

栉孔扇贝急性病毒性坏死症病毒单克隆抗体的制备 及 ELISA 检测

付崇罗^{1,2} 宋微波^{1*} 李 贇¹ 朱明壮¹

(¹中国海洋大学 海水养殖教育部重点实验室 青岛 266003)

(²聊城大学生命科学学院 聊城 252059)

摘 要 利用蔗糖密度梯度离心技术从自然发病的栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 组织分离纯化急性病毒性坏死症 (Acute virus necrobiotic disease, AVND) 病毒, 并以此为抗原免疫 Balb/c 小鼠。将免疫小鼠的脾细胞与 NS-1 骨髓瘤细胞进行融合, 最终筛选出 4 株能稳定传代并分泌该病毒特异性单克隆抗体 (Monoclonal Antibody, MAb) 的杂交瘤细胞系。应用胶体金标记免疫电镜技术在超微水平上对这 4 株 MABs 进行测定表明, 它们对 AVND 病毒均具有高度的特异性, 并且所识别的特异性位点均位于病毒粒子囊膜的纤突上。应用该单克隆抗体对不同养殖季节的一龄贝进行间接 ELISA 检测发现, 7 月中旬至 7 月底病毒感染率与感染强度均处于当年的最高峰, 与这一时期栉孔扇贝所表现出的最高死亡率完全吻合。

关键词 栉孔扇贝, AVND 病毒, 单克隆抗体, ELISA

中图分类号: S96 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2005)01-0116-05

自 20 世纪 90 年代起, 连续爆发的养殖栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 大规模死亡现象给我国的扇贝养殖业造成了巨大的经济损失^[1,2]。自 2000 年以来, 作者所在课题组利用超薄切片、电镜负染、组织病理学、多抗免疫学检测及人工感染实验等方法进行的系统性研究证实, 造成养殖中后期栉孔扇贝大规模死亡的病原是一种球形 RNA 病毒, 并将该种病害定名为急性病毒性坏死症 (AVND)^[1-7]。鉴于准确的诊断技术是实现病害控制的重要前提, 本研究利用杂交瘤单克隆抗体技术于国内首次成功地建立了分泌该病毒特异性单克隆抗体的小鼠杂交瘤细胞株, 从而为病毒检测和进一步开展该病毒的致病机理研究奠定了重要的基础。

1 材料和方法

1.1 材料

HRP-羊抗小鼠 IgG (H+L), FITC-羊抗小鼠 IgG 购自华美生物工程公司。小鼠单抗亚型测定试剂盒、10 nm 胶体金标记羊抗小鼠 IgG 和邻苯二胺 (OPD) 均购自 Sigma 公司。福氏完全佐剂、福氏不完

全佐剂、RPMI1640 培养基、HAT 和 HT 均购自 Gibco 公司, 酶标仪为 Labsystems, Mutiskan MK3。

1.2 病毒的分离和纯化

病料为 2002 年 7 月下旬于栉孔扇贝自然发病并呈大量死亡时采自青岛太平角海水养殖场的病贝。剔除闭壳肌、肝胰腺和性腺后, 分装保存于 -85℃ 备用。将病贝组织剪碎, 按 1:10 比例加入 TEN 缓冲液 (0.05mol/L Tris-HCl; 0.01mol/L EDTA; 0.36mol/L NaCl, pH 7.8), 冰浴中匀浆。匀浆液先后经 3500 × g 离心 15min 和 7500 × g 离心 15min。所得上清液经 6mL 35% (W/W) 的蔗糖垫 113000 × g 超速离心 90min。沉淀用少量 TEN 缓冲液重悬后经 8000 × g 离心 20min, 上清液铺于 30% ~ 60% (W/W) 连续蔗糖密度梯度上, 113000 × g 离心 2.5h, 收取乳白色病毒带。病毒粒子用 TN 缓冲液稀释后离心洗去其中的蔗糖, 最后用少量 TN 缓冲液重悬病毒粒子。测定纯化病毒悬液的蛋白质浓度^[8], 分装保存于 -85℃。同时, 提纯病毒液经 2% 磷钨酸负染, 透射电镜 (JEM-1200EX) 下鉴定病毒粒子的纯度。

