

猪细小病毒 SD-68 株 NS1 基因的克隆与序列分析

刘艳华¹, 范伟兴^{1,2**}, 王锡乐¹, 刘文强¹, 许传田¹, 张志¹

(1. 山东农业大学动物科技学院, 山东泰安 271018; 2. 国家动物流行病学中心, 山东青岛 266032)

Cloning and Sequence Analysis of NS1 Gene of Porcine Parvovirus SD-68 Strain

LIU Yan-hua¹, FAN Wei-xing^{1,2**}, WANG Xi-le¹, LIU Wen-qiang¹, XU Chuan-tian¹, ZHANG Zhi¹

(1. College of Veterinary Medicine, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China; 2. China Animal Epizootiology Center, Qingdao 266032, China)

Abstract: NS1 gene of Porcine parvovirus SD-68 strain was cloned and sequenced. Based on the sequence we can conclude that NS1 gene of SD-68 strain is composed of 1989 nucleotides, encodes a polypeptide of 662 amino acids and shares 99.9%, 99.9%, 99.7%, 98.1% identity of nucleotides and 99.7%, 99.5%, 99.5%, 96.7% identity of amino acids with that of SY-99 strain, Kresse strain, NADL-2(5075) strain and NADL-2(4973) strain, respectively. The distances of NS1 gene of all strains analyzed by phylogenetic tree, we can conclude that SD-68 strain is near to MVM(i) strain and far to BPV3 strains. The residues of Thr and Ser at the position 435 and 473 in the NS1 gene of SD-68 strain are phosphorylated sites because they are also found at the same position in the NS1 gene of MVM(i) strain.

Key words: Porcine parvovirus (PPV) SD-68 strain; NS1 gene; Phylogenetic tree

摘要: 对猪细小病毒(PPV)SD-68 株 NS1 基因进行了克隆和序列测定, 结果表明 SD-68 株 NS1 基因全长 1989bp, 编码 662 个氨基酸组成的多肽。该序列与 PPV SY-99 株、Kresse 株、NADL-2(5075)和 NADL-2(4973)株的 NS1 基因比较, 核苷酸的同源性分别为 99.9%、99.9%、99.7%、98.1%, 氨基酸的同源性分别为 99.7%、99.5%、99.5%、96.7%。PPV SD-68 株与 MVM(i)、MEV(Abashiri)、CPV、FPV、BPV3、GPV NS1 的进化树分析表明: PPV SD-68 株 NS1 与 MVM(i) NS1 亲缘关系最近, 与 BPV3 NS1 的亲缘关系最远; 在 Thr435 和 Ser473 位点 PPV SD-68 株与 MVM(i)完全一致, 表明 Thr435 和 Ser473 是 PPV SD-68 株 NS1 潜在的磷酸化位点。

关键词: 猪细小病毒 SD-68 株; NS1 基因; 进化树

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125 (2004)04-0353-03

猪细小病毒 (*Porcine parvovirus*, PPV) 是引起母猪繁殖障碍的主要病原之一, 主要引起母猪流产, 产死胎和畸形胎, 给养猪业造成巨大经济损失, 因此研究 PPV 生活周期和致病机理非常重要, 其中 NS1 是 PPV 的主要非结构蛋白, 在病毒繁殖和侵害宿主细胞过程中发挥着重要作用, 例如参与病毒 DNA 的复制, 调节早期启动子和晚期启动子, 对宿主细胞有细胞毒素作用, 并有转录激活的功能^[1], 但对其诸多功能的作用机理还不清楚, 因此对 PPV NS1 的进一步研究尤为重要。本研究是对 PPV 的一株自然弱毒株 (SD-68 株) NS1 基因进行了克隆和

序列分析, 为进一步研究 PPV NS1 的功能和作用机理提供分子生物学依据。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株及试剂来源

