

草鱼出血病病毒抗原亚单位的研制

方勤 江红 柯丽华

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071)

R917.1
~~R943.112~~ R392-33

A 提要 通过比较溶液的离子浓度对病毒形态结构的影响,发现 GCHV 在低盐溶液低温 (-20℃) 保存条件下,外壳蛋白会自动降解,但不十分完全。采用含 1% NP40 (Nonidet p40) 的稀盐溶液处理感染病毒的细胞,经冻融及差异离心,电镜下观察到纯度较高的病毒双层衣壳、核心衣壳及散在的子粒。纯化的病毒亚单位用核酸酶消化后,与等量的福氏佐剂混合,免疫家兔制备抗体。该抗血清经中和试验测定,显示了较强的中和病毒的能力。纯化的病毒亚单位在 7% 聚丙烯酰胺凝胶电泳条件下,未见病毒电泳条带。同时采用地高辛标记的 GCHV cDNA 克隆探针,与病毒 RNA 及亚单位样品进行斑点杂交,检测病毒 RNA 灵敏度达到 10 pg,病毒亚单位样品均为阴性结果。该亚单位制剂具有纯度高、体积小等特点,将是一种安全性能好、使用方法简便、又便于保存和运输的亚单位疫苗。

关键词 草鱼出血病病毒, 抗原亚单位, 中和试验, 分子杂交 研制, 疫苗。

草鱼出血病病毒(GCHV)是引起草鱼死亡的主要病原^[1]。十多年来,我们对该病毒的形态结构、生物学特性及某些分子生物学性质等进行了研究^[2-6],为揭示该病毒的致病机理及发展抗病毒制剂创造了条件。“七五”期间,国内对草鱼出血病防治技术的研究进展很大,随着组织浆及细胞灭活疫苗的相继应用^[7,8],出血病在一定程度上得到了控制。然而由于疫苗的稳定性和可能存在的残余感染性等因素,出血病在不同地区仍时有发生。由此看来,研制一种安全、高效的疫苗是防止出血病及发展鱼用病毒疫苗的必然趋势。国外对鱼用病毒疫苗的研究起步较早,特别是近期关于水生动物病毒基因工程疫苗的研究报道^[9,10],拓宽了鱼用疫苗的研究领域。一般说来,鱼用疫苗的纯度和安全性指标不及人用疫苗,但要使疫苗达到有效地防治出血病的目的,杜绝出血病的再度流行,就必须使疫苗生产走向正规及商业化的轨道。为寻找防治出血病的优选途径,“八五”期间,我们结合鱼用疫苗及本国国情,试图在细胞疫苗基础上通过理化方法制备病毒抗原亚单位,为鱼用亚单位疫苗研制探索新路,下面报告 GCHV 抗原亚单位研制的结果。

材料和方法

- 1 细胞培养和病毒增殖** 实验所用的细胞为鱼肾 CIK 细胞系,病毒毒株选用 GCHV₈₇₃,方法按文献^[3]进行。
- 2 病毒纯化及亚单位分离** 病毒纯化方法参照文献^[4],其病毒亚单位分离方法如下:待感染病毒的细胞出现 80% CPE 时,倒掉病毒维持液,用 10 mmol/L PBS 清洗三次,收集病变细胞。加入少量的 1% NP40 (溶于 10 mmol/L PBS),置 -30℃ 冰箱,经三次冻融后,样品置离心机 10000 g 低速离心 30 min,除去细胞碎片,然后,

130000 g 超速离心 2 h, 沉淀溶于 10 mmol/L PBS 中, 加入 200 mg/mL RNase, 27 ℃ 消化 4 h, 然后对双蒸水 4 ℃ 透析 48 h, 除去残余 NP40。

3 病毒样品的电镜观察 纯化的病毒样品经 2% PTA (pH6.9) 负染, F-700FA 型透射电镜下观察结果。

4 蛋白含量的紫外分光光度测定 纯化的病毒及亚单位分别在 UV-300 型分光光度上测定 OD₂₈₀ 及 OD₂₆₀ 光密度, 并根据 280 nm 及 260 nm 下的吸收差求出蛋白的浓度。

