

文章编号: 1674-5566(2024)01-0018-12

DOI: 10.12024/jsou.20230104053

### 3型鲤疱疹病毒白介素10单克隆抗体制备与鉴定

陈静<sup>1</sup>, 张艳维<sup>1</sup>, 刘琴<sup>1</sup>, 朱晓真<sup>1</sup>, 贾钊<sup>1</sup>, 王俊亚<sup>1</sup>, 高娃<sup>1</sup>,  
贾智英<sup>2</sup>, 桂朗<sup>1</sup>, 邹钧<sup>1</sup>

(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黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070)

**摘要:** 白介素(Interleukin, IL)10是脊椎动物Th2细胞(T helper 2 cell)和先天淋巴细胞(Innate lymphoid cell)分泌的一种多效应细胞因子。3型鲤疱疹病毒(Cyprinid herpesvirus 3, CyHV3)ORF134编码IL10样蛋白,本研究构建了ORF134原核表达质粒,在大肠杆菌DE3感受态细胞中表达CyHV3-IL10重组蛋白。SDS-PAGE分析结果表明,重组CyHV3-IL10蛋白约为18 ku,主要以包涵体形式表达。将CyHV3-IL10包涵体进行变性和复性,经分子筛凝胶柱层析纯化获得了纯度较高的重组CyHV3-IL10蛋白,利用CyHV3-IL10重组蛋白免疫小鼠制备了单克隆抗体,通过酶联免疫吸附测定法(Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)筛选,获得了2株亲和力和强的抗体,并利用激光共聚焦技术和Western blotting对抗体进行鉴定。结果表明, FITC标记的单克隆抗体能够特异性识别HEK293细胞中表达的CyHV3-IL10重组蛋白和感染CyHV3的镜鲤脾和鳃组织中表达的CyHV3-IL10蛋白。CyHV3-IL10单克隆抗体的制备为后续研究CyHV3-IL10蛋白功能和建立CyHV3诊断方法奠定基础,为CyHV3病毒检测试剂盒的研发提供新思路。

**关键词:** 鲤疱疹病毒3型; 白介素10; 单克隆抗体; Western blotting; 免疫荧光分析

**中图分类号:** S 917 **文献标志码:** A

鲤疱疹病毒(Cyprinid herpesvirus, CyHV)为DNA病毒,是危害鲤科鱼类养殖的重要病毒性病原, CyHV分为3种类型,即CyHV1、CyHV2和CyHV3。锦鲤疱疹病毒(Koi herpesvirus, KHV),又称为3型鲤疱疹病毒(Cyprinid herpesvirus 3, CyHV3),是诱发锦鲤疱疹病毒病(Koi herpesvirus disease, KHVD)的病原, CyHV3感染鲤、锦鲤等鲤科鱼类,造成大量死亡,大面积暴发时死亡率可高达80%~100%。

CyHV3是一种线性双链DNA病毒,其基因组为295 kb,编码164个开放阅读框(Open reading frame, ORF)<sup>[1]</sup>。已有质谱研究<sup>[2-3]</sup>表明, CyHV3含有46个结构蛋白,包含16个囊膜蛋白、3个衣壳蛋白、2个皮层蛋白和25个未知蛋白。虽然研究人员对CyHV3病毒蛋白有了一定的了解,但是由于CyHV3检测手段和技术的相对匮乏,目前只有少数蛋白的功能得到报道。早期研究利用预

测的ORF81膜蛋白制备兔抗血清并通过免疫组化分析了CyHV3的感染过程<sup>[4]</sup>; FUCHS等<sup>[5]</sup>对部分囊膜蛋白进行了初步鉴定,发现ORF149单克隆抗体对CyHV3病毒粒子的识别具有较好的特异性;郑树城等<sup>[6]</sup>制备了ORF136多克隆抗体并进行了鉴定;有趣的是, CyHV3基因组中ORF134编码白介素10(Interleukin 10, IL10)的同源分子,该蛋白与鲤IL10具有约25%的氨基酸序列一致性,推测其可能参与调节宿主的免疫反应<sup>[7]</sup>。PING等<sup>[8]</sup>发现ORF134编码的IL10在CyHV3感染过程中发挥至关重要的作用,能调控病毒复制和病毒感染活力。与CyHV3相比, CyHV2核衣壳呈六边形,直径为100~110 nm,基因组为线性双链DNA,全长290 304 bp,编码约150个蛋白<sup>[9]</sup>; CyHV1的核心为对称的20面体,呈六角形,有囊膜,其核衣壳在细胞核中形成,直径为80~100 nm。CyHV1含137个编码基因<sup>[10]</sup>。但是在CyHV1和

收稿日期: 2023-01-02 修回日期: 2023-05-24

基金项目: 国家自然科学基金(32030112)

作者简介: 陈静(2000—),女,硕士研究生,研究方向为鱼类免疫与病害防控。E-mail: 1024628013@qq.com

通信作者: 邹钧, E-mail: junz@shou.edu.cn

版权所有 ©《上海海洋大学学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydx.com>

CyHV2 基因组中没有发现编码 IL10 的蛋白。

一些 DNA 病毒编码类细胞因子和细胞因子受体调控宿主免疫,实现免疫逃逸。鼠痘病毒(Ectromelia virus)编码 1 个细胞肿瘤坏死因子受体(Tumor necrosis factor receptor, TNFR)同源分子<sup>[11]</sup>,该受体具有典型的 TNFR 结构域和结合趋化因子受体的结构域,抑制白细胞募集和促炎因子的产生,促进病毒传播,但不影响病毒复制。研究发现,鱼类淋巴囊肿病毒(Lymphocystic disease virus)<sup>[12]</sup>和石斑鱼虹彩病毒(Grouper iridovirus)<sup>[13]</sup>也编码 TNFR。从牙鲆中分离的淋巴囊肿病毒有 2 个 TNFRSF 同源基因,编码的蛋白含有信号肽和富含半胱氨酸的结构域(Cysteine rich domain, CRD),跟宿主 TNFR 不同的是其缺乏跨膜区,表明其为分泌蛋白。石斑鱼虹彩病毒基因组中 VP51 和 VP96 均编码类 TNFR,VP51 编码的类 TNFR 由信号肽、1 个跨膜结构域和 3 个胞外 CRD 组成,而 VP96 编码的蛋白则含有 2 个胞外 CRD,缺少跨膜结构域<sup>[14]</sup>。研究<sup>[14]</sup>发现,ORF96 在病毒感染早期表达,而 ORF51 为病毒晚期表达基因,能抑制病毒诱导的细胞凋亡,延迟感染细胞存活时间,增强病毒的复制和增殖。IL10 首先由 FIORENTIO 等<sup>[15]</sup>在小鼠中发现,主要由活化的 Th2 细胞(T helper 2 cell)和先天淋巴细胞(Innate lymphoid cell)分泌,是一种多效应细胞因子,具有多种免疫调控作用。IL10 抑制 Th1 细胞功能,是重要的抗炎细胞因子之一,能防止炎症引发的组织损伤,在维持免疫稳态中发挥重要作用。有研究<sup>[16-17]</sup>认为 EB 病毒(Epstein-Barr virus, EBV)的 IL10 可以下调抗原处理相关转运体蛋白和低分子多肽复合物-2、7 的基因表达,进而抑制 MHC-I 将抗原肽呈递给 CD8<sup>+</sup> T 细胞,从而协助肿瘤细胞逃脱机体免疫监视。为深入研究 CyHV3 的感染机制和 CyHV3-IL10 的免疫调控功能,本研究通过构建 pET21d-CyHV3-IL10 原核表达质粒,利用大肠杆菌表达重组蛋白并对重组蛋白进行了纯化,将重组 CyHV3-IL10 蛋白免疫小鼠,并制备单克隆抗体,对其特异性进行分析。本研究制备的 CyHV3-IL10 重组蛋白和单克隆抗体为 CyHV3-IL10 的功能鉴定和 CyHV3 诊断方法的建立奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物、菌种及细胞