基金项目: 国家 973 项目 (G1999012001); 长江学者奖励计划资助项目

* 通讯作者。Tel/Fax: 86-532-2032283; E-mail: wsong@ouc.edu.cn

作者简介: 付崇罗 (1964 -) 男, 副教授, 博士研究生。研究方向为水生生物病理学及免疫学。Tel: 86-532-2032348; E-mail: fuchongluo@hotmail.com

收稿日期: 2004-05-08, 修回日期: 2004-06-24

1.3 Balb/c 小鼠的免疫

将提纯病毒液与等量福氏完全佐剂充分乳化,经腹腔注射(100 μ g/每只)对3只6周龄 Balb/c 小鼠同时进行初次免疫。每隔2周用提纯病毒液与等量福氏不完全佐剂充分乳化后经腹腔注射加强免疫,共3次。细胞融合前3d,用不含佐剂的提纯病毒液经脾内直接注射法加强免疫^[9]。

1.4 细胞融合及杂交瘤细胞的培养

细胞融合前,对免疫的小鼠进行尾部采血,用间接 ELISA 方法检测小鼠血清的抗体滴度。无菌条件下取抗体滴度最高的小鼠脾脏制成细胞悬液,计数后按5:1的比例与处于对数生长期的 NS-1 骨髓瘤细胞用50% PEG 2000 进行细胞融合。将融合后的细胞用 RPMI1640-HAT 完全培养液(含20%新生小牛血清)重悬,置 CO₂ 培养箱中 37 $^{\circ}$ C 培养。12d 后改用 RPMI1640-HT 完全培养液继续培养。2周后,待杂交瘤细胞长满孔底 1/4 ~ 1/3 时,用下述两种方法对杂交瘤细胞进行筛选。

应用有限稀释法及时对阳性孔连续进行3次单克隆化后,应用小鼠单抗亚型测定试剂盒按使用说明测定单克隆抗体亚型。另外,将稳定的、阳性反应强的单克隆杂交瘤细胞制备相应的小鼠腹水单抗,并应用间接 ELISA 测定其抗体滴度。

1.5 间接酶联免疫吸附检测(ELISA)

将提纯病毒液用包被缓冲液(0.05mol/L 碳酸盐缓冲液, pH 9.6)适当稀释后,包被于高吸附性 96 孔酶标板,置 4 $^{\circ}$ C 过夜。甩干酶标板,用 3% BSA-PBS (pH 7.4) 室温封闭 30min。用 PBST(0.05% Tween-20/PBS, pH 7.4)洗板3次,每次5min。每孔加待测杂交瘤上清 100 μ L,室温孵育 1h。同上洗板后,每孔加 100 μ L HRP-羊抗小鼠 IgG (H + L) (1:1000 稀释)室温孵育 1h。同上洗板后,每孔加显色底物液(0.1mol/L 柠檬酸/磷酸氢二钠缓冲液, pH 5.0; 0.04% OPD; 0.15% H₂O₂) 100 μ L,室温蔽光显色 15min 2mol/L H₂SO₄ 终止反应,酶标仪检测 492nm 处 OD 值。

同时,设免疫小鼠的血清为阳性对照;由健康贝(本研究中的健康贝为采于 2003 年 3 月并经电镜负染检测^[6]证实无 AVND 病毒感染的个体)组织匀浆液经低速离心所得上清液作为阴性对照。待测孔的 OD 值(P) 阴性对照孔的 OD 值(N) \geq 2.1 判定为阳性。

1.6 间接免疫荧光检测(IFA)

病贝为 2003 年 7 月中旬扇贝呈现大量死亡时

采自青岛太平角海水养殖场。取扇贝各主要器官组织,用 Davidson's 固定液 4 $^{\circ}$ C 固定 48 h。以常规石蜡包埋方法制备组织切片。切片经脱蜡、复水后 PBS 冲洗 3 次,每次 5 min。滴加杂交瘤细胞上清液,37 $^{\circ}$ C 湿盒内孵育 1h。同上冲洗后,滴加 FITC-羊抗小鼠 IgG (1:10 稀释),37 $^{\circ}$ C 湿盒内暗处孵育 1h。最后,用 PBS 充分洗涤后缓冲甘油封片,荧光显微镜观察拍照。同时,设健康贝的组织切片为阴性对照;省去杂交瘤上清为空白对照。

