

抗 WSSV 囊膜蛋白 (VP28 和 VP19) 单抗的 体内中和效果研究

李青龙 战文斌* 绳秀珍

(中国海洋大学教育部海水养殖重点实验室, 青岛 266003)

摘要 通过酶联免疫吸附法(ELISA)测定不同稀释度对虾白斑综合征病毒(WSSV)与已制备的WSSV囊膜蛋白单克隆抗体结合的OD值。利用克氏原螯虾 *Cambarus proclarkii* 动物模型,将不同稀释度病毒与单抗1:1混合孵育2h后,肌肉注射克氏原螯虾(50 μ l/只),观察记录螯虾的死亡情况。ELISA结果显示,在 1×10^{-3} 病毒稀释度下两种单抗均足量。在螯虾体内中和实验中,当病毒浓度为 1×10^{-3} 、 1×10^{-4} 、 1×10^{-5} 和 1×10^{-6} 稀释度时,MAb1D6(VP28)螯虾组最终死亡率分别为100%、90%、16.7%和6.7%,而MAb2E9(VP19)螯虾组最终死亡率分别为100%、100%、100%和93.3%。这表明随病毒浓度的降低,MAb1D6(VP28)的中和效果越明显。而MAb2E9(VP19)并无明显的中和效果。

关键词 WSSV 囊膜蛋白 VP28 VP19 单克隆抗体 体内中和

中图分类号 S945.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2009)06-0056-06

In vivo neutralization assay of monoclonal antibodies specific to WSSV envelope protein (VP28 and VP19)

LI Qing-long ZHAN Wen-bin* SHENG Xiu-zhen

(Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003)

ABSTRACT The optical density (OD) was measured by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) with the combination of different dilutions of white spot syndrome virus (WSSV) and monoclonal antibodies (MAbs) specific to WSSV envelope protein. As the model animal, crayfishes *Cambarus proclarkii* were intramuscular injected of 50 μ l WSSV at different dilutions pre-incubated with MAbs, then their cumulative mortalities were recorded. Results of ELISA showed that both MAb1D6 (VP28) and MAb2E9 (VP19) were sufficient at 1×10^{-3} virus dilution. *In vivo* neutralization assay showed mortalities in the MAb1D6 (VP28) group were 100%, 90%, 16.7% and 6.7%, at a dilution of 1×10^{-3} , 1×10^{-4} , 1×10^{-5} and 1×10^{-6} , respectively; while mortalities in the MAb2E9 (VP19) group were 100%, 100%, 100% and

国家重点基础研究发展计划(973)项目(2006CB101806)和国家高技术研究发展计划(863)项目(2006AA100312)共同资助

* 通讯作者。E-mail:wbzhan@ouc.edu.cn

收稿日期:2008-12-09;接受日期:2009-05-06

作者简介:李青龙(1984-),男,硕士研究生,主要从事水产动物病害与免疫学研究。E-mail:qinglong.lee@hotmail.com, Tel:13583220744

93.3%, respectively. These results demonstrated that the neutralization effect of MAb1D6 was concentration dependent. MAb2E9 has no obvious neutralization effect.

KEY WORDS WSSV Envelope protein VP28 VP19 Monoclonal antibody
In vivo neutralization

