



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110279854 A

(43)申请公布日 2019. 09. 27

(21)申请号 201910654291.9

(22)申请日 2019.07.19

(71)申请人 暨南大学

地址 510632 广东省广州市天河区黄埔大道西601号

(72)发明人 李蔚 易婉盈 周天鸿

(74)专利代理机构 广州市华学知识产权代理有限公司 44245

代理人 苏运贞

(51)Int.Cl.

A61K 39/12(2006.01)

A61P 31/20(2006.01)

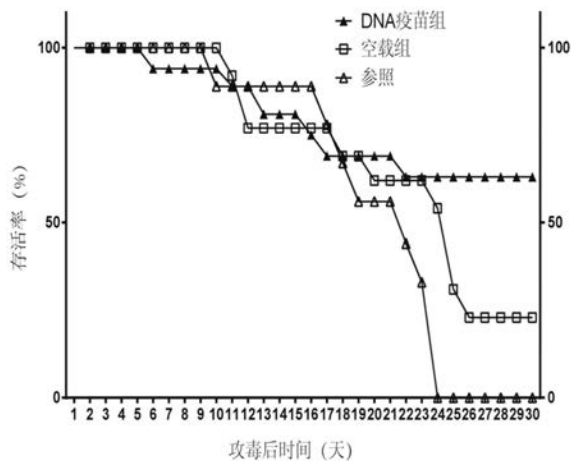
权利要求书1页 说明书4页
序列表5页 附图4页

(54)发明名称

一种大口黑鲈病毒DNA疫苗及其制备方法与应用

(57)摘要

本发明公开了一种大口黑鲈病毒DNA疫苗及其制备方法与应用。该DNA疫苗为含有大口黑鲈病毒MCP基因片段的重组质粒；MCP基因片段的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。本发明提供的DNA疫苗能显著引起大口黑鲈体内相关的特异性和非特异性免疫反应，对LMBV的攻毒起到良好的保护效果，免疫保护率达63%，可为后期大口黑鲈病毒DNA疫苗在生产应用及产业化生产中提供理论基础和科学依据。



1. 一种大口黑鲈病毒DNA疫苗,其特征在于:为含有大口黑鲈病毒MCP基因片段的重组质粒;MCP基因片段的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。

2. 根据权利要求1所述的大口黑鲈病毒DNA疫苗,其特征在于:所述的MCP基因片段通过人工合成得到,或是从大口黑鲈病毒LMBV-C基因组PCR扩增得到。

3. 权利要求1或2所述的大口黑鲈病毒DNA疫苗的制备方法,其特征在于包括如下步骤:将大口黑鲈病毒MCP基因片段插入到真核表达载体中,获得大口黑鲈病毒DNA疫苗。

4. 根据权利要求3所述的大口黑鲈病毒DNA疫苗的制备方法,其特征在于:所述的真核表达载体为带Flag标签的真核表达质粒。

5. 根据权利要求4所述的大口黑鲈病毒DNA疫苗的制备方法,其特征在于:所述的真核表达质粒为pCDNA3.1(+)

6. 权利要求1所述的大口黑鲈病毒DNA疫苗在养殖鱼类大口黑鲈病毒防治中的应用。

7. 根据权利要求7所述的应用,其特征在于:将权利要求1所述的大口黑鲈病毒DNA疫苗通过胸鳍基部注射方式给药,给药浓度为30~50μg/尾。

一种大口黑鲈病毒DNA疫苗及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药技术领域,具体涉及一种大口黑鲈病毒DNA疫苗及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)是我国淡水养殖的重要经济鱼类之一,近几年中国市场对大口黑鲈的需求量在不断增大,2017年全国大口黑鲈养殖比2016年增长31.57%,增长速度为淡水养殖鱼类之首。

[0003] 大口黑鲈养殖规模在不断增大,大口黑鲈的疾病特别是病毒性疾病的爆发也越频繁。大口黑鲈病毒(Largemouth bass virus,LMBV)属于虹彩病毒科蛙病毒属成员之一,对大口黑鲈具有极高的致病性,可造成大口黑鲈的高死亡率。目前,国内外对于LMBV病毒的有效治疗手法尚无报道,民间多采用保守性的预防措施为主,例如科学饲养、及时消毒等。因此,对于LMBV造成的经济损失仍未得到有效的止损。

[0004] 因此,迫切需要研制出一种能有效预防针对LMBV爆发的疫苗,寻求新的治疗手法。

发明内容

[0005] 本发明的首要目的在于克服现有技术的缺点与不足,提供一种大口黑鲈病毒DNA疫苗。

[0006] 本发明的另一目的在于提供上述大口黑鲈病毒DNA疫苗的制备方法。

[0007] 本发明的再一目的在于提供上述大口黑鲈病毒DNA疫苗的应用。

[0008] 本发明的目的通过下述技术方案实现:

[0009] 一种大口黑鲈病毒DNA疫苗,为含有大口黑鲈病毒(LMBV)主衣壳蛋白(MCP)基因片段的重组质粒;MCP基因片段的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0010] 所述的MCP基因片段可通过人工合成得到,或是从大口黑鲈病毒LMBV-C基因组PCR扩增得到。

[0011] 所述的大口黑鲈病毒LMBV-C基因组是抽提大口黑鲈病毒LMBV-C得到的基因组DNA。

[0012] 上述大口黑鲈病毒DNA疫苗的制备方法,包括如下步骤:将大口黑鲈病毒(LMBV)主衣壳蛋白(MCP)基因片段插入到真核表达载体中,获得大口黑鲈病毒DNA疫苗。

[0013] 所述的真核表达载体优选为带Flag标签的真核表达质粒。

[0014] 所述的真核表达质粒优选为pCDNA3.1(+).

[0015] 上述的DNA疫苗在养殖鱼类大口黑鲈病毒防治中的应用。

[0016] 在所述的应用中,DNA疫苗通过胸鳍基部注射方式给药,给药浓度优选为30~50μg/尾,更优选为40μg/尾。

[0017] 本发明相对于现有技术具有如下的优点及效果:

[0018] 本发明制备的针对大口黑鲈病的DNA疫苗能显著引起鱼体内相关的特异性和非特

异性免疫反应,对LMBV的攻毒起到良好的保护效果,免疫保护率达63%,可为后期DNA疫苗在生产应用及产业化生产中提供理论基础和科学依据。

附图说明

[0019] 图1为利用RT-qPCR和Western Blot实验方法检测MCP基因表达水平结果图;图中,A为RT-qPCR检测结果图,B为Western Blot检测结果图。

[0020] 图2为血清中和抗体效价鉴定结果图。

[0021] 图3为白细胞分类结果图;图中,A为嗜中性粒细胞的检测结果图,B为单核细胞的检测结果图,C为淋巴细胞的检测结果图。

[0022] 图4为免疫相关基因的表达分析结果图;图中,A为肝脏中白细胞介素-1 β 的检测结果图,B为脾脏中白细胞介素-1 β 的检测结果图,C为头肾中白细胞介素-1 β 的检测结果图,D为肝脏中白细胞介素-8的检测结果图,E为脾脏中白细胞介素-8的检测结果图,F为头肾中白细胞介素-8的检测结果图,G为肝脏中肿瘤坏死因子- α 的检测结果图,H为脾脏中肿瘤坏死因子- α 的检测结果图,I为头肾中肿瘤坏死因子- α 的检测结果图,J为肝脏中抗病毒基因的检测结果图,K为脾脏中抗病毒基因的检测结果图,L为头肾中抗病毒基因的检测结果图。

[0023] 图5为攻毒实验结果图。

具体实施方式

[0024] 下面结合实施例及附图对本发明作进一步详细的描述,但本发明的实施方式不限于此。

[0025] 实施例1 DNA疫苗的制备

[0026] (1) 构建表达LMBV-MCP蛋白的重组质粒:

[0027] 根据NCBI上LMBV的MCP基因序列(GenBank:FR682503.1),设计并合成特异性引物对,引物由华大基因公司合成,引物的序列如表1所示:

[0028] 表1 PCR获取MCP基因片段的引物序列

[0029]

目的基因	正向引物MCP-F1 (5' -3')	反向引物MCP-R1 (5' -3')
MCP	CGGGATCCGCCACCATGTCTTCTGTTACGG	CGGAATTCAGGATGGGGAAACCCATGG

[0030] 取大口黑鲈病毒LMBV-C(由中山大学何建国实验室馈赠,并已在文献“陈镇生.一株大口黑鲈病毒(LMBV)的分离、鉴定及特性分析[D].硕士学位论文,中山大学,2014”中公开)。用病毒DNA提取试剂盒(OMEGA,Viral DNA Kit)参照《分子克隆试验指南》中的方法抽提基因组DNA,以此为模板通过PCR技术进行扩增,获得MCP基因全长。

[0031] PCR扩增的反应体系为:病毒基因组DNA模板1 μ L、引物(MCP正向引物/反向引物)各2 μ L,PrimeSTART MAX DNA聚合酶(2 \times) 25 μ L,ddH₂O补足至50 μ L。

