

草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)出血病二价细胞灭活疫苗体液免疫效果及免疫保护率评价研究*

郝贵杰¹ 林 锋¹ 黄爱霞¹ 叶 霆² 姚嘉赞¹ 潘晓艺¹
袁雪梅¹ 徐 磊¹ 胡金春² 沈锦玉¹

(1. 农业农村部淡水渔业健康养殖重点实验室 浙江省鱼类健康与营养重点实验室 浙江省淡水水产研究所 浙江湖州 313001; 2. 衢州市水产技术推广中心 浙江衢州 324000)

摘要 草鱼出血病是由草鱼呼肠孤病毒(GCRV)引起的草鱼养殖业一种严重的病毒性出血病,给草鱼养殖产业造成重大损失。该病毒是一种双链分节段 RNA 病毒,根据 GCRV 多个病毒分离株基因序列分析及临床发病特点,共有三种基因型 GCRV,其中基因型和型较为流行。通过细胞分离培养基因型(GCRV-ZV8909)和型(GCRV-HZ13) GCRV,研制出草鱼出血病二价细胞灭活疫苗,通过绝对定量的方法,测定基因型和型的病毒含量分别为 2.0×10^9 及 1.5×10^6 copies/mL。用生理盐水将其分别进行 50 倍稀释和 100 倍稀释,包括原液及生理盐水对照共 4 组,分别腹腔注射免疫(20 ± 5) g 健康草鱼,剂量均为 0.2 mL/尾,每组 40 尾,各组于免疫后 3、5、7、14、21、28、42、56、70、84 d 分别取 3 尾采集血液制备血清。分别利用经原核表达并纯化制备两种基因型 GCRV 的 VP7 蛋白以及实验室保存的草鱼 IgM 单抗,建立了三抗体夹心酶联免疫方法(TAS-ELISA)分析评价疫苗体液免疫效果。结果表明,草鱼经腹腔注射不同剂量的细胞灭活疫苗后,与对照组相比,各免疫组血清抗体均有不同程度的提高,且原液组与 50 倍稀释组基本持平,但都高于 100 倍稀释组,各免疫组在免疫后 5 d 即可检测到两种基因型 GCRV 抗体,且抗体水平持续到 84 d,但两种基因型抗体水平达到高峰的时间不一致,抗基因型 GCRV 抗体达到高峰是在 28 d,抗基因型 GCRV 抗体是在 14 d 达到高峰。两种基因型抗体水平达到高峰时的血清效价分别为 1 : 800、1 : 600。免疫保护率实验结果表明,原液组保护率最高,为 67%,50 倍稀释组为 60%,100 倍稀释组只有 33%。

关键词 草鱼呼肠孤病毒(GCRV); 三抗体夹心酶联免疫方法(TAS-ELISA); 体液免疫; 免疫保护率
中图分类号 S942; Q955; S965 doi: 10.11693/hyhz20220300082

草鱼(grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*)是我国传统的“四大家鱼”之一,因营养高、味道鲜美且饲养成本低而广受欢迎,根据 2021 年中国渔业统计年鉴,2020 年草鱼产量占淡水养殖总产量的 18%,依然是中国淡水养殖鱼类产量的卫冕冠军,比 2019 年增加 0.69%,具有较高的经济价值。但随着草鱼大规模集约化养殖的发展,草鱼病害时有发生,如细菌性疾病、病毒性出血病、寄生虫病等,损失最大的是草鱼

出血病,据不完全统计,每年由该病导致的经济损失达 20 余亿元(陈爱平等,2010)。其病原为草鱼呼肠孤病毒(grass carp reovirus, GCRV),该病毒属于水生呼肠孤病毒属,是该属成员中毒力最强的一种,也是中国分离鉴定,并在国际上首次完成全基因序列分析的第一株鱼类病毒,可导致草鱼在鱼种阶段发生出血病,死亡率一般为 30%~50%,最高可达 60%~80% (Winton *et al*, 1987; 柯丽华等,1990; Rangel *et al*,

* 蓝色粮仓科技创新项目,2019YFD0900104 号;浙江省公益技术研究农业项目,2016C32076 号。郝贵杰,博士,研究员, E-mail: 391601350@qq.com

通信作者: 沈锦玉,硕士生导师,研究员, E-mail: shenjinyu@126.com; 胡金春,高级工程师, E-mail: 1025759928@qq.com

收稿日期: 2022-03-31, 收修改稿日期: 2022-06-10

1999; 王方华等, 2006)。GCRV 为双链分节段 RNA 病毒, 基因组分 11 个节段, 病毒颗粒为二十面体对称的球形颗粒, 病毒粒子平均直径为 60~70nm, 具有双层衣壳, 没有囊膜, 对氯仿和乙醚处理不敏感, 在 pH 3~11 范围内十分稳定(Francki *et al*, 1991; Fang *et al*, 2000, 2005; Qiu *et al*, 2001)。GCRV 病原学比较复杂, 目前国内报道有几十个分离株, 但不同分离株产生的细胞病变效应(CPE), 对草鱼的致病力差异较大, 而且其基因组带型及序列也存在差异。目前还没在血清学上对其进行分类, 但根据现有病毒分离株的核苷酸及氨基酸的序列信息, 构建系统进化树进行比对分析, 共有三种基因型 GCRV, 即 GCRV 型(GCRV- , 代表株为 GCRV-873 与 GCRV- ZV8909)、GCRV 型(GCRV- , 代表株为 GCRV- HZ08 与 GCRV-GD108)和 GCRV 型(GCRV- , 代表株为 GCRV-104)。近年来, 国内多家单位包括本实验室针对草鱼出血病开展的流行病学研究结果表明, 临床流行的毒株主要为 GCRV 型和 型, 型很少(张超等, 2010; Wang *et al*, 2012; 李永刚等, 2013; 杨映等, 2015)。

