

# 对虾病毒 IHHNV 衣壳蛋白的克隆表达及新型双抗夹心 ELISA 的高效检测

于 衬<sup>1,2</sup>, 刘国胜<sup>2</sup>, 杨茗涵<sup>2</sup>, 杨丽容<sup>2</sup>, 陈明谅<sup>2</sup>

(1. 宁波大学海洋学院, 浙江 宁波 315000; 2. 国家海洋局第三海洋研究所、国家海洋局海洋生物遗传资源重点实验室, 福建 厦门 361005)

**摘要:**通过利用分子生物学手段克隆 IHHNV 衣壳蛋白基因并构建原核表达载体, 筛选抗原特性好的多肽免疫兔以制备高效的特异性 IHHNV 多克隆抗体, 最终建立高效的检测对虾 IHHNV 的新型双抗夹心 ELISA 方法. 实验结果表明该方法成功表达了对虾病毒 IHHNV 衣壳蛋白基因的抗原多肽, 并制备出了高灵敏性的多克隆抗体. 将抗原多肽及多克隆抗体用于 ELISA 的检测, 抗体的效价在 1:12 800 以上, 最低可检测到 1 pg 的抗原蛋白, 表明已成功建立高效的双抗夹心 ELISA 方法, 对于对虾的海水养殖及 IHHNV 病毒性疾病的防控具有重要的参考价值.

**关键词:**海洋生物学; 传染性皮下及造血组织坏死病毒; 原核表达; 衣壳蛋白; 多克隆抗体; ELISA

DOI: 10.3969/J. ISSN. 2095-4972. 2018. 03. 015

中图分类号: P735

文献标识码: B

文章编号: 2095-4972(2018)03-0418-08

我国拥有全球最大的对虾养殖产业, 养殖总产量已多年位居世界第一<sup>[1]</sup>, 但随之而来的养殖病害问题也一直困扰着我国对虾养殖业, 特别是病毒性疾病, 尤其是近年来的传染性皮下及造血组织坏死病毒的暴发, 已对我国对虾养殖业造成了巨大的经济损失.

传染性皮下及造血组织坏死病毒最初于 1981 年在美国夏威夷地区养殖细角滨对虾中被发现<sup>[2]</sup>, 是世界各地养殖和野生对虾的重要病原之一, 该病毒在亚洲地区也具有流行趋势, IHHNV 病毒从 2001 年就开始在中国养殖的凡纳滨对虾中普遍流行, 并对不同种对虾造成了一定的经济损失<sup>[3-5]</sup>. IHHNV 是单链 DNA 细小病毒, 属于细小病毒科, 短浓核症病毒属 (*Brevdensovirus*), 是目前已知的对虾病毒中颗粒最小的一种, 直径只有 22 nm, 无包膜, 20 面体对称的球状颗粒<sup>[6-7]</sup>. IHHNV 主要对细角滨对虾和凡纳滨对虾比较敏感, 尤其会严重危害幼虾, 在自然条件下对于大部分养殖对虾, IHHNV 均可以感染, 严重时引起对虾的发病和死亡; 感染凡纳滨对虾后可以造成慢性矮小残缺综合症 (runt-deformity syn-

drome, RDS), 也是南美白对虾常见的一种慢性致病病毒. IHHNV 主要感染对虾的表皮、鳃、前后肠上皮细胞、神经索和神经节等外胚层组织; 造血组织、淋巴器官、性腺、结缔组织和横纹肌等中胚层器官, 感染对虾后可在宿主细胞核内形成一定的包涵体. 患此病的病虾身体变形, 引起慢性感染为主, 严重时可造成虾的大量死亡, 影响经济效益<sup>[8-11]</sup>.

目前人类对病毒的认识还很有限, 至今没有特异性杀灭宿主体内病毒的药物. 现阶段仍以预防为主, 最有效的预防措施即是避免养殖对虾与对虾病毒直接接触, 故而需要对对虾类病毒进行早期的快速有效诊断, 因此快速灵敏的病毒检测技术是必不可少的工具. 20 世纪 70 年代, Engvall 等 (1971) 在放射免疫分析方法的原理基础上创立了 ELISA 检测方法<sup>[12]</sup>. ELISA 反应以抗原和抗体特异性结合的免疫学特性为基础, 能特异性的检测出少量的待测样品, 具有较高的灵敏度和精确度. ELISA 通过酶与底物的颜色反应定量检测未知抗原或特异性抗体, 比如多肽、蛋白质、单克隆抗体、多克隆抗体等, 现已广泛应用于抗原抗体的分析以及疾病诊断等生物医

收稿日期: 2018-02-03

基金项目: 国家海洋局第三海洋研究所基本科研业务费资助项目 (海三科 2017005); 江苏省水产三新项目资助项目 (D2015-11-5)

