

研究报告



草鱼III型呼肠孤病毒 NS66 抗体制备及应用

李婉娟^{Δ1} 王龙龙^{Δ1} 喻飞¹ 赵燕楠¹ 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:【背景】草鱼III型呼肠孤病毒(grass carp reovirus, GCRV genotype III) 104株可导致典型性草鱼出血病, 对其编码片段的分析有望为临床免疫学检测提供依据。【目的】研究 GCRV104株 s6基因片段编码蛋白 NS66的可能功能, 制备良好的 GCRV104株 NS66蛋白多克隆抗体并分析其特异性。【方法】PCR方法扩增 GCRV104株 s6基因片段, 并克隆至表达载体 pGEX-4T-3, 转化到大肠杆菌 BL21后用 IPTG诱导表达, 其产物经 SDS-PAGE鉴定分析后, 通过纯化获得目的蛋白。然后用纯化的 pGEX-4T-3-NS66重组蛋白免疫小鼠, 获得 Anti pGEX-4T-3-NS66多克隆抗体, Western blot测定抗体效价, Western blotting和间接免疫荧光试验(indirect immunofluorescence assay, IFA)鉴定抗体特异性。【结果】SDS-PAGE分析显示表达的重组蛋白约 66 kD, 大小与预期相符, 主要存在于包涵体中; Western blotting测得制备的多克隆抗体效价大于 1:50 000, Western blotting和 IFA结果表明, 制备的多克隆抗体能特异性识别 GCRV104病毒。【结论】GCRV104病毒编码的非结构蛋白 NS66可能参与了复制和组装过程, 形成病毒包涵体, 这为建立 GCRV104免疫诊断及研究 GCRV编码的 NS66蛋白的功能奠定了前期基础。

关键词: 草鱼呼肠孤病毒, 104株, NS66, 多克隆抗体

Polyclonal antibody preparation and application of grass carp reovirus genotype III nonstructural protein NS66

LI Wan-Juan^{Δ1} WANG Long-Long^{Δ1} YU Fei¹ ZHAO Yan-Nan¹ LYU Li-Qun^{*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: [Background] Grass carp reovirus (GCRV) 104 strain can cause typical grass carp hemorrhagic disease, the analysis of its coding fragments is helpful to provide a basis for clinical immunological

Foundation item: Construction of National Modern Agricultural Industry Technology System (CARS-45-19)

^ΔThese authors equally contributed to this work

*Corresponding author: Tel: 86-21-61900454; E-mail: lqlv@shou.edu.cn

Received: 04-06-2019; Accepted: 16-08-2019; Published online: 09-09-2019

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-45-19)

^Δ对本文贡献相同

*通信作者: Tel: 021-61900454; E-mail: lqlv@shou.edu.cn

收稿日期: 2019-06-04; 接受日期: 2019-08-16; 网络首发日期: 2019-09-09

detection. **[Objective]** To study the possible function of the NS66 protein encoded by the *s6* gene segment of GCRV 104 strain, the highly specific polyclonal antibody against NS66 protein was prepared, and its specificity was identified. **[Methods]** *s6* gene segment amplified by PCR was cloned into the expression vector pGEX-4T-3, transformed into *E. coli* BL21 and induced by IPTG. After analysis and identification by SDS-PAGE, the target protein is obtained through purification. Mice were then immunized with purified recombinant protein to obtain polyclonal antibody. Titers were determined by Western blot, and antibody specificity was identified by Western blot and IFA (indirect immunofluorescence assay). **[Results]** The recombinant protein analysed by SDS-PAGE was about 66 kD, the same size as expected. The target protein was mainly present in inclusion bodies. The polyclonal antibody titer prepared by Western blot was more than 1:50 000. Western blot and IFA showed that the prepared polyclonal antibody recognizes the 104 strain, and the polyclonal antibody recognizes a single band with high specificity. **[Conclusion]** The study showed that the polyclonal antibody against NS66 protein can specifically recognize GCRV104 virus, which lays a foundation for the establishment of GCRV104 immunodiagnostic method and the study of GCRV-encoded NS66 protein.

