# 罗非鱼罗湖病毒 ORF10 蛋白的亚细胞定位及组织表达分析

陈中元1, 王荣华1, 刘志昕1,2, 余乃通1,2

- 湖南文理学院生命与环境科学学院,水生动物重要疫病分子免疫技术湖南省重点实验室,常德市农业生物大 分子研究中心,湖南 常德 415000;
- 中国热带农业科学院热带生物技术研究所,农业农村部热带作物生物学与遗传资源利用重点实验室,海南 海口 571101

摘要:为了研究罗非鱼罗湖病毒(tilapia lake virus, TiLV) ORF10 蛋白的功能,从染病莫桑比克罗非鱼(Oreochromis niloticus) 脾脏和肝脏组织中克隆获得 TiLV ORF10 基因编码序列,并成功构建了荧光定位载体 pEGFP-ORF10 和重组 表达载体 pET32a-ORF10。将荧光定位载体 pEGFP-ORF10 转染鲤(Cyprinus carpio)上皮瘤细胞(Epithelioma papulosum cyprinid, EPC),经荧光显微镜观察,在 EPC 的细胞核中观察到绿色荧光信号,表明该蛋白定位于细胞核中。将重 组载体 pET32a-ORF10 转化大肠杆菌 BL21(DE3)进行目的融合蛋白表达,聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测表 明, His-TiLV ORF10 融合蛋白成功表达并主要存在于上清液中。随后,采用 Ni-NTA 亲和层析的方法纯化融合蛋白 His-TiLV ORF10,以其为抗原多次免疫 Balb/C 小鼠,制备多克隆抗体。蛋白印迹法(WB)分析显示,制备的抗体可 以特异性识别 His-TiLV ORF10。利用蛋白印迹法进一步对感染 TiLV 莫桑比克罗非鱼的不同来源组织进行检测,结 果显示,TiLV ORF10 蛋白在染病莫桑比克罗非鱼肌肉、脾脏、肝脏和肾脏中的表达存在较大差异,其中以肝脏和 肾脏组织表达量为最高,脾脏次之,肌肉中表达量最低。本研究为深入了解 TiLV ORF10 蛋白的功能和病毒侵染与 致病等机理提供了重要基础。

罗非鱼是全球第二大淡水养殖鱼类,仅次于 鲤科鱼类<sup>[1]</sup>。据不完全统计,2017年我国罗非鱼产 量达170万t,占全球罗非鱼产量的40%左右<sup>[2]</sup>。但 是,随着罗非鱼养殖规模的不断扩大,其相关病 害也越来越严重,如类志贺邻单胞菌(*Plesiomonas shigelloides*)、无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*) 等细菌性病原感染给我国罗非鱼养殖业带来了巨 大的经济损失<sup>[3-4]</sup>。近年来发现一种严重危害罗非 鱼的传染性疾病,严重时导致大量的罗非鱼死亡, 经鉴定该病原为罗非鱼罗湖病毒(Tilapia Lake Virus, TiLV),简称罗湖病毒<sup>[5-7]</sup>。感染 TiLV 的罗非 鱼游动缓慢、食欲不振,严重者引起鱼体变黑,体 表出现溃烂,眼睛发炎变白等症状;解剖发现染 病罗非鱼肝脏和肾脏出血、脾脏肿大等特征<sup>[8-10]</sup>。 目前,该病毒已在我国海南省各市县的罗非鱼养 殖场中发现,并引起严重的病毒病害<sup>[11]</sup>。

TiLV 是一种 RNA 病毒, 其基因组由 10 个单链的负链 RNA 片段所组成, 最大的片段长度为 1.6~1.7 kb, 最小的片段长度为 0.4~0.5 kb<sup>[12-13]</sup>。 TiLV 属正黏病毒科, 但是目前未划分到具体属<sup>[13]</sup>。 TiLV RNA1 片段最长, 为 1641 bp, 含 1 个开放阅 读框(open reading frame, ORF), 编码蛋白与 C 型

作者简介:陈中元(1982-),男,理学博士,副研究员,研究方向为水生动物病害及免疫学.E-mail: chenzy@huas.edu.cn 通信作者:余乃通,理学博士,副研究员,研究方向为分子病毒学.E-mail: yunaitong@163.com

收稿日期: 2020-12-17; 修订日期: 2021-02-02.

