

引用格式:

杨柳, 许国洋, 牟豪, 白运川, 余远迪. 羊口疮病毒 F1L 蛋白对山羊痘病毒黏附 BHK21 细胞的影响[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2022, 48(1): 95–102.

YANG L, XU G Y, MU H, BAI Y C, YU Y D. The effect of orf virus F1L protein on adhesion of goatpox virus to BHK21 cells[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2022, 48(1): 95–102.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



羊口疮病毒 F1L 蛋白对山羊痘病毒 黏附 BHK21 细胞的影响

杨柳^{1,2}, 许国洋^{1,2#}, 牟豪^{1,2}, 白运川³, 余远迪^{1,2*}

(1.重庆市畜牧科学院, 重庆 402460; 2.重庆市兽用生物制品工程技术研究中心, 重庆 402460; 3.重庆酉阳土家族苗族自治县畜牧产业发展中心, 重庆 409812)

摘要: 以提取羊口疮痂皮中病毒的 DNA 为模板, 用 PCR 扩增羊口疮病毒(ORFV)的 059 基因序列, 并进行基因克隆、测序鉴定和生物信息学分析; 优化合成 059 基因编码序列, 连接载体 pET42a(+), 转化 *Escherichia coli* BL21(DE3); 用异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)诱导阳性克隆菌, 采用免疫印迹检测表达的 F1L 蛋白, 并以 His 柱纯化蛋白、梯度法复性及 Bradford 法测定蛋白浓度; 将 BHK21 细胞铺于 12 孔板中培养至单层, 分别作 F1L 蛋白、山羊痘病毒(GTPV)、先蛋白后病毒、蛋白和病毒混液 4 种方式孵育, 利用荧光定量 PCR 测定孵育至 1.0、6.0 h 的细胞黏附 GTPV 的量, 研究 ORFV F1L 蛋白对 GTPV 黏附 BHK21 细胞的影响。结果表明: 成功获得了 ORFV 重庆石柱分离株(ORFV-CQsz)的 059 基因编码序列, 其编码的 F1L 蛋白包含 1 个结合细胞表面硫酸乙酰肝素受体的结构域, 显示出肝素结合活性; 该蛋白羧基端有 2 个跨膜区, 不利于蛋白质的表达, 但优化 DNA 序列构建的重组质粒菌, 经 IPTG 诱导后获得对 F1L 蛋白的高效表达; 免疫印迹显示 F1L 蛋白对 ORFV 抗体有较好的反应原性; Bradford 法测定的纯化复性的 F1L 蛋白质量浓度为 1.06 mg/mL; 荧光定量 PCR 检测数据显示, 不同孵育处理下 GTPV 黏附细胞的拷贝数不同, 表明 F1L 蛋白对 GTPV 黏附 BHK21 细胞呈现一定的干扰作用, 能降低病毒黏附到细胞的拷贝数。

关键词: 羊口疮病毒; F1L 蛋白; 山羊痘病毒; BHK21 细胞; 黏附

中图分类号: S852.65⁺4

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2022)01-0095-08

The effect of orf virus F1L protein on adhesion of goatpox virus to BHK21 cells

YANG Liu^{1,2}, XU Guoyang^{1,2#}, MU Hao^{1,2}, BAI Yunchuan³, YU Yuandi^{1,2*}

(1.Chongqing Academy of Animal Sciences, Chongqing 402460, China; 2.Chongqing Research Center of Veterinary Biologicals Engineering and Technology, Chongqing 402460, China; 3.Chongqing Youyang Tujia and Miao Autonomous County Animal Husbandry Development Center, Chongqing 409812, China)

Abstract: Using the viral DNA extracted from the scab of goat mouth sore as a template, the orf virus (ORFV) 059 gene was amplified by PCR, cloned, sequenced. The 059 gene coding sequence was optimized and synthesized, then linked to vector pET42a(+) and transformed *Escherichia coli* BL21(DE3). The positive bacteria were cultured in IPTG LB solution, induced expression protein and detected by western blotting. The expression protein was collected with a His column, renatured by the gradient method, and its concentration was measured by Bradford method. BHK21 cells were cultured to

收稿日期: 2021-01-18

修回日期: 2022-01-12

基金项目: 重庆荣昌农牧高新技术产业研发专项(cstc2019ngzx0012); 重庆市技术创新与应用发展专项面上项目(cstc2019jscx-msxmX0325)

