DOI: 10.3724/SP.J.1118.2017.16364

传染性造血器官坏死病核酸疫苗的构建及其在虹鳟接种部位的消 长规律

李渊^{1,2} 徐黎明¹, 赵景壮¹, 刘淼¹, 任广明¹, 尹家胜¹, 卢彤岩¹

1. 中国水产科学研究院 黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070;

2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306

摘要:本研究将传染性造血器官坏死病病毒(infectious hematopoietic necrosis virus, IHNV)分离株 SD-12 糖蛋白 (glycoprotein, G)基因克隆进商业化载体 pcDNA3.1(+),构建了 IHNV G 的表达载体,即传染性造血器官坏死病 (infectious hematopoietic necrosis, IHN)核酸疫苗,命名为 pIHNsd-G。采用背鳍基部肌肉注射的方式,以 2 µg/尾的 剂量免疫虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)鱼苗(5.0±0.5) g。于免疫后第 4 天及第 7 天,利用 real-time PCR 技术检测免疫 虹鳟头肾及接种部位肌肉组织 *Mx-1* 基因表达情况;于免疫后第 21 天,以 100 倍半数组织培养感染剂量(tissue culture infective dose, TCID₅₀)采取腹腔注射的方式进行攻毒实验,计算核酸疫苗相对保护率(relative percent survival, RPS);于免疫后第 60 天及 150 天检测免疫虹鳟血清 IHNV 中和抗体效价;最后,以 pIHNsd-G 的启动子序列 和氨苄青霉素抗性基因序列为目标基因,利用 PCR 方法监测 pIHNsd-G 在免疫虹鳟接种部位的动态分布情况。结 果显示: *Mx-1* 基因在头肾和接种部位肌肉中均显著上调表达,并且在接种部位肌肉组织中明显高于同一时间点的 头肾组织;攻毒实验中 pIHNsd-G 对虹鳟的相对保护率高达 94.4%;而在免疫后第 60 天,所有免疫虹鳟血清中均存在中和抗体,其最高效价高达 320,在免疫后第 150 天,最高抗体效价为 80,自此,说明已成功获得有效的 IHN 核酸疫苗。pIHNsd-G 在虹鳟接种部位的 PCR 监测结果显示:在免疫后的第 1 天即可在注射部位的肌肉中检测到全部 pIHNsd-G 目标片段,在第 84 天时已经无法从注射部位肌肉中扩增出全长氨苄青霉素抗性基因,而所有目标基因在 第 150 天时均消失不见。本研究在成功构建 IHN 核酸疫苗并系统地验证了其有效性的基础上,开展了该疫苗在接种部位的动态分析研究,为 IHN 核酸疫苗的研发和安全性评价研究提供了基础数据。

关键词: 传染性造血器官坏死病病毒; 核酸疫苗; 消长; 虹鳟 中图分类号: S941 文献标志码: A 文章编号: 1005-8737-(2017)06-1280-08

传染性造血器官坏死病(infectious hematopoietic necrosis, IHN)是由传染性造血器官坏死病毒 (infectious hematopoietic necrosis virus, IHNV)引 起的鲑鳟鱼类主要疾病之一,给鲑鳟鱼类养殖业 造成了严重的经济损失^[1-2]。鲑鳟幼鱼最容易受到 该病的影响,成鱼一般不表现临床症状,却成为 病毒的终身携带者。病毒侵染的主要靶器官是肾 造血组织^[3]。而 IHN 大规模暴发,虹鳟鱼苗死亡 率可达 95%^[4]。IHN 已被国际兽疫局(OIE)列为 必须申报的疾病之一,是鱼类口岸第一类检疫 对象^[5]。该病已经成为限制中国冷水鱼养殖业发 展的瓶颈,并引起了从业人员的重点关注。但目 前中国没有有效的 IHN 防控药物^[6]。现已对 IHNV 疫苗、免疫佐剂及病毒复制干扰物等展开了大量 的研究,也报道了很多类型的鱼类病毒性疾病的 疫苗^[7-9],核酸疫苗已被证明对多种鱼类病毒性

通信作者: 卢彤岩, 研究员. E-mail: lutongyan@hotmail.com

收稿日期: 2016-12-09; 修订日期: 2017-02-16.

