

说明书

一种大口黑鲈虹彩病毒病灭活疫苗及其制备方法

技术领域

本发明属于兽用生物医药技术领域，具体涉及一种大口黑鲈虹彩病毒病灭活疫苗及其制备方法。

背景技术

随着我国水产业迅速发展，水生动物疾病，尤其是因病毒引起的爆发性流行病明显增多，危害极为严重。在报道的病毒中，虹彩病毒是一种危害较为普遍的病毒。虹彩病毒主要感染无脊椎动物和低等脊椎动物，虹彩病毒科(Iridoviridae)的病毒都是正二十面体病毒，直径在 120~300nm，大多是单分子线性双链 DNA 病毒，其基因组大小为 170~200kb。包括 5 个属，其中蛙病毒属(Ranavirus)、细胞肿大病毒属(Megalocytivirus)、淋巴囊肿病毒属(Lymphocystivirus)可以感染脊椎动物，主要感染鱼类、两栖类及爬行类等，而虹彩病毒属(Iridovirus)、绿虹彩病毒属(Chloriridovirus)感染无脊椎动物。现已陆续从世界各地患病的鱼类、两栖类及爬行类动物中分离、观察到多种虹彩病毒(Williams et al., 2005)。我国也从患病蛙、大菱鲆、鳊鱼、大黄鱼、石斑鱼、大口黑鲈等水生动物中分离到不同的虹彩病毒，在水产业中造成巨大损失的虹彩病毒有红鲷鱼虹彩病毒(red sea bream iridovirus)、台湾石斑鱼虹彩病毒(Taiwan Grouper iridovirus)、传染性脾肾坏死病毒(Infectious spleen and kidney necrosis virus)、大黄鱼虹彩病毒(Large yellow croaker iridovirus)和大菱鲆红体病虹彩病毒(Turbot reddish body iridovirus)及大口黑鲈虹彩病毒(Largemouth bass iridovirus)等。其中大口黑鲈虹彩病毒中蛙病毒属虹彩病毒(Largemouth bass ranavirus)更为严重(王庆等, 2011; 夏焱春等, 2018)。目前研究较多的蛙病毒为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，1996 年先被归类到虹彩病毒科，后又被归类到蛙病毒属。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 年从广东省佛山地区分得一株与 LMBV 同源性较高的病毒，肌肉注射后导致大口黑鲈 100% 死亡(DENG et al. 2011)。目前大口黑鲈的养殖产量已超 50 万吨，主要养殖区均有发病，夏季高发，发病时水温为 25~30 °C，危害成鱼，致死率高，给大口黑鲈养殖业造成了重大的经济损失，严重威胁该产业的健康发展。因此，如何预防和治疗大口黑鲈虹彩病毒病已成为当今大口黑鲈养殖业急需解决的重要问题。

蛙虹彩病毒可以感染十分广泛的培养细胞，如哺乳动物细胞、鱼类细胞和两栖类动物细胞等。虹彩病毒在体外感染细胞可以引起明显的细胞病变(cytopathic effect, CPE)如幼仓鼠肾细胞(BHK)、人宫颈癌上皮细胞(Hela)、人肾上皮细胞系(293T)、鲤鱼上皮瘤细胞

说明书

(Epithelioma papulosum cyprini, EPC) 和肥头鲤细胞 (Fathead minnow, FHM)。马冬梅等 (2016) 构建重组表达 MCP 蛋白的工程菌, 制备基因工程疫苗, 发现该疫苗对 LMBV 感染后 20 d 的大口黑鲈保护率最高达 67.7%。日本已经研发并商品化真鲷虹彩病毒 (Red sea bream iridovirus, RSIV) 注射型全细胞灭活疫苗 (Nakajima K, 1999)。疫苗免疫被认为是控制水生动物病毒性传染性疾病的最佳手段。疫苗作为化学药品和抗生素的替代品, 是治疗疾病、特别是病毒病的最好选择。灭活疫苗具有较强的安全性和免疫原性, 已广泛应用于多种人和动物疫苗的生产。

