

兔抗对虾白斑症病毒(WSSV)独特型抗体的制备 及其特性分析*

韦秀梅 绳秀珍 唐小千 邢婧 战文斌

(中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室 青岛 266003)

提要 以前期已制备的抗 WSSV 囊膜蛋白单克隆抗体 4G9(Ab1)杂交瘤细胞生产小鼠腹水,腹水经辛酸-硫酸铵法、Protein G 亲和层析法纯化后,用以制备兔抗血清,所得血清经纯化得到粗提的兔抗 WSSV 独特型抗体(Ab2)。采用竞争酶联免疫吸附实验、间接免疫荧光法、斑点免疫印迹和蛋白免疫印迹等实验方法分析了 Ab2 特性,结果表明:Ab2 能识别 Ab1 并与 WSSV 竞争 Ab1 的抗原结合位点,是具有模拟 WSSV 特性的抗独特型抗体;Ab2 能与中国对虾血细胞结合,并能部分阻断 WSSV 与血细胞膜的结合;其与中国对虾血细胞膜上结合的蛋白分子量分别为 94.5、51.5 和 27.0kDa,由此推断,这三个蛋白为 WSSV 在中国对虾血细胞膜上的结合蛋白。本研究结果可为进一步研究 WSSV 侵染机理提供资料。

关键词 独特型抗体,对虾白斑症病毒,竞争酶联免疫吸附实验, Dot-blot, 间接免疫荧光法, Western-blot

中图分类号 S945.1

对虾白斑症病毒(white spot syndrome virus, WSSV)具有很强的侵染性和复制能力,宿主范围广,危害严重,是备受关注的虾类病毒(Corbel *et al*, 2001; Lightner *et al*, 1998; Tan *et al*, 2001; Zhan *et al*, 1998)。自对虾 WSSV 病 1993 年暴发以来的十多年间,在对该病的病原、病理、检测及诊断技术等多方面的研究上取得了诸多成果,目前,探明 WSSV 感染的分子机理、寻找可靠的预防方法和有效的控制措施,成为研究热点。病毒入侵细胞的途径之一是通过病毒黏附蛋白与宿主特异性细胞受体结合,继而侵入并感染细胞(Haywood, 1994),因此,研究 WSSV 吸附和侵入宿主细胞过程中起关键作用的蛋白以及宿主细胞膜上的 WSSV 受体蛋白,并探讨两者之间的相互作用,对研究 WSSV 感染的分子机理和预防控制具有重要意义。

血细胞在对虾免疫系统中处于中心地位,既是

细胞免疫的承担者又是体液免疫因子的提供者。血细胞同时也是 WSSV 侵染的重要靶器官,已有研究采用免疫电镜、免疫荧光、原位杂交、流式细胞术等技术证明 WSSV 侵染血细胞并在其中增殖(王轶南等, 2008; 张志栋等, 2005; Jiravanichpaisal *et al*, 2006; Wang *et al*, 2002)。中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)是 WSSV 的敏感宿主之一,且敏感程度高于其它种类对虾,其血细胞上存在的 WSSV 受体可能多于其它种类对虾(姜有声等, 2004),因此中国对虾血细胞是研究 WSSV 细胞受体理想的实验材料。抗独特型抗体(anti-idiotypic antibody)具有模拟原始抗原特性,已有研究者以病毒的中和抗体制备抗独特型抗体,利用抗独特型抗体模拟病毒或者病毒感染相关蛋白与细胞受体结合的特性寻找到多种病毒的细胞受体蛋白,如牛疱疹病毒的细胞受体(Varthakavi *et al*, 1996),鸡细胞表面辛德毕斯病毒的受体(Wang *et al*,

* 国家重点基础研究发展计划“973”, 2006CB101806 号; 国家高技术研究发展计划“863”, 2006AA100312 号。韦秀梅, 博士研究生, E-mail: plum0102@gmail.com

通讯作者: 战文斌, 教授, E-mail: wbzhan@ouc.edu.cn

收稿日期: 2009-02-12, 收修改稿日期: 2009-04-26

1991)和狂犬病病毒的受体(Hanham *et al*, 1993), 这表明抗独特型抗体的研究和应用是研究病毒细胞受体有效技术途径, 但在水生动物病毒病的研究中却鲜有报道。

