

文章编号: 1000-0615(2019)05-1263-08

DOI: 10.11964/jfc.20180311207

鲫疱疹病毒ORF31R (CaHV-31R)的特征及其 编码蛋白与细胞器共定位

王子豪^{1,2}, 张奇亚^{1,2,3*}

(1. 中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与国家重点实验室, 湖北 武汉 430072;

2. 中国科学院大学, 北京 100049;

3. 中国科学院种子创新研究院, 北京 100101)

摘要: 鲫疱疹病毒(*Carassius auratus herpesvirus*, CaHV)是一种引起鲫急性鳃出血症和高死亡率的病毒病原。病毒要借助功能基因与细胞组分(如细胞器)的相互作用才能完成感染与复制。本实验通过生物信息分析、PCR扩增、重组质粒构建及其与细胞器标记质粒共转染鱼细胞(epithelioma papulosum Cyprinid, EPC)的荧光观察,对预测鲫疱疹病毒基因CaHV-31R编码蛋白的特性、亚细胞定位及与细胞器共定位进行研究。结果显示,鲫疱疹病毒编码蛋白CaHV-31R由313个氨基酸组成,含一个跨膜结构域(248~270 aa)和一个RNase E/G家族蛋白的典型结构域(40~182 aa);与5种来源鲤疱疹病毒同源蛋白多重比对发现,与鲤疱疹病毒II型中的日本株ST-J1和中国株SY-C1的同一性较高(分别为100%和80.7%),与鲤疱疹病毒I型代表株CyHV-1的同一性居中(为26.5%),而与鲤疱疹病毒III型中的德国株CyHV-3(或称锦鲤疱疹病毒Koi herpesvirus, KHV)和中国株CyHV-3-GZ11的同一性最低(分别为20.7%和18.2%);经基因扩增和构建真核重组质粒pEGFP-31R,当用其单独转染EPC细胞,绿色荧光信号主要在细胞质中呈弥散分布,少量在细胞质中或在细胞核外围呈点状分布;当用pEGFP-31R与内质网标记质粒pDsRed2-ER或与高尔基体标记质粒pDsRed2-Golgi共转染细胞,绿色荧光信号在胞质中的分布情况与单独转染时不同,分别能与2种有单层膜结构的细胞器——内质网和高尔基体共定位。研究表明,CaHV-31R是鲫疱疹病毒中一个能编码与细胞器共定位蛋白的基因。

关键词: 鲫疱疹病毒; 基因表达; 亚细胞分布; 与细胞器共定位; 病毒与宿主相互作用
中图分类号: S 941 **文献标志码:** A

大宗淡水鱼类养殖为国民提供了质优价廉、来源充足的蛋白质。鲫(*Carassius auratus*)属大宗淡水鱼,其产业地位相当重要^[1]。然而,普遍流行的疱疹病毒(herpesvirus)病发病速度快、死亡率高,对鲫及其他养殖和野生鱼类种群造成致命性危害^[2-5]。因此,鱼类疱疹病毒已被世界动物卫生组织(OIE)列入须重点检疫申报的疾病名录及我国“国家水生动物疫病监测”名录^[6],且倍

受关注^[7-9]。

感染鱼类的鲤疱疹病毒属(*Cyprinivirus*)为疱疹病毒目(*Herpesvirales*)中3个科之一的鱼蛙疱疹病毒科(*Alloherpesviridae*)的成员^[10],有高的致病性和强的传染性,在世界各地流行^[11-12],尚无有效方法防控,且不同病毒种引起的发病症状有所不同^[13]。被疱疹病毒感染的鱼即使幸存,也会因病降低或丧失商品价值。因此,人们尝试从

收稿日期: 2018-03-07 修回日期: 2018-12-17

资助项目: 国家自然科学基金(31772890, 31430091); 国家重点研发计划(2018YFD0900302); 中国科学院战略性先导科技专项(XDA08030202)

通信作者: 张奇亚, E-mail: zhangqy@ihb.ac.cn

阐明病毒与宿主相互作用及致病机理入手,寻找抗疱疹病毒的有效方法。虽已围绕鱼类疱疹病毒病原的分离、组织病理观察、基因组及转录组解析等开展了多方面研究^[14-19],但所获鱼类疱疹病毒基因与宿主相互作用的信息仍很有限^[20]。

基于已解析的鲫疱疹病毒(*Carassius auratus* herpesvirus, CaHV)全基因组^[21],并与已报道鲤疱疹病毒属成员(CyHV-1、CyHV-2、SY-C1和CyHV-3等)的基因组进行了比较^[22],从中筛查到与宿主相互作用或与细胞器共定位的潜在基因。由此,本实验对能编码含跨膜结构域蛋白的鲫疱疹病毒基因ORF31R(*CaHV-31R*),进行基因的PCR扩增、重组质粒构建、亚细胞定位及与不同细胞器共定位等进行研究。有关结果将为探讨CaHV入侵复制的关键过程及致病机理提供线索,并为疾病防控提供参考。

