

文章编号: 1000-0615(2019)06-1463-09

DOI: 10.11964/jfc.20180911458

II型鲤疱疹病毒ORF121蛋白的多克隆抗体制备及鉴定

余琳¹, 吕利群^{1,2,3}, 王浩^{1,2,3*}

(1. 上海海洋大学, 国家水生动物病原库, 上海 201306;

2. 上海海洋大学, 农业农村部淡水种质资源重点实验室, 上海 201306;

3. 上海海洋大学, 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306)

摘要: 针对CyHV-2病毒ORF121基因(GenBank: AFJ20543.1)进行原核表达系统的构建, 将纯化重组蛋白作为抗原来免疫BALB/c小鼠获得多克隆抗体, 应用该抗体开展CyHV-2病毒诊断及其感染机制研究。以CyHV-2病毒感染细胞上清液为扩增模板, 扩增ORF121基因构建至pGEX-4T原核表达载体, 经异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)诱导表达rORF121重组蛋白, 利用尿素纯化后免疫6周龄BALB/c小鼠制备多克隆抗体。结果显示, CyHV-2病毒ORF121基因可在原核表达系统中高效表达目的重组蛋白rORF121, 经SDS-PAGE分析大小约为60 ku, 主要以不可溶的包涵体存在。利用尿素溶解rORF121蛋白免疫BALB/c小鼠获得抗ORF121蛋白的多克隆抗体, Western Blot实验显示, 该抗体可特异性识别CyHV-2病毒感染RyuF-2细胞样品。研究表明, 利用CyHV-2感染RyuF-2细胞后, 本研究制备的抗ORF121蛋白的多克隆抗体能够通过间接免疫荧光实验特异性识别CyHV-2病毒感染的细胞样品。本研究制备的抗ORF121蛋白的多克隆抗体, 能够为CyHV-2病毒诊断技术的构建以及深入开展CyHV-2病毒感染机制提供良好的技术基础。

关键词: II型鲤疱疹病毒; ORF121; 原核表达; 多克隆抗体; 间接免疫荧光检测

中图分类号: Q 511; S 941.41

文献标志码: A

疱疹病毒性造血器官坏死病(herpesviral haematopoietic necrosis, HVHN)是鲫(*Carassius carassius*)的一种高致病性病毒病, 该病由鲤疱疹病毒2型(*Cyprinid herpesvirus 2*, CyHV-2)感染引起。CyHV-2隶属于鱼蛙疱疹病毒科(*Alloherpesviridae*)、鲤疱疹病毒属(*Cyprinivirus*)。鲤疱疹病毒属包含感染鲤的鲤疱疹病毒1型、2型和3型(CyHV-1, CyHV-2和CyHV-3), 以及感染鳊的鳊疱疹病毒1型^[1]。CyHV-2是一种具有囊膜的含双链线性大DNA基因组病毒, 病毒粒子呈椭圆形, 直径约为175~200 nm^[2]。1995年, Jung等^[3]首次报道了CyHV-2引起鱼类死亡病例。目前, 该病毒在澳大利亚和新西兰等地均有报道, 其流行情况遍布全球^[4]。自2009年以来, 在我国江苏省部

分地区养殖的异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)中检测到CyHV-2病毒, 随后该病毒在我国鲫主要养殖区域暴发流行^[5]。陈昌福等^[6]研究了组织浆疫苗的防控效果, 制备了异育银鲫疱疹病毒组织浆灭活疫苗。结果显示, 与接种正常异育银鲫组织浆组相比, 异育银鲫死亡率几乎是一致的, 均在90.0%以上, 且死亡率高于注射生理盐水的对照组(86.7%), 其实验结果证明, 接种病鱼组织浆灭活疫苗不能使受免疫异育银鲫产生对疱疹病毒的免疫保护力。目前, 有效防控CyHV-2病毒致病的技术还较少, 近年来, 国内外学者先后建立了普通PCR诊断技术、荧光定量PCR诊断技术、环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)检测技术、原位杂交技

收稿日期: 2018-09-18 修回日期: 2019-01-23

资助项目: 第四届中国科协青年人才托举工程(中国水产学会); 国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-45-19); 国家自然科学基金(31672690)

通信作者: 王浩, E-mail: h-wang@shou.edu.cn

术、血涂片免疫学诊断技术和电镜检测技术等^[7]。本课题组^[8]制备了CyHV-2衣壳蛋白ORF72和ORF92的单克隆抗体并建立了基于单抗的免疫学检测技术。彭俊杰等^[9]制备了ORF25蛋白单克隆抗体。近年来,世界各国科学家广泛开展了CyHV-2基因组的研究工作,2013年,美国学者完成了日本株ST-J1(Saitama, Japan-1)的全基因组测序工作,ST-J1毒株基因组全长290 304 bp,比较CyHV-1、CyHV-2和CyHV-3的全基因组序列发现,CyHV-2基因全长最短,约有150个独立的功能蛋白基因^[10]。2014年,华中农业大学完成CyHV-2中国株SY-C1的全基因组测序拼接工作,SY-C1毒株基因组全长为289 365 bp,与日本株ST-J1比较其同源性高达98.8%,约有151个独立的功能蛋白基因^[11]。2016年中国科学院水生生物研究所完成了CyHV-2中国株CaHV的全基因组测序拼接工作,CaHV毒株基因组全长为275 348 bp。同源性分析显示,CaHV与SY-C1更为接近,约有150个独立的功能蛋白基因^[12]。2018年,苏州大学完成了江苏射阳毒株CyHV-2-SY(SY)测序工作,基因组全长为290 455 bp,约有150个开放阅读框^[13]。上述病毒基因组测序工作的开展为深入研究CyHV-2病毒分子生物学诊断技术和致病机制提供了良好的基础数据。

