



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113769077 B

(45) 授权公告日 2022.07.29

(21) 申请号 202111156276.5

(22) 申请日 2021.09.30

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113769077 A

(43) 申请公布日 2021.12.10

(83) 生物保藏信息
CCTCC No.V202070 2020.10.14

(73) 专利权人 南阳师范学院
地址 473061 河南省南阳市卧龙区卧龙岗
1638号

(72) 发明人 姚伦广 孟晓红 邱苜 秦英惠
管翠翠 刘阳坤

(74) 专利代理机构 北京智为时代知识产权代理
事务所(普通合伙) 11498
专利代理师 王加岭

(51) Int.Cl.

A61K 39/12 (2006.01)

A61P 31/20 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

C12N 7/06 (2006.01)

(56) 对比文件

JP 2011016845 A, 2011.01.27

CN 111135295 A, 2020.05.12

王庆等. 大口黑鲈虹彩病毒病研究进展.《动物医学进展》.2011,(第02期),73-76.

审查员 王瑶

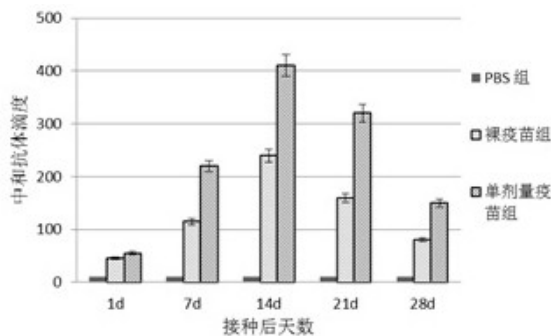
权利要求书1页 说明书8页 附图3页

(54) 发明名称

一种注射用大口黑鲈虹彩病毒灭活疫苗及其制备方法

(57) 摘要

本发明旨在提供一种注射用大口黑鲈虹彩病毒灭活疫苗及其制备方法,基于新分离得到的一株大口黑鲈虹彩病毒,将其灭活后与佐剂混合作为灭活疫苗,研究表明,所制备的灭活疫苗免疫效果好,相对免疫保护率最高可达100%,可广泛应用于大口黑鲈虹彩病毒感染的防控。



1. 一种注射用大口黑鲈虹彩病毒灭活疫苗,其特征在于,所述注射用大口黑鲈虹彩病毒灭活疫苗中包括灭活的大口黑鲈虹彩病毒N-LBIV-201907,大口黑鲈虹彩病毒N-LBIV-201907于2020年10月14日在中国典型培养物保藏中心CCTCC进行用于专利程序的培养物的保藏,其保存号为:CCTCC No.V202070,分类命名为大口黑鲈虹彩病毒N-LBIV-201907;保藏地址为:湖北省武汉市武汉大学保藏中心;

所述灭活疫苗还包括佐剂,所述佐剂为IMS1312;

所述灭活疫苗中包含 10^8 TCID₅₀ /ml的灭活大口黑鲈虹彩病毒N-LBIV-201907。

2. 一种制备权利要求1所述的注射用大口黑鲈虹彩病毒灭活疫苗的方法,其特征在于,包括如下步骤:

步骤一,EPC细胞的培养;

步骤二,大口黑鲈虹彩病毒N-LBIV-201907的增殖;

步骤三,病毒的收获;

步骤四,病毒滴度的测定;

步骤五,灭活处理;

步骤六,疫苗的制备:将灭活好的疫苗原液与佐剂混合后制备得到灭活疫苗。

3. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于,具体步骤如下:

步骤一,EPC细胞的培养:将EPC细胞于含10% (V/V) 胎牛血清的M199培养基中进行传代培养,25℃,5% CO₂恒温培养至细胞汇合,长成单层,细胞数量 $>10^6$ /mL;

步骤二,大口黑鲈虹彩病毒N-LBIV-201907的增殖:吸出EPC细胞中的培养液,然后按1/10的培养基体积加入滴度为 10^5 TCID₅₀/mL 的N-LBIV-201907的病毒悬液,在病毒吸附细胞1h后,补加pH7.2~7.5、含2% (V/V) 小牛血清的M199维持液进行病毒增殖;

步骤三,病毒的收获:病毒连续培养4~7天,在显微镜下观察,待80% EPC细胞出现典型细胞病变效应时,置于-80℃冰箱冻存,冻结后取出置于37℃水浴加热溶解,如此反复冻融两次,将病毒感染的细胞悬液装入50ml无菌离心管里,在4℃以4400 g 离心20 min,去除细胞碎片,收集离心后上清液,即获得扩增病毒原液,-80℃保存备用,用于后续滴度实验以及灭活疫苗制备;

步骤四,病毒滴度的测定:将大口黑鲈虹彩病毒N-LBIV-201907疫苗毒株进行传代扩增,收集病变细胞和病毒裂解液后,进行TCID₅₀测定,经测定,病毒接种细胞后第5天的TCID₅₀可达到 $10^{10.55}$ /ml以上,得到高滴度的病毒液;

