

传染性胰腺坏死病毒 VP3 蛋白的原核 表达及抗原性分析

赵丽丽, 刘敏, 哈卓, 刘巍巍, 赵永欣, 葛俊伟, 乔薪瑗, 李一经*
(东北农业大学动物医学学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:应用 RT-PCR 方法扩增了 IPNV 编码内衣壳 VP3 蛋白的基因 615 bp, 将 VP3 基因克隆至原核表达载体 pET30b, 并在大肠杆菌 BL21 中得到了表达。通过 SDS-PAGE 分析表明, 重组菌诱导后得到了预期大小约 30 ku 的 VP3 蛋白, 与理论值相符, 经薄层扫描分析表明目的蛋白表达量可占菌体总蛋白的 30%。用镍离子亲和层析柱纯化可溶性的 VP3 蛋白, 并制备抗血清。Western-blotting 结果显示, VP3 蛋白可被兔抗 IPNV 阳性血清识别; 间接 ELISA 结果显示, IPNV 细胞培养物作为抗原, 兔抗 VP3 蛋白高免血清稀释度为 1:25 600 时, P/N > 2, 抗血清可与 IPNV 全病毒发生反应, 以上两项结果说明, 表达的 VP3 蛋白与天然的 IPNV VP3 蛋白一样具有相同的抗原性。试验利用原核表达系统成功地高效表达了 IPNV VP3 蛋白, 融合蛋白以可溶性形式存在, 并制备了高效价的抗血清。

关键词:传染性胰腺坏死病毒; VP3 基因; 原核表达; 抗血清

中图分类号: S 917

文献标识码: A

传染性胰腺坏死病是由传染性胰腺坏死病毒 (infectious pancreas necrosis virus, IPNV) 引起鲑科幼鱼的一种高度接触传染性的急性病毒性疾病, 主要以鲑科鱼类幼鱼肝胰腺等内脏实质器官出血、坏死为临床特征^[1]。该病主要发生于人工养殖的虹鳟鱼场, 20 周龄以内的虹鳟鱼苗最为易感, 该病可引起虹鳟鱼卵和稚鱼 90% 以上的死亡率^[2], IPNV 强毒株对两月龄的幼鱼的致死率高于 70%^[3]。因该病流行范围广, 发病率和病死率高, 被许多国家列为鱼类进口的重点检疫项目。1960 年, Wolf 等^[2]首次从河鳟病鱼中分离出了传染性胰腺坏死病毒。1987 年, 我国由江育林等在山西虹鳟试验场稚鱼暴发性流行病群体中首次分离到了 IPNV 病毒^[4]。目前该病的流行范围遍及亚、欧、美各国, 给水产养殖业带来了巨大的经济损失。

IPNV 传染性胰腺坏死病毒属于双 RNA 病毒科 (Bimaviridae), 水生双 RNA 病毒属

(Aquabirnavirus) 成员。病毒粒子为无囊膜的二十面体, 直径约 60 nm^[5]。IPNV 基因组编码 2 种主要结构多肽, 即 VP2 和 VP3 衣壳蛋白。VP2 蛋白 (50 ku) 是 IPNV 的外衣壳蛋白, 含有病毒主要抗原决定簇, 其诱导的中和抗体能被动地保护宿主不受 IPNV 的感染, 是 IPNV 的保护性抗原^[6-7]。VP3 蛋白 (31.6 ku) 是继 VP2 蛋白之后的 IPNV 第二类主要结构蛋白, 三聚体 VP3 蛋白分布在衣壳内和分布在衣壳表面的 VP2 蛋白组装成病毒粒子^[8-9]。Tarrab 等^[10]通过 VP3 的单克隆抗体检测到在病毒的表面有部分 VP3 的存在。Park 等^[11]证实了 VP3 蛋白含有重要的中和表位, 并且 VP3 比 VP2 具有更好的免疫原性。

本试验利用原核表达系统表达 IPNV (sp) 株截短的 VP3 基因 (615 bp), 制备了抗 VP3 蛋白血清, 分析了 IPNV VP3 蛋白的抗原性, 为 VP3 蛋白在 IPNV 诊断和免疫防治方面的研究奠定了基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

