



鲤疱疹病毒 II 型主要免疫原性蛋白的鉴定

高 娃¹, 温 虹¹, 王 浩^{1,2,3}, 陆佳荃¹, 吕利群^{1,2,3}, 姜有声^{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, 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306;

3. 上海海洋大学, 水产动物遗传育种中心上海市协同创新中心, 上海 201306)

摘要: 为了鉴定 CyHV-2 的主要免疫原性蛋白, 本研究用分离的 CyHV-2-YC-1 分离株 (下简称 CyHV-2) 感染异育银鲫尾鳍细胞系 (GiCF), 用蔗糖密度梯度超速离心法对细胞感染液中的 CyHV-2 进行纯化, 纯化后的 CyHV-2 病毒免疫小鼠制备抗 CyHV-2 多克隆抗体。纯化的病毒颗粒经变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 和考马斯亮蓝染色后, 用抗 CyHV-2 多克隆抗体进行 Western blotting 分析和质谱鉴定。结果显示, 透射电镜下观察发现 50%~66% 的蔗糖梯度多见完整囊膜包裹的 CyHV-2 病毒颗粒, 也有少量囊膜破损的病毒颗粒。Western blotting 结果显示, 抗 CyHV-2 多克隆抗体与多种病毒蛋白具有特异性免疫反应, 质谱鉴定显示, 其中 8 种主要免疫原性蛋白分别是 ORF92、ORF115、ORF25、ORF57、ORF66、ORF72、ORF131 和 ORF132。研究表明, 通过蔗糖密度梯度超速离心法提纯 CyHV-2 病毒颗粒后, 本研究制备的抗 CyHV-2 多克隆抗体能够特异性识别 CyHV-2 病毒的主要免疫原性蛋白。本研究将为 CyHV-2 免疫学检测方法的建立以及疫苗的研制提供更多的候选抗原。

关键词: 鲤疱疹病毒 II 型; 免疫原性; 蛋白; 质谱鉴定

中图分类号: S 941.41

文献标志码: A

鲫 (*Carassius auratus*) 养殖成本低, 且养殖地域较广, 在中国淡水养鱼业的养殖规模越来越大, 其中最主要的养殖品种为异育银鲫 (*C. auratus gibelio*)^[1]。近几年来, 由于疱疹病毒性造血器官坏死病 (Herpesviral haematopoietic necrosis, HVHN) 的暴发, 对中国鲫养殖业的可持续发展造成了严重影响。鲫疱疹病毒性造血器官坏死病的病原为 II 型鲤疱疹病毒 (Cyprinid herpesvirus 2, CyHV-2), 该病毒又称金鱼造血器官坏死病毒 (Goldfish haematopoietic necrosis virus, GFHNV)^[2], 属鲤疱疹病毒科 (Herpesviridae)^[3]。Xu 等^[4] 检测出 CyHV-2 病毒核衣壳呈六角形, 直径 110~120 nm, 具有囊膜, 囊膜直径 170~200 nm, 基因组全长

290 304 bp, 共编码约 154 个潜在开放阅读框 (open reading frame, ORF)^[5]。1995 年 Jung 等^[6] 对 CyHV-2 进行了首次报道, 提出该病毒是金鱼造血器官坏死病的致病病原, 死亡率达到 90%~100%。随后, 多个国家和地区相继暴发, 如今 CyHV-2 已在全世界范围内流行^[7-10]。

CyHV-2 与鲤疱疹病毒 I 型和 III 型 (CyHV-1 和 CyHV-3) 都属于鲤疱疹病毒科。在过去的报道中, 认为 CyHV-1 和 CyHV-3 感染的物种是鲤 (*Cyprinus carpio*) 和锦鲤, CyHV-2 只感染金鱼, 如今随着对鲤疱疹病毒的深入研究以及病毒的扩散, 发现这 3 种鲤科疱疹病毒能够感染的鲤科物种比之前所知的更广泛^[9, 11-12]。其中, CyHV-1

收稿日期: 2019-06-06 修回日期: 2019-09-17

资助项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-45-19); 第四届中国科协青年人才托举工程 (中国水产学会); 上海海洋大学优秀本科生进实验室项目 (2018)

