

猪博卡病毒 *NP1* 基因的克隆及其生物信息学分析

郑英帅,左奕,柴瑞影,戚妍,李雅楠,袁万哲,孙继国*
(河北农业大学 动物医学院,河北 保定 071001)

摘要: 根据 GenBank 发表的猪博卡病毒主要抗原基因 *NP1* 基因设计 1 对引物,采用降落 PCR 方法进行扩增,克隆后测序,并对该基因进行生物信息学分析。结果表明:成功克隆到猪博卡病毒 *NP1* 基因;*NP1* 蛋白的二级结构中自由卷曲含量最高(51.77%),无跨膜蛋白,含有 1 个糖基化位点、30 个磷酸化位点,有 6 个线性 B 细胞优势抗原表位,分别位于 *NP1* 蛋白的 7—14 位、27—50 位、59—73 位、85—94 位、102—108 位、151—155 位。
关键词: 猪博卡病毒; *NP1* 基因; 克隆; 生物信息学分析
中图分类号: S855.3 Q51 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2015)03-0148-04

Cloning and Bioinformatics Analysis of Porcine Bocavirus *NP1* Gene

ZHENG Yingshuai,ZUO Yi,CHAI Ruiying,QI Yan,LI Yanan,YUAN Wanzhe,SUN Jiguo*
(College of Veterinary Medicine, Agricultural University of Hebei,Baoding 071001,China)

Abstract: A pair of primers were designed based on the published *NP1* genes of GenBank. The gene was amplified by PCR, and then cloned and sequenced. The gene was analyzed by bioinformatics methods. The results showed that the content of random coil in the secondary structure was high(51.77%). The protein of *NP1* contained zero transmembrane regions, one glycosylation sites, thirty phosphorylation sites and six B cell antigen epitopes. These antigen epitopes were at the protein amino acid 7—14, 27—50, 59—73, 85—94, 102—108, 151—155 aera, respectively.
Key words: porcine bocavirus; *NP1* gene; cloning; bioinformatics analysis

猪博卡病毒继 2009 年在瑞典被发现后,迅速广泛在世界范围内传播,但目前对于该病的传播方式、侵染机制、基因组结构功能等都不清楚,目前并无针对该病毒的有效检测方法,更无针对该病毒的疫苗问世,对该病的防治无从下手。尽管各国都展开了对猪博卡病毒的研究,但收效甚微。我国于 2010 年发现猪博卡病毒,国内对该病毒的研究较少。

猪博卡病毒(porcine bocavirus,PBoV)是单链无包膜的 DNA 病毒,结构简单,正二十面体颗粒,直径约 25~30 nm。属于细小病毒科细小病毒亚科的博卡病毒属。根据猪博卡病毒 ORF2 编码的核衣壳蛋白 VP1 的不同将目前世界上已分离的猪博卡病毒暂时分为 5 个基因型:猪博卡病毒 1—5 型(PBoV1—5)。此外,博卡病毒属还包括牛细小病毒

(BPV)、大猩猩博卡病毒(GBoV)、犬博卡病毒(MVC)、猪博卡病毒(PBoV)和人博卡病毒 1—4 型(HBoV1—4)^[1-3]。由此可以预见,博卡病毒不仅会给世界养猪业带来很大潜在威胁,同时还极大地威胁着人类健康。

对猪博卡病毒进行流行病学调查发现,该病毒在 PMWS(断奶仔猪多系统衰竭综合征)患猪中阳性率较高^[4],可能与呼吸道疾病病原共感染机体^[5]。猪博卡病毒的 ORF3 为猪博卡病毒特有开放阅读框(*NP1* 基因),*NP1* 基因大小约为 675 bp,编码 1 个相对保守且高度磷酸化的非结构性蛋白质,有报道称 ORF3 中存在 2 个亚基因组,但目前其功能还不明确^[6-8]。尽管猪博卡病毒根据 *VP1* 基因的不同而进行分型,猪博卡病毒的 *VP1* 蛋白是结构蛋

