

草鱼Ⅲ型呼肠孤病毒外衣壳蛋白 VP38 的表达分析及多克隆抗体制备^{*}

许焯琦¹, 王龙龙¹, 徐宁¹, 喻飞¹, 王浩^{1,2,3,4}, 吕利群^{1,2,3**}

(1. 上海海洋大学国家水生动物病原库, 上海 201306; 2. 上海海洋大学农业部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306; 3. 上海海洋大学水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306; 4. 广西壮族自治区海洋研究所, 广西海洋生物技术重点实验室, 广西北海 536000)

摘要:为进一步开展草鱼Ⅲ型呼肠孤病毒外衣壳蛋白 VP38 的生物学功能研究准备实验材料, 同时探讨并构建一种草鱼Ⅲ型呼肠孤病毒的免疫学检测方法。实验构建了 VP38 的原核表达质粒 pET28a-VP38, 转化至 BL21 感受态细胞后利用 IPTG (Isopropyl β-D-Thiogalactoside) 诱导表达, 8 mol/L 尿素溶解重组蛋白后免疫小鼠, 制备鼠抗 VP38 多克隆抗体; 利用制备的抗体探究 Grass carp reovirus-104 (GCRV-104) 感染后 VP38 在翻译水平的表达动力学; 利用 Western blot、间接免疫荧光分析 (IFA) 对抗体进行评估; 构建 VP38 的真核表达载体 pEGFP-N1-VP38, 转染至草鱼性腺 (Grass carp ovary, GCO) 细胞内进行亚细胞定位分析。结果显示: 重组 VP38 蛋白在原核表达系统中以包涵体形式存在; 制备的鼠抗 VP38 多克隆抗体既能够识别重组 VP38 蛋白, 也能够识别 GCO 细胞感染 GCRV-104 后表达的 VP38 蛋白; GCRV-104 感染后 72 h VP38 主要分布在细胞质中, 与亚细胞定位结果一致; VP38 在感染的前期微量表达, 感染中后期大量表达。本研究制备的鼠抗 VP38 多克隆抗体具有较高的效价和较好的特异性, 为构建草鱼Ⅲ型呼肠孤病毒的免疫学检测方法提供了较好的技术路线。

关键词:草鱼Ⅲ型呼肠孤病毒 外衣壳蛋白 表达分析 多克隆抗体 免疫学检测

中图分类号: S941.4 文献标识码: A 文章编号: 1002-7378(2019)03-0176-09



微信扫一扫, 与作者在线交流 (OSID)

0 引言

Grass carp reovirus-104 (GCRV-104) 是草鱼Ⅲ型呼肠孤病毒的代表株也是其唯一成员, 2009 年分离于湖北一养殖场患病草鱼^[1]。与以 GCRV873 为代表株的草鱼Ⅰ型呼肠孤病毒相比, GCRV-104 不编码时能够使感染细胞膜融合形成合胞体的 FSAT 蛋

白, 而编码后能负责吸附识别宿主的纤维样蛋白 VP55, 同时二者在毒性以及感染特性方面也存在较大的差异^[2]。VP38 是由 GCRV-104 *s10* 片段编码的大小为 346 aa 的外衣壳蛋白, 作为 GCRV 外衣壳蛋白的主要成分之一, 有保护病毒粒子、维持结构稳定的作用^[3]。序列分析表明 VP38 与Ⅱ型 GCRVs11 编码的 VP35 和Ⅰ型 GCRVs10 编码的 VP7 为同源

^{*}国家现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-45-19) 和第四届中国科协青年人才托举工程项目 (中国水产学会 D-8005-19-0012) 资助。

【作者简介】

许焯琦 (1997—), 女, 本科生, 主要从事水生病害防控技术的研究。

【**通信作者】

吕利群 (1971—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事水产疫病防控和绿色新渔药的研究, E-mail: lqlv@shou.com。

【引用本文】

DOI: 10.13657/j.cnki.gxkxyxb.20190903.008

许焯琦, 王龙龙, 徐宁, 等. 草鱼Ⅲ型呼肠孤病毒外衣壳蛋白 VP38 的表达分析及多克隆抗体制备 [J]. 广西科学院学报, 2019, 35(3): 176-184.

XU Y Q, WANG L L, XU N, et al. Expression analysis and polyclonal antibody preparation of outer shell protein VP38 encoded by genotype Ⅲ grass carp reovirus [J]. Journal of Guangxi Academy of Sciences, 2019, 35(3): 176-184.

蛋白,均含有保守的 CxxC-n16-HxC 锌结合基序(Zinc-binding motif),该基序负责与另外一个外衣壳蛋白相互作用^[4];此外 MRV 和 ARVs10 编码的蛋白与 VP38 在 N 端具有相同的亲水性谱,呈疏水—亲水—疏水—亲水的顺序^[1]。

草鱼 I 型呼肠孤病毒外衣壳蛋白由 VP5 和 VP7 组成,三维结构显示,两者在病毒颗粒中呈现相同的等价比,即各由 200 个三聚体亚单位组成,且 VP5 组分的含量在衣壳蛋白中所占的比例最大^[5]。本实验室前期利用酵母双杂交技术以及 Dot Blot 等技术验证了 VP5 与 VP7 在体外的相互作用^[6]。利用胰蛋白酶和糜蛋白酶对草鱼 I 型呼肠孤病毒颗粒进行酶解实验的结果表明,病毒颗粒的 VP7 蛋白经消化后,能够明显提高病毒的感染效率,推测相对于 VP7 蛋白,VP5 蛋白在病毒感染过程中起到识别和吸附宿主的作用^[4];有研究者利用酵母双杂交系统对能够与 VP7 相互作用的宿主蛋白进行筛选,发现核糖体蛋白 S20(RPS20)以及真核翻译起始因子 3 亚基 b((eIF3b)与 VP7 存在潜在的相互作用,但该研究仅利用生物信息学分析进一步预测了 VP7 与这两种蛋白之间的相互作用,并未通过其他有说服力的实验进行深入的验证^[7]。相对于草鱼 I 型及 II 型呼肠孤病毒,草鱼Ⅲ型呼肠孤病毒分离时间较晚,且研究相对滞后,对外衣壳蛋白 VP38 的研究尚不深入。

