

于頔滢, 赵登率, 张远航, 等. 羊轮状病毒 GS2023 株 NSP2 基因克隆及序列分析 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (4): 121-129.

YU D X, ZHAO D S, ZHANG Y H, et al. Cloning and sequence analysis of NSP2 gene of sheep rotavirus GS2023 strain [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (4): 121-129.

羊轮状病毒 GS2023 株 NSP2 基因克隆及序列分析

于頔滢^{1,2}, 赵登率², 张远航², 李平², 王天宇², 张克山²,
高寒², 覃丽梅², 赵孟孟^{2*}, 李家奎^{1*}

(1. 西藏农牧学院动物科学学院, 西藏 林芝 860114; 2. 佛山大学动物科技学院, 广东 佛山 528225)

摘要: 为研究羊轮状病毒 NSP2 蛋白的结构和功能, 以羊轮状病毒 GS2023 株 cDNA 为模板对 NSP2 基因进行 PCR 扩增与克隆, 并利用多种生物信息学分析预测软件分析 NSP2 的生物信息学特征。结果: NSP2 基因的开放阅读框长度为 954 bp, 编码 317 个氨基酸; NSP2 属于亲水性、稳定蛋白, 不存在信号肽; 亚细胞定位预测表明其主要定位于细胞质和细胞核中, 属于非跨膜蛋白; 该蛋白含有 36 个糖基化位点以及 49 个磷酸化位点; 二级结构由 α 螺旋结构、延伸链和无规则卷曲构成, 三级结构则呈自身首尾相连结构; NSP2 蛋白与国内外轮状病毒株的氨基酸相似性为 90.2%~98.7%; GS2023 株与国内牛源轮状病毒株 SCMY1 和 SCMY2 氨基酸对比发现在第 38 位由赖氨酸突变为精氨酸, 与国内多种羊源毒株和牛源毒株氨基酸对比发现在第 100、202 位分别由丝氨酸突变为天冬酰胺、由缬氨酸突变为异亮氨酸; 系统发育进化树分析结果显示, GS2023 株与国内牛源轮状病毒株遗传距离最近, 与其他羊源轮状病毒遗传距离较远。本研究成功克隆羊轮状病毒 NSP2 基因并分析 NSP2 蛋白的生物学特征, 为进一步研究 NSP2 蛋白的结构和功能提供理论参考。

关键词: 羊; 轮状病毒; NSP2; 序列分析; 系统发育进化分析

中图分类号: S852 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-5130(2025)04-0121-09

Cloning and sequence analysis of NSP2 gene of sheep rotavirus GS2023 strain

YU Dixi^{1,2}, ZHAO Dengshuai², ZHANG Yuanhang², LI Ping², WANG Tianyu², ZHANG Keshan²,
GAO Han², QIN Limei², ZHAO Mengmeng^{2*}, LI Jiakui^{1*}

(1. Tibetan Academy of Agriculture and Animal Sciences, Nyingchi 860114, China;
2. College of Animal Science and Technology, Foshan University, Foshan 528225, China)

Abstract: In order to study the structure and function of sheep rotavirus NSP2 protein, the cDNA of a sheep rotavirus GS2023 strain was used as a template to amplify and clone the NSP2 gene by PCR, and various bioinformatics analyses and prediction software were used to analyze the bioinformatics characteristics of NSP2. The results showed that the open reading frame of the NSP2 gene was 954 bp, encoding 317 amino acids. NSP2 was a hydrophilic and stable protein, with no signal peptide. The prediction of subcellular localization showed that it was mainly located in cytoplasm and nucleus and belonged to non-transmembrane protein. The NSP2 protein contained 36 glycosylation sites and 49 phosphorylation sites. Its secondary structure was composed of α helix structure, extended chain and random curl, while its tertiary structure was connected end to end. The amino acid similarity between the NSP2 protein and the rotavirus strains in China and in the world was 90.2%~98.7%. Compared with bovine rotavirus strains SCMY1 and SCMY2 in China, the amino acids of GS2023 were mutated from lysine to arginine at position 38, and from serine to asparagine and from valine to isoleucine at positions 100 and 202, respectively. The phylogenetic tree analysis showed that the genetic distance between the GS2023 strain and the bovine rotavirus strains in China was the closest, but it was far from other sheep rotaviruses. In this study, the NSP2 gene of a sheep rotavirus was successfully cloned and the biological characteristics of the NSP2 protein were analyzed, which provided theoretical reference for further research on the structure and function of the NSP2 protein.

Keywords: sheep; rotavirus; NSP2; sequence analysis; phylogenetic analysis

收稿日期: 2024-07-26; 修回日期: 2025-01-24

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2023YFD1801302, 2023YFD1801301); 国家肉牛牦牛产业技术体系项目 (CARS-37); 佛山大学高层次人才研究创业项目 (CGZ07001)

第一作者: 于頔滢, 女, 硕士研究生

* 通信作者: 李家奎, 博士, 教授, 主要从事动物群发性普通病、牦牛疾病诊断防控、高原动物疾病防治方面的研究, E-mail: lij210@mail.hazu.edu.cn; 赵孟孟, 副教授, 主要从事兽医微生物及其分子生物学方面的研究, E-mail: mengmengzhao2021@fosu.edu.cn。

轮状病毒 (Rotavirus, RV) 属于呼肠孤病毒科 (Reoviridae) 轮状病毒属, 主要感染肠道上皮细胞, 通常引起宿主腹泻, 伴随呕吐、体温升高等症状^[1]。它是引起多种幼龄动物和婴幼儿腹泻的主要病原体, 每年造成 2.5 亿儿童感染和 10 多万人死亡^[2-4]。RV 是引起羊病毒性腹泻的重要病原之一, 严重危害畜牧业的生产, 给我国畜牧业带来巨大经济损失。

RV 是无包膜的双链 RNA 病毒, 由 3 个同心衣壳和 11 个 dsRNA 片段构成二十面体结构, 外观呈车轮状, 病毒直径约 75 nm。RV 由 6 种结构蛋白, 即 VP1、VP2、VP3、VP4、VP6 和 VP7 以及 6 种非结构蛋白, 即 NSP1、NSP2、NSP3、NSP4、NSP5 和 NSP6 构成^[1,5-6]。其中 NSP2 蛋白是由 RV 第 8 基因片段编码的一种非结构蛋白, 参与病毒质体的形成^[7-8], 在轮状病毒复制过程中发挥重要作用。毒质体是 RV 基因组复制的场所, 已有研究表明 NSP2 蛋白与毒质体形成、基因组复制以及病毒组装有关, 常与 NSP5 共同作用以增强病毒感染力^[9-11]。

GS2023 毒株分离自我国西北部某羊场中有明显腹泻症状的羊肛拭子样品, 生物学特性未知。本试验对 GS2023 株的 NSP2 基因进行克隆以及序列分析, 为进一步研究 NSP2 蛋白的结构和功能提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料