收稿日期:2014-10-22
作者简介:郑英帅(1988-),男,河北邢台人,在读硕士研究生,研究方向:预防兽医学。E-mail:zhengyewun@163.com
* 通讯作者:孙继国(1957-),男,河北衡水人,教授,博士生导师,主要从事新型生物制品研究。
E-mail:sunjiguo2000@aliyun.com

白同时也是病毒核衣壳蛋白,但不同毒株的 VP1 蛋白同源性差异较大,变异性高,不适合用作诊断抗原,而 NP1 基因相对保守,适合用作诊断抗原。目前,国外对该病毒的检测也仅仅是基于 NP1 基因的 PCR 检测,尚未有血清学检测方法。鉴于此,本研究克隆了猪博卡病毒 NP1 基因,并对其进行生物信息学分析和 B 细胞抗原表位的预测,以期为猪博卡病毒有效的检测诊断方法的建立和表位疫苗的研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 病料

猪博卡病毒阳性病料是从临床患 PMWS(断奶仔猪多系统衰竭综合征)病猪中分离,由河北农业大学动物医学院实验室保存。

1.2 主要试剂

基因组 DNA 快速抽提试剂盒、柱式 DNA 胶回收试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司,质粒小提试剂盒与 PFU 酶购自天根生化科技有限公司,dNTP、DH5 α 、Peasy-Blunt 克隆载体均购自全式金公司,各种限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司。

1.3 引物合成与 PCR 扩增

参照 GenBank 上公布的猪博卡病毒 NP1 基因(KC473563.1)序列设计引物,其序列为 P1:5'-CCG-GAATTCATGAGTCAGAGATTCTCCGA-3';P2:5'-CCGCTCGAGTTATGACTCATTCATTGATTCA-3',下划线为酶切位点,其中 P1 的限制性酶切位点为 EcoRI,P2 的限制性酶切位点为 XhoI。扩增长度为 675 bp,包含 NP1 整个编码区。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。取 150 μ L 从病猪体内分离出的阳性血清按照血液 DNA 快速抽提试剂盒的操作提取病毒 DNA。并以提取的 DNA 样品为模板,P1 和 P2 为引物,采用 PCR 方法扩增目的基因,然后用含 1% EB 的琼脂糖凝胶进行电泳分析。

1.4 NP1 基因的克隆与测序

将胶回收的 PCR 产物与 pEASY-Blunt 克隆载体连接,转化至 DH5 α 感受态细胞,涂布到含有氨苄青霉素抗性的营养琼脂固体培养基上,过夜培养后挑取菌落扩增培养,经双酶切鉴定正确后送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.5 NP1 蛋白的生物信息学分析

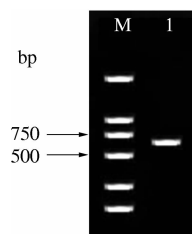
采用在线工具 ExPASy 的 GOR 方案和 SOPMA 方案分别预测猪博卡病毒 NP1 蛋白的理化性质和二级结构。应用 SignalP 软件预测 NP1 蛋白的信号

肽结构。应用在线软件 TMHMM(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)预测 NP1 蛋白的跨膜区域。应用专业蛋白质分析软件 DictyOGlyc(<http://www.cbs.dtu.dk/services/DictyOGlyc/>)和 NetPhos(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)分别对 NP1 蛋白糖基化位点和磷酸化位点进行预测。应用专业蛋白质分析软件(Protean),采用 Kyte-Doolittle 亲水性参数、Karplus-Schulz 柔韧性参数、Jameson-Wolf 抗原性参数和 Emini 表面可及性参数分别进行单参数预测。对各个参数的预测结果进行比较,最后进行综合分析以确定猪博卡病毒 NP1 蛋白的 B 细胞抗原表位^[9-10]。

2 结果与分析

2.1 NP1 基因的 PCR 扩增结果

以从血清提取的病毒 DNA 为模板,特异性引物 P1 和 P2 为引物,经过降落 PCR 扩增和 1% 的琼脂糖凝胶电泳分析可见,在 675 bp 左右出现特异性条带,大小与预期相符(图 1)。

