

# 间接酶联免疫法检测鲑鳟鱼类传染性造血器官坏死病病毒

金爽<sup>1</sup>, 金莉莉<sup>1</sup>, 郭欣硕<sup>2</sup>, 蔺翠翠<sup>2</sup>, 罗靳<sup>2</sup>, 王秋雨<sup>1\*</sup>

(1. 辽宁大学生命科学院, 沈阳 110036; 2. 辽宁省水产品质量安全检验检测局, 沈阳 110031)

**摘要:** **目的** 建立快速检测传染性造血器官坏死病病毒(IHNV)的间接酶联免疫法。**方法** 以传染性造血器官坏死病毒G蛋白(IHNV-G)为抗原, 免疫实验白兔, 制备兔抗IHNV免疫血清, 通过ELISA对兔抗血清进行效价及特异性评估, 并通过PCR方法进行验证。**结果** 应用间接ELISA技术, 检测到抗血清对IHNV-G和IHNV的效价分别达到1:32000和1:16000, 与其他对照病毒无交叉反应。与PCR检测结果符合率达到98%。**结论** 本文建立的间接酶联免疫法方法具有良好的灵敏性和特异性, 为IHNV的检测提供了快捷、高效的技术手段。

**关键词:** 鲑鳟鱼; 传染性造血器官坏死病病毒; 病毒糖蛋白; 间接酶联免疫法

## Identification of infectious hematopoietic necrosis virus in trout by indirect-enzyme-linked immune assays

JIN Shuang<sup>1</sup>, JIN Li-Li<sup>1</sup>, GUO Xin-Shuo<sup>2</sup>, LIN Cui-Cui<sup>2</sup>,  
LUO Jin<sup>2</sup>, WANG Qiu-Yu<sup>1\*</sup>

(1. College of Life Science, Liaoning University, Shenyang 110036, China; 2. Bureau of Testing on Aquatic Products Quality Safety of Liaoning Province, Shenyang 110031, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish an indirect enzyme-linked immune assays (ELISA) for the identification of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV). **Methods** An experimental rabbit was immunized to produce anti-IHNV serum with IHNV-G protein. To assess the titer and specificity of the anti-serum, the ELISA test was used. Further, PCR was used to verify the above ELISA experimental result. **Results** The titer of anti-serum of IHNV-G and IHNV reached to 1:32000 and 1:16000, respectively, moreover, the cross-reaction with other virus was 0%, and ELISA results was with 98% accordance rate with the method of PCR. **Conclusion** The indirect-ELISA of this research has a good specificity and sensitivity, and it is suitable for rapid detection and epidemiological investigation of IHNV infection in trout.

**KEY WORDS:** trout; infectious hematopoietic necrosis virus; IHNV-G protein; indirect-enzyme-linked immune assays

基金项目: 辽宁省海洋与渔业厅研究基金项目(2011014)

**Fund:** Supported by the Research Fund Projects of Ocean and Fishery Hall in Liaoning Province(2011014)

\*通讯作者: 王秋雨, 教授, 主要研究方向为食品质量与安全。E-mail: qiuyuwang@lnu.edu.cn

\*Corresponding author: WANG Qiu-Yu, Professor, Life Science School of Liaoning University, No. 66, Chongshan Road, Huanggu District, Shenyang 110036, China. E-mail: qiuyuwang@lnu.edu.cn

## 1 引言

传染性造血器官坏死病(infectious hematopoietic necrosis, IHN)是由传染性造血器官坏死病毒(infectious hematopoietic necrosis virus, IHNV)引起的一种鲑鳟鱼科内常见的急性病毒性传染病,常造成鱼苗或幼鱼 70%~90%的死亡率,在某些病例中甚至接近 100%<sup>[1]</sup>。1973年在明尼苏达州、南达科塔、西佛吉尼亚州、科罗拉多州等地的虹鳟鱼大规模暴发该疾病<sup>[2]</sup>。目前,该病的宿主范围和地理分布逐渐扩大,已扩散至美洲、欧洲、澳洲及亚洲的十余个国家,严重制约了世界鲑科鱼类产业的发展,造成了巨大的经济损失,在我国东北地区也已经发现该病毒<sup>[3,4]</sup>。

