

锦鲤疱疹病毒-CJ株 *ORF81* 基因的 克隆及生物信息学分析

周井祥*[#], 李新伟[#], 王好, 吕文亮, 朱霞

(吉林农业大学动物科技学院, 动物生产及产品质量安全教育部重点实验室, 吉林 长春 130118)

摘要: 为了解锦鲤疱疹病毒中国吉林株(KHV-CJ) *ORF81* 蛋白的结构特征和进化关系, 用框镜鲤尾鳍原代细胞增殖 KHV-CJ, 提取其 DNA, 经 PCR 扩增, 获得 *ORF81* 基因, 将其克隆到 pMD18-T 载体中, 构建重组质粒。应用生物信息学方法初步分析 KHV-CJ *ORF81* 基因的结构和功能, 并与 GenBank 上已公布的 3 株 KHV 构建系统进化树。结果显示, 获得了长 771 bp 的 *ORF81* 基因, 编码 256 个氨基酸; 预测 *ORF81* 基因的理论分子量为 28 246.50 u, 等电点为 8.404; 疏水性大于亲水性; 信号肽切割部位最可能位于 29 位的 S(丝氨酸); 有 4 个跨膜区; 抗原表位预测显示抗原性良好; 结构预测显示, 不存在 N-糖基化位点、存在 6 个 O-糖基化位点和 11 个磷酸化位点; 系统进化树分析显示, 与锦鲤疱疹病毒以色列株属同一分支。

关键词: 锦鲤疱疹病毒; *ORF81* 基因; 克隆测序; 生物信息学分析

中图分类号: S 917; Q 785

文献标志码: A

锦鲤疱疹病毒病(koi herpesvirus disease, KHVD)是由锦鲤疱疹病毒(koi herpesvirus, KHV)感染锦鲤(*Cyprinus carpio koi*)、鲤(*Cyprinus carpio carpio*)及其普通变种如框镜鲤等而导致的一种具有高度传染性和致死性的疾病。1998年 KHV 首次在以色列的 Magan Michael 地区和美国暴发^[1], 2000年传至英国、德国和比利时^[2]; 2002年4月, 印度尼西亚发生此病, 同年中国广东省和台湾省的锦鲤疑似发生此病^[3-4]; 2003年10月日本证实该病已在本国存在^[5]。目前, 该病在我国的鲤养殖中频繁发生, 造成鲤的大量死亡, 给鲤养殖业带来了严重危害。2007年国家质检总局发布警示预报, 要求将 KHV 作为必检项目, 并加强对其他国家进口的锦鲤和鲤的检测。

KHV 是双股线形 DNA 病毒, 是鱼类疱疹病毒属中基因组最大的病毒^[6]。目前, GenBank 已

经公布了 3 株分别来自日本、美国和以色列锦鲤疱疹病毒的基因序列^[7], 基因组大小为 295 kb, 并含有 22 kb 的末端同向重复序列; 有 156 个开放性阅读框(ORF), 8 个末端重复序列。KHV 的 156 个 ORF 的功能只有少数已经确定其功能。*ORF25* 和 *ORF99* 编码膜糖蛋白; *ORF81* 和 *ORF83* 编码主要囊膜蛋白, 主要在细胞质中合成^[8]。

研究发现, *ORF81* 在大量表达时出现细胞核缩小, 细胞从瓶壁脱落的现象。ROSENKRANZ 等^[9]对 *ORF81* 重组研究表明, 其重组体蛋白的表达可作为免疫荧光试验和 ELISA 检测 KHV 特异性血清抗体的诊断性抗原, 还可以用于抗 KHV 的亚单位或 DNA 疫苗的研究。*ORF72* 和 *ORF92* 编码衣壳蛋白, 邱芮瑜^[10]研究表明, KHV 的 *ORF72* 和 *ORF92* 可分别表达 47.6 ku 和 145 ku 的蛋白, 且二者表达量较大, 可用于 KHV 的快速

收稿日期:2011-07-15 修回日期:2011-09-14

资助项目:国家自然科学基金项目(30671621)

