLYRY		
	Cw8	SNDGPTLI		
	A2	AAGIGILTV	DRB1*0401	RNGYRALMDKSLHVGTQCALTRR
Melan-A	B45	AEEAAGIGIL		
	A2	KIFGSLAFL	DR11	GSYVSRLLGIGLVPIKWMALESILRRRF
SURVIVIN	A2	ELTLGEFLKL		

B细胞抗原表位主要用于诱导特异性的体液免疫应答。体液免疫应答所产生的抗体在抵抗病毒、胞内菌和胞外菌感染中发挥主要作用。T细胞表位抗原肽和MHC的结合后被T细胞识别，属于线性表位，而B细胞表位可以直接被B细胞抗原受体结合，它们的结构特征既有线性表位，也有构象表位，所以在利用生物信息学手段对B细胞表位进行预测时，抗原分子的疏水性和亲水性特征是预测的重要依据，但是由于B细胞抗原受体中抗原结合部位结构的多样性，目前对B细胞抗原表位的预测还远落后于T细胞抗原表位，特别是在对构象表位的预测中，还必须和抗原蛋白的结构数据相对应，才能使之更接近于真实。不过，目前也有一些软件可用于B细胞抗原表位的预测，如Bcepred, Discotope^[35](<http://cbs.dtu.dk/services/Discotope/>), Bcipep^[36]等。目前还有一种确定B细胞抗原表位的策略则是利用候选抗原制备获得的鼠源性的具有中和活性的单克隆抗体，筛选噬菌体肽展

示库，从而获得具有产生有效免疫应答的候选B细胞抗原表位肽段，如幽门螺旋杆菌^[37]、SARS病毒表面^[38]等。

4 基因组学对免疫学今后发展的作用

基因组学发展到现在，它所带来的研究手段和研究策略上的变革已经深深影响到免疫学的发展，而且还将发挥更大的作用，在众多免疫学基础研究领域中，特别是对不同免疫应答状态下细胞因子相互作用网络模式、免疫细胞发育和活化中的相关细胞信号转导网络机制以及免疫应答的可重塑性机制等方面的研究都离不开高通量和大规模的基因组学以及后续的功能基因组学、转录组学、蛋白组学等“组学”及生物信息学研究手段的支撑，从而为免疫学的研究提供巨大的发展空间。同时，免疫学和基因组学的相互交叉对我们开展与肿瘤和感染性疾病(如结核病、病毒性肝炎等等)相关的疫苗设计和研制提供了极大的便利。

参考文献

- 1 周光炎. 免疫学原理. 第1版. 上海: 上海科学技术出版社, 2007
- 2 Mak T W. The T cell antigen receptor: "The Hunting of the Snark". *Eur J Immunol*, 2007, 37 (Suppl 1): S83—S93 [[DOI](#)]
- 3 Nicholson L B, Kuchroo V K. T cell recognition of self and altered self antigens. *Crit Rev Immunol*, 1997, 17(5-6): 449—462
- 4 Takeda K, Akira S. Roles of Toll-like receptors in innate immune responses. *Genes Cells*, 2001, 6(9): 733—742 [[DOI](#)]
- 5 Klysk J. Concept of immunomics: a new frontier in the battle for gene function? *Acta Biotheor*, 2001, 49(3): 191—202 [[DOI](#)]
- 6 Santamaria P, Lindstrom A L, Boyce-Jacino M T, et al. HLA class I sequence-based typing. *Hum Immunol*, 1993, 37(1): 39—50 [[DOI](#)]
- 7 Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, et al. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila adults*. *Cell*, 1996, 86(6): 973—983 [[DOI](#)]
- 8 Rock F L, Hardiman G, Timans J C, et al. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(2): 588—593 [[DOI](#)]
- 9 Lu B, Zagouras P, Fischer J E, et al. Kinetic analysis of genomewide gene expression reveals molecule circuitries that control T cell activation and Th1/2 differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(9): 3023—3028 [[DOI](#)]
- 10 Lund R J, Löytöö M, Naumanen T, et al. Genome-wide identification of novel genes involved in early Th1 and Th2 cell differentiation. *J Immunol*, 2007, 178(6): 3648—3660
- 11 Santegobts S J, Gibbs S, Kroze K, et al. Transcriptional profiling of human skin-resident Langerhans cells and CD1a⁺ dermal dendritic cells: differential activation states suggest distinct functions. *J Leukoc Biol*, 2008, 84(1): 143—151 [[DOI](#)]
- 12 Harenberg A, Guillaume F, Ryan E J, et al. Gene profiling analysis of ALVAC infected human monocyte derived dendritic cells. *Vaccine*, 2008, 26(39): 5004—5013 [[DOI](#)]
- 13 Tarama R, Kato H, Ishikawa Y, et al. Gene expression changes induced by type IV allergy-inducible chemicals in dendritic cells. *J Vet Med Sci*, 2008, 70(7): 673—680 [[DOI](#)]
- 14 Miles A K, Matharoo-Ball B, Li G, et al. The identification of human tumour antigens: Current status and future developments. *Cancer Immunol Immunother*, 2006, 55(8): 996—1003 [[DOI](#)]
- 15 Van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, et al. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*, 1991, 254(5038): 1643—1647 [[DOI](#)]
- 16 Sahin U, Türeci O, Schmitt H, et al. Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(25): 11810—11813 [[DOI](#)]
- 17 Fortunato G, Calzagnano G, Bresciamorra V, et al. Multiple sclerosis and hepatitis C virus infection are associated with single nucleotide polymorphisms in interferon pathway genes. *J Interferon Cytokine Res*, 2008, 28(3): 141—152 [[DOI](#)]
- 18 Liou J M, Lin J T, Wang H P, et al. IL-1B-511 C→T polymorphism is associated with increased host susceptibility to *Helicobacter pylori* infection in Chinese. *Helicobacter*, 2007, 12(2): 142—149 [[DOI](#)]
- 19 Wurfel M M, Gordon A C, Holden T D, et al. Toll-like receptor 1 polymorphisms affect innate immune responses and outcomes in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008, 178(7): 710—720 [[DOI](#)]
- 20 Masignani V, Rappuoli R, Pizza M. Reverse vaccinology: a genome-based approach for vaccine development. *Expert Opin Biol Ther*, 2002, 2(8): 895—905 [[DOI](#)]
- 21 Pizza M, Scarlato V, Masignani V, et al. Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. *Science*, 2000, 287(5459): 1816—1820 [[DOI](#)]
- 22 Tettelin H, Saunders N J, Heidelberg J, et al. Complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain MC58. *Science*, 2000, 287(5459): 1809—1815 [[DOI](#)]
- 23 Wizemann T M, Heinrichs J H, Adamou J E, et al. Use of a whole genome approach to identify vaccine molecules affording protection against *Streptococcus pneumoniae* infection. *Infect Immun*, 2001, 69(3): 1593—1598 [[DOI](#)]
- 24 Maione D, Margarit I, Rinaudo C D, et al. Identification of a universal group B streptococcus vaccine by multiple genome screen. *Science*, 2005, 309(5731): 148—150 [[DOI](#)]
- 25 Bodilis J, Baray S. Molecular evolution of the major outer-membrane protein gene (*oprF*) of *Pseudomonas*. *Microbiology*, 2006, 152(Pt 4): 1075—1088 [[DOI](#)]

