

草鱼出血病病毒 VP6 蛋白的原核表达、纯化及免疫效果

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

(1. 苏州大学基础医学与生物科学学院, 江苏 苏州 215123;

2. 江苏省水生动物疫病预防控制中心, 江苏 南京 210036;

3. 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210046)

摘要: 为了探讨草鱼出血病病毒(GCRV)VP6亚单位疫苗对草鱼出血病的免疫保护作用,将vp6基因克隆进原核表达载体pET-28a(+),构建了重组质粒pET28a(+)-VP6。SDS-PAGE和Western-blotting显示,重组VP6蛋白的分子量约为43 ku,主要以包涵体形式存在,重组蛋白占菌体总蛋白的20%左右;Ni²⁺柱纯化后的重组蛋白,以每尾500 μg肌肉注射免疫草鱼(14~20 cm,60~120 g),并在第14、21、28、49、70天通过间接凝集反应检测抗体水平,结果显示,免疫注射后第14天可检测到鱼体产生的特异性抗体,第21天达到最高峰,第70天仍可检测到抗体的存在;免疫注射第21天人工接种GCRV,免疫后的草鱼对出血病的保护力达100%。

关键词: 草鱼出血病病毒;原核表达;纯化;免疫

中图分类号: S 941; Q 785

文献标志码: A

草鱼出血病病毒(grass carp reovirus, GCRV)是双链RNA(dsRNA)病毒,主要引起中国淡水养殖主要品种草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)在鱼种阶段发生出血病,死亡率高达90%以上,给水产养殖业造成巨大损失^[1-2]。免疫技术在水产养殖疾病防治中已取得了一定的效果^[3],而疫苗是水产疾病防治最有效的途径之一^[4]。目前,临床上应用国家农业部批准的GCRV甲醛灭活疫苗,也是亚洲唯一商业化的草鱼出血病疫苗^[5-6],疫苗安全性好,制造容易,但是由于部分抗原成分被破坏,故存在免疫效果不理想、免疫力持久性差等问题。传统减毒疫苗又称弱毒疫苗,疫苗免疫力强、作用时间长,但存在一定的安全隐患,具有潜在的致病危险,成本高,并且注射困难^[7],因此生产上急需安全、有效、质量可控的草鱼出血病疫苗^[8]。

基因疫苗又称核酸疫苗。DNA疫苗是指含

有编码抗原基因的真核表达质粒DNA,经直接接种体内后,可被宿主细胞摄取,并转录、翻译、表达出相应的抗原,然后通过不同途径刺激机体产生针对此种抗原的免疫应答。章怀云等^[9]采用外源DNA处理方法,将鲤精液、肝脏的总DNA以精子载体处理草鱼受精卵,获得了数批经外源DNA处理的草鱼群体。研究结果显示,经鲤总DNA处理的当年草鱼对草鱼出血病病毒的抗性显著增强。徐诗英等^[10]构建了核酸疫苗载体pFastBac-β-VP7₁-VP7₂,免疫草鱼结果显示,该核酸疫苗载体对草鱼病毒性出血病有较好的免疫保护效果。亚单位疫苗有抗体出现早、滴度高、持续时间长等优点,而且它具有胸腺依赖性免疫原的性质^[11]。Zhang等^[12]在大肠杆菌中表达了带His标签的GCRV VP7蛋白,并且研究了基于蛋白的GCRV检测方法,但没有研究重组VP7蛋白对草鱼出血病的免疫效果。He等^[7-8]利用大肠杆菌

收稿日期:2011-11-03 修回日期:2011-12-08

资助项目:苏州市自然科学基金(SYN201106);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:贡成良, E-mail: gongcl@suda.edu.cn