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(31972835); 湖南省自然科学基金项目(2019JJ50407); 湖南文理学院博士启动基金项目 (19BSQD28).

流感病毒 PB1 具有相似的功能<sup>[14]</sup>。ORF 预测表明, RNA2~RNA10 的9个片段均含有一个假定的 ORF, 但是它们的编码蛋白功能还不清楚。

TiLV RNA10 全长序列(GenBank 登录号 KU751823.1)为465 bp,其编码框(ORF10)大小为 342 bp,预计编码一个大小为12.7 kD的蛋白,生 物信息学分析未找到与其同源的保守结构域。目 前,TiLV ORF10 编码蛋白的功能还不清楚。为此, 本研究从感染TiLV 的莫桑比克罗非鱼(*Oreochroms mossambcus*)脾脏和肝脏组织中克隆获得TiLV *ORF10*基因编码序列,并成功构建了pEGFP-ORF10荧光定位载体和pET32a-ORF10重组表达 载体。随后,我们对TiLV ORF10进行亚细胞定位 分析、原核表达及多克隆抗体制备,同时分析了 其在染病莫桑比克罗非鱼肌肉、脾脏、肝脏和肾 脏中的表达情况。本研究旨为进一步揭示TiLV ORF10蛋白的功能以及TiLV 的致病机理提供基 础依据。

# 1 材料与方法

# 1.1 材料试剂

感染 TiLV 的莫桑比克罗非鱼于 2018 年 10 月从海南省文昌市罗非鱼养殖场获得; EcoR I、 EcoR V和T4连接酶均购自大连宝生物公司; Balb/C 小鼠购自海口美兰茂源贸易商行; 镍离子金属鳌 合亲和层析介质(Ni-NTA)购自生工生物工程(上 海)股份有限公司; 弗氏佐剂购自上海昂一生物 科技有限公司; E. coli DH5α和BL21 (DE3)购自 北京全式金(TransGen Biotech)生物有限公司; 质 粒 pEGFP-N3 和 pET32a(+)由本实验室保存。

# 1.2 方法

**1.2.1 pET32a-ORF10、pEGFP-ORF10 载体的** 构建 TiLV RNA10 全长序列(GenBank 登录号 KU751823.1)为 465 bp,其编码框(ORF10)序列为 342 bp。根据编码框序列设计一对用于克隆到原核 表达载体 pET32a(+)的特异引物,TiLVORF10-F: 5'-cc<u>GATATC</u>ATGAGTGTGGCAGATTATTTGTC-3' (下划线代表 *EcoR* V 酶切位点)和TiLVORF10-R: 5'-cc<u>GAATTC</u>CTAAGACTGCACGTCAAGAG-3' (下划线代表 *EcoR* I 酶切位点)。引物由广州艾基 生物技术有限公司合成。以染病罗非鱼脾脏和肝 脏的 cDNA 为模板,以 TiLV ORF10-F/R 为引物, 对 TiLV ORF10 基因进行 PCR 扩增,反应体系和 扩增条件按照 Yu 等<sup>[15]</sup>报道的条件进行,扩增产 物于 1%琼脂糖凝胶电泳检测,剩余 PCR 产物进 行回收和纯化。将目的基因和 pET-32a(+)质粒分 别用 EcoR I和 EcoR V限制性内切酶进行双酶切, 随后电泳进行回收和纯化,最后用 T4 连接酶将 目的基因连接至 pET-32a(+)载体中。将连接产物 转化至 DH5α 大肠杆菌中,随机挑取经 PCR 验证 大小正确的 3 个重组子送往广州艾基生物技术有 限公司进行测序,同时提取质粒,进行 EcoR I和 EcoR V 双酶切验证。

同理,构建荧光定位载体 pEGFP-ORF10:根据 TiLV ORF10 编码区设计一对特异引物,TiL-VORF10-F2:5'-ggAGATCTATGAGTGTGGCAGA TTATTTGTCAAGTG-3'(下划线代表 Bgl II 酶切位 点)和 TiLVORF10-R2:5'-ggGAATTCGTAGACTG CACGTCAAGAGACTTC-3'(下划线代表 EcoR I 酶切位点)。荧光定位载体 pEGFP-ORF10 构建方 法同上。

