

鲤春病毒血症病毒核蛋白原核表达 及单克隆抗体制备

王方 彭俊杰 王业大 刘学芹

华中农业大学水产学院/淡水水产健康养殖湖北省协同创新中心, 武汉 430070

摘要 以含有鲤春病毒血症病毒核蛋白基因的质粒 N-RFP 为模板, 通过 PCR 方法扩增 N 基因编码区全长, 大小为 1 254 bp。将该基因连接到 pGEX-KG 载体上, 构建了 SVCV-N-KG 重组质粒。将重组质粒转化到 BL21 菌株中进行诱导表达, 采用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析鲤春病毒血症病毒 N 蛋白的表达情况。以纯化后的 N 蛋白为抗原免疫 BALB/c 小鼠, ELISA 测定免疫小鼠的血清效价。将血清效价较高的小鼠脾细胞和骨髓瘤细胞融合, 4 次亚克隆后, 通过 ELISA 及染色体数目分析筛选出 1 株杂交瘤细胞, 命名为 N-2。将杂交瘤细胞注射到小鼠腹腔制备单克隆抗体。经间接免疫荧光和免疫印迹实验证明该抗体可以特异性识别鲤春病毒血症病毒 N 蛋白。进一步分析表明, 该抗体识别的靶位点位于 N 蛋白第 227~336 位氨基酸之间。

关键词 鲤春病毒血症病毒; 核蛋白; 原核表达; 单克隆抗体

中图分类号 S 941.41⁺6 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2017)03-0079-07

鲤春病毒血症 (spring viremia of carp, SVC) 是鲤最主要传染病之一, 具有高传染性、高致死率等特征。该病被世界动物卫生组织列入水生动物疫病名录^[1]。感染鱼出现肾脏、脾脏和肝脏组织的破坏, 导致出血、水盐平衡能力丧失及免疫反应损伤。一般在春季 10~17 °C 水温时死亡率较高。温度升高时, 受感染的鲤可以产生抗体中和病毒, 并防止再次感染^[2]。

引起 SVC 的病原为鲤春病毒血症病毒 (*Carp springvivirus*), 常称为 (spring viremia of carp virus, SVCV), 属于弹状病毒科 (*Rhabdoviridae*) 鲤春病毒属 (*Springvivirus*)。SVCV 基因组为不分节段的单股负链 RNA, 编码 5 种结构蛋白, 即核蛋白 N (nucleoprotein)、磷酸化蛋白 P (phosphoprotein)、基质蛋白 M (matrix protein)、糖蛋白 G (glycoprotein) 和 RNA 聚合酶 L (polymerase)^[3-4]。病毒的传播主要依赖鱼的粪便、尿液及媒介物^[2]。自 SVCV 发现以来, 国内外研究者对其进行了大量研究, 主要集中在 SVCV 毒株遗传变异性及其有效标记^[5-6]、SVCV 分离株的基因聚类与地理位置相关关系^[7]、EPC 细胞感染 SVCV 后 microRNA 及蛋白的差异研

究^[8]、SVCV 的致病机制研究^[9-10] 以及 SVCV 的检测方法等^[11-13]。

针对 SVCV N 蛋白的研究较少。有研究表明利用靶向 SVCV N 及 P 的干扰 RNA, 可以抑制病毒的复制, 且同时靶向这 2 个基因的串联 siRNA 抑制效果最佳^[14]。SVCV 的 N 蛋白可以通过泛素化靶标线粒体抗病毒信号蛋白, 从而抑制干扰素 1 的表达, 达到免疫逃逸的目的^[15]。

由于 SVC 的严重性与普遍性, 探究该病的致病机制及研制开发诊断试剂具有重要意义^[16]。基于 SVCV N 蛋白在病毒转录调节中的重要功能, 通过原核表达 SVCV 的 N 蛋白, 将其纯化后免疫 BALB/c 小鼠, 制备 SVCV-N 单克隆抗体, 可为 SVCV 的致病机制、快速检测及临床诊断奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1) 试验动物。4~6 周龄雌性 BALB/c 小鼠, 购自湖北省动物疫病预防控制中心。

2) 质粒、菌株、细胞株及毒株。质粒 pGEX-KG

收稿日期: 2016-09-20

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31172433); 湖北省科技支撑计划项目 (2015BBA234); 中央高校基本科研业务费专项 (2013PY071)

