

草鱼呼肠孤病毒 GCRV-GD108 株 VP5 蛋白 功能及免疫原性分析

王杭军^{1,2}, 叶 星^{1*}, 田园园¹, 张莉莉¹, 邓国成¹

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 农业部热带亚热带水产资源利用与养殖重点实验室, 广东 广州 510380;

2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 在前期研究中分离到一株草鱼呼肠孤病毒, GCRV-GD108, 并获得其全基因组序列。该病毒株的 M5 基因编码 VP5 蛋白, 该蛋白与哺乳动物正呼肠孤病毒 μ 2 蛋白具有较高的同源性及相似的 NTPase 结合保守区域, 推测 VP5 蛋白也同样具有 NTPase 活性。为检测 VP5 蛋白是否具有 NTPase 活性及其是否具有免疫保护作用, 采用已构建的原核表达载体表达 VP5 重组蛋白, 通过孔雀绿钼酸铵法检测纯化后的重组蛋白的 NTPase 活性。采用 DNASTAR 软件预测 M5 基因编码蛋白的抗原性, 综合蛋白亲水性、表面可及性与表面抗原性三项指标, 预测编码蛋白可形成抗原表位的氨基酸区域数多达 86 个, 提示 VP5 蛋白具有较强的免疫原性。用重组蛋白 VP5 免疫健康草鱼, 通过人工攻毒实验检测 VP5 蛋白的免疫保护作用。结果显示, VP5 重组蛋白具有 NTPase 活性, 且其 NTPase 活性依赖于 Mg^{2+} 或 Na^+/K^+ , 而 Ca^{2+} 的存在可能抑制其活性; VP5 蛋白可诱导草鱼产生高水平的抗体滴度, 并显著提高 IgM mRNA 的表达水平, 但未能为草鱼提供抗 GCRV 感染的保护。研究首次证实 GCRV-GD108 株 VP5 蛋白具有 NTPase 活性, 但不能为草鱼提供免疫保护作用。

关键词: 草鱼呼肠孤病毒 GCRV-GD108 株; 重组 VP5 蛋白; 核苷三磷酸酶; 活性; 免疫原性
中图分类号: S 917.4 **文献标志码:** A

草鱼呼肠孤病毒 (grass carp reovirus, GCRV) 是水生呼肠孤病毒属 (*Aquareovirus*, AQRV) 中致病力最强的病毒^[1], 是引起草鱼病毒性出血病的主要病原体。本实验室近年分离到草鱼呼肠孤病毒广东株 GVRV-GD108, 并已获得其全基因组序列。与其它水生呼肠孤病毒一样, 该病毒株的基因组由 11 条分节段的双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 组成, 但不同的是, 这 11 条节段编码 11 个蛋白而不是 12 个蛋白; 与已报道的其它草鱼呼肠孤病毒株存在较大的分子差异: 它与 GCRV 只有 7 个蛋白同源 (17.6%~45.8% 的氨基酸序列同源性), 但与哺乳类正呼肠孤病毒 MRV 却有 9 个蛋白同源 (15%~46% 的氨基酸序

列同源性)。根据 VP1-VP6 的氨基酸序列分别进行系统进化关系分析, 结果显示该株可能为水生呼肠孤病毒属中的新种, 且与其它 AQRVs 已知种相比与正呼肠孤病毒属 (*Orthoreovirus*, ORVs) 的关系更近^[2]。RT-PCR 检测显示, GCRV-GD108 株在我国南方草鱼出血病病毒流行株中具有一定的代表性^[3]。

BLAST 分析显示, GCRV-GD108 株的 M5 基因编码蛋白为结构蛋白 VP5。此 VP5 蛋白与水生呼肠孤病毒属中包括草鱼呼肠孤病毒、金体美洲鳊鱼呼肠孤病毒 (golden shiner reovirus, GSRV)、美洲草鱼呼肠孤病毒 (American grass carp reovirus, AGCRV) 和胭脂鱼呼肠孤病毒

收稿日期: 2012-05-23 修回日期: 2012-10-05

资助项目: 广东省重点科技项目 (2008A020100016); 广东省海洋渔业科技项目 (A200899F01, A201101G01)

