

猪细小病毒(PPV) SD1 株 NS1 基因的克隆与原核表达

谢金文^{1,2}, 沈志强^{2*}, 王金良², 任艳玲², 管宇², 苗立中²

(1. 山东省畜禽用蜂胶疫苗工程技术研究中心, 山东滨州 256600; 2. 山东省滨州畜牧兽医研究院, 山东滨州 256600)

摘要 [目的] 为建立猪细小病毒快速诊断方法提供理论依据。[方法] 根据 GenBank 上猪细小病毒基因组序列和原核表达质粒 pET30a (+) 多克隆位点序列设计 1 对引物, 应用 PCR 技术扩增出猪细小病毒 SD1 株 NS1 基因全序列, 对阳性重组质粒进行测序和同源性比较。构建原核表达重组质粒 pET 30a/ NS1, 并在大肠杆菌中进行诱导表达。[结果] 通过 PCR 扩增获得 2 208 bp 目的片段。所克隆 NS1 基因与已报道的 PPV 相应基因的核苷酸同源性为 97.3% ~ 99.4%, 表明 NS1 基因具有高度保守性, 但在偏 3' 端连续缺失 12 个碱基。所克隆的 PPV NS1 基因在原核细胞中成功表达, 其表达产物主要以包涵体形式存在。[结论] SDS-PAGE 检测结果表明 PPV NS1 蛋白的分子量为 86 kD。

关键词 猪细小病毒; NS1 基因; 克隆; 原核表达

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)07-02679-03

Cloning and Prokaryotic Expression of NS1 Gene of Porcine Parvovirus (PPV) SD1 Strain

XIE Jin-wen et al (Research Center for Veterinary Haploids Vaccines Engineering Technology of Shandong Province, Binzhou, Shandong 256600)

Abstract [Objective] The research aimed to provide the theoretical basis for establishing a rapid diagnosis method for porcine parvovirus (PPV). [Method] One pair of primers were designed according to PPV genome sequences on GenBank website and the sequences of prokaryotic expression vector pET30a (+) with multiple cloning sites. The whole sequence of NS1 gene in PPV SD1 strain was amplified by using PCR technology and the positive recombinant plasmid was analyzed by sequencing and homology comparison. The prokaryotic expression recombinant plasmid pET 30a/ NS1 was constructed to make its induction expression in *Escherichia coli*. [Result] The target fragment with the length of 2 208 bp was obtained from PCR amplification. The nucleotide homologies between the cloned NS1 gene and the reported relevant PPV genes were from 97.3% to 99.4%, which indicated that NS1 gene had high conservation. But it had a 12-basepair successive deletion near the hydroxyl end. The cloned PPV NS1 gene was successfully expressed in prokaryotic cell, and its expression products existed mostly in inclusion bodies. [Conclusion] The results of SDS-PAGE detection showed that the molecular weight of PPV NS1 protein was 86 kD.

Key words Porcine parvovirus; NS1 gene; Cloning; Prokaryotic expression

猪细小病毒(Porcine Parvovirus, PPV) 是引起母猪繁殖障碍性疾病的主要病原体之一。早在 1966 年, Mary 等进行猪瘟病毒组织培养时发现了 PPV。次年, Cartwright 等在对猪的不孕症、流产和死胎的病原学研究中分离出猪细小病毒, 首次证明了该病毒的致病作用。猪细小病毒感染的主要特征是怀孕母猪在怀孕前易感染, 引起胚胎或者胎儿的感染和死亡, 最终导致母猪发生流产、死胎、木乃伊胎和新生仔猪的死亡^[1-2]。成熟的 PPV 病毒粒子基因组是一条长约 5 000 bp 的单股负链 DNA, 主要有 2 个开放的阅读框架(Open Reading Frame, ORF), 编码区内基因相互重叠。5' 端的 ORF 编码 3 种非结构蛋白 NS1、NS2 和 NS3, 3' 端的 ORF 编码 3 个结构蛋白 VP1、VP2 和 VP3。5' 端的 ORF 编码的 NS1 基因是细小病毒属的保守序列, 核苷酸同源性可达 70%, 氨基酸同源性更高。PPV 非结构蛋白 NS1 中有 1 个长约 150 个氨基酸组成的 GKR 区, 开始于第 389 位的氨基酸。所有的细小病毒中都有该保守序列, 可以作为细小病毒诊断的探针。NS1 具有解旋酶活性, 改变 DNA 末端的空间结构, 是病毒复制所必需的, 同时具有调节 P40 转录的作用。NS1 蛋白是 PPV 基因组本身编码的反式激活蛋白, 对 PPV 早期和晚期的转录都起重要作用^[2-5]。NS1 蛋白不仅参与和促进病毒 DNA 复制、病毒衣壳蛋白的合成, 而且具有抑制多种异源启动子的作用, 并且在 NS2 蛋白的协同作用下对转化细胞有直接毒性作用, 还表现出抗肿瘤活性^[6-10]。

