

草鱼呼肠孤病毒 VP7 基因核酸疫苗的构建及免疫效果

徐诗英^{1,2}, 刘林³, 李婧慧², 邹勇², 倪金佛²,
杨鸷劼⁴, 贡成良³, 曹广力³, 薛仁宇³, 陈辉^{2*}

(1. 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210046;

2. 江苏省水生动物疫病预防控制中心, 江苏 南京 210036;

3. 苏州大学基础医学与生物科学学院, 江苏 苏州 215123;

4. 江苏省淡水水产研究所, 江苏 南京 210017)

摘要: 将草鱼呼肠孤病毒(GCRV)外衣壳蛋白 VP7 双基因(约 0.9 kb)及团头鲂的 β -肌动蛋白启动子(约 0.56 kb)经扩增并鉴定正确后,克隆至基因转移载体 pFastBac™ Dual 中,获得重组质粒 pFastBac- β -VP7₁-VP7₂,以此研究草鱼免疫实验及免疫效果。重组质粒按 10、30、60 μ g 分为 3 组,同时设 30 μ g 空载体组及对照组。于免疫后第 14、21、28、49 天通过 RT-PCR 检测 VP7 的转录水平、间接凝集反应测定抗体水平及攻毒试验检测免疫保护效果。结果显示, pFastBac- β -VP7₁-VP7₂ 导入鱼体后,VP7 基因在 β -肌动蛋白启动子的驱动下持续表达,至第 49 天仍能检测到目的基因的转录;各免疫组均有抗体产生,抗体效价在免疫后第 21 天达到最高,攻毒后 10、30、60 μ g 核酸疫苗免疫组死亡率分别为 0%、0%、5%,而空载体组和对照组分别为 30% 和 100%,表明 pFastBac- β -VP7₁-VP7₂ 作为核酸疫苗对草鱼病毒性出血病有较好的免疫保护效果。研究结果为草鱼呼肠孤病毒核酸疫苗的研发与生产应用奠定了基础。

关键词: 草鱼呼肠孤病毒; VP7; 核酸疫苗; β -肌动蛋白启动子

中图分类号: Q 753; S 917.4

文献标志码: A

草鱼病毒性出血病(hemorrhage disease of grass carp),是草鱼的一种严重病毒性疾病,其病原——草鱼呼肠孤病毒(grass carp reovirus, GCRV)^[1],隶属呼肠孤病毒科(Reoviridae),水生呼肠孤病毒属(Aquareovirus),是该病毒属中毒力最强的病毒株^[2],主要侵染于草鱼肝脏、心脏、肌肉、肾脏、脾、鳃、肠道等活的组织细胞内^[3],草鱼感染此病毒后死亡率极高,有时高达 80% 以上,且尚未找到有效防治的药物,至今一直是草鱼养殖发展中的“瓶颈”问题。

GCRV 基因组由 11 条分节段的双链 RNA(double strand RNA, dsRNA)组成。FANG 等^[4]通过序列分析和三维结构研究,表明成熟的 GCRV 颗粒由 7 种衣壳蛋白(VP1 ~ VP7)组成,其中 VP5 和 VP7 为病毒外衣壳组分,VP7 蛋白是

由 GCRV 第 10 片段编码,基因编码框为 830 bp,对应的分子量为 34 ku;蛋白酶裂解实验揭示 VP7 在病毒感染及致病过程中起着不可替代的作用^[5-6],FANG 等^[7]通过研究证明 VP7 蛋白具有较好的抗原性,而后来的研究中也证实所制备 VP5 和 VP7 抗体都能与抗原中和,且 VP7 的抗体中和活性是 VP5 的 3 倍,表明 VP7 可能是 GCRV 主要的抗原决定簇^[8]。HE 等^[9]体外中和试验也表明 VP7 多克隆抗体具有中和活性,使研制 GCRV 亚单位疫苗成为可能;郝贵杰等^[10]证明构建的含有 VP7 重组质粒可成功转染到真核细胞中,并可以在其中自行表达。

