



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104725503 B

(45)授权公告日 2018.08.17

(21)申请号 201510150323.3

(22)申请日 2015.03.31

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104725503 A

(43)申请公布日 2015.06.24

(73)专利权人 华中农业大学

地址 430070 湖北省武汉市洪山区狮子山街1号

专利权人 深圳市鸿鹄科技发展有限公司

(72)发明人 林鑫 伊丽竹 秦真东 周洋

兰江风 邓俊杰 谭锐敏

(74)专利代理机构 湖北武汉永嘉专利代理有限公司 42102

代理人 乔宇

(51)Int.Cl.

C07K 16/10(2006.01)

C07K 16/02(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61P 31/14(2006.01)

(56)对比文件

CN 103554254 A,2014.02.05,

WO 03050142 A1,2003.06.19,

CN 1569899 A,2005.01.26,

CN 101942496 A,2011.01.12,

US 2003049825 A1,2003.03.13,

CN 103421832 A,2013.12.04,

陈文捷等.鱼类神经坏死病毒研究进展与发展趋势.《水产学报》.2014,(第9期),

审查员 程静之

权利要求书1页 说明书5页

(54)发明名称

一种红鳍东方鲀神经坏死病毒衣壳蛋白卵黄抗体及其应用

(57)摘要

本发明属于生物技术领域,具体涉及一种红鳍东方鲀神经坏死病毒衣壳蛋白卵黄抗体及其应用。所述卵黄抗体由下述方法制备:将红鳍东方鲀神经坏死病毒衣壳蛋白基因重组到GST融合基因表达载体pGEX-5x-1中,构建成pGEX-5x-1-CP重组质粒;将pGEX-5x-1-CP重组质粒转化大肠杆菌并诱导融合基因表达;采用包涵体提纯技术提取并纯化得到GST-CP重组蛋白;用GST-CP重组蛋白免疫母鸡,收集鸡蛋并从鸡蛋中提取卵黄抗体。本发明所制备的卵黄抗体能够有效抑制红鳍东方鲀神经坏死病毒,效价高,具有良好的免疫保护效力,可以在鱼类的稚鱼期,将其作为抗神经坏死病毒疫苗添加到鱼类饲料中。

1. 一种红鳍东方鲀神经坏死病毒衣壳蛋白卵黄抗体,其特征在于,由下述方法制备得到:

(1)通过RT-PCR方法克隆红鳍东方鲀神经坏死病毒衣壳蛋白基因的DNA,然后重组到谷胱甘肽S-转移酶融合基因表达载体pGEX-5x-1中,构建成pGEX-5x-1-CP重组质粒,所述pGEX-5x-1-CP重组质粒中含有谷胱甘肽S-转移酶和神经坏死病毒衣壳蛋白的融合基因;所述pGEX-5x-1-CP重组质粒的构建方法为:将DNA和pGEX-5x-1载体分别进行双酶切,再进行连接反应得到含有谷胱甘肽S-转移酶和神经坏死病毒衣壳蛋白的融合基因的pGEX-5x-1-CP重组质粒;

(2)重组质粒pGEX-5x-1-CP在大肠杆菌中的表达:将pGEX-5x-1-CP重组质粒转化大肠杆菌,次日挑选转化平板上的大肠杆菌单菌落于含有氨苄青霉素的培养基中扩大培养,利用IPTG诱导谷胱甘肽S-转移酶和神经坏死病毒衣壳蛋白的融合基因在大肠杆菌中表达;收集菌体,采用包涵体提纯技术提取并纯化得到GST-CP重组蛋白;所述GST-CP重组蛋白的分子量大小为66kDa~68kDa;

(3)用GST-CP重组蛋白免疫产蛋母鸡,收集免疫母鸡所产鸡蛋,从所收集的鸡蛋中提取并纯化卵黄抗体;所述免疫为两翅及两侧胸肌注射;所述免疫的次数为3次,每次免疫的时间间隔为2周;所述免疫方式为:首次免疫注射由GST-CP重组蛋白与等体积完全弗氏佐剂乳化成的疫苗,第二次及第三次免疫注射由GST-CP重组蛋白与不完全弗氏佐剂乳化成的疫苗。

2. 根据权利要求1所述的红鳍东方鲀神经坏死病毒衣壳蛋白卵黄抗体,其特征在于,所述RT-PCR方法为:以红鳍东方鲀神经坏死病毒为模板,将红鳍东方鲀神经坏死病毒衣壳蛋白基因反转录成第一链cDNA,再用特异性引物扩增得到双链DNA。

