

# 锦鲤疱疹病毒 ORF134 基因的克隆与表达

杨毅 李莉娟 陈孝煊 袁军法

华中农业大学水产学院, 武汉 430070

**摘要** 以感染锦鲤疱疹病毒的患病鱼为材料,通过 RT-PCR 克隆 ORF134 的编码序列,在细胞水平分析其表达模式,并在原核表达系统中表达,获得可溶性的 ORF134 重组蛋白。结果表明 ORF134 在锦鲤疱疹病毒裂解感染中转录,证实 ORF134 为非结构功能基因。ORF134 全长为 624 bp,含有 1 个内含子,编码 179 个氨基酸,序列分析显示 ORF134 同已报道的高等脊椎动物病毒编码的 vIL-10 具有较低的序列同源性,但具有较高的结构相似性。体外表达分析显示 ORF134 呈分泌性表达,但不能形成寡聚体,与其他病毒编码的 vIL-10 具有差异。进一步通过原核表达获得可溶性的 ORF134 重组蛋白。

**关键词** 锦鲤疱疹病毒; 白细胞介素 10; 原核表达; 真核表达; 细胞因子

**中图分类号** S 917.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2013)04-0100-06

锦鲤疱疹病毒病(koi herpesvirus disease, KHVD)自 1998 年首次在以色列暴发以来,伴随着锦鲤贸易的国际化而迅速散播全球,锦鲤疱疹病毒(*Cyprinid herpesvirus 3*, CyHV-3)为其病原<sup>[1-2]</sup>。该病毒的感染可引起锦鲤、鲤及其变种框镜鲤的鱼苗和成鱼大量死亡。我国于 2002 年首次在广东发现养殖的锦鲤有 CyHV-3 的感染<sup>[3-4]</sup>,2003 年以来在我国北方养殖的鲤和框镜鲤也因感染 CyHV-3 大量死亡<sup>[5]</sup>,给我国的养殖业带来巨大的损失。世界动物卫生组织(OIE)将 KHVD 列为重点水生动物疫病名录,我国农业部将其列为二类疫病。

鉴于 CyHV-3 的严重危害,其基础研究也获得了较大的关注。CyHV-3 的全基因组测序已于 2007 年完成<sup>[6]</sup>。基因组分析显示,该病毒同其他高等脊椎动物病毒类似,编码多个同宿主细胞因子同源的基因,可能同其毒力相关。其中 ORF134 推导的氨基酸序列同宿主白细胞介素 10(interleukin-10, IL-10)同源。IL-10 是由 Th2 细胞、单核巨噬细胞、Th1 细胞、B 细胞等产生的具有多向性生物学活性的强免疫抑制因子。已有的研究显示哺乳动物病毒(如疱疹病毒科、痘病毒科的部分成员)亦编码 IL-10 的类似物(virus encoded IL-10, vIL-10),模拟宿主编码的 IL-10 的生物学功能,抑制宿主的免疫

反应,从而逃避宿主的免疫攻击<sup>[7]</sup>。在低等脊椎动物病毒中,锦鲤疱疹病毒和鳊鲮疱疹病毒基因组中编码 IL-10 类似物<sup>[8]</sup>,但其在病毒感染过程中是否转录,其表达模式如何,有何生物学功能等问题均未知。笔者通过扩增和克隆 CyHV-3 中国株 ORF134 基因,在细胞水平上分析其表达模式,以期为后续研究 vIL-10 的功能以及 CyHV-3 逃避宿主免疫机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞系

293T 细胞由笔者所在实验室保存,采用 25 cm<sup>2</sup> 的培养瓶以单层培养细胞的形式正常传代,培养基为含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基(GIBCO-BRL),培养温度为 37 °C,5% CO<sub>2</sub>。

### 1.2 病毒、菌株与质粒

KHV 中国株感染的锦鲤样品由笔者所在实验室保存。克隆用载体 pGEM-T Easy 购自 Promega 公司,真核表达载体 pcDNA3.1(+ )为 Invitrogen 公司产品。原核表达载体 pET-32a 为 Novagen 公司产品。大肠杆菌 DH5 $\alpha$  菌株和 BL21(DE3)菌株由笔者所在实验室保存。

收稿日期: 2012-08-29

基金项目: 教育部博士点新教师基金(20100146120013)

