

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2019.18096

鱼类病毒性出血性败血症病毒基质蛋白的原核表达及其亚细胞定位

朱若林, 沈娇娇, 蒋书东, 杨彩桥, 张晓华, 鲍传和, 彭开松

安徽农业大学动物科技学院, 安徽 合肥 230036

摘要: 为了对鱼类病毒性出血性败血症病毒(viral hemorrhagic septicemia virus, VHSV)基质蛋白(matrix protein, M)进行功能研究, 本实验通过 PCR 扩增了 M 基因全长序列, 将其克隆至原核表达载体 pET-32a(+), 转化至大肠杆菌 Rosetta (DE3)感受态细胞后进行 IPTG 诱导表达, 将纯化后的重组蛋白免疫 BALB/c 小鼠制备多克隆抗体, 采用间接 ELISA 检测抗体效价, 并运用 Western blot 和间接免疫荧光检测抗体特异性。结果显示, M 基因全长为 606 bp, IPTG 诱导得到的融合蛋白主要以包涵体的形式存在, 大小约为 36 kD, 比预计略小。间接 ELISA 检测抗体效价大于 1:102400, Western blot 检测显示该抗体可以特异性识别纯化的融合蛋白和 VHSV 感染的鲤上皮瘤(epithelioma papulosum cyprini, EPC)细胞中的 M 蛋白。间接免疫荧光结果显示 M 蛋白多抗能识别感染 VHSV 的 EPC 细胞中的 M 蛋白, 且 M 蛋白主要定位于细胞质和细胞膜。本研究中 M 蛋白多克隆抗体的制备将有助于开展 M 蛋白的功能研究及疾病的免疫学诊断。

关键词: 病毒性出血性败血症病毒; 基质蛋白; 原核表达; 多克隆抗体

中图分类号: S941

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2019)01-0214-07

鱼类病毒性出血性败血症(viral hemorrhagic septicemia, VHS)是一种以暴发性流行为主的动物疫病, 主要引起养殖虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)和牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)等发病, 造成脾肾坏死、变性及全身性出血等症状, 引起大量死亡, 自从 1938 年最初暴发于丹麦的虹鳟养殖场, 该疾病现已广泛流行于北半球, 给水产养殖业带来了重大的经济损失^[1-3]。其病原 VHSV 属于弹状病毒科(*Rhabdoviridae*), 诺拉弹状病毒属(*Novirhabdovirus*), 是一种不分节段的单链负义 RNA 病毒。据报道, VHSV 已从 80 多种淡水或海水鱼类中分离到, 被感染的鱼类广泛分布于北美^[4]、欧洲^[5]以及亚洲的日本^[6]和韩国^[7], 在中国^[8]和伊朗^[9]也各有一例报道。

M 蛋白是弹状病毒的结构蛋白, 同时也是一种多功能蛋白, 在病毒的侵染过程中发挥着多种作用, 包括参与病毒的组装和出芽, 抑制宿主基

因表达和核质间物质运输, 以及诱导宿主细胞凋亡等^[10-13], 这些研究主要集中于两种人畜共患病弹状病毒病原: 水泡性口炎病毒(vesicular stomatitis virus, VSV)和狂犬病毒(rabies virus, RABV)。目前对 VHSV 的研究多集中于病原分离^[6-9]、进化分析^[14-16]和非结构(non-virion, NV)蛋白的功能研究^[17-19], 对其他结构蛋白的功能研究则相对较少, 且至今无有效的商用病毒疫苗。对于 M 蛋白, Ke 等^[20]通过实验证明 VHSV M 蛋白能抑制宿主基因转录, Chiou 等^[21]在另一种相近的鱼类弹状病毒-传染性造血器官坏死病毒(infectious hematopoietic necrosis virus, IHNV)中证实其实 M 蛋白能抑制宿主基因表达并诱导细胞凋亡。鉴于 M 蛋白的多功能性, 研究 M 蛋白的功能及其与细胞的相互作用机制, 将有助于对 VHS 的有效防控。

为了对 VHSV M 蛋白功能进行研究, 本实验通过构建原核表达系统对 M 蛋白进行了原核表达,

收稿日期: 2018-03-16; 修订日期: 2018-05-07.

