

一种筛选对虾白斑综合症病毒中和抗体的新方法

高 宏 袁必锋 袁 丽 赵新颜 戴和平

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

摘要:用对虾淋巴组织的原代培养细胞与对虾白斑综合症病毒进行相互作用,洗去不能结合的病毒,然后用甲醛固定,再用 ELISA 法检测所吸附的病毒。当病毒与抗血清保温后,抑制病毒与细胞的吸附能力的抗血清中应含有中和抗体。此方法可以在缺少细胞系的情况下,简便地筛选到中和抗体。

关键词: 细胞原代培养; 对虾白斑综合症病毒(WSSV); 中和抗体

中图分类号: S945.4 + 6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2002)03-0259-05

对虾白斑综合症病毒(White Spot Syndrome Virus, WSSV)是一具有囊膜的双链 DNA 病毒,是造成自 1993 年以来对虾大面积爆发性死亡的主要病原体^[1,2]。另据报道,我国科学家对该病毒的全 DNA 序列已测定完成,其部分囊膜蛋白的结构和功能正在研究之中,但如何有效地防治该病毒病的爆发,仍然没有有效的方法。

病毒与宿主细胞相互作用机理的揭示,将会为最终防治 WSSV 提供必须的理论基础。中和抗体,特别是单克隆中和抗体是此项研究的有力工具。然而对虾细胞系目前还未成功建立,这为中和抗体的筛选带来了很大困难。在对虾原代细胞培养的基础上^[3],依据病毒感染宿主细胞,首先是病毒识别蛋白与一个宿主细胞受体蛋白的相互作用的原理,利用病毒与宿主细胞亲和吸附这一特性,建立了一个新的筛选中和抗体的方法。实验结果表明,该方法操作简便,数据可靠,完全可以在缺少细胞系的情况下成功地用于筛选中和抗体。

1 材料与方法

1.1 试剂 Leibovitz's L-15 培养基购自美国 LIFE TECHNOLOGIES 公司; 胎牛血清购自 Promega 公司; 人表皮生长因子购自 GIBCO 公司; 青霉素、硫酸链霉素购自 BIB 公司; 能特异结合 WSSV 的单链抗体 A1, 为本实验室制备; HRP/Anti-E Tag conjugate 鼠单抗购自 Pharmacia 公司。

1.2 WSSV 的分离纯化及电镜检测 染病对虾采自广东汕头。抽取的对虾血淋巴液经冻融后置于蔗糖密度梯度(30%、50% 和 60%)顶部,以 125,000r/min, 离心 90min。在 50%

收稿日期: 2001-09-01; 修订日期: 2001-09-29

基金项目: 中国科学院择优特别支持费[Stz98-3-05]; 国家自然科学基金[30050003H] 和 [30170727]

作者简介: 高宏(1971—), 男, 湖北省监利县人; 助理研究员; 研究方向为生化及分子生物学

通讯作者: 戴和平 Tel: 027-87647716; E-mail: hpdai@ihb.ac.cn

(W/V)—60% (W/V) 蔗糖密度之间有一白色透明带, 此即为 WSSV 形成的沉淀带, 取此白色透明带, 用孔径为 $0.45\mu\text{m}$ 的 NC 膜过滤除菌, 分装保存待用。纯化的病毒滤液用 2% 磷钨酸负染法, 在 Hitachi H-600 透射电镜下观察。

1.3 抗血清的制备 取 $25\mu\text{g}$ 纯化的完整病毒与完全弗氏佐剂混匀, 腹腔注射出生 6 个星期的雌性 $57 \times \text{DBA}$ 杂交小鼠。以三个星期为间隔, 以不完全弗氏佐剂与 $25\mu\text{g}$ 纯化病毒对小鼠进行三次腹腔注射。最后一次注射 10d 后, 心脏取血, 以 $10,000\text{r}/\text{min}$ 离心 10min, 取上清, -20°C 保存待用。

1.4 Dot blot 法检测抗血清的特异性 将 $2\mu\text{g}$ 对虾血淋巴液抽提物与 $2\mu\text{g}$ WSSV 分别点在 NC 膜上, 用 PBSM (PBS + 4% 脱脂牛奶) 在室温下封闭 1h, 再用 500 倍稀释的待测血清与之保温 1h, 用 PBST (PBS + 0.1% Tween - 20) 洗涤三次, 再用 PBS 洗涤三次, 然后用 2000 倍稀释的羊抗鼠 IgG/HRP conjugate 与之保温 30min, 再分别用 PBST, PBS 洗涤三次, 用 3, 3'-二氨基联苯/ H_2O_2 进行显色反应。