杨毅,硕士研究生,研究方向:水生动物疾病。E-mail: gujianzhong2011@sina.com

通讯作者: 袁军法,博士,讲师。研究方向:分子病毒学。E-mail: jfyan@mail.hzau.edu.cn

### 1.3 试剂与抗体

KOD plus Polymerase 为 TOYOBA 公司产品,限制性内切酶为宝生物工程公司产品;T4 DNA 连接酶为 NEB 产品;PCR 回收、Gel 回收、质粒小量提取试剂盒均购自 Omega 公司;M-MLV 逆转录酶购自 Promega 公司;Trizol 为 Invitrogen 公司产品;FuGeneHD 转染试剂为 Roche 公司产品。胎牛血清购自 GIBCOBRL。超敏 ECL 化学发光试剂盒为碧云天公司产品。HRP 标记的兔抗 S-tag 的抗体 (anti-S-HRP pAb) 由美国 Chrinsitopher C. Broder

教授 (Department of Microbiology and immunology, Uniformed Services University, Bethesda, MD) 惠赠。

### 1.4 引物设计

根据 CyHV-3-U 分离株基因组序列 (NC\_009127.1) 设计 ORF134 扩增用引物,由上海博亚生物技术有限公司合成,引物序列信息详见表 1。上下游引物分别引入相应的酶切位点,以斜体(下划线)表示。用于构建表达克隆的下游引物引入 S 标签,便于后续的检测。

表 1 引物列表

Table 1 List of primers

引物 Primer	序列 Sequence
vIL-10F1	5'-ATGTTCCCTTGCAGTGCTACTAAC-3'
vIL-10R1	5'-TCAATGTTTGCCTTGGTTTCAT-3'
vIL-10F2	5'-ATCGGATCCACC ATGTTCCCTTGCAGTGCT-3'
vIL-10R2	5'-AGACTCGAGTCAGCTATCCATATGTTGTCGTTTCGAA CTTGGCAGCTGCTGTTTCCTT ATGTTTGCCTTGGT-3'
OlidodT	5'-GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTTTTTTTTTTTTTTV-3'
Anchor	5'-GACCACGCGTATCGATGTCGAC-3'

### 1.5 基因扩增

取 CyHV-3 感染的锦鲤鳃 100 mg, 研磨后以 TRIzol 提取组织总 RNA, 经 DNase (RQ1, Promega) 消化后合成 cDNA。cDNA 合成: 取 2  $\mu$ g 总 RNA, 加入 1  $\mu$ g 的 oligodT 引物, 70  $^{\circ}$ C 温浴 5 min, 立即冰浴 5 min 后依次加入 5  $\mu$ L 的 M-MLV 5 $\times$  缓冲液、5  $\mu$ L dNTP (10 mmol/L)、25 U RNA 酶抑制剂和 200 U M-MLV 反转录酶, 补充 DEPC 处理的双蒸水至总体积为 25  $\mu$ L, 42  $^{\circ}$ C 温浴 1 h, 产物直接用作 PCR 扩增的模板。

以基因组 DNA 提取试剂盒 (博大泰克) 提取 CyHV-3 感染的锦鲤鳃组织 DNA, 操作按说明书进行, 其产物直接用作扩增的模板。

扩增反应体系与条件: 在 50  $\mu$ L 体系中, 以 2  $\mu$ L 的逆转录产物 (或 1  $\mu$ L 的基因组 DNA) 为模板, 以特异引物对扩增。其扩增条件为 94  $^{\circ}$ C、30 s, 50  $^{\circ}$ C、30 s, 68  $^{\circ}$ C、45 s, 25 个循环后 68  $^{\circ}$ C 延伸 5 min; 扩增后取 5  $\mu$ L PCR 产物以琼脂糖凝胶电泳检测, 并回收目的片段。

### 1.6 基因克隆

将回收的扩增产物与 pGEM-T easy 载体连接, 转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞中。连接、转化和筛选重组子的方法均按试剂手册进行。鉴定正确

的克隆子经正反向测序验证。

以上鉴定正确的质粒为模板, 以特异性引物扩增, 回收目的片段, 利用相应限制性内切酶消化, 回收目的片段并分别构建到表达载体 pcDNA3.1 和 pET32a 上, 分别命名为 pcDNA3.1-ORF134 和 pET32a-ORF134。酶切鉴定正确的克隆进一步通过测序验证。

