

锦鲤疱疹病毒主要囊膜蛋白基因的 PCR 扩增与序列分析

谭爱萍¹, 邹为民¹, 赵飞¹, 姜兰¹, 陈信廉², 劳海华¹, 简清¹, 陆小茜¹, 罗理¹

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东省水产动物免疫技术重点实验室, 广东 广州 510380; 2. 广州市兴达动物药业有限公司, 广东 广州 511475)

摘要: 为了进一步研究锦鲤疱疹病毒主要囊膜蛋白 (KHV-MEP) 的功能及锦鲤疱疹病毒 (KHV) 的感染机制, 根据 KHV-MEP 基因序列设计并合成 1 对引物, 从自然感染 KHV 发病的锦鲤 (*Cyprinus carpio* Koi) 肝组织总 DNA 中扩增获得特异性基因片段。将所得基因片段克隆到 pMD18-T Simple Vector 载体中, 获得重组质粒 T-KMEP; 酶切鉴定后进行序列测定, 并采用氨基酸亲水性分析软件 TMpred 对其编码氨基酸序列进行分析; 在对该片段所编码氨基酸可能抗原位点分析的基础上, 进行 PCR 改造构建原核表达载体, 获得重组表达载体 pBV-KMEP1 和 pBV-KMEP2。所获得的基因片段大小为 771 bp, 该基因片段与 GenBank 中已登录的 *KHV-MEP* 基因 (AB178537) 的同源性为 100%, 是一个完整的开放阅读框, 所编码的蛋白由 256 个氨基酸组成, 分子量为 28.2 kD, 等电点 (PI) 为 8.65。该序列含有 4 个跨膜区, 可构成主要抗原决定簇。结果显示所获得的目的基因片段就是锦鲤主要囊膜蛋白全基因。[中国水产科学, 2008, 15(5): 880-884]

关键词: 锦鲤疱疹病毒; 主要囊膜蛋白基因; 序列分析; 原核表达载体

中图分类号: S941.41 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2008)05-0880-05

锦鲤疱疹病毒病是由锦鲤疱疹病毒 (Koi Herpesvirus, KHV) 引起的一种传染性疾病, 于 1997 年在以色列首次发现, 先后在瑞典、英国、德国、美国、印度尼西亚和中国台湾等十几个国家和地区传播与流行, 造成很大的经济损失。目前有关锦鲤疱疹病毒病的流行病学研究表明, 感染 KHV 的鲤 (*Cyprinus carpio*) 和锦鲤 (*Cyprinus carpio* Koi) 的死亡率高达 80%~100%。该病毒的致病性具有水温依赖性, 其最适生活温度为 18~27 °C, 发病水温为 22~28 °C, 且在 22~24 °C 感染力最强^[1-2]。由于该病毒造成病鱼的死亡率高, 疫情难以控制, 已引起各国的高度关注。

KHV 属于疱疹病毒科, 是一种双链 DNA 病毒, 其病毒基因组的大小为 270~290 kb; 含有 31 条病毒多肽和至少 8 个糖基化蛋白; 具有囊膜, 直径为 170~230 nm, 核衣壳为 20 面体对称结构, 直径为 100~110 nm^[3-4]。主要囊膜蛋白 (Major envelop protein, MEP) 是锦鲤疱疹病毒囊膜的主要组成部分, 其功能与病毒对细胞吸附/穿入、从细胞核膜出芽释放及诱导细胞融合有关, 并有诱生中和抗体和

细胞毒作用^[5]。

本研究从自然感染 KHV 发病濒死锦鲤的肝组织提取基因组 DNA, 扩增出 KHV 的 MEP 全基因片段 (*KHV-MEP*), 对其序列进行测定及分析, 并构建原核表达载体, 旨在为进一步研究锦鲤疱疹病毒主要囊膜蛋白的功能及 KHV 的感染机制等提供基础依据和参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒来源 感染 KHV 锦鲤取自广东某进口锦鲤养殖场, 病鱼出现的症状包括: 眼球凹陷, 鳃颜色不均匀, 出血或伴有中度至严重坏死, 体表多黏液, 出现苍白的块斑与水泡, 局部皮肤溃烂, 鳍条和体表充血。按照刘荏等^[6]的方法进行 PCR 检测, 结果为 KHV 阳性。

1.1.2 菌株与质粒 大肠杆菌 DH5 α 购自威佳生物工程有限公司; 质粒 pMD18-T Simple Vector 购自宝生物工程 (大连) 有限公司。

1.1.3 工具酶和试剂 Taq 酶购自北京赛百盛基因

收稿日期: 2007-07-04; 修订日期: 2007-10-11.

