

文章编号: 1000- 0615(2005)04- 0529- 05

## 罗氏沼虾诺达病毒单克隆抗体的制备及应用

刘 问<sup>1,2</sup>, 钱 冬<sup>2</sup>, 吴建翔<sup>3</sup>, 邵健忠<sup>1</sup>

(1. 浙江大学生命科学学院, 浙江 杭州 310012; 2. 浙江省淡水水产研究所鱼病研究室, 浙江 湖州 313001;  
3. 浙江大学生物技术研究所, 浙江 杭州 310029)

**摘要:** 罗氏沼虾肌肉白浊病(whitish muscle disease of *Macrobrachium rosenbergii*) 是一种发生在罗氏沼虾苗种阶段的流行病, 发病虾苗出现肌肉白浊、白斑或白尾症状, 死亡率高达 60% 以上。作者所在实验室在确定其病原是罗氏沼虾诺达病毒(*Macrobrachium rosenbergii* Nodavirus, MrNV) 的基础上, 用 MrNV 免疫 BALB/c 小鼠, 取小鼠脾细胞与 SP2/0 鼠骨髓瘤细胞融合, 用间接 ELISA 筛选阳性孔, 经有限稀释法克隆, 得到 12 株能特异分泌抗 MrNV 的单克隆抗体(Mab) 的杂交瘤细胞。注射小鼠, 制备腹水单克隆抗体, ELISA 效价为  $1: 10^5 \sim 10^6$ 。亚型鉴定结果表明, 有 6 株单抗为 IgG1 型, 4 株单抗为 IgG2a 型, 2 株单抗为 IgG2b 型。12 株单抗与对虾白斑综合征病毒(WSSV) 和桃拉综合征病毒(TSV) 均无交叉反应。挑选效价高的腹水单抗 2B5, 建立了检测罗氏沼虾诺达病毒的三抗体夹心酶联免疫吸附测定(TAS-ELISA) 法, 该方法检测灵敏度达 0.98 ng 左右。Western blot 分析表明, 2B5 能与 MrNV 43kD 的外膜蛋白特异性结合。

**关键词:** 罗氏沼虾; 肌肉白浊病; 罗氏沼虾诺达病毒; 单克隆抗体; 三抗体夹心酶联免疫吸附测定

中图分类号: S945.4 文献标识码: A

## Production and application of monoclonal antibodies to *Macrobrachium rosenbergii* Nodavirus

LIU Wen<sup>1,2</sup>, QIAN Dong<sup>2</sup>, WU Jian-xiang<sup>3</sup>, SHAO Jian-zhong<sup>1</sup>

(1. College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310012, China;

2. Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001, China;

3. Institute of Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China

**Abstract:** Whitish muscle diseases of freshwater giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, is a new epidemic disease in the larvae and post-larvae of *M. rosenbergii* in recent years. The clinical sign of the disease is a whitish or opacity appearance of the muscles in abdomen. Mortalities may reach more than 60%, sometimes even reach 100%. The pathogen of the disease is confirmed as *Macrobrachium rosenbergii* Nodavirus(MrNV), an icosahedral and non-enveloped virus sized from 25- 26 nm with two linear ssRNA sized 3.0 kb and 1.3 kb respectively. MrNV was the first nodavirus founded in crustacean. To develop a rapid method for MrNV detection, monoclonal antibody against MrNV was prepared and used for virus detection. Briefly, mouse myeloma cells( SP2/0) were fused with spleen cells from BALB/c immunized with purified MrNV from diseased post-larvae(PL). Positive colonies were screened by indirect ELISA with the plates coated with purified MrNV and cloned 2- 3 times with limited dilution method. Twelve positive hybridoma cell lines secreting monoclonal antibodies (Mabs) against MrNV were at last obtained and used for ascites preparation. The titres of positive ascites Mabs were ranged from  $1: 10^5$  to  $1: 10^6$  by indirect ELISA. These twelve Mabs were isotyped by Southern Biotechnology clonotyping system, and the results showed that six Mabs were IgG1, four IgG2a and two IgG2b, respectively. No cross reactions were found when the twelve Mabs were used for indirect ELISA with white spot syndrome virus(WSSV) and Taura syndrome virus(TSV). A triple antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay(TAS-ELISA) was developed with the plates