作者简介: 杨柳(1976—), 男, 重庆酉阳人, 博士, 研究员, 主要从事兽医微生物研究, 492691662@qq.com; #并列第一作者, 许国洋(1986—), 男, 河南灵宝人, 硕士, 助理研究员, 主要从事兽医学研究, 424258322@qq.com; *通信作者, 余远迪, 博士, 助理研究员, 主要从事动物疫病防控研究, yuyuandi@126.com

a monolayer in a 12 well cell plate. Four treatments for protein F1L, goatpox virus(GTPV), first protein then virus and protein/virus co-incubation were performed. The fluorescence quantitative PCR was used to determine the amount of GTPV adhesion to the cells on incubation 1.0, 6.0 h, to study the effect of F1L protein on the adhesion of GTPV to BHK21 cells. Results showed that 059 gene coding sequence of ORFV Chongqing Shizhu isolate(ORFV-CQsz) was successfully obtained. This gene encodes F1L protein, which has a domain that binds to heparan sulfate receptor on the cell surface, and is the main heparin-binding active protein. The protein carboxy-terminal contains 2 transmembrane regions, which is not easy induced to expression. However, the *E. coli* transformed prokaryotic expression plasmid constructed using the optimized DNA sequence obtained high-efficient expression of F1L protein induced by IPTG. Western-blot showed that protein had good immunogenicity to ORFV antibody, and the mass concentration of purified refolded F1L protein was about 1.06 mg/mL by Bradford method. The fluorescence quantitative PCR showed the copies of GTPV adhesive BHK21 cells were different under different incubation treatments. F1L protein showed a certain interference effect on GTPV adhesion to BHK21 cells, and it could reduce the copies of virus adhering to cells.

Keywords: orf virus; F1L protein; goatpox virus; BHK21 cells; adhesion

山羊痘、羊口疮广泛发生于养羊的国家(地区),对牧羊造成严重危害,给农牧民带来较大经济损失。近些年来,随着养羊业的发展和生产方式的改变,羊病发生日趋复杂。临床上既有单一感染山羊痘病毒(GTPV)或羊口疮病毒(ORFV)的病例^[1-2],也存在2种病毒混合感染发病的情况^[3]。由于羊口疮和羊痘临床相似,导致诊断困难,常常出现误诊,鉴别诊断羊口疮或羊痘一直是当前研究热点^[4]。GTPV AV41株弱毒活疫苗在中国已应用多年,在防控山羊痘的过程中发挥了关键性作用,其安全性和有效性已得到充分证明。然而羊口疮在羊场常见多发,目前中国无商品化的羊口疮疫苗。当羊群携带ORFV时注射山羊痘活疫苗,其免疫效果是否受影响还有待深入研究。

F1L蛋白是ORFV的一种重要囊膜蛋白,为ORFV的059基因编码。CZERNY等^[5]用ORFV的单克隆抗体通过竞争性ELISA、免疫金电镜技术和Western blot等方法对病毒囊膜上的多种蛋白进行研究,发现单克隆抗体能与ORFV病毒表面特异性的抗原决定簇结合,其中相对分子质量大约 3.9×10^4 的病毒表面蛋白就是单克隆抗体的主要结合位点。根据DELHON等^[6]、MERCER等^[7]发布的ORFV全基因组DNA序列,分析发现 3.9×10^4 蛋白为ORFV基因组的中心保守区ORFV 059基因编码产生的,该基因编码区DNA长约1023 bp,包含1个完整的开放阅读框(ORF)。SCAGLIARINI等^[8]进一步鉴定ORFV F1L蛋白是免疫优势蛋白,免疫金染色显示该蛋白位于ORFV的表面。GALLINA等^[9]克隆、表达了F1L

