

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2016.15187

一种基于 II 型鲤疱疹病毒衣壳蛋白 72 的免疫学检测方法

孔善云¹, 姜有声¹, 许丹¹, 谢骏², 吕利群¹

1. 国家水生动物病原库, 农业部淡水种质资源重点实验室, 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306;
2. 中国水产科学研究院 淡水渔业研究中心, 农业部淡水渔业和种质资源利用重点实验室, 江苏 无锡 214081

摘要: II 型鲤疱疹病毒 (cyprinid herpesvirus 2, CyHV-2) 是引起养殖异育银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) 造血器官坏死症的致病病原。在临床筛查中基于病毒核酸的 PCR 和 real time PCR 技术已经建立, 但是稳定性更强的免疫学诊断技术国内外尚无报道。本研究目的是利用 CyHV-2 编码的 ORF72 基因 (GenBank 登录号: AFJ20502.1) 所编码的衣壳蛋白作为捕获抗原, 通过识别感染病毒的鱼体中的相应抗体, 从而对样本进行临床免疫学检测。首先采用 PCR 方法从纯化的 CyHV-2 基因组中扩增 ORF72 基因, 并把该基因克隆至原核表达载体 PGEX-4T-3, 并转化到大肠杆菌中诱导表达, 诱导表达的产物通过 SDS-PAGE 进行鉴定, 对表达的重组蛋白进行纯化。用已纯化的 72 重组蛋白对小鼠进行免疫, 制得 72 重组蛋白的抗体。Western blot 检测表明所制备的多克隆抗体既能识别原核表达的重组蛋白, 也可以识别 CyHV-2 病毒粒子上的衣壳蛋白 72。在上述基础上建立了基于 Western blot 技术的 CyHV-2 抗体检测技术: 用纯化的 72 重组蛋白作为检测抗原, 鲫鱼血清用作一抗, 兔抗鲫 IgM 多克隆抗体作为二抗, 酶标羊抗兔作为三抗鉴定鲫鱼是否存在 CyHV-2 特异性抗体。在对急性感染期的临床样本检测中, 本方法能在所有样本中检测出 ORF72 特异性抗体存在, 表明 72 重组蛋白作为相应抗体捕获原可以用于确诊鲫鱼是否感染 CyHV-2。本研究建立的实验室免疫学检测方法为商品化免疫学检测技术的开发奠定了基础, 对 CyHV-2 的检验检疫具有一定的临床应用价值。

关键词: II 型鲤疱疹病毒; ORF72; 原核表达; 多克隆抗体; 临床检测; 异育银鲫

中图分类号: S94

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2016)02-0328-08

鲫鱼 (*Crucian carp*) 饲养成本低, 养殖地域广, 在中国淡水养鱼上占有重要地位^[1], 中国鲫鱼养殖主要集中在东部、中部和南部地区, 如江苏、湖北、江西、安徽、山东、广东、四川、辽宁、湖南、浙江等省。据统计, 2013 年中国鲫鱼年产量达 259.44 万 t, 其中主要养殖品种为异育银鲫 (*Carassius auratus gibelio*)^[1]。近年来, 疱疹病毒性造血器官坏死病 (herpesviral haematopoietic necrosis, HVHN) 频发, 对中国鲫鱼养殖业造成了严重影响。HVHN 是鲫鱼的一种高致病性病毒病, 其病原为 II 型鲤疱疹病毒 (*Cyprinid herpesvirus 2*,

CyHV-2)。CyHV-2 与分离自鲤科鱼类的另外两种病毒鲤疱疹病毒 1 (*Cyprinid herpesvirus 1*, CyHV-1) 和鲤疱疹病毒 3 (*Cyprinid herpesvirus 3*, CyHV-3) 亲缘关系较近, 与沟鲇疱疹病毒 (*Ictalurid herpesvirus 1*, IcHV-1) 关系相对较远^[2-3]。Jung 等^[4]在 1995 年对 CyHV-2 进行了第一次报道, 发现 CyHV-2 是金鱼造血器官坏死病的致病病原。接着, 美国^[5-6]、澳大利亚^[7]、中国台湾^[8]、英国^[9]养殖的金鱼也暴发该病。自从 2011 年匈牙利首次在养殖的鲫鱼体内检测到 CyHV-2 后^[10], 近几年来关于 CyHV-2 感染鲫鱼的报道也逐渐增多, 捷克^[11]、

收稿日期: 2015-06-01; 修订日期: 2015-09-24。

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金资助项目 (CARS-46-12); 异育银鲫重大疾病防控技术体系研究与示范 (D2015-13)。