收稿日期: 2004-06-30

资助项目: 中国水产科学研究院科研基金(2003-4-4); 浙江省自然科学基金(M303493)

作者简介: 刘 问(1978-), 女, 浙江金华人, 研究实习员, 主要从事鱼类病害研究。Tel: 0572-2045132, E-mail: zjwy-lw@sohu.com

通讯作者: 邵健忠, Tel: 0571-88273287, E-mail: lscshao@mail.hz.zj.cn

pre-coated with rabbit polyclonal antibodies against MrNV for virus capturing, followed by MrNV and samples incubation, Mabs and goat-anti-mouse-IgG antibodies labeled with HRP. Mab 2B5, characterized as Mab against 43 kD coat protein of MrNV by Western blot, was selected for TAS-ELISA. The results showed that TAS-ELISA can be used successfully for minimum virus detection with the sensitivity of 0.98 ng MrNV, or with the viral titer of  $10^4.96$  when typical diseased PL homogenization supernatants were used for TAS-ELISA. TAS-ELISA could be considered as a useful technique for MrNV detection as well as for epidemiological studies for its rapid and inexpensive cost with high specificity and sensitivity.

**Key words:** *Macrobrachium rosenbergii*; whitish muscle diseases; *Macrobrachium rosenbergii* Nodavirus (MrNV); monoclonal antibodies; TAS-ELISA

罗氏沼虾肌肉白浊病(whitish muscle diseases of *Macrobrachium rosenbergii*) 又称白体病、白尾病,在我国最早于 1996 年前后发生于广东和广西地区,2001 年在全国主要罗氏沼虾苗种场广泛流行、蔓延,成为罗氏沼虾养殖业的主要威胁。该病主要危害罗氏沼虾虾苗,病虾表现为肌肉出现白斑、白浊或全身发白,病虾可在几天内死亡<sup>[1]</sup>。该病死亡率可高达 60% 以上,严重时可达 100%,严重威胁罗氏沼虾种苗业的发展。作者所在实验室目前已确定其病原是罗氏沼虾诺达病毒(*Macrobrachium rosenbergii* Nodavirus, MrNV)<sup>[2,3]</sup>。MrNV 病毒粒子呈廿面体,无囊膜,大小为 23~25 nm,病毒核酸为单链 RNA,由 2 个片段组成,分别为 3.0 kb 和 1.3 kb。为了更好地开展 MrNV 的检测、罗氏沼虾肌肉白浊病的防治以及了解 MrNV 的发生和分布规律,我们制备了 MrNV 的单克隆抗体,并建立了用于检测 MrNV 的三抗体夹心 ELISA(TAS-ELISA)。

## 1 材料与方 法

### 1.1 病毒来源

罗氏沼虾肌肉白浊病虾苗于 2001 年采集自浙江省湖州市发病罗氏沼虾苗场,挑取典型白浊症状虾苗, -40℃ 保存。对虾白斑综合征病毒(WSSV)由中国科学院武汉病毒研究所石正丽博士惠赠,对虾桃拉综合征病毒(TSV)由本实验室分离鉴定。

### 1.2 实验动物

雌性 BALB/c 纯系小鼠,8 周龄,购自上海实验动物中心。

### 1.3 主要试剂

福氏完全及不完全佐剂、聚乙二醇 4000 (PEG4000)、降植烷为 Sigma 公司产品;RPMI-1640 培养基、HAT、次黄嘌呤胸腺嘧啶核苷 (HT) 为

Gibco 公司产品;8-氮鸟嘌呤(8-AG)为 Aldrich 公司产品;小牛血清、胎牛血清为杭州四季青生物工程材料有限公司产品、羊抗鼠 IgG-辣根过氧化物酶标记(羊抗鼠 IgG-HRP)为上海华美生物工程公司产品;小鼠单抗 Ig 分型试剂盒为 SouthernBiotech 公司产品;兔抗 MrNV 多抗血清由本实验室制备。

