

文章编号: 1000-0615(2017)12-1919-09

DOI: 10.11964/jfc.20170110679

鲤春病毒血症病毒核蛋白、磷蛋白与基质蛋白的表达、 抗体制备及免疫原性比较

张海强, 邵玲*

(上海市水产研究所, 上海市水产技术推广站, 上海 200433)

摘要: 鲤春病毒血症病毒(SVCV)能够引起鲤科鱼类大量死亡, 被世界动物卫生组织(OIE)列为必须申报的重要疫病, 也是我国唯一被列为一类疫病的鱼类传染病。为建立SVCV的快速免疫学诊断方法, 研究其主要结构蛋白间的免疫原性差异, 实验首先采用原核表达系统克隆并诱导表达, 纯化SVCV的核蛋白(N)、磷蛋白(P)和基质蛋白(M), 并进一步免疫新西兰白兔制备抗血清, 抗血清经Protein A柱进一步纯化获得3种蛋白的多克隆抗体。利用间接酶联免疫吸附测定(ELISA)和免疫印迹实验(Western blot)对抗体效价和特异性进行分析验证。结果发现, SVCV的N、P和M重组蛋白均在原核表达系统获得大量表达, 且表达的蛋白经纯化后免疫实验动物产生了相应的多克隆抗体。Western blot结果显示, 3种蛋白抗体均与SVCV重组蛋白及天然蛋白发生特异性的免疫反应。ELISA结果显示, 针对P蛋白制备的抗体效价最高, 可达409 600; 针对N和M蛋白制备的抗体效价也均大于204 800。同时, 特异性检测实验结果显示, 制备的3种蛋白抗体均仅与SVCV发生特异性免疫反应, 而与SVCV宿主其他易感病毒均不发生交叉反应。实验结果将对SVCV的快速诊断及疫苗开发提供新的手段和思路。

关键词: 鲤; 鲤春病毒血症病毒; 结构蛋白; 多克隆抗体; 间接ELISA

中图分类号: Q 785; S 941.41

文献标志码: A

鲤春病毒血症(spring viremia of carp, SVC)是由鲤春病毒血症病毒(spring viremia of carp virus, SVCV)引起并导致宿主产生急性、出血性临床症状为主的一种烈性传染性疾病^[1], 该病主要感染鲤科(Cyprinidae)鱼类, 包括鲤(*Cyprinus carpio*)、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)、金鱼(*Carassius auratus*)等, 病鱼发病急, 死亡率可高达70%, 被世界动物卫生组织(World Organization for Animal Health, OIE)列入《水生动物疫病名录》, 为必须申报的疫病^[2]。该病分布广泛, 在欧洲、亚洲、美洲多个国家和地区均有报道, 并呈现扩张趋势^[3-5]。SVCV主要通过病鱼、病鱼排泄物、死鱼、被污染的水和器具等途径进行传播, 一旦暴发, 将给当地水产养殖业造成巨大的经济损

失^[6]。目前, SVC尚无有效治疗方法, 只能通过分子生物学或免疫学方法及时检测病原, 尽早发现并进行隔离或扑杀, 才能有效防控该病的暴发和流行^[7-8]。

SVCV隶属于弹状病毒科(Rhabdoviridae), *Spirivivirus*病毒属。病毒粒子呈子弹状, 基因组为不分节段的单股负链RNA, 大小约为11 019个碱基, 编码5个主要结构蛋白, 分别为核蛋白(N)、磷蛋白(P)、基质蛋白(M)、糖蛋白(G)和RNA聚合酶(L), 各基因排列顺序为3'-N-P-M-G-L-5', 且各基因转录水平依次下降20%~30%^[9-10]。N、P和M蛋白作为SVCV的主要结构蛋白, 在病毒的转录、复制及装配中发挥重要的作用^[11]。其中N蛋白为SVCV病毒粒子中含量最多的蛋白,

收稿日期: 2017-01-07 修回日期: 2017-05-28

资助项目: 国家自然科学基金(31602196); 上海市科技兴农重点攻关项目[沪农科攻字(2014)第7-3-5号]

通信作者: 邵玲, E-mail: lingshao405@163.com

与病毒RNA紧密结合,是病毒核衣壳的重要组成部分;P蛋白是一种磷酸化蛋白,与N蛋白和L蛋白共同参与病毒核酸的转录和复制;M蛋白位于病毒囊膜的内表面,连接着核衣壳与病毒囊膜,维持了病毒粒子的子弹状结构^[12]。目前,SVCV常用的检测方法是基于G基因的RT-PCR方法^[13-14],其操作相对复杂、成本较高,不适合大量样本的快速检测。此外,各毒株G基因之间变异较大,也削弱了该方法的可靠性^[15-16]。

本研究采用原核表达系统对SVCV的N、P和M 3种结构蛋白基因进行克隆与表达,并进一步制备3种蛋白的特异性多克隆抗体,同时采用间接ELISA方法对3种抗体进行了效价测定与比较分析。利用制备的3种蛋白的多克隆抗体和间接ELISA方法检测SVCV和SVCV宿主其他易感的多种水生病毒,研究结果表明,3种蛋白抗体均能高效特异地检测SVCV。本研究为SVCV免疫诊断技术的开发与基因工程疫苗的研制奠定了良好的基础。