*周井祥, 李新伟为同等贡献作者

通讯作者:周井祥, E-mail: zhjxnd@126.com

检测。

目前国内尚无有效控制 KHV 的方法。本研究以本实验室在国内首次分离到的锦鲤疱疹病毒吉林株 (KHV-CJ) 基因组为模板,成功克隆到 KHV 主要囊膜蛋白基因——ORF81 基因,并分析其生物学信息,旨在为锦鲤疱疹病毒的基因背景信息、发病机理、分子流行病学及基因工程疫苗的研究奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 细胞与病毒

锦鲤疱疹病毒中国吉林株 (KHV-CJ)、锦鲤疱疹病毒尾鳍原代细胞由吉林农业大学动物生产及产品质量安全教育部重点实验室分离保存或提供^[11]。

1.2 菌株与载体

pMD18-T 载体购自大连宝生物工程有限公司, *E. coli* DH5 α 购自北京全式金生物技术有限公司。

1.3 主要试剂

新生牛血清、Gibco M199 培养基为 Invitrogen 公司产品; *ExTaq* DNA 聚合酶、限制性内切酶 *Sma* I 和 *Xba* I、DNA Marker 等购自大连宝生物工程有限公司;凝胶回收试剂盒和质粒小提试剂盒购自天根生化有限公司。

1.4 引物的设计与合成

根据 GenBank 上登录的锦鲤疱疹病毒 ORF81 基因序列,利用 Primer Premiers 5.0 软件设计 1 对引物,上游引物: P1 5'-CCCGGGATGGCAGTCACCAAAGCT-3',下游引物: P2 5'-TCTAGATCACCACATCTTGCCGG-3',分别引入 *Sma* I 和 *Xba* I 限制性酶切位点(划线部位),由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.5 锦鲤疱疹病毒中国吉林株 (KHV-CJ) ORF81 基因的 PCR 扩增

按照 HASEGAWA 等^[12] 和 NEUKIRCH 等^[13] 的方法培养细胞。将 KHV-CJ 病毒液接种框镜鲤尾鳍原代细胞单层,逐日观察细胞病变情况,收集细胞病变达 70% ~ 80% 的细胞及上清液,收集病毒后常规方法提取病毒 DNA,采用 25 μ L 反应体系进行 PCR 扩增,反应条件如下:95

℃ 预变性 5 min,94 ℃ 40 s,59.3 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,35 个循环。

1.6 锦鲤疱疹病毒中国吉林株 (KHV-CJ) ORF81 基因的克隆及鉴定

将目的片段纯化回收后,与 pMD18-T 载体连接,转化至 DH5 α 感受态细胞,氨苄青霉素筛选单菌落,提取重组质粒后以 *Sma* I 和 *Xba* I 双酶切鉴定阳性重组质粒,命名为 pMD18-T-81,送至上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

1.7 锦鲤疱疹病毒中国吉林株 (KHV-CJ) ORF81 基因编码蛋白的生物信息学分析

利用 DNASTar 软件翻译出 ORF81 基因的核苷酸序列;利用 SignalPv3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 软件进行氨基酸序列的信号肽分析;利用 TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 软件进行跨膜区分析;利用 ProtScale (<http://www.expasy.ch/tools/protscale.html>) 软件分析蛋白的疏水性;利用 BepiPred 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/>) 软件和 DNASTar 6.0 (Protean) 对 ORF81 序列编码的蛋白进行抗原表位分析;分别利用 NetNGlyc1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) 和 YinOYang1.2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/YinOYang/>) 在线分析软件进行 N-糖基化位点和 O-糖基化位点预测,利用 NetPhos 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 进行磷酸化位点预测。

1.8 锦鲤疱疹病毒中国吉林株 (KHV-CJ) ORF81 基因的系统进化树分析

从 GenBank 上分别下载锦鲤疱疹病毒日本株、美国株和以色列株的基因序列,利用 DNASTar 6.0 (MegAlign) 构建不同锦鲤疱疹病毒株的 ORF81 基因进化树,分析其进化关系。

