

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190709001

http://www.yykxjz.cn/

张淑敏, 白昌明, 辛鲁生, 李亚楠, 李晨, 王崇明. 牡蛎疱疹病毒囊膜蛋白(ORF111)的基因克隆及表达. 渔业科学进展, 2020, 41(2): 183-190
Zhang SM, Bai CM, Xin LS, Li YN, Li C, Wang CM. Gene cloning and expression of Ostreid herpesvirus 1 envelope protein (ORF111). Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(2): 183-190

牡蛎疱疹病毒囊膜蛋白(ORF111) 的基因克隆及表达*

张淑敏^{1,2} 白昌明² 辛鲁生² 李亚楠² 李晨² 王崇明^{2①}

(1. 大连海洋大学水产与生命学院 大连 116023; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部海水养殖病害防治重点实验室 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛市海水养殖流行病学与生物安保重点实验室 青岛 266071)

摘要 本研究对编码牡蛎疱疹病毒(Ostreid herpesvirus 1, OsHV-1)囊膜蛋白的 *orf111* 基因进行了生物信息学分析、克隆和表达。首先, 通过特异性 PCR 扩增得到 *orf111* 基因全长序列, 并对其编码囊膜蛋白的理化性质、高级结构、跨膜区和抗原决定簇等进行生物信息学分析。结果显示, *orf111* 编码一种稳定的疏水性蛋白, 具有 5 个跨膜结构域和 9 个抗原决定簇, 同时, 氨基酸序列中还包含 1 个高度保守的精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(Arg-Gly-Asp, RGD)结构域。随后, 构建了 pET28a-*orf111* 重组质粒, 并将其转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中。最后, 通过使用异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导蛋白表达, 表达产物分子量约为 32 kDa。本研究应用原核表达得到了含 RGD 结构域的 OsHV-1 囊膜蛋白, 为进一步制备 ORF111 蛋白单克隆抗体及开展牡蛎疱疹病毒侵染机制的研究奠定了重要基础, 为将来 OsHV-1 的防控工作提供新的思路。

关键词 牡蛎疱疹病毒; 囊膜蛋白; 原核表达; 魁蚶

中图分类号 S944.4+4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)02-0183-08

自20世纪90年代以来, 随着贝类养殖业的迅速发展, 牡蛎疱疹病毒(Ostreid herpesvirus 1, OsHV-1)感染引起的人工养殖贝类大面积死亡在世界范围内频繁发生, OsHV-1已成为影响贝类养殖业健康发展的重要病原微生物之一(Comps *et al*, 1977; Renault *et al*, 1994a、1994b、1995、1998)。OsHV-1具有典型的疱疹样病毒粒子特征, 由双链DNA构成的核心由内至外分别由衣壳、被膜(Tegument)及囊膜包裹。OsHV-1

基因组DNA大小约200 kbp; 衣壳具有正二十面体结构($T=16$); 被膜由位于核衣壳与囊膜之间的基质蛋白组成; 囊膜来源于宿主细胞(磷脂层和膜蛋白), 同时含有病毒编码的糖蛋白。OsHV-1是 *Ostreavirus* 属(Herpesvirales目, Malacoherpesviridae科)下的唯一一种; 也是最早被发现可以感染无脊椎动物的疱疹病毒种(Ren *et al*, 2013; Renault *et al*, 2000; Le Deuff *et al*, 1999; Arzul *et al*, 2001; Davidon *et al*, 2005)。与脊椎

* 农业农村部海水养殖病害防治重点实验室开放课题、中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费(20603022019022)和现代农业产业技术体系(CARS-49)共同资助[This work was supported by Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control, MARA, Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, YSFRI, CAFS (20603022019022), and China Agriculture Research System (CARS-49)]. 张淑敏, E-mail: zhangshumin1223@foxmail.com

① 通讯作者: 王崇明, 研究员, E-mail: wangcm@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2019-07-09, 收修改稿日期: 2019-07-31

动物疱疹病毒的宿主特异性较高不同, OsHV-1表现出跨种属感染和流行的致病特点。OsHV-1可以感染多种双壳贝类, 如牡蛎、扇贝、蚶和蛤等, 对贝类幼虫及稚贝的致死率高达40%~100% (Renault, 2011; Renault *et al.*, 2012; 张福绥等, 1999; 王运涛等, 1999; 宋微波等, 2001)。2012和2013年春季, 山东多个地区人工养殖的魁蚶(*Scapharca broughtonii*)亲贝出现大量死亡, 通过电镜在死亡魁蚶中观察到疱疹样病毒粒子, 后经分子生物学检测及感染实验, 确定魁蚶种贝的大规模死亡与牡蛎疱疹病毒感染密切相关, 这也是全球首例在蚶科贝类中发现的疱疹样病毒感染(Bai *et al.*, 2016)。对魁蚶中病毒粒子进行纯化、基因组测序和序列比对分析, 发现死亡魁蚶中存在的病毒是牡蛎疱疹病毒的新变异株, 命名为牡蛎疱疹病毒魁蚶株, 简称OsHV-1-SB(夏俊洋, 2015)。

