

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2018.17050

鲤疱疹病毒 3 型 ORF136 基因编码蛋白多克隆抗体的制备与鉴定

郑树城^{1,2}, 李莹莹¹, 王庆¹, 曾伟伟¹, 王英英¹, 任燕¹, 石存斌¹

1. 中国水产科学研究院 珠江水产研究所, 农业部渔药创制重点实验室, 广东省水产动物免疫技术重点实验室, 广东 广州 510380;
2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306

摘要: 为了对鲤疱疹病毒 3 型(Cyprinid herpesvirus 3, CyHV-3)ORF136 基因编码蛋白进行功能研究和血清学诊断, 本实验通过对 ORF136 基因推导的第 31~157 位氨基酸序列进行 PCR 扩增, 并与原核载体 pET-32a(+)连接, 转化至大肠杆菌 Rosetta (DE3)感受态后进行 IPTG 诱导表达, 将纯化后的重组蛋白免疫新西兰白兔(*Oryctolagus cuniculus*)以制备 ORF136 多克隆抗体, 运用 Western blot 和间接免疫荧光技术对抗体进行鉴定。结果表明, 重组融合表达蛋白大小与预期一致, 约为 35 kD, 且主要分布在包涵体中。Western blot 分析显示, 免疫兔后获得的纯化 ORF136 多克隆抗体能特异性识别纯化的 CyHV-3 和感染 CyHV-3 的 KS 细胞; 间接免疫荧光分析进一步表明 ORF136 多抗能识别感染 CyHV-3 的 KS 细胞。ORF136 多克隆抗体的制备为 ORF136 蛋白功能研究和 CyHV-3 血清学诊断方法的建立提供了重要基础。

关键词: 鲤疱疹病毒 3 型; 锦鲤疱疹病毒; ORF136; 原核表达; 多克隆抗体

中图分类号: S941

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2018)01-0204-07

鲤疱疹病毒 3 型, 又称为锦鲤疱疹病毒(Koi herpesvirus, KHV), 是引起鲤(*Cyprinus carpio* Linnaeus)、锦鲤(*C. carpio haematopterus*)及其变种高度传染性锦鲤疱疹病毒病(Koi herpesvirus disease, KHVD)的病原^[1]。该病自从 1997 年在欧洲发现以来, 多个国家和地区都报道了由该疾病引起的鲤或锦鲤暴发性死亡现象, 给鲤及锦鲤养殖产业带来了严重的经济损失^[2-3]。CyHV-3 属于疱疹病毒目, 异疱疹病毒科, 鲤疱疹病毒属, 是具有囊膜的双链 DNA 病毒。病毒颗粒直径为 167~200 nm, 基因组全长 295 kb, 两端为 22 kb 的正向重复序列, 共编码 164 个开放阅读框(open reading frame, ORF), 包括 8 个重复 ORF, 是已知基因组最大的疱疹病毒^[4-6]。

目前, 运用质谱学的方法已鉴定到 46 种病毒结构蛋白。其中, Michel 等^[7]运用液相串联色谱技

术在 KHV-FL 株中鉴定到 13 种囊膜蛋白、3 种核衣壳蛋白、2 种皮层蛋白和 22 种未知蛋白共 40 种结构蛋白。随后, Yi 等^[8]通过对亚洲型 KHV-GZ10 和欧洲型 KHV-GZ11 进行质谱鉴定, 将鉴定的结构蛋白增加至 46 种。虽然通过蛋白质质谱鉴定对 CyHV-3 病毒蛋白有了一定的认识, 但大部分蛋白的精确定位和功能研究仍处于空白, 只有少数蛋白进行了较深入的鉴定, 其中, ORF81 编码蛋白是研究较多的结构蛋白之一^[9-10]。另外, Fuchs 等^[11]还对部分囊膜蛋白 ORF25、ORF65、ORF99、ORF136、ORF149 和主要衣壳蛋白 ORF92 进行了初步鉴定。

本研究选择的 ORF136 在亚洲型和欧洲型分离株中存在核苷酸序列差异, 其完整开放阅读框长度分别为 474 bp 和 462 bp, 该基因可作为 CyHV-3 分子分型的有效工具^[12]。虽然蛋白质谱分析显示

收稿日期: 2017-02-17; 修订日期: 2017-04-24.

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2013BAD12B02); 现代农业产业技术体系(CARS-45); 广东省海洋渔业科技与产业发展专项(A201501B13).

