

DOI:10.13350/j.cjpb.230204

• 论著 •

羊口疮病毒 E3L 蛋白亚细胞定位及生物信息学分析*

蒙泽菁^{1,2}, 房永祥², 贾怀杰², 高真贞², 陈国华², 何小兵², 景志忠^{1,2**}, 王晓霞^{1**}

(1. 兰州大学公共卫生学院营养与食品卫生学研究所, 甘肃兰州 730000; 2. 中国农业科学院兰州兽医研究所家畜疫病病原生物学国家重点实验室, 农业部兽医公共卫生重点实验室)

【摘要】 目的 克隆羊口疮病毒 020 基因, 构建其重组真核表达质粒并转染 HeLa 细胞, 分析 020 基因编码 E3L 蛋白的亚细胞定位, 分析该蛋白生物信息学特征。方法 提取羊口疮病毒基因组, PCR 扩增 020 基因并构建重组真核表达质粒, 转染 HeLa 细胞, 采用 Western blot 检测其在该细胞中的表达, 免疫荧光法检测该蛋白的亚细胞定位。利用 DNASTAR 软件分析不同毒株 ORFV E3L 氨基酸序列特点及其遗传演化关系; 利用 SOMPA 软件分析其二级结构; 利用 SignalP4.0 软件预测信号肽; 利用 TMHMM2.0 软件预测跨膜结构; 利用 NetPhos 3.1 预测磷酸化位点; 利用 NetNGlyc-1.0 预测糖基化位点; 应用 IDEB 和 SYFPEITHI 预测 ORFV E3L 蛋白的抗原表位。结果 成功克隆得到 ORFV 020 基因, 全长 549 bp, 编码 183 个氨基酸; 亚细胞定位显示该蛋白定位于细胞核和细胞质。生物信息学分析 ORFV E3L 蛋白 α 螺旋约占 40.44%、 β 折叠约占 5.46%、延伸链约占 16.94%、无规则卷曲约占 37.16%; 该蛋白无信号肽和跨膜结构, 可能存在 15 个磷酸化位点, 7 个 N-糖基化位点, 5 个 B 细胞线性表位, 2 个 CTL 表位, 3 个 Th 细胞表位, 3 个 B 细胞和 CTL 联合表位, 3 个 B 细胞和 Th 细胞联合表位。结论 ORFV E3L 蛋白定位于细胞核和细胞质, 含有多个抗原表位, 可能具有免疫原性。该蛋白高度保守, 具有成为优势保护性抗原的潜力。为进一步揭示 ORFV E3L 蛋白的功能奠定基础, 为 ORFV 诊断方法的建立及疫苗的研制提供了理论依据。

【关键词】 羊口疮病毒; 基因克隆; 亚细胞定位; 生物信息学

【中图分类号】 S852.65

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)02-0141-06

[*Journal of Pathogen Biology*. 2023 Feb;18(2):141-146.]

Subcellular localization and bioinformatics analysis of E3L protein of orf virus

MENG Ze-jing^{1,2}, FANG Yong-xiang², JIA Huai-jie², GAO Zhen-zhen², CHEN Guo-hua², HE Xiao-bing², JING Zhi-zhong^{1,2}, WANG Xiao-xia¹ (1. *Institute of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China*; 2. *State Key Laboratory of Veterinary of Etiological Biology, Key Laboratory of Veterinary Public Health of Agricultural Ministry, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences*)***

【Abstract】 **Objective** This study aims to clone the 020 gene of orf virus (ORFV) and to construct the recombinant eukaryotic expression plasmid. And then the recombinant plasmid is used to transfect HeLa cells, and to analyze the subcellular localization of E3L protein encoded by ORFV 020 gene. Meanwhile, the bioinformatics characteristics of E3L protein are analyzed. **Methods** ORFV genome was isolated and the 020 gene was amplified by PCR. The recombinant plasmid was transfected into HeLa cells, where the expression of the 020 gene was detected by Western blot, and the subcellular localization of the recombinant protein was detected by immunofluorescence. DNASTAR software was used to analyze the amino acid sequence characteristics and genetic evolution of ORFV E3L protein in different strains. SOMPA software was used to analyze the secondary structure of E3L. Signalp 4.0 software was used to predict its signal peptides. TMHMM2.0 software was used to predict its transmembrane structure. NetPhos 3.1 and NetNGlyc-1.0 software were used to predict its phosphorylation sites and glycosylation sites respectively. IDEB and SYFPEITHI software are used to predict the antigenic epitopes of ORFV E3L protein. **Results** ORFV 020 gene was cloned successfully, with a total length of 549 bp, encoding 183 amino acids. Subcellular localization showed that the encoded protein was located in both nucleus and cytoplasm. Bioinformatics analysis indicated that within ORFV E3L protein, α helix accounted for 40.44%, β turn accounted for 5.46%, extended strand accounted for 16.94%, and random coil accounted for 37.16%. E3L protein contains no signal peptide or transmembrane structure, but it may have 15 phosphorylation sites, 7 N-glycosylation sites, 5