发明内容

本发明要解决的技术问题是虹彩病毒危害成鱼, 致死率高, 给大口黑鲈养殖业造成了重大的经济损失, 严重威胁该产业的健康发展。因此, 如何预防和治疗大口黑鲈虹彩病毒病已成为当今大口黑鲈养殖业急需解决的重要问题。

为解决上述问题, 本发明针对大口黑鲈虹彩病毒病, 首次利用鱼类细胞系——鲤鱼上皮瘤细胞系 (Epithelioma papulosum cyprini, EPC), 建立了一种高效、安全、可规模生产的大口黑鲈虹彩病毒细胞培养灭活疫苗的制备方法, 并制备出大口黑鲈虹彩病毒病细胞培养灭活疫苗, 效果良好, 可广泛应用于水产养殖中疾病的防控。

为达到上述目的, 本发明通过以下技术方案实现, 一种大口黑鲈虹彩病毒病灭活疫苗, 包括大口黑鲈虹彩病毒 LMBV, 在 EPC 细胞上高滴度增殖, 其 TCID₅₀ 达 10¹¹/mL。保藏号: CCTCC NO: V202018; 保藏单位: 武汉大学 CCTCC。该疫苗的免疫效果好, 免疫保护率高, 免疫剂量为 TCID₅₀ 为 10⁹/mL, 0.1ml/尾 (大口黑鲈 50g~70g), 免疫后免疫保护率可达 100%。

病毒分离方法如下: 将刚死的感染虹彩病毒病鱼的肾脏、脾脏组织, 剪碎并加等体积 PBS 匀浆, 5000rpm 4℃离心 15min 后经 0.22μm 滤膜过滤制备成无菌组织匀浆液, EPC 培养至细胞单层约 80% 后, 弃去培养基经无血清的细胞维持液清洗 2 遍后, 将上述处理过的病料组织匀浆液上清 0.2ml 接种于 EPC 细胞上, 24℃吸附 1h, 期间每隔 15~20min 轻微晃动培养瓶一次以便均匀吸附。待吸附结束后, 换血清浓度为 2% 的 199 维持液继续 24℃培养, 逐日观察细胞病变 (CPE), 得到大口黑鲈虹彩病毒 LMBV。LMBV 能在该细胞系上进行连续稳定传代, 能进行病毒的大规模培养, 这对于开展疫苗的规模化生产与病害的免疫预防具有重要意义。

进一步地, 所述灭活疫苗还包括佐剂 IMS1312。能够增强免疫效果。

一种上述大口黑鲈虹彩病毒病灭活疫苗的制备方法, 包括以下步骤:

步骤 1. 培养 EPC 细胞;

说明书

步骤 2.将培养的 EPC 细胞进行 LMBV 病毒扩增，获得 LMBV 病毒液；

步骤 3.将 LMBV 病毒液进行灭活处理。

大口黑鲈蛙虹彩病毒 LMBV 对 EPC 细胞特别敏感，TCID₅₀ 为 10^{11.33}/ml，且 EPC 易培养，所以采用 EPC 进行病毒扩增。

进一步的，所述步骤 1 中培养 EPC 细胞，具体包括：

步骤 1.1，将长满单层 EPC 细胞的培养皿中的培养基去除，加入体积浓度为 0.25% 的胰蛋白酶消化液消化 1~2min，再加入 pH 在 7.4~7.6 的含有体积百分比 10% 的小牛血清的 199 培养基，用移液管轻吹细胞瓶底，再添加含有体积百分比 10% 的小牛血清的 199 培养基悬浮细胞，于 23~25℃ 进行培养扩增，待 EPC 细胞在培养皿中铺满即可进行下一步实验。

进一步的，所述步骤 2 中将培养的 EPC 细胞进行 LMBV 病毒扩增，具体包括：

步骤 2.1，在获得的 EPC 细胞中按照 1/10 的培养基体积接种感染复数 1~3 PFU/cell 的 LMBV 病毒悬液，待病毒吸附细胞 30~60min，补加含有体积百分比 2% 的小牛血清的 199 培养基进行病毒增殖 3~6 天，获得病变细胞；