Keywords: Grass carp reovirus, 104 strain, NS66, Polyclonal antibody

GCRV104 病毒是 2009 年 Fan 等从湖北患典型草鱼出血病的草鱼体内分离到的一株新致病型草鱼呼肠孤病毒(hubei grass carp disease reovirus, HGDRV)。此病毒基因组总大小为 23 706 bp, (G+C)mol% 含量为 51%, 由 11 个分节段的 dsRNA 片段组成^[1]。除第 2 节段与水生呼肠孤病毒属或者正呼肠孤病毒属相似性较高外, 其他片段使用 BLASTn 的核苷酸序列相似性搜索与 GCRV 其他株无显著相似性^[1]。目前已报道的 20 多个 GCRV 毒株中的基因组序列存在一定的变异差异^[2-4], 根据系统进化树不同 GCRV 毒株的核苷酸序列比对结果, 把 GCRV 各毒株划分为 I 型、II 型和 III 型病毒, 同一类型下的毒株间核苷酸序列相似性大于 95%, 而不同类型间的 GCRV 毒株相似性小于 30%^[5-6]。GCRV 一般可以编码多种结构蛋白^[7], 其他非结构蛋白不是病毒粒子的组成成分, 但可以在感染病毒的细胞中检测到^[8-9]。

GCRV 11 个分节段的 dsRNA 片段编码 12 种蛋白质(其中第 11 节段 dsRNA 片段编码 2 种蛋白)。GCRV104 NS66 蛋白由基因组片段 *s6* 编码, 通过对比发现 GCRV104 的 *s6* 编码的 NS66 与 GCRV873 的 *s4* 编码的 NS80, GCRV HZ08 的 *s4* 编码的 NS79 和 GCRV GD108 的 *M4* 编码的 NS1 同源^[1]。多数研究认为 I 型 GCRV 非结构蛋白 NS80 募集 VP4

和 NS38, 共同作用形成病毒加工的包涵体, 在病毒复制和组装中起关键性作用^[10-12]。就目前而言, 尚没有相关文献报道 NS66 蛋白在病毒感染中的作用, 因而其实际功能仍不清楚。本实验对草鱼呼肠孤病毒 104 株 *s6* 基因编码的 NS66 蛋白进行了原核表达、蛋白纯化以及多克隆抗体的制备和分析, 运用制备的抗草鱼 IgM 多克隆抗体进行针对病毒的血清学检测, 为 III 型 GCRV 血清学检测方法的建立以及 NS66 蛋白相关功能研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

GCRV104 病毒来自于武汉长江水产研究所, pGEX-4T-3 和 pEGFP-N1 质粒由本实验室保存, 大肠杆菌 DH5 α 和 BL21 (DE3)感受态细胞购自天根科技生化有限公司。草鱼肾脏细胞系 CIK (ctenopharyngon idellus kidney)细胞系和草鱼卵巢细胞系 GCO 由本实验室保存。

1.2 主要试剂和仪器

Prime Star Max、Primer Script First Strand cDNA Synthesis Kit、限制性内切酶 *Bam*H I、DNA 连接酶、DNA Marker 和 IPTG 等购自 TaKaRa 公司; HRP 标记的羊抗鼠 IgG 多克隆抗体购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 实验小鼠由度碧生物科技有限公司提供; M199 培养基购自吉诺生物医药

技术有限公司;胎牛血清购自杭州四季青生物工程有限公司。

净化工作台和恒温摇床,上海博讯实业有限公司;凝胶电泳仪,上海天能科技有限公司;PCR仪、蛋白测定仪、免疫印迹电转仪和凝胶成像系统购自伯乐生命医学产品有限公司;荧光倒置显微镜,奥林巴斯有限公司。

1.3 目的基因 PCR 扩增与重组表达质粒构建

参照 GenBank 上发表的 GCRV104 NS66 基因序列,利用引物设计软件 Primer Premier 5 设计用于原核表达和真核表达的特异性引物:pGEX-4T-3-NS66-F (5'-ATCTGGTTCCGCGTGGATCCATGCTCTCCGCTAGTCTATACT-3')和 pGEX-4T-3-NS66-R (5'-ACCCGGGAATTCGGGGATCCCTACAACCTCAGACCCTTTGAC-3') (划线处为限制性内切酶 *Bam*H I 酶切位点)用于基因的原核表达;pEGFP-N1-NS66-F (5'-GTACCGCGGGCCCGGGA TCCATGCTCTCCGCTAGTCTATACT-3')和 pEGFP-N1-NS66-R (5'-TGGTGGCGACCGGTGGATCCCTACAACCTCAGACCCTTTGAC-3') (划线处为限制性内切酶 *Bam*H I 酶切位点)用于基因的真核表达。提取 GCRV104 病毒基因组 RNA,使用 Primer Script First Strand cDNA Synthesis Kit 反向转录合成第一链 cDNA 作为 PCR 反应的模板,构建 50 μ L PCR 反应体系:cDNA 模板(8.5 mmol/L) 1 μ L,上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, *ExTaq* 酶 0.5 μ L, 10 \times Buffer 5 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 4 μ L, 加无菌去离子水至总体积 50 μ L。PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 34 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测后,用纯化回收试剂盒纯化目的片段送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

对应的载体分别进行酶切,酶切产物进行割胶回收后用 DNA 连接酶 50 $^{\circ}$ C 温育 1 h 连接,连接产物转化感受态大肠杆菌 DH5 α ,用 PCR 初步挑选阳性克隆,提取质粒,送生工生物工程(上海)股份有限公司测序鉴定。

