

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.02.01

BPV1 贵州株 L1 基因序列分析及原核表达

张旭^{1,2}, 张海³, 周碧君^{1,2*}, 王开功^{1,2}, 文明^{1,2}, 程振涛^{1,2},
罗引幸^{1,2}, 刘丽娟^{1,2}, 丁尊俄^{1,2}, 赵大杰^{1,2}

(1. 贵州大学动物科学学院, 贵阳 550025; 2. 贵州省动物生物制品工程技术研究中心, 贵阳 550025; 3. 贵阳市动物疫病预防控制中心, 贵阳 550081)

[收稿日期] 2018-10-24 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 02-0001-10 [中图分类号] S852.65

[摘要] 为表达牛乳头瘤病毒 1 型贵州株 (BPV1-GZLZ 株) 衣壳蛋白 L1 基因, 采用 PCR 方法从贵州省六枝特区某规模化养牛场疑似病牛的皮肤肿瘤病料样品中扩增 BPV1 L1 基因, 克隆至 pMD19-T 载体, 测序后进行生物信息学分析; 同时将 BPV1-GZLZ 株 L1 基因克隆于原核表达质粒 pCold I 中, 经 IPTG 诱导 L1 蛋白表达, 并对重组蛋白进行 SDS-PAGE 和 Western blotting 分析。生物信息学分析显示, BPV1-GZLZ 株 L1 基因核苷酸序列长为 1488 bp, 编码 495 个氨基酸, 分子结构式为 C₂₄₈₄H₃₈₈₄N₆₇₈O₇₃₇S₁₆, 理论等电点 (PI) 为 8.68, 二级结构主要包括 α -螺旋、无规则卷曲和 β -折叠为主, 无跨膜结构域和信号肽; BPV1-GZLZ L1 基因序列与 BPV1 参考株的核苷酸和氨基酸同源性均为 99.8%, 处在同一遗传进化分支, 且与 BPV13 和 BPV2、BPV2-GZ01 的亲缘关系较近; Western blotting 结果显示, 经 IPTG 诱导的重组表达蛋白能与 His 单抗产生特异性反应, 条带为 55.6 kD 左右与 SDS-PAGE 结果一致。研究表明, 试验构建了 BPV1-GZLZ 株 L1 基因原核表达载体并成功表达。

[关键词] 贵州株; L1 基因; 序列分析; 原核表达

Sequence Analysis and Prokaryotic Expression of L1 Gene of BPV1 Guizhou Strain

ZHANG Xu^{1,2}, ZHANG Hai³, ZHOU Bi-jun^{1,2*}, WANG Kai-gong^{1,2}, WEN Ming^{1,2}, HU Xing-yi^{1,2},
CHENG Zhen-tao^{1,2}, LUO Yin-xing^{1,2}, LIU Li-juan^{1,2}, DING Zun-e^{1,2}, ZHAO Da-jie^{1,2}

(1. College of Animal Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 2. Guizhou Animal Biological Engineering Technology Research Center, Guiyang 550025, China; 3. Guiyang Animal Disease Prevention and Control Center, Guiyang 550081, China)

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

Abstract: In order to express the capsid protein L1 gene of bovine papillomavirus type 1 Guizhou strain (BPV1-GZLZ strain). The BPV1 L1 gene was amplified from the skin tumor samples of suspected diseased cattle in a

基金项目: 贵州省科学技术厅农业攻关项目 (黔科合 NY[2015]3009-1 号); 贵州省科技平台及人才团队计划 (黔科合平台人才 [2018]5253); 贵州省研究生工作站计划项目 (GZZ2017002)

作者简介: 张旭, 硕士研究生, 从事动物疫病调查与动物传染病学研究。

通讯作者: 周碧君。E-mail: bjzhou@gzu.edu.cn

large-scale cattle farm in Liuzhi District, Guizhou Province by PCR, cloned into pMD19-T vector, and sequenced for bioinformatics analysis. Then L1 gene of BPV1-GZLZ strain was cloned into prokaryotic expression plasmid pCold I, L1 protein expression was induced by IPTG, and SDS-PAGE and Western blotting analysis were performed on recombinant protein. Bioinformatics analysis showed that the nucleotide sequence of L1 gene of BPV1-GZLZ strain was 1488 bp, encoding 495 amino acids, the molecular structure was $C_{2484}H_{3884}N_{678}O_{737}S_{16}$, the theoretical isoelectric point (PI) was 8.68, and the secondary structure mainly consisted of α -helix. Irregular coiling and β -sheet-based, no transmembrane domain and signal peptide; the nucleotide and amino acid homology of BPV1-GZLZ L1 gene sequence and BPV1 reference strain were both 99.8%, in the same genetic evolution branch And the relationship with BPV13 and BPV2, BPV2-GZ01 were closer; Western blotting results showed that the recombinantly expressed protein induced by IPTG could specifically react with His monoclonal antibody, and the band was about 55.6 kDa consistent with SDS-PAGE results. The prokaryotic expression vector of L1 gene of BPV1-GZLZ strain was constructed and successfully expressed in this study.

