

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2013.00427

鳊传染性脾肾坏死病毒 ORF093 基因的克隆、表达及其重组蛋白的免疫原性分析

付小哲, 李宁求, 彭媛媛, 林强, 石存斌, 黄志斌, 吴淑勤

中国水产科学研究院 珠江水产研究所, 农业部渔药创制重点实验室, 广东 广州 510380

摘要: 从患传染性脾肾坏死病毒(infectious spleen and kidney necrosis virus, ISKNV)病的鳊体内获得 ORF093 基因。采用 PCR 方法扩增 ISKNV ORF093 基因全长, 克隆入原核表达载体 pET32a(+), IPTG 诱导表达, Ni 柱纯化后, 免疫新西兰大白兔制备兔抗重组 093 蛋白血清, 免疫印记分析兔抗血清的特异性, 中和实验和免疫保护实验分析重组 093 蛋白的免疫原性。结果显示: ISKNV 重组 093 蛋白可以在大肠杆菌中以包涵体形式存在; 制备的兔抗血清可以特异性识别重组 093 蛋白, 对 ISKNV 具有中和作用, 可给鱼体提供至少 10 d 的 100% 预防保护; 重组 093 蛋白对 ISKNV 的攻击具有保护作用, 攻毒后 15 d, 093 免疫组平均相对保护率为 45.3%。结果说明重组 093 蛋白具有一定的免疫原性, 可作为 ISKNV 候选疫苗抗原和治疗血清制备抗原。本研究通过中和实验及免疫保护实验对重组 093 蛋白的免疫原性进行分析, 旨在为鳊 ISKNV 重组亚单位疫苗的研制奠定基础。

关键词: 鳊; 传染性脾肾坏死病毒; ORF093; 免疫原性

中图分类号: S941

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2013)02-0427-07

鳊(*Siniperca chuatsi*)是中国重要的淡水鱼特色养殖种类之一, 由传染性脾肾坏死病毒(infectious spleen and kidney necrosis virus, ISKNV)引起的鳊虹彩病毒病是鳊养殖的主要疫病, 导致鳊死亡率接近 100%, 成为制约鳊养殖业发展的主要瓶颈。1997 年, 吴淑勤等^[1]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。何建国等^[2]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脾和肾是其感染的主要器官, 将其命名为传染性脾肾坏死病毒, 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^[3]。传染性脾肾坏死病毒(ISKNV)是虹彩病毒科肿大细胞病毒属的代表种, 为细胞质内寄生的具囊膜二十面体病毒, 直径为 150 nm, 含有双链 DNA, 基因组由 111 362 个碱基组成, 包括 125 个预测开放读码框 ORF

(open reading frames)^[4]。

在 ISKNV 疫苗研究方面, 潘厚军等^[5]采用灭活组织浆疫苗对鳊鱼病毒病进行防治, 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^[6]进行了 ISKNV 主要衣壳蛋白(major capsid protein, MCP)的原核表达, 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。2009 年, 付小哲等^[7]对重组 MCP 蛋白的免疫原性进行了初步研究, 发现重组 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。Dong 等^[8]建立了鳊仔鱼细胞系, 对 ISKNV 高度

收稿日期: 2011-11-04; 修订日期: 2012-05-22.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31202032); 国家科技支撑计划项目(2012BAD25B02); 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. E-mail: fuxiaozhe-1998@163.com

通信作者: 吴淑勤, 研究员. E-mail: wushuqin001@21cn.com

敏感,感染滴度达到 $10^{6.6} \sim 10^{7.4}/(0.1 \text{ mL})$, 为灭活疫苗的研制奠定基础。在其他肿大细胞病毒疫苗研制方面,日本学者研制出抗真鲷虹彩病毒(RSIV)细胞灭活疫苗,免疫保护率在 75%以上^[9-11],是亚洲地区唯一的商品化渔用抗病毒疫苗。在基因工程疫苗研究方面, Park 等^[12]构建了 RSIV 的核酸疫苗,结果显示免疫真鲷血清在 BF-2 细胞上对病毒具有一定的中和作用。Caipang 等^[11]也对 RSIV 核酸疫苗进行了研究,结果显示重组核酸疫苗能够产生一定的免疫保护效果。Hajime Shimamoto 等^[13]对 RSIV 的保护性抗原进行了筛选,构建了重组亚单位疫苗和二联疫苗,结果显示 *E.tarda* 的外膜蛋白可以提高 RSIV 重组蛋白的免疫原性。Tamaru 等^[14]还研发了一种将 RSIV-MCP 表达于酵母表面的 Arming 系统,用于 RSIV 的口服疫苗的研制。