王方, 硕士研究生。研究方向: 水产病毒致病机理与综合防控。E-mail: 13871306962@163.com

通信作者: 刘学芹, 博士, 教授。研究方向: 水产病毒致病机理与综合防控。E-mail: xueqinliu@mail.hzau.edu.cn

为笔者所在实验室前期保存;N-RFP 质粒由笔者所在实验室研究生柳力月构建;DH5 α 大肠杆菌克隆菌株、BL21(DE3)大肠杆菌表达菌株均购自北京全式金生物技术有限公司;SP2/0 骨髓瘤细胞、FHM 细胞与 SVCV 为笔者所在实验室保存。*Bam* H I、*Xho* I 限制性内切酶购自 TaKaRa 公司;PCRmix、T4 DNA 连接酶购自 Thermo 公司;DNA 纯化回收试剂盒、质粒小量提取试剂盒购自 OMEGA 公司;

细胞培养基购自 Hyclone 公司;牛血清白蛋白、胰酶、HAT、HT、PEG 等购自 Sigma 公司;抗体购自武汉博士德生物工程有限公司。

3)引物序列。根据 GenBank 中 SVCV N 基因序列(AJ318079.1),利用 Primer5.0 软件设计扩增 N 基因全长及 4 个片段的特异性引物。所有引物的上下游均加入酶切位点 *Bam* H I/*Xho* I。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primers sequences

引物名称 Primer	引物序列 Primers sequences
SVCV-N-F	AAAGGATCCATGAGTGTTCATTCGGATCA
SVCV-N-R	AAACTCGAGTCCATAGGTTTGTATTATCCAT
SVCV-N1-F	CGGGATCCGCCACCATGAGTGTTCATTCGGATCAAAAACA
SVCV-N1-R	CCGCTCGAGCTCAGCACTCACCTCAGCGTTC
SVCV-N2-F	CGGGATCCGCCACCATGGCTGAGGTGAGTGCTGAGGATGA
SVCV-N2-R	CCGCTCGAGAACATGTCCCAGGGTGGCGAGT
SVCV-N3-F	CGGGATCCGCCACCATGGCCACCTGGGACATGTTGTAA
SVCV-N3-R	CCGCTCGAGTAAGGCGTAAGCCATCAGCAAGC
SVCV-N4-F	CGGGATCCGCCACCATGCTGATGGCTTACGCCCTTAGGT
SVCV-N4-R	CCGCTCGAGTCCATAGTGTGTTTATCCATTGCCC

1.2 重组质粒的构建

1)PCR 扩增目的基因。以含有 SVCV 核蛋白基因的质粒 N-RFP 为模板,SVCV-N-F 及 SVCV-N-R 为引物,PCR 扩增 SVCV N 基因编码区全长。PCR 程序如下:98 °C 预变性 2 min;98 °C 变性 10 s,55 °C 退火 15 s,72 °C 延伸 25 s,共 35 个循环;72 °C 延伸 5 min。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测。

2)酶切、连接与转化。将 PCR 回收产物及 pGEX-KG 质粒用限制性内切酶 *Bam* H I 和 *Xho* I 双酶切,连接并转化到大肠杆菌感受态细胞。步骤为:冰浴 30 min;42 °C 水浴 90 s,快速冰浴 2 min;加入 500 μ L 预热的 LB 培养基,混匀后置于 37 °C 摇床培养 45 min;将菌液涂布到含氨苄抗生素的 LB 琼脂平板,置于 37 °C 培养 12 h。

1.3 重组质粒的提取及鉴定

挑取平板上的单菌落,接种到 6 mL 含 0.1%氨苄抗生素的 LB 培养基中,置于 37 °C 摇床培养过夜;按照试剂盒操作步骤提取重组质粒。以 SVCV-N-F 及 SVCV-N-R 为引物对重组质粒进行 PCR 鉴定,将阳性质粒送往武汉擎科创新生物科技有限公司进行序列测定。测序结果与 GenBank 中 SVCV N 基因(AJ318079.1)进行核苷酸同源性比较分析。

1.4 重组蛋白诱导表达及纯化

对融合蛋白进行大量表达及纯化。步骤如下:

取大量诱导后的菌液,收集菌体;用 Buffer A 重悬后,进行高压破碎;4 °C 12 000 r/min 离心 10 min,收集包涵体沉淀;加入 Buffer A、SKL(20%)及 DTT;剧烈震荡后,室温静置 0.5~2 h;4 °C 12 000 r/min 离心 10 min 收集上清;加入 PEG 4000、氧化性谷胱甘肽、还原性谷胱甘肽,装袋后透析;将透析后蛋白加入 20%甘油-80 °C 保存备用。

