

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2020.19212

鲤疱疹病毒 3 型 ORF148 DNA 疫苗对建鲤鱼苗的免疫保护

吴静^{1,2}, 刘振兴², 马艳平², 梁志凌², 马江耀², 郝乐², 柯浩², 冯国清², 李玉谷¹

1. 华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642;

2. 广东省农业科学院动物卫生研究所, 广东省畜禽疫病防治研究重点实验室, 农业农村部兽用药物与诊断技术广东科学观测实验站, 广东 广州 510640

摘要: 鲤疱疹病毒 3 型(Cyprinid herpesvirus 3, CyHV-3)又称为锦鲤疱疹病毒(Koi herpesvirus, KHV), 是一种高传染性、致死性病毒。为开发新型 CyHV-3 DNA 疫苗, 前期研究中将 CyHV-3 ORF148 基因插入 pEGFP-N1 构建重组质粒, 在此基础上, 本研究通过转染试验、间接免疫荧光试验证实 pORF148-EGFP 融合蛋白可以在 CCB-J 细胞系和建鲤体内表达; 将重组质粒作为 DNA 疫苗, 肌肉注射免疫建鲤鱼苗, ELISA 检测表明免疫 pEGFP-ORF148 重组质粒可以显著提高建鲤血清特异性抗体水平; RT-qPCR 检测显示, 免疫 pEGFP-ORF148 重组质粒后, 建鲤脾脏和头肾中的免疫相关基因如 *IFN- α 1*、*Mx-1*、*CXCa*、*CXCR1*、*TNF- α* 、*IL-1 β* 及 *IgM* 基因表达量均显著提高。攻毒实验显示, CyHV-3 攻毒 21 d 后, PBS 组、pEGFP-N1 组和 pEGFP-ORF148 组的建鲤存活率分别为 30%、35%和 85%, 免疫 pEGFP-ORF148 可以显著提高建鲤的存活率($P<0.01$)。本研究旨在为 CyHV-3 DNA 疫苗的应用提供理论依据。

关键词: 鲤疱疹病毒 3 型; ORF148; DNA 疫苗; ELISA; RT-qPCR

中图分类号: S94

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2020)04-0454-09

锦鲤疱疹病毒病(KHVD)是由鲤疱疹病毒 3 型(Cyprinid herpesvirus 3, CyHV-3)引起的一种高传染性、致死性疾病, 近 20 年来, 在世界范围内流行, 严重威胁鲤 (*Cyprinus carpio*)、锦鲤 (*Cyprinus carpio haematopterus*)养殖业安全^[1-2]。CyHV-3 又称为鲤疱疹病毒(Koi herpesvirus, KHV), 疱疹病毒目(Herpesvirales), 疱疹病毒科(Herpesviridae), 鲤疱疹病毒属(*Cyprinivirus*), 基因组大小 295 kb, 编码 164 个 ORF, 包括 8 个重复 ORF, 是已知基因组最大的疱疹病毒^[3-4]。

在 KHVD 防治中已经开展了灭活疫苗、弱毒疫苗和 DNA 疫苗的研究^[5-7], 但目前仅有一种 CyHV-3 商品化疫苗^[8]。研究显示, 灭活疫苗较为安全, 但与弱毒疫苗相比, 其免疫保护力较弱, 成本高^[9], 而弱毒疫苗又可能出现毒力返强现象,

存在一定安全隐患^[6], 因此亟待开发新型疫苗。DNA 疫苗利用重组 DNA 技术将保护性抗原基因插入真核表达载体, 接种到体内进行内源性抗原表达, 诱导机体产生特定的体液和细胞免疫反应^[10]。DNA 疫苗具有价格低廉、生产方便、便于运输和保存等优点成为新型疫苗的研究热点^[11]。在加拿大, 大西洋鲑(*Salmo salar*)传染性造血器官坏死病毒(infectious hematopoietic necrosis virus, IHNV) DNA 疫苗, 成为第一个获准在水产养殖中应用的商业化 DNA 疫苗^[12]。2017 年, 大西洋鲑胰腺病毒(salmon pancreas disease virus, SPDV) DNA 疫苗被欧洲药品局授权, 可在欧盟内部使用^[13]。DNA 疫苗在水产养殖中表现出良好的市场前景^[14], 并且 CyHV-3 DNA 疫苗在前期研究中也显示了良好的保护效果^[15-18]。

收稿日期: 2019-07-29; 修订日期: 2019-10-05。

基金项目: 国家自然科学基金项目(31402347); 广东省科技计划项目(2016A020210029); 广东省海洋与渔业厅海港建设和渔业产业发展专项(A201701C04); 广州市科技计划项目(201707010216); 广东省自然科学基金项目(2018A030310193)。

作者简介: 吴静(1993–), 女, 硕士研究生, 研究方向动物解剖与组织胚胎学。E-mail: 20172027028@stu.scau.edu.cn

通信作者: 刘振兴, 副研究员, E-mail: liuzhenxing@gdaas.cn; 李玉谷, 教授, E-mail: liyugu@scau.edu.cn

