

## 研究报告

## II 型鲤疱疹病毒 ORF4 的多克隆抗体制备及其组织分布

晏文岩<sup>1Δ</sup> 鲁建飞<sup>1Δ</sup> 孔善云<sup>1</sup> 沈兆媛<sup>1</sup> 杨雨清<sup>1</sup> 吕利群<sup>1,2,3</sup> 许丹<sup>1,2,3\*</sup>

(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 农业部淡水水产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:**【目的】制备 II 型鲤疱疹病毒(CyHV-2) ORF4 多克隆抗体,利用免疫学方法研究 ORF4 编码蛋白在病毒感染过程中的组织表达特征。【方法】利用在线软件 SMART 和 BLASTx 分析 CyHV-2 ORF4 序列,采用 PCR 技术从 CyHV-2 基因组中扩增得到 ORF4 基因,克隆至表达载体 PGEX-4T-3 中,将获得的重组表达质粒转化到大肠杆菌 BL21(DE3)中,用 IPTG 诱导表达,表达产物经过 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定,再利用亲和层析法纯化出重组蛋白。用纯化的重组 ORF4 蛋白免疫新西兰兔,收集兔血,分离兔血清获得抗 ORF4 蛋白的多克隆抗体,再利用 Western blot 检测抗体与 ORF4 蛋白之间的特异性。提取攻毒后的异育银鲫肌肉、脑、鳃、脾脏、肝胰脏、心脏、肾脏等组织 DNA,用荧光定量 PCR 技术监测其病毒在各组织的复制水平。使用 RIPA 裂解液提取上述各组织总蛋白,再利用 Western blot 技术检测 ORF4 在感染 CyHV-2 的异育银鲫各组织中的表达情况。【结果】原核表达的重组 ORF4 蛋白分子量为 65 kD,与预期大小一致;获得的 ORF4 抗血清能特异性识别重组 ORF4 蛋白。病毒感染的异育银鲫体内 ORF4 主要表达在肾脏、脾脏和鳃上;荧光定量 PCR 证明 CyHV-2 主要在肾脏、脾脏和鳃上富集。【结论】CyHV-2 的非结构蛋白 ORF4 可能参与病毒的复制,是病毒复制感染周期的特征性指示蛋白之一,这为深入研究 ORF4 在 CyHV-2 感染过程中的作用机制提供参考。

**关键词:** II 型鲤疱疹病毒, ORF4, 原核表达, 多克隆抗体, 组织分布

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (No. 31602203); Excellent Undergraduate Program of Shanghai Ocean University (2016)

**\*Corresponding author:** Tel: 86-21-61900433; E-mail: dxu@shou.edu.cn

<sup>Δ</sup>These authors equally contributed to this work

**Received:** January 15, 2017; **Accepted:** April 26, 2017; **Published online** (www.cnki.net): May 09, 2017

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(No. 31602203); 上海海洋大学优秀本科生进实验室项目(2016)

**\*通讯作者:** Tel: 86-21-61900433; E-mail: dxu@shou.edu.cn

<sup>Δ</sup>对本文贡献相同

**收稿日期:** 2017-01-15; **接受日期:** 2017-04-26; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2017-05-09

## Prokaryotic expression, polyclonal antibody preparation and tissue-tropism analysis of cyprinid herpesvirus II non-structural protein ORF4

YAN Wen-Yan<sup>1Δ</sup> LU Jian-Fei<sup>1Δ</sup> KONG Shan-Yun<sup>1</sup> SHEN Zhao-Yuan<sup>1</sup> YANG Yu-Qing<sup>1</sup>  
LÜ Li-Qun<sup>1,2,3</sup> XU Dan<sup>1,2,3\*</sup>

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

(2. Key Laboratory of Aquaculture Ministry for Freshwater Aquatic Genetic Resources, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

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

**Abstract:** [Objective] Acquire the polyclonal antibody against non-structural protein ORF4 of cyprinid herpesvirus 2, and reveal the tissue distribution pattern of ORF4 protein during the virus infection. [Methods] The ORF4 structure was analyzed by SMART and BLASTx. The ORF of ORF4 was amplified from viral genomic DNA and cloned into plasmid PGEX-4T-3. The recombinant plasmid was transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3) for recombinant protein production after induction by IPTG. The expressed recombinant protein was then purified by affinity chromatography and the purified protein was used to immunize New Zealand rabbits to obtain the anti-ORF4 polyclonal antibody. The specificity of the anti-ORF4 polyclonal antibody was confirmed by Western blot. Furthermore, real time PCR analysis was employed to monitor the genomic replication level in various tissues of virus-infected *Carassius auratus gibelio* including muscle, brain, gill, spleen, liver pancreas, heart, kidney. And the tissue distribution pattern of ORF4 in infected *Carassius auratus gibelio* was subsequently analyzed by Western blot. [Results] The expressed recombinant ORF4 protein in bacteria was detected at 65 kD as expected. Immunoassays suggested that the home-made antibody can specially recognize either the recombinant protein or endogenous ORF4. It proved that the ORF4 was mainly distributed in the kidney, spleen and gill *in vivo*, which was in consistence with the high level of virus replication in these tissues revealed by real time PCR assay. [Conclusion] Non-structural viral protein ORF4 might involve in efficient viral replication, which could serve as a marker protein for active virus infection. This study paved the way for studying the mechanism of ORF4 in the process of cyprinid herpesvirus 2 infection.

