

张艳维,张永安,涂加钢. 乌鳢水泡病毒 L 蛋白的原核表达及多克隆抗体制备[J]. 华中农业大学学报, 2021, 40(4): 177-181.

DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2021.04.021

乌鳢水泡病毒 L 蛋白的原核表达及多克隆抗体制备

张艳维,张永安,涂加钢

华中农业大学水产学院/农业微生物学国家重点实验室,武汉 430070

摘要 为研究 L 蛋白在乌鳢水泡病毒(snakehead vesiculovirus, SHVV)增殖过程中发挥的作用,扩增 SHVV L 基因的前 900 个碱基,将其克隆到载体 pET-32a(+)中,构建原核表达质粒 pET32a-L,并转化至大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞。设置不同温度、IPTG 浓度及诱导时间,选择最佳的表达条件。通过 NI-NTA 亲和层析柱纯化蛋白,并利用纯化的蛋白免疫新西兰大白兔,制备多克隆抗体。用 Western blot 鉴定抗体特异性,间接免疫荧光观察 L 蛋白在 SHVV 感染斑点叉尾鲷卵巢细胞(channel catfish ovary, CCO)中的定位情况。结果显示,纯化的 L 蛋白分子质量约 42 ku,与预期大小相符。制备的 L 蛋白多克隆抗体可以与 L 蛋白发生特异性免疫反应,且 L 蛋白主要定位在细胞质,表明 L 蛋白多克隆抗体制备成功。

关键词 乌鳢水泡病毒; L 蛋白; 原核表达; 多克隆抗体; 间接免疫荧光; 弹状病毒

中图分类号 S 852.65⁺9.5 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2021)04-0177-05

弹状病毒是与人类疾病及工业、农业密切相关的一种重要病毒,其宿主范围广泛,主要包括哺乳动物、鸟类、昆虫、鱼类、爬行动物及植物等^[1],导致宿主患病或死亡,造成重大的经济损失。弹状病毒是一类不分节段的单股负链 RNA 病毒,具有包膜,病毒粒子长 100~430 nm,直径 45~100 nm^[2]。目前已经分离出来的鱼类弹状病毒有十几种^[3]。乌鳢水泡病毒(snakehead vesiculovirus, SHVV)是仲恺农业工程学院林鑫教授在 2014 年从广东顺德市的一个乌鳢养殖场中分离得到的 1 株弹状病毒,其基因组全长约 11 kb,主要编码 5 种结构蛋白:核蛋白(N)、磷蛋白(P)、基质蛋白(M)、糖蛋白(G)和 RNA 依赖性 RNA 聚合酶蛋白(L),属于弹状病毒科(Rhabdoviridae)、Perhabdovirus 属。感染 SHVV 的鱼会出现典型的弹状病毒病症状,主要包括出血、水肿等^[4]。

L 蛋白是弹状病毒的一种结构蛋白,同时也是分子质量最大的弹状病毒蛋白,约 240 ku,具有 RNA 聚合、mRNA 封端和封端甲基化等功能^[5-7]。据报道 β 微管蛋白、延伸因子 1 和鸟苷酸转移酶均与水泡性口炎病毒(vesicular stomatitis virus,

VSV)的 L 蛋白相互作用,并合成 VSV RNA 的必要因子^[8-10]。DNA 拓扑异构酶 1 与埃博拉病毒 L 蛋白相互作用,是 L 蛋白聚合酶活性所必需的^[11]。动力蛋白轻链 1 作为转录因子,通过与病毒 L 蛋白结合促进狂犬病毒的初级转录^[12]。虽然 L 蛋白的功能在人类或其他哺乳动物弹状病毒感染中已得到广泛研究^[11-13],但其在鱼类弹状病毒感染中的作用尚无报道。

由于 SHVV 是一种新的鱼类弹状病毒,目前还没有有效的防治 SHVV 感染的措施。基于 L 蛋白在病毒转录和复制中的重要作用,本研究将 L 基因前 900 个碱基构建在原核表达载体 pET-32a(+)上,进行表达及纯化,并将纯化的蛋白免疫新西兰大白兔,制备 SHVV L 蛋白多克隆抗体,以期后续 SHVV 的致病机制和 L 蛋白的功能研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料来源