对 OsHV-1 基因组序列进行生物信息学预测显示, OsHV-1 编码 124 个开放阅读框(Open reading frame, ORF), 其中, 38 个 ORF 编码膜蛋白。但由于缺乏细胞系, 还难以对上述预测结果进行验证。目前, 对 OsHV-1 预测 ORF 的真实性及其生物学功能的了解很有限。贾志磊等(2011)和张帅等(2014)仅针对牡蛎疱疹病毒的功能蛋白开展过功能预测、克隆和原核表达等研究工作, 国际上也仅有 1 例有关 OsHV-1 膜蛋白结构和功能方面的研究(Martenot *et al.*, 2019)。根据对脊椎动物疱疹病毒的研究显示, 疱疹病毒囊膜蛋白具有多种生物学功能(杨金华等, 2009), 是宿主细胞进行免疫识别的重要抗原表位, 也是设计和制备抗病毒药物及疫苗的关键靶标(He *et al.*, 2006)。研究病毒囊膜蛋白对揭示病毒与宿主细胞的相互作用机制和开发抗病毒药物等具有重要的作用。本研究根据已报道的牡蛎疱疹病毒及其魁蚶株全基因组序列, 成功克隆了预测为囊膜蛋白的 *orf111* 基因全长序列, 并利用生物信息学方法分析了其编码蛋白的基本结构特征。最后, 经原核表达成功得到了 *orf111* 基因编码的蛋白产物, 为进一步制备 ORF111 单克隆抗体及研究其功能奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

病料来源于 2012 年 5 月 23 日采集自山东省长岛某贝类育苗场的魁蚶种贝, 暂养过程中出现双壳闭合不全、反应迟钝、内脏团发白, 出现症状后 1 周内全部死亡。经实时定量 PCR 检测, 这批魁蚶病料中 OsHV-1-SB 的 DNA 载量约为 10^6 copies/ng 总 DNA。

组织病料在 -80°C 超低温冰箱保存备用。

1.2 总 DNA 的提取

将 1.1 中 OsHV-1-SB 呈阳性的组织样品从冰箱中取出后, 置于 4°C 冰箱, 过夜解冻, 剪取外套膜 30 mg, 根据海洋动物总 DNA 提取试剂盒(天根生化科技公司)说明书上的方法提取总 DNA。

1.3 PCR 引物设计

根据本实验室测定完成的 OsHV-1-SB 全基因组序列, 以及其他已公布的 OsHV-1 变异株基因组序列中 *orf111* 的基因序列, 使用 Premier 5.0 软件设计上下游引物: 上游引物 *orf111-F*: $5'-\text{CCGCTCGAGATGATTGGTCCGATTGTGGTACTAC}-3'$, 其中划线部分为添加的 *Xho* I 酶切位点; 下游引物 *orf111-R*: $5'-\text{CGCGGATCCTTATACAATTGGCAGCCATCTTCCT}-3'$, 其中划线部分为添加的 *Bam*H I 酶切位点。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.4 *orf111* 基因的扩增

以提取的总DNA为模板, 用高保真酶(东洋纺)进行 PCR 扩增, 反应体系: $10\times\text{PCR Buffer for KOD-Plus-Neo}$ 2.5 μl , dNTPs (2 mmol/L) 2.5 μl , MgSO_4 (25 mmol/L) 1.5 μl , 上、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.75 μl , KOD-Plus-NEO (1 U/ μl) 0.5 μl , 灭菌水 14.5 μl , 总体积为 25 μl 。PCR 扩增的反应条件: 94°C 预变性 2 min; 98°C 10 s, 55°C 30 s, 68°C 30 s, 进行 35 个循环; 最后, 72°C 延伸 10 min; PCR 产物置于 4°C 保存。用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检验得到的 PCR 产物。将扩增出的约 870 bp 的目的片段用 DNA 琼脂糖凝胶电泳回收试剂盒(天根生化科技公司)纯化回收, 并送至金唯智(中国)生物科技有限公司进行测序。

1.5 生物信息学分析

用 Gene tool 软件预测牡蛎疱疹病毒 *orf111* 基因的氨基酸序列; 用 NCBI 中 BLAST 工具(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行序列比对和相似性分析; 用 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>)工具对该蛋白质的理化性质进行预测和分析; 采用 SignalP 5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)进行信号肽预测; 使用 TMHMM5.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)在线预测牡蛎疱疹病毒 *orf111* 基因所编码蛋白质的跨膜区。采用在线软件 Predicting Antigenic Peptides (<http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.pl>)及 ABCpred(<http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/>)进行蛋白抗原特性分析。

1.6 重组表达载体的构建

用限制性核酸内切酶 *Bam*H I (NEB)和 *Xho* I (NEB)对纯化后的目的片段 *orf111* 和原核表达载体 pET28a(+) 分别进行双酶切,酶切体系为 20 μ l:*orf111* 及 pET28a(+) 各 10 μ l, *Bam*H I 1 μ l, *Xho* I 1 μ l, Buffer 2 μ l, 灭菌水 6 μ l, 37 $^{\circ}$ C 酶切过夜, 1%琼脂糖凝胶电泳检验双酶切结果, 并切胶回收。将双酶切后的 *orf111* 目的片段和原核表达载体 pET28a(+)经 T4 DNA 连接酶(NEB)连接, 得到重组表达载体 pET28a-*orf111*。连接体系为: *orf111* 酶切产物 3 μ l, pET28a(+)酶切产物 9 μ l, T4 DNA 连接酶 1 μ l, Buffer 2 μ l, 灭菌水 5 μ l, 总体积 20 μ l, 4 $^{\circ}$ C 连接过夜。

将重组表达载体转化至 DH5 α 感受态细胞(天根生化科技公司)中, 经含卡那霉素(Kan $^{+}$, 50 μ g/ μ l)的 LB 固体培养基筛选, 得到转化成功的表达菌株, 挑取单菌落, 进行菌落 PCR 验证。使用质粒小量提取试剂盒(天根生化科技公司)提取质粒并进行双酶切验证, 同时, 将重组表达载体送至金唯智(中国)生物科技股份有限公司进行测序。将测序正确的重组表达菌株置于 20%甘油, -80 $^{\circ}$ C 保存。

