

钟灵毓, 王元红, 白彩霞, 等. 羊口疮病毒 127 基因的克隆表达及亚细胞定位分析[J]. 江苏农业学报, 2019, 35(3): 646-652.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2019.03.020

羊口疮病毒 127 基因的克隆表达及亚细胞定位分析

钟灵毓¹, 王元红¹, 白彩霞¹, 杨侃侃¹, 俞赵荣¹, 鲁智敏¹, 张学琪¹, 刘自敏¹,
蒋书东¹, 李永东², 王 勇¹

(1. 安徽农业大学动物科技学院, 安徽 合肥 230036; 2. 宁波市疾病预防控制中心, 浙江 宁波 315010)

摘要: 为了对羊口疮病毒(ORFV) AH-F10 株 127 基因进行原核表达及亚细胞定位, 本试验采用 PCR 方法扩增出 ORFV127 基因, 成功构建原核表达重组质粒 pGEX-6p-1-ORFV127 和真核重组质粒 pEGFP-N1-ORFV127。将原核表达重组质粒转化到大肠埃希氏菌中表达, 并进行纯化和鉴定。以纯化的蛋白质免疫 BALB/c 雌鼠制备多克隆抗体, 利用 Western-blot 技术鉴定其反应原性。利用脂质体介导法将重组质粒 pEGFP-N1-ORFV127 转染至 Vero 细胞, 通过倒置荧光显微镜观察其在细胞中的表达及亚细胞定位。结果表明, 获得的 ORFV127 基因序列全长为 558 bp, ORFV127 蛋白在大肠杆菌中获得高效表达, 主要以包涵体蛋白质的形式表达, 大小约 49 000。Western-blot 结果显示, 免疫小鼠获得的抗 ORFV127 蛋白的多克隆抗体可特异性识别 ORFV127 蛋白, 倒置荧光显微镜观察发现, ORFV127 蛋白主要定位于细胞质。本试验结果为后续研究 ORFV127 蛋白的功能提供了宝贵的生物材料。

关键词: 羊口疮病毒; ORFV127 基因; 原核表达; 亚细胞定位

中图分类号: S855.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2019)03-0646-07

Prokaryotic expression and subcellular localization of Orf virus 127 gene

ZHONG Ling-yu¹, WANG Yuan-hong¹, BAI Cai-xia¹, YANG Kan-kan¹, YU Zhao-rong¹, LU Zhi-min¹,
ZHANG Xue-qi¹, LIU Zi-min¹, JIANG Shu-dong¹, LI Yong-dong², WANG Yong¹

(1. College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China; 2. Ningbo Municipal Center for Disease Control and Prevention, Ningbo 315010, China)

Abstract: This study was designed to achieve prokaryotic expression and subcellular localization of the Orf virus (ORFV) 127 gene of AH-F10 strain. The gene was amplified by PCR and cloned into pGEX-6p-1 and pEGFP-N1. The recombinant plasmids were named as pGEX-6p-1-ORFV127 and pEGFP-N1-ORFV127, respectively. Prokaryotic expression recombinant plasmid was transformed into *Escherichia coli* for expression, purification and identification. Then, the BALB/c mice were immunized with the purified ORFV127 protein to prepare polyclonal antibody and the reaction was detected by Western-blot. The recombinant plasmid pEGFP-N1-ORFV127 was transfected into Vero cells by liposome mediated method.

收稿日期: 2018-07-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(31602063); 安徽省自然科学基金项目(1508085QC60)

作者简介: 钟灵毓(1996-), 女, 江西新余人, 本科, 主要从事动物传染病研究。(E-mail) 1071338281@qq.com。王元红为共同第一作者。

通讯作者: 王 勇, (E-mail) wangyong119@ahau.edu.cn。李永东, (E-mail) liyd@nbcde.org.cn

The expression of ORFV127 protein in Vero cells was observed with inverted fluorescence microscopy. The results showed that the full length of ORFV127 gene sequence was 558 bp. The expressed ORFV127 protein was sized about 49 000, and with the form of inclusion body in *E. coli*. Moreover, Western-blot results showed that ORFV127 protein reacted specifically with the prepared polyclonal antibody and had good reactionogenicity. The results

of subcellular localization showed that the ORFV127 protein was mainly located in the cytoplasm. These results provide bio-materials for further study on the function of ORFV127 protein.