SHVV 由林鑫教授分离并在笔者所在实验室保存。斑点叉尾鲷卵巢细胞系(CCO)、质粒 pET-32a(+)和 pCDNA-L 由笔者所在实验室保存。试

收稿日期: 2021-02-05

基金项目:国家自然科学基金面上项目(31972832)

张艳维, E-mail: yanweizhang@webmail.hzau.edu.cn

通信作者:涂加钢, E-mail: tujiagang@mail.hzau.edu.cn

验所用 Trans 5a 大肠杆菌克隆菌株和 BL21 大肠杆菌表达菌株均购自北京全式金生物技术有限公司。反转录试剂盒和限制性内切酶购自宝生物工程(大连)有限公司。质粒抽提试剂盒、PCR 产物纯化回收、胶回收试剂盒购自广州美基生物科技有限公司。

1.2 引物合成

根据 GenBank 上发表的序列(登录号: KP876483.1),利用 Primer5.0 软件设计 1 对引物,引物序列如下:

L-FW:5'-TGGGATCCGGTACC
AAGCTTATGGATTATTCTCAGGAATA-3';
L-BW:5'-TGGTGGTGGTGGTGCCTCGAG
AGATAATTGAAGATTACACA-3'

其中,下划线为酶切位点(*Hind* III 和 *Xho* I),送至武汉擎科生物有限公司进行合成。

1.3 pET32a-L 重组表达质粒的构建

1)PCR 扩增目的基因。以含有 SHVV *L* 基因的质粒 pCDNA-L 为模板,L-FW 和 L-BW 为引物,PCR 扩增 *L* 基因的前 900 bp。扩增程序如下:98 °C 变性 10 s,55 °C 退火 5 s,72 °C 延伸 30 s,30 个循环,PCR 扩增结束后,产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测。

2)酶切、连接和转化。将原核表达载体 pET-32a(+)用限制性内切酶 *Hind* III 和 *Xho* I 进行双酶切,1 h 后将酶切产物经琼脂糖凝胶电泳分离后使用凝胶回收试剂盒进行回收、纯化。并采用 Clone Express One Step Cloning Kit 将纯化回收的 *L* 片段和酶切后的载体 pET-32a(+)进行连接,将连接产物转化至大肠杆菌 Trans 5a 感受态细胞中。步骤为:冰浴 30 min;42 °C 水浴 45 s 后立刻冰浴 2 min;加入 400 μL LB 液体培养基后放入 37 °C 摇床中培养 1 h;吸取 100 μL 菌液均匀涂布在含氨苄的 LB 固体培养基中;置于 37 °C 培养箱培养 12 h。

3)重组质粒的提取及鉴定。挑取单克隆菌落接种到含氨苄的 LB 液体培养基中,将其置于 37 °C 的摇床中进行培养,按照质粒抽提试剂盒操作步骤提取重组质粒。以载体 pET-32a(+)的通用测序引物(T7-FW 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'和 T7-BW 5'-GCTAGTTATTGCT CAGCG -3')对重组质粒进行 PCR 鉴定,将阳性质粒送至武汉擎科生物有限公司测序。测序结果与 GenBank 中 SHVV *L* 基因序列(登录号:KP876483.1)进行核苷酸序列

比较分析。

1.4 重组 His-L 蛋白的表达和纯化

将测序正确的重组表达质粒转化至 BL21 (DE3)感受态细胞中,并将 PCR 鉴定为阳性的菌落接种在含氨苄的 LB 液体培养基中,置于 37 °C、180 r/min 的摇床中震荡培养。当菌液 OD 值达到 0.6 时加入 IPTG 至其终浓度为 1 mmol/L。并在 16 °C、150 r/min 的摇床中过夜诱导表达。离心收集诱导表达的菌液,并用 PBS 重悬洗涤 2 次后进行高压破碎,4 °C、12 000 r/min 离心 30 min,收集上清和沉淀,进行 SDS-PAGE 鉴定分析。

通过上述分析发现重组蛋白表达在上清中,对转化了重组质粒的大肠杆菌进行大量诱导表达,离心后收集菌体,PBS 重悬。4 °C 高压破碎,离心收集上清。采用 Ni-NTA His-Band 树脂亲和层析柱试剂盒(Qiagen,德国)纯化重组蛋白,参照生工生物 Ni-NTA 纯化树脂预装柱操作说明进行纯化。再使用蛋白质浓缩管通过离心方法浓缩重组蛋白。浓缩后的重组蛋白通过 SDS-PAGE 电泳鉴定。

