



## 牡蛎疱疹病毒结构蛋白真核表达系统构建及多聚化特性

曹书华<sup>1,2</sup>, 魏茂乐<sup>2</sup>, 李永仁<sup>1</sup>, 黄博闻<sup>2</sup>,  
辛鲁生<sup>2\*</sup>, 白昌明<sup>2\*</sup>, 王崇明<sup>2</sup>

(1. 天津农学院水产学院, 天津市水产生态及养殖重点实验室, 天津 300384;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 海水养殖生物育种与可持续产出全国重点实验室, 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 农业农村部海水养殖病害防治重点实验室, 青岛市海水养殖流行病学与生物安保重点实验室, 山东 青岛 266071)

**摘要:** 牡蛎疱疹病毒 (OsHV-1) 在全球范围内导致牡蛎、扇贝与蚶类的大规模死亡, 成为双壳贝类养殖产业的重要威胁。为了解 OsHV-1 的结构与致病机制。本研究利用人胚胎肾细胞 (HEK293t), 构建 OsHV-1 主要核衣壳蛋白 (ORF104 和 ORF33) 的真核表达系统, 并对 ORF104 和 ORF33 潜在相互作用进行分析。实验首先通过特异性 PCR 扩增技术得到 *orf104* 和 *orf33* 的基因序列, 根据其编码蛋白的理化性质、跨膜区与三维结构等生物信息学分析结果, 选择 pCDNA3.1(+) 构建两种基因的重组表达质粒。重组质粒经大肠杆菌扩增、提取后, 利用转染试剂 Lipo8000™ 将 pCDNA3.1(+)-*orf104* 与 pCDNA3.1(+)-*orf33* 分别单独或共转染至 HEK293t。然后, 将转染后的细胞培养 18 h 后裂解收集蛋白。最后利用蛋白免疫印迹 (Western blot, WB) 与负染电镜检测两种目的蛋白的表达情况。结果显示, 实验成功构建了 OsHV-1 衣壳蛋白 ORF104 和 ORF33 的重组表达质粒载体, 通过真核细胞表达得到大小约为 135 与 35 ku 的目的蛋白。研究表明, 表达质粒可在真核表达系统中实现蛋白单独转染与共转染, 共转染蛋白间可能存在相互作用的趋势并形成多聚体, 其中, ORF33 自身即可形成分子质量不同的多聚体。本研究首次利用真核表达系统开展 OsHV-1 关键结构蛋白的表达, 为进一步开展该病毒结构蛋白功能与互作, 以及病毒入侵机制研究奠定基础。

**关键词:** 牡蛎疱疹病毒; 核衣壳蛋白; 真核表达系统; 蛋白多聚化

中图分类号: S 944.4

文献标志码: A

贝类增养殖作为海水养殖产业的重要支柱之一, 具有重要的社会、经济和生态价值<sup>[1]</sup>。自 20 世纪 90 年代以来, 中国海水贝类养殖的年产量呈快速上升趋势, 从 1991 年的 198.3 万 t 增加到 2022 年的 1 569.6 万 t, 年平均增长率为 6.9%。随着贝类养殖产业总体规模的不断扩大, 对人工苗

种的需求逐渐增加; 刺激海水贝类育苗量涨势迅猛, 从 2000 年的 1.7 千亿粒增加至 2022 年的 54.7 千亿粒, 年平均增长率为 16.3%<sup>[2]</sup>。在全国贝类生产稳中有升的同时, 由于病原微生物滋生、极端恶劣天气频现、种质退化等导致海水养殖贝类大规模死亡事件频繁发生, 造成了严重的经济

收稿日期: 2024-02-24 修回日期: 2024-02-24

资助项目: 国家自然科学基金 (32073014); 中国水产科学研究院基本科研业务费专项 (2023TD30); 黄海水产研究所基本科研业务费专项 (20603022023010); 国家现代农业产业技术体系 (CARS-49); 山东省博士后创新项目 (SDCX-ZG-202303048)

第一作者: 曹书华, 从事水产养殖动物疾病防控研究, E-mail: 471915062@qq.com

通信作者: 辛鲁生, 从事水产养殖动物疾病防控研究, E-mail: xinls@ysfri.ac.cn;

白昌明 (照片), 从事贝类病害防控与健康养殖研究, E-mail: baicm@ysfri.ac.cn



损失<sup>[3-5]</sup>。牡蛎疱疹病毒 (*Ostreid herpesvirus 1*, OsHV-1) 引起的疾病近年来在亚洲、欧洲、美洲、大洋洲与欧洲频繁发生, 引起包括牡蛎、扇贝与蚶类等双壳贝类的大规模死亡<sup>[6-8]</sup>。与脊椎动物疱疹病毒较强的宿主专一性不同, OsHV-1 的宿主范围较广, 目前已知可感染十余种双壳贝类<sup>[7]</sup>、1 种头足类与 1 种十足目动物<sup>[9-10]</sup>。长牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 作为全球范围内养殖范围最广, 养殖产量最大的贝类品种之一, 也是受 OsHV-1 病害危害最严重的物种<sup>[7]</sup>。长牡蛎幼虫、稚贝与幼贝是对 OsHV-1 最易感的生活史阶段, 成贝多表现为隐性感染。魁蚶 (*Scapharca broughtonii*) 与毛蚶 (*Anadara kagoshimensis*) 的幼虫至成贝各个生活史阶段对该病毒均易感<sup>[7-8]</sup>。对长牡蛎幼贝的感染实验结果表明, 牡蛎疱疹病毒病的发病机制是 OsHV-1 感染后, 导致长牡蛎免疫力下降, 环境中存在的致病菌进而突破宿主的免疫防线, 引起菌血症<sup>[11-12]</sup>。最新研究结果表明, 不同弧菌在 OsHV-1 感染长牡蛎后, 继发感染过程中扮演的角色各不相同, 其中哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 可以与 OsHV-1 协同作用, 在突破牡蛎免疫系统与致病过程中起着关键作用<sup>[13]</sup>。

