



鲤疱疹病毒 II 型 ORF25B 编码蛋白诱饵载体的构建及其互作蛋白的筛选

聂细荣^{1,2}, 薛明洋², 林格², 李逸群², 范玉顶², 刘文枝², 孟彦², 江南²,
曾令兵², 周勇^{2*}

¹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长江水产研究所, 湖北 武汉 430223

摘要:【目的】鲤疱疹病毒II型(Cyprinid herpesvirus 2, CyHV-2)感染养殖鲫引起的鲫造血器官坏死病, 给鲫养殖业造成了重大的经济损失。揭示CyHV-2感染宿主细胞的机制, 是建立鲫造血器官坏死病有效防治技术的重要基础。【方法】本研究针对CyHV-2富含抗原表位的ORF25B区域设计引物, 扩增ORF25B基因截短序列。将扩增产物克隆至酵母双杂交诱饵载体pGBKT7, 构建诱饵载体pGBKT7-tORF25B, 转化至酵母菌株Y2H Gold中。在营养缺陷型培养基上, 验证诱饵表达载体pGBKT7-tORF25B对酵母菌Y2H Gold自激活现象和毒性作用。利用酵母双杂交技术, 将诱饵菌株pGBKT7-tORF25B/Y2H Gold与鲫脑组织细胞系(GiCB) cDNA文库杂交。【结果】ORF25B基因截短序列扩增大小约为981 bp, 成功构建了诱饵菌株pGBKT7-tORF25B/Y2H Gold, 自激活和毒性验证结果表明, 诱饵表达载体对酵母菌株无自激活现象, 也无毒性作用, 初步筛选出4种与tORF25B基因编码蛋白互作的宿主蛋白。【结论】本研究结果为深入开展CyHV-2 ORF25B编码蛋白功能及病毒入侵宿主细胞的机制研究奠定了重要基础。

关键词: 鲤疱疹病毒 II 型, ORF25B 基因, 酵母双杂交, 诱饵载体, 互作蛋白

鲫(*Carassius auratus*), 具有食性广、生长迅速、适应性强、繁育能力高等优点, 其肉质鲜嫩, 营养价值丰富, 深受人们喜爱^[1]。2019年我国鲫的养殖产量为 275.56 万 t, 占淡水养殖总产量比

基金项目: 国家重点研发计划(2019YFD0900105); 国家自然科学基金(31802346); 国家大宗淡水鱼类产业技术体系建设专项资金(CARS-45-16); 湖北省技术创新专项(2018ABA101)

*通信作者。Tel: +86-27-81785198; Fax: +86-27-81780088; E-mail: zhouy@yfi.ac.cn

收稿日期: 2020-12-02; 修回日期: 2021-01-09; 网络出版日期: 2021-01-28

例为 9.14%^[2]。然而,随着养殖规模的扩大,集约化程度升高,病害问题成为制约我国鲫养殖产业健康发展的主要瓶颈^[3-5]。其中,鲫造血器官坏死病的危害最为严重,其病原为鲤疱疹病毒 II 型 (Cyprinid herpesvirus 2, CyHV-2)^[6-7]。CyHV-2, 又称为疱疹病毒性造血器官坏死症病毒 (Herpesviral haematopoietic necrosis virus, HVHNV)^[8], 或金鱼造血器官坏死症病毒 (Goldfish haematopoietic necrosis virus, GFHNV)^[9], 为疱疹病毒目 (Herpesvirales)、异疱疹病毒科 (Alloherpesviridae)、鲤疱疹病毒属 (*Cyprinivirus*) 成员^[10]。CyHV-2 是双链 DNA 病毒,有囊膜,病毒直径约 175–200 nm,核衣壳呈正二十面体对称,直径为 100–110 nm^[11]。CyHV-2 全基因组测序最先于 2013 年报道,病毒全长 290304 bp,预测的开放阅读框 (Open reading frame, ORF) 约 150 个 (序列号: JQ815364), 这 150 个 ORF 编码了病毒所有的结构和功能蛋白^[11]。通过对鲤疱疹病毒属 3 种病毒基因组比较和功能预测分析发现,它们都含有 ORF2、TNFR、ORF25 和 RING 四个重要的多基因家族。CyHV-2 ORF25 多基因家族成员有 ORF25、ORF25B、ORF25C 和 ORF25D,均编码囊膜蛋白,含有免疫球蛋白结构域^[11]。将 CyHV-2 ORF25 编码基因进行截短原核表达,制备抗 ORF25 的多克隆抗体,该抗体能特异性识别在鲫脑组织细胞系 (Gibel carp brain, GiCB) 上增殖的 CyHV-2^[12]。通过免疫金标记和电镜观察发现, CyHV-2 ORF25 基因编码蛋白能与 GiCB 细胞受体发生特异结合^[13]。许晨等^[14]利用酵母双杂交技术初步筛选出与 CyHV-2 ORF25 编码蛋白相互作用的宿主细胞受体 RACK1 基因。目前对 ORF25 多基因家族的研究主要集中在