菌株、菌株与质粒 IPNV(sp 株)购自美国 ATCC,编号为 VR-1318,CHESE-214 细胞由深圳出入境检验检疫局江育林教授惠赠,*Escherichia coli* BL21(DE3)菌株、pET30b 载体由本实验室保存。

主要试剂 小量 DNA 胶回收试剂盒、质粒抽提试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司,限制性内切酶购自 TaKaRa 公司,T₄ DNA 连接酶购自 NEB 公司,HRP 标记的羊抗兔 IgG 购自 Sigma 公司。

引物 上游引物 P1 5'-AGC GGATCC TGCATCCGGGATGGACGAG-3'含有 *Bam*H I 酶切位点和下游引物 P2 5'-AGC CTCGAG TCGTCGTTTCATCTGTC-3'含 *Xho* I 酶切位点由上海生物工程有限公司合成。

1.2 VP3 基因的克隆

经 CHESE-214 细胞繁殖的 IPNV 细胞培养毒,Trizol 裂解后,以氯仿、异丙醇抽提病毒总 RNA,经逆转录后,以 P1 和 P2 为引物通过 PCR 方法扩增 VP3 基因片段。PCR 循环条件为 95 ℃ 预变性 5 min,然后按照 94 ℃ 变性 1 min,48 ℃ 退火 40 s,72 ℃ 延伸 1 min,30 个循环,72 ℃ 终延伸 10 min,4 ℃ 终止反应。经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分离后,用胶回收纯化试剂盒回收目的片段。并将纯化的 VP3 基因与 pMD18-T simple 载体连接,16 ℃ 连接 3 h,转化到 JM109 感受态细胞中。筛选阳性质粒。经酶切,PCR 鉴定。阳性菌命名为 pMD18-T-VP3,送测序公司测序。

1.3 重组表达质粒 pET30b-VP3 的构建

重组质粒 pMD18-T-VP3 和原核表达载体 pET30b 质粒,分别经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切后,经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分离后,胶回收纯化试剂盒切胶回收两段目的基因,将 VP3 和 pET30b 用 T₄ DNA 连接酶连接,16 ℃ 连接 4 h,转化大肠杆菌 BL21 感受态。涂布含 50 μg/mL 的卡那霉素抗性的平板,37 ℃ 过夜培养。挑取单个菌落提取质粒,经酶切、PCR 鉴定后,将 pET30b-VP3/BL21 重组菌进行序列测定。

1.4 VP3 蛋白的诱导表达及纯化

将过夜培养的阳性重组菌 pET30b-VP3/

BL21 按 1:20 接种到 LB 培养基中,37 ℃ 振荡培养。当菌液 OD₆₀₀ 值达 0.6 时加入 IPTG(终浓度为 1.0 mmol/L)诱导 6 h,期间每隔 1 h 收集菌液处理,观察表达量的变化。诱导后菌液经超声波破碎后,4 ℃,5 000 × g 离心 10 min,上清和沉淀同时进行 SDS-PAGE 分析。用镍离子亲和层析柱纯化 VP3 蛋白,步骤按说明书进行。取菌体诱导前、诱导后和含有目的蛋白的细菌裂解上清液(纯化前)和收集的洗脱液(纯化后)进行 SDS-PAGE 检测,并用紫外分光光度计测定纯化的蛋白浓度。

1.5 抗血清的制备

兔抗全病毒血清的制备 用 CHESE-214 细胞繁殖 IPNV,经氯化铯(1.33 g/cm³)密度梯度离心法^[17]纯化病毒。纯化的病毒与等量的弗氏完全佐剂混合乳化,皮下接种新西兰大耳白兔,每只兔子接种免疫 2 mL,病毒的终浓度为 2 mg/mL。接种前,兔耳缘静脉无菌采血,分离血清,作为阴性血清。首免 14 d 后,用纯化的病毒与等量的弗氏不完全佐剂混合乳化进行第二次免疫接种,以后每隔两周加强免疫一次,4 次免疫后第 10 天兔心脏采血,无菌分离血清,-80 ℃ 保存。