基因,纯化蛋白免疫家兔,结果显示F1L蛋白有较强的免疫原性,能刺激宿主产生针对ORFV的中和抗体,意味着F1L蛋白具有作为亚单位疫苗的潜力。尤其是SCAGLIARINI等^[10]发现了肝素对F1L蛋白与胎羊睾丸细胞结合有竞争性抑制作用,证明ORFV F1L蛋白具有肝素结合活性,能够与表达于大多数哺乳动物细胞表面的硫酸乙酰肝素受体结合,故认为该蛋白在病毒吸附和侵染细胞的早期阶段发挥了重要作用。由于F1L蛋白既能够诱导机体产生保护性中和抗体,还可以阻止病毒ORFV吸附宿主细胞而发挥免疫作用,从而利于机体清除病原体,认为F1L蛋白已成为研制ORFV新型亚单位疫苗靶标抗原^[9]。已有的资料^[11]显示,黏附宿主细胞是病原感染发生的关键。许多病原微生物产生黏附蛋白,以促进其黏附宿主细胞。以GTPV AV41株研制的活疫苗免疫接种山羊后,病毒黏附侵染宿主细胞,在细胞内有一定程度的繁殖或复制,激发机体对病原的持久免疫力。目前,还少见F1L蛋白影响GTPV黏附细胞的相关报道。

本研究中,以ORFV F1L为配体蛋白、GTPV为靶标病毒、乳仓鼠肾成纤维细胞(BHK21)为宿主细胞,将蛋白F1L、病毒GTPV作不同处理后孵育BHK21细胞,测定孵育细胞黏附GTPV的量,分析GTPV黏附细胞拷贝数的变化,探究ORFV F1L蛋白是否干扰GTPV黏附BHK21细胞和ORFV对GTPV感染山羊细胞的影响,旨在为生产实际中用GTPV弱毒活疫苗免疫羊群提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试细胞和病毒

BHK21 细胞为重庆市兽用生物制品工程技术研究中心保存; GTPV 疫苗弱毒株(GTPV AV41 株)为重庆澳龙生物制品有限公司惠赠, 测定病毒 TCID₅₀ 约为 1×10^{-4} /mL。

1.1.2 主要试剂和引物

病毒 RNA/DNA 提取试剂盒(Viral RNA/DNA Extraction Kit Ver5.0)、DNA 胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自 OMEGA; 琼脂糖粉、5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-吡喃半乳糖苷(X-gal)、异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)、限制性内切酶 *Hind* III、*Eco*R I、T₄ DNA ligase、PCR Master Mix(2 \times)、pMD18-T vector 购自 TaKaRa; DMEM 细胞培养液购自 Gibco; 驴抗羊荧光标记二抗购自 Invitrogen。参考 GenBank 公布的基因(ID 为 KX951408.1), 设计合成 ORFV *F1L* 基因引物(5'-ATGGATCCACCCGAAATCACG-3', 5'-TCACACGATGGCCGTGAC-3'); 参考 GenBank 公布的基因(ID 为 AY040083.1), 设计合成 GTPV *P32* 基因引物(5'-ATGGCAGATATCCCATTA-3', 5'-CTAAACTATATACGTAAATAAC-3'); 参考文献[12], 设计合成荧光定量引物(5'-TGTTATTATGTTGATCCCGTTC-3', 5'-GTAAAATCATATAAGG TGCGACAA-3')。

1.1.3 主要仪器

气浴振荡器为上海博迅实业有限公司的产品; 细菌培养箱为上海跃进医疗器械有限公司的产品; 台式高速冷冻离心机为 Heraeus 的产品; 凝胶成像系统为 Syngene BOX EF 的产品; 电泳仪为上海比朗仪器制造有限公司的产品; 细胞培养箱为 Thermo 的产品; 倒置显微镜为 Olympus 的产品; 低速离心机 HICO21 为生工生物工程(上海)股份有限公司的产品; PCR 仪为 ABI Veriti™ 的产品; Odssay® CLX 为 Gene Company Limited 的产品; 核酸蛋白浓度测定仪为 Eppendorf BioPhotometer 的产品。

1.2 方法

1.2.1 病料处理和病毒 DNA 的提取

采集重庆市石柱某羊场发病羊的痂皮并称量痂皮的质量, 加入 5 倍量的磷酸缓冲溶液(1 \times PBS, pH 7.2), 用研钵反复研磨; 收集研磨液, 反复冻融 3 次, 3000 r/min 离心 30 min; 上清用 0.45 μ m 滤器过滤, 收集滤液, -20 $^{\circ}$ C 保存, 备用。同时取 GTPV AV41 株病毒溶液、羊口疮病样滤液各 200 μ L, 采用试剂盒提取病毒 DNA, 并将其置于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存, 备用。