在前期的研究中,我们利用酵母双杂交系统筛选了能与 GCRV-104 夹层蛋白 VP6 和外衣壳蛋白 VP38 相互作用的宿主蛋白^[8],发现 VP38 与宿主可能存在相互作用的蛋白有:剪切与多聚腺苷酸化特异性因子 5(CPSF5)、高迁移率组蛋白核小体结合结构域 2(HMGN2)、葡萄糖转运体 X(GLUTX)和蛋白酶体 $\beta 2$ 亚基(PSMB7);后期的定向酵母双杂交实验也证实了 VP38 与 PSMB7 之间的相互作用。为了深入开展 VP38 蛋白的功能研究,本研究在原核表达系统中诱导表达了重组 His-VP38 蛋白,并免疫小鼠制备多克隆抗体,获得了具有较高效价以及较好特异性的多克隆抗体,为后续的研究工作做了良好的铺垫,同时该研究也为构建草鱼Ⅲ型呼肠孤病毒的免疫学检测方法提供了良好的技术路线。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂与耗材

PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase, DNA

Ligation Kit(Mighty Mix),限制性内切酶等均购自 TAKARA; Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System 试剂盒、Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification Systems 试剂盒购自 Promega 公司; Bradford 蛋白浓度测定试剂盒、尿素、水合氯醛购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 2×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液、考马斯亮蓝快速染色液购自碧云天生物技术有限公司。

1.1.2 实验动物

4 只 8 周龄 Babl/c 小鼠购自度碧生物科技(上海)有限公司,暂养于本实验室动物房。所有动物操作均遵守实验动物福利操作技术规范^[9]。

1.1.3 细胞与病毒株

GCRV-104 病毒株由中国水产科学研究院长江水产研究所曾令兵研究员惠赠;草鱼肾脏(*Ctenopharyngodon idellus* kidney, CIK)细胞系及草鱼性腺(Grass carp ovary, GCO)细胞系保存于上海海洋大学国家水生动物病原库;大肠杆菌感受态 DH5 α 、BL21(DE3)购自上海近岸生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 基因的扩增及重组质粒的构建

根据草鱼Ⅲ型呼肠孤病(GCRV-104)的 *s10* 片段基因序列,使用 Primer Premier 5.0 软件设计 ORF 上游引物与下游引物,并分别插入限制性酶切位点和保护性碱基(引物序列见表 1);PCR 反应为 50 μ L 体系,其中 2×PrimeSTAR Max Premix 25 μ L,上下游引物各 1 μ L(浓度为 10 nmol/L),cDNA 模板(GCRV-104 感染的 CIK 细胞 cDNA 为模板) 1 μ L,无菌水 22 μ L;按照 98 $^{\circ}$ C 预变性 3 min,98 $^{\circ}$ C、10 s,55 $^{\circ}$ C、5 s,72 $^{\circ}$ C、5 s,35 个循环的程序进行 PCR;用 1%琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行分析;利用 Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System 对与目的基因大小一致的阳性条带进行割胶回收。

pET-28a-VP38 与 pEGFP-N1-VP38 的重组质粒按照传统双酶切的方法进行构建;将纯化后的 PCR 产物以及 pET-28a、pEGFP-N1 载体使用表 1 中所列的限制性内切酶进行酶切反应,37 $^{\circ}$ C 酶切 1 h;对酶切产物进行纯化回收,回收后的目的片段和载体质粒使用 DNA Ligation Kit 试剂盒 16 $^{\circ}$ C 连接 30 min;将 10 μ L 连接产物转化入 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中,涂到含有卡那霉素(Kan⁺)的 LB 平板筛选阳性菌落,对阳性菌落微量(1 mL)扩增 3 h 后进行 PCR 检测,对 PCR 验证正确的阳性菌大量扩增

并使用 Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System 试剂盒提取重组质粒,送测序鉴定。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物名称 Primer name	序列 Sequence	酶切位点 Cutting site	应用 Application
pET28a-VP38-F	CCG <i>GAATTC</i> ATGGAGACCCACGCTTACC	<i>EcoR</i> I	原核表达 Prokaryotic expression
pET28a-VP38-R	CCC AAGCTT GTGAACCCTCTACTCACCC- AG	<i>Hind</i> III	原核表达 Prokaryotic expression
pEGFP-N1-VP38-F	CCC AAGCTT ATGGAGACCCACGCTTACC	<i>Hind</i> III	真核表达 Eukaryotic expression
pEGFP-N1-VP38-R	CGG <i>GGTACC</i> GAACCCTCGTACTCACCCAG	<i>Kpn</i> I	真核表达 Eukaryotic expression

注:斜体碱基代表对应的酶切位点

Note: The italic part of the sequence represents the corresponding enzyme cutting site

