

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (7) :813 - 820; 4 July 2014
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.07.012

表达羊传染性脓疱病毒 F1L 基因的重组山羊痘病毒的构建与特性鉴定

张倩[#], 王震[#], 张辉^{*}, 李瑞芳, 纪太旺, 赵庆亮, 陈创夫^{*}

石河子大学动物科技学院, 新疆 石河子 832000

摘要:【目的】本文旨在构建可表达羊传染性脓疱病毒 F1L 基因的重组山羊痘病毒, 并对其生物学特性进行初步研究。【方法】将羊传染性脓疱病毒 F1L 基因与转移载体 pUC-TK12 连接, 同时插入 LacZ 报告基因和一双向启动子; 将重组转移载体转染已接种山羊痘病毒的 BHK-21 细胞, 通过蓝白斑筛选、纯化, 对重组病毒进行连续传代培养, 应用 PCR、间接免疫荧光和 Western 免疫印迹等方法进行鉴定, 并对重组病毒进行不同温度、酸碱度、有机溶剂和紫外照射等处理, 进行 TCID₅₀ 评价。rGpv-F1L 免疫小鼠后, 经酶联免疫吸附实验检测其特异性抗体水平。【结果】成功构建重组病毒转移载体 pTL-F1L, 将转移载体转染 BHK-21 细胞后, 通过蚀斑纯化获得了可稳定遗传的 rGpv-F1L。间接免疫荧光和 Western 免疫印迹检测发现其可稳定表达 F1L 蛋白。55℃30min 或紫外照射 1h 即可灭活重组病毒, 且其对强酸、强碱、有机溶剂等较敏感。接种重组山羊痘病毒的小鼠 40d 内机体可持续产生高水平的特异性抗体, 与接种 Gpv 病毒组相比差异极显著 ($P < 0.01$)。【结论】本文获得了可稳定表达羊传染性脓疱病毒 F1L 的重组山羊痘病毒疫苗候选株, 其具有良好的抗原性和生物学活性, 为同时预防羊传染性脓疱病和羊痘提供新途径。

关键词:羊传染性脓疱病毒 (Orfv), F1L 基因, 重组山羊痘病毒, 生物学特性

中图分类号:S852 **文章编号:**0001-6209 (2014) 07-0813-08

羊传染性脓疱病 (Contagious ecthyma, CE) 亦称羊口疮 (Orf), 是由羊传染性脓疱病毒 (Orf virus, Orfv) 引起的一种绵羊或山羊接触性、嗜上皮性传染病^[1]。主要感染羔羊和幼羊, 临床表现以口唇、舌、鼻、乳房等皮肤和黏膜部位形成丘疹、结节、水疱、脓疱、溃疡和疣状厚痂为主要特征^[2]; 本病自身症状轻微, 但由于病畜采食障碍, 常继发或混合感染其他病原菌, 从而引发较高的病死率。目前, 该病广泛流

行于养羊业发达的国家和地区, 在我国主要分布在甘肃、宁夏、内蒙、新疆、青海等地区, 常呈群发性流行^[3]; 同时也可感染人类, 作为一种人畜共患传染病^[4-5], 其不仅严重危害我国畜牧业发展, 造成巨大的经济损失, 也严重威胁着人类生存健康。因此预防该病的新型疫苗的研究迫在眉睫。羊传染性脓疱病毒 ORF059 基因编码 39kDa 的 F1L 蛋白, 是主要的肝素结合活性蛋白, 能够与大多数哺乳动物细胞

基金项目: 国家“973 项目” (2010CB30203); 国家自然科学基金 (30560109)

^{*} 通信作者。Tel: +86-993-2058002; Fax: +86-993-2058031; E-mail: ccf-xb@163.com, allanzhh@yahoo.com

作者简介: [#] 对本文有同等贡献。张倩 (1988 -), 女, 山东潍坊人, 硕士研究生, 主要从事畜禽病原分子生物学研究, E-mail: 845614587@qq.com; 王震 (1987 -), 男, 山东潍坊人, 博士研究生, 主要从事免疫遗传与抗病机理研究, E-mail: wangzhen6561806@163.com

收稿日期: 2013-10-23; 修回日期: 2014-01-16

表面表达的硫酸乙酰肝素受体结合,因此认为该蛋白在病毒吸附和入侵过程中起非常重要的作用^[6-8]。同时该蛋白还是 Orfv 囊膜蛋白的重要组成部分,是主要的免疫优势抗原,其既可以诱导宿主产生保护性中和抗体,也可以通过阻止 Orfv 吸附宿主细胞而发挥免疫保护作用,从而利于机体清除病原体。因此,其成为 Orfv 新型亚单位疫苗研究的标准抗原^[9]。