作者简介: 孔善云 (1990-), 女, 硕士研究生, 主要从事水产动物临床检测方面的研究。E-mail: 1217674441@qq.com

通信作者: 吕利群 (1971-), 博士, 教授。E-mail: lqlv@shou.edu.cn

意大利^[12]先后报道了 CyHV-2 感染鲫鱼并引起鲫鱼大批量死亡的情况。在中国, 多个实验室在 2012 年和 2013 年先后报道了 CyHV-2 感染鲫鱼的情况^[13-15]。虽 CyHV-2 有比较高的致死率, 但其可以感染的种类比较少, 只可以感染金鱼、鲫鱼以及它的普通变种^[6-8]。组织病理学研究表明, 被病毒感染的鲫鱼体表出血, 伴随眼球膨出, 腹部膨胀, 内脏器官严重出血, 鳃壁斑点状出血^[14]。Goodwin 等^[16]在感染了 CyHV-2 的亲鱼孵化出的鱼卵和鱼苗中发现了该病毒, 因此证明了该病毒存在垂直传播的情况。这些报道均表明 CyHV-2 是一种新生养殖鲫鱼病毒病, 其发病区域在逐年扩大。CyHV-2 病害已经引起中国水产养殖业管理部门及养殖户的高度重视。

CyHV-2 核衣壳呈六边形, 直径为 100~110 nm, 完整的病毒颗粒有囊膜, 呈椭圆形, 直径为 175~200 nm, 基因组为线性双链 DNA, 全长 290304 bp, 编码约 150 个基因。病毒的检测技术开发对疾病的防控起重要作用。国际上, 匈牙利学者曾率先利用 PCR 技术从鲤科鱼类(Cyprinid Fish)检测到 CyHV-2 感染^[10]。2013 年, RT-LAMP 技术被用于从基于体内检测到 CyHV-2 DNA, 在常温下可以更快更准确检测到该病毒^[17]。Wu 等^[18]在 2013 年报道从银鲫(*Carassius gibelio*) 中分离并纯化到 CyHV-2, 在电镜下观察到该病毒的大小为 170~200 nm, 而且结合 PCR 技术和组织病理学切片检测到鱼体鳃、肾和脾中有病毒存在。同年, 本实验室在异育银鲫鱼体上分离并用电镜观察到 CyHV-2 病毒, 并利用异育银鲫的组织病理学切片和病毒特异性 DNA 探针, 成功建立了 CyHV-2 原位荧光杂交(FISH)技术^[19]。目前, 本实验室已建立异育银鲫活体检测技术, 即从外周血中检测病毒滴度或血细胞感染^[20-21]。目前现有的 CyHV-2 诊断技术都是基于病毒基因组 DNA 特异性检测, 尚无免疫学诊断技术用于实验室或临床检测的报道。现代病毒病检验检疫中, 核酸诊断技术常用于临床样品的快速筛查, 免疫学技术则往往在病毒感染的确诊上发挥重要作用。本研究试图建立实验室免疫学检测技术应用于鱼类的疱疹病毒性

造血器官坏死病病毒(CyHV-2)的确诊。鉴于病毒衣壳蛋白 72 是病毒粒子上拷贝数最多的蛋白质之一, 并且衣壳蛋白通常也是诱导宿主产生特异性免疫的主要蛋白, 本研究主要探讨利用衣壳蛋白 72 作为捕获抗原检测异育银鲫血清中相应特异性抗体的可行性。

1 材料与方法

1.1 实验材料

含有 CyHV-2-YC 毒株 ORF72 基因的重组质粒 PGEX-4T-3-ORF72 由本实验室构建并保存; 大肠杆菌 DH5 α 和 BL21(DE3)感受态购自天根生物有限公司; 限制性内切酶、PCR 试剂盒、T4 连接酶购自 TaKaRa 公司; HRP 标记的羊抗鼠 IgG、羊抗兔 IgG 多克隆抗体购自碧云天生物有限公司; 6 周龄 ICR 小鼠购自上海实验动物研究中心; 兔抗鲫 IgM 多克隆抗体由吉尔生化(GL Biochem)根据合成多肽(PIQDCSDIDVQIVPPSLEAMLN)进行制备, 该抗体特异性识别鲫 IgM 的 CH₃ 恒定区。

1.2 ORF72 基因片段的扩增

根据 CyHV-2 ORF72 的基因序列设计引物(上游: 5'-CCGGAATTCCATGTACGGCTTAAACA AC GC-3'; 下游: 5'-TAAAGCGGCCGCAAATGTAGAGGCCGTTGAAT-3'), 在上下游引物序列中分别插入 *EcoR* I 和 *NoT* I 酶切位点, 以已纯化好的 CyHV-2 中所提的 DNA 为模板, 对 ORF72 基因进行 PCR 扩增, PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 用纯化回收试剂盒对目的片段进行回收。

1.3 ORF72 基因的克隆

将纯化回收得到的 PCR 产物和空质粒 PGEX-4T-3 分别在 37℃ 中进行双酶切处理 PCR 产物(体系: *EcoR* I 1 μ L, *NoT* I 1 μ L, 10 $\times$ buffer 3 μ L, PCR 纯化回收产物 $\leq$ 200 ng, 加灭菌水到 30 μ L; 质粒体系: *EcoR* I 1 μ L, *NoT* I 1 μ L, 10 $\times$ buffer 5 μ L, 质粒 $\leq$ 1 μ g, 加灭菌水到 50 μ L) 1h 后, 酶切后用 T4 DNA 连接酶连接 ORF72 目的片段和 PGEX-4T-3 (T4 Liqase 1 μ L, T4 Ligase buffer 2.5 μ L, PGEX-4T-3 98ng, ORF72 目的片段 220 ng, 加灭菌水到 25 μ L), 将连接以后的产物转化到 DH5 α

