

猪嵴病毒 CH441 株 VP1 基因的 克隆与序列分析

祝俊鹏¹, 杨彬², 兰喜², 柳纪省², 马小军¹

(1. 甘肃农业大学 动物医学院, 甘肃 兰州 730070; 2. 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, 草食动物疫病重点开放实验室, 甘肃 兰州 730046)

摘要:为了深入研究嵴病毒(swKoV)主要结构蛋白基因 VP1, 根据 GenBank 中已发表的猪嵴病毒基因序列设计特异性引物, 采用 RT-PCR 方法扩增猪嵴病毒 CH441 株 VP1 基因, 并对其进行克隆与测序分析。结果表明, swKoV CH441 株的 VP1 基因为 762 bp, 与 GenBank 已发表的嵴病毒属的 15 株嵴病毒序列的 VP1 基因相比较, swKoV CH441 株的 VP1 基因与其他各毒株 VP1 基因的核苷酸同源性为 81.5%~90.2%, 氨基酸同源性为 86.6%~96.9%, 进化分析显示, swKoV CH441 株与 GS-1 株之间的亲缘关系较近。生物信息学分析显示, VP1 蛋白理论等电点(pI)为 4.40, 理论分子质量为 26.978 2 kDa; 其序列上共发现 18 个磷酸化位点, 分别为 Ser(7)、Thr(6)和 Tyr(5), 而蛋白的磷酸化与信号转导有关, 预测该蛋白为一重要的信号转导分子; 无信号肽和跨膜区。为进一步开展 swKoV CH441 株 VP1 基因在遗传变异等方面的研究奠定了理论基础。

关键词: VP1 基因; 克隆; DNA 测序; 序列分析

中图分类号: Q78; S828 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2015)02-0072-06

doi: 10.7668/hbxb.2015.02.014

Molecular Cloning and Sequence Analysis of the VP1 Gene of *Porcine kobuvirus*

ZHU Jun-peng¹, YANG Bin², LAN Xi², LIU Ji-xing², MA Xiao-jun¹

(1. College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; 2. State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Key Laboratory of Grazing Animal Diseases, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, China)

Abstract: The aim of the study to investigate the main structural protein of the Kobuvirus VP1 gene. According to the sequences of PKV deposited in GenBank, a pair of special primers was designed for amplifying the VP1 gene of swKoV CH441 strain by RT-PCR. The results of sequence analysis showed that the whole VP1 gene of swKoV CH441 strain consisted of 762 bp. Compared with 15 PKV strains which were deposited in GenBank, the homology of nucleotide sequences was 81.5%~90.2%, and the homology of deduced amino acids was 86.6%~96.9%. Evolution analysis indicated that the swKoV CH441 strain was closely related to GS-1 strains. The bioinformatics analysis demonstrated that the isoelectric point and molecular weight of non-structural protein VP1 were 4.40 and 26.978 2 kDa. The protein had no signal peptide and transmembrane domain. There were 18 phosphorylation sites including 7 Sers, 6 Thrs and 5 Tyrs. Protein phosphorylation was concerned with signal transduction, so this protein may be a signaling molecule. The results provided a theoretical foundation for further research on the study of VP1 gene (protein) in the genetic variation.

Key words: VP1 gene; Cloning; DNA sequencing; Sequence analysis

猪嵴病毒(*Porcine kobuvirus*, PKV)属于微小核
糖核酸病毒科(Picornaviridae)嵴病毒属, 是一种单

股正链无囊膜 RNA 病毒, 其基因组约为 8 200 bp。
该病毒基因组是由 5' 非编码区(5' untranslated re-

收稿日期: 2015-01-24

基金项目: 国家国际科技合作专项(2011DFA31830)

作者简介: 祝俊鹏(1989-), 男, 江苏扬州人, 硕士, 主要从事动物免疫与抗病研究。

通讯作者: 马小军(1972-), 男, 甘肃泾川人, 副教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事动物免疫与抗病、动物中毒与营养代谢研究。

gion,5'-UTR)、1 个单一开放阅读框 (Open reading frame,ORF)、3'非编码区 (3'untranslated region,3'-UTR)以及 Poly (A) 尾巴组成^[1]。ORF 编码大小 2 488个氨基酸的多聚蛋白,经裂解酶裂解为前导蛋白 L、结构蛋白 P1 (VP0、VP3、VP1)以及非结构蛋白 P2 (2A、2B、2C)、P3 (3A、3B、3C、3D)^[2]。