VP3 蛋白抗血清的制备 对新西兰大耳白兔背部皮下多点注射纯化的 VP3 蛋白,每只兔子接种 2 mL,蛋白的终浓度为 2 mg/mL。免疫接种方法同上。第四次免疫后收集抗血清,无菌分装血清,-80 ℃ 保存。

1.6 抗血清效价的检测

感染 IPNV 的细胞培养物包被 ELISA 板,每孔 200 μL,4 ℃ 过夜。次日,PBST 洗板 3 次,每次 5 min。兔抗全病毒血清和兔阴性血清为一抗,倍比稀释。每孔 100 μL,37 ℃ 作用 1 h,PBST 洗板。HRP 标记的羊抗兔 IgG 为二抗,1:5 000 稀释,每孔 100 μL,37 ℃ 作用 1 h,PBST 洗板。OPD 37 ℃ 显色 15 min。2 mol/L H₂SO₄ 溶液,每孔 50 μL,终止反应后立刻在酶标仪上读 OD_{490nm} 值。间接 ELISA 方法测定 IPNV 抗血清效价。同时用纯化的 VP3 重组蛋白包被 ELISA 板,每孔 100 μL,每孔蛋白的浓度为 2 μg/mL。兔抗 VP3 蛋白血清和兔阴性血清为一抗,同样方法测定 VP3 蛋白抗血清效价。结果判定:当 P/N = (阳性血清 OD_{490nm} 的值 - 空白孔 OD_{490nm} 的值)/(阴性血清 OD_{490nm} 的值 - 空白孔 OD_{490nm} 的值) > 2

时,阳性血清的最大稀释度即为血清抗体效价。

1.7 VP3 蛋白抗原性的检测

将诱导后的 VP3 蛋白经 SDS-PAGE 后转印到硝酸纤维素膜上,NC 膜用 5% 的脱脂乳封闭,4 ℃ 过夜。次日,PBST 洗膜。制备的兔抗全病毒血清为一抗,1:1 000 稀释,37 ℃ 作用 2 h;HRP 标记的山羊抗兔 IgG 为二抗,1:2 000 稀释,37 ℃ 作用 2 h 后,在 4-氯-1-萘酚底物显色溶液中显色 15 min,显示结果。Western-blotting 分析检测 VP3 蛋白的抗原性。

用感染 IPNV 的细胞培养物包被 ELISA 板,抗 VP3 蛋白兔血清作为一抗,1:400 开始进行倍比稀释。HRP 标记的山羊抗兔 IgG 作为二抗,间接 ELISA 试验测定 VP3 蛋白抗血清与病毒的反应性。

2 结果与分析

2.1 VP3 基因的扩增及重组质粒的鉴定

胶回收 PCR 产物,连接 PMD18-T 载体,转化 JM109。获得阳性重组质粒 pMD18-T-VP3,经 *Bam*H I 和 *Xho* I 单双酶切及 PCR 鉴定,获得预期大小的目的片段 615 bp。测序结果表明通过 RT-PCR 方法成功地扩增了 VP3 目的基因(测序结果未显示)。

2.2 重组表达质粒 pET30b-VP3 的鉴定

经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切的 pET30b 和 VP3 基因连接后,转化 BL21,涂布 LB 平板培养后,挑取 pET30b-VP3/BL21 单菌落过夜培养,提取质粒,经 *Bam*H I 和 *Xho* I 单、双酶切鉴定,并用 P1 和 P2 引物进行 PCR 扩增。0.8% 琼脂糖凝胶电泳结果表明,PCR 产物和双酶切得到的目的片段均与预期大小的核酸片段相同(图 1)。测序结果表明 VP3 基因被正确地插入到 pET30b 载体上(测序结果未显示)。

2.3 VP3 蛋白的诱导表达及纯化

经 SDS-PAGE 分析可知与未诱导的重组菌相比,pET30b-VP3/BL21 重组菌经 IPTG 诱导后 1~6 h 均表达了预期大小的融合蛋白 VP3,在相对分子质量 30~35 ku 处出现了表达的目的蛋白带(图 2),与 DNASTar 软件预测的理论值 30 ku 相符,且一定范围内随着诱导时间的延长,表达量逐渐增多,在诱导 4 h 时表达量最大。经薄层扫描分析表明目的蛋白 4 h 时表达量可占菌体总蛋

