

## 猪细小病毒 HNZM-01 株 NSI 基因的 克隆及序列分析

郭东辉<sup>1</sup>, 王超群<sup>2</sup>, 王建辉<sup>3</sup>, 陈海宁<sup>1</sup>, 魏战勇<sup>1\*</sup>

(1. 河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450002; 2. 漯河出入境检验检疫局, 河南 漯河 462000;  
3. 新安县职业高级中学, 河南 洛阳 471800)

**摘要:** 为加强猪细小病毒病的监控, 对分离的猪细小病毒(PPV)HNZM-01 株 NSI 基因的序列进行了分析。设计一对特异性引物, 以抽提的 PPV HNZM-01 株的 DNA 为模板, 通过 PCR 反应扩增出大小约 2.27 kb 的目的片段, 并将其插入克隆载体 pGEM-T Easy 上, 构建了重组质粒并测序。结果表明, NSI 基因全长 1 989 bp, 与预期目的片段大小一致。序列分析结果表明, PPV HNZM-01 株的 NSI 基因与其他 PPV 毒株同源性在 98.2%~99.8%, 说明 NSI 基因具有高度保守性。同时应用 ANTHEPROT 软件分析了 HNZM-01 株 NSI 基因编码蛋白质的氨基酸组成和二级结构的含量、分布。结果表明, 由于 HNZM-01 株中碱基的突变, 造成其氨基酸序列与 NADL-2 株有所不同, 形成的二级结构略有差异, 但二级结构元件分布大致与 NADL-2 株相同。

**关键词:** 猪细小病毒; NSI 基因; 克隆; 序列分析

**中图分类号:** S852.65<sup>+</sup>9.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2012)03-0137-05

## Cloning and Sequence Analysis of NSI Gene of Porcine Parvovirus HNZM-01 Strain

GUO Dong-hui<sup>1</sup>, WANG Chao-qun<sup>2</sup>, WANG Jian-hui<sup>3</sup>, CHEN Hai-ning<sup>3</sup>, WEI Zhan-yong<sup>1\*</sup>

(1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;  
2. Luohe Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau of P. R., Luohe 462000, China;  
3. Vocational Senior School of Xin'an County, Luoyang 471800, China)

**Abstract:** In order to strengthen the monitoring PPV and get more analyse of the sequence of the NSI gene, the special primer pair was designed and synthesized according to the NSI gene sequence of PPV kress strain previously published in GenBank. After amplification from PPV HNZM-01-DNA, the PCR fragment in length of 2.27 kb was inserted in pGEM-T Easy vector. As expected, the cloned NSI gene is 1 989 bp in length and encodes 662 aa. NSI protein of HNZM-01 contains the conserved sequence GKRN. Compared to the corresponding region of other strains of PPV, the nucleotide sequence homology was between 98.2%—99.8%. The results showed that NSI gene is highly conservative. The further analysis of the field strain was done by the phylogenetic tree. The amino acid composition and percentage of secondary structure were compared between HNZM-01 and NADL-2 isolated using the ANTHEPROT software. The results showed that for the changes of NSI nucleotide sequence, the amino acid composition and secondary struc-

收稿日期: 2011-09-13

基金项目: 河南省杰出人才创新基金项目(0621002100)

作者简介: 郭东辉(1986-), 男, 河南新乡人, 在读硕士研究生, 研究方向: 动物分子免疫学。

E-mail: guodonghui0808@126.com

\* 通讯作者: 魏战勇(1975-), 男, 河南安阳人, 副教授, 博士, 主要从事动物分子免疫学研究。

E-mail: weizhanyong@henau.edu.cn

ture of HNKM-01 isolate had some difference compared with NADL-2 isolate, but the distribution of secondary structure unit changed not too much.

