



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

刘世旭^{1,2}, 王庆^{2*}, 常藕琴², 周文礼¹, 曾伟伟², 王英英²

(¹天津农学院 水产学院, 天津 300384; ²中国水产科学研究院 珠江水产研究所/农业农村部渔药创制重点实验室/
广东省水产动物免疫技术重点实验室, 广州 510380)

摘要:【目的】制备基因I型草鱼呼肠孤病毒(GCRV)VP7蛋白合成肽抗体并验证其特异性,为研究VP7外衣壳蛋白在基因I型GCRV病毒与宿主间的相互作用及研制基因工程疫苗提供参考依据。【方法】以GCRV GZ1208株为模板进行RT-PCR扩增,运用在线生物信息学分析软件对VP7蛋白B细胞表位进行功能预测,选择位于VP7蛋白第26~39位氨基酸的多肽序列进行人工合成,与钥孔血蓝蛋白载体蛋白偶联后免疫新西兰白兔以获得VP7蛋白合成肽抗体,然后采用Western blotting和间接免疫荧光试验验证VP7蛋白合成肽抗体对基因I型GCRV的特异性识别能力。【结果】VP7蛋白氨基酸序列在基因I型GCRV中高度保守,其合成肽抗体效价约1:256000。Western blotting分析结果显示,融合蛋白VP7约在55 kD处出现单一的特异性条带,而GZ1208株和JX0901株样品约在30 kD处出现对应的特异性条带,与预期结果基本一致;间接免疫荧光试验结果表明,VP7蛋白合成肽抗体可特异性识别感染基因I型GCRV的草鱼脑细胞(GCB),感染细胞中出现特异性绿色荧光信号,而感染其他基因型GCRV及正常未感染病毒的GCB细胞中均无特异性绿色荧光出现。【结论】制备获得的VP7蛋白合成肽抗体能特异性识别基因I型GCRV,而不识别其他基因型毒株,可用于草鱼出血病的临床诊断和基因I型GCRV的病原学研究。

关键词: 草鱼呼肠孤病毒(GCRV); 基因I型; VP7蛋白; 原核表达; 合成肽抗体

中图分类号: S943.112

文献标志码: A

文章编号: 2095-1191(2018)09-1849-09

Preparation and application of synthetic peptide antibody against VP7 protein of grass carp reovirus (GCRV) genotype I

LIU Shi-xu^{1,2}, WANG Qing^{2*}, CHANG Ou-qin², ZHOU Wen-li¹,
ZENG Wei-wei², WANG Ying-ying²

(¹Department of Aquaculture, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China; ²Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences/Key Lab of Fishery Drug Development, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Key Lab of Aquatic Animal Immune Technology of Guangdong Province, Guangzhou 510380, China)

Abstract: 【Objective】Anti-VP7 protein synthetic peptide antibody of grass carp reovirus (GCRV) genotype I was prepared and its specificity was identified to provide reference for the research on the interaction of VP7 capsid protein between GCRV genotype I and the host, and development of genetic engineering vaccine. 【Method】GCRV GZ1208 was used as the template to conduct RT-PCR amplification. Online bioinformatics software was used to predict the function of the B cell epitopes of VP7 protein. The polypeptide sequences of amino acid located at 26-39 positions of VP7 protein were selected and synthesized artificially. The New Zealand white rabbits were immunized with the polypeptide of VP7 coupling linked with keyhole limpet hemocyanin carrier protein, and the synthetic peptide antibody against VP7 protein was obtained. Then, Western blotting and indirect immunofluorescence assays were used to test the specific identification of anti-VP7 synthetic peptide antibody to GCRV genotype I. 【Result】The amino acid sequences of VP7 was highly conserved in genotype I GCRV, and the titer of synthetic peptide antibody was as high as 1:256000. The results of Western blotting indicated that the fusion protein VP7 showed a single specific band at about 55 kD, while GZ1208 strain and JX0901 strain showed corresponding specific bands at about 30 kD, which was consistent with the expected results. The results of indirect immunofluorescence assays indicated that VP7 protein synthetic peptide antibody could specifically

收稿日期: 2018-07-15

基金项目: 广东省科技计划项目(2016B090918115, 2016B020234003); 中国水产科学研究院基本科研业务费专项项目(2016HY-ZD0503, 2016ZD0502)

作者简介: *为通讯作者, 王庆(1976-), 副研究员, 主要从事水生动物病毒学研究工作, E-mail: sunny_929@163.com。刘世旭(1994-), 主要从事水生动物病毒学研究工作, E-mail: xuer_094@sina.com

identify the grass carp's brain cells (GCB) infected with genotype I GCRV, and the specific green fluorescence appeared in the infected cells. While there was no specific green fluorescence appeared in the cells infected with other genotypes GCRV and in normal cells. 【Conclusion】The synthetic peptide antibody against VP7 protein is successfully prepared, which can specifically recognize GCRV genotype I but cannot recognize other genotype strains. The present study can be applied in clinical diagnosis of grass carp hemorrhagic disease as well as pathogenic research of GCRV genotype I.

Key words: grass carp reovirus (GCRV); genotype I; VP7 protein; prokaryotic expression; synthetic peptide antibody

0 引言

【研究意义】草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 是我国最重要的淡水经济鱼,其产量约占全国淡水鱼生产总量的20%(Rao and Su, 2015),除西藏和青海呈零星养殖外,在我国其他各地均有一定规模养殖。据全国渔业统计结果显示,2014年我国草鱼养殖产量达506.99万t,2015年576.62万t,2016年589.88万t,其产值多年以来均稳居我国淡水鱼养殖首位。草鱼在全球40多个国家和地区均有分布(Dong et al., 2012),但随之而来的病害日趋频发,尤其是出血病严重阻碍了草鱼养殖业的健康发展(Brudeseth et al., 2013)。草鱼出血病主要由草鱼呼肠孤病毒(Grass carp reovirus, GCRV)引起,是我国分离鉴定的第一例水生病毒(Zhang et al., 2008),且该病毒致病力强、传染性高(Lu et al., 2011),一旦感染可导致草鱼苗大量死亡,造成严重的经济损失。因此,加强GCRV的致病机理及其防治措施研究,对确保草鱼养殖业健康发展具有重要意义。【前人研究进展】GCRV是研究水生呼肠孤病毒复制和发病机理的代表病毒(He et al., 2011),其基因组由11个双链RNA节段(S1~S11)组成,无囊膜,呈20面体的球状颗粒(Ye et al., 2012)。目前,已报道GCRV拥有40多个分离株,包括854、861、873、875、876、9014、991、V、H-962、ZV-8802、854、HZ08、JX09-01、JX09-02、GD108、104、106、109、Hunan1307和GZ1208等分离株,且不同分离株在致细胞病变、毒力、基因组电泳带型、基因组序列和特征等方面存在明显差异(Wang et al., 2012; Ye et al., 2012; Fan et al., 2013)。根据基因组差异,GCRV可分为3种基因型(Wang et al., 2012),其中873、HZ08、104分离株分别为基因I、II和III型的代表株(曾伟伟等, 2017)。不同基因型GCRV感染草鱼后引起的症状不完全相同,对草鱼的致病率和致死率也不相同(张敏利等, 2018)。其中,基因I型GCRV的S10节段编码蛋白与银大马哈鱼呼肠孤病毒(Coho salmon reovirus, SCSV)和条纹鲈呼肠孤病毒(Striped bass reovirus, SBRV)S10节段编码的外衣壳蛋白,以及哺乳动物正呼肠孤病毒(Mammalian orthoreovirus, MRV)S4节段编码的外衣壳蛋白同源

