

文章编号: 1000-0615(2008)05-788-06

白斑综合征病毒与中国对虾血细胞膜的体外结合实验

林颖博, 战文斌, 邢 婧, 唐小千, 刘宝良

(中国海洋大学教育部海水养殖重点实验室, 山东 青岛 266003)

摘要: 筛选小分子受体配基或抗受体蛋白的单克隆抗体作为阻断剂, 是阻断病毒感染的有效途径。通过差速离心法提取海捕中国对虾血细胞膜, 分别利用 Dot-Blot 和 ELISA 技术, 将血细胞膜包被于硝酸纤维素(NC)膜或酶标板, 使地高辛(Digoxigenin, DIG)标记的对虾白斑综合征病毒(WSSV-DIG)与之 4 °C 结合 4 h, 并以碱性磷酸酶标记抗 DIG 抗体作为探针检测, 实验结果皆为阳性, 证明体外环境下 WSSV 能稳定地与血细胞膜结合。通过血细胞膜免疫 Balb/c 小鼠生产抗中国对虾血细胞多克隆抗体, 以该多抗 37 °C 孵育血细胞膜 1 h, 然后使 WSSV-DIG 与血细胞膜结合并检测。在 Dot-Blot 实验中, 阻断组发色明显浅于未阻断组; 在 ELISA 实验中, 阻断组 OD 值比未阻断组降低 69%。可以推断, 多抗中抗血细胞受体的抗体与血细胞膜上的受体蛋白结合, 占据了 WSSV 黏附蛋白的结合位点, 从而显著地抑制了 WSSV 与血细胞膜的体外结合。实验所建立的 WSSV 与对虾血细胞膜体外结合技术可以应用于 WSSV 与血细胞受体蛋白的黏附特性的研究以及 WSSV 阻断剂的筛选, 多抗阻断实验证明了本方法的可行性。

关键词: 白斑综合征病毒; 血细胞膜; 受体蛋白; 阻断剂

中图分类号: S 945

文献标识码: A

病毒对宿主靶细胞的侵染开始于病毒黏附蛋白与细胞表面受体蛋白的特异性结合, 细胞受体蛋白的鉴定已经成为国内外对虾病毒病研究的热点之一。Assavalapsakul 等^[1]通过 VOPBA 法克隆了一个 65 ku 的对虾黄头病毒(YHV)的受体蛋白; Senapin 等^[2]发现斑节对虾(*Penaeus monodon*)细胞中的 β -actin 等蛋白因子与托拉病毒(TSV)核衣壳蛋白 VP1-VP3 存在相互作用; Sritunyalucksana^[3]则筛选并重组表达了能够与白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)囊膜蛋白 VP28 直接结合的斑节对虾 PmRab7 蛋白, 体内中和实验表明 PmRab7 可能参与 WSSV 的侵染过程。

对虾白斑综合征病毒是我国养殖对虾的主要病原, 自 1993 年暴发以来, 已经危害对虾养殖业近 15 年。由于对虾等无脊椎动物缺少获得性免疫系

统, 疫苗等常规方法对对虾病毒性疾病的防治难以奏效^[4], WSSV 每年造成巨额的经济损失。通过阻断病毒与靶细胞受体蛋白的结合从而阻断病毒的侵染, 是病毒学研究工作的一个新的方向, 目前在人类病毒性疾病的治疗中, 天然或经修饰的小分子受体配基^[5-6]和抗受体蛋白的单克隆抗体^[7]已作为阻断药物得以开发。本实验通过差速离心提取中国对虾血细胞膜, 并以地高辛标记提纯 WSSV 与之体外结合, 为研究 WSSV 血细胞受体蛋白及 WSSV 阻断剂提供了有效的筛选体系。

1 材料与方 法

1.1 材料及试剂

海捕中国对虾购于青岛小港水产品市场, 经 PCR 检测^[8]为 WSSV 感染阴性; 自然发病的 WSSV 感染中国对虾病料 2004 年收集于山东乳山

收稿日期: 2007-08-24

资助项目: 国家“八六三”高技术研究发展计划(2006AA100312); 国家重点基础研究发展计划(2006CB101806)