目前, 猪细小病毒感染在全世界许多国家和地区均有流行, 我国也不例外。20 世纪 80 年代初在我国不同地区分离

到猪细小病毒, 此后全国各地陆续都有猪细小病毒感染的报道。据报道, 我国猪群中 PPV 血清阳性率高达 80% 左右^[2]。特别是近年来, 猪细小病毒感染呈上升的趋势, 给养猪业带来了巨大的经济损失。为进一步研究猪细小病毒 NS1 基因, 建立快速、准确诊断猪细小病毒的方法, 减少猪细小病毒造成的损失, 笔者克隆了含有 NS1 基因的片段, 并且与已登录猪细小病毒的相应序列进行比较, 成功构建了原核表达重组质粒 pET 30a/ NS1, 并在 *E. coli* 中进行了诱导表达^[11-13]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞与病毒。PK 15 细胞、PPV-SD1 分离株均由山东省畜禽用蜂胶疫苗工程技术研究中心保存和提供。

1.1.2 菌株和质粒。pMD18-T vector 购自 Takara 公司, DH5、BL21 工程菌和原核表达质粒 pET30a (+) 由山东省畜禽用蜂胶疫苗工程技术研究中心保存。

1.1.3 工具酶及试剂。DNA Marker DL 2 000、DNA Marker DL15 000、限制性内切酶、T₄ 连接酶、Taq DNA 聚合酶、dNTP 和 DNA 凝胶回收试剂盒, 均购自大连宝生物工程有限公司; 琼脂糖(电泳纯) 购自上海生工生物工程公司; EB、氨苄青霉素购自华美生物工程公司; 胰蛋白胨、酵母提取物为 OXID 产品; 异丙基-D-硫代半乳糖苷(IPTG) 为 Promega 公司产品; 低分子量蛋白 Marker、TEMED 购自北京鼎国生物技术有限公司。

1.1.4 引物。根据 GenBank 报道的猪细小病毒基因组序列和原核表达质粒 pET30a (+) 多克隆位点序列, 用 Primer Premier 5.0 软件辅助设计一对引物:

PP1 : 5' - CGGAATTCATGGCAGCGGAAACACTTAC - 3'

PP2 : 5' - GCGTCGACTTGTCTGCTAGGCTTCGTCGTGT - 3'

基金项目 山东省自然科学基金项目(Y2005D10)。

作者简介 谢金文(1981-), 男, 安徽亳州人, 硕士, 研究实习员, 从事分子生物学与兽医免疫学方面的研究。* 通讯作者。

收稿日期 2007-11-23

引物的5'端分别加有 EcoR 和 Sal 酶切位点(划线部分)及其保护碱基,预期扩增片段长度为2 208 bp。引物由上海生物工程有限公司合成。试验用浓度为20 pmol/μl。

1.2 方法

1.2.1 病毒的培养及其基因组DNA的提取。猪细小病毒用PK15单层细胞培养,然后提取病毒基因组:取病毒液500 μl,加入终浓度为100 μg/ml蛋白酶K,1% SDS,50℃水浴1 h;加入等体积酚-氯仿混匀,12 000 r/min离心5 min;取上清加入1/10体积的3 ml/L NaAc、2倍体积的无水乙醇,-20℃沉淀50 min;12 000 r/min离心10 min,弃上清,待沉淀干燥后用TE溶液重悬,-20℃冻存储用。

