

文章编号: 1674 - 5566(2014)04 - 0487 - 05

## 锯缘青蟹呼肠孤病毒 p40 蛋白的体外表达与单克隆抗体制备

张 昭, 朱四东, 井晓欢, 杨季芳, 陈吉刚

(浙江万里学院 生物与环境学院, 浙江 宁波 315100)

**摘 要:** 锯缘青蟹呼肠孤病毒 (*Scylla serrata* reovirus, SsRV) 第 9 节段 (S9) 编码的 p40 蛋白可能为病毒的甲基转移酶 (methyltransferase)。为了便于确认 p40 在病毒复制过程中扮演的角色, 将 S9 片段的开放阅读框 (ORF) 克隆到原核表达载体 pET28a(+), 实现了在宿主表达菌 *E. coli* BL21 (DE3) 中的高效表达, 进而纯化了重组表达蛋白 p40 (rp40), 并制备了抗 SsRV p40 蛋白的 2 株单克隆抗体 (4B7、3E5)。经 Western blot 分析表明, 2 株单克隆抗体均可特异地识别 rp40 蛋白, 以及识别 SsRV 病毒蛋白中分子量为 46 ku 和 40 ku 2 条蛋白条带。实验结果不但确认 SsRV p40 为 SsRV 的结构蛋白, 也提示 p40 和 p46 蛋白可能具有相同的抗原表位。为该蛋白的后续功能研究奠定了基础。

**研究亮点:** 锯缘青蟹呼肠孤病毒 (SsRV) 是危害青蟹养殖业的重要病原之一, 是我国在国际上完成全基因组测序的第二株蟹类病毒。本研究开展 SsRV p40 蛋白的原核表达, 并制备其单克隆抗体, 为该蛋白的后续功能研究奠定基础。本研究为 SsRV 病毒蛋白单克隆抗体制备的首次报道。

**关键词:** 锯缘青蟹; 呼肠孤病毒; p40 蛋白; 甲基转移酶; 单克隆抗体

**中图分类号:** S 917; S 947.9

**文献标志码:** A

锯缘青蟹呼肠孤病毒 (*Scylla serrata* reovirus, SsRV) 是锯缘青蟹 (以下简称青蟹) 养殖业中造成重大危害的传染病原之一, SsRV 引起的青蟹传染性疾病给青蟹养殖业造成了巨大的经济损失<sup>[1]</sup>。SsRV 直径 70 nm, 无囊膜, 表面光滑, 其基因组为 12 节段双链 (ds) RNA, 是我国在国际上完成全基因组序列测序的第 2 株蟹类呼肠孤病毒, 属于呼肠孤病毒科新的病毒属成员<sup>[2-4]</sup>。SsRV 基因组 12 个节段 (S1-S12) 中, 除 S4 节段可能为多顺反子 (含有 2 个 ORF) 外, 其余节段均为单顺反子, 据此推断 SsRV 基因组可编码 13 种病毒蛋白 [p160, p100, p96, p67, p61, p50, p46, p40, p35, p32, p29, p25 和 p23 (px, x 代表多肽的理论分子量)]。生物信息学分析表明, p160 和 p100 分别为病毒的 RNA 依赖的 RNA 聚合酶

(RdRp) 和谷氨酸转移酶<sup>[2]</sup>, 而其他 11 种蛋白由于缺乏特征性基序, 以及它们与目前已报道的呼肠孤病毒蛋白同源性极低甚至没有同源性, 因此尚不清楚这些蛋白具有何功能<sup>[3]</sup>。

SsRV p40 蛋白由 SsRV 基因组第 9 节段编码, 同源性分析结果显示该蛋白部分序列与 RNA 结合蛋白 (RNA-binding protein) 及甲基化转移酶具有较高的同源性, 该蛋白可能是病毒复制过程中必需的甲基转移酶<sup>[3]</sup>, 但是由于缺乏该蛋白的特异性抗体, 其确切生物学功能无法确认。本研究旨在实现 SsRV p40 蛋白在原核系统中的高效表达, 进而纯化重组表达的目的蛋白, 制备和鉴定针对 p40 的单克隆抗体, 为 SsRV p40 功能和作用机制研究奠定物质基础。

