

## 草鱼呼肠孤病毒 HZ08 株 S10 编码蛋白 多克隆抗体制备及其特性分析

李永刚<sup>1,2</sup>, 曾伟伟<sup>1</sup>, 王庆<sup>1</sup>, 殷亮<sup>1,2</sup>, 王英英<sup>1</sup>,  
梁红茹<sup>1</sup>, 刘春<sup>1</sup>, 石存斌<sup>1</sup>, 吴淑勤<sup>1\*</sup>

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所,农业部渔药创制重点实验室,广东 广州 510380;

2. 上海海洋大学水产与生命学院,上海 201306)

**摘要:**为研究草鱼呼肠孤病毒(GCRV)HZ08株S10基因节段编码蛋白的可能功能,采用PCR方法扩增草鱼呼肠孤病毒HZ08株S10基因节段,并把该基因节段克隆至表达载体pET-32a(+),获得的重组表达载体pET-32a-S10转化到大肠杆菌BL21(DE3)菌株,用IPTG诱导表达,表达产物通过SDS-PAGE分析鉴定后,再通过变性、过Ni柱纯化、透析复性纯化获得目的蛋白。然后用纯化的重组蛋白免疫昆明小白鼠,制得多克隆抗体,用间接ELISA方法测定抗体效价,用Western blot和IFA(间接免疫荧光试验)鉴定抗体特异性。结果表明,SDS-PAGE分析表达的重组蛋白约为53 ku,大小与预期相符,目的蛋白主要存在于包涵体中;过Ni柱纯化、透析复性纯化后的重组蛋白纯度可达97.4%;间接ELISA测得制备的多克隆抗体效价约为 $1:10^6$ ,Western blot和IFA结果显示,制备的多克隆抗体能识别HZ08毒株,表明S10编码蛋白为GCRV-HZ08株的结构蛋白。

**关键词:**草鱼呼肠孤病毒;HZ08株;S10编码蛋白;多克隆抗体

**中图分类号:**Q 785; S 965.112

**文献标志码:**A

我国分离到的第一株鱼类病毒是草鱼呼肠孤病毒(grass carp reovirus,GCRV),由该病毒引起的草鱼出血病每年都给我国草鱼养殖业造成巨大经济损失,严重制约着我国草鱼养殖的健康发展<sup>[1]</sup>。草鱼出血病病原较为复杂,目前已报道有近30个分离株<sup>[2]</sup>,包括草鱼呼肠孤病毒836株(fish reovirus 836,FRV-836)、草鱼呼肠孤病毒854株(grass carp reovirus 854,GCRV-854。其中GCRV为草鱼呼肠孤病毒的英文缩写,后面的数字或字母表示不同的株型,以下表示方式均与此相同。)、GCRV-873、GCRV-861、GCRV875、GCRV-876、GCRV-991、GCRV-096、GCRV-829、GCRV-892、GCRV-V(越南株)、GCRV-H962(湖南株)、GCRV-ZV8802(浙江湖州8802株)、GCRV-ZV8909(浙江湖州8909株)、GCRV-HZ08(浙江湖州08

株)、GCRV-JX0901(江西0901株)、GCRV-JX0902(江西0902株)、GCRV-104、GCRV-9014、GCRV-2008、GCRV-GD108(广东108株)等。不同分离株在基因组序列、基因组带型、细胞病变、对草鱼的致病力等方面差异较大。根据现有的分离株基因序列信息,进行氨基酸和核苷酸序列比对以及构建系统进化树分析,所有毒株总体上可以分为3大类<sup>[3]</sup>,即3个基因型:GCRV I型(代表株为GCRV-873与GCRV-JX0901)、GCRV II型(代表株为GCRV-HZ08与GCRV-GD108)和GCRV III型(代表株为GCRV-104)。当前,全国各地分离到的毒株中,3类亚型均有报道,有单独感染,也有混合感染。通过近年来草鱼出血病病原监测和流行病学调查结果分析表明,目前导致草鱼出血病流行和暴发主要是以HZ08株为代表的GCRV II型。GCRV-

收稿日期:2013-09-25

修回日期:2013-11-26

资助项目:国家自然科学基金项目(31202026);国家科技支撑计划(2012BAD25B02);现代农业产业技术体系建设专项(CARS-46)

