

传染性造血器官坏死病毒表面糖蛋白基因核酸疫苗的构建及对虹鳟血液生化指标的影响

何琦瑶¹, 魏文燕², 汪开毓^{1,3*}, 刘家星²

(1. 四川农业大学鱼病研究中心, 四川 成都 611130;

2. 成都市农林科学院, 四川 成都 611130;

3. 四川农业大学动物疫病与人类健康四川省重点实验室, 四川 成都 611130)

摘要: 为研究传染性造血器官坏死病毒(infectious hematopoietic necrosis virus, IHNV)表面糖蛋白(glycoprotein, G)基因核酸疫苗对虹鳟免疫保护效果及血液生化指标的影响, 将IHNV G基因克隆至pMD19-T载体中, 连接产物在DH5 α 中进行转化, 获取重组质粒pMD19-T-G后回收G基因片段。将鉴定正确的G基因片段利用BamH I和Xho I酶切位点克隆在真核表达载体pVAX1上, 构建核酸疫苗pVAX1-G。重组质粒pVAX1-G按照8 μ g/尾的剂量注射虹鳟设为pVAX1-G组, 同时设8 μ g/尾空质粒组、PBS对照组和空白组, 于免疫后21 d, 以100倍半数组织培养感染剂量(tissue culture infective dose, TCID₅₀)通过腹腔注射的方式进行攻毒实验, 计算核酸疫苗相对保护率(relative percent survival, RPS), 攻毒后收集免疫虹鳟血清进行血液指标检测。结果显示, 攻毒后虹鳟血清中16项指标中谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、总胆红素(TBIL)、总胆汁酸(TBA)、葡萄糖(GLU)、尿素(Urea)、肌酐(CREA)、总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)和球蛋白(GLO)与正常虹鳟相比有显著变化, 空载组11项指标较pVAX1-G组变化显著; 攻毒后14 d pVAX1-G组累积死亡率为19%(19/100), 而空载组和PBS对照组分别为62%(62/100)和85%(85/100)。pVAX1-G核酸疫苗对虹鳟免疫保护率为78%。病理学观察发现, 免疫pVAX1-G组虹鳟的肝脏、脾脏、肾脏组织未见明显损伤。综上表明, pVAX1-G作为核酸疫苗有助于减轻IHNV对虹鳟的损伤, 对IHNV有较好的免疫保护效果。

关键词: 虹鳟; 传染性造血器官坏死病毒; 核酸疫苗; 血液生化指标

中图分类号: S 941.41

文献标志码: A

虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)属于冷水鱼类, 属鲑形目(Salmoniformes)、鲑科(Salmonidae)、大麻哈鱼属(*Oncorhynchus*), 原产于美国阿拉斯加地区, 是世界粮农组织(FAO)大力推荐养殖的经济鱼类之一。随着虹鳟在我国的养殖规模不断扩大, 各种病害也接踵而至^[1]。其中病毒性疾病对虹鳟危害最严重, 如传染性造血器官坏死病(infectious hematopoietic necrosis, IHN), 该病是一种急性系统性疾病, 以脾脏和肾脏造血组织坏死

为主要特征, 患病鱼体侧肌肉线条状“V”形出血, 仔鱼可见点状出血, 死亡率极高。稚鱼可见腹部胀满、眼球突出、肌肉出血少, 解剖观察肾脏贫血明显, 组织学检查脾脏、肾脏、造血组织坏死严重^[2]。

传染性造血器官坏死病毒(infectious hematopoietic necrosis virus, IHNV)是IHN的病原, 属弹状病毒科(Rhabdoviridae)、诺拉弹状病毒属(*Novirhabdovirus*)。IHNV病毒颗粒为弹状, 大小为

收稿日期: 2018-07-27 修回日期: 2018-11-29

资助项目: 成都市农林科学院科研创新专项(2017-Y2500W-16)

通信作者: 汪开毓, E-mail: kywang1955@126.com

120~300 nm×60~100 nm,含一条线状、单股负链RNA,全基因组长度约为11 kb,包含*N*、*P*(*M1*)、*M2*、*G*、*NP*和*L* 6个基因,分别编码病毒核蛋白、磷蛋白、基质蛋白、糖蛋白、非结构蛋白和聚合酶蛋白^[2-3]。

IHNV的成熟糖蛋白(glycoprotein, G)包括胞外结构域、跨膜结构域和胞浆结构域3部分,在病毒粒子表面形成三聚体突起。G蛋白是病毒的主要抗原,能诱导产生中和抗体和刺激细胞产生免疫。通常选择糖蛋白基因作为抗原基因来构建核酸疫苗^[4]。渔用核酸疫苗能够诱导鱼类产生高水平保护性免疫应答,免疫效果已得到认可^[5-7]。同时核酸疫苗具有安全无污染,储存方便等特点,具有良好的发展前景。本研究用IHNV的*G*基因构建pVAX1-*G*核酸疫苗,免疫虹鳟后进行攻毒实验,结果显示,pVAX1-*G*核酸疫苗对虹鳟传染性造血器官坏死病免疫保护率达到78%,有较好的免疫保护效果。

