

## 鳊传染性脾肾坏死病毒重组主衣壳蛋白免疫效果的初步验证

付小哲, 李宁求, 彭媛媛, 石存斌, 白俊杰, 吴淑勤

(中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东广州 510380)

**摘要:** 将大肠杆菌重组表达的鳊 (*Siniperca chuatsi*) 传染性脾肾坏死病毒 (ISKNV) 主衣壳蛋白 (MCP), 以不同剂量 (20  $\mu\text{g}/\text{尾}$ 、50  $\mu\text{g}/\text{尾}$ 、100  $\mu\text{g}/\text{尾}$ ) 腹腔注射免疫幼鳊 (2月龄), 测定各免疫组的血清抗体效价变化规律、头肾淋巴细胞增殖刺激指数 (SI)、肝脏 Mx 蛋白表达及相对免疫保护率 (RPS)。结果表明, 各免疫组抗体效价在第 14 天时达到峰值, 其中 50  $\mu\text{g}/\text{尾}$  免疫组的抗体效价最高, 随后各组的效价均下降, 至第 35 天时与对照组无差异; 头肾淋巴细胞经 LPS、ConA 刺激后, 50  $\mu\text{g}/\text{尾}$  免疫组及 100  $\mu\text{g}/\text{尾}$  免疫组的刺激指数均升高, 其中 50  $\mu\text{g}/\text{尾}$  免疫组的刺激指数最高, 20  $\mu\text{g}/\text{尾}$  免疫组与对照组无差异; 在免疫后 48 h 各剂量免疫组 Mx 蛋白均有低量表达, 对照组无表达, 各免疫组表达量无显著差异; 免疫后第 36 天攻毒, 50  $\mu\text{g}/\text{尾}$  免疫组的相对保护率最高, 为 64.3%。研究结果表明, 重组 MCP 蛋白有较好的免疫原性, 可以激发鳊特异性免疫及非特异性免疫应答, 当免疫剂量为 50  $\mu\text{g}/\text{尾}$  时, 免疫保护效果最好。[中国水产科学, 2009, 16(3): 388–393]

**关键词:** 鳊; 传染性脾肾坏死病毒; 主衣壳蛋白; 免疫保护

中图分类号: S94

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2009)03-0388-06

鳊 (*Siniperca chuatsi*) 是中国重要的淡水鱼特色养殖种类之一, 而近年来由传染性脾肾坏死病毒 (Infectious spleen and kidney necrosis virus, ISKNV) 导致的病毒病给鳊养殖产业造成了严重的经济损失。1997年, 吴淑勤等<sup>[1]</sup>首先在患病鳊中发现了直径 150 nm 的球形病毒, 并认为是鳊暴发性传染病的病原。1998年, 何建国等<sup>[2]</sup>通过回归感染进一步证明了该病毒的病原性, 通过组织学研究发现鳊鱼脾脏和肾脏是其感染的主要器官, 因而将其命名为传染性脾肾坏死病毒, 并通过主衣壳蛋白 (MCP) 基因等序列分析确定其为一种虹彩病毒<sup>[3]</sup>, 随后对 ISKNV 的全基因组序列进行了测定<sup>[4]</sup>。潘厚军等<sup>[5]</sup>采用灭活组织浆疫苗对鳊病毒病进行防治, 在室内和田间实验效果较好, 但是由于疫苗材料来源于病鳊内脏组织, 受季节和数量上的限制, 推广应用有一定的困难。由于基因工程疫苗不受上述条件的限制, 成为

研制鳊 ISKNV 疫苗的一个理想方法。2004年, 张敏等<sup>[6]</sup>进行了 ISKNV 主衣壳蛋白 (Major capsid protein, MCP) 的原核表达研究, 采用免疫印记的方法初步确定了重组 MCP 蛋白与 ISKNV MCP 蛋白有相同的抗原特性, 为 ISKNV 重组亚单位疫苗的研制提供了思路。本研究从抗体效价、淋巴细胞增殖指数、Mx 蛋白表达及相对免疫保护率等方面, 对 ISKNV 重组 MCP 蛋白的免疫原性进行分析, 并探讨不同免疫剂量的免疫保护效果, 旨在为鳊 ISKNV 疫苗的研制奠定基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 菌株

鳊 ISKNV 重组 MCP 基因工程菌为中国水产科学研究院珠江水产研究所保存。

#### 1.2 实验动物

实验鳊, 购于广东省佛山市某鳊养殖场, 2月龄,

收稿日期: 2008-11-15; 修订日期: 2009-01-03.