2 结果

2.1 框镜鲤尾鳍原代细胞 (MFC) 接种 KHV 后细胞病变

MFC 接种 KHV 后,5 ~ 6 d 出现细胞体积增大及少量的细胞空泡化,10 d 后病变更加明显,且

细胞开始从瓶壁脱落。

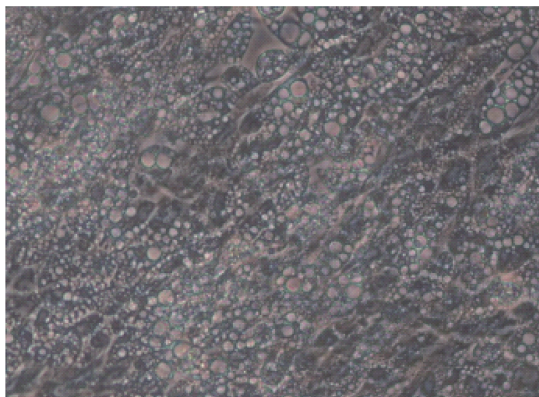


图1 KHV 在 MFC 产生的细胞病变

Fig.1 Cytopathic effect induced by KHV

2.2 ORF81 基因的 PCR 扩增和鉴定

PCR 扩增出一条与目的片段大小相符的 DNA 片段(图 2), pMD18-T-81 用 *Sma* I 和 *Xba* I 进行双酶切, 获得一段约 771 bp 的片段(图 3), 说明 ORF81 基因片段已成功克隆至载体中。

2.3 锦鲤疱疹病毒中国吉林株 (KHV-CJ) ORF81 基因的生物信息学分析

基因的序列测定和编码蛋白质分子特征测序结果表明, ORF81 基因长 771 bp, 为一完整的开放阅读框, 编码 256 个氨基酸, 预测 ORF81 的理论分子量为 28 246.50 u, 等电点为 8.404, 含有 25 个强碱性氨基酸(K、R)、21 个强酸性氨基酸(D、E)、105 个疏水氨基酸(A、I、L、F、W、V)、63 个极性氨基酸(N、C、Q、S、T、Y)。

信号肽分析 将测得的 ORF81 氨基酸序列在丹麦技术大学生物序列分析中心(CBS)的网站 <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP> 进行在线分析, 通过 SignalPv3.0 进行信号肽切割位点的预测。使用 Neural net-work(NN) 和 Hidden Markov(HMM) 两种模型进行预测, 前者能够对信号肽的分泌途径以及切割位点进行预测, 预测值标示为 Smean; 后者主要是对该氨基酸序列是否具有信号肽进行分析和预测, 同时也对信号肽切割位点及分布进行预测, 预测值

表示为 Sprob。结果显示(图 4), NN 和 HMM 显示信号肽切割部位最可能位于 29 位的 S(丝氨酸)。

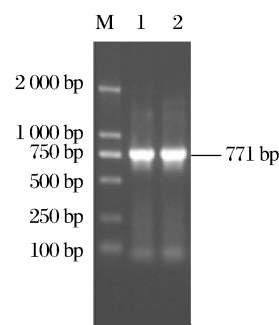


图2 锦鲤疱疹病毒中国吉林株 (KHV-CJ) ORF81 基因的 PCR 扩增

M:DNA 分子量标准; 1,2:PCR 产物。

Fig.2 PCR amplification of koi herpesvirus China Jilin strain ORF81 gene

M:DL2000DNA Markers; 1,2:product of PCR.

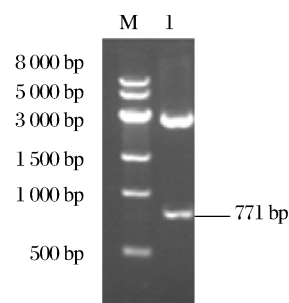


图3 锦鲤疱疹病毒中国吉林株 (KHV-CJ) ORF81 基因的双酶切鉴定

M:DNA 分子量标准; 1:pMD18-T-81 的双酶切产物。

Fig.3 The identification of koi herpesvirus China Jilin strain ORF81 gene using double restriction enzymes digestion

M:8000DNA Markers; 1:product from pMD18-T-81 digested by *Sma* I and *Xba* I

跨膜区分析 TMHMM 预测 ORF81 分别在 44~66 位、81~103 位、120~142 位、162~184 位有 4 个跨膜区(图 5), 其中 N 末端和 C 末端都位于病毒膜内区。