通信作者: 姜有声, E-mail: ysjiang@shou.edu.cn

和其他2种病毒比较起来危害性较小,所以鲜有报道。CyHV-3也称锦鲤疱疹病毒(Koi herpesvirus, KHV)^[13],KHV导致世界各地的锦鲤和鲤大量死亡,因此得到了国际的关注,关于KHV的主要免疫原性蛋白以及毒力基因都有相关的研究^[14-15]。但是目前关于CyHV-2蛋白的研究却非常有限。其中,有一些学者利用CyHV-2蛋白进行了免疫学检测方法的研究,利用ORF92编码的衣壳蛋白制备的单克隆抗体在实验中可以有效地运用免疫学检测方法对感染CyHV-2的细胞和组织进行鉴定^[16],Kong等^[17]利用ORF72建立了一种CyHV-2的免疫学检测方法。也有研究证明了一些CyHV-2蛋白具有免疫原性,周勇等^[18]利用ORF25进行原核表达的截短蛋白tORF25具有较好的免疫原性,ORF72编码的衣壳蛋白也被证实是一种有效的病毒免疫原^[19],也有研究发现ORF5具有免疫原性^[20]。但是目前还没有研究对CyHV-2的主要免疫原性蛋白进行过集中鉴定。

本研究采用20%~66%蔗糖密度梯度超速离心法对CyHV-2病毒进行纯化,免疫小鼠(*Mus musculus*)制备抗CyHV-2多克隆抗体,纯化的病毒经过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和考马斯亮蓝染色后运用抗CyHV-2多克隆抗体进行Western blotting分析,结合质谱分析鉴定出CyHV-2的主要免疫原性蛋白,为CyHV-2免疫学检测方法的建立以及疫苗的制备提供更多的候选抗原。

1 材料与方法

1.1 实验材料

CyHV-2-YC-1毒株(下简称CyHV-2)为本实验室保存毒株,取自自然发病鲤;异育银鲫尾鳍细胞系(GiCF)^[21]由本实验室建立;4周龄BABL/c雌性小鼠购自上海雷根生物科技有限公司。

蔗糖购自Sigma公司;SDS-PAGE配胶试剂、蛋白Marker、凝胶电泳缓冲液、转膜缓冲液和ECL化学发光显色液购自上海天能科技有限公司;HRP标记的羊抗小鼠IgG购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 实验方法

病毒增殖与纯化 用CyHV-2感染GiCF细胞,将出现明显细胞病变效应(cytopathic effect,

CPE)的细胞感染液进行1~2次冻融处理,于4℃下4 000 r/min离心20 min,底部沉淀为细胞碎片,收集上清液于4℃下32 000 r/min离心1.5 h,弃上清液,用无菌磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)重悬沉淀;将病毒悬液加入由质量体积比分别为20%、30%、40%、50%和66%的蔗糖密度梯度离心管上层,于4℃下25 000 r/min离心1 h;收集每一层的病毒样品于不同试管中,每管中加入少量无菌水,上层加入20%蔗糖溶液,于4℃下32 000 r/min离心2 h,收集每一管沉淀,用无菌水重悬,标记好每一层的病毒颗粒,将每一层纯化的病毒颗粒分别吸附于铜网上,3%的磷钨酸(pH 7.2~7.4)负染2 min,待铜网烘干后在透射电子显微镜下观察。

抗CyHV-2多克隆抗体制备 经纯化的CyHV-2病毒颗粒作为免疫原,免疫4周龄的BABL/c雌性小鼠,分4次进行免疫,每次腹腔注射200 μL/只。第1次免疫将CyHV-2病毒颗粒与弗氏完全佐剂等体积混合反复吹吸直至完全乳化后注射,第2次与第3次采用弗氏不完全佐剂完全乳化后注射,第4次采用纯抗原注射,第2次免疫在第1次免疫的2周后,第3次和第4次免疫分别在上一次免疫的1周后。通过小鼠眼角取血,血液在37℃放置1 h后,4℃过夜待血液分层,8 500 r/min离心2 min获得透明的淡黄色上清液即为抗CyHV-2多克隆抗体。

SDS-PAGE和考马斯亮蓝染色 配制由12%的分离胶和5%的浓缩胶组成的聚丙烯酰胺凝胶,将纯化好的病毒与2×蛋白上样缓冲液按1:1的比例混匀后在沸水中水浴5 min,冷却后点样进行电泳(80 V, 20 min后120 V, 80 min)。电泳结束后,其中一块凝胶用考马斯亮蓝染色液染色1~2 h后用脱色液进行脱色,直至凝胶上的条带清晰可见时用凝胶成像仪进行拍照。