Key words: orf virus; *ORFV127* gene; prokaryotic expression; subcellular localization

羊口疮,即羊传染性脓疱,是由痘病毒科、副痘病毒属的羊口疮病毒(*Orf virus*, *ORFV*)引起的绵羊、山羊、人、红鹿、松鼠和驯鹿等多种动物的一种急性、接触性、嗜上皮性人兽共患病,以口唇、舌、鼻、乳房等部位形成丘疹、水疱、脓疱和结成疣状结痂为特征,且主要引起皮肤和黏膜的增生性病变,3~6月龄的羔羊最易感染,成年羊发病较少^[1-4]。*ORFV*导致的死亡率不高,但若混合其他病原感染时,死亡率会显著升高^[5]。自19世纪50年代起,中国10余个省份不断有羊口疮疫情的相关报道,目前该病主要流行于中国西北地区,对中国畜牧养殖业造成了较大的危害^[6-7]。

口疮病毒基因组为线性双链DNA,其全长约为138 kb。基因组由中央核心基因和末端基因组成^[8]。中央核心基因(*ORFV009~ORFV111*)相对保守,主要参与调控病毒粒子在细胞浆中的装配成熟以及病毒的复制、包装和释放,两侧末端基因(*ORFV001~ORFV008*、*ORFV12~ORFV134*)主要为与病毒的毒力、宿主嗜性、免疫逃避和免疫调节有关的基因,这些基因具有较高的种间变异性,且大多与病毒的致病机制有关,因此末端变异区具有重要的研究价值^[9-13]。本试验研究的*ORFV127*基因位于基因组的3'UTR,编码白介素-10(vIL-10),是*ORFV*早期表达的基因之一^[14]。

本试验拟以羊口疮病毒AH-F10株基因组为模板,扩增出*ORFV127*基因,构建重组质粒pGEX-6p-1-*ORFV127*和pEGFP-N1-*ORFV127*,结合Western-blot及亚细胞定位等技术,获得了抗*ORFV127*蛋白的多克隆抗体及*ORFV127*基因在真核细胞中的表达情况,以期为后续研究*ORFV127*蛋白的生物学功能以及*ORFV*与宿主细胞相互作用机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

DH5 α 和Rosetta(DE3)感受态细胞购自TaKaRa公司,*ORFV* AH-F10株^[15]、pGEX-6p-1载体及Vero细胞由本实验室保存,6周龄SPF级BALB/c雌鼠购自安徽医科大学实验动物中心,许可证号:

SCXK(皖)2017-001。

1.2 主要试剂

Solution I、*rTaq* DNA聚合酶、pMD19-T载体、限制性内切酶*Eco* R I和*Bam* H I均购自TaKaRa公司,质粒小提试剂盒、无内毒素质粒大提试剂盒购自Axygen公司,琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒、病毒基因组DNA/RNA提取试剂盒购自Tiangen公司,谷胱甘肽S-转移酶(*GST*)标签鼠源单抗、羊抗小鼠IgG/*HRP*购自ZSCB-BIO公司,二氨基联苯胺(*DAB*)显色试剂盒购自Boster公司,增强化学发光(*ECL*)试剂盒、脂质体转染试剂Lipofectamine 2000、改良杜氏伊格尔培养基(*DMEM*)、胎牛血清(*FBS*)购自ThermoFisher公司,4',6-二脒基-2-苯基吲哚(*DAPI*)染色液购自Beyotime公司,其余试剂均为国产分析纯。

1.3 *ORFV127* 基因的扩增

根据GenBank上公布的*ORFV127*基因序列(No. KP010354.1),通过Primer Premier 5.0软件设计2对引物用于扩增*ORFV127*基因,预期扩增产物大小为558 bp。上、下游引物序列为:*ORFV127*-(pGEX-6p-1) up: 5'-CGGGATCCATGTCTGAACAA-CAAAATTCT-3'(下划线处为添加的*Bam* H I酶切位点),*ORFV127*-(pGEX-6p-1) dw: 5'-GGAAT-TCTTATGATTTAGTAGTCATGTATGAT-3'(下划线处为添加的*Eco* R I酶切位点),*ORFV127*-(pEGFP-N1) up: 5'-GGAATTCTGATGTCTGAACAACAAATTCT-3'(下划线处为添加的*Eco* R I酶切位点),*ORFV127*-(pEGFP-N1) dw: 5'-CGGGATCCCGTGATTTAGTACT-CATGTATGAT-3'(下划线处为添加的*Bam* H I酶切位点)。引物由上海生物工程有限公司合成。