目前,痘病毒包括山羊痘病毒(Goat pox virus, Gpv)作为表达载体可保持蛋白的天然构象和生物学活性,其有效性已被大量研究所证实^[10-12]。因此,本研究选择 Orfv 的 F1L 基因为目的基因,构建可高效表达 F1L 蛋白的重组山羊痘病毒,并对其遗传稳定性、理化特性和免疫原性进行检测和评价,为今后制备羊传染性脓疱-羊痘基因工程活载体疫苗奠定基础,使同时预防山羊痘和羊传染性脓疱病成为可能。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 感受态细胞购自上海生物工程技术服务有限公司

公司;pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司;pUC-TK12-LacZ 载体由本实验室构建和保存。

1.1.2 病毒和细胞:山羊痘弱毒疫苗购自新疆天康畜牧生物技术股份有限公司;6-8 周龄雌鼠购自实验动物中心;Orfv-shz 分离株由本实验室分离鉴定;BHK-21 细胞、vero 细胞由本实验室保存。

1.1.3 主要试剂和仪器:Taq DNA 聚合酶、dNTP、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA Marker 和病毒 DNA 提取试剂盒均购自 TaKaRa 公司;Lipofectamine 2000 和 Trizol 试剂购自美国 Invitrogen 公司;Goat anti-Mouse IgG-HRP 购自美国 Bioworld 公司;低熔点琼脂糖、X-gal 和各种抗生素均购自德国 Sigma 公司;DMEM 和胎牛血清购自美国 Gibco 公司;无内毒素质粒大提试剂盒、质粒小提试剂盒、普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒及超纯 RNA 提取试剂盒购自天根生物技术有限公司;其余试剂均为国产分析纯。PCR 仪,德国 Eppendorf;核酸电泳仪、凝胶成像仪,美国 Bio-Rad 公司;微量核酸蛋白分析仪,美国 Thermo 公司;sunrise 酶标仪,奥地利 Tecan 公司。

1.2 引物

本实验研究所用引物均根据 GenBank 中公布的序列,使用 Primer5.0 设计,由上海生工生物技术服务有限公司合成。序列见表 1。

表 1. PCR 引物序列

Table 1. Primers and sequence

| primer | sequence (5'→3') | restriction site | size /bp |
|--------|------------------------------|------------------|----------|
| F1L-F | CCCGGGATGGATCCACCCGAAATCA CG | <i>Sma</i> I | 1023 bp |
| F1L-R | CCCGGGTACACGATGGCCGTGACCA | <i>Sma</i> I | |
| P1 | ATTGACCGTAATGGGATAGG | | |
| P2 | CGGATTGACCGTAATGGGATA | | |

1.3 重组转移载体 pUC-TK12-LacZ-F1L 的构建

1.3.1 F1L 基因的克隆与测序:参照 Mini BEST Viral RNA/DNA Extraction Kit 说明书提取羊传染性脓疱病毒基因组,并以其为模版扩增 F1L 基因,经琼脂糖凝胶回收后与 pMD18-T 连接,转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,挑取单菌落进行培养,提取质粒后经 PCR 和酶切鉴定后送华大基因测序,将测序正确的质粒命名为 pMD18-T-F1L。

1.3.2 重组转移载体 pTL-F1L 的构建与鉴定:用限制性内切酶 *Sma* I 分别对 pUC-TK12-LacZ 质粒和 pMD18-T-F1L 质粒进行酶切,经 T4 DNA 连接酶连接,转化,经菌液 PCR 检测和酶切验证后送华大基

因进行测序,并用 P1、P2 作为测序引物鉴定转移载体与 F1L 基因的连接方向。将测序正确的质粒命名为 pUC-TK12-LacZ-F1L,简称 pTL-F1L。

1.4 重组山羊痘病毒 rGpv-F1L 的构建、筛选及鉴定

1.4.1 重组山羊痘病毒 rGpv-F1L 的构建和筛选:将重组转移质粒按转染试剂 Lipofectamine 2000 操作步骤转染至已感染 Gpv 疫苗株的 BHK-21 细胞中,进行同源重组,待出现明显细胞病变效应(cytopathic effect, CPE)时,收获病毒液。将获得的病毒液继续感染细胞,并通过 LacZ 筛选标记在含有 X-gal 的低熔点琼脂上挑取蓝色病毒蚀斑,如此反复

纯化 5 代, 得到重组山羊痘病毒 rGpv-F1L。

1.4.2 rGpv-F1L 的初步鉴定: 参照 Mini BEST Viral RNA/DNA Extraction Kit 提取第 5 代重组山羊痘病毒的 DNA, 对目的基因 F1L 进行 PCR 鉴定。

1.5 重组山羊痘病毒遗传稳定性检测

将重组山羊痘病毒按照上述方法进行连续的蓝白斑筛选, 纯化至第 20 代, -80°C 冰箱保存、备用。

1.5.1 重组山羊痘病毒 DNA 水平的检测: 将第 20 代重组山羊痘病毒感染 vero 细胞后收集病毒液, 使用 Mini BEST Viral RNA/DNA Extraction Kit 提取病毒 DNA, 对 F1L 基因进行 PCR 验证。同时将扩增后的目的基因与 pMD18-T 连接, 送华大基因测序检测其有无碱基的突变。

