

樊月圆, 朱红林, 周冬雪, 等. 羊口疮病毒口唇和内脏感染株 ORFV123 基因生物信息学特征与宿主转录响应的比较 [J]. 畜牧与兽医, 2026, 58 (2): 92-103.

FAN Y Y, ZHU H L, ZHOU D X, et al. Comparative analysis of ORFV123 gene from oral and visceral infection strains of orf virus: bioinformatics and host transcriptional response [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2026, 58 (2): 92-103.

羊口疮病毒口唇和内脏感染株 ORFV123 基因生物信息学特征与宿主转录响应的比较

樊月圆^{1#}, 朱红林^{1#}, 周冬雪¹, 李思瑶¹, 吴姣¹, 陈媛媛¹,
巴桑罗布², 富国文^{1*}, 张瑞雪^{1*}

(1. 云南农业大学动物医学院, 云南 昆明 650000;

2. 山南市畜牧兽医总站, 西藏 山南 856000)

摘要: 旨在探究羊口疮病毒 (ORFV) 口唇和内脏感染株的 ORFV123 基因编码蛋白分子特征及其对宿主细胞作用的差异。采用 PCR 技术扩增 ORFV123 基因, 克隆至 pMD-19T 进行测序, 采用生物信息学方法分析其基因特征; 同时构建真核表达载体 pEGFP-N1-123K、pEGFP-N1-123N, 将真核表达载体转染至原代山羊口腔上皮细胞, 分别采用 Western blot 和实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 验证融合蛋白在细胞内的表达水平; 运用转录组测序技术分析基因表达谱变化。结果: 口唇及内脏感染株的 ORFV123 基因全长均为 1 551 bp, 编码 516 个氨基酸, 虽进化分支不同, 但具有相似的理化特性和蛋白结构特征, 三维结构分析揭示, 2 个感染株 ORFV123 蛋白在 C 末端环区存在构象差异; Western blot 结果显示 2 株病毒 ORFV123 基因在羊口腔上皮细胞中均能成功表达。转录组分析显示 ORFV 口唇与内脏感染株间有 16 个差异表达基因 (DEGs), 7 个上调, 9 个下调, 2 个毒株与空细胞组比较共鉴定出 1 208 个 DEGs (口唇株 806 个, 内脏株 402 个), 且主要富集于蛋白质消化吸收通路、磷脂酰肌醇 3 激酶-蛋白激酶 B (PI3K-Akt) 信号通路与晚期糖基化终末产物-其受体 (AGE-RAGE) 通路。本文为深入了解 ORFV123 蛋白的功能及其在病毒致病机制中的作用提供了基础数据。

关键词: 羊口疮; 锚蛋白; ORFV123 基因; 口腔上皮细胞; 转录组测序

中图分类号: S852.6 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2026)02-0092-12

Comparative analysis of ORFV123 gene from oral and visceral infection strains of orf virus: bioinformatics and host transcriptional response

FAN Yueyuan^{1#}, ZHU Honglin^{1#}, ZHOU Dongxue¹, LI Siyao¹, WU Jiao¹, CHEN Yuanyuan¹,
Basangluobu², FU Guowen^{1*}, ZHANG Ruixue^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Yunnan Agricultural University, Kunming 650000, China;

2. Shannan Municipal Animal Husbandry and Veterinary Station, Shannan 856000, China)

Abstract: This study aimed to explore the molecular characteristics of the protein encoded by the ORFV123 gene in the lip and visceral infection strains of orf virus (ORFV) and the differences of the protein after being transfected in its host cells. The ORFV123 gene was amplified by PCR technology, and cloned into the pMD-19T vector for sequencing; and its genetic characteristics were analyzed using bioinformatic methods. Meanwhile, eukaryotic expression vectors pEGFP-N1-123K and pEGFP-N1-123N were constructed. Subsequently, the eukaryotic expression vectors were transfected into primary goat oral epithelial cells, and their expression levels were measured using Western blot and RT-qPCR, respectively. Finally, the gene expression profiles were analyzed using RNA-seq. The results showed that the full-length of the ORFV123 genes in both the oral and visceral strains was 1 551 bp, encoding 516 amino acids, which belonged to different evolutionary branches and shared with similar physicochemical properties and protein structural characteristics. The three-dimensional structural analysis

收稿日期: 2025-07-31; 修回日期: 2025-12-11

基金项目: 云南省兽医公共卫生国际联合研发中心项目 (202403AP140033); 2024 年云南省国际科技特派员 (个人) 认定工作项目 (202403AK140039); 云财教 (2025) 12 号施甸县农民院士科技服务站-富国文项目 (A3012025013)

第一作者: 樊月圆, 女, 副教授, 博士; 朱红林, 女, 硕士研究生。#共同第一作者

*通信作者: 富国文, 满族, 博士, 高级实验师, 主要从事动物传染病预防与控制, E-mail: fuguowen1@126.com; 张瑞雪, 博士, 助教, 主要从事兽医产科疾病研究, E-mail: 2024025@ynau.edu.cn。

revealed conformational differences in the C-terminal loop region of the ORFV123 protein between the two strains. The Western blot results showed that the ORFV123 genes of both the strains could be successfully expressed in goat oral epithelial cells. The transcriptome analysis showed that there were 16 differentially expressed genes (DEGs, 7 up-regulated and 9 down-regulated) between the orolabial and visceral infection strains of the ORFV, and a total of 1 208 DEGs were identified when the two strains were compared with the blank cell group (806 DEGs in the orolabial strain and 402 DEGs in the visceral strain), which were mainly enriched in signaling pathways such as protein digestion and absorption, PI3K-Akt, and AGE-RAGE. These findings provided fundamental insights into the function of the ORFV123 protein and its potential role in viral pathogenesis.

Keywords: orf; ankyrin repeat protein; ORFV123 gene; oral epithelial cells; transcriptome sequencing

羊口疮是由羊口疮病毒 (ORFV) 引发的一种高度接触性和嗜上皮性的人畜共患病。近年来,对 ORFV 各基因的深入研究也随之增加,对全球养羊业造成重大经济损失^[1-2]。ORFV 属于痘病毒科副痘病毒属,具有强传染性,能在恶劣环境中长期存活^[3]。病毒粒子呈卵圆形,含有线性双链 DNA 基因组,编码 132 个基因,G+C 含量较高^[4]。ORFV 基因组两端具有反向末端重复序列 (ITR),变异较大,编码与毒力和免疫调节相关的蛋白;中央核心区基因保守,参与病毒复制^[5]。ORFV 在宿主细胞内完成复制过程,并通过调节免疫反应逃避宿主防御^[6]。该病毒主要感染宿主上皮细胞,其毒力特征与致病机制密切相关^[7-8],深入了解 ORFV 上皮细胞嗜性、免疫调节逃逸策略及毒力-致病表型关联特性对羊口疮的防控技术研究至关重要。

ORFV 的宿主范围基因 (Hrg) 通过其编码的宿主范围因子 (Hrf) 调控病毒复制和宿主特异性,主要作用于细胞的抗病毒信号通路^[9]。目前已知 ORFV 的宿主范围基因包括 ORFV020 (痘苗病毒 E3L 同源基因) 和 5 个锚蛋白/类 F-box 基因 (ANK/F-box)^[10-12],即 ORFV008、ORFV123、ORFV126、ORFV128 和 ORFV129。这些基因参与多种细胞生理过程,包括细胞骨架重塑、信号转导和 mRNA 转录调控等^[13]。结构分析表明,这 5 个锚蛋白均具有典型的 ANK/F-box 结构特征:N 端含有 6~9 个不等的锚蛋白重复序列 (ANK repeats),C 端具有 1 个类 F-box 蛋白结构域,其中 ORFV123 基因预测的 ANK 重复基序数量最多,而 ANK 重复基序可作为蛋白质相互作用的桥梁,介导痘病毒与宿主靶蛋白的特异性结合,它们通过与跨膜蛋白和肌动蛋白纤维的相互作用维持细胞稳定性^[14-17]。目前,关于 ORFV 锚蛋白是否能影响病毒宿主范围及其与宿主细胞互作的机制尚不明确。