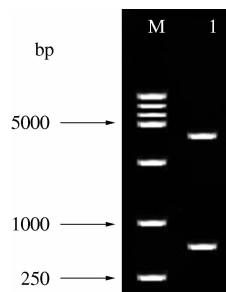


M. DL2000 Marker; 1. NP1 基因

图 1 NP1 基因 PCR 扩增结果

2.2 重组质粒 pEASY-Blunt-NP1 的酶切鉴定和测序结果

将 PCR 胶回收产物与 pEASY-Blunt 载体连接形成重组质粒 pEASY-Blunt-NP1 转化至 DH5 α 感受态细胞,提取质粒后双酶切鉴定,可见 675 bp 特异性酶切条带(图 2),与预期相符。测序结果表明,扩增基因为 NP1 基因。



M. DL15000 Marker; 1. 重组质粒 pEASY-Blunt-NP1 的 EcoRI 和 XhoI 双酶切

图 2 重组质粒 pEASY-Blunt-NP1 的酶切鉴定结果

2.3 NP1 蛋白的生物信息学分析

2.3.1 NP1 蛋白理化性质分析 运用在线工具 (Expsy) 对 NP1 的各种理化性质进行预测分析发现, NP1 蛋白约编码氨基酸 225 个, 分子质量为 25.852 ku, 理论等电点为 9.31, 高于 7.00, 表明该蛋白呈碱性; 不稳定系数是 54.01, 表明该蛋白不稳定; 脂肪指数为 43.63; 疏水性平均值为 -0.826; Ser (S) 含量最高达到 12.8%, 其次为 Arg (R) 含量 (10.6%) 和 Ala (A) 含量 (7.1%), Trp (W) 含量最低, 为 1.3%。

2.3.2 NP1 蛋白二级结构及信号肽区域分析 使用在线工具 Expsy 系统中的 GOR 进行蛋白质二级结构分析, 结果表明, NP1 蛋白的 α 螺旋所占比例为 31.86%, 伸展片段为 16.37%, 自由卷曲为 51.77%。此外, SignalP 分析表明 NP1 蛋白不具有信号肽结构。

2.3.3 NP1 蛋白跨膜区域分析 应用在线软件 (TMHMM) 预测 NP1 蛋白的跨膜区域, 结果表明, NP1 蛋白没有可能的跨膜区域 (图 3)。推断该蛋白不存在于病毒的囊膜中, 可能为包涵体表达。

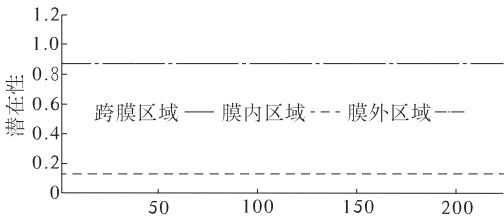


图 3 NP1 蛋白跨膜区域分析结果

2.3.4 NP1 蛋白糖基化位点预测 由图 4 可以看出, NP1 蛋白在第 199 位的苏氨酸处有 1 个 O-糖苷糖基化位点 (潜在系数为 0.602 6, 阈值为 0.519 6), 表明 NP1 蛋白可能在猪博卡病毒中参与调节生长。N-糖苷化作用可以抑制蛋白酶对糖蛋白的降解, 因为 NP1 未形成 N-糖苷糖基化位点, 所以可能不具备抵抗消化酶的能力。形成 O-糖苷糖基化位点可以对转录因子修饰, 表明 NP1 蛋白可能在猪博卡病毒的转录过程中起一定作用。此外, T 细胞表面糖蛋白多为 O-糖苷, NP1 蛋白可能对细胞免疫有一定影响。

2.3.5 NP1 蛋白磷酸化位点预测 由图 5 可以看出, NP1 蛋白共有 30 个可能的磷酸化位点, 其中丝氨酸 (Ser) 分别位于第 6 位、10 位、12 位、15 位、20 位、23 位、36 位、45 位、58 位、59 位、60 位、62 位、65 位、73 位、74 位、78 位、85 位、88 位、207 位、208 位、222 位处, 共 21 个; 苏氨酸 (Thr) 分别位于第 8 位、9 位、37 位、44 位、49 位、179 位、199 位处, 共 7 个; 酪氨酸 (Tyr) 分别位于第 66 位、191 位处, 共 2 个。