**Keywords:** Cyprinid herpesvirus 2, ORF4, Prokaryotic expression, Polyclonal antibody, Tissue distribution

异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)是我国主要的淡水养殖鱼类品种之一,其养殖地域广、产量高,在我国淡水养殖中有十分重要的地位<sup>[1]</sup>。随着异育银鲫养殖规模的持续扩大,集约化程度的不断提高,异育银鲫的病害问题日渐突出,特别是II型鲤疱疹病毒感染异育银鲫引起的疱疹病毒性造血器官坏死病(Herpesviral haematopoietic necrosis, HVHN)频发,严重影响了我国异育银鲫养殖业的健康发展<sup>[2]</sup>。CyHV-2在分类上归属于鱼疱疹病毒科(Alloherpesviridae)鲤疱疹病毒属(Cyprinivirus)<sup>[3]</sup>。CyHV-2病毒粒子核衣壳为六边形,直径介于

100 nm–110 nm 之间<sup>[4]</sup>,成熟的病毒粒子有呈椭圆形的囊膜,直径介于175 nm–200 nm 之间,CyHV-2属于双链DNA病毒,基因组全长约290 304 bp,共编码156个蛋白<sup>[5–6]</sup>。CyHV-2与I型鲤疱疹病毒(Cyprinid herpesvirus 1, CyHV-1)和III型鲤疱疹病毒(Cyprinid herpesvirus 3, CyHV-3)同源性最近,与沟鲇疱疹病毒(Ictalurid herpesvirus 1, IcHV-1)同源性较远<sup>[5]</sup>。目前,对CyHV-2的研究主要集中在分类鉴定、全基因组测序与注释、快速检测方法的建立等,对CyHV-2重要功能基因的研究和病毒免疫逃避机制的研究较少<sup>[7–9]</sup>。

肿瘤坏死因子(Tumor necrosis factor, TNF)通过与细胞表面肿瘤坏死因子受体 1 (Tumor necrosis factor receptor 1, TNFR1)和肿瘤坏死因子受体 2 (Tumor necrosis factor receptor 2, TNFR2)结合,可引起免疫反应、炎症反应、细胞增殖和细胞凋亡等<sup>[10]</sup>。许多大分子 DNA 病毒都可通过编码 vTNFR 来调控病毒复制,目前关于病毒编码的 vTNFR 的研究主要集中在痘病毒。疱疹病毒也能编码 vTNFR,人巨细胞病毒编码的 UL144 含有疱疹病毒侵入介体(HVEM, TNFR superfamily member 14),UL144 能通过 NF- $\kappa$ B 通路促进趋化因子 CCL22 的表达<sup>[11]</sup>。基于基因组信息分析表明, CyHV-2 编码 2 个 TNFR 类似物基因(ORF4 和 ORF151A),而 CyHV-1 编码 4 个 TNFR 类似物基因(ORF129A、ORF136A、136B 和 ORF147A), CyHV-3 编码 2 个 TNFR 类似物基因(ORF4 和 ORF12), CyHV-3 编码的 ORF12 基因已被证明可能在病毒免疫逃逸机制中起着重要作用,由此我们推测 CyHV-2 编码的 ORF4 可能对 CyHV-2 感染的致病机制发挥重要作用<sup>[5]</sup>。

本实验针对 CyHV-2 编码的 ORF4 基因进行结构分析,在原核系统中表达出了重组 GST-ORF4 蛋白,并制备出了亲和性好、特异性高的多克隆抗体,通过 Western blot 等技术检测了 ORF4 的组织分布特性,且 ORF4 的组织分布情况与病毒复制水平呈正相关,为 CyHV-2 编码的 ORF4 蛋白功能的深入研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

**1.1.1 基因组 DNA、质粒和菌株:** CyHV-2 病毒基因组 DNA 样品、PGEX-4T-3 质粒由本实验室保存;大肠杆菌 DH5 $\alpha$  和 BL21(DE3)感受态细胞购自天根生化科技(北京)有限公司。

**1.1.2 主要试剂和仪器及培养基:** PrimeSTAR Max DNA Polymerase、限制性内切酶、T4 连接酶、荧光定量 PCR 试剂购自 TaKaRa 公司;HRP 标记的羊抗兔 IgG 多克隆抗体、HRP 标记的羊抗鼠 IgG 多克隆抗体、GST-Tag 单克隆抗体购自上海英基生

物有限公司;6 月龄的纯种新西兰白兔,质量 2–3 kg,购自上海实验动物研究中心;异育银鲫购自上海海洋大学水产动物遗传育种中心,于实验室水族箱暂养 2 周后进行实验;血液/组织/细胞基因组提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。净化工作台,上海博讯实业有限公司;旋涡混合仪,上海琪特分析仪器有限公司;恒温振荡培养床,上海博讯实业有限公司;振荡器,上海贺德试验设备有限公司;琼脂糖凝胶电泳仪、凝胶成像系统、聚丙烯酰胺凝胶电泳仪、免疫印迹电转仪,上海天能科技有限公司;PCR 仪、CFX96 荧光定量 PCR 仪,伯乐生命医学产品有限公司。LB 培养基、PBS 溶液和含 5%牛奶的 PBST 溶液配制方法参照孔善云等<sup>[1]</sup>。