1.7 重组表达载体 pET28a-*orf111* 的诱导表达

将重组表达载体 pET28a-*orf111* 接种于 LB 液体培养基(Kan $^{+}$, 50 μ g/ μ l), 37 $^{\circ}$ C, 200 r/min, 恒温振荡培养过夜, 制备种子液; 第2天, 按 1:100 接种到 100 ml LB 液体培养基(Kan $^{+}$, 50 μ g/ μ l), 37 $^{\circ}$ C, 200 r/min, 摇床培养至 OD_{600nm} \approx 0.5~0.6 时, 取 30 ml 作为对照进行培养(不进行诱导), 其余菌液加入异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)至终浓度为 1 mmol/L, 37 $^{\circ}$ C 诱导表达 4 h 左右, 收集菌液, 10000 \times g 离心 3 min, 弃上清液, 沉淀中加入 1 \times PBS 超声破碎, 10000 \times g, 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min, 对照组按照上述方法进行破碎; 分别收集上清液和沉淀, 进行 SDS-PAGE 分析。上样前, 分别在上清液和沉淀中加入 4 \times SDS 上样缓冲液, 金属浴 100 $^{\circ}$ C, 5 min, 12% SDS-PAGE 电泳观察蛋白表达情况。

2 结果

2.1 *orf111* 基因 PCR 扩增及鉴定

以提取的总 DNA 作为模板, 经过 PCR 扩增获得相应的基因片段, PCR 产物使用 1%琼脂糖凝胶电泳检测, 在 750~1000 bp 之间出现了 1 条特异性条带, 与 *orf111* 基因预期的目的条带 870 bp 大小相符(图 1)。目的条带测序结果证实 PCR 扩增的特异性条带为目的条带。

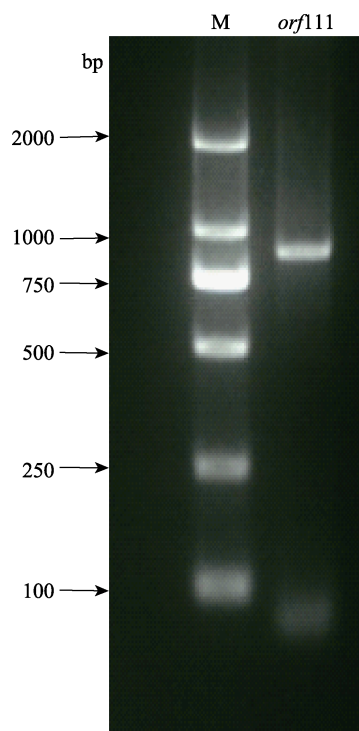


图 1 牡蛎疱疹病毒魁蚶株 *orf111* 基因扩增
Fig.1 Amplification of the *orf111* gene in Ostreid herpesvirus 1 SB strain

M: DNA marker; *orf111*: 目的基因 Target gene

2.2 *orf111* 基因序列分析

氨基酸序列分析, 结果显示, 牡蛎疱疹病毒魁蚶株的 *orf111* 基因序列中含有 1 个精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(Arg-Gly-Asp, RGD)序列(图 2); 经 SignalP 5.0 Server 软件分析, 该氨基酸序列无信号肽; 通过 TMMHM 5.0 在线工具对 *orf111* 基因编码的蛋白结构进行分析, 结果显示, 该蛋白在 5~27、107~129、149~171、191~213 和 258~280 氨基酸残基处存在 5 个跨膜区域(图 3)。

2.3 蛋白质理化参数及高级结构预测

2.3.1 理化性质分析 根据 ProtParam 预测结果, *orf111* 基因编码的蛋白质分子质量为 32.41 kDa, 理论等电点为 7.00。基因编码的 289 个氨基酸中, 带正电荷的碱性氨基酸精氨酸(Arg)和赖氨酸(Lys)共 26 个, 带负电荷的酸性氨基酸天冬氨酸(Asp)和谷氨酸(Glu)共 26 个。该蛋白质的不稳定系数和亲水性总平均值分别为 37.46 和 0.421, 是一种稳定的疏水性蛋白质。

2.3.2 高级结构预测 蛋白质主链通过不同的折叠方式产生由氢键维系的蛋白质二级结构, 并由此进一步折叠成球形。根据目前相关研究, 认为驱动蛋白

1	M I G P I V V L H L I C A V G F S I F M L Q Y Y N I L Y D K P A C	99
	ATG ATT GGT CCG ATT GTG GTA CTA CAT TTA ATA TGT GCT GTG GGA TTC AGC ATC TTT ATG TTG CAG TAC TAC AAC ATT CTT TAT GAT AAA CCT GCC TGT	
100	N H M G G C E M Q D I Y K V T E N S T E D E N G T L T T T T I K P	198
	AAT CAC ATG GGT GGA TGT GAG ATG CAA GAC ATA TAT AAA GTT ACG GAA AAT TCA ACA GAG GAT GAA AAT GGT ACA CTC ACC ACA ACC ACA ATT AAA CCC	
199	V K T P A C P V K E E C R G D E F C C K L C S E V K G N D Y S E R P	297
	GTA AAA ACA CCT GCT TGT CCG GTT AAA GAA TGC AGA GGT GAT GAG TTC TGC TGT AAA TTA TGC TCT GAG GTC AAG GGT AAT GAT TAC AGT GAA AGA CCG	
298	I H M E S T L Y I H N P A I I T I A I V G V V I G V F I I V C I A	396
	ATA CAC ATG GAA TCA ACA CTG TAT ATA CAC AAC CCT GCC ATA ATT ACA ATA GCA ATT GTG GGA GTA GTG ATT GGT GTA TTC ATC ATC GTT TGT ATA GCA	
397	N I C R M K S G K R G T T F V R F L I G I T L F L L F L T L A G S	495
	AAT ATA TGC AGG ATG AAA TCT GGA AAG AGA GGA ACG ACC TTT GTG AGA TTT CTT ATA GGA ATC ACG TTG TTT TTA TTA TTT TTA ACC TTA GCA GGG TCA	
496	V A F I V I S I I S D F D Y Y K A D C H A K L T L N I S W G F V C G	594
	GTG GCA TTC ATT GTC ATA TCG ATC ATA TCA GAT TTT GAT TAC TAC AAA GAC TGC CAT GCA AAA CTG ACA TTG AAC ATC AGC TGG GGA TTT GTT TGT GGT	
595	I L A I S Y S T S I L P S F T R I M R A E Q L K R D A L D I P D H	693
	ATA TTG GCA ATC AGT TAT TCT ACC AGC ATT CTA CCA TCG TTC ACC AGA ATC ATG AGA GCC GAA CAG TTA AAG AGA GAT GCG TTA GAC ATT CCC GAC CAT	
694	D E S T Q M L I K A D R L K H E P I E K P G L F S T I A R Y L L T	792
	GAT GAA TCA ACA CAG ATG TTA ATC AAG GCA GAC AGG TTG AAA CAC GAA CCT ATT GAG AAA CCT GGA TTG TTT TCT ACT ATA GCA AGA TAT TTG CTG ACG	
793	L C L L W W P A I T I Y F I G V G Q G R W L P I V *	870
	CTG TGT TTA TTG TGG TGG CCT GCA ATC ACA ATA TAT TTT ATA GGC GTT GGC CAA GGA AGA TGG CTG CCA ATT GTA TAA	