1 材料与方法

1.1 CaHV基因组DNA的制备及EPC细胞培养

CaHV基因组DNA由本实验室制备,方法与步骤参考文献^[23],并冻存在低温冰箱,用作扩增目的基因的模板。鲤上皮瘤细胞系(Epithelioma papulosum cyprinid, EPC)为本实验室长期保存^[24],在含10%新生牛血清和抗生素(100 IU青霉素/mL, 100 μg链霉素/mL)的M199培养基中,25℃恒温培养^[25],用于带病毒基因重组质粒的转染及与其他质粒的共转染。

1.2 CaHV-31R基因编码蛋白(CaHV-31R)的氨基酸序列多重比对及进化分析

参照CaHV基因组^[26]中的ORF31R基因,推导出其编码蛋白的氨基酸序列,并与5种鲤疱疹病毒的同源蛋白进行序列比对,构建进化树。这5种鲤疱疹病毒编码同源蛋白的ORF均为30R,它们来源的病毒基因组(登录号)分别是CyHV-1(NC_019491)、ST-J1(NC_019495)、SY-C1(KM200722)、CyHV-3(NC_009127)和CyHV-3-GZ11(KJ627438)。用ClustalX 1.83进行同源蛋白的多重序列比对,在NCBI数据库搜索相近序列,预测保守结构域,再用GenDoc软件编辑排列。另外,用MEGA 7.0软件构建系统进化树。

1.3 CaHV-31R基因的PCR扩增

*CaHV-31R*基因位于CaHV基因组中68 089~69 030 bp位点,设计了用于PCR扩增的2条引物

序列分别为P1: 5'-CCGGAATTCATGAAAGCT-ATAGTGGTGC-3'(EcoR I), P2: 5'-CGGGGT-ACCGTAGTGTGGATTCTGCTCTC-3'(Kpn I),序列中下划线部分为括号中标注的酶切位点。以CaHV基因组DNA为模板进行PCR扩增。试剂盒为TransGen Biotech公司产品,扩增体系(25 μL): 10×PCR Buffer 2.5 μL, Mg²⁺ 2.5 μL, dNTP Mix 1 μL, 引物P1和P2各0.5 μL, Taq polymerase 0.5 μL, DNA模板1 μL, 加ddH₂O至25 μL。扩增条件: 94℃预变性5 min; 94℃变性30 s, 57℃退火30 s, 72℃延伸1 min, 35个循环; 72℃延伸10 min。扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳分析,将与目的条带大小一致的核酸片段951 bp割胶回收备用。

1.4 含病毒基因CaHV-31R重组质粒的构建

将回收的目的基因*CaHV-31R*与空质粒pEGFP-N3分别用EcoR I和Kpn I双酶切后,进行连接(连接反应试剂盒为TaKaRa公司产品)。酶切体系: 10×fast digest buffer 2 μL, EcoR I和Kpn I各1 μL, 目的片段8 μL, 加ddH₂O至20 μL; 10×fast digest buffer 2 μL, EcoR I和Kpn I各1 μL, pEGFP-N3质粒2 μL, 加ddH₂O至20 μL, 分别用双酶切2 h。连接体系: 10×buffer 2.5 μL, 酶切后的DNA片段9 μL, 酶切后的质粒3 μL, T4 DNA ligase 1 μL, 加ddH₂O至25 μL, 16℃连接过夜。

取10 μL连接产物,转化TOP10感受态细胞,在42℃水浴中放置90 s,迅速转移到冰上放置3 min,加入1 mL不含抗生素的LB液体培养基,于37℃,150 r/min的摇床中震荡培养1 h后,以3 000 r/min离心5 min,弃上清液,留约100 μL重悬,取其中80 μL涂布于LB固体(含卡那霉素)平板上,37℃正置15 min,再倒置12 h至平板上长出菌落。挑取单菌落至抗性液体LB培养基中,37℃,250 r/min震荡培养5 h。参照“*CaHV-31R*基因的PCR扩增”进行菌落PCR扩增,经1%琼脂糖凝胶电泳检测,筛选阳性克隆菌经测序[生工生物工程](上海股份有限公司)验证。取测序正确的阳性克隆菌液10 μL,置于含抗生素LB液体培养基中37℃、250 r/min震荡培养12 h后,用去内毒素的质粒抽提试剂盒(OMEGA公司产品)抽提,至此获得重组质粒pEGFP-31R。