1.2.2 ORFV 059 基因的扩增和克隆及测序

以提取羊口疮病料的 DNA 为模板, PCR 扩增 ORFV 059 基因。反应体系(50 μ L): 2 \times Taq PCR Master Mixes 25.0 μ L, DNA 4.0 μ L, 上游引物(10 μ mol/L) 1.0 μ L, 下游引物(10 μ mol/L) 1.0 μ L, ddH₂O 19.0 μ L。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1.0 min, 55 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。PCR 产物用 1 \times TAE Buffer、1.0% 琼脂糖凝胶在 120 V 条件下电泳, EB 染色观察, 切胶回收目标 DNA, 连接 pMD18-T vector, 构建重组质粒, 转化感受态 *Escherichia coli* DH5 α 后涂布培养。采用蓝白斑法挑取阳性菌落培养, 用试剂盒提取阳性菌的质粒并测序。

1.2.3 生物信息学分析

将测序获得的 DNA 序列在 NCBI 上进行 BLAST 检索分析, 运用在线软件(<http://web.expasy.org/translate/>)翻译 F1L 蛋白, 查找蛋白质序列中的碱性氨基酸, 并分析蛋白保守结构域(http://smart.embl.de/smart/set_mode.cgi)、跨膜结构域和信号肽(<https://phobius.sbc.su.se/>)序列。

1.2.4 编码 F1L 蛋白 DNA 序列的优化及表达质粒的构建

根据大肠埃希菌密码子偏好性, 对编码 F1L 蛋白的 DNA 序列作优化处理, 在序列上、下游末端分别加 *Eco*R I 和 *Hind* III 单一酶切位点, 优化序列送至生工生物工程(上海)股份有限公司合成。采用

EcoR I、*Hind* III 双酶切质粒 pET42a(+), 优化合成 DNA 片段, 酶切产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 切胶回收目标片段。将回收片段(带黏性末端优化 DNA 和载体 pET42a(+))用 *T*₄ DNA ligase 于 16 °C 环境中连接过夜, 连接产物转化感受态 *E. coli* BL21 (DE3) 后涂板培养。挑单克隆于 LB 试管中振荡过夜, 取培养液进行菌液 PCR, 产物经电泳检测, 对阳性克隆菌的质粒测序鉴定。

1.2.5 蛋白的表达及免疫印迹试验

挑取阳性单克隆菌并接入 LB 培养液中, 于 37 °C 下 180 r/min 振荡培养。当菌液 OD_{600 nm}=0.4 时, 加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG, 同时培养空质粒 pET42a(+) 菌作为对照。分别于 3、6 h 取诱导菌液大约 1.0 mL, 于 4 °C 下 5000 r/min 离心 10 min 后去上清; 用 1×PBS 混匀沉淀, 5000 r/min 离心 10 min 之后弃上清, 重复洗涤 3 次; 最后向沉淀中加 100 μL 蛋白上样缓冲液并吹打混匀, 于沸水中煮沸 10 min 后冷却, 用 SDS-PAGE 胶(5% 浓缩胶+12% 分离胶)电泳。一方面, 将电泳胶经考马斯亮蓝染色之后脱色观察, 初步检测蛋白是否表达; 另一方面, 对电泳胶进行转移电泳, 将胶中蛋白转移到膜上, 以 ORFV 抗体(羊口疮阳性血清)为一抗(1:500)对转移膜进行孵育, 再用 1×PBS 洗涤后用驴抗羊荧光标记二抗(1:5000)进行孵育, 最后用 1×PBS 洗涤后采用 OD 成像仪对孵育膜摄像, 进一步检测表达蛋白是否为 F1L 蛋白。

1.2.6 蛋白的纯化和复性及浓度测定

收集 IPTG 诱导的重组质粒菌体, 用 20 mL 1×PBS 重悬 1000 mL LB 过夜培养的菌体, 再在冰水中超声裂解菌悬液(功率 300 W, 工作 4 s、间歇 5 s, 超声裂解 30 min); 裂解液以 12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清和沉淀, 分别作 SDS-PAGE 电泳检测。对于包涵体表达的蛋白, 裂解沉淀用 pH 8.0 的缓冲液(8 mol/L 尿素、20 mmol/L Tris-HCl、2 mmol/L EDTA、2 mmol/L 巯基乙醇)溶解过夜后, 12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清进行 SDS-PAGE 电泳观察。