RV GS2023 株由佛山大学广东省动物分子设计与精准育种重点实验室分离并保存, DH5 α 感受态细胞、DNA 聚合酶 2 \times Rapid Taq Master Mix、DNA Marker 均购自 Vazyme Biotech 公司; 5 \times PrimeScript RT Master Mix 反转录酶、pMD-18T 载体购自大连宝生物技术有限公司; 琼脂糖购自 Biosharp 公司; 50 \times TAE 购自武汉赛维尔生物科技有限公司; 琼脂糖凝胶回收试剂盒购自 HLINGENE 公司; 总 RNA 提取试剂盒购自广州飞扬生物工程有限公司。

1.2 引物设计

根据 NCBI 上传的羊轮状病毒 NSP2 序列 (GenBank: PP115433) 设计引物, 引物序列如下: NSP2-F: 5'-ATGGCTGAGCTAGCTTGCTTCT-3', NSP2-R: 5'-TTAAACTCCTATTTGAGAACTTCATCC-3', 引物由上海生工生物工程股份有限公司进行合成。

1.3 病毒总 RNA 提取与目的基因扩增

使用 Total RNA Kit 进行 GS2023 病毒株 RNA 的提取, 并利用 PrimeScript RT Master Mix 反转录酶将 RNA 反转录成 cDNA。反转录体系为: 16.0 μ L

RNA, 4.0 μ L 5 \times PrimeScript RT Master Mix 反转录酶。反转录反应程序为: 37 $^{\circ}$ C 15 min, 85 $^{\circ}$ C 5 s。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 反应总体积为 25.0 μ L: 2 \times Rapid Taq Master Mix 12.5 μ L, 上下游引物各 1.0 μ L, cDNA 3.0 μ L, RNase Free H₂O 7.5 μ L。反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 55 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 循环 30 次; 72 $^{\circ}$ C 5 min。使用 1% 的琼脂糖凝胶电泳 150 V 30 min 检测 PCR 扩增产物。

1.4 NSP2 基因克隆与测序

对 NSP2 扩增产物使用胶回收试剂盒进行凝胶回收, 将 4.5 μ L 回收后的纯化 PCR 产物与 0.5 μ L pMD-18T 载体, 5.0 μ L Solution I 在 4 $^{\circ}$ C 连接 16 h, 5.0 μ L 连接产物加入 30.0 μ L DH5 α 感受态细胞, 42 $^{\circ}$ C 热应激 45 s, 立即冰上孵育 3 min, 之后加入 300 μ L 无抗 LB 培养基, 并在 37 $^{\circ}$ C 摇床 200 r/min 摇菌 40 min, 将菌液均匀涂布至含氨苄抗生素的固体 LB 培养基上, 37 $^{\circ}$ C 恒温过夜培养后挑取单个菌落至含有氨苄的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 摇菌 5 h, 进行菌液 PCR。以菌液为模板进行 PCR 扩增, 反应总体积为 25.0 μ L: 2 \times Rapid Taq Master Mix 12.5 μ L, 上下游引物各 1.0 μ L, 菌液 3.0 μ L, RNase Free H₂O 7.5 μ L。反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 55 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 循环 35 次; 72 $^{\circ}$ C 5 min。使用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物, 出现阳性条带后将菌液送至上海生工生物公司进行测序。

1.5 NSP2 生物信息学分析

使用 ExPASY (<http://web.expasy.org/protparam/>) 对 NSP2 蛋白的理化性质和稳定系数进行分析和预测; ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>) 对 NSP2 蛋白的亲水/疏水性进行分析; SignalP-4.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-4.1>) 对 NSP2 蛋白的信号肽进行预测; WOLFP SORT II (<https://www.genscript.com/wolf-psort.html>) 对 NSP2 蛋白的亚细胞定位进行预测; TMHMM-2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>) 对 NSP2 蛋白的跨膜螺旋结构进行预测; YinYang-1.2 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/YinOYang-1.2/>) 对 NSP2 蛋白的糖基化位点进行预测; NetPhos-3.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetPhos-3.1>) 对 NSP2 蛋白的磷酸化位点进行预测; DNASTAR 软件对 NSP2 蛋白的抗原性进行分析; SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 和 SWISS-MODEL (<http://www.swissmodel.expasy.org/>) 对 NSP2 蛋白的二级结构和三级结构进行预测。

1.6 NSP2 序列相似性以及氨基酸突变分析

从 NCBI 中选取来自国内外具有代表性的不同年

份、不同种属的 40 株 RV 毒株 NSP2 序列, 利用 DNASTAR 软件进行相似性以及氨基酸突变分析。

表 1 RV 毒株 NSP2 参考序列信息

毒株	登录号	分离国家	年份	来源
GS2023-2023-sheep-China	PP115433	中国	2023	羊
RVA.Sheep-tc.ESP.OVR762.2002.G8P14	EF554155	西班牙	2002	羊
RVA.Antelope-wt.ZAF.RC-18-08.G6P14	FJ495134	南非	2008	羊
RVA.Goat-wt.UGA.BUW-14-085.2014.G6P1	KY055434	乌干达	2014	羊
RVA.Goat-wt.MAR.S19.2012.G10P14	MN067440	摩洛哥	2012	羊
RVA.Goat-wt.ARG.0040.2011.G8P1	KF577845	阿根廷	2011	羊
GO34-1999-goat-Bangladesh	GU937884	孟加拉国	1999	羊
XL-2010-goat-China	JQ004977	中国	2010	羊
LLR-1985-lamb-China	JQ031147	中国	1985	羊
LLR-2023-lamb-China	OQ603395	中国	2023	羊
Lamb-NT-2007-lamb	FJ031020	中国	2007	羊
CC0812-1.2008-lamb-China	HQ834203	中国	2008	羊
RVA.Cow-wt.UGA.BUW-14-A035.2014.G12P8	KX655535	乌干达	2013	牛
RVA.Cow-tc.China.SCMY2	ON012981	中国	2021	牛
RVA.Cow-tc.China.SCMY1	ON012970	中国	2021	牛
RVA.Cow-wt.ARG.B383.1998.G15P11	FJ347118	阿根廷	1998	牛
RVA.Cow-wt.ARG.4385VTDBA.2008.G8P11	OR344108	阿根廷	2008	牛
RVA.Cow-wt.TUR.K53.2006.G15P21	MZ848154	土耳其	2016	牛
RVA.Cow-wt.URY.LVMS3206.2016.GxP11	MN649761	乌拉圭	2016	牛
RVA.Ovine.Northern Ireland.R2WTA65.2014	OL989001	爱尔兰	2013	羊
RVA.Chamois-wt.SLO.GA471.2019.G8P14	OR270738	斯洛文尼亚	2019	羊
RVA.Yak-tc.CHN.QH-1.2015.G6P1	MK638877	中国	2015	牦牛
RVA.Yak-tc.CHN.HY-1.2018.G6P11	MK250431	中国	2017	牦牛
RVA.alpaca-wt.PER.356.2010.G3P14	KT878999	秘鲁	2010	羊驼
RVA.alpaca-wt.PER.1115.2010.G8P1	KT887538	秘鲁	2010	羊驼
HLJ-H3.2022.CHN-2021-cow-China	OQ807046	中国	2021	牛
RVA.Cow-wt.TUR.K060.2008.G10P11	MZ848152	土耳其	2008	牛
RVA.Calf-wt.MAR.S18.2012.G6P14	MN067451	摩洛哥	2012	牛
RVA.Cow-wt.TUR.Amasya-2.2015.G8P5	KX212884	土耳其	2015	牛
RVA.Rabbit-tc.NLD.K1130027.2011.G6P11	KC488892	荷兰	2011	兔
RVA.Pig-tc.VEN.A131.1988.G3P97	EF990688	委内瑞拉	1989	猪
RVA.Cow-tc.VEN.BRV033.1990.G6P61	EF990704	委内瑞拉	1990	牛
RVA.Pig-tc.VEN.A253.1988.G11P97	EF990696	委内瑞拉	1989	猪
Ind.Bo.HR.B85-2010-bovine-India	JF831950	印度	2010	牛
RVA.Bovine-tc.KOR.KJ44.2006.G5P1	MF940732	韩国	2006	牛
RVA.N2.India.HR.2011.B91-bovine	JX442771	印度	2011	牛
RVA.Bovine.Northern Ireland.R1WTA17	OL988989	爱尔兰	2013	牛
RVA.Guanaco-wt.ARG.Chubut.1999.G8P14	FJ347107	阿根廷	1999	羊驼
RVA.Cow-wt.URY.LVMS1812.2016.G6P5	MN649754	乌拉圭	2016	牛
RVA.Cow-wt.ZAF.MRC-DPRU3005.2009.G6P11	MW771202	南非	2009	牛