OsHV-1 隶属于疱疹病毒目 (Herpesvirales) 软体动物疱疹病毒科 (Malacoherpesviridae) 牡蛎疱疹病毒属 (*Ostreavirus*), 具有疱疹病毒典型的、由核衣壳、荚膜及囊膜组成的二十面体球形结构<sup>[8]</sup>。OsHV-1 的基因组大小约 210 kb, 但并不是简单的单一序列, 而是由多个直接或反向重复序列与数个单一序列按不同顺序间隔排列组成, 可以概括为 TR<sub>L</sub>-U<sub>L</sub>-IR<sub>L</sub>-X-IR<sub>S</sub>-U<sub>S</sub>-TR<sub>S</sub>, 其中 U<sub>L</sub> 和 U<sub>S</sub> 分别代表单一长序列与单一短序列, TR<sub>L</sub>/IR<sub>L</sub> 和 TR<sub>S</sub>/IR<sub>S</sub> 是 2 对反向重复序列, 分别位于 U<sub>L</sub> 和 U<sub>S</sub> 的两端, X 为一段长度约 1.5 kb 的单一序列。生物信息学分析预测 OsHV-1 基因组编码 124 个开放阅读框 (open reading frame, ORF)<sup>[14]</sup>。目前已完成 OsHV-1 感染长牡蛎、栉孔扇贝与魁蚶数个变异株的基因组测序<sup>[14-16]</sup>, 比较基因组学分析显示, OsHV-1 不同变异株核苷酸序列相似度为 93.5%, 不同变异株间的序列相似度较低<sup>[17-18]</sup>。基于不同变异株基因组序列构建的系统发育树拓扑结构显示, 各变异株以其宿主不同 (栉孔扇贝、长牡蛎和魁蚶) 分为 3 个支系, 表明宿主范围在该病毒系统分化过程中占主导地位<sup>[17]</sup>。

已开展的牡蛎疱疹病毒基因组研究对该病毒

有了初步的认识, 但在病毒蛋白质组成与功能等方面的研究还很欠缺<sup>[19]</sup>。目前仅通过原核表达对 3 个关键功能蛋白 ORF74、ORF24 与 ORF86 进行表达、纯化与酶学活性分析<sup>[20-22]</sup>, 对 ORF111、ORF25、ORF41 与 ORF72 这 4 个结构蛋白进行表达, 并分析了它们之间潜在的互作关系, 及与之结合的宿主蛋白<sup>[19, 23-24]</sup>。以上工作均是基于原核表达系统开展的, 原核细胞缺乏真核细胞所具有的翻译后修饰机制, 可能影响蛋白质的功能与稳定性。本研究首次尝试构建 OsHV-1 关键核衣壳蛋白基因 *orf104* 与 *orf33* 的真核表达体系, 在人胚胎肾细胞 (HEK293t) 中表达, 并对两种蛋白多聚化作用进行检测与分析。研究结果将为 OsHV-1 核衣壳蛋白功能、自组装等研究提供方法, 并为牡蛎疱疹病毒的致病机制研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 病料采集

发病魁蚶于 2022 年 6 月 23 日采集自山东省威海市某贝类育苗厂的魁蚶种贝。实验严格依照中国水产科学研究院黄海水产研究所动物伦理委员会相关规定执行。利用 OsHV-1 实时定量 PCR 对样本中病毒拷贝数进行了定量分析, 上游引物 BF: 5'-GTCGCATCTTTGGATTTAACA A-3'、下游引物 B4: 5'-ACTGGGATCCGACTGACAA C-3', 探针及生物素标记 B-6FAM-TGCCCCTGTCATCTTGAGGTATAGACAATC-BHQ-1<sup>[25]</sup>。引物和探针委托生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。反应体系为 Premix Ex Taq (TaKaRa) 10 μL, 上下游引物各 0.8 μL, 探针 0.4 μL, 模板 1.6 μL, DEPC 水 6.4 μL, 总体积 20 μL。反应条件: 95 °C 预变性 10 min; 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 20 s, 该过程进行 40 次循环。结果显示这批魁蚶被 OsHV-1 感染, 外套膜组织的病毒载量较其他组织高。挑选病毒载量高的魁蚶 (约 2×10<sup>6</sup> 拷贝/ng 总 DNA) 作为病料在 -80 °C 超低温冰箱保存备用。

### 1.2 总 DNA 的提取

从冰箱中取出“病料采集”中 OsHV-1 呈阳性的组织样品, 放置于 4 °C 过夜解冻, 剪取 30 mg 外套膜并裂解该组织, 根据海洋动物总 DNA 提取试剂盒 [天根生化科技 (北京) 有限公司] 说明书提取总 DNA。

### 1.3 引物设计

根据 ORF 104 和 ORF33 的基因序列 (NC\_005881.2), 通过 Primer Premier 5.0 软件设计引物, 引物序列见表 1, 分别添加 *Nhe* I 和 *Xba* I 酶切位点及相应的保护碱基-CTA-和-CTAG-, 此外, 添加 Kozak 标签 -GCCACC-和 Flag-tag 标签 -CTATCGTCGTCATCCTTGTAATC-。引物委托生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primers sequence

引物名称 primer name	引物序列 primers sequence(5'-3')
33-LF	GCTAGCGCCACCATGGAAAACAACGCAGCAGAAA TCT
33-SF	CTAGCTAGCGCCACC ATGGAAAACAACGCA
33-R1	CATCCTTGTAATCCTGAACAATTTTGCCACATATT CA
33-R2	TATCGTCGTCATCCTTGTAATCCTGAACAA
33-R3	CTAGTCTAGATTACTTATCGTCGTCATCCTTGTAAT CCTGA
104-LF	GCTAGCGCCACCATGTCTTTTGTAGCACCAGAG AGGTA
104-SF	CTAGCTAGCGCCACCATGTCTTTTGTAGCAC
104-R1	TCCTTGTAATCTCTAAGGTATTGAAAAAGTGGTGT TGG
104-R2	ATCGTCGTCATCCTTGTAATCTCTAAGGTATTG
104-R3	CTAGTCTAGATTACTTATCGTCGTCATCCTTGTAAT CTCTA

### 1.4 基因的扩增

以提取的总的病料 DNA 为模板, 用 Ex *Taq* 酶 (TaKaRa) 进行 PCR 扩增, 扩增体系: 10×Ex *Taq* Buffer 2.0 μL, dNTP (2.5 mmol/L) 1.6 μL, 模板 2.0 μL, 每轮 PCR 扩增上下游引物各 0.5 μL, Ex *Taq* (5 U/μL) 0.2 μL, DEPC 水 13.2 μL, 总体积 20.0 μL。第 1 轮 PCR 反应用引物 LF+R1, 模板为提取的总的阳性 DNA; 第 2 轮 PCR 反应用引物 SF+R2, 模板为第 1 轮 PCR 产物; 第 3 轮 PCR 反应用引物 SF+R3, 模板为第 2 轮 PCR 产物。每轮 PCR 反应的体系相同。PCR 扩增反应程序为: 94 °C 预变性 2 min; 98 °C 变性 10 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 (1 kb/min), 循环 35 次; 最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物置于 4 °C 冰箱保存。通过 1% 的琼脂糖凝胶电泳检验是否得到符合大小的 PCR 产物。将最终扩增出的目的片段用 DNA 琼脂糖凝胶电泳回收试剂盒 [天根生化科技