Western blotting 将上述SDS-PAGE分离后的另一块凝胶用湿转的方法(100 V, 70 min)转移至硝酸纤维素(NC)膜上,然后用5%的脱脂奶粉室温封闭2 h;1:1 000稀释的抗CyHV-2多克隆抗体4℃下孵育过夜,PBST缓冲液(含有0.1%的吐温-20的PBS溶液)洗膜4次,每次5 min;1:4 000稀释的HRP标记的羊抗小鼠IgG室温孵育1 h,用0.1%的PBST洗膜7次,每次5 min,将NC膜在ECL化学发光显色液中浸泡1 min后,用成像仪进行曝光拍照。

质谱鉴定 通过比对考马斯亮蓝脱色后的凝胶与 ECL 化学发光显色后的 NC 膜, 将与 NC 膜显色明显条带相应位置的考马斯亮蓝脱色凝胶小心切出, 进行胶内酶解, 运用液相色谱—串联质谱法 (LC-MS/MS) 进行质谱分析。原始数据在 NCBI 数据库中检索。

2 结果

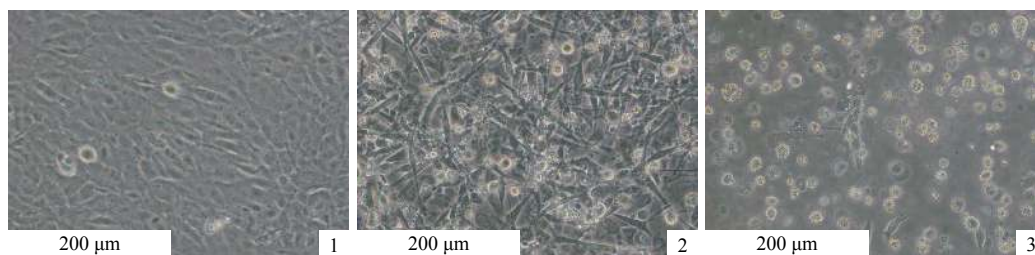
2.1 病毒纯化

与正常的细胞相比, GiCF 细胞在 CyHV-2 感染后的 3 d 左右出现 CPE, 此时细胞开始拉长, 死亡, 从培养瓶壁脱落, 在感染 8 d 左右出现明

显 CPE, 细胞有 90% 以上已经死亡 (图版 I)。此时收集细胞感染液进行病毒纯化。

蔗糖密度梯度超速离心后可见 3 条清晰的病毒条带 (图 1)。

病毒纯化后经透射电镜观察发现, 20%~30%、30%~40% 和 40%~50% 密度的蔗糖中杂质较多, 少见病毒颗粒; 50%~66% 密度的蔗糖收集到大量的病毒, 多为完整的病毒颗粒, 也有一些囊膜破损的病毒颗粒。完整的 CyHV-2 病毒颗粒呈圆形, 有囊膜包裹; 囊膜破损的病毒颗粒形态呈圆形, 囊膜部分呈现为透亮的一圈, CyHV-2 病毒颗粒直径为 110~120 nm (图版 II), 与之前的报道一致^[4]。



图版 I CyHV-2 感染异育银鲫尾鳍细胞

1. 正常的异育银鲫尾鳍细胞; 2. CyHV-2 感染 3 d 的异育银鲫尾鳍细胞; 3. CyHV-2 感染 8 d 的异育银鲫尾鳍细胞

Plate I GiCF cells infected with CyHV-2

1. uninfected GiCF cells; 2. GiCF cells infected with CyHV-2 at 3 days; 3. GiCF cells infected with CyHV-2 at 8 days

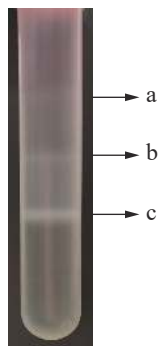


图 1 CyHV-2 蔗糖密度梯度超速离心纯化结果

a-c. 分别为蔗糖密度 30%~40%、40%~50% 和 50%~66% 超速离心后的病毒条带分布

Fig. 1 Results of CyHV-2 purification by sucrose density gradient ultracentrifugation

a-c. the distribution of virus bands after ultracentrifugation by 30%~40%, 40%~50% and 50%~66% sucrose density gradient

