

一组绵羊 OLA I 蛋白与绵羊痘病毒多肽的复性组装

王战红, 赵志荀, 吴国华, 邓阳, 朱国强, 赵芳燕, 卢曾军, 张强

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, 甘肃 兰州 730046

王战红, 赵志荀, 吴国华, 邓阳, 朱国强, 赵芳燕, 卢曾军, 张强. 一组绵羊 OLA I 蛋白与绵羊痘病毒多肽的复性组装. 生物工程学报, 2022, 38(1): 139-147.

WANG ZH, ZHAO ZX, WU GH, DENG Y, ZHU GQ, ZHAO FY, LU ZJ, ZHANG Q. Expression and refolding of OLA I protein with peptides derived from sheeppox virus. Chin J Biotech, 2022, 38(1): 139-147.

摘要: 本研究旨在体外组装小尾寒羊 OLA I 蛋白与绵羊痘病毒多肽复合物, 筛选绵羊痘病毒 CTL 表位肽。首先克隆小尾寒羊 OLA I 重链基因胞外区 OLA I α -BSP 和轻链基因 OLA I β_2m , 将获得的轻、重链基因分别插入原核表达载体 pET-28a(+) 并转化至 BL21(DE3) 细胞进行诱导表达, 收集菌体超声破碎, 过镍柱纯化获得一定纯度的 OLA I 重链和轻链 β_2m 包涵体蛋白, 稀释复性法将获得的轻、重链包涵体蛋白与绵羊痘病毒多肽 PV4 按摩尔比为 1:1:1 的比例进行共复性, 分子筛层析验证复性情况, ELISPOT 试验评价 OLA I 分子限制性多肽引起的 T 细胞免疫应答。结果表明, 克隆获得的重、轻链基因正确表达, 大小分别为 36.3 kDa 和 16.7 kDa, 分子筛和 SDS-PAGE 结果表明, 绵羊痘病毒多肽 PV4 与 OLA I 分子稳定结合, ELISPOT 试验确定该多肽可刺激引起 T 细胞免疫应答。本研究建立了小尾寒羊 OLA I 分子轻、重链的原核表达体系, 实现该轻、重链与绵羊痘病毒多肽 PV4 的复性, 确定了 1 个绵羊痘病毒 CTL 表位肽, 为下一步解析该复合物的结构及对羊痘 CTL 表位筛选提供思路。

关键词: OLA I; 绵羊痘病毒; 分子筛; CTL 表位

Received: February 25, 2021; **Accepted:** March 29, 2021; **Published online:** August 17, 2021

Supported by: National Natural Science Foundation of China (31872449, 31972687)

Corresponding author: ZHANG Qiang. Tel: +86-931-8343725; E-mail: zhangqiang@caas.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (31872449, 31972687)

Expression and refolding of OLA I protein with peptides derived from sheeppox virus

WANG Zhanhong, ZHAO Zhixun, WU Guohua, DENG Yang, ZHU Guoqiang, ZHAO Fangyan, LU Zengjun, ZHANG Qiang

State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, Gansu, China

Abstract: The aim of this study was to refold the OvisAries leukocyte antigen (OLA) class I protein with peptides derived from sheeppox virus (SPPV) to identify SPPV T cell epitopes. Two pairs of primers were designed based on the published sequence of a sheep major histocompatibility complex I to amplify the heavy chain gene of OLA I α -BSP and the light chain gene of OLA I β_2m . Both genes were cloned into a pET-28a(+) expression vector, respectively, and induced with IPTG for protein expression. After purification, the heavy chain and light chain proteins as well as peptides derived from SPPV were refolded at a ratio of 1:1:1 using a gradual dilution method. Molecular exclusion chromatography was used to test whether these peptides bind to the OLA I complex. T-cell responses were assessed using freshly isolated PBMCs from immunized sheep through IFN- γ ELISPOT with peptides derived from SPPV protein. The results showed that the cloned heavy chain and light chain expressed sufficiently, with a molecular weight of 36.3 kDa and 16.7 kDa, respectively. The protein separated via a SuperdexTM 200 increase 10/300 GL column was collected and verified by SDS-PAGE after refolding. One SPPV CTL epitope was identified after combined refolding and functional studies based on T-cell epitopes derived from SPPV. An OLA I/peptide complex was refolded correctly, which is necessary for the structural characterization. This study may contribute to the development of sheep vaccine based on peptides.

