

编码鳊传染性脾肾坏死病毒结构蛋白新基因 ORF90.5L 的鉴定分析

王庆¹, 罗永文², 刘春¹, 曾伟伟¹, 张超¹, 石存斌¹, 吴淑勤¹

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东 广州 510380; 2. 华南农业大学 兽医学院, 广东 广州, 510640)

摘要: 鳊传染性脾肾坏死病毒 (Infectious spleen and kidney necrosis virus, ISKNV) 全基因组序列于2001年完成测定, 全基因组为111 362 bp, 含有124个推测的开放阅读框 (ORF)。2007年, Eaton 等对12株已完成序列测定的虹彩病毒代表株进行分析比较, 除了已经推测的ORF外, 认为ISKNV基因组中还存在一个的核心基因 (Core gene) *ORF90.5L*。本研究以ISKNV的cDNA为模板, 根据Eaton等报道中推测的上下游位点设计引物扩增出一段963 bp的PCR产物。该序列编码一个320个氨基酸的蛋白质, 推测分子量为35 kD, 含有预测的跨膜区, 与虹彩病毒属 (*Iridovirus*) 其他成员编码的肉豆蔻基膜蛋白有较高的同源性。将该片段克隆到原核表达载体 pET32a(+) 中, 纯化表达的重组蛋白 pET90.5L 免疫昆明鼠获得高效价多克隆抗体。利用抗 pET90.5L 抗体与纯化病毒进行免疫印迹, 结果表明, 抗 pET90.5L 的多抗可以特异性识别病毒粒子中大小约为35 kD的蛋白条带, *ORF90.5L* 编码的蛋白应为病毒的结构蛋白。本研究旨在为ISKNV基因工程疫苗的研发和病原侵染机制研究提供基础参考。[中国水产科学, 2010, 17(4): 753-760]

关键词: 鳊传染性脾肾坏死病毒; 核心基因; 病毒结构蛋白

中图分类号: S94

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2010)04-0753-08

虹彩病毒是典型的正二十面体病毒, 又称为二十面体胞浆型脱氧核糖核酸病毒群 (Icosahedral cytoplasmic deoxyriboviruses)。由于病毒粒子呈周期性间隔的整齐排列, 形成晶格平面并互相重叠, 当有斜射光线照射时呈现蓝色或紫色虹彩, 故名虹彩病毒 (希腊文 *Iris*, *Iridos*)^[1]。根据国际病毒分类委员会 (ICTV) 第8次报告^[2], 虹彩病毒科被分为5个属: 虹彩病毒属 (*Iridovirus*)、绿虹彩病毒属 (*Chloriridovirus*)、蛙病毒属 (*Ranavirus*)、淋巴囊肿病毒属 (*Lymphocystivirus*) 和肿大细胞虹彩病毒属 (*Megalocytivirus*)。由于肿大细胞病毒对商业价值较高的淡水 and 海水鱼类的感染事件多有发生, 故其致病机理和疫苗研发一直是近几年研究的重点。日本已成功研发真鲷虹彩病毒 (Red sea bream iridovirus, RSIV) 注射型全细胞灭活疫苗并实现商业化, 针对RSIV研发的DNA疫苗也显示出良好的保护

效果^[3-4]。但是对于大部分已报道的肿大细胞虹彩病毒来说, 由于难以实现在常见鱼类细胞中的增殖, 细胞灭活疫苗的开发有一定难度, 利用基因工程技术研发疫苗是目前的一个重要方向。

Eaton 等^[5]对虹彩病毒属的12个代表株进行了序列分析, 在原有的19个核心基因 (core gene) 的基础上, 重新定义了额外的7个核心基因。作为核心基因, 推测它们极可能在病毒的生命周期中扮演重要的和必不可少的角色^[5-6]。*ORF90.5L* 作为核心基因, 由于当年测序错误或可能的移码原因而导致遗漏, 鉴此, 本研究对该基因进行了相关分析。业已证实与该基因同源的虎纹蛙病毒 (Tiger frog virus, TFV) *ORF001L* 基因为编码TFV重要的囊膜蛋白^[7]。为了验证 *ORF90.5L* 是否编码病毒重要的结构蛋白, 本研究对这一推测的新基因进行鉴定分析, 希望该基因

收稿日期: 2009-10-25; 修订日期: 2010-01-05.