1.2.2 蛋白的诱导表达及可溶性分析

将测序验证后的 pET-28a-VP38 重组质粒转化至 BL21 感受态细胞中,涂布至 LB (Kan⁺) 平板筛选阳性克隆,利用微量移液器挑取单菌落到 1 mL LB (Kan⁺) 液体培养基中,37℃、150 r/min 恒温摇床培养过夜。将培养菌液转移至新鲜的 20 mL LB (Kan⁺) 液体培养基中,37℃、150 r/min 恒温摇床培养 5 h 后,菌液中加入 20 μL 1 mol/L IPTG (Isopropyl β-D-Thiogalactoside) (培养液中 IPTG 终浓度为 1 mmol/L) 诱导蛋白表达;37℃、150 r/min 恒温摇床培养 5 h 后,收集菌体沉淀;4℃、8 500 r/min 离心 20 min,弃上清;用 1×Phosphate buffer saline Tween-20 (PBST) 溶液重悬洗涤 1 次,离心弃去上清。将菌体在 -80℃ 冷冻 30 min 后,在室温中融化,反复冻融 3 次;冻融后的菌体中加入 20 mL Phosphate buffer saline (PBS) 重悬,并加入 Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) 使其终浓度达到工作浓度 (100 μg/mL)。将重悬的菌液在冰上进行超声破碎 (超声 6 s 间隔 6 s,功率 300 W),直至溶液澄清;4℃、8 500 r/min 离心 20 min,分别收集上清和沉淀。蛋白诱导表达过程中应在加入 IPTG 诱导剂之前、诱导 5 h 后分别取 200 μL 菌液离心,弃上清后加入 20 μL 2×SDS-PAGE 上样缓冲液制样,同时取裂解后上清 20 μL,并加入 20 μL 2×SDS-PAGE 上样缓冲液制样,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,并使用考马斯亮蓝染色分析目的蛋白的表达情况及可溶性。

1.2.3 利用尿素溶液溶解包涵体蛋白

将尿素溶解于 PBS 中配制浓度为 8 mol/L 的尿素溶液。对于超声裂解后离心得到的沉淀,先使用 PBS 重悬,冰上摇动 20 min,8 500 r/min 离心 20 min,弃上清收集沉淀。在沉淀中加入 5 mL 8 mol/L 尿素,使用微量移液器反复吹打重悬直至沉淀完全溶解,冰上摇动 20 min,8 500 r/min 离心 20 min,收集

上清,并取 20 μL 制样,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,并使用考马斯亮蓝染色分析目的蛋白在 8 mol/L 尿素中的溶解性;使用 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。

1.2.4 实验动物的免疫以及多克隆抗体的收集

使用溶解于 8 mol/L 尿素的蛋白免疫小鼠,每只小鼠免疫目的蛋白的质量约为 200 μg。首次免疫时,将目的蛋白溶液与等体积的弗氏完全佐剂混合,并利用一次性注射器完全乳化,在小鼠腹腔内注射;第 2 次与第 3 次免疫时,使用弗氏不完全佐剂与目的蛋白溶液混合乳化,腹腔注射;第 4 次直接腹腔注射目的蛋白溶液。每次腹腔注射免疫间隔 1 周,期间注意观察小鼠的生理状态。最后一次免疫 3~4 d 后,对小鼠腹腔注射 10% (W:V) 水合氯醛溶液 (水合氯醛稀释于生理盐水中,按每 20 g 小鼠体重 100 μL 的剂量) 进行麻醉处理;待小鼠深度麻醉后,进行眼角取血,将全血在 37℃ 放置 2 h,4℃ 静置过夜,离心收集血清,取少量保存于 4℃ 用于后续实验,其他 -20℃ 保存备用。

1.2.5 病毒感染与样品收集

草鱼 CIK 细胞传至 12 孔细胞培养板,至细胞单层铺满后,使用无血清 M199 稀释 GCRV-104 病毒,使感染复数 MOI=10;27℃ 孵育细胞过夜后,换含有 10% (W:V) 胎牛血清、青霉素 100 U/mL、链霉素 0.1 mg/mL 的 M199 完全培养基,每 12 h 收集细胞样品 (移去培养基后,每孔加入 50 μL 2×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液,使用细胞刮刀将贴壁细胞完全刮下,转移至 1.5 mL 离心管中,-20℃ 保存)。

1.2.6 VP38 的亚细胞定位

将草鱼 GCO 细胞传至 12 孔细胞培养板中,至细胞单层铺满 60%~90% 左右,利用 Lipofectamine 3000 转染试剂盒将 1 μg pEGFP-N1-VP38 质粒转染至 GCO 细胞中;27℃ 培养 24 h 后,移去培养基,使用

灭菌的 PBS 漂洗一遍, 4% (W : V) 多聚甲醛固定 10 min, PBS 漂洗 2 次, 每次 10 min; 免疫染色通透液 (碧云天生物技术有限公司) 处理 10 min, PBS 漂洗 2 次, 每次 10 min; 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole) 染色液处理 10 min, PBS 漂洗 3 次, 每次 10 min; 使用奥林帕斯 IX17 荧光显微镜对样品进行图片采集及处理。

1.2.7 免疫印迹法 (Western blot) 分析

蛋白样品在 100 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min 后, 进行 SDS-PAGE 电泳, 然后采用湿转法转至 PVDF (polyvinylidene fluoride) 膜上, 用含 5% (W : V) 脱脂牛奶的 PBST 溶液室温震荡封闭 1 h; 实验制备的多克隆抗体 1 : 5 000 稀释于含有 2.5% (W : V) 脱脂牛奶的 PBST 溶液中, 室温孵育 2 h 或 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜; 用 PBST 溶液漂洗 5 次, 每次 5 min; HRP (Horse radish peroxidase) 标记的羊抗鼠的 IgG 单克隆抗体 (ABmart) 作为二抗 1 : 5 000 稀释于含有 2.5% 脱脂牛奶的 PBST 溶液中, 室温孵育 2 h 或 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h; PBST 漂洗 7 次, 每次 5 min; 使用天能 ECL 化学发光成像系统对 PVDF 膜进行信号捕获和图片处理。

1.2.8 间接免疫荧光分析 (IFA)

