

吴 健, 朱海霞, 赵志荀, 等. 山羊痘病毒 *A11R* 基因的克隆及生物信息学分析[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(1): 158-163.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2016.01.024

山羊痘病毒 *A11R* 基因的克隆及生物信息学分析

吴 健^{1,2}, 朱海霞¹, 赵志荀¹, 颜新敏¹, 赵银龙³, 吴 娜¹, 李 健¹, 张志东¹,
张 强¹, 李 影², 吴国华¹

(1. 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, 甘肃 兰州 730046; 2. 吉林农业大学动物科学技术学院, 吉林 长春 130118; 3. 西北民族大学生命科学技术学院, 甘肃 兰州 730124)

摘要: 为了分析绵羊痘病毒 A11R 蛋白质的分子特征, 提取了山羊痘病毒古浪分离株 (GL) 的基因组 DNA, 设计引物进行 PCR 扩增, 将 PCR 产物连接到 pGEM-T Easy 载体后转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 筛选阳性克隆进行序列测定, 利用生物信息学软件对 *A11R* 基因序列进行预测分析。结果显示, *A11R* 基因序列由 954 个核苷酸组成的开放阅读框, 编码 317 个氨基酸残基组成的多肽, 蛋白质分子质量的理论值为 36 091.7, 理论等电点为 5.14。A11R 蛋白质的二级结构中, α 螺旋占 29.02%, β 折叠占 10.41%, 其余 60.57% 为无规则卷曲。多序列比对分析显示, 不同羊痘病毒分离株 *A11R* 序列高度保守, 同源性在 98% 以上。进化树分析结果显示, GL 株与 NK 株、TU 株以及 SA 株在一个分支, 说明它们之间具有较近的亲缘关系, 上述研究结果为进一步研究 A11R 蛋白质的生物学功能和羊痘病毒早期蛋白质分子间相互作用奠定了基础。

关键词: 羊痘病毒; *A11R*; 基因克隆; 生物信息学

中图分类号: S827 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2016)01-0158-06

Cloning and bioinformatics analysis of *A11R* gene of Goatpox virus

WU Jian^{1,2}, ZHU Hai-xia¹, ZHAO Zhi-xun¹, YAN Xin-min¹, ZHAO Yin-long³, WU Na¹, LI Jian¹,
ZHANG Zhi-dong¹, ZHANG Qiang¹, LI Ying², WU Guo-hua¹

(1. State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology /Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Science, Lanzhou 730046, China; 2. College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 3. Academy of Life Science and Technology, Northwest University for Nationalities, Lanzhou 730124, China)

Abstract: To explore the molecular characteristics of A11R from Goatpox virus (GTPV), genomic DNA was extracted from Goatpox virus GuLang strains. The specific primers were designed and used to amplify A11R gene from genomic

DNA by PCR. The PCR product was ligated into pGEM-T Easy vector. After transformation into *Escherichia coli* DH5 α , the positive clones were sequenced and the sequences were analyzed with the bioinformatic softwares. The result showed *A11R* gene sequence contained an open reading frame (ORF) of 954 nucleotides and the deduced protein consisted of 317 amino acids with the theoretical molecular weight of 36 091.7 and isoelectric point of 5.14. Analysis of secondary structure of protein A11R revealed

收稿日期: 2015-05-13

基金项目: 国家质检总局公益性行业科研专项 (201310093); 国家自然科学基金项目 (31201892); 甘肃省自然科学基金项目 (1208RJZA101); 国家“863”计划项目 (2012AA101304)

作者简介: 吴 健 (1990-), 男, 吉林长春人, 硕士研究生, 主要从事分子免疫学研究。(Tel) 13019125792; (E-mail) 358496480@qq.com

通讯作者: 吴国华, (Tel) 18919924902; (E-mail) wuguohua@caas.cn;
李 影, (E-mail) thliying@163.com

that α -helix, β -strand and loop accounted for 29.02%, 10.41% and 60.57%, respectively. Multiple sequence alignment showed *A11R* gene from different Capripoxvirus isolates were highly conserved with similarity as high as 98%. Phylogenetic analysis demonstrated that, GL and NK, TU and SA were grouped in one branch, indicative a close genetic relationship.