国际病毒分类委员会 (ICTV) 2013 年 2 月最新的病毒分类报告对 Kobu 病毒属中的病毒进行了重命名,将人爱知病毒 (Aichi virus, AiV) 更名为爱知病毒 A (Aichi virus A),牛嗜病毒 (Bovine kobuvirus, BKV) 更名为爱知病毒 B (Aichi virus B),猪嗜病毒 (Porcine kobuvirus, PKV) 被正式确定为一个新种,并命名为爱知病毒 C (Aichi virus C)^[3]。

猪嗜病毒是一种近年来新发现的病毒,在有腹泻症状猪群中阳性检出率明显比无腹泻症状的猪群高,但是目前未有研究证实猪嗜病毒与肠道疾病是否有关。第 1 例猪嗜病毒是由匈牙利科学家 2007 年在猪的粪便中分离得到^[4],之后在中国^[5]、日本^[6]、泰国^[7]、韩国^[8]、荷兰^[9]、巴西^[3,9]、意大利^[10]、肯尼亚与乌干达^[11]等国家均检测到了猪嗜病毒。目前关于该病毒的研究相对较少,猪嗜病毒与人和动物各种疾病的关系也有待进一步研究。本研究从分子生物学的角度分析了猪嗜病毒 CH441

株 *VPI* 基因,为进一步了解猪嗜病毒的分子结构特点以及深入研究奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 病毒株

SwKoV CH441 株由中国农业科学院兰州兽医研究所动物传染病室于甘肃省武威市某猪场采集的猪粪便样品中分离得到,已测定其全序列,并已经提交至 GenBank,其序列资料引自 GenBank。

1.2 器材和试剂

PCR 仪 (Eppendorf, 德国)、电泳仪 (北京市六一仪器厂)、凝胶成像仪 (Biorad, 意大利)、RNeasy Mini Kit 试剂盒购自 QIAGEN 公司; PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit Ver. 2 试剂盒、T-vector pMD™ 19 (simple)、*E. coli* JM109 Competent Cell、限制性内切酶 *Kpn* I 与 *EcoR* I、DL2000 DNA Marker 均购自宝生物工程 (大连) 有限公司 (TaKaRa); AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒、AxyPrep 质粒 DNA 小量试剂盒均购自爱思进生物技术 (杭州) 有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 引物设计与合成 根据 GenBank 发表的基因序列 S-1-HUN (登录号: EU787450) 设计引物 (表 1), 由苏州金唯智生物科技有限公司合成。

表 1 引物名称、位置及序列

Tab. 1 The name, position and sequence of primers

引物 Primer	位置/bp Position	序列(5'-3') Sequence
KVPI-1	2 930 ~ 2 952	GGGGTACCGCTGCTGACGACGACAACGCACC
KVPI-2	3 669 ~ 3 691	GGAATTCTTGACGCACAATGGGAGAGCGGC

1.3.2 总 RNA 的提取 向存放猪粪便样品的离心管中加入适量 PBS (pH 值 7.3), 制成 30% 悬液。悬液反复冻融 4 次, 10 000 r/min 离心 8 min, 缓慢吸取上清 400 μL, 移至新的无 RNA 酶的离心管中, 按照 RNeasy Mini Kit 试剂盒使用说明提取猪嗜病毒 CH441 株总 RNA。

1.3.3 基因扩增 采用 50 μL 反应体系扩增 *VPI* 基因片段: 25 μL 2 × 1 step Buffer, 2 μL PrimeScript 1 step Enzyme Mix, RNA 7 μL, 上游引物 1 μL, 下游引物 1 μL, DEPC 水 14 μL。PCR 反应程序为: 50 ℃ 50 min; 94 ℃ 2 min; 94 ℃ 30 s, 52 ℃ 40 s, 72 ℃ 1.5 min, 循环 35 次; 72 ℃ 10 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 将与目的基因大小一致且特异性良好的片段按照 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒使用说明进行凝胶回收。

