

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710066904.4

[51] Int. Cl.

C12N 15/33 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C07K 1/14 (2006.01)

C07K 14/08 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 8 月 15 日

[11] 公开号 CN 101016547A

[51] Int. Cl. (续)

C07K 16/18 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

[22] 申请日 2007.1.25

[21] 申请号 200710066904.4

[71] 申请人 浙江大学

地址 310029 浙江省杭州市凯旋路 268 号浙
江大学华家池校区昆虫科学研究所

[72] 发明人 张传溪 徐海君 杨章女 林建国

[74] 专利代理机构 杭州天勤知识产权代理有限公司
代理人 胡红娟

权利要求书 2 页 说明书 17 页 附图 4 页

[54] 发明名称

海洋双 RNA 病毒 MABV 重组蛋白的制备方法
与应用

[57] 摘要

本发明公开了一种含有海洋双 RNA 病毒 MABV 结构蛋白基因的重组蛋白制备方法和应用,所述的重组蛋白包括 VP2 融合蛋白或 VP3 融合蛋白以及 VP2 或 VP3 蛋白,其中 VP2 融合蛋白编码序列具有序列表中 SEQID NO.1 所述的核苷酸序列,VP3 融合蛋白编码序列具有序列表中 SEQID NO.2 所述的核苷酸序列。本发明用重组蛋白制备的多克隆抗体在检测海洋双 RNA 病毒 MABV 中增加了检测的可信度;利用 ELISA 和 westernblot 进行检测,比其它方法(RT-PCR、原位杂交等)简单易行。利用制备 VP2 和 VP3 重组蛋白作为疫苗,比减毒疫苗更经济更安全。

1、一种含有海洋双 RNA 病毒 MABV 基因的 GST/VP2 融合蛋白的生产方法,其特征在于:提取病毒 MABV 的 RNA,反转录成 cDNA,以 cDNA 为模板,设计引物:

VP2 正向引物 (5'-ggatccatgtccctcaccacg-3')

VP2 反向引物(5'-ctcgagttaggccaccagggtg-3')

经 PCR 扩增后,得到的 DNA 片段克隆入 pGEM-T-easy 载体后用 BamH I 和 Xho I 双酶切,克隆到大肠杆菌表达载体 pGEX-4t-2 中,并转化到表达菌株 BL21 进行诱导表达,表达条件为细菌 OD600=1.0, IPTG 终浓度为 0.8 mM, 37℃, 摇 6 h, 采用包涵体分离结合割胶回收的方法纯化得到 GST/VP2 融合蛋白。

2、如权利要求 1 所述的方法而得到的 GST/VP2 融合蛋白。

3、一种含有海洋双 RNA 病毒 MABV 基因 VP2 蛋白的生产方法,其特征在于:将权利要求 2 所述的 GST/VP2 溶解在 1×PBS 的溶液中,将凝血酶 thrombin 加入溶液中,在 20℃酶切 12 hr,然后将酶切好的混合物通过亲和层析柱,吸附除去 GST,回收得到 VP2 蛋白。

4、一种含有海洋双 RNA 病毒 MABV 基因的 GST/VP3 融合蛋白的生产方法,其特征在于:提取病毒 MABV 的 RNA,反转录成 cDNA,以 cDNA 为模板,设计引物:

vp3 正向引物(5'-ggatcctcagggatggatgaagag-3')

vp3 反向引物 (5'-ctcgagttacacttctccgttatctcc-3')

经 PCR 扩增后,得到的 DNA 片段首先克隆入 pGEM-T-easy 载体;将重组 pGEM-T-easy 载体用 BamH I 和 Xho I 双酶切,将 vp3 进一步克隆到大肠杆菌表达载体 pGEX-4t-2 中,并转化表达菌株 BL21,进行诱导表达。GST/VP3 表达条件为细菌 OD600=0.8, IPTG 终浓度=0.8mM, 30℃摇 8 h, 通过谷胱甘肽亲和柱直接分离纯化得到 GST/VP3 融合蛋白。

5、如权利要求 4 所述的方法而得到的 GST/VP3 融合蛋白。

6、一种含有海洋双 RNA 病毒 MABV 基因 VP3 蛋白的生产方法,其特征在于:将权利要求 5 所述的 GST/VP3 融合蛋白溶解在 1×PBS 的溶液中,将凝血酶 thrombin 加入溶液中,在 20℃酶切 12 hr,然后将酶切好的混

合物通过亲和层析柱，吸附除去 GST，回收得到 VP3 蛋白。

7、如权利要求2或5所述的融合蛋白作为疫苗在诱导鱼产生免疫反应中的应用。

8、如权利要求3或6所述的蛋白作为疫苗在诱导鱼产生免疫反应中的应用。

9、如权利要求2或5所述的融合蛋白制备的多克隆抗体。

10、如权利要求9所述的多克隆抗体在检测海洋双RNA病毒MABV中的应用。

海洋双RNA病毒MABV重组蛋白的制备方法与应用

技术领域

本发明涉及基因工程领域，尤其是含有海洋双 RNA 病毒外壳蛋白基因 VP2 或 VP3 基因的融合蛋白及制备方法和应用。

背景技术

水生双 RNA 病毒属(*Aquabirnavirus*)隶属双 RNA 病毒科(*Birnaviridae*), 此科的一个明显特征是病毒基因组是由双节段的双链 RNA 组成。*Aquabirnavirus* 属的代表种是能引起鲑鱼急性传染性病的传染性胰坏死病毒(IPNV)。Sorimachi M、Hara T.1985 年首次从一种鲷(*Seriola quinqueradiana*)分离到海洋双 RNA 病毒 (Sorimachi M, Hara T. “Characteristics and pathogenicity of a virus isolated from yellowtail fingerlings showing ascites[J]”《Fish Pathol》1985,19:231-238.), 鲷感病的典型症状为贫血性腮坏死, 肝脏出血, 腹水等。其后从褐牙鲈、香鱼(徊游性)、琥珀鱼、红槽东方鲀、海鲷、珍珠贝和其他的海洋鱼类和十几种贝类病体中都分离到各种 MABV 病毒。最近甚至在浮游动物中也发现了这种病毒

Hosono H, Suzuki S, Kusuda R. 在“Genogrouping of birnaviruses isolated from marine fish: a comparison of VP2/NS junction regions on genome segment A[J]”(《J Fish Dis》1996,19:295-306)中的研究发现这些从海洋生物分离的双 RNA 病毒在血清型和基因组型上与 IPNV 不同, 并把这些从海洋生物分离到的水生双 RNA 病毒暂命名为海洋双 RNA 病毒(MABV)。组成双 RNA 病毒基因组的两条片段是 3.1kb 的 A 片段和 2.8kb 的 B 片段。B 片段编码一个分子量为 90kDa 的依赖 RNA 的 RNA 聚合酶; 而 A 片段编码一个分子量 106kDa 的聚蛋白, 编码的蛋白顺序为 NH2-VP2-NS-VP3-COOH。其中 VP2 和 VP3 为病毒的结构蛋白(Zhang, C X, Suzuki, S (2004) Aquabirnaviruses isolated from marine organisms form a

distinct genogroup from other aquabirnaviruses [J]. (《J Fish Dis》2004, 27 : 633-643)。