Keywords: OLA I ; sheeppox virus; molecular exclusion chromatography; CTL epitope

主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) 是一组免疫基因连锁群, 其编码的 MHC 分子广泛分布于有颌脊椎动物细胞表面, 在机体细胞免疫应答中发挥重要作用^[1]。绵羊的主要组织相容性复合体又称为绵羊白细胞抗原 (OvisAries leukocyte antigen, OLA), 位于绵羊的第 23 号染色体上, 包含 OLA I、OLA II 和 OLA III。其中 OLA I 主要参与内源性抗原肽的递呈。OLA I 分子由重链和轻链分子组成, 两者以非共价键结合^[2]。目前, 体外构建 MHC 复合物筛选 CTL 表位的研究已多次报道, Gao 等^[3-4]通过体外构建猪 SLA I (猪主要

组织相容性复合体) 复合物分别筛选出口蹄疫病毒 O 型和 A 型 CTL 表位肽 (ATRVTELLY) 和 (AMLRAATYY)。Zhang 等^[5]通过构建 SLA-1*0401 与猪源甲型流感 H1N1 表位肽结合的复合物并进一步解析该复合物的结构, 最后得到了 23 个候选的 H1N1 CTL 表位, 其中 3 条多肽被鉴定为跨物种的 H1N1 CTL 表位。后期该课题组也相继报道了运用 SLA I 复合物筛选出高致病性蓝耳病毒 CTL 表位方面的研究^[6-7]。

绵羊痘病毒 (sheeppox virus, SPPV) 是羊痘病毒属 (capripoxvirus, CaPVs) 的一种, 除绵羊痘病毒外, 羊痘病毒属还包含山羊痘病毒

(goatpox virus, GTPV) 和牛结节性皮肤病病毒 (lumpy skin diseases virus, LSDV), 可分别引起绵羊、山羊和牛发病^[8]。羊痘是所有动物痘病中最为严重的一种, 除可造成动物死亡外, 还对肉类、奶类、皮毛等产业造成巨大的影响, 对畜牧业经济发展具有非常重要的意义^[9]。目前, SPPV 和 GTPV 在我国均有分布, 甘肃省、新疆维吾尔自治区等地先后报道了 SPPV 和 GTPV 的发生^[10-12]。LSDV 于 2019 年在我国新疆维吾尔自治区也首次报道, 随后福建省、江西省、广东省、安徽省、浙江省、台湾省等中国南方地区也先后报道, 呈现愈发严重趋势^[13]。目前, 对于 LSDV 预防接种唯一的疫苗仍然是山羊痘减毒活疫苗, SPPV、GTPV 和 LSDV 的核苷酸序列同源性可达到 96%, 研究表明三者存在交叉保护, 但疫苗仅对 SPPV 和 GTPV 可产生完全保护, 对 LSDV 仅可产生部分保护作用, 且疫苗可产生较大副反应以及可能产生重组毒等风险^[14-16]。因而, 羊痘病毒新型疫苗的研发势在必行。本研究希望通过构建小尾寒羊 OLA I 复合物为羊痘 CTL 表位的筛选及表位疫苗研发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

小尾寒羊购自甘肃省刘家峡某羊场, Q5 High-Fidelity 2×Master Mix、T4 Ligase、*EcoR* I、

Hind III、*Nde* I 均购自 NEB 公司; Trans 5K Plus、大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3) 购自北京全式金公司; pET-28a(+) 为中国农业科学院兰州兽医研究所草食动物病毒病团队保存; RNA 提取试剂盒、质粒小提试剂盒、胶回收试剂盒、蛋白质分子质量标准 26616、Western blotting 发光液均购自 ThermoFisher 公司; 鼠源 His×6 单抗、HRP 标记的山羊抗小鼠购自 proteintech 公司; Superdex 200TM Increase 10/300 GL、Ni-NTA 凝胶购自 GE Healthcare 公司; 羊外周血淋巴细胞分离试剂盒购自天津灏洋公司; IFN- γ ELISPOT 试剂盒购自 MABTECH 公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 PCR 引物设计

根据 GenBank 中绵羊 MHC I 类分子重链和轻链基因参考序列 (登录号: 重链基因 AJ874679.2, 轻链基因 XM-012180604.2), 运用 Oligo 7.37 软件分别设计引物 (表 1), 引物合成委托苏州金唯智生物科技公司合成。

1.2.2 多肽预测及合成

使用 NetMHCpan 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCpan/>) 对 OLA I 分子限制性多肽进行预测, 导入绵羊痘病毒 A13L 蛋白氨基酸序列得到预测的 T 细胞表位肽, 多肽 PV4 (FKSFAPHRF) 位于 A13L 蛋白的 30-38 位氨基酸, 由南京金斯瑞生物有限责任公司通过

