

鲤疱疹病毒 II 型 ORF66 截短蛋白多克隆抗体的制备及互作多肽筛选

张小米 阙顺政 龙晨 王浩 吕利群

PREPARATION OF POLYCLONAL ANTIBODIES TO CYHV-2 ORF66 TRUNCATED PROTEIN AND SCREENING OF INTERCALATING PEPTIDES

ZHANG Xiao-Mi, QUE Shun-Zheng, LONG Chen, WANG Hao, L Li-Qun

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7541/2023.2022.0269>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

[青 *prdm14* 的原核表达、多克隆抗体制备及其应用](#)

PROKARYOTIC EXPRESSION, PREPARATION AND APPLICATION OF ANTI-PRDM14 POLYCLONAL ANTIBODY OF MEDAKA (*ORYZIAS LATIPES*) *PRDM14*

水生生物学报. 2017, 41(4): 748–754 <https://doi.org/10.7541/2017.93>

[黄颡鱼自噬相关基因 *LC3B* 和 *Beclin1* 的原核表达及多克隆抗体制备](#)

PROKARYOTIC EXPRESSION AND POLYCLONAL ANTIBODY PREPARATION OF AUTOPHAGY-RELATED GENES *LC3B* AND *BECLIN1* OF YELLOW CATFISH *PELTEOBAGRUS FULVIDRACO*

水生生物学报. 2019, 43(6): 1197–1202 <https://doi.org/10.7541/2019.141>

[中国绿水螭抗坏血酸过氧化物酶基因的克隆、抗体制备及表达分析](#)

MOLECULAR CLONING, ANTIBODY PREPARATION AND EXPRESSION ANALYSIS OF ASCORBATE PEROXIDASE IN *HYDRA SINENSIS*

水生生物学报. 2019, 43(2): 305–314 <https://doi.org/10.7541/2019.038>

[在患 CyHV-2 病的异育银鲫肠道黏膜中胆固醇、胆汁酸代谢通路基因的差异表达](#)

GENE DIFFERENCE EXPRESSION OF CHOLESTEROL AND BILE ACID METABOLISM PATHWAY IN INTESTINAL MUCOSA WITH THE CYHV-2 DISEASE *CARASSIUS AURATUS GIBELIO*

水生生物学报. 2017, 41(5): 956–962 <https://doi.org/10.7541/2017.119>

[三疣梭子蟹 *PtToll-1* 受体的原核表达及组织、细胞分布研究](#)

PROKARYOTIC EXPRESSION OF THE TOLL RECEPTOR *PTTOLL-1* AND ITS CELLULAR DISTRIBUTION IN *PORTUNUS TRITUBERCULATUS*

水生生物学报. 2018, 42(2): 300–306 <https://doi.org/10.7541/2018.038>

[鲤春病毒血症病毒糖蛋白酵母表面展示系统的建立](#)

ESTABLISHMENT OF YEAST EXPRESSION SYSTEM FOR SPRING VIREREMIA OF CARP VIRUS GLYCOPROTEIN

水生生物学报. 2019, 43(5): 977–982 <https://doi.org/10.7541/2019.116>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

doi: 10.7541/2023.2022.0269

鲤疱疹病毒II型ORF66截短蛋白多克隆抗体的制备及互作多肽筛选

张小米¹ 阙顺政¹ 龙晨¹ 王浩² 吕利群¹

(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水产种质资源与利用重点实验室, 上海 201306)

摘要: 为深入探究鲤疱疹病毒II型(Cyprinid herpesvirus 2, CyHV-2)在感染过程中的生物学功能, 构建了ORF66截短基因的原核表达质粒pET28a-tORF66, 转化至BL21感受态细胞后利用IPTG(Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside) 16℃诱导蛋白表达, 经尿素溶解透析获得溶解的重组蛋白后免疫6周龄小鼠, 制备鼠抗tORF66多克隆抗体。将纯化后重组蛋白进行噬菌体展示以此来筛选互作蛋白。经Western Blot检测显示, 抗体能够识别感染鲫鳍条细胞系GICF细胞中的鲤疱疹病毒II型, 效价较高, 特异性较好。噬菌体淘选结果通过生物信息学分析显示, 得到一条出现频次最高的多肽N'-LHLHQNRMSLSR-C'。该多肽与金鱼基因组中的3个基因有较高的同源性, 推断其可能与rORF66重组蛋白相互作用。这将为深入探究ORF66在CyHV-2病毒感染过程中的生物学功能、开发抗CyHV-2病毒新药物及寻找潜在的药物靶点提供新依据。