大肠杆菌(*Escherichia coli*)Rosetta(DE3)感受态细胞、HEK293 细胞(人胚胎肾细胞 293)由本实验室保存,HEK293 细胞用含 10% 胎牛血清、2% 青霉素链霉素(Penicillin-Streptomycin, 10 000 U/mL)的 DMEM 培养基,在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养;HEK293-F 细胞(人胚胎肾悬浮细胞 293)培养基为 Expi293™ 表达培养基(Gibco),在 36.5 °C、8% CO<sub>2</sub> 水平摇床培养箱中培养;SPF BALB/C 雌性小鼠(*Mus musculus*)、小鼠骨髓瘤细胞(SP2/0 Cell)由北京华大蛋白质研发中心有限公司提供;镜鲤体质量为(98.6±0.5) g,体长为(15.5±0.5) cm。

His-Tagged Protein Purification Kit 购于江苏康为世纪生物科技股份有限公司;ExTaq Mix 和 Prime star 购于 TaKaRa 公司;琼脂糖凝胶回收试剂盒购于 OMEGA;LB 液体培养基、琼脂粉、琼脂糖、氯化钠、甘油、Triton X-100、尿素、磷酸钠、10× TBS 漂洗液购于生工生物工程(上海)股份有限公司;限制性内切酶(*Hind* III、*Bam*H I)购于 Thermo Fisher Scientific;异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)、Tris-HCl、二硫苏糖(DTT)、乙二胺四乙酸(EDTA)购于 VWR 公司;氧化型谷胱甘肽、还原型谷胱甘肽、盐酸胍购于 Amresco 公司;高糖 DMEM 基础培养液、胎牛血清(FBS)、青霉素-链霉素、IMDM 培养基、磷酸缓冲盐溶液(PBS)、Expi293™ 表达培养基、ExpiFectamine™ 293 转染试剂盒购于 Gibco;考马斯亮蓝购于 BioRox 公司;Tween 20 购于 GPC 公司;Brefeldin A 和 RIPA 裂解液购于上海碧云天生物技术有限公司;Goat anti-mouse Ig, Human ads-UNLB 购于 Southern Biotech 公司;Anti-6His antibody 购买于杭州华安生物技术有限公司;IRDye® 800CW goat anti-mouse IgG secondary antibody 购于 LI-COR;jetPRIME 转染试剂盒购于 Polyplus Transfection 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 CyHV3-IL10 在大肠杆菌中的表达与纯化

CyHV3-IL10 的编码区序列从 NCBI 数据库(<https://ncbi.nlm.nih.gov/>)中获得(登录号:NC\_009127.1),信号肽用 SignalP 预测(<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP->

5.0),以获得成熟肽(A<sup>18</sup>-H<sup>179</sup>)。成熟肽序列由苏州金唯智生物科技有限公司合成,并克隆至pET21d原核表达载体,获得原核表达质粒pET21d-CyHV3-IL10;另外,合成CyHV3-IL10编码区(含信号肽)并克隆至真核表达载体pcDNA3.4,获得真核表达质粒pcDNA3.4-CyHV3-IL10-6His。基因合成和质粒构建由苏州金唯智生物科技有限公司完成。

将pET21d-CyHV3-IL10质粒转化至大肠杆菌*E. coli* Rosetta(DE3)感受态细胞,经菌落PCR鉴定获得阳性单克隆菌落,将其接种至含100 μg/mL氨苄青霉素的LB液体培养基中,37 °C、170 r/min培养过夜;当菌液OD<sub>600</sub>达到0.4~0.6时,加入0.1 mmol/L、0.5 mmol/L、1.0 mmol/L、5.0 mmol/L IPTG(终浓度)分别诱导4、8和10 h,取细菌培养液进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),电泳结果表明表达的重组CyHV3-IL10蛋白为包涵体,包涵体蛋白变性和复性具体方法步骤参考文献[18]。

#### 1.2.2 单克隆抗体的制备与亚型鉴定

将CyHV3-IL10原核重组蛋白(60 μg/只)皮下注射免疫4只SPF级BALB/c雌性小鼠,每2周进行1次加强免疫(30 μg/只),3次加强免疫后用ELISA测定血清效价。取免疫后小鼠的脾细胞,采用PEG法将脾细胞和SP2/0细胞进行融合。融合细胞用半固体培养基(含HAT)进行筛选,用ELISA方法测定血清与抗原的亲合力及单克隆的亚型。小鼠免疫和抗体ELISA筛选实验由北京华大蛋白质研发中心有限公司完成,详细方法参考文献[19]。

#### 1.2.3 抗体筛选和鉴定

将HEK293-F细胞接种于含30 mL Expi293™表达培养基(Gibco)的锥形瓶中,36.5 °C、8% CO<sub>2</sub>培养箱中培养24 h,取10 μL细胞悬液,加入90 μL 1×PBS,用台盘蓝(Trypan blue)染色测定活细胞数目占比,当活细胞达到85%以上时进行质粒转染。用移液器将细胞悬液从锥形瓶中转移至50 mL离心管中,1 000 r/min、离心5 min,弃上清,用培养基将细胞稀释至3×10<sup>6</sup> cells/mL。在36.5 °C、8% CO<sub>2</sub>、相对湿度>80%、200 r/min的摇床中培养24 h。利用ExpiFectamine™ 293转染试剂盒进行质粒转染。在15 mL的离心管中加入1.5 mL的Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium和25 μg pcDNA3.4-CyHV3-IL10-6His真核表达质粒,在另

一管中加入1.4 mL的Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium和80 μL ExpiFectamine™ 293 Reagent(1:1, v/v),混匀,静置5 min。将质粒和Reagent试剂混合,室温静置20 min,随后将质粒转移至细胞摇瓶中,置于摇床中培养,18~22 h后,向培养瓶中加入150 μL增强剂(Enhancer 1)和1.5 mL ExpiFectamine™ 293 Transfection Enhancer 2,置于32 °C、5% CO<sub>2</sub>的摇床中培养4 d,收集细胞培养基,用10 ku孔径的浓缩管浓缩至5 mL,用镍柱亲和层析(Ni-NTA)纯化蛋白<sup>[19]</sup>。

将提取的真核蛋白与原核重组蛋白进行SDS-PAGE和Western blotting分析。利用5%脱脂奶粉(TBS溶解)封闭PVDF滤膜2 h;一抗孵育2 h或过夜,一抗是5%脱脂奶粉1:4(v/v)稀释的鼠阳性杂交瘤细胞上清液,TBST洗膜3次,每次5 min;二抗(IRDye 800CW 山羊抗鼠IgG, 1:10 000, v/v)孵育1 h,Odyssey CLx双色红外激光成像系统拍照成像。

#### 1.2.4 抗体纯化与标记

取1 mg纯化后的抗体用磷酸盐缓冲液(PBS)(pH 7.4)透析,加入0.05 mol/L NaHCO<sub>3</sub>将pH调至9.5,再与FITC荧光素进行连接,避光反应2 h,12 000 r/min离心去除变性蛋白,透析除去游离FITC并脱盐获得抗体与荧光素的复合物。抗体标记实验由北京华大蛋白质研发中心有限公司完成,具体步骤参考QIN等<sup>[20]</sup>。

