

中华鳖病毒的血清学检测

张奇亚 李正秋 胡峻

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

摘要: 中华鳖病毒(TSV)是从病鳖中分离到的一种病毒病原。经细胞培养和差异离心制备 TSV 抗原, 肌注家兔获 TSV 抗体(TSV-Ab), 中和效价为 1:20。用 TSV-Ab 进行双向免疫扩散和间接 ELISA 检测, 被检样品有健康和病鳖组织匀浆液、TSV 细胞培养液、提纯的 TSV, 以及鱼传染性胰脏坏死病毒(IPNV)、草鱼呼肠弧病毒(GCV)、鱼病毒性出血败血症病毒(VHSV)、鲤痘疮病毒(Carp pox virus)和斑节对虾杆状病毒(MBV)。检测结果显示: IPNV、GCV、VHSV、Carp pox virus、MBV 和健康中华鳖的组织匀浆液与 TSV-Ab 呈阴性反应; 而感病中华鳖组织匀浆液、TSV 感染的细胞提取液与 TSV-Ab 呈阳性反应。

关键词 中华鳖病毒; 水生动物病毒; 血清学检测

中图分类号: S947.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-32007(2000)04-0356-06

水生动物病毒的血清学检测技术, 不仅是对病原进行分类鉴定、了解不同水生动物病毒之间血清学相关性的有效方法, 而且是对病毒病进行早期诊断和防治研究的重要手段。如今有些血清学检测技术, 如荧光抗体检测(Fluorescent antibody technique, FAT)、酶联免疫吸附(Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)、免疫电镜(Immunoelectron microscopy)、中和试验(Neutralization)、协同凝集反应(Coagglutination, COA)等已广泛用于鱼类病毒学研究^[1-4]。但是, 国际上关于爬行类动物病毒的血清学研究仅有少量资料^[5], 国内尚未见报道。近年, 在发现和分离到中华鳖病毒(*Trionyx sinensis* virus, TSV)之后, 对 TSV 的形态大小、结构多肽、感染及与宿主细胞的相互作用、理化性质等多方面开展了研究^[6-9]。并就 TSV 的血清学性质及其检测技术展开探讨。本研究在制备中华鳖病毒抗体(*T. sinensis* virus-Antibody, TSV-Ab)和测定 TSV-Ab 中和效价的基础上, 建立了 TSV 免疫扩散及 ELISA 检测技术, 并进一步利用这些技术检测了 TSV 与一些鱼、虾病毒抗原的血清学相关性。

1 材料与方法

1.1 病毒抗原和抗体的制备 通过细胞培养, 在鲤上皮乳头瘤细胞(Epithelioma pap-

收稿日期: 1999-08-23; 修订日期: 1999-12-08

基金资助: “淡水生态与生物技术”国家重点实验室基金

作者简介: 张奇亚(1957—), 女, 博士, 现主要从事水产动物病毒的研究。胡峻为武汉大学生命科学院基地班97届实习生, 现在美国攻读博士学位

losum cyprini, EPC) 中扩增 TSV。待感染细胞出现病变后, 收集细胞培养的病毒悬液, 反复冻融 2—3 次, 使被感染的细胞裂解, 并充分释放出其中的病毒颗粒。然后经 8,000r/min (HITACHI 离心机, 转头型号为 RPR-20) 离心 15min; 取上清, 以 28,000r/min (CENTR IKON T-2060 离心机, 转头型号为 TST 28.38) 离心 3h; 收集沉淀, 用 0.1×PBS(NaCl 0.8%, KCl 0.02%, KH₂PO₄ 0.02, Na₂HPO₄ 0.289%) 悬浮, 即得到用于接种家兔的 TSV 免疫抗原。