血液是动物体内循环系统的重要组成部分,具有运输、体内防御、免疫、体液调节以及维持内环境稳定的作用。血液学指标能反映动物的生理状态,可用于评价鱼类的健康状况^[8-10]。血液生化指标是鱼类重要的生化指标之一,本研究检测了虹鳟血清中总蛋白(TP)、球蛋白(GLO)、白蛋白(ALB)、谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)、碱性磷酸酶(ALP)、总胆红素(TBIL)等16项血液生化指标,根据正常虹鳟与免疫虹鳟攻毒前后血液生化指标的变化推测虹鳟感染IHNV的程度,从而为疫苗的保护效果提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

JRT基因型IHNV分离株IHNV-201605由本实验室分离保存。胖头鲮(*Pimephales promelas*)肌肉细胞(FHM)由本实验室保存。pVAX1真核表达载体、pMD19-T simple载体、感受态细胞DH5 α 、DNA Marker、*Bam*H I和*Xho* I限制性内切酶购自生工生物工程(上海)股份有限公司。DP117无内毒素质粒大提试剂盒、DP103质粒小提试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。DNA胶回收试剂盒、Trizol试剂盒、PrimeScriptTMRT试剂盒均购自TaKaRa公司,其他试剂为国产分析纯。

1.2 引物设计与合成

利用Oligo 7设计*G*基因序列的特异性引物(参考序列JX 649101.1)F: 5'-GGATCCCCACCAT-GGTTGAGACCGAACGCAACTCGCAGAG-3', R: 5'-CTCGAGGGACCTGTTTGCCAGGT-GATACATGGGGATACT-3',扩增片段大小为1 553 bp;参考Williams等^[11]合成IHNV检测引物F: 5'-GTTCAACTTCAACGCCAACAGG-3', R: 5'-TGAAGTACCCCACCCCGAGCATCC-3',扩增片段大小为371 bp。引物序列均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.3 IHNV *G*基因扩增

取保存于-80 °C的IHNV-201605分离株病毒液接种于FHM,于15 °C吸附1 h后弃病毒液,加含2%胎牛血清和100 IU/mL双抗的改良杜氏伊格尔培养基(dulbecco MEM, DMEM)于15 °C培养并每日观察细胞情况。待约80%细胞出现细胞病变(cytopathic effect, CPE)后,收获病毒悬液于-80 °C保存备用。将病毒悬液反复冻融3次,用Trizol试剂盒提取病毒RNA,按照PrimeScriptTMRT试剂盒说明书反转录成cDNA,以反转录的cDNA为模板进行*G*基因的扩增。PCR扩增反应体系:12.5 μ L 2 \times TaqMaster Mix,上下游引物各1 μ L,2 μ L模板,ddH₂O补齐25 μ L;反应程序:预变性94 °C 5 min;94 °C变性1 min,60 °C退火1 min,72 °C延伸1 min,40个循环;72 °C终延伸10 min。通过1%的琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增产物的大小,PCR产物送擎科梓熙生物(成都)技术有限公司进行序列测定,将测序结果在NCBI数据库上进行BLAST比对。

1.4 核酸疫苗pVAX1-*G*的构建

将上述PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳后,参考DNA回收试剂盒说明书回收PCR产物。回收产物与pMD19-T载体于16 °C过夜连接,连接产物转化至DH5 α 感受态细胞中。挑取单菌落扩大培养后提取质粒并进行PCR和测序鉴定。提取鉴定正确的pMD19-T-*G*与真核载体pVAX1质粒,经*Bam*H I和*Xho* I双酶切后用T4连接酶16 °C过夜连接,将上步得到的连接产物转化至DH5 α 中,将其涂布于含有卡那霉素(100 μ g/mL)的LB固体培养基上,置于37 °C培养箱培养。12 h后观察并挑选菌落进行PCR鉴定,PCR鉴定正确的菌落接种

于10 mL含卡那霉素的LB液体培养基中,于37 °C 200 r/min振荡过夜培养。将培养的菌液使用DP103质粒小提试剂盒提取质粒,将抽提的重组质粒进行单酶切和双酶切鉴定,鉴定正确后送至擎科梓熙生物(成都)有限公司测序。对鉴定正确的阳性菌在1 000 mL的LB培养基中扩大培养,随后使用DP117质粒大提试剂盒提取质粒,通过核酸蛋白仪对质粒浓度进行检测。

1.5 虹鳟的免疫及攻毒实验

将100~150 g虹鳟随机分成100尾/组,设pVAX1-G核酸疫苗组、空质粒载体组及PBS对照组和空白组。实验室饲养水温维持在(12±3) °C,暂养1周,实验前2 d禁食。pVAX1-G核酸疫苗组虹鳟按照8 μg/尾于背鳍基部进行注射免疫。空质粒载体组以相同方法注射空质粒载体,PBS对照组每尾虹鳟注射50 μL PBS缓冲液,空白组为不免疫不攻毒的正常虹鳟,仅为血液指标检测的正常对照。免疫后21 d进行攻毒实验,pVAX1-G核酸疫苗组、空质粒载体组和PBS对照组虹鳟经胸鳍基部注射100× TCID₅₀的病毒液,攻毒后水温维持在(12±3) °C,充气增氧,定时喂料,连续观察14 d,记录各组虹鳟发病和死亡情况并采集组织进行PCR检测,PCR反应条件参考Williams等^[11]。根据公式计算疫苗免疫保护率:RPS(%)=[1-(免疫组死亡率/对照组死亡率)]×100%。

