

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2018.17148

传染性造血器官坏死病核酸疫苗的构建及其抗性基因对环境细菌抗性的影响

李渊^{1,2}, 赵景壮¹, 刘淼¹, 卢彤岩¹, 任广明¹, 尹家胜¹, 纪锋¹, 徐黎明¹

1. 中国水产科学研究院 黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070;
2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306

摘要: 本研究以传染性造血器官坏死病毒(infectious hematopoietic necrosis virus, IHNV)分离株 XJ-13 为研究对象, 克隆其糖蛋白(glycoprotein, G)基因并连接到商业化载体 pcDNA3.1(+), 成功构建了真核表达载体 pIHNV-XJ-G。为了检测该载体作为核酸疫苗的可能性, 本研究以 2 μg/尾的剂量采用背鳍基部注射免疫虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)鱼苗[(5±0.5) g]。在免疫后第 4 天及第 30 天, 以 100 TCID₅₀ 的剂量利用 IHNV-XJ-13 对虹鳟进行腹腔注射攻毒; 在免疫后第 4 天及第 7 天, 利用 Real-time PCR 技术检测虹鳟头肾及接种部位肌肉组织 *Mx-1* 基因表达情况; 在免疫后第 4 天及 30 天检测虹鳟血清 IHNV 中和抗体效价; 在免疫后 65 d 内, 分别于不同时间点采集循环水池里的粪便、水以及虹鳟的肠内容物, 进行氨苄青霉素抗性菌的分离鉴定。攻毒试验结果显示, 核酸疫苗在免疫后第 4 天和第 30 天的相对保护率均高于 90%; *Mx-1* 基因检测结果显示, *Mx-1* 基因在头肾和接种部位肌肉中均显著上调表达; 中和抗体效价测定结果显示, 在免疫后第 4 天, 所有血清中均不存在中和抗体(效价均<20); 而在免疫后第 30 天, 10 尾虹鳟中有 8 尾血清中存在中和抗体, 最高效价为 160; 抗性菌分离结果显示, 分离到的氨苄青霉素抗性菌均是天然具有氨苄青霉素抗性的气单胞菌(*Aeromonas* sp.)和柠檬酸杆菌(*Citrobacter* sp.), 并未分离到包括大肠杆菌在内的任何具有氨苄青霉素抗性的指示菌, 且实验组和对照组的氨苄青霉素抗性菌的种类和数量均没有发生统计学意义的改变。本研究提供了具有良好保护效果的 IHNV 核酸疫苗, 并为 IHNV 核酸疫苗的安全评价提供了基础数据。

关键词: 传染性造血器官坏死病毒; 核酸疫苗; 抗性基因; 氨苄青霉素; 环境释放

中图分类号: S941

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2018)01-0220-08

传染性造血器官坏死病毒(Infectious Hematopoietic Necrosis Virus, IHNV)隶属于弹状病毒科(*Rhabdoviridae*)诺拉外弹状病毒属(*Novirhabdovirus*), 是传染性造血器官坏死病(Infectious Hematopoietic Necrosis, IHN)的病原体。IHN 是严重危害鲑鳟类的病毒性疾病, 可造成鱼苗或幼鱼 70%~90%的死亡率, 在某些病例中甚至接近 100%, 对世界鲑鳟鱼类养殖业造成了巨大的经济损失^[1]。世界动物卫生组织(Office International Des Epizooties, OIE)将其列为必须申报的动物疫病, 在

中国为二类疫病^[2-3]。目前国内外学者针对 IHNV 已经开展了疫苗的研发、免疫佐剂及病毒复制干扰物的筛选等大量研究^[4-6]。研究过程中发现核酸疫苗在诱导鱼类的体液免疫和细胞免疫反应方面非常有效^[7], 并且核酸疫苗在保护鱼类免受某些病毒性疾病攻击上取得了很好的成效^[8-9]。

核酸疫苗是由含保护性抗原基因的质粒构成, 其在导入机体后被宿主细胞摄取、表达、加工并提呈给免疫系统诱导特异性体液免疫和细胞免疫^[10]。Leong 等^[11]用致死剂量的 IHNV 攻击虹鳟, 免疫

收稿日期: 2017-04-14; 修订日期: 2017-06-21.

基金项目: 黑龙江省应用技术与开发计划项目(GA13B401); 中央公益性事业单位基本科研业务费专项经费项目(HSY20-1514, 2016HY-ZD0504).