收稿日期: 2013-12-09 修回日期: 2014-03-10

基金项目: 国家自然科学基金 (30800856); 浙江省自然科学基金 (LY13C190003); 宁波市自然科学基金 (2012A610141); 海洋公益性行业科研专项 (201305027-3)

作者简介: 张 昭 (1989—), 男, 硕士研究生, 研究方向为水产动物病毒学。E-mail: 410547122@qq.com

通信作者: 陈吉刚, E-mail: genomic@163.com

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 菌株和质粒

受体菌 *E. coli* Top10、表达菌 *E. coli* BL21 (DE3)、表达载体 pET-28a(+), 含 SsRV S9 基因片段(1 255 bp)的重组质粒 T-S9 由本实验室保存; 兔源抗 SsRV 多克隆抗体由本实验室制备保存。

### 1.2 实验动物、细胞及试剂

BALB/c 小鼠购自中国科学院上海实验动物中心; SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞由本实验室保存; 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、卡那霉素、IPTG 及标准分子量蛋白购自宝生物工程(大连)有限公司; TMB、RPMI-164、HRP 标记的羊抗兔 IgG 和 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 购自 Invitrogen 公司; NC 膜、Ni-NTA 亲和纯化试剂盒购自 Qiagen 公司; 转膜滤纸购自 Whatman 公司; 次黄嘌呤、氨基嘌呤、胸腺嘧啶核酸、聚乙二醇 4000 (PEG-4000)、3-3' 二氨基苯胺(DAB)和降植烷购自 Sigma 公司; 96 孔酶标板购自 NUNC 公司; 免疫球蛋白标准亚类鉴定试剂盒购自 Southern Biotech 公司; 新生牛血清(NCS)购自杭州四季青生物工程材料研究所。

### 1.3 SsRV S9 节段原核表达载体的构建

设计扩增 S9 片段(GenBank 登录号: JQ287707) ORF 引物对 9p (5' - CGGGATCCAT GGCAGACAGTATCACTGGAC - 3') 和 9f (5' - CCCAAGCTTAGTAATAAACATCAGCCTT - 3')。引物 9p 引入 BamH I 酶切位点, 引物 9f 引入 Hind III 酶切位点。以含 SsRV S9 基因节段的重组载体 T-S9 为模板, 用引物对 9p 和 9f 进行 PCR 扩增。PCR 产物电泳回收纯化后, 经 BamH I 和 Hind III 双酶切后, 克隆于表达载体 pET-28a(+), 转化感受态细胞 *E. coli* Top10 细胞, 并利用卡那霉素抗性平板初步筛选阳性克隆, 挑选阳性克隆并小量抽提质粒, 利用 PCR 和双酶切进行鉴定。

### 1.4 重组 p40 蛋白(rp40)的表达、鉴定与纯化

利用携带目的基因的重组质粒 pET-p40 转化表达受体菌 *E. coli* BL21(DE3), 挑选单个阳性克隆接种于 LB 培养基(含 Kan 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 37  $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min, 振荡培养过夜, 次日按 1:100 比例接种于含 10 mL 新鲜 LB 培养基(含 Kan 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的 100 mL 锥形瓶中, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 振荡培养, 当菌液 OD<sub>600</sub> 值达 0.8 左右时加入 1 mmol/L 的 IPTG 诱导表达, 并每间隔 1 小时进行取样,

同时取诱导 4 h 的含 pET-28a(+) 的菌液做对照, 于 4  $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 按陈志刚等<sup>[5]</sup>报道的方法进行 SDS-PAGE 和 Western blot 分析。变性条件下纯化目的产物按 Qiagen 公司的 QIAexpressionist™ 蛋白纯化系统操作指南进行, SDS-PAGE 及 Western blot 鉴定纯化的目的蛋白, 鉴定后的纯化蛋白采用 Bradford 法进行含量测定。