**1.2.2 TILV ORF10 亚细胞定位** 取生长状况良好的 EPC 细胞传到带有无菌盖玻片的 6 孔板上, 25 ℃培养 24 h 后,使用 Lipofectamine 3000 转染试剂盒(Invitrogen, USA)将质粒 pEGFP-ORF10 或 pEGFP-N3 转染到 EPC 中;取转染 24 h 和 48 h 的细胞,1×PBS 缓冲液(pH 7.4)清洗 3 次后,用 4%多聚甲醛固定 30 min;随后将细胞用 0.2% Triton X-100 透化 15 min, 1×PBS 缓冲液清洗;用 HOECHST 33342(1 μg/mL)染色 10 min, 1×PBS 缓冲液清洗 3 次,于荧光显微镜(OLYMPUS DP80)下观察。

**1.2.3 His-TiLV ORF10 的原核表达和蛋白纯化** 将测序正确的重组表达载体 pET32a-ORF10 转化 至大肠杆菌 BL21 (DE3);挑取单菌落接种于 30 mL 含氨苄青霉素(Amp)的 LB 培养基中,于 37 ℃、 200 r/min 培养至 6 h; 加入 IPTG 至终浓度为 1.0 mmol/L, 16 ℃、200 r/min 继续诱导表达过夜, 收集诱导表达的菌体;对菌体进行超声波破碎后, 4 ℃、12000 r/min 离心 10 min,分别收集上清和 沉淀并进行 SDS-PAGE 鉴定,其表达的融合蛋白 在上清中占大部分;继而用 Ni-NTA 亲和层析柱纯 化可溶性的目的蛋白 His-TiLV ORF10<sup>[16]</sup>,将纯化 后的目的蛋白进行 SDS-PAGE 鉴定。

1.2.4 TILV ORF10 多克隆抗体制备 将纯化的 融合蛋白 His-TiLV ORF10 与等量的完全弗氏佐 剂混合(1:1, v/v), 充分乳化后,腹部皮下注射免 疫小鼠; 然后每隔 1 周加强免疫 1 次, 共 4 次, 每 次使用同样剂量的融合蛋白和等量的不完全弗氏 佐剂(1:1, v/v)充分乳化后进行免疫; 最后一次 免疫 5 d 后,眼球取血,于4 ℃静置过夜,5000 r/ min 离心 10 min,取上层血清即为多克隆抗体, 分装后-80 ℃保存。

1.2.5 Western blot检测 将纯化的融合蛋白His-TiLV ORF10经SDS-PAGE电泳后,置于半干转膜 仪(Bio-Rad,美国)转印到 PVDF 膜上;用 5%脱脂 牛奶于4℃封闭过夜;加入1:500稀释的 TiLV ORF10多克隆抗血清,于37℃孵育2h后,1× TBST 缓冲液清洗;加入1:2000稀释的 HRP 标 记的 IgG(羊抗鼠),于37℃继续孵育2h,1×TBST 清洗;最后使用化学发光检测仪(ECL)拍照并保 存图片。

**1.2.6 TiLV ORF10 在染病罗非鱼各组织的表达** 分析 取感染 TiLV 第7天有明显症状的罗非鱼肌 肉、脾脏、肝脏和肾脏组织各 0.3 g,使用含有蛋 白酶抑制剂的 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5) 提取总蛋白<sup>[17]</sup>。取 12 μL 的总蛋白提取液,加入 等量 2×SDS 上样缓冲液,煮沸 5 min 后冷却,于 12000 r/min 离心 1 min,取上清。按照 **1.2.5** 所述 步骤进行 SDS-PAGE 电泳和 Western blot 检测,分 析染病罗非鱼各组织中的 TiLV ORF10 蛋白相对 表达情况。同时,使用 β-actin 抗体(1:2500)检测 染病罗非鱼各组织的 β-actin 蛋白作为内参对照。

2 结果与分析

# 2.1 TiLV ORF10 基因的克隆及载体构建

PCR结果显示,使用 TiLV ORF10-F/R 引物扩 增到一条大小约 350 bp 的特异 DNA 条带(图 1 泳 道 1),通过 *Eco*R I、*Eco*R V 双酶切和 T4 连接酶 将其连接到 pET32a 载体上;测序结果显示该片 段大小为 342 bp, Blastn 分析表明该序列为 TiLV ORF10 核苷酸序列,编码框无移位,表明成功构 建了重组表达载体 pET32a-ORF10,可用于下一 步的原核表达。同理,利用 TiLV ORF10-F2/ R2 引物也特异扩增到目的条带(图 1 泳道 2),通过 Bgl II、EcoR I 双酶切和 T4 连接酶将其连接到 pEGFP-N3 载体上,测序结果显示成功构建了荧 光定位载体 pEGFP-ORF10,可用于下一步 TiLV ORF10 的亚细胞定位分析。