由于海洋双 RNA 病毒其寄主广泛, 对多种鱼苗生产造成了很大的危害, 在许多未发病成鱼体内也检测到较高比例的 MABV 病毒携带者, 从而造成病毒的传播。除鱼贝病害诊断需要外, 亲鱼引进和繁育中也迫切需要有对病毒携带的亲鱼进行灵敏检测的手段。到目前为止, 已报道用来检测该病毒方法, 包括间接免疫荧光法(indirect immunofluorescence)、蛋白免疫印记法(immunodot blot)及 RT-PCR 法等, 相关检测技术可详见 Rodriguez Saint-Jean S, Borrego JJ, Perez-Prieto SI. 在 “Comparative evaluation of five serological methods and RT-PCR assay for the detection of IPNV in fish” (《J Virol Methods》2001 Sep;97(1-2):23-31) 中的研究。但至今还未见利用基因工程方法制备病毒外壳蛋白, 作为标准蛋白、作为免疫疫苗, 以及作为抗原制备抗体的专利和报道。

发明内容

本发明提供一种海洋双 RNA 病毒 MABV 蛋白的其制备方法和应用。

一种含有海洋双 RNA 病毒 MABV 基因的 GST/VP2 融合蛋白的生产方法, 包括提取病毒 MABV 的 RNA, 反转录成 cDNA, 以 cDNA 为模板, 设计引物:

VP2 正向引物 (5'-ggatccatgtccctcaccacg-3')

VP2 反向引物(5'-ctcgagttaggccaccagggtg-3')

经 PCR 扩增后, 得到的 DNA 片段克隆入 pGEM-T-easy 载体后用 BamH I 和 Xho I 双酶切, 克隆到大肠杆菌表达载体 pGEX-4t-2 中, 并转化到表达菌株 BL21 进行诱导表达, 表达条件为细菌 OD600=1.0, IPTG 终浓度为 0.8 mM, 37℃, 摇 6 h, 采用包涵体分离结合割胶回收的方法纯化得到 GST/VP2 融合蛋白。

一种含有海洋双 RNA 病毒 MABV 基因 VP2 蛋白的生产方法, 包括将所述的 GST/VP2 融合蛋白经凝血酶处理后, 用 GST 亲和柱吸附除去 GST, 回收得到的 VP2 蛋白。

一种含有海洋双 RNA 病毒 MABV 基因的 GST/VP3 融合蛋白的生产

方法,包括提取病毒 MABV 的 RNA,反转录成 cDNA,以 cDNA 为模板,设计引物:

vp3 正向引物(5'-ggatcctcagggatggatgaagag-3')

vp3 反向引物 (5'-ctcgagttacacttctccgttatctcc-3')

经 PCR 扩增后,得到的 DNA 片段首先克隆入 pGEM-T-easy 载体;将重组 pGEM-T-easy 载体用 BamH I 和 Xho I 双酶切,将 vp3 进一步克隆到大肠杆菌表达载体 pGEX-4t-2 中,并转化表达菌株 BL21,进行诱导表达。GST/VP3 表达条件为细菌 OD600=0.8, IPTG 终浓度=0.8mM, 30℃ 摇 8 h, 通过谷胱甘肽亲和柱直接分离纯化得到 GST/VP3 融合蛋白。

一种含有海洋双 RNA 病毒 MABV 基因 VP3 蛋白的生产方法,包括将所述的 GST/VP3 融合蛋白经凝血酶处理后,用 GST 亲和柱吸附除去 GST,回收得到的 VP3 蛋白。

本发明还提供了所述蛋白或融合蛋白,即 VP2 蛋白、VP3 蛋白、GST/VP2 融合蛋白或 GST/VP3 融合蛋白作为疫苗在诱导鱼产生免疫反应中的应用。

本发明还提供了所述蛋白或融合蛋白,即 VP2 蛋白、VP3 蛋白、GST/VP2 融合蛋白或 GST/VP3 融合蛋白制备的多克隆抗体。所述的多克隆抗体可以为抗 VP2 或 VP3 蛋白或抗 VP2 或 VP3 蛋白序列中各抗原簇的各种多克隆抗体。

本发明还提供了所述的多克隆抗体在检测海洋双 RNA 病毒 MABV 中的应用。采用 ELISA 检测方法或 Western blot 检测方法检测海洋双 RNA 病毒 MABV。

ELISA 检测方法,检测的条件为用包被液包被感染海洋双 RNA 病毒 MABV 动物的肾脏(血液或其它组织)提取液,一抗为抗 VP2 或 VP3 融合蛋白多克隆抗体,二抗为过氧辣根偶联的羊抗兔血清,以 OPD 为底物进行显色。这里“二抗”可以为任何抗兔的抗体,显色也可以为任何可以检测的 ELISA 显色方法。

Western blot 检测方法,检测的条件为将感染海洋双 RNA 病毒 MABV 动物的肾脏(血液或其它组织)提取液经变性凝胶电泳后,转移至 PVDF 膜进行杂交,一抗为抗 VP3 融合蛋白多克隆抗体,二抗为过氧辣根偶联的

羊抗兔血清，以 DAB 为底物进行显色。这里“二抗”可以为任何抗兔的抗体，显色也可以为任何可以检测的 Western blot 显色方法。

在本发明中，术语“基因”指编码具有海洋双 RNA 病毒（或多肽）的核苷酸序列。该术语还包括能编码具有与海洋双 RNA 病毒外壳蛋白相同功能的蛋白的序列的变异形式。这些变异形式包括(但不限于)：若干个核苷酸的缺失、插入和或取代，以及在 5' 和/或 3' 端添加数个核苷酸。

在本发明中，术语“海洋双 RNA 病毒外壳蛋白”指具有海洋双 RNA 病毒外壳蛋白活性的多肽。该术语还包括具有与海洋双 RNA 病毒外壳蛋白相同功能的序列的变异形式。这些变异形式包括(但不限于)：若干个氨基酸的缺失、插入和 / 或取代，以及在 C 末端和/或 N 末端添加一个或数个氨基酸。

该多肽的变异形式包括：同源序列、等位变异体、天然突变体，诱导突变体，在高或低的严谨度条件下能与海洋双 RNA 病毒 DNA 杂交的 DNA 所编码的蛋白，以及利用抗海洋双 RNA 病毒外壳蛋白的抗血清获得的多肽或蛋白。

本发明中，可选用本领域已知的各种载体，如市售的载体。所用的宿主细胞是指原核细胞。可用的原核宿主细胞如大肠杆菌，枯草杆菌等。本发明的抗体制备可以通过本领域内技术人员已知的技术进行制备。

本发明所提供的海洋双 RNA 病毒 MABV 的检测方法同时利用外壳蛋白 VP2 和 VP3 抗体进行双重检测，增加了检测的可信度；利用 ELISA 和 western blot 进行检测海洋双 RNA 病毒 MABV，比其它方法（RT-PCR、原位杂交等）简单易行；利用制备 VP2 和 VP3 融合蛋白作为疫苗，比减毒疫苗更经济更安全。

附图说明

图 1 vp2 基因片段在大肠杆菌中表达。泳道 1，蛋白标准分子量；泳道 2，在诱导条件 $OD_{600}=1.0$ 、IPTG=0.8 mM、温度 37℃ 下的诱导表达产物；泳道 3，表达产物的沉淀不可溶蛋白；泳道 4，表达产物的上清可溶性蛋白；泳道 5，载体 pGEX4t-2 的诱导表达产物；泳道 6，大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3)的裂解液；泳道 7，表达产物的 Western blot 验证。

