

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.00001

草鱼呼肠孤病毒 VP6 蛋白与大肠杆菌 LTB 亚基植物融合表达载体的构建

周勇¹, 曾令兵^{1,2}, 范玉顶¹, 罗晓松¹, 徐进¹, 肖艺^{1,2}

1. 中国水产科学研究院 长江水产研究所, 湖北 荆州 434000;

2. 华中农业大学 水产学院, 湖北 武汉 430070

摘要: 根据 GenBank 中草鱼呼肠孤病毒(Grass Carp Reovirus, GCRV)VP6 蛋白的全基因序列(AF403394)和大肠杆菌不耐热肠毒素 B 亚单位(LTB)的基因序列(M17874), 设计并合成特异性引物, 从感染草鱼呼肠孤病毒(GCRV)的草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)肾细胞(CIK)中提取病毒核酸作为模板, 进行 RT-PCR 扩增, 得到约 1.3 kb 的 GCRV VP6 基因读码框片段, 同时提取大肠杆菌(*Escherichia coli*)H44815 全基因组作为模板, 进行 PCR 扩增得到约 370 bp 的 LTB 基因读码框片段。将获得的 2 个目的片段分别克隆到 pCR2.1 载体上, 经酶切、PCR 扩增检测和序列测定确认后, 将其克隆到携带绿色荧光蛋白标记的植物表达载体 pCAMBIA1302 上, 成功构建了可将草鱼呼肠孤病毒 VP6 蛋白、大肠杆菌不耐热肠毒素 B 亚单位(LTB)、绿色荧光蛋白(GFP)融合表达的植物载体 pCAMBIA 1302-LTB-VP6。本研究旨在为草鱼出血病可饲化转基因植物疫苗研制奠定基础。[中国水产科学, 2011, 18(1): 1-7]

关键词: 草鱼出血病; 呼肠孤病毒; VP6 基因; LTB 基因; 植物表达载体;

中图分类号: Q786; S917

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)01-0001-07

草鱼出血病是一种严重危害草鱼养殖生产的病毒性鱼病, 其病原为草鱼呼肠孤病毒 (Grass Carp Reovirus, GCRV)。GCRV 为二十面体对称的球形颗粒, 直径约为 60~70 nm, 基因组由 11 条分节段的 dsRNA 组成^[1]。草鱼呼肠孤病毒颗粒由 7 种衣壳蛋白组成, 分子量分别约为 138 kD、137 kD、136 kD、79 kD、67 kD、43 kD 和 34 kD^[2]。GCRV VP6 蛋白由基因组 S8 片段编码, 是由 409 个氨基酸残基组成的病毒内衣壳蛋白, 分子量为 43 kD。该蛋白与哺乳动物呼肠孤病毒的 $\delta 2$ 蛋白的功能相似, 在病毒的转录与复制及病毒核衣壳形成中起着重要的作用^[3-4]。王伟等^[5]曾对 GCRV 单个多肽进行了免疫原性研究, 并筛选出 VP6 为

免疫原性强的多肽片段, 可刺激机体中和抗体的产生。Fang 等^[6]进行了在昆虫细胞(sf9)中将 GCRV VP6 与增强荧光蛋白(EGFP)基因融合表达的初步研究。

大肠杆菌不耐热肠毒素(LT)由 1 个 A 亚单位(LTA)和 5 个 B 亚单位(LTB)组成, 其中 B 亚单位具有与真核细胞表面的 GM1-神经节苷脂受体特异性结合的能力。LTB 不仅是强烈的免疫原, 也是一种强有力的黏膜免疫佐剂^[7]。本研究分别克隆了能与肠黏膜结合的 LTB 蛋白亚基基因、草鱼呼肠孤病毒强免疫性抗原 VP6 蛋白的全长基因, 并克隆进含有绿色荧光蛋白基因标记的 pCAMBIA 1302 植物表达载体, 构建了草鱼呼肠孤病毒 VP6

收稿日期: 2010-07-11; 修订日期: 2010-09-26.

基金项目: 农业部现代农业产业技术体系建设专项资金资助(nycyt-49-16); 农业部公益性行业科研专项(200803013).