表 1 绵羊 OLA I 重链基因和轻链基因克隆所需引物

Table 1 Primers used for amplifying the heavy and light chains of sheep OLA I gene

Names	Primer sequences (5'→3')	Restriction enzymes	Size (bp)
OLA I α -BSP-F	GGAATTCC <u>ATAT</u> GGGCTCCCACTCCCTGAGGTATGT	<i>Nde</i> I	36
OLA I α -BSP-R	CCA <u>AAGCTT</u> TCAACGATGATTCCACACCAATTTCTGTGCATCCA GAATATGATGCAGGCTGCGGAAGGAGGTCTGAGGAGGT	<i>Hind</i> III	81
OLA I - β_2 m-F	CGGAATTCATGGCTGTCTCCGCGGCCTTG	<i>EcoR</i> I	29
OLA I - β_2 m-R	CCA <u>AAGCTT</u> TTAGAGGTCTCGATCCCACTTA	<i>Hind</i> III	30

Underline displayed restriction site.

高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 纯化合成, 纯度为 95%。

1.2.3 重链 OLA I α -BSP、轻链 OLA I - β_2 m 基因的克隆

采集小尾寒羊静脉血, RNA 提取试剂盒提取总 RNA, 反转录获得 cDNA, 表 1 中的两组引物分别进行 PCR 扩增目的基因 OLA I α -BSP、OLA I - β_2 m, 琼脂糖凝胶电泳检测基因扩增目的条带, 胶回收试剂盒进行胶回收。

1.2.4 重、轻链原核表达载体的构建及重组蛋白的诱导表达纯化

将扩增的重、轻链基因分别连接至 pET-28a(+) 载体, 转化 *E. coli* Trans 5 α 感受态细胞中, 各取 50 μ L 分别涂于 2 个卡那霉素抗性的平板培养基上, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养, 分别挑取单克隆菌落培养后提取质粒, 对两质粒均进行双酶切鉴定和 PCR 鉴定及测序分析。测序正确的 2 个质粒分别命名为 pET28a-OLA I α -BSP、pET28a-OLA I - β_2 m。转化至宿主菌 *E. coli* BL21(DE3) 中, 2 个重组菌分别命名为 BL21(DE3)/pET28a-OLA I α -BSP 和 BL21(DE3)/pET28a-OLA I - β_2 m。2 个重组菌于 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 摇床培养至 OD_{600} 为 0.4–0.6 时, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 继续诱导培养 4 h, 收集菌体沉淀超声破碎, 按照 Ni-NTA 凝胶纯化手册进行蛋白纯化, 分光光度计测 2 个蛋白浓度, SDS-PAGE 检测 2 个蛋白表达情况。

1.2.5 免疫印迹分析

为检测目的蛋白确为正确表达, 对 1.2.4 中收集的蛋白进行 Western blotting 检测, 首先对样品进行 SDS-PAGE 电泳, 然后转印至 PVDF 膜进行免疫印迹分析, 一抗选用鼠源的 6 \times His 单抗 (1 : 3 000 稀释), 二抗选用 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG (1 : 6 000 稀释), ECL 发光成像分析。

1.2.6 重链 pET28a-OLA I α -BSP 和轻链 pET28a-OLA I - β_2 m 蛋白与绵羊痘病毒多肽的体外结合

镍柱纯化的重链 pET28a-OLA I α -BSP 和轻链 pET28a-OLA I - β_2 m 蛋白与羊痘病毒多肽 (PV4: FKSFAPHRF) 体外组装过程均在 4 $^{\circ}$ C 条件下进行。配制复性液 (100 mmol/L 的 Tris-HCl, pH 8.0; 400 mmol/L 的 L-Arg HCl; 2 mmol/L 的 EDTA; 5 mmol/L 的 GSH; 0.5 mmol/L 的 GSSH) 于 4 $^{\circ}$ C 预冷, 复性组装过程中, 轻链、多肽、重链以摩尔比为 1 : 1 : 1 的比例进行逐滴复性, 先加轻链 pET28a-OLA I - β_2 m 复性 8 h, 后加入多肽, 30 min 后加入重链 pET28a-OLA I α -BSP 继续复性, 整个过程均在 4 $^{\circ}$ C 冷库进行。复性完成后进行超滤浓缩至 1 mL, 然后以 4 $^{\circ}$ C、10 000 \times g 离心 10 min, 取上清为分子筛层析所需要的样品。

