



PRRS病毒Nsp2蛋白氨基酸序列和功能分析

PRRS virus Nsp2 amino acid sequence & function analysis

G06组成员：

张花景(组长) 邓玲玲(组员)
吴家俊(报告人) 程群(组员)



小组分工

资料收集 —— 张花景

PPT制作 —— 邓玲玲

PPT后期处理 —— 程群

PPT汇报 —— 吴家俊



研究背景

猪繁殖与呼吸综合征(PRRS)是由猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)引起的一种高度传染性疾病，主要特征是各种年龄的猪均可感染发病，出现生殖障碍和呼吸道症状，本病极易引起细菌、支原体、圆环病毒、猪瘟病毒、伪狂犬病毒等继发感染，加剧病程，使死亡率升高。此病每年给世界养猪业造成的损失达几十亿美元，间接损失难以计算。





2006 年开始在中国发生的猪高热病，是由PRRSV 变异株引起的一种急性高致死性疫病，该病毒引起的较高发病率，死亡率，从给中国养猪业造

根据上述背景知识和相关文献，我们小组经过讨论决定，利用生物信息学方法研究中国高致病性PRRSV毒株和典型毒株Nsp2的关系和区别，同时研究其氨基酸序列和毒力强弱关系。



技术路线

获取北美型，欧洲型和高致病性
TJ,HB,JS毒株Nsp2序列

Nsp2蛋白结构和功能分析

北美型、欧洲型毒株和高致病性
TJ,HB,JS毒株毒株Nsp2序列分析

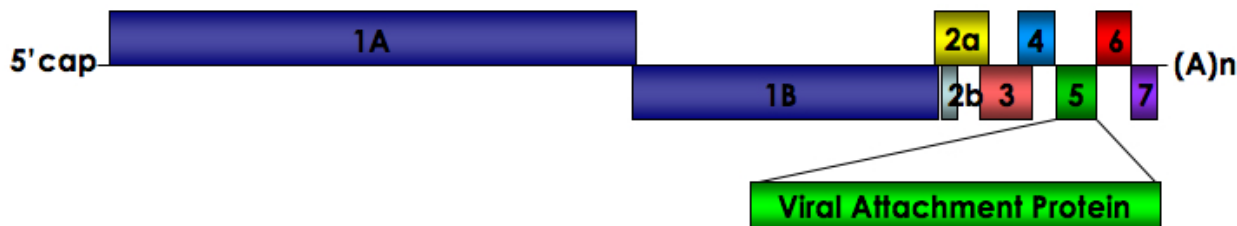
致弱毒TJM 株Nsp2 缺失的120个氨
基酸结构分析



PRRSV基因组信息

PRRSV为单股正链RNA病毒，其基因组长约15kb，由ORF 1 - ORF 7组成。ORF1是最大的一个读码框,长约12Kb，其中ORF1包括ORF1a和ORF1b，ORF1a所编码的寡聚蛋白经加工后,成为6个非结构蛋白(Nsp1 α ,Nsp1 β ,Nsp2~5)。根据病毒基因组差异，可将PRRSV分为以Lelystade株为代表的欧洲型毒株(LV)和以ATTC-VR-2332为代表的美洲型毒株。

PRRSV Genome





Nsp2结构和功能分析

在这6个非结构蛋白中，其中Nsp2基因和功能存在多样性，Nsp2在不同的分离株中常有氨基酸缺失，是造成种特异性的主要原因。其中Nsp2序列中含有编码半胱氨酸蛋白酶，该酶具有剪切功能。同时Nsp2蛋白还参与了PRRSV多肽组合和病毒的复制等复杂的过程。在免疫方面，Nsp2含有较多的抗原决定表位，具有极强的免疫原性。