1.4 重组蛋白表达纯化及多抗制备

大量培养测序结果与目的基因序列一致的阳性菌株,提取质粒后转化感受态大肠杆菌 BL21,氨苄霉素筛选,并再次测序验证序列。挑取单个阳性菌落接种于含有氨苄霉素浓度 50 mg/L 的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C、180 r/min 培养。培养菌浓度 OD_{600} 约为 0.6 时,加入 IPTG 至其终浓度为 1 mmol/L,诱导 5 h,4 $^{\circ}$ C、8 500 r/min 离心 10 min 收集菌体沉淀,用 PBS 溶液重悬后,超声破碎处理(功率 400 W,4 $^{\circ}$ C,工作 4 s,间隔 4 s,100 次)至液体呈现澄清透明状。超声后,4 $^{\circ}$ C、8 000 r/min 离心 30 min,然后用尿素纯化,蛋白测定仪检测纯化蛋白浓度。分别取诱导前、诱导后、纯化后蛋白进行 SDS-PAGE 分析以确定重组蛋白的特异性。LB 培养基、PBS 溶液和含 5% 牛奶的 PBST 溶液配制方法参照孔善云等^[13]。

用纯化的 pGEX-4T-3-NS66 重组蛋白免疫小鼠。采用腹腔注射免疫,弗氏完全佐剂与抗原 1:1 充分混匀乳化后免疫;首次免疫 7 d 后进行第 2 次免疫,弗氏不完全佐剂与抗原 1:1 充分混匀乳化后免疫;7 d 后进行第 3 次免疫;第 3 次免疫 2 周后进行第 4 次加强免疫,不加佐剂,注射 0.2 mg 重组蛋白。第 4 次免疫 7 d 后进行眼球采血,血液经 37 $^{\circ}$ C 静置 1 h 后,4 $^{\circ}$ C 过夜。次日,4 $^{\circ}$ C、4 000 r/min 离心 15 min 取上清,分装后置于 -80 $^{\circ}$ C 备用。

1.5 Western blotting 检测分析

用 MOI=10 的病毒感染草鱼肾脏细胞,接毒 72 h 后,去除细胞培养板内的培养基,加入适量 2 \times 蛋白上样缓冲液收集细胞,裂解进行 Western blotting 分析鉴定。经 SDS-PAGE 电泳(80 V,30 min; 120 V,60 min)后,采用湿转膜法(100 V,60 min)将蛋白转至 PVDF 膜,10 mL 含 5% 牛奶的 PBST 缓冲液室温振荡封闭 2 h。以制备的多克隆抗体作为一抗(以 1:5 000 比例稀释)室温孵育 1 h 后 4 $^{\circ}$ C 过夜,次日用 PBST 溶液清洗 5 次,每次 8 min 洗去残余的抗体,再用 HRP 标记的羊抗鼠的 IgG 抗

体作为二抗(以 1:5 000 比例稀释)室温振荡孵育 2 h, 用 PBST 缓冲液清洗 5 次, 每次 8 min, 最后将 PVDF 膜放入用天能 ECL 化学发光底物进行孵育显色, 凝胶成像系统拍照观察结果。

1.6 效价分析

如 1.5 所述制样、电泳, 并将蛋白转移到 PVDF 膜上, 用脱脂牛奶封闭。将纯化的多克隆抗体分别稀释 5 000、8 000、10 000、20 000、50 000 倍, 孵育封闭好的 PVDF 膜, 其余步骤同 1.5。

1.7 NS66 亚细胞定位

将草鱼卵巢细胞传代至 12 孔细胞培养板中, 待细胞长至单层铺满 80% 左右后, 用灭菌的 PBS 缓冲液洗涤细胞, 将 1 μ g 的 pEGFP-N1-NS66 质粒按 Lipo 3000 使用说明转染入细胞, pEGFP-N1 空载体作为阴性对照。转染 48 h 后, 荧光倒置显微镜下观察转染效率及蛋白表达信号; 然后将转染细胞用 PBS 缓冲液洗涤 3 次, 每次 5 min, 进行亚细胞定位, 步骤如下: 每孔加入 300 μ L 4% 的多聚甲醛固定 10 min, PBS 缓冲液洗涤 3 次, 每次 5 min, 每孔 300 μ L 免疫通透液进行细胞透化, 摇床室温孵育 15 min; PBS 洗涤 3 遍, 每次 5 min, 最后加入 DAPI 染色 10 min, 每孔加入 300 μ L 抗荧光衰减剂, 荧光倒置显微镜下观察结果。

1.8 间接免疫荧光试验(IFA)