大肠杆菌中, 筛选阳性克隆, 菌液 PCR 鉴定为阳性的提取其重组质粒, 经测序鉴定正确后, 命名为 PGEX-4T-3-ORF72。

1.4 诱导表达和可溶性分析

将测序正确的 PGEX-4T-3-ORF72 转化到 BL21 大肠杆菌中, 挑取 LB/Amp 平板筛选的阳性克隆, 接种阳性菌落 PGEX-4T-3-ORF72 到 5 mL LB(Amp^r)培养基中, 37℃摇床培养过夜。接着按照 1:100 的比例转移至刚配制的 LB(Amp^r)液体培养基中培养, 37℃, 150 r/min 恒温摇床培养 4 h, 加入终浓度为 0.2 mmol/L 的 IPTG 诱导, 诱导 5 h 后收集表达细菌, 4℃, 8500 r/min 离心 20 min; 1×PBS 洗涤两次, 用适量 1×PBS 重悬后进行超声破碎处理 30 min(6 s/6 s)至溶液澄清。4℃, 12000 r/min 离心 10 min 后分别收集上清和沉淀, 进行 SDS-PAGE 电泳, 鉴定表达蛋白的可溶性。

1.5 诱导表达条件的优化

将 PGEX-4T-3-ORF72 转化到 BL21 大肠杆菌中, 挑取 LB/Amp 平板筛选的阳性克隆, 接种阳性菌落到 5 mL LB(Amp^r)液体培养基中, 37℃摇床培养过夜。将培养好的阳性菌液按 1:100 比例转移至新鲜配制的 LB(Amp^r)培养基中, 37℃, 150 r/min 恒温摇床培养 4 h, 加入 IPTG 诱导(IPTG 终浓度设 0.1 mmol/L、0.2 mmol/L、0.5 mmol/L 和 1.0 mmol/L) 5 h 后取 50 mL 菌液离心, 收集菌体, 经 SDS-PAGE 分析不同浓度诱导下重组蛋白的表达量。

1.6 目的蛋白的纯化

在优化的表达条件下诱导表达大量目的蛋白。然后将沉淀分别用 2 mol/L、4 mol/L、6 mol/L、8 mol/L 的尿素处理, 每步均在 4℃下 8500 r/min, 离心 20 min, 接着将洗脱下的蛋白用透析袋透析, 依次放入含 6 mol/L、4 mol/L、2 mol/L 和 0 mol/L 尿素的 PBS 溶液中透析, 每个浓度透析 4 h。透析后用 BCA 法微量蛋白浓度测量试剂盒测其浓度, 于-80℃保存。

1.7 多克隆抗体的制备

用已纯化好的目的蛋白免疫小鼠。200 μg/只。第 1 次免疫为腹腔内注射, 抗原与弗氏完全佐剂

等体积充分混匀后免疫; 第 1 次免疫后 14 d 进行第 2 次免疫, 仍为腹腔内注射, 抗原与弗氏不完全佐剂等体积充分混匀乳化后对小鼠进行免疫。随后的第 3 次免疫是纯抗原, 不加佐剂; 主要采用皮下注射的方式。在免疫以后第 3 天, 采取眼角采血; 检测血清是否为阳性。

1.8 血清抗体特异性分析

用纯化后的 PGEX-4t-3-ORF72 重组蛋白以及含有 CyHV-2 病毒的组织液制备上样样品, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 接着采用电转膜法(100V, 75 min)转至聚偏二氟乙烯膜, 用 20 mL 5%牛奶室温震荡封闭 3 h。然后用自己制备的多抗血清 ORF72 作为一抗(稀释度 1:3000)室温震荡封闭 1 h 后 4℃过夜。用 PBST 清洗 8 次, 每次 5 min。再用 HRP 标记的山羊抗小鼠的 IgG 抗体作为二抗, 用 PBST 清洗 3 次, 每次 10 min, 接着将聚偏二氟乙烯膜放入 DAB 显色液中显色, 直到目的条带清晰为止。

1.9 基于 ORF72 的病毒诱导抗体的免疫学检测

取本实验室感染 CyHV-2 的鲫鱼内脏组织并提取其 DNA, 根据本实验室建立的检测 CyHV-2 的方法进行 PCR 检测^[17], 上游引物: 5'-CTTTAG CGTCAGGTCCATAGAGG-3', 下游引物: 5'-CGT CAGTCCCTGGCAGAAATAAG-3', 吸取 1 μLDNA 作为模板, PCR 程序: 94℃ 4 min; 94℃ 30 s, 62℃ 30 s, 72℃ 1 min; 72℃ 10 min, 进行 CyHV-2 病毒核酸的扩增和检测, 并用 1%琼脂糖凝胶电泳进行验证检测结果。本次研究取 7 条本实验室攻毒 CyHV-2 后的鲫鱼作为实验组, 提取其组织 DNA 做 PCR 检测, 1 条未感染 CyHV-2 的健康鲫鱼作为阴性对照, Western-blot 检测中取与 PCR 检测一致鲫鱼血液的血清作为一抗(稀释度 1:1000)室温震荡封闭 1 h 后 4℃过夜。用 PBST 清洗 8 次, 每次 5 min。用抗 IgM 的多抗作为二抗, 12 mL 2%牛奶 37℃孵育 2 h(稀释度 1:6000)。用 PBST 清洗 8 次, 每次 5 min。接着用 HRP 标记的山羊抗兔子 IgG 抗体作为三抗, 用 PBST 清洗 3 次, 每次 10 min, 最后将聚偏二氟乙烯膜放入 DAB 显色液中显色, 直到目的条带清晰为止。