本研究将 CyHV-3 ORF148 插入 pEGFP-N1 载体后构建的重组质粒作为 DNA 疫苗, 通过体内外试验, 分析 pORF148 的表达情况; DNA 疫苗免疫建鲤(*Cyprinus carpio* var. *jian*)鱼苗后, 通过 ELISA 及 RT-qPCR 方法分别检测特异性抗体水平与免疫相关基因的表达, 分析 DNA 疫苗诱导的免疫应答情况; 并进一步通过攻毒试验评价 DNA 疫苗对建鲤的免疫保护效果, 本研究为开发新型 CyHV-3 DNA 疫苗奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

pEGFP-ORF148/Top10、pET32a-modORF148/BL21 重组质粒^[19]、鼠抗 pORF148 多克隆抗体^[19]、鼠抗鲤多克隆抗体^[20]由本实验室前期制备、保存。建鲤脑细胞系(CCB-J)由本实验室建立^[21]。CyHV-3 毒株由本实验室分离^[22]。Lipofectamine 3000 试剂盒购自 Invitrogen 公司。小鼠 IgG-SABC-Cy3 免疫组化试剂盒购自博士德生物公司。质粒大量制备提取试剂盒购自百泰克公司。无内毒素质粒小提中量试剂盒购自天根公司。RNA 提取试剂盒购于 OMEGA 公司。RT-qPCR 试剂盒购于 Vazyme 公司。DAPI 荧光染料购自 GENVIEW 公司。其他试剂均为国产分析纯。10 g 左右的健康建鲤购自成都通威水产苗种有限责任公司, 经 PCR 检测^[23]证明无 CyHV-3 感染。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒 pEGFP-ORF148 的转染试验 根据无内毒素质粒小提试剂盒的说明书分别提取质粒 pEGFP-ORF148、pEGFP-N1。将 CCB-J 细胞($3 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5/\text{mL}$)接种于 24 孔板, 放置细胞爬片, 待细胞长至 80%~90%融合度时, 按照 Lipofectamine 3000 说明书将提取的质粒转染至 CCB-J 细胞。转染 48 h 后, 4%多聚甲醛固定 30 min, 1%BSA 37 °C 封闭 1 h, PBST 洗涤 3 次; 加入 1:100 稀释鼠抗 CyHV-3 pORF148 多克隆抗体, 37 °C 孵育 2 h, PBST 洗涤 3 次; 加入 1:100 稀释生物标记羊抗小鼠 SABC-Cy3, 37 °C 孵育 1 h,

PBST 洗涤 3 次; 封片, 激光共聚焦显微镜观察。

1.2.2 重组质粒 pEGFP-ORF148 的体内表达 建鲤鱼苗肌肉注射 20 μg 重组质粒(pEGFP-ORF148 或 PBS, $n=3$), 检测 pORF148-EGFP 融合蛋白的表达。注射 14 d 后, 丁香酚(20 mg/L)麻醉处死建鲤, 去除尾柄皮肤, 分离脾脏与注射部位肌肉组织, 冻存在液氮中。上述组织制备 5 μm 冷冻切片, DAPI 染色, 封片, 激光共聚焦显微镜观察。

1.2.3 DNA 疫苗免疫 根据质粒大提试剂盒的说明书分别提取质粒 pEGFP-ORF148、pEGFP-N1。测定浓度后, 采用 PBS 将质粒稀释至 35 ng/ μL , -20 °C 保存。取 120 尾健康建鲤分为 3 组($n=40$), 在尾柄肌肉分别注射 pEGFP-ORF148(DNA 疫苗组)、pEGFP-N1(空载体对照组)、PBS(空白对照组), 注射剂量为 3.5 $\mu\text{g}/\text{尾}$ (100 μL)质粒或 100 $\mu\text{L}/\text{尾}$ PBS, 免疫期间水温控制在 20~25 °C; 免疫 3 次, 每次间隔 2 周, 每次免疫 2 周后每组随机抽取 3 尾鱼, 丁香酚(20 mg/L)麻醉后尾静脉采集外周血(100 $\mu\text{L}/\text{尾}$), 分离血清, -20 °C 保存。

1.2.4 特异性血清抗体水平检测 pET32a-modORF148/BL21 诱导表达后纯化重组的 CyHV-3 pORF148 作为包被抗原, 鼠抗鲤 IgM 多克隆抗体作为检测抗体, 采用间接 ELISA 方法, 检测每次免疫后的血清特异性抗体水平^[19]。

1.2.5 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)检测免疫相关基因表达 第 3 次免疫 2 周后, 在 pEGFP-ORF148 组、pEGFP-N1 组和 PBS 组中, 每组随机抽取 3 尾鱼, 丁香酚(20 mg/L)麻醉处死, 分别取头肾及脾脏, 按照 E.Z.N.A.® Total RNA Kit II 试剂盒说明书(Omega 公司)提取 RNA, 样品通过微量核酸检测仪(德国 Thermo)检测纯度和 RNA 总量。提取的 RNA 按 Hiscript® II Q RT SuperMix for qPCR(+gDNA wiper)(Vazyme 公司)说明书合成 cDNA, 将合成的 cDNA 稀释 10 倍, 取 3 μL 作为模板按 ChamQ™ Universal SYBR® qPCR Master Mix 说明书(Vazyme 公司)进行 qPCR 分析免疫相关基因的表达情况, 选择 β -actin 作为内参基因, 相关引物序列见表 1。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法计算目的基因相对表达量^[24]。

表 1 免疫相关基因引物序列
Tab.1 The primer sequences of immune-related genes

引物 primer	序列(5'-3') sequence	登录号 accession No.	参考文献 reference
Mx-1	F: ACAATTTGCGGTCTTTGAGA R: CCCTGCCATTTCTCTTCG	cypCar00015892	[17]
IFN-α1	F: AACAGTCGGGTGTCGCAAG R: TCAGCAAACATACTCCCCAG	AB376666	[25]
IL-1β	F: AAGGAGGCCAGTGGCTCTGT R: CCTGAAGAAGAGGAGGAGGCTGTCA	AB010701	[25]
TNF-α	F: TTATGTGCGGTGCGGCCTTC R: AGGTCTTTCCGTTGTCGCTTT	AJ311800.2	[25]
IgM	F: CACAAGGCGGGAAATGAAGA R: GGAGGCACTATATCAACAGCA	AB004105	[17]
IgT	F: AAAGTGAGATGAAAGTGT R: TGGTAACAGTGGGCTTATT	AB598367	[17]
CXCa	F: CTGGGATTCTGACCATTTGGT R: GTTGGCTCTCTGTTTCAATGCA	AJ421443	[26]
CXCR1	F: GCAAATTGGTTAGCCTGGTGA R: AGGCGACTCCACTGCACAA	AB010468	[26]
β-actin	F: CAAGATGATGGTGTGCCAAGTG R: TCTGTCTCCGGCACGAAGTA	M24113.1	[25]