作者简介: 郑树城(1991-), 男, 硕士研究生, 主要从事水生动物病毒学研究. E-mail: shucheng1991@126.com

通信作者: 王庆(1976-), 副研究员, 主要从事水生动物病毒学研究. E-mail: sunny_929@163.com

ORF136 编码蛋白为结构蛋白, 但深入的功能定位还不清楚, 更多相关研究仍有待开展。本实验通过构建 pET-32a-ORF136 原核表达载体, IPTG 诱导表达后纯化重组蛋白, 免疫兔子获得多克隆抗体, 并用纯化的 CyHV-3 病毒和感染 CyHV-3 的 KS 细胞进行 Western blot 和间接免疫荧光分析。ORF136 基因编码蛋白多克隆抗体的制备为 ORF136 蛋白功能研究和 CyHV-3 血清学诊断方法的建立提供了重要材料。

1 材料与方法

1.1 病毒、细胞和细菌

鲤疱疹病毒 3 型 T 株(KHV-T)由德国动物健康研究院病原学研究所(FLI)KHV 参考实验室 Sven M. Bergmann 博士馈赠; 锦鲤吻端细胞(KS)由本实验建立保存; 大肠杆菌 DH5 α 感受态由本实验室制备保存; 大肠杆菌 Rosetta (DE3)感受态购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.2 材料

血液组织细胞基因组提取试剂盒(DP304)、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(DP209-03)、质粒小提试剂盒(DP103)和 DAB 显色试剂盒购自天根生化科技有限公司; rTaq Mix、限制性酶 *Xho* I 和 *Eco*R I、DNA -Tailing Kit(6109)、DNA marker、T4 Ligase 和 Ligase buffer 购自宝生物工程(大连)有限公司。pET-32a(+)质粒由本实验室保存; SDS-PAGE 试剂盒购自 Life Science 公司(美国); 弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂购自 Sigma 公司(美国)。HRP 标记的羊抗兔 IgG 购自博士德生物工程有限公司。Ni-Agarose His 标签蛋白纯化试剂盒(包涵体蛋白)购自北京康为世纪生物科技有限公司。RIPA 裂解液购自上海碧云天生物技术有限公司。Alexa Fluor 488 标记的羊抗兔 IgG(H+L)购自 Life Science 公司(美国)。

1.3 方法

1.3.1 基因克隆 根据 GenBank 中 CyHV-3 ORF136 基因序列, 用生物信息学软件 ABCpred (<http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/>)、BepiPred 1.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/>) 和 DNASTAR 子模块 Protean 预测 ORF136 基因潜在 B

细胞抗原表位。用 Primer Premier5.0 设计特异性引物(F: CCGGAATTCGGCACAACAACCATGA-ACTCTACC; R: CCGCTCGAGTTAGATTTTCT-AAAGTGCACGACGTC, 划线部分分别为限制性内切酶 *Eco*R I 和 *Xho* I 酶切位点)并由生工生物公司合成。

细胞培养及病毒感染增殖参考 Wang 等^[13]。基因组提取按试剂盒说明书进行。PCR 反应体系: 12.5 μ L rTaq Mix、引物各 1 μ L(10 μ mol/L)和 1 μ L DNA 模板, 补灭菌水至 25 μ L。反应程序如下: 94 $^{\circ}$ C, 5 min; 94 $^{\circ}$ C, 30 s, 55 $^{\circ}$ C, 30 s, 72 $^{\circ}$ C, 45 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C, 7 min。

将 PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳, 切胶回收后与 pMD18-T 载体连接, 转化至 DH5 α 感受态细胞, 筛选阳性克隆进行菌液 PCR 和双酶切鉴定并由生工生物公司测序验证。

1.3.2 原核载体构建 对重组克隆载体 pMD18-T-ORF136、原核表达载体 pET-32a (+)进行双酶切, 并将目的片段和双酶切后的原核载体进行连接。酶切体系为: 10 $\times$ buffer 2 μ L, *Eco*R I 和 *Xho* I 各 1 μ L, 质粒 1 μ g, 补 dd H₂O 水至 20 μ L。37 $^{\circ}$ C 水浴酶切 2 h。连接体系: T4 Ligase 1.5 μ L, 10 $\times$ T4 Ligase buffer 1.5 μ L, pET-32a (+) 3 μ L, 目的片段 9 μ L。16 $^{\circ}$ C 连接过夜。将连接产物转化至 DH5 α 感受态细胞, 筛选阳性克隆进行菌液 PCR 和双酶切鉴定并由生工生物公司测序验证, 该重组原核载体命名为 pET-32a-ORF136。

