维普资讯 http://www.cqvip.com

第19卷6期 中国病毒学 19（6）：568-571
2004年11月 VIROLOGICA SINICA November 2004

猪细小病毒SD-68株*vp2*基因的克隆及序列分析

刘艳华[1]，范伟兴[1,2**]，隋兆峰[1]，王锡乐[1]，徐龙涛[3]，孙中诚[3]，禚宝山[3]

（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；3. 齐鲁动物保健品厂，山东济南 250001）

Cloning and Sequence Analysis of *vp2* Gene of Porcine Parvovirus SD-68 Strain

LIU Yan-hua[1]，FAN Wei-xing[1,2*]，SUI Zhao-feng[1]，WANG Xi-le[1]，XU Long-tao[3]，SUN Zhong-cheng[3]，GAO Bao-shan[3]

(1.College of Veterinary Medicine, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China; 2.China Animal Epizootiology Center, Qingdao 266032, China; 3. Qilu Animal Health Products Factory, Jinan 250001, China)

Abstract: *vp2* gene of *Porcine parvovirus* (PPV) SD-68 strain was cloned and sequenced .The results showed that *vp2* gene of *Porcine parvovirus* (PPV) SD-68 strain was 1740bp and encoded a protein of 579 amino acids. *vp2* gene of SD-68 strain exhibited over 99% nucleotide sequence identity and 96% amino acid sequence identity with other PPV strains: Kresse, SY-99, NADL-2(5075), NADL-2(4973), US-1. Phylogenetic tree analysis of *vp2* gene showed the closest relationship between SD-68 strain and kresse strain. The difference between SD-68 strain and kresse strain was only on 378, 383 and 436 residues, which decided the tissue tropism of PPV, so the tissue tropism of SD-68 strain suggested more similar with kresse stain, that is to say, SD-68 was a dermatitis strain. Comparison of amino acid residues of virulent strain (kreese) and vaccine strain (NADL-2 and SD-68) suggested that 215, 378 and 383 were important residues that decided the pathogenicity of PPV.

Key words: *Porcine parvovirus* (PPV) SD-68 strain; VP2 gene; Phylogenetic tree analysis; Tissue tropism; Pathogenicity

摘要：对猪细小病毒（PPV）SD-68株*vp2*基因进行的克隆和序列测定表明：SD-68株VP2基因全长1740bp，编码579个氨基酸残基组成的多肽；PPV SD-68株与Kresse株、SY-99株、NADL-2（5075）株、NADL-2（4973）株、US-1株的VP2基因比较，核苷酸的同源性在99%以上，氨基酸的同源性在96%以上。进化树分析表明SD-68株与kresse株的亲缘关系最近；在决定毒株组织嗜性的关键氨基酸位点上(378，383及436)，SD-68株与kresse株的差异最小，据此推测SD-68株的组织嗜性与Kresse株相似，即SD-68株属皮炎型PPV；而比较弱毒株NADL-2、SD-68和强毒株kresse VP2的氨基酸差异后发现，215、378和383可能是决定PPV致病性强弱的关键位点。

关键词：猪细小病毒SD-68株；*vp2*基因；进化树分析；组织嗜性；致病性

中图分类号：S582.65 **文献标识码**：A **文章编号**：1003-5125（2004）06-0568-04

猪细小病毒（*Porcine parvovirus*，PPV）为引起母猪繁殖障碍病的主要病原之一，对养猪业的危害很大。完整的病毒粒子中包含大约5.0kb的单股负链线状DNA，在3'端形成Y形发夹结构，5'端形成U形或十字型发夹结构[1]。由于3'端回折的-OH基，因而能自我复制，形成复制型DNA（RF DNA），属自主型细小病毒[2,3]。PPV的全基因组共编码三种结构蛋白（VP1、VP2和VP3）和三种非

收稿日期：2004-04-15，修回日期：2004-05-20

作者简介：刘艳华（1979-），女，山东农业大学硕士研究生，从事动物传染病学与分子病毒学研究。E-mail: wangxile80@163.com

* 通讯作者．Corresponding author. Tel: 0532-5628464， E-mail : fanweixingsjl@hotmail.com.