囊膜蛋白是病毒诱导宿主产生中和抗体和保护性免疫的重要抗原。本研究在前期对 ISKNV ORF093 跨膜蛋白结构生物信息学分析的基础上,构建了 ISKNV ORF093 基因原核表达质粒,经 IPTG 诱导表达、Ni 柱纯化后,免疫新西兰大白兔,制备兔抗重组 093 蛋白血清,通过中和实验及免疫保护实验对重组 093 蛋白的免疫原性进行了分析,为鳜 ISKNV 重组亚单位疫苗的研制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验鳜购于广东省佛山市某鳜鱼养殖场,2 月龄,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),攻毒后改为每隔 3 d 投喂 1 次饵料鱼。

1.2 基因组、菌株及质粒

鳜 ISKNV 基因组、大肠杆菌 DH5 α 、大肠杆菌 BL21(DE3)、原核表达质粒 pET32a (+)由本实验室保存。

1.3 ISKNV ORF093 基因原核表达、蛋白纯化与复性

根据 GenBank 中传染性脾肾坏死病毒

(ISKNV)[NC_003494] ORF093 序列设计引物, P1: 5'-CGGAATTCATGAATAAAACGC-3'(下划线为 *EcoR* I 酶切位点)、P2: 5'-CGGAAGCTTTTAAACATGGCGTC-3'(下划线为 *Hind* III 酶切位点)。以本实验室自保存的 ISKNV 基因组为模板进行 PCR 扩增, 25 μL PCR 反应体系包含: 10 $\times$ buffer(含 Mg^{2+}) 2.5 μL , 4 $\times$ dNTP(10 mmol/L)0.5 μL , P1、P2(20 $\mu\text{mol/L}$)各 0.5 μL , *Taq* DNA 聚合酶(5 U/ μL)0.3 μL , DNA 1.0 μL , 无菌双蒸水补足。PCR 反应条件: 94℃预变性 4 min; 94℃变性 45 s, 50℃复性 45 s, 72℃延伸 30 s, 30 个循环; 72℃延伸 10 min。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测后, 产物使用 DNA 回收试剂盒(OMEGA, USA)纯化。

将纯化后的 ISKNV ORF093 PCR 产物及提取的原核表达质粒 pET32a(+), 分别用 *Hind* III和 *EcoR* I 进行双酶切, 酶切后的片段与载体进行连接, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 筛选阳性克隆并测序, 得到用于原核表达的重组质粒 pET32a-ORF093, 再将重组质粒转化表达菌大肠杆菌 BL21 (DE3)。

将含重组质粒 pET32a-ORF093 的大肠杆菌 BL21 (DE3) 接种到 5 mL 含 100 mg/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基中, 37℃, 250 r/min 的条件下培养至 OD 值 0.6 左右, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 诱导 4 h。分别取 1 mL 的诱导和未诱导的菌液于 4℃, 5 000 r/min 离心 5 min, 沉淀用 PBS 重悬, 加入等体积的上样缓冲液, 煮沸 5 min, 于 15% SDS-PAGE 上电泳分析原核表达情况。

将原核表达产物按照 His Bind Purification Kit(NOVAGEN, Canada)说明书进行纯化。纯化好的蛋白溶液装入透析袋, 在脲素、Tris-HCl、甘油缓冲液中 4℃透析复性, 再通过 PEG20000 进行蛋白浓缩。将复性产物于 SDS-PAGE 电泳分析, Bradford 法^[12]测定复性蛋白的浓度, -20℃冻存备用。