草鱼出血病一直是我国草鱼养殖中最难控制的疾病, 但目前未见病毒病的特效治疗药物, 因此采用疫苗免疫, 再联合早期诊断, 可有效降低该病的危害, 是控制病毒病最可取也是最有效的方法。传统的“土法疫苗”组织浆灭活疫苗在 20 世纪 70、80 年代时为各地控制草鱼出血病疫情起到了积极成效, 但其需大量鱼体扩增病毒, 费时费力, 并存在扩散病毒的危险(刘楠等, 1977)。目前细胞培养弱毒疫苗已取得了疫苗生产批准文号, 在多个地区进行了推广应用, 对草鱼出血病的控制起了很大的作用, 但也存在病毒毒力返强的风险(许淑英等, 1994); 因此研制细胞灭活疫苗尤其是二价细胞灭活疫苗具有较大的经济和社会效益。课题组前期研究表明疫苗免疫刺激机体启动了非特异性和特异性免疫应答(奕志娟等, 2015)。本研究从体液免疫及免疫保护率的角度对草鱼出血病二价细胞灭活疫苗进行免疫效果评价, 以表达纯化的 GCRV 结构蛋白 VP7 作为测试抗原, 以实验室自制的草鱼 IgM 单抗为一抗, 以商业化的羊抗鼠 HRP 酶标抗体为二抗, 建立了测试未知抗体的三抗体夹心酶联免疫方法(TAS-ELISA)检测方法评价疫苗特异性体液免疫应答的免疫效果, 并在实验室开展了二价疫苗免疫保护率实验, 为进一步开展二价疫苗的免疫示范和新兽药证书申报提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂

超微量分光光度计(NanoDrop2000); Mx3005P 荧光定量 PCR 仪(Stratagene 公司); MIR-154 低温恒温培养箱(日本三洋); 550 型酶标仪(Bio-rad); CKX31 倒置显微镜(奥林巴斯)。RNA 提取试剂盒购自 QIAGEN 公司, 反转录试剂盒 [FastQuant RT Kit (with gDNase)], 质粒小提试剂盒(TIANprep Mini Plasmid Kit)等购自 TIANGEN 公司, iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix 购自 Bio-RAD 公司, SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒, ELISA 相关试剂等购自索莱宝生物科技有限公司, M199 细胞培养基、0.25%胰酶消化液、双抗(青霉素、链霉素)均购自上海普飞生物技术有限公司, 引物合成及序列测定委托南京金斯瑞生物科技有限公司, 其他生化试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 实验用质粒、细胞株及实验动物等

pET28a 原核表达载体由宁波大学惠赠, 大肠杆菌 DH5 α 、BL21 (DE3)、草鱼 IgM 单抗、CIK 细胞由本实验室保存; 所用 GCRV 毒株为本实验室分离保存, 其中标准参考株 GCRV873 细胞悬液由中国水产科学研究院长江水产研究所鱼病研究室惠赠, (20 \pm 5) g 的健康草鱼购自长兴某养殖场。

1.3 两种基因型 GCRV 的实时荧光绝对定量 PCR (AQ-PCR)方法的建立

根据 GenBank 公布的基因 型和 型 GCRV 第六基因序列设计绝对荧光定量 PCR 特异性扩增引物, 目的片段大小分别为 102 bp 和 169 bp。上游和下游引物序列分别为 F1: 5'-CCCA CATCCTCCTCCAAT-3', R1: 5'-AACGACTTCGCCCTTGTA-3'; F2: 5'-GGACG GCGGCTGCTATGAT-3', R2: 5'-GCCCGTAACGCAG GGTAT-3'。

按常规方法构建含上述目的基因的阳性重组质粒。用 NanoDrop2000 测定所制备的基因 型、 型 GCRV 的标准质粒的浓度和纯度, 根据公式: 质粒拷贝数(单位: copies/ μ L)=6.02 \times 10²³(单位: copies/mol) \times 质粒浓度(单位: g/ μ L)/质粒分子量(单位: g/mol), 得出质粒拷贝数(李丽等, 2011)。基因 型、 型 GCRV 的标准质粒浓度分别为 157.1、118.8 ng/ μ L, 按公式得拷贝数分别为 1.4 \times 10¹²、6.4 \times 10¹¹ copies/ μ L。将基因 型、 型 GCRV 质粒分别用 ddH₂O 进行 10 倍梯度稀释, 稀释成 1 \times 10⁸~1 \times 10² copies/ μ L 的 7 个梯度, 将其分别作为模板进行荧光定量 PCR 反应, 每个模板重复做 3 次, 采用 20 μ L PCR 反应体系: iQ SYBR®

Green SuperMix 10 μL , 荧光定量 PCR 引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.5 μL , 模板 2 μL , ddH₂O 7 μL 。PCR 反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 40 个循环。

1.4 细胞病毒液培养及其病毒含量测定

两种基因型 GCRV (GCRV-ZV8909 及 GCRV-HZ13) 分别利用细胞瓶培养的方法进行扩增培养, 待基因型 GCRV 产生明显的细胞病变及基因型 GCRV 病毒复制达到一定的拷贝数后收获细胞病毒悬液, 经反复冻融 3 次后将其分别合并备用。

分别提取上述两种基因型 GCRV 细胞病毒液 RNA 并进行反转录, 按照 1.3 中方法进行定量 PCR 扩增, 根据系统给出的结果计算两种细胞病毒液的病毒拷贝数。

