

文章编号: 1000-0615(2016)03-0355-08

DOI: 10.11964/jfc.20151110160

II型草鱼呼肠孤病毒VP4、VP35蛋白 多克隆抗体制备及其免疫原性分析

宗乾坤¹, 张也¹, 吕利群^{1,2*}

(1. 上海海洋大学水产与生命学院, 农业部淡水种质资源重点实验室, 上海 201306;

2. 淡水水产健康养殖湖北省协同创新中心, 湖北武汉 430070)

摘要: 为建立针对II型草鱼呼肠孤病毒(GCRV)的血清学检测方法, 分别构建了GCRV JX02株外衣壳蛋白VP4、VP35的原核重组表达质粒PGEX-4T-3-S6、PGEX-4T-3-S11, 用纯化的重组蛋白rVP4、rVP35分别免疫小鼠制得相应的多克隆抗体, 用间接ELISA方法测定2种抗体的效价, 用Western Blot鉴定抗体的特异性。SDS-PAGE分析细菌表达的rVP4、rVP35大小分别约为98ku和61ku, 且都主要以包涵体的形式存在; 间接ELISA方法测定制备的抗体效价分别约为 1.4×10^5 和 $1:10^6$; Western Blot结果显示, 制备的2种多克隆抗体都既能够识别原核表达的重组蛋白, 又能够识别JX02毒株上的对应蛋白, 并且发现感染JX02的草鱼血清中存在结合VP4、VP35的相应抗体。本研究制备的2种多克隆抗体都具有良好的生物学特性, 并且这2种重组蛋白作为相应抗体捕获原可以用于通过检测抗病毒抗体来确诊草鱼是否感染II型GCRV。本研究将为GCRV主要流行株血清学检测方法的建立以及VP4、VP35蛋白相关功能研究奠定基础。

关键词: II型草鱼呼肠孤病毒; 原核表达; VP4蛋白; VP35蛋白; 多克隆抗体

中图分类号: Q 511; S 965.112

文献标志码: A

草鱼呼肠孤病毒(grass carp reovirus, GCRV)是我国科学家分离的第一株鱼类病毒, 隶属于水生呼肠孤病毒属(*Aquareovirus*)^[1], 该病毒能够引起我国主要的淡水养殖品种草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)在育种阶段暴发出血病, 并且致死率高, 严重影响我国水产事业的健康发展^[1-4]。草鱼呼肠孤病毒粒子呈二十面体对称, 具有双层衣壳, 无囊膜, 基因组由11条双链RNA组成^[5]。目前已有30多个分离株被报道^[6], 但是不同分离株在基因组序列、鱼体致病力、细胞病变等方面有较大差异^[7-12], 根据基因序列差异可以将其大致分为3个基因型^[12]: I型代表株为GCRV-873、II型代表株为GCRV-HZ08、III型代表株为GCRV-104。GCRV JX02株是本实验室2011年从江西南昌草鱼养殖区分离得到的一株II型GCRV

毒株, 经鉴定其与HZ08株基因序列同源性高达98%^[13]。当前国内主要针对I型GCRV开展研究^[14], 研究也主要是关于各基因节段及其编码蛋白的功能和作用, 而对于II型GCRV却知之甚少。根据全国主要草鱼养殖区流行病学调查结果表明, 目前II型GCRV是我国主要的流行株^[15], 因此当前急需开展针对II型GCRV的研究, 为临床的诊断和防治提供理论依据。

近几年有多个II型GCRV毒株陆续被报道, 作为一个新的分离株, 当前研究主要集中在基因组测序方面^[10-11], 而对于基因编码蛋白的功能和作用还没有进行深入研究。在II型GCRV病毒检验检疫中, 临床上通常用核酸诊断技术来快速筛查, 但是免疫学技术往往在病毒感染的确诊上发挥重要作用, 目前针对II型GCRV的免疫

收稿日期: 2015-11-16 修回日期: 2016-01-14

资助项目: 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-46-12)

通信作者: 吕利群, E-mail: lqlv@shou.edu.cn

学技术只有曾伟伟等^[6, 16]在HZ08株中有报道。GCRV JX02株S6基因编码的VP4蛋白和S11基因编码的VP35蛋白可能为病毒的外壳蛋白^[6, 11, 17], 外壳蛋白通常为病毒诱导宿主产生适应性免疫的主要蛋白, 所以这2种蛋白可用于病毒的免疫学检测。本实验对草鱼呼肠孤病毒JX02株S6基因编码的VP4蛋白和S11基因编码的VP35蛋白进行了原核表达、蛋白纯化以及多克隆抗体的制备和鉴定, 运用制备的抗草鱼IgM单克隆抗体进行针对病毒的血清学检测, 为GCRV主要流行株血清学检测方法的建立以及VP4、VP35蛋白相关功能研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