1.3.4 基因克隆与测序 将回收产物与 T-vector pMD™ 19 (simple) 载体连接, 置于连接仪中 16 ℃ 过

夜。将连接产物转化 JM109 感受态细胞, 加入 X-gal 和 IPTG, 涂布 LB 平板 (含 100 μg/mL 的氨苄青霉素), 置 37 ℃ 温箱中培养 12 h, 挑取白色菌落, 接种于 LB 培养液中 (含氨苄青霉素), 置于摇床中, 37 ℃、220 r/min 过夜培养。取 2 mL 菌液, 使用 AxyPrep 质粒 DNA 小量试剂盒提取质粒 DNA, 进行 PCR 鉴定和酶切鉴定, 将阳性质粒送北京金唯智生物科技有限公司测序。

1.3.5 序列分析 利用 DNASTAR 软件对猪嗜病毒 CH441 株 *VPI* 基因序列与 GenBank 发表的 15 株嗜病毒 *VPI* 基因序列进行比较分析。用 MEGA 5.0 对猪嗜病毒 CH441 株 *VPI* 基因与 GenBank 中登录的猪嗜病毒 *VPI* 基因进行遗传进化分析, 绘制遗传进化树。

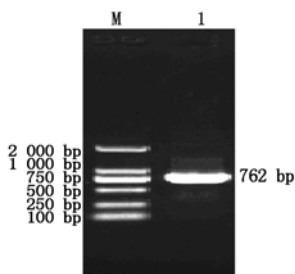
1.3.6 生物信息学分析 利用 ProParam 在线软件 (<http://web.expasy.org/protparam/>) 对猪嗜病毒 CH441 株 *VPI* 基因编码产物的理化性质进行预测。

使用 SignalP 4.1 在线软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 对蛋白信号肽进行预测。应用 TMHMM Server v. 2.0 在线软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/service-s/TMHMM/>) 预测蛋白跨膜区。通过 NetPhos 软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 预测蛋白磷酸化位点。利用 SOPMA 软件预测蛋白质二级结构。利用 SWISS-MODEL 软件预测猪嗜病毒 CH441 株 VP1 蛋白的三级结构。

2 结果与分析

2.1 swKoV CH441 株 VP1 的 RT-PCR 扩增

应用特异性引物,以提取的总 RNA 为模板,对 swKoV CH441 株进行 RT-PCR 扩增,经琼脂糖凝胶电泳检测,扩增出大小为 762 bp 的特异性目的条带(图 1),与预期大小一致。



M. DL2000 DNA Marker; 1. VP1 基因 RT-PCR 产物。

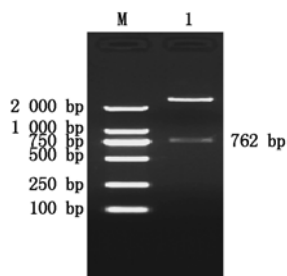
M. DL2000 DNA Marker; 1. The product of VP1 gene by RT-PCR.

图 1 swKoV CH441 株 VP1 基因目的片段的扩增

Fig. 1 Amplification of VP1 gene of swKoV CH441 strain

2.2 双酶切鉴定

PCR 纯化产物与 pMD19-T (simple) 载体连接、转化,扩增培养后得到的重组子 pMD19-T (simple)-VP1,用 *Kpn* I 和 *Eco*R I 进行双酶切后,得到 2 个大小为 2.7 kb 与 762 bp 的片段,对应于 pMD19-T (simple) 和 VP1 的大小(图 2),表明重组质粒为阳性。



M. DL2000 DNA Marker; 1. VP1 重组质粒的 *Kpn* I 和 *Eco*R I 双酶切产物。

M. DL2000 DNA Marker; 1. The double enzyme digestion product of VP1 recombinant plasmid with *Kpn* I and *Eco*R I.

图 2 pMD19-T (simple)-VP1 重组质粒双酶切鉴定

Fig. 2 Identification of pMD19-T (simple)-VP1 by *Kpn* I and *Eco*R I

2.3 猪嗜病毒 CH441 株 VP1 基因核苷酸序列分析及遗传进化分析

通过 DNASTAR 中的 MegAlign 软件将 CH441 株 VP1 基因序列与 GenBank 登录的参考序列(表 2)进行比对,结果显示,猪嗜病毒 CH441 株 VP1 基因与其他毒株 VP1 基因的核苷酸序列相似性为 81.5%~90.2%,氨基酸序列相似性为 86.6%~96.9%(图 3,4)。其中,猪嗜病毒 CH441 株 VP1 基因与 GS-1 株相似性最高,核苷酸序列相似性为 90.2%,氨基酸序列相似性为 96.9%。系统进化分析结果显示,猪嗜病毒 CH441 株与 GS-1 株处在同一个分支,说明这两者之间有较近的亲缘关系(图 5)。