IHN 被世界动物卫生组织(Office International Des Epizootie, OIE)列为必须申报的疾病,是口岸鱼类的第一类检疫对象,被我国列为二类疫病。近年来,随着水生动物及其产品的进出口贸易, IHNV 也在世界范围内扩散,造成该病的爆发急剧增加,因此 IHNV 的检测和防治显得愈发重要<sup>[5,6]</sup>。

研究表明,传染性造血组织坏死病毒呈子弹状,被分类为弹状病毒科(rhabdoviridae)、诺拉弹状病毒属(*Novirhabdovirus*)<sup>[7]</sup>,基因组为不分节段的单股负链 RNA<sup>[8,9]</sup>。该病毒具有囊膜,囊膜表面为形成病毒外壳突起的糖蛋白(即囊膜蛋白),简称 G 蛋白。IHNV 只有 1 个血清型,不同毒株的核苷酸序列相似性很高,但蛋白质表现出极大的差异。IHNV-G 蛋白是传染性造血组织坏死病毒的主要抗原<sup>[10]</sup>,G 蛋白参与病毒与细胞受体的识别和结合等过程,并与病毒的毒力直接相关。它还是病毒的主要抗原,可以诱导产生特异性免疫中和抗体,刺激细胞免疫<sup>[11,12]</sup>,是建立 IHNV 免疫诊断方法的理想病毒蛋白。我们在前期研究中已成功利用基因工程技术在大肠杆菌中表达纯化了 G 蛋白。本文利用切胶回收的 IHNV-G 蛋白免疫兔子制备多克隆抗体,尝试通过间接 ELISA 方法检测鱼类传染性造血器官坏死病毒,为进一步建立快速便捷的监测监控胶体金试纸条检测技术奠定基础。

## 2 材料与方法

### 2.1 材料

#### 2.1.1 病毒、动物

IHNV-G 蛋白由辽宁大学生命科学院保存。实

验用白兔(4 kg)购自辽宁省本溪长生生物有限公司。

#### 2.1.2 实验试剂、材料及主要仪器

弗氏完全佐剂(CFA)为 Sigma 公司产品,货号 F5881; 1640 改良型细胞培养基均购自 Hyclone 公司,货号为 SH30809; 辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔 IgG、联苯二胺(OPD)、96 孔细胞酶标板、75 cm<sup>2</sup> 细胞培养瓶均购自北京鼎国生物公司,货号分别为 HD001-1、P9029、XH108、430725; IHNV 一步法 RT-PCR 检测试剂盒购自北京海森通公司,货号为 HS70; 其他试剂均为分析纯,均购自北京鼎国生物公司。

SANYO MIR-154-PC 低温恒温培养箱,重庆奥特光学仪器有限公司; BDS-300PH 倒置显微镜,上海康华生化仪器有限公司; SRX-481 基因扩增仪,上海康华生化仪器有限公司; BioTek ELx808 酶标仪,北京莱贝赛威科技有限公司; Hettich MIKRO-220R 冷冻离心机,上海创萌生物科技有限公司; Himac cp80wx 高速离心机,泛泰仪器有限公司。

## 2.2 实验方法

### 2.2.1 病毒制备

(1)病毒增殖 IHNV 冻融后,置高速离心机上,6000 r/min 离心 2 min,去沉淀,然后 12000 r/min 离心 10 min,取上清 0.5 mL 加入新鲜培养的 FHM 单层细胞,置生化培养箱 20 °C 培养,用倒置显微镜适时观察,待细胞出现明显细胞病变时,无菌操作收获细胞病毒悬液,先冻存于 -20 °C 冰箱,后转存到 -80 °C 低温冰箱保存<sup>[13]</sup>。

(2)病毒纯化从 -80 °C 冰箱取出冻存的 IHNV 细胞悬液流水融解,3000 r/min 离心 10 min,然后 5000 r/min 离心 20 min,收集上清液,将上清液置超速离心机上 4 °C, 24000 r/min,离心 2 h,弃上清,将沉淀用少量 STE 缓冲液溶解,取 5~8 mL 病毒样品溶解液,然后在离心管中依次加入 30%、45%、60% 的蔗糖,25000 r/min,离心 2.5 h,在 30%与 45%以及 45%与 60%之间分别出现一条明亮的带,收集两条不同部位的带,分别装到不同的离心管,再去蔗糖,用 STE 缓冲液适量稀释纯化病毒,25000 r/min 离心 3 h,用少量 STE 缓冲液把沉淀悬起,充分混匀并分装,测定上述悬液的蛋白含量, -80 °C 低温冰箱保存。