1.6 血液生化指标检测

在攻毒后第5天开始每组取5尾虹鳟采血,将血液置于灭菌离心管中,4 °C过夜后于4 °C,

2 000 r/min离心10 min,分离血清送公司进行TP、GLO、ALB、AST、ALT、ALP、TBIL、TBA、CREA、Urea、GLU、K⁺、Na⁺、Cl⁻、Ca²⁺及P⁴⁺等血液生化指标检测。

2 结果

2.1 G基因的扩增与重组质粒pVAX1-G的构建

以IHNV-201605株基因组RNA反转录的cDNA为模板扩增G基因。凝胶电泳分析结果显示,出现与目的条带大小一致的特异性条带(图1-a)。将该PCR产物序列BLAST显示,该基因序列与目的基因序列相同,说明成功获取G基因。将该片段与pMD19-T载体连接,转化后挑取单菌落,提取质粒后进行双酶切鉴定,电泳结果显示,酶切后获得与目的条带大小一致的特异性条带。说明G基因已成功与pMD19-T载体连接,将该重组质粒命名为pMD19-T-G。提取pMD19-T-G质粒,进行双酶切,酶切后用DNA回收试剂盒回收大小约为1 500 bp的目的片段,将回收的片段以相同方法与pVAX1表达载体连接,连接的重组质粒用BamH I和Xho I进行双酶切鉴定,电泳结果显示,酶切后获得与目的条带大小一致的特异性条带(图1-b),说明已获得正确的pVAX1-G重组质粒,大量提取pVAX1-G重组质粒保存于-80 °C备用。

2.2 核酸疫苗免疫保护实验

各组虹鳟于免疫后21 d进行攻毒实验,14 d内每天观察各组虹鳟死亡症状并统计死亡率。结

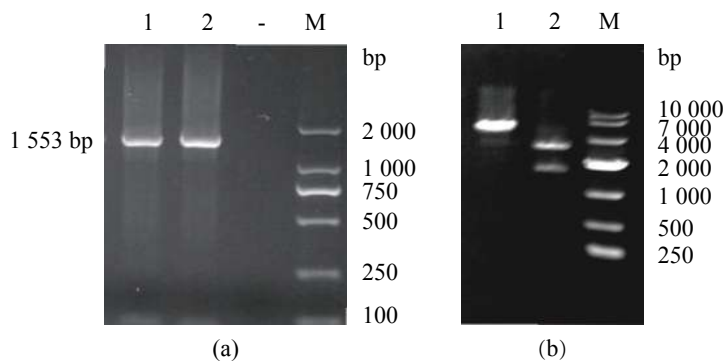


图1 凝胶电泳分析

(a) 1-2. G基因PCR产物, -, 阴性对照, M. DL2000分子量标准; (b) 1. pVAX1-G单酶切产物, 2. pVAX1-G双酶切; M. DL10000分子量标准; 下同

Fig. 1 Gel electrophoresis

(a) 1-2. G gene PCR products, -, negative control, M. DL2000 Marker; (b) 1. pVAX1-G digestion product, 2. pVAX1-G digestion product; M. DL10000 Marker; the same below

果显示,攻毒后3 d, PBS对照组虹鳟率先开始出现眼球突出、体色发黑、腹部膨大、肛门外拖有粪便等典型感染IHNV的症状并死亡,攻毒后4 d空载组虹鳟也出现相同发病症状并开始死亡,而pVAX1-G组虹鳟第5天才开始有少数的虹鳟出现死亡。攻毒后14 d内pVAX1-G组虹鳟的累计死亡率为19%(19/100),而空载组及PBS对照组的虹鳟累计死亡率分别为62%(62/100)和85%(85/100)(图2)。pVAX1-G核酸疫苗对攻毒IHNV的虹鳟相对保护率为78%。

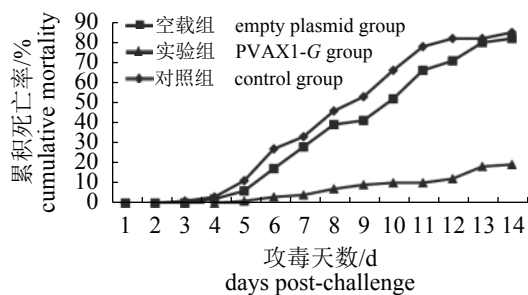


图2 攻毒实验结果

Fig. 2 Challenge of *O. mykiss*

2.3 PCR检测

提取攻毒后死亡虹鳟组织RNA并反转录为cDNA,经PCR扩增后产物经1%琼脂糖凝胶电泳,结果显示,空载组和pVAX1-G组在371 bp处均可见特异性的单一条带(图3),与预期条带大小一致。将扩增条带测序结果与GenBank中已知核酸序列进行BLAST比对,结果显示,该序列与GenBank中IHNV基因99%的同源性,提示感染IHNV是虹鳟致死的原因。