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(31402331); 安徽省现代农业产业技术体系(2016-2020)水产产业体系(皖农科[2016]84 号).

作者简介: 朱若林(1987-), 男, 博士, 研究方向为鱼类疾病防控. E-mail: jollinz@163.com

通信作者: 蒋书东, 副教授. E-mail: jshudong@163.com

将纯化的重组融合蛋白免疫小鼠制备了多克隆抗体, 通过间接 ELISA 和 Western blot 对抗体进行检测, 并利用间接免疫荧光对 M 蛋白的亚细胞定位进行了研究。实验结果将为进一步研究 VHSV M 蛋白的功能和疾病的免疫学诊断奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要材料

VHSV 毒株及包含病毒基因的质粒由中国科学院水生生物研究所张奇亚研究员馈赠; 原核表达载体 pET-32a、EPC 细胞由实验室保存; 大肠杆菌 DH5 α 感受态和 Rosetta (DE3) 感受态、反转录试剂盒、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶等均购自北京全式金生物技术有限公司, PAGE 胶蛋白微量回收试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 引物设计与合成

根据 GenBank 上发表的序列(登录号: KC685626), 利用 Primer5.0 软件设计了 1 对 M 基因的原核表达引物 FM-3.1 (5'-ACAGAATTCATGGCTCTAT-TCAAAAG-3') 和 RM-3.1 (5'-CTTCTCGAGCTA-CCGGGGTC-3'), 上下游引物分别引入 *EcoR* I 与 *Xho* I 两个酶切位点, 送至生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.3 M 基因的克隆

以包含 VHSV M 基因的质粒为模板, 用合成的上下游引物进行 PCR 扩增, 反应条件为 94℃ 预变性 5 min, 然后 94℃ 变性 30 s, 51℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 32 个循环, 再 72℃ 延伸 10 min。经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离后, 目的片段用胶回收试剂盒回收, 将回收产物与 pMD18-T 载体连接, 4℃ 连接过夜, 连接产物转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中, 并涂布于含氨苄青霉素的 LB 平板, 37℃ 过夜培养, 筛选阳性克隆后送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序验证。

1.4 原核表达载体的构建

将重组质粒 pMD18-T-M 和 pET-32a(+) 载体分别用 *EcoR* I 和 *Xho* I 在 37℃ 进行双酶切, 2 h 后, 酶切产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离后, 切胶回收目的片段, 用 T4 DNA 连接酶 4℃ 连接过夜, 转

化至 Rosetta(DE3) 感受态细胞中, PCR 筛选阳性克隆, 阳性克隆扩大培养后提取质粒, 经双酶切鉴定后, 送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 测序无突变后用于诱导原核表达。

1.5 融合蛋白的诱导表达

将包含重组原核表达载体的大肠杆菌 Rosetta (DE3) 接种于含氨苄的 LB 培养基中, 37℃ 振荡培养, 菌液 OD₆₀₀ 值达到 0.6 时加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 进行诱导表达, 6 h 后离心收集菌体, 菌体用 PBS 清洗 2 次后重悬, 在冰上进行超声破碎, 离心后分别收集上清和沉淀, 进行 SDS-PAGE 电泳分析。诱导的蛋白切胶后通过 PAGE 胶蛋白微量回收试剂盒按说明书进行回收纯化。

1.6 多克隆抗体制备

取纯化的 M 融合蛋白免疫 BALB/c 小鼠, 第 1 次免疫 50 μ g/只, 以后每隔 7 d 加强免疫, 1 次 20 μ g/只, 共 5 次。首次免疫加入与融合蛋白等体积的弗氏完全佐剂, 后 4 次加入与融合蛋白等体积的弗氏不完全佐剂。最后一次加强免疫 3 d 后取血, 分离血清。

1.7 间接 ELISA 检测抗体效价

以纯化的重组蛋白为抗原, 用碳酸盐包被液稀释到 2 μ g/mL 后包被 96 孔板, 待测多克隆抗体为一抗, 按 1:12800、1:256000、1:51200、1:102400、1:204800、1:409600、1:819200、1:1638400 的比例稀释, 用 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 为二抗, 经四甲基苯胺(TMB)溶液显色后用酶标仪测定 OD₄₅₀ 值, 以检测孔 OD₄₅₀ 值是阴性对照 OD₄₅₀ 2 倍以上来确定抗体效价。同时设立未免疫小鼠血清做阴性对照, PBS 缓冲液为空白对照, 每个样本重复 2 次取结果平均值。