结合已经报道的CyHV-2病毒基因组数据进行生物信息学分析,选取ORF3、ORF5、ORF35和ORF78等16个CyHV-2基因,结果显示,相对于上述基因,ORF121基因在血液、肝脏、肾脏、脾脏和鳃中表达量最高^[14]。针对ORF121基因靶点设计探针能够检测到鲫鱼血细胞中的病毒粒子。ORF121基因可作为开展CyHV-2病毒诊断技术研发的潜在检测靶点。另外,ORF121蛋白在CyHV-2病毒感染过程中高效表达,可能参与病毒感染早期的调控功能,其具体机制尚不得而知。因此,本实验利用原核表达技术表达CyHV-2 ORF121蛋白,并制备了ORF121蛋白的多克隆抗体,CyHV-2感染金鱼鳍条细胞系(RyuF-2)后利用ORF121多抗进行免疫荧光检测,以期对ORF121基因功能的研究和CyHV-2病毒诊断技术的开发提供技术基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

CyHV-2毒株由上海海洋大学国家水生动物

病原库保存。金鱼鳍条细胞系(RyuF-2)由东京海洋大学佐野元彦教授友情馈赠^[15]。RyuF-2细胞系培养温度为27℃,采用含10%血清的M199培养基进行传代培养。SPF级6周龄BALB/c小鼠购自上海市实验动物研究中心。限制性内切酶购自TaKaRa公司;pGEX-4T-3等原核表达质粒由本实验室保存。质粒抽提试剂盒、病毒提取试剂盒和感受态细胞购自天根生化科技(北京)有限公司;蛋白纯化试剂盒、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂和商品化抗体均购Sigma-Aldrich公司;引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。其他分子生物学试剂和细胞培养基等分别购自Promega公司和Thermo公司。

1.2 ORF121基因的扩增

根据CyHV-2 ORF121(GenBank: AFJ20543.1)基因序列设计ORF121基因扩增引物(上游:5'-CCGGAATTCATGTCTACAGAAATGGTTTTCATCG-3';下游:5'-CCGCTCGAGTCTACAT-ATCGTCTTCATCCTCGGGT-3'),在上下游引物序列中分别设计EcoRI和XhoI酶切位点。参照Wang等^[14]方法采用病毒DNA提取试剂盒[DP315,天根生化科技(北京)有限公司]从已纯化的CyHV-2病毒中提取DNA作为基因扩增模板,对ORF121基因进行扩增。PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳检测后,利用DNA片段纯化回收试剂盒进行回收。

1.3 ORF121基因原核表达质粒的构建

参照限制性内切酶反应体系说明,将上一步中纯化回收的ORF121基因PCR产物和原核表达质粒pGEX-4T-3分别置于37℃金属浴中双酶切反应2h。质粒酶切体系为EcoRI 2 μL, XhoI 2 μL, 10×Buffer 10 μL, 质粒≤2 μg, 加ddH₂O至100 μL。ORF121基因PCR产物酶体系为EcoRI 3 μL, XhoI 3 μL, 10×Buffer 9 μL, PCR纯化回收产物≤600 ng, 加ddH₂O至90 μL。双酶切反应产物经琼脂糖凝胶检测后,利用PCR产物回收试剂盒纯化回收。利用T4连接酶(TaKaRa)将双酶切后的ORF121基因产物和pGEX-4T-3质粒置于16℃恒温金属浴进行过夜连接反应。T4连接酶反应体系为T4 Ligase 1 μL, T4 Ligase buffer 2.5 μL, pGEX-4T-3 98 ng, ORF121基因产物 220 ng, 加ddH₂O至25 μL。将连接产物转化至DH5α感受态细胞中,经含有氨苄西林抗生素的LB平板筛选获得阳性克隆。阳

性质粒送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序正确后,进行质粒扩增备用。

1.4 ORF121基因的诱导表达及可溶性分析

参照GE公司pGEX原核表达系统,将ORF121原核表达重组质粒转化至BL21(DE3)感受态细胞中,经含有氨苄西林抗生素的LB平板筛选获得阳性单克隆菌落。挑取阳性克隆于13 mL LB(含100 mg/mL Amp⁺)培养基中37 °C, 180 r/min培养12 h,取200 μL于200 mL LB液体培养基(含100 mg/mL Amp⁺)中扩大培养,于37 °C, 180 r/min恒温摇床培养5 h,加入IPTG使其终浓度为1 mmol/L,诱导5 h,收集菌液8 500 r/min离心10 min,经PBS缓冲溶液重悬菌体后离心收集菌体,进行超声破碎30 min(超声6 s/间隔6 s,功率60%,100次)至菌液透明,4 °C 12 000 r/min离心30 min,分别收集菌体和上清液,经蛋白上样液混合制样,进行SDS-PAGE电泳检测分析。