基金项目:黑龙江省应用技术研究与开发计划项目(GA13B401);黑龙江省自然科学基金项目(C201462);中央公益性事业单位 基本科研业务费专项经费资助项目(HSY201514, 2016HY-ZD0504).

作者简介: 李渊(1989-), 女, 硕士研究生, 从事鱼类病毒学研究. E-mail: 1154662843@qq.com

疾病都十分有效^[10-11]。

20世纪90年代,伴随着分子免疫学与基因工 程技术的迅猛发展,新一代鱼用疫苗的研究也开 始起步, DNA 疫苗被认为是很有应用前景的一种 疫苗。表面糖蛋白(glycoprotein, G)是病毒的主要 抗原部分,能够诱导产生中和抗体、刺激细胞免 疫,还参与病毒与细胞的识别和结合等过程,直 接决定病毒毒力^[12],所以构建 DNA 疫苗过程中 常选用 G 基因作为抗原基因。1996年,在首次成功 利用 IHNV Round Butte 分离株的 G 基因构建了 IHNV 核酸疫苗,并以 10 μg/尾的剂量接种 6 周后 对虹鳟幼鱼提供了强大的免疫保护效果之后,另 一种更高效的 IHNV 核酸疫苗也问世, 纳克级的 免疫剂量即可对虹鳟幼鱼提供 80%~100%的相对 保护率^[13-14]。Alonso 等^[15]研发了一种 IHNV 自杀 性 DNA 疫苗 Pirf1A-G-PMT-M, 进行攻毒实验发现 此疫苗能略微提高鱼的成活率。鱼类核酸疫苗的研 究虽起步较晚, 但对 IHNV 核酸疫苗研究取得了很 大成效。而已报道的 IHNV 核酸疫苗均是利用 U 及 M基因型毒株的G基因构建^[13-14],尚未有关于利用 J 基因型的 IHNV 核酸疫苗的报道。并且目前也没 有关于核酸疫苗在免疫虹鳟体内动态分布的系统 研究。而核酸疫苗的体内存留时间及分布不但能够 在一定程度上反应核酸疫苗免疫持续期,而且对 核酸疫苗的安全性评价具有一定的指导意义。

本研究利用 IHNV SD-12 分离株(J 基因型)的 G基因构建了表达 IHNV G 的表达载体 pIHNsd-G, 即 IHNV 核酸疫苗,在验证该疫苗免疫效力的基 础上,以其启动子序列和氨苄青霉素抗性基因为 目标基因,开展了 pIHNsd-G 在虹鳟接种部位的 动态分布及消长规律研究。本研究不但提供了一种高效的 IHNV 核酸疫苗,而且为该核酸疫苗的 安全性评价研究提供了基础数据,为该疫苗的产 业化应用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

SV Total RNA Isolation System 购自 Promega; PrimeScript[™] One Step RT-PCR Kit Ver2.0 试剂 盒、pMD19-T simple 载体、DNA Marker、One Step SYBR[®] PrimeScript RT-PCR Kit II (Perfect Real Time)试剂盒、限制性内切酶购自大连宝生物公司; DNAzol[®] Reagent (Invitrogen, USA); IHNV 分离 株 SD-12 由本实验室保存提供(糖蛋白基因序列 accession no. KF871193.1); 鲤(*Cyprinus carpio*)上 皮瘤细胞(epithelioma papulosum cyprinid, EPC)由 中国水产科学研究院长江水产研究所鱼类病害教 研室曾令兵教授惠赠; 真核表达载体 pcDNA3.1 购自 Invitrogen 公司; 质粒大量提取试剂盒购自 Tiangen 生物公司。

1.2 引物设计与合成

利用 Premier 5.0 软件设计扩增 IHNV SD-12 表面糖蛋白基因序列, pIHNsd-G 载体中启动子 和氨苄青霉素抗性基因全长及片段序列的特异 性引物(表 1), 所有引物由哈尔滨博仕生物公司 合成。

1.3 G基因的扩增及表达载体 pIHNsd-G 的构建

利用 SV Total RNA Isolation System 对 IHNV SD-12 分离株进行 RNA 提取,以提取的 RNA 为 模版,利用 RT-PCR 一步反应试剂盒(TaKaRa)扩

