

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2015.15099

大鲵虹彩病毒主衣壳蛋白 MCP 基因 DNA 疫苗的构建及其免疫效果

曾宪辉^{1, 2}, 曾令兵^{1, 2, 3}, 周勇^{2, 3}, 范玉顶², 陈倩^{2, 3}, 刘文枝², 张雪萍^{2, 3},
张琳琳^{2, 3}

1. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306;
2. 中国水产科学研究院 长江水产研究所, 湖北 武汉 430223;
3. 华中农业大学 水产学院, 湖北 武汉 430070

摘要: 根据大鲵虹彩病毒(Chinese giant salamander iridovirus, GSIV)主衣壳蛋白(major capsid protein, MCP)基因序列设计特异性引物, 经 PCR 扩增得到 MCP 基因编码框 1392 bp 全长序列, 将其定向克隆到真核表达载体 pcDNA3.1(+), 构建重组质粒并命名为 pcDNA-MCP。将 pcDNA-MCP 质粒转染大鲵肌肉细胞系(GS-M), 间接荧光免疫染色结果显示, MCP 蛋白可在 GS-M 细胞中表达, 且转染后 72 h 的表达量显著高于转染后 48 h; 收集转染后 72 h 的 GS-M 细胞, 经 Western blot 检测, 可检测到 MCP 蛋白的特异性表达。将真核表达质粒 pcDNA-MCP 以 20 μg/尾的剂量经背部肌肉注射免疫健康大鲵(*Andrias davidianus*), 分别在免疫后第 1、3、5、7、14、21、28、35 天随机从实验组与对照组中采样, 尾静脉采血进行外周血白细胞计数、白细胞分类计数及测定血清中和抗体效价。结果表明, 免疫大鲵体内红细胞、中性粒细胞和单核细胞数量明显增加, 红细胞数在第 5 天极显著高于对照组($P<0.01$); 中性粒细胞(neutrophil)分类百分比从第 3 天开始升高, 第 5 天达到峰值($26.33\pm1.04\%$), 极显著高于对照组($P<0.01$); 单核细胞(monocyte)的变化趋势和中性粒细胞相似, 第 7 天达到峰值($15.83\pm0.76\%$), 极显著高于对照组($P<0.01$)。随后淋巴细胞大量增殖, 第 28 天淋巴细胞分类百分比达到峰值($68.33\pm1.53\%$), 极显著高于对照组($P<0.01$)。血清中和试验结果表明, 免疫大鲵体内产生了抗 MCP 蛋白的抗体, 免疫后第 28 天抗体效价最高[1 : (370.01 ± 31.55)]。真核质粒 pcDNA-MCP 在免疫大鲵的肌肉、肝、脾和肾的组织表达检测结果显示, 免疫接种后第 1、3、5、7、14、21、28 天大鲵的肌肉、肝、脾和肾组织中均存在真核质粒的分布; RT-PCR 结果显示, 免疫后第 7 天和 28 天, 在大鲵的上述组织中均有目的基因的表达。攻毒感染试验结果显示, 免疫组大鲵相对免疫保护率可达 73.3%。本研究为真核表达质粒 pcDNA-MCP 作为潜在候选疫苗应用于大鲵虹彩病毒病的预防和控制奠定了前期基础。

关键词: 大鲵; 虹彩病毒; 主衣壳蛋白; DNA 疫苗; 免疫保护率

中图分类号: Q785, S941

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2015)05-1055-13

中国大鲵(*Andrias davidianus*), 俗称“娃娃鱼”, 在分类学上属于鲵亚目(Cryptobranchoidea), 隐鳃鲵科(Cryptobranchidae)。大鲵属^[1], 是现存个体最大的有尾两栖动物, 属于国家二级保护动物, 具有很高的科研及经济价值。自 1979 年首次报道大鲵人工繁育成功以来^[2], 我国在大鲵自然分

布主要地区陆续开展了大鲵人工繁育与养殖技术的研究, 推动了大鲵人工养殖业迅速发展, 已经形成具有重大经济价值的产业^[3-4]。然而, 随着大鲵养殖规模的不断扩大与集约化程度的不断提高, 大鲵病害问题日益突出^[5-8]。近年来, 大鲵虹彩病毒病在我国大鲵主养区域广泛持续暴发与流行,

收稿日期: 2015-03-14; 修订日期: 2015-05-16.

基金项目: 农业部公益性行业科研专项(201203086-05).

作者简介: 曾宪辉(1989-), 男, 硕士研究生, 研究方向为水生动物病害防治. E-mail: zxh1021772170@126.com

通信作者: 曾令兵, 研究员, 主要从事水生动物病害防治研究. Tel: 86-27-81780158; E-mail: zlb@yfi.ac.cn

死亡率可达 100%，给大鲵养殖业造成了巨大的经济损失^[9–11]。

大鲵虹彩病毒(Chinese giant salamander iridovirus, GSIV)，属虹彩病毒科(Iridoviridae)、蛙病毒属(*Ranavirus*)成员，为双链DNA病毒^[9, 13]，主要感染鱼类、两栖类和爬行类等低等脊椎动物^[8–13]。耿毅等^[8, 10]首次报道了蛙病毒感染可导致养殖大鲵大规模死亡；江育林等^[9]从患病症状为四肢末端及背部皮肤溃疡、坏死的大鲵体内分离到蛙病毒，并对该病毒的理化及生物学特性进行了研究；孟彦等^[13]从患典型出血病的大鲵幼鱼和成鱼体内分离鉴定了大鲵虹彩病毒；周勇等^[14]建立了大鲵虹彩病毒的 TaqMan real-time PCR 检测方法；孙建滨等^[15]和 Liu 等^[16]研究了大鲵虹彩病毒细胞培养灭活疫苗的制备方法和免疫保护效果。目前，有关大鲵虹彩病毒 DNA 疫苗的研究尚未见报道。

主衣壳蛋白(major capsid protein, MCP)是虹彩病毒的二十面体衣壳蛋白，为一个单一的多肽，其分子量约为 49 kD，占病毒总蛋白的 45%^[12, 17]。虹彩病毒的 MCP 基因中含有许多高度保守的结构域，MCP 基因序列及其编码氨基酸序列的同源性可以反映不同虹彩病毒株之间的亲缘关系，是研究虹彩病毒分类及系统演变的靶基因，它不仅在病毒的包装和感染过程中发挥重要作用，而且还是病毒重要的抗原相关蛋白^[12, 18–20]。本研究将 GSIV MCP 编码基因定向克隆到真核表达载体 pcDNA3.1(+)中，构建大鲵虹彩病毒 MCP 基因 DNA 疫苗表达载体，研究了 DNA 疫苗免疫大鲵后的血细胞分类指标、真核表达质粒的组织表达特征、血清中和抗体滴度与免疫保护效果，旨在为大鲵虹彩病毒病 DNA 疫苗的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒株、细胞系、菌株与质粒 大鲵虹彩病毒(Chinese giant salamander iridovirus, GSIV)由本实验室分离鉴定；鲤上皮瘤细胞系(Epithelioma papilloma cyprini, EPC)由武汉大学中国典型培养物保藏中心保藏；大鲵肌肉细胞(Chinese giant

salamander muscle cell, GS-M)由中国科学院水生生物研究所张奇亚老师惠赠；真核表达载体 pcDNA3.1(+)购于 Invitrogen 公司；感受态细胞(DH5 α)与 pMD19-T 载体均购于 TaKaRa 公司。

1.1.2 实验大鲵 实验大鲵取自长江水产研究所鱼类病害研究室，平均体长 20 cm，体重 50g，暂养于 60 cm × 40 cm × 20 cm 塑料箱内，养殖用水为充分曝气除氯的自来水，温度控制在(20±1)℃，每天投喂新鲜鱼肉。