### 1.2 生物信息学分析及进化树构建

参照 GenBank 上发表的 II 型鲤疱疹病毒 ORF4 基因序列,选用在线软件 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)对 CyHV-2 ORF4 的氨基酸序列进行保守结构域预测。选用在线 BLASTx (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)软件对 CyHV-2 ORF4 的核苷酸序列进行同源性搜索;选择其他病毒,如 III 型鲤疱疹病毒 ORF4 (YP\_001096043.1)、新加坡石斑鱼虹彩病毒(Singapore grouper iridovirus, SIGV ORF50 (AAV91053.1)、黏液瘤病毒(Myxoma virus, MV) T2 (NP\_051879.1)、人巨细胞病毒(Human cytomegalovirus, HCMV) UL144 (AAD43177.1)及 Scale drop disease virus SDDV (YP\_009163884.1),用 DNAMAN 软件进行比对,并进行进化树分析。

### 1.3 ORF4 基因片段的扩增

利用引物设计软件 Primer Premier 5 设计其扩增引物(上游:5'-GGATCCGCGATGACACCACCACCAACAACA-3';下游:5'-GGAATTCCTTAAAGCTCTTCTGATGGAGTG-3'),在上下游引物序列中分别插入 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切位点, CyHV-2 病毒基因组 DNA 为模板,运用 PCR 技术对 ORF4 基因进行扩增。PCR 反应体系(50  $\mu$ L): 10 $\times$ Buffer 5  $\mu$ L, 10 mmol/L dNTPs 1  $\mu$ L, 10  $\mu$ mol/L 引物各 1  $\mu$ L, DNA 模板 0.5  $\mu$ L, 5 U/ $\mu$ L *Taq* DNA Polymerase

1  $\mu\text{L}$ , 加 ddH<sub>2</sub>O 至 50  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件: 94  $^{\circ}\text{C}$  5 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  50 s, 59  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 共 30 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 用纯化回收试剂盒回收目的片段。

#### 1.4 PGEX-4T-3-ORF4 重组质粒的构建和序列测定

将纯化 PCR 产物和质粒 PGEX-4T-3 分别用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 在 37  $^{\circ}\text{C}$  进行双酶切处理, 酶切 1 h, 酶切产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析后, 再用 PCR 产物纯化回收试剂盒回收。用 T4 连接酶将 ORF4 和 PGEX-4T-3 连接, 连接产物转化到大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中, 菌落经 PCR 筛选出阳性克隆, 扩增后提取质粒, 送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行序列测定。测序鉴定成功的质粒命名为 PGEX-4T-3-ORF4。

#### 1.5 重组蛋白的表达和纯化

将质粒 PGEX-4T-3-ORF4 转化到 BL21(DE3) 大肠杆菌中。挑取单个阳性菌落接种于氨苄西林浓度为 100 mg/L 的 LB 液体培养基中, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养; 培养菌 *OD*<sub>600</sub> 浓度约为 0.6 时, 加入 IPTG 至其终浓度为 1 mmol/L, 诱导 4 h; 8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 用 PBS 溶液重悬后进行超声破碎处理 20 min (6 s/6 s)。超声后, 4  $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 r/min 离心 20 min, 取上清液过 0.22  $\mu\text{m}$  的滤膜, 用谷胱甘肽亲和层析法纯化滤液, 用 SDS-PAGE 和 Western blot 技术对表达和纯化的蛋白进行检测。

#### 1.6 多克隆抗体的制备

用纯化的重组蛋白免疫新西兰兔。采用皮下多点注射免疫, 抗原与弗氏完全佐剂 1:1 充分混匀乳化后免疫; 第 1 次免疫 10 d 后进行第 2 次免疫, 抗原与弗氏不完全佐剂 1:1 充分混匀乳化后免疫; 10 d 后进行第 3 次免疫; 第 4 次免疫为加强免疫, 在第 3 次免疫两周后进行, 不加佐剂, 注射 0.2 mg 重组蛋白。第 4 次免疫 7 d 后心脏采血, 血液 37  $^{\circ}\text{C}$  静置 1 h, 然后 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜, 第二天 4  $^{\circ}\text{C}$ 、3 000 r/min 离心 10 min, 小心取上清, 分装后 -80  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

#### 1.7 血清抗体特异性分析

用纯化的 GST-ORF4 蛋白作为抗原进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 然后采用电转膜法(100 V, 75 min)转至 PVDF 膜, 用 20 mL 含 5% 牛奶的 PBST 溶液室温封闭 2 h。再用制备的多抗血清作为一抗(稀释度 1:3 000)室温孵育 1 h 后 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜。用 PBST 溶液清洗 3 次, 每次 10 min。再用 HRP 标记的羊抗兔的 IgG 抗体作为二抗(稀释度 1:5 000)室温 50 r/min 振荡孵育 2 h, 用 PBST 清洗 3 次, 每次 10 min, 最后将 PVDF 膜放入二氨基联苯胺(DAB)显色液中显色, 直到目的条带清晰为止, 并用双蒸水终止反应。