本课题组在西藏发现 1 例与常见的口唇、蹄和外

阴感染部位不同的羊口疮病例,主要表现为小肠及肠系膜病变,不易与其他腹痛疾病区分,未表现出明显的口唇部病变。本研究以内脏感染株和口唇感染株为研究对象,通过 PCR 分别扩增 ORFV123 基因,采用生物信息学分析特征、构建真核表达载体并通过 Western blot 鉴定表达 ORFV123 蛋白,转录组测序分析揭示不同表型 ORFV123 蛋白与宿主相互作用的分子机制,该结果为阐明 ORFV123 蛋白的结构-功能关系,揭示 ORFV 的致病机制提供重要理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

口唇及内脏感染 ORFV 样品均采自西藏尼玛县某羊场;原代山羊口腔上皮细胞由云南农业大学基础实验室分离保存。

pEGFP-N1 质粒载体、大肠杆菌 DH5 α 菌株和 pMD-19T 质粒载体购自宝日医生物技术 (北京) 有限公司;病毒 DNA/RNA 提取试剂盒、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Hind* III、*Kpn* I 均购自宝生物工程 (大连) 有限公司;2 \times Taq PCR Master Mix、琼脂糖凝胶回收试剂盒、无内毒素小提中量质粒试剂盒均购自天根生化科技有限公司;DMEM 高糖培养基、胎牛血清 (FBS)、Opti-MEM 培养基、脂质体 Lipo3000 均购自 Gbico 公司;鼠源绿色荧光蛋白 (GFP) 单克隆抗体、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗小鼠 IgG 均购自全式金生物技术有限公司;细胞裂解液、蛋白酶抑制剂 (PMSF) 均购自上海碧云天生物科技有限公司;增强化学发光试剂盒 (ECL) 购自亚科因生物技术有限公司。

1.2 特异性引物设计与合成

按照 ORFV123 (GenBank 登录号: KU672076.1) 序列设计引物,扩增包含基因完整阅读框在内的片段,长度为 1 717 bp。引物由北京擎科生物科技股份有限公司合成 (相关引物见表 1)。

表 1 引物序列信息

名称	序列 (5'→3')	片段大小/ bp
ORFV123-F	CCCAAGCTTATGGAAAACAACGATGGCAA	1 771
ORFV123-R	CGGGGTACCGGTTTATGCGAGGGAAGGAAGC	
TMED2-F	AGACATGGAAACAGAAGCTCAC	160
TMED2-R	CCAAAGGACCACTCTGCTGT	
CCNB1IP1-F	GACCCAGTCTGCCTTCTTTT	201
CCNB1IP1-R	TCAGTAGATTCCATCTTCAACCTTT	
FITM2-F	GCAACGTCCTCAACGTGTAT	199
FITM2-R	CCCCTGTAGTGTCTCGATGTT	
TRIM41-F	GTTGCTGACCATTCCAAGCG	129
TRIM41-R	GACCCATGCAGACCTCTACC	
PRDX1-F	CTGACGCGCGGCTGA	170
PRDX1-R	CAATGATCTCCGTGGGGCA	
PTPRR-F	TTCACGCTGCAGGATGCC	197
PTPRR-R	GCTGGCTTCCCATTCTTCTCT	
CLIC1-F	GTCTGATCAGGCTCCTGTGG	220
CLIC1-R	CCATCACTGCCAGCCTTCA	
LRAT-F	CCCCAAGCCGACAAGTTTTG	140
LRAT-R	CGCTGGCACAGGAGTATGAA	

注：下划线处分别为 *Hind* III 和 *Kpn* I 的酶切位点。

1.3 ORFV123 原核表达载体及真核表达载体的构建

采用核酸提取试剂盒分别提取 ORFV 口唇 (K) 和内脏 (N) 感染样品中的病毒基因组 DNA，以此为模板 PCR 分别扩增 ORFV123 基因开放阅读框。反应体系：高保真酶 Mixture 12.5 μ L，DNA 1 μ L，上、下游引物各 1 μ L，ddH₂O 补足体系至 25 μ L。反应条件：95 $^{\circ}$ C 3 min；95 $^{\circ}$ C 15 s，60 $^{\circ}$ C 15 s，72 $^{\circ}$ C 1 min，40 个循环；72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。反应结束后 4 $^{\circ}$ C 保存。扩增产物分别命名为 123K 和 123N，将产物连接至 pMD-19T 载体和 pEGFP-N1 载体，转化至 DH5 α 感受态细胞，经含氨苄西林或卡那霉素的 LB 固体培养基筛选阳性克隆后，挑取单克隆扩大培养并提取重组质粒，通过 *Hind* III/*Kpn* I 双酶切鉴定并测序验证，成功构建 pMD-19T-123K、pMD-19T-123N、pEGFP-N1-123K 和 pEGFP-N1-123N。

1.4 生物信息学分析

使用 MegAlign 软件比对 ORFV123 与 GenBank 上其他物种的序列同源性，并用 MEGA 5.0 软件构建进化树；运用 ExPasy ProtParam 在线软件 (<https://web.expasy.org/protparam/>) 对 ORFV123 进行基本参数和性质分析；使用 NetPhos 3.1 在线软件 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhos>) 预测/蛋白磷酸化位点；使用在线软件 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)，基于

TMHMM 方法进行蛋白质跨膜区预测；使用 NetNGlyc 1.0 在线软件 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php/NetNGlyc-1.0>) 预测基因 N-糖基化位点；使用 NetOGlyc 4.0 在线软件 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php/NetOGlyc-4.0>) 预测基因 O-糖基化位点；使用 SignalP 5.0 在线软件 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php/SignalP-5.0>) 预测蛋白信号肽；使用 SOPMA 在线软件 (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 预测蛋白的二级结构；使用 Swiss-Model 在线工具 (<https://swissmodel.expasy.org>) 预测三级结构。

1.5 Western blot 检测

构建的真核表达载体转染至山羊口腔上皮细胞 48 h 后，收集细胞，用含 1% PMSF 的细胞裂解液于冰上裂解 30 min，4 $^{\circ}$ C，12 000 r/min 离心 15 min 后收集上清与 5 \times SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液按 4:1 比例混合，98 $^{\circ}$ C 金属浴加热 10 min 使蛋白充分变性。样品经 SDS-PAGE 后转至硝酸纤维素膜，用 5% BSA 室温封闭 2 h，TBST 洗涤 3 次 (每次 5 min)；与抗 GFP 单克隆抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜；TBST 洗涤 3 次后与 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗室温孵育 2 h；最终经 TBST 充分洗涤后，使用 ECL 化学发光底物显影，通过化学发光成像系统采集信号。

1.6 转录组测序

收集转染 pEGFP-N1-123K 和 pEGFP-N1-123N 的原代山羊口腔上皮细胞并采用 TRIzol 试剂 (TaKaRa, China) 提取总 RNA, 测定其核酸浓度及完整性, 将合格 RNA 样品送北京青莲百奥生物科技有限公司进行转录组测序分析。测序原始数据经质控过滤后, 以每千碱基转录本每百万映射读数 (fragments per kilobase of transcript per million mapped fragments, FPKM) 标准化计算基因表达水平, 该指标可客观反映基因转录本丰度。基于 FPKM 值筛选差异表达基因 (DEGs), 对 ORFV123K/N 及空细胞 DEGs 进行京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 和基因本体论 (GO) 分析, 推测主要影响山羊口腔上皮细胞的生物学功能和通路。

