

公開
密件、不公開

執行機關(計畫)識別碼：150201F102

行政院農業委員會漁業署九十七年度科技計畫研究報告

計畫名稱：**重要養殖種類無特定病原(SPF)水產種苗之生產技術之開發與應用(2)** (第1年/全程1年)
(英文名稱) **Developing techniques for producing specific pathogen free (SPF) larvae grouper (2)**

計畫編號：**97農科-15.2.1-漁-F1(2)**

全程計畫期間：**97年7月1日至97年12月31日**
本年計畫期間：**97年7月1日至97年12月31日**

計畫主持人：**林正輝**
執行機關：**國立台灣海洋大學**



目 錄

目 錄	-----	<i>i</i>
中英文摘要	-----	<i>ii</i>
前 言	-----	1
材料方法	-----	1
結 果	-----	2
討 論	-----	2
參考文獻	-----	3
附 錄	-----	4

中文摘要

本計畫將利用主動免疫或被動免疫生產無特定病原之石斑魚苗，今年度將以抗 NNV 雞蛋抗體 IgY 或 NNV 次單位疫苗處理，生產無 NNV 病毒之石斑種苗。先利用含 IgY 之蛋粉或 NNV 次單元疫苗浸泡處理石斑魚苗，並評估 IgY 蛋粉及 NNV 次單元疫苗之保護效力，石斑魚花經 IgY 蛋粉(1 g/l)及 NNV 次單元疫苗(1 mg/l)浸泡處理組之活存率比對照組高約兩倍。

Abstract

In this plan, we will try to produce specific pathogen free larvae grouper by positive and negative immunization. The fertilized eggs were treated with IgY or with NNV subunit vaccine. The protection effects of IgY and NNV subunit vaccine were estimated by the mortality rate. The mortality of treatment with IgY or with NNV subunit vaccine is 50 % lower than control.

前 言

石斑魚為高經濟價值魚種，在市場具有相當的潛力。94年總產量約1萬3千公噸，總產值約27億元；在外銷方面，年出口量約4百公噸，佔總生產量的3.6%，總出口額約3千4百萬元，主要外銷到香港、大陸。由於石斑魚廣受東南亞各國重視，加上魚苗供不應求，致使魚苗售價高居不下，故國內外已有許多學者、業者陸續成功繁殖出石斑魚苗，例如台灣在2006年即生產4,308萬尾魚苗，產值高達2億6千萬元。石斑魚的種苗生產技術已有突破性的發展，主要歸功於種魚的催熟與產卵技術及餌料生物的大量培養等關鍵技術之確立。石斑魚種苗培育之主要瓶頸為活存率非常低，致魚苗價格高，因此增加種苗培育之活存率為日後努力發展之方向。石斑魚之病源在病毒方面有神經壞死病毒(NNV)、石斑魚虹彩病毒(GIV及TGIV)、淋巴囊腫病毒(LCDV)等。在魚苗階段主要遭受NNV感染，造成大量死亡。因此本計畫擬利用疫苗接種，生產無特定病源之石斑魚苗。石斑魚俗稱「鱸魚」或「過魚」，是臺灣重要的養殖經濟魚種。石斑魚自民國64年開始在澎湖地區試養成功後，臺灣南部地區業者，紛紛加入石斑魚養殖，產量逐年增加，至今已成為台灣重要養殖魚類。石斑魚苗生產利潤高，但目前因為疾病問題，成功再現率極低，約低於1%。石斑魚苗常感染神經壞死病毒(Nervous Necrosis Virus, VNN)及虹彩病毒(Grouper iridovirus, GIV)造成大量死亡。病毒性神經壞死症(Viral Nervous Necrosis, VNN)是國際水產養殖業之惡夢，在其他高價魚種如鱸魚、比目魚、海鱸、多種石斑、紅杉、鮫魚等都曾遭受神經壞死病毒(Nervous Necrosis Virus, VNN)的感染。到目前為止NNV已知可感染至少十二個科中的二十種海水魚，此病毒也是目前全世界海水魚養殖上最重要的病毒。石斑魚從受精卵孵化到2吋苗的這段期間內，小魚經常會有不正常如旋轉般的游動情況，體色變深，死亡率極高，有時甚至高達90~100%，造成養殖業者的極大損失。神經壞死病毒顆粒為無套膜之二十面體，基因相當簡單只含二條單股的正股RNA: RNA1核酸長度約為3 Kbs，轉譯之蛋白產物為約100 KDa的非結構蛋白，功能為RNA-dependent RNA polymerase。RNA2核酸長度約為1.4Kbs，轉譯的蛋白產物為約42 KDa的病毒外鞘蛋白。病毒外鞘蛋白可利用生物技術製造，當作疫苗。目前由於魚類病毒性疾病並無任何治療性藥物，利用疫苗事前預防是控制此類病害唯一的方法。由於NNV造成的嚴重死亡多發生在魚苗時期，以石斑魚為例，多半大量發病都在白身到體長兩吋以內的魚苗，在魚苗期施用疫苗是魚用疫苗研發上的重大挑戰。