成功表达 GCRV 外壳蛋白 VP5 和 VP7,并制备了抗 VP5 和 VP7 特异性抗体,发现该抗体可以体外中和病毒,表明 VP5 和 VP7 重组蛋白有成为亚单位疫苗的可能性,但并没有在草鱼上研究其免疫保护效果。通过对 GCRV 进行三维结构重建、衣壳蛋白结构及特性研究发现,VP6 蛋白与哺乳动物正呼肠孤病毒 $\delta 2$ 蛋白相似,均在内核和外壳的连接中起着重要作用^[2]。VP6 蛋白是 GCRV 的核衣壳之一,且有弱的 dsRNA 结合能力^[13]。用纯化的草鱼呼肠孤病毒蛋白免疫家兔制备抗血清,发现病毒结构蛋白 VP1、VP5、VP6、VP9 的抗血清具有中和效价,VP6 诱导的中和抗体效价最高,推测 VP6 是病毒多肽中的主要中和抗原^[14],适合作为候选抗原而用于草鱼疫苗研究^[15-16]。周勇等^[17]成功构建了融合表达草鱼呼肠孤病毒 VP6 蛋白和绿色荧光蛋白的植物表达载体 pCAMP IA1302-VP6,为研究转基因植物表达疫苗奠定了基础。Fang 等^[18]在昆虫细胞 (SF9) 中成功共表达了 GCRV VP6 和增强型绿色荧光蛋白 (EGFP) 基因。尽管已有较多的学者开展了草鱼出血病的疫苗研究,但至今仍未见重组 VP6 蛋白对草鱼出血病免疫效果的研究,因此本研究选用 VP6 为候选抗原基因,构建了原核表达载体 pET28a(+)-VP6,在用大肠杆菌成功表达目的蛋白的基础上,用 Ni²⁺ 柱纯化的重组蛋白免疫注射草鱼,初步研究了草鱼中 VP6 特异性抗体的产生规律以及对草鱼出血病的免疫保护作用,期望为草鱼出血病亚单位疫苗的研制提供进一步的帮助。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验草鱼购自江苏扬州市邗江区长江系家鱼原种场;草鱼出血病病毒 (GCRV),由深圳市动植物检疫局江育林研究员惠赠,并由江苏省水生动物疫病预防控制中心扩增;带有 VP6 完整 ORF 的重组质粒 pMD19T-VP6、表达载体 pET-28a(+)(Novage 公司)、*Escherichia coli* TG1、BL21 (DE3) 菌株由苏州大学医学部基础医学与生物科学学院分子生物学研究室保存。

1.2 实验方法

pET28a(+)-VP6 表达载体的构建 重组质粒 pMD19T-VP6 经 *EcoR* I / *Hind* III (Fermentas

公司)双酶切后,回收 *vp6* 基因片段 (1.23 kb),克隆进同样酶切的 pET-28a(+),获 pET28a(+)-VP6 重组表达载体,并送生工生物工程(上海)有限公司测序验证。

重组 VP6 在大肠杆菌中的诱导表达

重组质粒 pET28a(+)-VP6 转化大肠杆菌 BL21 菌株,挑取单个菌落接种于 3 mL LB 培养基(含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素)中,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。取 30 μL 活化菌液至 3 mL LB 液体培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养,待 OD₆₀₀ 值达到 0.4 ~ 0.6 时加入 IPTG(终浓度为 1 mmol/L)进行诱导表达,诱导时间分别为 1、2、3、4、5 和 6 h。

SDS-PAGE 和 Western-blotting 收集诱导表达菌体,与 2 \times SDS 上样缓冲液混合,煮沸 5 min,12 000 r/min 离心 5 min 后,取上清进行 SDS-PAGE(浓缩胶为 5%,分离胶为 10%)分析,电泳结束后,将蛋白条带转移至 PVDF 膜 (amcQualipor)上,用含 3% BSA 的 PBST 缓冲液 4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜;加入 1:1 000 稀释的鼠抗 His-6 抗体(北京天根公司),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h;1:2 000 稀释的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG(北京博奥森公司),37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min;每次反应后均用 PBST 洗膜 3 次;最后用 DAB[生工生物工程(上海)有限公司]显色。

为了分析重组蛋白的存在方式,取诱导表达菌液 200 mL,离心收集菌体。以 20 mL 超声破碎液 (1% TritonX-100、5 mmol/L Tris \cdot Cl、2.925 mg/mL NaCl、60.06 mg/mL 尿素, pH 8.0)重悬沉淀,冰上超声破碎 (80 W,每次 10 s,停 10 s,总时间 30 min)至菌液转清,5 000 r/min 离心 40 min,转移上清到新的 EP 管备用;沉淀用超声破碎液清洗 3 次,去离子水清洗 1 次。取沉淀,加入 3 mL 变性液 (5 mmol/L Tris \cdot Cl、10% 甘油、2.925 mg/mL NaCl、480.48 mg/mL 尿素, pH 8.0),4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。然后进行 SDS-PAGE。

