

三株草鱼出血病病毒免疫原性的比较

柯丽华 余兰芬 方勤 丁清泉 蔡宜权

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071)

提 要

从湖南邵阳、湖北仙桃、武汉南湖地区分离到的三株草鱼出血病病毒(GCHV873、GCHV875、GCHV876), 分别对家兔进行免疫, 并测定了它们在家兔体内形成抗体的水平以及这些抗体对相应抗原的中和能力。实验结果显示: GCHV873产生抗体滴度比GCHV875高一倍, 较GCHV876高8倍; 其抗体的中和效价分别是1:1778($10^{-3.25}$)、1:386($10^{-2.69}$)和1:181($10^{-1.25}$)。上述结果表明: GCHV873的免疫原性是三个分离株中最强的一个毒株。

关键词: 草鱼出血病病毒 免疫原性 抗体滴价 中和试验

在草鱼出血病病原研究方面, 国内自1978年以来, 陆续报道了这方面的研究进展^[1-4]。我实验室自1983年分离第一株鱼呼肠孤病毒(FRV-836)之后, 近几年又从湖南邵阳、湖北仙桃及武汉南湖地区分离得到三株不同分离物, 编号为GCHV873、GCHV875、GCHV876。并对它们的精细结构^[5,6]、生物学^[7]和生物化学特性^[8,9]以及理化因素的影响^[4]等均已进行系统研究和报道。在上述工作基础上, 试图对以上三个分离株的免疫原性进行比较, 为高效疫苗的制备提供免疫原性强的毒株, 进一步防治草鱼出血病及对此病毒免疫特性的深入研究等奠定物质基础和试验依据。本文报道了这三株病毒在家兔体内产生抗体的水平以及这些抗体对相应抗原中和能力的试验结果。

材 料 和 方 法

- 一、病毒毒株: 毒株GCHV873、GCHV875、GCHV876分别从湖南邵阳鱼场、湖北仙桃鱼场、武汉南湖鱼场中患出血病之草鱼组织分离得到。方法与前述^[4]相同。
- 二、细胞: 组织培养所用细胞为CIK细胞株^[10]。
- 三、试验动物: 1.5—2公斤健康雄兔由本所动物饲养室提供。
- 四、病毒提纯: 取感染GCHV的草鱼内脏, 按重量的10倍加入0.01mol/L磷酸盐缓冲液(PBS pH7.0)于YQ-3型匀浆机中, 以2500—5000r/m捣碎5分钟, 使之匀浆化, 冻融三次后用滤纸过滤, 滤液在RPR-20-2转头(Hitachi)经8000r/m 30分钟与16000r/m 4小时差异离心两次, 获得的病毒悬浮于少量PBS中, 置-20℃保存。
- 五、兔抗GCHV血清的制备: 部分纯化的三株病毒制备经ELISA检测后, 分别稀释成1:160

本文于1990年6月8日收到, 1991年1月29日修回

的效价, 各取 0.2ml 与等体积完全福氏佐剂混匀制成免疫复合物。采用淋巴结途径进行基础免疫。一周后, 用不完全佐剂与基础免疫等量之抗原混合, 在颈椎两侧皮下加强免疫。第三次加强注射于鼠蹊两侧皮下。两周后, 由颈动脉放血。各组抗体效价用 ELISA 法检测, 并在 DE302 型酶标光度计上测量其 OD 值。

制备好的兔抗血清经吸收后得到特异的抗 GCHV873、GCHV875、GCHV876 抗体, 于 56℃ 保温 30 分钟, 置 -20℃ 保存。

六、免疫复合物: 制备出的兔抗三株 GCHV 血清, 分别与相应病毒悬液按 1:10 混合均匀, 置 37℃ 保温 1 小时, 于 Eppendorf 离心机离心 10 分钟。沉淀溶于少量蒸馏水中, 此样品在 JEM-100C 电子显微镜下观察结果。

七、中和试验: 采用固定病毒量——倍比稀释抗血清的方法进行中和效价测定。用 Eagle's 液于等体积的病毒悬液 (滴价为 100 TCID₅₀/0.1ml)。充分摇匀, 于 37℃ 作用 1 小时, 取 0.2ml 中和作用后之病毒样品感染预先培养于 24 孔板中的 CIK 细胞, 置培养箱吸附 0.5—1 小时, 然后补充维持液到 1ml, 28℃ 培养, 逐日观察、记录病变结果。未加抗血清的病毒系列感染试验为对照组, 血清的中和效价按 Reed-Muech 法计算。

结果与讨论

一、免疫复合物的电镜观察

电镜下可见到成片的病毒粒子, 其表面吸附有大量抗体, 典型结果如图版 VII 1 所示。此结果表明所制备的抗血清是能够与 GCHV 产生免疫反应形成免疫复合物的特异抗血清。

