

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2017.8.03

牛乳头状瘤病毒 2 型贵州株 L2 基因克隆及生物信息学分析

张 海¹, 杨丽彦², 张 军³, 冯旭芳⁴, 周碧君^{1*}, 王开功¹, 文 明¹,
程振涛¹, 王 伟¹, 胡兴义¹

(1. 贵州大学动物科学学院, 贵阳 550025; 2. 贵州轻工职业技术学院, 贵阳 550025;

3. 贵州省六盘水市动物卫生监督所, 贵州六盘水 553001; 4. 贵州省德江县动物疫病预防控制中心, 贵州德江 565200)

[收稿日期] 2017-03-30 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 08-0014-09 [中图分类号] S852.65

[摘 要] 为分析牛乳头状瘤病毒 2 型贵州株 (BPV2-GZ01 株) L2 基因的分子特征, 预测编码蛋白的生物学功能, 对 BPV2-GZ01 株 L2 基因进行 PCR 扩增、克隆及序列测定, 应用生物信息学相关软件及方法, 对 BPV2-GZ01 株 L2 基因进行序列分析并对其编码蛋白进行二级结构、三级结构、B 细胞表位、保守结构域、跨膜结构域和信号肽预测。结果显示, L2 基因 PCR 扩增产物大小为 1404 bp, 编码 467 个氨基酸; 与参考株 BPV2 株、BPV2-SW01 株、BPV2-AKS01 株、BPV13 株、BPV1 株相应序列核苷酸同源性分别为 99.0%、99.7%、99.3%、83.9% 和 75.1%, 氨基酸的同源性分别为 98.9%、99.6%、99.4%、89.5% 和 82.7%; 系统进化显示, BPV2-GZ01 株 L2 基因与 BPV2-SW01 株亲缘关系最近; 二级结构以无规则卷曲、 β -折叠和 α -螺旋区域所占比例较大, 预测此蛋白可能存在 B 细胞优势抗原表位, 无跨膜区域, 无信号肽区域。本研究结果将为贵州省 BPV 核酸疫苗研究提供理论依据。

[关键词] 牛乳头状瘤病毒 2 型; 贵州株; L2 基因; 生物信息学分析

Cloning and Bioinformatic Analysis of L2 Gene of BPV2 from Guizhou Province

ZHANG Hai¹, YANG Li-yan², ZAHGN Jun³, FENG Xu-fang⁴, ZHOU Bi-jun^{1*}, WANG Kai-gong¹,
WEN Ming¹, CHENG Zhen-tao¹, WANG Wei¹, HU Xing-yi¹

(1. College of Animal Science, Guizhou University, Guiyang, 550025, China; 2. Guizhou Light Industry Vocational and Technical College

Guiyang, 550025, China; 3. Animal Health Supervision Institute of Liupanshui City, Lupanshui, Guizhou, 553001, China;

4. Dejiang County Animal Disease Prevention and Control Center, Dejiang, Guizhou 565200, China)

Corresponding author: ZHOU Bi-jun, E-mail: as.bjzhou@gzu.edu.cn

基金项目: 贵州省黔南州社会发展科技重大计划项目 [黔南社发科 (20140325)]; 贵州省农业委员会科技专项 (黔农财 [2015] 149 号)

作者简介: 张 海, 硕士研究生, 从事动物传染病学研究。

通讯作者: 周碧君。E-mail: as.bjzhou@gzu.edu.cn

Abstract: In order to study and analyze the L2 gene of Bovine papillomavirus 2 in Guizhou province, the L2 gene of BPV2-GZ01 strain was amplified, cloned and sequenced using bioinformatic softwares and methods, the secondary structure, tertiary structure, B-cell preponderant epitope, conserved domains analysis, transmembrane domain and signal peptide of L2 gene were predicted. The results indicated the length of L2 gene was 1404 bp, encoding 467 amino acids. The L2 gene of BPV2-GZ01 strain shared a nucleotide identities of 99.0%、99.7%、99.3%、83.9% and 75.1%, and an amino acid identities of 98.9%、99.6%、99.4%、89.5% and 82.7% with those of strains BPV2, BPV2-SW01, BPV2-AKS01, BPV13 and BPV1, respectively. The results of phylogenetic tree analysis indicated that there was a close relationship between BPV2-GZ01 strain and BPV2-SW01. Prediction of the secondary structure of L2 indicated that the random coil, extended strand and alphahelix took a higher percentage. The L2 protein was supposed contain antigen epitopes, and have a transmembrane domains, no signal peptide found. Tertiary structure is curved spiral structure. These results provided a theoretical basis for further research of nucleic acid vaccine of BPV.