GCRV JX02毒株由本实验室分离并保存^[13]; Trizol Reagent购自英潍捷基(上海)贸易有限公司; PCR相关试剂、PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit、限制性内切酶(*Bam*H I, *Eco*R I 和*Xho*L酶)和T4 DNA连接酶均购自宝生物工程(大连)有限公司; Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System和Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System购自普洛麦格(北京)生物技术有限公司; 大肠杆菌DH5 α 和BL21(DE3)感受态购自天根生化科技(北京)有限公司; 6周龄ICR小鼠购自上海实验动物研究中心; 鼠抗草鱼IgM单克隆抗体由本实验室先前制备并保存, 该抗体能够特异性识别草鱼IgM的CH₂恒定区; 透析袋、ELISA试剂盒、HRP标记的羊抗鼠IgG等蛋白相关试剂均购自上海威奥生物科技有限公司; PGEX-4T-3 Vector购自上海古朵生物科技有限公司。

1.2 S6、S11基因ORF框的扩增

分别根据II型GCRV HZ08株S6和S11 ORF框的基因序列并使用Primer Premier 5.0软件设计2对引物(S6上游: 5'-CGCGGATCCATGGGAAA CGTCCAGACGAACA-3'; 下游: 5'-CCGCT CGAGGGCCAAGACGGAGGAGGCCAG-3', 并在上下游引物序列中分别插入*Bam*H I 和*Xho*L酶切位点; S11上游: 5'-CCGGAATTCATGGAACC AGCAAAACCACTG-3'; 下游: 5'-CCGCT CGAGGGCCACTGTCCCTGGATCTCAGGT-3',

并在上下游引物序列中分别插入*Eco*R I 和*Xho*L酶切位点), 用TRIzol法^[19-20]提取感染JX02毒株的CIK总RNA, 用1st Strand cDNA合成试剂盒反转录为cDNA并以此为模板分别对S6、S11基因进行PCR扩增, PCR产物用1%琼脂糖凝胶电泳检测后, 用PCR产物纯化回收试剂盒分别对目的片段进行纯化回收。

1.3 VP4、VP35原核表达质粒的构建

将纯化回收的PCR产物和PGEX-4T-3空质粒分别在相应温度中进行双酶切处理(体系: *Eco*R I 1 μ L, 10 \times buffer 3 μ L, PCR纯化回收产物 \leq 200 ng, 加灭菌水至30 μ L; 质粒体系: *Eco*R I 1 μ L, 10 \times buffer 5 μ L, 质粒 \leq 1 μ g, 加灭菌水到50 μ L)酶切1.5 h后再用PCR产物纯化回收试剂盒纯化回收, 用T4 DNA连接酶将S6和S11目的片段分别和PGEX-4T-3空质粒进行连接(T4 Liqase 1 μ L, T4 Liqase buffer 2.5 μ L, PGEX-4T-3100 ng, S6目的片段400 ng, S11目的片段200 ng, 加灭菌水至25 μ L), 16 $^{\circ}$ C连接过夜后将产物转化到DH5 α 大肠杆菌中, 菌落PCR筛选出阳性克隆, 摇菌扩增并提取重组质粒, 经测序鉴定, 分别命名为PGEX-4T-3-S6、PGEX-4T-3-S11。

1.4 诱导表达及可溶性分析

将测序所得的PGEX-4T-3-S6、PGEX-4T-3-S11重组质粒分别转化到BL21大肠杆菌中, 分别取100 μ L转化菌液涂布到含氨苄西林(Ampr⁺)的LB固体培养板上, 挑取鉴定为阳性的菌落分别接种到5 mL LB (Ampr⁺)液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C摇床过夜培养。再将菌液按照1:100的比例转移至新鲜的LB(Ampr⁺)液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C, 150 r/min恒温摇床培养5 h。加入IPTG至其终诱导浓度为0.3 mmol/L, 诱导4 h后收集表达细菌, 4 $^{\circ}$ C, 8000 r/min离心20 min; 用1 \times PBS溶液洗涤2次, 再用适量1 \times PBS重悬沉淀, 超声破碎20 min (6s/6s)至溶液澄清。4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min离心10 min后分别收集上清和沉淀, 进行SDS-PAGE电泳来分别鉴定2种重组蛋白的可溶性。

1.5 诱导表达条件的优化

分别将含有PGEX-4T-3-S6、PGEX-4T-3-S11重组质粒的菌液按照1:100的比例转移至40 mL新鲜的LB(Ampr⁺)液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C, 150 r/min恒温摇床培养5 h。加入IPTG进行梯度

