

犬细小病毒 NS1 非结构蛋白可诱导细胞凋亡

潘红丽¹, 仲飞^{1*}, 潘素敏^{1,3}, 李秀锦², 张峰¹, 张考¹, 陈慧慧¹

¹ 河北农业大学动物医学院基础兽医部, 农业部动物疫病病原生物学华北科学观察实验站, 保定 071001

² 燕山大学环境与化学工程学院生物工程系, 秦皇岛 066004

³ 河北科技师范学院动物科技学院, 秦皇岛 066004

摘要: 【目的】研究犬细小病毒 (Canine parvovirus, CPV) 非结构蛋白 NS1 在 CPV 引起宿主细胞凋亡中的作用, 初步探讨 CPV 引起细胞凋亡的机制。【方法】首先采用 PCR 方法从犬细小病毒基因组中扩增 NS1 编码基因, 然后利用 pcDNA3.1A 质粒构建 NS1 真核表达载体 pcDNA-NS1, 并通过 HEK293FT 细胞瞬时表达 NS1 重组蛋白, 用 Western-blot 检测以确定重组 NS1 蛋白能否在真核细胞中表达。然后用 CPV 感染和用 pcDNA-NS1 表达载体转染 F81 宿主细胞, 通过 AnnexinV/PI 双染法检测磷脂酰丝氨酸外翻和通过化学发光法检测 caspase-3/7 活性, 分析感染 CPV 或转染 NS1 基因对 F81 宿主细胞凋亡的影响。【结果】结果表明, 本实验扩增的 NS1 基因序列与 GenBank 的序列一致, 构建的表达载体结构正确, 并能够介导 NS1 基因在真核细胞中表达。感染 CPV 和转染 NS1 基因均能诱导 F81 细胞膜磷脂酰丝氨酸外翻和明显提高细胞内 caspase-3/7 的活性, 表明 CPV 和 NS1 蛋白均能引起细胞的凋亡。【结论】CPV 诱导宿主细胞凋亡与其编码的 NS1 非结构蛋白有关。

关键词: 犬细小病毒, NS1 蛋白, 细胞凋亡

中图分类号: S852 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2012) 03-0367-07

犬细小病毒病是由犬细小病毒 (Canine parvovirus, CPV) 引起的一种急性传染病。此病主要表现急性出血性胃肠炎和急性心肌炎, 传染性强, 发病率和死亡率高, 是一种危害犬, 特别是幼犬的一种重要的传染性疾病^[1-2]。近 20 多年来, 国内外学者对犬细小病毒病的流行病学、病原生物学、诊断和防治方面进行了大量研究^[3-5], 但对犬细小病毒病的发病机制了解甚少。已有研究证实^[6], 在体内 CPV 感染可诱导肠粘膜上皮细胞的凋亡和坏死, 进而引起继发感染。芬兰学者 Janna Nykky 等^[7]研究发现

在体外 CPV 感染猫肾细胞 NLFK 和犬纤维瘤细胞 A72 可以引起细胞凋亡。CPV 是如何引起细胞凋亡的, 这一作用与病毒的哪一种编码蛋白有关尚未见报道。许多学者在研究其它动物 (包括人) 的细小病毒时发现, 细小病毒感染细胞后可以引起细胞的凋亡和坏死, 并且证明这一凋亡作用与病毒的 NS1 非结构蛋白有关。如 Hristov 等^[8]研究表明鼠细小病毒 H-1 的 NS1 蛋白能够使细胞周期停滞在 G2 期, 从而诱导细胞凋亡; Moffatt 等^[9]研究显示人细小病毒 B19 的 NS1 蛋白通过激活 caspase-3 诱导红

基金项目: 国家自然科学基金 (30771586); 河北省自然科学基金 (C2008000244)

* 通信作者。Tel: +86-312-7528473; E-mail: feizhong2000@yahoo.com

作者简介: 潘红丽 (1986-), 女, 河北石家庄人, 硕士研究生, 主要从事基因工程与分子免疫学方面的研究。E-mail: panhongli12345@126.com