Key words: Bovine papillomavirus 2 (BPV2); Guizhou strain; L2 gene; bioinformatics analysis

牛乳头状瘤是由牛乳头瘤病毒 (Bovine papillomavirus, BPV) 引起的一种体表或部分黏膜发生的慢性增生性疾病, 称为“疣”^[1-2], 是牛常见的良性肿瘤疾病。BPV 颗粒是直径为 55~60 nm 的正二十面体, 为无囊膜病毒, 长度约为 7000~8000 bp 的双链闭环超螺旋 DNA 分子^[3], 是乳头瘤病毒家族的成员。目前已知的有 14 个型基因型, 还有很多假定基因型^[4]。BPV L 区主要有两个开放阅读框 (ORF) L1 和 L2, 分别编码主要衣壳蛋白 L1 和次要衣壳蛋白 L2。L2 蛋白大小约为 63~78 ku, 在感染细胞的胞浆中合成后迅速转运到细胞核, 参与 BPV 的包装。L2 蛋白相对保守, 其上含很多有特异性的抗原表位, 可诱与不同型别的 BPV 抗体产生交叉中和反应, 因此有学者认为针对这些抗原位点的基因疫苗可能对广泛的乳头瘤病毒类型产生预防的作用^[5-6]。本试验对牛乳头状瘤病毒 2 型贵州株 (BPV2-GZ01 株) L2 基因进行了克隆和测序分析, 并与国内外不同毒株进行同源性比对, 绘制系统进化树, 分析不同毒株间的亲缘关系, 以阐明 BPV2-GZ01 株 L2 基因的分子特点; 采用生物信息学软件对 L2 基因编码蛋白进行了蛋白质理化性质、B 细胞表位、保守结构域、跨膜结构域、信号肽、二级结构和三级结构预测, 以丰富当前 BPV 贵州流行株的生物信息学特征。

1 材料与方法

1.1 材料 牛乳头状瘤病毒 2 型贵州株 (BPV2-GZ01 株) 阳性病料、大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞均由贵州大学动物疫病研究所保存; pMD19-T 载体购自宝生物工程 (大连) 有限公司; 2 \times Taq PCR MasterMix、DNA Marker、DNA 提取试剂盒均购自天根生化科技 (北京) 有限公司; 琼脂糖凝胶电泳回收试剂盒购自上海生物工程公司; 氨苄青霉素购自北京鼎国生物技术有限责任公司。

1.2 引物设计与合成 下载 GenBank 公布各型 BPV2 衣壳蛋白 L2 基因序列进行序列比对和分析, 选择较为保守的区域设计 1 对引物序列, 上游引物 P1: 5'-ATGAGTGCACGAAAAGGGTG-3'; 下游引物 P2: 5'-TTAGGCATCTTCCGTTTTTTTC-3'; 预期扩增片段长 1404 bp, 引物由上海英潍捷基公司合成。

1.3 BPV2-GZ01 株 L2 基因扩增 采用 DNA 提取试剂盒抽提病毒 DNA, 以此模板, 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系 50 μ L: 上、下游引物 (10 μ mol/L) 各 2 μ L, 2 \times Taq PCR MasterMix 25 μ L, 模板 2 μ L, 灭菌双蒸水 19 μ L。PCR 反应程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 52 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min。扩增产物于 1.2% 琼脂糖凝胶电泳上检测。

1.4 BPV2-GZ01 株 L2 基因克隆及序列分析 回

收纯化目的DNA并连接至pMD19-T载体上,再转化至大肠杆菌DH5 α 感受态细胞,利用含氨苄青霉素(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)抗性的LB平板筛选阳性重组子。提取质粒,进行PCR鉴定。将产物于1.2%琼脂糖凝胶

电泳检测,鉴定为阳性的重组质粒命名为pMD19-T-L2,送往赛默飞世尔科技(中国)有限公司测序。利用DNAS tar 、Mega 5.0等软件对测序结果进行分析,并绘制系统进化树。参考毒株信息见表1。

表 1 Genbank 中登陆的 BPV 参考株序列

Tab 1 GenBank landing BPV reference strains in sequence

名称 Names	乳头瘤病毒名称 Papillomavirus name	属 Genus	GenBank 登陆号 GenBank accession no.
BPV1	<i>Bos taurus</i> Papillomavirus 1	<i>Deltapapillomavirus</i>	X02346
BPV2	<i>Bos taurus</i> Papillomavirus 2	<i>Deltapapillomavirus</i>	M20219
BPV2-SW01	<i>Bos taurus</i> Papillomavirus 2	<i>Deltapapillomavirus</i>	KC878306
BPV2-AKS01	<i>Bos taurus</i> Papillomavirus 2	<i>Deltapapillomavirus</i>	KM455051
BPV3	<i>Bos taurus</i> Papillomavirus 3	<i>Xipapillomavirus</i>	AF486184
BPV4	<i>Bos taurus</i> Papillomavirus 4	<i>Xipapillomavirus</i>	X05817
BPV5	<i>Bos taurus</i> Papillomavirus 5	<i>Epsilonpapillomavirus</i>	AF457465
BPV6	<i>Bos taurus</i> Papillomavirus 6	<i>Xipapillomavirus</i>	AJ620208
BPV7	<i>Bos taurus</i> Papillomavirus 7	unnamed	DQ217793
BPV8	<i>Bos taurus</i> Papillomavirus 8	<i>Epsilonpapillomavirus</i>	DQ098913
BPV9	<i>Bos taurus</i> Papillomavirus 9	<i>Xipapillomavirus</i>	AB331650
BPV10	<i>Bos taurus</i> Papillomavirus 10	<i>Xipapillomavirus</i>	AB331651
BPV11	<i>Bos taurus</i> Papillomavirus 11	<i>Xipapillomavirus</i>	AB543507
BPV12	<i>Bos taurus</i> Papillomavirus 12	<i>Xipapillomavirus</i>	JF834523
BPV13	<i>Bos taurus</i> Papillomavirus 13	<i>Deltapapillomavirus</i>	JQ798171
BPV14	<i>Bos taurus</i> Papillomavirus 14	<i>Deltapapillomavirus</i>	KP276343