基金项目: 农业部公益性行业科研专项资助 (200803013); 现代农业产业技术体系建设专项资金资助项目 (nycytx-49-14)。

作者简介: 王庆 (1976-), 女, 博士, 助理研究员, 主要从事水生病毒学研究. E-mail: sunny_929@163.com

通讯作者: 吴淑勤, 研究员, 博士生导师. E-mail: wushuqin001@21cn.com

的发现能为 ISKNV 基因工程疫苗研发和病原侵染机制研究提供基础参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

ISKNV 感染鳃病料由本实验室保存。LA Tag DNA 聚合酶、限制性内切酶购自 TAKARA 公司, T_4 连接酶购自 Promega 公司, 质粒 pET32a(+) 购自 Merck 公司, dNTPs、DNA Marker 购自天根生物有限公司, 反转录试剂盒购自 TOYOBO 公司, 胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自 OMEGA 公司, 氨苄青霉素 (Ampicillin)、SDS、Tris 碱等均为 AMRESCO 公司产品, 抗 His Tag 单克隆抗体购自 Novagen 公司, 羊抗鼠 IgG-HRP 抗体和 DAB 浓缩显色液购自博士德公司, 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 病毒 cDNA 模板的制备

取约 50 mg 新鲜感染的鳃脾肾组织放入研钵中, 加入少量液氮, 迅速研磨。待组织研磨完全后, 加入 1 mL Trizol, 按照说明书方法提取总 RNA。按照 TOYOBO 反转录试剂盒说明书进行反转录, 合成的 cDNA 放置 -20°C 备用。

1.3 引物的设计

从 GenBank 中查找 ISKNV 的全基因组序列 (AF361960), 根据 Eaton 等^[5]发表的文章设计 ORF90.5L 的上下游引物。采用软件 DNA Star 中 MapDraw 分析序列中可能存在的酶切位点。为将目的片段定向克隆到载体 pET32a(+) 中, 上下游引物的 5' 端分别引入 BamHI 和 Xho I 的酶切位点, 设计的引物序列如下:

90.5L-F 5'-CGGGATCCatgacgacagtaacactgtatc-3';

90.5L-r 5'-CGCTCGAGctaggcaaatgcggcaata-3'。

1.4 重组质粒 pET90.5L 的构建和序列测定

从 -20°C 冰箱中取出制备的病毒 cDNA 模板, 采用引物 90.5L-F 和 90.5L-r 进行 PCR 扩增。扩增反应热循环参数为: 95°C 3 min; 95°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 1 min, 30 个循环; 72°C 延伸 10 min。全部 PCR 产物和 DNA Marker (DL3000) 在 1% 的琼脂糖凝胶中电泳。回收步骤按照 OMEGA 公司胶回收试剂盒进行。

纯化后的 PCR 产物和 pET32a(+) 进行 BamHI 和 Xho I 双酶切, 37°C 过夜。次日, 将酶切产物再次进行胶回收纯化。按照 T_4 连接酶说明书 16°C 连接过夜, 连接产物转化感染态细胞 DH5 α , 转化菌涂板培养, 挑选菌落, 接种 LA 液体培养基摇菌培养, 离心收集菌液提取质粒。质粒提取方法按照 OMEGA 质粒提取试剂盒说明进行。质粒经 BamHI 和 Xho I 双酶切后, 筛选阳性质粒, 并送上海生物工程有限公司进行序列测定。

1.5 ORF90.5L 的序列分析

序列分析采用软件 DNA Star, Clustal X 1.81, 蛋白跨膜区预测采用在线软件 TMHMM Server V.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)。同源性比较中所用序列在 GenBank 中登录号为 AY532606、AF361960、AY548484、AF389451、AY150217、AY666015、AY521625、NC_001824、NC_005902、ABR08658.1。

1.6 重组蛋白的诱导表达

经过鉴定无序列错误的重组质粒 pET90.5L 转化 BL-21 (DE3) 感受态细胞, 转化方法同 1.4。转化 LA 平板上长出的单菌落于 LA 液体培养基中 37°C 摇床活化过夜, 次日按照 1% 的比例转接于新鲜的 LA 液体培养基中, 培养至 OD_{600} 为 0.8 ~ 1.0 时, 加入终浓度为 1 mmol/L IPTG 诱导, 继续培养 3 ~ 5 h。取诱导培养后的菌液 1 mL $12\,000\text{ r/min}$ 离心 1 min 收集菌体, 尽可能地弃掉上清液, 加原培养液 1/10 体积的 PBS 重悬, 再加入等体积 2 $\times$ SDS-PAGE 上样缓冲液, 充分混匀后煮沸 5 ~ 10 min, 取 10 μL 用于 SDS-PAGE。电泳完成后, 用考马斯亮蓝染色液染色 30 min 以上, 再用脱色液脱色至背景干净, 观察蛋白带型。