基金项目: 国家科技支撑计划资助项目 (2006BAD03B05); 广东省自然科学基金资助项目 (7004728).

作者简介: 付小哲 (1978-), 女, 助理研究员, 从事水生动物病害防治研究. Tel: 020-81617592; E-mail: fuxiaozhe-1998@163.com

通讯作者: 吴淑勤. Tel: 86-20-81616813; E-mail: wushuqin001@21cn.com

体质量40~50 g,在充气及流水养殖池内暂养2周。从中随机挑取20尾,经镜检观察,寄生虫、肝脏分离细菌、PCR检测ISKNV全部阴性,确认健康后用于实验。实验期间水温27~31℃,每天投喂饵料鱼(鲮鱼),攻毒后改为每隔3天投喂1次饵料鱼。

### 1.3 重组MCP蛋白的制备

参考张敏等<sup>[6]</sup>的方法,将ISKNV重组MCP基因工程菌于含有氨苄青霉素LB培养基中30℃培养过夜,按体积比1:50扩大培养至OD<sub>600</sub>为0.6时,立即升温至42℃,诱导表达4 h,离心收集细菌,SDS-PAGE检测蛋白的表达。超声波破菌,离心收集包涵体,经2 mol/L脲素洗涤3次,用8 mol/L脲素、50 mmol/L Tris-Cl(pH 8.5)溶解,在脲素、Tris-Cl、甘油缓冲液中4℃透析复性。Bradford法<sup>[7]</sup>测定复性蛋白的浓度,-20℃冻存备用。

### 1.4 免疫分组

将实验鳎随机分为4个实验组,分别为MCP<sub>100</sub>组、MCP<sub>50</sub>组、MCP<sub>20</sub>组、对照组,每组60尾。其中MCP<sub>100</sub>、MCP<sub>50</sub>、MCP<sub>20</sub>为疫苗免疫组,分别为腹腔注射复性蛋白100 μg/尾、50 μg/尾、20 μg/尾,对照组腹腔注射50 mmol/L Tris-Cl(pH8.5)。各组的注射剂量均为300 μL/尾。

### 1.5 血清抗体效价的测定

免疫后第7天始、每隔7天每组随机取5尾鱼,尾静脉采血制备血清,5尾鱼的血清等量混合后作为一个样品,采用间接ELISA的方法,测定各组血清抗体效价。用MCP复性蛋白(2 μg/mL)包被96孔酶标板,4℃过夜;5% BSA 37℃封闭2 h;加入倍比稀释的鳎血清(对照用PBS代替),37℃反应2 h;加入1:1 000体积比稀释的鼠抗鳎IgM单抗血清,37℃反应2 h;加入1:2 000体积比稀释的HRP-羊抗鼠抗体,37℃反应1 h;TMB显色,H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止反应。酶标仪测450 nm及405 nm处吸光值(OD),免疫组(OD<sub>450</sub>-OD<sub>405</sub>)值大于对照组(OD<sub>450</sub>-OD<sub>405</sub>)值2.1倍( $S/N > 2.1$ )判为阳性。