ORF25 基因^[12-16],而尚未见关于 ORF25B 基因及其编码蛋白功能的研究。

本文通过分析 CyHV-2 ORF25B 的抗原表位,以富含抗原表位区域的基因序列为靶点,构建酵母双杂交诱饵载体 pGBKT7-tORF25B,将诱饵载体转化酵母菌株 Y2H Gold 后,验证其自激活及毒性。利用酵母双杂交技术,将诱饵菌株 pGBKT7-tORF25B/Y2H Gold 与 GiCB cDNA 文库杂交,初步筛选出与 ORF25B 发生互作的宿主细胞蛋白,以期为深入开展 CyHV-2 ORF25B 蛋白功能及其与宿主细胞的相互作用机制的研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料与主要试剂

酵母双杂交 GiCB cDNA 文库由本实验室建立并保存^[14,17];病毒样品来源于本实验室采集的 CyHV-2 阳性鲫组织; X- α -Gal、Aureobasidin A、酵母培养基等均购于美国 Clontech 公司;大肠杆菌感受态 DH5 α 、pMD19-T 载体、PCR 反应体系的整套试剂及 DNA marker 购于宝日医生物技术 (北京)有限公司; Y2H Gold 酵母感受态和 Y187 酵母感受态购于上海唯地生物技术有限公司;酵母质粒提取试剂盒购于北京索莱宝科技有限公司;病毒核酸提取试剂盒、质粒提取试剂盒购于美国 Omega Bio-Tek 公司;限制性内切酶 *EcoR* I、*BamH* I 购于美国 New England Biolabs (NEB)公司。

1.2 引物设计与合成

利用 TMHMM Server v.2.0、SignalP 5.0、DNA Star 7.0 (Protean)等生物信息学软件对 CyHV-2

(登录号: KM200722.1) ORF25B 基因序列进行综合分析, 选取该序列一段富含抗原表位的基因设计特异扩增引物 tORF25B-F/tORF25B-R, 分别在上下游引物加入 *EcoR* I、*Bam*H I 等酶切位点和保护碱基; 同时设计载体 pGBKT7 (5'T7/3'BD)、pGADT7 (5'T7/3'AD)通用引物, 以上引物均由武汉天一华煜基因科技有限公司合成(表 1)。

1.3 CyHV-2 tORF25B 基因克隆

采用病毒提取试剂盒提取 CyHV-2 病毒 DNA, 并进行 PCR 扩增。25 μL PCR 反应体系为: 10×Buffer 2.5 μL, tORF25B-F/tORF25B-R 引物各 0.5 μL, 10 mmol/L dNTP Mix 2 μL, 病毒总 DNA 模板 1 μL, Taq DNA 聚合酶 0.25 μL, ddH₂O 18.25 μL。PCR 反应程序为: 95 °C 5 min; 95 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。将扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳, 切胶回收目的条带。

1.4 pGBKT7-tORF25B 诱饵载体构建

将回收产物 tORF25B 连接到 pMD19-T 载体, 形成 pMD19-T-tORF25B 克隆, 通过菌落 PCR 检测获得的阳性克隆送公司测序。提取该阳性质粒, 分别用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Eco*R I 对获得的 pMD19-T-tORF25B 质粒和诱饵载体 pGBKT7 进行双酶切。琼脂糖凝胶电泳分析酶切结果, 回收双酶切完全的 tORF25B 和 pGBKT7

后用 T4 连接酶进行 16 °C 过夜连接。连接产物转化至感受态 *E. coli* DH5α 后, 将菌液涂布在含有卡那霉素的 LB 平板上筛选重组阳性克隆。利用 pGBKT7 通用引物(5'T7/3'BD)和 tORF25B-F/R 特异性引物进行菌落 PCR 检测, 同时进行双酶切验证。将鉴定条带大小正确的质粒送公司测序, 测序正确命名为 pGBKT7-tORF25B。

1.5 诱饵载体转化酵母菌株 Y2H Gold

按照 YeastmakerTM Transformation System 2 protocol 操作要求, 取 40 μL Carrier DNA 放入沸水中水浴 5 min 后, 迅速插入冰盒中静置冷却, 重复一次使其彻底变性。取 4 支无菌的 1.5 mL EP 管, 每管分别加入 2–5 μg 诱饵质粒 pGBKT7-tORF25B、阳性对照质粒 pGBKT7-53、阴性对照质粒 pGBKT7-lam、pGADT7-T, 各加入 100 μL 冰上融化的酵母感受态细胞(pGBKT7 载体系列用 Y2H Gold 酵母感受态, pGADT7-T 用 Y187 酵母感受态), Carrier DNA 10 μL, PEG/LiAc 600 μL 并轻柔混匀, 30 °C 水浴 30 min, 再将 EP 管放入 42 °C 水浴锅中孵育 15 min, 期间翻转 EP 管数次进行混匀。8000 r/min 离心 2 min, 弃上清直至 200 μL 重悬, 涂布于相应的培养皿上, 转入 Y2H Gold 的菌液涂于 SD/-Trp 缺陷培养平板上, Y187 菌液涂布于 SD/-Leu 缺陷培养平板上, 28 °C 培养箱恒温倒置培养 48–96 h。

表 1. tORF25B 基因扩增引物及 pGBKT7、pGADT7 通用引物

Table 1. Primers for tORF25B gene amplification and general primers for pGBKT7 and pGADT7

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Restriction enzyme	Purpose
tORF25B-F	CCGGAATTCCGAAGTCAACAACGGATCAACTC	<i>Eco</i> R I	Amplification of tORF25B gene
tORF25B-R	CGCGGATCCCCTGGATCTCGTCCCCGTCG	<i>Bam</i> H I	
5'T7	TAATACGACTCACTATAGGGCGAGC		General primers (pGBKT7, pGADT7)
3'BD	TTTTCGTTTTAAACCTAAGAGTC		
3'AD	AGATGGTGCACGATGCACAGTT		

The double underline of primer sequence is the restriction site.