1.1.3 主要试剂 限制性内切酶 *Hind* III、*Eco* R I(Promega), T4 DNA 连接酶(TaKaRa, T4 DNA Ligase), HRP 标记的羊抗兔 IgG(AbcLonal Biotechnology, INC), 病毒 DNA 提取试剂盒(OMEGA, Viral DNA Kit), 胶回收试剂盒(Promega, Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System), 总 RNA 提取试剂(life technologies, Trizol LS Reagent), 质粒提取试剂盒(OMEGA, Endo-free Plasmid Mini Kit II), 组织 DNA 提取试剂盒(OMEGA, Tissue DNA Kit), 免疫荧光染色试剂盒(Beyotime, 免疫荧光染色试剂盒-抗兔 Cy3), 兔抗 MCP 多克隆抗体(本实验室制备并保存), Western blot 试剂盒(GenScript, ONE-HOUR Western BasicKit (Rabbit)For Rabbit Primary Antibody), 荧光定量试剂盒(Biotek Corporation, 2×SYBR Real-time PCR Premixture 200T), 逆转录试剂盒(TaKaRa, PrimeScriptTM 1st strand cDNA Synthesis Kit)。

1.1.4 引物设计与合成 参照 GenBank 已登录的 GSIV MCP 基因序列(GenBank: JN615141.1)，并依据真核表达载体 pcDNA3.1(+)的特性与酶切位点以及 MCP 核酸序列上的酶切特性，在正向引物引入限制性内切酶 *Hind* III 识别位点(AAGCTT)及 Kozak 序列(GCCACC)，在反向引物引入限制性内切酶 *Eco* R I 识别位点(GAATTC)；其他引物均根据用途、实验原理及引物设计原则设计(表 1)。所有引物均由上海生工生物工程股份有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 MCP 基因的扩增、克隆与鉴定 利用鲤上皮瘤细胞系(EPC)大量增殖培养大鲵虹彩病毒

表 1 实验中所用引物序列
Tab. 1 Primers used in the study

引物名称 primer name	引物序列(5'-3') sequence(5'-3')	引物用途 application	登录号 GenBank access no
MCP-F	CCCAAGCTTGCACCATGCTTCTGTAACCGGT	MCP 序列扩增	JN615141.1
MCP-R	CCGGAATTCTTACAAGATTGGAAATCCC		
pcDNA3.1-F	CTAGAGAACCCACTGCTTAC	阳性克隆的筛选	
pcDNA3.1-R	TAGAAGGCACAGTCGAGG		
MCPjc-F	GACTTGGCCACTTATGAC	组织分布分析	JN615141.1
MCPjc-R	GTCTCTGGAGAAGAAGAA		
Rt-MCP-F	GCGGTTCTCACACGCAGTC	组织表达分析	JN615141.1
Rt-MCP-R	ACGGGAGTGACGCAGGTGT		
β-actin-F	TGAACCCAAAAGCCAACCGAGAAAAGAT	组织表达分析	HQ822274.1
β-actin-R	TACGACCAGAGGCATAACAGGGACAGGAC		

(GSIV)。收集细胞培养病毒, 采用病毒 DNA 提取试剂盒(OMEGA, Viral DNA Kit)抽提 GSIV 核酸, 以此核酸为模版进行 PCR 扩增 MCP 基因全长。采用 50 μL 反应体系: 10×PCR Buffer 5 μL, dNTP (10 mmol/L) 1 μL, Primers(MCP-F/MCP-R, 10 μmol/L)各 1 μL, rTaq DNA 聚合酶(5 U/μL) 0.5 μL, 病毒 DNA 模板为 1 μL, ddH₂O 补足至 50 μL。PCR 反应条件为: 95℃ 预变性 5 min; 95℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 90 s, 30 个循环, 72℃ 延伸 10 min。反应结束后, PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离并用胶回收试剂盒(Promega, Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System)回收目的片段, 将纯化的 MCP 基因与 pMD19-T 载体于 16 连接 4 h 后, 转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中, 经菌落 PCR 筛选阳性克隆并分别命名为: pMD19-T-MCP, 送上海生工生物工程有限公司测序。

1.2.2 真核表达质粒的构建、鉴定及大量制备 将重组质粒 pMD19-T-MCP 与真核表达载体 pcDNA3.1 (+) 分别由 Hind III 和 EcoR I 双酶切过夜, 酶切产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离后, 胶回收试剂盒回收目的片段并用 T4 DNA 连接酶 16℃ 连接过夜, 连接产物转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中, 菌落 PCR 筛选阳性克隆, 送上海生工生物工程有限公司测序。同时将该阳性克隆扩大培养并提取质粒, 经酶切鉴定后, 命名为 pcDNA-MCP。将含空质粒 pcDNA3.1(+)与重组质粒 pcDNA-MCP 的菌种分别接种于 5 mL LB 液体培养基(含 Amp

100 μg/mL)中, 于 37℃ 震荡培养过夜, 次日按 1 : 100 的比例扩大培养, 提取质粒。质粒 DNA 的提取采用 Endo-free Plasmid Mini Kit II (USA, OMEGA), 具体步骤参照试剂盒说明书。提取的质粒经自动核酸检测仪检测浓度后保存于 -20℃ 备用。

1.2.3 真核表达质粒转染 GS-M 细胞 通过脂质体 Lipofectamine-2000 介导, 将重组真核表达质粒 pcDNA-MCP 转染到 GS-M 细胞中。在转染后 48 h 与 72 h 将细胞用 4% 多聚甲醛于 4℃ 固定过夜, 以免抗 MCP 多克隆抗体为一抗, 红色荧光探针标记的羊抗兔 IgG(H+L) 抗体为二抗, DAPI 为细胞核染色剂, 参照免疫荧光染色试剂盒(Beyotime, 免疫荧光染色试剂盒—抗兔 Cy3)对转染重组质粒的 GS-M 细胞进行检测。同时用转染空质粒 pcDNA3.1(+)的 GS-M 细胞及没有转染质粒的 GS-M 细胞作为对照进行相同操作。转染后 72 h 弃细胞培养液, 收集细胞, 经 SDS-PAGE 电泳后, 转移至硝酸纤维素膜上, 以免抗 MCP 多克隆抗体为一抗, 参照 Western blot 试剂盒[GenScript, ONE-HOUR Western BasicKit(Rabbit)For Rabbit Primary Antibody]步骤进行 Western blot, 检测目的蛋白的表达, 同时将转染空质粒 pcDNA3.1(+)的 GS-M 细胞及没有转染质粒的 GS-M 细胞作为对照。

1.2.4 真核表达质粒 pcDNA-MCP 免疫大鲵 健康的暂养大鲵 144 尾随机分为 3 组, 每组 48 尾。PBS 对照组注射无菌 PBS 200 μL/尾; 空质粒 pcDNA3.1(+)对照组与真核重组质粒 pcDNA-MCP

试验组注射相应的质粒 20 μg (200 $\mu\text{L}/\text{尾}, 0.1 \mu\text{g}/\mu\text{L})$ 。3 个组均为背部肌肉多点注射, 注射免疫后正常饲喂。

1.2.5 真核表达质粒在大鲵体内分布与表达的检测 从免疫接种之日起分别在 1 d, 3 d, 5 d, 7 d, 14 d, 21 d, 28 d, 35 d, 42 d 时间点采样。实验组与对照组每组随机取 2 尾大鲵, 尾静脉采血, 一尾血液加抗凝剂用于血细胞计数, 白细胞分类计数及真核质粒的体内分布检测; 另一尾血液不加抗凝剂, 室温静置 1 h, 4°C 静置 12 h, 4000 r/min 离心 10 min 取上层血清, 用于抗体效价的测定。采血后解剖取其肝、脾、肾以及注射部位肌肉材料, 用组织 DNA 提取试剂盒提取其组织总 DNA(提取步骤参照 OMEGA Tissue DNA Kit 说明书), 用引物 MCPjc-F/MCPjc-R 检测真核质粒 pcDNA-MCP 在各组织中的分布情况。在免疫后第 7 天和第 28 天, 另取实验组与对照组大鲵的肝、脾、肾以及注射部位肌肉材料, 用 Trizol 法提取各组织总 RNA(步骤参照试剂盒说明书)并逆转录成 cDNA 第一链(步骤参照逆转录试剂盒说明书), 以第一链 cDNA 为模版, 引物 Rt-MCP-F/Rt-MCP-R 进行 PCR 检测重组质粒在各组织中的表达, 同时以大鲵 β -actin 基因作为对照。