通信作者:吴淑勤,E-mail:wushuqin001@21cn.com

HZ08 株是本研究室 2008 年从浙江湖州分离到的新毒株,已完成全基因组测序和部分分子生物学特性研究<sup>[2]</sup>。

GCRV-873(I 型)是第一个完成全基因组测序的水生呼肠孤病毒,是至今为止研究最为深入和系统的毒株,关于 GCRV-873 株基因组各基因节段及其编码蛋白的功能和作用研究比较多<sup>[5]</sup>。关于 GCRV 编码蛋白研究报道的有 VP4<sup>[6-7]</sup>、VP5<sup>[8-13]</sup>、VP6<sup>[14-19]</sup>、VP7<sup>[10,20-22]</sup> 等结构蛋白和 NS38<sup>[19,23]</sup>、NS80<sup>[24-25]</sup> 非结构蛋白等。GCRV-HZ08(II 型)为一个新的分离株,对其各节段基因及其编码蛋白的功能和作用还没有深入研究,只见关于 VP4 蛋白的一些研究报道<sup>[2,7]</sup>。通过生物信息学知识和软件分析表明<sup>[26]</sup>,HZ08 株 S10 编码一个长达 345aa 的 VP38 蛋白,分子量为 38.39 ku,该蛋白与禽呼肠孤病毒(avian reovirus, ARV)的非结构蛋白  $\sigma$ NS 同源性约 14.5%,与哺乳动物正呼肠孤病毒(mammal reovirus, MRV)的非结构  $\sigma$ NS 的同源性约 7.2%,在核苷酸和氨基酸水平上均找不到和水生呼肠孤病毒的同源基因。因此,一直以来 GCRV-HZ08 株 S10 基因编码蛋白被认为是该病毒的非结构蛋白,且可能具有与 MRV 和 ARV 的  $\sigma$ NS 蛋白相似的功能<sup>[26]</sup>。因此,本实验对 GCRV-HZ08 株的 S10 片段进行克隆、原核表达、纯化、制备鼠抗多克隆抗体及对其特性进行分析,旨在为 GCRV-HZ08 株 S10 编码蛋白功能的深入研究奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态、大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态、*BanH* I 酶、*Hand* III 酶、10  $\times$  buffer、*T*<sub>4</sub> Liqase、Liqase buffer 等购自宝生物工程(大连)有限公司;含有 GCRV-HZ08 毒株 S10 节段基因全长的 pVAX1-S10 重组质粒由本实验室构建并保存;pET-32a(+)质粒由本实验室保存;胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自 Omega 公司;PCR 试剂盒、SDS-PAGE 试剂盒、TMB 底物显色试剂盒、DAB 显色试剂盒等购自康为世纪有限公司,弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、HRP 标记的羊抗鼠 IgG 购自 Sigma 公司。6 周龄昆明小白鼠购自广东省实验动物中心。

### 1.2 S10 基因片段扩增

根据 GenBank 中 GCRV-HZ08 株 S10 基因序列设计 1 对引物(上游:5'-ATA GGA TCCATGGCGGGTGTGTCTCTCAACA-3';下游:5'-GCT AAG CTTCAGCATCTGCGCAAATATACGTC-3'),在上下游引物序列中分别插入 *BanH* I 和 *Hand* III 酶切位点(带下划线的基因),以 pVAX1-S10 重组质粒为模板,对 S10 基因进行 PCR 扩增,反应条件为:95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94  $^{\circ}$ C 45 s,54  $^{\circ}$ C 45 s,72  $^{\circ}$ C 1 min,共 33 个循环,72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测,并用胶回收试剂盒回收目的片段。

### 1.3 pET-32a-S10 重组表达载体构建

将回收纯化的 PCR 产物和原核表达载体 pET-32a(+)分别双酶切处理(*BanH* I 1  $\mu$ L,*Hand* III 1  $\mu$ L,10  $\times$  K buffer 2  $\mu$ L,质粒 16  $\mu$ L)后,经 1% 琼脂糖电泳分析,胶回收 S10 目的片段和处理好的 pET-32a(+)载体,用 *T*<sub>4</sub> DNA 连接酶连接 S10 目的片段和 pET-32a(+) [*T*<sub>4</sub> Liqase 1.5  $\mu$ L, *T*<sub>4</sub> Liqase buffer 1.5  $\mu$ L,pET-32a(+) 3  $\mu$ L,S10 目的片段 9  $\mu$ L,共 15  $\mu$ L],将连接产物转化到大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,筛选阳性克隆,菌液 PCR 鉴定为阳性的提取质粒,提取的重组质粒通过双酶切验证和测序鉴定都正确后,命名为 pET-32a-S10。

### 1.4 诱导表达和可溶性分析

**诱导表达** 将鉴定正确的重组质粒 pET-32a-S10 转化到大肠杆菌 BL21(DE3),挑取 LB/Amp 平板筛选的阳性克隆,于 LB/Amp 培养基中,37  $^{\circ}$ C,200 r/min 恒温摇床培养至光密度( $OD_{600}$  = 0.6)时,加入终浓度为 1 mmol/L 的 TPTG 诱导,诱导 10 h 后取 200  $\mu$ L 菌液离心收集菌体和上清备用,阴性对照用空载体 pET-32a(+)

**可溶性分析** 将 pET-32a-S10 诱导表达 20 mL,离心收集菌体,用磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffered Saline,PBS;0.01 mol/L 的 PBS 主要成分为 NaCl:8 g,KCl:0.2 g,Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>:1.42 g,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:0.27 g,加双蒸水至 1 L,高温高压灭菌)重悬离心洗涤 2 次后,加入 5 mL PBS 悬菌体,在冰上超声波破碎(工作 5 s,间歇 10 s,功率 250 W)约 2 h 至溶液澄清,吸取 200  $\mu$ L 破碎液,6 000 r/min 离心 5 min,将上清吸到另一 EP 管记为溶液 A,沉淀用 200  $\mu$ L 6 mol/L 的尿素溶解,记为溶液 B,分别将 A、B 溶液进行 SDS-PAGE,对该

重组蛋白进行可溶性分析,若目的蛋白主要在 A 溶液中,则该蛋白为可溶性蛋白;若目的蛋白主要在 B 溶液中,则目的蛋白主要在于包涵体中。

### 1.5 诱导表达条件的优化

采用棋盘法优化诱导条件,把 pET-32a-S10 转化到大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态中, LB/Amp 平板筛选阳性菌落,挑取单菌落于 3 mL LB/Amp 培养基中,在 37 °C, 200 r/min 恒温摇床培养 12 h,然后将菌液接种 20 μL 到 2 mL LB/Amp 培养基中,在 37 °C, 200 r/min 恒温摇床培养至光密度 ( $OD_{600}$  设 0.2、0.4、0.6、0.8 和 1.0,以实际测定为准)时,加入 TPTG 诱导 (IPTG 终浓度设 0.5、1.0、1.5、2.0 和 3.0 mmol/L),培养 10 h 后取 200 μL 菌液离心,收集菌体,经 SDS-PAGE 分析后用 BandScan 5.0 软件分析重组蛋白的相对表达量。