(北京) 有限公司] 纯化回收, 并委托生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序。

### 1.5 生物信息学分析

采用 SnapGene 6.0.2 软件预测 OsHV-1 的 *orf* 33 和 *orf* 104 基因的氨基酸序列。采用 NCBI 中 BLAST 工具 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行序列比对和相似性分析。采用 SignalP 5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 进行信号肽预测。使用 TMHMM 5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 在线预测牡蛎疱疹病毒 *orf* 104 基因所编码蛋白质的跨膜区。使用 AlphaFold 在线工具 (<https://colab.research.google.com/github/sokrypton/Colab Fold/blob/main/AlphaFold3>) 对蛋白的三维模型进行预测和分析。

### 1.6 载体构建

将目的片段和真核表达载体 pCDNA3.1(+) 进行双酶切处理, 双酶切反应体系: 10×Quick Cut Buffer (TaKaRa) 2.0 μL, Quick Cut *Nhe* I (25 Rxns) 和 Quick Cut *Xba* I (500 Rxns) 各 1.0 μL, 目的基因 3.0 μL, DEPC 水 13.0 μL, 总体积为 20.0 μL。反应条件为 37 °C 60 min。真核表达载体 pCDNA3.1(+) 双酶切体系及反应条件同上。

酶切产物纯化后, 在 T<sub>4</sub> DNA Ligase (TaKaRa) 连接酶的作用下于 16 °C 过夜连接, 得到连接产物 pCDNA3.1(+)-*orf* 33 和 pCDNA3.1(+)-*orf* 104。连接体系: T4 DNA Ligase (350 U/μL) 0.5 μL, 10× T4 DNA Ligase Buffer 1.0 μL, 目的基因双酶切产物 7.5 μL, pCDNA3.1(+) 双酶切产物 1.0 μL, 总体积 10.0 μL。

将重组表达载体转化至 Trans1-T1 感受态细胞 (全式金), 经含氨苄霉素 (Amp<sup>r</sup>, 50 μg/μL) 的 LB 固体培养基筛选, 长出的单菌落进行菌落 PCR 验证。将符合预期大小的菌液送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序, 测序结果正确的菌液加入 20% 的甘油混匀后于 -80 °C 超低温冰箱冻存, 同时将部分质粒复苏并扩大培养后, 使用无内毒素质粒大提试剂盒 (天根生化科技有限公司, 北京) 大量提取质粒。

### 1.7 HEK293t 细胞培养

分别取 5 mL 胎牛血清、44.5 mL DMEM (1×) 培养基、0.5 mL 青霉素-链霉素溶液 (100×) 于 50 mL 离心管中, 配置成 10% 的完全培养基, 封口

后于 4 °C 备用。准备 37 °C 的水浴锅, 从液氮罐中取出冻存的 HEK293t 细胞, 立即放入 37 °C 水浴, 融化后接种至含有 4 mL 完全培养基的培养瓶内, 于含 5% CO<sub>2</sub> 的 37 °C 恒温培养箱内培养。当细胞铺满细胞板的 70%~80% 时即可传代。首先将废弃培养基吸出, 分别取 2 mL PBS 洗 2 遍细胞, 加入 200 μL 胰酶细胞消化液 (0.25% 胰酶, 含酚红, 不含 EDTA), 消化 30~40 s, 直至细胞板上细胞呈流沙状掉落, 加入 1 mL 完全培养基终止消化, 轻轻吹打混匀, 最后 1/2 传代扩增细胞。

### 1.8 细胞转染

首先将 2 瓶细胞混匀, 加入 25 mL 10% 的完全培养基, 混匀后转至 24 孔板内培养, 每孔 1 mL 细胞悬液, 放入含 5% CO<sub>2</sub> 的 37 °C 恒温培养箱内, 过夜培养 12 h 以上。当细胞覆盖率达到 70%~80% 时, 吸出废液, 加入 1 mL 含 1% 链霉素-青霉素溶液的 DMEM; 取 75 μL 的 DMEM 于 1.5 mL EP 管内, 加入 4.8 μL 质粒至 DMEM 中轻轻混匀, 取 2.4 μL Lipo 8000™ 至上述混合溶液并轻轻混匀, 静置孵育 5~8 min, 取 25 μL pCDNA 3.1(+)-*orf33*/Lipo 8000™ 混合液接种至细胞内, 置于含 5% CO<sub>2</sub> 的 37 °C 恒温培养箱培养 6~8 h。吸出废液, 加入 1.5 mL 20% 的完全培养基。过夜表达, 当细胞覆盖率达到 80%~90% 时收集细胞。表达质粒 pCDNA3.1(+)-*orf104* 转染和两种质粒共转染<sup>[26]</sup> 方法同上。

去除废液, 加入 200 μL 预先配置的细胞裂解液 (蛋白酶抑制剂 cOmplete Tablets EDTA-free, EASYpack 和 Western 及 IP 细胞裂解液, 按照每片 50 mL 细胞裂解液的比例溶解稀释), 置于冰上裂解 30 min, 用 200 μL 移液枪轻轻吹打混匀, 收集蛋白液于 1.5 mL EP 管中; 离心机 4 °C 预冷, 8 000×g 离心 10 min, 收集蛋白上清液于 -20 °C 冰箱保存待用。

### 1.9 蛋白免疫印迹检测 (Western blot)

首先进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 将 1 袋 Tris-MOPS-SDS Running Buffer Power 溶于 1 L 纯水中, 完全溶解后置于 4 °C 冰箱预冷备用。将收集的蛋白液与 5× LDS Sample Buffer (GenScript) 按照 4:1 (体积比) 混合, 于金属浴 99.9 °C 变性 10 min。将预冷的 SDS-PAGE 电泳液倒入蛋白胶电泳槽, 将煮沸的蛋白冷却至室温后加入到预制胶 Sure-PAGE™ (Bis-Tris, 10 cm×8 cm, GenScript) 胶孔

中, 在 160 V 电压下进行 SDS-PAGE 凝胶电泳 50 min, 直至底部蛋白混合物进入预制胶的最下方。然后进行 Western blot 检测。称取 Tris 3.03 g、甘氨酸 14.4 g、200 mL 甲醇于烧杯中并定容至 1 L, 配置成电转液, 于冰箱 4 °C 预冷备用。1×TBST 中加入 5% 的脱脂奶粉溶解, 配置成封闭液, 冰箱 4 °C 预冷备用。