对虾白斑病是1992年开始流行于亚洲地区的病毒性流行病,是危害对虾养殖业健康发展的主要疾病之一。自从该病暴发以来,国内外学者对其进行了大量研究并取得了一些研究成果。该病的病原是白斑综合征病毒(White Spot Syndrome Virus, WSSV),病毒外被囊膜,囊膜内为核衣壳和内部的髓核,WSSV主要结构蛋白有VP28、VP26、VP19、VP24和VP15等。其中VP24和VP15已确定为核衣壳蛋白,VP28和VP19为囊膜蛋白(Tsai *et al.* 2006)。在病毒侵染宿主时,病毒上与感染相关的蛋白与靶细胞结合并发生相互作用,从而达到感染的目的(Hughson 1995)。Van Hulten等(2001)证实VP28参与了病毒的感染。Li等(2005)用大肠杆菌表达了VP(19+28)的融合蛋白,并通过在螯虾体内检测抗血清对抗WSSV感染的保护能力,确定VP19和VP28在WSSV感染宿主的过程中起了重要作用。因此有学者尝试利用病毒蛋白的抗体来中和削弱WSSV的致病力(Poulos *et al.* 2001)。到目前为止,虽然国内外对WSSV的研究已有了一定的进展,但对WSSV的分子生物学特性还不是很了解,很多蛋白质的功能还不清楚;蛋白质结构与致病性之间是否存在确切的关系尚未弄明白;病毒和受体的相互作用及抗体阻断的机制还有待于进一步研究。单克隆抗体具有单一特异性、可重复性和可稳定供应等优点,通过单克隆抗体的抗原位点分析,可以寻找到与WSSV感染相关的蛋白,为WSSV感染分子机理研究提供线索。本文用已研制的WSSV单克隆抗体,通过克氏原螯虾*Cambarus proclarkii*体内中和实验,分析了其在不同病毒稀释度下的中和效果,从中筛选可以阻碍病毒感染的中和抗体,分析WSSV囊膜蛋白在病毒感染中的作用,为研究病毒受体作用和病毒阻断提供基本的方法和思路,进而探索利用中和单克隆抗体进行WSSV防治的途径。

1 材料与方法

1.1 材料

自然感染WSSV后濒临死亡的中国对虾*Fenneropenaeus chinensis*取自山东省乳山对虾养殖厂,甲壳上白斑明显,于-80℃保存。用于感染实验的健康克氏原螯虾购于青岛南山水产品市场,体长(8.8±0.5)cm,体重(22.3±1.7)g。随机取虾鳃进行冰冻包埋(OCT),制备冰冻切片,间接免疫荧光法(Immunofluorescence assays, IFAs)确定螯虾未感染WSSV(Zhan *et al.* 2003);螯虾在实验前先暂养5d,养殖水温为25±1℃。

抗VP28的单抗MAb1D6及抗VP19的单抗MAb2E9均由本实验室研制,其分别与WSSV的28kDa及19kDa囊膜蛋白特异性结合(另文发表)。

1.2 WSSV粗提液的制备

选取白斑明显的中国对虾,取鳃丝称重,1g鳃丝加入10ml的0.01mol/L磷酸缓冲液(PBS, pH 7.4),在冰浴条件下匀浆,匀浆液经差速离心(400×g, 15 min, 4℃; 800×g, 15 min, 4℃)后取上清,将上清进行0.45μm滤膜过滤除菌,保存于-80℃,作为病毒粗提液的母液。

1.3 不同稀释度病毒与单抗配比的ELISA实验

用ELISA包被液(0.159g碳酸钠及0.294g碳酸氢钠溶于100ml蒸馏水中,临用前配置)将病毒粗提母液稀释至 1×10^{-1} 、 1×10^{-2} 、 1×10^{-3} 、 1×10^{-4} 、 1×10^{-5} 和 1×10^{-6} ,分别将其作为抗原包被酶标板,每孔100μl,4℃包被过夜。然后用PBS-T洗涤,加入PBS配成的2%~3%的牛血清白蛋白溶液在37℃培养箱中封闭45min。去除封闭液,用PBS-T洗酶标板3次,每次5min。加入两株WSSV蛋白单抗(杂交瘤上清),37℃作用

1h,将只加 PBS 的孔作为阴性对照。后用 PBS-T 洗 3 次,每次 5min。加入碱性磷酸酶标记的羊抗鼠二抗 (Goat Anti-Mouse IgM+IgG+IgA (H+L)-AP, Southern Biotech, PBS-T 稀释至 1 : 5 000), 37℃ 孵育 1h, 洗 3 次, 每次 5min。加入碱性磷酸酶发色液 pNPP (1mg pNPP 溶于 1ml 碳酸缓冲液中, 现用现配), 每孔 150 μ l, 发色 20min, 加入 2mol/L NaOH 终止发色 (50 μ l/每孔), 酶标仪 405nm 处测 OD 值。

