

# 虎纹蛙病毒的 ATP 酶基因克隆和序列分析\*

苗素英, 张 旻, 叶巧真, 王晓红, 江静波  
(中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

**摘 要:** 利用对应于蛙病毒-3 型 (FV3) ATP 酶基因 (ATPase) 的 162~178 nt 和 1 186~1 174 nt 碱基序列作为引物, 采用 PCR 方法扩增得到虎纹蛙病毒 (RTV) 的 ATP 酶基因, 并对该基因进行克隆、测序和分析。基因读码框大小为 945 bp, 预计可编码一相对分子质量为 35 500 的蛋白质。氨基酸序列比较结果, RTV 的 ATPase 基因与虹彩病毒科蛙病毒属的代表种 FV3 的一致性最高, 为 87.9%, 与该科其它脊椎动物病毒的一致性在 50%~52% 之间。ATP 酶蛋白质结构域分析可知该基因编码的 ATP 酶含有 Walker 型 ATP 酶 AAA 族蛋白质的全部结构域, 其中既具有 Walker 型 ATP 酶所具有的 Walker A 和 Walker B 保守区, 还含有 AAA 族蛋白质基因所具有的 SRH 高度保守区, 因此, 该基因是一完整的活性蛋白编码基因。

**关键词:** 虎纹蛙病毒; ATP 酶基因; 克隆; 序列分析

**中图分类号:** Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2003) 02-0074-04

虹彩病毒科 (Iridoviridae) 病毒是一类大型胞浆内 DNA 病毒, 可感染脊椎动物和无脊椎动物, 从已作了全基因组序列测定的病毒看, 脊椎动物虹彩病毒基因组的编码能力在 100~200 个蛋白质之间, 脊椎动物虹彩病毒中与已知蛋白质同源的基因主要约十余个 (GenBank 数据库), 其中研究较多的是主衣壳蛋白基因和胞嘧啶 DNA 甲基转移酶基因, 其它基因的结构和功能还有待作进一步的分析鉴定。

近十几年来, 虹彩病毒已被认为是水产养殖上的一类重要病原, 可引起贝类、鱼类、两栖类和爬行类的疾病, 危害较大。从人工养殖的泰国虎纹蛙 *Rana tigrina* Cantor 中分离到的一株可引起虎纹蛙幼体发病死亡的病毒, 根据形态学和细胞培养特征观察 (王晓红等, 待发表) 以及病毒衣壳蛋白基因的分析, 已确定它在分类上属于虹彩病毒科, 蛙病毒属 (*Ranavirus*), 并命名为虎纹蛙病毒 (*Rana tigrina ranavirus*, RTV)<sup>[1]</sup>。本文扩增、克隆了 RTV 的 ATP 酶 (adenosine triphosphatase, ATPase) 基因, 并对 ATPase 蛋白的结构域进行了分析, 为该基因的体外表达和功能鉴定奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 病毒和细胞

参见文献 [1]。

### 1.2 病毒核酸的提取

参见文献 [1]。

### 1.3 PCR 扩增反应

用于 ATPase 扩增的引物为 ATPF 和 ATPR, 其核苷酸序列分别对应于蛙病毒-3 型 (FV3) ATPase 基因的 162~178 nt 和 1 171~1 186 nt, 由上海生工生物工程公司 (简称上海生工) 合成, 引物序列如下:

ATPF: 5' - CCTCAACACCATATCTC - 3',

ATPR: 5' - ACACTAGATGTCCTA - 3'。

PCR 扩增反应体系和扩增反应条件见文献 [1]。

### 1.4 PCR 产物的纯化和克隆

PCR 产物经  $w = 1\%$  琼脂糖凝胶电泳鉴定, 用 PCR 产物纯化试剂盒 (上海生工) 纯化, 与 pUCm-T (上海生工) 载体连接后转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 用氨苄青霉素抗性和蓝白斑筛选阳性克隆, 并进行酶切鉴定。