白的 30%。超声波处理诱导后菌体,经 SDS-PAGE 分析,菌体上清和沉淀中均有目的蛋白出现,可知此蛋白以包涵体和可溶性两种形式存在(图 3)。与包涵体蛋白相比,可溶性蛋白纯化过程简单,且直接具有蛋白活性。经镍离子亲和层析柱纯化可溶性 VP3 蛋白,得到单一纯化的目的蛋白,紫外分光光度计测定蛋白浓度为 3 mg/mL(图 4)。



图 1 重组质粒 pET30b-VP3 酶切、PCR 鉴定结果

1. DNA marker DL15000; 2. *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切; 3. *Xho* I 单酶切; 4. *Bam*H I 单酶切; 5. DNA marker DL2000; 6. PCR 鉴定结果; 7. PCR 阴性对照。

Fig. 1 Restriction map of pET30b-VP3

1. DNA marker DL15000; 2. *Bam*H I/*Xho* I; 3. *Xho* I; 4. *Bam*H I; 5. DNA marker DL2000; 6. PCR product; 7. PCR negative control.

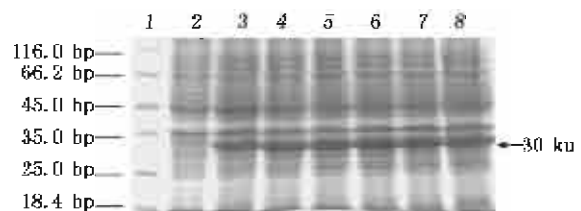


图 2 重组菌 pET30b-VP3/BL21 表达蛋白 SDS-PAGE 鉴定结果

1. 蛋白 marker; 2. 诱导前; 3~8. 诱导后 1~6 h。

Fig. 2 SDS-PAGE profile of expressed protein

1. Protein marker; 2. uninduced bacteria; 3~8. products by induced from 1 h to 6 h.

2.4 抗血清效价的测定

将本试验制备的兔抗全病毒血清和兔抗 VP3 蛋白血清作为阳性血清,免疫接种前兔的血清作为阴性血清,两者都进行倍比稀释,进行间接 ELISA 试验。测定结果表明两种抗血清与相应的抗原均有较强的反应性,满足 P/N > 2 时,血清的最大稀释度分别为 1:102 400 和 1:204 800,即为制备的兔抗全病毒血清和兔抗 VP3 蛋白血清效价(图 5 和图 6)。

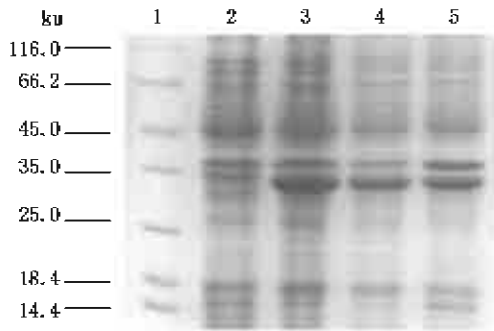


图3 重组菌诱导表达后超声上清和沉淀 SDS-PAGE 分析

1. 蛋白 marker; 2. 诱导前; 3. 诱导后; 4. 超声上清; 5. 超声沉淀。

Fig. 3 SDS-PAGE supersonic of expressed protein

1. Protein marker; 2. Uninduced bacteria; 3. Inducted products; 4. Supernatant after supersonic; 5. Precipitation after supersonic.

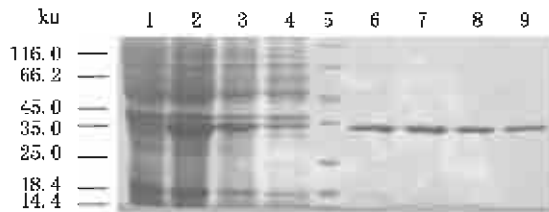


图4 VP3 蛋白纯化 SDS-PAGE 鉴定结果

1. 诱导前; 2. 诱导后; 3. 菌体超声后; 4. 菌体蛋白挂柱后流出液; 5. 蛋白 Marker; 6-9. 纯化 VP3 蛋白。

Fig. 4 The identification of VP3 protein purification by SDS-PAGE

1. Uninduced bacteria; 2. Inducted products; 3. Products after supersonic; 4. Proteins uncombined with Ni ion; 5. Protein Marker; 6-9. Purification of VP3 protein.