1.5 动物免疫

用纯化后的 SVCV-N 蛋白,免疫 4 周龄的雌性 BALB/c 小鼠,共进行 3 次皮下免疫及 1 次加强免疫。每次间隔时间为 14 d,抗原免疫剂量均为每只 200 μ g,第 2 次免疫及第 3 次免疫 10 d 后,对小鼠尾部静脉采血。收集血清,通过间接 ELISA 检测产生的抗体效价。选择抗体效价高的 BALB/c 小鼠进行加强免疫,间隔 3 d 后进行细胞融合实验。

1.6 间接 ELISA

包被稀释至 1 ng/ μ L 的抗原与 pGEX-KG 诱导的细菌全蛋白至 96 孔板,PBST 洗涤 3 次;加入封闭液 PBSA(PBS+1%BSA),37 °C 封闭 1 h;制备的单克隆抗体孵育 1 h;洗涤后用 HRP 标记的羊抗小鼠 IgG 孵育 45 min,加入底物液 A 与底物液 B,反应 10 min;加入终止液并用酶标仪测定 OD₆₃₀ 值。

1.7 细胞融合

1)脾细胞的制备。制备免疫脾细胞及饲养脾细胞,其方法类似,具体步骤如下:将小鼠处死,取脾脏

至研磨器中研磨。静置使组织团块沉于底部,收集上层的细胞悬液至无菌离心管中;重复洗涤2次后,将细胞悬液1 200 r/min,离心10 min,用RPMI-1640基础液重悬。免疫脾细胞重悬后计数备用。而饲养脾细胞离心后用适量HAT培养基重悬后放于37℃备用。

2)细胞融合。将复苏的瘤细胞与免疫脾细胞用PEG方法进行融合,具体步骤如下:计数后的SP2/0骨髓瘤细胞与免疫脾细胞按照1:3的比例,在离心管内混和,1 200 r/min离心10 min;弃上清;将离心管放于37℃水中,逐滴加入PEG 0.8 mL;缓慢加入RPMI-1640基础液40 mL;1 200 r/min离心5 min,细胞沉淀用HAT培养基重悬,并与饲养脾细胞混匀;接种于96孔培养板中,250 μL/孔;置于37℃5% CO₂培养箱中培养。

1.8 亚克隆筛选阳性杂交瘤细胞

将检测为阳性的杂交瘤进行亚克隆。将杂交瘤细胞进行梯度稀释至30 cell/mL,与制备的饲养脾细胞混匀后接入96孔板;待长成集落后换液;集落长至孔1/4时进行ELISA检测;检测值为阳性的孔再次进行亚克隆;重复几次,待ELISA检测试验组OD值阳性率100%、而对照组OD值阳性率为0%时即可建株。

1.9 染色体的制备

将杂交瘤细胞在6孔板中培养;待细胞长到80%左右,加入秋水仙素,使终质量浓度为0.4 μg/mL;3 h后用无血清1640培养基将细胞吹下,1 600 r/min离心5 min,收集细胞;细胞沉淀用600 μL的KCl(0.075 mol/L)低渗溶液悬浮,置37℃温育30 min;加入600 μL固定液1 600 r/min离心5 min;细胞沉淀用800 μL固定液重悬,重复固定2次后进行计数并滴片;用10% Giemsa染液染10~15 min,流水冲洗,自然干燥;正置显微镜进行观察并拍照。

1.10 单克隆抗体制备

将杂交瘤细胞用无血清1640培养基吹下;离心收集细胞,用1640培养基洗2次,最终以 1×10^5 cell/mL重悬;将重悬的杂交瘤细胞400 μL/只注射到小鼠腹腔;5~6 d后收集腹水;离心上清即为单克隆抗体。

1.11 单克隆抗体验证

1)ELISA验证。将制备的单克隆抗体用封闭液进行倍比稀释,从1:1 000~1:32 768 000,包被

好抗原后进行ELISA检测。根据对照孔的OD值及实验孔中的OD值来验证单克隆抗体的特异性。

2)间接免疫荧光实验。24孔板培养FHM细胞,待长满单层后感染SVCV,设未感染孔为阴性对照。24 h后进行间接免疫荧光实验。步骤如下(每进行下一步之前用PBS充分洗涤):吸弃培养基,用甲醇固定10 min;0.2%的Triton X-100通透10 min;封闭液PBSA封闭1 h;单克隆抗体用封闭液1:500稀释加入细胞孔孵育1~2 h;羊抗鼠IgG 488孵育45 min;DAPI染液孵育10 min;用PBS洗涤后在荧光显微镜下进行免疫荧光观察。