作者简介: 李渊(1989-), 硕士研究生, 从事鱼类病毒学研究. E-mail: 1154662843@qq.com

通信作者: 徐黎明, 博士, 副研究员, 从事鱼类病毒学研究. E-mail: lmxu0917@163.com

核酸疫苗的虹鳟存活率达到 100%, 而对照组的存活率仅为 10%~15%。尽管国外已经证明了 IHN 核酸疫苗的高效性, 并且针对 IHN 核酸疫苗也开展了大量的研究工作, 但目前仍未见关于核酸疫苗载体中的抗性基因是否会对免疫虹鳟及环境微生物造成影响的研究报道, 而从核酸疫苗自身的安全性考虑, 这是很有必要的。IHN 表面糖蛋白具有良好的免疫原性和免疫反应性^[12]。因此, 本研究在巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)启动子控制下用中国 IHNV-XJ-13 病毒株的 G 基因构建了 IHN 核酸疫苗, 命名为 pIHNxj-G。在系统验证所构建的 IHN 核酸疫苗有效性的基础上, 通过对免疫虹鳟肠道内容物、粪便和水环境中的氨苄青霉素抗性菌总类及数量的定点监测来分析疫苗载体中的氨苄青霉素抗性基因能否对虹鳟体内和体外环境中细菌的抗性产生影响。本研究为 IHN 核酸疫苗的安全评价提供了基础数据。

1 材料和方法

1.1 菌株、载体及细胞

IHN 分离株 XJ-13^[13]由本实验室分离保存; 真核表达载体 pcDNA3.1(+)购自 Invitrogen 公司; Fathead minnow 上皮瘤细胞(epithelioma papulosum cyprinid, EPC)由中国水产科学院长江水产研究所鱼类病害研究室曾令兵教授惠赠。

1.2 主要试剂

SV Total RNA Isolation System 购自 Promega; One Step SYBR[®] PrimeScript RT-PCR Kit II(Perfect Real Time)试剂盒、PrimeScript[™] One Step RT-PCR Kit Ver2.0 试剂盒、DNA Marker、pMD19-T simple 载体、限制性内切酶购自大连宝生物公司; 质粒大量提取试剂盒购自 Tiangen 生物公司; MEM 细胞培养基、胰酶购自 Hyclone 公司; 胎牛血清购自 Gibco。

1.3 引物设计与合成

利用 Premier5.0 软件设计扩增 IHNV-XJ-13 分离株的 G 基因序列的引物序列, F: 5'-GGATCCATG GACGCCATGATCACCCTCCGC-3'; R: 5'-CTCGAGTTAGGACCTGTTTGCCAGGTGATAC-3'。用于菌种鉴定的是 16S rDNA 通用引物其序列; 16sF: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3';

16sR: 5'-GRTACC TTGTTACGACTT-3', 所有引物均由哈尔滨博仕生物公司合成。

1.4 IHN 病毒增殖

取保存于-80℃冰箱的 IHNV-XJ-13 分离株培养悬液, 按照 MOI 为 0.01 的比例接种 EPC 单层细胞上, 于 15℃下孵育 1 h, 弃去含有病毒的细胞液, 加入 5 mL 细胞维持液(含有 2%胎牛血清的 MEM 培养液)于细胞培养瓶内, 于 15℃培养。当 70%以上细胞出现细胞病变(cytopathic effect, CPE), 收集细胞培养液(即病毒悬液), 分装保存于-80℃冰箱备用。

1.5 RNA 的提取以及目的片段扩增

将保存于-80℃冰箱的病变细胞冻融 2~3 次, 吸取病毒悬液 0.125 mL, 12000 g 离心 5 min, 弃去细胞碎片等沉淀, 利用 SV Total RNA Isolation system 试剂盒提取上清液中的病毒 RNA。

提取 IHNV-XJ-13 基因组 RNA, 利用 RT-PCR 一步反应试剂盒以 F/R 为引物扩增 G 基因, 大小为 1700 bp; 同时将从无病变的 EPC 细胞提取的 RNA 设为阴性对照组, PCR 扩增反应体系: 2×One Step buffer 25 μL, enzyme mix 2 μL, F/R 引物(10 pmol/μL)各 1 μL, RNA 10 μL, 用无菌水补充至 50 μL。PCR 扩增程序: 50℃ 30 min, 94℃预变性 5 min, 94℃变性 1 min, 53℃退火 1 min, 72℃延伸 50 s, 25 个循环, 72℃终延伸 10 min。PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳分析, 对目的条带进行胶回收, 然后将回收产物送上海生工生物公司进行测序。

1.6 重组质粒 pIHNxj-G 的构建及制备

将 1.5 步骤的胶回收产物, 利用 BamH I 和 Xho I 对回收产物进行双酶切, 胶回收后与 BamH I/Xho I 双酶切的 pcDNA3.1(+)载体在室温连接 30 min, 然后转化 *E.coli* DH5α, 37℃培养于含氨苄青霉素(100 μg/mL)的 LB 平板, 16 h 后, 挑取单菌落于 20 mL 的液体 LB 培养基中扩大培养, 14 h 后提取质粒, 用 BamH I/Xho I 双酶切鉴定, 将结果为阳性的单菌落委托上海生工生物工程技术服务有限公司测序。对已经确定的阳性菌在 500 mL 的液体 LB 培养基扩大培养。把扩大培养的菌液利用 Tiangen 质粒大量提取试剂盒提取质粒, 制备核