将 PVDF 膜浸入电转液中激活, 在半干转膜仪中依次放入 2 块转印滤纸、PVDF 膜、SDS-PAGE 凝胶、2 块转印滤纸, 并确保蛋白胶与 PVDF 膜之间无气泡。压紧后, 在 15 V 电压下转膜 50 min。取出 PVDF 膜, 用 1×TBST 浸洗 5 min, 重复 6 次。将洗好的 PVDF 膜置于封闭容器中, 加入封闭液, 于 4 °C 冰箱过夜。取出 PVDF 膜, 用 1×TBST 浸洗 5 min, 重复 6 次。将抗体用 Western-抗稀释液按照 1:1 000 (体积比) 的比例稀释, 稀释后的抗体加入到 PVDF 膜的正面, 于 37 °C 恒温培养箱内孵育 2 h (孵育一抗)。取 Glutathione Resin 和 SuperSignal™ West Pico PLUS Luminol/Enhancer Solution (Thermo) 各 500 μL 于 1.5 mL EP 管内, 混合均匀后加入到 PVDF 膜正面进行显影。

## 2 结果

### 2.1 基因片段扩增

预先配置 1% 的琼脂糖, 将 PCR 产物与 6× Loading Buffer 的预混液按照 5:1 (体积比) 混合上样, 在 120 V 电压下进行凝胶电泳检测, 结果显示, *orf33* 在约 1 000 bp 处出现一条明亮的特异性条带 (图 1-a), *orf104* 在约 3 500 bp 处出现一条明亮的特异性条带 (图 1-b), 与预测的目的基因的条带大小相符, 分别为 816 和 3 612 bp。测序结果与基因序列相符。

### 2.2 基因序列及编码蛋白序列特征

对牡蛎疱疹病毒 *orf33* 和 *orf104* 基因序列进行分析, 翻译结果显示, 两个基因均无特殊结构。经 SignalP 5.0 Server 在线软件进行分析, 该氨基酸序列含信号肽 (Sec/SPI) 的可能性分别为 0.007 4 和 0.508 7, 含 TAT 信号肽 (Tat/SPI) 的可能性分别为 0.000 6 和 0.160 9, 含脂蛋白信号肽 (Sec/SP II) 的可能性为 0.002 0 和 0.191 8。通过 TMMHM 5.0 在线工具对两基因编码的蛋白质结构进行分析, 结果显示, 2 个蛋白的开放阅读框全区域内均无

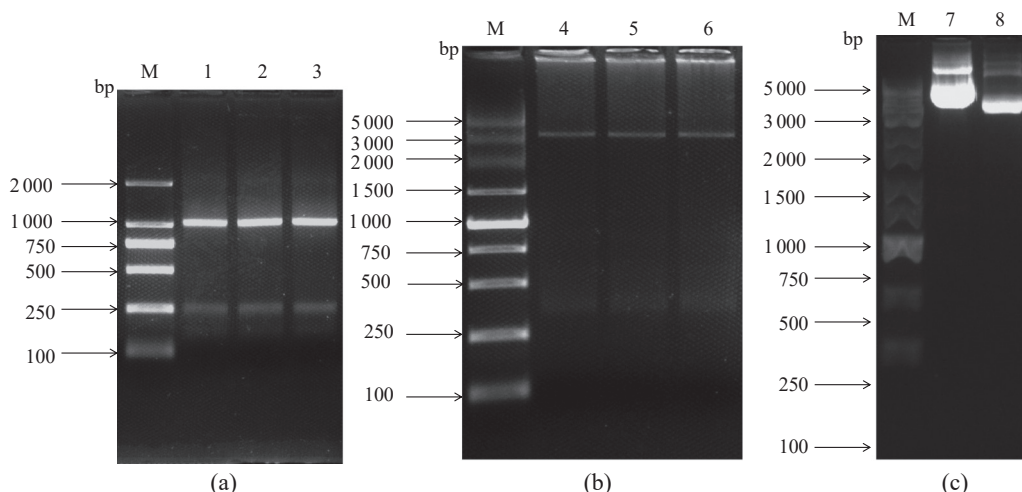


图1 凝胶电泳检测

(a) 牡蛎疱疹病毒 *orf33* 基因扩增; (b) 牡蛎疱疹病毒 *orf104* 基因扩增; (c) 重组表达质粒凝胶电泳图, M. Marker, 1~3. *orf33* 基因 PCR 产物, 4~6. *orf104* 基因 PCR 产物, 7. pCDNA3.1(+)-*orf104* 质粒, 8. pCDNA3.1(+)-*orf33* 质粒。

Fig. 1 Electrophoresis detection

(a) amplification of the *orf33* gene in *Ostreid herpesvirus* 1 strain; (b) amplification of the *orf104* gene in *Ostreid herpesvirus* 1 strain; (c) gel electrophoresis of recombinant expression vector plasmid, M. Marker, 1-3. PCR product of *orf33*, 4-6. PCR product of *orf104*, 7. plasmid of pCDNA3.1(+)-*orf104*, 8. pCDNA3.1(+)-*orf33*.

跨膜结构域。

### 2.3 基因编码蛋白质理化参数及高级结构预测

通过 ProtParam 在线预测软件进行预测, 结果显示, ORF33 和 ORF104 两个基因编码的蛋白质分子质量分别约为 34 和 133 ku, 理论等电点分别为 6.98 和 4.82。orf33 基因编码的 297 个氨基酸中, 带负电荷的酸性氨基酸天冬氨酸 (Asp) 和谷氨酸 (Glu) 和带正电荷的碱性氨基酸精氨酸 (Arg) 和赖氨酸 (Lys) 各 39 个, 在 orf104 基因编码的 1 204 个氨基酸中含量为 0。两个蛋白质的不稳定系数分别为 42.93 和 41.35; 脂肪系数分别为 90.91 和 31.95; ORF33 亲水性总平均值为 -0.491,

是一种稳定的亲水性蛋白; ORF104 亲水性总平均值 0.824, 是一种稳定的疏水性蛋白。

原子模型的带状图中, 彩虹色带状模型显示单个蛋白和构象变化体。图中可清楚观察到两个蛋白质的  $\alpha$  螺旋结构和  $\beta$  螺旋结构, 通过所有残基的扭转角度来将蛋白质结构参数化, 并构建了一个可微分蛋白质几何模型来计算所有残基的坐标, 同时计算残基之间的距离<sup>[27]</sup>, 扭转角度决定蛋白质的结构, 并通过反复迭代使预测结果更接近实际结构。图 2-a 表示 ORF33 蛋白的三维结构, 图 2-b 表示 ORF104 蛋白的三维结构, 其中螺旋部分为  $\alpha$  螺旋, 箭头条带表示  $\beta$  螺旋, 而线性条带代表无规则卷曲。

