

DOI: 10.12264/JFSC2023-0066

鲤疱疹病毒 II 型 *ORF66* 基因 DNA 疫苗载体的构建及其免疫效果

邵玲, 刘亚楠, 张明辉, 彭军辉, 高晓华, 张小明

上海市水产研究所; 上海市水产技术推广站, 上海 200433

摘要: 鲤疱疹病毒 II 型(CyHV-2)能够引起鲫大量死亡, 严重威胁我国水产养殖业的健康发展, 目前, 针对 CyHV-2 尚无有效的商业化疫苗或治疗措施。为构建 CyHV-2 DNA 疫苗, 本研究将其衣壳蛋白 ORF66 编码基因克隆至 pVAX1 真核表达载体上, 构建重组质粒 pVAX-*ORF66*。此外, 在 BL21(DE3)pLysS 中对 ORF66 蛋白进行了原核表达, 表达蛋白经纯化后免疫新西兰白兔制备了 ORF66 特异性抗体。酶联免疫吸附(ELISA)检测显示, 制备抗体效价达 1 : 20000 以上。将 pVAX-*ORF66* 质粒转染金鱼脑细胞系(GFB), 利用制备的 ORF66 抗体进行间接免疫荧光(IFA)检测, 结果显示, ORF66 蛋白可以在细胞中大量表达, 且主要定位于细胞质中。将 pVAX-*ORF66* 质粒肌肉注射鲫后进行 CyHV-2 免疫保护实验, 结果表明, 其相对免疫保护率达 55.6%。本研究针对 CyHV-2 构建了一种制备简单、成本低廉的 DNA 疫苗, 为鲫造血器官坏死病的免疫预防及感染分子机制研究奠定了前期实验基础。

关键词: 鲤疱疹病毒 II 型; ORF66 蛋白; DNA 疫苗; 免疫保护

中图分类号: S941

文献标志码: A

文章编号: 1005–8737–(2023)06–0775–11

鲤疱疹病毒 II 型(cyprinid herpesvirus 2, CyHV-2), 也称金鱼造血器官坏死病毒, 最早于 1992 年由日本学者从金鱼(*Carassius auratus*)中分离得到^[1], 为有囊膜的线性双链 DNA 病毒。CyHV-2 病毒粒子呈椭圆形, 直径 170~220 nm, 与鲤痘疮病毒(CyHV-1)、锦鲤疱疹病毒(CyHV-3)同隶属于鱼蛙疱疹病毒科鲤疱疹病毒属(Cyprinivirus)^[2–3]。CyHV-2 能够感染鲫(*Carassius auratus*)及其变种如异育银鲫(*Carassius auratus*)、金鱼及金鱼和鲤的杂交体, 且鱼卵、鱼苗、幼鱼、成鱼均易感。CyHV-2 常于水温 15~25 °C 时发病, 在全球多个国家和地区都有流行, 致死率高达 90%~100%^[4–8]。近年来, 我国江苏、北京、广州、武汉等地也暴发了由 CyHV-2 感染导致的异育银鲫大规模死亡病例, 造成了重大经济损失^[9–12]。由 CyHV-2 感染所引发的鲫造血器官坏死病已成为

严重危害我国鲫养殖业健康发展的重要疾病之一。目前, 针对 CyHV-2 仍缺乏有效的疫苗和治疗措施, 因此开发安全、高效的保护性疫苗对于预防该病的暴发和流行具有重要意义。

疫苗是预防水生动物疾病发生、保障水产养殖业绿色发展的有效途径。DNA 疫苗是新型疫苗的一种, 其制备成本低、容易运输和储存, 且不存在毒力返强现象, 免疫途径也多种多样, 具有良好的发展潜力和应用前景^[13]。1996 年, Anderson 等^[14]首次利用传染性造血器官坏死病毒(IHNV)的 G 基因构建了 DNA 疫苗, 将其肌肉注射虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)后, 病毒中和实验和攻毒保护实验均证实该疫苗可以诱导对 IHNV 的免疫保护。其后, 在斑马鱼(*Danio rerio*)、鲤(*Cyprinus carpio*)、大西洋鲑(*Salmo salar*)等多种鱼类中的研究均表明, 外源 DNA 能在其体内高效表达, 并可

收稿日期: 2023-03-24; 修订日期: 2023-05-10.

基金项目: 上海市科技兴农重点攻关项目(2021-02-08-00-12-F00755); 上海市自然科学基金项目(21ZR1457800); 上海市青年科技启明星计划项目(21QA1408300); 国家自然科学基金项目(31602196).

作者简介: 邵玲(1986–), 女, 博士, 研究员, 研究方向为水生动物 RNA 病毒. E-mail: lingshao405@163.com

诱导机体产生特异性的免疫应答^[15]。

DNA 疫苗制备的关键步骤是将保护性抗原编码基因及其调控元件构建至真核表达载体上。CyHV-2 相关研究中, 贡成良等^[16]利用家蚕杆状病毒表达系统, 构建了含有 CyHV-2 4 个 ORF 区的 DNA 疫苗 BmNPV-FA-D4ORF, 注射和口服免疫保护率分别为 80.01% 和 59.3%, 但杆状病毒系统基因片段长达 100 kb, 存在制备复杂、生产成本高、糖基化水平低等缺陷, 限制了其在实际生产中的应用。pVAX1 是专门设计用于 DNA 疫苗开发的真核表达载体, 其可以在大肠杆菌中进行高拷贝复制, 并含有 CMV 强启动子, 能够在真核细胞中实现目的蛋白高水平表达。pVAX1 还具有以下特点: (1) 其是 FDA 批准的可用于人体实验的载体, 基因安全性高; (2) 其仅保留真核表达所需的最基本 DNA 序列, 以最大限度减少染色体整合的可能性; (3) 因氨苄青霉素在部分机体中可诱发过敏反应, 其采用卡那霉素抗性作为替代筛选基因^[17-18]。因此, pVAX1 在基因安全性及制备简便程度上均优于杆状病毒表达系统。然而, 目前 pVAX1 载体在鱼类病毒 DNA 疫苗开发中尚未见应用报道。

CyHV-2 基因组全长 290304 bp, 共编码约 154 个开放阅读框(ORFs)^[19]。2020 年, 高娃等^[20]通过纯化 CyHV-2 病毒粒子, 共鉴定出 8 种 CyHV-2 主要免疫原性蛋白, 分别为 ORF66、ORF92、ORF115、ORF25、ORF57、ORF72、ORF131 和 ORF132, 其中, ORF66 为核衣壳蛋白。病毒衣壳蛋白一般具有较强的免疫原性, 在疫苗和免疫学检测方法开发中具有重要的应用价值。近期, 张小米等^[21]对 ORF66 截短蛋白进行了多克隆抗体的制备及互作多肽的筛选, Guo 等^[22]制备了针对 ORF66 的单克隆抗体并对感染细胞和组织进行了检测。然而, 目前 ORF66 分子生物学相关研究仍十分缺乏, 其高效 DNA 疫苗的开发也有待加强。本研究首次将 ORF66 全长 cDNA 克隆至真核表达载体 pVAX1 上, 构建了真核重组质粒 pVAX-ORF66, 并进一步探索了其在 GFB 细胞中的表达、定位及鲫免疫保护效果。研究结果为 CyHV-2 DNA 疫苗的开发提供了实验基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