表 2 GenBank 中登录的猪嗜病毒 VP1 基因的参考序列

Tab. 2 The reference sequences of VP1 gene of PKV logged in GenBank

编号 Number	序列名称 Sequence name	登录号 Accession number	来源国家 Contry of origin
1	CH-DX-2012	KJ452348	中国
2	CH/HNXX-4	JX401523	中国
3	CH-HZ-2011	JX827598	中国
4	ch-kobu/2008/China	KF695124	中国
5	GS-1/2012/CH	KC424639	中国
6	GS-2/2012/CH	KC424640	中国
7	K-4/2012/CH	KC424638	中国
8	K-30-HUN	GQ249161	匈牙利
9	S-1-HUN	EU787450	匈牙利
10	SH-W-CHN	JN630514	中国
11	swKoV CH441	KF539763	中国
12	THA/2007	AB624493	泰国
13	WB-1-HUN	JX177612	匈牙利
14	WUH1	JQ692069	中国
15	XX	KC204684	中国
16	Y-1-CHI	GU292559	中国

2.4 VP1 基因编码产物的理化性质分析

猪嗜病毒 CH441 株 VP1 基因全长 762 bp,编码 254 个氨基酸,其中含量最多的氨基酸是脯氨酸(Pro)(32 个,12.6%),不含 Pyl(O)、Sec(U)、Asx(B)(Aspartic acid or asparagine)、Glx(Z)(Glutamic acid or glutamine)、Xaa(X)(Unknown or 'other' amino acid)。强酸性氨基酸总数(Asp + Glu, 20 个)多于强碱性氨基酸总数(Arg + Lys, 11 个)。理论等电点(pI)为 4.40。预测相对理论分子量为 26.978 2 kDa,原子组成为 $C_{1226}H_{1836}N_{304}O_{372}S_6$ 。预测体外半衰期为 4.4 h(哺乳动物类网状细胞)。亲水性(GRAVY)系数为 0.005,脂肪系数是 68.82。不稳定系数是 42.79,属不稳定蛋白。