诱导(其中诱导rVP4的IPTG终浓度分别为0.1、0.3、0.5和0.7 mmol/L,而诱导rVP35的IPTG终浓度分别为0.1、0.3、0.5、0.7和0.9 mmol/L),诱导4 h后取10 mL菌液,4 °C,8000 r/min离心20 min收集菌体,经SDS-PAGE分析不同浓度诱导下重组蛋白的表达量并确定最佳诱导条件时的IPTG浓度。

1.6 目的蛋白的纯化

在优化的条件下大量诱导表达2种目的蛋白,然后分别用2、4、6、8 mol/L的尿素溶液对沉淀进行梯度重悬、洗涤处理,每次洗涤完后4 °C 8500 r/min离心20 min重新收集沉淀,接着将洗脱下的目的蛋白分别装入透析袋进行梯度透析,依次放入终浓度为6、4、2和0 mol/L尿素的PBS溶液中透析,每个浓度透析5 h。透析后的蛋白溶液采用BCA法微量蛋白浓度测量试剂盒测定其浓度,蛋白分装后放在-80 °C保存。

1.7 多克隆抗体的制备

将2种已纯化好的目的蛋白分别免疫小鼠,200 µg/只。第1次免疫采用腹腔内注射,抗原与等体积的弗氏完全佐剂充分混匀后免疫;第2次免疫在第1次免疫14 d后进行,仍采用腹腔内注射,抗原与等体积的弗氏不完全佐剂充分混匀乳化后再对小鼠进行免疫。第3次免疫在第1次免疫21天后进行,主要采用皮下注射的方式,并且是不加佐剂的纯抗原,1周后可以第4次免疫,免疫条件同前一次。在第4次免疫3 d后,可眼角采血并检测血清是否为阳性。

1.8 血清抗体特异性分析

分别用纯化好的VP4和VP35重组蛋白以及感染GCRV JX02病毒的CIK制备上样样品,进行SDS-PAGE凝胶电泳,然后采用电转膜法(100V,60min)转至聚偏二氟乙烯膜上。用15 mL含5%牛奶的PBST溶液室温震荡封闭4 h,再分别用自己制备的多抗血清作为一抗(稀释度为1:3000)室温震荡封闭0.5 h后4 °C过夜。用PBST清洗5次,每次5 min。再用HRP标记的山羊抗小鼠的IgG抗体作为二抗(稀释度:1:2000)室温震荡封闭2 h,用PBST清洗3次,每次10 min,最后将聚偏二氟乙烯膜放入DAB显色液中显色,目的条带清晰后用ddH₂O终止反应。

1.9 基于S6、S11的病毒诱导抗体的免疫学检测

取实验室感染的不同批次、不同时间及来自不同地区样品鱼的血液,其中感染JX02病毒的草鱼血清为实验组,而正常未感染病毒的草鱼血清为阴性对照组。分别用已纯化的rVP4、rVP35蛋白作为上样样品进行电泳,并以抽取部分样本血液的血清作为一抗(稀释度:1:500)室温震荡封闭0.5 h后4 °C过夜。用PBST清洗5次,每次5 min。用抗草鱼IgM的单抗作为二抗(稀释度为1:2000)。用PBST清洗5次,每次5 min。接着用HRP标记的山羊抗鼠IgG抗体作为三抗,用PBST清洗3次,每次10 min,最后将聚偏二氟乙烯膜放入DAB显色液中显色,直到目的条带清晰为止。

2 结果

2.1 S6、S11基因ORF框的扩增

为获得纯化的VP4、VP35重组蛋白用于抗体捕获,采取利用原核表达载体在细菌中高效表达重组蛋白VP4和VP35。根据设计的引物并以本实验室提取的GCRV JX02株基因组cDNA作为扩增模板,运用PCR技术分别成功获得S6、S11基因ORF片段。PCR产物经过电泳分别扩增出大小为1954和933 bp的特异性条带,结果与预期一致(图1)。

2.2 原核表达载体的构建

使用DNAssist软件对测序结果进行比对,结

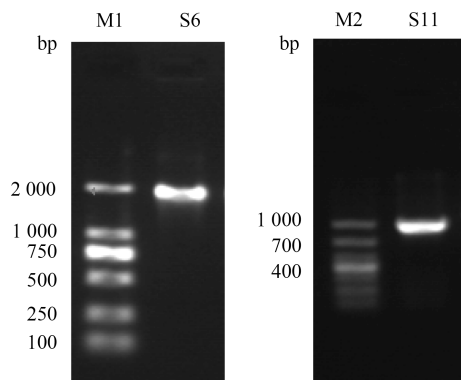


图1 S6和S11基因PCR扩增产物电泳图

M1.标准物质2000; M2.标准物质1000

Fig. 1 Electrophoretic profile of PCR products of S6 and S11 genes

M1.marker 2000; M2.marker 1000

果表明克隆质粒PGEX-4T-3-S6和PGEX-4T-3-S11都构建正确,将这2种重组质粒分别转化进大肠杆菌后可以用于诱导表达重组蛋白rVP4、rVP35,即GST-VP4和GST-VP35融合蛋白。

