

犬冠状病毒 V1 株膜蛋白基因的克隆与序列分析*

乔 军¹, 夏咸柱¹, 胡桂学², 谢之景¹, 闫 芳¹, 杨松涛¹, 黄 耕¹

(1 中国人民解放军 军事医学科学院 军事兽医研究所, 吉林 长春 130062;

2 吉林农业大学 动物科技学院, 吉林 长春 130118)

[摘 要] 根据 GenBank 中报道的 CCV Insavc-1 株核蛋白基因(M)序列,用特异性引物对分离的 CCV V1 野毒株进行了 RT-PCR 扩增,将扩增得到的 PCR 片段纯化后与 pGEM-T 连接得到重组质粒 pTM,并进行了核苷酸序列测定。结果表明,该基因全长为 789 bp,编码 263 个氨基酸,其中前 17 个氨基酸为信号肽。与 CCV 标准毒株 Insavc-1 M 基因相比,两者核苷酸的同源性为 92.1%;推导的氨基酸序列同源性为 90.9%,差异主要发生在该蛋白的 N 端前 1/3 区域内。在推导的 M 蛋白氨基酸序列中,发现了 3 个明显的疏水区,提示该蛋白可能是一个反复跨膜的蛋白;在 N 端 15~17,38~40,234~236 位氨基酸存在 3 个潜在的 N-联糖基化位点,可能是形成该蛋白表面抗原决定基的位点。另外,推导蛋白氨基酸序列的疏水性和抗原表位与 Insavc-1 株 M 蛋白存在一定差异,提示两者免疫原性可能有差别。

[关键词] 犬冠状病毒;膜蛋白基因;基因克隆;序列分析

[中图分类号] S858.292; S852.65+9.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9387(2004)12-0075-04

犬冠状病毒(Canine Coronavirus, CCV)属冠状病毒科冠状病毒属成员之一,主要引起犬发生以胃肠炎为主要特征的急性传染病^[1~3],也是冠状病毒血清 I 群中研究最少的病毒之一。近几年,国内各地都有暴发此病的报道,给养犬业造成了很大的经济损失。与国外相比,我国对 CCV 的研究起步较晚,夏咸柱等^[4]1996 年才首次分离出此病毒。鉴于该病危害日益严重和目前对该病毒分子生物学背景的了解甚少,本研究对国内分离的 CCV V1 野毒株保护性抗原之一的结构蛋白——膜蛋白(M)基因进行了全基因克隆和序列分析,以期进一步了解 CCV 的分子生物学特征,也为其表达并进而研究有效的基因工程疫苗奠定良好的基础。

1 材料与方 法

1.1 病 毒

CCV V1 野毒株由本实验室用 F81 和 CRFK 猫肾传代细胞从 1 只发病犬肝脏中分离而得到的,经系统的病毒学鉴定后保存。

1.2 质粒、菌株及主要试剂

大肠杆菌 JM109 由本室保存。反转录酶 M-MLV, RNasin, T₄ DNA 及连接酶 dNTPs 均为 MBI

产品; Taq plus DNA 聚合酶、DNA 片段快速纯化回收试剂盒,均购自上海生物工程技术服务有限公司; DMEM 培养基为 GIBCO 产品;pGEM-T 载体购自 Promega 公司;限制性内切酶均为大连宝生物公司产品。

1.3 引物的设计

根据 GenBank 中报道的 CCV Insavc-1 株膜蛋白基因序列,设计了 1 对特异性引物,即

CCV P₁: 5'-TA GGTACC ACC ATG AAG AAA
ATT TTG TTT TTA CTA GCG-3

CCV P₂ 5'-CT GCGGCCGC TTA TAC CAT
ATG TAA TAA TTT TTC-3

为下一步克隆需要,分别在上、下游引物中引入 *Kpn* 和 *Not* 酶切位点(下划线部分),并加有两个保护性碱基。引物由大连 TaKaRa 公司合成。

1.4 病毒的培养

参照文献[4]进行。

1.5 总 RNA 的提取

参照 Chomczynski P 等^[5]报道的“异硫氰酸胍-酚-氯仿抽提分离 RNA 的一步法”进行。

1.6 RT-PCR

RT 反应参照文献[6]进行。PCR 采用 50 μL

* [收稿日期] 2003-11-02

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30000123)