#### 1.8 荧光定量 PCR 扩增

参照本实验室建立的 CyHV-2 荧光定量检测方法对各组织中的病毒滴度进行测定<sup>[12]</sup>。取 3 条攻毒 CyHV-2 后的异育银鲫, 分别取肌肉、脑、鳃、脾脏、肝胰脏、心脏、肾脏组织 20 mg, 参照组织基因组提取试剂盒说明书提取总 DNA。将 DNA 模板稀释为 50 mg/L, 荧光定量 PCR 反应体系: SYBR Premix ExTaq 12.5  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{mol/L}$  上下游引物各 1  $\mu\text{L}$ , DNA 模板 1  $\mu\text{L}$ , 双蒸水 9.5  $\mu\text{L}$ , 总体积为 25  $\mu\text{L}$ 。每种样品组织均设 3 个重复, 同时设定双蒸水为阴性对照。

#### 1.9 各组织总蛋白的提取及检测

分别取肌肉、脑、鳃、脾脏、肝胰脏、心脏、肾脏组织 20 mg, 使用碧云天 RIPA 裂解液(中), 参照说明书提取上述各组织总蛋白。再利用 Western blot 技术进行检测, Western blot 参照 1.7, GAPDH 作为内参标定总蛋白的使用量。

## 2 结果与分析

### 2.1 ORF4 氨基酸序列结构域、同源性和进化分析

如图 1 所示, 通过 SMART 在线软件对 ORF4 蛋白的氨基酸进行结构域分析发现, 在 158–194 和 259–336 氨基酸残基间含有 2 个保守的 TNFR 功能结构域——半胱氨酸富集结构域(CRD)。BLASTx 分析表明, CyHV-2 ORF4 与 CyHV-3 ORF4、SIGV

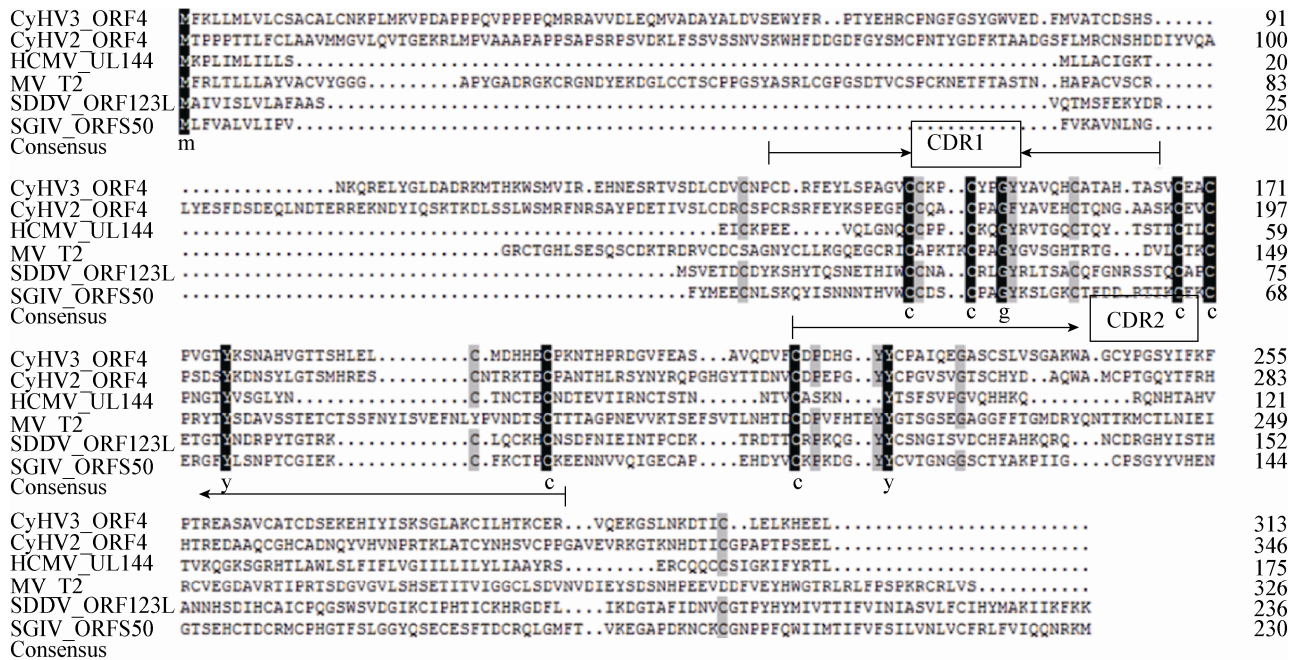


图1 CyHV-2 ORF4 与 CyHV-3、HCMV、SDIV 等病毒的 TNFR 氨基酸序列比对

Figure 1 Multiple sequence alignments of CyHV-2 ORF4 homologues in TNFRs of other species

注：在所有物种中完全保守的氨基酸残基用黑色表示；CRD：半胱氨酸富集结构域。

Note: The fully conserved amino acid residues in all species are represented in black; CRD: Cysteine rich domain.