作者简介: 周勇(1984-), 男, 硕士, 从事水产养殖病害研究. E-mail: zhouyong125@yahoo.com.cn

通讯作者: 曾令兵(1962-), 博士, 研究员, 从事水产养殖病害与防治技术研究. Tel: 0716-8115716;

E-mail: zeng lingbing@gmail.com

蛋白、大肠杆菌(*Escherichia coli*)不耐热肠毒素 B 亚单位和绿色荧光蛋白的植物融合表达载体,为研究 GCRV-VP6 抗原蛋白在植物体中的表达及研制草鱼出血病可饲化转基因植物疫苗奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 毒株、菌株与质粒

草鱼呼肠孤病毒 GCRV 毒株由武汉大学典型培养物收集保藏中心引进^[8];草鱼肾脏组织细胞系(CIK)由本实验室建立并保存^[9];大肠杆菌 H44851 株购自卫生部中国药品生物制品鉴定所;植物表达载体 pCAMBIA1302 购于澳大利亚 CAMBIA 公司;载体 pCR 2.1、大肠杆菌菌株 DH5 α 购于 Invitrogen 公司。

1.2 主要试剂

各种工具酶购自 Promega 公司;Taq DNA 聚合酶、10 $\times$ PCR Buffer、dNTPs、DL2000 bp 和 DL5000 bp DNA marker 为 TaKaRa 公司产品;细菌全基因组提取试剂盒、低熔点琼脂糖和卡那霉素为 Sigma 公司产品;逆转录试剂盒为 Invitrogen 公司产品;琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒和质粒 DNA 小量提取试剂盒为 OMEGA Bio-Tek 公司产品。

1.3 目的基因片段 PCR 引物的设计及扩增

根据 GenBank 中公布的 GCRV VP6 抗原蛋白编码基因序列(AF403394),大肠杆菌 LTB 基因编码序列(M17874),应用软件 Premier 5 设计特异性 PCR 扩增引物,引物序列如下:

GCRV-FP: 5'-CGGGATCCATGGCACAGCGTC-3'

GCRV-RP: 5'-GGACTAGTCAGATCTACCA TCCGAGTCCTCCGAGTCCCGACGAACATCGC CTG-3'

LTB-FP: 5'-CATGCCATGGATAAAGTAAAT-3'

LTB-RP: 5'-CATGGGATCCGTTTTCCATAC TGATTG-3'

P1302-FP: 5'-TTTGGAGAGAACACGGGGG ACT-3'

P1302-RP: 5'-TAAGGGTAAGTTTTCCGTAT GTTGC-3'

其中 LTB-FP、LTB-RP 为扩增 LTB 编码基因

的上、下游引物,设计与合成引物时分别引入 Nco I 和 BamH I 酶切位点;GCRV-FP、GCRV-RP 为扩增 GCRV-VP6 抗原蛋白编码基因的上、下游引物,设计与合成引物时分别引入 BamH I 和 Spe I 酶切位点;P1302-FP、P1302-RP 是根据植物表达载体 pCAMBIA 1302 上酶切位点 Nco I 和 Spe I 的两端序列设计的引物,用来通过 PCR 反应检测目的片段与载体的连接。

CIK 细胞培养和 GCRV 增殖参照文献[8-10]进行。病毒基因组 RNA 提取按以下方法进行:收集病毒感染发生典型细胞病变效应的细胞毒材料,-80 $^{\circ}$ C 至室温冻融 3 次,4 000 r/min 离心 30 min,取上清,分装于 35 mL 离心管中,20 000 r/min 离心 2 h (SW28, Beckman-coulter Optima L-80XP),无离子水悬浮病毒沉淀,Trizol 裂解病毒沉淀,采用氯仿、异丙醇抽提病毒基因组总 RNA,通过逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)扩增 GCRV-VP6 抗原蛋白编码基因。参照细菌全基因组提取试剂盒说明提取大肠杆菌 H44815 株全基因组,以其为模板使用引物 LTB-FP、LTB-RP 扩增 LTB 基因。PCR 反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min 后进入 PCR 循环,94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,55 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min 30s,30 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.4 重组质粒 pCR 2.1-VP6 和 pCR 2.1-LTB 构建