1.6 诱饵载体自激活活性和毒性检测

按照酵母双杂交融合步骤,将阳性对照菌株 pGBKT7-53/Y2H Gold 和阴性对照菌株 pGBKT7-lam/Y2H Gold 分别与 pGADT7-T/Y187 进行杂交融合,构成双杂阳性对照菌株 53×T 和双杂阴性对照菌株 lam×T。将转化后的重组菌株 pGBKT7-tORF25B/Y2H Gold、阴性对照 lam×T 和阳性对照 53×T 以三等分在同一个培养板上划线,分别划于 SD/-Trp、SD/-Trp/X- α -Gal、SD/-Trp/X- α -Gal/Aba 三种缺陷平板上,倒置于 28 °C 培养箱培养 2–4 d,观察菌落生长情况与颜色变化,判断诱饵菌株的自激活情况。同时将它们按 10^{-1} 等比稀释 4 个梯度(10^{-1} – 10^{-4}),分别取 100 μ L 菌液涂布于 SD/-Trp 营养缺陷平板上,观察在相同浓度下其生长状态,检测诱饵菌株有无毒性作用。

1.7 文库的多态性检测

鲫鱼脑组织细胞系 cDNA 文库由本实验室制备并保存^[4],复苏后涂布于 SD/-Leu 缺陷营养平板上,以检测其滴度。随机挑取 24 个单菌落,摇菌提取酵母核酸,用通用引物 pGADT7 (5'T7/3'AD)进行菌落 PCR,检测文库的多态性。

1.8 互作蛋白筛选及比对分析

参照 Clontech 酵母双杂交的操作步骤,将 pGBKT7-tORF25B/Y2H Gold 诱饵菌株与 GiCB cDNA 文库杂交融合,杂交后的菌液涂于双缺陷 SD/-Leu/-Trp/X- α -Gal/AbA (DDO/X/A)培养板上,28 °C 培养 48–96 h,待长出蓝色菌落,将其挑到 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X- α -Gal/AbA (QDO/X/A)四缺陷培养板上,继续培养 2–4 d,观察菌落生长状态。挑取四缺陷培养平板上的蓝色菌落进行摇菌提取质粒,用文库引物 pGADT7 和诱饵通用引物 pGBKT7 (表 1)对质粒进行 PCR 扩增。扩增产物

电泳后,将 2 对引物同时扩增为阳性条带的 PCR 产物送公司测序。将测序结果在 NCBI 里进行 BLAST 比对及开放阅读框分析,初步筛选出与 CyHV-2 ORF25B 互作的细胞受体蛋白基因。

2 结果和分析

2.1 tORF25B 基因扩增

以感染 CyHV-2 患病鲫组织中提取的病毒 DNA 为模板,tORF25B-F/tORF25B-R 为引物进行 PCR 扩增,扩增产物电泳结果显示,扩增片段的大小约为 981 bp (ORF25B 截短基因片段大小为 963 bp,引物两端的酶切位点和保护性碱基为 18 bp),条带符合预期大小(图 1)。

2.2 诱饵载体 pGBKT7-tORF25B 的构建

将回收的 tORF25B 产物连接到载体 pMD19-T 上,挑菌 PCR 检测结果符合预期条带,且测序结果比对正确,成功构建了 pMD19-T-tORF25B 重组质粒。将 pMD19-T-tORF25B 与 pGBKT7 的双酶

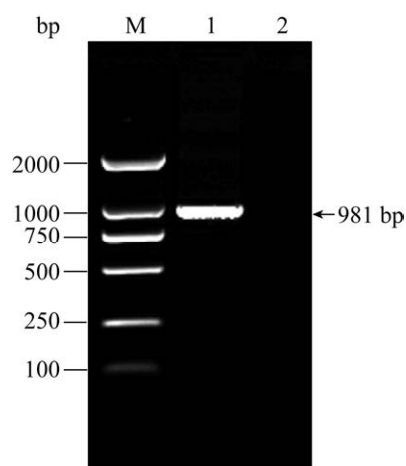


图 1. tORF25B 基因序列扩增

Figure 1. PCR amplification of tORF25B gene sequence. M: DL2000 marker; lane 1: truncated tORF25B gene; lane 2: negative control.