[作者简介] 乔 军(1971-),男,陕西横山人,副教授,在读博士,主要从事分子病毒学研究。

反应体系。取反转录产物 2 μL , 10 \times PCR buffer 5 μL , 25 mmol/L MgCl_2 4 μL , 引物 P_1 (25 pmol/ μL), P_2 (25 pmol/ μL) 各 1 μL , 2.5 mmol/L dNTPs 4 μL , 水 32.7 μL , *Taq* plus DNA 聚合酶 0.3 μL (5 U/ μL), 混匀。反应条件为 96 预变性 180 s; 94 40 s; 54 50 s; 72 80 s, 35 个循环; 然后 72 再延伸 10 min。PCR 产物用质量分数 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳分析。切下目的 DNA 片段, 按 DNA gel Extraction 试剂盒说明书进行回收。

1.7 PCR 产物的回收、连接物的转化、重组子的鉴定及 N 蛋白基因序列测定

取回收 DNA 片段, 与 pGEM-T 载体 16 过夜连接; 将连接产物转化大肠杆菌 JM109, 然后按常规方法涂在预制好的含适量 Amp 的 LB 琼脂平板上培养 12 h。挑选白色菌落, 增菌培养后提取质粒, 用限制性内切酶酶切和 PCR 方法鉴定以获得阳性重

组质粒。经酶切鉴定正确的重组子(命名为 pTM), 送上海联合基因生物公司进行序列测定。所测序列用 DNAMAN 和 DNASTAR 进行分析。

2 结果与分析

2.1 CCV V1 株 M 基因 RT-PCR 扩增结果

经质量分数 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, CCV V1 株 RT-PCR 产物大小为 789 bp, 与预期结果相符(图 1)。

2.2 阳性重组质粒 pTM 的鉴定

扩增产物连接到 pGEM-T 载体上, 得到 pTM1 和 pTM2 2 个重组子。克隆的重组子 pTM 分别用 *Kpn* 和 *Not* 双酶切, 可得 3 000 和 789 bp 2 个片段, 结果与预期一致(图 2)。以克隆的重组子 pTM 为模板, 用 PCR 方法进行鉴定, 可扩增出 789 bp 的核酸片段, 也与预期一致(图 3)。