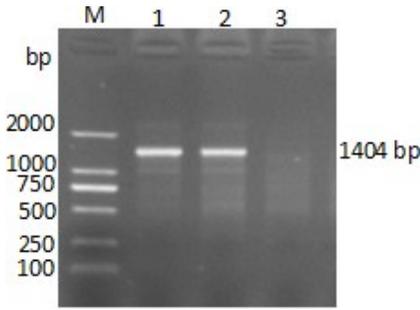
1.5 BPV2-GZ01 株 L2 基因生物信息学分析 采用在线软件 ExPASy (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>) 分析预测编码蛋白质的理化性质及氨基酸组成。采用 SPOMA 在线服务器 (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html) 预测蛋白质二级结构;采用 DNAS tar 软件 Protean 程序预测 B 细胞表位多参数;采用 NCBI 服务器上的 Conserved Domain Architecture Retrieval Tool (CDART) 工具 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) 预测保守结构域;采用 TMHMM2.0 Server 在线服务器 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 预测跨膜结构域;采用 SignalP4.1 在线服务器 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测信号肽。利用 SWISSMODEL (<http://www.swissmodel.expasy.org>) 在线预测蛋白质的三级结构。

2 结果与分析

2 结果与分析

2.1 BPV2-GZ01 株 L2 基因 PCR 扩增 以提取的 BPV2-GZ01 株病毒 DNA 为模板,进行 L2 基因特异性 PCR 扩增,经 1.2%琼脂糖凝胶电泳分析,得到大小为 1 404 bp 的条带(图 1),与预期结果相符。

2.2 测序结果 将鉴定的阳性重组质粒进行测序,测序结果采用 DNAS tar 软件进行序列拼接,获得 BPV2-GZ01 株 L2 基因核苷酸序列,由图 2 可知,L2 基因核苷酸序列长为 1404 bp,编码 467 个氨基酸。



M: DL2000 DNA Marker; 1-2: 扩增产物; 3: 阴性对照

M: DL2000 DNA Marker; 1-2: Amplification products; 3: Negative control

图 1 BPV2-GZ01 株 L2 基因 PCR 扩增电泳图

Fig 1 Amplification of L2 gene of BPV2-GZ01 by PCR

2.2.1 BPV2-GZ01 株 L2 基因核苷酸同源性分析
 将本试验克隆的 BPV2-GZ01 L2 基因序列与 GenBank 上公布的 16 株牛乳头状瘤病毒 L2 基因的对
 应序列进行核苷酸比对分析(图 3)。

结果显示, BPV2-GZ01 L2 基因序列与牛乳头
 状瘤病毒 2 型的核苷酸序列同源性为 99.0% ~
 99.7%, 其中与 BPV2-SW01(登录号: KC878306) 的
 同源性最高达到 99.7%; 与 NCBI 收录的另外两株
 BPV13(登录号: JQ79817)、BPV1(登录号: X02346)
 的同源性分别为 83.9%、75.1%。