1.2.6 攻毒实验 上述 1.2.3 中注射的 pEGFP-ORF148 组、pEGFP-N1 组和 PBS 组建鲤，第 3 次免疫 2 周后随机选择 20 尾，丁香酚(20 mg/L)麻醉，100 μLCyHV-3 毒株($10^{2.0}$ TCID₅₀/尾)滴鳃攻毒，冰上静置 3 min 后放入鱼缸^[27]。攻毒实验期间，水温控制在 23~25 ℃，每天记录各组死亡情况，攻毒后连续观察 21 d，统计分析各组累积存活率。对 3 组攻毒死亡的建鲤分别随机取 3 尾，提取脑组织 DNA 作为模板，按照文献[23]的方法进行 CyHV-3 检测。

1.2.7 数据统计分析 采用 SPSS 21.0 软件和 GraphPad Prism 6.0 对数据进行统计分析，其中抗体水平采用 *t* 检验，攻毒保护绘制 Kaplan-Meier 生存曲线并采用 Log Rank 检验，相对保护率按照以下方法^[28]计算：RPS=(1-免疫组死亡率/对照组死亡率)×100%。基因表达量通过单因素方差分析进行多重比较。显著性水平：*P*<0.05 为显著性差异，*P*<0.01 为极显著性差异。

2 结果与分析

2.1 重组质粒表达

2.1.1 pEGFP-ORF148 融合蛋白的转染试验

将 pEGFP-ORF148、pEGFP-N1 质粒分别转染

CCB-J 细胞，转染 48 h 后，两组细胞均可见增强型绿色荧光蛋白(EGFP)表达(图 1)；间接免疫荧光结果表明，pORF148 在 CCB-J 细胞中获得表达(图 1)。

2.1.2 pEGFP-ORF148 融合蛋白体内表达 为分析 pEGFP-ORF148 重组质粒在鱼体内表达情况，肌肉注射 20 μg 重组质粒，14 d 后取脾脏以及注射部位肌肉，制备冰冻切片进行显微观察，结果显示，pEGFP-ORF148 组在肌肉和脾脏中均可见绿色荧光信号，PBS 组均无绿色荧光(图 2)，表明 pEGFP-ORF148 融合蛋白可以在鱼体内表达。

2.2 免疫后血清 IgM 水平测定

采用间接 ELISA 方法检测 PBS、pEGFP-N1、pEGFP-ORF148 注射免疫后的血清特异性 IgM 水平，结果显示，pEGFP-ORF148 免疫组的血清抗 CyHV-3 pORF148 抗体水平随着免疫次数增加逐渐升高，第 1 次免疫 2 周后特异性抗体水平显著高于 PBS 组与 pEGFP-N1 组(*P*<0.05)；第 2 次和第 3 次免疫 2 周后，与 PBS 组和 pEGFP-N1 组存在极显著差异(*P*<0.01)。pEGFP-N1 组的抗 CyHV-3 pORF148 特异性抗体水平在 3 次免疫后与 PBS 组均无显著性差异(*P*<0.05) (图 3)。

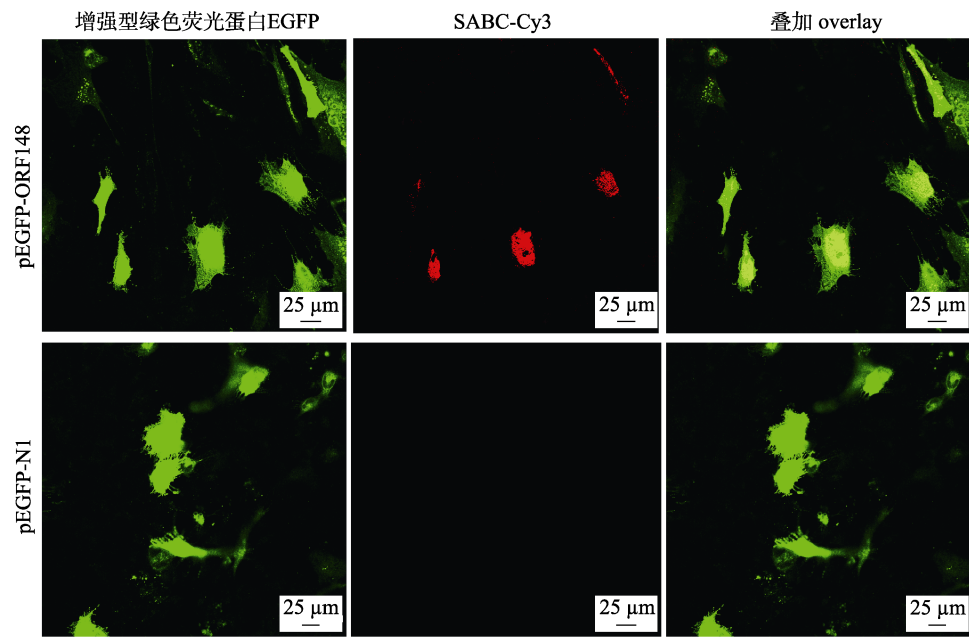


图 1 pEGFP-ORF148 体外表达
Fig. 1 Expression of pEGFP-ORF148 fusion protein *in vitro*