### 1.5 p40 蛋白单克隆抗体的制备及鉴定

方法和程序按文献[6]报道的方法进行。按 50  $\mu\text{g}/\text{只}$  剂量, 将重组表达并纯化的 rp40 蛋白与等量弗氏完全佐剂混合, 皮下注射免疫 BALB/c 小鼠。3 周后, 分别腹腔注射与等量弗氏不完全佐剂混合的表达纯化的 rp40 蛋白。3 周后再按每只小鼠 0.1 mg rp40 蛋白加强免疫 1 次。第 3 次免疫后 3 d, 麻醉致死小鼠收获脾脏, 将脾细胞与非分泌型骨髓瘤细胞(SP2/0)融合, 融合细胞用含 HAT 和 HT 的 RPMI 1640 溶液连续培养。获得的杂交瘤细胞于 RPMI 1640 培养基中持续培养, 取培养液上清用间接 ELISA 方法筛选抗体阳性细胞。包被抗原为系列稀释纯化的 rp40 蛋白(0.8 mg/mL)以及含 pET-28a(+) 载体的菌体蛋白(0.63 mg/mL), 一抗为杂交瘤细胞培养上清, 二抗为羊抗鼠 HRP 标记抗体, 当样品孔与阴性对照孔(RPMI 1640 培养液)的光吸收(OD)之比(P:N)  $\geq 2.1$  且 OD > 0.2 时, 判断为杂交瘤细胞分泌抗体阳性。采用极限稀释法亚克隆阳性杂交瘤细胞, 并进一步采用间接 ELISA 法筛选抗体阳性细胞。获得的阳性杂交瘤细胞经扩繁, 悬浮于无血清生长液, 腹腔注射经降植烷致敏的小鼠, 1 周后取腹水, 获得抗 SsRV p40 单克隆抗体。取 2 株单克隆抗体分别与纯化的 SsRV p40 蛋白、SsRV 全病毒蛋白, 以及含 pET-28a(+) 载体的菌体蛋白, 用 Western blot 方法检测其反应性, 并用免疫球蛋白标准亚类鉴定试剂盒鉴定亚类。

## 2 结果

### 2.1 重组 p40 蛋白的表达与纯化

重组载体 pET-p40 经 PCR 检测分别可获得 1 000 bp 左右的目的片段, 经 BamH I 和 Hind III 双酶切后, 可得到 4 kb 和 1 000 bp 左右的 2 个片段, 与预期相符, 说明目的片段基因已成功克隆入表达载体中。重组载体 pET-p40 转化 *E. coli*

BL21(DE3)获得重组表达菌,经 IPTG 诱导表达后,收集菌体裂解液经 12% SDS-PAGE 分离、染色、脱色后,在相对分子量( $M_r$ )约 46 ku 处出现一条明显的特异蛋白带(图 1a),与预期的融合蛋白大小一致,并且随诱导时间增加,表达的融合蛋白蛋白量越大,诱导 4 h 时达到高峰,而对照菌和未经诱导的重组菌此处则无此条带。经过免疫印迹分析,发现表达产物与兔源抗 SsRV 多克隆抗体可发生特异性反应(图 1b),说明 SsRV p40 蛋白在 *E. coli* BL21(DE3)中获得表达。

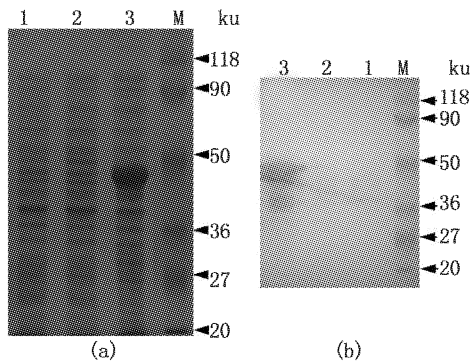


图 1 重组表达 p40 蛋白(rp40)的电泳图谱(a)及免疫印迹(b)

Fig.1 SDS-PAGE (a) and Western-blot (b) analysis of SsRV p40 protein expressed in *E. coli* BL21(DE3) strain

(a): 1. *E. coli* BL21(DE3) 菌体蛋白; 2. 质粒 pET28a(+) 在 *E. coli* BL21(DE3) 中诱导后 4 h 的表达; 3. 重组质粒 pET-p40 在 *E. coli* BL21(DE3) 中诱导后 4 h 的表达; M. 蛋白 Marker; (b): 1. *E. coli* BL21(DE3) 菌体蛋白与兔源抗 SsRV 多克隆抗体反应; 2. 质粒 pET28a(+) 质粒在 *E. coli* BL21(DE3) 中的诱导表达产物与兔源抗 SsRV 多克隆抗体反应; 3. 重组质粒 pET-VP40 在 *E. coli* BL21(DE3) 中的诱导表达产物与兔源抗 SsRV 多克隆抗体反应。