#### 1.2.5 抗体纯度与亲和常数测定

取上述纯化抗体,加入5×SDS-PAGE上样缓冲液,100 °C煮沸10 min,12 000 r/min离心2 min,用SDS-PAGE检测蛋白纯度。利用ELISA方法检测抗体亲和力,实验组为PBS梯度稀释纯化后的抗体,PBS为空白对照;分别加入二抗(山羊抗鼠IgG/HRP, 1:20 000)和显色液,最后加入终止液,测定双波长(450 nm和630 nm)吸光值。

#### 1.2.6 免疫荧光分析

使用Polyplus转染试剂盒将pcDNA3.4-CyHV3-IL10-6His表达质粒转染至HEK293细胞中从而获得表达蛋白上清液,进行Western blotting分析,详细步骤参考文献[20]。一抗分别为经5%脱脂奶粉稀释的亚型鉴定的鼠阳性杂交瘤细胞上清液(1:4, v/v)和Anti-6His antibody(1:1 000, v/v),步骤同1.2.3节。将贴壁HEK293细胞接种于铺有盖玻片的6孔细胞培养板,转染pcDNA3.4-CyHV3-IL10-6His和pcDNA3.4。培养

48 h,弃培养基,PBS清洗,4%多聚甲醛固定 15 min,PBS清洗 2 次,封闭通透液(5% FBS、0.5% Triton X-100 的 PBS)1 h,并利用封闭通透液稀释 FITC 标记的 CyHV3-IL10 抗体(1:200, v/v),室温孵育 4 h,PBS 洗涤 3 次,DAPI 孵育 15 min,洗涤,加入抗荧光淬灭剂封装片,在激光共聚焦显微镜(Leica SP8)下观察、拍照成像。

### 1.2.7 单克隆抗体特异性分析

使用无菌解剖器械从感染 3 型鲤疱疹病毒的镜鲤(*Cyprinus carpio* L,采集于黑龙江省)和健康镜鲤中分别取 1 mg 脾和鳃组织,无菌 PBS(pH 7.4)清洗,放入装有 1 mL TRIzol 的 2 mL 无 RNA 酶离心管中,组织破碎仪中破碎 1 min(频率 30 Hz);加入 0.2 mL 氯仿,涡旋震荡,冰上孵育 15 min,4 °C、12 000 r/min 离心 15 min;收集上清液,加入 0.3 mL 乙醇并混匀,静置 3 min;4 °C、12 000 r/min、离心 5 min,取上清液并转移至新的 EP 管中;加入 1.5 mL 异丙醇,放置 10 min,4 °C、12 000 r/min、离心 10 min,弃上清;加入 2 mL 含 0.3 mol/L 盐酸胍的 95%乙醇,静置 20 min,4 °C、7 500 r/min 离心 5 min,重复 3 次;加入 2 mL 无水乙醇,静置 20 min;4 °C、7 500 r/min 离心 5 min;干燥沉淀,加入 500  $\mu$ L 1% SDS 溶液,55 °C 金属浴中振荡溶解 3 h;取上清分装后于 -80 °C 保存待用。将蛋白样品与 5 $\times$ SDS-PAGE 上样缓冲液混匀,100 °C 煮沸 10 min,进行 Western blotting 分析,其中一抗为 CyHV3-IL10 单抗(1:1 000, v/v)4 °C 孵育过夜。

## 2 结果与分析

### 2.1 CyHV3-IL10 原核重组蛋白的表达与纯化

本研究对诱导 CyHV3-IL10 重组蛋白表达的 IPTG 浓度和时间进行了探讨。用 0.1、0.5、1.0 和 5.0 mmol/L 的 IPTG 诱导转化 pET21d-CyHV3-IL10 的大肠杆菌 *E. coli* Rosetta(DE3)4、8 和 10 h。如图 1a~1c 所示,1 mmol/L IPTG 诱导的蛋白表达比 0.1 mmol/L IPTG 和 0.5 mmol/L IPTG 诱导的蛋白表达量高。此外,8 h 和 10 h 诱导时蛋白表达量高于 4 h 时诱导的蛋白表达量。利用 SDS-PAGE 分析了细菌破碎后的上清液和沉淀,图 1d 显示,绝大部分 CyHV3-IL10 重组蛋白在包涵体中表达。

如图 2 所示,利用 AKTA 分子筛柱层析纯化蛋白,收集蛋白洗脱液并将洗脱液体积 32、37、42

mL 的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分析。结果显示,CyHV3-IL10 重组蛋白均为单一条带,表明纯化的重组蛋白纯度较高。

### 2.2 免疫小鼠的血清效价测定与阳性杂交瘤细胞的筛选

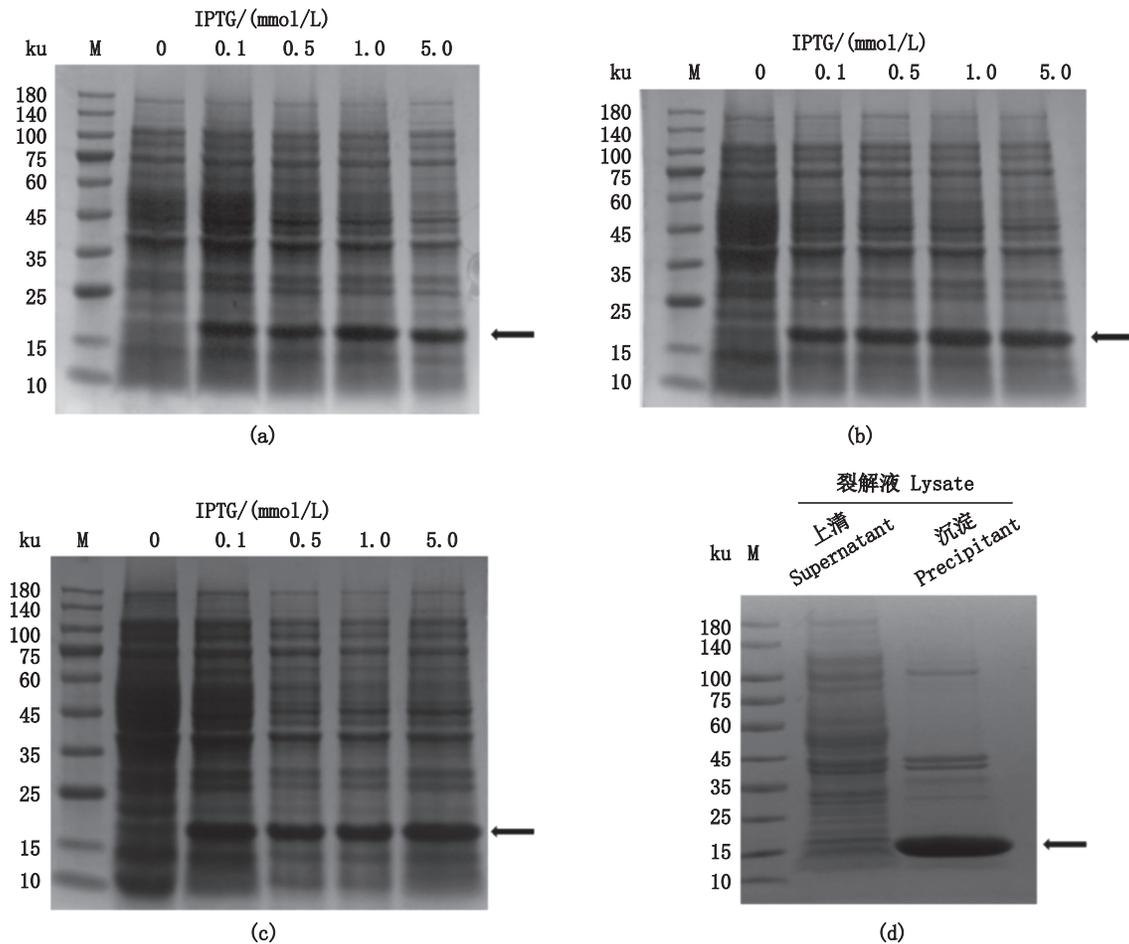
本研究利用 ELISA 检测了免疫小鼠血清的抗体效价。根据文献[19]中亲和常数计算公式,亲和常数=150 000 $\times$ A/抗体浓度(A 代表 1/2 OD 值所对应的抗体稀释倍数),1 号小鼠抗体效价最高,其次为 2 号和 4 号,3 号小鼠的抗体效价最低(图 3)。因此,本实验选取 1 号小鼠进行融合。经 ELISA 初步筛选获得 6 株阳性杂交瘤细胞,编号分别为 1、3、14、26、28 和 32。Ig 亚类鉴定分析表明,1 号和 3 号为 IgG1 亚型,14 号和 26 号为 IgG2a 亚型,28 号和 32 号为 IgG2b 亚型(表 1)。它们针对 CyHV3-IL10 原核重组蛋白的效价 OD 值为 0.513~0.716。