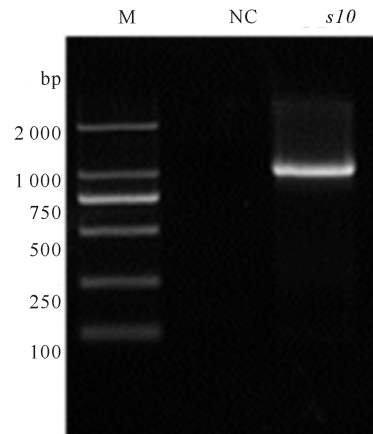
GCRV-104 感染 CIK 细胞 72 h 后, 移去培养基, PBS 漂洗 2 次; 4% (W : V) 多聚甲醛固定 10 min, PBS 漂洗 2 次, 每次 10 min; 免疫染色通透液处理 10 min, PBS 漂洗 2 次, 每次 10 min; 含 5% 脱脂牛奶的 PBS 溶液室温封闭 1 h; 实验制备的鼠抗 VP38 多克隆抗体 1 : 500 稀释于含有 2.5% 脱脂牛奶的 PBS 溶液中, 室温孵育 2 h 或 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜; 用 PBS 溶液漂洗 5 次, 每次 5 min; 红色荧光标记的羊抗鼠单克隆抗体 (ABmart) 1 : 500 稀释于含有 2.5% 脱脂牛奶的 PBS 溶液中, 室温孵育 2 h 或 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h; PBS 漂洗 4 次, 每次 5 min; 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DAPI 染色液处理 10 min, PBS 漂洗 3 次, 每次 10 min; 使用奥林帕斯 IX17 荧光显微镜对样品进行图片采集及处理。

2 结果与分析

2.1 基因的扩增与质粒的构建

利用 RT-PCR 技术成功获得相应的基因片段, 1% (W : V) 琼脂糖凝胶电泳结果显示扩增 VP38 的样品在约 1 000 bp 处出现一条特异性条带, 与 GCRV-104 *s10* 片段编码 VP38 的 ORF (1 041 bp) 大小一致 (图 1); 重组质粒 pET-28a-VP38 以及 pEGFP-N1-VP38 的测序结果表明两个重组质粒插

入片段序列及酶切位点序列完全正确, 无突变或移码现象, 可用于后续实验。



M: DL2000 Maker; NC: 阴性对照; *s10*: GCRV-104 *s10* 基因序列

M: DL2000 Maker; NC: Negative control; *s10*: GCRV-104 *s10* gene sequence

图 1 扩增产物电泳图

Fig. 1 Electropherogram of amplification product

2.2 重组蛋白的诱导表达及可溶性分析

VP38 重组蛋白样品经 10% SDS-PAGE 凝胶电泳后使用考马斯亮蓝染色分析。相对于未诱导的菌体样品, 经 IPTG 诱导的菌体样品在 48~35 kDa 出现一条明显的条带; 而超声裂解后的离心上清中在此处没有明显的条带, 因此重组 His-VP38 蛋白主要以包涵体的形式存在; 在 8 mol/L 尿素中, His-VP38 包涵体蛋白能够良好溶解, 且主条带明显杂带较少 (图 2)。

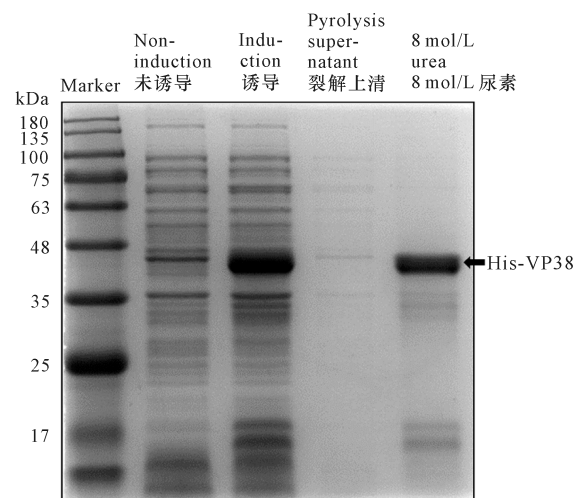


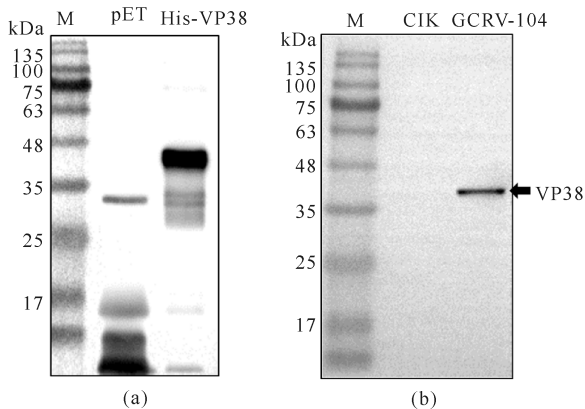
图 2 重组蛋白 His-VP38 的诱导表达及可溶性分析

Fig. 2 Induced expression and soluble analysis of recombinant protein His-VP38

2.3 多克隆抗体的分析

Western blot 检测结果显示本实验制备的鼠抗

VP38 多克隆抗体在稀释比例为 1 : 5 000 时,既能识别原核表达的 His-VP38 重组蛋白,也能够特异性识别 CIK 细胞感染 GCRV-104 72 h 后合成的病毒蛋白 VP38 (图 3),表明本实验制备的鼠抗 VP38 多克隆抗体具有较高的效价和较好的特异性。



(a) 鼠抗 VP38 多克隆抗体可识别原核表达的 His-VP38 蛋白;(b)鼠抗 VP38 多克隆抗体可识别感染 GCRV-104 的 CIK 样品中的 VP38 蛋白

(a) Mouse anti-VP38 polyclonal antibody can recognize His-VP38 protein expressed in prokaryotes;(b) Mouse anti-VP38 polyclonal antibody recognizes VP38 protein in CIK samples infected with GCRV-104