作者简介: 林颖博(1981-), 男, 山东栖霞人, 博士研究生, 从事水产病毒及受体研究。E-mail: linyingbo@gmail.com

通讯作者: 战文斌, Tel: 0532-82032284, E-mail: wbzhan@ouc.edu.cn

养殖场,经 PCR 法和间接免疫荧光法检测^[9]为 WSSV 阳性,取头胸部 -80 °C 保存备用。抗 WSSV 单克隆抗体由本实验室研制^[10];地高辛(DIG)蛋白标记试剂盒、碱性磷酸酶(AP)标记抗 DIG 抗体购于 Roche 公司;苯甲基磺酰氟(PMSF)购自 Gibco 公司;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)均购自 Sigma 公司,其它化学试剂购自上海生工生物技术有限公司。

1.2 实验方法

血细胞膜提取 用取有预冷抗凝剂(27 mmol·L⁻¹柠檬酸钠, 336 mmol·L⁻¹ NaCl, 115 mmol·L⁻¹葡萄糖, 9 mmol·L⁻¹ EDTA, pH 7.2)的注射器从海捕中国对虾围心腔抽取血淋巴,按 3:1 比例混匀后 4 °C 800 × g 离心 20 min,弃上清,沉淀加 4 °C 预冷的提膜缓冲液(蔗糖 10%, EDTA 2 mmol·L⁻¹, Hepes(Na) 20 mmol·L⁻¹, PMSF 2 mmol·L⁻¹)重悬,超声波破碎 45 s;取破碎液 4 °C 800 × g 离心 15 min 沉淀未破碎的细胞及细胞核;取上清 4 °C 15 000 × g 离心 15 min,沉淀线粒体、溶酶体等细胞器;取上清,4 °C 100 000 × g 离心 30 min,弃去上清,沉淀用 0.01 mol·L⁻¹ PBS 重悬,调整蛋白浓度至 1 mg·mL⁻¹, -80 °C 冻存备用。取上述样品 10 μL 滴于铜质载网上,室温放置 3~5 min 后用滤纸吸去多余液体,20 mg·mL⁻¹ 的磷钨酸钠染色 3~5 min,室温晾干,置透射电子显微镜(TEM)观察并拍照。

WSSV 提纯及标记 取 WSSV 病料 20 g,加入 25%(W/W)蔗糖 100 mL 及石英砂适量,置玻璃研钵中研碎;用纱布滤去组织碎块,800 × g、15 000 × g 离心各 15 min;取上清液 30 000 × g 离心 1.5 h,沉淀用 18 mL 25%蔗糖重悬,铺于不连续蔗糖密度梯度(62%, 57%, 52%, 46%, 40%, 33%)上,80 000 g 离心 2 h;取 52%与 46%蔗糖梯度间的病毒带,用 TNE 缓冲液按 5:1 稀释;30 000 × g 离心 1.5 h,沉淀用 PBS 重悬,过 Sephadex G-25 脱盐柱脱糖,调整蛋白浓度至 1 mg·mL⁻¹。取提纯 WSSV 溶液 1 mL,加 DIG-NHS 7 μL,室温震荡孵育 3 h,过 Sephadex G-25 脱盐柱以去除未反应的 DIG-NHS;30 000 × g 离心 1.5 h,沉淀用 PBS 重悬至 1 mL, -80 °C 分装冻存备用。按前述方法负染,透射电镜观测 WSSV 提纯效果;通过 Dot-Blot 法用 AP 标记抗

DIG 抗体及抗 WSSV 单克隆抗体检测标记效果。

血细胞膜和 WSSV-DIG 的 Dot-Blot 体外结合 取血细胞膜 3 μL 点在硝酸纤维素(NC)膜上,自然晾干,5%脱脂牛奶 4 °C 封闭过夜,PBST(PBS 含 0.05%吐温-20)洗 3 × 5 min;把 NC 膜放入用 PBST 128 倍稀释的 DIG 标记 WSSV(WSSV-DIG)4 °C 结合 4 h,以 PBST 代替 WSSV-DIG 作为对照;PBST 洗 3 × 5 min;AP 标记抗 DIG 二抗 37 °C 孵育 45 min,PBST 洗 3 × 5 min;取 66 μL NBT、33 μL BCIP 与 10 mL 底物缓冲液(10 mmol·L⁻¹ NaCl, 5 mmol·L⁻¹ MgCl₂, 100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 9.5)配制发色液发色。