[0032] PCR扩增的反应条件为:95 $^{\circ}$ C预变性5min;95 $^{\circ}$ C变性30s;58 $^{\circ}$ C退火30s;72 $^{\circ}$ C延伸1.5min,35个循环;72 $^{\circ}$ C延伸10min。

[0033] 通过上海生工公司人工合成3 \times Flag标签模板,再人工合成分别带EcoRI酶切位点的正向引物和带XbaI酶切位点的反向引物,引物的序列如表2所示,进行PCR扩增,纯化后,用内切酶EcoRI和XbaI对pCDNA3.1(+)和3 \times Flag片段进行双酶切并回收纯化,后将两者进

行连接,获得含有3×Flag标签的pCDNA3.1(+)质粒。其中,3×Flag标签模板的序列如下:

[0034] 5'-GACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATCGATTACAAGGATGACGATGACAA GTAA-3'。

[0035] 通过分子克隆技术,用内切酶BamHI和EcoRI对PCR产物和上述3×Flag标签的pCDNA3.1(+)质粒进行双酶切后回收,通过连接得到含有MCP基因片段的重组质粒。

[0036] 表2 PCR获取3×Flag基因片段的引物序列

[0037]

目的基因	正向引物3×Flag F1 (5'-3')	反向引物3×Flag R1 (5'-3')
3×Flag	GGAATTCGACTACAAAGACCATG	GCTCTAGATTACTTGTCATCGTCATCC

[0038] (2) 构建好的重组质粒在细胞中进行表达分析:

[0039] 将步骤(1)得到的无内毒素重组质粒常规(脂质体转染法,转染试剂为高效真核转染试剂(GenStar),DNA:转染试剂=1:3)转染鱼类细胞鲤鱼表皮瘤细胞系(EPC)(由中山大学何建国老师实验室馈赠,已在文献“王晓红,翁少萍,何建国.虎纹蛙病毒体外培养及其理化特性.水产学报,2002,26(4):363-366”中公开),转染48h后,通过RT-PCR对MCP基因表达进行鉴定,引物序列如表3所示,检测结果如图1A所示,结果表明重组质粒在细胞中可转录出MCP片段;其中,RT-PCR的反应体系和反应条件如下:转染EPC的cDNA样品1μL、引物(MCP正向引物/反向引物)各1μL,Premix Ex Taq DNA聚合酶(2×)10μL,ddH₂O补足至20μL;95℃预变性5min;95℃变性30s;60℃退火30s;72℃延伸50s,35个循环;72℃延伸10min。用抗Flag抗体(SIGMA-Aldrich)参照《分子克隆试验指南》中的Western Blot方法对MCP蛋白表达进行鉴定,检测结果如图1B所示。

[0040] 表3RT-PCR鉴定MCP基因表达的引物序列

[0041]	MCP	正向引物MCP-F2 (5'-3')	CGATCAAGCAGGAGCTAGGG
		反向引物MCP-R2 (5'-3')	GGCAGACAGAGACACGTTGA
	β-actin	正向引物(5'-3')	CAGGATGCAGAAGGAGATCACA
		反向引物(5'-3')	CTCCTGCTTGCTGATCCACAT

[0042] RT-PCR结果表明,重组质粒在细胞中可转录出MCP片段;Western Blot结果得出,重组质粒能正确表达MCP目的蛋白。因此,重组质粒即为DNA疫苗,可应用于后期免疫试验。

[0043] 将得到的重组质粒保存于-20℃冰箱中,用于后期免疫。

[0044] 实施例2 DNA疫苗免疫活体大口黑鲈并验证免疫效果

[0045] 将180尾健康的大口黑鲈(来自广东佛山市一大口黑鲈养殖场)随机分成3组,每组60尾,分别为DNA疫苗组、空载组和参照组(PBS组)。采用胸鳍基部注射法对大口黑鲈进行免疫,DNA疫苗组:每尾鱼注射重组质粒40μg(溶于100μL无菌PBS);空载组:每尾鱼均注射空载质粒40μg(溶于100μL无菌PBS);参照组:每尾鱼注射无菌PBS 100μL。分别在免疫后的第1、7、14、21、28天收集每组鱼的血液和组织,进行白细胞分类、血清中和抗体效价鉴定及免疫相关基因的表达分析。

[0046] 每组随机取3尾大口黑鲈,尾静脉采血,室温静置1h,4℃静置12h,4000r/min离心10min取上层血清,用于抗体效价的测定。血清中和抗体效价鉴定结果如图2所示,DNA疫苗组的血清中和抗体效价极显著高于对照组,引起了显著的抗体反应。