### 1.5 DNA 序列测定和分析

克隆片段采用 M13 通用引物进行双向测序, 测序由上海生工完成。序列分析采用的是 Blast、DNASar 软件。本实验所用的其他虹彩病毒参比序列取自 GenBank。用于 ATPase 基因比较的序列为 FV3 (AAA43823)、LCDV-1 (NP078656)、CIV (AAB94422)、鳃病毒 (AAL73346)、ISKNV

\* 收稿日期: 2002-05-23

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (990255)

作者简介: 苗素英 (1965 年生), 女, 副教授; E-mail: miaosy@163.net

(AAL98847)、GIV (AAL68652)、LMBV (AAL68654)、RSIV (BAA28670)、肺鱼虹彩病毒 (BAA96408)。

## 2 结果

### 2.1 PCR 扩增及其克隆

采用 ATPF 和 ATPR 引物对虎纹蛙病毒的核酸进行 PCR 扩增, 扩增产物电泳结果可见一明显条带, 约 1 000 bp (图 1), 与预期的大小相近。PCR 产物经纯化、连接、转化后的阳性克隆, 经 *Bam*H I 单酶切和 *Eco*R I 和 *Xba* I 双酶切鉴定, 单酶切结果可见约为 750 bp 和 3 000 bp 两条带, 双酶切可见约为 1 000 bp 和 2 700 bp 的两条带, 与 FV3 ATPase 基因一致 (图 2)。

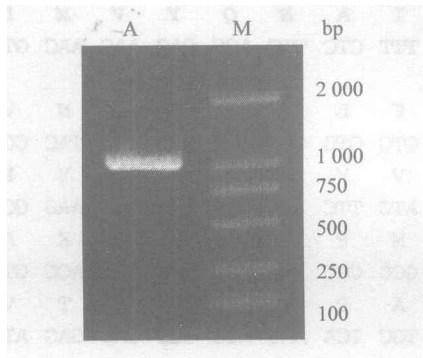


图 1 虎纹蛙病毒核酸 PCR 扩增结果

Fig.1 PCR products of RTV DNA

M 为核酸相对分子质量标准; A 为扩增产物

虎纹蛙病毒 ATPase 基因编码的氨基酸序列见图 3, 其中包括 39 个强碱性氨基酸 (K、R)、48 个强酸性氨基酸 (D、E)、102 个疏水性氨基酸 (A、I、L、F、W、V) 和 78 个极性氨基酸 (N、C、Q、S、T、Y), 从其氨基酸组成分析可见, Asp 含量最高, 为 9.52%, Cys、His、Trp 的含量最低, 仅为 1.59%。

蛋白质结构域搜索发现 ATPase 蛋白中含有 Walker 型 ATP 酶 AAA 族蛋白质的结构域 (图 4), 其中既具有 Walker 型 ATP 酶所具有的 Walker A (35-42aa) 和 Walker B (110-117aa) 保守区, 还含有 AAA 族蛋白质所具有 SRH 高度保守区 (146-162aa) (图 3)。

同源性分析结果, 虎纹蛙病毒 ATPase 蛋白的氨基酸序列与虹彩病毒科蛙病毒属的代表种 FV3 的一致性最高, 为 88%; 与淋巴囊肿病毒属代表种比目鱼病毒 (LCDV-1) 的 NTPase 一致性为 52%; 与石斑鱼虹彩病毒 (GIV)、真鲷虹彩病毒 (RSIV)、肺鱼虹彩病毒 (african lampegy iridovirus) 和鳊鱼虹彩病毒 (siniperca chuatsi virus) 的 ATPase 蛋白的一致性在 50% ~ 52% 之间; 与昆虫虹彩病毒 CIV 的一致性为 37%。