在变性条件下,利用 Ni-NTA 亲和纯化柱亲和纯化 rp40 蛋白,利用 Bradford 法测得纯化的 rp40 蛋白的浓度为 0.96 mg/mL。纯化的 rp40 蛋白经 SDS-PAGE 电泳(图 2a)和 Western blot(图 2b)分析,发现用 Ni-NTA 亲和纯化柱可获得高纯度的表达产物 rp40 蛋白。

## 2.2 rp40 蛋白的纯化与单克隆抗体的鉴定

细胞融合后,经含 HAT 和 HT 的培养基进行筛选,产生 100 余个杂交瘤克隆,通过间接 ELISA

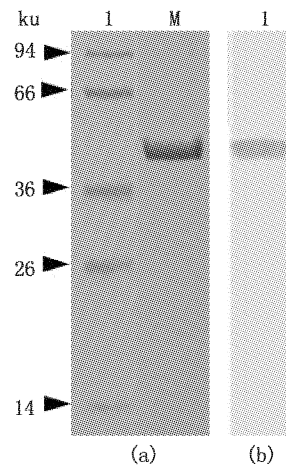


图 2 纯化的重组表达 p40 蛋白(rp40)的电泳图谱(a)及免疫印迹(b)

Fig.2 SDS-PAGE (a) and Western-blot (b) analysis of purified recombinant p40 protein (rp40) expressed in *E. coli* BL21(DE3) strain

(a): M. 蛋白 Marker; 1. 纯化的 rp40 蛋白; (b): 1. 纯化的 rp40 蛋白与兔源抗 SsRV 多克隆抗体反应。

检测杂交瘤培养上清中的抗体,筛选分泌特异性抗 SsRV p40 单克隆抗体的强阳性克隆,经 3 次克隆后,获得 2 株能稳定分泌抗 SsRV p40 单克隆抗体的细胞株,分别为 4B7 和 3E5(表 1)。间接 ELISA 法检测显示 2 株杂交瘤细胞上清均能特异地识别 rp40 蛋白( $P: N > 2.1$ ,  $OD > 0.2$ ),且与含空质粒的菌体蛋白不发生反应( $P: N < 2.1$ ,  $OD < 0.2$ ),见表 1。此外 2 株杂交瘤细胞上清稀释 2 430 倍后仍呈现阳性结果(表 1),说明 2 株杂交瘤细胞抗体分泌能力高。将杂交瘤细胞株 4B7 和 3E5 进行扩繁接种小鼠制备腹水,继而采用间接 ELISA 检测其效价,发现 2 株杂交瘤细胞株的腹水效价均为  $10^6$ 。对单抗的亚类分析表明单克隆抗体 4B7 和 3E5 分别属于 IgG2a 和 IgG1 亚类,且氢链均是  $\kappa$  链。Western blot 检测结果显示单克隆抗体 4B7 和 3E5 均可特异性识别纯化的 rp40,而不与含空质粒的菌体蛋白发生反应(图 3),说明 2 株单克隆抗体具有良好的反应性。此外,2 株抗体与 SsRV 全病毒的 Western blot 杂交结果显示,2 株抗体均可识别杂交膜中分子量为 40 ku 和 46 ku 的 2 条蛋白条带(图 3)。

表 1 ELISA 检测阳性的杂交瘤细胞株  
Tab.1 ELISA positive of two hybridoma cell lines

杂交瘤细胞株		梯度稀释的杂交瘤细胞上清 (P)						阴性对照 (N)	包被抗原
		1:10	1:30	1:90	1:270	1:810	1:2 430	RPMI 1640	
4B7	OD	3.474	3.195	3.176	2.924	2.856	2.505	0.157	A
	OD	0.145	0.123	0.111	0.106	0.100	0.106	0.106	B
3E5	OD	3.132	2.743	2.293	1.326	0.686	0.399	0.157	A
	OD	0.114	0.104	0.102	0.100	0.100	0.097	0.106	B

