

# 绵羊痘病毒多表位基因的构建及原核表达

陈轶霞 王明明 龙玲 邵忠伟 刘俊林

西北民族大学生命科学与工程学院, 兰州 730124

**摘要** 通过计算机软件筛选出绵羊痘病毒基因组中心编码区的 ORF90 核蛋白、ORF112 融合蛋白、ORF117 糖蛋白、ORF55 膜蛋白和基因组末端的 ORF134 宿主范围相关基因的 6 段 T、B 细胞优势抗原表位, 以柔性氨基酸(GPGPG)作为接头, 串联合成 1 条全新的多表位嵌合基因 *mE*, 将其克隆到原核表达载体 pET-32 中, 采用酶切分析与序列测定方法筛选鉴定阳性重组质粒, 构建 pET32-*mE* 质粒; 用 IPTG 在不同条件下诱导表达, 确定最佳表达条件, 表达产物经 SDS-PAGE 分析。结果表明, 重组蛋白是分子质量为 41 ku 的融合蛋白。在 IPTG 浓度为 0.5 mmol/L, 温度为 37 °C、诱导 4 h 时目的蛋白的表达量最大, 约占菌体的 32%。Western-blotting 试验表明, 目的蛋白可被羊痘血清识别。

**关键词** 绵羊痘病毒; 抗原表位; 多表位; 嵌合基因; 原核表达

**中图分类号** S 852.65<sup>+</sup>4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2015)02-0086-05

羊痘病毒(sheepox virus and goatpox virus, SGPV), 包括绵羊痘病毒(sheepox virus, SPPV) 和山羊痘病毒(goatpox virus, GTPV), GTPV 与 SPPV 基因组的同源性很高, 约为 96%。SGPV 引起的羊痘, 以皮肤及黏膜发生疱疹和丘疹为主要特征。发病羊的生产力和皮毛质量显著下降, 影响养羊业和国际贸易的健康发展。我国将该病列为一类动物疾病, 世界动物卫生组织(OIE)将其列为“法定通报疾病”。该病尚无有效的治疗方法, 主要通过接种传统疫苗预防该病<sup>[1]</sup>。近来很多报道显示, 我国应用很广的山羊痘疫苗能够引起并发症, 包括引起皮肤结节、流产等<sup>[2-4]</sup>, 弱毒疫苗存在潜在的致病性和毒力返强的危险性, 为有效防控羊痘带来了隐患, 不利于彻底消灭羊痘<sup>[5]</sup>。研制更安全、有效的新型疫苗是目前该领域主要的研究方向之一。表位多肽疫苗安全、稳定、无毒, 没有传染疾病的危险性, 可以大量合成生产, 是疫苗研究的一个新热点<sup>[6-8]</sup>。

研究表明 SGPV ORF90、ORF99、ORF52 核蛋白均具有良好的免疫原性<sup>[9]</sup>; 共表达 SGPV 基因组中心编码区 ORF117 糖蛋白和基因组末端的 ORF134 宿主范围相关基因, 中心编码区 ORF112 融合蛋白和 ORF55 膜蛋白的核酸疫苗的免疫效果均强于表达单一抗原的核酸疫苗, ORF117 和

ORF134 主要激发细胞免疫, ORF117 和 ORF134 激发 T 淋巴细胞增殖与 IFN- $\gamma$  分泌的能力优于 ORF112 融合蛋白。但这些抗原都不能完全抵御强毒的攻击<sup>[10]</sup>。这可能是由于庞大的痘病毒的免疫保护性是由很多抗原共同参与完成的。本试验利用生物信息学方法, 筛选出 SPPV ORF90 核蛋白、ORF112 融合蛋白、ORF117 糖蛋白、ORF55 膜蛋白和 ORF134 宿主范围相关基因的 T、B 抗原表位, 串联成一条新的嵌合基因, 并在 *E. coli* 中表达, 为研制基因工程疫苗奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、载体及试剂

羊痘标准阴性、阳性血清购自上海顺铂生物工程有限公司; pET-32a(DE3)、BL21 由笔者所在实验室保存, PCR 试剂、限制性内切酶 *Bam*H I、*Eco*R I、T4 连接酶等试剂购自上海生工生物工程有限公司; 质粒提取试剂盒购自北京博大泰克公司; 兔抗羊辣根过氧化物酶标记的二抗购自武汉博士德生物工程有限公司; 其他常规试剂为国产分析纯。