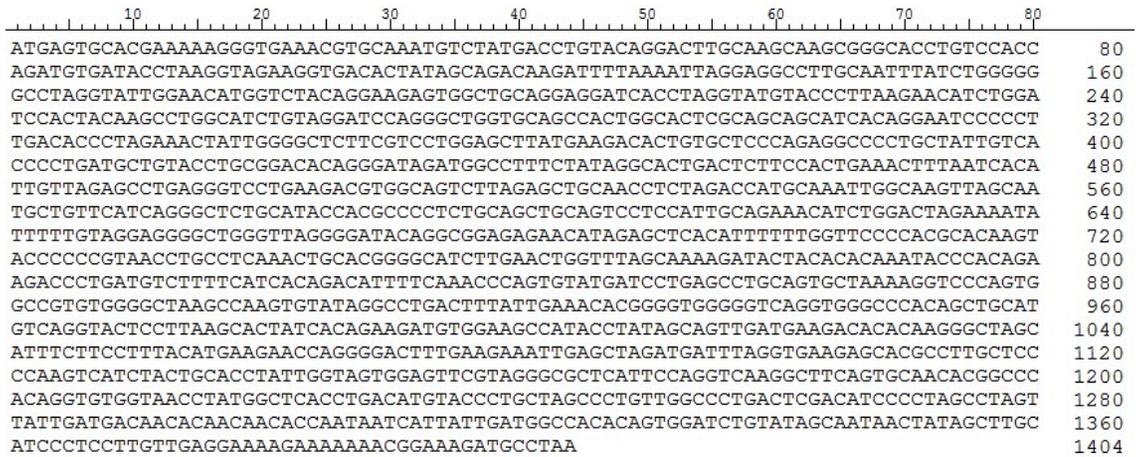


图 2 BPV2-GZ01 株 L2 基因测序结果

Fig 2 Sequencing result of L2 gene of BPV2-GZ01

		Percent Identity																		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17		
Divergence	1	■	27.2	52.7	53.7	28.5	51.5	27.5	29.0	47.9	51.8	54.4	25.1	24.1	23.8	24.9	24.6	25.5	1	BPV12
	2	139.7	■	25.4	25.6	33.3	25.4	27.2	33.1	26.0	26.1	26.7	52.2	52.4	52.6	51.9	52.5	52.8	2	BPV14
	3	47.9	126.9	■	68.0	31.3	63.7	27.2	30.2	67.1	60.4	68.5	25.7	25.9	25.7	26.1	26.5	26.0	3	BPV3
	4	49.3	125.0	31.6	■	31.1	66.2	27.3	30.8	69.2	62.1	73.0	27.0	26.1	26.8	27.1	25.8	26.0	4	BPV4
	5	129.5	82.1	126.7	125.9	■	27.6	27.2	64.7	28.5	30.3	28.8	31.6	32.1	32.2	31.8	28.9	28.4	5	BPV5
	6	51.8	141.6	34.7	33.3	138.4	■	27.6	29.8	64.8	60.5	66.0	26.3	26.4	26.4	26.2	25.6	27.7	6	BPV6
	7	106.6	163.1	98.4	97.3	156.1	102.4	■	26.5	29.0	28.5	28.8	26.4	26.2	26.5	26.6	27.1	27.4	7	BPV7
	8	137.6	88.5	133.7	135.6	34.9	128.0	161.8	■	32.1	29.7	29.9	30.6	30.6	32.5	30.5	26.9	31.4	8	BPV8
	9	51.1	133.0	34.9	31.5	123.9	36.2	100.0	125.7	■	60.9	69.2	26.9	26.1	26.5	26.8	25.5	27.3	9	BPV9
	10	47.2	141.2	37.0	37.6	127.6	39.4	97.5	130.5	36.5	■	63.1	24.4	24.8	24.6	25.2	25.3	24.3	10	BPV10
	11	49.8	129.9	32.1	26.8	131.8	35.3	94.2	135.9	32.0	37.4	■	26.2	26.4	26.4	26.2	24.7	27.1	11	BPV11
	12	155.1	51.6	130.3	132.2	83.8	141.5	156.3	83.7	131.8	147.1	138.5	■	99.3	99.0	99.7	75.1	83.9	12	BPV2-GZ01
	13	151.7	51.5	128.8	131.8	83.4	139.4	158.1	83.7	131.4	144.1	136.1	0.7	■	99.2	99.0	75.6	83.8	13	BPV2-AKS01
	14	153.4	51.3	129.6	131.8	83.9	140.3	156.9	85.1	130.4	146.1	136.1	1.0	0.8	■	98.7	75.1	84.0	14	BPV2
	15	154.2	51.9	129.7	131.6	83.8	142.2	156.3	83.7	132.4	145.6	137.8	0.3	1.0	1.3	■	74.9	83.8	15	BPV2-SW01
	16	146.7	54.6	126.0	129.8	89.8	152.4	148.8	90.1	139.8	140.4	132.5	24.4	23.8	24.2	24.5	■	75.4	16	BPV1
	17	150.4	52.0	134.2	129.7	84.6	140.2	163.4	86.1	139.2	148.0	127.7	15.2	15.4	15.3	15.2	23.7	■	17	BPV13
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17		

图 3 BPV2-GZ01 株 L2 基因的核苷酸同源性分析

Fig 3 Nucleotide homology analysis of L2 gene of BPV2-GZ01

2.2.2 BPV2-GZ01 株 L2 基因编码蛋白的氨基酸
 同源性分析 采用DNASar软件分析出BPV2-GZ01
 L2 基因的氨基酸序列,并与 GenBank 中公布的 16
 株牛乳头状瘤病毒 L2 基因编码氨基酸序列作同源
 性分析(图 4)。结果显示,BPV2-GZ01 L2 基因氨
 基酸序列与牛乳头状瘤病毒 2 型的氨基酸序列同
 源性为98.7%~99.6%,其中与 BPV2-ASK01(登
 录号:KC878306)的同源性最高达到 99.6%;与 NCBI
 收录的另外两株 BPV13(登录号:JQ79817)、BPV1

(登录号:X02346)的同源性分别为 89.5%、82.7%。

2.2.3 BPV2-GZ01 株 L2 基因系统进化树分析
 将BPV2-GZ01株 L2 基因与国内外发表的BPV不同
 毒株 L2 基因的核苷酸序列采用DNASar软件绘制
 遗传进化树。结果显示,BPV2-GZ01 株与 BPV2、
 BPV2-SW01、BPV2-AKS01株都处在同一遗传进化
 分支(图 5),其中BPV2-SW01株的亲缘关系最近。
 BPV2-GZ01株与BPV13和BPV1的亲缘关系较近。