* **【基金项目】** 国家重点研发计划项目(No. 2017YFD0500903); 甘肃省青年科技基金计划(No. 20JR5RA215); 中国农业科学院创新工程(No. CAAS-ASTIP-2016-LVRI-06)

** **【通讯作者】** 王晓霞, E-mail: wangxiaoxia@lzu.edu.cn; 景志忠, E-mail: zhizhongj@163.com

【作者简介】 蒙泽菁(1997-), 女, 广西贵港人, 在读研究生。主要研究方向: 公共卫生, 病毒感染与免疫。E-mail: mengzj20@lzu.edu.cn

linear epitopes of B cell, 2 cytotoxic T lymphocyte (CTL) epitopes, 3 T helper (Th) cell epitopes, 3 combined B cell and CTL epitopes, and 3 combined B- and Th-cell epitopes. **Conclusion** ORFV E3L protein is located in the nucleus and cytoplasm, and contains multiple antigenic epitopes, which may be immunogenic. This protein is highly conserved and has the potential to be a dominant protective antigen. This study lays a foundation for further revealing the function of ORFV E3L protein, and provides a theoretical basis for the establishment of diagnostic methods and the development of vaccine targeting ORFV infection.

【Key words】 orf virus; gene cloning; subcellular localization; bioinformatics

羊口疮(Orf)是由羊口疮病毒(orf virus, ORFV)引起的一种急性、接触性人兽共患传染病^[1]。ORFV是痘病毒科(Poxviridae)、副痘病毒属(Parapoxvirus)的一员。痘病毒科中受关注度较高的主要有新兴起的具有高流行和传播风险的猴痘病毒(monkeypox virus, MPXV)和牛痘病毒(cowpox virus, CPXV),已经宣布根除但仍被高度重视的天花病毒(variola virus, VARV),以及儿童较易感的传染性软疣病毒(molluscum contagiosum virus, MCV)^[2]。ORFV是一种嗜上皮病毒,主要引起羊口唇部、眼部、舌头以及口腔黏膜等上皮病变,可出现大小不等的水疱、脓疱和丘疹等。ORFV主要感染绵羊和山羊,尤其是羔羊和幼羊。ORFV在一定条件下会传染给人,易感人群主要为与羊接触密切的从业人员,包括牧民、剪羊毛工人、兽医、屠宰场工人等^[3-5]。

ORFV包含134个预测开放阅读框(opening reading frames, ORFs),分为中央核心区(ORFs009-111)和末端区(ORFs001-008, ORFs112-134),核心区的基因相对保守^[6]。ORFV基因组在其末端都有一个反向重复序列,且末端基因是可变区,与毒力、免疫调节和发病机制等有关^[6-8]。当病毒入侵机体后,机体为抵抗病毒的感染和增殖,会启动天然免疫系统和特异性免疫系统来清除病毒。病毒为抵抗机体的免疫清除作用,也会产生一些免疫逃避机制。ORFV 020基因与痘苗病毒E3L直系同源^[9]。在所有已知的E3L直系同源物中,痘苗病毒的E3L具有逃避先天免疫监视的功能^[10],然而,关于ORFV编码的E3L蛋白的生物学功能研究甚少。ORFV020位于ORFV基因组中央核心区,其编码的E3L蛋白在病毒感染早期表达,通过抑制宿主干扰素来参与免疫逃避。E3L蛋白通过结合干扰素诱导的双链RNA(double-stranded RNA, dsRNA)依赖性蛋白激酶(protein kinase R, PKR),使ORFV对I型和II型干扰素产生抗性^[11-13]。虽然ORFV ORF020编码的E3L蛋白与VACV E3L蛋白之间在结构上具有较高的相似性,但两者是否具有相同的生物学功能尚不清楚。Ando等^[14]的研究表明E3L蛋白在病毒感染的早期高表达,并具有不同的细胞抗原表位,这些抗原表位可能在亚单位疫苗或减

毒疫苗诱发机体的保护性免疫中发挥重要作用。

本研究从羊口疮病毒QH-3株中克隆ORF020基因并解析其编码蛋白E3L的亚细胞定位,采用生物信息学分析ORFV E3L蛋白的二级结构,预测其磷酸化位点、糖基化位点和抗原表位,为了解ORFV E3L蛋白的结构和功能提供技术支撑,为羊口疮病毒疫苗的研制奠定基础。

材料与方法

1 材料

1.1 细胞、载体和病毒株 HeLa细胞、pEGFP-N1载体、ORFV QH-3株由中国农业科学院兰州兽医研究所家畜疫病病原生物学国家重点实验室提供。

1.2 主要试剂 dNTPs购自生工生物工程(上海)股份有限公司;基因组DNA提取试剂盒,胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒均购自天根生化科技(北京)有限公司;DNA Marker DL2000和高保真酶购自宝日医生物技术(北京)有限公司;限制性内切酶, T₄DNA连接酶,蛋白Marker及RIPA裂解液购自美国ThermoFisher公司;鼠源抗EGFP抗体和HRP标记兔抗鼠IgG购自美国Sigma公司。