### 2.3 CyHV3-IL10 单克隆抗体鉴定

为研究单克隆抗体能否识别真核细胞中表达的 CyHV3-IL10 重组蛋白,本实验将 pcDNA3.4-CyHV3-IL10-6His 质粒转染至 HEK293-F 细胞中表达 CyHV3-IL10 重组蛋白,转染后 5 d,收集细胞培养液,通过镍柱亲和层析进行纯化。将纯化的真核和原核 CyHV3-IL10 重组蛋白进行 Western blotting 分析。如图 4 所示,4 株抗体均能特异性检测到原核表达的 CyHV3-IL10 重组蛋白,且检测到 2 个蛋白条带,分子量为 18 ku(单聚体)和 36 ku(二聚体)。1 号和 32 号抗体能够特异性检测 CyHV3-IL10 真核重组蛋白,蛋白大小约为 25 ku。但是,3 号和 14 号不识别 HEK293-F 细胞中表达的真核 CyHV3-IL10 重组蛋白,因此,选取 1 号和 32 号抗体(命名为 CyHV3-1-IL10 和 CyHV3-32-IL10)进行大规模制备和纯化。

### 2.4 单克隆抗体纯度及亲和常数测定

本实验对单克隆抗体的纯度、浓度和亲和常数进行了测定。结果表明,CyHV3-1-IL10 和 CyHV3-32-IL10 抗体的浓度分别为 2.8 和 1.9 mg/mL。图 5a 和 5c 显示,两株抗体的亲和常数分别为  $2.74\times 10^9$  (CyHV3-1-IL10) 和  $1.62\times 10^{10}$  (CyHV3-32-IL10),表明 CyHV3-32-IL10 与抗原的亲和力略高于 CyHV3-1-IL10。图 5b 和 5d 显示,纯化的 CyHV3-1-IL10 和 CyHV3-32-IL10 抗体均为 2 条条带,大小为 55 ku(小鼠 Ig 重链)和 25 ku(小鼠 Ig 轻链),表明纯化的单克隆抗体纯度较高。

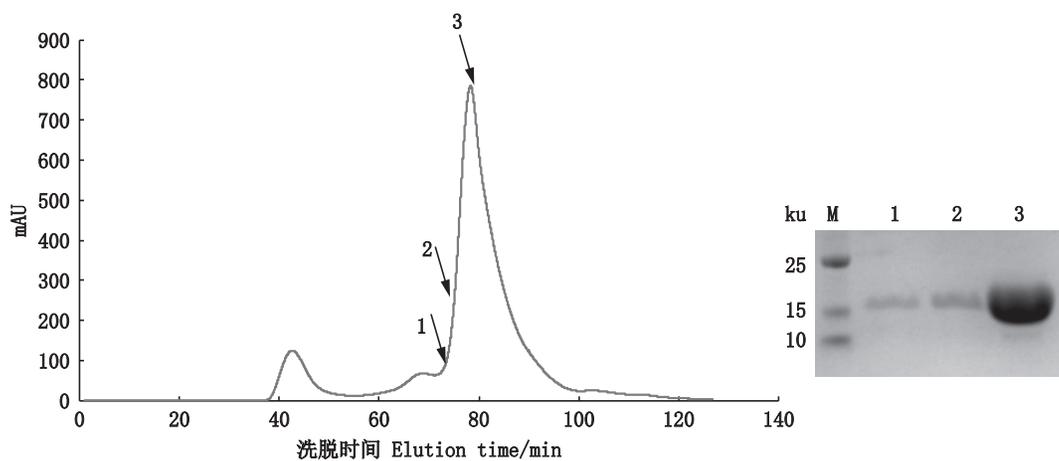


(a)不同浓度 IPTG 诱导 4 h 时 CyHV3-IL10 原核蛋白的表达; (b)不同浓度 IPTG 诱导 8 h 时 CyHV3-IL10 原核蛋白的表达; (c)不同浓度 IPTG 诱导 10 h 时 CyHV3-IL10 原核蛋白的表达; (d) 1 mmol/L IPTG 诱导 8 h 时 CyHV3-IL10 原核蛋白的可溶性分析。箭头所指为 CyHV3-IL10 原核重组蛋白。

(a) Induction of expression of recombinant CyHV3-IL10 protein by different concentrations of IPTG at 4 h; (b) Induction of expression of recombinant CyHV3-IL10 protein by different concentrations of IPTG at 8 h; (c) Induction of expression of recombinant CyHV3-IL10 protein by different concentrations of IPTG at 10 h; (d) Analysis of solubility of recombinant CyHV3-IL10 protein induced by 1 mmol/L IPTG at 8 h. Arrows indicate the recombinant CyHV3-IL10 prokaryotic protein.

图 1 不同浓度 IPTG 诱导 CyHV3-IL10 原核蛋白表达和可溶性分析

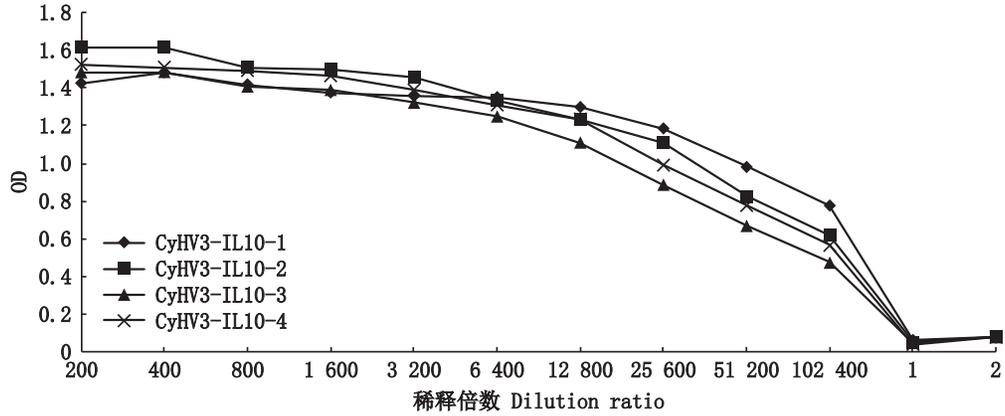
Fig. 1 Induction of recombinant CyHV3-IL10 protein by different concentrations of IPTG and solubility analysis



M. 蛋白标准; 1. 洗脱液 32 mL; 2. 洗脱液 37 mL; 3. 洗脱液 42 mL。  
M. Protein Marker; 1. Elution fraction 32 mL; 2. Elution fraction 37 mL; 3. Elution fraction 42 mL.