### 3 讨论

虹彩病毒中, 对 ATP 具有高度亲和力的 NTPase 的活性早在 CIV<sup>[2]</sup>、FV3<sup>[3]</sup> 和 LCDV-1<sup>[4]</sup> 的纯化病毒粒子中就有研究, FV3 中的 ATPase 与宿主细胞本身具有的 ATPase 明显不同, 是病毒特异的, 这种酶位于病毒的核心, 能将 ATP 水解为 ADP<sup>[3]</sup>; 而 LCDV-1 的酶活性位置是在核衣壳与囊膜之间<sup>[4]</sup>。如今, DNA 的序列测定结果, 在 FV3、LCDV-1、CIV、RSIV、鳊鱼病毒和肺鱼病毒等虹彩病毒中都得到了与已知 ATPase 同源的基因的完整或部分序列 (GenBank 数据库), 相对于其它基因来看, 本文克隆得到的虎纹蛙病毒 ATPase 基因序列与上述虹彩病毒 ATPase 基因的一致性不高, 与 FV3 的一致性为 88%, 其阅读框的大小相差 24 bp, 与 CIV 的一致性仅为 37%。

AAA 蛋白质族是目前较热的研究方向, 近几年来, 已鉴定了 200 多个该族的基因<sup>[5]</sup>。AAA 族蛋白质的基因有 3 个保守区域, WalkerA 和 WalkerB 是所有 Walker 型 ATPase 均具有的保守区域, 而另一高度保守的区域 SRH 区为 AAA 家族所特有<sup>[10]</sup>。WalkerA、B 区是 ATP 酶的结合位点, 而 SRH 区则可能是催化中心<sup>[5,7]</sup>。除了结合和水解 ATP 的功能

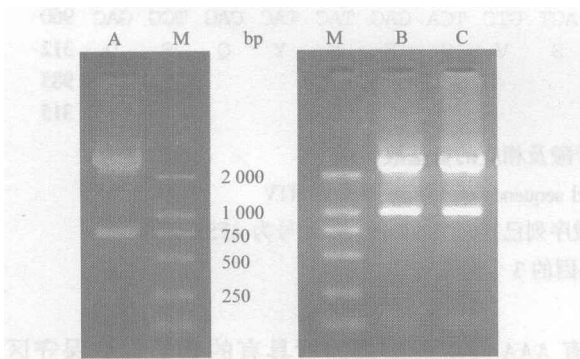


图 2 重组质粒酶切鉴定电泳图

Fig.2 Restriction pattern of recombinant plasmid

M 为 DNA 相对分子质量标准; A 为 *Bam*H I 单酶切结果;

B 和 C 为 *Eco*R I / *Xba* I 双酶切结果

### 2.2 ATPase 基因序列及分析

重组质粒经 M13 通用引物双向测序, 可知插入片段为 985 bp, 其中虎纹蛙病毒 ATPase 基因的读码框大小为 945 bp, GC 含量为 55% (图 3)。