1 材料与方法

1.1 细胞、病毒和菌株

鲤上皮瘤细胞(epithelioma papulosum cyprinid, EPC)、草鱼肾细胞(*C. idellus* kidney, CIK)购于中国检验检疫科学院。SVCV-265(Gen Bank序列号:KJ513477)、草鱼呼肠孤病毒(grass carp reovirus, GCRV)、传染性造血器官坏死病病毒(infectious haematopoietic necrosis virus, IHNV)、锦鲤疱疹病毒(koi herpesvirus, KHV)、鲤疱疹病毒Ⅱ型(cyprinid herpesvirus-2, CyHV-2)、传染性皮下及造血组织坏死病毒(infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus, IHHNV)以及白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)病毒分离株或病毒感染组织均为本实验室分离和保存。SVCV病毒滴度采用50%组织培养感染剂量法(TCID₅₀)进行测定,在1.5 mL EP管中将SVCV EPC细胞培养物做10倍梯度稀释,连续做10个稀释度,每个稀释度做8个重复,向96孔板EPC单层细胞中加入病毒稀释液,同时设置正常的EPC细胞作为阴性对照。显微镜下连续观察10 d,统计每个孔出现细胞病变效应(cytophthic effect, CPE)情况,采用Reed-Muench法对SVCV病毒滴度进行计算^[17]。DH5 α 、BL21(DE3)pLysS大肠杆菌

感受态细胞购自TaKaRa公司。

1.2 试剂和耗材

M199细胞培养液、胰酶、胎牛血清(FBS)为Hyclone公司产品;Trizol、PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis反转录试剂盒、PrimeSTAR HS DNA Polymerase PCR *Taq*酶、限制性内切酶、DL2000 DNA Marker、T₄-DNA连接酶等购自TaKaRa公司;PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (26616、26619)预染蛋白Marker、原核表达载体pRSET-A、ProBond Purification System蛋白纯化试剂盒为Invitrogen公司产品;异丙基硫代- β -D-半乳糖苷(IPTG)为Sigma公司产品;PCR胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒等购自Axygen公司;蛋白浓度(BCA)测定试剂盒、碱性磷酸酶(AP)标记山羊抗兔IgG、BCIP/NBT碱性磷酸酯酶显色试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;对硝基苯磷酸盐(PnPP)购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.3 SVCV N、P、M蛋白的原核表达

目的基因PCR扩增 SVCV EPC细胞培养物总RNA的抽提参照Trizol操作说明书进行,RNA反转录参照PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis反转录试剂盒说明书进行。根据SVCV-265毒株N、P和M基因序列,利用Primer Premier 5.0软件设计了3对引物,引物N-F: 5'-CACGAGCTCATCATGAGTGTTCATTCGGATC-3'(含*Sac*I酶切位点),N-R: 5'-CCGGAATTCCTTACCCATAGGTTTGTATCC-3'(含*Eco*R I酶切位点),预计产物1279 bp;引物P-F: 5'-AACGAGCTCATCATGTCTCTACATTCGAAATTG-3'(含*Sac*I酶切位点),P-R: 5'-CCGGAATTCCTTACAACCTATATTTTGTATACAAC-3'(含*Eco*R I酶切位点),预计产物952 bp;引物M-F: 5'-AACGAGCTCATCATGTCTACTCTAAGAAAGC-3'(含*Sac*I酶切位点),M-R: 5'-CCGGAATTCCTTAATCTCCATGAACAGGGA-3'(含*Eco*R I酶切位点),预计产物694 bp;引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。3种基因的PCR扩增体系均为50 μ L,包括ddH₂O 31.5 μ L, 5 \times PrimeSTAR Buffer (Mg²⁺ plus) 10 μ L,上下游引物(10 μ mol/L)各1 μ L; dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 各4 μ L, PrimeSTAR HS DNA Polymerase (2.5 U/ μ L) 0.5 μ L, cDNA模板

2 μL 。PCR扩增条件均为98 $^{\circ}\text{C}$ 预变性30 s; 98 $^{\circ}\text{C}$ 变性10 s、55 $^{\circ}\text{C}$ 退火5 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸1 min/kb,共35个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保温。

重组质粒的构建与鉴定 分别将pRSET-A载体和经琼脂糖凝胶电泳切胶纯化回收的PCR产物用Sac I和EcoR I 37 $^{\circ}\text{C}$ 双酶切3 h,酶切片纯化回收。回收片段在T₄-DNA连接酶作用下,于16 $^{\circ}\text{C}$ 连接3 h。将连接产物转化DH5 α 大肠杆菌感受态细胞,挑取单克隆扩大培养后PCR进行鉴定。提取阳性克隆质粒,双酶切后进行电泳鉴定,并进一步通过测序、比对确定重组质粒插入序列的正确性,所有样品均由生工生物工程(上海)股份有限公司测序。将测序比对无误的阳性重组质粒转化BL21(DE3)pLysS感受态细胞,挑取单克隆进行鉴定、保存。