步骤五,灭活处理:取保存于-80℃的高滴度的病毒液于室温融化,加入福尔马林溶液使其终浓度为0.2% (V/V),混合均匀后置于37℃条件下灭活48-72h,灭活结束后,添加终浓度为0.05%的亚硫酸钠中和残余福尔马林,即获得大口黑鲈虹彩病毒N-LBIV-201907灭活疫苗原液,并置于4℃冰箱保存备用;

步骤六,疫苗的制备:将灭活好的疫苗原液用0.65%鱼用生理盐水稀释至效价为 2×10^8 TCID₅₀ /ml,加入1:1的佐剂IMS1312混匀,即得到注射用大口黑鲈虹彩病毒灭活疫苗。

一种注射用大口黑鲈虹彩病毒灭活疫苗及其制备方法

[0001] 技术领域:

[0002] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种注射用大口黑鲈虹彩病毒灭活疫苗及其制备方法。

[0003] 背景技术:

[0004] 大口黑鲈(*Micropterus salmoides*),俗称加州鲈、黑鲈,原产于北美密西西比河流域,属广温性鱼类,具有生长快、病害少、肉质鲜美、价格高和容易捕捞等众多优点而深受渔民的喜爱。20世纪70年代,大口黑鲈首次引入中国台湾,繁殖了十几代后,于1983年引入广东省,在深圳、佛山、惠州一带进行人工养殖,佛山顺德地区是大口黑鲈的主要养殖区。因为大口黑鲈的养殖在国内具有较好的经济效益,在近十几年内已迅速发展成为我国主要的经济养殖鱼种,并被认定为名优品种之一,具有重要的经济价值。大口黑鲈的产量在不断增多,根据中国《2018年中国渔业统计年鉴》分析得出,2017年全国大口黑鲈养殖产量约为46万吨,相比于2016年增长31.57%,增长速度为淡水养殖鱼类之首。日渐增长的市场需求使得大口黑鲈的养殖规模逐渐变大,养殖密度也升高,与此同时,大口黑鲈在养殖过程中出现的病害概率也会增多,其中虹彩病毒病是大口黑鲈养殖中常见的病毒性疾病。大口黑鲈蛙虹彩病毒(*Largemouth bass ranavirus, LMBV*),该病毒最早于1991年在美国佛罗里达州被发现,大口黑鲈感染该病毒后,通常症状不明显,或体表有出血、眼球突出。2008年至2010年初,顺德地区大口黑鲈养殖鱼塘大面积暴发疾病,造成重大经济损失。对濒死鱼剖检发现鱼鳔肿大,布满红色气腺。鱼鳔、肾脏研磨除菌后,接种鲤鱼上皮瘤细胞(EPC)分离到致病性大口黑鲈虹彩病毒。

[0005] 一般认为健康鱼感染大口黑鲈虹彩病毒主要是通过在水体里接触病原或者食入带病鱼饵,人工感染实验和孵化场还未发现垂直传播的病例。大口黑鲈虹彩病毒不仅可以导致大面积鱼暴发疾病死亡引起鱼灾,也可以是不表现任何症状的隐性带毒,这给疾病诊断带来困难。对该病的诊断必须综合流行情况、症状、剖检、病毒分离鉴定等进行判定。大口黑鲈虹彩病毒感染对大口黑鲈有致死性。Zilberg D等进行大口黑鲈虹彩病毒的人工感染试验的结果显示,以 10^6 TCID₅₀/0.1mL剂量通过腹腔注射的方式攻毒,感染后第3天,病鱼呈现螺旋状游动,第4天病鱼体色发黑、无活力、腹部轻度膨大,攻毒鱼在3-5天内全部死亡,濒死鱼剖检后,所有感染鱼都有急性腹膜炎症状,感染大口黑鲈虹彩病毒鱼的肝脏、胃、肠道和脾脏表层部分出现坏死和炎性病变,鱼鳔与腹腔接触表面有纤维蛋白渗出物,胃肠道的黏膜上皮层有局部坏死病灶。

[0006] 由于大口黑鲈虹彩病毒在发病机理、流行病学方面的研究并不深入,再加上野生鱼类带毒情况的普遍性,目前对大口黑鲈虹彩病毒还没有采取有效的防控措施,且鉴于大口黑鲈虹彩病毒感染可以不显现任何症状,并且野生鱼带毒情况较为普遍,从传播途径尽可能切除感染机会也很有必要,因此,疫苗的研发和应用也就成了未来大口黑鲈虹彩病毒病防控的重要方向之一。专利申请CN202011348356.6公开了将柑橘黄酮提取物和黑枸杞花青素提取物添加至工厂化循环水养殖(RAS)系统中,柑橘黄酮提取物和黑枸杞花青素提取物协同作用,抑制虹彩病毒的增殖,解决RAS养殖系统中虹彩病毒引起鱼类患病致死的技术