材料方法

1. 抗NNV雞蛋白抗體IgY之製備：

將純化之NNV經滅毒處理，並配合雞場對蛋雞進行免疫注射，收集NNV注射之蛋雞所生之雞蛋，純化具抗NNV之雞蛋白抗體IgY。

2. NNV次單位疫苗之製備：

本實驗室已將NNV外鞘蛋白基因接入基因表現載體，並可利用大腸桿菌製造NNV之外鞘蛋白，當作次單位疫苗。

3. 抗NNV雞蛋白抗體IgY與NNV次單位疫苗之效果評估：

收集石斑魚魚花，分別以抗NNV雞蛋白抗體IgY或NNV次單位疫苗處理，於孵化後4星期觀察魚苗活存率。

魚苗約2cm分別浸泡組(1 mg/l)及投餵組(250 mg/Kg)NNV次單位疫苗，投餵組每週投餵一

次。4 星期後再浸泡 NNV 病毒(10^9 TCID₅₀/l)，浸泡 NNV 病毒前採樣，每組取五尾魚抽血，並以 RT-PCR 分析，確認實驗組或對照組是否受到 NNV 之感染。在浸泡 NNV 病毒後，每天觀察魚苗行為及記錄死亡情形。

結 果

1. 抗 NNV 雞蛋抗體 IgY 之製備

注射 NNV 之雞隻生蛋能力降低，因此產生之 IgY 較少，可改用 NNV coat protein 注射雞隻。

2. NNV 次單位疫苗之製備

利用 RT-PCR 選殖 NNV 外鞘蛋白基因，再接到表現載體 pET23a(圖一)，並利用大腸桿菌製造 NNV 之外鞘蛋白，當作次單位疫苗(圖二)。

3. 抗 NNV 雞蛋抗體 IgY 與 NNV 次單位疫苗之效果評估

石斑魚魚花分別以抗 NNV 雞蛋抗體 IgY(1g/l)或 NNV 次單位疫苗處理，於孵化後 4 星期觀察，抗 NNV 雞蛋抗體 IgY (1 g/l)及 NNV 次單位疫苗 (1 mg/l) 處理組魚苗活存率比對照組高約兩倍。因魚苗(約 1cm)移動會造成死亡，無法詳細計算只能目測。因此無法在第 30 天浸泡 NNV 病毒。因颱風造成大部份死亡。

剩餘部份魚苗養至約 2cm 分三組(每組 15 尾)，NNV 次單位疫苗浸泡組(1 mg/l)、投餵組(250 mg/Kg)及對照組，投餵組每週投餵一次。四星期後，每組取五尾魚抽血，並以 RT-PCR 分析，確認是否受到 NNV 之感染，對照組有兩尾(圖三)，浸泡組有一尾(圖四)，投餵組則沒有(圖五)。浸泡 NNV 病毒後，沒有死亡。

結 論

1. 完成抗 NNV 雞蛋抗體 IgY 之製備

2. 完成 NNV 次單位疫苗之製備

3. 抗 NNV 雞蛋抗體 IgY (1 g/l)及 NNV 次單位疫苗 (1 mg/l) 處理組魚苗活存率比對照組高約兩倍

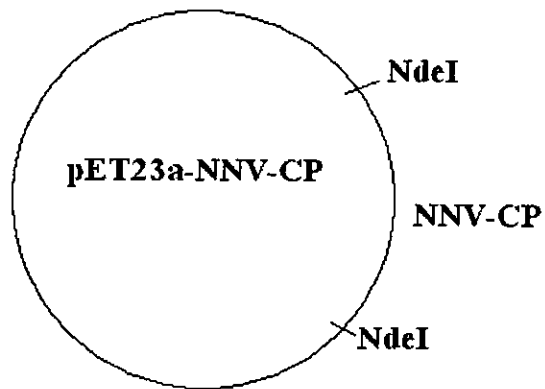
4. NNV 會影響雞隻生蛋能力，擬改用 NNV coat protein 再測試

