

网络出版时间:2018-02-26 08:48

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2018.06.001

网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.s.20180226.0846.002.html

# 羊口疮病毒榆林株 *B2L* 和 *F1L* 串联基因在昆虫杆状病毒系统的表达

冯 平<sup>1,2</sup>, 李云章<sup>1</sup>, 孙丰廷<sup>3</sup>, 屈 雷<sup>2</sup>, 闫海龙<sup>2</sup>

(1 内蒙古农业大学 兽医学院, 内蒙古 呼和浩特 010018; 2 榆林学院 生命科学学院, 陕西 榆林 719000;

3 武汉中拓康明生物科技有限公司, 湖北 武汉 430040)

**【摘 要】**【目的】克隆分析羊口疮病毒(ORFV)榆林株(ORFV-Yulin)的 *F1L* 基因序列, 通过昆虫杆状病毒表达 *B2L* 和 *F1L* 串联基因。【方法】采用 PCR 方法扩增 ORFV-Yulin 株 *F1L* 全长基因, 测序后对其进行序列分析和遗传进化分析。扩增 ORFV-Yulin 株 *B2L* 融合基因(*rB2L*)和 *F1L* 融合基因(*cF1L*), 利用碱基 linker 连接, 通过重叠 PCR 方法扩增获得 ORFV *rB2L*-linker-*cF1L* 重组基因(*rB2LcF1L*), 将其与昆虫杆状病毒表达载体 pBac5 连接构建表达载体 pBac-*rB2LcF1L*。将 pBac-*rB2LcF1L* 包装出杆状病毒, 侵染 sf9 细胞, 通过 SDS-PAGE、Western-blotting 以及质谱鉴定等方法验证目的基因 *rB2LcF1L* 的表达。【结果】克隆获得了 1 029 bp 的 *F1L* 全长基因, 该基因高度保守, 与 FJ-MH2015 株的序列相似性最高, 核苷酸和氨基酸的相似性分别为 99.0% 和 99.4%。系统进化分析表明, ORFV-Yulin 株与 XP(KU199840.1)、FJ-MH2015(KM675409.1)以及 Shanxi(HQ221964.1)株同处于一个分支。PCR 扩增获得了 855 bp 的 *cF1L* 基因、1 180 bp 的 *rB2L* 基因及 1 983 bp 的 *rB2LcF1L* 基因, 成功构建了 pBac-*rB2LcF1L* 载体, 并包装出相应的杆状病毒。*B2L* 和 *F1L* 串联基因通过昆虫杆状病毒表达系统获得成功表达, 表达产物的分子质量为 80 ku, 且有部分重组蛋白能分泌到细胞培养基中。【结论】ORFV-Yulin 株的 *B2L* 和 *F1L* 串联基因在昆虫杆状病毒系统表达成功。

**【关键词】** 羊口疮病毒; *F1L* 基因; *F1L*+*B2L* 串联表达; 昆虫杆状病毒; 基因表达

**【中图分类号】** S852.65<sup>+</sup>4; Q784

**【文献标志码】** A

**【文章编号】** 1671-9387(2018)06-0001-08

## Co-expression of *B2L* and *F1L* genes of Orf virus strain ORFV-Yulin in baculovirus system

FENG Ping<sup>1,2</sup>, LI Yunzhang<sup>1</sup>, SUN Fengting<sup>3</sup>, QU Lei<sup>2</sup>, YAN Hailong<sup>2</sup>

(1 College of Veterinary Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia 010018, China;

2 College of Life Sciences, Yulin University, Yulin, Shaanxi 719000, China; 3 Combio-Pioneer Co., LTD., Wuhan, Hubei 430040, China)

**Abstract:** 【Objective】This study cloned and analyzed the sequence of *F1L* gene of Orf virus (ORFV) strain Yulin (ORFV-Yulin) and its co-expressed *B2L* and *F1L* genes in baculovirus system. 【Method】The full-length gene of *F1L* of ORFV-Yulin was amplified by PCR, and the sequenced gene was analyzed by genetic evolution. The fused gene of *B2L* (*rB2L*) and *F1L* (*cF1L*) of ORFV-Yulin was amplified by PCR and the ORFV *B2L*-linker-*cF1L* recombinant gene (*rB2LcF1L*) was amplified by overlapping PCR method with linker. The baculovirus expression vector pBac-*rB2LcF1L* was constructed with pBac5 and *rB2LcF1L*

〔收稿日期〕 2017-03-27

〔基金项目〕 陕西省科技厅农业科技创新与攻关项目(2016NY-120); 陕西省科技厅重大统筹项目(2014KTDZ02-01); 陕西省教育厅专项科研计划项目(14JK1860); 榆林学院重点项目(14YK41)

〔作者简介〕 冯 平(1980—), 男, 陕西米脂人, 副教授, 在读博士, 主要从事动物疫病防控研究。E-mail: fengping\_ren@126.com

〔通信作者〕 李云章(1956—), 男(蒙古族), 内蒙古呼和浩特人, 教授, 博士生导师, 主要从事反刍动物疾病研究。

E-mail: liyunzhang1956@163.com

to get baculovirus expressing *rB2LcF1L* gene after the infection of sf9 cells. The expressed product was identified by SDS-PAGE, mass spectrometry and western blot. 【Result】 The length of *F1L* gene obtained by cloning was 1 029 bp. The gene was highly conserved and had the highest similarity with FL-MH2015 strain with the nucleotide and amino acid similarity of 99.0% and 99.4%, respectively. The phylogenetic analysis showed that the ORFV-Yulin strain belonged to a branch with XP (KU199840.1), FJ-MH2015 (KM675409.1) and Shanxi (HQ221964.1). The lengths of *cF1L*, *rB2L*, and *rB2LcF1L* obtained by PCR were 855 bp, 1 180 bp and 1 983 bp, respectively. The pBac-*rB2LcF1L* vector was successfully constructed, followed by packaging the corresponding baculovirus. The tandem gene of *rB2L* and *cF1L* was successfully expressed as 80 ku protein by baculovirus expression system and some recombinant proteins secreted into cell culture medium. 【Conclusion】 The recombinant *B2L* and *F1L* gene of ORFV-Yulin was successfully expressed in baculovirus expression system.