问题;专利申请CN202010052797.5制备得到了一种大口黑鲈虹彩病毒病灭活疫苗;易婉盈等以表达LMBV外衣壳蛋白(MCP)的重组表达质粒pCDNA3.1(+)-MCP为材料,构建对LMBV有免疫作用的DNA疫苗,通过胸鳍基部注射的方法免疫大口黑鲈,在攻毒实验中DNA疫苗组的免疫保护率达62.5%,对大口黑鲈虹彩病毒的攻击起到了良好的保护作用。然而,目前在虹彩病毒的防治方面没有特效药物,我国也无商品化的虹彩病毒疫苗,因此,分离合适的疫苗毒株并开展相关的研究,推进疫苗的产业化生产对于大口黑鲈的养殖产业具有积极的意义,也是目前亟需解决的产业问题。

[0007] 发明内容:

[0008] 为了解决大口黑鲈虹彩病毒的预防和治疗难的问题,本发明旨在提供一种注射用大口黑鲈虹彩病毒灭活疫苗及其制备方法,基于本发明人新分离得到的一株大口黑鲈虹彩病毒,将其灭活后与佐剂混合作为灭活疫苗,研究表明,所制备的灭活疫苗免疫效果好,相对免疫保护率最高可达100%,可广泛应用于大口黑鲈虹彩病毒感染的防控。

[0009] 为解决以上技术问题,本发明采用如下技术手段:

[0010] 一种注射用大口黑鲈虹彩病毒灭活疫苗,其特征在于,所述注射用大口黑鲈虹彩病毒灭活疫苗中包括灭活的大口黑鲈虹彩病毒N-LBIV-201907,所述大口黑鲈虹彩病毒N-LBIV-201907于2020年10月14日在中国典型培养物保藏中心CCTCC进行用于专利程序的培养物的保藏,其保存号为:CCTCC No.V202070,分类命名为大口黑鲈虹彩病毒N-LBIV-201907;保藏地址为:湖北省武汉市武汉大学保藏中心。

[0011] 优选的,所述灭活疫苗还包括佐剂,所述佐剂为IMS1312。

[0012] 优选的,所述灭活疫苗中包含 10^8 TCID₅₀ /ml的灭活大口黑鲈虹彩病毒N-LBIV-201907。

[0013] 本发明还请求保护所述的注射用大口黑鲈虹彩病毒灭活疫苗的制备方法,其特征在于:所述灭活疫苗的制备包括如下步骤:

[0014] 步骤一,EPC细胞的培养;

[0015] 步骤二,大口黑鲈虹彩病毒N-LBIV-201907的增殖;

[0016] 步骤三,病毒的收获;

[0017] 步骤四,病毒滴度的测定;

[0018] 步骤五,灭活处理;

[0019] 步骤六,疫苗的制备:将灭活好的疫苗原液与佐剂混合后制备得到灭活疫苗。

[0020] 优选的,所述的注射用大口黑鲈虹彩病毒灭活疫苗的制备方法,其特征在于:具体步骤如下:

[0021] 步骤一,EPC细胞的培养:将EPC细胞于含10% (V/V) 胎牛血清的M199培养基中进行传代培养,25℃,5%CO₂恒温培养至细胞汇合,长成单层,细胞数量 $>10^6$ /mL;

[0022] 步骤二,大口黑鲈虹彩病毒N-LBIV-201907的增殖:吸出EPC细胞中的培养液,然后按1/10的培养基体积加入N-LBIV-201907的病毒悬(10⁵TCID₅₀/mL),在病毒吸附细胞1h后,补加含2% (V/V) 小牛血清的M199 (pH7.2~7.5) 维持液进行病毒增殖;

[0023] 步骤三,病毒的收获:病毒连续培养4~7天,在显微镜下观察,待80% EPC细胞出现典型细胞病变效应时,置于-80℃冰箱冻存,冻结后取出置于37℃水浴加热溶解,如此反复冻融两次,将病毒感染的细胞悬液装入50ml无菌离心管里,在4℃以4400 g 离心 20

min,去除细胞碎片,收集离心后上清液,即获得扩增病毒原液,-80℃保存备用,用于后续滴度实验以及灭活疫苗制备;

[0024] 步骤四,病毒滴度的测定:将大口黑鲈虹彩病毒N-LBIV-201907疫苗毒株进行传代扩增,收集病变细胞和病毒裂解液后,进行TCID₅₀测定,经测定,病毒接种细胞后第5天的TCID₅₀可达到10^{10.55}/ml以上,得到高滴度的病毒液;

[0025] 步骤五,灭活处理:取保存于-80℃的高滴度的病毒液于室温融化,加入福尔马林溶液使其终浓度为0.2% (V/V),混合均匀后置于37℃条件下灭活48-72h,灭活结束后,添加终浓度为0.05%的亚硫酸钠中和残余福尔马林,即获得大口黑鲈虹彩病毒N-LBIV-201907灭活疫苗原液,并置于4℃冰箱保存备用;