由 ATPase 基因核苷酸序列推断, 该基因编码一个由 315 个氨基酸组成的多肽链 (图 3), 其相对分子质量为 35 500, 等电点为 5.11。

|          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |     |     |     |     |          |          |          |          |          |          |     |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----|-----|-----|-----|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----|
| 1        | CGG      | AGA      | GCG      | TAG      | ATT      | AAA      | AGA      | GAT      | ATG      | GAA      | CAA | GTA | CCC | ATA | AAG      | GAA      | ATG      | AGG      | TTG      | TCT      | 60  |
| 1        |          |          |          |          |          |          |          |          | M        | E        | Q   | V   | P   | I   | K        | E        | M        | R        | L        | S        | 12  |
| 61       | GAC      | CTG      | AGG      | CCC      | AAC      | GAC      | AAG      | AGC      | ATA      | GAC      | ACC | GAC | CTA | GGC | GGA      | ACT      | AAG      | CTC      | GTT      | GTC      | 120 |
| 13       | D        | L        | R        | P        | N        | D        | K        | S        | I        | D        | T   | D   | L   | G   | G        | T        | K        | L        | V        | V        | 32  |
| 121      | ATA      | GGC      | AAG      | CCG      | GGG      | TCC      | GGC      | AAG      | TCC      | ACC      | CTG | ATC | AAG | GCC | CTT      | CTC      | GAC      | TCC      | AAG      | AGG      | 180 |
| Walker A |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |     |     |     |     |          |          |          |          |          |          |     |
| 33       | I        | <b>G</b> | <b>K</b> | <b>P</b> | <b>G</b> | <b>S</b> | <b>G</b> | <b>K</b> | <b>S</b> | T        | L   | I   | K   | A   | L        | L        | D        | S        | K        | R        | 52  |
| 181      | CAC      | ATC      | ATA      | CCG      | TGC      | GCG      | GTG      | GTG      | ATA      | TCG      | GGG | TCC | GAG | GAG | GCA      | AAC      | GGC      | TTC      | TAC      | AAG      | 240 |
| 53       | H        | I        | I        | P        | C        | A        | V        | V        | I        | S        | G   | S   | E   | E   | A        | N        | G        | F        | Y        | K        | 72  |
| 241      | GGG      | GTG      | GTG      | CCC      | GAC      | CTC      | TTT      | ATC      | TAC      | CAC      | CAG | TTC | TCC | CCC | TCC      | ATC      | ATA      | GAC      | AGG      | ATC      | 300 |
| 73       | G        | V        | V        | P        | D        | L        | F        | I        | Y        | H        | Q   | F   | S   | P   | S        | I        | I        | D        | R        | I        | 92  |
| 301      | CAC      | AGG      | AGG      | CAG      | GTC      | AAG      | GCC      | AAG      | GCC      | GAA      | ATG | GGC | TCA | AAA | AAG      | TCC      | TGG      | CTC      | CTG      | GTG      | 360 |
| 93       | H        | R        | R        | Q        | V        | K        | A        | K        | A        | E        | M   | G   | S   | K   | K        | S        | W        | <b>L</b> | <b>L</b> | <b>V</b> | 112 |
| 361      | GTC      | ATA      | GAC      | GAC      | TGC      | ATG      | GAC      | AAC      | GCC      | AAG      | ATG | TTC | AAC | GAC | AAG      | GAG      | GTG      | AGG      | GCG      | CTG      | 420 |
| Walker B |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |     |     |     |     |          |          |          |          |          |          |     |
| 113      | <b>V</b> | <b>I</b> | <b>D</b> | <b>D</b> | <b>C</b> | M        | D        | N        | A        | K        | M   | F   | N   | D   | K        | E        | V        | R        | A        | L        | 132 |
| 421      | TTT      | GAG      | AAC      | GGC      | AGG      | CAC      | TGG      | AAC      | GTG      | TTG      | GTG | GTT | ATC | GCC | AAC      | CAG      | TAT      | GTC      | ATG      | GAT      | 480 |
| 133      | F        | E        | N        | G        | R        | H        | W        | N        | V        | L        | V   | V   | I   | A   | <b>N</b> | <b>Q</b> | <b>Y</b> | <b>V</b> | <b>M</b> | <b>D</b> | 152 |