2.3 重组蛋白rVP4、rVP35的诱导表达及可溶性分析

SDS-PAGE结果显示,经IPTG诱导的菌体沉淀分别在98和61 ku处出现一条明显的目的条带,而在未经IPTG诱导的对照菌中不存在该目的条带(图2)。由于目的蛋白rVP4和rVP35都主要存在于沉淀中,所以本实验揭示目的蛋白rVP4和rVP35都主要是以包涵体的形式存在。

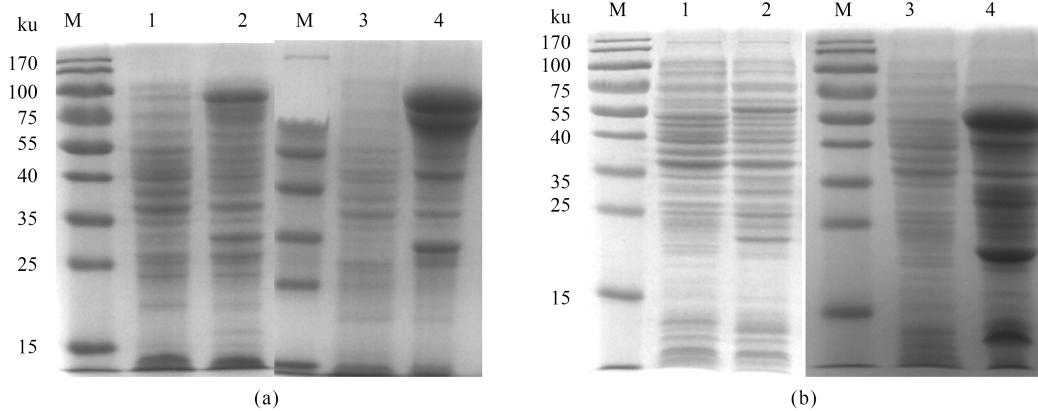


图2 重组蛋白rVP4(a)及rVP35(b)的诱导表达及可溶性分析

M. 蛋白质标准物质; 1. 未诱导细菌沉淀; 2. 诱导细菌沉淀; 3. 诱导细菌超声破碎后的上清; 4. 诱导细菌超声破碎后的沉淀

Fig. 2 Induced expression and solubility analysis of rVP4 (a) and rVP35 (b) protein

M. protein marker; 1. the precipitate of uninduced bacterial control; 2. the precipitate of induced bacterial control; 3. the supernatant of induced bacteria after ultrasonic; 4. the precipitate of induced bacteria after ultrasonic

光度法测定其浓度分别约为2和3 mg/mL。SDS-PAGE结果分析显示, rVP4样品经过透析后目的条带单一且显著,几乎没有了杂带(图4-a),而透析后的rVP35样品相比透析前杂带大量减少,且以目的条带为主,表明纯化的效果较好(图4-b)。

2.6 多克隆抗体的制备及其特异性分析

Western Blot结果显示, rVP4样品中出现了大小约为98 ku的目的条带,病毒蛋白样品中出现了大小约为72 ku的单一一条带,这与VP4大小一致(图5-a); rVP35样品中出现了大小约为61ku的目的条带,病毒蛋白样品中出现大小约为35ku的单一一条带,这与VP35大小一致(图5-b),以上结果表明制备的anti-VP4和anti-VP35多克隆抗体都可以与对应的重组蛋白产生特异性免疫反应,同

2.4 rVP4和rVP35表达条件的优化

SDS-PAGE结果对比发现,当IPTG浓度为0.1 mmol/L时rVP4和rVP35的目的条带都较为明显,证明这2种重组蛋白都能达到较高的表达量;而随着IPTG浓度提高后目的条带都没有明显的变化,证明这2种重组蛋白表达量在不同浓度IPTG诱导下并没有发生显著性变化,所以根据本实验室之前的蛋白诱导经验,将rVP4和rVP35的IPTG诱导浓度都定为0.3 mmol/L即能够达到很好的诱导效果(图3)。