### 1.6 目的蛋白的大量表达和纯化

挑取 LB/Amp 平板筛选得阳性单菌落到 1 mL LB/Amp 培养基培养 10~12 h,然后将其接种到 1 L LB/Amp 培养基,37 °C, 200 r/min 恒温摇床培养,在优化的表达条件下诱导表达。将诱导表达的菌液在 10 000 r/min 离心 5 min,收集菌体,用 400 mL PBS 重悬离心洗涤 2 次,再加入 100 mL PBS 重悬,在冰上超声波破碎至溶液澄清。将破碎液离心收集包涵体(该蛋白可溶性检验为包涵体蛋白),然后参照 Ni-凝胶纯化试剂盒(包涵体蛋白纯化)说明书纯化目的蛋白。用 50 mL Binding Buffer 溶解包涵体过夜,将溶解液 10 000 r/min 离心 20 min 收集上清,再 0.45 μm 的滤膜过滤,将上清负载上已平衡好的 Ni 柱流速 10 倍柱体积/h,收集流穿液;用 15 倍柱体积的 Binding Buffer 洗去未结合蛋白和杂蛋白,然后用 20 mL Elution Buffer 洗脱目的蛋白,收集洗脱峰(整个纯化过程在 4 °C 冰箱中进行)。将 Ni 柱上洗脱下的蛋白装入透析袋,依次放入含 6、4、2、1、0.5 和 0 mol/L 尿素的 PBS 溶液中透析,每个浓度透析 12 h(全部过程在 4 °C 冰箱中进行)。透析完成后加入 PEG-6000,4 °C 冰箱静置浓缩,浓缩 50% 后分装成 1 mL/管,用紫外吸光度法测浓度后 -20 °C 保存备用。

### 1.7 多克隆抗体的制备

将纯化的目的蛋白用无菌 PBS 稀释至 200 μg/mL 后注射昆明小白鼠。第一次免疫用弗氏

完全佐剂 1:1 乳化,注射量为 200 μL/只,共免疫 10 只。第二次免疫和第三次免疫用弗氏不完全佐剂 1:1 乳化,注射同样的量。每次免疫时间间隔 14 d。第三次免疫 10 d 后断尾取血,制备血清,用间接酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immuno sorbent assay, ELISA) 法检测血清抗体的效价。如果抗体效价不够,可以加强免疫一次,如果足够高,则第 14 天摘眼球取血。采取的血样 37 °C 静置 1 h 后 4 °C 冰箱静置过夜,第二天 3 000 r/min 离心 8 min,收集血清, -20 °C 保存备用。对照组注射无菌 PBS 制备阴性血清。

### 1.8 血清抗体效价测定

根据本实验室建立的草鱼呼肠孤病毒间接 ELISA 检测方法(结果尚未发表)来测定血清抗体效价,即用纯化的 S10 编码蛋白作为抗原包被聚苯乙烯反应板建立的间接 ELISA 方法。其简要过程如下:将纯化的重组蛋白用 pH 9.6 的碳酸盐缓冲液(配方:  $Na_2CO_3$  0.15 g,  $NaHCO_3$  0.293 g,加双蒸水 90 mL 后用 1 mol/L 的 HCl 调 pH 至 9.6,最后定容至 100 mL)按 1:8 000 倍稀释(70 ng/mL)包被 100 μL 于 96 孔酶标板,4 °C 过夜;用 200 μL 1% BSA 于 37 °C 封闭 2 h;将制备的血清按 1:10<sup>1</sup>、1:10<sup>2</sup>、1:10<sup>3</sup>、1:10<sup>4</sup>、1:10<sup>5</sup>、1:10<sup>6</sup>、1:10<sup>7</sup>、1:10<sup>8</sup>、1:10<sup>9</sup>、1:10<sup>10</sup> 等梯度稀释加入 100 μL,37 °C 孵育 2 h,以相应稀释倍数的阴性血清做对照;加入 1:5 000 稀释的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 100 μL,37 °C 孵育 1 h;以上每步反应后都用 200 μL PBST(配方:0.01 mol/L 的 PBS 中加入 0.05% 的吐温 20)洗板 3~5 次,每次 5 min;最后用 TMB(3',3',5',5'-四甲基联苯胺)底物显色试剂盒显色 20 min,加入 0.5 mol/L 的  $H_2SO_4$  终止显色,在酶标仪 (Infinite M200 PRO) 上读  $OD_{450}$  值。当  $OD_{450} \geq 0.277$ ,且  $P/N \geq 2.1$  的结果判定为阳性。

### 1.9 多克隆抗体特性分析

**Western blot 分析** 将纯化的 GCRV-HZ08 病毒、IPTG 诱导的 pET-32a(+) 空载体和纯化的 S10 基因编码重组蛋白经 SDS-PAGE 电泳,电泳结束后用半干转膜法将蛋白转移到 NC 膜上,用 TBST(配方:NaCl 8.77 g,Tris 1.21 g,900 mL 双蒸水溶解,再用浓 HCl 调 pH 至 8.0,然后双蒸水定容至 1 L,最后加入 0.05% 的吐温 20)缓冲液配制的 5% 脱脂牛奶在 4 °C 冰箱封闭过夜;加入