1.7 重组蛋白的 Western blot 检测

按照 1.6 中方法进行 SDS-PAGE 蛋白电泳, 电泳结束后, 180 mA 恒流 3 h 将蛋白转移至硝酸纤维素 (NC) 膜上, 加封闭液于常温下封闭 2 h, 用 PBST (含 0.05% TWEEN-20 的 0.01 mol/L PBS) 洗涤 3 次, 每次 5 min。加入适量稀释的抗 His-tag 单抗, 常温

下轻摇孵育1~2 h, PBST洗涤3次, 每次5 min; 再加入反应底物为辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠IgG (IgG-HRP), 轻摇孵育1~2 h。PBST洗涤3次, 每次5 min。最后, 用加入显色液避光显色10 min 观察结果。用双蒸水漂洗终止显色反应。

1.8 重组蛋白的纯化

大量诱导表达的重组菌悬液, 6 000 r/min 离心收集, 细菌沉淀用0.01 mol/L PBS重悬, 超声破菌后, 弃上清。沉淀中加入含8 mol/L 尿素的PBS, 4℃下垂直混合仪上使包涵体中的蛋白质溶解过夜。7 000 r/min 离心30 min 除去沉淀。上清中加入适量的Ni-NTA 亲和层析柱料, 4℃垂直混合过夜或室温2~3 h。填料装入蛋白纯化柱, 利用重力流纯化His 标签蛋白。SDS-PAGE 鉴定蛋白质的纯化情况。

1.9 多克隆抗体的制备

纯化蛋白透析过夜后, 测定蛋白浓度, 取适量蛋白与等体积的完全福氏佐剂混合。注射器反复推送混匀。取昆明鼠10只, 采用腹部皮下多点注射方式进行免疫, 另有5只注射pET32a(+)空载体表达的硫氧还蛋白作为对照, 两周后进行第2次免疫, 以后每隔7 d 免疫一次, 使用不完全福氏佐剂, 免疫剂量按首次免疫的剂量一半进行。在第4次免疫后的7 d, 以拔眼球法取鼠血。血清分装后, 放置-80℃保存。

1.10 病毒蛋白的 Western Blot 分析

病料组织中病毒的纯化参考He等^[8]方法, 稍加修改。取2~3条检测阳性病鱼的脾肾组织, 充分研磨, 反复冻融3次, 10 000 g 离心30 min 后取上清。在上清中加入NaCl至终质量分数为2.3%, 聚乙二醇8 000 (PEG 8 000) 至终质量分数为8%。4℃震荡过夜。取出10 000 g 离心10 min, 弃上清, 将沉淀溶于pH为8.0的TNE缓冲液中。经蔗糖梯度离心后, 收集病毒条带, 再次离心收集并加适量TNE重悬, 取10 μL 样品送至电镜观察, 其余-70℃保存。

纯化的病毒进行蛋白电泳、转膜步骤及封闭过程见1.6, 一抗使用自行制备的抗pET90.5L血清稀释1 000倍与膜室温孵育1~2 h, HRP标记的羊抗鼠IgG二抗室温孵育1~2 h, PBST洗涤后DAB显色。

2 结果与分析

2.1 重组质粒 pET90.5L 的构建

以ISKNV的cDNA为模板, 扩增出了950 bp左右的片段, 与预期大小相符(图1a)。将PCR产物进行凝胶回收, 与pET32a(+)进行BamH I和Xho I双酶切, 连接。构建的重组质粒进行双酶切鉴定, 结果显示, 可以切出预期大小的质粒片段和插入的PCR产物片段(图1b)。

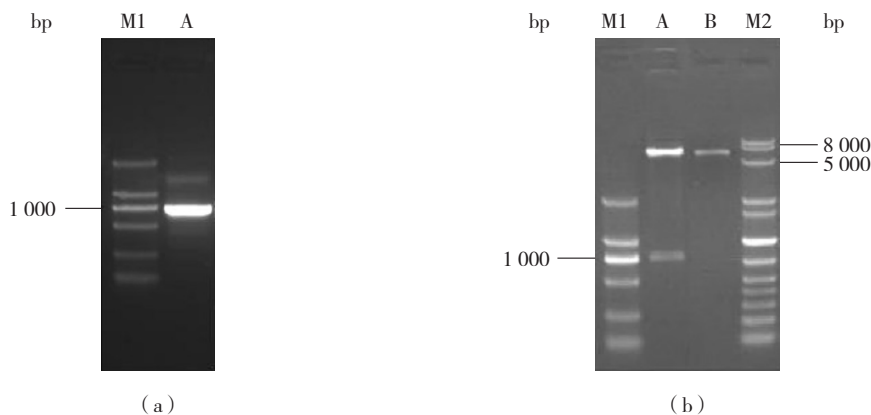


图1 ORF90.5L的PCR产物(a)和质粒pET32a(+)、重组质粒pET90.5L的双酶切结果(b)