### 2.2.2 兔抗 IHNV 血清的制备

(1) 动物免疫选择 8 个月龄雌性大白兔 2 只, 首先利用弗氏完全佐剂对实验大白兔进行诱导, 诱导途径为足底注射, 每个足底注射剂量为 0.5 mL。间隔 15 d 后, 进行首次免疫, 免疫途径为大腿内侧淋巴和足底免疫, 注射 IHNV-G 蛋白 500  $\mu\text{g}/\text{次}$ , 间隔 15 d 进行二次免疫, 免疫途径为背部皮下多点注射及足底注射, 免疫原、免疫剂量和首次免疫相同。间隔 15 d 进行第三次免疫, 免疫原、免疫途径、免疫剂量与二次免疫相同。

(2) 免疫血清的获得第 3 次加强免疫后 15 d 后, 进行颈动脉采血, 血液置于离心管中 37  $^{\circ}\text{C}$  放置 1 h, 然后置于 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中过夜, 待血清析出后提取血清, 每管 1 mL 分装, 冻存于 -20  $^{\circ}\text{C}$  冰箱。

### 2.2.3 实验白兔血清抗体效价的测定

用纯化后的 IHNV-G 蛋白包被酶联反应板, 设立阴性对照和空白对照, 将制备的 IHNV-G 蛋白兔抗血清作为阳性血清, 按 1:500、1:1000、1:2000、1:4000、1:8000、1:16000、1:32000、1:64000 稀释阳性血清和阴性血清, 进行 ELISA 实验。

### 2.2.4 IHNV-G 蛋白抗血清与 IHNV 反应

用纯化的 IHNV(5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 包被 ELISA 板, 将 IHNV-G 抗血清和阴性血清按 1:500、1:1000、1:2000、1:4000、1:8000、1:16000、1:32000、1:64000 二倍比例稀释, 空白对照加入 PBS, 进行 ELISA 检测。

### 2.2.5 兔抗 IHNV 血清介导的间接 ELISA 实验

#### (1) ELISA 方法的建立与检测步骤

兔源多克隆抗体用碳酸盐缓冲液(pH=9.6)适当稀释后包被 96 孔酶标板, 每孔 100  $\mu\text{L}$ , 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜。次日用含 0.05% 的吐温-20 的碳酸盐缓冲液(PBST)洗涤 3 次, 每次 5 min。然后, 每孔加入 200  $\mu\text{L}$  1% BSA, 37  $^{\circ}\text{C}$  封闭 1 h, PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min。加待检样品, 每孔 100  $\mu\text{L}$ , 每个样品重复 2 个孔, 并设立阴性、阳性和空白对照。阳性对照孔加入纯化的 IHNV 病毒, 阴性对照孔分别加入正常鱼组织悬液, 空白对照加入 PBS, 37  $^{\circ}\text{C}$  作用 1 h, PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min。加入 1:5000 的 HRP 标记的羊抗兔 IgG, 每孔 100  $\mu\text{L}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  作用 1 h, PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min。加入新鲜配制的 OPD 底物使用液, 37  $^{\circ}\text{C}$  作用 10 min。加入 0.2 mol/L 的  $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液终止反应。ELx808 酶标仪测定各孔  $\text{OD}_{490\text{nm}}$  值<sup>[14]</sup>。

### (2) ELISA 检测结果判断标准

结果判定: 阳性血清  $\text{OD}_{490\text{nm}}$  减空白孔  $\text{OD}_{490\text{nm}}(\text{P})$  与阴性血清  $\text{OD}_{490\text{nm}}$  减空白孔  $\text{OD}_{490\text{nm}}(\text{N})$  的比值大于或等于 2.1(P/N 2.1) 作为阴性和阳性的分界值。

### 2.2.6 ELISA 检测的特异性

用间接 ELISA 检测 IHNV 阳性样品 5 份, 同时检测对虾白斑综合症病毒(WSSV)、锦鲤疱疹病毒(KHV)、鲤春鱼病毒血症病毒(SVCoV)、传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHNV)阳性样品各 5 份, 评价 ELISA 检测的特异性。