M199 细胞培养液、胰酶、胎牛血清(FBS)、青霉素/链霉素溶液购自 GIBCO 公司; 病毒 DNA 提取试剂盒、PrimeSTAR HS DNA Polymerase PCR *Taq* 酶、限制性内切酶、DNA Marker、T4-DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司; 预染蛋白 Marker、ProBond Purification System 蛋白纯化试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、PCR 胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒、脂质体 Lipofectamine 2000、Alexa Fluor 488 标记的羊抗兔 IgG(H+L)购自 Invitrogen 公司; 细胞核染液 DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole)购自 Roche 公司; 异丙基硫代- β -D-半乳糖苷(IPTG)购自 Merck 公司; 辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG(H+L)购自 Jackson ImmunoResearch 公司; ECL 化学发光检测试剂购自天根生化科技(北京)有限公司。

1.2 细胞、病毒、菌株和质粒

金鱼脑细胞系(goldfish brain cell, GFB)由连云港海关段宏安研究员惠赠^[23]。细胞用含 10% FBS、100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的 M199 培养基于 25 $^{\circ}$ C 培养。CyHV-2 由本实验室分离和保存。大肠杆菌 DH5 α 、BL21(DE3)pLysS 感受态细胞购自 TaKaRa 公司; 原核表达载体 pRSET-A 和真核表达载体 pVAX1 购自 Invitrogen 公司。

1.3 CyHV-2 ORF66 基因的克隆

利用病毒 DNA 提取试剂盒抽提 CyHV-2 感染鲫核酸。根据 GenBank 中 CyHV-2 ORF66 基因序列, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计引物(表 1)并由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。PCR 扩增体系为 50 μ L, 包括 ddH₂O 31.5 μ L、5 $\times$ PrimeSTAR Buffer (Mg²⁺ plus) 10 μ L、上下游引物 (10 μ mol/L)各 1 μ L、dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 4 μ L、PrimeSTAR HS DNA Polymerase (2.5 U/ μ L) 0.5 μ L、cDNA 模板 2 μ L。PCR 反应条件为 98 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 98 $^{\circ}$ C 变性 10 s、58 $^{\circ}$ C 退火 5 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min; 4 $^{\circ}$ C 保温。

1.4 质粒构建

将回收的 PCR 产物和原核表达质粒 pRSET-A

分别用 *Bam* HI 和 *Hind* III 进行双酶切, 酶切片段回收后在 T4-DNA 连接酶作用下于 16 ℃ 连接过夜, 连接产物转化 DH5 α 大肠杆菌感受态细胞, 菌液 PCR 筛选阳性克隆并送生工生物工程(上海)股份有限公司进行双向序列测定, 测序正确的质粒命名为 pRSET-ORF66。此外, 将 ORF66 基因 PCR 扩增后构建至真核表达质粒 pVAX1 上, 菌液 PCR 筛选阳性克隆, 双向测序验证正确后将其命名为 pVAX-ORF66。

表 1 本研究所用引物
Tab. 1 Details of the primers used in this study

引物名称 primer	序列(5'—3') sequence (5'—3')	酶切位点 restriction site
pRSET-ORF66F	ATT <u>GGATCC</u> ATGACCTCCCT CCAGCAAGCTA	<i>Bam</i> HI
pRSET-ORF66R	CCG <u>AAGCTT</u> AATAAATCATG AGATCGTCTAGGTCGTG	<i>Hind</i> III
pVAX-ORF66F	ATT <u>AAGCTT</u> GCCACCATGAC CTCCCTCCAGCAAGCTA	<i>Hind</i> III
pVAX-ORF66R	CCG <u>GGATCC</u> TTAATAAATCA TGAGATCGTCTAGGTCGTG	<i>Bam</i> HI

注: 下划线表示限制性内切酶酶切位点。
Note: Underline indicates restriction site.

1.5 ORF66 蛋白的原核表达

将重组质粒 pRSET-ORF66 转化 BL21(DE3)-pLysS 感受态细胞, 挑取单克隆进行 PCR 鉴定、保存。将空载体对照菌和 ORF66 重组表达菌 pRSET-ORF66-BL21(DE3)pLysS 分别用 1 mmol/L 的 IPTG 进行诱导表达, 5000 g 离心 10 min, 收集诱导前(0 h)和诱导后 1、3、5 h 的菌体。用适量体积 PBS 重悬, 冻融破碎 3 次后, 5000 g 离心 10 min, 分别收集上清和沉淀, 并进行 SDS-PAGE 电泳分析。

收集诱导表达 5 h 的菌体, 超声破碎后采用蛋白纯化试剂盒进行重组蛋白的纯化, 纯化产物置于透析袋(截留分子量 14 kD)中 4 ℃ 透析过夜。利用 BCA 试剂盒测定纯化蛋白浓度, 并取 30 μ g 纯化产物进行 SDS-PAGE 电泳检测。

1.6 ORF66 抗体的制备

采用本实验室建立的抗体制备方法^[24], 其步骤简要如下: 将纯化 ORF66 蛋白皮下多点免疫新西兰白兔, 免疫剂量为 500 μ g/只, 加等量完全弗氏佐剂乳化。首次免疫后每隔两周加强免疫 1 次, 共 4 次, 均加等量不完全弗氏佐剂。免疫后颈动

脉采血, 离心获得抗血清, 抗血清经 Protein A 柱纯化得到多克隆抗体。采用间接 ELISA 方法测定制备抗体的效价, 将 1 μ g/mL 纯化 ORF66 重组蛋白作为抗原包被 96 孔酶标板, 将制备抗体倍比稀释至 1 : 80000 作为一抗, 每个稀释度设置 3 个复孔, 以 HRP 标记的羊抗兔 IgG(H+L)抗体作为二抗, 显色后用酶标仪测定 OD₄₅₀ 处吸光值(A)。当 P/N>2.1 时为阳性, P 为 A_{实验孔}-A_{空白孔}, N 为 A_{阴性孔}-A_{空白孔}。

1.7 蛋白免疫印迹试验(Western blot)

SDS-PAGE 电泳结束后, 利用 Bio-Rad 蛋白转印系统将蛋白转印至 PVDF 膜, 以制备的多克隆抗体作为一抗(1 : 1000 稀释), HRP 标记的羊抗兔 IgG(H+L)作为二抗(1 : 10000 稀释), 检测 ORF66 蛋白的表达, 采用 ECL 化学发光检测试剂显色, 拍照保存。

1.8 间接免疫荧光(indirect immunofluorescence assay, IFA)

将 10⁷ TCID₅₀/mL 的 CyHV-2 感染 GFB 细胞。此外, 将 pVAX-ORF66 质粒转染 GFB 细胞, 同时转染空载体 pVAX1 作为阴性对照, 转染步骤按照 Lipofectamine 2000 说明书操作。感染后 72 h 及转染后 36 h, 细胞用 4%多聚甲醛室温固定 30 min, PBS 洗 3 次后加入 0.2% Triton X-100 通透 15 min, PBS 洗 3 次, 4%牛血清白蛋白(BSA) 37 ℃ 封闭 2 h, 加入 ORF66 多克隆抗体(1 : 500 稀释), 37 ℃ 孵育 2 h, PBS 洗 3 次, 加入 Alexa Fluor 488 标记的羊抗兔 IgG(H+L)(1 : 1000 稀释), 37 ℃ 孵育 1 h, DAPI 室温染核 10 min, 荧光显微镜下观察并拍照。

