

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

石斑魚神經壞死病毒 DNA 疫苗之開發

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2313-B-002-057-

執行期間：93年08月01日至94年07月31日

執行單位：國立臺灣大學漁業科學研究所

計畫主持人：陳秀男

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 94 年 10 月 31 日

石斑魚神經壞死病毒 DNA 疫苗之開發

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC93 - 2313 - B - 002 - 057

執行期間：93 年 8 月 1 日至 94 年 7 月 31 日

計畫主持人：陳秀男 教授

共同主持人：

計畫參與人員：

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

執行單位：臺灣大學漁業科學研究所

中 華 民 國 94 年 10 月 31 日

中英文摘要

計畫中文摘要：

本計畫針對感染石斑魚的神經壞死病毒(Nervous Necrosis Virus ;NNV),以市售的 RNA 抽取套組(Trizol),抽取其 RNA,進而利用針對病毒 RNA2 的專一性引子,以 RT-PCR 的方式增殖病毒蛋白質鞘的基因片段,再與含真核生物啟動子的表現質體(pTarget T mammalian Express vector)接合,將此質體轉形(Transform)至大腸桿菌中,培養後純化含有病毒鞘蛋白基因的大腸桿菌質體,以此質體為疫苗轉移感染(Transfer)至石斑魚腦細胞株(GBC1),以西方雜交式判斷此細胞株是否產生神經壞死病毒的蛋白質鞘,以體外的方式(In vitro)探討此疫苗的效果。實驗結果顯示:利用專一性引子 NNV-F 及 NNV-R 可有效的增殖病毒蛋白質鞘片段基因,其產物約 1345bp,包含完整的增殖病毒蛋白質鞘基因,此段 DNA 經與質體結合後轉形(Transform)至大腸桿菌中,純化的質體以 Lipofectin 及電穿透作用(Electroporation)皆可有效的送入 GBC1 細胞株中,利用大鼠抗 NNV 抗體以西方雜交的方式,可確認細胞產生病毒鞘蛋白約 42KDa,因此可應用至魚體實驗,進而利用此 DNA 疫苗處理石斑魚苗,以防治 NNV 的感染。

Abstract :

Nervous Necrosis Virus (NNV) has been demonstrated to be main causes for the cultured marine fish worldwide. In recent decade, Taiwan, cultured groupers have been found to be infected by NNV with a massive mortality especially for the horal fish. The present study attempts to develop the DNA vaccines for protect NNV infection in marine fish. It is successful to extract viral RNA and amplify a 1330 bp product using specific primers (NNV-F&R) against NNV RNA2 by RT-PCR. After gene cloning, the purified plasmid that contained viral capsid protein genome was used as DNA vaccine and transfected into GBC1 cell line by lipofectin or Electroporation. The protection efficacy of DNA vaccine is then evaluated using rat anti-NNV antibody by western blot hybridization method. It is verified that the transfected cell produce 42KDa protein is same as the molecular weight of NNV capsid protein. Therefore, it is hopeful that developed DNA vaccine may be beneficial to grouper aquaculture industry in Taiwan.

一、前言

自 1994 年起，臺灣養殖的石斑魚受神經壞死病毒(Nervous Necrosis Virus ; NNV) 的感染，引起魚苗及仔稚魚的大量死亡。罹患病毒性神經壞死症(Viral nervous necrosis disease, VNN diseases)的魚苗，會表現出不正常的游泳行為，如螺旋前進、翻滾式前進、迴旋打轉等，部份魚苗的身體有側彎的情形，並伴隨著食慾不振的情況，虛弱的魚苗先是浮於水面上，最後沉入池底死亡，死亡率可達百分之百。從病魚的組織病理切片的觀察發現腦、脊髓和視網膜均有組織壞死現象。電子顯微鏡的觀察，可見病變的細胞其細胞質有 25nm 的病毒顆粒，目前的實驗結果顯示：此病毒可以垂直感染或水平感染至其他魚體。