1.7 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 验证

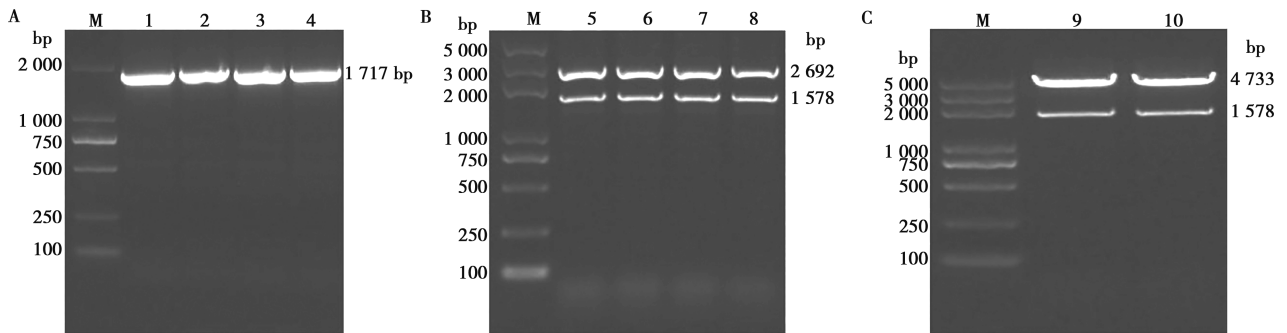
提取转染 pEGFP-N1-123K 和 pEGFP-N1-123N 的原代山羊口腔上皮细胞 RNA, 参照 PrimeScript™ RT 试剂盒说明书进行基因组 DNA 去除以及 cDNA 逆转录合成。从 ORFV 2 个毒株间选取涵盖免疫调节、上皮细胞凋亡等与致病机制相关功能, 且包含转录组

中上调/下调趋势, 涉及 2 个毒株差异富集通路的 DEGs, 进行 RT-qPCR 验证, RT-qPCR 所用引物序列详见表 1。使用 AceQ® qPCR® SYBR® Green 预混液 (Vazyme, China), 在 Applied Biosystems RT-qPCR 仪上扩增, 以 β -actin 作为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因 mRNA 的相对表达量。

2 结果与分析

2.1 ORFV123 基因的扩增及原核、真核表达载体的构建

以 ORFV 基因组 DNA 为模板, 采用特异性引物扩增 ORFV123。琼脂糖凝胶电泳结果显示 PCR 产物在预期位置出现单一目的条带 (图 1A), 表明 PCR 扩增成功。使用胶回收试剂盒纯化目的条带, 将纯化产物分别克隆至 pMD-19T 和 pEGFP-N1, 经 *Kpn* I / *Hind* III 双酶切鉴定, pMD-19T-123K、pMD-19T-123N、pEGFP-N1-123K 和 pEGFP-N1-123N 均可见 2 个条带, 见图 1B、1C。测序分析表明, 扩增序列与已发表序列一致, 载体构建成功。



1、2. 口唇感染株; 3、4. 内脏感染株; 5、6. 重组载体 pMD-19T-123K; 7、8. 重组载体 pMD-19T-123N; 9. pEGFP-N1-ORFV123K; 10. pEGFP-N1-ORFV123N。

A. ORFV123 基因片段扩增产物; B. ORFV123 基因重组克隆载体 (pMD-19T-123); C. 重组真核表达载体双酶切鉴定结果。

图 1 ORFV123 基因 PCR 及克隆质粒双酶切

2.2 ORFV123 基因生物信息学分析

经 DNAMAN 分析显示, 口唇及内脏感染株 ORFV123 基因均编码 525 个氨基酸, 且 2 株 ORFV123 蛋白的氨基酸组成及比例高度一致, 其中源自口唇感染株 (ORFV123K) 和源自内脏感染株 (ORFV123N) 的 ORFV123 等电点分别为 6.62 和 6.51, 不稳定指数分别为 30.08 和 30.71, 为稳定蛋白。平均疏水指数 >0 , 呈现亲水性特征, 其中 ORFV123K 第 14 位脯氨酸 (Pro, P) (-2.589) 和第 420 位丙氨酸 (Ala, A) (2.1) 分别呈现最低和最高疏水值, ORFV123N 相应位点为第 14 位 Pro (-2.589)

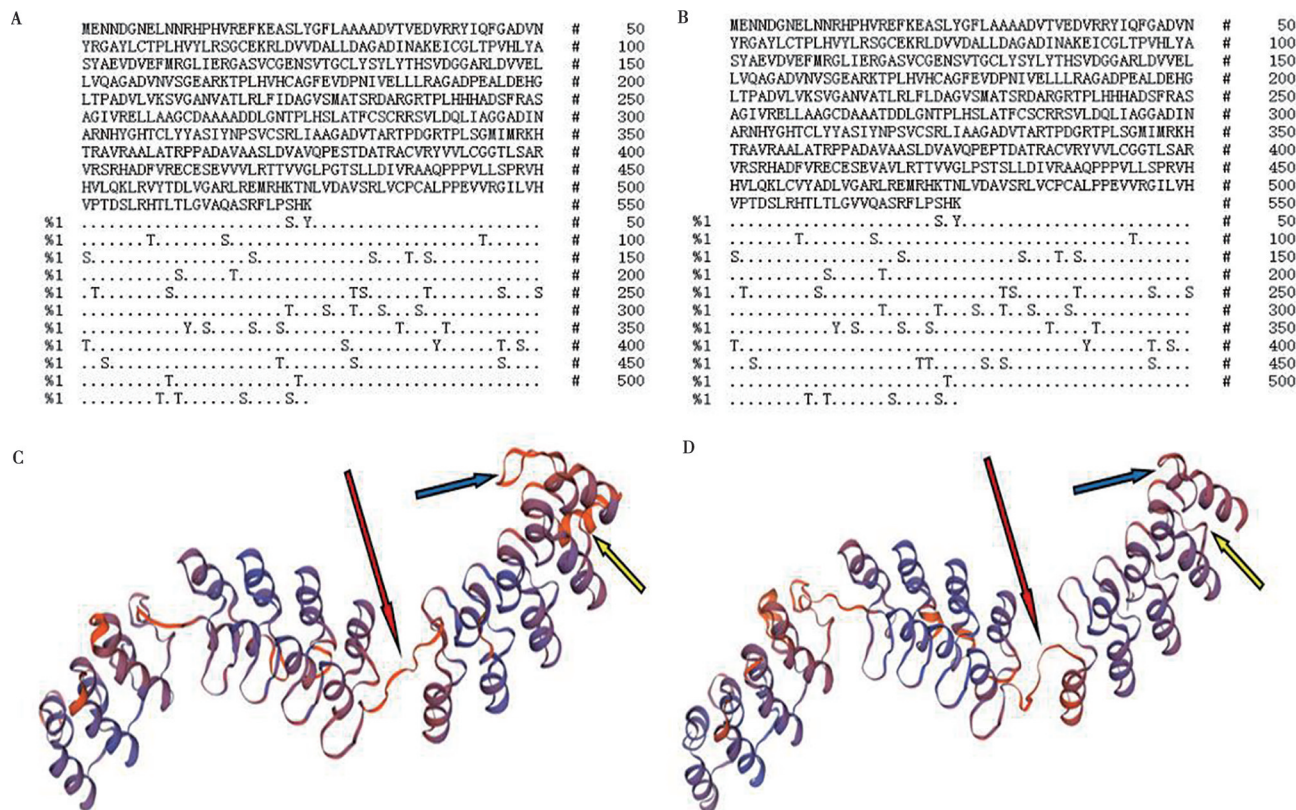
和第 371 位半胱氨酸 (Cys, C) (1.944)。

跨膜结构域分析结果显示口唇和内脏感染株 ORFV123 蛋白均不存在跨膜结构, 是非跨膜蛋白。ORFV123 蛋白均含 45 个潜在磷酸化位点 (图 2A、2B), 其中 ORFV123K 包含 12 个丝氨酸 (Ser, S), 11 个苏氨酸 (Thr, T) 和 6 个酪氨酸 (Tyr, Y) 位点, ORFV123N 为 12 个 Ser, 13 个 Thr 和 6 个 Tyr 位点, 二者差异主要体现为 ORFV123N 多 2 个 Thr 位点, 分别位于 200 和 400 区间; 结合文中进化树分析所用的 18 株参考序列进一步比对发现, 该 2 个 Thr 位点为 ORFV123N 特有, 18 株参考毒株中均未检出。