1.5.2 重组山羊痘病毒 RNA 水平的检测: 重组山羊痘病毒感染 vero 细胞后, 待出现明显细胞病变时加入 Trizol 进行处理, 按照超纯 RNA 提取试剂盒提取总 RNA, 反转录为 cDNA, 对目的基因 F1L 进行检测。

1.5.3 重组山羊痘病毒间接免疫荧光试验: 重组山羊痘病毒接种 vero 细胞后, 待出现明显细胞病变时, 加入多聚甲醛 4°C 固定 30min, PBS (由 NaCl, KCl, Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 配制而成) 漂洗细胞后加入羊口疮病毒阳性血清 37°C 反应 2 h, 再用 PBS 洗涤 3 次。然后加入异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的二抗 37°C 反应 1 h, PBS 漂洗后置于荧光显微镜下观察。

1.5.4 重组山羊痘病毒 Western blot 检测: 重组山羊痘病毒接种 vero 细胞, 36 - 48 h 后收获细胞, 用细胞裂解液 RIPA 裂解细胞。SDS-PAGE 凝胶电泳后转移到硝酸纤维素膜上, 以羊口疮病毒阳性血清为一抗、辣根过氧化物酶标记的二抗进行 Western blot 检测。

1.6 重组山羊痘病毒的理化特性检测

1.6.1 重组山羊痘病毒耐热试验: 将重组山羊痘病毒悬液分别置于 37°C 、 50°C 、 55°C 和 60°C 水浴中, 每个温度各作用 15 min、30 min、45 min 和 1 h, 然后按照 Reed-Muench 法测定 TCID_{50} ^[13]。

1.6.2 重组山羊痘病毒耐酸、耐碱试验: 分别将重组山羊痘病毒悬液经 pH 值为 3、5、7、9 和 11 的 PBS 处理 30min 和 1h, 然后按上述方法测定 TCID_{50} ^[13]。

1.6.3 重组山羊痘病毒对氯仿、乙醚的敏感性试验: 重组山羊痘病毒悬液经终浓度为 20% 的氯仿

4°C 作用 10min, 取上清液测定 TCID_{50} 。重组山羊痘病毒经终浓度为 20% 乙醚 4°C 处理数小时后, 取下层病毒液测定 TCID_{50} ^[13]。

1.6.4 重组山羊痘病毒对紫外线的敏感性试验: 重组山羊痘病毒液于垂直距离 50 cm、20 W 的紫外灯下分别照射 15、30、45 和 1 h, 然后按照上述方法测定 TCID_{50} ^[13]。

1.6.5 敏感性试验判定标准: 在外部作用条件下, 实验组病毒滴度比对照组病毒滴度降低 2 个滴度及以上, 判断病毒对作用条件敏感, 降低 2 个滴度以下, 判断病毒对该作用条件有一定的抵抗力^[14]。

1.7 重组山羊痘病毒 rGpv-F1L 免疫原性的检测

分别用山羊痘病毒疫苗和重组山羊痘病毒 rGpv-F1L 免疫 6 - 8 周龄小鼠, 每只以 $104.5\text{TCID}_{50}/100\ \mu\text{L}$ 剂量皮下注射。免疫后每 10d 断尾采血, 分离血清, 进行间接 ELISA 检测。以感染 vero 细胞的羊传染性脓疱病毒为包被抗原, 经包被液 (NaHCO_3 缓冲液, pH9.6) 稀释后, 按 $100\ \mu\text{L}/\text{孔}$ 4°C 包被过夜。用含 2% BSA 的封闭液 37°C 封闭 2 h, 清洗后加入一抗血清, 37°C 孵育 1h。再次清洗后加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 的二抗, 洗涤后, 加入底物溶液 (TMB) 避光显色 15 min, 2 mol/L 硫酸终止反应后, 测定 OD_{450} 值。

2 结果

2.1 重组转移载体 pTL-F1L 的构建及鉴定

以羊传染性脓疱病毒基因组为模板对 F1L 基因进行扩增, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 获得了大小约为 1023 bp 的特异性条带。将 F1L 目的片段与转移载体 pUC-TK12-LacZ (pTL) 连接、转化后, 对阳性克隆菌的质粒进行酶切验证, 获得了预期大小的目的条带。阳性菌送华大基因测序, 结果显示我们成功获得了重组转移载体 pTL-F1L。

2.2 重组山羊痘病毒 rGpv-F1L 的筛选与初步鉴定

2.2.1 重组山羊痘病毒的筛选: BHK-21 细胞接种山羊痘弱毒株病毒 48 - 72 h 后, 细胞形态由梭形逐渐变圆, 体积缩小, 且不断聚集, 进而逐渐脱落 (图 1-B)。将重组转移载体 pTL-F1L 转染至已感染山羊痘弱毒苗的 BHK-21 细胞, 待出现明显细胞病变时, 收获病毒液; 并通过 LacZ 报告基因在含有 X-gal

