

猪细小病毒 Vaccine 株 VP2 基因克隆与抗原性分析

梁秀丽, 方丽云, 吕晓丽, 龚国琴, 付云飞, 魏战勇*

(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 [目的] 为研制和筛选猪细小病毒核酸疫苗提供依据。[方法] 对猪细小病毒 Vaccine 株 VP2 进行克隆、测序以及抗原性分析。[结果] 参考 GenBank 公布的 NADL-2 株序列, 设计出 1 对引物, 并利用该引物扩增了猪细小病毒 vaccine 株 VP2 主要抗原基因, 将其克隆到 pGEM-T Easy 载体上, 测序获得 656 bp 核苷酸序列, 并推导出其氨基酸序列, 共编码 218 氨基酸, 与 NADL-2 株相应的序列进行比较分析, 比 NADL-2 毒株缺失 781 bp, 两者核苷酸同源率为 98.9%, 氨基酸同源率为 97.2%; 应用 DNASTar 软件对氨基酸的抗原表位进行了预测, 共有 7 个抗原表位, 分别在氨基酸 N 端的第 10~18、34~39、94~103、121~126、137~144、156~165 和 209~214 区段, 此序列具有较好的免疫原性。[结论] 该研究为发展特异性和敏感性诊断系统和研制疫苗提供了有力的技术依据, 为研究蛋白质特性分析提供了理论依据。

关键词 猪细小病毒; VP2 基因; 抗原性分析

中图分类号 Q785 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)01-0037-03

Molecular Cloning and Antigenicity Analysis of VP2 Gene of PPV Vaccine Strain

LIANG Xu-li et al (Anyang University of Technology, Anyang, Henan 455000)

Abstract The objective of the study is to provide basis for the development and screening of porcine parvovirus nucleic acid vaccine. Designing a pair of primers according to NADL-2 strain of PPV from Gen Bank, the major antigen regions of VP2 of vaccine strain were amplified by PCR. The PCR products were cloned into pGEM-T Easy vector. 656 bp nucleotide sequences were acquired; and 218 bp amino acid sequences were deduced. Compared it with NADL-2 strain correspondingly, absence 781 bp and the homologies of nucleotide and amino acid sequences of the two strains were 98.9% and 97.2% respectively. The prediction of VP2 antigen epitopes showed that seven antigen epitopes were located at the segments of 10~18, 34~39, 94~103, 121~126, 137~144, 156~165 and 209~214 in amino acid N-terminal. This study has provided technical basis for developing specific and sensitive diagnosis system and developing vaccines and provided theoretic basis for study on protein property analysis.

Key words PPV; VP2 gene; Antigenicity analysis

猪细小病毒病是猪细小病毒(Porcine parvovirus, PPV)引起的猪繁殖障碍性疾病之一, 以初产母猪流产、不孕、产死胎、畸形胎、木乃伊胎及弱胎等为特征, 同时可引起仔猪的皮炎和腹泻, 其他类型的猪感染后无明显临床症状。猪细小病毒病给养猪业带来巨大的经济损失, 因此是猪病研究的热点之一^[1]。对于该病的防制主要是以免疫预防为主, 目前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^[2]。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。完整的 PPV 粒子中含有一单股线状的 DNA, 链长约 5.0 kb, 成熟的病毒粒子仅含有负链 DNA 基因组。PPV 基因组总共编码 2 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^[3]。笔者对猪细小病毒 Vaccine 株 VP2 进行了克隆、测序以及抗原性分析, 为研制和筛选猪细小病毒核酸疫苗研制提供理论依据, 为 VP2 与其他强毒株比较提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 病毒。猪细小病毒活疫苗购自中牧实业股份有限公司成都药械厂(批号:0210001), 定为 Vaccine 株。

1.1.2 菌株、质粒及试剂。大肠杆菌菌株 JM109 由河南农业大学牧医工程学院实验室保存, 按常规方法制备 CaCl₂ 感受

态细胞^[4]。pGEMT Easy 载体、蛋白酶 K 和 T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司; EcoR 酶、Taq 酶、DNA Marker DL 2000、异丙基-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农业大学牧医工程学院实验室提供。

