

草鱼呼肠孤病毒外衣壳蛋白 VP7 重组疫苗的 构建及其免疫效力评价

徐诗英^{1,2}, 李婧慧², 邹勇^{2,3}, 刘林³, 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 江苏省水生动物防疫检疫研究重点实验室, 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)

摘 要:为探明呼肠孤病毒(GCRV)外衣壳蛋白 VP7 基因工程亚单位疫苗产生的抗体效价水平和免疫保护力, 用 RT-PCR 方法从 GCRV 中扩增到 VP7 基因片段, 并克隆至原核表达载体 pET-28a(+)中, 得到重组质粒 pET-VP7, 酶切鉴定后, 将 pET-VP7 转化到大肠杆菌 BL21(DE3)中进行诱导表达, 产生的重组蛋白经变性和复性后, 按 0.5、1.0、2.0 mg/尾的注射剂量分为 3 个免疫组, 以等体积的氢氧化铝为佐剂进行注射。经 SDS-PAGE 电泳分析, 发现了相对分子质量为 34 000 的蛋白表达带; Western Blot 检测结果显示表达的蛋白具有很好的抗原性; 间接凝集试验结果表明, 3 个免疫组均有抗体产生; 攻毒试验结果表明, 0.5、1.0、2.0 mg/尾重组蛋白剂量组的保护率分别为 90%、85%、90%, 对照组为 0, 表明所构建的疫苗具有较好的免疫作用。

关 键 词:草鱼呼肠孤病毒; VP7 蛋白; 重组疫苗; 免疫效力

中图分类号: S941.41 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2011)06-0659-06

Development and efficacy of a grass carp reovirus (GCRV) outer capsid protein VP7 subunit vaccine

XU Shi-ying^{1,2}, LI Jing-hui², ZOU Yong^{2,3}, LIU Lin³, 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 Provincial Key Laboratory for Aquatic Animal Epidemic Prevention and Quarantine, Jiangsu Center for Control and Prevention of Aquatic Animal Infectious Disease, Nanjing 210036, China; 3. School of Biology and Basic Medical Sciences, Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215123, China)

Abstract: Antibody titer and immunoprotection induced by VP7 subunit vaccine were explored in the present study. The gene of the grass carp reovirus(GCRV) coding the outer capsid protein VP7 was amplified and inserted into prokaryotic expression vector pET-28a(+) to obtain pET-VP7, which was transformed into BL21(DE3) for expressing. SDS-PAGE showed that the expressed VP7 protein had a molecular weight of about 34 000 and Western Blot detection indicated good immunoreactivity of the protein. After denaturation and renaturation, the expressed VP7 protein was used to immunize grass carp based on three doses: 0.5, 1.0 and 2.0 mg, which was mixed with an equal volume of aluminum hydroxide adjuvant except the control. Indirect agglutination detection showed that antibody against VP7 protein was produced in the immunized groups. Challenge experiment with GCRV showed that 90%, 85% and 90% protection were achieved in groups respectively immunized with 0.5, 1.0 and 2.0 mg of the expressed VP7 protein and no protection was shown in the control group which

收稿日期: 2011-08-11

基金项目: 江苏省科技支撑计划项目(SBE200930495); 江苏省农业科技自主创新资金项目(SCX(11)2165)

作者简介: 徐诗英(1984—), 男, 山东威海人, 硕士研究生, 主要从事水生生物病害与防治研究, xsy190@163.com; 李婧慧(1986—), 女, 江苏南京人, 助理工程师, 主要从事水生生物病害与防治研究, data@jsbf.cn; *通信作者, chenhui@jsbf.cn。徐诗英和李婧慧对本课题有同等贡献。

demonstrated that the VP7 subunit vaccine made here had good immunoprotection against GCRV.