2 方法

2.1 ORFV DNA的提取 从经牛睾丸原代细胞培养的ORFV中提取该病毒的DNA,按天根生化科技(北京)有限公司提供的基因组DNA提取试剂盒说明书方法操作。

2.2 引物设计与合成 根据NCBI报道的ORFV 020基因序列(登录号:AFS31122.1),利用SnapGene设计扩增引物。上游引物P1:ATCAAGCTTCAATGGCCTGCGAGTGC;下游引物P2:ACTGGATCCGAGCTGATGCCGAG。引物由西安擎科泽西生物科技有限公司合成。

2.3 目的基因的PCR扩增 用合成的引物,以提取的ORFV DNA为模板PCR扩增ORFV 020基因片段。50 μL PCR反应体系:ORFV DNA 2 μL, GXL DNA高保真酶 2 μL, 5 × GXL Buffer 10 μL, dNTPs mix 6.4 μL, 上、下游引物各 1.25 μL, ddH₂O 26.6 μL。PCR反应程序:95 °C预变性 5 min;94 °C变性 30 s, 60 °C退火 40 s, 72 °C延伸 1 min, 共 35 个循

环;72 °C延伸 10 min。4 °C结束反应。

2.4 PCR 产物回收、连接与转化 取 PCR 产物进行 1.5%琼脂糖凝胶电泳,胶回收、纯化目的片段后连接至 pEGFP-N1 载体。连接体系:10 × T₄DNA 连接 Buffer 2 μL,pEGFP-N1 载体 2 μL,目的片段 10 μL,T₄DNA 连接酶 2 μL,ddH₂O 4 μL,轻轻混匀后放入 22 °C 恒温金属浴孵育 10 min,70 °C 灭活 5 min。将连接产物转化至大肠埃希菌 DH5α 感受态细胞,37 °C 培养过夜后挑单克隆菌进行菌液 PCR 鉴定、酶切鉴定及测序鉴定(由西安擎科泽西生物科技有限责任公司完成),测序正确的质粒命名为 pEGFP-020 质粒。

2.5 ORFV E3L 蛋白真核表达及亚细胞定位 利用 Lipofectamine 2000 将 pEGFP-020 质粒转染至 HeLa 细胞,同时设置空载对照。培养 24 h 后收集细胞,提取总蛋白,采用 Western blot 验证其真核表达情况。一抗为鼠 GFP 抗体,二抗为 HRP 标记的兔抗鼠 IgG。用同样方法将 pEGFP-020 质粒和空载质粒分别转染至 HeLa 细胞,24 h 弃去上清,PBS 清洗 3 遍,4%多聚甲醛溶液室温固定 30 min,PBS 清洗 3 次,DAPI 染细胞核 10min 后用 PBS 清洗 3 次,通过荧光显微镜观察 ORFV E3L 蛋白定位情况。

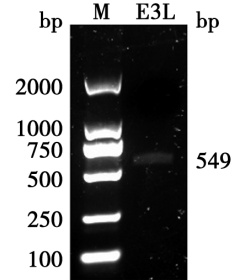
2.6 ORFV E3L 蛋白生物信息学分析 应用 SOMPA 在线分析软件(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)对 ORFV E3L 蛋白的二级结构进行分析;利用 SignalP4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)对 ORFV E3L 蛋白序列中是否存在潜在的信号肽进行预测;利用 TMHMM2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)软件预测 ORFV E3L 蛋白的跨膜结构域测;利用 NetPhos3.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetPhos-3.1>)预测 ORFV E3L 蛋白磷酸化位点;利用 NetNGlyc-1.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetNGlyc-1.0>)预测 ORFV E3L 蛋白糖基化位点;使用 IDEB(<http://www.iedb.org/>)预测 ORFV E3L 蛋白 B 细胞抗原表位,应用 SYFPEITHI (<http://www.syfpeithi.de/0-Home.htm>)预测 T 细胞抗原表位。

结 果

1 羊口疮病毒 020 基因克隆

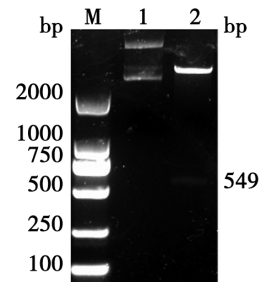
以提取的羊口疮病毒 DNA 为模板,经 PCR 扩增,得到一条 549 bp 的片段,与预期目的片段大小相符(图 1)。PCR 产物经连接、转化后挑取单克隆进行 PCR 鉴定及双酶切鉴定,结果见图 2,结果与预期一致。测序确认为 ORFV 020 基因。其编码蛋白含 183