### 2.2.7 ELISA 检测与 PCR 检测的符合率

随机抽取待检市场样品 100 份, 同时用 PCR 方法作为对照来评价 ELISA 方法的相对特异性和敏感性, 以及 ELISA 和 PCR 法检测结果的符合率。PCR 方法见 IHNV 一步法 RT-PCR 检测试剂盒。

## 3 结果与分析

### 3.1 IHNV 悬液的蛋白含量

IHNV 的 FHM 细胞培养物超速离心后, 病毒悬液再稀释 20 倍后, 蛋白的吸光度值  $\text{OD}_{260\text{nm}}$  值为 0.336,  $\text{OD}_{280\text{nm}}$  值为 0.282。带入蛋白含量公式:  $\text{Pr}=(\text{OD}_{280\text{nm}} \times 1.45 - \text{OD}_{260\text{nm}} \times 0.74) \times \text{稀释倍数}$ , 算出病毒悬液的蛋白含量为 3.21 mg/mL。

### 3.2 免疫实验白兔血清抗体效价的测定

ELISA 检测结果表明本实验获得的多抗与 IHNV-G 蛋白发生了较强的反应, 血清最大稀释度为 1:32000, 仍满足 P/N 2.1(见图 1)。

### 3.3 IHNV-G 蛋白抗血清与 IHNV 反应

ELISA 检测结果表明本实验获得的兔源多抗与 IHNV 在稀释比例为 1:16000 时, 仍满足 P/N>2.1(见图 2)。

### 3.4 ELISA 检测的特异性结果

ELISA 检测结果表明, IHNV-G 蛋白抗血清对对虾白斑综合症病毒(WSSV)、锦鲤疱疹病毒(KHV)、鲤春鱼病毒血症病毒(SVCoV)、传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHNV)这四种病毒进行检测, P/N<2.1 结果为阴性, 并无交叉反应, 表明本实验制备的抗血清具有良好的特异性(见图 3)。

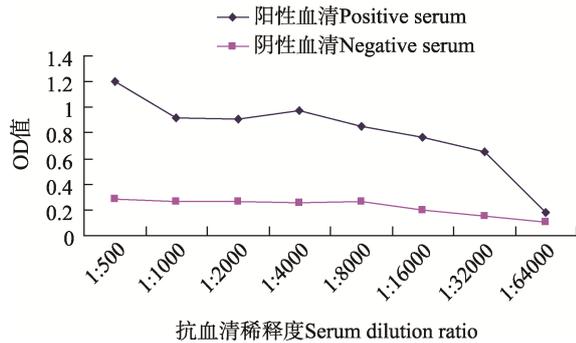


图 1 间接 ELISA 检测 IHNV-G 蛋白多抗效价结果

Fig. 1 The titer results of IHNV-G protien infected rabbit serum

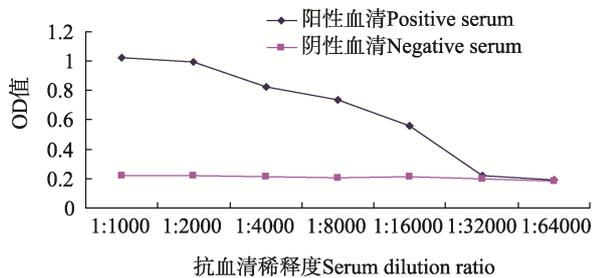


图 2 间接 ELISA 检测 IHNV-G 抗血清与 IHNV 反应结果

Fig. 2 The results of purified IHNV reacted with the anti-serum

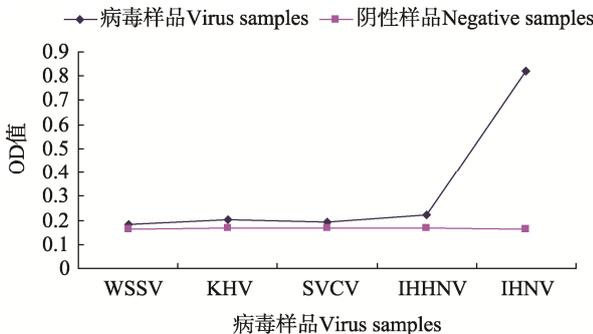


图 3 间接 ELISA 检测 IHNV-G 抗血清与 WSSV, KHV, SVCV, IHNV, IHNV 反应结果

Fig. 3 The results of WSSV, KHV, SVCV, IHNV, IHNV reacted with the anti-serum

### 3.5 水产样品检测

用本实验建立的间接 ELISA 方法检测水产样品 100 份, 其中 ELISA 检测 26 份阳性样品, 74 份阴性样品; PCR 检测 28 份为阳性, 72 份为阴性。26 份样品用 ELISA 和 PCR 方法检测结果为阳性, 72 份为阴性, 计算得出 ELISA 的特异性和敏感性分别为