血细胞膜和 WSSV-DIG 的 ELISA 体外结合 血细胞膜及 WSSV-DIG 分别以包被缓冲液(35 mmol·L⁻¹ NaHCO₃, 15 mmol·L⁻¹ Na₂CO₃, pH 9.6)和 PBST 梯度稀释,作棋盘滴定。酶标板每孔加入血细胞膜 100 μL 4 °C 包被过夜,倾去包被液,3%的牛血清白蛋白溶液 37 °C 封闭 45 min,PBST 洗 3 × 5 min;每孔加入 WSSV-DIG 100 μL,4 °C 结合 4 h(以 PBST 代替 WSSV-DIG 作为阴性对照),PBST 洗 3 × 5 min;加入 AP 标记的抗 DIG 抗体 100 μL,37 °C 孵育 45 min,PBST 洗 3 × 5 min;加入 pNPP 发色液(pNPP 50 mg,1 mol·L⁻¹ 二乙醇胺 10 mL,含 0.01% MgCl₂·6 H₂O, pH 9.8)100 μL 发色 40 min,2 mol·L⁻¹ NaOH 终止发色,酶标仪测 OD 值。

抗中国对虾血细胞多克隆抗体的制备 以提取的中国对虾血细胞膜免疫 SPF 级 Balb/c 小鼠生产多克隆抗体,免疫共分 4 次,分别间隔 2 周、1 周、1 周。第 1 次免疫,血细胞膜与福氏完全佐剂 1:1 混匀,腹腔注射 100 μL;第 2 次免疫,血细胞膜与福氏不完全佐剂 1:1 混匀,腹腔注射 100 μL;第 3、第 4 次免疫,尾静脉注射血细胞膜 100 μL。第 4 次免疫 7 d 后,脱颈法处死小鼠,心脏取血并制备血清,按文献[11]所述方法制备中国对虾血细胞滴片并以间接免疫荧光法检测抗血清的特异性, -20 °C 冻存备用。

多抗阻断 WSSV 与血细胞膜的结合 按血细胞膜和 WSSV-DIG 的 Dot-Blot 体外结合和血细胞膜和 WSSV-DIG 的 ELISA 体外结合的方法将血细胞膜吸附于 NC 膜或酶标板,加入抗中国对虾血细胞多克隆抗体,37 °C 孵育 1 h,PBST 洗 3 × 5 min;按前述方法加入 WSSV-DIG 孵育并通过 AP 标记抗 DIG 抗体检测 WSSV-DIG 与血细胞膜的结

合;对照组加入未免疫小鼠的血清代替多抗。

2 结果与分析

2.1 血细胞膜及 WSSV-DIG 的电镜观察

透射电镜观察发现,本实验提取的中国对虾

血细胞膜以细胞膜卷曲形成的膜泡为主,同时含有片状细胞膜(图 1-A)。本实验提纯的 WSSV 经 DIG 标记后透射电镜观察,病毒呈短棒状,平均长(271.1 ± 35.8) nm,宽(91.8 ± 7.2) nm,大部分完整具囊膜(图 1-B)。