1.2.7 分子筛和 SDS-PAGE 鉴定轻、重链与羊痘病毒多肽结合

取 1.2.6 中浓缩的蛋白样品 500 μ L, 层析柱选用 SuperdexTM 200 Increase 10/300 GL, 以 0.5 mL/min 的流速进行分子筛层析, 收集峰值处的蛋白样品进行 SDS-PAGE 检测。

1.2.8 ELISPOT 试验

采集小尾寒羊全血 (免疫了山羊痘 AV41 株), 使用羊外周血淋巴细胞分离试剂盒分离全血中的 PBMCs, 将 PBMCs 稀释至 2.5×10^5 /mL, 合成的多肽稀释至 2 μ g/mL, 各取 100 μ L 于 96 孔板中每孔混合 (96 孔板预包被羊 IFN- γ 的抗体), 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件孵育 20 h 后去除细胞, 生物素标记的 IFN- γ 作一抗孵育 1 h, 酶链亲和素作二抗孵育 1 h, 加入现配的 AEC 显色液室温避光显色直至有斑点肉眼可见, 去离子水清洗板子并吹干。刀豆蛋白 ConA 作为阳性对照, 没有抗原肽刺激的细胞作为阴性对照。将风干的板子放于 ELISPOT 自动读板仪内, 调

整参数进行斑点计数。

2 结果与分析

2.1 重链 OLA I α -BSP、轻链 OLA I $-\beta_2m$ 基因扩增结果

以试剂盒提取的总 RNA 反转录后的 cDNA 为模板, 用重链、轻链引物分别扩增得到重、轻链, 结果显示, PCR 成功扩增出目的条带, 经琼脂糖凝胶电泳检测得到重链基因 OLA I

α -BSP 大小为 843 bp, 轻链基因 OLA I $-\beta_2m$ 大小为 357 bp (图 1)。

2.2 重组蛋白诱导表达及纯化

SDS-PAGE 结果显示, 重链蛋白 pET28a-OLA I α -BSP 和轻链蛋白 pET28a-OLA I $-\beta_2m$ 都以包涵体形式表达, 分子量大小分别为 36.3 kDa 和 16.7 kDa, 经镍柱纯化均得到一定纯度的包涵体蛋白, 经纯化的重链和轻链蛋白的 SDS-PAGE 检测结果如图 2 所示。

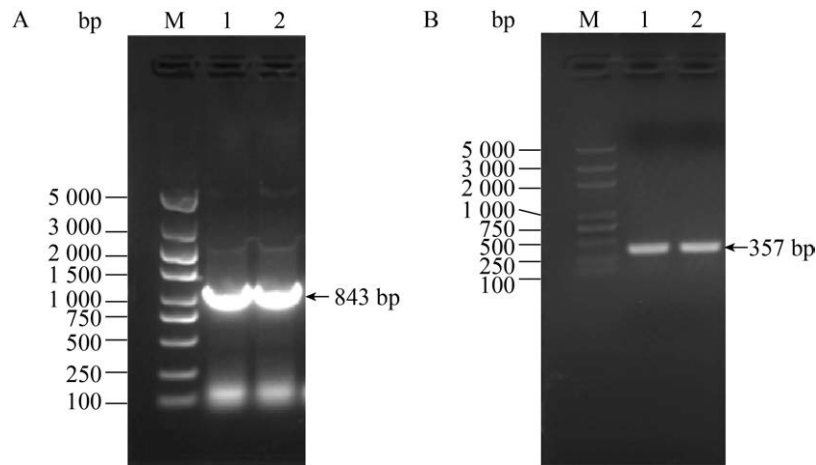


图 1 PCR 分别扩增重链和轻链基因

Figure 1 PCR amplification of heavy chain OLA I α -BSP (A) and light chain OLA I $-\beta_2m$ gene (B). (A) M: DNA marker; 1 and 2: OLA I α -BSP. (B) M: DNA marker; 1 and 2: OLA I $-\beta_2m$.