收稿日期: 2011-10-17; 修回日期: 2012-01-13

细胞系 K562 和 UT7/EPO 细胞的凋亡。由此可见 NS1 蛋白是细小病毒非常重要的致病因子。为了研究 CPV 引起细胞凋亡是否与病毒 NS1 非结构蛋白有关,本实验在细胞水平上通过转染 NS1 基因,研究 NS1 蛋白对细胞凋亡的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种、载体、细胞株及病毒:大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 由本实验室保存; pcDNA3.1A 载体购自美国 Invitrogen 公司;人胚胎肾细胞 HEK293FT 由中科院微生物所惠赠;猫肾细胞 F81 为本实验室保存细胞株;犬细小病毒 CPV-2a 型毒株^[10]由中国农业大学刘维全博士惠赠。

1.1.2 主要试剂和仪器:限制性内切酶,IPTG,X-gal,质粒小量提取试剂盒,Caspase-Glo3/7 assay 均购自美国 Promega 公司;蛋白胨和酵母提取物购自英国 Oxoid 公司;琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自

天根生化科技(北京)有限公司;预染蛋白分子量 Marker 购自 Bio-Rad Laboratories 公司;小鼠抗 His 单克隆抗体购自 Santa Cruz Biotechnology 公司;碱性磷酸酶标记兔抗小鼠 IgG 抗体购自 Vector Laboratories 公司;TansStart FastPfu DNA 聚合酶,pEASY-Blunt Cloning Kit 均购自北京全式金生物技术有限公司;Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit 购自 eBioscience 公司;DMEM,胎牛血清均购自 Gibco 公司;脂质体 LipofectamineTM 2000 购自 invitrogen 公司;其它试剂均为国产分析纯。ATC201 型 PCR 仪为美国阿波罗公司产品;MCO-15AC 型 CO₂ 恒温培养箱为日本三洋公司产品;CX31 荧光显微镜为日本 Olympus 公司产品;BPCL-L 微弱发光测量仪为中国科学院生物物理研究所产品。

1.2 NS1 基因的克隆

参考 GenBank 已发表的犬细小病毒非结构蛋白 NS1 基因的序列(No. M_19296),设计 2 对引物用于扩增犬细小病毒 NS1 基因(表 1)。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

表 1 扩增犬细小病毒 NS1 基因的引物

Table 1 Primers for amplification of CPV NS1 gene

Primers	Sequence (5'→3')	Sizes/bp	Restriction sites
NS1-F	CGCGGATCCACC <u>ATGTCTGGCAACCACTATACTG</u>	2030	BamH I
NS1-R	CGGCACCGGT <u>TTAATCCAAGTCGTCTCGAAAATC</u>		Age I
NS1-F	CGCGGATCCACC <u>ATGTCTGGCAACCACTATACTG</u>	2027	BamH I
NS1/MH-R	CGGCACCGGT <u>ATCCAAGTCGTCTCGAAAATCTTC</u>		Age I

The sizes of the amplified PCR products include the corresponding primers. The italic and underlined letters indicate restriction sites. The shadowed letters represent the complementary sequences against the template DNA.

鉴于实验室目前缺少犬细小病毒 NS1 蛋白的特异性抗体,在下游引物 NS1/MH-R 设计时去除犬细小病毒 NS1 基因的终止密码子,这样可将犬细小病毒 NS1 基因与 pcDNA3.1A 载体上的 His 标签融合,便于表达产物的鉴定。另一个下游引物 NS1-R 中包含终止密码子,用于构建与 His 标签非融合真核表达载体。

用犬细小病毒感染 F81 细胞,采用 Hirt 法^[11]提取病毒基因组 DNA,然后以病毒基因组 DNA 为模板,通过 PCR 方法扩增犬细小病毒 NS1 基因。PCR 热循环条件:94℃ 预变性 4 min,94℃ 变性 1 min,58℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 2 min,30 个循环,72℃ 延伸 10 min,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,然后将纯化的 PCR 产物克隆到 pEasy-Blunt 载体上,