(a) M1: DL3000 DNA分子量标记; A: ORF90.5L PCR产物。(b) M1和M2: DL3000和1 kb DNA Ladder DNA分子量标记; A: 重组质粒pET90.5L的双酶切结果; B: 质粒pET32a(+)的双酶切结果。

Fig. 1 PCR product of ORF90.5L (a) and double enzymes digestion of plasmid pET32a(+) and recombinant plasmid pET90.5L (b)
M1: DNA Marker; A: PCR product of ORF90.5L. (b) M1 and M2: DNA Marker; A: double enzymes of digested product of pET90.5L; B: double enzymes of digested product of pET32a(+).

2.2 ORF90.5L的序列分析

重组质粒pET90.5L经序列测定后,结果表明,预测的ORF90.5L为963 bp,与ISKNV基因组(AF361960)反义链84 663~83 701 bp的序列完全吻合(图2)。使用DNASar软件和TMHMM(Server V.2.0)在线软件分析,ORF90.5L推导的蛋白序列为320个氨基酸(图2),编码一个预测大小约35 kD的蛋白,含有预测的跨膜螺旋。推导的氨基酸序列与脊椎动物虹彩病毒代表株比较,与同病毒属条石鲷虹彩病毒(Rock sea bream iridovirus, RBIV) ORF085

具有较高的同源性,为84.2%,与不同病毒属代表株虎纹蛙病毒(TFV)、虎皮蝾螈病毒(*Ambystoma tigrinum* virus, ATV)、蛙病毒3型(Frog virus 3, FV3)、石斑鱼虹彩病毒(Grouper iridovirus, GIV)、淋巴囊肿病病毒1型(Lymphocystis disease virus 1, LCDV-1)、淋巴囊肿病病毒中国株(Lymphocystis disease virus-isolate China, LCDV-C)、蛙病毒(*Rana grylio* virus, RGV)、新加坡石斑鱼虹彩病毒(Singapore grouper iridovirus, SGIV)同源序列相比,同源性在34%~43%(图3)。

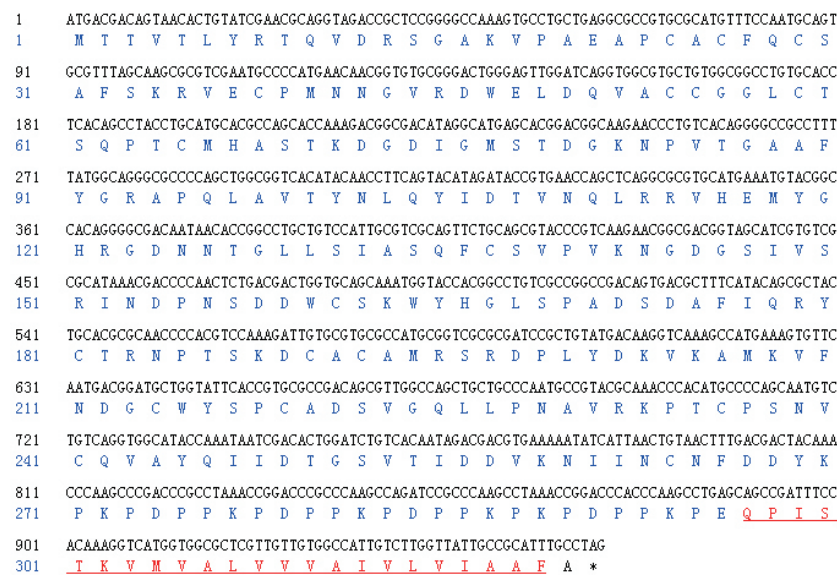


图2 ORF90.5L的核苷酸序列和推导的氨基酸序列
下划线为推测的跨膜区。

Fig. 2 Nucleotide acid sequence and deduced amino acid sequence of ORF90.5L
the transmembrane helix is indicated by underline.

