

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2016.15240

鲤春病毒血症病毒糖蛋白的截短表达及其免疫原性分析

徐进, 周勇, 陈倩, 曾令兵

中国水产科学研究院 长江水产研究所, 湖北 武汉 430223

摘要: 为了揭示鲤春病毒血症病毒(spring viremia of carp virus, SVCV)糖蛋白编码基因的主要免疫原性决定区域, 本研究对 SVCV 的糖蛋白基因进行截短表达, 并用纯化的重组蛋白作为免疫原制备了兔抗血清以分析其免疫原性。通过 SOSUI 以及 DNASTar 6.0 软件对 SVCV 糖蛋白基因的跨膜区、亲水性以及抗原表位进行分析后, 采用 RT-PCR 对该基因主要抗原决定区域编码片段进行扩增, 并构建重组表达质粒 pGEX-Gtr, 对其进行诱导表达后获得截短的 SVCV 糖蛋白的重组蛋白。将表达的重组蛋白进行纯化复性后, 作为免疫原制备兔抗血清, 采用 ELISA 法检测其效价, 采用免疫印迹以及间接免疫荧光技术检测该重组蛋白的免疫原性。研究结果显示, 截短表达的糖蛋白编码基因长 1317 bp, 编码 439 个氨基酸(29~467), 推测分子量为 49.6 kD。利用该重组蛋白制备的兔抗血清, 其与重组蛋白的反应效价为 1:64000。免疫印迹及间接免疫荧光结果显示, 该兔抗血清与 SVCV-HN 株能发生特异性反应, 表明该重组蛋白与天然的病毒表面糖蛋白的免疫原性无差异。上述研究结果表明, 截短表达的重组蛋白具有很好的免疫原性, 可应用于免疫诊断技术研发与基因工程疫苗的研制。

关键词: 鲤春病毒血症病毒; 糖蛋白编码基因; 克隆; 蛋白截短表达; 免疫原性

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2016)02-0352-07

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)感染引起的一种急性、高致死性的传染病, 主要危害鲤科鱼类特别是普通鲤(*Cyprinus carpio*), 给鲤鱼养殖造成巨大的经济损失^[1], 是中国一类动物疫病^[2-3]。SVCV 属弹状病毒科(Rhabdoviridae)、水泡性病毒属(*Vesiculovirus*), 为单股负链 RNA 病毒^[4]。SVCV 基因组长约 11 kb, 包含 5 个主要的开放阅读框, 分别编码核蛋白、磷蛋白、基质蛋白、糖蛋白和 RNA 聚合酶^[5]。糖蛋白是位于病毒囊膜表面的结构及功能蛋白, 具有高度的抗原性, 既是动物机体免疫系统识别的成分, 也是病毒感染时细胞与病毒相互作用的重要因子^[6-8]。因此, 针对糖蛋白基因结构与功能的研究对揭示 SVCV 的血清学特征和感染机理、研究免疫学诊断技术与研制高效疫苗等

具有重要的意义。

由于 SVCV 糖蛋白不易在体外获得大量表达, 因此, 本研究旨在找出 SVCV 糖蛋白中的主要免疫原性决定区域, 减小编码基因长度, 通过外源诱导表达获得具有免疫原性的截短糖蛋白。本研究通过生物软件对 SVCV 糖蛋白编码基因的跨膜结构、亲水性和抗原性进行分析, 并对预测的主要抗原性决定区域进行原核表达, 利用获得的重组蛋白制备兔抗血清, 并对重组糖蛋白的免疫原性进行分析, 为 SVCV 的免疫诊断技术研发与基因工程疫苗研制等奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

鲤鱼上皮瘤细胞(epithelioma papulosum cyprini, EPC)由中国科学院水生生物研究所张奇亚

收稿日期: 2015-06-23; 修订日期: 2015-08-18.

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金资助项目(CARS-46-11).