个氨基酸,序列如下:MACECASLILELLQKSGDKL-PAKQIAKELGISKHETNRQLYRMLDSDDVCCE-DGNPPRFVVECAPSAPAEEDENSDAEPMETEA-GCDTLFGGDIDIMTQSSVIRLKSLNPVSAVNEFC-MMTHRPLEFCETRSGGEDHCPRTCTITISGKV-VAAANGASKKLARHAACASALTILINNCGISF。



M DNA 标志物(DL2000)
图 1 ORFV E3L PCR 扩增产物 1%琼脂糖凝胶电泳分析
M DNA marker DL2000

Fig. 1 Electrophoretic map of PCR amplification products of ORFV E3L



M DNA 标志物(DL2000) 1 pEGFP-ORF020 重组质粒 2 pEGFP-ORF020 双酶切

图 2 重组质粒 PCR 鉴定及双酶切鉴定
M DNA marker DL2000 1 pEGFP-ORF020 recombinant plasmid 2 pEGFP-ORF020 plasmid after double enzyme digestion

Fig. 2 Double digestion of recombinant plasmid

2 羊口疮病毒 E3L 蛋白真核表达及亚细胞定位

Western blot 显示 ORFV E3L 基因与 VACV E3L 基因相似,可编码两种 E3L 同工型,分别为全长型约 53 ku,短亚型约 44 ku^[15](图 3),与预期结果一致。通过荧光显微镜观察到 ORFV E3L 蛋白定位于细胞核和细胞质中(图 4)。

3 不同 ORFV 毒株 E3L 蛋白氨基酸序列比较分析

从 NCBI 数据库中搜索到 17 条 ORFV E3L 蛋白氨基酸序列(表 1),DNAstar 软件分析显示该基因编码的 E3L 蛋白同源性达到或超过 85.2%,表明该蛋白高度保守。该毒株与来源于中国陕西的 ORFV/YL/2013/China 毒株同源性最高,为 99.5%;与来源于印度的 ORFV/Shahjahanpur/82/Goat/2004 毒株同源性最低,为 85.2%(图 5,6)。

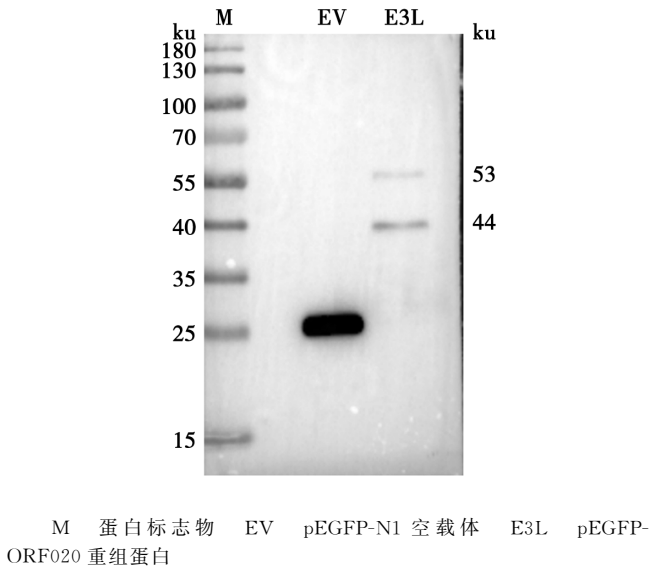
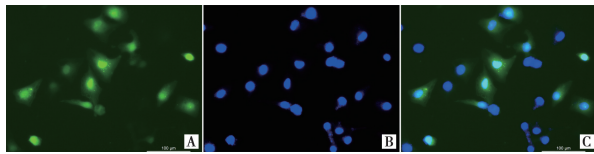


图 3 ORFV E3L Western blot 分析

M protein marker EV pEGFP-N1 empty vector E3L pEGFP-ORF020 recombinant protein

Fig. 3 Western blotting results of ORFV E3L protein



A EGFP B DAPI C 叠加

图 4 ORFV E3L 亚细胞定位

Fig. 4 Subcellular localization observed of ORFV E3L protein

表 1 ORFV E3L 不同 ORFV 毒株来源

Table 1 List of sources of different ORFV strains

序号 No.	登录号 GenBank	名称 Names	国家 Countries
1	AEW70357.1	ORFV/XinJiang/2011/China	中国 China
2	AEW70359.1	ORFV/ShanX/2011/China	中国 China
3	AFS31122.1	ORFV/GanSu/2009/China	中国 China
4	AHL29093.1	orfv-chGanSu	中国 China
5	AHX98333.1	ORFV/YL/2013/China	中国 China
6	AWN09305.1	ORFV/Tamil Nadu/68/1/Sheep/2008	印度 India
7	AWN09306.1	ORFV/Shahjahanpur/82/Goat/2004	印度 India
8	AWN09307.1	ORFV/Mukteswar/59/05/Goat/P51	印度 India
9	AWN09308.1	ORFV/Mukteswar/59/05/Goat/P6	印度 India
10	AWN09309.1	ORFV/Bangalore/89/05/Goat	印度 India
11	AWN09310.1	ORFV/Jalandhar/SP41/Goat/2007	印度 India
12	AWN09311.1	ORFV/Assam/LK/Goat/2014	印度 India
13	AWN09312.1	ORFV/Meghalaya/SP45/Goat/2003	印度 India
14	AWN09313.1	ORFV/Alwar/Goat/2008	印度 India
15	AWN09314.1	ORFV/Gujarat/SP26/Goat/2006	印度 India
16	AWN09315.1	ORFV/Hyderabad/25/Sheep/2006	印度 India
17	BAX30159.1	ORFV/2015/Zambia/Lu01	赞比亚 Zambia

