

# 猪细小病毒 HN—3 株 VP2 基因克隆与抗原性分析

梁秀丽<sup>1</sup>, 方丽云<sup>2</sup>, 王东方<sup>2</sup>, 貂鹏涛<sup>2</sup>, 付云飞<sup>2</sup>, 魏战勇<sup>2\*</sup>

(1. 安阳工学院, 河南 安阳 455000; 2. 河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450002)

**摘要:** 参考 GenBank 公布的 NADL—2 株序列, 设计出 1 对引物。利用该引物扩增了猪细小病毒 HN—3 株 VP2 主要抗原基因, 将其克隆到 pGEM—T Easy 载体上; 测序获得 1 438bp 核苷酸序列, 并推导出其氨基酸序列。共编码 475 氨基酸, 与 NADL—2 株相应的序列进行比较分析, 两者核苷酸同源率为 99.4%, 氨基酸同源率为 99.3%。应用 DNASTar 软件对氨基酸的抗原表位进行了预测, 共有 11 个抗原表位, 分别在氨基酸 N 端的 11~24, 81~108, 121~135, 139~148, 150~172, 221~239, 241~259, 316~342, 344~352, 390~405 和 426~439 区段, 此序列具有较好的免疫原性。

**关键词:** 猪细小病毒; VP2 基因; 抗原性分析

**中图分类号:** S858.28 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2007)11-0100-04

## Molecular Cloning and Antigenicity Analysis of VP2 Gene from PPV HN—3 Strain

LIANG Xiu-li<sup>1</sup>, FANG Li-yun<sup>2</sup>, WANG Dong-fang<sup>2</sup>, MO Peng-tao<sup>2</sup>, FU Yun-fei<sup>2</sup>, WEI Zhan-yong<sup>2\*</sup>

(1. Anyang University of Technology, Anyang 455000, China;

2. College of Animal Husbandry and Veterinary, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** A pair of primers was designed according to the sequence of NADL—2 strain from GenBank, and was used to amplify the major antigen regions of VP2 of HN—3 strain by PCR. The PCR products were then cloned into pGEM—T Easy vector. A 1 438bp nucleotide fragment was acquired, with a deduced peptide of 475 amino acids. Sequence comparison showed that the nucleotide and amino acid sequences of VP2 of HN—3 strain were 99.4% and 99.3% similarity, respectively, with those of NADL—2 strain. The VP2 antigen epitopes were predicted using DNASTar software, indicating that eleven antigen epitopes were located, respectively, at the N-terminal region of 11—24, 81—108, 121—135, 139—148, 150—172, 221—239, 241—259, 316—342, 344—352, 390—405 and 426—439.

**Key words:** PPV; VP2 gene; Antigenicity analysis

猪细小病毒病是由猪细小病毒(PPV)感染所引起的以母猪繁殖障碍为主要特征的病毒性传染病。其特征是母猪孕前期感染该病毒时, 经胎盘使胚胎或胎儿受到侵袭, 引起母猪流产、胚胎死亡、胎儿畸形等, 同时还可引起仔猪的皮炎和腹泻<sup>[1]</sup>。在猪群中检出率甚高, 给养猪业带来巨大的经济损失。目前对本病的防制主要是以免疫预防为主, 国内外普遍应用的疫苗主要有弱毒疫苗和灭活疫苗两种。弱毒疫苗和灭活疫苗尽管有许多优点, 但弱毒疫苗存在毒力返强潜在危险, 灭活疫苗需要大剂量免疫和

多次接种等缺点<sup>[2]</sup>。因此, 寻找更为安全、有效、实用的新型疫苗仍是猪细小病毒免疫预防研究的主要方向。

PPV 外观呈六角形或圆形、无荚膜, 分为“实心的”和“空心的”两种。完整的 PPV 粒子中含有一单股线状的 DNA, 链长约 5.0kb, 成熟的病毒粒子仅含有负链 DNA 基因组。PPV 基因组总共编码两种蛋白, 即结构蛋白(VP1, VP2, VP3)和非结构蛋白(NS1, NS2, NS3)。结构蛋白主要功能区包括抗原决定簇区、受体结合部位及血凝部位, 其中 VP2 蛋

收稿日期: 2007-07-06

作者简介: 梁秀丽(1978-), 女, 河南安阳人, 助理兽医师, 硕士, 主要从事动物病原学研究。

通讯作者: 魏战勇(1975-), 男, 河南安阳人, 讲师, 博士, 主要从事分子病毒学和分子免疫学的研究。

白病毒粒子主要成分约占 80% 左右, 具有良好的免疫原性, 能够诱导机体产生中和抗体<sup>[3]</sup>。鉴于此, 本试验对猪细小病毒 VP2 进行了克隆、测序以及抗原性分析, 以期对猪细小病毒核酸疫苗的研制提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 病毒及病毒增殖