作者简介: 于衬 (1991—), 女, 硕士研究生; E-mail: yuchen\_1007@163.com

通讯作者: 陈明谅 (1982—), 男, 副研究员; E-mail: mlchen\_gg@tio.org.cn

药领域,尤其是检测试剂盒的开发为疾病的临床诊断提供更多便利性和准确性。

由于缺乏对 IHNV 较敏感的对虾细胞系,关于 IHNV 的侵入宿主机制以及在宿主体内的复制机制研究较少,需要进行深入的研究,本研究用纯化的多肽制备了 2 种高效的特异性多克隆抗体,在原核表达系统中成功表达了具有较好免疫原性的抗原多肽,并成功建立了高效的检测对虾 IHNV 的新型双抗夹心 ELISA 方法,对于 IHNV 病毒的早期诊断提供有力的方法,有助于建立完善的对虾病毒监控系统,对及时预防和控制对虾病毒 IHNV 的爆发和流行具有重要意义。

## 1 材料与与方法

### 1.1 材料

1.1.1 材料来源 感染有传染性皮下及造血组织坏死病毒的对虾样品采集于福建莆田市对虾养殖塘,经国家海洋局第三海洋研究所海洋生物遗传资源重点实验室杨丰研究员实验室鉴定,所采集的对虾感染的病毒为传染性皮下及造血组织坏死病毒。

1.1.2 主要试剂与仪器 原核表达质粒载体 pET-22b(+) 为本实验室保存,海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒、通用 DNA 纯化回收试剂盒和质粒小提中量试剂盒购于北京天根生化科技有限公司,Primer STAR HS Mix、限制性核酸内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III 购于大连宝生物 Takara 公司,Taq 酶、预染色蛋白 Marker 购于赛默飞世尔科技(中国)有限公司,DL2000 DNA Marker、DL10000 DNA Marker、X-gal、pEASY-T1 载体、抗 His 标签鼠单克隆抗体、羊抗鼠或兔 HRP-IgG 抗体、内参 GAPDH 鼠抗体、ProteinIso<sup>®</sup> Ni-NTA Resin His 标签蛋白纯化试剂盒购于全式金(北京)生物公司,克隆用感受态细胞 DH5 $\alpha$  及蛋白表达用感受态细胞 BL21(DE3) 购于生工生物工程(上海)股份有限公司,诱导剂 IPTG、氨苄青霉素、丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺(体积比为 29:1) 购于北京索莱宝科技有限公司,高效快速克隆试剂盒 ClonExpress Multis One Step Cloning Kit 购于南京诺唯赞生物科技有限公司。PCR 仪购于 Bio-RAD 公司,电热恒温水槽购于上海精宏有限公司,摇床购置于上海福玛公司,隔水式恒温培养箱购于上海一恒科技有限公司。

### 1.2 抗原多肽的选取

根据 NCBI 数据库中的 IHNV 衣壳蛋白基因序列,经 ClustalW 软件比对发现衣壳蛋白的同源基因在病毒中同源性高达 99%,因此我们选择衣壳蛋

白基因作为抗原多肽的来源。通过利用 DNASTar 中的 protean 模块对衣壳蛋白的氨基酸序列进行分析,并参考疏水性、抗原指数、表位可能性等指标,选择指数高的多肽片段作为免疫多肽,最终选取了 2 条约 15 个氨基酸长度的免疫多肽片段,分别命名为 IHNV-polypeptide-A 和 IHNV-polypeptide-B,将多肽序列送至杭州华安生物技术有限公司进行多肽合成并免疫兔子,随后进行血清抗体滴度的检测,经多抗纯化及抗体效价的测定,制备成特异性的多克隆抗体 A 和 B,作为双抗夹心 ELISA 的抗体。此外,选取一段包含 2 条免疫多肽序列的基因序列克隆至原核表达载体 pET-22b(+),用来表达双抗夹心 ELISA 检测用的抗原蛋白,抗原蛋白基因片段长 450 bp,预测蛋白大小为 17 kDa。

### 1.3 抗原蛋白的克隆

1.3.1 引物设计 根据 IHNV 衣壳蛋白基因的同源序列,使用引物设计软件 primer premier 5.0 设计抗原多肽克隆引物。在进行原核表达引物设计时,目的基因引物两端添加 15 bp 与线性化载体两端互补的同源序列,为防止碱基移码造成氨基酸翻译的错乱,在前引物 5' 端添加 G 碱基。酶切位点选取 *Bam*H I(GGATCC) 和 *Hind* III(AAGCTT)。本研究所设计的引物均由厦门安特奥生物技术有限公司进行合成。

1.3.2 原核表达载体构建 以感染 IHNV 的对虾鳃组织为样本提取 DNA,以提取的 DNA 为模板,利用设计的衣壳蛋白基因鉴定引物进行 PCR 扩增(表 1),扩增结束后进行琼脂糖凝胶电泳,并切胶纯化回收后连接至载体 pEASY-T1,连接产物转化感受态细胞 DH5 $\alpha$ ,并经阳性克隆鉴定、质粒提取、基因测序鉴定后将质粒命名为 pEASY-capsid。以质粒 pEASY-capsid 为模板,利用抗原蛋白克隆引物(表 1)扩增抗原蛋白目的基因片段,对 PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳并切胶纯化回收。pET-22b(+) 经由 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切并纯化回收后,利用高效快速克隆试剂盒 ClonExpress Multis One Step Cloning Kit 将纯化的抗原蛋白基因片段连接至酶切后的线性化载体 pET-22b(+),连接产物转化感受态细胞 DH5 $\alpha$ ,并经阳性克隆鉴定、质粒提取酶切鉴定后,送至上海铂瑞生物科技有限公司进行基因测序,将克隆无误的原核表达质粒命名为 pET-capsid。