### 1.2 表位筛选与设计

参照文献<sup>[11]</sup>, 用网上软件 DNASTAR、AB-Cpred、CTLPred、BepiPred 1.0 Server 等分析 SP-

收稿日期: 2014-04-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(31260609; 31360533); 西北民族大学中央高校基本科研业务费专项(ZYZ2012072)

陈轶霞, 博士, 教授. 研究方向: 动物重大疫病病原分子生物学. E-mail: chenyx69@126.com

PV (AY368684) ORF90 核蛋白、ORF112 融合蛋白、ORF117 糖蛋白、ORF55 膜蛋白和 ORF134 基因的 6 个 T、B 表位,其位置及序列见表 1。

表 1 各优势抗原表位氨基酸序列

Table 1 Amino acid sequence of the dominant antigen epitope

来源 Sources	氨基酸位置 Positions	序列 Sequences
ORF112	61~73	KYIYKMAESDDIIDDYISDEDA
ORF90	133~140	NIDFKKIHSLLFIPFCNIHGFLISE
ORF112	99~119	SIHDSKFLNFLISDPLDLKPNIDTET
ORF117	113~154	MKSLNRQTINKIKRASAPTAIFVLVL- TIVSSIGTAIRYKDELFPNACNKG- WVPYDDSCYLNS
ORF55	47~51	SKSICSRIDNSGKYPNKC
ORF134	129~151	IKWEIKKMMKLVLLKNILDG- EETVKKIYAKKVN

### 1.3 多表位嵌合基因的构建

在 SGPV ORF90、ORF112、ORF117、ORF134 和 ORF55 基因序列中找出各表位氨基酸对应的核苷酸的序列,表位间通过 GPGPG 连接,合成一条新的基因,命名为 *mE* 基因,大小约 600 bp。由上海生工生物工程技术有限公司合成。用 DNASTAR 分析其抗原性。

### 1.4 *mE* 基因的 PCR 扩增

根据 *E* 基因序列,设计 1 对引物,在 3' 和 5' 端分别加入 *Bam* H I 和 *Eco* R I 酶切位点,并引入起始密码子 ATG 和终止密码子 TAA,用灭菌双蒸水稀释(50 pmol/ $\mu$ L)备用。按照常规体系,以 *E* 基因克隆质粒为模板,采用如下参数进行 PCR:94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94  $^{\circ}$ C 55 s,55  $^{\circ}$ C 40 s,72  $^{\circ}$ C 1 min,35 个循环;72  $^{\circ}$ C 10 min。

### 1.5 *mE* 原核表达载体的构建

将 *Bam* H I 和 *Eco* R I 双酶切的 PCR 产物和 pET32 载体,用 T4DNA 连接酶连接(4  $^{\circ}$ C),转化大肠杆菌(BL21)(DE3)感受态细胞。阳性质粒经双酶切、PCR 鉴定,并对序列进行测序分析。重组质粒命名为 pET32-*mE*。

### 1.6 *mE* 重组质粒的表达及条件优化

将 pET32-*mE* 重组质粒菌液按 1% 的量接种于含 100  $\mu$ g/mL Amp 的 LB 培养液中,37  $^{\circ}$ C、230 r/min 振荡培养约 3 h,至  $D_{600}$  为 0.6~0.8 时,加入不同终浓度的 IPTG (0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mmol/L),收集不同温度(28、37、45  $^{\circ}$ C)、不同时间(1、2、4、6、8 h)的菌液,各取出 1 mL 菌液,加入 100

$\mu$ L 1 $\times$ SDS-PAGE 上样缓冲液,煮沸 5 min,取 20  $\mu$ L 进行 12% 的 SDS-PAGE 电泳,检测表达情况。另设未诱导的 pET32 菌液和诱导的空载体菌液作为阴性对照。

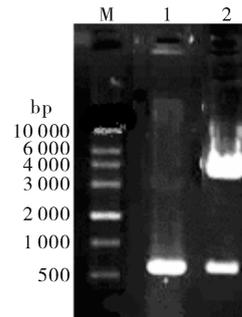
### 1.7 表达产物的 Western-blotting 鉴定

将 SDS-PAGED 的蛋白转移至硝酸纤维素膜。将其浸在 PBST(含 5% BSA)中,室温封闭 2 h, PBST 洗涤 3 次,将膜与羊痘标准阳性血清(1:60 稀释)温育 1 h,同时以同样稀释的羊痘阴性血清作对照,洗涤,最后与 1:5 000 稀释的兔抗羊辣根过氧化物酶标记的二抗温育 1 h,显色。