关键词: 鲤疱疹病毒II型; ORF66截短蛋白; 原核表达; 多克隆抗体; 噬菌体展示

中图分类号: S941.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2023)05-0796-07



鲫(*Carassius auratus*)是我国重要的淡水养殖品种之一。鲫养殖范围广、养殖成本低, 市场价格相对较高, 且营养价值丰富, 深受养殖者与消费者欢迎。随着水产养殖业的不断发展及养殖规模的壮大, 鲫的病害问题日益突出。由鲤疱疹病毒II型(Cyprinid herpesvirus 2, CyHV-2)引起的疱疹病毒性造血器官坏死症(Herpseviral haematopoietic necrosis, HVHN)是近年鲫的主要病害之一, 其严重威胁着鲫养殖业的健康发展^[1]。CyHV-2与鲤疱疹病毒I型和III型(CyHV-1和CyHV-3)都属鲤疱疹病毒科。CyHV-1对鲤(*Cyprinus carpio*)、鲫、圆腹雅罗鱼(*Leuciscus idus*)、鲤与金鱼(*Carassius auratus auratus*)杂交种等均有危害, 但与另外两种病毒相比其危害性更小^[2]。CyHV-3对鲤科鱼类及其杂交种都具有危害性, 金鱼通常为CyHV-3潜在携带者^[2]。而CyHV-2相比于CyHV-1和CyHV-3对宿主的选择则相对较少, 仅有鲫、金鱼及其普通变种可被此病毒感染, 目前尚无其他鱼种及物种感染发病的报道^[3]。

CyHV-2为全长约290304 bp的线性双链DNA

病毒, 呈24面体衣壳状, 直径约为110—120 nm; 具有囊膜的CyHV-2粒子直径约为175—200 nm^[4]。目前已公开发表的CyHV-2全基因序列有7株^[5]。李莉娟等^[6]通过测序发现, CyHV-2中国株SY-C1全长289365 bp, 含有约150个开放阅读框, 与日本株ST-J1相比具有98.8%的序列同源性。CyHV-2 ORFs中仅有ORF72、ORF78和ORF79等的功能得到验证^[1, 7-10]。高娃等^[4, 11]鉴定出CyHV-2的8种免疫原性蛋白, 即ORF92、ORF115、ORF25、ORF57、ORF66、ORF72、ORF131和ORF132, 其中ORF66、ORF72和ORF92为衣壳蛋白, ORF66更是首次被报道的具有免疫原性的衣壳蛋白。目前已有学者利用ORF92、ORF72和ORF66编码的衣壳蛋白制备的单克隆抗体进行免疫学检测方法的研究, 但尚未见ORF66在CyHV-2感染过程中的生物学功能相关的报道^[12-14]。衣壳蛋白具有较好的免疫原性, 可以诱发机体产生特异性免疫^[15], 因此探究ORF66在CyHV-2病毒感染过程中的生物学功能具有重大意义。

噬菌体展示技术(Phage Display Technique, PDT)

收稿日期: 2022-06-30; 修订日期: 2022-07-27

基金项目: 国家现代农业产业技术体系项目(CARS-45-16)资助 [Supported by the Earmarked Fund for CARS (CARS-45-16)]

作者简介: 张小米(1996—), 女, 硕士; 主要从事分子病毒学方向研究。E-mail: M200100255@st.shou.edu.cn

通信作者: 吕利群, E-mail: lqlv@shou.edu.cn

由 Smith GP 在 20 世纪 80 年代首次提出^[16, 17], 因其快速方便在免疫学等领域得到广泛应用。其原理是利用基因重组技术将外源性编码多肽或蛋白的 DNA 序列(基因)剪接到编码噬菌体衣壳蛋白的基因中, 使外源氨基酸序列的遗传信息融合到衣壳蛋白的内源氨基酸上, 形成“杂交”融合蛋白展示于噬菌体的表面^[18]。再通过蛋白质之间的相互作用进行 3—5 轮的生物淘洗, 即可迅速高效地筛选出具有相互作用的目的蛋白或多肽^[19]。病毒病的危害促使了更多抗体类、多肽类抗病毒药物的研发, 噬菌体展示技术也顺势成为当下筛选抗病毒药物最流行的技术之一^[20, 21]。有研究利用噬菌体展示技术筛选出了 4 个与猪呼吸与生殖免疫综合征病毒具有较高亲和力的多肽, 并且鉴定出这 4 个多肽为抗病毒药物的潜在靶点^[22]。万偲佳等^[23]通过噬菌体展示技术成功筛选出与草鱼呼肠孤病毒 NS31 蛋白互作蛋白。

本实验对 ORF66 截短基因进行原核表达, 构建原核表达载体 pET-28a-tORF66, 在 小鼠中制备截短蛋白的多克隆抗体, 同时通过噬菌体展示技术筛选与 rORF66 蛋白相互作用的多肽, 以期对 CyHV-2 ORF66 编码蛋白生物学功能研究和 CyHV-2 鉴定与防治手段的开发提供新的技术参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

CyHV-2 毒株由本实验室分离并保存; 鲫鳍条细胞系(GICF)^[23]由本实验室构建并保存; M199 培养液购于吉诺生物技术有限公司; 血清购于武汉普诺赛生物; 限制性核酸内切酶、DH5 α 、BL21 购买于北京全式金生物技术有限公司; T4 连接酶、Pyrobest DNA Polymerase、PrimeSTAR Max DNA Polymerase 购于 TaKaRa 公司; Seamless Cloning Kit 购自碧云天(Beyotime Biotechnology)公司; pET-28a(+) 等原核表达质粒、Ph. D. -12TM Phage 噬菌体展示试剂盒由本实验室保存; PF 级 6 周龄 BALB/c 小鼠购自上海市实验动物研究中心。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制剂等分别购自天根生化科技(北京)有限公司、Sigma-Aldrich 公司、Promega 公司、Bio-Rad 公司和 Thermo 公司。