2.5 目的蛋白rVP4和rVP35的纯化

纯化后的重组蛋白rVP4和rVP35用紫外吸光

时也能够特异性识别感染CIK中GCRV JX02病毒粒子上的对应蛋白且条带单一。间接ELISA方法测定制备的anti-VP4和anti-VP35抗体效价分别约为 $1:4 \times 10^5$ 、 $1:10^6$,表明制备的这2种多克隆抗体的效价较高。

2.7 基于rVP4和rVP35的病毒诱导抗体的免疫学检测

Western Blot检测结果显示, rVP4样品中的实验组(一抗为感染病毒的鱼血清)在约98 ku处存在目的条带,而阴性对照组(一抗为健康鱼血清)没有出现目的条带(图6-a)。同样rVP35样品中的实验组(一抗为感染病毒的鱼血清)在约61 ku处存在目的条带,而阴性对照组(一抗为健康鱼血清)没有出现目标条带(图6-b)。以上结果证明了rVP4和

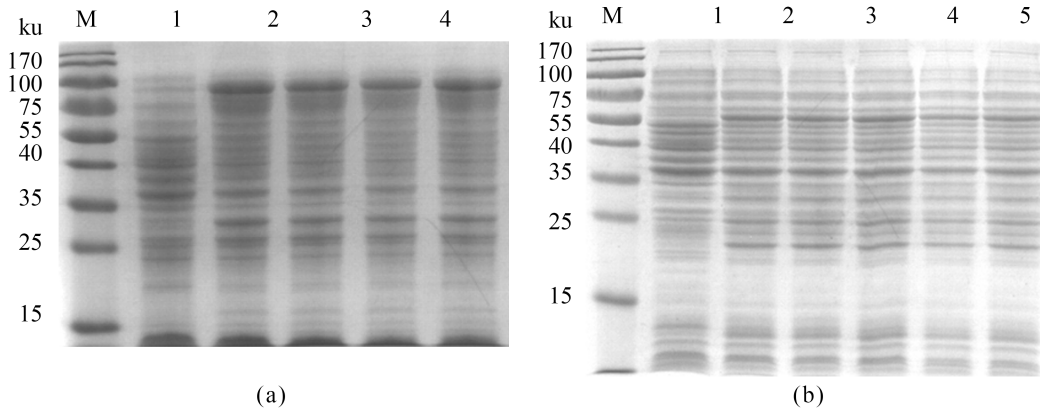


图 3 不同浓度IPTG对rVP4(a)及rVP35(b)的诱导效果

M. 蛋白质标准物质; 1. 未诱导菌体的沉淀; 2. 0.1 mmol/L浓度诱导的菌体沉淀; 3. 0.3 mmol/L浓度诱导的菌体沉淀; 4. 0.5 mmol/L浓度诱导的菌体沉淀; 5. 0.7 mmol/L浓度诱导的菌体沉淀

Fig. 3 Effect of IPTG concentration on the expression of rVP4 (a) and rVP35 (b)

M. protein marker; 1. the precipitate of uninduced bacteria; 2. the precipitate of bacteria induced by 0.1 mmol/L IPTG; 3. the precipitate of bacteria induced by 0.3 mmol/L IPTG; 4. the precipitate of bacteria induced by 0.5 mmol/L IPTG; 5. the precipitate of bacteria induced by 0.7 mmol/L IPTG