基因工程疫苗以其抗原性强、保护时间长、安全性好、制备和运输方便等优点已引起行业内的广泛关注^[11-12]。而免疫预防也是草鱼出血病最

收稿日期:2011-05-24 修回日期:2011-09-04

资助项目:江苏省科技支撑计划项目(BE2009387);江苏省农业科技自主创新资金项目(SCX(11)2165)

通讯作者:陈辉,E-mail:chenhui@jsbf.cn

有效的防治方法之一^[13]。目前,有关草鱼出血病基因工程疫苗的研究报道并不多。本研究将团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)的 β -肌动蛋白启动子控制的 VP7 基因克隆进杆状病毒转移载体 pFastBacTM Dual 中,并同时另一拷贝的 VP7 基因置于杆状病毒多角体蛋白(polh)启动子控制之下,构建 VP7 基因核酸疫苗表达载体,并初步开展了核酸疫苗的免疫效果以及对草鱼出血病的免疫保护作用的研究。期望为草鱼呼肠孤病毒核酸疫苗的研发与生产应用提供新的技术方案。

1 材料与方法

1.1 实验材料

病毒毒株、细胞株和载体 实验草鱼购自扬州市邗江区长江系家鱼原种场,草鱼呼肠孤病毒毒株为 GCRV873 (原称草鱼出血病病毒 GCHV873)^[14],由深圳市动植物检疫局惠赠,草鱼肾细胞系 CIK,为江苏省水生动物疫病预防控制中心实验室保存,重组质粒 pMD- β -actin、*E. coli* TG1 为苏州大学医学部基础医学与生物科学学院分子生物学实验室保存,pFastBacTM Dual 载体为 Invitrogen 公司产品,pMD18-T 载体为 Takara 公司产品。

主要试剂 QIAamp Viral RNA Mini Kit 为 QIAGEN 公司产品, RNA PCR Kit(AMV) Ver. 3.0、限制性内切酶、T₄ DNA 连接酶、DNase I、Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0 等购自 TaKaRa 公司, M199 培养基(GIBCO BRL)购自上海沪峰生物科技有限公司,绵羊红细胞、兔血清购自上海源叶生物科技有限公司,其他常规试剂为国产分析纯。

1.2 VP7 基因的扩增、克隆与鉴定

VP7 的扩增 GCRV RNA 的抽提、反转录参照试剂盒说明进行。根据 GenBank 中已公开的 VP7 基因序列(登录号为 AF403396)设计引物:P₁: 5'-GAATTCATGCCACTTCACATGATTCC-3' (下划线示 *Eco* R I 位点)和 P₂: 5'-AAGCTTAATCGGATGGCTCCACATG-3' (*Hind* III)。反应条件: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 40 s; 55 °C 退火 45 s; 72 °C 延伸 1 min; 35 个循环, 72 °C 延伸 8 min。取产物琼脂糖凝胶电泳鉴定。

产物的克隆和鉴定 PCR 扩增产物回收纯化, *Eco* R I / *Hind* III 双酶切后与 pMD18-T 载体连接,产物命名为 T-VP7,经转化 *E. coli* TG1

培养后送至上海生工生物工程公司测序鉴定。

1.3 核酸疫苗的构建及免疫效果

β -肌动蛋白启动子的扩增与克隆 以 pMD- β -actin 为模板进行 β -actin 基因的扩增,引物序列: P₃: 5'-TCTCCCGGGCTCTTACAGGAAACGGGTC-3' (*Sma* I) 和 P₄: 5'-CTACTCGAGATTGGAGCTCAAAGTGAGG-3' (*Xho* I)。反应条件: 94 °C 预变性 4 min, 94 °C 变性 1 min; 55 °C 退火 50 s; 72 °C 延伸 40 s; 35 个循环, 72 °C 延伸 10 min, 回收 PCR 产物, *Sma* I / *Xho* I 双酶切后,克隆进同样酶切 pFastBacTM Dual 载体中,将重组载体命名为 pFastBac- β -actin,并酶切鉴定。

