

文章编号: 1674-5566(2018)04-0469-08

DOI:10.12024/j.sou.20170602077

利用原核及真核表达系统体外表达草鱼 II 型呼肠孤病毒外突 VP56 蛋白的研究

盛佳璐¹, 宗乾坤¹, 喻飞¹, 王浩^{1,2,3}, 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)

摘要: 草鱼 II 型呼肠孤病毒是当前引起我国草鱼出血病的主要流行毒株, VP56 是其外层衣壳上的唯一突起蛋白并有可能在病毒入侵阶段发挥核心作用, 但该蛋白的具体功能尚不清楚。为了探讨 VP56 的生物学功能, 分别利用大肠杆菌原核表达系统和杆状病毒真核表达系统研究了 VP56 的体外表达特性。首先从 GCRV-JX02W 株的细胞感染混合物中抽提总 RNA, 并通过 RT-PCR 方法获得目的基因 VP56, 分别克隆至 pGEX-4T-3 及 pFastBacHTA 载体上, 将质粒 pGEX-4T-3-VP56 转化至 BL21(DE3), 经 IPTG 诱导后, 成功表达融合蛋白 GST-VP56, 大小为 83 ku, 以包涵体形式存在; 蛋白经纯化后免疫老鼠, 制备了 VP56 的多克隆抗体, 可以和 rVP56 产生特异性免疫结合。将 pFastBacHTA-VP56 转化至 DH10Bac, 成功转座后, 提取重组杆粒 DNA 并鉴定且测序正确后转染 SF9 昆虫细胞。结果表明, 自转染 96 h 起, 转染杆粒的细胞生长停滞, 不断裂解。Western blot 结果显示, 细胞表达重组蛋白 His-VP56, 大小约为 62 ku, 为可溶蛋白。本研究利用原核表达系统和真核表达系统体外表达了 VP56 蛋白, 制备了抗 VP56 多克隆抗体, 为深入研究 VP56 蛋白在病毒入侵时的生物学功能奠定了基础。

关键词: 草鱼 II 型呼肠孤病毒; VP56; 原核表达; 真核表达

中图分类号: S 917 **文献标志码:** A

草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 为我国主要淡水养殖品种, 占全国鱼类养殖产量首位。草鱼出血病自 20 世纪 70 年代至今仍在长江中下游暴发流行, 波及全国, 年死亡损失超过 30%, 严重危害草鱼养殖业的发展^[1-4]。草鱼呼肠孤病毒 (Grass carp reovirus, GCRV) 是草鱼出血病的主要病原。草鱼来源的呼肠孤病毒为双链 RNA 病毒, 隶属水生呼肠孤病毒属, 呼肠孤病毒科。病毒由核酸基因组和蛋白质衣壳组成。与其他无囊膜病毒类似, 核酸基因组为病毒增殖和遗传变异提供信息, 衣壳则保护核酸免受外界因素影响和破坏, 并负责介导病毒侵染靶组织和协助病毒进入细胞内部。草鱼呼肠孤病毒毒株较复杂, 至今还没在血清学上对其进行分类, 但通过对现有流行毒株的分离及序列信息分析, 目前存在 I 型、II 型

和 III 型 3 个基因型^[5]。其中, I 型主要有 GCRV873, 096, 875, 876, 991 株等, 之间同源性约为 72.5% 至 99.7%^[5], II 型主要有 HZ08, GD108, JX02, 9014, 106 等, III 型主要有 104, HB1007 等。但草鱼 II 型 GCRV 作为主要流行毒株^[6], 其致病机制仍不清楚, 并且 II 型 GCRV 与 I、III 型在基因组序列、鱼体致病力、细胞病变等方面差异较大^[7-11]。当前已完成 II 型 GCRV 部分毒株的基因组测序工作^[10-11], 但其编码蛋白质的功能研究尚为空白。JX02 是本实验室保存的一株 II 型 GCRV 病毒, 与 II 型代表株 HZ08 有着极高的同源性^[12]。

II 型 GCRV 共编码 12 种蛋白, 包括 2 种非结构蛋白和 9 种结构蛋白。对于其基因编码蛋白的功能和作用只能根据分子生物学分析

收稿日期: 2017-06-07 修回日期: 2018-01-05

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-46-12); 国家自然科学基金 (31672690, 31072244)