本研究前期工作已制备的抗 WSSV 囊膜蛋白单克隆抗体(单抗)4G9, 经金标记免疫电镜法证实其结合位点位于 WSSV 的囊膜上, 经克氏原螯虾(*Cambrus proclarkii*)体内中和实验表明具有中和 WSSV 的特性, 由此推断单抗 4G9 的抗原结合位点在 WSSV 侵染过程中起重要作用(王晓洁等, 2005)。本研究旨在以单抗 4G9 制备具有模拟 WSSV 特性的兔抗 WSSV 独特型抗体, 并分析其特性, 为探明 WSSV 侵染机理提供新的思路和方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 SPF 级 BALB/c 小鼠购自山东大学实验动物中心, 纯系新西兰白兔购自青岛市药检所, 自然发病的 WSSV 感染中国对虾收集于山东省乳山对虾养殖场, 经 PCR 法和间接免疫荧光法(Zhan *et al*, 2003)检测为 WSSV 阳性; 海捕中国对虾购自青岛市小港水产品市场, 经 PCR 法和间接免疫荧光法检测为 WSSV 阴性。

1.1.2 实验药品与试剂 地高辛(DIG)蛋白标记试剂盒、碱性磷酸酶(AP)标记的抗 DIG 抗体购于 Roche 公司, AP 标记的羊抗兔 IgG 抗体、AP 标记的羊抗小鼠 Ig 抗体、异硫氰酸荧光素(FITC)标记的羊抗兔 IgG 抗体、氯化硝基四氮唑蓝(NBT)、5-溴-4-氯-3-吡啶-磷酸(BCIP)、对硝基苯磷酸二钠(pNPP)购自 Sigma 公司, 其它化学试剂购自上海生工生物技术服务有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 抗 WSSV 单抗(Ab1)的腹水生产及纯化

(1) Ab1 的腹水生产 复苏本研究前期已制备的抗 WSSV 囊膜蛋白单抗(4G9)杂交瘤细胞(王晓洁等, 2005), 培养至指数生长期, 以 RPMI1640 悬浮后, 800g、3min 离心洗涤 3 次, 沉淀以 RPMI1640 重悬, 调整细胞浓度至 $(0.5—2.0) \times 10^7$ 个/ml, 以每只 0.5ml 接种入小鼠腹腔, 饲养并密切观察小鼠, 14 天左右小鼠腹部膨大后收集腹水。

(2) Ab1 的纯化 取小鼠腹水 10ml, 10000g 离心 30min, 弃沉淀; 上清以 60mmol/L 的乙酸-乙酸钠缓冲液(10.8mmol/L NaAc, 49.2mmol/L HAc, pH 4.0)

稀释 4 倍, 加入 1ml 辛酸, 室温搅拌 30min, 10000g 离心 30min; 上清以 1mol/L NaOH 调节 pH 至 7.2, 加硫酸铵至 33% 饱和度; 4 放置过夜后, 10000g 离心 30min; 沉淀以 PBS (137mmol/L NaCl, 2.7mmol/L KCl, 8.09mmol/L Na₂HPO₄, 1.47mmol/L KH₂PO₄, pH 7.4)溶解, 得到的样品经 Protein G 亲和层析柱(Amersham)纯化、透析、冷冻干燥后以 PBS 溶解, 调整蛋白浓度至 1.0mg/ml, -80 保存备用, 并以十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)鉴定其纯度。

1.2.2 兔抗 WSSV 独特型抗体(Ab2)的制备及效价测定

(1) Ab2 的制备 用上述提纯的 Ab1 免疫新西兰白兔, 免疫共分 4 次进行, 前 2 次是背部 6 点注射, 免疫间隔为 2 周, 后 2 次是耳缘静脉注射, 免疫间隔为 1 周。第 1 次, 基础免疫, 纯化的 Ab1 与福氏完全佐剂等体积混匀, 每点注射 0.2ml; 第 2 次, 加强免疫, 纯化的 Ab1 与福氏不完全佐剂等体积混匀, 每点注射 0.2ml; 第 3、4 次, 加强免疫, 不加佐剂, 每只注射 0.6ml 纯化的 Ab1。最后一次加强免疫后的第 7 天采血; 所采血样 37 倾斜放置 1h, 4 放置过夜后, 10000g 离心 30min, 取上清。抗血清经辛酸-硫酸铵法纯化, 置 4 透析完全, 以 SDS-PAGE 鉴定纯度。