切产物连接转化后, 利用 pGBKT7 (5'T7/3'BD)通用引物和 tORF25B-F/R 特异性引物进行菌落 PCR, 获得大小分别约为 1257 bp 和 981 bp 的目的条带, 与预期条带大小一致, 且双酶切鉴定条

带大小也与预期大小一致(图 2)。阳性测序结果与 GenBank 公布的 CyHV-2 ORF25B 基因序列比对完全一致。上述结果均表明, 已成功构建了诱饵质粒 pGBKT7-tORF25B。

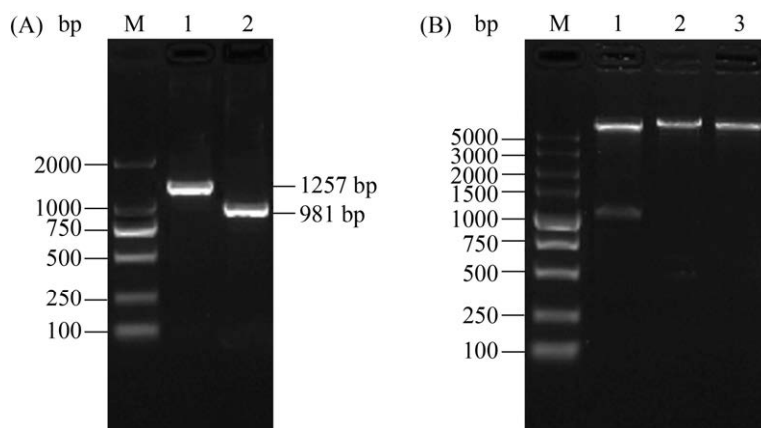


图 2. 重组质粒 pGBKT7-tORF25B PCR (A)和双酶切鉴定(B)

Figure 2. PCR amplification and digestion identification of pGBKT7-tORF25B. A: PCR amplification of pGBKT7-tORF25B. M: DL2000 marker; lane 1: general primer amplification of pGBKT7-tORF25B; lane 2: specific primer amplification of pGBKT7-tORF25B. B: digestion identification of pGBKT7-tORF25B. M: DL5000 marker; lane 1: digestion of pGBKT7-tORF25B with *Bam*H I and *Eco*R I; lane 2: identification of *Bam*H I digestion; lane 3: PCR of *Eco*R I digestion.

2.3 诱饵质粒 pGBKT7-tORF25B 的表达鉴定

将诱饵质粒 pGBKT7-tORF25B 转化至酵母菌株 Y2H Gold 后, 挑取单菌落摇菌扩大培养, 提取酵母总核酸, 用 5'T7/3'BD 和 tORF25B-F/R 特异性引物对其进行 PCR, 扩增获得大小分别约为 1257 bp 和 981 bp 的目的条带, 且序列比对正确, 证明成功获得了重组菌株 pGBKT7-tORF25B/Y2H Gold (图 3)。

2.4 诱饵载体自激活活性和毒性检测

将成功转化的重组菌株 pGBKT7-tORF25B/Y2H Gold 与阴性对照 lam×T 和阳性对照 53×T 以三等分分别划线于 SD/-Trp、SD/-Trp/X-α-Gal、SD/-Trp/X-α-Gal/Aba 三种选择性平板, 结果显示在 SD/-Trp 培养皿上 3 种菌体均长出白色菌落;

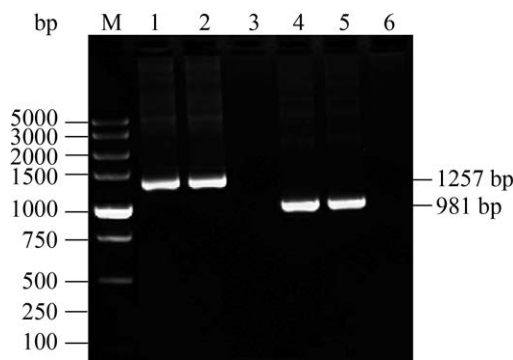


图 3. pGBKT7-tORF25B 酵母转化菌株的 PCR 检测

Figure 3. Colony PCR result of yeast transformed plasmid pGBKT7-tORF25B. M: DL5000 marker; lane 1: general primer amplification of pGBKT7-tORF25B in Y2H Gold; lane 2: general primer amplification of positive control; lane 3: general primer amplification of negative control; lane 4: specific primer amplification of pGBKT7-tORF25B in Y2H Gold; lane 5: specific primer amplification of positive control; lane 6: specific primer amplification of negative control.

在 X- α -Gal 的诱导下, 只有阳性对照菌株 53 \times T 长出蓝色菌落, 而诱饵菌株 pGBKT7-tORF25B/Y2H Gold 和阴性对照菌株 lam \times T 均生长出白色菌落, 且在加了 Aba 的 SD/-Trp 缺陷培养基上诱饵菌株不能生长, 如图 4, 表明诱饵菌株 pGBKT7-tORF25B 无自激活现象。

将重组菌株 pGBKT7-tORF25B/Y2H Gold 与阴性对照 lam \times T 和阳性对照 53 \times T 按 10^{-1} – 10^{-4} 倍浓度稀释, 分别涂布在 SD/-Trp 营养缺陷平板上, 结果显示在 10^{-4} 倍梯度下, 三种菌株都能肉眼分辨出每个单克隆菌落, 其诱饵菌株 pGBKT7-tORF25B 与阴性对照 lam \times T 和阳性对照 53 \times T 菌株在培养板上生长状态良好, 菌落大小与数量均差别不大, 表明构建的诱饵菌株无毒性(图 5)。

2.5 文库的多态性检测

将实验室保藏的酵母双杂交 GiCB cDNA 文库复苏后, 测得滴度为 1.92×10^6 CFU/mL。从涂布有文库菌液的平板中随机挑取的 24 株单菌落提取酵母质粒, 用 5'T7/3'AD 引物进行 PCR 扩增, 结果显示产物条带大小上下交错, 且大多数在 1.0 kb 以上(图 6), 证明文库具有较好的多态性。