维普资讯 http://www.cqvip.co

结构蛋白（NS1、NS2 和 NS3），其中 VP2 是其主要免疫原性蛋白，同时 VP2 在决定毒株的组织嗜性和致病性上起重要作用[4]。本文将在山东分离到的一弱毒株 PPV（定名为 SD-68）的 *vp2* 基因进行了克隆和测序，并与已报道的 PPV Kresse 株、NADL-2 株、US-1 株和 SY-99 株的 *vp2* 基因进行核苷酸和氨基酸同源性比较，旨在进一步了解我国分离株 PPV SD-68 株 *vp2* 基因的结构特点以及 *vp2* 基因变异对 PPV 免疫原性、组织嗜性及致病性的影响，为 PPV 分子流行病学调查、亲缘性和减毒机理的研究积累资料，同时也为 PPV 作载体、构建基因工程疫苗提供分子生物学依据。

1 材料和方法

1.1 病毒株和细胞株

PPV SD-68 株为山东齐鲁动物保健品厂分离到的一株自然弱毒株，PK-15 细胞株由本实验室保存。

1.2 主要试剂

Taq DNA 聚合酶、*Bam*H Ⅰ、*Pst* Ⅰ、X-gal.、IPTG、PMD18-T 载体、PCR 回收试剂盒以及 Marker 等试剂均购自大连 TaKaRa 公司。

1.3 引物的设计与合成

参照 GenBank 收录的 PPV NADL-2（5075）株、NADL-2（4973）株和 Kresse 株的 VP2 基因，设计两对引物用于扩增 SD-68 株的 *vp2* 基因。其中，P1 与 P2 扩增从 2600 到 3728 的 1128bp 个碱基；P3 与 P4 扩增从 3683 到 4564 的 881bp 个碱基。

P1-5'-GGACATTACTTCTTCAGAG -3'，P2-5'-GTGTTCCTGGGTGTTGG-3'；

P3-5'-CTACTAACTGAACCTACC-3'，P4-5'-TGATTAACCAAGTAACTGAG-3'；

以上引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.4 PPV DNA 提取

参照李文刚等[5]介绍的方法提取 PPV DNA。

1.5 PCR 扩增

以提纯的 PPV DNA 为模板扩增，条件为 95℃ 40s 变性，52℃ 40s 退火，72℃ 延伸 1min，共 32 个循环；最后 72℃延伸 10min，PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳检测。

1.6 克隆与序列分析

PCR 产物的克隆按常规方法[6]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 载体连接后，转化 *E. coli* TG1，提取重组质粒，经 PCR 法和酶切法鉴定阳性克隆。阳性重组质粒送交上海生工生物工程有限公司测序。

将测序结果拼接后与 PPV Kresse 株、SY-99 株[7]、NADL-2 (5075) 株、NADL-2 (4973) 株及 US-1 株的 *vp2* 基因进行核苷酸和氨基酸的同源性分析。

2 结果

2.1 PPV SD-68 株 *vp2* 基因的 PCR 扩增结果

以 PPV SD-68 株基因组为模板，用所设计的两对引物，分别扩增出 1128bp 和 881bp 的特异性条带，与预期结果相符。

2.2 PPV SD-68 株 *vp2* 基因的克隆与酶切鉴定

分别挑取所克隆的这两种阳性重组质粒，碱裂解法少量抽提重组质粒。以 *Bam*H Ⅰ和 *Pst* Ⅰ双酶切，两种阳性重组质粒分别切出约 1128bp 和 2700bp 及 881bp 和 2700bp 的特异性条带，与预期结果相符。

2.3 PPV SD-68 株 VP2 测序结果

用 DNA Star 软件将两段测序结果拼接，得一长 1740bp 的核苷酸序列（GenBank 收录号为 AY502115），编码 579 个氨基酸残基组成的蛋白质，推测其分子量为 64kDa。

2.4 核苷酸序列分析

利用 DNA Star 对 SD-68 株 VP2 核苷酸序列进行分析显示：该序列与 Kresse 株的同源性为 99.3%，共有 12 个核苷酸差异；与 SY-99 株的同源性为 99.3%，共有 11 个核苷酸差异；与 NADL-2（5075）株的同源性为 99.2%，共有 14 个核苷酸差异；与 NADL-2（4973）株的同源性为 99.0%，共有 18 个核苷酸差异；与 US-1 株的同源性为 98.8%，共有 23 个核苷酸差异。

2.5 氨基酸序列分析

PPV SD-68 株 VP2 基因推导的氨基酸序列与 PPV Kresse 株、SY-99 株、NADL-2（5075）株、NADL-2（4973）株及 US-1 株的氨基酸同源性分别为 98.6%、98.5%、98.5%、97.9%、96.2%。PPV SD-68 株与 Kresse 株的 VP2 共有 8 个氨基酸残基变化，分别是 Gly-192→Ser，Ile-215→Thr，Thr-233→Ser，Val-253→Ile，Val-391→Leu，Ala-436→Pro，Arg-545→Gln，Arg-565→Lys；与 NADL-2（5075）之间共有 9 个氨基酸的差别，分别为 Ser-45→Thr，Gly-192→Ser，Thr-233→Ser，Val-253→Ile，Gly-378→Asp，Gln-383→His，Val-391→Leu，Ala-436→Pro，Arg-545→Gln；与 SY-99 株共有 8 个氨基酸变异，分别为 Ile-11→Thr，Gly-91→Val，Gly-192→Ser，Ile-215→Thr，Val-253→Ile，Val-391→Leu，Asn-521