### 1.6 淋巴细胞增殖实验

取免疫后35 d的鳎鱼(每组随机取3尾)用70%酒精体表消毒,在无菌条件下取出头肾放在RPMI1640中,用剪刀剪碎后过200目不锈钢丝网,

4℃1 000 r/min离心10 min收集细胞,RPMI1640重悬细胞沉淀,缓慢加到等体积的淋巴细胞分离液(密度1.077)上,4℃1 000 r/min离心30 min,分离淋巴细胞;分离的淋巴细胞用RPMI1640洗2次后,重悬于RPMI1640完全培养基(含10%小牛血清)中,0.4%台盼兰活体染色计数活细胞数在95%以上,调细胞密度至 $1 \times 10^6$ 个/mL。将调整好浓度的细胞加入96孔细胞培养板中,每孔100 μL,分别用LPS及ConA刺激淋巴细胞增殖。每孔加入LPS(1mg/mL)5 μL,ConA(100 μg/mL)10 μL,同时设空白对照(即不加刺激物),每个样品重复3个孔,28℃培养62 h,再加入MTT(5 mg/mL)10 μL继续培养4 h,加入酸性10% SDS溶液100 μL至完全溶解,酶标仪测570 nm处吸光值(OD),并计算淋巴细胞增殖刺激指数SI( $SI = \text{添加刺激物淋巴细胞培养液吸光值} / \text{未添加刺激物淋巴细胞培养液吸光值}$ )。

### 1.7 重组MCP诱导鳎Mx蛋白体内表达

免疫后24 h、48 h随机取3尾鳎的肝脏(等量混合),按照SV Total RNA Isolation System试剂盒方法(Promega)提取总RNA,用DNA酶(Promega)消化后,取RNA样品用1%琼脂糖凝胶电泳检测提取RNA的质量和浓度。以18s RNA作为DNA残留检测基因,PCR检测RNA中的DNA是否消化完全,如有目的带(280 bp)出现,则需重新消化RNA样品。

取2 μg消化完全的RNA样品进行逆转录反应,以cDNA为模板、18s RNA为内标,半定量PCR方法检测重组MCP诱导鳎Mx蛋白mRNA的表达。18s RNA及Mx蛋白的PCR反应体系为:10×PCR Buffer 2.5 μL,引物F(25 μmol/L)、引物R(25 μmol/L)各0.5 μL,dNTPs(10 mmol/L)0.5 μL,Taq E(5 U/μL)0.5 μL,RNA或cDNA 2 μL,无菌双蒸水补足25 μL;反应条件为94℃预变性3 min,然后以94℃变性30 s、52℃30 s、72℃延伸1 min进行30个循环反应,循环结束后72℃再延伸8 min。所用引物如下:

18S\_F: 5'-ATGCTACTTTAGCGCCTAC-3'

18S\_R: 5'-TATACGCTATTGGAGCTGG-3'

Mx\_F: 5'-TATGAGGAGAAGGTGCCGTCCCTGCA  
TCGACCT-3'

Mx\_R: 5'-CCCCTGCACCTGACGATCATGTAGC-3'

## 1.8 相对免疫保护率的测定

取具有典型鳃病毒病症状的鳃鱼脾和头肾,经PCR检测为ISKNV阳性后,以1:10质量体积比加PBS冰浴匀浆,4℃4 000 r/min离心30 min,取上清经0.22 μm微孔滤膜过滤除菌,加入青霉素和链霉素至1 000 UI/mL,4℃冰箱中保存。取病毒滤液接种于胰蛋白胨琼脂培养基上,培养温度为30℃,48 h后,观察培养基上无细菌生长,此滤液用于人工感染实验。免疫后36 d,背肌注射病毒液300 μL,连续观察15 d,每天早晚观察记录各组鱼的死亡情况。取死亡鱼的脾、肾进行ISKNV的PCR检测,对肝、脾、肾、脑进行细菌分离,以确定死因,并计算相对免疫保护率(Relative percentage survival, RPS)。

相对免疫保护率(RPS) = (1 - 免疫组死亡率 / 对照组死亡率) × 100%

## 2 结果与分析

### 2.1 血清抗体效价

免疫后7 d各免疫组即可检测到抗体。第14天时各免疫组的抗体效价达到峰值,其中MCP<sub>50</sub>的最高,为1:600;MCP<sub>100</sub>组次之,为1:400;MCP<sub>20</sub>组相对最低,为1:200。随后各免疫组的抗体效价均呈下降趋势,至35 d时与对照组无显著差异(图1)。结果显示,3个免疫组中,MCP<sub>50</sub>组可刺激鱼体产生最强的体液免疫应答。