图 3 鼠抗 VP38 多克隆抗体的分析

Fig. 3 Analysis of mouse anti-VP38 polyclonal antibody

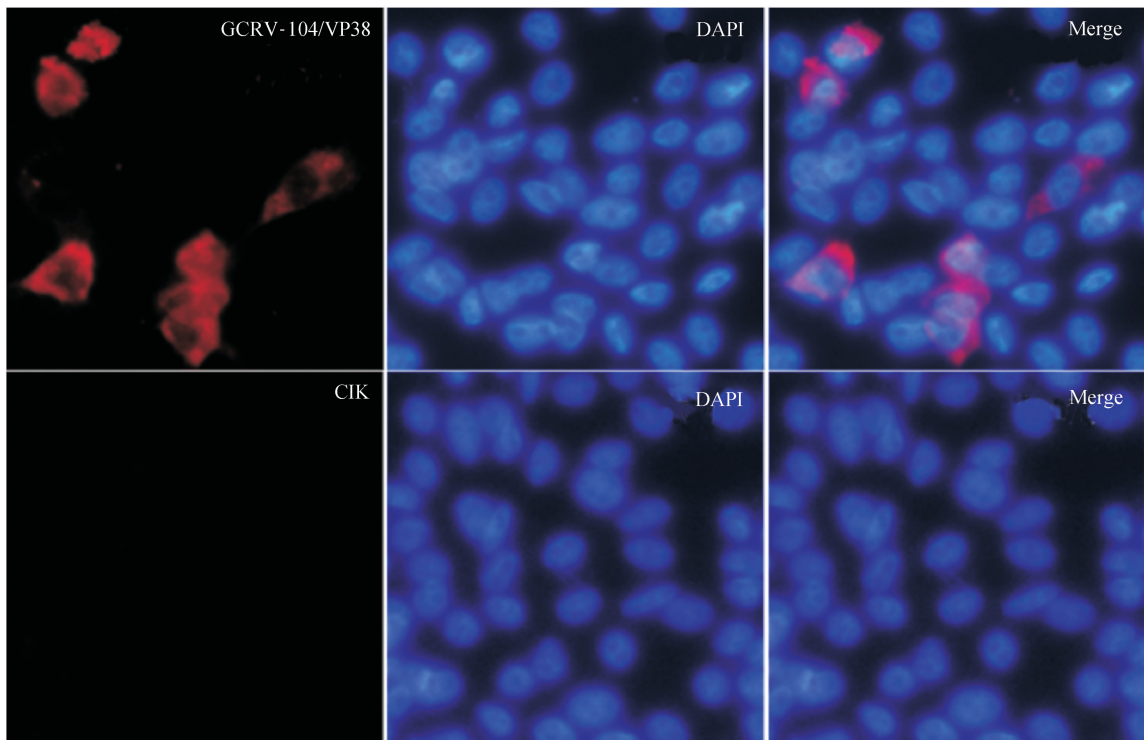


图 5 GCRV-104 感染 CIK 细胞样品的间接免疫荧光分析

Fig. 5 Indirect immunofluorescence analysis of GCRV-104 infected CIK cells with mouse anti-VP38 polyclonal antibody

2.4 VP38 在 GCRV-104 感染过程中翻译水平的表达动力学

分别在 GCRV-104 感染 CIK 细胞 0 h,12 h,24 h,36 h,48 h,60 h,72 h,84 h 取细胞蛋白样品,利用实验制备的鼠抗 VP38 多克隆抗体和商品化内参抗体鼠抗 GAPDH 单克隆抗体(Santa Cruz Biotechnology)进行 Western blot 检测,结果显示在 GCRV-104 感染后 12 h VP38 即出现了微量的表达,但在 36 h 后才随着感染时间的延长表达量逐渐增高(图 4)。

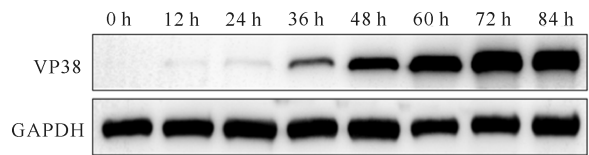


图 4 VP38 在 GCRV-104 感染过程中的表达动力学

Fig. 4 Expression dynamics of VP38 during GCRV-104 infection

2.5 间接免疫荧光分析(IFA)

间接免疫荧光结果显示(图 5),感染 GCVR-104 病毒 72 h 后的草鱼 CIK 细胞出现特异性的荧光信号,而未感染病毒的正常细胞则无荧光信号;VP38 蛋白主要分布于细胞质内;IFA 的结果也表明本研究制备的鼠抗 VP38 多克隆抗体具有较高的效价以及较好的特异性。