1.5 目的蛋白的纯化

将菌液沉淀依次用2、4、6和8 mol/L的尿素洗去杂蛋白,每次洗涤后4 °C条件下8 500 r/min离心20 min,冰上孵育30 min,每次离心前按照1:1 000的比例加入蛋白酶抑制剂PMSF。洗脱蛋白依次经含有8、6、4、2和0 mol/L尿素的PBS溶液中透析,每次透析4 h。透析后的蛋白经SDS-PAGE胶和Western Blot分析后置于-80 °C备用。

1.6 ORF121多克隆抗体的制备

将纯化后的ORF121重组蛋白与弗氏佐剂(1:1)涡旋震荡充分混匀,达到“油包水”的乳化状态,采用腹腔注射的方法免疫BALB/c小鼠,共免疫4次,每次100 ng/只。第1次免疫是将500 μL抗原与500 μL弗氏完全佐剂等体积完全混匀后经腹腔注射进行。第1次免疫后2周进行第2次免疫,500 μL抗原与弗氏不完全佐剂完全混匀进行腹腔注射。第2次免疫后1周采用纯抗原免疫,1周后进行最后一次纯抗原免疫;1周后采用摘除眼球取血,用1.5 mL离心管将血液倾斜置于37 °C 1 h,4 °C隔夜。将隔夜的血液样品5 000 r/min离心10 min,收集血清并检测多克隆抗体效价。血清保存于-80 °C备用。

1.7 ORF121多克隆抗体特异性分析

分别取纯化后的ORF121重组蛋白、感染CyHV-2病毒的RyuF-2细胞样品、纯化的GST蛋白和正常

RyuF-2细胞样品,经蛋白上样Buffer处理后进行SDS-PAGE凝胶电泳分析和Western Blot分析。SDS-PAGE凝胶电泳采用考马斯亮蓝快速染液进行染色分析。Western Blot采用湿转法(100 v, 75 min)将样品转至PVDF膜上,5%脱脂牛奶37 °C封闭2 h后,经一抗隔夜4 °C孵育(ORF121多抗1:5 000稀释,GST标签多抗1:4 000稀释)。HRP标记兔抗作为二抗(1:5 000稀释)37 °C孵育1 h后,PBS-T缓冲液清洗3次,每次5 min。将PVDF膜置于ECL发光液中采用化学发光法显色拍照分析。

1.8 间接免疫荧光检测

将RyuF-2细胞传至6孔板,细胞达80%,感染CyHV-2病毒(MOI=5),2 h后去除病毒,加入完全培养基连续观察,待细胞出现典型病变后用PBS缓冲溶液清洗3次,每次5 min,加入2 mL 4%多聚甲醛固定液室温固定10 min,移去固定液后加入0.4%Triton X-100透化,PBS缓冲溶液洗3次,每次5 min,加入5%脱脂牛奶室温封闭2 h,PBS缓冲溶液清洗3次后加入ORF121多抗(对照组加入免疫前BALB/c小鼠血清)(1:400的比例稀释抗体)室温孵育1 h,PBS缓冲溶液洗3次后加入FITC标记的二抗(1:200比例稀释抗体),PBS缓冲溶液清洗3次加入DAPI室温染色10 min,PBS缓冲溶液洗3次,每次5 min,加入封片剂后倒置荧光显微镜观察并拍照记录。

2 结果

2.1 ORF121基因氨基酸序列分析

基于生物信息学技术,ORF121基因全长801 bp表达蛋白约为28.59 ku。利用TMHMM^[16]数据库在线分析ORF121基因,发现该蛋白为膜外蛋白。根据ORF121基因DNA序列推导氨基酸序列,通过NCBI数据库protein BLAST比对后发现,CyHV-2病毒ORF121蛋白与CyHV-1和CyHV-3的ORF121蛋白相比具有一定的保守性氨基酸结构域,但其同源性低于30%(图1)。

2.2 ORF121基因片段的扩增及原核表达质粒的构建

根据GenBank数据库中CyHV-2病毒ORF121(GenBank: AFJ20543.1)基因序列设计扩增引物,提取国家水生动物病原库保藏的CyHV-2病毒株DNA

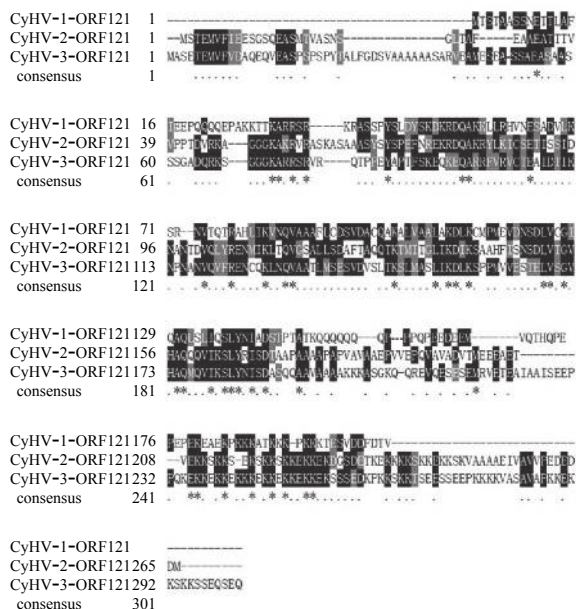


图1 CyHV-2 ORF121与CyHV-3、CyHV-1 ORF121氨基酸序列比对

在图中黑色用来表示完全保守的氨基酸残基

Fig. 1 Multiple sequence alignment of CyHV-2 ORF121 with CyHV-3 and CyHV-1 ORF121