1.5 草鱼出血病二价细胞灭活疫苗的制备

按相同病毒拷贝数将 GCRV-ZV8909 和 GCRV-HZ13 细胞病毒悬液混合作为病毒原液, 按照体积加入终浓度为 3.75 mL/L 福尔马林溶液(含 40%甲醛), 用恒温水浴锅 65 $^{\circ}\text{C}$ 灭活 2 h, 灭活后的病毒液重接 CIK 细胞, 培养 7 d 后观察细胞病变。经灭活检验后, 将疫苗原液用生理盐水进行稀释, 分别进行 50 倍、100 倍稀释备用。

1.6 草鱼免疫及血清样品制备

草鱼在恒温循环系统中充氧饲养, 水温 24~26 $^{\circ}\text{C}$ 。试验共分 4 个组: 疫苗原液组、50 倍稀释组、100 倍稀释组、生理盐水对照组, 每组 50 尾, 分别为腹腔注射, 剂量均为 0.2 mL/尾。各组在免疫后的 3、5、7、14、21、28、42、56、70、84 d 各取 3 尾鱼, 每尾鱼采集血液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜放置后 2 500 r/min, 离心 10 min 收集血清置于-80 $^{\circ}\text{C}$ 的超低温冰箱中保存备用。

1.7 两种基因型 GCRV S10 基因原核表达载体的构建及鉴定

分别根据 GCRV- 及 GCRV- 第 10 基因片段序列(型 S10 909 bp, 型 1 124 bp)和 pET-28a 表达序列的特征, 设计原核表达引物 F3:

5'-CGCATATGCCACTGCACATGATTCCGCAAG-3';

R3: 5'-CGCTCGAGTTAATCGGACGGTCCACATGC-3';

F4: 5'-CGCATATG ATGGCGGGTGTGTCTCTCAACA-3'

R4: 5'-CGCTCGAG CTACAGCATCTGCGCAATATA-3'。

该两对引物上下游引物 5'端分别含 *Nde* 及 *Xho* 酶切位点, 扩增片段分别为 840 bp 和 1 050

bp。PCR 反应体系按试剂盒配制, cDNA 模板为各病毒悬液提取 RNA 并反转录获得, 纯化回收 PCR 扩增产物后, 将其分别克隆至 pMD19-T 载体, 进行阳性克隆筛选并测序。重组表达质粒 pET-28a-S10 的构建采用常规酶切连接方法, 连接产物转化至 BL21 (DE3) 感受态细胞, 进行阳性克隆筛选并测序, 同时进行重组菌保种待用。

1.8 重组蛋白的表达纯化与鉴定

1.8.1 重组蛋白的诱导表达 取上述保存的菌液 30 μL , 接种至 3 mL 含有 100 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 置速度为 250 r/min 的 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床过夜培养。第 2 天分管培养新鲜菌液, 同样条件恒温摇至 OD₆₀₀ 结果为 0.6~0.8 时, 加入 IPTG 诱导, 其终浓度为 1 mmol/L, 同时设置未诱导组, 分别放至两种温度的摇床进行诱导培养, 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养 4 h, 15 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养 16 h, 然后收集菌液, 8 000 r/min 离心 10 min 后收集菌体, 加入 2 倍体积的 PBS 重悬菌体, 再加入溶菌酶进行超声破碎, 其终浓度为 1 mg/mL, 最后, 分别取全细胞裂解液以及经离心处理的沉淀和上清液进行 SDS-PAGE 分析。

1.8.2 表达蛋白纯化与 Western blot 鉴定 重组菌液经 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床扩大培养至 OD₆₀₀ 结果为 0.6~0.8 时, 如上加入 IPTG 进行诱导培养 16 h 后收集菌体。按照 Ni-Agarose His 标签蛋白纯化试剂盒说明进行重组蛋白纯化, 依次进行装柱、平衡、菌体裂解、离心、上柱、冲洗、洗脱等。分别收集蛋白洗脱液, SDS-PAGE 电泳分析, 并进行蛋白免疫印迹(Western blot)鉴定。

1.9 受免草鱼体液免疫效果评价

免疫草鱼不同时间血清抗体水平测试: 用实验室前期建立的 TAS-ELISA 方法进行测定, 首先用 pH 9.6 的碳酸盐缓冲液即包被液 CBS 稀释上述纯化的 VP7 融合蛋白至终浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$, 按照 100 $\mu\text{L/孔}$ 的量加入 96 孔酶标板, 置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜包被, 用 PBST 洗液充分洗涤包被板, 洗涤 3~4 次, 每次 3~5 min; 用含 8%脱脂奶粉的 PBS 封闭, 200 $\mu\text{L/孔}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h, 同上洗涤。将草鱼血清分别进行 1:80 稀释, 每孔加入 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1h, 同上洗涤。然后每孔加入 100 μL 1:1 000 稀释的草鱼 IgM 单抗腹水(本室制备), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1h, 同上洗涤。每孔加入 50 μL 1:2 000 稀释的羊抗鼠 IgG 酶标抗体, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1h, 同上洗涤。每孔加入 200 μL TMB 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育显色 10 min, 用 50 μL 2mol/L 浓硫酸终止反应后, 于酶标仪上读取 OD₄₅₀ 值。P/N \geq 2.1 者判为阳性,

$P/N < 2.1$ 者判为阴性(P 代表 TAS-ELISA 所测受免草鱼血清中抗体的 OD 值, N 代表所测健康草鱼的相应血清中抗体的 OD 值)。

受免草鱼血清抗体效价测定: 根据上述测定结果, 分别取与两种基因型病毒抗原结合抗体水平达到高峰时的草鱼血清, 进行 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:600, 1:800, 1:1200 梯度稀释, 按照上述方法分别测定抗两种基因型 GCRV 抗原的血清抗体效价, 未免疫草鱼血清分别做同比例稀释进行对照。