1.7 胶体金标记免疫电镜技术(IEM)对 MAbs 特异性及病毒结合位点的检测

取提纯病毒液(20 ~ 25 μ L)滴在涂有蜡膜的载玻片上,将带有 Formvar 膜的铜网膜面朝下漂浮在液滴上吸附 1min(以下步骤均于涂有蜡膜的载玻片上完成,并将载玻片置于室温条件下的湿盒内^[10])。PBS 洗涤 3 \times 5min,用 3% BSA-PBS 封闭 30min。然后与杂交瘤上清孵育 1h。同上洗涤后,将铜网与胶体金标记羊抗小鼠 IgG (1:10 稀释)孵育 1h。最后,铜网用 PBS 洗涤 3 \times 5min,经 2% 磷钨酸负染,电镜观察拍照。

为进一步观察单抗是否同时与石蜡组织切片中经甲醛固定后的病毒抗原发生特异性结合,利用 IEM 对此进行了检测。取提纯病毒液(约 20 ~ 25 μ L)滴在涂有蜡膜的载玻片上,将带有 Formvar 膜的铜网膜面朝下漂浮在此液滴上吸附 1min。用 PBS 洗涤 3 \times 5min 后,将铜网置于 4% 甲醛-PBS 中固定 10min。随后洗涤、封闭、分别与单抗和胶体金标记二抗作用等步骤同上。同时,实验设健康贝上清液代替病毒液为阴性对照,省去杂交瘤上清为空白对照。

1.8 不同养殖季节栉孔扇贝感染 AVND 病毒的间接 ELISA 检测

2003 年 4 月至 11 月于不同养殖季节自青岛太平角海水养殖场采集一龄栉孔扇贝,每次 15 只。解剖扇贝,按下述方法进行样品处理以及间接 ELISA 检测:取外套膜和鳃,称重后剪碎,按 1:9 的比例加入 TEN 缓冲液冰浴中匀浆。匀浆液先后以 3500 \times g 离心 15min 和 7500 \times g 离心 15min,取上清液做为 ELISA 检测的样品。样品经包被缓冲液稀释后包被于高吸附性 96 孔酶标板,每样品设 3 个平行孔。以下步骤与上述对杂交瘤细胞筛选的 ELISA 操作方法相同。但一抗统一使用由 3C8 制备的腹水抗体。同时,设提纯病毒液作为阳性对照;由健康贝制备的上清液作为阴性对照。样品孔的平均 OD 值(P) Y

阴性对照孔的 OD 值 (N) ≥ 2.1 判定为阳性。

2 结果

2.1 病毒粒子的电镜负染观察

纯化的病毒粒子在形态上近似圆球形,直径约 110~170nm。病毒粒子外包双层囊膜,囊膜的表面带有 20~25nm 的纤突,其形态特征与王崇明等所报道的完全一致^[3](图 1)。

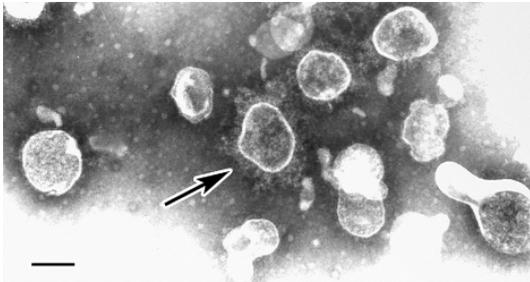


图 1 AVND 病毒粒子的电镜负染

Fig.1 Negatively stained AVND virions purified from infected *Chlamys farreri*

Spikes were obviously on envelop of some virions (arrow). Bar: 100 nm.

2.2 杂交瘤细胞的培养及筛选

在所接种的 4 块 96 孔培养板中共有 249 孔出现杂交瘤细胞生长,融合率约为 65%。经间接 ELISA 方法初步筛选出 12 孔阳性杂交瘤细胞。后经原位 IFA 技术进一步检测发现,其中的 10 株杂交瘤细胞仅与病贝的组织细胞发生特异性反应(图 2)而另外的 2 孔杂交瘤细胞由于与病贝和健康贝的血细胞均发生反应(非特异性反应)而被排除。采用有限稀释法对这 10 孔杂交瘤细胞连续进行 3 次