目前研究已知神經壞死病毒屬於結病毒科(Nodaviridae)之一種，魚類的結病毒屬(Fish nodavirus)，與昆蟲結病毒屬(Insect nodavirus)有所區分。這個屬的病毒可分成 TPNNV, SJNNV, BFNNV 及 RGNNV 四大類，每一大類的病毒蛋白質鞘核酸序列相似度高達 90% 以上。NNV 病毒大小約 20-34nm，型態介於圓形與二十面體之間，不具有外套膜，核酸含有 2 段 RNA，其中 RNA1 可轉譯出分子量為 110kDa 的蛋白質，此蛋白質只有在成熟的病毒中會出現，推測其功能為 RNA-dependent RNA polymerase；RNA2 可以轉譯出兩條分子量為 40kDa 及 42kDa 的鞘蛋白。鞘蛋白上含有病毒的抗原決定基，可以幫助宿主細胞辨識。此病毒主要感染魚苗時期，經由水平感染或垂直感染，可造成魚苗很高的死亡率，目前尚無有效的防治措施，因此藉由分子生物學的技術研發石斑魚神經壞死病毒的 DNA 疫苗以防治 NNV 的感染應為一可行且迫不及待的方法。

二、研究目的

本計畫擬利用生物技術的方法研發石斑魚神經壞死病毒的 DNA 疫苗，先於體外(In vitro)的方式探討其效果，進而應用此 DNA 疫苗處理石斑魚苗，以探討其對於 NNV 的免疫反應及防治成效，評估此疫苗將來運用於魚苗養殖場的效果與實用性。

三、文獻探討

關於魚類的神經壞死病毒(Nervous Necrosis Virus ; NNV)，最早於 1990 年日本養殖的鸚鵡魚(*Oplegnathus fasciatus*)體內發現(Yoshikoshi *et al.*, 1990)，陸續在世界各地皆有病例被報告，目前已知有超過 24 種魚類受到此病毒感染並傳出大量死亡的疫情(Munday *et al.*, 2002)。以往的實驗大多偏重流行病學及組織病理學的研究(Arimoto *et al.*, 1993 ; Le Breton *et al.*, 1997)。為避免病毒的傳播，可利用物理或化學處理來抑制病毒的活性，結果顯示病毒在 pH 3 及 pH 10-12 時感染力會下降，病毒的感染力在 60 處理 1 小時後亦會顯著的下降，碘、氯(50 ppm)處理 10 分鐘，紫外線($1 \times 10^5 \mu\text{W} \cdot \text{sec}/\text{cm}^2$)及臭氧處理皆可使病毒的活性下降(Arimoto *et al.*, 1996 ; Frerich *et al.*, 1996)。在利用病毒的偵測方式來防治疫情的傳播，Nishizawa 等人於 1994 年建立以 RT-PCR 的方法，增殖病毒的鞘蛋白基因 RNA2 來檢驗魚體是否受用 NNV 病毒所感染(Nishizawa *et al.*, 1994)。Chi *et al.* (1999)建立了石斑魚(*Epinephelus coioides*)的鰭細胞株(GF-1)，此細胞株可連續繼代培養而且對 GNNV 的感受性高，細胞病變明顯，易於判讀病毒感染情形(Chi *et al.*, 1999)。原位雜交法不僅可偵測 NNV 病毒，同時發現病毒不只在腦、視網膜等組織，亦出現在鰓，骨骼肌，肝臟，幽門腺，小腸和心臟的血球等處(Chi *et al.*, 2001 ; Comp *et al.*, 1996)。2000 年 Valle 等人發展出兩步驟 RT-PCR 加上 nested PCR 的方法可以

快速檢測魚體的血液、精子和卵巢是否有病原性(Valle *et al.*, 2000)。有關利用免疫方法來檢測NNV病毒方面,Lai 等人在 2001 建立了石斑魚(*Epinephelus awoara*)的腦細胞株(GB cell line),此細胞株對病毒具有感受性(Lai *et al.*, 2001)。2002 年以融合瘤所生產的鼠抗體片段基因轉殖到此腦細胞株,細胞內產生的蛋白質(抗體)可與NNV病毒產生中和反應。此單元抗體可產生被動免疫,但仍未有活體試驗結果(Lai *et al.*, 2002)。將NNV病毒及病毒鞘蛋白被注射入兔子體內,會產生多元抗血清,在攻擊試驗時會對培養的細胞產生保護的效果(Hegde *et al.*, 2002)。