2.6 文库筛选及序列比对

用 GiCB cDNA 酵母双杂交文库与诱饵菌株 pGBKT7-tORF25B 进行双杂交, 将在双缺培养平板 DDO/X/A 生长出的阳性蓝斑挑取到四缺平板 QDO/X/A 反复加压筛选 2–3 次, 最终获得 23 个阳性克隆(图 7)。提取酵母双杂阳性质粒, 经诱饵通用引物 5'T7/3'BD 鉴定无误后, 再用文库通用引物 pGADT7 鉴定条带分布大小, 其电泳结果显

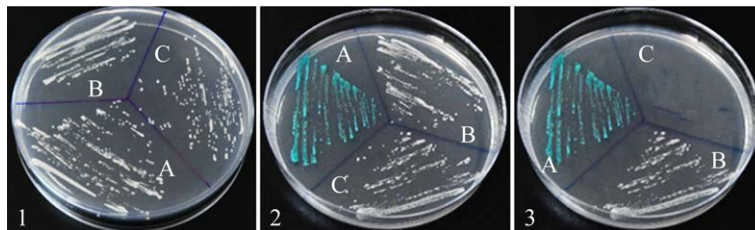


图 4. pGBKT7-tORF25B 诱饵菌株自激活验证

Figure 4. Autoactivation detection of pGBKT7-tORF25B in Y2H Gold. 1: SD/-Trp medium; 2: SD/-Trp/X- α -Gal medium; 3: SD/-Trp/X- α -Gal/Aba medium. A: 53 \times T; B: lam \times T; C: pGBKT7-tORF25B.



图 5. pGBKT7-tORF25B 毒性验证试验

Figure 5. Toxicity detection of recombinant bait plasmid pGBKT7-tORF25B. A: pGBKT7-tORF25B; B: lam \times T; C: 53 \times T.



图 6. 菌落 PCR 鉴定文库多态性

Figure 6. PCR detection of polymorphism of library. M: DL 2000 marker; lane 1–24: identification of library amplification products.

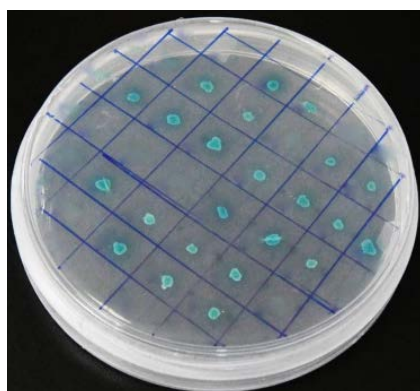


图 7. QDO/X/A 四缺培养基双杂后的阳性菌落
Figure 7. The positive strains of hybridization on QDO/X/A medium.

示 23 株阳性克隆大小约 750–2000 bp (图 8), 将 PCR 产物送公司测序, 测序结果进行 BLAST 比对及 ORF 分析, 成功初步筛出 4 种与鱼类相关的互作蛋白基因序列(表 2), 分别为 RPL6、RPL6L、RHPN1 和 ALAS1。

3 讨论

CyHV-2 感染鲫、金鱼及其变种, 其引起的疾病流行于世界各地, 通常暴发于春秋两季, 传播速度快、致死率高达百分之百^[3-8]。CyHV-2 有

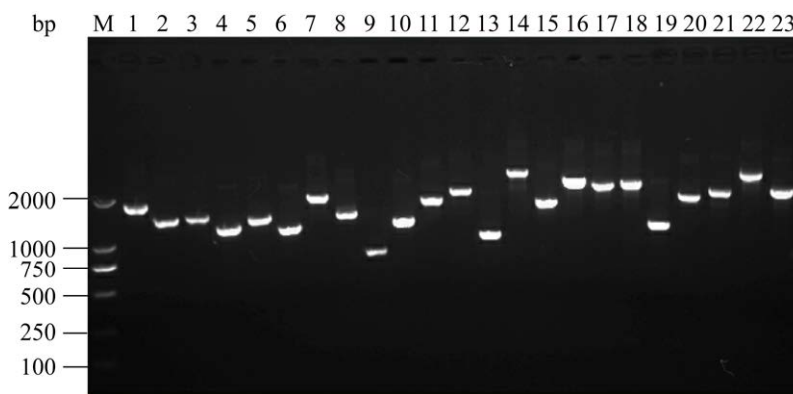


图 8. 酵母双杂质粒 PCR 初步筛选结果

Figure 8. Yeast plasmid PCR confirmation of positive interactions. M: DL 2000 marker; lane 1–23: positive colony PCR products.

表 2. 与 tORF25B 蛋白互作的基因
Table 2. Interacting genes with tORF25B protein

The interacting proteins	GenBank accession No.
<i>Danio rerio</i> ribosomal protein L6 (RPL6)	BC093106.1
<i>Carassius auratus</i> 60S ribosomal protein L6-like (RPL6L)	LOC113052749
<i>Carassius auratus</i> rhophilin Rho GTPase binding protein 1 (RHPN1)	XM_026290459.1
<i>Carassius auratus</i> 5'-aminolevulinatase synthase 1 (ALAS1)	XM_026240821.1

