

## 口疮病毒 020 基因的克隆、表达及多抗制备

王 勇<sup>1</sup>, 赵玉洁<sup>1</sup>, 杨侃侃<sup>1</sup>, 殷冬冬<sup>1</sup>, 白彩霞<sup>1</sup>, 潘 飞<sup>1</sup>,  
梅跃辉<sup>1</sup>, 颜秀梅<sup>2</sup>, 王 君<sup>2</sup>, 徐前明<sup>1</sup>, 蒋书东<sup>1\*</sup>

(1. 安徽农业大学动物科技学院, 合肥 230036; 2. 安徽华澳生物技术有限公司, 合肥 231131)

**摘 要:** 羊口疮是由口疮病毒 (orf virus, ORFV) 引起的接触性、嗜上皮性的传染病。020 基因是该病毒重要的酶活力调节蛋白。根据 GenBank 中 020 基因的序列设计引物, 从 ORFV-F10 株感染的病料中提取 DNA, PCR 扩增获得目的基因。然后将其亚克隆至 pET-32a(+) 原核表达载体, 构建重组表达质粒 pET-32a-ORF-020。鉴定正确后转化 BL21 感受态细胞, 进行 IPTG 诱导表达。表达产物进行 SDS-PAGE 和 Western-blot 分析。最后将纯化的 020 蛋白免疫 BALB/c 雌鼠, 制备多抗血清。SDS-PAGE 结果表明, ORFV 020 基因在体外获得正确表达, 大小约 37 kDa。Western-blot 结果表明, 制备的多抗血清能够与 020 蛋白发生特异性反应具有良好的反应原性。

**关键词:** 羊口疮病毒; 020 基因; 克隆; 原核表达; 多克隆抗体

中图分类号: S858.26

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2017)05-0780-04

### Cloning and expression of the Orf virus 020 gene and its polyclonal antibody preparation

WANG Yong<sup>1</sup>, ZHAO Yujie<sup>1</sup>, YANG Kankan<sup>1</sup>, YIN Dongdong<sup>1</sup>, BAI Caixia<sup>1</sup>, PAN Fei<sup>1</sup>,  
MEI Yuehui<sup>1</sup>, YAN Xiumei<sup>2</sup>, WANG Jun<sup>2</sup>, XU Qianming<sup>1</sup>, JIANG Shudong<sup>1</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

2. Anhui Huao Biotechnology PTY LTD, Hefei 231131)

**Abstract:** Orf is an infectious disease caused by orf virus (ORFV). Animals can be infected by ORFV through contact and it is preferred to epithelial infection. The ORFV 020 gene is an important enzyme regulating protein activity of the virus. In this study, specific PCR primers were designed according to the sequence of the Orf 020 gene in GenBank. After the viral DNA was extracted from ORFV infected clinical samples, The Orf 020 gene was amplified by PCR and subcloned to pET-32a prokaryotic expression vector. The recombinant plasmid was identified and named as pET-32a-ORF-020, which was then transformed into E.coli competent cell BL21 and induced by IPTG. The expressed proteins were identified by SDS-PAGE and Western blot. The ORF 020 protein was then purified and immunized to BALB/c mice for antiserum preparation. The results of SDS-PAGE showed that the Orf 020 gene was correctly expressed in vitro. The protein size was about 37 kDa. The western-blot analysis showed that the prepared antiserum reacted specifically with the ORF 020 protein.

**Key words:** ORFV; 020 gene; clone; prokaryotic expression; polyclonal antibody

羊口疮 (orf), 亦称为羊传染性脓疱皮炎、口疮或口疮溃疡, 是由痘病毒科 (Poxviridae) 副痘病毒属 (*Parapoxvirus*) 的口疮病毒 (orf virus, ORFV) 引起的一种接触性人兽共患传染病<sup>[1]</sup>。该病在冬春季节多发, 主要危害羔羊, 且发病率高, 也能够感染成年羊, 但多为散发。ORFV 的病变特点是鼻、

唇或乳房部位出现水泡、丘疹、脓疱性病变以及痂皮<sup>[2]</sup>。该病导致的死亡率为 5% 左右, 对羔羊的发病率可高达 80% 左右。由于病变部位多在口唇周围, 影响羔羊吮乳和采食, 导致动物的生长速度减缓, 养殖经济效益降低, 对养羊业的健康发展产生影响。该病的分布较广, 中国多个地区和周边一些