重组 VP6 蛋白的纯化 离心收集诱导表达菌体,加入适量变性液,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,12 000 r/min 离 10 min,取上清过 Ni 柱纯化,整个过程在 4 $^{\circ}\text{C}$ 中完成。Ni 柱用 5 倍柱床体积的 MCAC-0(即变性液)平衡后,加入待纯化的样品,调整流速至 6 滴/min,使样品中带 His-标签的蛋白与 Ni 柱螯合;用 5 倍柱床体积 MCAC-0 除去未结合蛋白;再用由 MCAC-1000(5 mmol/L Tris \cdot Cl、10% 甘

油、29.22 mg/mL NaCl、480.48 mg/mL 尿素、68.05 mg/mL 咪唑, pH 8.0) 稀释的不同浓度的咪唑洗脱液洗脱样品,按每 1 mL 分步收集,测定 OD₂₈₀,分步收集的样品加 2 倍体积的无水乙醇于 -20 °C 静置 1 h,4 °C 12 000 r/min 离心 10 min,弃上清,沉淀用适量的 1 × PBS 溶解, -20 °C 保存。临用前加入等体积 2 × SDS 凝胶加样缓冲液,100 °C,煮 5 min,12 000 r/min,5 min,取上清进行 SDS-PAGE 检测。

鱼体免疫 于实验前 2 周,选取健壮无病的同一批次草鱼鱼种(体长 14 ~ 20 cm,体质量 60 ~ 120 g)于 19 ~ 22 °C 水温中充氧饲养。重组 VP6 蛋白(2.5 μg/μL)与氢氧化铝佐剂(深圳高盛源国际贸易有限公司)等体积混匀,按 400 μL/尾背鳍基部肌肉注射免疫鱼体,同时设未免疫的草鱼为对照组,每组 40 尾。

致敏红细胞的制备 绵羊“O”型红细胞(上海源叶生物科技有限公司)用 PB 缓冲液(0.11 mol/L pH 7.2)洗 3 次,取沉积红细胞 0.1 mL,与 0.1 mL GCRV 和 2 mL PB 缓冲液混合,电磁搅拌下缓慢滴加 0.25 mL 戊二醛(2.5%),于室温搅拌 4 h 后,用 PB 缓冲液洗 3 次,然后加稀释液 20 mL 配成 0.5% 致敏红细胞悬液。

间接凝集法测抗体效价法 草鱼免疫注射重组蛋白后,每天观察鱼的活动情况和死亡情况,并且在第 14、21、28、49、70 天随机取 3 尾草鱼尾静脉采血,于灭菌离心管中,4 °C 过夜,2 000 r/min 离心 10 min,分离血清, -20 °C 保存,采用间接凝集反应检测抗体效价^[19]。

免疫保护力检测 疫苗注射后第 21 天,将 GCRV 病毒液用含双抗(100 μg/mL 青霉素,50 μg/mL 链霉素)的灭菌生理盐水稀释至 LD₅₀ 的 10⁻⁵ 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,每尾 0.2 mL,分箱饲养,控温(31 ± 1) °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(RPS) = [(对照组死亡率 - 免疫组死亡率)/对照组死亡率] × 100%^[20]。

2 结果与分析

2.1 表达载体 pET-28a(+)-VP6 的鉴定

重组质粒 pET-28a(+)-VP6 经 *EcoR* I /

Hind III 双酶切后,可检测到约 1.23 kb 的片段(图 1),与预期切出的片段大小相符,证明 *vp6* 基因已成功克隆到原核表达载体 pET-28a(+)中,测序结果显示 *vp6* 基因序列正确,并与 pET-28a(+)中的 His-标签序列位于同一读码框中,表明 pET-28a(+)-VP6 已按设计要求正确构建。