2 结果与分析

2.1 *ORF72* 基因扩增

为了制备纯化的 *ORF72* 蛋白用于抗体捕获, 计划利用原核表达载体在细菌中高效表达重组蛋白 rORF72。根据 GenBank 中鲫鱼疱疹病毒 II 型外衣壳蛋白 72 基因的全基因组序列设计其对应的引物, 并以本实验室保存的 CyHV-2 盐城株基因组 DNA 作为扩增模板, 运用 PCR 技术获得 *ORF72* 基因全长。PCR 产物经过电泳扩增出一条大小约为 1110 bp 的特异性条带, 大小与预期一致(图 1)。



图 1 *ORF72* 基因 PCR 扩增产物电泳图

M: marker 2000; 1: PCR 扩增产物。

Fig. 1 Electrophoretic profile of PCR products of *ORF72* gene
M: marker 2000; 1: amplification products.

2.2 原核表达载体构建

利用基因克隆的常规方法, 将纯化回收的上述 PCR 扩增产物和 PGEX-4T-3 原核表达载体双酶切, 然后进行连接、转化, 最后提取质粒, 通过提质粒测序方法鉴定重组质粒, 测序结果显示克隆质粒 PGEX-4T-3-ORF72 构建正确, 该质粒转化进大肠杆菌后可以用于诱导表达重组蛋白 rORF72, 即 GST-ORF72 融合蛋白。

2.3 重组蛋白 rORF72 的诱导表达及可溶性分析

将含重组质粒 pGEX-4T-3-ORF72 的大肠杆菌 DH5 α 用 1 mmol/L IPTG 进行诱导, 诱导 4 h 后的菌体用超声波破碎, 将离心后的上清及沉淀分别制样, 进行 SDS-PAGE 分析。结果显示, 经 IPTG 诱导的菌体沉淀在 68 kD 处出现一条明显的目的条带, 而在未经 IPTG 诱导的对照菌中不存在该目的条带(图 2)。由于目的蛋白 rORF72 主要

存在于沉淀中, 可以确定目的蛋白 rORF72 主要以包涵体形式存在(图 2)。

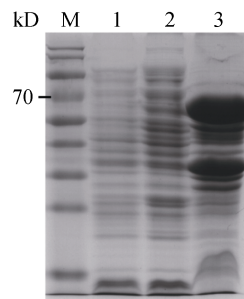


图 2 重组蛋白 rORF72 的诱导表达及可溶性分析

M: 蛋白质 marker; 1: 未诱导细菌沉淀; 2: 诱导细菌超声破碎后的上清; 3: 诱导细菌超声破碎后的沉淀。

Fig. 2 Induced expression and solubility analysis of rORF72
M: protein marker; 1: precipitate of uninduced bacterial control; 2: supernatant of induced bacterial after ultrasonic; 3: precipitate of induced bacterial after ultrasonic.

2.4 rORF72 表达条件的优化

为了探究 rORF72 的最佳诱导表达条件, 通过对 0.1 mmol/L、0.2 mmol/L、0.5 mmol/L、1.0 mmol/L 不同 IPTG 浓度诱导条件的对比, 最终得出当 IPTG 最终浓度为 0.2 mmol/L 时, 其诱导效果达到最佳(图 3)。

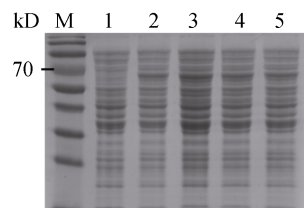


图 3 不同浓度 IPTG 的诱导效果

M: 蛋白质 marker; 1: 未诱导菌体的沉淀; 2: 0.1 mmol/L 浓度诱导的菌体沉淀; 3: 0.2 mmol/L 浓度诱导的菌体沉淀; 4: 0.5 mmol/L 浓度诱导的菌体沉淀; 5: 1.0 mmol/L 浓度诱导的菌体沉淀。

Fig. 3 Effect of IPTG concentration on the expression of rORF72
M: protein marker; 1: precipitate of uninduced bacterial; 2: precipitate of bacterial induced by 0.1 mmol/L IPTG; 3: precipitate of induced bacterial induced by 0.2 mmol/L IPTG; 4: precipitate of induced bacterial induced by 0.5 mmol/L IPTG; 5: precipitate of bacterial induced by 1.0 mmol/L IPTG.