图2 牡蛎疱疹病毒魁蚶株 *orf111* 基因序列及推导的氨基酸序列Fig.2 Nucleotide and deduced amino acid sequence of the *orf111* gene in Ostreid herpesvirus 1 SB strain

方框所示序列为 RGD 三肽
Boxed sequence is the RGD tripeptide

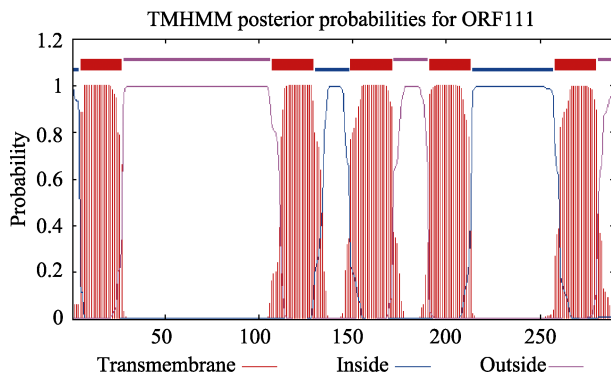


图3 牡蛎疱疹病毒魁蚶株 *orf111* 基因编码蛋白跨膜区预测
Fig.3 Transmembrane domain prediction of the ORF111 protein in Ostreid herpesvirus 1 SB strain

质主链折叠形成二级结构的动力主要是疏水效应。通过 SOPMA 在线预测软件对 *orf111* 基因编码的蛋白质二级结构进行预测,结果显示,蛋白质主要由 4 种二级结构元件组成,其中, α 螺旋占 38.41%, β 转角占 4.15%, 延伸链占 26.30%, 无规则卷曲占 31.14%。

经在线工具 Predicting Antigenic Peptides 分析发现, *orf111* 基因编码的蛋白质有 9 处抗原决定簇,分别为 4~33、63~76、79~89、102~134、145~177、179~189、191~211、222~228、250~280 氨基酸残基,且在 63~76、79~89、102~134、145~177 区域及附近存在 B 细胞抗原表位的可能性较高,易于与抗体嵌合(张昱等, 2008; 王笑英等, 2010)。

2.4 序列相似性分析

通过 NCBI 中的 BLAST 工具进行 DNA 序列相似

性分析,结果表明,牡蛎疱疹病毒魁蚶株 *orf111* 基因与牡蛎疱疹病毒参考株(OsHV-1, AVC68720.1)、急性病毒性坏死病毒(*Chlamys acute necrobiotic virus*, AVNV, ADD24836.1)、鲍疱疹病毒(*Haliotid herpesvirus 1*, HaHV-1, YP_006908732)等病毒的 *orf111* 基因有序列相似性。此外,将克隆得到的基因片段翻译成氨基酸序列,进行 BLAST 后发现,该蛋白质与牡蛎疱疹病毒参考株(OsHV-1)、急性病毒性坏死病毒(AVNV)、鲍疱疹病毒(HaHV-1)也具有序列相似性。其中, *orf111* 基因的氨基酸序列与牡蛎疱疹病毒 *orf111* 基因的氨基酸序列相似性为 99.65%,与急性病毒性坏死病毒 ORF111 相似性为 99.31%,与鲍疱疹病毒 ORF80 相似性为 32.20%。

2.5 重组质粒 pET28a-*orf111* 菌落 PCR 和双酶切鉴定

挑取 5~7 个单菌落,分别接种于 3 ml 不含卡那霉素的 LB 新鲜液体培养基中, 37°C, 摇床振荡培养 12 h,以菌液作为模板,进行菌落 PCR,使用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,结果显示,在 750~1000 bp 之间靠近 1000 bp 处出现了特异性条带,与 *orf111* 基因的大小相符(图 4)。挑取鉴定为阳性的 pET28a-*orf111* 重组菌提取质粒,使用 *Xho* I 及 *Bam* H I 限制性核酸内切酶,对重组质粒进行双酶切鉴定,使用 1% 琼脂糖凝胶电泳对双酶切产物进行检测,结果与预期大小相符(图 5)。重组质粒测序结果显示:目的基因与牡蛎疱疹病毒魁蚶株 *orf111* 基因的 DNA 序列同源性高达 100%,且所有碱基无缺失、突变。以上结果表明,重组表达载体构建成功。

