

斑点叉尾鮰病毒囊膜蛋白基因 ORF6 和 ORF10 的原核表达及抗体制备*

王树云 陈孝煊 王 敏 周金敏 于艳梅 岳刚毅 李莉娟**

华中农业大学水产学院, 武汉 430070

摘要 为获得斑点叉尾鮰疱疹病毒 ORF6 和 ORF10 基因, 设计特异性引物进行 PCR 扩增, 成功构建 pET-32a-ORF6 和 pET-32a-ORF10 原核表达载体, 经 IPTG 诱导后目的蛋白在大肠杆菌中成功表达并制备多抗, 通过 Western blot 证明 ORF10 的抗体具有特异性, 且 ORF10 为病毒的结构蛋白。

关键词 斑点叉尾鮰疱疹病毒; 囊膜蛋白; 原核表达; 多克隆抗体

中图分类号 Q 939.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)06-0764-04

斑点叉尾鮰病毒(channel catfish virus, CCV) 最先由 Fijan 等从驯养的发病斑点叉尾鮰鱼体分离得到, Wolf 等^[1]根据其总体形态学特征将其划分为 α 疱疹病毒亚科, 是最早发现的鱼类疱疹病毒。现将其归于疱疹病毒目、鱼类疱疹病毒科、鮰鱼疱疹病毒属(Herpesvirales, Alloherpesviridae, *Ictalurivirus*)^[2]。由 CCV 引发的斑点叉尾鮰病毒病, 是一种严重的出血性疾病, 而且斑点叉尾鮰是 CCV 的自然宿主, 一般对体长小于 15 cm, 体质量少于 10 g 以及 1~4 周龄的斑点叉尾鮰感染性极高, 并且即将孵化的鱼卵也极易受到 CCV 感染, 该病既可水平传播又可垂直传播, 偶发性和致死率高, 发病快, 使得鮰鱼养殖场遭受到巨大经济损失^[3]。目前已建立 CCV 的检测方法, 对该病的诊断和预防具有重要的意义^[4]。

CCV 是具有囊膜的双链 DNA 病毒, 基因组全长为 134 kb, 包含有 77 个开放阅读框(open reading frames, ORFs), 其中 14 个处于末端重复序列^[5]。序列分析显示 ORF6 和 ORF10 为膜蛋白, 含有跨膜区和胞内区, 可能参与病毒的吸附、入侵以及传播过程^[6], 因此, ORF6 和 ORF10 有可能成为制备疫苗的候选基因。本研究基于 CCV 全基因组序列, 设计特异性引物, 通过 PCR 技术获得 ORF6 和 ORF10 的基因片段, 在大肠杆菌中表达相应蛋白, 同时制备多抗, 旨在为今后斑点叉尾鮰病毒病 DNA

疫苗的开发以及基因功能的进一步研究提供理论基础。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

斑点叉尾鮰病毒(CCV)、*E. coli* DH10B、AD494(DE3) 宿主菌、载体 pET-32a 为笔者所在实验室保存。

1.2 主要试剂

Taq DNA 聚合酶和 T_4 DNA 连接酶为 Promega 公司产品, 限制性内切酶 *Hind* III、*Eco*R I、*Bam*HI 为 TaKaRa 公司产品, DNA marker 以及蛋白 marker 为武汉贝博公司产品, 凝胶回收试剂盒为 Omega 公司产品, 蛋白纯化试剂盒为 Novagen 公司产品, IPTG 及氨苄青霉素 Amp、卡那霉素 Kan 为 Sigma 公司产品, 弗氏完全佐剂为 Sigma 公司产品, 硝酸纤维素膜(Hybond-N)为 Amersham 公司产品, 碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG、BCIP/NBT 显色试剂盒为华美公司产品。

1.3 引物合成及目的序列的 PCR 扩增

根据 GenBank 上已公布的 CCV 基因组(登录序列号: M75136), 针对其开放阅读框 ORF6、ORF10 设计特异引物。ORF6F: 5'-GCG GAA TTC ATG AAC TCT CTC ACT-3', ORF6R: 5'-GCG AAG CTT TCA GAC CCG GAT CTC-3';

收稿日期: 2010-03-22; 修回日期: 2010-06-23

* 国家自然科学基金项目(30700624)、华中农业大学科技创新基金和华中农业大学科研启动基金资助

** 通讯作者. E-mail: amethystlily1127@yahoo.com.cn

王树云, 女, 1983 年生, 硕士研究生. 研究方向: 水产动物医学. E-mail: wwssyy123@126.com

ORF10F: 5'- GCG GGA TCC ATG ACC GTC AAG GGT-3', ORF10R: 5'-GCG AAG CTT TTA GAT GTA CGG AGA-3' (斜体部分为酶切位点), 引物由北京奥科生物技术公司合成。