通信作者: 叶 星, E-mail: gzyexing@163.com

(golden ide reovirus, GIRV)等的核衣壳蛋白 VP5 的氨基酸同源率为 24%~25%,与哺乳动物正呼肠孤病毒(mammalian reovirus, MRV)的 $\mu 2$ 及禽呼肠孤病毒(avian reovirus, ARV)的 μA 同源率为 20%^[2]。研究显示,MRV 的 $\mu 2$ 是决定病毒毒株在转录酶和核苷三磷酸酶(nucleoside triphosphatase, NTPase)活性方面差异的关键因子^[4-5];体外实验显示纯化的 $\mu 2$ 依赖双价离子、具有核苷三磷酸酶和 RNA 三磷酸酶(RNA triphosphatase, RTPase)活性^[6];禽呼肠孤病毒(avian orthoreovirus, ARV)的 μA 也已证实具有 NTPase 和 RTPase 活性,且这二种酶可能拥有相同的活性位点^[7]。 $\mu 2$ 和 μA 蛋白的这些酶活性与病毒 RNA 合成及病毒 RNA 的 5'加帽有关。大多数呼肠孤病毒感染细胞时利用 $\mu 2$ 作为微管结合蛋白,锚定在感染细胞微管上^[8]。使用针对 MRV 的 $\mu 2$ 的 siRNAs,可阻隔病毒双链 RNA、蛋白的合成和包涵体的形成,证实 $\mu 2$ 是病毒复制的关键组份^[9]。

MRV 的 $\mu 2$ 氨基酸序列中存在保守的 $\mu 2$ 样 NTP 结合区域:415-KGSFKSTI-422,该区域中的两个赖氨酸 K 对其活性是必需的^[10]。轮状病毒(rotavirus)的 NSP2 蛋白和 ARV 的 μA 蛋白与 MRV 的 $\mu 2$ 是同源蛋白,均含有类似的 $\mu 2$ 样 NTP 结合区域,且均已被证实具有 NTPase 和 RTPase 活性^[7,11]。Attoui 等^[12]和 Kim 等^[13]通过对序列同源性和保守结构域的分析,推测水生呼肠孤病毒属中已知的几种呼肠孤病毒 GCRV、GIRV、GSRV 等的 VP5 蛋白也具有 NTPase 和(或)RTPase 活性,但迄今未有实验证实。在 GCRV-GD108 株的 VP5 蛋白中也存在类似的 $\mu 2$ 样 NTP 结合保守区域 405-KGSFKSTI-412,推测该蛋白也可能具有相似的活性与功能。

本实验采用原核表达系统获得 GCRV-GD108 株重组 VP5 蛋白,采用孔雀绿钼酸铵法检测该蛋白是否具有 NTP 酶活性,并通过免疫健康草鱼和人工感染实验,确定该蛋白是否具有免疫保护功能。

1 材料与方法

1.1 实验材料

GCRV-GD108 病毒株由本实验室分离、纯化

与保存;原核表达工程菌 pET30c-M5/BL21(DE3)为前期实验构建;健康草鱼鱼种由珠江水产研究所广州水产良种基地提供;辣根过氧化物酶标记的兔抗草鱼 IgM 为本实验室制备与保存。Elisa 试剂盒购自 Invitrogen 公司;ATP 酶检测试剂盒购自南京建成公司;Power SYBR Green Master Mix 购自 Applied Biosystem 公司;其他化学试剂为国产或进口分析纯试剂。主要仪器有 MK3 型酶标仪(美国, Thermo)、ABI 7300 荧光定量 PCR 仪(美国, ABI)、紫外分光光度计(德国, Eppendorf)。

1.2 重组蛋白活性测定

重组蛋白的制备 取基因工程菌 pET30c-M5/BL21(DE3)接种到 10 mL 含卡那霉素的液体 LB 培养基中,37 °C 200 r/min 振荡培养约 16 h 后,转接至 50 mL 新培养液中继续培养。待 OD₆₀₀ 值达 0.5 左右时,加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG,诱导培养 4 h 后,10 000 r/min 离心 1 min。菌体与重组蛋白的处理方法根据用于活性测定或用于草鱼免疫注射而略有不同,分别在下文作介绍。

活性测定用重组蛋白的纯化 ATPase 活性测定实验中重组蛋白纯化过程使用的结合缓冲液为 20 mmol/L Tris-HCl,50 mmol/L NaCl。用该结合缓冲液清洗诱导表达后的菌体,重悬后经超声破碎。超声破碎程序设定:工作时间 3 s,间歇时间 3 s,功率 300 W,破碎时间 15 min。用含 2 mol/L 脲的上述结合缓冲液洗涤包涵体 2 次,含 6 mol/L 脲的缓冲液溶解包涵体。透析液为加入 5 mmol/L 咪唑的上述结合缓冲液,透析复性时脲浓度梯度依次为 2、1、0 mol/L。每次透析以 50 倍体积,4 °C 透析 16 h。纯化后的 VP5 重组蛋白经分光光度计测定蛋白浓度后用于蛋白活性检测及免疫试验。