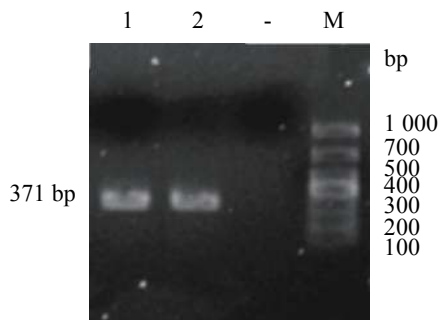


图3 IHNV PCR检测

M. DL1000分子量标准; - 阴性对照

Fig. 3 The PCR detection of IHNV

M. DL 1000 DNA marker; - negative control

2.4 生化指标检测结果

空载组虹鳟血清中的ALT、GLU、Urea和CREA含量均极显著高于空白组($P < 0.01$)。ALT、AST、ALP活性分别在空载组、pVAX1-G、空白组呈现递减趋势,且pVAX1-G组虹鳟血清中ALT、AST、ALP活性比空载组低(图4-a)。虹鳟血清中TBIL、TBA、GLU、Urea、CREA含量均呈现空白组 < pVAX1-G组 < 空载组的趋势,与空白组相比,IHNV感染虹鳟后TBIL、TBA和GLU都升高;血清中Urea、CREA含量也显著增高($P < 0.05$)。且空载组较pVAX1-G组变化更为明显(图4-b)。空载组虹鳟血清中的TP含量极显著低于空白组($P < 0.01$),ALB含量极显著低于空白组($P < 0.001$),GLO含量相比空白组具有显著性差异($P < 0.05$)。虹鳟血清中TP、ALB、GLO含量均为空白组 > pVAX1-G组 > 空载组;攻毒虹鳟TP、ALB、GLO含量均低于正常虹鳟,pVAX1-G组与对照组TP、ALB、GLO含量较为接近(图4-c)。IHNV感染后,虹鳟血清中 K^+ 、 Na^+ 和 Cl^- 含量无显著性差异($P > 0.05$), P^{5+} 和 Ca^{2+} 含量有降低的趋势(图4-d)。

2.5 组织病理学观察

经石蜡切片、H.E染色后观察发现,IHNV攻毒后主要损伤虹鳟肝脏、脾脏和肾脏组织,未免疫pVAX1-G的虹鳟攻毒后肝脏、脾脏和肾脏组织损伤较为严重。虹鳟的正常肝细胞形态为卵圆或椭圆、肝细胞饱满、细胞结构清晰完整、细胞核形状规则。肝细胞连接紧密,细胞边界清晰。肝索排列整齐,血窦结构清晰(图版-1)。pVAX1-G疫苗组虹鳟攻毒后肝细胞间连接疏松,间隙增宽,箭头所示可见少量炎性细胞浸润(图版-2)。未免疫疫苗虹鳟攻毒后肝组织损伤严重,呈坏死状态。肝细胞肿大,细胞轮廓模糊,肝组织大面积空泡变性,箭头所示肝细胞内有空泡形成(图版-3)。肝组织内肝细胞疏松,狄氏间隙水肿,间隙明显增宽。间质内可见大小不同炎症灶,灶内可见增生的结缔组织及浸润的炎性细胞。箭头所示大量炎性细胞浸润(图版-4)。pVAX1-G疫苗组虹鳟攻毒后肾脏组织未见明显病变,肾间质可见丰富造血细胞。肾小管上皮细胞结构完整,细胞核为圆形或椭圆形(图版-5)。未免疫pVAX1-G的虹鳟攻毒后肾实质坏死,肾小管上皮细胞脱落,部分肾小管结构模糊。箭头所示肾间质水肿,肾间质细胞成分减少(图版-6)。pVAX1-G疫苗组虹鳟