目前魚類的病毒性疾病尚無治療的藥物可供使用,因此應用疫苗免疫為防治病毒感染的一種可行方法,疫苗的種類可分為殺死疫苗、減毒疫苗、重組疫苗、次單元疫苗及DNA疫苗、其中DNA疫苗有成本較殺死疫苗低,安全性較減毒疫苗高,同時可能激發細胞性及體液性免疫,以往的實驗結果顯示:Lorenzen等人在 1998 年以鮭魚的VHSV G-protein及N-protein作為DNA疫苗,接種後發現在活體血清中有抗體產生(Lorenzen *et al.*, 1998)。2003 年Sommerset等人以比目魚的結病毒G-protein的核酸序列,藉著質體轉殖到大腸桿菌中,培養後純化出DNA疫苗,施予後發現此疫苗顯著的降低了攻擊試驗的死亡率(Sommerset *et al.*, 2003)。因此應用NNV病毒的DNA疫苗來防治臺灣養殖石斑魚的病毒性神經壞死症實為可行且有效的方法。

石斑魚是國內重要的養殖對象魚,具有很高的經濟價值,但是對於造成養殖業嚴重損失的石斑魚神經壞死病毒,並未研發出有效的預防及治療措施,有效而製造方式簡便的疫苗更顯得迫切而需要。以病毒的鞘蛋白來刺激魚體產生專一性免疫應該是一迫不及待及可行的辦法。

參考文獻：

- Arimoto, M., Mori, K., Nakai, T., Moroga, K., and Furuuwa. I.(1993). Pathogenicity of the causative agent of viral nervous necrosis disease of striped jack, *Pseudocaranx dentex*(Block & Schneider). *Journal of Fish Diseases*. 16,461-469.
- Arimoto, M., Sato.J., Maruyama, K., Mimura, G. and Furuuwa, I. (1996). Effect of chemical and physical treatment on the inactivation of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV).*Aquaculture*. 143, 15-22.
- Chi S. C., Lo B. J and Lin S. C.(2001) Characterization of grouper nervous necrosis virus(GNNV). *Journal of Fish Diseases*. 24,3-13.
- Chi S. C., Hu W. W. and Lo B. J. (1999) Establishment and characterization of a continuous cell line (GF-1) derived from grouper, *Epinephelus coioides* (Hamilton) : a cell line susceptible to grouper nervous necrosis virus (GNNV). *Journal of Fish Diseases*. 22,173-182.
- Comps, M., Trindade, M. and Delert, C. L. (1996). Investigation of fish encephalitis viruses(FEV) express in mariner fishes using DIG-labelled probes. *Aquaculture*. 143, 113-121.
- Hegde A., Chen C. L., Qin Q. W., Lam T. J and Sin Y. M.(2002) Characterization, pathogenicity and neutralization studies of a nervous necrosis virus isolated from grouper, *Epinephelus tauvin*, in Singapore. *Aquaculture*. 213,55-72.
- Frerichs, Y., Neuyen, H. D., Furuhashi. M. and Nakai, T. (1996). Mass mortality of cultured sevenband grouper, *Epinephelus septemasciatus*, associated with viral nervous necrosis.

- Fish Pathology. 31,165-170.
- Lai Y. S., Joseph A. C. J., Guo I. C., Chen S. C., Fang K. and Chang C. Y.(2002) In vitro efficiency of intra- and extracellular immunization with mouse anti-YGNNV antibody against yellow grouper nervous necrosis virus. *Vaccine*.20,3221-3229.
- Lai T. S., Chiu H. C., Ju H. Y., Lin Y. S., Chen S. C., Guo I. C., Fang K. and Chang C. Y.(2001) Propagation of yellow grouper nervous necrosis virus (YGNNV) in a new nodavirus-susceptible cell line from yellow grouper, *Epinephelus awoara*(Temminck & Schlegel), brain tissue. *Journal of fish diseases*.24, 299-309.
- Le Breton, A., Grisez, L., Sweetman. J. and Ollevier, F. (1997). Viral nervous necrosis (VNN) associated with mass mortalities in cage-reared sea bass, *Dicentrarchus labrax*(L.). *Journal of Fish Diseases*. 20, 145-151.
- Lorenzen N., Lorenzen E., Einer-Jensen K., Heppell J., Wu T and Davis H.(1998) Protective immunity to VHS in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Qalbaum) following DNA vaccination. *Fish & Shellfish Immunology*. 8,261-270.
- Munday, B. L. and Kwang, J. and Moody, N. (2002) Betanodavirus infection of teleost fish: a review. *Journal of Fish Diseases*. 25, 127-142.
- Nishizawa T., Mori K., Nakai T., Furusawa I. And Muroga K. (1994) Polymerase chain reaction (PCR) amplification of RNA of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Diseases of Aquatic Organisms*. 18,103-107.
- Sommerset I., Lorenzen E., Lorenzen N., Bleie H. and Nerland A. H.(2003)A DNA vaccine directed against a rainbow trout rhabdovirus induces early protection against a nodavirus challenge in turbot. *Vaccine*. 21,4661-4667.
- Valle, D. L., Zanella L., Patarnello P., Paolucci L., Belevedere P and Colombo L.(2000) Development of a sensitive diagnostic assay for fish nervous necrosis virus based on RT-PCR plus nested PCR. *Journal of Fish Diseases*. 23,321-327.
- Yoshikoshi, K. and Inoue K. (1990) Viral nervous necrosis in hatchery-reared larvae and juvenile of Japanese parrotfish, *Oplegnathus fasciatus* (Temminck & Schelgel). *Journal of Fish Disease* 13,69-77.