将草鱼肾脏细胞传代至 12 孔细胞培养板中, 待细胞长至单层铺满 90% 左右后, 接种 MOI=10 的 GCRV104 病毒, 以未接种病毒的正常细胞作为阴性对照。病毒接种 3 d 后, 吸净细胞培养板内的培养基, 用预冷 PBS 缓冲液(0.01 mol/L)清洗 3 次, 使用 4% 多聚甲醛溶液固定, 免疫通透液破坏细胞膜系结构, 5% 脱脂牛奶封闭 1 h。一抗为 1:1 000 稀释的鼠抗 NS66 蛋白多克隆抗体, 37 $^{\circ}$ C 作用 1 h 后, PBST 清洗 3 次, 每次 5 min; 二抗为 1:500 稀释的四甲基异硫氰酸罗丹明(TRITC)标记的兔抗鼠 IgG, 37 $^{\circ}$ C 作用 1 h, PBST 缓冲液轻洗 3 次, 每次 5 min。最后加入 DAPI 染色 10 min, 每孔加入 300 μ L

抗荧光衰减剂, 荧光倒置显微镜下观察结果。

1.9 蛋白表达动力学

将草鱼肾脏细胞传代至 6 孔细胞培养板中, 待细胞长至单层铺满 90% 左右后, 接种 MOI=10 的 GCRV104 病毒, 以未接种病毒的正常细胞作为阴性对照。以空白细胞为对照, 在感染 12、24、36、48、60、72、96 h 分别吸除细胞培养板上的培养基, 加入适量蛋白上样缓冲液取一次样。如 1.5 所述进行 Western blotting 分析。

2 结果与分析

2.1 NS66 基因扩增鉴定与重组质粒的构建

根据 GenBank 中草鱼呼肠孤病毒的 NS66 序列设计引物, 并以 GCRV104 基因组 RNA 作为初始模板, 逆转录后经 PCR 扩增获得 NS66 序列。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析, 扩增出一条大小约为 1 800 bp 的特异性条带(图 1), 与预期大小基本一致, 表明目的基因扩增成功。

将上述 PCR 产物割胶回收, 质粒分别进行酶切、纯化回收后进行连接、转化, 最后提取质粒, PCR 扩增、测序等方法鉴定重组表达载体, 测序结果显示重组表达载体构建成功。

2.2 重组蛋白的表达和纯化及多克隆抗体的制备

将原核表达重组表达载体转化到大肠杆菌 BL21 后, 用于诱导表达重组蛋白 pGEX-4T-3-

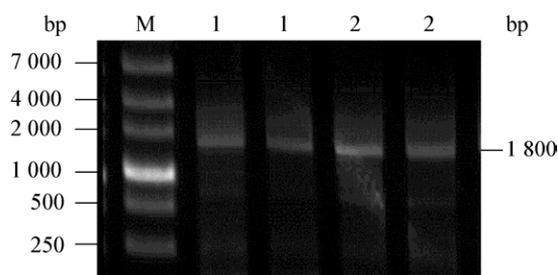


图 1 NS66 基因 PCR 扩增产物电泳图

Figure 1 Electrophoretic profile of PCR products of NS66 gene

注: M: DL2000 分子量标准; 1: pGEX-4T-3-NS66 PCR 产物; 2: pEGFP-N1-NS66 PCR 产物。

Note: M: DL2000 DNA Marker; 1: pGEX-4T-3-NS66 PCR products; 2: pEGFP-N1-NS66 PCR products.

NS66, 用终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 进行诱导, 4 h 后取总菌体制样进行 SDS-PAGE 分析。与未经 IPTG 诱导组相比, 经 IPTG 诱导的菌体在 66 kD 处出现一条明显的目的条带(图 2), 说明重组蛋白诱导成功。用尿素纯化重组蛋白, 经 SDS-PAGE 分析, 在 66 kD 处出现一条单一条带, 说明获得了纯的 pGEX-4T-3-NS66 重组蛋白, 可用于后续实验。

2.3 Western blotting 分析

以 GCRV104 病毒感染的草鱼肾脏细胞总蛋白为材料, NS66 多克隆抗体为一抗进行 Western blotting, 未感染病毒草鱼肾脏细胞总蛋白为对照, 检测病毒感染表达的 NS66 蛋白。结果显示, 感染病毒 72 h 的样品泳道中, 约 66 kD 处出现一条特异性条带, 与病毒 *s6* 基因自身编码的蛋白大小基本一致(图 3), 而加入空白细胞对照组的孔道中未出现条带, 表明制备的多抗能特异识别感染 GCRV104 病毒的对应蛋白, 具有良好的特异性。

2.4 效价分析

以 GCRV104 病毒感染的草鱼肾脏细胞总蛋白为材料, NS66 多克隆抗体为一抗, HRP(辣根过氧化物酶)标记的兔抗鼠 IgG 为二抗, 使用 Western