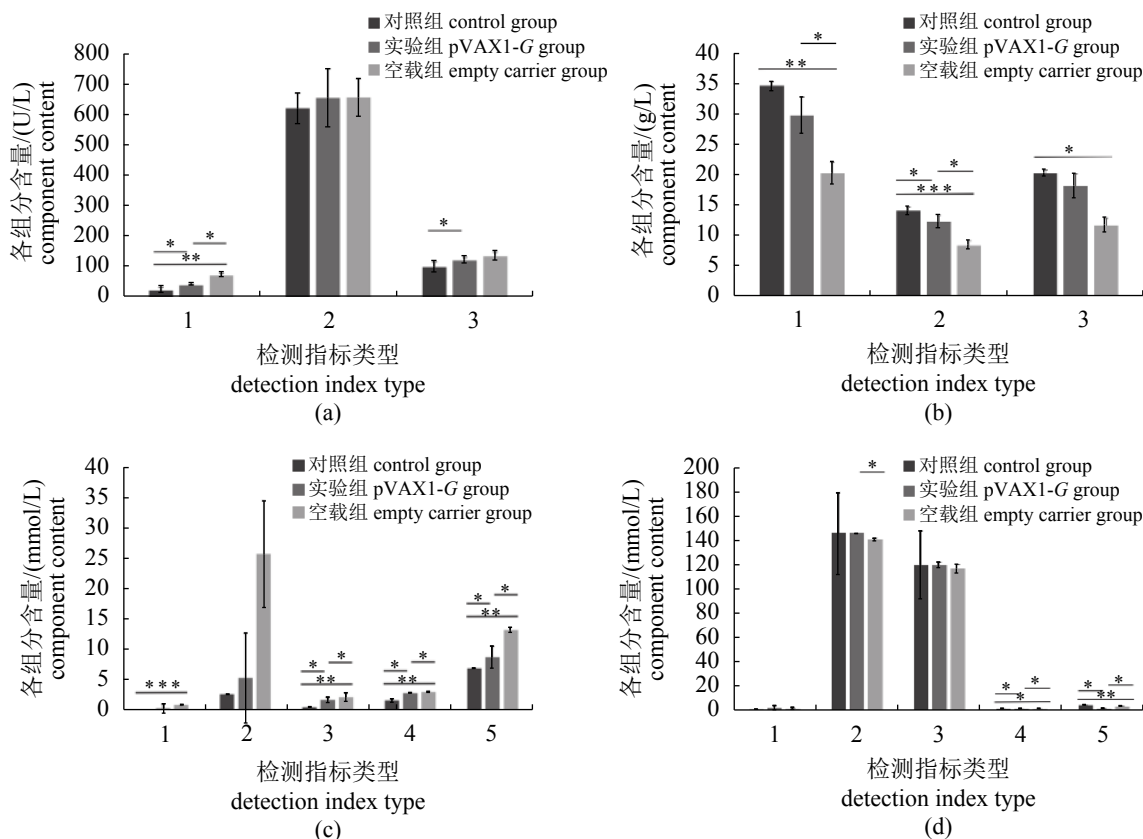


图4 血液生化指标检测结果

(a) 1. 谷丙转氨酶, 2. 谷草转氨酶, 3. 碱性磷酸酶; (b) 1. 总蛋白, 2. 白蛋白, 3. 球蛋白; (c) 1. 总胆红素, 2. 总胆汁酸, 3. 血糖, 4. 尿素, 5. 血肌酐; (d) 1. 钾离子, 2. 钠离子, 3. 氯离子, 4. 钙离子, 5. 磷离子; *. $P < 0.05$, **. $P < 0.01$, ***. $P < 0.001$

Fig. 4 The results of the blood biochemistry

(a) 1. ALT, 2. AST, 3. ALP; (b) 1. TP, 2. ALB, 3. GLO, (c) 1. TBIL, 2. TBA, 3. GLU, 4. Urea, 5. CREA; (d) 1. K^+ , 2. Na^+ , 3. Cl^- , 4. Ca^{2+} , 5. P^{5+} ; *. $P < 0.05$, **. $P < 0.01$, ***. $P < 0.001$

攻毒后脾脏组织未见明显病变, 脾脏组织结构完整, 脾索、脾血窦清晰可见(图版-7)。未免疫pVAX1-G的虹鳟攻毒后脾脏内细胞成分减少, 箭头所示为脾造血组织坏死(图版-8)。

3 讨论

本实验用构建的重组质粒pVAX1-G对虹鳟进行免疫, 同时设空载组和PBS对照组, 免疫后用 $100 \times TCID_{50}$ IHNV病毒液进行攻毒。攻毒后pVAX1-G组、空载组及PBS对照组的累计死亡率分别为19%、62%和85%, 说明pVAX1-G能有效降低虹鳟感染IHNV的死亡率。根据虹鳟IHNV核酸疫苗研究的相关报道显示, 在载体pcDNA3.1上构建的IHNV核酸疫苗免疫虹鳟, 对虹鳟攻毒IHNV后的免疫保护率为72%~94%^[18]。本实验构建的pVAX1-G核酸疫苗对攻毒IHNV的虹鳟相对保护率为78%也有较高的免疫保护率, 说明利用

IHNV的G基因构建的核酸疫苗对虹鳟具有很好的保护效果。后续研究可通过调整载体结构、使用免疫佐剂等方式, 提高该核酸疫苗免疫效果。

ALT、AST是肝脏中2种重要的指示酶, ALT的活性是肝细胞坏死和肝功能障碍的特异性指标^[12]。当肝脏损伤时可导致细胞膜通透性增加或细胞坏死, ALT和AST分别大量进入血清, 使血清活性明显升高^[13]。范腾飞等^[14]研究嗜水气单胞感染异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)后的血液生化指标的影响, 结果显示, 鱼体在病原菌作用后ALT、AST活性显著增加。血清内ALT、AST含量的显著上升与肝脏组织受到严重损伤有关。本研究中空载组虹鳟血清中ALT、AST活性显著高于正常虹鳟, 同时ALP表现异常, 提示肝脏组织受损严重, 引起血清内酶含量的显著上升。pVAX1-G组虹鳟血清中ALT、AST、ALP活性较空载组升高不显著, 说明IHNV核酸疫苗pVAX1-

G可以降低IHNV对虹鳟肝脏的损害程度。

肾脏是鱼体重要的免疫和排泄器官^[19],当鱼体受到感染时,病鱼肾细胞减少,肾小球滤过功能降低,肾小管重吸收功能出现障碍,肾脏机能减弱,不能维持自身渗透压平衡,鱼体排泄受阻^[15]。本研究中虹鳟血清TBIL、TBA、GLU、Urea、CREA含量均呈现空白组<pVAX1-G组<空载组的趋势。与空白组相比,IHNV感染虹鳟后TBIL、TBA和GLU都升高,说明虹鳟肝肾组织损伤严重^[16],也与IHNV能破坏虹鳟造血组织的研究一致^[1]。血清中Urea、CREA含量也显著增高,提示鱼体肾脏功能出现障碍,使代谢终产物无法及时排泄而使其在血液中含量急剧升高。TBIL、TBA、GLU、Urea和CREA等5项指标测定结果均显示空载组较pVAX1-G组变化更为明显,说明IHNV核酸疫苗pVAX1-G可以减少IHNV对虹鳟肝脏和肾脏的损害程度。