ORF50、MV T2、SDDV ORF123L 一致性较高。氨基酸序列比对分析结果表明，半胱氨酸残基较为保守(图 1)。进化树结果表明，CyHV-2 ORF4 与 CyHV-3 ORF4 的亲缘关系最近(图 2)。

## 2.2 ORF4 基因扩增鉴定

根据 GenBank 中 II 型鲤疱疹病毒 ORF4 的 ORF 框序列设计引物，并以 CyHV-2 基因组 DNA 作为模板，经 PCR 扩增获得 ORF4 ORF 框序列。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析，扩增出一条大小约为 1 041 bp 的特异性条带，大小与预期一致(图 3)。

## 2.3 原核表达载体的构建

将上述 PCR 产物割胶回收，回收产物和 PGEX-4T-3 质粒分别进行双酶切，然后进行连接、转化，最后提取质粒，通过 PCR 扩增、测序等方法鉴定重组质粒，测序结果显示重组质粒 PGEX-4T-3-ORF4 构建正确，将质粒转化到大肠杆菌后用于诱导表达重组蛋白 GST-ORF4。

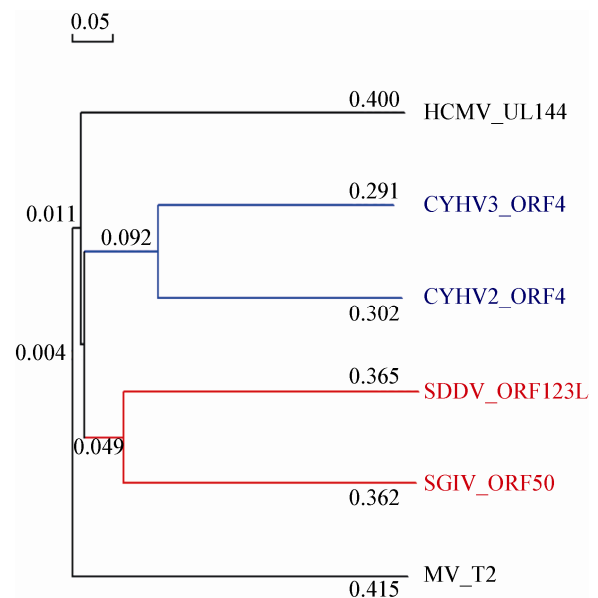


图2 基于 CyHV-2 ORF4 构建的系统进化树

Figure 2 Phylogenetic tree of CyHV-2 ORF4 amino acid sequence homologues in TNFRs of other species

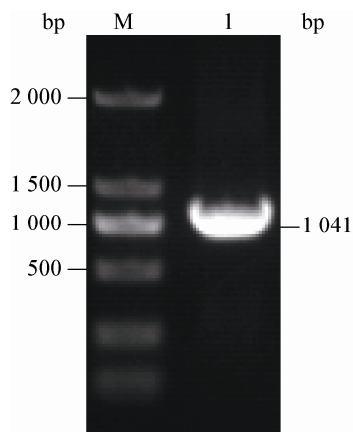


图3 ORF4 基因 PCR 扩增产物电泳图

**Figure 3** Electrophoretic profile of PCR products of ORF4 gene

Note: M: DL2000 marker; 1: PCR products.

## 2.4 重组蛋白的表达和纯化

将含有质粒 PGEX-4T-3-ORF4 的大肠杆菌 BL21(DE3)用终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 进行诱导, 4 h 后取总菌体制样进行 SDS-PAGE 分析。图 4 结果表明, 与未经 IPTG 诱导组相比, 经 IPTG 诱导的菌体在 65 kD 处出现一条明显的目的条带, 同时, 利用 GST-Tag 单克隆抗体检测上述蛋白, 图 5 结果显示, 只有诱导组在 65 kD 处出现条带, 与预期相符, 说明 GST-ORF4 蛋白表达成功。将诱导组的菌体超声波破碎, 离心后取上清经谷胱甘肽亲和层析柱纯化出重组蛋白, 经 SDS-PAGE 分析, 图 6 显示在 65 kD 处出现一条单一条带, 说明获得了纯的 GST-ORF4 重组蛋白, 可用于后续实验。

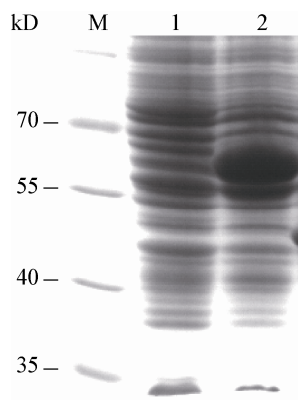


图4 表达产物的 SDS-PAGE 分析

**Figure 4** SDS-PAGE of expressed product

Note: M: Protein marker; 1: Uninduced bacterial; 2: Induced bacterial.