Tab. 1 Frimer's used in this study				
引物名称(片段大小) primer (fragment size)	引物序列(5'→3') sequence (5'→3')	退火温度/℃ annealing temperature	扩增片段 amplified fragment	
G (1700 bp)	F: GGATCCATGGACGCCATGATCACCACTCCGC R: CTCGAGTTAGGACCTGTTTGCCAGGTGATAC	60	糖蛋白 glycoprotein	
CMV-full (588 bp)	F: GTTGACATTGATTATTGACTAGTTA R: GAGCTCTGCTTATATAGACCT	52	完整启动子 full promoter	
CMV-fragment (271 bp)	F: CCCATAGTAACGCCAATA R: AGTCAAACCGCTATCCAC	51	启动子片段 promoter fragment	
AMP R-complete (861 bp)	F: TTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCA R: ATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCG	56	完整氨苄抗性基因 complete ampicillin resistance gene	
AMP R- fragment (258 bp)	F: GACCGAGTTGCTCTTGCC R: ATTTCCGTGTCGCCCTTA	55	氨苄抗性基因片段 ampicillin resistance gene fragment	

表 1 本研究所用的引物 Tab 1 Primers used in this stud

增 IHNV SD-12 分离株的 G 基因。PCR 扩增反应 体系: 2×1 step buffer 25 µL, enzyme mix 2 µL, 上 游和下游引物(10 pmol/µL)各 1 µL, 1.3 步骤提取 的 RNA 10 µL, 用无菌水补充至 50 µL。PCR 扩增 程序: 50℃ 30 min, 94℃预变性 5 min; 94℃变性 1 min, 50℃退火1 min, 72℃延伸 50 s, 25 个循环; 72℃终延伸 10 min。将一步反应 PCR 产物进行 1%的琼脂糖凝胶回收,回收产物利用 BamH I/Not I 双酶切, 胶回收后与 BamH I/Not I 双酶切的 pcDNA3.1(+)载体室温连接 30 min, 然后转化大 肠杆菌(Escherichia coli) DH5α、涂布到选择性培 养基上(氨苄青霉素 100 µg/mL)。挑取单菌落,提 取质粒后 BamH I/Not I 双酶切鉴定,将结果为阳 性的单菌落委托上海生工生物工程技术服务有限 公司测序。阳性重组质粒命名为 pIHNsd-G, 即为 本研究中的 IHN 核酸疫苗。

1.4 虹鳟的免疫

将体重(5.0±0.5)g的虹鳟随机分成4组,每组 150 尾,实验组 300 尾,暂养水温维持在(14±1)℃ 的循环水池(60 cm×60 cm×50 cm)中,7 d 后进行 pIHNsd-G 的注射免疫(注射位置为背鳍基部),实验 前禁食 2 d。pIHNsd-G 以磷酸盐溶液(PBS)作为溶 剂进行配制,实验鱼的免疫剂量为 2 μg/尾,同时 设空载体质粒(2 μg/尾)阴性对照组、空白对照组 (50 μL PBS/ind)及未做任何处理的对照组。免疫实 验结束后将各组虹鳟重新置于循环水池内暂养。

1.5 攻毒实验

免疫后第 21 天进行攻毒实验, 空载体质粒 (2 μg/尾)阴性对照组、空白对照组(50 μL PBS/ ind)、 未做任何处理的对照组及免疫虹鳟组, 每组各 50 尾。实验前禁食 2 d。利用 PBS 溶液将检测 用的 IHNV 强毒 SD-12 株进行稀释, 攻毒剂量为 100 TCID₅₀, 攻毒方式为腹腔注射。攻毒实验结 束后将各组虹鳟重新置于循环水池内暂养, 连续 21 d 观察各组虹鳟发病及死亡情况。

1.6 Mx-1 基因检测

Mx-1 基因被认为是 DNA 疫苗在鱼中引起非特异性免疫的标记基因^[16],因此检测该基因可用于分析 DNA 疫苗的有效性。免疫后第4天、第7 天分别采集虹鳟头肾和接种部位肌肉组织,每组 各取虹鳟 5 尾。利用 RNA 提取试剂盒提取组织 RNA,利用 One Step SYBR[®] PrimeScript RT-PCR Kit II (Perfect Real Time)试剂盒,以 *β-actin* 为内参 基因,对 *Mx-1* 基因进行定量分析。Real-time PCR 仪器为 ABI7500。以注射 PBS 的虹鳟为空白对照。