1.5 转染与共转染

转染前一天,参照上述“CaHV基因组DNA的制备及EPC细胞培养”,先将无菌盖玻片放入6孔

板中,再传入EPC细胞,培养24 h至细胞长成单层,备用。

转染 在已长成单层的EPC细胞中加入2.5 μg 重组质粒pEGFP-31R,按LipofectamineTM3 000(Invitrogen)转染试剂盒说明书操作。以空pEGFP-N3代替pEGFP-31R作为对照。

共转染 在已长成单层的EPC细胞中,加入pEGFP-31R和内质网标签质粒pDsRed2-ER(Clontech)各1.25 μg ,加入125 μL Opti MEM培养基(Gibco)混匀后,再加入3.75 μL 的LipofectamineTM3000与125 μL Opti MEM培养基的混合液,混匀后静置5 min,加入单层细胞中进行pEGFP-31R与内质网标签质粒的共转染。另外,用高尔基体标签质粒pDsRed2-Golgi(Clontech)替代内质网标签质粒pDsRed2-ER,操作同上,进行pEGFP-31R与高尔基体标签质粒的共转染。

转染或共转染的细胞在25 $^{\circ}\text{C}$ 培养36 h后,经荧光显微镜(Leica)观察,当明确融合蛋白已表达,即用4%的多聚甲醛溶液(paraformaldehyde, PFA)室温固定30 min,然后PBS缓冲液漂洗3次,每次5 min。用0.2% Triton X-100透明15 min, PBS缓冲液漂洗3次,每次5 min;加入终浓度为1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的Hoechst 33342(Sigma)避光染核15 min, PBS缓冲液漂洗3次,每次5 min;从6孔板中取出盖玻片,并将有细胞的一面向下,用PBS缓冲液配制的50%甘油封片,荧光显微镜下观察、拍照。蓝色荧光信号指示细胞核的位置;绿色荧光信号指示CaHV-31R的亚细胞定位;而红色荧光信号则指示细胞器内质网或高尔基体相应的细胞内定位,由2种质粒共转染出现黄色信号,则表明CaHV-31R与相应细胞器共定位。

2 结果

2.1 CaHV-31R的结构特征及与CaHV同源蛋白的进化分析

对CaHV31-R进行生物信息分析,推导出其编码的蛋白由313个氨基酸(aa)组成,对包括CaHV-31R在内6种疱疹病毒同源蛋白(CaHV、ST-J1、SY-C1、CyHV-1、CyHV-3和CyHV-3-GZ11)的结构域同一性进行比对。结果显示,位于CaHV-31R氨基酸(aa)248~270位点有一个跨膜结构域(transmembrane domain, TM),这意味着该跨膜结构域可能帮助CaHV-31R跨膜定位,但CaHV-31R与来自不同鲤疱疹病毒同源蛋白的跨膜结构域

同一性有显著不同:与ST-J1高度一致,与CyHV-3-GZ11和CyHV-1较低,而SY-C1和CyHV-3则完全缺失(图1-a, TM)。另外,预测到一个RNase E/G家族蛋白的典型结构域,位于CaHV-31R的40~182 aa位点,在所比对的6种鱼疱疹病毒同源蛋白中,这一结构域有高度保守性(图1-a, RNase E/G),预示鱼类疱疹病毒的CaHV-31R及其同源蛋白可能有RNase E/G家族成员的作用。进一步分析发现,CaHV与鲤疱疹病毒II型中的ST-J1和SY-C1毒株同源蛋白的同一性最高,分别为100%和80.7%;与鲤疱疹病毒I型中的CyHV-1毒株同源蛋白的同一性较低,为26.5%;而与鲤疱疹病毒III型中的CyHV-3和CyHV-3-GZ11毒株同源蛋白的同一性最低,分别仅为20.7%和18.2%(图1-a)。上述表明,CaHV-31R与鲤疱疹病毒II型成员亲缘关系更近,也预示CaHV-31R及其同源蛋白可与宿主相互作用可能与此型疱疹病毒引起的相似病症有关。

由CaHV-31R与鲤疱疹病毒的不同毒株,包括同属于CyHV-2的毒株ST-J1和SY-C1、CyHV-1及同属CyHV-3的毒株CyHV-3-GZ11,其同源蛋白所构建的进化树(图1-b)显示,CaHV与CyHV-2的2个毒株ST-J1和SY-C1亲缘关系最近,ST-J1与SY-C1有距离,是因缺少了65个aa的缘故;与CyHV-1亲缘关系居中;而与CyHV-3和CyHV-3-GZ11毒株亲缘关系较远。可见进化分析结果与氨基酸序列比对结果相符。