1.3.3 原核表达诱导与纯化 将鉴定正确的重组原核载体转化至大肠杆菌 Rosetta (DE3)中, 筛选阳性克隆, 接种于含有氨苄的 LB 培养基中, 在 37 $^{\circ}$ C 下摇床培养至 OD₆₀₀ 为 0.4, 加入终浓度为 0.8 mmol/L 的 IPTG 进行表达诱导, 4 h 后 10000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 进行少量表达鉴定。将收集的菌体用 PBS 清洗 2 次后重悬, 在冰上超声波破碎, 10000 r/min 离心 5 min, 分别收集上清和包涵体沉淀, 运用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进行鉴定。参照 Ni-凝胶纯化试剂盒的方法对包涵体蛋白进行纯化。

1.3.4 多克隆抗体制备与纯化 将纯化的重组蛋白对兔子进行皮下多点注射免疫(表 1)(佐剂和蛋

白体积比为 1 : 1), 免疫 66 d 后, 进行颈动脉采血。将血液于 37℃ 静置 1 h 后, 3000 r/min 离心 10 min, 收集血清, 用亲和纯化的方式对抗血清进行纯化, 于-20℃下保存。

表 1 pET-32a-ORF136 重组蛋白免疫新西兰白兔流程
Tab. 1 The procedure of New Zealand white rabbit immunized with recombinant protein of pET-32a-ORF136

免疫次数 immuniza- tion time	免疫周期/d immuniza- tion cycle	免疫剂量/mg immuniza- tion dose	免疫佐剂 immunization adjuvant
第 1 次 the 1 st time	0	0.6	弗氏完全佐剂 Freund's complete adjuvant
第 2 次 the 2 nd time	12	0.3	弗氏不完全佐剂 Freund's incomplete adjuvant
第 3 次 the 3 rd time	33	0.3	弗氏不完全佐剂 Freund's incomplete adjuvant
第 4 次 the 4 th time	54	0.3	弗氏不完全佐剂 Freund's incomplete adjuvant

1.3.5 SDS-PAGE 与免疫印迹分析(Western blot)

聚丙烯酰胺凝胶由 12%的分离胶和 4%的浓缩胶组成, 将纯化的病毒液与 RIPA 裂解液裂解后感染 CyHV-3 的 KS 细胞分别与 5×蛋白上样缓冲液按比例混合后在沸水中加热 5 min, 冷却后点样进行电泳分析(200 V, 35 min)。将 SDS-PAGE 分离后的凝胶用湿转的方法转移至硝酸纤维素膜, 5%的脱脂奶粉室温封闭 1 h, 然后用封闭剂 1 : 1000 稀释的多克隆抗体室温下孵育 1 h, 接着用 0.05%的 PBST 清洗 3 次, 每次 10 min; 最后用封

闭剂 1 : 10000 稀释的 HRP 标记羊抗兔 IgG 室温孵育 1 h, 用 0.05%的 PBST 清洗 3 次后进行 DAB 显色。

1.3.6 间接免疫荧光 细胞培养及病毒感染增殖参考 Wang 等^[13]的方法进行, 待细胞出现病变, 吸弃细胞培养液, PBS 清洗 3 遍, 滴入-20℃预冷的甲醇和丙酮(1 : 1)混合液覆盖样品, 平放于-20℃冰箱, 30 min; 吸弃固定液, 自然干燥, 用含有 0.05%吐温-20 的 PBS(PBST)清洗 3 次, 每次 5 min, 加入 10%的脱脂奶粉溶液室温封闭 1 h, PBST 清洗 3 次后加入 1 : 100 PBS 稀释的 ORF136 多克隆抗体室温孵育 1 h; PBST 清洗 3 次, 最后加入 1 : 100 PBS 稀释的 Alexa Fluor 488 标记的羊抗兔 IgG(H+L)室温孵育 1 h; PBST 清洗 3 次, 碘化丙啶(PI)进行核染, 荧光倒置显微镜下观察。