PPV HN-3 株由河南省动物性食品安全重点实验室分离鉴定; HN-3 株属于强毒株, 已适应 PK-15 细胞。按常规细胞培养方法<sup>[4]</sup>, 使用 PK-15 细胞(购自中国兽药监察所), 用 RPMI 1640 培养液加 10% 无牛病毒性腹泻病毒抗体的胎牛血清作为 PK-15 细胞的培养液(pH 7.2); 在细胞传代时直接接种 PPV 病毒, 按 1000 TCID<sub>50</sub> 接种 PK-15 细胞, 接种后 3~4 d 待细胞出现明显病变后, 收获病毒, 冻后于 -20℃ 备用。

### 1.2 菌株、质粒及试剂

大肠杆菌菌株 JM109 由河南省动物性食品安全重点实验室保存, 按常规方法制备 CaCl<sub>2</sub> 感受态细胞<sup>[5]</sup>。pGEM-T Easy 载体、蛋白酶 K 和 T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司; EcoRI 单酶切酶、Taq 酶、DNA Marker DL 2000、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, 其他常规试剂均由河南省动物性食品安全重点实验室提供。

### 1.3 引物的设计与合成

参照 Genbank 公布的 NADL-2 序列, 用 Primer Premier 5.0 生物软件设计出了扩增 VP2 基因主要抗原编码区上游引物和下游引物, 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。上游引物: 5'-CAC GCA TCA AGA CTC ATA-3' (位于 3002~3019 bp); 下游引物: 5'-TGA ATA GGG TTC CAC ATA-3' (位于 4423~4440 bp)。

### 1.4 模板的制备

参照文献[6]进行。取增殖的病毒液 5 mL, 加入等体积样品裂解缓冲液[0.02 mol/L Tris HCl (pH 7.5), 0.03 mol/L EDTA, 1% SDS], 混匀后加入 4 μL 蛋白酶 K (20 mg/mL), 置 55℃ 水浴 30 min; 用饱和平衡酚(pH 8.0)抽提 2 次, 取水相加入酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1) 抽提 1 次; 取水相再加入 (24:1) 氯仿/异戊醇, 抽提 1 次, 取上清加入 1/10 体积的 3 mol/L 乙酸钠(pH 5.2), 2.5 倍体积的无水乙醇置 -20℃ 沉淀 2 h 以上。12000 r/min 离心

15 min, 弃上清, 再用 75% 乙醇洗涤, 静置干燥后, 用少量(20 μL 左右)超纯水溶解, 贮存于 -20℃ 备用。

### 1.5 PCR 反应

PCR 反应采用 50 μL 反应体系, 组成有 10× PCR buffer 5 μL, MgCl<sub>2</sub> 6 mmol/L, dNTPs 浓度为 100 μmol/L, 上下游引物各 1 μL, 模板 8 μL, 灭菌双蒸水添加至 50 μL。反应条件为 95℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 1 min, 57℃ 复性 50 s, 72℃ 延伸 2 min, 32 个循环, 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 保存。

### 1.6 PCR 扩增片段的鉴定

取 8 μL PCR 产物与 2 μL 上样缓冲液(溴酚蓝)混匀后, 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 以 Marker DL 2000 为对照, 观察拍照。

### 1.7 PCR 扩增片段的克隆

将 PCR 产物用凝胶回收试剂盒进行回收纯化。将已纯化的 PCR 扩增片段与载体 pGEM-T Easy 在 T4 连接酶作用下 16℃ 连接过夜。将上述连接产物 10 μL 与准备好的 200 μL JM109 感受态细胞混合, 按常规方法转化并涂布于含氨苄青霉素、X-gal、IPTG 的 LB 平板上, 37℃ 温箱培养 16 h, 挑取白色菌落作进一步筛选、鉴定。

### 1.8 重组质粒的酶切分析

挑取上述白色菌落在含氨苄青霉素 (50 μg/mL) 的 LB 液体培养基中 37℃ 培养 16 h, 用质粒提取试剂盒提纯重组质粒 DNA。取上述质粒进行 PCR 扩增、酶切鉴定。PCR 扩增体系和反应条件参照 1.5 进行。酶切鉴定 EcoRI 单酶切酶消化, 在 37℃ 3 h 后, 1% 琼脂糖凝胶电泳, 观察结果, 初步鉴定阳性重组质粒。