图 1 TiLV ORF10 基因的 PCR 扩增 Lane M, Trans 2000 DNA marker; Lane 1, TiLV ORF10-F/R 引物扩增产物; Lane 2, TiLV ORF10-F2/R2 引物扩增产物. Fig. 1 PCR amplification of TiLV ORF10 Lane M, Trans 2000 DNA marker; Lane 1, PCR product by TiLV ORF10-F/R primers;

Lane 2, PCR product by TiLV ORF10-F2/R2 primers.

#### 2.2 TiLV ORF10 的亚细胞定位分析

为了分析 TiLV ORF10 蛋白在 EPC 中表达后 的亚细胞定位分布和动态特征,将 pEGFP-ORF10 和 pEGFP-N3 质粒分别转染细胞,于不同时间点 制样并置于荧光显微镜观察。结果显示,转染 pEGFP-ORF10 的 EPC 细胞在细胞核中(24 h 和 48 h)出现绿色荧光,表明 TiLV ORF10 蛋白定位 于 EPC 的细胞核中(图 2);而转染 pEGFP-N3 细胞 的对照组,在 48 h 的细胞核和细胞质中出现绿色 荧光,表明 EGFP 蛋白定位于 EPC 的细胞核和细 胞质中,与预期结果一致(图 2)。

## 2.3 融合蛋白 His-TiLV ORF10 的原核表达和纯化

将测序正确的 pET32a-ORF10 重组表达载体和 pET32a 空载体转化至 BL21 (DE3)表达菌株中,于 LB 液体培养基(含 1.0 mmol/L 的 IPTG)中诱导表达; pET32a-ORF10 表达菌经超声波破碎后,上



图 2 TiLV ORF10 在 EPC 中的亚细胞定位分析

用质粒 pEGFP-ORF10 或 pEGFP-N3 转染 EPC 细胞, 于 24 h 和 48 h 时间点制样并置于荧光显微镜观察. 绿色荧光信号表示 TiLV ORF10-EGFP 或 EGFP 蛋白, 蓝色荧光表示 EPC 的细胞核; 放大倍数,×40. Fig. 2 The subcellular localization of TiLV ORF10 in EPC cells EPC cells transfected with plasmid pEGFP-ORF10 or pEGFP-N3 were collected at 24 and 48 h and were observed under a fluorescent microscope. Green fluorescence signals indicate TiLV ORF10-EGFP

or EGFP protein; blue fluorescence signals indicate the nuclei of EPC; magnification, ×40.

清经 SDS-PAGE 电泳,结果显示在 33~34 kD 处出现 1 条特异蛋白条带,即 His-TiLV ORF10 融合蛋白(图 3,泳道 2);而空载体 pET32a 表达菌在 22~23 kD 处出现一条特异蛋白条带,即 pET32a 载体自身表达蛋白(图 3,泳道 1)。

将超声波破碎后的 pET32a-ORF10 表达菌上 清液上样于 Ni-NTA 亲和层析柱,于不同咪唑浓 度的洗脱液进行洗脱。结果显示在经 75 mmol/L 咪唑的洗脱液洗脱后,层析柱中已除去大部分其 他杂蛋白,最后使用 100 mmol/L 咪唑的洗脱液将 His-TiLV ORF10 融合蛋白进行收集并保存, SDS-PAGE 电泳结果显示获得的融合蛋白 His-TiLV ORF10 纯度较高(图 3 泳道 3),可用于下一步抗体 制备。





Lane M, 标准蛋白 marker; Lane 1, pET32a/DE3 可溶性蛋白; Lane 2, pET32a-ORF10/DE3 可溶性蛋白;

- Lane 3, 纯化后的 His-TiLV ORF10 融合蛋白. Fig. 3 Prokaryotic expression and protein
  - purification of His-TiLV ORF10
- Lane M, protein marker; Lane 1, soluble protein of
- pET32a/DE3; Lane 2, soluble protein of pET32a-ORF10/DE3; Lane 3, purified His-TiLV ORF10 protein.