1.10 相对免疫保护率测定

草鱼免疫按照 1.6 中方法进行, 0.2 mL/尾, 每组免疫 30 尾, 注射同样剂量的 PBS 作为对照组。攻毒所用 GCRV 为实验室自行分离保存的毒株即江西株 JX2008, 其半数致死量为 $10^{7.5}$ LD₅₀/mL, 半数组织细胞感染量为 $10^{9.0}$ TCID₅₀/mL, 攻毒注射在草鱼免疫后

35 d 进行, 腹腔注射剂量为 0.2 mL。水温 28 °C 左右饲养, 观察 15 d 并记录死亡情况, 计算对照组和试验组死亡率, 并按下列公式进行计算:

$$\text{相对免疫保护率(\%)} = 1 - \frac{\text{免疫鱼死亡率}}{\text{对照鱼死亡率}} \times 100\% \quad (1)$$

2 结果

2.1 细胞扩大培养两种基因型 GCRV

正常生长的 CIK 细胞接种 GCRV-ZV8909 和 GCRV-HZ13 后, 用倒置荧光显微镜观察其病变情况如图 1, GCRV-HZ13 株可见部分细胞脱落死亡, 但不表现出明显的破鱼网状, 而 GCRV-ZV8909 株则出现边缘不整齐的空洞, 少许细胞脱落, 随着病变发展, 最后呈现典型破鱼网状, 与 GCRV- 型代表株 GCRV-873 的细胞病变一致, 而对照细胞未出现任何病变。

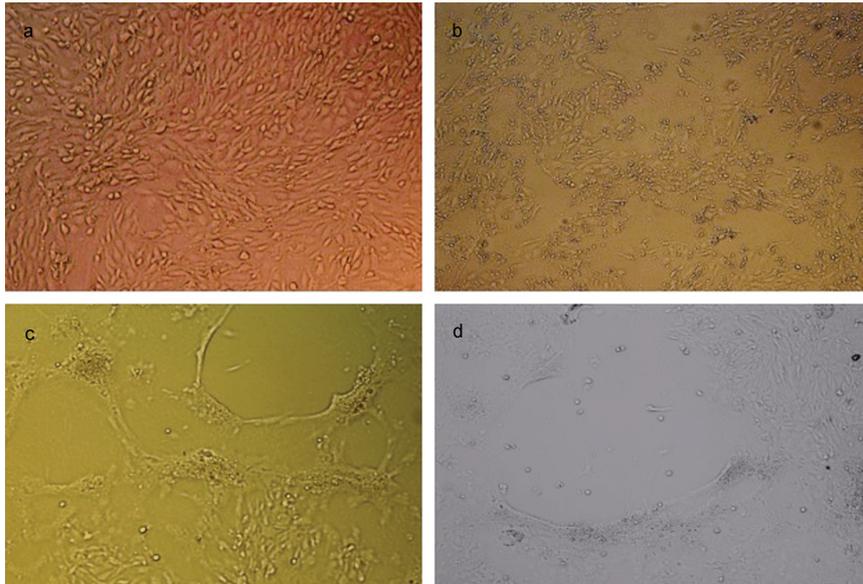


图 1 倒置荧光显微镜观察 GCRV 感染细胞后的病变(400×)

Fig.1 Fluorescent microscopic observation of the CPE of GCRV cultured with the cells (400×)

注: a. 对照(正常 CIK 细胞); b. GCRV-HZ13 感染 CIK 细胞; c. GCRV-ZV8909 感染 CIK 细胞; d. GCRV-873 感染 CIK 细胞

2.2 两种基因型 GCRV 的 AQ-PCR 方法的建立

将基因型、型 GCRV 质粒梯度稀释后选取 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^2$ copies/ μ L 的 7 个梯度作为标准品进行实时荧光定量 PCR 扩增后, 由系统自动生成的基因型、型 GCRV 的熔解曲线及标准曲线可知, 基因型、型 GCRV 质粒在梯度稀释浓度范围内具有较好的线性关系, 显示本研究建立的基因型、型 GCRV 质粒标准曲线能够准确地反映目的基因的扩增。由熔解曲线可知产物的 T_m (DNA 熔解温度)值均一, 熔解曲线表现为单一的峰, 说明引物的特异性较好。

2.3 两种基因型 GCRV 在细胞病毒悬液中拷贝数测定结果

根据 1.3 中 AQ-PCR 方法测定 1.4 中病毒悬液 RNA 得出的 Ct 值(循环阈值), 再由标准曲线得出的公式及试验过程中的稀释情况, 计算 GCRV-ZV8909 病毒液和 GCRV-HZ13 病毒液的拷贝数分别为 2.0×10^9 copies/mL 和 1.5×10^6 copies/mL。

2.4 草鱼出血病二价细胞灭活疫苗的制备

将 GCRV-ZV8909 和 GCRV-HZ13 按病毒拷贝数测定结果等比例混合, 均含病毒拷贝数约 1.5×10^6

copies/mL, 即每 mL 混合病毒液中含有 0.75 μ L GCRV-ZV8909 和 999.25 μ L GCRV-HZ13, 并以此作为原液。混合病毒原液按照 1.5 中方法进行灭活, 灭活检验结果表明合格, 将该疫苗原液用生理盐水进行稀释, 分别进行 50 倍、100 倍稀释备用。

2.5 两种基因型 GCRV S10 基因原核表达载体的构建及鉴定

2.5.1 两种基因型 GCRV S10 基因编码区 PCR 扩增

两种基因型 GCRV 目的基因经 PCR 扩增后电泳, 结果显示目的条带大小与预期一致, 分别为 840 bp 和 1 050 bp, 测序为正确序列, 如图 2 所示。

