

斑点叉尾鮰病毒多克隆抗体的制备 及其生物活性鉴定

吴兵¹ 罗宇良¹ 王敏¹ 曹胜波²
王卫民¹ 陈龙² 黄锋涛¹ 刘学芹¹

1. 华中农业大学水产学院/农业动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室, 武汉 430070;

2. 华中农业大学动物医学院, 武汉 430070

摘要 利用斑点叉尾鮰卵巢细胞增殖斑点叉尾鮰病毒,然后将经过超速离心纯化的病毒免疫4周龄BABL/C雌鼠。每2周免疫1次,第4次免疫2周后,经眼眶采血,分离血清,通过酶联免疫吸附试验检测其抗体效价,并利用间接免疫荧光试验和与病毒孵育试验检测所制备多克隆抗体的生物活性。结果表明,制备的多克隆抗体ELISA效价为1:25 600,间接免疫荧光试验证明该多克隆抗体特异性良好,同时与病毒的孵育试验证明该多克隆抗体具备中和活性,能够有效阻断斑点叉尾鮰病毒对细胞的感染。

关键词 斑点叉尾鮰病毒;多克隆抗体;制备;效价;生物活性

中图分类号 S 941 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2011)05-0631-04

斑点叉尾鮰病毒(*Ictalurid herpesvirus-1*,又名 channel catfish virus,简称CCV)最先由Fijan等^[1]从驯养的患病斑点叉尾鮰分离得到,是人类最早发现的鱼类疱疹病毒。该病毒是引发斑点叉尾鮰病毒性疾病(channel catfish virus disease,CCVD)的主要病原,可以导致严重的出血性毒血症。该病在夏季水温25~30℃时可广泛流行,传播速度快,病程短,死亡率高^[2]。发病鱼表现为鳍基部出血或充血,腹部和尾柄处充血,腹腔部膨胀,临死前病鱼反应迟钝,眼球突出,侧翻^[2-4]。尽管我国目前尚无发生CCVD的正式报道,但近年来国内已有疑似病例的流行和发病,给斑点叉尾鮰的养殖造成了巨大的经济损失^[5-6],因此,开展CCV疫苗、诊断试剂等相关研究已迫在眉睫。

目前,国内外关于CCV的检测最常用的是PCR方法^[7],也有一些基于PCR的新方法被用于CCV的检测^[8-9]。这些PCR方法虽然敏感性高、特异性强,但也存在技术和设备要求高、周期长、易出现假阳性等缺陷,不适合于临床大规模流行病学调查。因此迫切需要开展CCV的临床快速检测方法

研究,尤其是血清学快速检测方法研究,为尽快掌握CCV在我国斑点叉尾鮰养殖中的流行现状、疫情的预警预报提供有效工具。本研究利用纯化的CCV病毒制备多克隆抗体,并对制备的抗体进行生物活性检测,旨在为建立检测CCV抗体和抗原的诊断方法、相关蛋白功能检测等研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试动物、毒株、细胞及主要试剂

健康BABL/C 4周龄雌性小白鼠,购自湖北省疾病预防控制中心;CCV和斑点叉尾鮰卵巢细胞(channel catfish ovary cell,CCO)由华中农业大学水产学院提供;辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠IgG抗体,购自武汉博士德生物公司;底物液A、B为显色液,购自武汉科前动物生物制品有限责任公司。

1.2 病毒纯化

将CCV病毒接种铺满单层的CCO细胞。当细胞产生90%病变(CPE)之后,收集细胞和上清,-80℃冻融1次,4℃1 000 r/min离心20 min,去

收稿日期:2010-12-23

基金项目:国家自然科学基金项目(30901118)、教育部新教师基金项目(20070504047)、湖北省自然科学基金项目(2008CBB099)

吴兵,硕士研究生,研究方向:水产动物病毒学。E-mail:bing_wu_0601@163.com

通讯作者:刘学芹,博士,副教授。研究方向:水产动物病毒学。E-mail:xueqinliu@mail.hzau.edu.cn

掉杂质,收集上清液,再用 50%蔗糖垫底,以 4 ℃ 25 000 r/min 超速离心 2.5 h,沉淀溶于适量 PBS 中,测定其浓度后进行分装,于-80 ℃ 保存。按同样的方法处理正常的 CCO 细胞作为对照。

1.3 免疫程序

用纯化的 CCV 病毒抗原免疫 4 周龄 BALB/C 小鼠,共免疫 4 次,每次间隔 2 周。初次免疫时抗原加等量弗氏完全佐剂,后 3 次加等量弗氏不完全佐剂,抗原免疫剂量均为每次每只 200 μg,免疫途径为颈背部多点皮下注射。