性较高,具有相同的锌指结构和相似的亲水基团分布情况,由此预测GCRV的S10节段基因编码一种外衣壳蛋白(Liu et al., 2016)。Chen等(2013)研究证实,GCRV含7种结构蛋白和4种非结构蛋白,其中VP7具有较好的抗原性。郝贵杰等(2010)以VP7基因为靶基因构建重组表达质粒,并成功转染至真核细胞中,实现了高效表达;Luo等(2015)的抗体中和试验结果也证实,VP7是GCRV的主要抗原表位,为研制GCRV基因疫苗提供了参考资料。采用原核表达系统获得重组蛋白再免疫实验动物制备多克隆抗体的方法较常见,但存在抗体特异性差、效价低的问题。合成肽是以化学合成方法按蛋白氨基酸顺序合成类似抗原表位的一种保护性短肽,与变性蛋白的结合性较高,抗原的特定区域能被合成肽识别(高华义等, 2018)。合成肽属于小分子物质,以半抗原形态存在,很难在免疫动物体内引起有效的免疫反应,因此必须耦联载体蛋白(黄剑波, 2016)。Tanzadehpanah等(2016)研究表明,以合成肽为抗原制备多克隆抗体,可降低抗原用量,且得到的多克隆抗体效价较高。【本研究切入点】GCRV GZ1208株分离自广州某养殖场发病草鱼,其S10节段全长909 bp,含一个831 bp的开放阅读框(ORF),编码VP7外衣壳蛋白(分子量约30 kD),但至今未见针对VP7蛋白合成肽制备抗体的研究报道。【拟解决的关键问题】以GCRV GZ1208株为模板进行RT-PCR扩增,运用在线生物信息学分析软件对VP7蛋白B细胞表位进行功能预测,选择位于VP7蛋白第26~39位氨基酸的多肽序列进行人工合成,与钥孔血蓝蛋白载体蛋白偶联后免疫新西兰白兔以获得VP7蛋白合成肽抗体,然后采用Western blotting和间接免疫荧光试验验证合成肽抗体对基因I型GCRV的特异性识别能力,为后续研究VP7外衣壳蛋白在基因I型GCRV病毒与宿主间的相互作用及研制基因工程疫苗提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

草鱼脑细胞(GCB)及GCRV GZ1208株、JX09-01株、Hunan1307株、HZ08株、传染性脾肾坏死病毒

(ISKNV)、锦鲤疱疹病毒(KHV)由中国水产科学研究院珠江水产研究所鱼病室保存提供;GCRV 104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;pE-T32a(+)质粒由农业农村部渔药创制重点实验室保存提供;M199培养基、小牛血清(FBS)和胰酶购自美国Gibco公司;Trizol Reagent购自美国Invitrogen公司;反转录试剂盒购自TOYOBO公司;大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 和BL21(DE3)、*EcoR* I酶、*Xho* I酶、*Taq* DNA聚合酶、dNTPs及DNA Marker购自TaKaRa公司;T4 Ligase购自Promega公司;质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒购自OMEGA公司;SDS-PAGE试剂盒、DAB显色试剂盒购自康为世纪生物科技有限公司;HRP标记的羊抗兔IgG和FITC标记的羊抗兔IgM购自博士德生物工程有限公司。

1.2 S10基因扩增

根据GenBank上GCRV GZ1208株VP7外衣壳蛋白的编码序列(KU240083.1)设计引物(5'-CCGGAA TTCATGCCACTTCACATGATTCGCAA-3'和5'-ACGCTCGAGATCGGATGGCTCCACATGGCAAG-3'),下划线部分分别为*EcoR* I和*Xho* I酶切位点;以GCRV GZ1208株感染GCB细胞,运用Trizol法提取细胞RNA,RT-PCR扩增目的片段。反应体系25.00 μ L:dNTPs 4.00 μ L,GZ1208株cDNA模板2.00 μ L,上、下游引物各0.50 μ L,10 \times PCR Buffer 2.50 μ L,LA *Taq* DNA聚合酶0.25 μ L,ddH₂O 15.25 μ L。扩增程序:95 $^{\circ}$ C预变性4 min;94 $^{\circ}$ C 35 s,65 $^{\circ}$ C 35 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,进行35个循环;72 $^{\circ}$ C延伸8 min。反应结束后回收纯化扩增产物。

1.3 生物信息学分析

S10基因测序结果在NCBI上进行BLAST分析,运用DNASTAR和IEBD对VP7蛋白氨基酸序列进行抗原表位预测。

1.4 多肽合成及抗体制备

根据抗原表位预测结果,选择位于VP7蛋白上第26~39位氨基酸的多肽序列(TKTRTETTFDHD)送至南京金斯瑞生物科技有限公司合成多肽,与钥孔血蓝蛋白载体蛋白KLH偶联后免疫新西兰白兔。参照王玉坤等(2008)、李丽等(2015)、宗乾坤等(2016)的方法收集血清制备抗体。

1.5 间接ELISA检测血清抗体效价

采用pH 7.4的碳酸盐缓冲液稀释VP7蛋白合成肽(终浓度4 μ g/mL)包被96孔酶标板,每孔100.00 μ L,分别按1:1000、1:2000、1:4000、1:8000、1:16000、1:32000、1:64000、1:128000、1:256000和1:512000

梯度加入血清抗体及HRP标记的羊抗兔IgG(1:5000倍稀释)100.00 μ L,其余步骤参照Mahajan等(2015)、Yu等(2015)、张玉瑶等(2015)、Andreolla等(2018)的方法进行操作。

1.6 表达载体构建

扩增获得的S10基因目的片段与原核表达载体pET-32a(+)进行双酶切,酶切产物在16 $^{\circ}$ C下连接10~12 h,连接体系:T4 Ligase 0.50 μ L,T4 Ligase Buffer 2.00 μ L,pET-32a(+)2.00 μ L,S10基因目的片段5.50 μ L。将连接产物转化至*E. coli* DH5 α 中,收集后扩培养菌液,提取重组质粒。重组质粒进行双酶切鉴定,阳性质粒送至广州市艾基生物技术有限公司进行测序。当双酶切鉴定和测序结果显示载体构建成功时,将重组表达载体命名为pET-32a-S10。