### 1.9 核苷酸序列测定及分析

将上述经 PCR 和酶切分析鉴定为阳性的克隆质粒, 委托北京奥科生物技术有限责任公司进行测序。与 Genbank 公布的 NADL-2 株 VP2 序列进行序列比较。

### 1.10 VP2 结构和抗原性分析

通过测序结果来推导出相应的 VP2 蛋白的氨基酸序列, 并应用 DNASTar 软件对二级结构和抗原性进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 PCR 扩增结果

取 8 μL PCR 产物与 2 μL 上样缓冲液(溴酚蓝)混合后, 在 1% 琼脂糖凝胶上电泳, 以 Marker DL 2000 为对照。可见在 1000 bp ~ 2000 bp 之间有 1 条特异性亮带(图 1), 与预期的 1438 bp 相符阴性对照(ddH<sub>2</sub>O)无任何扩增条带的出现。

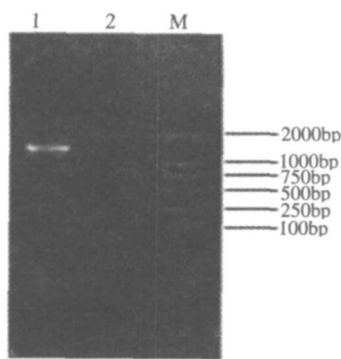


图1 PPV VP2 的 PCR 产物

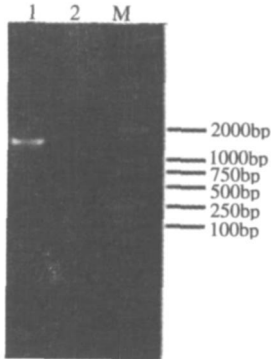


图2 阳性克隆株 PCR 鉴定结果

2.2 阳性重组质粒 PCR 及酶切鉴定

通过基因克隆技术获得了疑似阳性克隆, 提取其质粒, 进行 PCR 扩增鉴定。鉴定结果表明, 在 1438 bp 左右有 1 条特异性亮带(图 2); 通过 *Eco*RI 单酶切酶切消化鉴定在 500bp ~ 750 bp 和 750 bp ~ 1000bp 均有 1 条特异性条带(图 3)。

2.3 VP2 测序与分析

将上述获得的阳性克隆, 经北京奥科生物技术有限责任公司进行测序, 获得了 1 个长度为 1438 bp 的核苷酸序列, 与预期的 PCR 扩增片段相符, 编码 1426 氨基酸(图 4)。将此序列与 GenBank 公布的 NADL-2 株的 VP2 编码核酸序列进行比较, 通过 DNASTar 软件分析, 发现两者核苷酸同源率为 99.4%, 氨基酸同源率为 99.3%。

2.4 VP2 蛋白的 B 细胞表位预测结果

由所测的核苷酸序列推导出了相应的氨基酸序

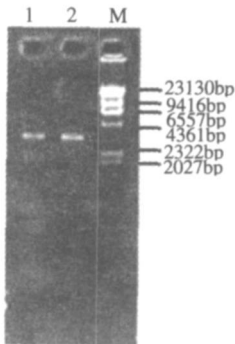


图3 克隆阳性株 *Eco*RI 酶切鉴定结果

列, 应用 DNASTar 软件对 VP2 蛋白分子的二级结构、蛋白的柔性区域、VP2 蛋白氨基酸残基位于表面的可能性、亲水性区域及抗原指数进行了预测, 预测结果见图 5。

