

传染性胰腺坏死病病毒分离株 VP2 基因抗原表位区 融合表达及免疫特性的分析

王健楠¹, 赵丽丽², 刘立月², 连科迅², 李一经², 葛俊伟², 刘 敏^{1*}

(1. 东北农业大学动物科学与技术学院, 黑龙江 哈尔滨 150030;

2. 东北农业大学动物医学学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: 利用 RT-PCR 方法扩增出 IPNV-ZYX 分离株主要结构蛋白 VP2 的抗原表位区基因(616 bp), 命名为 IPNV VP2 COE, 将其克隆到 pCold TF 表达载体中构建重组质粒 pCold TF-VP2 COE, 在大肠杆菌 BL21(DH5 α)感受态表达, 经 SDS-PAGE 电泳分析, 表达蛋白约 78 ku, 用镍离子亲和层析柱纯化该蛋白, 制备抗血清, 间接 ELISA 结果显示, IPNV (ATCC VR-1318) 细胞培养物与鼠抗 VP2 COE 蛋白血清发生特异性反应, 效价为 1 : 12 800; 间接免疫荧光结果显示, 鼠抗 VP2 COE 血清可与黑龙江某渔场已知感染 IPNV 虹鳟肝组织产生特异性的荧光, 以上两项结果表明, 表达 IPNV VP2 COE 蛋白具有良好的免疫原性和免疫反应性, 为 IPNV 检测方法的建立及疫苗的制备提供理论依据。

关键词: IPNV-ZYX 分离株; VP2 COE 蛋白; 原核表达; 免疫特性

中图分类号: Q 785; S 941.41

文献标志码: A

传染性胰腺坏死病(infectious pancreatic necrosis virus, IPNV)隶属于双 RNA 病毒科, 水生双链 RNA 病毒属, 是引起鲑科鱼类肝胰腺等内脏实质器官出血和坏死的主要病原。由其引起的传染性胰腺坏死病是一种急性、高度接触性传染病, 对 14~70 d 的稚鱼易感, 致死率高达 90%^[1]。1957 年 Snieszko 在美国河鳟(*Salvelinus fontinalis*)病鱼体内分离得到病毒, 1964 年 Wolf 对病毒的特性作了较为详细的研究, 目前该病在北美、南美、欧洲、亚洲和南非的各国广泛流行^[2]。20 世纪 80 年代中期, 该病毒传入中国, 江育林^[3] 1989 年首次分离得到 IPNV。由于我国鲑鳟渔业养殖规模的不断扩大以及进口贸易的增加, 近年来在我国的东北三省、山东、山西、陕西、甘肃及台湾等地均暴发有该病, 给水产养殖业造成巨大经济损失。

传染性胰腺坏死病病毒的病毒粒子由无囊膜的衣壳包围着 A、B 两个线状双股 RNA 分子组成, 直径为 50~70 nm^[4]。A 段基因大小为 3 097 bp, 含

有 2 个重叠的开放阅读框(ORFs), 小阅读框编码一个 17 ku 多肽 VP5, 只存在于被感染的细胞中, 在天然病毒株中不编码 VP5^[5]; 大阅读框编码由 pVP2-VP4-VP3 组成的多聚蛋白前体, 分子量大小为 106 ku, 在病毒成熟时, pVP2 进一步形成 IPNV 的外壳蛋白 VP2(54 ku)。VP2 蛋白是 IPNV 的主要保护性抗原, 含有该病毒主要的血清型特异性抗原决定簇和能够诱导机体产生中和抗体, 其诱导的中和抗体能保护宿主不受 IPNV 的感染^[6-9]。Petter 等^[10]分析 IPNV VP2 抗原表位位于 153~330 氨基酸。

在大肠杆菌中表达重组蛋白具有遗传背景清楚、目的基因表达水平高、培养周期短、抗污染能力强等特点, 是重组蛋白药物研究和生产中使用最广泛的表达系统^[11-12]。其中关键的问题是选用合适的表达载体, 现已建立的大肠杆菌表达系统有融合表达、非融合表达、分泌表达、带纯化标签的表达载体等, 而融合表达载体又有 pET 系列、

收稿日期: 2012-01-04

修回日期: 2012-02-23

资助项目: 国家科技支撑计划(2012BAD25B02); 黑龙江省教育厅科技项目(11541019)