PCR 反应扩增的 GCRV VP6 抗原蛋白编码基因产物和 LTB 编码基因产物经琼脂糖电泳后,回收纯化目的片段,于 16 $^{\circ}$ C 分别与 pCR 2.1 载体连接 12~14 h,用连接产物转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,涂布含 50 μ g/mL 卡那霉素(Kan⁺)抗性 LB 平板,37 $^{\circ}$ C 培养 12~16 h,从 LB 琼脂平板上挑取菌落接种于 5 mL 含 50 μ g/mL 卡那霉素(Kan⁺)的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 震荡培养过夜,使用质粒 DNA 小量提取试剂盒提取质粒。对重组质粒 pCR 2.1-LTB 分别进行 Nco I 单酶切, Nco I、BamH I 双酶切鉴定,同时进行 PCR 鉴定。对重组质粒 pCR 2.1-VP6 分别进行 Spe I 单酶切, BamH I、Spe I 双酶切鉴定,同时用 LTB-FP、LTB-RP, GCRV-FP、GCRV-RP 进行 PCR 鉴定。重组质粒 pCR 2.1-LTB 和 pCR 2.1-VP6 送上海生工生物工程

技术有限公司测序。含阳性重组质粒 pCR 2.1-LTB 的大肠杆菌命名为 pCR 2.1-LTB/DH5 α ; 含阳性重组质粒 pCR 2.1-VP6 的大肠杆菌命名为 pCR 2.1-VP6/DH5 α 。

1.5 pCAMBIA 1302-LTB-VP6 植物融合表达载体的构建

用质粒 DNA 小量提取试剂盒从大肠杆菌 pCR 2.1-LTB/DH5 α 和 pCR 2.1-VP6 /DH5 α 提取重组质粒 pCR 2.1-LTB 和 pCR 2.1-VP6, 然后用 *Nco* I 和 *Bam*H I 双酶切质粒 pCR 2.1-LTB; 用 *Bam*H I 和 *Spe* I 双酶切质粒 pCR 2.1-VP6; 用 *Nco* I 和 *Spe* I 双酶切质粒 pCAMBIA 1302, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分析酶切结果。采用胶回收试剂盒分别回收目的基因片段和酶切载体, 用 T4 DNA 连接酶将 GCRV VP6 和大肠杆菌 LTB 编码基因片段与酶切后的植物表达载体 pCAMBIA 1302 连接, 用连接产物转化 *E. coli* DH5 α 的感受态细胞。涂布含 50 μ g/mL 卡那霉素 (Kan⁺) 抗性 LB 平板, 37 $^{\circ}$ C 培养 12~16 h, 挑取菌落接种于 5 mL 含 50 μ g/mL 卡那霉素 (Kan⁺) 的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 震荡培养过夜, 使用质粒 DNA 小量提取试剂盒提取质粒, 将提取的质粒分别用 *Nco* I 和 *Spe* I 单酶切, *Nco* I、*Spe* I 双酶切鉴定, 同时分别用 LTB-FP、LTB-RP, GCRV-FP、GCRV-RP, P1302-FP、P1302-RP 进行 PCR 鉴定。重组质粒 pCAMBIA 1302-LTB-VP6 送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

2 结果与分析

2.1 LTB 与 VP6 基因的克隆及测序

细菌全基因提取试剂盒提取大肠杆菌 H44815 株全基因组后, 利用合成的引物 LTB-FP、LTB-RP, PCR 扩增出约 370 bp 的基因片段, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分析结果如图 1(第 2 泳道)所示。GCRV 病毒经过 Trizol 的裂解后, 运用氯仿、异丙醇抽提病毒总 RNA, 利用合成的引物 GCRV-FP、GCRV-RP, RT-PCR 扩增出约 1.3 kb 的基因片段, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分析结果如图 1(第 3 泳道)所示。