2 结果与分析

2.1 目的基因克隆

基于蛋白的二级结构、疏水性(hydrophobicity)、表面可及性(surface probability)、柔韧性(flexibility)和抗原性(antigenic index)等多个参数, 运用 ABCpred、Bepipred 和 DNASTar 子模块 Protean 等在线分析网站和软件共有的预测区域为最终的 B 细胞抗原表位预测结果。结果显示 ORF136 编码蛋白第 31~157 位氨基酸区域为较完整的潜在 B 细胞抗原表位(图 1)。

将预测的抗原表位区域进行 PCR 扩增, 1.5%的琼脂糖电泳分析显示获得一条与预期大小相符的条带, 片段大小为 381 bp(图 2)。

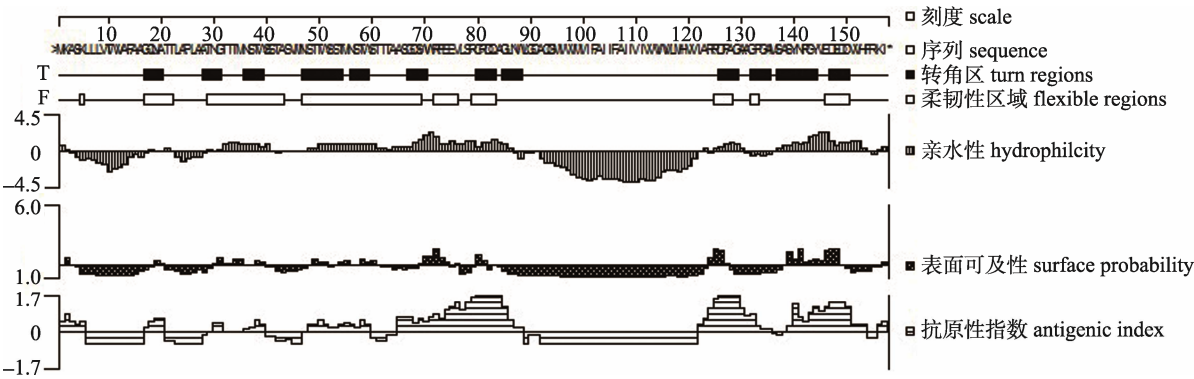


图 1 CyHV-3 ORF136 抗原表位分析
Fig. 1 Analysis of epitope of ORF136 in CyHV-3

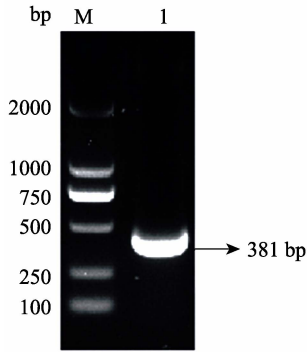


图 2 *ORF136*(第 91~471 位核苷酸)PCR 扩增结果

M: DL2000; 1: *ORF136*(第 91~471 位核苷酸).

Fig. 2 PCR amplification of *ORF136*
(num. 91–471 nucleotide)

M: DL2000; 1: *ORF136*(num. 91–471 nucleotide).

2.2 重组原核载体的鉴定

将构建的重组原核载体 pET-32a-ORF136 进行双酶切鉴定, 获得与预期大小相符的两条条带, 表明重组原核载体构建成功(图 3)。

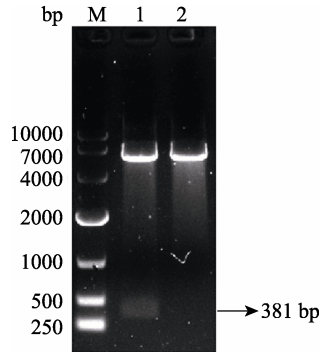


图 3 pET-32a-ORF136 双酶切鉴定

M: DL10000; 1: pET32a-ORF136; 2: pET32a.

Fig. 3 Double enzymatic digestion of pET32a-ORF136

M: DL10000; 1: pET32a-ORF136; 2: pET32a.