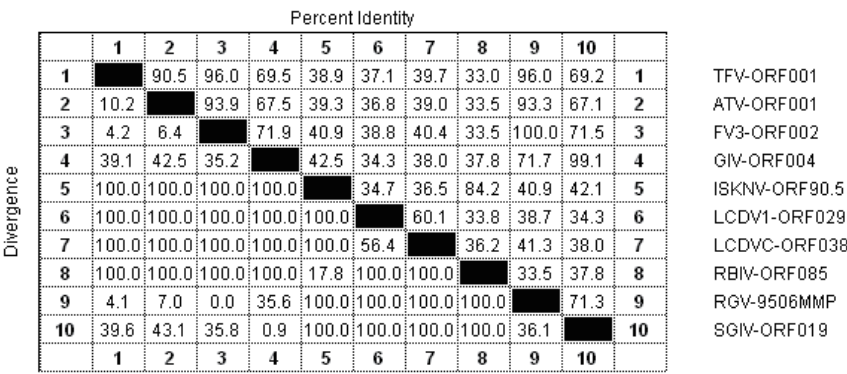


图3 ISKNV ORF90.5L推导的氨基酸序列与其他虹彩病毒类似ORF推导序列的同源性比较

Fig. 3 Homology comparison of deduced amino sequence of ISKNV-ORF90.5 and similar ORFs from other iridovirus

2.3 重组蛋白 pET90.5L 的表达和纯化

重组菌 BL21 在 37 ℃ 诱导表达后,收集细胞进行 SDS-PAGE 分析,结果见图 4。pET32a(+) 空载体经诱导后,可产生明显条带,大小约为 21 kD。90.5L 基因克隆时在引物后面加上了终止密码子,所以理论上应该是预测蛋白大小 35 kD 加上约 16.5 kD 的融

合肽。pET90.5L 重组蛋白的大小预测为 51.5 kD,从 SDS-PAGE 胶上可以看出特异性表达带(图 4)。重组蛋白经过超声破碎后,将上清和沉淀进行电泳,重组表达蛋白基本为包涵体(资料未显示)。重组蛋白对 Ni-NTA 亲和层析柱料具有较高的亲和力,纯化蛋白几乎无杂带(图 4)。

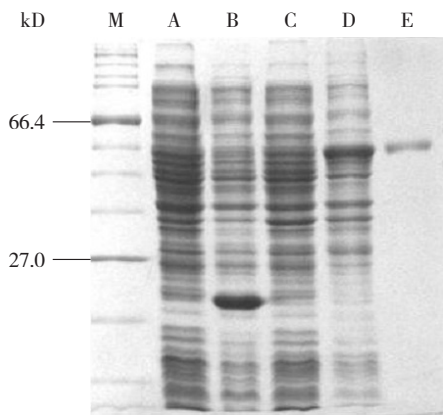


图 4 表达纯化的重组蛋白 pET90.5L 样品电泳图
M: 蛋白分子量标记; A: pET32a(+), 未诱导; B: pET32a(+), 1 mmol/L IPTG 诱导; C: pET90.5L, 未诱导; D: pET90.5L, 1 mmol/L IPTG; E: 纯化的重组蛋白 pET90.5L.

Fig. 4 Protein expression and purification of recombinant protein pET90.5L

M: Protein Marker; A: pET32a(+), without IPTG induction; B: pET32a(+), with 1 mmol/L IPTG induction; C: pET90.5L, without IPTG induction; D: pET90.5L, with 1 mmol/L IPTG induction; E: purified recombinant pET90.5L.

2.4 重组蛋白 pET90.5L 的 Western blot 检测

重组蛋白 pET90.5L 经 SDS-PAGE 后转膜,使用商品化的抗 His-tag 的抗体检测重组蛋白的表达。

Western blot 的结果显示,抗体可以检测到空载体和重组质粒预测大小的表达带,说明重组蛋白确实正常表达了(图 5)。

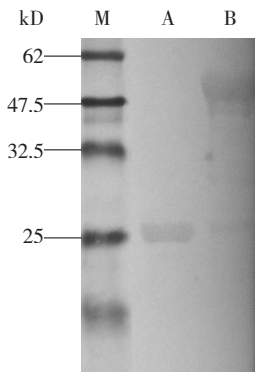


图 5 重组质粒 pET90.5L 表达产物的 Western blot 检测
M: 蛋白分子量标记; A: pET32a(+) 表达产物; B: 重组质粒 pET90.5L 表达产物.