2.2 目的基因CaHV-31R及其重组质粒

以鲤疱疹病毒CaHV基因组为模板,经PCR扩增出的产物琼脂糖凝胶电泳后显示:已获得含目的基因CaHV-31R的核酸条带,其分子量大小为951 bp(图2-a)。

从目的基因CaHV-31R与空质粒pEGFP-N3连接后转化、涂板的菌TOP10中所挑取的8个单菌落,经PCR扩增、电泳检测结果显示,仅有一个菌落(5号孔)出现951 bp的特异核酸条带,与先前PCR扩出的目的基因大小一致(图2-b),且测序的结果与目的基因CaHV-31R的序列一致,证实重组质粒pEGFP-31R已构建成功。

2.3 CaHV-31R的亚细胞定位

对空质粒pEGFP-N3转染细胞进行观察,结果显示,绿色荧光信号呈弥散形分布在整个细胞中。而对重组质粒pEGFP-31R单独转染的细胞进

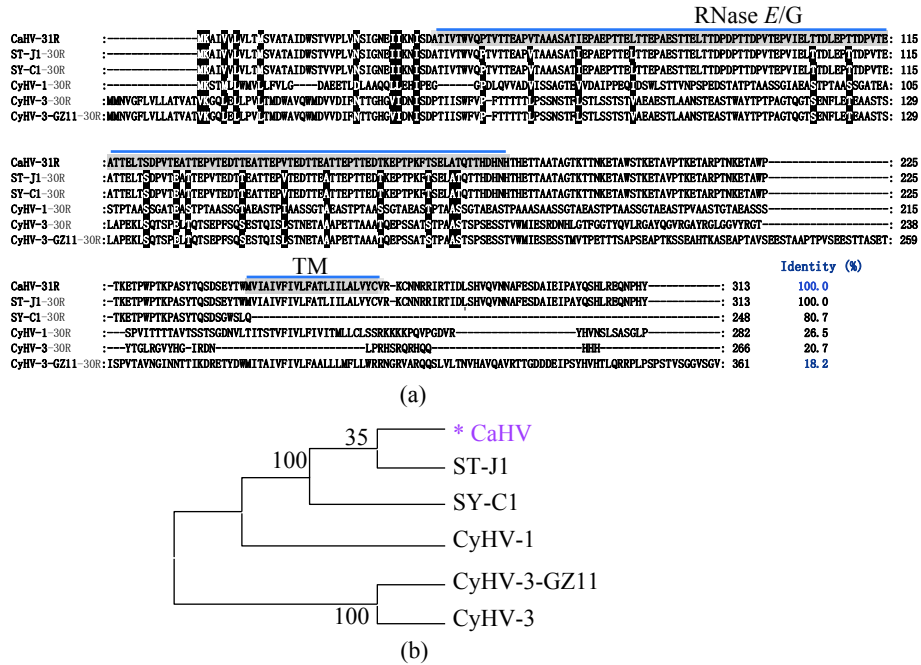


图 1 CaHV-31R与5种鲤疱疹病毒同源蛋白序列比对及进化树分析

(a) CaHV-31R与5种同源蛋白序列比对，它们来自ST-J1、SY-C1、CyHV-3、CyHV-3-GZ11和CyHV-1这5种鲤疱疹病毒，黑色阴影示保守氨基酸，灰色阴影与线条示预测的结构域，RNase E/G. RNase E/G 家族蛋白的典型结构域，TM. 跨膜结构域，Identity. 鲤疱疹病毒同源蛋白与CaHV-31R的同一性；(b) 6种疱疹病毒同源蛋白的进化树

Fig. 1 Sequence alignment and phylogenetic tree of CaHV-31R and 5 Cyprinid hepesvirus homology proteins

(a) alignment between CaHV-31R and homology proteins of 5 cyprinid hepesviruses, ST-J1, SY-C1, CyHV-3, CyHV-3-GZ11 and CyHV-1, the complete conserved residues are covered by black shade, the predicted domain is indicated by gray shade and line, RNase E/G. conserved domain of RNase E/G family, TM. transmembrane domain of CaHV-31R, identity. between the homology protein from Cyprinid hepesviruses with CaHV-31R; (b) phylogenetic tree of homology proteins from these 6 hepesviruses

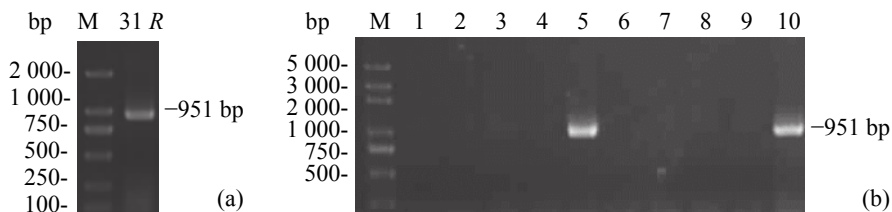


图 2 CaHV-31R及转化菌落PCR扩增产物的电泳图

(a) CaHV-31R PCR扩增产物的电泳图，M: Trans2K DNA marker; 31R: CaHV-31R; (b) 转化菌落PCR扩增产物的电泳图，M: Trans2K Plus DNA marker, 1~8. 单菌落PCR产物的电泳检测结果，9. 阴性对照，10. 阳性对照