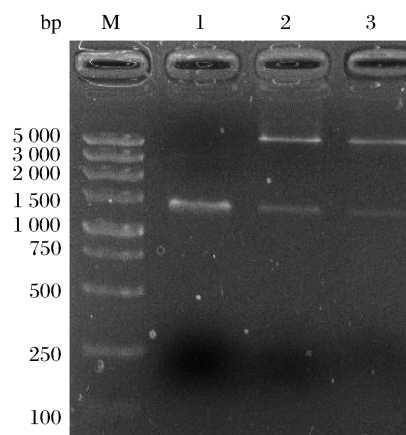


图 1 重组质粒 pET-28a(+)-VP6 的酶切鉴定

M. DNA DL5000 Marker; 1. *vp6* 的 PCR 鉴定; 2-3. *EcoR* I / *Hind* III 双酶切 pET-28a(+)-VP6。

Fig. 1 Enzyme digestion and PCR analysis of pET-28a(+)-VP6

M. DNA DL5000 Marker; 1. PCR product of *vp6*, amplified from pET-28a(+)-VP6; 2-3. pET-28a(+)-VP6 digested with *EcoR* I and *Hind* III.

2.2 重组 VP6 蛋白的鉴定

将鉴定正确的质粒 pET28a(+)-VP6 及空载体 pET-28a(+)转化表达菌 BL21,挑取阳性单克隆培养,经 IPTG(终浓度为 1 mmol/L)诱导表达后,收集诱导表达菌体总蛋白,以鼠抗 His6 单克隆抗体进行 Western-blotting 鉴定。结果显示在 43 ku 处出现明显的特异性条带(图 2),与理论分子量一致,表明 VP6 已在大肠杆菌中成功表达。

2.3 诱导表达时间的优化

将 pET-28a(+)-VP6 重组菌经 IPTG 分别诱导 1、2、3、4、5 和 6 h 后,收集菌体进行 SDS-PAGE 检测(图 3)。凝胶灰度扫描分析显示,随着诱导时间的增加,重组蛋白的表达水平增加,至诱导 5 h,达到最高值,重组蛋白占菌体总蛋白的比例约为 20%。

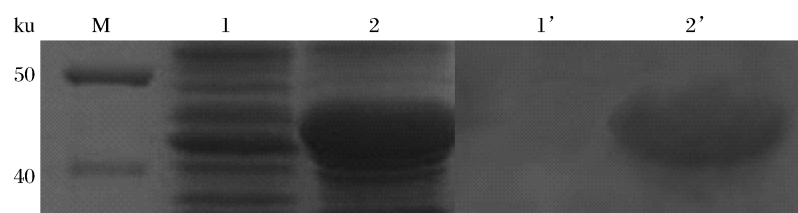


图2 重组VP6蛋白的SDS-PAGE和Western-blotting分析

M. 标准分子量蛋白(10~200 ku); 1,1'. pET-28α(+)转化菌; 2,2'. pET-28α(+)-VP6转化菌。

Fig. 2 Analysis of SDS-PAGE and Western-blotting of recombinant VP6

M. protein marker(10~200 ku); 1,1'. transformed *E. coli* BL21 strain with pET-28α(+); 2,2'. transformed *E. coli* BL21 strain with pET-28α(+)-VP6.

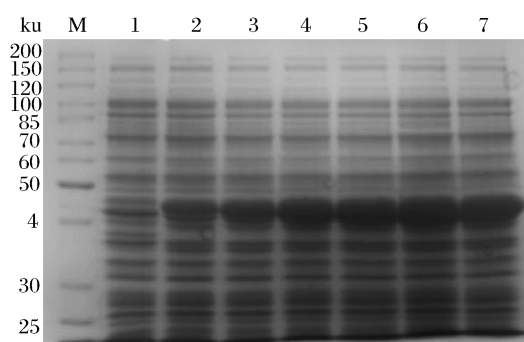


图3 诱导时间与重组VP6表达水平的关系

M. 标准分子量蛋白; 1. pET-28α(+)转化菌; 2~7. pET-28α(+)-VP6转化菌分别用IPTG诱导1,2,3,4,5和6h。

Fig. 3 Induction expression of pET-28α(+)-VP6 in *E. coli* BL21 strain

M. protein marker; 1. transformed *E. coli* BL21 strain with pET-28α(+); 2~7. transformed *E. coli* BL21 strain with pET-28α(+)-VP6 were induced with IPTG for 1,2,3,4,5 and 6 h, respectively.