Key words: grass carp reovirus; VP7 protein; recombinant vaccine; immune efficacy

草鱼出血病(hemorrhagic disease of grass carp)是一种高传染性、高致死性的病毒性疾病,其病原草鱼呼肠孤病毒(grass carp reovirus, GCRV)^[1]是中国分离鉴定的第1株鱼类病毒,也是水生呼肠孤病毒属中致病力最强的毒株^[2],主要侵染于草鱼的肝脏、心脏、肌肉、肾脏、脾、鳃、肠道等组织细胞内,导致化学药物治疗效果欠佳,当年死亡率最高可达90%,是中国淡水养殖中最为突出的问题之一^[3]。采用免疫法提高草鱼对GCRV的抵抗能力,是当前防控GCRV感染的有效途径。常用于临床的中国农业部批准的甲醛灭活苗在疾病预防控制上取得了较好的效果,但在传统疫苗或灭活疫苗中存在的热原、变应原、免疫抑制原和其他有害反应原对宿主具有一定的致病风险。

VP7为毒粒外衣壳组分^[4],在免疫应答中可能起到重要的作用。GCRV基因组由11条分段的双链RNA组成^[5-6]。VP7蛋白由S10基因片段编码,编码框共有830 bp,编码蛋白的相对分子量约34 000。结构蛋白VP7含有1个锌指序列,可以调节基因表达,其氨基酸序列与哺乳动物呼肠孤病毒(mammal reovirus, MRV)的δ3相似^[7]。Fang等^[8]构建了高效表达VP7蛋白的原核表达载体,证明了VP7蛋白具有较好的抗原性和在病毒感染过程中不可替代的作用^[8]。VP7多克隆抗体的中和活性使研制GCRV亚单位疫苗成为可能^[9]。笔者将病毒免疫原性蛋白VP7的基因片段扩增并克隆至原核表达载体中进行表达,将表达的产物制成亚单位疫苗,旨在为草鱼出血病的预防及控制提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒毒株、菌株和载体

供试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(原草鱼出血

病病毒GCHV873)^[5],由深圳市动植物检疫局惠赠。草鱼肾细胞系CIK由江苏省水生动物疫病预防控制中心实验室保存。大肠杆菌TG1、BL21(DE3)菌株、pET-28a(+)载体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。pMD18-T载体为TaKaRa公司产品。

1.1.2 主要试剂

病毒RNA提取试剂盒为QIAGEN公司产品。反转录及PCR扩增试剂盒、限制性内切酶、T₄ DNA连接酶、DNA纯化试剂盒、DL2000 DNA marker等购自TaKaRa公司。PageRuler™ Unstained Protein Ladder购自Fermentas公司。鼠源组氨酸单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记羊抗鼠IgG及显色剂DAB均购自Promega公司。绵羊红细胞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 方法

1.2.1 VP7基因的扩增和克隆及鉴定

参照试剂盒说明进行GCRV873 RNA的抽提和反转录。根据GenBank中VP7基因序列(Accession No. AF403396)设计引物P₁和P₂。P₁(EcoR I): 5'-GAATTCATGCCACTTCACATGATTCC-3'; P₂(Hind III): 5'-AAGCTTAATCGGATGGCTCCACATG-3'。PCR扩增反应条件: 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。取产物进行琼脂糖凝胶电泳鉴定。回收、纯化产物,经EcoR I、Hind III双酶切后与pMD18-T载体连接,将产物命名为T-VP7。培养经转化的大肠杆菌TG1,提取T-VP7质粒进行PCR、酶切及测序鉴定。

扩增的目的基因经EcoR I、Hind III酶切后,克隆进同样酶切的pET-28a(+)中,获得重组载体pET-VP7,培养转化大肠杆菌TG1,提取重组质粒,进行PCR和双酶切鉴定。

1.2.2 目的蛋白的诱导表达

将重组载体 pET-VP7 转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞, 37 °C 振荡培养 1 h, 涂 LB 板(含卡那霉素)培养, 37 °C 过夜, 挑取单菌落于 LB 液体培养基, 37 °C 振荡培养, 过夜, 从中另取 1% 菌液于新培养基中扩大培养, 至 OD_{600} 为 0.6 时加入终浓度为 1.0 mmol/L 的 IPTG, 诱导培养 4~6 h, 离心, 弃上清, 用 1×PBS 洗离心沉淀物 2 次, 加入等体积样品缓冲液, 混匀, 煮沸 5 min, 用 10% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳。取纯化的蛋白泳道转硝酸纤维素膜, 以鼠源组氨酸单克隆抗体为一抗, 以羊抗鼠 IgG 为二抗进行孵育, 洗涤后以 DAB 显色, 进行 Western Blot 分析。