### 1.4 抗原蛋白的表达及纯化

1.4.1 诱导表达条件的优化 培养条件在重组蛋白的诱导表达过程中具有至关重要的作用,比如培养温度会影响蛋白产生速度,进而会影响正确折叠,

导致表达蛋白的折叠错误;诱导时培养温度过高或者当诱导时间过长时都会导致所表达的蛋白因产生过快而不能形成正确的折叠结构;相反当诱导培养温度过低或者诱导时间过短时细胞的生长速度较慢,融合蛋白的产量较低.而诱导剂 IPTG 浓度较高时会导致细胞的死亡,影响蛋白的表达,IPTG 浓度

较低时,诱导表达不足,蛋白的产量较低.因此,需要对原核表达诱导过程中的培养温度、诱导培养时间和诱导剂浓度等培养条件进行优化选择,以优化后的诱导表达条件进行诱导表达抗原多肽以获取最大的效益.

表 1 衣壳蛋白 PCR 引物  
Tab.1 PCR primers of capsid protein

引物名称	引物序列(5'—3')	用途
pEASY-capsid-F	AGCAAGCCCAAGGAAAAGAT	基因鉴定
pEASY-capsid-R	TGGTCCTTTGATTGGTGACA	基因鉴定
pET-capsid-F	AATTAATTCGGATCCGTCACAACAAGAGCAAGCCCAAG	抗原蛋白克隆
pET-capsid-R	TGCGGCCGCAAGCTTGTCTGCTGGGTAGACTAGGTTTC	抗原蛋白克隆

注:下划线表示酶切位点,酶切位点后加碱基 G 以防止读码框移码

本研究中我们主要通过对培养温度(28、30、32、34、36、37、38℃)、诱导剂 IPTG 浓度(0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mmol/dm<sup>3</sup>)和培养时间(1、2、3、4、5 h) 3 个因素作进一步的优化筛选,研究诱导温度、诱导时间、IPTG 浓度等因素对融合蛋白表达量的影响,以优化目的蛋白的产量.蛋白表达诱导完成后通过 western blot 方法<sup>[13]</sup>检测实验组中的 His 标签融合蛋白的表达以筛选最适的培养条件.

1.4.2 抗原蛋白的大量制备 通过对诱导条件的优化筛选,以最适的诱导条件进行融合蛋白表达的大量诱导培养.首先将重组质粒转化 *E. coli* 表达菌株 BL21 (DE3),挑取单菌落于 5 cm<sup>3</sup> 液体 LB (Amp<sup>+</sup>) 培养基中,37℃ 摇床中 180 r/min 摇速培养 12 h,将培养物以体积比 1:50 的比例接种于含抗生素 Amp 的 200 cm<sup>3</sup> 液体 LB 培养基中,于 37℃ 摇床中 180 r/min 转速下培养至菌液 OD<sub>600</sub> 值约为 0.6 ~ 0.7. 实验组加入最适浓度的 IPTG,对照组不加 IPTG,于摇床中最适温度下,180 r/min 的转速继续培养最适时间以诱导重组蛋白的表达.取等量 OD<sub>600</sub> 值的培养菌液,以 12 000 r/min 的转速进行离心,时间为 1 min,离心好后收集菌体,向菌体中加入 20 mm<sup>3</sup> 的 2 × SDS buffer,然后煮沸 10 min,配制丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺体积分数为 12% 的 SDS 蛋白胶 (SDS-PAGE),各取 10 mm<sup>3</sup> 上样进行 SDS-PAGE 电泳鉴定所诱导表达的 His 标签融合蛋白.

1.4.3 抗原蛋白的纯化 抗原蛋白诱导完成后,将培养液转移到离心管中,于 4℃ 下 8 000 r/min 离心 10 min,收集菌体,去除上清;按照 1 g 菌体加入 10

cm<sup>3</sup> PBS 的比例,使用 PBS 将菌体悬浮,PBS 加入终浓度为 1 mmol/dm<sup>3</sup> 的 PMSF 中,经充分混匀后,在冰浴中进行超声破碎,超声条件为功率 300 W,循环时间 30s(超声 15s,间隔停留 15 s),总超声时间为 10 ~ 20 min;4℃ 下 12 000 r/min 离心 10 min,去除上清,将上清和沉淀分别进行体积分数为 12% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳以鉴定蛋白形式. ProteinIso<sup>®</sup> Ni-NTA Resin 可以在非变性或变性条件下纯化任何表达系统所表达的 His 标签重组蛋白,因此可以利用 ProteinIso<sup>®</sup> Ni-NTA Resin 进一步纯化超声后的蛋白.对纯化的 His 标签重组蛋白进行体积分数为 12% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳并用考马斯亮蓝染色以分析鉴定纯化的目的蛋白.