的低熔点琼脂上挑取蓝色病毒蚀斑,经过多轮筛选纯化后,在第五代病毒液中可观察到 90% 以上的蓝

色蚀斑(图 1-G),表明我们获得了较纯的重组山羊痘病毒 rGpv-F1L。

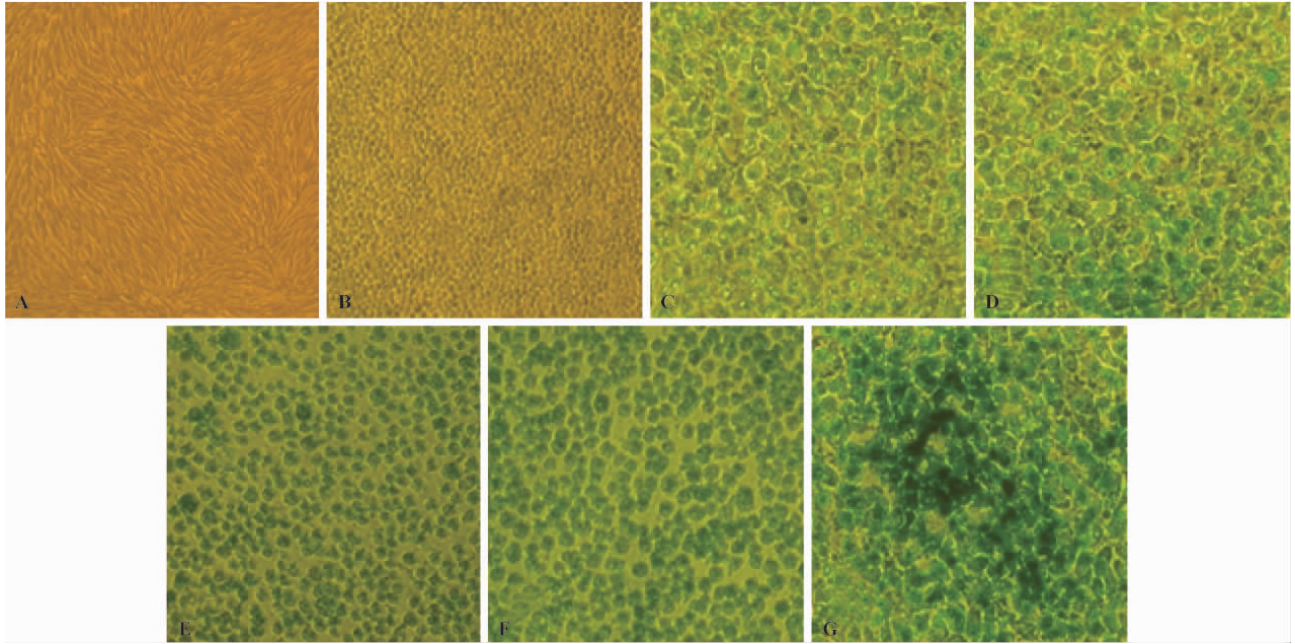


图 1. rGpv-F1L 的蚀斑筛选

Figure 1. Plaque screening of rGpv-F1L. A: Regular BHK-21 cell (100 ×); B: Pathological BHK-21 cell (100 ×); C-G: Blue plaques of 1 – 5 generations (100 ×).

2.2.2 重组山羊痘病毒的初步鉴定:以第 5 代重组山羊痘病毒 DNA 为模板对 F1L 基因进行 PCR 鉴定,结果显示:我们获得了与预期片段长度一致的特异性条带,大小约为 1023 bp。表明 F1L 基因已成功重组到山羊痘弱毒株病毒的基因组中。

2.3 重组山羊痘病毒的遗传稳定性检测

2.3.1 重组山羊痘病毒基因水平的检测:分别以纯化 20 代后的重组山羊痘病毒的 DNA 和 RNA 为模板,对目的基因 F1L 进行检测,均获得了预期大小的特异性目的条带,表明重组山羊痘病毒的 F1L 基因能够在 BHK-21 细胞中进行稳定的复制和转录。同时测序结果表明,目的基因 F1L 在重组病毒中无变异现象,遗传稳定性良好。

2.3.2 重组山羊痘病毒的间接免疫荧光检测:重组病毒感染 vero 细胞后,进行间接免疫荧光试验,结果显示,感染重组山羊痘病毒的 vero 细胞出现特异性的绿色荧光,说明重组山羊痘病毒 F1L 基因能够在 vero 细胞中表达。而阴性对照组中,接种山羊痘弱毒株病毒的 vero 细胞未呈现绿色荧光反应(图 2)。