作者简介: 徐进(1982-), 男, 副研究员, 从事水生动物疾病研究. E-mail: xujin@yfi.ac.cn

通信作者: 曾令兵, 研究员. E-mail: zlb@yfi.ac.cn

研究员惠赠。SVCV-HN 株由本实验室分离保藏。RNA 提取试剂 TRIzol LS 为 Invitrogen 公司产品; 一步法 RT-PCR 试剂盒、克隆载体 pMD19-T simple、异丙基硫代- β -D-半乳糖苷(IPTG)、DL2000 DNA marker、DL10000 DNA marker 等为 TaKaRa 公司产品; 蛋白质 marker (SM0431)为 Fermentas 公司产品; 限制性内切酶为 NEB 公司产品; T4 DNA 连接酶、PCR 产物回收试剂盒、质粒提取试剂盒等为 Promega 公司产品; 原核表达质粒 pGEX-5X-1、大肠杆菌感受态细胞 BL21 (DE3)以及蛋白纯化试剂盒 GST Bulk Kit 为 GE Health 公司产品; 弗氏不完全佐剂及弗氏完全佐剂为 Sigma 公司产品; 辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔 IgG、免疫荧光染色试剂盒(抗兔 Cy3)为碧云天公司产品; 一步法快速 WB (HRP)试剂盒(兔)为北京康为世纪生物科技有限公司产品。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 根据 GenBank 中 SVCV 糖蛋白的基因序列信息(NCBI 登录号: DQ097384), 利用蛋白质跨膜区域分析工具 SOSUI^[9](<http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui>)以及 DNASTar 6.0(Protean)软件分析糖蛋白的跨膜区、疏水性及抗原性; 利用 Primer Premier 5.0 软件, 根据上述分析结果确定截短表达区域, 对该截短区域的基因片段设计引物进行扩增, 上游引物 PF 引入 BamH I 酶切位点: 5'-AATGGATCCCCATATCATGGCAACCTGT AATTC-3', 下游引物 PR 引入 Not I 酶切位点: 5'-AATGCGGCCGCGAATTTTAGACTAGTTCCCA-3', 引物由北京天一辉远生物公司合成。

1.2.2 病毒培养及病毒 RNA 提取 将 SVCV 病毒悬液接种于 24 h 内长满单层的 EPC 细胞中, 于 20℃在 MEM(含 2% FBS)培养基中培养, 直至细胞病变效应(cytopathogenic effect, EPC)出现并达 80%左右时, 收集培养物, 于-80℃至室温冻融 3 次, 5000 r/min 离心 10 min, 取上清用 TRIzol LS 试剂提取病毒总 RNA(按说明书的方法进行)。

1.2.3 目的基因克隆及表达载体构建 以提取的 SVCV-HN 基因组 RNA 为模板, 采用一步法 RT-PCR 对目的基因进行扩增。扩增产物经 1%琼

脂糖凝胶电泳检测后, 产物经胶回收试剂盒回收纯化, 连接 pMD19-T 载体构建 pMD19-T-Gtr。pMD19-T-Gtr 经测序确认无突变且读码框正确无误后, 将 pMD19-T-Gtr 及原核表达质粒 pGEX-5X-1 分别经 BamH I 和 Not I 双酶切、胶回收后, 将酶切产物在 T4 DNA 连接酶的作用下于 16℃连接过夜构建原核表达重组质粒 pGEX-Gtr, 然后转化感受态 *E. coli* BL21(DE3)细胞, 筛选阳性克隆, 提取重组质粒进行双酶切鉴定。

1.2.4 融合蛋白表达及纯化 将上述经过鉴定的含重组质粒的阳性菌株以 1:100 接种 20 mL 新鲜的 LB(含氨苄青霉素)液体培养基中, 37℃、150 r/min 培养, 菌液 OD_{600nm} 值达到 0.6 时, 加入终浓度为 0.1 mmol/L IPTG 诱导表达 4 h。取 5 mL 菌液于 4℃、12000 r/min 离心 5 min 后, 收集菌体沉淀, 菌体经 5 mL PBS 重悬后, 于冰上超声波破碎, 4℃、12000 r/min 离心 5 min 后, 将上清与沉淀进行 SDS-PAGE 检测, 以确定目的蛋白是以可溶性形式存在于上清中还是以包涵体形式存在于沉淀中。对于包涵体形式表达的重组蛋白, 用 8 mol/L 的尿素溶液进行变性处理, 然后采用 GST 融合蛋白纯化试剂盒进行纯化, 纯化后的重组蛋白用 PBS 透析复性, 并测定蛋白浓度。

1.2.5 多抗制备及其效价测定 以纯化的重组蛋白作为免疫原, 采用皮下多点注射的方法免疫新西兰大白兔制备抗血清, 共免疫 4 次, 每次间隔 11 天。首次免疫采用纯化后的重组蛋白 0.6 mg 与等量完全弗氏佐剂混合后注射, 其余 3 次取重组蛋白 0.3 mg 与等量不完全弗氏佐剂混合后注射。免疫结束后于心脏取血, 4℃静置过夜后, 将析出的血清进行分装保存于-80℃。