送上海生工生物工程技术有限公司测序。

1.3 NS1 基因表达载体的构建

利用 pcDNA3.1A 真核表达载体,通过 BamH I 和 Age I 位点分别将 NS1 基因从 pEasy-Blunt 载体上转到 pcDNA3.1A 质粒中的 BamH I 和 Age I 位点上,构建成与 His 标签融合和与 His 标签非融合的 NS1 基因的真核表达载体,pcDNA-NS1/His 和 pcDNA-NS1。

1.4 NS1 蛋白的表达及鉴定

用质粒抽提试剂盒制备 pcDNA-NS1/His 重组质粒,采用磷酸钙转染法^[12]将 15 μ g 重组质粒转染 T25 细胞瓶培养的 HEK293FT 细胞,48 h 后裂解细胞。与此同时,用空载体 pcDNA3.1A 转染 HEK293FT 细胞作为阴性对照。

采用 Western blot 法鉴定表达产物, 首先蛋白样品经 SDS-PAGE 凝胶电泳, 然后印迹到硝酸纤维素膜上, 在含有 5% 脱脂奶粉的 TBST 中 4°C 封闭过夜。然后用 1:500 倍稀释的鼠抗-His 单克隆抗体(一抗)在室温杂交 2 h, 再以 1:500 倍稀释碱性磷酸酶标记羊抗小鼠抗体(二抗)杂交 1 h, 最后加入 2 ml 显色液(NBT/BCIP)显色 5-10 min, 自来水冲洗终止反应, 根据膜上的显色带判断结果, 最后用扫描仪记录显色图谱。

1.5 细胞感染和转染

细胞感染: 取对数期生长状态良好的 F81 细胞, 以 2×10^5 细胞/ml 接种于 24 孔或 96 孔板中, 加入 CPV (MOI:30) 病毒悬液作为 CPV 感染组, 同时设置未作任何处理的 F81 细胞为空白对照。

细胞转染: F81 细胞传代 24 h 后, 由 Lipofectamine 2000 脂质体介导用 pcDNA-NS1 质粒转染贴壁细胞(转染组), 同时用 pcDNA3.1A 空载体转染细胞(阴性对照组)。

1.6 Annexin V/PI 双染色法检测细胞凋亡

将 F81 细胞培养在 24 孔板中, 设立空白对照组、CPV 感染组、转染 pcDNA-NS1 组和阴性对照组; 24 h 后, 参照 Annexin-V-FITC Apoptosis Detection Kit 试剂盒说明对细胞进行染色。主要过程为: 用胰酶消化细胞, 用 PBS 洗细胞 3 次, 将细胞悬浮于结合缓冲液中。取 100 μ L 细胞悬浮液, 加入 5 μ L Annexin-V-FITC 和 5 μ L 250 ng/ μ L PI, 混匀后室温避光孵育 15 min, 用结合缓冲液洗一次, 然后在荧光显微镜下检测细胞凋亡情况。

1.7 Caspase-3/7 活性检测

将 F81 细胞培养在 96 孔板中, 设立空白对照组、CPV 感染组、转染 pcDNA-NS1 组和阴性对照组; 感染 CPV (MOI:30) 和转染质粒 12 h 24 h 36 h 和 48 h 后, 按照 Caspase-Glo3/7 assay 试剂盒操作说明, 加入 100 μ L Caspase-Glo3/7 试剂于 96 孔板中, 轻轻的混匀, 室温孵育 90 min, 然后用微弱发光测量仪测定相对发光值(Relative Luminescence), 相对发光值表示 Caspase-3/7 的活性。实验共重复 3 次。