1.4 抗重组 ISKNV 093 融合蛋白多克隆抗体的制备

将复性蛋白浓度调整为 2 mg/mL, 与等体积弗氏佐剂(第一次用完全佐剂, 以后用不完全佐剂)

混合充分乳化,皮下多点注射新西兰大白兔,初次免疫 15 d 后加强免疫 1 次,以后每隔 7 d 加强 1 次。每次加强免疫前均由耳静脉取血 1 mL,ELISA 检测抗体效价。待效价达到所需效价时,颈动脉采血制备抗血清。4℃下 5 000 r/min 离心 10 min,取上清,在血清中加入 0.05%叠氮钠,小管分装后-20℃保存。

1.5 免疫印记分析

将纯化后的重组 ISKNV 093 融合蛋白及感染 ISKNV 的鳊鱼脾肾组织上清进行 SDS-PAGE,电转至硝酸纤维素膜,50 g/L 的脱脂奶粉 37℃封闭 1 h,加入上述制备的兔抗血清,4℃孵育 2 h,洗涤后加羊抗兔 IgG-HRP 37℃孵育 1 h,用 3,3'-氨基联苯胺显色。

1.6 病毒液的制备

取具有典型鳊鱼虹彩病毒病症状的鳊鱼脾和头肾,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,此病毒滤液用于中和试验及免疫保护试验。

1.7 中和试验

将实验鳊随机分为 3 个实验组,分别为 093 免疫组(093)、阳性对照组(+)、阴性对照组(-),每组 30 尾,每个组设一个平行对照组。将制备好的兔抗重组 ORF093 融合蛋白血清与病毒滤液按 1:1 比例混合,4℃放置过夜(12 h 左右),次日腹腔注射 093 组鱼体;阳性对照组腹腔注射病毒滤液;阴性对照组腹腔注射 PBS(pH 7.4)。各组的注射体积均为 200 μL/尾。观察 1 个月,每天记录发病情况。

1.8 免疫保护试验

将实验鳊随机分为 2 个实验组,分别为 093 组(093)、对照组(cont.),每组 30 尾,每组设平行对照。其中 093 组腹腔注射复性后的重组蛋白(50 μg/尾),对照组腹腔注射 Tris-HCl(50 mmol/L, pH 8.5),各组的注射体积均为 50 μL/尾。免疫后 30 d,背肌注射病毒液 100 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)。

1.9 统计分析

应用软件 SPSS 13.0 对中和试验结果及免疫保护试验结果进行 *T* 检验, $P < 0.05$ 被认为不同组间具有显著差异。

2 结果与分析

2.1 ORF093 重组原核表达载体的构建

以 ISKNV 基因组为模板,使用 P1、P2 引物进行 PCR 扩增,产物电泳显示,在 927 bp 处有一特异性条带,符合预期大小,如图 1 所示。扩增产物克隆至质粒 pET-32a(+),载体经双酶切鉴定,得到 927 bp DNA 片段,显示 ORF093 基因成功重组到表达载体中,见图 2。重组质粒经测序后与 GenBank 中核酸序列进行比对,相似性 100%。

2.2 ISKNV 093 的原核表达

将含有 pET32a(+)空载体菌体、诱导前菌体、诱导后菌体和诱导上清进行 SDS-PAGE 电泳,诱导后菌体显示大小约 51 kD 处有一富集蛋白带,而空质粒对照菌、诱导前菌体及诱导上清中无此条带(图 3),说明表达的重组蛋白以不溶性包涵体形式存在于胞质中。用 Ni 柱纯化重组蛋白的提取物,收集纯化产物,SDS-PAGE 电泳结果显示已经获得较高纯度的重组蛋白(图 4)。

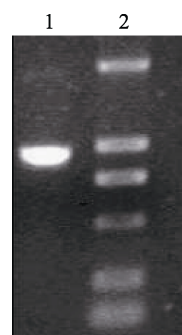


图1 ORF093 基因的 PCR 扩增

1: PCR 产物; 2: DL2000 分子量标准。

Fig. 1 PCR amplification of ORF093 gene

1: PCR product of ORF093 gene; M: DNA Marker DL2000.