2.4 VP6重组蛋白的可溶性分析

取诱导表达菌液200 mL,离心收集菌体。冰上超声破碎离心后,收集上清,同时沉淀加入适量变性液4℃过夜。菌体超声波裂解上清和菌体超声波裂解沉淀进行10% SDS-PAGE分析(图4)。结果显示,菌体超声波裂解上清中目的蛋白条带的比例较小,而菌体超声波裂解沉淀中含大量的目的蛋白,说明重组表达的VP6蛋白主要以包涵体形式存在。

2.5 重组VP6蛋白的纯化

包涵体用变性液溶解,离心取上清,经Ni-NTA His-bind螯合亲和层析柱纯化,再利用不同咪唑浓度的洗脱液进行置换,洗脱特异结合的蛋白。收集蛋白洗脱液,用SDS-PAGE检测洗脱效

果(图5),结果显示,当用10 mmol/L的咪唑洗脱时,有大量杂蛋白被洗脱。随着咪唑浓度的增加,洗脱液中杂蛋白含量逐渐下降。用100 mmol/L的咪唑溶液洗脱时,洗脱效果较佳,在SDS-PAGE胶中有一条43 ku的目的条带,且几乎观察不到其它杂蛋白条带。

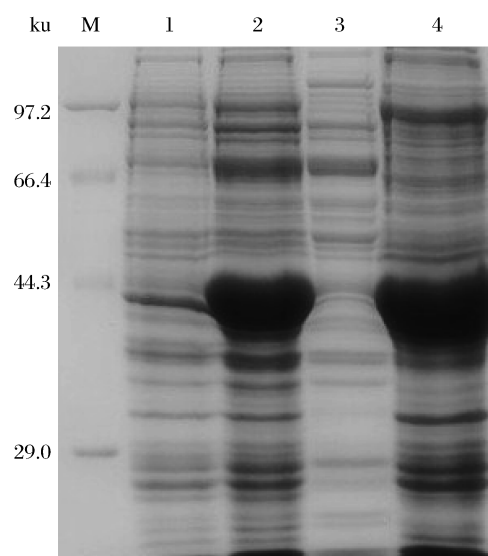


图4 大肠杆菌表达的重组VP6蛋白的可溶性分析

M. 标准分子量蛋白; 1. pET-28α(+)转化菌; 2. pET-28α(+)-VP6转化菌; 3. pET-28α(+)-VP6转化菌的裂解上清; 4. pET-28α(+)-VP6转化菌的裂解沉淀。

Fig. 4 Solubility analysis of recombinant VP6 protein expressed in *E. coli*

M. protein marker; 1. transformed *E. coli* BL21 strain with pET-28α(+); 2. transformed *E. coli* BL21 strain with pET-28α(+)-VP6; 3. the supernatant of transformed *E. coli* BL21 strain with pET-28α(+)-VP6 lysate; 4. the precipitation of transformed *E. coli* BL21 strain with pET-28α(+)-VP6 lysate.

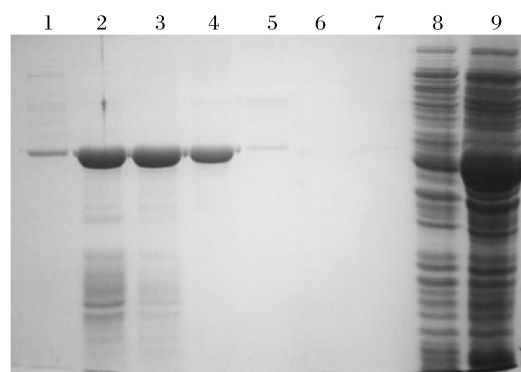


图 5 纯化 VP6 重组蛋白的 SDS-PAGE 分析

1~7. 不同浓度(10、20、50、100、200、300 和 400 mmol/L)咪唑洗脱样品; 8. pET-28 α (+) 转化菌; 9. pET-28 α (+)-VP6 转化菌。

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of the purified VP6 recombinant protein

1-7. the purified protein eluted by 10, 20, 50, 100, 200, 300 and 400 mmol/L of glyoxalin solution, respectively; 8. transformed *E. coli* BL21 strain with pET-28 α (+); 9. transformed *E. coli* BL21 strain with pET-28 α (+)-VP6.