1.7 融合蛋白表达

重组表达载体pET-32a-S10转化至*E. coli* BL21(DE3),扩大培养及诱导操作参照胡涛等(2015)的方法,待OD₆₀₀=0.4时加入终浓度为1 mmol/L的IPTG诱导8 h,然后在冰上对菌体沉淀进行超声波破碎(AI-Juboori and Yusaf, 2012;吴倩等, 2015):破碎4 s,停顿15 s,功率250 W,离心收集上清液和沉淀,以考马斯亮兰染色确定融合蛋白的表达形式。

1.8 诱导条件优化及目的蛋白纯化

参考Cheng等(2016)、罗忠永等(2017)的方法进行IPTG诱导条件优化,发现当OD₆₀₀=1.2、IPTG终浓度为1.6 mmol/L时,融合蛋白的表达量最高。诱导后进行离心,超声波破碎菌体沉淀,按试剂盒说明通过Ni柱亲和层析进行纯化,洗脱得到纯化的融合蛋白。纯化融合蛋白经SDS-PAGE分析,参考Suwal等(2014)的方法用0.3 mol/L KCl溶液进行回收。

1.9 Western blotting分析

分别选取GCRV的基因I型(GZ1208和JX0901)、II型(HZ08和Hunan1307)、III型(104)毒株及KHV和ISKNV感染GCB细胞,感染7 d后收集GCB细胞,加入上样缓冲液,混匀后沸水浴10 min,取5.00 μ L进行上样;剩余步骤参考刘文慧等(2015)的方法,最后采用DAB显色液进行显色。

1.10 间接免疫荧光试验

将GCB细胞传至96孔板,待细胞长至单层并占据孔板表面积80%~90%时,接种GZ1208、JX09-01、Hunan1307、HZ08和104株的病毒液,设立空白对照,接毒5 d后进行间接免疫荧光试验(Gao et al., 2018; Wang et al., 2018),一抗为兔抗VP7多克隆抗体(1:200倍稀释),二抗为FITC标记的羊抗兔IgM(1:50倍稀释),于倒置荧光显微镜观察结果。

2 结果与分析

2.1 目的片段扩增及序列测定结果

经1.0%琼脂糖凝胶电泳检测发现,阴性对照无任何条带,而S10基因扩增产物的特异性条带位于750~1000 bp,大小约850 bp(图1),与预期结果一致。PCR扩增产物送至广州艾基生物技术有限公司测序,测序结果与KU240083.1序列一致。

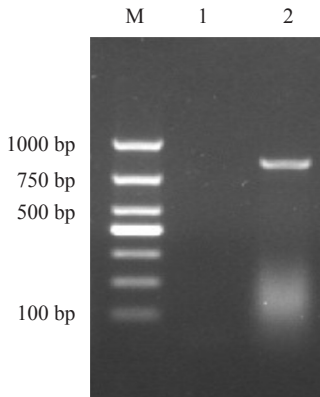


图1 S10基因的PCR扩增电泳结果

Fig.1 PCR amplification electrophoresis of S10 gene
M:DL1000 DNA Marker; 1:阴性对照;2:S10基因PCR扩增产物
M: DL1000 DNA Marker; 1: Negative control; 2: PCR amplification products of S10 gene

2.2 VP7蛋白抗原表位分析结果

采用DNASTAR分析GZ1208株VP7蛋白氨基酸

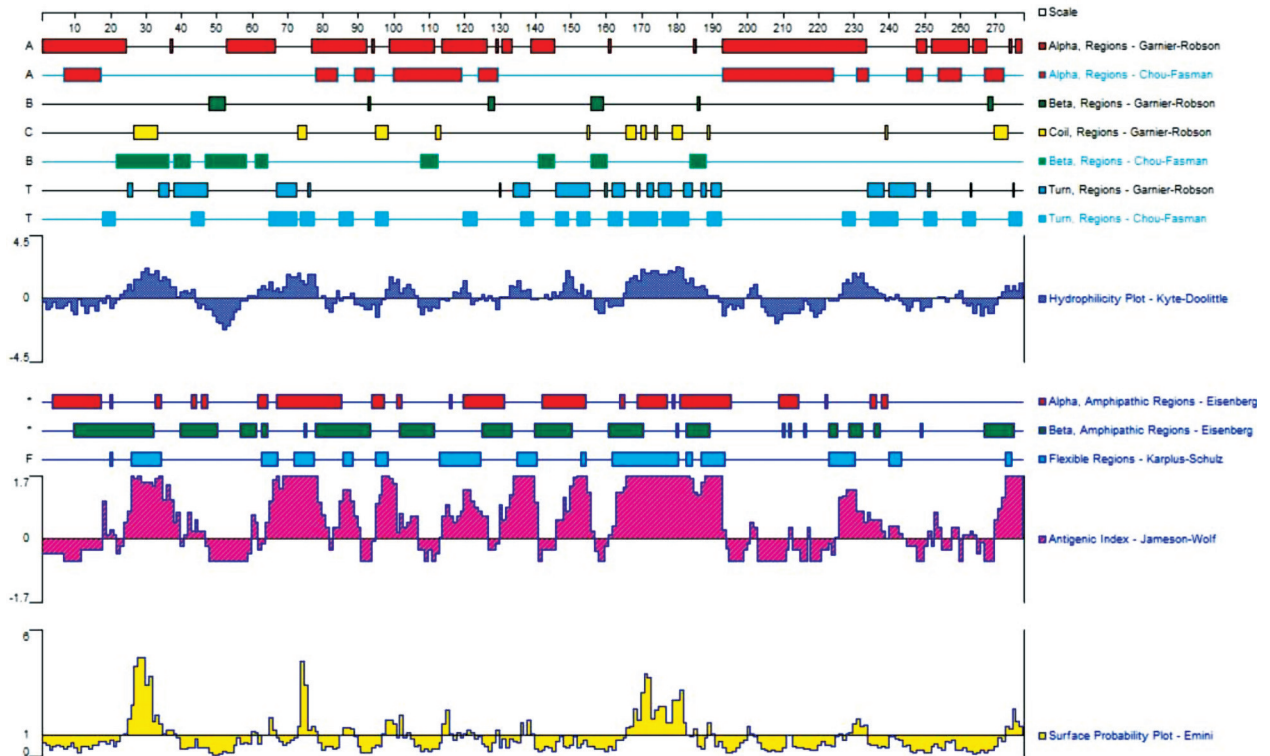


图2 VP7蛋白的抗原表位分析结果

Fig.2 Antigen epitope analysis of VP7 protein

Hydrophilicity: 亲水性; Antigenic index: 抗原指数; Flexible region: 疏松区域; Surface probability: 表露性