采用合成的引物PCR扩增*ORFV127*基因,PCR扩增条件:95℃预变性5 min;95℃变性50 s,57℃退火30 s,72℃延伸40 s,30个循环后,72℃再延伸10 min。PCR扩增体系:*rTaq* DNA聚合酶Mix 10 μ l,AH-F10株基因组模板1 μ l,上、下游引物各1 μ l,补加灭菌ddH₂O至20 μ l。PCR产物按胶回收试剂盒步骤回收纯化后克隆至pMD19-T载体,并进行PCR、双酶切及序列测定,对测序结果进行

分析。

1.4 *ORFV127* 基因重组质粒的构建

将鉴定正确的质粒经 *Eco* R I 和 *Bam* H I 酶切后分别克隆至同样经双酶切的 pGEX-6p-1 及 pEGFP-N1 载体中。菌液 PCR 扩增、双酶切鉴定阳性克隆,将测序正确的重组质粒分别命名为 pGEX-6p-1-*ORFV127* 和 pEGFP-N1-*ORFV127*。

1.5 重组蛋白质的诱导及纯化

将重组表达质粒 pGEX-6p-1-*ORFV127* 转化至 Rosetta 感受态细胞。挑取单菌落接种于含氨苄青霉素的溶菌肉汤 (LB) 液体培养基中,37 ℃ 恒温摇床振荡培养至 OD_{600} 为 0.6~0.8 时,加入异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 至终浓度为 1 mmol/L,33 ℃ 恒温摇床振荡培养 3~6 h 后离心收集菌体进行 SDS-PAGE 电泳。采用常规包涵体洗涤、尿素复性及蔗糖浓缩方法^[16]对重组蛋白质进行纯化。

1.6 重组蛋白质的 Western-blot 鉴定

将纯化后的重组蛋白质经 SDS-PAGE 电泳后,转膜,5% 脱脂奶粉 4 ℃ 封闭过夜,杂交膜清洗液 (TBST) 漂洗 3 次后加入 1:1 000 稀释的抗 GST 标签的鼠源单抗,37 ℃ 孵育 1 h。TBST 漂洗 3 次后加入 1:1 000 稀释的辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗鼠 IgG 二抗,37 ℃ 孵育 1 h。TBST 漂洗 3 次,DAB 试剂盒显色。

1.7 多克隆抗体的制备及分析

以纯化的 *ORFV127* 蛋白免疫 6 周龄 BALB/c 雌鼠,免疫程序参照文献[17]进行。第 4 次免疫 7 d 后,从小鼠眼眶采血,分离血清。对已诱导的重组蛋白质及 pGEX-6p-1 对照菌蛋白质进行 SDS-PAGE 电泳,转膜,以制备的血清为一抗,HRP 标记的羊抗鼠 IgG 作为二抗进行 Western-blot 分析。

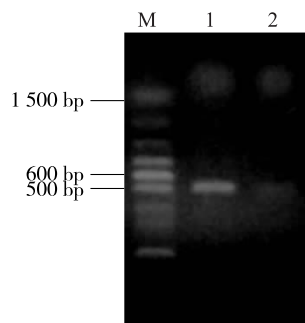
1.8 亚细胞定位分析

常规方法复苏 Vero 细胞,接种于 6 孔板中,加入含 10% FBS 的 DMEM 培养基并将其置于 37 ℃、5% CO₂ 的细胞培养箱中进行培养。待其细胞密度达到 70%~80% 时,利用脂质体介导法按 Lipofectamine 2000 试剂盒说明书将重组质粒 pEGFP-N1-*ORFV127* 转染至 Vero 细胞。设置空载体转染组作为阴性对照。转染 48 h 后 DAPI 染色细胞核,在倒置荧光显微镜下观察表达蛋白质在 Vero 细胞中的定位。

2 结果与分析

2.1 目的基因的扩增

以 AH-F10 株基因组为模板,经 PCR 成功扩增出 *ORFV127* 基因,产物经 1% 琼脂凝胶电泳鉴定,显示出 1 条大小约为 558 bp 的特异性片段,与预期相符(图 1)。