Fig. 5 Identification of recombinant protein expression product of pET90.5L by western blot
M: Protein marker; A: protein expression product of pET32a(+); B: protein expression product of pET90.5L.

2.5 病毒蛋白的 Western blot 检测

在铜网上滴加 5 μ L 病毒液,吸附 1 min,经过负染后,电镜下可见到大量纯化的病毒粒子,直径在 150 nm 左右(图 6)。取 10 μ L 病毒液进行 SDS-PAGE 电泳,转膜后用抗 pET90.5L 的抗血清作为一抗孵育。结果显示,纯化的 ISKNV 病毒粒子经 SDS-PAGE 电泳,有约 30 条的蛋白条带,其带型分布和条带数目与董传甫^[13]纯化 ISKNV 病毒粒子后的电泳结果

相似(图 7a)。Western blot 结果显示,抗 pET90.5L 的抗血清可以特异性识别病毒蛋白上大小约 35 kD 的蛋白条带(图 7b),抗 pET32a(+) 空载体血清则不能检测到任何蛋白条带。对应于纯化病毒粒子的电泳图,分子量 35 kD 左右的病毒蛋白至少有 4~5 条,很难通过肉眼观察来判断本研究中 *ORF90.5L* 编码的结构蛋白在病毒粒子蛋白电泳图中的对应条带。

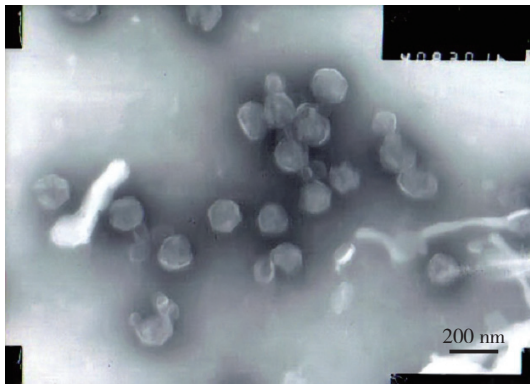


图6 纯化的ISKNV病毒颗粒
Fig. 6 Purified virus particles under EM

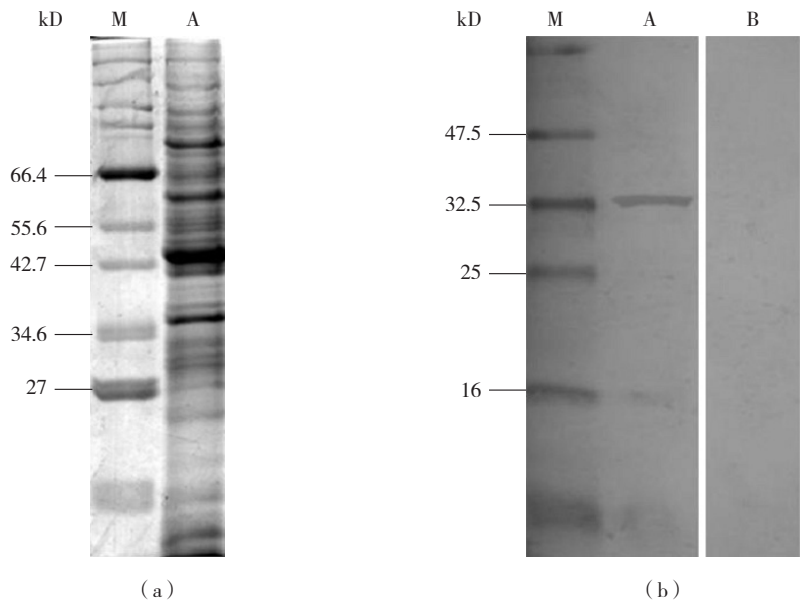


图7 纯化病毒粒子的SDS-PAGE电泳图(a)和病毒蛋白的Western blot图谱(b)
(a)M: 蛋白分子量标记; A: 纯化的病毒颗粒; (b)M: 蛋白分子量标记; A: 使用抗pET90.5L抗体检测; B: 使用抗pET32a(+)抗体检测.
Fig. 7 SDS-PAGE of purified virus (a) and Western blot of viral proteins (b)
(a) M: protein marker; A: purified virus particles. (b) M: protein marker; A: detected by anti-pET90.5L antibody; B: detected by anti-pET32a(+) antibody.