1.8 数据统计方法

采用 SPSS18.0 统计软件中的 *t* 检验方法对数据进行显著性检验。

2 结果

2.1 NS1 基因的扩增和真核表达载体的构建

以 CPV 的 DNA 为模板, 利用设计的 2 对引物, 依据设定的条件通过 PCR 方法扩增出了 PCR 产物, 扩增的 PCR 片段约为 2030 bp, 与预期的片段大小一致。经过测序证明, 本试验扩增的 NS1 基因序列与 GenBank 发表的序列一致。利用 *Bam*H I 和 *Age* I 将此 DNA 片段插入 pcDNA3.1A 载体上构建 NS1 真核表达载体 pcDNA-NS1/His 和 pcDNA-NS1 (图 1-A)。重组质粒分别用 *Bam*H I 和 *Age* I 双酶切鉴定均得到约 5.5 kb(载体)和 2000 bp 的 2 条 DNA 片段, 2000 bp 的小片段即为犬细小病毒 NS1 基因, 表明已将其克隆到 pcDNA3.1A 载体上(图 1-B)。

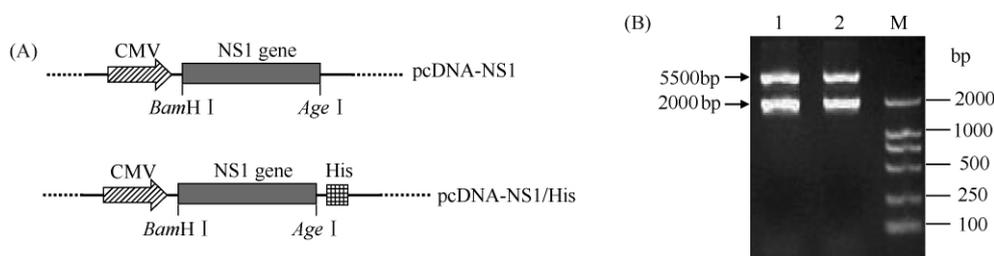


图 1 NS1 表达载体的结构及酶切鉴定图谱

Fig. 1 Structure and restriction analysis of NS1 expression vectors. (A): NS1 gene expression vectors. CMV, human cytomegalovirus (CMV) promoter; NS1, non-structural protein-1 of canine parvovirus; His, 6 \times histidine tag. (B): Restriction analysis of NS1 gene expression vectors. Lane 1, pcDNA-NS1/His digested by *Bam*H I and *Age* I; Lane 2, pcDNA-NS1 digested by *Bam*H I and *Age*I; M, DL 2000 DNA Marker.

2.2 NS1 在 HEK293FT 细胞中的表达

为证明构建的 pcDNA-NS1 真核表达载体能否在真核细胞中进行表达, 本研究通过磷酸钙介导将

NS1 基因表达载体 pcDNA-NS1/His 转染 HEK293FT 细胞 48 h 后裂解细胞, 通过 Western blot 检测细胞中表达的 NS1 融合蛋白, 结果见图 2。由图 2 可见,

在分子质量约 70 kDa 处有 1 条明显的杂交带,而空载体在相应位置未见杂交带,这说明 NS1 基因能够在真核细胞中表达。

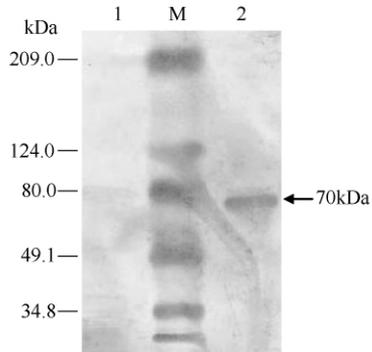


图2 Western blot 检测重组 NS1 在 HEK293FT 细胞的表达

Fig.2 Detection of recombinant NS1 expressed in HEK293FT cells by Western-blot. Lane 1, the sample from pcDNA3.1A-transfected cells; Lane 2, the sample from pcDNA-NS1/His-transfected cells; M, prestained protein marker.