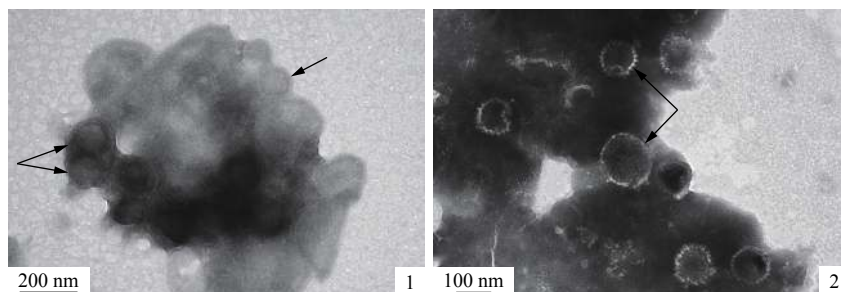
2.2 SDS-PAGE 和 Western blotting

对纯化的病毒进行 SDS-PAGE 分析, 考马斯亮蓝染色并脱色后的凝胶用成像仪拍照可以看到许多丰度不一的蛋白条带 (图 2-a)。凝胶湿

转后的 NC 膜以抗 CyHV-2 多克隆抗体进行 Western blotting 分析, 成像仪曝光拍照结果显示, 多条蛋白能够与抗 CyHV-2 多克隆抗体识别并发生特异性免疫反应, 其中 8 条具有明显特异性免疫反应的蛋白分别为 ORF92、ORF115、ORF25、ORF57、ORF66、ORF72、ORF131 和 ORF132, 其分子量分别为 140、84、66、64、45、41、35 和 17 ku (图 2-b)。

2.3 质谱分析

将其中 8 条具有明显特异性免疫反应的蛋白胶条切割下来进行质谱分析。鉴定结果显示, ORF92、ORF66 和 ORF72 定位为核衣壳, 其中, ORF92 (YP_007003911.1) 为主要衣壳蛋白, ORF66 (YP_007003885.1) 和 ORF72 (YP_007003891.1) 为衣壳三重联体蛋白。ORF115 (YP_007003933.1)、ORF25 (YP_007003844.1)、ORF131 (YP_007003952.1) 和 ORF132 (YP_007003951.1) 定位为囊膜, 为膜蛋白。ORF57 (YP_007003878.1) 为未知蛋白 (图 2-b, 表 1)。



图版 II 透射电镜下纯化的 CyHV-2 颗粒

1. 黑色箭头为完整的 CyHV-2 病毒颗粒；2. 黑色箭头为囊膜破损的 CyHV-2 病毒颗粒

Plate II Purified particles of CyHV-2 under transmission electron microscope

1. black arrow indicates virions of CyHV-2 with intact envelopes; 2. black arrow indicates damaged virions of CyHV-2 with envelopes

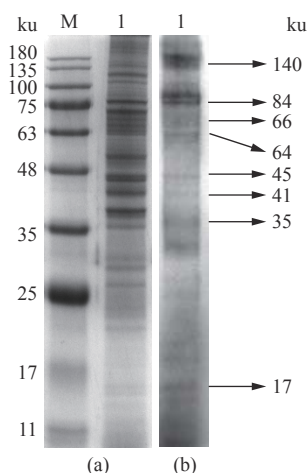


图 2 纯化的 CyHV-2 病毒 SDS-PAGE 电泳 (a) 和 Western blotting 结果 (b)

M. 蛋白标准；1. 纯化的 CyHV-2 病毒颗粒

Fig. 2 Results of SDS-PAGE of purified CyHV-2 virions (a) and Western blotting analysis (b)

M. protein Marker; 1. purified CyHV-2 virions

3 讨论

CyHV-2 病毒对水产养殖业构成的重大威胁和造成的巨大经济损失已经不容小觑^[22]。为了更好地应对 CyHV-2 的暴发，首先要建立有效的检测方法，目前对于 CyHV-2 病毒的检测方法有很多种，比较成熟的有细胞培养技术、PCR 技术^[23]和环介导等温检测技术^[24]等，但是基于免疫学的检测方法还尚未成熟，本实验鉴定的 8 个主要免疫原性蛋白可以为 CyHV-2 的免疫学检测方法的建立提供更多的候选抗原。