3. 根据权利要求1所述的红鳍东方鲀神经坏死病毒衣壳蛋白卵黄抗体,其特征在于,所述重组质粒pGEX-5x-1-CP在大肠杆菌中的表达为:pGEX-5x-1-CP重组质粒转化大肠杆菌,次日挑选转化平板上的单菌落于含有氨苄青霉素的LB液体培养基中,于37℃、200转/分钟进行恒温摇床培养,当大肠杆菌的OD值达到0.4~0.6时,加入终浓度为1 mmol/L的IPTG,在25~37℃诱导4~8小时。

4. 根据权利要求1所述的红鳍东方鲀神经坏死病毒衣壳蛋白卵黄抗体,其特征在于,步骤(3)所述从鸡蛋中提取并纯化卵黄抗体的方法为:将所收集鸡蛋的蛋清和蛋黄分离,取蛋黄,去掉卵黄膜,然后加入灭菌蒸馏水,充分摇匀、置于4℃条件下过夜后,收集上清即为卵黄抗体。

5. 权利要求1~4任一所述红鳍东方鲀神经坏死病毒衣壳蛋白卵黄抗体在制备鱼用抗神经坏死病毒疫苗制品中的应用。

一种红鳍东方鲀神经坏死病毒衣壳蛋白卵黄抗体及其应用

发明领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种红鳍东方鲀神经坏死病毒衣壳蛋白卵黄抗体及其应用。

技术背景

[0002] 神经坏死病毒(Nervous necrosis virus,NNV)是一种在世界范围内流行的鱼类病原,流行在中国大陆、台湾、日本、澳大利亚、英国、加拿大、挪威等国家和地区,可造成30多种重要经济鱼类的稚鱼、仔鱼甚至石斑鱼成鱼大规模死亡,严重危害着鱼类的健康养殖。此病毒病的研究是国际水产病害的研究热点。神经坏死病毒分类上属于野田村病毒科(Nodaviridae),乙型野田村病毒属(Betanodavirus)。病毒粒子直径约30-40纳米,二十面体,无囊膜。神经坏死病毒为单一正链、2节段RNA病毒。病毒基因组由RNA1和RNA2组成。RNA1编码病毒RNA聚合酶;RNA2编码衣壳蛋白,也是病毒的唯一结构蛋白,和病毒感染密切相关,是研究病毒疫苗的重要蛋白。神经坏死病毒主要感染鱼苗,患病鱼类在脑部和视网膜可见明显的空泡,可导致鱼苗死亡率达90%以上。目前对此病毒病还没有特效药物可以治疗,疫苗是防治此类疾病的重要手段。但是到目前为止,还没有商品化的疫苗。专利CN200410027186公开了一种神经坏死病毒重组蛋白疫苗,但是该疫苗存在以下不足:(1)神经坏死病毒感染鱼类是在稚鱼期,此时稚鱼还没有产生抗体的能力,因此此类疫苗无法在稚鱼期使用,因此应用价值不大;(2)这种疫苗需要靠注射来防疫,相对于人类和畜牧而言,由于鱼苗较小,生活在水中,注射免疫法耗时,操作不便,因而大大限制了该疫苗的商品化推广。

发明内容

[0003] 本发明的目的在于提供一种红鳍东方鲀神经坏死病毒衣壳蛋白卵黄抗体及其应用。

[0004] 为解决以上技术问题,本发明采用以下技术方案:

[0005] 一种红鳍东方鲀神经坏死病毒衣壳蛋白卵黄抗体,由下述方法制备得到:

[0006] (1)通过RT-PCR方法克隆红鳍东方鲀神经坏死病毒衣壳蛋白基因的DNA,然后重组到谷胱甘肽S-转移酶融合基因表达载体pGEX-5x-1中,构建成pGEX-5x-1-CP重组质粒,所述pGEX-5x-1-CP重组质粒中含有谷胱甘肽S-转移酶和神经坏死病毒衣壳蛋白的融合基因;

[0007] (2)重组质粒pGEX-5x-1-CP在大肠杆菌中的表达:将pGEX-5x-1-CP重组质粒转化大肠杆菌,次日挑选转化平板上的大肠杆菌单菌落于含有氨苄青霉素的培养基中扩大培养,利用IPTG诱导谷胱甘肽S-转移酶(GST)和神经坏死病毒衣壳蛋白的融合基因在大肠杆菌中表达;收集菌体,采用包涵体提纯技术提取并纯化得到GST-CP重组蛋白;