重组蛋白活性检测 采用中国南京建成生物工程研究所研制的 ATP 酶检测试剂盒,初步检测其 ATPase 活性。参照试剂盒的操作说明进行检测。初步证实重组蛋白具有 ATPase 活性后,分别检测其 NTPase 活性和蛋白酶量对其活性的影响。

采用孔雀绿钼酸铵法检测重组蛋白 NTPase 活性^[14-15]。实验前配制反应终止液,由下列各成份组成:孔雀石绿(质量浓度 0.081 2%)、聚乙烯

醇(质量浓度 2.32%)、钼酸铵(质量浓度为 5.72%,溶于 6 mol/L HCl 中配制)、去离子水,以 2:1:1:2 混合。实验反应体系共为 50 μ L,其中 $MgCl_2$ 4 mmol/L, Tris-HCl 20 mmol/L (pH 7.9), NTP 10 mmol/L,加入重组 VP5 蛋白 40 ng,最后加去离子水定容。反应体系混匀后随即在 37 $^{\circ}C$ 反应 25 min;加入 50 μ L 终止液,37 $^{\circ}C$ 作用 5 min;加入 25 μ L 30% 柠檬酸三钠,作用 5 min;酶标仪 OD₆₃₀ 测 A 值。

蛋白酶量对其活性的影响实验是在上述反应体系中加入蛋白量梯度为 4、8、12、20、40、80、120、160、240 ng。不同的底物实验分别加入的底物为 ATP、CTP、GTP 和 UTP。酶反应最适时间实验设置时间分别为 5、10、20、30、40、50、60 min。

1.3 免疫原性分析与免疫保护试验

免疫原性分析 用 DNASTAR 软件中的 Protean 对 M5 编码的氨基酸序列进行分析,采用 Kyte-Doolittle 方法预测蛋白的亲水性,Emini 法预测蛋白表面可及性,Jameson-Wolf 法预测蛋白表面抗原性。结合上述指标分析 M5 基因编码氨基酸的抗原决定簇。在线 (<http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?#forms::antigenic>) 预测编码蛋白可形成抗原表位的氨基酸区域数。

免疫试验用重组蛋白的纯化 基因工程菌接种到含卡那霉素的液体 LB 培养基培养过夜后,转接至 200 mL 新培养液中继续培养,IPTG 诱导表达 4 h 后,离心沉淀收集菌体,用 PBS 洗涤两次后,6 000 r/min,4 $^{\circ}C$ 离心 5 min。用 PBS 重悬菌体,超声破碎,程序设定为工作时间 5 s,间歇时间 5 s,功率 400 W,破碎时间 30 min。10 000 r/min,4 $^{\circ}C$ 离心 30 min,收集包涵体。用含 2 mol/L 脲的 PBS 洗涤包涵体两次,离心后弃上清。包涵体用含 8 mol/L 脲的 PBS 变性。变性后经透析使蛋白复性,透析液中脲浓度梯度依次为 2、1、0 mol/L,每次透析以 50 倍体积,4 $^{\circ}C$ 透析 16 h。若测定的蛋白浓度较低,则将复性后的蛋白用聚乙二醇浓缩到合适浓度。

重组蛋白免疫草鱼保护试验 以体质量 15~25 g 的健康草鱼为免疫对象,暂养一周后进行免疫试验。试验组共分 3 组,注射剂量(蛋白量/鱼的体质量)分别为 1、3 和 5 μ g/g;将纯化的重组 VP5 蛋白用 PBS 稀释至所需浓度后,

与等体积的弗氏不完全佐剂充分混匀,试验组以每尾鱼 0.1 mL 的注射量腹腔注射。对照组 2 组,分别为空白对照组和注射等体积 PBS 对照组,每组各 30 尾鱼,试验组和对照组均各设 2 个平行组,一组用于取血样,另一组则用于攻毒实验。

