

邢雪, 王元红, 李传峰, 等. 羊口疮病毒 F1L 融合 Fe 蛋白的表达与鉴定[J]. 江苏农业学报, 2020, 36(1): 130-135.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2020.01.018

羊口疮病毒 F1L 融合 Fe 蛋白的表达与鉴定

邢雪^{1,2}, 王元红^{1,2}, 李传峰², 缪秋红², 曹映¹, 王桂军¹, 刘光清²

(1.安徽农业大学动物科技学院,安徽合肥 230036; 2.中国农业科学院上海兽医研究所,上海 200241)

摘要: 本研究克隆了羊口疮病毒安徽分离株的 *FIL* 基因,融合 Fe 蛋白编码基因后,插入载体 pET-32a 中,构建了重组质粒 pET-*FIL-Fe*。将 pET-*FIL-Fe* 转化 BL21(DE3)感受态细胞,用 IPTG 诱导表达重组蛋白 F1L-Fe。SDS-PAGE 分析结果显示,羊口疮病毒 *FIL-Fe* 基因在 BL21(DE3) 获得了正确表达。将大量表达的 F1L-Fe 蛋白进行纯化,然后免疫 BALB/c 鼠,制备了抗 F1L 蛋白的多克隆抗体。最后,以制备的多克隆抗体对 F1L-Fe 融合蛋白进行 Western-blot 检测和分析,结果表明 F1L-Fe 蛋白能与制备的多克隆抗体发生特异性反应,具有良好的反应原性。本研究结果为进一步研发羊口疮病毒亚单位疫苗提供了物质基础。

关键词: 羊口疮病毒; F1L-Fe 蛋白; 多克隆抗体

中图分类号: S855.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2020)01-0130-06

Expression and identification of orf virus F1L fused with Fe protein

XING Xue^{1,2}, WANG Yuan-hong^{1,2}, LI Chuan-feng², MIAO Qiu-hong², CAO Yi¹, WANG Gui-jun¹, LIU Guang-qing²

(1. College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China; 2. Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 200241, China)

Abstract: In this study, the *FIL* gene of orf virus (ORFV) Anhui isolated strain was cloned. After fusing with the coding gene of Fe protein, it was inserted into the expression vector pET-32a to construct recombinant plasmid pET-*FIL-Fe*. Subsequently, pET-*FIL-Fe* was transformed into BL21(DE3) competent cells, and the expression of recombinant protein F1L-Fe was induced by IPTG. The results of SDS-PAGE showed that the *FIL-Fe* gene was successfully expressed in BL21(DE3). Then the F1L-Fe protein was expressed in large quantities and purified. To prepare the polyclonal antibody against F1L protein, BALB/c mice were immunized with the recombinant protein. Western blot results indicated that the F1L-Fe protein reacted specifically with the prepared polyclonal antibody and showed good reactogenicity. In a word, the results of this study provide the material foundation for further developing the subunit vaccine against ORFV.

Key words: orf virus (ORFV); F1L-Fe protein; polyclonal antibody

收稿日期: 2019-08-07

基金项目: 国家重点研发计划项目(2016YFD0500108, 2016YFD0501003);
上海市科技兴农创新项目[沪农科创字(2019)第 3-3 号]; 中
央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2019JB06)

作者简介: 邢雪(1993-), 女, 安徽池州人, 硕士研究生, 主要从事畜
禽传染病防治研究。(E-mail) 2386242406@qq.com

通讯作者: 刘光清, (E-mail) liugq@shvri.ac.cn; 王桂军, (E-mail) wgj
@ahau.edu.cn

羊口疮(ORF), 即羊传染性脓疱(Contagious septhyma), 是一种主要在病畜鼻孔、嘴唇处出现脓疱以及丘疹等病症的流行病, 该病主要感染 1~3 月龄的羔羊^[1-2]。中国养羊地域均出现过该病, 并且发病率呈显著的上升趋势, 危害着中国养羊业的发展, 严重阻碍了中国畜牧业的持续发展^[3-6]。