血清总蛋白含量反映鱼体的营养和代谢状况,也间接反映机体非特异性免疫水平的高低^[17],郭松林等^[16]研究发现,病原菌对鳊鲈肝功能的破坏导致病原菌感染鳊鲈后,其血清中的TP与对照组和浸泡组相比极显著下降。本实验中感染IHNV的虹鳟血清TP、ALB、GLO也显著降低,说明机体免疫功能障碍,机体损伤导致蛋白合成减少。血清蛋白及P⁵⁺、Ca²⁺指标结果显示,IHNV对血液中电解质平衡有破坏作用,而IHNV核酸疫苗pVAX1-G能减少这种破坏作用,降低IHNV对虹鳟肝脏和肾脏的损害程度。

余泽辉^[1]对感染IHNV自然发病的虹鳟组织病理学观察发现,其肝脏、肾脏和脾脏受损严重。头肾大面积变性、坏死;脾淋巴细胞减少,广泛充血、出血,大面积变性、坏死;肝细胞空泡变性,肝脏部位严重坏死形成局灶性的坏死灶,肝细胞索排列紊乱。有研究报道,感染IHNV后虹鳟造血器官脾脏和肾间组织严重坏死^[18]。本实验组织病理学观察显示,未免疫pVAX1-G疫苗的虹鳟攻毒后,肝脏、脾脏和肾脏损伤严重,呈现典型的IHNV感染症状,表现为肝细胞大面积空泡变性,肝间质大量炎性细胞浸润,肝组织严重坏死;脾脏和肾脏造血组织坏死。而免疫pVAX1-G疫苗的虹鳟攻毒后组织病理学观察显示,肝脏内有少量炎性细胞浸润,脾脏和肾脏组织未见明显病变,提示pVAX1-G疫苗可以明显降低IHNV对虹鳟组织的损伤程度。

本实验表明,IHNV核酸疫苗疫苗pVAX1-G可以显著提高鱼体的免疫力,降低IHNV对鱼体器官的损害程度。核酸疫苗具有免疫效果好、保护期长、可构建多价疫苗、生产成本低和使用安全等特点,具有广阔的前景,本研究为IHNV核酸疫苗对虹鳟IHNV的防治及核酸疫苗的研发提供临床依据。

参考文献:

- [1] 余泽辉. 四川地区1株虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)源传染性造血器官坏死病毒的分离鉴定[D]. 雅安: 四川农业大学, 2015.
Yu Z H. Isolation and Identification of an IHNV isolate from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[D]. Yaan: Sichuan Agricultural University, 2015(in Chinese).
- [2] 吴金炉, 曾志南. 鱼类病毒病与鱼类病毒疫苗[J]. 海洋科学, 1999(4): 37-42.
Wu J L, Zeng Z N. Fish viral diseases and viral vaccines[J]. *Marine Sciences*, 1999(4): 37-42(in Chinese).
- [3] Kurath G, Leong J C. Characterization of infectious hematopoietic necrosis virus mRNA species reveals a nonvirion rhabdovirus protein[J]. *Journal of Virology*, 1985, 53(2): 462-468.
- [4] Corbeil S, Lapatra S E, Anderson E D, et al. Evaluation of the protective immunogenicity of the N, P, M, NV and G proteins of infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* using DNA vaccines[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1999, 39(1): 29-36.
- [5] 郑凤荣. 淋巴囊肿病毒(Lymphocystis disease virus)核酸疫苗的免疫效果评价及安全性研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2006.
Zheng F R. The research about protective efficiency and safety of DNA vaccine against Lymphocystis disease virus (LCDV)[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2006(in Chinese).
- [6] 欧阳征亮. 鲤春病毒血症病毒(SVCV)糖蛋白DNA疫苗的构建及免疫效果的评估[D]. 广州: 中山大学, 2007.
Ouyang Z L. Construction of a DNA vaccine encoding spring viremia of carp virus's glycoprotein and assessment of immune protection in zebrafish (*Danio rerio*)[D]. Guangzhou: Sun Yat-sen University, 2007(in Chinese).
- [7] 乔迁. 大菱鲆红体病虹彩病毒核酸疫苗及两种海水名

