

斜带石斑鱼神经坏死病毒主衣壳蛋白抗体的制备

陈晓艳^{1,2}, 何建国¹

(1. 中山大学 生命科学学院, 广东 广州 510275; 2. 暨南大学 生物工程学系, 广东 广州 510632)

摘要:将含有斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)神经坏死病毒(orange-spotted grouper nervous necrosis virus, OGNNV)的主衣壳蛋白(main capsid protein, MCP)基因的重组质粒 pET32a-MCP 转入大肠杆菌 BL21 后, 用异丙基硫代- β -D-半乳糖(IPTG)诱导表达, 用柱层析纯化表达的融合蛋白作为抗原免疫新西兰大白兔, 制备抗 MCP 融合蛋白的血清。用 ELISA 方法检测抗血清的效价, 用 Western-blot 检测抗血清的特异性。结果显示, 获得的抗血清稀释 1:22 000 倍时仍呈阳性, 并能有效中和 OGNNV, 实验组的相对存活率达 54.50%。这说明, 本研究用纯化的 MCP 融合蛋白制备兔抗 OGNNV MCP 抗体是成功的, 并证实了 OGNNV 主衣壳蛋白的免疫原性。本研究旨在重组表达主衣壳蛋白基因制备抗 OGNNV 疫苗提供科学依据, 并为进一步研究提供重要的实验材料。[中国水产科学, 2006, 13(5): 841-844]

关键词:斜带石斑鱼神经坏死病毒; 主衣壳蛋白; 抗体

中图分类号: S941 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2006)05-0841-04

斜带石斑鱼神经坏死病毒(orange-spotted grouper nervous necrosis virus, OGNNV)于2000年由本实验室首次发现并对其进行研究^[1]。该病毒隶属于 β 诺达病毒属(*Betanodavirus*)的RGNNV(red-spotted grouper nervous necrosis virus)血清型^[1-2]。OGNNV基因组由2个片段组成:RNA1和RNA2, RNA1由3 103个核苷酸组成, 含有1个编码病毒依赖RNA的RNA聚合酶(RdRp)的开放阅读框(ORF), 编码982个氨基酸组成的A蛋白; RNA2由1 433个核苷酸组成, 含有1个编码病毒主衣壳蛋白(MCP)的ORF(nt 27-1 043), 编码的 α 蛋白由338个氨基酸组成^[2]。OGNNV在中国严重危害着斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)、赤点石斑鱼(*E. akaara*)等鱼类的育苗生产, 自然感染死亡率可达90%以上, 成为制约石斑鱼苗生产的“瓶颈”^[1-2]。目前对于该病毒病还没有特效药物, 主要以预防为主。

病毒的主衣壳在侵染宿主细胞过程中起重要作用, 也是病毒主要的抗原^[3-4]。本研究以纯化的重组表达 MCP 融合蛋白免疫家兔, 制备抗 OGNNV 的 MCP 抗体, 并对重组表达的 MCP 的免疫原性进

行了初步研究, 旨在制备抗 OGNNV 的基因工程疫苗提供理论依据。

1 材料

1.1 实验动物

6月龄的纯种新西兰兔2只, 体质量2~3 kg, 购自广东省医学实验动物中心。

健康斜带石斑鱼购自广东省阳江市某养鱼场, 体长8~10 cm, 平均体质量9~10 g。

1.2 重组质粒和表达菌

重组质粒 pET32a-MCP 由作者构建^[5], 大肠杆菌 BL21 由第一军医大学彭红娟博士惠赠。

1.3 试剂与溶液

不完全佐剂和完全佐剂购自 Gibco BRL 公司, 羊抗兔 IgG-HRP 购自华美生物工程公司和博士德生物公司, 层析柱购自上海景华公司, 填料为 Ni-NTA-Agarose, 购自 Novagen 公司, 其他试剂为国产分析纯。

1.4 试验器材

试验用酶标板为 USA 公司产品, 酶标仪为 Bio-Rad 公司的 Model 550 Microplate Reader。

收稿日期: 2005-07-25; 修订日期: 2006-01-09。

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863计划)项目(2003AA603011); 暨南大学校内博士启动基金(51204062)。

作者简介: 陈晓艳(1972-), 女, 博士, 主要从事水生经济动物病害控制及免疫学研究。Tel: 020-33038064; E-mail: chenxy5@sohu.com。现在暨南大学生物工程学系工作。