2.3 感染 CPV 和转染 NS1 表达载体对 F81 细胞凋亡的影响

凋亡早期细胞膜内侧的磷脂酰丝氨酸外翻到细胞膜的表面,能够和 Annexin V-FITC 特异性结合,在蓝光激发下能够发射绿色荧光。碘化丙啶(Propidium iodide, PI)仅能透过破损的细胞膜而和 DNA 结合,在蓝光照射下呈红色。经过 Annexin V/PI 双染,若细胞呈 Annexin V(-)/PI(-),细胞未发生凋亡;若细胞 Annexin V(+)/PI(-),说明细胞处于凋亡早期;若细胞 Annexin V(+)/PI(+),则表明细胞处于凋亡晚期或坏死。Annexin V/PI 双染检测结果显示,CPV 感染的 F81 细胞和转染 pcDNA-NS1 质粒的 F81 细胞部分细胞膜周围呈绿色,个别细胞的细胞核呈红色;而空白对照组和空载体阴性对照组的 F81 细胞极少数细胞膜周围呈绿色(如图 3)。实验表明,感染 CPV 和转染 NS1 基因表达载体均能引起 F81 宿主细胞的凋亡,由此可见 CPV 引起细胞凋亡与其编码的 NS1 蛋白有密切关系。

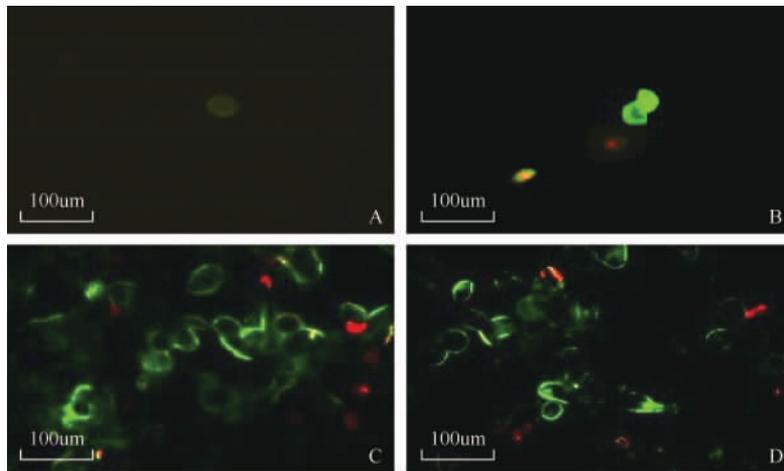


图3 凋亡细胞膜磷脂酰丝氨酸外翻(Annexin-V-FITC)的检测分析

Fig.3 Analysis of membrane phosphatidylserine externalization of apoptotic cells by Annexin V-FITC. F81 cells were stained with Annexin-V and PI and subjected to fluorescence microscope analysis. A: Blank control (F81 cells without treatment); B: Negative control (F81 cells transfected with pcDNA3.1A); C: F81 cells were infected with CPV; D: F81 cells were transfected with pcDNA-NS1.

2.4 Caspase-3/7 活性的测定

Caspase-3/7 是细胞凋亡途径中的关键酶,在正常细胞中以酶原的形式存在于胞浆中,在细胞凋亡的早期阶段被激活,活化 caspase-3/7 裂解细胞内相应的底物,从而导致细胞的凋亡。通过测定 caspase-3/7 活性可以反映细胞凋亡的情况。Caspase-3/7 试剂盒将 caspase 的酶促反应与荧光素酶发光反应相偶联,通过发光测定仪测定相对发光

值(Relative Luminescence)就可评价 caspase-3/7 的活性。图 4 为感染 CPV 和转染 pcDNA-NS1 质粒后,F81 细胞 caspase-3/7 活性的检测结果。

检测结果显示,在感染 CPV 12h 后,F81 细胞的 caspase-3/7 活性开始急剧上升,在 24 h 时 caspase-3/7 活性达到最大值,明显高于空白对照组($P < 0.01$)。但随着时间的进一步延长,caspase-3/7 的活性表现快速下降,36 h 时 caspase-3/7 的活性仅为