#### 2.4 抗体特异性检测

将纯化的融合蛋白第 5 次免疫小鼠后,眼球 取血,获得 TiLV ORF10 多抗血清。为了检测 TiLV ORF10 多抗血清特异性,以 pET32a-ORF10 /DE3 表达菌的诱导表达总蛋白为抗原,以制备的 TiLV ORF10 多抗血清为抗体,进行 Western blot 检测。 结果显示,Western blot 检测到一条大小约 35 kD 的特异目的蛋白条带,即His-TiLV ORF10 融合蛋 白,大小与目标一致,表明 TiLV ORF10 多抗血清 可以特异性识别 TiLV ORF10 表达蛋白(图 4)。

# 2.5 染病罗非鱼各组织中 TiLV ORF10 蛋白含量 分析

以制备的染病罗非鱼肌肉、脾脏、肝脏和肾 脏总蛋白为抗原,以 TiLV ORF10 多抗血清(1: 800 稀释)为抗体。Western blot 结果显示,在染病 罗非鱼的4个组织中均检测到一条大小约21 kD的 特异蛋白条带(图 5),大小与 TiLV ORF10 蛋白



图 4 Western blot 检测 TiLV ORF10 多抗血清特异性 Lanes 1~2, pET32a-ORF10/DE3 诱导表达总蛋白. Fig. 4 The specificity of TiLV ORF10 polyclonal antibody by Western blot Lanes 1-2, Induced total proteins of pET32a-ORF10/DE3.



# 图 5 TiLV ORF10 在染病罗非鱼各 组织中的蛋白表达含量

Lane 1, 感染 TiLV 罗非鱼的脾脏总蛋白; Lane 2, 感染 TiLV 罗非鱼的肌肉总蛋白; Lane 3, 感染 TiLV 罗非鱼的肝脏 总蛋白; Lane 4, 感染 TiLV 罗非鱼的肾脏总蛋白. Fig. 5 The protein expression level of TiLV ORF10 in virus infected tilapia tissues Lane 1, total proteins from TiLV infected tilapia spleen tissue;

Lane 2, total proteins from TiLV infected tilapia muscle tissue; Lane 3, total proteins from TiLV infected tilapia liver tissue; Lane 4, total proteins from TiLV infected tilapia kidney tissue. 分子量一致。进一步分析显示, TiLV ORF10 蛋白 在染病罗非鱼肌肉、脾脏、肝脏和肾脏的表达量差 异较大,其中在肝脏和肾脏表达量最高,脾脏次 之,肌肉中含量最低。而β-actin蛋白在染病罗非鱼 的肌肉、脾脏、肝脏和肾脏中的表达量相对一致。

# 3 讨论

开展病毒未知功能蛋白在细胞中的定位研究, 对阐明病毒基因的功能具有一定的借鉴意义。如 大鲵虹彩病毒 ADRV-13R 蛋白的一系列亚细胞定 位研究, 表明 ADRV-13R 上的跨膜结构域是该蛋 白定位于内质网和病毒加工成所必需的, 暗示 ADRV-13R 在内质网和病毒加工厂中完成病毒生 活周期的某个过程<sup>[18]</sup>。TiLV ORF10 基因编码蛋 白功能未知,也没有可借鉴的同源蛋白功能的相 关报道。因此, 本研究通过 PCR 从感染 TiLV 莫 桑比克罗非鱼脾脏和肝脏组织 cDNA 中成功克 隆到 TiLV ORF10 基因编码序列,并构建了荧光定 位载体 pEGFP-ORF10。亚细胞定位结果显示, TiLV ORF10 蛋白在 EPC 细胞中表达后聚集于细 胞核, 表明该蛋白可能在细胞核内发挥相关功能, 如作为转录因子、调控蛋白、各种酶类等功能因 子; 但是, TiLV ORF10 蛋白的具体功能有待进一 步深入研究。