2 方法

2.1 免疫抗原的制备

将重组质粒 pET32a-MCP 转入大肠杆菌 BL21 后,用异丙基硫代- β -D 半乳糖苷(IPTG)诱导表达,收集表达菌,用装有 Ni-NTA-Agarose 填料的层析柱纯化目的蛋白,按照体积比 1:1 的比例加入完全或者不完全佐剂(首次注射时加入完全佐剂,以后的几次注射加入不完全佐剂),在研钵中充分混匀,制备成油包水乳剂。

2.2 免疫动物

取新西兰大白兔 2 只,1 只注射用柱层析纯化的蛋白制备成的抗原,另 1 只注射佐剂 PBS 作为对照。注射前从耳静脉取 1 mL 血制备血清,留作对照。首次免疫采用皮下多点注射方式进行,免疫剂量按每 kg 兔体质量注射 1 mg 抗原;首次免疫 15 d 后进行第二次免疫,以后每隔 7~10 天免疫 1 次,免疫剂量按首次免疫的剂量进行肌肉注射。

2.3 抗血清的制备

在第 4 次免疫后的 7~10 d,从兔的耳缘静脉抽取 1 mL 血,转入平皿中,室温下或 37℃ 下放置 30 min。待其凝固后,放置 4℃ 过夜使血块收缩。吸出上清液(血清),沉淀转入离心管中于 4℃ 下 2 500 g 离心 30 min,取上清液即血清与前面的上清液混合。4℃,1 500 g 离心全部分离的血清部分。将血清用免疫双扩散法或 ELISA 法检测效价,达到所需效价时可割断兔颈动脉放血,如果效价不高可再进行一次加强免疫,7~10 d 后再放血。放血前 24 h 停止喂食,以降低血脂浓度。按上述方法制备血清,加入 0.05% 叠氮钠作为防腐剂,−70℃ 保存。

2.4 抗血清特异性检测

将诱导表达后的重组菌进行 SDS-PAGE 电泳后,将其上的蛋白转移至硝酸纤维素膜,用免疫前、免疫后以及注射佐剂 PBS 对照的血清分别进行 Western-blot 分析。

2.5 从抗体中去除交叉反应抗体

挑取转化空质粒 pET32a 的 BL21 于 LA 液体培养基中,37℃ 振荡过夜。次日,按 1% 的比例接种到新鲜 LA 培养基中,37℃ 振荡培养至 OD₆₀₀ 约为 0.8~1.0,加 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,继续培养 2~3 h,离心收集菌体,冰上超声破碎菌体至溶液澄清。按适量比例与抗血清混匀,4℃ 作用 12 h,12 000 r/min 离心 5 min,上清即为去除交叉抗体的

抗血清。

2.6 抗血清中和 OGNNV

取健康鱼 21 尾,分为 2 个组(C1 和 C2),C1 组 11 尾,C2 组 10 尾。将制备好的兔抗融合蛋白血清和抗佐剂 PBS 血清用 1×PBS 稀释 100 倍,稀释的抗血清与病毒液按体积比 1:2 的比例混合,即取 100 μ L 稀释的抗血清与 200 μ L 病毒液混合,4℃ 放置过夜(12 h 左右),次日肌肉注射鱼体内。C1 组注射含兔抗融合蛋白血清与病毒的混合液,C2 组注射兔抗佐剂 PBS 血清与病毒的混合液作对照,每天观察记录发病情况。本实验重复进行 3 次。

2.7 抗血清被动免疫斜带石斑鱼

取健康鱼 16 尾,每尾肌肉注射 300 μ L 病毒液。攻毒 12 h 后,分成 D1 组和 D2 组,每组 8 尾。D1 组肌肉注射 300 μ L 用 PBS 稀释了 100 倍的兔抗融合蛋白血清;D2 组为对照组,注射 300 μ L 稀释了同样倍数的兔抗佐剂 PBS 血清,每天观察记录发病情况。本实验重复进行 3 次。

3 结果

3.1 ELISA 检测抗血清效价

用抗原免疫兔子经抗体效价检测后,放血制备抗血清,每只兔子获得血液 50~80 mL,最后得到血清每只 20~35 mL。用间接 ELISA 法检测抗血清效价。结果显示,用柱层析纯化的抗原免疫兔子,获得的抗血清稀释 1:22 000 倍时仍呈阳性。