收稿日期: 2017-03-26

基金项目: 国家自然科学基金(31602063), 安徽省自然科学基金(1508085QC60), 安徽农业大学稳定和引进人才科研项目(yj2015-16)和安徽农业大学大学生科技创新基金项目共同资助。

共同第一作者: 王 勇, 博士, 讲师。E-mail: wangyong119@ahau.edu.cn; 赵玉洁, 本科生。E-mail: 759538187@qq.com

\* 通信作者: 蒋书东, 副教授。E-mail: jsd@ahau.edu.cn

国家均发生过口疮疫情<sup>[3-5]</sup>。

ORFV 的基因组为线性双链 DNA, 长度约为 138 kb, 编码 134 个基因<sup>[6]</sup>。研究发现, 020 基因是一类能够产生干扰素抑制的基因, 能够抑制干扰素诱导的 dsRNA 依赖性蛋白激酶的激活<sup>[7]</sup>, 但其具体的作用机制尚不清楚。因此, 本实验期望通过克隆表达 020 基因, 进行原核表达并免疫动物, 制备多克隆抗体, 为进一步研究 020 基因的致病机制提供宝贵的生物材料。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

ORFV AH-F10 株<sup>[8]</sup>、pGEM-T Easy 载体、pET-32a(+)载体由本实验室保存; DH5 $\alpha$ 、BL21 感受态细胞购自天根公司; 限制性内切酶 *Bam*H I、*Eco*R I、*rTaq* DNA 聚合酶、Solution I 购自 TaKaRa 公司; 质粒提取试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自 AXYGEM 公司; PBS 缓冲液、SDS-PAGE 凝胶试剂盒购自碧云天公司; 抗 His 标签的鼠源单抗、羊抗鼠 IgG-HRP 购自北京中杉金桥公司; ECL 化学发光试剂盒购自 Thermo 公司; 弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂购自 Sigma 公司; 其余试剂均为国产分析纯。6 周龄雌性 BALB/c 小鼠购自安徽医科大学实验动物中心。

### 1.2 方法

**1.2.1 引物设计** 根据 GenBank 收录的 ORFV 的 020 基因序列 (DQ184476.1), 设计一对特异性引物用于 PCR 扩增。上下游引物序列 020-F: 5' -CG GGATCCATGGCCTGCGAGTGCGC-3'; 020-R: 5' -G GAATTCCTAGAAGCTGATGCCGCGAGT TG-3'。引物上下游引物中分别添加了 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切位点, 由上海生工生物工程有限公司合成。

**1.2.2 目的基因 020 的克隆** 用蛋白酶 K 法提取 ORFV AH-F10 株总 DNA, 以该 DNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系 20  $\mu$ L: *rTaq* Mix 10  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 7  $\mu$ L, 上下游引物各 1  $\mu$ L, DNA 模板 1  $\mu$ L。扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 30 min; 94 $^{\circ}$ C 45 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 共 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 10 min。将 PCR 产物用琼脂糖凝胶进行电泳验证。

**1.2.3 原核表达重组质粒的构建** 将 ORFV 020 基因的 PCR 产物电泳后进行胶回收, 与载体 pGEM-T easy 连接后转化至 DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 涂布于 Amp (100  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>) 平板, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。次日挑取单个菌落进行摇菌培养, 对菌液进行 PCR、双酶切鉴定以及序列测定。将鉴定正确的重组质粒利用 *Bam*H

I 和 *Eco*R I 进行双酶切后克隆至 pET-32a 载体。对重组质粒进行 PCR、双酶切鉴定以及序列测定。将构建成功的重组质粒命名为 pET-32a-ORF-020。

**1.2.4 目的蛋白 020 的诱导表达** 将重组质粒 pET-32a-ORF-020 和空载体质粒 pET-32a 分别转化 BL21 感受态细胞, 涂布于含 Amp (100  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>) 的 LB 平板, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。次日挑选单克隆菌落, 于恒温摇床 37 $^{\circ}$ C 震荡培养至 OD<sub>600</sub> 值为 0.6~0.8 时, 分别取样加入 1 mmol·L<sup>-1</sup> 的 IPTG 进行诱导表达, 取不同时间段的菌液超声裂解, 离心后分别取上清和沉淀用 SDS-PAGE 电泳分析蛋白是否成功表达, 以及产物的表达形式。