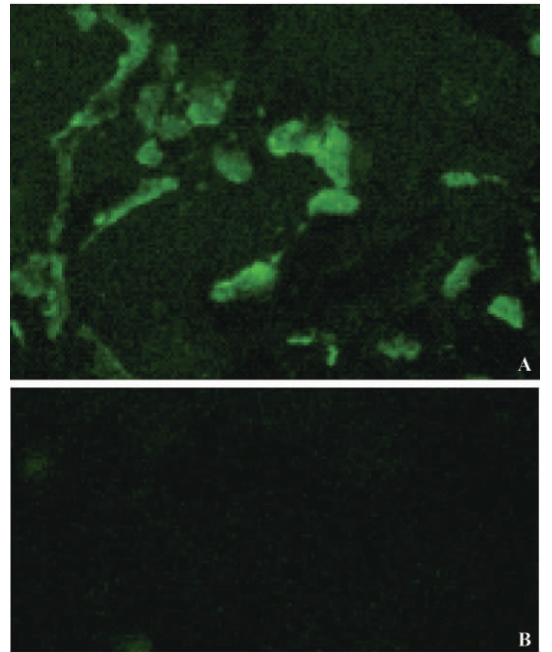


图 2. rGpv-F1L 和 Gpv 感染的 vero 细胞的间接免疫荧光检测

Figure 2. IFA result of infection cell by rGpv-F1L and Gpv. A: IFA result of infection by rGpv-F1L; B: IFA result of infection by Gpv.

2.3.3 重组山羊痘病毒 F1L 的蛋白印迹检测: 重组山羊痘病毒感染细胞后, 待出现明显细胞病变时, 裂解细胞, 用羊传染性脓疱病毒阳性血清作为一抗进行蛋白印迹检测。结果显示, 在 39kDa 处可见一特异性条带, 说明重组山羊痘病毒在细胞中表达了 F1L 蛋白 (图 3)。

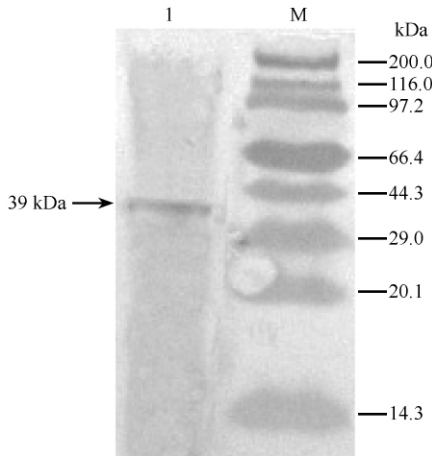


图 3. rGpv-F1L 表达 F1L 的 Western blot

Figure 3. Western blot result of rGpv-F1L. Lane 1, rGpv-F1L; M, Protein marker.

2.4 重组山羊痘病毒的理化特性检测

2.4.1 重组山羊痘病毒的热敏感性试验: 不同温度处理的重组病毒接种细胞后, 统计细胞病变, 依据 Reed-Muench 方法计算 TCID₅₀。从表 2 中可以看出, 重组病毒经 50℃ 水浴作用 1h、55℃ 水浴作用 30min 或 60℃ 水浴 15min, 即可被灭活 (表 2)。

2.4.2 重组山羊痘病毒的酸碱敏感性试验: 重组病毒 rGpv-F1L 经 pH 值为 3、5、7、9 及 11 的 PBS, 37℃ 分别作用 30 min 和 1 h。其对 BHK 细胞的感染性结果显示: 在 pH 为 5 和 9 溶液中作用 1 h, 重组病毒仍具有一定的耐受性, 而 pH 值为 3 和 11 时, 其对重组病毒具有一定的灭活效果 (表 3)。

2.4.3 重组山羊痘病毒对有机溶剂的敏感性试验: 分别经乙醚和氯仿处理的重组病毒, 感染细胞, 测定 TCID₅₀。结果显示: 病毒经乙醚或氯仿处理后, 病毒滴度均呈现明显下降趋势, 说明该重组病毒对乙醚和氯仿等有机溶剂较敏感 (表 4)。

表 2. 重组山羊痘病毒经不同温度处理后对 BHK 细胞的感染性

Table 2. Recombinant virus titer of determination deal with heating

| T / °C | time | virus titer (LogTCID ₅₀ / 0.1 mL) |
|--------|--------|--|
| 37 | 15 min | 7.38 |
| | 30 min | 7.30 |
| | 45 min | 7.37 |
| | 1 h | 7.13 |
| 50 | 15 min | 5.64 |
| | 30 min | 4.50 |
| | 45 min | 3.25 |
| | 1 h | - |
| 55 | 15 min | 2.88 |
| | 30 min | - |
| | 45 min | - |
| | 1 h | - |
| 60 | 15 min | - |
| | 30 min | - |
| | 45 min | - |
| | 1 h | - |

- : Representing inactivated viruses don't produce CPE.