### 1.4 病毒提纯

病虾称重后,以 1:10 的比例加入  $0.04 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  pH 7.0 的磷酸盐缓冲液(PBS),匀浆,  $9\,000 \sim 10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min,取上清液搅拌加入 NaCl 和 PEG<sub>6000</sub>,使终浓度分别为  $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  和 10%,4℃ 过夜,  $8\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min,沉淀加 PBS 溶解后,  $35\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 2.5 h (Hatachi 55P-72),加少量 PBS 重新溶解病毒沉淀,测定蛋白含量(Biorad 核酸蛋白测定仪)。

### 1.5 小鼠免疫

将提纯的 MrNV 抗原与等量福氏完全佐剂充分混合,经皮下多点注射 BALB/c 小鼠,每只 80 μg,间隔 14 d 用含等量的福氏不完全佐剂的病毒抗原相同剂量作第 2、3、4 次免疫,14 d 后,腹腔注射不加佐剂的提纯 MrNV,每只 100 μg,3 d 后取脾细胞用于细胞融合。

### 1.6 细胞融合和单克隆抗体筛选

提前将 SP2/0 鼠骨髓瘤细胞经 8-AG 培养液选择 HGPRT<sup>-</sup> 株<sup>[4]</sup>,将免疫小鼠脾细胞与 SP2/0 细胞按 (5~10):1 的比例混合<sup>[5,6]</sup>,在 50% PEG<sub>4000</sub> 作用下融合,用 HAT 培养液进行培养,14 d 后,换以 HT 培养液。当杂交瘤细胞长满孔底面积 1/10 时,用间接 ELISA 检测杂交瘤细胞上清,筛选抗体阳性孔,筛选时包被抗原为  $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  纯化的 MrNV。选择强阳性反应杂交瘤细胞,通过有限稀释法进行两至三次克隆,最后一次克隆检测为阳性的孔所得的细胞株即为分泌单克隆抗

体的杂交瘤细胞株。将分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株继续培养,一部分液氮冻存,一部分用于制备小鼠腹水抗体。

### 1.7 小鼠腹水抗体制备及效价测定

往 BALB/c 小鼠腹腔注射 0.5 mL 降植烷,一周后腹腔接种  $5 \times 10^5$  个杂交瘤细胞,9~11 d 左右便有明显腹水产生,用针头穿刺收集腹水,离心取上清即为腹水抗体,分装后-80 °C 冻存。间接 ELISA 测定腹水单克隆抗体的效价,包被抗原为  $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  纯化的 MrNV。

### 1.8 单克隆抗体的亚类鉴定

采用 SouthernBiotech 公司的小鼠单抗 Ig 分型试剂盒,测定 12 种单抗腹水的亚类。

### 1.9 单克隆抗体与 WSSV 和 TSV 的交叉反应测定

将虾类的主要病毒对虾白斑综合征病毒(WSSV)和桃拉综合征病毒(TSV)分别与 12 种单克隆抗体进行 TAS-ELISA 检测,以 MrNV 作阳性对照,以健康虾提纯液作阴性对照。

### 1.10 TAS-ELISA 法的建立

**TAS-ELISA 法操作步骤** 用  $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  兔抗 MrNV 多抗包板,37 °C 2 h, PBST 洗 3 遍;加 1:10 的病虾匀浆上清液,并设阳性、阴性对照,37 °C 1 h, PBST 洗 3 遍;加单抗 2B5,37 °C 1 h, PBST 洗 3 遍;加羊抗鼠 IgG-HRP,37 °C 1 h, PBST 洗 3 遍;最后邻苯二胺-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 暗处显色 15~30 min,  $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应。用酶联免疫检测仪(Biorad Model 550)测定各孔在 490nm 的 OD 值。

**对提纯病毒的检测灵敏度的测定** 将提纯病毒以  $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  开始,按 1:4 的稀释度作倍比稀释,用对应稀释度的健康虾提纯液作阴性对照,操作步骤如上,确定 TAS-ELISA 对提纯病毒的检测灵敏度。