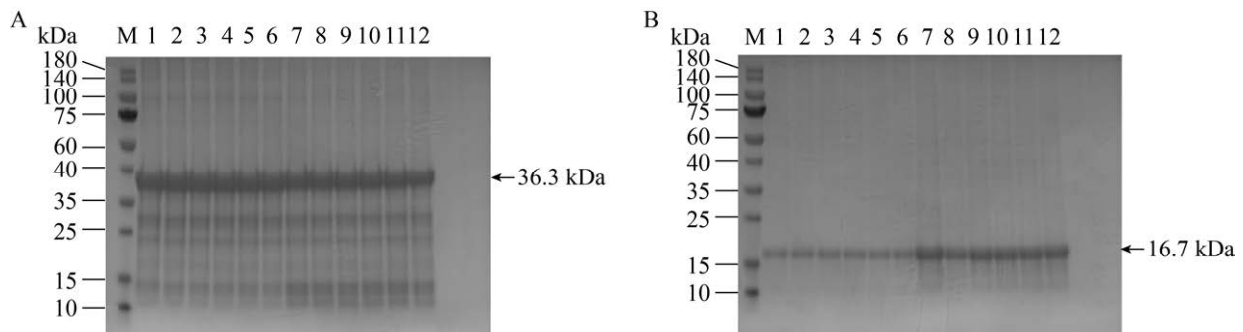


图 2 重链蛋白 pET28a-OLA I α -BSP 和轻链蛋白 pET28a-OLA I $-\beta_2m$ 的表达纯化

Figure 2 Expression and purification of the recombinant protein. (A) M: protein marker; 1-12: purified pET28a-OLA I α -BSP recombinant protein. (B) M: protein marker; 1-12: purified pET28a-OLA I $-\beta_2m$ recombinant protein.

2.3 重组蛋白的免疫印迹分析

Western blotting 结果表明, 重链蛋白 pET28a-OLA I α -BSP 和轻链蛋白 pET28a-OLA I β_2 m 均与抗 6 \times His 蛋白抗体产生特异性反应, 重链蛋白主要以包涵体形式存在, 分子量为 36.3 kDa, 轻链蛋白只以包涵体形式存在, 分子量大小为 16.7 kDa (图 3)。

2.4 分子筛层析验证轻、重链蛋白与多肽 PV4 的复性结合

将小尾寒羊重链蛋白 OLA I α -BSP、轻链蛋白 OLA I β_2 m 与绵羊痘病毒多肽 PV4 进行体外稀释复性。分子筛层析及 SDS-PAGE 鉴定是否正确复性, 结合分子筛试验中 SuperdexTM 200 Increase 10/300 GL 柱子吸光度峰值的位置 (复合物约在 14.5 mL 处, 预测的分子量为 53 kDa, 该峰左右的标准品近似位置分别为 75 kDa 和 44 kDa), 收集从左往右 3 个峰的蛋白样品进行 SDS-PAGE 分析, 结果表明, 3 个峰从左往右第 1 个峰蛋白分子量为 36.3 kDa, 第 2 个峰蛋白包含分子量为 36.3 kDa 和 16.7 kDa 的 2 个蛋白, 第 3 个蛋白分子量为 16.7 kDa。结合分子筛出峰的位置以及 SDS-PAGE 结果表明, 分子筛图中从左往右 3 个峰依次代表重链的多聚体、正确复性的 OLA I /肽复合物 (大小

为 53 kDa) 和轻链 β_2 m (图 4)。

2.5 ELISPOT 试验

通过 IFN- γ 特异性的 ELISPOT 试验检测抗原特异性 T 淋巴细胞反应, 结果显示, 用多肽 PV4 刺激免疫了山羊痘 AV41 株的小尾寒羊 PBMC 与 MOCK 组 (单独培养基刺激) 相比具有差异, 表明该多肽可刺激小尾寒羊 PBMC 的 T 细胞免疫应答, 为 1 条 OLA I 分子限制性的 T 细胞表位 (图 5)。

3 讨论

当前, 疫苗接种仍是预防、控制多数传染病的有效策略, 针对羊痘病毒属各种, 山羊痘弱毒苗仍是控制山羊痘、绵羊痘及牛结节性皮肤病的首选。弱毒苗虽然保护周期长, 但其安全性仍存在争议^[17-18]。因此, 研制更加安全有效的疫苗十分必要。CTL 表位是 MHC 分子的限制性表位, 本研究通过体外构建表达小尾寒羊 OLA I 分子的轻、重链, 与绵羊痘病毒多肽进行体外共复性, 成功筛选出小尾寒羊 OLA I 分子限制性的绵羊痘病毒限制性多肽, 结合 ELISPOT 试验将 OLA I 分子限制性多肽引起的 T 细胞免疫应答进行评价, 确定了 1 条绵羊痘病毒 T 细胞表位肽 (PV4: FKSFAPHRF)。