图 2 CyHV3-IL10 原核重组蛋白表达及纯化

Fig. 2 Expression and purification of prokaryotic recombinant CyHV3-IL10 protein



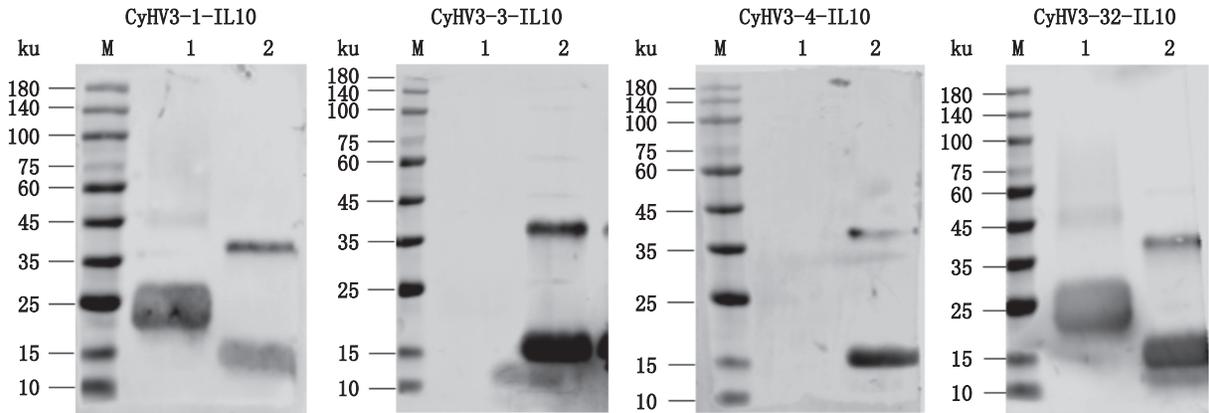
1. PBS; 2. 免疫前血清(1:200, v/v).  
 1. PBS; 2. Sera prior to immunization (1:200, v/v).

图3 免疫小鼠血清抗体效价分析  
 Fig. 3 Analysis of serum antibody titers of immunized mice

表1 CyHV3-IL10 杂交瘤细胞株抗体效价测定及抗体亚型鉴定

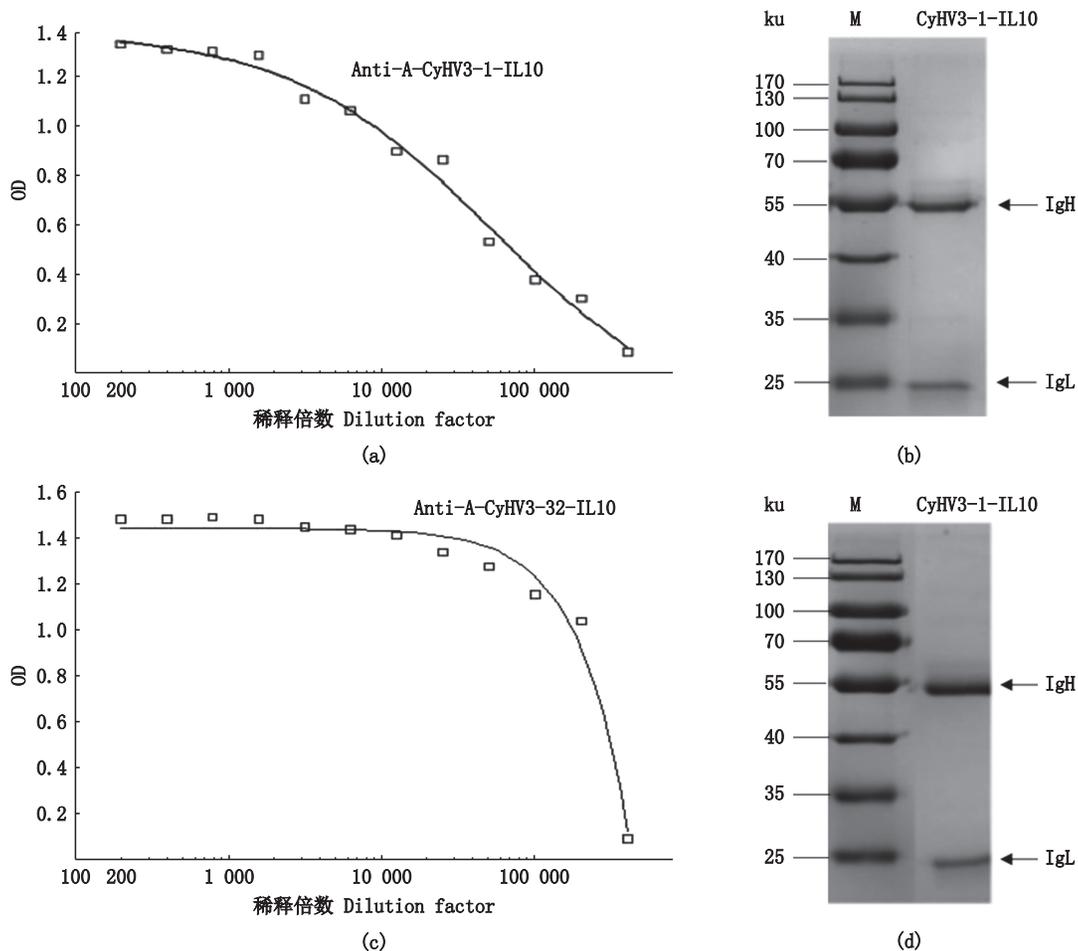
Tab. 1 Determination of antibody titers and isotypes of CyHV3-IL10 hybridoma cell lines

杂交瘤细胞株编号 Hybridoma cell line number	针对免疫原的OD值 OD value against immunogens	抗体亚型 Ig subtype
1	0.595	IgG1
3	0.531	IgG1
14	0.610	IgG2a
26	0.593	IgG2a
28	0.618	IgG2b
32	0.716	IgG2b
阴性 Negative control	0.072	IgG1
PBS	0.040	
阳性 Positive control	0.916	



M. 蛋白标准; 1. HEK293-F 细胞中表达的重组 CyHV3-IL10 蛋白; 2. CyHV3-IL10 原核重组蛋白。  
 M. Protein marker; 1. Recombinant CyHV3-IL10 protein expressed in the HEK293-F cells; 2. Prokaryotic recombinant CyHV3-IL10 protein.

图4 CyHV3-IL10 单克隆抗体的 Western blotting 分析  
 Fig. 4 Western blotting analysis of CyHV3-IL10 monoclonal antibodies



(a) CyHV3-1-IL10 单克隆抗体的 ELISA 分析; (b) CyHV3-1-IL10 抗体 Western blotting 分析; (c) CyHV3-32-IL10 单克隆抗体的 ELISA 分析; (d) CyHV3-32-IL10 抗体 Western blotting 分析。

(a) ELISA analysis of CyHV3-1-IL10 monoclonal antibody; (b) Western blotting analysis of CyHV3-1-IL10 monoclonal antibody; (c) ELISA analysis of CyHV3-32-IL10 monoclonal antibody; (d) Western blotting analysis of CyHV3-1-IL10 monoclonal antibody.