1.9 攻毒保护实验

实验鲫[体重(30 $\pm$ 5) g、体长(11 $\pm$ 1) cm]购自上海浦东申孙水产养殖有限公司, 经镜检寄生虫观察、肝脾肾组织细菌分离、PCR 检测 CyHV-2、草鱼呼肠孤病毒(GCRV)、锦鲤疱疹病毒(KHV)、鲤春病毒血症病毒(SVCV)全部阴性。养殖水槽为室内循环水养殖系统, 水温 19~22 ℃, 实验前暂养两周使其适应环境, 每天早晚定时投喂 2 次。在实验组鲫背鳍基部注射 20 μ g/尾 pVAX-ORF66 (溶于 100 μ L PBS, 20 条), 同时分别设置注射空载体 pVAX1 (20 条)和 PBS 的对照组(40 条)。免疫 28 d 后, 取 20 条 PBS 注射鲫作为空白组并腹腔注射 0.2 mL GFB 细胞培养上清。剩余各组鲫进行

CyHV-2 攻毒, 腹腔注射 0.2 mL 10^7 TCID₅₀/mL 的病毒液。连续观察 42 d, 每天记录各组鱼的死亡情况。死亡鱼取鳃、肝、脾和肾组织进行 PCR 检测, 确认为 CyHV-2 感染, 并计算相对免疫保护率(relative percentage survival, RPS), $RPS=[1-(\text{免疫组死亡率}/\text{对照组死亡率})]\times 100\%$ 。

2 结果与分析

2.1 ORF66 基因的扩增

PCR 结果显示, 扩增得到大小约 1200 bp 的特异性条带(图 1)。PCR 产物经胶回收、双酶切及纯化后克隆至 pRSET-A 载体中。重组质粒经 *Bam* HI 和 *Hind* III 双酶切鉴定和测序验证, 表明重组质粒含有目标基因片段(图 2)。

分析显示, CyHV-2 ORF66 基因 ORF 区全长 1200 bp, 编码 399 个氨基酸, 蛋白预测分子量为 45.37 kDa。BLAST 分析显示, CyHV-2 ORF66 蛋白与同属 CyHV-1 和 CyHV-3 ORF66 蛋白具有一定程度的保守性, 氨基酸序列同源性分别为 47.7%和 62.5% (图 3)。

2.2 ORF66 蛋白抗体的制备

重组质粒 pRSET-ORF66 转化、诱导表达后 SDS-PAGE 分析显示, 在约 45 kD 处出现清晰的蛋白条带, 与 ORF66 蛋白预期大小相符(图 4a)。重组蛋白纯化后进一步免疫新西兰白兔, 制备针对 ORF66 蛋白抗体, 其浓度为 16.19 mg/mL。用 ELISA 法对制备的多克隆抗体进行效价测定, 结果表明, 其效价大于 1:20000。利用制备的多克隆抗体对 ORF66 重组蛋白进行 Western blot 检测, 结果显示, 在 PVDF 膜上产生了分子量约 45 kD

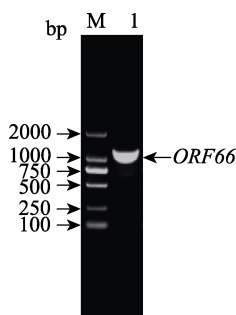


图 1 CyHV-2 ORF66 基因的 PCR 扩增

M: DL2000 DNA Marker; 1: ORF66 基因。

Fig. 1 PCR amplification of the ORF66 gene
M: DL2000 DNA Marker; 1: the ORF66 gene.

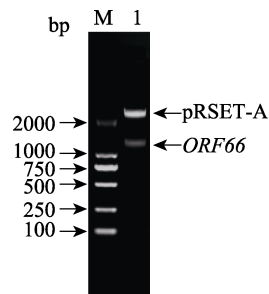


图 2 重组质粒 pRSET-ORF66 的双酶切鉴定

M: DL2000 DNA Marker; 1: 重组质粒 *Bam* HI 和 *Hind* III 双酶切产物。

Fig. 2 Double-enzyme digestion identification of the recombinant plasmid pRSET-ORF66

M: DL2000 DNA marker; 1: double-enzyme digestion of the recombinant plasmid by *Bam* HI and *Hind* III.

的反应条带, 表明制备抗体可以特异性识别 ORF66 重组蛋白(图 4b)。

为进一步验证制备抗体的特异性, 利用 Western blot 检测了正常和 CyHV-2 感染鲫鳃、肝、脾、肾组织匀浆。结果证实, 制备的 ORF66 抗体能与感染鱼组织发生特异性反应, 并在 PVDF 膜上产生相应分子量大小的条带(图 5)。

2.3 ORF66 真核细胞表达的检测

将 ORF66 基因扩增后(引物见表 1)克隆至真核表达载体 pVAX1 中, 构建重组质粒 pVAX-ORF66。质粒经 PCR (图 6a)及 *Hind* III 和 *Bam* HI 双酶切验证(图 6b), 证实含有目标大小的基因片段, 测序结果也进一步证实了重组质粒阅读框正确无误。

为研究 pVAX-ORF66 在真核细胞中的表达情况, 首先对 CyHV-2 感染的 GFB 细胞进行 IFA 检测。感染后 72 h, 利用 ORF66 蛋白抗体检测发现, CyHV-2 感染细胞出现明显的绿色荧光(图 7), 而未感染细胞则无明显荧光信号。此外, 感染细胞中 ORF66 蛋白主要分布于细胞质中。本实验也进一步证实, 制备的抗体可以特异性识别 CyHV-2 ORF66 蛋白。

将 pVAX-ORF66 和空载体 pVAX1 转染 GFB 细胞, 利用制备的 ORF66 抗体作为一抗对转染细胞进行 Western blot 检测。结果表明, ORF66 能在转染细胞中大量表达(图 8)。进一步, IFA 实验表明, ORF66 在 pVAX-ORF66 转染细胞中得到高水