表 3. 重组山羊痘病毒经不同 pH 处理后对 BHK 细胞的感染性

Table 3. Recombinant virus titer of determination deal with pH

| group | time | virus titer (LogTCID ₅₀ / 0.1 mL) |
|-------|--------|--|
| pH3 | 30 min | 2.88 |
| | 1 h | 2.63 |
| pH5 | 30 min | 4.38 |
| | 1 h | 4.00 |
| pH7 | 30 min | 6.25 |
| | 1 h | 6.50 |
| pH9 | 30 min | 4.88 |
| | 1 h | 4.25 |
| pH11 | 30 min | 3.37 |
| | 1 h | 2.75 |

表 4. 重组山羊痘病毒经乙醚、氯仿处理后对 BHK 细胞的感染性

Table 4. Recombinant virus titer of determination deal with ether and chloroform

| group | virus titer (LogTCID ₅₀ / 0.1 mL) |
|---------------|--|
| ether | 3.26 |
| control group | 7.12 |
| chloroform | 2.14 |
| control group | 7.15 |

2.4.4 重组山羊痘病毒对紫外线敏感性试验: 重组病毒在垂直距离 50cm, 功率为 20W 的紫外灯下照射不同时间后, 病毒滴度比对照组降低 2 个滴度以上, 说明该重组病毒对紫外照射较敏感 (表 5)。

表 5. 重组山羊痘病毒经紫外照射后对 BHK 细胞的感染性

Table 5. Recombinant virus titer of determination deal with rays

| group | time | virus titer (LogTCID ₅₀ /0.1mL) |
|-------------|--------|--|
| 20 W, 50 cm | 0 min | 7.23 |
| | 15 min | 5.38 |
| | 30 min | 4.25 |
| | 45 min | 2.63 |
| | 1 h | - |

- : Representing inactivated viruses don't produce CPE.

2.5 rGpv-F1L 免疫小鼠后特异性抗体水平检测

重组病毒 rGpv-F1L 免疫小鼠后, 分离血清, 进行间接 ELISA 检测。结果显示, 免疫 rGpv-F1L 的小鼠 40 d 内可产生较高水平的 F1L 特异性抗体, 与 Gpv 对照组相比差异极显著 ($P < 0.01$) (图 4)。

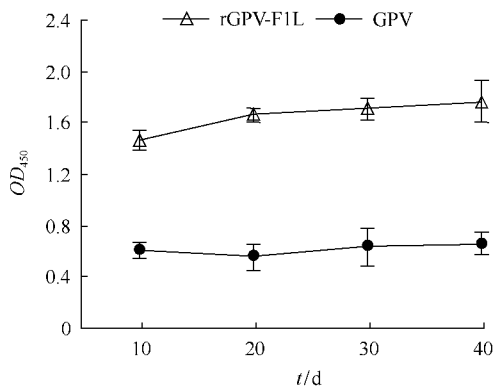


图 4. rGpv-F1L 免疫小鼠后特异性抗体水平

Figure 4. Levels of specific antibodies immunized rGpv-F1L in mice.

3 讨论

羊传染性脓疱病是一种急性、高度接触性的人兽共患病, 该病发病率高, 给我国养羊业造成巨大的经济损失, 同时也直接威胁着人类健康。目前用于预防羊传染性脓疱病的疫苗主要是弱毒疫苗, 其存在毒力返强、对易感动物有一定危险性、免疫效果易受多种因素影响且保存和运输具有一定限制等缺点。本研究以山羊痘病毒疫苗为载体构建可高效表达羊传染性脓疱病毒优势抗原基因 F1L 的重组二联活疫苗候选株 rGpv-F1L, 期望能同时预防山羊痘病毒和羊传染性脓疱病的感染, 实现一种疫苗预防两种疾病, 以便在生产和使用中比两种疫苗联合免疫产生更显著的效果^[15]。尤其重要的是, 重组山羊痘病毒 rGpv-F1L 活载体疫苗候选株可以与 Orfv

野毒感染相区别, 不干扰血清学检测, 克服了现有羊传染性脓疱病毒弱毒疫苗的缺陷。

羊传染性脓疱病毒与山羊痘病毒都属于痘病毒科, 有交叉免疫效果。同时其与山羊痘病毒具有相同或相似的宿主范围^[16]; 本研究使用的山羊痘病毒疫苗载体具有基因组结构庞大、可容纳较大外源基因、使用较安全等特点, 其进入机体后可自行复制, 并表达外源蛋白^[17]。国内外近年来有将 Gpv 作为疫苗载体的研究报道, 并有不少反刍兽类动物病毒的保护性抗原基因在 Gpv 疫苗载体表达系统中获得表达, 显示出了良好的应用前景^[18-20]。本文构建的重组山羊痘病毒转移载体含有一个来源于山羊痘病毒早期转录因子和中期转录因子起始密码子之间大小为 56 bp 的双向启动子, 能够高效的表达外源蛋白; 同时插入的报告基因可形成肉眼可见的蓝色病毒蚀斑, 为重组山羊痘病毒后续的筛选和纯化奠定了基础^[21]。