待检样品有患病中华鳖组织匀浆液和 TSV 感染的细胞培养液, 还有其它的鱼、虾病毒, 包括在 EPC 细胞中培养的 TSV、在 RTG-2 中培养的传染性胰脏坏死病毒 (Infectious Pancreatic Necrosis Virus, IPNV)、在 CIK 细胞中培养的草鱼呼肠弧病毒 (Grass Carp Reovirus, GCV)、在 CHSE 细胞中培养的病毒性出血败血症病毒 (Viral Haemorrhagic Septiaemia Virus, VHSV)、在 R-1 细胞中培养的鲤鱼痘疮病毒 (Carp Pox Virus) 和从患病斑节对虾组织中初步提纯的对虾杆状病毒 (Monodon Baculovirus, MBV)。

用提纯 TSV 作为免疫抗原肌注家兔, 每周一次, 加强免疫 3—4 次, 在进行末次免疫接种一周后采血, 制备 TSV-Ab。收集到的 TSV-Ab 可直接用于免疫扩散、或经冻融过的 EPC 细胞裂解液按 1:1 与之混合, 吸附其中的非特异性抗体后用免疫扩散或 ELISA 检测。

1.2 中和试验 抗血清在 56℃ 条件下, 保温 30min 进行灭活处理, 冷却后用 PBS 缓冲液, 作系列倍比稀释, 使其稀释度分别为原血清的 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, …, 每管加入量为 0.5mL。病毒用 PBS 缓冲液稀释至 200 个 TCID₅₀/0.1mL, 分别在上述各管中加 0.5mL(与血清等量)充分混匀, 37℃, 1h。取出后, 在已长成单层的细胞培养板中, 以每孔 0.1mL 的量加入相应孔中, 每个稀释度接种 3 个孔。同时设病毒滴度对照和正常细胞对照。最后根据细胞病变计算 TSV-Ab 的中和效价。

1.3 免疫扩散测试 1% 琼脂铺在直径为 5cm 的平皿中, 打上梅花型的孔, 在中心孔内加入经过或未经 EPC 细胞裂解液吸附的 TSV-Ab 1mL, 在侧孔内加入不同待检样品 0.5mL, 作双向免疫扩散测试。

1.4 ELISA 检测 取被检测样品 100μL 加入酶标板中, 37℃ 包埋 2h 或 4℃ 包埋过夜, 倾去反应液, 加入洗涤液 (Phosphate-Buffered Saline with Tween, PBST: 含有 0.005% Tween-20 的 0.02×PBS, pH = 7.4) 洗涤 3 次, 再加入 0.01g/mL 牛血清白蛋白 (溶于 1×PBS), 每孔 100μL, 37℃ 作用 30min, 按前法洗 3 次; 加入经 EPC 细胞裂解液吸附过的 TSV-Ab, 每孔 100μL, 37℃ 反应 45min, 按前法洗 3 次; 加入用 1×PBS 按 1:1000 稀释的酶标羊抗兔 IgG, 每孔 100μL, 37℃ 反应 45min, 洗 3 次; 每孔加入反应底物 100μL (0.2mol/L 磷酸盐 - 0.1mol/L 柠檬酸缓冲液, pH = 5.0, 邻苯二胺 1mg/mL 和 30% H₂O₂ 1μL), 37℃ 反应 15min 后, 加入反应终止液 (2M H₂SO₄), 每孔 200μL。以正常细胞裂解液或健康动物组织匀浆液取代相应被检病毒样品, 设阴性对照。用酶标仪在 490nm 检测 OD 值。当样品孔的 OD 值 (P) 与阴性对照孔的 OD 值 (N) 之比 (P/N 值) 大于 2 的为阳性。

1.5 TSV-Ab 浓度的选择 取 100 个 TCID₅₀ 的 TSV, 分别加入以 1:2, 1:20, 1:200, 1:2000 倍稀释的 TSV-Ab, 各进行 ELISA 反应。根据 P/N 值, 选择适宜的抗体浓度, 用于对不同病毒抗原的 ELISA 检测。