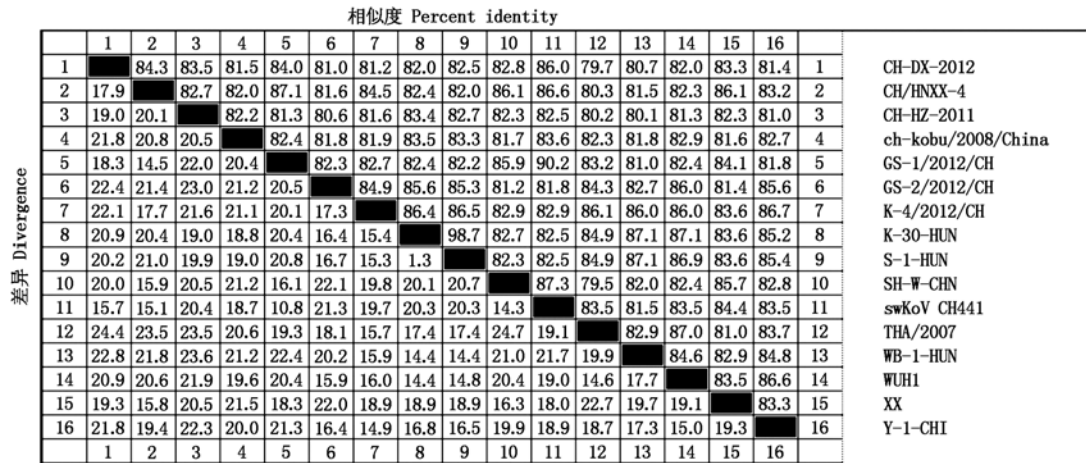


图3 猪嗜病毒 VP1 基因核苷酸序列一致性分析结果

Fig.3 The nucleotide sequence distance of PKV VP1 gene

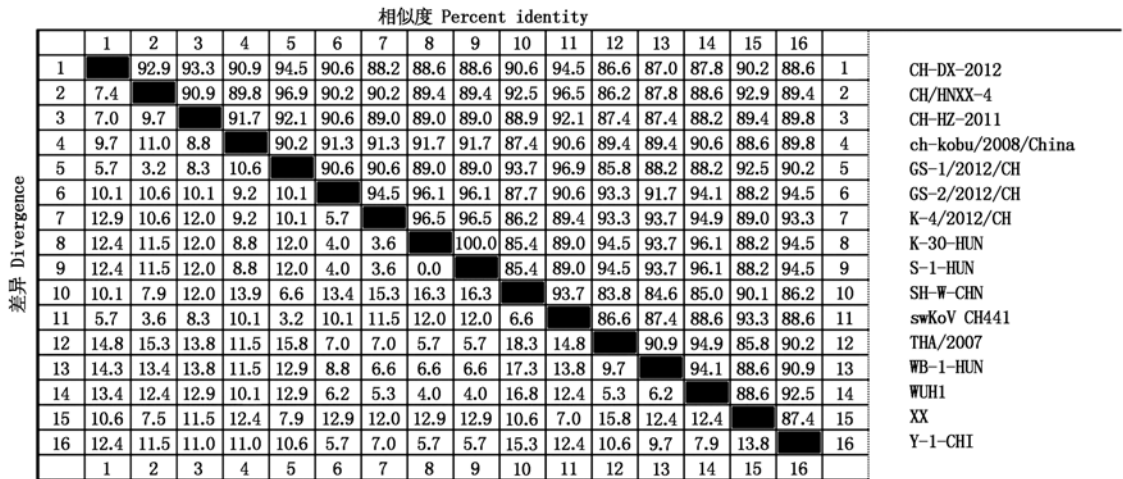


图4 猪嗜病毒 VP1 基因氨基酸序列一致性分析结果

Fig.4 The amino acids sequence distance of PKV VP1 gene

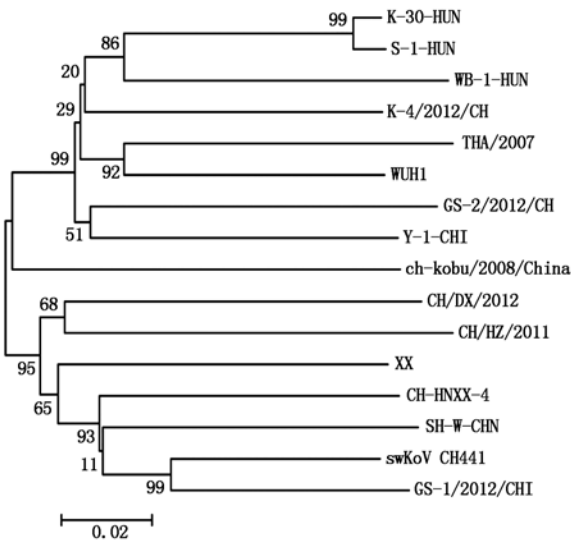


图5 猪嗜病毒 VP1 基因核苷酸序列的系统进化树

Fig.5 Phylogenetic tree based on PKV VP1 gene

2.5 信号肽分析

使用 SignalP 4.1 在线软件分析,结果表明结构蛋白 VP1 无信号肽,属非分泌蛋白。

2.6 跨膜区分析

使用 TMHMM Server v. 2.0 在线软件分析,结果显示结构蛋白 VP1 无跨膜区。

2.7 磷酸化位点的预测

利用 NetPhos 2.0 软件进行预测,结果显示(图6),该氨基酸序列中包含 18 个潜在的磷酸化位点,其中 6 个位于苏氨酸(Thr),7 个位于丝氨酸(Ser),