Key words: Capripox virus; *A11R*; gene clone; bioinformatics

羊痘 (Capripox, CP) 是由羊痘病毒 (Capripox virus, CPV) 引起的一种急性、烈性、接触性传染病, 中国将其列为一类动物疾病, 世界卫生组织 (OIE) 将其列为“法定通报疾病”^[1], 许多国家都爆发过山羊痘与绵羊痘, 如越南、蒙古、希腊等均爆发过该病^[2]。近年来中国的江苏、宁夏、内蒙古、山东、湖南、青海、甘肃、黑龙江、云南等地均有羊痘发生^[3], 有的地区呈爆发性流行。羊痘主要特征是病羊皮肤与粘膜上出现特异的痘疹且传播快, 致死率高。发病羊的生产力以及皮毛质量明显下降, 影响养羊业以及进出口贸易的健康发展。该病尚无特效的治疗方法, 主要通过接种传统疫苗预防该病^[1]。羊痘病毒基因组序列全长约为 150 kb, 有 147 个开放阅读框 (Open reading frame, ORF), 编码密度为 93%, 所编码的蛋白质的功能主要通过借鉴和参考痘苗病毒 (Vaccinia virus, VACV) 的研究成果推断而来。研究结果表明, F10^[4], A11^[5], A11R^[6-7], L2^[8], A6^[5,9] 是痘苗病毒粒子早期装配必需的蛋白质, 如果缺少这些蛋白质, 在病毒体膜的生物合成的早期步骤中无法形成“月牙状”膜^[4-9]。因此本研究从中国绵羊痘病毒分离株中克隆了与痘苗病毒同源的 *A11R* 基因并对其进行初步分析, 以便为深入研究羊痘病毒早期装配机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 毒株与细胞

绵羊痘病毒古浪株 (GL), 由中国农业科学院兰州兽医研究所分离鉴定, Vero 细胞由本实验室保存。

1.2 菌株以及主要试剂

TaKaRa MiniBest Viral RNA/DNA Extraction Kit ver 4.0、Premix Taq 酶、DL2000 DNA marker 等均购自宝生物工程 (大连) 有限公司。pGEM-T Easy 载体购自普洛麦格生物技术 (北京) 有限公司。DMEM 培养基购自 HyClone。大肠杆菌 DH5a 感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司。MinElute Gel Extraction Kit (50) 购自 QIAGEN 公司。

1.3 羊痘病毒基因组 DNA 的提取

羊痘病毒接种 Vero 细胞, 待 80% 左右细胞发生病变后收取病毒培养液, 参照 TaKaRa MiniBest Viral RNA/DNA Extraction Kit ver 4.0 试剂盒说明书提取羊痘病毒基因组, 用 Nanodrop 2000 超微量核酸仪测其浓度后 -20 °C 保存备用。

1.4 引物的设计与合成

参照文献 [10] 在 NCBI 上找到 *GTPV-FZ* 全基因组序列 (GenBank: KC951854) 及其 CDS 所编码的蛋白质氨基酸序列, 使用 DNASTar 中的 Primer Select 软件进行包含 *A11R* 片段的引物设计。上游引物 A11R-C-UP: 5'-AAAACAAACG-GCTGAAA-3', 下游引物 A11R-C-DOWN: 5'-ATG-TAATTATTGGAGGTGTAT-3', 预期扩增片段大小为 1 154 bp。引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

1.5 目的基因的克隆与鉴定

以提取的羊痘基因组作为模板进行 PCR 扩增, 反应条件: 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 30 s, 50 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。扩增完成后进行核酸电泳检测目的条带。然后进行胶回收并连接到 pGEM-T Easy 载体, 随后转化入大肠杆菌 DH5a 感受态细胞, 涂布于氨苄抗性的 LB 平板 (平板已添加 X-Gal 与 IPTG), 37 °C 培养过夜。随机挑取 3 个白色菌落进行菌落 PCR、产物进行核酸电泳。随后挑取 1 个阳性克隆进行摇菌扩大培养 12~14 h 后提取质粒并送苏州金唯智生物科技有限公司测序。

1.6 不同分离株 *A11R* 蛋白质同源性分析

应用 NCBI Blast 系统进行序列比对, 分析不同羊痘毒株 (SPPV 的 TU、SA、NK 分离株; GTPV 的 PL、GV 分离株)^[11] 以及 LSDV (疙瘩皮肤病毒, 与羊痘病毒同源性很高, 同属于羊痘病毒属) 的 *A11R* 同源性。

1.7 *A11R* 蛋白质的生物信息学分析

1.7.1 基本理化性质分析 应用 Vector NTI Advance 软件对 *A11R* 蛋白质进行理论分子质量、等

电点以及氨基酸组成等进行计算并使用 ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/>) 分析蛋白质的亲水性与疏水性。