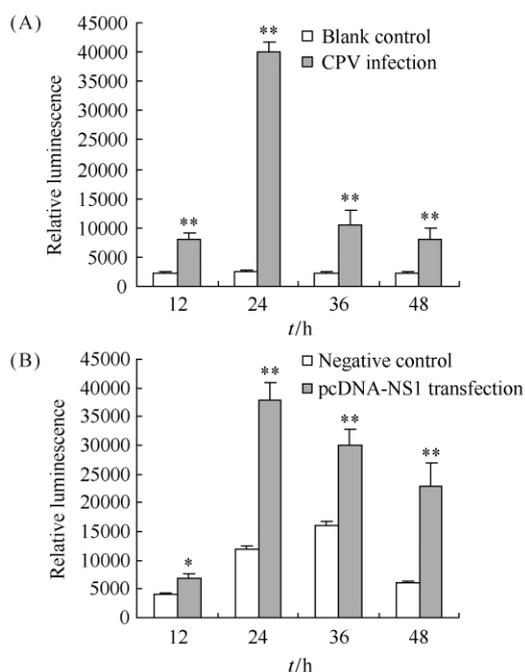


图4 感染 CPV 和转染 NS1 基因对 F81 细胞 caspase-3/7 活性的影响

Fig. 4 The effect of CPV infection and NS1 gene transfection on caspase-3/7 activity. (A): CPV-infected cells. Blank control, F81 cells without treatment; CPV infection, F81 cells were infected with CPV. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with blank control. (B): NS1-transfected cells. pcDNA-NS1 transfection, F81 cells were transfected with pcDNA-NS1; Negative control, F81 cells were transfected with pcDNA3.1A. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with negative control.

24 h 时的 1/3。由此可见 CPV 诱导 F81 细胞凋亡的作用在感染后 24 h 时最明显。此后随着细胞趋于凋亡晚期并出现坏死, 凋亡作用逐渐减弱, caspase-3/7 活性呈现明显下降趋势。

在转染 NS1 质粒的 F81 细胞中, 转染后 24 h 其 caspase-3/7 活性变化与感染 CPV 细胞的活性变化基本相似, caspase-3/7 的活性达到最大值, 并与同时期感染 CPV 细胞的 caspase-3/7 活性相近。然而随着时间的延长, Caspase-3/7 活性下降的速度与感染 CPV 细胞 caspase-3/7 活性下降的速度相比明显变慢。上述结果表明, 感染 CPV 和转染 NS1 基因均能引起 F81 细胞的凋亡, 这进一步证明在 CPV 诱导宿主细胞凋亡过程中 NS1 蛋白起到重要作用。

3 讨论

与其它动物细小病毒一样, CPV 是感染犬最简

单的病毒之一, CPV 编码的结构蛋白和非结构蛋白在病毒的增殖过程中均起重要作用。NS1 蛋白是该病毒重要的非结构蛋白, 在病毒复制的早期 NS1 大量表达, 研究证实 NS1 在病毒复制和转录等过程发挥重要作用^[13-14]。病毒在宿主细胞中大量增殖必定会严重干扰宿主细胞的正常功能, 病毒编码的蛋白, 特别是非结构蛋白对宿主细胞功能的干扰作用较大。为研究 CPV NS1 非结构蛋白对细胞凋亡的影响, 本实验构建了 NS1 基因的真核表达载体, 通过转染 F81 宿主细胞, 研究 NS1 蛋白对细胞凋亡的影响。由于 NS1 基因表达载体不含信号肽序列, 所以表达的重组 NS1 蛋白存在于细胞内, 与自然感染 CPV 一样, 重组 NS1 蛋白在宿主细胞内可以直接与细胞相互作用, 以排除其它因素的干扰。本实验之所以选用 pcDNA3.1A 载体表达 NS1 蛋白是因为该载体不仅含有较强的人类巨细胞病毒 CMV 启动子, 而且还具有用于构建与 His 标签融合的重组蛋白, 以便于重组蛋白的鉴定。本实验分别构建了 pcDNA-NS1/His 和 pcDNA-NS1 两个真核表达载体, 前者用于鉴定构建的 NS1 表达载体能否介导 NS1 在细胞内表达, 后者则用来研究 NS1 蛋白诱导细胞的凋亡作用。

采用磷酸钙转染方法在 HEK293FT 细胞中瞬时表达重组蛋白, 是目前人们在确定构建的表达载体能否介导目的基因在真核细胞中表达和小规模制备重组蛋白较为理想的方法。由于此方法比较经济, 操作简单, 所以受到人们的青睐。为此本实验也采用了 HEK293FT 细胞表达系统, 证明构建的 NS1 基因表达载体能够有效地介导 NS1 基因在真核细胞中表达。重组 NS1 在细胞内的有效表达是研究 NS1 蛋白诱导细胞凋亡作用的重要条件。