The fully conserved amino acid residues in all species are represented in black

作为扩增模板。PCR扩增产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳检测，条带大小约801 bp与预期大小一致(图2)。纯化的PCR产物经双酶切克隆连接至原核表达载

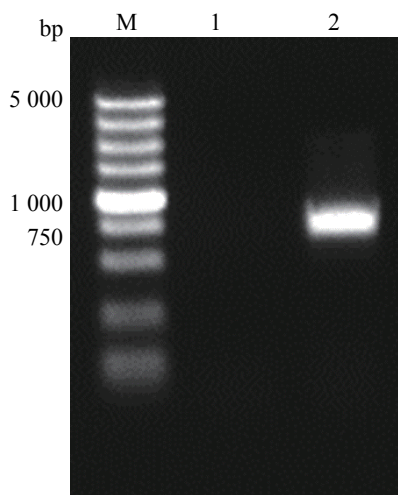


图2 ORF121基因PCR扩增产物电泳图

M. Marker 5000; 1. 阴性对照; 2. PCR扩增图

Fig. 2 Electrophoretic profile of PCR product of ORF121 gene

M. Marker 5000; 1. negative control; 2. amplification products

体pGEX-4T-3, 重组质粒经生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 与ORF121(GenBank: AFJ20543.1)基因序列比对, 基因序列一致符合预期。

2.3 目的蛋白rORF121的诱导表达及其可溶性分析

重组质粒转化进BL21(DE3)感受态大肠杆菌中, 经1 mmol/L的IPTG诱导。离心收集诱导后的菌液, 经超声破碎后, 分别制样分析上清液和沉淀中ORF121蛋白的表达情况。SDS-PAGE结果显示, 相对于未诱导的对照组和诱导后超声的上清中, 沉淀中蛋白约为60 ku高效表达, 略大于ORF-121蛋白(约为28.59 ku)融合GST标签(27 ku)后理论大小55.59 ku(图3)。重组蛋白rORF121主要以包涵体形式存在。

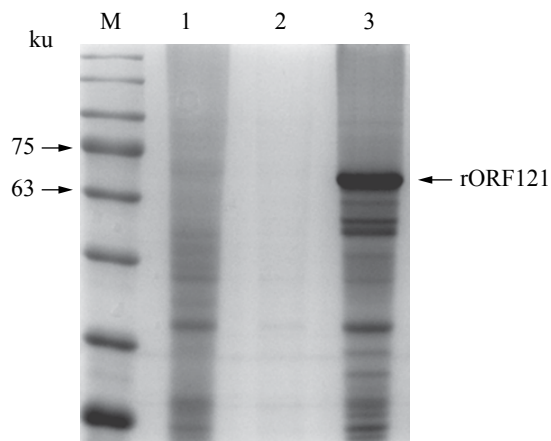


图3 重组蛋白rORF121的诱导表达和可溶性分析

M. 蛋白质marker; 1. 未诱导细菌沉淀; 2. 诱导细菌超声破碎后的上清液; 3. 诱导细菌超声破碎后的沉淀

Fig. 3 Induced expression and solubility analysis of rORF121

M. protein marker; 1. precipitate of uninduced bacteria control; 2. supernatant of induced bacteria after ultrasonic; 3. precipitate of induced bacteria after ultrasonic

2.4 重组蛋白rORF121的纯化

分别选择8、6、4、2和0 mol/L尿素溶解沉淀中ORF121包涵体蛋白, 经透析袋除去尿素后分析蛋白纯化情况。SDS-PAGE胶分析, 诱导后的包涵体中存在大量rORF121蛋白, 部分包涵体蛋白可以被尿素溶解略有少量杂蛋白, 经透析袋透析后获得单一条带证实rORF121蛋白纯化效果较好(图4)。

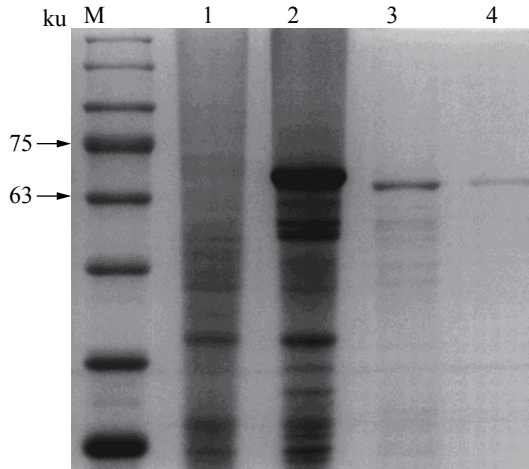


图4 纯化产物的SDS-PAGE分析

M. 蛋白质marker; 1. 未导细菌沉淀; 2. 诱导细菌超声破碎后的沉淀; 3. 尿素纯化后的样品; 4. 透析后的样品

Fig. 4 SDS-PAGE of purified rORF121

M. protein marker; 1. precipitate of uninduced bacteria; 2. precipitate of induced bacteria after ultrasonic; 3. purified sample from precipitate by urea; 4. purified sample after dialysis