- 26 Ren S X, Fu G, Jiang X G, et al. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. *Nature*, 2003, 422(6934): 888—893[\[DOI\]](#)
- 27 Yang H L, Zhu Y Z, Qin J H, et al. In silico and microarray-based genomic approaches to identifying potential vaccine candidates against *Leptospira interrogans*. *BMC Genomics*, 2006, 7: 293[\[DOI\]](#)
- 28 Hassainya Y, Garcia-Pons F, Kratzer R, et al. Identification of naturally processed HLA- Λ 2-restricted proinsulin epitopes by reverse immunology. *Diabetes*, 2005, 54(7): 2053—2059[\[DOI\]](#)
- 29 Singh H, Raghava G P. ProPred: prediction of HLA-DR binding sites. *Bioinformatics*, 2001, 17(12): 1236—1237[\[DOI\]](#)
- 30 Donnes P, Elofsson A. Prediction of MHC class I binding peptides, using SVMHIC. *BMC Bioinformatics*, 2002, 3: 25[\[DOI\]](#)
- 31 Akiyama Y, Maruyama K, Nara N, et al. Cytotoxic T cell induction against human malignant melanoma cells using HLA-A24-restricted melanoma peptide cocktail. *Anticancer Res*, 2004, 24(2B): 571—577[\[DOI\]](#)
- 32 Correa I, Plunkett T. Update on HER-2 as a target for cancer therapy: HER2/neu peptides as tumour vaccines for T cell recognition. *Breast Cancer Res*, 2001, 3(6): 399—403
- 33 Jin S, Wang Y, Zhang Y, et al. Humoral immune responses against tumor-associated antigen OVA66 originally defined by serological analysis of recombinant cDNA expression libraries and its potentiality in cellular immunity. *Cancer Sci*, 2008, 99(8): 1670—1678[\[DOI\]](#)
- 34 Doytchinova I A, Guan P, Flower D R. Quantitative structure-activity relationships and the prediction of MHC supermotifs. *Methods*, 2004, 34(4): 444—453[\[DOI\]](#)
- 35 Haste Andersen P, Nielsen M, Lund O. Prediction of residues in discontinuous B-cell epitopes using protein 3D structures. *Protein Sci*, 2006, 15(11): 2558—2567[\[DOI\]](#)
- 36 Saha S, Bhasin M, Raghava G P. Bcipep: a database of B-cell epitopes. *BMC Genomics*, 2005, 6(1): 79[\[DOI\]](#)
- 37 Reiche N, Jung A, Brabletz T, et al. Generation and characterization of human monoclonal scFv antibodies against *Helicobacter pylori* antigens. *Infect Immun*, 2002, 70(8): 4158—4164[\[DOI\]](#)
- 38 Duan J, Yan X, Guo X, et al. A human SARS-CoV neutralizing antibody against epitope on S2 protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 333(1): 186—193[\[DOI\]](#)