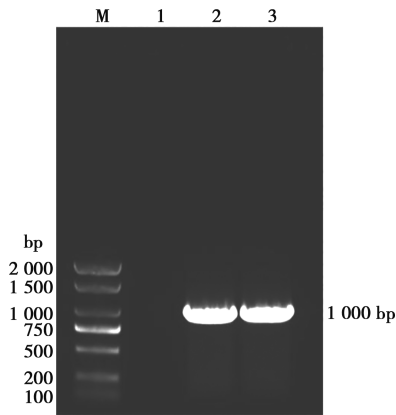
1.7 遗传进化树分析

利用 MEGA 软件进行 NSP2 基因系统发育分析, 采用邻位归并法, 1 000 个重复, 构建系统发育进化树, 展示出大于 70% 的可信度值。

2 结果与分析

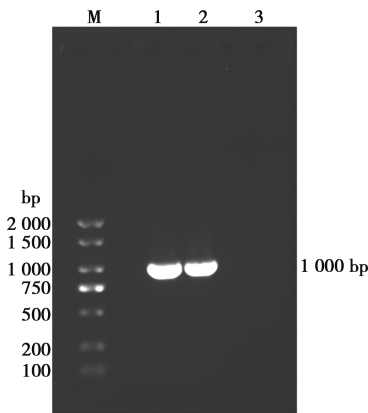
2.1 NSP2 的 PCR 扩增与鉴定

以轮状病毒 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳得到扩增条带。如图 1 所示, 扩增条带约 1 000 bp, 与目的片段大小一致。使用菌液进行 PCR 扩增, 如图 2 所示, 扩增条带约为 1 000 bp。将阳性菌液进行测序, 结果显示目的条带序列正确。



M. DL2000 DNA Marker; 1. 阴性对照; 2、3. NSP2 基因 PCR 扩增产物。

图 1 NSP2 基因扩增结果



M. DL2000 DNA Marker; 1. 阴性对照; 2、3. PCR 扩增产物。

图 2 菌液 PCR 电泳结果

2.2 生物信息学分析

2.2.1 碱基分布及理化性质

通过在线软件 ExPASy 分析 NSP2 蛋白的理化性质, 结果显示: NSP2 基因全长为 1 016 bp, 含有 317 个氨基酸。其中腺嘌呤 (A) 为 365 个, 占比

35.93%; 胞嘧啶 (C) 为 166 个, 占比 16.34%; 鸟嘌呤 (G) 为 199 个, 占比 19.59%; 胸腺嘧啶 (T) 为 286 个, 占比 28.15%。理论等电点为 9.06。

2.2.2 亲疏水性分析

使用 ProtScale 软件对 NSP2 蛋白进行分析, 结果如图 3 所示, NSP2 蛋白亲水性残基较多, 疏水性残基较少, 说明该蛋白属于亲水性蛋白。其中第 61 位氨基酸疏水值最小, 为 -3.144; 第 83 位氨基酸疏水值最大, 为 2.567。

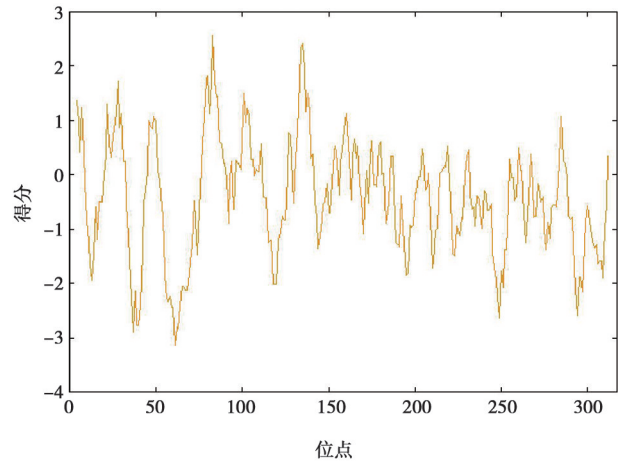


图 3 GS2023 株 NSP2 蛋白亲/疏水性预测

2.2.3 稳定系数与信号肽预测

使用 ExPASy 软件分析可知, NSP2 蛋白分子量为 36 689.22 Da, 分子式为 $C_{1649}H_{2585}N_{447}O_{473}S_{14}$ 。不稳定指数为 36.72, 不稳定指数小于 40 表明目的蛋白属于稳定蛋白。使用 SignalP-4.1 软件预测 NSP2 蛋白的信号肽, 结果表明该蛋白没有信号肽位点, 结果见图 4。