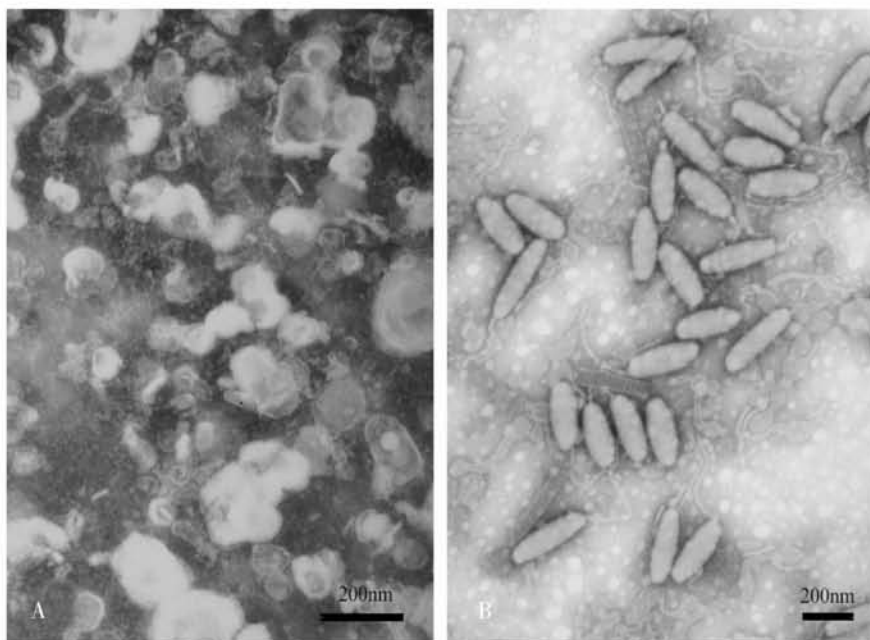


图 1 血细胞膜及 WSSV-DIG 的透射电镜观察

A. 中国对虾血细胞膜以细胞膜卷曲形成的膜泡为主,同时含有片状细胞膜; B. 经 DIG 标记后的 WSSV 病毒粒子

Fig. 1 Transmission electron microscope observation of plasma membrane and WSSV-DIG

A. Most of the isolated haemocyte plasma membranes curled into vesicles while some of them were in the shape of sheet

B. WSSV particles that were labeled with DIG

2.2 Dot-Blot 法检测 WSSV-DIG

通过 Dot-Blot 法检测 DIG 标记效果,标记后的 WSSV 与抗 WSSV 单克隆抗体(图 2-A1)及 AP 标记抗地高辛抗体(图 2-A3)反应皆为阳性,阴性对照无非特异性显色(图 2-A2,图 2-A4),说明 WSSV 被成功地标记上 DIG。

2.3 抗中国对虾血细胞多克隆抗体制备

本实验所制备的多克隆抗体与中国对虾血细胞的间接免疫荧光反应为强阳性(图 3-A)。所有血细胞的细胞膜皆由于与抗体反应而呈现黄绿色荧光;未免疫小鼠血清代替多抗作为阴性对照,无非特异性荧光出现(图 4-B)。

2.4 Dot-Blot 法检测 WSSV-DIG 与血细胞膜的体外结合及其多抗阻断

血细胞膜吸附于 NC 膜, WSSV-DIG 与血细胞膜通过黏附蛋白与受体蛋白间的特异性识别而

结合,标记于 WSSV 上的 DIG 被 AP 标记的抗 DIG 二抗检测到,发色后实验组显蓝紫色(图 2-B1, B2),阴性对照无非特异性显色(图 2-B3, B4),证明 WSSV 能与所提取的中国对虾血细胞膜在体外条件下特异性结合。阻断实验中经多抗阻断的阻断组发色较浅(图 2-C1, C2),明显浅于未经阻断的对照组(图 2-C3, C4),说明 WSSV 通过黏附蛋白与细胞膜受体蛋白的结合被阻断。

2.5 ELISA 法检测 WSSV-DIG 与血细胞膜的体外结合及其多抗阻断

ELISA 检测 WSSV-DIG 与血细胞膜的体外结合也为阳性($P/N > 2.1$),经棋盘滴定法确定 OD 值曲线拐点处的各反应物浓度,即血细胞膜 32 倍稀释, WSSV-DIG 128 倍稀释为阻断实验用最适反应物浓度。经抗血细胞多抗阻断, WSSV-DIG 与血细胞膜的结合强度也明显降低,阻断组