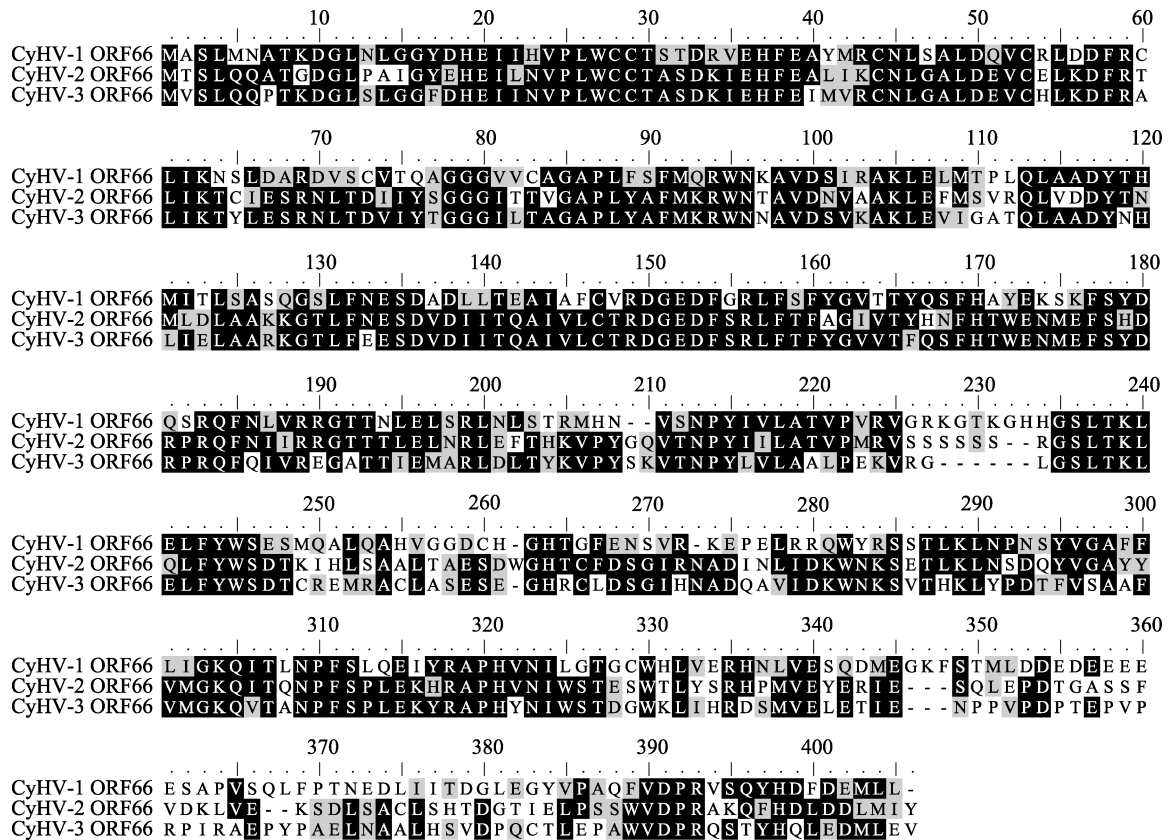


图 3 CyHV-2 ORF66 与 CyHV-1、CyHV-3 ORF66 氨基酸序列比对

采用 ClustaW 软件, 对 CyHV-2 ORF66 氨基酸序列进行比对分析, 深色为保守氨基酸位点。

Fig. 3 Alignment of the amino acid sequence of CyHV-2 ORF66 with that of CyHV-1 and CyHV-3
Multiple alignment of the amino acid sequence of CyHV-2 ORF66 with that of CyHV-1 and CyHV-3 by
ClustaW software. Conserved amino acid residues are represented in dark.

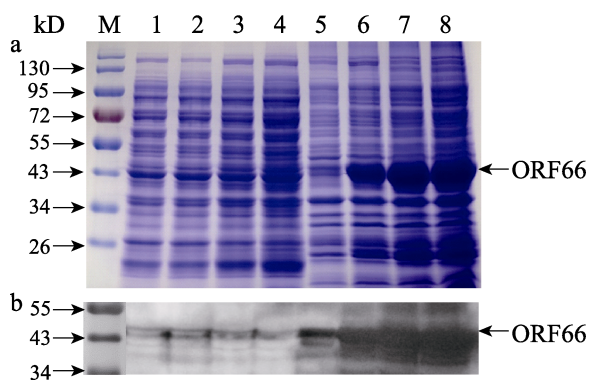


图 4 ORF66 蛋白原核表达和多克隆抗体的制备

a. 重组 ORF66 蛋白的原核表达; M: 蛋白 Marker;

1: pRSET-A 空载体转化 BL21(DE3)pLysS 菌株 IPTG 诱导 3 h 上清;
2-4: pRSET-ORF66 转化 BL21(DE3)pLysS 菌株诱导 1、3、5 h 上清;
5-8: pRSET-ORF66 转化 BL21(DE3)pLysS 菌株诱导 0、1、3、5 h 沉淀; b. 重组 ORF66 蛋白的 Western blot 鉴定。
Fig. 4 Prokaryotic expression and preparation of polyclonal antibody against CyHV-2 ORF66 protein
a. SDS-PAGE analysis of the prokaryotic expressed ORF66 protein, M: protein marker; 1: supernatant of pRSET-A transformed BL21(DE3)pLysS collected at 3 h post IPTG induction; 2-4: supernatant of pRSET-ORF66 transformed BL21(DE3)pLysS collected at 1, 3, 5 h post induction; 5-8: precipitate of pRSET-ORF66 transformed BL21(DE3)pLysS collected at 0, 1, 3, and 5 h post induction; b. Western blot identification of the recombinant ORF66 protein.

平表达, 而对照组无表达。此外, 与感染细胞中一致, 真核重组 ORF66 蛋白也主要分布于胞质中 (图 9)。以上结果表明, 外源基因 ORF66 可以在鱼类细胞中正确表达。

2.4 ORF66 DNA 疫苗免疫保护效果评估

实验鲫背鳍注射 pVAX-ORF66 DNA 疫苗 28 d 后进行 CyHV-2 感染实验。攻毒后 42 d 内, 空白组鲫无死亡, 各感染组鱼均出现了不同程度的临

床症状, 包括行动迟缓、鳃出血、腹部膨大, 肛门红肿、体表和鳍条基部出血、鳃上有出血点等。实验组死亡鲫与对照组感染鲫临床症状一致, 并且内脏组织 PCR 检测均为 CyHV-2 阳性。实验组鲫死亡率(8/20)显著低于注射空质粒的对照组(18/20)和注射 PBS 的空白组(19/20), 相对免疫保护率达 55.6% (图 10 和表 2)。本实验表明制备的 DNA 疫苗具有良好的免疫保护效果, 可以作为潜在抗 CyHV-2 疫苗。

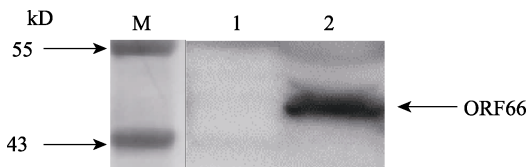


图 5 利用 ORF66 抗体对 CyHV-2 感染组织的 Western blot 鉴定

M: 蛋白质 Marker; 1: 正常鲫组织; 2: CyHV-2 感染组织。
Fig. 5 Western blot identification of CyHV-2 infected *Carassius auratus* tissue with prepared ORF66 antibody
M: protein marker; 1: normal tissue; 2: CyHV-2 infected tissue.