[0008] (3)用GST-CP重组蛋白免疫产蛋母鸡,收集免疫母鸡所产鸡蛋,从所收集的鸡蛋中提取并纯化卵黄抗体。

[0009] 按上述方案,所述GST-CP重组蛋白的分子量大小为66kDa~68kDa。

[0010] 按上述方案,所述RT-PCR方法为:以红鳍东方鲀神经坏死病毒为模板,采用特异性引物将红鳍东方鲀神经坏死病毒衣壳蛋白基因反转录成第一链cDNA,再PCR扩增得到双链cDNA。

[0011] 按上述方案,所述pGEX-5x-1-CP重组质粒的构建方法为:将cDNA和pGEX-5x-1载体分别进行双酶切,再进行连接反应得到含有谷胱甘肽S-转移酶和神经坏死病毒衣壳蛋白的融合基因的pGEX-5x-1-CP重组质粒。

[0012] 按上述方案,所述重组质粒pGEX-5x-1-CP在大肠杆菌中的表达为:pGEX-5x-1-CP重组质粒转化大肠杆菌,次日挑选转化平板上的单菌落于含有氨苄青霉素的LB液体培养基中,于37℃、200转/分钟进行恒温摇床培养,当大肠杆菌的OD值达到0.4~0.6时,加入终浓度为1mmol/L的IPTG,在25~37℃诱导4~8小时。

[0013] 按上述方案,所述免疫为两翅及两侧胸肌注射。

[0014] 按上述方案,所述免疫的次数为3次,每次免疫的时间间隔为2周。

[0015] 按上述方案,所述免疫方式为:首次免疫注射由GST-CP重组蛋白与等体积完全弗氏佐剂乳化成的疫苗,第二次及第三次免疫注射由GST-CP重组蛋白与不完全弗氏佐剂乳化成的疫苗。

[0016] 按上述方案,步骤(3)所述从鸡蛋中提取并纯化卵黄抗体的方法为:将所收集鸡蛋的蛋清和蛋黄分离,取蛋黄,去掉卵黄膜,然后加入灭菌蒸馏水,充分摇匀、置于4℃条件下过夜后,收集上清即为卵黄抗体。

[0017] 上述红鳍东方鲀神经坏死病毒衣壳蛋白卵黄抗体在制备鱼用抗神经坏死病毒疫苗制品中的应用。

[0018] 本发明的有益效果:本发明方法制备得到的卵黄抗体表达持续稳定,经中和试验证实,本发明所制备的卵黄抗体能够有效抑制红鳍东方鲀神经坏死病毒,效价高,具有良好的免疫保护效力,可以在鱼类的稚鱼期,将其作为抗神经坏死病毒疫苗添加到鱼类饲料中,为鱼类神经坏死病毒疫苗的商品化推广提供了可能性,具有广阔的应用前景。

具体实施方式

[0019] 为了更好地理解本发明,下面结合实施例进一步阐明本发明的内容,但本发明的内容不仅仅局限于下面的实施例。

[0020] 实施例1:红鳍东方鲀神经坏死病毒衣壳蛋白基因pGEX-5x-1-CP重组质粒的构建

[0021] 以红鳍东方鲀神经坏死病毒感染的鱼类细胞提取的总RNA为模板,采用下游引物CP-NotI-BW:GATGCGGCCGCTTAGTTTCCCGAGTCAACCC,将红鳍东方鲀神经坏死病毒衣壳蛋白基因进行RT-PCR反应生成第一链cDNA,RT-PCR反应的试剂为:反转录酶、dNTP、缓冲液;条件为:75℃,5min;42℃,1小时;80℃,10min。随后,将获得的cDNA作为模板,使用上游引物CP-SalI-FW:5'-GGTCGACTCATGGTACGCAAGGGTGATAAG-3'和下游引物CP-NotI-BW:GATGCGGCCGCTTAGTTTCCCGAGTCAACCC,PCR扩增得到双链DNA。PCR反应的试剂为:高保真DNA聚合酶、dNTP、缓冲液;PCR扩增反应条件为:预变性95℃5min;随后95℃,40s;61℃,40s;72℃,1min;共35个循环,随后在72℃延伸5min,4℃保存。将反应产物在1%的琼脂糖上电泳分离,提纯目的DNA片段。随后将提纯的DNA片段和pGEX-5x-1载体分别用SalI和NotI双酶切,用T₄DNA连接酶将酶切的DNA片段连接到酶切的pGEX-5x-1载体上,获得到含有GST和神