**Key words:** Orf virus (ORFV); *F1L* gene; co-expression of *B2L* and *F1L*; baculovirus; gene expression

羊口疮病毒(Orf virus, ORFV)又称为接触传染性脓疱皮炎病毒(Contagious pustular dermatitis virus, CPDV),是人畜共患、接触性、嗜上皮性传染病羊口疮的病原<sup>[1]</sup>。ORFV 属于痘病毒科脊索动物痘病毒亚科的副痘病毒属,病毒粒子呈椭圆形,大小约 260 nm×160 nm,外面包绕着螺旋丝状结构,病毒粒子外常有囊膜包裹<sup>[2]</sup>。ORFV 基因组庞大,约有 135 个基因 *Orf001—Orf135*,其中 *Orf001—Orf008* 及 *Orf112—Orf135* 为末端反向重复序列区域,*Orf009—Orf111* 为中央区基因组区域<sup>[3-4]</sup>。这些基因片段编码多种不同的蛋白,主要有抗细胞凋亡蛋白、羊口疮病毒干扰素抗性蛋白(Interferon resistance protein, IFNR)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(Granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)、GM-CSF/IL-2 (The inhibitor of granulocyte-macrophage colony stimulation factor/interleukin-2, GIF)、CEV-IL-10 (A cytokine interleukin-10 orthologue, vIL-10)、血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)、dUTPase 蛋白、锚蛋白(ANK)重复蛋白、趋化因子结合蛋白(Chemokine-binding protein, CBP)、42 ku 蛋白、39 ku 蛋白、10 ku 蛋白、DNA 聚合酶以及 RNA 聚合酶等<sup>[5-9]</sup>。目前,国内外学者对 ORFV 的研究主要集中在与病毒毒力、免疫调节以及免疫原性相关的蛋白方面,如与病毒毒力和免疫逃避有关的 IL-10 和 VEGF 等,与宿主免疫防御机制和免疫逃避有关的免疫调节蛋白 OV\_IFNR、GIF、vIL-10 和 VEGF 等,以及能刺激机体产生强烈免疫反应且具有免疫原性的 39 和 42 ku 蛋白等<sup>[10-13]</sup>。

ORFV 免疫反应以细胞免疫反应为主,但体液免疫反应也发挥着一定的作用<sup>[14-15]</sup>。42 ku 蛋白由

*Orf011(B2L)* 基因编码,又称为 B2L 蛋白,是病毒表面囊膜的组成成分之一,能够刺激机体产生强烈的体液免疫应答,同时还可引起淋巴细胞的增殖分化<sup>[16]</sup>,被广泛应用于副痘病毒属的实验室检测<sup>[17-18]</sup>。

39 ku 蛋白又称为 F1L 蛋白,由 *Orf 059(F1L)* 基因编码,*F1L* 基因长 1 005 bp,位于 ORFV 基因组比较保守的中部区域<sup>[19]</sup>。有研究证实,利用纯化的不同 ORFV 毒株分别制备单克隆抗体,然后通过免疫荧光技术成功检测到 3 种单克隆抗体均与病毒颗粒表面的囊膜特异性结合,而 F1L 蛋白和 22 ku 蛋白则是 ORFV 单克隆抗体的主要结合位点。蛋白免疫印迹试验发现,利用 ORFV 制备的兔抗羊口疮病毒多克隆血清,也能检测到 F1L 蛋白和 22 ku 蛋白条带,这表明 F1L 蛋白为免疫原性蛋白<sup>[20]</sup>。同时还有研究表明,宿主体液免疫产生的抗体主要与 F1L 蛋白结合,该蛋白是病毒表面微管的组成成分之一,能够刺激宿主产生中和抗体,该结果进一步证实 F1L 蛋白是免疫原性蛋白<sup>[21]</sup>。此外,该蛋白能够与表达于大多数哺乳动物细胞表面的硫酸乙酰肝素(HS)受体结合,在病毒吸附和侵入过程中起重要作用<sup>[12]</sup>。鉴于此蛋白的重要性,国内外学者对其高度关注,以期将其应用于基因工程疫苗的研制及疾病的诊断等方面。

目前,疫苗接种被认为是预防和控制该病可靠且有效的手段。国外已有羊口疮弱毒疫苗,但我国市场上尚无口疮弱毒疫苗供应。由于弱毒疫苗本身存在毒力返强、病毒扩散等缺陷。因此,研制使用简单、方便、免疫效果确实的羊口疮基因工程亚单位疫苗已成为防控羊口疮疫病的必然趋势。目前,ORFV 的 2 种主要抗原基因 *B2L* 和 *F1L* 已经在不同

的系统中获得了单独或共同表达,如原核系统和真核表达载体 pCDNA3.1、pVAX1 等<sup>[22-25]</sup>。此外,国内已经研发出 B2L 基因的重组菌,该重组菌可以传代且高效表达 B2L 蛋白<sup>[26]</sup>。然而,原核系统表达的蛋白缺乏相关的翻译后修饰,而目的蛋白在 pCDNA3.1、pVAX1 质粒中的表达具有水平低、费用高、操作复杂、周期长等缺点。

本课题组从陕西榆林发病的陕北白绒山羊病料中分离出 ORFV-Yulin 株,并在杆状病毒表达系统中对其 B2L 全长基因进行了表达<sup>[27]</sup>,本研究拟进一步对 ORFV-Yulin 株的 F1L 全长基因进行扩增和序列分析,并采用杆状病毒表达系统对 B2L 和 F1L 进行串联表达,以期为羊口疮基因工程亚单位疫苗的研制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材 料