1.2 rORF66 基因的扩增

利用生物信息学软件 DNA star 对 ORF66 编码蛋白的抗原表位进行分析预测, 筛选出具有丰富抗原表位的 232—335aa 区域作为目的截短蛋白。根据 CyHV-2 ORF66 (GenBank: AKC02013.1) 基因序

列设计 ORF66 基因扩增引物(F: 5'-ATGGGTCGCG GATCCGAATTCCGAGGAAGTCTCACCAAA CTC-3'; R: 5'-TTGTCGACGGAGCTCGAATTCTTG AGATTCGATTCGTTTCGT-3')。采用病毒 DNA 提取试剂盒从已纯化的 CyHV-2 病毒中提取 DNA, 作为基因模板进行扩增 ORF66 基因。扩增后的 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 切胶回收采用 DNA 纯化试剂盒进行纯化。

1.3 rORF66 基因原核表达质粒的构建

参照全式金限制性核酸内切酶说明书, 将原核表达质粒 pET-28a(+) 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴中酶切反应 1h, 将酶切产物用 1.2 中的方法进行纯化回收。参照碧云天公司 Seamless Cloning 连接酶反应体系将酶切后的 pET-28a(+) 质粒与纯化后的 ORF66 基因产物进行连接反应 50 $^{\circ}\text{C}$ 、15min。随后将上述产物转化至 DH5 α 感受态细胞中, 通过 LB 平板(含 Kana+) 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养, 长出菌落后进行筛选, 以此得到阳性克隆菌落, 随后使用质粒抽提试剂盒, 将提取产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.4 rORF66 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 ORF66 原核表达重组质粒按照感受态说明书转化至 BL21(DE3) 中, 加入终浓度为 0.5 mmol/L IPTG 低温诱导, 置于离心机 8500 r/min 离心 20min, 收集细菌沉淀进行超声破碎至菌液透明, 4 $^{\circ}\text{C}$ 12000 r/min 离心 30min, 取沉淀和上清制样进行 SDS-PAGE 检测。

1.5 目的蛋白的纯化

将菌液沉淀用 2 mol/L 的尿素经 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床洗涤杂蛋白 30min, 加入 PMSF(1:1000) 后 4 $^{\circ}\text{C}$ 、8500 r/min 离心 30min, 收集沉淀按上述方法增加浓度依次用 4、6 和 8 mol/L 的尿素洗涤。收集洗脱物置于透析袋中, 依次用含降浓度梯度的透析液进行透析, 每个浓度透析至少 6h, 透析结束后经 PEG20000 进行浓缩后收集液体, 将收集的蛋白经 SDS-PAGE 和 Western Blot 分析。样品保存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.6 rORF66 多克隆抗体的制备

参照余琳等^[24]方法进行 rORF66 多克隆抗体的制备。将纯化后的 ORF66 重组蛋白与佐剂按 1:1 混匀乳化, 形成油包膜状态, 随后按 100 ng/只进行空腹注射进行免疫小鼠。第 1 次免疫: 混合抗原与弗氏完全佐剂空腹注射。第 2 次免疫: 抗原与弗氏不完全佐剂 1:1 混合后注射, 于第 1 次免疫两周后进行。第 3 次免疫: 距离上次免疫 1 周后进行抗原免疫。第 4 次免疫: 在 1 周后进行纯抗原免疫。免疫结束 1 周后眼球取血收集血清检测多克隆抗体效价。血清保存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.7 rORF66多克隆抗体特异性分析

GICF感染CyHV-2病毒,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、未诱导大肠杆菌沉淀样、诱导细菌沉淀样、尿素纯化后的rORF66蛋白样品进行Western Blot检测。蛋白样品进行SDS-PAGE电泳,通过半干转法(2.5 A, 25 V, 4min)转至PVDF膜,使用含5%牛奶的封闭液封闭1h。制备多克隆抗体稀释液(稀释比例1:5000)作为一抗4℃过夜孵育;次日以PBST摇床震荡漂洗6次,每次6min,清除多余抗体;以HRP标记的羊抗室温孵育2h;孵育后洗膜8次,每次6min。随后将PVDF膜进行显色30s,利用天能ECL胶成像系统进行观察。

1.8 多克隆抗体效价分析

以MOI=10的CyHV-2病毒感染GICF细胞,接毒6d,刮下细胞,800 r/min离心10min,除去上清液按比例加入适量蛋白上样缓冲液。如1.7所述进行Western Blot检测。将多克隆抗体分别稀释2500、5000、10000、20000和50000倍,其余步骤与1.7相同。

1.9 ORF66在CyHV-2感染过程中蛋白质水平变化的检测

以MOI=10的CyHV-2病毒感染GICF细胞,28℃孵育3h,换含有10%(*W:V*)胎牛血清的M199培养基,分别在CyHV-2感染GICF细胞0、24h、48h、72h、96h、120h和144h取细胞蛋白样品(步骤同1.8),利用实验制备的鼠抗rORF66多克隆抗体和商品化内参抗体兔抗 β -actin单抗进行Western Blot检测。