		Percent Identity																		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17		
Divergence	1	■	99.4	98.9	98.7	19.2	18.4	27.8	17.7	22.0	29.1	18.4	16.9	17.7	18.8	89.7	59.0	82.9	1	BPV2
	2	0.4	■	99.4	99.1	19.2	18.8	28.0	16.7	19.9	27.1	17.5	18.6	17.7	18.8	89.5	58.8	83.1	2	BPV2-AKS01
	3	0.9	0.4	■	99.6	19.0	18.2	28.0	17.7	22.0	29.1	18.6	18.6	17.7	19.0	89.5	58.3	82.7	3	BPV2-GZ01
	4	1.1	0.6	0.2	■	19.0	18.6	28.0	17.1	22.0	29.3	17.9	18.6	17.7	19.0	89.5	58.3	82.9	4	BPV2-SW01
	5	173.9	172.1	173.9	173.9	■	75.3	22.9	74.6	23.1	25.6	72.8	71.3	74.8	59.0	19.3	19.3	19.4	5	BPV3
	6	183.3	181.4	183.3	183.3	25.0	■	23.9	71.9	24.3	23.4	76.5	66.3	78.6	55.9	18.7	18.5	18.3	6	BPV4
	7	119.0	119.0	119.0	119.0	162.2	161.9	■	21.2	21.2	69.6	22.2	21.8	22.0	22.5	27.4	29.2	28.3	7	BPV5
	8	176.9	175.1	176.9	175.1	27.5	28.1	166.1	■	21.6	23.4	70.2	65.7	71.9	56.3	16.8	18.7	18.3	8	BPV6
	9	190.8	190.8	190.8	190.8	153.2	160.2	204.0	159.8	■	21.6	22.7	21.4	23.1	21.0	20.4	20.4	22.6	9	BPV7
	10	120.9	120.9	120.9	120.9	165.4	154.3	31.5	162.7	209.0	■	23.4	21.7	23.8	21.7	25.9	31.9	26.4	10	BPV8
	11	189.2	187.1	187.1	187.1	29.7	25.0	151.9	31.9	153.5	154.9	■	69.8	76.9	56.0	18.0	18.7	18.5	11	BPV9
	12	176.7	174.9	176.7	176.7	27.9	34.1	151.5	35.9	150.9	158.3	30.3	■	70.0	62.2	19.1	19.3	16.8	12	BPV10
	13	184.7	182.8	184.7	184.7	27.9	22.9	162.4	30.2	153.8	158.7	25.1	29.7	■	58.7	17.8	18.5	17.7	13	BPV11
	14	179.4	177.5	175.7	175.7	47.3	51.3	156.2	52.5	152.2	165.3	50.6	42.9	48.6	■	19.7	19.7	19.6	14	BPV12
	15	9.4	9.6	9.6	9.6	170.2	181.0	122.9	173.1	200.0	123.8	179.0	167.8	175.1	179.0	■	58.2	82.1	15	BPV13
	16	51.3	51.8	52.6	52.6	169.0	182.0	109.8	181.2	215.0	113.5	178.2	182.9	189.4	176.4	53.1	■	60.2	16	BPV14
	17	15.8	15.5	16.0	16.0	159.6	171.6	119.7	176.1	180.0	122.5	171.4	170.7	171.1	176.7	17.5	51.2	■	17	BPV1
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17			

图 4 BPV2-GZ01 株 L2 基因编码蛋白的氨基酸同源性分析

Fig 4 Amino acid homology analysis of L2 gene of BPV2-GZ01

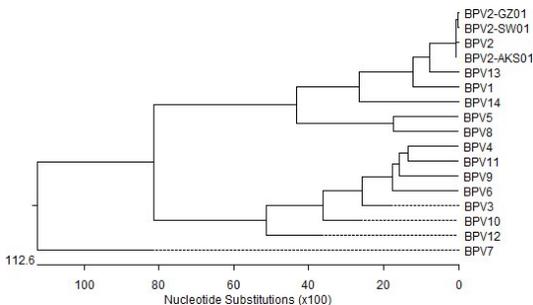


图 5 BPV2-GZ01株 L2 基因核苷酸序列的系统进化树

Fig 5 Phylogenetic tree of L2 gene BPV2-GZ01 on nucleotide sequence

2.3 BPV2-GZ01 株 L2 蛋白质理化性质的分析
 使用ExPASy (Compute PI/MW)、ProtParam在线分
 析软件预测蛋白质的理化性质及氨基酸组成。L2
 蛋白分子质量为 49.41127 ku, 分子结构式为

$C_{2183}H_{3456}N_{596}O_{702}S_4$,理论等电点(PI)为 4.85。其氨
 基酸组成中Gly(G)和Leu(L)最多,均占到9.1%以
 上,不含Pyl(0)和Sec(U)。在该蛋白的氨基酸中,
 碱性氨基酸有3种(Arg、Lys、His),共45个,占 9.6%;
 酸性氨基酸有 2 种(Asp、Glu),共 56 个,占 12%;亲
 水性氨基酸有 6 种(Asp、Glu、His、Lys、Ser、Thr),共
 159 个,占 34.1%;疏水性氨基酸 9 种(Ala、Ile、Pht、
 Leu、Met、Pro、Val、Trp、Tyr),共 207 个,占 44.33%,
 推测 L2 蛋白为碱性蛋白。L2 蛋白在哺乳动物网
 状细胞、酵母和埃希氏大肠杆菌中表达的半衰期分
 别大于 30 h、20 h 和 10 h,在溶液中的不稳定指数
 为 43.74,高于阈值 40,属于不稳定类蛋白^[7]。

2.4 BPV2-GZ01 株 L2 基因 B 细胞表位预测

2.4.1 L2 基因编码蛋白二级结构预测 采用

SOPMA 在线服务器预测 L2 基因编码蛋白的二级结构,结果见图 6。BPV2-GZ01 株 L2 基因编码蛋白的二级结构主要包括 α -螺旋、 β -转角、无规则卷曲和 β -折叠,所占比例分别为 19.06%、8.78%、49.89% 和 22.27%。在整个蛋白二级结构中无规则卷曲、 β -折叠和 α -螺旋区域出现相对较多,而此序列中 β -转角所占比例相对较少。