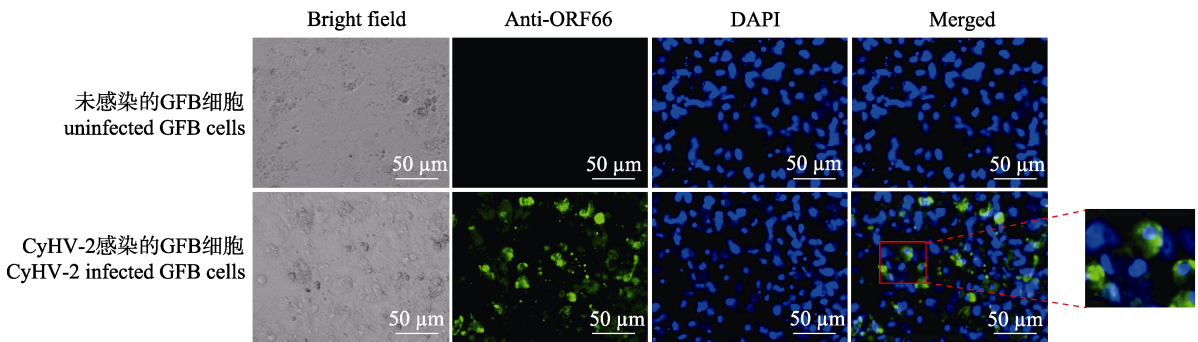


图 7 CyHV-2 感染 GFB 细胞中 ORF66 蛋白的间接免疫荧光检测

CyHV-2 感染 GFB 细胞 72 h 后, 细胞经 4%多聚甲醛固定和 0.2% Triton X-100 通透处理后, 利用 ORF66 蛋白抗体作为一抗, Alexa Fluor 488 标记的羊抗兔 IgG(H+L)作为二抗(绿色), DAPI 染核后(蓝色)置于倒置荧光显微镜下观察。
Fig. 7 IFA detection of CyHV-2 infected GFB cells with prepared antibody against ORF66
At 72 h post CyHV-2 infection, GFB cells were fixed with 4% paraformaldehyde and permeabilized with 0.2% Triton X-100. Cells were then immunostained using the antibody against ORF66 followed by Alexa Fluor 488 labeled goat anti-rabbit IgG (green). Nuclei were stained with DAPI (blue). Cells were observed under an inverted fluorescence microscope.

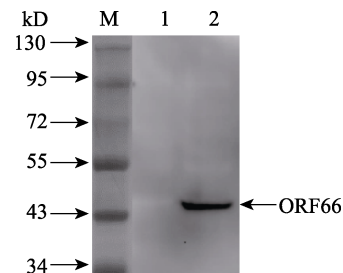


图 8 pVAX-ORF66 转染 GFB 细胞中 ORF66 蛋白的 Western blot 检测

M: 蛋白质 Marker; 1: 空载体 pVAX1 转染 36 h 后细胞裂解液;
2: 重组质粒 pVAX-ORF66 转染 36 h 后细胞裂解液。
Fig. 8 Western blot detection of the ORF66 protein in pVAX-ORF66 transfected GFB cells
M: protein Marker; 1: lysate of pVAX1 transfected cells collected at 36 hpt; 2: lysate of pVAX-ORF66 transfected cells collected at 36 hpt.

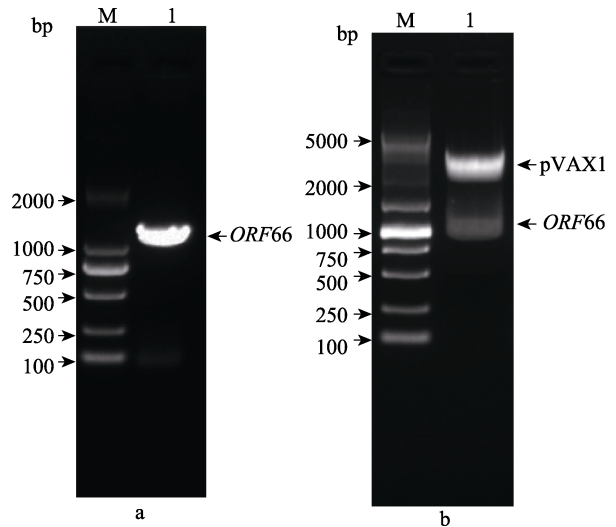


图 6 真核表达质粒 pVAX-ORF66 的 PCR 和双酶切鉴定
a. PCR 鉴定; M: DL2000 DNA Marker; 1: ORF66 基因;
b. 双酶切鉴定; M: DL5000 DNA Marker;
1: Hind III 和 Bam HI 双酶切产物。

Fig. 6 Identification of the eukaryotic expression plasmid pVAX-ORF66 by PCR and double-enzyme digestion
a. PCR identification; M: DL2000 DNA Marker; 1: the ORF66 gene; b. Double-enzyme digestion identification; M: DL5000 DNA Marker; 1: double-enzyme digestion of the recombinant plasmid by Hind III and Bam HI.

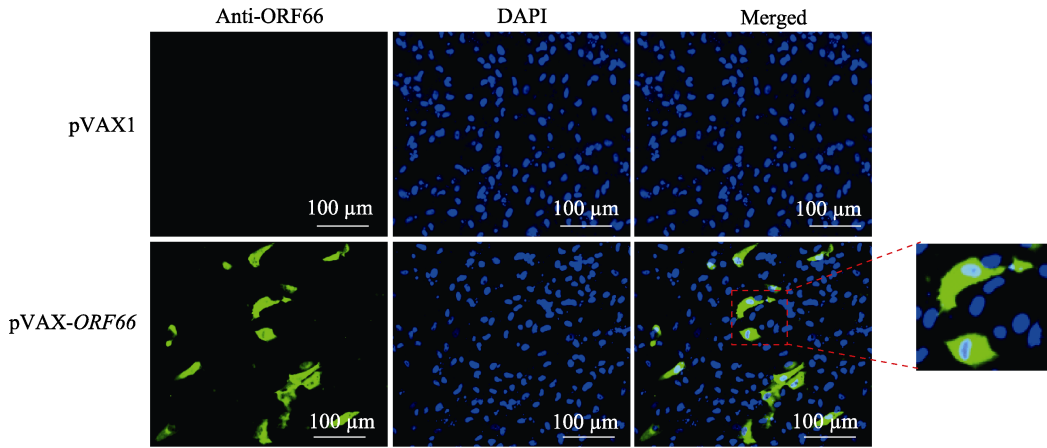


图 9 pVAX-ORF66 转染 GFB 细胞中 ORF66 蛋白的间接免疫荧光检测

pVAX-ORF66 转染 GFB 细胞 36 h 后, 细胞经 4%多聚甲醛固定和 0.2% Triton X-100 通透处理后, 利用 ORF66 蛋白抗体作为一抗, Alexa Fluor 488 标记的羊抗兔 IgG(H+L)作为二抗(绿色), DAPI 染核后(蓝色)置于倒置荧光显微镜下观察。

Fig. 9 IFA detection of the ORF66 protein in pVAX-ORF66 transfected GFB cells

At 36 h post pVAX-ORF66 transfection, GFB cells were fixed with 4% paraformaldehyde and permeabilized with 0.2% Triton X-100. Cells were then immunostained using the antibody against ORF66 followed by Alexa Fluor 488-labeled goat anti-rabbit IgG (green). Nuclei were stained with DAPI (blue). Cells were observed under an inverted fluorescence microscope.