图 5 单克隆抗体的 ELISA 和 Western blotting 分析

Fig. 5 ELISA and Western blotting analysis of monoclonal antibodies

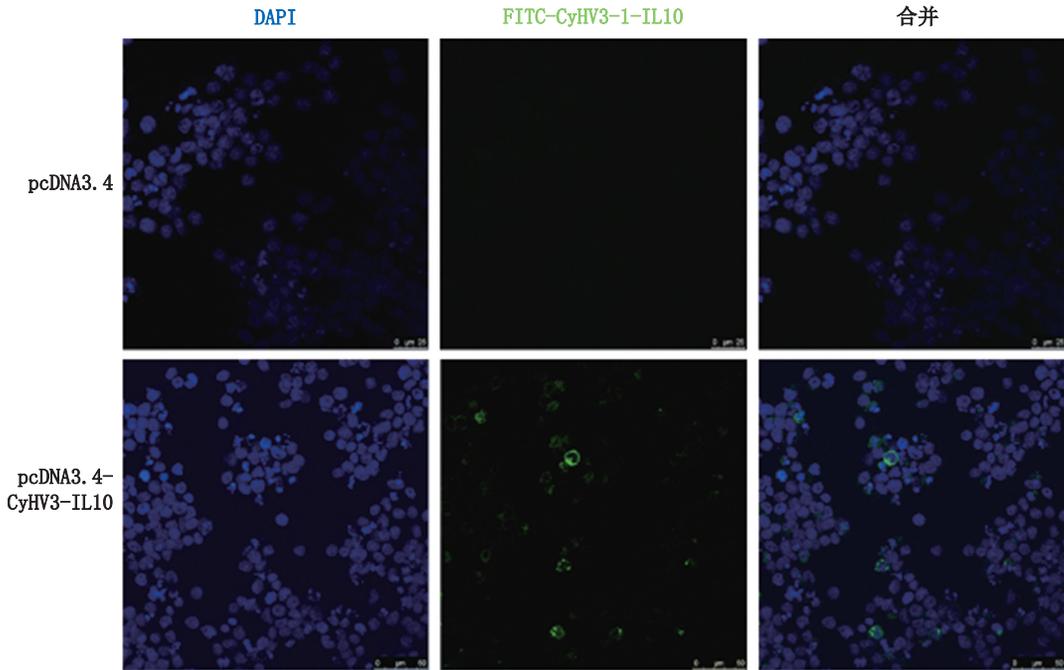
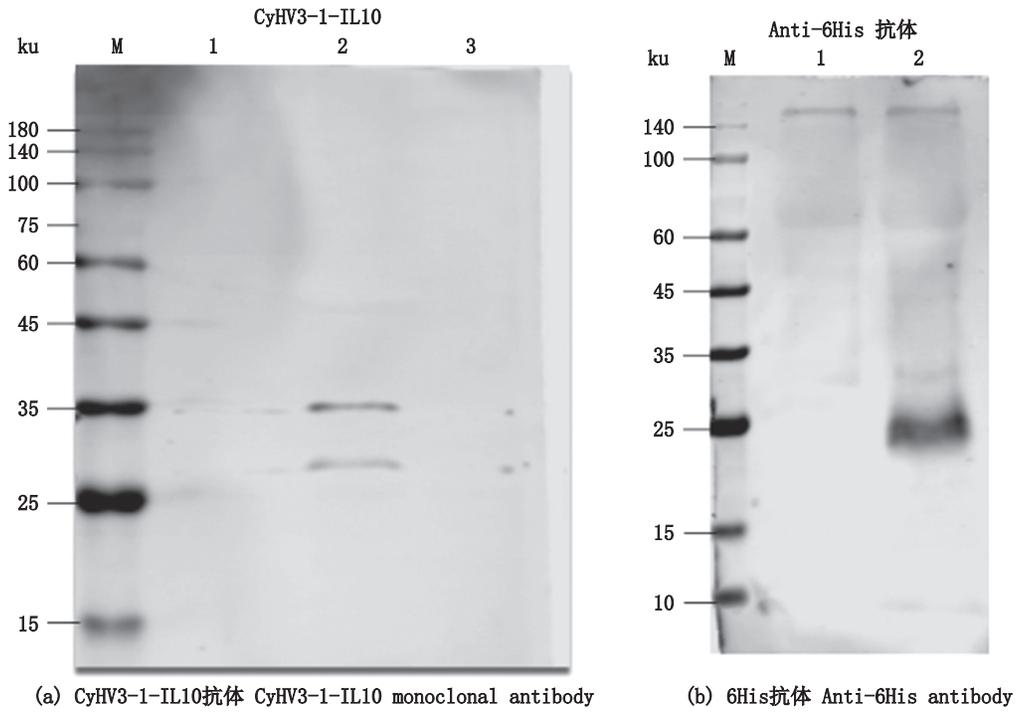
## 2.5 免疫荧光分析

为了检验纯化的 CyHV3-1-IL10 和 CyHV3-32-IL10 抗体能否用于免疫荧光实验, 本实验将 pcDNA3.4-CyHV3-IL10-6His 真核表达质粒及 pcDNA3.4 载体(对照)转染至 HEK293 细胞中, 24 h 后收集细胞和培养基进行 Western blotting 分析。如图 6a 所示, CyHV3-1-IL10 抗体能够检测到 pcDNA3.4-CyHV3-IL10-6His 重组蛋白的表达, 重组蛋白大小约为 27 ku 和 35 ku, 在培养基中未检测到重组蛋白。通过激光共聚焦分析, 用 FITC 标记的 CyHV3-1-IL10 单抗对表达 CyHV3-IL10 蛋白的细胞进行染色, 结果显示, 转染 pcDNA3.4-CyHV3-IL10-6His 的 HEK293 细胞质中呈现很强的绿色荧光信号, 对照组细胞中未观察到绿色荧光信号。以上结果表明, 本研究制备的单克隆抗体具有很高的

特异性, 可应用于直接免疫荧光检测细胞中 CyHV3-IL10 蛋白的表达。

## 2.6 感染的镜鲤鳃和脾中 CyHV3-IL10 蛋白 Western blotting 分析

已有研究表明, 鳃为 CyHV3 感染的主要黏膜器官, 而脾则是核心系统免疫器官。为研究感染后镜鲤鳃和脾中的 CyHV3-IL10 蛋白表达情况, 我们利用 CyHV3-1-IL10 抗体对这 2 个组织中 CyHV3-IL10 的蛋白含量进行了 Western blotting 分析。结果如图 7 所示, 感染 CyHV3 病毒的镜鲤鳃和脾中均出现一条大小约 18 ku 的蛋白条带, 与 CyHV3-IL10 蛋白理论值大小一致, 而健康鱼鳃和脾中未出现该蛋白条带, 说明 CyHV3-IL10 在病毒感染宿主后得到了表达。同时, 该结果显示本研究中制备的 CyHV3-IL10 单克隆抗体具有很高的特异性。



(c) HEK293细胞中CyHV3-IL10重组蛋白的免疫荧光检测(抗体为CyHV3-1-IL10, 绿色为CyHV3-IL10蛋白, 蓝色为细胞核)

Immunofluorescence detection of CyHV3-IL10 recombinant protein expressed in the HEK293 cells (CyHV3-1-IL10 monoclonal antibody was used for staining.

The CyHV3-IL10 protein was stained in green and nucleus (DAPI) in blue)

M. 蛋白标准; 1. 转染 pcDNA3.4 质粒的 HEK293 细胞; 2. 转染 pcDNA3.4-CyHV3-IL10-6His 质粒的 HEK293 细胞的培养基。

M. Protein marker; 1. HEK293 cells transfected with pcDNA3.4; 2. HEK293 cells transfected with pcDNA3.4-CyHV3-IL10-6His; 3. Culture medium of HEK293 cells transfected with pcDNA3.4-CyHV3-IL10-6His.