1.2.3 VP7 蛋白的诱导表达及粗蛋白的制取

大量收集诱导表达的菌液, 于 50 mL 离心管中 12 000 r/min、4 °C 离心 10 min, 收集沉淀, 以超声破碎缓冲液重悬沉淀, 冰浴超声 40 min, 12 000 r/min 离心 20 min, 取沉淀, 用去离子水清洗, 加入含 8 mol/L 尿素的变性液溶解, 于 12 000 r/min、4 °C 离心 10 min, 取上清, 分别于含有 6.0、4.0、2.0、1.0 mol/L 尿素的 PBS 中透析, 最后于 1×PBS 中透析过夜。收集透析的蛋白液体, 冷冻后抽制成冻干粉以便保存。使用时以无菌水溶解, 与考马斯亮兰 G-250 显色液混匀, 采用 Bradford 法, 用核酸蛋白分析仪于 595 nm 测定蛋白浓度。

1.2.4 蛋白疫苗与试验鱼的处理

于试验前 2 周选取体长 16~20 cm、体质量 80~120 g、健壮无病的同一批次草鱼于 19~22 °C 水温中充氧饲养。随机分成 3 组(每组 35 尾), 分别注射 0.5、1.0、2.0 mg/尾的蛋白疫苗, 每组中取 15 尾用于抗体测定, 取 20 尾用于攻毒, 均以等体积的氢氧化铝^[10]为佐剂, 注射总体积为 0.4 mL, 于背鳍基部肌肉注射。以未攻毒的普通草鱼为对照。

1.2.5 抗体效价的测定

免疫注射后第 14、21、28、49、70 天, 每组

取 3 尾草鱼, 分别于其尾静脉采血 1 mL, 4 °C 过夜, 2 000 r/min 离心 10 min, 分离血清, -20 °C 保存。抗体检测采用间接凝集法。选用的致敏载体为用戊二醛一步法制备的绵羊红细胞^[10-11]。

1.2.6 攻毒用毒株 LD_{50} 的测定

于草鱼 CIK 细胞培养第 7 天收集 GCRV873 病毒液, 按 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 进行倍比稀释, 随机选取体长 16~20 cm、体重 80~120 g 的正常草鱼 40 尾, 将其分为 5 组, 按 0.2 mL/尾的剂量进行胸鳍基部注射, 恒温加热管控制水温 (31 ± 1) °C, 充气增氧, 每天定时投喂饵料并观察、记录, 直至不再出现发病致死情况。采用 Reed-Muench 方法测定毒株的 LD_{50} ^[12], 以此确定病毒液的感染力。

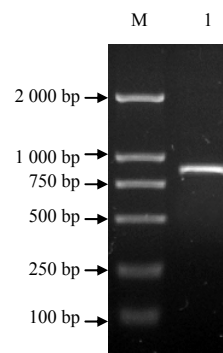
1.2.7 草鱼攻毒试验

疫苗注射后第 21 天, 将病毒液用含双抗(青霉素和链霉素)的灭菌生理盐水稀释为 LD_{50} 的 $10^{1.5}$ 倍, 按 0.2 mL/尾剂量, 于已免疫草鱼和普通草鱼的胸鳍基部分别进行注射, 各感染 20 尾, 恒温加热管控制水温 (31 ± 1) °C, 定时检查、记录发病情况, 最后计算死亡率和免疫保护力。免疫保护力 = 1 - 免疫组死亡率/对照组死亡率。