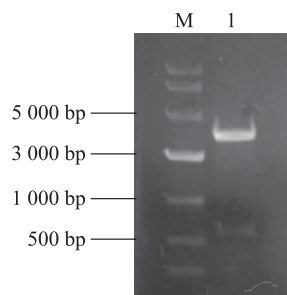
M:DL 1 500 bp 标准分子质量;1:PCR 扩增产物;2:阴性对照。

图 1 *ORFV127* 基因 PCR 扩增产物

Fig.1 PCR products of *ORFV127* gene

2.2 重组质粒的鉴定

将重组质粒 pGEX-6p-1-*ORFV127* 和 pEGFP-N1-*ORFV127*,分别经 *Bam* H I 和 *Eco* R I 双酶切得到 2 个片段,均与预期相符(图 2、图 3)。测序结果显示,目的基因已成功克隆至 pGEX-6p-1 和 pEGFP-N1 载体中且未发生碱基缺失或突变。



M:DL10 000 bp 标准分子质量;1:重组质粒 pGEX-6p-1-*ORFV127* 双酶切产物。

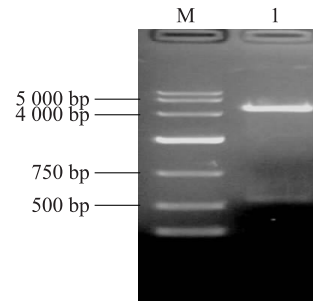
图 2 重组质粒 pGEX-6p-1-*ORFV127* 的鉴定

Fig.2 Identification of recombinant plasmid pGEX-6p-1-*ORFV127*

2.3 序列分析

采用 DNASTar 软件将 AH-F10 株 *ORFV127* 基因编码的氨基酸序列与 GenBank 公布的 10 株

ORFV127 基因编码的氨基酸序列进行同源性分析。对比结果(图 4)显示,本试验毒株与 10 株参考毒株的氨基酸序列同源性为 97.0%~100.0%。AH-F10 株与 NZ2 株的氨基酸序列完全一致,与 OV-SA00 株的氨基酸序列同源性高达 97.0%,而与中国福建、山东及广东地区流行毒株的氨基酸序列同源性为 97.3%~99.1%。*ORFV127* 基因位于末端变异区,该区域的基因大多具有较高的种间变异性,但根据对比结果发现,AH-F10 株的 *ORFV127* 基因编码的蛋白质保守性较高,因此本试验研究的 *ORFV127* 蛋白具有一定的代表性。