5 兔抗 GCHV 及其亚单位血清的制备 纯化的 GCHV 及其亚单位约 100 μg (样品蛋白含量约 0.5 μg/μL) 与等体积的福氏佐剂混合, 淋巴结途径免疫家兔, 两周后加强免疫一次, 第二次加强后的第三天采血, 收集抗血清, 采用 ELISA 法测定抗体效价。

6 病毒核酸的聚丙烯酰胺凝胶电泳 病毒核酸的提取方法及聚丙烯酰胺凝胶电泳条件见文献^[4]。电泳后, 凝胶用 EB 染色、ZDJ-多功能紫外透射电镜观察结果。

7 地高辛探针标记 采用 DIG-dUTP (德国宝灵曼公司生产) 对 2 μg GCHV cDNA 克隆片段 (另文报道) 进行标记, 方法按试剂盒操作指南进行。标记的探针经无水乙醇沉淀, 真空干燥后, 溶于 50 μL TE 缓冲液中, -20 ℃ 保存备用。

8 斑点杂交 将煮沸变性的 cDNA 阳性对照、GCHV RNA 及亚单位样品点于 NC 膜上 80 ℃, 烤干 1 h, 杂交在 42 ℃ 条件下进行。杂交液含 50% 甲酰胺、5 × SSC、0.1% N-Lauroylsarcosine, Na-salt, 0.02% SDS, 1% Blocking reagent。首先进行 4 h 预杂交, 以除去非特异性物质, 然后加入 10 μL 经热变性的探针, 42 ℃ 杂交过夜。杂交完毕, 用 0.1 × SSC、0.1% SDS 室温洗膜 2 次, 42 ℃ 洗膜 2 次。滤膜用 1% Blocking solution 封闭 30 分钟后, 再加入 DIG 抗体-碱性磷酸酶复合物孵育 30 分钟。洗涤后, 加入底物 NBT 及 X-phosphate 显色过夜, 出现兰紫色斑点者判为阳性。

结 果

1 病毒亚单位的分离

1.1 溶液的离子浓度对完整病毒结构的影响

将纯化的病毒溶于不同离子浓度的 SSC 中 (10 × SSC ~ 0.01 × SSC), -20 ℃ 保存, 不同时间取样, 电镜下观察其变化。结果发现, GCHV 在高盐及生理盐状态下保存, 形态结构比较完整 (图 1a), 而在低盐溶液中保存, 病毒空壳数量会随判着时间的延长及冻融次数逐渐增加 (图 1b), 这一结果可能是因为低浓度的盐溶液会使外壳蛋白子粒松散, 而冻融则可以通过物理作用破坏病毒内部结构, 从而影响病毒衣壳结构的严紧度。

1.2 NP40 对病毒亚单位分离效果的电镜观察

采用 NP40 对感染病毒的细胞进行处理, 经三次冻融和一次差异离心, 电镜观察的结果如图 1c, d 所示。从图 1c, d 中我们可以看到成片的结构松散的病毒双层衣壳、核心衣壳 (c) 及散在的子粒 (d), 未见到完整病毒颗粒。同时采用 1% Triton-X-100 在相同条件下处理病毒样品, 视野中偶见完整的病毒粒子 (未图示), 说明同样浓度的 NP40 较 Triton-X-100 处理效果要好。

2 GCHV 亚单位中和效价的测定

将纯化的病毒亚单位免疫家兔, 抗体经 ELISA 和细胞中和试验测定结果如下表所示。从表中可以看出, 采用同样的抗原量免疫家兔测得病毒亚单位与完整病毒的抗体效价基本相同, 而 GCHV 亚单位抗体的中和效价略低于完整病毒的中和效价。这是因为完整病毒降解为亚单位后, 其抗原性减弱的缘故。根据鱼用疫苗浸泡免疫的有关报道^[9], 完整病毒降解为亚单位后, 其免疫保护效果可能会比完整病毒更好, 这是因为完整病毒降解为亚单位后更易渗透鱼