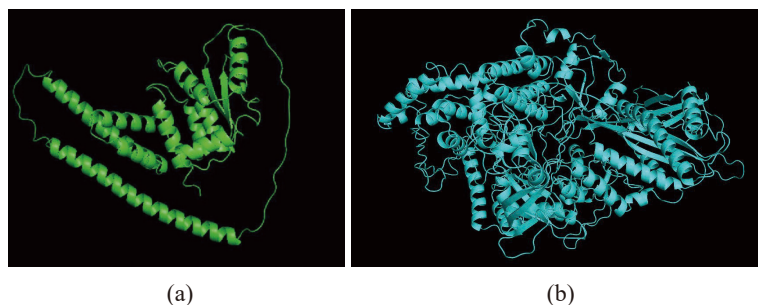


图2 蛋白三维模型预测

(a) ORF33 三维模型预测结果, (b) ORF104 三维模型预测结果。

Fig. 2 Prediction of protein 3D model

(a) the predicted 3D model of ORF33, (b) the predicted 3D model of ORF104.

## 2.4 表达质粒构建

使用无内毒素质粒大提试剂盒 [天根生化科技(北京)有限公司] 提取重组质粒, 通过 1% 的琼脂糖进行凝胶电泳检测, 结果显示, 在 5 000 bp 附近出现明亮的特异性条带 (图 2-c), 特异性条带测序证实为含有目的基因的真核表达质粒。

## 2.5 质粒的表达与鉴定

将收集的蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳检测及 Western blot 检测, 结果显示, 1~2 号泳道为 ORF33, 该蛋白在 35 ku 附近蛋白条带最明显, 与预测结果相符, 但在 60~100 ku 存在 3 条颜色较浅的蛋白带, 结果证明 ORF33 存在自身相互作用形成多聚体结构的可能性; 3~4 号泳道内为 ORF104, 蛋白条带在 140 ku 附近, 与预测结果相符; 5~6 号泳道为 ORF33 和 ORF104 在真核细胞内共转染表达结果, 分别在 35 与 140 ku 附近出现蛋白条带, 证明 ORF104 和 ORF33 可以在真核表达系统中同时表达, 但不能确定两蛋白是否存在相互作用 (图 3)。

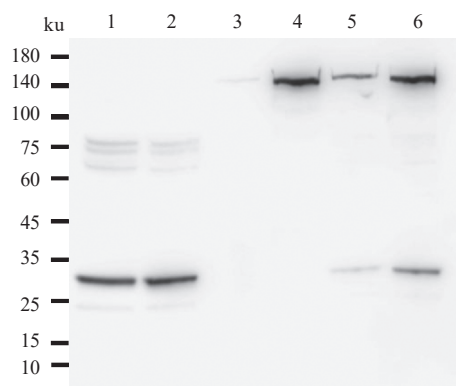


图 3 蛋白免疫印迹检测

Fig. 3 Western blot of the proteins

## 2.6 蛋白电镜检测

蛋白液经负染后上镜观察, 由于 ORF33 蛋白粒子直径较小, 不能在负染色背景下明确分辨出该蛋白粒子, 观察到 ORF104 蛋白微粒, 蛋白粒子形状各异, 直径在 20 nm 左右; pCDNA3.1(+)-orf 33 和 pCDNA3.1(+)-orf 104 共转染情况较好, 蛋白微粒较多且形状较为规则, 可能存在多聚化现象, 粒子直径为 10~30 nm (图 4)。

## 3 讨论

疱疹病毒基因组庞大、结构复杂、编码蛋白

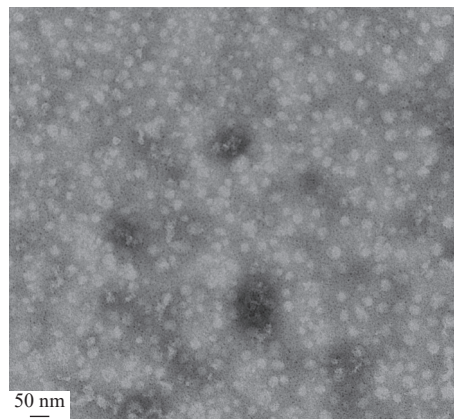


图 4 蛋白电镜检测

Fig. 4 Electron microscopy detection of proteins

种类繁多, 病毒感染宿主细胞牵涉到病毒多种类型蛋白分子与宿主细胞发生一系列有序的动态反应<sup>[28-29]</sup>。首先是病毒粒子与宿主进行特异性黏附, 分子基础是病毒结构蛋白与宿主细胞表面受体的特异性识别与结合<sup>[30]</sup>, 进而使病毒囊膜与宿主细胞膜融合, 便于病毒衣壳穿透宿主细胞<sup>[31-32]</sup>。为保证病毒粒子遗传物质的复制与表达, 衣壳最终通过细胞骨架穿过细胞质进入到宿主细胞核内部<sup>[33-34]</sup>。根据疱疹病毒种类和宿主细胞类型差异, 病毒进入细胞后, 其核衣壳可以与宿主细胞丝状肌动蛋白纤维或微管网络相互作用, 由特定蛋白牵引到细胞核<sup>[35-37]</sup>。作为疱疹病毒的“骨架”, 核衣壳蛋白不仅为病毒基因组提供了容纳空间及保护性外壳, 在病毒的复制、组装、成熟以及侵染过程中都起到非常重要的作用<sup>[36]</sup>。针对人类等哺乳动物疱疹病毒的研究表明,  $\gamma$  疱疹病毒亚科的人疱疹病毒 4 型 (human herpesvirus 4, HHV-4) 的组装需要 BCLF1、BORF1、BDLF1、BFRF3、BDRF1、BVRF2 等 6 种成分, 其中 BFRF3 为主要骨架<sup>[38]</sup>。Yuan 等<sup>[39]</sup> 和 Wang 等<sup>[40]</sup> 借助冷冻电镜研究发现, 由 UL18 编码的 VP23 蛋白是单纯疱疹病毒 (herpes simplex virus, HSV) 衣壳的主要结构蛋白, 并参与病毒的包装过程。

