

高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒 JL 株 *Nsp10* 基因生物信息学分析

周思旋¹, 徐健², 周碧君³, 王开功³

(1. 贵州省畜牧兽医研究所, 贵州贵阳 550005; 2. 贵州省贵阳市农业委员会, 贵州贵阳 550081;

3. 贵州大学动物科学学院, 贵州贵阳 550025)

摘要:本研究旨在对高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 贵州 JL 株 *Nsp10* 基因(GenBank 登录号: EU886322) 进行生物信息学分析, 了解其生物学特征, 为下一步 *Nsp10* 的表达和 ELISA 检测方法的建立奠定基础。应用 BioEdit、DNASTar、Psort II、SignalP、TMHMM、ProtFun、Clustal 1.81、Mega 等软件对 *Nsp10* 蛋白的理化参数、信号肽、跨膜区域、亲水性、表面可及性、抗原性、二级结构、亚细胞定位及与其他 PRRSV 毒株相应片段同源性等进行分析 and 预测。该蛋白理论分子质量为 26.38 ku, pI 为 8.93, 为稳定蛋白, 不含信号肽, 无跨膜结构, 具有良好的形成抗原表位的条件。亚细胞定位结果表明, 该蛋白极有可能位于细胞质, 其编码氨基酸序列与参考毒株同源性为 97.4%~100%。该蛋白保守性较高, 是可溶性蛋白, 有良好的抗原性, 具备作为靶蛋白建立免疫方法的条件。

关键词:高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒 JL 株; *Nsp10* 基因; 生物信息学分析

中图分类号: Q78

文献标识码: A

文章编号: 1671-7236(2012)01-0006-05

猪繁殖与呼吸障碍综合征病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 属于套式病毒目、动脉炎病毒科、动脉炎病毒属, 可引起妊娠母猪早产、流产、死胎、木乃伊胎等繁殖障碍及各种年龄猪呼吸系统疾病, 仔猪高死亡率、感染猪出现免疫抑制等。自 2005 年以来, 中国开始流行以“高热病”为特征的高致病性猪繁殖与呼吸综合征变异毒株(HP-PRRSV), 其致病力大、感染力强, 给中国养猪业造成了巨大的经济损失(杨汉春等, 2001; 刘金霞等, 2007)。PRRSV 基因组长度约 15 kb, 含有 8 个开放阅读框(ORFs), 其基因组顺序依次为: 5'-ORF1a-ORF1b-ORF(2-6)-ORF7-3'(Zhang 等, 2009), 3C 样丝氨酸蛋白酶(3C-like serine proteinases, 3CLSP) 将 ORF1b 编码的多肽切割成 *Nsp9*、*Nsp10*、*Nsp11*、*Nsp12* 等 4 个非结构蛋白, 这些蛋白形成复制酶复合体, 同步完成动脉炎病毒基因组的复制和亚基因组转录(韦祖樟等, 2008)。其中 *Nsp10* 由其 C 端的超家族 1(superfamily1, SF1) 解旋酶(helicase, Hel) 结构域和

N 端锌结合结构域(zinc-binding domain, ZBD) 组成(Gorbalenya 等, 2006)。目前有关 *Nsp10* 的研究尚少, 本研究在对 PRRSV 贵州分离株 JL 株 *Nsp10* 基因克隆测序的基础上, 对其基因编码蛋白进行生物信息学分析, 了解其生化及结构特征, 为下一步对该基因进行表达和建立 ELISA 检测方法奠定基础。

1 材料与方法

1.1 基因序列 数据资料来源于 NCBI 数据库, GenBank 登录号分别为: EF536003、EU880434、EF112445、EU880431、AF331831、EU880437、EU880443、AF159149、EU880436、AY032626、EU880435、EU86024、EU880433、EU880438。其中 AF159149、AF331831、EF536003、AY032626、EU880438 和 EU880443 为 2006 年以前分离的毒株, EU880437、EU880433、EU880434、EU880435、EU880431、EU880436、EU86024 和 EF112445 为 2006 年以后的流行毒株; EU886322 为高致病性 PRRSV 贵州 JL 毒株 *Nsp10* 基因序列。