疏水性分析 通过 ProtScale 在线分析表明, 该蛋白具有一定疏水性, 提示该蛋白高疏水性区与膜蛋白跨膜区有明显相关性(图 6)。

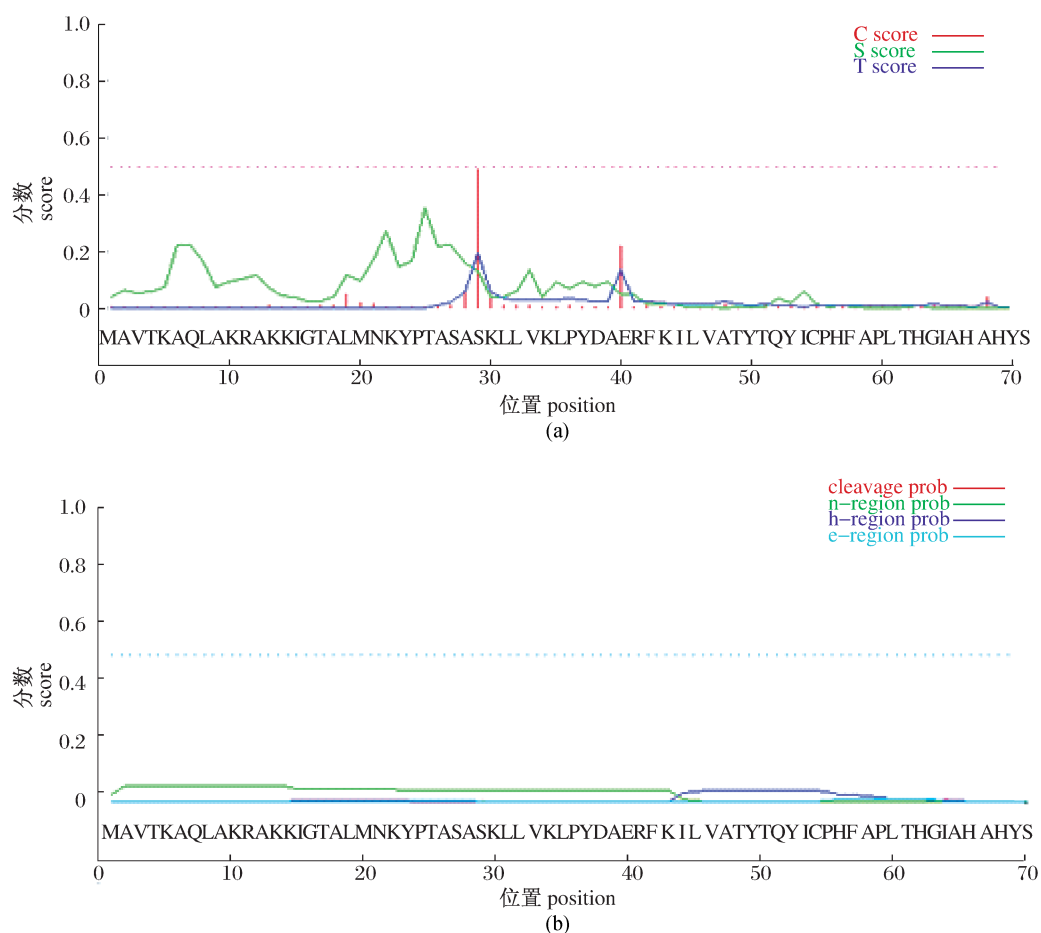


图4 锦鲤疱疹病毒中国吉林株 (KHV-CJ) *ORF81* 的信号肽预测

(a) SignalP – NN 预测 (euk 在线分析): 序列; (b) SignalP – HHM 预测 (euk 在线分析): 序列。

Fig. 4 The prediction of signal peptide of koi herpesvirus China Jilin strain *ORF81* gene

(a) SignalP – NN prediction (euk networks): sequence; (b) SignalP – HHM prediction (euk networks): sequence.

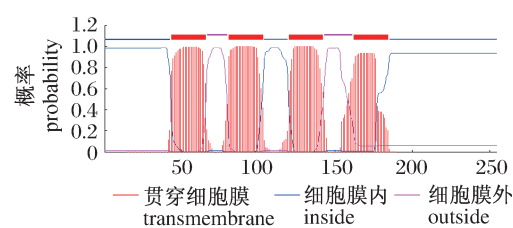


图5 锦鲤疱疹病毒中国吉林株 (KHV-CJ) *ORF81* 的跨膜区分析

序列的 TMHMM 预测后概率。

Fig. 5 Transmembrane domain analysis of koi herpesvirus China Jilin strain *ORF81* gene

TMHMM postyrior probabilities for sequence.