1.7.2 蛋白质抗原表位预测 应用 DNASTar7.1 软件中的 Protean 对 A11R 蛋白质的 B 淋巴细胞抗原表位进行预测。

1.7.3 二级结构分析 应用 PredictProtein (<http://www.predictprotein.org/>) 对 A11R 蛋白质进行二级结构预测。

1.7.4 三级结构分析 应用 Phyre2.0 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) 对 A11R 蛋白质进行 3D 结构预测分析并使用 Raswin 软件初步预测三级结构。

2 结果

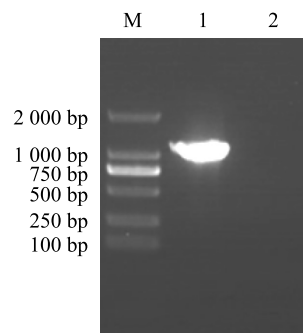
2.1 *A11R* 基因的克隆

提取羊痘古浪毒株基因组为模板进行 PCR 扩增,结果扩增出一条约 1 100 bp 的条带(图 1),与预期基因片段长度一致。

2.2 不同分离株 *A11R* 同源性分析

羊痘病毒不同分离株以及疙瘩皮肤病毒(LSDV)所编码的 *A11R* 核苷酸以及氨基酸序列同源性极高(表 1)。GL 毒株与其余毒株核苷酸同源

性最低 98% (LSDV-NI), 最高为 100% (SPPV-TU、SPPV-SA、SPPV-NK), 而氨基酸序列同源性最低为 99% (GTPV-PL、GTPV-GV、GTPV-FZ、LSDV-NI), 最高为 100% (SPPV-TU、SPPV-SA、SPPV-NK)。同时使用 DNASTar7.1 的 MegAlign 初步绘制不同羊痘病毒分离株以及 LSDV 的 *A11R* 系统发育树,发育树绘制采用邻近法,比对模型为氨基酸。结果显示 GL 毒株与 NK、SA、TU 毒株亲缘性高,FZ 与 LSDV、GV 与 PL 亲缘性很高(图 2)。



M: DL2000 DNA marker; 1: *A11R* 基因 PCR 扩增产物; 2: 阴性对照。

图 1 *A11R* 基因的 PCR 扩增

Fig.1 PCR amplification of *A11R* gene

表 1 不同分离株 *A11R* 同源性分析

Table 1 Homology analysis of *A11R* from different isolates

毒株	GTPV-PL (%)	GTPV-GV (%)	GTPV-FZ (%)	SPPV-TU (%)	SPPV-SA (%)	SPPV-NK (%)	LSDV-NI (%)	GTPV-GL (%)
GTPV-PL		100	100	99	99	99	100	99
GTPV-GV	100		100	99	99	99	100	99
GTPV-FZ	100	100		99	99	99	100	99
SPPV-TU	99	99	99		100	100	99	100
SPPV-SA	99	99	99	100		100	99	100
SPPV-NK	99	99	99	100	100		99	100
LSDV-NI	99	99	99	98	98	98		98
GTPV-GL	99	99	99	100	100	100	99	

表中右上部分为 *A11R* 核苷酸序列同源性,左下部分为对应氨基酸的同源性。

2.3 羊痘病毒 *A11R* 蛋白质的生物信息学分析

2.3.1 理化性质 羊痘病毒的 *A11R* 的 DNA 序列含有 1 个由 954 个核苷酸组成的开放阅读框,编码由 317 个氨基酸残基组成的多肽,蛋白质分子质量的理论值为 36 091.7,理论等电点 (PI) 为 5.14;原子组成是 $C_{1615}H_{2642}N_{410}O_{500}S_9$;负电荷残基 (Asp+Glu) 共有 48 个,正电荷残基

(Arg+Lys) 共有 38 个。该蛋白质由 19 种氨基酸组成,其中 Ile、Glu、Leu、Lys 的含量相对较多,His、Cys 相对较少。不稳定系数 (Instability index) 为 52.49,表明这个蛋白质性质不稳定。脂肪系数为 110.35,总平均亲水性为 -0.190。亲水性分析结果表明该蛋白质是亲水蛋白质(图 3)。

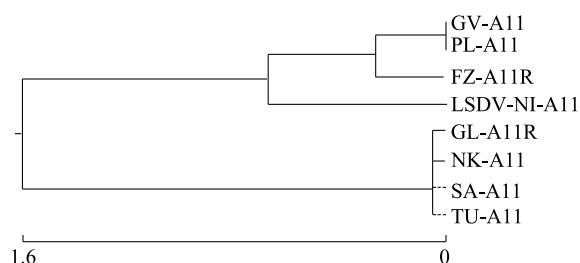


图2 不同分离株的 A11R 系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree of different isolates based on amino acid sequence of A11R