酸疫苗 pIHNxj-G。保证质粒的浓度在 1000 ng/ μ L 以上。

1.7 虹鳟的免疫及攻毒试验

将虹鳟(5 \pm 0.5) g 随机分 2 组, 每组 200 尾, 暂养于水温 15 $^{\circ}$ C 的循环水池(60 cm \times 60 cm \times 50 cm) 中, 7 d 后从虹鳟背鳍基部进行肌肉注射, 试验前禁食 2 d。实验组注射的核酸疫苗免疫剂量为 2 μ g/尾(50 μ L/尾磷酸盐溶液), 同时设空白对照 pcDNA3.1 免疫组。注射后将各组虹鳟重新置于循环水池内暂养。

在免疫后的第 4 天和第 30 天分别进行攻毒试验, 试验前禁食 2 d。利用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)以 100 TCID₅₀ 剂量的 IHNV 强毒株 XJ-13, 采用腹腔注射的方式对免疫虹鳟($n=50$)进行攻毒。注射后将各组虹鳟重新置于循环水池内暂养, 连续观察 21 d, 记录各组虹鳟发病及死亡情况。根据公式计算疫苗免疫保护率(relative percent survival, RPS): $RPS=[1-(\text{免疫组死亡率}/\text{对照组死亡率})]\times 100$ 。

1.8 *Mx-1* 基因检测及中和抗体效价测定

于免疫后第 4 天和第 7 天采集虹鳟($n=5$)头肾和接种部位肌肉组织, 利用 RNA 提取试剂盒提取组织 RNA。然后利用 One Step SYBR[®] PrimeScript RT-PCR Kit II(Perfect Real Time)试剂盒, 以 β -actin 为内参基因, 对 *Mx-1* 基因实时荧光定量 PCR 检测, 以注射 pcDNA3.1 的虹鳟为对照, 所用 Real-time PCR 仪器为 ABI7500。数据分析采用比较 CT 法($\Delta\Delta CT$)。相对表达量= $2^{-\Delta\Delta CT}=2^{-(\Delta CT_{\text{处理}}-\Delta CT_{\text{对照}})}=2^{-[(CT_{\text{处理}}-CT_{\text{内参}})-(CT_{\text{对照}}-CT_{\text{内参}})]}$, 数据取 3 次重复的平均值。

于免疫后第 4 天和第 30 天采取尾缘静脉取血的方式各分别收集 10 尾虹鳟的血液, 置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜, 800 g 室温离心 10 min, 收集血清。参照 LaPatra 等^[14]的方法, 将 EPC 接种到 96 孔细胞培养板上长成单层细胞, 然后将倍比稀释的血清与病毒悬液于 15 $^{\circ}$ C 提前孵育 1 h。按照 100 TCID₅₀ 浓度每孔分别接种 100 μ L 血清抗体混合液, 15 $^{\circ}$ C 细胞培养箱中孵育 1 h, 吸去孵育液, 加入新鲜的细胞维持液。置于 15 $^{\circ}$ C 二氧化碳细胞培养箱中恒温培养, 连续观察 10 d, 记录出现 CPE 的孔数。

以只接病毒组为参照, 使细胞病变孔数减少一半的血清稀释度即为抗体效价^[14]。

1.9 核酸疫苗抗性基因环境释放的监测

分别在免疫后的第 1、3、5、7、14、21、35、49、65 天的时间点, 采集循环水池里的虹鳟粪便、水以及 5 尾虹鳟的肠内容物。将湿重 0.1 g 的粪便在无菌 500 μ L PBS 中进行充分搅拌, 并在 4 $^{\circ}$ C 放置 30 min, 利用尼龙布过滤掉残渣。吸取过滤液涂布含有氨苄青霉素的 LB 平板, 2 个重复, 分别在 37 $^{\circ}$ C 和 18 $^{\circ}$ C 下倒置培养过夜。挑取平板上的所有单菌落, 并在含有氨苄青霉素的 LB 液体培养基中培养过夜。阳性菌液利用通用引物 16S rDNA 进行 PCR 扩增, 将 PCR 产物送至生物公司进行序列测定。采集的肠内容物做相同处理。而来自每个时间点的水样品直接涂布含有氨苄青霉素的 LB 平板, 其他步骤与上述相同。设置来自注射 PBS 的虹鳟的样本为对照组。将测序所得序列输入到 NCBI 进行 Blast 检索, 对所分离的细菌种类进行初步分析, 然后对实验组和对照组的抗不同来源的抗菌数量进行统计学分析。

2 结果与分析

2.1 G 基因的扩增与重组质粒 pIHNxj-G 的构建

以提取的 IHNV-XJ-13 病毒悬液 RNA 为模板, 利用 RT-PCR 一步反应试剂盒扩增 IHNV-XJ-13 分离株的 G 基因, 然后进行琼脂糖凝胶电泳分析, 在 1700 bp 的位置出现特异性条带(图 1), 序列分析结果显示该基因序列与目的基因序列相同, 说明已获得 G 基因。将该 G 基因片段与商业化载体 pcDNA3.1(+)连接, 转化大肠杆菌 DH5 α , 随机挑取单菌落扩大培养, 提取质粒, 利用酶切方法进行鉴定, 鉴定结果与预期相符(图 2)。该结果表明已成功获得重组质粒 pIHNxj-G。