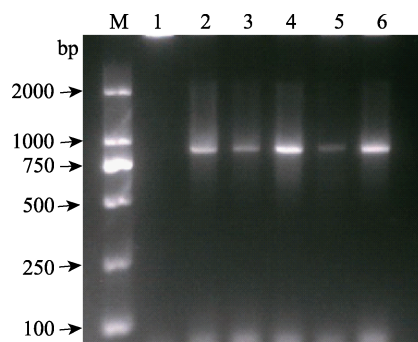


图 4 重组表达载体 pET28a-orf111 菌落 PCR 鉴定
Fig.4 Bacterial colony PCR of recombinant pET28a-orf111

M: DNA marker; 1~6: 重组质粒 pET28a-orf111 菌落
Recombinant pET28a-orf111 bacterial colony

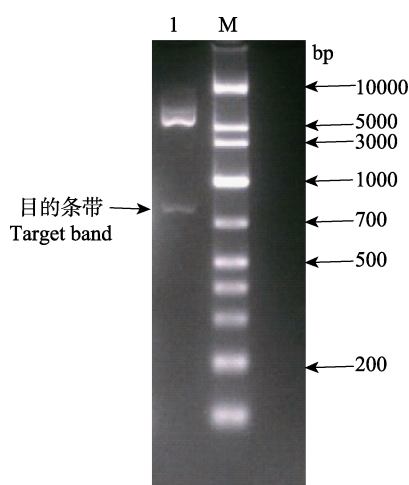


图 5 重组表达载体 pET28a-orf111 双酶切鉴定
Fig.5 Double enzyme digestion of recombinant pET28a-orf111

M: DNA marker; 1: *Xho* I 与 *Bam*H I 双酶切产物
pET28a-orf111 digested with *Xho* I and *Bam*H I

2.6 重组表达载体 pET28a-orf111 的诱导表达及鉴定

在诱导温度为 37℃、IPTG 终浓度为 1 mmol/L、诱导培养时间为 4 h 情况下, 诱导重组表达载体 pET28a-orf111 蛋白表达。将诱导表达的 pET28a-orf111 超声破碎后, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 其中沉淀中在 30~40 kDa 明显的出现了 1 条清晰的特异性条带, 约为 32 kDa, 与目的蛋白大小相符, 实验中未诱导的重组菌上清液、沉淀和诱导的重组菌上清液均无目的条带(图 6), SDS-PAGE 电泳结果显示, 重组蛋白主要以包涵体形式存在于沉淀中。

3 讨论

疱疹病毒侵入宿主细胞是一个高度复杂的过程,

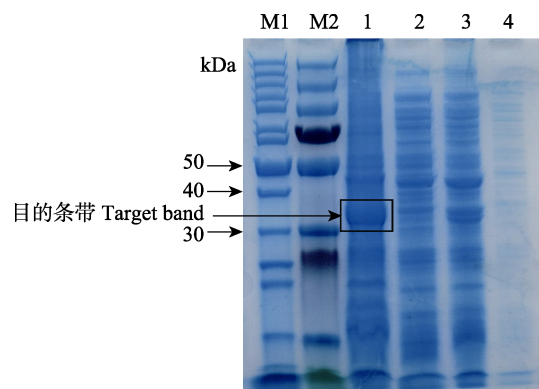


图 6 重组表达载体 pET28a-orf111 诱导表达蛋白的 SDS-PAGE

Fig.6 SDS-PAGE of induced recombinant pET28a-orf111

M1、M2: 蛋白 Marker; 1、2: 分别为 IPTG 诱导的重组表达载体沉淀和上清液; 3、4: 分别为未诱导重组表达载体沉淀和上清液

M1, M2: Protein marker; 1: Precipitate protein of recombinant strain induced by IPTG; 2: Supernatant of recombinant strain induced by IPTG; 3: Precipitate of recombinant strain; 4: Supernatant of recombinant strain

涉及镶嵌在病毒粒子脂质双层结构中的多种囊膜蛋白和糖蛋白, 以及位于宿主细胞表面的受体分子。对脊椎动物疱疹病毒感染过程的研究结果显示, 其侵入过程首先是从病毒与宿主分子或者细胞的特异性粘附开始, 之后, 病毒粒子囊膜与宿主细胞膜融合, 使病毒衣壳穿透宿主细胞(Spear *et al*, 2003; Spear, 2004; Agelidis *et al*, 2015)。对牡蛎疱疹病毒魁蚶株基因组进行的生物信息学分析, 结果显示, 牡蛎疱疹病毒魁蚶株 *orf111* 基因的胞外结构域中存在 1 个 RGD 结构域。RGD 结构域不仅是细胞与基质黏附作用和细胞生长、生存的生理基础, 在介导病毒与细胞间的黏附过程中也至关重要(张光辉等, 2010)。内源性 RGD 结构域主要存在于粘附蛋白中, 如铁蛋白、玻连蛋白、血管性血友病因子(von Willebrand factor, vWF)、纤维粘连蛋白等, 其具有一定的生物活性, 能与细胞表面的整合素受体特异性结合, 是存在于细胞外基质中一段高度保守的结构域(朱丽红等, 2010; 陈治宇等, 2003; 柴宁莉等, 2012; 张光辉等, 2010; 侯瑞珍等, 2008; 史嘉玮等, 2005; Kostetski *et al*, 2000)。对虾白斑综合征病毒(White spot syndrome virus, WSSV)膜蛋白相关研究表明, 在 WSSV 病毒感染初期, 含 RGD 结构域的膜蛋白介导了病毒对宿主细胞膜的粘附, 病毒膜蛋白和细胞受体的粘附作用确实通过 RGD 结构域实现(刘庆慧等, 2005, 林兆宇, 2009; 陈文博, 2009; 唐小千, 2010; 赵建梅, 2013)。王中一等(2018)研究发现, WSSV 入侵凡纳滨对虾细胞时, 是因为 VP26 和