相对来说，预防是有效控制病害侵入的关键，因此疫苗的研制十分重要，但是目前关于预防 CyHV-2 疫苗的研究十分有限，其中，有研

究揭示了 ORF104 在 CyHV-2 感染过程中的作用，也表明 ORF104 是 CyHV-2 的潜在候选疫苗^[25]，基于酵母源的 ORF25 家族也被开发为 CyHV-2 潜在候选疫苗^[26]。相对 CyHV-2 目前带来的损失，仅有这些研究是不够的，因此开发一种安全有效的 CyHV-2 疫苗仍然是一项高度优先具有挑战性的研究，本实验鉴定的 CyHV-2 的主要免疫原性蛋白可以为疫苗的研制提供更多的主要靶点。

在 2013 年，Davison 等^[27]的研究中提到 CyHV-2 基因组预计包含 150 个功能蛋白。其中，本研究最终鉴定结果显示的 8 个具有主要免疫原性的蛋白分别为 ORF92、ORF115、ORF25、ORF57、ORF66、ORF72、ORF131 和 ORF132。ORF92、ORF66 和 ORF72 是衣壳蛋白，且 ORF66 是首次发现的具有免疫原性的衣壳蛋白，病毒衣壳蛋白具有良好的抗原性，能够诱发机体的体液免疫与细胞免疫。因此，衣壳蛋白在 CyHV-2 病毒的研究中能够发挥巨大的作用。ORF115、ORF25、ORF131 和 ORF132 是囊膜蛋白，目前除了 ORF25 外，其他几个囊膜蛋白都没有被研究过，病毒囊膜蛋白的主要功能是帮助病毒进入宿主细胞，囊膜在识别宿主、侵入宿主细胞和病毒的抗原性方面起重要作用，因此，本研究鉴定的几个囊膜蛋白能够为 CyHV-2 感染宿主过程的研究提供更多的依据。且有研究表明，CyHV-2 与 CyHV-3 的同源性高达 81.55%^[28]，本研究鉴定的 CyHV-2 的主要免疫原性蛋白对于 CyHV-3 的研究也有一定的帮助。此外，蛋白在病毒中含量的高低会影响蛋白的鉴定，CyHV-2 中 ORF5 和 ORF104 的含量可能相对较低，因此在本实验中没有鉴定出。

综上所述，本实验采用蔗糖密度梯度超速离心法成功提纯了 CyHV-2 病毒，证明了通过体

表 1 CyHV-2 主要免疫原性蛋白 LC-MS/MS 鉴定

Tab. 1 Identification of major immunogenic proteins from CyHV-2 by LC-MS/MS

序号 no.	蛋白 protein	蛋白编号 accession	分子质量/ku mass	可信度 -10lgP	总肽段总数 peptides	定位 localization	蛋白描述 description
1	ORF92	YP_007003911.1	140	447	67	核衣壳 nucleocapsid	主要衣壳蛋白 major capsid protein
2	ORF115	YP_007003933.1	84	245	13	囊膜 envelope	膜蛋白 membrane protein
3	ORF25	YP_007003844.1	66	155	5	囊膜 envelope	膜蛋白 membrane protein
4	ORF57	YP_007003878.1	64	348	32	未知 unknown	未知蛋白 unknown protein
5	ORF66	YP_007003885.1	45	309	24	核衣壳 nucleocapsid	衣壳三重联体蛋白1 putative capsid triplex subunit 1
6	ORF72	YP_007003891.1	41	324	17	核衣壳 nucleocapsid	衣壳三重联体蛋白2 putative capsid triplex subunit 2
7	ORF131	YP_007003952.1	35	87	2	囊膜 envelope	膜蛋白 membrane protein
8	ORF132	YP_007003951.1	17	150	4	囊膜 envelope	膜蛋白 membrane protein

注: 蛋白可信度得分, 值越大表明该蛋白包含的可信肽段越多

Notes: -10lgP, a larger value indicates that the protein contains more reliable peptides

外感染细胞进而提纯病毒的方法可行, 并成功制备了抗 CyHV-2 多克隆抗体, 通过对纯化 CyHV-2 病毒颗粒进行 Western blot 分析, 经 LC-MS/MS 鉴定结果表明, ORF92、ORF115、ORF25、ORF57、ORF66、ORF72、ORF131 和 ORF132 为主要免疫原性蛋白, 丰富了 CyHV-2 免疫原性蛋白数量, 并且为下一步研究提供了思路。本课题组下一步计划筛选其中几个蛋白, 研究其在表达过程中的时序性, 进而对 CyHV-2 更全面深入的研究提供更多的理论依据。

参考文献 (References):

- [1] 刘文枝, 曾令兵, 张辉, 等. 异育银鲫感染鲤疱疹病毒 II 型(CyHV-2)后血液生理生化指标变化的研究[J]. 上海海洋大学学报, 2013, 22(6): 928-935.
- Liu W Z, Zeng L B, Zhang H, et al. Studies on the change of blood biochemical indices in gibel carp, *Carassius auratus gibelio*, infected with Cyprinid herpesvirus II[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2013, 22(6): 928-935(in Chinese).
- [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] Davison A J, Eberle R, Ehlers B, et al. The order Herpesvirales[J]. *Archives of Virology*, 2009, 154(1): 171-177.