注:包被抗原“ A”代表纯化的 rp40;包被抗原“ B”代表含 pET-28a(+)载体的菌体蛋白。

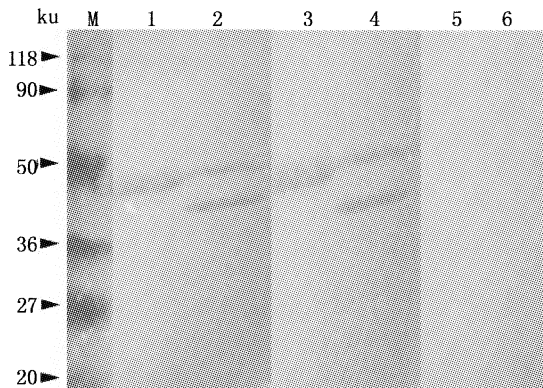


图 3 SsRV p40 蛋白单克隆抗体的 Western blot 鉴定

Fig.3 Western blot analysis of mAbs against SsRV p40 protein

M. 蛋白 Marker; 1,3. 抗 SsRV p40 单克隆抗体 4B7 和 3E5 分别与 rp40 纯化蛋白反应; 2,4. 抗 SsRV p40 单克隆抗体 4B7 和 3E5 分别与 SsRV 全病毒蛋白反应; 5,6. 抗 SsRV p40 单克隆抗体 4B7 和 3E5 分别与 *E. coli* 菌体蛋白反应。

### 3 讨论

本研究采用 pET28a(+) 表达载体,载体的 N-末端含有 6 个组氨酸标签利于融合表达蛋白的 Ni-NTA 柱纯化。含重组表达载体的宿主菌 *E. coli* BE21(DE3) 在 IPTG 的诱导下实现了 SsRV p40 蛋白在该系统中的高效表达,其蛋白表达量达 0.96 mg/L。影响外源蛋白在大肠杆菌中高效表达的因素较多,单从外源基因层面考虑,认为 SsRV p40 蛋白在原核细胞易于表达的可能原因有:重组质粒在表达菌中稳定且拷贝数多;目的基因序列不存在特殊的二级结构;目的蛋白序列含有较少的大肠杆菌稀有密码子,且为不连续分布;该蛋白对宿主菌毒性小。此外,p40 蛋白为 SsRV 的优势结构蛋白,也是该蛋白能够实现高效体外表达的重要原因之一。

阳性杂交瘤细胞筛选对抗体制备影响至关

重要。筛选方法的合理性和灵敏性等都关系着整个实验的成败。考虑到以 rp40 蛋白作为免疫原制备单抗增加了杂交瘤细胞筛选的难度,我们用 rp40 蛋白和载体蛋白分别包被 ELISA 板同时进行 ELISA 检测筛选,将 rp40 包被孔抗体检测阳性和载体蛋白包被孔抗体检测阴性的杂交瘤细胞孔定位阳性杂交瘤细胞孔,避免了载体蛋白、菌体蛋白及其他成分对筛选所造成的干扰,最终成功获得 2 株特异性强、分泌能力高的杂交瘤细胞株。

2 株单克隆抗体与全病毒蛋白杂交后均呈现出 2 条明显的杂交条带,条带对应的蛋白分子量分别为 46 ku 和 40 ku。根据 SsRV 12 个节段所编码的氨基酸序列的理论分子量,Western blot 图谱中的 46 ku 和 40 ku 条带分别对应 SsRV S7 和 S9 节段所编码 p46 和 p40 蛋白。SsRV p46 蛋白与目前已报道的病毒蛋白缺乏同源性,SVMProt 蛋白功能预测分析将 SsRV p46 蛋白归类于转移酶家族-转移含磷基团 (Transferases-Transferring phosphorus-containing groups),该家族成员具有激酶活性,也具有含磷成员如二磷酸和核苷酸的转移活性<sup>[3]</sup>。SVMProt 预测将 p40 蛋白归为分子内转移酶家族,且 p40 蛋白部分氨基酸序列与甲基转移酶具有较高同源性,以此推断该蛋白可能为病毒的甲基转移酶,它参与了 SsRV mRNA 的 5' 端加帽<sup>[3]</sup>。众多研究结果已表明,呼肠孤病毒 mRNA 的加帽需要 2 个甲基转移酶的参与,如 7'-N-methyltransferase 和 2'-O-methyltransferase<sup>[7-8]</sup>。SsRV p46 和 p40 蛋白是否具有类似的功能,甚至是否编码病毒的 2 个甲基转移酶? 如此假设成立,即可以解释 2 株抗 SsRV p40 单克隆抗体均可以识别 SsRV p46 和 p40 两种病毒蛋白,因为 2 个蛋白可能具有相同的抗原表位。上述推断是否成立需要实验研究进一步证实。本研究结果还表明,兔源抗 SsRV 多克隆抗体和 2 株单克隆抗