2.5 目的蛋白 rORF72 的纯化

由于重组蛋白 rORF72 主要以包涵体的形式存在, 不能用亲和层析柱进行纯化。本研究选择

将重组蛋白用不同浓度的尿素进行洗涤纯化,纯化后的蛋白质再用透析袋进行透析除掉尿素,透析完成后用紫外吸光光度法测其浓度为 17 mg/mL。利用 SDS-PAGE 检测其纯度,图 4 显示,最终经过透析后, rORF72 样品中几乎没有杂带,显示纯化效果较好。

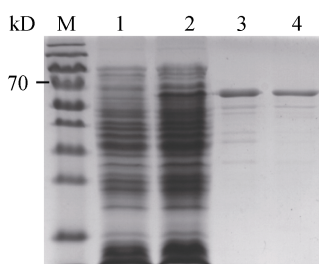


图 4 纯化产物的 SDS-PAGE 分析

M: 蛋白 marker; 1: 未诱导的沉淀; 2: 0.2 mmol/L 浓度诱导的沉淀; 3: 尿素纯化后的样品; 4: 透析后的样品。

Fig. 4 SDS-PAGE of purified rORF72

M: protein marker; 1: precipitate of uninduced bacterial; 2: precipitate of bacterial induced with 0.2 mmol/L IPTG; 3: purified sample from precipitate by urea; 4: purified sample after dialysis.

2.6 多克隆抗体的制备及特异性分析

利用纯化的 rORF72 作为免疫原免疫小鼠,经加强注射后收集小鼠血清获得抗 ORF72 多克隆抗体。为了鉴定该抗体是否特异性识别 ORF72,纯化的 rORF72 和病毒感染的组织样本被用来制样进行免疫印迹分析。Western blot 结果显示, anti-ORF72 多克隆抗体可以与 rORF72 蛋白产生特异性免疫反应,同时,也可以识别被 CyHV-2 感染的鲫鱼组织中存在病毒粒子上的 ORF72 蛋白(图 5)。

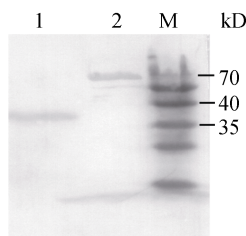


图 5 Western-blot 检测重组蛋白

M: marker; 1: 病毒蛋白; 2: rORF72 重组蛋白。

Fig. 5 Western-blot detection of rORF72

M: protein marker; 1: virus particle sample; 2: recombinant protein rORF72.

2.7 基于 rORF72 的病毒诱导抗体的免疫学检测

上述实验证明, rORF72 具有病毒粒子 ORF72 一样的免疫原性,初步判断可以用于作为捕获抗原来检测鲫鱼体内的相应抗体。因此,本实验室委托公司合成鲫 IgM 多肽,制备抗鲫 IgM 多克隆抗体;并利用临床感染鲫鱼血清样本来检验基于 rORF72 的免疫学检测方法的可行性。在 PCR 检测中,取 7 条本实验室攻毒 CyHV-2 后的鲫鱼作为实验组,提取其组织 DNA 做 PCR 检测,1 条未感染 CyHV-2 的健康鲫鱼作为阴性对照,结果表明(图 6),感染 CyHV-2 的鲫鱼在约 600 bp 处出现目的条带,阴性对照组没有出现目的条带。在 Western-blot 检测中,阳性对照一抗为感染过 CyHV-2 的不同鲫鱼血清,二抗为抗 IgM-CH₃ 的多抗,三抗为酶标抗体。对临床样本的检测结果显示,在约 68 kD 处出现目的条带;阴性对照组没有出现目标条带。阳性对照组,一抗为抗 ORF72 重组蛋白的多抗,在约 68 kD 处出现目的条带(图 7)。

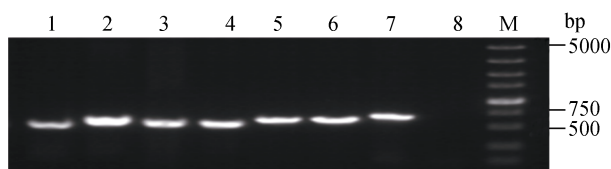


图 6 基于鲫鱼组织所提 DNA 的 PCR 检测

M: marker; 1~7: 实验组; 8: 阴性对照组。

Fig. 6 Detection of gene DNA of CyHV-2 by PCR assay from 8 crucian carp tissue samples

M: marker; 1~7: positive control; 8: negative control.

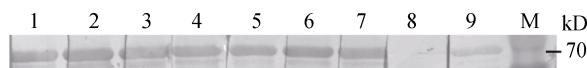


图 7 基于 rORF72 的 Western-blot 检测

M: marker; 1~9: PGEX-4t-3-ORF72 蛋白。

Fig. 7 Western-blot clinical test

M: marker; 1~9: PGEX-4t-3-ORF72 protein.