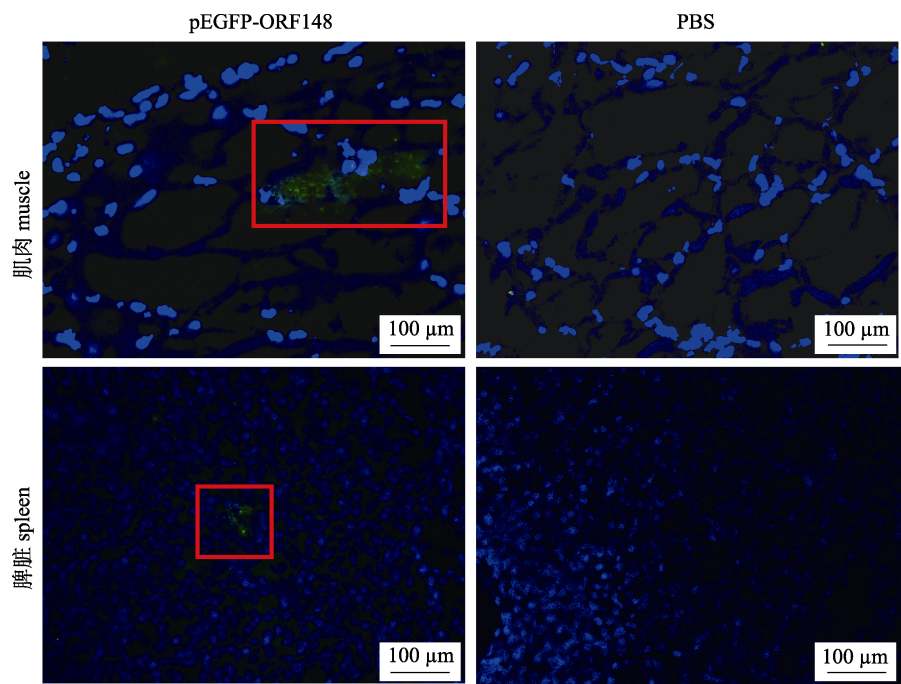


图 2 pEGFP-ORF148 融合蛋白体内表达
图中红色方框内绿色信号示建鲤组织内表达的 pORF148-EGFP 融合蛋白。
Fig. 2 Expression of pEGFP-ORF148 fusion protein *in vivo*
The green signals in the red box indicate the expression of pORF148-EGFP fusion protein *in vivo*.

2.3 免疫相关基因表达分析

通过 RT-qPCR 分析建鲤在第 3 次免疫 2 周后脾脏及肾脏免疫相关基因的表达, 结果显示, 与 PBS 组相比, 在 pEGFP-ORF148 疫苗免疫组(DNA

疫苗免疫组)建鲤头肾组织中, 天然性免疫基因 *IFN-α1*、*CXCα*、*IL-1β*、*TNF-α* 分别极显著地上调表达 145.30 倍、4.19 倍、52.27 倍、131 倍($P<0.01$), *Mx-1* 和 *CXCR1* 分别上调表达 4.03 倍和 3.05 倍

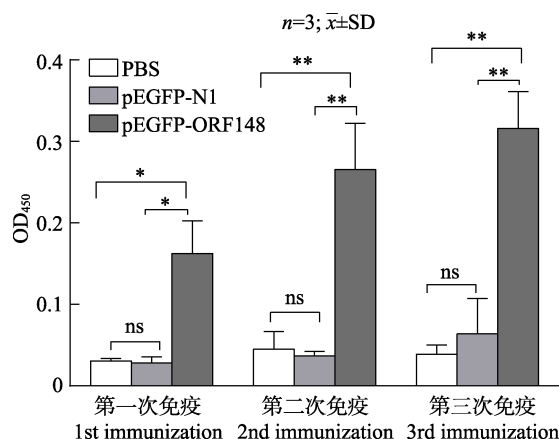


图3 建鲤血清抗 CyHV-3 pORF148 特异性抗体水平检测
*或**表示显著性差异 $P<0.05$ 或 $P<0.01$.

Fig. 3 Detection of anti-CyHV-3 pORF148 antibody in serum of *Cyprinus carpio* var. *jian* after the immunization with PBS, pEGFP-N1 and pEGFP-ORF148

* and ** indicate the significant difference at $P<0.05$ and $P<0.01$, respectively.

($P<0.05$); *IgM* 基因极显著地上调表达 12.16 倍 ($P<0.01$)。相对于 PBS 组, DNA 疫苗免疫组的脾脏组织中, *IFN- α* 、*CXC α* 、*TNF- α* 和 *IgM* 分别上调 22.44 倍、4.63 倍、6.14 倍和 4.23 倍 ($P<0.01$), *IL-1 β* 上调表达 2.56 倍 ($P<0.05$)。值得注意的是 pEGFP-N1 免疫组的 *IL-1 β* 在头肾中极显著地上调表达 35.94 倍 ($P<0.01$); *CXC α* 在头肾中上调表达 3.43 倍 ($P<0.05$), 在脾脏组织中上调表达 4.40 倍 ($P<0.01$) (图 4)。

2.4 攻毒保护

建鲤在第 3 次免疫 2 周后进行攻毒实验, 攻毒 7 d 后建鲤开始死亡, 攻毒 15 天死亡率趋于稳定, 统计显示 PBS 组、pEGFP-N1 组和 pEGFP-ORF148 组分别死亡 14 尾、13 尾和 3 尾, 存活率分别为 30%、35%和 85% (图 5)。pEGFP-ORF148 组建鲤相对 PBS 组保护率为 79%, 相对于 pEGFP-N1 组保护率为 77%。结果显示, 与 PBS 或 pEGFP-N1 对照组相比, pEGFP-ORF148 免疫后显著提高了攻毒建鲤的存活率 ($P<0.01$)。对 3 组死亡的建鲤分别随机取 3 尾进行 CyHV-3 检测, 结果均为阳性 (图 6)。