## 1.5 双抗夹心 ELISA 检测方法的建立

1.5.1 多克隆抗体效价的测定 为检测针对 IHHNV 病毒衣壳蛋白所制备的多克隆抗体的效价,我们创新的采用 2 种不同免疫多肽所制备的抗体进行双抗夹心 ELISA 检测抗体的效价,具体为:(1)包被多抗:利用碳酸盐包被缓冲液 (0.05 mol/dm<sup>3</sup>, pH 值为 9.6) 分别以抗体体积比为 1:200、1:400、1:800、1:1 600、1:3 200、1:6 400、1:12 800 的比例等梯度稀释所制备的兔多克隆抗体 A,然后包被于 96 孔酶标板,平行 3 孔,每孔 100 mm<sup>3</sup>,并设置空白对照和阴性对照,置于 4℃ 冰箱过夜 12 h. 为避免蒸发,酶标板上加一层保鲜膜.(2)洗涤酶标板:弃去孔中液体,用 pH 值为 7.4 的 1 × PBST 洗涤酶标孔,放置 2 min 略作摇动吸去液体后在吸水纸上拍干,洗涤液加满孔重复洗涤 3 次,每次 3 min.(3)封闭

酶标板:配制质量分数为 1% 的 BSA (PBST),每孔加入  $200 \text{ mm}^3$  并去除各孔中的气泡,置于  $37^\circ\text{C}$  培养箱中避光孵育 1 h。(4)洗涤酶标板:弃去孔中液体,用 pH 值为 7.4 的  $1 \times$  PBST 洗涤酶标孔,放置 2 min 略作摇动吸去液体后在吸水纸上拍干,洗涤液加满孔重复洗涤 3 次,每次 3 min。(5)加入抗原蛋白:将纯化的抗原蛋白用 PBS 稀释到适当的含量 ( $1 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ ),一般抗原量为每孔  $20 \sim 200 \text{ ng}$ ,体积为  $100 \text{ mm}^3$ ,置于  $37^\circ\text{C}$  1 h,为避免蒸发,酶标板上加一层保鲜膜。(6)洗涤酶标板:弃去孔中液体,用 pH 值为 7.4 的  $1 \times$  PBST 洗涤酶标孔,放置 2 min 略作摇动吸去液体后在吸水纸上拍干,洗涤液加满孔重复洗涤 3 次,每次 3 min。(7)孵育所制备的兔多克隆抗体 B 稀释比例为  $1:5\,000$ ,每孔加  $100 \text{ mm}^3$ , $37^\circ\text{C}$  避光孵育 45 min。(8)洗涤酶标板:弃去孔中液体,用 pH 值为 7.4 的  $1 \times$  PBST 洗涤酶标孔,放置 2 min 略作摇动吸去液体后在吸水纸上拍干,洗涤液加满孔重复洗涤 3 次,每次洗涤时间 3 min。(9)加入有辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的抗体:将 HRP 标记羊抗兔 IgG 稀释 5 000 倍,每孔加  $100 \text{ mm}^3$ , $37^\circ\text{C}$  避光孵育 45 min。(10)洗涤酶标板:弃去孔中液体,用 pH 值为 7.4 的  $1 \times$  PBST 洗涤酶标孔,放置 2 min 略作摇动吸去液体后在吸水纸上拍干,洗涤液加满孔重复洗涤 3 次,每次 3 min。(11)加入显色底物液显色(现用现配):TMB-过氧化氢尿素溶液每孔  $100 \text{ mm}^3$ ,置于  $37^\circ\text{C}$  避光孵育 5 min。(12)终止显色反应:每孔加入终止液 ( $2 \text{ mol}/\text{dm}^3 \text{ H}_2\text{SO}_4$ )  $50 \text{ mm}^3$  以终止反应,20 min 内利用酶标仪测定各孔  $OD_{450}$  吸收值。(13)结果判定:以样本孔的吸收值 ( $P$ ) 与阴性测定孔均值 ( $N$ ) 的比值 ( $P/N$ ) 表示检测结果,只有  $P/N$  比值大于 2 时可作为抗体的有效效价。

**1.5.2 抗原蛋白检出量的测定** 在测定双抗夹心 ELISA 对 IHNV 病毒抗原蛋白的检出量时,包被抗体多抗 A 的稀释比例为  $1:6\,400$ ;对于待检测的抗原蛋白,用 PBS 稀释到适当浓度,以  $10^6$ 、 $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$ 、 $10^1$ 、1 pg 的质量梯度加入酶标板。其他操作方法及结果的判定参见多克隆抗体效价的测定部分。