体,此外加入有效的佐剂也有利于提高其免疫保护效果。总之,更为有效的方法有待于我们通过鱼体试验及深入的研究才能作出结论。

表 完整病毒与亚单位抗体的 ELISA 效价及中和效价的比较

Tab. Comparison of antisera ELISA and neutralization titre
for both GCHV and its subunits

样品 Samples	抗原用量 Antigen dose	抗体 ELISA 效价 Antibody ELISA titre	抗体中和效价 Neutralization titre
GCHV 亚单位 GCHV subunits	100ug/each	1:2580	1:901.6
完整病毒 Intact viron	100ug/each	1:2580	1:1148

3 病毒亚单位制剂的核酸检测

3.1 聚丙烯酰胺凝胶电泳

经核酸酶消化的病毒亚单位及未经核酸酶消化的亚单位制备同时用酚、氯仿进行抽提,相同条件下,经 PAGE 凝胶电泳,EB 染色后在紫外灯下观察的结果见图 2。从图中可以看出,未经核酸酶消化的样品,电泳染色后呈现明显的 11 条带,而 RNase 处理后,核酸带消失。

3.2 地高辛标记探针的核酸检测

未经消化的 GCHV 亚单位与 RNase 处理的样品经聚丙烯酰胺凝胶电泳确定初步结果后,再将此样品与 Dig 标记 GCHV cDNA 探针杂交,同时设置 cDNA 克隆为阳性对照,其分子杂交结果见图 3。图中 A₁₋₅ 为 10 倍稀释的 GCHV RNA 样品, B₁₋₃ 为 RNase 消化的病毒亚单位, B₄ 为未经酶消化的亚单位样品, B₅ 为阴性对照, C₁₋₅ 为 cDNA 克隆阳性对照。图 3 结果可以看出,标记的 DIG - cDNA 探针能检测到 10 pg 的 GCHV RNA,而同样浓度的亚单位经 RNase 消化检测结果则为阴性。

讨 论

呼肠孤病毒不同属种,外壳蛋白内部结构强度差异很大。有的在保存时会自行脱落^[12],有的则需用物理和化学方法加以处理^[13]。根据草鱼出血病病毒在稀盐溶液低温保存条件下极易脱落这一特性,实验中我们采用上述方法,制备得到了较高纯度的病毒亚单位制剂。近年来,关于轮状病毒亚单位疫苗的研究,已证明由第九基因片段编码的 VP7 蛋白是决定血清型特异性和产生中和抗体的主要外壳蛋白,亦有人证实 VP3 位于外壳蛋白上,可表现出高水平的中和活性^[14]。本实验室王伟等曾对 GCHV 单个多肽进行了免疫原性的研究^[6],并筛选出 Vp6 为免疫原性强的多肽片段。这就说明单个多肽作为抗原能刺激肌体中和抗体的产生。至于中和效价不高,是由于保存时间过长或因其单一的多肽不具备足够的免疫原性,原因有待进一步探讨。我们研制的 GCHV 亚单位疫苗含有完整病毒的多肽成份,并采用分子杂交技术对其核酸进行了严格的检测,检测灵敏度可达到 10 pg。该疫苗经鱼体浸泡免疫实验,已证实对草鱼出血病具有较高的免疫保护效果(浙江淡水水产所承担,另文报道),如在生产环节中进一步提高疫苗效价,降低成本,或采用更为有效的佐剂及免疫途径,将具有应用前景,同时亦将为国内鱼用疫苗的深入研究及商品化生产探索一条新的途径。