3 讨论

质谱分析鉴定出的 CyHV-3 编码蛋白可能有

46 种^[29-30], 包括 3 种衣壳蛋白、15 种囊膜蛋白、2 种皮层蛋白和 26 种未知蛋白^[31], 但只有少数的免疫原性已被鉴定^[32-33]。CyHV-3 至少包含 5 个基因家族: ORF2、ORF25、ORF72、ORF81 和 ORF83^[33-34]。其中 ORF25 家族是一个保守家族, 包括 ORF 25、65、148 和 149, 这些基因可能是由一个共同祖先进化而来^[34]。ORF148 编码糖基化 I 型囊膜蛋白^[35], 生物信息分析显示, 该蛋白具有良好的免疫原性^[16]。近年来, 两项研究显示使用囊膜蛋白 ORF25 和 ORF81 作为 DNA 疫苗接种可引起鱼体的特异性免疫应答, 显著降低死亡率 ($<20\%$)^[15-16]; 后期 Embregts 等^[17]在此基础上研究发现不同的免疫方法和攻毒方式对 CyHV-3 ORF25 DNA 疫苗保护效果存在一定影响, 其中选择肌肉注射并通过浸泡攻毒, 相对保护率可达 89%; Cui 等^[18]构建的 CyHV-3 ORF81 重组疫苗通过胃肠道途径对鲤和锦鲤进行免疫, 相对保护率分别为 71%、53%。本研究通过对建鲤肌肉注射接种 pEGFP-ORF148 疫苗, 攻毒 21 d 后发现相比于 PBS 组, ORF148 疫苗对的建鲤保护率为 79%, 显著提高了攻毒建鲤的存活率。

细胞因子在脊椎动物免疫应答中具有关键作用, 是调节炎症过程中的重要介质^[36]。在这些细胞因子中, *IL-1 β* 和 *TNF- α* 由巨噬细胞产生, 介导对微生物入侵的免疫反应和诱导其他细胞因子表达^[27]。本研究结果显示, DNA 疫苗免疫后, 在头肾中检测到 *IL-1 β* 和 *TNF- α* 极显著性上调。Pérez-Sánchez 等^[37]的研究表明, DNA 疫苗可以诱导虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) *IL-1 β* 和 *TNF- α* 基因的上调表达, 与本研究结果一致。I 型 IFN 系统在抗病毒中具有重要作用, 这种抗病毒作用可归因于许多干扰素刺激基因, 如 *Mx-1* 等的表达^[38], 本研究选择的干扰素基因 (AB376666) 经进化分析确认为 I 型干扰素: *IFN- α 1*^[39]。本研究结果显示, 接种 pEGFP-ORF148 疫苗在建鲤 *Mx-1* 和 *IFN- α 1* 显著上调表达, 这一结果提示接种 DNA 疫苗激活了鱼体抗病毒免疫反应。IgM 和 IgT 与鱼类获得性免疫应答相关, IgM 是鱼类血清中的主要免疫球蛋白, IgT 在黏膜免疫中发挥着重要作用^[40]。本研究结果显示, 在接种 pEGFP-ORF148 疫苗的

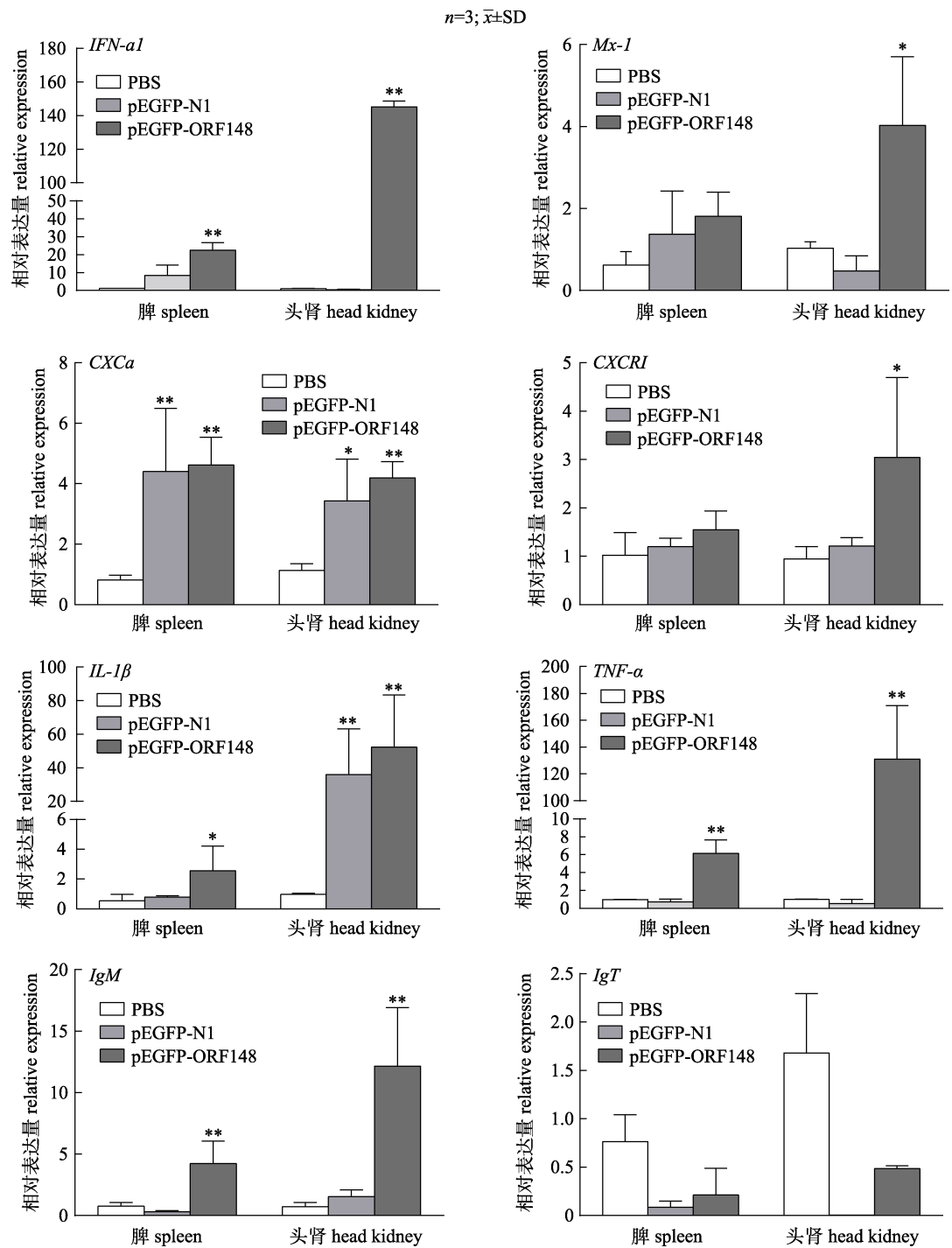


图 4 建鲤第三次免疫后相关免疫基因的表达
*或**表示显著性差异 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 。