1.2 方法 PRRSV *Nsp10* 分子质量、等电点等理化性质预测利用 protparam 软件完成; 氨基酸组成由 BioEdit 分析软件预测; 所编码蛋白质是否含有信号肽利用 SignalP 3.0 Server 程序预测; 亚细胞定位采用 Psort II 预测; 目的蛋白进行跨膜区结构应用 TMHMM 预测; 亲水性、表面可及性、蛋白抗原指数采用 DNASTar 分析软件预测; *Nsp10* 二级结构用 MLRC 分析软件预测; 多序列比对及同源性分析采

收稿日期: 2011-06-23

作者简介: 周思旋(1984—), 女, 江西人, 研究实习员, 硕士, 研究方向: 兽医微生物与传染病。

通信作者: 徐健(1985—), 男, 硕士。E-mail: 35087082@qq.com

基金项目: 国家自然科学基金项目资助“三带喙库蚊作为 PRRSV 生物媒介可能性实验研究”(31072158); 贵州省农业攻关项目“贵州省猪繁殖与呼吸综合征防控研究与应用”[黔科合 NY 字(2009)3071 号]。

用 DNASTar、Clustal_1.81 及 Mega 软件分析。

2 结果与分析

2.1 PRRSV *Nsp10* 基因编码产物理化性质分析

蛋白质的基本性质包括其相对分子质量、氨基酸组成和等电点(pI)等(蒋彦,2003)。根据在线服务器分析结果,目的蛋白分子质量为 26.38 ku,理论

pI 为 8.93,不稳定系数为 37.12,小于 40,属于稳定蛋白。应用 BioEdit 软件对目的基因推导的氨基酸序列进行统计分析,结果见图 1。由图 1 可知,组成目的蛋白的氨基酸共有 20 种,其中带负电荷的氨基酸残基(Asp+Glu)共有 20 个,带正电荷的氨基酸残基(Arg+Lys)共有 25 个。

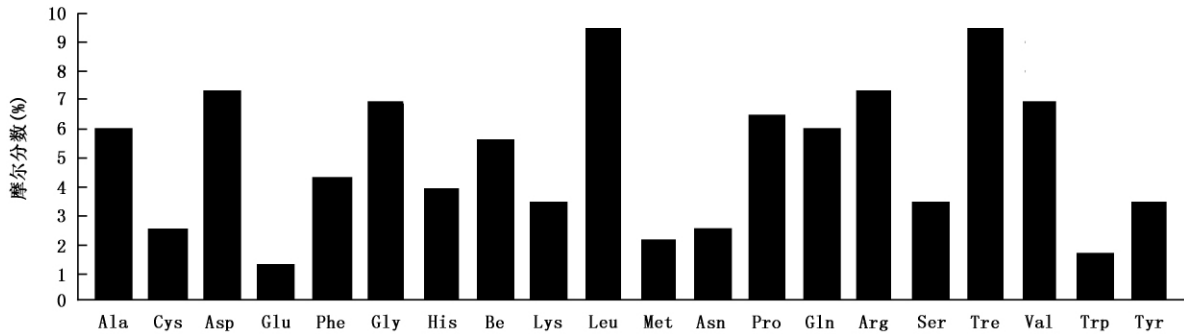


图 1 *Nsp10* 蛋白的氨基酸组成

2.2 *Nsp10* 基因信号肽预测 蛋白质的定位是通过信号序列引导实现的。信号序列长度通常为 15~60 个氨基酸,位于新生肽的 N 端。信号序列根据运输方向的不同分为 3 种类型,即入核信号、引导肽和信号肽,其中信号肽指导内膜系统的蛋白质运输,且在完成蛋白质定位后被切下(徐飞等,2011)。本研究通过 SignalP 3.0 Server 对 *Nsp10* 基因编码产物进行