1.8 Western blot 分析

取 VHSV 感染 EPC 细胞后的细胞悬液和诱导的 M 融合蛋白, 进行 Western blot 检测抗体血清的特异性, 同时分别以未感染 VHSV 的 EPC 细胞和未诱导的细菌作为对照, 按照如下条件进行实验: 样本经 SDS-PAGE 电泳后转印到 PVDF 膜上, 用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 用 TBST 洗膜 3 次, 将制备的抗体血清经 1:1000 倍稀释后作为一抗, 室温作用 2 h, 接着用 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 经

1 : 1500 稀释后作为二抗, 室温作用 2 h, 最后用 NBT/BCIP 底物显色液进行显色。

1.9 间接免疫荧光检测

将 VHSV 病毒接种于 EPC 单层细胞上 48 h, 观察到细胞病变后, 弃掉细胞培养液, PBS 清洗 3 遍, 经 4%多聚甲醛固定和 0.2%Triton-X 100 透化后, 以制备的多克隆抗体为一抗, 以 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 抗体为二抗, 用 DAPI 进行核染后, 用激光共聚焦显微镜进行观察。

2 结果与分析

2.1 重组载体的构建及鉴定

根据设计的引物 PCR 扩增 M 基因, 将片段切胶回收后连接到 pMD18-T 中, 获得重组载体 pMD18-T-M。将 pMD18-T-M 和 pET-32a(+)分别用 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切后连接, 获得了重组载体 pET-32a-M。两个重组载体均通过双酶切和测序来进行验证是否正确。双酶切鉴定结果见图 1, 两个载体均被切割成目的片段和载体片段, 且大小与预计相符。

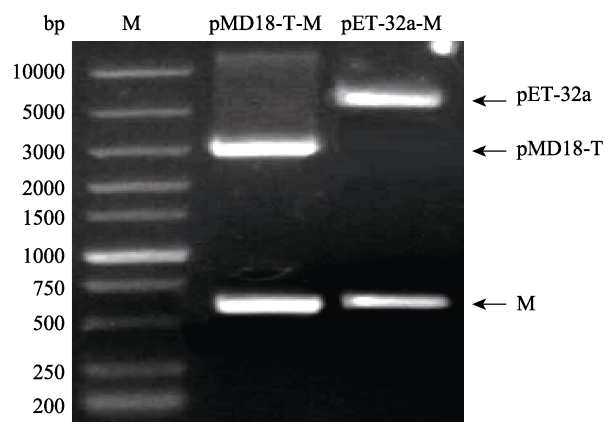


图 1 pMD18-T-M、pET-32a-M 重组质粒的双酶切验证
Fig. 1 Restriction enzyme double-digestion of recombinant plasmid pMD18-T-M and pET-32a-M
M: super 10000 DNA marker.

2.2 融合蛋白的诱导表达

将诱导表达产物进行 SDS-PAGE 电泳, 结果显示在约 36 kD 的位置出现了大量表达的蛋白质, 比预计的 40 kD 略小。超声破碎处理诱导后的菌体, 将上清和沉淀分别进行 SDS-PAGE 电泳检测, 结果显示, 融合蛋白主要存在于沉淀中, 以不溶

性的包涵体形式存在。将包涵体进行切胶回收, 经 SDS-PAGE 检测后结果显示, 获得了较纯的 M 融合蛋白(图 2)。

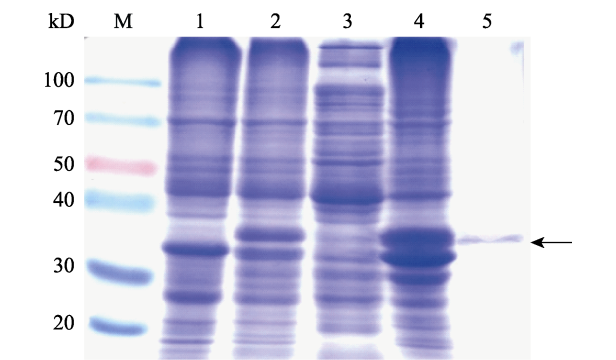


图 2 蛋白诱导表达产物的 SDS-PAGE 分析
M: 蛋白分子量标准; 1: 未诱导; 2: 诱导; 3: 诱导上清;
4: 诱导沉淀; 5: 纯化的 M 融合蛋白。
箭头所示为融合蛋白所在位置。