基金项目: 广东省重大科技兴海 (兴渔) 项目 (070103); 珠江水产研究所所长基金项目 (2006G3); 广州市番禺区科技计划项目 (2007-Z-46-1).

作者简介: 谭爱萍 (1979-), 女, 研究实习员, 从事水产动物疾病的研究. Tel: 020 81616135; E-mail: aipingtan2004@126.com

通讯作者: 邹为民, 研究员. Tel: 020 81616135, E-mail: zwm018@163.com

技术有限公司; 限制性内切酶、T4 DNA Ligase 购自 New England BioLabs 公司; DNA 分子 Marker 为宝生物工程(大连)有限公司产品; 组织基因组 DNA 提取试剂盒(BIOKETE-DP1901)、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(BIOKETE-DP1501)、质粒小量制备试剂盒(BIOKETE-DP1001) 购自百泰克生物技术有限公司; LB 培养基(固体和液体)、琼脂糖等相关试剂购自康龙生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 取感染 KHV 濒死锦鲤的肝脏组织, 称重, 剪碎后, 按 BIOKETE-DP1901 试剂盒操作步骤提取基因组 DNA, 20 °C 保存。

1.2.2 引物设计与 PCR 扩增 根据 GenBank 已登录的锦鲤疱疹病毒主要囊膜蛋白基因序列(AB178537、AB178324), 设计合成引物: P1: 5'-ATGGCAGTCACCAAAGC-3', P2: 5'-TCACCA-CATCTTGCCG-3'。以基因组 DNA 为模板, P1、P2 为引物进行 PCR 扩增。100 μL PCR 反应体系为: dd H₂O 68.5 μL, 10×PCR Buffer 10 μL, PCR 染料 10 μL, 10 mmol/L dNTP 2.5 μL, 5 U/L Taq DNA 聚合酶 1.5 μL, 20 mol/L 上下游引物各 2.5 μL, 模板 2.5 μL。反应条件为: 93 °C 预变性 2 min, 经 93 °C 1 min, 52 °C 1 min, 72 °C 1 min, 35 个循环后, 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。

1.2.3 基因克隆与序列分析 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 直接与 pMD18-T Simple Vector 16 °C 连接过夜。连接反应液转化大肠杆菌 DH5α, 转化菌涂布在含有氨苄青霉素的 LB 固体培养基中 37 °C 培养过夜, 挑取白斑接种于含有氨苄青霉素的 LB 液体培养基中 37 °C 过夜培养, 离心取菌体并使用 BIOKETE-DP1001 试剂盒提取重组质粒, 经 EcoR V 酶切鉴定后, 在 ABI PRISM™3730 全自动荧光测序仪上进行测序。通过 Blast、Vector NTI suite 6.0、DNATOOLS 软件对所测序列进行同源性和蛋白质分析, 并用氨基酸亲水性分析软件 TMpred 分析所克隆的片段编码氨基酸的可能抗原位点。

1.2.4 原核表达载体构建 在分析所得片段编码氨基酸的可能抗原位点的基础上, 设计末端含有 EcoR I 和 Sal I 酶切位点的接头引物: P3: 5'-CGGAATTCATGCTGACCAAGACCA-3', P4: 5'-CGGGATCCTTA GACAATCTCACGC-3'。以含 KHV-MEP 基因片段的质粒为模板, P3、P4 为引物

进行 PCR 扩增。扩增产物经纯化后, 用 EcoR I 和 Sal I 双酶切, 酶切产物定向插入到同样双酶切后的表达质粒 pBV220, 转化大肠杆菌 DH5α, 蓝白斑筛选重组子。阳性质粒经双酶切鉴定后再测序。

2 结果与分析

2.1 KHV 主要囊膜蛋白基因的 PCR 扩增及鉴定

琼脂糖凝胶电泳结果显示, PCR 产物大小约为 770 bp, 连接入 pMD18-T Simple Vector 的重组子 T-KMEP, 经 EcoR V 酶切鉴定含有目的片段(图 1), 与预期相符合。