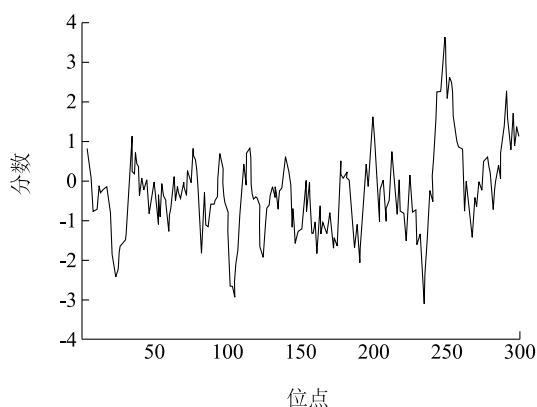


图3 A11R 蛋白质的亲水性与疏水性分析

Fig.3 Hydrophilic and hydrophobic analysis of protein A11

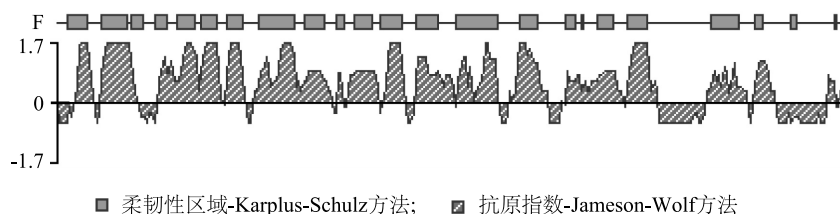


图4 A11R 蛋白质的可塑性与抗原指数分析

Fig.4 Analysis of flexible region and the antigenic index of protein A11R

3 讨论

羊痘病毒 (CPV) 是对乙醚敏感的偶蹄兽痘病毒, 长度为 194~200 nm, 为线性双股 DNA 病毒, 病毒复制的全过程都在胞浆内进行, 目前尚无特效兽药可以防治, 只能通过注射弱毒疫苗来预防, 想要治疗羊痘就要深入研究羊痘病毒。而目前就病毒活载体疫苗方面研究很多, 一苗多免更是目前研究的热门, 但这些实质都是预防手段, 一旦发病并不能起到

2.3.2 A11R 蛋白质抗原表位的预测 应用软件 DNASTar 对 A11R 蛋白质进行可塑性分析, 采用 Karplus 方案预测可塑性, 采用 Jameson-Wolf 方案对其抗原表位进行预测。A11R 蛋白质可塑性较高区域和潜在的抗原表位位点见图 4。可塑性较高的区域可能具有一定的柔韧性, 这些区域形成 B 淋巴细胞抗原表位的可能性较大, 容易与抗体进行嵌合。因此可以推测 A11R 蛋白质的抗原表位可能主要位于氨基酸序列的第 9~15、18~34、41~76、79~112、145~177、206~242、262~290 等位点 (图 5)。

2.3.3 A11R 蛋白质二级结构分析 根据 Predict-Protein 预测结果显示, 该蛋白质二级结构组成分别是 α -螺旋 (H) 占 29.02%, β -折叠 (E) 占 10.41%, 无规则卷曲占 60.57%, 共同构成了 A11R 蛋白质的二级结构骨架 (图 5)。

2.3.4 A11R 蛋白质三级结构预测 根据 PHYRE2.0 蛋白质结构预测服务器 (使用 Intensive 选项) 对 A11R 蛋白质进行三级结构预测^[16]。可观察到 A11R 的螺旋结构有 10 个左右 (图 6), 且可发现 N 端存在 1 个较长的 α 螺旋, 与图 5 结合可见 A11R 蛋白质的三级结构预测可信度较高。

治疗作用。而在基因组方面最近有新报道, 羊痘福州株已经成功进行全基因组测序, 基因组及功能基因的研究取得了重要进展^[10], 近年来, 业内对弱毒疫苗的安全性提出质疑, 通过对已发表的羊痘病毒基因组序列比对发现, 羊痘强毒与羊痘弱毒的基因组在 ORF1~ORF147 间并没有出现明显的缺失。由于羊痘基因组构成是两端相同的反向末端重复序列 (Inverted terminal repeat, ITR) 以及中心编码区, 研究人员推测基因组两端的重复序列的差异有可能是