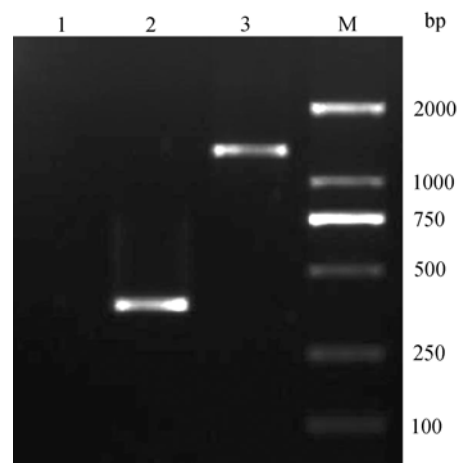


图1 GCRV VP6和LTB编码基因的PCR扩增结果
凝胶电泳图

1. PCR阴性对照; 2. LTB基因PCR扩增产物(370 bp); 3. VP6 基因PCR扩增产物(1 263 bp); M. DNA marker DL2000.

Fig. 1 Analysis of RT-PCR products of GCRV VP6 and LTB coding gene

1. PCR negative control; 2. Products of LTB gene (370bp); 3. Products of GCRV-VP6 gene (1 263 bp); M. DNA marker DL2000.

将目的基因克隆到 pCR 2.1 载体, 构建了 pCR 2.1-LTB 和 pCR 2.1-VP6 重组质粒。将 PCR 2.1-LTB 用 *Nco* I 单酶切后得到大小约为 4.3 kb 的基因片段; 用 *Nco* I、*Bam*H I 双酶切后得到大小约为 370 bp 和 3.9 kb 的基因片段。将 pCR 2.1-VP6 用 *Spe* I 单酶切后得到大小约为 5.2 kb 的基因片段; 用 *Bam*H I、*Spe* I 双酶切后得到大小约为 1.3 kb 和 3.9 kb 的基因片段(图 2)。以 LTB-FP、LTB-RP, GCRV-FP、GCRV-RP 为引物进行 PCR 扩增分别得到约为 370 bp 和 1.3 kb 基因片段(图 2), 表明 LTB 和 GCRV VP6 基因片段已分别插入到克隆载体 pCR 2.1 中。测序结果表明, 扩增到的 LTB 和 GCRV VP6 基因与 GenBank 公布的参考序列一致。

2.2 pCAMBIA 1302-LTB-VP6 阳性重组质粒的鉴定

重组质粒 pCAMBIA 1302-LTB-VP6 用 *Nco* I 单酶切后得到大小约为 370 bp 和 11.8 kb 的基因片段; 用 *Spe* I 单酶切后得到大小约为 12.1 kb 的基因片段; 用 *Nco* I、*Spe* I 双酶切后得到大小约为 370 bp、1.3 kb 和 10.5 kb 的基因片段, 用 LTB-FP、LTB-RP, GCRV-FP、GCRV-RP, P1302-FP、P1302-

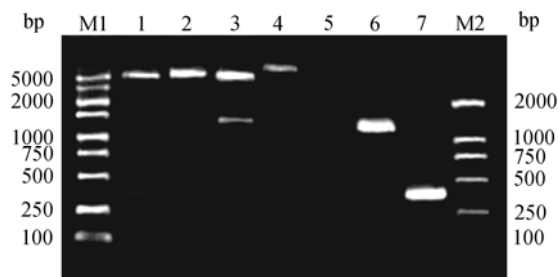


图2 重组质粒pCR 2.1-VP6和pCR 2.1-LTB酶切及PCR鉴定结果

M1. DNA marker DL5000; 1. *Nco* I 和 *Bam*HI 双酶切pCR 2.1-LTB; 2. *Nco* I 单酶切pCR 2.1-LTB; 3. *Bam*HI 和 *Spe* I 双酶切pCR 2.1-VP6; 4. *Spe* I 单酶切pCR 2.1-VP6; 5. PCR阴性对照; 6. pCR 2.1-VP6 PCR鉴定结果; 7. pCR 2.1-LTB PCR鉴定结果; M2. DNA marker DL2000.

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid by restriction enzyme analysis and PCR

M1. DNA marker DL4500; 1. pCR 2.1-LTB digested by *Nco* I and *Bam*HI; 2. pCR 2.1-LTB digested by *Nco* I; 3. pCR 2.1-VP6 digested by *Bam*HI and *Spe* I; 4. pCR 2.1-VP6 digested by *Spe* I; 5. PCR negative control; 6. pCR 2.1-VP6 identified by PCR; 7. pCR 2.1-LTB identified by PCR; M2. DNA marker DL2000.

RP 3 对引物进行 PCR 扩增分别得到约为 370 bp、1.3 kb 和 1.6 kb 的基因片段(图 3), 表明 *LTB* 和 *GCRV* *VP6* 基因片段已插入到表达载体 pCAMBIA 1302 中(图 4)。测序结果表明, 插入到 pCAMBIA1302 中的 *LTB* 基因和 *VP6* 基因的序列与 GenBank 公布的 *GCRV-VP6* 基因参考序列一致(图 5), 删除 *LTB* 基因和 *VP6* 基因的终止密码 TAA, 使其能和 *GFP* 基因在同一开放阅读框内, 可在 CaMV35S 启动子下进行融合表达(图 6)。另外, 在质粒 pCAMBIA 1302 上 *LTB* 基因与 *VP6* 基因间引入了柔性 Linker(*Bam*HI 酶切位点); 在 *VP6* 基因与 *GFP* 基因间引入 GGGACTCGGAGGACTC GG 基因片段。