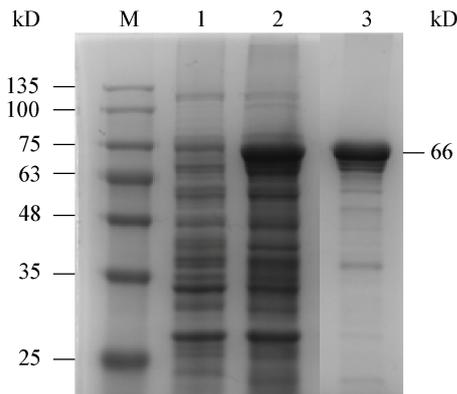


图 2 纯化的重组 NS66 蛋白 SDS-PAGE 分析

Figure 2 SDS-PAGE of purified product

注: M: 蛋白分子量标准样; 1: 未诱导菌体; 2: 诱导菌体; 3: 纯化后的 pGEX-4T-3-NS66 蛋白。

Note: M: Protein marker; 1: Uninduced bacterial; 2: Induced bacterial; 3: The purified protein.

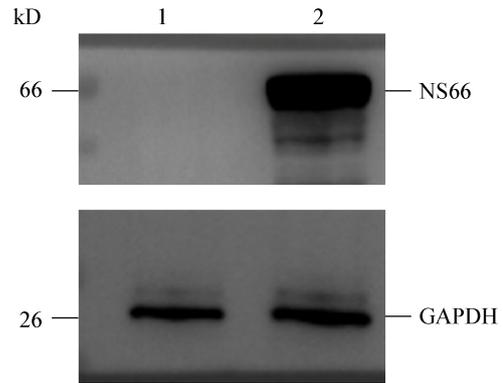


图 3 Western blotting 分析多克隆抗体特性

Figure 3 Analysis of the character of serum antibody by western blotting

注: 1: 正常肾脏细胞; 2: 感染 GCRV 72 h 的细胞。

Note: 1: Normal kidney cell; 2: Cells infected GCRV 72 h.

blotting 方法测定抗体效价, 结果显示该 NS66 重组蛋白多克隆抗体效价大于 1:50 000 (图 4), 抗体效价较高。

2.5 NS66 亚细胞定位

在草鱼卵巢细胞中分别过表达绿色荧光蛋白 pEGFP-N1 和重组载体 pEGFP-N1-NS66, 发现荧光信号后进行固定和透化, 在荧光显微镜下发现 pEGFP-N1-NS66 蛋白分布在细胞核外的细胞基质中, 呈点块状分布(图 5)。

2.6 间接免疫荧光

用正常细胞和攻毒 3 d 的草鱼肾脏细胞固定和透化处理, 以 NS66 蛋白多克隆抗体为一抗, HRP

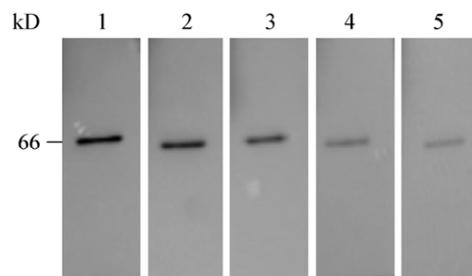


图 4 多抗效价的检测

Figure 4 Determination of the titers of the serum antibody

注: 稀释比例: 1: 5 000; 2: 8 000; 3: 10 000; 4: 20 000; 5: 50 000.

Note: Dilution ratio: 1: 5 000; 2: 8 000; 3: 10 000; 4: 20 000; 5: 50 000.

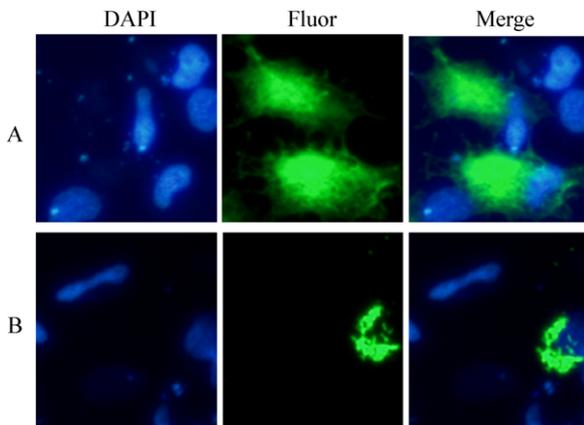


图 5 荧光免疫细胞化学方法显示 NS66 蛋白的分布
Figure 5 Expression pattern of NS66 by fluorescent immunocytochemistry

注: A: 过表达 pEGFP-N1 质粒的对照细胞; B: 过表达 pEGFP-N1-NS66 质粒的细胞。

Note: A: The cell with overexpressed pEGFP-N1; B: The cell with overexpressed pEGFP-N1-NS66.