蛋白的诱导表达 将pRSET-A空载对照和N、P、M基因重组BL21(DE3)pLysS表达菌株分别按1:100比例接种到含氨苄(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)和氯霉素(35 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的LB液体培养基中,于37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min培养过夜。将活化菌液再以1:100比例接种到25 mL LB培养基中,于37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min培养约4~6 h ($\text{OD}_{600}\approx 0.5$),加入IPTG,使其终浓度为1 mmol/L,进行诱导表达。分别取诱导后0、1、3、5 h的菌液各5 mL,4000 r/min离心10 min,收集菌体。菌体用适量的PBS重悬,经-80~-42 $^{\circ}\text{C}$ 反复冻融破碎3次后,4000 r/min离心10 min,收集上清液,并将沉淀用适量体积的PBS重悬。分别取10 μL 上清液和10 μL 沉淀重悬液,加入2 \times 蛋白质电泳上样缓冲液,煮沸5 min后进行SDS-PAGE电泳分析。

融合蛋白的纯化与鉴定 取诱导表达5 h后的菌液,4000 r/min离心10 min收集菌体,经超声破碎后采用ProBond Purification System蛋白纯化试剂盒进行重组蛋白的纯化,纯化产物置于PBS中4 $^{\circ}\text{C}$ 透析过夜(透析袋截留分子量为14 ku)。用蛋白浓度(BCA)测定试剂盒测定纯化蛋白浓度,取30 μg 纯化产物进行SDS-PAGE电泳检测,并将纯化产物保存于-20 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.4 多克隆抗体的制备

将获得的N、P和M三种重组纯化蛋白分别在颈部、背部皮下多点各免疫2只SPF级新西兰白兔,免疫前兔耳缘静脉取血2 mL,于37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱静置1 h,然后4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜,次日7000 r/min离心20 min,吸取上清液作为兔抗阴性血清对

照。蛋白初次免疫时加等量完全弗氏佐剂乳化,免疫剂量为500 $\mu\text{g}/\text{只}$ 。第15天进行第2次免疫,第29天进行第3免疫,第43天进行第4次免疫,均加等量不完全弗氏佐剂。于免疫后第53天颈静脉采血,离心收集上清液,获得抗血清,抗血清经Protein A柱纯化,得到多克隆抗体。

1.5 酶联免疫吸附试验(ELISA)

采用间接ELISA方法检测制备的抗体效价,具体操作方法:将纯化后的融合蛋白分别以20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度包被96孔酶标板,100 $\mu\text{L}/\text{孔}$,4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜;弃去包被液(0.05 mol/L碳酸盐缓冲液,pH 9.6),用PBST (PBS中含0.05% Tween-20,pH 7.4)洗涤3次,每次5 min;加入封闭液(含2% BSA的PBST)100 $\mu\text{L}/\text{孔}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭2 h;弃去封闭液,PBST洗涤3次,每次5 min;将抗体从1:200开始倍比稀释至1:409 600共12个稀释度,分别加入酶标板中,100 $\mu\text{L}/\text{孔}$;同时设置正常兔血清作为阴性对照,PBS缓冲液为空白对照,每个样品分别设置3个复孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育2 h;PBST洗涤3次,每次5 min;加入1:800稀释的碱性磷酸酶(AP)标记的山羊抗兔IgG抗体,100 $\mu\text{L}/\text{孔}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h;PBST洗涤3次,每次5 min;加入新配置的PnPP底物显色液(PnPP终浓度为1 mg/mL,pH 9.8),各100 $\mu\text{L}/\text{孔}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光显色20 min,用酶标仪测定 OD_{405} 值。当 $\Delta A=(A_{\text{检测孔}}-A_{\text{空白孔}})/(A_{\text{阴性孔}}-A_{\text{空白孔}})>2.1$ 时为阳性,出现阳性结果的最大稀释倍数即为抗体效价。

病毒作为抗原时,其中SVCV为EPC细胞感染后的培养物,GCRV为CIK细胞感染后的培养物,IHNV为EPC细胞感染后的培养物,KHV为病毒感染锦鲤组织匀浆液,CyHV-2为病毒感染鲫组织匀浆液,IHHNV和WSSV均为病毒感染凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)组织匀浆液。分别取不同病毒感染培养物50 μL 加入50 μL 包被液中,或病毒组织匀浆液7000 r/min离心10 min后取50 μL 上清液加入50 μL 包被液中,共100 $\mu\text{L}/\text{孔}$,4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜,设置抗体稀释度为1:1000,后续ELISA操作步骤同上。

1.6 蛋白质免疫印迹试验(Western blot)

分别取不同时间诱导表达的N、P、M重组蛋白或SVCV感染的EPC细胞培养物,SDS-PAGE电泳结束后,采用半干电转移法将蛋白转印至PVDF膜,以制备的多克隆抗体为一抗(稀释