### 1.7 瞬时转染

以小皿为例, 转染前 1 d 将 1 $\times$ 10<sup>6</sup> 细胞接种至小皿, 细胞接种后 18~24 h, 以转染试剂 FuGeneHD 将 3  $\mu$ g 质粒转至靶细胞中, 操作按试剂说明书进行。

### 1.8 ORF134 的可溶性分析

将 pcDNA3.1-ORF134 转染 293T 细胞, 转染后 48 h, 分别收集细胞和培养基上清, 分析 ORF134 的表达模式。其中细胞以 PBS (pH 7.4) 洗涤 2 次, 以 1 mL 裂解液裂解, 以 12 000 r/min 离心 1 min 去细胞碎片, 取上清备用。培养基上清以 12 000 r/min 离心 1 min 去细胞碎片, 取上清。分别在上述 2 种上清中加入 20  $\mu$ L 的 S protein 树脂 (Novagen), 4  $^{\circ}$ C 摇动孵育 30 min。3 000 r/min 离心 1 min 收集树脂, 分别以 1 mL 裂解缓冲液洗涤 2 次。最后以 50  $\mu$ L 1 $\times$  SDS-PAGE 上样缓冲液重悬树脂。剧烈震荡 5 min 后 3 000 r/min 离心 1 min, 取

上清用于后续的 Western blot 分析。

### 1.9 ORF134 的原核表达

挑取含重组表达质粒的单菌落接种于 4 mL LB (含 50 mg/L Amp) 培养基中过夜培养。活化菌液以 1/100 稀释接种到 10 mL LB (含 50 mg/L Amp) 培养基中, 37 °C 摇床培养 3 h, 加 IPTG 至终浓度 1 mmol/L, 分别在 37 °C 诱导 4 h 和 16 °C 诱导过夜, 取诱导培养物各 1 mL, 收集菌体进行 SDS-PAGE 电泳分析。取上述诱导后的细菌, 冰浴超声波 (VC750, Sonics) 破碎, 分别收集上清和沉淀, 以 SDS-PAGE 电泳分析, 检测目的蛋白的分布。

### 1.10 Western-blot 检测

待检样品以 6 × 上样缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 6.8, 100 mmol/L DTT, 2% SDS, 0.1% bromophenol blue, 10% glycerol) 稀释, 煮沸 10 min 后上样。经 SDS-PAGE 分离后, 将蛋白转移到 PVDF 膜上。以 anti-S-HRP pAb (1:20 000 稀释) 后 37 °C 孵育 1 h。经过 5 次洗涤后以化学发光法检测。

### 1.11 序列分析与结构模拟

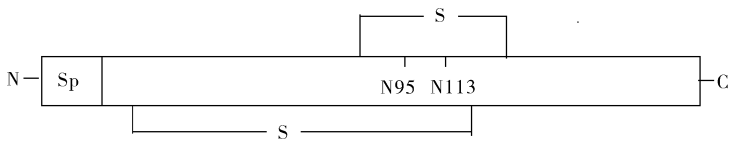
以 DNASTAR 进行常规的序列拼接与编辑, 序列比对以 Clustal X1.83 软件进行。以 Expasy 服务器上的在线工具进行蛋白质信号肽 (SignalIP 3.0)、跨膜区 (SOSUD) 和保守结构 (PROSITE) 的预测。

## 2 结果与分析

### 2.1 ORF134 的分子特征

根据已有的 CyHV-3 基因组序列, 该病毒编码的 ORF134 可能为 IL-10 类似物 (vIL-10)。先前的序列分析显示 ORF134 基因含内含子。以感染 KHV 的患病锦鲤 RNA 为模板, 通过 RT-PCR 获得 ORF134 的 mRNA 序列, 显示 ORF134 为功能性基因。进而以感染 KHV 的患病锦鲤基因组 DNA 为模板, 扩增 ORF134 基因。序列测定显示 ORF134 全长大小为 624 bp, 其编码区为 540 bp。比较其编码区以及基因序列显示 ORF134 含内含子, 内含子边缘为 GT/AG, 符合通常的内含子剪接规律, 其序列与 CyHV-3 其他分离株编码的 ORF134 序列完全一致。