4 羊口疮病毒 E3L 蛋白生物信息学分析

4.1 二级结构 SOPMA 分析 ORFV E3L 蛋白中 α -螺旋约占 40.44%, β -折叠约占 5.46%, 无规则卷曲约占 37.16%, 延长链约占 16.94% (图 7)。

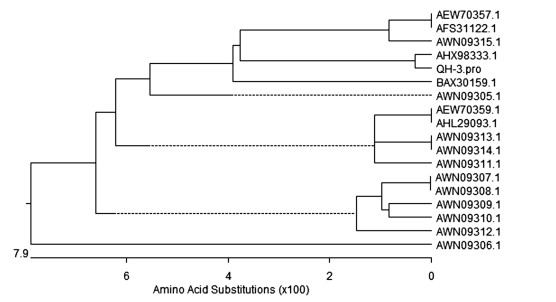


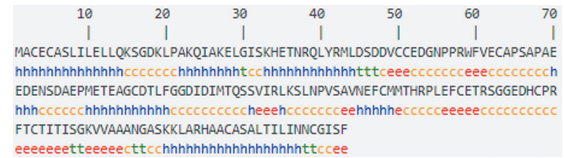
图 5 E3L 蛋白氨基酸序列的系统进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree of E3L protein in different ORFV strains

		Percent Identity																			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18		
	1	100	94.5	100.0	94.5	92.3	93.4	85.8	91.8	91.8	91.8	91.8	92.9	91.8	92.9	92.9	98.4	91.8	92.9	1	AEW70357.1
	2	5.7	100	94.5	100.0	92.9	95.6	89.6	96.7	96.7	96.7	96.2	97.8	96.2	97.8	97.8	94.0	93.4	93.4	2	AEW70359.1
	3	0.0	5.7	100	94.5	92.3	93.4	85.8	91.8	91.8	91.8	92.9	91.8	92.9	92.9	98.4	91.8	92.9	3	AFS31122.1	
	4	5.7	0.0	5.7	100	92.9	95.6	89.6	96.7	96.7	96.7	96.2	97.8	96.2	97.8	94.0	93.4	93.4	4	AHL29093.1	
	5	8.1	7.5	8.1	7.5	100	92.3	84.7	91.8	91.8	91.8	91.3	91.8	90.2	91.8	91.8	92.9	92.3	5	AHX98333.1	
	6	6.9	4.5	6.9	4.5	8.1	100	89.6	94.5	94.5	93.4	94.0	95.6	95.1	94.5	94.5	92.9	93.4	6	AWN09305.1	
	7	15.8	11.2	15.8	11.2	17.2	11.2	100	90.2	90.2	88.5	89.1	89.6	90.2	88.5	88.5	85.2	85.2	7	AWN09306.1	
	8	8.7	3.4	8.7	3.4	8.7	5.7	10.6	100	97.8	98.4	96.7	97.3	95.6	95.6	92.3	92.3	8	AWN09307.1		
	9	8.7	3.4	8.7	3.4	8.7	5.7	10.6	0.0	100	97.8	98.4	96.7	97.3	95.6	95.6	92.3	92.3	9	AWN09308.1	
	10	8.7	3.4	8.7	3.4	8.7	6.9	12.5	2.2	2.2	100	98.4	95.6	96.2	96.7	96.7	92.3	93.4	92.3	10	AWN09309.1
	11	8.7	3.9	8.7	3.9	8.7	6.3	11.8	1.7	1.7	97.3	100	97.8	96.2	96.2	92.3	94.0	91.8	11	AWN09310.1	
	12	7.5	2.2	7.5	2.2	8.7	4.5	11.2	3.4	3.4	4.5	2.8	100	97.3	97.8	97.8	92.3	93.4	92.3	12	AWN09311.1
	13	8.7	3.9	8.7	3.9	10.6	5.1	10.6	2.8	2.8	3.9	2.2	2.8	100	96.2	96.2	91.3	91.8	90.7	13	AWN09312.1
	14	7.5	2.2	7.5	2.2	8.7	5.7	12.5	4.5	4.5	3.4	3.9	2.2	3.9	100	92.3	93.4	92.3	14	AWN09313.1	
	15	7.5	2.2	7.5	2.2	8.7	5.7	12.5	4.5	4.5	3.4	3.9	2.2	3.9	0.0	100	92.3	93.4	92.3	15	AWN09314.1
	16	1.7	6.3	1.7	6.3	7.5	7.5	16.5	8.1	8.1	8.1	8.1	8.1	8.1	8.1	8.1	100	93.4	93.4	16	AWN09315.1
	17	8.7	6.9	8.7	6.9	8.1	6.9	16.5	8.1	8.1	6.9	6.9	6.9	6.9	6.9	6.9	6.9	100	92.9	17	BAX30159.1
	18	7.5	6.9	7.5	6.9	0.5	7.5	16.5	8.1	8.1	8.1	8.1	8.1	8.1	8.1	8.1	6.9	7.5	18	QH-3.pro	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18			