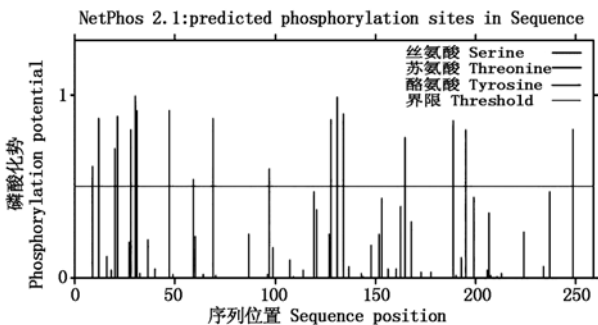


图6 猪嗜病毒 CH441 株 VP1 基因编码产物磷酸化位点预测结果

Fig.6 Phosphorlation analysis for PKV CH441 strain structural protein VP1

5 个位于酪氨酸 (Tyr)。

2.8 *VP1* 基因编码产物的二级结构预测

通过 SOPMA 软件预测猪嗜病毒 CH441 株 *VP1* 基因蛋白质二级结构,结果表明,*VP1* 基因结构含有 α -螺旋、 β -转角、延伸链和无规则卷曲,所占比例分别为 4.33%、1.97%、16.54%、77.17%;由此推测,猪嗜病毒 CH441 株 *VP1* 基因所编码的蛋白质中最多的蛋白质二级结构是无规则卷曲,其中 α -螺旋、 β -转角和延伸链散在分布于整个蛋白质中。

2.9 *VP1* 基因编码产物的三级结构预测

利用 SWISS-MODEL 在线软件进行同源建模,得到猪嗜病毒 CH441 株 *VP1* 蛋白的三级结构模型 (图 7)。

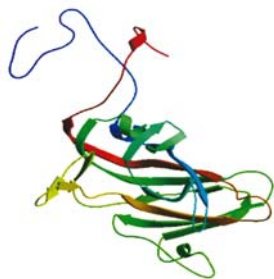


图 7 猪嗜病毒结构蛋白 *VP1* 三级结构预测结果

Fig. 7 The tertiary structure of
PKV structural protein *VP1*

3 讨论

猪嗜病毒是由 Reuter 等^[1]最先发现的,目前在全世界流行广泛。近年来,猪嗜病毒在我国各地相继被检测出来,而且检测阳性率呈上升趋势。目前,猪嗜病毒在腹泻猪群与健康猪群中均有较高的检出率,但仍不能确定该病毒引起猪的腹泻。猪嗜病毒拥有 3 种结构蛋白,即 *VP0*、*VP1* 和 *VP3*。其中结构蛋白 *VP0* 与 *VP3* 的位置、结构及功能尚未报道,结构蛋白 *VP1* 暴露于病毒粒子最外面,是主要的优势免疫原蛋白,也是最容易发生变异的蛋白^[12]。分析猪嗜病毒 *VP1* 基因对研究猪嗜病毒的遗传变异具有重要的意义,而且对研究猪嗜病毒的分子结构及对该病的诊断及防制都具有十分重要的意义。

本研究经过鉴定与序列测定确定通过 RT-PCR 成功克隆了猪嗜病毒 CH441 株 *VP1* 基因。*VP1* 基因核苷酸相似性分析结果显示,猪嗜病毒 CH441 株 *VP1* 基因与其他 15 株猪嗜病毒 *VP1* 基因核苷酸相似性为 81.5%~90.2%,表明 *VP1* 基因存在较为明显的变异。氨基酸同源性分析结果显示,氨基酸序列相似性为 86.6%~96.9%,该结果明显高于核苷酸相似性,表明 *VP1* 基因的部分变异为无义突变。

通过遗传进化分析结果可知猪嗜病毒 CH441 株与标准株 S-1-HUN 亲缘关系较远,与 GS-1 株在同一个分支,说明两者的亲缘关系较近。遗传进化分析结果与陈如敬等^[13]提出的猪嗜病毒可能在欧亚两地存在独立进化的观点相似。

