

# 锦鲤疱疹病毒 - CJ 株 ORF136 基因的原核表达及免疫原性研究

王好<sup>1</sup>,周井祥<sup>1\*</sup>,王秋举<sup>1</sup>,吕文亮<sup>1</sup>,张亚斌<sup>2</sup>,郑伟<sup>2</sup>

(1 吉林农业大学,长春 130118; 2 吉林省水产科学研究院,长春 130033)

[收稿日期]2013-06-21 [文献标识码]A [文章编号]1002-1280(2013)09-0006-04 [中图分类号]S852.659

**[摘要]** 为了研究能有效预防锦鲤疱疹病毒(KHV)的疫苗,以 KHV-CJ 株为模板克隆了锦鲤疱疹病毒 ORF136 基因,并构建重组质粒 PET32a-ORF136,用 IPTG 诱导表达,SDS-PAGE 检测获得含 his 标签大小为 36.4 kDa 的蛋白条带。蛋白纯化后免疫鲤鱼,不同天数采血收集血清用间接 ELISA 检测抗体水平。结果显示:用 10、20 和 40 μg/尾的蛋白免疫后均可检测到 KHV 抗体,用 PET32a-ORF136 表达的蛋白 20 和 40 μg/尾的蛋白免疫后的抗体水平比 10 μg/尾剂量蛋白免疫后的抗体水平高但差异不显著( $P>0.05$ )。

**[关键词]** 锦鲤疱疹病毒;ORF136 基因;原核表达;免疫原性

## Immunity Test Research and Prokaryotic Expression of ORF136 Gene of Koi Herpesvirus - CJ Strain

WANG Hao<sup>1</sup>, ZHOU Jing-xiang<sup>1\*</sup>, WANG Qiu-ju<sup>1</sup>, LV Wen-liang<sup>1</sup>, ZHANG Ya-bin<sup>2</sup>, ZHENG Wei<sup>2</sup>

(1. Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 2. Jilin Academy of Fishery Sciences, Changchun 130033, China)

**Abstract:** To study a vaccine which can be used to effectively prevent koi herpes virus, koi herpes virus ORF136 gene was selected, the recombinant plasmid PET32a-ORF136 was induced by IPTG, SDS-PAGE detection of the protein indicate the size of 36.4 kDa bands(contains his tags). Purified protein immuned carps, and serum was collected in different days, antibodies level of serum were determined by indirect ELISA. The results show that health koi can induce the production of KHV antibodies after immune proteins at 10, 20 and 40 μg/fish were intramuscular injected into health kois, respectively. The antibody levels of the group of 20 μg/fish and the group of 40 μg/fish were higher than the group of 10 μg/fish, and the differences were not significant ( $P>0.05$ ).

**Key words:** koi herpes virus; ORF136 gene; prokaryotic expression; immunogenicity

锦鲤疱疹病毒病(koi herpesvirus disease, KHVD)是由锦鲤疱疹病毒(koi herpesvirus, KHV)引起的一种高致病性和高死亡率的病毒性疾病。该病主要发生在温度为 18~28℃ 的春秋季节,在夏冬季很少发病或不发病。成鱼对该病易感且死亡率较

高<sup>[1-3]</sup>。1998 年 KHVD 在以色列和美国爆发并进行了报道,这是对该病的首次报道<sup>[4]</sup>。随后该病在全球蔓延开来,英国于 2000 年<sup>[5]</sup>,印尼于 2002 年,南非于 2003 年和日本于 2003 年 10 月相继报道了 KHVD 的发生<sup>[6]</sup>。2002 年在我国的广东省锦鲤也

基金项目:长春市科学技术局先进实用技术的示范推广项目(12XN35)

作者简介:王好,从事动物病毒分子生物学研究。

通讯作者:周井祥。Email:zhjxnd@126.com

确定发生了 KHVD<sup>[7]</sup>,同年10月台湾省也报道了该病的发生<sup>[8]</sup>。由于该病的广泛流行及其高致病性和高死亡率,OIE已经将其列为必报项目。我国也于2007年将其列为必检项目,并要求加强对进出口鲤鱼和锦鲤的检疫。