**1.2.5 重组蛋白的纯化** IPTG 大量诱导表达的蛋白经离心后收集细菌沉淀; 用 PBS 洗涤沉淀, 室温 4 500 r·min<sup>-1</sup> 离心 25 min。弃去上清, 反复洗涤 3 次。再次重悬沉淀, 经 -20 $^{\circ}$ C 反复冻融 3 次。将菌液置于冰浴中进行超声波裂解 30 min。离心后弃上清, 用 PBS 缓冲液重悬沉淀、离心并弃上清。依次用含 2、4、5 和 6 mol·L<sup>-1</sup> 尿素的 PBS 缓冲液重悬沉淀, 离心后弃上清; 用含 8 mol·L<sup>-1</sup> 尿素的 PBS 缓冲液重悬沉淀 (每 1 g 沉淀加 4 mL), 4 $^{\circ}$ C 过夜。离心后收集上清。放入透析袋中进行透析复性, 最后用 TGE 4 $^{\circ}$ C 条件下透析 1 次。

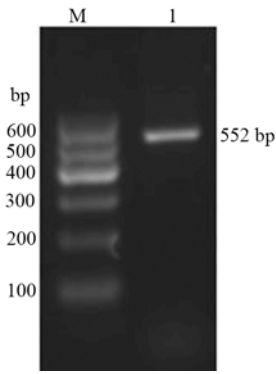
**1.2.6 Western-blot 鉴定** 把纯化得到的目的蛋白 020 经 SDS-PAGE 电泳后湿转至硝酸纤维素膜上, 用脱脂奶粉溶液 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜, 用 TBST 漂洗 3 次。漂洗后加入 1:2 000 稀释的抗 His 标签的鼠源单抗, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。漂洗后加入 1:1 000 稀释的羊抗鼠 IgG-HRP 二抗, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后洗膜 3 次, 利用 ECL 化学发光试剂盒显色。

**1.2.7 多克隆抗体制备** 以纯化的 020 重组蛋白免疫 6 周龄 BALB/c 雌鼠。首免时将蛋白与等体积弗氏完全佐剂混匀, 皮下注射, 50  $\mu$ g·只<sup>-1</sup>; 首免 2 周和 4 周后进行二免和三免, 分别将蛋白与等体积弗氏不完全佐剂混匀, 皮下注射, 50  $\mu$ g·只<sup>-1</sup>。三免后 1 周眼眶采血分离血清。将获得的血清作为一抗, 以 020 原核表达产物作为抗原, 进行 Western-blot 鉴定。

## 2 结果与分析

### 2.1 ORFV 020 基因的克隆

PCR 扩增结果显示成功扩增出大小约 552 bp 的条带 (见图 1), 与预期相符。pGEM-T-ORFV-020 测序结果显示, 经比对序列为 ORFV 020 基因, 大小为 552 bp, 未发生碱基突变或缺失。

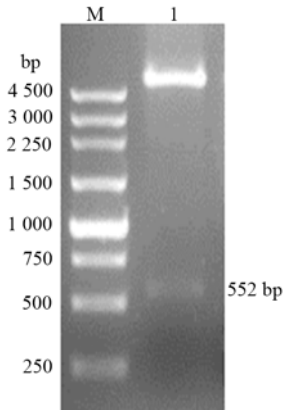


M: DNA Marker; 1: ORFV 020 基因的 PCR 扩增产物  
M, DNA Marker; 1: ORFV 020 PCR products

图 1 ORFV 020 基因的 PCR 扩增  
Figure 1 PCR products of ORFV 020

2.2 重组质粒 pET-32a-020 的鉴定

pET-32a-ORF-020 双酶切鉴定结果显示, 有两条特异性条带, 分别为载体条带和目的基因条带(见图 2)。测序结果表明 020 目的基因正确插入到原核表达载体 pET-32a 中, 未发生碱基突变或缺失。



M: DNA 分子质量标准; 1: 重组质粒 pET-32a-ORF-020 双酶切产物

M: DL4500 DNA Marker; 1: The recombinant plasmid pET-32a-ORF-020 digested by double enzyme

图 2 重组质粒 pET-32a-ORF-020 双酶切鉴定

Figure 2 Identification of recombinant plasmid pET-32a-ORF-020 by double enzyme digestion