2.2 核酸疫苗保护效力分析

利用 Tiangen 质粒大量提取试剂盒制备核酸疫苗 pIHNxj-G。并以 2 μ g/尾的剂量采用背鳍基部肌肉注射的方式对虹鳟进行免疫, 于免疫后第 4 天和第 30 天进行攻毒试验。结果显示, 免疫组虹鳟的存活率均为 90% 以上, 而 PBS 对照组虹鳟存活率仅为 6%~8%。利用公式可计算出该疫苗在

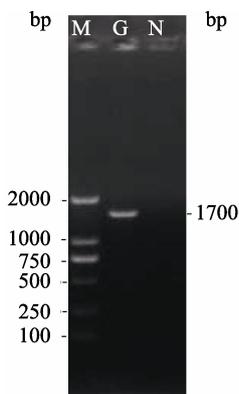


图 1 G 基因 PCR 扩增产物的凝胶电泳分析

G: 阳性样本 PCR 产物; N: 阴性对照;

M: DL2000 DNA marker.

Fig. 1 Gel electrophoresis of PCR product of the G gene

G: G gene PCR products; N: negative control;

M: DL2000 DNA marker.

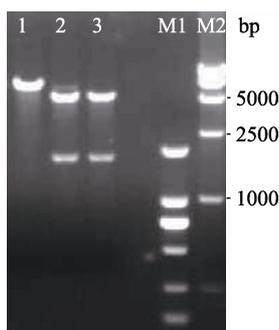


图 2 pIHNxj-G 酶切产物的凝胶电泳分析

1: pIHNxj-G 质粒; 2,3: pIHNxj-G 酶切产物;

M1: DL2000 DNA marker; M2: DL15000 DNA marker.

Fig. 2 Gel electrophoresis of digestion

products of the pIHNxj-G

1: pIHNxj-G plasmid; 2,3: pIHNxj-G digestion product;

M1: DL2000 DNA marker; M2: DL15000 DNA marker.

免疫后 4 d 和 30 d 可提供 93.5%和 91.5%的相对保护率。上述结果表明核酸疫苗 pIHNxj-G 对虹鳟具有良好的保护效果, 能够抵抗 IHNV 对虹鳟的进攻。具体结果如表 1 所示。

表 1 核酸疫苗 pIHNxj-G 保护效力分析

Tab. 1 Protection efficacy analysis of the DNA vaccine pIHNxj-G

免疫后天数/d days post vaccination	累计存活率*/% cumulative survival*		相对保护率/% relative percentage of survival
	疫苗组 vaccine group	空载体组 empty plas- mid group	
4	94	8	93.5
30	92	6	91.5

注: *每组虹鳟尾数为 50。

Note: *The number of rainbow trout in each group was 50.

2.3 Mx-1 基因检测结果

对免疫后第 4 天和第 7 天的头肾及接种部位肌肉组织 RNA 中 *Mx-1* 基因的定量分析结果显示, 与 pcDNA3.1(+)对照组相比, 在免疫后第 4 天, *Mx-1* 基因在接种部位肌肉组织中表达量平均上调了 82.8 倍, 在头肾组织中平均上调了 12.2 倍; 在免疫后第 7 天, 上述两种组织中的 *Mx-1* 基因表达量分别上调了 139 倍和 32 倍。统计分析结果显示, 各组数据间均存在显著差异(图 3, $P < 0.05$)。

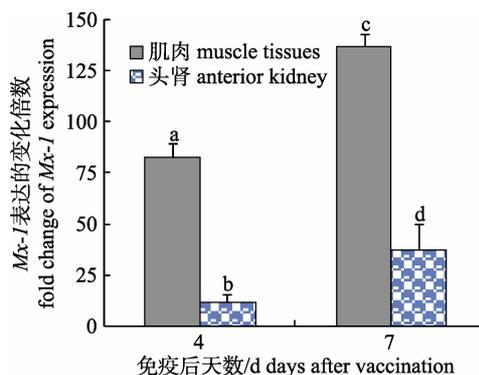


图 3 免疫虹鳟 *Mx-1* 基因水平的实时定量分析

不同字母表示不同组织间数据差异极显著($P < 0.01$)。

Fig. 3 Real time analyses of *Mx-1* gene expression level in immunized rainbow trout

Values with different letters indicated extremely significant differences ($P < 0.01$).