KHV是鱼类最大的疱疹病毒<sup>[9]</sup>,其基因组大小为295 kbp,直径为100~110 nm。KHV具有156个开放阅读框(ORF),但只有少数确定了其功能。ORF136为囊膜蛋白基因<sup>[10]</sup>,对该基因的克隆与表达方面的研究内容国内外未见报道。本研究以本实验室分离保存的KHV吉林株(KHV-CJ株)为模板,克隆囊膜蛋白基因ORF136,构建原核表达载体并进行表达,并验证表达蛋白的免疫原性,旨在为研制相应的疫苗奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 毒株 KHV-CJ株由吉林农业大学重点实验室分离保存<sup>[11]</sup>;兔抗鱼二抗为实验室自制;500~600 g健康鲤鱼,购自未发生过KHV的长春某渔场,抽检部分鱼,经PCR检测KHV阴性。

1.1.2 载体与菌株 PMD18-T,大连宝生物工程有限公司,E. coli DH5 $\alpha$ ,北京金全生物技术有限公司。PET-32a为本实验室保存。

1.1.3 主要试剂 新生牛血清、M199培养基,GIBCO公司;ExTaq DNA聚合酶、限制性内切酶EcoR I和Hind III、DNA Marker,大连宝生物工程有限公司;DNA胶回收试剂盒,天根生化有限公司。镍离子金属螯合亲和层析介质(Ni-NTA),上海锐谷生物科技有限公司。其它试剂均为国产分析纯产品。

### 1.2 方法

1.2.1 引物的设计与合成 根据Genbank登录的(GenBank: AP008984.1)锦鲤疱疹病毒ORF136基因序列用Primer primer5.0设计1对引物。上游引物P1 5'-GAATTCATGAAGGCCTCTAAACTGC-3',下游引物P2 5'-AAGCTTTTAGATTTTTCTAAAGTGCACG-3',划线部分分别为EcoR I和Hind III限制性酶切位点,送上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.2.2 ORF136基因的扩增 按照Hasegawa<sup>[12]</sup>和Neukirch<sup>[13]</sup>的方法培养锦鲤尾鳍细胞(KFC),待细胞长成单层后取实验室保存的KHV-CJ株病毒液500  $\mu$ L接种在细胞上,每日观察细胞的病变,当病

变达到70%~80%时收集细胞和上清液,用相应的方法提取病毒DNA,进行PCR的特异性扩增。用25  $\mu$ L反应体系进行扩增,反应条件如下:95  $^{\circ}$ C预变性5 min,94  $^{\circ}$ C变性30 s,58  $^{\circ}$ C复性30 s,72  $^{\circ}$ C延伸1 min,35个循环,72  $^{\circ}$ C 10 min,反应结束4  $^{\circ}$ C保存。

1.2.3 ORF136基因的克隆与鉴定 纯化回收目的基因后与pMD18-T载体4  $^{\circ}$ C过夜连接;将连接产物转化入DH5 $\alpha$ 感受态细胞中,用含1  $\mu$ g/mL氨苄青霉素的LB固体培养基筛选单菌落,提取质粒后用EcoR I和Hind III进行双酶切鉴定,命名为pMD18-T-136,阳性质粒送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

### 1.2.4 ORF136基因原核表达载体的构建及鉴定

将pMD18-T-136用EcoR I和Hind III双酶切后回收的目的片段和同样用EcoR I和Hind III双酶切后回收的PET-32a大片段,16  $^{\circ}$ C过夜连接,连接体系为:目的片段:10  $\mu$ L,PET-32a大片段:1  $\mu$ L,10倍T4Buffer:1  $\mu$ L,T4DNA连接酶:1  $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O:1  $\mu$ L,总体系为14  $\mu$ L。

将连接产物总量转化入大肠杆菌DH5 $\alpha$ 感受态细胞中,用含1  $\mu$ g/mL氨苄青霉素的LB固体培养基筛选单菌落,提取质粒分别用PCR和用EcoR I及Hind III双酶切进行鉴定,阳性质粒命名为PET32a-ORF136。

1.2.5 重组蛋白的诱导表达 将鉴定正确的阳性质粒转化入大肠杆菌BL21中,用含1  $\mu$ g/mL氨苄青霉素的LB固体培养基筛选单菌落,挑取单个菌落接种于含1  $\mu$ g/mL氨苄青霉素的LB培养基中,37  $^{\circ}$ C过夜培养后,按1%接种于新鲜的LB培养中,37  $^{\circ}$ C培养至OD<sub>600</sub>为0.6时,加入IPTG至终浓度为1 mmol/L诱导表达4 h,另一组不加IPTG作为对照组。SDS-PAGE电泳后考马斯亮蓝染色观察。