2.3 原核表达

将诱导表达的重组蛋白大量表达后进行超声波破碎, 破碎产物离心后进行 SDS-PAGE 分析, 结果显示获得与目的大小相符的蛋白条带, 大小约为 35 kD(pET-32a 载体自身携带标签蛋白分子量约为 18 kD, *ORF136* 蛋白预测分子量约为 17 kD), 且目的蛋白主要分布在包涵体中(图 4)。

2.4 Western blot 分析

将纯化后的重组蛋白免疫兔子, 获得的多克隆抗体用纯化的 CyHV-3 病毒和感染 CyHV-3 的 KS 细胞进行 Western blot 分析, 在约 15 kD 处出

现特异条带(图 5), *ORF136* 编码蛋白预测分子量约为 17 kD, 与预期大小一致, 说明该多克隆抗体能特异性识别 CyHV-3。

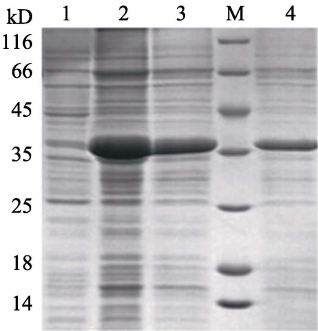


图 4 pET-32a-ORF136 表达蛋白的 SDS-PAGE 分析

M: 蛋白标准; 1: pET-32a-ORF136 诱导表达上清; 2~4: pET-32a-ORF136 诱导表达包涵体 2 倍、5 倍和 10 倍稀释.

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of proteins expression of pET-32a-ORF136

M: marker; 1: The supernatant of expressed proteins induced by pET-32a-ORF136; 2–4: The two-fold diluted inclusion bodies of expressed proteins induced by pET-32a-ORF136; 3: The inclusion bodies of expressed proteins induced by pET-32a-ORF136 (The two-fold, five-fold and ten-fold dilution, respectively).

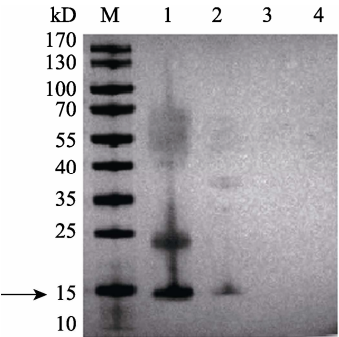


图 5 *ORF136* 多克隆抗体的 Western blot 分析

M: 蛋白标准; 1~4: 分别为纯化的 CyHV-3、感染 CyHV-3 的 KS 细胞、感染 CyHV-3 的 KS 细胞上清和未感染的 KS 细胞.

Fig. 5 Western blot analysis of polyclonal antibody against *ORF136*

M: marker; 1–4: Purified CyHV-3 virions, KS cell infected with CyHV-3, supernatant of KS cell infected with CyHV-3 and KS cell uninfected with CyHV-3, respectively.

2.5 间接免疫荧光

利用制备的 *ORF136* 多克隆抗体对感染 CyHV-3 的 KS 细胞进行间接免疫荧光分析, 结果显示, 在感染 CyHV-3 的 KS 细胞核周围观察到特异性绿色荧光(图 6a); 而未感染 CyHV-3 的 KS 细

胞只观察到染核的红色荧光, 未观察到特异性绿色荧光(图 6b), 进一步表明该抗体可识别 CyHV-3。

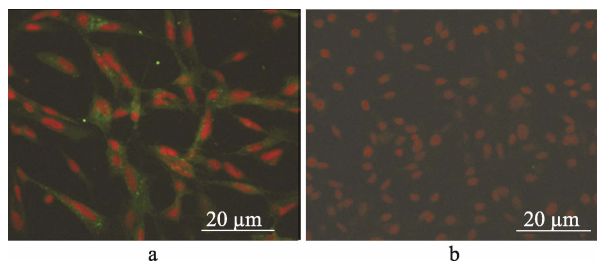


图 6 ORF136 多克隆抗体间接免疫荧光分析

a: 感染 CyHV-3 的 KS 细胞; b: 未感染 CyHV-3 的 KS 细胞.

Fig. 6 Indirect immunofluorescence assay of polyclonal antibody against ORF136

a: KS cells infected with CyHV-3; b: KS cells uninfected with CyHV-3.