2.6 VP38 在 GCO 细胞中的亚细胞定位

在 GCO 细胞中转染 pEGFP-N1-VP38 质粒 24 h 后, 对细胞核进行 DAPI 染色, 在荧光显微镜下拍

照并利用配套的软件对图片进行处理。结果显示, GFP-VP38 蛋白主要分布在细胞质中, 局部有高表达(图 6), 该结果与 IFA 实验结果基本一致。

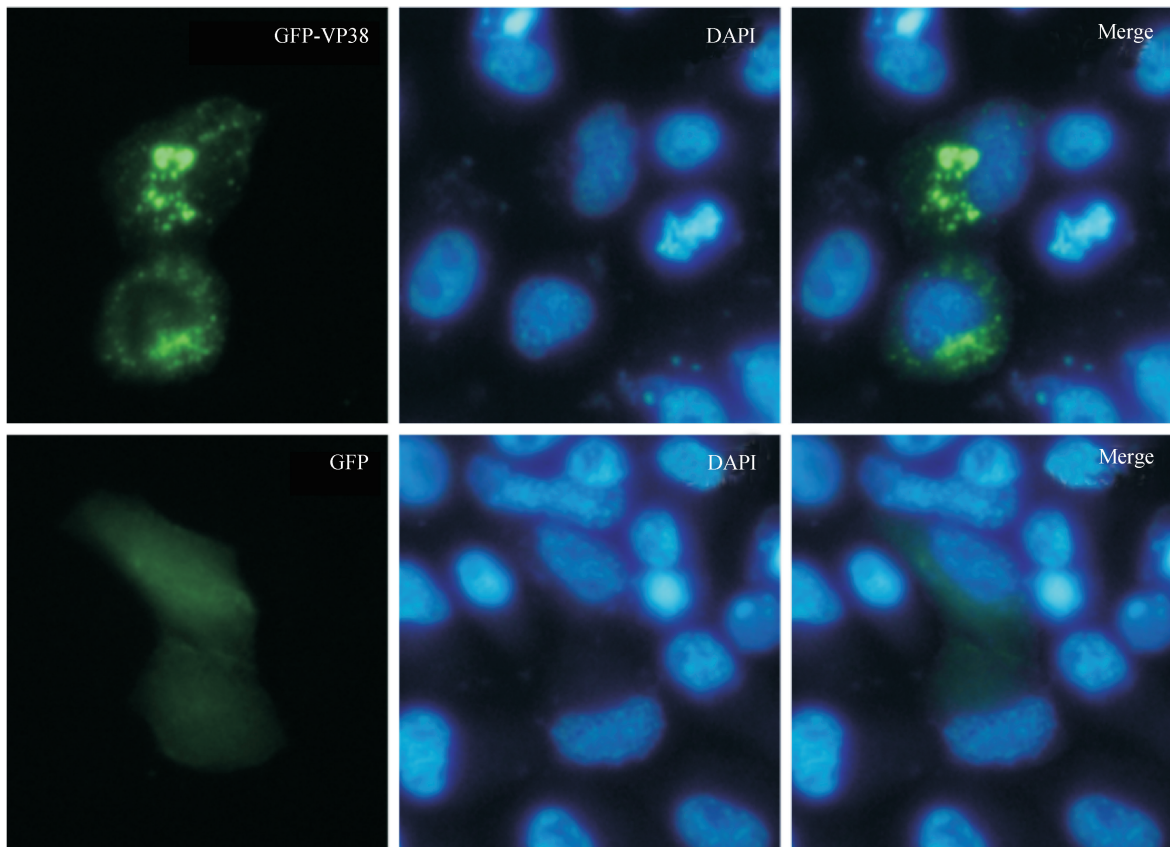


图 6 GFP-VP38 在 GCO 细胞中的亚细胞定位

Fig. 6 Subcellular localization of GFP-VP38 in GCO cells

3 讨论

病毒入侵宿主的过程, 是宿主与病毒之间的博弈。作为具有细胞结构的高等生物, 在亿万年与病原体的“军备竞赛”中, 无论原核生物还是真核生物, 都进化出了复杂的抗病毒免疫系统, 依赖这些抗病毒系统, 宿主能够将病毒清除保证个体的健康^[10]; 而作为体型较小, 看起来较为弱势的病毒, 却又能通过一些狡猾的手段逃避这些抗病毒机制, 最终取得博弈的胜利^[10-11]。作为主要的生物功能的执行者, 蛋白质及其之间的相互作用对于各种生物学进程至关重要。目前已经鉴定的草鱼来源的呼肠孤病毒其编码的蛋白也仅有 10~13 个^[3, 12-13], 在病毒与宿主的博弈中, 病毒蛋白与宿主蛋白之间必定存在纷繁复杂的相互作用, 而各个病毒蛋白也必定通过与宿主的相互作用承担着多种多样生物学功能。为了保证顺利复制、装配和传播, 病毒会编码一些非结构蛋白在病毒感染复制

过程中行使重要的调控作用^[14-18]; 而结构蛋白除了组成病毒颗粒的特定结构外, 也会行使一些特定的生物学功能, Wang 等^[19]发现 VP5 能够与细胞表面的 LamR 分子相互作用, 而利用抗体封闭 LamR 后能够降低 GCRV 病毒的感染, 该结果也一定程度上证实了 VP5 在识别宿主方面的功能; VP7 通过与 VP5 形成三聚体复合物, 构建了病毒粒子外层的三聚体网络, 维持病毒粒子的稳定性^[5], 同时保护病毒粒子^[4]; 除了黏附以及识别受体外, VP55 和 VP56 还是类泛素化系统中 SUMO 连接酶 Ubc9 的底物, 病毒可能利用类泛素化修饰保证了病毒的正常复制^[20-21]; 本实验室近期的研究结果也显示, 一种细胞外基质蛋白 Fibulin-4 能够与 VP7、VP56 以及 VP55 相互作用。这些证据都说明了除了行使结构上的功能外, 草鱼呼肠孤病毒的外衣壳蛋白还具有一些特定的生物学功能。

目前对于草鱼的 3 种呼肠孤病毒的外衣壳蛋白

质研究主要集中在其结构上的功能、宿主细胞受体的识别以及在免疫学检测方法的构建^[4-7,22],对于其在病毒感染过程中执行的生物学功能缺乏深入的研究。尽管有学者利用酵母双杂交系统筛选了能与草鱼 I 型呼肠孤病毒的外衣壳蛋白 VP7 以及草鱼 II 型呼肠孤病毒外衣壳蛋白 VP35 相互作用的宿主蛋白,但相关的结果并未利用其他实验进行验证,也并未深入探究外衣壳蛋白与宿主蛋白相互作用对病毒或者宿主产生的影响^[7]。前期的研究中,我们在酵母双杂交系统发现 VP38 与 PSMB7 之间的相互作用,尽管酵母双杂交是一种比较可靠且较为灵敏的蛋白互作系统,但也具有假阳性率高的缺点^[23]。为了深入开展 VP38 蛋白的功能研究,本研究制备了具有较高效价以及较好特异性的鼠抗 VP38 多克隆抗体,利用该抗体我们同时探究了 GCRV-104 感染 CIK 细胞后 VP38 在翻译水平上的表达动力学,VP38 在感染后 12 h 即出现了微量的表达,12~24 h 间并未出现明显的增加,直到 36 h 后才随着感染进程表达量逐步增高,因此我们推测前期表达的微量蛋白可能执行了一些调控功能,而后期大量表达的 VP38 蛋白则用于病毒颗粒的组装。