步骤 2.2，将病变细胞反复冻融 2~3 次，将病毒释放出来，然后于 2000~3000r/min 离心 10~15min，收集上清液即 LMBV 病毒液。

进一步的，所述步骤 2.2 中冻融条件为：于 -80℃ 冻存，然后于 20~25℃ 自然溶解。

进一步的，所述步骤 3 中将 LMBV 病毒液进行灭活处理为在 LMBV 病毒液中加入二乙烯亚胺至其终浓度为 2%，得到的混合液于 37℃ 灭活 48h。

本发明的有益效果在于：本发明成功筛选到了一种大口黑鲈蛙虹彩病毒 LMBV，也得到了一种对 LMBV 敏感的鲤鱼上皮瘤细胞系 (Epithelioma papulosum cyprini, EPC)。此外，本发明的灭活疫苗的免疫实验证实其对于大口黑鲈虹彩病毒病的免疫保护效果良好，提高养殖大口黑鲈的存活率和养殖效益。并且，该灭活疫苗生产成本低、工艺简单且安全性能好，可广泛应用于水产养殖中疾病的防控。

附图说明

图 1 是本发明 EPC 感染 LMBV 后第 6 天示意图。

图 2 是本发明第 7 代 LMBV 细胞毒感染 EPC 细胞的电镜超薄切片示意图。

具体实施方式

下面将结合本发明实施例中的附图，对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述，显然，所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例，而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例，本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例，都属于本发明保护的范围。

说明书

实施例 1：

本实施例提供一种大口黑鲈虹彩病毒病灭活疫苗的制备方法，包括以下步骤：

步骤 1，EPC 细胞培养：取长满单层的 EPC 1 瓶，在无菌超净台里吸弃旧培养基，每瓶添加 2ml 浓度为 0.25%(V/V)胰蛋白酶消化液，消化 1min 左右，迅速添加 2ml pH 在 7.4 的含 10%(V/V)小牛血清的 199 培养基，用移液管轻吹细胞瓶底，再添加 6ml 含 10% (V/V)小牛血清的 199 培养基悬浮细胞。取 2 个 T25 细胞培养瓶，每瓶加 4ml 细胞悬液，置于 25℃ 培养箱中培养，待细胞形成汇合单层并铺满培养皿后得到 EPC 细胞，用于扩增病毒。

步骤 2，LMBV 病毒扩增：吸出 EPC 细胞中的培养液，然后按 1/10 的培养基体积加入感染的病毒悬液，病毒的感染复数 MOI(Multiplicity of infection)为 1~3 PFU/cell，在病毒吸附细胞 60 分钟后，补加含 2% (V/V) 小牛血清的 199(pH7.2~7.5) 维持液进行病毒增殖（这里的病毒增殖是指病毒复制，在细胞上能够大量繁殖）。

病毒的收获：病毒连续培养 3~6 天，在显微镜下观察，待 EPC 细胞出现典型细胞病变效应时，将 T25 细胞瓶置于 -80℃ 冰箱冻存，结冻后取出细胞瓶放室温(20~25℃，以下相同)慢慢溶解，如此反复冻融两次，在超净台里用移液管轻吹培养瓶壁，将病毒感染的细胞悬液装入 50ml 无菌离心管里，以 2500r/min 离心 10min，收集离心后上清液，即获得扩增病毒原液，用于后续滴度实验以及灭活疫苗制备。

病毒滴度测定：将 LMBV 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。首先，在 96 孔细胞培养板中将 EPC 细胞培养至单层细胞备用，用维持液将 LMBV 病毒液作连续 10 倍稀释，即 10⁻¹、10⁻².....10⁻¹² 每个稀释度取 100μL 加入 96 孔细胞培养板中，每个稀释度作 8 个重复，并设空白细胞培养对照。置 24℃ 培养箱中。逐日观察细胞病变，并记录细胞病变孔数，直到对照细胞老化脱落为止。按 Reed-Muench 法计算病毒滴度 TCID₅₀ 值。病毒接种细胞后不同天数的病毒感染量，第 6 天 TCID₅₀ 为 10^{11.33}/ml。