采用 ELISA 法对血清效价进行测定。用纯化的重组蛋白包被酶标板, 并设立空白对照(纯水)与阴性对照(未免疫兔血清)。每孔加入 100 μ L 重组蛋白溶液(5 mg/L), 于 4℃包被过夜。次日将液体倒出, 用 PBST 洗涤 3 次, 然后用 5%脱脂奶粉 200 μ L/孔于 37℃封闭 1.5 h, PBST 洗涤 3 次, 将待测抗体进行 2 倍梯度稀释后(1:1000~1:512000)加入酶标板, 100 μ L/孔、37℃孵育 1 h 后, 用 PBST

洗涤 3 次。每孔加入 1 5000 倍稀释的羊抗兔-HRP 抗体, 37℃ 孵育 1 h, 用 PBST 洗涤 3 次后, 加入 100 μL/孔底物显色液, 暗处显色 30 min 后, 加入 50 μL/孔终止液(2 mol/L H₂SO₄)终止反应, 用酶标仪测定 450 nm 波长下的吸光值 *A*。当 $\Delta A = (A_{\text{阳性孔}} - A_{\text{空白孔}}) / (A_{\text{阴性孔}} - A_{\text{空白孔}}) > 2.1$ 时, 此时的最大稀释倍数即为抗体效价。

1.2.6 免疫印迹及间接免疫荧光法分析重组蛋白的免疫原性 取感染 SVCV-HN 的 EPC 细胞及正常 EPC 细胞, 冻融 1 次, 分别取 1 mL 于 3000 r/min 离心 10 min, 沉淀用 50 μL PBS 悬浮, 加入等量 2× 上样缓冲液沸水浴 10 min 后, 进行 SDS-PAGE 分析。电泳完毕后, 将蛋白转至 PVDF 膜。转膜后, 以制备的多抗为一抗, HRP 标记的羊抗兔 IgG 为二抗, 使用一步法快速 WB (HRP) 试剂盒参照其说明书进行免疫印迹实验。

采用细胞爬片的方法在 6 孔板中培养 EPC 细胞(培养条件同上), 待细胞单层铺满培养板 80% 区域后, 接种 SVCV 病毒, 同时设置空白对照。间接荧光免疫实验采用免疫荧光染色试剂盒

进行。分别在接种病毒 48 h、72 h 后用 4% 多聚甲醛固定细胞, 4℃ 过夜。然后去除固定液, 用洗涤液洗涤 3 次, 加入封闭液孵育 1 h 后, 用洗涤液洗涤 3 次。加入制备的多抗(稀释 500 倍), 4℃ 孵育过夜后去除多抗, 用洗涤液洗涤 3 次后加入 Cy3 荧光标记的羊抗兔抗体孵育 1 h, 洗涤, 加入 DAPI 染色液对细胞核染色 10 min, 置于荧光显微镜下观察。

2 结果与分析

2.1 SVCV 糖蛋白结构分析

SOSUI 软件对 SVCV 糖蛋白进行完整氨基酸序列分析的结果显示(图 1A), 该蛋白存在 2 个跨膜区, 分别位于 N 端(6~28 aa)和 C 端(468~490 aa), 中间的 439 aa(29~467 aa)位于膜外。结合 DNASTar 6.0 软件对糖蛋白进行完整氨基酸序列分析(图 1B), 该区段亲水性强, 抗原性系数高, 因此推测该区段应该是 SVCV 糖蛋白的主要免疫原性决定区域, 故而选择该区段氨基酸序列(对应糖蛋白编码基因 85~1401 bp)进行截短表达。