Key words: Guizhou strain; L1 gene; sequence analysis; prokaryotic expression

牛乳头状瘤(bovine papillomatosis, BP)是由牛乳头状病毒(bovine papillomavirus, BPV)引起牛体表或黏膜的肿瘤性疾病,可引起良性和恶性肿瘤^[1-2]。良性肿瘤在一般情况下可自行消退,但当环境因素和遗传因素协同作用时会导致恶性肿瘤,导致牛死亡^[3-4]。在集约化饲养场牛乳头状瘤十分普遍,其发病率较高,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^[5],在一定程度上造成了较大的经济损失。

BPV 为无囊膜病毒,直径为 55~60 nm 的正二十面体,其遗传物质的长度约为 7000~8000 bp 双链闭环 DNA 分子^[6]。BPV 基因组含有 3 个区域:早期转录区(E 区)、晚期转录区(L 区)和非编码区(NCR)^[7],L 区编码主要衣壳蛋白 L1 和次要衣壳蛋白 L2。BPV L1 基因编码的衣壳蛋白暴露在病毒粒子表面,可能与病毒感染及免疫有关^[8];研究表明 BPV L1 蛋白具有 B 细胞特异性抗原表位,可诱导机体产生中和性抗体,激发保护性免疫,是进行预防免疫的主要抗原^[9-10]。因此,BPV L1 蛋白是研制预防性疫苗的候选基因,也是临床上诊断 BPV 理想抗原^[11],对牛乳头状瘤的诊断方法的建立具有重要价值。本试验通过对 BPV1 贵州株(BPV1-GZLZ 株)L1 基因进行克隆、测序分析、构建重组质粒 pCold-BPV1-L1,并进行 IPTG 诱导表达 L1 重组

蛋白,经 SDS-PAGE 和 Western blotting 分析,为 BPV1 诊断试剂和基因工程疫苗的研制奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料 牛乳头状瘤病毒 1 型贵州株(BPV1-GZLZ 株)、大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞、大肠杆菌 BL21 感受态细胞、pCold I 原核表达载体均由贵州省动物疫病与兽医公共卫生重点实验室保存;EcoR I、Xho I、异丙基硫基半乳糖苷购自宝生物工程(大连)有限公司;兔源 BPV1 L1 多克隆抗体由贵州省动物生物制品工程技术研究中心制备;2 \times Taq PCR MasterMix、DNA Marker、DNA 提取试剂盒、His 单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(H+L)、DAB 辣根过氧化物酶显色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;Tween-20、PVDF 膜购自北京索莱宝科技有限公司,其他均为分析纯化。

1.2 引物设计与合成 根据 GenBank 公布的 BPV1 L1 基因序列,设计特异性引物,上游引物 P1: 5'-CCGCTCGAGATGGCGTTGTGGCAACAAGGCCAGAAGCTG-3';下游引物 P2: 5'-CGGAATCTTATTTTTTTTTTTTTTTTGCAGGCTTACTGG-3';预期扩增片段长 1488 bp,引物由上海英潍捷基公司合成。

1.3 目的片段扩增及纯化 采用 DNA 提取试剂盒

对病料组织总 DNA 进行提取,以此为模板进行 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。扩增产物进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 BPV1-GZLZ 株 L1 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 μ g/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-L1,送往赛默飞世尔科技(中国)有限公司测序。利用 DNASTar、Mega 5.0 等软件对 BPV1-GZLZ 株与国内外主要的 BPV 参考毒株(表 1)的核苷酸及其推导的氨基酸序列进行比对分析,并绘制系统进化树。

表 1 GenBank 中登陆的 BPV 参考株序列信息

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.	分离地 Source	分离年份 Year
BPV1	<i>Bos taurus</i> Papillomavirus 1	<i>Deltapapillomavirus</i>	X02346	-	2008
BPV2	<i>Bos taurus</i> Papillomavirus 2	<i>Deltapapillomavirus</i>	M20219	-	1988
BPV2-GZ01	<i>Bos taurus</i> Papillomavirus 2	<i>Deltapapillomavirus</i>	KX113620	中国	2016
BPV3	<i>Bos taurus</i> Papillomavirus 3	<i>Xipapillomavirus</i>	AF486184	美国	2002
BPV4	<i>Bos taurus</i> Papillomavirus 4	<i>Xipapillomavirus</i>	X05817	英国	1998
BPV5	<i>Bos taurus</i> Papillomavirus 5	<i>Epsilonpapillomavirus</i>	AF457465	美国	2002
BPV6	<i>Bos taurus</i> Papillomavirus 6	<i>Xipapillomavirus</i>	AJ620208	-	2005
BPV7	<i>Bos taurus</i> Papillomavirus 7	<i>unnamed</i>	DQ217793	日本	2011
BPV8	<i>Bos taurus</i> Papillomavirus 8	<i>Epsilonpapillomavirus</i>	DQ098913	-	2007
BPV9	<i>Bos taurus</i> Papillomavirus 9	<i>Xipapillomavirus</i>	AB331650	-	2007
BPV10	<i>Bos taurus</i> Papillomavirus 10	<i>Xipapillomavirus</i>	AB331651	日本	2007
BPV11	<i>Bos taurus</i> Papillomavirus 11	<i>Xipapillomavirus</i>	AB543507	日本	2013
BPV12	<i>Bos taurus</i> Papillomavirus 12	<i>Xipapillomavirus</i>	JF834523	日本	2011
BPV13	<i>Bos taurus</i> Papillomavirus 13	<i>Deltapapillomavirus</i>	JQ798171	巴西	2013
BPV14	<i>Bos taurus</i> Papillomavirus 14	<i>Deltapapillomavirus</i>	KP276343	新西兰	2015

1.5 BPV1-GZLZ 株 L1 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 DNASTar 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 SWISS-MODEL (<http://www.swissmodel.expasy.org>) 在线预测蛋白质的三级结构。

1.6 原核表达载体构建

1.6.1 酶切与连接 用 EcoR I 和 Xho I 对构建的质粒 pMD19-T-L1 和原核表达载体 pCold I 进行双酶切,37 $^{\circ}$ C 水浴过夜,酶切体系为 40 μ L;10 \times H