图 2 *vp3* 基因片段在大肠杆菌中表达。泳道 1, 蛋白标准分子量; 泳道 2, 在诱导条件 $OD_{600}=0.8$ 、 $IPTG=0.8mM$ 、温度 $37^{\circ}C$ 下的诱导表达产物; 泳道 3, 表达产物的沉淀不可溶蛋白; 泳道 4, 表达产物的上清可溶性蛋白; 泳道 5, 载体 pGEX4t-2 的诱导表达产物; 泳道 6, 大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3)的裂解液; 泳道 7, 回收纯化的 VP3 融合蛋白; 泳道 8, 表达产物的 Western blot 验证。

图 3 在 MABV 感染的 CHSE-214 细胞中通过免疫印迹来检测 MABV VP2 (VP2 前体)和 VP3 蛋白。

泳道 1: 标准蛋白分子量;

A. 泳道 2 和 3: 用 GST/VP3 抗血清检测 VP3 蛋白 (约 27 kDa); 泳道 4: 未感染病毒的细胞作为阴性对照。

B. 泳道 5 和 6: 用 GST/VP2 抗血清检测 VP2 前体(约 56 kDa) 以及成熟的 VP2 蛋白 (约 54 kDa) ; 泳道 7: 未感染病毒的细胞作为阴性对照。

图 4A 鱼病毒的 ELISA 检测, 利用抗 VP2 抗体进行 ELISA 检测, 灰柱为 GST/VP2 或 GST/VP3 抗血清与不同滴度病毒的反应; 黑柱(control 1)为免疫前兔血清与不同滴度病毒的反应; 白柱(control 2)为只有二抗与不同滴度病毒的反应。每个柱体为三个重复的平均值。

图 4B 鱼病毒的 ELISA 检测, 利用抗 VP3 抗体进行 ELISA 检测, 灰柱为 GST/VP2 或 GST/VP3 抗血清与不同滴度病毒的反应; 黑柱(control 1)为免疫前兔血清与不同滴度病毒的反应; 白柱(control 2)为只有二抗与不同滴度病毒的反应。每个柱体为三个重复的平均值。

图 5AB 用 GST/VP2 抗血清进行 MABV 在香鱼 *ayu* (*Plecoglossus altivelis*)中的 ELISA 分析。

黑柱感染后不同天数的鱼肾样品。白柱(control 1)为无病毒鱼肾。灰柱(control 2)为感染病毒鱼肾与免疫前兔血清反应。每个柱体为三个重复的平均值。

图 5B 用 GST/VP3 抗血清进行 MABV 在香鱼 *ayu* (*Plecoglossus altivelis*)中的 ELISA 分析。

黑柱感染后不同天数的鱼肾样品。白柱(control 1)为无病毒鱼肾。灰

柱(control 2)为感染病毒的血肾与免疫前兔血清反应。每个柱体为三个重复的平均值。

图 6 鱼病毒的 Western blot 检测。用 GST/VP3 抗血清对香鱼体中的 MABV 病毒进行免疫分析。用 MABV-Y6 病毒感染鱼后取感染后不同天数的鱼肾样品作分析, 未感染病毒的血肾作为对照。

具体实施方式

MABV 病毒的分离、VP2 和 VP3 基因克隆

将从感病香鱼(*Plecoglossus altivelis*)中分离到的 MABV 在 鲑鱼细胞系 CHSE-214 (Chinook salmon embryo cell line) 中于 20℃ 中培养, 繁殖病毒, 并进一步提取病毒 RNA, 反转录成 cDNA。

以 MABV Y-6 病毒感染的鱼细胞总 RNA 反转录的 cDNA 为模板, 设计引物。其中正向引物含有 *Bam*HI 酶切位点(下划线碱基), 反向引物含有 *Xho*I 酶切位点(下划线碱基)。

vp2 正向引物 (5'-ggatccatgtccctcaccacg-3')

vp2 反向引物(5'-ctcgagttaggccaccagggtg-3')

vp3 正向引物(5'-ggatcctcagggatggatgaagag-3')

vp3 反向引物 (5'-ctcgagttacacttctccgttatctcc-3')

PCR 扩增条件: 94℃ 1min, 54℃ 40s, 72℃ 1min, 30 个循环。经 PCR 扩增后, 得到的 DNA 片段首先克隆入 pGEM-T-easy 载体。并经测序确定了已克隆到病毒外壳蛋白 Vp2 和核心蛋白 VP3 基因。其中, Vp2 基因的编码区的核苷酸和推导的氨基酸序列对应 GenBank 登录号: AY283781。vp3 基因的编码区的核苷酸和推导的氨基酸序列对应 GenBank 登录号 AY283781。

VP2 和 VP3 在大肠杆菌中与 GST 融合高效表达

将重组 pGEM-T-easy 载体用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切, 分别将 vp2 和 vp3 进一步克隆到大肠杆菌表达载体 pGEX-4t-2 中, 并转化表达菌株 BL21, 进行诱导表达。GST/VP2 最适合表达条件为细菌 OD600=1.0, IPTG 终浓度为 0.8 mM, 37℃, 摇 6 h。而 GST/VP3 最适合表达条件为细菌

OD₆₀₀=0.8, IPTG 终浓度=0.8mM, 30℃摇 8 h。薄层扫描显示在最适合表达条件下, GST/VP2 最高表达水平占细菌总蛋白的 23.6%, 而 GST/VP3 最高表达水平可达到细菌总蛋白的 42.7%。SDS-PAGE 和用抗 GST 抗体进行的 Western blot 结果显示表达的 GST/VP2 大小约 46 kDa, 而 GST/VP3 为 53 kDa 与预计的分子量相符合。SDS-PAGE 分析还显示 GST/VP2 表达产物几乎全是不可溶性的包涵体, 而 GST/VP3 除不可溶性的包涵体外, 还有部分是可溶性蛋白。

其中 VP2 融合蛋白具有序列表中 SEQ ID NO.1 所述的核苷酸序列, VP3 融合蛋白具有序列表中 SEQ ID NO.2 所述的核苷酸序列。

在 SEQ ID NO.1 所述的核苷酸序列及 SEQ ID NO.2 所述的核苷酸序列中第 664~678 位置编码的氨基酸序列为凝血酶 (thrombin) 切割位点, 能将融合蛋白的 GST 和 VP2 (或 VP3) 切开, 后面为 VP2 或 VP3 序列。