2.5 VP3 蛋白抗原性的检测

重组蛋白经 SDS-PAGE 转印到 NC 膜上, 本实验制备的兔抗 IPNV 血清 1:1 000 稀释作为一抗, HRP-羊抗兔 IgG 1:2 000 稀释作为二抗, Western-blotting 结果如图 7。诱导后的菌体蛋白和纯化的 VP3 蛋白在 30~35 ku 处出现了明显的特异性条带, 且反应条带单一。这与 SDS-PAGE 出现的蛋白目的带位置相符。而对照未经诱导的菌体蛋白无条带产生。Western-blotting 结果说明表达的 VP3 蛋白可被兔抗 IPNV 阳性血清识别, 表达的 VP3 蛋白具有良好的抗原性。

2.6 VP3 蛋白免疫原性的检测

用感染 IPNV 的细胞培养物包被 ELISA 板,

与兔抗 VP3 蛋白的免疫血清进行试验, 结果如表 1。从结果可知, 抗 VP3 蛋白的兔血清稀释度为 1:25 600 时, P/N 仍大于 2。说明制备的抗血清与全病毒抗原发生较强的特异性反应, 抗 VP3 蛋白的免疫血清能够识别 IPNV 抗原, VP3 蛋白具有良好的免疫原性。

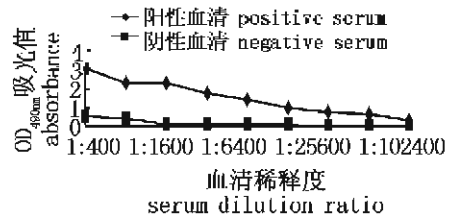


图5 间接 ELISA 检测兔抗全病毒血清效价结果

Fig. 5 The result of purified IPNV infected rabbit serum

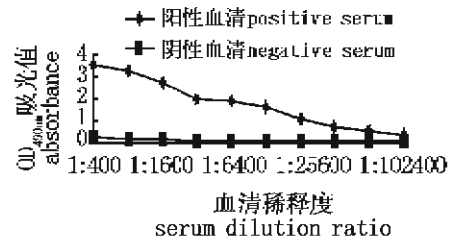


图6 间接 ELISA 检测抗 VP3 蛋白兔血清效价结果

Fig. 6 The result of VP3 protein infected rabbit serum

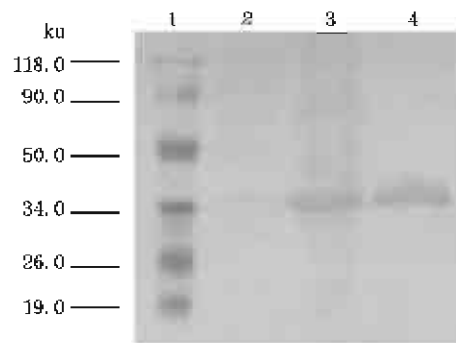


图7 表达目的蛋白的 Western-blotting 检测

1. 预染蛋白 marker; 2. 诱导前; 3. 诱导后; 4. 纯化蛋白。

Fig. 7 The identification of expressed protein by Western-blotting

1. Prestained protein marker; 2. Uninduced bacteria; 3. Inducted products; 4. Purified VP3 protein.

表 1 间接 ELISA 检测病毒结果
Tab.1 The indirect ELISA result of inspection

抗 VP3 蛋白血清稀释度 serumdilution ratio	1:100	1:400	1:1 600	1:6 400	1:25 600
阳性血清 positive	1.664 ± 0.033	1.430 ± 0.039	1.199 ± 0.028	0.467 ± 0.040	0.304 ± 0.192
阴性血清 negative	0.238 ± 0.012	0.106 ± 0.017	0.062 ± 0.003	0.052 ± 0.004	0.042 ± 0.008

注: $P/N = (\text{阳性血清 OD}_{490\text{nm}} \text{ 的值} - \text{空白孔 OD}_{490\text{nm}} \text{ 的值}) / (\text{阴性血清 OD}_{490\text{nm}} \text{ 值} - \text{空白孔 OD}_{490\text{nm}} \text{ 的值}) > 2$, 则判断为阳性。

Notes: $P/N = (\text{positive OD}_{490\text{nm}} - \text{blank OD}_{490\text{nm}}) / (\text{negative OD}_{490\text{nm}} - \text{blank OD}_{490\text{nm}}) > 2$, it's positive.