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of prokaryotic expression products
M: protein marker; 1: non-induced bacteria; 2: induced bacteria;
3: induced supernatant; 4: induced precipitation; 5: purified fusion protein. The target protein is indicated by an arrow.

2.3 ELISA 检测结果

利用间接 ELISA 检测获得多克隆抗体的效价, 通过两次重复采样结果的平均值来计算抗体效价, 结果见表 1。其中阴性对照 N 和空白对照 PBS 检测数据均小于 0.1, 取 $P/N \geq 2.0$ 的血清稀释度为待检血清的效价, 如表 1 所示, 待检血清效价大于 1 : 102400。

表 1 ELISA 检测多克隆抗体效价
Tab. 1 The titer of polyclonal antibody detected by ELISA

稀释度 dilution	多克隆抗体 P ^a	阴性对照 N ^b	P/N	空白对照 PBS
1 : 2 ⁷ ×100	0.380	0.062	5.071	0.054
1 : 2 ⁸ ×100	0.297	0.061	4.108	0.050
1 : 2 ⁹ ×100	0.198	0.060	3.148	0.054
1 : 2 ¹⁰ ×100	0.123	0.048	2.542	0.046
1 : 2 ¹¹ ×100	0.111	0.065	1.479	0.061
1 : 2 ¹² ×100	0.074	0.056	1.263	0.053
1 : 2 ¹³ ×100	0.080	0.066	1.118	0.046
1 : 2 ¹⁴ ×100	0.058	0.053	1.074	0.051

注: ^a表示两组待测多抗检测结果的平均值; ^b表示两组阴性对照检测结果的平均值。

Note: ^a denotes average value of two groups of polyclonal antibody results; ^b denotes average value of two groups of negative control results.

2.4 Western blot 检测结果

取 VHSV 感染 EPC 细胞后的细胞悬液和诱导的 M 融合蛋白进行 Western blot, 检测抗体血清的特异性, 结果显示两者均能检测到单一的条带, 且大小符合预期。其中 VHSV 感染的 EPC 细胞中为单一的 M 蛋白, 预计大小为 22 kD(图 3A), 融合蛋白大小为约 36 kD, 与诱导结果大小一致(图 3B), Western blot 结果表明制备的多克隆抗体能特异性识别 M 蛋白及其融合蛋白。

2.5 间接免疫荧光检测结果

利用制备的多抗通过间接免疫荧光检测了 VHSV 感染 48 h 的 EPC 细胞中的 M 蛋白, 并利用共聚焦荧光显微镜观察。结果显示, 制备的多抗可以识别 EPC 细胞中的 M 蛋白, 且 M 蛋白主要定位于细胞质和细胞膜上。

3 讨论

弹状病毒是一类宿主范围非常广泛的病毒, 能够感染脊椎动物、节肢动物和植物等, 造成重大危害。根据国际病毒分类委员会(the international committee on taxonomy of viruses, ICTV)第十次报告, 弹状病毒科包含 18 个属共计 131 种病毒^[22]。其中, 鱼类弹状病毒主要归于水泡性口炎病毒属(*Vesiculovirus*)和诺拉弹状病毒属, 而 VHSV 则属于诺拉弹状病毒属^[23]。VHSV 能感染全球 80 多种鱼类, 在适宜水温条件下, 对敏感鱼类如虹鳉、大菱鲂和牙鲆等, 特别是鱼苗, 致死率可高达 100%, 对水产业危害重大^[15]。鉴于该病在水产养殖中的危害性, 世界动物卫生组织(Office International Des Epizooties, OIE)将其列入水生动物疫病名录, 要求各国如有相关疫情需及时上报。因此,