分别从免疫 1 周和 2 周后的每组鱼中取 5 尾鱼的血制备抗血清。ELISA 检测草鱼抗血清的抗体水平,具体操作如下:纯化蛋白用包被液(0.05 mol/L 碳酸盐,pH 9.6)稀释到 1 μ g/mL 后,每个聚苯乙烯板反应孔加 0.1 mL,4 $^{\circ}C$ 包被过夜。次日,用 PBST(PBS + 0.02% Tween-20)洗涤 3 次,每次 3 min。加稀释后的一抗 0.1 mL,一抗分别是免疫组鱼血清及空白组鱼血清,按第一孔 1:200 比例稀释,第二孔 1:500 比例稀释,依次倍比稀释到 1:128 000。置 37 $^{\circ}C$ 孵育 1 h。用 PBST 洗涤 5 次,每次 3 min。加入二抗为 HRP 标记的兔抗草鱼抗体(1:10 000 稀释)0.1 mL,37 $^{\circ}C$ 孵育 1 h,PBST 洗涤 5 次。于各反应孔中加入 TMB 底物溶液 0.1 mL,37 $^{\circ}C$ 避光反应 10 min。于各反应孔中加入 1 mol/L 硫酸 0.1 mL 终止反应。结果判定,在 ELISA 检测仪上,于 450 nm 处,以空白对照孔调零后测各孔 OD 值,若大于规定的阴性对照 OD 值的 2.1 倍,即为阳性结果。

感染草鱼吻端成纤维细胞 PSF 的 GCRV-GD108 病毒株用于攻毒实验。病毒增殖的具体方法参照文献[2],每尾草鱼腹腔注射细胞冻融悬液 0.1 mL,注射量为预实验的半致死量。每天观察记录各组发病与死亡鱼的数量,连续观察 2 周。

取免疫后的各组鱼及对照组草鱼各 3 尾,提取其头肾组织的总 RNA,荧光定量 PCR 检测其 IgM mRNA。荧光定量 PCR 具体操作参考刘明智等^[16]。计算免疫组草鱼头肾 IgM mRNA 相对于空白组草鱼头肾 IgM mRNA 的表达量。

2 结果

2.1 ATP 活性测定

透析复性后的纯化蛋白,分光光度计测定蛋白浓度为 41 ng/ μ L。使用 ATP 酶检测试剂盒检测重组蛋白 VP5 的活性,结果显示 VP5 在 Na^+K^+ -ATP 酶管和 Mg^{2+} -ATP 酶管中均可检测到活

性,而在 Ca^{2+} -ATP 酶管和 $\text{Ca}^{2+} \text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶管未检测到活性,说明重组 VP5 蛋白的 ATPase 活性是依赖 Na^+ 、 K^+ 和(或) Mg^{2+} 的;测得重组 VP5 的 ATPase 活力为 $0.693 \mu\text{mol Pi}/(\text{mg prot} \cdot \text{h})$ 。

对酶量与活性的关系分析结果显示,反应体系中蛋白量为 40 ng 时,即可达到合适的实验测量结果(图 1)。酶反应时间则以 30 min 左右较为合适(图 2)。该蛋白对 4 种 NTP 底物均有一定活性,ATP,CTP,UTP 和 GTP 的 A_{630} 值分别为 3.062,2.151,2.124 和 2.027。

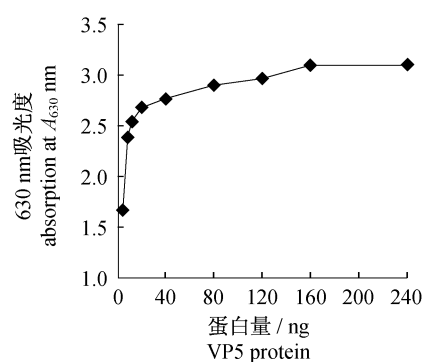


图 1 蛋白量对 VP5 ATPase 活性的影响
Fig. 1 Impact of protein concentration on ATPase activity of VP5

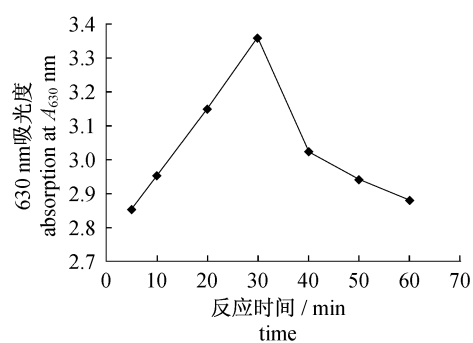


图 2 反应时间对 VP5 ATP 酶活性的影响
Fig. 2 Time curve of ATPase activity of the VP5 protein

2.2 ELISA 分析草鱼血清抗体

用 1,3 和 5 $\mu\text{g/g}$ 3 个剂量的重组 VP5 免疫草鱼,免疫 7 d,所有受免草鱼的抗血清 ELISA 检测结果均为阳性。其中 5 $\mu\text{g/g}$ 免疫剂量诱导草鱼产生的抗体效价最高,稀释 1:64 000 时抗血清仍为阳性。免疫 14 d,各免疫剂量组草鱼的血清抗体效价均明显增加。其中 5 $\mu\text{g/g}$ 免疫量组受免草鱼抗血清的抗体效价最高,稀释 1:128 000 时