Buffer 4 μL , *EcoRI*、*XhoI*各 2 μL , pColdI/pMD19-T-L1 20 μL 、ddH₂O 12 μL 。酶切后采用胶回收试剂盒进行纯化回收,将目的片段与线性 pCold I 16 $^{\circ}\text{C}$ 连接过夜,连接体系为 10 μL :目的片段 4 μL 、线性 pCold I 4 μL 、Solution I 5 μL 。

1.6.2 重组质粒转化 将连接产物转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,利用含氨基青霉素 (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 PCR 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 pColdI-BPV1-L1,送往赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司测序。

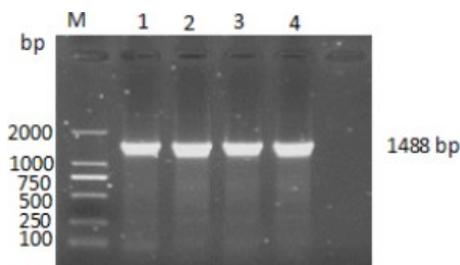
1.7 重组蛋白诱导表达与鉴定 首先对含有阳性重组质粒的 BL21 表达宿主菌进行诱导,再进行温度和诱导条件的优化,按 1 : 100 的比例接种于含氨基青霉素抗性的 LB 培养液中,37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养至 OD₆₀₀ \cong 0.6 左右,加入 IPTG (终浓度为 1.0 mmol/L),同时设立无 IPTG 诱导对照组,37 $^{\circ}\text{C}$ 继续震荡培养 5 h。取诱导表达菌液,离心取沉淀,用 PBS 洗涤一次,用 PBS 悬浮沉淀,吹匀置于冰上超声破碎处理,12000 r/min 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min,分别收集上清和沉淀,并对上清、沉淀和无 IPTG 诱导组用 5 \times SDS 蛋白上样缓冲液沸水浴 4 min 制样,用 12% SDS-PAGE 鉴定。之后对重组原核表达蛋白进行 Western blotting 鉴定,一抗为 His-tag 抗体 (稀释度为 1 : 1000),

二抗为辣根过氧化物酶 (HRP) 标记山羊抗小鼠 IgG (H+L) (稀释度为 1 : 1000),最后加入二氨基联苯胺 (DAB)-H₂O₂ 避光显色,分析结果。

2 结果与分析

2.1 BPV1-GZLZ 株 L1 基因 PCR 扩增 以提取的 BPV1-GZLZ 株阳性组织病料 DNA 为模板,进行 L1 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 1488 bp 的条带,与预期结果相符,结果见图 1。

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 DNASTar 软件进行序列拼接,获得 BPV1-GZLZ 株 L1 基因核苷酸序列。由图 2 可知,L1 基因核苷酸序列长为 1488 bp,编码 495 个氨基酸。



M: DL2000 DNA Marker; 1-4: 扩增产物

M: DL2000 DNA Marker; 1-4: Amplification products

图 1 BPV1-GZLZ 株 L1 基因 PCR 扩增电泳图

Fig 1 Amplification of L1 gene of BPV1-GZLZ by PCR

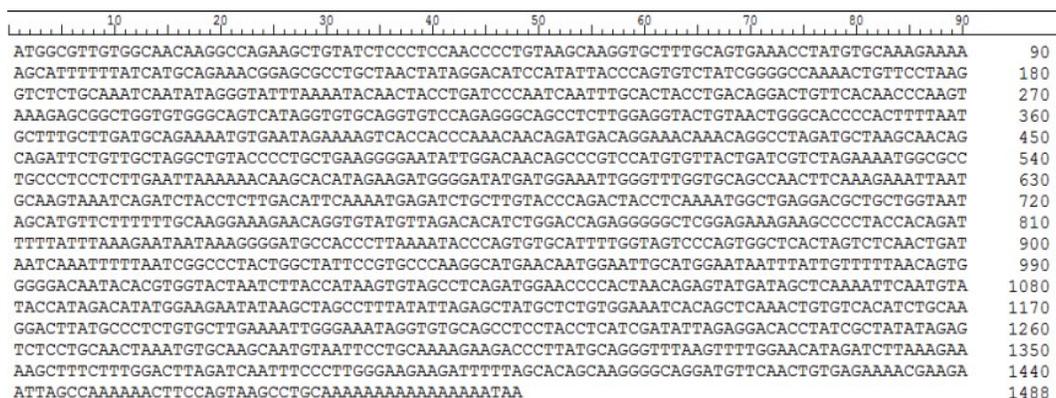


图 2 BPV1-GZLZ 株 L1 基因测序结果

Fig 2 Sequencing result of L1 gene of BPV1-GZLZ

2.2.1 BPV1-GZLZ 株 L1 基因核苷酸同源性分析
 将克隆的 BPV1-GZLZ L1 基因序列与 GenBank 上公布的 15 株牛乳头状瘤病毒 14 个基因型的 L1 基因进行核苷酸比对分析。由图 3 可知, BPV1-GZLZ L1 基因序列与牛乳头状瘤病毒 1 型 BPV1(登录号:

X02346) 的核苷酸序列同源性为 99.8%, 与 NCBI 收录的另外两株 BPV2(登录号: JQ79817)、BPV2-GZ01(登录号: KX113620) 的同源性分别为 82.9%、82.8%, 与 NCBI 收录 1 株 BPV13(登录号: JQ79817) 的同源性为 83.9%。