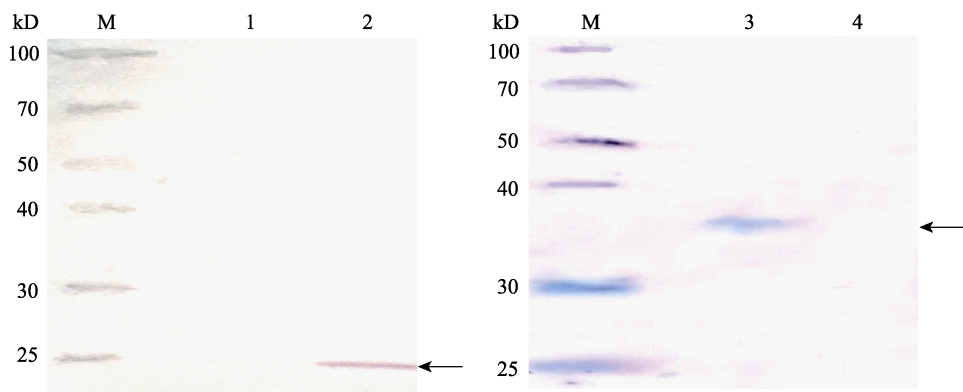


图 3 Western blot 检测多克隆抗体特异性

M: 蛋白分子量标准; 1: 未感染 VHSV 的 EPC 细胞; 2: 感染 VHSV 的 EPC 细胞; 3: 纯化后的融合蛋白 4: 未诱导细菌.

Fig. 3 Specificity of polyclonal antibody detected by Western blot

M: protein marker; 1: uninfected EPC cells; 2: EPC cells infected by VHSV; 3: purified fusion protein; 4: non-induced bacteria.

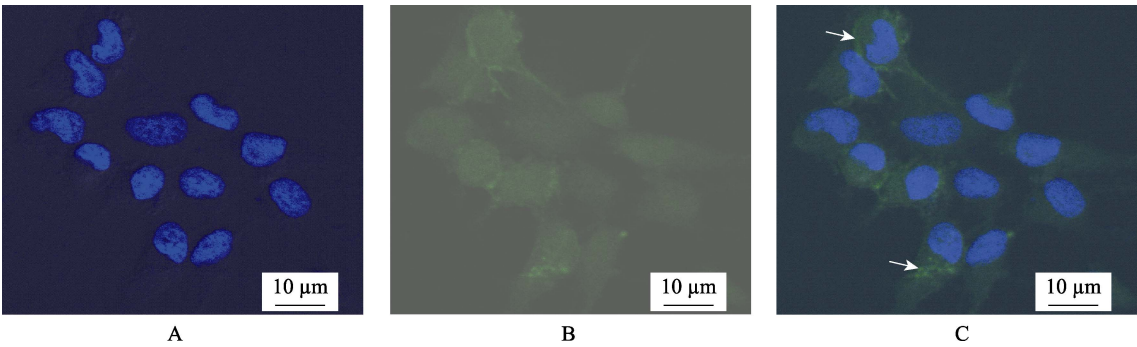


图 4 VHSV M 蛋白在鲤上皮瘤细胞中的定位

A. DAPI 染核; B. 间接免疫荧光检测 M 蛋白; C. 叠加效果; 箭头所示为检测的 M 蛋白的位置.

Fig. 4 Subcellular localization of M protein in epithelioma papulosum cyprini (EPC) cells

A. DAPI-stained nuclei; B. M protein detected by indirect immunofluorescence; C. Merge. M protein is indicated by arrows.

深入了解 VHSV 病毒的生物学特性和致病机理, 加强对病毒的诊断和防治非常重要。由于 M 蛋白在病毒侵染过程中的多功能性, 本研究利用大肠杆菌高效表达了 M 蛋白, 并制备了多克隆抗体, 实验结果显示, 该抗体能特异性识别纯化的融合蛋白和 VHSV 感染的 EPC 细胞中的 M 蛋白, 且效价较高, 表明抗体质量较好。