1.2.2 PCR扩增。以上述抽提的DNA为模板,应用PCR扩增NS1基因。PCR循环参数为:94℃预变性5 min,然后94℃40 s,55℃1 min,72℃150 s,共30个循环,最后72℃延伸10 min。反应产物于1%琼脂糖凝胶上电泳检测。

1.2.3 PCR产物的回收纯化。参照试剂盒操作说明进行。

1.2.4 感受态细胞的制备。参照《分子克隆实验指南》^[14]进行操作。

1.2.5 猪细小病毒NS1基因的克隆。回收纯化产物与克隆载体pMD18-T vector在高效连接液的作用下16℃连接反应。进一步的转化和克隆参照《分子克隆实验指南》进行。以氨苄抗性、质粒PCR与酶切反应来筛选和鉴定重组克隆。

1.2.6 重组质粒的序列测定与分析。经鉴定的阳性重组质粒pMD18-T/NS1由上海生物工程有限公司测序,测序结果用Blast和DNASar软件进行同源性分析。

1.2.7 原核表达质粒pET30a/NS1的构建。pMD18-T/NS1用EcoR和SalI双酶切,再经回收纯化,以同样方法处理pET30a(+)载体,两者经T₄连接酶连接反应,转化大肠杆菌BL21菌后,涂布于含卡那霉素的平板,挑取白色单菌落扩大培养,质粒小量提取后,以PCR和双酶切反应来筛选和鉴定阳性重组质粒。

1.2.8 细菌的培养和蛋白质的提取。按照《分子克隆实验指南》进行细菌的培养和细菌蛋白的提取。

1.2.9 表达产物的SDS-PAGE鉴定。蛋白提取物用SDS-PAGE鉴定,浓缩胶为3%,分离胶为10%,其他染色脱色等均参照《分子克隆实验指南》进行。

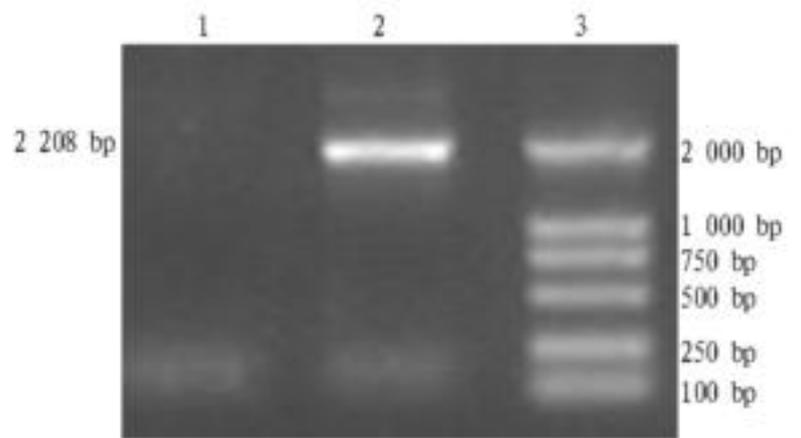
2 结果与分析

2.1 PCR扩增产物的鉴定以提取PPV的基因组DNA为模板,应用PCR方法扩增PPV NS1基因,PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳。从图1可见与预期目的基因大小(2 208 bp)相符的条带。

2.2 NS1基因克隆及重组质粒的鉴定 NS1 PCR回收纯化产物与pMD18-T vector连接后,转化、提取质粒,并经过PCR、EcoR + SalI双酶切鉴定。由图2、3可知,电泳结果与预期结果一致,表明成功构建了pMD18-T/NS1重组质粒。

2.3 NS1基因的序列测定与分析用DNASar分析上海生物工程有限公司测序结果。研究表明,该试验克隆的结果与已经登录的登录号为AY583318、AY684866、D0623、DQ675456、M8367和44978的猪细小病毒相应基因序列的同源性分别为99.4%、98.6%、97.3%、98.8%、98.9%和98.7%。不同的