图 6 CyHV3-1-IL10 单克隆抗体的 Western blotting 和免疫荧光分析

Fig. 6 Western blotting and immunofluorescence analysis of CyHV3-1-IL10 monoclonal antibody

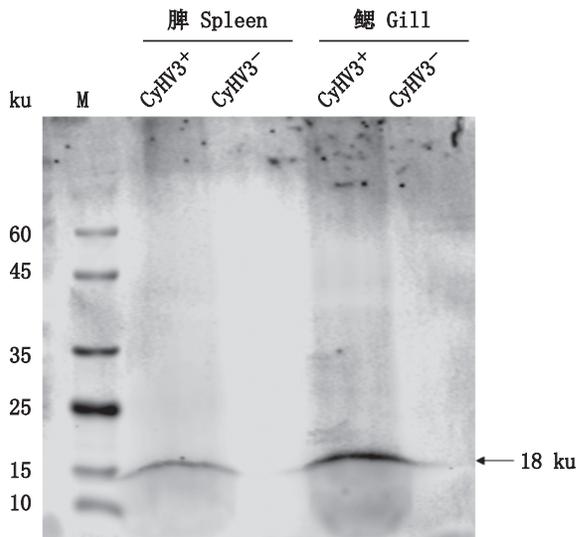


图7 感染镜鲤鳃和脾中CyHV3-IL10蛋白  
Western blotting分析

Fig. 7 Western blotting analysis of CyHV3-IL10 protein in the gills and spleen of infected Koi carp

### 3 讨论

CyHV3自1997年首次报导以来,在全球多个国家传播、流行,范围覆盖亚洲、欧洲、北美及非洲等多个地区,给鲤及锦鲤养殖业造成不可估量的经济损失<sup>[21]</sup>。CyHV3主要感染锦鲤、普通鲤等鲤科鱼类,具有传染速度快、发病率和死亡率高的特点,感染后发病率和死亡率高达80%~100%。有研究<sup>[22]</sup>表明,非鲤科鱼类如河鲈科(*Perca fluviatilis*)、真鲈科(*Percichthyidae*)、刺鱼科(*Gasterosteidae*)、鲟科(*Acipenseridae*)和花鲈科(*Poeciliidae*)等亦有可能感染并携带CyHV3,最近研究显示,患病鱼中病毒载量可能与水体中的轮虫数目有关,提示CyHV3有可能通过轮虫富集。锦鲤疱疹病毒病暴发一般发生在春秋季节,病毒最适增殖温度为15~25℃,发病温度为18~28℃<sup>[23-24]</sup>,当温度低于10℃或高于30℃时病毒不再增殖<sup>[25]</sup>。携带CyHV3病鱼在适宜温度时可再次发病或死亡<sup>[26]</sup>。

目前病毒的检测方法分为免疫学检测、分子生物学检测和生物传感器检测等<sup>[27]</sup>。其中经典免疫学检测方法包含血凝和血凝抑制试验、琼脂扩散试验、酶联免疫吸附试验和胶体金免疫层析技术。血凝和血凝抑制试验可以应用于早期病毒的诊断,具有较高的准确性,但不适合大批量样本检测;胶体金免疫层析方法具有简单、快速

等特点,但无法进行定量测定;血清学双抗体夹心ELISA检测方法具有较高的准确性和灵敏度,是病原检测的重要手段之一。相较于免疫学检测方法,分子生物学检测方法具有较高的特异性和灵敏度,但仪器设备要求高,假阳性率高。生物传感器操作简单,设备要求低,但需要设计探针且生物信号不稳定<sup>[25]</sup>。因此,发展多种病毒综合检测技术可提高CyHV3诊断的可靠性。本研究制备了CyHV3-IL10单克隆抗体,可用于免疫荧光检测和Western blotting分析,CyHV3-IL10为分泌蛋白,因此,制备的单克隆抗体可用于制备ELISA检测试剂盒,通过定量分析血清中的CyHV3-IL10浓度来评估血清中病毒载量。

迄今,虽然研究人员对鲤疱疹病毒开展了流行病学<sup>[21]</sup>、检测与诊断<sup>[28-29]</sup>、基因组学<sup>[1,30]</sup>、防治疫苗<sup>[31-32]</sup>等方面的研究,但对CyHV3致病机理的了解非常有限。研究发现,一些DNA病毒编码类宿主细胞因子或细胞因子受体,如细胞肿瘤坏死因子受体、IL8和IL10,可以调控宿主的免疫反应,实现免疫逃逸<sup>[33]</sup>。CyHV3基因组中ORF134编码一个类IL10分子,同样,巨细胞病毒和EB病毒也编码一个类宿主IL10分子<sup>[34-35]</sup>,疱疹病毒类IL10在不同物种中如何调控宿主的免疫反应值得深入研究。不是所有疱疹病毒都编码类IL10分子,例如,跟CyHV3进化关系较近的CyHV1和CyHV2基因组则不含IL10基因,其原因尚不清楚。已有的研究表明,CyHV3-IL10具有类似于宿主同源物的功能,能抑制脂多糖诱导的IL1 $\beta$ 、TNF $\alpha$ 、IL12、MHC I等基因的表达,抑制凋亡<sup>[36]</sup>。但对CyHV3-IL10的调控功能仍缺乏全面的了解,其调控宿主免疫反应的作用机制尚不清楚,本研究制备的CyHV3-IL10重组蛋白和单克隆抗体将有助于CyHV3-IL10免疫功能的解析。

综上,本研究制备了纯度高的CyHV3-IL10重组蛋白,获得了特异性高的鼠源单克隆抗体,该抗体可用于Western blotting、免疫荧光和激光共聚焦分析,为CyHV3-IL10蛋白功能的研究和CyHV3免疫诊断方法的建立提供重要基础,为CyHV3检测试剂盒的研发提供新的研究思路。