1.2.6 血细胞计数与白细胞分类计数 利用 Dacie 氏稀释液将血液稀释 200 倍, Nubarer 计数板分别对红细胞(red blood cell, RBC)和白细胞(white blood cell, WBC)进行计数, 每个样品重复 3 次。用常规方法推血涂片 3 张, 在空气中快速晾干, Wright-Giemsa 染液混合染色 10 min 左右, 冲洗晾干, 在油镜下随机观察 100 个白细胞, 计数各类白细胞数量, 得出某种白细胞所占分类百分比。

1.2.7 血清中和抗体效价检测 采用病毒学常规微量中和试验方法测定免疫后大鲵血清的中和抗体效价。将待检血清 56°C 30 min 灭活并从 1:10 倍比稀释至 1:1280, 每个滴度设 6 个复孔, 取 50 μL 不同稀释度的血清与 50 μL 200 TCID₅₀/100 μL 的 GSIV 病毒液在 96 孔板中混合, 混匀后置于 20°C 温箱中和 2 h, 每隔 20 min 混匀一下, 随后每孔加 100 μL 的 GS-M 细胞悬液, 置 25°C 培养箱中培养,

并同时设阳性与阴性对照孔, 48 h 后开始观察并记录结果, 以 Reed-Muench 法计算血清的中和抗体滴度。

1.2.8 攻毒保护试验 在免疫后第 28 天, 每组随机取 30 尾大鲵进行攻毒实验, 每尾腹腔注射 10⁷ TCID₅₀/100 μL 的 GSIV 400 μL 进行攻毒感染试验。攻毒后每天观察并记录感染发病与死亡情况, 连续观察 15 d。实验结束后计算相对免疫保护率(relative percent survival, RPS): RPS = (1 - 免疫组死亡率/对照组死亡率) × 100%。

1.2.9 数据分析 实验数据用 SPSS20.0 统计软件进行生物统计分析, 用单因素方差分析进行差异显著性检验: $P > 0.05$, 没有显著性差异; $0.01 < P < 0.05$, 存在显著性差异; $P < 0.01$, 存在极显著性差异。

2 结果与分析

2.1 MCP 基因的扩增、克隆与鉴定

经 PCR 反应扩增得到 GSIV MCP 基因片段大小约为 1392 bp, 与预期大小一致(图 1)。回收纯化 PCR 扩增产物, 连接到 pMD19-T 载体, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 获得了阳性重组菌株 pMD19-T-MCP/DH5 α 。测序结果显示, 成功将大小为 1392 bp 的目的片段连接到 pMD19-T 载体中, 与 GenBank 参考序列的同源性为 100%。

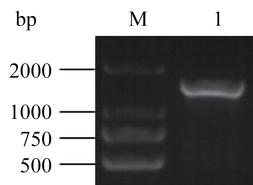


图 1 GSIV MCP 基因的 PCR 扩增结果

M: DL2000 DNA Marker; 1: MCP 基因 PCR 结果.

Fig.1 PCR amplification results of GSIV MCP gene
M: DL2000 Marker(Takara); 1: PCR product of GSIV MCP gene.

2.2 真核表达质粒的构建与鉴定

阳性重组质粒 pMD19-T-MCP 与真核表达质粒 pcDNA3.1(+)分别经 Hind III 和 EcoR I 双酶切, 回收目的片段连接过夜后, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, PCR 鉴定获得了阳性重组菌株 pcDNA-

MCP/DH5 α 。提取重组质粒经双酶切鉴定,结果表明目的片段与预期大小的核酸片段相同(图 2)。测序结果进一步表明 MCP 基因已正确插入到真核表达载体 pcDNA3.1(+))中。

2.3 真核表达质粒在 GS-M 细胞中的表达

脂质体 Lipofectamine-2000 介导真核表达质粒 pcDNA-MCP 转染 GS-M 细胞, 转染后 48 h 与

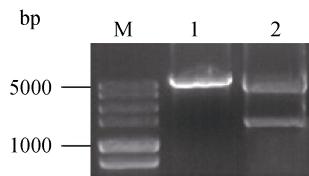


图 2 真核表达质粒 pcDNA-MCP 双酶切鉴定结果

M: DL5000 DNA marker; 1: 经 EcoR I 单酶切的重组质粒 pcDNA-MCP; 2: 经 Hind III 和 EcoR I 双酶切的重组质粒 pcDNA-MCP

Fig. 2 Identification of eukaryotic expression plasmid pcDNA-MCP by restriction enzyme digestion

M: DL5000 DNA marker; 1: pcDNA-MCP digested by EcoR I; 2: pcDNA-MCP digested by Hind III and EcoR I.

72 h 间接荧光免疫实验结果显示, 转染真核表达质粒的 GS-M 细胞胞质中可观察到红色荧光, 且转染后 72 h 的表达量显著高于转染后 48 h(图 3)。本实验同时用 pcDNA3.1(+)空质粒转染 GS-M 细胞, 并和正常 GS-M 细胞一起作为对照进行间接荧光免疫实验, 均未发现任何荧光。Western blot 检测转染后 72 h 的细胞, 转染真核表达质粒 pcDNA-MCP 的细胞在 70 kD 左右有一条清晰的特异性条带, 而未转染质粒与转染空质粒的细胞无特异性条带出现(图 4), 表明成功构建的真核表达质粒 pcDNA-MCP 能够在 GS-M 细胞中稳定表达。

2.4 PCR 检测真核表达质粒在大鲵体内的分布

应用特异性引物, 通过 PCR 检测真核表达质粒在不同时间点血液和各组织器官中的分布情况(表 2, 图 5)。在每个时间点随机选择 2 尾大鲵收集组织样, 当两个样品均为阴性时则判断为阴性, 否则为阳性。从表中可以看出, 经肌肉注射真核表达质粒, 在注射后 1 d 即能够在血液、肝、脾、肾和注射部位肌肉等组织器官中检测到真核质粒

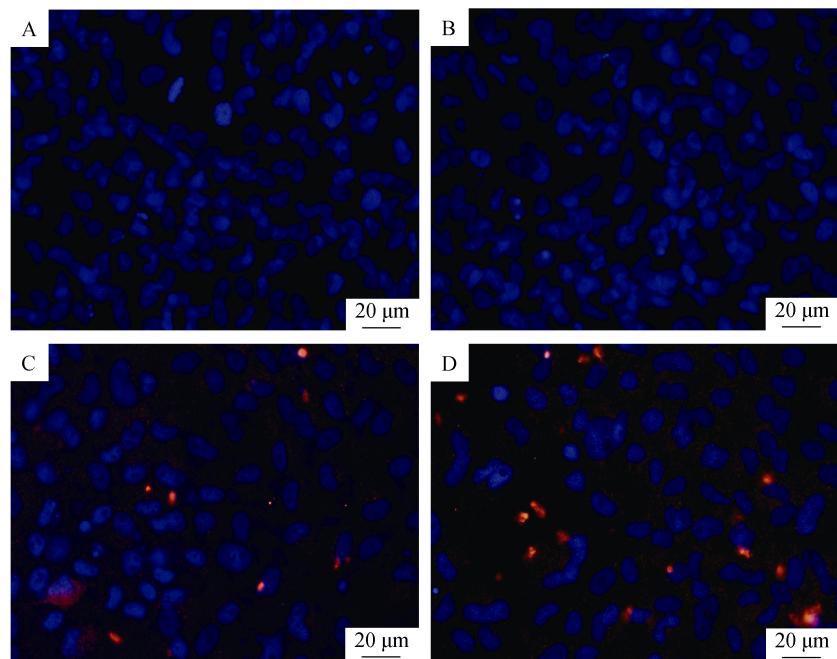


图 3 间接荧光免疫检测真核表达质粒在 GS-M 细胞中的表达

- A. 转染质粒 pcDNA3.1(+)后 48 h;
- B. 转染质粒 pcDNA3.1(+)后 72 h;
- C. 转染质粒 pcDNA-MCP 后 48 h;
- D. 转染质粒 pcDNA-MCP 后 72 h.