了分析,利用神经网络模型(NN)和隐马尔可夫模型(HMM)进行信号肽分析,结果见图 2。对于一个典型的信号肽,C 值和 Y 值趋向于+1,S 值在剪切位点之前高而在剪切位点之后变低。综合两种模型分析结果,可以得出 *Nsp10* 编码产物不存在信号肽和切割位点,该蛋白不是分泌蛋白,在细胞质中合成后不进行蛋白转运,而是留在细胞中直接作用。

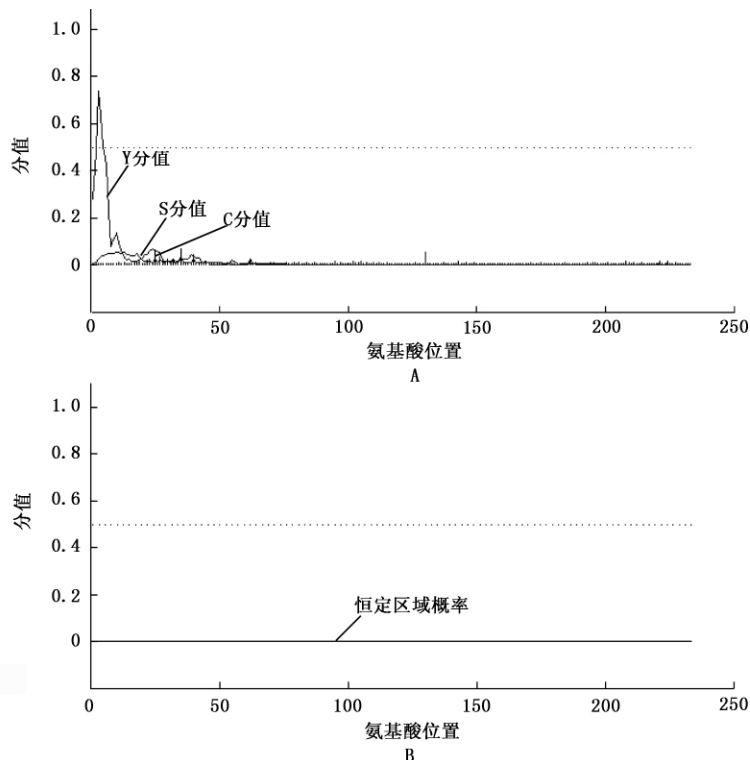


图 2 信号肽预测

注:A 为神经网络模型分析结果,B 为隐马尔可夫模型分析结果。

2.3 跨膜区结构预测 应用 TMHMM 服务器,对目的蛋白的跨膜区域进行预测,结果见图 3。由图 3 可知,目的蛋白均为膜周边蛋白,而无整合膜蛋白,不存在跨膜结构,表明目的蛋白为水溶性蛋白,容易分离。

2.4 亲水性、表面可及性及抗原表位预测 应用 DNASTar 软件对 Nsp10 蛋白进行亲水性、表面可及性及抗原表位预测分析,结果见图 4。由图 4 可知, Nsp10 具有多个亲水性高的区域,有良好的形成抗原表位的条件;表面可及性区域主要有 145—151、175—181、203—211 等;抗原表位是指能与抗体特异性结合的,位于抗原分子表面具有特殊结构的化学结构,也称抗原决定簇,抗原指数分析显示目的蛋白含有多个抗原指数较高的区域,如 5—12、17—24、