2.4.2 L2 基因编码蛋白 B 细胞多参数分析 采用

DNASar 程序包中的 Protean 软件综合分析预测 L2 基因编码蛋白 B 细胞表位各参数。采用 Kyte-Doolittle 法分析亲水性, Karplus-Schulz 法分析柔韧性 Jameson-Wolf 法分析抗原指数和 Emini 法分析氨基酸表面可及性进行分析,以高于阈值的氨基酸残基作为候选参考区域,结果见图 7。由图可知,该蛋白在整个氨基酸区域中,都具有良好的亲水性,柔韧性分布较均匀,抗原性和表面可及性较高。



h: α -螺旋; t: β -转角; c, 无规则卷曲; e: β -折叠

h: Alpha helix; t: Beta turn; c: Random coil; e: Extended strand

图 6 BPV2-GZ01 L2 基因编码蛋白二级结构预测

Fig 6 Secondary structure prediction of BPV2-GZ01 L2 protein

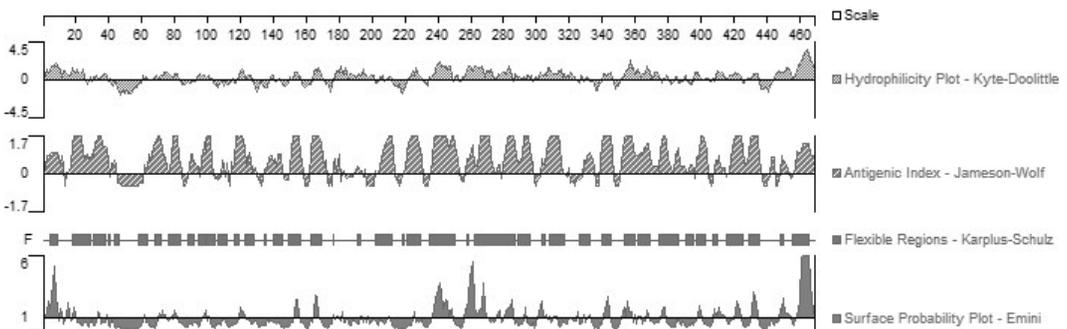


图 7 BPV2-GZ01 L2 蛋白 B 细胞表位参数预测

Fig 7 B cell epitope prediction for L2 protein of BPV2-GZ01 by the DNASar method

2.5 BPV2-GZ01 株 L2 基因编码蛋白保守结构域预测 采用 NCBI 服务器上的 CDART 工具分析 L2

基因氨基酸序列保守结构域,没有发现具有明显特征的保守结构域(图 8)。

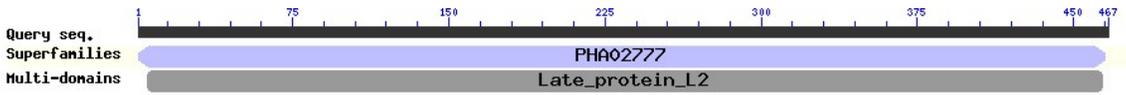


图 8 BPV2-GZ01 L2 基因编码蛋白保守结构域分析

Fig 8 Conserved domain analysis of L2 protein of BPV2-GZ01

2.6 BPV2-GZ01 株 L2 基因编码蛋白的跨膜结构预测 采用 TMHMM2.0 Server 在线服务器对 L2 蛋白跨膜结构域进行预测和分析。图 9 结果显示, BPV2-GZ01 L2 基因编码蛋白有跨膜结构域。

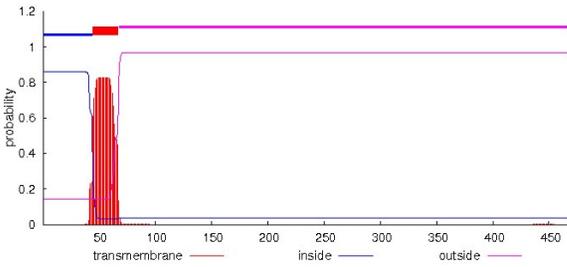


图 9 L2 蛋白跨膜结构域预测

Fig 9 Prediction of trans membrane domains of L2 protein

2.7 BPV2-GZ01 株 L2 基因编码蛋白信号肽预测 采用 SignalP4.1 在线服务器对 L2 蛋白序列中是否存在潜在的信号肽进行预测。预测结果显示,此蛋白无信号肽(图 10),即为非分泌蛋白。

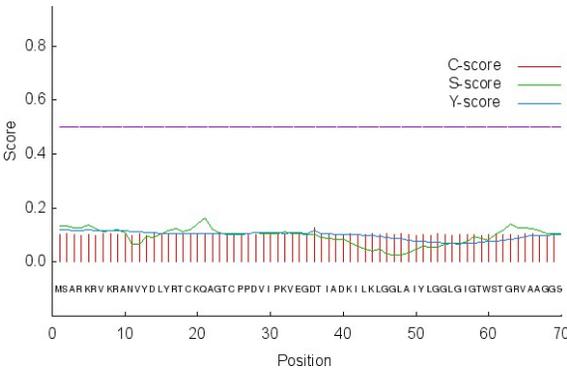


图 10 L2 蛋白信号肽预测

Fig 10 The signal peptide analysis of L2 protein

2.8 L2 基因编码蛋白三级结构预测 利用 SWISS-MODEL 预测了 L2 基因编码蛋白的三级结构,结果见图 11。

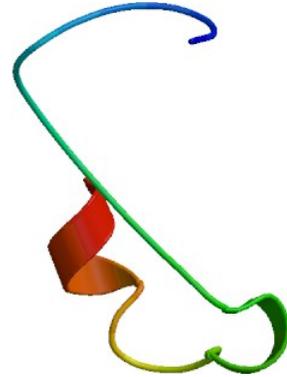


图 11 BPV2-GZ01 L2 基因编码蛋白三级结构预测

Fig 11 Tertiary structure prediction of BPV2-GZ01 L2 protein

3 讨论

近年来,贵州省极力打造生态畜牧业大省,其中养牛业为重点发展项目之一,为加快肉牛品改进程,从2015年来先后向国外和省外引进了大量优质种牛,以快速发展养牛业,自从2016年初发现 BPV 以来犊牛的发病率有逐渐上升的趋势,对养牛业造成了较大的经济损失。由于 BPV 种属特异性高,难以进行体外培养^[8]。BPV 基因型很多,不同的基因型引起临床发病的部位各不相同^[9-10]。到目前为止依旧没有有效的疫苗来预防牛乳头状瘤病的发生^[10-12]。以抗原表位为基础的表位疫苗具有针对性强,毒副作用小等优点已成为疫苗研制的热点和趋势^[13]。而利用生物信息学的方法对抗原表位的预测也是较为实用、简便的方法之一^[14]。因此 BPV2-GZ01 株 L2 基因的生物信息学分析对 BPV 疫苗的研究有非常重要的意义。

本研究根据 GenBank 公布的牛乳头状瘤病毒 2 型 L2 基因序列,设计特异性引物,从 BPV2-GZ01 株中克隆该基因,经质粒鉴定及 DNA 测序验证克隆成功。本研究测序结果显示, BPV2-GZ01 基因序列全长为 1404 bp,编码 467 个氨基酸。BPV2-GZ01 株 L2 基因与 NCBI 收录的 16 株毒株核苷酸和氨基