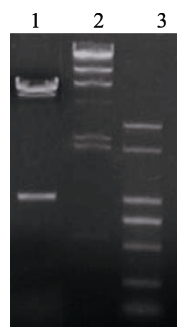


图 2 重组质粒 pET32a-093 的酶切鉴定

1: 重组质粒 pET32a-093 被 *EcoR* I + *Hind* III 双酶切; 2: 分子量标准 λ DNA/*Hind*III; 3: 分子量标准 DL3000.

Fig. 2 The identification of the recombination plasmid pET32a-093 by restriction enzymes

1: pET32a-093 digested by *EcoR* I and *Hind* III; 2: DNA Maker λ DNA/*Hind*III; 3: DNA Maker DL3000.

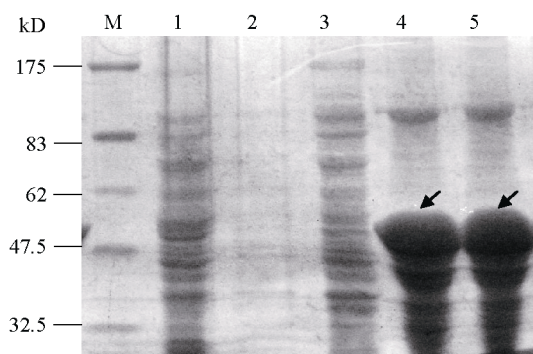


图 3 SDS-PAGE 分析 ORF093 原核表达产物

M: 蛋白 marker; 1: 诱导后的 pET32a(+)空载体; 2: 重组菌诱导表达上清; 3: 重组菌诱导表达前菌体; 4、5: 重组菌诱导表达产物.

Fig. 3 The prokaryotic expression analysis of ORF093 by SDS-PAGE

M: Protein molecular weight marker; 1: pET32a(+)/BL21, induced; 2: supernatant of pET32a-093/BL21, induced; 3: pET32a-093/BL21, non-induced; 4, 5: pET32a-093/BL21, induced. Arrows indicated recombinant 093 fusion protein.

2.3 重组 093 蛋白的免疫印记分析

重组 093 融合蛋白经过纯化、复性后免疫新西兰兔, 制备兔抗 ISKNV 093 血清, 获得的抗血清经 ELISA 检测, 抗体效价为 1×10^4 。Western blotting 结果显示, 兔抗血清可与重组 093 融合蛋白及病鳃组织中的 ISKNV 发生特异性反应, 其特异杂交带的大小与该基因编码的融合蛋白大小一致, 说明用重组 093 蛋白可以刺激机体产生特异性抗 ISKNV 抗体, 表达产物具有与 ISKNV 093 蛋白相似的抗原特性(图 5)。

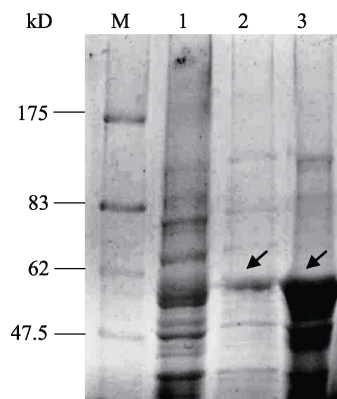


图 4 SDS-PAGE 分析重组蛋白的纯化

M: 蛋白 marker; 1: 诱导后的 pET32a(+)空载体; 2: 纯化后的重组蛋白; 3: 重组菌诱导表达产物.

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the recombinant ISKNV-093 protein

M: Protein molecular weight marker; 1: pET32a(+)/BL21, induced; 2: The purified recombinant 093 fusion protein; 3: pET32a-093/BL21, induced. Arrows indicated recombinant 093 fusion protein.