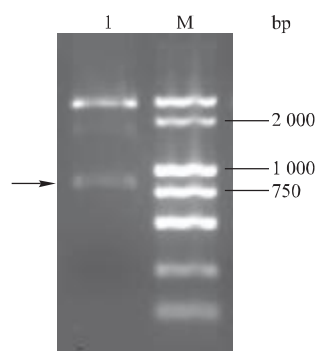


图 1 重组子 T-KMEP 的酶切鉴定

M. DL-3000 分子量标准; 1. EcoR V 酶切的 T-KMEP。箭头所指为目的片段。

Fig.1 The identification of the recombinant plasmids T-KMEP M. DL-3000 Marker; 1. T-KMEP digested with EcoR V. Arrow shows the target fragment.

2.2 KHV 主要囊膜蛋白基因的序列及其分析

测序结果显示, 得到的基因片段大小为 771 bp。Blast 比对和 Vector NTI suite 6.0 软件分析表明该片段与 GenBank 中登录的 KHV-MEP 基因(AB178537) 同源性为 100%。

使用 DNATOOLS 软件对该序列进行分析, 发现其开放阅读框(ORF) 长度为 771 bp, 是一个完整的开放阅读框, 所编码的蛋白质由 256 个氨基酸组成, 分子量为 28.2 kD, 等电点(PI) 为 8.65。所编码的氨基酸与 GenBank 中登录的 KHV-MEP(AB178537) 的同源性也达 100%(图 2)。

通过氨基酸亲水性分析软件 TMpred 对其编码氨基酸序列进行分析。结果表明, 该序列含有 4 个跨膜区, 分别位于第 44 至 64 位氨基酸、第 80 至 104 位氨基酸、第 119 至 139 位氨基酸、第 161 至 184 位氨基酸的位置(图 3)。

```

1      M A V T K A Q L A K R A K K I G T A L M
1      ATGGCAGTCACCAAAGCTCAACTGGCCAAGAGAGCCAAAAAATCGGCACCGCCCTGATG
21     N K V P T A S A S K L L V K L P V D A E
61     AACAAAGGTGCCCACTGCGTCGGCGAGCAAGCTCCTCGTCAAGCTTCCCGTAGACGCTGAG
41     R F K I L V A T V T Q V I C P M F A P L
121    CGATTCAAGATACTCGTCGCAACTGTACGCAGGTCATCTGTCCAATGTTTGCCCGGCTG
61     T M G I A H A M Y S N D P N F D L N G A
181    ACGATGGGCATTGCGCACGCCATGTACTCCAACGATCCCAACTTTGATCTCAACGGCGCC
81     F I G I G I F G A L V F L V L L G T F I
241    TTCATCGGCATCGGAATCTTCGGTGCCCTCGTCTTCCTCGTCCTCCTCGGAACCTTCATC
101    M L C Y R C V K G G H S M F M L M R P V
301    ATGCTCTGCTACCGGTGCGTGAAGGGAGGCCACAGCATGTTTCATGCTGATGAGGCCCGTG
121    L A L F I L N I F L F L I G V I Y A G I
361    TTGGCGCTGTTTATCCTCAACATCTTCCTCTTCCTGATCGGGGTCATCTACGCCGGCATC
141    N L L C K T V T Y S K T A V C V S Q N A
421    AACCTGCTGTGCAAGACGGTCACCTACTCGAAGACGGCGGTGTGCGTGTCTCAGAACGCC
161    M S L A V L E L F T A C L I L L K E T L
481    ATGTCCCTGGCCGTGCTGGAGCTCTTACC GCCTGCCTGATCCTCCTCAAAGAGACCCTT
181    Y S G L R M A E I K A R V S G G A M E Y
541    TACAGCGGCCTGCGCATGGCCGAGATCAAGGCCCGCGTGAGCGGGCGCTATGGAGTAC
201    E G S D D E Y Y Y N S Y Q N V A E G L Q
601    GAAGGAAGCGACGACGAATACTACTACAACCTCCTACCAGAACGTAGCGGAGGGCCTCCAG
221    R S M R D Y Q D D E D F S D P D T E S V
661    AGGTCTATGCGCGACTATCAGGACGACGAGGATTTTTCTGACCCAGACACTGAGAGCGTC
241    I G Q A S K I P R K Y T G K M W -
721    ATCGGTCAGGCCTCCAAAATCCCACGCAAGTACACCGGCAAGATGTGGTGA