1:1 000 稀释的血清后在 37 °C 摇床上孵育 2 h;加入用 HRP 标记的羊抗鼠 IgG (1:5 000 倍稀释), 37 °C 孵育 1 h;每次反应后用 TBST 洗 3~5 次,每次 5 min,最后用 DAB (二氨基联苯胺) 显色剂显色并观察结果。

间接免疫荧光试验 (indirect immunofluorescent assay, IFA) 将草鱼肾细胞系 (CIK) 传代至 96 孔细胞培养板中,待细胞长至单层铺满 80% 左右后,感染 GCRV-HZ08 株 (60 拷贝/ $\mu\text{L}$ );感染病毒 5 d 后 (GCRV-HZ08 株感染 CIK 细胞无 CPE 产生),将细胞培养板中的培养基吸尽,用 0.01 mol/L 的 PBS 洗涤 3 次,加入 80% 的丙酮溶液室温孵育 30 min,吸去丙酮,室温干燥 1 h;每孔加 100  $\mu\text{L}$  1:1 000 稀释的鼠抗 S10 编码蛋白多克隆抗体,37 °C 孵育 1 h, PBST 洗涤 3 次,加入 1:50 稀释的羊抗鼠 IgG-FITC 标记的荧光二抗 100  $\mu\text{L}$ , 37 °C 孵育 1 h; PBST 洗涤 3 次,最后加入细胞核染料碘化丙啶 (PI) 作用 5 min, 荧光倒置显微镜 (Nikon, Eclipse Ti-S) 下观察结果。阴性对照为未感染病毒的正常 CIK 细胞。

## 2 结果

### 2.1 S10 基因扩增产物鉴定

S10 基因 PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,扩增出一条大小约为 1 100 bp 的特异性条带,大小与预期一致,而阴性对照没有扩增条带 (图 1)。

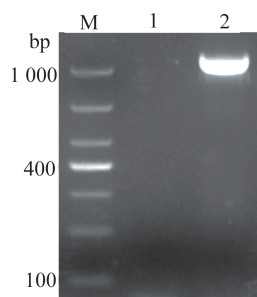


图 1 S10 基因 PCR 扩增产物电泳图

M. DL marker 1000; 1. 阴性对照; 2. 以 pVAX1-S10 质粒为模板的 PCR 扩增产物

Fig. 1 Electrophoretic profile of PCR products of S10 gene

M. DL marker 1000; 1. negative control; 2. PCR products with the template of plasmid pVAX1-S10

### 2.2 重组表达载体鉴定

先将胶回收的 PCR 扩增产物和 pET-32a (+) 载体双酶切,然后进行连接、转化,最后提取质粒,通过电泳、酶切、测序等方法鉴定重组质粒,结果显示 S10 基因片段已成功转化到原核表达载体 pET-32a (+) 中。PCR 和双酶切鉴定结果 (图 2) 均显示重组表达质粒 pET-32a-S10 构建正确,测序结果显示目的片段序列正确,阅读框也正确,且目的基因片段 S10 和 pET-32a (+) 的 His-Tag 标签蛋白序列在同一开放阅读框下。

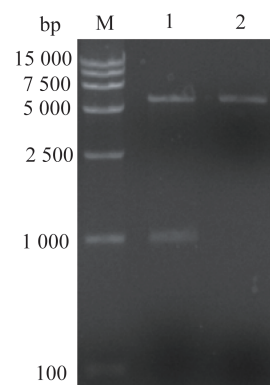


图 2 重组质粒 pET-32a-S10 双酶切鉴定

M. DL marker 15000; 1. 重组质粒 pET-32a-S10 双酶切产物; 2. pET-32a (+) 双酶切产物

Fig. 2 Restriction map of recombinant plasmid pET-32a-S10

M. DL marker 15000; 1. restriction products of recombinant plasmid pET-32a-S10; 2. restriction products of pET-32a (+)

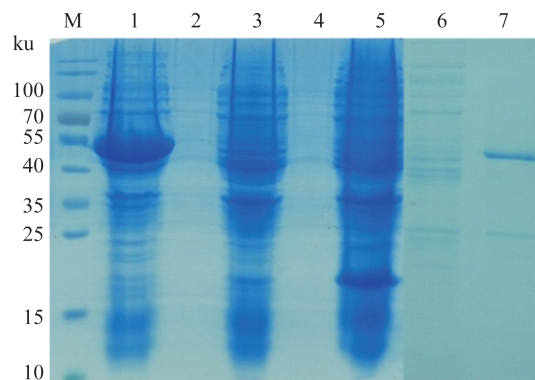
### 2.3 重组表达载体的诱导表达和目的蛋白可溶性分析

经 SDS-PAGE 分析诱导表达的重组蛋白显示,重组质粒 pET-32a-S10 菌株在 53 ku 处出现一条目的条带 (图 3), pET-32a (+) 载体的 His-标签蛋白与目的蛋白一起融合表达。

取超声波破碎液离心后的上清溶液 A 和 6M 尿素溶解沉淀的溶液 B,经 SDS-PAGE 分析表明,融合标签蛋白的目的蛋白主要存在 B 溶液中,即目的蛋白主要存在于包涵体中 (图 3)。

### 2.4 优化后的表达条件

通过对重组质粒 pET-32a-S10 诱导表达的条件进行优化,最后得出当诱导表达条件:OD<sub>600</sub> 为 0.8 左右, IPTG 终浓度为 1.5 mmol/L 时,其表达条件最佳,目的蛋白的含量可达 60% 以上。