在 NCBI 网站上用 blastp 检测序列蛋白质搜索蛋白质序列数据库得出蛋白表达预测图(图 6), *GCRV-VP6* 基因序列与哺乳动物的 Sigma2 蛋白基因序列相似, 表明 *LTB* 基因、*VP6* 基因和 *GFP* 基因可在同一开放阅读框(ORF)内。

3 讨论

草鱼出血病是草鱼鱼种阶段一种危害极大的

病毒性鱼病, 实践证明, 免疫预防是预防该病最为有效的方法之一^[4]。草鱼出血病疫苗的研制大致经历了组织灭活疫苗、细胞培养灭活疫苗、减毒活疫苗、亚单位疫苗等阶段, 但都存在一定的缺

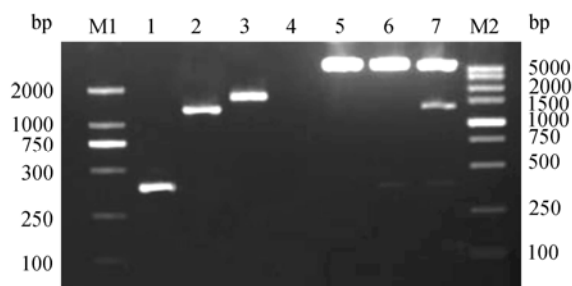


图3 pCAMBIA 1302-LTB-VP6酶切和PCR鉴定结果

M1. DNA marker DL2000; 1、2、3. PCR鉴定结果; 4. PCR阴性对照; 5. pCAMBIA 1302-LTB-VP6经 *Spe* I 单酶切, 目的片段大小为 12 170 bp; 6. pCAMBIA 1302-LTB/VP6经 *Nco* I 单酶切, 目的片段大小为 370 bp 和 11 800 bp; 7. pCAMBIA 1302-LTB/VP6 经 *Nco* I 和 *Spe* I 双酶切, 目的片段大小约 10 540 bp、1 260 bp 和 370 bp; M2. DNA marker DL5000.

Fig. 3 Identification of recombinant expression plasmids by restriction enzyme analysis and PCR

M1. DNA marker DL2000; 1,2,3. Identified by PCR; 4. PCR negative control; 5. pCAMBIA 1302-LTB-VP6 digested by *Spe* I, interest fragment was about 12 170 bp; 6. pCAMBIA 1302-LTB/VP6 digested by *Nco* I, interest fragments were about 370 bp and 11 800 bp; 7. pCAMBIA 1302-LTB/VP6 digested by *Nco* I and *Spe* I, interest fragments were about 10 540 bp, 1 260 bp and 370 bp, respectively; M2. DNA marker DL5000.