| 481      | CTC      | ACC      | CCC      | GAC      | CTG      | AGA      | TCC      | TCT      | GTG      | GAC      | GGC | GTG | TTT | CTC | TTT      | AGG      | GAG      | AAC      | AAC      | GTC      | 540 |
| SRH 区    |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |     |     |     |     |          |          |          |          |          |          |     |
| 153      | <b>L</b> | <b>T</b> | <b>P</b> | <b>D</b> | <b>L</b> | <b>R</b> | <b>S</b> | <b>S</b> | <b>V</b> | <b>D</b> | G   | V   | F   | L   | F        | R        | K        | N        | N        | V        | 172 |
| 541      | ACT      | TAC      | AGG      | GAC      | AAG      | ACG      | TAC      | GCA      | AAC      | TTT      | GCC | AGC | GTG | GTG | CCC      | AAG      | AAG      | CTC      | TAC      | CCC      | 600 |
| 173      | T        | Y        | R        | D        | K        | T        | Y        | A        | N        | F        | A   | S   | V   | V   | P        | K        | K        | L        | Y        | P        | 192 |
| 601      | ACA      | GTC      | ATG      | GAG      | ACT      | GTG      | TGT      | CAG      | AAT      | TAC      | AGG | TGC | ATG | TTC | ATC      | GAC      | AAC      | ACA      | AAG      | GCC      | 660 |
| 193      | T        | V        | M        | E        | T        | V        | C        | Q        | N        | Y        | R   | C   | M   | F   | I        | D        | N        | T        | K        | A        | 212 |
| 661      | ACA      | GAC      | AAC      | TGG      | CAT      | GAC      | AGC      | GTC      | TTT      | TGG      | TAC | AAG | GCC | CCC | TAC      | AGC      | AAG      | TCG      | ACC      | GTG      | 720 |
| 213      | T        | D        | N        | W        | H        | D        | S        | V        | F        | W        | Y   | K   | A   | P   | Y        | S        | K        | S        | T        | V        | 232 |
| 721      | GCT      | CCG      | TTT      | GGG      | GCC      | AGG      | TCC      | TAC      | TGG      | AAG      | TAC | GCC | TGC | TCA | AAG      | ACG      | GGC      | GAG      | GAG      | ATG      | 780 |
| 233      | A        | P        | F        | G        | A        | R        | S        | Y        | W        | K        | Y   | A   | C   | S   | K        | T        | G        | E        | E        | M        | 252 |
| 781      | CCA      | GCG      | GTT      | TTC      | GAC      | AAT      | GTA      | AAG      | ATC      | CTG      | GGA | GAC | TTG | CTG | CTC      | AAG      | GAG      | CTG      | CCC      | GAA      | 840 |
| 253      | P        | A        | V        | F        | D        | N        | V        | K        | I        | L        | G   | D   | L   | L   | L        | K        | E        | L        | P        | E        | 272 |
| 841      | GCG      | GGA      | GAG      | GCT      | CTC      | GTC      | ACG      | TAC      | AAC      | GGG      | AAA | GAT | GGC | CCT | AGC      | GAC      | GAC      | GA       | GAT      | GGC      | 900 |
| 273      | A        | G        | E        | A        | L        | V        | T        | Y        | N        | G        | K   | D   | G   | P   | S        | D        | D        | E        | D        | G        | 292 |
| 901      | CCT      | AGC      | GAT      | GAC      | GAA      | GAG      | GGT      | CTG      | AGC      | AAA      | GAC | AGT | GTC | TCA | GAG      | TAC      | TAC      | CAG      | TCG      | GAC      | 960 |
| 293      | P        | S        | D        | D        | E        | E        | G        | L        | S        | K        | D   | S   | V   | S   | E        | Y        | Y        | Q        | S        | D        | 312 |
| 961      | TTG      | GAC      | GAT      | TAG      | GGA      | CAT      | CTA      | GTG      | T        |          |     |     |     |     |          |          |          |          |          |          | 985 |
| 313      | L        | D        | D        | *        |          |          |          |          |          |          |     |     |     |     |          |          |          |          |          |          | 315 |