作者简介: 盛佳璐 (1993—), 男, 硕士研究生, 研究方向为分子病毒学。E-mail: 873182643@qq.com

通信作者: 吕利群, E-mail: lqlv@shou.edu.cn

与其他已知基因或蛋白的比较来推测^[10]。S7 编码的 VP56 与 III 型 GCRV-104 VP55 蛋白同源性达到 15.1%, 且与 VP55 的分子质量非常接近, 亲水性相似, 据推测其为参与细胞吸附作用的外纤维蛋白, 参与病毒和细胞的吸附过程^[13]。

本实验室运用酵母双杂交技术筛选了与 VP56 蛋白相互作用的宿主蛋白, 并且验证了 VP56 蛋白与 GCJAM-A 蛋白无相互作用^[14]。Fibulin 蛋白是筛选出的唯一一个胞外基质蛋白, 而且与 I 型 GCRV 的 VP7, III 型 GCRV 的 VP55 均能相互作用^[15]。有研究发现, 杆状病毒表达 I 型 GCRV 的 VP6 与 VP7 感染蚕蛹所制备的冻干粉作为草鱼口服疫苗, 可能会对 GCRV 有良好的免疫效果^[16]。然而还没有对 II 型 GCRV 蛋白进行真核表达等相关研究。本研究计划克隆位于病毒 S7 基因组片段上的 VP56 基因编码序列, 构建原核表达质粒 pGEX-4T-3-VP56 与真核表达质粒 pFastBacHTA-VP56, 分别在大肠杆菌及昆虫细胞中研究相应重组蛋白的表达情况, 为进一步研究 VP56 蛋白的功能及在体内体外验证病毒与草鱼细胞的相互作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

GCRV-JX02W 毒株由本实验室分离保存, CIK 细胞、pGEX-4T-3 Vector 由本实验室保存, DH5 α , BL21 (DE3) 购自天根生物有限公司, 大肠杆菌 DH10Bac 感受态 (自己制备), Trizol Reagent、Cellfectin[®] II Reagent、pFastBacHTA

Vector、昆虫细胞 SF9 及其培养基 Sf-900[™] III SFM, 转染培养基 Grace's Insect Medium (unsupplemented) 均购自 Invitrogen。Pyrobest Polymerase、PrimeScript[™] II 1st Strand cDNA Synthesis Kit、PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase、His60 Ni Superflow Resin、限制性内切酶、T4 连接酶均购自 TaKaRa 公司。6 周龄 ICR 小鼠购自上海实验动物研究中心。卡那霉素, 庆大霉素, 四环素, X-gal 均购自上海生工有限公司。IPTG, HRP 标记的羊抗鼠 IgG 等蛋白相关试剂购自上海威奥生物科技有限公司; Anti-His Tag Mouse Monoclonal Antibody 购自 Proteintech。

1.2 试验方法

1.2.1 引物设计与合成

使用 Primer Premier 5.0 软件设计引物 (表 1), 送至上海生物工程有公司合成。

1.2.2 S7 基因 ORF 的扩增及 pGEX-4T-3-S7、pFastBacHTA-S7 的构建

用 Trizol 法提取感染 JX02W 毒株的 CIK 总 RNA, 用 PrimeScript[™] II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒将所提取的总 RNA 反转录成 cDNA 以此为模板, 分别以 pGEX-4T-3-VP56F 与 pGEX-4T-3-VP56R 为引物, 以 pFastBacHTA-VP56F 与 pFastBacHTA-VP56R 为引物扩增, PCR 条件如下: 94 °C 预变性 3 min, (94 °C 30 s, 61.1 °C 30 s, 72 °C 2 min) 35 cycles, 72 °C 10 min, 用 Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System 试剂盒对 PCR 产物目的片段纯化回收。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primers used in the present study

基因 Gene	正向引物 Sense primer(5'-3')	反向引物 Antisense primer(5'-3')	
VP56	CGC <u>GGATCC</u> ATGGCC	CCG <u>CTCGAG</u> GGCCACT	pGEX-4T-3 cloning
	ACTCGTGACAGCCGC	TACAGCAAACCTACCGTCCAA	
VP56	CGC <u>GGATCC</u> GATGGC	CCG <u>CTCGAG</u> GGCCACT	pFastbac-HTA cloning
	CACTCGTGACAGC	TACAGCAAACCTACCGTCC	

注: 斜体下划线碱基序列为酶切位点

Notes: The italicized and underlined nucleotides represent the recognition sites of restriction enzymes

用 BamH I 和 Xho I 限制性内切酶将 pGEX-4T-3 (pFastBacHTA) 和回收的 S7 片段进行双酶切处理, 用 T4 DNA 连接酶将纯化的目的片段分别与酶切好的 pGEX-4T-3 (pFastBacHTA) 空质粒进行连接, 体系为 16 °C, 连接 12 h, T4 Liqase