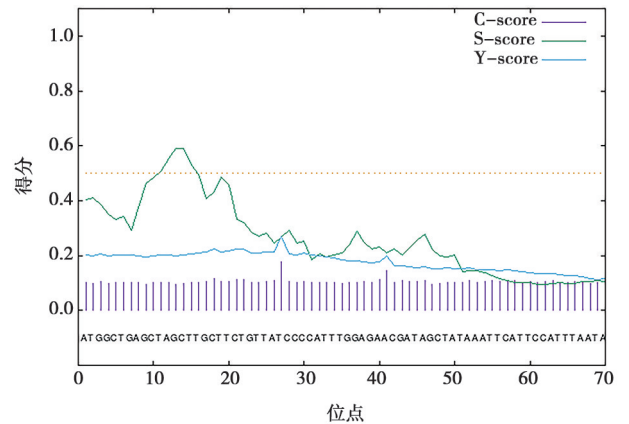


图 4 GS2023 株 NSP2 蛋白信号肽预测

2.2.4 亚细胞定位预测

使用 WOLFP SORT II 分析目的蛋白的亚细胞定

位,结果显示该蛋白可能位于细胞质和细胞核中,占比分别为17.5%和14%。

2.2.5 跨膜螺旋结构预测

使用TMHMM-2.0对NSP2蛋白进行跨膜螺旋结构预测,结果如图5所示,表明NSP2蛋白无跨膜螺旋结构,提示NSP2蛋白属于非跨膜蛋白。

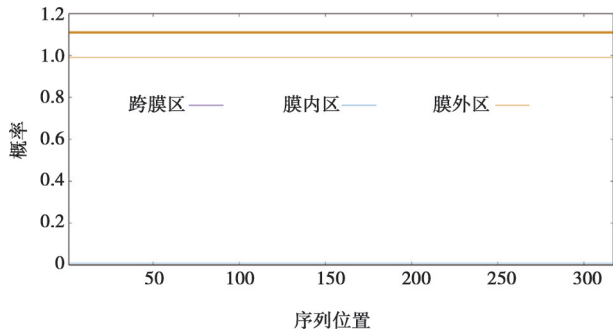


图5 GS2023株NSP2蛋白跨膜螺旋结构预测

2.2.6 糖基化位点及磷酸化位点预测

利用YinYang-1.2对目的蛋白的糖基化位点进行预测,结果如图6所示,NSP2蛋白存在36个糖基化位点,均匀分布。使用NetPhos-3.1对目的蛋白的磷酸化位点进行预测,结果如图7所示,显示NSP2蛋白含有49个磷酸化位点,其中丝氨酸磷酸化位点为20个,苏氨酸磷酸化位点为16个,酪氨酸磷酸化位点为13个。

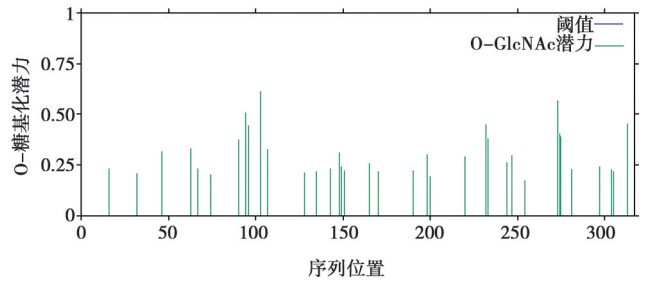


图6 GS2023株NSP2蛋白糖基化位点预测

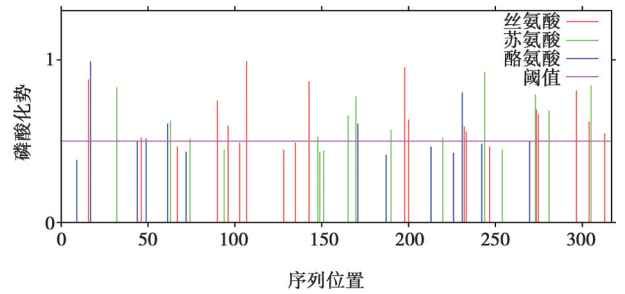


图7 GS2023株NSP2蛋白磷酸化位点预测

2.2.7 抗原性分析

利用DNASTAR软件进行NSP2蛋白的抗原性分析,结果如图8所示,显示该蛋白在第20、60、250、280、300等多个位点附近存在抗原性强的抗原表位。

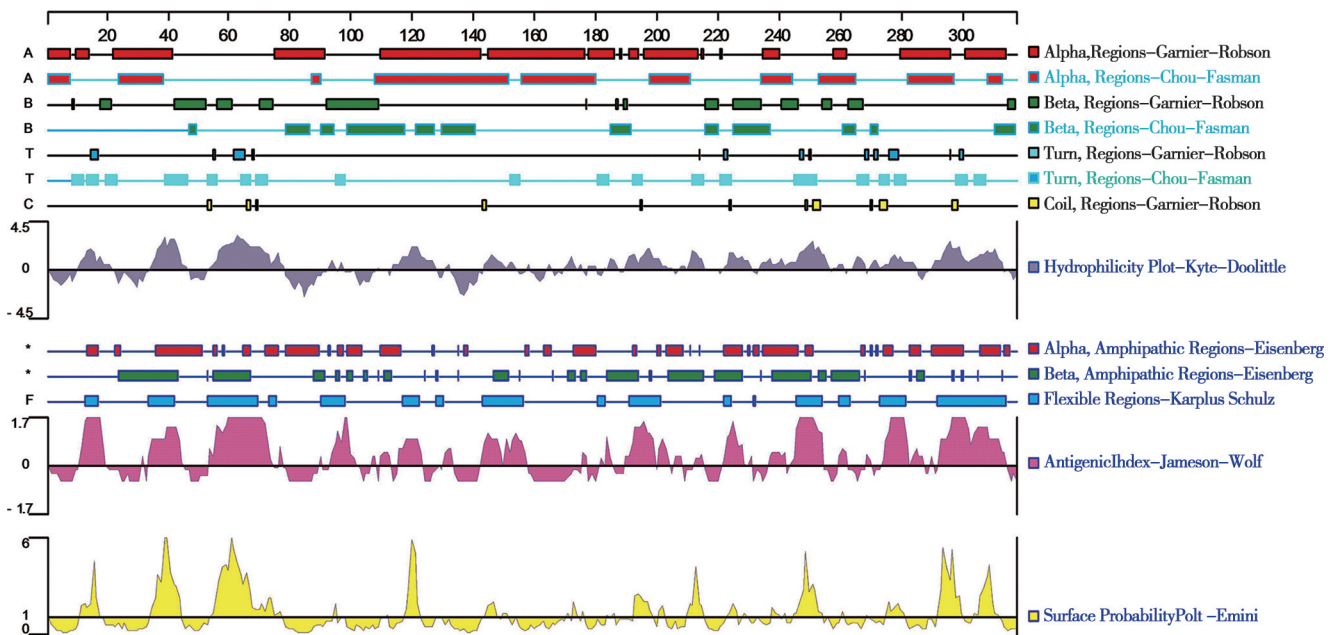


图8 GS2023株NSP2蛋白抗原性预测

2.2.8 二级结构预测

使用 SOPMA 预测并分析 NSP2 蛋白的二级结构, 结果如图 9 所示, 该蛋白由 α 螺旋结构、延伸链和无规则卷曲共同组成。其中 α 螺旋结构由 149 个氨基酸组成, 占比 47%, 多集中于 75~130、230~317 位