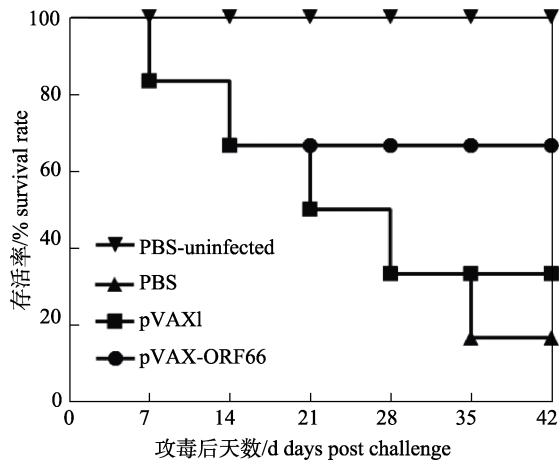


图 10 CyHV-2 攻毒后免疫鲫的存活率

实验鲫背鳍肌肉注射 20 μg pVAX-ORF66 质粒(溶于 100 μL PBS)、20 μg pVAX1 质粒(溶于 100 μL PBS)或 100 μL PBS (每组 20 条)。免疫 28 d 后, 腹腔注射 0.2 mL 10^7 TCID₅₀/mL 的 CyHV-2 细胞培养上清, 连续观察 42 d, 每天记录各组鱼的死亡情况并绘制存活率曲线。

Fig. 10 Survival curve of immunized *Carassius auratus* post challenge with CyHV-2

Carassius auratus were intra-muscular injected with 20 μg pVAX-ORF66, pVAX1 plasmid (dissolved in 100 μL PBS) or 100 μL PBS ($n=20$ for each group). At 28 days post injection, fish were challenged by intra-peritoneal injection of 0.2 mL CyHV-2 cell culture supernatant (10^7 TCID₅₀/mL). Mortality was monitored daily for 42 days, and the result was expressed as Kaplan-Meier survival curve.

表 2 CyHV-2 攻毒后免疫鲫的免疫保护率

Tab. 2 Relative protection rate of immunized *Carassius auratus* post challenge with CyHV-2

组别 group	鱼总 数/尾 fish number	死亡 数/尾 death number	死亡 率/% death rate	存活 率/% survival rate	免疫 保护率/% RPS	P
pVAX-ORF66	20	8	40	60	55.6	<0.05
pVAX 对照组 PVAX control group	20	18	90	10	/	
PBS 对照组 PBS control group	20	19	95	5	/	

3 讨论

鲫为我国主要大宗淡水养殖品种之一, 随着大规模、集约化水产养殖业的不断发展, 其病害问题日益突出。其中, CyHV-2 引起的鲫造血器官坏死病因其高致病性、高死亡率严重制约了鲫养殖业的发展^[8]。免疫接种是预防水生动物疾病发生、保障水产养殖业健康发展的有效途径。因此, 研制安全有效的 CyHV-2 保护性疫苗对于该病的防控具有重要意义^[25]。前期, 廖红等^[26]和周勇等^[27]分别制备了 CyHV-2 ORF5 和 ORF25 截短蛋

白的亚单位疫苗,免疫保护率分别为 35%和 47%。王维玲^[28]和潘晓艺等^[29]制备了 CyHV-2 灭活疫苗,免疫保护率分别为 73.1%和 100%。灭活疫苗和亚单位疫苗存在接种剂量大、免疫持续时间较短、需多次接种并且需要加入佐剂增强免疫等,限制了其在鱼用疫苗中的应用。鱼用 DNA 疫苗常用的质粒载体有 pcDNA3.1(+)、pEGFP-N1 及杆状病毒表达载体 pFastBacDual 等^[16,30-31]。pVAX1 载体是 FDA 推荐的唯一可以应用于人体实验的真核载体质粒,且其仅保留真核表达所需的最基本 DNA 序列,基因安全性高并且操作简便。本研究首次将 CyHV-2 衣壳蛋白 ORF66 编码基因克隆至 pVAX1 上,构建了重组表达载体 pVAX-ORF66。转染 GFB 细胞后,利用制备的抗体进行 IFA 和 Western blot 检测,均证实 ORF66 蛋白可以在 GFB 细胞中大量表达。攻毒实验进一步表明, pVAX-ORF66 免疫鲫可以获得较高的免疫保护率(55.6%)。此外,感染后 21 d (注射后 49 d),实验鲫肌肉组织中仍可以 PCR 检出载体序列,而实验水体和鱼体排泄物中均未检出(数据未展示),提示该疫苗可以提供较长时间的免疫保护且对环境相对安全。因此,本研究开发的 CyHV-2 DNA 疫苗具有制备工艺简单、成本低廉、质量可控、安全有效等优势,具备良好的大规模免疫预防推广应用价值。

病毒的早期诊断是切断其传播的有效途径,近年来,针对 CyHV-2 已开发出多种分子生物学检测方法,包括普通 PCR、双重 PCR、巢式 PCR、实时荧光定量 PCR 和环介导等温扩增(LAMP)等^[32-34]。然而,传统免疫学检测方法操作简便、特异性强、可同时处理大量样本,且不依赖于昂贵仪器设备,在鱼类病原诊断实践中具备重要价值。孔善云等^[35]和 Kong 等^[36]利用 ORF72 蛋白抗体,建立了针对 CyHV-2 的免疫学诊断方法。徐晔等^[37]、周勇等^[38]、Wu 等^[39]利用 ORF90、ORF4、ORF25 重组蛋白抗体,建立了 ELISA 和 IFA 检测方法。本研究中,笔者对 ORF66 蛋白进行了原核表达并制备了其特异性抗体,抗体效价达 1 : 20000 以上,Western blot 和 IFA 等实验均提示其可用于 CyHV-2 的免疫学检测。因此,本研究制备的

ORF66 抗体有助于 CyHV-2 检测技术的多样化发展,为该病的早期诊断提供了有力的技术支撑。

研究表明,鲫感染 CyHV-2 后 3 d,即可在鳃中检测到 ORF66 蛋白。感染后 5 d,在鳃、鳃、脾和肾组织中也可检出,其中肾组织中表达水平最高^[22]。CyHV-2 主要易感器官为鳃、鳃、脾和肾^[8,22],提示 ORF66 蛋白组织表达模式与其易感器官高度一致。因此,ORF66 在 CyHV-2 复制循环过程中起到重要作用。然而,ORF66 作用分子机制研究目前仍处于起步阶段,仅张小米等^[21]采用噬菌体表面展示技术发现多肽 N'-LHLHQNRMSLSR-C' 与 ORF66 截短体(232~335 aa 区域)有较强的亲和力,氨基酸序列比对显示该多肽可能来源于 BLT1、GTF3C2 或 SKT。本研究中,笔者发现 ORF66 蛋白主要定位于细胞质中。进一步分析发现,前述 3 个蛋白仅 SKT 位于细胞质中,故推测其为 ORF66 的互作蛋白。因此,本研究制备的 ORF66 特异性抗体也为 ORF66 蛋白功能的解析提供了前期基础。

总之,本研究开发了一种制备简单、成本低廉的 CyHV-2 DNA 疫苗,为鲫造血器官坏死病的防控提供了一种潜在的预防措施。

参考文献:

- [1] Jung S J, Miyazaki T. Herpesviral haematopoietic necrosis of goldfish, *Carassius auratus* (L.)[J]. Journal of Fish Diseases, 1995, 18(3): 211-220.
- [2] Davison A J, Eberle R, Ehlers B, et al. The order herpesvirales[J]. Archives of Virology, 2009, 154(1): 171-177.
- [3] Waltzek T B, Kelley G O, Stone D M, et al. Koi herpesvirus represents a third cyprinid herpesvirus (CyHV-3) in the family Herpesviridae[J]. The Journal of General Virology, 2005, 86(Pt 6): 1659-1667.
- [4] Xu J, Zeng L B, Zhang H, et al. Cyprinid herpesvirus 2 infection emerged in cultured gibel carp, *Carassius auratus gibelio* in China[J]. Veterinary Microbiology, 2013, 166(1-2): 138-144.
- [5] Fichi G, Cardeti G, Cocumelli C, et al. Detection of Cyprinid herpesvirus 2 in association with an *Aeromonas sobria* infection of *Carassius carassius* (L.), in Italy[J]. Journal of Fish Diseases, 2013, 36(10): 823-830.
- [6] Jeffery K R, Bateman K, Bayley A, et al. Isolation of a cyprinid herpesvirus 2 from goldfish, *Carassius auratus* (L.),

- in the UK[J]. Journal of Fish Diseases, 2007, 30(11): 649-656.
- [7] Boitard P M, Baud M, Labrut S, et al. First detection of Cyprinid Herpesvirus 2 (CyHV-2) in goldfish (*Carassius auratus*) in France[J]. Journal of Fish Diseases, 2016, 39(6): 673-680.
- [8] Yuan R, Chen J, Liu X M, et al. A review: Research progress on cyprinid herpesvirus 2[J]. Chinese Journal of Fisheries, 2019, 32(1): 38-45. [袁锐, 陈静, 刘训猛, 等. 鲤疱疹病毒 2 型研究进展[J]. 水产学杂志, 2019, 32(1): 38-45.]
- [9] Xu J, Zeng L B, Yang D G, et al. Isolation and characterization of Cyprinid herpesvirus 2 WH strain[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2013, 20(6): 1303-1309. [徐进, 曾令兵, 杨德国, 等. 鲤疱疹病毒 2 型武汉株的分离与鉴定[J]. 中国水产科学, 2013, 20(6): 1303-1309.]
- [10] Li L J, Luo Y Z, Liu X Q, et al. Molecular surveillance of Cyprinid herpesvirus 2 in goldfish cultured in China[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2013, 32(1): 92-96. [李莉娟, 罗杨志, 刘学芹, 等. 金鱼鲤疱疹病毒 II 型的分子诊断[J]. 华中农业大学学报, 2013, 32(1): 92-96.]
- [11] Thangaraj R S, Nithianantham S R, Dharmaratnam A, et al. Cyprinid herpesvirus-2 (CyHV-2): A comprehensive review[J]. Reviews in Aquaculture, 2021, 13(2): 796-821.
- [12] Wang L, He J G, Liang L, et al. Mass mortality caused by Cyprinid Herpesvirus 2 (CyHV-2) in Prussian carp (*Carassius gibelio*) in China[J]. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 2012, 32(5): 164-173.
- [13] Lorenzen N, LaPatra S E. DNA vaccines for aquacultured fish[J]. Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics), 2005, 24(1): 201-213.
- [14] Anderson E D, Mourich D V, Fahrenkrug S C, et al. Genetic immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against infectious hematopoietic necrosis virus[J]. Molecular Marine Biology and Biotechnology, 1996, 5(2): 114-122.
- [15] Evensen Ø, Leong J A C. DNA vaccines against viral diseases of farmed fish[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 35(6): 1751-1758.
- [16] Gong C, Cao G, Li K, et al. Cyprinid herpesvirus II DNA vaccine based on baculovirus vector as well as building method and application thereof: CN108728490B[P]. 2021-03-26. [贡成良, 曹广力, 李坤, 等. 一种基于杆状病毒载体的鲤疱疹病毒 II 型 DNA 疫苗及其构建方法与应用: CN108728490B[P]. 2021-03-26.]
- [17] Qu Y P, Liu J G, Yang D Q. Application of eukaryotic expression plasmid pVAX1[J]. Journal of Wenzhou Medical College, 2009, 39(2): 194-196. [曲云鹏, 刘建国, 杨德琴. 真核表达质粒 pVAX1 的应用[J]. 温州医学院学报, 2009, 39(2): 194-196.]
- [18] Zhou Y X, He J X, Quan W X, et al. Construction and immune protection verification of dengue virus multivalent DNA vaccine[J]. Immunological Journal, 2023, 39(1): 70-77. [周仔欣, 何久香, 全纹萱, 等. 登革病毒多价 DNA 疫苗构建及免疫保护效果验证[J]. 免疫学杂志, 2023, 39(1): 70-77.]
- [19] Davison A J, Kurobe T, Gatherer D, et al. Comparative genomics of carp herpesviruses[J]. Journal of Virology, 2013, 87(5): 2908-2922.
- [20] Gao W, Wen H, Wang H, et al. Identification of major immunogenic proteins from Cyprinid herpesvirus 2[J]. Journal of Fisheries of China, 2020, 44(9): 1441-1447. [高娃, 温虹, 王浩, 等. 鲤疱疹病毒 II 型主要免疫原性蛋白的鉴定[J]. 水产学报, 2020, 44(9): 1441-1447.]
- [21] Zhang X M, Que S Z, Long C, et al. Preparation of polyclonal antibodies to cyhv-2 orf66 truncated protein and screening of intercalating peptides[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2023, 47(5): 796-802. [张小米, 阙顺政, 龙晨, 等. 鲤疱疹病毒 II 型 ORF66 截短蛋白多克隆抗体的制备及互作多肽筛选[J]. 水生生物学报, 2023, 47(5): 796-802.]
- [22] Guo B Q, Wei C, Luan L L, et al. Production and application of monoclonal antibodies against ORF66 of cyprinid herpesvirus 2[J]. Journal of Virological Methods, 2022, 299: 114342.
- [23] Xu Y, Zhou Y, Wang F Z, et al. Development of two brain cell lines from goldfish and silver crucian carp and viral susceptibility to Cyprinid herpesvirus-2[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal, 2019, 55(9): 749-755.
- [24] Shao L, Tang Q, Zhang H Q. The antiviral effect of carp (*Cyprinus carpio*) Rhbdd3[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2020, 27(2): 137-146. [邵玲, 汤茜, 张海强. 鲤 Rhbdd3 蛋白的抗病毒功能[J]. 中国水产科学, 2020, 27(2): 137-146.]
- [25] Ito T, Kurita J, Ozaki A, et al. Growth of cyprinid herpesvirus 2 (CyHV-2) in cell culture and experimental infection of goldfish *Carassius auratus*[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2013, 105(3): 193-202.
- [26] Liao H, Lin H, Hao Z X, et al. Cloning, expression and identification of immunogenicity of ORF5 truncation genes of cyprinid herpesvirus 2[J]. Chinese Veterinary Science, 2016, 46(11): 1394-1400. [廖红, 林华, 郝中香, 等. 鲤疱疹病毒 2 型 ORF5 截短基因的克隆表达及免疫原性研究[J]. 中国兽医科学, 2016, 46(11): 1394-1400.]
- [27] Zhou Y, Shi Y H, Fan Y D, et al. Polyclonal antibody preparation and immunogenicity analysis of the prokaryotically expressed Cyprinid herpesvirus II ORF25 truncated protein[J]. Freshwater Fisheries, 2018, 48(6): 40-45. [周勇,