## 2 结果与讨论

### 2.1 抗原蛋白的克隆

利用 DNA 提取试剂盒提取患病对虾鳃组织 DNA,根据设计的 IHNV 衣壳蛋白基因引物进行 PCR 扩增,扩增产物电泳结果如图 1,将 PCR 产物连接至 T 载体 pEASY-T1,提取阳性克隆质粒进行基因测序验证,并经与 NCBI 数据库比对,比对结果

显示与 IHNV 衣壳蛋白序列同源性高达 99%,表明所扩增的基因片段为 IHNV 的衣壳蛋白基因片段。将选取的抗原蛋白片段克隆至原核表达载体 pET-22b(+) 中,并经阳性克隆筛选鉴定、质粒提取后酶切鉴定以及基因测序验证。pET-capsid 双酶切电泳结果如图 2,基因测序结果显示与 PCR 扩增的衣壳蛋白基因一致性为 100%,这些结果表明我们所选取的抗原多肽基因片段已成功克隆至原核表达载体 pET-22b(+) 中。

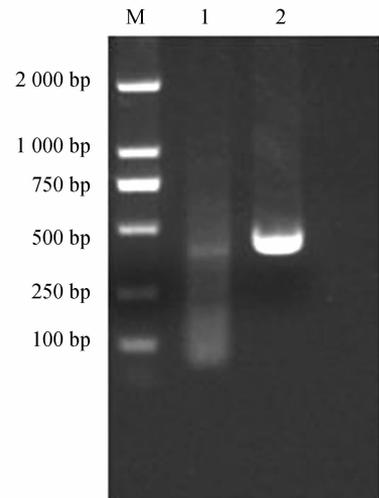


图 1 IHNV 衣壳蛋白基因扩增电泳结果

Fig. 1 Gel electrophoresis of IHNV capsid protein gene amplification

M:DL2000 DNA marker;1:阴性对照;2:感染 IHNV 对虾组织 DNA

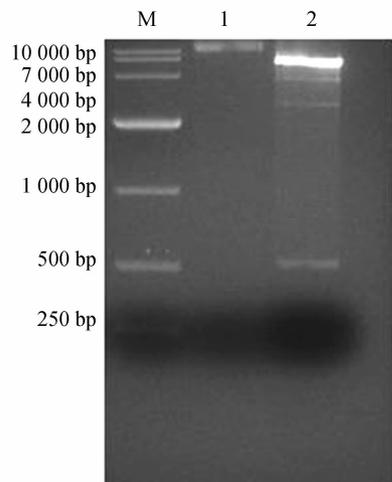


图 2 表达载体 pET-capsid 双酶切鉴定电泳结果

Fig. 2 Electrophoretic result of double enzyme digestion of the expression vector pET-capsid

M:DL10000 DNA marker;1:载体 pET-22b(+);2:表达载体 pET-capsid

### 2.2 原核表达条件的优化

为选择最适的诱导表达条件,本研究针对诱导

温度、IPTG 浓度、诱导时间进行了研究探索. 为确定 His 标签融合蛋白表达的最适温度, 诱导时间设为 4 h, IPTG 浓度设为  $0.5 \text{ mmol/dm}^3$ , 共设置了  $28 \sim 38^\circ\text{C}$  范围内的 7 个温度梯度, 以探究诱导温度对融合蛋白表达量的影响. 诱导表达结束后制备样品, 采用 western blot 方法进行检测, 以 GAPDH 蛋白作为内参, 利用 His 标签抗体检测所表达的融合蛋白.

由图 3a、b 可知, 在诱导温度为  $37^\circ\text{C}$  时, 融合蛋白的表达量最高, 因此我们选择  $37^\circ\text{C}$  为该抗原多肽

诱导表达的最适诱导温度. 当选择诱导温度为  $37^\circ\text{C}$ , 诱导时间设定为 4 h, 在诱导剂 IPTG 浓度为  $0.1 \text{ mmol/dm}^3$  时, 融合蛋白的表达量最高(图 3c、d), 因此我们选择  $0.1 \text{ mmol/dm}^3$  为该抗原多肽诱导表达的最适诱导剂浓度. 在诱导温度为  $37^\circ\text{C}$ 、诱导剂 IPTG 浓度为  $0.1 \text{ mmol/dm}^3$  的条件下, 诱导时间为 4 h 时融合蛋白表达量即达到最高值(图 3e、f), 故而我们确定诱导时间 4 h 为该抗原多肽诱导表达的最适诱导时间.