Fig. 2 Electrophoresis of CaHV-31R and the products of transforming bacteria by PCR

(a) electrophoresis of CaHV-31R PCR, M: Trans2K DNA marker, 31R. CaHV-31R; (b) electrophoresis of the products of transforming bacteria by PCR, M. Trans2K Plus DNA maker, 1-8. single bacterial colony PCR, 9. negative control, 10. positive control

行荧光观察，发现与空质粒转染后的分布情况不同，绿色荧光信号主要呈现在胞质中，部分绕核周围或在胞质中呈点状分布(图3-a)。

2.4 CaHV-31R与2种细胞器的共定位

pEGFP-31R与内质网标签质粒pDsRed2-ER共转染的结果显示，绿色荧光信号主要呈现弥散状分布在胞质中，部分在胞质中或绕核周围呈

点状分布，代表CaHV-31R融合蛋白；红色荧光信号在细胞质中呈散点状分布，红色荧光信号代表细胞内质网；而叠加后的图显示大部分荧光信号呈黄色，此外，还出现少部分绿色荧光信号(图3-b)，表明CaHV-31R与内质网部分共定位。pEGFP-31R与高尔基体标签质粒pDsRed2-Golgi共转染的结果显示代表CaHV-31R融合蛋白的绿色荧光信号主要呈现在胞质中，且呈斑块

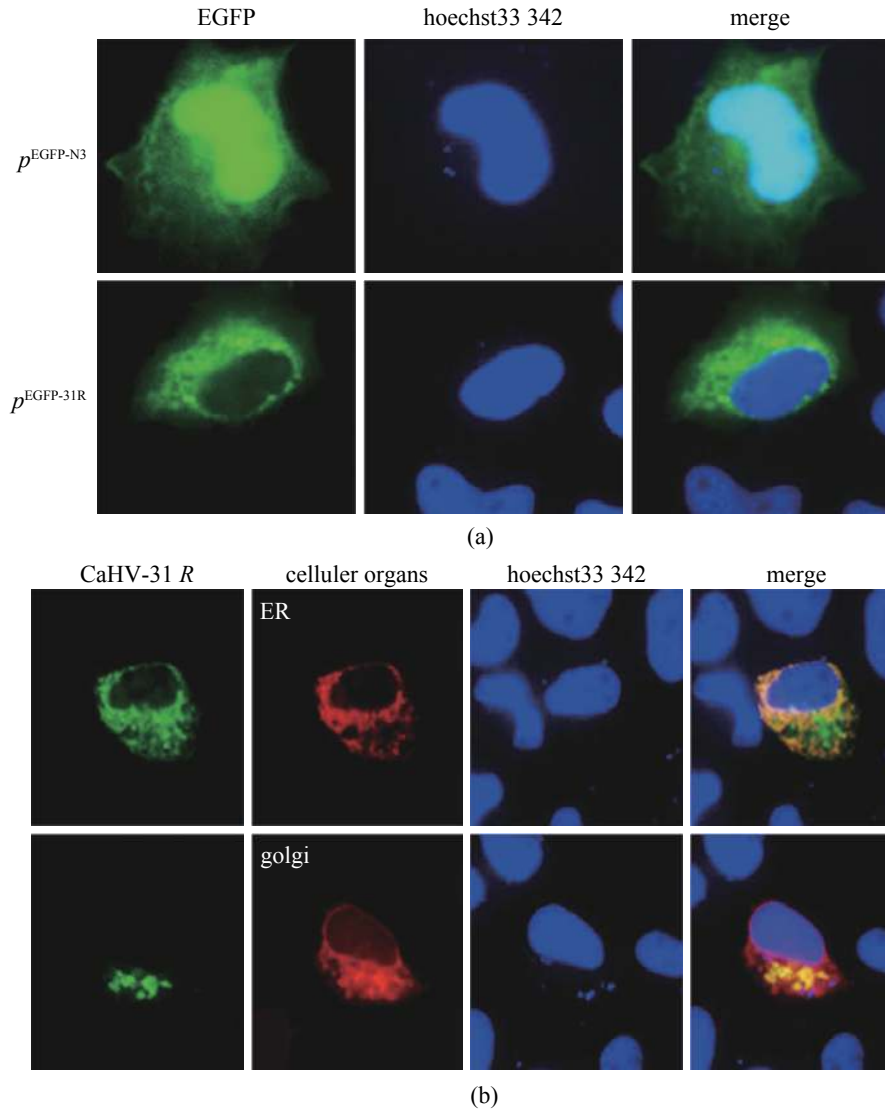


图 3 荧光显微图

(a) CaHV-31R在EPC细胞中的亚细胞定位。融合蛋白呈绿色(EGFP), 细胞核呈蓝色(Hoechst33342); 前两者叠加示融合蛋白的亚细胞定位。(b) CaHV-31R与两种细胞器的共定位。CaHV-31R融合蛋白呈绿色(CaHV-31R), 内质网和高尔基体都呈红色(ER, Golgi); 核呈蓝色(Hoechst33342); 叠加显示黄色信号为共定位(Merge)