2 结 果

2.1 TSV-Ab对 TSV 感染细胞的影响 细胞板的左 3 列依次为 TSV(100 个 TCID₅₀) 加按倍比系列稀释的 TSV-Ab。细胞板的右 3 列依次是 10 倍系列稀释的 TSV 病毒滴度对照。整个细胞板的最下 1 排为不加 TSV, 也不加 TSV-Ab 的细胞对照。可见细胞对照生长完全正常; 而未加抗体时, 100 个 TCID₅₀ 的 TSV 能使细胞充分病变(图 1)。根据细胞病变的情况及有关计算方法^[10], 测得 TSV-Ab 的中和效价为 1:20。

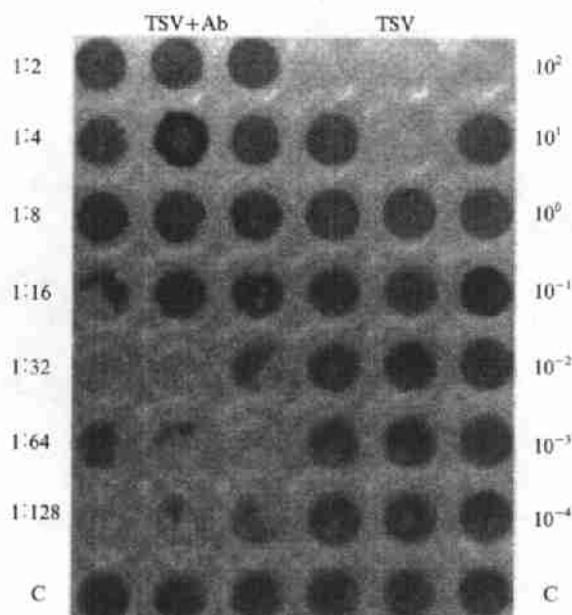


图 1 TSV-Ab 对 TSV 感染细胞的影响。细胞板的右侧 3 列为加入不同滴度(从上至下依次从 100 到 0.0001 个 TCID₅₀) TSV 感染细胞的结果; 左侧 3 列在加 TSV(100 个 TCID₅₀) 的同时再加入系列稀释(从上至下稀释比为 1:2 至 1:128) 的 TSV-Ab, 显示 TSV-Ab 对 TSV 感染细胞的抑制作用。最下 1 排的 1 至 6 列为不加 TSV 和 TSV-Ab 的正常细胞对照。

Fig.1 Effect of TSV-Ab TSV infection cells. The right 3 lanes show the infection results by different TSV titles (100 to 0.0001 TCID₅₀ from up to down), the left 3 lanes show the serial dilution of TSV-Ab (1:2 to 1:128 from up to down). The last row from lane 1 to lane 6 is normal cell control without TSV and TSV-Ab.

2.2 免疫扩散结果 用未经细胞裂解液吸附的 TSV-Ab 与经差离心提纯的 TSV^P 产生了 2 条沉淀线(图 2A)。经过 EPC 细胞裂解液吸附的 TSV-Ab 与同样的抗原 TSV^P 反应, 只产生 1 条特异的沉淀线(图 2B)。IPNV、Carp pox virus、VHSV、GCV 和 MBV 与未经过或经过细胞裂解液吸附的 TSV-Ab 作用, 都无沉淀线(图 2A, B), 表明这些鱼虾病毒与 TSV 之间缺少血清学相关性。

提纯的 TSV^P(TSV-purified, TSV^P)稀释 5 倍(1/5 TSV^P)和稀释 50 倍(1/50 TSV^P)的 TSV 样品与 TSV-Ab 都能产生清晰的沉淀线, 但稀释至 500 倍(1/500 TSV^P)时, 就看不到沉淀线。感染 TSV 的细胞培养液(TSV-infected culture cell, TSV^c), 分别稀释 5 倍(1/5 TSV^c)和 50 倍(1/50 TSV^c)与 TSV-Ab 反应, 前者出现沉淀线, 但后者未出现沉淀线。用来