VP7 双基因的克隆 VP7 基因的扩增、克隆与鉴定中 VP7 的 PCR 产物,经 *Eco* R I / *Hind* III 酶切后,直接克隆进同样酶切的 pFastBac- β -actin 中,获得重组载体并命名为 pFastBac- β -VP7₁,并酶切鉴定。

以 T-VP7 载体为模板,用所设计引物 P₅: 5'-TATCTCGAGATGCCACTTCACATGATTCC-3' (*Xho* I) 和 P₆: 5'-GCTGGTACCTTAATCGGATGGCTCCACATG-3' (*Kpn* I) 进行 PCR 扩增,反应条件同 VPT 基因的扩增、克隆与鉴定,回收扩增产物, *Xho* I / *Kpn* I 双酶切后克隆进同样酶切的 pFastBac- β -VP7₁,将其命名为 pFastBac- β -VP7₁-VP7₂(图 1),并酶切鉴定。

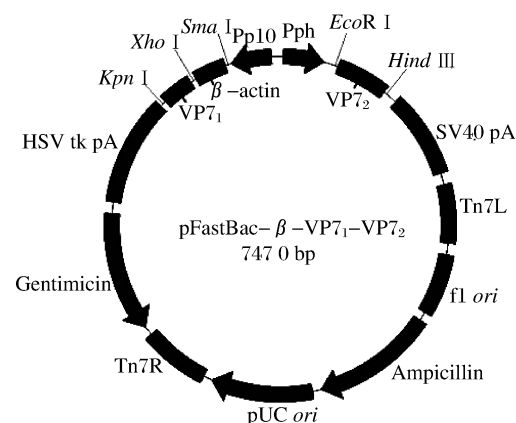


图 1 重组质粒 pFastBac- β -VP7₁-VP7₂ 结构图

Fig. 1 The structure of recombinant plasmid pFastBac- β -VP7₁-VP7₂

重组质粒与实验鱼的处理 于实验前两周,选取规格在 14 ~ 20 cm,体质量 60 ~ 120 g,健壮无病的同一批次草鱼鱼种于 19 ~ 22 °C 水温中充氧饲养。实验共分 5 个组:(1) 对照组(不处理);(2)

注射重组质粒 10 $\mu\text{g}/\text{尾}$; (3) 注射重组质粒 30 $\mu\text{g}/\text{尾}$; (4) 注射重组质粒 60 $\mu\text{g}/\text{尾}$; (5) 注射空载体质粒 30 $\mu\text{g}/\text{尾}$ 。以上各处理组注射体积均为 0.4 mL, 背鳍基部注射。

RT-PCR 检测 VP7 的转录 于免疫接种后第 14、21、28、49 天, 每组取 1 尾草鱼尾静脉采血, 提取总 RNA, 加入 DNase I, 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 1 h, 煮沸 10 min 灭活, 用引物 P₅/P₆, 按 30 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 42 $^{\circ}\text{C}$ 30 min, 99 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 5 $^{\circ}\text{C}$ 5 min 进行反转录, 以反转录产物为模板, 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min 后, 按 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 40 s, 62 $^{\circ}\text{C}$ 退火 50 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min (5 cycle); 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 40 s, 66 $^{\circ}\text{C}$ 退火 50 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min (30 cycle), 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 8 min 进行 PCR 扩增。

抗体水平的测定 第 14、21、28、49 天每组取 3 尾草鱼采血后, 于灭菌离心管中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 2 000 r/min 离心 10 min, 分离血清, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 采用间接凝集反应检测抗体效价, 致敏红细胞采用绵羊红细胞经戊二醛一步法制备^[15]。

病毒 LD₅₀ 测定 将培养第 7 天收集的病毒液按 10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵ 稀释后, 以 0.2 mL/尾于胸鳍基部注射草鱼, 每组 8 尾, 用恒温加热管使水温控制在 (31 \pm 1) $^{\circ}\text{C}$ 范围内, 充气增氧, 定时投喂饵料, 观察其临床有无死亡和发病症状, 直至不再出现发病死亡现象。采用 Reed-Muench 两氏法测定毒株的 LD₅₀^[16]。