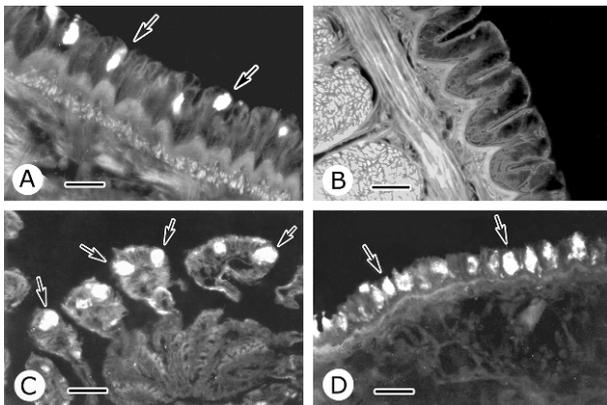


图 2 IFA 技术对单克隆抗体特异性的测定

Fig.2 The specificity of Mabs was examined by indirect IFA

MAb 3C8 shows positive reaction with the mantle epithelium of diseased scallop (A) and negative reaction with mantle of healthy scallop (AVND virus negative control) (B). Positive reactions of MAb 3C8 with gills (C) and intestine (D) of diseased scallop. Bars: 25 μ m.

单克隆化后,又经过半年的连续传代培养和多次检测,最后获得 4 株能稳定传代并具有很强的阳性反应的单克隆杂交瘤细胞系(2B3、3C8、3G7、4C7)。其中 3C8 所分泌单抗的亚型为 IgG1,其余 3 株均为 IgG2b;由 3C8 和 2B3 制备的腹水单抗具有较高的抗体滴度(均为 1:8192)。

2.3 胶体金标记免疫电镜技术对 MAbs 与 AVND 病毒特异性结合位点的检测

应用胶体金标记免疫电镜技术对上述 4 株单抗分别进行研究,它们均能获得高特异性和低背景污染的金颗粒标记的病毒粒子,且金颗粒均特异性地标记在病毒粒子囊膜表面的纤突上(图 3)。而阴性对照和空白对照检测中,整个铜网几乎观察不到胶体金颗粒存在。实验结果还显示 4 株单抗能与甲醛固定的病毒粒子同样发生明显地特异性反应(图 3-B)。

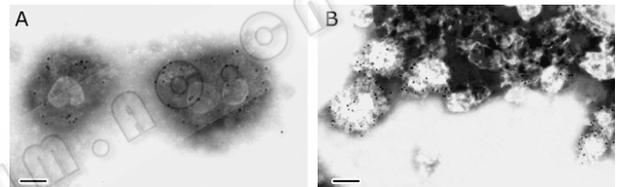


图 3 胶体金标记免疫电镜对单克隆抗体与病毒粒子结合位点的检测

Fig.3 Epitopes ultrastructural localizations were examined by immunoelectron microscopy

The MAb used was 3C8. Gold particles located on spikes of virions (A) and also combined with spikes of formaldehyde fixed virions (B). Bars: 100nm.

2.4 不同养殖季节栉孔扇贝病毒感染的 ELISA 检测

应用单抗建立的 ELISA 检测技术对 2003 年不同养殖季节的一龄贝进行动态检测显示:7 月中旬之前,扇贝的平均病毒感染率一直保持在相对较低的水平(图 4-A);自 7 月中旬开始,平均病毒感染率呈现出急剧上升。至 7 月底,感染率达到当年的最高峰(92.3%)。自 8 月底,病毒感染率开始出现明显下降的趋势。ELISA 检测还显示,扇贝的病毒感染强度也表现出与此相似的规律(图 4-B)。

3 讨论

目前,利用间接 ELISA 方法对大量的杂交瘤细胞进行筛选是单克隆抗体制备中常用的方法。但因病毒提纯液中极易污染宿主的组织蛋白成分,以间接 ELISA 方法所筛选出的单抗中有可能包含针对宿主蛋白的非目的抗体。这种问题同样也在对虾不