1.5 多克隆抗体的制备

将纯化后的重组 His-L 蛋白免疫新西兰大白兔,分 3 次进行免疫,第 1 次免疫时将蛋白抗原与等量的弗式完全佐剂混合,充分乳化,采用皮下多点注射法免疫新西兰大白兔。第 2 次和第 3 次免疫分别第 1 次免疫后第 2、4 周后进行,采用蛋白抗原与等量的弗式不完全佐剂混合,乳化后进行皮下多点注射。在第 3 次免疫 7 d 后经心脏取血,4 °C 隔夜静置,5 000 r/min 离心 30 min,收集血清。检测多克隆抗体的效价,并将血清保存在 -80 °C 冰箱备用。

1.6 Western blot 检测

使用 T25 细胞瓶在含有 10% 热灭活胎牛血清(Gibco,New Zealand)、青霉素(100 μg/mL)和链霉素(100 μg/mL)的 MEM(HyClone,USA)培养基中培养 CCO 细胞,待细胞长满单层后感染 SHVV,并把未感染 SHVV 的 CCO 细胞作为对照。24 h 后收集细胞样品,加入 SDS 上样缓冲液,将样品放置在金属浴中煮沸 10 min,进行 Western blot 分析。具体步骤如下:配制 6% 的聚丙烯酰胺;点样后 80 V 进行电泳;待溴酚蓝指示剂到达分离胶底部时,结束电泳,并用转膜仪转印装置将蛋白条带电转印到 PVDF 膜上,以 9 V 恒压电转印 60 min;5% 脱脂奶粉封闭 2 h,将一抗(L 多抗 1:1 000 稀释;GST 标

签抗体 1 : 5 000 稀释) 4 °C 过夜孵育, TBST 缓冲液清洗 3 次, 每 5 min 清洗 1 次; HRP 标记的兔抗或者鼠抗作为二抗孵育 1 h; TBST 缓冲液清洗 3 次, 每次 10 min。将 PVDF 膜置于 ECL 发光液中, 采用化学发光法显色、拍照分析。

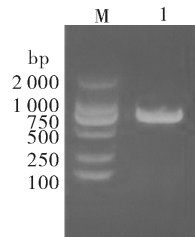
1.7 间接免疫荧光检测

将长满单层状况良好的 CCO 细胞接种到培养皿中, 待细胞长至 70%~80% 时, 感染 SHVV, 并用未感染 SHVV 的 CCO 细胞作为对照。孵育 1 h 后换成 5% FBS 的 MEM 培养基继续培养, 24 h 后吸弃培养基, 用 PBS 洗涤 3 次, 加入 4% 多聚甲醛室温固定 15 min; PBS 洗涤 3 次后, 加入 0.5% Triton, 室温孵育 15 min; PBS 洗涤 3 次后, 加入 5% PBSA 封闭 1 h; 加入 L 蛋白多克隆抗体, 37 °C 孵育 2 h; PBS 洗涤 3 次后, 加入 FITC 标记的荧光二抗 (1 : 100~1 : 200), 37 °C 避光孵育 1 h; PBS 洗涤 3 次后, 用 DAPI 核染 15 min, 再用 PBS 洗涤 3 次。用激光共聚焦显微镜观察并拍照。

2 结果与分析

2.1 SHVV L 基因的克隆

用含有 SHVV L 基因的质粒 pCDNA-L 为模板进行 PCR 扩增, 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 可见约为 900 bp 的特异性条带 (图 1), 与目的片段大小一致。



M: DNA marker 2000; 1: L 基因。M: DNA marker 2000; 1: Target gene of L.