1.10 ORF66在CyHV-2感染过程中mRNA水平变化的检测

感染及取样步骤同1.9,使用TRIzol试剂从感染CyHV-2的GICF细胞中提取总RNA;逆转录获得cDNA -20℃保存。使用CFX96实时荧光定量PCR仪(美国伯乐)检测目的基因ORF66。RT-qPCR所使用试剂为TB Green[®] Premix Ex Taq[™] II (Tli RNaseH Plus)。设计ORF66基因RT-qPCR扩增引物(F: 5'-GATTCGGGCATCAGAAACGC-3'; R: 5'-GCCCATCACGTAGTAGGCTC-3'), β -actin内参基因RT-qPCR扩增引物(F: 5'-CCATCTCCTGCTCGAAGTC-3'; R: 5'-CACTGTGCCCATCTACGAG-3')。根据试剂制造商说明书设置扩增程序:95℃ 30s,95℃ 5s,60℃ 30s 40个循环,95℃ 10s,65℃ 5s。相对定量结果使用2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法分析。

1.11 ORF66重组蛋白噬菌体文库的淘选

取100 μ L终浓度为100 μ g/mL ORF66蛋白溶液加入到事先预冷的96孔板中,对照孔中加入100 μ L缓冲液,调节pH为8.6,在增湿环境中4℃轻微晃动过夜,除去包被液后加入封阻液,4℃至少作用1h,

除尽封阻液后迅速加入TBST充分洗板6—8次。将96孔板加入噬菌体文库进行包被,于室温缓慢晃动1h,倒尽孔板中液体,向孔中快速加入TBST旋转式清洗孔板,除尽孔中液体,重复动作洗涤10次,向孔板中加入100 μ L洗脱液竞争洗脱下已结合的噬菌体。参照说明书将洗脱下来的洗脱物加入到ER2738培养物中,37℃ 180 r/min恒温摇床培养4.5h使其进行扩增4℃ 10000 r/min离心10min重复离心,上清液加入PEG/NaCl 4℃放置12h,10000 r/min离心5min去除上清,加入1 mL TBS溶解,重复上述沉淀方法,最后将沉淀溶于200 μ L TBS,即为第一轮筛选后所得扩增洗脱物。相同步骤筛选第二轮、第三轮。第三轮完成后挑选20个噬菌斑进行测序。

2 结果

2.1 ORF66表达质粒的构建

提取CyHV-2病毒DNA为模板,针对CyHV-2 ORF66蛋白第232—335aa区域的氨基酸编码基因设计扩增引物,扩增后进行电泳得到一条约342 bp条带,与预期大小相同。将目的条带回收、酶切后连接至pET-28a(+)载体获得重组质粒,测序结果正确,ORF66表达质粒构建成功。

2.2 目的蛋白rORF66的诱导表达及其可溶性分析

重组质粒转化至BL21(DE3)中,经诱导表达后超声破碎取样,分析上清液和沉淀中ORF66蛋白表达情况。SDS-PAGE结果显示,相较于诱导前细菌沉淀、诱导后细菌沉淀以及超声破碎后上清液,超声破碎后的沉淀中有一蛋白在17 kD处大量表达,与ORF66截短蛋白(约为12 kD)融合6 \times His标签(5 kD)后理论大小17 kD相同。该结果表明本实验获得的rORF66重组蛋白大量存在于包涵体中。

2.3 重组蛋白rORF66的纯化

将超声破碎后的沉淀经不同浓度的尿素进行溶解依次来分析ORF66重组蛋白的纯化情况,SDS-PAGE结果显示(图1)包涵体经高浓度尿素溶解后,大量的rORF66溶于尿素中,其中含有少量的杂蛋白。

2.4 多克隆抗体的特异性分析

以rORF66多克隆抗体作为一抗进行Western Blot,依照结果显示,尿素纯化的样品泳道中,一条特异性条带位于约17 kD大小处,与rORF66基因编码的重组蛋白大小基本一致(图2),未诱导细菌总蛋白有微量蛋白表达,经超声破碎后的细菌沉淀样品泳道中有大量的杂带;感染CyHV-2后的GICF样品泳道中,显示出一条特异性条带,其位置大约在45 kD处,与CyHV-2 ORF66基因编码蛋白的大小基本一致(图3),对照组中未感染病毒细胞未出现条

带, 表明制备的多克隆抗体具有较好的特异性。

2.5 多克隆抗体效价分析

以 CyHV-2 病毒感染的 GICF 总蛋白为材料, 将制备好的鼠抗 ORF66 多克隆抗体作为一抗孵育, HRP 标记的兔抗鼠 IgG 为二抗, 经 Western Blot 检测该多抗效价, 结果显示该 rORF66 蛋白多抗效价大于 1:50000 (图 4)。