5. IgY 及 NNV 次單位疫苗使用濃度需再測試

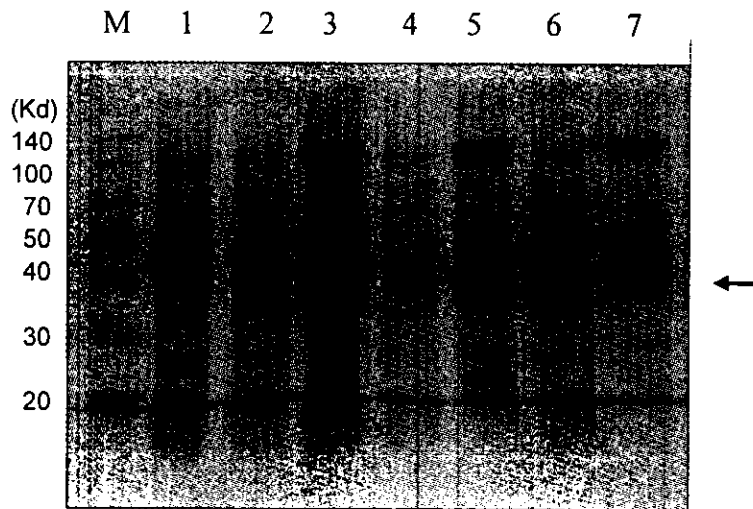
參考文獻

- Gagné, N, Johnson, SC, Cook-Versloot, M, MacKinnon, AM, and Olivier, G (2004). Molecular detection and characterization of nodavirus in several marine fish species from the northeastern Atlantic. *Diseases of Aquatic Organisms* 63, 181-189.
- Lai, Y-S, Chiu, H-C, Murali, S, Guo, I-C, Chen, S-C, Fang, K and Chang, C-Y (2001). In vitro neutralization by monoclonal antibodies against yellow grouper nervous necrosis virus (YGNNV) and immunolocalization of virus infection in yellow grouper, *Epinephelus awoara* (Temminck & Schlegel). *Journal of Fish Diseases* 24, 237-244.
- Lai, Y-S, Murali, 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.
- Lai, Y-S, John, J A C, Lin, C-H, Guo, I-C, Chen, S-C, Fang, K, Lin, C-H and Chang, C-Y (2003). Establishment of cell lines from a tropical grouper, *Epinephelus awoara* (Temminck & Schlegel), and their susceptibility to grouper irido- and nodaviruses. *Journal of Fish Diseases* 26, 31-42.
- Lu, MW and Lin, CS (2003). Involvement of the terminus of grouper betanodavirus capsid protein in virus-like particle assembly. *Archives of Virology* 148, 345-355.
- Murall, S, Wu, M-F, Guo, I-C, Chen, S-C, Yang, H-W, and Chang, C-Y (2002). Molecular characterization and pathogenicity of a grouper iridovirus (GIV) isolated from yellow grouper, *Epinephelus awoara* (Temminck & Schlegel). *Journal of Fish Diseases* 25, 91-100.
- Shieh, JR, and Chi, SC (2005). Production of monoclonal antibodies against grouper nervous necrosis virus (GNNV) and development of an antigen capture ELISA. *Diseases of Aquatic Organisms* 63, 53-60.

附錄：



圖一、pET23a-NNV-CP 之構築



圖二、NNV 外鞘蛋白經誘導表現後之電泳圖。

M: Protein marker;

1: E. coli BL21;

2: E. coli BL21(pET23a-NNV-CP) uninduced;

3: E. coli BL21(pET23a-NNV-CP) induced with IPTG for 3 hours (Total protein);

4, 6: E. coli BL21(pET23a-NNV-CP) induced with IPTG for 3 hours (soluble protein);

5, 7: E. coli BL21(pET23a-NNV-CP) induced with IPTG for 3 hours (insoluble protein).

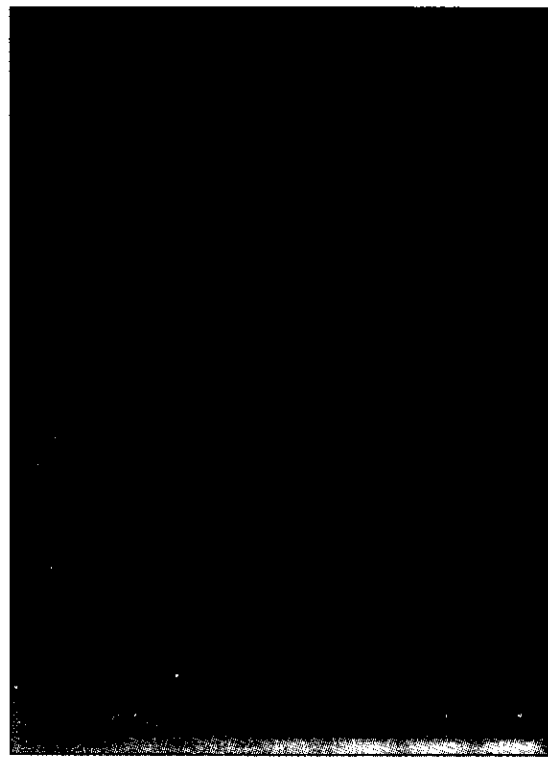
Arrow shown is NNV coat protein.