比1:1000),碱性磷酸酶(AP)标记的山羊抗兔IgG抗体为二抗,采用BCIP/NBT碱性磷酸酯酶显色试剂盒显色,印迹结果拍照保存。

2 结果

2.1 重组表达质粒的构建

分别利用设计的N、P、M基因的特异性引物进行RT-PCR扩增,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定,结果显示,均扩增出相应大小的PCR片段(图1)。分别将N、P、M基因的PCR产物进行纯化、回收,双酶切后连接至pRSET-A载体中,并转化DH5 α 大肠杆菌感受态细胞。PCR鉴定阳性的克隆接种扩大培养后提取质粒,重组质粒经*Sac*I和*Eco*R I双酶切后进行电泳鉴定,结果显示,N、P、M基因重组质粒均能切出目标大小的片段(图2)。进一步将质粒双向测序验证,测序正确无误的质粒转化BL21(DE3)pLysS感受态细胞,挑取单克隆进行PCR鉴定、保存。

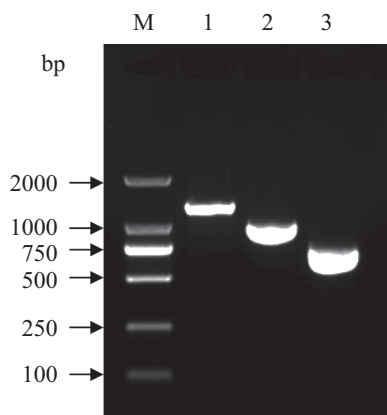


图1 N、P、M基因的PCR扩增

M. DL2000 DNA Marker; 1. N基因; 2. P基因; 3. M基因

Fig. 1 PCR amplification of the N, P and M genes

M. DL2000 DNA Marker; 1. the N gene; 2. the P gene; 3. the M gene

2.2 重组蛋白的表达与纯化

分别将N、P、M基因重组表达菌株在LB培养基中培养,利用IPTG进行诱导表达。分别取诱导后0、1、3、5 h的培养上清液和菌体沉淀进行SDS-PAGE电泳分析。结果显示,诱导表达的重组N蛋白大小约为50 ku、P蛋白约为40 ku、M蛋白约为28 ku,与预期相符,且表达的3种重组蛋白均主要以非分泌型表达(图3-a,图4-a,图5-a)。将表达的N、P、M重组蛋白纯化、透析

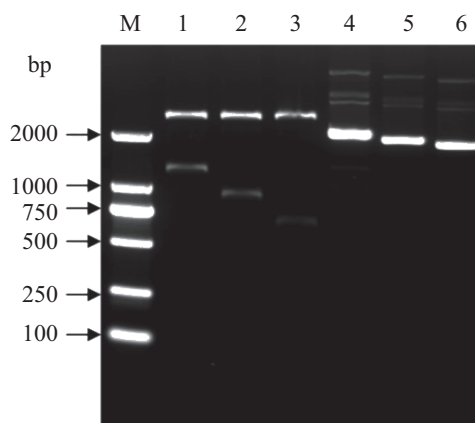


图2 N、P、M基因重组质粒*Sac*I/*Eco*R I双酶切鉴定

M. DL2000 DNA Marker; 1~3. N、P、M重组质粒*Sac*I/*Eco*R I双酶切产物; 4~6. N、P、M重组质粒

Fig. 2 Identification of the N, P and M recombinant plasmids by *Sac*I and *Eco*R I

M. DL2000 DNA Marker; 1-3. *Sac*I/*Eco*R I digestion of the N, P and M recombinant plasmids; 4-6. undigested the N, P and M recombinant plasmids

后,获得纯度较高的N、P、M重组蛋白。

2.3 制备抗体的免疫印迹分析

纯化后的重组蛋白免疫新西兰白兔获得了特异性的抗血清,抗血清进一步经Protein A柱纯化获得了针对3种蛋白的多克隆抗体。将制备好的多克隆抗体作为一抗,对表达的重组蛋白进行免疫印迹分析鉴定。结果显示,N、P和M重组蛋白均可以与相应的多克隆抗体发生特异性反应。重组N蛋白在PVDF膜上产生的反应条带分子量约50 ku,P蛋白产生的反应条带分子量约40 ku,M蛋白产生的反应条带分子量约28 ku,说明诱导表达的N、P、M重组蛋白均可以被制备的相应多克隆抗体特异性识别(图3-b,图4-b,图5-b)。

为了进一步验证制备的多克隆抗体的特异性,实验还以SVCV天然病毒作为抗原(病毒滴度为 $TCID_{50}=10^{-6.1875}/0.1$ mL)、以制备的多克隆抗体作为一抗,进行了免疫印迹分析鉴定。结果发现,制备的N、P、M蛋白多克隆抗体都能与相应的病毒条带发生特异性反应,在PVDF膜上产生相应分子量大小的条带(图6),表明天然病毒可以被制备的多克隆抗体特异性识别,这也为利用制备的抗体来诊断病毒提供了可行性。