ORF134 编码 179 个氨基酸, 预测分子质量为 20.1 ku, 其模式结构见图 1。高级结构预测显示其为分泌性可溶蛋白, 其 N 端 1~17 (MFLAVLLTATIFFEARG) 为可能的信号肽序列, 含有 2 个可能的 N-糖基化位点 (N95, N113)。序列中含有的 4 个保守的半胱氨酸构成二硫键 (C27-C124, C79-C130)。序列比对显示该基因同鲤 IL-10 基因氨基酸同源性较低, 仅为 23.5%, 同其他病毒编码的 vIL-10 同源性也仅有 17%~27% (图 2), 但同源建模显示与 vIL-10 具有相似的三维结构 (结果未显示), 同先前的报道一致<sup>[8]</sup>。



Sp: 信号肽序列; S-S: 二硫键; N95 和 N113: 潜在的 N-糖基化修饰位点。Sp: Signal peptide. S-S: Disulfide bond. N95 and N113: The positions of the potential N-linked glycosylation sites are shown.

图 1 锦鲤疱疹病毒 ORF134 蛋白模式图

Fig. 1 Schematic of CyHV-3 ORF134 protein

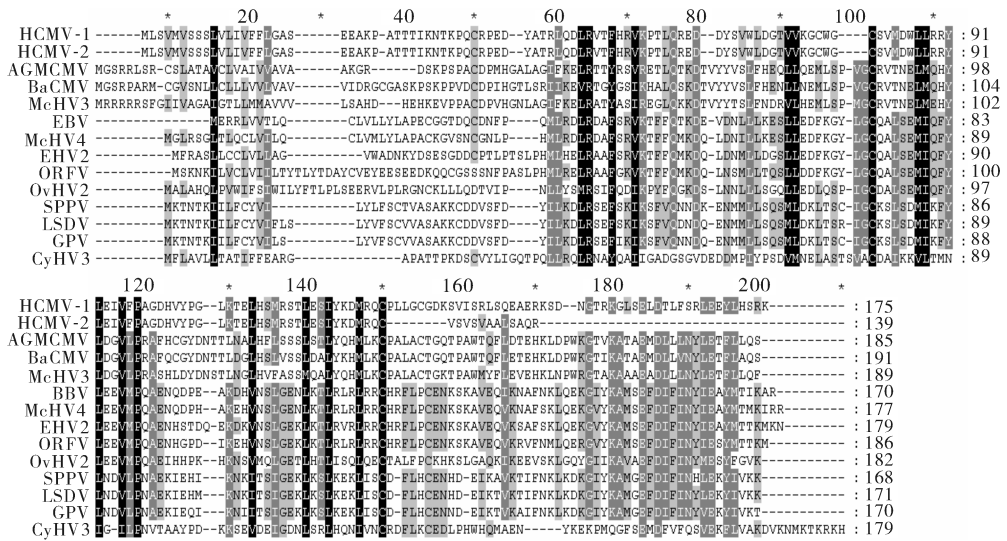
### 2.2 ORF134 为分泌性蛋白

为分析 ORF134 的分泌性, 将 ORF134 编码区同 s 标签融合后克隆至真核表达载体 pcDNA3.1 载体, 瞬时转染 293T 细胞, 分析其表达策略。Western blot 结果显示可在细胞裂解液以及培养基上清中检测到 ORF134 的表达, WB 结果呈现 2 条带, 其分子质量相差 2 ku 左右。为分析其能否同其他 vIL-10 一样形成寡聚体, 收集的样品经非还原性 SDS-PAGE 后 WB 验证, 结果表明 ORF134 不能形成二聚体, 仅以单体的形式存在

(图 3, 泳道 3)。

### 2.3 ORF134 的原核表达

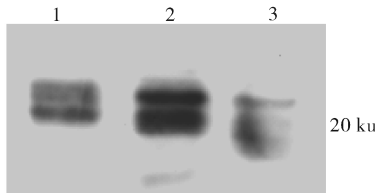
尝试将 vIL-10 编码区克隆至原核表达载体 pET32a, 制备可溶性的 ORF134 编码产物。通过小量诱导表达后 SDS-PAGE 电泳分析显示, pET32a-ORF134 在 37 °C 的表达呈包涵体形式, 其融合蛋白大小为 43 ku, 与预期一致。为获得可溶性的蛋白, 降低诱导温度和 IPTG 浓度, 结果显示在 0.1 mmol/L 的 IPTG 浓度下, 16 °C 诱导时 pET32a-ORF134 部分可溶 (图 4)。