自病鳖组织匀浆液的 TSV (TSV from tissues, TSV^t) 与 TSV-Ab 作用, 能产生沉淀线(图 2C)。另有试验显示, 正常鳖组织匀浆液与 TSV-Ab 不产生免疫沉淀线。

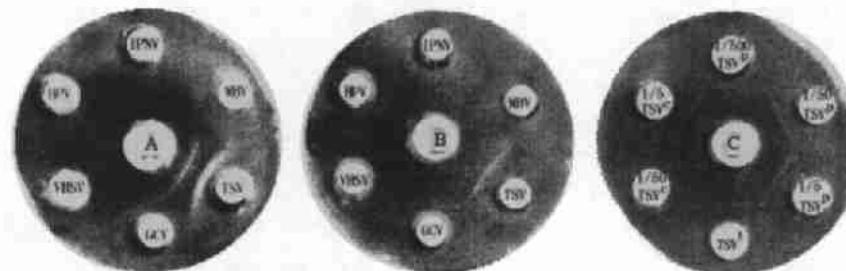


图 2 免疫扩散检测的结果。中心孔内加入未经细胞裂解液吸附的抗体 TSV-Ab(A) 和经过正常 EPC 细胞裂解液吸附的抗体 TSV-Ab(B,C), 側孔内加入为图中所示的不同病毒。

Fig. 2 The results of immunodiffusion test. The central holes are the TSV-Ab non absorbed (A) or absorbed (B, C) by normal EPC lysis, and the side holes are different viruses isolated from aquatic animals.

2.3 ELISA 以 TSV-Ab 稀释倍数为横坐标, 以 TSV 的 OD 值(P)与阴性对照孔的 OD 值(N)之比为纵坐标, 绘出 TSV-Ab 浓度变化曲线(图 3)。

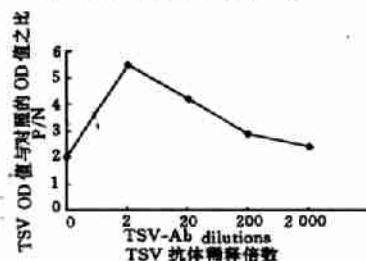


图 3 经 ELISA 检测所得, 不同稀释倍数(2, 20, 200 和 2000) TSV-Ab 和 100 个 TCID₅₀ TSV 反应的 OD 值(P)、与对照样的 OD 值(N)之比。OD_{50%} 约相当于 TSV-Ab 稀释 200 倍。

Fig. 3 ELISA OD value ratio of 100 TCID₅₀ TSV sample (P) and the negative control (N) reacted with the different dilution (2, 20, 200, 2000) of TSV-Ab. The dilution of TSV-Ab corresponding to the OD_{50%} was about 1:200.

当 TSV-Ab 稀释 2 倍时, P/N 达到峰值; 当 TSV-Ab 稀释倍数降低时, 会因背景值过高, 而使 P/N 值下降; 随着 TSV-Ab 稀释倍数从 2 增加, P/N 值也会下降, 这是由于随着 P 值下降, 对照 N 值也相应下降的缘故, 但 P/N 值变化相对较小; 当 TSV-Ab 稀释 200 倍时, P/N 值接近 OD_{50%}(图 3)。因此, 在进行 ELISA 检测时, 选择用稀释 200 倍的 TSV-Ab。当 P/N > 2 时, 判断为阳性(+), 反之为阴性(-)。

表 1 TSV-Ab 对 TSV 及其它水生动物病毒的 ELISA 检测结果

Tab. 1 The results of ELISA detection of TSV and other different viruses form aquatic animals with TSV-Ab.

viruses	TSV ^p	10 ⁻² TSV ^p	TSV ^t	TSV ^s	IPNV	Carp-pox	VHSV	GCV	MBV
P/N	6±1.2	4.2±1.0	3.3±0.8	5.4±1.0	1.4±0.5	1.1±0.5	1.2±0.8	1.0±0.6	0.8±0.4
	+	+	+	+	-	-	-	-	-

注: TSV^p 经差异离心提纯的 TSV; TSV^t: TSV 病鳖组织匀浆液; TSV^s: TSV 感染的细胞液。

TSV^p: TSV-purified; TSV^t: TSV from tissues; TSV^s: TSV-infected culture cell.