1.4 不同病毒稀释度的螯虾体内中和实验

用无菌 PBS 将病毒粗提母液稀释至 1×10^{-3} 、 1×10^{-4} 、 1×10^{-5} 和 1×10^{-6} 。将稀释后的病毒粗提液与 MAb1D6 (VP28)、MAb2E9 (VP19) 分别以 1 : 1 比例混合, 室温孵育 2h, 然后将 WSSV 和单抗的混合液经腹部皮下注射入螯虾体内, 每只螯虾注射 50 μ l, 注射不同稀释度的病毒与骨髓瘤细胞培养上清的混合液作为阳性对照, 注射 PBS 与骨髓瘤细胞培养上清的混合液作为阴性对照, 各注射 30 只虾 (表 1)。注射后每 12h 观察并记录螯虾的死亡情况, 绘制累积死亡率曲线。死亡的螯虾用免疫荧光法检测是否被 WSSV 感染。

表 1 各实验组注射液成分

Table 1 Composition of injection solutions for each group

MAb1D6 (VP28) 组	MAb2E9 (VP19) 组	阳性对照组 Positive control	阴性对照组 Negative control
25 μ l WSSV (1×10^{-3}) + 25 μ l MAb1D6 (VP28)	25 μ l WSSV (1×10^{-3}) + 25 μ l MAb2E9 (VP19)	25 μ l WSSV (1×10^{-3}) + 25 μ l 骨髓瘤细胞培养上清	
25 μ l WSSV (1×10^{-4}) + 25 μ l MAb1D6 (VP28)	25 μ l WSSV (1×10^{-4}) + 25 μ l MAb2E9 (VP19)	25 μ l WSSV (1×10^{-4}) + 25 μ l 骨髓瘤细胞培养上清	
25 μ l WSSV (1×10^{-5}) + 25 μ l MAb1D6 (VP28)	25 μ l WSSV (1×10^{-5}) + 25 μ l MAb2E9 (VP19)	25 μ l WSSV (1×10^{-5}) + 25 μ l 骨髓瘤细胞培养上清	25 μ l PBS + 25 μ l 骨髓瘤细胞培养上清
25 μ l WSSV (1×10^{-6}) + 25 μ l MAb1D6 (VP28)	25 μ l WSSV (1×10^{-6}) + 25 μ l MAb2E9 (VP19)	25 μ l WSSV (1×10^{-6}) + 25 μ l 骨髓瘤细胞培养上清	

2 结果

2.1 ELISA 检测结果

ELISA 结果显示 (图 1) MAb1D6 (VP28) 在 1×10^{-1} 病毒稀释度下 OD 值很高, 之后随稀释度的增加 OD 值明显降低, 在 1×10^{-4} 稀释度下 OD 值接近阴性对照。MAb2E9 (VP19) 初始 OD 较低, 且在 1×10^{-1} 和 1×10^{-2} 病毒稀释度时的 OD 值相近, 在 1×10^{-2} 稀释度以后随稀释度增加 OD 值逐渐降低, 在 1×10^{-4} 稀释度时的 OD 值接近阴性对照。

2.2 螯虾体内中和实验结果

实验结果显示 (图 2, 图 3), 阴性对照组分别在第 4 天、第 10 天、第 16 天和第 18 天各死亡 1 例, 累积死亡率为 13.3%。阳性对照组的 1×10^{-3} 、 1×10^{-4} 和 1×10^{-5} 病毒稀释度组分别在第 2 天、第 1 天和第 4 天出现死亡, 全部死亡的时间分别为第 8 天、第 9 天和第 8 天; 1×10^{-6} 组在第 3 天出现死亡, 随后其死亡速度比其他阳性对照组略缓慢, 在第 16 天时最终累积死亡率达 86.7%。

MAb1D6 (VP28) 组中的 1×10^{-3} 病毒稀释度组在第 5 天出现死亡, 第 19 天全部死亡; 1×10^{-4} 组在第 5 天出现死亡, 第 22 天最终累积死亡率为 90%; 1×10^{-5} 组在第 5 天出现死亡, 死亡速度很缓慢, 在第 24 天最终累