		Percent Identity																	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		
Divergence	1	■	82.9	99.1	68.1	46.9	44.4	53.3	47.8	41.4	53.5	44.8	45.7	44.7	35.4	87.7	82.9	1	BPV2.seq
	2	16.8	■	82.8	68.8	45.6	43.3	53.5	44.2	40.9	54.7	44.0	39.2	44.8	34.4	83.7	99.8	2	BPV1.seq
	3	0.9	16.8	■	67.8	46.5	44.0	53.5	47.7	40.4	53.9	44.4	45.7	44.6	34.9	87.6	82.8	3	BPV2-GZ01.seq
	4	33.2	31.8	33.5	■	44.3	45.0	54.1	43.8	40.4	53.9	44.4	44.8	44.2	39.9	68.4	68.7	4	BPV14.seq
	5	63.0	65.3	63.3	62.8	■	67.4	42.8	66.5	45.2	42.5	67.0	65.3	67.7	60.8	45.5	45.7	5	BPV3.seq
	6	64.0	67.5	64.3	63.8	32.8	■	43.3	66.5	42.2	44.1	69.4	64.6	74.8	56.6	44.3	43.5	6	BPV4.seq
	7	53.6	54.4	53.1	52.6	72.6	73.5	■	43.8	38.5	70.6	44.4	39.3	43.0	40.6	52.9	53.5	7	BPV5.seq
	8	57.8	64.9	58.0	64.4	33.1	34.6	70.3	■	39.8	43.8	66.5	64.1	66.4	60.1	46.4	44.2	8	BPV6.seq
	9	63.4	60.8	63.5	66.4	68.3	69.7	76.2	67.8	■	38.6	44.1	42.6	43.3	40.6	42.2	40.8	9	BPV7.seq
	10	53.0	52.7	52.9	52.6	71.1	68.4	31.3	67.0	76.2	■	41.3	42.3	40.9	39.5	54.4	54.7	10	BPV8.seq
	11	63.4	68.1	63.4	66.8	31.3	31.5	67.6	35.2	65.3	72.0	■	66.5	70.6	53.7	44.4	43.9	11	BPV9.seq
	12	61.6	66.8	62.3	63.7	35.6	36.6	72.3	37.8	68.0	70.4	33.9	■	64.5	41.9	40.4	39.2	12	BPV10.seq
	13	65.2	65.9	65.2	68.7	32.3	25.3	73.4	33.9	65.2	70.1	30.0	35.4	■	50.5	44.7	45.1	13	BPV11.seq
	14	57.5	61.8	58.3	56.5	38.5	40.7	65.5	39.3	54.9	67.0	41.0	38.7	40.8	■	35.3	34.5	14	BPV12.seq
	15	12.1	15.6	12.1	33.0	66.4	63.8	55.5	60.6	60.2	51.3	65.9	62.8	65.1	57.7	■	83.9	15	BPV13.seq
	16	16.9	0.2	16.9	31.9	65.1	67.1	54.5	64.9	61.2	52.7	68.1	66.6	65.3	61.4	15.5	■	16	BPV1-GZLZ.seq
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		

图 3 BPV1-GZLZ 株 L1 基因的核苷酸同源性分析

Fig 3 Nucleotide homology analysis of L1 gene of BPV1-GZLZ

2.2.2 BPV1-GZLZ 株 L1 基因编码蛋白氨基酸同源性分析
 采用 DNASTar 软件分析出 BPV1-GZLZ L1 基因的氨基酸序列, 并与 GenBank 中公布的 15 株牛乳头状瘤病毒 14 个基因型的 L1 基因编码氨基酸序列作同源性分析。由图 4 可知, BPV1-GZLZ L1 基因氨基酸序列与牛乳头状瘤病毒 1 型 BPV1

(登录号: X02346) 的氨基酸序列同源性为 99.8%; 与 NCBI 收录的另外两株 BPV2(登录号: JQ79817)、BPV2-GZ01(登录号: KX113620) 的同源性分别为 92.1%、91.3%, 与 NCBI 收录 1 株 BPV13(登录号: JQ79817) 的同源性为 92.7%。

		Percent Identity																	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		
Divergence	1	■	92.1	98.6	45.8	42.4	58.2	45.4	38.6	57.6	43.2	43.6	44.0	43.8	94.6	79.3	92.1	1	BPV2.pro
	2	8.1	■	91.3	45.4	42.1	59.2	45.6	38.3	58.0	42.5	44.0	43.3	42.5	92.7	79.8	99.8	2	BPV1.pro
	3	1.2	9.0	■	44.8	41.8	58.4	44.4	37.8	57.8	42.4	43.6	43.4	43.0	94.4	79.1	91.3	3	BPV2-GZ01.pro
	4	75.0	75.6	77.3	■	72.4	42.0	73.5	42.5	41.6	74.8	71.8	72.9	63.9	45.4	43.9	45.4	4	BPV3.pro
	5	80.1	81.3	81.9	29.8	■	41.2	70.4	40.6	41.2	77.0	68.3	82.2	60.7	43.0	41.1	42.1	5	BPV4.pro
	6	55.8	53.3	55.0	83.4	85.9	■	42.4	38.4	81.0	40.8	41.2	40.8	41.2	59.2	59.4	59.2	6	BPV5.pro
	7	75.6	75.0	77.8	29.8	33.6	85.9	■	42.5	42.8	73.1	66.6	68.4	65.0	46.0	44.5	45.6	7	BPV6.pro
	8	95.7	96.0	97.7	79.3	85.8	95.1	79.9	■	37.0	43.5	40.8	41.2	42.1	38.2	39.6	38.3	8	BPV7.pro
	9	55.0	53.7	54.6	86.5	84.7	21.7	84.0	98.5	■	41.0	41.4	41.6	42.4	58.0	58.4	58.0	9	BPV8.pro
	10	78.1	80.4	79.9	24.9	23.9	87.5	30.3	80.1	87.5	■	72.9	78.1	62.0	42.8	43.6	42.5	10	BPV9.pro
	11	83.1	83.1	83.7	27.9	35.5	84.9	39.3	90.8	86.8	29.3	■	69.8	58.2	44.4	41.3	44.0	11	BPV10.pro
	12	80.7	83.1	81.9	28.5	18.2	90.3	35.1	84.3	87.8	21.4	33.3	■	62.6	44.6	43.7	43.3	12	BPV11.pro
	13	79.0	81.2	80.7	38.2	42.2	86.1	38.2	86.9	82.6	36.1	35.8	39.9	■	43.0	41.3	42.5	13	BPV12.pro
	14	5.4	7.4	5.6	76.2	77.8	54.2	74.5	98.4	54.6	79.9	83.1	79.6	80.7	■	79.9	92.7	14	BPV13.pro
	15	22.5	21.8	23.0	76.7	77.6	53.3	75.6	91.4	54.1	73.8	84.3	78.4	80.1	21.7	■	79.8	15	BPV14.pro
	16	8.1	0.0	9.0	75.6	81.3	53.3	75.0	96.0	53.7	80.4	83.1	83.1	81.2	7.4	21.8	■	16	BPV1-GZLZ.pro
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		