通过生物信息学软件预测结构蛋白 *VP1* 信号肽,结果显示,结构蛋白 *VP1* 无信号肽。这样可以避免猪嗜病毒 CH441 株结构蛋白 *VP1* 表达后信号肽被剪切掉,从而可以得到完整的结构蛋白 *VP1*。猪嗜病毒 CH441 株结构蛋白 *VP1* 的磷酸化位点预测结果表明,共有 18 个潜在的磷酸化位点存在。相关研究表明,蛋白的磷酸化/去磷酸化对蛋白活性的发挥起重要作用,刘善荣等^[14]认为,蛋白的先后磷酸化可将信号由细胞膜外传导至细胞核,进而控制蛋白的转录与翻译。信号转导途径和多种信号分子都参与病毒的感染、复制及转录过程。由此推测结构蛋白 *VP1* 可能与细胞信号的传递有一定的关系。二级结构预测结果显示,无规则卷曲是猪嗜病毒 CH441 株 *VP1* 基因所编码的蛋白质中主要的蛋白质二级结构。无规则卷曲的作用是使蛋白质有较大的构象柔性,构成蛋白质的特定功能部位。由此推测,由于 *VP1* 蛋白在病毒表面,因此,无规则卷曲是其最多的结构。本研究克隆并分析猪嗜病毒 CH441 株的 *VP1* 基因序列,为进一步开展猪嗜病毒 CH441 株 *VP1* 基因在遗传变异及结构等方面的研究奠定了理论基础,为今后建立该病毒的诊断方法及深入研究提供了理论依据。

参考文献:

- [1] Reuter G, Boros A, Pankovics P. Kobuvirus-a comprehensive review [J]. Rev Med Virol, 2011, 21: 31-32.
- [2] Yamashita T, Sakae K, Tsuzuki H, et al. Complete nucleotide sequence and genetic organization of Aichi virus, a distinct member of the Picornaviridae associated with acute gastroenteritis in humans [J]. Journal of Virology, 1998, 72(10): 8408-8412.
- [3] Ribeiro J, De Arruda Leme R, Alfieri A F, et al. High frequency of Aichi virus C (porcine kobuvirus) infection in piglets from different geographic regions of Brazil [J]. Tropical Animal Health and Production, 2013, 45(8): 1757-1762.
- [4] Reuter G, Boldizsár A, Kiss I, et al. Candidate new species of Kobuvirus in porcine hosts [J]. Emerging Infectious Diseases, 2008, 14(12): 1968-1970.
- [5] Yu J M, Jin M, Zhang Q, et al. Candidate porcine kobuvirus, China [J]. Emerging Infectious Diseases, 2009, 15(5): 823-825.

- [6] Khamrin P, Maneekarn N, Hidaka S, *et al.* Molecular detection of kobuvirus sequences in stool samples collected from healthy pigs in Japan [J]. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 2010, 10(7): 950 – 954.
- [7] Khamrin P, Maneekarn N, Kongkaew A A, *et al.* Porcine kobuvirus in piglets, Thailand [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2009, 15(12): 2075 – 2076.
- [8] Park S J, Kim H K, Moon H J, *et al.* Molecular detection of porcine kobuviruses in pigs in Korea and their association with diarrhea [J]. *Archives of Virology*, 2010, 155(11): 1803 – 1811.
- [9] Barry A F, Ribeiro J, Alfieri A F, *et al.* First detection of kobuvirus in farm animals in Brazil and the Netherlands [J]. *Infection Genetics and Evolution*, 2011, 11(7): 1811 – 1814.
- [10] Di Profio F, Ceci C, Di Felice E, *et al.* Molecular detection of porcine kobuviruses in Italian swine [J]. *Research in Veterinary Science*, 2013, 95(2): 782 – 785.
- [11] Amimo J O, Okoth E, Junga J O, *et al.* Molecular detection and genetic characterization of kobuviruses and astroviruses in asymptomatic local pigs in East Africa [J]. *Archives of Virology*, 2014, 159(6): 1313 – 1319.
- [12] Yamashita T, Ito M, Kabashima Y, *et al.* Isolation and characterization of a new species of kobuvirus associated with cattle [J]. *The Journal of General Virology*, 2003, 84(Pt 11): 3069 – 3077.
- [13] 陈如敬, 吴学敏, 车勇良, 等. 猪嶙病毒福建株 3D 基因的克隆及遗传进化分析 [J]. *福建农业学报*, 2012, 27(9): 941 – 944.
- [14] 刘善荣, 刘厚奇, 戚中田, 等. 蛋白激酶与蛋白磷酸酶在细胞增殖分化中的机制研究 [J]. *第二军医大学学报*, 2004, 25(5): 550 – 552.