1.1.1 载体、菌株与主要试剂 MDBK 细胞、昆虫杆状病毒表达系统质粒 pBac5、线性化的 Bacmid、

陕北白绒山羊 ORFV 榆林株 ORFV-Yulin B2L 基因 T 载体(pGT-B2L),均由本实验室保存;Top10 大肠杆菌感受态细胞、预染蛋白 Marker (CW0986M)、SDS-PAGE 上样缓冲液(CW0027A),购自康为世纪生物科技有限公司;PCR 反应试剂、pGEM-Teasy 载体、PrimeSTAR® HS 高保真聚合酶、总 DNA 提取试剂盒、DNA Marker,均购自 TaKaRa 公司;质粒 DNA 小量制备试剂盒和 DNA 凝胶回收试剂盒,购自 OMGA 公司;细胞转染试剂 (Sofast,11103),购自梭华公司;抗 His-Tag Mouse (KM8001)、HRP 标记的山羊抗鼠二抗(LK2003),购自天津三箭生物科技有限公司;昆虫细胞培养基 SFX-Insect(SH30278.02),购自 HyClone。

1.1.2 引物设计 参照 GenBank 中登录的 ORFV F1L 基因序列(GenBank 登录号 KU199840.1)设计引物 1F/1R,用于扩增 F1L 基因。根据 B2L<sup>[27]</sup> 和 F1L 的测序结果,分别设计串联的杆状病毒表达引物 2F/2R 和 3F/3R,引物均由中美泰和公司合成,其序列见表 1。

表 1 本研究中所用到的引物及其序列

Table 1 Primers and their sequences used in this study

| 引物 Primer | 序列(5'→3')Sequence                                | 用途 Use         |
|-----------|--------------------------------------------------|----------------|
| 1F        | ATGGATCCACCCGAAATCACG                            | F1L 克隆         |
| 1R        | TCACACGATGGCCGTGACC                              | F1L Clone      |
| 2F        | GGACGCTAGCATGTGGCCGTTCTCTCC                      | rB2LcF1L 克隆    |
| 2R        | GGGGTGCGGCGCGGGAGGCGACCCACCGCCATTTATTGGTTTGAGAAC | rB2LcF1L clone |
| 3F        | CAAACCAATAAATGGCGGTGGGTGCGCTCCGCGCGCACCCCAAG     | rB2LcF1L 克隆    |
| 3R        | GCAGAAAGCTTCACGATGGCCGTGACCAGCAGCCCC             | rB2LcF1L clone |

注:2F 和 3R 序列中的下划线部分分别是 *Nhe* I 和 *Hind*Ⅲ酶切位点。  
Note:The underlined in sequences of 2F and 3R represent the cleavage sites *Nhe* I and *Hind*Ⅲ, respectively.

### 1.2 F1L 全长基因的扩增

用总 DNA 提取试剂盒从 ORFV-Yulin 株转染细胞中提取 ORFV 的 DNA,用之作为模板,用表 1 中的克隆引物 1F/1R 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 50 μL:5×PrimeSTAR® Buffer (Mg<sup>2+</sup> plus) 10 μL,dNTPs(25 mmol/L) 4 μL,引物 1F 和 1R(25 pmol/μL)各 1 μL,DNA 模板 4 μL,PrimeSTAR® HS 高保真聚合酶 0.5 μL,加 ddH<sub>2</sub>O 补足 50 μL。扩增条件为:98℃ 1 min;98℃ 10 s,55℃ 30 s,72℃ 80 s,35 个循环;72℃ 10 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳检测。

### 1.3 F1L 全长基因的遗传变异分析

用 DNA 凝胶回收试剂盒回收 PCR 产物,将其与 pGEM-Teasy 载体连接后,转化 Top10 大肠杆菌感受态细胞,挑单菌落进行 PCR 鉴定(PCR 反应程

序同上),提取阳性菌落质粒送中美泰和公司测序,将阳性质粒命名为 pGT-F1L。从 GenBank 中选取其他 15 株 ORFV 毒株(表 2)的 F1L 基因序列,利用 DNASar 分析本试验分离毒株与这 15 株参考毒株核苷酸和推导的氨基酸序列的相似性并构建遗传进化树。

### 1.4 融合基因 rB2LcF1L 的 PCR 扩增与 pGT-rB2LcF1L 的构建

分别以 pGT-B2L 和 1.3 中获得的阳性质粒 pGT-F1L 为模板,用表 1 中的表达载体引物 2F/2R 和 3F/3R,分别扩增 B2L 融合基因(rB2L)和 F1L 去掉编码 1—70 位氨基酸信号肽的核苷酸融合基因(cF1L),反应体系和程序同上。rB2L 和 cF1L 融合基因的 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,回收纯化,送中美泰和公司测序后进行融合 PCR 扩增。