100%(72/72)和 92.9%(26/28); ELISA 和 PCR 两种方法检测结果的符合率为 98% [(26+72)/100], 详细结果见表 1。

表 1 水产样品检测结果

Table 1 The detection results of aquatic samples

	PCR	ELISA
阳性数	28	26
阴性数	72	74
总数	100	100

## 4 讨论与结论

传染性造血器官坏死病毒在北美, 亚洲太平洋沿岸, 以及欧洲等地区都有分布, 常造成鱼苗的死亡率达到 70%~100%, 对鲑鳟鱼类的饲养造成严重影响, 有关 IHNV 的快检也有报道<sup>[15-17]</sup>, 但是均涉及到贵重的生物仪器, 而且需要专业人员进行操作, 通常检测周期为 15 d, 对于突然的病毒爆发事件的快速诊断并不适用。

我们针对国内 IHNV 的流行情况, 计划建立一个快速检测 IHNV 的方法-间接 ELISA 方法, 此法通过抗原抗体的特异性结合来检测鱼类样本中的 IHNV。此方法不需特殊仪器设备, 操作简单、快捷, 适合于突发事件的大批量检测, 从样品处理到判定样品检测结果仅需 1 d, 对于 IHNV 引起的鲑鳟鱼类感染快速初步筛查起到辅助作用。

另外, IHNV 的 ELISA 检测发展之所以缓慢, 是因为该病毒培养困难、生物安全性低, 而且病毒本身抗原决定簇多、免疫产生的抗体不纯、血清效价低。本实验是通过构建表达的重组 G 蛋白为病毒抗原, 相对于病毒更容易纯化和批量生产, 保证了制备抗体过程中抗原的均一和高效。关于大白兔的免疫, 在设计免疫方案时, 抗原的性质和纯度、抗原量、免疫途径、次数及间隔时间、佐剂的应用及动物对该抗原的免疫应答等因素均应周全考虑。在本研究中所用的免疫原是切胶回收的 IHNV-G 蛋白, 由于胶粒本身就是免疫佐剂的一种, 所以实验中, 只在首次诱导免疫时用了弗氏完全佐剂, 其余三次免疫未使用佐剂, 这样既保证了免疫佐剂的量, 又降低了免疫过程中的不良反应。同时, 对大白兔的多个部位进行免疫, 与之前仅做背部多点式注射的免疫途径相比, 本研究

方法产生的血清效价与已报道<sup>[18]</sup>的比较高出 3 倍。

使用本文的检测方法与常规 RT-PCR 方法<sup>[19]</sup>, 同时检测相同的鱼类样品 100 份, 符合率达到 98%, 显示两种方法均具有良好的特异性和灵敏性, 但间接 ELISA 检测方法具有方便、简洁、快速的优点。