抗原表位分析 用 <http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/> 在线软件及 DNASTar 6.0 (Protean) 对锦鲤疱疹病毒 *ORF81* 基因编码的蛋白进行抗原表位分析, 得出其抗原表位主要集中在

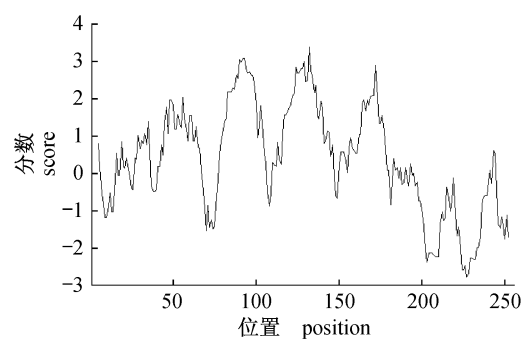


图6 锦鲤疱疹病毒中国吉林株 (KHV-CJ) *ORF81* 基因的疏水性分析

序列的 Protoscale 分析输出信息。

Fig. 6 Hydrophobicity analysis of koi herpesvirus China Jilin strain *ORF81* gene

Protoscale output for user sequence.

在第 7~14、21~28、68~77、105~111、184~212、218~239 和 245~254 位氨基酸(图 7),表明该蛋

白的表面抗原决定簇主要位于这些区域,预示这些抗原表位可能与该病毒的致病性有关。

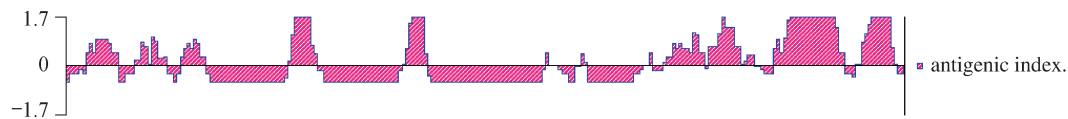


图 7 锦鲤疱疹病毒中国吉林株(KHV-CJ) *ORF81* 基因的抗原表位分析

Fig. 7 The prediction of the antigenic determinants of koi herpesvirus China Jilin strain *ORF81* gene

糖基化及磷酸化位点的预测 分别通过 NetNGlyc1.0 在线分析软件和 YinOYang1.2 在线分析软件对锦鲤疱疹病毒中国吉林株(KHV-CJ) *ORF81* 进行 N-糖基化位点和 O-糖基化位点预测。结果表明,其氨基酸序列不存在潜在的 N-糖基化位点;分别在 4、148、157、252 位存在 4 个潜在的 O-糖基化位点。用 NetPhos 2.0 在线分析软件对锦鲤疱疹病毒中国吉林株(KHV-CJ) *ORF81* 进行磷酸化位点进行预测,结果显示,当阈值取 0.5 时,其氨基酸存在 11 个潜在的磷酸化位点(包括 4 个 Ser-丝氨酸、1 个 Thr-苏氨酸和 6 个 Tyr-酪氨酸位点)。

2.4 锦鲤疱疹病毒中国吉林株(KHV-CJ) *ORF81* 基因的系统进化树分析

从 GenBank 上分别下载锦鲤疱疹病毒日本株(KHV-J)、美国株(KHV-U)和以色列株(KHV-I)的 *ORF81* 基因,和中国吉林株(KHV-CJ) *ORF81* 基因构建了系统进化树(图 8),结果显示, KHV-CJ 与 KHV-I 处于一个分支。

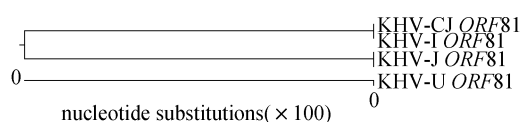


图 8 锦鲤疱疹病毒中国吉林株(KHV-CJ) *ORF81* 基因的系统进化树

Fig. 8 Phylogenetic tree of koi herpesvirus China Jilin strain *ORF81* gene

3 讨论

锦鲤疱疹病毒病是由锦鲤疱疹病毒(KHV)引起的锦鲤和鲤的一种高致病性疾病。该病多发生在水温为 18~28℃ 的春秋季节,具有高度传染性,发病率和死亡率均可高达 80%~100%^[8]。目前,锦鲤疱疹病毒病已在多国爆发,造成了巨大的经济损失。防治病毒性传染病的有效方法是疫