1.7 中和抗体效价测定

分别于免疫后第 60 天、第 150 天采取尾缘静脉取血的方式各收集 10 尾免疫虹鳟的血液,置于 4℃冰箱过夜,800 g 室温离心 10 min,收集上清 (血清),采取注射空载体的虹鳟血清为阴性对照。参照 LaPatra 等^[17]的方法,利用敏感细胞系 EPC 对血清中 IHNV 中和抗体的效价进行检测。同时对 免疫后第 60 天、第 150 天的虹鳟进行攻毒实验,每组 50 尾,以注射空载体的虹鳟为阴性对照。

1.8 pIHNsd-G 接种部位动态分布的监测

分别于免疫后 1 d、3 d、5 d、7 d、42 d、65 d、 84 d、130 d、150 d 收集免疫虹鳟注射部位的肌肉 组织,每组样本数量为 5。称取 0.05 g 组织样本, 利用组织匀浆器充分研磨后,用 DNAzol 提取组 织 DNA。以所提取的 DNA 作为 PCR 模板,分别 以表 1 中的引物对载体中的目标基因氨苄青霉素 抗性基因和启动子基因序列进行扩增。扩增程序 如下: 95℃ 10 min; 94℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 45 s, 共 35 个循环; 72℃ 10 min。利用凝胶电泳对 PCR 产物进行分析。

2 结果与分析

2.1 G基因的扩增与表达载体 pIHNsd-G 构建

利用 RT-PCR 一步反应试剂盒, 以提取的 IHNV 基因组 RNA 为模板扩增 IHNV SD-12 分离株 的 G 基因。凝胶电泳分析结果显示出现与目的条带 大小相符的特异性条带(图 1)。序列分析结果显示该 基因序列与目的基因序列相同, 说明已获得 G 基 因。将该 G 基因片段与商业化载体 pcDNA3.1(+) 连接,转化 E. coli DH5α, 随机挑取单菌落, 提取质 粒,利用 BamH I/Not I 双酶切法进行鉴定, 结果 显示酶切后获得与目的条带大小相符的特异性条 带(图 2)。该结果表明已成功获得 IHNV G 表达载 体,即 IHN 核酸疫苗 pIHNsd-G。利用 Tiangen 质 粒大量提取试剂盒制备 pIHNsd-G 用于免疫实验。







图 2 pIHNsd-G 酶切产物的凝胶电泳分析 1: pIHNsd-G 酶切产物; 2: pIHNsd-G 质粒; M: DL15000 分子量标准. Fig. 2 Gel electrophoresis of digestion products of the pIHNsd-G 1: pIHNsd-G digestion product; 2: pIHNsd-G plasmid; M: DL15000 DNA marker.

2.2 pIHNsd-G保护效力分析

利用2 μg/尾的剂量采用背鳍基部肌肉注射的 方式对体重(5.0±0.5) g 虹鳟进行免疫,并于免疫后 第 21 天进行攻毒实验。结果显示,免疫组虹鳟的累 计存活率为90%,而 PBS 对照组及空白对照组的虹 鳟累计存活率仅为 5%(图 3)。该结果说明 pIHNsd-G 的相对保护率为 94.4%,能够刺激虹鳟免疫反应, 具有特异性的保护效果,能够抵抗 IHNV 对虹鳟 的进攻。



2.3 Mx-1 基因检测结果

对免疫后第 4 天、第 7 天的头肾及接种部位 肌肉组织 RNA 中 *Mx-1* 基因的定量分析结果显示, 与空白对照组相比, *Mx-1* 基因在两种组织中均显 著上调表达(*P*<0.01),并且第 4 天在接种部位肌肉 组织中的 *Mx-1* 基因水平高于同一时间点的头肾组 织中的 *Mx-1* 基因水平 72 倍;而在免疫后第 7 天, 上述两种组织中的 *Mx-1* 基因上调水平均显著高 于第 4 天的上调水平,在头肾组织中上升 25 倍, 而在肌肉组织中上升 54 倍(图 4)。