2 结果与分析

2.1 VP7 基因的扩增、克隆与鉴定结果

VP7 基因经 RT-PCR 扩增, 得到图 1 中约 890 bp 的目的条带。

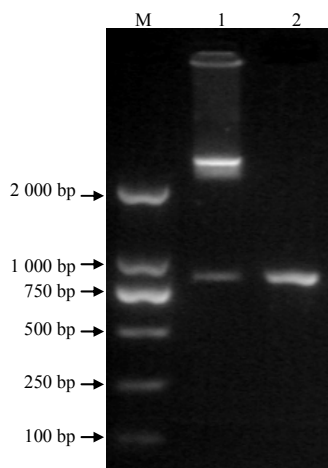


M DL 2 000 DNA 相对分子质量标准; 1 VP7 基因的 PCR 扩增结果。

图 1 VP7 基因的 PCR 扩增结果

Fig.1 Amplification of VP7 gene by PCR

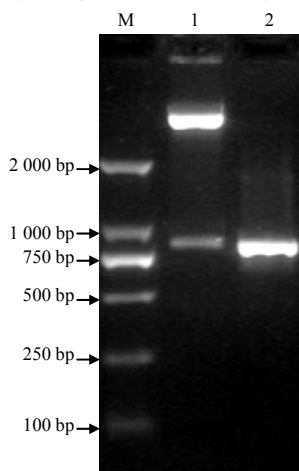
测序结果(图2)显示,目的基因与GenBank参考序列同源性为99%。已将目的基因克隆进pET-28a(+)载体中,获得重组载体pET-VP7,经双酶切及PCR鉴定的结果见图3。



M DL2 000 DNA 相对分子质量标准;1 *EcoR* I、*Hind* III双酶切 T-VP7; 2 VP7基因。

图2 T-VP7的酶切和PCR鉴定结果

Fig.2 Enzyme digestion and PCR analysis of T-VP7



M DL2 000 DNA 相对分子质量标准;1 *EcoR* I、*Hind* III双酶切 pET-VP7; 2 VP7基因。

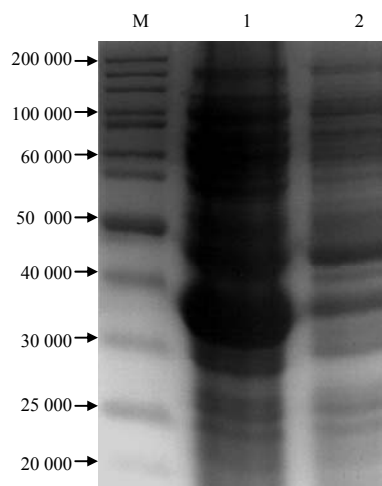
图3 重组载体 pET-VP7 的酶切和 PCR 鉴定结果

Fig.3 Enzyme digestion and PCR analysis of pET-VP7

2.2 目的蛋白的表达及检测结果

重组表达质粒pET-VP7在大肠杆菌BL21中获得表达。在诱导5 h后,经SDS-PAGE电泳,表达的融合蛋白相对分子质量约为34 000(图4),与预期结果相符。经BandScan软件分析,蛋白的最高表达量占细菌总蛋白的32.8%;Western Blot分析结果表明,

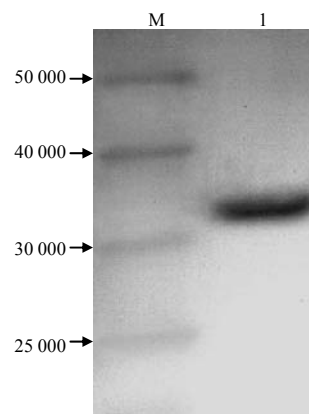
在34 000处有一明显的识别条带(图5),表明产物蛋白能与抗His单克隆抗体识别,证实其具有良好的抗原反应性。



M 蛋白质相对分子质量标准;1,2 IPTG 分别诱导 pET-VP7/BL21 和 pET-28a(+)/BL21 后的总蛋白提取物。

图4 pET-VP7/BL21 蛋白表达的 SDS-PAGE 分析结果

Fig.4 SDS-PAGE analysis of the VP7 protein expressed in *E.coli* containing pET-VP7/BL21



M 蛋白质相对分子质量标准;1 目的蛋白 VP7。

图5 pET-VP7/BL21 蛋白表达的 Western Blot 分析结果

Fig.5 Western Blot analysis of the VP7 protein expressed in *E.coli* containing pET-VP7/BL21