TSV 及其它水生动物病毒与 TSV-Ab 进行 ELISA 检测的结果(表 1)显示, 病鳖组织匀浆液(TSV^b)、TSV 细胞培养液(TSV^c)和稀释了 100 倍的 TSV^p(1/100 TSV^c)与 TSV-Ab 都呈阳性反应; IPNV、Carp-pox virus、VHSV、GCV 和 MBV 与 TSV-Ab 则呈阴性反应。另外, 正常鳖组织匀浆液与 TSV-Ab 也呈阴性反应。

3 讨 论

已有报道指出: 水生动物病毒有不同种类, 可分为虹彩病毒(Iridoviridae)、疱疹病毒(Herpesviridae)、小 RNA 病毒(Picornaviridae)、双 RNA 病毒(Birnaviridae)、呼肠孤病毒(Reoviridae)、弹状病毒(Rhabdoviridae)、逆转病毒(Retroviridae)、正粘病毒(Orthomyxoviridae)、副粘病毒(Paramyxoviridae)、野田病毒(Nodaviridae)、冠状病毒(Coronaviridae)、杆状病毒(Baculoviridae)^[11, 12]等十几个科。国内近年已分别从鳖、蛙、鳅等特种水生动物中观察到不同的病毒, 并进行了相应研究^[13—17]。根据已知结果, 对有的病毒已进行分类, 如将从我国养殖沼泽绿牛蛙中分离到的病毒(*Rana grylio* virus, RGV)鉴定为虹彩病毒^[16]; 但有的病毒尚待鉴定, 如 TSV。因此建立和应用血清学检测方法, 不仅对水生动物病毒病的早期诊断有重要意义, 而且对我国水生动物病毒学的深入研究十分必要。

无论是双向免疫扩散还是 ELISA 检测结果, 都显示 TSV-Ab 与 IPNV、Carp pox virus、VHSV、GCV 和 MBV 之间呈阴性反应。这表明了两种方法检测的结果相符, 而且也说明 TSV 与这 5 种病毒之间没有血清学相关性。IPNV 属双 RNA 病毒, Carp pox virus 属疱疹病毒, VHSV 是弹状病毒, GCV 是呼肠孤病毒, MBV 属杆状病毒, 检测结果提示, TSV 不属这些病毒家族成员。

采用经 EPC 细胞裂解液吸附的 TSV-Ab, 在与 TSV 进行免疫扩散时, 仅产生 1 条特异沉淀线(图 2B 与 C); 而未经 EPC 细胞裂解液吸附的 TSV-Ab 进行免疫扩散检测, 会有其它沉淀线产生(图 2A), 这是否由于其中含有宿主细胞的抗原, 还有待进一步探讨。IPNV、Carp pox virus、VHSV、GCV 和 MBV 等病毒都不是由 EPC 细胞培养, 因此用是否经吸附处理的 TSV-Ab, 都不会影响它们的免疫扩散结果。而用双向免疫扩散和直接 ELISA 方法不仅能测出细胞培养液中的 TSV, 也能测出鳖组织匀浆液中的 TSV, 这使对中华鳖病毒病的检测和诊断更为快速和方便。

参考文献:

- [1] Olesen N J, Lorenzen N, Jorgensen P E V. Serological differences among isolates of viral haemorrhagic septicaemia virus detected by neutralizing monoclonal and polyclonal antibodies [J]. *Dis Aquat. Org.* 1993, 16: 163—170
- [2] Hill B J, Way K. Serological classification of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus and other aquatic birnaviruses [J]. *Ann. Rev. Fish Dis.* 1995, 5: 55—77
- [3] Dixon P F, Groot J de. Detection of rainbow trout antibodies to infectious pancreatic necrosis virus by an immunoassay [J]. *Dis. Aquat. Org.* 1996, 26: 125—132
- [4] Taksdal T, Thorud K. Evaluation of a rapid coagglutination (COA) test for the detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in tissue samples of Atlantic salmon, *Salmo salar* L[J]. *J. Fish Dis.* 1999, 22: 117—124
- [5] Ahne W, Kurstak E. Viruses of Lower Vertebrates [M], New York; Spring-Verlag 1989, 105—113