二、抗体效价的测定

三株病毒抗血清, 经酶联免疫吸附试验后, 分别测定它们的效价, 其结果如表 1 和图 2。

由表 1 和图 2 看出: 用相同抗原量分别免疫动物, 而这些抗原在动物体内所产生抗体的效价却很不相同。GCHV873 抗体效价是 1:2560, 比 GCHV875 高 1 倍, 较 GCHV876 高 8 倍。这些抗体稀释 20 倍后, 经 ELISA 检测, 并通过酶标光度计测量 OD 值, 也同样显示了 GCHV873 为最高值。

三、抗体中和效价的测定

通过组织培养, 分别测量了三株抗体中和相应病毒感染力的中和效价 (表 2), 其结果显示: GCHV873 抗血清稀释至 1:2560 仍有 1/4 病毒被中和, 使 25% 细胞不发生病变, 其中和效价为 1:1778 ($10^{-3.25}$), 比 GCHV875 高 4 倍, 比 GCHV876 高 10 倍。

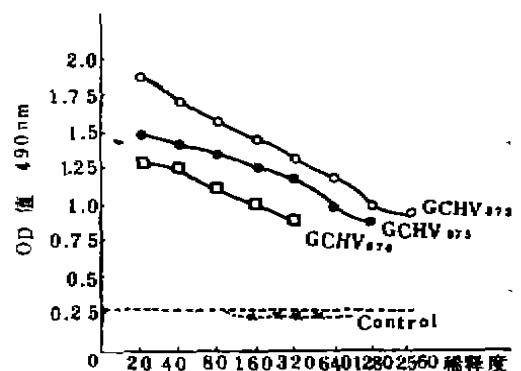


图2 ELISA 法测定三株抗体滴度
Fig.2 Detection of three anti-GCHV antibodies titer by ELISA

表1 三株抗体效价的比较

Table 1 The comparison of three anti-GCHV antibodies titres

样 品 specimen	GCMV873	GCHV875	GCHV876	阳性血清 positive serum	正常细胞 control cell	培养液 medium	封被液 closing buffer
效 价 titre	1:2560	1:1280	1:320	1:20000	—	—	—

表2 三株 GCHV 抗体中和效价的比较

Table 2 Comparison of the neutralizing titre of three anti-GCHV antibodies

样 品 specimen	血清稀释度 dilution of serum	细胞病变率 CPE rate	中和效价 neutralizing titre
GCHV873	1:1280 ($10^{-3.1}$)	25%	1:1778 ($10^{-3.25}$)
	1:2560 ($10^{-3.4}$)	75%	
	1:5080 ($10^{-3.7}$)	100%	
GCHV876	1:80 ($10^{-1.9}$)	40%	1:181 ($10^{-2.25}$)
	1:160 ($10^{-2.2}$)	92%	
	1:320 ($10^{-2.5}$)	100%	
GCHV875	1:320 ($10^{-2.5}$)	38%	1:386 ($10^{-2.59}$)
	1:640 ($10^{-2.8}$)	84%	
	1:1280 ($10^{-3.1}$)	100%	

综观表1、2所列结果，GCHV873 抗体滴价约为GCHV875的2倍、GCHV876的8倍，但就其中和抗原的效价而言，则比GCHV875高4倍，比GCHV876高10倍。实验结果表明GCHV873具有较丰富的特异抗原决定簇，因而在动物体内所产生的抗体能有地效中和相应抗原，阻断病毒对敏感细胞的侵染，其免疫原性在三个分离株中为最强。

参 考 文 献

- 〔1〕 中国科学院水生生物研究所第三研究室病毒组，1978，水生生物学集刊，6(3):221—239。
- 〔2〕 中国科学院水生生物研究所第三研究室病毒组，武汉大学病毒所电镜室，1980，水生生物学集刊，7(1):75—78。
- 〔3〕 中国科学院武汉病毒研究所，中国水产科学研究院长江水产所沙市分所，1983，淡水渔业，3:39。
- 〔4〕 柯丽华等，1990，水生生物学报，No.2。
- 〔5〕 中国科学院武汉病毒研究所，中国水产科学院长江水产所沙市分所，1984，2:21—22。
- 〔6〕 王炜 等，1990，病毒学报，5(1):44—48。
- 〔7〕 方勤 等，1989，病毒学杂志，3:315—319。
- 〔8〕 左文功等，1984，淡水渔业，3:38。

Comparison of the Immunogenicity of Three Grass Carp Hemorrhage Viruses

Ke Li-hua Yu Lan-fen Fang Qin Ding Qing-quan Cai Yi-quan

(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan 430071)

The immunogenic comparison of three grass carp hemorrhage viruses, GCHV873, GCHV875 and GCHV876 derived from different areas has been carried out on the basis of the levels of the elicited serum antibodies in rabbits. The anti-GCHV873 antibody titre was 2 folds higher than GCHV875 and 8 folds than GCHV876. Their neutralizing titres were 1 : 1778 ($10^{-2.25}$), 1 : 386 ($10^{-2.50}$) and 1 : 181 ($10^{-2.25}$) respectively. These experimental results suggested that GCHV873 is a stronger immunogen among three isolates.

Key words, Grass Carp Hemorrhage Virus Immunogenicity Anti-body titre Neutralizing test