羊口疮病毒(ORF virus, ORFV) 为线性双链

DNA 病毒,属痘病毒科副痘病毒属,基因组大小约 134 kb^[7]。其中 ORFV 059 基因编码 FIL 蛋白,FIL 蛋白作为羊口疮的主要免疫原蛋白,能激发机体产生免疫反应,诱发宿主产生中和抗体^[8]。因此,FIL 蛋白可以作为研发羊口疮新型疫苗的免疫原蛋白之一。

在疫苗开发方面,Fe 蛋白作为普遍存在于生物界的铁贮藏蛋白,有自组装形成纳米颗粒的功能,主要技术体现在铁蛋白纳米笼的高度对称和自组装性,形成了一个有效的抗原递送系统,广泛应用于疫苗、药物研发等行业。在已开发研究的疫苗中,铁蛋白作为抗原的理想载体,已成功将来自 HIV-1 病毒的 Tat 蛋白和流感病毒的血凝素蛋白分别与幽门螺旋杆菌的铁蛋白融合形成纳米笼,激起体液反应并诱导产生中和抗体,成功地开发了能够有效针对这些病原体的疫苗^[9]。

本研究即在选择 ORFV *FIL* 为靶基因,去除其跨膜区后,与铁蛋白基因融合,构建重组质粒 pET-*FIL-Fe*,然后转化感受态细胞 BL21(DE3)表达重组融合蛋白 F1L-Fe,并制备抗 F1L-Fe 重组蛋白的多克隆抗体,以便为研发 ORFV 亚单位疫苗提供物质基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 病毒、细胞和菌株 羊口疮病毒株及其阳性血清、载体 pET-32a 均由本实验室储藏;DH5 α 和 BL21(DE3)感受态细胞均来自 TransGen Biotech 公司。

1.1.2 主要试剂 LA *Taq* 聚合酶购自 TaKaRa(大连)公司,pMD19T 载体、*Solution I* 连接酶、*EcoR I* 和 *EcoR V* 限制性内切酶购自 NEB(北京)公司,质粒小提试剂盒来自美国 AXYGEM 公司,胶回收试剂盒来自 Sangon Biotech 公司,兔抗羊 IgG-HRP 来自 CW Bio 公司,ECL 化学发光试剂盒来自美国 Thermo 公司,其余试剂均为分析纯。

1.1.3 试验动物 5 周龄的 BALB/c 健康雌鼠来自上海杰思捷实验动物有限公司[许可证号码:SCXX(沪)2018-0004]。

1.2 方 法

1.2.1 重组质粒 pET-*FIL-Fe* 的构建 据 GenBank 上已发表的 ORFV *FIL* 基因序列,去除其跨膜区(TM_H)设计用于扩增 *FIL* 截短基因的 PCR 引物,扩增片段大小为 873 bp。并设计融合 PCR 引物通

过 linker 蛋白(SGG)将 *FIL* 与 Fe 连接起来,上下引物两端分别添加酶切位点 *EcoR I* 和 *EcoR V*。引物(由上海擎科公司合成)序列见表 1。

表 1 构建重组质粒 pET-*FIL-Fe* 的引物

Table 1 Primers used to construct recombinant plasmid pET-*FIL-Fe*

引物名称	引物序列(5'→3')
<i>FIL F</i>	ATGGATCCACCCGAAATC
<i>FIL R</i>	CACGATGGCCGTGACCAG
<i>FIL-F</i> (TM _H)	GCCGGGCTGCTGTCA
<i>FIL-R</i> (TM _H)	GACCAGCAGCCCGCCACGTGGCGAGCAGC
<i>FIL-Fe F1</i> (<i>EcoR V</i>)	GCGATATCATGGATCCACCCGAAATC
<i>FIL-Fe R1</i> (<i>EcoR I</i>)	GCGAATTCTTAGCTCTTCCGGGACTTGGCGAT
<i>FIL-Fe F2</i>	GGGCTGCTGGTCACGGCCATCGTGTCCGGTG-GCGACATCATCAAGCTG
<i>FIL-Fe R2</i>	CAGCTTGATGATGTCCGCCACCCGACACGATG-GCCGTGACCAGCAGCCC