表 2 本研究中用到的其他 ORFV 毒株信息

Table 2 Information of ORFV strains used in this study

| 毒株<br>Virus strain | 分离国别<br>Country of isolation | 分离年份<br>Year of isolation | F1L 基因序列登录号<br>Accession number | 宿主<br>Host |
|--------------------|------------------------------|---------------------------|---------------------------------|------------|
| OV20               | 意大利 Italy                    | 2001                      | AY040085.1                      | 绵羊 Sheep   |
| Jilin              | 中国吉林 Jilin, China            | 2008                      | FJ808075.1                      | 绵羊 Sheep   |
| Shanxi             | 中国 China                     | 2009                      | HQ221964.1                      | 山羊 Goat    |
| FJ-SL              | 中国 China                     | 2012                      | KC568409.1                      | 山羊 Goat    |
| OV-HN3/12          | 中国 China                     | 2012                      | KC569751.1                      | 绵羊 Sheep   |
| Xinjiang2          | 中国 China                     | 2013                      | KF666561.1                      | 山羊 Goat    |
| Xinjiang/SHZ1      | 中国 China                     | 2012                      | KF726851.1                      | 山羊 Goat    |
| XP                 | 中国福建 Fujian, China           | 2014                      | KM675408.1                      | 山羊 Goat    |
| XD                 | 中国福建 Fujian, China           | 2013                      | KM675409.1                      | 山羊 Goat    |
| sdjn059            | 中国 China                     | 2014                      | KP336710.1                      | 山羊 Goat    |
| FJ-MH2015          | 中国 China                     | 2015                      | KU199840.1                      | 山羊 Goat    |
| GY-AHF             | 中国 China                     | 2013                      | KX029229.1                      | 山羊 Goat    |
| Jilin-Nongan       | 中国 China                     | 2011                      | JQ271535.1                      | 绵羊 Sheep   |
| NA1-11             | 中国 China                     | 2011                      | JQ619904.1                      | 绵羊 Sheep   |
| Gansu2010          | 中国 China                     | 2010                      | JX142183.1                      | 绵羊 Sheep   |

利用碱基 linker 连接,通过重叠 PCR 扩增获得 ORFV rB2L-linker-cF1L 融合基因(rB2LcF1L)。融合 PCR 扩增体系为 50  $\mu$ L: 5  $\times$  PrimeSTAR<sup>®</sup> Buffer(Mg<sup>2+</sup> plus) 10  $\mu$ L, dNTPs(25 mmol/L) 4  $\mu$ L, rB2L 和 cF1L 融合 PCR 模板各 4  $\mu$ L, Prime-STAR<sup>®</sup> HS 高保真聚合酶 0.5  $\mu$ L, 加 ddH<sub>2</sub>O 补足 50  $\mu$ L。扩增程序为: 98  $^{\circ}$ C 1 min; 98  $^{\circ}$ C 10 s, 56  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 70 s, 10 个循环。然后取 1  $\mu$ L 前述 PCR 产物作为第 2 次 PCR 的模板,以 2F 和 3R 为引物进行 PCR 扩增,反应体系为 50  $\mu$ L: 5  $\times$  Prime-STAR<sup>®</sup> Buffer (Mg<sup>2+</sup> plus) 10  $\mu$ L, dNTPs (25 mmol/L) 4  $\mu$ L, 模板 1  $\mu$ L, 引物 2F、3R (25 pmol/ $\mu$ L) 各 1  $\mu$ L, PrimeSTAR<sup>®</sup> HS 高保真聚合酶 0.5  $\mu$ L, 加 ddH<sub>2</sub>O 补足 50  $\mu$ L。扩增程序为: 98  $^{\circ}$ C 1 min; 98  $^{\circ}$ C 10 s, 55  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 120 s, 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳检测。

切胶回收 rB2LcF1L 基因, 将其与 pGEM-Teasy 载体连接后, 转化 Top10 大肠杆菌感受态细胞, 挑取单菌落进行 PCR 鉴定(反应体系和反应程序同第 2 次 PCR), 提取阳性菌落质粒进行 *Nhe* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定后, 送中美泰和公司测序, 将阳性质粒命名为 pGT-rB2LcF1L。

1.5 rB2LcF1L 在昆虫杆状病毒表达系统中的表达

1.5.1 昆虫杆状病毒表达载体 pBac-rB2LcF1L 的构建 将 pGT-rB2LcF1L 和杆状病毒表达载体 pBac5 分别用 *Nhe* I 和 *Hind* III 双酶切后连接, 均转化 Top10 大肠杆菌感受态细胞, 挑取单菌落进行

PCR 鉴定(反应体系和反应程序同 1.4 节第 2 次 PCR 扩增), 提取阳性菌落质粒进行 *Nhe* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定, 将鉴定正确的质粒送中美泰和公司测序。将阳性质粒命名为 pBac-rB2LcF1L。

1.5.2 昆虫杆状病毒的包装 取 6 孔细胞培养板, 以  $1 \times 10^6$  mL<sup>-1</sup> 的细胞密度接种生长状态良好的 sf9 细胞, 置于 27  $^{\circ}$ C 培养 2 h, 待细胞的融合度达到 80% 左右时进行转染。用 100  $\mu$ L 无血清培养基将 3  $\mu$ g pBac-rB2LcF1L 与 3  $\mu$ g 线性化的 Bacmid 混匀, 作为溶液 I; 用 100  $\mu$ L 无血清培养基稀释 5  $\mu$ L 的梭华转染试剂后, 缓慢滴加到溶液 I 中, 混匀, 静置 20 min。将混合液加入到上述接种了 sf9 的细胞板中, 27  $^{\circ}$ C 孵育 5~7 d, 荧光显微镜下观察报告基因 cGFP 的表达情况, 待病变细胞达到 90% 以上后收获细胞上清液于 1 mL 离心管中, 标注为 P1 代重组杆状病毒, -80  $^{\circ}$ C 长期保存。

1.5.3 B2L 和 F1L 重组蛋白在 sf9 细胞中的表达与验证 将 sf9 细胞按照  $2.5 \times 10^6$  mL<sup>-1</sup> 的细胞总数铺入 T25 方瓶, 待细胞贴壁 2 h 后, 用 1 mL 注射器将 100  $\mu$ L P1 代病毒盲接到 T25 方瓶中, 培养 5~7 d, 观察荧光, 收取细胞上清液和细胞样品备用。向细胞样品中加入适量的 SDS-PAGE 上样缓冲液, 沸水浴 5~10 min 后, 以 8 000 r/min 离心 5 min, 取上清液。对细胞上清液和细胞处理后的样品, 用 12% 的 SDS-PAGE 检测重组蛋白的表达情况。切取凝胶上的目的蛋白条带, 送华大基因公司进行质谱鉴定。与此同时, 将上述样品经 SDS-PAGE 电泳后转印至硝酸纤维素膜(NC 膜)上, 分别以 His 标签抗体为一抗、HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 为二抗进行