6 个多基因家族, 包括 ORF2、ORF22、ORF25、ORF153、TNFR 和 RING 家族。其中 ORF25 家族编码高度分化的预测 1 型膜糖蛋白, 目前针对 ORF25 家族的其他成员均有报道, 如 Zhou 等^[13]在毕赤酵母中表达了 tORF25、tORF25C 和 tORF25D 蛋白, Cao 等^[18]在利用杆状病毒表达系统表达的 9 种截短 CyHV-2 膜糖蛋白中也包含这 3 个蛋白。上述两个研究报告均发现, 在 ORF25 家族中, ORF25、ORF25C 和 ORF25D 均有一定的免疫原性, 可作为潜在候选疫苗。ORF25B 作为 ORF25 家族一员, 不同毒株间存在部分碱基突变或缺失, 推测这些基因序列多样性可能展示 CyHV-2 进化史的动态特征^[10], 目前鲜见关于 ORF25B 的研究报道。抗原表位是决定抗原特异性的化学基团, 也是蛋白质抗原性的基础^[19]。本研究通过生物信息学软件分析 CyHV-2 ORF25B 的抗原表位, 截短表达其富含抗原表位的区域, 利用酵母双杂交技术, 初步筛选出 ORF25B 的细胞受体, 不仅为鲫造血器官坏死病亚单位疫苗靶位点的选择提供数据支撑, 也为阐明 CyHV-2 感染宿主的机理奠定重要基础。

酵母双杂交系统是 Fields 和 Song 发明的一种具有很高灵敏性的研究蛋白质间关系的技术^[20], 该技术目前已在分析已知蛋白间的互作和发现新基因等方面得到广泛运用^[21-23]。但酵母双杂交无法避免的缺陷是高假阳性和假阴性结果,

而诱饵靶蛋白自激活是造成假阳性结果的主要原因^[24-25]。为排除该诱饵菌株具有自激活活性的可能性, 本研究将 pGBKT7-tORF25B/Y2H Gold 涂布在 X- α -Gal 底物的 SD/-Trp 缺陷培养基上, 发现菌落颜色无变蓝现象, 亦不能在 SD/-Trp/X- α -Gal/Aba 上诱饵菌株生长, 表明该诱饵菌株无激活活性, 若诱饵菌株和阳性对照菌株 53 \times T 一样在底物 X- α -Gal 的诱导下呈蓝色, 且在有 Aba 抗性的 SD/-Trp 平板上生长, 说明该诱饵菌株存在自激活现象。当诱饵质粒对酵母菌株有毒性作用时, 酵母生长速度缓慢或不能生长, 此时会对实验结果造成假阴性影响^[26]。双杂阴性对照 lam \times T 和阳性对照 53 \times T 菌株本身不具有毒性, 本研究在 SD/-Trp 营养缺陷培养平板上, 显示出诱饵菌株 pGBKT7-tORF25B/Y2H Gold 与阴性对照 lam \times T 和阳性对照 53 \times T 的菌落大小及数量差异不显著, 证明了 pGBKT7-tORF25B 质粒对酵母菌 Y2H Gold 的生长无毒性作用。本研究排除了诱饵载体 pGBKT7-tORF25B 毒性和自激活带来的干扰, 可用于下一步筛选酵母双杂交 GiCB cDNA 文库。

文库质量的好坏对诱饵蛋白的成功筛选十分关键^[27], 许晨等^[14]构建的酵母双杂交 GiCB cDNA 文库滴度为 1.24×10^6 CFU/mL, 插入文库片段大小约为 1.5 kb。本研究通过对该文库复苏涂于 SD/-Leu 平板测得其滴度为 1.92×10^6 CFU/mL, 随

机挑菌, 提取酵母质粒扩增显示文库插入条带大小大多数在 1.0 kb 以上, 多态性较好, 符合双杂文库构建要求。利用酵母双杂交 GiCB cDNA 文库, 许晨等^[14]筛出 CyHV-2 ORF25 的受体蛋白 RACK1 基因。本研究利用该文库, 通过对 CyHV-2 tORF25B 互作蛋白的筛选, 在 QDO/X/A 平板上筛选出 23 株阳性克隆菌株, 其中有 19 个基因序列或因碱基缺失导致翻译后的氨基酸序列太短, 或因起始端编码基因序列移码与宿主细胞氨基酸序列不匹配而被排除。本实验最终初步成功筛选出 4 种与 CyHV-2 tORF25B 互作的候选宿主蛋白, 分别为核糖体蛋白 L6 (ribosomal protein L6, RPL6)、60S 核糖体蛋白 L6L (60S ribosomal protein L6-like, RPL6L)、Rho 蛋白 1 (rhophilin Rho GTPase binding protein 1, RHPN1)、5-氨基酮戊酸合成酶(5'-aminolevulinic synthase 1, ALAS1)。

本研究构建了诱饵质粒 pGBKT7-tORF25B, 证明了诱饵质粒对酵母菌 Y2H Gold 无毒性和自激活性。利用酵母双杂交技术筛选出 4 种与 ORF25B 互作的宿主蛋白基因, 研究结果为进一步揭示 ORF25B 与宿主细胞的相互关系、阐明 CyHV-2 感染鲫鱼细胞的机制奠定前期基础。

参 考 文 献

- [1] Zhang JF, Qi TT, Dong CJ, Li XJ. Development of phylogenetic relationship of different crucian carp (*Carassius auratus*) strains in China. *Henan Shuichan*, 2018(3): 25–27. (in Chinese)
张江凡, 齐甜甜, 董传举, 李学军. 中国不同鲫鱼品系系统发育关系研究进展. *河南水产*, 2018(3): 25–27.
- [2] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2020 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2020.
- [3] Fichi G, Susini F, Cocumelli C, Cersini A, Salvadori M, Guarducci M, Cardeti G. New detection of Cyprinid