四、研究方法

1. 病毒感染GBC-1 細胞株

以 10^3 TCID₅₀/ml的GNNV，感染石斑魚腦細胞株GBC1(Grouper Brain Clone-1)，經吸附 30 分鐘後，以PBS清洗 3 次，加入含 2%FCS的L-15 培養基，於 31 的恆溫箱中培養 7-10 天。待明顯的CPE(Cytopathogenic effect)出現後，收集培養液與細胞。

2. 病毒RNA的抽取

GNNV 感染的 GBC1 細胞以 DEPC 處理之 PBS 清洗 2 次後，加入 1ml 之 TRIZOL(Gibco)分解細胞，待此溶液分裝至 1.5ml 離心管中，加入 0.2ml 之氯仿，搖晃數分鐘後，10000g 離心 15 分鐘，收集上層液至另一新的離心管，再加入兩倍量之異丙醇，混勻後至於 -20 15 分鐘，10000g 離心 15 分鐘沉澱 RNA。沉澱

物以 75%酒精清洗多餘的鹽類後，10000g 離心 15 分鐘，去除酒精後風乾，再溶於 50ul的水中。檢測純化之RNA純度，A260/A280 應在 1.8 以上。

3. RT-PCR反應

將抽取的病毒RNA為模板，利用NNV RNA2 核酸序列所設計的引子對(NNV-F及NNV-R)進行RT-PCR反應，以增殖病毒蛋白質DNA；先將 1 μ l病毒 RNA加入 100 μ M引子(NNV-R 5'-ACC CAA CAG CCC AAC GAG C-3')，0.2mM dNTPs，PCR buffer(15mM Tris-HCl, pH8.0, 50mM KCl, 2mM MgCl₂)，25mM MCl₂ 及 MMLV reverse transcriptase共 20 μ l於 42 反應 1 小時。在 99 破壞MMLV reverse transcriptase後，加入 80 μ l含 1 unit Taq polymerase、0.2mM dNTPs、PCR buffer及 100 μ M引子(NNV-F 5'-AAG TCA AAA TGG TAC GCA A-3')的反應液進行PCR反應，反應條件為以 94 denature 5 分鐘，之後以 94 30 秒；50 30 秒；72 1 分鐘進行 40cycles，最後 72 5 min結束反應。

4.核酸電泳分析

PCR的產物以 1.5% 洋菜膠電泳分析。膠體利用EtBr染色後，以紫外燈箱觀察並照相記錄之。

5.基因轉殖與菌株的篩選

將步驟 3. PCR所得的NNV 病毒蛋白質鞘DNA與帶有真核生物啟動子的質體 pTarget T mammalian Express vector(Promega)於 14 結合 16 小時，再Transform到大腸桿菌JM109 中，於含有Ampicillin 37 下培養 18 小時，篩選含有病毒蛋白質鞘DNA的菌株。

6.基因轉殖大腸桿菌菌株的確認

利用市售質體抽取套組(Plasmid DNA Purified Kit；Promega)抽取基因轉殖成功的大腸桿菌之質體，經限制酵素Apa I 及Sac I切割後，以洋菜膠電泳分析判斷其核酸大小確認是否含有所欲選殖DNA，進而用偵測NNV的PCR引子(F2&R3)以PCR的方式再確認，同時將此質體送到民間生技公司進行基因定序的工作，以確認所轉殖的基因為NNV病毒的鞘蛋白。