2.3 抗体效价的测定结果

经间接凝集试验测定,各免疫组均有抗体产生(表1),抗体滴度在前3周呈逐步增长趋势,之后不同程度地降低。

表 1 免疫草鱼抗体效价的间接凝集反应检测结果

Table 1 Antibody titers of the immunized grass carps by indirect agglutination

组 别	抗体效价				
	14 d	21 d	28 d	49 d	70 d
0.5 mg/尾VP7组	1 4~1 8	1 8	1 4~1 8	1 4~1 8	1 4
1.0 mg/尾VP7组	1 8~1 32	1 16~1 32	1 8	1 4~1 8	1 4
2.0 mg/尾VP7组	1 16	1 16~1 32	1 4~1 8	1 4~1 8	1 4
对照	<1 2	<1 2	<1 2	<1 2	<1 2

2.4 死亡率和免疫保护力

采用 Reed-Muench 方法测得所培养毒株的 LD_{50} 为 0.2 mL $10^{-2.5}$ 病毒稀释液, 选用攻毒剂量为 LD_{50} 的 $10^{1.5}$ 倍。攻毒实验后, 各组鱼在经 4~7 d 的病毒潜伏期后均有死亡现象(表 2), 死亡鱼肌肉、肠道有轻度充血或出血, 少部分鱼体腹腔出血, 肝、脾、肾等因失血而呈灰白色。

表 2 攻毒鱼的死亡率和免疫保护率

Table 2 Death rate and immunoprotection of the experimental fish

组 别	死亡率/%	免疫保护率/%
0.5 mg/尾VP7组	10	90
1.0 mg/尾VP7组	15	85
2.0 mg/尾VP7组	10	90
对照	100	0

3 结论与讨论

在免疫的时候, 常辅以佐剂^[13-14]以增强动物的免疫效果。氢氧化铝佐剂是目前唯一被美国 FDA(Food and Drug Administration)认证的人用疫苗佐剂, 也是较早应用于鱼类的佐剂。Jenkins^[12]等用人的球蛋白作为抗原与氢氧化铝混合后免疫莫桑比克罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*), 2 周后二者的抗体滴度相差不大。本研究中自制氢氧化铝佐剂的免疫效果明显, 经过 70 d 的观察, 未见因使用氢氧化铝可能出现的红斑、皮下结节、接触性过敏和肉芽肿性炎症等反应, 且草鱼的活力及行为能力均表现正常。

方勤等^[15-16]对低温保存的 3 株草鱼呼肠孤病毒 GCRV873、GCRV875、GCRV876 与新分离的 GCRV991 毒株进行细胞培养和病毒感染特性研究, 发现湖南地区的 GCRV873、GCRV991 毒株的感染性最强。这一结果与湖南地区草鱼发病死亡率高的

情况相吻合。本研究中以 GCRV873 株外衣壳蛋白 VP7 基因为候选基因构建重组蛋白疫苗, 疫苗注射后 2 周内, 在免疫组草鱼血清中可检测到抗体, 随免疫时间的延长, 抗体效价呈明显的上升趋势, 在第 3 周达到最高水平, 之后, 随时间的延长, 免疫期过去, 抗体水平逐渐降低, 符合抗体消长规律。经攻毒试验, 草鱼免疫保护率为 85%~90%, 明显高于对照组, 说明疫苗对呼肠孤病毒表现出较强的抵抗力。供试鱼在攻毒后 4~7 d, 即潜伏期过后开始出现死亡现象, 且对照组 80% 的鱼在第 7 天全部出现爆发性死亡, 这与文献^[17]中 4 d 后发病、5~7 d 后表现出明显的出血症状而进入死亡高峰期的结果相符。考虑到鱼体免疫及生产实际, 目的蛋白并未纯化, 但试验结果表明了基因工程蛋白 VP7 良好的免疫保护性。该蛋白疫苗在草鱼出血病防治生产实践中具有广阔的应用前景。为了更好地防治草鱼出血病, 增强草鱼抵抗呼肠孤病毒侵袭的能力, 还需在生产实践中对基因工程亚单位疫苗进行深入研究。