通讯作者: 刘 敏, E-mail: liumin-707@163.com

pGEX 等。表达载体的类型虽多, 但选择合适的、满足人们需求的表达载体却很难, 笔者曾尝试了多种表达载体表达 VP2 COE 蛋白, 效果均不理想, 如 pET 系列及 pProEx HTb 表达载体表达目的蛋白以包涵体形式存在、pGEX-6p-1 虽可溶表达, 但表达量比例较小。

本研究利用原核表达载体 pCold 表达 IPNV-ZYX 分离株 VP2 蛋白抗原表位区基因(616 bp), 获得重组融合蛋白 pCold TF-VP2 COE, 制备抗 VP2 COE 融合蛋白血清, 并初步研究融合蛋白 VP2 COE 的原核表达特性和免疫特性, 为 VP2 蛋白在 IPNV 诊断和免疫防治方面的研究奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

毒株、菌株和质粒 IPNV(Sp 株)购自美国 ATCC, 编号为 VR-1318, IPNV-ZYX 分离株由本实验室分离保存, EPC 细胞由深圳出入境检验检疫局江育林教授惠赠, *Escherichia coli* BL21(DH5 α)菌株、pCold TF 载体由本实验室保存。

主要试剂 少量 DNA 胶回收试剂盒、质粒抽提试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司, 限制性内切酶购自 TaKaRa 公司, T₄ DNA 连接酶购自 NEB 公司, Earthox-His 标签抗体、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 购自 Sigma 公司, FITC 标记的羊抗鼠 IgG 购自北京中杉生物有限公司。

引物 上游引物 P1 5'-GGATCCACGAACCCC CAGGACAAAG-3' 含有 BamH I 酶切位点和下游引物 P2 5'-CTGCAGTGATTGGTCTGAGCACG-3' 含有 Pst I 酶切位点。由上海生工生物公司合成。

1.2 VP2 COE 基因的克隆

经 EPC 细胞繁殖的 IPNV-ZYX 分离毒细胞培养毒, Trizol 裂解后, 以氯仿、异丙醇抽提病毒总 RNA, 经逆转录后, 以 P1 和 P2 为引物通过 PCR 方法扩增 VP2 COE 基因片段。经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分离后, 用胶回收纯化试剂盒回收目的片段。并将纯化的 VP2 COE 基因与 pMD18-T Simple 载体连接, 16 °C 连接 3 h, 转化到 JM109 感受态细胞中。筛选阳性质粒。经酶切, PCR 鉴定。阳性菌命名为 pMD18-T-VP2 COE, 送测序公司测序。

1.3 重组表达质粒 pCold TF-VP2 COE 的构建

重组质粒 pMD18-T-VP2 COE 和原核表达载体 pCold TF 质粒, 分别经 BamH I 和 Pst I 双酶切

后, 经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分离后, 胶回收纯化试剂盒切胶回收两段目的基因, 将 VP2 COE 和 pCold TF 用 T₄ DNA 连接酶连接, 16 °C 连接 12 h, 转化大肠杆菌 JM109 感受态。涂布含 50 μ g/mL 的氨苄抗性的平板, 37 °C 过夜培养。挑取单个菌落提取质粒, 经酶切、PCR 鉴定。

1.4 重组表达质粒 pCold TF-VP2 COE 的鉴定

经 BamH I 和 Pst I 双酶切的 pCold TF 和 VP2 COE 基因连接后, 转化 JM109 感受态, 涂布 LB 平板培养后, 挑取 pCold TF-VP2 COE/JM109 单菌落过夜培养, 提取质粒, 经 BamH I 和 Pst I 单、双酶切鉴定, 并用 P1 和 P2 引物进行 PCR 扩增。0.8% 琼脂糖凝胶电泳结果表明, PCR 产物和双酶切得到的目的片段均与预期大小的核酸片段相同(图 1)。测序结果表明, VP2 COE 基因被正确地插入到 pCold TF 载体上。

1.5 重组蛋白的诱导表达、纯化及鉴定

将重组质粒 pCold TF-VP2 COE 转化大肠杆菌 BL21(DH5 α)感受态细胞, 37 °C 振荡培养 OD_{600nm} 值达 0.6 时, 15 °C 200 r/min 振荡培养 30 min, 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 15 °C 诱导 24 h 进行表达。菌液经超声波破碎后, 4 °C, 5 000 r/min 离心 10 min, 进行 SDS-PAGE 分析。用镍离子亲和层析柱纯化 VP2 COE 蛋白。