细胞的凋亡涉及多种基因的激活和表达, 不同的基因产物对细胞的凋亡有不同的作用, 有的起促进作用, 而有的起抑制作用。Caspase 是细胞凋亡过程中一类关键的同源半胱天冬氨酸蛋白酶。在细胞的凋亡过程中, 参与细胞凋亡起始阶段的启动 caspases (如 caspase-2, 8, 9, 10) 在外来信号的作用下被切割激活, 激活的启动 caspases 对执行 caspases (如 caspase-3, 6, 7) 进行切割使其激活, 被激活的执行 caspase 通过对多种靶蛋白的水解, 导致细胞凋亡^[15]。Caspase-3 是 caspase 家族中最重要的凋亡执行者, 通过降解 DNA 修复酶 PARP (poly

ADP-ribose polymerase)^[16],活化 DNA 裂解因子 DFF-45 (DNA fragmentation factor-45)^[17],导致 DNA 修复的抑制并启动 DNA 的降解,从而诱导细胞的凋亡。

Annexin-V/PI 双染法和 caspase-3/7 活性检测实验结果显示,感染 CPV 和转染 NS1 基因均能诱导 F81 细胞膜磷脂酰丝氨酸外翻,caspase-3/7 活性都明显高于对照细胞,表明感染 CPV 和转染 NS1 基因都能诱导 F81 细胞发生凋亡,其作用机制可能是通过上调 caspase 蛋白酶活性,从而诱导细胞凋亡。由此可见,在 CPV 诱导宿主细胞凋亡过程中,NS1 蛋白起了重要作用。

本研究证实 CPV 编码的非结构蛋白 NS1 在 CPV 诱导细胞凋亡过程中起重要作用,是引起细胞凋亡的重要因子。但有关 NS1 如何引起细胞凋亡的详细机制还有待进一步探讨。

参考文献

- [1] Parrish CR. Emergence, natural history and variation of canine, mink and feline parvovirus. *Advances in Virus Research*, 1990, 38: 403-450.
- [2] Llamas-Saiz AL, Agbandje-McKenna M, Parker JS, Wahid AT, Parrish CR, Rossmann MG. Structural analysis of a mutation in canine parvovirus which controls antigenicity and host range. *Virology*, 1996, 225 (1): 65-71.
- [3] Jennifer P. Canine parvoviral enteritis: a review of diagnosis, management, and prevention. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 2004, 14 (3): 167-176.
- [4] 韩冬梅,仲飞,李秀锦,王微,王幸兴,潘素敏. 大肠杆菌 LTB 亚基基因表达载体对犬细小病毒 VP2 DNA 疫苗免疫应答的增强作用. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2011, 51 (1): 91-97.
- [5] 王微,李秀锦,仲飞,王幸兴,韩冬梅,靳慧君,潘素敏,李巍. 犬细小病毒 VP2 蛋白在真核细胞中的分泌表达及特性. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2009, 49 (5): 648-652.
- [6] Bauder B, Suchy A, Gabler C, Weissenböck H. Apoptosis in feline panleukopenia and canine parvovirus enteritis. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health*, 2000, 47 (10): 775-784.
- [7] Nykky J, Tuusa JE, Kirjavainen S, Vuento M, Gilbert L. Mechanisms of cell death in canine parvovirus-infected cells provide intuitive insights to developing nanotools for medicine. *International Journal of Nanomedicine*, 2010, 5: 417-428.
- [8] Hristov G, Krämer M, Li J, El-Andaloussi N, Mora R, Daeffler L, Zentgraf H, Rommelaere J, Marchini A. Through its nonstructural protein NS1, parvovirus H-1 induces apoptosis via accumulation of reactive oxygen species. *Journal of Virology*, 2010, 84 (12): 5909-5922.
- [9] Moffatt S, Yaegashi N, Tada K, Tanaka N, Sugamura K. Human parvovirus B19 nonstructural (NS1) protein induces apoptosis in erythroid lineage cells. *Journal of Virology*, 1998, 72 (4): 3018-3028.
- [10] 刘维全,范泉水,江禹,夏咸柱,黄耕,王吉贵,房金波,王蕾. 肉食兽细小病毒通用 PCR 诊断技术的建立. *中国兽医学报 (Chinese Journal of Veterinary Science)*, 2001, 21 (3): 249-251.
- [11] Hirt B. Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *Molecular Biology*, 1967, 26 (2): 365-369.
- [12] Frederick MA, Robert EK, Seidman JG, Kevin S, Roger B, David DM, John AS. 精编分子生物学实验指南. 颜子颖,王海林译. 第三版. 北京: 科学出版社, 1998: 310-311.
- [13] Christensen J, Tattersall P. Parvovirus initiator protein NS1 and RPA coordinate replication fork progression in a reconstituted DNA replication system. *Journal of Virology*, 2002, 76 (13): 6518-6531.
- [14] Rhode SL. trans-Activation of parvovirus P38 promoter by the 76K noncapsid protein. *Journal of Virology*, 1985, 55 (3): 886-889.
- [15] 岳原亦,张扬,张一奇. Caspase 家族与细胞凋亡. *中国医疗前沿 (National Medical Frontiers of China)*, 2011, 6 (6): 25-26.
- [16] Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG, Earnshaw WC. Cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature*, 1994, 371 (6495): 346-347.
- [17] 刘斌剑. DFF 和 CIDE 介导细胞凋亡的分子机制. *国外医学. 分子生物学分册*. 2003, 25 (1): 44-47.

