

FMDV OA/ 58 病毒株 VP3 蛋白结构的模拟与分析

周建华, 丛国正, 高闪电, 常惠芸

(中国农业科学院 兰州兽医研究所, 家畜疫病病原生物学国家重点实验室,
农业部畜禽病毒学重点开放实验室, 国家口蹄疫参考实验室, 甘肃 兰州 730046)

摘要:以口蹄疫病毒株 OA/ 58 RNA 为模板, 反转录并扩增目的 cDNA, 然后与 pMD18T 载体连接并转化 JM109 菌株, 提取的重组质粒用凝胶电泳、PCR 和 BamH I、Hind III 双酶切法鉴定。分析表明, 口蹄疫病毒 VP1、VP2、VP3 和 VP4 在核苷酸水平上的变异率是无差异的($p > 0.05$); 而它们在氨基酸水平上的变异率差异显著($p < 0.05$)。该毒株与 20 株源于 GenBank 中的 VP3 氨基酸序列比较发现其保守区主要位于第 1~24、26~35、37~43、45~57、61~122、124~173、175~209、211~220 位。运用同源建模, OA/ 58 VP3 蛋白三维空间结构可分为 A、B、C 3 个结构区域。保守区氨基酸残基在维持 VP3 蛋白的空间构象和功能方面具有重要作用。

关键词: 口蹄疫病毒; VP3 蛋白; 同源建模

中图分类号: Q945 文献标识码: A 文章编号: 1000- 7091(2008)06- 0028- 04

Construction and Analysis of VP3 Protein from A Foot2and2mouth Disease Virus Strain OA/ 58

ZHOU Jian2hua, CONG Gu2zheng, GAO Shan2dian, CHANG Hu2yun

(Chinese Academy of Agriculture Science, State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Key Laboratory
of Animal Virology of Ministry of Agriculture, National FMD Reference Laboratory, Lanzhou 730046, China)

Abstract: Foot2and2mouth disease virus strain OA/ 58 RNAs were used as templates for RT2PCR. The amplified cDNA products were cloned into pMD18T vectors and transformed into JM109. The recombinant plasmids were identified by electrophoresis, PCR, and analysis of tow cleavages with BamH I and Hind III. After analyzing the difference among VP1, VP2, VP3, VP4, at the nucleotide level, the mutation rates of these 4 encoding sequences were no difference ($p > 0.05$), however, at the amino acid level, those mutation rates were different ($p < 0.05$). The regions of 1- 24th, 26- 35th, 37- 43th, 45- 57th, 61- 122th, 124- 173th, 175- 209th and 211- 220th in VP3 protein most probably are conservative. Depending on homology modeling the FMDV strain OA/ 58 VP3 protein, the 3D mold was gained. And this 3D mold was divided into A, B and C regions. This research should be used as an instruction in order to direct the work on FMDV VP3 protein.

Key words: Foot2and2mouth disease virus; VP3 protein; Homology modeling

口蹄疫是由口蹄疫病毒(Foot2and2mouth disease virus, FMDV)引起的一种急性、烈性、高度接触传染性和可快速远距离传播的动物疾病。口蹄疫的暴发给当地带来严重的经济损失, 疫区乃至整个国家的畜产品出口受到封锁。这使得口蹄疫成为家畜疾病中的头号/ 经济病^[1]。FMDV 属于微 RNA 病毒科, 口疮病毒属, 其基因组为正链单股 RNA, 它既是转录中的 mRNA, 又是负链合成的模板, 长度约为 8 500 个核苷酸。此种病毒有 7 个血清型, 分别是 A、O、C、

Asial 和南非 1, 2, 3 型^[2]。FMDV 的蛋白衣壳由 60 个亚单位构成, 每个亚单位由 4 个结构蛋白组成。

具有感染性的 FMDV 衣壳蛋白进入易感动物血液中可以启动免疫应答, 其衣壳蛋白是 FMDV 抗原性和免疫原性决定多肽, 包括 VP1、VP2、VP3 和 VP4 4 种结构蛋白, 其中 VP1 蛋白大部分暴露在病毒表面, 是决定病毒抗原性的主要成分, 其中 VP1 第 140~160 和 200~213 位氨基酸残基是 FMDV 的主要抗原位点^[3- 5], 且 VP1 蛋白位于病毒颗粒的顶