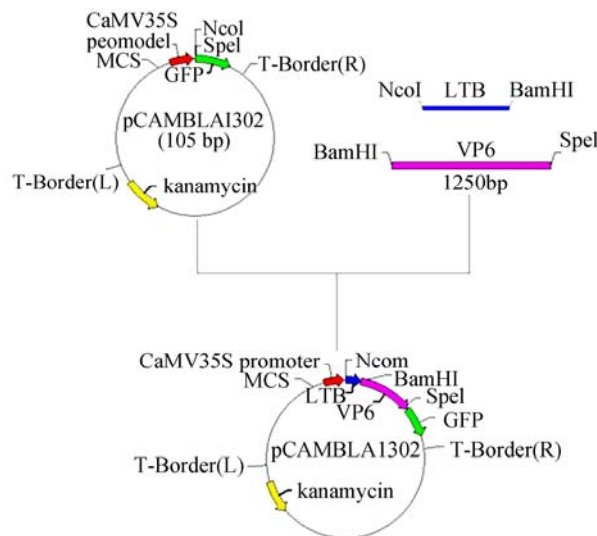


图4 重组质粒pCAMBIA 1302-LTB-VP6构建图

Fig. 4 Scheme of construction of recombinant plasmid pCAMBIA 1302-LTB-VP6

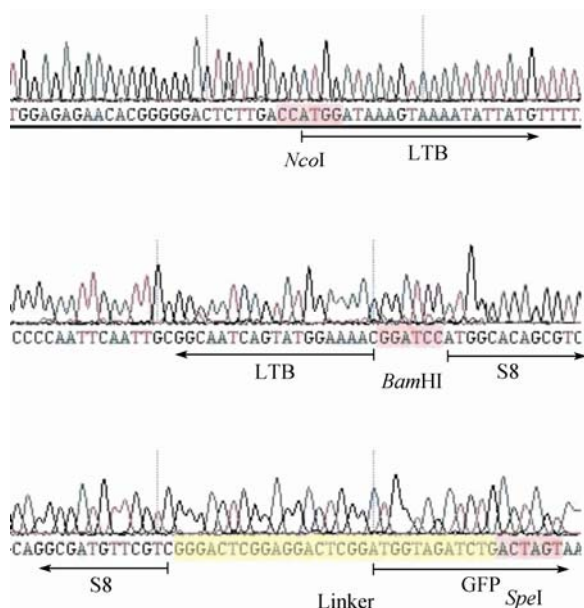


图5 重组质粒pCambia1302-LTB-VP6基因部分测序结果

Fig. 5 Partial sequences of the plant-based expression vector pCambia1302-LTB-VP6

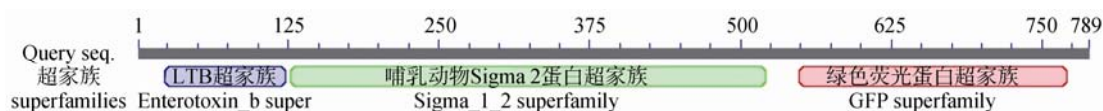


图6 NCBI上blastp蛋白表达预测图

Fig. 6 Forecast map of protein expression

导的IgA抗体可经血循环进入小肠上皮细胞,在穿过小肠上皮细胞的过程中能与病毒形成复合物,抵抗病毒的原发感染^[15]。通过对草鱼呼肠孤病毒粒子三维重构、衣壳蛋白结构及特性进行研究发现,VP6与人呼肠孤病毒(MRV)δ2蛋白一样在内核和外壳的连接、病毒的转录与复制及病毒核衣壳形成中起着重要的作用^[1,16]。纯化的单个病毒多肽免疫家兔获得抗血清,结果表明病毒结构蛋白VP1、VP5、VP6、VP9的抗血清具有中和效价,VP6诱导的中和抗体效价最高,所以VP6极可能是病毒多肽中的主要中和抗原^[5]。现已知道编码这个多肽的基因序列,因此可以通过将这段序列与载体结合制成基因疫苗来免疫草鱼。为了提高GCRV-VP6蛋白的免疫原性,可以将具有黏膜免疫佐剂性的大肠杆菌不耐热肠毒素B亚基(LTB)与GCRV-VP6蛋白融合表达。Rask等^[17]将重组LTB作为佐剂与人丙种球蛋白(HGG)共同免疫后,

陷^[11]。组织灭活疫苗因材料来源不稳定和疫苗成份复杂而受到限制。细胞培养灭活疫苗因使用宿主来源细胞培养病毒,可能诱发潜在的免疫病理反应。减毒活疫苗因减毒机理尚不清楚,存在毒力返祖的危险性而导致病毒感染或疾病传播。亚单位疫苗由于制备工艺复杂、成本高、难以推广应用。因此,迫切需要研发新型的草鱼出血病疫苗。近年,在医学与兽医学领域转基因植物疫苗的研究迅速发展,为草鱼出血病可饲化转基因植物疫苗研究奠定了理论基础^[12-13]。因鱼类习性和生存环境的特殊性,口服途径免疫是一种最为自然与引起鱼体应激反应最小的免疫途径。因此,渔用可饲化转基因植物疫苗研究,不仅具有重要的科学意义,而且具有广泛的推广应用前景。