56—63、142—152、162—170、175—183、203—211 等区段,可能是潜在的抗原表位,为使机体产生免疫应答和免疫反应具有特异性奠定了基础。

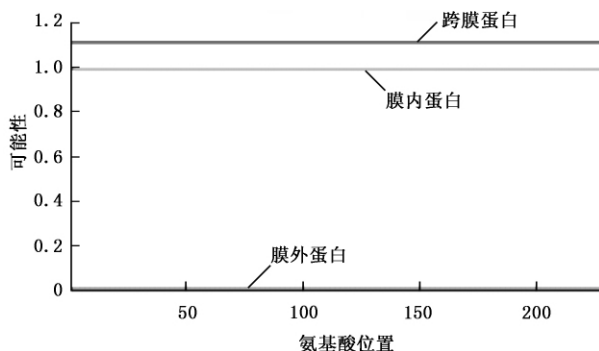


图 3 Nsp10 蛋白跨膜区结构预测

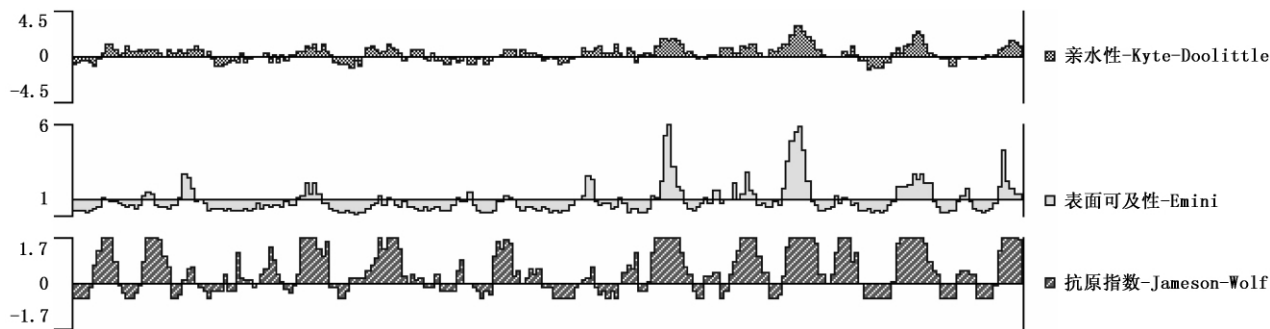


图 4 Nsp10 蛋白亲水性、表面可及性及抗原表位预测

2.5 Nsp10 蛋白二级结构预测 采用 MLRC 分析软件对 Nsp10 二级结构及拓扑结构进行预测,结果见图 5。其蛋白质二级结构由 α -螺旋(21.46%)、延伸链(24.89%)和无规卷曲(50.64%)3 种结构模块

组成。由此可推测,无规卷曲是 Nsp10 最主要的蛋白质二级结构元件, α -螺旋、延伸链则散布于其整个蛋白质中。

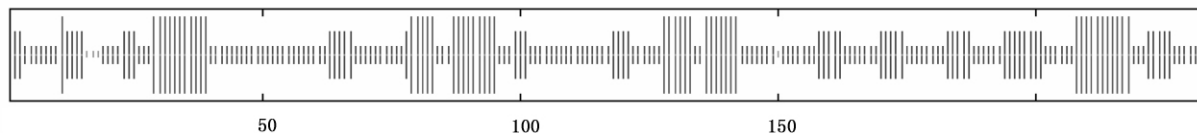


图 5 Nsp10 的二级结构

注:竖线从长到短依次表示 α -螺旋、延伸链、无规卷曲。

2.6 Nsp10 蛋白亚细胞定位预测 利用 Psort II 分析该基因所编码蛋白质的亚细胞定位,结果见

表 1。结果显示,该蛋白极有可能位于细胞质。

表 1 Nsp10 的亚细胞定位

位置	细胞质	细胞核	细胞支架	分泌腺系统	内质网	空泡	高尔基体	线粒体
比例(%)	52.2	17.4	8.7	4.3	4.3	4.3	4.3	4.3

2.7 同源性分析结果 将测序结果与 GenBank 公布的部分毒株相应序列进行同源性比较,结果见图 6。经生物信息学软件分析比较发现,PRRSV JL

分离株与 PRRSV 其他分离株蛋白质同源性很高,均在 97.4%以上,且与近期分离株的同源性高于早期分离的经典毒株。

		同源性 (%)																
变异度		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		
	1		99.6	99.1	99.6	99.6	98.3	97.9	97.9	99.6	99.6	99.6	97.9	97.9	97.9	99.6	1	
	2	0.4		99.6	100.0	100.0	98.7	98.3	97.4	100.0	100.0	100.0	98.3	97.4	98.3	100.0	2	
	3	0.9	0.4		99.6	99.6	98.3	97.9	97.0	99.6	99.6	99.6	97.9	97.0	97.9	99.6	3	
	4	0.4	0.0	0.4		100.0	98.7	98.3	97.4	100.0	100.0	100.0	98.3	97.4	98.3	100.0	4	
	5	0.4	0.0	0.4	0.0		98.7	98.3	97.4	100.0	100.0	100.0	98.3	97.4	98.3	100.0	5	