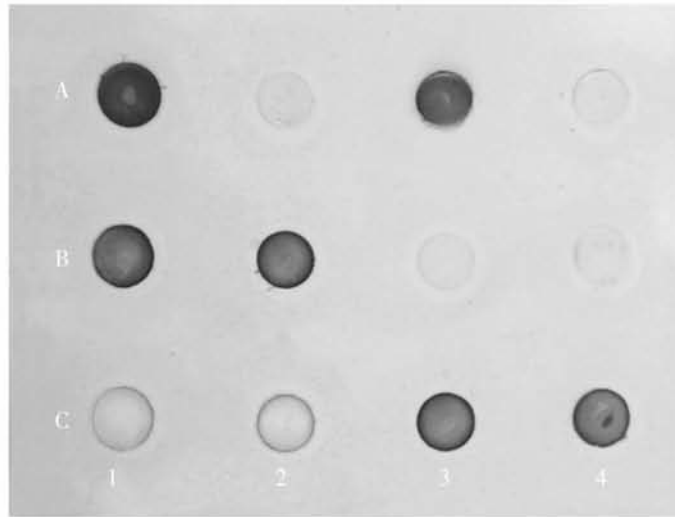


图2 Dot-Blot 检测 DIG 标记效果、Dot-Blot 体外结合体系建立及多抗封闭效果

- A. 检测 DIG 标记效果: A1:标记后的 WSSV 与 WSSV 单抗反应阳性;A2:不加单抗的阴性对照无非特异性显色;A3:标记后的 WSSV 与抗 DIG 二抗反应阳性;A4:不加抗 DIG 抗体的阴性对照无非特异性显色
 B. Dot-Blot 体外结合体系:B1, B2:WSSV-DIG 与血细胞膜在体外结合被抗 DIG 二抗检测到;B3, B4:不加 WSSV-DIG 的阴性对照无非特异性显色
 C. 体外结合的多抗阻断实验:C1, C2:多抗阻断后 Dot-Blot 发色明显低于对照组;C3, C4:以未免疫小鼠血清代替多抗的对照组

Fig. 2 Detecting of DIG labeling, WSSV-DIG and plasma membrane *in vitro* reaction and polyclonal antibody blocking by Dot-Blot

- A. Detection of DIG labeling: A1: Detection of DIG labeled WSSV by monoclonal antibody of WSSV showed a positive result. A2: Negative control without primary antibody had no unspecific reaction. A3: Labeling of WSSV with DIG was verified by the anti-DIG antibody. A4: Negative controls without anti-DIG antibody had no unspecific reaction
 B. *In vitro* combination system based on Dot-Blot: B1, B2: The combinations of WSSV-DIG and haemocyte plasma membrane were proved by the positive reaction with anti-DIG antibody. B3, B4: Negative controls without WSSV-DIG had no unspecific reaction
 C. Block experiments of *in vitro* combination: C1, C2: After blocked by polyclonal antibody of WSSV, the reaction signals were significantly weaker than the unblocked control groups. C3, C4: Unblocked controls where polyclonal antibody was replace by serum of unimmunized mouse showed no block effect.

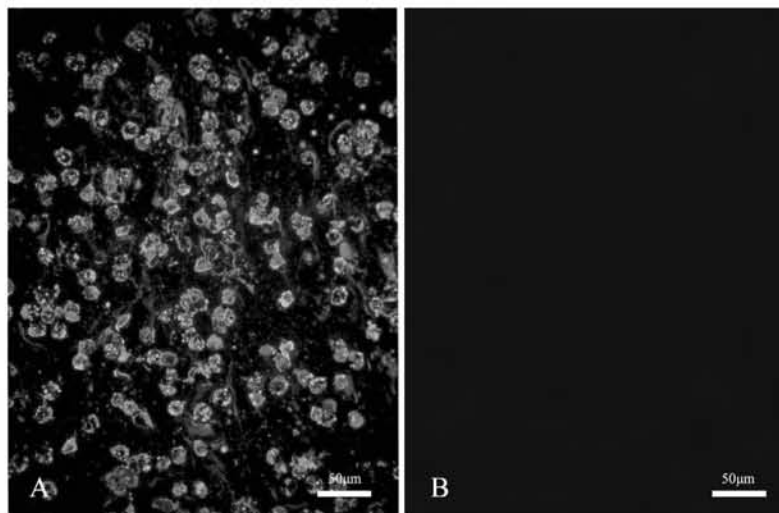


图3 间接免疫荧光检测抗中国对虾血细胞多克隆抗体

- A. 中国对虾所有血细胞都与多抗反应而发出黄绿色荧光; B. 未免疫小鼠血清代替多抗作为阴性对照,无非特异性荧光出现

Fig. 3 Polyclonal antibody to haemocytes of *F. chinensis* tested by Immunofluorescence Assay Test