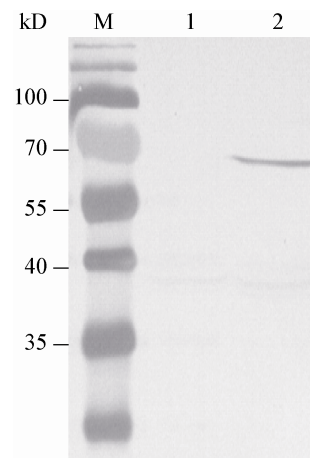


图5 表达产物的 Western blot 检测

**Figure 5** Western blot detection of expressed product

Note: M: Protein marker; 1: Uninduced bacterial; 2: Induced bacterial.

## 2.5 多克隆抗体的制备及特异性分析

纯化的重组 GST-ORF4 蛋白免疫新西兰兔后, 为了鉴定获得的抗 ORF4 多克隆抗体是否能特异性识别 ORF4, 利用制备的抗 ORF4 的血清为一抗, 未诱导的菌体和诱导的菌体为抗原, 进行 Western blot 检测。图 7A 结果显示, CyHV-2 ORF4 抗血清能检测到一条 65 kD 的单一蛋白条带, 说明所制备的多克隆抗体可以与 GST-ORF4 蛋白产生特异性免疫反应。为了验证制备的多克隆抗体能否识

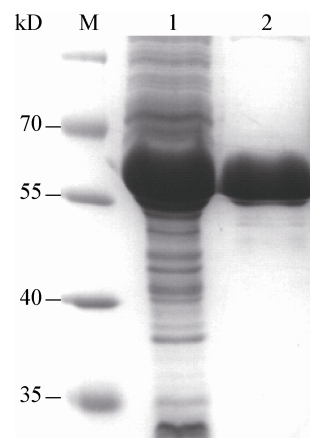


图6 纯化的重组 ORF4 蛋白 SDS-PAGE 分析

**Figure 6** SDS-PAGE of purified product

注: M: 蛋白 Marker; 1: 未诱导的菌体; 2: 纯化的 GST-ORF4 蛋白。

Note: M: Protein marker; 1: Uninduced bacterial; 2: The purified GST-ORF4 protein.

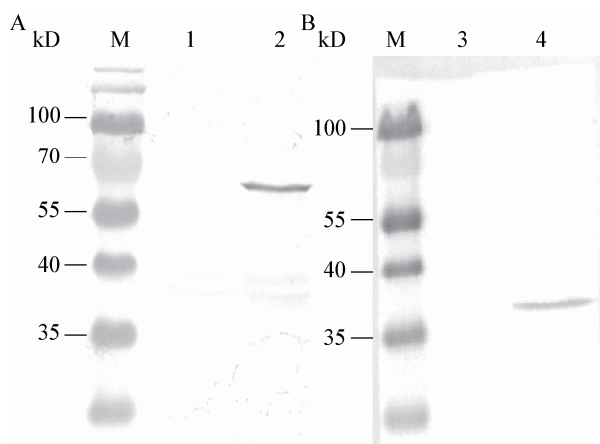


图 7 利用制备的多抗血清检测重组 ORF4 蛋白

**Figure 7 Detection of rORF4 by the polyclonal antibody**

注: M: Marker; 1: 未诱导的菌体; 2: 诱导的菌体; 3: 未感染的肾脏; 4: 感染的肾脏。

Note: M: Protein marker; 1: Uninduced bacterial; 2: Induced bacterial; 3: Uninfected kidney; 4: Infected kidney.

别体内的 ORF4 蛋白, 利用制备的抗 ORF4 的血清为一抗, 未感染和感染鱼的肾脏为抗原, 经 Western blot 检测, 结果如图 7B 所示, 在未感染组中没有检测到条带, 在感染组中检测到一条大小为 38 kD 的单一一条带。

## 2.6 感染 CyHV-2 后濒死异育银鲫各组织中病毒的分布情况

利用绝对定量的方法, 对 CyHV-2 在各组织中的分布进行定量分析。图 8 结果表明 CyHV-2 主要在肾脏和脾脏中富集, 而脑和肌肉中分布最少。

## 2.7 ORF4 蛋白在感染 CyHV-2 后濒死异育银鲫各组织中的分布情况

在利用 Western blot 分析各组织中 ORF4 蛋白分布的实验中, 与内参蛋白 GAPDH 相比, ORF4 蛋白在各组织中分布差异明显, 只在肾脏、脾脏和鳃中检测出 ORF4 蛋白质的分布, 肌肉、脑、肝胰脏和心脏组织中未被检测出, 并且在肾脏和脾脏中 ORF4 蛋白条带最粗, 而在鳃中 ORF4 蛋白条带较浅, 这很可能预示着 ORF4 主要在肾脏、脾脏和鳃中行使调控功能(图 9)。