收稿日期: 2008- 10- 23

基金项目: 国家科技支撑计划(2006BAD06A14; 2006BAD06A10)

作者简介: 周建华(1981-), 男, 内蒙古呼和浩特人, 硕士, 主要从事病毒基因工程研究

通讯作者: 常惠芸(1965-), 女, 河南许昌人, 研究员, 博士, 主要从事病毒基因工程与受体研究。

点,对胰蛋白酶敏感,具有刺激机体产生中和抗体的能力^[6]。FMDV 的 VP1、VP2、VP3 结构蛋白位于病毒颗粒的表面,VP4 蛋白位于病毒粒子的内部^[7]。FMDV 的 VP2 蛋白同样具有多段抗原决定簇^[6,8]。但 VP3 蛋白也是病毒衣壳表面的组成部分,理论上也应该是机体免疫攻击的对象,并且也应该是影响病毒衣壳组装和分解的关键性因子。为了分析 FMDV OA/ 58 VP3 蛋白结构和功能的关系,此研究建立在同源模建的基础上,联合运用数理统计学的方法探讨 VP3 蛋白编码基因核苷酸和氨基酸序列分子进化的特点及在 O 型 FMDV 结构蛋白总体分子进化速度中的地位。这些都为研究 VP3 蛋白在整个病毒衣壳所起到的作用提供了相关的生物信息学和分子进化的参考信息。

1 材料和方法

1.1 材料

FMDV OA/ 58 病毒株由国家口蹄疫参考实验室种毒保藏中心保存。主要试剂分别购自大连宝生物公司、博大泰克公司、Qiagen 公司。上下游引物参考 FMDV 毒株 VP3 基因两端设计的。

1.2 VP3 基因扩增

含有 FMDV OA/ 58 病毒株的病理组织经研磨后,参考 RNeasy Mini Kit 操作说明提取总 RNA,所有器皿和试剂均经 0. 1% 的 DEPC(焦碳酸二乙酯)水溶液去 RNase 处理。参考大连宝生物公司 RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3. 0 说明书操作。采用 PCR 技术从 cDNA 中扩增 VP3 基因,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳纯化和琼脂糖凝胶 DNA 提取试剂盒回收。

1.3 VP3 基因的克隆

将纯化的 PCR 产物和 pMD18T 载体于 16 e 水浴进行过夜连接反应,转化感受态细胞 E. coli JM109,均匀涂布于含有 X2gal、Amp 和 IPTG 的 LB 琼脂平板上,挑取白色单菌落。按照小型质粒试剂盒说明书提取质粒,并进行酶切和 PCR 鉴定,将初步鉴定为阳性的重组质粒(pMD18T2VP3)送往上海生工测序。

1.4 序列分析

从 GenBank 中找出了 20 株 O 型 FMDV 全基因序列(序列号: EU214601、EF552697、EF552676、EF552695、EF552694、EF552693、EF552692、EU400597、EU140964、AF308157、NC004004、AJ539139、AF189157、EF175732、DQ248888、AJ320488、AJ633821、AY312587、AY312589、AB079061),并且利用 DNASTar 软件分别对比了这 20 株 FMDV 基因组中的 VP1、VP2、VP3、VP4

蛋白编码区基因及其编码产物的氨基酸序列。

通过将上述 4 种蛋白的核苷酸或氨基酸的突变个数与其对应的蛋白质核苷酸或氨基酸总数相比从而求得这四种蛋白的核苷酸和氨基酸的变异率。利用 SPSS11. 5 for Windows 软件包进行单因方差分析和 Duncan 法进行多重比较来分析 VP3 蛋白编码基因和氨基酸序列的分子变异在这 4 种结构蛋白中所处于的状态。

1.5 VP3 蛋白保守区域的确定

利用 DNASTar 软件的 MegAlign 计算模块对比分析 FMDV OA/ 58 毒株 VP3 的氨基酸序列与 1. 4 中所提及的 20 株 O 型 FMDV VP3 氨基酸序列的共同区域,从而确定 FMDV OA/ 58 毒株 VP3 蛋白氨基酸序列的保守区。