序列的抗原指数、亲水性、表露性和疏松区域等参数,结果(图2)显示,位于第26~39位的氨基酸片段抗原指数、亲水性和表露性均较高,可能为VP7蛋白的抗原表位。此外,BLAST比对分析结果显示,VP7蛋白氨基酸序列在基因I型GCRV中高度保守。

2.3 VP7合成肽抗体效价检测结果

采用间接ELISA测定血清抗体效价,结果显示抗体稀释倍数为1:256000时,多肽抗体与阴性对照比值为2.70,即VP7蛋白合成肽抗体效价约1:256000。

2.4 重组质粒双酶切鉴定结果

对重组质粒pET-32a-S10进行EcoR I和Xho I双酶切鉴定,经1.0%琼脂糖凝胶电泳检测,发现约在6000和850 bp处各出现一条特异性条带(图3);阳性样品送至广州艾基生物技术有限公司测序,结果表明目的片段正确无误。

2.5 融合蛋白的表达与纯化结果

通过SDS-PAGE分析,发现经IPTG诱导获得的融合蛋白约在55 kD处出现明显的特异性条带,其大小与预期结果(53 kD)基本一致;将IPTG诱导得到的菌体重悬液进行超声波破碎处理后,亦可得到与预期结果一致的特异性条带(图4),说明VP7融合蛋白主要以包涵体的形式存在。

融合蛋白经Ni柱亲和层析纯化后进行电泳,发

表 1 合成肽抗体间接ELISA检测结果

Table 1 Indirect ELISA results of synthetic peptide antibody

| 序号 No. | 抗体稀释倍数 Antibody dilution multiple | OD | P/N |
|--------|-----------------------------------|-------|-------|
| 1 | 1:1000 | 3.001 | 28.58 |
| 2 | 1:2000 | 2.774 | 26.42 |
| 3 | 1:4000 | 2.424 | 23.09 |
| 4 | 1:8000 | 1.873 | 17.84 |
| 5 | 1:16000 | 1.259 | 11.99 |
| 6 | 1:32000 | 0.709 | 6.75 |
| 7 | 1:64000 | 0.391 | 3.72 |
| 8 | 1:128000 | 0.309 | 2.93 |
| 9 | 1:256000 | 0.283 | 2.70 |
| 10 | 1:512000 | 0.115 | 1.09 |
| 11 | 阴性血清 | 0.105 | - |

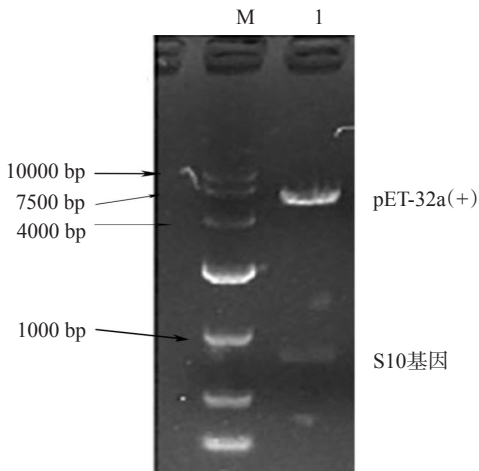


图 3 重组质粒pET-32a-S10的双酶切鉴定电泳结果

Fig.3 Digestion identification electrophoresis of recombinant plasmid pET-32a-S10

M: DL10000 DNA Marker; 1: 重组质粒pET-32a-S10双酶切鉴定产物
Digestion identification products of recombinant plasmid pET-32a-S10

现纯化后的融合蛋白约在55 kD处可见单一的特异条带,而未纯化的菌体总蛋白中含有较多的杂带(图5),说明蛋白的纯化效果良好。

2.6 Western blotting分析结果

Western blotting分析结果(图6)显示,融合蛋白样品约在55 kD处出现单一的特异性条带,而空载体蛋白泳道无对应条带。此外,GZ1208株和JX09-01株样品约在30 kD处出现对应的特异性条带,与预期结果基本一致;其他样品则无任何条带出现,说明制备的合成肽抗体血清只能特异性识别VP7融合蛋白和基因I型GCRV。

2.7 间接免疫荧光试验结果

由图7可知,制备的合成肽抗体可特异性识别感染基因I型GCRV的GCB细胞,感染细胞中出现特异性绿色荧光信号,而感染其他基因型GCRV及正常未感染病毒的GCB细胞中均无特异性绿色荧光出现。

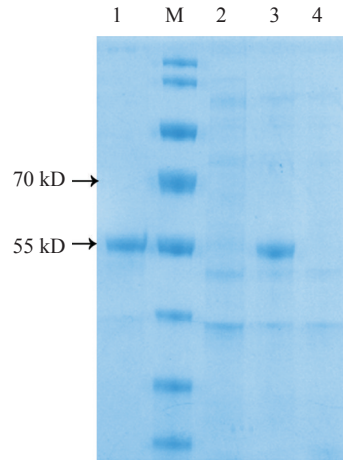


图 4 重组质粒pET-32a-S10表达产物的SDS-PAGE分析结果
Fig.4 SDS-PAGE analysis results of recombinant plasmid pET-32a-S10 expression product

M: 低相对分子质量蛋白标准品; 1: 重组质粒IPTG诱导表达产物的沉淀; 2: 重组质粒IPTG诱导表达产物的上清液; 3: 重组质粒pET-32a-S10的诱导表达产物; 4: pET-32a(+)空载体的诱导表达产物
M: Low relative molecular weight protein marker; 1: Sediment of expression product induced by recombinant plasmid IPTG; 2: Supernatant of expression product induced by recombinant plasmid IPTG; 3: Expression product of recombinant plasmid pET-32a-S10 induced by IPTG; 4: Expression product induced by pET-32a(+) empty carrier

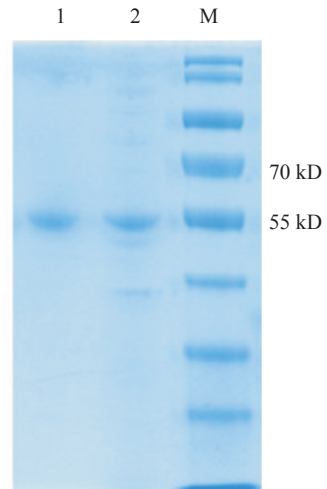


图 5 融合蛋白经Ni柱亲和层析纯化后的SDS-PAGE分析结果

Fig.5 SDS-PAGE analysis of fusion protein after affinity chromatography purification of Ni column

M: 低相对分子质量蛋白标准品; 1: 纯化后的融合蛋白; 2: 未纯化的菌体总蛋白
M: Low relative molecular weight protein marker; 1: Fusion protein after purification; 2: Total bacterial proteins without purification