2.6 ORF66 在 CyHV-2 感染过程中蛋白水平变化的检测

将制备的细胞蛋白样品进行 Western Blot 检测,

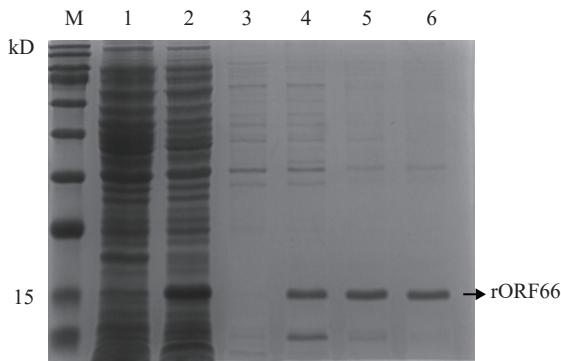


图 1 纯化产物的 SDS-PAGE 分析
Fig. 1 SDS-PAGE of purified rORF66

M. 蛋白质 Marker; 1. 诱导前细菌沉淀; 2. 诱导细菌超声破碎后的沉淀; 3. 2 mol/L 尿素纯化的沉淀; 4. 4 mol/L 尿素纯化的沉淀; 5. 6 mol/L 尿素纯化的沉淀; 6. 8 mol/L 尿素纯化的沉淀

M. protein marker; 1. bacterial precipitation prior to induction; 2. sedimentation of induced bacteria after ultrasonic fragmentation; 3. precipitation purified from 2 mol/L urea; 4. precipitation purified from 4 mol/L urea; 5. precipitation purified from 6 mol/L urea; 6. precipitation purified from 8 mol/L urea

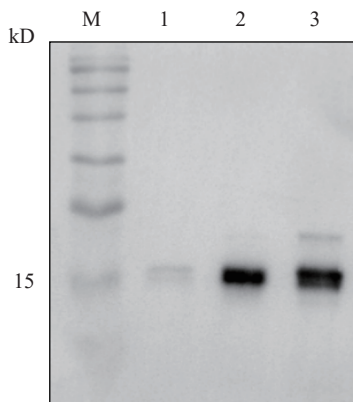


图 2 细菌沉淀与纯化 His-ORF66 的免疫印迹分析

Fig. 2 Western Blot analysis of bacteria and His-ORF66 with anti-His monoclonal antibody

M. Marker; 1. 未诱导细菌沉淀; 2. 8 mol/L 尿素纯化的沉淀; 3. 诱导细菌超声破碎后的沉淀

M. protein marker; 1. precipitate of uninduced bacteria; 2. purified sample from precipitate by 8 mol/L urea; 3. precipitate of induced bacteria

结果显示在 CyHV-2 感染 GICF 后 72h ORF66 表达量逐渐提高 (图 5)。

2.7 ORF66 在 CyHV-2 感染过程中 mRNA 水平变化的检测

将制备的细胞样品提取 RNA 后经 RT-qPCR 分析, 结果显示 ORF66 基因在感染 72h 后明显扩增 (图 6),

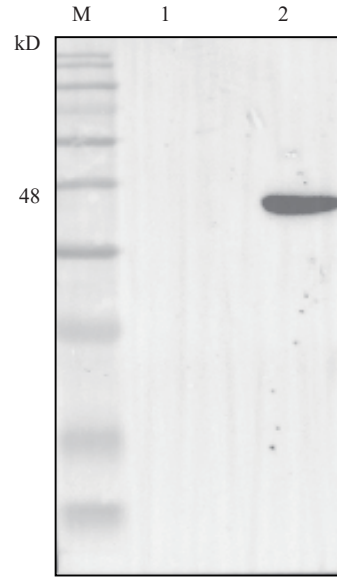


图 3 Western Blot 检测病毒蛋白
Fig. 3 Western Blot detection of ORF66

M. Marker; 1. 健康的 GICF 细胞; 2. 感染病毒的 GICF 细胞
M. protein marker; 1. healthy GICF cells; 2. infected GICF cells

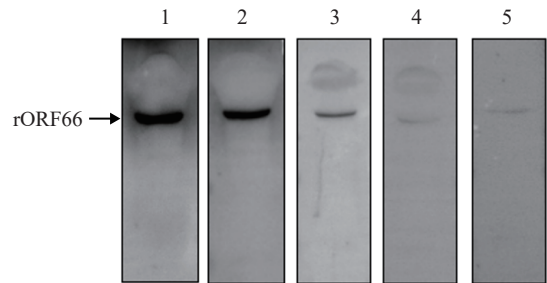


图 4 多抗效价检测

Fig. 4 Determination of the titers of the serum antibody
稀释比例: 1. 1:2500; 2. 1:5000; 3. 1:10000; 4. 1:20000; 5. 1:50000
Dilution ratios: 1. 1:2500; 2. 1:5000; 3. 1:10000; 4. 1:20000; 5. 1:50000

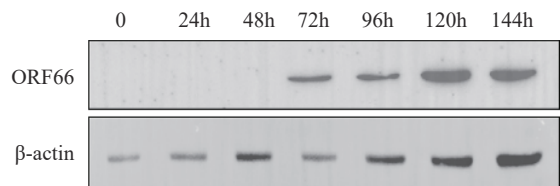


图 5 ORF66 在 CyHV-2 感染过程中的动力学表达学
Fig. 5 Expression dynamics of ORF66 during CyHV-2 infection