Nsp2结构和功能分析

Nsp2氨基端分析

```
gb|AAD12132.2|_428-535 -----HYSPPA
NSP2_HB AGKRARKPRSGATTMVAHHASSAHETRQATKHEGAGANKAEHLKRYSPPA
NSP2_JS AGKRARKTRSGATTMVAHYASSAHETRQATKHEGVGANKAEHLKRYSPPA
NSP2_TJ AGKRARKPRSGATTMVAHHASSAHETRQATKHEGAGANKAEHLKRYSPPA
NSP2_VR-2332 AGKRARKARSCATATVAGRALSVRETRQAKEHEVAGANKAEHLKHYSPPA
:*****

gb|AAD12132.2|_428-535 EGNCGWHCISAIANRMVNSKFETTLPERVRPPDDWATDEDLVNAIQILRL
NSP2_HB EGNCGWHCISAIANRMVNSNFETTLPERVRPSDDWATDEDLVNTIQILRL
NSP2_JS EGNCGWHCISAIANRMVNSNFETTLPKRVRPSDDWATDEDLVNTIQILRL
NSP2_TJ EGNCGWHCISAIANRMVNSNFETTLPERVRPSDDWATDEDLVNTIQILRL
NSP2_VR-2332 EGNCGWHCISAIANRMVNSKFETTLPERVRPPDDWATDEDLVNAIQILRL
*****:*****:****.*****:*****

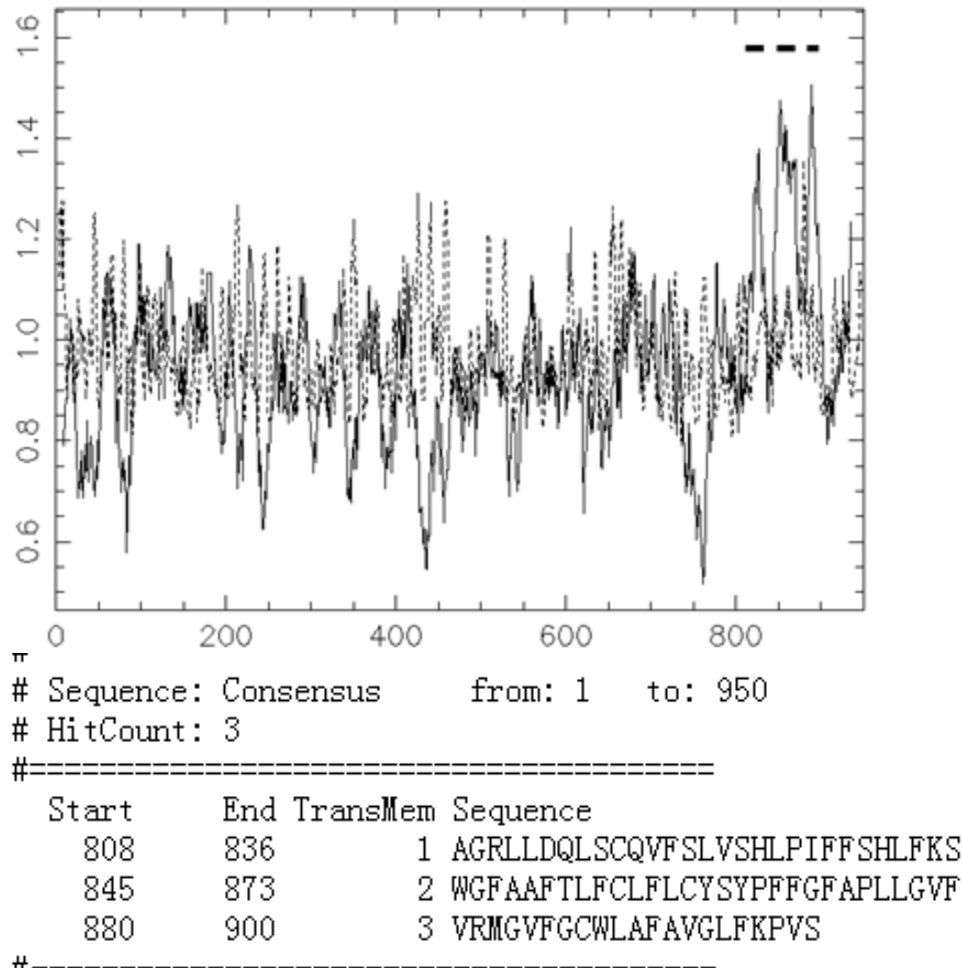
gb|AAD12132.2|_428-535 PAALDRNGACTSAKYVLKLEGEHWTVTVTPGMSPSLLPLECVQGCCGHKG
NSP2_HB PAALDRNGACGSAKYVLKLEGEHWTVSVIPGMSPTLLPLECVHGCCEHKG
NSP2_JS PAALDRNGACGSAKYVLKLEGGHWTVSVIPGMSPTLLPLECVQGCCGHKG
NSP2_TJ PAALDRNGACGSAKYVLKLEGEHWTVSVIPGMSPTLLPLECVQGCCGHKG
NSP2_VR-2332 PAALDRNGACTSAKYVLKLEGEHWTVTVTPGMSPSLLPLECVQGCCGHKG
***** *****: * *****:*****:*** **

gb|AAD12132.2|_428-535 GL-----
NSP2_HB GLVSPDAVEISGFDPACLDRLAKVMHLPSSSTIPAALAE LSDSNRPVSPA
NSP2_JS GLVSPDAVEISGFDPACLDRLAKVMHLPSSSTIPAALAE LSDSNRPVSPA
NSP2_TJ GLVSPDAVEISGFDPACLDRLAKVMHLPSSSTIPAALAE LSDSNRPVSPA
NSP2_VR-2332 GLGSPDAVEVSGFDPACLDRLAEVMHLPSSAIPAALAE MSGDSDRSASPV
**
```