Fig. 4 Immune-related genes expression in the spleen and head kidney of *Cyprinus carpio* var. *jian* after the third time immunization with PBS, pEGFP-N1, pEGFP-ORF148
* and ** indicate the significant difference at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively.

建鲤头肾和脾脏中 IgM 极显著上调表达, 而 IgT 均未上调表达, 一方面, 这可能与取样组织不属于黏膜免疫系统有关; 另一方面, 如何通过优化

免疫途径、疫苗递送系统以及免疫佐剂的使用以更好地激活鱼类的黏膜免疫应答, 还有待进一步研究。

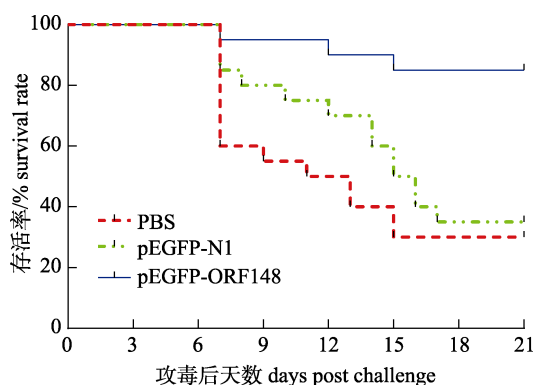


图 5 CyHV-3 攻毒后的免疫建鲤存活率曲线

Fig. 5 Survival rates of *Cyprinus carpio* var. *jian* immunized with PBS, pEGFP-N1, pEGFP-ORF148 post the CyHV-3 infection

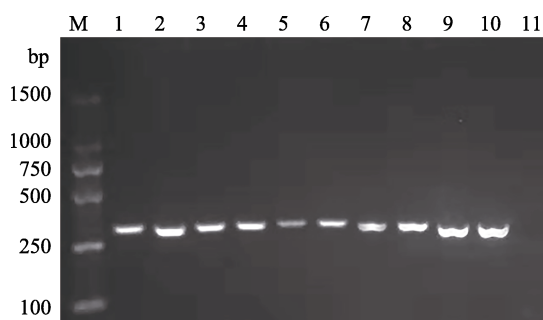


图 6 CyHV-3 PCR 检测结果

M: DL 1500 DNA 分子质量标准; 1~3: PBS 组; 4~6: pEGFP-N1 组; 7~9: pEGFP-ORF148 组; 10: 阳性对照; 11: 阴性对照。

Fig. 6 Detection of CyHV-3 DNA by PCR

M: DL 1500 marker; 1~3: PBS; 4~6: pEGFP-N1; 7~9: pEGFP-ORF148; 10: positive control; 11: negative control.

值得注意的是, 本研究结果显示在免疫 pEGFP-N1 疫苗的建鲤头肾组中, IL-1 β 和 CXCa 均有显著上调表达。相关研究指出 DNA 疫苗接种诱导天然免疫应答的机制可能是由于宿主免疫系统识别 DNA 基序、mRNA 转录物或表达的蛋白抗原所致^[41]。相关报告表明, 空质粒在保护性免疫应答反应中具有重要作用^[14]。非甲基化 CpG 基序被证明具有病原体相关分子模式(PAMP)的作用, 通过与 Toll 样受体(TLRs)结合可激活巨噬细胞、树突状细胞、B 细胞和刺激 Th1 细胞^[42], 并可间接刺激其增殖或分泌促炎性细胞因子(IL-1 β 、IL-6、IL-18 及 TNF- α)和 Th1 相关的细胞因子(IFN- α 1 和 IL-12)^[43]。本研究结果中 IL-1 β 和 CXCa 在空载体免疫后出现显著上调的现象是否与非甲基化 CpG 基序作用相关有待下一步研究验证。

参考文献:

- [1] Gotesman M, Kattlun J, Bergmann S M, et al. CyHV-3: The third cyprinid herpesvirus[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2013, 105(2): 163-174.
- [2] Bergmann S M, Sadowski J, Kiełpiński M, et al. Susceptibility of koi×crucian carp and koi×goldfish hybrids to koi herpesvirus (KHV) and the development of KHV disease (KHVD)[J]. Journal of Fish Diseases, 2010, 33(3): 267-272.
- [3] Han J E, Kim J H, Renault T, et al. Identifying the viral genes encoding envelope glycoproteins for differentiation of cyprinid herpesvirus 3 isolates[J]. Viruses, 2013, 5(2): 568-576.
- [4] Bergmann S M, Schütze H, Fischer U, et al. Detection of koi herpesvirus (KHV) genome in apparently healthy fish[J]. Bulletin European Association of Fish Pathologists, 2009, 29(5): 145-152.
- [5] Boutier M, Gao Y, Vancsok C, et al. Identification of an essential virulence gene of cyprinid herpesvirus 3[J]. Antiviral Research, 2017, 145: 60-69.
- [6] Boutier M, Ronsmans M, Ouyang P, et al. Rational development of an attenuated recombinant cyprinid herpesvirus 3 vaccine using prokaryotic mutagenesis and *in vivo* bioluminescent imaging[J]. PLoS Pathogens, 2015, 11(2): e1004690.
- [7] Perelberg A, Ronen A, Hutoran M, et al. Protection of cultured *Cyprinus carpio* against a lethal viral disease by an attenuated virus vaccine[J]. Vaccine, 2005, 23(26): 3396-3403.
- [8] Boutier M, Gao Y, Donohoe O, et al. Current knowledge and future prospects of vaccines against cyprinid herpesvirus 3 (CyHV-3)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 93: 531-541.
- [9] Ronen A, Perelberg A, Abramowitz J, et al. Efficient vaccine against the virus causing a lethal disease in cultured *Cyprinus carpio*[J]. Vaccine, 2003, 21(32): 4677-4684.
- [10] Wolff J A, Malone R W, Williams P, et al. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*[J]. Science, 1990, 247(4949): 1465-1468.
- [11] Heppell J, Davis H L. Application of DNA vaccine technology to aquaculture[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2000, 43(1): 29-43.
- [12] Salenius K, Simard N, Harland R, et al. The road to licensure of a DNA vaccine[J]. Current Opinion in Investigational Drugs, 2007, 8(8): 635-641.
- [13] Dalmo R A. DNA vaccines for fish: Review and perspectives on correlates of protection[J]. Journal of Fish Diseases, 2018, 41(1): 1-9.
- [14] Collins C, Lorenzen N, Collet B. DNA vaccination for finfish aquaculture[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 85: 106-125.
- [15] Zhou J X, Wang H, Li X W, et al. Construction of KHV-CJ

- ORF25 DNA vaccine and immune challenge test[J]. Journal of Fish Diseases, 2014, 37(4): 319-325.
- [16] Zhou J X, Xue J D, Wang Q J, et al. Vaccination of plasmid DNA encoding ORF81 gene of CJ strains of KHV provides protection to immunized carp[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal, 2014, 50(6): 489-495.
- [17] Embregts C W E, Tadmor-Levi R, Veselý T, et al. Intra-muscular and oral vaccination using a Koi herpesvirus ORF25 DNA vaccine does not confer protection in common carp (*Cyprinus carpio* L.)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 85: 90-98.
- [18] Cui L C, Guan X T, Liu Z M, et al. Recombinant *Lactobacillus* expressing G protein of spring viremia of carp virus (SVCV) combined with ORF81 protein of koi herpesvirus (KHV): A promising way to induce protective immunity against SVCV and KHV infection in cyprinid fish via oral vaccination[J]. Vaccine, 2015, 33(27): 3092-3099.
- [19] Hao L, Liang Z L, Ma J Y, et al. The expression and application of pORF148 recombinant protein: CN108047317A[P]. 2018-05-18. [郝乐, 梁志凌, 马江耀, 等. pORF148 重组蛋白及其制备方法和应用: CN108047317A[P]. 2018-05-18.]
- [20] Ma Y P, Hao L, Liang Z L, et al. Establishment of CyHV-3 pORF65 antibody detection method by indirect carp serum ELISA[J]. South China Fisheries Science, 2018, 14(3): 113-119. [马艳平, 郝乐, 梁志凌, 等. 基于间接 ELISA 的鲤血清 CyHV-3 pORF65 抗体检测方法的建立[J]. 南方水产科学, 2018, 14(3): 113-119.]
- [21] Liu Z X, Li Y, Ma Y P, et al. Establishment of carp brain cell line and its application: CN109971710A[P]. 2019-07-05. [刘振兴, 李盈, 马艳平, 等. 建鲤脑细胞系及其建立方法与应用: CN109971710A[P]. 2019-07-05.]
- [22] Liu Z X, Ke H, Ma Y P, et al. First report of occurrences of two cyprinid herpesvirus 3 variants, I⁺ II⁻ and I⁺ II⁺, in China[J]. Fish Pathology, 2016, 51(4): 169-175.
- [23] Yuasa K, Sano M, Kurita J, et al. Improvement of a PCR method with the Sph I-5 primer set for the detection of koi herpesvirus (KHV)[J]. Fish Pathology, 2005, 40(1): 37-39.
- [24] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_t} Method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [25] Zhang D X, Kang Y H, Chen L, et al. Oral immunization with recombinant *Lactobacillus casei* expressing OmpA1 confers protection against *Aeromonas veronii* challenge in common carp, *Cyprinus carpio*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2018, 72: 552-563.
- [26] Forlenza M, Walker P D, de Vries B J, et al. Transcriptional analysis of the common carp (*Cyprinus carpio* L.) immune response to the fish louse *Argulus japonicus* Thiele (Crustacea: Branchiura)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2008, 25(1-2): 76-83.
- [27] El-Din M M M. Histopathological studies in experimentally infected koi carp (*Cyprinus carpio* Koi) with koi herpesvirus in Japan[J]. World Journal of Fish and Marine Sciences, 2011, 3(3): 252-259.
- [28] Yasumoto S, Kuzuya Y, Yasuda M, et al. Oral immunization of common carp with a liposome vaccine fusing koi herpesvirus antigen[J]. Fish Pathology, 2006, 41(4): 141-145.
- [29] Yi Y, Zhang H T, Lee X, et al. Extracellular virion proteins of two Chinese CyHV-3/KHV isolates, and identification of two novel envelope proteins[J]. Virus Research, 2014, 191: 108-116.
- [30] Michel B, Leroy B, Stalin Raj V, et al. The genome of cyprinid herpesvirus 3 encodes 40 proteins incorporated in mature virions[J]. Journal of General Virology, 2010, 91(2): 452-462.
- [31] Zheng S C, Wang Q, Li Y Y, et al. Research Advances in cyprinid herpesvirus 3[J]. Chinese Journal of Virology, 2016, 11(1): 108-120. [郑树城, 王庆, 李莹莹, 等. 鲤疱疹病毒3型研究进展[J]. 病毒学报, 2016, 11(1): 108-120.]
- [32] Monaghan S J, Thompson K D, Bron J E, et al. Expression of immunogenic structural proteins of cyprinid herpesvirus 3 *in vitro* assessed using immunofluorescence[J]. Veterinary Research, 2016, 47: 8.
- [33] Tu C E, Lu Y P, Hsieh C Y, et al. Production of monoclonal antibody against ORF72 of koi herpesvirus isolated in Taiwan[J]. Folia Microbiologica, 2014, 59(2): 159-165.
- [34] Davison A J, Kurobe T, Gatherer D, et al. Comparative genomics of carp herpesviruses[J]. Journal of Virology, 2013, 87(5): 2908-2922.
- [35] Aoki T, Hirono I, Kurokawa K, et al. Genome sequences of three koi herpesvirus isolates representing the expanding distribution of an emerging disease threatening koi and common carp worldwide[J]. Journal of Virology, 2007, 81(10): 5058-5065.
- [36] Gomez D, Sunyer J O, Salinas I. The mucosal immune system of fish: The evolution of tolerating commensals while fighting pathogens[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 35(6): 1729-1739.
- [37] Pérez-Sánchez T, Balcázar J L, Merrifield D L, et al. Expression of immune-related genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) induced by probiotic bacteria during *Lactococcus garvieae* infection[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2011, 31(2): 196-201.
- [38] Robertsen B. The interferon system of teleost fish[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2006, 20(2): 172-191.
- [39] Adamek M, Rakus K Ł, Chyb J, et al. Interferon type I responses to virus infections in carp cells: *In vitro* studies on