	6	1.7	1.3	1.7	1.3	1.3		99.6	97.0	98.7	98.7	98.7	99.6	97.0	99.6	98.7	6	
	7	2.2	1.7	2.2	1.7	1.7	0.4		97.4	98.3	98.3	98.3	100.0	97.4	100.0	98.3	7	
	8	2.2	2.6	3.1	2.6	2.6	3.1	2.6		97.4	97.4	97.4	97.4	100.0	97.4	97.4	8	
	9	0.4	0.0	0.4	0.0	0.0	1.3	1.7	2.6		100.0	100.0	98.3	97.4	98.3	100.0	9	
	10	0.4	0.0	0.4	0.0	0.0	1.3	1.7	2.6	0.0		100.0	98.3	97.4	98.3	100.0	10	
	11	0.4	0.0	0.4	0.0	0.0	1.3	1.7	2.6	0.0	0.0		98.3	97.4	98.3	100.0	11	
	12	2.2	1.7	2.2	1.7	1.7	0.4	0.0	2.6	1.7	1.7	1.7		97.4	100.0	98.3	12	
	13	2.2	2.6	3.1	2.6	2.6	3.1	2.6	0.0	2.6	2.6	2.6	2.6		97.4	97.4	13	
	14	2.2	1.7	2.2	1.7	1.7	0.4	0.0	2.6	1.7	1.7	1.7	0.0	2.6		98.3	14	
	15	0.4	0.0	0.4	0.0	0.0	1.3	1.7	2.6	0.0	0.0	0.0	1.7	2.6	1.7		15	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15			

图 6 贵州分离株 JL 与 PRRSV 参考株 Nsp10 蛋白的同源性比较

注:1, EU86024; 2, EU886322(贵州分离株 JL); 3, EU880434; 4, EU880435; 5, EU880437; 6, EF536003; 7, AF331831; 8, AY032626; 9, EU880436; 10, EU880431; 11, EU880433; 12, EU880443; 13, EU880438; 14, AF159149; 15, EF112445。

3 讨论

PRRSV *Nsp10* 基因全长 1320 bp, 由 ORF1b 所编码, Bautista 等(2002)鉴定了 *Nsp10* 的生化特性, 证实它具有 NTP 酶和双链 RNA 解旋的活性。锌结合结构域对解旋酶功能是必需的(Bautista 等, 2002), 因为 ZBD 中的单个残基的替代或整个结构域的缺失可致 *Nsp10* 功能缺失, 而且失活的 *Nsp10* 功能不能被野生型 ZBD 反式互补(in trans), 说明 ZBD 在 *Nsp10* 也起到顺式(in cis)调控功能的作用。故可以推测 ZBD 通过某种未知的机制调节解旋酶活性, 在 PRRSV 的复制和转录中起着关键作用。