Nsp2氨基端含有半胱氨酸蛋白酶(45-152位)，在各毒株中均没有缺失，由此可见是相当保守的。



用Tmap对Nsp2蛋白氨基酸序列进行分析，发现在808-836，845-873和880-900三个接近羧基端的区域存在跨膜区。





典型株和高致病性毒株Nsp2结构和功能分析

因为北美典型毒株VR-2332和欧洲型毒株LV的Nsp2基因和蛋白信息未单独收录在Genbank中，故阅读相关文献后用seqret程序提取相关毒株的Nsp2氨基酸序列，同时在Genbank中提取中国高致病性PRRSV毒株HB、TJ、JS的Nsp2氨基酸序列。

ORF	Protein product	Amino acid location of each cleavage product			Percent identity of SD-01-08 with VR and LV	
		SD-01-8-P33	VR	LV	VR	Lelystad
1a	Nsp1	1-385	1-383	1-385	52.2	92.0
	Nsp2	386-1229	384-1363	386-1246	33.8	90.6
	Nsp3	1230-1676	1364-1809	1247-1693	58.5	96.6
	Nsp4	1677-1879	1810-2013	1694-1896	61.1	97.0
	Nsp5	1880-2049	2014-2183	1897- 2066	68.2	95.9
	Nsp6	2050-2065	2184-2199	2067-2082	75.0	93.8
	Nsp7	2066-2334	2200-2458	2083-2351	45.2	96.7
	Nsp8	2335-2379	2459-2503	2352-2396	66.7	97.8
1b	Nsp9	1-645	1-640	1-645	74.2	98.9
	Nsp10	646-1087	641-1081	646-1087	65.3	97.7
	Nsp11	1088-1311	1082-1304	1088-1311	74.9	98.7
	Nsp12	1312-1463	1305-1457	1312-1463	39.5	97.4
ORF5	GP5	1-201	1-200	1-201	56.5	93.5

^a The polyprotein cleavage products are based on the proteolytic processing of EAV 1a and 1b proteins (Snijder et al., 1995, 1996; van Dinten et al., 1996; Allende et al., 1999; Wootton et al., 2000).