体均能与病毒 SsRV 病毒分子量为 40 ku 蛋白发生反应,这进一步确证了笔者前期所预测的 SsRV S9 节段编码的 p40 蛋白为病毒的结构蛋白<sup>[3]</sup>,同时也证明 2 株单克隆抗体识别的是非构象依赖性抗原表位。由于单抗是由单个细胞起源的细胞克隆分泌的,由单克隆细胞产生的抗体只针对抗原的单一抗原决定簇。而多抗是由多个不同克隆的 B 细胞产生的,是多种细胞的混合物,但其中的每一种抗体也只是针对一种决定簇。因此,兔源抗 SsRV 多克隆抗体可能包含针对 SsRV 多种结构蛋白的抗体混合物,其中至少含有一种针对 p40 蛋白某决定簇的抗体。兔源 SsRV 多克隆抗体与 2 株单克隆抗体的抗原 p40 识别表位之间的差异需要实验进一步分析。总之,本研究利用现代分子生物学技术与单克隆抗体技术,获得了 2 株针对 SsRV p40 蛋白的单克隆抗体,它们具有较高的效价和较好的特异性,期望为 SsRV p40 蛋白在病毒粒子中的定位和功能分析提供一定的物质基础。

#### 参考文献:

[1] 陈吉刚,杨季芳,王海丽,等. 养殖锯缘青蟹呼肠孤样病

毒粒子的电镜观察[J]. 海洋学研究, 2008, 26(4): 93 - 96.

- [2] CHEN J G, XIONG J, YANG J F, et al. Nucleotide sequences of four RNA segments of a reovirus isolated from the mud crab *Scylla serrata* provide evidence that this virus belongs to a new genus in the family Reoviridae [J]. Archives of Virology, 2011, 156(3): 523 - 528.
- [3] CHEN J G, XIONG J, CUI B J, et al. Molecular characterization of eight segments of *Scylla serrata* reovirus (SsRV) provides the complete genome [J]. Archives of Virology, 2012, 157(8): 1551 - 1557.
- [4] DENG X X, LÜ L, OU Y J, et al. Sequence analysis of 12 genome segments of mud crab reovirus (MCRV) [J]. Virology, 2012, 422(2): 185 - 194.
- [5] 陈吉刚,杨季芳,任萍,等. 鲈鱼 *hepcidin* 原核表达及生物学活性测定[J]. 水生生物学报, 2010, 34(4): 554 - 561.
- [6] ZHOU J Y, CHEN J G, WANG J Y, et al. cDNA cloning and functional analysis of goose interleukin-2 [J]. Cytokine, 2005, 30(6): 328 - 338.
- [7] CHENG L P, SUN J C, ZHANG K, et al. Atomic model of a cypovirus built from cryo-EM structure provides insight into the mechanism of mRNA capping [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011, 108(4): 1373 - 1378.
- [8] 方勤,丁清泉. 呼肠孤病毒内源性转录的结构基础 [J]. 中国病毒学, 2004, 19(5): 535 - 539.

## *In vitro* expression of *Scylla serrata* reovirus protein p40 and preparation of monoclonal antibodies against the expressed protein

ZHANG Zhao, ZHU Si-dong, JING Xiao-huan, YANG Ji-fang, CHEN Ji-gang

(College of Biological and Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, Zhejiang, China)

**Abstract:** We previously suggested that the protein p40 encoded by *Scylla serrata* reovirus (SsRV) segments S9 is likely to represent a methyltransferase. In order to confirm the role of p40 in the SsRV replication, the open reading frame (ORF) of SsRV segments S9 was cloned into the pET 28a(+) expression vectors and introduced into *E. coli* BL21 (DE3) by transformation. After induction, N-terminally 6 × his-tagged p40 recombinant protein (rp40) with molecular mass of 46 ku were obtained. The rp40 protein was purified by Ni-NTA and used for immunization of BALB/c mice for monoclonal antibody (MAb) production. Western blot assay showed that two MAbs could specifically recognize the rp40 expressed in *E. coli*. This was the first report on the MAb production of SsRV protein.

**Key words:** *Scylla serrata*; reovirus; p40; methyltransferase; monoclonal antibody