1 μ L, T4 Liqase buffer 2.5 μ L, 空质粒 100 ng, 目的片段 300 ng (400 ng), 加灭菌水到 25 μ L。取连接产物各 10 μ L 分别转化 DH5 α , 各挑取 10 个单菌落进行 PCR 验证并测序, 取阳性单菌落扩增并提取质粒, 标记为 pGEX-4T-3-VP56 及

pFastBacHTA-VP56。

1.2.3 重组质粒 pGEX-4T-3-VP56 的诱导表达、优化及目的蛋白的纯化

将测序正确的 pGEX-4T-3-VP56 质粒转化 BL21 (DE3),挑取平板上菌落接种到含 Amp⁺ LB 培养基 37 °C 过夜活化。将活化的过夜培养物转移到新鲜的含 Amp⁺ LB 培养基,37 °C,190 r/min,恒温振荡培养 3 h。加入 IPTG 进行诱导,设置 0、0.1、0.3、0.5、0.7 mmol/L 5 个梯度,诱导 4 h 后收集表达细菌,4 °C,8 000 r/min 离心 20 min;沉淀用蒸馏水洗涤两次,用 1 × PBS 重悬沉淀,超声波破碎至溶液澄清。4 °C,8 500 r/min 离心 20 min 后收集上清和沉淀,利用 SDS-PAGE 分析原核表达 GST-VP56 蛋白的可溶性。

在优化条件下大量诱导表达 GST-VP56,用尿素溶液重悬沉淀(4 °C 摇床 20 min),配制 2,4,6 mol/L 尿素洗去杂蛋白,各洗两次,每次洗涤完后 4 °C 8 500 r/min 离心 20 min,收集沉淀,最后用 8 mol/L 尿素重悬沉淀,洗脱液采用 Bradford 法测其浓度,蛋白分装后放在 -80 °C 保存。

1.2.4 VP56 的多克隆抗体制备及特异性分析

从 -80 °C 冰箱取出纯化的蛋白。用纯化的蛋白免疫小鼠,200 μg/只,共免疫 4 次。第 1 次采用腹腔内注射,rVP56 与弗氏完全佐剂按 1:1 混匀呈乳化状态后注射。2 周后的第 2 次注射仍采用腹腔注射,与弗氏不完全佐剂充分 1:1 混匀后注射。第 3 次免疫在第 2 次免疫一周后进行,皮下注射不加佐剂的纯抗原。1 周后可以采取第 4 次免疫,注射条件同第 3 次。在第 4 次免疫一周后,眼角取血,血液放置 37 °C 1 h,4 °C 过夜。第二天 5 000 r/min 离心 10 min 收集血清,分装每管 50 μL,-80 °C 保存,一管 4 °C 备用。检验多抗血清的效果,用纯化的 rVP56 上样,Western blot 检测 VP56 多抗血清的特异性。将转好的 PVDF 膜在含 5% 牛奶的 PBST 溶液室温震荡孵育 2 h,用制备的 VP56 多抗血清作为一抗(1:3 000)室温震荡孵育 1 h 后 4 °C 过夜,PBST 洗 3 次,每次 5 min。再用羊抗鼠的 IgG 作二抗(1:3 000)室温震荡孵育 3 h,PBST 洗 3 次,每次 5 min,最后将 PVDF 膜置于 DAB 溶液里显色,用

ddH₂O 终止反应。

1.2.5 重组质粒 pFastBacHTA-VP56 的转座及杆粒的提取、鉴定

复苏实验室冻存的 DH10Bac 菌,制备 DH10Bac 感受态。将 pFastBacHTA-VP56 质粒转化 DH10Bac 感受态,涂布于 50 μg/mL 卡那霉素,7 μg/mL 庆大霉素,10 μg/mL 四环素,100 μg/mL X-gal,40 μg/mL IPTG 的 LB 琼脂板,于 37 °C,培养 48 h。之后挑取白斑在以上平板上划线纯化,24 h 后挑取白斑放入含 50 μg/mL 卡那霉素,7 μg/mL 庆大霉素,10 μg/mL 四环素的 LB 液体培养基中过夜培养,使用 PureLink™ Hipure 提取杆粒 DNA。使用引物 pUC/M13 F (5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3')、R (5'-AGCGGATAACAATTTTCACACAGG-3'),对杆粒 DNA 进行扩增,PCR 反应体系:模板 1 μL,引物各 1 μL,PrimeSTAR Max Premix(2 ×)25 μL,无菌水 22 μL。反应条件为 93 °C 预变性 3 min,(94 °C 45 s,55 °C 45 s,72 °C 5 min) 35 cycles,72 °C 7 min。