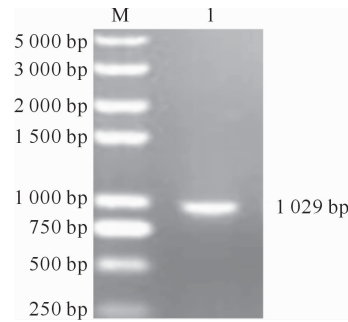
孵育,用 ECL 显色液进行显色,最后在化学发光仪中曝光。

2 结果与分析

2.1 F1L 全长基因的 PCR 扩增及序列分析

琼脂糖凝胶电泳结果(图 1)显示,扩增产物条带长度为 1 029 bp 左右,与预期结果相符。序列分析结果显示,ORFV-Yulin 株的 F1L 高度保守,与表 2 中 15 株参比毒株核苷酸的相似性为 96.7%~99.0%,氨基酸的相似性为 96.1%~99.4%,其中与 ORFV FJ-MH2015 株 F1L 序列核苷酸和氨基酸的相似性最高,分别为 99.0%和 99.4%。F1L 基因的遗传进化分析结果(图 2)显示,该毒株与参考毒株 XP(KM675408.1)、FJ-MH2015(KU199840.1)以

及 Shanxi(HQ221964.1)株处于同一进化分支上。



M, DL5000 DNA Marker;1. F1L 基因全长扩增产物  
M, DL5000 DNA Marker;1. Amplification product of full-length F1L gene

图 1 ORFV-Yulin 株 F1L 基因的 PCR 扩增结果  
Fig.1 PCR amplification of F1L of ORFV-Yulin

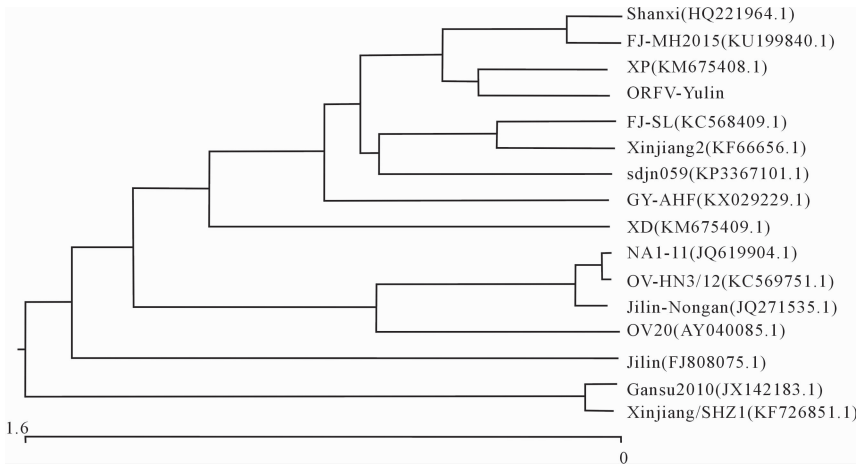
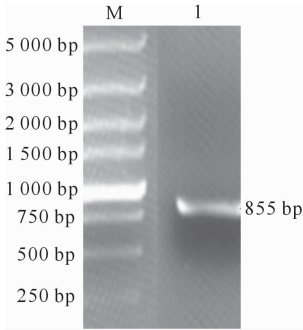


图 2 ORFV-Yulin 株 F1L 基因的遗传进化分析  
Fig.2 Phylogenetic tree according to F1L gene of ORFV-Yulin

2.2 rB2LcF1L 融合基因的扩增

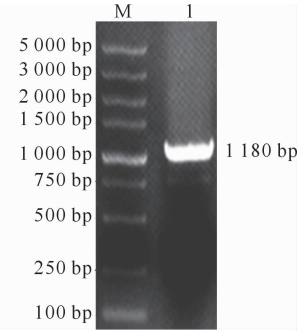
2.2.1 cF1L 融合基因的扩增 由图 3 可知,cF1L 扩增获得了 855 bp 的片段,与预期结果相符。将纯化后的 PCR 产物送中美泰和公司测序,结果正确。



M, DL5000 DNA Marker;1. cF1L 基因扩增产物  
M, DL5000 DNA Marker;1. Amplification product of cF1L gene

图 3 ORFV-Yulin 株 cF1L 基因的 PCR 扩增  
Fig.3 PCR amplification of cF1L of ORFV-Yulin

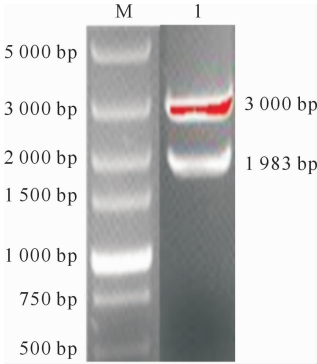
2.2.2 rB2L 融合基因的扩增 图 4 显示,rB2L 扩增获得了 1 180 bp 的片段,与预期结果相符。将纯化后的 PCR 产物送中美泰和公司测序,结果正确。



M, DL5000 DNA Marker;1. rB2L 基因扩增产物  
M, DL5000 DNA Marker;1. Amplification product of rB2L gene