3 讨论

草鱼是我国淡水养殖的主养品种,每年的产量超过500万t,位居淡水养殖鱼类之首(杨映等, 2015),但也是水产养殖动物中病害最多发的一种鱼类(Wu et al., 2017)。GCRV隶属于水生呼肠孤病毒

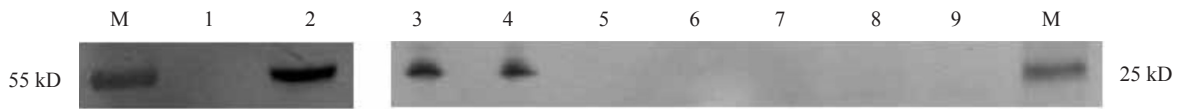


图 6 融合蛋白VP7抗血清特性的Western blotting分析结果

Fig.6 Western blotting analysis of fusion protein VP7 antiserum characters

M:低相对分子质量蛋白标准品;1:pET-32a(+)空载体的诱导表达产物;2:VP7融合蛋白;3:纯化的GZ1208株;4:纯化的JX09-01株;5:Hunan1307株;6:HZ08株;7:104株;8:ISKNV;9:KHV

M: Low relative molecular weight protein marker; 1: Expression product induced by pET-32a(+) empty carrier; 2: VP7 fusion protein; 3: Purified GZ1208 strain; 4: Purified JX09-01 strain; 5: Hunan1307 strain; 6: HZ08 strain; 7: 104 strain; 8: ISKNV; 9: KHV

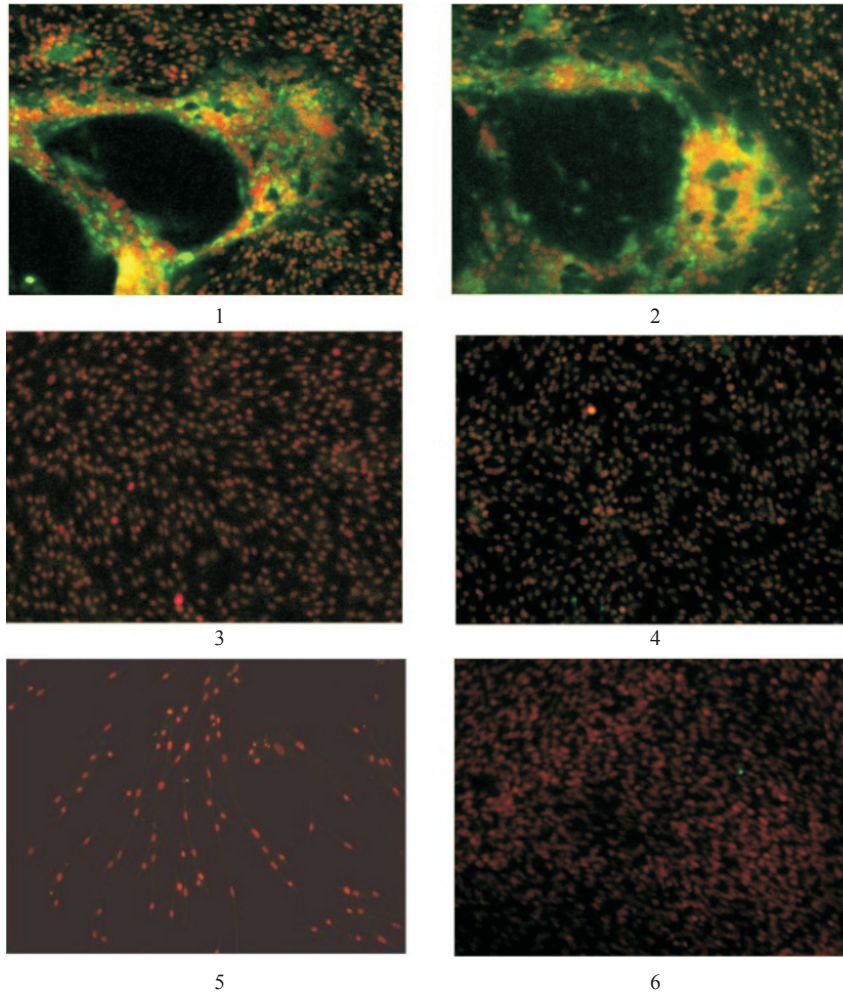


图 7 合成肽抗体(融合蛋白VP7抗血清)特异性的间接免疫荧光试验结果

Fig.7 Indirect immunity fluorescence test of synthetic peptide antibody(fusion protein VP7 antiserum) characteristics

1:感染GZ1208株的GCB细胞;2:感染JX09-01株的GCB细胞对照;3:感染Hunan1307株的GCB细胞;4:感染HZ08株的GCB细胞;5:感染104株的GCB细胞;6:未感染病毒的正常GCB细胞

1: GCB cells infected by GC1208 strain; 2: GCB cells control infected by JX09-01 strain; 3: GCB cells infected by Hunan1307 strain; 4: GCB cells infected by HZ08 strain; 5: GCB cells infected by 104 strain; 6: Uninfected GCB cells

属(*Aquareovirus*),是我国分离鉴定的第一株水生动物病毒,其发现可追溯到1953年(Tian et al., 2017);草鱼感染发病的临床症状主要是肌肉充血,肠道出血,鳍条、鳃盖充血,故又称为草鱼出血病(Qiu et al., 2001)。GCRV基因组可分为11个节段双链RNA,具有较高的变异性(Hao et al., 2017)。GCRV流行情况复杂,我国至少存在3种基因型(He et al., 2017),以基因II型为主,其次为基因I型,也有基因I型和II型混合感染的情况存在。GCRV的外衣壳蛋

白主要是VP5和VP7,二者以200个三聚体的形式出现,而形成外层衣壳(Liu et al., 2017)。其中,VP7在GCRV感染宿主并使之患病的过程中发挥着不可忽视的作用(Ivanovic et al., 2007; Fang et al., 2008),尤其在病毒与宿主细胞相互作用及病毒进入宿主细胞的过程中,外衣壳上的三聚体作为受体识别位点存在(Yan et al., 2014),故推测VP7蛋白有助于GCRV入侵草鱼(Shao et al., 2011)。

目前用于草鱼出血病免疫防控的疫苗主要有

灭活疫苗、弱毒疫苗和土法疫苗(高岩等,2017),也有部分实验室针对基因工程疫苗开展了积极研究,如重组亚单位疫苗和核酸疫苗,主要采用GCRV的外衣壳蛋白制备。虽然市场上已有商品化的疫苗可供使用,但每年因草鱼出血病暴发引起的经济损失仍居高不下。草鱼出血病频繁暴发可能与GCRV复杂的基因型有关。黄毅昌等(2016)研究指出,不同基因型毒株间多数功能性位点的保守性较低。Wang等(2016)研究证实,不同基因型GCRV在生物学特性上存在明显差异,采用不同基因型GCRV免疫鮡,其交叉保护性较低。本研究结果表明,以IPTG诱导获得的VP7融合蛋白与钥孔血蓝蛋白载体蛋白偶联后,免疫新西兰白兔而获得的VP7蛋白合成肽抗体只能识别基因I型GCRV,进一步证实3种基因型GCRV的外衣壳蛋白存在明显差异。