3 讨论

由 CyHV-3 引起的锦鲤疱疹病毒病自从在欧洲暴发以来, 已传播至世界多个国家, 覆盖亚洲、欧洲、北美洲和非洲等多个地区^[14]。其中作为备受大众喜爱的锦鲤, 仍然继续随着国际贸易来往而成为潜在的传染源, 威胁着多个国家鲤鱼及锦鲤养殖产业的发展。虽然已有不少关于 CyHV-3 的研究, 包括检测诊断^[15-16]、分子流行病学^[17]、全基因组学^[4,18]及疫苗制备^[19-20]等方面, 但对于 CyHV-3 的结构蛋白研究却十分有限, 而病毒结构蛋白的鉴定和功能解析, 是深入了解 CyHV-3 致病机理及其与宿主互动的前提, 同时也是 KHVD 有效防控的理论基础。ORF136 编码蛋白是一个推测的囊膜蛋白, 但关于该蛋白的具体功能还缺乏深入研究。

目的基因编码蛋白在制备抗体前进行生物信息学分析, 有利于表达特定的抗原表位区域, 从而提高抗体制备的成功率。本研究在生物信息学的基础上对 ORF136 进行了分析, 根据预测的编码蛋白氨基酸序列截取抗原指数较强的第 31~157 位氨基酸作为抗原表达区域, 实验结果表明该区域表达的蛋白确实具有良好的免疫原性。重组蛋白的获得不仅是制备抗体的基础, 在实际应用上也具有一定的价值。如基于 II 型的鲤疱疹病毒(Cyprinid herpesvirus 2, CyHV-2)衣壳蛋白

ORF72 的免疫学检测方法的建立, 即将纯化的 ORF72 重组蛋白作为检测抗原, 临床样本检测表明该方法能检测出 ORF72 特异性抗体^[21]。

此外, 虽然目前已有许多 CyHV-3 的检测诊断方法, 但在实际广泛应用中主要还是基于分子的检测技术, 血清学诊断并没有得到广泛的应用。尤其是对于潜伏感染的宿主来说, 基于分子的检测并不能判断宿主体内是否存在病毒, 而血清学诊断技术能弥补这个缺陷。如基于血清学原理的双抗体夹心 ELISA 检测方法, 在病原的检测上就具有重要的应用意义。张琳琳等^[22]将传染性胰坏死病病毒(infectious pancreatic necrosis virus, IPNV)VP2 重组蛋白制备的兔源多克隆抗体作为捕获抗体, 建立了兔源 VP2 多克隆抗体和鼠源 VP2 单克隆抗体双夹心抗体 ELISA 检测方法, 具有较高的敏感性和特异性。基于重组蛋白制备的多克隆抗体夹心 ELISA 应用广泛, 在其他的疾病病原检测上同样有报道, 如罗非鱼无乳链球菌^[23]、牛肠道病毒^[24]和猪传染性胃肠炎病毒^[25]等等。基于免疫学原理的 CyHV-3 检测方法的建立, 需要有能特异性识别 CyHV-3 的抗体。本研究制备的 ORF136 编码蛋白多克隆抗体能特异性识别纯化的病毒和感染 CyHV-3 的细胞, 在后续可用于 CyHV-3 双抗体夹心 ELISA 方法的建立。

本实验成功构建了 CyHV-3 ORF136 重组原核表达载体, 在大肠杆菌诱导表达后纯化重组蛋白, 免疫兔子后获得的多克隆抗体能特异性识别纯化的 CyHV-3 病毒和感染 CyHV-3 的细胞, 为后续 ORF136 蛋白功能研究和 CyHV-3 血清学诊断方法的建立奠定了基础。

参考文献:

- [1] Hedrick R P, Gilad O, Yun S, et al. A herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi, a strain of common carp[J]. Journal of Aquatic Animal Health, 2000, 12(1): 44-57.
- [2] Sano M, Ito T, Kurita J, et al. First detection of koi herpesvirus in cultured common carp *Cyprinus carpio* in Japan[J]. Fish Pathology, 2004, 39(3): 165-167.
- [3] Bretzinger A, Fischer-Scherl T, Oumouna M, et al. Mass mortalities in koi carp, *Cyprinus carpio*, associated with gill