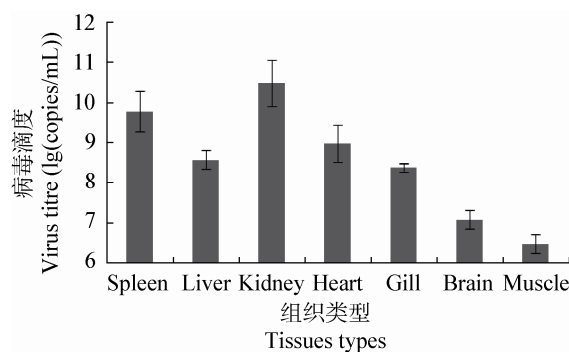


图 8 CyHV-2 在异育银鲫不同组织中的分布情况

**Figure 8 The distribution of CyHV-2 in different tissues of allogynogenetic crucian carp**

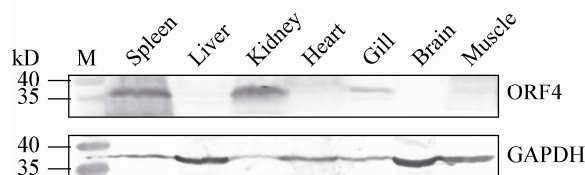


图 9 ORF4 蛋白质在各组织中的分布

**Figure 9 The distribution of ORF4 protein in different tissues**

## 3 结论与讨论

生物体在受到病毒感染时通过一系列免疫反应来抵抗病毒的侵袭, 与此同时病毒也进化出了多种策略促进病毒侵染。疱疹病毒能通过编码宿主蛋白类似物调控细胞的免疫反应来逃避细胞的免疫攻击, 如肿瘤坏死因子受体类似物、干扰素受体类似物等<sup>[13]</sup>。

本文对 CyHV-2 的 ORF4 基因的氨基酸序列进行分析, 发现其在 158–194 和 259–336 位点分别含有一个 TNFR 结构, 与 TNFR 超家族成员的 TNFR1 和 TNFR2 结构相似。CyHV-2 ORF4 的 TNFR 结构与其他病毒的 TNFR 超家族成员同源性较近, 与 CyHV-3 ORF4 一致性有 34%, 与其他病毒编码的 vTNFR 一致性在 20%–32% 之间。在水生动物病毒中, SGIV 通过编码的 vTNFR ORF50 来调控细胞的 TNF 和 TNFR, 达到逃避宿主免疫攻击的目的<sup>[14]</sup>。

与 CyHV-2 同源性很近的 CyHV-3 编码了两种 vTNFR (ORF4 和 ORF12), 通过 Western blot 检测感染 CyHV-3 病毒后的鱼血清和细胞上清, 结合质谱分析, 只检测出 ORF12 病毒蛋白<sup>[15]</sup>。在斑马鱼胚胎中过表达 CyHV-3 的 ORF4 和 ORF12, 会导致胚胎缺陷, 甚至死亡, 能促进细胞凋亡。CyHV-3 vTNFRs 引起的凋亡主要是通过内源性凋亡途径, 同时也需要外源性凋亡途径的参与, 这预示着 CyHV-3 ORF4 可能在病毒免疫逃逸机制中起着重要作用<sup>[16]</sup>, 也预示着 CyHV-2 ORF4 很可能是 vTNFR, 行使着与宿主 TNFR 相似的功能。

本实验首先从 CyHV-2 基因组 DNA 中扩增出了 ORF4 基因的 ORF 框序列, 并将其插入到表达载体 PGEX-4T-3 中, 再利用原核表达的 GST-ORF4 蛋白免疫新西兰兔, 获得了效价高、特异性好的多克隆抗体。利用该多克隆抗体, 我们研究了 ORF4 的组织分布情况。迄今为止, 已有多位学者运用不同技术对 CyHV-2 的组织分布进行了研究。姚卓凤等<sup>[17]</sup>研究了急性和慢性感染条件下, 异育银鲫鳃、脾脏、肾脏和脑组织的病理损伤情况, 在不同感染模型中, 脾脏、肾脏、鳃和脑组织的病理损伤都很严重, 且以坏死病变为主。林秀秀等<sup>[18]</sup>利用 PCR 方法在异育银鲫的体肾、肠道、脾脏、头肾、肝胰脏、鳃中均检测出 CyHV-2 病毒粒子。同时, 林秀秀等<sup>[19]</sup>利用透射电镜研究患病异育银鲫肾脏、脾脏、头肾、肝胰脏、肠道、鳃各组织细胞超微病理学, 在这些组织中均观察到 CyHV-2 的病毒粒子, 其中在肾脏和脾脏中观察到大量的 CyHV-2 粒子, 而肝胰脏、头肾、鳃和肠道中 CyHV-2 粒子较少。因此, 他们推测 CyHV-2 通过感染体肾、头肾、脾脏的吞噬细胞, 引起宿主免疫机能的改变。本实验中我们利用荧光定量 PCR 技术检测出 CyHV-2 在肾脏、脾脏、脑、肝胰脏、鳃、肌肉和心脏均有分布, 且按照肾脏、脾脏、心脏、肝胰脏、鳃、脑、肌肉的顺序依次减少(图 8), 与已报道的研究结果基本一致。在利用 Western blot 技术检测 ORF4 的组织分布实验中发现其主要分布在肾脏、脾脏、鳃中, 其

他组织中没有检测出 ORF4 蛋白质的分布, 可能与 ORF4 蛋白质在这些组织中表达量少有关。同时, ORF4 作为病毒的非结构蛋白, 在病毒侵染宿主过程中主要起调控作用, 在不同细胞中的表达量会有一定的差异性, 已有的研究表明 CyHV-2 侵染的主要靶器官为肾脏和脾脏, 这预示着 ORF4 可能在病毒与宿主的相互作用中发挥着重要的免疫调控作用。