### 2.2 淋巴细胞增殖指数

各组鳃头肾淋巴细胞经LPS、ConA刺激后,淋巴细胞均有增殖反应,其中MCP<sub>50</sub>组的刺激指数最高,其次为MCP<sub>100</sub>,与对照组有显著差异( $P < 0.05$ );而MCP<sub>20</sub>与对照组的刺激指数无显著差异( $P > 0.05$ ),如图2所示。结果表明,重组MCP蛋白可刺激机体产生体液免疫和细胞免疫,且刺激指数与免疫剂量存在一定的相关性,免疫剂量为50 μg/尾时,淋巴细胞增殖反应最强;免疫剂量为100 μg/尾时,增殖反应下降;而免疫剂量为20 μg/尾时,不能有效地刺激淋巴细胞增殖。

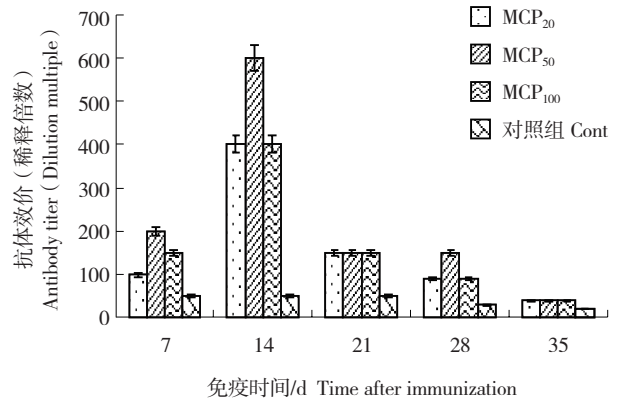


图1 各实验组血清抗体效价比较

MCP<sub>20</sub>、MCP<sub>50</sub>、MCP<sub>100</sub>分别为鳃腹腔注射复性蛋白20 μg/尾、50 μg/尾和100 μg/尾组。

Fig. 1 Comparison of titer of antibody in serum of different experimental group

MCP<sub>20</sub>, MCP<sub>50</sub> and MCP<sub>100</sub> mean the groups at MCP injection doses of 20 μg/ind, 50 μg/ind and 100 μg/ind, respectively.

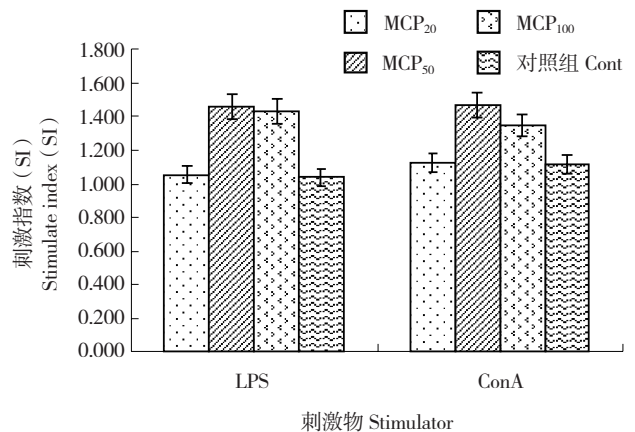


图2 不同实验组淋巴细胞增殖刺激指数

MCP<sub>20</sub>、MCP<sub>50</sub>、MCP<sub>100</sub>分别为鳃腹腔注射复性蛋白20 μg/尾、50 μg/尾和100 μg/尾组。

Fig. 2 Stimulation index of lymphocyte proliferation in different experimental group

MCP<sub>20</sub>, MCP<sub>50</sub> and MCP<sub>100</sub> mean the groups at MCP injection doses of 20 μg/ind, 50 μg/ind and 100 μg/ind, respectively.