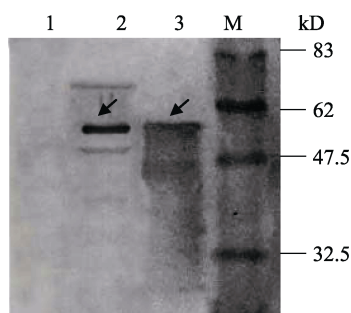


图 5 重组 ISKNV-093 融合蛋白的 Western-blotting 分析

1: 兔抗血清, pET32a(+)/BL21; 2: 兔抗血清, 患病鳃的脾肾组织上清; 3: 兔抗血清, pET32a-093/BL21; M: 预染蛋白 marker.

Fig. 5 Western-blotting analysis of the recombinant ISKNV-093 protein

1: pET32a(+)/BL21; 2: Supernatant of the spleen and kidney of *Siniperca chuatsi* infected ISKNV; 3: The purified recombinant 093 fusion protein; M: Protein molecular weight marker.

2.4 中和试验

攻毒后 10 d 内, 093 组无死亡, 从攻毒后 11 d 起, 093 组开始陆续出现死亡, 至第 28 天, 093-1 组累计死亡率 40%, 093-2 组累计死亡率 46.7%。阳性对照组从攻毒后第 5 天开始出现死亡, 至第 28 天累计死亡率达 100%, 阴性对照组无死亡, 093 组与对照组相比, 累计死亡率差异显著 ($P < 0.05$)(图 6)。说明制备的抗血清可给鱼体提供至少 10 天的 100% 预防保护。

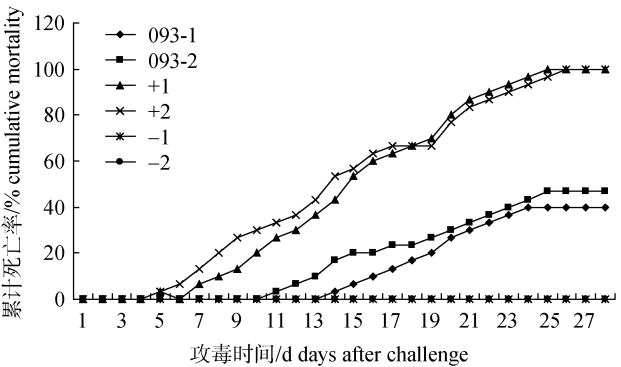


图 6 中和试验累计死亡曲线

093 组与对照相比具显著性差异($P<0.05$).

Fig. 6 Cumulative mortality curves of neutralizing test
The 093 group is significantly different from the control group ($P<0.05$).

2.5 重组蛋白免疫保护效果

重组 093 蛋白免疫鱼体后 30 d, 背肌注射病毒攻毒。结果显示(表 1, 图 7), 攻毒后 15 d 内, 093 免疫组平均累计死亡率为 41.6%, 对照组累计死亡率为 76%, 免疫组的平均相对保护率为 45.3%, 093 组与对照组相比, 相对免疫保护率差异显著($P<0.05$), 显示重组 093 蛋白具有一定的免疫保护性。

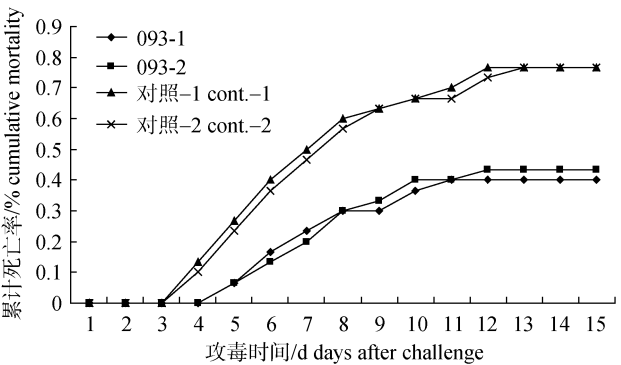


图 7 免疫后累计死亡率曲线

093 组与对照组相比具显著性差异($P<0.05$).

Fig. 7 Cumulative mortality curves of post-vaccination
The 093 group is significantly different from the control group ($P<0.05$).