- manner that requires the expression of another membrane biogenesis protein, A6[J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(20): 11276-11286.
- [6] MARURI AVIDAL L, WEISBERG A S, MOSS B. Association of the vaccinia virus A11 protein with the endoplasmic reticulum and crescent precursors of immature virions[J]. *Journal of Virology*, 2013, 87(18): 10195-10206.
- [7] RESCH W, WEISBERG A S, MOSS B. Vaccinia virus nonstructural protein encoded by the *A11R* gene is required for formation of the virion membrane[J]. *Journal of Virology*, 2005, 79(11): 6598-6609.
- [8] MARURI-AVIDAL L, WEISBERG A S, MOSS B. Vaccinia virus L2 protein associates with the endoplasmic reticulum near the growing edge of crescent precursors of immature virions and stabilizes a subset of viral membrane proteins[J]. *Journal of Virology*, 2011, 85(23): 12431-12441.
- [9] MENG X, EMBRY A, ROSE L, et al. Vaccinia virus A6 is essential for virion membrane biogenesis and localization of virion membrane proteins to sites of virion assembly[J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(10): 5603-5613.
- [10] ZENG X, CHI X, LI W, et al. Complete genome sequence analysis of goatpox virus isolated from China shows high variation [J]. *Veterinary Microbiology*, 2014, 173(1): 38-49.
- [11] TULMAN E R, AFONSO C L, LU Z, et al. The genomes of sheeppox and goatpox viruses[J]. *Journal of Virology*, 2002, 76(12): 6054-6061.
- [12] 经忠初,欧绍毅. 怀孕母羊免疫山羊痘活疫苗引起流产的原因及预防[J]. *广西畜牧兽医*, 2013, 29(2): 104-107.
- [13] CHANG S J, SHIH A C, TANG Y L, et al. Vaccinia mature virus fusion regulator A26 protein binds to A16 and G9 proteins of the viral entry fusion complex and dissociates from mature virions at low pH[J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(7): 3809-3818.
- [14] TOWNSLEY A C, SENKEVICH T G, MOSS B. Vaccinia virus A21 virion membrane protein is required for cell entry and fusion [J]. *Journal of Virology*, 2005, 79(15): 9458-9469.
- [15] LALIBERTE J P, WEISBERG A S, MOSS B. The membrane fusion step of vaccinia virus entry is cooperatively mediated by multiple viral proteins and host cell components[J]. *Plos Pathog*, 2011, 7(12): 1000-1014.
- [16] WOLFE C L, MOSS B. Interaction between the G3 and L5 proteins of the vaccinia virus entry-fusion complex[J]. *Virology*, 2011, 412(2): 278-283.
- [17] CHANG S J, SHIH A C, TANG Y L, et al. Vaccinia mature virus fusion regulator A26 protein binds to A16 and G9 proteins of the viral entry fusion complex and dissociates from mature virions at low pH[J]. *J Virol*, 2012, 86(7): 3809-3818.
- [18] NELSON G E, WAGENAAR T R, MOSS B. A conserved sequence within the H2 subunit of the vaccinia virus entry-fusion complex is important for interaction with the A28 subunit and infectivity[J]. *J Virol*, 2008, 82(13): 6244-6250.
- [19] WOLFE C L, OJEDA S, MOSS B. Transcriptional repression and RNA silencing act synergistically to demonstrate the function of the eleventh component of the vaccinia virus entry-fusion complex[J]. *J Virol*, 2012, 86(1): 293-301.
- [20] PERINO J, FOO C H, SPEHNER D, et al. Role of sulfatide in vaccinia virus infection[J]. *Biol Cell*, 2011, 103(7): 319-331.
- [21] SATHESHKUMAR P S, CHAVRE J, MOSS B. Role of the vaccinia virus O3 protein in cell entry can be fulfilled by its sequence flexible transmembrane domain [J]. *Virology*, 2013, 444(1-2): 148-157.
- [22] BROWN E, SENKEVICH T G, MOSS B. Vaccinia virus F9 virion membrane protein is required for entry but not virus assembly in contrast to the related L1 protein [J]. *J Virol*, 2006, 80(19): 9455-9464.
- [23] XIAO Y, ZENG Y, ALEXANDER E, et al. Adsorption of recombinant poxvirus L1-protein to aluminum hydroxide-CpG vaccinia adjuvants enhances immune responses and protection of mice from vaccinia virus challenge[J]. *Vaccine*, 2013, 31(2): 319-326.
- [24] 卢 昌,吴国华,王 曼,等.痘病毒入侵融合复合物的研究进展[J]. *动物医学进展*, 2014, 35(9): 97-101.

(责任编辑:陈海霞)