1.4 血清获取

四免后 14 d,眼眶采血,血样于室温放置 1 h,然后 4 ℃ 条件下 1 000 r/min 离心 20 min,收集上清即为制备的多抗血清,-20 ℃ 冻存。

1.5 酶联免疫吸附试验(ELISA)

用包被液(pH 9.6,0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液)将纯化的 CCV 病毒悬液抗原进行稀释后,按照 0.625 μg/孔的浓度包被聚丙烯酶标板,4 ℃ 过夜;弃去包被液,然后每孔加入 200 μL 洗涤液(含 0.05% Tween 20 的 0.01 mol/L pH 7.4 PBS, PBST)洗涤 4 次,每次 5 min,在干毛巾上拍干;每孔加入 100 μL 封闭液(含 1% BSA 的 PBS),37 ℃ 温育 1 h,拍干,洗板同前;加入 100 μL 适当稀释的多克隆抗血清(按 1:400 到 1:25 600 倍比稀释),对照组加入正常小鼠血清(按 1:400 到 1:25 600 倍比稀释以作阴性对照),37 ℃ 温育 30 min,洗涤同前;每孔加入 100 μL 适当稀释倍数的辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG 抗体,37 ℃ 温育 30 min,同上洗涤;加底物液 100 μL(底物液 A 50 μL,底物液 B 50 μL)显色 10 min,每孔加终止液 50 μL,于酶标

仪 630 nm 下测定光密度,保存结果。

1.6 间接免疫荧光检测多克隆抗体

将 CCO 细胞接种到 24 孔板,待细胞长到 80% 后,加入适量 CCV 悬液,28 ℃ 孵育 1 h,期间每隔 15 min 轻摇晃 1 次,之后吸弃 CCV 悬液,加入含 5% 胎牛血清的 DMEM 低糖培养基,置于 28 ℃ 培养、增殖,显微镜下观察,待细胞出现病变后分别用制备的多抗和正常小鼠血清作为一抗进行间接免疫荧光检测。加入 100% 甲醇固定 10 min。经 PBS 漂洗 3 次后,加入适当稀释倍数的多克隆抗体,28 ℃ 孵育 1 h,PBS 漂洗 3 次后,加入按 1:500 稀释的 Alexa Fluor goat anti-mouse IgG,28 ℃ 孵育 30 min,最后经过 PBS 漂洗 3 次后,通过荧光显微镜观察照相。

1.7 多克隆抗体中和活性检测

在 200 μL 的中和体系中,将 56 ℃ 灭活 30 min 的多克隆抗体从 1:4 至 1:2 048 倍比稀释,CCV 感染剂量为 100 PFU;多克隆抗体稀释液和病毒悬液充分混合,在 28 ℃ 孵育 1 h 后,加入 24 孔板培养的 CCO 细胞中,28 ℃ 温育 1 h 后,加细胞维持液,28 ℃ 培养箱中培养。阳性对照为 CCV 感染的 CCO 细胞,阴性对照为正常 CCO 细胞。接种后,每 12 h 在显微镜下观察细胞病变。

2 结果与分析

2.1 间接 ELISA 检测多克隆抗体的效价

检测结果如表 1,在抗原 1:800 包被孔、血清 1:25 600 稀释所得到的值为 0.615±0.084,与阴性对照组相比较差异极显著,且 P/N 值远远大于 2,因此可以鉴定为阳性,同时可判断血清的 ELISA 效价为 1:25 600。

表 1 间接 ELISA 检测多克隆抗体的效价

Table 1 Indirect ELISA to detect the titer of polyclonal antibody

组别 Group	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800	1:25600
多克隆抗体 Polyclonal antibody	1.605±0.106	1.458±0.200	1.478±0.201	1.307±0.204	1.071±0.321	0.824±0.137	0.615±0.084
空白对照 Control dilutions	0.158±0.009	0.141±0.009	0.136±0.015	0.128±0.021	0.131±0.020	0.136±0.022	0.141±0.024