3 讨论

传染性胰腺坏死病是一种重要的水生动物病毒性疾病,死亡率极高,给虹鳟的养殖业带来巨大的经济损失^[12]。目前针对此病还没有特效药物,主要以预防为主。Milne 等^[13]根据 VP2 基因设计扩增 VP2 基因中 206 bp 片段的一对引物,成功地建立了 IPNV RT-PCR-ELISA 检测方法,这种方法灵敏度能够达到 1.5×10 PFU。Ana 等^[14]用编码 IPNV VP2 基因的 DNA 疫苗免疫虹鳟,研究表明 IPNV DNA 疫苗可激发鱼体内和体外的免疫反应。McKenna 等^[15]将编码 IPNV 基因 A 片段(VP2, VP3, VP4)序列克隆到森林病毒表达载体上,转染 BHK 细胞,表达的蛋白被 IPNV VP3 单克隆抗体所识别。此外还有学者利用昆虫细胞杆状病毒表达系统^[16]和酵母^[17]等构建了 IPNV 基因工程疫苗,研究表明构建的基因工程疫苗免疫虹鳟后均可激发特异性免疫应答。补体结合试验、血凝试验是应用较早的检测方法,此后应用 ELISA,生物素标记核酸探针,RT-PCR 等方法建立了不同的快速检测 IPNV 的方法^[18-20],为 IPNV 的检测和 IPN 的疫情监测提供了可靠依据。

VP2 蛋白和 VP3 蛋白是 IPNV 的主要结构蛋白。迄今为止,多国学者已对 VP2 蛋白的结构和功能进行了研究^[21-24],对 VP3 蛋白的研究相对较少。一般认为 VP2 蛋白是 IPNV 的主要保护性抗原,含有主要的抗原位点,VP3 蛋白作为 IPNV 的内衣壳蛋白参与病毒粒子的组成^[9]。但 Moon 等^[25]将 IPNV VP3 和 VP2 基因分别在大肠杆菌表达后免疫虹鳟,通过 ELISA 和中和试验检测免疫后虹鳟血清的抗体效价,证实 VP3 蛋白较 VP2 蛋白具有更好的免疫原性。这与 Park 等^[11]的研究结果相符合。因此本试验选取 VP3 蛋白为研究对象,研究其抗原性,旨在为 VP3 基因结构与

功能的深入研究、建立 IPNV 的诊断方法和进一步研究抗 IPNV VP3 蛋白的免疫保护作用提供理论依据。

VP2 和 VP3 蛋白是检测 IPNV 的重要抗原,而原核表达的 VP2 蛋白多以包涵体形式存在^[26-28],纯化过程繁琐。本试验构建的原核表达载体系统表达的 VP3 蛋白以可溶形式存在,容易纯化,纯化后得到了单一的较纯的目的蛋白。通过 Western 和间接 ELISA 试验对 VP3 蛋白的抗原性进行分析。本试验制备的 VP3 蛋白可被兔抗 IPNV 阳性血清识别,反应条带单一,说明表达的 VP3 蛋白具有良好的反应原性。同时,本试验制备的兔抗 VP3 蛋白的血清可与 IPNV 特异反应,表明 VP3 蛋白也具有较好的免疫原性。有些物质能与抗体起反应,但本身不能诱导抗体的形成^[29],只具有反应原性而不具有免疫原性,应用范围相对较窄。在免疫防治方面,免疫原性更为重要。而本实验制备的 VP3 蛋白同时具有这两种特性,即具有抗原性。因此,VP3 蛋白可作为 IPNV 的检测抗原,同时可诱导动物机体产生特异性的免疫应答,还可以作为研究 IPNV 免疫保护的候选抗原基因。另外,VP3 蛋白完全可以代替全病毒制备抗原进行病毒繁殖,病毒纯化等繁琐工艺,这对于 IPNV 在细胞培养上繁殖周期长,培养难度大具有更重要的现实意义。本试验还制备了两种高效价的抗血清也为建立传染性胰腺坏死病的诊断方法奠定了基础。