图 6 ORFV E3L 蛋白氨基酸序列的距离矩阵

Fig. 6 Distance of E3L protein in different ORFV strains



Hh α -螺旋 Ee 延伸链 Tt β -转角 Cc 无规则卷曲

图 7 ORFV E3L 蛋白二级结构分析

Hh α -helix Ee Extended strand Tt β -turn Cc Random coil

Fig. 7 Secondary Structure Analysis of the ORFV E3L Protein

4.2 信号肽、跨膜结构域、磷酸化位点、糖基化位点

SignalP5.0 预测 ORFV E3L 蛋白无信号肽。TMHMM2.0 预测 ORFV E3L 蛋白不存在跨膜结构域, 该蛋白氨基酸均位于膜外侧。NetPhos3.1 预测 ORFV E3L 蛋白存在 15 个磷酸位点, 分别为 Ser⁷、Ser³²、Thr³⁶、Ser⁴⁶、Ser⁶⁶、Ser⁷⁵、Thr⁸²、Thr⁸⁸、Thr⁹⁸、Ser¹⁰¹、Ser¹⁰⁷、Thr¹²¹、Thr¹³⁰、Ser¹³²、Ser¹⁵⁹ (图 8)。NetNGlyc-1.0 预测 ORFV E3L 蛋白存在 7 个潜在糖基化位点, 分别位于 37、55、74、10、115、156 位、177 位的氨基酸 (图 9)。

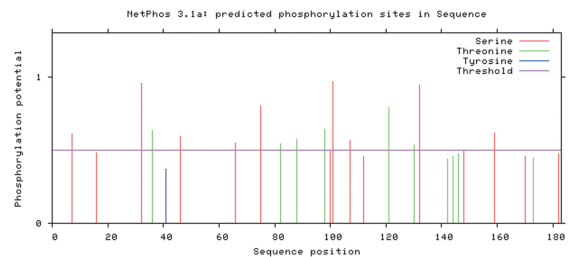


图 8 ORFV E3L 蛋白磷酸位点预测

Fig. 8 Phosphorylation site prediction results of ORFV E3L

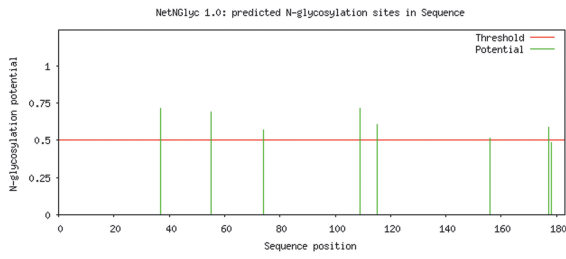


图9 ORFV E3L糖基化位点预测
Fig. 9 Prediction of ORFV E3L glycosylation sites

4.3 抗原表位 通过IEDB的Bepipred 2.0对ORFV E3L蛋白B细胞表位预测,阈值设定为0.5。通过SYFPEITHI在线软件,选用参数HLA-A*0201预测CTL细胞抗原表位,长度为9个氨基酸,阈值设定为23;选用参数HLA-DRB1*0401预测Th细胞抗原表位,长度为15个氨基酸,阈值设定为26^[16]。结果显示ORFV E3L有5个B细胞表位(表2),2个细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)表位和3个Th抗原表位(表3)。

表2 ORFV E3L B细胞抗原表位预测
Table 2 B cell epitopes prediction results of ORFV E3L

编号 No.	开始 Start	结束 End	多肽 Peptide	长度(bp) Length
1	15	21	KSGDKLP	7
2	29	38	LGISKHETNR	10
3	45	107	DSDDVCCEDGNPPRWFVECAPSAPAEEDENS DAPMETEAGCDTLFGGDIDIMTQSSVIRLKS	63
4	127	139	FCETRSGGEDHCP	13
5	152	162	VAAANGASKKL	11

表3 T细胞抗原表位预测
Table 3 Prediction results of T cell epitopes

表位类型 The type of epitope	起始点 Initial point	序列 Sequence	分数 Score
CTL表位	12	LLQKSGDKL	24
	88	TLFGGDIDI	23
Th表位	38	RQLYRMLDSDVCCCE	28
	58	RWFVECAPSAPAEED	26
	148	SGKVVAANGASKKL	26

讨论

近年来,羊口疮在国内的发生呈上升趋势^[17]。羊口疮作为一种重要的人兽共患病可通过接触传播,不仅对羊养殖业造成巨大经济损失,还可能危害人类健康,故被认为是重大公共卫生问题。对羊口疮病毒基因组中单个基因的研究,有助于进一步了解羊口疮病毒,进而为疫苗的研制提供依据。