SignalP 5.0 预测证实 2 株蛋白均无信号肽, 提示其非分泌蛋白特性。

SOPMA 预测 ORFV 口唇感染株和内脏感染株的 ORFV123K/N 蛋白含有 4 种二级结构, 主要以 α 螺旋为主, 占比为 50.10% 和 49.14%, 无规则卷曲次之。Swiss-Model 在线软件预测显示 2 株蛋白三维结构存在 3 处差异 (图 2C、2D 中 3 个箭头标记处),

分别在第 299, 419 和 457 ~ 472 位, ORFV123N 在 299 位缺失 Thr。ORFV123N 在第 419 位中的 Ala 在 ORFV123K 中被替换为缬氨酸 (Val, V), 此为保守替换。ORFV123N 蛋白在 C 末端区域 (对应模板第 457 ~ 472 位附近) 展现出与模板更连续、更长的对齐区域, 而 ORFV123K 蛋白在该区域的比对则出现多个短片段错位与中断。



A. 口唇感染株 ORFV123 蛋白磷酸化位点预测; B. 内脏感染株 ORFV123 蛋白磷酸化位点预测; C. 口唇感染株 ORFV123 蛋白质三级结构; D. 内脏感染株 ORFV123 蛋白质三级结构。箭头分别表示 3 处差异。

图 2 ORFV123K/N 生物信息学分析

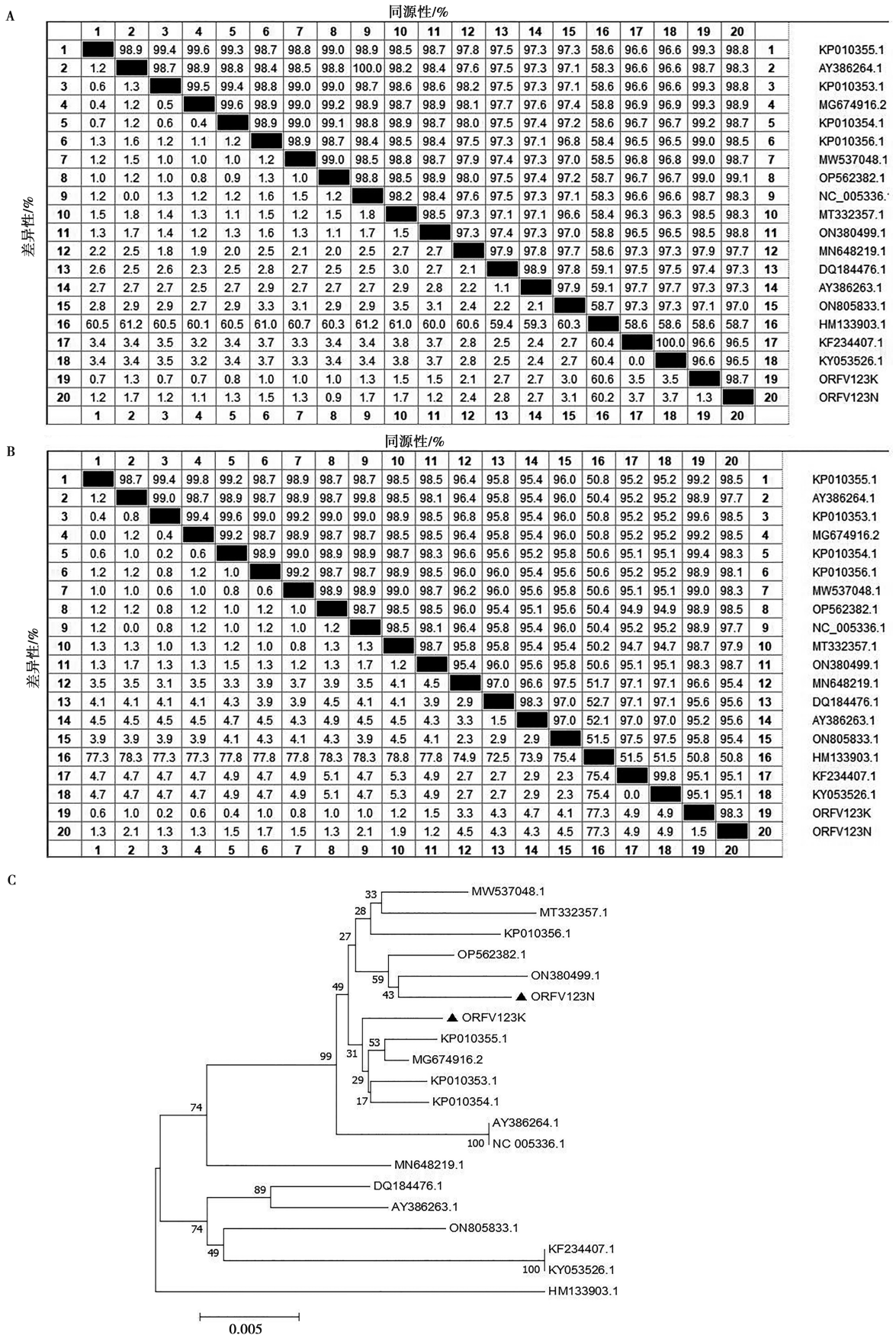
2.3 ORFV123 同源性和遗传进化分析

DNAMAN 分析显示, ORFV123K 和 ORFV123N 核苷酸及氨基酸序列同源性分别为 98.73% 和 98.48%, 存在 8 个氨基酸差异, 与 18 株不同地区 ORFV123 比较, 核苷酸同源性在 96.5% ~ 99.3% 之间, 氨基酸同源性在 95.2% ~ 99.8% 之间。在核苷酸序列中, ORFV123K 与中国福建株 (KP010353/KP010355) 同源性最高, 为 98.8%; ORFV123N 与马来西亚株 (OP562382) 同源性最高, 为 99.1% (图 3A); 在氨基酸序列中, ORFV123K 与中国福建株 (KP010354)、ORFV123N 与西班牙株

(ON805833) 同源性最高, 分别为 98.3% 和 98.7% (图 3B); 进化分析表明, ORFV123K 与中国福建分离株聚于同一分支, 而 ORFV123N 与印度分离株 (ON380500) 遗传距离最近, 二者分属不同进化分支 (图 3C)。

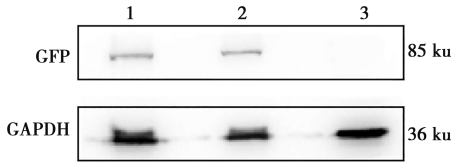
2.4 融合蛋白表达的鉴定

将重组真核表达质粒分别转染山羊口腔上皮细胞后, Western blot 结果显示, 试验组在 85 ku 处均检测到特异性条带 (图 4), 与预测的 GFP-ORFV123 融合蛋白分子量一致, 而空载体对照组未见相应条带。