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] Rangel A A, Rockemann D D, Hetrick F M, et al. Identification of grass carp hemorrhage virus as a new genogroup of aquareovirus[J]. J Gen Virol, 1999, 80: 2399-2402.
- [3] LI J, WANG T, YI Y, et al. A detection method for grass carp hemorrhagic virus(GCHV) based on a reverse transcription-polymerase chain reaction[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 1997, 29: 7-12.
- [4] Fang Q, Shan 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] 柯丽华, 方勤, 蔡宜权. 一株新的草鱼出血病毒分离物的特性[J]. 水生生物学报, 1990, 14(2): 153-159.
- [6] 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.
- [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] Fang Q, Seng E K, Ding Q Q. Characterization of infectious particles of grass carp reovirus by treatment with proteases[J]. Arch Virol, 2008, 153(2): 675-682.
- [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, 13(5): 1643-1648.
- [10] 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.
- [11] 何福林, 肖克宇, 龚泽修. 草鱼出血病毒血凝作用及影响因素[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2002, 28(1): 48-50.
- [12] Jenkins P G, Wrathmell A B, Harris J E, et al. The effects of different adjuvants on intestinal antigen absorption and subsequent immune responses of the tilapia *Oreochromis mossambicus*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 1994, 4(3): 167-177.
- [13] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 2版. 北京: 科学出版社, 1997: 329-330.
- [14] Aguilar J C, Rodriguez E G. Vaccine adjuvants revisited[J]. Vaccine, 2007, 25: 3752-3762.
- [15] 方勤, 肖调义, 李旅, 等. 四株草鱼呼肠孤病毒毒株的细胞感染特性比较研究[J]. 中国病毒学, 2002, 17(2): 182-184.
- [16] 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: 自然科学版, 1997, 23(2): 154-157.
- [17] 肖雪, 颜其贵, 欧洋, 等. 草鱼呼肠孤病毒的研究进展[J]. 水利渔业, 2006, 26(5): 106-109.

责任编辑: 王赛群

(上接第640页)

- [2] 袁军, 孙福在, 田宏先, 等. 防治马铃薯环腐病有益内生细菌的分离和筛选[J]. 微生物学报, 2002, 42(3): 270-274.
- [3] 高增贵, 庄敬华, 陈捷, 等. 玉米根系内生细菌种群及动态分析[J]. 应用生态学报, 2004, 15(8): 1344-1348.
- [4] Phae C G, Shoda M, Kita N, et al. Biological control of crown and root rot and bacterial wilt of tomato by *Bacillus subtilis* NB22 [J]. Annals of the Phytopathological Society of Japan, 1992, 58(3): 329-339.
- [5] 董春, 董成刚, 赵青峰, 等. 利用拮抗细菌防治烟草青枯病初步研究[J]. 广东农业科学, 1996(5): 28-30.
- [6] 尹华群, 易有金, 罗宽, 等. 烟草青枯病内生拮抗细菌的鉴定及小区防治的初步测定[J]. 中国生物防治, 2004, 20(3): 219-220.
- [7] 易有金, 尹华群, 罗宽, 等. 烟草内生短芽孢杆菌的分离鉴定及对烟草青枯病的防效[J]. 植物病理学报, 2007, 37(3): 301-306.
- [8] 吕建林, 刘二明, 柏连阳, 等. 烟草青枯病生防菌混合接种对其定殖及防效的影响[J]. 中国生物防治, 2010, 26(2): 200-205.
- [9] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 2007: 46-47.
- [10] Buchanan R E, Gibbons N E. 伯杰氏细菌鉴定手册[K]. 8版. 中国科学院微生物研究所, 译. 北京: 科学出版社, 1984: 729-732.
- [11] 陶然, 杨朝晖, 曾光明. 微生物絮凝剂产生菌的筛选、鉴定及培养条件和工艺的优化研究[D]. 长沙: 湖南大学, 2006: 25-36.
- [12] 徐雪莲, 代鹏. 2株抗枯萎病尖镰孢菌内生细菌菌株的分离及鉴定[J]. 果树学报, 2007, 24(4): 483-486.
- [13] 李佳, 李术娜, 郭晓军, 等. 一株大丽轮枝菌拮抗细菌7247菌株的分离与鉴定[J]. 棉花学报, 2009, 21(2): 156-158.

责任编辑: 罗慧敏