先以 ORFV 基因组为模板以 *FIL F*/*FIL R* 为引物进行 PCR 扩增,胶回收后连接 PMD-19T,转化后获得 PMD-19T-*FIL*,然后将上述重组质粒以引物 *FIL* (TM_H)-*F*/*FIL R* (TM_H)进行 PCR 扩增,胶回收后加 DMT(Dimethyl terephthalate,对苯二甲酸二甲酯)转化 DH5 α 后,挑取单克隆进行 PCR 鉴定,鉴定正确后分别以 *FIL-Fe F1* (*EcoR V*)/*FIL-Fe R2* (*EcoR V*)为引物扩增 *FIL* (TM_H),以 *FIL-Fe F2*/*FIL-Fe R1* (*EcoR I*)为引物扩增 Fe 蛋白,胶回收后进行融合 PCR,第一次反应条件为 95 °C 预变性 5 min;94 °C 20 s、72 °C 90 s,10 个循环;72 °C 延伸 5 min,第一次反应结束后,取出 PCR 管加入引物 *FIL-Fe F1* (*EcoR V*)、*FIL-Fe R1* (*EcoR I*)。第二次反应条件为 95 °C 预变性 5 min;94 °C 20 s、56 °C 20 s、72 °C 40 s,10 个循环;72 °C 延伸 5 min。待反应结束后,胶回收 PCR 产物。用 *EcoR I* 和 *EcoR V* 双酶切后胶回收,然后与经 *EcoR I* 和 *EcoR V* 双酶切的 pET-32a 载体连接,并转化 DH5 α ,于含 AMP(氨苄青霉素,Amoxicillin)的 LB 平板 37 °C 培养。次日挑单克隆并进行 PCR 鉴定。鉴定正确后进行 *EcoR I* 和 *EcoR V* 双酶切鉴定,将双酶切验证准确的质粒送桑尼(上海)公司测序。

1.2.2 F1L-Fe 蛋白的诱导表达及 SDS-PAGE 分析 将质粒 pET-*FIL-Fe* 转化感受态细胞 BL21

(DE3),挑取单克隆于含 AMP 的 LB 培养液中,37 ℃,220 r/min 培养。 OD_{600} 值为 0.6~0.8 时,加 1 mmol/L 的 IPTG(异丙基- β -D-硫代半乳糖苷),分别以 16 ℃,220 r/min 诱导过夜,37 ℃,220 r/min 诱导 5 h,取菌液,经 12 000 r/min 离心 1 min,弃上清液。加 PBS 重悬,与蛋白质上样缓冲液混匀,95 ℃ 10 min 后进行 SDS-PAGE 电泳分析。

1.2.3 F1L-Fe 蛋白的可溶性分析及纯化 取 3 ml 菌液到 300 ml 的含 AMP 的 LB 培养液中,加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG,37 ℃,220 r/min 诱导 5 h,将已诱导的菌液 4 ℃ 8 000 r/min 离心 15 min,弃上清液,加入 30 ml PBS 吹打混匀沉淀,离心,重复上述步骤 3 次。最后向沉淀加入 10 ml PBS 后超声裂解,最后 4 ℃ 8 000 r/min 离心 20 min,SDS-PAGE 电泳分析沉淀和上清液。结果证明 F1L-Fe 重组蛋白主要以包涵体的形式存在,收集沉淀,分别加 2 mol/L、4 mol/L 尿素洗涤沉淀,离心取沉淀,用 4 ml 8 mol/L 尿素溶解沉淀,离心,将上清液放于透析袋中透析复性,获得目的重组蛋白。

1.2.4 F1L-Fe 蛋白的透射电镜观察 取重组融合蛋白 F1L-Fe 4 ℃,8 000 r/min 离心 10 min,吸取 20 μ l 上清液滴于封口膜,铜网吸附 3~5 min,以 10 g/L 磷钨酸(pH 6.8~7.4)负染 1 min,透射电镜(TEM)下观察并拍照。