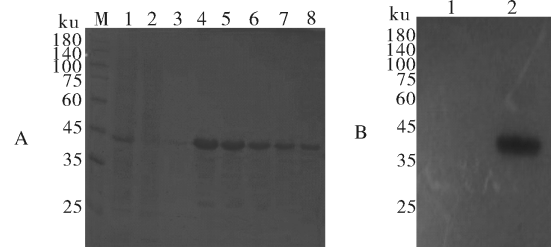
图 1 L 基因的 PCR 扩增结果

Fig.1 PCR amplification of L gene

2.2 诱导表达并纯化 His-L 蛋白

对诱导表达的菌液进行高压破碎, 收集上清、流穿液及洗脱下来的蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分析 (图 2), 结果显示, 该融合蛋白在上清中表达, 且在第 2 次洗脱下来的浓度最高, 往后依次降低, 蛋白分子质量约 42 ku, 与目的蛋白大小预期一致。收集纯化浓缩后的融合蛋白样品, 及诱导前的样品

用 His 标签抗体进行 Western blot 鉴定, 结果显示, 诱导前的样品无条带, 纯化后的 His-L 重组蛋白样品在 42 ku 左右有 1 条清晰的带, 与预期大小一致。



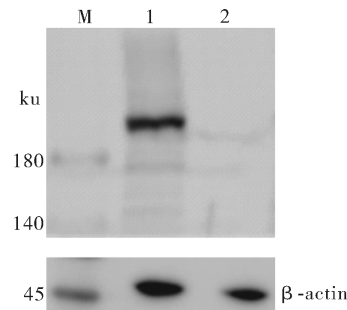
A: SDS-PAGE 鉴定纯化的 His-L 重组蛋白。M: 蛋白 marker; 1: 诱导后上清; 2: 流穿液; 3~8: 纯化后洗脱的蛋白; B: His-L 重组蛋白的鉴定。1: 诱导前蛋白样; 2: 纯化的 His-L 重组蛋白样。A: Purified recombinant His-L protein by SDS-PAGE. M: Protein marker; 1: Supernatant of bacteria after induction; 2: Liquid flow-through; 3-8: Purified protein eluted after purification; B: Identification of His-L recombinant protein. 1: Protein before induction; 2: Purified recombinant protein His-L.

图 2 重组 His-L 蛋白的表达和纯化的 SDS-PAGE 分析

Fig.2 SDS-PAGE analysis of expressed and purified recombinant His-L protein

2.3 Western blot 验证 L 蛋白多抗

重组蛋白 His-L 经纯化后免疫新西兰大白兔, 收集血清获得 L 蛋白的多克隆抗体。通过 Western blot 进行分析, 结果显示, 感染 SHVV 的蛋白样品有 1 条单一的条带, 大小约 220 ku, 与目的蛋白大小一致 (图 3), 而未感染 SHVV 的 CCO 细胞样品没有出现条带, 表明制备的多克隆抗体能特异性识别 L 蛋白。



M: 蛋白 marker; 1: 感染 SHVV 的 CCO 细胞样; 2: 未感染 SHVV 的 CCO 细胞样。M: Protein marker; 1: SHVV infected CCO cell; 2: Uninfected CCO cell.

图 3 L 蛋白的 Western blot 检测

Fig.3 Detection of L protein using Western blot

2.4 间接免疫荧光实验研究 L 蛋白的亚细胞定位

将 SHVV 感染 CCO 细胞, 通过间接免疫荧光

观察 L 蛋白的定位情况。结果显示, L 蛋白多克隆抗体可以特异性地识别感染 SHVV 的 CCO 细胞中的 L 蛋白,且 L 蛋白定位在细胞质中,这与 SHVV