2.6 重组 VP6 蛋白的免疫效果

草鱼注射蛋白疫苗后,按不同免疫时间检测抗体水平,结果如图 6 所示,与对照组相比,草鱼免疫注射重组 VP6 蛋白后,在血液中均可检测到

抗体,并在第 21 天达到高峰,随后呈下降趋势,并且在免疫后第 70 天仍能检测到抗体。统计学分析表明,与对照相比,抗体水平具有显著差异。数据以正偏差形式表示($N=3$) (** $P<0.01$)。

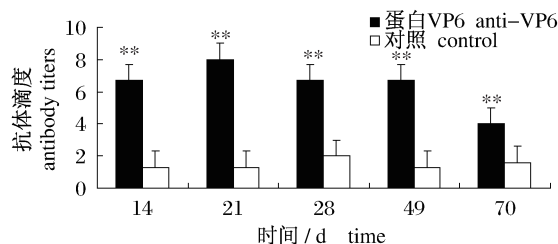


图 6 免疫草鱼血液中抗 VP6 抗体水平的变化

Fig. 6 The changes of the anti-VP6 antibody level in the blood of the immunized grass carp

为了进一步检测免疫效果,草鱼免疫注射重组 VP6 蛋白第 21 天,人工接种 GCRV,定时喂料,检查、记录发病情况,结果(表 1)显示,攻毒 4~7 d 后,对照组 100% 发病死亡,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;而免疫组未见感染发病,表明用纯化的重组 VP6 蛋白免疫草鱼对出血病具有较好的免疫保护作用。

表 1 免疫接种重组 VP6 蛋白对草鱼出血病的免疫保护作用

Tab. 1 Immunoprotection of recombinant VP6 protein against GCRV

组别 groups	实验鱼数/尾 no. of fish	死亡鱼数/尾 no. of fish death	死亡率/% mortality rate	免疫保护力/% immunoprotection
免疫组 immunized group	20	0	0	100
对照组 control group	20	0	100	—

3 讨论

草鱼呼肠孤病毒复制与轮状病毒极其相似^[21]。研究结果显示,轮状病毒 VP6 诱导的 IgA 抗体可经血循环进入小肠上皮细胞,在穿过小肠上皮细胞的过程中与病毒形成复合物,抵抗病毒的原发感染^[22]。将表达轮状病毒衣壳蛋白 VP6 的转基因马铃薯给鼠口服后,可在鼠的血清和肠内分别检测到抗 VP6 IgG 和 IgA 抗体^[23]。对 GCRV 不同衣壳蛋白抗血清的中和能力研究结果显示,VP1、VP5、VP6、VP9 的抗血清均具有中和病毒的作用,但 VP6 诱导的中和抗体效价最高^[14-16]。目前,已分离到多种 GCRV 毒株,病毒结构蛋白的同源性分析显示,不同毒株间 VP6 蛋

白的同源性达到 99%,保守性相对较好,因此,选用 VP6 作为亚单位疫苗,不仅免疫效果好,而且也有可能对多种 GCRV 毒株攻击具有较好的免疫保护作用。

由于大肠杆菌表达系统具有易于操作、表达高效和稳定等优点,因此得以广泛应用^[24]。表达载体 pET-28a(+)具有与 Ni²⁺ 高亲和结合特性的 6 个组氨酸标签序列,便于重组蛋白的纯化,降低技术难度。因此,本研究选择 pET-28a(+)为表达载体,构建了 GCRV vp6 基因的重组表达载体,SDS-PAGE 和 Western-blotting 检测结果显示,重组表达质粒转化菌用 IPTG 诱导 5 h 后,重组 VP6 蛋白的表达水平达到最高,约占菌体总蛋白的 20%,表明 vp6 基因在大肠杆菌表达菌中得到了