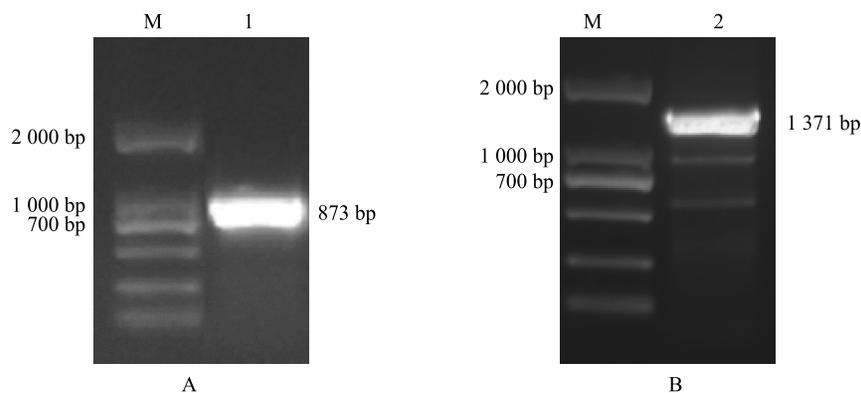
1.2.5 F1L-Fe 蛋白的 Western-blot 鉴定 将 F1L-Fe 蛋白经 SDS-PAGE 电泳后,半干转法转移至硝酸纤维素滤膜(CN)上,使用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 室温封闭 2 h。加 ORFV 阳性血清为一抗,4 ℃ 孵育 12 h,TBST 清洗 3 次。加兔抗羊 IgG-HRP 为二抗,37 ℃ 孵育 1 h,清洗后 ECL 显色观察。

1.2.6 F1L-Fe 蛋白的鼠源多克隆抗体的制备与鉴定 将融合蛋白 F1L-Fe 与弗氏完全佐剂等比例混合,乳化完全后免疫 5 周龄 BALB/c 雌鼠,每只 50 μ g 皮下注射,7 d 后进行第二次免疫,将融合蛋白 F1L-Fe 与弗氏不完全佐剂等比例乳化后,每只 50 μ g 皮下注射。首次免疫后的第 4 周和第 6 周进行第三次和第四次免疫,步骤与第二次免疫相同。第四次免疫后 7 d 小鼠眼眶处采血,分离血清。以获得的小鼠血清为一抗,以 F1L-Fe 融合蛋白为抗原,进行 Western-blot 鉴定分析。

2 结果

2.1 *FIL-Fe* 基因 PCR 扩增

PCR 扩增产物,在 700~1 000 bp 处有特异性条带,约 873 bp,与预期相符合(图 1A)。融合 PCR 扩增产物,在 1 000~2 000 bp 处有特异性条带,约 1 371 bp,与预期相符合(图 1B)。



M:DL2 000 bp 标准分子量;泳道 1:*FIL* 截短基因 PCR 扩增产物;泳道 2:*FIL-Fe* 基因 PCR 扩增产物。

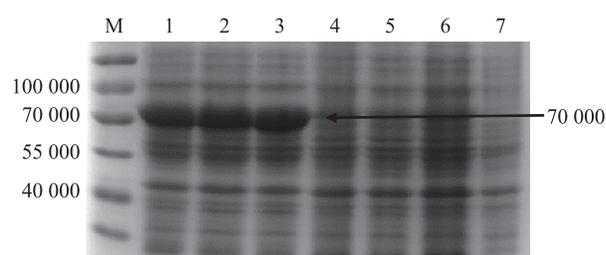
图 1 *FIL* 截短基因以及 *FIL-Fe* PCR 扩增结果

Fig.1 PCR amplification results of *FIL* truncated gene and *FIL-Fe*

2.2 F1L-Fe 蛋白的诱导表达及鉴定

将鉴定正确的表达质粒 pET-*FIL-Fe* 转入 BL21 (DE3) 进行诱导表达,电泳结果表明,表达质粒 pET-*FIL-Fe* 经 IPTG 诱导后出现了特异性蛋白条

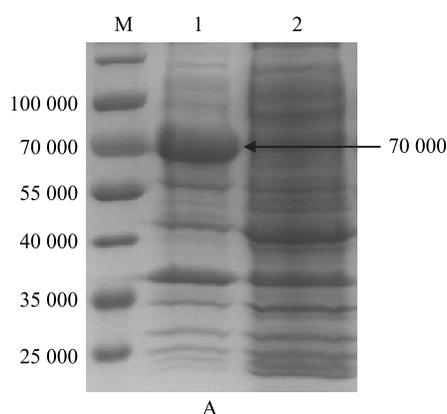
带,相对分子质量大小约 70 000,与预期相符合,且在 37 ℃ 下诱导的蛋白质产量显著多于其他条件。结果说明,在 37 ℃、1 mmol/L IPTG、4 h 条件下能够获得正确的蛋白质表达且表达量较大(图 2)。