1.2.6 杆粒 DNA 转染昆虫细胞及 Western Blot 检测重组蛋白

使用转染试剂 Cellfectin® II Reagent,于六孔板转染昆虫细胞,细胞存活率大于 95%,密度为 $1.5 \times 10^6 \sim 2.5 \times 10^6$,转染条件为每孔细胞数量 8×10^5 个,杆粒 DNA 1 μg 和 Cellfectin® II Reagent 8 μL。取 8 μL Cellfectin® II Reagent 稀释于 100 μL 不含抗生素的 Grace 培养基混匀,放置 10 min,取 1 μL 杆粒 DNA 稀释于 100 μL 不含添加剂的 Grace 培养基混匀,将稀释的 Cellfectin® II Reagent 与稀释的 DNA 混匀,室温孵育 30 min,逐滴加入六孔板。27 °C 孵育 3 ~ 5 h,吸出转染混合物,换以新鲜 2 mL Sf-900™ III SFM 培养基。27 °C 孵育 72 h 后,每天观察细胞。

运用 His60 Ni Superflow Resin 纯化 His-VP56 蛋白,纯化后的蛋白溶液采用 Bradford 法测其浓度,蛋白分装 -80 °C 保存。用 Anti-His 单抗作为一抗,HRP 标记的羊抗鼠的 IgG 作二抗进行 Western blot 分析。

2 结果

2.1 S7 基因 ORF 的扩增及 pGEX-4T-3-S7 和 pFastBacHTA-S7 的构建

提取感染 JX02W 毒株的 CIK 总 RNA, 用 PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒将所提取的总 RNA 反转录成 cDNA, 以此 cDNA 作为模板, 克隆进 pGEX-4T-3 与 pFastBacHTA 载体上。PCR 扩增出约 1 539 bp 条带, 大小和 VP56 基因大小相同(图 1)。质粒测序结果表明 pGEX-4T-3-S7 与 pFastBacHTA-S7 均构建成功。

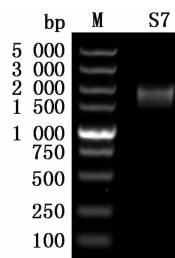


图 1 S7 基因 PCR 扩增电泳图
Fig. 1 Electrophoretic profile of PCR products of S7 gene

M. marker 5 000

2.2 重组蛋白 rVP56 的诱导表达、优化及蛋白纯化

SDS-PAGE 结果显示, 经 IPTG 诱导的菌体沉淀相比未经 IPTG 诱导的对照菌在 83 ku 有一条明显的目的条带(图 2)。目的蛋白几乎全部存在于沉淀中。SDS-PAGE 结果对比发现, 使用 IPTG 0.1~0.7 mmol/L 诱导, 目的条带均比较明显, 且 IPTG 浓度的提高对目的蛋白的表达没有明显变化, 所以将 IPTG 诱导浓度定为 0.1 mmol/L(图 3)。纯化后的重组蛋白 rVP56, 80% 溶解在 8 mol/L 的尿素里, 用 Bradford 蛋白质定量法测定其浓度约 2.4 mg/mL。rVP56 纯化后几乎没有了杂带(图 4)。

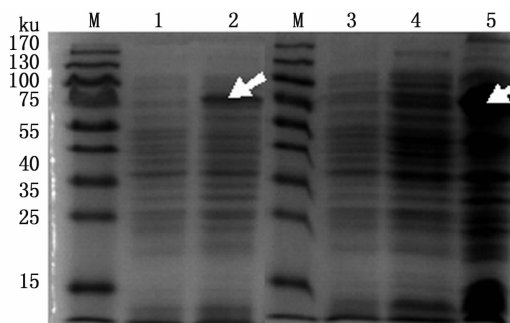


图 2 重组蛋白 rVP56 的诱导表达及可溶性分析

Fig. 2 Induced expression and solubility analysis of rVP56 protein

M. 蛋白质标准物质; 1,3. 未诱导细菌沉淀; 2. 诱导细菌沉淀; 4. 诱导细菌超声破碎后的上清; 5. 诱导细菌超声破碎后的沉淀

M. protein marker; 1,3. the precipitate of uninduced bacterial control; 2. the precipitate of induced bacterial control; 4. the supernatant of induced bacteria after ultrasonic; 5. the precipitate of induced bacteria after ultrasonic