[0047] 上述每组随机取的3尾大口黑鲈,尾静脉采血,加抗凝剂用于白细胞分类计数。白

细胞分类结果如图3所示,鱼体内嗜中性粒细胞和单核细胞在白细胞中占比显著升高,淋巴细胞占显著降低,引起了一定的炎症反应。

[0048] 取各组大口黑鲈的肝脏、脾脏、头肾,使用Trizol (Takara公司) 试剂提取总RNA并进行逆转录,获得cDNA,对cDNA进行实时荧光定量PCR,其中,反应体系:SYBR Premix Ex Taq II (2×) 10μL,引物(正/反引物)各0.8μL,R0X Reference Dye II (50×) 0.4μL,cDNA模板2μL,ddH₂O 6μL,总共20μL体系;反应条件:95℃预变性2min;95℃变性10s,60℃退火34s,循环次数40次。溶解曲线反应条件:95℃15s;60℃1min,95℃15s。以鉴定免疫相关基因白细胞介素-1β (IL-1β)、白细胞介素8 (IL-8)、肿瘤坏死因子-α (TNF-α)、抗病毒基因 (Mx) 的表达。引物序列见表4。免疫相关基因的表达分析结果如图4所示,免疫相关基因在DNA疫苗组呈极显著上调现象,引起了有效的非特异性免疫反应。

[0049] 表4 PCR鉴定大口黑鲈中免疫相关基因表达的引物序列

[0050]	IL-1β	正向引物IL-1β-F(5'-3')	TGGTGGAAAACAGCATGGAGC
		反向引物IL-1β-R(5'-3')	AGGGTGCACGTAGTTCGACA
	IL-8	正向引物IL-8-F(5'-3')	GAGTTTGAGGAGCCTGGGTGT
		反向引物IL-8-R(5'-3')	GGGTCCAGGCAAACCTCTTG
	TNF-α	正向引物TNF-α-F(5'-3')	ACTTCGTCTACAGCCAGGCA
		反向引物TNF-α-R(5'-3')	AGTAACGCGAGACCCTGTGG
	Mx	正向引物Mx-F(5'-3')	TAAAATGGCTGGGGGTCGGGG
		反向引物Mx-R(5'-3')	CATTGCACGGAACGACCACC

[0051] 实施例3攻毒试验

[0052] 将免疫了30天后的大口黑鲈进行LMBV的攻毒试验,攻毒用的LMBV为LMBV-C病毒株,攻毒浓度为 4.8×10^7 TCID₅₀/mL,攻毒剂量为200μL/尾。逐日观察鱼体的死亡情况,及时记录死亡数,各组大口黑鲈的存活率比较分析结果如图5所示。在鱼体死亡趋于平缓时,计算免疫保护率(Relative Percent Survival,RPS) = (1-免疫组死亡率/对照组死亡率)。结果表明,DNA疫苗对大口黑鲈的免疫保护率达63%,极显著高于对照组。

[0053] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

- <110> 暨南大学
 <120> 一种大口黑鲈病毒DNA疫苗及其制备方法与应用
 <160> 18
 <170> SIPOSequenceListing 1.0
 <210> 1
 <211> 1392
 <212> DNA
 <213> 大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*)
 <220>
 <223> MCP基因片段核苷酸序列

<400> 1

atgtcttctg ttacgggttc tggcatcact agcgggttca ttgatctcgc cacttatgac	60
agccttgaca aagcgctgta cggtggaaaa gatgcaacta cttatttcgt caaagagcat	120
tatcccgtgg gttggtttac caaactgcct acggctgcc aaaaaacttc tggtagcct	180
gctttcgggc agcacttttc cgtaggagtg cccaggtcgg gcgactatgt gctcaactct	240
tggctggtcc tcaagacccc ccagattaaa ctgctggcgg ccaaccagtt taacaatgac	300
ggtaccatca gatggacca aaatctcatg cacaacgttg tggagcacgc cgcactctcg	360
ttcaacgaga ttcaggccca gcagttaac actgctttcc tggacgcctg gaacgagtac	420
accatgcccg aggccaagcg catcggctac tacaacatga ttggcaacac tagcgatctc	480
gtcaatcccg ccccgccac cggcgaagca ggagctaggg tcctgcccgc caaaaacctt	540
gtccttcctc tccccttctt tttcggcaga gacagcgggc tggccctgcc tacagtcacc	600
ctgccttaca acgaaattag aatcaccatc agcctgagat ccattcagga tctcctgatt	660
cttcagcaca agacgaccgg agaagtcaag cccatcgttg ccacagatct ggaaggaggt	720
ctcccagaca cggtagaggc tcacgtctac atgactgtgg gtctggtgac tgccgccgag	780
cgtcaggcta tgagcagctc agtcaggac atggtggtgg agcagatgca gatggctccg	840
gtccacatgg tcaaccccaa gaacgccacc gtctttcacg cagacctgcg cttttccac	900
gccgtcaaag cgctcatgtt tatggtgcaa aacgtcactc acaagtctgt gggttccaac	960
tacacttgcg tcaactcctgt tgttgagcgg ggtaacaccg tcctggagcc cgccctggcc	1020
gtcgatccgg tcaagagcgc cagtctggtg tacgaaaaca ctaccaggct tccagacatg	1080
agcgtagagt actattccct ggtgcagccc tggtagctac caccgccc tccatcagc	1140
actggccacc acctctactc ttacgcctg agcctcaacg atcctcacc ttcagggtct	1200
accaatttcg gtcgcctgac caacgcaagc atcaacgtgt ctctgtctgc cgaggccgga	1260
actgccgccg gaggaggagg ggcagacaac tctggctaca aaaaccctca gaaatacgcc	1320
ctgggtgtca tggccatcaa ccacaacatt atccgcatca tgaacggttc catgggtttc	1380
cccatcctgt aa	1392