VR-2332和LV毒株Nsp2氨基酸序列比对结果

Pairwise Alignment Result

LENGTH	SCORE	IDENTITY	SIMILARITY	GAPS
1062	1048.5	327/1062 (30.8%)	449/1062 (42.3%)	283/1062 (26.6%)

VR-2332和TJ毒株Nsp2氨基酸序列比对结果

Pairwise Alignment Result

LENGTH	SCORE	IDENTITY	SIMILARITY	GAPS
980	3833.0	739/980 (75.4%)	797/980 (81.3%)	30/980 (3.1%)

LV和TJ毒株Nsp2氨基酸序列比对结果

Pairwise Alignment Result

LENGTH	SCORE	IDENTITY	SIMILARITY	GAPS
1019	1033.5	322/1019 (31.6%)	446/1019 (43.8%)	227/1019 (22.3%)



那么，典型株和高致病性毒株氨基酸序列又有什么区别呢？



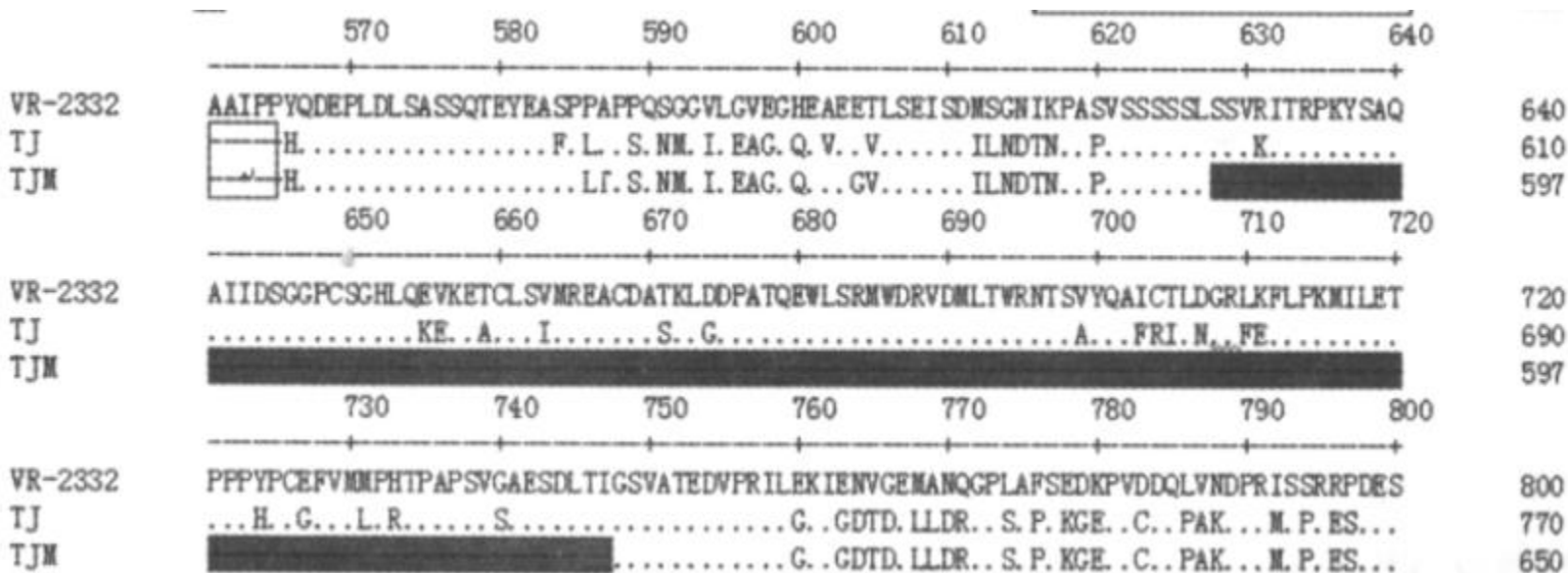


运行Weblab中的clustalw程序，以北美VR-2332毒株为当前序列，选取典型的中国高致病性PRRSV毒株TJ,HB,JS与北美毒株进行多序列比对，可以发现，TJ毒株Nsp2氨基酸序列在第480位和531-559位氨基酸都存在共30个氨基酸缺失现象。

```
NSP2_VR-2332  VKNYPRWTPPPPPKVVQPRKTKPVKSLPERKPVAPRRKVGSDCGSPVSLGGDVPNSWED
NSP2_HB       VKSYPRWTPPPPPRVRVQPRRTKSVKSLPEGKVPVAPRRKVRSDCGSPVLMGDNVPNGSEE
NSP2_JS       VKSYPRWTPPPPPRVRVQPRRTKSVKSLPEDKVPVAPRRKVRSDCGSPVLMGDNVPNGSEE
NSP2_TJ       VKSYPRWTPPPPPRVRVQPRRTKSVKSLLEYKVPVAPRRKVRSDCGSPVLMGDNVPNGSEE
                **. ***** :**** :*. **** * ***** ***** :*. :***. *:
NSP2_VR-2332  LAVSSPFDLPTPEPATPSSELVIVSSPQCIFRPATPLSEPAPIPAPRGTVSRPVTPLSE
NSP2_HB       -TVGGPLNFPTPSEPMPMSEPVLPASRRVPKLMTPLSGSAPVPAPRRTVTTTLT-----
NSP2_JS       -TVGDSLNFPTPSEPMPMSEPVLPASRRVPKLMTPLSGSAPVPAPRRTVTTTLT-----
NSP2_TJ       -TVGGPLNFPTPSEPMPMSEPILVPASRRVPKLLTPLSGSAPVPAPRRTVTTTLT-----
                :*... :::***. ** ** * :*: .: : : **** .**:** ** : .:*
NSP2_VR-2332  PIPVPAPRRKFQQVKRLSSAAAIPPYQDEPLDLSASSQTEYEASPPAPPQSGGVLGVEGH