PPV SD-68 株是由齐鲁动物保健品厂分离的一株自然弱毒株, PK-15 细胞由本实验室保存, 宿主菌大肠杆菌 TG1 由山东畜禽疫病防治中心保存, pMD18-T 质粒载体、Taq DNA 聚合酶、BamH I、Hind III、X-gal、IPTG、PCR 回收试剂盒以及 Marker 等试剂均购自大连 TaKaRa 公司。

收稿日期: 2003-12-15, 修回日期: 2004-01-30

作者简介: 刘艳华 (1979-), 女, 山东肥城籍, 硕士研究生, 从事动物传染病与分子病毒学研究。

** 通讯作者。Corresponding Author. E-mail: fanweixingsjl@hotmail.com

1.2 PPV SD-68 株病毒 DNA 的提取

参照李文刚等^[2]的方法提取 PPV SD-68 株 DNA。

1.3 引物设计

参照 GenBank 收录的 PPV NADL-2(5075)株、NADL-2(4973)株、Kresse 株全基因组序列,选择保守序列设计了一对引物用于扩增 SD-68 株 NS1 基因, P1: 5'-CTTCAGTTAGTTCCTTTCTGC-3', P2: 5'-GTATCCTGGTAGAGTTAGTCC-3', 以上引物由大连 TakaRa 公司合成。

1.4 PCR 扩增

以提纯的 PPV SD-68 株 DNA 为模板,扩增 NS1 序列。扩增条件为 95℃ 40s 变性, 58℃ 1min, 72℃ 2min, 反应周期为 32 个循环。取 8μL PCR 产物用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳。

1.5 克隆与序列分析

PCR 产物的克隆按常规方法^[3]进行, PCR 产物经 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳纯化后, 用 PCR 回收试剂盒回收, 与 pMD18-T 质粒载体连接后, 转化大肠杆菌 TG1, 提取重组质粒, 经 PCR 法和酶切法鉴定阳性克隆, 阳性重组质粒送交大 TakaRa 公司测序。

将测序结果与 PPV Kresse 株、SY-99 株、NADL-2(5075)株、NADL-2(4973)株)的 NS1 基因进行核苷酸和氨基酸的同源性分析。

1.6 细小病毒 NS1 基因进化树分析

用 DNASTar 分析 PPV SD-68 株与 *Minute virus of mice* (MVM)、*Mink enteritis virus* (MEV)、*Canine parvovirus* (CPV)、*Feline panleukopenia virus* (FPV)、*Goose parvovirus* (GPV)、*Bovine parvovirus* (BPV3) 的亲缘关系。

2 结果

2.1 PPV SD-68 株 NS1 基因的 PCR 扩增结果

以 PPV SD-68 株全基因组为模板, 经 PCR 扩增出一条特异性条带, 长度约为 2.2kb, 与预期结果相符。

2.2 PPV SD-68 株 NS1 基因的克隆与酶切鉴定结果

挑取克隆的阳性重组质粒, 碱裂解法少量抽提重组质粒。以 *Bam*H I 和 *Hind*III 双酶切, 切出长约 2.2kb 和 2.7kb 的特异性条带, 与预期结果相符(图 1)。

2.3 NS1 核苷酸序列测定和分析

测序结果表明 PPV SD-68 株 NS1 基因全长 1989bp(GenBank 收录号为 AY502114), 编码 662 个

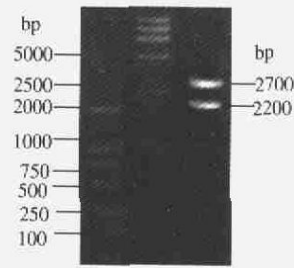


图 1 重组质粒的双酶切鉴定

Fig.1 Recombinant Plasmid digested by enzyme

1, DL-2000 marker; 2, DL-15000 marker; 3, Products of PPV SD-68 NS1 gene digested by *Bam*H I and *Hind*III.