2.4 中和抗体效价测定结果

对免疫后第 60 天和第 150 天的虹鳟进行攻毒 实验,并利用 EPC 细胞检测免疫后第 60 天和第 150 天的虹鳟血清中和抗体的效价,攻毒实验结 果显示在免疫后第 60 天和第 150 天 pIHNsd-G 对 虹鳟的保护率都能达到 89%以上,在免疫后第 60 天,所有免疫虹鳟血清中均存在中和抗体,其最 高效价高达 320。在免疫后第 150 天,有一尾鱼的 血清中不存在中和抗体(效价<20),而剩余的 9 尾 鱼血清中均存在不同效价的中和抗体,其中一尾 鱼效价最高(80)(表 2)。该结果说明 pIHNsd-G 能 够刺激虹鳟特异性免疫反应,而使免疫虹鳟产生 中和 IHNV 的抗体,因而能够阻挡 IHNV 的进攻, 而免疫虹鳟血清中的中和抗体效价随着时间的增 加逐步下降,但是仍然能够为免疫虹鳟提供显著 的特异性保护(表 2)。

表 2 不同时间点由 pIHNsd-G 疫苗接种引发的 中和抗体反应和特异性保护 Tab. 2 Neutralizing antibody response and specific

protection elicited by pIHNsd-G vaccination at different time point

免疫后天数/d	血清中和抗体效价(尾数)	相对保护率/%
days post-	serum neutralizing	relative percent
vaccination	antibody titer (quantity)	survival
60	>40(1), >80 (2), >160(3), >320(4)	91.3
150	<20(1), >30(4), >40 (4), >80(1)	89.3

注:每组虹鳟尾数为 10, 注射空载体的虹鳟血清抗体效价均小 于 20(阴性).

Note: The number of rainbow trout in each group was 10, and the serum antibody titer of rainbow trout injected with empty vector was less than 20 (negative).

2.5 pIHNsd-G的接种部位动态分布

于免疫后不同时间点,利用表 1 中的引物 CMV full(588 bp)和 CMV fragment (271 bp)以启 动子基因序列为目标基因进行了 PCR 监测。凝胶 电泳结果显示,在免疫后的第 1 天即可在注射部 位的肌肉中检测到符合目标基因大小的特异性条 带(588 bp 和 271 bp),随时间的增加,特异性条带 在第 150 天消失不见(图 5)。

利用表 1 中的引物 AMP R full (861 bp)和 AMP R fragment (258 bp)进行以氨苄青霉素抗性 基因序列为目标基因的 PCR 扩增。凝胶电泳结果 显示,在免疫后的第 1 天即可在注射部位的肌肉 中检出符合目标基因大小的特异性条带(861 bp 和 258 bp);但随时间逐渐增加,在第 8 天已经无 法从注射部位肌肉中扩增出全长氨苄青霉素抗性 基因(861 bp),只能检测到氨苄青霉素抗性基因 的片段(258 bp);而在第 150 天时所有条带均消失 不见(图 6)。









1, 3, 5, 7, 42, 65, 84, 130, 150: 分别为免疫后天数; C: 阴性 对照; M: DL2000 分子量标准.

Fig. 6 Gel electrophoresis of PCR product of ampicillin resistant gen

1, 3, 5, 7, 42, 65, 84, 130, and 150 represent days post-vaccination, respectively; C: negative control; M: DL2000 DNA marker.

3 讨论

核酸疫苗的目的是把遗传物质转移到体细胞 内影响其免疫系统^[18]、包含启动子和增强子序 列、目标基因、多聚腺苷酸化序列、转录终止序 列、抗生素抗性基因和复制起点^[19]。通常选择能 够在原核生物中自主复制的由 DNA(不同于染色 体 DNA)组成的环状分子的质粒 DNA(pDNA)作 为传递基因的载体。G 蛋白是 IHNV 的主要抗原 蛋白,具有多个抗原表位并且能够刺激机体产生 保护性抗体^[6]。本研究利用 IHNV SD-12 分离株 的 G 蛋白基因连接载体 pcDNA3.1(+), 成功获得 IHNV G 表达载体,即为本研究的核酸疫苗 pIHNsd-G。通过肌肉注射免疫虹鳟^[20], 2 μg/尾剂 量的 pIHNsd-G 对虹鳟(5.0±0.5) g 的相对保护率能 达到 94.4%。作为干扰素信号通路的关键蛋白因 子 Mx-1 已经被用来评价核酸疫苗刺激鱼类非特 异性免疫的指标^[21],本研究发现在第4天时,头 肾和接种部位肌肉中 Mx-1 基因均显著上调表达, 并且接种部位肌肉组织中的 Mx-1 基因水平显著 高于同一时间点的头肾组织, 而第7天的 Mx-1 基 因水平显著高于第4天。在免疫后第60天,所有 免疫虹鳟血清中均存在中和抗体,其最高效价高 达 320, 但随着时间大幅增加血清中的中和抗体 会逐渐减少,这与 Kurath 等^[22]的实验结果一致。 这一系列实验证明了 pIHNsd-G 能够刺激虹鳟的 非特异性免疫及特异性免疫。