步骤 3，病毒的灭活：取 100ml 病毒原液，加入二乙烯亚胺（BEI），病毒液与 BEI 混合均匀后 BEI 终浓度为 2%，将混合液于 37℃ 灭活 48h，待灭活结束后添加终浓度为 2% 的亚硫酸钠中和残余 BEI，即获得病毒灭活疫苗原液，并置于 4℃ 冰箱保存备用。BEI 组，终浓度 2%，37℃ 48h。

灭活病毒疫苗的使用：将病毒灭活疫苗原液用鱼用生理盐水（0.65%）稀释至效价为 2 × 10⁹ 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。

实施例 2

LMBV 灭活条件的确定及安全性试验。

说明书

按照实施例 1 的方法获得扩增病毒原液，分成 3 等分，分别加入 BEI 至 BEI 终浓度分别为 1%、2%、2%，在 37 °C 恒温摇床中 120r/min 灭活 24h、48h、72h 后，用同等浓度硫代硫酸钠溶液终止灭活并取样。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，观察 7~10 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 2 次，若盲传出现细胞病变，则表明病毒灭活仍不完全，若盲传 2 次均未出现细胞病变，则表明病毒灭活完全，疫苗安全。检测结果见表 1。

表 1 不同浓度的 BEI 处理病毒不同时间后的细胞盲传结果

灭活终浓度	灭活时间 (h)	CPE
1.0%	24	+++
	48	+++
	72	+++
2.0%	24	+++
	48	-
	72	-
3.0%	24	-
	48	-
	72	-

(+++表示未传代即检测到 CPE，++表示第 1 次盲传后检测到 CPE，+表示第 2 次盲传后检测到 CPE，- 表示 3 次盲传均未检测到 CPE)

从表 1 可知，病毒液与 BEI 混合均匀后终浓度 2%，37°C 灭活 48 小时的安全性检测结果显示，灭活病毒液不会引起细胞病变，证明病毒已被有效灭活。后续的疫苗安全性试验中，也证明了该灭活条件可有效灭活病毒。

实施例 3

灭活疫苗的安全性检验

无菌检验：取实施例 1 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 30°C 培养 15 天，若有菌落生长，则表明疫苗有细菌污染；若无菌落生长，则表明疫苗是无菌的。

鱼体安全性实验：取上述制备好的疫苗，注射健康 50g~70g 的大口黑鲈 30 尾，注射剂量为 0.1~0.2ml/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有临床症状，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临床症状或死亡，则表明疫苗安全。

鱼体注射疫苗后的应激性测试及摄食影响：单剂量 (0.1ml/尾) 和双倍剂量 (0.2ml/尾) 接种大口黑鲈的临床症状观察如下：

说明书

分别将 50g~70g 大口黑鲈随机分为空白对照组、免疫组，每组 30 尾，暂养水温维持在 $(24\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 的循环水池（60cm×60cm×50cm）中，7 日后进行疫苗腹腔注射免疫；对照组注射无菌磷酸盐缓冲溶液 PBS，试验前停食 2 日。注射后连续 4 周，详细观察记录免疫大口黑鲈的临床症状，单剂量和双倍剂量接种后 1~14 日临床症状观察结果未见任何异常，各组大口黑鲈精神状态良好，无食欲下降或不采食，无浮头，未出现异常游泳姿势如倒立、异常转圈、底部持续横游等，无间歇性或持续性侧游、竖游、旋转游泳、呆滞。有明显的受惊反应，体表体色正常，注射部位无病变，排便正常。后续观察结果相同，未见不良反应，也没有出现因为疫苗注射而造成的特异性死亡及畸形发生。结果表明单剂量和双倍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，安全性良好。