(A)



M 1 2 3 4 5

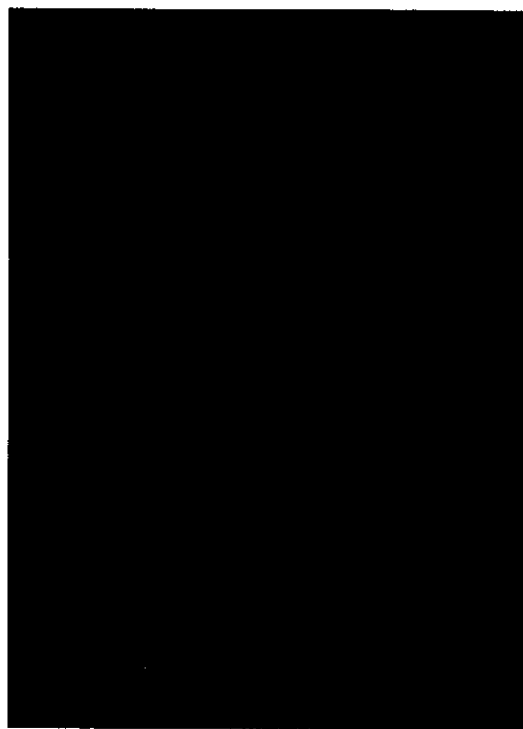
(B)



M 1 2 3 4 5

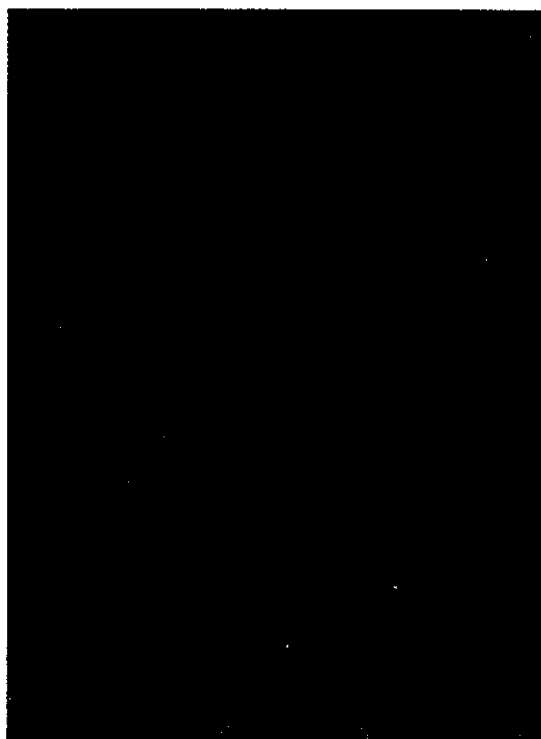
圖三、對照組 NNV 檢測電泳圖。(A)RT-PCR；(B)Nest PCR。

(A)



1 M 2 3 4 5

(B)



1 M 2 3 4 5

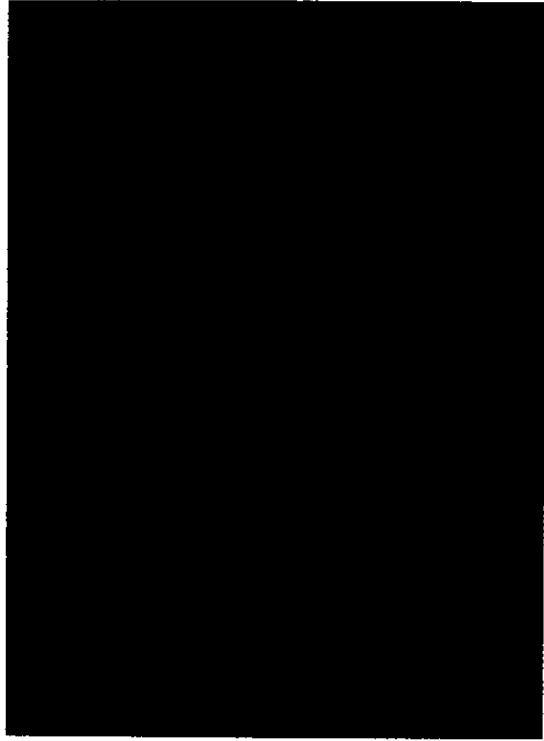
圖四、浸泡組 NNV 檢測電泳圖。(A)RT-PCR；(B)Nest PCR。

(A)



1 2 M 3 4 5

(B)



1 2 M 3 4 5

圖五、投餵組 NNV 檢測電泳圖。(A)RT-PCR；(B)Nest PCR。