[0026] 步骤六,疫苗的制备:将灭活好的疫苗原液用0.65%鱼用生理盐水稀释至效价为2×10⁸ TCID₅₀ /ml,加入1:1的佐剂IMS1312混匀,即得到可直接使用的大口黑鲈虹彩病毒细胞培养灭活疫苗。

[0027] 基于以上技术方案,本发明具有如下优点和有益效果:

[0028] 首先,本发明通过在南阳地区爆发大口黑鲈虹彩病毒感染的养殖场分离得到一株高致死率的虹彩病毒毒株,对其进行分离和鉴定得到虹彩病毒毒株,属于河南南阳地区首次分离得到该类虹彩病毒,经分析发现,该毒株与其他报道的毒株具有较高的同源性,但MCP的核酸序列也存在差异,该毒株的发现填补了南阳地区该毒株分离的空白,丰富了大口黑鲈虹彩病毒的研究。

[0029] 其次,本发明对于分离得到的病毒液进行培养和灭活,制备得到大口黑鲈虹彩病毒灭活疫苗,经试验表明,所述灭活疫苗均具有良好的免疫原性,其中,大口黑鲈在接种免疫后,能产生较高滴度的特异性的中和抗体,在免疫后的第1d即能检测到抗体的产生,在第14d达到最高值,随后效价逐渐降低,表明本发明的疫苗能够较好的预防感染的发生和病程的进展,采用本发明的疫苗进行接种后,其30天后的保护率达到76%,而接种80天后的保护率达到100%,而采用仅包含灭活病毒液的裸疫苗进行接种后,其保护率不及本发明的疫苗。以上试验表明,本发明的疫苗具有很好的保护率,其在接种30天后的保护率高于现有报道的保护率(CN2020xxxx2797.5,30日保护率为50%)以及DNA疫苗的保护率(易婉盈等,62.5%),且在接种80日后可以达到100%的相对保护率。

[0030] 综上所述,本发明首次从南阳地区分离得到大口黑鲈虹彩病毒,为该病毒毒株本身和流行病学的研究提供了丰富的资源,另外,该病毒毒株具有良好的免疫原性,采用其制备得到的疫苗能够刺激产生高滴度的中和抗体,具有很好的预防作用,动物实验表明,采用本发明的疫苗进行接种后,其30天后的保护率达到76%,高于现有技术的报道,而接种80天后的保护率达到100%。

[0031] 附图说明:

[0032] 图1 病毒分离时的细胞病变情况:A,正常的EPC细胞;B,感染病毒后病变的EPC细胞。

[0033] 图2 分子鉴定结果:M,DL5000;1,分离的病毒液;2,阴性对照。

[0034] 图3 N-LBIV-201907与LMBIV-NB001序列比对情况。

[0035] 图4 动物回归试验结果,病死鱼表现出明显的体表溃疡症状。

[0036] 图5部分病死实验鱼进行病毒检测结果,M,DL5000;1,第10代病毒液;2,阴性对照;

3-6为病死实验鱼病毒检测结果。

[0037] 图6 接种后的中和抗体滴度测定结果。

[0038] 具体实施方式：

[0039] 实施例1. 大口黑鲈虹彩病毒的分离与鉴定

[0040] 1. 大口黑鲈虹彩病毒感染样品的采集

[0041] 2019年6-7月,河南省南阳市某养殖场爆发大规模的大口黑鲈病症,主要症状为病鱼体色发黑、无活力、腹部轻度膨大,死亡率高达70%,濒死鱼剖检后,表现为急性腹膜炎症状,肝脏、胃、肠道和脾脏表层部分出现坏死和炎性病变,但是深层部分表现正常,鱼鳃与腹腔接触表面有纤维蛋白渗出物,胃肠道的黏膜上皮层有局部坏死病灶,符合大口黑鲈虹彩病毒感染的相关病症指征。于该养殖场采集了20尾体表出现溃疡症状的大口黑鲈,采集的样本分别使用封口袋单独保存,-80℃冻存备用。

[0042] 2. 大口黑鲈虹彩病毒N-LBIV-201907的分离

[0043] 将采集的大口黑鲈染病样品进行解剖后,无菌条件下取肝脏、脾脏、肾脏等样品,以质量体积比1:8加入无菌生理盐水,冰浴条件下研磨匀浆,将匀浆液分为两份,其中一份在BHI平板、血平板和RS培养基平板上进行划线,28℃培养24h分离细菌,经分离均未分离得到细菌,其表明大口黑鲈相关症状的出现并非细菌感染。