(2) Ab2 的效价测定 纯化的 Ab1 用 PBS 稀释 100 倍, 以每孔 100 μ l 加入 96 孔酶标板, 4 包被过夜; 吸出包被液, PBST(PBS 含 0.05% 吐温-20)洗 3 次, 每次 5min; 每孔加入 200 μ l 3% 的牛血清白蛋白, 37 封闭 1h; PBST 洗 3 次, 每次 5min; 每孔加入 100 μ l 倍比稀释(1:1000, 1:2000, 1:4000—1:256000)的上述方法制备的 Ab2, 37 孵育 1h, 以正常兔血清代替 Ab2 为阴性对照; PBST 洗 3 次, 每次 5min; 每孔加入 100 μ l AP 标记的羊抗兔 IgG 抗体(1:5000), 37 孵育 45min; PBST 洗 3 次, 每次 5min; 每孔加入 100 μ l pNPP 发色液(pNPP 50mg, 1mol/L 二乙醇胺 10ml, 含 0.01% MgCl₂·6H₂O, pH 9.8), 暗处反应 20—40min, 2mol/L NaOH 终止发色, 以酶标仪测各孔 405nm 波长处的 OD 值; 计算各实验孔与阴性对照孔 OD 值之比(P/N), 当 P/N > 2.1 时为阳性。

1.2.3 竞争酶联免疫吸附实验(ELISA)检测 Ab2 模拟 WSSV 的特性

(1) WSSV 的提纯 取自然感染 WSSV 的中国对虾头胸部, 去除眼、肝胰腺及头胸甲, 剪碎后加入以 TNE (10mmol/L Tris-HCl, 10mmol/L NaCl, 0.5mmol/L EDTA, pH 8.0)配制的 25%(W/W)蔗糖中研

磨; 研磨后的样品 600g 离心 20min, 取上清; 800g 离心 20min, 取上清; 20000g 离心 2h, 弃去上清; 沉淀以 25% 蔗糖重悬, 铺于不连续蔗糖密度梯度上, 20000g 离心 2h, 吸取病毒区带, 以 TNE 稀释 6 倍后 20000g 离心 90min; 所得沉淀以 PBS 重悬, 调整蛋白浓度 1mg/ml, -80 冻存, 用于竞争 ELISA 和 DIG 标记。

(2) 竞争 ELISA 提纯的 WSSV 用 PBS 稀释 100 倍, 以每孔 100 μ l 加入 96 孔酶标板, 4 包被过夜; 吸出包被液, PBST 洗 3 次, 每次 5min; 每孔加入 200 μ l 3% 的牛血清白蛋白 37 封闭 1h; PBST 洗 3 次, 每次 5min; 纯化的 Ab1 用 PBS 稀释 100 倍, Ab1 稀释液与倍比稀释(1:10, 1:20, 1:40—1:2560) 的 Ab2 等体积混合为实验组, Ab1 稀释液与 PBS 混合为无竞争对照, 4 放置过夜后, 每孔加入 100 μ l 混合液, 37 孵育 1h; PBST 洗 3 次, 每次 5min; 每孔加入 100 μ l AP 标记的羊抗小鼠 Ig 抗体(1:5000), 37 孵育 1h; PBST 洗 3 次, 每次 5min; 每孔加入 100 μ l pNPP 发色液, 暗处反应 20—40min, 2mol/L NaOH 终止发色, 以酶标仪测各孔 405nm 波长处的 OD 值, 按照公式抑制率 = (1 - OD 实验组/OD 无竞争对照组) \times 100% 计算抑制率。

1.2.4 间接免疫荧光实验(IIFA)检测 Ab2 与中国对虾血细胞结合

(1) 血细胞滴片的制备 用吸有 4 预冷抗凝剂 (27mmol/L sodium citrate, 336mmol/L NaCl, 115mmol/L glucose, 9mmol/L EDTA, pH 4.2) 的注射器从中国对虾围心腔抽取血淋巴液, 按抗凝剂与血淋巴 3:1 比例混匀, 800g 离心 20min, 弃上清; 沉淀用抗凝剂重悬, 800g 离心 20min, 弃上清; 沉淀用 PBS 重悬, 滴于干净载玻片上, 室温沉降 1h, 丙酮固定后备用。

(2) IIFA 以 Ab2(1:50) 为第一抗体, 滴加在上述制备的血细胞滴片上, 37 湿盒中孵育 45min, 以正常兔血清为阴性对照; PBST 洗 3 次, 每次 5min; 以 FITC 标记的羊抗兔 IgG(1:160) 为第二抗体, 滴加在血细胞滴片上, 37 湿盒中孵育 45min; PBST 洗 3 次, 每次 5min; 甘油封片, 荧光显微镜下观察。