Fig.3 Detection of eukaryotic expression plasmid expression in GS-M cell by indirect immunofluorescence method
A. 48 h post-transfection with pcDNA3.1(+); B. 72 h post-transfection with pcDNA3.1(+); C. 48 h post-transfection with pcDNA-MCP; D. 72 h post-transfection with pcDNA-MCP.

表 2 不同时间点各组织器官中真核表达质粒 pcDNA-MCP 的分布
Tab. 2 Distribution of pcDNA-MCP plasmids in various tissues at different time points

组织 tissue	注射后的时间/d time after inoculation								
	1	3	5	7	14	21	28	35	42
血液 blood	+	+	+	+	+	+	-	-	-
肝 liver	+	+	+	+	+	+	+	-	-
脾 spleen	+	+	+	+	+	+	+	-	-
肾 kidney	+	+	+	+	+	+	+	+	-
肌肉 muscle	+	+	+	+	+	+	+	+	+

注: “+”表示组织中存在 pcDNA-MCP 质粒; “-”表示组织中不存在 pcDNA-MCP 质粒。

Note: “+” denote positive; “-” denote negative.

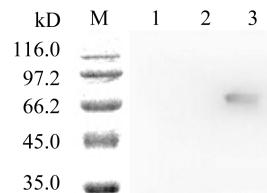


图 4 Western blot 检测真核表达质粒在 G-SM 细胞中的表达
M: 蛋白 marker; 1: 正常 GS-M 细胞; 2: 转染空质粒的 GS-M 细胞; 3: 转染 pcDNA-MCP 的 GS-M 细胞。

Fig. 4 Detection of eukaryotic expression plasmid expression in GS-M cell by Western blot

M: protein marker; 1: GS-M cell; 2: GS-M cell transfected with pcDNA3.1(+); 3: GS-M cell transfected with pcDNA-MCP.

pcDNA-MCP 的信号, 但血液在接种后 28 d 已经检测不到真核表达质粒的信号, 而肝、脾、肾和肌肉在第 28 天仍能检测到信号; 第 35 天, 肾和肌肉中可检测到信号, 直到第 42 天只有注射部位肌肉能够检测到信号, 可见真核表达质粒在组织

器官中能够停留较长时间。

2.5 RT-PCR 检测 MCP 基因的表达

免疫后第 7 天和 28 天, RT-PCR 检测 MCP 基因在大鲵体内的表达情况, 结果表明, 免疫组大鲵的肝、脾、肾与注射部位肌肉中均有不同程度 MCP 基因的表达(图 6), 而对照组中没有目的基因的表达, β -actin 基因表达正常。

2.6 血细胞计数

注射真核表达质粒 pcDNA-MCP 后, 大鲵外周血细胞的数量变化如图 7 所示。从图 7A 中可看出, 从免疫后第 1 天开始, 对照组的红细胞数(RBC)一直维持在 $3.5 \times 10^7/\text{mL}$ 左右, 而免疫组的红细胞数则在第 3 天与第 7 天显著高于对照组($P < 0.05$), 第 5 天极显著高于对照组($P < 0.01$), 其他免疫时间没有明显差异($P > 0.05$)。免疫后第 3

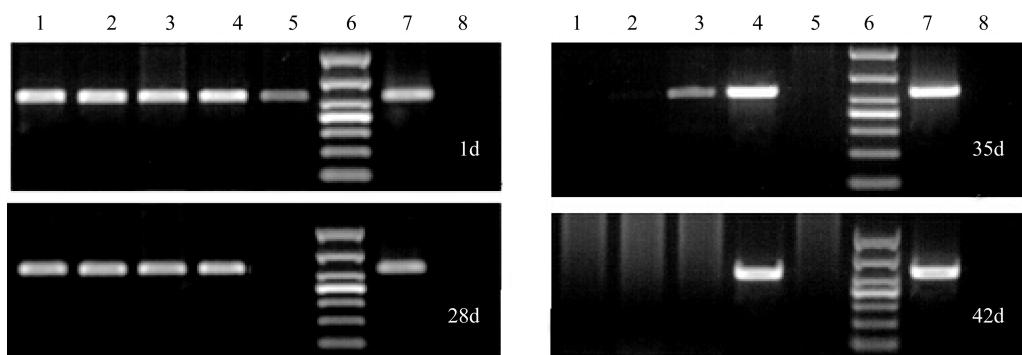


图 5 PCR 检测免疫后不同时间点各组织器官中真核表达质粒 pcDNA-MCP 的分布

1: 肝; 2: 脾; 3: 肾; 4: 接种部位肌肉; 5: 血清; 6: DL 2000 marker; 7: pcDNA-MCP; 8: 阴性对照。

Fig. 5 Presence of recombinant plasmid pcDNA-MCP in tissues at different time after immunization detected by PCR
The PCR products migrated through 1% agarose gel. 1: liver; 2: spleen; 3: kidney; 4: inoculated muscle; 5: serum; 6: DL2000 marker(TaKaRa); 7: pcDNA-MCP plasmid; 8: negative control.

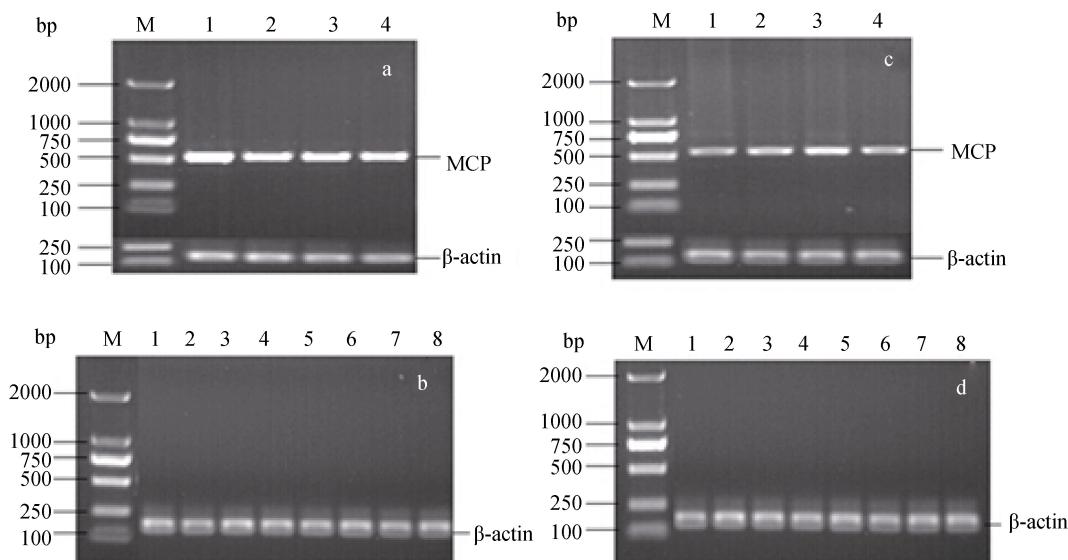


图 6 免疫后第 7 天和第 28 天 MCP 基因在大鲵各组织中表达的 RT-PCR 检测结果

a. 注射质粒 pcDNA-MCP 后第 7 天; b. 注射 PBS 后第 7 天; c. 注射质粒 pcDNA-MCP 后第 28 天; d. 注射 PBS 后第 28 天。1-4: 注射 PBS; 5-8: 注射 pcDNA3.1(+). M: DL2000 DNA marker; 1, 5: 肝; 2, 6: 脾; 3, 7: 肾; 4, 8: 注射部位肌肉。

Fig. 6 Expression of MCP gene in tissues of Chinese giant salamander on the 7th and 28th days after immunization by RT-PCR
a. Injected with pcDNA-MCP plasmid for 7 days; b. Injected with PBS for 7 days; c. Injected with pcDNA-MCP plasmid for 28 days;
d. Injected with PBS for 28 days. 1-4: injected with PBS; 5-8: injected with pcDNA3.1(+)plasmid. M: DL2000 DNA marker; 1, 5:
liver; 2, 6: spleen; 3, 7: kidney; 4, 8: muscle of injection site.