3 讨论

CyHV-2 感染引起的鲫鱼造血器官坏死病是中国鲫鱼养殖业目前面临的核心挑战之一。迄今为止,我国水产病害研究领域的专家们对该病的应对是卓有成效的。目前多种检测 CyHV-2 的诊

断方法已经建立起来,已经报道的有细胞培养分离法、电镜技术和 PCR 法^[22-24]。各方法有自己的独特优势和劣势。比如,细胞培养分离要建立分离培养 CyHV-2 的敏感细胞系,而且分离病毒试验周期长,但是细胞分离培养技术非常灵敏,可靠性高;超薄切片下观察病毒粒子需要电子显微镜,而且仪器操作较为专业,耗时较长,不适合于基层进行检测;目前 PCR 检测技术灵敏度高、应用广泛,但 PCR 技术容易发生模板污染进而产生假阳性,PCR 通常只用于初筛。最理想的病毒确诊技术应该是综合运用多种检测方法。本文建立的免疫学方法可以相对迅速地进行 CyHV-2 抗体的检测,可以用于实验室内对 PCR 初筛后的疑似阳性样品进行确诊。

由于目前国内国际对锦鲤疱疹病毒(*Koi herpesvirus*, KHV)(又名: CyHV-3)的研究比较深入,且根据已经公布的序列 CyHV-2 与 CyHV-3 的同源性达到 81.55%^[23],因此 CyHV-3 的相关研究成果对 CyHV-2 的研究具有指引作用。CyHV-3 的膜蛋白和衣壳蛋白已经鉴定清楚,目前已报道的有 ORF72、ORF25、ORF81、ORF140、ORF134、ORF59 等^[25-30]。基于本实验室前期对本病毒的研究及 Tu 等^[25]的报道, KHV 衣壳蛋白 72 可能中和免疫表位从而产生免疫保护。且 CyHV-2 的 ORF72 也可能为衣壳蛋白^[31]。因此本研究对 CyHV-2-YC 毒株的 ORF72 基因进行克隆、原核表达、尿素透析纯化、制备多抗及用作捕获抗原检测鱼体中产生的相应抗体。本研究结果表明, CyHV-2 的 ORF72 确实是一种有效的病毒免疫原,可以在宿主体内诱导特异性抗体。通过运用本研究建立的免疫检测方法能在实验室内通过抗体检测达到检测鲫鱼是否感染 CyHV-2 的目的。但是,该方法目前没有办法区分病毒是急性感染还是慢性感染或恢复期感染。

本实验室利用分离自江苏射阳患病异育银鲫得到的 CyHV-2,已成功建立人工注射感染模型,并发现鲫疱疹病毒的感染可同时引起鱼体急性感染和持续性感染两种不同的模式^[27]。在肾组织中,急性感染和持续性感染两种不同模式下不同基因

的表达量有差异,鱼体 3 个免疫相关基因在不同组织及不同时间的表达量^[32-33]。但是这些研究仅限于研究宿主先天免疫反应,鲫鱼对 CyHV-2 感染产生的获得性免疫(抗体免疫及细胞免疫)的研究尚是空白。病毒感染通常诱导鱼体产生高水平、特异性、持续性抗体,对鱼体起到了保护作用。本实验室前期研究发现感染 CyHV-2 后幸存的异育银鲫将不再发病,也一定程度上支持获得性免疫对 CyHV-2 的感染有拮抗作用。本研究建立的免疫学检测方法也同时可以用于检测 CyHV-2 诱导鱼体产生的抗体应答,为后期研究提供了技术支撑。

综上,我们通过制备 GST-ORF72 纯化蛋白和抗鲫 IgM 的多抗建立了检测鲫鱼感染血清中的抗病毒 ORF72 抗体的免疫学检测方法,本研究结果说明 ORF72 可以用于血清学诊断。但是,如果要对本文建立的方法进行商业化应用,需要制备相应单克隆抗体。我们下一步计划制备针对 ORF72 和鲫 IgM 的单克隆抗体,在此基础上探讨 dot-blot、IFA 等更多免疫学检测方法用于病毒检测的可能性。

参考文献:

- [1] Liu W Z, Zeng L B, Zhang H, et al. Studies on the change of blood biochemical indices in gibel carp, *Carassius auratus gibelio*, infected with *Cyprinid herpesvirus II*[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2013, 22(6): 928-935. [刘文枝, 曾令兵, 张辉, 等. 异育银鲫感染鲤疱疹病毒 II 型 (CyHV-2) 后血液生理生化指标变化的研究[J]. 上海海洋大学学报, 2013, 22(6): 928-935.]
- [2] Waltzek T B, Kelley G O, Stone D M, et al. *Koi herpesvirus* represents a third cyprinid herpesvirus(CyHV-3) in the family Herpesviridae[J]. J Gen Virol, 2005, 86(6): 1659-1667.
- [3] Hanson L, Dishon A, Kotler M. Herpesviruses that infect fish[J]. Viruses, 2011, 3(11): 2160-2191.
- [4] Jung S J, Miyazaki T. Herpesviral haematopoietic necrosis of goldfish, *Carassius auratus* (L.)[J]. J Fish Dis, 1995, 18(3): 211-220.
- [5] Groff J M, LaPatra S E, Munn R J, et al. A viral epizootic in cultured populations of juvenile goldfish due to a putative herpesvirus etiology[J]. J Vet Diagn Invest, 1998, 10(4): 375-378.
- [6] Goodwin A E, Khoo L, LaPatra S E, et al. Goldfish hemato-