1.2.6 表达蛋白的纯化及蛋白质浓度的测定 将表达后的菌液反复冻融3次用Ni-Denature-Gu-HCl裂解表达菌,经超声破碎后利用Ni-NTA-琼脂糖凝胶层析柱进行纯化。

用分光光度计测定蛋白质的浓度,分别在OD<sub>280nm</sub>和OD<sub>260nm</sub>的光密度下测定蛋白质的浓度。

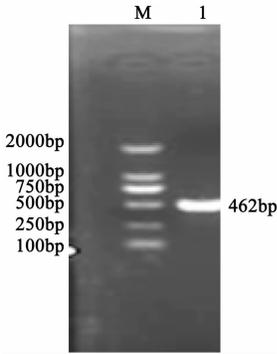
1.2.7 抗体水平检测 将纯化后的蛋白1:1加不完全佐剂,按10、20和40  $\mu$ g/mL的浓度分别免疫三组鱼,同时设置空白和生理盐水两组作为对照组,每组10条鱼。分别在免疫后4、7、10、14、18、24和28 d

采血收集血清,用间接 ELISA 检测抗体的水平<sup>[14]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 ORF136 基因的扩增

PCR 扩增出一条与目的基因大小一致的片段 (图 1)



M:DNA 分子质量标准;1:ORF136PCR 产物

图 1 KHV -CJ 株 ORF136 基因 PCR 扩增

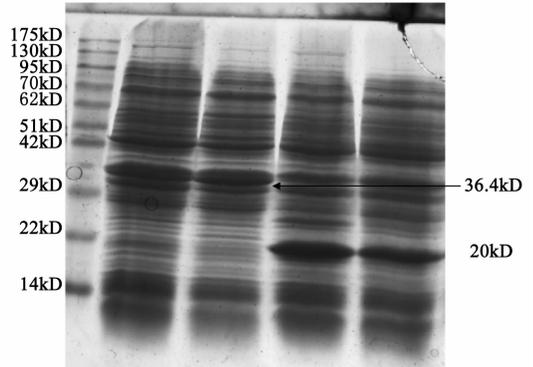
2.2 重组质粒 pMD18T - ORF136 的鉴定 PCR 扩增出一条与目的基因大小一致的片段, pMD18 - T - ORF136 用内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切后获得一条大小约为 462 bp 的片段,说明 ORF136 基因已成功连接到载体中。

### 2.3 重组质粒 PET32a - ORF136 鉴定

2.3.1 PCR 鉴定 用提取的重组质粒 PET - ORF136 作为模板进行 PCR 扩增,结果获得了长为 462 bp 的片段,与目的基因大小一致。

2.3.2 酶切鉴定 对重组质粒 PET - ORF136 用

*EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切后得到与 ORF136 大小一致的一条 462 bp 的片段和一条大于 462 bp 的片段。  
2.4 重组蛋白的表达 ORF136 表达蛋白的理论大小为 16.4 kD, PET - 32a 自带 20 kD 左右的融合蛋白,重组蛋白的总分子量约为 36.4 kD;诱导表达后经 SDS - PAGE 分析,如图 2,诱导的样品在 36 kD 有 1 条蛋白带,与理论结果相符。



M:蛋白 Marker;1:PET32a - ORF136 诱导菌总蛋白(2 h);  
2:PET32a - ORF136 诱导菌总蛋白(4 h);  
3:PET32a 诱导菌总蛋白;4:PET32a 未诱导菌总蛋白

图 2 PET32a - ORF136 表达产物的 SDS - PAGE 分析

2.5 纯化蛋白的浓度 镍柱纯化的蛋白经分光光度计测定重组质粒 PET32a - ORF126 表达蛋白的浓度为 0.416mg/mL。

2.6 抗体水平 用间接 ELISA 检测<sup>[14]</sup> 不同天数的抗体水平见表 1。

表 1 鲤鱼血清 ELISA 抗体水平检测 (OD<sub>450nm</sub>)