3)Western blot检测。用T25细胞瓶培养FHM细胞,待长满单层后感染SVCV,设未感染细胞为阴性对照。24 h后进行样品收集,煮样后进行Western blot检测,具体步骤如下:配制12%的聚丙烯酰胺凝胶;点样后80 V电压2.5 h进行跑胶;采用干转的方法,9 V电压30 min进行转膜;封闭后加入制备的单克隆抗体(1:5 000稀释)孵育1~2 h;洗涤4次后加入HRP标记的羊抗鼠二抗(1:5 000稀释)孵育45 min;洗涤4次,用ECL化学发光底物进行孵育显色。

1.12 单克隆抗体所识别抗原位点初步确定

通过对SVCV-N蛋白抗原表位进行预测,将N蛋白分为4段,每段之间重复6个氨基酸。第1段:1~127位氨基酸;第2段:122~232位氨基酸;第3段:227~336位氨基酸;第4段:331~418位氨基酸。根据分段结果分别设计引物进行扩增,并连接到pGEX-KG载体进行表达。将4段表达的蛋白进行Western blot检测。用制备的单克隆抗体为一抗,HRP标记的羊抗鼠抗体作为二抗。根据显色结果来确定制备的单克隆抗体所识别的抗原位置。

2 结果与分析

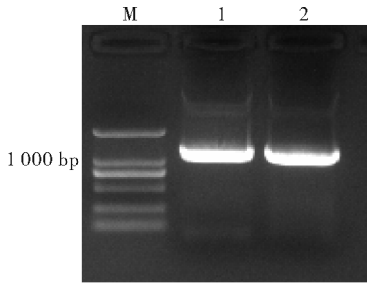
2.1 SVCV-N基因的扩增

以含有SVCV N基因的质粒为模板,SVCV-N-F及SVCV-N-R为引物进行PCR扩增。扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,在1 254 bp位置检测到特异性目的条带(图1),与预期结果一致。

2.2 重组质粒SVCV-N-KG的验证

将连接产物转化到大肠杆菌感受态细胞,将长出的单菌落进行培养。质粒提取后进行PCR鉴定,1%琼脂糖凝胶电泳。在凝胶成像仪下观察到大小为1 254 bp的目的条带(图2),PCR验证为阳性的

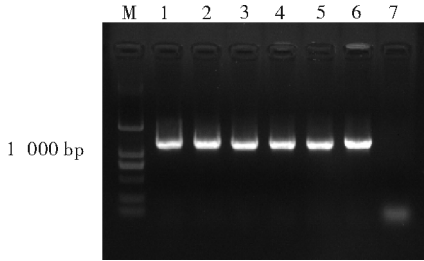
质粒送到公司进行序列测定,将测序结果在 NCBI 上与 SVCV 的 *N* 基因进行比对,核苷酸同源率为 99%,证明重组质粒构建成功,命名为 SVCV-N-KG。



M: DL2000 marker; 1, 2: SVCV-N 基因 PCR 扩增产物。
M: DL2000 marker; 1, 2: PCR amplification product of SVCV-N.

图 1 SVCV-N 基因 PCR 扩增产物

Fig.1 PCR product of SVCV-N



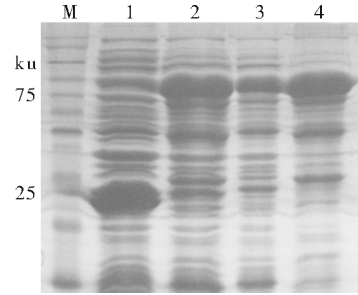
M: DL2000 marker; 1~6: 重组质粒 PCR 产物; 7: 阴性对照。
M: DL2000 marker; 1~6: PCR amplification product of recombinant plasmid; 7: Negative control.

图 2 重组质粒 PCR 鉴定

Fig.2 PCR identification of recombinant plasmid

2.3 SVCV-N 原核表达

将提取的重组质粒 SVCV-N-KG 转化大肠杆菌 BL21,加入 0.1% IPTG,37 °C 诱导 6 h。5 000 r/min 离心 10 min。收集菌液,高压破碎后收集上清、沉淀进行 SDS-PAGE 检测;结果表明该融合蛋白主要以包涵体形式表达,上清中也有少量表达,蛋白大小约为 70 ku (图 3),与预期大小一致。



M: 蛋白 marker; 1: pGEX-KG 组细菌蛋白; 2: SVCV-N-KG 组细菌总蛋白; 3: SVCV-N-KG 组上清液; 4: SVCV-N-KG 组包涵体。
M: Protein marker; 1: Total bacteria protein of pGEX-KG group; 2: Total bacteria protein of SVCV-N-KG group; 3: Soluble group of SVCV-N-KG; 4: Insoluble group of SVCV-N-KG.