大肠杆菌表达的重组 VP2 和 VP3 蛋白的纯化

由于大肠杆菌表达的是 N 端融合了谷胱甘肽的 VP3, 而且部分是可溶性的, 因此可以通过谷胱甘肽亲和柱直接分离纯化 GST/VP3。将细菌用溶菌酶 lysozyme 和超声波处理后, 通过亲和柱分离回收了产物。产物经 SDS-PAGE 和 western blot 分析, 结果显示 (见图 2) GST/VP3 已经成功被纯化回收。由于大肠杆菌表达的 GST/VP2 是以不可溶的包涵体形式存在, 我们采用了包涵体分离结合割胶回收的方法纯化 GST/VP2。包涵体分离使用 Novagen 公司的 Protein Refolding Kit, 用 lysozyme (溶菌酶) 将含 GST/VP2 的表达细菌裂解在冷的 1×PBS 的溶液中, 并经超声波处理后, 通过离心和 1×包涵体洗液处理 3 次, 回收包涵体。再用 1×包涵体溶解液溶解包涵体, 通过 SDS-PAGE, 将含目的条带的 PAGE 胶割下后透析, 回收 GST/VP2 蛋白。将凝血酶加入溶解在 1×PBS 的溶液的 GST/VP2 和 GST/VP3 溶液中, 在 20℃酶切 12hr, 然后将酶切好的混合物通过亲和层析柱, 吸附除去 GST, 回收得到 VP2 和 VP3 蛋白。

VP2 和 VP3 多克隆抗体制备

用纯化的重组 VP2 和 VP3 蛋白免疫 14-16 周龄的健康新西兰大白兔，每次注射 500 μ l 含 80 μ g 左右纯化的 GST/VP3 和 GST/VP2。第一次加 500 μ l 福氏完全佐剂溶液乳化，皮下多点注射免疫；3 周后，同剂量 GST/VP3 和 GST/VP2 加福氏不完全佐剂溶液乳化，腿部肌肉多点注射免疫；2 周后，直接用 GST/VP3 和 GST/VP2 溶于 1ml 生理盐水免疫；1 周后，再次用抗原加强免疫。1 周后，收集兔抗血清，-70℃ 保存备用。制备的多克隆抗体的效价测定结果表明，抗 Vp2 多克隆抗体和抗 VP3 多克隆抗体的效价结果均为：1: 512 000，达到高效价水平，可以用于进一步检测应用。

GST-VP2 融合蛋白和 GST-VP3 融合蛋白作为疫苗诱导香鱼产生抗体

将纯化的 GST-VP2 融合蛋白和 GST-VP3 融合蛋白溶于 PBS，配制成 1 μ g/1 μ l 的溶液，每 100 μ l 溶液加上适量 5 μ l Gen⁺ 抗生素，作为免疫抗原，免疫香鱼。分别制备鱼抗 GST-VP2 融合蛋白的血清和鱼抗 GST-VP3 融合蛋白的血清。结合 ELISA 方法评价了这两种血清对感染病毒的细胞的保护作用，中和抗体的效价分别为 1: 3,200 和 1: 800。VP2 融合蛋白免疫鱼的血清对感染病毒的细胞的保护作用比 VP3 融合蛋白免疫鱼的血清对病毒感染细胞的保护作用更强，为抗病毒疫苗的筛选提供了依据。

用多克隆抗体检测 MABV 病毒

用感染指数 (MOI) 为 0.1 的 MABV 感染 CHSE-214 细胞，当 90% 细胞出现病理症状时，收获细胞，进行 SDS-PAGE 和 Western blot 分析，以确定多克隆抗体的特异性和检测有效性。当用兔抗 GST/VP3 抗血清进行蛋白印迹检测时，可以清楚地检测到 1 条 27kDa 的特异性蛋白条带 (图 3 中泳道 2 和 3)，其与预测的 VP3 分子量一致。当用兔抗 GST/VP2 抗血清检测时，可以检测到 3 条蛋白质条带，大小分别为 56、54 和 35 kDa ((图 3 中泳道 5 和 6)，其中 56 kDa 蛋白与 VP2 前体蛋白 proVP2 大小一致，54kDa 蛋白则与 VP2 蛋白大小一致，35 kDa 则是未知蛋白，有可能是 VP2 的降解形式。在没有病毒感染的细胞中，VP2 和 VP3 的都没有检测到阳性条带。结果表明本实验制备的兔抗 VP2 和兔抗 VP3 抗血清可以用于该病毒的特异性检测。

为了确定两种多克隆抗体的检测 MABV 灵敏度, 对不同稀释浓度的病毒粒子进行了 ELISA 检测。结果表明, 当 MABV 病毒滴度从 9.76×10^7 TCID₅₀/ml 稀释到 1.00×10^4 TCID₅₀/ml 时, 无论是兔抗 GST/VP2 抗血清还是兔抗 GST/VP3 抗血清, 均可以检测到。这说明两种多克隆抗体检测 MABV 都达到了相当高的灵敏度。

用多克隆抗体检测感病香鱼体内 MABV 病毒

将体长 10 cm 香鱼分为 2 组, 每组 22 条。1 组腹膜下每条注射 0.01ml MABV (10^7 TCID₅₀), 另 1 组每条注射 0.01ml PBS 作为对照。感染后不同天数取鱼肾脏, 进行 ELISA 和 western blot 检测。

ELISA 检测的具体操作步骤如下: 肾脏匀浆上清液溶在 Tris 溶液中使最终浓度 (50mM Tris.Cl pH6.8, 100mM DTT, 2%SDS), 沸水浴变性后样品用包被液 (15mM Na₂CO₃, 35mM NaHCO₃, pH 9.6) 包被在 96 孔的 ELISA 板上; 再用封闭液 PBS-T (PBS pH 7.4, 0.5% Tween-20) 加 3% 脱脂奶粉封闭 30 分钟; 抗 VP2 抗体和抗 VP3 抗体以 1:2000 分别稀释在 3% 脱脂奶粉的 PBS-T 溶液中 37℃ 温浴 1 小时; 用 PBS-T 洗涤 3 次, 每次 5 分钟; 用 HRP 偶联的羊抗兔抗体作为二抗 37℃ 反应 1 小时; 用 PBS-T 洗涤 3 次, 每次 5 分钟; 最后, 加入 100μl OPD 柠檬酸溶液 (0.4mg/ml, pH 5.0) 显示, 以 50ul 50mM H₂SO₄ 终止反应, 在 492nm 处测定吸光值。

Western blot 的操作方法如 Towbin 等 (1979) (Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76: 4350-4354) 所述。

ELISA 检测结果表明, 在 MABV 感染后第 4 天 GST/VP3 抗血清就可以明显地检测到香鱼体内 MABV 病毒(图 5B), 而用 GST/VP2 抗血清则第 8 天才能很明显地检测到香鱼体内病毒(图 5A)。结果提示使用 ELISA 检测方法时, VP3 抗血清比 VP2 抗血清能更灵敏地检测病鱼体内的 MABV 病毒。

进一步用 GST/VP3 抗血清对感染后不同天数鱼肾进行 Western blot 分析, 结果也显示在 MABV 感染后第 4 天可以明显地检测特异性条带(图

6), 这进一步确定了 ELISA 检测的结果。

从以上检测方法得到了如下检测结果: (1) 利用 VP3 抗体, 在病毒感染后 4 天就能用 ELISA 方法检测到病毒, 而用 VP2 抗体则需 6 天; (2) 利用 VP3 抗体, 在病毒感染后 6 天就能用 Western blot 方法检测到病毒。
(3) VP3 抗体的灵敏性高于 VP2 抗体。