人工感染试验 于疫苗注射后第 21 天, 将病毒液用含双抗的灭菌生理盐水稀释至 LD₅₀ 的 10^{1.5} 倍, 经胸鳍基部分别注射已免疫的草鱼和普通草鱼, 每组感染 20 尾, 剂量均为 0.2 mL, 分箱饲养, 控温 (31 \pm 1) $^{\circ}\text{C}$, 充气增氧, 定时喂料, 检查、记录发病情况, 最后根据统计结果计算死亡率和保护力。

免疫保护力 (%) = [(对照组死亡率 - 免疫组死亡率) / 对照组死亡率] \times 100

2 结果

2.1 VP7 基因的扩增、克隆与鉴定

经 RT-PCR 扩增得到约 0.9 kb 的目的条带 (图 2-a), 经回收, 连接 pMD18-T 载体, 双酶切与 PCR 鉴定结果见图 2-b。测序结果显示, 所克隆的片段为 830 bp, 与 GenBank 参考序列的同源性为 99%。

2.2 核酸疫苗的构建

以 pMD- β -actin 为模板, PCR 扩增得到约 0.56 kb 片段, 与 2 个 VP7 基因经双酶切后, 依次克隆进同样酶切 pFastBacTM Dual 载体中, 得到重

组载体 pFastBac- β -VP7₁-VP7₂。酶切和 PCR 鉴定结果见图 3。

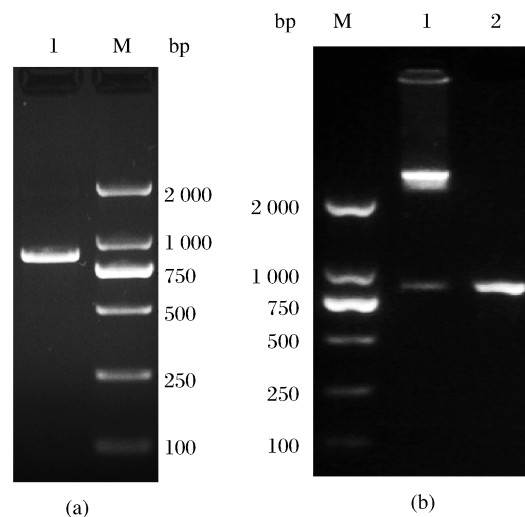


图 2 VP7 基因 PCR 扩增结果 (a), T-VP7 的酶切和 PCR 鉴定 (b)

a: 1. VP7 基因 PCR 产物; M. DL2000 DNA 相对分子质量标准。b: M. DL2000 DNA 相对分子质量标准; 1. *EcoR* I / *Hind* III 双酶切 T-VP7; 2. VP7 的 PCR 鉴定。

Fig. 2 The amplification of VP7 gene by PCR, Enzyme digestion and PCR analysis of T-VP7

a: 1. PCR production of VP7 gene; M. DNA marker DL2000. b: M. DNA marker DL2000; 1. T-VP7 digested with *EcoR* I / *Hind* III; 2. PCR analysis of VP7.

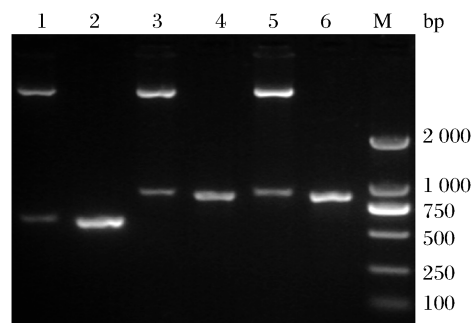


图 3 pFastBac- β -VP7₁-VP7₂ 酶切和 PCR 鉴定结果

1. *Sma* I / *Xho* I 双酶切 pFastBac- β -VP7₁-VP7₂; 2. β -actin 的 PCR 鉴定; 3. *Xho* I / *Kpn* I 双酶切 pFastBac- β -VP7₁-VP7₂; 4. VP7₁ 的 PCR 鉴定; 5. *EcoR* I / *Hind* III 双酶切 pFastBac- β -VP7₁-VP7₂; 6. VP7₂ 的 PCR 鉴定; M. DL2000 DNA 相对分子质量标准。