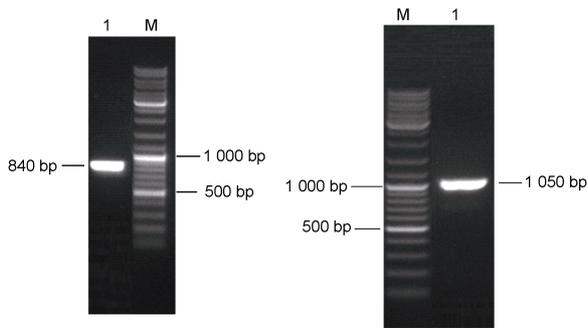


图 2 两种基因型 GCRV S10 目的基因 PCR 扩增电泳图谱
Fig.2 PCR amplification of S10 gene of genotype and GCRV

注: M: marker; 1: 目的片段; 左: GCRV- ; 右: GCRV-

2.5.2 重组质粒 pET28a-S10 的鉴定

将上述目的条带克隆于原核表达载体 pET28a 载体中, 构建了表达目的蛋白的原核表达载体 pET28a-S10, 小量提取重组质粒, 进行双酶切鉴定, 结果表明: S10 基因片段已成功克隆入 pET28a 中(图 3)。

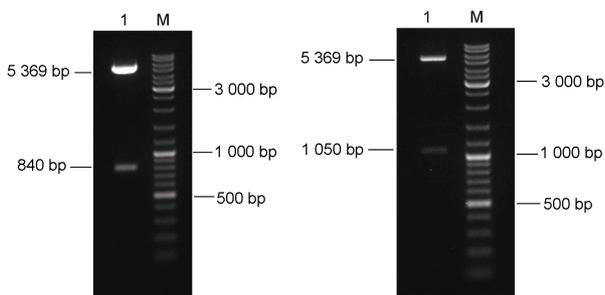


图 3 重组质粒 PET-S10 双酶切鉴定结果

Fig.3 Restriction of recombinant plasmid PET-S10

注: M: marker; 1: 目的片段; 左: GCRV- ; 右: GCRV-

2.6 两种基因型 GCRV S10 基因原核表达蛋白的纯化及鉴定

2.6.1 诱导表达融合蛋白

将上述重组质粒转化

至大肠杆菌 BL21 (DE3)中进行 IPTG 诱导表达, 分别于 20 °C 诱导过夜; 37 °C 诱导 4 h, 收集菌体, 超声破碎, 分别离心收集上清和沉淀, 沉淀用 500 μ L 包涵体溶解液溶解, 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析融合蛋白的表达情况, 结果表明, 两种融合蛋白均能在大肠杆菌中以包涵体形式表达, 分子量分别为 32 kDa 和 41 kDa, 如图 4 所示。

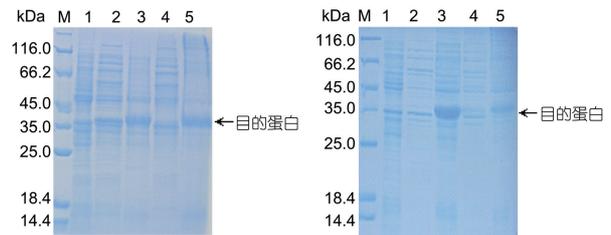


图 4 GCRV-S10 融合蛋白 SDS-PAGE 分析结果图

Fig.4 Analysis results of the expression of PET-S10 by SDS-PAGE

注: M: marker; 1: 诱导前总蛋白; 2: 20 °C 上清; 3: 20 °C 沉淀; 4: 37 °C 上清; 5: 37 °C 沉淀。左: GCRV- ; 右: GCRV-

2.6.2 表达蛋白纯化鉴定及浓度测定

大量诱导表达融合蛋白, 超声破碎菌体, 镍琼脂糖亲和层析纯化, 进行 SDS-PAGE 及 Western blot 检测, 见图 5、图 6, 表明两个蛋白均获得了较好的纯化, 测定结果表明两个纯化蛋白的浓度分别为 0.70 和 0.72 mg/mL; 蛋白纯度检测采用 SDS-PAGE, 通过软件扫描测定, 纯度均大于 80%。两个蛋白的表达纯化为进一步 ELISA 评价疫苗免疫效果提供了有用的试剂。

2.7 免疫草鱼的抗体水平测定

草鱼腹腔注射不同剂量的细胞灭活疫苗后, 血清中出现了抗 GCRV 抗体的变化(如图 7, 图 8), 抗基

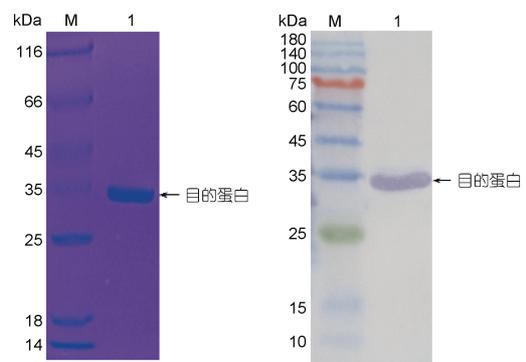


图 5 GCRV- 纯化蛋白 SDS-PAGE 及 Western blotting 分析

Fig.5 Analysis results of the purified protein of GCRV- by SDS-PAGE and the Western blotting

注: M: prestained marker; 1: 目的蛋白

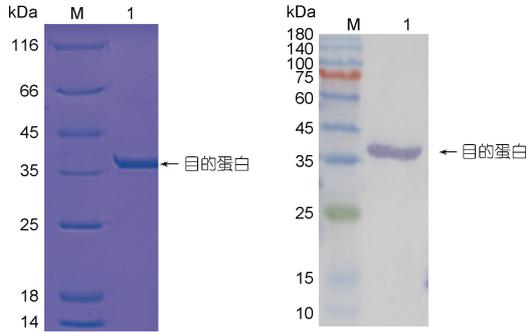


图6 GCRV- 纯化蛋白 SDS-PAGE 及 Western blotting 分析

Fig.6 Analysis results of the purified protein of GCRV- by SDS-PAGE and the Western blotting
注: M: prestained marker; 1: 目的蛋白