天白细胞数(WBC)迅速增加, 显著高于对照组($P<0.05$), 第 5 天与第 7 天极显著高于对照组($P<0.01$), 第 14 天与第 21 天显著高于对照组($P<0.05$), 其他免疫时间无明显差异($P>0.05$), 而对照组的白细胞数量一直在 $1.9\times10^6/\text{mL}$ 上下浮动(图 7B)。

2.7 白细胞分类计数

注射真核表达质粒 pcDNA-MCP 后, 大鲵外周血白细胞分类百分比(DLC)如图 8 所示。随着免疫时间变化, 中性粒细胞(neutrophil)分类百分比从第 3 天开始升高, 第 5 天达到峰值($26.33\pm1.04\%$), 极显著高于对照组($P<0.01$), 较对照组高近 1 倍, 第 7 天显著高于对照组($0.01<P<0.05$)(图 8A); 单核细胞(monocyte)和中性粒细胞的变化趋势比较相似(图 8B), 第 5 天和第 14 天单核细胞分类百分比免疫组显著高于对照组($0.01<P<0.05$), 第 7 天达到峰值, 极显著高于对照组($P<0.01$), 为($15.83\pm0.76\%$), 是对照组的 2 倍多, 其他时间无明显差异($P>0.05$); 免疫后第 21 天、28 天与 35 天免疫组

的淋巴细胞(lymphocyte)分类百分比极显著高于对照组($P<0.01$), 第 28 天达到峰值, 为($68.33\pm1.53\%$), 约为对照组的 1.4 倍, 第 14 天显著高于对照组($0.01<P<0.05$), 其他免疫时间没有显著差异($P>0.05$)(图 8C)。

2.8 血清中和抗体效价检测

免疫后的大鲵, 分别在第 1、3、7、14、21、28 和 35 天采血并收集血清, 用病毒微量中和实验检测血清中和抗体效价。结果表明, 随着免疫时间的延长, 免疫组大鲵血清抗体效价明显上升, 与对照组存在显著差异($P<0.05$)。对照组的血清抗体效价一直维持在 1:10 左右, 而免疫组抗体效价缓慢升高, 第 28 天达到峰值, 为 1:(370.01 ± 31.55), 随后第 35 天抗体效价有所下降, 为 1:(213.51 ± 12.72), 但仍显著高于对照组($P<0.05$)(图 9)。

2.9 免疫保护率

如图 10 所示, 注射真核表达质粒 pcDNA-MCP 后, 大鲵对 GSIV 产生了较高的免疫力, 根据相对免疫保护计算公式 $RPS=(1-\text{免疫组死亡率}/$

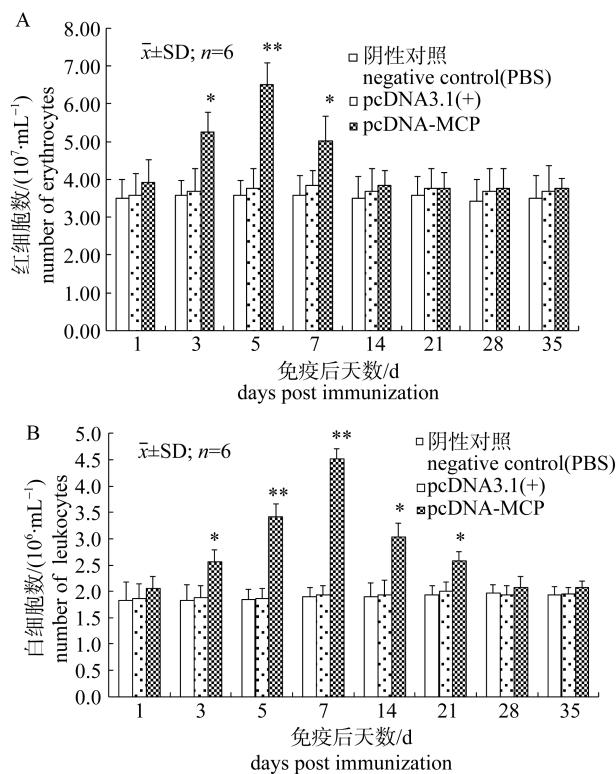


图 7 注射免疫真核质粒 pcDNA-MCP 后中国大鲵外周血
血细胞数量变化

A. 红细胞数; B. 白细胞数。**表示与对照组差异显著($P<0.05$);
***表示与对照组差异极显著($P<0.01$)。

Fig.7 Changes of hematocyte numbers in peripheral blood of Chinese giant salamander after immunization with pcDNA-MCP.

A.RBC; B. WBC. ** denotes significant difference ($P<0.05$), and *** denotes extremely significant difference ($P<0.01$) compared with the negative control.

对照组死亡率)×100%计算, 免疫组大鲵的相对免疫保护率达到了 73.3%。攻毒感染试验各时间点免疫组与 PBS 对照组的存活率差异性比较分析结果显示, 在感染后第 1、2、3、4 天, 免疫组与 PBS 对照组存活率无差异($P>0.05$), 第 5 天与第 6 天差异显著($P<0.05$), 第 7 天及以后免疫组与 PBS 对照组存活率差异极显著($P<0.01$)。注射空质粒 pcDNA3.1(+)对照组相对免疫保护率为 13.3%, 与 PBS 对照组差异不显著。攻毒感染试验后 PBS 对照组大鲵全部死亡, 其症状与自然感染大鲵虹彩病毒的患病大鲵相同, 且 PCR 检测死亡大鲵为 GSIV 阳性, 表明其死亡是由于人工感染大鲵虹彩病毒所致。