在细胞质完成基因组的转录、复制一致。而对照组则没有观察到绿色荧光(图 4)。表明制备的多克隆抗体可以特异性地与 L 蛋白结合。

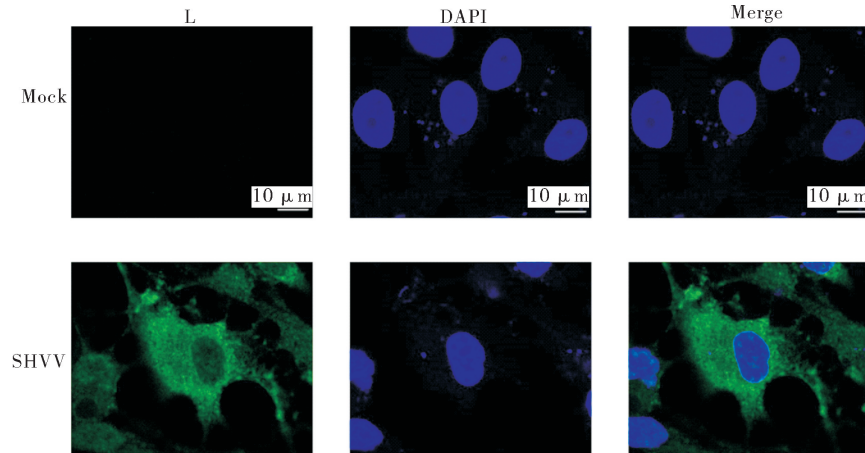


图 4 间接免疫荧光分析 L 多克隆抗体特异性

Fig.4 Indirect immunofluorescence analysis of L polyclonal antibody

3 讨论

乌鳢是我国重要的淡水养殖品种,SHVV 是从发病乌鳢中分离得到的 1 株弹状病毒,SHVV 感染给我国乌鳢养殖业造成了巨大的经济损失。弹状病毒的 L 蛋白有 5 个功能结构域:RdRp、Cap、CD(连接器域)、MT(甲基转移酶结构域)和 CTD(C 端结构域)^[14],其中 RdRp 是主要的功能结构域,发挥聚合酶的功能。Rahmeh 等^[15]的研究发现,VSV P 蛋白可以与 L 蛋白结合,并将 L 蛋白 C 端球状结构域(CD、MT 和 CTD)稳定地锚定在 N 端 RdRp 和 CAP 结构域。Qiu 等^[16]对 VSV 的 L 蛋白 N 末端结构域进行连续突变,表明 N 末端许多氨基酸对于病毒转录是必需的。本研究的目的是制备 SHVV L 蛋白的多克隆抗体,为研究其功能提供基础资料。但因为 SHVV L 蛋白分子质量大(240 ku),原核表达及纯化较困难,因此,本研究在制备 L 蛋白多克隆抗体时选择 RdRp 结构域的前 900 bp 进行克隆、蛋白表达和纯化以及制备多克隆抗体。这也是本研究的不足之处,后续有待更深入地对 RdRp 全结构域进行研究,以及进一步开展 L 蛋白与宿主蛋白互作、L 蛋白的翻译后修饰等深入研究。

我们用制备的 L 蛋白多克隆抗体检测 SHVV 感染 CCO 细胞过程中的 L 蛋白,能观察到 1 条清晰的目的蛋白条带,说明 L 蛋白 RdRp 结构域具有很好的免疫原性。但是也能观察到一些杂带,说明

L 蛋白多克隆抗体可能与细胞蛋白或其他病毒蛋白发生非特异性结合。

我们利用 L 蛋白多克隆抗体对 SHVV 感染 CCO 细胞过程中的 L 蛋白的亚细胞进行了定位研究,但是只是对 SHVV 感染 CCO 细胞 24 h 的 L 蛋白进行亚细胞定位,没有对病毒感染不同时间点开展研究,因而无法确定 L 蛋白在 SHVV 感染的早期和晚期是否发生定位的改变,后续有待进一步深入研究。

参考文献 References

- [1] KUZMIN I V, NOVELLA I S, DIETZGEN R G, et al. The rhabdoviruses: biodiversity, phylogenetics, and evolution[J]. *Infection, genetics and evolution*, 2009, 9(4): 541-553.
- [2] DIETZGEN R G, KONDO H, GOODIN M M, et al. The family Rhabdoviridae: mono- and bipartite negative-sense RNA viruses with diverse genome organization and common evolutionary origins[J]. *Virus research*, 2017, 227: 158-170.
- [3] 阮红梅,张奇亚.鱼类弹状病毒分子生物学研究动态[J]. *中国水产科学*, 2003, 10(6): 513-519. RUAN H M, ZHANG Q Y. Molecular biology of fish rhabdoviruses-review[J]. *Journal of fishery sciences of China*, 2003, 10(6): 513-519 (in Chinese with English abstract).
- [4] LIU X D, WEN Y, HU X Q, et al. Breaking the host range: mandarin fish is susceptible to a *Vesiculovirus* derived from snakehead fish[J]. *The journal of general virology*, 2015, 96(4): 775-781.
- [5] BUJNICKI J M, RYCHLEWSKI L. In silico identification, structure prediction and phylogenetic analysis of the 2'-O-ri-