**图3 SDS-PAGE 胶分析表达产物及目的蛋白可溶性**  
M. 低分子量蛋白质 marker; 1. 诱导 pET-32a-S10 的菌体; 2. 诱导 pET-32a-S10 的上清; 3. 未诱导 pET-32a-S10 的菌体; 4. 未诱导 pET-32a-S10 的上清; 5. 诱导 pET-32a(+) 的菌体; 6. 上清溶液 A; 7. 尿素溶解沉淀的溶液 B

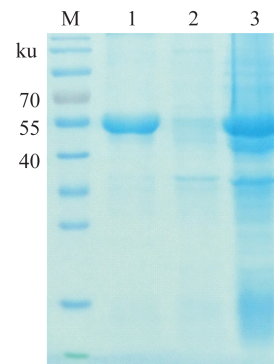
**Fig.3 Analysis of the expressed product and the solubility of the objective protein by SDS-PAGE**

M. low molecular weight protein marker; 1. the bacteria of induced by pET-32a-S10; 2. the supernatant of induced by pET-32a-S10; 3. the bacteria of did not induce by pET-32a-S10; 4. the supernatant of did not induce by pET-32a-S10; 5. the bacteria of induced by pET-32a(+); 6. solution A of supernatant; 7. solution B of sediment with urea dissolved

## 2.5 目的蛋白纯化结果

在优化后的表达条件下,大量诱导表达目的蛋白,并纯化目的蛋白。经 SDS-PAGE 电泳分析(图4),纯化的目的蛋白在约53 ku处呈现单一

条带,无杂带;在通过 Ni 柱的流穿液中只有微量目的蛋白;用 BandScan 5.0 软件对电泳结果分析,菌体总蛋白量中含重组目的蛋白约 59.4%,而通过 Ni 柱纯化后的目的蛋白纯度高达 97.4%。



**图4 纯化产物的 SDS-PAGE 分析**

M. 低分子量蛋白质 marker; 1. 纯化的 S10 蛋白; 2. 过 Ni 柱流穿液; 3. 菌体总蛋白

**Fig.4 SDS-PAGE of purified product**

M. low molecular weight protein marker; 1. the purified protein; 2. liquid flow in Ni column; 3. the whole thallus proteins

## 2.6 血清抗体效价

用间接 ELISA 法对 S10 基因编码重组蛋白鼠抗血清进行效价测定,结果表明该抗体效价约为  $1:10^6$ (表1)。

**表1 ELISA 测定血清抗体效价 ( $OD_{450}$ )**  
**Tab.1 ELISA titer of serum antibody ( $OD_{450}$ )**

|                                | 抗体稀释度 antibody dilution |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                    |
|--------------------------------|-------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
|                                | 1:10 <sup>1</sup>       | 1:10 <sup>2</sup> | 1:10 <sup>3</sup> | 1:10 <sup>4</sup> | 1:10 <sup>5</sup> | 1:10 <sup>6</sup> | 1:10 <sup>7</sup> | 1:10 <sup>8</sup> | 1:10 <sup>9</sup> | 1:10 <sup>10</sup> |
| P                              | 1.402 0                 | 1.038 9           | 1.005 0           | 0.980 3           | 0.858 6           | 0.361 0           | 0.125 9           | 0.077 5           | 0.068 1           | 0.079 1            |
| P <sub>平</sub>                 | 1.398 0                 | 1.036 2           | 0.989 3           | 0.867 4           | 0.772 7           | 0.368 9           | 0.123 3           | 0.086 8           | 0.065 8           | 0.068 1            |
| N                              | 1.400 0                 | 1.037 6           | 0.997 2           | 0.923 8           | 0.815 7           | 0.365 0           | 0.124 6           | 0.082 2           | 0.067 0           | 0.073 6            |
| N <sub>平</sub>                 | 0.455 7                 | 0.327 6           | 0.250 8           | 0.160 0           | 0.081 0           | 0.066 6           | 0.066 7           | 0.059 6           | 0.064 6           | 0.072 7            |
| P <sub>平</sub> /N <sub>平</sub> | 0.443 4                 | 0.331 3           | 0.254 8           | 0.137 4           | 0.074 5           | 0.069 4           | 0.069 9           | 0.059 3           | 0.063 4           | 0.091 7            |
|                                | 0.449 6                 | 0.329 4           | 0.252 8           | 0.148 7           | 0.077 8           | 0.068 0           | 0.068 3           | 0.059 5           | 0.064 0           | 0.082 2            |
|                                | 3.11                    | 3.15              | 3.94              | 6.21              | 10.49             | 5.37              | 1.82              | 1.38              | 1.05              | 0.90               |

注:“P”是阳性血清  $OD_{450}$  值;“N”是阴性血清  $OD_{450}$  值;“P<sub>平</sub>”是阳性血清  $OD_{450}$  平均值;“N<sub>平</sub>”是阴性血清  $OD_{450}$  平均值;“P<sub>平</sub>/N<sub>平</sub>”是阳性血清  $OD_{450}$  平均值和阴性血清  $OD_{450}$  平均值的比值

Notes:“P” means positive serum  $OD_{450}$ ;“N” means negative serum  $OD_{450}$ ;“P<sub>平</sub>” means average of positive serum  $OD_{450}$ ;“N<sub>平</sub>” means average of negative serum  $OD_{450}$ ;“P<sub>平</sub>/N<sub>平</sub>” means ratio of average of positive and negative serum  $OD_{450}$

## 2.7 Western blot 分析多抗血清特性

由免疫昆明小白鼠制备的多克隆抗体经 Western blot 分析,加入纯化的 GCRV-HZ08 毒株的孔道中,在约 38 ku 处出现一条特异性条带,与病毒 S10 基因自身编码的蛋白大小一致;在加入