F1L 蛋白作为羊传染性脓疱病毒的主要优势结构抗原^[9], 在本文中我们通过蛋白印迹和间接免疫荧光检测均显示该重组病毒可稳定表达 F1L 蛋白, 且具有较强的反应原性。同时 rGpv-F1L 首免小鼠后即产生较高水平的 F1L 特异性抗体, 且免疫 40 d 后仍可产生较强的特异性抗体反应; 说明其具有较好的反应原性和免疫活性。刘忠伟等报道山羊痘疫苗免疫期可维持长达 6-12 个月^[22], 所以对于该重组病毒候选株后续特异性抗体水平的检测仍是必要的。

病毒对不同理化因子的抵抗力, 是鉴定病毒的一个重要依据。理化因子的作用, 或有益于病毒的生存, 或造成病毒某些生物学特性的改变, 或使病毒活性丧失。在本研究中我们对重组病毒的理化特性进行了评价, 发现该重组病毒对高热、强酸强碱、有机溶剂和紫外照射较敏感; 这对该候选疫苗的开发如存储、运输、免疫后的消毒工作等具有重要的指导意义。

本文构建了重组羊传染性脓疱病毒优势抗原基因 F1L 的山羊痘病毒, 并证实其具有一定的免疫活性, 使同时预防羊传染性脓疱病和羊痘成为可能, 为研发 Orfv 和 Gpv 双价疫苗奠定了基础。

参考文献

- [1] Mazur C, Ferreira II, Rangel Filho FB, Galler R. Molecular characterization of Brazilian isolates of orf virus. *Veterinary Microbiology*, 2000, 73 (4) : 253-259.
- [2] Fleming SB, Mercer AA. Poxviruses • Genus Parapoxvirus. Berlin: Springer, 2007: 127-165.
- [3] Zhao K, Song D, He W, Lu H, Zhang B, Li C, Chen K, Gao F. Identification and phylogenetic analysis of an Orf virus isolated from an outbreak in sheep in the Jilin province of China. *Veterinary Microbiology*, 2010, 142 (3-4) : 408-415.
- [4] Chan KW, Hsu WL, Wang CY, Yang CH, Lin FY, Chulakasian S, Wong ML. Differential diagnosis of orf viruses by a single-step PCR. *Journal of Virological Methods*, 2009, 160 (1-2) : 85-89.
- [5] Venkatesan G, Balamurugan V, Bora DP, Yogisharadhya R, Prabhu M, Bhanuprakash V. Sequence and phylogenetic analyses of an Indian isolate of orf virus from sheep. *Veterinaria Italiana*, 2011, 47 (3) : 323-332.
- [6] Gallina L, Scagliarini A, Ciulli S, Prosperi S. Cloning and expression of the Orf virus F1L gene: possible use as a subunit vaccine. *Veterinary Research Communications*, 2004, 28 (Suppl 1) : 291-293.
- [7] Scagliarini A, Gallina L, Dal Pozzo F, Battilani M, Ciulli S, Prosperi S. Heparin binding activity of orf virus F1L protein. *Virus Research*, 2004, 105 (2) : 107-112.
- [8] Zhao K, He W, Gao F, The research proress of orf virus. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2008, 35 (11) : 133-136. (in Chinese)
赵魁, 贺文琦, 高丰. 羊传染性脓疱皮炎病毒研究进展. 中国畜牧兽医, 2008, 35 (11) : 133-136.
- [9] Scagliarini A, Ciulli S, Battilani M, Jacoboni I, Montesi F, Casadio R, Prosperi S. Characterisation of immunodominant protein encoded by the F1L gene of orf virus strains isolated in Italy. *Archives of Virology*, 2002, 147 (10) : 1989-1995.
- [10] Ning Z, Peng Y, Hao W, Duan C, Rock DL, Luo S. Generation of recombinant Orf virus using an enhanced green fluorescent protein reporter gene as a selectable marker. *BMC Veterinary Research*, 2011, 7 (10) : 80.
- [11] Perrin A, Albina E, Breard E, Sailleau C, Prome S, Grillet C, Kwiatek O, Russo P, Thiery R, Zientara S, Cetre-Sossah C. Recombinant capripoxviruses expressing proteins of bluetongue virus: evaluation of immune responses and protection in small ruminants. *Vaccine*, 2007, 25 (37-38) : 6774-6783.
- [12] Chen S, Sun L, Liu W, Sun X, Liu X. Recombinant fowlpox virus coexpressing HA and NA gene from subtype H5N1 of avian influenza virus and its protective efficacy. *Acta Microbiologica Sinica*, 2006, 46 (1) : 111-114. (in Chinese)
陈素娟, 孙蕾, 刘武杰, 孙学辉, 刘秀梵. 共表达 H5 亚型禽流感病毒 HA 和 NA 基因的重组鸡痘病毒及其免疫效力. 微生物学报, 2006, 46 (1) : 111-114.
- [13] Thakur AK, Fezio WL. A computer program for estimating LD50 and its confidence limits using modified Behrens-Reed-Muench cumulant method. *Drug and Chemical Toxicology*, 1981, 4 (3) : 297-305.
- [14] 金明兰. 口蹄疫病毒基因重组鸡痘病毒活载体疫苗系统鉴定研究. 吉林大学学位论文, 2007.
- [15] Hosamani M, Singh SK, Mondal B, Sen A, Bhanuprakash V, Bandyopadhyay SK, Yadav MP, Singh RK. A bivalent vaccine against goat pox and Peste des Petits ruminants induces protective immune response in goats. *Vaccine*, 2006, 24 (35-36) : 6058-6064.
- [16] Kang W, Xu Z, Hua Q, Zhou X, Yang Y, Dong J. Cloning and expression of capripoxvirus P32 protein gene. *Veterinary Science in China*, 2006, 36 (06) : 454-459. (in Chinese)
康文玉, 徐自忠, 高洪, 花群义, 周晓黎, 杨云庆, 董俊. 羊痘病毒 P32 蛋白编码基因的克隆及表达. 中国兽医科学, 2006, 36 (06) : 454-459.
- [17] Tulman ER, Afonso CL, Lu Z, Zsak L, Sur JH, Sandybaev NT, Kerembekova UZ, Zaitsev VL, Kutish GF, Rock DL. The genomes of sheeppox and goatpox viruses. *Journal of Virology*, 2002, 76 (12) : 6054-6061.
- [18] Berhe G, Minet C, Le Goff C, Barrett T, Ngangnou A, Grillet C, Libeau G, Fleming M, Black DN, Diallo A. Development of a dual recombinant vaccine to protect small ruminants against peste-des-petits-ruminants virus and capripoxvirus infections. *Journal of Virology*, 2003, 77 (2) : 1571-1577.
- [19] Diallo A, Minet C, Berhe G, Le Goff C, Black DN, Fleming M, Barrett T, Grillet C, Libeau G. Goat immune response to capripox vaccine expressing the hemagglutinin protein of peste des petits ruminants. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2002, 969 (10) : 88-91.