与其在翻译水平趋势基本一致。

2.8 噬菌体筛选滴度分析及互作多肽的鉴定

将每轮筛选的噬菌体空板进行可视化计数观察后(图7),再参照Ph.D.-12™ Phage噬菌体展示试剂盒说明书对每一次筛选前后进行滴度测定,总体来看三轮筛选后的结果与筛选轮数以正相关的趋势上升,此结果说明筛选结果良好(表1)。在最后一轮筛选结束后,随机挑选20个噬菌斑通过DNA序列测定得到筛选后序列结果。将测序结果对比Ph.D.-12™ Phage噬菌体展示试剂盒说明书翻译成氨基酸序列,通过APE软件分析,由此筛选出一条与ORF66重组蛋白相互作用的蛋白序列,判断该多肽序列N'-LHLHQNRMSLSR-C'与rORF66具有较强的亲和力。从NCBI金鱼蛋白文库进行氨基酸序列比对,预测与白三稀B₄受体1(Leukotriene B₄ receptor 1-like)、通用转录因子3C多肽2样亚型X1(General transcription factor 3C polypeptide 2-like isoform X1)以及镰尾蛋白同源异构体X1(Sickle tail protein homolog isoform X1)3个金鱼相关基因互作,其中与宿主白三稀B₄受体1有连续6个氨基酸重复,与一般转录因子3C多肽2样亚型X1有连续5个氨基酸重复,

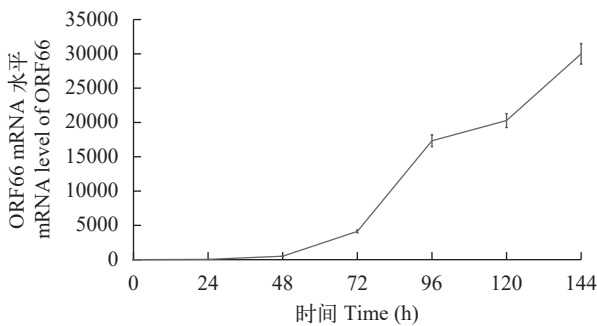


图6 ORF66在CyHV-2感染过程中的动力表达学

Fig. 6 Transcription dynamics of ORF66 during CyHV-2 infection

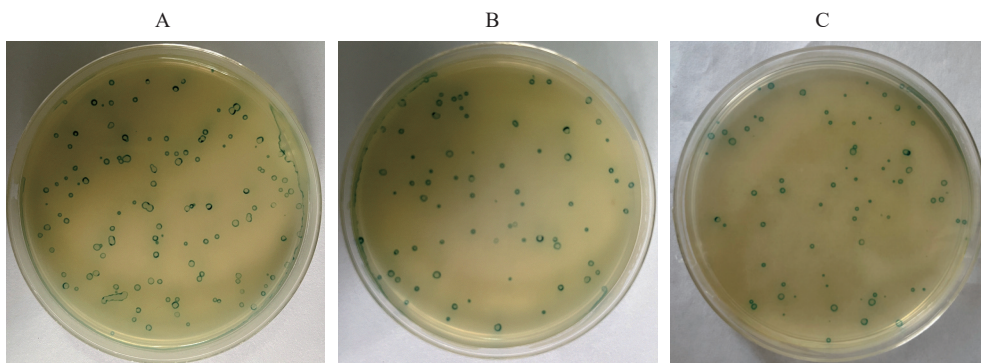


图7 噬菌体空斑计数板

Fig. 7 Phage plaque plate

A. 第一轮筛选; B. 第二轮筛选; C. 第三轮筛选

A. the first screening round; B. the second screening round; C. the third screening round.

与镰尾蛋白同源异构体X1有4个连续氨基酸重复,因此预测rORF66重组蛋白可能与上述多肽互作。

3 讨论

目前已有7株CyHV-2毒株完成了全基因组序列的测定,但学者对其中预测的开放阅读框编码蛋白功能的研究却较少^[25]。病毒存在较大的变异性,在自然环境中病毒随时可能发生变化,这对病毒病的相关研究造成一定阻碍,而了解CyHV-2各开放阅读框可能编码蛋白的功能,将会为CyHV-2感染机制的研究提供新的依据,同时对开发疱疹病毒性造血器官坏死症防控手段提供技术支撑。

本实验通过生物信息技术将ORF66编码蛋白进行分析,构建出表达质粒,经原核表达尿素纯化后腹腔注射小鼠,以此成功制备出抗CyHV-2 ORF66截短基因编码蛋白的多克隆抗体,抗体效价较高且特异性好。将该多抗与感染CyHV-2出现CPE(Cytopathic effect)的GICF细胞的总蛋白进行免疫印迹检测,发现抗体能与病毒特异性结合,由此表明该多抗可用于CyHV-2的免疫诊断。利用该抗体本实验探究了CyHV-2感染GICF细胞后ORF66编码蛋白在mRNA水平的变化趋势,ORF66编码蛋白在感染120h后才开始随着感染进程大量表达,结果与其在蛋白质水平的变化趋势基本一致,该结果显示ORF66编码蛋白后期的大量表达主要用于病毒粒子的装配。

有研究预测ORF66编码蛋白为CyHV-2衣壳三联体亚基1(Capsid triplex subunits 1),对被感染生物体而言该蛋白是一种特定的病毒抗原,能够刺激机体产生免疫反应^[11, 12]。通过序列对比发现,鲤疱疹病毒不同型病毒的ORF66基因序列同源性较低,造成其编码的蛋白与其同源蛋白在结构上的差异,这一特点或与CyHV-2病毒特殊的生物学特征有关