纯化的重组蛋白的孔道中,在约 53 ku 处出现一条特异条带,大小与预期一致;而加入空载体菌体的孔道中没有任何条带(图5)。

## 2.8 间接免疫荧光分析多抗血清特性

IFA 结果显示,制备的多克隆抗体能使感染



HZ08 毒株的 CIK 细胞产生特异性的荧光(图 6-a),而在未感染病毒的正常 CIK 细胞中观察不到荧光信号(图 6-b)。

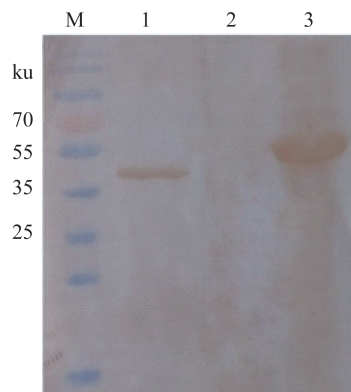


图 5 Western blot 分析 S10 编码蛋白抗血清特性

M. 低分子量蛋白质 marker; 1. 纯化的 HZ08 毒株; 2. pET-32a(+ )空载体; 3. 纯化的重组 S10 蛋白

Fig. 5 Analysis of the character of serum antibody against S10 encoded protein by Western blot

M. low molecular weight protein marker; 1. purified HZ08 strain; 2. pET-32a(+ ); 3. purified S10 encode recombinant protein

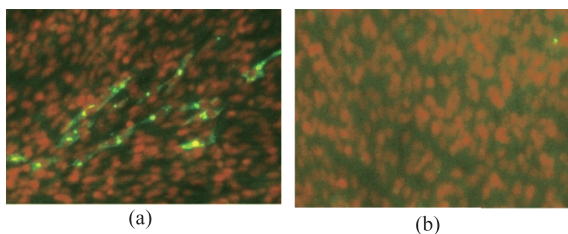


图 6 多克隆抗体的 IFA 鉴定

(a) 接种 HZ08 株的 CIK 细胞; (b) 正常 CIK 细胞

Fig. 6 Identification of IFA with polyclonal antibody

(a) CIK cells with HZ08 strain; (b) normal CIK cells

### 3 讨论

GCRV 引起的草鱼出血病发病率高,流行季节长,死亡量大,危害范围广,对我国草鱼养殖业的健康发展有严重阻碍作用<sup>[27]</sup>。通过本实验室近几年的流行病学调查发现,引起草鱼出血病的主要流行毒株是 GCRV-HZ08 株代表的 II 型毒株。GCRV-HZ08 株是 GCRV 的新成员,全基因组序列测定已经完成,部分分子生物学特性也通过分子生物信息软件分析得到了结果,但是对该毒株各基因节段及其编码的蛋白功能还没有进行系统研究。认识 GCRV 各节段基因及其编码蛋白的功能,不仅对该病毒的深入研究具有重要意

义,对草鱼出血病的疫苗、诊断试剂、药物等防控产品的开发具有更为重要的意义。

本研究构建了含有 GCRV-HZ08 株 S10 基因的重组载体 pET-32a-S10,该载体通过 IPTG 诱导表达可获得 S10 编码的重组蛋白。优化诱导表达条件后,目的蛋白表达量可达菌体总蛋白的 60% 以上,构建的原核表达质粒表达量高,操作简便,为 S10 编码蛋白功能的研究提供了丰富的材料。对表达的重组蛋白可溶性分析显示,该重组蛋白主要以包涵体形式存在,改变诱导条件也不能对该蛋白的可溶性产生显著影响,这可能主要与目的蛋白自身氨基酸的组成和标签蛋白有关<sup>[28]</sup>,而受表达条件的影响较小。将包涵体裂解后,通过 Ni 柱纯化、透析复性纯化后纯度可达到 97.4%,一般融合 His-Tag 标签蛋白的重组蛋白用咪唑洗脱纯度在 95% 以上,表明我们获得目的蛋白已经比较纯。用纯化蛋白免疫昆明小白鼠,制得多克隆抗体,通过间接 ELISA 检测抗体效价约为  $1:10^6$ ,相比 GCRV-HZ08 株 VP4(S6 编码)制备的多克隆抗体效价  $1:8\ 000$  和单克隆抗体效价  $1:720\ 000$  都高<sup>[2,7]</sup>,S10 编码蛋白能够诱导产生更高效价的抗体,说明 S10 编码蛋白免疫原性较强。通过 Western blot 分析和 IFA 检测发现,该多克隆抗体能够特异性识别 GCRV-HZ08 毒株,说明 S10 基因编码蛋白能在成熟的病毒粒子中稳定存在,表明 S10 基因编码蛋白为该病毒的结构蛋白,该结果与前期通过生物信息学分析所得 S10 基因编码蛋白可能为 GCRV-HZ08 毒株的非结构蛋白的结果<sup>[26]</sup>不一致。GCRV-HZ08 为一个新分离的毒株,与研究较为深入的 GCRV-873 株在基因组带型、基因组序列、致细胞病变、毒力等多方面存在较大的差异<sup>[1,3,26]</sup>,该毒株各节段基因及其编码蛋白的功能均未进行过系统研究,其可能的结构和功能,只是通过简单生物信息学分析,与其他已知功能和作用的基因及蛋白比较而获得的初步结果,真实性有待于通过实验来验证。本研究的通过实验分析发现,S10 基因编码蛋白为该病毒的结构蛋白,而不是非结构蛋白,其具体功能和作用有待于进一步深入研究。