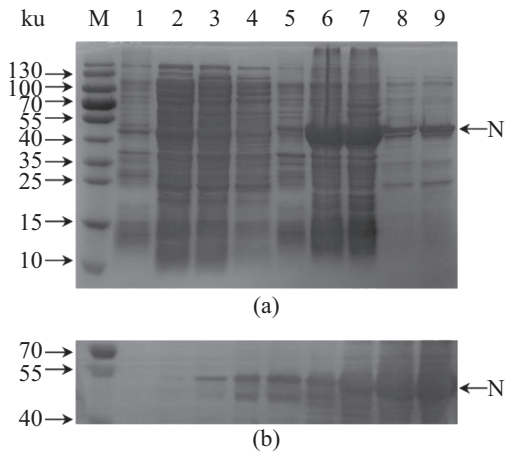


图 3 SVCV重组N蛋白的表达、纯化与鉴定

(a) SVCV重组N蛋白的表达和纯化, M. 蛋白Marker; 1. pRSET-A空载体菌株诱导3 h沉淀; 2~4. 诱导0、3、5 h上清液; 5~7. 诱导0、3、5 h沉淀; 8~9. 纯化的N蛋白; (b) SVCV重组N蛋白的Western blot鉴定, M. 蛋白Marker; 1. 空载体菌株诱导3 h上清液; 2~4. 诱导0、3、5 h上清液; 5. 空载体菌株诱导3 h沉淀; 6~9. 诱导0、1、3和5 h沉淀, 下同

Fig. 3 Expression, purification and identification of the N protein

(a) SDS-PAGE analysis of the expression and purification of the N protein. M. protein Marker; 1. pellet collected at 3 h post induction of pRSET-A empty vector clone; 2-4. supernatant collected at 0, 3, 5 h post induction; 5-7. pellet collected at 0, 3, 5 h post induction; 8-9. the purified N protein; (b) Western blot identification of the N protein. M. protein Marker; 1. empty vector clone supernatant collected at 3 h post induction; 2-4. supernatant collected at 0, 3, 5 h post induction; 5. empty vector clone pellet collected at 3 h post induction; 6-9. pellet collected at 0, 1, 3 and 5 h post induction, the same below

2.4 制备抗体效价测定

Western blot检测表明制备的多克隆抗体针对重组及天然N、P和M蛋白均具有良好的特异性, 因而以纯化后的重组蛋白作为抗原, 以2倍梯度稀释(起始稀释比1:200)的抗体作为一抗, 进行抗体效价的ELISA检测。3次重复实验结果显示(表1), P蛋白的抗体效价大于409 600, N和M蛋白抗体效价也均大于204 800, 3种蛋白抗体均能高效地与相应蛋白发生特异性反应, 且组间重复实验变异系数均小于10%, 表明实验重复性良好。

2.5 制备抗体的特异性实验

为研究本实验所制备N、P、M蛋白多克隆抗体的特异性, 本研究还分别对几种SVCV宿主常见的水生病毒进行了间接ELISA检测。以SVCV、GCRV、IHN病毒感细胞悬液, 以及

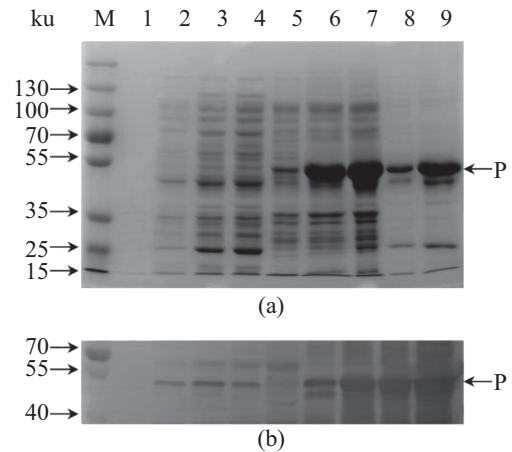


图 4 SVCV重组P蛋白的表达、纯化与鉴定

(a) SVCV重组P蛋白的表达和纯化; (b) SVCV重组P蛋白的Western blot鉴定

Fig. 4 Expression, purification and identification of the P protein

(a) SDS-PAGE analysis of the expression and purification of the P protein; (b) Western blot identification of the P protein. M. protein Marker

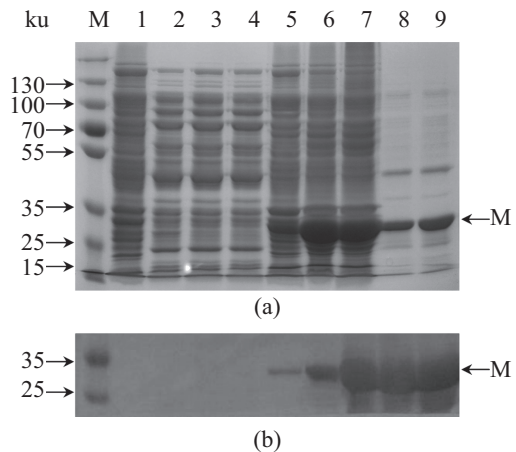


图 5 SVCV重组M蛋白的表达、纯化与鉴定

(a) SVCV重组M蛋白的表达和纯化; (b) SVCV重组M蛋白的western blot鉴定, M. 蛋白Marker; 1. pRSET-A空载体菌株诱导3 h上清液; 2-5. 诱导0、1、3和5 h上清液; 6-9. 诱导0、1、3和5 h沉淀