M:DL10 000 bp 标准分子质量;1:重组质粒 pEGFP-N1-*ORFV127* 双酶切产物。

图 3 重组质粒 pEGFP-N1-*ORFV127* 的鉴定

Fig.3 Identification of recombinant plasmid pEGFP-N1-*ORFV127*

AH-F10	MSKNKTIIVQVVTITTYTITTCAYCVFVFESEEDROCCSSSNFFASTPHMTREIRAFAGKVKTFECMKDCINSMITTCSTIDDFKGYIGCCALSEMTCFY	100
NZ2	MSKNKTIIVQVVTITTYTITTCAYCVFVFESEEDROCCSSSNFFASTPHMTREIRAFAGKVKTFECMKDCINSMITTCSTIDDFKGYIGCCALSEMTCFY	100
OV-4A82	MSKNKTIIVQVVTITTYTITTCAYCVFVFESEEDROCCSSSNFFASTPHMTREIRAFAGKVKTFECMKDCINSMITTCSTIDDFKGYIGCCALSEMTCFY	100
OV-SA00	MSKNKTIIVQVVTITTYTITTCAYCVFVFESEEDROCCSSSNFFASTPHMTREIRAFAGKVKTFECMKDCINSMITTCSTIDDFKGYIGCCALSEMTCFY	100
gdz	MSKNKTIIVQVVTITTYTITTCAYCVFVFESEEDROCCSSSNFFASTPHMTREIRAFAGKVKTFECMKDCINSMITTCSTIDDFKGYIGCCALSEMTCFY	100
GO	MSKNKTIIVQVVTITTYTITTCAYCVFVFESEEDROCCSSSNFFASTPHMTREIRAFAGKVKTFECMKDCINSMITTCSTIDDFKGYIGCCALSEMTCFY	100
SI	MSKNKTIIVQVVTITTYTITTCAYCVFVFESEEDROCCSSSNFFASTPHMTREIRAFAGKVKTFECMKDCINSMITTCSTIDDFKGYIGCCALSEMTCFY	100
NP	MSKNKTIIVQVVTITTYTITTCAYCVFVFESEEDROCCSSSNFFASTPHMTREIRAFAGKVKTFECMKDCINSMITTCSTIDDFKGYIGCCALSEMTCFY	100
YX	MSKNKTIIVQVVTITTYTITTCAYCVFVFESEEDROCCSSSNFFASTPHMTREIRAFAGKVKTFECMKDCINSMITTCSTIDDFKGYIGCCALSEMTCFY	100
SDLC	MSKNKTIIVQVVTITTYTITTCAYCVFVFESEEDROCCSSSNFFASTPHMTREIRAFAGKVKTFECMKDCINSMITTCSTIDDFKGYIGCCALSEMTCFY	100
SDTA	MSKNKTIIVQVVTITTYTITTCAYCVFVFESEEDROCCSSSNFFASTPHMTREIRAFAGKVKTFECMKDCINSMITTCSTIDDFKGYIGCCALSEMTCFY	100
AH-F10	IEEVMPCAENHGPDKEHVNSIGELKTLRLRIRCHRFPCENKSKAVECVKRVFNMLCERGVYKAMSEFDIFINYIESYMTTK	185
NZ2	IEEVMPCAENHGPDKEHVNSIGELKTLRLRIRCHRFPCENKSKAVECVKRVFNMLCERGVYKAMSEFDIFINYIESYMTTK	185
OV-4A82	IEEVMPCAENHGPDKEHVNSIGELKTLRLRIRCHRFPCENKSKAVECVKRVFNMLCERGVYKAMSEFDIFINYIESYMTTK	185
OV-SA00	IEEVMPCAENHGPDKEHVNSIGELKTLRLRIRCHRFPCENKSKAVECVKRVFNMLCERGVYKAMSEFDIFINYIESYMTTK	184
gdz	IEEVMPCAENHGPDKEHVNSIGELKTLRLRIRCHRFPCENKSKAVECVKRVFNMLCERGVYKAMSEFDIFINYIESYMTTK	185
GO	IEEVMPCAENHGPDKEHVNSIGELKTLRLRIRCHRFPCENKSKAVECVKRVFNMLCERGVYKAMSEFDIFINYIESYMTTK	185
SI	IEEVMPCAENHGPDKEHVNSIGELKTLRLRIRCHRFPCENKSKAVECVKRVFNMLCERGVYKAMSEFDIFINYIESYMTTK	185
NP	IEEVMPCAENHGPDKEHVNSIGELKTLRLRIRCHRFPCENKSKAVECVKRVFNMLCERGVYKAMSEFDIFINYIESYMTTK	185
YX	IEEVMPCAENHGPDKEHVNSIGELKTLRLRIRCHRFPCENKSKAVECVKRVFNMLCERGVYKAMSEFDIFINYIESYMTTK	185
SDLC	IEEVMPCAENHGPDKEHVNSIGELKTLRLRIRCHRFPCENKSKAVECVKRVFNMLCERGVYKAMSEFDIFINYIESYMTTK	185
SDTA	IEEVMPCAENHGPDKEHVNSIGELKTLRLRIRCHRFPCENKSKAVECVKRVFNMLCERGVYKAMSEFDIFINYIESYMTTK	185

图 4 AH-F10 株 *ORFV127* 基因编码的氨基酸序列同源性分析

Fig.4 Homology analysis of amino acid sequence encoded by *ORFV127* gene of AH-F10 strain

2.4 重组蛋白质的 SDS-PAGE 检测

取不同诱导时间的菌液进行 SDS-PAGE 电泳,以未诱导的菌液作阴性对照。SDS-PAGE 电泳结果(图 5)显示,重组菌经诱导后表达的蛋白质大小约为 49 000,且在诱导 3 h 时表达量最高。对 *ORFV127* 蛋白进行可溶性分析,取超声破碎后菌液的上清与沉淀进行 SDS-PAGE 电泳。结果(图 6)显示,沉淀中有明显特异性条带,说明表达的 *ORFV127* 蛋白在大肠杆菌中主要以包涵体的形式存在。