经坏死病毒衣壳蛋白融合基因的pGEX-5x-1-CP重组质粒。所述连接反应体系为:DNA 2 μ l, pGEX-5x-16 μ l, 10 \times 连接缓冲液2 μ l, T₄DNA连接酶1 μ l, 16 $^{\circ}$ C, 30分钟。

[0022] 实施例2:重组质粒pGEX-5x-1-CP在大肠杆菌中的表达

[0023] 将pGEX-5X-1-CP重组质粒转化大肠杆菌,次日挑选转化平板上的单菌落于含有氨苄青霉素的LB液体培养基中,于37 $^{\circ}$ C、200转/分钟进行恒温摇床培养,当大肠杆菌的OD值达到0.4-0.6时,加入终浓度为1mmol/L的IPTG,在25-37 $^{\circ}$ C诱导4-8小时。6000rpm离心10min,收集菌体。高压破碎菌体,菌体破碎后的悬浮液经4 $^{\circ}$ C, 12,000rpm离心10min,分别收集上清和沉淀。对收集的沉淀采用包涵体提纯技术来大量提取蛋白,具体步骤如下:

[0024] (1) 沉淀使用20mL buffer A (50mM Tris-HCl, 5mM EDTA, pH 8.0) 充分悬起,混匀, 4 $^{\circ}$ C离心10,000rpm 20min,去除上清;重复一次;

[0025] (2) 沉淀使用20mL buffer B (50mM Tris-HCl, 5mM EDTA, 2M脲, pH8.0) 充分悬起,混匀, 4 $^{\circ}$ C冷冻离心10,000rpm 20min,去除上清;重复一次;

[0026] (3) 沉淀用1%的曲拉通分别洗涤, 4 $^{\circ}$ C冷冻离心10,000rpm 20min,去除上清;重复一次;

[0027] (4) 沉淀使用20mL buffer C (0.1M Tris-HCl, 10mM DTT, 8M脲, pH8.0) 充分悬起,混匀,置于37 $^{\circ}$ C恒温摇床上以200rpm快速震荡1h, 4 $^{\circ}$ C离心10,000rpm 10min,保留上清,去除沉淀;

[0028] (5) 将上清装入透析袋中,置于50倍体积透析液 (0.1M Tris-HCl, 5mM EDTA, 5mM Cysteins, pH8.0) 中, 4 $^{\circ}$ C透析16h以上;再置于上述透析液 (1L) 中4 $^{\circ}$ C透析16h以上, 4 $^{\circ}$ C冷冻离心10,000rpm 10min,保留上清,去除沉淀。然后采用SDS-PAGE检测提取GST-CP重组蛋白的浓度、纯度以及重组蛋白的分子量,检测结果显示提取的重组蛋白的浓度可以达到5毫克/毫升以上,纯度达99%以上,重组蛋白的分子量为68kD。采用包涵体结合SDS-PAGE提取重组蛋白的方法,可以快速获得大量纯化的重组蛋白,为后续制备卵黄抗体提供便利。此外,由于GST分子量比较大 (26kD),比起其它融合小肽 (比如His-tag) 具有更好的免疫源性。

[0029] 实施例3:红鳍东方鲀神经坏死病毒卵黄抗体的制备

[0030] 1. 抗原的制备:将重组蛋白与等体积佐剂充分乳化 (充分乳化后将乳化产物置于水中,看其是否散开,不散开这说明乳化充分),首次免疫注射由GST-CP重组蛋白与等体积完全弗氏佐剂乳化成的疫苗,第二次及第三次免疫注射由GST-CP重组蛋白与不完全弗氏佐剂乳化成的疫苗。

[0031] 2. 免疫:选取健康母鸡10羽,取1ml疫苗在母鸡两翅及两侧胸肌注射,每点注射0.25ml,每2周免疫一次,具体的免疫程序见下表1,首免后即开始收集鸡蛋, 4 $^{\circ}$ C保存备用,选取免疫前的鸡蛋为阴性对照。

[0032] 表1免疫程序

免疫次序	免疫剂量	佐剂	免疫位点
[0033] 首免	400 μ g/只	完全弗氏佐剂	胸肌、翅膀分点
二免	400 μ g/只	不完全弗氏佐剂	胸肌、翅膀分点
三免	400 μ g/只	不完全弗氏佐剂	胸肌、翅膀分点