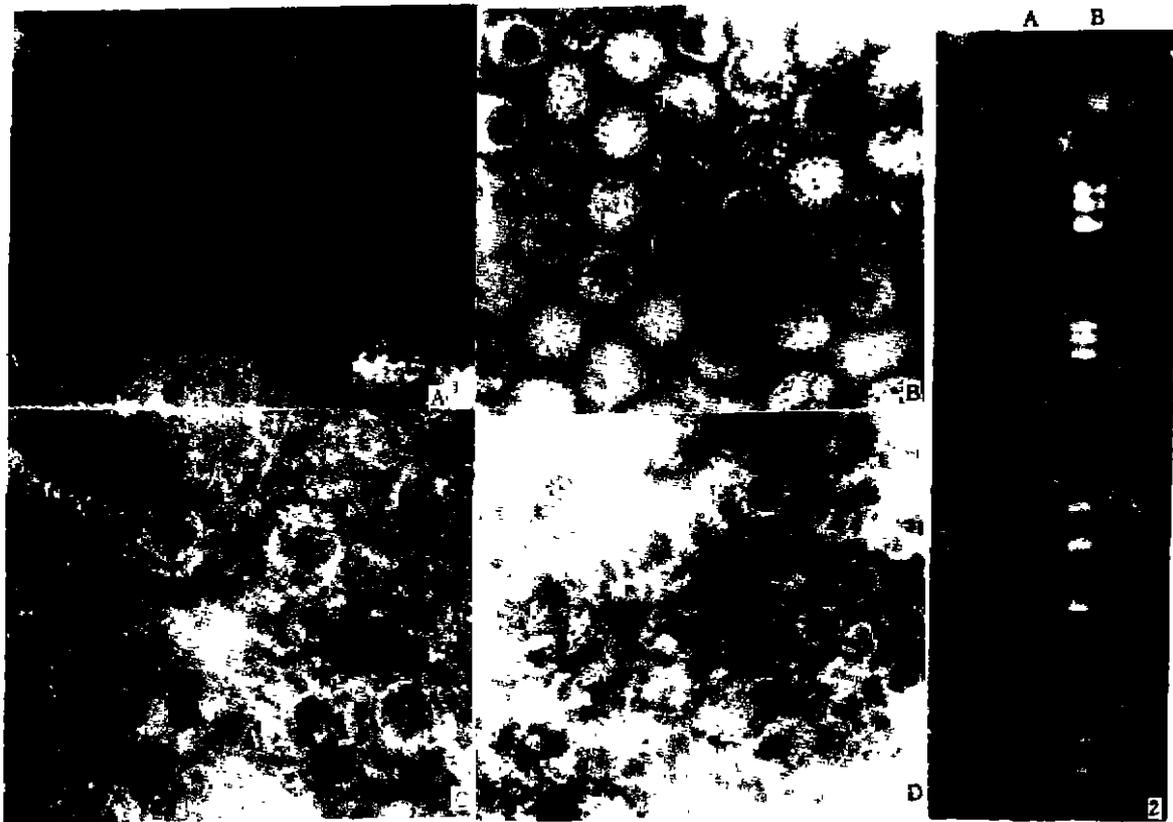


图1 草鱼出血病病毒及其亚单位的电镜观察

- A. 完整病毒($\times 243000$)
 B. 完整病毒及空壳混合物($\times 135000$)
 C. 经 NP40TH 处理后结构松散的病毒核心
 衣壳及外层衣壳($\times 140000$)
 D. NP40 处理后的散在子粒($\times 94500$)

Fig. 1 Electron micrographs of GCHV and its subunits

- A. intact virion ($\times 243000$)
 B. The mixture of intact virus and top components
 ($\times 135000$)
 C. loosen top and core components treated by 1% NP40
 ($\times 140000$)
 D. capsomers treated by 1% NP40 ($\times 94500$)

图2 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

- A. 未经 RNase 消化的亚单位样品核酸抽提物
 B. 经 RNase 消化的亚单位样品核酸抽提物

Fig. 2 Electrophoresis analysis of GCHV-RNA by PAGE

- A. undigested preparation of GCHV subunits
 B. digested preparation of GCHV subunits

致谢 本室王伟同志及技术室邓红同志在工作中给予很大帮助,在此表示感谢。



图 3 斑点杂交检测结果

A1-5 为 10ng-1 μ g 的 GCHV-RNA

B1-3 为消化后的亚单位样品

B4 未经 RNase 消化的亚单位样品

B5 为阴性对照(pBR328)