在间接免疫荧光试验中, 结果显示制备的多抗可以识别 VHSV 感染的 EPC 细胞中的 M 蛋白, 且 M 蛋白主要定位于细胞质或细胞膜上, 这与病毒感染过程中 M 蛋白发挥的作用是相关的。在 VSV 和 RABV 中, 有多项研究表明 M 蛋白参与病毒的组装和出芽^[10]、抑制宿主基因转录和蛋白质核质运输^[11]、诱导细胞凋亡^[12-13]等。Larrous 等^[24]的结果显示狂犬病毒的 M 蛋白与线粒体共定位, 并通过线粒体途径诱导细胞凋亡。Ameyama 等^[25]报道狂犬病毒 M 蛋白会与糖蛋白一起与高尔基体相结合, 推测与病毒的出芽过程相关。本实验中观察到的细胞质中的 VHSV M 蛋白有可能与线粒体或者高尔基体发生相互作用, 但还需进一步研究。此外, 大量的研究表明, 病毒出芽过程中, M 蛋白会与病毒核蛋白复合体结合后再与细胞膜结合, 完成病毒出芽^[26-27]。本研究中大量的 M 蛋白位于细胞膜, 表明病毒感染细胞已处于晚期, 大量组装的病毒处于出芽的阶段。而赵雪超等^[28]观察到狂犬病病毒 BD-06 株的 M 蛋白定位于细胞核膜, 发挥抑制蛋白质核质运输作用, 这种现象在本研究中没有见到, 可能是取样时间较晚, 病毒感染已处于晚期。

在构建原核表达载体的过程中, 通过设计引物在目的蛋白的 N 端加上了 His 标签, 重组融合蛋白可以诱导成功, 但是在利用 His 标签蛋白纯化试剂盒纯化时, 总有杂蛋白无法去除, 可能是与目的蛋白产生了非特异性结合, 于是利用 0.25 mol/L KCl 溶液显色后切胶回收的方式进行纯化, SDS-PAGE 电泳结果显示纯化效果较好。此外, 在对 M 蛋白进行原核表达时, 融合蛋白预计大小为 40 kD, 而实际只有约 36 kD, 比预计的略小。张世宽等^[29]和宫苗苗等^[30]分别对 VSV 和 RABV 的 M 蛋白进行原核表达时, 得到的融合蛋白均与预计大

小一致。推测本研究中, 融合蛋白编码基因不是主要从 pET-32a(+)载体的 Trx·Tag 处的 ATG 开始转录, 而是从下游第二个 ATG 起始转录, 如此得到的融合蛋白大小预计值与实际大小则一致。

综上所述, 本研究通过大肠杆菌原核表达系统制备了能特异性识别 VHSV 的 M 蛋白且效价较高的多克隆抗体, 该抗体将可用于建立基于 M 蛋白的 VHSV 免疫学检测方法或进行病毒与宿主的相互作用机制研究等, 为 VHSV 的防治和疫苗研发打下基础。

参考文献:

- [1] Schaperclaus W. Die Schädigungen der deutschen Fischerei durch Fischparasiten und Fischkrankheiten[J]. Allg Fischztg, 1938, 41: 267-270.
- [2] Studer J, Janies D A. Global spread and evolution of viral haemorrhagic septicaemia virus[J]. Journal of Fish Diseases, 2011, 34(10): 741-747.
- [3] Kim R, Faisal M. Emergence and resurgence of the viral hemorrhagic septicemia virus (*Novirhabdovirus, Rhabdoviridae, Mononegavirales*)[J]. Journal of Advanced Research, 2011, 2(1): 9-23.
- [4] Faisal M, Shavalier M, Kim R K, et al. Spread of the emerging viral hemorrhagic septicemia virus strain, genotype IVb, in Michigan, USA[J]. Viruses, 2012, 4(5): 734-760.
- [5] Duesund H, Nylund S, Watanabe K, et al. Characterization of a VHS virus genotype III isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) at a marine site on the west coast of Norway[J]. Virology Journal, 2010, 7(1): 19.
- [6] Ju J B, Takano T, Hirono I, et al. Genome analysis of viral hemorrhagic septicemia virus isolated from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*, in Japan[J]. Fisheries Science, 2006, 72(4): 906-908.
- [7] Wisik K, Seokryel K, Duwoon K, et al. An outbreak of VHSV (viral hemorrhagic septicemia virus) infection in farmed olive flounder *Paralichthys olivaceus* in Korea[J]. Aquaculture, 2009, 296(1-2): 165-168.
- [8] Zhu R L, Zhang Q Y. Determination and analysis of the complete genome sequence of *Paralichthys olivaceus* rhabdovirus (PORV)[J]. Archives of Virology, 2014, 159(4): 817-820.
- [9] Ahmadvand S, Soltani M, Mardani K, et al. Isolation and identification of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) from farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran[J]. Acta Tropica, 2016, 156: 30-36.
- [10] Rajani K R, Kneller E L P, Mckenzie M O, et al. Complexes