仍为阳性。

2.3 M5 基因编码蛋白的抗原性分析

DNASTar 软件预测 M5 基因的抗原决定簇,根据亲水性 (Hydrophilicity > 0)、抗原指数 (Antigenic index > 0) 和表面可及性 (Surface probability > 1) 3 个指标确定 VP5 的抗原表位。VP5 蛋白有 312 个氨基酸位点亲水性 > 0,394 个氨基酸位点抗原指数 > 0,169 个氨基酸位点表面可及性 > 1,根据这 3 项指标,在线预测 VP5 蛋白可形成抗原表位的氨基酸区域数为 86(表 1)。

表 1 DNASTar 预测 M5 基因编码蛋白的抗原表位
Tab. 1 Epitopes prediction of M5 encoding protein by DNASTar software

相关参数 related parameters	预测区域(AA) predicting region(AA)
	7 ~ 17, 24 ~ 35, 50 ~ 55, 60 ~ 72, 77 ~ 82, 89 ~ 92, 97 ~ 101, 106 ~ 120, 123 ~ 140, 153 ~ 155, 156 ~ 167, 168 ~ 181, 182 ~ 189, 198 ~ 207, 209 ~ 217, 223 ~ 227, 233 ~ 235, 246 ~ 264, 268 ~ 275, 277 ~ 282, 289 ~ 292, 293 ~ 306, 325 ~ 338, 350 ~ 359, 370 ~ 375, 378 ~ 396, 404 ~ 409, 419 ~ 428, 432 ~ 446, 452 ~ 457, 460 ~ 466, 471 ~ 477, 497 ~ 503, 505 ~ 511, 516 ~ 524, 525 ~ 527, 546 ~ 553, 560 ~ 564, 569 ~ 572, 577 ~ 584, 586 ~ 588, 608 ~ 611, 634 ~ 636, 642 ~ 654, 658 ~ 671, 674 ~ 687, 704 ~ 715, 721 ~ 726
M5 抗原区综合分析 antigenic regions of M5	

2.4 免疫保护试验

用 1,3 和 5 $\mu\text{g/g}$ 3 个不同剂量的重组 VP5 蛋白免疫草鱼,两周内受免鱼用 GCRV-GD108 病毒株进行人工攻毒,统计 2 周后各组的死亡数,3 组鱼死亡尾数分别为 25、25 和 26 尾,对照组死亡尾数为 30 尾,说明 VP5 重组蛋白未能为受免鱼提供保护。

2.5 荧光定量 RT-PCR 检测草鱼头肾 IgM mRNA 水平

采用荧光定量 RT-PCR 方法检测草鱼头肾 IgM 的转录,免疫 2 周后 3 个不同免疫剂量组(1、3 和 5 $\mu\text{g/g}$)的 IgM mRNA 水平均高于对照组,相对表达量(免疫组/对照组)分别为 (2.19 ± 0.34) , (3.90 ± 0.76) 和 (4.44 ± 0.52) (图 3)。

表 2 ELISA 检测受免草鱼抗血清滴度
Tab.2 ELISA analysis for antibody titer of the immunized grass carp

稀释度 dilution	$A_{450\text{nm}}$ 吸光值 absorption at $A_{450\text{nm}}$								
	免疫 7 d 后 7 d post-immuned			免疫 14 d 后 14 d post-immuned			阴性血清 negative serum	空白对照 control	
	1	3	5	1	3	5	0	0	
1	1:200	1.016	1.400	1.426	1.239	1.401	1.823	0.175	0.055
2	1:500	0.673	1.043	1.239	1.300	1.424	1.497	0.100	0.042
3	1:1000	0.453	0.755	1.138	0.952	1.218	1.446	0.079	0.045
4	1:2000	0.286	0.465	0.976	0.668	0.993	1.160	0.068	0.046
5	1:4000	0.168	0.272	0.768	0.356	0.557	1.087	0.062	0.037
6	1:8000	0.105	0.154	0.629	0.192	0.355	1.767	0.05	0.046
7	1:16000	0.068	0.082	0.378	0.118	0.234	0.551	0.053	0.055
8	1:32000	0.061	0.063	0.250	0.079	0.122	0.339	0.054	0.046
9	1:64000	0.052	0.056	0.140	0.066	0.084	0.233	0.049	0.040
10	1:128000	0.050	0.049	0.085	0.054	0.064	0.162	0.057	0.050