标记的兔抗鼠 IgG 为二抗, DAPI 染核固定后在荧光显微镜下发现, 感染 GCRV104 病毒的草鱼肾脏细胞能观察到特异性的红色荧光信号(图 6A), 而未感染病毒的正常草鱼肾脏细胞中观察不到荧光信号(图 6B), 表明制备的多克隆抗体能特异性识别 GCRV104 病毒。

2.7 蛋白表达动力学

如图 7 所示, GCRV104 NS66 蛋白随着感染时间的推移表达量逐渐升高。

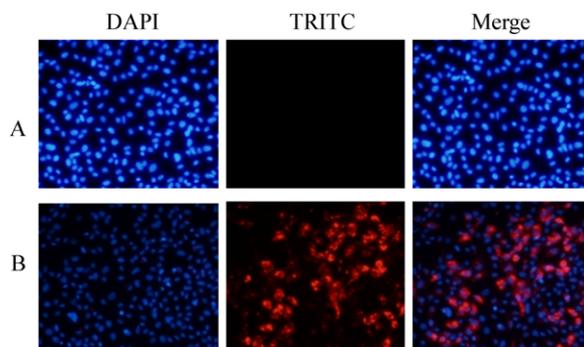


图 6 多克隆抗体的 IFA 鉴定
Figure 6 Identification of IFA with polyclonal antibody

注: A: 正常肾脏细胞; B: 感染 GCRV 72 h 的细胞。

Note: A: Normal kidney cell; B: Cells infected GCRV 72 h.

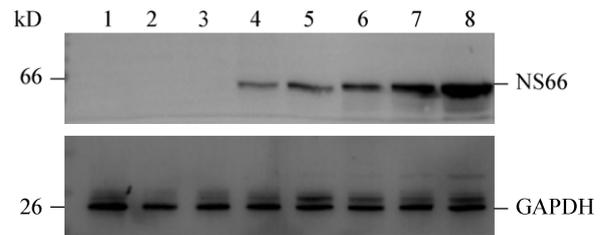


图 7 病毒感染条件下检测 NS66 蛋白的表达

Figure 7 Detection the expression of NS66 protein by viral infection

注: 1: 正常细胞; 2: 感染 12 h; 3: 感染 24 h; 4: 感染 36 h; 5: 感染 48 h; 6: 感染 60 h; 7: 感染 72 h; 8: 感染 96 h.

Note: 1: Normal cells; 2: 12 h; 3: 24 h; 4: 36 h; 5: 48 h; 6: 60 h; 7: 72 h; 8: 96 h.

3 讨论与结论

草鱼呼肠孤病毒感染养殖草鱼引起的草鱼出血病传染率高、致病性强、流行范围广, 死亡率高达 80%^[2,14]。青鱼(*Mylopharyngodon piceus*)、稀有鮡鲫(*Gobiocypris rarus*)和麦穗鱼(*Pseudorasbora parva*)等水生动物也能被此病毒感染^[15], 感染 GCRV 的草鱼体表、肌肉和内脏组织等器官广泛出血、缺血、坏死以及肝功能代谢失调, 最终导致死亡^[16]。GCRV 在形态结构、细胞的感染特性、宿主的敏感性和基因组等研究方面都取得较大进展^[17], 目前 GCRV104 病毒全基因组序列测定已经完成, 但是对该毒株各基因节段及其编码的蛋白功能还没有进行系统研究^[1]。蛋白作为主要生物功能的执行者是病毒与宿主之间相互作用的关键性媒介。了解 GCRV 各节段基因及其编码蛋白的功能, 不仅对该病毒的深入研究具有重要意义, 对草鱼出血病的疫苗、诊断试剂、药物等防控产品的开发也具有更为深远的意义。

通过对 NS66 氨基酸序列分析表明 NS66 只有一个卷曲结构, 与草鱼呼肠孤病毒其他株的同源序列对比没有保守组氨酸和半胱氨酸位点, 此前研究发现非结构蛋白 NS66 与水生呼肠孤病毒非结构蛋白的相似性很低(15%–21%)^[1], 且其与正呼肠孤病毒的 μ NS 蛋白相似性也很低(12%), 但是 NS66 与正呼肠孤病毒的同源 μ NS 蛋白都有的卷曲结构可