SEQUENCE LISTING

<110> 浙江大学

<120> 海洋双 RNA 病毒 MABV 重组蛋白的制备方法与应用

<130>

<160> 4

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 1320

<212> DNA

<213> GST/VP2

<400> 1

atgtccccta tactaggtta ttggaaaatt aagggccttg tgcaaccac tcgacttctt	60
ttggaatata ttgaagaaaa atatgaagag catttgtatg agcgcatga aggtgataaa	120
tggcgaaaca aaaagtttga attgggtttg gagtttccca atcttcctta ttatattgat	180
ggtgatgtta aattaacaca gtctatggcc atcatacgtt atatactga caagcacaac	240
atgttgggtg gttgtccaaa agagcgtgca gagatttcaa tgcttgaagg agcggttttg	300
gatattagat acggtgtttc gagaattgca tatagtaaag actttgaaac tctcaaagtt	360
gattttctta gcaagctacc tgaaatgctg aaaatgttcg aagatcgttt atgtcataaa	420
acatatatta atggtgatca tgtaaccat cctgacttca tgttgtatga cgctcttgat	480
gttgttttat acatggaccc aatgtgcctg gatgcgttcc caaaattagt ttgttttaaa	540
aaacgtattg aagctatccc acaaattgat aagtacttga aatccagcaa gtatatagca	600
tggcctttgc agggctggca agccacgttt ggtggtggcg accatcctcc aaaatcggat	660
ctggttccgc gtggatccat gtccctcacc acgaaccccc aggacaaagt gaacaaccag	720
ctagtcacca aaggagtgac agtcctaaac ctaccaacag ggttcgacaa gccatacgtc	780

```

cgccctggagg acgagacccc acaagggccc cagtcaatga acggcgcccg gatgaggtgc      840
acagctgcaa ttgcaccacg aaggtacgaa atcgacctcc catccgcacg cctccccaca      900
gtaccagega ctgggaccct cacaacaatc tatgaaggga acgccgacat tgtgaactca      960
accacagtga ccggcgacat cagcttcaga ctggaacaag accccccgaa tgacacgaag     1020
tacgacttcc agctcgactt cctcggttta gacaacaacg tccccgtcgt gtcaataacc     1080
agctctacgc tggccacaac cgacaactac aggggggtct cagtcaaatt cacacagtca     1140
atcccaacag agacaatcac aaaacccatc accaggggtca agctgtccta caaaatcaac     1200
cagcagacag ctatcggcaa tgcagcaacg cttggacccc tggggccctc atccgtctca     1260
ttctcatcag gaaacggcaa cgtacctgga gtgctcaggc caatcacctt ggtggcctaa     1320

```

<210> 2

<211> 1395

<212> DNA

<213> GST/VP3

<400> 2

```

atgtccccta tactaggtta ttggaaaatt aagggccttg tgcaaccac tcgacttctt      60
ttggaatatc ttgaagaaaa atatgaagag catttgtatg agcgcgatga aggtgataaa     120
tggcgaaaca aaaagtttga attgggtttg gagtttccca atcttcctta ttatattgat     180
ggtgatgtta aattaacaca gtctatggcc atcatagctt atatagctga caagcacaaac     240
atgttgggtg gttgtccaaa agagcgtgca gagatttcaa tgcttgaagg agcggttttg     300
gatattagat acggtgtttc gagaattgca tatagtaaag actttgaaac tctcaaagtt     360
gattttctta gcaagctacc tgaaatgctg aaaatgttcg aagatcgttt atgtcataaa     420
acatatttaa atggtgatca tgtaacccat cctgacttca tgttgtatga cgctcttgat     480
gttgttttat acatggaccc aatgtgcctg gatgcgttcc caaaattagt ttgttttaaa     540
aaacgtattg aagctatccc acaaattgat aagtacttga aatccagcaa gtatatagca     600
tggcctttgc agggctggca agccacgttt ggtgggtggcg accatcctcc aaaatcggat     660
ctggttccgc gtggatcctc agggatggat gaagagctgc agaagctgct gcacgccacc     720
atggccagag caaaagaggt gaaagacgcc gaagtcttca aacttctcaa gctgatgtcc     780
tggaccagga agaacgggct caccgaccac atgtatgaat ggtcaaaaga ggaccctgaa     840
gcagtcaaat ttggcaaact catcagcaca ccacaaaac accaagagaa gccaaaagga     900

```

```

cccgaccagc acacggcaca ggaggcaaaa gccgtccgga tctcactaga tgcagtgaag 960
gcaggagcag actttgcctc ccagactgg atcgcgagaga atggataccg cgggccatca 1020
ccaggccagt tcaagtacta cgtcatcaca gggcgcgctc cagaccacag agacgagtac 1080
gaggactacg tgcgaaaacc aataacaaga ccacggaca tggacaaaat cagacgccta 1140
gccaacagtg tctacggact tccccaccaa gaacctgcac cagaggaatt ctaccaagcg 1200
gtagtgcaga tcttcgcaga aaatggagga cgaggaccag atcaagacca gatgcaagac 1260
ctgagggact tggcccgga gatgaaacga cgaccccgac cagctgagac acgcaggcaa 1320
aaccgagctc caccacgggc ggcacccagt ggaagctcac gttttacccc ctccggagat 1380
aacggagaag tgtaa 1395

```

<210> 3

<211> 439

<212> PRT

<213> GST/VP2

<400> 3

```

Met Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp Lys Ile Lys Gly Leu Val Gln Pro
1           5           10           15
Thr Arg Leu Leu Leu Glu Tyr Leu Glu Glu Lys Tyr Glu Glu His Leu
          20           25           30
Tyr Glu Arg Asp Glu Gly Asp Lys Trp Arg Asn Lys Lys Phe Glu Leu
          35           40           45
Gly Leu Glu Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Tyr Ile Asp Gly Asp Val Lys
          50           55           60
Leu Thr Gln Ser Met Ala Ile Ile Arg Tyr Ile Ala Asp Lys His Asn
65           70           75           80
Met Leu Gly Gly Cys Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ile Ser Met Leu Glu
          85           90           95
Gly Ala Val Leu Asp Ile Arg Tyr Gly Val Ser Arg Ile Ala Tyr Ser
          100          105          110

```


Lys Asp Phe Glu Thr Leu Lys Val Asp Phe Leu Ser Lys Leu Pro Glu
 115 120 125
 Met Leu Lys Met Phe Glu Asp Arg Leu Cys His Lys Thr Tyr Leu Asn
 130 135 140
 Gly Asp His Val Thr His Pro Asp Phe Met Leu Tyr Asp Ala Leu Asp
 145 150 155 160
 Val Val Leu Tyr Met Asp Pro Met Cys Leu Asp Ala Phe Pro Lys Leu
 165 170 175
 Val Cys Phe Lys Lys Arg Ile Glu Ala Ile Pro Gln Ile Asp Lys Tyr
 180 185 190
 Leu Lys Ser Ser Lys Tyr Ile Ala Trp Pro Leu Gln Gly Trp Gln Ala
 195 200 205
 Thr Phe Gly Gly Gly Asp His Pro Pro Lys Ser Asp Leu Val Pro Arg
 210 215 220
 Gly Ser Met Ser Leu Thr Thr Asn Pro Gln Asp Lys Val Asn Asn Gln
 225 230 235 240
 Leu Val Thr Lys Gly Val Thr Val Leu Asn Leu Pro Thr Gly Phe Asp
 245 250 255
 Lys Pro Tyr Val Arg Leu Glu Asp Glu Thr Pro Gln Gly Pro Gln Ser
 260 265 270
 Met Asn Gly Ala Arg Met Arg Cys Thr Ala Ala Ile Ala Pro Arg Arg
 275 280 285
 Tyr Glu Ile Asp Leu Pro Ser Ala Arg Leu Pro Thr Val Pro Ala Thr
 290 295 300
 Gly Thr Leu Thr Thr Ile Tyr Glu Gly Asn Ala Asp Ile Val Asn Ser
 305 310 315 320
 Thr Thr Val Thr Gly Asp Ile Ser Phe Arg Leu Glu Gln Asp Pro Pro
 325 330 335
 Asn Asp Thr Lys Tyr Asp Phe Gln Leu Asp Phe Leu Gly Leu Asp Asn
 340 345 350
 Asn Val Pro Val Val Ser Ile Thr Ser Ser Thr Leu Ala Thr Thr Asp