表 1 噬菌体展示回收率

Tab. 1 Phage display recovery rate

噬菌体库 Phage library	淘选组别 Panning	投入量 Input amount (PFU)	回收量 Recovery amount (PFU)	回收率 Recovery rate (PFU)
12肽 12 peptides	1	4.22×10^{10}	2.13×10^4	0.51×10^{-6}
	2	3×10^{10}	0.67×10^4	0.22×10^{-6}
	3	2×10^{10}	1.33×10^5	0.67×10^{-5}

联,这也导致了CyHV-2在感染谱上的独特性。

病毒的衣壳蛋白可作为筛选抗病毒药物及病毒疫苗的候选蛋白。基于ORF66编码蛋白具有较好的免疫原性,本实验利用噬菌体展示技术对纯化后的rORF66重组蛋白进行生物淘选,通过分析比对推测出一条可能与rORF66相互作用的多肽序列。使用NCBI进行BLAST信息比对,发现有3个金鱼基因与该条多肽有多个相互作用的多肽位点,其中白三稀B₄受体1(BLT1),在其他研究中被证明可能与炎症反应有关^[26]。白三稀B₄作为一种炎症介导因子,与人类的多种炎症疾病关系密切,在免疫反应中发挥着重要的作用,当宿主受到病原感染时,释放的白三稀B₄能够诱发炎症反应并加强巨噬细胞对病原体的吞噬能力^[27]。BLT1作为白三稀B₄的高亲和力受体,主要表达于白细胞表面,能够活化和介导白细胞向炎症部位迁移。有研究证明BLT1在斑马鱼早期胚胎发育、病原感染及蛋白免疫过程中也发挥了重要的作用^[28]。综上所述,BLT1可能在CyHV-2病毒侵染宿主的过程中也发挥了作用,BLT1与ORF66编码蛋白的互作关系可能为ORF66编码蛋白生物学功能及其致病机制的研究奠定基础,为开发抗CyHV-2病毒的新型药物及预测宿主抗病毒药物的作用靶点提供帮助。

参考文献:

- [1] Yuan R, Chen J, Liu X M, *et al.* A review: research progress on cyprinid herpesvirus 2 [J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2019, **32**(1): 38-45. [袁锐, 陈静, 刘训猛, 等. 鲤疱疹病毒2型研究进展 [J]. *水产学杂志*, 2019, **32**(1): 38-45.]
- [2] Tian F Y, He J Q, Wang L, *et al.* Research progress of herpes virus hematopoietic necrosis in goldfish [J]. *China Animal Health Inspection*, 2012, **29**(4): 78-80. [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] Luo D, Liang L G, Xie J, *et al.* Research progress of cyprinid herpesvirus I, II, III [J]. *Journal of Hydroecology*, 2014, **35**(3): 94-100. [罗丹, 梁利国, 谢骏, 等. 鲤疱疹病毒 I、II、III型研究进展 [J]. *水生态学杂志*, 2014, **35**(3): 94-100.]
- [4] Gao W, Wen H, Wang H, *et al.* Identification of major immunogenic proteins from cyprinid herpesvirus 2 [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2020, **44**(9): 1441-1447. [高娃, 温虹, 王浩, 等. 鲤疱疹病毒 II 型主要免疫原性蛋白的鉴定 [J]. *水产学报*, 2020, **44**(9): 1441-1447.]
- [5] Tang R, Lu L, Wang B, *et al.* Identification of the immediate-early genes of cyprinid herpesvirus 2 [J]. *Viruses*, 2020, **12**(9): 994.
- [6] Li L J, Luo Y Z, Liu X Q, *et al.* Molecular surveillance of cyprinid herpesvirus 2 in goldfish cultured in China [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2013, **32**(1): 92-96. [李莉娟, 罗杨志, 刘学芹, 等. 金鱼鲤疱疹病毒 II 型的分子诊断 [J]. *华中农业大学学报*, 2013, **32**(1): 92-96.]
- [7] 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.
- [8] Li L, Luo Y, Gao Z, *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.
- [9] Du M, Chen M, Shen H, *et al.* CyHV-2 ORF104 activates the p38 MAPK pathway [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, **46**(2): 268-273.
- [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] Gao W, Wen H, Wang H, *et al.* Identification of structure proteins of cyprinid herpesvirus 2 [J]. *Aquaculture*, 2020(523): 735184.
- [12] Guo B, Wei C, Luan L, *et al.* Production and application of monoclonal antibodies against ORF66 of cyprinid herpesvirus 2 [J]. *Journal of Virological Methods*, 2022(299): 114342.
- [13] 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.
- [14] Shen Z, Jiang Y, Lu J, *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.
- [15] Preena P G, Kumar T V A, Johny T K, *et al.* Quick hassle-free detection of cyprinid herpesvirus 2 (CyHV-2) in goldfish using recombinase polymerase amplification-lateral flow dipstick (RPA-LFD) assay [J]. *Aquaculture International*, 2022, **30**(3): 1211-1220.
- [16] Xu S Q, He Z H, Tao B Z, *et al.* Phage display technology and its application in antivirals discovery [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2022, **57**(7): 1937-1945. [许世琦, 贺子涵, 陶炳灼, 等. 噬菌体展示技术及其在抗病毒药物发现中的应用 [J]. *药学报*, 2022, **57**(7): 1937-1945.]
- [17] Delhalle S, Schmit J C, Chevigné A. Phages and HIV-1: from display to interplay [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2012, **13**(4): 4727-4794.