2.4 中和抗体效价测定结果

利用 EPC 细胞检测免疫后第 4 天和 30 天的虹鳟血清中和抗体的效价, 结果如表 2 所示, 在免疫后第 4 天, 所有血清中均不存在中和抗体(效价均 < 20); 在免疫后第 30 天, 只有两尾鱼的血清中不存在中和抗体, 而剩余的 8 尾鱼血清中均存有效价不同的中和抗体, 其中最高效价高达 160。该结果说明核酸疫苗 pIHNxj-G 能够刺激虹鳟特异性免疫反应, 而使免疫虹鳟产生中和 IHNV 的抗体。

表 2 免疫虹鳟血清中和抗体效价

Tab. 2 Neutralizing antibody titers of serum from immunized rainbow trout

免疫后天数/d days post vaccination	血清中和抗体效价 serum neutralizing antibody titer (quantity)
4	$< 20(10)$
30	$< 20(2), > 40(3), > 80(2), > 160(3)$

注: 每组虹鳟尾数为 10, 注射空载体的虹鳟血清抗体效价均小于 20(阴性)。

Note: The number of rainbow trout in each group was 10, and the serum antibody titer of rainbow trout injected with empty vector was less than 20 (negative).

2.5 抗性菌的分离结果

共分离得到 105 株氨苄青霉素抗性菌。用 16S rDNA 通用引物 PCR 扩增获得抗性菌株的 16S rDNA 基因片段, 把所有的 PCR 阳性产物进行测序, 将测序所得序列输入到 NCBI 进行 Blast 检索。所分离的抗性菌主要有以下几种: 中间气单胞菌(*Aeromonas media*)、豚鼠气单胞菌(*A. caviae*)、气单胞菌属(*Aeromonas sp.*)、弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)和柠檬酸杆菌属(*Citrobacter sp.*)。中间气单胞菌占 47%, 弗氏柠檬酸杆菌占了 32%, 豚鼠气单胞菌占了 11%, 还有 10% 的菌只能确定到气单胞菌属和柠檬酸杆菌属, 具体分布见图 4a。上述菌是从免疫后的虹鳟的粪便、肠道内容物和环境水中分离而来的, 对照组为从注射 PBS 后的虹鳟的粪便、肠道内容物和环境水中分离出来的细菌。统计分析发现, 实验组和对照组虹鳟养殖水体、粪便和肠道内容物的氨苄青霉素抗性菌的数量没有发生统计学意义上的改变($P > 0.05$, 图 4b), 且各组氨苄青霉素抗性分离菌的种类也保持一致, 具体结果如图 5~7 所示。

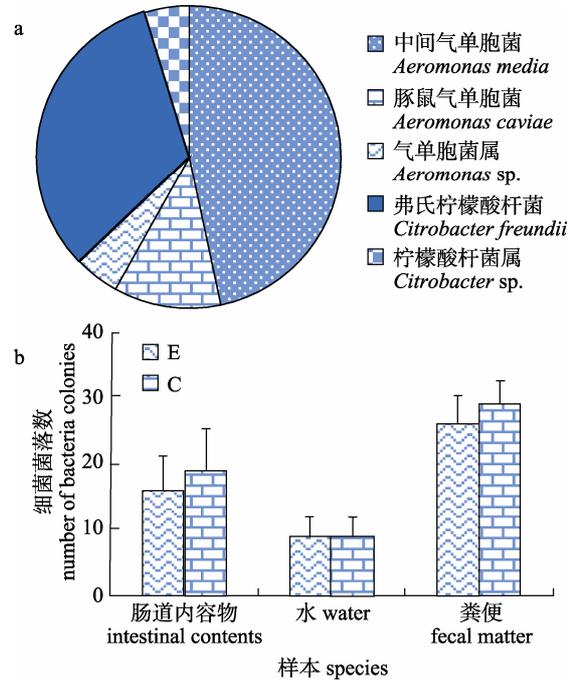


图 4 从虹鳟养殖环境中分离的氨苄青霉素抗性的细菌
E: 实验组; C: 对照组.

Fig. 4 The isolated ampicillin resistant bacteria from the environment of rainbow trout culture
E: experiment group; C: control group.

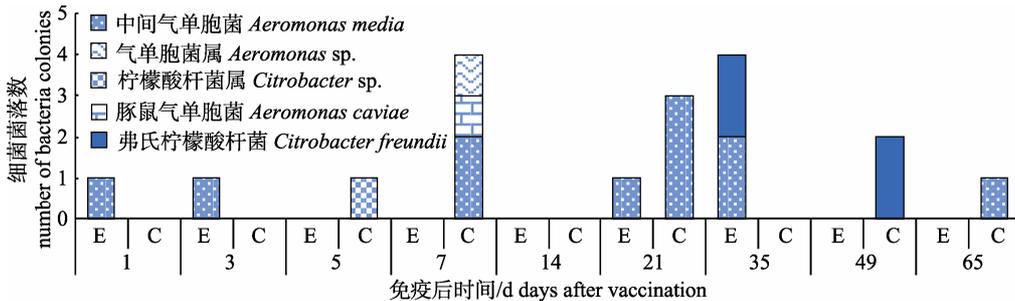


图 5 来自养殖环境水中的氨苄青霉素抗性细菌
E: 实验组; C: 对照组.