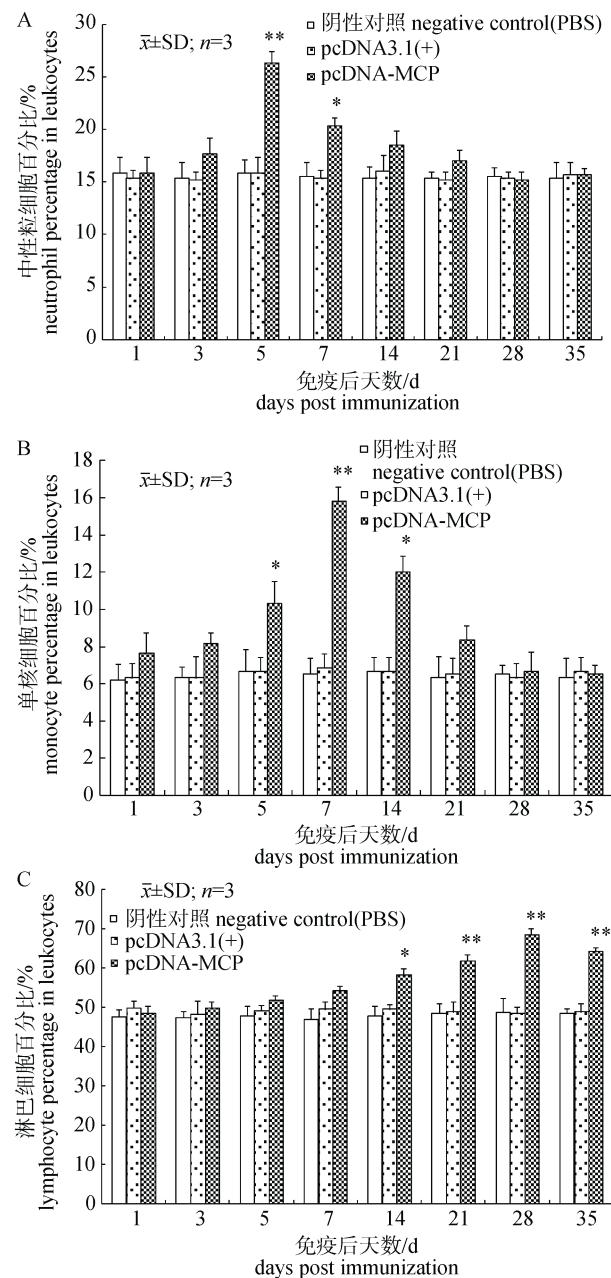


图 8 注射真核质粒 pcDNA-MCP 后大鲵外周血白细胞分
类百分比变化

A. 中性粒细胞百分比; B. 单核细胞百分比; C. 淋巴细胞百分比。**表示与对照组差异显著($P<0.05$); ***表示与对照组差异极显著($P<0.01$)。

Fig.8 Changes of differential leucocyte count in peripheral blood of Chinese giant salamander after immunization with pcDNA-MCP.

A. Neutrophil percentage in leukocytes; B. Monocyte percentage in leukocytes; C. Lymphocyte percentage in leukocytes. ** denotes significant difference ($P<0.05$), and *** denotes extremely significant difference ($P<0.01$) compared with the negative control.

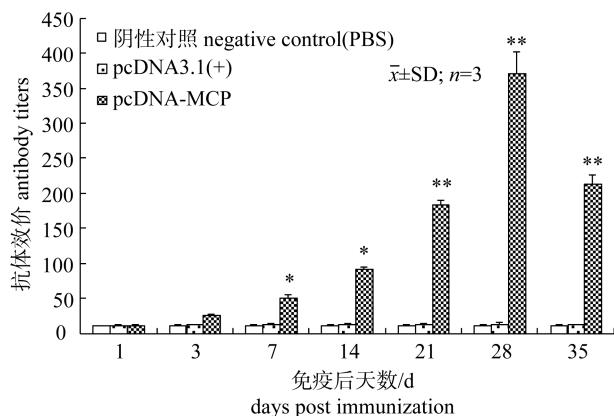


图 9 注射质粒 pcDNA-MCP 免疫中国大鲵后血清抗体效价变化

“*”表示与对照组差异显著($P<0.05$)；“**”表示与对照组差异极显著($P<0.01$)。

Fig.9 Changes of serum antibody titers of giant salamander after immunized with pcDNA-MCP plasmid
“*”denotes significant difference($P<0.05$), and “**”denotes extremely significant difference($P<0.01$) compared with negative control.

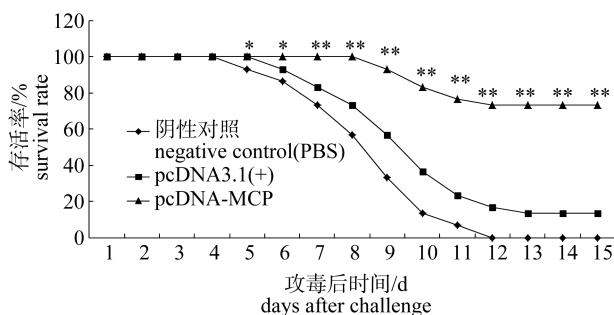


图 10 GSIV 攻毒感染后免疫大鲵的存活率
“*”表示与对照组相比差异显著 ($P<0.05$)；“**”表示差异极显著 ($P<0.01$)。

Fig.10 Survival rate of immunized giant salamander after challenged with live GSIV
“*”denotes significant difference ($P<0.05$), and “**”denotes extremely significant difference ($P<0.01$) with negative control.

3 讨论

疫苗免疫是预防和控制水产养殖病害最为有效的途径^[21]。DNA 疫苗作为继传统疫苗和亚单位疫苗之后的第三代疫苗，具有生产成本低、分子稳定、设计操作简便、便于运输与保存等优点。此外它较之传统疫苗更加安全，不存在弱毒疫苗那样的返祖危险，而且 DNA 疫苗的抗原相关表位稳定^[21-22]。自 1996 年渔用 DNA 疫苗首次应用以来，渔用 DNA 疫苗得到了迅速发展。到目前为

止，渔用 DNA 疫苗的研究主要集中在鱼类病毒病方面，如病毒性出血败血症病毒(VHSV)^[23]、传染性造血器官坏死病毒(IHN)^[24]、鱼类虹彩病毒(RSIV)^[20]、淋巴囊肿病毒(LCDV)^[25]、鲺传染性脾肾坏死病毒(ISKNV)^[26]等。在国外，许多细菌及病毒的 DNA 疫苗已经商品化，如虹鳟 IHN 的 DNA 疫苗等^[27-28]。大鲵虹彩病毒病近年在我国大鲵主养区广泛暴发与流行，死亡率可达 100%，目前尚无有效的治疗方法，除了 Liu 等^[16]关于 GSIV 细胞培养灭活疫苗的研究外，有关 GSIV 其他疫苗的研究尚无报道。

一般认为，真核表达质粒通过肌肉接种后诱导机体产生免疫应答的途径主要有以下 3 种：(1)被局部的肌细胞通过内吞的方式摄入胞内^[29]；(2)被局部的抗原提呈细胞(APC)摄入；(3)进入血液循环分布到各组织并进入组织细胞。进入细胞中的部分，可以长时间停留在细胞内，并持续表达蛋白，诱导机体的免疫应答^[30-32]。研究发现，裸质粒通过肌肉接种后初期，所有含有血管的组织均可检测到，8 周以后只有注射局部可检测到^[33]。Sangun 等^[34]用 IL-10 重组质粒经过肌肉途径免疫小鼠，研究在其体内的分布和免疫机制，发现免疫后 5 h 到两周时间内均能检测到 IL-10 重组质粒和重组质粒转录的 mRNA。本研究所构建的真核表达质粒含有 GSIV 的主衣壳蛋白(MCP)基因结构，用该质粒注射免疫大鲵后 1 d 即能在大鲵的血液、肝、脾、肾以及注射部位肌肉检测到该质粒，说明部分质粒已经通过内吞的方式摄入肌肉细胞内，还有一部分质粒通过血液循环已进入各组织细胞中；在免疫后的第 28 天血液中已经检测不到真核质粒的信号，可能是血液中的质粒已都进入到各组织细胞中或者已经被降解的缘故，但仍能在其他组织器官中检测到真核表达质粒 pcDNA-MCP 的信号。RT-PCR 检测结果显示，在第 7 天与第 28 天上述组织中均有 MCP 基因转录信号。本研究结果表明，真核表达质粒 pcDNA-MCP 不仅能在大鲵体内转移并长时间停留，而且还能在相应的组织器官中进行转录并表达。

近年国内外的研究发现, 虹彩病毒的主衣壳蛋白(MCP)作为病毒的主要结构蛋白, 在病毒的装配和感染过程中起着重要的作用, 是病毒的主要抗原相关蛋白^[18~20]。Caipang 等^[20]发现, 用含有RSIV MCP 基因的DNA 疫苗免疫虹鳟, 可产生较高的免疫保护作用, RPS 为 42.8%~68.7%; Fu 等^[26]构建了含 ISKNV 主衣壳蛋白 MCP 基因的质粒 pcMCP 并用其免疫鱲(*Siniperca chuatsi*), 攻毒实验表明可获得较好的免疫保护作用(RPS 为 80%)。本研究发现中国大鲵在接种疫苗 pcDNA-MCP 后也能获得较高的免疫保护率, RPS 为 73.3%; 同时发现空质粒组获得了 13.3% 的相对免疫保护率, 也对病毒产生了一定的保护力, 这可能是质粒 DNA 分子发挥了类似免疫佐剂的作用而诱导机体的免疫应答效应, 如质粒 DNA 结构存在以 CpG 为基元的 6 碱基核苷酸序列对鱼体产生的免疫激活功能^[35]。