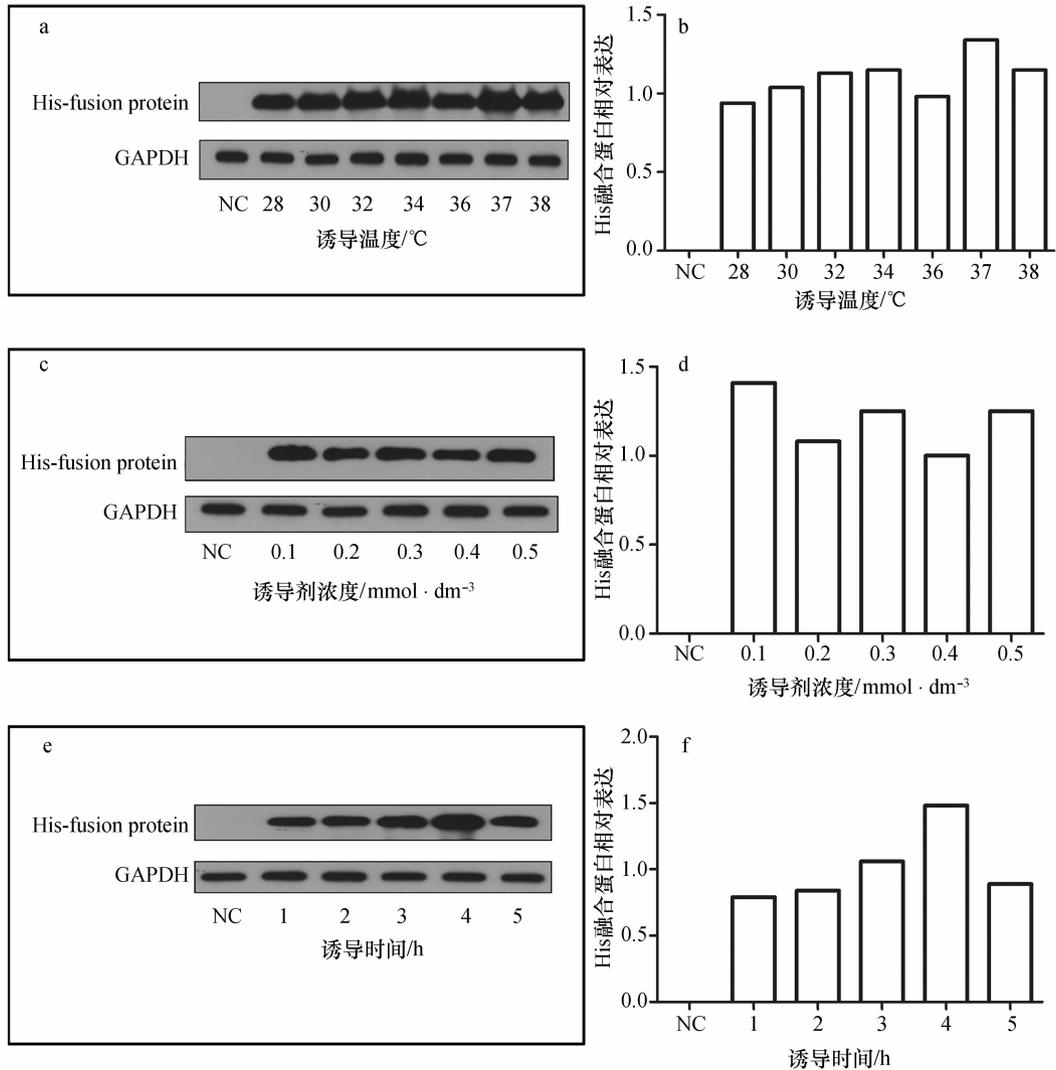


图3 原核表达条件的优化结果

Fig. 3 Optimization of the condition of prokaryotic expression

NC: 未诱导组

### 2.3 蛋白纯化

抗原蛋白诱导完成后经离心收集菌体及超声波破碎, Ni-NTA 进行蛋白的纯化, 将未诱导菌、诱导菌、超声上清及沉淀、纯化洗涤样、咪唑洗脱等的蛋白样品进行体积分数为 12% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳, 并用考马斯亮蓝染色, 结果如图 4, IPTG 诱导后

有大量目的蛋白表达, 超声后目的蛋白集中于沉淀中, Ni-NTA 纯化时,  $50 \text{ mmol/dm}^3$  的咪唑液可以完全洗脱超声后蛋白, 纯化的蛋白浓度为  $5 \text{ mg/cm}^3$ . 实验结果表明所构建的 IHNV 病毒抗原蛋白原核表达载体成功表达, 并且我们已成功纯化出目的蛋白, 纯化的蛋白可以用于 ELISA 的检测.