2.5 多克隆抗体的制备及特异性分析

rORF121蛋白经纯化后免疫BALB/c小鼠收集小鼠血清获得ORF121蛋白的多克隆抗体。分别制备未感染CyHV-2病毒的细胞样品、感染CyHV-2病毒的细胞样品、纯化后的rORF121蛋白样品以及GST标签蛋白样品。经SDS-PAGE分析显示,各样品所含蛋白符合预期,正常细胞样品和感染CyHV-2病毒细胞样品含有细胞总蛋白。纯化后的rORF121蛋白条带单一大小在60 ku附近。GST标签蛋白样品条带清晰、单一,大小约27 ku(图5)。上述样品进行Western Blot实验,利用GST标签抗体孵育后结果显示, rORF121蛋白在66 ku左右处有一条单一明显条带。阳性对照样品GST标签在27 ku附近有单一条带与预期大小一致,而正常细胞样品和感染病毒细胞样品均无条带,实验结果显示,重组蛋白rORF121表达纯化效果较好(图6)。采用本研究制备的ORF121蛋白的多克隆抗体孵育上述样品, Western Blot实验结果显示,感染CyHV-2病毒细胞样品在40 ku大小附近有一条清晰条带。重组蛋白rORF121样品在60 ku附近处出现一条清晰单一条带; GST标签蛋白样品在27 ku附件出现单一条带; 空白细胞样品未出现条带(图7)。综上,本研究制备的ORF121多克隆抗体可以识别CyHV-2病毒且抗体特异性较强无杂带。因本研究中GST标签融合蛋白作为抗原

免疫BALB/c小鼠过程中未切除GST标签蛋白,制备的多克隆抗体亦可识别GST标签蛋白。

2.6 间接免疫荧光检测

CyHV-2感染RyuF-2细胞后利用间接免疫荧光试验分析病毒感染情况。CyHV-2感染细胞后感染组细胞出现病毒感染空斑,细胞稀疏且部分脱落悬浮在细胞培养基中,未感染病毒细胞生长正常。经固定、透化和孵育ORF121多克隆

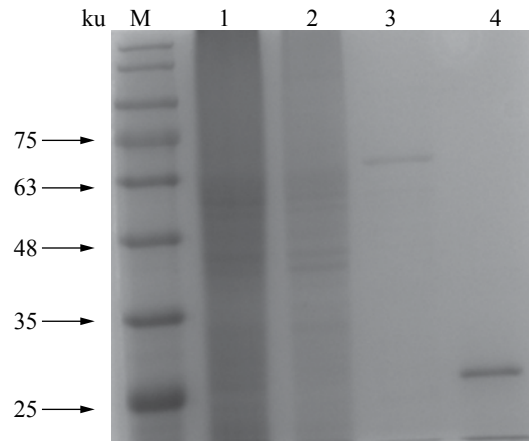


图5 重组蛋白ORF121表达分析

M. 蛋白质marker; 1. 未感染病毒的RyuF-2细胞; 2. 感染CyHV-2的RyuF-2细胞; 3. rORF121重组蛋白; 4. GST标签蛋白

Fig. 5 Expression analysis of recombinant ORF121

M. protein marker; 1. uninfected RyuF-2 cell; 2. infected RyuF-2 cell; 3. recombinant protein rORF121; 4. GST labeled protein

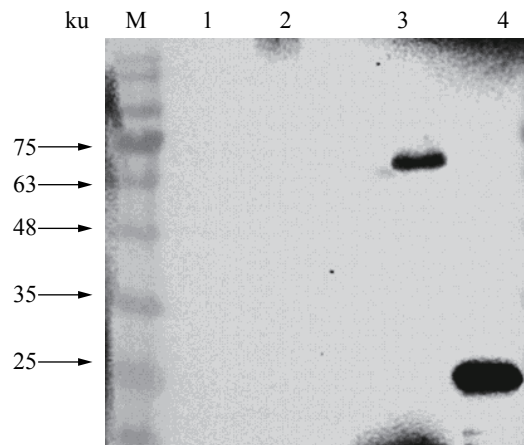


图6 纯化的GST与GST-ORF121的免疫印迹分析

M. marker; 1. 感染CyHV-2的RyuF-2细胞; 2. 未感染病毒的RyuF-2细胞; 3. rORF121重组蛋白; 4. GST标签蛋白

Fig. 6 Western Blot analysis of purified GST and GST-ORF121 with anti-GST monoclonal antibody

M. protein marker; 1. infected RyuF-2 cell; 2. uninfected RyuF-2 cell; 3. recombinant protein rORF121; 4. GST labeled protein

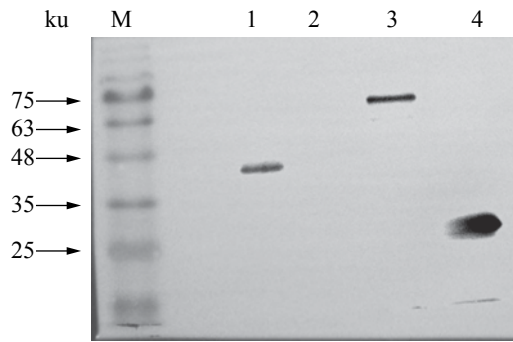


图7 Western Blot检测重组蛋白

M. 蛋白marker; 1. 感染CyHV-2的RyuF-2细胞; 2. 未感染病毒的RyuF-2细胞; 3. rORF121重组蛋白; 4. GST标签蛋白

Fig. 7 Western Blot detection of rORF121

M. protein marker; 1. infected RyuF-2 cell; 2. uninfected RyuF-2 cell; 3. recombinant protein rORF121; 4. GST labeled protein

抗体后, 使用倒置荧光显微镜观察。病毒感染组细胞出现典型的红色荧光信号(罗丹明标记的二抗); 而未感染组和阴性对照血清组孵育的细胞样品均未出现荧光信号(图8)。以上表明, 本研究制备的ORF121多克隆抗体可应用于间接免疫荧光实验检测CyHV-2病毒的感染情况。