1	cacgcacatcaagactcatacatctaaatgcccagaacacgaacatacaaaagaatcatgtactaaattcagaa
76	H A S R L I H L N M P E H E T Y K R I H V L N S E
151	tcaggggtggcgggacaaatgggtacaagcagatgcacacacacaaatggtaacaccttggctactaatagatgct
226	S G V A G Q M V Q D D A H T Q M V T P W S L I D A
301	aacgcattggggagtgiggttcaatccagcggactggcagttaatatccaacaacatgacagaaataaacttagtt
376	N A W G V W F N P A D W Q L I S N N M T E I N L V
451	agttttgaacaagaataatcattagtagtacttaaaacaattacagaatcagcaacctcaccaccaaccaacta
526	S F E Q E I F N V V L K T I T E S A T S P P T K L
601	tataataatgatctaaactgcaagcttaattggctgcactagacaccaataaacacacttccatacacaccagcagca
676	Y N N D L T A S L M V A L D T N N T L P Y T P A A
751	cctagaagtgaaacacttggtttttatccatggtttacctacaaaacacactacacataattacattatcatgc
826	P R S E T L G F Y P W L P T K P T Q Y R Y Y L S C
901	atcagaacactaaatcccaacatacactggacaatcacaacaaataacagactcaataacaaacaggactcac
976	I R N L N P P T Y T G Q S Q Q I T D S I Q T G L H
1051	agtgacattatgttctacacaatagaaaaatgcaglaccaattcatcttcaagaacaggagatgaattctccaca
1126	S D I M F Y T I E N A V P I H L L R T G D E F S T
1201	ggaatataatcactttgacacaaaaccactaaaattaaactcactcatggcaacaaatagatctctaggactgcct
1276	G I Y H F D T K P L K L T H S W Q T N R S L G L P
1351	ccaaaactactaaactgaacctaccacagaaggagaccaataaccaggaacactaccagcagtaaacacaagaaaa
1426	P K L L T E P T T E G D Q Y P G T L P A A N T R K
	ggtttatcaccaaaacagctaaataatagctacacagaagcaacagcaattaggccagctcaggtaggatatataca
	G Y H Q T A N N S Y T E A T A I R P A Q V G Y N T
	ccatacatgaattttgaatactccaatggtggaccatttctaactcctatagttaccaacagcagacacacaaat
	P Y M N F E Y S N G G P F L T P I V P T A D T Q Y
	aatgatgatgaacaaaatgggtctataaagatttacaatgggttaccaacatggacacttaaccacatcttcacaa
	N D D E P N G A I R F T M G Y Q H G H L T T S S Q
	gaggtagaagaatgacacattcaatccacaaagtaaatgtggaagagctccaaatcaacaatttaacaaacaggca
	E V E R Y T F N P Q S K C G R A P N Q Q F N Q Q A
	ccactaaaccttagaaaatacaataatggaacacttttaccttcagatccaataggagggaagctaacatgcac
	P L N L E N T N N G T L L P S D P I G G K A N M H
	ttcatgaatacactcaatacatatggaccatttaacagcactaaacaataactgcacctgtatttccaaatgggtcaa
	F M N T L N T Y G P L T A L N N T A P V F P N G Q
	atatgggataaagaacttgatacagatctaaacactagactacatgattacagctccatttggttgtaaaaaaat
	I W D K E L D T D L K P R L H V T A P F V C K N N
	ccaccaggcaaacattttgtaaaaatagcaccasacctaacagatgatttcaatgtcgtactctctcacaacac
	P P G Q L F V K I A P N L T D D F N A D S P Q Q P
	agaataataacttattcaaaccttttgggtgaaaggaacactaacatttcacagcaaaaatgagatccngtaatatg
	R I I T Y S N F W W K G T L T F T A K M R S S N M
	tggaaccctattc
	W N P I X