酸同源性分析, BPV2-GZ01 L2 基因序列与其中 3 株牛乳头状瘤病毒 2 型核苷酸和氨基酸序列同源性高达 99.0%~99.7% 和 98.7%~99.6%, 其中与 BPV2-SW01 同源性最高, 为 99.7% 和 99.6%; 与 NCBI 收录的另外 2 株 BPV13、BPV1 的核苷酸和氨基酸同源性分别为 83.9%、75.1% 和 89.5%、82.7%。从系统进化树可以看出, BPV2-GZ01 株与 BPV2-SW01 亲缘关系最近, 与 BPV13、BPV1 和 BPV14 的亲缘关系也比较近, 同属于 Delt 属。

BPV2-GZ01 株 L2 蛋白二级结构预测结果显示, 无规则卷曲和 β -折叠占 70.16%, β -转角和 α -螺旋占 29.84%。蛋白质的二级结构是抗原表位的基础, α 螺旋和 β 折叠不适合做抗原表位, 该结构具有稳定高、不易变形的特性, 因此是构成蛋白质骨架的主要结构; 而转角和无规则卷曲形成抗原表位的可能性增加, 因为该结构易发生扭曲和盘旋^[15]。当然预测一个蛋白的生物学特征时, 单一参数的预测结果正确率往往是很有限制的, 还需综合考虑跨膜结构、信号肽、亲水性、表面可及性、抗原指数及柔韧性等预测结果来作出分析^[16]。随着生物信息学技术的不断发展, 比较全面的预测蛋白质的生物学特征已成为可能。L2 蛋白氨基酸的亲水性、表面可及性、抗原指数及柔韧性均较高, 提示该蛋白具有较好的免疫原性, 可初步应用于免疫学的相关研究中。综合保守结构域、信号肽和跨膜结构域分析发现, BPV2-GZ01 L2 蛋白无特征性功能结构域和信号肽, 有跨膜结构域, 即 L2 蛋白为二次跨膜蛋白和非分泌型蛋白^[17]。氨基酸的二级结构是高级结构的基础, 同时也对高级结构的形成产生一定的影响^[18-19]。通过蛋白质的三级结构预测为 BPV2-GZ01 L2 基因抗原表位的分析提供了更为直观的分子模型, 增加了 B 细胞抗原表位预测的可靠性。以上的试验和模拟数据为进一步解析该基因功能打下坚实的理论基础和支撑, 对后期基因表达和核酸疫苗研制的研究提供试验参考。

参考文献:

[1] Brandt S, Apprich V, Hackl V, *et al.* Prevalence of bovine papillomavirus and *Treponema* DNA in bovine digital dermatitis lesions[J]. *Veterinary microbiology*, 2011, 148(2): 161-167.

[2] Lima E G, Lira R C, Jesus A L S, *et al.* Development of a DNA-based vaccine strategy against bovine papillomavirus infection, involving the E5 or L2 gene[J]. *Genetics and Molecular Research*, 2014, 13(1): 1121-1126.

[3] Campo M S. Papillomavirus and disease in humans and animals [J]. *Veterinary and Comparative Oncology*, 2003, 1(1): 3-14.

[4] Roperto S, Munday J S, Corrado F, *et al.* Detection of bovine papillomavirus type 14 DNA sequences in urinary bladder tumors in cattle[J]. *Veterinary Microbiology*, 2016, 190: 1-4.

[5] Gambhira R, Jagu S, Karanam B, *et al.* Role of L2 cysteines in papillomavirus infection and neutralization[J]. *Virology Journal*, 2009, 6(1): 1.

[6] Batista M V A, Freitas A C, Balbino V Q. Entropy-based approach for selecting informative regions in the L1 gene of bovine papillomavirus for phylogenetic inference and primer design[J]. *Genetics and Molecular Research*, 2013, 12(1): 400-407.