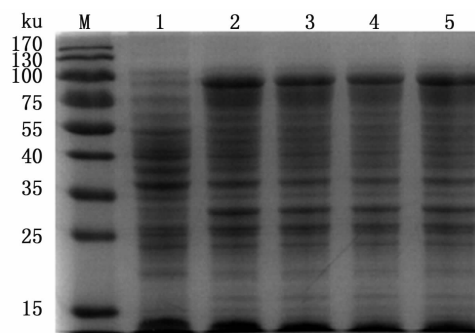


图 3 不同浓度 IPTG 对 rVP56 的诱导效果

Fig. 3 Effect of IPTG concentration on the expression of rVP56

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

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

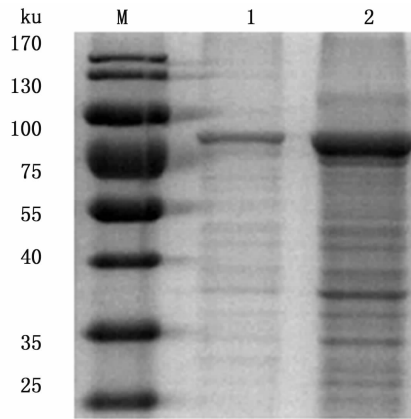


图 4 rVP56 纯化产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE of purified rVP56

M. 蛋白标准物质; 1. 纯化后的样品; 2. 0.1 mmol/L 浓度诱导的沉淀

M. protein marker; 1. purified sample; 2. the precipitate of bacteria induced with 0.1 mmol/L

2.3 VP56 多克隆抗体特异性分析

Western blot 结果显示, rVP56 样品中出现了大小约为 83 ku 的目的条带(图 5); 制备的 anti-VP56 多克隆抗体与重组蛋白 rVP56 产生特异性免疫反应。

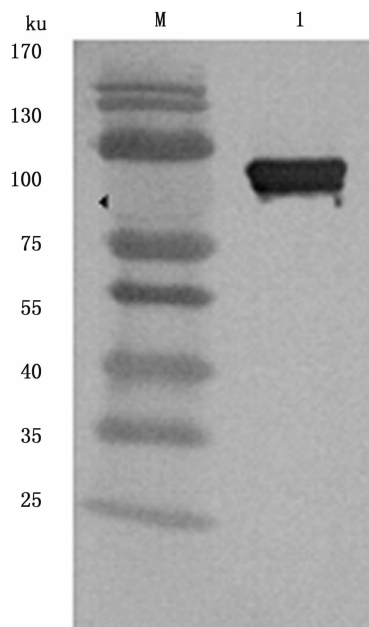


图 5 Western-blot 检测 rVP56 重组蛋白

Fig. 5 Western-blot detection of rVP56

M. Marker; 1. rVP56 重组蛋白

M. protein marker; 1. recombinant protein rVP56

2.4 杆粒 DNA 的鉴定

以 PureLink™ Hipure 试剂盒提取杆粒 DNA 为模板, 对杆粒 DNA 进行扩增, PCR 反应体系: 模板 1 μ L, 引物各 1 μ L, PrimeSTAR Max Premix ($2 \times$) 25 μ L, 无菌水 22 μ L。反应条件为 93 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, (94 $^{\circ}$ C 45 s, 55 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 5 min) 35 cycles, 72 $^{\circ}$ C 7 min。PCR 产物经过电泳显现为约 4 000 bp 特异性条带, 大小和预期相同(图 6)。

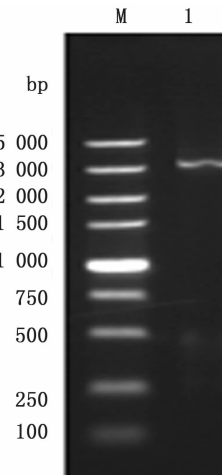


图 6 杆粒 DNA 扩增电泳图

Fig. 6 Electrophoretic profile of PCR products of recombinant bacmid DNA

M. 标准物质 5 000

M. marker 5 000

2.5 重组蛋白 VP56 的真核表达及纯化

按照 Bac-to-bac 杆状病毒表达系统用户手册于六孔板转染昆虫细胞, 设置一个未转染的对照, 27 $^{\circ}$ C 下孵育细胞 72 h, 每天观察细胞。自转染后 96 h, 发现细胞核体积比对照组稍变大, 细胞生长停滞, 呈囊泡状(图 7)。将六孔板每孔细胞刮下于离心管, 1 000 r/min 离心 5 min, 采用 0.22 μ m 滤膜过滤病毒上清液。细胞沉淀加入 $2 \times$ SDS loading buffer 30 μ L, 100 $^{\circ}$ C 煮沸 5 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清制样, 取少量病毒上清反复冻融后制样, Western 结果显示, 表达了重组蛋白 VP56, 大小约为 62 ku, 为可溶蛋白。大量表达 His-VP56, 使用 His60 Ni Superflow Resin 纯化 His-VP56 蛋白制样(图 8)。