- [18] Xu P, Ghosh S, Gul A R, *et al.* Screening of specific binding peptides using phage-display techniques and their biosensing applications [J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2021(137): 116229.
- [19] Jaroszewicz W, Morcinek-Orłowska J, Pierzynowska K, *et al.* Phage display and other peptide display technologies [J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2021, **46**(2): fuab052.
- [20] Mimmi S, Maisano D, Quinto I, *et al.* Phage display: an overview in context to drug discovery [J]. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2019, **40**(2): 87-91.
- [21] Sokullu E, Gauthier M S, Coulombe B. Discovery of antivirals using phage display [J]. *Viruses*, 2021, **13**(6): 1120.
- [22] Zhou J, Hu J, Shi Z, *et al.* Phage display library based antiviral screening: porcine respiratory and reproductive syndrome virus endoribonuclease is a target for antiviral screening [J]. *Research Journal of Biotechnology*, 2017, **12**(1): 70-77.
- [23] Lu J, Xu D, Lu L. 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.
- [24] Yu L, Lü L Q, Wang H. Preparation and characterization of polyclonal antibody against cyprinid herpesvirus 2 ORF121 [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2019, **43**(6): 1463-1471. [余琳, 吕利群, 王浩. II型鲤疱疹病毒ORF121蛋白的多克隆抗体制备及鉴定 [J]. 水产学报, 2019, **43**(6): 1463-1471.]
- [25] Thangaraj R S, Nithianantham S R, Dharmaratnam A, *et al.* Cyprinid herpesvirus-2 (CyHV-2): a comprehensive review [J]. *Reviews in Aquaculture*, 2021, **13**(2): 796-821.
- [26] Deng B, Lin Y L, Ma S, *et al.* Antagonist of leukotriene B₄ receptor 1 attenuates cisplatin induced acute kidney injury in mice and its associated mechanism [J]. *Chinese Journal of Nephrology*, 2015(5): 345-350. [邓博, 林玉丽, 马帅, 等. 白三烯B₄受体1拮抗剂对顺铂致小鼠急性肾损伤的保护作用及机制研究 [J]. 中华肾脏病杂志, 2015(5): 345-350.]
- [27] Li X J, Wang J F, Zhang Y, *et al.* Effects of U75302, blocker of leukotriene B₄ receptor 1, on cellular immunity and inflammation in septic mice [J]. *Academic Journal of Second Military Medical University*, 2014, **35**(3): 246-250. [李秀娟, 王嘉锋, 张燕, 等. 白三烯B₄受体1拮抗剂U75302对脓毒症小鼠细胞免疫与炎症反应的影响 [J]. 第二军医大学学报, 2014, **35**(3): 246-250.]
- [28] Tang Y F. Molecular cloning and characterization of zebrafish leukotriene B₄ receptor [D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2016: 11-13. [唐宇飞. 斑马鱼白三烯B₄受体基因的克隆和功能鉴定 [D]. 上海: 华东理工大学, 2016: 11-13]

PREPARATION OF POLYCLONAL ANTIBODIES TO CYHV-2 ORF66 TRUNCATED PROTEIN AND SCREENING OF INTERCALATING PEPTIDES

ZHANG Xiao-Mi¹, QUE Shun-Zheng¹, LONG Chen¹, WANG Hao² and LÜ Li-Qun¹

(1. National Pathogen Collection Center for Aquatic Animals, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Cyprinid herpesvirus 2 (CyHV-2) causes herpesviral haematopoietic necrosis, which is a serious threat to the health of the crucian carp farming industry. ORF66 is an immunogenic capsid protein of CyHV-2. To investigate the biological function of cyprinid herpesvirus 2 during infection, a prokaryotic expression plasmid pET28a-tORF66 with ORF66 truncated gene was constructed based on a region with abundant antigenic table, transformed into BL21 receptor cells and then induced to express the protein using IPTG (Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside) at 16°C. The lysed recombinant protein was obtained by urea lysis dialysis and then immunized in 6-week-old mice to prepare a murine anti-tORF66 polyclonal antibody. The solubilised recombinant proteins were screened for intercalating peptides by phage display techniques. The Western Blot assay showed that the antibody was able to recognize CyHV-2 in infected GICF cells with high potency and good specificity. The results of the phage elution showed by bioinformatics analysis that a peptide with the highest frequency of occurrence, N'-LHLHQNRMSLSR-C', was obtained. The polypeptide has high homology with three genes in the goldfish genome, including the leukotriene B₄ receptor 1 (BLT1) gene, which has six consecutive amino acid repeats with the polypeptide, so it is inferred that the polypeptide may interact with the rORF66 recombinant protein. This will provide a new basis for an in-depth investigation of the biological function of ORF66 during CyHV-2 virus infection, the development of new anti-CyHV-2 virus drugs and the search for potential drug targets.

Key words: CyHV-2; ORF66 truncated protein; Polyclonal antibody; Prokaryotic expression; Phage display