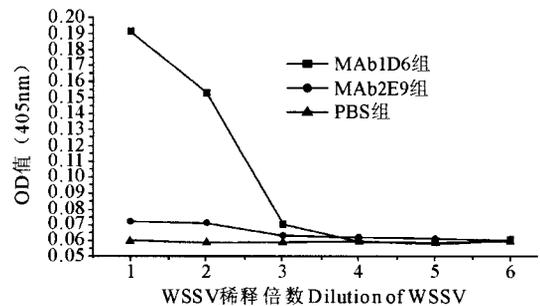


图 1 病毒与单抗配比的 OD 值曲线

Fig. 1 Graph of OD values for the proportion of WSSV to MAbs

积死亡率为 16.7%; 1×10^{-6} 组仅在第 6 天和第 23 天各死亡 1 例,最终累积死亡率仅为 6.7%(图 2)。

MAb2E9(VP19)组中 1×10^{-3} 、 1×10^{-4} 和 1×10^{-5} 病毒稀释度组分别在第 3 天、第 3 天、第 2 天开始死亡,全部死亡的时间分别为第 8 天、第 8 天和第 10 天。 1×10^{-6} 组第 3 天出现死亡,在第 11 天最终累积死亡率达 93.3%(图 3)。

死亡螯虾经免疫荧光检测,阴性对照组、MAb1D6(VP28)的 1×10^{-5} 和 1×10^{-6} 病毒稀释度组死亡螯虾全为 WSSV 阴性,其他组死亡螯虾均已感染 WSSV。

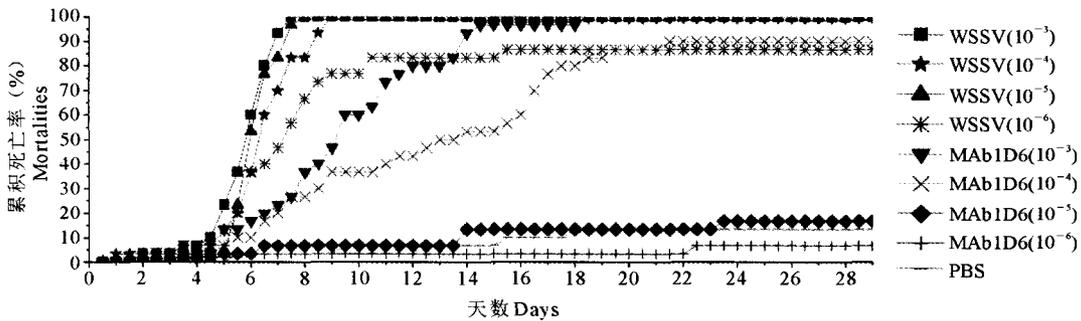


图 2 不同病毒稀释度下 MAb1D6(VP28)体内中和实验累积死亡率曲线

Fig. 2 *In vivo* neutralization tests of different dilution of WSSV with MAb1D6(VP28)

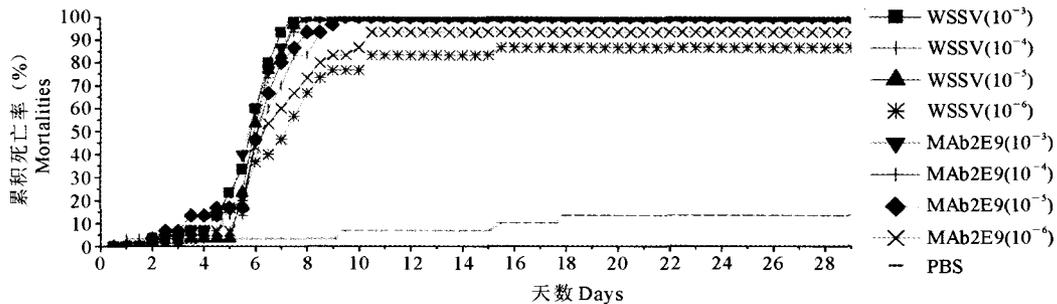


图 3 不同病毒稀释度下 MAb2E9(VP19)体内中和实验累积死亡率曲线

Fig. 3 *In vivo* neutralization tests of different dilution of WSSV with MAb2E9(VP19)

3 讨论

WSSV 宿主广泛,研究表明克氏原螯虾也可被 WSSV 感染(Huang *et al.* 2001)。因螯虾具有便于养殖,受环境制约影响较小,价格低廉等优势,一些学者利用螯虾进行 WSSV 病毒的增殖和提取以及病毒感染的研究(Jiravanichpaisal *et al.* 2006)。