### 参考文献:

- [1] 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.
- [2] YI Y, ZHANG H T, 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.
- [3] MICHEL B, LEROY B, RAJ V S, 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.
- [4] ROSENKRANZ D, KLUPP B G, TEIFKE J P, et al. Identification of envelope protein pORF81 of Koi herpesvirus [J]. *Journal of General Virology*, 2008, 89(4): 896-900.
- [5] FUCHS W, GRANZOW H, DAUBER M, et al. Identification of structural proteins of Koi herpesvirus [J]. *Archives of Virology*, 2014, 159(12): 3257-3268.
- [6] 郑树城, 李莹莹, 王庆, 等. 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[J]. *中国水产科学*, 2018, 25(1): 204-210.
- ZHENG S C, LI Y Y, WANG Q, et al. Identification and development of a polyclonal antibody against proteins encoded by the *ORF136* gene in *Cyprinid herpesvirus 3*[J]. *Journal of Fisheries Sciences of China*, 2018, 25(1): 204-210.
- [7] SUNARTO A, LIONGUE C, MCCOLL K A, et al. Koi herpesvirus encodes and expresses a functional interleukin-10[J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(21): 11512-11520.
- [8] OUYANG P, RAKUS K, BOUTIER M, et al. The IL-10 homologue encoded by cyprinid herpesvirus 3 is essential neither for viral replication *in vitro* nor for virulence *in vivo* [J]. *Veterinary Research*, 2013, 44(1): 53.
- [9] ZHOU Y, JIANG N, MA J, et al. Protective immunity in Gibel carp, *Carassius gibelio* of the truncated proteins of cyprinid herpesvirus 2 expressed in *Pichia pastoris* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 47(2): 1024-1031.
- [10] DAVISON A J, KUROBE T, GATHERER D, et al. Comparative genomics of carp herpesviruses[J]. *Journal of Virology*, 2013, 87(5): 2908-2922.
- [11] AL RUMAIH Z, TUAZON KELS M J, NG E, et al. Poxvirus-encoded TNF receptor homolog dampens inflammation and protects from uncontrolled lung pathology during respiratory infection [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(43): 26885-26894.
- [12] PONTEJO S M, SÁNCHEZ C, MARTÍN R, et al. An orphan viral TNF receptor superfamily member identified in lymphocystis disease virus[J]. *Virology Journal*, 2013, 10(1): 188.
- [13] HUANG X H, HUANG Y H, CAI J, et al. Identification and characterization of a tumor necrosis factor receptor like protein encoded by Singapore grouper iridovirus[J]. *Virus Research*, 2013, 178(2): 340-348.
- [14] YU Y P, HUANG Y H, NI S W, et al. Singapore grouper iridovirus (SGIV) TNFR homolog VP51 functions as a virulence factor via modulating host inflammation response [J]. *Virology*, 2017, 511: 280-289.
- [15] FIORENTINO D F, BOND M W, MOSMANN T R. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones[J]. *Journal of Experimental Medicine*, 1989, 170(6): 2081-2095.
- [16] SALEK-ARDAKANI S, ARRAND J R, MACKETT M. Epstein-Barr virus encoded interleukin-10 inhibits HLA-class I, ICAM-1, and B7 expression on human monocytes: implications for immune evasion by EBV [J]. *Virology*, 2002, 304(2): 342-351.
- [17] RESSING M E, HORST D, GRIFFIN B D, et al. Epstein-Barr virus evasion of CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cell immunity via concerted actions of multiple gene products [J]. *Seminars in Cancer Biology*, 2008, 18(6): 397-408.
- [18] 朱晓真, 王俊亚, 贾钊, 等. 草鱼 II 型干扰素的单克隆抗体制备与鉴定[J]. *水产学报*, 2022, 46(8): 1487-1498.
- ZHU X Z, WANG J Y, JIA Z, et al. Preparation and characterization of monoclonal antibodies for type II interferons in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2022, 46(8): 1487-1498.
- [19] 王梓璇, 贾钊, 邬恺正, 等. 草鱼 IFN $\alpha$  和 IFN $\delta$  重组蛋白表达、纯化及单克隆抗体制备[J]. *水产学报*, 2022, 46(11): 2053-2065.
- WANG Z X, JIA Z, WU K Z, et al. Expression of recombinant proteins and preparation of monoclonal antibodies for IFN $\alpha$  and IFN $\delta$  in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2022, 46(11): 2053-2065.
- [20] QIN Y T, SUN Z S, WANG W, et al. Characterization of CD3 $\gamma/\delta$ <sup>+</sup> cells in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2021, 114: 103791.
- [21] 郑树城, 王庆, 李莹莹, 等. 鲤疱疹病毒 3 型研究进展[J]. *病毒学报*, 2016, 32(1): 108-120.
- ZHENG S C, WANG Q, LI Y Y, et al. Research advances in cyprinid Herpesvirus 3[J]. *Chinese Journal of Virology*, 2016, 32(1): 108-120.
- [22] MINAMOTO T, HONJO M N, YAMANAKA H, et al. Detection of cyprinid herpesvirus-3 DNA in lake plankton [J]. *Research in Veterinary Science*, 2011, 90(3): 530-532.
- [23] 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.
- [24] GILAD O, YUN S S, ADKISON M A, et al. Molecular comparison of isolates of an emerging fish pathogen, koi herpesvirus, and the effect of water temperature on mortality of experimentally infected koi [J]. *Journal of General Virology*, 2003, 84(10): 2661-2667.
- [25] PERELBERG A, SMIRNOV M, HUTORAN M, et al. Epidemiological description of a new viral disease afflicting cultured *Cyprinus carpio* in Israel [J]. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 2003, 55(1): 5-12.
- [26] ST-HILAIRE S, BEEVERS N, WAY K, et al. Reactivation of Koi herpesvirus infections in common carp *Cyprinus carpio* [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2005, 67(1/2): 15-23.
- [27] 莫一群, 王雅琴, 陆辉, 等. 禽流感病毒检测方法研究进展[J]. *中国家禽*, 2023, 45(6): 82-95.  
MO Y Q, WANG Y Q, LU H, et al. Research progress on detection methods for avian influenza virus [J]. *Poultry China*, 2023, 45(6): 82-95.
- [28] 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.
- [29] 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.
- [30] 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.
- [31] WEBER E P S, 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.
- [32] 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.
- [33] ZOU J, SECOMBES C J. The function of fish cytokines [J]. *Biology*, 2016, 5(2): 23.
- [34] HOLDER K A, GRANT M D. Human cytomegalovirus IL-10 augments NK cell cytotoxicity [J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2019, 106(2): 447-454.
- [35] YOON S I, JONES B C, LOGSDON N J, et al. Epstein-Barr virus IL-10 engages IL-10R1 by a two-step mechanism leading to altered signaling properties [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(32): 26586-26595.
- [36] 阳瑞雪. 鲤疱疹病毒3型vIL-10基因的克隆表达及其对免疫相关因子调节作用的研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2019.  
YANG R X. Expression of cyprinid herpesvirus 3 encoded viral interleukin 10 and its regulation on immune related genes [D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2019.

## Preparation and characterization of Cyprinid herpesvirus 3 interleukin 10 monoclonal antibody

CHEN Jing<sup>1</sup>, ZHANG Yanwei<sup>1</sup>, LIU Qin<sup>1</sup>, ZHU Xiaozhen<sup>1</sup>, JIA Zhao<sup>1</sup>, WANG Junya<sup>1</sup>, GAO Wa<sup>1</sup>, JIA Zhiying<sup>2</sup>, GUI Lang<sup>1</sup>, ZOU Jun<sup>1</sup>

(1. College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Heilongjiang Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, Heilongjiang, China)

**Abstract:** Cyprinid herpesvirus 3 (CyHV3), also known as Koi herpesvirus (KHV), is a highly contagious pathogen that threatens the sustainability of cyprinid aquaculture. The ORF134 gene of CyHV3 encodes an interleukin (IL) 10 like protein. In this study, we constructed a prokaryotic expression plasmid of ORF134 and transformed it into the *E. coli* Rosetta (DE3) cells for expression of recombinant protein. The recombinant CyHV3-IL10 protein was purified by size exclusion chromatography and used for immunization of mice to generate monoclonal antibodies. The antibodies were then characterized by ELISA, Western blotting and immunofluorescent assay. SDS-PAGE analysis showed that the recombinant CyHV3-IL10 protein was approximately 18 ku in size and was expressed mainly in the form of inclusion bodies. The inclusion bodies were denatured, refolded and subjected to size exclusion chromatography. The recombinant CyHV3-IL10 protein was of high purity. Western blotting and immunofluorescence analyses revealed that the CyHV3-IL10 monoclonal antibodies recognized the recombinant CyHV3-IL10 protein expressed in the *E. coli* and HEK293 cells and could specifically detect the HEK293 cells expressing the CyHV3-IL10 protein. In summary, the availability of CyHV3-IL10 monoclonal antibodies lays the foundation for the functional study of CyHV3-IL10 and the establishment of CyHV3 diagnostic tools, and provides novel strategies for the prevention and control of the diseases caused by CyHV3.

**Key words:** CyHV3; IL10; monoclonal antibody; Western blotting; immunofluorescence assay