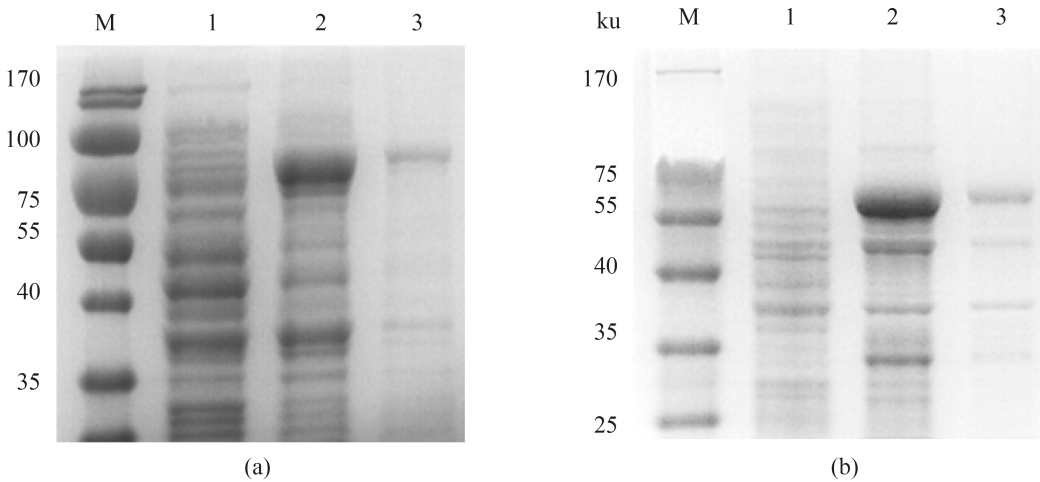


图 4 rVP4 (a)及rVP35 (b)纯化产物的SDS-PAGE分析

M. 蛋白标准物质; 1. 未诱导的沉淀; 2. 0.3 mmol/L浓度诱导的沉淀; 3. 透析后的样品

Fig. 4 SDS-PAGE of purified rVP4 (a) and rVP35 (b)

M. protein marker; 1. the precipitate of uninduced bacteria; 2. the precipitate of bacteria induced with 0.3 mmol/L IPTG; 3. purified sample after dialysis

rVP35都具有病毒粒子相应衣壳蛋白一样的免疫原性, 初步判断都可以用于作为捕获抗原来检测草鱼体内的相应抗体。

3 讨论

GCRV被认为是我国草鱼养殖中危害最大的病毒性病原, 因其引起的草鱼出血病发病率高, 流行季节长, 致死率高, 严重影响了我国草鱼养殖业的健康发展^[2, 4]。最新的流行病学调查发现, 引起我国草鱼出血病的主要流行毒株

是以GCRV HZ08株为代表的II型毒株, 并且该毒株和其他毒株在基因组序列、毒力、细胞培养特性等方面均存在较大差异^[7-11]。相比研究较为深入的GCRV-873株而言, II型GCRV毒株作为GCRV的新成员, 其各节段基因及其编码蛋白的功能均未进行过深入研究, 当前研究主要是通过分子生物学分析以及与其他已知功能和作用的基因及蛋白比较来推测其编码蛋白可能的结构和功能, 但这些推测需要更多的实验来验证其真实性。针对II型GCRV各基因节段及其编码蛋白功能的研究不仅有助于对该病毒的

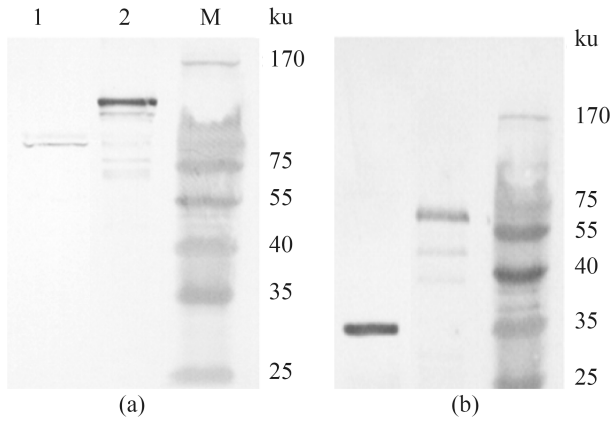


图5 Western Blot检测rVP4 (a)及rVP35 (b)重组蛋白

M. 蛋白质标准物质; 1. 病毒蛋白; 2. 重组蛋白

Fig. 5 Western Blot detection of rVP4 (a) and rVP35 (b)

M. protein marker; 1. virus particle sample; 2. recombinant protein

深入了解, 而且能够为一线草鱼出血病的诊断及防治提供理论指导。传统的核酸诊断技术在病毒检测中使用较多, 但由于其高灵敏性易产生假阳性。杨倩等^[18]制备了针对873株草鱼呼肠孤病毒的单克隆抗体, 并利用该抗体建立了免疫

学检测方法, II型GCRV报道中只见到曾伟伟等^[16]针对HZ08株草鱼呼肠孤病毒VP4蛋白制备了相应的单克隆抗体, 却并没有针对II型GCRV的免疫学诊断技术。

本研究分别克隆获得了负责编码GCRV JX02株外衣壳蛋白的S6、S11基因, 并且成功构建到原核表达载体上, 通过IPTG诱导、纯化获得了这2种重组蛋白。SDS-PAGE分析显示, 这2种重组蛋白都主要以包涵体的形式存在, 用纯化蛋白分别免疫小鼠, 制得相应的多克隆抗体, 通过间接检测抗体效价分别约为 $1:4 \times 10^5$ 、 $1:10^6$, S11编码蛋白能够诱导产生更高效价的抗体, 说明S11编码蛋白免疫原性较强。Western Blot结果显示, 制备的2种多克隆抗体都既能够识别原核表达的重组蛋白, 也能够识别JX02毒株上的对应蛋白, 并且发现感染JX02的草鱼血清中存在结合VP4、VP35的相应抗体, 说明本实验制备的多克隆抗体具有良好的生物学特性, 并且这2种重组蛋白作为相应抗体捕获原可以用于确诊草鱼是否感染II型GCRV。本研究将为GCRV主要流行株血清学检测方法的建立以及VP4、VP35