- herpesvirus 2 in mass mortality event of *Carassius carassius*, (L.), in Italy. *Journal of Fish Diseases*, 2016, 39(12): 1523–1527.
- [4] Luo YZ, Lin L, Liu Y, Wu ZX, Gu ZM, Li LJ, Yuan JF. Haematopoietic necrosis of cultured Prussian carp, *Carassius gibelio* (Bloch), associated with Cyprinid herpesvirus 2. *Journal of Fish Diseases*, 2013, 36: 1035–1039.
- [5] Wang L, He JG, Liang LG, Zheng X, Xu P. Mass mortality caused by Cyprinid Herpesvirus 2 (CyHV-2) in Prussian carp (*Carassius gibelio*) in China. *Bulletin- European Association of Fish Pathologists*, 2012, 32: 164–173.
- [6] Xu J, Zeng LB, Zhang H, Zhou Y, Ma J, Fan YD. Cyprinid herpesvirus 2 infection emerged in cultured gibel carp, *Carassius auratus gibelio* in China. *Veterinary Microbiology*, 2013, 166(1/2): 138–144.
- [7] Daněk T, Kalous L, Veselý T, Krásová E, Reschová S, Rylková K, Kulich P, Petrtýl M, Pokorová D, Knytl M. Massive mortality of Prussian carp *Carassius gibelio* in the upper Elbe basin associated with herpesviral haematopoietic necrosis (CyHV-2). *Diseases of Aquatic Organisms*, 2012, 102(2): 87–95.
- [8] Jung SJ, Miyazaki T. Herpesviral haematopoietic necrosis of goldfish, *Carassius auratus* (L.). *Journal of Fish Diseases*, 1995, 18(3): 211–220.
- [9] Groff JM, LaPatra SE, Munn RJ, Zinkl JG. A viral epizootic in cultured populations of juvenile goldfish due to a putative herpesvirus etiology. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians Inc*, 1998, 10(4): 375–378.
- [10] Davison AJ, Eberle R, Ehlers B, Hayward GS, McGeoch DJ, Minson AC, Pellett PE, Roizman B, Studdert MJ, Thiry E. The order herpesvirales. *Archives of Virology*, 2009, 154(1): 171–177.
- [11] Davison AJ, Kurobe T, Gatherer D, Cunningham C, Korf I, Fukuda H, Hedrick RP, Waltzek TB. Comparative genomics of carp herpesviruses. *Journal of Virology*, 2013, 87(5): 2908–2922.
- [12] Zhou Y, Shi YH, Fan YD, Liu WZ, Jiang N, Zhao JQ, Xu C, Zeng LB. Polyclonal antibody preparation and immunogenicity analysis of the prokaryotically expressed Cyprinid herpesvirus II ORF25 truncated protein. *Freshwater Fisheries*, 2018, 48(6): 40–45. (in Chinese)
周勇, 史玉恒, 范玉顶, 刘文枝, 江南, 赵建青, 许晨, 曾