氨基酸处; 无规则卷曲由 113 个氨基酸组成, 占比 35.65%, 在氨基酸全部位点中均匀分布; 延伸链由 55 个氨基酸组成, 占比 17.35%, 在氨基酸全部位点中均匀分布; 该蛋白不存在 β 转角结构。

```

      10      20      30      40      50      60      70
      |      |      |      |      |      |      |
MAELACFCYPHLENDYSYKFI PFNLAIKCMLTAKVDKRDQDKFYNSIIYG IAPPPQFKKRYNTNDNSRGM
hhhhhhheeeccccceeeccccchhhhhheehccccccccceeeeeccccccccchhecccccccc
NYETPMFNKVAVLICEALNSIKVTQSDVANVLSRVVSVRHLENLVLRRNHQDVL FHSKELLKLSVLI AI
ccccchhhhhhhhhhhhhhhhhccccchhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhccccchhhhhhhhhhhhhhh
GHSKEIETTATAEGGEIVFQNAAF TMWKLTYLEHKLMPILDQNFIEYKITV NEDKPISESHIKELIAELR
ccccccccceeeccccceeeccccchheeeccccccccccccccccchheeeccccccccchhhhhhhhhhh
WQYNKFAVITHGKGYRVV KYSSVANHADRVYATFKSNKNGNTLEFNLLDQR I IWQNWYAFTSSMKQGN
hccccceeeccccceeechhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhcc
TLDVCKLLFQKMKRESNPFKGLSTDRKMDEV SQIGV
chhhhhhhhhhhhhhhhhccccchhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhcc

```

Sequence length : 317

SOPMA :

Alpha helix (Hh) :	149 is	47.00%
3 ₁₀ helix (Gg) :	0 is	0.00%
Pi helix (Ii) :	0 is	0.00%
Beta bridge (Bb) :	0 is	0.00%
Extended strand (Ee) :	55 is	17.35%
Beta turn (Tt) :	0 is	0.00%
Bend region (Ss) :	0 is	0.00%
Random coil (Cc) :	113 is	35.65%
Ambiguous states (?) :	0 is	0.00%
Other states :	0 is	0.00%

注: 蓝色表示 α 螺旋, 绿色表示 β 转角, 橙色表示无规则卷曲, 红色表示延伸链。

图 9 GS2023 株 NSP2 蛋白二级结构预测

2.2.9 三级结构预测

SWISS-MODEL 对 GS2023 株 NSP2 蛋白进行三级结构预测, 成功构建出该蛋白三级结构模式图 (图 10), NSP2 蛋白呈自身首尾相连的四聚体结构。GMQE 值为 0.89 (全球模型质量估计, 可信度范围为 0~1, 数值越大表明质量越好), 与模板相似度为 88.42%。

析, 结果如图 12 所示, 表明该 NSP2 蛋白与国内牛源毒株 SCMY1、SCMY2 的 NSP2 蛋白在第 38 位点发生突变, 与国内多种羊源毒株和牛源毒株在第 100、202 位点发生突变。

2.3 氨基酸相似性分析

使用 DNASTAR 软件对 RV 的 NSP2 蛋白进行氨基酸相似性比对, 结果如图 11 所示, 显示 GS2023 毒株与其他参考毒株的相似性为 90.2%~98.7%; 与国内牛源流行株 SCMY1 和 SCMY2 的氨基酸相似性最高, 为 98.7%; 与乌干达牛源毒株 G12P [8] 的氨基酸相似性最低, 为 90.2%。