苗免疫,目前,该病较为有效的疫苗是减毒疫苗,免疫锦鲤和鲤,免疫保护率可达 80% 以上^[14],但是弱毒苗存在散播病毒和病毒变异的可能,而且在国内还没有研制出有效的弱毒疫苗。因此,需要进一步研究安全有效的基因工程疫苗,避免病毒的散播并消除病毒变异的可能性,并填补目前国内没有有效疫苗的空白,控制 KHV 在我国暴发流行。而本研究选用 KHV-CJ *ORF81* 基因进行克隆和生物信息学分析,正是为基因工程疫苗的研制打下基础。

本实验成功获得了长 771 bp 的 *ORF81* 基因。生物信息学分析表明,其编码的蛋白具有 4 个跨膜区;抗原表位预测显示抗原性良好;使用 Neural net-work (NN) 和 Hidden Markov (HMM) 两种模型对其信号肽进行预测,显示信号肽切割部位最可能位于 29 位的 S(丝氨酸)氨基酸。信号肽是引导翻译出的前体蛋白通过细胞膜分泌到胞外的一段序列,只有切除信号肽序列后前体蛋白才能进入到分泌信号区,变成具有正常功能的成熟蛋白^[15],因此预测信号肽切割位点,可以对进行表达研究的引物设计和表达载体的构建提供有价值的信息,另外,含有信号肽的蛋白质一般都是分泌到细胞外,可能作为重要的细胞因子起作用,从而具有潜在的应用价值;通过分析软件分析表明,其氨基酸序列不存在潜在的 N-糖基化位点,具有 4 个潜在的 O-糖基化位点,糖基化是真核生物蛋白质翻译前或翻译后的一个重要修饰过程,并可提高蛋白基因组的多样性^[16],其中 N-糖基化作用位点与抗原性和免疫原性有关^[17]。

系统进化树分析表明,锦鲤疱疹病毒中国吉林株(KHV-CJ) *ORF81* 基因与以色列株的进化关系最近,同源率为 100%,所以可怀疑 KHV 是由以色列等欧美国家传播至我国,这为 KHV 有效疫苗的引进,以及研究资料的参考提供了依据。