- [20] Romero CH, Barrett T, Chamberlain RW, Kitching RP, Fleming M, Black DN. Recombinant capripoxvirus expressing the hemagglutinin protein gene of rinderpest virus: protection of cattle against rinderpest and lumpy skin disease viruses. *Virology*, 1994, 204(1): 425-429.
- [21] Wang F, Liu S, Shao Y, Chen H. Biological characteristics of recombinant goat pox virus expressing β -galactosidase gene. *Chinese Journal of Preventive*

Veterinary Medicine, 2007, 29(9): 655-660. (in Chinese)

王芳, 刘胜旺, 邵昱昊, 陈洪岩. 表达 LacZ 基因的重组山羊痘病毒的构建及其生物学特征研究. *中国预防兽医学报*, 2007, 29(9): 655-660.

[22] 王芳. 表达 FMDV vp1 基因的重组山羊痘病毒的构建及其生物学特性研究, 中国农业科学院学位论文, 2007.

Characterization of a recombinant Goatpox virus expressing Orfv F1L gene

Qian Zhang[#], Zhen Wang[#], Hui Zhang^{*}, Ruifang Li, Taiwang Ji, Qingliang Zhao, Chuangfu Chen^{*}

College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi 832000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Abstract: [Objective] In order to establish the vaccine against the contagious ecthyma, we constructed and characterized recombinant goatpox virus expressing F1L protein of Orf virus. [Methods] The F1L gene was amplified and cloned into the vector pUC-TK12 carrying the LacZ gene and a bidirectional promoter. With the help of liposome, the recombinant plasmid pTL-F1L was transfected into the BHK-21 cells, which had been infected by Gpv. The aim is to make the Gpv and pTL-F1L recombined randomly and get the recombinant virus, which was defined as rGpv-F1L. The rGpv-F1L was screened by blue plaque, and then the F1L recombination and translation were identified by PCR, indirect immunofluorescence and Western blot. By the means of TCID₅₀, we evaluated the physicochemical properties of rGpv-F1L. Female mice were immunized with the rGpv-F1L, and the specific antibodies levels in serum were detected by ELISA. [Results] We obtained rGpv-F1L, which was stably expressing F1L protein. The results of biological characteristics showed the rGpv-F1L was sensitive to acids, alkalis, organic solvents and ultraviolet. The activity of specific antibodies significantly increased in mice infected by rGpv-F1L more than Gpv ($P < 0.01$). [Conclusion] In this research, we have successfully obtained the candidate vaccine, which is stably expressing F1L of Orf virus. Thereby the candidate vaccine with excellent antigenicity and biological activity provides new avenues for the prevention of contagious ecthyma and capripox.

Keywords: Orf virus (Orfv), F1L gene, recombinant goat pox virus, biological characteristics

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Key Project of China National Programs for Fundamental Research and Development (2010CB30203) and by the National Natural Science Foundation of China (30560109)

^{*} Corresponding author. Tel: +86-993-2058002; Fax: +86-993-2058031; E-mail: cef-xb@163.com, allanzhh@yahoo.com

[#] These authors contributed equally to this work.

Received: 23 October 2013 / Revised: 16 January 2014