VP37与网格重链蛋白相互作用,从而介导WSSV进入宿主细胞中,并加快WSSV病毒在宿主体内的一系列活动。由此推测,囊膜蛋白ORF111中的RGD结构域在OsHV-1与宿主细胞膜上的特异性受体结合,在侵染宿主细胞的过程中都扮演着重要角色。ORF111也是首个被成功克隆和表达的含RGD结构域的OsHV-1结构蛋白,对该蛋白进行生物信息学分析和原核表达将有助于理解和研究OsHV-1的侵染机制。王中一等(2019)通过酵母双杂交技术筛选与wsv112互作的宿主蛋白,为研究wsv112的调控机制提供新的思路。这一研究成果将对研究膜蛋白ORF111的互作蛋白,及其在病毒侵染宿主过程中的作用机制提供参考。

在生物的生命活动中膜蛋白起着至关重要的作用,如能量转换、细胞增殖和分化、物质运输以及信号转导等,而膜蛋白的功能与其结构息息相关(Yildirim *et al.*, 2007)。对病毒囊膜蛋白的序列和结构进行生物信息学预测,将为后续开展相关实验验证提供帮助。序列比对发现,牡蛎疱疹病毒魁蚶株*orf111*基因编码蛋白的氨基酸序列与数据库中牡蛎疱疹病毒参考株和急性病毒性坏死病毒的*orf111*基因编码蛋白的氨基酸序列相似度分别为99.89%和99.65%,并未发现其中的氨基酸序列有高变异区。上述结果显示,ORF111蛋白比较保守,这一特点有利于利用该蛋白制备适用于不同牡蛎疱疹病毒变异株的单克隆抗体。对ORF111蛋白的高级结构进行分析,发现其氨基酸序列的可变区存在大量的B细胞抗原优势表位,这一结果说明,ORF111蛋白可能具有较好的抗原性(王笑英等, 2010)。B细胞抗原优势表位与蛋白质高级结构有着紧密联系,但目前ORF111蛋白的结构及功能研究尚处于起步阶段,所以,本研究通过生物信息学方法预测得到的结果还有待进一步验证。

目前,国内外仅对OsHV-1功能蛋白开展过诱导表达和初步结构、功能研究。如开展了*dUTPase*基因及*IAP-86*基因的克隆、表达及功能相关研究(贾志磊等, 2011; 张帅等, 2014),但对于贝类疱疹病毒囊膜蛋白结构和功能的研究工作较少,仅Martenot等(2019)对牡蛎疱疹病毒参考株开展了相关研究。Martenot等(2019)研究表明,牡蛎疱疹病毒参考株*orf25*基因编码的膜蛋白参与了OsHV-1与宿主细胞的相互作用,ORF25抗体对宿主抗病毒具有促进作用。同时,其研究还表明,病毒与宿主之间的相互作用需要*orf72*和*orf41*基因编码的膜蛋白共同参与。根据牡蛎疱疹病毒*orf25*、*orf41*和*orf72*基因的生物信息学分析,这3种基因编码的囊膜蛋白不含RGD结构域。本研究首次以含

有RGD结构域的*orf111*基因为研究对象,经基因克隆、表达载体重组及诱导表达,成功得到32 kDa的目的蛋白,大小与目的基因*orf111*和pET28a(+)原核表达载体标签序列融合表达的重组蛋白预期一致。该结果为进一步研究囊膜蛋白ORF111的功能以及牡蛎疱疹病毒的致病机制奠定基础,为牡蛎疱疹病毒的防控工作提供新的思路。

参 考 文 献

- Agelidis AM, Shukla D. Cell entry mechanisms of HSV: What we have learned in recent years. *Future Virology*, 2015, 10(10): 1145–1154
- Arzul I, Nicolas JL, Davison AJ, *et al.* French scallops: A new host for Ostreid herpesvirus-1. *Virology*, 2001, 290: 342–349
- Bai CM, Gao WH, Wang CM, *et al.* Identification and characterization of Ostreid herpesvirus 1 associated with massive mortalities of *Scapharca broughtonii* broodstocks in China. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2016, 118: 65–75
- Chai NL, Xu SP, Shi H, *et al.* Arginine-glycin-aspartic acid could enhance oxymatrine liposomes therapeutic effect on hepatic fibrosis. *Global Traditional Chinese Medicine*, 2012, 5(9): 645–650 [柴宁莉, 徐世平, 石卉, 等. 精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸对氧化苦参碱脂质体减轻肝纤维化的增强作用研究. *环球中医药*, 2012, 5(9): 645–650]
- Chen WB. Design and evaluation a novel protein vaccine for the precaution of white spot syndrome virus (WSSV) infection. Master's Thesis of Liaoning Normal University, 2009 [陈文博. 一种预防白斑综合症病毒的新型蛋白疫苗的设计和评估. 辽宁师范大学硕士研究生学位论文, 2009]
- Chen ZY, Hou J, Wang XF. Synthesis of peptides and analogues containing RGD domain. *Journal of Chengde Medical College*, 2003, 20(3): 246–247 [陈治宇, 厚今, 王兴发. 含RGD序列肽及类似物的合成. *承德医学院学报*, 2003, 20(3): 246–247]
- Comps M, Bonami JR. Infection virale associe a des mortalites chez l'huire *Crassostrea gigas*. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de L'academie des sciences*.1977, 285: 1139–1140
- Davidon AJ, Trus BL, Cheng N, *et al.* A novel class of herpesvirus with bivalve hosts. *Journal of General Virology*, 2005, 86(1): 41–53
- He JY, Hu HJ, Harrison R, *et al.* Transmembrane segments prediction and understanding using support vector machine and decision tree. *Expert Systems with Applications*, 2006, 30(1): 64–72
- Hou RZ, Wang W, Li CR, *et al.* Studies on the effects of RGD peptide on the proliferation, adherence and motility of human fibrosarcoma cell HT1080. *Journal of Northeast Normal University (Natural Science Edition)*, 2008, 40(1): 120–124 [侯瑞珍, 王巍, 李春蓉, 等. RGD对人纤维肉瘤细胞HT1080增殖、黏附及转移影响的研究. *东北师大学报(自然科学版)*, 2008, 40(1): 120–124]
- Jia ZL, Wang CM, Ren WC, *et al.* Cloning, expression of *Chlamys farreri* acute viral necrosis virus dUTPase gene