- and skin disease[J]. Bulletin of the European Association of Fish Pathology, 1999, 19(5): 182-185.
- [4] Aoki T, Hirono I, Kurokawa K, et al. Genome sequences of three koi herpesvirus isolates representing the expanding distribution of an emerging disease threatening koi and common carp worldwide[J]. Journal of Virology, 2007, 81(10): 5058-5065.
- [5] Miyazaki T, Kuzuya Y, Yasumoto S, et al. Histopathological and μ L trastructural features of koi herpesvirus (KHV)-infected carp *Cyprinus carpio*, and the morphology and morphogenesis of KHV[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2008, 80(1): 1-11.
- [6] Miwa S, Ito T, Sano M, et al. Morphogenesis of koi herpesvirus observed by electron microscopy[J]. Journal of Fish Diseases, 2007, 30(12): 715-722.
- [7] Michel B, Leroy B, Stalin Raj V, et al. The genome of cyprinid herpesvirus 3 encodes 40 proteins incorporated in mature virions[J]. Journal of General Virology, 2010, 91(2): 452-462.
- [8] Yi Y, Zhang H, Lee X, et al. Extracellular virion proteins of two Chinese CyHV-3/KHV isolates, and identification of two novel envelope proteins[J]. Virus Research, 2014, 191: 108-116.
- [9] Rosenkranz D, Klupp B G, Teifke J P, et al. Identification of envelope protein *orf81* of koi herpesvirus[J]. Journal of General Virology 2008, 89(4): 896-900.
- [10] Zhou J, Xue J, Wang Q, et al. Vaccination of plasmid DNA encoding *orf81* gene of cj strains of KHV provides protection to immunized carp[J]. Vitro Cellular & Developmental Biology Animal, 2014, 50(6): 489-495.
- [11] Fuchs W, Granzow H, Dauber M, et al. [J]. Archives of Virology, 2014, 159(12): 3257-3268.
- [12] Dong C F, Li X Z, Weng S P, et al. Emergence of fatal European genotype CyHV-3/KHV in mainland China[J]. Veterinary Microbiology, 2013, 162(1): 239-244.
- [13] Wang Y Y, Zeng W W, Li Y Y, et al. Development and characterization of a cell line from the snout of koi (*Cyprinus carpio* L.) for detection of koi herpesvirus[J]. Aquaculture, 2015, 435: 310-317.
- [14] Boutier M, Ronsmans M, Rakus K, et al. Cyprinid herpesvirus 3: An archetype of fish alloherpesviruses[J]. Advances in Virus Research, 2015, 93: 161-256.
- [15] Bergmann S M, Riechardt M, Fichtner D, et al. Investigation on the diagnostic sensitivity of molecular tools used for detection of koi herpesvirus[J]. Journal of Virological Methods, 2010, 163(2): 229-233.
- [16] Gilad O, Yun S, Zagmutt-Vergara F J, et al. Concentrations of a koi herpesvirus (KHV) in tissues of experimentally infected *Cyprinus carpio* koi as assessed by real-time taqman PCR[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2004, 60(3): 179-187.
- [17] Kurita J, Yuasa K, Ito T, et al. Molecular epidemiology of koi herpesvirus[J]. Fish Pathology, 2009, 44(2): 59-66.
- [18] Li W, Lee X, Weng S P, et al. Whole-genome sequence of a novel Chinese cyprinid herpesvirus 3 isolate reveals the existence of a distinct European genotype in east Asia[J]. Veterinary Microbiology, 2015, 175(2-4): 185-194.
- [19] Weber E P, Malm K V, Yun S C, et al. Efficacy and safety of a modified-live cyprinid herpesvirus 3 vaccine in koi (*Cyprinus carpio* koi) for prevention of koi herpesvirus disease[J]. American Journal of Veterinary Research, 2014, 75(10): 899-904.
- [20] Perelberg A, Ronen A, Hutoran M, et al. Protection of cultured *Cyprinus carpio* against a lethal viral disease by an attenuated virus vaccine[J]. Vaccine, 2005, 23(26): 3396-3403.
- [21] Kong S Y, Jiang Y S, Xu D, et al. An immunological method to detect CyHV-2 based on capsid protein 72[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2016, 23(2): 328-335. [孔善云, 姜有声, 许丹, 等. 一种基于 II 型鲤疱疹病毒衣壳蛋白 72 的免疫学检测方法[J]. 中国水产科学, 2016, 23(2): 328-335.]
- [22] Zhang L L, Lian K X, Zhang Y, et al. development of a double antibody sandwich ELISA for detection of infectious pancreatic necrosis virus[J]. Freshwater Fisheries, 2014(4): 57-62. [张琳琳, 连科迅, 张英, 等. 传染性胰坏死病毒双抗体夹心 ELISA 检测方法的建立[J]. 淡水渔业, 2014(4): 57-62.]
- [23] Zhang X Y. Establishment of DAS-ELISA detection for *Streptococcus agalactiae* in tilapia[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2014, 29(6): 570-574. [张新艳. 罗非鱼无乳链球菌双抗体夹心 ELISA 检测方法的建立[J]. 福建农业学报, 2014, 29(6): 570-574.]
- [24] Xing Z L, Wang X P, Zhu L S, et al. Development of a direct sandwich ELISA for detection of BEV antigen and BEV epidemiological investigation in Jilin province[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2016, 36(4): 567-571. [邢泽黎, 王新平, 朱利塞, 等. 双抗体夹心 ELISA 检测牛肠道病毒抗原方法的建立及流行病学调查[J]. 中国兽医学报, 2016, 36(4): 567-571.]
- [25] Qu Y, Ge J W, Tang L J, et al. Development of a double antibody sandwich ELISA for detection of transmissible gastroenteritis virus [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2013, 35(5): 364-368. [屈月, 葛俊伟, 唐丽杰, 等. 猪传染性胃肠炎病毒双抗体夹心 ELISA 检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2013, 35(5): 364-368.]