能是正呼肠孤病毒参与病毒组装和复制的关键结构^[18]。不同基因型草鱼呼肠孤病毒间基因组序列相似性较低^[19],在病毒毒力、感染特性上具有较大的差异^[20-21],NS66蛋白与GCRV其他基因型同源蛋白不一致的结构很可能与GCRV104病毒所特有的一些生物学特性密切相关。目前尚无相关文献报道NS66蛋白在病毒感染中的作用,因而其实际功能仍不清楚,但是可以根据其同源蛋白预测其功能。在哺乳动物中,MRV通过编码的 μ NS参与病毒包涵体的形成和装配^[22-24],在病毒复制中起关键性作用^[25]。与GCRV104病毒同源性很近的I型草鱼呼肠孤病毒中,非结构蛋白NS80是形成病毒包涵体的基本结构^[26],在病毒复制和组装过程中招募病毒的其他蛋白到包涵体中,将病毒的各结构成分组装成完整的病毒粒子^[27]。II型草鱼呼肠孤病毒中,与NS80同源的蛋白为NS79蛋白,也具有形成病毒包涵体的功能^[28]。

本研究通过对草鱼呼肠孤病毒NS66基因原核表达质粒的构建,表达并制备了NS66原核表达的多克隆抗体,效价大于1:50 000。用Western blotting和间接荧光免疫的方法检测抗体感染病毒细胞的总蛋白,pGEX-4T-3-NS66多克隆抗体能特异性地检测GCRV,说明该抗体效价和特异性满足后续GCRV免疫检测的要求。呼肠孤病毒在复制和组装过程中主要集中分布在感染细胞中的细胞质中,分布在细胞核周围^[29-30]。真核表达细胞亚定位结果表明,NS66蛋白分布于细胞质中,团状分布,可能是病毒复制过程中的“病毒工厂”结构区。因而我们预测NS66蛋白也可能具有形成病毒包涵体的功能。利用NS66原核表达的多克隆抗体,我们同时探究了GCRV104病毒感染草鱼肾脏细胞后NS66蛋白的表达动力学,NS66在感染后24 h开始出现少量的表达,24-96 h期间随着感染时间的推移表达量逐渐升高,直至84 h出现明显的增加,我们推测晚期大量表达的NS66蛋白可能是满足后期大量病毒颗粒组装和复制的需要。本实验对于III型

呼肠孤病毒研究提供了前提基础,可用于NS66在病毒致病机制方面的研究,为抗GCRV104病毒新型疫苗的创制和免疫检测试剂盒的研发奠定了前期基础。

REFERENCES

- [1] Fan YD, Rao SJ, Zeng LB, et al. Identification and genomic characterization of a novel fish reovirus, Hubei grass carp disease reovirus, isolated in 2009 in China[J]. *Journal of General Virology*, 2013, 94(10): 2266-2277
- [2] Wang T, Li JL, Lu LQ. Quantitative *in vivo* and *in vitro* characterization of co-infection by two genetically distant grass carp reoviruses[J]. *Journal of General Virology*, 2013, 94: 1301-1309
- [3] Ye X, Tian YY, Deng GC, et al. Complete genomic sequence of a reovirus isolated from grass carp in China[J]. *Virus Research*, 2012, 163(1): 275-283
- [4] Hao GJ, Shen JY, Pan XY, et al. Isolation and identification of a strain of grass carp reovirus in Huzhou[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2011, 32(1): 47-52 (in Chinese)
郝贵杰, 沈锦玉, 潘晓艺, 等. 草鱼呼肠孤病毒湖州分离株的分离及鉴定[J]. *渔业科学进展*, 2011, 32(1): 47-52
- [5] Zeng WW, Wang Q, Liu YK, et al. Isolation and identification of new GCRV strain and primary study on its immunogenicity[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2011, 35(5): 790-795 (in Chinese)
曾伟伟, 王庆, 刘永奎, 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
- [6] Ma J. Study on the inhibition of replication of grass carp reovirus by RNA interference[D]. Wuhan: Doctoral Dissertation of Huazhong Agriculture University, 2013 (in Chinese)
马杰. RNA 基因干扰技术抑制草鱼呼肠孤病毒复制的研究[D]. 武汉: 华中农业大学博士学位论文, 2013
- [7] Zhang X, Jin L, Fang Q, et al. 3.3 Å Cryo-EM structure of a nonenveloped virus reveals a priming mechanism for cell entry[J]. *Cell*, 2010, 141(3): 472-482
- [8] Cheng LP, Fang Q, Shah S, et al. Subnanometer-resolution structures of the grass carp reovirus core and virion[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2008, 382(1): 213-222
- [9] Becker MM, Peters TR, Dermody TS. Reovirus σ NS and μ NS proteins form cytoplasmic inclusion structures in the absence of viral infection[J]. *Journal of Virology*, 2003, 77(10): 5948-5963
- [10] Cai L, Sun XY, Shao L, et al. Functional investigation of grass carp reovirus nonstructural protein NS80[J]. *Virology Journal*, 2011, 8: 168
- [11] Fan C, Zhang LL, Lei CF, et al. Expression and identification of inclusion forming-related domain of NS80 nonstructural