软体动物疱疹病毒科目前已知包括两种疱疹病毒, 即牡蛎疱疹病毒 (OsHV-1) 与鲍疱疹病毒 (*Haliotid herpesvirus 1*, HaHV-1), 两种病毒分别感染并引起双壳贝类与腹足贝类的急性大规模死亡, 给贝类养殖产业造成严重危害<sup>[8, 41-42]</sup>。OsHV-1 与 HaHV-1 也是目前国际病毒分类委员会 (ICTV) 确认分类地位的两种贝类病毒性病原<sup>[41]</sup>。基于基因组核苷酸序列开展的系统发育分析结果显示, 软体动物疱疹病毒与其他脊椎动物疱疹病毒的亲缘

关系较远<sup>[14, 43]</sup>。OsHV-1 被确定为疱疹病毒的一员更多的是依据该病毒在冷冻电镜下呈现的典型拓扑结构, 即有 16 个顶点 (T=16) 的正二十面体结构<sup>[14]</sup>。无论从 OsHV-1 基因组水平、预测 ORF 序列或推测结构蛋白质序列, 都与已知疱疹病毒间不存在同源性。仅有编码 OsHV-1 末端酶 ATP 酶亚基的 ORF109 序列与部分哺乳动物疱疹病毒、T4 样噬菌体序列有同源性<sup>[14]</sup>。由于 OsHV-1 与其他认识比较深入的脊椎动物疱疹病毒亲缘关系较远, 无法基于同源基因预测相关 ORF 编码蛋白的功能<sup>[44]</sup>。另一方面, 目前尚缺乏支撑 OsHV-1 体外增殖的细胞系, 缺乏纯化病毒及其核酸与蛋白质样品的稳定平台, 导致对 OsHV-1 基因功能、蛋白组成与感染机制等方面的研究相对落后<sup>[8, 19]</sup>。

国内外对 OsHV-1 与贝类细胞互作的研究处于初步阶段, 主要借助原核表达系统对 OsHV-1 主要囊膜蛋白进行表达、纯化与功能分析。Martenot 等<sup>[19]</sup>完成推测编码病毒囊膜蛋白的 *orf25*、*orf41* 和 *orf72* 三个基因的表达、纯化与各表达产物的多克隆抗体制备。体内 (稚贝) 与体外 (血淋巴细胞) 的功能验证试验表明, ORF25 在 OsHV-1 与宿主细胞互作中发挥更重要的作用。硫酸葡聚糖可以通过竞争结合病毒囊膜蛋白的方式, 减缓病毒的复制与传播, 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  硫酸葡聚糖浸浴可显著减少长牡蛎稚贝感染 OsHV-1 后的死亡率<sup>[19]</sup>。在此基础上, Yu 等<sup>[24]</sup>利用原核表达后纯化的 ORF25 与 ORF72 两种蛋白, 通过 Pull-down 实验与质谱分析, 研究了与上述两种囊膜蛋白互作的魁蚶血淋巴细胞分子。结果显示, 与两种囊膜蛋白互作的宿主蛋白分子主要参与细胞骨架组装、能量代谢与核酸加工相关的细胞功能<sup>[24]</sup>。原核表达系统还被应用到疱疹病毒关键功能酶基因, 如脱氧尿苷焦磷酸酶 (dUTP pyrophosphatase, dUTPase)、引物酶 (primase)、凋亡抑制蛋白基因 (IAP-86) 等<sup>[20-22]</sup>。截至目前, 尚没有对 OsHV-1 主要核衣壳蛋白 (major capsid protein, MCP) 基因开展过蛋白水平的相关研究。

由核衣壳蛋白作为支架形成的正二十面体结构, 在包括 OsHV-1 在内所有疱疹病毒中都非常保守, 说明其在病毒致病性方面发挥着关键作用。此外, 衣壳还具有良好的抗原性, 可诱发或逃逸机体的免疫应答等<sup>[45-46]</sup>, 并被认为是疾病防控过程中的潜在关键靶点<sup>[39]</sup>。Martenot 等<sup>[19]</sup>推测 ORF104 编码 OsHV-1 的主衣壳蛋白。Rosani 等<sup>[47]</sup>

利用高通量测序技术验证了这一猜想, 并发现该 ORF 的转录最能反映样本中病毒总 RNA 的转录水平。本实验首次以 *orf104* 与 *orf33* 为研究对象, 生物信息分析结果表明, 基因 *orf104* 和 *orf33* 编码的蛋白无跨膜结构域, 且氨基酸序列不含有信号肽。AlphaFold 对 ORF104 和 ORF33 的预测结果显示, 两蛋白结构较为松散, 虽然存在未预测出的结构, 但是大部分结构呈螺旋形态, 说明两蛋白间存在相互作用的结构基础。随后将包含两个基因的真核质粒转入到 HEK293t 细胞内表达。真核表达系统更省时高效, 可在短时间内获得较高浓度的蛋白, 且更接近天然蛋白的结构与功能, 有利于后期对蛋白结构功能的研究。

本研究首次成功在真核系统表达了 OsHV-1 两个结构蛋白, 即 ORF104 和 ORF33, 表达蛋白分子呈现出 10~30 nm 的蛋白微粒。本结果为进一步开展牡蛎疱疹病毒入侵机制研究奠定了基础, 同时也将推进针对牡蛎疱疹病毒更有效的防控工作的开展。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

#### 参考文献 (References):

- [1] 宋林生. 我国海水养殖贝类病害发生现状及防控策略 [J]. 水产学报, 2023, 47(11): 119412.  
Song L S. The occurrence and prevention and control strategies of mollusc diseases in marine aquaculture of China [J]. Journal of Fisheries of China, 2023, 47(11): 119412 (in Chinese).
- [2] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2019 中国渔业统计年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2019.  
Bureau of Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. China fishery statistical yearbook [M]. Beijing: China Agricultural Press, 2019 (in Chinese).
- [3] 宋林生. 海水养殖贝类病害预警预报技术及其应用 [J]. 大连海洋大学学报, 2020, 35(1): 1-9.  
Song L S. An early warning system for diseases during mollusc mariculture: exploration and utilization [J]. Journal of Dalian Ocean University, 2020, 35(1): 1-9 (in Chinese).
- [4] 张国范, 李莉, 阙华勇. 中国牡蛎产业的嬗变——新认知、新品种和新产品 [J]. 海洋与湖沼, 2020, 51(4):