图 3 SVCV-N-KG 可溶性分析

Fig.3 Solubility analysis of SVCV-N-KG by SDS-PAGE

2.4 免疫后小鼠血清效价测定

将纯化的融合蛋白免疫 5 只雌性 BALB/c 小鼠。经过 3 次免疫后进行断尾采血,血清处理后用 ELISA 封闭液倍比稀释(1 : 100~1 : 12 800),测定血清中的抗体效价。结果如表 2 所示,小鼠免疫

表 2 免疫小鼠血清效价

Table 2 Serum titer in immune mice

血清稀释比例 Dilution ratio of serum	1 号鼠 OD 值 Optical density of mouse 1	2 号鼠 OD 值 Optical density of mouse 2	3 号鼠 OD 值 Optical density of mouse 3	4 号鼠 OD 值 Optical density of mouse 4	5 号鼠 OD 值 Optical density of mouse 5	阴性鼠 OD 值 Optical density of NC mouse
1 : 100	2.749	2.630	2.838	2.687	2.812	0.123
1 : 200	2.681	2.721	2.784	2.862	2.811	0.149
1 : 400	2.684	2.603	2.725	2.837	2.800	0.112
1 : 800	2.627	2.484	2.690	2.790	2.684	0.138
1 : 1 600	2.605	2.215	2.520	2.673	2.585	0.114
1 : 3 200	2.484	1.923	2.301	2.620	2.349	0.109
1 : 6 400	2.421	1.504	1.883	2.312	1.977	0.149
1 : 12 800	2.123	1.015	1.488	1.904	1.512	0.146

效果良好,在稀释度 1 : 12 800 时,5 只小鼠 OD 值仍在 1 以上,按照 ELISA 检测结果,选择 1 号小鼠进行加强免疫,用于后期细胞融合实验。

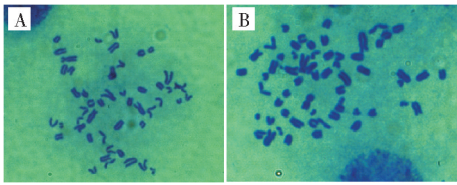
2.5 杂交瘤细胞的染色体制备

将分泌特异性抗 SVCV-N-KG 的细胞株扩大培养,进行染色体制备,同时制备 SP2/0 瘤细胞的

染色体作为对照。如图 4 所示,杂交瘤细胞染色体数目大于瘤细胞染色体数目,表明瘤细胞与脾细胞成功融合。

2.6 单克隆抗体效价测定

将筛选出的杂交瘤细胞扩大培养后注入小鼠腹腔制备腹水。将收集的腹水离心后进行倍比稀释



A:SP2/0; B:杂交瘤细胞。A:SP2/0 cells; B:Hybridoma cells.

图 4 细胞染色体计数

Fig.4 Chromosome counting of cells

表 3 单克隆抗体效价测定

Table 3 Titer determination of monoclonal

抗体稀释比例 Dilution ratio of antibody	con-N-2 OD 值 Optical density of con-N-2	N-2 OD 值 Optical density of N-2
1 : 1 000	0.075	2.356
1 : 2 000	0.069	2.061
1 : 4 000	0.086	2.310
1 : 8 000	0.073	1.696
1 : 16 000	0.061	1.549
1 : 32 000	0.066	1.002
1 : 64 000	0.065	0.673
1 : 128 000	0.068	0.371
1 : 256 000	0.061	0.237
1 : 512 000	0.059	0.111
1 : 1 024 000	0.058	0.103
1 : 2 048 000	0.064	0.077
1 : 4 096 000	0.056	0.065
1 : 8 192 000	0.061	0.064
1 : 16 384 000	0.059	0.060
1 : 32 768 000	0.058	0.056