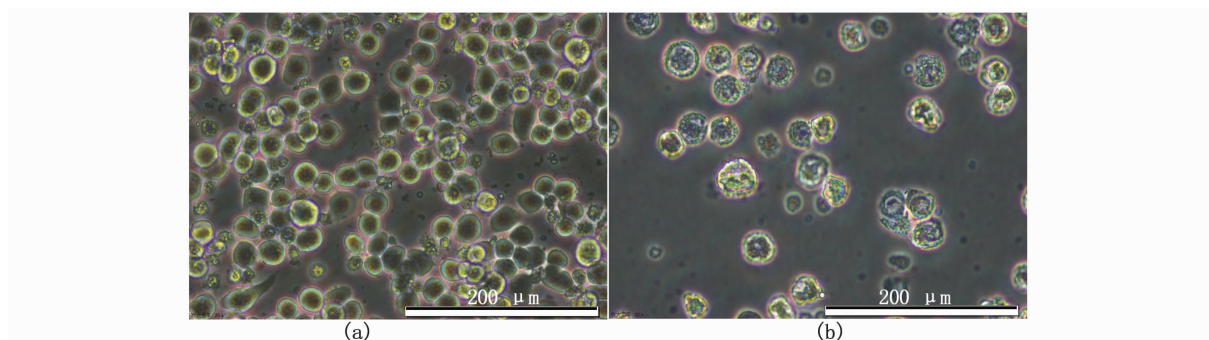


图7 昆虫细胞的感染现象

Fig.7 Signs of infection

a. 正常 SF9 细胞; b. 杆粒转染的 SF9 细胞(转染后 96h)

a. Normal SF9 cell; b. SF9 cell transfected by bacmid(96 h after transfection)

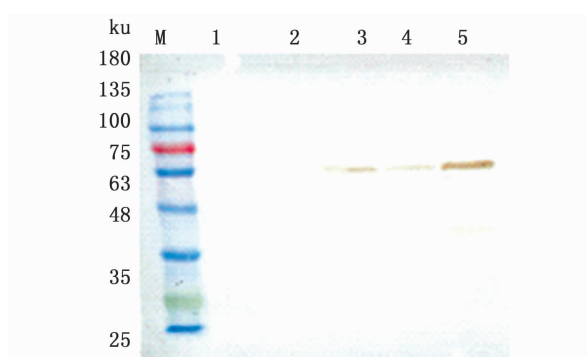


图8 His-VP56 的 Western Blot 分析

Fig.8 Western Blot Analysis of His-VP56

M. 蛋白标准物质; 1. 正常 SF9 细胞; 2-3. 不同杆粒转染的 SF9 细胞; 4. 病毒上清; 5. 纯化后的 VP56

M. protein marker; 1. Normal SF9 cell; 2-3. SF9 cell transfected by different bacmids; 4. Virus supernatant; 5. VP56 after purification

3 讨论

I 型 GCRV 被最早发现,长期以来国内将其视为模式毒株并开展深入研究^[17]。和永杏等对 I 型 GCRV-JX01 外衣壳蛋白 VP5 和 VP7 作为亚单位疫苗的疫苗蛋白原的免疫保护性进行了研究,表明 VP7 与 VP5 抗血清均能特异性中和 GCRV 病毒粒子,能有效阻止病毒的感染^[18-19]。有研究表明,使用杆状病毒表达系统在蚕体表达的 VP7 蛋白可作为草鱼口服蛋白疫苗,重组的病毒可作为 VP6 核酸疫苗^[16]。而 II 型 GCRV 毒株 (HZ08、GD108、106、109、918 和 HuNan794) 等最近几年才被陆续报道,王杭军等对 GD108 株 VP5 蛋白进行了原核表达及免疫原性研究,首次发现其 VP5 蛋白可诱导草鱼产生高滴度的抗体,但不