- 贵鱼类疾病的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2010.
- Qiao Q. The study for TRBIV genetic vaccine and the diseases of two rare marine fish species[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2010(in Chinese).
- [8] 赵巧娥. 饲料脂肪水平对鳃幼鱼生长、血液生化指标及消化生理的影响[D]. 华中农业大学, 2011.
- Zhao Q E. Effect of dietary lipid levels on growth performance, blood biochemical indices and digestive physiology of juvenile yellowcheek carp (*Elopichthys bambusa*)[D]. Huazhong Agricultural University, 2011
- [9] 许品诚, 曹萃禾. 湖泊围养鱼类血液学指标的初步研究[J]. 水产学报, 1989, 13(4): 347-352.
- Xu P C, Cao C H. On hematology of the blood of fishes cultured in the lake pen[J]. Journal of Fisheries of China, 1989, 13(4): 347-352(in Chinese).
- [10] 陈洁, 熊邦喜, 顾钱洪, 等. 内源及外源因子对鱼类血液生理生化指标的影响[J]. 湖北农业科学, 2011, 50(9): 1861-1865.
- Chen J, Xiong B X, Gu Q H, *et al.* The effect of endogenous and environment factors on hematology physiological and biochemical indices of fish[J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2011, 50(9): 1861-1865(in Chinese).
- [11] Williams K, Blake S, Sweeney A, *et al.* Multiplex reverse transcriptase PCR assay for simultaneous detection of three fish viruses[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1999, 37(12): 4139-4141.
- [12] Lin L, Zeng X L, Zhang J. Effect of profenofos poisoning on liver lipid peroxidation and liver function in rabbits[J]. *Chinese Journal of Clinical Rehabilitation*, 2004, 8(21): 4380-4381.
- [13] 张盛华, 秦任甲. 临床血液流变学指标检测报告单设计不合理应该修正[J]. *中国医学物理学杂志*, 2012(1): 3181-3183.
- Zhang S H, Qin R J. The unreasonable setting up for test report of clinical hemorheology indicators should be revised[J]. *Chinese Journal of Medical Physics*, 2012(1): 3181-3183.
- [14] 范腾飞, 叶应旺, 胡王, 等. 灭活疫苗对异育银鲫败血症血液和生化指标的影响研究[J]. *淡水渔业*, 2013, 43(4): 64-68.
- Fan T F, Ye Y W, Hu W, *et al.* Studies on influences of formalin-killed *Aeromonas hydrophila* on hematological and biochemical parameters in bacterial septicemia *Carassius auratus gibelio*[J]. *Freshwater Fisheries*, 2013, 43(4): 64-68(in Chinese).
- [15] 孙金辉, 王庆奎, 陈成勋, 等. 嗜水气单胞菌灭活疫苗对虹鳟免疫力和抗病力的影响[J]. *淡水渔业*, 2013, 43(1): 44-49.
- Sun J H, Wang Q K, Chen C X, *et al.* Effects of inactivated *Aeromonas hydrophila* vaccine on immunity and disease resistance of *Oncorhynchus mykiss*[J]. *Freshwater Fisheries*, 2013, 43(1): 44-49(in Chinese).
- [16] 郭松林, 关瑞章, 冯建军, 等. 嗜水气单胞菌感染对美洲鳊血液和生化指标的影响[J]. *集美大学学报(自然科学版)*, 2010, 15(2): 93-97.
- Guo S L, Guan R Z, Feng J J, *et al.* Influences of blood and biochemical parameters on American eels (*Anguilla rostrata*) challenged by *Aeromonas hydrophila*[J]. *Journal of Jimei University (Natural Science)*, 2010, 15(2): 93-97(in Chinese).
- [17] Bayne C J, Gerwick L. The acute phase response and innate immunity of fish[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2001, 25(8-9): 725-743.
- [18] 徐黎明, 赵景壮, 卢彤岩, 等. 一种中国虹鳟传染性造血器官坏死病核酸疫苗及其应用: 中国, 105816871A[P]. 2016-08-03.
- Xu L M, Zhao J Z, Lu T Y, *et al.* Infectious hematopoietic necrosis (IHN) nucleic acid vaccines for Chinese rainbow trout and application thereof: China, 105816871-A[P]. 2016-08-03(in Chinese).
- [19] Fan W, Duan Y J, Huang X L, *et al.* Pathological changes and etiological diagnosis in farmed adult rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) associated with a low mortality[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2016, 40(2): 287-293.

Construction of glycoprotein gene nucleic acid vaccine against infectious hematopoietic necrosis, and its effect on serum biochemical indices

HE Qiyao¹, WEI Wenyan², WANG Kaiyu^{1,3*}, LIU Jiaying²

(1. Fisheries Department of Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China;

2. Institute of Fisheries of Chengdu Agriculture and Forestry Academy, Chengdu 611130, China;

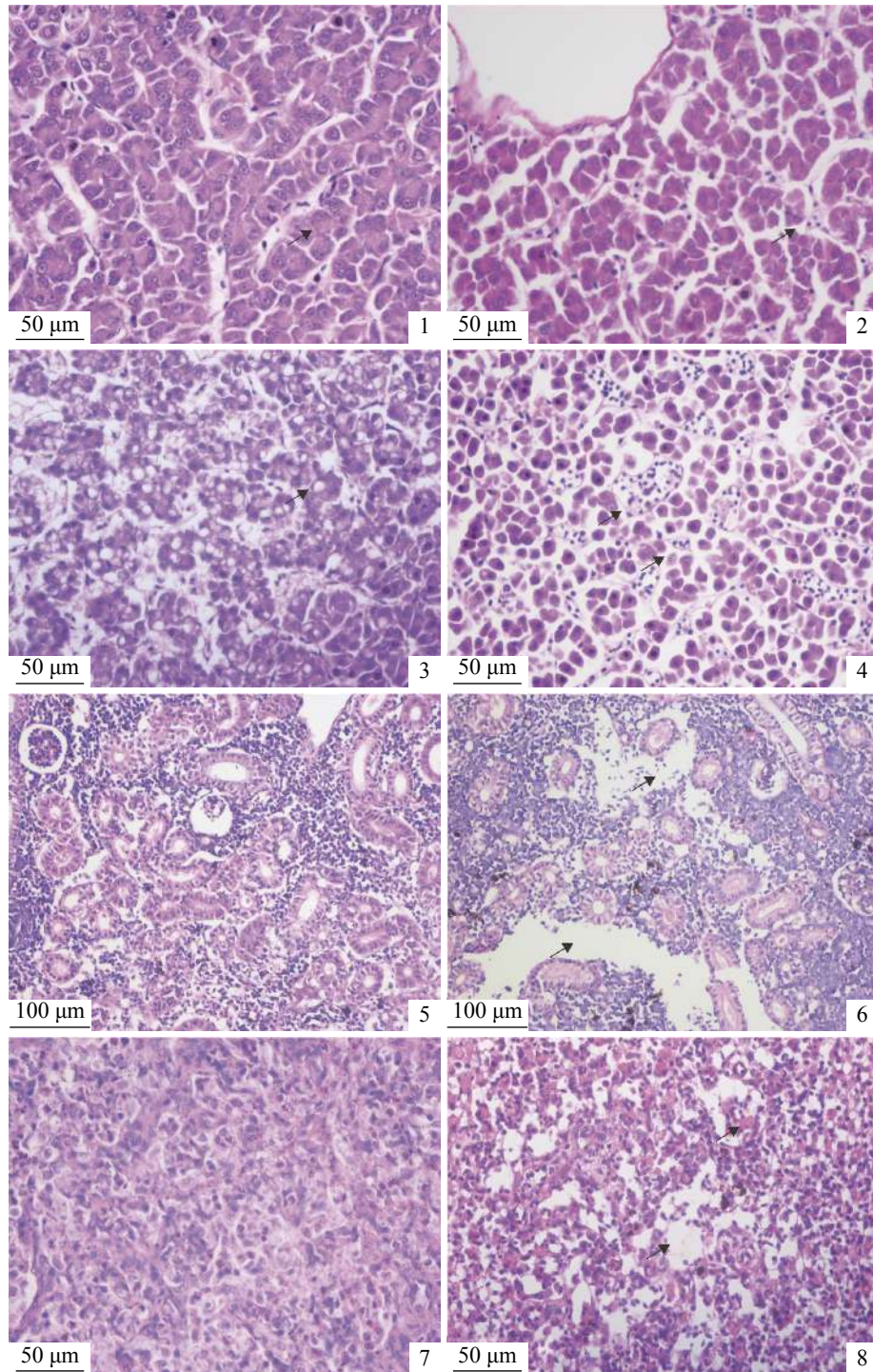
3. Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