草鱼呼肠孤病毒的复制与轮状病毒极其相似^[14]。对轮状病毒研究显示,其VP6抗原蛋白诱

发现LTB能与细胞表面的GM1-神经节苷脂受体特异性结合,提高抗原的黏膜免疫原性,还能介导针对它的体液和黏膜B细胞和T细胞的长期记忆反应。Jobling等^[18]利用LTB基因与肺炎链球菌表面蛋白A(PSPA)的基因融合表达了具有免疫活性的重组蛋白。Comanjen等^[19]将LTB与犬细小病毒VP2蛋白以及绿色荧光标记蛋白在土豆中表达,将转基因土豆通过干燥粉碎等过程制备成饲料投喂鲤,通过荧光显微镜观察以及ELISA检测法可以检测到表达的融合蛋白在肠道被鱼体吸收,可诱导机体产生免疫应答反应。本研究设计将LTB与GCRV-VP6蛋白融合表达,表达产物通过口服途径进入草鱼鱼体。在草鱼肠道内,LTB将与草鱼肠黏膜表面的GM1-神经节苷脂受体特异性结合,提高GCRV VP6的黏膜免疫原性,并可使GCRV VP6蛋白较长时间地固定在肠道内,延长免疫时间。

本研究在引物设计时去掉了编码LTB和VP6蛋白基因的终止子(TAA),同时分别引入1个柔性Linker,目的是干扰 α 2螺旋的形成,以最大程度保持LTB、VP6和GFP融合蛋白三者的天然构象^[20]。该融合蛋白带有LTB的信号肽序列,所以表达产物为分泌型蛋白,GFP蛋白可用来对该融合蛋白进行定位研究。利用双元植物表达载体pCambia 1302成功构建了表达LTB和GCRV-VP6蛋白的植物表达载体,为实现LTB和GCRV-VP6蛋白在植物中的表达奠定了物质基础。随着对鱼类黏膜免疫系统,尤其是免疫应答启动机理认识的不断增加,依赖于植物及其表达载体,为草鱼呼肠孤病毒病可食性转基因植物疫苗的研制提供了新的思路。

参考文献:

- [1] Fang Q, Shah S, Liang Y Y, et al. 3D reconstruction and capsid protein characterization of grass carp reovirus[J]. Sci China Ser C: Life Sci, 2005, 48 (6): 593–600.
- [2] Fang Q, Attoui H, Francois J, et al. Sequence of genome segments 1, 2 and 3 of the grass carp reovirus (Genus *Aquareovirus*, Family Reoviridae)[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 274(3): 762–766.
- [3] 肖雪, 颜其贵, 欧洋, 等. 草鱼呼肠孤病毒的研究进展[J]. 水利渔业, 2006, 26(5): 106–109.
- [4] 王方华, 李安兴. 草鱼病毒性出血病研究进展[J]. 南方水产, 2006, 2(3): 66–71.
- [5] 王伟, 赵桃英, 方勤. 草鱼出血病病毒多肽的免疫原性[J]. 中国病毒学, 1995, 10(2): 166–168.
- [6] Fang Q, Eng K S, Wen D. Construction and co-expression of grass carp reovirus VP6 protein and enhanced green fluorescence protein in the insect cells [J]. Virol Sin, 2007, 22(5): 397–404.
- [7] Rollwagen F M, Pacheco N D, Clements J D, et al. Killed campylobacter elicits immune response and protection when administered with an oral adjuvant [J]. Vaccine, 1993, 11(3): 1316–1320.
- [8] 柯丽华, 方勤, 蔡宜权. 一株新的草鱼出血病病毒分离物特性[J]. 水生生物学报, 1990, 14(2): 153–159.
- [9] 左文功, 钱华鑫, 许映芳, 等. 草鱼肾脏组织细胞系CIK的建立[J]. 淡水渔业, 1984(2): 38–39.
- [10] 方勤, 柯丽华, 蔡宜权. 草鱼出血病病毒的生长特性及高滴价培养[J]. 病毒学杂志, 1989(3): 315–319.
- [11] 许淑英, 李焕林, 郑国成, 等. 草鱼出血病细胞培养弱毒疫苗的制备及其免疫效果[J]. 水产学报, 1994, 18(2): 110–115.
- [12] Li Y, Sun M, Liu J, et al. High expression of foot- and mouth disease virus structural protein VP1 in tobacco chloroplasts [J]. Plant Cell Rep, 2006, 25(4): 329–333.
- [13] Li H Y, Ramalingam S, Chye M L. Accumulation of recombinant SARS-CoV spike protein in plant cytosol and chloroplasts indicate potential for development of plant-derived oral vaccines [J]. Exp Biol Med, 2006, 231(8): 1346–1352.
- [14] Betty C A, David Y G, Mary K E. Ultra-structural study of rotavirus replications in cultured cells [J]. J Gen Virol, 1980, 46: 75–85.
- [15] Burns J W, Siadat P M, Krishanany A A, et al. Protective effect of rotavirus VP6 specific IgA monoclonal antibodies that lack neutralizing activity [J]. Science, 1996, 272: 104–107.
- [16] Cheng L P, Fang Q, Shah S. Subnanometer-resolution structures of the grass carp reovirus core and virion [J]. J Mol Biol, 2008, 382: 213–222.
- [17] Rask C, Fredriksson M, Lindblad M, et al. Mucosal and systemic antibody responses after peroral or intranasal immunization: effects of conjugation to enterotoxin B subunits and/ or of co-administration with free toxin as adjuvant [J]. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand, 2000, 108(3): 178–186.
- [18] Jobling M G, Palmer L M, Erbe J L, et al. Construction and characterization of versatile cloning vectors for the efficient delivery of native foreign proteins to the periplasm of *Escherichia coli* [J]. Plasmid, 1997, 38 (3): 158–173.
- [19] Companjen A R, Florack D E A, Slootweg T. Improved uptake of plant-derived LTB-linked proteins in carp gut and induction of specific humoral immune responses upon infeed delivery [J]. Fish Shellfish Immunol, 2006, 21: 251–260.
- [20] 韩小艳, 赵娜, 王永祥. 接头序列及其在融合蛋白构建中的应用[J]. 河北医科大学学报, 2007, 28(3): 224–227.