1.5 对虾细胞的原代培养 主要参照 Tapay^[3] 和 Hsu^[4] 的方法, 稍有改进。取市场购得斑节对虾 (*Penaeus monodon* Fabricius) 5 只(随机抽血淋巴液检测均为健康对虾), 体长 8—12cm, 置于 10% 的 NaClO 溶液(含 $100\text{IU} \cdot \text{L}^{-1}$ 青霉素, $100\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 链霉素) 中浸泡 3—5min。在无菌条件下, 摘取对虾的淋巴器官, 在 L-15 培养基(含 10% 的胎牛血清、 $5\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl、 $100\text{IU} \cdot \text{L}^{-1}$ 青霉素、 $100\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 链霉素、 $100\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 表皮生长因子、30% 的虾肌肉抽提物) 中洗涤一次, 转入含有 $500\mu\text{L}$ L-15 培养基的 1.5mL 的离心管中, 充分剪碎淋巴器官。以每孔 $20\mu\text{L}$ 淋巴悬浮液接种于 96 孔细胞培养板上, 30—60min 后, 每孔中再加入新鲜的 L-15 培养液至 $200\mu\text{L}$, 在 26°C 条件下培养过夜。

1.6 宿主细胞吸附 WSSV 的检测 待对虾淋巴细胞组织的迁出细胞形成单层后, 倾去培养液, 分别接种如 1.2 所制备的病毒, 保温 1h 后, 加入 L-15 培养基至 $200\mu\text{L}$, 26°C 培养 4h 后, 小心倒掉细胞培养孔中的培养基, 用 PBS 轻洗三次, 然后用 4% 的甲醛固定细胞 10min。用 ELISA 法检测细胞吸附 WSSV 的量。

1.7 ELISA 用 PBS 将上述已固定的细胞培养板洗三次, 每孔加入 $200\mu\text{L}$ PBSM, 封闭 30min 后倒掉, 再用 PBS 清洗三次, 每孔加入用 PBSM 稀释 40 倍的一抗(A1 单链抗体) $100\mu\text{L}$, 保温 30min 后倒掉, 用 PBST 和 PBS 分别洗三次, 然后每孔加用 PBSM 稀释 8000 倍的二抗(HRP/Anti-E Tag conjugate) $100\mu\text{L}$, 反应 30min 后倒掉, 用 PBST 和 PBS 分别洗三次, 每孔加入 $100\mu\text{L}$ 显色底物(TMB/ H_2O_2), 10min 后每孔加入 $25\mu\text{L}$ $2\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2SO_4 终止反应, 测 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值。

1.8 中和抗体的检测 将病毒和待测抗血清按一定比例混合, 26°C 保温 1—2h 后, 加入到每个培养细胞孔中, 再加入 L-15 培养基至 $200\mu\text{L}$, 26°C 培养 4h 后, 按 1.6 和 1.7 所示方法检测该抗血清是否抑制细胞与 WSSV 的亲和吸附。

2 结果

2.1 纯化的 WSSV 的电镜观察

图 1 示经过蔗糖密度梯度离心提纯, 在电镜下观察到的 WSSV 粒子。1a 为失去囊膜的病毒粒子, 1b 为完整病毒, 其中病毒囊膜基本完整, 一端的尾样附属物清晰可见。用

OD_{280nm} 测定并计算出提纯的病毒蛋白含量为 $0.28mg/mL$ 。病毒的完整性是病毒吸附和感染宿主细胞的基础。提纯的病毒含有相当的完整性,用活体注射法显示该病毒制剂具有感染力,故可以用于对虾细胞的吸附和感染的研究。

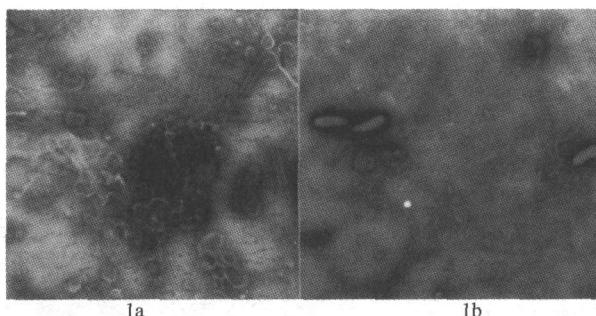


图 1 纯化的 WSSV 病毒粒子电镜图 ($\times 20000$)。1a, 失去囊膜的 WSSV; 1b, 完整的 WSSV 的病毒粒子

Fig. 1 Electron Micrograph of purified WSSV ($\times 20000$). 1a, virus without envelope, 1b, virus with envelope