**Key words:** porcine parvovirus; NS1 Gene; cloning; sequence analysis

猪细小病毒(porcine parvovirus, PPV)属于细小病毒属<sup>[1]</sup>,不但能感染猪,还可感染牛、犬、猫、绵羊、鹅、兔等动物。研究表明,PPV 与犬细小病毒(canine parvovirus, CPV)、猫泛白细胞减少病毒(feline panleukopenia virus, FPV)抗原性相近<sup>[2]</sup>。猪细小病毒基因组结构简单,为单链线状 DNA,大小约为 5.0 kb,两端均含有发夹结构。基因组包括 2 个主要的开放阅读框架(ORF),分别位于基因组的两端,其中 5'端的 ORF 编码 3 种非结构蛋白,分别为 NS1、NS2、NS3<sup>[3-4]</sup>。在临床诊断技术上,也可用非结构蛋白 NS1 来区别灭活疫苗免疫猪和自然感染猪<sup>[5]</sup>。

我国于 1983 年首次分离到 PPV<sup>[6]</sup>,此后在各地陆续分离了数株 PPV,都属于同一血清型。目前,PPV 的预防主要依靠灭活疫苗和弱毒疫苗<sup>[7]</sup>,但加强细小病毒病的监控和流行病学分析仍然是猪病防控的重点之一。为进一步研究 PPV 的结构,为新型疫苗的研制提供参考,从河南省中牟县某猪场采集了临床诊断为感染 PPV 的病料,对 PPV 的 NS1 基因进行克隆、序列和结构分析,并与往年分离提取的几种分离株的核苷酸序列进行比对,在 GenBank 查询并下载了河北、山东、广西、湖北、四川、黑龙江等省和国外报道的 19 个 NS1 序列,利用 DNASTar 软件对以上序列进行了比较分析,报告如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 病料采集及预处理

病料采自于河南省中牟县某猪场,临床检测初步诊断为 PPV 感染。无菌条件下取病死仔猪的淋巴结、肺脏、脾脏等,剪碎,加入适量的 PBS 液研磨,将研磨后的样品移入 1.5 mL 的离心管中,放-20℃冰箱中保存。

### 1.2 主要试剂及仪器

pGEM-T Easy 载体、T4 DNA 连接酶均购自 Promega 公司;限制性内切酶、PCR 相关试剂、DNA Marker、异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)、5-溴-4-氯-3-吡啶半乳糖苷(X-gal)购自大连宝生物工程技术有限公司;DNA 凝胶回收试剂盒购自杭州维特洁生物技术有限公司;质粒提取试剂盒购自北京博大泰克生物公司;PCR 仪(PTC200)为美国 MJ 公司产

品;其他常规试剂及仪器均由河南省动物源性食品安全实验室提供。

### 1.3 引物的设计与合成

根据 GenBank 中的 PPV Kresse 株基因序列(U44978),应用 Primer Premier 5 软件设计一对引物。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成,上游引物 F: 5'-CGGGATCCGGTGGAGCCTAACACTATAAAT-3';下游引物 R: 5'-CCAAGCTT-TATCCTGGTAAGATTAGTCCTG-3'。

### 1.4 猪细小病毒的增殖

按常规细胞培养方法,使用 PK-15 细胞培养。在细胞传代时同步接种分离的 PPV,按培养液体积的 2%接毒<sup>[8]</sup>,置于含 5% CO<sub>2</sub> 的 37℃恒温培养箱中培养,细胞出现 80%的病变时收获病毒,反复冻融 3 次,8 000 r/min 离心 30 min 以去除细胞碎片,冻于-20℃冰箱中保存备用。将分离到的病毒命名为 HNKM-01。

### 1.5 PCR 模板 DNA 的制备

取培养病毒的细胞悬液反复冻融 3 次,以充分裂解细胞。参照 Cao 等<sup>[9]</sup>的方法提取病毒基因组 DNA。将提取的 DNA 置于-20℃冰箱中保存备用。

### 1.6 PCR 及电泳检测

以提取的 DNA 为模板,进行 PCR 扩增,PCR 反应体系为 50 μL,其组分如下: 10×PCR 缓冲液 5 μL, MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/μL) 4 μL, dNTPs 3 μL (25 mmol/μL), Taq 酶 1 U, 上下游引物各 1 μL (50 pmol/μL), 反转录 cDNA 液 5 μL, 最后用双蒸水补至 50 μL。扩增程序为: 95℃变性 5 min; 94℃50 s, 55℃45 s, 72℃2 min, 35 个循环; 之后 72℃延伸 7 min, 4℃保存 10 min。反应结束后,取 3 μL 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.7 目的基因的克隆

PCR 扩增产物经电泳鉴定后,用凝胶回收试剂盒回收目的片段,然后将目的片段与 pGEM-T Easy 载体连接,转入 DH5α 感受态细胞。挑取疑似阳性菌落进行培养,用质粒提取试剂盒提取重组质粒,进行 PCR、酶切鉴定。