病毒编码 IL-10 类似物的氨基酸序列以 Clustal W 方法进行比对,编码 IL-10 类似物的病毒名称标注其上。Proteins were aligned by the Clustal W method, using the CLust X2 software program. vIL-10 host names are shown. Nucleotide sequence accession numbers for the indicated viruses are as follows: HCMV-1, Human herpesvirus 5 (AD169), AAF36285; HCMV-2, Human herpesvirus 5, FJ997279; AGMCMV, African green monkey CMV, AAF63435; BaCMV, Baboon CMV, AAF63436; McHV3, Macaine herpesvirus 3, AAF59907.1; EBV, Human herpesvirus 4, P03180. McHV4, Macaine herpesvirus 4, AAK95412; EHV2, Equine herpesvirus 2, AAB26148; ORFV, Orf virus, AAC57332; OvHV2, Ovine HV2, ABB2222; SPPV, Sheenpox virus, NP-659579; LSDV, Lumpy skin disease virus, AAN02729; GPV, Goatpox virus, YP-001293197; CyHV-3, this study.

图 2 病毒编码的 vIL-10 氨基酸序列比对

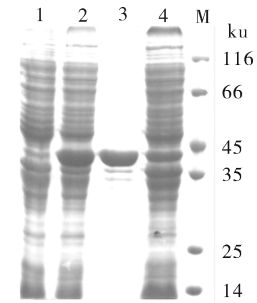
Fig. 2 Alignment of virus encoded IL-10 proteins



泳道 1 和 2 为还原性的变性胶,泳道 3 为非还原性变性胶。1:细胞裂解物;2:培养基上清;3:细胞裂解物。The 293T cells were transfected with ORF134 constructs tagged with S-tag at C-terminal. Cell lysate and supernatant were precipitated with S-agarose and loading to SDA-PAGE under reduced condition (Lane 1 and 2) or non-reduced condition (Lane 3). Western blot detection was performed using HRP- conjugated rabbit anti-S-peptide antibody. 1: cell lysate of ORF134; 2: Supernatant of ORF134; 3: cell lysate of ORF134 under non-reduced condition.

图 3 ORF134 真核表达分析

Fig. 3 The expressing profile of ORF134 in 293T cells



M: 低分子量蛋白标准品; 1: 未诱导菌体总蛋白; 2: 诱导后的菌体总蛋白; 3: 诱导后不可溶部分; 4: 诱导后可溶部分。M: Low molecular mass marker, 1: Non-induced; 2: Total; 3: Insoluble segment of induced; 4: Soluble segment of induced.

图 4 锦鲤疱疹病毒 ORF134 的原核表达与可溶性分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of ORF134 expression in *E. coli* at 16 °C

### 3 讨论

IL-10 的主要作用是抑制细胞免疫,直接或间接抑制 T 淋巴细胞的增殖与成熟,也可上调体液免

疫,包括促进 B 淋巴细胞的增殖、成熟以及抗体的分泌。在长期的选择压力下,有些病毒为逃避宿主的免疫攻击,自身亦编码 IL-10 类似物来抑制宿主的细胞免疫。病毒编码功能性的 IL-10 在疱疹病

毒<sup>[9-13]</sup>、痘病毒<sup>[14]</sup>中已有较多的报道,上述病毒的宿主均为高等脊椎动物。在低等脊椎动物中,仅发现 CyHV-3 的基因组中存在 IL-10 的同源基因 (ORF134)。近来在鳃鲈疱疹病毒基因组中也发现 IL-10 的同源基因<sup>[8]</sup>,说明低等脊椎动物病毒也可能存在同其他病毒类似的免疫逃避机制。本文通过 RT-PCR 获得 CyHV-3 中国株 ORF134 编码序列,测序显示该序列同 CyHV-3 其他分离株编码的 ORF134 序列完全一致。先前的病毒结构蛋白质组学研究中未发现 ORF134 编码产物<sup>[15]</sup>,提示 ORF134 为非结构基因,本文的结果也进一步证实 ORF134 为功能性非结构基因,在病毒裂解感染过程中转录。