图 4 BPV1-GZLZ 株 L1 基因编码蛋白的氨基酸同源性分析

Fig 4 Amino acid homology analysis of L1 gene of BPV1-GZLZ

2.2.3 BPV1-GZLZ 株 L1 基因系统进化树分析

将 BPV1-GZLZ 株 L1 基因与国内外发表的 BPV 不同毒株 L1 基因的核苷酸序列采用 DNASTar 软件绘制遗传进化树。结果显示,BPV1-GZLZ 株与 BPV1

(登录号:X02346)处在同一遗传进化分支(图 5)。由图 5 可知,BPV1-GZLZ 株与 BPV13(登录号:JQ79817)和 BPV2(登录号:JQ79817)、BPV2-GZ01(登录号:KX113620)的亲缘关系较近。

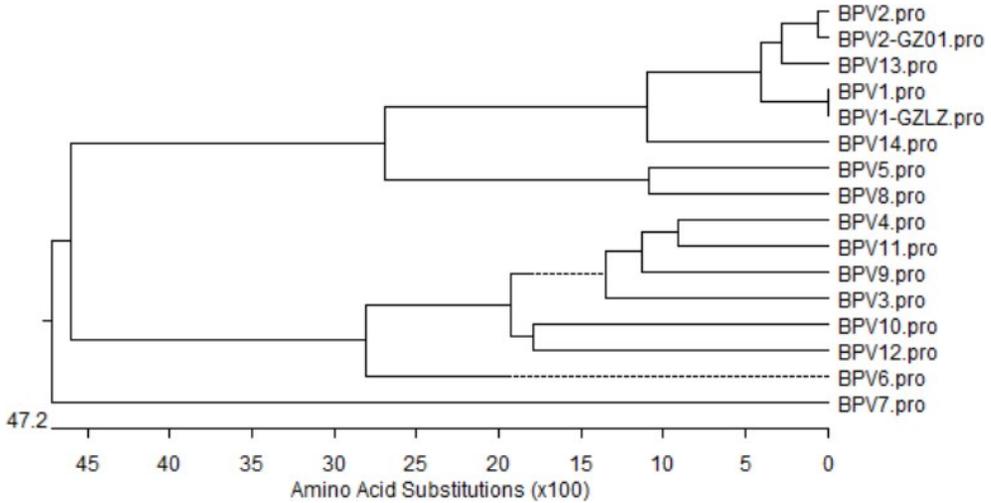


图 5 BPV1-GZLZ 株 L1 基因核苷酸序列的系统进化树

Fig 5 Phylogenetic tree of L1 gene BPV1-GZLZ on nucleotide sequence

2.3 BPV1-GZLZ 株 L1 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。L1 蛋白分子质量为 55.55122 ku,分子结构式为 $C_{2484}H_{3884}N_{678}O_{737}S_{16}$,理论等电点(PI)为 8.68。其氨基酸组成中 Leu 最多,占到 9.1%,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 68 个,占 11.7%;酸性氨基酸有 2 种(Asp、Glu),共 52 个,占 10.5%;亲水性氨基酸有 6 种(Asp、Glu、His、Lys、Ser、Thr),共 165 个,占 33.33%;疏水性氨基酸 9 种(Ala、Ile、Pht、Leu、Met、Pro、Val、Trp、Tyr),共 217 个,占 43.84%,推测 L1 蛋白为碱性蛋白。L1 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 39.38,低于阈值 40,属于稳定类蛋白。

2.4 BPV1-GZLZ 株 L1 基因 B 细胞表位预测

2.4.1 L1 基因编码蛋白二级结构预测 采用 SOPMA 在线服务器预测 L1 基因编码蛋白的二级结构(图 6)。

由图 6 可知,BPV1-GZLZ 株 L1 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 21.01%、12.12%、38.59% 和 28.28%。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 L1 基因编码蛋白 B 细胞多参数分析 采用 DNASTar 程序包中的 Protean 软件综合分析预测 L1 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(图 7)。由图 7 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。