### 参考文献:

- [1] Zhang C, Wang Q, Shi C B, *et al.* Isolation and identification of a grass carp reovirus isolate GCRV HZ08 [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(6): 1257 - 1263. [张超,王庆,石存斌,

- 等. 草鱼呼肠孤病毒 HZ08 株的分离鉴定. 中国水产科学, 2010, 17(6): 1257 - 1263. ]
- [ 2 ] Zeng W W, Wang Q, Zhang L S, *et al.* Prokaryotic expression and purification of VP4 protein of grass carp reovirus HZ08 strain and preparation of polyclonal antibody [ J ]. Chinese Journal of Biologicals, 2011, 24(12): 1482 - 1486. [ 曾伟伟, 王庆, 张乐生, 等. 草鱼呼肠孤病毒 HZ08 株 VP4 蛋白的原核表达、纯化及多克隆抗体的制备. 中国生物制品学杂志, 2011, 24(12): 1482 - 1486. ]
- [ 3 ] Wang Q, Zeng W 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.
- [ 4 ] Liu B Q. Development of a fluorescent quantitative polymerase chain reaction technique for detection of grass carp reovirus two strains [ D ]. Dalian: Dalian Ocean University, 2012. [ 刘宝芹. 两株草鱼呼肠孤病毒 FQ-PCR 方法的建立及其在病毒定量分析中的应用. 大连: 大连海洋大学, 2012. ]
- [ 5 ] Attoui H, Fang Q, Jaafar F M, *et al.* Common evolutionary origin of aquareoviruses and orthoreoviruses revealed by genome characterization of golden shiner reovirus, grass carp reovirus, striped bass reovirus and goldenidereovirus ( genus *Aquareovirus*, family Reoviridae ) [ J ]. Journal of General Virology, 2002, 83(8): 1941 - 1951.
- [ 6 ] Yan L M, Guo H, Sun X Y, *et al.* Characterization of grass carp reovirus minor coreprotein VP4 [ J ]. Virology Journal, 2012, 9(1): 89.
- [ 7 ] Zeng W W, Wang Q, Wang Y Y, *et al.* Preparation and identification of monoclonal antibody against grass carp reovirus HZ-08 VP4 protein [ J ]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(3): 450 - 455. [ 曾伟伟, 王庆, 王英英, 等. 草鱼呼肠孤病毒 HZ08 株 VP4 蛋白单克隆抗体的制备及鉴定. 水产学报, 2013, 37(3): 450 - 455. ]
- [ 8 ] Zhang L L, Shen J Y, Lei C F, *et al.* Expression of outer capsid protein VP5 of grass carp reovirus in *E. coli* and analysis of its immunogenicity [ J ]. Virology Sinica, 2009, 24(6): 545 - 551.
- [ 9 ] He Y Y, Xu H X, Yang Q, *et al.* The use of an *in vitro* microneutralization assay to evaluate the potential of recombinant VP5 protein as an antigen for vaccinating against grass carp reovirus [ J ]. Virology Journal, 2011, 8(1): 132.
- [ 10 ] Wang Y. cDNA cloning, expression of vp5 and vp7 genes and subcellular localization of VP5 and VP7 proteins in grass carp reovirus [ D ]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2011. [ 王雅. 草鱼呼肠孤病毒 vp5、vp7 基因 cDNA 的克隆、表达及 VP5、VP7 蛋白亚细胞定位研究. 湛江: 广东海洋大学, 2011. ]
- [ 11 ] Xie J G, Yan X Y, Jian J C, *et al.* Construction, transformation, and self-activity research of bait recombinant vector with vp5 gene [ J ]. Journal of Guangdong Ocean University, 2012, 32(3): 42 - 48. [ 谢吉国, 闫秀英, 简纪常, 等. 草鱼呼肠孤病毒 vp5 基因诱饵重组载体的构建、转化与自激活作用检测. 广东海洋大学学报, 2012, 32(3): 42 - 48. ]
- [ 12 ] Jian J C, Wang Y, Yan X Y, *et al.* Molecular cloning and prokaryotic expression of vp5 gene of grass carp reovirus strain GCRV096 [ J ]. Virus Genes, 2013, 47(3): 483 - 489.
- [ 13 ] Wang H J, Ye X, Tian Y Y, *et al.* Analysis of function and immunogenicity of GCRV-GD108 VP5 [ J ]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(1): 109 - 115. [ 王杭军, 叶星, 田园园, 等. 草鱼呼肠孤病毒 GCRV-GD108 株 VP5 蛋白功能及免疫原性分析. 水产学报, 2013, 37(1): 109 - 115. ]
- [ 14 ] Zhou Y. Study on immune efficacy of DNA vaccine with VP6 gene of grass carp reovirus [ D ]. Suzhou: Soochow, 2012. [ 周勇. 草鱼呼肠孤病毒 VP6 基因核酸疫苗免疫效果研究. 苏州: 苏州大学, 2012. ]
- [ 15 ] Li J. Immunogenicity of VP6 and NS38, and screening of the proteins that interacted with VP6 and NS38 in grass carp reovirus strain 096 [ D ]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2012. [ 李杰. 草鱼呼肠孤病毒 (GCRV096) VP6 和 NS38 蛋白的免疫原性及其相互作用蛋白的筛选. 湛江: 广东海洋大学, 2012. ]
- [ 16 ] Liu L, Xu S Y, Li H J, *et al.* Prokaryotic expression, purification and immune efficacy of VP6 protein of grass carp reovirus [ J ]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(3): 429 - 435. [ 刘林, 徐诗英, 李婧慧, 等. 草鱼出血病病毒 VP6 蛋白的原核表达、纯化及免疫效果. 水产学报, 2012, 36(3): 429 - 435. ]
- [ 17 ] Xue R Y, Liu L, Cao G L, *et al.* Oral vaccination of BacFish-vp6 against grass carp reovirus evoking antibody response in grass carp [ J ]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 34(1): 348 - 355.
- [ 18 ] Fang Q, Seng E K, Dai W, *et al.* Construction and co-expression of grass carp reovirus VP6 protein and enhanced green fluorescence protein in the insect cells [ J ]. Virology Sinica, 2007, 22(5): 397 - 404