Construction of plant-based fusion expression vector of the GCRV VP6 antigenic protein and *Escherichia coli* LTB protein

ZHOU Yong¹, ZENG Lingbing^{1,2}, FAN Yuding¹, LUO Xiaosong¹, XU Jin¹, XIAO Yi^{1,2}

1. Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Jingzhou 434000, China;

2. Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract: Grass carp reovirus (GCRV) is the first aquatic animal virus isolated and well characterized in China, which causes severe hemorrhage in fingerlings and yearlings of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) with above 90% morbidity and leads to huge economic losses. GCRV has been classified to the genus of aquareoviruses and shares the typical physico-chemical properties and morphological characteristics with other aquareoviruses, which consists of a double-layered capsid in spherical structure, containing a genome composed of 11 segments of double-stranded RNA. GCRV has been considered to be the most pathogenic aquareovirus in fishes, therefore, it represents a model system for the studies of replication and pathogenesis of aquareoviruses both *in vitro* and *in vivo*. Currently, there are limited vaccines available for the prevention and control of the disease, moreover, none of them is commercialized and able to be delivered through oral administration. The application of plants as a production system for vaccines facilitates a novel and safe approach of vaccination. Besides their application in human beings, they can be used as oral veterinary vaccines in animals. It should be noted that several plant-derived vaccines for different animals, utilizing various plant production systems, are under investigation. Although up to date not yet readily available, the development of these plant-based vaccines is in an advanced stage and shows great potential for use in future. Especially in aquaculture, oral vaccination has multi- advantages, since it is a relatively effortless, cost effective and stress-free immunization method, which can be used at almost any age of fish.

For the purpose to generate a plant-based vaccine against grass carp hemorrhage, here we presented the result of constructing a plant-based fusion expression vector, in which a gut adhesion molecule gene (*LTB*), a GCRV antigenic peptide coding gene (GCRV-VP6) and a green fluorescent protein gene (*GFP*) were included. In this study the specific primer pairs for amplifying the GCRV-VP6 gene and the *Escherichia coli* *LTB* gene were designed and synthesized based on the sequences of GCRV-VP6 gene and *Escherichia coli* *LTB* gene posted in GenBank. GCRV genome was extracted from the virus infected grass carp kidney cell line (CIK) and the GCRV VP6 coding region was amplified by RT-PCR. The *LTB* coding region was amplified from *Escherichia coli* H44815 genome. The PCR products were cloned into pCR2.1 vector respectively and then sequenced and subcloned into vector pCAMBIA 1302, which contained a green fluorescence protein gene marker in order to track the route of antigen uptake. This study has made a solid base for the innovation of edible transgenic plant vaccine against grass carp hemorrhage through oral immunization. [Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(1): 1–7]

Key words: GCRV; VP6 gene; *LTB* gene; plant-based expression vector

Corresponding author: ZENG Lingbing. Tel: 0716-8115716; E-mail: zenglingbing@gmail.com