通过构建原核表达载体 pET32a-ORF10, 我 们成功表达了融合蛋白 His-TiLV ORF10。SDS-PAGE 分析显示融合蛋白 His-TiLV ORF10 在 *E. coli* DE3 主要以可溶性的形式存在,而可溶性蛋白 在后续的蛋白纯化中能更好地保持蛋白的活性, 从而为后续制备高效价、特异性强的多抗血清提 供重要基础。本研究将纯化蛋白免疫小鼠,获得 了鼠源的TiLV ORF10多克隆抗血清。Western blot 特异性检测结果表明,制备的多克隆抗血清能特 异地识别和检测 TiLV ORF10 目的条带蛋白,这 为下一步深入研究 TiLV ORF10 蛋白功能和病毒 的侵染与致病机理提供了基础。

以本文制备的多克隆抗血清检测染病罗非鱼 各组织中 TiLV ORF10 蛋白的表达情况,结果显 示该蛋白在染病罗非鱼肝脏和肾脏中表达量最高, 暗示罗非鱼的肝脏和肾脏可能是 TiLV 的主要靶 器官。罗非鱼是我国重要的淡水养殖鱼类,近年 来其养殖规模和产量不断增加。但是,目前海南 的罗非鱼正面临着罗湖病毒病流行与暴发的风 险。因此,研究 TiLV ORF10 蛋白在染病罗非鱼各 组织中的表达情况为下一步预防和控制 TiLV 提 供科学依据。

## 参考文献:

- Liang Y, Cai C X. International training of prevention and control technology of tilapia lake virus disease was held in Guangzhou, China[J]. China Fisheries, 2018(7): 14. [梁艳, 蔡晨旭. 罗非鱼湖病毒病防控技术国际培训在广州举行 [J]. 中国水产, 2018(7): 14.]
- [2] Li J B, Qin Z D, Zhao L J, et al. Infection of tilapia lake virus in GIFT Oreochromis niloticus and E-11 cell[J]. Journal of Fisheries of China, 2020, 44(1): 142-155. [李嘉波, 秦 真东,赵丽娟,等. 罗非鱼湖病毒对吉富罗非鱼和 E-11 细 胞的感染[J]. 水产学报, 2020, 44(1): 142-155.]
- [3] Liu Z G, Ke X L, Lu M X, et al. Identification and pathological observation of a pathogenic *Plesiomonas shigelloides* strain isolated from cultured tilapia (*Oreochromis niloticus*)
  [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2015, 55(1): 96-106. [刘志 刚,可小丽,卢迈新,等. 尼罗罗非鱼致病性类志贺邻单 胞菌(*Plesiomonas shigelloides*)的分离鉴定及其病理学观 察[J]. 微生物学报, 2015, 55(1): 96-106.]
- [4] Liu G J, Zhu J L, Chen K M, et al. Development of *Strepto-coccus agalactiae* vaccines for tilapia[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2016, 122(2): 163-170.
- [5] Tattiyapong P, Sirikanchana K, Surachetpong W. Development and validation of a reverse transcription quantitative polymerase chain reaction for tilapia lake virus detection in clinical samples and experimentally challenged fish[J]. Journal of Fish Diseases, 2018, 41(2): 255-261.
- [6] Dong H T, Siriroob S, Meemetta W, et al. Emergence of tilapia lake virus in Thailand and an alternative semi-nested RT-PCR for detection[J]. Aquaculture, 2017, 476: 111-118.
- [7] Surachetpong W, Janetanakit T, Nonthabenjawan N, et al. Outbreaks of tilapia lake virus infection, Thailand, 2015-2016
   [J]. Emerging Infectious Diseases, 2017, 23(6): 1031-1033.
- [8] Al-Hussinee L, Subramaniam K, Ahasan M S, et al. Complete genome sequence of a tilapia lake virus isolate obtained

from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. Genome Announcements, 2018, 6(26): e00580-e00518.