#### 参考文献

- [1] Sophie SH, Carl SR, Craig S, *et al.* Epidemiological investigation of infectious hematopoietic necrosis virus in saltwater net-pen reared Atlantic salmon in British Columbia, Canada [J]. *J Aquacul*, 2002, (212): 49–67.
- [2] 姜红, 李月红, 吴东明, 等. 鱼类传染性造血器官坏死病临床诊断及检测[J]. *中国水产*, 2010, (11): 53.  
Jiang H, Li YH, Wu DM, *et al.* The clinical diagnosis and detection of Infectious hematopoietic necrosis disease [J]. *China Fish*, 2010, (11): 53.
- [3] 吉尚雷, 李月红, 卢玉, 等. 1 株传染性造血器官坏死病病毒 (IHNV) 的分离与鉴定 [J]. *中国兽医杂志*, 2014, 50(4): 80–85.  
Ji SL, Li YH, Lu Y, *et al.* The isolation and detection of an infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) in Rainbow trout [J]. *Chin J Vet Med*, 2014, 50(4): 80–85.
- [4] Hoffmann B, Beer M, Schütze H, *et al.* Fish rhabdoviruses: molecular epidemiology and evolution [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2005, 292: 81–117.
- [5] Alonso M, Chiou PP, Leong JA. Development of a suicidal DNA vaccine for infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2011, 30(3): 815–23.
- [6] Oidtmann BC, Pearce FM, Thrush MA, *et al.* Model for ranking freshwater fish farms according to their risk of infection and illustration for viral haemorrhagic septicaemia [J]. *Prev Vet Med*, 2014, 115(3–4): 263–79.
- [7] Amend DF. Detection and transmission of infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout [J]. *J Wildl Dis*, 1975, 11(4): 471–478.
- [8] 吴金炉, 曾志南. 鱼类病毒病与鱼类病毒疫苗[J]. *海洋科学*, 1999, (4): 7–42.  
Wu JL, Zeng ZN. Fish virus disease and fish virus vaccine [J]. *Mar Sci*, 1999, (4): 7–42.
- [9] Wolf K. Fish viruses and fish viral disease [M]. New York: Cornell University Press, 1988, 476–493.
- [10] Verjan N, Ooi EL, Tomonori N, *et al.* A soluble nonglycosylated recombinant infectious Hematopoietic necrosis virus (IHNV) G-protein induces IFNs in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2008, 25(1/2): 170–180.
- [11] Boudinot P, Blanco M, De Kinkelin P, *et al.* Combined DNA immunization with the glycoprotein gene of viral hemorrhagic septicemia virus and infectious hematopoietic necrosis virus induces double-specific protective immunity and nonspecific response in rainbow trout [J]. *Virology*, 1998, 249(2): 297–306.
- [12] Corbeil S, Lapatra SE, Anderson ED, *et al.* Evaluation of the protective immunogenicity of the N, P, M, NV and G proteins of infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* using DNA vaccines [J]. *Dis Aquat Organ*, 1999, (1): 29–36.
- [13] 郭闯, 陈静, 刘训猛, 等. 间接 ELISA 方法快速检测鲤春鱼病毒 (SVCV) 的初步研究[J]. *金陵科技学院学报*, 2012, 28(4): 79–82.  
Guo C, Chen J, Liu XM, *et al.* A preliminary study on rapid diagnosis of spring viremia of carp virus by indirect ELISA [J]. *J Jinling Inst Technol*, 2012, 28(4): 79–82.
- [14] 郑晓聪, 刘荭, 张朋, 等. 对虾白斑综合征病毒双抗体夹心 ELISA 方法的建立[J]. *中国动物检疫*, 2012, 29(4): 41–44.  
Zheng XC, Liu H, Zhang P, *et al.* Development of double antibody sandwich ELISA for detection of white spot syndrome virus [J]. *China Anim Health Ins*, 2012, 29(4): 41–44.
- [15] Overturf K, LaPatra S, Powell M. Real-time PCR for the detection and quantitative analysis of IHNV in salmonids [J]. *Fish Dis*, 2001, 24: 325–333.
- [16] Chiou PP, Drolet BS, Leong JC. Polymerase chain amplification of infectious hematopoietic necrosis virus RNA extracted from fixed and embedded fish tissue [J]. *J Aquat Anim Health*, 1995, (7): 9–15.
- [17] Alonso M, Rodríguez S, Perez PSI, *et al.* Nested PCR improves detection of infectious hematopoietic necrosis virus in cells coinfecting with infectious pancreatic necrosis virus [J]. *J Virol Meth*, 1999, 81: 1–9.
- [18] 刘学光, 郑怀东, 郭欣硕, 等. 传染性造血器官坏死病毒糖蛋白的原核表达及多克隆抗体的制备[J]. *大连海洋大学学报*, 2013, 28(3): 254–258.  
Liu XG, Zheng HD, Guo XS, *et al.* Prokaryotic expression and polyclonal antibody production of the glycoprotein gene of Infectious hematopoietic necrosis virus [J]. *J Dalian Fish Univ*, 2013, 28(3): 254–258.
- [19] Heid CA, Stevens J, Livak KJ, *et al.* Real time quantitative PCR [J]. *Genome Res*, 1996, 6: 986–989.

(责任编辑: 杨翠娜)

#### 作者简介



金 爽, 硕士研究生在读, 主要研究方向为生物化学与分子生物学。  
E-mail: 787925821@qq.com



王秋雨, 教授, 主要研究方向为食品质量与安全。  
E-mail: qiuyuwan@lnu.edu.cn