将诱导后的 VP2 COE 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳并转膜, 以 Earthox-His 标签抗体孵育, 进行 Western-blotting 分析。

1.6 抗血清的制备

将纯化的蛋白与等量的弗氏完全佐剂混合乳化, 腹腔注射 6~8 周龄 BALB/c 雌鼠, 每只 50 μ g。接种前鼠尾静脉无菌采血, 分离血清, 作为阴性血清。首免 14 d 后, 用纯化蛋白与等量的弗氏不完全佐剂混合乳化进行第二次免疫接种, 以后每隔两周加强免疫一次, 3 次免疫后第 10 天鼠眼球采血, 无菌分离血清, -80 °C 保存。

1.7 抗体效价的检测及免疫原性的分析

用重组 VP2 COE 蛋白包被 ELISA 板, 鼠抗 VP2 COE 蛋白血清和鼠阴性血清为一抗, HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 作为二抗, OPD 显色。结果判定: 当 P/N=(阳性血清 OD_{490 nm} 的值 - 空白孔 OD_{490 nm} 的值)/(阴性血清 OD_{490 nm} 的值 - 空白孔 OD_{490 nm} 的值)>2 时, 阳性血清的最大稀释度即为血清抗

体效价。

同时用感染 IPNV Sp(VR-1318)的细胞培养物包被 ELISA 板,用同样的方法测定 VP2 COE 蛋白抗血清与病毒的反应性。

1.8 间接免疫荧光(IFA)检测免疫原性

参照文献[2]介绍的常规方法制备 EPC 单层爬片,12 h 后接种 IPNV Sp(VR-1318),接毒后 24 h 分别取出接毒细胞爬片。将制备好的接毒爬片和黑龙江某渔场已知感染 IPNV 虹鳟肝组织触片同时用 4%多聚甲醛室温固定 30 min, PBS 缓冲液洗涤 3 次; 0.3%的 BSA 37 °C 封闭 1 h, PBS 缓冲液洗涤 3 次; 加入鼠抗 VP2 COE 蛋白血清和鼠阴性血清, 37 °C 作用 1 h, PBS 缓冲液洗涤 3 次; 加入 FITC 标记的羊抗鼠 IgG, 37 °C 作用 30 min, PBS 缓冲液洗涤; 荧光显微镜观察结果。

2 结果与分析

2.1 VP2 COE 基因的克隆及重组质粒的鉴定

随机挑取单菌落于 5 mL 含有氨苄抗性的 LB 液体培养基中,提取重组质粒分别进行单、双酶切鉴定和 PCR 鉴定, 0.8%琼脂糖凝胶电泳结果表明, PCR 产物和单、双酶切得到的目的片段均与预期大小的核酸片段相同(616 bp), 测序结果显示成功获得 VP2 COE 基因(结果未显示)。

2.2 重组表达质粒 pCold TF-VP2 COE 的鉴定

重组质粒 pCold TF-VP2 COE 单、双酶切及 PCR 产物经 0.8%琼脂糖凝胶电泳分析与预期的目的片段大小相符, 可用于诱导表达(图 1)。

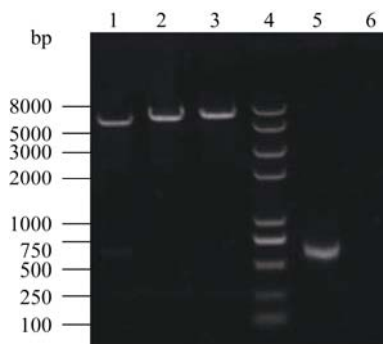


图 1 重组表达质粒 pCold TF-VP2 COE 酶切和 PCR 鉴定结果

1. *Bam*H I 和 *Pst* I 双酶切; 2. *Pst* I 单酶切; 3. *Bam*H I 单酶切; 4. DNA marker DL8 000; 5. PCR 鉴定结果; 6. PCR 阴性对照。

Fig. 1 Restriction map of pCold TF-VP2 COE

1. *Bam*H I /*Pst* I; 2. *Pst* I; 3. *Bam*H I; 4. DNA marker DL8 000; 5. PCR product; 6. PCR negative control.