[0044] 另一份转移至50mL离心管中,反复冻融3次后(-80℃和室温交替冻融),8000g、4℃离心20min,取上清,经灭菌的0.22μm滤器过滤后,将滤液于-80℃下冻存备用。将鲤鱼上皮瘤细胞(*Epithelioma papulosum cyprini*, EPC,由南阳师范学院提供)进行传代培养,至细胞汇合度为85-90%时,弃去培养基,试验组取200μL滤液与800μL M199培养基混匀,对照组采用200μL无菌PBS与800μL M199培养基混匀,分别接种于健康的EPC细胞,25℃吸附1h,期间每隔20min轻轻晃动培养瓶一遍均匀吸附,吸附完成后添加4mL含有2%胎牛血清的M199培养基,置于25℃ 5%CO₂的细胞培养箱中进行培养,每日于显微镜下观察细胞状态至发现实验组细胞单层80%出现细胞病变时收获培养物(图1),反复冻融3次后(-80℃和室温交替冻融),在4℃以4400g离心20min,去除细胞碎片,即得到病毒原液。将上述病毒原液按照上述步骤感染新的健康EPC细胞,重复至收获第10代病毒液。

[0045] 大口黑鲈虹彩病毒N-LBIV-201907的分子鉴定

[0046] 采用许峰(《海洋与湖泊》,2020年1月,Vol 1 .51, No. 1,第156-162页)报道的方法对第10代病毒液进行分子鉴定,以第10代病毒液为样品进行DNA的提取,以此为模板,采用报道的引物进行PCR检测,扩增产物经1%(W/V)琼脂糖凝胶电泳分离、胶回收试剂盒回收纯化后与pGEM-T Easy载体16℃连接3h,将连接产物转化E.coli DH5α感受态细胞后,涂布与含100mg/mL氨苄青霉素的LB平板上,37℃培养过夜,挑取3个菌落进行扩大培养,提取质粒,PCR鉴定后(见图2)均扩增得到长度为1029bp的序列,选取阳性克隆进行测序,经序列分析表明。其与许峰分离得到的LMBIV-NB001(MN176304.1)的同源性为98.83%,经BLAST比对,其与现有报道的大口黑鲈虹彩病毒均存在较高的同源性,表明本发明从大口黑鲈中分离得到的病毒为大口黑鲈虹彩病毒。序列比对结果如图3所示,其中与LMBIV-NB001存在多个核苷酸位点的突变。

[0047] 大口黑鲈虹彩病毒N-LBIV-201907的动物回归试验

[0048] 健康大口黑鲈30尾随机分成3组,每组10尾鱼,置于26-28℃水箱中养殖。其中第1

和2组作为感染组,腹腔注射上述制备的第10代病毒液0.2mL/尾;第3组作为对照组,腹腔注射无菌生理盐水 0.2 mL/尾。注射后每日观察实验鱼的情况并做好记录,持续观察并记录发病和死亡情况,取病死实验鱼的脾、肾等组织,提取 DNA 检测病毒。

[0049] 第3组的对照组在此试验期间全部健活,第1和2组的感染组注射病毒液7天后全部发病,且在接毒10天后即达到90%死亡,感染12天后全部死亡,且病死鱼表现出明显的体表溃疡症状(见图4)。对部分病死实验鱼进行病毒检测,均能扩增得到MCP基因的特异性条带(见图5),以上试验表明,本发明所分离得到的毒株为大口黑鲈虹彩病毒,且该毒株具有较强的致死性。

[0050] 5. 大口黑鲈虹彩病毒N-LBIV-201907病毒滴度的测定

[0051] 1) 将 EPC细胞传入 96 孔板中,置 25℃培养箱中培养;

[0052] 2) 将大口黑鲈虹彩病毒N-LBIV-201907第10代病毒液从 10^{-1} 到 10^{-12} 作10倍系列稀释;

[0053] 3) 将稀释好的病毒悬液加入 96 孔板中,每孔加 100 μ l,每个稀释度加 3 孔;

[0054] 4) 对照组中加培养基;

[0055] 5) 将 96 孔板置于 25℃培养箱中培养,直至不再有新的 CPE 产生;

[0056] 6) 甲醛固定后用结晶紫染色,按照 Reed & Muench(1938)的方法计算病毒的 TCID₅₀值。

[0057] 经测定,大口黑鲈虹彩病毒N-LBIV-201907第10代病毒液的滴度为 $10^{10.25}$ TCID₅₀/mL。

[0058] 病毒的保藏

[0059] 2020年10月14日在中国典型培养物保藏中心CCTCC进行用于专利程序的培养物的保藏,其保存号为:CCTCC No.V202070,分类命名为大口黑鲈虹彩病毒N-LBIV-201907;保藏地址为:湖北省武汉市武汉大学保藏中心。

[0060] 实施例2. 大口黑鲈虹彩病毒N-LBIV-201907灭活疫苗的制备方法

[0061] 步骤一,EPC细胞的培养:将EPC细胞于含10% (V/V) 胎牛血清的M199培养基中进行传代培养,25℃,5%CO₂恒温培养至细胞汇合,长成单层,细胞数量 $>10^6$ /mL