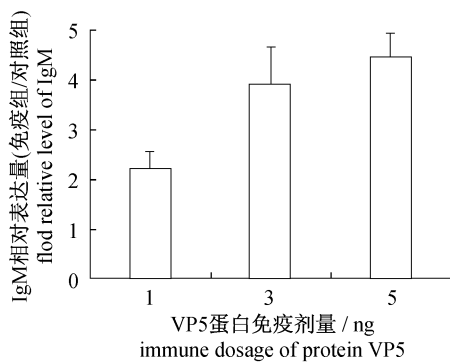


图 3 免疫组草鱼头肾 IgM mRNA 的相对表达量
Fig.3 Relative level of the head kidney IgM mRNA of the immunized grass carp

3 讨论

NTPase 能催化水解 NTP 并释放能量,在生物机体内的物质运送、能量转换和信息传递方面具有重要作用,该能量反应在生命形式中有着广泛的利用^[17]。Agutter 等^[18]首先在大鼠肝脏的细胞核膜上发现 NTPase。NTPase 也普遍存在于病毒中,与病毒的单链 RNA 转录和复制相关^[19]。在 MRV、ARV 中已证实有 NTPase 的存在^[20-21]。本研究 GCRV-GD108 株 M5 基因的编码蛋白 VP5 与 MRV 的 $\mu 2$ 、ARV 的 $M\mu A$ 等蛋白具有较高的同源性,且带有一个典型的 $\mu 2$ 样 NTP 结合区域,该保守区域在所有的多角体呼肠孤病毒(turreted Reoviridae)如质型多角体病毒(Cypovirus)、斐济病毒(Fijivirus)等中均有存在^[10]。Su 等^[7]用原核表达载体 pET28a 成功表

达了具有活性的 MRV μA 蛋白。为证明 GCRV-GD108 株 VP5 蛋白也具有相关酶活性,本研究将原核表达的 VP5 蛋白,通过包涵体变性与复性纯化,证实其具有 NTPase 活性。这也是首次在水生呼肠孤病毒中证实了 VP5 蛋白具有 NTPase 活性。

NTPase 活性测定有多种方法,如分光光度法、同位素标记法与比色法等^[22-25]。本实验采用孔雀绿钼酸铵法检测重组 VP5 蛋白的 NTPase 活性。该方法的原理是 NTPase 水解核苷三磷酸所产生的无机磷可与钼酸作用生成磷钼酸,后者可被还原剂还原成钼蓝,通过柠檬酸三钠淬灭底物非酶促水解产生的无机磷,通过比色,间接反映出酶活性。使用该方法时避免磷污染的干扰,是精确检测 NTPase 活性的关键,因此实验过程中所用材料与器皿均要避免磷污染。本研究首先采用商品化的 ATPase 试剂盒初步确定了 VP5 蛋白具有 ATPase 活力。随后通过孔雀绿钼酸铵方法,进一步检测该蛋白的 NTPase 活性及影响其活性的因素。本研究初步活性实验结果显示,纯化 VP5 蛋白的 ATPase 活性是 Na^+/K^+ 或 Mg^{2+} 依赖,但不依赖 Ca^{2+} ;但在 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 同时存在时,未检测到酶活性,说明 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 同时存在时, Ca^{2+} 可能会抑制 ATP 的水解。对 ATP、CTP、UTP 与 GTP 4 种 NTP 底物的活性比较显示,该蛋白对 ATP 的亲嗜性较高,提示在病毒核内 VP5 蛋白提供能量方式是以水解 ATP 释放能量为主。