PCR 反应体系为 50 μ L: 含 10 \times *Taq* buffer 5 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L) 8 μ L, dNTP Mix (25 mmol/L) 2 μ L, *Taq* 酶 (1 U/ μ L) 1 μ L, 引物 (10 pmol/L) F/R: 各 2 μ L, CCV 基因组 DNA 1 μ L, 用灭菌 ddH₂O 补足到 50 μ L。PCR 扩增循环参数为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 相应退火温度下 (ORF6 为 58 $^{\circ}$ C, ORF10 为 59 $^{\circ}$ C) 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 进行 30 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.4 重组表达载体的构建

ORF6 和 ORF10 的扩增片段用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳鉴定, 经凝胶回收试剂盒纯化后, 分别进行双酶切后回收靶片段, 并与经过相同双酶切处理的表达载体 pET-32a 连接。将连接产物转化大肠杆菌 *E. coli* DH10B 菌株, 挑取阳性转化子, 进行酶切鉴定, 并将获得的阳性克隆子 pET-32a-ORF6 和 pET-32a-ORF10 测序。将测序结果正确的阳性重组子转化入表达宿主菌 AD494(DE3) 中。

1.5 目的基因在大肠杆菌中的诱导表达

挑选阳性克隆子接种于 4 mL 的 LB-Amp 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜, 翌日按 1:100 的比例将此培养菌接种于新鲜 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养至 $D_{600\text{nm}}$ 达到 0.6 时^[7] (约 3 h), 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 并加入 0.5% 的葡萄糖^[8]。分别于诱导后的 1、2、3、4、5 h 取样 1 mL, 然后 13 000 r/min 离心 3 min, 收集菌样, 以 100 μ L PBS 重悬沉淀, 再加入 25 μ L 5 \times 上样缓冲液, 沸水浴中煮 10 min, 取适量样品进行聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析。

1.6 多克隆抗体的制备

初步纯化的蛋白质样品经 SDS-PAGE 分离, 从凝胶上切割与预期相对分子质量相符的表达蛋白带, 加入 PBS 缓冲液反复研磨, 直至能通过 6# 针头。选取 2~3 kg 的新西兰大白兔 4 只, 每只取血 1 mL 作为对照血清。1 周后用弗氏完全佐剂对试验动物诱导, 诱导后 5 d, 初次免疫用 500 μ g 抗原, 以背部两侧皮下多点的方式注射, 初次免疫后隔 2 周加强免疫 2 次, 抗原用量为 300 μ g。第 2 次加强免疫后 10 d, 从耳侧静脉采取血样, 对抗体效价进行检测。收集血清于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

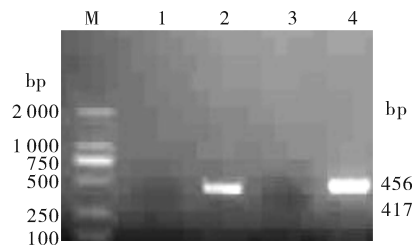
1.7 多克隆抗体的 Western blot 检测

取纯化的蛋白包涵体及 CCV 病毒粒子进行 SDS-PAGE 分离, 半干法将蛋白转移至硝酸纤维素膜后进行 Western blot 分析。将膜在含 5% 脱脂牛奶的 TBS 缓冲液中 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h, TBS-T 缓冲液洗膜 3 次 (各 10 min), 一抗为制备的兔抗血清, 1:1 000 倍稀释于含 3% BSA 的 TBS 缓冲液中, 将膜浸入一抗稀释缓冲液 37 $^{\circ}$ C 温浴 1 h, TBS-T 缓冲液洗膜 3 次 (各 10 min), 二抗为碱性磷酸酶 (AP) 标记的羊抗兔 IgG, 1:2 000 倍稀释于含 3% BSA 的 TBS 缓冲液中, 将膜浸入二抗稀释缓冲液 37 $^{\circ}$ C 温浴 1 h, TBS-T 缓冲液洗膜 3 次 (各 10 min), 然后用 BCIP/NBT 显色试剂盒显色 2~10 min。

2 结果与分析

2.1 ORF6/ORF10 的 PCR 扩增及重组表达载体的酶切鉴定

ORF6 和 ORF10 基因全长分别为 417 和 456 bp, 其扩增结果如图 1 所示, 大小与预期一致。



M. DNA marker (DL 2 000); 1, 3. 阴性对照 Negative control; 2. ORF6 扩增产物 PCR fragment of ORF6; 4. ORF10 扩增产物 PCR fragment ORF10.