- <210> 2
 <211> 30
 <212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> PCR获取MCP基因片段的正向引物序列	
<400> 2	
cgggatccgc caccatgtct tctgttacgg	30
<210> 3	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> PCR获取MCP基因片段的反向引物序列	
<400> 3	
cggaattcca ggatggggaa acccatgg	28
<210> 4	
<211> 69	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 3×Flag标签模板序列	
<400> 4	
gactacaaag accatgacgg tgattataaa gatcatgaca tcgattacaa ggatgacgat	60
gacaagtaa	69
<210> 5	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> PCR获取3×Flag基因片段的正向引物序列	
<400> 5	
ggaattcgac tacaaagacc atg	23
<210> 6	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> PCR获取3×Flag基因片段的反向引物序列	
<400> 6	
gctctagatt acttgtcatc gtcattcc	27
<210> 7	

<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	PCR鉴定MCP基因表达的正向引物序列	
<400>	7	
cgatcaagca ggagctaggg		20
<210>	8	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	PCR鉴定MCP基因表达的反向引物序列	
<400>	8	
ggcagacaga gacacgttga		20
<210>	9	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	β -actin正向引物序列	
<400>	9	
caggatgcag aaggagatca ca		22
<210>	10	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	β -actin反向引物序列	
<400>	10	
ctcctgcttg ctgatccaca t		21
<210>	11	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	IL-1 β 正向引物序列	
<400>	11	
tggtggaaaa cagcatggag c		21

<210>	12	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	IL-1 β 反向引物序列	
<400>	12	
	agggtgcacg tagttcgaca	20
<210>	13	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	IL-8正向引物序列	
<400>	13	
	gagtttgagg agcctgggtg t	21
<210>	14	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	IL-8反向引物序列	
<400>	14	
	gggtccaggc aaacctcttg	20
<210>	15	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	TNF- α 正向引物序列	
<400>	15	
	acttcgtcta cagccaggca	20
<210>	16	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	TNF- α 反向引物序列	
<400>	16	

agtaacgcga gaccctgtgg	20
<210> 17	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> Mx正向引物序列	
<400> 17	
taaaatggct ggggtcgggg	20
<210> 18	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> Mx反向引物序列	
<400> 18	
cattgcacgg aacgaccacc	20