7. 以此質體為疫苗轉移感染(Transfer)至石斑魚腦細胞株(GBC1)

將純化的質體與Lipofectin(Invitrogen)混合一小時，而後置放於GBC1 細胞株培養基中或利用電穿透儀以電穿透作用(Electroporation)的方式將純化的質體送入GBC1 細胞株中，於細胞的培養基中加入抗生素G-418 800 μ g/ml，篩選轉移感染成功的細胞。

8. 利用轉移感染的GBC-1 細胞株分析質體所轉譯的病毒蛋白質之表現

將含轉移感染成功的GBC-1 細胞株，進行SDS-PAGE電泳分析，確認在分子量處是否多出一條Band於 37-40kDa之間，並進行Western blot hybridization，以大鼠抗NNV抗體確認細胞所產生的病毒鞘蛋白與病毒本身的鞘蛋白質一致。

五、結果與討論

實驗結果顯示：10³ TCID₅₀/ml 的 GNNV，可順利的感染石斑魚腦細胞株 GBC1(Grouper Brain Clone-1)，在感染 7-10 天後，可產生明顯的 CPE(Cytopathogenic effect)，在抽取病毒的 RNA 後，以一般偵測魚類神經壞死病毒 NNV 所用的引子(NNV-F2&R3)，進行 RT-PCR 反應，可得產物約 426 bp，進而利用病毒 RNA2 所設計的專一性引子 NNV-F 及 NNV-R，

亦可有效的增殖病毒蛋白質鞘片段基因，其產物約 1345bp(圖一)，此 PCR 產物包含完整的增殖病毒蛋白質鞘基因，因此將此段 DNA 經與質體 pTarget T mammalian Express vector(Promega)結合，再轉形(Transform)至大腸桿菌 JM109 中，以 Ampicilling 篩選含病毒蛋白質鞘基因的菌株共 24 株。在利用市售質體抽取套組(Plasmid DNA Purified Kit;Promega)抽取基因轉殖成功的大腸桿菌之質體後，經限制酵素 Apa I 及 Sac I 切割，以 1.5%洋菜膠電泳分析確認此 24 個質體皆含有所欲選殖的 DNA 片段，同時亦用偵測 NNV 的 PCR 引子(F2&R3)，以 PCR 的方式再確認，同時將一質體送到民間生技公司進行基因定序的工作，確認所轉殖的基因確實為 NNV 病毒的鞘蛋白。