- [9] Kembou Tsofack J E, Zamostiano R, Watted S, et al. Detection of tilapia lake virus in clinical samples by culturing and nested reverse transcription-PCR[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2017, 55(3): 759-767.
- [10] Kibenge F S. Emerging viruses in aquaculture[J]. Current Opinion in Virology, 2019, 34: 97-103.
- [11] Chen X Z, Guo S L, Pang L, et al. Research progress on the infection of tilapia lake virus[J]. China Animal Health Inspection, 2017, 34(10): 55-59. [陈信忠, 郭书林, 庞林, 等. 罗非鱼湖病毒感染研究进展[J]. 中国动物检疫, 2017, 34(10): 55-59.]
- [12] Acharya V, Chakraborty H J, Rout A K, et al. Structural characterization of open reading frame-encoded functional genes from tilapia lake virus (TiLV)[J]. Molecular Biotechnology, 2019, 61(12): 945-957.
- [13] Bacharach E, Mishra N, Briese T, et al. Characterization of a novel orthomyxo-like virus causing mass die-offs of tilapia[J]. mBio, 2016, 7(2): e00431-16.
- [14] Lin R W, Chen G W, Sung H H, et al. Naturally occurring mutations in PB1 affect influenza A virus replication fidelity, virulence, and adaptability[J]. Journal of Biomedical Science, 2019, 26(1): 55.
- [15] Yu N T, Zhang Y L, Xiong Z, et al. A simplified method for the simultaneous detection of nervous necrosis virus and iridovirus in grouper *Epinephelus* spp.[J]. Acta Virologica, 2019, 63(1): 80-87.
- [16] Yu N T, Feng T C, Wang J H, et al. Cloning and prokaryotic expression of *Rep* gene of the Haikou isolate of *Banana bunchy top virus* and preparation of polyclonal antiserum against Rep[J]. Plant Protection, 2011, 37(4): 38-43. [余乃通, 冯团诚, 王健华,等. 香蕉束顶病毒海口分离物 *Rep* 基因 的克隆、原核表达、抗血清制备及检测[J]. 植物保护, 2011, 37(4): 38-43.]
- [17] Chen Z Y, Li T, Gao X C, et al. Protective immunity induced by DNA vaccination against *Ranavirus* infection in Chinese giant salamander *Andrias davidianus*[J]. Viruses, 2018, 10(2): 52.
- [18] Yu N T, Zhang Q Y. A transmembrane domain of *Andrias davidianus* ranavirus 13R is crucial for co-localization to endoplasmic reticulum and viromatrix[J]. 3 Biotech, 2019, 9(11): 433.

# Subcellular localization of Tilapia Lake Virus ORF10 protein and its tissue expression analysis

CHEN Zhongyuan<sup>1</sup>, WANG Ronghua<sup>1</sup>, LIU Zhixin<sup>1, 2</sup>, YU Naitong<sup>1, 2</sup>

- Changde Research Center for Agricultural Biomacromolecule, Hunan Provincial Key Laboratory for Molecular Immunity Technology of Aquatic Animal Diseases, College of Life and Environmental Sciences, Hunan University of Arts and Science, Changde, Hunan 415000, China;
- Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Tropical Crops, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China

Abstract: To study the protein function of Tilapia Lake Virus (TiLV) ORF10, the TiLV ORF10 coding region was amplified from the cDNA of spleen and kidney tissues of TiLV-infected tilapia. The eukaryotic expression vector pEGFP-ORF10 and recombinant expression vector pET32a-ORF10 were then constructed. pEGFP-ORF10 was transfected into Epithelioma papulosum cyprini (EPC) cells for fluorescence microscopy observation. Green fluorescence signals were observed in the nuclei of EPC, indicating that TiLV ORF10 was localized in the nucleus. The recombinant vector pET32a-ORF10 was transformed into E. coli DE3 for protein expression analysis, and the results showed that His-TiLV ORF10 was successfully expressed in the supernatant form. Furthermore, the fusion protein His-TiLV ORF10 was purified by Ni-NTA affinity chromatography and was subsequently used to immunize Balb/C mice to prepare polyclonal antibodies. Western blot analysis showed that mice antibodies can specifically recognize His-TiLV ORF10. To further analyze the protein content of TiLV ORF10 in the muscle, spleen, liver, and kidney tissues of TiLV-infected tilapia, the polyclonal antibodies were used for western blot detection. The results revealed differential protein contents of TiLV ORF10 in the muscle, spleen, liver, and kidney tissues. The highest expression was observed in the liver and kidney tissues, followed by the spleen. The lowest expression was found in the muscle tissues. The subcellular localization, polyclonal antibody preparation, and tissue expression analysis of TiLV ORF10 in this article provide an important preliminary basis for the further study of the function of the ORF10 protein.

Key words: Oreochromis mossambicus; Tilapia Lake Virus; ORF10; subcellular localization; tissue expression Corresponding author: YU Naitong. E-mail: yunaitong@163.com