**对病虾组织中病毒的检测灵敏度测定** 将病虾以 1:10 匀浆后,离心取上清液,按 1:4 的稀释度作倍比稀释,用对应稀释度的健康虾苗匀浆液作阴性对照,确定 TAS-ELISA 对病虾的检测灵敏度。

### 1.11 Western blot 分析

参照《分子克隆实验指南》(第二版),以提纯 MrNV 为抗原进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳,电泳后的凝胶一部分用于考马斯亮蓝 R-250 染色,另一部分凝胶进行半干电转移(Bio-Rad 半干转膜仪),转膜方法参照 Bio-Rad 半干电转移操作手册。将转膜后的硝酸纤维素滤膜用 5% 脱脂奶溶液 4 °C 封闭过夜;PBS 漂洗滤膜,加单抗 2B5,37 °C 孵育 1 h;PBS 漂洗滤膜,加碱性磷酸酶标记的羊抗鼠 IgG,37 °C 孵育 1 h;最后用 5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸/氮蓝四唑(NBT/BCIP)染色剂显色。

## 2 结果

### 2.1 杂交瘤细胞的融合、筛选和克隆化

将免疫的 BALB/c 小鼠脾细胞与 SP2/0 鼠骨髓瘤细胞在 50% PEG<sub>4000</sub> 作用下融合,融合率达 95%。当每孔杂交瘤细胞培养至覆盖 10% 孔底时,用间接 ELISA 检测培养上清,阳性率达 28.9%。挑选具较强阳性反应的杂交瘤细胞系,经两至三次有限稀释法克隆,共得到 12 株单克隆抗体杂交瘤细胞株,依次命名为 1A1、1A6、1B3、1E1、2B5、2E7、3B4、3B11、4B9、4D3、4E2、4H8。

### 2.2 腹水单克隆抗体的制备及效价测定

将 BALB/c 小鼠腹腔注射降植烷,一周后腹腔注射杂交瘤细胞,9~11 d 左右有明显腹水产生,收集腹水,每只小鼠可收集腹水 5~10 mL。用间接 ELISA 法测上清效价,结果 12 株单抗的效价为 1:10<sup>5</sup> 至 1:10<sup>6</sup>(表 1)。

表 1 12 株单克隆杂交瘤细胞株腹水效价

Tab. 1 Titres of ascitic fluids of 12 mabs to MrNV

腹水单抗 ascitic fluids	1A1	1A6	1B3	1E1	2B5	2E7	3B4	3B11	4B9	4D3	4E2	4H8
效价 titre	1:10 <sup>6</sup>	1:10 <sup>5</sup>	1:10 <sup>5</sup>	1:10 <sup>6</sup>	1:10 <sup>6</sup>	1:10 <sup>6</sup>	1:10 <sup>6</sup>	1:10 <sup>5</sup>	1:10 <sup>6</sup>	1:10 <sup>6</sup>	1:10 <sup>6</sup>	1:10 <sup>6</sup>

### 2.3 单克隆抗体的亚类鉴定

采用 SouthernBiotech 公司的小鼠单抗 Ig 分型试剂盒, 检测 12 种小鼠腹水单抗的亚类, 结果 1A1、1B3、1E1、3B4、4D3、4H8 的抗体类型为 IgG1; 1A6、2B5、2E7、4B9 的抗体类型为 IgG2a; 3B11、4E2 的抗体类型为 IgG2b(表 2)。

### 2.4 特异性试验

将 12 种单抗分别与 WSSV 和 TSV 进行 TAS-ELISA 检测, 健康虾提纯液作阴性对照, 发现 12 种单抗与 WSSV 和 TSV 均无交叉反应(表 3)。

表 2 MrNV 单克隆抗体亚类鉴定结果

Tab. 2 Isotypes of ascitic fluids of 12 mabs to MrNV

单克隆抗体 mabs	亚类 isotype	单克隆抗体 mabs	亚类 isotype
1A1	IgG1	3B4	IgG1
1A6	IgG2a	3B11	IgG2b
1B3	IgG1	4B9	IgG2a
1E1	IgG1	4D3	IgG1
2B5	IgG2a	4E2	IgG2b
2E7	IgG2a	4H8	IgG1

表 3 单克隆抗体与 WSSV 和 TSV 的交叉反应测定

Tab. 3 Reaction of mabs with WSSV and TSV tested by TAS-ELISA

病毒 virus	单克隆抗体 mabs											
	1A1	1A6	1B3	1E1	2B5	2E7	3B4	3B11	4B9	4D3	4E2	4H8
WSSV	0.072	0.065	0.075	0.077	0.069	0.072	0.075	0.071	0.076	0.071	0.074	0.059
TSV	0.070	0.072	0.079	0.076	0.057	0.073	0.086	0.072	0.074	0.069	0.089	0.061
MrNV	2.619	2.107	2.235	2.741	2.552	2.491	2.555	2.747	2.638	2.619	2.939	2.811
阴性对照 control	0.068	0.064	0.077	0.063	0.067	0.073	0.072	0.069	0.066	0.061	0.055	0.061