对 VP5 氨基酸序列分析显示其具有 86 区域

可形成抗原表位,提示 VP5 应具有较强的免疫原性。本研究进一步通过免疫保护实验来确定 VP5 重组蛋白是否具有免疫保护作用。ELISA 抗体效价分析显示,以不同剂量的 VP5 免疫,受免草鱼血清均具有较高抗体滴度;同时受免草鱼头肾 IgM mRNA 表达水平高于对照组,抗体滴度与基因转录水平都说明重组 VP5 蛋白可诱导草鱼机体产生免疫应答。但攻毒试验显示,重组蛋白 VP5 未能为草鱼提供有效的抗 GCRV 的保护作用,这进一步证明该蛋白是病毒核衣壳内的结构蛋白。本研究为下一步开展该蛋白在病毒复制与转录上的功能研究奠定基础。

参考文献:

- [1] Rangel A A C, Rockemann D D, Hetrick F M, *et al.* Identification of grass carp haemorrhage virus as a new genogroup of aquareovirus [J]. *Journal of General Virology*, 1999, 80(9) : 2399 – 2402.
- [2] Ye X, Tian Y Y, Deng G C, *et al.* Complete genomic sequence of a reovirus isolated from grass carp in China [J]. *Virus Research*, 2012, 163(1) : 275 – 283.
- [3] 迟妍妍, 田园园, 叶星, 等. 南方养殖草鱼呼肠孤病毒的分子特性比较及双重 PCR 检测方法的建立 [J]. *病毒学报*, 2011, 27(4) : 358 – 365.
- [4] Noble S, Nibert M L. Core protein $\mu 2$ is a second determinant of nucleoside triphosphatase activities by reovirus cores [J]. *Journal of Virology*, 1997, 71 : 7728 – 7735.
- [5] Parker J S L, Broering T J, Kim J, *et al.* Reovirus core protein $\mu 2$ determines the filamentous morphology of viral inclusion bodies by interacting with and stabilizing microtubules [J]. *Journal of Virology*, 2002, 76 : 4483 – 4496.
- [6] Kim J, Parker J S L, Murray K E, *et al.* Nucleoside and RNA triphosphatase activities of orthoreovirus transcriptase cofactor $\mu 2$ [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(6) : 4394 – 4403.
- [7] Su Y P, Shien J H, Liu H J, *et al.* Avian reovirus core protein μA expressed in *Escherichia coli* possesses both NTPase and RTPase activities [J]. *Journal of General Virology*, 2007, 88 : 1797 – 1805.
- [8] Carvalho J, Arnold M M, Nibert M L. Silencing and complementation of reovirus core protein $\mu 2$: functional correlations with $\mu 2$ -microtubule association and differences between virus- and plasmid-derived $\mu 2$ [J]. *Virology*, 2007, 364(2) : 301 – 316.
- [9] Kobayashi T, Chappell J D, Danthi P, *et al.* Gene-specific inhibition of reovirus replication by RNA interference [J]. *Journal of Virology*, 2006, 80 : 9053 – 9063.
- [10] Nibert M L, Kim J. Conserved sequence motifs for nucleoside triphosphate binding unique to turreted *Reoviridae* members and Coltiviruses [J]. *Journal of Virology*, 2004, 78(10) : 5528 – 5530.
- [11] Vasquez-Del C R, Gonzaleg-Nilo F D, Riadi G, *et al.* Histidine triad-like motif of the rotavirus NSP2 octamer mediates both RTPase and NTPase activities [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2006, 362(3) : 539 – 554.
- [12] 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 golden ide reovirus (genus *Aquareovirus*, family *Reoviridae*) [J]. *Journal of General Virology*, 2002, 83 : 1941 – 1951.
- [13] Kim J, Tao Y Z, Nibert M L, *et al.* Orthoreovirus and aquareovirus core proteins: Conserved enzymatic surfaces, but not protein-protein interfaces [J]. *Virus Research*, 2004, 101(1) : 15 – 28.
- [14] Henkel R D, Vandenberg J L, Walsh R A. A microassay for ATPase [J]. *Analytical Biochemistry*, 1988, 169 : 312 – 318.
- [15] Chan K M, Delfert D, Junger K D. A direct calorimetric assay for Ca^{2+} -stimulated ATPase activity [J]. *Analytical Biochemistry*, 1986, 157 : 375 – 380.
- [16] 刘明智, 叶星, 田园园. 嗜水气单胞菌外膜蛋白 W 基因的表达及其免疫原性分析 [J]. *微生物学通报*, 2011, 38(3) : 437 – 445.
- [17] Committee on Biomolecular Materials and Processes, National Research Council. *Inspired by biology: From molecules to materials to machines* [M]. Washington, DC: The National Academies Press, 2008 : 149.
- [18] Agutter P S, McArdle H J, McCaldin B. Evidence for involvement of nuclear envelope nucleoside triphosphatase in nucleocytoplasmic translocation of ribonucleoprotein [J]. *Nature*, 1976, 263(5573) : 165 – 167.
- [19] Borowski B, Niebuhr A, Schmitz H, *et al.* NTPase/helicase of Flaviviridae: Inhibitors and inhibition of the enzyme [J]. *Acta Biochimica Polonica*, 2002, 49