### 1.8 核酸序列测定及分析

取 PCR 及酶切均为阳性的重组菌液,送大连宝

生物工程有限公司测序,并利用 DNASTar 软件对所测核酸序列进行分析比较。

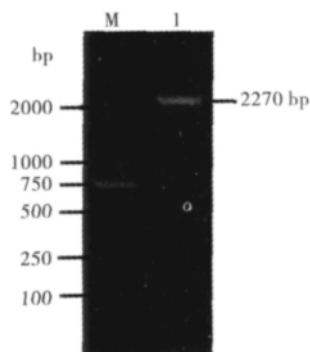
### 1.9 NSI 蛋白结构分析

应用 ANTHEPROT 软件分析 HN2M-01 株、NJ 株和 SR-1 株 NSI 基因编码蛋白质的氨基酸组成和二级结构的含量、分布。

## 2 结果与分析

### 2.1 NSI 基因的 PCR 扩增结果

以所提的 DNA 为模板,用设计合成的上、下游引物通过 PCR 技术扩增目的片段,经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,获得特异性片段(图 1),长度约为 2.27 kb,与预期扩增的 DNA 片段大小相符。

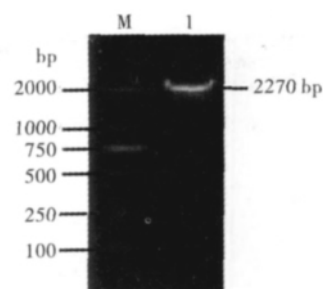


M. DNA 分子质量标准; 1. NSI 基因的 PCR 产物

图 1 PPV NSI 基因 PCR 产物电泳图谱

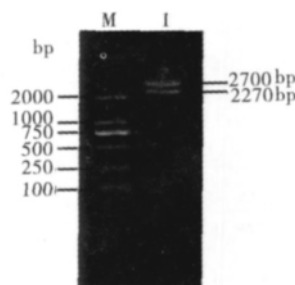
### 2.2 NSI 基因的克隆与鉴定结果

将纯化的 PCR 产物与 pGEM-T Easy 载体连接、转化后,筛选重组菌,提取质粒。以该质粒为模板,用上、下游引物进行 PCR 扩增,得到约 2.27 kb 的目的片段(图 2);同时,对重组质粒用 *EcoR* I 进行酶切鉴定,结果与预期的片段大小相符(图 3),证明目的基因已插入到载体中。



M. DNA 分子质量标准; 1. NSI 重组质粒的 PCR 产物

图 2 重组质粒 PCR 鉴定结果



M. DNA 分子质量标准; 1. 重组质粒的酶切结果

图 3 重组质粒酶切鉴定结果

### 2.3 PPV NSI 基因测序结果及同源性分析

将鉴定正确的重组菌液送大连宝生物工程有限公司测序,结果表明,本次扩增出的 PPV HN2M-01 NSI 基因片段,长度为 1 989 bp,编码 662 个氨基酸。利用 DNASTar 软件对 GenBank 上登录的相应序列(表 1)进行比较分析。结果表明,PPV HN2M-01 株的 NSI 基因与其他 PPV 毒株同源性在 98.2%~99.8%;该分离株与美国分离的 NADL-2 株的同源性最高,为 99.8%,亲缘关系较近;与山东、江苏的分离株(Tai'an 株和 NJ 株)同源性均为 99.7%,遗传关系也较近。不同 PPV 毒株间 NSI 基因的同源性在 98%以上(图 4)。

表 1 试验中参考的 PPV 序列信息

毒株	GenBank 登录号	分离地点	毒株	GenBank 登录号	分离地点
HN2M-01(cexu)		河南	SR-1	DQ675456	四川
Challenge	AY644866	英国	BQ	EU790641	黑龙江
VRI-1	AY390557	韩国	ZJ	EU790642	浙江
Tornau	AY684869	德国	S-1	EU707335	上海
China	AY553318	湖北	Tai'an	FJ853420	山东
HN-Z1	AY789533	河南	JY	HM627652	甘肃
HN-Z3	AY789534	河南	LZ	HM627653	甘肃
NJ	AY686601	江苏	NADL-2	NC 001718	美国
SD-68	AY502114	山东	Kresse	U44978	美国
POVG	D00623	美国			