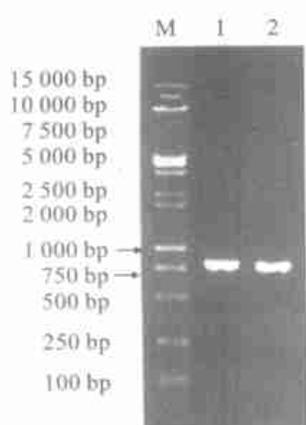


图 1 PCR 扩增结果

M, D, L 15 000 + 2 000; 1. CCV *Insavc-1*;
2. CCV V1

Fig. 1 Amplification of PCR

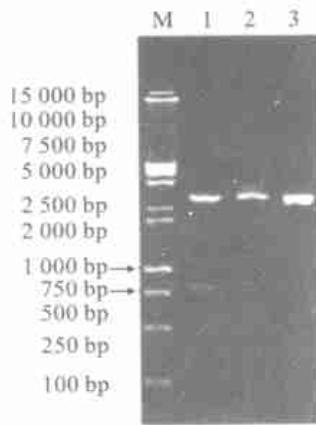


图 2 重组质粒 pTM 的酶切鉴定

M, D, L 15 000 + 2 000; 1. pTM/ *Kpn* +
Not; 2. pTM/ *Kpn*; 3. pTM

Fig. 2 Identification of recombinant
by enzyme digestion

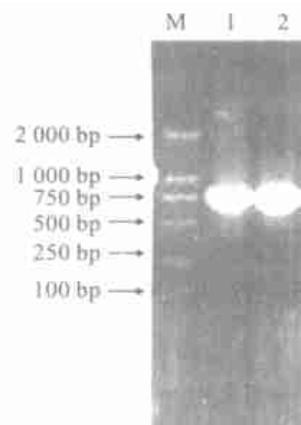


图 3 重组质粒 PCR 扩增

M, D, L 15 000 + 2 000; 1. pTM1
(positive); 2. pTM2 (positive)

Fig. 3 Identification of recombinant
by PCR

2.3 CCV V1 株 M 蛋白基因 cDNA 序列测定结果及推导的氨基酸序列

对重组质粒 pTM 的序列测定表明, CCV V1 株 M 蛋白 cDNA 的阅读框全长 789 bp, 编码 263 个氨基酸, 其中前 17 个氨基酸为信号肽, 比 *Insavc-1* 株 M 蛋白多 1 个氨基酸(图 4)。此信息已被 GenBank 收录, 其登录号 (Accession number) 为 AY390343。用 DNAMAN 对所测序列进行分析, 结果表明, 与 GenBank 中 CCV 标准毒株 *Insavc-1* M 基因相比, 两者核苷酸的同源性为 92.1%, 推导氨基酸序列的同源性为 90.9%; 同时发现两毒株的差异部分主要集中在该蛋白 N 端的前 1/3 处; 在 N 端 15~17, 38~

40, 234~236 位还发现 3 个潜在的 N-联糖基化位点, 其与 *Insavc-1* 株 M 蛋白糖基化位点的位置和数量完全相同, 推测这可能是形成该蛋白表面抗原决定基的重要位点。

2.4 推导的 CCV V1 株 M 蛋白疏水性及抗原表位分析

用 DNASTAR 软件对 CCV V1 与 *Insavc-1* 株 M 蛋白进行疏水性及抗原表位分析, 结果发现, V1 株在 58~68, 90~100, 120~130 位氨基酸有 3 个明显的疏水区, 提示该蛋白可能是一种多次跨膜的糖蛋白; 而且两者在 19~22, 105~108, 208~210, 248~251 位氨基酸残基抗原表位存在较明显的差异(图

5) ,提示两毒株 M 蛋白免疫原性可能有差别。

```

1   ATGAAGAAAATTTGTTTTACTAGCGTGTGCAATTGCATGCGCATGTGGTGAACGTTATTGCGCCATGAAATCT
1   M K K I L F L L A C A I A C A C G E R Y G A M K S
76  GACTCAGAAACTTCGGTGTGTAATAGCACTGCTACTGATTGTGAATCATGCTTCAACGGAGGTGATCTTATTTGG
26  D S E T S C R N S T A T D C E S C F N G G D L I W
151 CATCTTGCAAACCTGGAACCTTCAGCTGGTCTATAATATTGATCGTTTTATAACGGTTTTACAGTATGGTAGACCT
51  H L A N W N F S W S I I L I V F I T V L Q Y G R P
226 CAATTTAGCTGGTTCGGTATGGCATTAAATGCTTATTATGTGGCTATTATGGCCATTGTTTGGCTCTTACG
76  Q F S W F V Y G I K M L I M W L L W P I V L A L T
301 ATTTTTAATGCATACTCTGAATATGAAGTTCCAGATATGTAATGTTCCGGCTTAGCTTTGCAAGTGCATTTGTT
101 I F N A Y S E Y E V S R Y V M F G F S F A G A I V
376 ACATTTATACITTTGGATTATGTTTTATTAGATCCATTACAGTATACAGAAGGACTGAGTCTTGTGTGGTCTTTG
126 T F I L W I M Y F I R S I Q L Y R R T E S W W S F
451 AACCTGAAACTAACGCAATTCTTTGCGTTAGTGCATTAGGAAGAAGCTACGTGCTTCTCTTGAAGGTGTGCCA
151 N P E T N A I L C V S A L G R S Y V L P L E G V P
526 ACTGGTGTCACTCTAACATTGCTCTCAGGGAATTTGTATGCTGAAGGGTTCAAATTTGCAAGTGGTATGAACATC
176 T G V T L T L L S G N L Y A E G F K I A G G M N I
601 GACAATTTACAAAATACGTAATGGTTGCATTACCTAGCAGGACCATTGTCTACACACTTGTGGCAAGAAATTG
201 D N L P K Y V M V A L P S R T I V Y T L V G K K L
676 AAAGCAAGTAGTGCACAGGATGGCTTACTATGAAAATCTAAAGCTGGTGATTACTCAACAGATGCACGAACT
226 K A S S A T G W A Y Y V K S K A G D Y S T D A R T
751 GATAATTTGAGTGAGCAAGAAAAATTATTACATATGGTATAA
251 D N L S E Q E K L L H M V *
1