红细胞是血液循环中最重要的固有免疫细胞, 具有识别、黏附、浓缩、杀伤抗原的能力, 参与机体免疫调控^[36]。郭峰曾提出“红细胞天然免疫主干道理论”, 认为在人血液免疫中存在反应路线图, 即抗原进入血液循环可首先刺激血浆中的补体, 黏附上 C3b 补体, 随后黏附上红细胞, 经红细胞处理后, 最后黏附上白细胞, 激活一系列血液免疫反应^[37~39]。本研究发现, 在注射免疫真核质粒 pcDNA-MCP 后的第 3 天和 5 天, 红细胞数量明显增加, 随后逐渐降低, 而白细胞从第 3 天开始升高, 第 7 天达到峰值。实验结果与上述理论相似, 可推断在免疫早期, 红细胞起着比较重要的作用。

本研究通过观察免疫后不同时间大鲵外周血中各白细胞的变化情况, 发现在免疫早期, 中性粒细胞和单核细胞的数量迅速增加, 分别在第 5 天和第 7 天达到峰值; 在免疫后的 1 周内, 淋巴细胞没有明显变化, 在第 14 天时开始有增加的趋势, 第 28 天达到峰值, 此期间中性粒细胞和单核细胞的数量减少。这与 Liu 等^[16]及杨星等^[40]的研究结果一致。由此可以推断, 在免疫应答早期主要是红细胞进行粘附、包围抗原, 随后与单核细胞及中性粒细胞一起发挥作用吞噬抗原; 在免疫

后期则主要由淋巴细胞发挥特异性免疫作用。血清微量中和试验结果显示, 免疫组大鲵的血清抗体水平在免疫后逐渐升高, 第 28 天达到峰值(1:370.01±31.55), 而对照组大鲵的血清中和抗体一直处于 1:10 的水平, 这与 Liu 等^[16]大鲵虹彩病毒细胞培养灭活疫苗微量中和试验结果相似, 也与试验中淋巴细胞分类百分比的变化趋势相近。

本研究所构建的大鲵虹彩病毒 DNA 疫苗免疫大鲵后, 可诱导免疫大鲵产生较强的细胞免疫活性和刺激机体产生特异性抗体, 其免疫保护率显著高于对照组, 表明以大鲵虹彩病毒主衣壳蛋白 MCP 基因构建的 DNA 疫苗在大鲵虹彩病毒病的预防中具有潜在的应用价值。

参考文献:

- [1] Morescalchi A, Odiema G, Olmo E. Karyological relationships between the Cryptobranchid salamanders[J]. Experientia, 1977, 33: 1579~1581.
- [2] Yang A S, Liu G J. The preliminary research in artificial propagation of Chinese giant salamanders (*Andrias davidianus*)[J]. Freshwater Fisheries, 1979(2): 1~5.[阳爱生, 刘国钧. 大鲵人工繁殖的初步研究[J]. 淡水渔业, 1979(2): 1~5.]
- [3] Qiao Z G. Progress of reproductive biology and artificial propagation research on *Andrias davidianus*[J]. Acta Zoologica Sinic, 2005, 51(Suppl): 78~84.[乔志刚. 中国大鲵繁殖生物学及人工繁殖技术研究进展[J]. 动物学报, 2005, 51(增刊): 78~84.]
- [4] Wang H W. A study on status and perspective for research of *Megalobatrachus davidianus*(Blanchard) in our country[J]. Modern Fisheries Information, 2002, 17(7): 5~8.[王海文. 我国大鲵研究现状与发展前景的探讨[J]. 现代渔业信息, 2002, 17(7): 5~8.]
- [5] Zhou X Y, Lin A Y, Bian B T, et al. Progress on Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*) diseases research[J]. Journal of Mountain Agriculture and Biology, 2012, 31(3): 255~260.[周小愿, 蔺爱英, 边保团, 等. 中国大鲵疾病研究进展[J]. 山地农业生物学报, 2012, 31(3): 255~260.]
- [6] Ling K, Cao Z J, Ding S H, et al. Research progress of Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*) disease control[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2013, 49(12): 55~57.[凌空, 曹朕娇, 丁诗华, 等. 大鲵病害防治研究进展[J]. 中国兽医杂志, 2013, 49(12): 55~57.]
- [7] Gao Z Y, Zeng L B, Meng Y, et al. Isolation and identifica-

- tion of *Citrobacter freundii* from diseased giant salamander, *Andrias davidianus*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52(2): 169–176.[高正勇, 曾令兵, 孟彦, 等. 患病大鲵中弗氏柠檬酸杆菌的分离鉴定[J]. 微生物学报, 2012, 52(2): 169–176.]
- [8] Geng Y, Wang K Y, Zhou Z Y, et al. First report of a ranavirus associated with morbidity and mortality in farmed Chinese giant salamanders(*Andrias davidianus*)[J]. *J Comp Pathol*, 2010, 145: 95–102.
- [9] Jiang Y L, Zhang M, Jing H L, et al. Isolation and characterization of an iridovirus from sick giant salamander (*Andrias davidianus*)[J]. *Chinese Journal of Virology*, 2011, 27(3): 274–282.[江育林, 张昱, 景宏丽, 等. 患病中国大鲵中分离到一株虹彩病毒及其特性的研究[J]. 病毒学报, 2011, 27(3): 274–282.]
- [10] Geng Y, Wang K Y, Li C W, et al. PCR detection and electron microscopic observation of bred Chinese giant salamander infected with ranavirus associated with mass mortality[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2010, 40(8): 817–821.[耿毅, 汪开毓, 李成伟, 等. 蛙病毒感染致养殖大鲵大规模死亡的电镜观察及 PCR 检测[J]. 中国兽医学报, 2010, 40(8): 817–821.]
- [11] Dong W Z, Zhang X M, Yang C M, et al. Iridovirus infection in Chinese Giant Salamanders[J]. *Emerg Infect Dis*, 2011, 17(12): 2388–2389.
- [12] Xiao F, Zhang Q Y. Molecular biology of iridoviruses from aquatic animals[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, 28(2): 202–206.[萧枫, 张奇亚. 水生动物虹彩病毒的分子生物学[J]. 水生生物学报, 2004, 28(2): 202–206.]
- [13] Meng Y, Ma J, Jiang N, et al. Pathological and microbiological findings from mortality of the Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*)[J]. *Arch Virol*, 2014, 159: 1403–1412.
- [14] Zhou Y, Zeng L B, Meng Y, et al. Establishment of a TaqMan real-time PCR assay for detecting the giant salamander iridovirus[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(5): 772–778.[周勇, 曾令兵, 孟彦, 等. 大鲵虹彩病毒 TaqMan real-time PCR 检测方法的建立[J]. 水产学报, 2012, 36(5): 772–778.]
- [15] Sun J B, Zeng L B, Zhang H, et al. Studies on the method of inactivating ginat salamander iridovirus with β -propiolactone [J]. *Freshwater Fisheries*, 2013, 43(3): 66–71.[孙建滨, 曾令兵, 张辉, 等. 大鲵虹彩病毒 β -丙内酯灭活方法的研究[J]. 淡水渔业, 2013, 43(3): 66–71.]
- [16] Liu W Z, Xu J, Ma J, et al. Immunological responses and protection in Chinese giant salamander *Andrias davidianus* immunized with inactivated iridovirus[J]. *Vet Microbiol*, 2014, 174(3–4): 382–390.
- [17] Zhao Z L, Teng Y, Liu H, et al. Characterization of a late gene encoding for MCP in soft-shelled turtle iridovirus (STIV)[J]. *Virus Res*, 2007, 129: 135–144.
- [18] Nakajima K, Maeno Y, Yokoyama K, et al. Antigen analysis of red sea bream iridovirus and comparison with other fish iridovirus[J]. *Fish Pathol*, 1998, 33(2): 73–78.
- [19] Qin Q W, Shi C Y, Gin K Y, et al. Antigenic characterization of a marine fish iridovirus from grouper, *Epinephelus* spp.[J]. *J Virol Methods*, 2002, 106: 89–96.
- [20] 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, 26: 130–138.
- [21] Joel H, Heather L D. Application of DNA vaccine technology to aquaculture[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2000, 43: 29–43.
- [22] Dong G Z, Wang Y F. Principle and Method of Animal Genetic Engineering Vaccine[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2009: 5.[董光志, 王云峰. 动物基因工程疫苗原理与方法[M]. 北京: 化学工业出版社, 2009: 5.]
- [23] Byon J Y, Ohira T, Hirono I, et al. Comparative immune responses in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* after vaccination with viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) recombinant glycoprotein and DNA vaccine using a microarray analysis[J]. *Vaccine*, 2006, 24(7): 921–930.
- [24] Corbell S, Kurath G, LaPatra S E. Fish DNA vaccine against infectious hematopoietic necrosis virus: Efficacy of various routes of immunization[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2000, 10(8): 711–723.
- [25] Ji Y T, Xiu Q S, Xi G C. Formation and oral administration of alginate microspheres loaded with pDNA coding for lymphocytis disease virus (LCDV) to Japanese flounder[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2008, 24: 592–599.
- [26] Fu X Z, Li N Q, Lin Q, et al. Protective immunity against infectious spleen and kidney necrosis virus induced by immunization with DNA plasmid containing mcp gene in Chinese perch *Siniperca chuatsi*[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2014, 40: 259–266.
- [27] Newman S G. Bacterial vaccines for fish[J]. *Ann Rev Fish Dis*, 1993(3): 145–185.
- [28] Lorenzen N, Lapatra S E. DNA vaccines for aquacultured fish[J]. *Rev Sci Tech*, 2005, 24: 201–203.
- [29] Wolff J A, Malone R W, Williams, et al. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*[J]. *Science*, 1990, 247: 1465.
- [30] Tang D, David M, Johnson S L. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response[J]. *Nature*,