3 讨论

肿大细胞虹彩病毒属是虹彩病毒科最新定义的属,其病毒属成员引起广泛的淡水和海水的鱼类疾病^[1-2]。鳃传染性脾肾坏死病毒(ISKNV)是肿大细胞病毒属的代表种,是最早发现的感染淡水鱼类的肿大细胞病毒^[9-10],也是第一个完成全基因组序列测定的肿大细胞病毒^[11]。其致病性强,通过浸泡和注射感染,在适宜温度下,死亡率可达100%^[12]。目前,使用传统方法制备ISKNV细胞灭活苗的研究取得了一定突破,董传甫^[13]建立了ISKNV敏感细胞系MFF-1,并尝试制备了ISKNV福尔马林灭活细胞疫苗,经试验证实对鳃的保护率为90%以上^[13]。但是该病毒基因工程疫苗和侵染机制的研究未见极大突破,怎样筛选免疫原性强的结构蛋白和识别特异性宿主受体的囊膜蛋白是目前基因工程疫苗研发和感染机制研究的关键。

在虹彩病毒中,研究比较清楚的结构蛋白是主衣壳蛋白(Major capsid protein, MCP)。MCP占整个病毒粒子多肽的40%~45%,是虹彩病毒粒子中丰度最高的蛋白,并且在虹彩病毒科中高度保守,因此可以利用MCP的同源性差异进行虹彩病毒分子进化方面的研究^[14]。由于在细胞系上增殖容易,蛙病毒属几个成员的基因组、功能基因组和蛋白质组的研究都取得了很大进展。新加坡石斑鱼虹彩病毒(SGIV)的蛋白质组在2006年就完成测定,鉴定了44个病毒蛋白,包含了大量结构蛋白,特别是囊膜蛋白的信息,不过大部分蛋白未进行实验验证^[15]。Wang等^[7]和Zhao等^[16]分别利用免疫胶体金技术和蛋白分离技术鉴定了蛙病毒属虎纹蛙病毒(TFV)和沼泽绿牛蛙虹彩病毒(RGV)的3个囊膜蛋白。由于肿大细胞病毒属在常见鱼细胞系中增殖困难,因此蛋白质组学研究较为滞后。

Eaton等^[5]利用比较基因组学分析软件对12个完成全序列测定的虹彩病毒阅读框进行了重新划分,分析了每个属的保守基因,并在原有19个核心基因的基础上,额外划分了7个核心基因,其中与

*ISKNV ORF90.5L*同源的基因都推测为编码的肉豆蔻基(十四烷基)膜蛋白^[5]。国际病毒分类委员会第八次报告中将ATV病毒中鉴定的2个肉豆蔻基膜蛋白列为虹彩病毒的结构蛋白,但对其在病毒粒子上的位置未进行标识^[2]。在TFV中也有推测编码类似蛋白的基因,如ORF001和ORF055,其中ORF001编码的蛋白已经证实为病毒囊膜蛋白^[5,7]。鉴此,本研究把目标锁定在ORF90.5L上,这是重新划分ORF后获得的核心基因。与之同源的TFVORF001L已经证实编码病毒重要的囊膜蛋白^[7]。作为同样核心基因的ORF90.5L是否同样编码ISKNV的囊膜蛋白仍存疑问。

为了验证该基因转录本的存在,本研究从感染ISKNV的cDNA中扩增到963 bp的完整ORF,与基因组反义链84663至83701的序列一致,也从实验上证实了Eaton等^[5]对序列分析的结果。为了证明该基因编码的蛋白是否为病毒结构蛋白,本研究将目的片段克隆到表达载体中,获得原核表达产物免疫小鼠。重组蛋白的抗血清可以特异性识别纯化病毒粒子上推测大小的病毒蛋白,说明ORF90.5L编码的蛋白很可能就是病毒的结构蛋白。推导的蛋白序列经TMHMM(Server V.2.0)在线软件分析含有一个跨膜螺旋,很可能为膜蛋白。为了验证该蛋白在病毒粒子上的定位,下一步将尝试用免疫胶体金的方式对该蛋白进行定位,目前这部分内容正在进行中。

ORF90.5L的发现和验证为ISKNV基因工程疫苗和病原—宿主感染机制的研究提供了重要理论参考。

参考文献:

- [1] Williams T, Barbosa-Solomieu V, Chinchar VG, et al. A decade of advances in iridovirus research [J]. Adv Virus Res, 2005, 65: 173-248.
- [2] Chinchar G, Essbauer S, He J G, et al. Family iridoviridae. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA, editors. Virus taxonomy classification and nomenclature of viruses eight report of the international committee on the taxonomy of viruses [M]. San Diego: Academic Press, 2005: 145-161.
- [3] Nakajima K, Maeno Y, Honda A, et al. Effectiveness of a vaccine