- and the determination of its enzymatic activity. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(9): 1320–1326 [贾志磊, 王崇明, 任伟成, 等. 急性病毒性坏死病毒 dUTPase 基因的克隆、表达及其产物的酶学活性分析. *水产学报*, 2011, 35(9): 1320–1326]
- Kostetski PV, Artem'ev IV. A conformational analysis of biologically active RGD-containing cyclopeptideptides. *Bioorganicheskaya Khimiya*, 2000, 26(4): 290–298
- Le Deuff RM, Renault T. Purification and partial genome characterization of a herpes-like virus infecting the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of General Virology*, 1999, 80(5): 1317–1322
- Lin ZY. Characterization of an envelope protein (VP13A) of white spot syndrome virus and the research into the interaction between envelope proteins (VP31 and VP33) and host cells. Master's Thesis of Xiamen University, 2009 [林兆宇. 对虾白斑综合症病毒(WSSV)膜蛋白 VP13A 的鉴定及 VP31 和 VP33 与宿主细胞互相作用的初步研究. 厦门大学硕士研究生学位论文, 2009]
- Liu QH, Huang J, Han WJ, *et al.* Clone and sequence analysis of white spot syndrome virus (WSSV)-VAP1 gene. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2005, 12(3): 352–356 [刘庆慧, 黄健, 韩文君, 等. WSSV-VAP1 基因克隆与序列分析. *中国水产科学*, 2005, 12(3): 352–356]
- Martenot C, Faury N, Morga B, *et al.* Exploring first interactions between Ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) and its host, *Crassostrea gigas*: Effects of specific antiviral antibodies and dextran sulfate. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1128
- Ren W, Chen H, Renault T, *et al.* Complete genome sequence of acute viral necrosis virus associated with massive mortality outbreaks in the Chinese scallop, *Chlamys farreri*. *Virology Journal*, 2013, 10: 110
- Renault T, Cochenec N, Le Deuff RM, *et al.* Herpes-like virus infecting Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) spat. *Bulletin-European Association of Fish Pathologists*, 1994a, 14(2): 64–66
- Renault T, Le Deuff RM, Chollet B, *et al.* Concomitant herpes-like virus infections in hatchery-reared larvae and nursery-cultured spat *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2000, 42(3): 173–183
- Renault T, Le Deuff RM, Cochenec N, *et al.* Herpes-like viruses associated with high mortality levels in larvae and spat of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*: A comparative study, the thermal effects on virus detection in hatchery-reared larvae, reproduction of the disease in axenic larvae. *Veterinary Research*, 1995, 26(5–6): 539–543
- Renault T, Le Deuff RM, Cochenec N, *et al.* Herpesviruses associated with mortalities among Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in France-comparative study. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 1994b, 145(10): 735–742
- Renault T, Lipart C. Diagnosis of herpes-like virus infections in oysters using molecular techniques. *European Aquaculture Society Special Publication*, 1998, 26: 235–236
- Renault T, Moerau P, Faury N, *et al.* Analysis of clinical Ostreid herpesvirus 1 (Malacoherpesviridae) specimens by sequencing amplified fragments from three virus genomes areas. *Journal of Virology*, 2012, 86(10): 5942–5947
- Renault T. A review of mortality outbreaks in the Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, reported since 2008 in various European members states. In: Renault T. The rehted implementation of council directive. Paris. The OIE and its partners, 2011, 5–9
- Shi JW, Dong NG. Application of RGD peptide in tissue engineering. *Chinese Journal of Experimental Surgery*, 2005, 22(9): 1150–1152 [史嘉玮, 董念国. RGD 肽在组织工程领域的应用. *中华实验外科杂志*, 2005, 22(9): 1150–1152]
- Song WB, Wang CM, Wang XH, *et al.* New research progress on massive mortality of cultured scallop *Chlamys farreri*. *Marine Sciences*, 2001, 25(12): 23–26 [宋微波, 王崇明, 王秀华, 等. 栉孔扇贝大规模死亡的病原研究新进展. *海洋科学*, 2001, 25(12): 23–26]
- Spear PG, Longnecker R. Herpesvirus entry: An update. *Journal of Virology*, 2003, 77(19): 10179–10185
- Spear PG. Herpes simplex virus: Receptors and ligands for cell entry. *Cellular Microbiology*, 2004, 6(5): 401–410
- Tang XQ. Study on the WSSV receptors in haemocytes of *Fennropenaeus chinensis*. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2010 [唐小千. 中国对虾白斑症病毒(WSSV)血细胞受体蛋白的研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2010]
- Wang XY, Du PG, Wu CF, *et al.* Bioinformatics analysis of OLFM1 epitope and preparation of polyclonal antibody. *Chinese Journal of Immunology*, 2010, 26(8): 721–723 [王笑英, 杜培革, 吴春风, 等. OLFM1 蛋白的生物信息学分析及其多克隆抗体制备与鉴定. *中国免疫学杂志*, 2010, 26(8): 721–723]
- Wang YT, Xiang JH. Studies on causation of the mass mortality of *Chlamys farreri*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1999, 30(6): 770–774 [王运涛, 相建海. 栉孔扇贝大规模死亡的原因探讨. *海洋与湖沼*, 1999, 30(6): 770–774]
- Wang ZY, Liu QH, Huang J. *In vitro* interaction between domain of clathrin heavy chain in *Litopenaeus vannamei* and WSSV structural proteins. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(2): 138–145 [王中一, 刘庆慧, 黄健. 凡纳滨对虾网格重链蛋白与 WSSV 结构蛋白在体外的相互作用. *渔业科学进展*, 2018, 39(2): 138–145]
- Wang ZY, Liu QH, Lu CY, *et al.* Identification of the host interactors of wsv112 of WSSV by yeast two-hybrid. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(4): 156–162 [王中一, 刘庆慧, 卢翠玉, 等. 利用酵母双杂交技术筛选与 wsv112 互作的宿主蛋白. *渔业科学进展*, 2019, 40(4): 156–162]
- Xia JY. Sequence and analysis of the genome of OsHV-1 *Scapharca broughtonii* strain. Master's Thesis of Ocean University of China, 2015, 1–2 [夏俊洋. 牡蛎疱疹病毒魁蚶株基因组测定与分析. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2015, 1–2]
- Yang JH, Ye R. Advances in the viral transmembrane proteins: Structure, function and antiviral drug design. *Journal of Microbes and Infection*, 2009, 4(4): 231–240 [杨金华, 叶荣. 病毒跨膜蛋白的结构功能与抗病毒药物设计. *微生物与感染*, 2009, 4(4): 231–240]
- Yildirim MA, Goh KI, Cusick ME, *et al.* Drug-target network. *Nature Biotechnology*, 2007, 25(10): 1119–1126
- Zhang FS, Yang HS. Analysis of the sauses of mass mortality of farming *Chlamys farreri* in summer in coastal areas of Shandong, China. *Marine Sciences*, 1999, 23(1): 44–47 [张