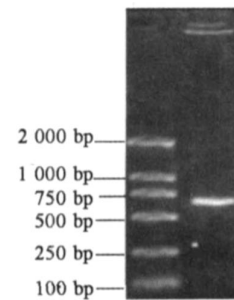
1.6 FMDV OA/ 58 VP3 蛋白空间结构的模拟

用 PDB 蛋白数据库中提供的 BLAST 程序分析 FMDV OA/ 58 毒株 VP3 氨基酸序列在数据库中的同源蛋白,并以与 FMDV OA/ 58 VP3 蛋白氨基酸序列一致性超过 60% 的氨基酸序列为模板进行结构模拟^[9]。

2 结果与分析

2.1 FMDV OA/ 58 VP3 基因 TR2PCR 和转化结果

凝胶电泳显示 PCR 扩增产物约 600 bp,这与预期的扩增长度相符(图 1)。从培养 JM109 转化菌的平皿中挑取单克隆扩增培养并提取质粒后经琼脂糖凝胶电泳、PCR 和 BamH I、Hind III 双酶切鉴定,目的片段长约 600 bp,证明所克隆的 cDNA 为 VP3 基因。



M. DNA 分子质量标准; 1. PCR 扩增产物。
M. DL2000 DNA Marker; 1. PCR amplification product.

图 1 OA/ 58 VP3 基因 PCR 电泳图

Fig1 The electrophoresis of VP3 gene from OA/ 58

212 FMDV OA/ 58 VP3 蛋白核苷酸序列和氨基酸推导序列

FMDV OA/ 58 VP3 基因序列和其氨基酸序列(图 2)。其全长为 654 个核苷酸,由 218 个氨基酸组成。

GIFPVACSDGYGGLVTTDPKTADPAYGKVFNPARNMLPGRFTNFDVAEACPTFLHFEGG
VPYVTTKTSDRVLQAQFDLSLAAKHMSNTFLAGLAQYYTQYSGTINLHFMFTGPTDAKA
RYMAYAPPMEPPKTPEAAAHCIHAEWDTGLNSKFTFSIPYLSAADYAYTASSIAETTNV
QGWVCLFQITHGKAEGDALVVLASAGKDFELRLPVDARTQ

图2 OA/58 VP3 核苷酸序列和推导的氨基酸序列

Fig.2 The nucleotide and amino acid sequence of VP3 from FMDV strain OA/58

2.3 VP3 基因序列分析

核苷酸突变率单因素方差分析 ANOVA 结果显示(表 1), 4 个结构蛋白(VP1、VP2、VP3、VP4)编码区的核苷酸变异率差异不显著($p>0.05$)。这表明, O 型 FMDV 结构蛋白编码区的核苷酸序列在 3D 蛋白酶(3D^{pol})的转录过程中并没有特异性地在某个编码区突变率增高, 即 O 型 FMDV 4 种结构蛋白核苷酸序列的突变是随机性的, 这是 O 型 FMDV 进化衍变的原动力, 但不是促使 O 型 FMDV 免于被自然选择所淘汰的直接动力。

表 1 O 型 FMDV 编码基因的核苷酸变异率

Tab.1 The mutation rate of VP1, VP2, VP3 and VP4 genes in serotype O FMDV

基因名称 Gene	核苷酸数 The number of nucleotide	核苷酸变异率/% The mutation rate of nucleotides
VP4	255	4.905 9 ? 1.215 38
VP2	654	4.814 8 ? 1.407 43
VP3	660	5.181 5 ? 1.472 89
VP1	639	6.799 1 ? 1.899 56

注: 表中数据为平均值 ? 标准误。

Note: The mutation rate of nucleotides: the mean ? standard error.

氨基酸变异率单因素方差分析 ANOVA 结果显示, 这 4 种结构蛋白的氨基酸序列突变率有显著的差异($p<0.05$), 这表明 O 型 FMDV 结构蛋白在氨基酸水平上的变异速率是有明显差异的。利用 Dun2 can 法多重比较(表 2), 其中 VP2 蛋白的变异率最高, 且其与 VP3 和 VP4 的氨基酸变异率差异显著; VP1 蛋白氨基酸变异率处于一种过渡状态, 并不是突变率十分高的; VP3 和 VP4 的变异率之间无差异, 且都保持了较低的变异率。

表 2 O 型 FMDV 编码产物氨基酸变异率的分析

Tab.2 The analysis of mutation rate of amino acid sequences in O serotype FMDV

结构蛋白 Structure protein	氨基酸数 The number of amino acid	氨基酸序列变异率/% The mutation rate of amino acid
VP4	85	1.294 ? 0.459b
VP3	220	1.568 ? 0.342b
VP1	213	3.868 ? 1.059ab
VP2	218	5.183 ? 1.357a

注: 表中氨基酸序列变异率数据为平均值 ? 标准误; 字母不同表示两者之间差异显著。

Note: The mutation rate of amino acid: the mean ? standard error; The different alphabets showed significant difference each other.