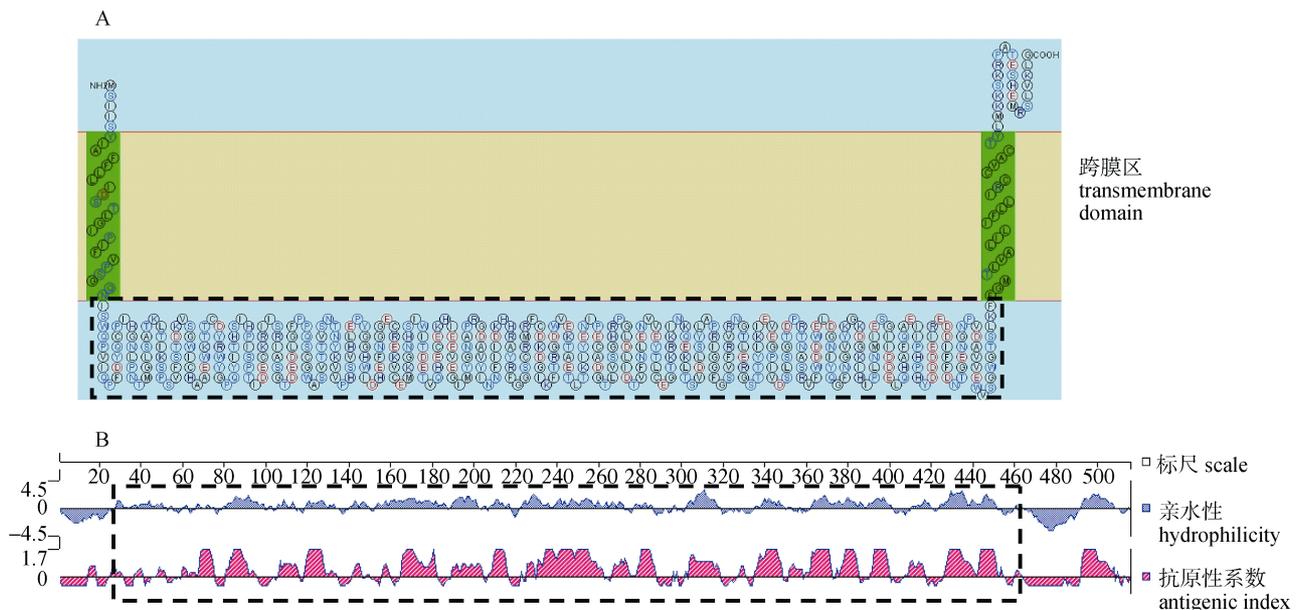


图 1 SVCV 糖蛋白的跨膜区、抗原表位以及亲水性分析

A: SVCV 糖蛋白的跨膜区分析; B: SVCV 糖蛋白的抗原表位和亲水性分析; 图中黑色虚线所选区域即为表达所选取的氨基酸区段。

Fig. 1 Analysis of the transmembrane, antigenic and hydrophilic domain of SVCV

A: analysis of the transmembrane domain of SVCV; B: analysis of the antigenic and hydrophilic domain of SVCV; the selected region of the black dashed line is the selected amino acid section for the expression.

2.2 基因克隆及表达载体构建

琼脂糖凝胶电泳显示(图 2), 以 SVCV 基因组总 RNA 为模板, 通过 RT-PCR 扩增得到单一扩增产物, 约为 1339 bp(含引物酶切位点), 片段大小符合预期。

构建的原核表达重组质粒 pGEX-Gtr 经过 *Bam*H I 和 *Not* I 双酶切鉴定(图 3), 结果显示酶切产

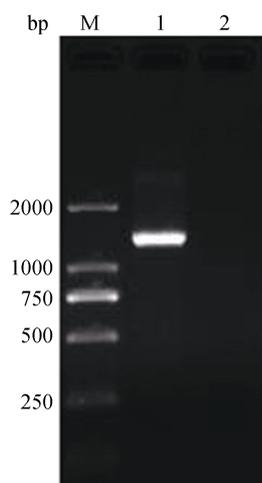


图 2 SVCV 截短糖蛋白基因扩增产物检测

M: DL2000 DNA marker; 1: 截短糖蛋白基因片段; 2: 阴性对照.

Fig. 2 The PCR product of the truncated glycoprotein gene of SVCV

M: DL2000 DNA marker; 1: the truncated glycoprotein gene; 2: negative control.

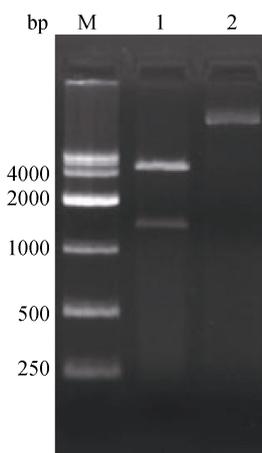


图 3 重组表达质粒 pGEX-Gtr *Bam*H I/*Not* I 双酶切鉴定

M: DL10000 DNA marker; 1: 经过双酶切的 pGEX-Gtr 质粒; 2: 未经过双酶切的 pGEX-Gtr 质粒.