参照文献[13]的方法, 采用 His 柱纯化蛋白, 再用 SDS-PAGE 分析蛋白纯化效果。参照文献[14]的

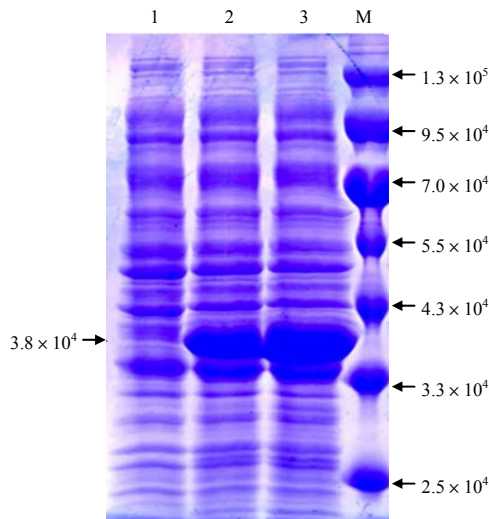
梯度透析复性方法, 对过柱纯化的蛋白质作复性处理。按照 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒说明书测定复性蛋白质的浓度。

1.2.7 GTPV P32 基因克隆及其绝对定量标准曲线制定

以提取 GTPV AV41 株基因组 DNA 为模板, 通过 PCR 扩增 P32 基因, 产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳, 切胶回收目标条带, 产物连接 pMD18-T 载体、转化 *E. coli*; 挑阳性克隆菌作液体培养, 再对菌液进行测序鉴定; 采用试剂盒抽提 pMD18-P32 质粒, 以此为模板作梯度稀释, 参照文献[12]的方法, 制定 GTPV 绝对定量标准曲线。

1.2.8 F1L 蛋白对 GTPV 黏附 BHK21 细胞试验

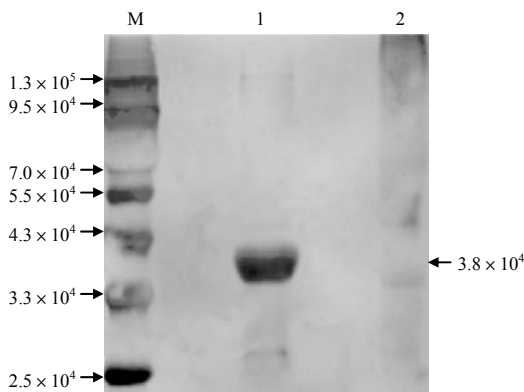
从液氮中取出 BHK21 细胞冻存管, 快速置于 37 °C 的水中, 不停摇动直至全部融化; 将融化液加到有 10% 小牛血清 DMEM 液的细胞瓶, 于 37 °C 5% CO₂ 培养箱中培养; 待细胞长满瓶后弃细胞培养液, 用 1×PBS 洗涤, 再以胰酶消化适当时间; 取完全培养液终止消化, 将贴壁细胞轻轻吹打下来, 低速离心收集细胞; 用 10% 小牛血清 DMEM 培养基重悬细胞, 将重悬液加至 12 孔细胞板中, 然后置于细胞培养箱中培养, 直至细胞长至单层。用 1×PBS 洗涤 BHK21 单层细胞, 再用 0.15 mg 复性的蛋白 F1L、0.15 mL 病毒 GTPV 对单层细胞进行蛋白孵育(阴性对照)、先蛋白孵育后病毒孵育、蛋白和病毒混液孵育、病毒孵育(阳性对照)4 种处理。每种处理设置 3 个重复。参照文献[15], 选择病毒 DNA 于细胞内未复制前, 即病毒孵育 1.0、6.0 h 终止孵育; 用 1×PBS 洗涤 3 次, 之后每孔加 200 μL 1×PBS 反复冻融; 将冻融液体以 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 抽提 DNA 为模板, 进行荧光定量 PCR。反应体系(20.0 μL): 上游引物(10 μmol/L) 0.4 μL, 下游引物(10 μmol/L) 0.4 μL, TB Green Premix Ex Taq 10.0 μL, 模板 2.0 μL, dd H₂O 7.2 μL。反应条件: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 30 s, 共 40 个循环。每个样重复 3 次。最后分析病毒拷贝数差异。