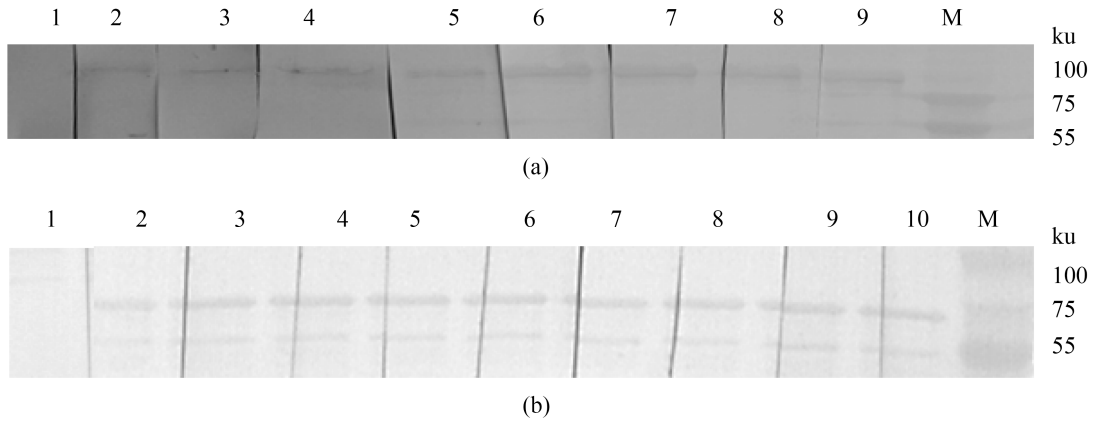


图6 基于rVP4 (a)及rVP35(b)的Western Blot检测

M. 标准物质; 1. 阴性对照组; 2-10. 实验组

Fig. 6 Western Blot clinical test of rVP4 (a) and rVP35 (b)

M. marker; 1. negative control; 2-10. positive control

蛋白相关功能研究奠定了基础。

参考文献:

[1] 张超, 王庆, 石存斌, 等. 草鱼呼肠孤病毒HZ08株的分离鉴定[J]. 中国水产科学, 2010, 17(6): 1257-1263.
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 (in Chinese).

[2] 王方华, 李安兴. 草鱼病毒性出血病研究进展[J]. 南方水产, 2006, 2(3): 66-71.

Wang F H, Li A X. Advances in research of hemorrhage disease of grass carp [J]. South China Fisheries Science, 2006, 2(3): 66-71 (in Chinese).