1.2 方 法

1.2.1 引物的设计与合成。参照 GenBank 公布的 NADL-2 (序列号:NC_001718) 序列, 用 Primer Premier 5.0 生物软件设计出扩增 VP2 基因主要抗原编码区上游引物和下游引物, 引物由北京奥科生物技术有限责任公司合成, 引物的序列及位置如下:

上游引物:5'-CAC GCA TCA AGA CTC ATA-3' (位于 3 002-3 019 bp)

下游引物:5'-TGA ATA GGG TTC CAC ATA-3' (位于 4 423-4 440 bp)

1.2.2 模板的制备。按参考文献[5]进行, 取 5 ml 的灭菌水溶解后按下述方法进行 DNA 模板的制备。取溶解后的猪细小病毒活疫苗液 2 ml, 加入等体积样品裂解缓冲液[0.02 mol/L Tris-HCl (pH 值 7.5), 0.03 mol/L EDTA, 1% SDS], 混匀, 加入 4 μl 蛋白酶 K (20 ng/ml), 置 55℃ 水浴 30 min; 用饱和平衡酚 (pH 值 8.0) 抽提 2 次, 取水相加入酚:氯仿:异戊醇 (25:24:1) 抽提一次; 取水相, 再加入 (24:1) 氯仿:异戊醇, 抽提一次, 取上清加入 1/10 体积的 3 mol/L 乙酸钠 (pH 值 5.2), 2.5 倍体积的无水乙醇置 -20℃ 沉淀 2 h 以上; 12 000 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。

1.2.3 PCR 反应。PCR 反应采用 50 μl 反应体系, 组成有:10

作者简介 梁秀丽(1978-), 女, 河南安阳人, 在读硕士, 助理兽医师, 从事分子病毒学方面的研究。* 通讯作者。

收稿日期 2007-07-10

×PCR buffer 5 μl, MgCl₂ 6 mmol/L, dNTPs 浓度为 100 μmol/L, 上下游引物各 1 μl, 模板 8 μl, 最后用灭菌双蒸水添加至 50 μl。反应条件为 95 预变性 5 min, 进入循环 94 变性 1 min, 55 复性 50 s, 72 延伸 2 min, 进行 36 个循环后, 72 延伸 10 min, -4 保存。

1.2.4 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。

1.2.5 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 pGEMT Easy 在 T4 连接酶作用下 16 连接过夜。将 10 μl 上述连接产物与准备好的 200 μl JM09 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。

1.2.6 重组质粒的酶切分析。挑取上述白色菌落在氨苄青霉素的 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, 操作按说明书进行。取质粒进行 PCR 扩增、酶切鉴定。PCR 扩增体系和反应条件参照“1.2.3”进行, 添加 1 μl 模板。酶切鉴定用 EcoRI 单酶切消化, 在 37 3 h 后, 1% 琼脂糖凝胶电泳并观察结果, 并初步鉴定阳性重组质粒。

1.2.7 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, 交北京奥科生物技术有限责任公司进行测序。将测序结果与 GenBank 公布的 NADL-2 株 VP2 序列进行序列比对。

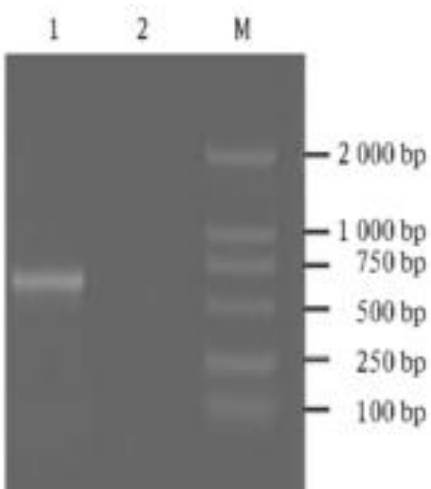
1.2.8 VP2 结构和抗原性分析。通过测序结果来推导出相应的 VP2 蛋白的氨基酸序列, 并应用 DNASTar 软件对二级结构和抗原性进行分析。

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, 以 Marker DL 2000 为对照, 在 1% 琼脂糖凝胶上电泳。由图 1 可以看出, 猪细小病毒 Vaccine 株在 500 ~ 750 bp 有一条亮带, 与预期的 656 bp 相符。