Fig. 3 Identification of recombinant plasmid pGEX-Gtr by restriction enzymes of *Bam*H I and *Not* I

M: DL10000 DNA marker; 1: pGEX-Gtr digested with *Bam*H I and *Not* I; 2: undigested pGEX-Gtr.

物符合预期, 表明原核表达重组质粒构建成功。

2.3 糖蛋白的诱导表达与纯化

将经 IPTG 诱导表达 4 h 的 BL21 菌液于冰上超声波破碎, 破碎后产物离心后, 分别取上清以及重悬的沉淀进行 SDS-PAGE 分析。结果显示, 目的蛋白约为 77 kD(含融合表达的 GST-Tag, 约 27 kD), 分子量大小符合预期, 并且, 目的蛋白主要在沉淀中, 表明该蛋白是以包涵体的形式进行表达(图 4)。包涵体经过 8 mol/L 尿素变性后, 采用 GST 融合蛋白纯化试剂盒纯化, 纯化后的蛋白复性后, 测定其浓度为 4 mg/mL。

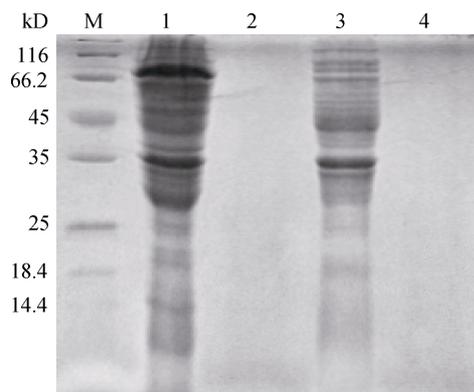


图 4 目的蛋白的诱导表达及可溶性分析

M: 蛋白质 marker; 1: IPTG 诱导的菌体沉淀; 2: IPTG 诱导的上清; 3: 未诱导的菌体沉淀; 4: 未诱导的上清.

Fig. 4 Expression and solubility analysis of the recombination glycoprotein

M: protein marker; 1: bacteria pellet protein of induced pGEX-Gtr; 2: supernatant of induced pGEX-Gtr; 3: bacteria pellet protein with pGEX-Gtr not induced; 4: supernatant of bacteria with pGEX-Gtr not induced.

2.4 抗血清效价测定

实验以纯化后的重组蛋白作为抗原, 以实验中制备的兔抗血清作为阳性血清, 并按 2 倍梯度稀释(起始倍数 1 1000)阳性血清作为一抗, 进行 ELISA 检测。结果表明, $\Delta A > 2.1$ 时, 抗血清的最大稀释倍数, 即抗血清效价为 1 64000(表 1)。说明抗血清和截短表达的重组蛋白的亲合性高。

2.5 重组蛋白的免疫原性分析

以正常对照 EPC 细胞和接种了 SVCV-HN 的 EPC 细胞作为抗原, 以本实验制备的兔抗血清为抗体, 分别采用免疫印迹和间接免疫荧光法检测

表 1 ELISA 检测抗血清的效价

Tab. 1 Determination of the antibody titer by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

稀释倍数 dilution	空白 blank	阴性对照 negative contr.	1K	2K	4K	8K	16K	32K	64K	128K	256K	512K
吸光值 <i>A</i> absorbance	0.03	0.04	0.88	0.68	0.50	0.27	0.18	0.11	0.08	0.05	0.04	0.03
ΔA			84	65	46	23	14	7	4	1	0	-1

抗原抗体的反应, 进而评估重组蛋白的免疫原性。

免疫印迹检测结果显示, 本实验制备的多抗血清与感染 SVCV 的 EPC 细胞总蛋白的一条约 60 kD 的条带即 SVCV 的糖蛋白发生特异性反应(图 5), 表明制备的抗血清具有较好的特异性, 间接证明截短表达的重组蛋白和 SVCV 的天然糖蛋白具有相似的免疫原性。

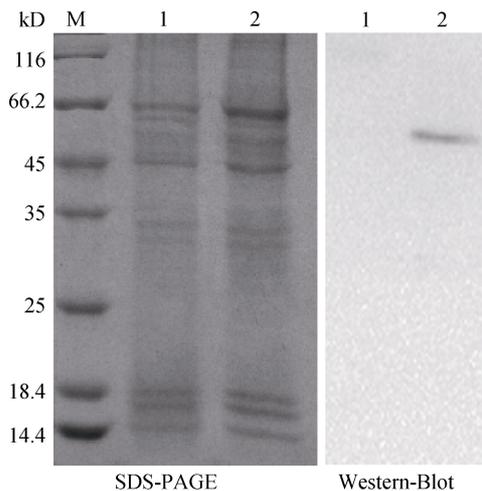


图 5 抗血清与 SVCV 免疫印迹分析

M: 蛋白质 marker; 1: EPC 细胞; 2: 感染 SVCV 的 EPC 细胞.