Fig. 5 Expression, purification and identification of the M protein

(a) SDS-PAGE analysis of the expression and purification of the M protein; (b) Western blot identification of the M protein, M. protein Marker; 1. empty vector clone supernatant collected at 3 h post induction; 2-5. supernatant collected at 0, 1, 3 and 5 h post induction; 6-9. pellet collected at 0, 1, 3 and 5 h post induction

KHV、CyHV-2、IHHNV和WSSV病毒阳性组织匀浆上清液作为抗原, 以纯化的N、P和M重组

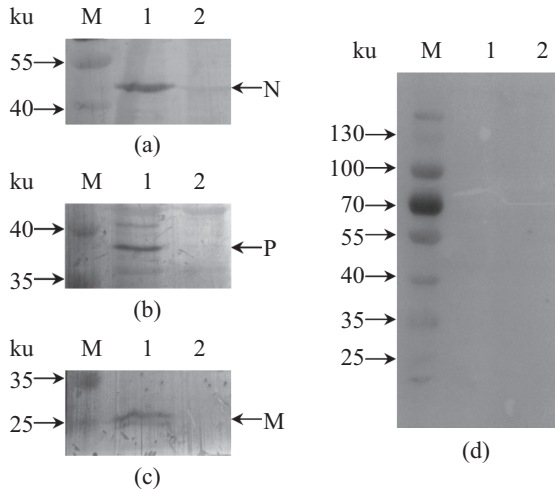


图6 N、P、M蛋白抗体与SVCV感染的EPC细胞培养物的Western blot反应

M. 蛋白Marker; 1. SVCV感染EPC细胞培养物; 2. 正常EPC细胞。(a) SVCV感染细胞培养物与N蛋白抗体的Western blot; (b) SVCV感染细胞培养物与P蛋白抗体的Western blot; (c) SVCV感染细胞培养物与M蛋白抗体的Western blot; (d) SVCV感染细胞培养物与免疫前兔血清的Western blot

Fig. 6 Western blot identification of antibodies against the N, P and M proteins with SVCV cell culture

M. protein Marker; 1. SVCV EPC cell culture; 2. normal EPC cell culture. (a) identification of antibody against the N protein; (b) identification of antibody against the P protein; (c) identification of antibody against the M protein; (d) identification of SVCV with normal rabbit serum

蛋白作为阳性对照，以正常兔血清作为阴性对照，以PBS缓冲液作为空白对照，分别以制备的N、P和M抗体作为一抗，进行了间接ELISA检测。每个样品设置3个平行，实验重复3次。结果发现，制备的N、P、M蛋白多克隆抗体仅与SVCV发生特异性反应，与其他实验水生病毒均

不发生反应(表2)，差异均极显著($P < 0.001$)，同时，P蛋白和M蛋白多克隆抗体效价优于N蛋白抗体($P < 0.05$)。以上结果说明本实验制备的N、P、M蛋白的多克隆抗体具有良好的特异性，相应的间接ELISA方法也可以应用于SVCV样品的检测。

3 讨论

鲤科(Cyprinidae)鱼类是我国主要的淡水养殖品种，而SVCV能够感染多种鲤科经济鱼类，对我国水产养殖业构成了严重威胁。作为唯一被列为一类疫病的鱼类传染性疾病，SVC分布广泛、发病急、致死率高。目前针对SVC尚缺乏有效的疫苗和治疗措施，因此快速、灵敏、准确的检测方法对于控制该病的暴发流行具有重要的意义。目前针对SVCV的主要检测方法包括分子生物学方法和免疫学方法两大类。其中，ELISA方法灵敏度高、特异性强、操作简单，可同时处理大量样本，受到了国内外学者的普遍关注^[18]。

OIE推荐的SVCV的免疫学检测方法包括ELISA和间接免疫荧光实验(IF)，而SVCV的5种结构蛋白中，病毒外膜糖蛋白G因位于病毒表面，具有较强的免疫原性。因此，目前SVCV免疫学检测方法大多是基于G蛋白开发的，然而由于SVCV是RNA病毒，G基因变异迅速，毒株之间抗原性差异很大，而且实验数据表明基于欧洲分支毒株制备的抗体与亚洲分支毒株无交叉反应^[19]，大大限制了基于SVCV G蛋白的ELISA检测方法的应用。SVCV进化研究表明，N基因

表1 N、P、M蛋白多克隆抗体的效价测定
Tab. 1 Titers of the anti-N, P, M polyclonal antibodies

稀释度 ($\times 10^3$) dilution	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	空白对照 blank	阴性对照 negative
A_{405nm} 吸光值 A_{405nm} absorbance														
N蛋白抗体 anti-N antibody	3.04	2.88	2.73	2.40	1.98	1.52	0.98	0.65	0.39	0.24	0.18	0.13	0.09	0.12
P蛋白抗体 anti-P antibody	2.68	2.35	2.02	1.71	1.42	1.17	0.94	0.73	0.59	0.37	0.24	0.15	0.09	0.11
M蛋白抗体 anti-M antibody	1.08	0.95	0.84	0.70	0.65	0.55	0.46	0.37	0.29	0.23	0.14	0.11	0.09	0.11
ΔA														
N蛋白抗体 anti-N antibody	98.3	93.0	88.0	77.0	63.0	47.7	29.7	18.7	10.0	5.0	3.0	1.3		
P蛋白抗体 anti-P antibody	129.5	113.0	96.5	81.0	66.5	54.0	42.5	32.0	25.0	14.0	7.5	3.0		
M蛋白抗体 anti-M antibody	49.5	43.0	37.5	30.5	28.0	23.0	18.5	14.0	10.0	7.0	2.5	1.0		