```

图 4 CCV VI 株 M 蛋白基因核苷酸序列及其推导的氨基酸序列

(阴影部分为起始密码子和终止密码子;下划线部分为信号肽;方框部分为潜在的 N-联糖基化位点)

Fig.4 Sequence of M gene of CCV V1 and deduced amino acid sequence
(The initiation and stop codon were shadowed;Signal peptide was underlined,
Potential N-glycosylating sites were covered with box)

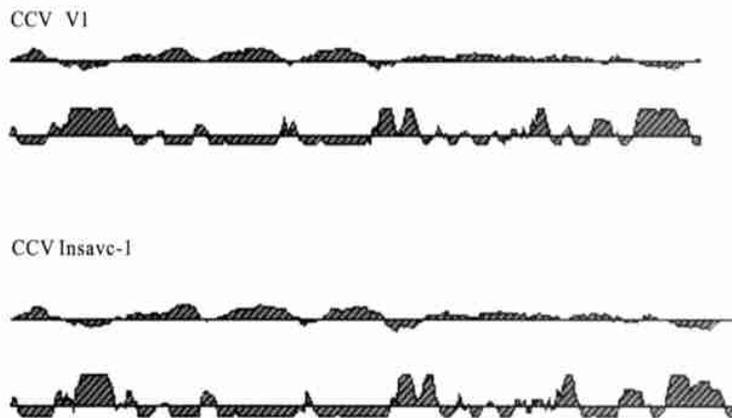


图 5 DNASTAR 软件对推导的 CCV V1 和 Insavc-1 株 M 蛋白疏水性及抗原表位分析

Fig.5 Analysis of hydrophobicity and antigenic index of M protein of CCV V1 and Insavc-1 strain by using DNASTAR software

3 讨论

3.1 冠状病毒膜蛋白的生物学功能

膜蛋白主要包埋在病毒脂质囊膜中,在冠状病

毒粒子构建中起主要作用。Motokawa^[7]在研究 TGEV M 蛋白的二级结构时发现,约 10%的 N 端暴露在病毒的外表面,剩下的约 80 个氨基酸残基(占该分子大小的 1/3)形成 3 个疏水的 α -螺旋区,3

次插入脂膜双层中,形成多次跨膜的蛋白;N 端还有 1 个由 17 个氨基酸残基组成的信号肽,1 个约 40 个残基组成的高度亲水区,其中含有糖基化位点,构成 M 蛋白的外区。本研究对 CCV V1 株推导的 M 蛋白氨基酸序列分析结果与上述研究结果基本一致。

M 蛋白内部区域与核衣壳蛋白相互作用,可能在病毒的装配中起作用,因为病毒的芽生大多发生在 M 蛋白的富集区域。另外,由于 M 蛋白部分位于病毒的表面,与机体的免疫系统直接接触,因此也是诱导机体产生中和抗体的保护性抗原之一。M 蛋白 N 端附近的 2 个糖基化位点和 C 端的 1 个糖基化位点可能与该蛋白的免疫原性密切相关。但