- 1992, 356(6365): 152–154.
- [31] Rebinovieh N R, McIrmesp, Klein D L. Vaccine technologies: view to the future[J]. Science, 1994, 265(5177): 1404.
- [32] Ulmer J B, Donnelly J J, Parker S E, et al. Heterologous protection against influenza by infection of DNA encoding aviral protein[J]. Science, 1993, 259(5102): 1745–1749.
- [33] Oh Y K, et al. Nasal absorption and biodistribution of plasmid DNA: an alternative route of DNA vaccine delivery[J]. Vaccine, 2001, 19: 4519–4525.
- [34] Sangun C, Massoud D, Sujin L, et al. Distribution fate and mechanism of immune modulation following mucosal delivery of Plasmid DNA encoding IL-10[J]. Immunology, 1999, 163: 2393–2402.
- [35] Klinman D M, Yi A K, Beaucage S L, et al. CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12 and interferon gamma[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 2879–2883.
- [36] Guo F, Qian B H, Zhang L Z. Modern Red Cell Immunology[M]. Shanghai: The Second Military Medical University Press, 2002: 1.[郭峰, 钱宝华, 张乐之. 现代红细胞免疫学 [M]. 上海: 第二军医大学出版社, 2002: 1.]
- [37] Guo F. To establish an up-to-date experimental study system for modern systemic immunology[J]. Medical Journal of Chinese People's Liberation Army, 2006, 31(2): 89–91.[郭峰. 构建现代系统免疫学新的实验研究体系[J]. 解放军医学杂志, 2006, 31(2): 89–91.]
- [38] Guo F. Theory of hemaimmune reaction road map[J]. Journal of Oncology, 2005, 11(3): 157.[郭峰. 血液免疫反应路线图理论[J]. 肿瘤学杂志, 2005, 11(3): 157.]
- [39] Guo F. The theory of red cell innate immune reaction main road and modern systems immunology[J]. Chinese Journal of Nature, 2006, 28(2): 1–5.[郭峰. 红细胞天然免疫主干道路论与现代系统免疫学[J]. 自然杂志, 2006, 28(2): 1–5.]
- [40] Yang X, Liu W Z, Xiao H B, et al. Immune responses in the peripheral blood and protection of giant salamander (*Andrias davidianus*) immunized with a killed *Aeromonas hydrophila* vaccine[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2014, 21(3): 621–628.[杨星, 刘文枝, 肖汉兵, 等. 嗜水气单胞菌灭活疫苗免疫后大鲵外周血免疫指标的变化[J]. 中国水产科学, 2014, 21(3): 621–628.]

Construction and immune efficacy of an *MCP*-containing DNA vaccine for Chinese giant salamander iridovirus

ZENG Xianhui^{1,2}, ZENG Lingbing^{1,2,3}, ZHOU Yong^{2,3}, FAN Yuding², CHEN Qian^{2,3}, LIU Wenzhi², ZHANG Xueping^{2,3}, ZHANG Linlin^{2,3}

1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China;

3. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract: Based on major capsid protein (MCP) gene sequences of Chinese giant salamander iridovirus (GSIV) in GenBank, specific primers were designed, and the full-length *MCP* sequence (1392 bp) was amplified by PCR. Then, *MCP* was cloned into the eukaryotic expression vector pcDNA3.1 (+) to construct the recombinant expression vector pcDNA-MCP. Giant salamander (*Andrias davidianus*) muscle (GS-M) cells were transfected with the recombinant expression vector, pcDNA-MCP. At 48 h and 72 h post-transfection, MCP protein expressions in GS-M cells were detected by indirect immunofluorescence assay. The results showed that the protein expression level at 72 h post-transfection was significantly higher than that at 48 h post-transfection; western blot assay also confirmed the specific expression of MCP in GS-M cells at 72 h post-transfection. The eukaryotic plasmid pcDNA-MCP was used as a DNA vaccine to immunize Chinese giant salamanders by injection in dorsal muscle at a dose of 20 µg/ind; then, peripheral blood from Chinese giant salamanders in both tested and control groups was collected on day 1, day 3, day 7, day 14, day 21, day 28, and day 35 post-immunization for hemocyte count, classification, and serum-neutralizing antibody titration. The red and white blood cell counts showed significant increase in numbers of erythrocytes and leukocytes in the peripheral blood of immunized Chinese giant salamanders on day 5 and day 7 post-immunization ($P<0.01$). Additionally, the differential leukocyte counts of neutrophils and monocytes were $(26.33\pm1.04)\%$ and $(15.83\pm0.76)\%$, respectively, at day 5 and day 7 post-immunization, and both significantly changed compared with the control group ($P<0.01$). The percentage of lymphocytes was $(68.33\pm1.53)\%$ at day 28 ($P<0.01$). The serum neutralization assay demonstrated that the antibody titer peaked on day 28 post-immunization [1 : (370.01 ± 31.55)]. PCR results revealed that pcDNA-MCP was distributed in the muscle, liver, spleen, and kidney from day 1 to day 28 post-vaccination. RT-PCR results revealed that *MCP* was expressed in all of the above tissues at day 7 and day 28 post-vaccination. A challenge test was conducted at day 28 post-immunization and produced a relative survival of 73.3%. This study provides a fundamental basis for the application of the pcDNA-MCP plasmid as a potential DNA vaccine to prevent and control GSIV infection in Chinese giant salamanders in the future.

Key words: *Andrias davidianus*; iridovirus; major capsid protein; DNA vaccine; relative percent survival

Corresponding author: ZENG Lingbing. E-mail: zlb@yfi.ac.cn