本研究通过对 HP-PRRSV *Nsp10* 抗原性、二级结构、信号肽、亚细胞定位及进化特点等进行预测, 分析该基因编码蛋白功能, 并通过同源性了解其进化特征。对于一个蛋白质的生物学特征, 单参数预测结果正确率有限, 通常采用多种方案综合考虑, 其中亲水性、表面可及性、二级结构和抗原性比较重要(Saha 等, 2006)。亲水性残基一般位于蛋白质表面, 因此, 蛋白质亲水部位与抗原表位有密切关系。*Nsp10* 有多个亲水性区域, 说明该蛋白可能存在多个抗原表位。表面可及性参数指蛋白质抗原中氨基酸残基被溶剂分子接触的可能性, 表面可及性参数高的区域可能是抗原表位存在的区域, *Nsp10* 有 3 个表面可及性参数得分 ≥ 3 的氨基酸区段, 表明抗原表位可能在这其中。Jameson-Wolf 法是最常用的分析抗原氨基酸序列的方法, 预测结果表明 *Nsp10* 具有多个抗原表位, 提示其具有良好的免疫

原性。

蛋白质二级结构对抗原表位有很大影响, α -螺旋、 β -折叠的化学键能比较高, 能较牢固地维持蛋白质的高级结构, 很难与抗体嵌合, 且经常处于蛋白质内部, 一般不作为抗原表位。蛋白质转角及无规卷曲则比较松散, 易于发生扭曲、盘旋并展示在蛋白质表面, 成为抗原表位可能性较大(吕燕波等, 2003)。*Nsp10* 蛋白的二级结构元件中, 以无规卷曲和延伸链为主, 主要是在细胞质中发挥生物学作用, 不存在信号肽和跨膜结构, 为水溶性蛋白。该蛋白不是分泌蛋白, 在细胞质中合成后不进行蛋白转运, 而留在细胞中直接作用。

通过与序列的相似性检索得到的相关序列进行编码氨基酸序列同源性比对, 结果显示 *Nsp10* 编码氨基酸具有非常高的同源性, 为 97.4%~100%, 且与 2006 年以前分离的毒株(GenBank 登录号分别为 AF159149、AF331831、EF536003、AY032626、EU880438 和 EU880443)的 *Nsp10* 氨基酸同源性为 97.4%~98.7%; 与 2006 年以后分离的流行毒株(GenBank 登录号分别为 EU880437、EU880433、EU880434、EU880435、EU880431、EU880436、EU86024 和 EF112445)的氨基酸同源性为 99.6%~100%。推测 *Nsp10* 片段变异趋势可能与病毒的变异方向一致, 表明该蛋白有较高的保守性, 具备作为靶蛋白建立免疫学检测方法的条件。本研究通过对 *Nsp10* 蛋白特点的研究, 了解了该蛋白的结构和特征, 为该蛋白表达及建立基于 *Nsp10* 的 ELISA 免疫学检测方法奠定了基础。

参 考 文 献

- 1 韦祖樟,孙志,袁世山.猪繁殖与呼吸综合征病毒分子生物学研究进展[J].微生物学通报,2008,35(3):408~413.
- 2 刘金霞,周艳君,安同庆,等.猪繁殖与呼吸综合征病毒 ORF3 基因的表达及其单克隆抗体的制备[J].中国兽医学报,2007,27(5):609~612.
- 3 吕燕波,万瑛,吴玉章. SARS 病毒基因组所编码的 M 蛋白的二级结构和 B 细胞表位预测[J].中国生物工程杂志,2003,19(6):41~45.
- 4 杨汉春,黄芳芳,郭鑫,等.猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV) BJ-4 株全基因组序列测定与分析[J].农业生物技术学报,2001,9(3):212~218.
- 5 徐飞,成述儒,罗玉柱.奶牛 DRB3 基因生物信息学分析[J].中国奶牛,2011,2:4~8.
- 6 蒋彦.基础生物信息学及应用[M].北京:清华大学出版社,2003,150~160.
- 7 Bautista E M, Faaberg K S, Mickelson D, et al. Functional properties of the predicted helicase of porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. Virology, 2002, 298(2): 258~270.
- 8 Gorbalenya A E, Enjuanes L, Ziebuhr J, et al. Nidovirales: evolving the largest RNA virus genome[J]. Virus Research, 2006, 117(1): 17~37.
- 9 Saha S, Raghava G P. Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network[J]. Proteins, 2006, 65(1): 40~48.
- 10 Zhang Y F, Han C H, Lin J, et al. Expression of porcine reproductive and respiratory syndrome virus ORF7 gene and purification and immunological activity analysis of the recombinant protein[J]. Agricultural Science & Technology, 2009, 10(2): 62~67, 72.