NSP2_HB       -----HQDEPLDLSASSQTEYEAFLAPSQNMGILEAGGQ
NSP2_JS       -----HQDEPLDLSASSQTGYEAFLTPSQNMGALEAGGQ
NSP2_TJ       -----HQDEPLDLSASSQTEYEAFLAPSQNMGILEAGGQ
                :***** ** * :*. * * . *:
```



另外根据文献得到，TJ毒株经过细胞传代92次后得到致弱株TJM株Nsp2 在此缺失仍然存在的情况下发生了进一步的片段缺失，该段缺失为120 个氨基酸整段缺失，比以往发现的PRRSV 毒株Nsp2 缺失片段都大。





TJM 株Nsp2 蛋白的这120 个氨基酸的缺失与PRRSV 的毒力致弱有什么关系呢？





提取这120个氨基酸片段，对其进行功能预测，因为其降低了毒性，猜测其是否涵盖抗原表位，用weblab的Antigenic程序进行抗原表位预测，结果如下：

```
=====
:
: Sequence:      from: 1   to: 120
: HitCount: 6
=====
```

Max_score_pos at "*"

(1) Score 1.171 length 11 at residues 70->80

```
      *
Sequence: TSVYQAICTLD
          |           |
          70         80
```

Max_score_pos: 74

(2) Score 1.147 length 14 at residues 92->105

```
      *
Sequence: ETPPPYPCEFVMMP
          |           |
          92         105
```

Max_score_pos: 99



(3) Score 1.107 length 21 at residues 19->39

```

          *
Sequence: GGPCSGHLQE VKETCL SVMRE
          |             |
          19             39
Max_score_pos: 33
```

(4) Score 1.089 length 9 at residues 8->16

```

          *
Sequence: PKYSAQAI I
          |             |
          8             16
Max_score_pos: 13
```

(5) Score 1.086 length 9 at residues 107->115

```

          *
Sequence: TPAPSVGAE
          |             |
          107           115
Max_score_pos: 109
```



(6) Score 1.080 length 8 at residues 82->89

```

          *
Sequence: RLKFLPKM
          |             |
          82           89
Max_score_pos: 88
```