Fig. 5 Ampicillin resistant bacteria from water
E: experiment group; C: control group.

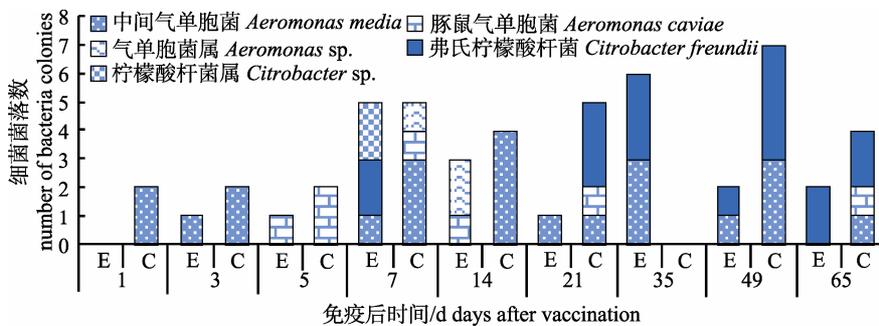


图 6 来自粪便的氨苄青霉素抗性细菌
E: 实验组; C: 对照组.

Fig. 6 Ampicillin resistant bacteria from feces
E: experiment group; C: control group.

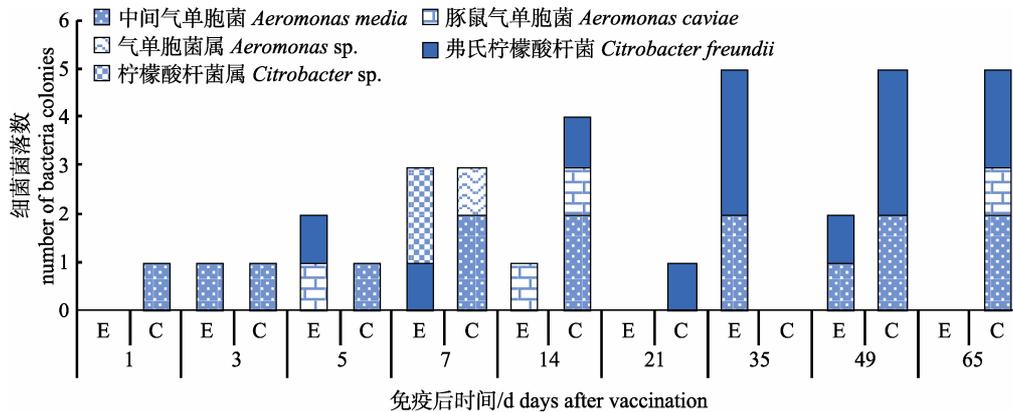


图 7 来自肠道内容物的氨苄青霉素抗性细菌

E: 实验组; C: 对照组.

Fig. 7 Ampicillin resistant bacteria from gut contents

E: experiment group; C: control group.

3 讨论

核酸疫苗接种后抗原蛋白质在宿主细胞内表达, 直接与组织相容性复合物 MHC I 或 II 类分子结合, 免疫反应刺激机体产生比较广泛的细胞免疫和体液免疫, 对疾病的防治更加有效^[15], 并且前期研究结果显示, 纳克免疫剂量的 IHN 核酸疫苗即能对虹鳟幼鱼提供高达 80%~100% 的相对保护率^[16]。本研究利用 IHNV-XJ-13 分离株的主要保护性抗原 G 基因连接载体 pcDNA3.1(+), 成功获得 IHN 核酸疫苗 pIHNxj-G, 通过背鳍基部肌肉注射免疫虹鳟, 2 μg/尾剂量的该疫苗对(5±0.5) g 虹鳟的相对保护率不管是在免疫后第 4 天还是第 30 天均能达到 90% 以上。LaPatra 等^[17]研究也发现了 IHN 核酸疫苗在免疫后第 4 天虹鳟即能对免疫虹鳟产生有效的保护, 但此时免疫虹鳟血清中并不存在 IHNV 中和抗体。干扰素信号通路的关键蛋白因子 Mx-1 已成为评价核酸疫苗刺激鱼类非特异性免疫的一个指标^[18-19], 本研究发现第 4 天时, 头肾和接种部位肌肉中 Mx-1 基因均显著上调表达, 这一结果为 IHN 核酸疫苗的早期非特异性免疫保护提供了合理的解释。免疫后第 30 天的中和抗体效价分析结果显示大多数免疫虹鳟血清中均存在中和抗体, 其中最高效价高达 160, 此时攻毒试验结果显示该核酸疫苗的相对保护率高于 90%, 该结果说明该核酸疫苗在免疫后第 30 天即可提供特异性免疫保护。综上所述, 该核酸疫苗不但