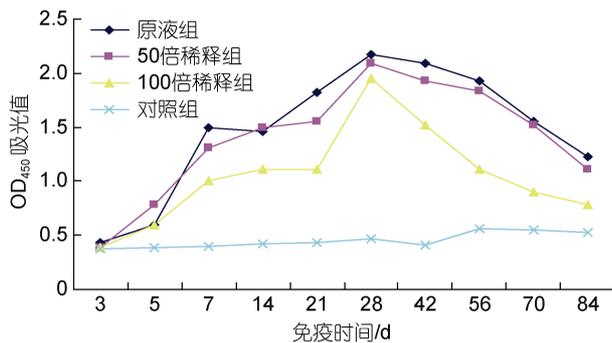


图7 草鱼腹腔注射疫苗不同时间后血清中抗 型 GCRV 抗体水平

Fig.7 The serum antibody levels of anti-GCRV- on different times post intraperitoneal injection of vaccine

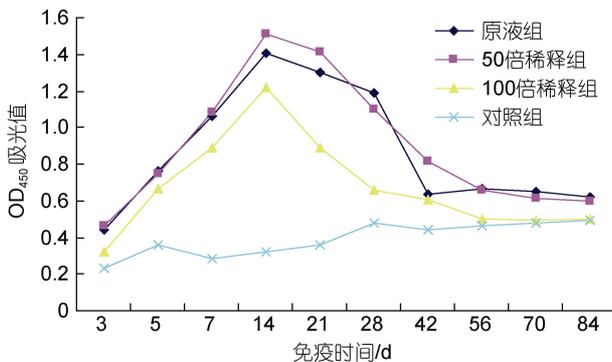


图8 草鱼腹腔注射疫苗不同时间后血清中抗 型 GCRV 抗体水平

Fig.8 The serum antibody levels of anti-GCRV- on different times post intraperitoneal injection of vaccine

因 型 GCRV 抗体的变化与对照组相比, 三种不同免疫剂量在接种疫苗 5 d 后, 草鱼血清抗 GCRV 的抗体稍有增加, 接种 7 d 后, 抗 GCRV 抗体均有明显增加, 28 d 后增加更为显著, 达到最高峰, 但 42 d 后开

始下降, 且一直持续到第 84 d。抗基因 型 GCRV 抗体的变化与对照组相比, 三种不同免疫剂量在接种疫苗 5 d 后, 草鱼血清抗 GCRV 的抗体稍有增加, 14 d 后增加更为显著, 达到最高峰, 但 21 d 后开始下降, 且一直持续到第 84 d。由图可以看出, 原液组与 50 倍稀释组产生的抗体水平基本相同, 且都高于 100 倍稀释组。

2.8 免疫草鱼的抗体效价测定

TAS-ELISA 法测定血清效价, 结果表明, 抗基因 型 GCRV 的血清效价是 1 : 800, 抗基因 型 GCRV 的血清效价是 1 : 600。

2.9 相对免疫保护率测定

按照 1.8 中方法测定核酸疫苗免疫草鱼的相对免疫保护率, 结果表明, 核酸疫苗 pEGFP-N1-VP7 以 0.5 μ g/尾注射免疫草鱼, 其相对免疫保护率为 67%, 而对照组为 30%, 显示出较好的免疫效果。

3 讨论

2019 年我国农业农村部印发了关于加快推进水产养殖业绿色发展的若干意见, 提出了三个方面的措施, 其中最重要的就是加强疫病防控, 全面实施苗种检疫及疫苗的推广, 因此, 在“减抗替抗”及绿色养殖的大环境下, 水产养殖用疫苗的推广势在必行。

草鱼是我国重要的淡水经济鱼类, “四大家鱼”之一, 产量约占我国淡水养殖鱼类产量的 1/5, 连续多年单个鱼类产量排名第一。但在养殖过程中病害也较多, 危害较大的疾病俗称草鱼“四病”, 即草鱼出血病、烂鳃病、肠炎病、赤皮病, 其中每年引起草鱼损失最严重的为草鱼出血病, 病原为草鱼呼肠孤病毒, 目前公认的该病毒有三个基因型, 最早于 1980 年分离和研究的 GCRV 属于基因 型(如 GCRV-873 株等); 张超等(2010)首次报道了基因 型 GCRV, 如 GCRV-HZ08 株; Fan 等(2013)在国内首次分离并报道了基因 型 GCRV, 即 HGDRV (GCRV-104)。不同基因型毒株各阶段序列同源性相似性为 15.1%~ 46.1% 不等, 各基因型之间交叉保护较低, 这也意味着即使免疫过单种疫苗, 仍然会有被其他基因型病毒感染的风险, 目前临床上流行的 GCRV 主要为基因 型和 型。

草鱼出血病疫苗的研究起步于 20 世纪 70 年代, 历经了组织浆灭活疫苗即“土法疫苗”、细胞灭活疫苗、减毒活疫苗、基因工程疫苗等。多年来, 许多科学家致力于该病毒的研究, 全国各地相继应用组织

浆灭活疫苗和细胞灭活疫苗进行免疫防治, 使得出血病在一定程度上得到了控制。而目前代表最高研究水平的是草鱼出血病活疫苗(GCRV-892 株), 2012 年, 中国水产科学研究院珠江水产研究所将该活疫苗转让给大华农公司且重新获得了该产品的兽药生产批准文号: 兽药生字(2014)190026013, 至此, 我国水产疫苗开始进入产业化生产阶段, 该疫苗自上市以来, 逐渐在各草鱼主养区推广, 免疫草鱼的平均成活率为 65%~90%, 比未免疫草鱼的成活率要高 15%~20%, 显示出了较好的效果(吉华松等, 2019)。但该疫苗仅仅对基因型草鱼出血病有较好的保护。