- [19] Xiong L F. Cloning, expression of vp6 and ns38 genes and immunogenicity of VP6 and NS38 in grass carp reovirus [ D ]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2011. [熊玲芳. 草鱼呼肠孤病毒 vp6 和 ns38 基因的克隆、表达及 VP6 和 NS38 免疫原性研究. 湛江: 广东海洋大学, 2011.]
- [20] Zhang L L, Shen J Y, Lei C F, *et al.* High level expression of grass carp reovirus VP7 protein in prokaryotic cells [ J ]. *Virology Sinica*, 2008, 23 ( 1 ): 51 - 56.
- [21] Xu S Y, Liu L, Li J H, *et al.* Construction and immune efficacy studies on DNA vaccine with VP7 gene of grass carp reovirus [ J ]. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35 ( 11 ): 1694 - 1700. [徐诗英, 刘林, 李婧慧, 等. 草鱼呼肠孤病毒 VP7 基因核酸疫苗的构建及免疫效果. 水产学报, 2011, 35 ( 11 ): 1694 - 1700.]
- [22] Wei X C, Yang Z X, Wang Y, *et al.* Artificial synthesis and prokaryotic expression of grass carp reovirus VP7 protein gene [ J ]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2013, 44 ( 3 ): 645 - 650. [韦先超, 杨泽晓, 王印, 等. 草鱼出血病病毒 VP7 蛋白基因的人工合成与原核表达. 海洋与湖沼, 2013, 44 ( 3 ): 645 - 650.]
- [23] Shao L, Fan C, Maj E, *et al.* Molecular characterization of nonstructural protein NS38 of grass carp reovirus [ J ]. *Virology Sinica*, 2010, 25 ( 2 ): 123 - 129.
- [24] Fan C, Shao L, Fang Q. Characterization of the nonstructural protein NS80 of grass carp reovirus [ J ]. *Archives of Virology*, 2010, 11 ( 155 ): 1755 - 1763.
- [25] Cai L, Sun X Y, Shao L, *et al.* Functional investigation of grass carp reovirus nonstructural protein NS80 [ J ]. *Virology Journal*, 2011, 8 ( 1 ): 168.
- [26] Zhang C. Isolation, identification of grass carp reovirus HZ08 and molecular characteristics of its complete genome [ D ]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2010. [张超. 草鱼呼肠孤病毒 HZ08 株的分离鉴定与全基因组分子特征分析. 上海: 上海海洋大学, 2010.]
- [27] Wang C Q, Wang H Y. Grass carp hemorrhage prevention measures [ J ]. *Heilongjiang Animal Science And veterinary Medicine*, 2010 ( 14 ): 62 - 63. [王春清, 王海玉. 草鱼出血病的防治措施. 黑龙江畜牧兽医, 2010 ( 14 ): 62 - 63.]
- [28] Su Y. Studies on soluble expression of recombinant proteins in *Escherichia coli* [ D ]. Shanghai: East China Normal University, 2007. [苏裕. 大肠杆菌中重组蛋白可溶性表达的研究. 上海: 华东师范大学, 2007.]



## Preparation and characteristics of polyclonal antibody against S10 encoded protein of grass carp reovirus HZ08 strain

LI Yonggang<sup>1,2</sup>, ZENG Weiwei<sup>1</sup>, WANG Qing<sup>1</sup>, YIN Liang<sup>1,2</sup>, WANG Yingying<sup>1</sup>,  
LIANG Hongru<sup>1</sup>, LIU Chun<sup>1</sup>, SHI Cunbin<sup>1</sup>, WU Shuqin<sup>1\*</sup>

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

**Abstract:** To explore the probable function of segment 10 (S10) encoded protein of grass carp reovirus (GCRV) HZ08 strain, the ORF of S10 gene was amplified and cloned into the prokaryotic expression vector pET-32a(+), and the obtained recombinant expression vector was named pET32a-S10. The recombinant vectors were transformed into BL21 competent cells. The *Escherichia coli* containing recombinant vector expressed fusion protein of approximately 53 ku after induction by IPTG. The recombinant protein was purified through Ni-chelating affinity chromatography, and the purity was above 97.4% explained by SDS-PAGE gel scan analysis. Polyclonal antibody against S10 encoded protein was generated by immunization of female Kunming mice with purified recombined protein. The antibody titers in sera of the immunized mice were detected by ELISA and the specificity of the antibody was identified by Western blot and indirect immunofluorescence assay (IFA). The results showed that the antibody titer cloning is  $1:10^6$  and can specially identify the GCRV-HZ08. This means the S10 encoded protein is one of the structural protein of GCRV-HZ08.

**Key words:** grass carp reovirus; HZ08 strain; S10 encoded protein; polyclonal antibody

**Corresponding author:** WU Shuqin. E-mail: wushuqin001@21cn.com