[0062] 步骤二,大口黑鲈虹彩病毒N-LBIV-201907的增殖:吸出EPC细胞中的培养液,然后按1/10的培养基体积加入N-LBIV-201907的病毒悬(10^5 TCID₅₀/mL),在病毒吸附细胞1h后,补加含2% (V/V) 小牛血清的M199 (pH7.2~7.5)维持液进行病毒增殖,

[0063] 步骤三,病毒的收获:病毒连续培养4~7天,在显微镜下观察,待80% EPC细胞出现典型细胞病变效应时,置于-80℃冰箱冻存,冻结后取出置于37℃水浴加热溶解,如此反复冻融两次,将病毒感染的细胞悬液装入50ml无菌离心管里,在 4℃以 4400 g 离心 20 min,去除细胞碎片,收集离心后上清液,即获得扩增病毒原液,-80℃保存备用,用于后续滴度实验以及灭活疫苗制备;

[0064] 步骤四,病毒滴度的测定:将大口黑鲈虹彩病毒N-LBIV-201907疫苗毒株进行传代扩增,收集病变细胞和病毒裂解液后,进行TCID₅₀测定,经测定,病毒接种细胞后第5天的TCID₅₀可达到 $10^{10.55}$ /ml以上,得到高滴度的病毒液;

[0065] 步骤五,灭活处理:取保存于-80℃的高滴度的病毒液于室温融化,加入福尔马林溶液使其终浓度为0.2% (V/V),混合均匀后置于37℃条件下灭活48-72h,灭活结束后,添

加终浓度为0.05%的亚硫酸钠中和残余福尔马林,即获得大口黑鲈虹彩病毒N-LBIV-201907灭活疫苗原液,并置于4℃冰箱保存备用。

[0066] 步骤六,疫苗的制备:

[0067] 将灭活好的疫苗原液用鱼用生理盐水(0.65%)稀释至效价为 10^8 TCID₅₀/ml,得到可供直接使用的大口黑鲈虹彩病毒裸疫苗。

[0068] 或者,

[0069] 与佐剂混合制备得到灭活疫苗,根据先前报道,IMS1312为水佐剂,与疫苗混合方便,因此,本发明也选择IMS1312佐剂作为与灭活疫苗乳化的使用佐剂,具体的制备方法为:将灭活好的疫苗原液用鱼用生理盐水(0.65%)稀释至效价为 2×10^8 TCID₅₀ /ml,加入1:1的佐剂IMS1312混匀,即得到可直接使用的大口黑鲈虹彩病毒病细胞培养灭活疫苗。

[0070] 实施例3. 大口黑鲈虹彩病毒灭活疫苗的安全性检验和免疫效力评价

[0071] 1. 灭活疫苗的安全性检验

[0072] 1.1灭活效果检验

[0073] 取制备好的疫苗按上述病毒增殖的方法接种EPC细胞,同时设置阴性对照(未接种病毒的EPC细胞冻融上清液),观察7天,若出现细胞病变效应则表明病毒灭活不完全;若未见细胞病变效应,再盲传3次,若盲传出现细胞病变,则表明病毒灭活仍不完全,若盲传3次均未出现细胞病变,则表明病毒灭活完全,疫苗安全。

[0074] 无菌检验

[0075] 取上述制备好的疫苗,接种脑浸液细菌培养基(BHI)平板,用划线法涂平板后于37℃培养15天,若有菌落生长,则表明疫苗有细菌污染,需用0.22μm滤膜过滤除菌后使用;若无菌落生长,则表明疫苗是无菌的。

[0076] 鱼体安全性检验

[0077] 取上述制备好的疫苗,注射50-80g健康的大口黑鲈鱼苗90尾,随机分为单剂量组、双倍剂量组和高剂量组,注射剂量分别为0.1 ml/尾、0.2 ml/尾或0.5ml/尾,阴性对照注射相同剂量的生理盐水。饲养15~30天,若疫苗组出现死亡或临床症状,而阴性对照组未出现临床症状或死亡,表明疫苗不安全;若疫苗组和阴性对照组均未见死亡,则表明疫苗安全。

[0078] 结果表明,各剂量组的鱼苗在注射接种后15天全部健活,未出现临床症状,表明单剂量、双倍剂量和高剂量腹腔注射接种该灭活疫苗对大口黑鲈的临床症状、存活情况及生长情况不产生任何不良影响,本发明的灭活疫苗具有较好的安全性。

[0079] 实施例4. 大口黑鲈虹彩病毒灭活疫苗的免疫效力评价

[0080] 1.大口黑鲈活体免疫

[0081] 试验大口黑鲈来源于南阳某大口黑鲈养殖场,体重为 $120g \pm 10g$,该养殖场大口黑鲈无虹彩病毒感染的临床症状,且随机取10尾大口黑鲈进行PCR检测,均无虹彩病毒感染。