参考文献:

- [1] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 第 2 版. 北京:科学出版社,1997.
- [2] Wolf K, Snieszko S, Dunbar C, et al. Virus nature of infectious pancreatic necrosis in trout[J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1960, 104(5): 105 - 108.
- [3] Roberts R J, Pearson M D. Infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon, *Salmo salar*[J]. Fish

- Diseases, 2005, 28(7): 383 - 390.
- [4] 江育林. 虹鳟传染性胰腺坏死病毒(IPNV)的初步研究[J]. 水生生物学报, 1989, 13(4): 353 - 358.
- [5] Dobos P. The molecular biology of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) [J]. Annual Review Fish Diseases, 1995, 5: 25 - 54.
- [6] Frost P, Havarstein L S, Lygren B, *et al.* Mapping of neutralization epitopes on infectious pancreatic necrosis virus [J]. J Gen Virol, 1995, 76(5): 1165 - 1172.
- [7] Heppell J, Tarrab E, Lecomte J, *et al.* Strain variability and localization of important epitopes on the major structural protein (VP2) of infectious pancreatic necrosis virus [J]. Virology, 1995, 214(1): 40 - 49.
- [8] Dobos P, Hallett R, Kells D T, *et al.* Biophysical studies of infectious pancreatic necrosis virus [J]. J Virol, 1977, 22(1): 150 - 159.
- [9] Hjalmarsson A, Carlmalin E, Everitt E. Identification of a VP3-containing ribonucleoprotein core structure and evidence for O-linked glycosylation of the capsid protein VP2 [J]. J Virol, 1999, 73: 3484 - 3490.
- [10] Tarrab E, Berthiaume L, Heppell J, *et al.* Antigenic characterization of serogroup 'A' of infectious pancreatic necrosis virus with three panels of monoclonal antibodies [J]. Gen Virol, 1993, 74(9): 2025 - 2030.
- [11] Park J W, Jeong G. Identification of VP3 as an important neutralising epitope from RTstrain, a Korean isolate of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 1996, 6: 207 - 219.
- [12] 刘新建, 李贵生. 国内鱼类病毒病研究进展 [J]. 生态科学, 2004, 23(3): 282 - 285.
- [13] Milne S A, Gallacher S, Cash P, *et al.* A reliable RT-PCR-ELISA method for the detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in farmed rainbow trout [J]. Journal of Virological Methods, 2006, 132(1): 92 - 96.
- [14] Ana I H, Sara I P, Sylvia R S. *In vitro* and *in vivo* immune responses induced by a DNA vaccine coding the VP2 gene of the infectious pancreatic necrosis virus [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2009, 27(2): 120 - 129.
- [15] McKenna B M, Fitzpatrick R M, Phenix K V, *et al.* Formation of infectious pancreatic necrosis virus-like particles following expression of Segment A by recombinant semliki forest virus [J]. Marine Biotechnology, 2001, 3(2): 103 - 10.
- [16] Shivappa R B, McAllister P E, Edwards G H, *et al.* Development of a subunit vaccine for infectious pancreatic necrosis virus using a baculovirus insect/larvae system [J]. Dev Biol Basel, 2005, 121: 165 - 174.
- [17] Thomas Allnutt F C, Robert M, Christopher G, *et al.* Antigenicity of infectious pancreatic necrosis virus VP2 subviral particles expressed in yeast [J]. Vaccine, 2007, 25(26): 4880 - 4888.
- [18] 江育林, 于平, 李正秋. 用酶联免疫吸附试验快速检测虹鳟的传染性胰脏坏死病毒 [J]. 水生生物学报, 1990, 14(3): 276 - 279.
- [19] 周建玲, 童裳亮, 宫云浩. 用生物素标记寡核苷酸 DNA 探针快速检测鱼传染性胰腺坏死病毒 IPNV [J]. 水产学报, 1995, 19(4): 310 - 314.
- [20] 刘兴发, 李红卫, 钟志宏, 等. 虹鳟鱼传染性胰腺坏死病毒反转录-聚合酶链氏反应的建立 [J]. 中国兽医科技, 1997, 27(11): 26 - 27.
- [21] Fridholm H, Eliasson L. Immunogenicity properties of authentic and heterologously synthesized structural protein VP2 of infectious pancreatic necrosis virus [J]. Immunology, 2007, 20(4): 635 - 648.
- [22] Guerrero L, Herrera E, Salinas J, *et al.* Detection and genotyping of an infectious pancreatic necrosis virus from asymptomatic rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) facilities in Mexico [J]. Intervirology, 2008, 51: 285 - 292.
- [23] Phenix K V, McKenna B, Fitzpatrick R, *et al.* Cell culture evaluation of the semliki forest virus expression system as a novel approach for antigen delivery and expression in fish [J]. Mar Biotechnol, 2000, 2: 27 - 37.
- [24] Ingerslev H C, Rønneseth A, Pettersen E F, *et al.* Differential expression of immune genes in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) challenged intraperitoneally or by cohabitation with IPNV [J]. Scandinavian Journal of Immunology Basic Immunology, 2008, 69(1): 90 - 98.
- [25] Moon C H, Do J W. Comparison of the immunogenicity of recombinant VP2 and VP3 of infectious pancreatic necrosis virus and marine birnavirus [J]. Archives of Virology, 2004, 149(10): 2059 - 2068.
- [26] Petter F, Knut B, Curt E, *et al.* Analysis of the antibody response in Atlantic salmon against recombinant VP2 of infectious pancreatic necrosis