能够刺激鱼体产生非特异性免疫反应而提供早期保护, 而且能够刺激鱼体产生特异性免疫反应而提供长期特异性保护。

核酸疫苗作为一种新型疫苗, 它的安全性是一个非常值得重视的问题, 例如核酸疫苗所携带的抗性基因是否能够发生基因漂移而使环境中的其他细菌获得抗性。本研究分离所得的抗性菌主要为中间气单胞菌和弗氏柠檬酸杆菌, 并没有分离到包括大肠杆菌在内的转基因环境释放试验的指示菌。气单胞菌在自然界分布广泛, 普遍存在于淡水、污水、淤泥、土壤和人类粪便中^[20]。柠檬酸杆菌属于肠杆菌科, 是动物和人肠道内的正常菌群, 普遍分布在自然环境中^[21]。而这些菌均为天然抗氨苄青霉素菌^[22-23], 因此不是核酸疫苗载体的抗性基因漂移所致。本研究发现, 实验组和对照组的虹鳟养殖水中、粪便和肠道内容物的氨苄青霉素抗性菌的种类和数量没有发生统计学意义上的变化, 说明该核酸疫苗的抗性基因并未对环境中的抗性菌数量和种类产生影响, 因此可以初步判断核酸疫苗的氨苄青霉素抗性基因不会产生基因漂移, 不会使体内及体外环境中其他微生物获得抗性。目前, 加拿大已经有商品化的 IHN 核酸疫苗(Apex-IHN), 尽管在已有的文献报道中并没有关于疫苗载体抗性基因对环境微生物抗性影响的研究, 但是 Apex-IHN 的成功上市进一步证明了核酸疫苗的安全特性。

综上所述,本研究不但提供了一株高效的 IHN 核酸疫苗,而且初步证明了该核酸疫苗的抗性基因对免疫虹鳟的体内及体外微生物都是安全的。本研究为 IHN 核酸疫苗的安全评价提供了基础数据。

参考文献:

- [1] Meng Z N, Liu M. Epidemiology of contagious IHNV and research progress of its detection technique[J]. Scientific Fish Farming, 2010(11): 50-52. [孟兆娜, 刘敏. 传染性造血组织坏死病病毒(IHNV)的流行病学及检测技术研究进展[J]. 科学养鱼, 2010(11): 50-52.]
- [2] LaPatra S E. The use of serological techniques for virus surveillance and certification of finfish[J]. Annual Review of Fish Diseases, 1996, 6: 15-28.
- [3] Wolf K. Fish Viruses and Fish Viral Diseases[M]. Ithaca: Cornell University Press, 1988.
- [4] Alonso M, Chiou P P, Leong J A. Development of a suicidal DNA vaccine for infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2011, 30(3): 815-823.
- [5] Chiou P P, Lin C M, Perez L, et al. Effect of cecropin B and a synthetic analogue on propagation of fish viruses *in vitro*[J]. Marine Biotechnology, 2002, 4(3): 294-302.
- [6] Anderson E, Clouthier S, Shewmaker W, et al. Inactivated infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) vaccines[J]. Journal of Fish Diseases, 2008, 31(10): 729-745.
- [7] Boudinot P, Blanco M, Kinkelin P D, et al. Combined DNA immunization with the glycoprotein gene of viral hemorrhagic septicemia virus and infectious hematopoietic necrosis virus induces double-specific protective immunity and non-specific response in rainbow trout[J]. Virology, 1998, 249(2): 297-306.
- [8] Evensen Ø, Leong J A. DNA vaccines against viral diseases of farmed fish[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 35(6): 1751-1758.
- [9] Hølvold L B, Myhr A I, Dalmo R A. Strategies and hurdles using DNA vaccines to fish[J]. Veterinary Research, 2014, 45(1): 21.
- [10] Donnelly J J, Ulmer J B, Shiver J W, et al. DNA vaccines[J]. Immunology, 1997, 15(15): 771-774.
- [11] Leong J C, Johnson M, Jordan D, et al. Genetic vaccination of rain bow trout[C]. 8th International Symposium of Society of Chinese Bioscientists In America, HongKong, 1999.
- [12] Xu L M, Liu H B, Yin J S, et al. Prokaryotic Expression and immunogenicity analysis of glycoprotein from infectious hematopoietic necrosis virus[J]. Chinese Journal of Virology, 2013, 29(5): 529-534. [徐黎明, 刘红柏, 尹家胜, 等. 传染性造血器官坏死病毒糖蛋白原核表达及免疫原性分析[J]. 病毒学报, 2013, 29(5): 529-534.]
- [13] Zhao Y H, Xu L M, Liu M, et al. Isolation and identification of an infectious hematopoietic necrosis virus from Xinjiang Uygur Autonomous Region[J]. Chinese Journal of Fisheries, 2016, 29(1): 12-16. [赵羽涵, 徐黎明, 刘森, 等. 传染性造血器官坏死病毒新疆株的分离与鉴定[J]. 水产学杂志, 2016, 29(1): 12-16.]
- [14] LaPatra S E, Turner T, Lauda K A, et al. Characterization of the humoral response of rainbow trout to infectious hematopoietic necrosis virus[J]. Journal of Aquatic Animal Health, 1993, 5(3): 165-171.
- [15] Zhang J X, Zheng F R, Qu L Y, et al. Study on safety of DNA vaccine to lymphocystis disease in flounder[J]. Scientific Fish Farming, 2010(9): 55-57. [张进兴, 郑风荣, 曲凌云, 等. 牙鲆淋巴囊肿病 DNA 疫苗的安全性研究[J]. 科学养鱼, 2010(9): 55-57.]
- [16] 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.
- [17] LaPatra S E, Corbeil S, Jones G R, et al. Protection of rainbow trout against infectious hematopoietic necrosis virus four days after specific or semi-specific DNA vaccination[J]. Vaccine, 2001, 19(28-29): 4011-4019.
- [18] Schneider-Schaulies S, Schneider-Schaulies J, Schuster A, et al. Cell type-specific MxA-mediated inhibition of measles virus transcription in human brain cells[J]. Journal of Virology, 1994, 68(11): 6910-6917.
- [19] Pavlovic J, Zürcher T, Haller O, et al. Resistance to influenza virus and vesicular stomatitis virus conferred by expression of human MxA protein[J]. Journal of Virology, 1990, 64(7): 3370-3375.
- [20] Li H. Research progress of aeromonas and its infection[J]. Journal of North China Coal Medical University, 2008, 10(6): 769-771. [李皇. 气单胞菌及其感染研究进展[J]. 河北联合大学学报: 医学版, 2008, 10(6): 769-771.]
- [21] Zhou J L. RFLP typing of citrobacter O antigen gene cluster and the interpretation of five O-serogroups[D]. Tianjin: Nankai University, 2011. [周加利. 柠檬酸杆菌 O 抗原基因簇 RFLP 分型及 5 个 O 血清型基因簇的破译[D]. 天津: 南开大学, 2011.]
- [22] Qu F, Cui E B, Bao C M, et al. Resistant genes of aeromonas [J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2005, 15(3): 249-252. [曲芬, 崔恩博, 鲍春梅, 等. 气单胞菌的耐药基因研