Fig. 3 Fluorescence micrographs

(a) the subcellular localization of CaHV-31R in EPC cell. The fused proteins coded present green (EGFP). Nucleus presents blue. Merge: the subcellular localization of the fused protein. (b) The colocalizations of CaHV-31R with two different cellular organs. CaHV-31R fused proteins coded present green (CaHV-31R). Both of these two cellular organs present red (ER, Golgi); Nucleus presents blue (Hoechst33342); Colocalization of CaHV-31R fused protein with endoplasmic reticulum and with Golgi apparatus respectively show yellow (Merge)

状聚集在核一侧分布; 代表细胞器高尔基体的红色荧光信号在核一侧分布也聚集呈斑块状分布, 同时在细胞质其他部位也有弥散分布; 叠加后, 在CaHV-31R融合蛋白与高尔基体在核侧聚集分布的状况高度吻合, 呈现亮黄色荧光信号(图3-b), 但在细胞质其他部位却出现部分红色荧光信号, 表明pEGFP-31R与高尔基体也是部分共定位。

3 讨论

鲫疱疹病毒CaHV基因组有150个预测基因(或开放阅读框ORFs), 对这些基因结构特征(包括保守结构域)加以注释, 对阐明其功能及病毒致病分子机理具有重要的意义。经预测CaHV-31R编码的蛋白CaHV-31R含有保守性跨膜结构域, 这预示其有与膜结构细胞器共定位的潜能。研究结果与这一推测相符, CaHV-31R的确能与

所测2种有膜结构的细胞器内质网和高尔基体共定位。此外,还预测到CaHV-31R含有一个RNase E/G家族蛋白的典型结构域,该结构域也被认为是剪切和加工RNA酶的功能结构域^[26]。现已知RNase E/G家族蛋白是一类参与RNA降解的酶类,同时又被认为是一个功能尚不明晰的酶^[27]。但鱼疱疹病毒CaHV-31R及同源蛋白的RNase E/G结构域的功能尚待验证。

已知不同型疱疹病毒感染宿主鱼时,通过作用不同靶器官,可引起相应的病症。对鲤疱疹病毒属不同毒株所引起的病症进行比较发现,鲤疱疹病毒I型(CyHV-1)引起鲤痘疮,鲤疱疹病毒II型(CyHV-2)引起鲤等造血器官坏死和鳃贫血,鲤疱疹病毒III型(CyHV-3)可引起锦鲤鳃溃疡^[13],新鉴定的鲫疱疹病毒能引起鲫急性鳃出血和高致死率,其靶器官主要是鳃和头肾^[23]。

CaHV-31R与CyHV II型的同源蛋白序列具有高度同一性,达80%以上。但与I型或III型同源蛋白相比显著要低。因此,CaHV-31R与II型聚为一支,可能意味它们均是以鳃和造血器官为靶器官,且是引起出血及相关病症的鱼类疱疹病毒核心致病因子。疱疹病毒是大DNA病毒,其基因组可编码100多个,甚至超过200个的推导基因^[28]。CaHV与其他鲤疱疹病毒基因组及鱼蛙疱疹病毒科(*Alloherpesviridae*)家族成员都含12个核心基因,也有其他保守基因和同源序列,但在基因组大小、基因组两端有无直接重复序列等方面存在显著差异^[21]。这些分析提示,水产疱疹病毒与宿主的相互作用及其致病分子机制研究面临诸多难题与挑战。

部分共定位意味病毒蛋白与宿主细胞器有部分相关性。CaHV-31R与内质网和高尔基体是部分共定位,预示它们存在相关性。当然,这可能与细胞内病毒蛋白的水平有关,也可能与病毒复制过程、蛋白含量或实验过程及条件等有关。如今,关于水产病毒致病分子机制的研究已倍受关注^[8]。

本研究以引起鲫急性鳃出血症和大量死亡的疱疹病毒病原基因CaHV-31R为对象,利用生物信息学分析了其结构特征及与其他鱼类疱疹病毒同源蛋白的进化关系;通过PCR扩增、重组质粒构建与转染、亚细胞定位观察,明确了该基因编码蛋白主要在胞质中和核外围一圈呈弥散或部分点状分布;并通过将含有病毒基因的