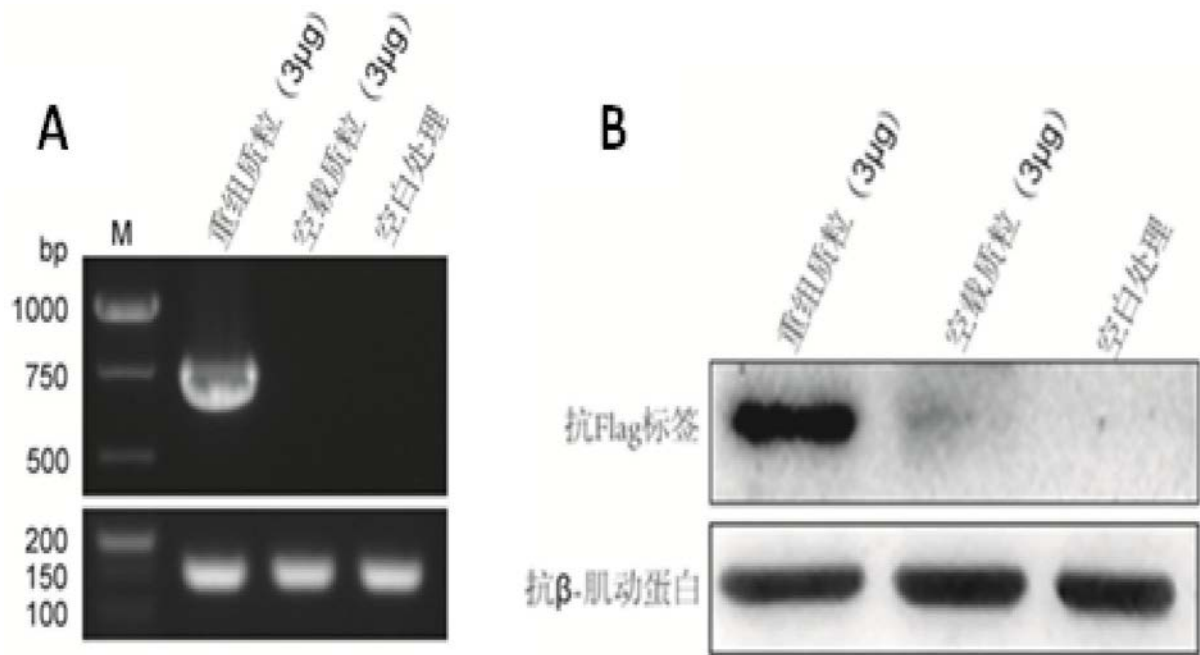


图1

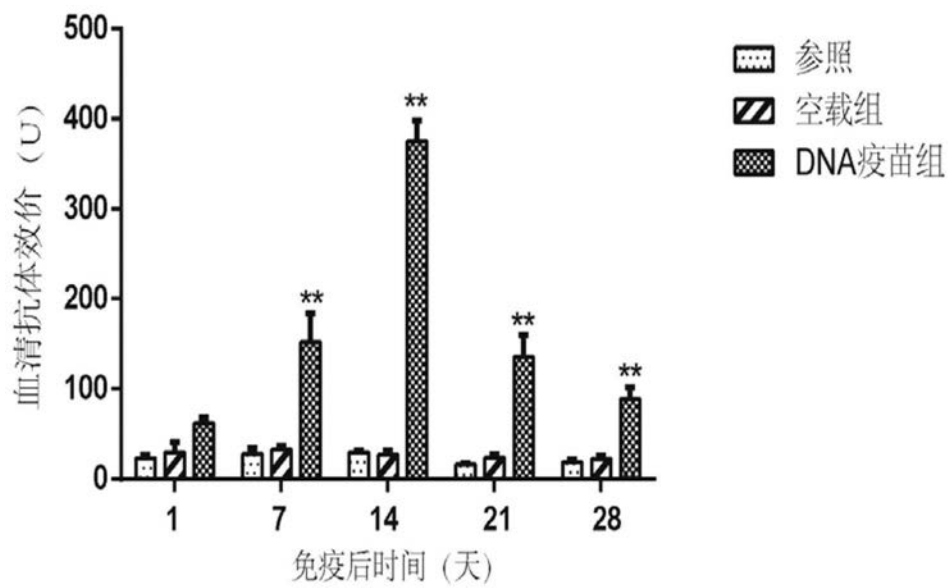
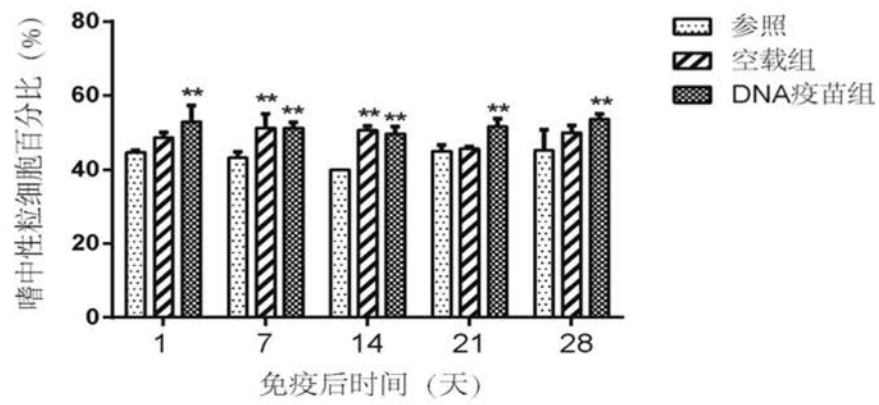
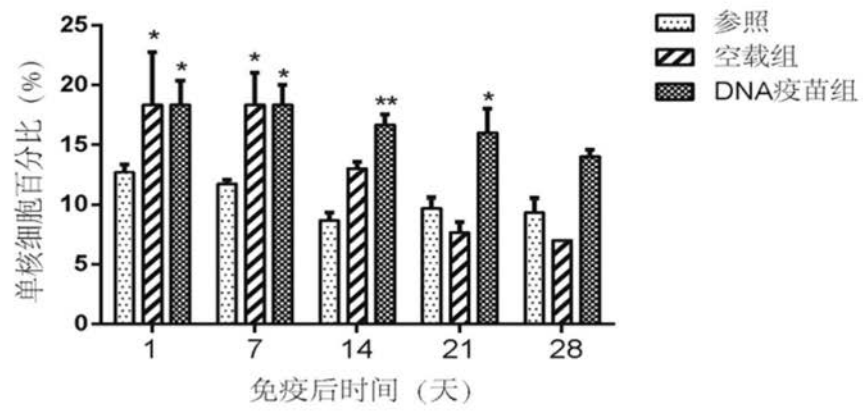