采用原核表达或真核表达系统诱导表达获得重组蛋白,并免疫实验动物制备多克隆抗体的方法较常见,但抗体效价水平不一。郝贵杰等(2010)利用真核表达系统制备的GCRV VP7蛋白抗体效价仅1:320;刘学光等(2013)通过原核表达传染性造血器官坏死病病毒(IHNV)G蛋白并制备相应的多克隆抗体效价为1:10⁵;黄新新等(2015)以原核表达桃拉综合征病毒VP1高变区蛋白并制备多克隆抗体,其抗体效价为1:217;黄溢和冯勇(2017)借助原核表达系统制备的大鲵虹彩病毒主要衣壳蛋白多克隆抗体的抗体效价为1:50000;汤亚芳等(2018)利用原核表达蛋白制备的基因II型GCRV VP6蛋白抗体效价为1:10⁵。原核表达的融合蛋白在表达过程中常出现包涵体形式。包涵体不溶于水,无法形成正确次级键的表达产物,因此免疫后制备的血清有时不能正常识别原始生物蛋白。本研究中采用pET-32a(+)质粒构建的重组质粒pET-32a-S10经IPIG诱导表达后,融合蛋白也是以包涵体形式存在;制备获得的VP7蛋白合成肽抗体效价约1:256000,其抗体效价高于一般的多克隆抗体,且抗体的特异性较好,能准确识别基因I型GCRV,而不识别其他基因型毒株,表明制备获得的合成肽抗体已达到预期设计要求,为后续的研究工作打下一定基础。

4 结论

制备获得的VP7蛋白合成肽抗体能特异性识别基因I型GCRV,而不识别其他基因型毒株,可用于草鱼出血病的临床诊断和基因I型GCRV的病原学研究。

参考文献:

- 高华义,吕传忠,任东兴,陈文娟,辛波,梁姗,付旭彬. 2018. 多肽合成去势疫苗免疫佐剂的筛选[J]. 黑龙江畜牧兽医, (7): 169-172. [Gao H Y, Lü C Z, Ren D X, Chen W J, Xin B, Liang S, Fu X B. 2018. The screening of immunoadjuvant in peptide synthesis castration vaccine[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, (7): 169-172.]
- 高岩,裴超,张超,李笋,孔祥会. 2017. 草鱼呼肠孤病毒疫苗的研发与应用[J]. 水产科学, 36(2): 237-242. [Gao Y, Pei C, Zhang C, Li Z, Kong X H. 2017. A review of research and development of vaccine against grass carp reovirus[J]. Fisheries Science, 36(2): 237-242.]
- 郝贵杰,潘晓艺,姚嘉赟,徐洋,尹文林,沈锦玉. 2010. 草鱼呼肠孤病毒衣壳蛋白VP7基因真核表达载体pCI-VP7的构建及鉴定[J]. 水产学报, 34(5): 807-813. [Hao G J, Pan X Y, Yao J Y, Xu Y, Yin W L, Shen J Y. 2010. Construction and identification of recombinant eukaryotic expression vector pCI-VP7 containing GCRV VP7 gene[J]. Journal of Fisheries of China, 34(5): 807-813.]
- 胡涛,安艳,吕群丹,徐英武. 2015. 拟南芥SPX1蛋白原核表达及纯化分析[J]. 生物技术通报, 31(8): 88-93. [Hu T, An Y, Lü Q D, Xu Y W. 2015. Prokaryotic expression and purification of AtSPX1 protein in *Arabidopsis thaliana*[J]. Biotechnology Bulletin, 31(8): 88-93.]
- 黄剑波. 2016. PRRSV SC株GP5蛋白合成肽抗体的制备及ADE作用研究[D]. 成都: 四川农业大学. [Huang J B. 2016. Preparation of GP5 protein synthetic peptide antibody of PRRSV SC strain and the research of ADE[D]. Chengdu: Sichuan Agricultural University.]
- 黄溢,冯勇. 2017. 大鲵虹彩病毒主要衣壳蛋白的原核表达及多克隆抗体制备[J]. 湖北农业科学, 56(21): 4146-4150. [Huang M, Feng Y. 2017. Prokaryotic expression and polyclonal antibody preparation of the major capsid protein of Chinese giant salamander iridovirus[J]. Hubei Agricultural Sciences, 56(21): 4146-4150.]
- 黄新新,袁辰刚,宁雪,顾鸣,蔡强,刘锐,陆承平. 2015. 桃拉综合征病毒VP1高变区蛋白抗体制备及初步特性分析[J]. 中国免疫学杂志, (2): 221-224. [Huang X X, Yuan C G, Ning X, Gu M, Cai Q, Liu R, Lu C P. 2015. Polyclonal antibody specific for hypervariable region of VP1 capsid protein of Taura syndrome virus (TSV) preparation and characteristic analysis[J]. Chinese Journal of Immunology, (2): 221-224.]
- 黄毅昌,雷燕,杨玉滔,闫秀英,简纪常,吴灶和. 2016. 草鱼出血病分子流行病学及GCRV多样性研究[J]. 安徽农业科学, 44(11): 120-125. [Huang Y C, Lei Y, Yang Y T, Yan X Y, Jian J C, Wu Z H. 2016. Molecular epidemiology of hemorrhage disease of grass carp and the diversity research of GCRV[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 44(11): 120-125.]
- 李丽,鞠文,殷德辉,孟日增,李娟,宋秀英,徐坤. 2015. 生物素标记的布鲁菌多克隆抗体的制备[J]. 中国生物制品学杂志, 28(2): 147-154. [Li L, Ju W, Yin D H, Meng R Z, Li J, Song X Y, Xu K. 2015. Preparation of biotin-labeled polyclonal antibody against *Brucella abortus*[J].