- of vesicular stomatitis virus matrix protein with host rael and Nup98 involved in inhibition of host transcription[J]. PLoS Pathogens, 2012, 8(9): e1002929.
- [11] Mire C E, Whitt M A. The protease-sensitive loop of the vesicular stomatitis virus matrix protein is involved in virus assembly and protein translation[J]. Virology, 2011, 416(1): 16-25.
- [12] Larrous F, Gholami A, Mouhamad S, et al. Two overlapping domains of a lyssavirus matrix protein that acts on different cell death pathways[J]. Journal of Virology, 2010, 84(19): 9897-9906.
- [13] Cary Z D, Willingham M C, Lyles D S. Oncolytic vesicular stomatitis virus induces apoptosis in U87 glioblastoma cells by a type II death receptor mechanism and induces cell death and tumor clearance *in vivo*[J]. Journal of Virology, 2011, 85(12): 5708-5717.
- [14] Pierce L R, Stepien C A. Evolution and biogeography of an emerging quasispecies: diversity patterns of the fish Viral Hemorrhagic Septicemia virus (VHSV)[J]. Molecular Phylogenetics & Evolution, 2012, 63(2): 327-341.
- [15] He M, Yan X C, Liang Y, et al. Evolution of the viral hemorrhagic septicemia virus: divergence, selection and origin[J]. Molecular Phylogenetics & Evolution, 2014, 77(1): 34-40.
- [16] Getchell R G, Cornwell E R, Bogdanowicz S, et al. Complete sequences of 4 viral hemorrhagic septicemia virus IVb isolates and their virulence in northern pike fry[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2017, 126(3): 211-227.
- [17] Biacchesi S, Merour E, Chevret D, et al. NV proteins of fish novirhabdovirus recruit cellular PPM1Bb protein phosphatase and antagonize RIG-I-mediated IFN induction[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 44025.
- [18] Chinchilla B, Gomez-Casado E. Identification of the functional regions of the viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) NV protein: Variants that improve function[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2017, 70: 343-350.
- [19] Baillon L, Merour E, Cabon J, et al. A single amino acid change in the non-structural NV protein impacts the virulence phenotype of viral hemorrhagic septicemia virus in trout[J]. Journal of General Virology, 2017, 98(6): 1181-1184.
- [20] Ke Q, Weaver W, Pore A, et al. Role of viral hemorrhagic septicemia virus matrix (M) protein in suppressing host transcription[J]. Journal of Virology, 2017, 91(19): e00279-17.
- [21] Chiou P P, Kim C H, Ormonde P, et al. Infectious hematopoietic necrosis virus matrix protein inhibits host-directed gene expression and induces morphological changes of apoptosis in cell cultures[J]. Journal of Virology, 2000, 74(16): 7619-7627.
- [22] Walker P J, Blasdel K R, Calisher C H, et al. ICTV virus taxonomy profile: Rhabdoviridae[J]. Journal of General Virology, 2018, 99: 447-448.
- [23] Mahy B W J, Van Regenmortel M H V. The Encyclopedia of Virology[M]. 3rd ed. Salt Lake: Academic Press, 2008: 221-227.
- [24] Larrous F, Gholami A, Mouhamad S, et al. Two overlapping domains of a lyssavirus matrix protein that acts on different cell death pathways[J]. Journal of Virology, 2010, 84(19): 9897-9906.
- [25] Ameyama S, Toriumi H, Takahashi T, et al. Monoclonal antibody #3-9-16 recognizes one of the two isoforms of rabies virus matrix protein that exposes its N-terminus on the virion surface[J]. Microbiology and Immunology, 2003, 47(9): 639-651.
- [26] Solon J, Gareil O, Bassereau P, et al. Membrane deformations induced by the matrix protein of vesicular stomatitis virus in a minimal system[J]. Journal of General Virology, 2005, 86(12): 3357-3363.
- [27] Dancho B, McKenzie M O, Connor J H, et al. Vesicular stomatitis virus matrix protein mutations that affect association with host membranes and viral nucleocapsids[J]. Journal of Biological Chemistry, 2009, 284(7): 4500-4509.
- [28] Zhao X C, Zhang X W, Zhang S F, et al. Prokaryotic expression and purification of matrix protein of bd-06 strain rabies virus and preparation of its polyclonal antibody[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2013, 40(4): 36-39. [赵雪超, 张学伟, 张守峰, 等. 狂犬病病毒 BD-06 株基质蛋白的原核表达、纯化及其多克隆抗体的制备[J]. 中国畜牧兽医, 2013, 40(4): 36-39.]
- [29] Zhang S K, Chen B J, Xiao X, et al. Preparation of recombinant VSV Matrix protein and establishment of ELISA for antibody detection[J]. Journal of Shanghai Jiaotong University (Agricultural Science), 2014, 32(1): 89-94. [张世宽, 陈备娟, 肖贤, 等. 重组水泡性口炎病毒基质蛋白制备及 ELISA 检测方法的建立[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2014, 32(1): 89-94.]
- [30] Gong M M, Zeng N, Cheng C F, et al. Development of indirect ELISA for detection of antibodies against rabies virus based on prokaryotic expression of matrix protein[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2013, 29(1): 17-22. [宫苗苗, 曾妮, 程朝飞, 等. 狂犬病病毒基质蛋白的原核表达及其间接 ELISA 方法的建立[J]. 中国人兽共患病学报, 2013, 29(1): 17-22.]