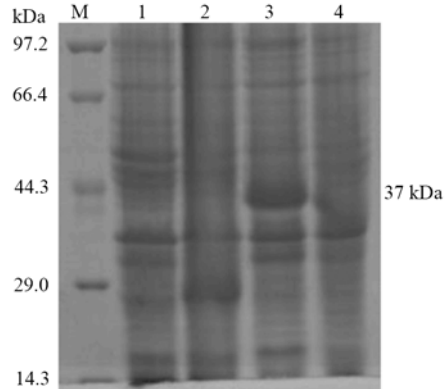
2.3 表达产物的 SDS-PAGE 分析

pET-32a-ORF-020 诱导表达后经 SDS-PAGE 电泳检测, 同时设置诱导/未诱导的 pET-32a(+)空载体, 以及未诱导的 pET-32a-ORF-020 作为对照。结果显示在 37 °C, 经 1 mmol·L<sup>-1</sup> IPTG 诱导 4 h 成功表达出目的蛋白。大约在 37 kDa 处有一条目的条带, 与预期相符(见图 3)。

2.4 重组蛋白的可溶性分析及纯化

pET-32a-ORF-020 在经 1 mmol·L<sup>-1</sup> IPTG 37°C 诱导表达 4 h 后, 将优化诱导后的菌液超声破碎,

离心后将上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳, 结果表明 ORFV 020 重组蛋白主要以包涵体形式表达(见图 4)。对包涵体洗涤、透析后得到纯化的重组蛋白 020(见图 5)。

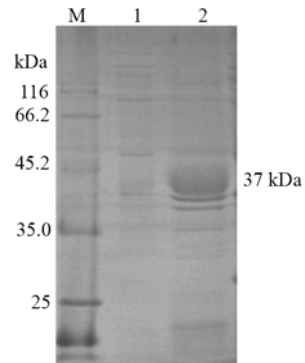


M: 蛋白质分子质量标准; 1: 未诱导的空载体 pET-32a(+); 2: 空载体 pET-32a(+)经 IPTG 诱导 4h 的表达产物; 3: 重组质粒 pET-32a-ORF-020 被 1 mmol·L<sup>-1</sup> IPTG 诱导 4 h 的表达产物; 4: 未经 IPTG 诱导的 pET-32a-ORF-020 表达产物

M: Protein marker; 1: Expression of pET-32a(+) empty vector without IPTG; 2: IPTG induced pET-32a(+) empty vector; 3: IPTG induced recombinant plasmid pET-32a-ORF-020; 4: Expression of pET-32a-ORF-020 without IPTG

图 3 重组 ORFV 020 蛋白的 SDS-PAGE 分析

Figure 3 SDS-PAGE analysis of the recombinant ORFV 020 protein



M: 蛋白质分子质量标准; 1: 表达产物超声破碎后上清; 2: 表达产物超声破碎后沉淀

M: Protein marker; 1: Supernatant after ultrasonic treatment; 2: Precipitation after ultrasonic treatment

图 4 ORFV 020 重组蛋白可溶性分析

Figure 4 Soluble analysis of the recombinant ORFV 020 protein

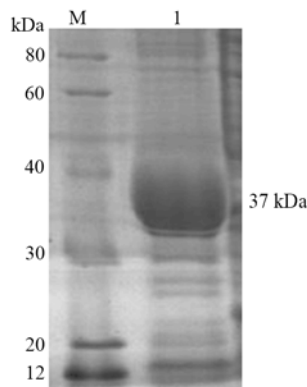
2.5 Western-blot 分析

对 ORFV 020 重组蛋白进行 Western-blot 检测, 结果显示大约在 37 kDa 处有目的条带, 与预期条带大小相符(见图 6)。表明诱导表达的 020 重组蛋白能够与特异性抗体反应, 具有良好的反应原性。

2.6 多克隆抗体血清制备

三免后 1 周, 眼眶采血并分离小鼠血清, 用该血清作为一抗, 以原核表达的 ORFV020 蛋白作为抗

原进行 Western-blot 鉴定。结果表明制备获得的多抗血清能够与 ORFV 020 重组蛋白发生特异性反应。

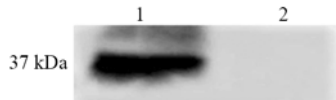


M: 蛋白质分子质量标准; 1: 纯化的 ORFV 020 重组蛋白  
M: Protein marker; 1: SDS-PAGE analysis of purified