M:蛋白质分子质量标准;泳道 1~3:37 °C 诱导;泳道 4~6:16 °C 诱导;泳道 7:pET-32a 空载体已诱导。

图 2 SDS-PAGE 电泳检测表达的重组 F1L-Fe 蛋白

Fig.2 Detection of the recombinant F1L-Fe protein by SDS-PAGE electrophoresis



M:蛋白质 marker;泳道 1:破碎后沉淀;泳道 2:破碎后上清液;泳道 3:纯化后的 F1L-Fe 蛋白。

图 3 F1L-Fe 蛋白的可溶性分析以及纯化后的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig.3 Solubility of F1L-Fe protein and SDS-PAGE analysis after purification

2.3 F1L-Fe 蛋白的可溶性分析及纯化

SDS-PAGE 分析结果表明,融合蛋白 F1L-Fe 主要出现在沉淀中。说明重组融合蛋白 F1L-Fe 主要以包涵体的方式存在(图 3A)。尿素纯化该包涵体蛋白,纯化后通过 SDS-PAGE 分析,结果获得了相对单一的目的条带(图 3B)。

2.4 F1L-Fe 蛋白的透射电镜负染观察

透射电镜负染观察可见 F1L-Fe 蛋白可自组装为球形颗粒,大小均一且结构、形态稳定,直径约 100 nm(图 4)。

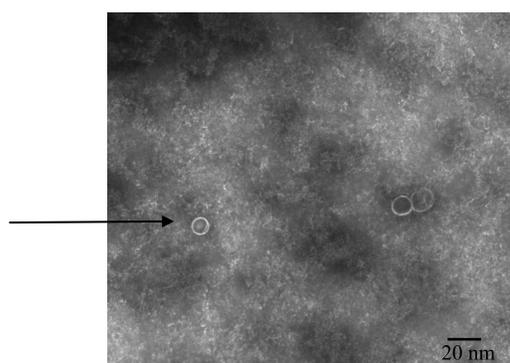
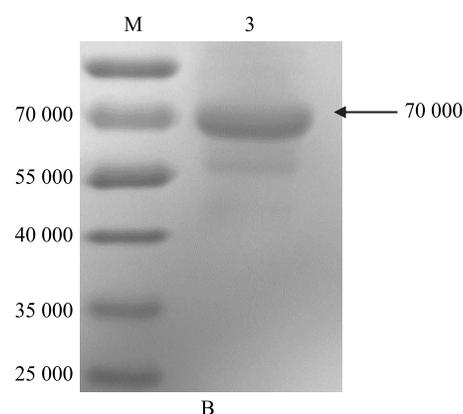


图 4 F1L-Fe 的透射电镜负染观察

Fig.4 Negative staining observation of F1L-Fe by transmission electron microscope

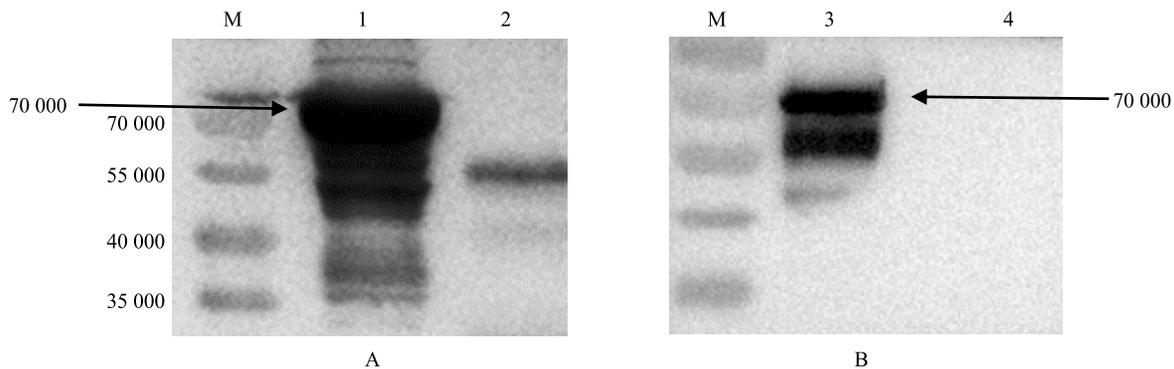
2.5 F1L-Fe 蛋白的 Western-blot 鉴定及其多克隆抗体的制备