在进行体内中和实验之前,必须保证抗体相对于 WSSV 是足量的。两株抗体的筛选和鉴定实验已表明抗体和虾组织没有非特异性作用,因此排除了抗体与非病毒成分的非特异性问题。ELISA 实验所测得的 OD 值是 WSSV 与单抗结合量的体现。各株单抗初始 OD 值直接反映出抗体的效价,可以看出 MAb1D6(VP28)的效价较高,而 MAb2E9(VP19)的效价较低。由于本实验中单抗的量是一定的,因此当 WSSV 过量的时候,OD 值不变;而当 WSSV 不足量时,OD 值随 WSSV 浓度降低而降低。因此我们可以得出,MAb1D6(VP28)和 MAb2E9(VP19)在 1×10^{-3} 病毒稀释度时 WSSV 均已不足量。在后面的体内中和实验中,选择 1×10^{-3} 病毒稀释度及更高病毒稀释倍数即可保证这两种单抗相对于 WSSV 都是过量的。

在以往螯虾动物模型的相关感染实验中,实验周期都较短(Wang *et al.* 2008),很多时候不能完全反映出实验的真正结果,本实验为了保证最后的死亡率趋于稳定,实验周期长达 30 d。通过观察不同病毒稀释度感

染组的阳性对照,可以看出 1×10^{-3} 、 1×10^{-4} 和 1×10^{-5} 组的累积死亡率曲线基本重叠,这说明随 WSSV 浓度降低,螯虾的感染死亡速度并无显著差异,直到稀释至 1×10^{-6} 时,死亡速度才有所减缓,且最终没有全部死亡。阴性对照组出现极个别死亡,经免疫荧光检测死亡螯虾未被感染,推测可能是由于注射引起继发感染或者养殖环境等原因导致死亡。

实验结果证明,MAb1D6(VP28)可以延缓螯虾的死亡,且随病毒浓度降低,延缓效果越明显。这表明 MAb1D6(VP28)这株单抗是具有中和性的,可以阻断病毒对螯虾的感染,且中和效果与病毒浓度相关,也进一步验证了 VP28 是 WSSV 上与感染相关的蛋白,MAb1D6(VP28)所对应的抗原决定簇可能是病毒与受体的结合位点,或者是结合位点的临近点。抗体与病毒结合后封闭了 VP28 上的抗原位点,使其不能与受体相结合。而 MAb2E9(VP19)的各实验组与相应浓度下的阳性对照组死亡情况并无明显差异,可以证明这株抗体并无中和作用。虽然 MAb2E9(VP19)并无体内中和作用,但只能说明这株抗体所对应的抗原决定簇不是病毒与受体的关键位点,尚不能证明 VP19 蛋白与病毒侵染受体无关。

值得注意的是,ELISA 结果证明在 1×10^{-3} 病毒稀释度时,WSSV 对 MAb1D6(VP28)已经不足量,但是在螯虾体内中和实验中当病毒稀释度为 1×10^{-3} 和 1×10^{-4} 时,MAb1D6(VP28)只是在一定程度上延缓螯虾死亡,并未完全抑制螯虾的死亡,二者之间出现差异的原因可能是 WSSV 除了 VP28 之外还有其他与感染相关的蛋白,而 MAb1D6 只能封闭 VP28。而当病毒稀释度为 1×10^{-5} 和 1×10^{-6} 时,MAb1D6 组的螯虾累积死亡率曲线与阴性对照无显著差异,这与 Natividad 等(2007)的研究结果相一致。在螯虾体内中和实验中,作者推测 WSSV 与单抗的反应存在着一种平衡,它们之间的结合能力与二者的浓度比例有关,抗体比例越高,WSSV 被结合的比例也越高,螯虾越不容易被感染。病毒侵染宿主细胞是一个很复杂的过程,抗体中和病毒的分子机理还有待于进一步研究。