- [4] Xu J, Zeng L B, Zhang H, et al. Cyprinid herpesvirus 2 infection emerged in cultured gibel carp, *Carassius auratus gibelio* in China[J]. *Veterinary Microbiology*, 2013, 166(1-2): 138-144.
- [5] 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.
- [6] Jung S J, Miyazaki T. Herpesviral haematopoietic necrosis of goldfish, *Carassius auratus*[J]. *Journal of Fish Diseases*, 1995, 18(3): 211-220.
- [7] Goodwin A E, Khoo L, LaPatra S E, et al. Goldfish hematopoietic necrosis herpesvirus (Cyprinid herpesvirus 2) in the USA: molecular confirmation of isolates from diseased fish[J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2006, 18(1): 11-18.
- [8] 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.
- [9] Fichi G, Cardeti G, Cocumelli C, et al. Detection of Cyprinid herpesvirus 2 in association with an *Aeromonas sobria* infection of *Carassius carassius* (L.), in Italy[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2013, 36(10): 823-830.
- [10] Becker J A, Tweedie A, Rimmer A, et al. Incursions of Cyprinid herpesvirus 2 in goldfish populations in Australia despite quarantine practices[J]. *Aquaculture*, 2014,

- 432: 53-59.
- [11] Bergmann S M, Sadowski J, Kiełpiński M, *et al.* Susceptibility of koi × crucian carp and koi × goldfish hybrids to koi herpesvirus (KHV) and the development of KHV disease (KHVD)[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2010, 33(3): 267-272.
- [12] Hedrick R P, Waltzek T B, Mcdowell T S. Susceptibility of koi carp, common carp, goldfish, and goldfish × common carp hybrids to cyprinid herpesvirus-2 and herpesvirus-3[J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2006, 18(1): 26-34.
- [13] 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 Aquatic Animal Health*, 2000, 12(1): 44-57.
- [14] 郑树城, 王庆, 李莹莹, 等. 鲤疱疹病毒3型T分离株主要免疫原性蛋白的鉴定[J]. *淡水渔业*, 2018, 48(2): 68-72.
- Zheng S C, Wang Q, Li Y Y, *et al.* Identification of major immunogenic proteins from Cyprinid herpesvirus 3 strain T[J]. *Freshwater Fisheries*, 2018, 48(2): 68-72(in Chinese).
- [15] Boutier M, Gao Y, Vancsok C, *et al.* Identification of an essential virulence gene of cyprinid herpesvirus 3[J]. *Antiviral research*, 2017, 145: 60-69.
- [16] Shen Z Y, Jiang Y S, Lu J F, *et al.* Application of a monoclonal antibody specific for the ORF92 capsid protein of Cyprinid herpesvirus 2[J]. *Journal of Virological Methods*, 2018, 261: 22-27.
- [17] 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.
- [18] 周勇, 史玉恒, 范玉顶, 等. 鲤疱疹病毒II型ORF25截短蛋白的多克隆抗体制备与免疫原性分析[J]. *淡水渔业*, 2018, 48(6): 40-45.
- Zhou Y, Shi Y H, Fan Y D, *et al.* Polyclonal antibody preparation and immunogenicity analysis of the prokaryotically expressed Cyprinid herpesvirus II ORF25 truncated protein[J]. *Freshwater Fisheries*, 2018, 48(6): 40-45(in Chinese).
- [19] 孔善云, 姜有声, 许丹, 等. 一种基于II型鲤疱疹病毒衣壳蛋白72的免疫学检测方法[J]. *中国水产科学*, 2016, 23(2): 328-335.
- Kong S Y, Jiang Y S, Xu D, *et al.* An immunological method to detect CyHV-2 based on capsid protein 72[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(2): 328-335(in Chinese).
- [20] 廖红, 林华, 郝中香, 等. 鲤疱疹病毒2型ORF5截短基因的克隆表达及免疫原性研究[J]. *中国兽医科学*, 2016, 46(11): 1394-1400.
- Liao H, Lin H, Hao Z X, *et al.* Cloning, expression and identification of immunogenicity of ORF5 truncation genes of Cyprinid herpesvirus 2[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2016, 46(11): 1394-1400(in Chinese).
- [21] 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.
- [22] 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.
- [23] Goodwin A E, Merry G E, Sadler J. Detection of the herpesviral hematopoietic necrosis disease agent (Cyprinid herpesvirus 2) in moribund and healthy goldfish: validation of a quantitative PCR diagnostic method[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2006, 69(2-3): 137-143.
- [24] 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.
- [25] Du M, Chen M L, Shen H F, *et al.* CyHV-2 ORF104 activates the p38 MAPK pathway[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 46(2): 268-273.
- [26] Zhou Y, Jiang N, Ma J, *et al.* Protective immunity in gibel carp, *Carassius gibelio* of the truncated proteins of Cyprinid herpesvirus 2 expressed in *Pichia pastoris*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 47(2): 1024-1031.
- [27] Davison A J, Kurobe T, Gatherer D, *et al.* Comparative genomics of carp herpesviruses[J]. *Journal of Virology*, 2013, 87(5): 2908-2922.
- [28] 徐进, 曾令兵, 杨德国, 等. 鲤疱疹病毒2型武汉株的分离与鉴定[J]. *中国水产科学*, 2013, 20(6): 1303-1309.
- Xu J, Zeng L B, Yang D G, *et al.* Isolation and characterization of Cyprinid herpesvirus 2 WH strain[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, 20(6): 1303-1309(in Chinese).