Non-structural protein NS1 of canine parvovirus induces the apoptosis of cells

Hongli Pan¹, Fei Zhong^{1*}, Sumin Pan^{1,3}, Xiujin Li², Feng Zhang¹, Kao Zhang¹, Huihui Chen¹

¹ Department of Basic Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine, Agricultural University of Hebei, North China Research Center of Animal Epidemic Pathogen Biology, Ministry of Agriculture of China, Baoding 071001, China

² Department of Biotechnology, College of Environmental and Chemical Engineering, Yanshan University, Qinhuangdao 066004, China

³ Department of Animal Science, Hebei Normal University of Science and Technology, Qinhuangdao 066004, China

Abstract: [Objective] To investigate the effects of canine parvovirus (CPV) non-structural protein-1 (NS1) on the cell apoptosis induced by CPV and preliminarily explore the mechanism of CPV-induced apoptosis. [Methods] First, the NS1 gene was amplified by PCR from CPV genomic DNA and subcloned into pcDNA3.1A vector to generate NS1 eukaryotic expression vector pcDNA-NS1. To verify whether pcDNA-NS1 vector can mediate NS1 expression in eukaryotic cells, the human embryo kidney (HEK) 293FT cells were used to transiently express the recombinant NS1. The effects of NS1 on CPV-induced apoptosis were investigated by infecting the F81 host cells with CPV and transfecting the cells with NS1 vector. The apoptosis of the cells was detected by AnnexinV/PI double staining for phosphatidylserine externalization on membrane and by luminescence method for caspase-3/7 activities. [Results] The results show that the sequence of NS1 gene amplified was consistent with the GenBank. The NS1 expression vector was shown to be correct and could mediate NS1 expression in eukaryotic cells. The phosphatidylserine on outside of membrane was detected and the caspase-3/7 activities were increased in both CPV-infected cells and NS1-transfected cells. These results indicate that both CPV and NS1 protein can induce the apoptosis of the cells. [Conclusion] CPV-induced apoptosis was closely related to its non-structural protein NS1.

Keywords: canine parvovirus, NS1 protein, cell apoptosis

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30771586) and by the National Natural Science Foundation of Hebei (C2008000244)

* Corresponding author. Tel: +86-312-7528473; E-mail: feizhong2000@yahoo.com

Received: 17 October 2011/Revised: 13 January 2012