能为草鱼提供抗 GCRV 感染下免疫保护^[20-21]。本实验室宗乾坤等^[22]对 GCRV-JX02 株外衣壳蛋白 VP4、VP35 蛋白进行了研究,为 GCRV 主要流行株血清学检测方法的建立奠定了基础。苏岚等^[23]对 III 型 GCRV104 株 VP6 蛋白进行了毕赤酵母表达,使表达的蛋白免受蛋白酶的降解。

本研究对 II 型 GCRV 的 S7 基因编码的 VP56 蛋白进行了体外表达。首先采用了最经典的大肠杆菌原核表达系统,构建了 pGEX-4T-3-VP56 原核表达载体,表达 GST-VP56 融合蛋白。遗憾的是表达的蛋白质形成了不溶的包涵体,于是使用尿素梯度重悬混匀处理的方法,获得了浓度为 2.4 mg/mL 的 GST-VP56 融合蛋白,大小约为 83 ku。并用纯化的蛋白免疫小鼠获得了抗 VP56 的多克隆抗体。于是采用本实验室常规的 Bac-to-Bac 重组杆状病毒构建技术,尝试运用杆状病毒表达系统在昆虫细胞内表达 VP56 蛋白。把 VP56 基因克隆至 pFastBacHTA 载体上,用自己制备的大肠杆菌 DH10Bac 感受态转化,涂布卡那,庆大霉素,四环素的三抗 LB 平板,提取重组杆粒,转染昆虫细胞。待细胞出现明显病变现象时,收集细胞及分离病毒上清,Western blot 结果显示,转染杆粒的细胞与其 P₁ 病毒上清均成功表达了 His-VP56 蛋白,大小与预计相同,约为 62 ku,为可溶蛋白,并运用 His60 Ni Superflow Resin 纯化试剂盒纯化 His-VP56 蛋白,浓度约为 1.5 mg/mL。

本实验体外表达了 II 型 GCRV 外层衣壳上的突起蛋白 VP56,运用大肠杆菌原核表达系统和杆状病毒真核表达系统获得了不同形式纯化的

蛋白,其中大肠杆菌表达的蛋白制作了抗 VP56 多克隆抗体为其免疫原性研究提供了实验材料,昆虫细胞表达的可溶性蛋白为研究其自身生物功能和进一步研究病毒与草鱼宿主细胞蛋白相互作用以及研究基于杆状病毒表达载体的 GCRV 新型基因工程疫苗奠定了基础。

参考文献:

- [1] 张超,王庆,石存斌,等. 草鱼呼肠孤病毒 HZ08 株的分离与鉴定[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.
- [2] 王方华,李安兴. 草鱼病毒性出血病研究进展[J]. 南方水产科学, 2006, 2(3): 66-71. WANG F H, LI A X. Advances in research of hemorrhage of grass carp[J]. South China Fisheries Science, 2006, 2(3): 66-71.
- [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 carp's Toxic Bleeding Disease [J]. Fishery Modernization, 2008, 35(1): 45-49.
- [4] ZHANG Q Y, RUAN H M, LI Z Q, et al. Detection of Grass Carp Hemorrhage Virus (GCHV) from Vietnam and comparison with GCHV strain from China [J]. High Technology Letters, 2003, 9(2): 7-13.
- [5] 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.
- [6] 曾伟伟,王庆,王英英,等. 草鱼呼肠孤病毒三重 PCR 检测方法的建立及其应用[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 detection of grass carp reovirus and its application[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2013, 20(2): 419-426.
- [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(2): 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与鉴定[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.
- [9] 曾伟伟,王庆,刘奎奎,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.
- [10] 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.
- [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]. 上海: 上海海洋大学, 2010. ZHANG C. Isolation, identification of grass carp reovirus HZ08 and molecular characteristics of its complete genome [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2010.
- [11] ZHANG C, WANG Q, SHI C B, et al. Molecular analysis of grass carp reovirus HZ08 genome segments 1-3 and 5-6. [J]. Virus Genes, 2010, 41(1): 102-104.
- [12] 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): 756-762. WANG T, XU D, LÜ 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): 756-762.
- [13] 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.
- [14] 喻飞,王浩,宗乾坤,等. 草鱼呼肠孤病毒 GCRV VP56 相互作用蛋白的鉴定[J]. 水产学报, 2016, 40(3): 371-378. YU F, WANG H, ZONG Q K, et al. Screening of potential host proteins interacting with VP56 of type II grass carp reovirus by yeast two-hybrid system[J]. Journal of Fisheries of China, 2016, 40(3): 371-378.
- [15] YU F, WANG H, LIU W S, et al. Grass carp *Ctenopharyngodon idella* Fibulin-4 as a potential interacting partner for grass carp reovirus outer capsid proteins [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2015, 48: 169-174.
- [16] LIU B, GONG Y C, LI Z, et al. Baculovirus-mediated GCRV vp7 and vp6 genes expression in silkworm and grass carp[J]. Molecular Biology Reports, 2016, 43(6): 509-515.
- [17] ATTOUI H, FANG Q, JAARAR M F, et al. Common evolutionary origin of aquareoviruses and orthoreoviruses revealed by genome characterization of Golden shiner reovirus, Grass carp reovirus, Striped bass reovirus and golden ide reovirus (genus *Aquareovirus*, family Reoviridae). [J]. Journal of General Virology, 2002, 83(8): 1941-1951.
- [18] HE Y X, 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: 132.
- [19] HE Y X, YANG Q, XU H X, et al. Prokaryotic expression and purification of grass carp reovirus capsid protein VP7 and its vaccine potential [J]. African Journal of Microbiology