Fig. 5 Immunoblotting analysis of SVCV in EPC cells

M: protein marker; 1: EPC cells; 2: EPC cells infected with SVCV.

间接免疫荧光检测结果显示, 实验制备的兔抗血清与 SVCV-HN 分离株能发生特异性的抗原抗体反应, 接种有 SVCV-HN 的 EPC 细胞, 48 h 和 72 h 以后在细胞内均呈现出橙红色荧光, 而阴性对照细胞未出现荧光(图 6)。该实验结果表明, 本实验制备的兔抗血清能很好地识别病毒表面的糖蛋白, 因此进一步证明, 截短表达的糖蛋白与病毒表面的天然糖蛋白在免疫原性上无差异。

3 讨论

SVCV 曾经给欧洲的鲤鱼养殖业造成了巨大的经济损失^[1]。中国在 2001—2004 年开展的全国

范围的 SVCV 监测工作中分离和鉴定了 15 个 SVCV 毒株^[6, 9], 随后中国又陆续出现了多篇关于 SVCV 分离鉴定的研究报道^[10-11], 本研究所用 SVCV-HN 毒株也是本实验室于 2012 年从湖南省一鲤鱼养殖场的发病鲤鱼中分离得到。可见, 目前 SVCV 已成为中国鲤鱼养殖业的潜在威胁。对其开展快速诊断技术以及免疫防控技术, 具有重要意义。由于糖蛋白是 SVCV 的主要抗原蛋白, 决定了 SVCV 的血清学特征^[12], 因此对其基因结构和免疫原性开展研究, 可为 SVCV 的免疫学诊断技术研究以及基因工程疫苗研制奠定基础。

由于 SVCV 完整的糖蛋白基因很难在体外获得大量表达^[13-14], 因此, 目前国内学者通常采用截短表达方式获得截短的糖蛋白。例如, 张家林等^[15]采用 pET-28a 原核表达质粒对糖蛋白的 21~463 aa 区段进行了体外诱导表达, 并用该蛋白作为免疫原制备了单克隆抗体。该研究选择表达区域时, 去除了 N 端“无用”的信号肽和 C 端影响重组蛋白高效表达的疏水性氨基酸序列, 目的是为了获得重组蛋白的高效表达, 而未对糖蛋白基因的抗原表位进行分析, 存在一定的盲目性。本研究根据 SOSUI 以及 DNASTar 6.0 软件对 SVCV 糖蛋白基因的跨膜区、亲水性以及抗原表位进行分析后, 保留亲水性和抗原性系数最高的 29~467 aa 区段进行原核表达, 最后成功获得了具有较好免疫原性的重组蛋白。

本研究利用获得的重组蛋白制备了兔抗血清, 抗体效价测定结果表明, 抗血清与蛋白的亲合性很好, 间接免疫荧光实验证实其与病毒表面的天然糖蛋白一样, 具有较好的免疫原性。这表明, 尽管原核表达系统无法对蛋白进行糖基化、磷酸化和酰基化等翻译后的修饰与加工, 但是只要蛋白能够正确折叠, 即可保持其免疫原性, 而糖基化或许不是糖蛋白保持免疫原性所必需的。在本研