维普资讯 http://www.cqvip.com

→His，Arg-545→Gln，Arg-565→Lys；与NADL-2（4973）株存在12个氨基酸的变异；与US-1株存在22个氨基酸的变异，其中包含11个散在的点突变：Gly-13→Ala，Glu-143→Ala，Gly-192→Ser，Val-253→Ile，Gly-378→Asp，Gln-383→His，Val-391→Leu，Ala-436→Pro，Arg-545→Gln，Gly-555→Lys，Arg-565→Lys；另外还包含229～237连续9个氨基酸残基的突变："QITDTIQTG"→"PNNRLNTNR"，这是由于US-1株对应的核苷酸序列在686位插入了碱基C，同时在711位缺失掉碱基A而导致的结果，此区域（尤其是233位点）可能是PPV VP2的高突变区。此外各毒株的436位点氨基酸残基的变异也较大。

对PPV各毒株VP2的氨基酸变异分析时发现：在378，383及436位点上（位于VP2基因的两个BgIII酶切位点之间，这是决定毒株组织嗜性的重要区域[8]），SD-68株与Kresse株只有两个氨基酸的差异，即Val-391→Leu，Ala-436→Pro；而与NADl-2（5075）株有四个氨基酸的差异，分别为Val-391→Leu，Gly-378→Asp，Gln-383→His，Ala-436→Pro，（因为在391位点Kresse株与NADL-2（5075）株的氨基酸残基相同，推测此位点的变异对毒株的组织嗜性没有影响。）据此推测SD-68株的组织嗜性与Kresse株相近，即SD-68株易侵害猪的皮肤、口腔、舌以及脑组织，属于皮炎型PPV。

在215、378和383这3个位点上，皮炎型强毒株Kresse株与弱毒株NADL-2（5075）株不同，而弱毒株NADL-2(5075)株与SD-68株(已知SD-68株为一弱毒株）相同，因此推测这三点在决定毒株的致病性强弱上起重要作用。

用DNA Star分析各毒株VP2的抗原指数时发现，SD-68株发生变异的氨基酸残基的抗原指数与其它PPV毒株相应氨基酸残基的抗原指数相差很小，并且Krresse株与NADL-2（5075）株在5个变异氨基酸残基上的抗原指数差异很小，因此推测强毒株与弱毒株的免疫原性相差不大，并且VP2的抗原指数较高，推测其免疫原性良好。而与其他毒株相比，US-1株在229～237位点无论是抗原性还是疏水性都有较大差异，即抗原性和亲水性明显高于其他毒株，这可能会造成US-1株在免疫原性上与其他毒株有一定差异。

2.6 系统进化树分析

SD-68株和其它几株PPV VP2的进化树分析表明，SD-68株与kresse株和SY-99株的遗传距离最近（见图1）。

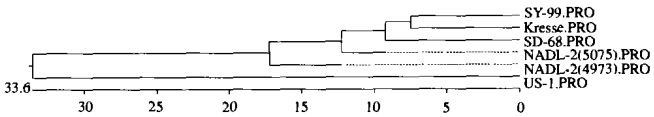

图1 PPV SD-68株 VP2与Kresse、SY-99、NADL-2(5075)、NADL-2(4973)、US-1株的进化树

Fig.1 Phylogentic tree of *vp2* of PPV SD-68 with Kresse, SY-99, NADL-2(5075), NADL-2(4973) and US-1.

3 讨论

PPV毒株根据其致病性可分为4类，一类是以NADL-8株为代表的强毒株，口服接种可透过胎盘屏障，导致胎儿死亡；一类是以Kresse株为代表的皮炎型强毒株，口服接种可导致免疫不充分的胎儿死亡；一类是以NADL-2株为代表的疫苗型毒株，当口服接种时对妊娠母猪和胎儿都没致病性，但当子宫内接种时会对胎儿产生致病性；一类以IFA-A83株为代表，其特点还不清楚[8]。由于GenBank中未收录NADL-8株和IFA-A83株的*vp2*基因，因此本文只将SD-68株与有代表性的Kresse株和NADL-2株进行比较。NADL-2（5075）株是用NADL-2（4973）株制备感染性克隆时得到的，二者的*vp2*基因在134、274、275、1665和1694位发生变异，其编码的氨基酸残基也发生相应的改变，至今还没有关于两毒株变异原因以及变异意义的报道。