氨基酸, 推测其分子量为 75.6kDa。利用 DNASTar 对 SD-68 株 NS1 核苷酸序列进行分析显示: 该序列与 PPV SY-99 株、Kresse 株、NADL-2(5075)株和 NADL-2(4973)株 NS1 基因核苷酸同源性分别为 99.9%、99.9%、99.7%、98.1%。

2.4 氨基酸序列分析

该序列与 SY-99 株氨基酸同源性为 99.7%, 只有 1 个氨基酸变化, 即 Gly-242→Ser; 与 Kresse 株和 NADL-2(5075)株的同源性均为 99.5%, 都有 2 个氨基酸变化, 并且这两个氨基酸变化相同, 分别为 Val-55→Ala、Arg-195→Lys; 与 NADL-2(4973)株的同源性为 96.7%, 共有 17 个氨基酸变化, 除了 Val-55→Ala、Arg-86→Gly、Arg-195→Lys、Arg-274→Lys 和 Val-376→Cys 散在的点变异外, 主要变异集中在 621~636 位点, 即由 SD-68 株: “NLHLTPPPDSAIRTP” 变异为 “T-AHLQH-ARFSNTDT”, 这主要是 NADL-2(4973)株 NS1 基因的核苷酸序列从 1862 到 1906 位 15 个碱基中有 5 个碱基缺失, 4 个碱基发生变异的结果。以上结果表明, PPV 的 NS1 基因具有高度保守性。

PPV SD-68 株与 MVM、FPV、CPV 和 MEV (Abashiri) NS1 同源性分别为 70.3%、67.3%、67.1%、67.1%, 其中从 380 到 530 约 150 个氨基酸残基同源性明显高于其他区域, 同源性可高达 86%, 在这个区域内存在 MVM NS1 的 2 个磷酸化位点, 即 Thr435 和 Ser473^[4], 在这两个位点上, PPV SD-68 株及其它四株 PPV 与 MVM 氨基酸残基完全一致, 这表明 PPV SD-68 株 NS1 序列上的 Thr435 和 Ser473 也是其潜在的磷酸化位点。

2.5 进化树分析

PPV SD-68 株 NS1 与 MVM、MEV、CPV、FPV、BPV3、GPV 的 NS1 进化树分析结果表明: PPV SD-68 株 NS1 与 MVM (i) NS1 的亲缘关系最近,

同源性高达 67.6%, 而与 BPV3 NS1 的亲缘关系最远, 只有 15.1% 的同源性; 而 MEV(Abashiri)、CPV、FPV NS1 的亲缘关系非常近, 同源性高达 99%; 这可能是 MEV(Abashiri)、CPV、FPV 感染亲缘关系相近的宿主, 又都引起肠炎的遗传基础(图 2)。

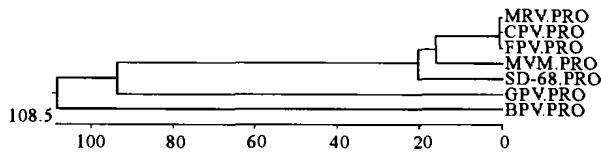


图 2 PPV SD-68 株 NS1 和其它细小病毒 NS1 的进化树分析
Fig. 2 Phylogenetic tree of NS1 of PPV SD-68 strain with other parvovirus

MEV, Mink enteritis virus; CPV, Canine parvovirus; FPV, Feline panleukopenia virus; MVM, Minute virus of mice; GPV, Goose parvovirus; BPV, Bovine parvovirus

3 讨论

PPV NS1 基因具有高度保守性, 这比 PPV VP2 基因的同源性要高^[5], PPV NS1 基因与 MVM、MEV、CPV、FPV NS1 基因的同源性(67%以上)也比这几种细小病毒结构蛋白的同源性要高(低于 60%)^[6], 这从分子水平证实了有关报道: 几种脊椎动物细小病毒的抗血清与 NS1 能产生交叉免疫反应, 而结构多肽仅在紧密相关的几种细小病毒之间才能产生类似的反应^[7,8]。在 PPV、MVM、MEV、CPV、FPV NS1 氨基酸序列中, 380~530 为这几种细小病毒的高度保守区, 这段保守序列含有 NS1 发挥 ATPase/GTPase 功能, 与 ATP/GTP 结合的位点^[9], 其中在 PPV NS1 序列上为“GPASTGKSIIAQHI”, 在 MVM(i)、MEV (Abashiri)、CPV、FPV NS1 序列上为“GPASTGKSIIAQHI”, 在 GPV 序列上为“GPATTGKINIAEAI”, 在 BPV3 序列上为“GPASTGKINLAKAI”。NADL-2(5075)是用 NADL-2 (4973)制备感染克隆时得到的^[10], 两者在 621~636 位点变异很大, NADL-2(4973)缺失 2 个氨基酸残基, 而 PPV 其它 3 个毒株在此处与 NADL-2 (5075) 相同, 此处产生变异的原因还不清楚。