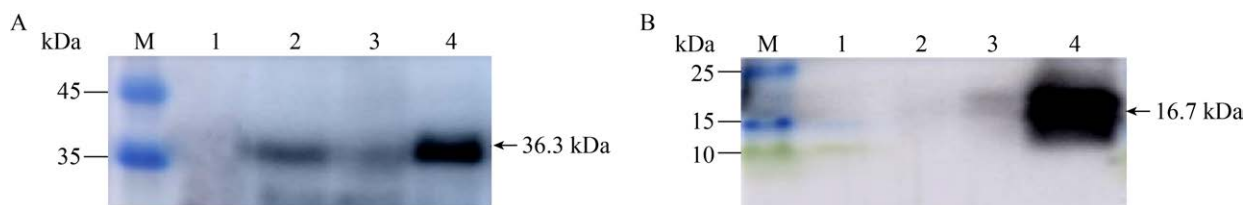


图 3 Western blotting 检测重链蛋白 pET28a-OLA I α -BSP 和轻链蛋白 pET28a-OLA I β_2 m 的表达
Figure 3 Western blotting analysis of expressed recombinant protein. (A) M: protein marker; 1: pET-28a(+); 2: uninduced pET28a-OLA I α -BSP; 3: supernatant of induced pET28a-OLA I α -BSP with IPTG; 4: pellet of induced pET28a-OLA I α -BSP with IPTG. (B) M: protein marker; 1: pET-28a(+); 2: uninduced pET28a-OLA I β_2 m; 3: supernatant of induced pET28a-OLA I β_2 m with IPTG; 4: pellet of induced pET28a-OLA I β_2 m with IPTG.

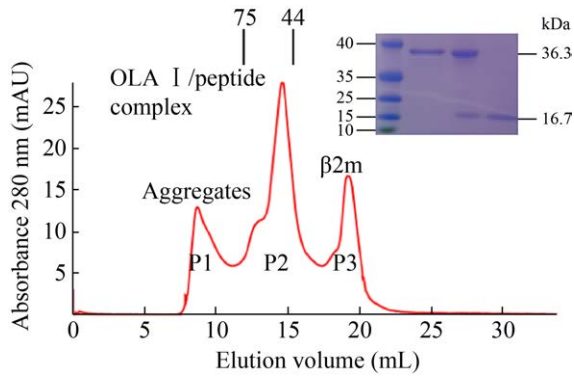


图 4 体外复性验证多肽与 OLA I 分子的结合
 Figure 4 Gel filtration chromatograms of the refolded complex with a Superdex 200 Increase 10/300 GL column (GE Healthcare). Peak 1, peak 2 and peak 3 represent the aggregated heavy chain, the correctly refolded OLA I/peptide complex (53 kDa) and the extra β_2m , respectively. Inset: SDS-PAGE gel (12%) for peak 1, peak 2 and peak 3.

本研究采用大肠杆菌表达 OLA I 分子的轻、重链，获得了大量表达的轻、重链包涵体蛋白，通过稀释复性法使得轻、重链蛋白与多肽在体外正确复性组装。表达、复性过程参考夏春等构建 SLA I 复合物筛选猪繁殖与呼吸综合征病毒 CTL 表位中的方法^[6-7]。在重链基因的

构建过程中，通过在重链基因的 C 末端添加一个 BSP 标签，可被 BirA 酶识别，能够催化生物素标记在重链上，为亲和素的结合及 OLA I 四聚体构建奠定基础。表达载体选用 pET-28a(+), 载体自带 ATG 起始密码子，蛋白表达过程中其 N 端融合 6×His 标签，因此可用抗 His 的单抗对目标蛋白的特异性进行验证。纯化表达的 OLA I 分子轻、重链蛋白与多肽稀释放性后，选择分子筛层析柱 Superdex™ 200 Increase 10/300GL 对成功复性的 OLA I/肽复合物进行分离，图 4 即为该 OLA I/肽复合物的分子筛峰图，图中从左往右共出现 3 个峰分别代表 3 个不同分子量大小的蛋白，结合 3 个不同分子量蛋白的出峰位置以及收集各个峰的蛋白样品进行 SDS-PAGE 分析，结果表明，3 个峰从左往右依次是重链的多聚体、正确复性的 OLA I/肽复合物 (峰值在 14.5 mL) 和轻链蛋白 OLA I- β_2m 。在复性过程中，对包涵体形式表达的 OLA I 分子采用稀释复性法使其恢复生物学功能，即先配制折叠复性液于 4 °C 预冷，采用搅拌逐滴复性方式，先滴加轻