## 参 考 文 献

- [1] Kong SY, Jiang YS, 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)  
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
- [2] Tian FY, He JQ, Wang L, et al. The research progress of goldfish herpesviral haematopoietic necrosis[J]. Chinese Journal of Animal Quarantine, 2012, 29(4): 78-80 (in Chinese)  
田飞焱, 何俊强, 王璐, 等. 金鱼疱疹病毒性造血器官坏死病研究进展[J]. 中国动物检疫, 2012, 29(4): 78-80
- [3] Waltzek TB, Kelley GO, Stone DM, 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
- [4] Podok P, Wang H, Xu LJ, et al. Characterization of myeloid-specific peroxidase, keratin 8, and dual specificity phosphatase 1 as innate immune genes involved in the resistance of crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) to Cyprinid herpesvirus 2 infection[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2014, 41(2): 531-540
- [5] Podok P, Xu LJ, Xu D, et al. Different expression profiles of Interleukin 11 (IL-11), Intelectin (ITLN) and Purine nucleoside phosphorylase 5a (PNP 5a) in crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) in response to cyprinid herpesvirus 2 and *Aeromonas hydrophila*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2014, 38(1): 65-73
- [6] Davison AJ, Kurobe T, Gatherer D, et al. Comparative genomics of carp herpesviruses[J]. Journal of Virology, 2013, 87(5): 2908-2922
- [7] He JQ, Shi XJ, 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] Wu T, Ding ZF, 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
- [9] Ma J, Jiang N, LaPatra SE, et al. Establishment of a novel and highly permissive cell line for the efficient replication of cyprinid herpesvirus 2 (CyHV-2)[J]. Veterinary Microbiology, 2015, 177(3/4): 315-325

- [10] Grell M, Becke FM, Wajant H, et al. Tumor necrosis factor (TNF) receptor type 2 mediates thymocyte proliferation independently of TNF receptor type 1[J]. *European Journal of Immunology*, 1998, 28(1): 257-263
- [11] Poole E, King CA, Sinclair JH, et al. The UL144 gene product of human cytomegalovirus activates NF $\kappa$ B via a TRAF6-dependent mechanism[J]. *The EMBO Journal*, 2006, 25(18): 4390-4399
- [12] Xu LJ, Podok P, Xie J, et al. Comparative analysis of differential gene expression in kidney tissues of moribund and surviving crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) in response to cyprinid herpesvirus 2 infection[J]. *Archives of Virology*, 2014, 159(8): 1961-1974
- [13] Rahman MM, McFadden G. Modulation of tumor necrosis factor by microbial pathogens[J]. *PLoS Pathogens*, 2006, 2(2): e4
- [14] Guan LY, Huang YH, Cai J, et al. Molecular characterization and tentative functional analysis of Singapore grouper iridovirus open reading frame 050 (SGIV ORF050)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(7): 1095-1105 (in Chinese)  
关丽雅, 黄友华, 蔡佳, 等. 石斑鱼虹彩病毒 ORF050 的分子特征和功能初步分析[J]. *水产学报*, 2013, 37(7): 1095-1105
- [15] Kattlun J, Menanteau-Ledouble S, El-Matbouli M. Non-structural protein pORF 12 of cyprinid herpesvirus 3 is recognized by the immune system of the common carp *Cyprinus carpio*[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2014, 111(3): 269-273
- [16] Yi Y, Qi HM, Yuan JM, et al. Functional characterization of viral tumor necrosis factor receptors encoded by cyprinid herpesvirus 3 (CyHV3) genome[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 45(2): 757-770
- [17] Yao ZF, Huang J, Zhang JM, et al. Investigation of viral load in healthy fish naturally infected with cyprinid herpesvirus II (CyHV-2)[J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2016, 55(4): 980-983 (in Chinese)  
姚卓凤, 黄建, 张俊梅, 等. 自然感染鲤疱疹病毒 II 的病毒载量研究[J]. *湖北农业科学*, 2016, 55(4): 980-983
- [18] Lin XX, Ye YT, Wu P, et al. The injury effect of infection by cyprinid herpesvirus 2 (CyHV-2) on tissues and organs of gibel carp (*Carassius auratus gibelio*)[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2016, 35(3): 587-594 (in Chinese)  
林秀秀, 叶元土, 吴萍, 等. 鲤疱疹 II 型病毒(CyHV-2)感染对异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)组织器官的损伤作用[J]. *基因组学与应用生物学*, 2016, 35(3): 587-594
- [19] Lin XX, Ye YT, Wu P, et al. Ultra-pathological observation of cyprinid herpesvirus 2 (CyHV-2) of allogenyetics silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) with hematopoietic necrosis[J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2016, 29(1): 17-23 (in Chinese)  
林秀秀, 叶元土, 吴萍, 等. 异育银鲫造血器官坏死症病鱼体内鲤疱疹病毒 II 型的电镜观察与超微病理学特征[J]. *水产学杂志*, 2016, 29(1): 17-23