本研究以在我国首次分离到的锦鲤疱疹病毒

中国吉林株的 DNA 作为模板,成功将其 ORF81 基因克隆,并采用生物信息学方法对 ORF81 的结构和功能进行了分析,为我国锦鲤疱疹病毒的基因背景信息,发病机理,分子流行病学及基因工程疫苗的研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] HEDRICK R P, GILAD O, YUN S, *et al.* A herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi, a strain of common carp [J]. *Journal of Aquaculture Animal Health*, 2000, 12 (1) : 44 - 57.
- [2] HAENEN O M, WAY K, BERGMANN S M, *et al.* The emergence of koi herpesvirus and its significance to European aquaculture [J]. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 2004, 24 (6) : 293 - 307.
- [3] 刘荻, 史秀杰, 高隆英, 等. 进口锦鲤暴发病病原的 nested-PCR 鉴定 [J]. *华中农业大学学报*, 2002, 21 (5) : 414 - 418.
- [4] 徐达, 涂坚. 锦鲤疱疹病毒传播媒介之探讨 [J]. *台湾兽医志*, 2007, 33 (2) : 88 - 95.
- [5] IIDA T, SANO M. Koi herpesvirus disease [J]. *Uirusu*, 2005, 55 (1) : 145 - 51.
- [6] PIKARSKY E, RONEN A, ABRAMOWITZ J, *et al.* Pathogenesis of acute viral disease induced in fish by carp interstitial nephritis and gill necrosis virus [J]. *Journal of Virology*, 2004, 78 (17) : 9544 - 9551.
- [7] AOKI T, HIRONO I, KUOKAWA K, *et al.* Genome sequences of three koi herpesvirus isolates representing the expanding distribution of an emerging disease threatening koi and common carp worldwide [J]. *Journal of Virology*, 2007, 81 (10) : 5058 - 5065.
- [8] 朱霞, 王好, 李新伟, 等. 锦鲤疱疹病毒病的研究进展 [J]. *中国兽医科学*, 2011, 41 (1) : 106 - 110.
- [9] ROSENKRANZ D, KLUPP B G, TEIFKE J P, *et al.* Identification of envelope protein pORF81 of koi herpesvirus [J]. *Journal of General Virology*, 2008, 89 (4) : 896 - 900.
- [10] 邱芮瑜. 锦鲤疱疹病毒结构蛋白之表现 [J]. *家畜卫生所学术研讨专讯*, 2008 (2) : 7 - 10.
- [11] 朱霞, 李新伟, 王好, 等. 一株锦鲤疱疹病毒的分离与鉴定 [J]. *中国预防兽医学报*, 2011, 33 (5) : 340 - 343.
- [12] HASEGAWA S, SOMAMOTO T, NAKAYASU C, *et al.* A cell line (CFK) from fin of isogenic ginbuna crucian carp [J]. *Fish Pathology*, 1997, 32 (2) : 127 - 128.
- [13] NEUKIRCH M, BOTTCHER K, BUNNAJIRAKUL S. Isolation of a virus from Koi with altered gills [J]. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 1999, 19 (5) : 221 - 224.
- [14] PERELBERG A, RONEN A, DISHON A, *et al.* Characterization of the virus causing carp mass mortality (CyHV-3) and its modification to a vaccine in the Israeli common and koi carp industry, 2006, 70 (1) : 147 - 156.
- [15] SCHULTZ U, KÖCK J, SCHLICHT H, *et al.* Recombinant duck interferon: A new reagent for studying the mode of interferon action against hepatitis B virus [J]. *Virology*, 1995, 212 (2) : 641 - 649.
- [16] WEERAPANA E, IMPERIALI B. Asparagine linked protein glycosylation: from eu-karyotic to prokaryotic systems [J]. *Glycobiology*, 2006, 16 (6) : 91 - 101.
- [17] GUNN P, SATO F, POWELL K, *et al.* Rotavirus neutralizing protein VP7: antigenic determinants investigated by sequence analysis and peptide synthesis [J]. *Journal of Virology*, 1985, 54 (3) : 791 - 797.

Cloning and bioinformatics analysis of *ORF81* gene of koi herpesvirus-CJ strain

ZHOU Jing-xiang^{*#}, LI Xin-wei[#], WANG Hao, LV Wen-liang, ZHU Xia
(Key Laboratory of Animal Production, Product Quality and Security, Ministry of Education of the People's Republic of China, Jilin Agriculture University, Changchun 130118, China)

Abstract: To study its structure and function, the *ORF81* gene was amplified by PCR from koi herpesvirus China's Jilin strains (KHV-CJ) infected. Mirror carp primary fin cells were then cloned into the vector pMD18-T to construct the recombinant plasmid. The structure and function of the gene were studied by means of bioinformatics software, including phylogenetic tree analysis compared with other three KHV strains published in GenBank. The results showed that the length of the *ORF81* gene, encoding 256 aa, was 771 bp. The molecular weight was 28 246. 50 u and the isoelectric point was 8. 404. The protein is hydrophobic. The most likely signal peptide cut was in 29 bit(Ser). *ORF81* has four transmembrane regions. The antigenicity of *ORF81* was good. According to the protein structure analysis, there may be no N-glycosylation sites, 6 O-glycosylation sites and 11 phosphorylation sites. Phylogenetic analysis showed that the *ORF81* gene of KHV-CJ was in the same branch with the Israel strain. Above all, *ORF81* gene may have good immunogenicity. The study established the foundation for genetic background information, pathogenesis, molecular epidemiology and genetic engineering vaccine research of koi herpesvirus.

Key words: koi herpesvirus; *ORF81* gene; cloning and sequencing; bioinformatics analysis

Corresponding author: ZHOU Jing-xiang. E-mail: zhjxnd@126. com

[#]ZHOU Jing-xiang and LI Xin-wei contributed equally to this work.