图 4 ORFV-Yulin 株 rB2L 基因的 PCR 扩增  
Fig.4 PCR amplification of rB2L of ORFV-Yulin

2.2.3 rB2LcF1L 融合基因的扩增 利用 2.2.1 和 2.2.2 中获得的 PCR 模板进行融合 PCR,获得目的片段(1 983 bp)后与 pGEM-Teasy 载体连接,获得载体 pGT-rB2LcF1L。对 pGT-rB2LcF1L 进行 *Nhe*I 和 *Hind*Ⅲ双酶切鉴定,结果获得了 3 000 和 1 983 bp 的片段(图 5),与预期结果相符。将该质粒送美泰和公司测序,结果正确。



M. DL5000 DNA Marker;1. 质粒 pGT-rB2LcF1L

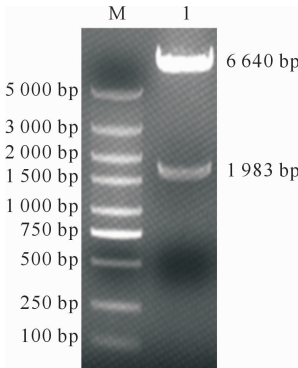
M. DL5000 DNA Marker;1. The plasmid pGT-rB2LcF1L

图 5 pGT-rB2LcF1L 的 *Nhe*I 和 *Hind*Ⅲ双酶切鉴定

Fig. 5 Double digestion of pGT-rB2LcF1L with *Nhe*I and *Hind*Ⅲ

2.3 pBac-rB2LcF1L 载体的鉴定

菌落 PCR 鉴定获得了 1 983 bp 的片段(图略),与预期结果一致。pBac-rB2LcF1L 载体经 *Nhe*I 和 *Hind*Ⅲ双酶切后获得了 6 640 和 1 983 bp 的片段(图 6),其长度与预期结果相符,质粒 pBac-rB2LcF1L 测序鉴定结果正确,表明 pBac-rB2LcF1L 载体构建成功。



M. DL5000 DNA Marker;1. 质粒 pBac-rB2LcF1L

M. DL5000 DNA Marker;1. The plasmid named pBac-rB2LcF1L

图 6 昆虫杆状病毒表达重组质粒 pBac-rB2LcF1L 的 *Nhe*I 和 *Hind*Ⅲ双酶切鉴定

Fig. 6 Double digestion of recombinant baculovirus expression vector pBac-rB2LcF1L with *Nhe*I and *Hind*Ⅲ

2.4 rB2LcF1L 融合蛋白在昆虫杆状病毒表达系统中的表达

2.4.1 表达 rB2LcF1L 的昆虫杆状病毒的包装 将质粒 pBac-rB2LcF1L 转染 sf9 细胞,27 ℃孵育 5 d 后即可观察到报告基因 *cGFP* 的表达,细胞可见绿色荧光(图 7),表明杆状病毒包装成功,获得了表达 rB2LcF1L 融合蛋白的杆状病毒。

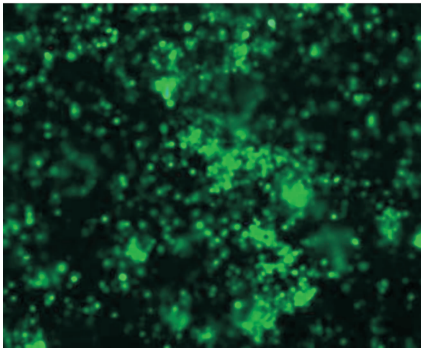
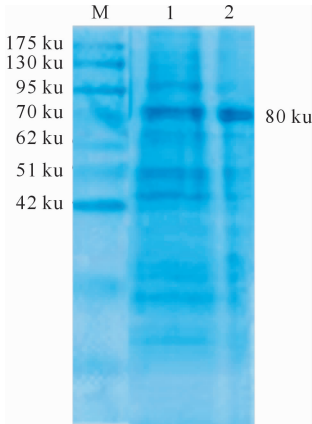


图 7 表达融合蛋白 rB2LcF1L 的昆虫杆状病毒 *cGFP* 基因的表达(×200)

Fig. 7 Expression of *cGFP* in baculovirus expressing the rB2LcF1L protein of ORFV-Yulin (×200)

2.4.2 rB2LcF1L 在 sf9 细胞中的表达 SDS-PAGE 结果显示,细胞培养上清、细胞样品中均有 1 条明显的条带,分子质量约为 80 ku(图 8),表明融合蛋白 rB2LcF1L 在 sf9 细胞中得到了表达,且表达的蛋白有一部分可分泌到细胞外。