Fig. 3 Enzyme digestion and PCR analysis of pFastBac- β -VP7₁-VP7₂

1. pFastBac- β -VP7₁-VP7₂ digested with *Sma* I / *Xho* I; 2. PCR analysis of β -actin; 3. pFastBac- β -VP7₁-VP7₂ digested with *Xho* I / *Kpn* I; 4. PCR analysis of VP7₁; 5. pFastBac- β -VP7₁-VP7₂ digested with *EcoR* I / *Hind* III; 6. PCR analysis of VP7₂; M. DNA marker DL2000.

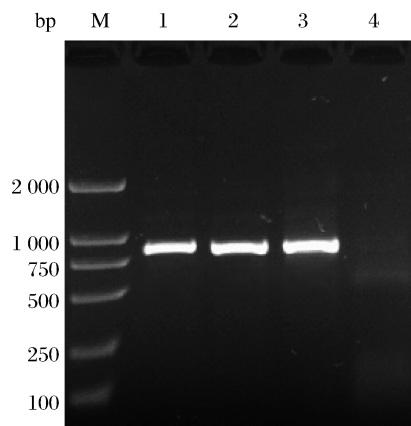


图4 RT-PCR 检测核酸疫苗的转录

M. DL2000 DNA 相对分子质量标准; 1~3. 10~60 µg 疫苗组; 4. 空载体组。

Fig. 4 Detection of transcriptions of DNA vaccine by RT-PCR

M. DNA marker DL2000; 1-3. Vaccine 10-60 µg; 4. pFastBac™ Dual.

2.3 RT-PCR 检测核酸疫苗的转录

pFastBac-β-VP7₁-VP7₂ 免疫草鱼后, 经 RT-PCR 检测 VP7 基因的表达, 结果显示免疫组均可

扩增出 0.9 kb 的特异性条带, 说明 VP7 基因已在草鱼体内成功转录。图 4 为第 14 天检测结果, 此后的第 49 天依然能检测到相应的 VP7 基因的 mRNA。

2.4 抗体水平的测定

草鱼注射 pFastBac-β-VP7₁-VP7₂ 后, 按不同免疫时间检测抗体水平, 结果如表 1 所示, 各免疫组均有抗体产生, 各组在 21 d 左右抗体效价达到最高, 之后有所下降。

2.5 死亡率和免疫保护力

采用 Reed-Muench 方法测得所培养的 GCRV 的 LD₅₀ 为 10^{-2.5}/0.2 mL, 经稀释为 10⁻¹ 后对免疫 21 d 的草鱼进行攻毒, 结果显示, 接种病毒 4~7 d 后, 实验鱼均有死亡现象, 死亡鱼肌肉、鳃盖、肠道有轻度充血和出血, 少部分鱼体腹腔出血, 肝胰脏发白, 表现出明显的出血病症状。各组死亡率和免疫保护力结果见表 2。各免疫组的死亡率明显低于空载体组和阴性对照组, 说明注射 pFastBac-β-VP7₁-VP7₂ 对 GCRV 的感染有较好的保护作用。

表 1 草鱼免疫后抗体效价检测结果

Tab. 1 Antibody titers of the immunized grass carps

组别 group	时间/d time			
	14	21	28	49
10 µg	1:4~1:8	1:8~1:32	1:8~1:16	1:8~1:16
30 µg	1:4~1:8	1:16~1:64	1:4~1:8	1:4~1:8
60 µg	1:4~1:16	1:8~1:32	1:4~1:8	1:8~1:16
空载体 vector	1:2	1:2~1:4	1:2	1:2
对照 control	<1:2	<1:2	<1:2	<1:2

表 2 实验鱼的死亡率和免疫保护力

Tab. 2 Death rate and immunoprotection of the experimental fish

组别 group	DNA 注射量/µg quality of DNA	实验鱼数/尾 no. of fish	死亡鱼数/尾 mortality	死亡率/% death rate	免疫保护力/% immunoprotection
1	10	20	0	0	100
2	30	20	0	0	100
3	60	20	1	5	95
空载体 vector	30	20	6	30	70
对照 control	/	20	20	100	0