把该片段放于blastp中进行同源性比对，物种选择为猪，搜索结果
显示同源性较低，综合这两个结果，TJM毒株缺失的120个氨基酸
可能存在抗原表位。

```
>  sp|Q2VJ60.1|RN19A_PIG  RecName: Full=E3 ubiquitin-protein ligase RNF19A; AltName: Full=Double  
ring-finger protein; Short=Dorfin; AltName: Full=RING  
finger protein 19A  
Length=838
```

[GENE ID: 654326 RNF19](#) | ring finger protein 19 [Sus scrofa]

Score = 28.0 bits (80), Expect = 7e-05

Identities = 16/63 (25%), Positives = 24/63 (38%), Gaps = 2/63 (3%)

```
Query 8 PKYSAQAIIDSGGPCSGHLQEVK--ETCLSVMREACDATKLDDPATQEWLSRMWDRVDML 65  
P+ +A I + G C+ V E C M+E D L W + W R +  
Sbjct 302 PRCAAYIIKMNDGSCNHMTCAVCGCEFCWLCMKEISDLHYLSPSGCTFWGKKPWSRKKKI 361  
  
Query 66 TWR 68  
W+  
Sbjct 362 LWQ 364
```

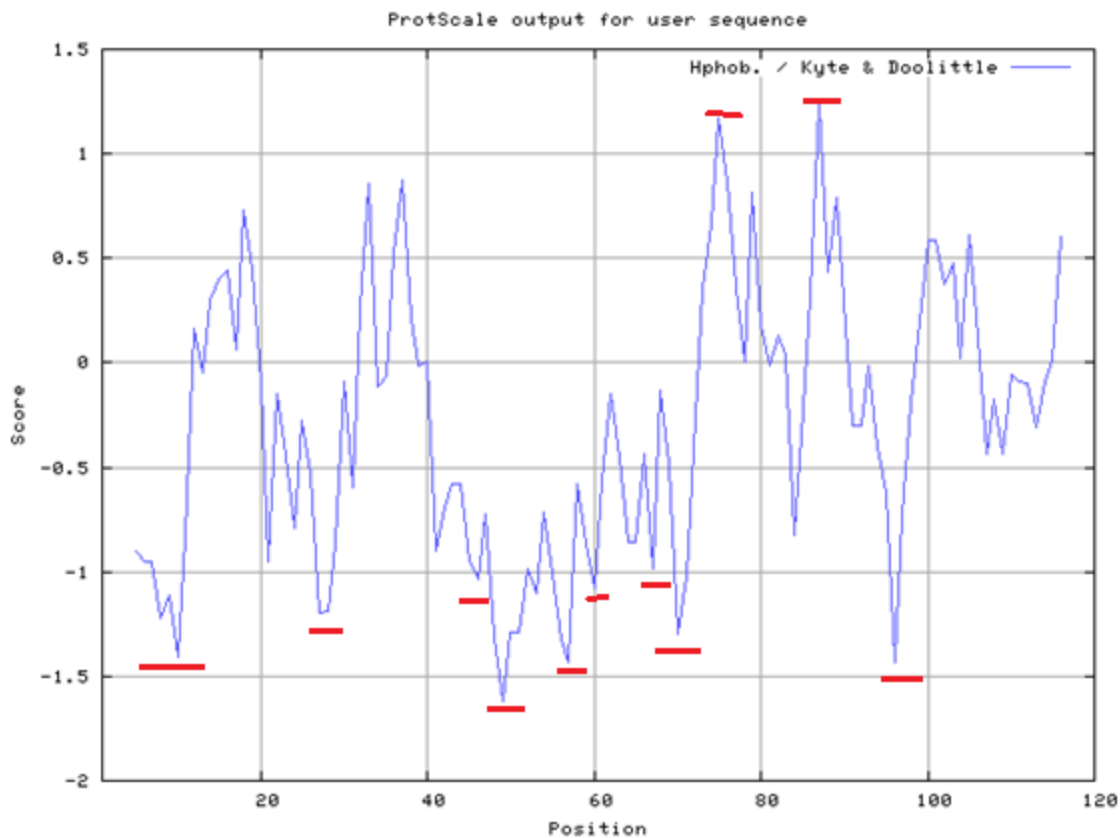


运用Garnier程序对缺失的120aa进行二级结构预测，结果显示， α 螺旋为34.6%，无规则卷曲为27.9%，二者总共占了62.5%

```
      .  10   .  20   .  30   .  40   .  50
      SSVRITRPKYSAQAIIDSGGPCSGHLQEVKETCL SVMREACDATKLD DPA
helix          HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
sheet EEEEE   EEEEE
turns          TTT   TTT TT
coil C   C   C   C   CCC
      .  60   .  70   .  80   .  90   . 100
      TQEWLSRMWDRV DMLTWRNTSVYQAICTLDGR LKFLPKMILETPPPYPCE
helix HHHHH          HHHH
sheet          EEE   EEEEE   EEEEE   E
turns          TTT T   TT TT TT   TTT   T   TT
coil          C   C   C   C   C
      . 110   . 120
      FVMPHTPAPSVGAESDLTI
helix          HHHHHH
sheet EEEE
turns          T