高效表达,且能被鼠抗 His6 单克隆抗体识别,在分子量为 43 ku 处有特异性条带。对 vp6 基因表达的蛋白进行可溶性与不可溶性分析后,显示表达蛋白主要以包涵体的形式存在,这可能是因为重组表达蛋白部分折叠或错误折叠所引起,大肠杆菌菌体内环境相对比较还原,从而导致包涵体形式表达的产物主要以还原形式存在,不能形成正确的分子二硫键^[25-26]。蛋白的纯度对保证疫苗的质量至关重要,在用 Ni 柱亲和层析纯化重组 VP6 蛋白时,发现不同浓度的咪唑缓冲液对重组蛋白的洗脱效果明显不同,当用 100 mmol/L 的咪唑溶液洗脱时,纯化的重组蛋白中几乎无杂蛋白,表明洗脱效果较佳,该研究结果为大量获得重组 VP6 蛋白,制备 GCRV 亚单位疫苗提供了有益的帮助。

抗体产生水平和体内抗体的维持时间是评估疫苗的重要指标。草鱼免疫注射重组 VP6 蛋白后,在不同检测时间点,草鱼血液中的抗体水平均高于对照组,说明纯化的重组 VP6 蛋白具有良好的免疫原性;检测结果显示,免疫注射后的草鱼其血液中抗体水平在第 21 天达到高峰,随后呈下降趋势,该结果与体内抗体的消长规律相符。在免疫后第 70 天仍能在血液中检测到 VP6 抗体,推测重组 VP6 疫苗对草鱼出血病有较长时间的免疫保护作用。尽管重组 VP6 蛋白免疫草鱼后,能在血液中检测到特异性抗体,但总体来说,抗体水平不是特别高,推测与免疫剂量、免疫次数、使用的佐剂是否合适及佐剂乳化状态等多种因素有关。攻毒后,对照组发病死亡的鱼经解剖分析后,表明死因是由 GCRV 引起的,排除了其他病原菌导致的死亡,而免疫组草鱼没有出现感染发病死亡,这在一定程度上评估了 VP6 作为亚单位疫苗的潜在可能性,可以认为 VP6 作为 GCRV 亚单位疫苗具有良好的前景。

参考文献:

- [1] Rangel A A, Rockemann D D, Hetrick F M, *et al.* Identification of grass carp haemorrhage virus as a new genogroup of aquareovirus [J]. *Journal of General Virology*, 1990, 80: 2399 - 2402.
- [2] Cheng L, Fang Q, Sanket S, *et al.* Subnanometer-resolution structures of the grass carp reovirus core and virion [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2008, 382(1): 213 - 222.
- [3] 向泉,唐龙碧. 免疫技术在水产动物养殖中的应用 [J]. *渔业现代化*, 2001, 5: 20 - 22.
- [4] Heng J F, Su J G, Huang T, *et al.* The polymorphism and haplotype of TLR3 gene in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) and their associations with susceptibility/resistance to grass carp reovirus [J]. *Fish Shellfish & Immunology*, 2011, 30 (1): 45 - 50.
- [5] 杨先乐,杜森英,曾令兵,等. 草鱼出血病细胞培养灭活疫苗的研究 [J]. *水产学报*, 1989, 13 (2): 138 - 143.
- [6] Sommerset I, Krossoy B, Biering E, *et al.* Vaccines for fish in aquaculture [J]. *Expert Reviews Vaccines*, 2005, 4(1): 89 - 101.
- [7] 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 Vol*, 2011, 5(13): 1643 - 1648.
- [8] He Y X, Xu H X, Yang Q, *et al.* The use of an *in vitro* microneutralization assay to evaluate the potential of recombinant VP5 protein as an antigen for vaccinating against grass carp reovirus [J]. *Virology Journal*, 2011, 8: 132.
- [9] 章怀云,萧克宇,陈韬,等. 外源 DNA 处理的草鱼对草鱼出血病毒的抗性观察 [J]. *湖南农业大学学报*, 1997, 23(2): 154 - 157.
- [10] 徐诗英,刘林,贡成良,等. 草鱼呼肠孤病毒 VP7 基因核酸疫苗的构建及免疫效果的研究 [J]. *水产学报*, 2011, 35(11): 1694 - 1700.
- [11] 单晓枫,高云航,李影,等. 鱼用疫苗研究进展 [J]. *中国兽药杂志*, 2005, 39(11): 19 - 22.
- [12] Zhang L L, Shen J Y, Lei C F, *et al.* High level expression of grass carp reovirus VP7 protein in prokaryotic cells [J]. *Chinese Journal of Virology*, 2008, 23(1): 51 - 56.
- [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] 王炜,赵桃英,方勤. 草鱼出血病病毒多肽的免疫原性 [J]. *中国病毒学*, 1995, 10(2): 166 - 168.
- [15] 王炜,蔡宜权,方勤. 草鱼出血病病毒多肽的基因定位 [J]. *中国病毒学*, 1994, 9(4): 356 - 361.
- [16] 方勤,田静. 草鱼呼肠孤病毒 (GCRV) 部分基因片段 cDNA 文库的构建 [J]. *中国病毒学*, 2000, 15 (1): 78 - 82.
- [17] 周勇,范玉顶,徐进,等. 草鱼呼肠孤病毒 VP6 蛋白基因植物表达载体的构建 [J]. *淡水渔业*, 2009, 39 (4): 40 - 44.