- [3] 马贵华, 陈道印, 刘六英, 等. 草鱼出血病的免疫学研究进展[J]. 渔业现代化, 2008, 35(1): 45–49.
Ma G H, Chen D Y, Liu L Y, *et al.* The study situation of the immunology of grass carps toxic bleeding disease [J]. Fishery Modernization, 2008, 35(1): 45–49 (in Chinese).
- [4] Zhang Q Y, Ruan H M, Li Z Q, *et al.* Detection of grass carp hemorrhage virus(GCRV) from vietnam and comparison with GCHV strain from China [J]. High Technology Letter, 2003, 9(2): 7–13.
- [5] 曾伟伟, 王庆, 张超, 等. 草鱼呼肠孤病毒HZ08株S4全基因序列分析[J]. 生物学杂志, 2012, 29(2): 12–17.
Zeng W W, Wang Q, Zhang C, *et al.* Molecular analysis of grass carp reovirus HZ08 strain genome segment 4 [J]. Journal of Biology, 2012, 29(2): 12–17 (in Chinese).
- [6] 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[J]. 中国生物制品学杂志, 2011, 24(12): 1482–1485.
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): 1482–1485 (in Chinese).
- [7] Rao Y L, Su J G. Insights into the antiviral immunity against grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) reovirus (GCRV) in grass carp [J]. Journal of Immunology Research, 2015; 2015: 670437.
- [8] 徐洋, 郝贵杰, 沈锦玉, 等. 两株草鱼呼肠孤病毒江西株的分离和鉴定[J]. 淡水渔业, 2010, 40(3): 44–49.
Xu Y, Hao G J, Shen J Y, *et al.* Isolation and identification of two grass carp reovirus strains in Jiangxi province [J]. Freshwater Fisheries, 2010, 40(3): 44–49 (in Chinese).
- [9] 曾伟伟, 王庆, 刘永奎, 等. 一株草鱼呼肠孤病毒弱毒株的分离、鉴定及免疫原性初步分析[J]. 水生生物学报, 2011, 35(5): 790–795.
Zeng W W, Wang Q, Liu Y K, *et al.* Isolation and identification of new GCRV strain and primary study on its immunogenicity [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2011, 35(5): 790–795 (in Chinese).
- [10] 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[D]. 广州: 中国水产科学院珠江水产研究所. 2010.
Zhang C. Isolation identification of grass carp reovirus HZ08 and molecular characteristics of its complete genome[D]. Guangzhou: Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences. 2010 (in Chinese).
- [11] Zhang C, Wang Q, Shi C B, *et al.* Molecular analysis of grass carp reovirus HZ08 genome segments1-3 and 5-6 [J]. Virus Genes, 2010, 41(1): 102–104.
- [12] 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.
- [13] 王士, 许丹, 吕利群. 应用dsRNA测序技术检测草鱼呼肠孤病毒的混合感染[J]. 上海海洋大学学报, 2012, 21(5): 756–761.
Wang T, Xu D, Lu L Q. Detection of the co-infection of different grass carp reovirus strains using dsRNA sequencing technology [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2012, 21(5): 756–761 (in Chinese).
- [14] 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.
- [15] 曾伟伟, 王庆, 王英英, 等. 草鱼呼肠孤病毒三重RT-PCR检测方法的建立及其初步应用[J]. 中国水产科学, 2013, 20(2): 419–426.
Zeng W W, Wang Q, Wang Y Y, *et al.* Establishment of multiplex PCR for grass carp reovirus and its application [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2013, 20(2): 419–426 (in Chinese).
- [16] 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[J]. 水产学报, 2013, 37(3): 450–455.
Zeng W W, Wang Q, Wang Y Y, *et al.* Preparation and identification of monoclonal antibody against VP4 protein of grass carp reovirus HZ08 strain [J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(3): 450–455 (in Chinese).
- [17] 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.
- [18] 杨倩, 曹海鹏, 和永杏, 等. 一株草鱼呼肠孤病毒检测

- 用单克隆抗体的制备及其特性[J]. 中国免疫学杂志, 2012, 28(3): 240–241.
- Yang Q, Cao H P, He Y X, et al. Preparation and characteristics of a monoclonal antibody of grass carp reovirus for viral detection [J]. Chinese Journal of Immunology, 2012, 28(3): 240–241 (in Chinese).
- [19] Attoui H, Billoir F, Cantaloube J F, et al. Strategies for the sequence determination of viral dsRNA genomes[J]. Journal of Virological Methods. 2000, 89: 147–158.
- [20] Maan S, Rao S J, Attoui H, et al. Rapid cDNA synthesis and sequencing techniques for the genetic study of bluetongue and other dsRNA viruses [J]. Journal of Virological Methods, 2007, 143: 132–139.

Preparation and immunogenicity of polyclonal antibodies against VP4, VP35 protein of type II grass carp reovirus

ZONG Qiankun¹, ZHANG Ye¹, LÜ Liqun^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Freshwater Fishery Germplasm Resources, College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Aquaculture Collaborative Innovation Center of Hubei Province, Wuhan 430070, China)

Abstract: To develop serological methods for detecting type II grass carp reovirus (GCRV), the genes encoding outer capsid proteins VP4 and VP35 were cloned into the prokaryotic expression vector PGEX-4T-3 respectively. Polyclonal antibodies were generated by immunization of mice with the purified recombinant VP4 and VP35 proteins respectively and titered by ELISA. The specificity of antibodies was determined by Western blot. SDS-PAGE results showed that the size of the recombinant VP4 and VP35 proteins was about 98ku and 61ku, respectively. The recombinant proteins mainly existed in the form of inclusion bodies. The titer of antibody against VP4 was up to $1:4 \times 10^5$, the titer of antibody against VP35 was up to $1:10^6$. The results of Western blot showed that antibodies were able to identify both recombinant proteins and corresponding capsid proteins in virus particles. Furthermore, serum antibodies of grass carp infected by JX02 were able to recognize VP4 and VP35 proteins specifically. In this paper, the polyclonal antibodies against VP4 and VP35 were successfully prepared, which laid a foundation for developing a serological diagnostic method for major epidemic strains of GCRV and functional studies of these two viral capsid proteins.

Key words: type II grass carp reovirus; prokaryotic expression; VP4; VP35; polyclonal antibody

Corresponding author: LÜ Liqun. E-mail: lqlv@shou.edu.cn

Funding projects: Earmarked Fund for China Agriculture Research System (CARS-46-12)