使用羊口疮阳性血清对 F1L-Fe 重组融合蛋白

进行 Western-blot 试验,结果显示在约 70 000 处有特异性条带,表明重组融合蛋白 F1L-Fe 已获得准确表达且能够被 ORFV 阳性血清特异识别(图 5A)。用鉴定正确的重组融合蛋白免疫小鼠,第四次免疫后 7 d,采血并分离小鼠血清,将该血清作为一抗,以纯化后的重组融合蛋白 F1L-Fe 作为抗原,Western-blot 分析鉴定结果表明,获得的鼠源多克隆抗体血清能够与重组融合蛋白 F1L-Fe 发生特异性反应(图 5B)。

3 讨论

羊口疮病主要病症是在患病羊的口唇、顎及舌面等大量长出水疱丘疹,水疱部位会出现结痂从而引起患病羊进食困难,消瘦、抵抗力下降甚至死亡^[10]。目前该病在中国养羊区流行普遍,又属于人畜共患病,不仅感染羊,也威胁了养殖人员的健康,



M:蛋白质 marker;泳道1,3:纯化的FIL-Fe蛋白;泳道2,4:pET-32a空载体已诱导。

图5 纯化后的FIL-Fe蛋白及其多克隆抗体Western-blot鉴定

Fig.5 Western-blot identification of purified FIL-Fe protein and its polyclonal antibody

因此羊口疮病的暴发与流行对中国养殖业的发展及人类的健康都有严重的威胁。目前,羊口疮病的暴发趋势逐年上升,但对该病的治疗尚无特效方法,国内外在防控方面上主要以接种羊口疮弱毒活疫苗的方法进行预防,但是仍然不能预防和控制该病^[11-12]。

据调查,亚单位疫苗的安全性和效率通常需要通过佐剂来改善,在此铁蛋白纳米颗粒疫苗提供了另一种辅佐免疫原的思路^[13]。此外还有研究报道,铁蛋白的纳米颗粒疫苗能够有效地改善流感病毒疫苗免疫的效力和广度^[14]。据研究,高度有序重复的结构形式可以诱导更强的免疫应答,因此铁蛋白纳米笼可以通过在其外表面上有序地展示多种抗原来增强抗原的免疫原性^[15]。

本研究将ORFV FIL蛋白与Fe蛋白融合,但通常2个蛋白质结构域之间可能存在结构的扰动,从而引起融合蛋白质的不稳定性,产生错误折叠成为异构产物,导致生物学活性受损以及表达率下降^[16-17]。在此,Linker蛋白可能成为2个蛋白质之间有效的连接工具,可在结构域之间供应适当的间距以降低其干扰,恢复甚至改善折叠,允许体内释放游离蛋白质药物结构域以改善生物活性^[18]。本研究选择以Gly和Ser为组合的柔性接头,以及亲水性的氨基酸来提供结构柔性,以此来改善融合蛋白FIL-Fe的表达率和生物学活性。

FIL基因作为ORFV新型疫苗研究中的一个重要免疫原性基因^[19],本试验选择FIL基因作为预防羊口疮的候选疫苗,并将铁蛋白作为其免疫佐剂,通过SGG的Linker蛋白联接。在本试验中我们首次