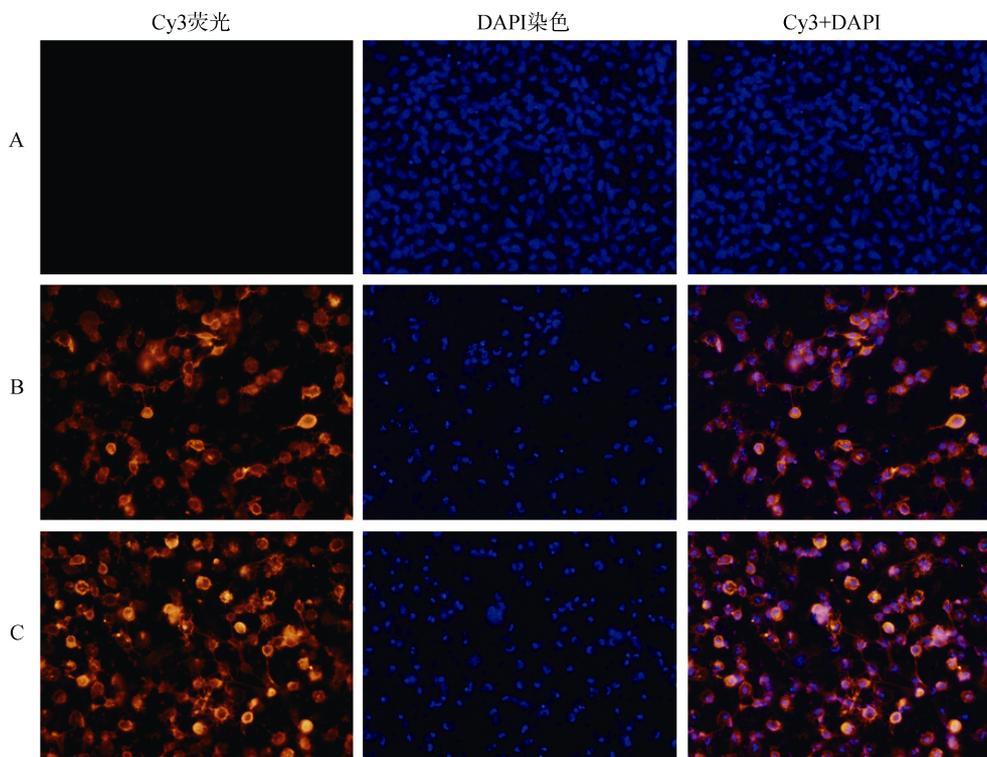


图 6 间接免疫荧光法检测 SVCV 重组蛋白的免疫原性($\times 400$)

A: EPC 细胞阴性对照(72 h); B: 接种 SVCV-HN 48 h 后的 EPC 细胞; C: 接种 SVCV-HN 72 h 后的 EPC 细胞.

Fig. 6 The immunogenicity test of the recombination protein by indirect immunofluorescence assay ($\times 400$)

A: Immunofluorescence staining of normal EPC cells at 72 h pi; B: immunofluorescence staining of EPC cells infected with SVCV-HN at 48 h pi; C: 72 h pi.

究中, 由于去掉了糖蛋白两端的疏水区, 降低了疏水性氨基酸的影响, 使得原核表达的蛋白能够正确折叠, 因而获得较好的免疫原性。

参考文献:

- [1] Ahne W, Bjorklund H V, Essbauer S, et al. Spring viremia of carp (SVC)[J]. Dis Aquat Organ, 2002, 52(3): 261–272.
- [2] 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. [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.]
- [3] Wang S, Zhang L F, Xu L P, et al. Progress in the nucleic acid testing of Carp virus[J]. Inspection and Quarantine Science, 2012, 22(3): 49–51. [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.]
- [4] Walker P J, Benmansour A, Calisher C H. Family Rhabdoviridae: The Seventh Report of the International Committee for Taxonomy of Viruses[Z]. San Diego: Academic Press, 2000.
- [5] 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.
- [6] Liu H, Fu F, Huang J, et al. Amino acid sequence of a Chinese isolate of spring viremia of carp virus and preliminary analysis of the glycoprotein gene[J]. Virologica Sinica, 2005, 20(6): 647–651. [刘荭, 付峰, 黄健, 等. 鲤春病毒血症病毒中国分离株糖蛋白基因和氨基酸序列的初步解析[J]. 中国病毒学报, 2005, 20(6): 647–651.]
- [7] Zhang J L, Li Y, Li Q. Advances of glycoprotein of spring viremia of carp virus (SVCV)[J]. Biotechnology Bulletin, 2014(5): 20–24. [张家林, 李洋, 李强. 鲤春病毒血症病毒 G 蛋白的研究进展[J]. 生物技术通报, 2014(5): 20–24.]
- [8] Hirokawa T, Boon-Chiang S, Mitaku S. SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins[J]. Bioinformatics, 1998, 14(4): 378–379.
- [9] Liu H, Gao L, Shi X, et al. Isolation of spring viraemia of carp virus (SVCV) from cultured koi (*Cyprinus carpio koi*) and common carp (*C. carpio carpio*) in P. R. China[J]. Bull Eur Assoc Fish Pathol, 2004, 24(4): 194–202.