氨酸 (Tyr) 分别位于第 66 位、191 位处, 共 2 个。

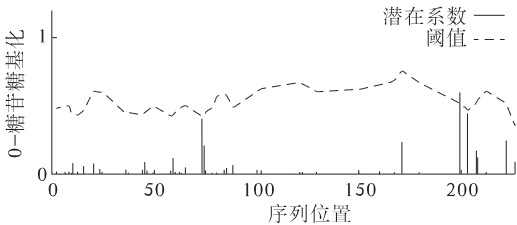


图 4 NP1 蛋白糖基化位点分析结果

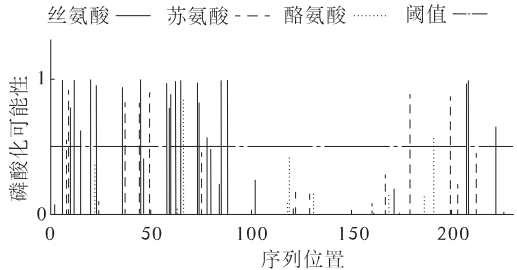


图 5 NP1 蛋白磷酸化位点分析结果

2.3.6 NP1 抗原表位分析 由图 6 可知, NP1 蛋白具有很好的亲水性 (按照 Kyte - Doolittle 方法的氨基酸亲水性标准), 其亲水性位点主要在第 1—20 位、23—77 位、85—94 位、102—109 位区段, 根据 Emini 方法标准来分析 NP1 蛋白表面可及性, 结果表明, 该蛋白中表面可及性较高的区域主要分布在第 4—14 位、27—48 位、59—72 位、85—95 位、101—106 位处, 根据 Jameson - Wolf 方法标准分析 NP1 蛋白各区段抗原系数, 发现 1—77 位、85—96 位、102—112 位、123—132 位、151—155 位这些区段的抗原系数较高, 剔除掉柔性较低的区段并综合分析上述结果可知, NP1 蛋白的 7—14 位、27—50 位、59—73 位、85—94 位、102—108 位、151—155 位区段处为该蛋白的抗原表位。

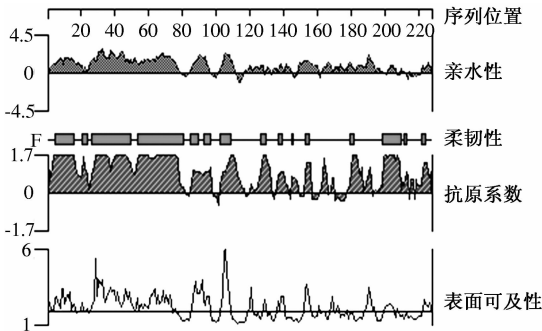


图 6 NP1 蛋白的抗原表位分析结果

3 讨论

本研究通过对分离鉴定的猪博卡病毒的 NP1 基因进行糖基化位点和磷酸化位点的分析, 发现 NP1 蛋白含有较为复杂的二级结构, 仅有 1 个 O-

糖苷糖基化位点和 30 个磷酸化位点,这表明 NP1 蛋白通过对转录因子进行修饰进而影响病毒转录过程。因 T 细胞表面对 O-糖苷糖基化位点的聚集作用,可以推测 NP1 蛋白对细胞免疫有一定影响。为深入了解该蛋白在猪博卡病毒侵入机制和免疫学反应方面所起的作用提供了理论依据,本研究通过对 NP1 蛋白在二级结构、跨膜区、亲水性、表面可及性、抗原性等多种参数进行综合分析,确定了 NP1 蛋白有 6 个 B 细胞线性优势表位,分别位于该蛋白的第 7—14 位、27—50 位、59—73 位、85—94 位、102—108 位、151—155 位区段。这与李彬等^[8]报道的 NP1 蛋白可作为诊断抗原的候选蛋白的研究结果一致。本研究为 PBoV 的血清学诊断方法的研究提供了参考,同时也为猪博卡病毒 NP1 蛋白免疫机制的研究、临床诊断方法、亚单位疫苗的研发和该病毒病的预防奠定了基础。