### 2.4 PPV NSI 基因系统发生树的构建

应用 DNASTar 软件绘制了来自不同地方的 18 个分离株的系统进化树(图 5)。结果表明:此次从

中牟分离的 PPV 属于 NADL-2 变异毒株,与湖北、山东及河北分离株同源性最高,发生的变异较小,而此前本课题组(河南省动物源性食品安全重点

		Percent identity																		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Divergence	1		99.4	99.5	98.7	98.7	98.6	99.6	99.0	99.8	99.7	98.2	98.7	99.5	99.6	99.7	98.2	99.3	99.1	99.3
	2	0.6		99.4	98.7	98.8	98.9	99.5	99.2	99.6	99.6	98.0	98.8	99.5	99.5	99.5	98.6	99.4	99.3	99.4
	3	0.5	0.6		98.7	98.6	98.5	99.5	99.0	99.7	99.6	98.1	98.6	99.4	99.6	99.6	98.2	99.2	99.1	99.2
	4	1.3	1.3	1.3		99.7	98.4	98.8	99.0	98.9	98.9	97.3	98.9	98.8	98.8	98.8	98.1	98.9	99.4	98.7
	5	1.3	1.2	1.4	0.3		98.5	98.8	99.1	98.9	97.3	99.0	98.9	98.7	98.8	98.2	99.0	99.5	98.8	5
	6	1.4	1.1	1.5	1.6	1.5		98.7	98.7	98.8	98.8	97.2	98.5	98.8	98.6	98.7	98.8	99.0	98.8	6
	7	0.4	0.5	0.5	1.2	1.2	1.3		99.1	99.8	99.9	98.2	98.8	99.9	99.6	99.7	98.3	99.4	99.2	7
	8	1.0	0.8	1.0	1.0	0.9	1.3	0.9		99.2	99.2	97.6	99.4	99.2	99.1	99.1	98.4	99.4	99.4	8
	9	0.2	0.4	0.3	1.1	1.1	1.2	0.2	0.8		99.9	98.4	98.9	99.7	99.8	99.9	98.4	99.5	99.3	9
	10	0.3	0.4	0.4	1.1	1.1	1.2	0.1	0.8	0.1		98.3	98.9	99.8	99.7	99.8	98.4	99.5	99.3	10
	11	0.5	0.6	0.5	1.3	1.4	1.5	0.5	1.0	0.3	0.4		97.3	98.1	98.2	98.3	98.8	97.9	97.7	11
	12	1.3	1.1	1.3	1.1	1.0	1.5	1.2	0.6	1.1	1.1	1.3		98.9	98.7	98.8	98.3	99.1	99.3	12
	13	0.5	0.5	0.6	1.2	1.1	1.2	0.1	0.8	0.3	0.2	0.6	1.1		99.5	99.6	98.4	99.5	99.3	13
	14	0.4	0.5	0.4	1.2	1.3	1.4	0.4	0.9	0.2	0.3	0.4	1.2	0.5		99.7	98.3	99.3	99.2	14
	15	0.3	0.5	0.4	1.2	1.3	1.3	0.3	0.9	0.1	0.2	0.4	1.2	0.4	0.3		98.3	99.4	99.2	15
	16	1.8	1.4	1.8	1.9	1.8	1.2	1.7	1.6	1.6	1.6	1.8	1.7	1.6	1.7	1.7		98.6	98.6	16
	17	0.7	0.6	0.8	1.0	0.9	1.0	0.6	0.5	0.5	0.5	0.8	0.9	0.5	0.7	0.6	1.4		99.4	17
	18	0.9	0.7	0.9	0.6	0.5	1.2	0.8	0.5	0.7	0.7	0.9	0.6	0.7	0.8	0.8	1.4	0.6		18
	19	0.7	0.6	0.8	1.3	1.2	1.4	0.6	1.0	0.5	0.5	0.8	1.2	0.6	0.7	0.6	1.7	0.7	0.8	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19