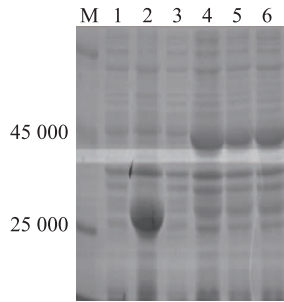
2.5 Western-blot 鉴定

纯化后的蛋白质经抗 *GST* 标签的单抗进行

Western-blot 检测,结果(图 7)显示,存在大小约 49 000 的特异性条带及大小约 27 000 的 *GST* 蛋白,说明 *ORFV127*-*GST* 融合蛋白能够被 *GST* 单抗特异性识别,重组融合蛋白质具有良好的反应原性。

2.6 多克隆抗体的制备

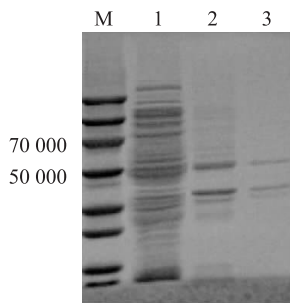
获得的蛋白质经第 4 次免疫后 7 d,小鼠眼眶采血并分离血清,用该血清作为一抗,*ORFV127* 蛋白作为抗原进行 Western-blot 鉴定,结果(图 8)表明,制备的多克隆抗体能够与 *ORFV127* 蛋白发生特异性反应,而未诱导的 pGEX-6P-1-*ORFV127* 重组菌未见该条带。这说明制备的抗 127-*GST* 融合蛋白质多克隆抗体特异性较好。



M: 蛋白质分子质量标准; 1: 未经异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导的空载体 pGEX-6p-1; 2: 空载体 pGEX-6p-1 经 IPTG 诱导 3 h 的产物; 3: 未经诱导的重组质粒表达产物; 4: 重组质粒诱导 3 h 的表达产物; 5: 重组质粒诱导 4 h 的表达产物; 6: 重组质粒诱导 5 h 的表达产物。

图 5 重组 ORFV127 蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig.5 SDS-PAGE analysis of the recombinant ORFV127 protein



M: 蛋白质分子质量标准; 1: 诱导表达产物破碎后的上清液; 2: 诱导表达产物破碎后的沉淀; 3: 纯化后的 ORFV127 重组蛋白。

图 6 ORFV127 蛋白经 IPTG 诱导表达产物电泳

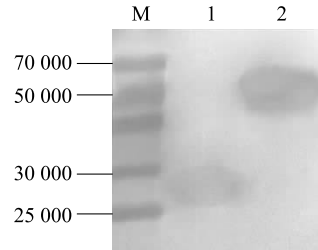
Fig.6 SDS-PAGE analysis of ORFV127 protein expression induced by IPTG

2.7 重组质粒 pEGFP-N1-ORFV127 在 Vero 细胞中的表达检测

转染 48 h 后, 用 DAPI 染色细胞核, 在倒置荧光显微镜下观察空载体和重组质粒在 Vero 细胞中的表达情况。结果 (图 9) 表明, 转染 pEGFP-N1 空载体质粒及 pEGFP-N1-ORFV127 重组质粒的细胞中绿色荧光均在细胞质中出现。

3 讨论

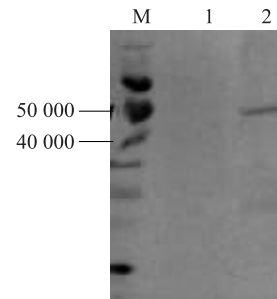
羊口疮是一种重要的人畜共患传染病, 主要感染部分羊属动物和人类, 传播速度较快, 在世界各地的发生率不断上升, 对养羊业造成威胁^[6]。葛士坤



M: 蛋白质分子质量标准; 1: pGEX-6P-1 空载体经 IPTG 诱导表达产物; 2: pGEX-6P-1-ORFV127 重组质粒经 IPTG 诱导表达产物。