1.2.5 斑点免疫印迹(Dot-blot)检测 Ab2 阻断 WSSV 与中国对虾血细胞膜的结合

(1) 血细胞膜的提取 上述 IIFA 所获得的中国对虾血细胞沉淀, 以 4 预冷的缓冲液(10%蔗糖, 2mmol/L EDTA, 20mmol/L Hepes(Na), 2mmol/L PMSF,

pH 7.4) 重悬, 调整细胞浓度至 10^7 个/ml, 冰浴条件下超声波破碎 45s, 振幅 25%, 每运行 4s, 间歇 1s; 破碎样品 800g 离心 15min 后取上清; 15000g 离心 15min 后取上清; 100000g 离心 30min, 弃去上清; 沉淀用 PBS 重悬, 调整蛋白浓度至 1mg/ml, -80 冻存储备用(林颖博等, 2008)。

(2) WSSV 的标记 提纯的 WSSV 以 DIG-NHS 标记, 以 Sephadex G-25 脱盐柱除去未结合的 DIG-NHS, 所得 DIG 标记 WSSV(WSSV-DIG) 冻存于 -80, 用于 Dot-blot 阻断实验和 ELISA 阻断实验。

(3) Dot-blot 阻断实验 提纯的中国对虾血细胞膜以每点 3 μ l 滴加在硝酸纤维素(NC)膜上, 自然晾干, 放入 5% 的脱脂奶粉中 4 封闭过夜; PBST 洗 3 次, 每次 5min; 加入 Ab2, 37 孵育 1h; PBST 洗 3 次, 每次 5min; 再放入以 PBS 稀释 128 倍的 WSSV-DIG 液中为实验组, 4 结合 4h; 以正常兔血清代替 Ab2 为抗体阴性对照, 以 PBS 代替 WSSV-DIG 为病毒阴性对照; PBST 洗 3 次, 每次 5min; 加入 AP 标记抗 DIG 二抗(1:2000), 37 孵育 45min; PBST 洗 3 次, 每次 5min; 取 66 μ l NBT 贮存液(0.5g NBT 溶于 10ml 70% DMSO)、33 μ l BCIP 贮存液(0.5g BCIP 溶于 10ml 100% DMSO)与 10ml 底物缓冲液(10mmol/L NaCl, 5mmol/L MgCl₂, 100mmol/L Tris-HCl, pH 9.5) 配成发色液, NC 膜放入发色液中, 室温显色。

1.2.6 ELISA 检测 Ab2 阻断 WSSV 与中国对虾血细胞膜的结合 提纯的血细胞膜用 PBS 稀释 32 倍, 以每孔 100 μ l 加入 96 孔酶标板, 4 包被过夜; 吸出包被液, PBST 洗 3 次, 每次 5min; 每孔加入 200 μ l 3% 的牛血清白蛋白 37 封闭 1h, PBST 洗 3 次, 每次 5min; 加入 Ab2, 37 孵育 1h; PBST 洗 3 次, 每次 5min; 每孔加入 100 μ l WSSV-DIG, 4 结合 4h; 以正常兔血清代替 Ab2 为抗体阴性对照, 以 PBS 代替 WSSV-DIG 为病毒阴性对照; PBST 洗 3 次, 每次 5min; 每孔加入 100 μ l AP 标记的抗 DIG 抗体(1:2000), 37 孵育 45min; PBST 洗 3 次, 每次 5min; 每孔加入 100 μ l pNPP 发色液, 暗处反应 20—40min, 以 2mol/L NaOH 终止, 以酶标仪测各孔 405nm 波长处的 OD 值。

1.2.7 Western-blot 鉴定 Ab2 在中国对虾血细胞膜上的结合蛋白 提纯的中国对虾血细胞膜经 SDS-PAGE 后, 取出电泳凝胶, 剪取与凝胶大小相同的 NC 膜, 以转移缓冲液(25mmol/L Tris, 192.5mmol/L 甘氨酸, 20% 甲醇, pH 8.3) 润湿, 剪取比凝胶稍大的滤纸以转