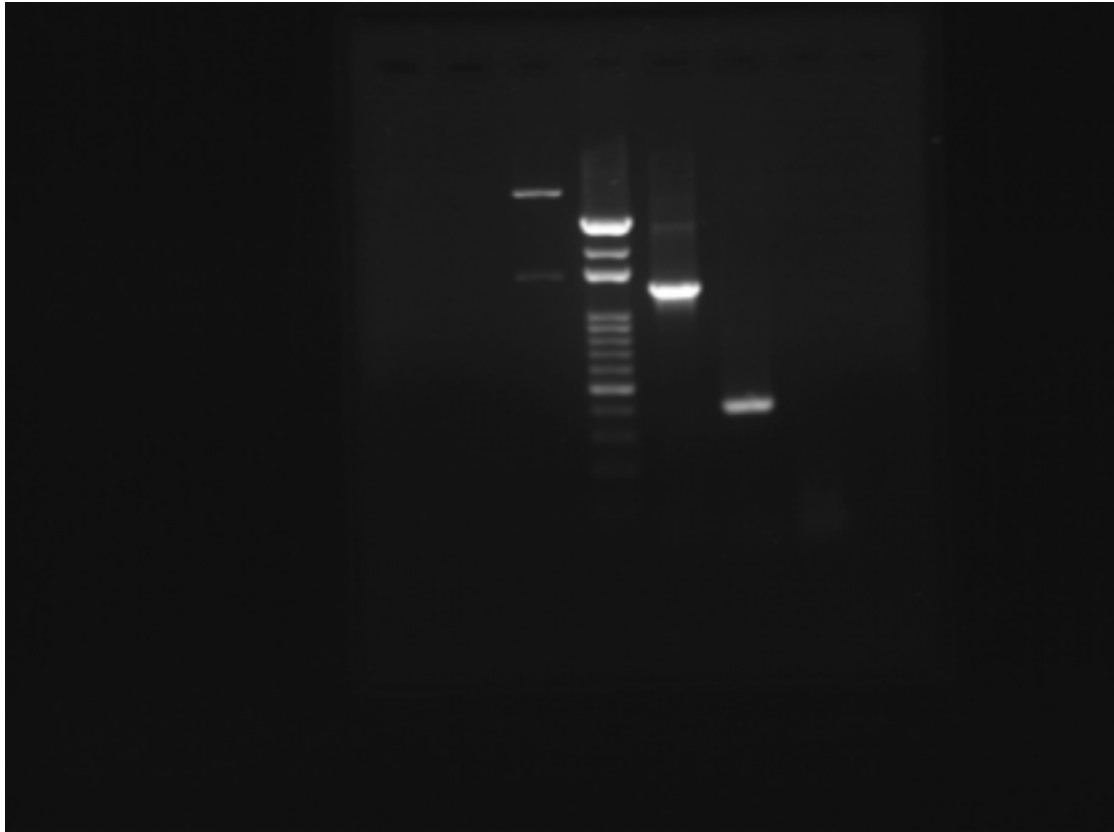
將純化的質體與Lipofectin(Invitrogen)混合一小時，而後置放於GBC1 細胞株培養基中或利用電穿透儀以電穿透作用(Electroporation)的方式將純化的質體送入GBC1 細胞株中，並於細胞的培養基中加入抗生素G-418 800 μ g/ml以篩選轉移感染成功的細胞，結果顯示電穿透作用的效果比Lipofectin好，在 25cm² 的細胞培養盒中，Lipofectin的轉移感染在抗生素 G-418 一個月的篩選後只有 5-10 個細胞菌落(Clone)存活，但電穿透作用者常有 20-50 個 clone。

將殘存的轉移感染細胞繼續以含 G-418 的 L-15(10%FCS)培養基培養，經 1-2 個月後進行 10%SDS-PAGE 電泳分析，再利用大鼠抗 NNV 抗體(本實驗室自己免疫大鼠所得)以西方雜交的方式，確認細胞是否產生 NNV 病毒的鞘蛋白，結果如圖二所示，經轉移感染再以抗生素 G-418 篩選所得的轉移感染成功細胞，與大鼠抗 NNV 抗體在 42KDa 處多出一條蛋白質 Band，因此推論此含病毒蛋白質鞘基因的質體可成功的在魚類細胞株 GBC1(Grouper Brain Clone-1)轉譯病毒的蛋白質，因此此質體應可做為 NNV 病毒的疫苗，應用至石斑魚苗的活體實驗，進而利用此 DNA 疫苗於產業，以防治 NNV 的感染。