- poietic necrosis herpesvirus (*Cyprinid herpesvirus 2*) in the USA: molecular confirmation of isolates from diseased fish[J]. *J Aquat Anim Health*, 2006, 18(1): 11–18.
- [7] Stephens F J, Raidal S R, Jones B. Haematopoietic necrosis in a goldfish (*Carassius auratus*) associated with an agent morphologically similar to herpesvirus[J]. *Aust Vet J*, 2004, 82(3): 167–169.
- [8] Chang P H, Lee S H, Chang H C, et al. Epizootic of herpes-like virus infection in goldfish, *Carassius auratus*, in Taiwan[J]. *Fish Pathol*, 1999, 34(4): 209–210.
- [9] Jeffery K R, Bateman K, Bayley A, et al. Isolation of a cyprinid herpesvirus 2 from goldfish, *Carassius auratus*(L.), in the UK[J]. *J Fish Dis*, 2007, 30(11): 649–656.
- [10] Doszpoly A, Benko M, Csaba G, et al. Introduction of the family Alloherpesviridae: the first molecular detection of herpesviruses of cyprinid fish in Hungary [J]. *Magy Allatorvosok*, 2011, 133(3): 174–181.
- [11] Danek T, Kalous L, Vesely T, et al. Massive mortality of Prussian carp *Carassius gibelio* in the upper Elbe basin associated with herpesviral hematopoietic necrosis (CyHV- 2)[J]. *Dis Aquat Organ*, 2012, 102(2): 87–95.
- [12] Fichi G, Cardeti G, Cocumelli C, et al. Detection of *Cyprinid herpesvirus 2* in association with an *Aeromonas sobria* infection of *Carassius carassius*(L.), in Italy[J]. *J Fish Dis*, 2013, 36(10): 823–830.
- [13] Wang L, He J Q, Liang L Q, et al. Mass mortality caused by Cyprinid herpesvirus 2 (CyHV-2) in Prussian carp (*Carassius gibelio*) in China[J]. *Bull Eur Assoc Fish Pathol*, 2013, 32(5): 164–173.
- [14] Xu J, Zeng L B, Zhang H, et al. Cyprinid herpesvirus 2 infection emerged in cultured gibel carp, *Carassius auratus gibelio* in China[J]. *Vet Microbiol*, 2013, 166(1–2): 138–144.
- [15] Luo Y Z, Lin L, Liu Y, et al. Haematopoietic necrosis of cultured Prussian carp, *Carassius gibelio* (Bloch), associated with *Cyprinid herpesvirus 2*[J]. *J Fish Dis*, 2013, 36(12): 1035–1039.
- [16] Goodwin A E, Sadler J, Merry G E, et al. Herpesviral haematopoietic necrosis virus (CyHV-2) infection: case studies from commercial goldfish farms[J]. *J Fish Dis*, 2009, 32(3): 271–278.
- [17] He J Q, Shi X J, Yu L, et al. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for diagnosis of *Cyprinid herpesvirus 2*[J]. *J Virol Methods*, 2013, 194(1–2): 206–210.
- [18] Wu T, Ding Z F, Ren M, et al. The histo-and ultra-pathological studies on a fatal disease of Prussian carp (*Carassius gibelio*) in mainland China associated with *Cyprinid herpesvirus 2* (CyHV-2)[J]. *Aquaculture*, 2013, 412–413: 8–13.
- [19] Xu L J, Shen X B, Xie J, et al. Suppression subtractive hybridization and real time RT-PCR reveal differentially expressed immune-related genes in crucian carp *Carassius auratus gibelio* challenged with *Cyprinid herpesvirus 2*[C]// Abstract of Academic Seminar, Fish Disease Committee, China Society of Fisheries, Beijing, 2013: 81–92.
- [20] Xu L J, Podok P, Xie J, et al. Comparative analysis of differential gene expression in kidney tissues of moribund and surviving crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) in response to cyprinid herpesvirus 2 infection[J]. *Arch Virol*, 2014, 159(8): 1961–1974.
- [21] Wang H, Xu L J, Lu L Q. Detection of cyprinid herpesvirus 2 in peripheral blood cells of silver crucian carp, *Carassius auratus gibelio* (Bloch), suggests its potential in viral diagnosis[J]. *J Fish Dis*, 2016, 39(2): 155–162.
- [22] Tong G Z, Zhou Y J, Hao X F, et al. Highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome, China[J]. *Emerg Infect Dis*, 2007, 13(9): 1434–1436.
- [23] Xu J, Zeng LB, Yang DG, et al. Isolation and characterization of *Cyprinid herpesvirus 2* WH strain[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, 20(6): 1303–1309. [徐进, 曾令兵, 杨德国, 等. 鲤疱疹病毒 2 型武汉株的分离与鉴定[J]. *中国水产科学*, 2013, 20(6): 1303–1309.]
- [24] Luo D, Liang LG, Xie J, et al. Development of duplex PCR for detection of *Cyprinid herpesvirus 2*[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2014, 36(5): 379–382. [罗丹, 梁利国, 谢骏, 等. 2 型鲤疱疹病毒双重 PCR 快速检测方法的建立及应用[J]. *中国预防兽医学报*, 2014, 36(5): 379–382.]
- [25] Tu C, Lu Y P, Hsieh C Y, et al. Production of monoclonal antibody against ORF72 of koi herpesvirus isolated in Taiwan[J]. *Folia Microbiol*, 2014, 59(2): 159–165.
- [26] Zhou J X, Li X W, Zhu X, et al. Cloning and bioinformatics analysis of ORF25 gene of *Kio herpesvirus* CJ strain[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2012, 46(3): 1–4. [周井祥, 李新伟, 朱霞, 等. 锦鲤疱疹病毒 CJ 株 ORF25 基因的克隆及生物信息学分析[J]. *中国兽药杂志*, 2012, 46(3): 1–4.]
- [27] Zhou J X, Li X W, Wang H, et al. Cloning and bioinformatics analysis of ORF81 gene of koi herpesvirus-CJ strain[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 35(12): 1780–1786. [周井祥, 李新伟, 王好, 等. 锦鲤疱疹病毒 CJ 株 ORF81 基因的克隆及生物信息学分析[J]. *水产学报*, 2012, 35(12): 1780–1786.]
- [28] Lv W X. Establishment of detection and prokaryotic expres-