A. 核苷酸序列同源性分析; B. 氨基酸序列同源性分析; C. 遗传进化树, ▲为本试验 ORFV123 基因。

图 3 ORFV123K/N 同源性和进化树分析



1. pEGFP-N1-123K; 2. pEGFP-N1-123N; 3. 口腔上皮细胞阴性对照。

图4 融合蛋白功能验证

2.5 转录组测序

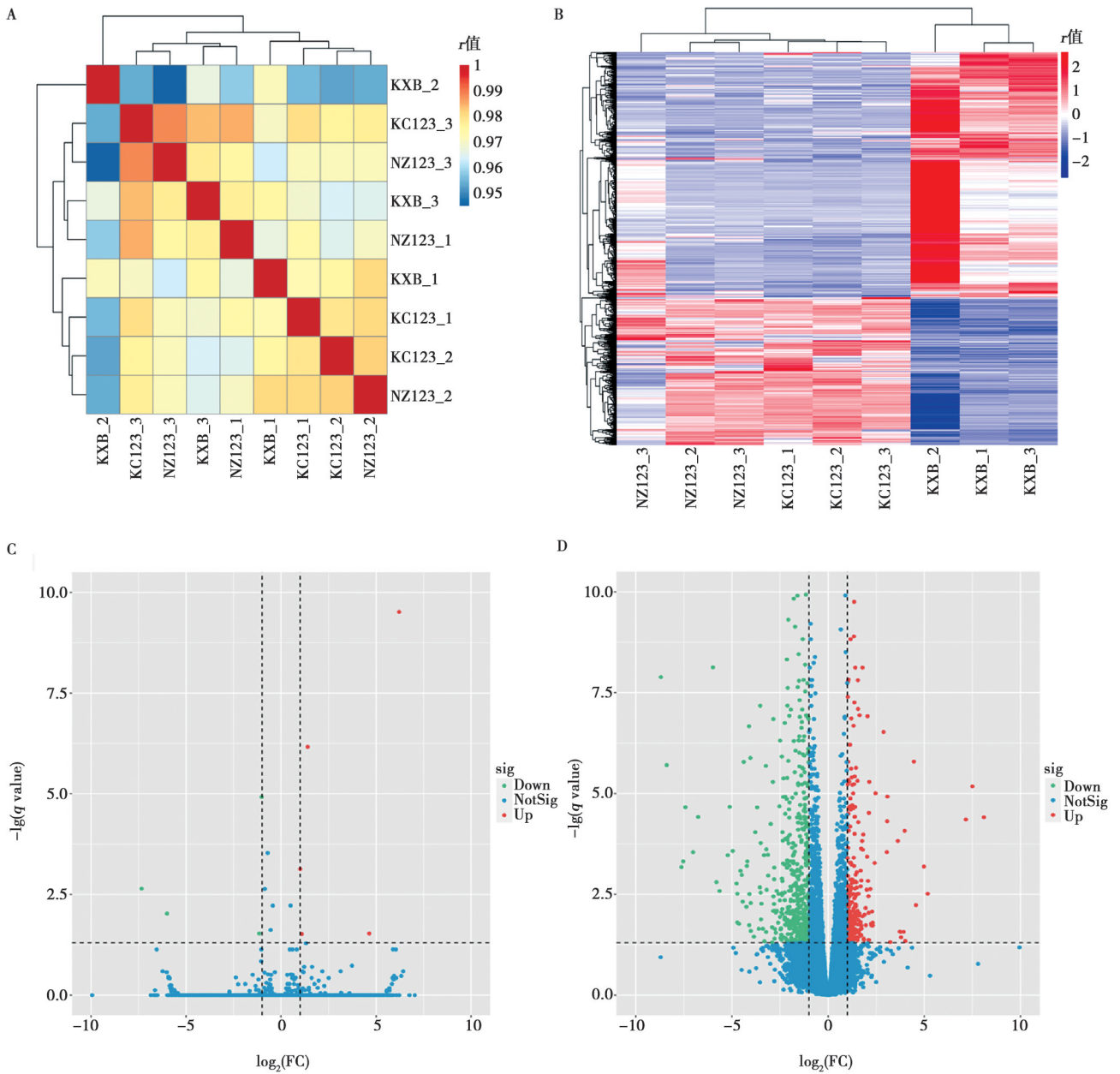
2.5.1 样本重复性检验及差异基因聚类分析

采用皮尔逊相关系数 r 评估生物学重复相关性, 结果显示各样本间 r 值均接近 1 (图 5A), 表明重复

性好且组间差异显著, 符合后续分析要求。

转录本聚类分析结果 (图 5B) 显示, ORFV123K/N 组间共表达基因占主导, 差异基因较少; 而与空细胞组比较时, 2 组均呈现显著差异表达模式。

火山图分析显示 (图 5C、5D), 以差异倍数 (fold change, FC) 的绝对值 $|FC| \geq 2$ 且 $P \leq 0.05$ 为阈值, 口唇与内脏感染株间共鉴定出 16 个 DEGs (7 个上调, 9 个下调)。与空细胞组比较, 口唇感染株检测到 806 个 DEGs (308 个上调, 498 个下调), 内脏感染株检测到 402 个 DEGs (148 个上调, 254 个下调)。结果表明, 2 个感染株间转录谱相似, 而与空细胞组存在显著差异。



A. 重复性检验; B. DEGs 热图; C. ORFV123K 与 ORFV123N 组火山图; D. ORFV123K/N 组与空细胞组火山图。

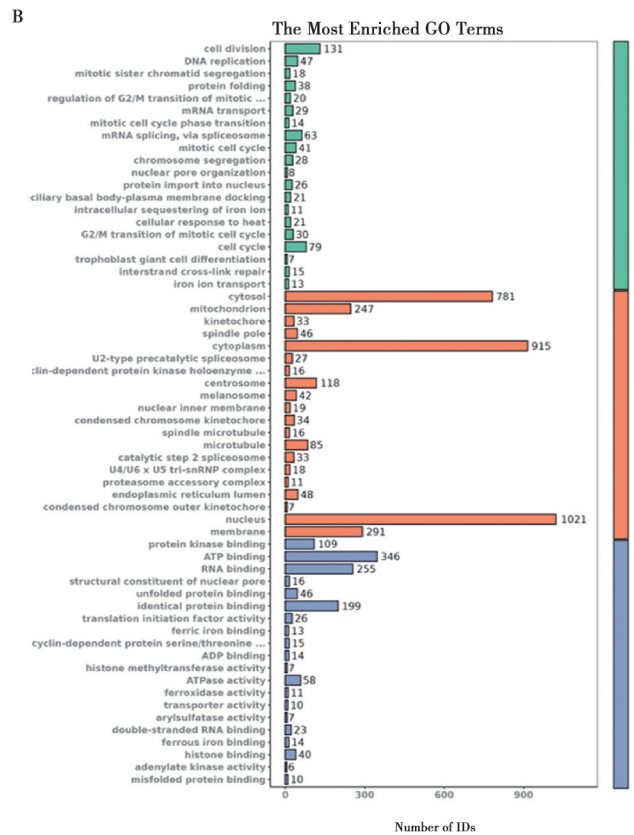
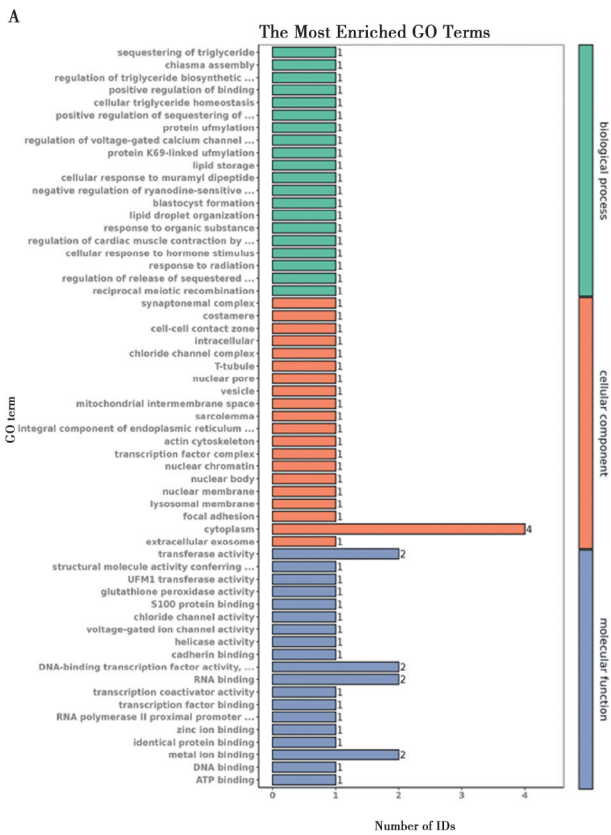
图5 ORFV123K/N 的转录组差异分析