本研究从羊口疮病毒QH-3株中PCR扩增得到020基因,将其构建至真核表达载体,在HeLa细胞中表达的ORFV E3L蛋白有两种异构体,分别为全长型和短亚型,可能与核糖体的扫描泄漏有关。从单个mRNA转录产物翻译生成多种蛋白质,与以下几种病

毒蛋白相似;禽呼肠孤病毒的S1基因具有3个连续的开放阅读框,它们彼此部分重叠,可从不同的翻译起始位点编码3种蛋白质中的两种,即p10和p17^[18];16型人乳头瘤病毒通过核糖体扫描泄漏从E6/E7双顺反子mRNA中产生E7蛋白^[19];痘苗病毒E3L基因编码两种分子质量分别为25 ku和20 ku的VACV E3L^[20]。

亚细胞定位表明该基因编码的E3L蛋白定位于细胞核和细胞质中,与痘病毒E3家族成员中痘苗病毒E3L蛋白和粘液瘤病毒M029蛋白相似^[21-22]。由于所有痘病毒都只在细胞质中复制和转录其基因组,且细胞质是病毒dsRNA产生的主要场所,因此ORFV E3L定位于细胞质中可增加其与dsRNA和PKR相互作用的可能性。

蛋白磷酸化和糖基化在病毒感染过程中扮演重要角色^[23]。磷酸化的一个重要机制是调节蛋白质功能,并控制着细胞增殖、分化等生命活动^[24]。采用生物信息学方法预测ORFV E3L蛋白存在15个激酶磷酸化修饰位点,其中有9个丝氨酸磷酸化位点,6个苏氨酸磷酸化位点,7个潜在N-糖基化位点。表明该蛋白可能影响细胞的增殖与分化。

蛋白质的二级结构与抗原表位的形成关系十分密切。抗原表位是指在免疫应答过程中能被特异的效应分子或B、T淋巴细胞所识别的抗原分子中具有特殊结构与免疫活性的化学基团,抗原表位可分为T细胞抗原表位和B细胞抗原表位^[25-26]。ORFV E3L的二级结构预测结果显示,该蛋白形成 α 螺旋较多, β 折叠较少,这可能与该蛋白的氨基酸组成有关。 α 螺旋占比较高能更好地维持蛋白的高级结构,但会影响其与抗体嵌合,且这些结构常位于蛋白质内部,因而这些区域很少形成抗原表位^[27]。该蛋白具有较多的无规则卷曲结构,这些结构较易扭曲、盘旋并呈现在蛋白表面,故更有利于抗体嵌合,这些区域常含有B细胞优势抗原表位。

预测ORFV E3L含有多个抗原表位,可能具有免疫原性,可作为潜在抗原用于诊断方法的建立与疫苗的研制。预测B细胞优势表位为15-21、29-38、45-107、127-139、152-162肽段,其中45-107肽段是最大的一段B细胞抗原表位,这可能与该肽段的亲水性、表面可接及性以及三级结构等有关;CTL表位为12-20、88-96肽段;Th表位为38-52、58-72、148-162肽段。其中B细胞、CTL联合表位为15-20、88-96、152-154肽段;B细胞、Th联合表位为45-52、58-72、152-162;B细胞、CTL、Th联合表位为152-154肽段。表明宿主在感染羊口疮病毒过程中,ORFV E3L蛋白可诱导机体产生细胞免疫和体液免疫,为ORFV亚单位

疫苗研发提供了方向。同时,不同 ORFV 毒株同源性比较显示该蛋白高度保守,提示 ORFV E3L 蛋白具有成为稳定抗原的潜力。

生物信息学预测 ORFV E3L 蛋白定位于细胞核和细胞质,含有多个抗原表位,可能具有免疫原性。该蛋白高度保守,具有成为优势保护性抗原的潜力。克隆表达的 ORFV E3L 蛋白有两种异构体。为进一步揭示 ORFV E3L 蛋白的功能奠定了基础,为 ORFV 诊断方法的建立及疫苗的研制提供理论依据。