质粒 pEGFP-31R,分别与带有内质网的标记质粒 pDsRed2-ER或带有高尔基体标记的质粒 pDsRed2-Golgi共转染鱼类细胞,显示与内质网部分共定位,与高尔基体部分共定位。本研究结果不仅新鉴定了一个能与细胞器共定位的鲫疱疹病毒蛋白CaHV-31R,也为后续相关研究提供了候选材料。

参考文献:

- [1] 赵永锋,胡海彦,蒋高中,等.我国大宗淡水鱼的发展现状及趋势研究[J].*中国渔业经济*,2012,30(5):91-99. Zhao Y F, Hu H Y, Jiang G Z, et al. Current status and development trend on national conventional freshwater fishery industry[J]. *Chinese Fisheries Economics*, 2012, 30(5): 91-99(in Chinese).
- [2] 张奇亚,桂建芳.水生病毒学[M].北京:高等教育出版社,2008:122-128. Zhang Q Y, Gui J F. *Aquatic Virology*[M]. Beijing: Higher Education Press, 2008: 122-128(in Chinese).
- [3] Walker P J, Winton J R. Emerging viral diseases of fish and shrimp[J]. *Veterinary Research*, 2010, 41(6): 51.
- [4] 桂建芳,朱作言.水产动物重要经济性状的分子基础及其遗传改良[J].*科学通报*,2012,57(15):1751-1760. Gui J F, Zhu Z Y. Molecular basis and genetic improvement of economically important traits in aquaculture animals[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2012, 57(15): 1751-1760(in Chinese).
- [5] Murray A G. Epidemiology of the spread of viral diseases under aquaculture[J]. *Current Opinion in Virology*, 2013, 3(1): 74-78.
- [6] OIE. Manual of diagnostic tests for aquatic animals[EB/OL]. 2016. <http://www.oie.int/international-standard-setting/aquatic-manual/access-online/>.
- [7] 张奇亚,桂建芳.水产动物的病毒基因组及其病毒与宿主的相互作用[J].*中国科学:生命科学*,2015,58(2):156-169. Zhang Q Y, Gui J F. Virus genomes and virus-host interactions in aquaculture animals[J]. *Science China Life Sciences*, 2015, 58(2): 156-169(in Chinese).
- [8] Gui L, Chinchar V G, Zhang Q Y. Molecular basis of pathogenesis of emerging viruses infecting aquatic animals[J]. *Aquaculture and Fisheries*, 2018, 3(1): 1-5.
- [9] Wang J, Gui L, Chen Z Y, et al. Mutations in the C-terminal region affect subcellular localization of crucian carp herpesvirus (CaHV) GPCR[J]. *Virus Genes*, 2016,