- 740-749.
- Zhang G F, Li L, Que H Y. An evolution of oyster mariculture industry in China: new knowledge, variety and product[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2020, 51(4): 740-749 (in Chinese).
- [ 5 ] Zhu P, Liu G F, Liu C, *et al.* Novel RNA viruses in oysters revealed by virome[J]. *iMeta*, 2022, 1(4): e65.
- [ 6 ] Mandas D, Salati F. *Ostreid herpesvirus*: a pathogen of oysters[J]. *Virology: Research & Reviews*, 2017, 1(2): 1-5.
- [ 7 ] Solomieu V B, Renault T, Travers M A. Mass mortality in bivalves and the intricate case of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2015, 131: 2-10.
- [ 8 ] 白昌明, 辛鲁生, 王崇明. 软体动物疱疹病毒及其对贝类养殖产业的危害 [J]. *渔业科学进展*, 2021, 42(1): 214-226.
- Bai C M, Xin L S, Wang C M. Malacoherpesviruses and their associated damages to mollusk aquaculture industry[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(1): 214-226.
- [ 9 ] Bookelaar B E, O'Reilly A J, Lynch S A, *et al.* Role of the intertidal predatory shore crab *Carcinus maenas* in transmission dynamics of *Ostreid herpesvirus*-1 microvariant[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2018, 130(3): 221-233.
- [10] Prado-Alvarez M, García-Fernández P, Faury N, *et al.* First detection of OsHV-1 in the cephalopod *Octopus vulgaris*. Is the octopus a dead-end for OsHV-1?[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2021, 183: 107553.
- [11] De Lorgeril J, Lucasson A, Petton B, *et al.* Immune-suppression by OsHV-1 viral infection causes fatal bacteraemia in Pacific oysters[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 4215.
- [12] Alfaro A C, Nguyen T V, Merien F. The complex interactions of *Ostreid herpesvirus* 1, *Vibrio* bacteria, environment and host factors in mass mortality outbreaks of *Crassostrea gigas*[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2019, 11(4): 1148-1168.
- [13] Oyanedel D, Lagorce A, Bruto M, *et al.* Cooperation and cheating orchestrate *Vibrio* assemblages and polymicrobial synergy in oysters infected with OsHV-1 virus[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2023, 120(40): e2305195120.
- [14] Davison A J, Trus B L, Cheng N Q, *et al.* A novel class of herpesvirus with bivalve hosts[J]. *Journal of General Virology*, 2005, 86(1): 41-53.
- [15] Xia J Y, Bai C M, Wang C M, *et al.* Complete genome sequence of *Ostreid herpesvirus*-1 associated with mortalities of *Scapharca broughtonii* broodstocks[J]. *Virology Journal*, 2015, 12(1): 110.
- [16] Ren W C, Chen H X, Renault T, *et al.* Complete genome sequence of acute viral necrosis virus associated with massive mortality outbreaks in the Chinese scallop, *Chlamys farreri*[J]. *Virology Journal*, 2013, 10(1): 110.
- [17] Bai C M, Morga B, Rosani U, *et al.* Long-range PCR and high-throughput sequencing of *Ostreid herpesvirus* 1 indicate high genetic diversity and complex evolution process[J]. *Virology*, 2019, 526: 81-90.
- [18] Morga B, Jacquot M, Pelletier C, *et al.* Genomic diversity of the *Ostreid herpesvirus* type 1 across time and location and among host species[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 711377.
- [19] Martenot C, Faury N, Morga B, *et al.* Exploring first interactions between *Ostreid herpesvirus* 1 (OsHV-1) and its host, *Crassostrea gigas*: effects of specific antiviral antibodies and dextran sulfate[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1128.
- [20] 贾志磊, 王崇明, 任伟成, 等. 急性病毒性坏死病毒 dUTPase 基因的克隆、表达及其产物的酶学活性分析 [J]. *水产学报*, 2011, 35(9): 1320-1326.
- Jia Z L, Wang C M, Ren W C, *et al.* Cloning, expression of *Chlamys farreri* acute viral necrosis virus dUTPase gene and the determination of its enzymatic activity[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(9): 1320-1326 (in Chinese).
- [21] 钱璟, 王崇明, 潘鲁青, 等. 急性病毒性坏死病毒引物酶表达及酶学活性分析 [J]. *水产学报*, 2013, 37(9): 1401-1408.
- Qian J, Wang C M, Pan L Q, *et al.* Expression and enzymatic activity analysis of primase from acute viral necrosis virus[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(9): 1401-1408 (in Chinese).
- [22] 张帅, 王崇明, 宋晓玲, 等. 急性病毒性坏死病毒 IAP-86 基因的克隆、表达及抗凋亡研究 [J]. *水产学报*, 2014, 38(2): 274-281.
- Zhang S, Wang C M, Song X L, *et al.* Cloning, expression of acute viral necrosis virus IAP-86 gene and studies of its anti-apoptotic mechanism[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(2): 274-281 (in Chinese).
- [23] 张淑敏, 白昌明, 辛鲁生, 等. 牡蛎疱疹病毒囊膜蛋白 (ORF111) 的基因克隆及表达 [J]. *渔业科学进展*, 2020, 41(2): 183-190.
- Zhang S M, Bai C M, Xin L S, *et al.* Gene cloning and