2.3 重组蛋白的诱导表达纯化及鉴定

经 SDS-PAGE 分析, pCold TF-VP2 COE/BL21 (DH5 α)重组菌经 IPTG 诱导后在 78 ku 处出现明显的目的蛋白条带, 与 DNASTar 软件预测的理论值 78 ku 相符, 同时将收集的菌液进行超声波破碎, 离心后取其上清和沉淀分别进行 SDS-PAGE 分析, 结果表明在上清中目的蛋白的量较大, 而沉淀中仅有少量的目的蛋白, 说明目的蛋白以可溶形式表达(图 2)。

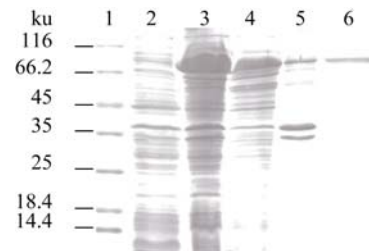


图 2 重组表达质粒 pCold TF-VP2 COE 诱导表达 SDS-PAGE 鉴定结果

1. 蛋白 Marker; 2. 诱导前; 3. 诱导后; 4. 超声上清; 5. 超声沉淀; 6. 纯化 VP2 COE 蛋白。

Fig. 2 SDS-PAGE profile of expressed protein

1. protein marker; 2. uninduced bacteria; 3. induced products; 4. supernatant after supersonic; 5. precipitation after supersonic; 6. purification of VP2 COE protein.

重组蛋白经 SDS-PAGE 转印到 NC 膜上, 商品化 Earthox-His 标签抗体血清 1 : 5 000 稀释作用, Western-blotting 结果如图 3, 诱导后的菌体蛋白和纯化的 VP2 COE 蛋白在 70~80 ku 处出现了明显的特异性条带, 且反应条带单一。这与 SDS-PAGE 出现的蛋白目的带位置相符。而对照未经诱导的菌体蛋白无条带产生。Western-blotting 结果说明重组蛋白已经成功表达。

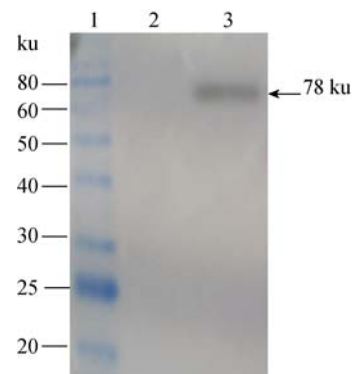


图 3 表达目的蛋白的 Western-blotting 检测

1. 预染蛋白 Marker; 2. 诱导前; 3. 诱导后。

Fig. 3 The identification of expressed protein by Western-blotting

1. Prestained protein marker; 2. uninduced bacteria; 3. induced products.

2.4 免疫小鼠血清抗体水平及免疫原性的分析

将本实验制备的鼠抗 VP2 COE 蛋白血清作为阳性血清, 免疫接种前鼠血清作为阴性血清, 重组 VP2 COE 蛋白作为抗原, 进行间接 ELISA 试验。结果表明, 抗血清与相应的抗原有较强的反应性, 满足 $P/N > 2$ 时, 血清的最大稀释度分别为 1 : 51 200, 即为制备的鼠抗 VP2 COE 蛋白血清效价(表 1)。

用感染 IPNV Sp(VR-1318)的包培养物包被 ELISA 板, 和鼠抗 VP2 COE 蛋白血清作为阳性血清, 免疫接种前鼠的血清作为阴性血清, 两者都倍比稀释, 进行间接 ELISA 实验, 结果如图 4。从结果可以看出, 抗 VP2 COE 蛋白的鼠血清稀释度为 1 : 12 800 时, P/N 仍大于 2。说明制备的抗血清与 IPNV Sp(VR-1318)全病毒抗原发生较强的特异性反应, 抗 VP2 COE 蛋白的免疫血清能够识别 IPNV 抗原, 表明实验所诱导表达的蛋白具有良好的免疫原性, 可以诱导小鼠产生较高水平的免疫应答反应。

2.5 间接免疫荧光检测免疫原性

分别以感染 IPNV Sp(VR-1318)的细胞和已知感染 IPNV 虹鳟肝组织作为抗原, 鼠抗 VP2 COE 蛋白血清作为阳性血清, 免疫前鼠的血清作为阴性血清, 进行间接免疫荧光实验, 结果如图 5。从结果可以看出, 制备抗血清与病料和 IPNV Sp (VR-1318)均反应, 呈现绿色荧光病灶, 表明鼠抗 VP2 COE 蛋白血清特异性强, 再次表明表达的重组蛋白具有和天然蛋白一样的免疫原性。