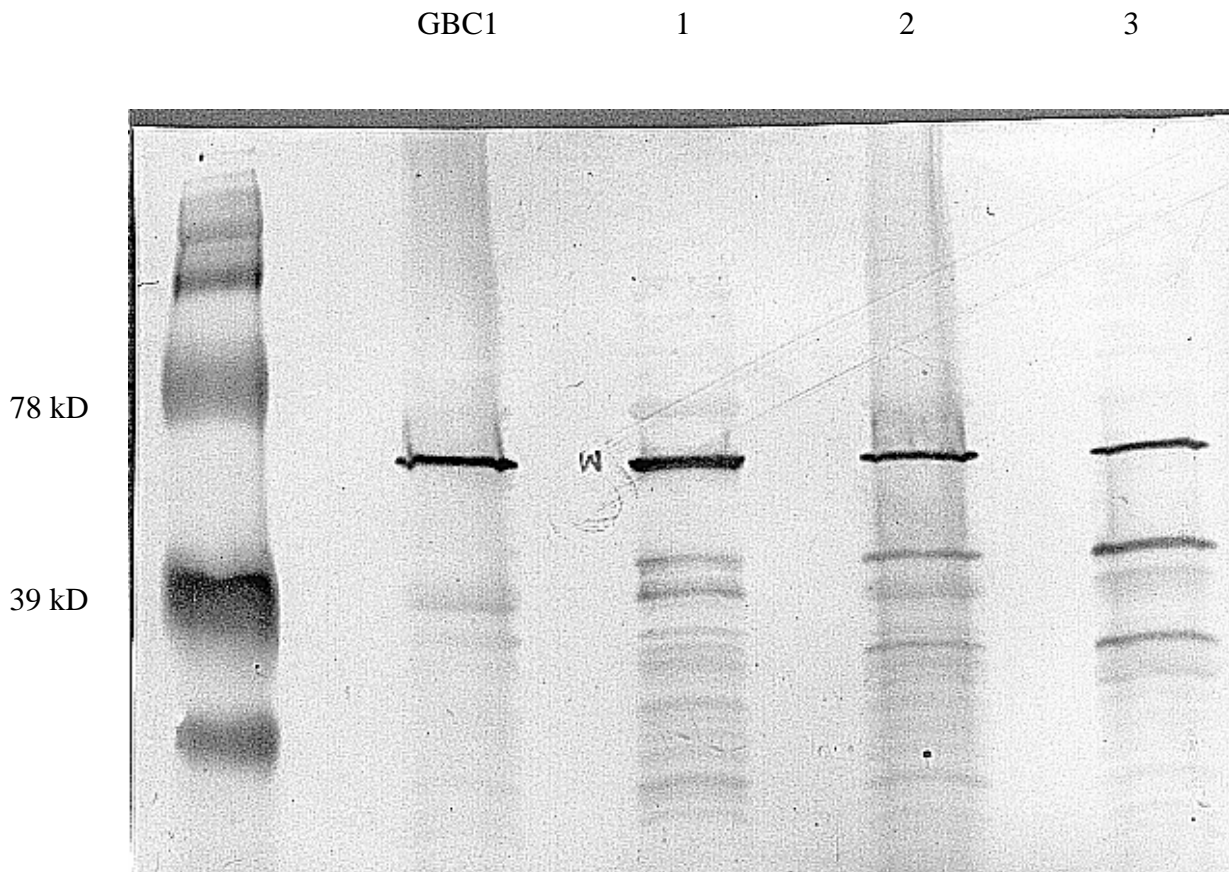
六、計畫成果自評

本計畫針對感染石斑魚的神經壞死病毒(Nervous Necrosis Virus ;NNV)，抽取其 RNA，進而利用針對此病毒鞘蛋白基因 RNA2 的專一性引子(NNV F&R)，以 RT-PCR 的方式增殖後，再與含真核生物啟動子(Promoter)的表現質體接合，經質體轉形(Transform)至大腸桿菌中，篩選培養、純化含有病毒鞘蛋白基因的大腸桿菌質體，以此質體為疫苗轉移感染至石斑魚腦細胞株(GBC1)中，經 G-418 抗生素篩選細胞後、利用大鼠抗 NNV 抗體以西方雜交的方式判斷此細胞株是否產生神經壞死病毒的蛋白質鞘，結果顯示此含病毒蛋白質鞘基因的質體可成功的在魚類細胞株 GBC1(Grouper Brain Clone-1)轉譯病毒的蛋白質，因此此質體應可做為 NNV 病毒的 DNA 疫苗，應用至石斑魚苗的活體實驗，進而利用此 DNA 疫苗於產業，以防治 NNV 的感染。但由於此計畫原預計兩年完成，卻只核准一年，因此有關第二年將進行的魚類活體實驗，魚體對於 NNV 的免疫反應及防治成效的評估不及完成實為可惜。

M NNV NNV
FR F₂R₃



圖一 1.5% 洋菜膠電泳分析，利用魚類神經壞死病毒 NNV 的蛋白質鞘基因專一性引子 NNV-F 及 NNV-R，以 RT-PCR 的方式增殖病毒蛋白質鞘片段基因，其產物約 1345bp(NNV-F 及 NNV-R)。NNVF₂R₃ 為一般偵測魚類神經壞死病毒 NNV 所用的引子，其產物約 426 bp，M 為 100 bp ladder marker。



圖二 Western blot hybridization , 10% PAGE 聚丙烯膠電泳分析後 , 以 rat anti-NNV antibody (2000X dilute)及 anti-rat antibody-HRP(5000X dilute) 進行西方雜交反應 , 可見約 42KDa 多產生一條 Band , GBC1 為 Control 的細胞 , 1、2、3 為成功轉移感染成功的 GBC-1 細胞株。