| 组别                  | 免疫时间/d          |                  |                |                |                |                |                |
|---------------------|-----------------|------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|                     | 4               | 7                | 10             | 14             | 18             | 24             | 28             |
| 生理盐水                | 0.1053 ± 0.0055 | 0.1230 ± 0.0013  | 0.1133 ± 0.003 | 0.1189 ± 0.001 | 0.1153 ± 0.002 | 0.1148 ± 0.003 | 0.1195 ± 0.001 |
| 空白                  | 0.1076 ± 0.0053 | 0.09368 ± 0.0011 | 0.1044 ± 0.009 | 0.1156 ± 0.006 | 0.1131 ± 0.005 | 0.0944 ± 0.001 | 0.1126 ± 0.005 |
| PET32a - 136(10 μg) | 0.1278 ± 0.0065 | 0.2423 ± 0.036   | 0.3305 ± 0.035 | 0.5363 ± 0.021 | 0.6460 ± 0.036 | 0.4823 ± 0.059 | 0.3333 ± 0.035 |
| PET32a - 136(20 μg) | 0.1365 ± 0.0013 | 0.3353 ± 0.067   | 0.5655 ± 0.065 | 0.7130 ± 0.040 | 0.9450 ± 0.014 | 0.8708 ± 0.034 | 0.5285 ± 0.022 |
| PET32a - 136(40 μg) | 0.1408 ± 0.0012 | 0.3103 ± 0.012   | 0.5575 ± 0.050 | 0.7203 ± 0.023 | 1.019 ± 0.072  | 0.8228 ± 0.024 | 0.5643 ± 0.014 |

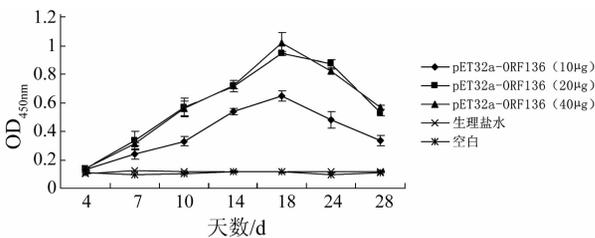


图 3 不同剂量表达蛋白免疫鲤鱼血清 ELISA 抗体水平检测结果

由图 3 可以看出,用 10、20 和 40 μg/尾的蛋白免疫后均可检测到 KHV 的抗体,用 PET32a - ORF136 表达的蛋白 20 和 40 μg/尾的蛋白免疫后的抗体水平比 10 μg/尾剂量蛋白免疫后的抗体水平高且差异显著 ( $P < 0.05$ ),且维持的时间也较长,而 20 和 40 μg/尾的蛋白免疫后的抗体水平差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

### 3 讨论

KHVD 于 2002 年在我国发现并开始传播<sup>[7]</sup>, 至今已在很多地方发生<sup>[11]</sup>。目前, 国内主要使用抗生素进行治疗, 但是治疗效果不佳, 而且水产品安全也受到极大的威胁。严重阻碍鲤鱼规模化养殖的持续健康发展。因此, 为了预防本病的发生和养殖业的发展, 需要进一步研究有效的基因工程疫苗, 避免病毒的散播并消除病毒变异的可能性, 并填补目前国内没有有效疫苗的空白, 控制 KHV 在我国暴发流行。KHV 的囊膜蛋白是该病毒囊膜的重要组成部分, 部分表达囊膜蛋白基因可作为检测或者免疫的候选基因<sup>[15]</sup>。因此, 本研究选用 KHV - CJ 株 ORF136 基因作为研究对象; 虽然注射免疫费时费力, 但考虑到注射免疫相较于其他免疫方法能够使中和抗体维持的时间较长, 因此本研究采用肌肉注射的方法进行免疫。

研究选择 KHV 囊膜蛋白基因 ORF136 将其克隆至 PET32a 原核表达载体中, 并表达出相对分子量约为 36.4 kD 融合蛋白。用纯化的蛋白免疫鱼后用间接 ELISA 检测抗体水平, 检测结果表明: 用 10、20 和 40  $\mu\text{g}$ /尾的蛋白免疫后均可检测到 KHV 的抗体, 用 PET32a - ORF136 表达的蛋白 20 和 40  $\mu\text{g}$ /尾的蛋白免疫后的抗体水平比 10  $\mu\text{g}$ /尾剂量蛋白免疫后的抗体水平高且差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 且维持的时间也较长; 而用 PET32a - ORF126 表达的蛋白 10、20 和 40  $\mu\text{g}$ /尾的蛋白免疫后的抗体水平差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

国内学者针对 KHV 部分基因进行了克隆测序及分析<sup>[16-18]</sup>, 对几种蛋白表达并进行了一些免疫试验, 但多数未采用鱼抗体进行体外实验<sup>[19-20]</sup>。为研制预防 KHV 的疫苗, 本实验选取 KHV - CJ 株 ORF136 基因作为研究对象, 并用 ELISA 检测该基因表达蛋白免疫鱼后不同时间的抗体水平确定其免疫效果, 为研究 KHV 疫苗提供新的思路。

### 参考文献:

[1] Gilad O, Yun S, Adkison M A, *et al.* Molecular comparison of isolates of an emerging fish pathogen, koi herpesvirus, and the effect of water temperature on mortality of experimentally infected koi[J]. *J Gen Virol*, 2003, 84(10): 2661 - 2667.