图 7 ORFV127 蛋白 Western-blot 分析

Fig.7 Western-blot analysis of the ORFV127 protein



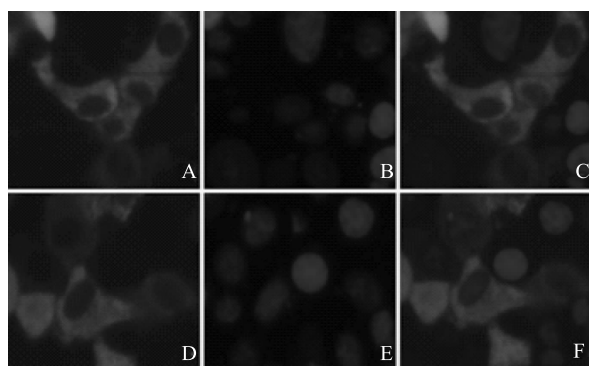
M: 蛋白质分子标准质量; 1: 未诱导的 pGEX-6P-1-ORFV127 重组菌; 2: 纯化的 ORFV127 重组蛋白。

图 8 ORFV127 多克隆抗体特异性的 Western-blot 分析

Fig.8 Western-blot analysis of specificity of the polyclonal antibody against ORFV127

等^[18]对 2006-2016 年中国羊口疮病毒的遗传进化进行分析, 发现世界各地流行的代表性毒株在中国均有变种分布, 推测中国 ORFV 毒株进化特殊且可能来源于国外 OV-SA00 株和 NZ2 株。本研究从 AH-F10 株中扩增出 ORFV127 基因全长, 测序后将其序列与各地区经典毒株序列进行对比分析。结果表明, AH-F10 株 ORFV127 基因编码的氨基酸序列与 NZ2 株的完全一致, 与 OV-SA00 株的氨基酸序列同源性为 97.0%, 而与中国福建、山东及广东地区流行毒株的氨基酸序列同源性为 97.3%~99.1%。由此可见, 在安徽地区流行的 ORFV 毒株较复杂, 需对其演化进行持续监测, 为当地疫病防控及国内外 ORFV 遗传进化分析提供基础。

为深入了解 ORFV127 基因的功能, 本试验对 ORFV127 基因进行原核表达。原核表达是目前外源基因表达最常用的方法之一, 而成功表达目的蛋



A:转染 pEGFP-N1 的 Vero 细胞中表达情况;B:转染 pEGFP-N1 的 Vero 细胞中 DAPI 染色细胞核情况;C:图 A 和图 B 的叠加;D:转染 pEGFP-N1-ORFV127 的 Vero 细胞中表达情况;E:转染 pEGFP-N1-ORFV127 的 Vero 细胞中 DAPI 染色细胞核情况;F:图 D 和图 E 的叠加。

图 9 转染 48 h 后观察 ORFV127 蛋白在 Vero 细胞中的表达情况

Fig.9 Expression of ORFV127 protein in Vero cells after 48 h of transfection

白质后获取抗体则是研究该基因及其基因表达产物生物学功能的关键。本研究通过 GST 标签融合表达系统成功构建重组原核表达载体 pGEX-6P-1-ORFV127,并对表达条件进行优化。在本试验中, IPTG 浓度的变化对目的蛋白质表达影响不明显,但转速及温度的变化对目的蛋白质表达有显著影响,在 33 ℃ 恒温摇床转速为 150 r/min 时诱导 3 h,大量高效表达出 127-GST 融合蛋白质。蛋白质经尿素纯化、蔗糖浓缩后免疫 6 周龄 BALB/c 雌鼠,经 Western-blot 鉴定,成功获得特异性良好的抗 127-GST 融合蛋白质的多克隆抗体血清。这为建立新的 ORFV 检测方法以及深入研究 ORFV127 功能提供宝贵的生物材料。

另外,为研究 ORFV127 基因在宿主细胞中的表达分布情况,本试验利用融合表达 EGFP 和 ORFV127 蛋白的真核表达质粒,将其转染至 Vero 细胞中进行 127-EGFP 融合蛋白质的表达检测。在病毒侵染过程中,病毒基因组的复制、蛋白质的表达、粒体的组装以及病毒在细胞间的运动等都是在特定的亚细胞位点完成的,病毒编码蛋白质的功能与其在细胞内的定位密切相关。相关研究指出,在 ORFV 感染早期,ORFV127 蛋白能够抑制宿主体内的先天反应和炎症反应,削弱抗原提呈细胞的抗原

提呈能力,达到病毒抵抗宿主免疫反应的目的^[19-20]。本试验亚细胞定位结果显示,绿色荧光聚集在细胞质,提示该蛋白质主要在细胞质中行使其生物学功能,这与 ORFV127 蛋白抑制细胞释放炎性介质,干扰抗原呈递的功能相一致。日后可以进一步优化试验过程,在不同时间点对 ORFV127 蛋白的定位进行观察,有利于更加准确、全面地掌握 ORFV127 蛋白的定位信息,进而分析该蛋白质在 ORFV 感染宿主细胞过程中发挥的作用。