3 讨论

合适的载体是基因治疗能否达到预期目的的关键。本研究选用的载体为杆状病毒的

pFastBac™ Dual 供体质粒, 它拥有相互间具有一定竞争性的双启动子(ph 启动子和 p10 启动子), 可同时大量表达两个目的基因, 双表达的蛋白能够保持各自独立的活性^[17-18]。作为一种基因转

移载体,其包含一个重组元件 mini-Tn7 左右臂 (Tn7L 和 Tn7R),可同时介导 β -actin-VP7₁ 和 polh-VP7₂ 表达盒插入到 BmBacmid (即重组病毒基因组) 的靶位点上,完成重组病毒的构建。因而,构建的 pFastBac- β -VP7₁-VP7₂ 注射鱼体后,VP7₁ 可在 β -肌动蛋白启动子的驱动下表达,起到核酸疫苗作用,重组载体 pFastBac- β -VP7₁-VP7₂ 又可通过 Bac-to-Bac 系统获得重组 BmBacmid,具有 β -actin-VP7₁ 表达元件,亦可起到核酸疫苗的作用;同时 BmBacmid 感染的家蚕幼虫或蛹后,在多角体蛋白启动子的驱动下可表达重组 VP7,起蛋白疫苗的作用,从而有可能实现一载多用、多重防治。

β -肌动蛋白启动子是驱动目的基因在鱼体细胞中表达的主要元件。GÓMEZ-CHIARRI 等^[19] 比较了 CMV (Cytomegaovirins) 与 2 种鱼源启动子——鲤 β -肌动蛋白和底鳃 (*Fundulus heteroclitus*) 乳酸脱氢酶 β -肌动蛋白启动子驱动荧光素酶基因的表达,结果显示, β -肌动蛋白启动子驱动效果稍差,但差异并不显著。 β -肌动蛋白启动子具有与 SV40 早期启动子相当的或更强的启动转录活性^[20],在很多组织和细胞中都诱导到外源基因较高水平的表达^[21],因而成为水产动物核酸疫苗载体构建过程中安全而高效的替代元件。本研究中,发现 VP7 基因在团头鲂 β -肌动蛋白启动子控制下可成功转录,且在注射 49 d 后仍能通过 RT-PCR 检测到 VP7 的表达,表明重组载体 pFastBac- β -VP7₁-VP7₂ 注射 49 d 后仍没有被降解,在草鱼体内仍可发挥核酸疫苗的功能。

许多研究表明,核酸疫苗的免疫效果与接种剂量和次数有一定的相关性,并且接种剂量随着抗原基因种类的不同而变化。不同鱼种和不同大小的个体,其最佳注射剂量不同,但其与个体体质量无明显比例关系。中等大小鱼注射剂量一般为 1~50 μ g,也有报道 10~100 μ g 的剂量即可得到良好的免疫效果^[22],更低的剂量也有作用^[23],过高的剂量则会导致外源基因表达水平的降低^[24]。本研究设计 10、30、60 μ g 3 个剂量组,各组的抗体效价测定基本在 21 d 时达到最高,随后下降,符合抗体消长规律,30 μ g 剂量组略高于其它两组,提示 30 μ g、0.4 mL 条件下可参考为生产中的中剂量使用。从整体看,各组产生的抗体效价水平并不理想,这可能与给药方法途径、注射体积、

免疫次数及是否使用佐剂等有关,这些都将直接影响 DNA 疫苗外源基因的入核水平和表达水平。从攻毒实验看,空载体组免疫保护率为 70%,也对病毒产生一定的抗性,但在抗体效价测定实验中并未有明显的凝集现象,表明极可能是质粒 DNA 分子同时起到佐剂作用而加强免疫应答效应,可能存在免疫激活序列,即以 CpG 为基元的 6 碱基 DNA 序列对动物机体产生免疫激活功能^[25],从而激活机体的非特异性免疫系统产生免疫效应。回感实验表明,免疫各组草鱼的确能够抵抗强毒的攻击,所研究的疫苗起到了很好的保护作用,但实际生产中为达到更为理想的免疫效果,可尝试在随后的一定时期内加强免疫 1~2 次。同时,最佳的给药途径、注射剂量等都有待于进一步研究探索。