1 IPTG诱导6 h的空质粒pET42a(+); 2、3分别为IPTG诱导3、6 h的重组质粒菌; M 蛋白Marker。

图3 F1L蛋白表达的SDS-PAGE结果

Fig.3 Result of SDS-PAGE profile of expressed F1L protein



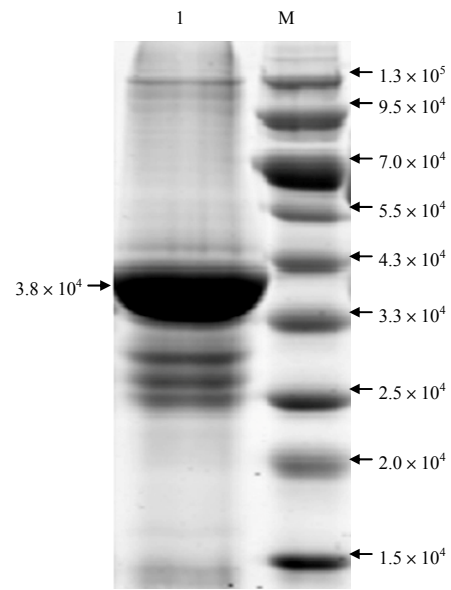
M 蛋白Marker; 1 IPTG诱导6 h的重组质粒菌; 2 IPTG诱导6 h的空质粒pET42a(+)

图4 F1L-CQsz蛋白免疫印迹检测结果

Fig.4 Result of western blotting of F1L-CQsz protein

2.4 F1L 蛋白的纯化结果及复性蛋白质的浓度

对超声破碎 IPTG 诱导重组菌悬液的 SDS-PAGE 检测结果发现, 裂解液上清液泳道中无明显可见的目的蛋白带, 而沉淀泳道中出现相对分子质量约为 3.8×10^4 且与预期相符的蛋白带, 表明 F1L 蛋白主要以包涵体的形式表达。对于用 His 柱纯化蛋白的检测, 从图 5 可知, 在相对分子质量大约为 3.8×10^4 处出现了 1 条明显的与预期相符的蛋白条带, 表明纯化到了以包涵体形式表达的 F1L 蛋白。采用 Bradford 法测定的纯化复性的 F1L 蛋白质量浓度为 1.06 mg/mL 。



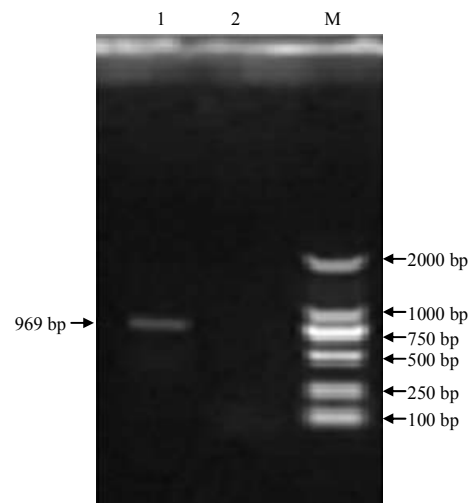
1 纯化蛋白; M 蛋白 Marker。

图5 纯化蛋白的SDS-PAGE分析结果

Fig.5 Result of SDS-PAGE profile of the purified protein

2.5 GTPV P32 基因克隆及定量标准曲线

从图 6 可知, 在 1000 bp 左右出现单一的 DNA 条带, 该结果与预期分子大小相符。回收目的条带连接 pMD18-T vector、转化 *E. coli* DH5 α , 结果成功构建了重组质粒(pMD18-P32)菌。以提取的该质粒为模板, 建立了研究 GTPV AV41 株的绝对定量标准曲线(图 7)。