coil          CCCCCCCC
#-----
#
# Residue totals: H: 36   E: 29   T: 26   C: 29
#                   percent: H: 34.6 E: 27.9 T: 25.0 C: 27.9
#
#-----
#-----
# Total_sequences: 1
# Total_hitcount: 36
#
```



Expasy网站对该氨基酸片段进行疏水性分析，结果表明，大部分氨基酸的亲水性较强。





结论

1. 中国流行高致病PPRSV毒株是由北美毒株VR-2332变异得来，其Nsp2缺失的30个氨基酸与其高致病性无关，只能作为鉴定高致病性毒株的一个序列特征。

2. 从以上结构预测结果可以得出，TJM毒株缺少的120个氨基酸使Nsp2蛋白的二级结构发生了改变，并且相对于TJ强毒株，也少了6个抗原表位，而这些可能是造成了TJM毒株弱毒性的原因。而对其功能的进一步了解，则需要通过其他实验来发现。



参考文献

- 1.表达 P R R S V 强弱毒 N s p 2 的 M a r c - 1 4 5 细胞系的建立及 N s p 2 蛋白对 P R R S V 复制的影响, 王凤雪, 西北农业学报.
- 2.高致病性 PRRSV SC-JX01 株 Nsp2 基因的序列分析和抗原表位预测, 郭杨, 中国兽医杂志 2010 年(第 46 卷) 第 4 期.
3. Monoclonal antibody and porcine antisera recognized B-cell epitopes of Nsp2 protein of a Chinese strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, Yulin Yan, etc, Virus Research.
4. PRRSV 分离株 Nsp2 基因和 ORF5 基因的遗传变异分析, 王剑非, 家畜生态学报 Vol. 32 No. 1.
5. Heterogeneity in Nsp2 of European-like porcine reproductive and respiratory syndrome viruses isolated in the United States, Ying Fang, etc, Virus Research.
- 6.猪繁殖与呼吸综合征病毒非结构蛋白研究进展, 刘准, 动物医学进展, 2010, 31(12) : 12—124.



致谢

1. 首先感谢罗老师半年来的悉心指导和无私付出，正是罗老师的辛勤工作，使我们对生物信息学这门课程有了更深入的了解，并熟练掌握了相关软件的操作。同时，我们也被罗老师高尚的人格所感染，我们庆幸在研究生时期遇到像罗老师一样的精神导师。
2. 再次感谢我们G06小组的每个成员，半年的交流合作，增强了组员间的沟通协作能力及相关软件操作技术，同时也增进了友谊组员们的友谊。感谢每个G06小组组员的付出。



中国农业科学院上海兽医研究所
Shanghai Veterinary Research Institute, CAAS

谢谢聆听~