```

图2 锦鲤主要囊膜蛋白核苷酸序列及推导出的氨基酸序列

Fig.2 Nucleotide sequence and the predicted amino acid sequence of KHV-MEP

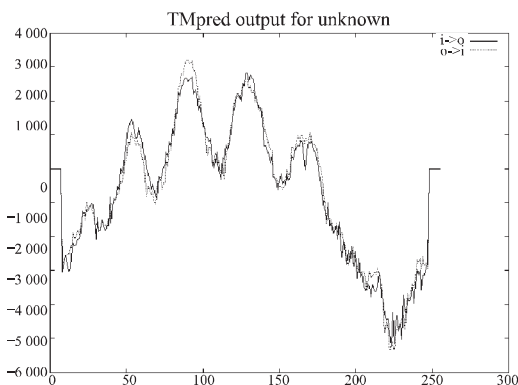


图3 锦鲤主要囊膜蛋白氨基酸亲水性图谱

Fig.3 Hydrophilicity profile of KHV-MEP

2.3 原核表达载体的构建

将 PCR 扩增的 DNA 片段用 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切, 插入原核表达载体 pBV220 的 *EcoR* I 和 *Sal* I 位点, 转化大肠杆菌 DH5 α , 筛选得到 2 个转化子, 分别命名为 pBV-KMEP1 和 pBV-KMEP2。用 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切重组质粒 DNA, 得到的插入片段大小约 780 bp, 与 PCR 改造片段大小相同 (图 4)。测序验证表明插入片段与预期目标序列完全一致。

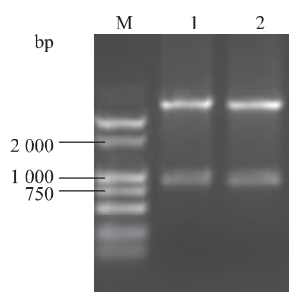


图4 重组质粒的酶切鉴定

M. DL-3000 分子量标准; 1. *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切的 pBV-KMEP1; 2. *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切的 pBV-KMEP2.

Fig.4 The identification of the recombinant plasmids PBV-KMEP

M. DL-3000 Marker; 1.pBV-KMEP1 digested with *EcoR* I /*Sal* I ; 2.pBV-KMEP2 digested with *EcoR* I /*Sal* I .

3 讨论

目前人们主要在锦鲤疱疹病毒病的流行病学、诊断方法和检测标准、分类等方面进行了研究。Antychowicz 等^[7]对锦鲤疱疹病毒病的流行病学、致病性和分子生物学进行过报道; Gilad 等^[8]测定了不同水温下患锦鲤疱疹病毒病锦鲤的死亡情况; Gunimaladevi 等^[9]、Soliman 等^[10]报道采用 LAMP 法能高度灵敏、快速、省力检测出 KHV 病毒; 刘蕊等^[6]、乌日琴等^[11]也初步建立了快速、灵敏和操作简便的 KHV 病毒的 PCR 检测方法。但其免疫学方面的研究报道较少,有关锦鲤疱疹病毒囊膜蛋白的研究,国内属首次报道。

囊膜是囊膜病毒的一个组成部分,源于宿主的细胞膜。有研究发现,病毒的囊膜决定病毒的抗原性,并与病毒的感染密切相关;研究还发现,病毒囊膜表面的囊膜蛋白通常有 1~3 种,并具有良好的免疫原性^[12-14]。

本研究获得 771 bp 的目的基因片段,经测序与同源性分析,该基因片段和其氨基酸序列与 GenBank 中登录的锦鲤主要囊膜蛋白基因 (AB178537) 同源性均为 100%,显示所获得的目的基因片段就是锦鲤主要囊膜蛋白全基因。而氨基酸亲水性分析结果表明,本研究所获得的基因片段含有 4 个跨膜区,可构成主要抗原决定簇。同时原核表达载体的成功构建,可为后期 *KHV-MEP* 基因的表达和进一步研究锦鲤主要囊膜蛋白的功能及 KHV 的感染机制等提供基础材料和参考。

参考文献:

- [1] Gilad O, Yun S, Andree B. Initial characteristics of Koi herpesvirus and development of a polymerase chain reaction assay to detect the virus in Koi, *Cyprinus carpio* Koi[J]. Dis Aquat Org, 2002, 48 (2): 101-108.
- [2] Perelberg A, Smirnov M, Hutoran M, et al. Epidemiological description of a new viral disease afflictive cultured *Cyprinus Carpio* in Israel[J]. Israel J Aquac, 2003, 55 (1): 5-12.
- [3] Hutoran M, Ronen A, Perelberg A, et al. Description of an as yet unclassified DNA virus from diseased *Cyprinus carpio* species[J]. J Virol, 2005, 79 (4): 1 983-1 991.
- [4] 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): 4 677-4 684.
- [5] 孟祥俊. 单纯疱疹病毒糖蛋白的特性及其临床意义 [J]. 国外医学病毒学分册, 2002, 21 (5): 184-188.
- [6] 刘蕊, 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.
- [7] Antychowicz J, Reichert M, Matras M, et al. Epidemiology, pathogenicity and molecular biology of Koi Herpesvirus isolated in Poland[J]. Bull Vet Inst Pulawy, 2005, 49: 367-373.
- [8] 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: 2 661-2 668.
- [9] Gunimaladevi I, Kono T, Venugopal M N, et al. Detection of koi herpesvirus in common carp, *Cyprinus carpio* L., by loop-mediated isothermal amplification [J]. J Fish Dis, 2004, 27 (10): 583-589.
- [10] Soliman H, El-Matbouli M. An inexpensive and rapid diagnostic method of Koi Herpesvirus (KHV) infection by loop-mediated isothermal amplification [J]. J Virol, 2005, 17 (2): 83.
- [11] 乌日琴, 刘中勇, 黄宝春. PCR 方法快速检测锦鲤疱疹病毒基因 [J]. 检验检疫科学, 2005, 15 (2): 6-8.
- [12] 龙燕, 徐进平, 王健, 等. 对虾白斑综合症病毒囊膜蛋白 VP28 的表达及其抗病毒感染作用 [J]. 中国病毒学, 2006, 21 (2): 178-180.
- [13] 贾启军, 孟小林, 徐进平, 等. 对虾白斑综合症病毒囊膜蛋白 VP19 的融合表达及其抗病毒感染作用 [J]. 中国病毒学, 2006, 21 (6): 585-588.
- [14] 魏克强, 许梓荣. 家蚕蛹表达对虾白斑综合症病毒囊膜蛋白 Vp28 和 Vp19 的免疫原性 [J]. 中国兽医学报, 2006, 26 (4): 360-362.

PCR amplification and sequence analysis of the major envelop protein gene of KHV

TAN Ai-ping¹, ZOU Wei-min¹, ZHAO Fei¹, JIANG Lan¹, CHEN Xin-lian², LAO Hai-hua¹, JIAN Qing¹, LU Xiao-dan¹, LUO Li¹

(1.Guangdong key Laboratory of Aquatic Animal Immune Technique, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China; 2.Guangzhou Xingda Animal Health Products Co., Ltd, Guangzhou 511475, China)

Abstract: In the present study, the total DNA of Koi Herpesvirus (KHV) was extracted from the liver of Koi carp (*Cyprinus carpio* Kio). To study the function of the major envelop protein (KHV-MEP) and the infection mechanism of KHV. *KHV-MEP* gene was amplified using the primers which were designed based on the *KHV-MEP* gene sequence in GenBank (AB178537, AB178334). The PCR product was then ligated to pMD18-T simple vector and transformed into *E.coli* DH5 α . The sequencing result of recombinant plasmid indicates that the major envelop protein gene of KHV is 771 bp long. It is an integrate exoteric Open Reading Frame (ORF), encoding a protein composing 256 amino acids whose molecular mass is 28.2 kD and isoelectric point (PI) is 8.65. It has the highest homology of 100% with the major envelop protein gene of KHV (AB178537) in GenBank. Amino acid hydrophilic analysis indicates that there are 4 transmembrane regions, which are the main antigenic determinant of the major envelop protein. The results show that the target fragment is the major envelop protein gene of KHV. [Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15 (5): 880-884]

Key words: Koi Herpesvirus (KHV); major envelop protein gene; sequence analysis; prokaryotic expression vector

Corresponding author: ZOU Wei-min. Tel: 020-81616135; E-mail: zwm018@163.com