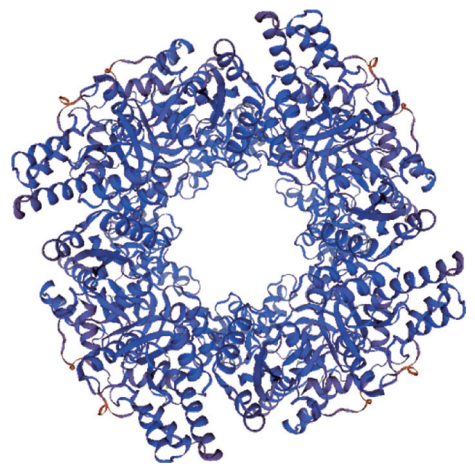


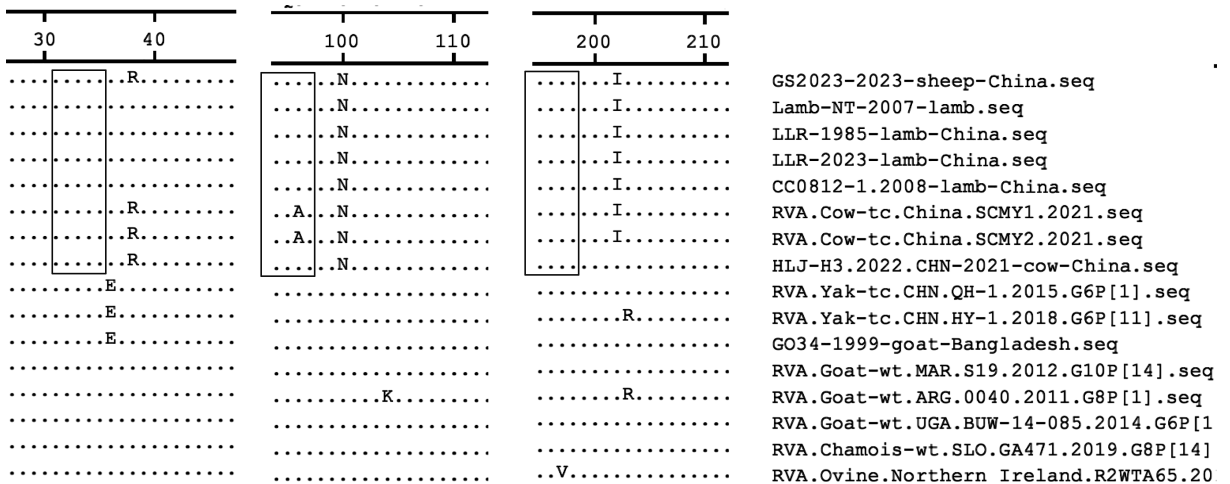
图 10 GS2023 株 NSP2 蛋白三级结构预测

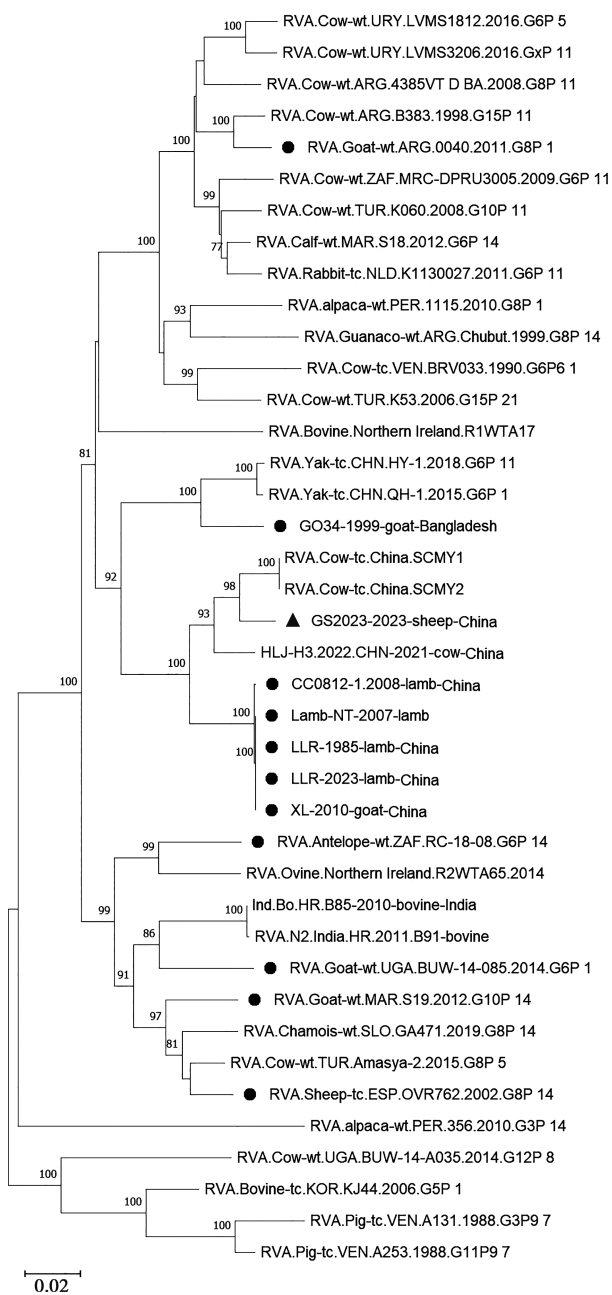
2.4 氨基酸序列比对

将 GS2023 株的 NSP2 氨基酸序列与选取的 40 株轮状病毒株 NSP2 氨基酸序列进行氨基酸序列比对分

		Percent Identity																												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27		
Divergence	1	■	98.1	96.5	98.4	98.1	98.1	95.9	98.7	98.7	92.4	97.2	96.2	97.2	95.9	95.9	90.2	95.9	95.9	95.3	96.2	96.5	95.9	96.5	95.9	96.2	98.1	1	GS2023-2023-sheep-China.seq	
	2	1.9	■	96.2	98.4	100.0	100.0	100.0	96.5	98.1	98.1	92.1	96.9	96.2	97.5	95.9	95.6	90.6	96.5	96.5	95.3	96.9	96.5	96.2	97.2	96.2	96.5	100.0	2	CC0812-1.2008-lamb-China.seq
	3	3.6	3.9	■	96.5	98.2	96.2	96.2	95.3	95.9	95.9	92.1	96.2	95.9	96.5	95.6	95.3	89.3	95.3	95.3	95.6	95.9	96.2	95.9	95.6	97.2	97.8	96.2	3	GO34-1999-goat-Bangladesh.seq
	4	1.6	1.6	3.5	■	98.4	98.4	98.4	96.2	98.4	98.4	92.5	97.2	96.5	97.2	96.2	95.9	89.9	96.9	96.9	95.6	97.2	96.9	95.9	96.9	95.9	96.2	98.4	4	HLJ-H3.2022.CHN-2021-cow-China.seq
	5	1.9	0.0	3.9	1.6	■	100.0	100.0	96.5	98.1	98.1	92.1	96.9	96.2	97.5	95.9	95.6	90.6	96.5	96.5	95.3	96.9	96.5	96.2	97.2	96.2	96.5	100.0	5	Lamb-NT-2007-lamb.seq
	6	1.9	0.0	3.9	1.6	0.0	■	100.0	96.5	98.1	98.1	92.1	96.9	96.2	97.5	95.9	95.6	90.6	96.5	96.5	95.3	96.9	96.5	96.2	97.2	96.2	96.5	100.0	6	LLR-1985-lamb-China.seq
	7	1.9	0.0	3.9	1.6	0.0	0.0	■	96.5	98.1	98.1	92.1	96.9	96.2	97.5	95.9	95.6	90.6	96.5	96.5	95.3	96.9	96.5	96.2	97.2	96.2	96.5	100.0	7	LLR-2023-lamb-China.seq
	8	4.2	3.5	4.9	3.9	3.5	3.5	3.5	■	95.6	95.6	91.8	95.9	97.2	97.8	96.2	95.3	89.3	95.0	95.0	95.6	95.9	97.8	96.5	97.5	95.9	96.2	96.5	8	RVA.Antelope-wt.ZAF.RC-18-08.G6P[14].seq
	9	1.3	1.9	4.2	1.6	1.9	1.9	4.5	0.0	■	100.0	91.8	96.5	95.9	96.5	95.3	95.3	89.9	95.9	95.9	94.7	96.2	95.9	95.3	95.9	95.3	95.6	98.1	9	RVA.Cow-tc.China.SCMY1.2021.seq
	10	1.3	1.9	4.2	1.6	1.9	1.9	4.5	0.0	0.0	■	91.8	96.5	95.9	96.5	95.3	95.3	89.9	95.9	95.9	94.7	96.2	95.9	95.3	95.9	95.3	95.6	98.1	10	RVA.Cow-tc.China.SCMY2.2021.seq
	11	8.0	8.3	8.3	8.0	8.3	8.3	8.3	8.7	8.7	8.7	■	95.3	94.0	92.5	94.7	95.9	84.9	93.4	93.4	94.0	94.7	92.1	91.8	91.2	92.5	92.1	92.1	11	RVA.Cow-tc.VEN.BRV033.1990.G6P[1].seq
	12	2.9	3.2	3.9	2.9	3.2	3.2	3.2	4.2	3.5	3.5	4.9	■	98.1	96.5	98.1	98.1	89.6	98.1	98.1	97.5	98.1	96.2	95.9	95.9	95.9	96.2	96.9	12	RVA.Cow-wt.ARG.4385VT_D_BA.2008.G8P[11].seq
	13	3.9	3.9	4.2	3.5	3.9	3.9	3.9	2.9	4.2	4.2	6.2	1.9	■	96.9	97.8	96.9	89.6	96.9	96.9	96.9	98.7	96.9	95.9	95.9	95.6	95.9	96.2	13	RVA.Cow-wt.ARG.B383.1998.G15P[11].seq
	14	2.9	2.6	3.5	2.9	2.6	2.6	2.6	2.2	3.5	3.5	8.0	3.5	3.2	■	96.5	95.9	90.6	95.3	95.3	95.9	96.9	98.4	97.8	98.4	96.5	96.9	97.5	14	RVA.Cow-wt.TUR.Amasya-2.2015.G8P[5].seq
	15	4.2	4.2	4.5	3.9	4.2	4.2	4.2	3.9	4.9	4.9	5.6	1.9	2.2	3.5	■	97.5	88.4	96.9	96.9	98.1	97.8	96.5	95.0	95.6	95.3	95.6	95.9	15	RVA.Cow-wt.TUR.K060.2008.G10P[11].seq
	16	4.2	4.5	4.9	4.2	4.5	4.5	4.5	4.9	4.9	4.9	4.2	1.9	3.2	4.2	2.6	■	88.1	96.5	96.5	97.2	96.9	95.6	95.0	94.7	95.3	95.6	95.6	16	RVA.Cow-wt.TUR.K53.2006.G15P[21].seq
	17	10.5	10.1	11.6	10.8	10.1	10.1	10.1	11.6	10.8	10.8	16.9	11.2	11.2	10.1	12.7	13.1	■	88.7	89.0	88.7	89.3	89.3	90.9	89.9	89.0	89.3	90.6	17	RVA.Cow-wt.UGA.BUW-14-A035.2014.G12P[8].seq
	18	4.2	3.5	4.9	3.2	3.5	3.5	5.2	4.2	4.2	6.9	1.9	3.2	4.9	3.2	3.5	12.3	■	98.7	96.5	97.5	95.3	94.3	95.0	94.7	95.0	96.5	18	RVA.Cow-wt.URU.LVMS1812.2016.G6P[5].seq	
	19	4.2	3.5	4.9	3.2	3.5	3.5	5.2	4.2	4.2	6.9	1.9	3.2	4.9	3.2	3.5	11.9	1.3	■	96.5	97.5	95.3	94.3	95.0	94.7	95.0	96.5	19	RVA.Cow-wt.URU.LVMS3206.2016.GxP[11].seq	
	20	4.9	4.9	4.5	4.5	4.9	4.9	4.9	4.5	5.6	5.6	6.2	2.6	3.2	4.2	1.9	2.9	12.3	3.5	■	96.9	95.9	94.7	95.0	95.0	95.6	95.3	20	RVA.Cow-wt.ZAF.MRC-DPRU3005.2009.G6P[11].seq	
	21	3.9	3.2	4.2	2.9	3.2	3.2	3.2	4.2	3.9	3.9	5.6	1.9	1.3	3.2	2.2	3.2	11.6	2.6	2.6	■	96.9	95.9	96.2	95.9	96.9	96.9	21	RVA.Goat-wt.ARG.0040.2011.G8P[1].seq	
	22	3.6	3.5	3.9	3.2	3.5	3.5	3.5	2.2	4.2	4.2	8.3	3.9	3.2	1.6	3.5	4.5	11.6	4.9	4.9	4.2	■	97.2	98.4	95.9	96.2	96.5	22	RVA.Goat-wt.MAR.S19.2012.G10P[14].seq	
	23	4.2	3.9	4.2	4.2	3.9	3.9	3.9	3.5	4.9	4.9	4.9	4.2	4.2	2.2	5.2	5.2	9.7	5.9	5.6	4.2	2.9	■	97.2	95.6	95.9	96.2	23	RVA.Goat-wt.UGA.BUW-14-085.2014.G6P[1].seq	
	24	3.6	2.9	4.5	3.2	2.9	2.9	2.9	2.6	4.2	4.2	9.4	4.2	4.2	1.6	4.5	5.6	10.8	5.2	5.2	5.2	4.2	1.6	2.9	■	95.6	95.9	97.2	24	RVA.Sheep-tc.ESP.OVR782.2002.G8P[14].seq
	25	4.2	3.9	2.9	4.2	3.9	3.9	3.9	4.2	4.9	4.9	8.0	4.2	4.5	3.5	4.9	4.9	11.9	5.6	5.6	5.2	3.9	4.2	4.5	4.5	■	98.7	96.2	25	RVA.Yak-tc.CHN.HY-1.2018.G6P[11].seq
	26	3.9	3.5	3.2	3.9	3.5	3.5	3.5	3.9	4.5	4.5	8.3	3.9	4.2	3.2	4.5	4.5	11.6	5.2	5.2	4.5	4.2	3.9	4.2	4.2	1.3	■	96.5	26	RVA.Yak-tc.CHN.QH-1.2015.G6P[1].seq
	27	1.9	0.0	3.9	1.6	0.0	0.0	0.0	3.5	1.9	1.9	8.3	3.2	3.9	2.6	4.2	4.5	10.1	3.5	3.5	4.9	3.2	3.5	3.9	2.9	3.9	3.5	■	27	XL-2010-goat-china.seq