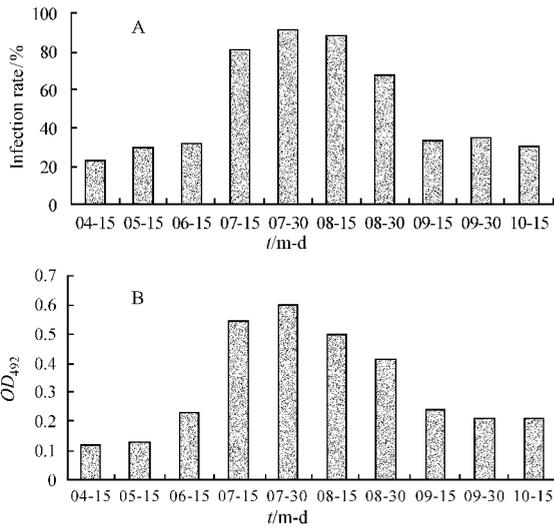


图4 栉孔扇贝不同养殖季节病毒感染率(A)和感染强度(B)的ELISA检测

Fig.4 Virus infection rate(A) and virus infection densities(B) during different seasons of 2003(examined by indirect ELISA)

同病毒的单抗制备中遇到^[11-13]。为此,本研究使用经电镜负染检测的健康扇贝为阴性对照,应用原位IFA技术对ELISA所筛选的12株阳性杂交瘤细胞进行了特异性鉴定。结果表明,有10株杂交瘤细胞株所产生的单克隆抗体可以特异性地原位检测出病贝主要器官组织(如外套膜、鳃、肾、生殖腺、胃、肠、肝胰腺等)中病毒感染的阳性细胞,而作为阴性对照的健康贝的组织切片中则没有检测到特异性阳性反应。另外,利用胶体金免疫电镜技术还进一步证实,最后所获得的4株稳定的单克隆抗体(2B3,3C8,3G7,4C7)所识别的特异性位点均位于AVND病毒的囊膜纤突上。利用该单抗建立的IFA技术对病贝所进行的原位检测显示,病毒可广泛感染栉孔扇贝与外环境直接接触的器官外膜上皮细胞和消化道黏膜上皮细胞,并由此进一步侵染到皮下结缔组织中的某些细胞(另文发表)。这与本课题组以前电镜超薄切片的观察结果完全一致^[2,4,5]。上述结果表明,本研究所建立的单克隆抗体对该病毒具有高度的特异性。

流行病学调查结果显示,养殖栉孔扇贝的大规模死亡通常为一龄贝,并且死亡高峰集中在7月下旬的高水温期^[2]。本工作应用特异性单克隆抗体建立的ELISA检测技术对不同养殖季节的一龄贝进行检测发现,7月中旬前,养殖扇贝群体具有较低的感染率,但是,体内的病毒感染强度均处于很低水平。至7月中旬,病毒的感染率和强度均呈现急剧上升

的趋势,至7月底,感染率和强度均达到当年的最高峰,与这一时期栉孔扇贝所表现出的高死亡率完全吻合^[2]。该结果提示,在水温较低时,仅有少数扇贝体内携带病毒,随着水温的升高,病毒复制和水平传播速度加快,至7月中旬,病毒的感染率和强度达到致病的临界水平后,导致扇贝群体随后爆发大规模的死亡。

致谢 中国水产科学研究院黄海水产研究所的王崇明老师和黄剑宇同学、青岛大学医学院电镜室谭金山老师、聊城大学生命科学学院孙震晓博士分别在病毒提取、电镜观察和细胞培养工作中给予了热情帮助,在此一并致谢。