[7] Guruprasad K, Reddy B V B, Pandit M W. Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence[J]. *Protein engineering*, 1990, 4(2): 155-161.

[8] 史巧芸, 庞峰, 杜丽, 等. 牛乳头状瘤病毒的研究进展[J]. *中国畜牧兽医*, 2015, 6(42): 1613-1619.

Shi Q Y, Pang F, Du L, *et al.* Research progress on bovine papillomavirus[J]. *China Animal Husbandry Veterinary Medicine*, 2015, 42(6): 1613-1619.

[9] Freitas A C, Silva M A R, Carvalho C C R, *et al.* Papillomavirus DNA detection in non epithelial tissues: A discussion about bovine papillomavirus[J]. *Pathogenesis*, 2007, 11:12.

[10] Modis Y, Trus B L, Harrison S C. Atomic model of the papillomavirus capsid[J]. *The EMBO Journal*, 2002, 21(18): 4754-4762.

[11] 梁辰. 牛乳头状瘤病毒的检测及其细胞感染试验[D]. 东北农业大学, 2013.

Liang C. Detection of bovine papilloma virus and its infection test [D]. Northeast Agricultural University, 2013.

[12] 权鑫. 苦参碱抗牛乳头状瘤病毒感染 C127 细胞研究[D]. 东北农业大学, 2015.

Quan X. Study on the effect of matrine on C127 cells infected with bovine papilloma virus [D]. Northeast Agricultural University, 2015.

[13] Correia B E, Bates J T, Loomis R J, *et al.* Proof of principle for epitope-focused vaccine design[J]. *Nature*, 2014, 507(7491): 201-206.

[14] 成岩, 白靓, 董丽刚, 等. 布鲁氏菌 S2 株 L7/L12 蛋白 B 细胞线性抗原表位的预测与鉴定[J]. *中国病原生物学杂志*, 2015, 10(3): 206-210.

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2017.8.04

雏鹅大肠杆菌的分离鉴定及药敏试验

黄宇翔, 张 军, 李洪彬, 邹 跃, 杨旭东, 王志强, 刘力威

(黑龙江省兽医科学研究所, 黑龙江齐齐哈尔 161005)

[收稿日期] 2017-01-05 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 08-0022-04 [中图分类号] S858.3

[摘要] 为有效防治雏鹅大肠杆菌病, 无菌采集疑似大肠杆菌病例雏鹅的肝、脾等组织, 进行病原菌的分离培养, 经过培养特性、形态染色、生化特性以及致病性试验, 鉴定为大肠杆菌。选用 7 种临床常用抗菌药物进行药敏试验, 药敏试验结果表明, 分离菌株对庆大霉素、阿莫西林、氧氟沙星、头孢唑啉产生耐药性, 对丁安卡娜高度敏感。

[关键词] 雏鹅; 大肠杆菌; 分离鉴定; 药敏试验

Isolation, Identification and Drug Sensitivity Test of *Escherichia coli* from Gosling

HUANG Yu-xiang, ZHANG Jun, LI Hong-bin, ZOU Yue, YANG Xu-dong, WANG Zhi-qiang, LIU Li-wei

(Heilongjiang Institute of Veterinary Science, Qiqihar, Heilongjiang 161005, China)

Abstract: In order to effectively prevent and control colibacillosis of gosling, sterile collection of gosling of suspected *E.coli* liver and spleen tissues were bacteria isolated and cultured. The strain was identified based on

作者简介: 黄宇翔, 高级兽医师, 从事畜禽传染病防治的研究。E-mail: huangyuxiang-2007@163.com

Cheng Y, Bai L, Dong L G, *et al.* Prediction and preliminary evaluation of B-cell linear epitopes in the L7/L12 protein of *Brucella suis* S2 [J]. Journal of Pathogen Biology, 2015, 10 (3): 206-210.

[15] 张双翔, 程振涛, 唐 宇, 等. 绵羊肺炎支原体热休克蛋白 Hsp70 的生物信息学分析[J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41(7): 74-80.

Zhang S X, Cheng Z T, Tang Y, *et al.* Bioinformatics analysis of Hsp70 gene of *Mycoplasma ovipneumoniae* [J]. China Animal Husbandry Veterinary Medicine, 2014, 41(7): 74-80.

[16] 唐 媛, 李春花, 张 瑗, 等. 蛋白质的二级结构预测研究进展 [J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(26): 5180-5182.

Tang Y, Li C H, Zhang Y, *et al.* Advanced studies on protein secondary structure prediction [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2013, 13 (26): 5180-5182.

[17] Saha S, Raghava G P S. Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network [J]. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 2006, 65(1): 40-48.

[18] 杨 羽, 吴清民. 羊布鲁氏菌 16M 基因组分泌蛋白的生物信息学分析[J]. 畜牧兽医学报 2009 40(7): 1059-1062.

Yang Y, Wu Q M. Analysis of the secreted protein encoding genes in genome of *Brucella melitensis* 16M [J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2009, 40(7): 1059-1062.

[19] 孙 伟, 李 达, 苏 锐, 等. 绵羊 YAP1 基因全长 cDNA 克隆及生物信息学分析 [J]. 中国农业科学, 2013, 46(8): 1725-1735.

Sun W, Li D, Su R, *et al.* Cloning and bioinformatics analysis of full-length cDNA sequence of YAP1 gene in sheep [J]. China Agriculture Science, 2013, 46(8): 1725-1735.

(编辑: 李文平)