图 11 GS2023 株与参考毒株 NSP2 基因的氨基酸序列相似性分析





注：▲代表 GS2023 毒株；●代表羊源轮状病毒株。

图 13 NSP2 基因系统发育进化树分析

3 讨论

RV 是导致许多幼龄动物和 5 岁以下儿童发生腹泻及死亡的人畜共患病原之一，给无数家庭造成影响和经济损失，也给我国畜牧业的发展造成严重危害^[12]。目前对于轮状病毒病的防控措施多以疫苗为主，尚无临床获批的抗轮状病毒药物^[13-14]。

NSP2 蛋白是 RV 的非结构蛋白，在血清中可产生特异性抗体，有研究表明 NSP2 与病毒逃避抗病毒免疫应答有关^[13]。本研究发现 NSP2 编码区为

954 bp，属于稳定存在的亲水性蛋白。NSP2 蛋白不存在信号肽且无跨膜螺旋结构，属于非跨膜蛋白，说明该蛋白序列中缺少可以靶向信号的部分，没有明确的靶向信号来指导蛋白的定位，推测该蛋白合成后不经过运输即发挥作用。

目前对于轮状病毒抗体的研究多针对结构蛋白 VP6^[15-18]，也有部分抗体针对非结构蛋白进行研究，如 NSP4 抗体^[19]、NSP3 和 NSP5^[20] 抗体。本研究结果显示 GS2023 毒株 NSP2 蛋白存在多个抗原性表位，推测该蛋白可能适合用作抗体的制备，此前范耀春等^[21]、陈肖宏等^[22] 研究表明 NSP2 可用于多克隆抗体的制备，本研究进一步证实该猜想。

氨基酸突变图显示 GS2023 毒株与 3 种国内牛源毒株 SCMY1、SCMY2 和 HJL 在第 38 位点产生突变，由赖氨酸 K 突变为精氨酸 R，而遗传进化树分析显示 GS2023 毒株与这 3 种毒株的亲缘关系最近，推测这种跨种属的亲缘关系相近现象可能是由于在第 38 号位点出现突变所致。GS2023 毒株为绵羊源毒株，在第 100 号位点发生共同突变，由丝氨酸 S 突变为天冬酰胺 N；在第 202 位发生突变，由缬氨酸 V 突变为异亮氨酸 I。国内其他羔羊源毒株以及 2 株牛源流行株 SCMY1 和 SCMY2 在相同位点发生相同突变情况，而国内其他山羊源毒株则没有在该几处位点发生突变，这与遗传进化树分析结果一致。遗传进化树结果表明，GS2023 绵羊源毒株与 2 株牛源毒株 SCMY1 和 SCMY2 的亲缘关系最近；在羊源毒株中与羔羊源毒株的亲缘关系较山羊源毒株更近，推测可能是由于与 2 株牛源毒株及羔羊源毒株在第 100、202 位点出现突变所致，这两处氨基酸位点或与病毒种属的分类有关。病毒蛋白的关键氨基酸位点突变会影响病毒毒力或病毒增殖，李凯等^[23] 发现寨卡病毒蛋白关键氨基酸突变促进了病毒的复制，李明等^[24] 发现登革病毒非结构蛋白氨基酸突变减弱了病毒毒性，此结论在多种病毒上已被研究证实^[25-27]。本研究发现 GS2023 毒株 NSP2 蛋白在多个位点发生突变，推测与 RV 毒力改变或病毒增殖有关。