图 3 虎纹蛙病毒 ATP 酶基因的核苷酸及相应的氨基酸序列

Fig.3 DNA nucleotide and deduced amino acid sequence of ATPase gene of RTV  
(虎纹蛙病毒 (*Rana tigrina* ranavirus) ATPase 基因核苷酸序列已登录 GenBank, 录入号为 AF511654)  
黑斜体分别示 AAA 蛋白质基因的 3 个保守区

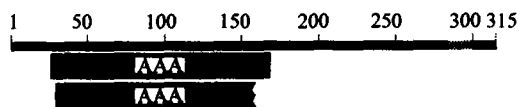


图 4 虎纹蛙病毒 ATPase 蛋白所包含的蛋白质结构域

Fig.4 Organization of conserved domains in RTV ATPase gene

外, 该类蛋白质还具有多种细胞学活性如基因的表达、细胞周期的调节、蛋白质的降解、过氧化酶体的装配和 26S 蛋白酶功能等<sup>[8,9]</sup>。AAA 族蛋白质基因序列的高度保守性和功能的多样性这一矛盾的存在, 引起了生物学家广泛的兴趣。本研究所得到的虎纹蛙病毒的 ATPase 基因经结构域分析, 发现其

具有 AAA 族蛋白质基因所具有的全部三个保守区域 (图 3), 说明该基因所编码的蛋白质也是 Walker 型 AAA 族蛋白质的成员, 同时也说明它是一完整的活性蛋白编码基因, 它的功能还有待于鉴定。

## 参考文献:

- [1] 苗素英, 何建国, 张利红, 等. 虎纹蛙病毒主要衣壳蛋白基因的克隆和序列分析[J]. 水产学报, 2001, 25: 559-563.
- [2] MONNIER C, DEVAUCHELLE G. Enzyme activities associated with an invertebrate iridovirus: Nucleotide phosphohydrolyase activity associated with iridescent virus type 6 (*Chilovirulent virus*) [J]. J Virol, 1976, 19: 180-186.

- [3] VILAGINES R, MCAUSLAN B R. Proteins of polyhedral cytoplasmic deoxyribovirus. II. Nucleotide phosphohydrolase activity associated with frog virus 3[J]. J Virol, 1971, 7:619 - 624.
- [4] FLUGEL R M, DARAI G, GELDERBLOM H. Viral proteins and adenosine triphosphate phosphohydrolase activity of fish lymphocystis disease virus[J]. Virology, 1982, 122:48 - 55.
- [5] KARATA K, INAGAWA T, WILKINSON A J, et al. Dissecting the role of a conserved motif (the second region of homology) in the AAA family of ATPases[J]. J Biol Chem, 1990, 274:26225 - 26231.
- [6] SWATTIELD J C, BROMBERG J F, JOHNSTON S A. Nature, 1992, 357:698 - 700.
- [7] BEYER A. Sequence analysis of the AAA protein family[J]. Protein Sci, 1997, 6(10): 2043 - 2046.
- [8] CONFALONIERI F, DUGUET T. A 200-amino acid ATPase module in search of a basic function[J]. Bioassays, 1995, 17(7):630 - 650.
- [9] PATEL S, LATTERICH M. The AAA team: related ATPases with diverse functions[J]. Trends Cell Biol, 1998, 8:65 - 71.

## Cloning and Analysis of RTV ATPase Gene

MIAO Su-ying, ZHANG Min, YE Qiao-zhen, WANG Xiao-hong, JIANG Jing-bo  
(School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

**Abstract:** The putative adenosine triphosphatase (ATPase) gene of *Rana tigrina* ranavirus (RTV) was amplified, cloned and sequenced. The ORF of ATPase gene consists of 945 bp, which codes for a protein of 315 aa with a predicted molecular mass of 35 500. The identity of the ATPase gene was 88% and 52% to that of frog virus 3 (FV3) and lymphocystis disease virus (LCDV-1), respectively. The RTV ATPase protein was belonged to AAA (for ATPase associated with diverse cellular activities) protein family of the Walker-type ATPases. There were all of three highly conserved motifs (Walker A, Walker B and SRH) of AAA protein within the amino acid sequence of the RTV ATPase.

**Key words:** *Rana tigrina* ranavirus; ATPase gene; clone; sequence analysis