### 2.3 重组MCP诱导鳃Mx蛋白体内表达

重组MCP免疫后48 h, MCP<sub>20</sub>、MCP<sub>50</sub>、MCP<sub>100</sub>组鳃肝脏组织Mx蛋白的mRNA均有低量表达,各组间表达量无显著差异( $P > 0.05$ );而免疫后24 h,各组均未检测到Mx蛋白的表达(图3)。

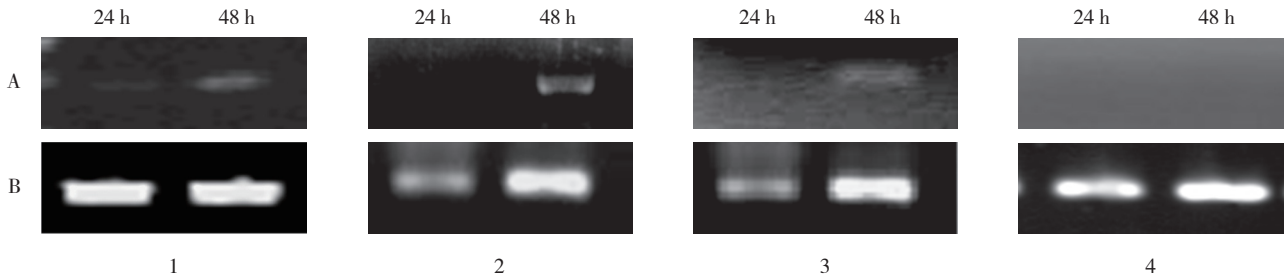


图3 MCP免疫后24 h、48 h肝脏组织Mx蛋白的表达

A: Mx 基因片段; B: 18s RNA 基因片段。1: MCP<sub>20</sub>组; 2: MCP<sub>50</sub>组; 3: MCP<sub>100</sub>组; 4: 对照组  
 Fig. 3 Expression of Mx mRNA from liver after induced 24 h & 48 h by MCP protein  
 A: Mx gene fragment; B: 18s RNA gene fragment.  
 1: MCP<sub>20</sub> group; 2: MCP<sub>50</sub> group; 3: MCP<sub>100</sub> group; 4: control group

2.4 相对免疫保护率

攻毒后第2天开始除MCP<sub>100</sub>组外, 各组均有鱼死亡; 第3~6天, 对照组死亡加剧, 累积死亡率约80%, 至第9天时累积死亡率达100%; MCP<sub>20</sub>组在第2~9天内累积死亡率达89.3%, MCP<sub>100</sub>组在第3~9天内累积死亡率为57.1%, MCP<sub>50</sub>组在第2~11天内累积死亡率为35.7%; 11 d后各组均无实验鱼死亡。死亡鱼经PCR检测及细菌分离, 证实均为ISKNV感染导致死亡。攻毒结果显示(图4): 对照组相对于其他免疫组, 死亡速度最快、死亡率最高; 而各免疫组在一定程度上均延缓了死亡时间, 其中MCP<sub>50</sub>组免疫保护效果最好, 相对免疫保护率为64.3%; MCP<sub>100</sub>组免疫保护效果次之, 相对免疫保护率为42.9%; MCP<sub>20</sub>组的相对保护率仅为10.7%。

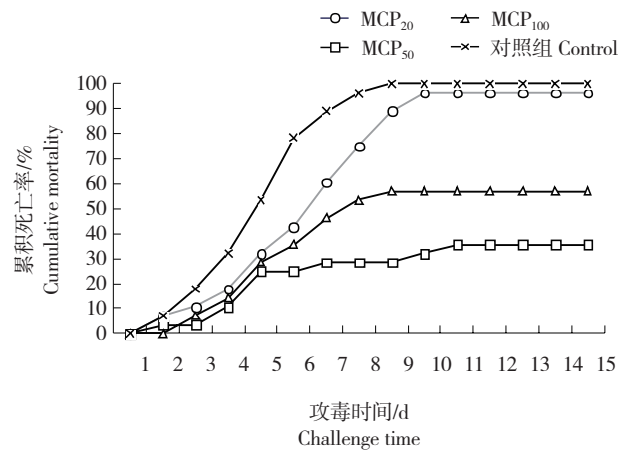


图4 不同实验组累积死亡率曲线  
 MCP<sub>20</sub>、MCP<sub>50</sub>、MCP<sub>100</sub>分别为鳃腹腔注射复性蛋白20 μg/尾、50 μg/尾和100 μg/尾组。  
 Fig. 4 Cumulative mortality curves of different experimental group  
 MCP<sub>20</sub>, MCP<sub>50</sub> and MCP<sub>100</sub> mean the groups at MCP injection doses of 20 μg/ind, 50 μg/ind and 100 μg/ind, respectively.