## 2 结果与分析

### 2.1 表达质粒的酶切、PCR 鉴定结果

以 pET32-*mE* 为模板 PCR 扩增出约 600 bp 的目的条带;pET32-*E* 质粒用 *Bam* H I 和 *Eco* R I 双酶切后得到目的条带和 4.0 kb 的载体条带(图 1),测序结果表明 *mE* 基因被正确插入到表达载体中。



M. DNA 分子质量标准 DNA molecular weight marker; 1. pET32-*mE* 的 PCR 鉴定 PCR product of pET32-*mE*; 2. pET32-*mE* 的酶切鉴定 pET32-*mE* digested with *Eco*R I and *Bam*H I.

图 1 表达质粒的 PCR 及酶切鉴定结果

Fig. 1 Identification of recombinant plasmid by *Eco*R I / *Bam*H I restrictive digestion and PCR

### 2.2 表达质粒中的 *mE* 基因的序列分析

序列测定结果表明 *mE* 基因为完整的开放阅读框,生物信息学预测分析表明,该重组多表位蛋白有良好的抗原性、亲水性、表面可及性及柔性,见图 2。

### 2.3 重组菌的诱导表达、诱导条件的优化及 Western-blotting 分析

在不同诱导剂浓度、诱导时间、温度下进行诱导表达,结果表明 IPTG 浓度 0.5 mmol/L、时间 4 h、温度 37  $^{\circ}$ C 为最佳的诱导表达条件。目的蛋白主要以包涵体的形式存在(图 3~5),大小约 41 ku。

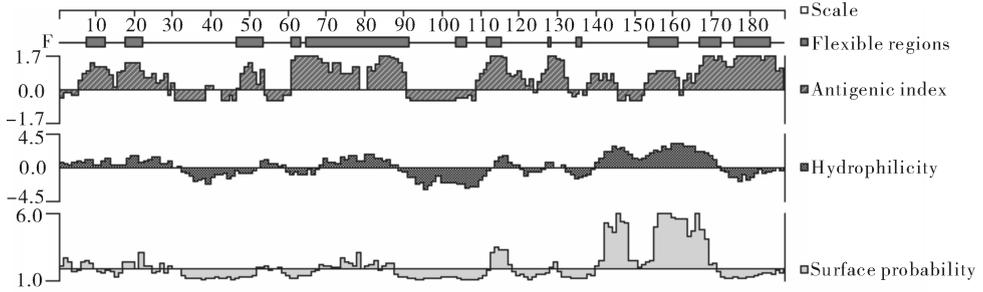
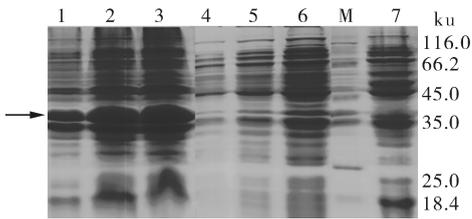


图 2 *mE* 多表位蛋白的生物信息学分析

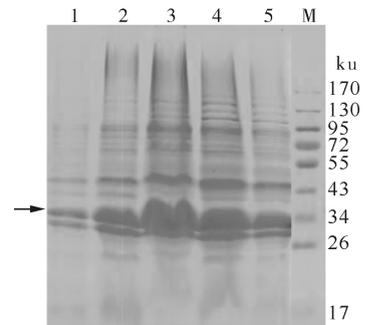
Fig. 2 Analyses on flexible regions, antigenic index, hydrophilicity plot and surface probability plot for SGPV *mE* gene protein



1~3: 菌液分别在 28, 37, 45 °C 诱导的菌体裂解液沉淀 Sedimentation of pET32-mE/BL21 induced at 28, 37, 45 °C by ultrasonic vibration; 4~6: 菌液分别在 28, 37, 45 °C 诱导的菌体裂解液上清 Supernatants of pET32-mE/BL21 induced at 28, 37, 45 °C by ultrasonic vibration; 7: 诱导的空载体 Expressed production of pET-32/BL21; M: 蛋白标准 Protein molecular weight.