- 福绥, 杨红生. 山东沿岸夏季栉孔扇贝大规模死亡原因分析. 海洋科学, 1999, 23(1): 44–47]
- Zhang GH, Yao W, Hao CF, *et al.* Inhibitory effect of RGD on silica-induced stimulation in rat lung fibroblast. *Modern Preventive Medicine*, 2010, 37(11): 2016–2018 [张光辉, 姚武, 郝长付, 等. RGD 短肽对二氧化硅致肺成纤维细胞激活的抑制效应. 现代预防医学, 2010, 37(11): 2016–2018]
- Zhang S, Wang CM, Song XL, *et al.* Cloning, expression of acute viral necrosis virus IAP-86 gene and studies of its anti-apoptotic mechanism. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(2): 274–281 [张帅, 王崇明, 宋晓玲, 等. 急性病毒性坏死病毒 IAP-86 基因的克隆、表达及抗凋亡研究. 水产学报, 2014, 38(2): 274–281]
- Zhang Y, Wang YL, Zhang YG, *et al.* Construction of VP1 and prediction of B cell epitopes from FMDV AF72. *Biotechnology Bulletin*, 2008(6): 158–163 [张昱, 王永录, 张永光, 等. 口蹄疫病毒株 AF72 VP1 的结构构建与 B 细胞表位预测. 生物技术通报, 2008(6): 158–163]
- Zhao JM. Identification and characterization of the binding proteins of VP31 and VP110 in Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2013 [赵建梅. 对虾白斑症病毒 (WSSV) 囊膜蛋白 VP31、VP110 在中国明对虾血细胞和鳃细胞中结合蛋白的研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2013]
- Zhu LH, Wu Y, Yuan L, *et al.* Effects of immobilized GRGDSPC peptides on proliferation of periodontal ligament fibroblasts on type-1 collagen. *Acta Medicinae Universitatis Scientiae et Technologiae Huazhong*, 2010, 39(6): 856–859 [朱丽红, 吴勇, 袁理, 等. RGD 七肽固定胶原对人牙周膜成纤维细胞增殖的影响. 华中科技大学学报(医学版), 2010, 39(6): 856–859]

(编辑 马瑾艳)

Gene Cloning and Expression of Ostreid Herpesvirus 1 Envelope Protein (ORF111)

ZHANG Shumin^{1,2}, BAI Changming², XIN Lusheng², LI Yanan², LI Chen², WANG Chongming^{2①}

(1. Department of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023; 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao Key Laboratory of Mariculture Epidemiology and Biosecurity, Qingdao 266071)

Abstract The envelope protein (ORF111) of Ostreid Herpesvirus 1 (OsHV-1) were studied using bioinformatics analysis, gene cloning and expression. Firstly, we designed the primers of the *orf111* gene based on the complete genome sequence of OsHV-1, and successfully cloned the gene. We further analyzed the biological characteristics of the deduced protein sequence encoded by ORF111 gene, which including physicochemical properties, advanced structure, transmembrane region, and antigen determinant cluster. The results showed that the ORF111 protein is a stable hydrophobic protein, which contains nine antigenic determinants, five transmembrane domain structures, and a highly conservative pure ammonia arginyl-glycyl-aspartate (Arg-Gly-Asp, RGD) sequence. Then the OsHV-1-*orf111* gene was linked with a pET28a(+) plasmid, and the recombinant plasmid pET28a-*orf111* was successfully constructed. Finally, the recombinant plasmid was transformed into DH5 α , and the recombinant protein was expressed after inducing by isopropyl-beta-D-thiogalactosine (IPTG). The SDS-PAGE test showed that the molecular weight of the ORF111 protein was about 32 kDa. In this study, an OsHV-1 envelope protein containing the RGD domain was successfully obtained by prokaryotic expression, which lays a foundation for the preparation of monoclonal antibodies of ORF111, and provides important basis for further study of the infection mechanism of OsHV-1. It also stimulates new ideas for the prevention and control of OsHV-1.

Key words Ostreid herpesvirus 1; Envelope protein; Prokaryotic expression; *Scapharca broughtonii*

① Corresponding author: WANG Chongming, E-mail: wangcm@ysfri.ac.cn