Bioinformatics Prediction of the Nsp10 Gene of Highly Pathogenic PRRSV JL Strain

ZHOU Si-xuan¹, XU Jian², ZHOU Bi-jun³, WANG Kai-gong³

(1. Guizhou Institute of Animal and Veterinary Science, Guiyang 550005, China;

2. Guiyang Agricultural Committee, Guiyang 550081, China;

3. College of Animal Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: The biocharacteristics of Nsp10 of HP-PRRSV were analyzed which in basis to express it and establish the ELISA method. BioEdit, DNASTar, Psort II, SignalP, TMHMM, ProtFun, Clustal_1.81, Mega software packages were used to predict the physical and chemical properties, hydrophilicity, signal peptide, transmembrane, surface probability plot, antigenic index, secondary structure, subcellular localization and homology within the amino acid sequences of Nsp10. The predicted molecular weight was 26.38 ku and pI was 8.93. It was a stable protein and had no signal peptide and transmembrane. The study showed that Nsp10 possessed potential antigenicity and it mainly exerted the biological effects in the cytoplasm. The results showed that Nsp10 protein had highly homology with other PRRSV strain which selected. Nsp10 protein was a soluble protein with good conservatism and antigenicity. It can be a target protein used as coating antigen for ELISA detection.

Key words: highly pathogenic PRRSV JL strain; Nsp10 gene; bioinformatics prediction

猪圆环病毒 1 型衣壳蛋白基因启动子增强人类免疫缺陷病毒 1 型质粒疫苗的抗原表达和免疫原性的研究

Fiona L Tanzer 等著 刘丹摘译 张云霞校

摘要: 开发人类免疫缺陷病毒 1 型(HIV-1)和其他人类病原体的疫苗有希望的途径之一是基于质粒的 DNA 疫苗的使用。但是,注射相对大剂量的质粒只能产生相对弱的反应。猪圆环病毒 1 型(PCV-1)是一种致病的小 ssDNA 病毒,本试验旨在研究其基因元件在小剂量注射质粒疫苗时是否对质粒有增强表达的作用。将线性化的 PCV-1 基因组插入 HIV-1 质粒疫苗 pTHgrttnC 的 CMV 启动子 5'端,与 10 倍剂量未修饰的 pTHgrttnC 相比,能使多抗原的表达增加 2 倍,小鼠体内的 CTL 反应提高 3 倍。PCV-1 衣壳蛋白基因

启动子(Pcap)也有同样的效果。增强作用可能是由于圆环病毒上一个假定的复合宿主转录因子结合位点和一个尚未鉴别的转录增强序列。研究发现 PCV-1 基因组源的增强子序列能显著增加 HIV-1 C 亚型疫苗质粒 pTHgrttnC 在体外的抗原表达,且能增强其在小鼠体内的免疫原性。这将显著降低本疫苗或其他基于质粒的疫苗的免疫剂量,或增强其免疫应答。同时,本研究还报道了其他圆环病毒源的序列在这方面应用的潜力。

关键词: PCV-1; HIV-1; 启动子; 质粒; 增强
(原载: Virol J, 2011, 8; 51)