3 讨论

3.1 淋巴细胞增殖

鱼类的淋巴细胞中能对ConA和LPS产生刺激反应的细胞在功能上相对于哺乳动物的T细胞和B细胞<sup>[8]</sup>, 且鱼类的头肾相当于哺乳动物的脊髓<sup>[9]</sup>, 因此通过检测实验鱼的T、B淋巴细胞增殖反应强弱, 可反映鱼体的细胞免疫和体液免疫功能状态。曾慷等<sup>[10]</sup>采用MTT比色法研究了ConA、LPS对健康和ISKNV感染后的鳃头肾淋巴细胞转化的影响, 结果表明ConA、LPS能够促进健康鳃头肾淋巴细胞的转化。秦磊等<sup>[11]</sup>采用MTT比色法对嗜水气单胞菌与迟

缓爱德华氏菌亚单位偶联疫苗免疫小鼠后的脾淋巴细胞刺激指数进行了检测, 结果表明, 小鼠经亚单位疫苗免疫后, 脾淋巴细胞可以有较好地增殖, 可产生细胞免疫。陈昌福<sup>[12]</sup>采用MTT比色法对鲤胸腺、头肾和血液中的淋巴细胞刺激指数进行了测定, 结果表明, LPS可刺激血液、头肾、胸腺中淋巴细胞增值, 其中头肾的SI为1.33。本研究发现, 鳃头肾淋巴细胞经ConA、LPS诱导后刺激指数均有上升, 其中50 μg重组MCP蛋白免疫组的SI最高, 说明重组MCP蛋白

可诱导鳎产生细胞免疫及体液免疫应答,且应答水平与剂量存在一定的相关性。

### 3.2 MCP蛋白诱导Mx蛋白体内表达

Mx蛋白是由I型干扰素(IFN $\alpha/\beta$ )诱导宿主细胞产生的、具有广泛抗病毒作用的蛋白,是非特异免疫研究的一个非常理想的标记基因,近年来已相继在多种鱼类中发现了具有部分抗病毒活性的Mx蛋白,如:褐牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)<sup>[13]</sup>、石斑鱼(*Epinephelus coioides*)<sup>[14]</sup>、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)<sup>[15]</sup>、大西洋鲑(*Salmo salar*)<sup>[16]</sup>、斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)<sup>[17]</sup>、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)<sup>[18]</sup>、鳊(*Siniperca chuatsi*)<sup>[19]</sup>等。本实验结果表明,各剂量的MCP蛋白均可诱导鳎Mx蛋白表达。曾有研究认为<sup>[20]</sup>,除病毒、双链RNA等I型干扰素诱导剂外,细菌及其他微生物感染细胞并不能诱导Mx蛋白表达。而近年来研究发现,虹鳟<sup>[21-22]</sup>经DNA疫苗免疫后,从肾和肝检测到高浓度的Mx蛋白表达;石斑鱼<sup>[23]</sup>经腹腔注射鳃弧菌后第3天,脾脏Mx基因显著表达。Chen等<sup>[14]</sup>研究发现,石斑鱼Mx基因前的启动子上,不仅带有IFN激活反应元件ISRE(IFN-stimulated response element),还有NF- $\kappa$ B(Nuclear factor kappa B)的结合位置,推测Mx蛋白不仅可通过IFN途径诱导表达,还可能通过NF- $\kappa$ B途径激活诱导表达。因此,本研究中Mx蛋白的表达,可能是由于MCP蛋白通过Toll样受体(TLRs)信号转导通路激活NF- $\kappa$ B诱导产生,从而使鳎产生抗病毒的非特异性免疫,且Mx蛋白的表达量与免疫剂量无相关性。