2.5 BPV1-GZLZ 株 L1 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 L1 基因氨基酸序列保守结构域(图 8),由图 8 可知,没有发现具有明显特征的保守结构域。



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 BPV1-GZLZ L1 基因编码蛋白二级结构预测

Fig 6 Secondary structure prediction of BPV1-GZLZ L1 protein

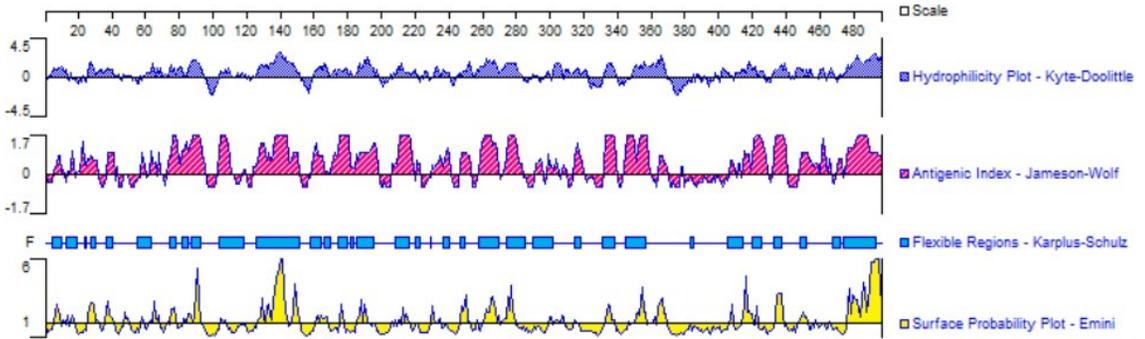


图 7 BPV1-GZLZ L1 蛋白 B 细胞表位参数预测

Fig 7 B cell epitope prediction for L1 protein of BPV1-GZLZ by the DNASTar method

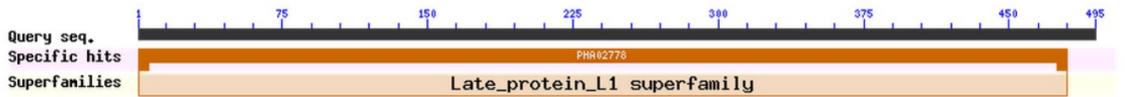


图 8 BPV1-GZLZ L1 基因编码蛋白保守结构域分析

Fig 8 Conserved domain analysis of L1 protein of BPV1-GZLZ

2.6 BPV1-GZLZ 株 L1 基因编码蛋白的跨膜结构预测 采用 TMHMM2.0 Server 在线服务器对 L1 蛋白跨膜结构域进行预测和分析(图 9)。由图 9 可知, BPV1-GZLZ L1 基因编码蛋白发现无跨膜结构域。

2.7 BPV1-GZLZ 株 L1 基因编码蛋白信号肽预测 采用 SignalP4.1 在线服务器对 BPV1-GZLZ 株 L1 蛋白序列中是否存在潜在的信号肽进行预测。结果显示,此蛋白无信号肽,即为非分泌蛋白(图 10)。

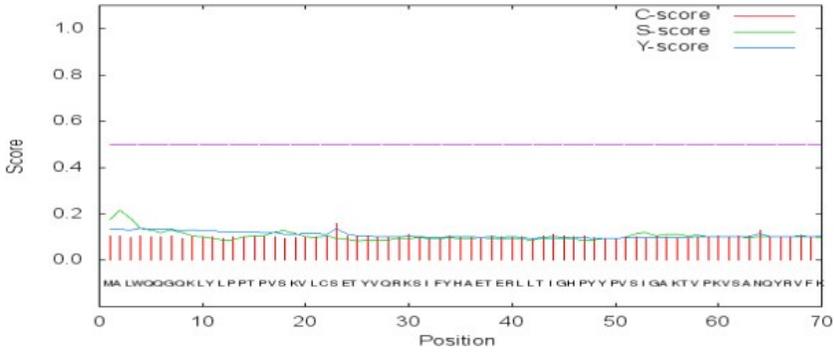


图 9 L1 蛋白跨膜结构域预测

Fig 9 Prediction of trans membrane domains of L1 protein

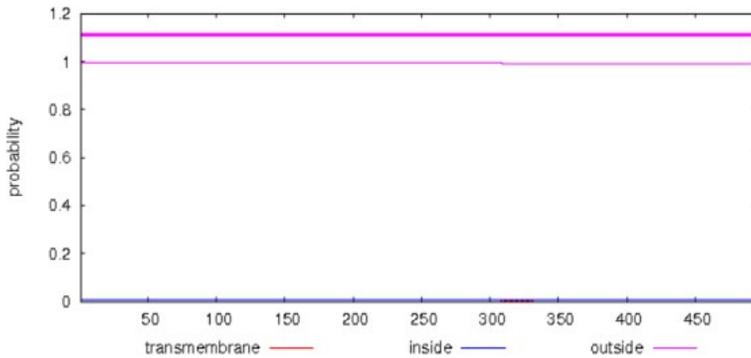
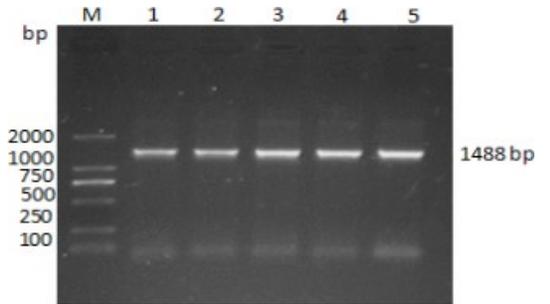