通过 ORF134 推导的氨基酸序列,功能预测显示其为分泌蛋白,为 IL-10 超家族成员。序列比对显示 ORF134 同其他病毒编码的 vIL-10 氨基酸同源性很低,但结构模拟显示同已报道的 vIL-10 具有非常类似的高级结构<sup>[8]</sup>,提示 ORF134 可能同其他病毒编码的 vIL-10 具有相似的功能。ORF134 在哺乳动物细胞 293T 中表达结果显示在细胞和培养基上清中均可检测到 ORF134 的表达,说明 ORF134 呈分泌性表达,符合细胞因子的分泌性表达模式。WB 结果显示呈现 2 条带,大小相差 2 ku,推测为糖基化修饰的结果,序列分析也显示 ORF134 的编码产物含有 2 个潜在的糖基化位点 (N95, N113),但需要进一步的生化分析。非还原性 SDS-PAGE 分析显示 ORF134 不能形成寡聚体,同已知的 IL-10 或 vIL-10 存在较大的差别。已知的 vIL-10 均通过形成同源二聚体后同相应受体结合,发挥其生物学功能<sup>[7]</sup>。

为进一步研究 ORF134 的功能,需要利用可溶性蛋白,分析其可能的免疫调节功能。因此尝试利用原核表达系统获得可溶性的蛋白。在现有的细胞因子类产品中,多数商业化的试剂利用原核表达系统来生产,如人肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor alpha, TNF $\alpha$ )。在鱼类细胞因子研究中,也利用其原核表达产物开展相关研究,如原核表达的金鱼 TNF $\alpha$  以及 IL-10 均具有相应的生物学活性<sup>[16-17]</sup>。本文利用原核表达系统,通过优化诱导条件,获得可溶性的 ORF134 基因产物,其诱导的产物同预期一致,为进一步评价其生物学活性奠定了基础。

高等脊椎动物病毒编码的 vIL-10 已证实在体外具有广泛的免疫抑制作用,可作为细胞因子合成

抑制因子和巨噬细胞失活因子<sup>[7,18]</sup>。体内研究亦显示 vIL-10 可削弱其抵抗病毒抗原的天然免疫和获得性免疫反应<sup>[19]</sup>,说明 vIL-10 在病毒逃避宿主的免疫攻击中具有重要的作用。但低等脊椎动物病毒编码的 vIL-10 类似物是否为功能性基因,以及其生物学特点等基础生物学问题均缺乏研究。本文的研究结果证实 ORF134 为功能性的非结构基因,在病毒裂解感染中转录,并分析了其体外表达模式,获得了可溶性的重组蛋白,后续将进一步分析 CyHV-3 vIL-10 的生物学功能以及其同病毒毒力的关系,明晰 vIL-10 在 CyHV 免疫逃避中作用及机制。

## 参 考 文 献

- [1] GILAD O, YUN S, ANDREE K B, et al. Initial characteristics of koi herpesvirus and development of a polymerase chain reaction assay to detect the virus in koi, *Cyprinus carpio koi* [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2002, 48(2): 101-108.
- [2] MICHEL B, FOURNIER G, LIEFFRIG F, et al. Cyprinid herpesvirus 3 [J]. Emerging Infectious Diseases, 2008, 16(12): 1835-1843.
- [3] 周永灿, 袁军法, 任武泽, 等. 锦鲤疱疹病毒的检测与人工感染实验 [J]. 武汉大学学报: 理学版, 2005, 51(S2): 249-252.
- [4] 刘荻, 史秀杰, 高隆英, 等. 进口锦鲤暴发病病原的 nested-PCR 鉴定 [J]. 华中农业大学学报, 2002, 21(5): 414-418.
- [5] 朱霞, 李新伟, 王好, 等. 一株锦鲤疱疹病毒的分离与鉴定 [J]. 中国预防兽医学报, 2011, 22(5): 340-343.
- [6] AOKI T, HIRONO I, KUROKAWA K, et al. Genome sequences of three koi herpesvirus isolates representing the expanding distribution of an emerging disease threatening koi and common carp worldwide [J]. Journal of Virology, 2007, 81(10): 5058-5065.
- [7] SLOBEDMAN B, BARRY P A, SPENCER J V, et al. Virus-encoded homologs of cellular interleukin-10 and their control of host immune function [J]. Journal of Virology, 2009, 83(19): 9618-9629.
- [8] VAN-BEURDEN S J, FORLENZA M, WESTPHAL A H, et al. The alloherpesviral counterparts of interleukin 10 in European eel and common carp [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2012, 31(6): 1211-1217.
- [9] CHANG W L, BARRY P A, SZUBIN R, et al. Human cytomegalovirus suppresses type I interferon secretion by plasmacytoid dendritic cells through its interleukin 10 homolog [J]. Virology, 2009, 390(2): 330-337.
- [10] LI M T, LIN Y L, CHANG P C, et al. Identification of novel viral interleukin-10 isoforms of human cytomegalovirus AD 169 [J]. Virus Research, 2008, 131(2): 213-223.
- [11] LOCKRIDGE K M, ZHOU S S, KRAVITZ R H, et al. Primate