图 4 PPV 不同分离株 NSI 基因的核苷酸序列同源性分析

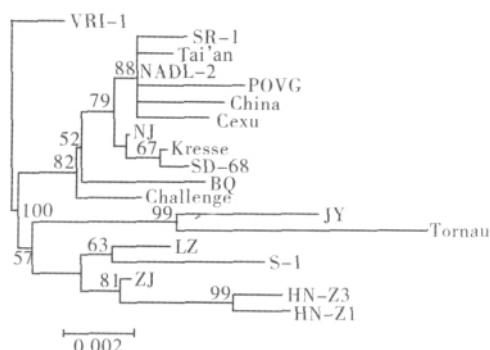


图 5 不同地区分离株的 NSI 核苷酸序列的系统进化树

实验室)分离的河南 HN-Z1、HN-Z3 株变异较大,由此推测 PPV 发生了变异。

## 2.5 PPV NSI 编码蛋白质的组成分析

经分析,HNZM-01 株 NSI 蛋白的相对分子

质量大约为 7.6 kD,与美洲型相比变化不大。不同氨基酸的含量有所变化,其中含量增加的有 His、Asp、Glu;含量下降的有 Asn、Lys。HNZM-01 株中 Thr 含量最高,达 10.27%,其次是 Leu 和 Glu,含量分别为 7.85%和 7.55%。

## 2.6 PPV NSI 蛋白的二级结构分析

蛋白质的二级结构包括  $\alpha$  螺旋、 $\beta$  折叠、 $\beta$  转角和无规则卷曲,应用 ANTHEPROT 软件中 Double Prediction 方法对 HNZM-01 株和 NADL-2 株 NSI 基因编码的蛋白质进行分析,得出二级结构的分布及含量,如图 6、图 7。结果表明:由于 HNZM-01 株中碱基的突变,造成其氨基酸序列与 NADL-2 株有所不同,形成的二级结构有一定的差异,但二级结构元件分布大致与后者相同。两者仅在  $\alpha$  螺旋的分布上有差别,分别为 36%和 35%。

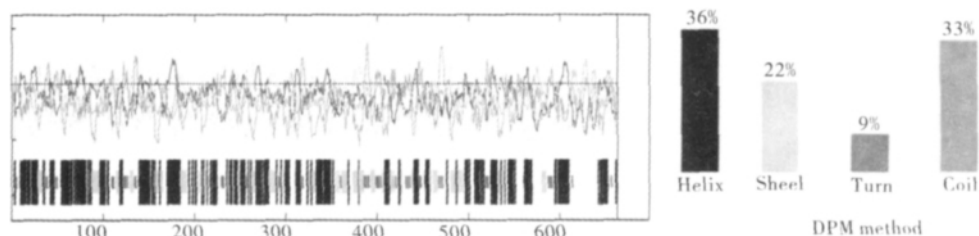


图 6 HNZM-01 株 NSI 蛋白的二级结构分布及含量

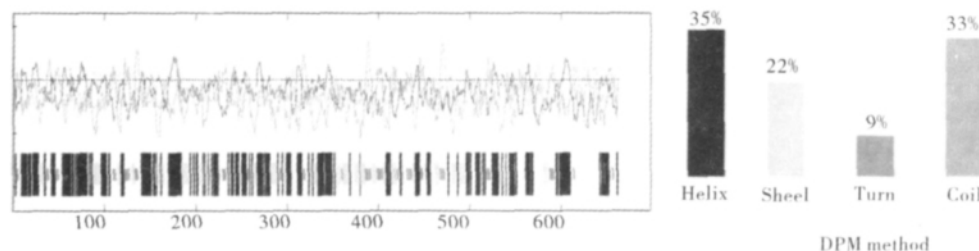


图 7 NADL-2 株 NSI 蛋白的二级结构分布及含量

### 3 讨论

通过对 PPV HN2M-01 株 NSI 基因克隆测序得知,其全长为 1 989 bp,共编码 662 个氨基酸残基,与国内外所报道的 PPV NSI 基因长度大小相符<sup>[10-15]</sup>。该毒株的 NSI 序列与美国分离的 NADL-2 株的同源性较高,为 99.8%。其次是山东、江苏的分离株(Tai'an 株和 NJ 株),同源性均为 99.7%。但是与河南分离株(HN-Z1 株和 HN-Z3 株)的同源性较低,为 98.7%。NADL-2 株是细胞适应性的弱毒株<sup>[16]</sup>,妊娠母猪感染后不能通过胎盘感染胎儿,可以用作弱毒疫苗来防止 PPV 感染。HN-Z1 株和 HN-Z3 株在 NCBI 上标记为强毒株,因此,引起 2011 年该猪场 PPV 疫情的原因可能来自疫苗株变异。