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。从图 2 可以看出, 猪细小病毒活疫苗株在 656 bp 有一条亮带; 由图 3 可知, 通过 EcoRI 单酶切消化发现在 500 ~ 750 bp(约 589 bp) 有一条亮带。

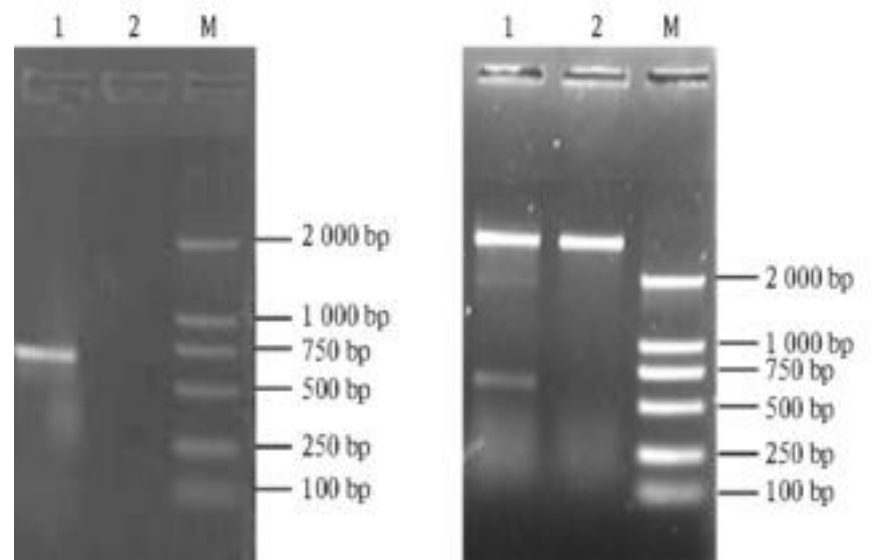
2.3 VP2 测序与分析 获得的阳性克隆经北京奥科生物技术有限责任公司进行测序, 获得了长度为 656 bp 的核苷酸序列。与预期的 PCR 扩增片段相比, 缺失了 781 bp。该片段编码 218 氨基酸(测序结果已登录于 GenBank, 序列号: AY788089, 图 4)。将该序列与



注:1 为 PPV 疫苗株的 PCR 产物;2 为阴性对照。
Note :1 means PCR products of PPV vaccine strain, 2 means negative control .

图 1 PPV vaccine 毒株 VP2 PCR 产物
Fig.1 PCR product of virus strain of PPV vaccine

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 98.9%, 氨基酸同源率为 97.2%。



注:1 为 PGEM-VP2-Vac 的重组质粒;2 为阴性对照;M 为 Marker DL2000。

Note :1 means PCR products of PPV vaccine strain, 2 means negative control .