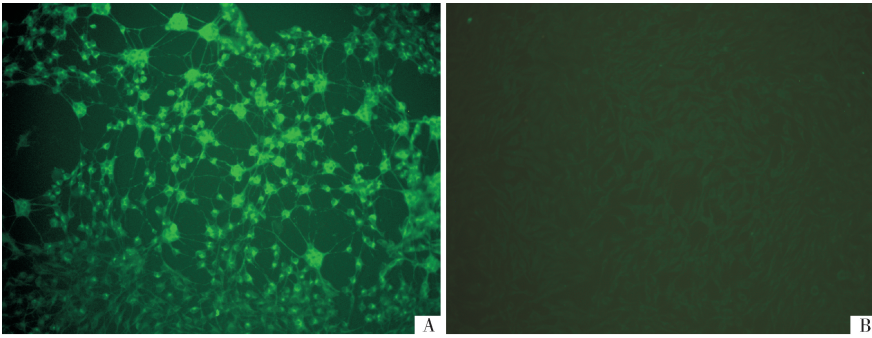
2.2 间接免疫荧光检测多克隆抗体

结果如图 1 所示,在荧光显微镜下可以观察到以多克隆抗体作为一抗的细胞中出现了特异性的绿荧光信号(图 1-A),而在正常小鼠血清作为一抗的细胞中未能观察到特异性绿色荧光信号(图 1-B),说明制备的多克隆抗体能够特异性地识别 CCV

抗原。

2.3 多克隆抗体中和活性检测

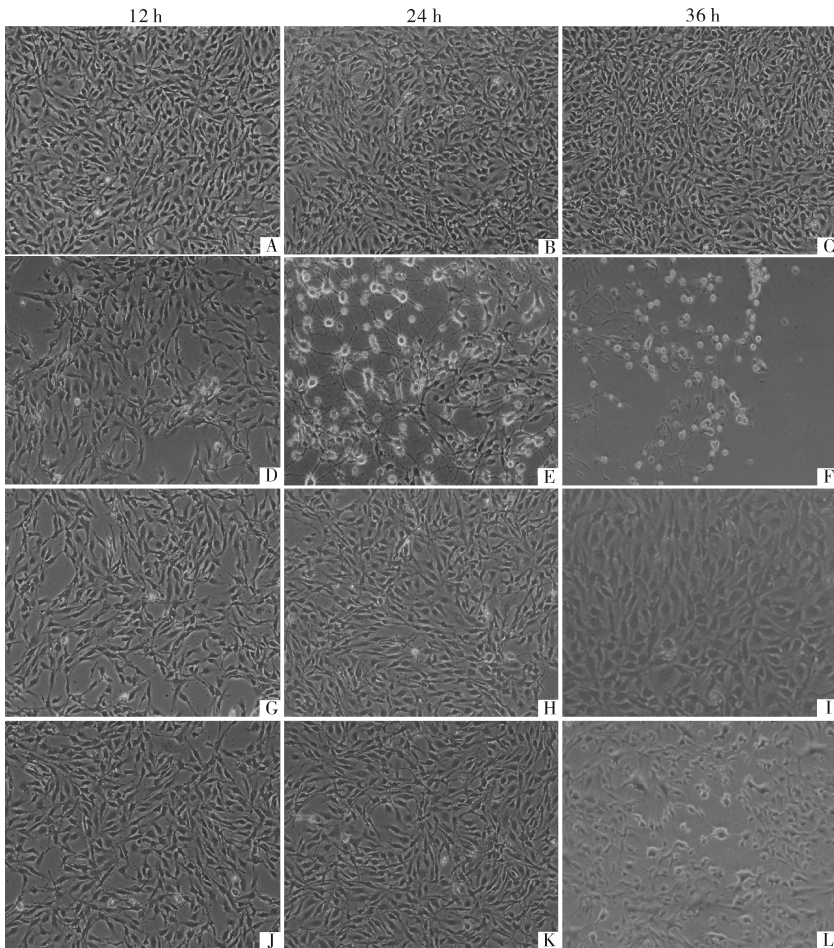
如图 2 所示,在 12 h 时,各组均未出现细胞病变。但 24 h 后,阳性对照组开始出现细胞病变,而其他组则仍未出现细胞病变,在 36 h 后,阳性对照组细胞已完全死亡,而血清稀释度为 1:512 组开始



A:多抗荧光照片 Immunofluorescence staining of CCV-infected CCO cells with polyclone antibody;
 B:正常小鼠血清荧光照片 Immunofluorescence staining of CCV-infected CCO cells with normal serum.

图 1 间接免疫荧光结果(100×)

Fig. 1 Indirect immunofluorescent assay



A-C:阴性对照 Negative control; D-F:阳性对照 Positive control; G-I:多克隆抗体组(1 : 256) Polyclone antibody(1 : 256); J-L:多克隆抗体组(1 : 512) Polyclone antibody(1 : 512).