核酸疫苗的组织残留、疫苗载体抗性基因漂移以及 DNA 疫苗能否整合到鱼基因组的不确定 性使核酸疫苗的安全性备受争议。尽管核酸疫苗

在保护鱼类抵抗某些病毒方面非常有效,如大鲵 虹彩病毒^[23],但目前仅有一种 IHN 核酸疫苗 (ApexIHN)在加拿大被批准上市^[24]。为了快速解 决 IHN 这一严重的病害问题, 本研究在成功验证 所构建的 IHN 核酸疫苗 pIHNsd-G 免疫保护效力 的基础上, 以其启动子和氨苄青霉素抗性基因为 目标基因, 开展了 pIHNsd-G 在接种部位的动态 分布跟踪实验,结果表明以 2 µg/尾的剂量免疫虹 鳟(体重 5.0 g±0.5 g), 于免疫后 130 d 时仍可以利 用 PCR 方法在接种部位肌肉中检测到残留的 pIHNsd-G、而于免疫后 150 d 利用 PCR 检测不到 目标基因片段。由于 PCR 方法不能进行绝对定量, 因此本结果说明 pIHNsd-G 片段能够在接种部位 存留至少130d。目前对于核酸疫苗在免疫虹鳟体 内动态分布的研究较少, Boudinot 等^[25]利用病毒 性出血性败血症病毒(viral hemorrhagic septicemia virus. VHSV)核酸疫苗免疫成年虹鳟. 用 PCR 方 法证明了在免疫后第 45 天接种部位肌肉中仍然 存在 VHSV G 基因。Alonso 等^[26]用 1.5 µg IHN 核酸疫苗免疫 0.4 g 左右的虹鳟, 在 120 d 利用 PCR 方法仍能检测到接种部位肌肉中含有 IHNV G 基因。与本研究相比,上述两个研究均没有给 出核酸疫苗从免疫虹鳟体内消除所需的时间,而 是通过 G 基因的存在与否来辅助说明核酸疫苗发 挥功效的实效性及残留时间。而本研究旨在为所 构建的核酸疫苗的安全评价提供参考,因此选择 了存在潜在隐患的启动子基因和抗性基因进行监 测。但由于不同大小的鱼的代谢速度会有所不同, 针对不同大小的虹鳟, 核酸疫苗的体内残留时间 也会有一定的差别,因此本研究结果的前提是 2 μg/尾单剂量一次接种体重为(5.0±0.5)g的虹鳟。 但是,5g左右是虹鳟接受注射免疫的最佳规格之 一,因此,本研究结果对 pIHNsd-G 作为核酸疫苗 的产业化应用及安全性评价具有更现实的指导意 义。此外, 本研究没有选择 G 基因作为目标基因 来检测 pIHNsd-G 的体内残留情况, 而是选择了 与安全性相关的启动子基因序列和氨苄青霉素抗 性基因序列为目标基因进行了 pIHNsd-G 在接种 部位的动态分布的 PCR 监测, 旨在为核酸疫苗的 安全评价提供参考。

参考文献:

- Ammayappan A, LaPatra S E, Vakharia V N. Molecular characterization of the virulent infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) strain 220–90[J]. Virol J, 2010, 7(1): 10–20.
- [2] Kolodziejek J, Schachner O, Dürrwald R, et al. "Mid-G" region sequences of the glycoprotein gene of Austrian infectious hematopoietic necrosis virus isolates form two lineages within European isolates and are distinct from American and Asian lineages[J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(1): 22–30.
- [3] Amend D F, Yasutake W T, Mead R W. A hematopoietic virus disease of rainbow trout and sockeye salmon[J]. T Am Fish Soc, 1969, 98(4): 796–804.
- [4] USA, Center for Food Security & Public Health. Infectious hematopoietic necrosis[J]. Infectious Hematopoietic Necrosis, 2007, 1(4): 277–280.
- [5] Chen H L, Wang Y J, Jiang Y L. Research progress of infectious hematopoietic necrosis[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2012, 40(21): 11128–11132. [陈红莲, 王永 杰, 蒋业林. 传染性造血器官坏死病研究进展[J]. 安徽农 业科学, 2012, 40(21): 11128–11132.]
- [6] Xu L M, Liu H B, Lu T Y. Cloning and bioinformatics analysis of matrix protein from IHNV-Sn isolate[J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(9): 1409–1415. [徐黎明, 刘 洪柏, 卢彤岩. 传染性造血器官坏死病毒-Sn 株基质蛋白 基因克隆及生物信息学分析[J]. 水产学报, 2013, 37(9): 1409–1415.]
- [7] Anderson E, Clouthier S, Shewmaker W, et al. Inactivated infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) vaccines[J].
 J Fish Dis, 2008, 31(10): 729–745.
- [8] Simon B, Nomellini J, Chiou P, et al. Recombinant vaccines against infectious hematopoietic necrosis virus: production by the *Caulobacter crescentus* S-layer protein secretion system and evaluation in laboratory trials[J]. Dis Aquat Org, 2001, 44(1): 17–27.
- [9] Chiou P P, Lin C M, Perez L, et al. Effect of cecropin B and a synthetic analogue on propagation of fish viruses in vitro[J]. Mar Biotechnol, 2002, 4(3): 294–302.
- [10] Evensen Ø, Leong J A. DNA vaccines against viral diseases of farmed fish[J]. Fish Shellfish Immunol, 2013, 35(6): 1751–1758.
- [11] Hølvold L B, Myhr A I, Dalmo R A. Strategies and hurdles using DNA vaccines to fish[J]. Vet Res, 2014, 45: 21.
- [12] Cox J H, Dietzschold B, Schneider L G. Rabies virus glycoprotein. II. Biological and serological characterization[J]. Infect Immun, 1977, 16(3): 754–759.
- [13] Anderson E D, Mourich D V, Fahrenkrug S C, et al. Genetic

immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against infectious hematopoietic necrosis virus[J]. Mol Marine Biol Biotechnol, 1996, 5(2): 114–122.

- [14] Corbeil S, LaPatra S E, Anderson E D, et al. Evaluation of the protective immunogenicity of the N, P, M, NV and G proteins of infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout oncorhynchus mykiss using DNA vaccines[J]. Dis Aquat Org, 1999, 39(1): 29–36.
- [15] Alonso M, Chiou P P, Leong J A. Development of a suicidal DNA vaccine for infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV)[J]. Fish Shellfish Immunol, 2011, 30(3): 815–823.
- [16] Deng K L. Studies on *Mx1* genes in different ploidy cyprinids and theri copy number[D]. Changsha: Hunan Normal University, 2011. [邓凯龙. *Mx1* 基因在不同倍性鲫鲤的克 隆及拷贝数研究[D]. 长沙: 湖南师范大学, 2011.]
- [17] LaPatra S E, Turner T, Lauda K A, et al. Characterization of the humoral response of rainbow trout to infectious hematopoietic necrosis virus[J]. J Aquat Anim Health, 1993, 5(3): 165–171.
- [18] Foss G S, Rogne S. Gene medication or genetic modification? The devil is in the details[J]. Nat Biotechnol 2003, 21(11): 1280–1281.
- [19] Gillund F, Dalmo R, Tonheim T C, et al. DNA vaccination in aquaculture — expert judgments of impacts on environment and fish health[J]. Aquaculture, 2008, 284(1): 25–34.
- [20] Corbeil S, Kurath G, LaPatra S E. Fish DNA vaccine against infectious hematopoietic necrosis virus: efficacy of various routes of immunisation[J]. Fish Shellfish Immunol, 2000,

10(8): 711-723.