参考文献:

- [1] 中国科学院武汉病毒研究所,中国水产科学院长江水产研究所沙市分所草鱼出血病研究协作组. 草鱼出血病病原——鱼呼肠孤病毒 (FRV) 核酸特性的研究[J]. 淡水渔业,1984,(4):7-9.
- [2] ANGEL A A, ROCKEMANN D D, HETRICK F M. Identification of grass carp hemorrhage virus as a new genogroup of aquareovirus [J]. Journal of General Virology, 1990, 80: 2399-2402.
- [3] 毛树坚, 邵建忠, 杭绮, 等. 草鱼出血病的病原研究 [J]. 水产学报, 1989, 13(1): 1-4.
- [4] FANG Q, SHANG S, LIANG Y, et al. 3D reconstruction and capsid protein characterization of grass carp reovirus [J]. Science in China Series C, 2005, 48(6): 593-600.
- [5] IVANOVIC T, AGOSTO M A, NIBERT M L, et al. A role for molecular chaperone Hsc70 in reovirus outer capsid disassembly [J]. Journal of Biological Chemistry, 2007, 282(16): 12210-12219.
- [6] FANG Q, SENG E K, DING Q Q. Characterization of infectious particles of grass carp reovirus by treatment with proteases [J]. Archives of Virology, 2008, 153(2): 675-682.
- [7] ZHANG L L, SHEN J Y, FANG Q, et al. High level expression of grass carp reovirus VP7 protein in prokaryotic cells [J]. Virologica Sinica, 2008, 23(1): 51-56.
- [8] SHAO L, SUN X, FANG Q. Antibodies against outer-capsid proteins of grass carp reovirus expressed in E. coli are capable of neutralizing viral infectivity

- [J]. *Virology Journal*, 2011, 8: 347.
- [9] HE Y X, YANG Q, XU H X, *et al.* Prokaryotic expression and purification of grass carp reovirus capsid protein VP7 and its vaccine potential [J]. *African Journal of Microbiology Research*, 2011, 5 (13): 1643 – 1648.
- [10] 郝贵杰, 潘晓艺, 姚嘉赞, 等. 草鱼呼肠孤病毒衣壳蛋白 VP7 基因真核表达载体 pCI-VP7 的构建及鉴定 [J]. *水产学报*, 2010, 34(5): 807 – 813.
- [11] HARIHARAN M J, DRIVER D A, TOWNSEND K, *et al.* DNA immunization against herpes simplex virus: enhanced efficacy using a sindbis virus-based vector [J]. *Journal of Virology*, 1998, 72 (2): 950 – 958.
- [12] MONTGOMERY D L, SHIVER J W, LEANDER K R, *et al.* Heterologous and homologous protection against influenza A by DNA vaccination: optimization of DNA vectors [J]. *DNA and Cell Biology*, 1993, 12(9): 777 – 783.
- [13] 王方华, 李安兴. 草鱼病毒性出血病研究进展 [J]. *南方水产*, 2006, 2(3): 66 – 71.
- [14] 柯丽华, 方勤, 蔡宜权. 一株新的草鱼出血病病毒分离物的特性 [J]. *水生生物学报*, 1990, 14(2): 153 – 159.
- [15] 朱立平, 陈学清. 免疫学常用实验方法 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2000: 102 – 107.
- [16] 殷震, 刘景华. 动物病毒学 [M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 1997: 329 – 330.
- [17] GATEHOUSE L N, MARKWICK N P, POULTON J, *et al.* Expression of two heterologous proteins depends on the mode of expression: comparison of *in vivo* and *in vitro* methods [J]. *Bioprocess Biosystems Engineering*, 2008, 31(5): 469 – 475.
- [18] HU Y C, LUO Y L, JI W T, *et al.* Dual expression of the HA protein of H5N2 avian influenza virus in a baculovirus system [J]. *Journal of Virological Methods*, 2006, 135(1): 43 – 48.
- [19] GÓMEZ-CHIARRI M, CHIAVERINI L A. Evaluation of eukaryotic promoters for the construction of DNA vaccines for aquaculture [J]. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering*, 1999, 15: 121 – 124.
- [20] ROBERT M, FREDERICKSON, MONETTE R, *et al.* 5' flanking and first intron sequences of the human β -actin gene required for efficient promoter activity [J]. *Nucleic Acids Research*, 1989, 17(1): 254 – 270.
- [21] SCHULTE P M, GÓMEZ-CHIARRI M, POWERS D A, *et al.* Structural and functional differences in the promoter and 5' flanking region of LDH-B within and between populations of the teleost *Fundulus heteroclitus* [J]. *Genetics*, 1997, 145: 759 – 769.
- [22] CORBEIL S, LAPATRA S E, ANERSON E D, *et al.* Nanogram quantities of a DNA vaccine protect rainbow trout fry against heterologous strains of infectious hematopoietic necrosis virus [J]. *Vaccine*, 2000, 18(25): 2817 – 2824.
- [23] HEPPELL J, LORENZEN N, ARMSTRONG N K, *et al.* Development of DNA vaccines for fish: vector design, intramuscular injection and antigen expression using viral haemorrhagic septicaemia virus genes as model [J]. *Fish & Shellfish Immunology* 1998(8): 271 – 286.
- [24] SCHULTE P M, POWERS D A, SCHARTL M. Efficient gene transfer into *Xiphophorus* muscle and melanoma by injection of supercoiled plasmid DNA [J]. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1998(7): 241 – 247.
- [25] KLINMAN D M, YI A K, BEAUCAGE S L, *et al.* CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93: 2879 – 2883.