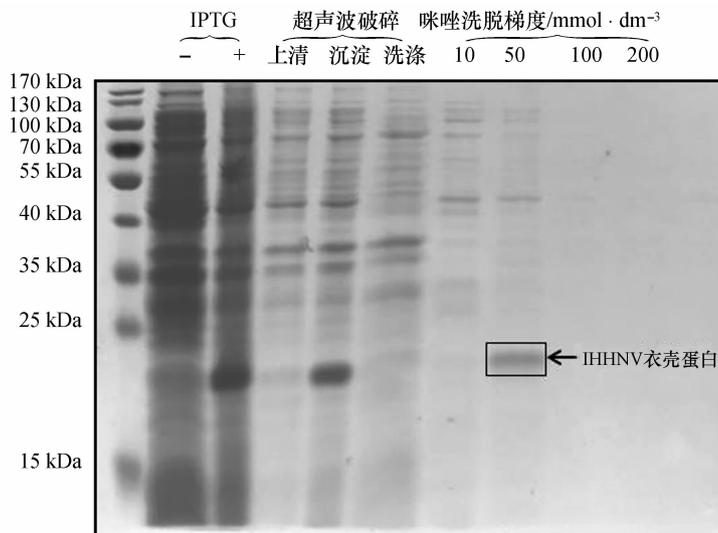


图 4 His 标签融合蛋白的表达及纯化

Fig. 4 Expression and purification of His tag fusion protein

## 2.4 双抗夹心 ELISA 检测

双抗夹心 ELISA 检测包被抗体效价时,抗原蛋白加入量为 100 ng,利用质量分数为 1% 的 BSA (PBST) 于 37℃ 下封闭 1 h,检测抗体稀释倍数 5 000,由 ELISA 检测结果可知最大包被抗体稀释比例组的  $P/N$  比值在 9 以上,表明所制备的多克隆抗

体具有较高的效价,抗体稀释 12 800 倍时仍具有较强的捕获抗原蛋白能力.将多抗 A 稀释 6 400 倍进行酶标板包被时,检测不同浓度的抗原蛋白,结果显示在抗原蛋白为 1 pg 时,ELISA 检测  $P/N$  比值大于 9,表明所建立的双抗夹心 ELISA 检测方法具有非常高的灵敏度(表 2、3、图 5、6).

表 2 双抗夹心 ELISA 效价

Tab. 2 Double anti sandwich ELISA titer

多抗 A 稀释倍数	$OD_{450}$ (抗原蛋白 100 ng)			均值 $\pm$ 标准差
200	2.107	2.169	2.152	2.143 $\pm$ 0.641
400	2.051	2.040	2.155	2.082 $\pm$ 1.269
800	1.967	2.058	2.133	2.053 $\pm$ 1.663
1 600	1.588	1.627	1.730	1.648 $\pm$ 1.467
3 200	1.432	1.342	1.455	1.410 $\pm$ 1.194
6 400	0.967	0.951	0.933	0.950 $\pm$ 0.340
12 800	0.468	0.470	0.427	0.455 $\pm$ 0.485
阴性对照	0.049	0.049	0.053	0.050 $\pm$ 0.046

表 3 双抗夹心 ELISA 检测抗原蛋白

Tab. 3 Detection of antigen protein by double anti sandwich ELISA

抗原蛋白加入量/pg	$OD_{450}$ (多抗 A 稀释 6 400 倍)			均值 $\pm$ 标准差
$1 \times 10^6$	1.170	1.100	1.230	1.167 $\pm$ 1.067
$1 \times 10^5$	0.940	0.969	0.920	0.943 $\pm$ 0.404
$1 \times 10^4$	0.903	0.863	0.916	0.894 $\pm$ 0.453
$1 \times 10^3$	0.798	0.802	0.757	0.786 $\pm$ 0.408
$1 \times 10^2$	0.792	0.721	0.740	0.751 $\pm$ 0.603
$1 \times 10^1$	0.672	0.712	0.687	0.690 $\pm$ 0.331
1	0.559	0.525	0.472	0.519 $\pm$ 0.719
阴性对照	0.055	0.063	0.066	0.061 $\pm$ 0.093

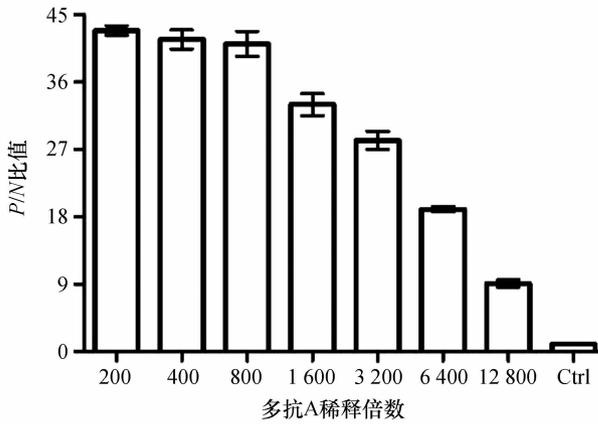


图5 双抗夹心 ELISA 检测抗体效价

Fig.5 Detection of antibody titer by double anti sandwich ELISA

Ctrl:阴性对照组

### 3 结论

本研究针对对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒衣壳蛋白制备了高效的 2 种多克隆抗体,并成功表达了抗原蛋白,成功建立了新型的用以检测传染性皮下及造血组织坏死病毒的双抗夹心 ELISA 方法.所建立的双抗夹心 ELISA 检测方法抗体效价较高,在 1:12 800 以上;灵敏性较好,最低可检测 1 pg