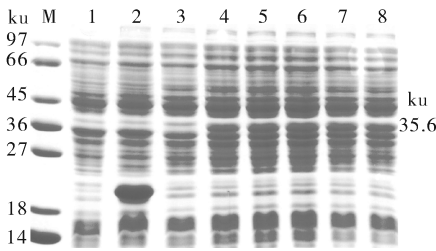
图 1 ORF6 和 ORF10 的 PCR 扩增

Fig. 1 Amplification of ORF6 and ORF10 gene fragments with PCR

对重组质粒 pET-32a-ORF6 和 pET-32a-ORF10 进行双酶切, 电泳结果显示目的片段已正确插入。测序结果与已公布序列完全吻合, 无变异碱基。

2.2 ORF6 和 ORF10 在大肠杆菌中的表达

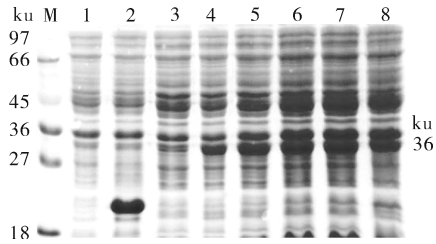
经 SDS-PAGE 分析, 分别含有重组质粒 pET-32a-ORF6 和 pET-32a-ORF10 的表达宿主菌 AD494(DE3) 经 IPTG 诱导后, 都出现了表达条带 (图 2 和图 3), 检测结果显示 pET-32a-ORF6 诱导表达的蛋白与预计的分子质量基本相符, 但 pET-32a-ORF10 诱导表达的蛋白则比理论值稍小。诱导表达蛋白可溶性分析显示 ORF6 和 ORF10 均以包涵体形式存在 (图 4)。



M. 蛋白标准 Protein marker; 1. pET-32a 未诱导 No-induced pET-32a; 2. pET-32 诱导 Induced pET-32a; 3~8. pET-32a-ORF6 诱导 0、1、2、3、4、5 h Induced pET-32a-ORF6 for 0, 1, 2, 3, 4, 5 h.

图 2 ORF6 表达产物的 SDS-PAGE 分析

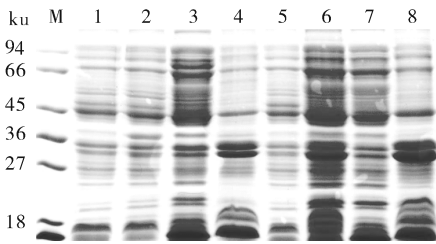
Fig. 2 The SDS-PAGE analysis of the product of expression of gene ORF6



M. 蛋白标准 Protein marker; 1. pET-32a 未诱导 No-induced pET-32a; 2. pET-32a 诱导 Induced pET-32a; 3~8. pET-32a-ORF10 诱导 0、1、2、3、4、5 h Induced pET-32a-ORF10 for 0, 1, 2, 3, 4, 5 h.

图 3 ORF10 表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 The SDS-PAGE analysis of the product of expression of gene ORF10



M. 蛋白标准 Protein marker; 1. pET-32a-ORF6 未诱导 No-induced pET-32a-ORF6; 2. pET-32a-ORF6 诱导 Induced pET-32a-ORF6; 3. pET-32a-ORF6 诱导上清 Supernatant of induced pET-32a-ORF6; 4. pET-32a-ORF6 诱导沉淀 Sediment of induced pET-32a-ORF6; 5. pET-32a-ORF10 未诱导 No-induced pET-32a-ORF10; 6. pET-32a-ORF10 诱导 Induced pET-32a-ORF10; 7. pET-32a-ORF10 诱导上清 Supernatant of induced pET-32a-ORF10; 8. pET-32a-ORF10 诱导沉淀 Sediment of induced pET-32a-ORF10.

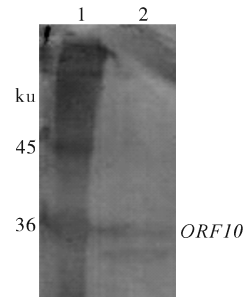
图 4 SDS-PAGE 分析表达蛋白的可溶性

Fig. 4 The solubility analysis of the recombinant proteins with SDS-PAGE

2.3 多克隆抗体制备及 Western blotting 分析

将纯化的蛋白包涵体和 CCV 病毒粒子经 SDS-

PAGE 分析后转膜,并分别与 ORF6 和 ORF10 的多克隆抗体进行杂交,ORF10 的多克隆抗体显示特异性条带(图 5),说明 ORF10 多克隆抗体可以识别其表达蛋白,特异性较好,也说明 ORF10 编码的蛋白为 CCV 的结构蛋白;而 ORF6 未能出现明显的杂交带(结果未显示)。



1. 纯化的 pET-32a-ORF10 包涵体 Purified pET-32a-ORF10 inclusion; 2. 纯化的 CCV 病毒 Purified CCV.