- Chinese Journal of Biologicals, 28(2):147-154.]
- 刘文慧, 阙丽丽, 崔永胜, 谭李倩, 梁雪雪, 李新, 赵微. 2015. 人星状病毒I型非结构蛋白nsP1a及其C末端蛋白nsP1a/4的原核表达及鉴定[J]. 病毒学报, 31(1):46-50. [Liu W H, Kan L L, Cui Y S, Tan L Q, Liang X X, Li X, Zhao W. 2015. Prokaryotic expression and identification of human astrovirus nonstructural proteins, nsP1a and nsP1a/4 [J]. Chinese Journal of Virology, 31(1):46-50.]
- 刘学光, 郑怀东, 郭欣硕, 罗靳, 蔺翠翠, 王秋雨. 2013. 传染性造血器官坏死病毒糖蛋白的原核表达及多克隆抗体的制备[J]. 大连海洋大学学报, 28(3):254-258. [Liu X G, Zheng H D, Guo X S, Luo J, Lin C C, Wang Q Y. 2013. Prokaryotic expression and polyclonal antibody preparation of glycoprotein gene in infectious hematopoietic necrosis virus [J]. Journal of Dalian Ocean University, 28(3):254-258.]
- 罗忠永, 王印, 杨泽晓. 2017. PRRSV M蛋白基因片段的原核表达及间接ELISA检测方法的初步建立[J]. 中国兽医科学, 47(1):95-99. [Luo Z Y, Wang Y, Yang Z X. 2017. Establishment of an indirect ELISA using the prokaryotically-expressed M protein for the detection of antibodies against PRRSV [J]. Chinese Veterinary Science, 47(1):95-99.]
- 汤亚芳, 曾伟伟, 王庆, 王英英, 石存斌, 冯茹, 高辉, 王承宝. 2018. 草鱼呼肠孤病毒II型VP6蛋白多克隆抗体制备及其特异性分析[J]. 淡水渔业, 48(1):9-14. [Tang Y F, Zeng W W, Wang Q, Wang Y Y, Shi C B, Feng R, Gao H, Wang C B. 2018. Preparation and specification analysis of polyclonal antibody against grass carp reovirus type II VP6 protein [J]. Freshwater Fisheries, 48(1):9-14.]
- 王玉坤, 李锦程, 曹远银. 2008. 兔抗灭多威多克隆抗体的制备[J]. 江苏农业科学, (2):79-81. [Wang Y K, Li J C, Cao Y Y. 2008. Preparation of rabbit anti-methomyl polyclonal antibody [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, (2):79-81.]
- 吴倩, 张丽芬, 陈复生. 2015. 超声波对蛋白质提取及改性影响的研究进展[J]. 食品与机械, 31(4):256-259. [Wu Q, Zhang L F, Chen F S. 2015. Research progress of ultrasonic effect on protein extraction and modification [J]. Food & Machinery, 31(4):256-259.]
- 杨映, 于辉, 古勇明. 2015. 草鱼呼肠孤病毒研究进展[J]. 广东农业科学, 42(15):92-97. [Yang Y, Yu H, Gu Y M. 2015. Research progress on grass carp reovirus [J]. Guangdong Agricultural Sciences, 42(15):92-97.]
- 曾伟伟, 王庆, 王英英, 李莹莹, 郝贵杰, 石存斌, 沈锦玉. 2017. 草鱼呼肠孤病毒HZ08株抗体IPMA检测方法的建立及应用[J]. 水产学报, 41(1):142-149. [Zeng W W, Wang Q, Wang Y Y, Li Y Y, Hao G J, Shi C B, Shen J Y. 2017. Establishment and application of immunoperoxidase monolayer assay for detection of the antibody against grass carp reovirus HZ08 [J]. Journal of Fisheries of China, 41(1):142-149.]
- 张敏利, 盛佳璐, 喻飞, 王浩, 吕立群. 2018. 草鱼Fibulin-4蛋白与草鱼呼肠孤病毒外衣壳蛋白相互作用的研究[J]. 病毒学报, 34(4):557-564. [Zhang M L, Sheng J L, Yu F, Wang H, Lü L Q. 2018. Studies on the interaction of grass carp Fibulin-4 protein with grass carp reovirus outer capsid proteins [J]. Chinese Journal of Virology, 34(4):557-564.]
- 张玉瑶, 马秀丽, 黄兵, 李玉峰, 于可响, 李建亮, 刘存霞, 韩宏宇, 崔言顺. 2015. 鸭甲肝病毒I型和3型间接ELISA方法的建立与应用[J]. 微生物学报, 55(4):501-509. [Zhang Y Y, Ma X L, Huang B, Li Y F, Yu K X, Li J L, Liu C X, Han H Y, Cui Y S. 2015. Indirect ELISA for simultaneous detection of antibodies against duck hepatitis a type 1 and 3 viruses [J]. Acta Microbiologica Sinica, 55(4):501-509.]
- 宗乾坤, 张也, 吕立群. 2016. 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[J]. 水产学报, 40(3):355-362. [Zong Q K, Zhang Y, Lü L Q. 2016. Preparation and immunogenicity of polyclonal antibodies against VP4, VP35 protein of type II grass carp reovirus [J]. Journal of Fisheries of China, 40(3):355-362.]
- Al-Juboori R A, Yusaf T. 2012. Identifying the optimum process parameters for ultrasonic cellular disruption of *E. coli* [J]. International Journal of Chemical Reactor Engineering, 10(1):1498-1502.
- Andreolla A P, Erpen L M S, Frandoloso R, Kreutz L C. 2018. Development of an indirect ELISA based on recombinant capsid protein to detect antibodies to bovine leukemia virus [J]. Brazilian Journal of Microbiology, pii: S1517-8382(18)30043-1. doi: 10.1016/j.bjm.2018.05.001.
- Brudeseth B E, Wiulsrød R, Fredriksen B N, Lindmo K, Løkling K E, Bordevik M, Steine N, Klevan A, Gravnin-gen K. 2013. Status and future perspectives of vaccines for industrialised fin-fish farming [J]. Fish & Shellfish Immunology, 35(6):1759-1768.
- Chen C L, Sun X Y, Liao L J, Luo S X, Li Z Q, Zhang X H, Wang Y P, Guo Q L, Fang Q, Dai H. 2013. Antigenic analysis of grass carp reovirus using single-chain variable fragment antibody against IgM from *Ctenopharyngodon idella* [J]. Science China. Life Sciences, 56(1):59-65.
- Cheng Z Y, Zhang M, Ning R H, Hu B Q, Wen C G. 2016. Molecular cloning, prokaryotic expression and functional characterization of superoxide dismutase gene from *Siniperca chuatsi* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 53:116. doi: 10.1016/j.fsi.2016.04.097.
- Dong Z D, Zhang J, Ji X S, Zhou F N, F Y, Chen W Y, Zeng Y Q, Li T M, Wang H. 2012. Molecular cloning, characterization and expression of cathepsin D from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. Fish Shellfish Immunology, 33(5):1207-1214.
- Fan Y D, Rao S J, Zeng L B, Ma J, Zhou Y, Xu J, Zhang H. 2013. Identification and genomic characterization of a novel fish reovirus, Hubei grass carp disease reovirus, isolated in 2009 in China [J]. The Journal of General Virology, 94(10):2266-2277.
- Fang Q, Seng E K, Ding Q Q, Zhang L L. 2008. Characterization of infectious particles of grass carp reovirus by treatment with proteases [J]. Archives of Virology, 153(4):675-682.
- Gao S, Shi W, Wang Y T, Guo M T, Duan K X, Song A C,