图 10 L1 蛋白信号肽预测

Fig 10 The signal peptide analysis of L1 protein

2.8 原核表达载体构建 将克隆的质粒 pMD19-T-BPV1-L1 与原核表达载体 pCold I 同时用 *EcoR* I 和 *Xho* I 进行双酶切,酶切产物用 1.2%的琼脂糖凝胶电泳检测,均能扩增出相应的目的条带(图 11),将回收的目的片段进行纯化回收,构建原核表达载体 pColdI-BPV1-L1,将构建的质粒进行菌液 PCR 鉴定(图 12),送公司测序。

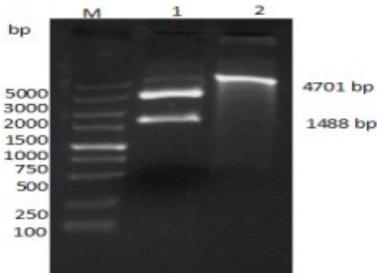


M:DL2000 DNA Marke;1-5:质粒 PCR 鉴定结果

M;DL2000 DNA Marke;1-5:Plasmid PCR identification results

图 12 原核表达载体 pCold I 双酶切

Fig 12 Prokaryotic expression vector pCold I double digestion

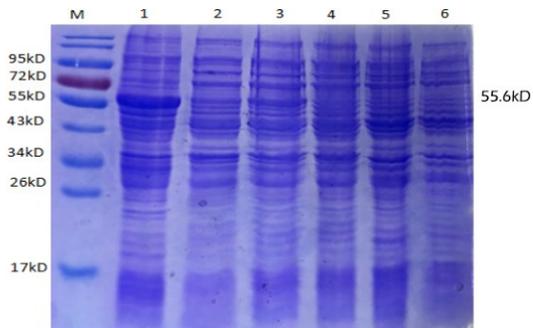


M;DL5000 DNA Marke;1;pMD19-T-BPV1-L1;2;pCold I

图 11 质粒 pMD19-T-BPV1-L1 双酶切

Fig 11 Plasmid pMD19-T-BPV1-L1 double digestion

2.9 pColdI-BPV1-L1 原核表达及鉴定结果 对含有阳性重组质粒 pColdI-BPV1-L1 的 BL21 表达宿主菌进行温度和诱导表达,12%的 SDS-PAGE 电泳鉴定结果(图 13)显示,重组表达蛋白主要以包涵体形式存在,重组蛋白分子量约为 55.6 kD,与理论值一致。



M: 预染的蛋白分子量标准;1: pColdI-BPV1-L1 转入 BL21 菌经超声诱导菌液沉淀,2:pColdI-BPV1-L1 转入 BL21 菌经超声诱导菌液上清;3: pColdI-BPV1-L1 转入 BL21 菌诱导菌液未破碎;4: pColdI-BPV1-L1 转入 BL21 菌未诱导菌液;5: pColdI 转入 BL21 菌诱导菌液;6: pColdI 转入 BL21 菌未诱导菌液

M:Pre-stained protein molecular weight standard; 1:Transfer of pColdI-BPV1-L1 into BL21 bacteria by ultrasound-induced bacterial precipitation; 2:Transfer of pColdI-BPV1-L1 into BL21 bacteria by ultrasonic-induced bacterial supernatant; 3:pColdI-BPV1-L1 transferred into BL21 bacteria induced bacterial liquid was not broken; 4:pColdI-BPV1-L1transferred into BL21 bacteria did not induce bacterial liquid; 5: pColdI transferred into BL21 bacteria-inducing bacterial solution; 6: pColdI transferred to BL21 bacteria did not induce bacterial liquid

图 13 重组 pColdI-BPV1-L1 蛋白表达产物的鉴定

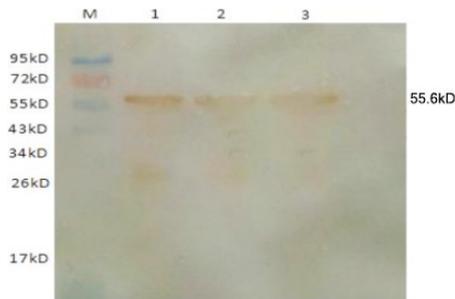
Fig 13 Identification of recombinant pColdI-BPV1-L1 protein expression product

2.10 pColdI-BPV1-L1 重组原核表达蛋白的鉴定结果 Western blotting 结果显示,经 IPTG 诱导的重组表达蛋白能与 His 单抗和已制备好的兔源 BPV1 LI 多克隆抗体产生特异性反应产生特异性反应,条带为 55.6 kD 左右,与 SDS-PAGE 结果一致,结果见图 14 和图 15。

3 讨论与结论

牛乳头状瘤病在 1929 年被首次报道,现在世界各地都广泛流行并传播^[12]。在我国新疆、东北和海南地区近两年也有该病的报道^[13]。BPV 会影响牛产奶量出现下降和皮革质量、生长性能等,严重的会导致牛死亡^[14]。贵州省为快速发展养牛业,从外地引进优质牛种,牛交易过于频繁,给 BPV 的感染带来了巨大的潜在风险,也给该省持续健康发展的养牛业带来巨大的挑战。

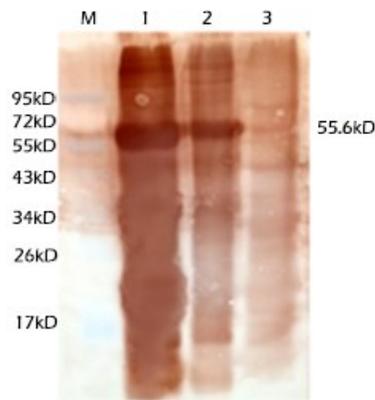
本研究应用 PCR 扩增、克隆测序、生物信息学分析,构建了 pCold I-BPV1-L1 原核表达质粒并且