2.2 WSSV 抗血清的特异性

用完整 WSSV 颗粒免疫小鼠, 目的是想获得中和抗体。Dot-blot 的结果(图 2)显示, 所制备的 WSSV 抗血清能特异性的与 WSSV 结合。对虾血淋巴液 $2\mu g$ 另有 ELISA 实验表明, 该抗血清的效价在 10^4 以上(数据未显示)。用克氏螯虾活体检测, 该抗血清对 WSSV 有至少 80% 的中和效率。

2.3 对虾淋巴细胞的原代培养

图 3 示原代培养细胞的倒置显微镜照片。原代培养的细胞由于不能传代生长, 存在细胞分布不均, 致实验结果不稳定等问题。为此在培养细胞时, 每次尽可能地剪碎淋巴器官并打散细胞, 使之最大限度地均匀分布于每个细胞培养孔中。每个样品均同时做 8 个重复的测量, 对于明显偏高或偏低的读数弃之不用。因此在实验中, 每次原代培养的细胞基本分布均匀, 在细胞培养的最初几个小时内, 游离出来的细胞大多呈圆形, 分散良好, 如图 3a。经过 12h 培养后, 细胞贴壁生长, 呈树枝状, 如图 3b。

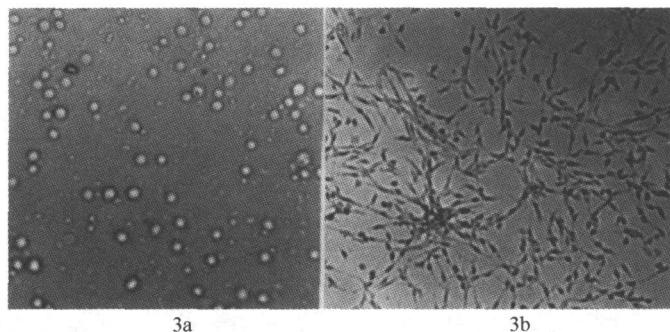


图 3 原代培养的对虾淋巴细胞倒置显微镜图 ($\times 400$)。3a, 培养 1—2h 的细胞形态; 3b, 经过 12h 培养后的细胞形态

Fig. 3 Microscopy of Primary cultured shrimp lymphoid organ cells ($\times 400$). 3a, cultured cells in 1—2h; 3b, cultured cells in 12h

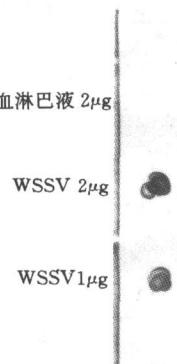


图 2 抗血清的 Dot blot

Fig. 2 Dot blot for
antiserum against WSSV

2.4 ELISA 对 WSSV 吸附及中和抗体的检测

原代培养的对虾淋巴细胞是 WSSV 的宿主细胞,其亲和吸附病毒的能力是有一定限度的。当其表面受体位点被病毒饱和后,多余的病毒将不能被继续吸附。ELISA 测试的结果清楚地表明,当病毒的上样量分别为每孔 5.6ng、28ng、56ng、280ng、560ng 时,细胞所吸附的病毒的数量与所加病毒量在一定范围内呈正比例(图 4)。当轻轻洗去不能吸附的病毒后,为了后面 ELISA 测试的方便,用固定剂将其固定。A1 是本实验室通过噬菌体展示技术制备的抗 WSSV 单链抗体(另文发表),它能特异性识别 WSSV,并能和 WSSV 特异性结合。它带有 E-Tag 小肽,可以和二抗(HRP/Anti-E Tag conjugate)结合,再通过二抗上偶联的辣根过氧化物酶(HRP)的显色反应将信号逐级放大,从而可以检测到细胞上吸附的痕量 WSSV。在实验中发现,细胞培养板上每孔的细胞吸附病毒的量随添加病毒量的增加有明显的梯度变化。当所加病毒量从 5.6ng 提高到 56ng 时,细胞吸附病毒的量也随着升高,但当病毒从 280ng 提高到 560ng 时,细胞吸附病毒的量不再有明显的升高。显然 280ng 病毒量是培养细胞对病毒的饱和吸附量,故在和抗血清的反应中,选用的病毒蛋白量为 280ng。

当病毒预先和抗血清保温后,再用如上方法进行 ELISA 测试。对照组为培养细胞和培养细胞中仅加入 280ng 病毒,实验组为加入 280ng 病毒和 1.0 μ L 抗血清的混合物。每组为 8 个细胞孔,实验结果为 8 孔的平均读数。从图 5 中可以清楚地看出,WSSV 的抗血清能有效地抑制 WSSV 与原代培养细胞结合。在预先与病毒保温后,病毒不能再吸附到原代培养细胞上,ELISA 检测到的数值很低(3),与未加病毒的对照组(1)接近。而没有抗体作用的另一组对照(2)则有相当高的 ELISA 反应,两者的差别显著。多次重复实验的结果都非常一致。这与该抗血清在克氏鳌虾活体实验的中和效率是一致的。