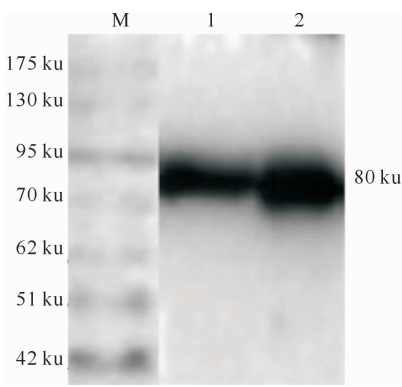
M. 蛋白 Marker;1. 细胞上清;2. 细胞沉淀

M. Protein Marker;1. Cell supernatant;2. Cell precipitation

图 8 ORFV-Yulin 株 rB2LcF1L 在 sf9 细胞中的表达

Fig. 8 Expression of rB2LcF1L of ORFV-Yulin in sf9 cells

Western blotting 结果(图 9)和后续的谱鉴定结果均证实,B2LcF1L 表达成功。



M. 蛋白 Marker;1. 细胞上清;2. 细胞沉淀

M. Protein Marker;1. Cell supernatant;2. Cell precipitation

图 9 ORFV-Yulin 株 rB2LcF1L 在 sf9 细胞中表达的 Western blotting 鉴定

Fig. 9 Western blotting of rB2LcF1L of ORFV-Yulin in sf9 cells

### 3 讨 论

李雯丽<sup>[28]</sup>对陕西省 4 个区/县的白绒山羊和奶山羊主要养殖基地进行了口疮病原的检测和发病率调查,结果发现,检出率最高的达 82.6%,最低的也达到了 24.1%,而且检出率最高羊场发生过相当严重的羊口疮疫情,导致大批量新生羔羊被淘汰,这说明陕西山羊口疮病毒携带率和发病情况不容乐观。本研究以本课题组前期从榆林市某白绒山羊场分离到的 ORFV-Yulin 株为研究对象,对其 F1L 的全长基因进行了克隆分析,发现 ORFV-Yulin 株的 F1L 与参考毒株 FJ-MH2015 (KU199840.1)、Shanxi (HQ221964.1) 及 XP(KM675408.1) F1L 基因的相似度均高达 99.0%,这表明羊口疮病毒的 F1L 基因高度保守。系统发育进化树分析表明,ORFV-Yulin 株与 FJ-MH2015 (KU199840.1)、Shanxi (HQ221964.1) 以及 XP(KM675408.1) 株同属于一个分支,而 FJ-MH2015 (KU199840.1)、Shanxi (HQ221964.1) 以及 XP(KM675408.1) 等毒株的宿主均为山羊。综上所述,本课题组从白绒山羊疑似病例分离到的毒株可能与近年来山羊的频繁流动,既跨地区引种等因素有关。对 F1L 基因进行克隆和序列分析,有利于从分子水平上了解 ORFV-Yulin 株病毒,并且对白绒山羊种群中 ORFV 的流行病学调查、分子生物学研究及工程苗的研制和开发等具有重要意义。

由于 ORFV 具有免疫逃避机制,因此在动物感染该病毒后,机体无法获得终身免疫力,而且容易引起继发性感染。此外,由于羔羊免疫机制还未健全,因此尚不能通过注射疫苗的方式提高新生羔羊抵抗

ORFV 感染的能力,而母源特异性抗体的保护时间又较短,若 ORF 一旦流行,羔羊淘汰率势必增加。现在国外临床生产中应用的羊口疮疫苗多为弱病毒苗,而羊口疮弱病毒苗在生产和应用过程中会面临病毒扩散、毒力返强的风险。为此,安全性能高、免疫原性强、不存在宿主致病风险的羊口疮基因工程亚单位疫苗的研制就显得极为迫切。已有研究表明,F1L 具有肝素结合活性,使该蛋白在细胞的吸附和侵入过程中可能起重要的作用<sup>[21]</sup>。与之相一致,Gallina 等<sup>[12]</sup>研究发现,F1L 重组蛋白能够刺激机体产生功效高效的中和抗体,可能通过阻止 ORFV 对宿主细胞的吸附而发挥免疫保护作用。而作为 ORFV 囊膜的重要组分,B2L 蛋白够诱导机体产生高水平的 IgG,王延璞等<sup>[26]</sup>将 B2L 基因与 pGEM-4Z 载体重组,获得了具有较高表达水平且能够传代的重组菌,这为 ORFV 亚单位疫苗的研制奠定了良好的基础。鉴于 F1L 和 B2L 蛋白的重要性,赵魁<sup>[7]</sup>构建了 F1L 和 B2L 基因单独表达以及串联表达的核酸疫苗,免疫效果优于单独 F1L 或 B2L 基因核酸疫苗,这说明 F1L 和 B2L 基因串联表达的重组蛋白的免疫效果应该更好。本试验将去掉信号肽区域的 F1L 和 B2L 基因串联,并在昆虫杆状病毒表达系统成功获得了部分分泌型的 F1L 和 B2L 串联重组蛋白,为以后 ORFV 基因工程亚单位疫苗的批量生产提供了一定的理论依据。

### [参考文献]

[1] McKeever D J, Jenkinson D M, Hutchison G, et al. Studies on the pathogenesis of Orf virus infection in sheep [J]. J Comp Pathol, 1988, 99: 317-328.

[2] Mercer A, Haig D. Parapoxviruses [J]. Encyclopedia of Virology, 1999, 18(2): 1140-1146.

[3] Delhon G, Tulman E R, Afonso C L, et al. Genomes of the Parapoxviruses Orf virus and bovine papular stomatitis virus [J]. J Virol, 2004, 78(1): 168-177.

[4] Cottone R, Büttner M, Bauer B, et al. Analysis of genomic rearrangement and subsequent gene deletion of the attenuated Orf virus strain D1701 [J]. Virus Research, 1998, 56: 53-67.

[5] Balassu T C, Robinson A J. Orf virus replication in bovine testis cells: kinetics of viral DNA, polypeptide, and infectious virus production and analysis of virion polypeptides [J]. Archives of Virology, 1987, 97(3): 267-281.

[6] 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(3): 278-284.

Yu Y Z, Wu Z J, Zhu Z B, et al. Molecular characteristics and immune evasion strategies of ORFV [J]. Chinese Journal of Virology, 2012(3): 278-284.