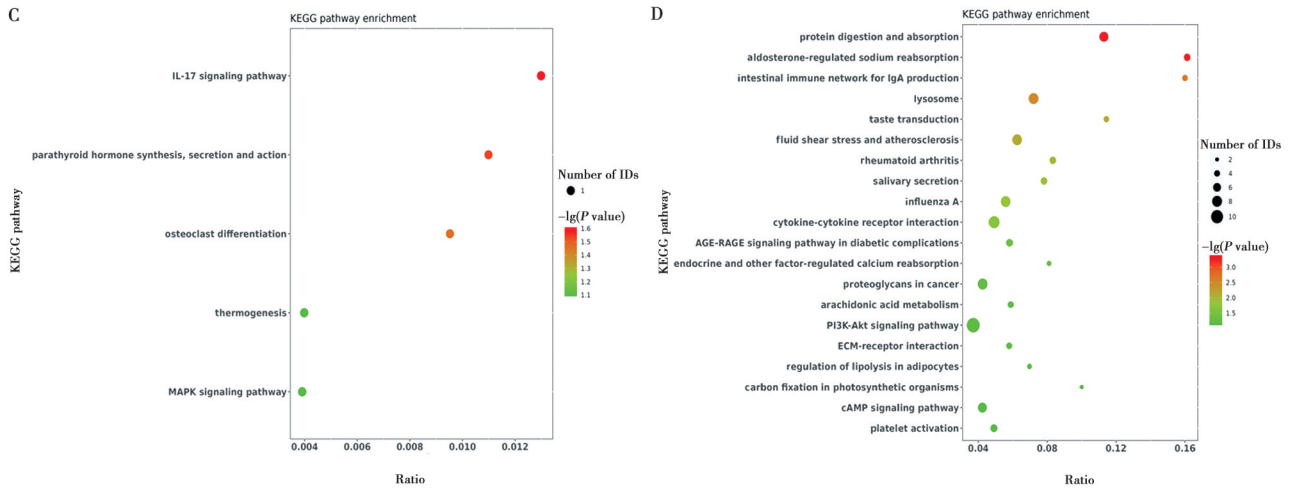
2.5.2 差异基因 GO 及 KEGG 分析

GO 分析显示, 口唇与内脏感染株间 DEGs 注释到 89 个基因条目 (GO term), 包括生物学过程 (biological process, BP) 42 个, 细胞组分 (cellular component, CC) 28 个, 分子功能 (molecular function, MF) 19 个; 与空细胞组比较则注释到 2 427 个 GO term (BP 1 413 个, CC 308 个, MF 706 个), 均存在显著富集条目 ($P < 0.01$)。ORFV123K/N 间的差异主要体现在特定生物学功能层面, 富集的条目包括甘油三酯隔离 (sequestering of triglyceride)、交叉组装 (chiasma assembly)、甘油三酯生物合成调控 (regulation of triglyceride biosynthetic process) 等; 而与空细胞组的差异则更多聚焦于细胞分裂 (cell division)、DNA 复制 (DNA replication)、有丝分裂姐妹染色单体分离 (mitotic sister chromatid segregation)、动粒组装 (kinetochore assembly) 等基础且广泛的生物过程, 同时在细胞组分层面显著富集于细胞质 (cytoplasm)、细胞核 (nucleus) 等结构, 分子功能层面

则富集于 ATP 结合 (ATP binding)、RNA 结合 (RNA binding) 等功能 (图 6A、6B)。

KEGG 通路富集分析 (图 6C、6D) 结果表明, 2 个感染株间 16 个 DEGs 显著富集于白介素-17 信号通路 (IL-17 signaling pathway) (富集倍数 1.8, $P < 0.01$), ORFV123N 中, 核因子 κ B 抑制蛋白 α 基因 (NFKBIA) 显著上调 ($FC = 3.2, P < 0.05$), 该基因编码的核因子 κ B 抑制蛋白 α (I κ B α) 可抑制核因子 κ B (NF- κ B) 炎症通路激活; 同时白介素-6 (IL-6) 显著下调 ($FC = 0.4, P < 0.05$), 其编码的 IL-6 是介导局部炎症的关键分子。ORFV123K 则呈现相反的表达特征: IL-6 显著上调 ($FC = 2.5, P < 0.05$), NFKBIA 显著下调 ($FC \approx 0.31, P < 0.05$)。此外, 2 个感染株与空细胞组比较, 重点富集于 PI3K-Akt 信号通路 (PI3K-Akt signaling pathway)、蛋白质消化与吸收通路 (protein digestion and absorption)、IgA 介导的肠道免疫网络通路 (intestinal immune network for IgA production) 等。





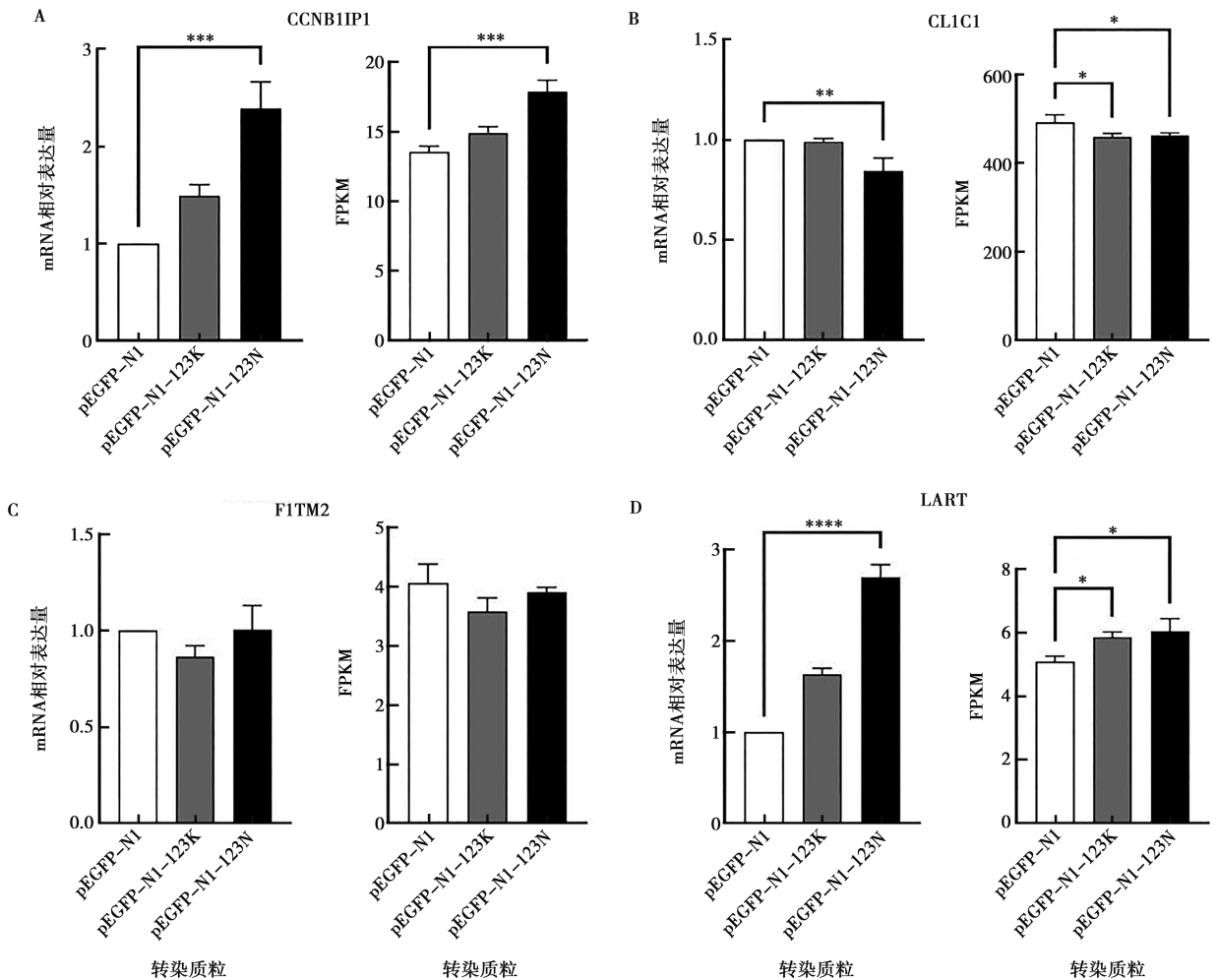
A. ORFV123K/N GO 注释三联图; B. ORFV123K/N 与空细胞组 GO 注释三联图; C. ORFV123K/N KEGG 通路散点图; D. ORFV123K/N 与空细胞组 KEGG 通路散点图。