3 讨论

目前细胞培养法是筛选中和抗体的主要方法之一。由于对虾细胞系至今仍未成功建立,为获取 WSSV 中和抗体带来了很大的困难。作者曾试用对虾活体筛选 WSSV 的中和抗体,但是由于 WSSV 的大范围的感染,很难找到无感染的对虾做实验,再加上需具备很

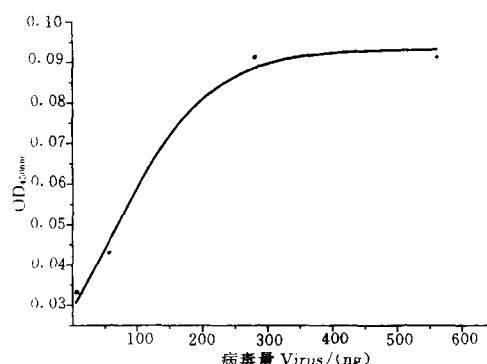


图 4 ELISA 检测 WSSV 与原代培养细胞的亲和吸附

Fig.4 Detection of affinity binding of primary cultured with WSSV by ELISA



图 5 ELISA 检测中和抗体

1, 细胞; 2, + WSSV; 3, + WSSV + 抗血清

Fig.5 Detection of neutralized antibody
1, cells only; 2, cells + WSSV;
3, cells + WSSV + antiserum

好的养殖对虾的实验条件,限制了活体实验;也曾尝试用红细胞吸附法筛选 WSSV 的中和抗体,未成功。WSSV 感染宿主细胞的初期,必须具有完整囊膜结构这一实验结果,暗示着 WSSV 在感染宿主细胞的初期必须首先经过一个亲和吸附和相互作用的过程。根据这个设想,用对虾原代培养的细胞对 WSSV 完整病毒颗粒进行吸附,用 ELISA 法测定吸附的 WSSV 的量,凡是能抑制病毒与宿主细胞亲和吸附的抗体,就会阻止病毒的进一步感染,就应是中和抗体。制备的 WSSV 抗血清在以前的克氏鳌虾活体实验中显示出 80% 以上的中和效率,在本实验中显示出完全抑制 WSSV 与对虾原代培养细胞的亲和吸附,进一步证明了这个抗血清具有中和病毒的能力。本技术的关键是:1,每个细胞培养板的小孔底部必须有足够的细胞均匀贴壁,这样才能获得可靠的有价值的 ELISA 信号;2,当病毒吸附细胞后,必须轻轻洗去未吸附的病毒,然后用固定液将其固定,这样就避免了后面的 ELISA 操作过程引起的细胞脱落。由于每次实验都选用了细胞和细胞 + 病毒作为对照,因此所获数据应正确反映了抗体的中和能力。通过大量的实验和不断的技术改进,此方法操作简便,数据稳定,结果可靠,在目前没有对虾细胞系的情况下,完全可以用于单克隆和噬菌体中和抗体的初步筛选,为最终的活体实验选中目标。

参考文献:

- [1] 黄捷,宋晓玲,于佳,等.杆状病毒的皮下及造血组织坏死-对虾爆发性病的病原和病理学[J].海洋水产研究 1995,16(1):1—10
- [2] Wongteerasupaya C, Vickers J, Sriurairatana S, et al. A non-occluded systemic baculovirus origin and causes high mortality in the black tiger prawn penaeus monodon [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*. 1995,21:69—77
- [3] Tapay L M, Lu Y, Gose R B, et al. Development of an in vitro quantal assay in primary cell cultures for a non-occluded baculo-like virus of penaeid shrimp [J]. *J. Virol Method*. 1997,64:37—41

A NOVEL METHOD OF SCREENING NEUTRALIZING ANTIBODY AGAINST WHITE SPOT SYNDROME VIRUS USING PRIMARY CULTURED CELLS

GAO Hong, YUAN Bi-feng, YUAN Li, ZHAO Xin-yan and DAI He-ping

(Institute of hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

Abstract: According to the characteristics of affinity binding of virus with host cells, a novel method of screening neutralizing antibody against white spot syndrome virus (WSSV) has been established. After interaction of WSSV with primary cultured cells from shrimp lymphoid organ, unbound virus is washed away, and the cells are fixed by formaldehyde. Then the virus, which can bind on the cells, are assayed by ELISA. After incubation of virus with its antiserum, the antiserum that can inhibit virus binding ability to the cells should contain neutralizing antibody. This method has some strong points with handle easy and data stable, which can be used to screen neutralizing antibody under the lack of cell lines.

Key words: Primary cell cultures; White Spot Syndrome Virus (WSSV); Neutralizing antibody