3 讨论

2007年, 鲫造血器官坏死病在江苏盐城海岸首次被发现, 并迅速扩散到射阳和兴化等地, 目前已在全国流行, 给养殖户造成巨大的经济损

失^[5]。自2009年推广“中科3号”等^[17]新品种以来, 鲫产量在2016年已经达300万t, 新品种的推广和应用对鲫产量和品质的提高起到了巨大的推动作用, 并有持续上升趋势, 因此, 开展该病的防控研究具有现实的应用价值。现有研究显示, CyHV-2病毒感染谱较窄, 主要感染鲫及其普通变种。陈昌福等^[6]利用患病鲫组织浆液作为感染源, 感染异育银鲫、鲫、湘云鲫、黄金鲫、津新乌鲫、建鲤、草鱼和黄颡鱼, 发现CyHV-2对异育银鲫和鲫感染最为敏感, 致死率100%, 对其他品种感染率较低。Hedrick等^[18]对金鱼、鲤和鲤的杂交品种进行CyHV-2攻毒实验显示, 鲤和鲤的杂交品种均能感染该病毒而成为该病毒的携带者。Dospoly等^[19]研究显示, 其能够感染鱼卵、鱼苗、鱼种和亲鱼, 且幼鱼较成鱼更易感染。与CyHV-2相比CyHV-1对鲤、鲫、圆腹雅罗鱼、鲤和金鱼杂交种等均有危害, CyHV-3不仅能感染鲤、其他鲤科鱼、锦鲤和鲫的杂交后代, 还能感染锦鲤和金鱼的杂交后代、金鱼和鲟等使其成为CyHV-3的潜在携带载体^[20]。综上所述, 在感染谱方面, CyHV-2相对于CyHV-1和CyHV-3具有其独特的宿主嗜性。疱疹病毒为了保持其在宿主种群中始终存在, 一些疱疹病毒科病毒在宿主的神经系统中建立了潜伏感染, 潜伏感染是疱疹病毒科病毒的共同特点之一。已有研究证实, CyHV-3可在锦鲤中发生潜伏感染, 主