M: 预染的蛋白分子量标准;1-3: 诱导的 pColdI-cLSm14A 重组菌; M:Pre-stained protein molecular weight standard; 1-3:Induced recombinant pColdI-cLSm14A

图 14 重组蛋白 pColdI-BPV1-L1 的 Western blotting 鉴定

Fig 14 Western blotting identification of recombinant protein pColdI-BPV1-L1



M: 预染的蛋白分子量标准;1-2: 诱导的 pColdI-BPV1-L1 重组菌; 3:空载体 pColdI

图 15 重组蛋白 rHis-L1 的 Western blotting 鉴定

Fig 15 Identification of recombinant protein rHis-L1 by Western blotting

成功诱导表达。结果显示 BPV1-GZLZ 株 L1 基因序列全长是 1488 bp, 编码 495 个的氨基酸, 分子结构式为 C₂₄₈₄H₃₈₈₄N₆₇₈O₇₃₇S₁₆, 二级结构主要包括 α-螺旋、无规则卷曲和 β-折叠为主。彭昊等^[15] 研究结果显示,BPV-GX-LA150909 与 BPV1 参考株无论是基因组还是 L1 基因同源性非常高,而本研究中 BPV1-GZLZ L1 基因序列与牛乳头状瘤病毒 1 型参考株 BPV1 的核苷酸和氨基酸同源性均为 99.8%,BPV1-GZLZ 株与 BPV1 参考株处在同一遗传进化分支,说明 BPV1-GZLZ 株与 BPV-GX-LA150909 株可能均来自相同的来源。本研究采用外源基因常用的大肠杆菌表达系统,与酵母、昆虫、

细胞等原核表达系统相比,大肠杆菌表达系统具有培养简单、成本低、生长繁殖快、表达量高等优点。实验选用了具有良好表达效果的 pCold I 原核载体,该载体为氨苄抗性,载体带有 His-tag 标签,为方便进行后续的蛋白纯化实验。SDS-PAGE 和 Western blotting 检测结果显示,重组表达蛋白主要以包涵体的形式存在,且与 His 单抗产生特异性反应,与预期结果相同,证明 L1 基因在大肠杆菌 BL21 中得到了有效的表达;该蛋白具有均匀的柔韧性和良好的亲水性,其抗原性和表面可及性也较高,但能否刺激机体产生体液免疫、产生特异性抗体,还需进一步研究验证。

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] Ataseven V S, Özgür Kanat, Ergün Y. Molecular identification of bovine papillomaviruses in dairy and beef cattle: First description of Xi- and Epsilon papillomaviruses in Turkey[J]. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 2016, 40(6):757-763.
- [3] Leal A M, Ferraz O P, Carvalho C, *et al.* Quercetin induces structural chromosomal aberrations and uncommon rearrangements in bovine cells transformed by the E7 protein of bovine papillomavirus type 4[J]. *Veterinary & Comparative Oncology*, 2010, 1(1):15-21.
- [4] Borzacchiello G, Roperto F. Bovine papillomaviruses, papillomas and cancer in cattle[J]. *Veterinary Research*, 2008, 39(5):45.
- [5] Modis Y, Trus B L, Harrison S C. Atomic model of the papillomavirus capsid[J]. *Embo Journal*, 2014, 21(18):4754-4762.
- [6] Campo M S. Papillomavirus and disease in humans and animals. [J]. *Veterinary & Comparative Oncology*, 2010, 1(1):3-14.
- [7] Pang F, Shi Q, Du L, *et al.* Complete genome sequence of bovine papillomavirus genotype 13 from local yellow cattle in Hainan province, China.[J]. *Genome Announcements*, 2014, 2(6). doi: 10.1128/genomeA.01087-14.
- [8] Doorbar J. The papillomavirus life cycle[J]. *Journal of Clinical Virology*, 2005, 32(1 Suppl):7-15.
- [9] Freitas A C, Silva, M. A R, *et al.* Recent insights into Bovine Papillomavirus [J]. *African Journal of Microbiology Research*, 2011, 5(33):6004-6012.
- [10] Lowy D R, Frazer I H. Chapter 16: Prophylactic human papillomavirus vaccines [J]. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 2003, 2003(31):111-116.
- [11] McGrath M, de Villiers G K, Shephard E, *et al.* Development of human papillomavirus chimaeric L1/L2 candidate vaccines [J]. *Archives of Virology*, 2013, 159(10):2079-2088.
- [12] Ogawa T, Tomita Y, Okada M, *et al.* Broad-spectrum detection of papillomaviruses in bovine teat papillomas and healthy teat skin [J]. *Journal of General Virology*, 2004, 85(Pt 8):2191-2197.
- [13] 梁辰, 姜晓文, 刘旭, 等. 牛乳头状瘤的病理学观察及其病毒基因型分析[J]. *中国预防兽医学报*, 2013, 35(5):423-425.
Liang C, Jiang X W, Liu X, *et al.* The pathologic examination of bovine papilloma and the virus genotype analysis [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2013, 35(5):423-425.
- [14] Lima E G, Lira R C, Jesus A L, *et al.* Development of a DNA-based vaccine strategy against bovine papillomavirus infection, involving the E5 or L2 gene [J]. *Genetics & Molecular Research* Gmr, 2014, 13(1):1121-1126.
- [15] 彭昊, 吴翠兰, 李军, 等. 广西黄牛乳头状瘤病毒的鉴定及其基因组序列分析[J]. *南方农业学报*, 2018, 49(3):563-571.
Peng H, Wu C L, Li J, *et al.* Identification of bovine papillomavirus and genome sequence analysis for cattle in Guangxi [J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2018, 49(3):563-571.

(编辑:李文平)