355 360 365
 Asn Tyr Arg Gly Val Ser Val Lys Phe Thr Gln Ser Ile Pro Thr Glu
 370 375 380
 Thr Ile Thr Lys Pro Ile Thr Arg Val Lys Leu Ser Tyr Lys Ile Asn
 385 390 395 400
 Gln Gln Thr Ala Ile Gly Asn Ala Ala Thr Leu Gly Pro Leu Gly Pro
 405 410 415
 Ser Ser Val Ser Phe Ser Ser Gly Asn Gly Asn Val Pro Gly Val Leu
 420 425 430
 Arg Pro Ile Thr Leu Val Ala
 435

<210> 4

<211> 464

<212> PRT

<213> GST/VP3

<400> 4

Met Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp Lys Ile Lys Gly Leu Val Gln Pro
 1 5 10 15
 Thr Arg Leu Leu Leu Glu Tyr Leu Glu Glu Lys Tyr Glu Glu His Leu
 20 25 30
 Tyr Glu Arg Asp Glu Gly Asp Lys Trp Arg Asn Lys Lys Phe Glu Leu
 35 40 45
 Gly Leu Glu Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Tyr Ile Asp Gly Asp Val Lys
 50 55 60
 Leu Thr Gln Ser Met Ala Ile Ile Arg Tyr Ile Ala Asp Lys His Asn
 65 70 75 80
 Met Leu Gly Gly Cys Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ile Ser Met Leu Glu
 85 90 95

Gly Ala Val Leu Asp Ile Arg Tyr Gly Val Ser Arg Ile Ala Tyr Ser
 100 105 110
 Lys Asp Phe Glu Thr Leu Lys Val Asp Phe Leu Ser Lys Leu Pro Glu
 115 120 125
 Met Leu Lys Met Phe Glu Asp Arg Leu Cys His Lys Thr Tyr Leu Asn
 130 135 140
 Gly Asp His Val Thr His Pro Asp Phe Met Leu Tyr Asp Ala Leu Asp
 145 150 155 160
 Val Val Leu Tyr Met Asp Pro Met Cys Leu Asp Ala Phe Pro Lys Leu
 165 170 175
 Val Cys Phe Lys Lys Arg Ile Glu Ala Ile Pro Gln Ile Asp Lys Tyr
 180 185 190
 Leu Lys Ser Ser Lys Tyr Ile Ala Trp Pro Leu Gln Gly Trp Gln Ala
 195 200 205
 Thr Phe Gly Gly Gly Asp His Pro Pro Lys Ser Asp Leu Val Pro Arg
 210 215 220
 Gly Ser Ser Gly Met Asp Glu Glu Leu Gln Lys Leu Leu His Ala Thr
 225 230 235 240
 Met Ala Arg Ala Lys Glu Val Lys Asp Ala Glu Val Phe Lys Leu Leu
 245 250 255
 Lys Leu Met Ser Trp Thr Arg Lys Asn Gly Leu Thr Asp His Met Tyr
 260 265 270
 Glu Trp Ser Lys Glu Asp Pro Glu Ala Val Lys Phe Gly Lys Leu Ile
 275 280 285
 Ser Thr Pro Pro Lys His Gln Glu Lys Pro Lys Gly Pro Asp Gln His
 290 295 300
 Thr Ala Gln Glu Ala Lys Ala Val Arg Ile Ser Leu Asp Ala Val Lys
 305 310 315 320
 Ala Gly Ala Asp Phe Ala Ser Pro Asp Trp Ile Ala Glu Asn Gly Tyr
 325 330 335
 Arg Gly Pro Ser Pro Gly Gln Phe Lys Tyr Tyr Val Ile Thr Gly Arg

340	345	350	
Val Pro Asp Pro Arg Asp Glu Tyr Glu Asp Tyr Val Arg Lys Pro Ile			
355	360	365	
Thr Arg Pro Thr Asp Met Asp Lys Ile Arg Arg Leu Ala Asn Ser Val			
370	375	380	
Tyr Gly Leu Pro His Gln Glu Pro Ala Pro Glu Glu Phe Tyr Gln Ala			
385	390	395	400
Val Val Glu Ile Phe Ala Glu Asn Gly Gly Arg Gly Pro Asp Gln Asp			
405	410	415	
Gln Met Gln Asp Leu Arg Asp Leu Ala Arg Gln Met Lys Arg Arg Pro			
420	425	430	
Arg Pro Ala Glu Thr Arg Arg Gln Asn Arg Ala Pro Pro Arg Ala Ala			
435	440	445	
Pro Ser Gly Ser Ser Arg Phe Thr Pro Ser Gly Asp Asn Gly Glu Val			
450	455	460	