2.4 VP3 蛋白氨基酸序列的保守区

通过 DNASTar 软件的多序列比较, 我们将 OA/58 与 114 涉及到的 20 株 O 型 FMDV 的 VP3 蛋白氨基酸序列进行比较, 发现 FMDV OA/58 毒株 VP3 氨基酸序列的保守区主要位于第 1~24、26~35、37~43、45~57、61~122、124~173、175~209、211~220 位。VP3 蛋白一级结构中只有些零星的突变热点(图 2 中将突变热点的氨基酸标为灰色)。

2.5 VP3 蛋白 3D 模型

通过 PDB 数据库的 BLAST 查询结果显示 PDB 代号为 1FOD 的 FMDV 结构蛋白中的亚基氨基酸序列一致性大于 80%, 以 1FOD 作为同源模建的模板来构建 OA/58 VP3 蛋白的空间结构。通过 Swiss2 pdbViewer 蛋白质分析软件计算得到 FMDV OA/58 VP3 蛋白 3D 模型。其 VP3 蛋白的三维空间结构主要由 β 折叠片和无规卷曲组成, 可被划分为 A、B、C 3 个功能区。图 3 所示, A 区为 VP3 蛋白 N 端的一段由 45 个氨基酸组成并游离于环境中的多肽链, 且仅有 3 个氨基酸突变热点(图 2 方框中所标的氨基酸即是, 3 个突变热点由灰色标出)为 A、M、F; B 区由 6 个反向 β 折叠片、无规卷曲和 β 转角组成了一个 β 折叠桶的结构, 这与 Acharya 等^[10]的研究成果一致, 并且 β 折叠桶内部聚集着大量的非极性氨基酸残基侧链而其外部分布着众多的亲水性侧链集团, 这些疏水侧链形成了一个封闭的疏水核心区域, 有利于 OA/58 VP3 蛋白高级结构的稳定; C 区是与 VP3 蛋白与 VP1、VP2 相互作用于有关的区域, 这一区域的氨基酸侧链可以与 VP1、VP2 的相关结构通过氢键和配位键来实现 FMDV 蛋白衣壳的形成。

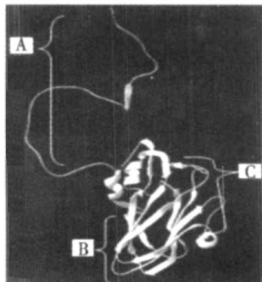


图3 OA/58 VP3 蛋白 3D 模型

Fig.3 The 3D model of VP3 protein from FMDV strain OA/58

3 讨论

目前, 口蹄疫亚单位疫苗的研究热点以 VP1 蛋白为主, 其接种动物后均可在一定程度上抵抗 FMDV 的攻击, 但 VP1 蛋白无法刺激机体的免疫反应水平像全病毒所诱导的反应一样强。这可能是由于 VP1 蛋白自身无法诱导机体产生如同由完整的衣壳蛋白所诱导机体产生的/健全的0免疫应答。免疫系统有多种途径来消灭侵入的抗原物质, 通常将它们分为两类。免疫系统碰到外来抗原时产生免疫应答的类型部分地取决于抗原的属性, 免疫应答是根据由 B 淋巴细胞执行, 还是由 T 淋巴细胞执行来定义的。针对外来分子产生特异性抗体是识别外源抗原的最基本环节。这种识别要求抗体能够结合到抗原的一小部分结构或区域上。这就需要将引起机体免疫应答研究的视野范围扩大到其他结构蛋白上。VP3 蛋白作为 FMDV 衣壳中的关键蛋白应该引起研究人员的足够重视, 其 A 区的游离多肽链和 B 区的 B- 折叠桶均可以成为机体产生的多克隆抗体攻击的靶标。