图4 VP2 基因的核苷酸序列及其推导的氨基酸序列

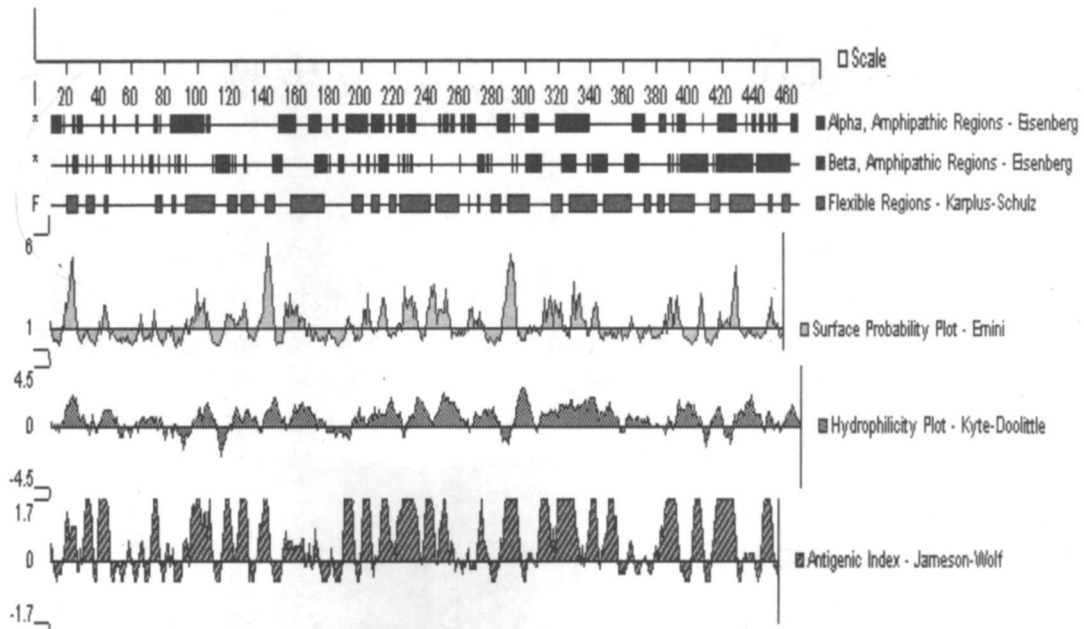


图5 VP2 结构及抗原性分析

### 3 讨论

目前,猪细小病毒分子生物学的相关研究报道较多,PPV 基因组总共编码两种蛋白,即结构蛋白(VP1,VP2,VP3)和非结构蛋白(NS1,NS2,NS3),其中主要集中在 VP1 和 VP2 基因方面。而 VP2 又是 PPV 的主要结构蛋白,分子量为 64kD,能够诱导机体产生中和抗体,保护机体免遭病毒的攻击,具有良好的免疫原性<sup>[7]</sup>。

众多试验证实,应用 VP2 基因重组作为疫苗或者免疫原能够获得较为理想的效果。本试验扩增了 PPV VP2 基因,以期为进一步基因疫苗的研究奠定基础。赵俊龙等<sup>[7]</sup>利用真核表达载体构建了含有 VP1 和 VP2 的基因疫苗,分别以肌肉注射的方式,间隔 2 周两次免疫小鼠,结果发现所有表达质粒均能诱导产生明显的细胞免疫和体液免疫。该结果为全面研究猪细小病毒基因疫苗提供了科学依据<sup>[8]</sup>。应用 DNASTAR 软件对分析了 HN-3 株与 NADL-2 株的 VP2 进行了比较分析,发现两者核苷酸同源性在 99.4%,氨基酸同源性在 99.3%,具有相当高的同源性。

B 细胞表位的预测参数较多,在操作过程中必须综合考虑多种参数,以克服单参数预测模型的局限性,提高预测的准确性。其中亲水性、氨基酸残基位于表面可能性、二级结构的预测及抗原指数尤为重要,因为亲水性和表面可能性是形成表位的首要条件<sup>[9]</sup>。作为 B 细胞抗原表位,首先应存在于蛋白抗原表面,且具有一定的柔性,以利于与 B 细胞抗原受体或抗体结合。经抗原指数、亲水性指数和蛋

白质表面可能性指数筛选出的氨基酸区段中(抗原指数 $\geq 0$ ,亲水性指数 $\geq 0$ ,以及氨基酸的表面可能性指数 $\geq 1$ ),如果内部或附近又具有柔性结构,则有可能是 B 细胞表位。预测和确定 VP2 蛋白的抗原表位,一方面有利于对 VP2 基因进一步成功表达,为发展特异性和敏感性诊断系统和研制疫苗提供有力的技术依据;另一方面为研究蛋白质特性分析提供理论依据。综合以上结果,应用 DNASTAR 软件对氨基酸的抗原表位进行了预测,共有 11 个抗原表位,分别在氨基酸 N 端的 11~24,81~108,121~135,139~148,150~172,221~239,241~259,316~342,344~352,390~405 和 426~439 区段。

#### 参考文献:

- [1] Harding M J, Molitor T W. A monoclonal antibody which recognizes cell surface antigen and inhibits porcine parvovirus replication [J]. Arch Virol, 1992, 123: 323-333.
- [2] 殷震,刘景华.动物病毒学[M].2 版.北京:科学出版社,1997.
- [3] 赵俊龙,陈焕春,吕建强等.猪细小病毒 PCR 检测方法的建立与应用[J].中国兽医学报,2003,23(2):142-144.
- [4] 姆布鲁克,拉塞尔.分子克隆实验指南[M].3 版.黄培堂,译.北京:科学出版社,2002:96-98.
- [5] Maranga L, Rueda P, Antonis AFG, et al. Large scale production and downstream processing of a recombinant porcine parvovirus vaccine [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2002, 59: 45-50.
- [6] 章金刚.细小病毒感染的宿主特异性分子机理[J].中国兽医学报,2000(1):50-53.
- [7] 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.
- [8] 吕燕波,万瑛,吴玉章.SARS 病毒 S 蛋白的 B 细胞表位预测[J].第三军医大学学报,2004,26(2):101-103.
- [9] 万涛,孙涛,吴加金等.蛋白顺序性抗原决定簇的多参数综合预测[J].中国免疫学杂志,1997(13):329-333.