- 令兵. 鲤疱疹病毒 II 型 ORF25 截短蛋白的多克隆抗体制备与免疫原性分析. *淡水渔业*, 2018, 48(6): 40–45.
- [13] Zhou Y, Jiang N, Ma J, Fan YD, Zhang LL, Xu J, Zeng LB. Protective immunity in gibel carp, *Carassius gibelio* of the truncated proteins of cyprinid herpesvirus 2 expressed in *Pichia pastoris*. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 47(2): 1024–1031.
- [14] Xu C, Zhou Y, Shi YH, Fan YD, Liu WZ, Jiang N, Zhao JQ, Zeng LB. Construction and preliminary application of the yeast two-hybrid cDNA library from gibel carp brain cells. *Freshwater Fisheries*, 2019, 49(1): 27–32. (in Chinese)
许晨, 周勇, 史玉恒, 范玉顶, 刘文枝, 江南, 赵建青, 曾令兵. 鲫脑组织细胞系酵母双杂交 cDNA 文库的构建及初步应用. *淡水渔业*, 2019, 49(1): 27–32.
- [15] Zhou JX, Li XW, Zhu X, Wang H, Lv WL. Cloning and bioinformatics analysis of ORF25 gene of kio herpesvirus CJ strain. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2012, 46(3): 1–4. (in Chinese)
周井祥, 李新伟, 朱霞, 王好, 吕文亮. 锦鲤疱疹病毒 CJ 株 ORF25 基因的克隆及生物信息学分析. *中国兽药杂志*, 2012, 46(3): 1–4.
- [16] Peng JJ, Zhang Q, Jia LL, Lin L, Yuan JF, Zeng LB, Zhou Y, Liu XQ. Prokaryotic expression and preparation of monoclonal antibody against ORF25 protein of cyprinid herpesvirus II. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2017, 36(2): 96–101. (in Chinese)
彭俊杰, 张琪, 贾路路, 林鑫, 袁军法, 曾令兵, 周勇, 刘学芹. 鲤疱疹病毒 II 型(CyHV-2) ORF25 蛋白的原核表达及单克隆抗体的制备. *华中农业大学学报*, 2017, 36(2): 96–101.
- [17] Ma J, Jiang N, LaPatra SE, Jin L, Xu J, Fan YD, Zhou Y, Zeng LB. Establishment of a novel and highly permissive cell line for the efficient replication of cyprinid herpesvirus 2 (CyHV-2). *Veterinary Microbiology*, 2015, 177(3): 315–325.
- [18] Cao ZW, Liu SJ, Nan H, Zhao KX, Xu XD, Wang GX, Ji H, Chen HY. Immersion immunization with recombinant baculoviruses displaying cyprinid herpesvirus 2 membrane proteins induced protective immunity in gibel carp. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 93: 879–887.
- [19] Ghochikyan A, Petrushina I, Davtyan H, Hovakimyan A, Saing T, Davtyan A, Cribbs DH, Agadjanyan MG. Immunogenicity of epitope vaccines targeting different B cell antigenic determinants of human α -synuclein: feasibility study. *Neuroscience Letters*, 2014, 560: 86–91.
- [20] Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 1989, 340(6230): 245–246.
- [21] Fields S, Sternglanz R. The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends Genet*, 1994, 10(8): 286–292.
- [22] Chien CT, Bartel PL, Sternglanz R, Fields S. The two-hybrid system: A method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1991, 88: 9578–9582.
- [23] Wang ZY, Liu QH, Lu CY, Huang J. Identification of the host interactors of wsv112 of WSSV by yeast two-hybrid. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(4): 156–162. (in Chinese)
王中一, 刘庆慧, 卢翠玉, 黄健. 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.
- [24] Suter B, Kittanakom S, Stagljar I. Two-hybrid technologies in proteomics research. *Current Opinion in Biotechnology*, 2008, 19(4): 316–323.
- [25] Luban J, Golf SP. The yeast two-hybrid system for studying Protein-protein interaction. *Current Opinion in Biotechnology*, 1995, 6(1): 59–64.
- [26] Zhang D, Zhai YZ, Feng GH. Construction and identification of the bait vector containing the gene encoding HCV core protein in yeast two-hybrid system. *Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 2014, 13(16): 1329–1331. (in Chinese)
张丹, 翟永贞, 冯国和. 丙型肝炎病毒核心蛋白酵母双杂交诱饵载体的构建及鉴定研究. *临床和实验医学杂志*, 2014, 13(16): 1329–1331.
- [27] Li YX, Li F, Zhou XL, Xie FL, Li YG. Screening proteins interacting with the outer membrane protein Opa22 in *Mesorhizobium huakuii* 7653R with bacterial two-hybrid library. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2014, 33(2): 28–33. (in Chinese)
李一星, 李芳, 周鑫兰, 谢福莉, 李友国. 利用细菌双杂交文库筛选华葵中慢生根瘤菌 7653R 中与外膜蛋白 Opa22 互作的蛋白. *华中农业大学学报*, 2014, 33(2): 28–33.

Construction of a bait vector and preliminary screening of host proteins interacting with Cyprinid herpesvirus 2 ORF25B using yeast two hybrid system

Xirong Nie^{1,2}, Mingyang Xue², Ge Lin², Yiqun Li², Yuding Fan², Wenzhi Liu², Yan Meng², Nan Jiang², Lingbing Zeng², Yong Zhou^{2*}

¹ College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

² Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Wuhan 430223, Hubei Province, China

Abstract: [Objective] The hemopoietic necrosis disease of *Carassius auratus gibelio* infected by Cyprinid herpesvirus 2 (CyHV-2) has caused huge economic losses to the farming industry of this fish. To reveal the mechanism of CyHV-2 infecting host cells might provide an important basis for the investigations of prevention and control technology for this disease. [Methods] In this study, we designed primers for the epitope rich region of CyHV-2 ORF25B, and amplified truncated ORF25B gene by polymerase chain reaction (PCR). Next, we cloned the amplified product into yeast two hybrid bait expression vector pGBKT7. Then the bait recombinant vector pGBKT7-tORF25B was constructed and we transformed it into yeast Y2H Gold. In addition, we detected the transcriptional self-activation and toxicity of the bait protein on the auxotroph medium. Using yeast two hybrid technique, we hybridized the bait strain pGBKT7-tORF25B/Y2H Gold with GiCB cDNA library. [Results] The truncated ORF25B gene was about 981 bp. It was suggested that the bait strain pGBKT7-tORF25B/Y2H Gold was obtained. And the bait vector was shown to have no toxicity to the yeast cells and no self-activation phenomenon to the report genes. There were four candidate host proteins interacting with tORF25B gene coded protein were preliminarily obtained. [Conclusion] The results of this study have laid a foundation for further study on the protein function of CyHV-2 ORF25B and the mechanism of this virus invasion into host cells.

Keywords: Cyprinid herpesvirus 2, ORF25B gene, yeast two hybrid, bait vector, interacted protein

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Key R&D Program of China (2019YFD0900105), by the the National Natural Science Foundation of China (31802346), by the the Earmarked Fund for China Agriculture Research System (CARS-45-16) and by the Key Project of Scientific & Technological Innovation of Hubei Province (2018ABA101)

*Corresponding author. Tel: +86-27-81785198; Fax: +86-27-81780088; E-mail: zhouy@yfi.ac.cn

Received: 2 December 2020; Revised: 9 January 2021; Published online: 28 January 2021