Identification of major immunogenic proteins from Cyprinid herpesvirus 2

GAO Wa¹, WEN Hong¹, WANG Hao^{1,2,3}, LU Jiaquan¹, LÜ Liquan^{1,2,3}, JIANG Yousheng^{1,2,3*}

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

2. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. Shanghai Collaborative Innovation for Aquatic Animal Genetics and Breeding, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: In order to obtain promising tools for improved diagnostics and new vaccine development, we purified Cyprinid herpesvirus 2 (CyHV-2) particles and identified more immunologic proteins in CyHV-2 particles by LC-MS. Firstly, the caudal fin of *Carassius auratus gibelio* (GiCF) cell line was infected with CyHV-2, and viral particles were purified from the cell supernatant by sucrose density gradient in combination with ultracentrifugation. The purified virions were observed by transmission electron microscope. Then the prepared purified virions were used to immunize mice to prepare an anti-CyHV-2 polyclonal antibody, and at the same time purified virions were separated by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and stained with coomassie brilliant blue, and then subjected to Western blotting analysis and mass spectrometry identification using anti-CyHV-2 polyclonal antibody. Transmission electron microscope (TEM) results showed that a large amount of intact CyHV-2 virus particles were detected at 50%-66% sucrose density and virus particles without capsule were occasionally observed. Western blotting results showed that some protein bands had specific immunoreactivity with anti-CyHV-2 polyclonal antibody. 8 major immunogenic proteins were further identified as ORF92, ORF115, ORF25, ORF57, ORF66, ORF72, ORF131 and ORF132 through mass spectrometry identification. Among them, ORF92, ORF66 and ORF72 are capsid proteins, and ORF115, ORF25, ORF131 and ORF132 are membrane proteins. The capsid protein and membrane protein of the virus play an important role in virus infection. In conclusion, the major immunogenic proteins of CyHV-2 virion were identified. This was fundamental and applied research on CyHV-2. Indeed, this knowledge is crucial for understanding the biology and pathogenesis of CyHV-2 infection and for facilitating the development of efficacious protein-based diagnostic methods and vaccine candidates.

Key words: Cyprinid herpesvirus 2 (CyHV-2); immunogenicity; protein; mass spectrometry identification

Corresponding author: JIANG Yousheng. E-mail: ysjiang@shou.edu.cn

Funding projects: National Modern Agricultural Industry Technology System Construction Special (CARS-45-19); Young Elite Scientists Sponsorship Program by CAST (Chinese Association for Science and Technology) and CSF (China Society of Fisheries); Excellent Undergraduates Entering Laboratory Program by Shanghai Ocean University (2018)