移缓冲液润湿,按照滤纸-NC膜-凝胶-滤纸的顺序放置,入盛有转移缓冲液的电泳槽内,将NC膜面向阳极;200mA电泳5h;转移后的NC膜以3%的牛血清白蛋白37℃封闭1h;PBST洗3次,每次5min;加入Ab2,37℃孵育1h,以正常兔血清代替Ab2作为阴性对照;PBST洗3次,每次5min;加入AP标记的羊抗兔IgG二抗(1:5000),37℃孵育1h,PBST洗3次,每次5min;放入新鲜配制的NBT/BCIP发色液,室温显色。

2 结果

2.1 Ab1的纯化

纯化Ab1的SDS-PAGE结果显示:在分子量约50kDa和25kDa处各有1条清晰条带,分别为小鼠抗WSSV单克隆抗体IgG的重链和轻链条带,无其它蛋白带(图1a),证明从小鼠腹水中纯化得到了较纯的Ab1。

2.2 Ab2的制备及效价测定

纯化Ab2的SDS-PAGE结果显示:在分子量约53kDa和22kDa处各有1条清晰条带,分别为兔抗Ab1 IgG的重链和轻链条带,无其它蛋白带(图1b),证明从兔抗血清中纯化得到较纯的Ab2。Ab2稀释倍数低于1:64000时,Ab2组与阴性对照组光吸收值之比P/N 2.1,Ab2效价为1:64000。

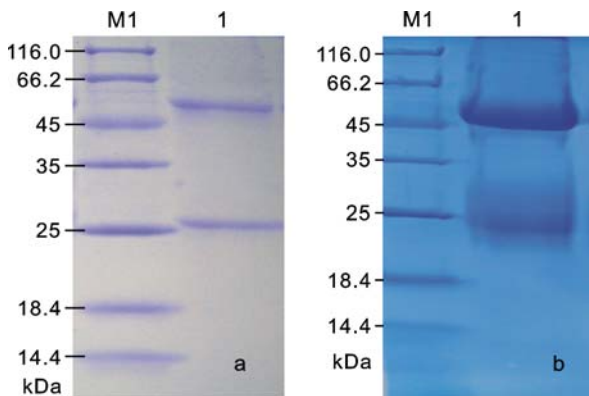


图1 纯化Ab1和Ab2的SDS-PAGE结果

Fig.1 SDS-PAGE results of purified Ab1 and Ab2

a: M为Marker, 1为纯化Ab1; b: M为Marker, 1为纯化Ab2

2.3 竞争ELISA检测Ab2模拟WSSV的特性

梯度稀释的Ab2与定量Ab1孵育,加入包被有WSSV的酶标板中,再以AP标记的羊抗小鼠IgG抗体检测与WSSV结合的Ab1,根据各孔OD值计算抑制率,分析Ab2抑制效果。结果显示Ab2能竞争抑制

Ab1与WSSV的结合,Ab2稀释10倍时,抑制率为78.5%,随Ab2稀释倍数的增加,抑制率降低,稀释至40、160、640、2560倍时,抑制率分别为71%、48%、17%、12%。此结果表明Ab2与WSSV竞争结合Ab1上的同一位点,Ab2抗体具有模拟WSSV特性。

2.4 IIFA检测Ab2与中国对虾血细胞结合

IIFA结果显示,Ab2能与中国对虾血细胞结合,结合在血细胞上的Ab2又与FITC标记的羊抗兔IgG结合,荧光显微镜下可见血细胞上有黄绿色荧光出现(图2a);正常兔血清代替Ab2作为对照时,不能与血细胞结合,血细胞上无黄绿色荧光出现,经伊文斯兰衬染为红色(图2b)。由此证明Ab2具有与血细胞结合的特性。

2.5 Dot-blot检测Ab2阻断WSSV与中国对虾血细胞膜的结合

提纯的中国对虾血细胞膜吸附于NC膜上,与正常兔血清孵育后再与WSSV-DIG孵育的抗体阴性对照,正常兔血清不能阻断WSSV与血细胞膜的结合,WSSV-DIG与NC膜上的血细胞膜结合,再与AP标记的抗DIG二抗结合,发色后显紫色(图3a);血细胞与Ab2孵育时,Ab2能与血细胞膜结合,并能部分阻断WSSV与血细胞的结合,因而Ab2实验组发色较浅(图3b);以PBS代替WSSV-DIG的病毒阴性对照无显色(图3c)。证明Ab2对WSSV与血细胞膜的结合有阻断作用。