- [6] 张奇亚, 李正秋, 江育林等. 中华鳖病毒病原的发现 [J]. 科学通报, 1996, 41(21): 1987—1990
- [7] 张奇亚, 李正秋. 中华鳖病毒病的组织病理研究 [J]. 水生生物学报, 1997, 21(4): 87—90
- [8] 张奇亚, 李正秋, 桂建芳. 中华鳖病毒感染引起宿主死亡的细胞病理学研究 [J]. 病毒学报, 1999, 15(1): 50—54
- [9] 张奇亚, 李正秋. 中华鳖病毒感染鱼类细胞的研究 [J]. 中国兽医学报, 1999, 2000, 20(1): 15—18
- [10] 殷震, 刘景华主编. 动物病毒学 [M]. 北京: 科学出版社 1997
- [11] Granzow H, Weiland F, Fichtner D, et al. Studies of the ultrastructure and morphogenesis of fish pathogenic viruses grown in cell culture[J]. *J. Fish Dis.*, 1997, 20:1—10
- [12] Lightner D V, Redman R M. Strategies for the control of viral diseases of shrimp in the Americas[J]. *Fish Pathology*, 1998, 33(4): 165—180
- [13] 张奇亚, 李正秋, 桂建芳. 特种水产养殖动物病毒病及其防治的生物技术研究 [A]. 中美农业科技与发展研讨论文集 [C]. 北京: 中国农业出版社, 1996, 168—174
- [14] 张奇亚, 李正秋, 江育林等. 沼泽绿牛蛙病毒的分离及其细胞感染的研究 [J]. 水生生物学报, 1996, 20(4): 389—391
- [15] Zhang Q-Y, Jiang Y-L, Li Y, et al. Isolation and characterization of nuleocapsids and enveloped virions of penaeus monodon baculovirus (MBV) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1998, 22(Suppl.): 1—5
- [16] Zhang Q-Y, Li Z-Q, Gui J-F, Studies on morphogenesis and cellular interactions of *Rana grylio* virus in an infected fish cell line[J]. *Aquaculture*, 1999, 175: 185—197
- [17] 张奇亚, 李正秋. 在患病鳜鱼组织中观察到 3 种病毒. 科学通报, 1999, 44(2): 192—195

SEROLOGICAL DETECTION FOR THE *TRIONYX SINENSIS* VIRUS

ZHANG Qi-ya LI Zheng-qiu and HU Jun

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

Abstract: *Trionyx sinensis* virus (TSV) was isolated from the lethal disease Chinese soft-shelled turtle. Antibody to the virus (TSV-Ab) has been produced from rabbits raised to TSV that was purified from infected EPC cells. The neutralization titer of TSV-Ab was 1:20. The TSV-Ab was applied to immunodiffusion and indirect ELISA for the virus pathogen detection. The detected samples included the homogenate of the health and diseased turtle tissues, TSV infected cell extracts, purified TSV, and other viruses from aquatic animals. Immunodiffusion and ELISA results by the TSV-Ab indicated that infectious pancreatic necrosis virus (IPNV), grass carp reovirus (GCV), viral haemorrhagic septiaemia virus (VHSV), carp pox virus, monodon baculovirus (MBV) and the homogenate of health turtle tissues were seronegative, while the infected cell extracts and the homogenate of diseased turtle tissues were seropositive. Thus, the immunodiffusion and the ELISA test were easy and sensitive methods for detecting TSV pathogen in the turtle aquaculture.

Key words: Chinese soft-shelled turtle virus; Aquatic animals virus; Serological detection.