图 6 GO 注释三联图和 KEGG 通路散点图

2.5.3 RT-qPCR 验证

为验证转录组测序结果的可靠性，从 2 个感染株间 16 个 DEGs 中，选取周期蛋白 B1 相互作用蛋白 1 (CCNB1IP1)、氯通道蛋白 1 (CLIC1)、脂肪储存诱导跨膜蛋白 2 (FITM2)、卵磷脂视黄醇酰基转移酶 (LRAT)、过氧化物还原酶 1 (PRDX1)、蛋白酪氨

酸磷酸酶受体 R (PTPRR)、跨膜 emp24 结构域蛋白 2 (TMED2) 和三重基序蛋白 41 (TRIM41) 共 8 个关键差异基因（涉及免疫调节、上皮细胞功能等与本研究致病机制相关的通路）进行 RT-qPCR 验证。如图 7 所示，RT-qPCR 结果与转录组测序一致，证实了转录组数据的可靠性。



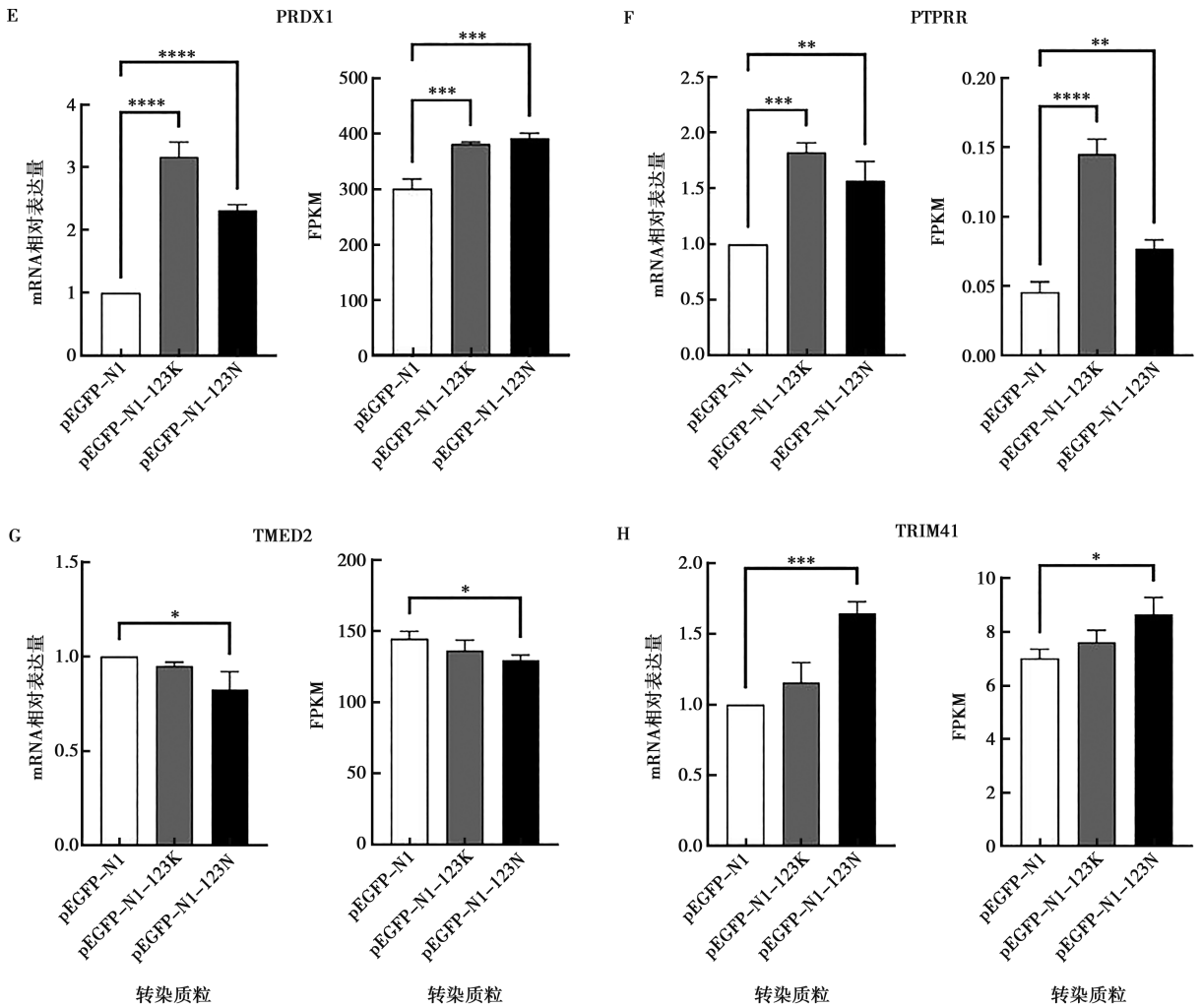


图7 RT-qPCR 验证表达基因

3 讨论

ORFV 在全球各地均有小规模暴发和流行。基因组分析显示，ORFV 编码 5 个具有 ANK/F-box 结构特征的锚蛋白基因^[18]。研究显示，ANK/F-box 参与病毒和宿主之间的免疫调节，ORFV123 基因编码的蛋白含有最丰富的 ANK 重复基序，其生物学功能及作用机制仍不清楚^[19]。因此，本研究对口唇和内脏感染株的 ORFV123 基因进行生物信息学分析及功能分析，为进一步探索 ORFV123 在病毒-宿主互作中发挥作用。

病毒基因组的不稳定性会诱发核苷酸突变和氨基酸变异，改变其理化性质，进而影响病毒与宿主的相互作用。分子流行病学研究表明，ORFV 在不同地域存在明显的遗传分化特征。本研究发现，口唇感染株与中国福建株 (KP010353/KP010355) 的核苷酸同源性达 99.3%，而内脏感染株与马来西亚株 (OP562382) 的同源性为 99.1%，2 个感染株间保守

性>96.5%。这一地理分布特征与 Mangga 等^[20]的研究结果相互印证，提示 ORFV 可能存在不同的区域性传播链。生物信息学分析显示，2 个感染株 ORFV123 结构特征与 Lacek 等^[21]报道 ORFV 锚蛋白二级结构一致，但其具体作用在 ORFV 与宿主细胞的作用机制尚未进行验证，需进一步进行深入研究。磷酸化位点分析发现，ORFV123N 较 ORFV123K 多 2 个特有 Thr 位点，该差异或为二者功能分化的关键分子基础 Thr 作为磷酸化修饰的核心位点，其特有存在可能通过调控 ORFV123 蛋白与宿主信号分子的相互作用，影响病毒对不同组织的适应性。三级结构预测有 3 处差异，ORFV123N 在 299 位缺失 Thr，此位点的缺失可能导致局部主链结构的细微调整。ORFV123N 中第 419 位的 Ala 在 ORFV123K 中被保守替换为 Val，疏水，预计对蛋白质结构影响较小。ORFV123N 蛋白在 C 末端区域展现出与模板更连续、更长的对齐区域，而 ORFV123K 蛋白在该区域的比对则出现多个短片段错位与中断。这些定位于潜在功能位点的结构差