Construction and immune efficacy studies on DNA vaccine with VP7 gene of grass carp reovirus

XU Shi-ying^{1,2}, LIU Lin³, LI Jing-hui², ZOU Yong², NI Jin-di², YANG Yuan-jie⁴,
GONG Cheng-liang³, CAO Guang-li³, XUE Ren-yu³, CHEN Hui^{2*}

(1. College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China;

2. Jiangsu Center for Control and Prevention of Aquatic Animal Infectious Disease, Nanjing 210036, China;

3. Pre-clinical Medical and Biological Science College, Soochow University, Suzhou 215123, China;

4. Freshwater Fisheries Research Institute of Jiangsu Province, Nanjing 210017, China)

Abstract: Double GCRV outer capsid protein VP7 genes (0.9 kb) and β -actin promoter (0.56 kb) from *Megalobrama amblycephala* were amplified and cloned into gene transfer vector pFastBacTM Dual to obtain recombinant pFastBac- β -VP7₁-VP7₂. Immune experiment and immunological effect were studied. The recombinant plasmids were divided into three groups based on doses: 10, 30, 60 μ g. 30 μ g pFastBacTM Dual group and control group were designed in addition. Immune efficacy was determined by means of transcriptions of VP7, antibody detection by indirect agglutination reaction and challenge experiment on the 14th, 21st, 28th, and 49th days after immunization. The results showed that pFastBac- β -VP7₁-VP7₂ was transformed into body cell, VP7 gene could be controlled for expression constantly by β -actin promoter, and transcription of VP7 was still in process on the 49th day. Antibody was produced and the titers reached their peak on the 21th day after immunization. The mortality rates were 0%, 0% and 5% respectively in 10 μ g, 30 μ g and 60 μ g vaccine immunization groups, 30% in pFastBacTM Dual group, and 100% in control group after GCRV injection. All results suggested that pFastBac- β -VP7₁-VP7₂ had good immuno-protective efficacy as DNA vaccine against GCRV. Therefore, the study provided important academic basis for research, development and application of the GCRV genetic vaccine.

Key words: grass carp reovirus; VP7; DNA vaccine; β -actin promoter

Corresponding author: CHEN Hui. E-mail: chenhui@jsbf.cn