2.6 ELISA检测Ab2阻断WSSV与中国对虾血细胞膜的结合

提纯的中国对虾血细胞膜吸附于96孔酶标板上,与正常兔血清孵育后再与WSSV-DIG孵育的抗体阴性对照,正常兔血清不能阻断WSSV与血细胞膜的结合,WSSV-DIG与酶标板上的血细胞膜结合,再与AP标记的抗DIG二抗结合,OD值为0.497;血细胞与Ab2孵育后再与WSSV-DIG孵育的实验组,Ab2能部分阻断WSSV与血细胞膜的结合,OD值降低至0.269;以PBS代替WSSV-DIG的病毒阴性对照OD值仅为0.057。证明Ab2能部分阻断WSSV与血细胞膜的结合。

2.7 Western-blot鉴定Ab2在中国对虾血细胞膜上的结合蛋白

提纯的中国对虾血细胞膜经SDS-PAGE后,转移至NC膜上,与Ab2孵育,再以AP标记的羊抗兔IgG二抗检测结合在血细胞膜上的Ab2,结果显示分子量为94.5、51.5、27.0kDa的三个血细胞膜蛋白能

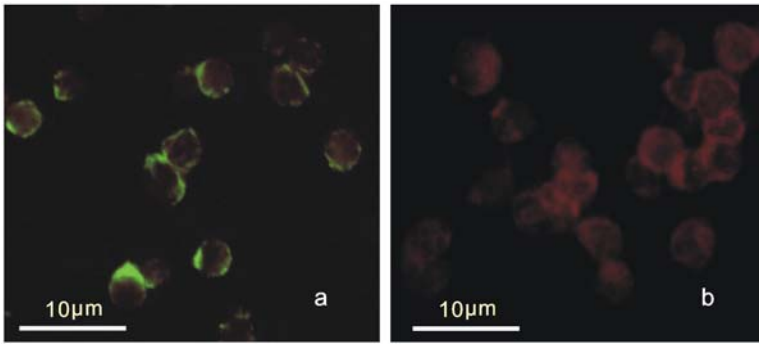


图2 IIFA 检测 Ab2 与中国对虾血细胞结合

Fig.2 Detection of Ab2 binding to Chinese shrimp haemocyte by IIFA
a: 血细胞可与 Ab2 反应而发出黄绿色荧光; b: 正常兔血清代替 Ab2 作为阴性对照, 伊文斯兰衬染(Bar = 10µm)



图3 Dot-blot 检测 Ab2 阻断 WSSV 与中国对虾血细胞膜的结合

Fig.3 Ab2 blocked the binding of WSSV with Chinese shrimp haemocyte membrane detected by Dot-blot
a: 血细胞膜和正常兔血清反应, 再与 WSSV-DIG 孵育; b: 血细胞膜和 Ab2 反应, 再与 WSSV-DIG 孵育; c: 血细胞膜和 Ab2 反应, 再与 PBS 孵育

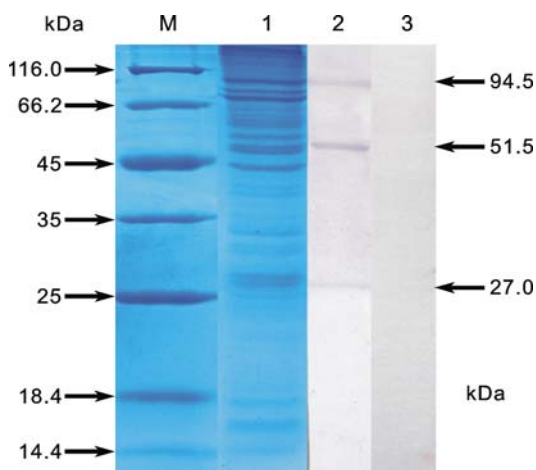


图4 Western-blot 鉴定 Ab2 在中国对虾血细胞膜上的结合蛋白

Fig.4 Identification of Ab2 binding protein on Chinese shrimp haemocyte membrane by Western-blot
M: Marker; 1: 提纯的血细胞膜; 2: Ab2 在血细胞膜上的结合蛋白; 3: 阴性对照

特异性与 Ab2 结合, 出现清晰显色(图 4), 而以正常血清代替 Ab2 的阴性对照则无蛋白条带显色。说明分子量为 94.5、51.5、27.0kDa 的三个蛋白是中国对虾血细胞膜上的 WSSV 结合蛋白。