Prokaryotic expression and subcellular localization of the matrix protein of the viral hemorrhagic septicemia virus in finfish

ZHU Ruolin, SHEN Jiaojiao, JIANG Shudong, YANG Caiqiao, ZHANG Xiaohua, BAO Chuanhe, PENG Kaisong

School of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China

Abstract: Viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) is one of the most serious pathogens of finfish that affects over 80 marine and freshwater species in North America, Europe, and Asia. The genome of VHSV is a negative-sense, single stranded RNA containing approximately 12000 base pairs that encode six proteins, which are the nucleoprotein (N), phosphoprotein (P), matrix protein (M), glycoprotein (G), non-virion protein (NV), and RNA polymerase protein (L) in order from 3' to 5'. The M protein functions in a variety of rhabdovirus infection processes such as assembly and budding, inhibiting host-cell directed transcription and gene expression, inducing apoptosis of the host cell, et al., which were all thoroughly investigated in other rhabdoviruses such as vesicular stomatitis virus and rabies virus, while less so in VHSV. In order to investigate the function of the M protein of VHSV, the M gene was amplified by PCR and cloned into the prokaryotic expression vector pET-32a(+), which was transformed into *Escherichia coli* Rosetta (DE3) competent cells. The recombinant protein was induced by IPTG, and the polyclonal antibody was prepared by immunizing BALB/c mice with purified recombinant protein. The titer of the antibody was detected by an indirect ELISA, and the antibody specificity was tested by western blot and indirect immunofluorescence. The results showed that the full-length M gene was 606 bp. The fusion protein induced by IPTG mainly existed in the form of an inclusion body, and the size was about 36 kDa, which was slightly smaller than expected. The indirect ELISA assay showed that the titer of the antibody was greater than 1 : 102400. The western blot showed that the antibody could specifically identify the purified fusion protein and M protein in VHSV infected *Epithelioma papulosum cyprinid* (EPC) cells. The indirect immunofluorescence showed that the M protein antibody can recognize the M protein in VHSV infected EPC cells, and the M protein was mainly localized in the cytoplasm and cell membrane. These results suggest that the prepared polyclonal antibody can be used as an effective tool to study the function of the M protein and for the diagnosis of VHSV.

Key words: viral hemorrhagic septicemia virus; matrix protein; prokaryotic expression; polyclonal antibody

Corresponding author: JIANG Shudong. E-mail: jshudong@163.com