NSP2 蛋白与其他国内外流行株的氨基酸相似性为 90.2% ~ 98.7%，与国内牛源流行株 SCMY1 和 SCMY2 的氨基酸相似性最高，与乌干达牛源毒株 G12P [8] 的氨基酸相似性最低，可见该蛋白整体保守性较高，不同种属和发现地点的毒株之间较为相似，提示使用对应疫苗或能全面防控多种轮状病毒株。

4 结论

本试验成功克隆羊 RV NSP2 基因，分析结果表

明 NSP2 由 317 个氨基酸组成, 属于稳定存在的亲水性蛋白、非跨膜蛋白, 不存在信号肽; 含有 36 个糖基化位点以及 49 个磷酸化位点; NSP2 蛋白与其他国内外流行株的氨基酸相似性为 90.2%~98.7%; 氨基酸突变显示 GS2023 毒株在第 38、100、202 位点发生突变; 系统进化树显示 GS2023 株与国内牛源 RV 株遗传距离最近, 与其他羊源 RV 的序列遗传距离较远。本研究为深入了解 RV NSP2 蛋白的结构和功能提供了理论依据。

参考文献:

- [1] CRAWFORD S E, RAMANI S, TATE J E, et al. Rotavirus infection [J]. *Nature Reviews Disease Primers*, 2017, 3: 17083.
- [2] JIANG L, TANG A, SONG L, et al. Advances in the development of antivirals for rotavirus infection [J]. *Frontiers in Immunology*, 2023, 14: 1041149.
- [3] 吴文欢, 孙颜红. 全球轮状病毒疫苗研究进展 [J]. *病毒学报*, 2024, 40 (4): 907-913.
- [4] LIU Z, SMITH H, CRIGLAR J M, et al. Rotavirus-mediated DGAT1 degradation: a pathophysiological mechanism of viral-induced malabsorptive diarrhea [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2023, 120 (51): e2302161120.
- [5] 汪雨婷, 云中宴, 马瑞, 等. 轮状病毒结构蛋白的研究进展 [J]. *中兽医学杂志*, 2015 (10): 50.
- [6] SAURABH S, SIRCAR S, KATTOOR J J, et al. Analysis of structure-function relationship in porcine rotavirus A enterotoxin gene [J]. *Journal of Veterinary Science*, 2018, 19 (1): 35-43.
- [7] NICHOLS S L, HALLER C, BORODAVKA A, et al. Rotavirus NSP2: a master orchestrator of early viral particle assembly [J]. *Viruses*, 2024, 16 (6): 814.
- [8] NICHOLS S L, NILSSON E M, HARDING H B, et al. Flexibility of the rotavirus NSP2 C-terminal region supports factory formation via liquid-liquid phase separation [J]. *Journal of Virology*, 2023, 97 (2): e0003923.
- [9] 郑继航, 杨学磊. A 组轮状病毒结构和非结构蛋白的研究进展 [J]. *中国病毒病杂志*, 2015, 5 (3): 234-240.
- [10] CRIGLAR J M, HU L, CRAWFORD S E, et al. A novel form of rotavirus NSP2 and phosphorylation-dependent NSP2-NSP5 interactions are associated with viroplasm assembly [J]. *Journal of Virology*, 2014, 88 (2): 786-798.
- [11] 林家锋. 轮状病毒非结构蛋白 NSP2 多抗的制备及与 NSP5、宿主蛋白互作研究 [D]. 锦州: 锦州医科大学, 2022.
- [12] 韩敦. 猪 A 群轮状病毒 VP6 蛋白单克隆抗体的制备及抗原表位鉴定 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2014.
- [13] 刘阳阳, 冉旭华, 闻晓波. 轮状病毒拮抗宿主先天性免疫机制研究进展 [J]. *中国人兽共患病学报*, 2016, 32 (7): 659-664.
- [14] JING Z, SHI H, CHEN J, et al. Rotavirus viroplasm biogenesis involves microtubule-based dynein transport mediated by an interaction between NSP2 and dynein intermediate chain [J]. *Journal of Virology*, 2021, 95 (21): e0124621.
- [15] 黄校花. 抗猪轮状病毒 VP6 单克隆抗体的制备及双抗体夹心 ELISA 检测方法的建立 [D]. 南昌: 江西农业大学, 2023.
- [16] 苏温曦. A 组轮状病毒 VP6 蛋白抗体制备及血清抗体检测方法的建立 [D]. 兰州: 甘肃中医药大学, 2022.
- [17] 李木子, 刘佳丽, 王瑞翀, 等. 牛轮状病毒 VP6 蛋白单克隆抗体的制备及双抗体夹心 ELISA 方法的建立 [J]. *中国兽医科学*, 2018, 48 (11): 1352-1357.
- [18] 刘广阔, 邹敏, 吴发兴, 等. 基于 VP6 蛋白的牛轮状病毒抗体间接 ELISA 检测方法的建立与应用 [J]. *动物医学进展*, 2024, 45 (1): 1-6.
- [19] 王璐. 猪轮状病毒 NSP4 蛋白单克隆抗体的制备及抗原表位的鉴定 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2013.
- [20] 谷凤丽. 猪轮状病毒 NSP3 和 NSP5 蛋白单抗的制备及抗原表位鉴定 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2015.
- [21] 范耀春, 李传印, 陈元鼎. A 组轮状病毒非结构蛋白 NSP2 的研究进展 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2010, 23 (2): 214-6.
- [22] 陈肖宏, 闻晓波, 冉旭华. 轮状病毒 SA11 株 NSP2 蛋白的原核表达及其多克隆抗体的制备 [J]. *黑龙江八一农垦大学学报*, 2021, 33 (1): 15-20.
- [23] 李凯, 闫秀丽, 贺梦娇, 等. 寨卡病毒 E 蛋白和 NS1 蛋白关键氨基酸突变可促进病毒在小鼠睾丸中的复制 [J]. *科学通报*, 2024, 69 (19): 2827-2834.
- [24] 李明, 房恩岳, 刘晓辉, 等. 登革病毒 Ban18HK20 株非结构蛋白氨基酸定点突变对病毒增殖及毒力的影响 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2023, 36 (8): 902-910.
- [25] 陈梦婷. SFTSV 糖蛋白 Gn 及其第 323 位氨基酸突变对细胞自噬与病毒增殖的影响 [D]. 济南: 山东大学, 2023.
- [26] 杜蒙育. 肠道病毒 71 型 VP1 蛋白关键氨基酸突变对病毒毒力的影响 [D]. 济南: 山东大学, 2023.
- [27] CHEN H, PHUEKTES P, YEO L S, et al. Attenuation of neurovirulence of chikungunya virus by a single amino acid mutation in viral E2 envelope protein [J]. *Journal of Biomedical Science*, 2024, 31 (1): 8.