- [21] Trobridge G D, LaPatra S E, Kim C H, et al. Mx mRNA expression and RFLP analysis of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* genetic crosses selected for susceptibility or resistance to IHNV[J]. Dis Aquat Org , 2000, 40(1): 1–7.
- [22] Kurath G, Garver K A, Corbeil S, et al. Protective immunity and lack of histopathological damage two years after DNA vaccination against infectious hematopoietic necrosis virus in trout[J]. Vaccine, 2006, 24(3): 345–354.
- [23] Zeng X H, Zeng L B, Zhou Y, et al. Construction and immune efficacy of an MCP-containing DNA vaccine for Chinese giant salamander iridovirus[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2015(5): 1055–1067. [曾宪辉, 曾令兵, 周勇, 等. 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[J]. 中国水产科学, 2015(5): 1055–1067.]
- [24] Salonius K, Simard N, Harland R, et al. The road to licensure of a DNA vaccine[J]. Curr Opin Investig Drugs, 2007, 8(8): 635–641.
- [25] Boudinot P, Blanco M, de Kinkelin P, et al. Combined DNA immunization with the glycoprotein gene of viral hemorrhagic septicemia virus and infectious hematopoietic necrosis virus induces double-specific protective immunity and nonspecific response in rainbow trout[J]. Virology, 1998, 249(2): 297–306.
- [26] Alonso M, Chiou P P, Leong J A. Development of a suicidal DNA vaccine for infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV)[J]. Fish Shellfish Immunol, 2011, 30(3): 815–823.

Construction and the growth and decline pattern of an infectious hematopoietic necrosis nucleic acid vaccine in rainbow trout

LI Yuan^{1, 2}, XU Liming¹, ZHAO Jingzhuang¹, LIU Miao¹, REN Guangming¹, YIN Jiasheng¹, LU Tongyan¹

1. Heilongjiang River Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China;

2. College of Fishery and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: In this study, the infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) isolate SD-12 glycoprotein (glycoprotein, G) gene was cloned into commercial vector pcDNA3.1 (+) to construct an IHNV G expression vector, known as an infectious hematopoietic necrosis (IHN) nucleic acid vaccine and named pIHNsd-G. Rainbow trout (5 ± 0.5) g were immunized with 2 µg of the vaccine by intramuscular injection at the dorsal fin base. The expression of the Mx-1 gene was detected by real-time PCR in the anterior kidney and the muscles from vaccine-delivered sites of the rainbow trout at 4 days and 7 days after immunization, respectively. At 21 days post immunization, the relative protection rate (RPS) of the vaccine was calculated by challenge with SD-12 at a dose of 100% of the tissue culture-infective dose (TCID₅₀) by intraperitoneal injection. The serum neutralizing antibody titers of immunized rainbow trout were tested at 60 and 150 days post-immunization. Finally, the pIHNsd-G promoter sequence and ampicillin resistance gene sequence were used as target genes and the dynamic distribution of pIHNsd-G in the inoculated part of the rainbow trout was monitored by PCR. The results showed that the Mx-1 gene was significantly up-regulated in the kidney and the muscles at the inoculated site and was significantly higher in the muscle tissue than in the head kidney at the same time point. Challenge of rainbow trout showed that the RPS of pIHNsd-G for rainbow trout was 94.4%. The neutralizing antibody titer revealed that at 60 days post-immunization, neutralizing antibodies were found in all of the serum samples of immunized rainbow trout and the highest titer was 320, while the highest antibody titer at 150 days post-immunization was 80. Since then, it has been shown that an effective IHN nucleic acid vaccine has been successfully obtained. The results of PCR following the injection of pIHNsd-G rainbow trout showed that all pIHNsd-G target fragments were detected in the muscle of the injection site on the first day after immunization; it was not possible to amplify the full-length ampicillin resistance gene from the injection site muscle at 84 days, and all target genes disappeared at 150 days. Based on the successful construction of an IHN nucleic acid vaccine and the systematic validation of its effectiveness, this study carried out dynamic analysis of the vaccine at the inoculation site, which provides basic data for the research and development of IHN nucleic acid vaccines and safety evaluations.

Key words: infectious hematopoietic necrosis virus; nucleic acid vaccine; growth and decline; rainbow trout Corresponding author: LU Tongyan. E-mail: lutongyan@hotmail.com