- against red sea bream iridoviral disease in a field trial test [J]. Dis Aquat Organ, 1999, 36 (1): 73–75.
- [4] Caipang C M, Takano T, Hirono I, et al. Genetic vaccines protect red seabream, *Pagrus major*, upon challenge with red seabream iridovirus (RSIV) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2006, 21 (2): 130–138.
- [5] Eaton H E, Metcalf J, Penny E, et al. Comparative genomic analysis of the family Iridoviridae: re-annotating and defining the core set of iridovirus genes [J]. Virol J, 4: 11.
- [6] McCarthy C B, Theilmann D A. AcMNPV ac143 (odv-e18) is essential for mediating budded virus production and is the 30th baculovirus core gene [J]. Virology, 2008, 375: 277–291.
- [7] Wang Q, Luo Y W, Xie J F, et al. Identification of two novel membrane proteins from the tiger frog virus (TFV) [J]. Virus Res, 2008, 136: 35–42.
- [8] He J G, Lu L, Deng M, et al. Sequence analysis of the complete genome of an iridovirus isolated from the tiger frog [J]. Virology, 2002, 292: 185–97.
- [9] 吴淑勤, 李新辉, 潘厚军, 等. 鳊暴发性传染病的研究 [J]. 水产学报, 1997, 21 (增刊): 50–60.
- [10] 何建国, 翁少萍, 黄志坚. 鳊暴发流行病病毒性病原研究 [J]. 中山大学学报: 自然科学报, 1998, 3 (5): 74–77.
- [11] He J G, Deng M, Weng S P, et al. Complete genome analysis of the mandarin fish infectious spleen and kidney necrosis iridovirus [J]. Virology, 2001, 291: 126–39.
- [12] He J G, Zeng K, Weng S P, et al. Systemic disease caused by an iridovirus-like agent in cultured mandarin fish, *Siniperca chuatsi* (Basillewsky), in China [J]. J Fish Dis, 2000, 23: 219–222.
- [13] 董传甫. 肿大细胞病毒敏感细胞系的建立及病毒蛋白组和疫苗的研究 [D]. 广州: 中山大学, 2008: 28–51.
- [14] Tidona C A, Schnitzler P, Kehm R, et al. Is the major capsid protein of iridoviruses a suitable target for the study of viral evolution? [J]. Virus Genes, 1998, 16: 59–66.
- [15] Song W, Lin Q, Joshi S B, et al. Proteomic studies of the Singapore grouper iridovirus [J]. Mol Cell Proteomics, 2006, 5: 256–264.
- [16] Zhao Z, Ke F, Huang Y H, et al. Identification and characterization of a novel envelope protein in *Rana grylio* virus [J]. J Gen Virol, 2008, 89 (8): 1866–1872.

Identification of a new gene *ORF90.5L* encoding putative virus structural protein of mandarin fish infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV)

WANG Qing¹, LUO Yongwen², LIU Chun¹, ZENG Weiwei¹, ZHANG Chao¹, SHI Cunbin¹, WU Shuqin¹

(1. Pearl River Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China; 2. College of Veterinary medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510640, China)

Abstract: In 2001, the genome of mandarin fish infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) was completely determined which consist of 111 362 bp nucleic acids with 124 putative open reading frames (ORFs). In 2007, Eaton et al re-annotated and defined ORFs of 12 iridovirus strains with clear genome information, and ORF90.5L was defined as a new core gene within the genome of ISKNV. Using the cDNA of ISKNV and the primers designed according to Eaton's paper, a specific PCR product with 963 bp was amplified. The presumed ORF90.5L encodes a 320 amino acid protein with putative molecular weight of 35kDa and a transmembrane helix. The putative protein encoded by ORF90.5L shares high identity with similar ORFs which encoding putative myristylated membrane protein. The PCR product of ORF90.5L was cloned into expression vector pET32a(+), and the recombinant protein was expressed and purified followed by anti-pET90.5L mouse antibody was prepared. The Western blot analysis showed that specific viral protein could be detected by anti-pET90.5L antibody which suggested the protein encoded by ORF90.5L is possible to be structural protein of ISKNV. [Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17 (4): 753–760]

Key words: infectious spleen and kidney necrosis virus; core gene; virus structural protein

Corresponding author: WU Shuqin. E-mail: wushuqin001@21cn.com