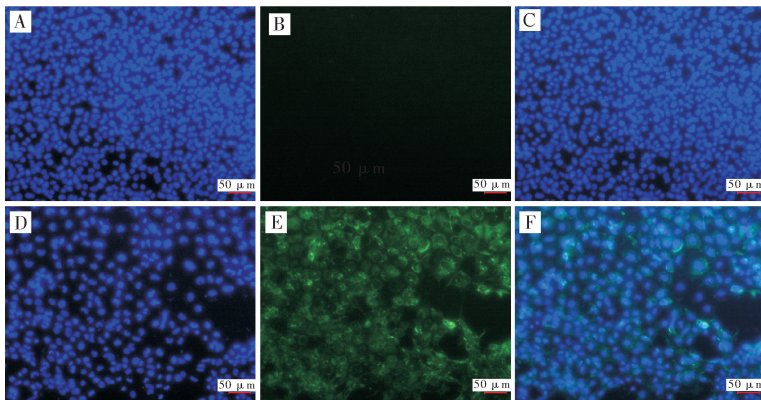
(1 : 1 000~1 : 32 768 000),将稀释好的抗体进行 ELISA 检测。包被 pGEX-KG 细菌全蛋白作为对照,包被纯化的 SVCV-N 融合蛋白作为试验组。结果如表 3 所示:对照组 OD 值较低,而试验组 OD 值较高,表明制备的单克隆抗体对原核表达的 N 蛋白特异性较好。

2.7 单克隆抗体的间接免疫荧光(IFA)分析

将 SVCV 接种于 FHM 细胞,同时设未感染的细胞作为阴性对照组,36 h 后用所制备的单克隆抗体为一抗,Alexa Fluor 488 goat anti-mouse Ig G 为二抗,DAPI 为细胞核染料,进行间接免疫荧光分析。结果显示,感染 SVCV 的 FHM 细胞呈现特异性绿色荧光,而未感染组细胞中无明显绿色荧光,表明制备的单克隆抗体可以与 SVCV 病毒的蛋白结合(图 5)。

2.8 单克隆抗体的 Western blot 分析

SVCV 感染 FHM 细胞,设置未感染组作为对照。24 h 后进行 Western blot 实验。SVCV 感染组在约 47 ku 处有明显条带,对照组样品未检测到明显条带(图 6),表明制备的单克隆抗体特异性良好。



A:对照组 DAPI; B:对照组 FITC; C:A 与 B 合并图; D:试验组 DAPI; E:试验组 FITC; F:D 与 E 合并图。A:DAPI staining in the control; B:FITC in the control; C:Merge of A and B; D:DAPI staining in the treatment group; E:FITC in the treatment group; F:Merge of D and E.

图 5 单克隆抗体在 FHM 细胞上的 IFA 分析

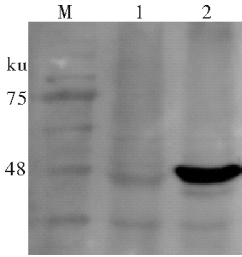
Fig.5 Indirect immunofluorescence assay of MAbs in FHM cells

2.9 单克隆抗体靶位点的初步分析

利用 DNA Star 软件预测 SVCV-N 蛋白抗原表位。根据预测结果将 SVCV N 蛋白分成 4 段表达,第 1 段:1~127 位氨基酸;第 2 段:122~232 位

氨基酸;第 3 段:227~336 位氨基酸;第 4 段:331~418 位氨基酸。将 4 个蛋白片段分别用制备的单克隆抗体进行 Western blot 检测,结果表明单克隆抗体主要识别 N3 段,即 N 蛋白第 227~336 位氨基酸

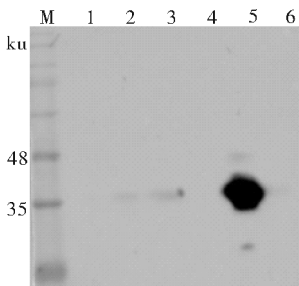
之间(图 7)。



M: 蛋白分子质量梯度; 1: 未感染细胞组; 2: SVCV 感染细胞组
M: Protein marker; 1: Uninfected cells as control; 2: Infected cells by SVCV.

图 6 单克隆抗体的 Western blot 分析

Fig.6 Specificity of monoclonal antibodies analyze by Western blot



M: 蛋白梯度; 1: pGEX-KG 组细菌总蛋白; 2: SVCV-N1-KG 组细菌总蛋白; 3: SVCV-N2-KG 组细菌总蛋白; 4: 空; 5: SVCV-N3-KG 组细菌总蛋白; 6: SVCV-N4-KG 组细菌总蛋白 M: Protein marker; 1: Total bacteria protein of pGEX-KG group; 2: Total bacteria protein of SVCV-N1-KG group; 3: Total bacteria protein of SVCV-N2-KG group; 4: Blank well; 5: Total bacteria protein of SVCV-N3-KG group; 6: Total bacteria protein of SVCV-N4-KG group.