[0082] 试验用大口黑鲈饲养在室内塑料水族箱中,持续供给充足的氧气,室内温度保持在27℃,饲养期间每天定期排污和换水,每天投喂一次饲料。购买回来的大口黑鲈先室内喂养两周以适应环境后,再进行免疫试验。

[0083] 将330尾左右的大口黑鲈随机分成3组:单剂量疫苗组、裸疫苗组和PBS组,每组约110尾。免疫前先将大口黑鲈浸泡麻醉,免疫时采用胸鳍基部注射的方式进行,单剂量疫苗组、裸疫苗组的每条鱼均0.1mL疫苗,PBS组的每条鱼均注射0.1mL灭菌PBS。

[0084] 血清中和抗体效价的测定

[0085] 分别在免疫后的第 1、7、14、21、28 d 随机从各组中抽取5尾大口黑鲈,进行静脉抽血,加入抗凝剂后,4℃条件下3000×g 离心15min,取上层血清,-80℃保存,用于抗体中和效价的测定。

[0086] 血清中和抗体效价的测定方法

[0087] 1)将生长良好的EPC 细胞铺在96孔板中,接种密度为 6×10^4 /孔,放置在 26℃

[0088] 培养箱中培养过夜;

[0089] 2)从-80℃冰箱取出血清样品,冰上溶解后,在 56℃水浴锅中水浴 30 min;

[0090] 3)采用无血清的M199培养基对血清进行从 1:5 倍比稀释至 1:640;

[0091] 4)往不同稀释度的血清中加入等量体积的 $100\text{TCID}_{50}/0.1\text{ mL}$ 的大口黑鲈虹彩病毒N-LBIV-201907,置于 26℃培养箱中和 1 h,每隔 20 min 上下颠倒混匀;

[0092] 5)用排枪吸走 96 孔板中的旧培养基,随后往每排中加入 $100\mu\text{L}$ /孔的上述梯度稀释混合液,26℃培养箱中孵育 1 h;

[0093] 6)用排枪吸走混合液,随后往每孔中加入 $100\mu\text{L}$ M199(含双抗及2% FBS)。设置阴性和阳性对照,26℃培养箱中继续培养;

[0094] 7)培养72h后观察结果,以不产生 CPE的最高血清稀释度数为该血清的中和抗体滴度。

[0095] 血清中和抗体效价的测定结果

[0096] 在免疫后的1、7、14、21、28d分别对各组大口黑鲈进行血清中和抗体效价测定,结果如图6所示,大口黑鲈在接种免疫后,各剂量组均产生特异性抗体,在免疫后的第1d即能检测到抗体的产生,在第14d达到最高值,其中单剂量依苗组最高超过1:400,而裸疫苗组也达到1:200,随后效价逐渐降低。

[0097] 相对免疫保护率的测定

[0098] 在疫苗免疫鱼体后的第30 d分别从各组随机取50尾进行攻毒实验,第80d从各组剩下的大口黑鲈中随机取50尾进行攻毒实验,分别向单剂量疫苗组、裸疫苗组和 PBS 组和 PBS 组大口黑鲈注射病毒滴度为 $5 \times 10^9\text{TCID}_{50}/\text{mL}$ 的大口黑鲈虹彩病毒N-LBIV-201907,每尾注射剂量为 $200\mu\text{L}$ 。攻毒后的一个月观察鱼体的死亡情况,计算相对免疫保护率。结果如下表1所示。

[0099] 表1 相对免疫保护率的测定

组别	免疫 30d 后的保护率		免疫 80d 后的保护率	
	存活数量	保护率	存活数量	保护率
单剂量疫苗组	38 尾	76%	50 尾	100%
裸疫苗组	18 尾	36%	35 尾	70%
PBS 组	0 尾	0%	0 尾	0%

[0101] 基于表1的结果可知,采用本发明的疫苗进行接种后,其30天后的保护率达到76%,

而接种80天后的保护率达到100%，而采用仅包含灭活病毒液的裸疫苗进行接种后，其保护率不及本发明的疫苗。以上试验表明，本发明的疫苗具有很好的保护率，其在接种30天后的保护率高于现有报道的保护率(CN2020xxxx2797.5, 30日保护率为50%)以及DNA疫苗的保护率(易婉盈等, 62.5%)，且在接种80日后可以达到100%的相对保护率。