3 讨论

本研究基于抗体可变区本身可作为一种抗原诱导机体产生抗独特型抗体, 抗独特型抗体具有模拟初始抗原特性(Jerne, 1974)的理论, 以抗 WSSV 囊膜蛋白单抗(Ab1)为抗原, 制备了兔抗 WSSV 独特型抗体(Ab2)。Ab2 经竞争 ELISA 验证, 能与 WSSV 竞争结合 Ab1 的可变区, 具有模拟 WSSV 特性, 具备抗独特型抗体性质; IIFA、Dot-blot 阻断实验和 ELISA 阻断实验等技术方法进一步证实, Ab2 能与血细胞结合, 对 WSSV 与血细胞膜的结合有阻断作用, 因此, 推测 Ab2 在血细胞膜上的结合位点是 WSSV 与血细胞结合的关键位点。Western-blot 结果显示, Ab2 能与中国对虾血细胞膜上分子量为 94.5、51.5、27.0kD 的三个蛋白发生特异性结合, 表明这三个蛋白是 WSSV 在中国对虾血细胞上的结合蛋白, 可能是中国对虾血细胞膜上的 WSSV 受体。

不同研究者采用不同方法研究 WSSV 细胞受体, 所得结果不尽相同。已报道的例如通过病毒铺覆蛋白印迹技术(Virus overlay protein-binding assay, VOPBA)发现斑节对虾(*Penaeus monodon*)血细胞膜上的分子量约为 25kDa 的蛋白 PmRab7 可与重组 WSSV-VP28 结合(Sritunyalucksana *et al*, 2006); 采用亲和层析技术发现 WSSV-VP26 能与克氏原螯虾血细胞的肌动蛋白和细胞骨架结合, 可能参与 WSSV 向宿主细胞核的转运(Xie *et al*, 2005); 应用免疫共沉淀方法发现日本对虾(*Marsupenaeu japonicus*)的整合素(integrin)可与 WSSV-VP187 结合, 推断整合素在 WSSV 感染中行使细胞受体功能(Li *et al*, 2007)。本研究利用兔抗 WSSV 独特型抗体在中国对虾血细胞膜上找到 3 个 WSSV 结合蛋白, 期望为研究 WSSV 侵染机理提供新思路和新方法。应该指出的是, 作为受体应具备识别特异的信号物质并与之结合以及把识别和接受的信号准确无误的放大并传递到细胞内部, 启动一系列胞内生化反应的两个基本特性。根据这一理论, 目前本研究利用兔抗 WSSV 独特型抗体找到 3 个可能的 WSSV 结合蛋白, 具备细胞受体识别特异的信号物质

并为之结合的特性,但其是否具备另一个特性还有待于进一步的研究。

本研究制备的兔抗 WSSV 独特型抗体是粗提多抗,特异性不十分理想,但为下一步制备效价高,特异性强,少或无血清交叉反应的抗 WSSV 独特型单抗提供了技术和方法。