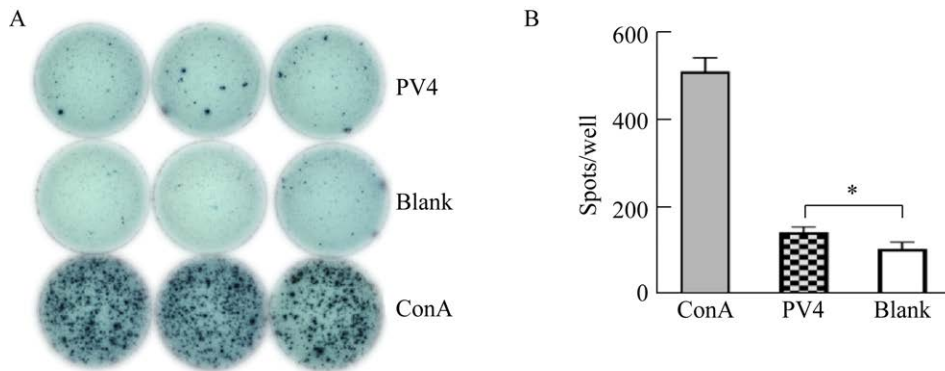


图 5 多肽 PV4 刺激 PBMC 产生 IFN- γ 增殖情况
 Figure 5 Determination of the peptide PV4 as a stimulator of PBMCs with a IFN- γ specific ELISPOT test. (A) Peptide PV4 was performed as a stimulator in the ELISPOT assay, no peptide stimulation was used as a negative control and the ConA was used as a positive control. (B) Column represents the mean number of spots in each group. T test was used in the statistical analysis. *: $P < 0.05$.

链 OLA I- β_2m 蛋白复性 8 h, 再加入多肽 PV4 继续复性 30 min, 最后滴加重链蛋白 OLA I- α -BSP 过夜复性, 轻链、多肽、重链复性过程的摩尔比为 1:1:1, 复性过程发现, 多肽对复性的成功与否起着决定作用, 多数多肽不能与 OLA I 分子的轻、重链形成复合物, 即不能在固定位置形成分子筛图谱的峰, 这与先前的文献报道一致^[19-20]。本研究的多肽来自绵羊痘病毒 A13L 蛋白的第 30-38 位氨基酸, A13L 在痘苗病毒研究中已被证明具有良好的免疫原性^[21-22], 参考痘苗病毒作为痘病毒研究中的模式病毒, 本试验中筛选的 T 细胞表位来源于绵羊痘病毒 A13L, 也证明绵羊痘 A13L 后续可作为绵羊痘亚单位疫苗研发的新靶点。

当前在动物研究领域, 构建动物 MHC I 类分子筛选病毒 CTL 表位已多次报道, 其中应用最广泛的是猪 SLA I 类分子, 通过构建猪 SLA I 分子在口蹄疫病毒、猪繁殖与呼吸综合征病毒、猪流感病毒的研究中均有较多报道^[3-7]。关于牛 BoLA I 分子用于牛瘟病毒表位肽相关研究也有报道^[23]。在家禽相关研究中, 先后有构建鸡、鸭 MHC I 分子用于高致病性禽流感 (H5N1) CTL 表位的相关研究^[24-25]。结合结构生物学方面的研究, 通过解析相应 MHC 分子的复合物可得到其抗原结合槽 (PBG) 的构象, 从而确定多肽的结合基序, 为 CTL 表位的筛选及多肽递呈的分子机制研究奠定基础。本研究为首次公开报道构建绵羊 OLA I 分子用于羊痘病毒方面的研究, 为后续羊痘病毒 CTL 表位的筛选同时也为其他病原 (如小反刍兽疫) CTL 表位的筛选提供思路。