Critine^[8]研究发现,TGEV M 蛋白的 C 端具有免疫优势,针对这个区域的特异性抗体可以中和 TGEV,并能介导补体依赖型 TGEV 感染的细胞融合。

3.2 研究 CCV M 蛋白及其基因的意义

Elia 等^[9]研究发现,自然感染 CCV 的病犬血清中抗 CCV S 糖蛋白抗体虽产生得最早,但持续的时间很短,而抗 M 和 N 蛋白的抗体持续时间很长;在 CCV 的诊断方面,研究 M 和 N 蛋白的意义更大一些。因此,积极开展 CCV M 蛋白及其基因的研究,不但可以进一步弄清 M 蛋白的生物学功能,而且可为 CCV 快速诊断试剂和有效基因工程疫苗的研制奠定良好基础。

[参考文献]

- [1] 殷震,刘景华.动物病毒学[M].第2版.北京:科学出版社,1997.671-703.
- [2] 夏咸柱.养犬大全[M].长春:吉林人民出版社,1993.561-564.
- [3] Tennant B J, Gaskell R C, Jones C J, et al. Studies on the epizootiology of canine coronavirus[J]. Veterinary Record, 1993, 132(2): 7-11.
- [4] 夏咸柱,邹啸环,黄耕,等.犬冠状病毒在我国首次分离成功[J].中国兽医学报,1996,16:58.
- [5] Chomczynski P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction[J]. Analytical Biochemistry, 1987, 162:156-159.
- [6] 乔军,孟庆龄,夏咸柱,等.犬瘟热、犬冠状病毒联合 PCR 检测方法的建立及初步应用[J].西南农业学报,2002,15(1):93-95.
- [7] Motokawa K. Comparison of the amino acid sequence and phylogenetic analysis of the peplomer, integral membrane and nucleocapsid protein of feline, canine and porcine coronavirus[J]. Journal of Microbiology and Immunology, 1996, 40(6): 425-433.
- [8] Critine. Membrane protein molecules of transmissible gastroenteritis coronavirus also expose the carboxy-terminal region on the external surface of the virion[J]. Journal of Virology, 1995, 69:5269-5277.
- [9] Elia G, Decaro N, Tinelli A, et al. Evaluation of antibody response to canine coronavirus infection in dogs by western blotting analysis[J]. New Microbiol, 2002, 25(3): 275-280.

Cloning and sequence analysis of membrane protein gene of canine coronavirus strain V1

QIAO Jun¹, XIA Xian-zhu¹, HU Gui-xue², XIE Zhi-jing¹, YAN Fang¹, YANG Song-tao¹, HUANG Gen¹

(1 Institute of Military Veterinary, Academy of Military Medical Sciences of PLA, Changchun, Jilin 130062, China;

2 College of Animal Science and Technology, Jinlin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118, China)

Abstract: According to membrane protein gene sequence of canine coronavirus strain V1 reported by GenBank, a pair of specific primers was designed and used to amplify M gene. The positive PCR product was purified and ligated with pGEM-T. The correct positive recombinant was used for sequencing. The complete length of M gene of CCV V1 was 789 bp and encoded 263 amino acids. The initiative 17 amino acids was signal peptide. The homology of nucleic acid and amino acid between CCV V1 and Insavc-1 was 91.7% and 90.2% respectively. The different parts mainly exist in front of one third region of protein. Three hydrophobic regions exist in the protein, which denotes that it is a continuous cross-membrane protein. Three N-glycosylating sites were also found in region of 15-17, 38-40 and 234-236 amino acids, which possibly consist of antigenic site on the surface of the protein. Moreover, there were some differences in the hydrophobicity and antigenic index between two strains, which may cause some difference in immunogenicity.

Key words: canine coronavirus; membrane protein gene; gene cloning; sequence analysis