【参考文献】

- [1] Weber O, Siegling A, Friebe A, et al. Inactivated parapoxvirus ovis (Orf virus) has antiviral activity against hepatitis B virus and herpes simplex virus[J]. *J Gen Virol*, 2003, 84(Pt 7):1843-1852.
- [2] Bohelay G, Duong TA. Human poxvirus infections[J]. *Ann Dermatol Venereol*, 2019, 146(5):387-398.
- [3] Bayindir Y, Bayraktar M, Karadag N, et al. Investigation and analysis of a human orf outbreak among people living on the same farm[J]. *New Microbiol*, 2011, 34(1):37-43.
- [4] Hosamani M, Scagliarini A, Bhanuprakash V, et al. Orf: an update on current research and future perspectives[J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2009, 7(7):879-893.
- [5] Key SJ, Catania J, Mustafa SF, et al. Unusual presentation of human giant orf (ecthyma contagiosum)[J]. *J Craniofac Surg*, 2007, 18(5):1076-1078.
- [6] 向华, 黄忍, 朱江江, 等. 羊口疮病毒 ORFV129 锚蛋白在山羊睾丸细胞中的亚细胞定位[J]. *华北农学报*, 2020, 35(4):222-229.
- [7] Bala JA, Balakrishnan KN, Abdullah AA, et al. The re-emerging of orf virus infection: A call for surveillance, vaccination and effective control measures[J]. *Microb Pathog*, 2018(120):55-63.
- [8] Bergqvist C, Kurban M, Abbas O. Orf virus infection[J]. *Rev Med Virol*, 2017, 27(4):105-109.
- [9] McKeever DJ, Reid HW, Inglis NF, et al. A qualitative and quantitative assessment of the humoral antibody response of the sheep to orf virus infection[J]. *Vet Microbiol*, 1987, 15(3):229-241.
- [10] Smith GL, Benfield CTO, Maluquer de Motes C, et al. Vaccinia virus immune evasion: mechanisms, virulence and immunogenicity[J]. *J Gen Virol*, 2013, 94(Pt 11):2367-2392.
- [11] Brandt T, Heck MC, Vijaysri S, et al. The N-terminal domain of the vaccinia virus E3L-protein is required for neurovirulence, but not induction of a protective immune response[J]. *Virology*, 2005, 333(2):263-270.
- [12] Chang HW, Jacobs BL. Identification of a conserved motif that is necessary for binding of the vaccinia virus E3L gene products to double-stranded RNA[J]. *Virology*, 1993, 194(2):537-547.
- [13] Kim YG, Muralinath M, Brandt T, et al. A role for Z-DNA binding in vaccinia virus pathogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(12):6974-6979.
- [14] Ando J, Ngo MC, Ando M, et al. Identification of protective T-cell antigens for smallpox vaccines [J]. *Cytotherapy*, 2020, 22(11):642-652.
- [15] Tseng YY, Lin FY, Cheng SF, et al. Functional analysis of the short isoform of orf virus protein OV20.0 [J]. *J Virol*, 2015, 89(9):4966-4979.
- [16] 李莎莎, 陶佳, 吕咏雪, 等. 细粒棘球绦虫原头节抗原 Eg-00512 的生物信息学分析[J]. *中国病原生物学杂志*, 2022, 17(1):71-74, 113.
- [17] 常亮. 甘肃东部地区羊传染性脓疱皮炎病的调查及防治试验[J]. *西北农业学报*, 2021, 30(11):1618-1622.
- [18] Racine T, Barry C, Roy K, et al. Leaky scanning and scanning-independent ribosome migration on the tricistronic S1 mRNA of avian reovirus [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(35):25613-25622.
- [19] Stacey SN, Jordan D, Williamson AJ, et al. Leaky scanning is the predominant mechanism for translation of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein from E6/E7 bicistronic mRNA [J]. *J Virol*, 2000, 74(16):7284-7297.
- [20] Chang HW, Watson JC, Jacobs BL. The E3L gene of vaccinia virus encodes an inhibitor of the interferon-induced, double-stranded RNA-dependent protein kinase [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, 89(11):4825-4829.
- [21] Chang HW, Uribe LH, Jacobs BL. Rescue of vaccinia virus lacking the E3L gene by mutants of E3L [J]. *J Virol*, 1995, 69(10):6605-6608.
- [22] Rahman MM, Liu J, Chan WM, et al. Myxoma virus protein M029 is a dual function immunomodulator that inhibits PKR and also conscripts RHA/DHX9 to promote expanded host tropism and viral replication [J]. *PLoS Pathog*, 2013, 9(7):e1003465.
- [23] 郝锐, 刘仟仟, 王璐, 等. 乙型肝炎病毒核心蛋白序列特征的生物信息学分析[J]. *中国病原生物学杂志*, 2022, 17(1):31-36, 42.
- [24] Kovarova H, Hajduch M, Livingstone M, et al. Analysis of state-specific phosphorylation of proteins by two-dimensional gel electrophoresis approach [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2003, 787(1):53-61.
- [25] Soria-Guerra RE, Nieto-Gomez R, Govea-Alonso DO, et al. An overview of bioinformatics tools for epitope prediction: implications on vaccine development [J]. *J Biomed Inform*, 2015(53):405-414.
- [26] 王芬, 胡容, 李龙, 等. 细粒棘球绦虫胰岛素受体蛋白的生物信息学分析[J]. *中国病原生物学杂志*, 2020, 15(11):1295-1298.
- [27] 周晓涛, 周文涛, 杨晨晨, 等. EM18-GST 原核表达载体的构建及空间结构的生物信息学分析[J]. *中国病原生物学杂志*, 2013, 8(10):899-902.

【收稿日期】 2022-10-30 【修回日期】 2022-12-15