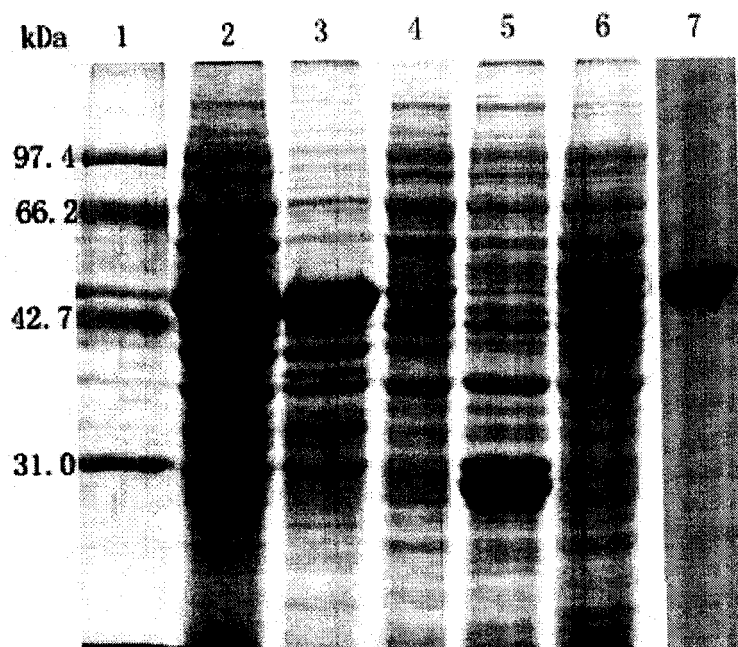


图 1

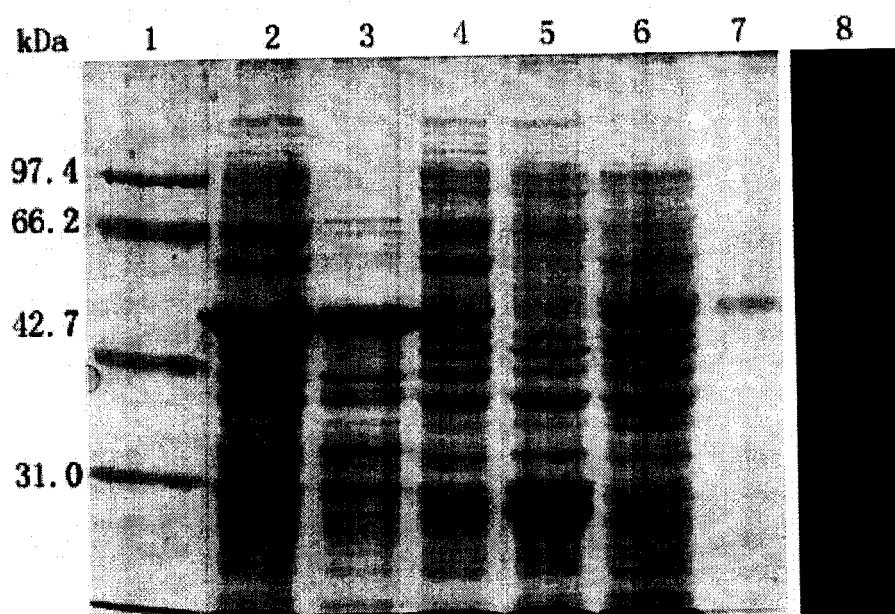


图 2

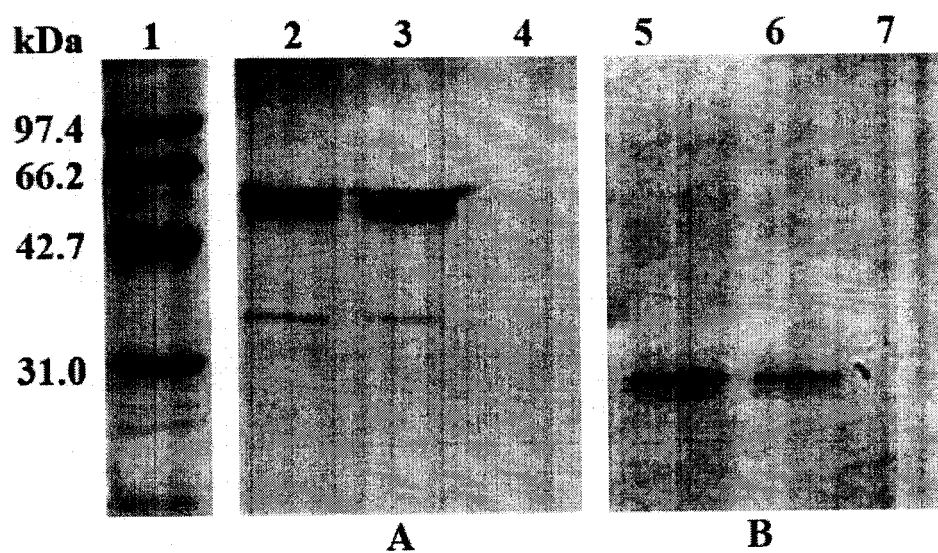


图 3

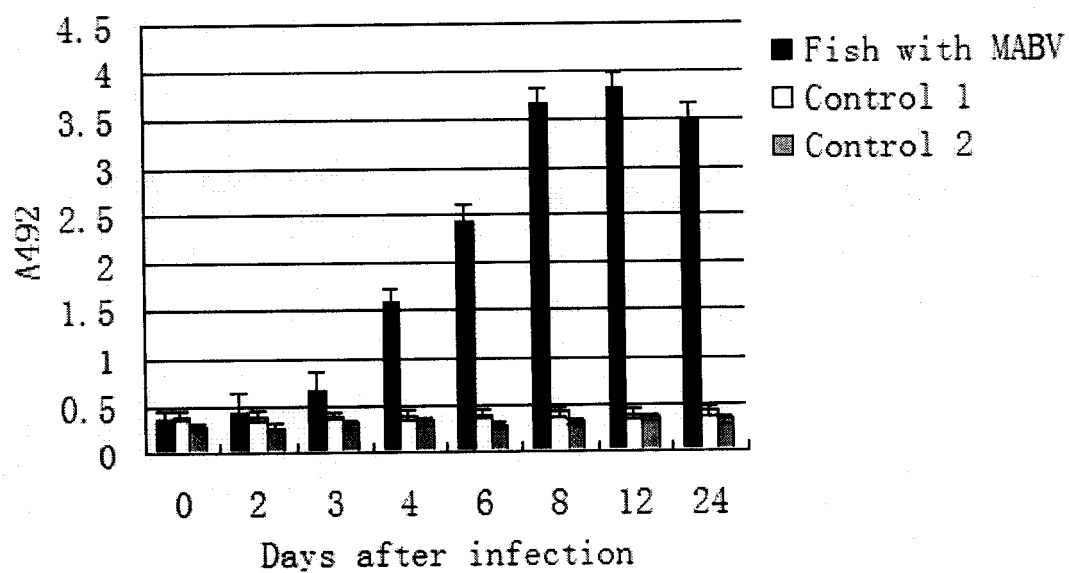


图 4A

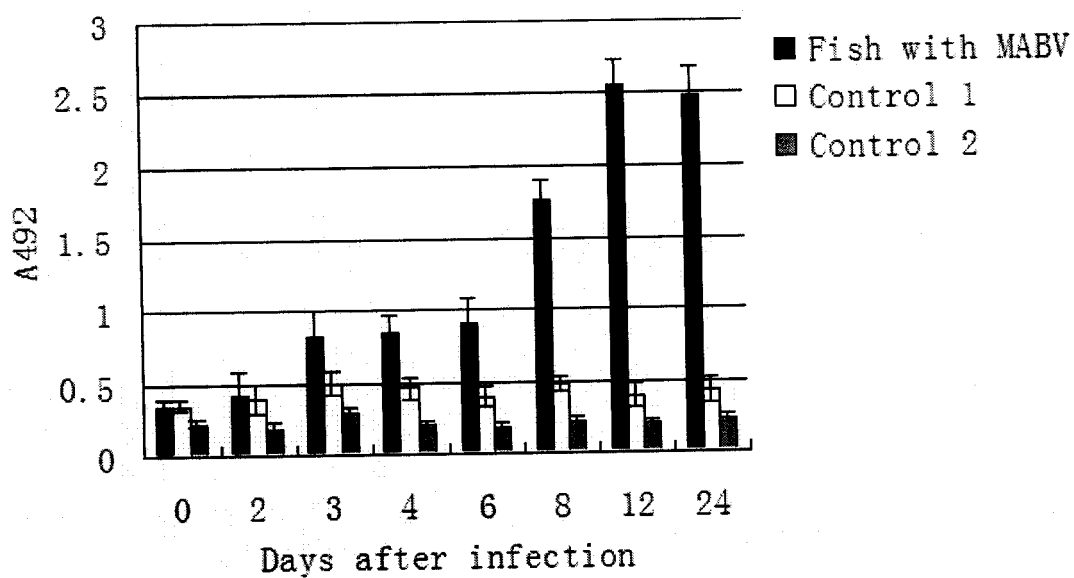


图 4B

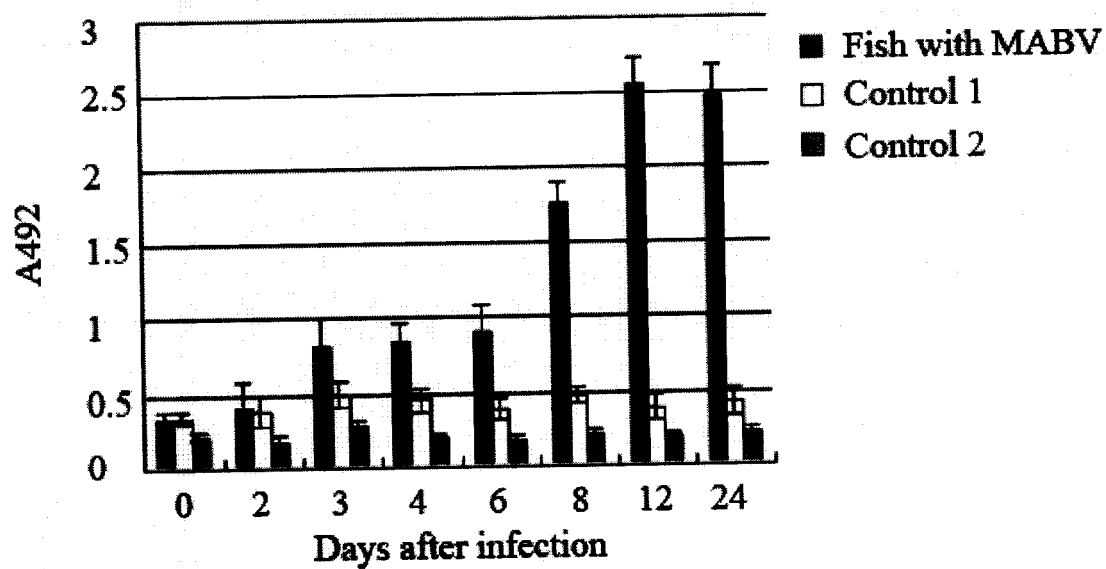


图 5A

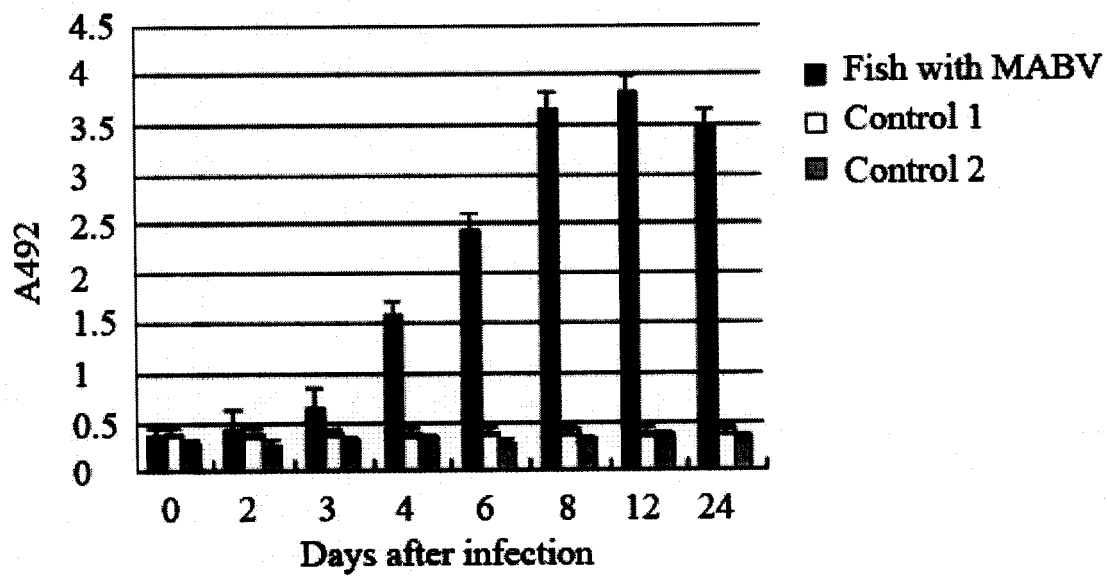


图 5B

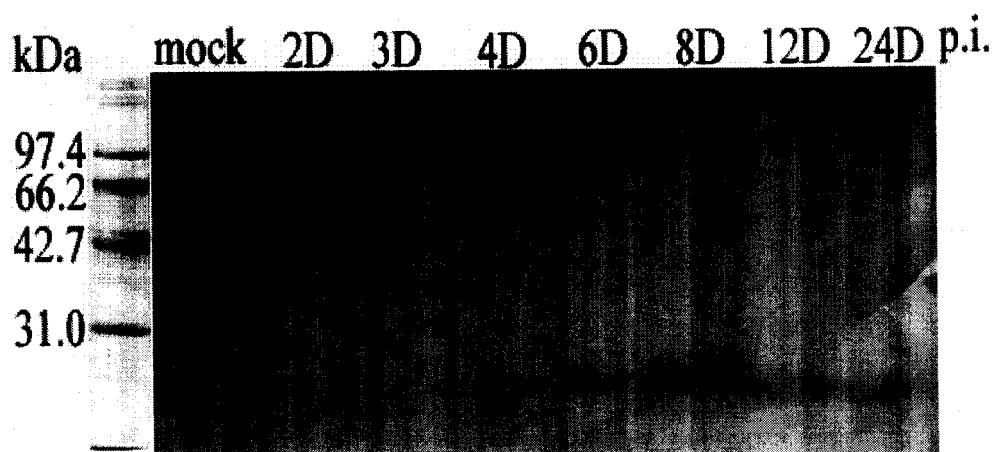


图 6

专利名称(译)	海洋双RNA病毒MABV重组蛋白的制备方法与应用		
公开(公告)号	CN101016547A	公开(公告)日	2007-08-15
申请号	CN200710066904.4	申请日	2007-01-25
[标]申请(专利权)人(译)	浙江大学		
申请(专利权)人(译)	浙江大学		
当前申请(专利权)人(译)	浙江大学		
[标]发明人	张传溪 徐海君 杨章女 林建国		
发明人	张传溪 徐海君 杨章女 林建国		
IPC分类号	C12N15/33 C12N1/21 C07K19/00 C07K1/14 C07K14/08 A61K39/12 C07K16/18 G01N33/53 G01N33/569		
代理人(译)	胡红娟		
其他公开文献	CN101016547B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种含有海洋双RNA病毒MABV结构蛋白基因的重组蛋白制备方法和应用，所述的重组蛋白包括VP2融合蛋白或VP3融合蛋白以及VP2或VP3蛋白，其中VP2融合蛋白编码序列具有序列表中SEQID NO.1所述的核苷酸序列，VP3融合蛋白编码序列具有序列表中SEQID NO.2所述的核苷酸序列。本发明用重组蛋白制备的多克隆抗体在检测海洋双RNA病毒MABV中增加了检测的可信度；利用ELISA和westernblot进行检测，比其它方法(RT - PCR、原位杂交等)简单易行。利用制备VP2和VP3重组蛋白作为疫苗，比减毒疫苗更经济更安全。