参 考 文 献

- [1] 宋微波,王崇明,王秀华,等. 栉孔扇贝大规模死亡的病原研究新进展. 海洋科学, 2001, 25(2): 23-26.
- [2] 王秀华,王崇明,李 筠,等. 胶州湾栉孔扇贝大规模死亡的流行病学调查. 水产学报, 2002, 26(2): 149-155.
- [3] 王崇明,王秀华,宋晓玲,等. 栉孔扇贝一种球形病毒的分离纯化及其超微结构观察. 水产学报, 2002, 26(2): 180-184.
- [4] 贺桂珍,李 赞,王崇明,等. 栉孔扇贝和海湾扇贝病原体感染与疾病发生关系探讨. 高技术通讯, 2003, 13(3): 75-79.
- [5] 贺桂珍,李 赞,宋微波,等. 栉孔扇贝病原感染与病害发生关系探讨. 水产学报, 2003, 27: 273-277.
- [6] 李 赞,贺桂珍,王秀华,等. 急性病毒性坏死症病毒感染的ELISA检测. 高技术通讯, 2003, 13(7): 90-92.
- [7] 艾海新,王崇明,王秀华,等. 栉孔扇贝急性病毒性坏死症病原人工感染研究. 中国水产科学, 2003, 10(5): 386-390.
- [8] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *An Biochem*, 1976, 72: 248-254.
- [9] 朱立平,陈学清. 免疫学常用实验方法. 北京:人民军医出版社, 2000, 25.
- [10] Gowen B, Bamford J K, Bamford D H, et al. The tailless icosahedral membrane virus PRDI localizes the proteins involved in genome packaging and injection at a unique vertex. *J Virol*, 2003, 77: 7863-7871.
- [11] Zhan W B, Wang Y H, Fryer L J, et al. Production of monoclonal antibodies (MAbs) against white spot syndrome virus (WSSV). *J Aquat Anim Health*, 1999, 11: 17-22.
- [12] Poulos B T, Kibler R, Bradley-Dunlop D, et al. Production and use of antibodies for the detection of Taura syndrome virus in penaeid shrimp. *Dis Aquat Org*, 1999, 37: 99-106.
- [13] Poulos B T, Pantoja C R, Bradley-Dunlop D, et al. Development and application of monoclonal antibodies for the detection of white spot syndrome virus of penaeid shrimp. *Dis Aquat Org*, 2001, 47: 13-23.

Monoclonal antibodies prepared and used for detection of *Acute virus necrobiotic disease virus* in scallop *Chlamys farreri* by indirect ELISA

FU Chong-luo^{1,2} SONG Wei-bo^{1*} LI Yun¹ ZHU Ming-zhuang¹

(¹ Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 26600, China)

(² College of Life Science, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China)

Abstract : For developing monoclonal antibodies against acute virus necrobiotic disease (AVND) virus, mice of Balb/c strain were immunized with AVND virions which were isolated from the infected scallop *Chlamys farreri*. The spleen cells from immunized mice were then fused with NS-1 myeloma cells and the hybridomas were screened by means of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunofluorescence assay (IFA). Finally, 4 stable MAbs of IgG isotype were obtained. Moreover, the combined position of these 4 MAbs to this virus was examined by immunogold electron microscopy (IEM). The results demonstrate that all 4 MAbs recognized epitopes on the envelope of the virions. Subsequently, a MAb-based ELISA was developed and used for detection of the infection rate and densities of the scallops which were sampled during different seasons from mid-April to mid-October, 2003. The result exhibited that both of the infection rate and infection densities sharply rose in mid-July and reached to the spikes, which right corresponds with their mortality during this period.

Key words : *Chlamys farreri*, AVND virus, Monoclonal antibody, ELISA

Foundation items : Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (G1999012001)

* Corresponding author. Tel/Fax : 86-532-2032283 ; E-mail : wsong@ouc.edu.cn

Received date : 05-08-2004

The Eighth Editorial Board of Acta Microbiologica Sinica

EDITOR-IN-CHIEF

LI Ji-lun Academician

(College of Biology, Chinese Agricultural University, Beijing 100094, China)

VICE-EDITOR-IN-CHIEF

TAN Hua-rong Professor

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

LU De-ru Professor

(Institute of Genetics, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

WANG Ao-quan Professor

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

QU Yin-bo Professor

(School of Life Science, Shandong University, Jinan 250100, China)

XU Jian-guo Professor

(National Institute of Communicable Diseases Prevention and Control, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China)

MEMBERS OF THE BOARD

CAI Yong-feng

CHEN Yong-qing

CHENG Chi

DONG Xiu-zhu

FAN Yun-liu

GUO Jun

HU Fu-quan

HU Yuan-yang

HUANG Li

LU Cheng-ping

MIN Hang

QIAN Shi-jun

SHAO Yi-ming

SHENG Jun

TANG Hong

TIEN Po

WANG Ping

WANG Hua-ming (USA)

XIE Hong

YANG Su-sheng

ZHAI Zhong-he

ZHANG Yao-ping (USA)

ZHENG Tian-ling

ZHU Bao-quan

ZHUGE Jian

MANAGING EDITORS

WANG Jin-fang

WANG Min