图 3 不同温度诱导的表达产物的 SDS-PAGE 分析

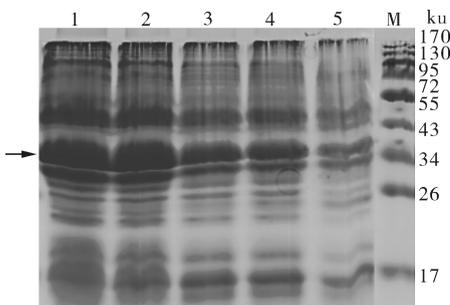
Fig. 3 SDS-PAGE analyses of recombinant proteins induced at different temperature



1~5: 菌液分别经 IPTG 诱导 1, 2, 4, 6, 8 h 后的表达产物 Proteins from pET32-mE /BL21 induced by IPTG at 1, 2, 4, 6, 8 h at 37 °C, respectively; M: 蛋白标准 Protein molecular weight.

图 5 不同时间诱导的表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 5 SDS-PAGE analyses of recombinant proteins induced by IPTG for varied periods

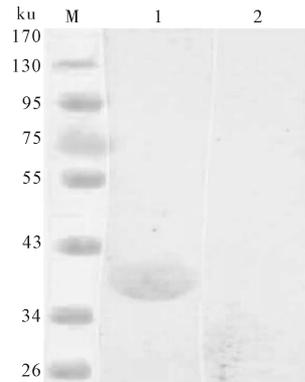


1~5: 菌液 37 °C 分别经 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mmol/L IPTG 诱导的表达产物 Proteins from pET32-mE/BL21 induced by 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mmol/L IPTG at 37 °C, respectively; M: 蛋白标准 Protein molecular weight.

图 4 不同 IPTG 浓度诱导的表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analyses of recombinant proteins induced by IPTG at different concentrations

Western-blotting 结果显示, 重组蛋白与羊痘阳性血清出现特异性反应, 而与正常羊血清无反应(图 6)。



M: 蛋白标准 Protein weight marker; 1: 羊痘阳性血清 Positive serum against sheeppox virus; 2: 阴性血清对照 Negative control.

图 6 重组蛋白的 Western-blotting 分析

Fig. 6 Western-blotting analysis of the products

### 3 讨 论

多肽疫苗是按照病原体抗原基因中已知或预测的某段抗原表位的氨基酸序列,通过化学合成技术制备的疫苗,一般组合 T 细胞和 B 细胞表位。T 细胞表位经抗原递呈细胞内吞、蛋白酶酶解后,由 MHC-II 类分子将其递呈给 Th 细胞,进一步与 TCR 结合,使之活化并分泌细胞因子; B 细胞上的受体可与 B 细胞表位结合,使 B 细胞活化产生抗体;此外,多肽疫苗经过适当的修饰后,可能会活化体内的肽特异性 CTL,实现细胞毒效应。目前,口蹄疫病毒、艾滋病病毒、血吸虫等保护性抗原决定簇研制成的多肽疫苗已显示出良好的前景。本试验利用生物信息学方法筛选出 SGPV 的 6 个 T、B 抗原表位,合成多表位串联基因,在大肠杆菌中成功表达,并具有抗原性,为研制 SGPV 基因工程疫苗奠定了基础。

B 细胞表位预测方法很多,包括抗原性方案、亲水性方案、可及性方案、可塑性方案、电荷分布方案、二级结构预测方案等,如 BepiPred、ABCpred 等。但是,每种预测方案都存在局限性,应该综合考虑多种方案以得到满意的结果<sup>[12-13]</sup>。本研究综合运用 Epredic、ABCpred、DNASTAR、epiPred 1.0 Server 等多种预测软件,构建的多表位基因在大肠杆菌中得到表达,并具有抗原性。

迄今为止,还没有 SGPV 单一抗原产生良好免疫保护效果的报道,原因是痘病毒的基因组庞大,全病毒的良好免疫保护性可能是多种抗原共同作用的结果。当前,SGPV 基因工程疫苗的研究多以其膜蛋白为靶抗原<sup>[12]</sup>。而研究表明,SGPV 感染羊的 CD8<sup>+</sup> 细胞显著增加,导致 CD4<sup>+</sup>:CD8<sup>+</sup> 比值明显降低,这与羊的外周血中的 SGPV 特异性细胞毒性 T 淋巴细胞(CTLs)增加相一致,说明患病羊可能主要是以 CD8<sup>+</sup> 细胞介导的 CTL 反应为主来对抗 SGPV 的入侵。大部分流感病毒的特异性 CTL 不识别囊膜蛋白,只识别病毒的内部蛋白(如基质蛋白和核蛋白)。SGPV 是否也具有这样的特性还不得而知,如果 SGPV 也有同样的特性,那么其核蛋白也许在免疫保护性方面发挥着重要作用<sup>[11]</sup>。因此,