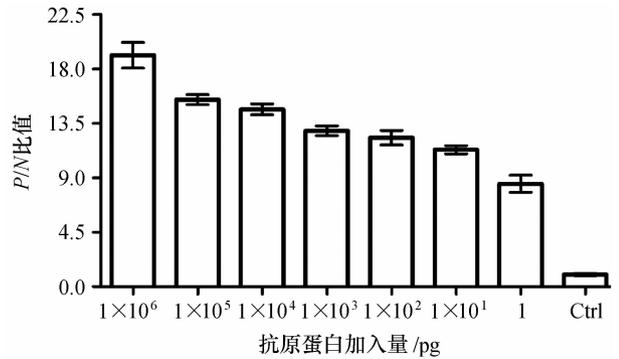


图6 双抗夹心 ELISA 检测抗原蛋白

Fig.6 Detection of antigen protein by double anti sandwich ELISA

Ctrl:阴性对照组

的抗原蛋白,为开发针对对虾 IHNV 的临床检测试剂盒提供了研究基础,对于预防和控制对虾病毒提供了一种新的有效检测手段,对于虾类水产养殖疾病防治具有重要意义.由于时间原因,我们所建立的新型双抗夹心 ELISA 检测方法还在进行临床样品的检测应用研究中.

### 参考文献:

- [1] FAO. Yearbook of fishery and aquaculture statistics[R]. Rome:FAO,2012.
- [2] LIGHTNER D V, REDMAN R M, BELL T A. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis, a newly recognized virus disease of penaeid shrimp[J]. Invertebrate Pathology,1983,42(1):62-70.
- [3] FLEGEL T W. Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand[J]. Aquaculture, 2006,258(1/4):1-33.
- [4] TAN Y, XING Y, ZHANG H, et al. Molecular detection of three shrimp viruses and genetic variation of white spot syndrome virus in Hainan province, China, in 2007[J]. Fish Diseases,2009,32(9):777-784.
- [5] 杨冰,宋晓玲,黄健,等.对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHNV)的流行病学与检测技术研究进展[J].中国水产科学,2005,12(4):519-524.
- [6] BONAMI J R, TRUMPER B, MARI J, et al. Purification and characterization of the infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus of penaeid shrimps[J]. Journal of General Virology, 1990,71: 2 657-2 664.
- [7] MARI J, BONAMI J R, LIGHTNER D V. Partial cloning of the genome of infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus, an unusual parvovirus pathogenic for penaeid shrimps; diagnosis of the disease using a specific probe[J]. Journal of General Virology, 1993,74: 2 637-2 643.
- [8] OIE. International diagnostic manual for aquatic animal diseases[M]. 3. Paris:OIE, 2003:214-226.
- [9] LIGHTNER D V, REDMAN T A, BELL T A. Detection of IHNV virus in *Penaeus stylirostris* and *P. vannamei* imported into Hawaii[J]. Journal of the World Mariculture Society,1983,14(1/4):212-225.
- [10] KALAGAYAN H, GODIN D M, KANNA R, et al. IHNV virus as an etiological factor in run-deformity syndrome (RDS) of juvenile *Penaeus vannamei* cultured in Hawaii[J]. Journal of the World Aquaculture Society, 1991, 22(4): 235-243.
- [11] BELL T A, LIGHTNER D V. IHNV virus: infectivity and pathogenicity studies in *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei* [J]. Aquaculture,1984,38(3):185-194.
- [12] ENGVALL E, PERLMANN P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G[J]. Immunochemistry, 1971, 8(9): 871-874.
- [13] LIU G S, CHEN M L, YU C, et al. Molecular cloning, characterization and functional analysis of a putative mitogen-activated

protein kinase kinase kinase 4 (MEKK4) from blood clam *Tegillarca granosa*[J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2017, 66: 372-381.

## Cloning and expression of IHHNV capsid protein and efficient detection of IHHNV through a new type of double antibody sandwich ELISA

YU Chen<sup>1,2</sup>, LIU Guo-sheng<sup>2</sup>, YANG Ming-han<sup>2</sup>, YANG Li-rong<sup>2</sup>, CHEN Ming-liang<sup>2</sup>

(1. School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China; 2. Key Laboratory of Marine Biogenetic Resources, Third Institute of Oceanography, SOA, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** In this study we used molecular biology methods to clone the gene of IHHNV capsid protein and construct prokaryotic expression vector. We screened the polypeptide with high antigen characteristics to immunize rabbits for preparing efficient and specific IHHNV polyclonal antibodies. Finally, we established a new highly efficient double antibody sandwich ELISA method to detect shrimp IHHNV. The results showed that the antigen polypeptide of the IHHNV capsid protein gene of shrimp virus was successfully expressed and highly sensitive polyclonal antibodies were prepared. When used the antigenic peptide and polyclonal antibodies for the detection of ELISA, the titer of ELISA was more than 1:12 800, and the lowest antigen protein of 1pg could be detected. Our research showed that the highly efficient double antibody sandwich ELISA method has been successfully established, which can have important value for the shrimp culture and the prevention and control of IHHNV virus disease.

**Key words:** marine biology; infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus; prokaryotic expression; capsid protein; polyclonal antibody; ELISA

DOI:10.3969/J. ISSN.2095-4972.2018.03.015

(责任编辑:王 静)