图 7 单抗识别 SVCV-N 蛋白靶位点的初步分析

Fig.7 Preliminary analysis of the target site of monoclonal antibody in SVCV-N

3 讨论

SVCV 的宿主范围很广,能感染四大家鱼和其他鲤科鱼类,其中鲤是最主要、最易感的宿主^[17]。感染 SVCV 的鱼体内水盐平衡遭到破坏,临床症状表现为体内出血、腹膜炎以及大量腹水,病鱼体色发黑、腹部膨大、眼球突出、肛门红肿,皮肤、鳃和眼球常有出血斑点^[18]。这些临床症状的出现是 SVCV 在鱼体内增殖,尤其是在毛细血管内皮细胞、造血组织和肾细胞内增殖所致^[19]。

在 SVCV 编码的 5 种蛋白中,核蛋白 N 含量最丰富,可以与病毒 RNA 相互作用,形成核衣壳的双螺旋结构,在转录调节中起着重要的作用^[16]。目前

针对 SVCV N 蛋白的研究较少。早在 1970 年,研究者对同属于弹状病毒科的水泡性口炎病毒(VSV)N 蛋白的形态发生进行了研究^[20]。VSV 核蛋白的 N 末端氨基酸残基可以保护病毒 RNA 不被核酸酶降解^[21],C 末端结构决定 N-RNA 的装配、衣壳化及 RNA 合成^[22]。同属于弹状病毒的 VSV 和狂犬病毒的 N 蛋白在 RNA 结合及组装上有高度保守的折叠特性^[23]。也有研究表明将病毒性出血败血症病毒(VHSV)N 蛋白的多肽免疫鱼体,对其进行病毒感染会导致死亡率升高,解释了亚单位疫苗失败的原因^[24]。

单克隆抗体在传染病、免疫性疾病、内分泌性疾病等方面,皆优于现有的抗血清,具有特异性强、灵敏度高和易标准化等优点^[25]。本研究制备了针对 SVCV-N 的单克隆抗体,为研究 SVCV N 蛋白在 SVCV 致病机制及宿主抗病毒免疫过程中的作用提供了有效工具。单克隆抗体靶位点初步鉴定为 N 蛋白第 227~336 位氨基酸之间,为病毒疫苗的研发提供一定的参考价值。另外,制备的单克隆抗体在临床诊断和治疗方面也具有一定的应用价值。

参 考 文 献

- [1] ROY P. Phosphoproteins of spring viremia of carp virus [J]. *Virology*,1981,112:274-281.
- [2] AHNE W, BJORKLUND H V, ESSBAUER S, et al. Spring viremia of carp (SVC) [J]. *Dis Aquat Org*,2002,52:261-272.
- [3] BJORKLUND H V, HIGMAN K H, KURATH G. The glycoprotein genes and gene junctions of the fish rhabdoviruses spring viremia of carp virus and hiram rhabdovirus: analysis of relationships with other rhabdoviruses[J]. *Virus Res*,1996, 42:65-80.
- [4] HOFFMANN B, SCHUTZE H, METTENLEITER T C. Determination of the complete genomic sequence and analysis of the gene products of the virus of spring viremia of carp, a fish rhabdovirus[J]. *Virus Res*,2002,84:89-100.
- [5] MILLER O, FULLER F J, GEBREYES W A, et al. Phylogenetic analysis of spring viremia of carp virus reveals distinct subgroups with common origins for recent isolates in North America and the UK[J]. *Dis Aquat Org*,2007,76:193-204.
- [6] PADHI A, VERGHESE B. Molecular evolutionary and epidemiological dynamics of a highly pathogenic fish rhabdovirus, the spring viremia of carp virus (SVCV) [J]. *Vet Microbiol*, 2012,156:54-63.
- [7] STONE D M, KERR R C, HUGHES M, et al. Characterisation of the genomes of four putative vesiculoviruses: tench rhabdovirus, grass carp rhabdovirus, perch rhabdovirus and eel rhabdovirus European X[J]. *Arch Virol*,2013,158:2371-2377.