- sion of ORF140 genes on koi herpesvirus[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2012. [吕文雪. 锦鲤疱疹病毒检测方法的建立及 ORF140 基因的原核表达[D]. 长春: 吉林农业大学, 2012.]
- [29] Yang Y, Li L J, Chen X X, et al. Cloning and expression of ORF134 in *Cyprinid herpesvirus 3*[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2013, 32(4): 100–105. [杨毅, 李莉娟, 陈孝煊, 等. 锦鲤疱疹病毒 ORF134 基因的克隆与表达[J]. 华中农业大学学报, 2013, 32(4): 100–105.]
- [30] Ke H, Liu ZX, Lin M, et al. Cloning, analysis of *Koi herpesvirus* envelope protein ORF59 and prokaryotic expression of major B cell epitope domain[J]. South China Fisheries Science, 2010, 6(4): 56–62. [柯浩, 刘振兴, 林敏, 等. 锦鲤疱疹病毒囊膜蛋白 ORF59 的克隆, 分析及其主要 B 细胞表位区的原核表达[J]. 南方水产科学, 2010, 6(4): 56–62.]
- [31] Davison A J, Kurobe T, Gatherer D, et al. Comparative genomics of carp herpesviruses[J]. J Virol, 2013, 87(5): 2908–2922.
- [32] Podok P, Wang H, Xu L, et al. Characterization of myeloid-specific peroxidase, keratin 8, and dual specificity phosphatase 1 as innate immune genes involved in the resistance of crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) to *Cyprinid herpesvirus 2* infection[J]. Fish Shellfish Immun, 2014, 41(2): 531–540.
- [33] Podok P, Xu L, Xu D, et al. Different expression profiles of Interleukin 11 (IL-11), Intelectin (ITLN) and Purine nucleoside phosphorylase 5a (PNP 5a) in crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) in response to *Cyprinid herpesvirus 2* and *Aeromonas hydrophila*[J]. Fish Shellfish Immun, 2014, 38(1): 65–73.

An immunological method to detect CyHV-2 based on capsid protein 72

KONG Shanyun¹, JIANG Yousheng¹, XU Dan¹, XIE Jun², LYU Liqun¹

1. National Pathogen Collection Center for Aquatic Animals; College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences; Department of Agriculture Laboratory of Freshwater Fishery and Germplasm Resource Utilization, Wuxi 214081, China

Abstract: Cyprinid herpesvirus II (CyHV-2) is the main pathogen causing haematopoietic necrosis disease in *Carassius auratus gibelio*. Although many nucleic acid-based diagnostic methods have been applied, no stable and sensitive immunological diagnostic methods have been reported. In this study, to detect CyHV-2 in clinical samples by immunological methods, recombinant protein 72, encoded by the CyHV-2 ORF72 gene, was used as a capture antigen to identify specific antibodies against CyHV-2 in the serum of infected fish. First, ORF72 was amplified from the purified CyHV-2 genome, and cloned into expression vector PGEX-4t-3 to produce recombinant GST-ORF72 in *Escherichia coli*. The recombinant protein was detected by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. The purified recombinant protein 72 was used to immunize mice and polyclonal antibodies were obtained. Western blotting showed that the polyclonal antibody could not only identify the recombinant protein, but could also recognize protein 72 in virus particles. A Western blotting protocol was established for the specific detection of antibodies against protein 72 protein of CyHV-2 and then applied to detect CyHV-2 infection in clinical fish sera samples. In conclusion, the Western blotting technique established in this study could be used for specific serodiagnosis of CyHV-2 infection.

Key words: CyHV-2; ORF72; prokaryotic expression; polyclonal antibody; clinical test; *Carassius auratus gibelio*
Corresponding author: LYU Liqun. E-mail: lqlv@shou.edu.cn