3.2 Western-blot 检测抗血清特异性

用不同血清分别进行 Western-blot 分析,只有免疫了融合蛋白抗原后制备的抗血清能与目的蛋白带发生反应,免疫前的血清以及注射佐剂 PBS 后的血清都不能与目的蛋白带发生反应(图 1)。

3.3 抗血清中和 OGNNV

注射病毒后第 5 天,一些个体开始发病死亡,在随后的 1~2 d,累积死亡率增加。实验结束时,C1 组的累积死亡率为 18.18%,C2 组的累积死亡率为 40.00%,相对存活率为 54.50%。

3.4 抗血清被动免疫斜带石斑鱼

D1 组和 D2 组均在攻毒后第 5 天出现发病个体,2 个组发病鱼症状相同,在随后的 2~3 d,累积死亡率增加。实验结束时,D1 组和 D2 组的累积死亡率均为 25.00%,实验组(D1)与对照组(D2)的累积死亡率没有区别。

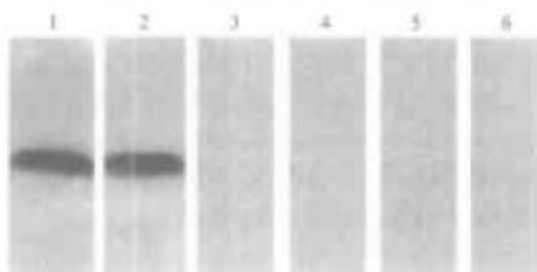


图1 抗血清的 Western-blot 分析

1-2:融合蛋白免疫后的血清 Western-blot 结果;3-4:免疫前的血清 Western-blot 结果;5-6:PBS 免疫后的血清 Western-blot 结果。

Fig.1 Western-blot analysis of anti-fusion protein serum of rabbit

1-2: Western-blot with anti-sera immunized with fusion protein;3-4: Western-blot with sera before immunization;5-6: Western-blot with sera immunized with PBS.

4 讨论

本研究中采用柱层析法纯化 OGNNV MCP 重组融合表达蛋白制备抗原免疫新西兰兔,获得抗 MCP 融合蛋白血清。用间接 ELISA 法检测抗血清效价,显示制备的抗血清效价很高。

将抗血清与病毒液中和后,注入鱼体内。从实验结果可以看出,实验组的累积死亡率明显低于对照组。由此可见,制备的抗 MCP 融合蛋白血清能中和 OGNNV,也进一步证实了 OGNNV 主衣壳蛋白的免疫原性,为重组表达主衣壳蛋白基因制备抗 OGNNV 疫苗提供了依据。Hegde 等^[6]在对巨石斑鱼(*E. taucina*)神经坏死病毒(ETNNV)实验中也有类似的报道,Lai 等^[7]在对青石斑鱼(*E. auranatus*)神经坏死病毒(YGNNV)研究中也证实了上述结果。

研究表明,用特异性抗体被动免疫鱼体,可以有

效保护机体免受细菌或病毒等传染性病害的攻击^[8]。将实验鱼攻毒 12 h 后,注射抗血清。结果显示,注射抗血清的实验组与对照组累积死亡率没有差别,推测可能因为病毒注入鱼体 12 h 后已进入机体细胞内,并在其中扩增,而抗血清中的抗体只能中和血液或体液中的病毒,无法对细胞内的病毒起作用,具体原因还需进一步研究证实。

参考文献:

- [1] Lin L, He J G, Mori K, et al. Mass mortalities associated with viral nervous necrosis in hatchery-reared groupers in the People's Republic of China[J]. Fish Pathology, 2001, 36(3): 186-188.
- [2] 陈晓艳, 黄少萍, 吕 玲, 等. 斜带石斑神经坏死病毒基因组 RNA1 和 RNA2 序列测定及分析[J]. 中山大学学报, 2005, 44(1): 73-77.
- [3] Nishizawa T, Takano R, Muraga K. Mapping a neutralizing epitope on the coat protein of striped jack nervous necrosis virus[J]. J Gen Virol, 1999, 80: 3 023-3 027.
- [4] Tanaka S, Mori K, Arimoto M, et al. Protective immunity of seabass grouper, *Epinephelus septemfasciatus* Thunberg, against experimental viral nervous necrosis[J]. J Fish Dis, 2001, 24: 15-22.
- [5] 陈晓艳, 黄少萍, 吕 玲, 等. 斜带石斑神经坏死病毒外壳蛋白基因克隆与序列分析[J]. 水产学报, 2004, 28(2): 183-188.
- [6] Hegde A, Chen C L, Qin Q W, et al. Characterization, pathogenicity and neutralization studies of a nervous necrosis virus isolated from grouper, *Epinephelus taucina*, in Singapore[J]. Aquaculture, 2002, 213: 55-72.
- [7] Lai Y S, Chiu H C, Murali S, et al. In vitro neutralization by monoclonal antibodies against yellow grouper nervous necrosis virus(YGNNV) and immunolocalization of virus infection in yellow grouper, *Epinephelus auranatus* (Temminck & Schlegel)[J]. J Fish Dis, 2001, 24: 237-244.
- [8] LaFrentz B R, LaPatra S E, Jones G R, et al. Passive immunization of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *Flavobacterium psychrophilum*, the causative agent of bacterial coldwater disease and rainbow trout fry syndrome[J]. J Fish Dis, 2003, 26: 377-384.

Preparation of antibodies against MCP of OGNNV

CHEN Xiao-yan^{1,2}, HE Jian-guo¹

(1. Life Science School of Zhongshan University, Guangzhou 510275, China; 2. Department of Biotechnology of Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: Recombinant expression vector pET32a-MCP which inserted with MCP gene of OGNNV was transformed into BL21 for expression of MCP by inducing of IPTG. Polyclonal antibody to fusion protein was prepared from rabbits immunized with recombinant protein purified through column chromatography.

The titre of anti recombinant protein sera was tested by ELISA. Western blot analysis confirmed specificity of the anti-sera. Results showed that the antibodies with the titre of 1:22 000 could effectively neutralize OGNNV, and the relative percentage survival(RPS) of the fish injected with antibodies reached 54.50%. The antibodies was successfully prepared with purified recombinant MCP. Conclusion: which confirmed the immunogenicity of MCP from OGNNV and provided the scientific basis for anti-OGNNV vaccine of recombinant MCP. Also, the polyclonal antibodies can be used in further studies. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(5):841-844]

Key words: orange-spotted grouper nervous necrosis virus; main capsid protein; antibodies

国际会议征稿通知:

INTERNATIONAL CONFERENCE ON ENVIRONMENTAL
AND PUBLIC HEALTH MANAGEMENT:

AQUACULTURE AND ENVIRONMENT

7-9 December, 2006

CALL FOR PAPERS

SECOND AND FINAL ANNOUNCEMENT

ORGANIZERS

Croucher Institute for Environmental Sciences, Hong Kong Baptist University

Area of Excellence: The Centre for Marine Environmental Research and Innovative Technology (MERIT)

SPONSORS

Hong Kong Baptist University and The Croucher Foundation, Hong Kong

MAJOR THEMES

- Current status of environmental contamination of aquaculture industries
- Environmental impact of aquaculture industries
- Fate, persistence, distribution and ecotoxicological impacts of chemicals used in aquaculture industries
- Waste minimization in aquaculture industries
- Health risk assessment of contaminated aquaculture products
- Ecological aquaculture, sustainable aquaculture ecosystems
- Integrated aquaculture and agriculture systems
- Management techniques of "Good Aquaculture Practices"/"Organic Fish Farming"
- Aquaculture and integrated coastal management (ICM)

SUBMISSION OF PAPERS

The conference will consist of invited keynote lectures, oral presentations and poster displays. Participants intending to contribute papers or posters should submit an abstract of no more than 300 words in English to the Organizing Committee before October 15, 2006. The abstract should be typed on A4-size paper with abstract title, names of authors and their affiliations clearly shown. Selected paper will be published by Environmental Geochemistry and Health (Springer) after rigorous peer reviews.

CORRESPONDENCE:

The Conference Secretariat

International Conference on Environmental and Public Health Management

Croucher Institute for Environmental Sciences, Hong Kong Baptist University, Kowloon Tong, Hong Kong

Telephone: (852) 3411 7054; Facsimile: (852) 3411 7743; E-mail: cies@hkbu.edu.hk

Website: http://www.cieshk.org/upcoming_event.asp