NS1 蛋白的推测分子量约为 75.6 kDa, 但用 SDS-PAGE 凝胶电泳测出的分子量为 86 kDa, 这可能是 NS1 被磷酸化和糖基化的缘故, 有研究表明, PPV 上有 3 个潜在的糖基化位点: 356~359、446~

449、515~516^[9]。NS1 的磷酸化和糖基化对于 NS1 在病毒复制和转录激活的功能很重要^[11], 因为 NS1 发挥其功能的过程也是 NS1 与宿主细胞内的细胞因子相互作用的过程, 而 NS1 与细胞因子相互作用的结果往往是 NS1 的磷酸化或糖基化。

虽然国内外学者对 PPV NS1 的功能和作用机理进行了一些研究, 但到目前为止, 对 PPV NS1 的许多作用机制还不清楚, 例如 PPV NS1 在哪些作用位点以怎样的形式和哪些细胞因子相互作用等等, 因此这就需要对 PPV NS1 进行更深入的研究, 这对 PPV 进行预防和监测也具有重大意义。

参考文献

- [1] 周锐, 陈焕春. 猪细小病毒的分子生物学研究进展[J]. 国外兽医学-畜禽传染病, 1998, 18 (3): 15-18.
- [2] 李文刚, 甘孟侯. 聚合酶链反应检测猪细小病毒的研究[J]. 中国兽医杂志, 1995, 22 (8): 3-5.
- [3] J 萨姆布鲁克, E F 弗里奇等, 著, 金冬雁, 黎孟枫, 等, 译. 分子克隆实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [4] Lachmann S, Rommeleare J, Nuesch J P. Novel PKCeta is required to activate replicative functions of the major nonstructural protein NS1 of minute virus of mice[J]. J Virol, 2003, 77(4): 8048-8060.
- [5] 李昌文, 仇华吉, 吴丹, 等. 猪细小病毒 SY-99 株 VP2 基因的序列分析[J]. 动物医学进展, 2001, 22(1): 44-46.
- [6] Jayarama V, Sukla B, Ranga V S, et al. Nucleotide Sequence Analysis of the Capsid Genes and the Right-Hand Terminal Palindrome of Porcine Parvovirus, Strain NADL-2[J]. Virology, 1989, 173:368-377.
- [7] Cotmore S F, Tattersall P. The Autonomously Replicating Parvovirus of Vertebrates[J]. Adv Virus Res, 1987, 33: 91-114.
- [8] Mengeling W L, Paul P S, Bunn T O, et al. Antigenic relationships among autonomous Parvoviruses[J]. J Gen Virol, 1992, 187: 515-524.
- [9] 吴丹, 仇华吉, 李昌文, 等. 猪细小病毒 SY-99 株非结构蛋白 NS1 基因的克隆与序列分析[J]. 中国预防兽医学报, 2002, 24: 241-244.
- [10] Jayarama V, Sukla B, Ranga V S, et al. The Complete nucleotide sequence of infectious clone of Porcine Parvovirus strain NADL-2 [J]. Virology, 1990, 178: 611-616.
- [11] Corbau R, Salom N, Rommeleare J, et al. Phosphorylation of the viral nonstructural protein NS1 during MVMP infection of A9 cells[J]. Virology, 1999, 259(2): 402-415.