碱基随机分布于整个序列,但在偏3'端有连续12个碱基的缺失。

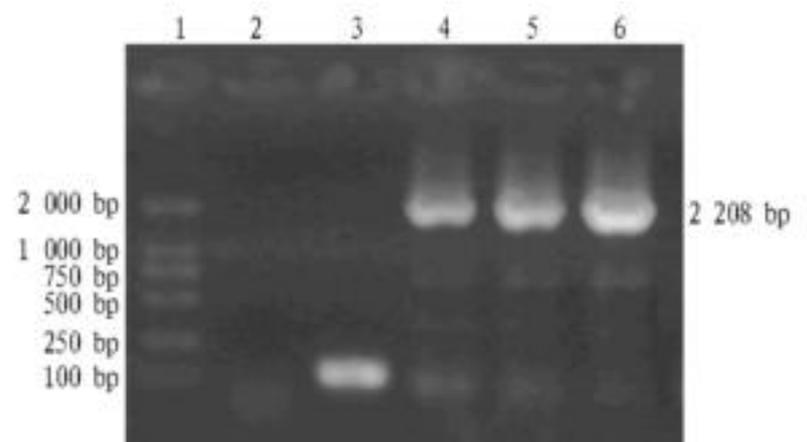


注:1. 阴性对照;2. PCR产物;3. DNA Marker DL 2 000。

Note: 1. Negative control; 2. Product of PCR; 3. DNA Marker DL 2 000.

图1 PCR产物电泳结果

Fig.1 The result of PCR amplification on NS1 gene



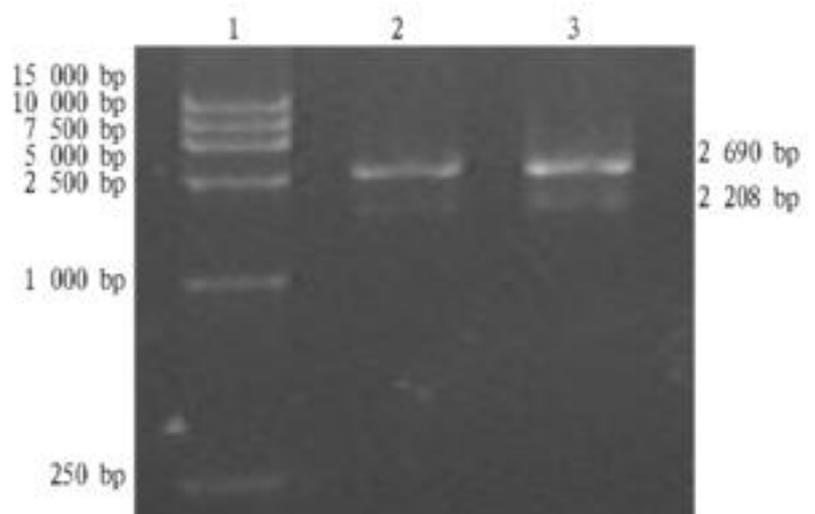
注:1. DNA Marker DL 2 000;2. 空白;3. 阴性对照;4,5. pMD18-T/NS1重组质粒PCR鉴定;6. pET30a/NS1重组质粒PCR鉴定。

Note: 1. DNA Marker DL 2 000; 2. Blank; 3. Negative control; 4,5. Identification of pMD18-T/NS1 by PCR; 6. Identification of pET30a/NS1 by PCR.

图2 重组质粒的PCR鉴定

Fig.2 Identification of recombinant plasmid by PCR amplification

2.4 原核表达重组质粒的鉴定构建的pET30a/NS1重组质粒经过PCR、EcoR + SalI双酶切鉴定。由图3、4可知,在约208 bp处有特异的DNA条带,与预期结果一致,证明重组质粒构建成功。



注:1. DNA Marker DL 15 000;2,3. EcoR + SalI双酶切pMD18-T/NS1。

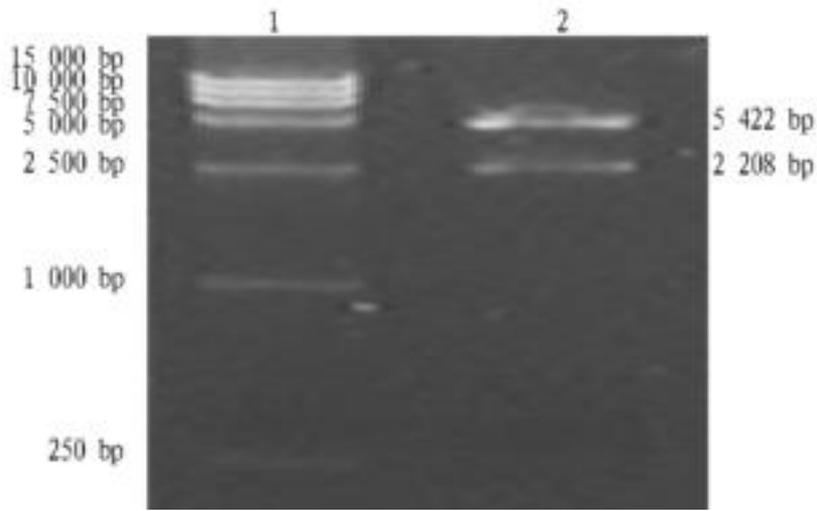
Note: 1. DNA Marker DL 15 000; 2,3. Recombinant plasmid digested by EcoR + SalI.