- bose (cap 1) methyltransferase domain in the large structural protein of ssRNA negative-strand viruses[J]. Protein engineering, design and selection, 2002, 15(2): 101-108.
- [6] OGINO T, BANERJEE A K. An unconventional pathway of mRNA cap formation by vesiculoviruses[J]. Virus research, 2011, 162(1/2): 100-109.
- [7] POCH O, BLUMBERG B M, BOUGUELERET L, et al. Sequence comparison of five polymerases (L proteins) of unsegmented negative-strand RNA viruses; theoretical assignment of functional domains [J]. The journal of general virology, 1990, 71 (5): 1153-1162.
- [8] GUPTA A K, MATHUR M, BANERJEE A K. Unique capping activity of the recombinant RNA polymerase (L) of vesicular stomatitis virus: association of cellular capping enzyme with the L protein[J]. Biochemical and biophysical research communications, 2002, 293(1): 264-268.
- [9] MOYER S A, BAKER S C, LESSARD J L. Tubulin: a factor necessary for the synthesis of both Sendai virus and vesicular stomatitis virus RNAs[J]. PNAS, 1986, 83(15): 5405-5409.
- [10] DAS T, MATHUR M, GUPTA A K, et al. RNA polymerase of vesicular stomatitis virus specifically associates with translation elongation factor-1 alphabeta for its activity[J]. PNAS, 1998, 95(4): 1449-1454.
- [11] TAKAHASHI K, HALFMANN P, OYAMA M, et al. DNA topoisomerase 1 facilitates the transcription and replication of the Ebola virus genome[J]. Journal of virology, 2013, 87(16): 8862-8869.
- [12] BAUER A, NOLDEN T, NEMITZ S, et al. A dynein light chain 1 binding motif in rabies virus polymerase L protein plays a role in microtubule reorganization and viral primary transcription[J]. Journal of virology, 2015, 89(18): 9591-9600.
- [13] MUNDAY D C, WU W N, SMITH N, et al. Interactome analysis of the human respiratory syncytial virus RNA polymerase complex identifies protein chaperones as important cofactors that promote L-protein stability and RNA synthesis[J]. Journal of virology, 2015, 89(2): 917-930.
- [14] LIANG B, LI Z L, JENNI S, et al. Structure of the L protein of vesicular stomatitis virus from electron cryomicroscopy [J]. Cell, 2015, 162(2): 314-327.
- [15] RAHMEH A A, MORIN B, SCHENK A D, et al. Critical phosphoprotein elements that regulate polymerase architecture and function in vesicular stomatitis virus [J]. PNAS, 2012, 109(36): 14628-14633.
- [16] QIU S H, OGINO M, LUO M, et al. Structure and function of the N-terminal domain of the vesicular stomatitis virus RNA polymerase[J]. Journal of virology, 2016, 90(2): 715-724.

Prokaryotic expression of L protein of snakehead vesiculovirus and preparation of its polyclonal antibody

ZHANG Yanwei, ZHANG Yongan, TU Jiagang

College of Fisheries, Huazhong Agricultural University/State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Wuhan 430070, China

Abstract To study the role of L protein in the snakehead vesiculovirus (SHVV) proliferation, the first 900 bases of the SHVV L gene was amplified and inserted into pET-32a (+) to construct pET32a-L prokaryotic expression plasmid, and transformed into *E. coli* BL21 (DE3) competent cells. Different temperature, IPTG concentration and induction time were designed and the best expression conditions were selected. The purified protein was purified by NI-NTA affinity chromatography column, and was used to immunize New Zealand white rabbits to prepare polyclonal antibodies. Western blot was used to identify the specificity of the antibody. Indirect immunofluorescence was used to study the location of L protein in channel catfish ovary (CCO) cells after SHVV infection. The results showed that the purified L protein was about 42 ku. The L protein polyclonal antibody can react specifically with the L protein, and the L protein is mainly localized in cytoplasm, indicating that the L protein polyclonal antibody has been successfully prepared.

Keywords snakehead vesiculovirus; L protein; prokaryotic expression; polyclonal antibody; indirect immunofluorescence; *Perhabdovirus*

(责任编辑:边书京)