参考文献:

- [1] Fu X, Wang X C, Ni B, *et al.* Recombination analysis based on the complete genome of bocavirus [J]. *Virology*, 2011, 8; 182-188.
- [2] Zeng S, Wang D, Fang L, *et al.* Complete coding sequences and phylogenetic analysis of porcine bocavirus [J]. *Gen Virol*, 2011, 92(4): 784-788.
- [3] Lau S K, Woo P C, Yip C C, *et al.* Co-existence of multiple strains of two novel porcine bocaviruses in the same pig, a previously undescribed phenomenon in members of the family Parvoviridae, and evidence for inter-and intra-host genetic diversity and recombination [J]. *Gen Virol*, 2011, 92(9): 2047-2059.
- [4] Zhang H B, Huang L, Liu Y J, *et al.* Porcine bocaviruses: Genetic analysis and prevalence in Chinese swine population [J]. *Epidemiol Infect*, 2011, 139(10): 1581-1586.
- [5] McKillen J, McNeilly F, Duffy C, *et al.* Isolation in cell cultures and initial characterization of two novel bocavirus species from swine in Northern Ireland [J]. *Vet Microbiol*, 2011, 152(1/2): 39-45.
- [6] Chen A Y, Luo Y, Cheng F, *et al.* Bocavirus infection induces mitochondrion-mediated apoptosis and cell cycle arrest at G2/M phase [J]. *Journal of Virology*, 2010, 84(11): 5615-5626.
- [7] 翟少伦, 陈胜男, 魏文康, 猪博卡病毒的研究进展 [J]. *病毒学报*, 2012, 28(2): 190-193.
- [8] 李彬, 毛立, 何孔旺, 等. 猪博卡病毒 *NP1* 基因的克隆与原核表达 [J]. *华北农学报*, 2011, 26(3): 28-31.
- [9] 魏星灿, 贾青, 陶隽, 等. 猪 *CBI* 基因的生物信息学分析 [J]. *河南农业科学*, 2013, 42(12): 129-132.
- [10] 胡慧艳, 贾青, 陶隽, 等. 家猪 TBP 蛋白结构与理化性质的生物信息学分析 [J]. *河南农业科学*, 2014, 43(3): 128-132.
- *****
- (上接第 132 页)
- broiler chickens [J]. *British Poultry Science*, 2002, 43: 270-273.
- [19] 黄晓亮, 常斌, 杜炳旺, 等. 壳聚糖在贵妃鸡日粮中的应用效果 [J]. *中国饲料*, 2008(7): 18-20.
- [20] 李忠荣, 冯玉兰. 壳聚糖对河田鸡脂肪沉积的影响 [J]. *中国畜牧杂志*, 2010, 46(3): 39-41.
- [21] 刘梅. 壳聚糖对肉仔鸡脂肪代谢的影响 [J]. *江苏农业科学*, 2011, 39(3): 267-269.
- [22] LeHoux J, Grondin F. Some effects of chitosan on liver function in the rat [J]. *Endocrinology*, 1993, 132: 1078-1084.
- [23] Zhang W, Zhang J, Jiang Q, *et al.* The hypolipidemic activity of chitosan nanopowder prepared by ultrafine milling [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 95: 487-491.
- [24] Ormrod D J, Holmes C C, Miller T E. Dietary chitosan inhibits hypercholesterolaemia and atherogenesis in the apolipoprotein E-deficient mouse model of atherosclerosis [J]. *Atherosclerosis*, 1998, 138(2): 329-334.
- [25] Czechowska-Biskup R, Rokita B, Ulanski P, *et al.* Radiation-induced and sonochemical degradation of chitosan as a way to increase its fat-binding capacity [J]. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, 2005, 133: 383-390.