图 2 重组质粒的 PCR 鉴定 图 3 克隆阳性株 EcoRI 酶切鉴定结果

Fig.2 PCR identification results of the recombinant plasmid Fig.3 Identification results of the positive clone strain by the restriction digestion of EcoRI

```

1  cacgcatcaagactcatacatctaaatgcccagaacacgaaacatacaaaaagaatatactgtactaaattcagaa
  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
76  tcaggggtggcgggacaaatggtaacagcgaatgcacacacacaaaatggtaacacctggctactaatagatgct
  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
151 aacgcatgggagtggttcaatccagcggactggcagttaatatccaacaacatgacagaataaaacttagtt
  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
226 agtttgaacaagaatattcaatgtagtacttaaaacaattacagaatcagcaacctcaccaccaacccaaaata
  S F E Q A I F N V V L K T I T E S A T S P P T K I
301 tataataatgatctactgcaagcttaattggctgactagacaccaataaacacttccatcacaccagcagca
  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
376 cctagaagtgaacacttggtttttatccatgggtacctacaaaacaaactcaatcacagatattacattatcagc
  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
451 atcagaacacataaaaccaccaacatacactggacaaacacaacaaatacagactcaatacaacaggactacac
  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
526 agtgacattatgtctacacaatagaaaatgcagtaacatcatcttctaagaacaggagatgaattctccaca
  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
601 ggaatatatcactttgacacaaaagaagatccagtaaatgtggaacccattca
  G I Y H F D T K K R S S N M 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

Fig.4 Nucleotide sequence of VP2 gene and their deduced amino acid sequence

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相应的氨基酸序列, 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, 结果见图 5。

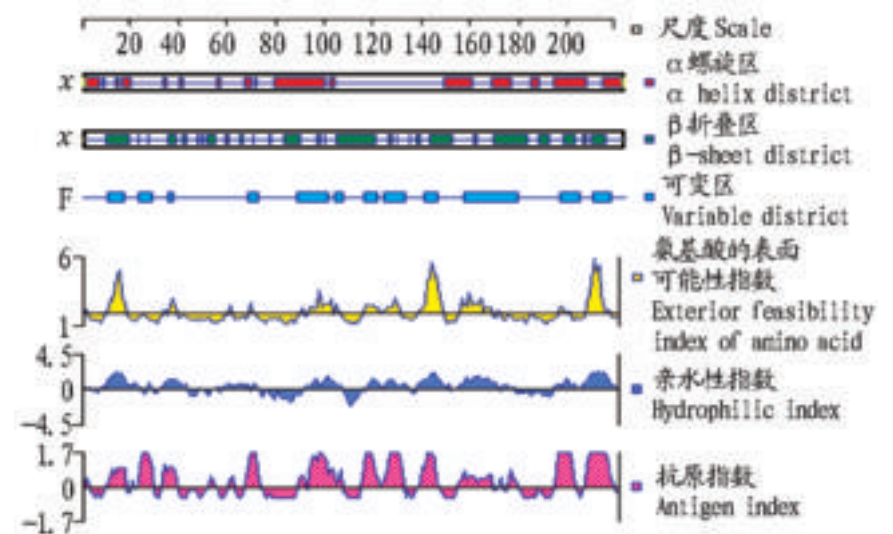


图 5 VP2 结构及抗原性分析

Fig.5 VP2 structure and its antigenicity analysis

3 小结与讨论

PPV 基因组共编码2种蛋白即结构蛋白(VP1、VP2、VP3)和非结构蛋白(NS1、NS2、NS3)。目前国内外关于猪细小病毒分子生物学的研究逐渐增多,主要集中在VP1和VP2基因方面。VP2是PPV的主要结构蛋白,分子量为64 kD,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。通过该试验可知,Vaccine 株扩增产物长度为656 bp,与两引物之间的NADL-2株的序列长度不相符,与NADL-2株相比缺失了781 bp。Maranga 等将猪细小病毒利用VP2基因制成重组疫苗,免疫母猪后产生强的抗PPV感染能力^[7]。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。基于这些试验结果,该试验扩增了PPV VP2基因,以期作为基因疫苗的进一步研究奠定基础。

国内外关于猪细小病毒基因疫苗的报道较少。赵俊龙等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周免疫小鼠2次,结果表明所有表达质粒均能诱导产生明显的细胞免疫和体液免疫;崔保安等将IL2和VP2基因一同构建了真核表达,证实了VP2在体内具有良好的免疫原性,并且IL-2具有增强其免疫原性的作用。这些结果都为全面研究猪细小病毒基因疫苗提供了理论依据^[8-9]。

应用DNASTar软件对Vaccine株与NADL-2株的VP2进行了比较分析,发现两者核苷酸同源率为98.9%,氨基酸同源率为97.2%,具有相当高的同源性,且VP序列是PPV基因组中最易变的,可以推测整个基因组变异亦很小。关于B细胞表位的预测参数较多,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的可能性、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^[10]。总之,作为B细胞抗原表位首先应易于蛋白抗原表面,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 0,亲水性指数 0,以及氨基酸的表面可能性指数 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。总之,VP2蛋白较有可能成为B细胞表位的区段位于N端第10~18、34~39、94~103、121~126、137~144、156~165和209~214区段。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。