灭活疫苗乳化佐剂筛选

选取 IMS1312、Montanide ISA 763A、铝胶作为佐剂，与实施例 1 制备的病毒灭活疫苗原液混合乳化制备成终浓度为含 TCID_{50} 为 $10^9/\text{ml}$ 的佐剂疫苗，免疫 50g~70g 的健康大口黑鲈。每种佐剂疫苗免疫 20 尾，免疫剂量 0.1ml/尾，另设裸疫苗组（不加佐剂）及磷酸缓冲液（PBS）对照组。免疫 30 日和 80 日后采用 LMBV 强毒进行攻毒，攻毒浓度为 TCID_{50} $10^{10}/\text{ml}$ ，每尾注射 0.1ml，评价不同佐剂乳化后疫苗的效果。结果表明，佐剂 IMS1312 乳化后的灭活疫苗，免疫保护率最高（表 2），且 IMS1312 为水佐剂，与疫苗混合方便，因此，选择 IMS1312 佐剂作为与灭活疫苗乳化的使用佐剂。

表 2 不同佐剂疫苗的免疫保护率

组别	免疫 30 日后保护率	免疫 80 日后保护率
1312 佐剂	50%	100%
裸疫苗	20%	50%
763A 佐剂	30%	40%
铝胶佐剂	20%	40%
对照	0%	0%

灭活疫苗保护率及最小免疫剂量的测定

按照实施例 1 的方法制备 TCID_{50} 为 $10^{11}/\text{mL}$ 的 LMBV 病毒液，采用 BEI 进行灭活，制备灭活疫苗，并将疫苗进行稀释，稀释到终浓度为 $10^{10}/\text{mL}$ 、 $10^9/\text{mL}$ 、 $10^8/\text{mL}$ 、 $10^7/\text{mL}$ ，设置对照 PBS 组，每组都用 IMS1312 佐剂进行乳化，乳化后进行大口黑鲈免疫，每组免疫 20 尾、50g~70g 健康大口黑鲈，腹腔注射免疫剂量 0.1ml/尾，免疫 30 日和 80 日后进行攻毒，每日统计死亡鱼数，根据统计出来的各组的死亡率，依下列公式计算相对保护率 (Relative

说明书

percentage survival, RPS) : 相对保护率 (RPS)= [1-(免疫组死亡率/对照组死亡率)]×100%。

以确定疫苗的免疫保护率及最小免疫剂量。具体结果见表 3。

表 3 疫苗保护率及最小免疫剂量试验

组别	免疫 30 日 后保护率	免疫 80 日 后保护率
1312 佐剂 10^{10} /mL	80%	100%
1312 佐剂 10^9 /mL	50%	100%
1312 佐剂 10^8 /mL	0%	60%
1312 佐剂 10^7 /mL	0%	20%
对照	0%	0%

攻毒结果表明（表 3），最小免疫剂量为病毒滴度 TCID₅₀ 为 10^9 /mL，0.1ml/尾（大口黑鲈 50g~70g）。最佳免疫剂量为 TCID₅₀ 为 10^9 /mL，0.1ml/尾（大口黑鲈 50g~70g）。经试验测定 80 日时免疫保护率达 100%。因此，确定大口黑鲈虹彩病毒病灭活疫苗的抗原为灭活前病毒含量不低于 10^9 /mL，0.1ml/尾。

灭活疫苗在生产上的示范试验

在浙江湖州某养鱼场实施，按照实施例 1 的方法制备 TCID₅₀ 为 10^9 /mL 的 IMS1312 佐剂 LMBV 灭活疫苗，0.1ml/尾免疫大口黑鲈（±50g）8000 尾，养殖 6 个月后，随机取鱼 20 尾以强毒攻击，测定其免疫保护率。经测定免疫保护率达 80%。

综上，本发明制备的疫苗免疫保护效果好，可应用于大口黑鲈虹彩病毒病的预防免疫，提高养殖大口黑鲈的存活率和养殖效率。

尽管上面已经示出和描述了本发明的实施例，可以理解的是，上述实施例是示例性的，不能理解为对本发明的限制，本领域的普通技术人员在本发明的范围内可以对上述实施例进行变化、修改、替换和变型。