### 3.3 MCP蛋白作为候选疫苗

MCP是虹彩病毒的主要结构蛋白,在病毒感染过程中其表达量占病毒粒子总蛋白的45%左右<sup>[24]</sup>,是病毒粒子的主要抗原蛋白。本研究发现,注射免疫重组MCP蛋白可获得较好的免疫保护效果,相对免疫保护率为64.3%。Húsgarð等<sup>[25]</sup>克隆表达了神经坏死病毒SJNNV株的主衣壳蛋白基因T2片段,制备油包水乳剂免疫大菱鲆,5周后相对存活率为33%,10周后相对存活率为82%。陈晓艳<sup>[26]</sup>克隆表达了神经坏死病毒OGNNV株的主衣壳蛋白基因片段,将表达产物直接免疫斜带石斑鱼,一次免疫后相

对保护率为22.2%,3次免疫后相对保护率为55.6%。Christopher等<sup>[24]</sup>构建了真鲷虹彩病毒(RSIV)6个基因的DNA疫苗,其中MCP疫苗的相对保护率最好,为57.1%。说明主衣壳蛋白是多种鱼类病毒较好的保护性抗原。综上所述,重组MCP蛋白可诱导鳎产生特异性及非特异性免疫应答,可对鱼体产生较好的免疫保护效果,是鳎虹彩病毒疫苗研制的候选抗原。

### 参考文献:

- [1] 吴淑勤,李新辉,潘厚军,等. 鳎爆发性传染病病原研究[J]. 水产学报,1997,21: 56-60.
- [2] 何建国,翁少萍,黄志坚,等. 鳎爆发性流行病病毒病原研究[J]. 中山大学学报:自然科学版,1998,37: 74-77.
- [3] 邓敏,何建国,左涛,等. 鳎传染性脾肾坏死病毒(ISKNV)PCR检测方法的建立及虹彩病毒新证据[J]. 病毒学报,2000,16(4): 365-369.
- [4] He J G, Deng M, Weng S P, et al. Complete genome analysis of the mandarin fish infectious spleen and kidney necrosis iridovirus [J]. Virology, 2001,291: 126-139.
- [5] 潘厚军,吴淑勤,石存斌,等. 鳎疫苗预防鳎病毒性暴发性传染病试验[J]. 水产科技,2000,6: 18-21.
- [6] 张敏,白俊杰,劳海华,等. 鳎传染性脾肾坏死病毒主要衣壳蛋白基因的原核表达[J]. 中国病毒学,2004,19(2): 137-140.
- [7] 汪家政,范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社,2002: 42-47.
- [8] Partula S. Surface markers of fish T-cells [J]. Fish Shellfish Immunol, 1999,9: 241-257.
- [9] Dalmo R A, Ingebrigtsen K, Bogwald J. Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES) [J]. J Fish Dis, 1997,20(3): 241-273.
- [10] 曾慷,何建国,王晓红,等. 传染性脾肾坏死病毒、ConA和LPS对体外鳎的头肾淋巴细胞转化的影响[J]. 水产学报,2001,25(5): 464-468.
- [11] 秦磊,陆承平,陈怀青. 细菌亚单位疫苗免疫小鼠的细胞免疫指标检测[J]. 南京农业大学学报,1999,22(4): 73-76.
- [12] 陈昌福. 柱状嗜纤维菌脂多糖对鲤不同组织中离体培养淋巴细胞转化率的影响[J]. 华中农业大学学报,1998,17(1): 66-70.
- [13] Lin OE, Ohira T, Hirono I, et al. Immunoanalysis of antiviral Mx protein expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) cells [J]. Dev Comp Immunol,2005,29(5): 443-455.
- [14] Chen YM, Su YL, Lin JH, et al. Cloning of an orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) Mx cDNA and characterisation of its expression in response to nodavirus [J]. Fish Shellfish Immunol, 2006, 20(1): 58-71.
- [15] Acosta F, Petrie A, Lockhart K, et al. Kinetics of Mx expression in

- rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr in response to VHS-DNA vaccination[J]. Fish Shellfish Immunol, 2005, 18 (1): 81–89.
- [16] Lockhart K, Gahlawat SK, Soto-Mosquera D, et al. IPNV carrier Atlantic salmon growers do not express Mx mRNA and poly I: C-induced Mx response does not cure the carrier state [J]. Fish Shellfish Immunol, 2004, 17 (4): 347–352.
- [17] Plant KP, Thune RL. Cloning and characterisation of a channel catfish (*Ictalurus punctatus*) Mx gene [J]. Fish Shellfish Immunol, 2004, 16 (3): 391–405.
- [18] 王伟, 白俊杰, 劳海华, 等. 草鱼 Mx 蛋白基因的克隆与原核表达 [J]. 中国水产科学, 2003, 10 (5): 365–369.
- [19] 吴海峰, 白俊杰, 劳海华, 等. 鳊鱼 Mx 蛋白全长 cDNA 的克隆和序列分析 [J]. 中国病毒学, 2004, 19 (3): 271–275.
- [20] 闫若潜, 吴文学, 夏春, 等. Mx 蛋白研究进展 [J]. 动物医学进展, 2004, 25 (6): 52–55.
- [21] Boudinot P, Blanco M, de Kinkelin P, 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 nonspecific response in rainbow trout [J]. Virology, 1998, 249 (2): 297–306.
- [22] Kim C H, Johnson M C, Drennan J D, et al. DNA vaccines encoding viral glycoproteins induce nonspecific immunity and Mx protein synthesis in fish [J]. Virology, 2000, 74 (15): 7 048–7 054.
- [23] 吴政隆. 发展以弧菌为载体之石斑鱼神经坏死病疫苗 [D]. 台北: 台湾国立成功大学生物科技研究所, 2005.
- [24] Christopher Marlowe A. Caipang, Tomokazu Takano, Ikuo Hirono, et al. Genetic vaccines protect red seabream, *Pagrus major*, upon challenge with red seabream iridovirus (RSIV) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2006, 21 (2): 130–138.
- [25] Húsgarð S, Grotmol S, Hjeltnes Brit K, et al. Immune response to a recombinant capsid protein of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) in turbot *Scophthalmus maximus* and Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*, and evaluation of a vaccine against SJNNV [J]. Dis Aqu Organ, 2001, 45: 33–44.
- [26] 陈晓艳. 斜带石斑鱼神经坏死病毒基因组序列测定与分析及其主衣壳蛋白基因的克隆、表达和免疫保护研究 [D]. 广州: 中山大学, 2004.

## Immune effect of recombinant major capsid protein of infectious spleen and kidney necrosis virus from *Siniperca chuatsi*

FU Xiao-zhe, LI Ning-qiu, PENG Yuan-yuan, SHI Chun-bin, BAI Jun-jie, WU Shu-qin

(Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China)

**Abstract:** Infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) from mandarin fish, *Siniperca chuatsi*, is the causative agent of a disease causing high mandarin fish mortalities and leading to great economic losses in China. In this study, to develop a vaccine to protect mandarin fish against infection with ISKNV, the immunogenicity of the recombinant major capsid protein (MCP) was tested with several experiments. The juvenile Mandarin fish were vaccinated by intraperitoneal injection with MCP expressed in *E. coli*, and the dose was 20 µg/ind, 50 µg/ind and 100 µg/ind respectively. Several immunological indexes were measured which include the kinetics of serum antibody, the stimulation index (SI) of the head kidney lymphocyte proliferation, the expression of Mx (myxovirus resistance) protein in liver and the relative percentage survival (RPS). The results showed that the antibody titer of the 50 µg/ind group was higher than the others, and on the 14<sup>th</sup> day that of each vaccination group reached the peak, then dropped down, on the 35<sup>th</sup> day that of each vaccination group showed no difference from the control group. After head kidney lymphocyte of each group stimulated with LPS and ConA, respectively, the SI of 50 µg/ind group was the highest and that of 20 µg/ind group showed no difference from the control group. The Mx protein expressed low-levelly at 48 h post-vaccination, and its expression showed no significant difference in three vaccination groups. After virulent challenge infection, the RPS of 50 µg/ind group was the highest, accounting for 64.3%. In conclusion, the best specific and nonspecific immunity of *Siniperca chuatsi* were induced by renatured MCP with dose of 50 µg/ind. [Journal of Fishery Sciences of China, 2009, 16 (3): 388–393]

**Key words:** *Siniperca chuatsi*; infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV); major capsid protein (MCP); immune protection

**Corresponding author:** WU Shu-qin. E-mail: wushuqin001@21cn.com