- [18] Fang Q, Eng K S, Wen D, *et al.* Construction and co-expression of grass carp reovirus VP6 protein and enhanced green fluorescence protein in the insect cells[J]. *Virologica Sinica*, 2007, 22(5):397-404
- [19] 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.
- [20] De Las A I, Heras S, Saint-Jean R, *et al.* Immunogenic and protective effects of an oral DNA vaccine against infectious pancreatic necrosis virus in fish[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 28(4):562-570.
- [21] Betty C A, David Y G, Mary K E. Ultra-structural study of rotavirus replication in cultured cells[J]. *Journal of General Virology*, 1980, 46:75-85.
- [22] Burns J W, Siadat P M, Krishanane A A, *et al.* Protective effect of rotavirus VP6-specific IgA monoclonal antibodies that lack neutralizing activity [J]. *Science*, 1996, 272(5258):104-107.
- [23] Yu J, William L. Expression of rotavirus capsid protein VP6 in transgenic potato and its oral immunogenicity in mice [J]. *Transgenic Research*, 2003, 12(2):163-169.
- [24] Manning D S, Leong J C. Expression in *Escherichia coli* of the large genomic segment of infectious pancreatic necrosis virus [J]. *Virology*, 1990, 179(1):16-25.
- [25] Chrnyk B A, Evans J, Lillquist J, *et al.* Inclusion body formation and protein stability in sequence variants of interleukin21 [J]. *Biological Chemistry*, 1993, 268(24):18053-18061.
- [26] 刘志伟, 龙北国, 赵卫. SARS 冠状病毒 Mc 区原核表达及包涵体复性的研究[J]. *微生物学免疫学进展*, 2007, 35(3):12-15.

Prokaryotic expression, purification and immune efficacy of VP6 protein of grass carp reovirus

LIU Lin¹, XU Shi-ying^{2,3}, LI Jing-hui², ZOU Yong², NI Jin-di², YANG Yuan-jie²,
CAO Guang-li¹, XUE Ren-yu¹, CHEN Hui², GONG Cheng-liang^{1*}

(1. School of Biology & Basic Medical Sciences, Soochow University, Suzhou 215123, China;

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

3. College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

Abstract: In order to study the immuno-protective efficacy of GCRV-VP6 subunit vaccine, the recombinant expression vector pET28a(+)-VP6 was constructed by cloning *vp6* gene of GCRV into the prokaryotic expression plasmid pET-28a(+). The results of SDS-PAGE and Western-blotting showed that the molecular mass of the recombinant VP6 protein was approximately 43 ku. The recombinant protein reached 20% of the total bacterial proteins, and was mainly in the form of insoluble bodies. The grass carp (60-120 g in body weight and 14-20 cm in body length) was immunized with 500 μ g purified VP6 protein by Ni²⁺ affinity chromatography and antibody titers in the blood of fish were determined by means of indirect agglutination reaction on the 14th, 21st, 28th, 49th and 70th days post-vaccination. The results showed that the specific antibody could be detected on the 14th day, reached peak on the 21st day and could be still detected on the 70th day after immunization. The fish in vaccinated group and control group were challenged with GCRV on 21st days after vaccine delivery and the relative survival rate in the vaccinated group was 100%. These results provided important academic foundation for research and development of GCRV genetic vaccine.

Key words: grass carp reovirus; prokaryotic expression; purification; immunize

Corresponding author: GONG Cheng-liang. E-mail: gongcl@suda.edu.cn