图 2 多克隆抗体中和活性检测

Fig. 2 Detection of neutralization of polyclonal antibodies

出现细胞病变,血清稀释倍数较低的组均为出现病变,说明制备的多克隆抗体能够抑制 CCV 对 CCO 细胞的感染,具备中和 CCV 的活性。

3 讨 论

高滴度和高特异性抗体是建立血清学诊断方法

和开展相应病毒研究工作的重要材料。为保证获得高质量的抗体,本试验首先通过超高速离心纯化的方式获得纯度较高的病毒抗原,然后通过佐剂乳化后免疫小鼠获得抗体。本试验中,我们利用间接 ELISA 方法监测抗体效价增长规律,并在抗体 ELISA 效价达到 1 : 25 600 的时候采血、分离血清;而后又分别通过间接免疫荧光和病毒中和试验进行抗体生物活性评价。间接免疫荧光试验结果表明该多抗血清能够特异性地结合 CCV 病毒,说明制备的多抗具有较好的特异性。同时病毒中和试验表明该抗体能够特异性阻断 CCV 对 CCO 细胞的侵入,说明制备的多抗具有 CCV 中和活性,即使对多抗原液进行 1 : 256 稀释后,仍然能够有效抑制 CCV 的入侵,表明制备的多抗具有较好的中和活性。

近年来斑点叉尾鲷病毒性疾病的暴发和流行,给我国斑点叉尾鲷养殖造成了巨大的经济损失,并严重影响了该鱼的出口创汇。CCV 是引发斑点叉尾鲷病毒性疾病的主要病原之一。尽管目前我国尚无 CCV 暴发的正式报道,但近年来已有疑似病例出现。但究竟 CCV 在我国斑点叉尾鲷养殖中是否流行,流行情况如何,血清流行病学规律又如何等诸多问题仍急需解答。

本研究通过病毒纯化、抗体效价检测、抗体生物学活性检测等试验,证实获得了较高质量的 CCV

多克隆抗体,此抗体为用小鼠制备单克隆抗体的中间产物,证明抗原免疫效果较好,为单克隆抗体的制备奠定了较好的基础,也为 CCV 血清学检测方法、蛋白功能等相关研究提供了重要材料。

参 考 文 献

- [1] FIJAN N N. Progress report on acute mortality of channel catfish fingerlings caused by a virus[J]. Bulletin-Office International des Epizooties, 1968, 69(7): 1167-1168.
- [2] 陈昌福. 斑点叉尾鲷主要疾病与防治对策[J]. 科学养鱼, 2004 (12): 12-13.
- [3] 杨凡, 袁万安. 斑点叉尾鲷病毒宿主研究[J]. 中国预防兽医学报, 2009, 31(11): 838-841.
- [4] 刘玉林, 王敏, 王卫民. 斑点叉尾鲷病毒性疾病综述[J]. 水利渔业, 2006, 26(6): 84-86.
- [5] 孟彦, 肖汉兵, 曾令兵. 斑点叉尾鲷病毒病研究概述[J]. 淡水渔业, 2006, 37(5): 72-75.
- [6] 耿毅, 汪开毓. 斑点叉尾鲷疑似疱疹病毒感染的病理形态学观察[J]. 中国兽医学报, 2005, 25(6): 636-642.
- [7] BOYLE J, BLACKWELL J. Use of polymerase chain reaction to detect latent channel catfish virus[J]. Am J Vet Res, 1991, 52(12): 1965-1968.
- [8] 李慧芳, 刘荏, 吕建强, 等. TaqMan 实时荧光 PCR 快速检测斑点叉尾鲷病毒[J]. 长江大学学报, 2008, 5(1): 42-46.
- [9] 杜玉东. 斑点叉尾鲷疱疹病毒核酸探针检测方法的研究[D]. 武汉: 华中农业大学图书馆, 2009.

Preparation and bioactivity of polyclonal antibody against channel catfish virus

WU Bing¹ LUO Yu-liang¹ WANG Min¹ CAO Sheng-bo²
WANG Wei-min¹ CHEN Long² HUANG Feng-tao¹ LIU Xue-qin¹

1. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University/Key Laboratory of Agricultural Animal Genetics, Breeding and Reproduction of Ministry of Education, Wuhan 430070, China;

2. College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract Channel catfish virus was propagated in the channel catfish ovary cell line and then purified by ultracentrifugation. This purified virus was used to immunize the female BALB/C mice to gain polyclonal antibody. ELISA was used to detect the antibody titer. The bioactivity was identified by indirect immunofluorescent assay and serum neutralization tests. The ELISA titer of the polyclonal antibody was 1 : 25 600. The polyclonal antibody showed high specificity at the indirect immunofluorescent assay. It could stop the virus from infecting the cell efficiently.

Key words channel catfish virus; polyclonal antibody; preparation; antibody titer; bioactivity

(责任编辑:边书京)