3 讨论

化学药物、抗生素等对病毒病的治疗效果甚微, 目前疫苗、抗血清等仍是防治病毒病的最有效方法, 且疫苗、抗血清等生物制剂作为符合环境友好和可持续发展战略的病害控制措施, 已成为水产养殖领域研究开发的前沿热点。传统的灭活疫苗存在抗原竞争、低免疫原性、高成本及安全性低等问题^[15-17], 基因工程疫苗逐渐成为研发热点。目前已有多个渔用基因工程疫苗研制成功, 并在欧美、加拿大等国进行商品化应用, 如 IPNV 重组 VP2 亚单位疫苗、VHSV 重组 G 蛋白亚单位疫苗、IHNV G 蛋白 DNA 疫苗等^[18-19]。筛选具有较好免疫原性的保护性抗原是基因工程疫苗研制的的核心内容。董传福等^[20]对 ISKNV 蛋白质组进行研究, 鉴定了包括 ORF093 在内的 37 个病毒蛋白。本研究采用兔抗血清与感染 ISKNV 脾肾组织上清进行 Western blotting, 结果也进一步证实了 ORF093 编码蛋白为 ISKNV 蛋白。中和实验结果显示, 制备的兔抗血清对病毒具有中和作用, 可给鱼体提供至少 10 d 的 100% 预防保护, 显示 ORF093 有一定的免疫原性, 具有治疗鳊鱼虹彩病毒病的潜力。在疫苗研究方面, Shimamoto 等^[13]对真鲷虹彩病毒 MCP、ORF18R、ORF351R 重组亚单位疫苗进行了研究, 结果显示 3 个重组表达蛋白的相对免疫保护率在 27%~52%, 其中重组 351 蛋白免疫原性最好, 将其与 *E.tarda* 的 37 kD 外膜蛋白融合表达后, 相对免疫保护率可达 76%。Caipang 等^[11]对真鲷虹彩病毒 MCP、ORF569、ORF374、ORF575、ORF018、ORF291 等 6 个蛋白进行了保护性抗原筛选, 结果显示构建的 6 个 DNA 疫苗对真鲷虹彩病毒具有一定的免疫保护

表 1 重组 093 蛋白的免疫保护效果
Tab. 1 Immunization efficiency of recombinant 093 protein

组别 group	实验鱼数 total number	死亡数 death number	死亡率/% mortality	平均死亡率/% average mortality	相对保护率/% RPS	t 检验 t test
093-1	30	12	40	41.6	45.3%	$P<0.05$
093-2	30	13	43.3			
对照-1 control-1	30	23	76	76	/	
对照-2 control-2	30	23	76			

效果, 其中 ORF569 的相对免疫保护率最好, 不同实验批次(对照组不同)的相对免疫保护效果达 47.6%~71.4%。真鲷虹彩病毒 ORF569 与 ISKNV ORF093 同源性最高, 本研究结果显示以腹腔注射 Tris-Hcl 为对照, 制备的重组 093 亚单位疫苗对鳊鱼有保护作用, 相对免疫保护效果为 45.3%, 与真鲷虹彩病毒的研究结果相一致。

目前, 日本、韩国及中国的科研人员对鱼类肿大细胞病毒的保护性抗原进行了研究, 但均未筛选到高效的保护性抗原。而相对于基因工程疫苗, 全病毒灭活疫苗保护效果更好, RSIV 甲醛灭活疫苗不同实验批次的相对免疫保护率可达 75%~85.7%^[9-11], ISKNV 细胞灭活疫苗对鳊鱼的免疫保护效果达到 100%^[20]。可能是由于虹彩病毒是一类具有囊膜的大 DNA 胞质病毒, 基因组含有 100 余个 ORF, 单个蛋白的免疫原性有限, 因此通过构建多价基因工程疫苗, 可能会获得较好的免疫保护效果。

参考文献:

- [1] 吴淑勤, 李新辉, 潘厚军, 等. 鳊暴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. 鳊暴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. 鳊鱼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. 鳊鱼疫苗预防鳊鱼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. 鳊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] 付小哲, 李宁求, 彭媛媛, 等. 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[J]. 中国水产科学, 2009, 16(3): 1-6.
- [8] Dong C F, Weng S P, Shi X J, et al. Development of a mandarin fish *Siniperca chuatsi* fry cell line suitable for the study of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) [J]. Virus Res, 2008, 135(2): 273-281.
- [9] Nakajima K, Maeno Y, Honda A, et al. Effectiveness of a vaccine against red sea bream iridoviral disease in a field trial test [J]. Dis Aquat Organ, 1999, 36(1): 73-75.
- [10] Caipang C M, Hirono I, Aoki T, et al. Immunogenicity, retention and protective effects of the protein derivatives of formalin-inactivated red seabream iridovirus (RSIV) vaccine in red seabream, *Pagrus major* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2006, 20(4): 597-609.
- [11] Caipang C M, Takano T, Hirono I, 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.
- [12] Park S J, Seo H J, Son J H, et al. Development of DNA vaccine against red sea bream iridovirus (RSIV) [J]. J Microbiol Biotechnol, 2005, 15(4): 873-879.
- [13] Shimamoto H, Kawai K, Ikawa T, et al. Protection of red sea bream *Pagrus major* against red sea bream iridovirus infection by vaccination with a recombinant viral protein [J]. Microbiol Immunol, 2010, 54: 135-142.
- [14] Tamaru Y, Ohtsuka M, Kato K, Manabe S, Kuroda K, Sanada M, Ueda M. Application of the arming system for the expression of the 380R antigen from red sea bream iridovirus (RSIV) on the surface of yeast cells: a first step for the development of an oral vaccine [J]. Biotechnol Prog, 2006, 22(4): 949-953.
- [15] Leong Jo-Ann C. Molecular and biotechnological approaches to fish vaccines[J]. Biotechnology, 1993(4): 286-293.
- [16] Davis H L, McCluskie M J. DNA vaccines for viral diseases[J]. Microbes Infection, 1999(1): 7-21.
- [17] Newman S G. Bacterial vaccines for fish[J]. Annual Review Fish Disease, 1993(3): 145-185.
- [18] Joël Heppella, Heather Davis L. Application of DNA vaccine technology to aquaculture[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2000, 43: 29-43.
- [19] Lepal A, Siwicki A K, Terech-Majewska E. Application of DNA vaccines in fish[J]. Polish J Veterin Sci. 2010, 13(1): 213-215.
- [20] 董传福. 肿大细胞病毒敏感细胞系的建立及病毒蛋白组和疫苗的研究[D]. 广州: 中山大学, 2008.

Cloning and expression of *ORF093* gene and the immune effect of its recombinant protein of infectious spleen and kidney necrosis virus in *Siniperca chuatsi*

FU Xiaozhe, LI Ningqiu, PENG Yuanyuan, LIN Qiang, SHI Cunbin, HUANG Zhibin, WU Shuqin

Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key laboratory of Fishery Drug Development, Ministry of Agriculture, Guangzhou 510380, China

Abstract: The full-length *ORF093* gene from infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) isolated from mandarin fish, *Siniperca chuatsi*, was amplified by PCR, and then cloned into the prokaryotic expression plasmid pET32a(+). The recombinant 093 protein expression was induced by IPTG and purified by Ni-NTA affinity chromatograph. Polyclonal antibodies were raised in rabbits against the purified protein and the reaction of the antibody was confirmed by western blotting using the purified protein and the spleen and kidney of healthy and diseased mandarin fish. The immunogenicity of 093 protein was investigated by neutralization test and immune protection test. The results showed that the recombinant 093 protein was found as the inclusion bodies in *E. coli*. Western blotting of rabbit sera against recombinant 093 protein and the spleen and kidney of diseased mandarin fish showed a protein recognition. The antiserum could neutralize ISKNV infection and could provide fish 10-days-long 100% protection. The recombinant 093 protein could protect mandarin fish against virulent challenge with ISKNV and the average RPS of 093 group was 45.3%. The results indicated that the recombinant 093 protein had similar antigenicity to original 093 protein of ISKNV. It could be a potential vaccine candidate and antigen candidate for antiserum treatment.

Key words: *Siniperca chuatsi*; Infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV); ORF093 protein; Immunogenicity

Corresponding author: WU Shuqin. E-mail: wushuqin001@21cn.com