3 讨论

传染性胰腺坏死病是一种重要的水生动物病毒性疾病, 死亡率极高, 给虹鳟的养殖业带来巨大的经济损失^[13]。通过疫苗进行免疫防治是预防和控制该疾病的主要措施, 而疫苗研制的前提是病原免疫特性的基础研究。因此, 进行传染性胰腺坏死病毒主要结构蛋白的表达及其免疫原性等方面的

研究, 对开展该病毒的免疫防治工作尤为重要。

VP2 蛋白作为 IPNV 的主要衣壳蛋白, 占病毒蛋白总量的 62%。VP2 蛋白的中心可变区由 150 个氨基酸组成(200~350 氨基酸), 包含病毒的血清型表位和抗原表位^[14]。Heppell 等^[15]和 Blake 等^[16]确定 VP2 多聚蛋白的高变区位于 183(243)~335 氨基酸。同时, VP2 蛋白还携带决定病毒毒力和适应细胞培养的因子^[17]。以往的研究证实, VP2 蛋白的 217~221 氨基酸残基与病毒毒性有关^[18]。Petter 等^[19]将 IPNV VP2 基因克隆到大肠杆菌表达系统中, 通过诱导后表达 VP2 蛋白的菌液裂解液接种到虹鳟体内, 在受试鱼血清中检测到了抗 IPNV 的抗体; Labus 等^[20]比较了截短的 VP2 基因在细菌、酵母、鱼和哺乳动物细胞表达 VP2 蛋白的免疫原性, 虽然 4 种不同表达系统诱导的抗体滴度是相似的, 但由于在酵母、鱼和哺乳动物细胞上表达的 VP2 蛋白更接近于全病毒的免疫原性。因此, 本实验选取 VP2 基因中和表位和血清型表位区域, 利用大肠杆菌表达系统成功表达融合蛋白, 并在 BALB/c 上制备抗血清, 以期表达重组蛋白的免疫特性接近天然 IPNV VP2 蛋白, 为 IPNV-ZYX 分离株 VP2 基因结构与功能的深入研究、建立 IPNV 的诊断方法和进一步研究抗 IPNV VP2 蛋白的免疫保护作用提供理论依据。

以往研究表明, 原核表达的 VP2 蛋白多以包涵体形式存在^[10,19-21], 其原因可能在于该蛋白在大肠杆菌中不能够折叠、二硫键不能正确配对、过多蛋白间的非特异性结合。表达载体是影响蛋白表达的最关键因素。pCold 低温表达载体能够促进二硫键的正确结合, 防止蛋白质错误折叠, pCold DNA 通过利用一种来自大肠杆菌自身在低温诱导时产生的 *cspA* 启动子, 可使大肠杆菌在 15 °C 低温下表达重组蛋白, 同时, 在 *cspA* 启动子的下游, 有 *Lac* 操纵子插入, 严格地控制表达进行, 有效地控制了蛋白质折叠速率、促进目的蛋白正确折叠, 成功地

表 1 间接 ELISA 检测 VP2 COE 蛋白结果
Tab. 1 The indirect ELISA result of inspection

抗 VP2 COE 蛋白血清稀释度 serum dilution ratio	1 : 100	1 : 800	1 : 6 400	1 : 51 200
阳性血清 positive	3.5523±0.0234	2.9480±0.0847	2.5537±0.0383	0.5137±0.0147
阴性血清 negative	0.0503±0.00186	0.04733±0.00067	0.04367±0.0003	0.05167±0.00233

注: $P/N = (\text{阳性血清 } OD_{490 \text{ nm}} \text{ 的值} - \text{空白孔 } OD_{490 \text{ nm}} \text{ 的值}) / (\text{阴性血清 } OD_{490 \text{ nm}} \text{ 的值} - \text{空白孔 } OD_{490 \text{ nm}} \text{ 的值}) > 2$, 则判断为阳性。

Notes: $P/N = (\text{positive } OD_{490 \text{ nm}} - \text{blank } OD_{490 \text{ nm}}) / (\text{negative } OD_{490 \text{ nm}} - \text{blank } OD_{490 \text{ nm}}) > 2$, it's positive.