除了国内分离的 3 种基因型的草鱼呼肠孤病毒病外,再加上由美国分离的 AGCRV-PB01-155/PB04-123/PB04-151 等^[12],能够感染草鱼的呼肠孤病毒总共可分为 4 类群。不同基因型草鱼呼肠孤病毒间基因组序列同源性较低^[3],在病毒毒力、感染特性上具有较大的差异^[24-27],但能够出现混合感染的情况^[28],因此区分病原,选择合适的草鱼出血病疫苗等防控方法,对于草鱼出血病的防控具有重要意义。外衣壳蛋白处于病毒颗粒的最外侧,且相对于其他病毒蛋白表达量较高,因此常常作为开发亚单位疫苗^[29]、构建免疫学检测方法的首选目标。本研究通过制备鼠抗 VP38 多克隆抗体,构建了一种草鱼 III 型呼肠孤病毒的免疫学检测方法,对于草鱼出血病病原的区分以及疾病防控具有一定的意义。

参考文献

- [1] FAN Y, RAO S, ZENG L, et al. Identification and genomic characterization of a novel fish reovirus, Hubei grass carp disease reovirus, isolated in 2009 in China [J]. *Journal of General Virology*, 2013, 94(Pt10): 2266-2277.
- [2] NIBERT M L, DUNCAN R. Bioinformatics of recent aqua- and orthoreovirus isolates from fish: Evolutionary gain or loss of fast and fiber proteins and taxonomic implications [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(7): e68607.
- [3] FANG Q, SENG E K, DING Q Q, et al. Characterization of infectious particles of grass carp reovirus by treatment with proteases [J]. *Archives of Virology*, 2008, 153(4): 675-682.
- [4] PEI C, KE F, CHEN Z Y, et al. Complete genome sequence and comparative analysis of grass carp reovirus strain 109 (GCR_eV-109) with other grass carp reovirus strains reveals no significant correlation with regional distribution [J]. *Archives of Virology*, 2014, 159(9): 2435-2440.
- [5] QIN F, SHAH S, LIANG Y, et al. 3D reconstruction and capsid protein characterization of grass carp reovirus [J]. *Science in China Series C: Life Sciences*, 2005, 48(6): 593-600.
- [6] LIU W, WANG H, YU F, et al. Grass carp reovirus outer capsid proteins VP5 and VP7 interact in vitro [J]. *Archives of Virology*, 2017, 162(8): 2375-2380.
- [7] YAN X, XIE J, LI J, et al. Screening and analysis on the protein interaction of the protein VP7 in grass carp reovirus [J]. *Virus Genes*, 2015, 50(3): 425-433.
- [8] 王龙龙, 邱军强, 喻飞, 等. 利用酵母双杂交技术筛选草鱼 III 型呼肠孤病毒 VP6 和 VP38 相互作用蛋白的研究 [J]. *生物学杂志*, 2018, 35(4): 16-20.
- [9] 英国纽卡斯尔大学. 实验动物福利操作技术规范网站 [EB/OL]. [2019-04-18]. <http://pwc.cnilas.org/>.
- [10] YOU LIANG R, JIANGUO S. Insights into the antiviral immunity against grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) reovirus (GCRV) in grass carp [J]. *Journal of Immunology Research*, 2015: 670437. Doi: 10. 1155/2015/670437.
- [11] GACK M U, DIAMOND M S. Innate immune escape by Dengue and West Nile viruses [J]. *Current Opinion in Virology*, 2016, 20: 119-128.
- [12] JAAFAR F M, GOODWIN A E, BELHOUCHE M, et al. Complete characterisation of the American grass carp reovirus genome (genus *Aquareovirus*; Family Reoviridae) reveals an evolutionary link between aquareoviruses and coltivirus [J]. *Virology*, 2008, 373(2): 310-321.
- [13] WANG Q, ZENG W, LIU C, et al. Complete genome sequence of a reovirus isolated from grass carp, indicating different genotypes of GCRV in China [J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(22): 12466.
- [14] LU J, WANG H, ZHANG Y, et al. Grass carp reovirus NS26 interacts with cellular lipopolysaccharide-induced