- (3):597-614.
- [20] Bisailon M, Bergeron J, Lemay G. Characterization of the nucleotide triphosphate phosphohydrolase and helicase activities of the reovirus $\lambda 1$ protein [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272 (29): 18298-18303.
- [21] Coombs K M. Stoichiometry of reovirus structural proteins in virus, ISVP, and core particles [J]. *Virology*, 1998, 243(1):218-228.
- [22] 徐友涵,宋鏊华.一种简便、灵敏的 ATPase 活性测定法 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 1986, 4: 64-66.
- [23] Smith C D, William W W. Solubilization and reconstitution of a nuclear envelope-associated ATPase [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1984, 259(19):11890-11894.
- [24] Tiffany B R, White B C, Krause G S. Nuclear-envelope nucleoside triphosphatase kinetics and mRNA transport following brain ischemia and reperfusion [J]. *Annals of Emergency Medicine*. 1995, 25(6):809-817.
- [25] Fiske C H. The colorimetric determination of phosphorus [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1925, 66:375-400.

Analysis of function and immunogenicity of GCRV-GD108 VP5

WANG Hangjun^{1,2}, YE Xing^{1*}, TIAN Yuanyuan¹, ZHANG Lili¹, DENG Guocheng¹

(1. Pearl River Fishery Research Institute, CAFS; Key Lab of Tropic & Subtropic Fisheries Resource Utilization and Aquaculture, Ministry of Agriculture, Guangzhou 510380, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: A strain of grass carp reovirus, named GCRV-GD108 was isolated from sickened grass carp with symptoms of haemorrhage in Guangdong Province. Its whole genomic sequence was obtained. This reovirus consisted of 11 dsRNA segments which encoded 11 proteins instead of 12 proteins that belonged to *Aquareovirus* (AQRV). Sequence comparison showed that it possessed only 7 homologous proteins to grass carp reovirus (GCRV) (with 17.6% – 45.8% identities), but 9 homologs to MRV (with 15% – 46% identities). The virus structure protein VP5, which was encoded by M5 gene of GCRV-GD108, shared a high homology and a conserved motif for NTP binding with the $\mu 2$ protein of mammalian reovirus (MRV), suggesting that the VP5 protein is functional homologue of $\mu 2$, and possesses NTPase activity. A prokaryotic expression vector of M5 gene had been constructed previously, and the engineering bacteria pET30c-M5/BL21 (DE3) was selected. According to the requirements of experience, we had chosen appropriate purification method of VP5 protein. The NTPase activity of the purified recombinant VP5 protein was analyzed, using the method of malachite green/ammonium molybdate reagent for quantification of the released Pi of NTP. The result showed that the recombinant protein possessed NTPase activity. The activity of VP5 is dependent on the cations Mg^{2+} or Na^+/K^+ , but its activity was inhibited with the presence of Ca^{2+} . DNASTAR software was used to predict the antigenicity of M5 gene encoded protein. Online prediction based on the analysis results of the three indexes, hydrophilicity, surface probability and antigenic index, showed that 86 regions in the M5 encoding protein potentially form epitopes, suggesting that VP5 possesses strong immunogenicity. The purified recombinant VP5 protein was used to immunize the healthy grass carp, and its protection role was tested by artificial infection of the immunized fish. The serum of the immunized grass carp was analyzed by ELISA and the mRNA level of IgM from the head kidney of grass carp was analyzed by qRT-PCR. These results indicated that recombinant protein VP5 could induce the immunized grass carp to produce high titer antibodies and the expression levels of IgM were significantly improved. However, this protein could not provide protection for GCRV infection. The NTPase activity of GCRV-GD108 VP5 protein was confirmed for the first time, but this protein could not provide immune protection for grass carp.

Key words: grass carp reovirus GD108 (GCRV-GD108); recombinant VP5 protein; nucleoside triphosphatase (NTPase); enzymatic activity; immunogenicity

Corresponding author: YE Xing. E-mail: gzyexing@163.com