- cytomegaloviruses encode and express an IL-10-like protein [J]. *Virology*, 2000, 268(2): 272-280.
- [12] KOTENKO S V, SACCANI S, IZOTOVA L S, et al. Human cytomegalovirus harbors its own unique IL-10 homolog (cmvIL-10)[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(4): 1695-1700.
- [13] LIU Y, MALEFYT R D, BRIERE F, et al. The EBV IL-10 homologue is a selective agonist with impaired binding to the IL-10 receptor[J]. *Journal of Immunology*, 1997, 158(2): 604-613.
- [14] FLEMING S B, MCCAUGHAN C A, ANDREWS A E, et al. A homolog of interleukin-10 is encoded by the poxvirus orf virus[J]. *Journal of Virology*, 1997, 71(6): 4857-4861.
- [15] MICHEL B, LEROY B, STALINRAJ V, et al. The genome of *Cyprinid herpesvirus 3* encodes 40 proteins incorporated in mature virions[J]. *The Journal of General Virology*, 2010, 91(2): 452-462.
- [16] BELOSEVIC M, GRAYFER L, HODGKINSON J W, et al. Characterization and functional analysis of goldfish (*Carassius auratus* L.) interleukin-10[J]. *Molecular Immunology*, 2011, 48(4): 563-571.
- [17] GRAYFER L, WALSH J G, BELOSEVIC M. Characterization and functional analysis of goldfish (*Carassius auratus* L.) tumor necrosis factor- $\alpha$ [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2008, 32(5): 532-543.
- [18] SLOBEDINAN B, JENKINS C, GARCIA W, et al. Expression of a human cytomegalovirus latency-associated homolog of interleukin-10 during the productive phase of infection[J]. *Virology*, 2008, 370(2): 285-294.
- [19] CHANG W L, BARRY P A. Attenuation of innate immunity by cytomegalovirus IL-10 establishes a long-term deficit of adaptive antiviral immunity[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(52): 22647-22652.

## Cloning and expression of ORF134 in *Cyprinid herpesvirus 3*

YANG Yi LI Li-juan CHEN Xiao-xuan YUAN Jun-fa

*College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China*

**Abstract** *Cyprinid herpesvirus 3* (CyHV-3), also known as koi herpesvirus (KHV), is the causative agent of an emerging and mortal disease in common (*Cyprinus carpio carpio*) and koi (*Cyprinus carpio koi*) carp. Since its emergence in the late 1990s, KHV has caused severe financial and economic losses in both koi and common carp culture industries worldwide. CyHV-3 contains an interleukin-10 like open reading frame (ORF134), which has been identified from multiple members of Herpesvirales and Poxviridae. Here in this study, ORF134 of CyHV-3 was amplified by RT-PCR. It is 624 bp in full-length with an intron and encodes a peptide of 179 amino acids. Multiple sequence alignment indicated that ORF134 shared 23.5% amino acid sequence similarity with carp IL-10. Homology modeling suggested that ORF134 had a similar three-dimensional structure with vIL-10 encoded by EBV, but shared low sequence similarity with other vIL-10. To analysis the expression profile of ORF134, the coding region of ORF134 was cloned into pcDNA3.1 vector and expressed in 293T cells. The results suggested that ORF134 could secrete from expressed cells, but different from other identified viral IL-10 homologs, ORF134 could not form homodimer under non-reduced condition. Further study showed that soluble fusing protein of ORF134 was also expressed in *E. coli*.

**Key words** *Cyprinid herpesvirus 3*; interleukin-10; prokaryotic expression; eukaryotic expression; cytokine

(责任编辑:边书京)