通过对 HN2M-01 株和 NADL-2 株蛋白质的二级结构进行分析可知,HN2M-01 株只在氨基酸序列的中间部分  $\alpha$  螺旋比 NADL-2 株稍多,其他二级结构几乎一致,说明 HN2M-01 株中 NSI 基因的碱基突变较少,表明 NSI 基因高度保守。

虽然 PPV NSI 基因的碱基突变较少,但 HN2M-01 株与先前本课题组分离的毒株相比有很大的差异,由此推测,PPV 发生了变异。因此,加强 PPV 的检测,追溯病原来源,对 PPV 的防控有重要意义。

#### 参考文献:

- [1] 卫功树. 浅谈猪细小病毒与母猪繁殖失能[J]. 现代农业科技, 2007(14): 176.
- [2] Mengeling W L, Ridpath J F, Vorwald A C. Size and antigenic comparisons among the structural proteins of selected autonomous parvoviruses[J]. J Gen Virol, 1988, 69(4): 825-837.
- [3] 张彦桃, 梁秀丽, 刘芳, 等. 猪细小病毒感染 Marc-145 细胞后对其分泌白细胞介素 6 转录时相的影响[J]. 河南农业科学, 2011, 40(6): 138-141.
- [4] 张莉, 王利丽, 鄢明华, 等. 猪细小病毒 PPT1 株免疫原性研究[J]. 天津农业科学, 2010, 16(3): 62-64.
- [5] Madsen E S, Madsen K G, Nielsen J, et al. Detection of antibodies against porcine parvovirus nonstructural protein NSI may distinguish between vaccinated and infected pigs[J]. Vet Microbiol, 1997, 54(1): 1-16.
- [6] 潘雪珠. 猪细小病毒 S-1 株的分离和鉴定[J]. 上海畜牧兽医通讯, 1983(1): 1-3.
- [7] 王在时. 猪细小病毒病及研究进展[J]. 中国兽医杂志, 1990, 16(5): 44-46.
- [8] 倪娇, 赵建增, 刘长辉, 等. 猪细小病毒在 PK15 细胞中增殖规律的研究[J]. 中国兽医杂志, 2009, 43(1): 21-24.
- [9] Cao S, Chen H, Zhao J, et al. Detection of porcine circovirus type 2, porcine parvovirus and porcine pseudorabies virus from pigs with post weaning multi systemic wasting syndrome by multiplex PCR[J]. Vet Research Communications, 2005, 29(3): 263-269.
- [10] Daniel L, Jean R. Terminal regions of the NSI protein of the parvovirus minute virus of mice are involved in cytotoxicity and promoter trans inhibition[J]. J Virol, 1992, 66: 5705-5713.
- [11] 冉旭华, 孟凡. 猪细小病毒 NSI 基因的克隆与序列分析[J]. 生物技术, 2008, 13(1): 3-5.
- [12] Cui S, Mart J, Joaquim S. Phylogeny and evolution of the NSI and VP1/VP2 gene sequences from porcine parvovirus[J]. Virus Research, 2009, 140(1/2): 209-215.
- [13] Lachmann S, Rommeleare J, Nuesch J P. Novel PKC $\epsilon$  is required to activate replicative functions of the major nonstructural protein NSI of minute virus of mice[J]. J Virol, 2003, 77(4): 8048-8060.
- [14] Streck A F, Bonatto S L, Homeier T, et al. High rate of viral evolution in the capsid protein of porcine parvovirus[J]. J Gen Virol, 2011, 92(11): 2628-2636.
- [15] 邱莹, 胡传伟, 朱晓林, 等. 猪细小病毒 NSI 基因和 VP2 基因的克隆与序列分析[J]. 西南农业学报, 2009, 22(5): 1460-1464.
- [16] Zeeuw E J, Leinecker N, Herwig V, et al. Study of the virulence and cross-neutralization capability of recent porcine parvovirus field isolates and vaccine viruses in experimentally infected pregnant gilts [J]. J Gen Virol, 2007, 88(2): 420-427.