[0034] 3. 卵黄抗体水溶性组分 (WSF) 的提取纯化: 将收集的鸡蛋, 用5%的新洁尔灭杀菌30min, 晾干; 用蛋黄分离器分离蛋黄, 将蛋黄在滤纸上滚动, 尽量去掉卵黄膜, 用注射器吸取蛋黄液于量筒中, 加入9倍体积预冷的灭菌蒸馏水, 充分摇匀, 4 $^{\circ}$ C过夜, 4 $^{\circ}$ C, 10000rpm/min离心30min, 收集上清即为卵黄抗体水溶性组分 (WSF)。

[0035] 实施例4: 红鳍东方鲀神经坏死病毒卵黄抗体的效价测定

[0036] 将GST-CP重组蛋白用pH=9.6的碳酸盐缓冲液 (Na_2CO_3 0.15g, NaHCO_3 0.293g, 加双蒸水90mL后用1mol/L的HCl调pH至9.6, 最后定容至100mL) 稀释成10ng/mL包被100 μ L于96孔酶标板, 4 $^{\circ}$ C过夜; 用100 μ L 5%脱脂奶粉于37 $^{\circ}$ C封闭2h, 200 μ L洗涤缓冲液PBST (PBS+0.05% Tween-20) 洗涤4次, 每次孵育3min, 拍干。将实施例3制备的WSF用pH=7.6的磷酸缓冲液按1:6400、1:12800、1:25600、1:51200等梯度稀释每孔加入100 μ L 37 $^{\circ}$ C孵育2h, 以相应稀释倍数的阴性WSF做对照; PBST洗涤4次, 加入1:5000稀释的HRP标记的兔抗鸡IgG 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C孵育1h; 最后用TM B (3', 3', 5', 5'-四甲基联苯胺) 底物显色试剂盒显色20min, 加入2mol/L的 H_2SO_4 终止显色, 在酶标仪 (Infinite M200PRO) 上读OD450值。P/N \geq 2.1, 即为效价值, 效价测定结果显示, 红鳍东方鲀神经坏死病毒卵黄抗体效价值为51200。

[0037] 实施例5: 红鳍东方鲀神经坏死病毒卵黄抗体的Western blot特异性检测

[0038] 将GST-CP重组蛋白通过SDS-PAGE分离, 电泳结束后胶条割至合适大小, 将胶和滤纸用转膜缓冲液处理, 把预先裁好并用甲醇处理过的PVDF膜浸入转膜缓冲液中, 用半干法将蛋白转移至PVDF膜上, 80mA, 转膜9min。转膜完成后取出PVDF膜浸于含5%脱脂奶粉的TBST中, 液体必须覆盖膜的全部, 室温摇床上封闭1h, 用TBST洗膜3次, 每次5min。将膜浸入实施例3制备的红鳍东方鲀神经坏死病毒衣壳蛋白的WSF (1:400稀释) 中, 室温孵育1h, TBST洗膜3次每次5min, 加入1:3000HRP标记的兔抗鸡IgG, 37 $^{\circ}$ C孵育1h, 洗涤后用DAB显色试剂盒显色。结果表明可以产生特异性的卵黄抗体。

[0039] 实施例6: 红鳍东方鲀神经坏死病毒卵黄抗体的中和试验

[0040] 本实验采用固定病毒稀释抗体的方法, 6孔板中和实验用于WB检测, 12孔板用IF检测, 每个组设置3个重复。

[0041] (1) 抗体稀释: 中和活性检测时, 将WSF做1:20、1:40、1:80、1:160、1:320、1:640、1:1280、1:2560、1:5120稀释。

[0042] (2) 红鳍东方鲀神经坏死病毒与抗体孵育: 从-80 $^{\circ}$ C取出红鳍东方鲀神经坏死病毒病毒, 取200 μ L病毒液与抗体, 于28 $^{\circ}$ C孵育1.5h。

[0043] (3) 感染SSN-1细胞: 将上述抗体-病毒孵育混合液从28 $^{\circ}$ C中取出, 震荡混匀。用移液枪吸掉孔板中的培养基, 6孔板加入200 μ L抗体病毒混合液, 加5%FBS-MEM培养基补至

1ml,12孔板加入100 μ l抗体病毒混合液,加5%FBS-MEM培养基补至500 μ l,同时设置全病毒组和无病毒组。

[0044] (4) 孵育:红鳍东方鲀神经坏死病毒感染细胞在28 $^{\circ}$ C CO₂细胞培养箱中孵育,观察各孔的病变情况。

[0045] 结果表明:抗体在稀释到1:2560时,仍然有中和病毒感染的能力。这表明本发明制备的红鳍东方鲀神经坏死病毒卵黄抗体具有较高的效价。