参 考 文 献

- 王轶南, 战文斌, 邢 婧, 2008. 流式细胞术检测对虾白斑症病毒(WSSV)对克氏原螯虾血细胞的感染. 中国海洋大学学报, 38(3): 384—388
- 王晓洁, 邢 婧, 绳秀珍等, 2005. 白斑症病毒感染与病毒囊膜完整性的关系. 中国海洋大学学报, 35(5): 785—791
- 张志栋, 战文斌, 薛艳红等, 2005. 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)感染白斑症病毒(WSSV)后大颗粒血细胞的变化. 海洋与湖沼, 36(1): 67—71
- 林颖博, 战文斌, 邢 婧等, 2008. 白斑综合征病毒与中国对虾血细胞膜的体外结合实验研究. 水产学报, 32(5): 788—793
- 姜有声, 邢 婧, 王世表等, 2004. 白斑综合征病毒的体外增殖研究. 水产学报, 28(Sup.): 93—96
- Corbel V, Zuprizal Z, Shi C *et al*, 2001. Experimental infection of European crustaceans with white spot syndrome virus (WSSV). *J Fish Dis*, 24: 377—382
- Hanham C A, Zhao F, Tignor G H, 1993. Evidence from the anti-idiotypic network that the acetylcholine receptor is a rabies virus receptor. *J Virol*, 67(1): 530—542
- Haywood A M, 1994. Virus Receptors: binding, adhesion strengthening, and changes in viral structure. *J Virol*, 68(1): 1—5
- Jerne N K, 1974. Towards a network theory of the immune system. *Ann Immunol (Paris)*. 125C(1—2): 373—389
- Jiravanichpaisal P, Sricharoen S, Soderhall I *et al*, 2006. White spot syndrome virus (WSSV) interaction with crayfish haemocytes. *Fish Shellfish Immunol*, 20: 718—727
- Li D F, Zhang M C, Yang H J *et al*, 2007. α -integrin mediates WSSV infection. *Virology*, 368: 122—132
- Lightner D V, Hasson K W, White B L *et al*, 1998. Experimental infection of western hemisphere penaeid shrimp with Asian white spot syndrome virus and Asian yellow head virus. *J Aquat Anim Health*, 10: 271—281
- Sritunyalucksana K, Wannapapho W, Lo C F *et al*, 2006. PmRab7 is a VP28-binding protein involved in White Spot Syndrome Virus infection in Shrimp. *J Virol*, 80(21): 10734—10742
- Tan L T, Soon S, Lee K L *et al*, 2001. Quantitative analysis of an experimental white spot syndrome virus (WSSV) infection in *Penaeus monodon* Fabricius using competitive polymerase chain reaction. *J Fish Dis*, 24(6): 315—323
- Varthakavi V, Minocha H C, 1996. Identification of a 56kDa putative bovine herpesvirus 1 cellular receptor by anti-idiotypic antibodies. *J Gen Virol*, 77: 1875—1882
- Wang K S, Schmaljohn A L, Kuhn R J *et al*, 1991. Antiidiotypic antibodies as probes for the Sindbis virus receptor. *Virology*, 181(2): 694—702
- Wang Y T, Liu W, Seah J N *et al*, 2002. White spot syndrome virus (WSSV) infects specific hemocytes of the shrimp *Penaeus merguensis*. *Dis Aquat Org*, 52: 249—259
- Xie X X, Yang F, 2005. Interaction of white spot syndrome virus VP26 protein with actin. *Virology*, 336: 93—99
- Zhan W B, Chen J, Xing J *et al*, 2003. Using monoclonal antibodies to diagnose white spot syndrome virus disease of shrimp. *Amer Fish Soc Symp*, 38: 309—313
- Zhan W B, Wang Y H, Fryer J L *et al*, 1998. White spot syndrome virus infection of cultured shrimp in China. *J Aquat Anim Health*, 10: 405—410

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF RABBIT ANTI-IDIOTYPIC ANTIBODY OF WHITE SPOT SYNDROME VIRUS (WSSV)

WEI Xiu-Mei, SHENG Xiu-Zhen, TANG Xiao-Qian, XING Jing, ZHAN Wen-Bin

(Laboratory of Pathology and Immunology of Aquatic Animals, Laboratory of Mariculture Ministry of Education of China (LMMEC), Ocean University of China, Qingdao, 266003)

Abstract During the past more than ten years since a white spot syndrome virus (WSSV) disease outbreak in 1993, many research papers have been published on the pathogen, pathology, detection and diagnostic methods of the disease. Recent works focused mainly on the infection mechanism and searching the strategies of prophylaxis and control of WSSV infection. The purpose of this work was to produce rabbit anti-idiotypic antibody of WSSV (Ab2), analyze its characterization, and find a new way to study WSSV infection mechanism. Anti-WSSV envelope protein monoclonal antibody (Ab1), which was produced previously, was purified from ascitic fluid using caprylic acid-ammonium sulfate (CA-AS) and Protein G agarose, then used to immunize rabbit, and finally Ab2 was purified from rabbit antiserum using CA-AS. The Ab2 was characterized by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), indirect immunofluorescence assay (IIFA), Dot-blot and Western-blot. Results of competitive ELISA indicate that Ab2 could recognize Ab1 specifically and inhibit competitively the binding of WSSV with Ab1, implying that Ab2 could compete against the same paratope on Ab1 with WSSV, and represent an internal image of WSSV. In the meantime, IIFA proved that Ab2 could bind to the haemocyte membrane of Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). The results of both Dot-blot and ELISA blocking experiments show that Ab2 could block the binding of WSSV to haemocyte membrane. By Western-blot, three protein bands of 94.5, 51.5 and 27.0kDa were recognized specifically by Ab2, and they were considered to be WSSV binding protein on Chinese shrimp haemocyte membrane.

Key words Idiotypic antibody, WSSV, ELISA, Dot-blot, IIFA, Western-blot