- virus (IPNV) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 1998, 8(6): 447-456.
- [27] Baney X. Recombinant protein expression in *Escherichia coli* [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 1999, 10(5): 411-421.
- [28] Marte B L, Suzanne B, Anthony E, *et al.* Antigenic comparison of a truncated form of VP2 of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus expressed in four different cell types [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2001, 11(3): 203-216.
- [29] 崔治中, 崔保安. 兽医免疫学[M]. 第1版. 北京: 中国农业出版社, 2004.

Prokaryotic expression of VP3 gene of infectious pancreas necrosis virus and antigenicity of expressed product

ZHAO Li-li, LIU Min, HA Zhuo, LIU Wei-wei, ZHAO Yong-xin,
GE Jun-wei, QIAO Xin-yuan, LI Yi-jing*

(College of Veterinary Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: Infectious pancreatic necrosis (IPN) virus, the etiologic agent of infectious pancreatic necrosis in salmonid fish, causes significant losses to the aquaculture industry. The gene for the viral inner capsid protein (VP3) was amplified by RT-PCR method from IPNV, and cloned into pET30b vector. The expression of recombinant plasmid pET30b-VP3 in *E. coli* BL21(DE3) was induced and detected by SDS-PAGE analysis. The predicted molecular weight for unmodified r-trunc VP3 was approximately 30 ku and this was found to be the case for *E. coli* protein. The amount of expression made up 30 percent of the bacteria protein total expression by thin layer scanning analysis. The results showed that the VP3 gene of IPNV can express successfully in *E. coli* BL21. The fusion protein was purified with ProBond™ resin from the suspension centrifuged and the antisera against VP3 protein was produced. The pET30b-VP3 fusion protein can be recognized by the positive serum of IPNV by Western-blotting analysis. The prepared antisera reacted specifically with IPNV antigen by indirect ELISA. The antisera against VP3 protein had OD values at least twice that obtained for the negative control serum at a dilution of 1:25 600. The results showed that the expressed VP3 protein was immunogenical and antigenical which is the same as the natural IPNV VP3 protein. In this experiment the IPNV VP3 protein was expressed successfully by using prokaryotic expression system. The expressed fusion protein was active and the antisera against VP3 protein were produced.

Key words: infectious pancreas necrosis virus(IPNV); VP3 gene; prokaryotic expression; antisera

Corresponding author: LI Yi-jing. E-mail: yijingli@163.com