C1-5 为 GCHV-cDNA 阳性克隆

Fig 3 Detection of GCHV-RNA by DIG-labelled GCHV-cDNA dot hybridization

A1-5 are RNA samples from 10ng-1 μ g

B1-3 are the subunits digested by RNase

B4 is positive control (GCHV-RNA)

B5 is negative control (pBR328)

C1-5 are GCHV-cDNA positive clone products

参 考 文 献

- 1 中国科学院武汉病毒研究所, 中国水产科学院长江水产研究所沙市分所. 草鱼出血病病毒的电镜观察初报. 淡水渔业, 1983, (3):39
- 2 柯丽华, 方勤, 蔡宜权. 一株新的草鱼出血病分离物特性. 水生生物学报, 1990, 14(2):153-159
- 3 方勤, 柯丽华, 蔡宜权. 草鱼出血病病毒的生长特性及高价培养. 病毒学杂志, 1989, (3):315-319
- 4 柯丽华, 王伟, 方勤等. 草鱼出血病病毒多肽及其基因组的体外翻译. 病毒学报, 1992, 8(2):169-173
- 5 王伟, 蔡宜权, 方勤等. 草鱼出血病病毒多肽的基因定位. 中国病毒学, 1994, 9(4):356-361
- 6 王伟, 赵桃英, 方勤等. 草鱼出血病病毒多肽的免疫原性. 中国病毒学, 1995, 10(2):166-168
- 7 杨先乐, 夏春, 左文功. 草鱼出血病细胞培养灭活疫苗的研究. 水生生物学报, 1993, 17(1):46-52
- 8 邓初夏, 高汉蛟, 李燕等. 草鱼出血病细胞培养灭活疫苗的研究及其在应用. 1990. 草鱼出血病防止技术研究鉴定会资料
- 9 张念慈, 曹静, 吴乐丁等. 草鱼浸泡免疫同位素[3 H]-人血清白蛋白示踪研究. 草鱼出血病防止技术研究鉴定会资料, 1990.
- 10 Thiry F L, Dheur I, Rossius M, *et al.* A recombinant viral haemorrhagic virus glycoprotein expressed in insect cells protective immunity in rainbow trout. *Journal of General Virology*, 1994, 75, 1579-1587
- 11 Lorenzen N, Olesen N J, Jorgensen P E *et al.* Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of the glycoprotein gene of VHS virus, and immunization of rainbow trout with the recombinant protein. *Journal of General Virology*, 1993, 74, 623-

630

- 12 Amano Y, Katagin S, Ishida N *et al.* Spontaneous degradation of reovirus capsid into subunits. *J Virol* 1971, 8:805~808
- 13 Greenberg H B, Valdesuso J, Wyke K V. Production and preliminary characterization of monoclonal antibodies directed at two surface proteins of rhesus rotavirus. *Journal of Virology*, 1983, 47(8):267~275
- 14 Shatkin A J, Sipe J D. RNA polymerase activity in purified reoviruses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1968, 61:1462~1468

Preparation of Grass Carp Hemorrhage Virus Antigen Subunit

Fang Qin Jiang Hong Ke Lihua

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

By studying the fine structure of GCHV (Grass Carp Hemorrhage Virus), It was found that the capsid of purified GCHV can be degraded spontaneously into its morphological units by logging in a buffer of low ionic strength, but not very completely. The virus preparation was obtained from GCHV infected cell, then treated with 1% NP40 reagent in low - salt solution and freeze thaw ng, finally purified by differential centrifugation. Using negative staining method, out, core capsid and capsomeres of the virus were showed by electron micrograph. Afterwards, the preparation digested by RNase was equally mixed with Freund's adjuvant and immunized rabbits. The antibody was tested by ELISA and neutralization test, which demonstrated the preparation can elicit good levels of antibody. The RNA - free preparation was detected by PAGE and DIG - labelled GCHV - cDNA hybridization. The sensitivity of the test is approximately to 10pg, the samples of subunit all showed negative. The preparation has a high purity, small volume and better safety. Besides, it is easy to use, also convenient in transportation and conservation. It will be a ideal vaccine against grass carp hemorrhage disease.

Key words GCHV, Antigen subunits, Neutrilization test, Dot hybridization