1 GTPV; 2 空白对照; M DNA Marker。

图6 GTPV P32基因PCR产物电泳结果

Fig.6 Result of electrophoresis of PCR product of GTPV P32 gene

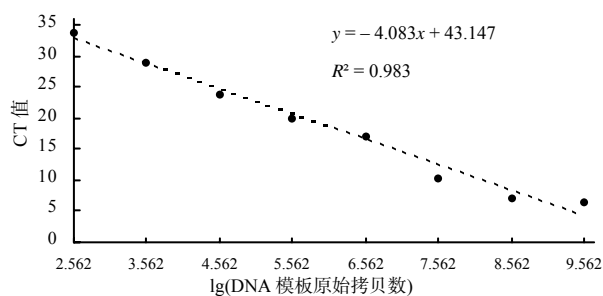
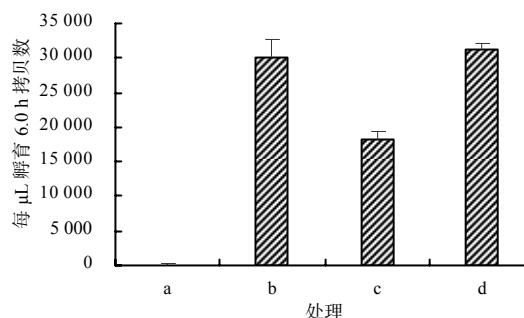
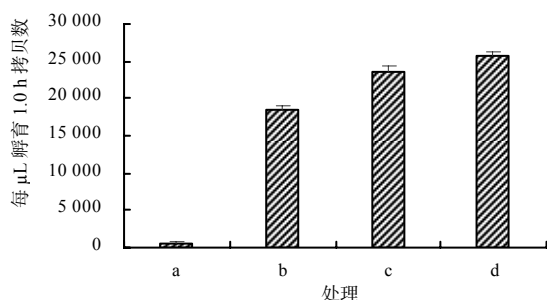


图7 GTPV绝对定量标准曲线

Fig.7 GTPV absolute quantitative standard curve



a 蛋白孵育组; b 先蛋白后病毒孵育组; c 蛋白和病毒共孵育组; d 病毒孵育组。

图8 荧光定量测定不同处理下细胞黏附 GTPV 的拷贝数

Fig.8 The copies of GTPV adhered to cells under different treatments were tested by fluorescence quantitative method

3 结论与讨论

本研究中,克隆了 ORFV-CQsz 株的 059 基因,发现该基因编码蛋白 F1L 的氨基酸序列 C-端包含 2 个跨膜区域。由于存在跨膜区结构域,导致蛋白不容易获得高效表达。目前,对于跨膜蛋白的表达,通常采取截去跨膜区段,再对剩余部分蛋白质进行表达^[17]。本研究中,通过对 F1L-CQsz 蛋白质的 DNA 编码序列进行优化处理后合成,以此构建原核表达质粒菌,最终实现了对目标蛋白的高效表达。

病原黏附细胞并侵入感染,通常是多种因子协同作用的结果^[18],但黏附宿主细胞是感染发生的第一步。研究^[19-21]发现,细菌、病毒、寄生虫等病原体特异地黏附真核细胞表面的氨基葡聚糖分子(如肝素、硫酸乙酰肝素、硫酸软骨素等多糖)受体,是形成病原感染的主要机制之一。经对 ORFV-CQsz 059 基因及其编码蛋白分析,发现 F1L-CQsz 蛋白有肝素结合活性;此外,作为一种痘病毒,GTPV 外膜蛋白中包含有结合细胞表面肝素类似物的 Pox_P35 结构域^[6],这就意味着蛋白 F1L-CQsz 和 GTPV AV41 均可黏附细胞表面。在本研究中,对两者进行不同处理后孵育 BHK21 细胞,结果发现 F1L-CQsz 蛋白干扰了 GTPV AV41 株黏附 BHK21

2.6 蛋白 F1L 对 GTPV 黏附 BHK21 细胞的影响

从图 8 可知,病毒 GTPV 孵育 1.0、6.0 h 的细胞,其黏附病毒数量均呈现为蛋白处理组的最低,病毒处理组的最高,先蛋白后病毒、蛋白和病毒混液共孵育的居中的特点。表明蛋白 F1L 对 GTPV 黏附到 BHK21 细胞有一定的干扰作用,F1L 蛋白质降低了病毒黏附到细胞的数量。

细胞,降低了病毒黏附细胞的拷贝数。其原因可能是蛋白与病毒竞争性吸附细胞表面受体,从而导致细胞黏附病毒的数量变少。本研究结果显示,F1L-CQsz 蛋白介导了 ORFV 黏附 BHK21 细胞,表明其功能可能与 ORFV 其他毒株的 F1L 蛋白功能一样,在黏附宿主细胞上发挥作用^[10]。由于 F1L 蛋白是 ORFV 的一种重要囊膜蛋白,提示 ORFV 可影响 GTPV 黏附和感染宿主细胞。