- A. All kinds of Chinese shrimp haemocytes reacted with the polyclonal antibody and showed green fluorescence;
 B. No unspecific fluorescence was observed in the negative control where polyclonal antibody was replace by serum of unimmunized mouse

OD 值降低 69%(图 4),显著低于未阻断组($P < 0.05$)。

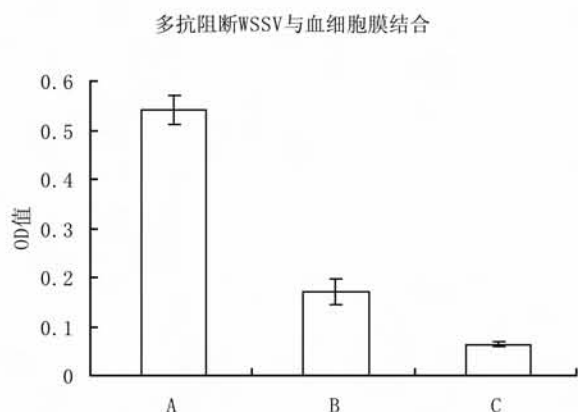


图 4 多抗对 WSSV-DIG 与血细胞膜的 ELISA 结合的阻断

经血细胞多抗阻断, WSSV-DIG 与血细胞膜的结合明显减弱 ($P < 0.05$), 显著低于未阻断组。A: 未阻断组; B: 阻断组; C: 阴性对照组

Fig. 4 Polyclonal antibody blocked the combination of WSSV-DIG with plasma membrane in ELISA

After blocked by polyclonal antibody, the combination of WSSV-DIG with haemocyte plasma membrane decreased significantly ($P < 0.05$) compared with the unblocked group A; unblocked group, B; blocked group, C; negative control

3 讨论

在 WSSV 感染早期,即可从对虾血细胞中检测到 WSSV 病毒粒子^[12],说明对虾血细胞是 WSSV 侵染的重要靶器官。体外原代培养的血细胞可以被 WSSV 感染证明对虾血细胞中存在 WSSV 受体蛋白^[13],但受到新鲜血细胞取材等的限制,原代培养技术很难用于大规模的受体及阻断剂筛选。本实验采用的血细胞膜可以从冻存的对虾血细胞提取,并且含有丰富的 WSSV 受体蛋白,是良好的 WSSV 受体蛋白及阻断剂筛选实验材料。

ELISA 和 Dot-Blot 结合实验的结果证明, WSSV-DIG 能在体外环境下与血细胞膜特异性结合,说明 WSSV 通过其黏附蛋白与血细胞膜上的受体蛋白发生了黏附。抗血细胞多克隆抗体中含有抗各种血细胞膜蛋白的抗体,包括抗受体蛋白的受体抗体。由于阻断实验中受体抗体与受体蛋白结合后占据了 WSSV 黏附蛋白的结合位点,所以竞争性抑制了 WSSV-DIG 与血细胞膜的结

合。但是,多抗的加入没有完全阻断 WSSV-DIG 的黏附,造成这一结果的原因可能是由于: WSSV 受体蛋白在血细胞膜蛋白中可能并非主要蛋白,因此在多抗生产中产生的受体抗体效价及特异性都不够高,并不能完全阻断血细胞膜上的每一个受体位点。因此,进一步以本实验建立的体外结合技术为筛选体系,筛选高效价的特异性单克隆受体抗体,对阻断 WSSV 感染具有重要意义。

参考文献:

- [1] Assavalapsakul W, Smith D R, Panyim S. Identification and characterization of a *Penaeus monodon* lymphoid cell-expressed receptor for the yellow head virus [J]. J Virol, 2006, 80 (1): 262 - 269.
- [2] Senapin S, Phongdara A. Binding of shrimp cellular proteins to *Taura syndrome* viral capsid proteins VP1, VP2 and VP3 [J]. Virus Res, 2006, 122: 69 - 77.
- [3] Sritunyalucksana K, Wannapapho W, Lo C F, et al. PmRab7 is a VP28-binding protein involved in white spot syndrome virus infection in shrimp [J]. J Virol, 2006, 80(21):10734 - 10742.
- [4] Hauton C, Smith V J. Adaptive immunity in invertebrates; a straw house without a mechanistic foundation [J]. Bioessays, 2007, 29 (11): 1138 - 1146
- [5] Billick E, Seibert C, Pugach P, et al. The differential sensitivity of human and rhesus macaque CCR5 to small-molecule inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 entry is explained by a single amino acid difference and suggests a mechanism of action for these inhibitors [J]. J Virol, 2004, 78 (8): 4134 - 4144.
- [6] Seibert C, Ying W W, Gavrillov S, et al. Interaction of small molecule inhibitors of HIV-1 entry with CCR5 [J]. Virology, 2006, 349 (1):41 - 54.
- [7] Olson W C, Rabut G E E, Nagashima K A, et al. Differential inhibition of human immunodeficiency virus type 1 fusion, gp120 binding, and CC-chemokine activity by monoclonal antibodies to CCR5 [J]. J Virol, 1999, 73 (5):4145 - 4155.
- [8] 国家质量监督检验检疫总局(译). 水生动物疾病诊断手册(第3版)[M]. 北京:中国农业出版社, 2000: 165 - 179.
- [9] Zhan W B, Chen J, Xing J, et al. Using

- monoclonal antibodies to diagnose white spot syndrome virus disease of shrimp [J]. American Fisheries Society Symposium, 2003, 38:309-313.
- [10] Zhan W B, Wang Y H, Fryer J L, *et al.* Production of monoclonal antibodies against white spot syndrome virus [J]. Journal of Aquatic Animal Health, 1999, 11:17-22.
- [11] Lin Y B, Zhan W B, Li Q, *et al.* Ontogenesis of haemocytes in shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) studied with probes of monoclonal antibody [J]. Dev Comp Immunol, 2007, 31:1073-1081.
- [12] Wang Y T, Liu W, Seah J N, *et al.*, White spot syndrome virus (WSSV) infects specific hemocytes of the shrimp *Penaeus merguensis* [J]. Dis Aquat Org, 2002, 52:249-259.
- [13] Jiang Y S, Zhan W B, Wang S, *et al.* Development of primary shrimp hemocyte cultures of *Penaeus chinensis* to study white spot syndrome virus (WSSV) infection [J]. Aquaculture, 2006, 253: 114-119.

Researches on *in vitro* combination of WSSV and haemocyte plasma membrane of Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*)

LIN Ying-bo, ZHAN Wen-bin, XING Jing, TANG Xiao-qian, LIU Bao-liang
(Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: Selecting small molecular ligands or monoclonal antibodies to cellular receptors as inhibitors is an effective approach to inhibit virus infection. In this research, haemocyte plasma membranes (HPM) of Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) were isolated employing differential centrifugation. Utilizing the techniques of Dot-Blot and ELISA, HPMs immobilized in microtiter plates or nitrocellulose (NC) membranes were incubated with Digoxigenin labeled white spot syndrome virus (WSSV-DIG) at 4 °C for 4 h. Then alkaline phosphatase labeled antibodies against DIG was used as a sensitive probe to detect the *in vitro* combination of WSSV-DIG to HPM. Both ELISA and Dot-Blot combination showed positive reactions. In blocking experiment, polyclonal antibody against haemocytes of Chinese shrimp was allowed to bind to the HPM at 37 °C for 1 h before the incubation with WSSV-DIG. In Dot-Blot assay, the blocked group showed a significantly lighter color compared with the unblocked group. In ELISA assay, OD value of the blocked group was 69% lower than that of the unblocked group. It can be deduced that some receptor antibodies, which were specifically against the WSSV receptors, existed in the polyclonal antibody. During incubation, these antibodies adhered to the receptors on the HPM and significantly blocked the combination of WSSV-DIG. The *in vitro* combining technology between WSSV and HPM developed in this research provides a strategy to characterization of WSSV receptors and selection inhibitor to WSSV. The blocking experiments carried out with polyclonal antibody have proved the feasibility.

Key words: white spot syndrome virus; haemocyte plasma membrane; receptor; inhibitor