参考文献:

- [1] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 2 版. 北京:科学出版社, 1997: 977-980.
- [2] LI W, NING Z, HAO W, et al. Isolation and phylogenetic analysis of orf virus from the sheep herd outbreak in northeast China[J]. BMC Veterinary Research, 2012, 8(1): 229.
- [3] 王勇,殷冬冬,杨侃侃,等. 羊口疮病毒的分离鉴定及其遗传进化分析[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2017, 38(2): 10-14.
- [4] DE LA CONCHA-BERMEJILLO A, GUO J, ZHANG Z, et al. Severe persistent orf in young goats[J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2003, 15(5): 423-431.
- [5] VIKOREN T, LILLEHAUG A, AKERSTEDT J, et al. A severe outbreak of contagious ecthyma (orf) in a free-ranging musk ox (*Ovibos moschatus*) population in Norway[J]. Veterinary Microbiology, 2008, 127(1/2): 10-20.
- [6] 杨海波,孟庆玲,乔军,等. 羊口疮病毒新疆流行株的分离鉴定及其遗传进化分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2015, 43(2): 14-22.
- [7] 杨钰,冯杰,刘媛,等. 重庆地区羊口疮病毒的分离鉴定及 FIL 基因的原核表达[J]. 中国畜牧兽医, 2015, 42(6): 1396-1401.
- [8] TSAI S M, CHAN K W, HSU W L, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of orf virus[J]. Journal of Virological Methods, 2009, 157(2): 200-204.
- [9] 白刚,贾怀杰,何小兵,等. 羊口疮病毒 ORF129 基因重组质粒的构建及其在 BHK-21 细胞中的表达[J]. 甘肃农业大学学报, 2013, 48(5): 8-13.
- [10] IMLACH W, MCCAUGHAN C A, MERCER A A, et al. Orf virus-encoded interleukin-10 stimulates the proliferation of murine mast cells and inhibits cytokine synthesis in murine peritoneal macrophages[J]. Journal of General Virology, 2002, 83(5): 1049-1058.
- [11] DELHON G, TULMAN E R, AFONSO C L, et al. Genomes of the parapoxviruses ORF virus and bovine papular stomatitis virus[J]. Journal of Virology, 2004, 78(1): 168-177.
- [12] 闫丰超,邵佳,窦永喜. 羊口疮病毒分子生物学研究进展[J]. 中国兽医科学, 2013(1): 103-109.

- [13] 成伟伟,张克山,刘永杰,等. 羊传染性脓疱病毒基因组结构和主要基因功能研究进展[J]. 动物医学进展, 2014, 35(7): 82-85.
- [14] BENNETT J R, LATEEF Z, FLEMING S B, et al. Orf virus IL-10 reduces monocyte, dendritic cell and mast cell recruitment to inflamed skin[J]. Virus Research, 2016, 213: 230-237.
- [15] WANG Y, YANG K, BAI C, et al. Development of a SYBR Green I real-time PCR for the detection of the orf virus[J]. AMB Express, 2017, 7(1): 21.
- [16] 王 勇,赵玉洁,杨侃侃,等. 口疮病毒 020 基因的克隆、表达及多抗制备[J]. 安徽农业大学学报, 2017, 44(5): 780-783.
- [17] 殷冬冬,白彩霞,唐井玉,等. *Nectin-4* 基因的原核表达及多克隆抗体制备[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2016, 37(3): 6-10.
- [18] 葛士坤,张凯照,鲁 荣,等. 2006-2016 年中国羊口疮病毒的遗传演化分析[J]. 中国畜牧兽医, 2018, 45(2): 439-447.
- [19] 于永忠,吴志军,朱战波,等. 羊口疮病毒分子特征与免疫逃逸策略[J]. 病毒学报, 2012, 28(3): 278-284.
- [20] CHAN A, BAIRD M, MERCER A A, et al. Maturation and function of human dendritic cells are inhibited by orf virus encoded interleukin-10[J]. Journal of General Virology, 2006, 87(11): 3177-3181.

(责任编辑:王 妮)