鉴于国内尚无预防羊口疮的商品化疫苗,临床上对羊口疮的防控形势十分严峻。生产实践中以 GTPV AV41 株制备的山羊痘活疫苗广泛免疫注射羊群,而 ORFV 可影响 GTPV 黏附和感染宿主细胞;因此,在使用 GTPV 弱毒活疫苗免疫山羊之前,检测羊群健康状态,确保羊群不携带 ORFV,可更好的发挥 GTPV 活疫苗的免疫效果。

参考文献:

- [1] 颜新敏,吴国华,李健,等.羊痘在中国的流行现状分析[J].中国农学通报,2010,26(24):6-9.
- [2] 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]. Veterinary Microbiology, 2010, 142(3/4): 408-415.
- [3] 朱相儒.羊口疮病毒和山羊痘病毒的分离鉴定及羊口

- 疮病毒 B2L 蛋白单克隆抗体的研制[D]. 扬州: 扬州大学, 2016.
- [4] 何亚鹏, 张琪, 史怀平, 等. 绵羊痘病毒、山羊痘病毒及羊口疮病毒多重 PCR 检测方法的建立和应用[J]. 动物医学进展, 2017, 38(3): 11–15.
- [5] CZERNY C P, WALDMANN R, SCHEUBECK T. Identification of three distinct antigenic sites in parapoxviruses[J]. Archives of Virology, 1997, 142(4): 807–821.
- [6] 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.
- [7] MERCER A A, UEDA N, FRIEDERICH S M, et al. Comparative analysis of genome sequences of three isolates of Orf virus reveals unexpected sequence variation[J]. Virus Research, 2006, 116(1/2): 146–158.
- [8] 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.
- [9] GALLINA L L, SCAGLIARINI A, CIULLI S. et al. Cloning and expression of the orf virus *FIL* gene: possible use as a subunit vaccine [J]. Veterinary Research Communications, 2004, 28(1): 291–293.
- [10] SCAGLIARINI A, GALLINA L, DAL POZZO F, et al. Heparin binding activity of orf virus *FIL* protein[J]. Virus Research, 2004, 105(2): 107–112.
- [11] 沈克飞, 许国洋, 胡瑞思, 等. 山羊化脓隐秘杆菌重庆分离株 CbpA 肝素结合结构域鉴定[J]. 畜牧兽医学报, 2018, 49(1): 173–180.
- [12] BHANUPRAKASH V, HOSAMANI M, BALAMURUGAN V, et al. In vitro antiviral activity of plant extracts on goatpox virus replication[J]. Indian Journal of Experimental Biology, 2008, 46(2): 120–127.
- [13] 张磊, 唐永凯, 李红霞, 等. 鲤鱼重组IL-17N的原核表达条件优化及蛋白纯化[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2020, 46(3): 364–369.
- [14] 黄鹏煌, 王泽, 田海山, 等. 重组人成纤维细胞生长因子 8b 原核表达载体的构建和纯化研究[J]. 中国生物工程杂志, 2013, 33(1): 14–19.
- [15] TERRINHA A M, VIGARIO J D, PETISCA J L, et al. Autoradiographic study on sheeppox virus infection[J]. Journal of Bacteriology, 1965, 90(6): 1703–1709.
- [16] GORDON J, KOVALA T, DALES S. Molecular characterization of a prominent antigen of the vaccinia virus envelope[J]. Virology, 1988, 167(2): 361–369.
- [17] 邢雪, 王元红, 李传峰, 等. 羊口疮病毒 *FIL* 融合 Fe 蛋白的表达与鉴定[J]. 江苏农业学报, 2020, 36(1): 130–135.
- [18] CHHATWAL G S. Anchorless adhesins and invasins of Gram-positive bacteria: a new class of virulence factors [J]. Trends in Microbiology, 2002, 10(5): 205–208.
- [19] YUAN Z Z, YAN X J, ZHANG A D, et al. Molecular mechanism by which surface antigen HP0197 mediates host cell attachment in the pathogenic bacteria *Streptococcus suis*[J]. Journal Biological Chemistry, 2013, 288(2): 956–963.
- [20] SPILLMANN, D. Heparan sulfate: anchor for viral intruders?[J]. Biochimie, 2001, 83(8): 811–817.
- [21] WADSTROM T, LJUNGH Å. Glycosaminoglycan-binding microbial proteins in tissue adhesion and invasion: key events in microbial pathogenicity[J]. Journal Medical Microbiology, 1999, 48(3): 223–233.

责任编辑: 邹慧玲
英文编辑: 柳 正