从对 20 株 O 型 FMDV 4 种结构蛋白核苷酸和氨基酸变异率的数理统计分析来看, 结构蛋白在核苷酸水平上的变异率无差异($p > 0.05$), 但其在氨基酸水平的变异率是有差异的($p < 0.05$)。从 O 型 FMDV 结构蛋白氨基酸的突变率来看, VP2 蛋白的氨基酸突变率比 VP1、VP3、VP4 这 3 种结构蛋白的变异率高, 这可能暗示了 VP2 基因在不同宿主细胞中会随着核苷酸变异痕迹的不断加深而使 O 型 FMDV 更能够适应, 这也符合病毒所携带遗传物质以/集约型0为原则的事实。在 O 型 FMDV 结构蛋白分子衍化的研究中, 数理统计方法的引入有效地推动了 O 型 FMDV 进化, 尤其是其分子进化方面的研究, 填补了人们对 O 型 FMDV 结构蛋白分子进化即微观进化认识上的空白, 推动进化论的研究进入分子水平, 并建立了一套依赖于核酸、蛋白质序列信息的理论方法。结果表明, O 型 FMDV 自身 RNA 转录变异只是 O 型 FMDV 结构蛋白变异的初始动力, 而病毒和宿主细胞对病毒蛋白自身所行使功能的选择压力才是推动 O 型 FMDV 变异的直接动因。

此外, X 射线晶体学方法是迄今研究蛋白质结构最有效的方法, 但是由于对样品的需要量大、纯度要求高等原因, 此法也受到很大限制。因而迫切需

要一种不依赖晶体培养、迅速、简便易行的测定蛋白质结构的方法。随着生物信息学的发展, 研究人员可以利用蛋白质数据库中的资源, 以计算机为辅助手段来模拟所要研究的蛋白质, 从而得到一些对于今后试验有参考价值的信息。周建华等^[8, 9, 11, 12]已经将 O 型 FMDV 的前导蛋白和 3C 蛋白酶的空间结构进行了尝试性分析, 这些分析结果可用于后期的基因突变试验中。本试验就是以此为目的, 对 FMDV OA/58 毒株 VP3 蛋白进行了有意义的尝试, 这些信息为今后的进一步试验提供了一定的参考信息。

参考文献:

- [1] Grubman M J, Baxt B. Foot and mouth disease [J]. Clin Microbiol Rev, 2004, 17: 465- 493.
- [2] Knowles N J, Samuel P R. Molecular epidemiology of foot and mouth disease virus [J]. Virus, 2003, 91: 65- 80.
- [3] Strohmaier K, Fraze R, Adam K H. Location and characterization of antigenic protein of the FMDV immunizing protein [J]. J Gen Virol, 1982, 59: 295- 306.
- [4] Geysem H M, Meloem R H, Barteling S J, et al. Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid [J]. Proc Natl Acad Sci, 1984, 81: 3998- 4002.
- [5] 周建华, 丛国政, 高闪电, 等. FMDV OA/58 病毒株 VP1 蛋白结构构建与 B 细胞抗原表位的预测[J]. 华北农学报, 2007, 22(6): 176- 179.
- [6] Jackson T, Stuart D J, Fry E. Structure and receptor binding [J]. Virus, 2003(91): 33- 46.
- [7] Mason P W, Grubman M J, Baxt B. Molecular basis of pathogenesis of FMDV[J]. Virus Research, 2003(91): 9- 32.
- [8] 周建华, 丛国政, 高闪电, 等. 口蹄疫 OA/58 病毒株 VP2 蛋白结构模拟与 B 细胞抗原表位的分析[J]. 华北农学报, 2008, 23(3): 1- 4.
- [9] 丁达夫, 汤海旭, 张保红, 等. 同源蛋白质三级结构的预测[M]// 理论物理与生命科学. 上海: 上海科学技术出版社, 1997: 119- 148.
- [10] Achary R, Fry E, Stuart D, et al. The three-dimensional structure of foot and mouth disease virus at 2.9 Å resolution [J]. Nature, 1989, 337: 709- 716.
- [11] 周建华, 丛国政, 高闪电, 等. 口蹄疫病毒株 OA/58 L 蛋白酶的结构构建和功能分析[J]. 华北农学报, 2007, 22(4): 172- 175.
- [12] 周建华, 丛国政, 高闪电, 等. 口蹄疫病毒株 OA/58 3C 蛋白酶的结构模拟和功能分析[J]. 华北农学报, 2007, 22(6): 9- 13.