图3 pMD18-T/NS1的双酶切鉴定

Fig.3 Identification of pMD18-T/NS1 by double endonuclease digestion

2.5 NS1基因在大肠杆菌中的表达由图5可知,有NS1基因连入的质粒在约86 kDa处有较弱的目的蛋白条带,空质

粒转化菌培养提取物没有相应条带,表达产物在上清液中含
量极低,主要以包涵体形式存在。

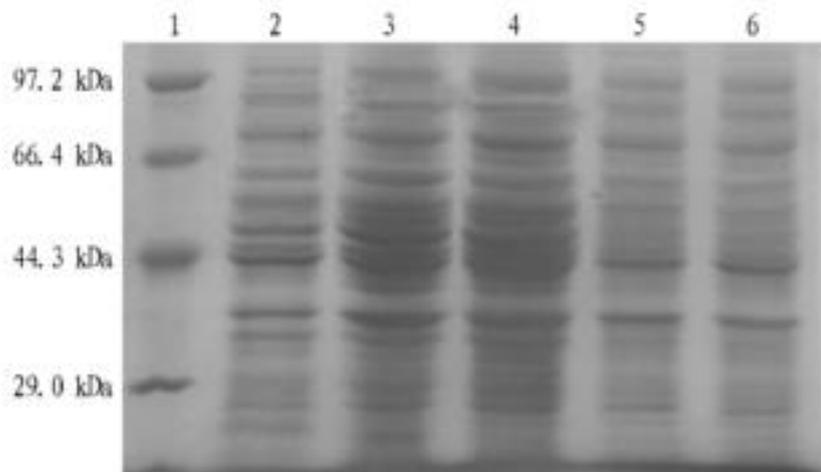


注:1. DNA Marker DL 15 000;2. EcoR + SalI 双酶切 pET 30a/ NS1。

Note: 1. DNA Marker DL15 000; 2. Recombinant plasmid digested by EcoR + SalI.

图4 pET 30a/ NS1 的双酶切鉴定

Fig.4 Identification of pET 30a/ NS1 by double endonuclease digestion



注:1. 低分子量蛋白标准;2. pET 30a/ NS1 裂解上清;3,4. pET 30a/ NS1 裂解沉淀;5,6. 经IPTG 诱导的 pET 30a。

Note: 1. Protein molecular weight Marker (low); 2. The supernatant of ultrasonic broken pET 30a/ NS1; 3, 4. The deposit of ultrasonic broken pET 30a/ NS1; 5, 6. pET 30a induced by IPTG.

图5 NS1 在 BL21(DE3) 菌中的表达

Fig.5 SDS PAGE of expression products of NS1 in BL21

3 讨论

猪细小病毒的 NS1 基因具有高度的保守性,比 VP2 基因的同源性高^[15]。该试验所测得 NS1 基因序列与 GenBank 中已发表的登录号为 AY583318、AY684866、D00623、DQ675456、M88367 和 44978 的猪细小病毒相应基因序列的同源性分别为 99.4%、98.6%、97.3%、98.8%、98.9% 和 98.7%,从而验证了 PPV 不同毒株 NS1 基因的同源性很高这个结论。在 PPV NS1 氨基酸序列中,380~530 为高度保守区。这段序列含有 NS1 基因发挥 ATPase/GTPase 功能、与 ATP/GTP 结合的位点。比对结果表明,试验所测序列在 1 703~1 714 bp 连续缺失的 12 个碱基不在上述高度保守区域内。至于缺失的原因以及对 NS1 蛋白的编码、NS1 蛋白的免疫活性等的影响尚需进一步研究。