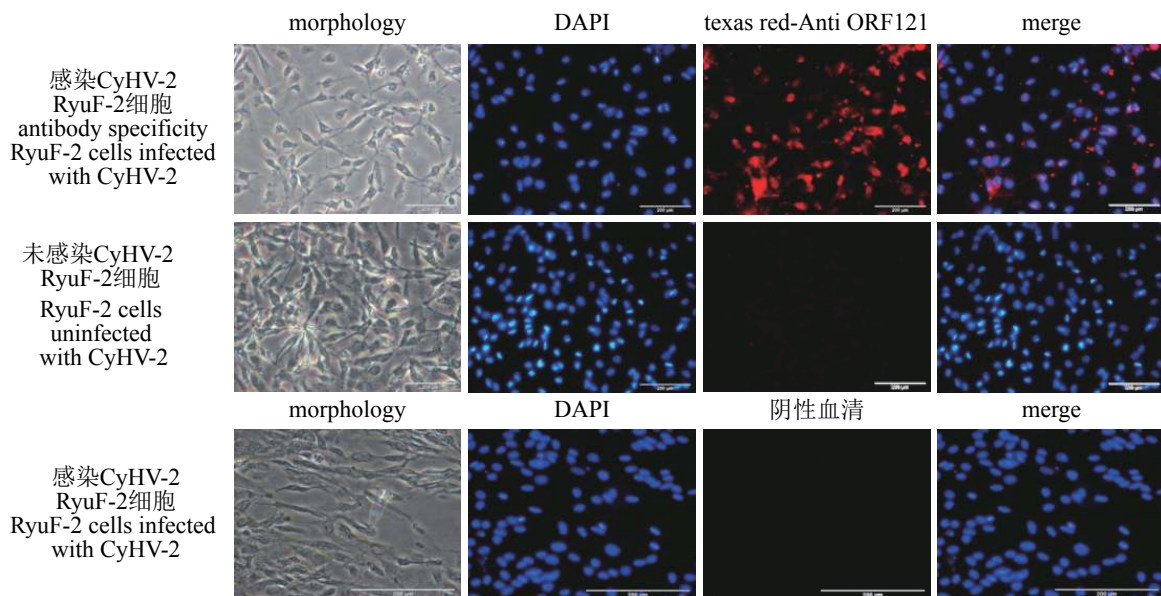


图8 间接免疫荧光分析ORF121多克隆抗体特异性

Fig. 8 Indirect immunofluorescence analysis of ORF121 polyclonal antibody

要潜伏在锦鲤的白细胞中^[21-22]。在温度等条件刺激下病毒可由潜伏状态转变为激活甚至是烈性感染状态。在前期的研究中本课题组开展了CyHV-2实验室感染模型的建立^[14],发现 10^6 个/mL病毒粒子的滴度感染鲫后,在病毒感染72 h后一部分鲫发生急性死亡,而另一部分鲫则继续存活,对于CyHV-2是否存在潜伏感染及其急性感染和慢性感染的机制尚不得而知,有待进一步研究。目前,针对CyHV-1和CyHV-3感染机制和结构蛋白、非结构蛋白、囊膜蛋白和疫苗防控等均开展了广泛的研究,取得了一定的研究进展^[23]。自2009年在中国流行以来至少有4株不同的CyHV-2毒株全基因组已被公开报道,给深入研究CyHV-2病毒的感染机制奠定了良好的基础。疱疹病毒科病毒种类繁多,其感染宿主包括在马、牛、猪、犬、猫及禽类甚至某些无脊椎动物,如牛疱疹病毒(bovine herpesviruses, BHV)、伪狂犬病病毒(pseudorabies virus, PRV)和鸭瘟病毒(duck plaguevirus, DPV)等^[24]。不同的疱疹病毒生物学特性具有较大的差异,但也有其共同的特征如具有囊膜、双链DNA病毒和基因呈时序性表达等特点。开展CyHV-2感染机制及其潜伏激活的验证实验不仅有助于防控鲫造血器官坏死病的流行,对比较3种基因型鱼类疱疹病毒的感染特点以及阐释疱疹病毒科病毒宿主嗜性及其潜伏感染机制均有重要的意义。

本课题组在前期的研究中建立了2株鲫鳍条细胞系SCC-DF(CTCC NO:201525)和GiCF细胞系^[25]均能够稳定感染CyHV-2病毒。比较多个CyHV-2基因如ORF3、ORF5、ORF35和ORF78等发现ORF121基因在多个组织中高效表达,且可以作为原位杂交探针应用于鲫血液中CyHV-2病毒粒子的快速诊断^[14]。生物信息学分析显示,ORF-121基因在CyHV-1、CyHV-2和CyHV-3同源性较低,仅具有部分保守性蛋白。为深入研究CyHV-2病毒感染机制,本研究克隆并原核表达了rORF-121蛋白且主要为不可溶蛋白,免疫BALB/c小鼠获得了多克隆抗体。应用ORF121对CyHV-2感染细胞后进行免疫荧光实验证实该多抗可应用CyHV-2在细胞水平的感染检测实验。获得的ORF121多克隆抗体检测CyHV-2病毒感染RyuF-2细胞样品显示条带大小约为40 ku,比ORF121预期大小28.59 ku略大,推测其原因可能是CyHV-2在感染过程中ORF121出现了翻译后修饰,但其具体机

制尚不明确。综上,CyHV-2区别于CyHV-1和CyHV-3毒株在宿主嗜性、潜伏感染机制和蛋白功能上均有其独特的生物学特性,因此,以ORF121基因功能为突破口开展CyHV-2病毒感染机制和潜伏感染验证等研究具有重要的价值。本研究制备的ORF121多克隆抗体及相关CyHV-2免疫学诊断方法为下一步ORF121单克隆抗体的制备和CyHV-2病毒感染机制和防控技术的开发奠定了良好的基础。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] Groff J M, LaPatra S E, Munn R J, et al. A viral epizootic in cultured populations of juvenile goldfish due to a putative herpesvirus etiology[J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 1998, 10(4): 375-378.
- [3] Jung S J, Miyazaki T. Herpesviral haematopoietic necrosis of goldfish, *Carassius auratus* [J]. Journal of Fish Diseases, 1995, 18(3): 211-220.
- [4] Waltzek T B, Kurobe T, Goodwin A E, et al. Development of a polymerase chain reaction assay to detect *Cyprinid herpesvirus 2* in goldfish[J]. Journal of Aquatic Animal Health, 2009, 21(1): 60-67.
- [5] Wu T, Ding Z F, Ren M, et al. The histo- and ultra-pathological studies on a fatal disease of Prussian carp (*Carassius gibelio*) in mainland China associated with *Cyprinid herpesvirus 2*(CyHV-2)[J]. Aquaculture, 2013, 412-413: 8-13.
- [6] 陈昌福, 陈辉, 胡明, 等. 异育银鲫疱疹病毒病及其防控对策(下)[J]. 当代水产, 2015(5): 77-79.
Chen C F, Chen H, Hu M, et al. *Carassius auratus* herpes virus disease and its prevention and control measures (below)[J]. Current Fisheries, 2015(5): 77-79.
- [7] He J Q, Shi X J, Yu L, et al. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for diagnosis of *Cyprinid herpesvirus 2*[J]. Journal of Virological Methods, 2013, 194(1-2): 206-210.
- [8] Kong S Y, Jiang Y S, Wang Q, et al. Detection methods of *Cyprinid herpesvirus 2* infection in silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) via a pORF72 monoclonal