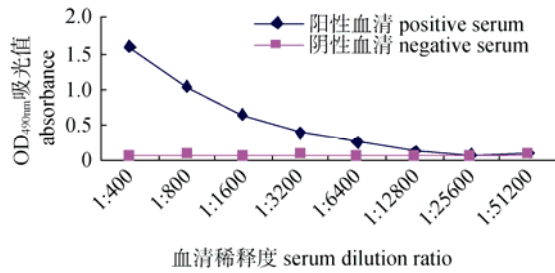


图 4 间接ELISA检测抗VP2 COE 蛋白鼠血清免疫原性结果
Fig. 4 The result of VP2 COE protein infected BALB/c serum

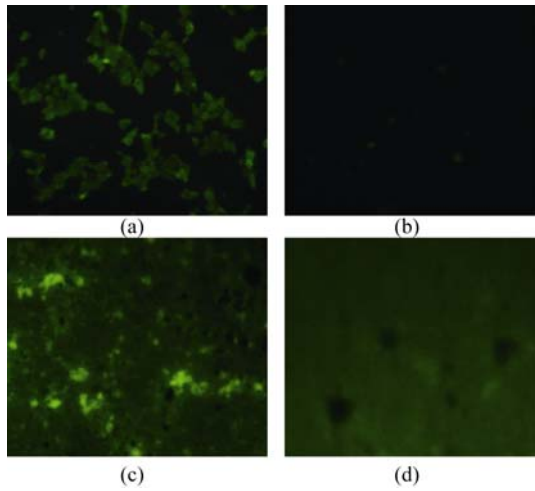


图 5 间接免疫荧光检测抗 VP2 COE 蛋白鼠血清结果(400×)

(a) 阳性血清 IFA 结果; (b) 阴性血清 IFA 结果; (c) 阳性血清 IFA 检验患病虹鳟肝触片; (d) 阴性血清 IFA 检验患病虹鳟肝触片。

Fig. 5 The IFA result of the antisera against VP2 COE protein (400×)

(a) the IFA result of positive serum; (b) the IFA result of negative serum; (c) the IFA result of testing liver samples of rainbow trout naturally infected with IPNV by positive serum; (d) the IFA result of testing liver samples of rainbow trout naturally infected with IPNV by negative serum.

使目的蛋白在大肠杆菌中实现可溶性表达, 并得到较高的蛋白产量。本实验利用 pCold 原核表达载体表达的 VP2 COE 蛋白以可溶形式存在, 容易纯化, 纯化后得到了单一的较纯的目的蛋白, 而且不需要包涵体变性和复性条件的摸索。通过间接 ELISA 和间接免疫荧光实验表明, 鼠抗 VP2 COE 蛋白的血清可与 IPNV Sp(VR-1318) 特异反应, 表明表达融合蛋白 VP2 COE 具有良好的免疫原性和反应原性。同时, 利用间接免疫荧光方法从已知感染 IPNV 虹鳟肝组织中检测到 IPNV 病毒粒子的存在, 因此, VP2 COE 蛋白可作为 IPNV 的诊断抗原,

并且为间接免疫荧光检测 IPNV 方法的建立提供了更加现实的理论依据。

参考文献:

- [1] Wolf K, Snieszko S, Dunbar C, *et al.* Virus nature of infectious pancreatic necrosis in trout[J]. Proceedings of The Society for Experimental Biology and Medicine, 1960, 104(5): 105–108
- [2] Hill B J. Infectious pancreatic necrosis virus and its virulence[M]. London: Academic Press, 1982
- [3] 江育林. 虹鳟传染性胰腺坏死病毒(IPNV)的初步研究[J]. 水生生物学报, 1989, 13(4): 353–358.
- [4] Dobos P, Hill B J, Hallett R, *et al.* Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes[J]. Journal of Virology, 1979, 32(2): 593–605.
- [5] Magyar G, Dobos P. Evidence for the detection of the infectious pancreatic necrosis virus polyprotein and the 17 kDa polypeptide in infected cells and of the NS protease in purified virus[J]. Virology, 1994, 204(2): 580–589.
- [6] Bayliss C D, Spies U, Shaw K, *et al.* A comparison of the sequences of segment A of four infectious bursal disease virus strains and identification of a variable region in VP2[J]. Journal of General Virology, 1990, 71(6): 1303–1312.
- [7] Pryade A, Melvin W T, Munro A L S. Nucleotide sequence analysis of the serotype-specific epitope of infectious pancreatic necrosis virus[J]. Archives of Virology, 1993, 129(1–4): 278–293.
- [8] Caswell, Reno P, Nicholson B. Monoclonal antibodies to infectious pancreatic necrosis virus: analysis of viral epitopes and comparison of different isolates[J]. Journal of General Virology, 1986, 67(10): 2193–2205.
- [9] Esther T, Berthiaume L, Grothe S, *et al.* Evidence of a major neutralizable conformational epitope region on VP2 of infectious pancreatic necrosis virus[J]. Journal of General Virology, 1995, 76(3): 551–558.
- [10] Petter F, Leiv S H, Bjarte L, *et al.* Mapping of neutralization epitopes on infectious pancreatic necrosis viruses[J]. Journal of General Virology, 1995, 76(5): 1165–1172.
- [11] Baneyx F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*[J]. Current Opinion in Biotechnology, 1999, 10(5): 411–421.
- [12] Makrides S C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*[J]. Microbiology Reviews, 1996, 60(3): 512–538.
- [13] 刘新建, 李贵生. 国内鱼类病毒病研究进展[J]. 生态科学, 2004, 23(3): 282–285.