- tumor necrosis factor-alpha factor, LITAF [J]. *Virus Genes*, 2016, 52(6): 789-796.
- [15] GUO H, SUN X, YAN L, et al. The NS16 protein of aquareovirus - C is a fusion-associated small transmembrane (FAST) protein, and its activity can be enhanced by the nonstructural protein NS26 [J]. *Virus Research*, 2013, 171(1): 129-137.
- [16] CAI L, SUN X, SHAO L, et al. Functional investigation of grass carp reovirus nonstructural protein NS80 [J]. *Virology Journal*, 2011, 8(1): 168.
- [17] ZHANG J, GUO H, CHEN Q, et al. The N-terminal of aquareovirus NS80 is required for interacting with viral proteins and viral replication [J]. *PLoS ONE*, 2016, 11(2): e0148550.
- [18] LU L F, LI S, WANG Z X, et al. Grass carp reovirus VP41 targets fish MITA to abrogate the Interferon Response [J]. *Journal of Virology*, 2017, 91(14): JVI.00390-17. DOI: 10.1128/JVI.00390-17.
- [19] WANG H, YU F, LI J, et al. Laminin receptor is an interacting partner for viral outer capsid protein VP5 in grass carp reovirus infection [J]. *Virology*, 2016, 490: 59-68.
- [20] YU F, WANG H, WANG L, et al. Orthoreovirus outer-fiber proteins are substrates for SUMO-conjugating enzyme Ubc9 [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(48): 79814-79827.
- [21] YU F, WANG L, WANG H, et al. Repression of SUMOylation pathway by grass carp reovirus contributes to the upregulation of PKR in an IFN-independent manner [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(42): 71500-71511.
- [22] XU S Y, LI J H, ZOU Y, et al. Development and efficacy of a grass carp reovirus (GCRV) outer capsid protein VP7 subunit vaccine [J]. *Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences)*, 2011, 37(6): 659-664.
- [23] FIELDS S, SONG O K. A novel genetic system to detect protein-protein interactions [J]. *Nature*, 1989, 340(6230): 245-246.
- [24] RAO Y, SU J. Insights into the antiviral immunity against grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) reovirus (GCRV) in grass carp [J]. *Journal of Immunology Research*, 2015, 2015(2): 1-18.
- [25] WANG Q, ZENG W, LIU C, et al. Complete genome sequence of a reovirus isolated from grass carp, indicating different genotypes of GCRV in China [J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(22): 12466.
- [26] 张超, 王庆, 石存斌, 等. 草鱼呼肠孤病毒 HZ08 株的分离与鉴定 [J]. *中国水产科学*, 2010, 17(6): 1257-1263.
- [27] 徐洋, 郝贵杰, 沈锦玉, 等. 两株草鱼呼肠孤病毒江西株的分离与鉴定 [J]. *淡水渔业*, 2010, 40(3): 44-49.
- [28] WANG T, LI J, LU L. Quantitative in vivo and in vitro characterization of co-infection by two genetically distant grass carp reoviruses [J]. *Journal of General Virology*, 2013, 94(Pt6): 1301-1309.
- [29] 刘世旭, 王庆, 常藕琴, 等. 基因 I 型草鱼呼肠孤病毒 VP7 蛋白合成肽抗体的制备及应用 [J]. *南方农业学报*, 2018, 49(9): 173-181.

Expression Analysis and Polyclonal Antibody Preparation of Outer Shell Protein VP38 Encoded by Genotype Ⅲ Grass Carp Reovirus

XU Yeqi¹, WANG Longlong¹, XU Ning¹, YU Fei¹, WANG Hao^{1,2,3,4}, LV Liqun^{1,2,3}

(1. National Pathogen Collection Center for Aquatic Animals, Shanghai Ocean University, Shanghai, 201306, China; 2. Key Laboratory of Aquaculture Ministry for Freshwater Aquatic Genetic Resources, Shanghai Ocean University, Shanghai, 201306, China; 3. National Experimental Teaching Demonstration Center for Fishery Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai, 201306, China; 4. Guangxi Key Lab for Marine Biotechnology, Guangxi Institute of Oceanography, Beihai, Guangxi, 536000, China)

Abstract: To prepare experimental materials for further research on the biological function of VP38 and build an immunological detection method of genotype Ⅲ grass carp reovirus, in the experiment the prokaryotic ex-

pression plasmid pET28a-VP38 was constructed and transformed into BL21 competent cells, the expression of recombinant fusion protein was induced by IPTG and dissolved in 8 mol/L urea, the mice were immunized with recombinant protein to prepare mouse anti-VP38 polyclonal antibodies. Western blot and indirect immune-fluorescence analysis (IFA) were carried out to evaluate the antibody. The expression kinetics of VP38 at the translation level after GCRV-104 infection was investigated with the prepared antibodies. The antibody was evaluated by Western blot and indirect immunofluorescence assay (IFA). The eukaryotic expression vector pEGFP-N1-VP38 was constructed and transfected into grass carp GCO cells for sub-cellular localization analysis. The results showed that the recombinant VP38 protein existed as an inclusion body in the prokaryotic expression system. The prepared mouse anti-VP38 polyclonal antibody could recognize both the recombinant VP38 protein and the VP38 protein expressed by GCO cells infected with GCRV-104. VP38 was mainly distributed in the cytoplasm 72 h after GCRV-104 infection, which was consistent with the results of sub-cellular localization. VP38 was expressed in a small amount in the early stage of infection and in a large amount in the middle and late stage of infection. The mouse anti-VP38 polyclonal antibody prepared in this study has higher titer and better specificity, and provides a better technical route for constructing the immunological detection method of genotype III grass carp reovirus.

Key words: Genotype III grass carp reovirus, outer shell protein, expression analysis, polyclonal antibodies, immunological detection

责任编辑: 陆 雁

(上接第 175 页 Continue from page 175)

Advance in Peroxiredoxin 1 and Peroxiredoxin 2 of Teleost Immune Factors

ZHENG Qi, ZOU Zihong, CAI Jia, JIAN Jichang

(College of Fishery, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, Guangdong, 524088, China)

Abstract: Peroxiredoxin 1 (Prx 1) and Peroxiredoxin 2 (Prx 2) are conserved immune factors in vertebrates and play an important role in teleost innate immunity, which are also known as Natural Killer Enhancing Factor (NKEF A/B). Both types of proteins contain an active cysteine site at the N-terminus and C-terminus, respectively. Prx 1 and Prx 2 can eliminate reactive oxygen species (ROS) such as H_2O_2 and also participate in anti-pathogen immune responses. In this paper, the structure, antioxidant mechanism and biological function of fish Prx 1 and Prx 2 were reviewed.

Key words: fish, teleost, peroxiredoxin 1, peroxiredoxin 2, immunity, structure, function

责任编辑: 符支宏



微信公众号投稿更便捷

联系电话: 0771-2503923

邮箱: gxkxyxb@gxas.cn

投稿系统网址: <http://gxkx.ijournal.cn/gxkxyxb/ch>