推测 PPV NS1 蛋白的分子量为 75.6 kDa,但用 SDS-

PAGE 凝胶电泳检测出的分子量为 86 kDa。该试验也验证了这一点。SDS PAGE 电泳图显示,在 66.4~97.2 kDa 有一条外源蛋白条带,但表达量较低。这可能是由于 PPV NS1 基因较长,难以在大肠杆菌表达系统中高效表达。PPV NS1 蛋白推测分子量与 SDS PAGE 电泳测得结果有出入。这可能是由于 PPV NS1 蛋白被磷酸化和糖基化的缘故。PPV NS1 蛋白上有 3 个潜在的糖基化位点,即 356~359、446~449、515~516。在猪细小病毒复制和转录激活过程中,PPV NS1 蛋白的磷酸化和糖基化起着举足轻重的作用^[12,16]。这是因为 PPV NS1 蛋白发挥功能的过程也是它与宿主细胞内细胞因子相互作用的过程,但 NS1 与细胞因子相互作用的结果往往是 NS1 的磷酸化或者糖基化。NS1 蛋白只有在 PPV 进行复制时才可大量表达。这可能也是试验中 NS1 表达量较低的原因之一。

PPV 分布广泛,并且造成的经济损失巨大。这已经引起世界各国的关注。目前已经基本了解 PPV 基因组的初级结构、转录图谱和翻译图谱,NS1 的功能和作用机制的研究也有一定的进展,但有许多机理尚不清楚,需要进行更为深入的研究。

参考文献

- [1] 殷震,刘景华.动物病毒学[M].2版.北京:科学出版社,1997.
- [2] 陈进会,郭万柱.猪细小病毒检测技术研究进展[J].动物医学进展,2005,26(8):34-37.
- [3] 张宇,曹三杰,文心田.猪细小病毒分子生物学研究进展[J].贵州畜牧兽医,2005,29(6):12-14.
- [4] 颜其贵,徐静,郭万柱,等.猪细小病毒分子生物学研究进展[J].四川畜牧兽医,2001,28(127):25-28.
- [5] LEGENDERE D, ROMMELARE J. Terminal region of the NS1 protein of the parvovirus minute virus of rice are involved in cytotoxicity and promoter transinhibition[J]. J Virol, 1990,66:5705-5713.
- [6] MATTHEW M, DAVID J P. Amino acids 16-275 of minute virus of rice NS1 include a domain that specifically binds (ACCA)₂₋₃ containing DNA[J]. Virology, 1998,251:123-131.
- [7] DANIEL L, JEAN R. Terminal regions of the NS1 protein of the parvovirus minute virus of rice are involved in cytotoxicity and promoter transinhibition[J]. J Virol, 1992,66:5705-5713.
- [8] 刘艳华,范伟兴,王锡乐,等.猪细小病毒SD68株NS1基因的克隆与序列分析[J].中国病毒学,2004,19(4):353-355.
- [9] 吕建强,陈焕春,赵俊龙,等.猪细小病毒NS1基因的克隆及表达[J].中国兽医学报,2003,23(5):435-437.
- [10] 崔尚金,符芳,宋波,等.猪细小病毒Z株NS部分基因的扩增及序列分析[J].中国兽医科技,2003,33(9):19-22.
- [11] 殷华平,郭万柱,徐志文,等.猪细小病毒(PPV)SC1株非结构蛋白NS1基因的克隆和序列分析[J].中国预防兽医学报,2005,27(6):504-508.
- [12] 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(4):241-244.
- [13] SCARES R M, DURIGON E L, BERSANO J G, et al. Detection of porcine parvovirus DNA by polymerase chain reaction assay using primers to the highly conserved nonstructural protein gene, NS1[J]. J Virol Methods, 1999,78(1/2):191-198.
- [14] 萨姆布鲁克J,拉塞尔D W.分子克隆实验指南[M].3版.黄培堂,王嘉玺,朱厚础,等,译.北京:科学出版社,2002.
- [15] 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.
- [16] CORBAUR, SALOMN, ROMMELARE J, et al. Phosphorylation of the viral nonstructural protein NS1 during MVM infection of A9 cells[J]. Virology, 1999,259(2):402-415.