REFERENCES

- [1] Hammarlund E, Dasgupta A, Pinilla C, et al. Monkeypox virus evades antiviral CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses by suppressing cognate T cell activation. *PNAS*, 2008, 105(38): 14567-14572.
- [2] 郑世军. 动物分子免疫学. 北京: 中国农业出版社, 2015.
Zheng SJ. *Veterinary Molecular Immunology*. Beijing: China Agricultural Press, 2015 (in Chinese).
- [3] Gao FS, Fang QM, Li YG, et al. Reconstruction of a swine SLA-I protein complex and determination of binding nonameric peptides derived from the foot-and-mouth disease virus. *Vet Immunol Immunopathol*, 2006, 113(3/4): 328-338.
- [4] Gao FS, Zhai XX, Jiang P, et al. Identification of two novel foot-and-mouth disease virus cytotoxic T lymphocyte epitopes that can bind six SLA-I proteins. *Gene*, 2018, 653: 91-101.
- [5] Zhang NZ, Qi JX, Feng SJ, et al. Crystal structure of swine major histocompatibility complex class I SLA-I*0401 and identification of 2009 pandemic swine-origin influenza A H1N1 virus cytotoxic T lymphocyte epitope peptides. *J Virol*, 2011, 85(22): 11709-11724.
- [6] Fan SH, Wang YL, Wang S, et al. Polymorphism and peptide-binding specificities of porcine major histocompatibility complex (MHC) class I molecules. *Mol Immunol*, 2018, 93: 236-245.
- [7] Pan XC, Zhang NZ, Wei XH, et al. Illumination of PRRSV cytotoxic T lymphocyte epitopes by the three-dimensional structure and peptidome of swine lymphocyte antigen class I (SLA-I). *Front Immunol*, 2020, 10: 2995.
- [8] Yeruham I, Yadin H, Van Ham M, et al. Economic and epidemiological aspects of an outbreak of sheep pox in a dairy sheep flock. *Vet Rec*, 2007, 160(7): 236-237.
- [9] Babiuk S, Bowden TR, Boyle DB, et al. Capripoxviruses: an emerging worldwide threat to sheep, goats and cattle. *Transbound Emerg Dis*, 2008, 55(7): 263-272.
- [10] Yan XM, Chu YF, Wu GH, et al. An outbreak of sheep pox associated with *goat poxvirus* in Gansu province of China. *Vet Microbiol*, 2012, 156(3/4): 425-428.
- [11] He CC, Tong JJ, Zhang XP, et al. Comparative analysis of ankyrin (ANK) genes of five capripoxviruses isolate strains from Xinjiang province in China. *Virol J*, 2020, 17: 133.
- [12] Zhao ZX, Fan B, Wu GH, et al. Development of loop-mediated isothermal amplification assay for specific and rapid detection of differential goat pox virus and sheep pox virus. *BMC Microbiol*, 2014, 14: 10.

- [13] Lu G, Xie JX, Luo JL, et al. Lumpy skin disease outbreaks in China, since 3 August 2019. *Transbound Emerg Dis*, 2021, 68(2): 216-219.
- [14] Tuppurainen ESM, Oura CAL. Review: lumpy skin disease: an emerging threat to Europe, the Middle East and Asia. *Transbound Emerg Dis*, 2012, 59(1): 40-48.
- [15] Abutarbush SM, Hananeh WM, Ramadan W, et al. Adverse reactions to field vaccination against lumpy skin disease in Jordan. *Transbound Emerg Dis*, 2016, 63(2): e213-e219.
- [16] Hamdi J, Bamouh Z, Jazouli M, et al. Experimental evaluation of the cross-protection between sheepox and bovine lumpy skin vaccines. *Sci Rep*, 2020, 10: 8888.
- [17] Tuppurainen ESM, Venter EH, Shisler JL, et al. Review: capripoxvirus diseases: current status and opportunities for control. *Transbound Emerg Dis*, 2017, 64(3): 729-745.
- [18] Baron MD, Diop B, Njeumi F, et al. Future research to underpin successful peste des petits ruminants virus (PPRV) eradication. *J Gen Virol*, 2017, 98(11): 2635-2644.
- [19] Garboczi DN, Hung DT, Wiley DC. HLA-A2-peptide complexes: refolding and crystallization of molecules expressed in *Escherichia coli* and complexed with single antigenic peptides. *PNAS*, 1992, 89(8): 3429-3433.
- [20] Silver ML, Parker KC, Wiley DC. Reconstitution by MHC-restricted peptides of HLA-A2 heavy chain with β 2-microglobulin, *in vitro*. *Nature*, 1991, 350(6319): 619-622.
- [21] Davies DH, Liang XW, Hernandez JE, et al. Profiling the humoral immune response to infection by using proteome microarrays: high-throughput vaccine and diagnostic antigen discovery. *PNAS*, 2005, 102(3): 547-552.
- [22] Hermanson G, Chun S, Felgner J, et al. Measurement of antibody responses to modified vaccinia virus Ankara (MVA) and Dryvax[®] using proteome microarrays and development of recombinant protein ELISAs. *Vaccine*, 2012, 30(3): 614-625.
- [23] Li X, Liu J, Qi JX, et al. Two distinct conformations of a rinderpest virus epitope presented by bovine major histocompatibility complex class I N*01801: a host strategy to present featured peptides. *J Virol*, 2011, 85(12): 6038-6048.
- [24] Li XY, Zhang LJ, Liu YJ, et al. Structures of the MHC I molecule BF2*1501 disclose the preferred presentation of an H5N1 virus-derived epitope. *J Biol Chem*, 2020, 295(16): 5292-5306.
- [25] Wu YN, Wang JY, Fan SH, et al. Structural definition of duck major histocompatibility complex class I molecules that might explain efficient cytotoxic T lymphocyte immunity to influenza A virus. *J Virol*, 2017, 91(14): e02511-e02516.

(本文责编 郝丽芳)