[2] Perelberg A, Ronen A, Hutoran M, *et al.* Protection of cultured *Cyprinus carpio* against a lethal viral disease by an attenuated virus vaccine[J]. *Vaccine*, 2005, 23(26): 3396 - 3403.

[3] Ronen A, Perelberg A, Abramowitz J, *et al.* Efficient vaccine against the virus causing a lethal disease in cultured *Cyprinus carpio*

[J]. *Vaccine*, 2003, 21(32): 4677 - 4684.

[4] 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.

[5] Haenen O, Way K, Bergmann S, *et al.* The emergence of koi herpesvirus and its significance to European aquaculture[J]. *Bull Eur Assoc Fish Pathol*, 2004, 24(6): 293 - 307.

[6] Tida I, Sano M. Koi herpesvirus disease[J]. *Uirusu*, 2005, 55(2): 145 - 151.

[7] 刘荭, 史秀杰, 高隆英, 等. 进口锦鲤暴发病原的 nested-PCR 鉴定[J]. *华中农业大学学报*, 2002, 21(05): 414 - 418.

[8] 徐达, 涂坚, 郑穹翔, 等. 锦鲤疱疹病毒传播媒介之探讨[J]. *台湾兽医志*, 2007, 33(2): 88 - 95.

[9] Pikarsky E, Ronen A, Abramowitz J, *et al.* Pathogenesis of acute viral disease induced in fish by carp interstitial nephritis and gill necrosis virus[J]. *J Virol*, 2004, 78(17): 9544 - 9551.

[10] Michel B, Leroy B, Stalin V, *et al.* The genome of cyprinid herpesvirus 3 encodes 40 proteins incorporated in mature virions[J]. *J Gen Virol*, 2010, 91(2): 452 - 462.

[11] 朱霞, 王好, 李新伟, 等. 锦鲤疱疹病毒病的研究进展[J]. *中国兽医科学*, 2011, 41(01): 106 - 110.

[12] Hasegawa S, Somamoto T, Nakayasu C, *et al.* A cell line (CFK) from fin of isogenic ginbuna crucian carp[J]. *Fish Pathology*, 1997, 32(6): 127 - 128.

[13] Neukirch M, Bttcher K, Sumram B. Isolation of a virus from koi with altered gills[J]. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists Weymouth*, 1999, 57(5): 221 - 224.

[14] 王世若, 王兴龙, 韩文瑜. 现代动物免疫学[M]. 长春: 吉林科学技术出版社, 2001: 466 - 468

[15] Rosenkranz D, Klupp B G, Teifke J P, *et al.* Identification of envelope protein pORF81 of koi herpesvirus[J]. *J Gen Virol*, 2008, 89(4): 896 - 900.

[16] 刘振兴, 柯浩, 孟轩, 等. 锦鲤疱疹病毒囊膜蛋白 ORF132 的克隆及分析[J]. *广东农业科学*, 2011, (06): 134 - 136.

[17] 周井祥, 李新伟, 王好, 等. 锦鲤疱疹病毒 - CJ 株 ORF81 基因的克隆及生物信息学分析[J]. *水产学报*, 2011, (12): 1780 - 1786.

[18] 周井祥, 王好, 吕文亮, 等. 锦鲤疱疹病毒 - CJ 株 ORF124 基因的克隆及生物信息学分析[J]. *中国兽药杂志*, 2013, 47(05): 14 - 18.

[19] 柯浩, 刘振兴, 林敏, 等. 锦鲤疱疹病毒囊膜蛋白 ORF59 的克隆、分析及其主要 B 细胞表位区的原核表达[J]. *南方水产*, 2010, 42(04): 56 - 62.

[20] 杨毅, 李莉娟, 陈孝焯, 等. 锦鲤疱疹病毒 ORF134 基因的克隆与表达[J]. *华中农业大学学报*, 2013, 58(04): 100 - 105.