- [14] Haverstein L S, Kalland K H, Christie K E, *et al.* Sequence of the large double-stranded RNA segment of the N1 strain of infectious pancreatic necrosis virus: a comparison with other Birnaviridae[J]. *Journal of General Virology*, 1991, 71(2): 299–308.
- [15] Heppell J, Tarrab E, Berthiaume L, *et al.* Characterization of the small open reading frame on genome segment A of infectious pancreatic necrosis virus[J]. *Journal of General Virology*, 1995, 76(8): 2091–2096.
- [16] Blake S, Ma J Y, Caporale D A, *et al.* Phylogenetic relationships of aquatic birnaviruses based on deduced amino acid sequences of genome segment A cDNA[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2001, 45(2): 89–102.
- [17] Hong J R, Gong H Y, Wu J L, *et al.* A novel Anti-apoptosis gene of the Bcl-2 family, regulates Mcl-1 and viral protein expression[J]. *Virology*, 2002, 295(2): 217–229.
- [18] Song H, Santi N, Evensen O, *et al.* Molecular determinants of infectious pancreatic necrosis virus virulence and cell culture adaptation[J]. *Journal of Virology*, 2005, 79(16): 10289–10299.
- [19] Petter F, Knut B, Curt E, *et al.* Analysis of the antibody response in Atlantic salmon against recombinant VP2 of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 1998, 8(6): 447–456.
- [20] Labus M B, Breeman S, Anthony E, *et al.* Antigenic comparison of a truncated form of VP2 of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus expressed in four different cell types[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2001, 11(3): 203–216.
- [21] Baney X. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 1999, 10(5): 411–21.

Prokaryotic expression and analysis of a recombinant fusion protein of epitope of VP2 gene of isolated strains of infectious pancreatic necrosis virus

WANG Jian-nan¹, ZHAO Li-li², LIU Li-yue², LIAN Ke-xun², LI Yi-jing², GE Jun-wei², LIU Min^{1*}

(1. College of Animal Science and Technology, Northeast Agriculture University, Harbin 150030, China;

2. College of Veterinary Medicine, Northeast Agriculture University, Harbin 150030, China)

Abstract: Infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) is a major viral pathogen of salmonid fish and causes serious economic losses to salmonid aquaculture. We amplified a 616 bp epitope of the VP2 gene from recent IPNV-ZYX isolated from farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) of China, and cloned into pCold TF vector (designated as pCold TF-VP2 COE). The expression of recombinant plasmid pCold TF-VP2 COE in *E. coli* BL21(DE3) was induced and detected by SDS-PAGE analysis. The predicted molecular weight for recombinant VP2 COE protein was approximately 78 ku and this was confirmed in this study. The fusion protein was purified with ProBondTM resin from the suspension centrifuged and the antisera against VP2 COE protein were produced. The prepared antisera reacted specifically with IPNV(ATCC VR-1318) antigen by indirect ELISA. The antisera against VP2 COE protein had OD values at least twice that obtained for the negative control serum at a dilution of 1:12 800. IFA showed specific reaction of the antisera against VP2 COE protein with liver samples of rainbow trout naturally infected with IPNV in Heilongjiang province. The results showed that the expressed VP2 COE protein was immunogenic and antigenic which was the same as the natural IPNV VP2 protein. All this work established a foundation for further study on vaccine and rapid diagnosis of IPNV.

Key words: IPNV-ZYX isolated; VP2 COE protein; prokaryotic expression; antisera

Corresponding author: LIU Min. E-mail: liumin-707@163.com