- Research, 2011, 5(13): 1643-1648.
- [20] 王杭军, 叶星, 田园园, 等. 草鱼呼肠孤病毒 GCRV-GD108 株 VP5 蛋白的原核表达[J]. 华中农业大学学报, 2013, 32(2): 97-102.
- WANG H J, YE X, TIAN Y Y, et al. Prokaryotic expression of GCRV-GD108 VP5 protein [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2013, 32(2): 97-102.
- [21] 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[J]. 水产学报, 2013, 37(1): 109-116.
- 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): 109-116.
- [22] 宗乾坤, 张也, 吕利群. 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, 2016, 40(3): 355-362.
- ZONG Q K, ZHANG Y, LÜ L Q. Preparation and immunogenicity of polyclonal antibodies against VP4, VP35 protein of type II grass carp reovirus[J]. Journal of Fisheries of China, 2016, 40(3): 355-362.
- [23] 苏岚, 曾令兵, 周勇, 等. 草鱼呼肠孤病毒 VP6 蛋白在毕赤酵母中表达的初步研究[J]. 淡水渔业, 2012, 42(6): 38-42.
- SU L, ZENG L B, ZHOU Y, et al. Preliminary study on the expression of Grass carp reovirus VP6 protein in *Pichia pastoris*[J]. Freshwater Fisheries, 2012, 42(6): 38-42.

Prokaryotic and eukaryotic expression analysis of outer capsid VP56 protein encoded by type II reovirus of grass carp

SHENG Jialu¹, ZONG Qiankun¹, YU Fei¹, WANG Hao^{1,2,3}, LÜ Liqun^{1,2,3}

(1. National Pathogen Collection Center for Aquatic Animals, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory of Agriculture 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)

Abstract: Type II reovirus of grass carp represents the pandemic strain for grass carp hemorrhagic disease in China. VP56 is the outer most protein on the virion of type II reovirus, and is suggested to play a key role during viral entry. To facilitate the study on biological functions of VP56, here, we investigated the prokaryotic and eukaryotic expression of VP56 gene of type II reovirus. The VP56 ORF encoded by the S7 genomic fragment was amplified by RT-PCR technology from the cDNA of GCRV-JX02W infected CIK cells, and it was cloned into the pGEX-4T-3 and pFastBacHTA, respectively. After confirmation of the clones by sequencing analysis, the pGEX4T-3-VP56 was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) strain to express fusion protein GST-VP56. SDS-PAGE and Western Blot assays indicated that GST-VP56 was successfully expressed in *E. coli* BL21 (DE3) strain with the molecular weight of about 83 ku. The recombinant protein mainly existed in the form of inclusion bodies. Polyclonal antibody was generated by immunization of mice with the purified recombinant VP56 proteins and the specificity of antibodies was determined by Western Blot. pFastBacHTA-VP56 was transformed into *E. coli* DH10Bac strain to get recombinant bacmid DNA that was analyzed by PCR. Then, the recombinant bacmid DNA was transfected into SF9 cells. Positive SF9 cells transfected with bacmid DNA stopped growth and lysed at 96 h post transfection. Western Blot results showed that the His-tag antibody could be specifically bound to His-VP56 fusion protein with the molecular weight of about 62 ku, which was soluble protein. In this paper, recombinant VP56 proteins were successfully expressed by both prokaryotic and eukaryotic expression systems, and polyclonal antiserum against VP56 was generated, which laid a foundation for characterizing the function of VP56 protein during viral infection.

Key words: type II grass carp reovirus; VP56; prokaryotic expression; eukaryotic expression