参 考 文 献

- 许 华,黄 健,杨官品. 2008. 对虾白斑综合征病毒蛋白质组的研究进展. 海洋水产研究,29(2):118~125
- 刘 非,寸树健,杨 凯,邓百煌,杨晓仪,吴文言. 2006. 对虾白斑综合征病毒(WSSV)结构蛋白 VP28 与 VP26 的功能分析. 中山大学学报,45(5):83~86
- 朱建中,陆承平. 2001. 对虾白斑综合征病毒在螯虾动物模型和感染特性. 水产学报,25(1):47~51
- 易志刚,黄 健,李 筠. 2004. WSSV 结构、功能及基因组学研究概况. 海洋水产研究,25(1):79~84
- 罗 展,黄 健,周 丽. 2007. 抗白斑综合征病毒(WSSV)感染途径研究进展. 海洋水产研究,28(5):116~122
- 莫照兰,雷质文,杨 冰,黄 健,张培军. 2002. 对虾 WSSV 人工感染螯虾及其检测. 海洋科学,26(3):43~46
- Huang, C. H., Zhang, R., and Zhang, J. H. 2001. Purification and characterization of white spot syndrome virus (WSSV) produced in an alternate host; crayfish, *Cambarus clarkii*. Virus Research, 76: 115~125
- Hughson, F. M. 1995. Molecular mechanisms of protein-mediated membrane fusion. Curr. Opin. Struct. Biol. 5(4): 507~513
- Jiravanichpaisal, P., Sricharoen, S., Söderhäll, I., and Söderhäll, K. 2006. White spot syndrome virus (WSSV) interaction with crayfish haemocytes. Fish & Shellfish Immunol. 20:718~727
- Klasse, P. J., and Sattentau, Q. J. 2002. Occupancy and mechanism in antibody-mediated neutralization of animal viruses. J. Gen. Virol. 83: 2091~2108
- Li, H. X., Meng, X. L., Xu, J. P., Lu, W., and Wang, J. 2005. Protection of crayfish, *Cambarus clarkii*, from white spot syndrome virus by polyclonal antibodies against a viral envelope fusion protein. J. Fish Diseases, 28(5):285~291
- Lo, C. F., Ho, C. H., Peng, S. E., Chen, C. H., Hsu, H. C., Chiu, Y. L., Chang, C. F., Liu, K. F., Su, M. S., Wang, C. H., and Kou, G. H. 1996. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. Dis. Aquat. Organ. 27: 215~222
- Natividad, K. D. T., Maiko, H., Michiaki, T., Nakao, N., and Masatoshi, M. 2007. White spot syndrome virus (WSSV) inactivation in *Penaeus japonicus* using purified monoclonal antibody targeting viral envelope protein. Aquaculture, 269: 54~62
- Poulos, B. T., Pantoja, C. R., Bradley-Dunlop, D., Aguilar, J., and Lightner, D. V. 2001. Development and application of monoclonal antibodies for the detection of white spot syndrome virus of penaeid shrimp. Diseases of Aquatic Organisms, 47:13~23
- Tsai, J. M., Wang, H. C., Leu, J. H., Hsiao, H. H., Wang, A. H. J., Kou, G. H., and Lo, C. F. 2004. Genomic and proteomic analysis of thirty-nine structural proteins of shrimp white spot syndrome virus. J. Virol. 78(20): 11360~11370

- Tsai, J. M., Wang, H. C., Leu, J. H., Wang, A. H. J., Zhuang, Y., Walker, P. J., Kou, G. H., and Lo, C. F., 2006. Identification of the nucleocapsid, tegument, and envelope proteins of the shrimp white spot syndrome virus virion. *J. Virol.* 80(6): 3 021~3 029
- Van Hulst, M. C., Reijns, M., Vermeesch, A. M., Zandbergen, F., and Vlak, J. M. 2002. Identification of VP19 and VP15 of white spot syndrome virus (WSSV) and glycosylation status of the WSSV major structural proteins. *J. Gen. Virol.* 83 (1): 257~265
- Van Hulst, M. C. W., Witteveldt, J., Snippe, M., and Vlak, J. M. 2001. White spot syndrome virus envelope protein VP28 is involved in the systemic infection of shrimp. *Virol.* 285: 228~233
- Wang, Y. N., Zhan, W. B., Xing, J., and Jiang, Y. S. 2008. *In vivo* neutralization assays by monoclonal antibodies against white spot syndrome virus (WSSV) in crayfish (*Cambarus proclarkii*). *Acta Oceanologica Sinica*, 27(2):126~132
- Zhan, W. B., Chen, J., Xing, J., and Zhou, L. 2003. Using monoclonal antibodies to diagnose white spot syndrome virus disease of shrimp. *Am. Fish. Soc. Symp.* 38: 309~313