- [7] 赵 魁. 羊传染性脓疱病毒重组 DNA 疫苗的构建与实验免疫研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2010.  
Zhao K. Study on the construction and experimental immunity of recombinant DNA vaccine against Orf virus [D]. Changchun: Jilin University, 2010.
- [8] 林裕胜, 江锦秀, 林 甦, 等. 羊传染性脓疱病毒研究进展 [J]. 动物医学进展, 2016, 37(2): 91-96.  
Lin Y S, Jiang J X, Lin S, et al. Progress on *Contagious ecthyma* virus [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2016, 37(2): 91-96.
- [9] 邵洪泽. 羊传染性脓疱病毒 *FIL* 基因克隆表达及分子生物学检测方法的建立与初步应用 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2013.  
Sao H Z. Cloning and expression of *FIL* gene of CEV and establishment and preliminary application of molecular biological detection methods [D]. Changchun: Jilin Agriculture University, 2013.
- [10] Hosamani M, Bhanuprakash V, Scagliarini A, et al. Comparative sequence analysis of major envelope protein gene (*B2L*) of Indian orf viruses isolated from sheep and goats [J]. Veterinary Microbiology, 2006, 116(4): 317-324.
- [11] 王廷璞, 薛双虎. 羊接触传染性脓疱性皮炎病毒核酸及蛋白类型分析 [J]. 中国兽医学报, 1998(4): 328-333.  
Wang T P, Xue S H. Analysis of nucleic acid and envelop protein of *Contagious ecthyma* virus [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 1998(4): 328-333.
- [12] Gallina L, Scagliarini A, Ciulli S, et al. Cloning and expression of the Orf virus *F1L* gene; possible use as a subunit vaccine [J]. Veterinary Research Communications, 2004, 28(S1): 291-293.
- [13] Housawi F M T, Roberts G M, Gilray J A, et al. The reactivity of monoclonal antibodies against Orf virus with other parapoxviruses and the identification of a 39 kD a immunodominant protein [J]. Archives of Virology, 1998, 143(12): 2289-2303.
- [14] Haig D M, Mc Innes C J, Deane D, et al. The immune and inflammatory response to Orf virus [J]. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 1997, 20: 197-204.
- [15] Azwai S M, Carter S D, Woldehiwet Z. Immune responses of the camal to *Contagious ecthyma* (Orf) virus infection [J]. Vet Micro, 1995, 47: 119-131.
- [16] Guo J, Zhang Z, Edwards J F, et al. Characterization of a North American Orf virus isolated from a goat with persistent, proliferative dermatitis [J]. Virus Res, 2003, 93(2): 169-179.
- [17] Zheng M, Liu Q, Jin N, et al. A duplex PCR assay for simultaneous detection and differentiation of Capripoxvirus and Orf virus [J]. Mol Cell Probes, 2007, 21(4): 276-281.
- [18] 余 波, 冉懋韬, 谭诗文, 等. 羊传染性脓疱病毒 PCR 检测方法的建立及 *CBP* 基因的序列分析 [J]. 畜牧与兽医, 2013, 45(7): 30-34.  
Yu B, Ran M T, Tan S W, et al. Establishment of PCR method for detection of Orf virus and sequencing analysis of *CBP* gene [J]. Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2013, 45(7): 30-34.
- [19] 闫丰超, 邵 佳, 窦永喜. 羊口疮病毒分子生物学的研究进展 [J]. 中国兽医科学, 2013(1): 103-109.  
Yan F C, Shao J, Dou Y X. Progress on molecular characteristics of Orf virus [J]. Chinese Veterinary Science, 2013(1): 103-109.
- [20] Czerny C P, Waldmann R, Scheubeck T. Identification of three distinct antigenic sites in parapoxviruses [J]. Archives of Virology, 1997, 142(4): 807-821.
- [21] Scagliarini A, Ciulli S, Battilani M, et al. Characterisation of immunodominant protein encoded by the *FIL* gene of Orf virus strains isolated in Italy [J]. Archives of Virology, 2002, 147(10): 1989-1995.
- [22] 李 杰, 李前瑞, 田婷婷, 等. 羊口疮病毒 *B2L* 和 *VIR* 基因原核表达及抗原性鉴定 [J]. 动物医学进展, 2013, 34(3): 1-6.  
Li J, Li Q R, Tian T T, et al. Prokaryotic expression of Orf virus *B2L*, *VIR* genes and antigenicity evaluation [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2013, 34(3): 1-6.
- [23] 赵文博, 李瑞航, 贺鹏亮, 等. 羊口疮病毒 *B2L* 基因克隆及表达 [J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2015, 27(2): 42-45.  
Zhao W B, Li R H, He P L, et al. Cloning and expression of ORFV *B2L* gene [J]. Journal of Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2015, 27(2): 42-45.
- [24] Zhao K, He W, Wei G, et al. Orf virus DNA vaccines expressing ORFV 011 and ORFV 059 chimeric protein enhances immunogenicity [J]. Virol J, 2011, 8(1): 562.
- [25] 张克山, 刘永杰, 孔汉金, 等. 羊口疮病毒 *B2L* 基因 DNA 疫苗载体的构建及其在 BHK-21 细胞中的表达 [J]. 中国人兽共患学报, 2013, 29(10): 951-954.  
Zhang K S, Liu Y J, Kong H J, et al. Construction of DNA vaccine carrier for ORFV *B2L* gene and its expression in BHK-21 cells [J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2013, 29(10): 951-954.
- [26] 王廷璞, 赵菲侠, 安建平, 等. 羊传染性脓疱病毒 42K 囊膜蛋白基因克隆及表达 [J]. 中国预防兽医学报, 2006, 28(1): 29-32.  
Wang T P, Zhao F Y, An J P, et al. The cloning and expression of *Contagious ecthyma* virus 42K envelop protein gene [J]. Chinese Journal of Prevent Veterinary Medicine, 2006, 28(1): 29-32.
- [27] 冯 平, 李云章, 孙丰廷, 等. ORFV-Yulin 株的分离鉴定及其 *B2L* 基因在昆虫杆状病毒系统中的表达 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2017, 45(9): 32-38.  
Feng P, Li Y Z, Sun F T, et al. Isolation and identification of ORFV-Yulin strain and the expression of *B2L* gene in baculovirus system [J]. Journal of Northwest A&F University (Nat Sci Ed), 2017, 45(9): 32-38.
- [28] 李雯丽. 陕西白绒山羊和奶山羊口疮病原调查及灭活疫苗免疫效果评估 [D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2016.  
Li W L. Molecular elologies of Orf in cashmere and dairy goats in Shaanxi province and the effects of the inactivated avicine [D]. Yangling, Shaanxi: Northwest A&F University, 2016.