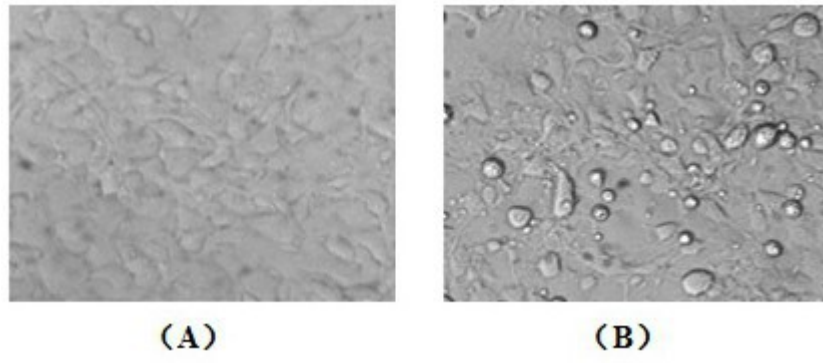


图1



图2

MN176304.1.txt	TTTCGGGCAGCAGTTTTCCGCTAGGAGTGCCAGGTCGGGC	40
N-LBIV-201907.txt	TTTCGGGCAGCAGTTTTCCGCTAGGAGTGCCAGGTCGGGC	40
Consensus	tttcgggagca ttttc g aggagtgccaggtcgg c	
MN176304.1.txt	GACTATGTGCTCAACTCTTGGCTGGTCCTCAAGACCCCC	80
N-LBIV-201907.txt	GACTATGTGCTCAACTCTTGGCTGGTCCTCAAGATCCCC	80
Consensus	gactatgtgctcaactcttggctggtcctcaaga ccccc	
MN176304.1.txt	AGATTAAACTGCTGGCGGCCAACCAAGTTTAACAATGACGG	120
N-LBIV-201907.txt	AGATTAAACTGCTGGCGGCCAACCAAGTTTAACAATGACGG	120
Consensus	agattaaactgctggcgggc aaccagtttaacaatgacgg	
MN176304.1.txt	GTCAAGCAGGAGCTAGGGTCCGCGCCATAAACCTTGT	360
N-LBIV-201907.txt	GTCAAGCAGGAGCTAGGGTCCGCGCCATAAACCTTGT	360
Consensus	gtcaagcaggagctagggctcctgcccgc aaaaaccttgt	
MN176304.1.txt	ACGTCTACATGACTGTGGGCTCTGGTGACTGCCGCCGAGCG	600
N-LBIV-201907.txt	ACGTCTACATGACTGTGGGCTCTGGTGACTGCCGCCGAGCG	600
Consensus	acgtctacatgactgtggg ctggtgactgccgccgagcg	
MN176304.1.txt	CAGATGCAGATGGCTCCGGTCCACATGGTCAACCCCAAGA	680
N-LBIV-201907.txt	CAGATGCAGATGGCTCCGGTCCACATGGTCAACCCCAAGA	680
Consensus	cagatgcagatggctccgggtccacatggtcaacc caaga	
MN176304.1.txt	CCTCACCCTTCAGGCTCCACCAACTACG	1028
N-LBIV-201907.txt	CCTCACCCTTCAGGCTCCACCAACTACG	1028
Consensus	cctcacccttcagg tc acccaactacg	

图3

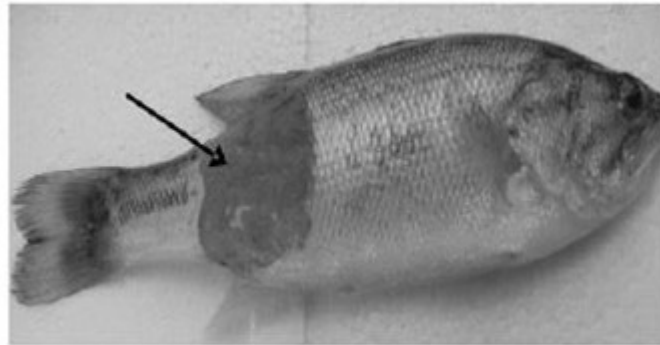


图4

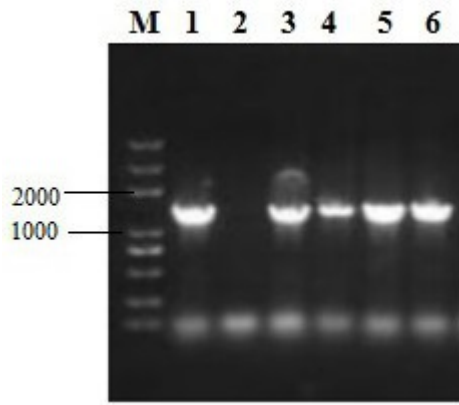


图5

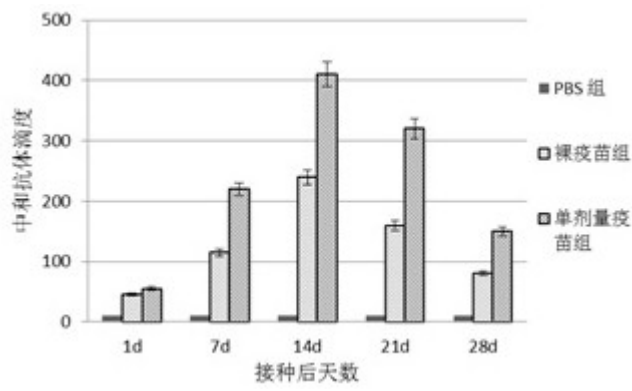


图6