图 5 ORF10 的特异性检测

Fig. 5 The specificity analysis of ORF10

3 讨论

疱疹病毒囊膜蛋白在其感染的过程中起着重要的作用,它们促成病毒粒子对宿主细胞的入侵而且参与病毒在细胞间的传递过程;同时,病毒囊膜蛋白还决定着病毒粒子对组织的趋向性及宿主种类^[9]。由于囊膜蛋白在病毒的侵染过程中起着至关重要的作用,因此一直是研究的热点,例如 HIV 的囊膜糖蛋白 gp160^[10]。关于疱疹病毒糖蛋白的研究很多,HSV-1 至少有 11 种糖蛋白,其中 7 种位于囊膜上,PRV 有 9 种膜糖蛋白,BHV-1 有 7 种囊膜糖蛋白,VZV 有 5 种糖蛋白,所有这些糖蛋白结构类似^[5]。而有关斑点叉尾鲷疱疹病毒的囊膜蛋白的研究却甚少。目前研究认为 CCV 的 ORF59 是其主要的囊膜糖蛋白,其表面可形成 3 个潜在的糖基位点,从而成为制备 DNA 疫苗的主要候选基因^[11]。

本研究克隆的 ORF6 和 ORF10 被认为是可能的 CCV 囊膜蛋白,经成功克隆并表达后,发现两者的分子质量大小与预期值略有差异,这可能与蛋白的表达后修饰如糖基化有关。经 Western blotting 分析证实 ORF10 的表达蛋白特异性良好,且为 CCV 的结构蛋白,出现了 2 条杂交带,可能是病毒粒子中结构蛋白发生降解的原因。而 ORF6 则未能出现明显的杂交带,可能是由于其在病毒粒子中的含量很少或为非结构蛋白,具体原因还需要进一步确认。

参 考 文 献

- [1] WOLF K, DARLINGTON R W. Channel catfish virus: a new herpesvirus of ictalurid fish [J]. *Journal of Virology*, 1971, 10: 525-533.
- [2] ANDREW J, DAVISON A J, EBERLE R, et al. The order herpesvirales [J]. *Archives of Virology*, 2009, 154: 171-177.
- [3] SANCHEZ-MARTINEZ J G, AGUIRRE-GUZMAN G, CRUZ-HERNANDEZ N I D I, et al. First detection of channel catfish virus associated with mortality of cultured catfish (*Ictalurus punctatus*, Rafinesque) in Mexico [J]. 2007, 38: 1428-1431.
- [4] 杜玉东, 陈孝焯, 吴志新, 等. 斑点叉尾鮰疱疹病毒 PCR-ELISA 检测方法的建立 [J]. *华中农业大学学报*, 2009, 28(5): 604-608.
- [5] KUCUKTAS H, BRADY Y J. Molecular biology of channel catfish [J]. *Aquaculture*, 1999, 172: 147-161.
- [6] STINGLEY R L, GRAY W L. Transcriptional regulation of the channel catfish virus genome direct repeat region [J]. *Journal of General Virology*, 2000, 81: 2005-2010.
- [7] 解庭波. 大肠杆菌表达系统的研究进展 [J]. *长江大学学报: 自然科学版*, 2008, 5(3): 77-82.
- [8] 赵博生. 青岛文昌鱼 p23 基因的克隆、鉴定、表达、纯化和功能分析 [D]. 青岛: 中国海洋大学海洋生命学院, 2006.
- [9] VANDERHEIJDEN N, HANSON L A, THIRY E, et al. Channel catfish virus gene 50 encodes a secreted, mucin-like glycoprotein [J]. *Virology*, 1999, 257: 220-227.
- [10] MOORE J P, SODROSKI J. Antibody cross-competition analysis of the human immunodeficiency virus type-1 gp120 exterior envelope glycoprotein [J]. *Journal of Virology*, 1996, 70: 1863-1872.
- [11] KUCUKTAS H, BRADY Y J, TUZUN S. Cloning and expression of a putative glycoprotein gene of channel catfish virus using baculovirus expression system [J]. *Diseases of aquatic organisms*, 1998, 30(34): 231-237.

Prokaryotic Expression of Channel Catfish Herpesvirus ORF6 and ORF10 and Antibodies Preparation

WANG Shu-yun CHEN Xiao-xuan WANG min

ZHOU Jin-min YU Yan-mei YUE Gang-yi LI Li-juan

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

Abstract Primers were designed according to the channel catfish virus open reading frame 6 and 10, and both fragments of 417 bp and 456 bp were produced by PCR. The recombinant expressing plasmid pET-32a-ORF6 and pET-32a-ORF10 were constructed and subsequently expressed in *E. coli* after induced with IPTG. The purified proteins were used to immune rabbits separately and antibodies were obtained. Western blot analysis indicated that the polyclonal antibodies of ORF10 could react specifically with the purified CCV virions demonstrating that the ORF10 is a structural protein of CCV.

Key words channel catfish herpesvirus; membrane protein; prokaryotic expression; polyclonal antibody

(责任编辑:边书京)