- 史玉恒, 范玉顶, 等. 鲤疱疹病毒 II 型 ORF25 截短蛋白的多克隆抗体制备与免疫原性分析[J]. 淡水渔业, 2018, 48(6): 40-45.]
- [28] Wang W L. Studies on the cultivation of cyprinid herpesvirus 2 by microcarrier and the immune efficacy of immersion with inactivated vaccine[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2017. [王维玲. 鲤疱疹病毒 II 型微载体培养技术与灭活疫苗浸泡免疫效果研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2017.]
- [29] Pan X Y, Lin L Y, Zhu Y, et al. Preparation and efficacy of inactivated vaccine against cyprinid herpesvirus-2[J]. *Oecologia et Limnologia Sinica*, 2022, 53(5): 1143-1150. [潘晓艺, 蔺凌云, 朱悦, 等. 鲤疱疹病毒 2 型(CyHV-2)灭活疫苗制备及其免疫效力测定[J]. 海洋与湖沼, 2022, 53(5): 1143-1150.]
- [30] Wang B, Jian J C, Cai S H, et al. Construction and evaluation of streptococcusagalactiae DNA vaccine for Tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2013, 43(12): 30-35. [王蓓, 简纪常, 蔡双虎, 等. 罗非鱼无乳链球菌 DNA 疫苗的构建及免疫效果研究[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2013, 43(12): 30-35.]
- [31] Wu J, Liu Z X, Ma Y P, et al. Immunization of *Cyprinus carpio* var. *jian* with Cyprinid herpesvirus 3 ORF148 DNA vaccine against koi herpesvirus disease[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2020, 27(4): 454-462. [吴静, 刘振兴, 马艳平, 等. 鲤疱疹病毒 3 型 ORF148 DNA 疫苗对建鲤鱼苗的免疫保护[J]. 中国水产科学, 2020, 27(4): 454-462.]
- [32] Waltzek T B, Kurobe T, Goodwin A E, et al. Development of a polymerase chain reaction assay to detect cyprinid herpesvirus 2 in goldfish[J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2009, 21(1): 60-67.
- [33] Xu Y, Duan H A, Zhou Y, et al. Establishment of real-time PCR assay for detection of Cyprinid herpesvirus 2[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2014, 36(12): 952-956. [徐晔, 段宏安, 周毅, 等. 鲤科疱疹病毒 2 型 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2014, 36(12): 952-956.]
- [34] Li Q, Yue Z Q, Liu H, et al. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of lymphocystis disease virus[J]. *Journal of Virological Methods*, 2010, 163(2): 378-384.
- [35] Kong S Y, Jiang Y S, Xu D, et al. An immunological method to detect CyHV-2 based on capsid protein 72[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(2): 328-335. [孔善云, 姜有声, 许丹, 等. 一种基于 II 型鲤疱疹病毒衣壳蛋白 72 的免疫学检测方法[J]. 中国水产科学, 2016, 23(2): 328-335.]
- [36] Kong S Y, Jiang Y S, Wang Q, et al. Detection methods of Cyprinid herpesvirus 2 infection in silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) via a pORF72 monoclonal antibody[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2017, 40(12): 1791-1798.
- [37] Xu Y, Duan H, Zhou Y, et al. Cyprinid herpesvirus II type sandwich ELISA detection kit and detection method: CN106771134B[P]. 2018-10-16. [徐晔, 段宏安, 周毅, 等. 一种鲤疱疹病毒 II 型夹心 ELISA 检测试剂盒及检测方法: CN106771134B[P]. 2018-10-16.]
- [38] Zhou Y, Fan Y D, Xu J, et al. Cloning, expression and immunological assay of ORF 4 encoding protein of Cyprinid herpesvirus II[J]. *Freshwater Fisheries*, 2017, 47(1): 61-65. [周勇, 范玉顶, 徐进, 等. 鲤疱疹病毒 II 型 ORF4 基因的克隆、表达与免疫学检测方法[J]. 淡水渔业, 2017, 47(1): 61-65.]
- [39] Wu R H, Zhang Q, Li Y. Development, characterization of monoclonal antibodies specific for the ORF25 membrane protein of Cyprinid herpesvirus 2 and their applications in immunodiagnosis and neutralization of virus infection[J]. *Aquaculture*, 2020, 519: 734904.

Construction and immune efficacy of a cyprinid herpesvirus 2 *ORF66*-containing DNA vaccine

SHAO Ling, LIU Yanan, ZHANG Minghui, PENG Junhui, GAO Xiaohua, ZHANG Xiaoming

Shanghai Fisheries Research Institute; Shanghai Fisheries Technical Extension Station, Shanghai 200433, China

Abstract: Cyprinid herpesvirus 2 (CyHV-2) is a highly contagious pathogen that causes haematopoietic necrosis disease in goldfish (*Carassius auratus auratus*) and gibel carp (*Carassius auratus gibelio*). Currently, there are no licensed vaccines or therapeutics for CyHV-2. Nonetheless, pVAX1 is a eukaryotic plasmid designed for the development of animal DNA vaccines. This vector allows high-copy number replication in *E. coli* and contains a CMV promotor for high-level expression of foreign proteins. In this study, the coding region of the CyHV-2 major capsid protein ORF66 was amplified by PCR and cloned into the pVAX1 vector to construct a recombinant plasmid, pVAX-ORF66. Additionally, a recombinant prokaryotic expression plasmid, pRSET-ORF66, was constructed and transformed into *E. coli* BL21(DE3)pLysS. The ORF66 recombinant protein was then produced by induction with 1 mmol/L IPTG; subsequently, the polyclonal antibody was prepared by subcutaneously immunizing New Zealand rabbits with the purified protein. The titer and specificity of the prepared antibody were analyzed using an ELISA assay, Western blotting, and an indirect immunofluorescence assay (IFA). Next, the recombinant plasmid pVAX-ORF66 was transfected into goldfish brain (GFB) cells, and the expression of ORF66 protein was detected by IFA and Western blotting. Finally, pVAX-ORF66 was intramuscularly injected into gibel carp at the anterior-to-dorsal fin region, before being infected with CyHV-2. The results demonstrated that the full nucleotide length of ORF66 was 1200 bp and the molecular weight of the recombinant protein was approximately 45 kDa, which were both consistent with their predicted sizes. The prepared rabbit polyclonal antibody was highly specific to CyHV-2, with a minimum titer of 1:20000. ORF66 expression could be detected in both infected and pVAX-ORF66 transfected GFB cells and was mainly distributed in the cytoplasm. Finally, the relative survival rate of immunized gibel carp was determined to 55.6%. Collectively, in this study, a eukaryotic expression plasmid, pVAX-ORF66, was constructed that could serve as a DNA vaccine for the prevention and control of CyHV-2. These results also provide a basis for further studies regarding the molecular function of ORF66 during CyHV-2 infection.

Key words: cyprinid herpesvirus 2; ORF66; DNA vaccine; immune protection

Corresponding author: SHAO Ling. E-mail: lingshao405@163.com