图2

A



B



C

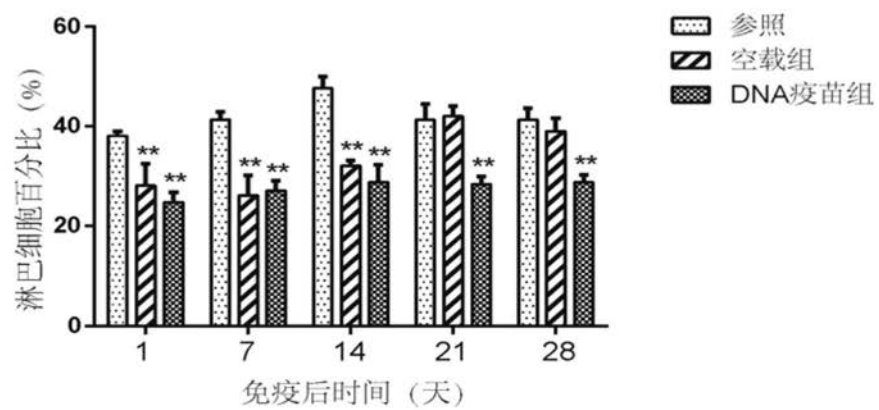


图3

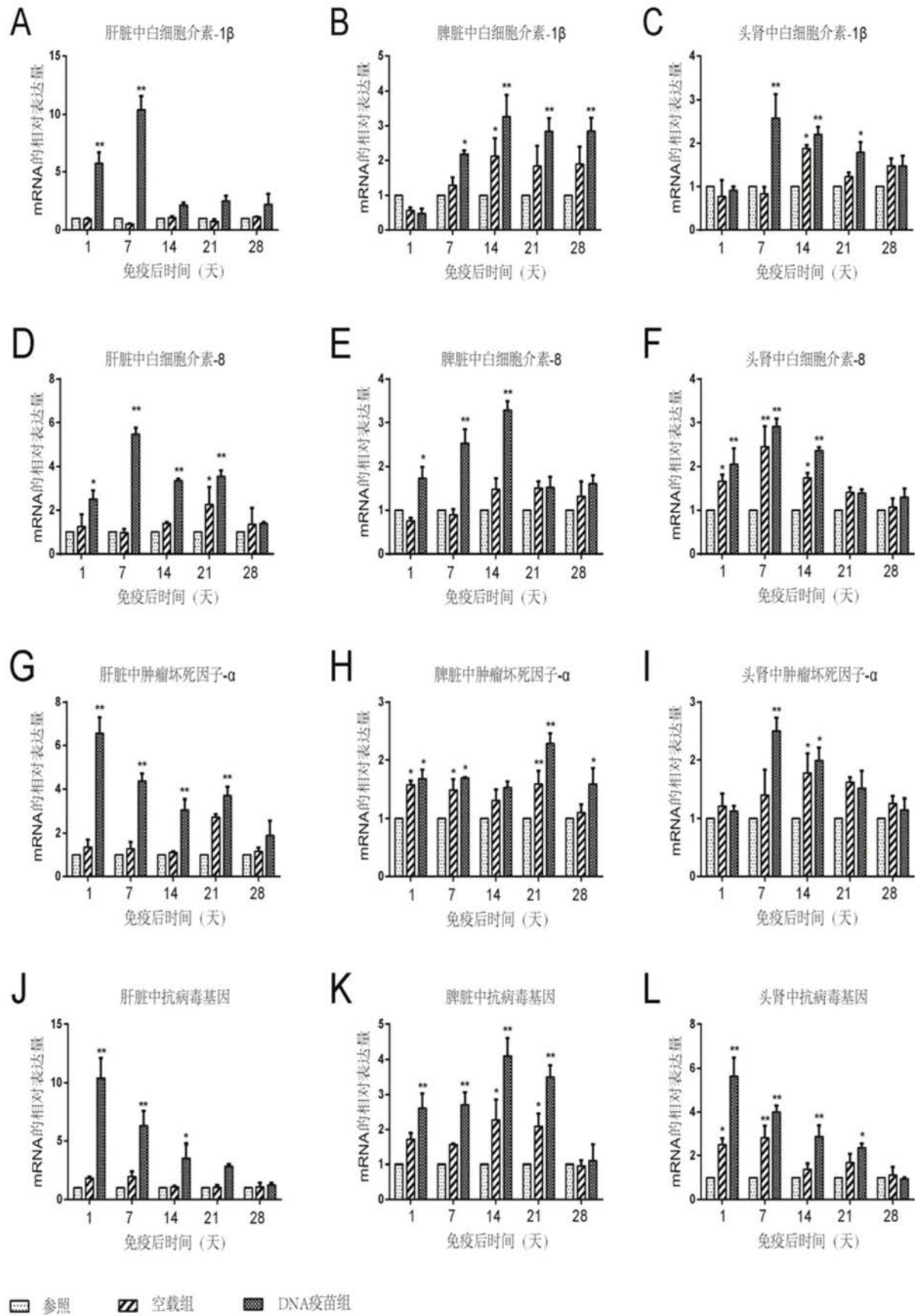


图4

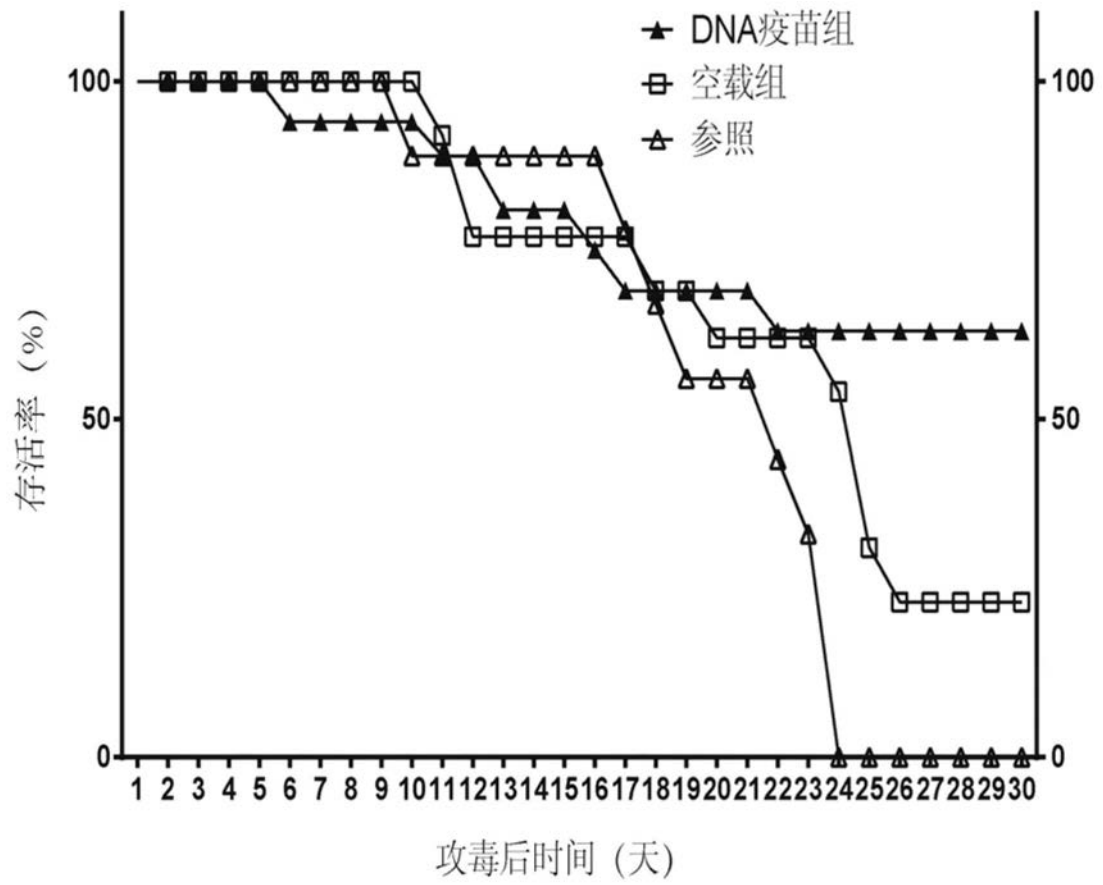


图5