本研究通过研制针对基因型和型 GCRV 的草鱼出血病二价细胞灭活疫苗, 通过绝对定量的方法, 测定基因型和型的病毒含量分别为 2.0×10^9 及 1.5×10^6 copies/mL。用生理盐水将其分别进行 50 倍稀释和 100 倍稀释, 包括原液及生理盐水对照共 4 组, 通过腹腔注射免疫(20 ± 5) g 健康草鱼, 并开展了免疫效果评价。众所周知, 鱼类作为特异性与非特异性免疫并存的脊椎动物, 在病原微生物侵袭或疫苗免疫后都会产生非特异性免疫或特异性的体液免疫应答, 课题组之前从免疫基因及小分子的转录水平做过免疫效果评价, 与对照组相比, 注射免疫不同剂量的草鱼出血病灭活疫苗均能刺激草鱼脾脏中主要组织相容性复合体(MHC)、干扰素(IFN)、补体 3(C3)等 6 种主要免疫基因不同程度的上调表达, 说明疫苗刺激机体启动了非特异性和特异性免疫应答(奕志娟等, 2015)。本研究利用原核重组系统成功表达出两种基因型 GCRV 的 VP7 蛋白, 并进行了纯化制备和鉴定, 利用实验室保存的草鱼 IgM 单抗, 建立了三抗体夹心 ELISA 分析评价疫苗体液免疫效果。结果表明, 草鱼经腹腔注射不同剂量的细胞灭活疫苗后, 与对照组相比, 各免疫组血清抗体均有不同程度的提高, 且原液组与 50 倍稀释组基本持平, 但都高于 100 倍稀释组, 各免疫组在免疫后 5 d 即可检测到两种基因型 GCRV 抗体, 且抗体水平持续到 84 d, 但两种基因型抗体水平达到高峰的时间不一致, 抗基因型 GCRV 抗体达到高峰是在 28 d, 抗基因型 GCRV 抗体是在 14 d 达到高峰。两种基因型抗体水平达到高峰时的血清效价分别为 1:800、1:600。

目前, 全球已经有很多商品化的鱼类病毒灭活疫苗, 有美国的针对鲑的传染性胰腺坏死病毒灭活疫苗, 有日本的针对长吻鲈(*Caranx delicatissimus*)、点带

石斑鱼(*Epinephelus malabaricus*)的虹彩病毒灭活疫苗, 有捷克的针对鲤的鲤春病毒灭活疫苗等等(吴淑勤等, 2014), 这些疫苗具有较高的免疫保护率, 如 Fan 等(2012)研制的针对大菱鲆红体病虹彩病毒研制的灭活疫苗通过皮下注射其免疫保护率达到 83%以上。本研究利用实验室自行分离的当前流行强毒株 GCRV-HZ13 进行草鱼出血病二价细胞灭活疫苗免疫保护率实验, 结果表明, 原液组保护率最高, 为 67%, 50 倍稀释组为 60%, 100 倍稀释组只有 33%, 因此实际应用中可考虑用 50 倍稀释的剂量进行草鱼免疫, 下一步将进行免疫中试实验。

目前国外鱼用疫苗自动注射装置较为完备, 为疫苗的推广使用奠定了重要基础, 朱焯等(2020)研制的鱼用疫苗自动注射装置, 以 10~12 cm 长的草鱼苗作为自动注射对象, 开展活鱼注射试验, 并将注射生理盐水的育苗暂养 3 周, 发现存活率为 98.8%, 自动注射装置的研发, 成功解决了人工注射效率低、损伤大的问题, 有望为今后鱼用疫苗的推广应用提供有力的保障。

4 结论

本研究从体液免疫及免疫保护率的角度出发, 对草鱼出血病二价细胞灭活疫苗进行免疫效果评价, 建立了测试未知抗体的三抗体夹心酶联免疫方法(TAS-ELISA), 评价疫苗特异性体液免疫应答的免疫效果, 并在实验室开展了二价疫苗免疫保护率实验。免疫保护率实验结果表明原液组保护率最高, 为 67%, 50 倍稀释组为 60%, 100 倍稀释组为 33%, 可为进一步开展二价疫苗的免疫示范和新兽药证书申报提供基础数据。

参 考 文 献

- 王方华, 李安兴, 2006. 草鱼病毒性出血病研究进展[J]. 南方水产, 2(3): 66-71.
- 吉华松, 张翔, 高任, 等, 2019. 草鱼出血病疫苗的发展历程及市场现状剖析[J]. 江西水产科技(5): 38-44.
- 朱焯, 徐皓, 江涛, 等, 2020. 草鱼疫苗自动注射技术研究[J]. 渔业现代化, 47(4): 12-19.
- 刘楠, 冯祖强, 1977. 注射土法免疫组织浆防治草鱼鱼种出血病[J]. 淡水渔业(12): 10-13.
- 许淑英, 李焕林, 邓国成, 等, 1994. 草鱼出血病细胞培养弱毒疫苗的制备及其免疫效果[J]. 水产学报, 18(2): 110-117.
- 李丽, 赵成萍, 李宏, 等, 2011. 质粒制备绝对定量 PCR 标准曲线方法的建立[J]. 农业生物技术学报, 19(6): 1157-1162.
- 李永刚, 曾伟伟, 王庆, 等, 2013. 草鱼呼肠孤病毒分子生物学研究进展[J]. 动物医学进展, 34(4): 97-103.