### 2.5 TAS-ELISA 的检测系统

将提纯 MrNV 稀释到  $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 按 1:4 的稀释度作倍比稀释后进行 TAS-ELISA 检测, 结果表明, TAS-ELISA 对提纯病毒有较高的检测灵敏

度, 达到 0.98 ng 左右(图 1)。将病虾匀浆后, 上清作倍比稀释后进行 TAS-ELISA 检测, 结果表明, TAS-ELISA 对病虾的检测灵敏度达到 1:40960(图 2)。

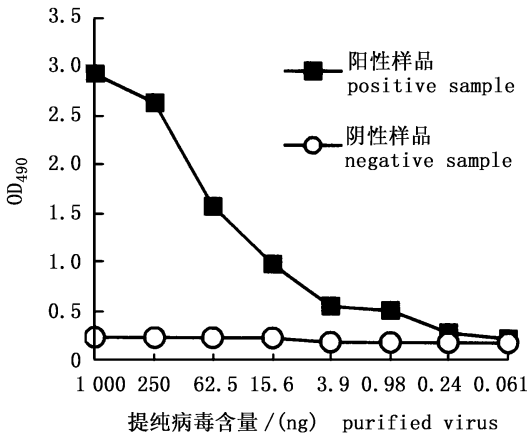


图 1 TAS-ELISA 对提纯病毒的检测灵敏度

Fig. 1 Detection of the purified MrNV by TAS-ELISA

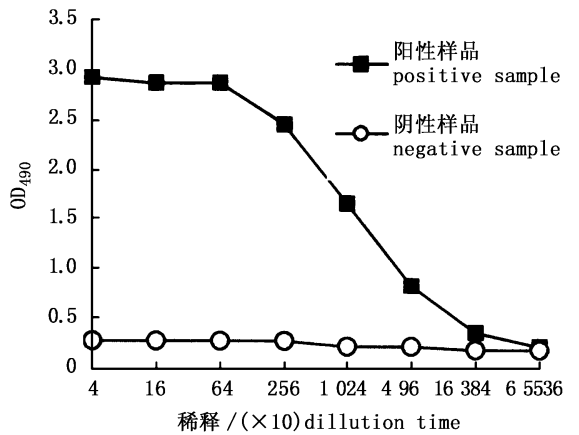


图 2 TAS-ELISA 对 MrNV 的检测灵敏度

Fig. 2 Detection of MrNV in infected post-larvae by TAS-ELISA

### 2.6 Western blot 分析

对提纯 MrNV 进行 SDS-PAGE 电泳, 考马氏亮蓝染色后可见 43 kD 处有一外壳蛋白条带, 经

Western blot 分析, 表明单抗 2B5 是针对 MrNV 43 kD 的外壳蛋白的特异性抗体(图 3)。

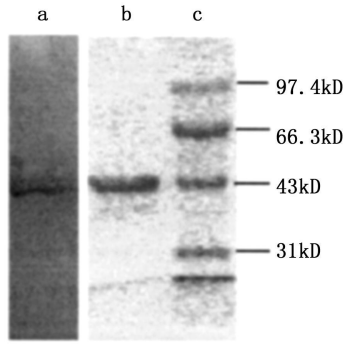


图 3 单抗 2B5 的 Western blot 分析

Fig. 3 Western blot analysis of 2B5

a. 单抗 2B5 免疫转印; b. 提纯 MrNV 的 SDS-PAGE; c. 蛋白低分子量 marker

a. Western blot of 2B5; b. SDS-page of purified MrNV; c. protein marker

### 3 讨论

将提纯的 MrNV 作抗原免疫 BALB/c 小鼠, 共获得 12 株分泌 MrNV 特异性抗体的 Mab 杂交瘤细胞株。用  $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  提纯病毒包板, 经间接 ELISA 方法测定, 12 株杂交瘤细胞培养物诱导 BALB/c 小鼠所得腹水效价在  $1: 10^5 \sim 1: 10^6$ 。12 种单克隆抗体的亚类分别为: 1A1、1B3、1E1、3B4、4D3、4H8 属于 IgG1 亚型; 1A6、2B5、2E7、4B9 属于 IgG2a 亚型; 3B11、4E2 属于 IgG2b 亚型。12 种单克隆抗体特异性强, 均不与虾类的主要病毒 WSSV 和 TSV 反应。单克隆抗体 2B5 可与病毒主要结构蛋白 43 kD 衣壳蛋白结合, 表明该单抗为抗病毒衣壳蛋白的抗体。以抗 MrNV 的单克隆抗体 2B5 为基础建立的 TAS-ELISA 检测方法, 操作简便, 检测特异性强, 灵敏度高, 可达 0.98 ng。

罗氏沼虾肌肉白浊病于 1996 年在我国出现, 2001 年在全国广泛流行。该病主要危害罗氏沼虾虾苗, 病虾表现为肌肉出现白斑、白浊或全身发白, 死亡率可高达 60% 以上, 严重时达 100%, 给我国罗氏沼虾苗种业造成了极大的损失。罗氏沼虾肌肉白浊病的病原属罗氏沼虾诺达病毒, 按照国际病毒分类系统, 诺达病毒科分为  $\alpha$  诺达病毒