- protein of grass carp reovirus[J]. *Virologica Sinica*, 2009, 24(3): 194-201
- [12] Fan C, Shao L, Fang Q. Characterization of the nonstructural protein NS80 of grass carp reovirus[J]. *Archives of Virology*, 2010, 155(11): 1755-1763
- [13] Kong SY, Jiang YS, Xu D, et al. An immunological method to detect CyHV-2 based on capsid protein 72[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(2): 328-335 (in Chinese)
孔善云, 姜有声, 许丹, 等. 一种基于 II 型鲤疱疹病毒衣壳蛋白 72 的免疫学检测方法[J]. *中国水产科学*, 2016, 23(2): 328-335
- [14] Ge XP, Miao LH. Current state and development suggestion on national conventional freshwater fishery industry[J]. *Chinese Fishery Quality and Standards*, 2011, 1(3): 22-31 (in Chinese)
戈贤平, 缪凌鸿. 我国大宗淡水鱼产业发展现状与体系研究进展[J]. *中国渔业质量与标准*, 2011, 1(3): 22-31
- [15] Zhang LL, Luo Q, Fang Q, et al. An improved RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of grass carp reovirus[J]. *Journal of Virological Methods*, 2010, 169(1): 28-33
- [16] Yin L. Diversity analysis on biological characteristics of three strains of grass carp reovirus from different genotype[D]. Shanghai: Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2014 (in Chinese)
殷亮. 三株不同基因型草鱼呼肠孤病毒生物学特性的差异分析[D]. 上海: 上海海洋大学硕士学位论文, 2014
- [17] Li X, Zeng WW, Wang Q, et al. Progress on grass carp reovirus[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2016, 37(7): 94-101 (in Chinese)
李贤, 曾伟伟, 王庆, 等. 草鱼呼肠病毒研究进展[J]. *动物医学进展*, 2016, 37(7): 94-101
- [18] Shao L, Fan C, Maj E, et al. Molecular characterization of nonstructural protein NS38 of grass carp reovirus[J]. *Virologica Sinica*, 2010, 25(2): 123-129
- [19] Fang Q, Seng EK, Ding QQ, et al. Characterization of infectious particles of grass carp reovirus by treatment with proteases[J]. *Archives of Virology*, 2008, 153(4): 675-682
- [20] Zhang C, Wang Q, Shi CB, 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 (in Chinese)
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
- [21] Xu Y, Hao GJ, Shen JY, et al. Isolation and identification of two grass carp reovirus strains in Jiangxi province[J]. *Freshwater Fisheries*, 2010, 40(3): 44-49 (in Chinese)
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
- [22] Wiener JR, Bartlett JA, Joklik WK. The sequences of reovirus serotype 3 genome segments M1 and M3 encoding the minor protein μ 2 and the major nonstructural protein μ NS, respectively[J]. *Virology*, 1989, 169(2): 293-304
- [23] Broering TJ, Kim J, Miller CL, et al. Reovirus nonstructural protein μ NS recruits viral core surface proteins and entering core particles to factory-like inclusions[J]. *Journal of Virology*, 2004, 78(4): 1882-1892
- [24] Tourís-Otero F, Martínez-Costas J, Vakharia VN, et al. Characterization of the nucleic acid-binding activity of the avian reovirus non-structural protein σ NS[J]. *Journal of General Virology*, 2005, 86: 1159-1169
- [25] Arnold MM, Murray KE, Nibert ML. Formation of the factory matrix is an important, though not a sufficient function of nonstructural protein μ NS during reovirus infection[J]. *Virology*, 2008, 375(2): 412-423
- [26] Trask SD, McDonald SM, Patton JT. Structural insights into the coupling of virion assembly and rotavirus replication[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2014, 12(1): 70
- [27] Ke F, He LB, Zhang QY, et al. Nonstructural protein NS80 is crucial in recruiting viral components to form aquareoviral factories[J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e63737
- [28] Sun XY, Pei C, Song HL, et al. Polyclonal antibody preparation of grass carp reovirus NS79 protein[J]. *Henan Fisheries*, 2018(2): 21-24 (in Chinese)
孙效迎, 裴超, 宋华丽, 等. 草鱼呼肠孤病毒 NS79 蛋白多克隆抗体制备[J]. *河南水产*, 2018(2): 21-24
- [29] Broering TJ, Arnold MM, Miller CL, et al. Carboxyl-proximal regions of reovirus nonstructural protein μ NS necessary and sufficient for forming factory-like inclusions[J]. *Journal of Virology*, 2005, 79(10): 6194-6206
- [30] Miller DJ, Schwartz MD, Ahlquist P. Flock house virus RNA replicates on outer mitochondrial membranes in *Drosophila* cells[J]. *Journal of Virology*, 2001, 75(23): 11664-11676