- 杨映, 于辉, 古勇明, 2015. 草鱼呼肠孤病毒研究进展[J]. 广东农业科学, 42(15): 92-97.
- 吴淑勤, 陶家发, 巩华, 等, 2014. 渔用疫苗发展现状及趋势[J]. 中国渔业质量与标准, 4(1): 1-13.
- 张超, 王庆, 石存斌, 等, 2010. 草鱼呼肠孤病毒 HZ08 株的分离与鉴定[J]. 中国水产科学, 17(6): 1257-1263.
- 陈爱平, 江育林, 钱冬, 等, 2010. 草鱼出血病[J]. 中国水产(11): 56-57.
- 柯丽华, 方勤, 蔡宜权, 1990. 一株新的草鱼出血病病毒分离物的特性[J]. 水生生物学报, 14(2): 153-159.
- 奕志娟, 郝贵杰, 袁雪梅, 等, 2015. 草鱼出血病灭活疫苗上调草鱼脾细胞主要免疫分子的表达[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 31(2): 177-181.
- FAN T J, HU X Z, WANG L Y, *et al*, 2012. Development of an inactivated iridovirus vaccine against turbot viral reddish body syndrome [J]. Journal of Ocean University of China, 11(1): 65-69.
- FAN Y D, RAO S J, ZENG L B, *et al*, 2013. Identification and genomic characterization of a novel fish reovirus, Hubei grass carp disease reovirus, isolated in 2009 in China [J]. Journal of General Virology, 94(10): 2266-2277.
- FANG Q, ATTOUI H, FRANÇOIS J, *et al*, 2000. Sequence of genome segments 1, 2, and 3 of the grass carp reovirus (genus *Aquareovirus*, family *Reoviridae*) [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 274(3): 762-766.
- FANG Q, SHAH S, LIANG Y Y, *et al*, 2005. 3D Reconstruction and capsid protein characterization of grass carp reovirus [J]. Science in China Series C: Life Sciences, 48(6): 593-600.
- FRANCKI R I B, FAUQUET C M, KNUDSON D L, *et al*, 1991. Classification and Nomenclature of Viruses: Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses [M]. Vienna: Springer: 186-192.
- QIU T, LU R H, ZHANG J, *et al*, 2001. The molecular characterization of RNA segment S9 of grass carp hemorrhage virus (GCHV), an aquareovirus [J]. Aquaculture, 203(1/2): 1-7.
- RANGEL A A C, ROCKEMANN D D, HETRICK F M, *et al*, 1999. Identification of grass carp haemorrhage virus as a new genogroup of aquareovirus [J]. Journal of General Virology, 80(9): 2399-2402.
- WANG Q, ZENG W W, LIU C, *et al*, 2012. Complete genome sequence of a reovirus isolated from grass carp, indicating different genotypes of GCRV in China [J]. Journal of Virology, 86(22): 12466.
- WINTON J R, LANNAN C N, FRYER J L, *et al*, 1987. Morphological and biochemical properties of four members of a novel group of reoviruses isolated from aquatic animals [J]. Journal of General Virology, 68(2): 353-364.

EVALUATION OF HUMORAL IMMUNE EFFICACY AND PROTECTION RATE OF BIVALENT CELL INACTIVATED VACCINE AGAINST GRASS CARP HEMORRHAGIC DISEASE

HAO Gui-Jie¹, LIN Feng¹, HUANG Ai-Xia¹, YE Ting², YAO Jia-Yun¹, PAN Xiao-Yi¹,
YUAN Xue-Mei¹, XU Lei¹, HU Jin-Chun², SHEN Jin-Yu¹

(1. Key Laboratory of Healthy Freshwater Fisheries Aquaculture, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Key Laboratory of Fish Health and Nutrition of Zhejiang Province, Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001, China, 2. Quzhou Aquatic Technology Extension Center, Quzhou 324000, China)

Abstract Grass carp haemorrhagic disease is a serious threat to grass carp culture. The pathogen of gohemorrhage of grass carp is grass carp reovirus (GCRV), a double-stranded partitioned RNA virus. In terms of the gene sequence of GCRV isolates, there are three GCRV genotypes in clinical practice, among which genotype and are more popular. Bivalent cell inactivated vaccine of grass carp hemorrhagic disease was developed by cell isolation and culture of type (GCRV-ZV8909) and type (GCRV-HZ13) GCRV. The contents of genotypes and were measured to be 2.0×10^9 and 1.5×10^6 copies/mL, respectively, and four groups were set up in the experiment, including the original fluid, normal saline control, and 50- and 100-time normal saline dilution groups, 40 healthy individuals [(20 ± 5) g] per group. They were intraperitoneally injected at dose of 0.2 mL/tail. Three blood samples were collected to prepare serum from each group on 3, 5, 7, 14, 21, 28, 42, 56, 70, and 84 d. The VP7 protein of GCRV were expressed in prokaryotic expression and then purified. The triple antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (TAS-ELISA) was established to evaluate the humoral immune effect of the vaccine combined grass carp IgM monoclonal antibody. Results show that the serum antibody of grass carp after being injected with different doses of cell-inactivated vaccine increased to different degrees compared to the control group. The original-fluid group was the same as the 50-time dilution group, but higher than 100-time dilution group. The two genotypes of GCRV antibodies could be detected out 5 d after immunization in each immune group, and the antibody level lasted until the 84 d. However, the peak time of the two genotypes of GCRV antibodies was not consistent. The peak time of the antibody against genotype GCRV was 28 d, and that of the antibody against genotype GCRV was 14 d. The serum titers of the antibody levels peaked at 1 : 800 and 1 : 600 for the two genotypes, respectively. The experiment on the immune protection shows that the original fluid group showed the highest protection rate of 67%, the 50-time dilution group was 60%, while the 100-time dilution group was 33% only.

Key words grass carp reovirus (GCRV); triple antibody sandwich enzyme-linked immunoassay (TAS-ELISA); humoral immunity; immune protection rate