- 究[J]. 中华医院感染学杂志, 2005, 15(3): 249-252.]
- [23] Zhu M, Xu Y H. Study on antibiotic resistance from *Citrobacter freundii*[J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2006, 27(12): 1136-1138. [朱梅, 徐元宏. 枸橼酸杆菌耐药机制的研究[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(12): 1136-1138.]

Construction of a nucleic acid vaccine against infectious hematopoietic necrosis, and the influence of resistance genes on resistance of environmental bacteria

LI Yuan^{1,2}, ZHAO Jingzhuang¹, LIU Miao¹, LU Tongyan¹, REN Guangming¹, YIN Jiasheng¹, JI Feng¹, XU Liming¹

1. Heilongjiang River Fishery Research Institute Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China;
2. College of Fishery and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: In this study, the glycoprotein (G) gene of the infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) isolate XJ-13 was cloned and inserted into a commercial vector pcDNA3.1 (+) to construct a nucleic acid vaccine (pIHNVxj-G). Rainbow trout (5 ± 0.5) g were immunized using this vaccine via the base of the dorsal fin at a dose of 2 μ g vaccine per fish. At 4 and 30 days post-vaccination (d.p.v.), the rainbow trout were challenged by IHNV-XJ-13 at a dose of 100 TCID₅₀ by intraperitoneal injection. Expression of the *Mx-1* gene in the head kidney and muscle from the vaccine delivery site was detected by real-time PCR at 4 and 7 d.p.v., respectively. During the following 65 days, fecal matter, water, and intestinal contents of the rainbow trout were collected at different time points to identify ampicillin-resistant bacteria. The results of the challenge test showed that the relative protection rate of the nucleic acid vaccine was higher than 90% at 4 and 30 d.p.v. The results of *Mx-1* gene detection showed that the *Mx-1* gene was significantly up-regulated in the head kidney and muscle from the vaccine delivery site. Neutralizing antibody titers showed that there was no neutralizing antibody (titer<20) in any of the sera at 4 d.p.v. At 30 d.p.v., neutralizing antibodies were detected from 8 of 10 serum samples, and the highest titer was 160. The ampicillin-resistant bacteria isolated in this study mainly belonged to *Aeromonas* sp. and *Citrobacter* sp., which are naturally resistant to ampicillin. However, no indicator bacteria like *Escherichia coli* were isolated, and there were no significant differences in the number or the species of the isolated ampicillin-resistant bacteria between the vaccination group and the control. This study not only provided an effective IHNV DNA vaccine, but also provided supportive data for the safety evaluation of the IHNV DNA vaccine.

Key words: infectious hematopoietic necrosis virus; nucleic acid vaccine; resistance gene; Ampicillin; environmental release

Corresponding author: XU Liming. E-mail: lmxu0917@163.com