在PPV VP2氨基酸序列的4个保守区域中，25～34位点9个连续的甘氨酸折叠成α-螺旋结构，可能是产生VP3蛋白的切割位点；TPWS是所有细小病毒共有的区域；YNNDLTA序列是所有自主性细小病毒共有的序列，这两个保守序列对于保持SD-68株的种属特异性可能很重要；无感染性缺损病毒NADL-2*的基因组中没有"VFPNGQIWDKEL"这段序列，因此推测这段序列的缺失可能会使PPV无法产生病毒完整的结构蛋白和成熟的病毒粒子[9]。

为进一步了解PPV VP2蛋白的生物学特性，国内外学者已成功的在体外表达了VP2蛋白，同时利用PPV VP2良好免疫原性和自我包装成空衣壳类病毒的功能，将VP2作为抗原载体，在其N末端插入外源基因构建杂交粒子来研究增进细胞免疫的方法[10~13]。

参考文献

[1] Bergeron J, Menezes J, Tijssen P. Genomic Organizaton and Mapping if Transcription and Translation Products of the NADL-2 Strain of

维普资讯 http://www.cqvip.com

Porcine Parvovirus [J]. Virology, 1993, 197:86-98.

[2] 殷 震，刘景华. 动物病毒学[M]. 第二版. 北京：科技出版社，1997, 1150-1151.

[3] 尤永进，许泉兴，周智爱. 猪细小病毒研究近况[J]. 上海农业学报，1995, 11: 90-96.

[4] Molitor T H, Joo H S, Collett M S. Porcine parvovirus: Virus purification and structural and antigenic properties of virion polypeptides [J]. J Virol, 1983, 45:842-854.

[5] 李文刚，甘孟候. 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.

[6] J. 萨姆布鲁克, E F 弗里奇等，著. 金冬雁，梨孟枫，等译. 分子克隆实验指南. 北京：科学出版社，1998.

[7] 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.

[8] Bergeron J, Herbert B, Tijssen P. Genome organization of the Kresse strain of porcine parvovirus: identification of allotropic determinant and comparison with those of NADL-2 and field isolates [J]. J Virol, 1996, 70(4): 2508-2553.

[9] Ranz A I, Manclus J J, Diaz-Aroca E, *et al*. Porcine parvovirus: DNA sequence and genome organization [J]. J Gen Virol, 1989, 70(10), 2541-2553.

[10] 吕建强，赵俊龙，陈焕春，等. 猪细小病毒VP2蛋白在昆虫细胞中的表达及其特性[J]. 微生物学报, 2002, 42:675-679.

[11] 赵俊龙，陈焕春，吕建强，等. 猪细小病毒结构蛋白 VP1 和 VP2 的基因免疫研究[J]. 病毒学报, 2003, 19(1): 47-51.

[12] Sedlik C, Sarraseca J, Rueda P, *et al*. Imuunogenicity of poliovirus B and T cell epitopes presented by hybrid porcine parvovirus particles [J]. J Gen Virol, 1995, 76:2361-2368.

[13] Sedlik C, Saron M, Sarraseca J, *et al*. Recombinant parvovirus-like particles as an antigen carrier: a novel nonreplicative exogenous antigen to elicit protective antiviral cytotoxic T cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA. 1997, 94:7503-7508.

中国科学院武汉病毒研究所招聘启事

中国科学院武汉病毒研究所建于 1956 年，是中国科学院唯一从事病毒学研究的综合性研究机构。拥有一支过硬的科研、管理队伍，具备一流的设施、高等级生物安全实验室平台和良好的科研氛围。近年来，根据国家战略需求，将学科重点由普通病毒学扩展到医学病毒和新生疾病的研究。

由于研究所科研发展的需要，研究所首期聘学科组长（百人计划）五名。研究方向为：病毒免疫学、艾滋病、流行病学及新生疾病、疫苗与抗病毒药物和分子病毒学。受聘者将组织独立的研究小组开展科研工作。欢迎有识之士积极应聘。

应聘者须具有博士学位，良好的科研工作经历，在国际知名学术期刊上发表过高质量论文。年龄一般在 45 周岁以下。

研究所将为受聘者提供优厚的工作和生活条件，薪资报酬及科研启动经费将根据受聘者的资格和经验决定。

应聘者需提供以下材料：（1）个人履历（2）最终学历证明复印件和 5 篇代表性论文复印件；（3）应聘后工作设想；（4）3 封推荐信。报名截止期 2005 年 2 月 25 日。

同时招聘副研究员和助理研究员若干名，研究领域主要有：肿瘤病毒、肝炎病毒、流感病毒、人畜共患病毒、水生病毒、应用微生物等，欢迎有相应资历者前来应聘。

地址：湖北省武汉武昌小洪山中区 44 号 中科院武汉病毒所人事处
邮编：430071
更多详情请查看如下网站：http://www.whiov.ac.cn
联系电话：86-27-87199413，传真：86-27-87198072
联系人：袁志明 尚纳新
电子邮箱：yzm@wh.iov.cn shang@wh.iov.cn