Abstract: The aim of this study was to study the effect of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) nucleic acid vaccine on the immune protection of *Oncorhynchus mykiss* and serum biochemical indices of *Oncorhynchus mykiss*. Cloning the glycoprotein gene (*G*) into pMD19-T vector, we transformed the linked product in DH5 α , obtaining recombinant plasmid pMD19-T-*G*, and recovering the *G* gene fragment. The identified correct *G* gene fragment was cloned on eukaryotic expression vector pVAX1 using *Bam*H I and *Xho* I cleavage sites to construct nucleic acid vaccine pVAX1-*G*. The recombinant plasmid pVAX1-*G* was injected into *O. mykiss* at a dose of 8 μ g/ind. as pVAX1-*G* group, while 8 μ g/ind. empty group, PBS control group and blank group were set up. Twenty-one days after immunization, an anti-virus experiment was carried out. After anti-virus, serum was collected and blood indexes were tested. The results showed that there were significant changes in 16 indexes in *O. mykiss* serum after the attack: glutamic-pyruvic transaminase (ALT), glutamate transaminase (AST), alkaline phosphatase (ALP), total bilirubin (TBIL), total bile acid (TBA), glucose (GLU), the urea (Urea), creatinine (CREA), total protein (TP), albumin (ALB) and globulin (GLO) were compared with normal *O. mykiss*, and the changes of 11 indexes in no-load group were more significant than those in pVAX1-*G* group. The cumulative death rate of pVAX1-*G* group was 19%(19/100)14 days after the attack, while that of no-load group and PBS control group was 62%(62/100) and 85%(85/100), respectively. The protective rate of pVAX1-*G* nucleic acid vaccine for *O. mykiss* was 78%. The results showed that pVAX1-*G* as a nucleic acid vaccine was helpful to reduce IHNV's injury to *O. mykiss* and had better immune protection effect against IHNV.

Key words: *Oncorhynchus mykiss*; infectious hematopoietic necrosis virus; nucleic acid vaccine; Serum biochemical indicators

Corresponding author: WANG Kaiyu. E-mail: kywang1955@126.com

Funding projects: Research Innovation Project of Chengdu Academy of Agriculture and Forestry Sciences(2017-Y2500W-16)



图版 虹鳟肝脏, 脾脏和肾脏组织病理学观察

1. 虹鳟正常肝组织(H.E×400), ↑示正常肝细胞; 2. 免疫pVAX1-G后攻毒的肝组织(H.E×400), ↑示炎性细胞浸润; 3~4. 未免疫pVAX1-G虹鳟攻毒后的肝组织(H.E×400), ↑示空泡变性和炎性细胞浸润; 5. 免疫pVAX1-G后攻毒的肾组织(H.E×200); 6. 未免疫pVAX1-G虹鳟攻毒后的肾组织(H.E×200), ↑示肾间质水肿; 7. 免疫pVAX1-G后攻毒的脾组织(H.E×400); 8. 未免疫pVAX1-G虹鳟攻毒后的肾组织(H.E×400), ↑示造血组织坏死

Plate Optical microscope observation of liver, spleen and kidney

1. normal hepatic tissue (H.E×400), ↑normal liver cell; 2. liver tissue of the immune group (H.E×400), ↑inflammatory cell infiltration; 3-4. the liver tissue of the non-immune group (H.E×400), ↑vacuolation degeneration and inflammatory cell infiltration; 5. kidney tissue in the immune group (H.E×200); 6. kidney tissue of the non-immune group (H.E×200), ↑edema of renal interstitium; 7. spleen tissue of the immune group (H.E×400); 8. spleen tissue of the non-immune group (H.E×400), ↑hematopoietic necrosis