ORFV 020 recombinant protein

图 5 纯化的 ORFV 020 重组蛋白分析

Figure 5 Purified ORFV 020 recombinant protein



1: ORFV 020 重组蛋白; 2: pET-32a(+)空载体诱导表达产物

1: Recombinant ORFV 020; 2: pET-32a(+) empty vector expressed proteins

图 6 ORFV 020 蛋白 Western-blot 鉴定

Figure 6 Western-blot identification on purified ORFV 020 protein

### 3 讨论

羊口疮是一种急性、高度接触性的人兽共患病,在世界各地均有分布。由于该病会导致羊的口唇出现脓疱,影响动物的采食,给养羊业带来了较大的经济损失。ORFV 是引起该病的病原,为痘病毒家族中的主要成员之一,具有基因组庞大的特点。其编码蛋白的 134 个基因中有 89 个和其他动物痘病毒编码蛋白的基因高度保守,而其余位于基因组两端的基因,其功能主要与毒力和免疫调节有关<sup>[7]</sup>。截至目前,国内外对 ORFV 的研究主要集中在病毒分离鉴定及遗传进化分析、基因克隆及表达、抗体检测方法建立、活载体疫苗构建、免疫逃逸机制等方面<sup>[8-11]</sup>。研究发现,020 基因位于病毒基因组的一端,与免疫调节有关<sup>[7]</sup>。020 蛋白能够抑制 IFN 诱导的 dsRNA 依赖的酶的激活。但是目前国内缺乏对于 ORFV 020 基因的功能研究,有待深入研究。而制备针对该蛋白的多抗血清是对其功能研究的一个重要基础。

大肠杆菌原核表达载体作为非常成熟的表达载体,拥有繁殖速度快、培养简单、诱导表达效率高特点,其中的 pET-32a(+)系统常用于外源基因的大量诱导表达。因此,本实验从 ORFV F10 株感染动物的结痂病料中 PCR 克隆获得 020 基因。利用 pET-32a(+)原核表达系统对 020 蛋白进行诱导表达,并免疫动物制备 020 多抗血清。结果表明 ORFV 020 蛋白在原核表达系统中得到了成功表达,表达产物主要为包涵体形式存在。将重组蛋白免疫小鼠后,制备的鼠源多抗血清能够与 ORFV 020 原核表达蛋白发生特异性反应,证明制备的抗体能够用于后续 020 蛋白功能的研究。本研究将为 ORFV 020 基因功能和 ORFV 的致病机制研究提供重要的实验材料。

### 参考文献:

- [1] 张克山, 何继军, 尚佑军, 等. 羊传染性脓疱病毒湖北株的鉴定及分子特征分析[J]. 畜牧兽医学报, 2010, 41(9): 1154-1157.
- [2] 向智龙, 卓建华, 鲜思美, 等. 羊口疮病毒环介导等温扩增快速检测方法的建立及应用[J]. 中国兽医科学, 2011, 41(6): 588-592.
- [3] ZHAO K, SONG D G, HE W Q, et al. Identification and phylogenetic analysis of an Orf virus isolated from an outbreak in sheep in the Jilin province of China[J]. Vet Microbiol, 2010, 142(3/4): 408-415.
- [4] KUMAR N, WADHWA A, CHAUBEY K K, et al. Isolation and phylogenetic analysis of an orf virus from sheep in Makhdoom, India[J]. Virus Genes, 2014, 48(2): 312-319.
- [5] 李瑞芳, 李国华, 孟仁, 等. 新疆羊口疮病毒分离鉴定及 B2L 基因分析与表达[J]. 中国预防兽医学报, 2013, 35(3): 202-205.
- [6] OEM J K, ROH I S, LEE K H, et al. Phylogenetic analysis and characterization of Korean orf virus from dairy goats: case report[J]. Virol J, 2009, 6(1): 1-5.
- [7] FRIEBE A, FRIEDERICH S, SCHOLZ K, et al. Characterization of immunostimulatory components of orf virus (parapoxvirus ovis)[J]. J Gen Virol, 2011, 92(7): 1571-1584.
- [8] WANG Y, YANG K K, BAI C X, et al. Development of a SYBR Green I real-time PCR for the detection of the orf virus[J]. AMB Express, 2017, 7(1): 21-26.
- [9] ABRAHÃO J S, CAMPOS R K, TRINDADE G S, et al. Detection and phylogenetic analysis of orf virus from sheep in Brazil: a case report[J]. Virol J, 2009, 6(1): 47-50.
- [10] DIEL D G, LUO S, DELHON G, et al. Orf virus ORFV121 encodes a novel inhibitor of NF- $\kappa$ B that contributes to virus virulence[J]. J Virol, 2011, 85(5): 2037-2049.
- [11] 张凯照, 于梦, 宁章勇. 羊口疮病毒活载体疫苗和生物制剂的研制现状[J]. 中国畜牧兽医, 2015, 42(9): 2499-2505.