将羊口疮FIL蛋白与铁蛋白利用融合PCR进行融合,然后将其与pET-32a载体连接起来,成功构建可表达FIL-Fe融合蛋白的原核表达载体pET-FIL-Fe,SDS-PAGE分析结果表明,pET-FIL-Fe原核表达载体在大肠杆菌感受态细胞中成功且大量表达了FIL-Fe重组融合蛋白,其中通过SDS-PAGE分析试验可以看出FIL-Fe蛋白的表达量很高,说明铁蛋白可能存在促进FIL蛋白表达的作用,但有待后续研究。最后我们获得了FIL-Fe融合蛋白的多克隆抗体,Western-blot鉴定结果表明其具有良好的反应原性。本研究首次选择了FIL蛋白与铁蛋白通过Linker蛋白进行融合,初步构建了FIL-Fe蛋白纳米颗粒以及获得了其多克隆抗体,为后续羊口疮亚单位疫苗的研发奠定了物质基础。

参考文献:

- [1] 陈溥言. 兽医传染病学[M]. 北京:中国农业出版社, 2006.
- [2] 殷震. 动物病毒学[M]. 北京:科学出版社, 1997.
- [3] CARGNELUTTI J F, MASUDA E K, MARTINS M, et al. Virological and clinico-pathological Features of ORF virus infection in experimentally infected rabbits and mice[J]. Microbial Pathogenesis, 2011, 50(1):56-62.
- [4] 涂明亮,安维雪,张志丹,等. 羊口疮病毒内蒙株的生物学特性[J]. 中国兽医学报, 2016, 36(8):1349-1353.
- [5] 王盈盈,贾怀杰,白刚,等. 羊口疮病毒甘肃流行株的分离鉴定及其ORF070基因和ORF109基因的序列分析[J]. 中国兽医科学, 2013(8):782-787.
- [6] 王晴楠,张凯照,宁章勇. 我国1984-2014年羊口疮报道文献的统计分析[J]. 畜牧与兽医, 2015, 47(9):111-113.
- [7] ZHANG K, LIU Y, KONG H, et al. Comparison and phylogenetic analysis based on the B2L gene[J]. Arch Virol, 2014, 159(6):1475-1479.

- [8] CZERNY C P, WALDMANN R, SCHEUBECK T. Identification of three distinct antigenic sites in parapoxviruses[J]. Archives of Virology, 1997, 142(4): 807-821.
- [9] KARCH C P, BURKHARD P. Vaccine technologies: from whole organisms to rationally designed protein assemblies[J]. Biochem Pharmacol, 2016,120:1-14.
- [10] 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, 2003, 78(1): 168-177.
- [11] SCAGLIARINI A, CIULLI S, BATTILANI M, et al. Characterisation of immunodominant protein encoded by the F1L gene of ORF virus strains isolated in Italy[J]. Archives of Virology, 2002, 147(10): 1989-1995.
- [12] CZERNY C P, Waldmann R, Scheubeck T. Identification of three distinct antigenic sites in parapoxviruses[J]. Archives of Virology, 1997, 142(4): 807-821.
- [13] KANEKIYO M, WEI C J, YASSINE H M, et al. Self-assembling influenza nanoparticle vaccines elicit broadly neutralizing H1N1 antibodies[J]. Nature, 2013, 499:102-106.
- [14] KANEKIYO M, BU W, JOYCE M G, et al. Rational design of an Epstein-Barr virus vaccine targeting the receptor-binding site[J]. Cell, 2015, 162:1090-1100.
- [15] LI C Q, SOISTMAN E, CARTER D C. Ferritin nanoparticle technology. A new platform for antigen presentation and vaccine development [J]. Ind Biotechnol, 2006,2(2):143-147.
- [16] ZHAO H, YAO X, XUE C, et al. Increasing the homogeneity, stability and activity of human serum albumin and interferon-alpha2b fusion protein by linker engineering[J]. Protein Expr Purif, 2008,61:73-77.
- [17] BAI Y, SHEN W C. Improving the oral efficacy of recombinant granulocyte colony-stimulating factor and transferrin fusion protein by spacer optimization[J]. Pharm Res, 2006,23:2116-2121.
- [18] CHEN X, ZARO J L, SHEN W C. Fusion protein linkers: property, design and functionality[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2013,65(10):1357-1369.
- [19] PALERMO L M, HAFENSTEIN S L, Parrish C R. Purified feline and canine transferrin receptors reveal complex interactions with the capsids of canine and feline parvoviruses that correspond to their host ranges[J]. Journal of Virology, 2006, 80(17):8482-8492.

(责任编辑:陈海霞)