- [8] WU S S, LIU L Y, ZOHAIB A, et al. MicroRNA profile analysis of *Epithelioma papulosum cyprini* cell line before and after SVCV infection[J]. *Developmental and comparative immunology*, 2015, 48: 124-128.
- [9] LIU L Y, ZHU B B, WU S S, et al. Spring viraemia of carp virus induces autophagy for necessary viral replication[J]. *Cellular microbiology*, 2015, 17(4): 595-605.
- [10] YANG Y, HUANG J, LI L, et al. Up-regulation of nuclear factor E2-related factor 2 upon SVCV infection[J]. *Fish shellfish immunol*, 2014, 40(1): 245-252.
- [11] SHIMAHARA Y, KURITA J, NISHIOKA T, et al. Development of an improved RT-PCR for specific detection of spring viraemia of carp virus[J]. *J Fish Dis*, 2015, 39: 269-275.
- [12] LIU H, ZHENG X, ZHANG F, et al. Selection and characterization of single-chain recombinant antibodies against spring viraemia of carp virus from mouse phage display library[J]. *J Virol Methods*, 2013, 194: 178-184.
- [13] ASHRAF U, LU Y A, LIN L, et al. Spring viraemia of carp virus: recent advances[J]. *Journal of general virology*, 2016, 97: 1037-1051.
- [14] GOTESMAN M, SOLIMAN H, BESCH R, et al. Inhibition of spring viraemia of carp virus replication in an *Epithelioma papulosum cyprini* cell line by RNAi [J]. *Journal of fish diseases*, 2015, 38: 197-207.
- [15] LU L F, LI S, LU X B, et al. Spring viremia of carp virus N protein suppresses fish IFN 1 production by targeting the mitochondrial antiviral signaling protein[J]. *The journal of immunology*, 2016, 96(9): 3744-3753.
- [16] 付峰, 刘荭, 黄健, 等. 鲤春病毒血症病毒(SVCV)的研究进展[J]. *中国水产科学*, 2006, 13(2): 328-334.
- [17] ZHANG Q Y, GUI J F. Virus genomes and virus-host interactions in aquaculture animals[J]. *Sci China Life Sci*, 2015, 58: 156-169.
- [18] 黄琪琰. *水产动物疾病学*[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2004.
- [19] 江育林. *水生动物疾病诊断手册*[M]. 国家质量监督检验检疫总局, 译. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- [20] ZAJAC B A, HUMMELER K. Morphogenesis of the nucleoprotein of vesicular stomatitis virus[J]. *J Virol*, 1970, 6(2): 243-252.
- [21] CHEN L Y, YAN Q, LU G L, et al. Several residues within the N-terminal arm of vesicular stomatitis virus nucleoprotein play a critical role in protecting viral RNA from nuclease digestion[J]. *Virology*, 2015, 478: 9-17.
- [22] HEINRICH B S, MORIN B, RAHMEH A A, et al. Structural properties of the C terminus of vesicular stomatitis virus N protein dictate N-RNA complex assembly, encapsidation, and RNA synthesis[J]. *J Virol*, 2012, 86(16): 8720-8729.
- [23] LUO M, GREEN T J, ZHANG X, et al. Conserved characteristics of the rhabdovirus nucleoprotein[J]. *Virus research*, 2007, 129: 246-251.
- [24] ESTEPA A, COLL J M. Enhancement of fish mortality by rhabdovirus infection after immunization with a viral nucleoprotein peptide[J]. *Viral immunology*, 1993, 6(4): 237-243.
- [25] 孔君, 刘箐, 韩跃武, 等. 单克隆抗体制备技术的最新进展及应用前景[J]. *免疫学杂志*, 2011, 27(2): 170-173.

Prokaryotic expression and preparation of monoclonal antibody against nucleoprotein of spring viremia of carp virus

WANG Fang PENG Junjie WANG Yeda LIU Xueqin

College of Fisheries, Huazhong Agricultural University/Freshwater Aquaculture Collaborative Innovation Center of Hubei Province, Wuhan 430070, China

Abstract The full-length coding sequence of the nucleoprotein (N) gene in spring viremia of carp virus (SVCV) was amplified by PCR method using N-RFP plasmid as the template. The PCR production was cloned into the prokaryotic expression vector pGEX-KG. The fusion protein SVCV-N-KG was analyzed by SDS-PAGE. The BALB/c mice was immunized by purified SVCV-N-KG protein and the serum titer was determined by ELISA. One monoclonal antibody (McAb N-2) against N protein were generated and selected by ELISA and chromosome number analysis after four times of subcloning selection. McAb N-2 was characterized by IFA (indirect immunofluorescent assay) and Western blot assay. Further analysis showed that McAb N-2 targeted the 227-336 amino acid region of N protein. This study laid a foundation for the study of pathological mechanisms and clinical diagnosis of SVCV.

Keywords spring viremia of carp virus; nucleoprotein; prokaryotic expression; monoclonal antibody

(责任编辑: 边书京)