- antibody[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2017, 40(12): 1791-1798.
- [9] 彭俊杰, 张琪, 贾路路, 等. 鲤疱疹病毒 II 型(CyHV-2)ORF25蛋白的原核表达及单克隆抗体的制备[J]. 华中农业大学学报, 2017, 36(2): 96-101.
- Peng J J, Zhang Q, Jia L L, *et al.* Prokaryotic expression and preparation of monoclonal antibody against ORF25 protein of *Cyprinid herpesvirus II* [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2017, 36(2): 96-101(in Chinese).
- [10] Davison A J, Kurobe T, Gatherer D, *et al.* Comparative genomics of carp herpesviruses[J]. *Journal of Virology*, 2013, 87(5): 2908-2922.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] Liu B, Zhou Y, Li K, *et al.* The complete genome of *Cyprinid herpesvirus 2*, a new strain isolated from Allogynogenetic crucian carp[J]. *Virus Research*, 2018, 256: 6-10.
- [14] Wang H, Xu L J, Lu L Q. Detection of *Cyprinid herpesvirus 2* in peripheral blood cells of silver crucian carp, *Carassius auratus gibelio* (Bloch), suggests its potential in viral diagnosis[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2016, 39(2): 155-162.
- [15] Shibata T, Nanjo A, Saito M, *et al.* *In vitro* characteristics of *Cyprinid herpesvirus 2*: effect of kidney extract supplementation on growth[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2015, 115(3): 223-232.
- [16] Krogh A, Larsson B, von Heijne G, *et al.* Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2001, 305(3): 567-580.
- [17] 桂建芳. 异育银鲫养殖新品种——“中科3号”简介[J]. 科学养鱼, 2009(5): 21.
- Gui J F. Introduction of a new breed of *Carassius auratus* - "Zhongke No.3"[J]. *Scientific Fish Farming*, 2009(5): 21.
- [18] Hedrick R P, Waltzek T B, McDowell T S. Susceptibility of koi carp, common carp, goldfish, and goldfish×common carp hybrids to *Cyprinid herpesvirus2* and *herpesvirus3*[J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2006, 18(1): 26-34.
- [19] Doszpoly A, Benko M, Csaba G, *et al.* Introduction of the family Alloherpesviridae: the first molecular detection of herpesviruses of cyprinid fish in Hungary[J]. *Magyar Allatorvosok Lapja*, 2011, 133(3): 174-181.
- [20] 罗丹, 梁利国, 谢骏, 等. 鲤疱疹病毒 I、II、III型研究进展[J]. *水生生态学杂志*, 2014, 35(3): 94-400.
- Luo D, Liang L G, Xie J, *et al.* Research progress of *Cyprinid herpesvirus I, II, III*[J]. *Journal of Hydroecology*, 2014, 35(3): 94-400(in Chinese).
- [21] Eide K E, Miller-Morgan T, Heidel J R, *et al.* Investigation of *koi herpesvirus* latency in *koi*[J]. *Journal of Virology*, 2011, 85(10): 4954-4962.
- [22] Prescott M A, Reed A N, Jin L, *et al.* Rapid detection of *Cyprinid herpesvirus 3* in latently infected *koi* by recombinase polymerase amplification[J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2016, 28(3): 173-180.
- [23] 郑树城, 王庆, 李莹莹, 等. 鲤疱疹病毒3型研究进展[J]. *病毒学报*, 2016, 32(1): 108-120.
- Zheng S C, Wang Q, Li Y Y, *et al.* Research advances in *Cyprinid herpesvirus 3*[J]. *Chinese Journal of Virology*, 2016, 32(1): 108-120(in Chinese).
- [24] 向骏, 程安春, 汪铭书. 疱疹病毒衣壳蛋白及其组装研究进展[J]. *中国农业科学*, 2010, 43(22): 4739-4745.
- Xiang J, Cheng A C, Wang M S. Advance in capsid proteins and assembly of herpesvirus[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2010, 43(22): 4739-4745(in Chinese).
- [25] Lu J F, Xu D, Lu L Q. A novel cell line established from caudal fin tissue of *Carassius auratus gibelio* is susceptible to *Cyprinid herpesvirus 2* infection with the induction of apoptosis[J]. *Virus Research*, 2018, 258: 19-27.

Preparation and characterization of polyclonal antibody against *Cyprinid herpesvirus 2* ORF121

YU Lin¹, LÜ Liquan^{1,2,3}, WANG Hao^{1,2,3*}

(1. National Pathogen Collection Center for Aquatic Animals, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources Aquaculture, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. National Experimental Teaching Demonstration Center for Fishery Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: *Cyprinid herpesvirus 2* (CyHV-2) is an emerging pathogen of the crucian carp, *Carassius carassius*, which has caused huge economic losses in China and appears to be spreading worldwide. The objective of this study was to produce and characterize new polyclonal antibodies against CyHV-2 ORF121 that were suitable for diagnostic use and the investigation of ORF121 function. The open reading frame (ORF) of 121 was amplified from the culture supernatant of the CyHV-2. ORF121 was subcloned into the pGEX-4T vector and recombinant protein was expressed in *Escherichia coli*. The purified recombinant protein ORF121 was used to immunize mice and polyclonal antibodies were obtained. The recombinant protein ORF121 was purified under urea conditions then used to 6-week-old BALA/c mice to prepare its polyclonal antibody. Western Blot and indirect fluorescence assay (IFA) assay were used to validate the ORF121 polyclonal antibody. We found the recombinant protein ORF121(rORF121) could be expressed in *E. coli*. aggregated in the form of inclusion body. The specificity of the anti-ORF121 polyclonal antibody was confirmed by Western Blot. IFA with anti-ORF121 polyclonal antibody for the detection of CyHV-2 infected RyuF-2 cells was developed in this study. In conclusion, the anti-ORF121 polyclonal antibody will be a valuable tool in further studies to elucidate the mechanisms of viral infection and CyHV-2 diagnosis.

Key words: *Cyprinid herpesvirus 2*; ORF121; prokaryotic expression; polyclonal antibody; IFA

Corresponding author: WANG Hao. E-mail: h-wang@shou.edu.cn

Funding projects: Young Elite Scientists Sponsorship Program by CAST (Chinese Association for Science and Technology) and CSF (China Society of Fisheries); National Modern Agricultural Industry Technology System Construction Special (CARS-45-19); National Natural Science Foundation of China (31672690)