异,为阐释2株病毒在毒力或宿主范围上可能存在的表型差异提供了结构生物学依据。

多数脊索动物痘病毒含有痘病毒锚蛋白C端重复序列结构域(PRANC),能够特异性结合I型泛素连接酶(SCF1)^[21]。虽有研究仅证实ORFV5种ANK蛋白含有PRANC结构域,可与细胞SCF1复合物相互作用,但后续尚未进行深入研究。值得注意的是,与已报道的痘病毒ANK蛋白(如VACV K1L)相比^[12],2个感染株ORFV123也含有ANK基序。因此,推测本研究发现的2个感染株ORFV病毒中的ORFV123蛋白也介导蛋白相互作用。为进一步探究ORFV蛋白与宿主细胞的作用机制,多选用表达蛋白于宿主细胞来进一步探究其发挥的作用。本研究通过真核表达ORFV123基因展开分析,结合转录组KEGG通路富集结果(ORFV123K/N与空细胞组DEGs富集于PI3K-Akt通路)发现:PI3K/Akt通路在细胞增殖中起关键作用,而2个毒株ORFV123诱导的DEGs均涉及该通路,证实ORFV123参与宿主细胞增殖调控,且口唇株更多的DEGs可能使其对宿主细胞增殖的影响更显著。此外,ORFV常通过调节宿主免疫功能与NF- κ B通路影响自身复制。本研究中DEGs显著富集于与晚期糖基化终末产物-受体信号通路(AGE-RAGE)、NF- κ B活性及炎症反应相关的通路,且关键节点基因蛋白激酶B α 型(AKT1)与雷帕霉素靶蛋白(mTOR)、NF- κ B的表达变化与Wu等^[22]报道的ORFV免疫逃逸机制高度吻合,这提示2个感染株ORFV123可能通过调控上述通路及基因,影响宿主免疫应答,而2个感染株在ORFV123结构与DEGs数量上的差异,或许正是其在免疫逃逸效率或炎症诱导能力上存在区别的重要分子基础。具体而言,ORFV123K可能通过诱导更多DEGs(806个)调控口腔黏膜上皮细胞的增殖与凋亡,配合C末端结构错位导致的蛋白互作差异,增强局部炎症反应;而ORFV123N可能通过较少DEGs(402个)及连续的C末端结构,聚焦调控IL-17信号通路,引发肠道特异性病变,这种“结构-转录-表型”的关联,为完整解析ORFV123的功能机制提供了闭环证据。后续可构建ORFV123C端结构域突变体及PRANC结构域缺失株,结合Co-IP试验验证其与SCF1复合物的互作能力,并借助PI3K/Akt、NF- κ B通路特异性抑制剂明确2个毒株对宿主细胞增殖及免疫应答的调控差异,再通过动物感染模型对比2个毒株在口腔黏膜、肠道组织的病变及通路基因表达,进一步完善ORFV123功能机制的阐释体系。

本研究旨在解析ORFV123蛋白的生物学功能,通过构建其真核表达载体并转染至宿主细胞,运用转

录组测序技术分析基因表达谱变化来探究其在病毒与宿主互作过程中的作用。尚未构建ORFV123基因F-box结构域的特异性敲除突变体,其生物学功能是否主要依赖于ANK重复基序介导的蛋白互作仍需要功能缺失试验验证。本研究的发现为后续借助CRISPR/Cas9介导的基因编辑、点突变及功能回补试验等分子病毒学技术,深入探究ORFV123蛋白功能及其与宿主互作中的具体分子机制奠定了基础。

参考文献:

- [1] KASSA T. A review on human orf: a neglected viral zoonosis [J]. *Res Rep Trop Med*, 2021, 12: 153-172.
- [2] 田谦,张江绒,王凯玲,等.羊口疮疫苗研究进展[J].*中国兽医科学*, 2024, 54(11): 1510-1516.
- [3] 张大俊,王国春,史喜娟,等.灭活的羊口疮病毒抑制口蹄疫病毒在BHK-21细胞中的复制[J].*中国兽医科学*, 2022, 52(4): 403-409.
- [4] SAHU B P, MAJEE P, SINGH R R, et al. Recombination drives the emergence of orf virus diversity: evidence from the first complete genome sequence of an Indian orf virus isolate and comparative genomic analysis [J]. *Arch Virol*, 2022, 167(7): 1571-1576.
- [5] 刘丽佳,孙正楠,向华,等.羊口疮病毒B2L截短重组蛋白刺激小鼠产生特异性抗体的研究[J].*中国兽医科学*, 2021, 51(1): 66-73.
- [6] KHATIWADA S, DELHON G, NAGENDRAPRABHU P, et al. A parapoxviral virion protein inhibits NF- κ B signaling early in infection [J]. *PLoS Pathog*, 2017, 13(8): e1006561.
- [7] MCKEEVER D J, JENKINSON D M, HUTCHISON G, et al. Studies of the pathogenesis of orf virus infection in sheep [J]. *J Comp Pathol*, 1988, 99(3): 317-328.
- [8] 张江绒,田谦,王艳华,等.羊口疮病毒基因组结构及重要基因功能研究进展[J].*畜牧与兽医*, 2024, 56(9): 142-151.
- [9] PERKUS M E, GOEBEL S J, DAVIS S W, et al. Vaccinia virus host range genes [J]. *Virology*, 1990, 179(1): 276-286.
- [10] BRANDT T, HECK M C, 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.
- [11] SUN T W, YANG C L, KAO T T, et al. Host range and coding potential of eukaryotic giant viruses [J]. *Viruses*, 2020, 12(11): 1337.
- [12] MOSAVI L K, CAMMETT T J, DESROSIERS D C, et al. The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition [J]. *Protein Sci*, 2004, 13(6): 1435-1448.
- [13] LI J, MAHAJAN A, TSAI M D. Ankyrin repeat: a unique motif mediating protein-protein interactions [J]. *Biochemistry*, 2006, 45(51): 15168-15178.
- [14] 樊月圆,刘泽武,袁嘉芮,等.肠道源和口唇源羊口疮病毒ORF128基因的比较分析[J].*动物医学进展*, 2025, 46(7): 1-10.
- [15] NAGENDRAPRABHU P, KHATIWADA S, CHAULAGAIN S, et

- al. A parapoxviral virion protein targets the retinoblastoma protein to inhibit NF- κ B signaling [J]. PLoS Pathog, 2017, 13 (12): e1006779.
- [16] 丁鹤, 宫鹏涛, 苑淑贤, 等. 弓形虫棒状蛋白 ROP54 编码基因的生物信息学分析及原核表达 [J]. 畜牧与兽医, 2022, 54 (4): 102-106.
- [17] 庞峰, 龙琴琴, 程振涛. 羊口疮病毒编码的 NF- κ B 抑制基因研究进展 [J]. 中国兽医学报, 2022, 42 (4): 813-817, 823.
- [18] 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.
- [19] 葛士坤, 张凯照, 刘健新, 等. 羊口疮病毒 GDZC 株锚蛋白基因的克隆及序列分析 [J]. 中国畜牧兽医, 2016, 43 (12): 3085-3093.
- [20] MANGGA H K, BALA J A, BALAKRISHNAN K N, et al. Genome-wide analysis and molecular characterization of orf virus strain UPM/HSN-20 isolated from goat in Malaysia [J]. Front Microbiol, 2022, 13: 877149.
- [21] LACEK K, BAUER B, BIENKOWSKA-SZEWCZYK K, et al. Orf virus (ORFV) ANK-1 protein mitochondrial localization is mediated by ankyrin repeat motifs [J]. Virus Genes, 2014, 49 (1): 68-79.
- [22] WU G, SONG T, TANG L, et al. Total saponins of *Panax japonicus* alleviates CCl₄-induced acute liver injury in rats by regulating the PI3K/AktNF- κ B signaling pathway [J]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2024, 44 (2): 244-251.

· 信息 ·