参考文献

- [1] HARDING MJ, MOLITOR T W. A monoclonal antibody which recognizes cell surface antigen and inhibits porcine parvovirus replication[J]. Arch Viro, 1992, 123: 323-333.
 - [2] SEDLIK C, SARON M, SARRASECA J, et al. Recombinant parvovirus-like particles as an antigen carrier: a novel nonreplicative exogenous antigen to elicit protective antiviral cytotoxic T cell[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(14): 7503-7508.
 - [3] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 2版. 北京: 科学出版社, 1997.
 - [4] 萨姆布鲁克, 拉塞尔著. 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] 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.
 - [6] SEDLIK C, DRID A, DERIAUDE E, et al. Intranasal delivery of recombinant parvovirus-like particle elicits cytotoxic T cell and neutralizing antibody responses[J]. Virology, 1999, 73(4): 2739-2744.
 - [7] MARANGA L, RUEDA P, ANTONIS A F G, et al. Large scale production and downstream processing of a recombinant porcine parvovirus vaccine[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2002, 59: 45-50.
 - [8] 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.
 - [9] 崔保安, 魏战勇, 王学斌, 等. IL-2与猪细小病毒VP2基因真核双表达载体免疫原性的研究[J]. 生物工程学报, 2005(3): 425-430.
 - [10] 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.
- (上接第36页)
- 为主。这也表明该系统的分布式、支持矢量数据保存与传输与可扩展的特征将为开展其他类似的环境监测提供了必要的技术支持。
- 总之,研究设计的分布式信息系统,实现了多源数据的集成,为区域环境动态监测提供了数据集成平台,提供了动态评估区域环境质量的有效途径,适宜在更多的地区推广应用,从而实现为环境保护、资源开发利用提供更多科学决策信息的目标。

参考文献

- [1] OPENSHAW S, ABRAHART R J. GeoComputation[M]. London and New York: Taylor & Francis, 2000.
- [2] 王行风, 徐寿成. XML Web GIS的空间数据管理技术[J]. 计算机工程与应用, 2001(12): 139-141.
- [3] 潘瑜春, 赵春江. 地理信息技术在精准农业中的应用[J]. 农业工程学报, 2003, 19(4): 1-6.
- [4] 张梨, 林晖, 李斌. 互联网时代的地理信息系统[J]. 测绘学报, 1998, 27(2): 9-15.
- [5] 龚健雅, 李斌, 汤勤. 当代GIS的若干理论与技术[M]. 武汉: 武汉测绘科技大学出版社, 1999.
- [6] 唐大仕, 邬伦, 张晶. 基于CORBA组件技术的GIS系统[J]. 地理学与国土研究, 2001, 17(4): 30-34.
- [7] 阎君. 地理信息共享与开放式地理信息系统技术研究[J]. 中国图像图形学报, 1998, 3(2): 140-145.
- [8] 张正兰, 刘耀东, 张明. 基于ArcIMS的Web GIS系统开发[J]. 河海大学学报: 自然科学版, 2004, 32(1): 113-116.
- [9] 刘纪远. 中国资源环境遥感宏观调查与动态研究[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1996.
- [10] 李德仁. 关于地理信息理论的若干思考[J]. 武汉测绘科技大学学报, 1997, 22(2): 93-95.
- [11] 韩海洋, 黄建明, 龚健雅, 等. Internet下多数据源、超媒体空间信息的分布式调度与管理[J]. 武汉测绘科技大学学报, 1999, 24(3): 204-208.
- [12] 谭喜成. 基于J2EE与ArcIMS的Web GIS构建研究与实践[J]. 测绘信息与工程, 2005, 30(2): 20-22.
- [13] 周艳明, 陈镇虎. 分布式GIS软件体系结构[J]. 计算机工程, 2001, 27(9): 37-39.
- [14] 陈静, 龚健雅, 朱欣焰, 等. 基于J2EE的分布式Web GIS[J]. 测绘通报, 2004, (2): 27-30.
- [15] 刘纪远. 二十世纪九十年代中国土地利用变化的遥感时空信息研究[M]. 北京: 中国科学出版社, 2005.
- [16] 康冬舟, 益建芳. Web GIS实现技术综述及展望[J]. 信阳师范学院学报: 自然科学版, 2002, 15(1): 119-124.