- expression of *Ostreid herpesvirus 1* envelope protein (ORF111)[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(2): 183-190 (in Chinese).
- [24] Yu J N, Liu Y, Huang B W, *et al.* Characterization of host cell potential proteins interacting with OsHV-1 membrane proteins[J]. *Viruses*, 2021, 13(12): 2518.
- [25] 张翔, 谷莉, 郑玉东, 等. 基于原位 LAMP 技术的牡蛎疱疹病毒 (OsHV-1) 易感宿主调查 [J]. *渔业科学进展*, 2023, 44(2): 174-185.  
Zhang X, Gu L, Zheng Y D, *et al.* Survey of *Ostreid herpesvirus 1* (OsHV-1) susceptible hosts based on *in situ* LAMP technique[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2023, 44(2): 174-185 (in Chinese).
- [26] Scheich C, Kümmler D, Soumailakakis D, *et al.* Vectors for co-expression of an unrestricted number of proteins[J]. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(6): e43.
- [27] Senior A W, Evans R, Jumper J, *et al.* Improved protein structure prediction using potentials from deep learning[J]. *Nature*, 2020, 577(7792): 706-710.
- [28] Davison A J. Herpesvirus genes[J]. *Reviews in Medical Virology*, 1993, 3(4): 237-244.
- [29] van Beurden S J, Peeters B P, Rottier P J, *et al.* Genome-wide gene expression analysis of *Anguillid herpesvirus 1*[J]. *BMC Genomics*, 2013, 14(1): 83.
- [30] Gerold G, Bruening J, Pietschmann T. Decoding protein networks during virus entry by quantitative proteomics[J]. *Virus Research*, 2016, 218: 25-39.
- [31] Mettenleiter T C. Initiation and spread of  $\alpha$ -herpesvirus infections[J]. *Trends in Microbiology*, 1994, 2(1): 2-4.
- [32] Nishiyama Y. Herpesvirus genes: molecular basis of viral replication and pathogenicity[J]. *Nagoya Journal of Medical Science*, 1996, 59(3-4): 107-119.
- [33] Weed D J, Dollery S J, Sari T K, *et al.* Acidic pH mediates changes in antigenic and oligomeric conformation of herpes simplex virus gB and is a determinant of cell-specific entry[J]. *Journal of Virology*, 2018, 92(17): e01034.
- [34] Sathiyamoorthy K, Chen J, Longnecker R, *et al.* The COMPLEXity in herpesvirus entry[J]. *Current Opinion in Virology*, 2017, 24: 97-104.
- [35] Heilingloh C S, Krawczyk A. Role of L-particles during herpes simplex virus infection[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 2565.
- [36] Russell T, Bleasdale B, Hollinshead M, *et al.* Qualitative differences in capsidless L-particles released as a by-product of bovine herpesvirus 1 and herpes simplex virus 1 infections[J]. *Journal of Virology*, 2018, 92(22): e01259.
- [37] van Beurden S J, Leroy B, Wattiez R, *et al.* Identification and localization of the structural proteins of *Anguillid herpesvirus 1*[J]. *Veterinary Research*, 2011, 42(1): 105.
- [38] Henson B W, Perkins E M, Cothran J E, *et al.* Self-assembly of epstein-barr virus capsids[J]. *Journal of Virology*, 2009, 83(8): 3877-3890.
- [39] Yuan S, Wang J L, Zhu D J, *et al.* Cryo-EM structure of a herpesvirus capsid at 3.1 Å[J]. *Science*, 2018, 360(6384): eaao7283.
- [40] Wang J L, Yuan S, Zhu D J, *et al.* Structure of the herpes simplex virus type 2 C-capsid with capsid-vertex-specific component[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 3668.
- [41] Renault T. Malacoherpesviruses of mollusks[M]//Kibenge F S B, Godoy M G. *Aquaculture virology*. San Diego: Academic Press, 2016: 513-524.
- [42] Corbeil S. Abalone viral ganglioneuritis[J]. *Pathogens*, 2020, 9(9): 720.
- [43] Savin K W, Cocks B G, Wong F, *et al.* A neurotropic herpesvirus infecting the gastropod, abalone, shares ancestry with oyster herpesvirus and a herpesvirus associated with the amphioxus genome[J]. *Virology Journal*, 2010, 7(1): 308.
- [44] Zhang Q Y, Ke F, Gui L, *et al.* Recent insights into aquatic viruses: emerging and reemerging pathogens, molecular features, biological effects, and novel investigative approaches[J]. *Water Biology and Security*, 2022, 1(4): 100062.
- [45] Banks T A, Rouse B T. Herpesviruses—immune escape artists?[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 1992, 14(4): 933-941.
- [46] Griffin B D, Verweij M C, Wiertz E J H J. Herpesviruses and immunity: the art of evasion[J]. *Veterinary Microbiology*, 2010, 143(1): 89-100.
- [47] Rosani U, Young T, Bai C M, *et al.* Dual analysis of virus-host interactions: the case of *Ostreid herpesvirus 1* and the cupped oyster *Crassostrea gigas*[J]. *Evolutionary Bioinformatics*, 2019, 15: 1176934319831305.

## Construction of and polymerizing characterization with eukaryotic expression system for *Ostreid herpesvirus 1* structural proteins

CAO Shuhua<sup>1,2</sup>, WEI Maole<sup>2</sup>, LI Yongren<sup>1</sup>, HUANG Bowen<sup>2</sup>,  
XIN Lusheng<sup>2\*</sup>, BAI Changming<sup>2\*</sup>, WANG Chongming<sup>2</sup>

(1. Tianjin Key Laboratory of Aqua-Ecology and Aquaculture, College of Fishery,  
Tianjin Agriculture University, Tianjin 300384, China;

2. State Key Laboratory of Mariculture Biobreeding and Sustainable Goods,  
Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control,  
Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Qingdao Key Laboratory of Mariculture Epidemiology and Biosecurity,  
Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

**Abstract:** *Ostreid herpesvirus 1* (OsHV-1) infection has been linked to mass mortality of cultivated mollusks of different species worldwide. In this study, we established a eukaryotic system for the expression of ORF104 and ORF33 of OsHV-1, and investigated the polymerizing characterization of ORF104 and ORF33. Firstly, the biochemical characteristics, typical domains and 3D structures were analyzed bioinformatically. Secondly, we constructed recombinant plasmids for the two genes, and individually transfected or co-transfected them into Human Embryonic Kidney Cells (HEK293t). Finally, the expression and polymerization of the two target proteins were investigated using Western blot (WB) and electron microscopy. Bioinformatic analysis demonstrated that hydrophilicity of ORF33 and ORF104 were  $-0.49$  and  $0.82$ , making them stable hydrophilic and hydrophobic proteins respectively. For the construction of recombinant plasmids, genes of ORF33 and ORF104 were amplified with specifically designed primers, which generated PCR products of about 1 000 bp and 3 500 bp for ORF33 and ORF104 respectively. The recombinant plasmids were transmitted into HEK293t cells using Lipo8000<sup>TM</sup> for expression. The target bands around 140 ku and 35 ku in length were obtained by WB analysis after SDS-PAGE. However, the interaction between the two viral proteins was still undetermined. The ORF104 protein was identified by electron microscopy, which had a diameter of approximately 20 nm. Due to the small diameter of ORF33, it could not be clearly resolved with the background particles under negative staining electron microscopy in the present study. When the products of the two co-transfected plasmids were investigated, the diameter of the particles was between 10 and 30 nm. In summary, we established a method for the expression of OsHV-1 structural proteins using the eukaryotic expression system for the first time. Polymerization of the two proteins individually and together was investigated and characterized. The method described here provides a new approach for further research on the function, interaction of structural proteins, and infection mechanisms of OsHV-1.

**Key words:** *Ostreid herpesvirus 1*; nucleocapsid protein; eukaryotic expression system; protein polymerization

**Corresponding authors:** XIN Lusheng. E-mail: [xinls@ysfri.ac.cn](mailto:xinls@ysfri.ac.cn);

BAI Changming. E-mail: [baicm@ysfri.ac.cn](mailto:baicm@ysfri.ac.cn)

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (32073014); Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2023TD30); Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, YSFRI, CAFS (20603022023010); China Agriculture Research System of MOF and MARA (CARS-49); Postdoctoral Innovation Project of Shandong Province (SDCX-ZG-202303048)