- Cyprinid herpesvirus 3 and *Rhabdovirus carpio* infections[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2012, 33(3): 482-493.
- [40] Mikalsen A B, Torgersen J, Aleström P, et al. Protection of Atlantic salmon *Salmo salar* against infectious pancreatic necrosis after DNA vaccination[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2004, 60: 11-20.
- [41] Valero Y, Awad E, Buonocore F, et al. An oral chitosan DNA vaccine against nodavirus improves transcription of cell-mediated cytotoxicity and interferon genes in the European sea bass juveniles gut and survival upon infection[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2016, 65: 64-72.
- [42] Tonheim T C, Bøgvold J, Dalmo R A. What happens to the DNA vaccine in fish? A review of current knowledge[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2008, 25(1-2): 1-18.
- [43] Klinman D M. CpG DNA as a vaccine adjuvant[J]. Expert Review of Vaccines, 2003, 2(2): 305-315.

Immunization of *Cyprinus carpio* var. *jian* with Cyprinid herpesvirus 3 ORF148 DNA vaccine against koi herpesvirus disease

WU Jing^{1,2}, LIU Zhenxing², MA Yanping², LIANG Zhiling², MA Jiangyao², HAO Le², KE Hao², FENG Guoqing², LI Yugu¹

1. College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;
2. Key Laboratory of Livestock Disease Prevention of Guangdong Province; Scientific Observation and Experiment Station of Veterinary Drugs and Diagnostic Techniques of Guangdong Province, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Institute of Animal Health, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China

Abstract: Cyprinid herpesvirus 3 (CyHV-3), also known as koi herpesvirus (KHV), is a highly contagious and lethal virus. At present, a kind of commercial attenuated vaccine has been used in Israel against this virus. However, this vaccine, as well as other reported gene-modified attenuated vaccines against CyHV-3 infection, cannot exclude the risk of reversion to virulence. In contrast to live vaccines, DNA vaccines are easy to produce and safe to apply. CyHV-3 has a genome of 295 kb, which is predicted to encode 164 different open reading frames (ORFs). Among them, ORF148 encodes a glycosylated type I membrane protein and bioinformatics analysis has shown that this protein has good immunogenicity. During our previous study, CyHV-3 ORF148 was inserted into pEGFP-N1, generating a pEGFP-ORF148 recombinant plasmid. In the present study, it was confirmed that a pORF148-EGFP fusion protein could be successfully expressed *in vitro* and *in vivo* by transfection assay and immunofluorescence analysis, respectively. The carps, *Cyprinus carpio* var. *jian*, (≈ 10 g), divided into three groups ($n=45$), were intramuscularly injected with the pEGFP-ORF148 recombinant plasmid, pEGFP-N1 and PBS three times at two-week intervals. The results of ELISA showed that immunization with the pEGFP-ORF148 recombinant plasmid could significantly ($P<0.01$) improve the titer of specific antibodies against CyHV-3. The RT-qPCR revealed that injection with the pEGFP-ORF148 recombinant plasmid caused 145.30-, 131-, 52.27-, 12.16-, 4.19-, 3.05-, 4.03-fold increases of *IFN- α 1*, *TNF- α* , *IL-1 β* , *IgM*, *CXC α* , *CXCRI*, *Mx-1* gene expression in the head kidney, respectively, when the PBS immunized carps served as a control group. In the spleen, the expression of *IFN- α 1*, *CXC α* , *TNF- α* and *IgM* from pEGFP-ORF148 recombinant plasmid injected carps were 22.44-, 4.63-, 6.14-, and 4.23 times higher than those of control group. Post-infection with CyHV-3, the survival rates of carps immunized with PBS, pEGFP-N1, and the pEGFP-ORF148 recombinant plasmid were 30%, 35% and 85%, respectively, suggesting that immunization with the pEGFP-ORF148 recombinant plasmid significantly protected the carps against the CyHV-3 infection ($P<0.01$). In conclusion, DNA vaccination based on the pEGFP-ORF148 recombinant plasmid could elicit the activation of an immune response and production of a specific antibody to produce effective protection against CyHV-3 infection. Thus, this study highlights a potential DNA vaccine candidate against CyHV-3.

Key words: CyHV-3; ORF148; DNA vaccine; ELISA; RT-qPCR

Corresponding author: LIU Zhenxing, E-mail: liuzhenxing@gdaas.cn; LI Yugu, E-mail: liyugu@scau.edu.cn