和  $\beta$  诺达病毒两个属, 两者的结构基本相似, 都是由两个单链 RNA 组成, 其中较大的 RNA1 主要编码病毒的 RNA 多聚酶, 而 RNA2 则编码大小为 43 kD 的结构蛋白, 也是病毒中含量最高的蛋白。 $\alpha$  诺达病毒主要感染昆虫,  $\beta$  诺达病毒主要感染鱼类<sup>[7]</sup>。罗氏沼虾诺达病毒为首个从甲壳类中分离到的诺达病毒, 其在诺达病毒科中的确切地位还有待于确立。Romestand 等<sup>[8]</sup>曾报导 MrNV 多克隆抗体的制备及检测应用, 而关于 MrNV 单克隆抗体的研究, 目前国内外尚无报道。

单克隆抗体的理化性状高度均一, 生物活性单一, 与抗原结合特异性强的特点, 对诊断疾病、防治疾病及疾病机制研究等方面起着巨大作用。TAS-ELISA 检测方法的建立, 对研究 MrNV 在虾体及水生生物中的发生分布及传播途径的研究将发挥重要作用。TAS-ELISA 检测灵敏度高, 不需特殊仪器, 整个操作规程约需 4~5 h, 肉眼即可判断结果, 适合各罗氏沼虾苗种场用于 MrNV 诊断。2003 年通过对湖州市各罗氏沼虾苗种场虾苗的 MrNV 检测表明, 该方法稳定可靠。

### 参考文献

- [1] 钱冬, 杨国梁, 刘问, 等. 罗氏沼虾肌肉白浊病原的初步研究[J]. 水生生物学报, 2002, 26(5): 472-476.
- [2] 钱冬, 石正丽, 曹铮, 等. 罗氏沼虾肌肉白浊病原的鉴定[J]. 中国水产科学, 2003, 6.
- [3] Qian D, Shi Z L, Zhang S, et al. Extra small virus-like particles (XSV) and odavirus associated with whitish muscle disease in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* [J]. J Fish Dis, 2003, 26: 521-527.
- [4] 杨廷彬, 尹学念. 实用免疫学[M]. 长春: 长春出版社, 1994. 385-393.
- [5] 青玲, 吴建祥, 戚益军, 等. 蚕豆萎蔫病毒单克隆抗体制备及检测应用[J]. 微生物学报, 2000, 40(2): 166-173.
- [6] 于翠, 吴建祥, 周雪平. 番茄花叶病毒单克隆抗体的制备和检测应用[J]. 微生物学报, 2002, 42(4): 453-457.
- [7] Van Regenmortel M H V, Fauquet C M, Bishop D H L, et al. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses[M]. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Academic Press, 2000.
- [8] Romestand B, Borami J R. A sandwich enzyme linked immunosorbent assay (S-ELISA) for detection of MrNV in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) [J]. J Fish Dis, 2003, 26(2): 71-75.