表 2 N、P、M 蛋白多克隆抗体特异性检测
Tab. 2 Specificity of the anti-N, P, M polyclonal antibodies

n=3

抗原 antigen	SVCV	GCRV	IHNV	KHV	CyHV-2	IHHNV	WSSV	阳性对照 positive	空白对照 blank	阴性对照 negative
A_{405 nm} 吸光值 A_{405 nm} absorbance										
N 蛋白抗体 anti-N antibody	0.30	0.15	0.16	0.16	0.17	0.19	0.18	3.84	0.11	0.19
P 蛋白抗体 anti-P antibody	0.49	0.13	0.12	0.11	0.12	0.13	0.14	3.85	0.10	0.20
M 蛋白抗体 anti-M antibody	0.48	0.14	0.15	0.14	0.16	0.17	0.19	3.60	0.11	0.22
ΔA										
N 蛋白抗体 anti-N antibody	2.4	0.5	0.6	0.6	0.8	1.0	0.9	46.6		
P 蛋白抗体 anti-P antibody	3.9	0.3	0.2	0.1	0.2	0.3	0.4	37.5		
M 蛋白抗体 anti-M antibody	3.4	0.3	0.4	0.3	0.5	0.5	0.7	31.7		

和P基因均更为保守^[20]。此外, N、P、M蛋白的表达水平也均高于G蛋白^[9], 因此更适合用来开发SVCV的免疫学检测方法。

抗体的特异性是病毒免疫学检测的关键^[21], 而SVCV宿主范围广泛, 包括鲤、草鱼、鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)、鳙(*Aristichthys nobilis*)、鲫、斑马鱼(*Danio rerio*)等鲤科鱼类以及鲇(*Silurus asotus*)、狗鱼(*Esox lucius*)、太阳鱼(*Lepomis gibbosus*), 甚至包括对虾等。本研究制备的针对SVCV N、P、M蛋白的多克隆抗体ELISA仅能检测到SVCV, 而与SVCV宿主其他易感病毒GCRV、IHNV、KHV、CyHV-2、IHHNV、WSSV等均无交叉反应。此外, Western blot鉴定也显示制备的多克隆抗体特异性良好。因此, 本研究所制备N、P、M多克隆抗体可以广泛用于SVCV的免疫学检测。

本研究制备的针对P蛋白的抗体效价能达到409 600, 而针对N和M蛋白的多克隆抗体效价为204 800。其中, 针对P蛋白的抗体效价最高, 推测是由以下两方面原因导致的: 一方面是诱导BL21(DE3)pLysS菌株本身在P蛋白大小位置表达蛋白较少, 因而纯化的重组P蛋白纯度高于N和M重组蛋白, 从而P蛋白抗体特异性更好, 效价也更高(图3, 4, 5); 另一方面, 蛋白抗原表位多位于亲水性较高的区域, 利用生物信息学软件的计算结果显示, P蛋白疏水性氨基酸含量仅为28.3%, 而M蛋白为35.3%, N蛋白为40.1%, 因而推测P蛋白亲水性更高, 抗原表位更多, 更容易被实验免疫动物所识别, 从而产生的抗体效价更高。

目前, 对于SVCV结构蛋白免疫原性的比较尚未见报道。本研究系统比较了SVCV N、P、M三种蛋白的免疫原性并建立了相应的ELISA检测方法, 为SVCV的快速诊断及疫苗开发提供新的思路和研究方向。

参考文献:

- [1] Ahne W. Uptake and multiplication of spring viraemia of carp virus in carp, *Cyprinus carpio* L.[J]. Journal of Fish Diseases, 1978, 1(3): 265-268.
- [2] Reschova S, Pokorova D, Nevorankova Z, et al. Detection of spring viraemia of carp virus (SVCV) with monoclonal antibodies[J]. Veterinarni Medicina, 2007, 52(7): 308-316.
- [3] Zhang N Z, Zhang L F, Jiang Y N, et al. Molecular analysis of spring viraemia of carp virus in China: a fatal aquatic viral disease that might spread in East Asian[J]. PLoS One, 2009, 4(7): e6337.
- [4] Padhi A, Verghese B. Molecular evolutionary and epidemiological dynamics of a highly pathogenic fish rhabdovirus, the spring viremia of carp virus (SVCV)[J]. Veterinary Microbiology, 2012, 156(1-2): 54-63.
- [5] Dikkeboom A L, Radi C, Toohey-Kurth K, et al. First report of spring viremia of carp virus (SVCV) in wild common carp in North America[J]. Journal of Aquatic Animal Health, 2004, 16(4): 169-178.
- [6] 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.
Fu F, Liu H, Huang J, et al. Study progress of spring viremia of carp virus[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(2): 328-334(in Chinese).
- [7] 王姝, 张利峰, 徐立蒲, 等. 鲤春病毒核酸检测方法研