- Lian G H, Ren T, Li Y J, Tang L J, Sun L, Liu M. 2018. Establishment and evaluation of an indirect immunofluorescence assay for the detection of salmonid alphavirus [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 66(4):293-299.
- Hao K, Chen X H, Qi X Z, Yu X B, Du E Q, Ling F, Zhu B, Wang G X. 2017. Protective immunity of grass carp induced by DNA vaccine encoding capsid protein gene (vp7) of grass carp reovirus using bacterial ghost as delivery vehicles[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 64:414-425.
- He L B, Zhang A D, Pei Y Y, Chu P F, Li Y M, Huang R, Liao L J, Zhu Z Y, Wang Y P. 2017. Differences in responses of grass carp to different types of grass carp reovirus (GCRV) and the mechanism of hemorrhage revealed by transcriptome sequencing[J]. *BMC Genomics*, 18(1):452. doi: 10.1186/s12864-017-3824-1.
- He Y X, Yang Q, Xu H X, Wu H, Wu F Y, Lu L Q. 2011. Prokaryotic expression and purification of grass carp reovirus capsid protein VP7 and its vaccine potential[J]. *African Journal of Microbiology Research*, 5(13):1643-1648.
- Ivanovic T, Agosto M A, Chandran K, Nibert M L. 2007. A role for molecular chaperone Hsc70 in reovirus outer capsid disassembly[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 282(16):12210-12219.
- Liu B, Gong Y, Li Z, Hu X L, Cao G L, Xue R Y, Gong C L. 2016. Baculovirus-mediated GCRV vp7 and vp6 genes expression in silkworm and grass carp[J]. *Molecular Biology Reports*, 43(6):509-515.
- Liu W S, Wang H, Yu F, Lu L Q. 2017. Grass carp reovirus outer capsid proteins VP5 and VP7 interact in *vitro* [J]. *Archives of Virology*, 162(8):2375-2380.
- Lu L, Xu H, He Y, Li J. 2011. Protection of grass carp, *Ctenopharyngodon idellus* (Valenciennes), through oral administration of a subunit vaccine against reovirus[J]. *Journal of Fish Diseases*, 34(12):939-942.
- Luo S X, Yan L, Zhang X H, Yuan L, Fang Q, Zhang Y A, Dai H P. 2015. Yeast surface display of capsid protein VP7 of grass carp reovirus: Fundamental investigation for the development of vaccine against hemorrhagic disease[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(12):2135-2145.
- Mahajan S, Mohapatra J K, Pandey L K, Sharma G K, Pattnaik B. 2015. Indirect ELISA using recombinant non-structural protein 3D to detect foot and mouth disease virus infection associated antibodies[J]. *Biologicals*, 43(1):47-54.
- Qiu T, Lu R H, Zhang J, Zhu Z Y. 2001. Complete nucleotide sequence of the S10 genome segment of grass carp reovirus (GCRV) [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 44(1):69-74.
- Rao Y L, Su J G. 2015. Insights into the antiviral immunity against grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) reovirus (GCRV) in grass carp [J]. *Journal of Immunological Research*, 2015:670437. doi: 10.1155/2015/670437.
- Shao L, Sun X Y, Fang Q. 2011. Antibodies against outer-capsid proteins of grass carp reovirus expressed in *E. coli* are capable of neutralizing viral infectivity[J]. *Virology Journal*, 8:347. doi: 10.1186/1743-422X-8-347.
- Suwal S, Roblet C, Amiot J, Doyen A, Beaulieu L, Legault J, Bazinet L. 2014. Recovery of valuable peptides from marine protein hydrolysate by electro dialysis with ultrafiltration membrane: Impact of ionic strength[J]. *Food Research International*, 65:407-415.
- Tanzadehpanah H, Asoodeh A, Mahaki H, Mostajabodave Z, Chamani J, Mojallal-Tabatabaei Z, Emtenani S, Emtenani S, Moradi M R. 2016. Bioactive and ACE binding properties of three synthetic peptides assessed by various spectroscopy techniques[J]. *Process Biochemistry*, 51(12):2067-2075.
- Tian Y Y, Jiao Z Z, Dong J J, Sun C F, Jiang X Y, Ye X. 2017. Grass carp reovirus - GD108 fiber protein is involved in cell attachment [J]. *Virus Genes*, 53(4):613-622.
- Wang Q, Xie H L, Zeng W W, Wang L C, Liu C, Wu J X, Wang Y Y, Li Y Y, Bergmann S M. 2018. Development of indirect immunofluorescence assay for TCID₅₀ measurement of grass carp reovirus genotype II without cytopathic effect onto cells [J]. *Microbial Pathogenesis*, 114:68-74.
- Wang Q, Zeng W W, Liu C, Zhang C, Wang Y Y, Shi C B, Wu S Q. 2012. Complete genome sequence of a reovirus isolated from grass carp, indicating different genotypes of GCRV in China [J]. *Journal of Virology*, 86(22):12466.
- Wang Q, Zeng W W, Yin L, Wang Y Y, Liu C, Li Y Y, Zheng S C, Shi C B. 2016. Comparative study on physical-chemical and biological characteristics of grass carp reovirus from different genotypes [J]. *Journal of The World Aquaculture Society*, 47(6):862-872.
- Wu M L, Li H Y, Jiang H, Hou G, He J, Jiang Y, Chen H. 2017. Structure and function of S9 segment of grass carp reovirus Anhui strain [J]. *Virusdisease*, 28(1):26-32.
- Yan X Y, Wang Y, Xiong L F, Jian J C, Wu Z H. 2014. Phylogenetic analysis of newly isolated grass carp reovirus [J]. *SpringerPlus*, 3:190. doi: 10.1186/2193-1801-3-190.
- Ye X, Tian Y Y, Deng G C, Chi Y Y, Jiang X Y. 2012. Complete genomic sequence of a reovirus isolated from grass carp in China [J]. *Virus Research*, 163(1):275-283.
- Yu F X, Du Y H, Huang X Y, Ma H, Xu B L, Adungo F, Hayasaka D, Buerano C C, Morita K. 2015. Application of recombinant severe fever with thrombocytopenia syndrome virus nucleocapsid protein for the detection of SFTSV-specific human IgG and IgM antibodies by indirect ELISA [J]. *Virology Journal*, 12:117. doi: 10.1186/s12985-015-0350-0.
- Zhang L L, Shen J Y, Lei C F, Li X M, Fang Q. 2008. The high level expression of grass carp reovirus VP7 protein in prokaryotic cells [J]. *Virologica Sinica*, 23(1):51-56.