Identification and development of a polyclonal antibody against proteins encoded by the *ORF136* gene in Cyprinid herpesvirus 3

ZHENG Shucheng^{1,2}, LI Yingying¹, WANG Qing¹, ZENG Weiwei¹, WANG Yingying¹, REN Yan¹, SHI Cunbin¹

1. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Key Laboratory of Fishery Drug Development of Ministry of Agriculture; Key Laboratory of Aquatic Animal Immune Technology of Guangdong Province, Guangzhou 510380, China;
2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: Cyprinid herpesvirus 3 (CyHV-3), also known as koi herpesvirus (KHV), is the etiologic agent of koi herpesvirus disease (KHVD) causing morbidity and mortality in common carp and koi *Cyprinus carpio* L. populations around the world. Recently, knowledge about diagnosis and detection based on nucleic acid has been reported, but validation of serological techniques for virus infection is limited due to lack of effective antibodies. Additionally, fundamental research on the function of structural proteins from CyHV-3 is necessary to understand the relationship between host and virus. ORF136 is one of the predicted envelope proteins incorporated into mature virions. To study the function of proteins encoded by the *ORF136* gene of CyHV-3 and to establish serological methods for detection of CyHV-3, the predicted antigenic determinant based on amino acid sequences of proteins encoded by *ORF136* was amplified using PCR. Then, the recombinant prokaryotic expression vector was constructed by connecting the cloned fragment to prokaryotic expression vector pET-32a (+), used for transformation of *E. coli* Rosetta (DE3) and protein expressions induced by IPTG. New Zealand white rabbits were immunized with the recombinant proteins of pET-32a-ORF136 four times. Furthermore, the antisera were collected and affinity purification was used to obtain polyclonal antibody after 66 days. Characterization of the polyclonal antibody against the ORF136 protein was further analyzed using western blot and indirect immunofluorescence assays. The expected product size of 381 bp was obtained and the recombinant prokaryotic expression vector pET-32a-ORF136 was confirmed to be constructed as expected using enzyme digestion. As SDS-PAGE analysis indicated that the molecular weight of recombinant protein pET-32a-ORF136 was consistent with the expected size (about 35 kD) and was distributed in the inclusions. Western blot analysis further showed that the purified polyclonal antibody could specifically recognize purified CyHV-3 virions and KS cells infected with CyHV-3. Moreover, immunofluorescence staining showed that specifically green fluorescence was present in the cytoplasm of KS cells infected with CyHV-3, but not in the negative control, further suggesting that CyHV-3 was recognized by the polyclonal antibody. The purified recombinant proteins and effective antibodies are necessary to develop serological methods to detect antigens, except nucleic acid detection method. The purified recombinant proteins could be used as antigens to capture antibodies against CyHV-3 from common carp or koi exposed to KHVD. Similarly, development of a double antibody sandwich ELISA for detection of CyHV-3 also requires an effective polyclonal antibody to capture antigens released from the host. Antibodies produced by recombinant proteins from rabbit or mouse provides the foundation for functional research into structural and nonstructural proteins. In this study, the polyclonal antibody against the ORF136 protein was prepared and analyzed using immunoblotting and immunofluorescence techniques, which provides an essential and valid tool for further research into CyHV-3.

Key words: Cyprinid herpesvirus 3; koi herpesvirus; *ORF136*; prokaryotic expression; polyclonal antibody

Corresponding author: WANG Qing. E-mail: sunny_929@163.com