- [10] Teng Y, Liu H, Lv J Q, et al. Characterization of complete genome sequence of the spring viremia of carp virus isolated from common carp (*Cyprinus carpio*) in China[J]. Arch Virol, 2007, 152(8): 1457–1465.
- [11] An W, Xiao Y, Zhang C W, et al. Isolation and identification of a new SVCV isolate[J]. Fisheries Science and Technology Information, 2014, 41(1): 32–34, 38. [安伟, 肖雨, 张崇文, 等. 一株鲤春病毒血症病毒的初步分离及鉴定[J]. 水产科技情报, 2014, 41(1): 32–34, 38.]
- [12] Vestergård Jorgensen P E, Olesen N J, Ahne W, et al. SVCV and PFR viruses: Serological examination of 22 isolates indicates close relationship between the two fish rhabdoviruses[M]//Viruses of Lower Vertebrates, Heidelberg: Springer Verlag, 1989: 349–366.
- [13] Luo P X, Zhang Q, Wang M, et al. Prokaryotic expression and polyclonal antibody preparation of G protein of spring viremia of carp virus[J]. Journal of Hydroecology, 2014, 35(4): 81–86. [罗培骁, 张琪, 王敏, 等. 鲤春病毒血症病毒 G 蛋白的原核表达及多克隆抗体的制备[J]. 水生生态学杂志, 2014, 35(4): 81–86.]
- [14] Lan W S, Liu H, Gao L Y, et al. High-level expression and purification of recombinant glycoprotein of spring viremia of carp virus (SVCV)[J]. Chinese Journal of Animal Infectious Diseases, 2010, 18(2): 18–22. [兰文升, 刘蕊, 高隆英, 等. 鲤春病毒血症病毒糖蛋白的高效表达和纯化[J]. 中国动物传染病学报, 2010, 18(2): 18–22.]
- [15] Zhang J L, Li Q, Ye S G, et al. Prokaryotic expression of glycoprotein and preparation of monoclonal antibody in spring viremia of carp virus (SVCV)[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2014, 29(5): 454–458. [张家林, 李强, 叶仕根, 等. 鲤春病毒血症病毒糖蛋白的原核表达及单克隆抗体的制备[J]. 大连海洋大学学报, 2014, 29(5): 454–458.]

Expression and immunogenicity analysis of a truncated glycoprotein of spring viremia of carp virus (SVCV)

XU Jin, ZHOU Yong, CHEN Qian, ZENG Lingbing

Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China

Abstract: To reveal the main immunogenic domain of the glycoprotein of spring viremia of carp virus (SVCV), the glycoprotein encoding gene was truncated and expressed, and the immunogenicity of the truncated glycoprotein was analyzed using a rabbit polyclonal antibody produced in response to the recombination protein. The transmembrane, antigenic and hydrophilic domains of SVCV were analyzed by SOSUI and DNASTar 6.0 software. The predicted main immunogenic domain was amplified by reverse transcription polymerase chain reaction and cloned into a prokaryotic expression plasmid. The truncated glycoprotein was expressed in BL21 cells. After purification and refolding, the protein was used to produce antiserum in rabbits. The antiserum titer was tested by an enzyme-linked immunosorbent assay and the immunogenicity of the protein was tested by immunoblotting and indirect immunofluorescence assay (IFA). The results showed that the truncated glycoprotein gene was 1339 bp encoding a 439 aa peptide (from 29 to 467aa of the full-length glycoprotein) with a predicted molecular weight of 49.6 kD. The antiserum titer against the recombinant glycoprotein was 1 : 64000. Immunoblotting and IFA results demonstrated that the antiserum reacted immunologically with the natural glycoprotein on the surface of SVCV-HN. There was no difference in immunogenicity between the truncated glycoprotein produced in this study and the natural glycoprotein of SVCV. Therefore, the truncated glycoprotein of SVCV had good immunogenicity and could be used in immunological diagnosis and genetic engineering vaccine development of SVCV.

Key words: spring viremia of carp virus (SVCV); glycoprotein encoding gene; cloning; truncated expression; immunogenicity

Corresponding author: ZENG Lingbing. E-mail: zlb@yfi.ac.cn