本研究选用 SGPV 基因组中心编码区的 ORF90 核蛋白、ORF112 融合蛋白、ORF117 糖蛋白、ORF55 膜蛋白和羊痘病毒基因组末端的 ORF134 宿主范围相关基因为候选抗原筛选表位抗原,有可能会增强 SGPV 多肽疫苗的免疫保护性。

### 参 考 文 献

- [1] BHANUPRAKASH V, INDRANI B K, HOSAMANI M, et al. The current status of sheep pox disease[J]. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2006, 29(1):17-60.
- [2] 黄国敏, 韦春葵. 注射山羊痘活疫苗引起孕羊流产的报告[J]. *广西畜牧兽医*, 2004, 20(5):214-215.
- [3] 李华春, 高华峰, 姚俊, 等. 山羊痘灭活疫苗研究[J]. *云南畜牧兽医*, 2005(3):5-6.
- [4] 赵利平, 魏学峰, 陈九连, 等. 山羊痘灭活疫苗免疫保护试验[J]. *中国兽药杂志*, 2005, 39(8):21-23.
- [5] TULMAN E R, AFONSO C L, LU Z, et al. The genomes of sheep and goatpox viruses[J]. *Journal of Virology*, 2002, 12: 6054-6061.
- [6] SPEARMAN P, KALAMS S, ELIZAGA M, et al. Safety and immunogenicity of a CTL multiepitope peptide vaccine for HIV with or without GM-CSF in a phase I trial[J]. *Vaccine*, 2009, 27(2):243-249.
- [7] XU W, LIU J, GONG W, et al. Protective immunity against *Chlamydia trachomatis* genital infection induced by a vaccine based on the major outer membrane multi-epitope human papillomavirus major capsid protein L1 [J]. *Vaccine*, 2011, 29(15):2672-2678.
- [8] ZHAO C, SUN Y, ZHAO Y, et al. Immunogenicity of a multi-epitope DNA vaccine against hantavirus[J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2012, 8(2):208-215.
- [9] BOWDEN T R, COUPAR B E, BABIUK S L, et al. Detection of antibodies specific for sheeppox and goatpox viruses using recombinant capripoxvirus antigens in an indirect enzyme-linked immunosorbent assay[J]. *J Virol Methods*, 2009, 61(1):19-29.
- [10] ZHENG M, JIN N, LIU Q, et al. Immunogenicity and protective efficacy of Semliki forest virus replicon-based DNA vaccines encoding goatpox virus structural proteins[J]. *Virology*, 2009, 391(1):33-43.
- [11] 陈轶霞, 刘俊林, 王明明, 等. 羊痘病毒多表位核酸疫苗的构建及表达[J]. *中国兽医学报*, 2013, 33(8):1196-1200.
- [12] 陈轶霞, 才学鹏, 景志忠, 等. 羊痘病毒 P32 基因真核表达载体的构建、表达及其免疫原性[J]. *病毒学报*, 2008, 24(2):133-135.

## Construction and prokaryotic expression of multi-epitope chimeric gene of sheeppox virus

CHEN Yi-xia WANG Ming-ming LONG Ling SHAO Zhong-wei LIU Jun-lin

*College of Life Science and Engineering, Northwest University for Nationalities,  
Lanzhou 730124, China*

**Abstract** To design a new gene encoding the multi-epitope chimeric antigen of sheeppox virus (SPPV) and express the chimeric gene, the dominant epitopes of *ORF90*, *ORF112*, *ORF117*, *ORF55* and *ORF134* gene of SPPV were analyzed and selected by computer software and reported references. A recombinant multi-epitope chimeric gene including SPPV six multi-epitope genes was constructed and cloned into prokaryotic expression vector pET-32. The recombinant plasmids pET32-mE were induced by IPTG. The SDS-PAGE analysis showed that the concentration of the fusion protein in *E. coli* protein was about 32, with a molecular weight of 41 ku. The optimal temperature, concentration of IPTG and induced time for the recombinant protein were 37 °C, 0.5 mmol/L and 4 h, respectively. The fusion protein was identified correctly by positive serum against capripoxvirus by Western-blotting, suggesting potential value of genetically engineering vaccine.

**Key words** sheeppox virus; epitope; multi-epitope; chimeric gene; prokaryotic expression

(责任编辑:边书京)