- 52(4): 484-494.
- [10] ICTV. The ICTV online (10th) report[EB/OL]. 2017. <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>.
- [11] Michel B, Fournier G, Loeffrig F, *et al.* Cyprinid herpesvirus 3[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2010, 16(12): 1835-1843.
- [12] Gotesman M, Kattlun J, Bergmann S M, *et al.* CyHV-3: The third cyprinid herpesvirus[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2013, 105(2): 163-174.
- [13] Goodwin A. Herpesviruses in fish[R]. Southern Regional Aquaculture Center, US, 2012.
- [14] Waltzek T B, Kelley G O, Stone D M, *et al.* Koi herpesvirus represents a third cyprinid herpesvirus (CyHV-3) in the family Herpesviridae[J]. *Journal of General Virology*, 2005, 86(6): 1659-1667.
- [15] Reed A N, Izume S, Dolan B P, *et al.* Identification of B cells as a major site for cyprinid herpesvirus 3 latency[J]. *Journal of Virology*, 2014, 88(16): 9297-9309.
- [16] Gao F X, Wang Y, Zhang Q Y, *et al.* Distinct herpesvirus resistances and immune responses of three gynogenetic clones of gibel carp revealed by comprehensive transcriptomes[J]. *BMC Genomics*, 2017, 18: 561.
- [17] Li W, Lee X Z, Weng S P, *et al.* Whole-genome sequence of a novel Chinese cyprinid herpesvirus 3 isolate reveals the existence of a distinct European genotype in East Asia[J]. *Veterinary microbiology*, 2015, 175(2-4): 185-194.
- [18] Li L J, Luo Y Z, Gao Z X, *et al.* Molecular characterisation and prevalence of a new genotype of Cyprinid herpesvirus 2 in mainland China[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2015, 61(6): 381-387.
- [19] 夏思瑶, 王浩, Podok P, 等. 鲤疱疹病毒 II 型对异育银鲫背鳍细胞的显微形态与免疫基因表达水平的影响[J]. *水产学报*, 2016, 40(12): 1915-1922.
- Xia S Y, Wang H, Podok P, *et al.* The expression analysis of immune genes and microscopic morphology of CCF cells in response to Cyprinid herpesvirus 2 infection[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(12): 1915-1922(in Chinese).
- [20] 桂朗, 张奇亚. 中国水产动物病毒学研究概述[J]. *水产学报*, 2019, 43(1): 168-187.
- Gui L, Zhang QY. A brief review on aquatic animal virology researches in China[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(1): 168-187(in Chinese).
- [21] Zeng X T, Chen Z Y, Deng Y S, *et al.* Complete genome sequence and architecture of crucian carp *Carassius auratus* herpesvirus (CaHV)[J]. *Archives of Virology*, 2016, 161(12): 3577-3581.
- [22] Davison A J, Kurobe T, Gatherer D, *et al.* Comparative genomics of carp herpesviruses[J]. *Journal of Virology*, 2013, 87(5): 2908-2922.
- [23] 方进, 邓院生, 王俊, 等. 急性病毒性鲫鳃出血病的病理变化[J]. *中国水产科学*, 2016, 23(2): 336-343.
- Fang J, Deng Y S, Wang J, *et al.* Pathological changes of acute viral hemorrhages in the gills of crucian carp[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(2): 336-343(in Chinese).
- [24] 桂朗, 李正秋, 张奇亚. 牙鲆一株弹状病毒病原的分离与鉴定[J]. *水生生物学报*, 2007, 31(3): 345-353.
- Gui L, Li Z Q, Zhang Q Y. Isolation and characterization of a rhabdovirus from diseased flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, 31(3): 345-353(in Chinese).
- [25] Zhang Q Y, Li Z Q, Gui J F. Studies on morphogenesis and cellular interactions of *Rana grylio* virus in an infected fish cell line[J]. *Aquaculture*, 1999, 175(3-4): 185-197.
- [26] Belasco J G. Ribonuclease E: Chopping knife and sculpting tool[J]. *Molecular Cell*, 2017, 65(1): 3-4.
- [27] Ait-Bara S, Carpousis A J. RNA degradosomes in bacteria and chloroplasts: classification, distribution and evolution of RNase E homologs[J]. *Molecular Microbiology*, 2015, 97(6): 1021-1135.
- [28] Johnson D C, Baines J D. Herpesviruses remodel host membranes for virus egress[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2011, 9(5): 382-394.

Characterization of *Carassius auratus* herpesvirus ORF31R (CaHV-31R) and the encoded protein colocalization with cellular organs

WANG Zihao^{1,2}, ZHANG Qiya^{1,2,3*}

(1. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China;

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

3. Innovation Academy of Seed Design, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: *Carassius auratus* herpesvirus (CaHV) is a pathogen that can cause crucian carp disease with acute gill hemorrhages and high mortality. Interactions of functional genes with cellular components, such as cellular organs, are needed by viruses to complete infection and replication. In the present study, bioinformatic analysis, PCR amplification, gene cloning, constructing recombinant plasmids, and fluorescence observation of the fish cells (epithelioma papulosum Cyprinid, EPC) cotransfected with cellular organs tagged plasmids were used to analyze the characteristics, subcellular localization and colocalization with cellular organs of the protein encoded by the gene CaHV ORF31R (CaHV-31R). As the results show, the encoding protein CaHV-31R was composed of 313 amino acids, which consists of a transmembrane domain (248–270 aa) and a typical domain of RNase E/G protein family (40–182 aa). The multiple alignment with homology proteins from 5 different fish herpesviruses exhibited higher identity (100% and 80.7%) with the Japanese strain ST-J1 and Chinese strain SY-C1, which were both the members of type II Cyprinid herpesviruses, centered identity (26.5%) with CyHV-1 which was the representative member of type I Cyprinid herpesviruses, and the lowest identity (20.7% and 18.2%) with the Germanic strain CyHV-3(also named *Koi* herpesvirus, KHV) and Chinese strain (CyHV-3-GZ11), which were both the members of type III Cyprinid herpesviruses. The plasmids pEGFP-31R was constructed by PCR amplification, gene cloning, and then used to transfect EPC cells. pEGFP-31R dispersed distribution in cytoplasm and a small part of spotty distribution were found circling around outside the nucleus. CaHV-31R was used to colocalize with two cellular organs with monolayer membrane in cytoplasm, which was endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. The results indicated that CaHV-31R was a gene of *Carassius auratus* herpesvirus, and was able to encode a protein that colocalizes with cellular organs.

Key words: *Carassius auratus* herpesvirus; gene expression; subcellular distribution; colocalization with cellular organs; host-virus interaction

Corresponding author: ZHANG Qiya. E-mail: zhangqy@ihb.ac.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31772890, 31430091); National Key R&D Program of China (2018YFD0900302); Strategic Pilot Science and Technology of the Chinese Academy of Sciences Project (XDA08030202)