- 究进展[J]. 检验检疫学刊, 2012, 22(3): 49-51.
- Wang S, Zhang L F, Xu L P, *et al.* Progress in the nucleic acid testing of carp virus[J]. Journal of Inspection and Quarantine, 2012, 22(3): 49-51(in Chinese).
- [8] Shao L, Xiao Y, He Z K, *et al.* An N-targeting real-time PCR strategy for the accurate detection of spring viremia of carp virus[J]. Journal of Virological Methods, 2016, 229: 27-34.
- [9] Lyles D S, Kuzmin I V, Rupprecht C E. Rhabdoviridae[C]// Knipe D M, Howley P M. Fields Virology. 6th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2013: 885-922.
- [10] Wertz G W, Perepelitsa V P, Ball L A. Gene rearrangement attenuates expression and lethality of a nonsegmented negative strand RNA virus[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95(7): 3501-3506.
- [11] Hoffmann B, Schütze 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 Research, 2002, 84(1-2): 89-100.
- [12] Ahne W, Bjorklund H V, Essbauer S, *et al.* Spring viremia of carp (SVC)[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2002, 52(3): 261-272.
- [13] 高隆英, 史秀杰, 刘蕊, 等. 用RT-PCR法快速检测鲤春病毒血症病毒基因[J]. 水生生物学报, 2002, 26(5): 452-456.
- Gao L Y, Shi X J, Liu H, *et al.* Detection of spring viremia of carp virus (SVCV) gene using reverse-polymerase chain-reaction (RT-PCR)[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2002, 26(5): 452-456(in Chinese).
- [14] Koutná M, Vesely T, Psikal I, *et al.* Identification of spring viraemia of carp virus (SVCV) by combined RT-PCR and nested PCR[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2003, 55(3): 229-235.
- [15] 耿波, 孙效文, 牟振波, 等. 鲤春病毒糖蛋白(G)基因的分离及同源性比较[J]. 生物技术通报, 2006(S1): 450-454.
- Geng B, Sun X W, Mu Z B, *et al.* The isolation of glycoprotein g gene of spring viraemia of carp virus and the comparison of sequence homologous[J]. Biotechnology Bulletin, 2006(S1): 450-454(in Chinese).
- [16] Xiao Y, Shao L, Zhang C W, *et al.* Genomic evidence of homologous recombination in spring viremia of carp virus: a negatively single stranded RNA virus[J]. Virus Research, 2014, 189: 271-279.
- [17] Reed L J, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints[J]. The American Journal of Hygiene, 1938, 27(3): 493-497.
- [18] 王宏华, 侯竹美, 张全启, 等. 病毒性出血性败血症病毒单链抗体的原核表达及其功能鉴定[J]. 水产学报, 2016, 40(1): 128-134.
- Wang H H, Hou Z M, Zhang Q Q, *et al.* Prokaryotic expression and functional verification of ScFv antibody against viral hemorrhagic septicemia virus[J]. Journal of Fisheries of China, 2016, 40(1): 128-134(in Chinese).
- [19] Dixon P F, Longshaw C B. Assessment of commercial test kits for identification of spring viraemia of carp virus[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2005, 67(1-2): 25-29.
- [20] 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]. Diseases of Aquatic Organisms, 2007, 76(3): 193-204.
- [21] 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(in Chinese).

Recombinant expression and polyclonal antibody preparation of the nucleoprotein, phosphoprotein and matrix protein of spring viremia of carp virus

ZHANG Haiqiang, SHAO Ling*

(Shanghai Fisheries Technical Extension Station, Shanghai Fisheries Research Institute, Shanghai 200433, China)

Abstract: Spring viremia of carp virus (SVCV) is an OIE listed highly pathogenic agent of several economically important Cyprinidae fish species. Currently, there is no effective vaccine or drug available for this virus, and prevention of SVCV mostly relies on prompt diagnosis. Previously, detection methods based on the G gene or the G glycoprotein have been developed. However, the highly genetic diversity of the G gene seriously limits the reliability of those methods. To develop a rapid immunological detection method for SVCV, the N, P and M genes of SVCV were cloned into a pRSET-A prokaryotic expression vector. Recombinant proteins were then induced with 1 mmol/L IPTG at 37 °C. Next, recombinant proteins were purified and used to immunize New Zealand rabbits. Titers and specificities of antibodies were verified by indirect ELISA and Western blot. Our results indicated the obtained antibodies were highly specific to SVCV and the titers could reach at least as high as 204 800. Besides, indirect ELISA assays based on prepared antibodies showed there was no cross reaction with other aquatic viruses. Our results will be useful for the rapid immunological detection of SVCV and provide a new insight into the vaccine development of SVCV.

Key words: *Cyprinus carpio*; spring viremia of carp virus; structural protein; polyclonal antibody; indirect ELISA

Corresponding author: SHAO Ling. E-mail: lingshao405@163.com

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31602196); Key Basic Research Program (HNKG (2014) 7-3-5) from Shanghai Municipal Agricultural Commission