

间接 ELISA 技术在病原性鳃弧菌 SMP1 快速检测中的应用

邹玉霞¹, 莫照兰¹, 高 光³, 刘 婷^{1,2}, 张培军¹

(1. 中国科学院 海洋研究所 实验海洋生物学开放实验室, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院 研究生院, 北京 100049; 3. 汕头大学 海洋生物研究所, 广东 汕头 515063)

摘要:以大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)出血症的病原菌——鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*) SMP1 为抗原, 制备兔抗血清, 测定了抗血清的工作浓度和对抗原的特异性, 建立了在大菱鲆肝肾组织中检测 SMP1 的间接 ELISA 方法。SMP1 人工感染大菱鲆, 用建立的间接 ELISA 对大菱鲆肾脏和肝脏进行检测, 结果肾脏的阳性检出率为 87.7%, 肝脏的阳性检出率为 90%。该方法的建立有助于快速准确地鉴定由 SMP1 引起的大菱鲆疾病。

关键词: 间接 ELISA; 鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*); 检测; 大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)
中图分类号: Q819 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2007)06-0075-04

大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)是欧洲名贵海水鱼种, 中国于 1992 年引进大菱鲆进行人工繁殖, 现已达到大规模生产。然而随着养殖规模的扩大, 大菱鲆的疾病也日渐突出^[1]。作者从患出血症的大菱鲆中分离到一株致病菌 SMP1, 经鉴定为鳃弧菌^[2]。鳃弧菌是鱼类弧菌病的重要病原, 丹麦学者 Sorensen 和 Larsen^[3] 将鳃弧菌分为 10 个血清型, 即 O1~O10。其中 O1, O2, O3 型是主要的病原, O2 和 O3 进一步分为 O2a 和 O2b 亚型, O3A 和 O3B 亚型。弧菌性疾病危害面大, 传播速度快, 传统的微生物培养的方法已经不能满足病害防治的需要, 因此建立快速、灵敏、准确的诊断技术在大菱鲆弧菌病的防治中有着十分重要的意义。酶联免疫吸附实验(ELISA)因其灵敏度高、可重复性强、易制成检测特定种类病原菌的商品性试剂盒、更适合于野外操作及大量样品的检测而在病原检测中有着突出的优点^[4], 已被证明是鱼类细菌性及病毒性疾病的快速检测方法^[5-9]。Snow 等^[10] 建立了出血性败血症病毒(VHSV)的 ELISA 检测方法, 用来检测感染的大菱鲆, 对大菱鲆 VHSV 感染的防治具有重要的参考价值。作者以大菱鲆病原菌——鳃弧菌为研究对象, 探讨了对肝肾样品的处理方法, 建立起检测该病原菌的间接 ELISA 方法, 并用该方法从大菱鲆中检测出鳃弧菌, 以期为大菱鲆病害的防治提供依据。

1 材料与方 法

1.1 试剂与仪器

1.1.1 试剂

包被液: 碳酸缓冲液, 0.01 mol/L, pH 9.6; 封闭

液: 用 0.01 mol/L PBS 配制的 2% 牛血清白蛋白(BSA); 洗涤液: 0.01 mol/L PBS, pH 7.2; 酶标二抗: 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔血清(HRP-IgG, 北京鼎国生物有限公司产品); 底物溶液: 用磷酸盐-柠檬酸盐缓冲液(pH 5.0)配制的邻苯二胺(OPD, 北京鼎国生物公司产品), 加 30% H₂O₂, 终体积比为 1.5 mL/L, 使用前配制; 终止液: 2 mol/L H₂SO₄。

1.1.2 仪器

聚苯乙烯 96 孔微量板, 国产; 生化培养箱, 上海跃进医疗器械厂; 酶标仪(precision microplate reader, Emax 公司)

1.2 实验菌株

菌株 SMP1 分离于患急性出血症的大菱鲆, 人工感染后确定为病原菌, 经鉴定为鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)^[2]。

1.3 抗原的制备

将菌株 SMP1 接种于 2216E 斜面, 28℃ 培养 24 h, 用包被液洗脱下来, 加入 0.5% 的福尔马林溶液, 60℃ 恒

收稿日期: 2004-10-18; 修回日期: 2005-07-27

基金项目: 国家 863 计划资助项目(2003AA622070); 国家自然科学基金资助项目(30471335); 青岛市科技计划项目(04-2-JS-132)

作者简介: 邹玉霞(1973), 女, 山东龙口人, 博士, 主要从事海洋微生物及水产动物病害研究; 莫照兰, 通讯作者, E-mail: zhlm0@ms.qdio.ac.cn

温 1 h 灭活, 经检验无活菌后, 调节菌液浓度为 10^8 个/mL, 置于 4℃ 备用。

1.4 免疫血清的制备

选择体质量为 2~2.5 kg 的新西兰纯种健康雄性大白兔 2 只, 兔耳静脉免疫注射, 初次免疫剂量为 0.5 mL, 第三周和第四周各加强一次, 注射剂量为 1 mL, 第五周静脉取血少量, ELISA 方法测定抗体效价, 当效价大于 5 000 时, 心脏采血, 采集的兔血清静置 2 h 后, 4℃ 过夜, 低速离心 (2 500 r/min, 10 min) 取血清, 再经 56℃ 处理 10 min, 以去除血清中的补体。制备好的抗体血清分装小离心管后, -20℃ 保存。

1.5 间接 ELISA 一抗的效价及一抗工作浓度的确定

以培养的 SMP1 菌悬液为抗原, 经福尔马林减毒后再热处理 (60℃, 1 h)。固定抗原的浓度 (10^7 个/mL), 系列稀释抗血清 (体积比为 1: 500~1: 8 000), 用间接 ELISA 技术测定抗体效价及最佳工作浓度。

1.6 免疫血清特异性的测定

弧菌属的细菌共 11 株, 由中国科学院微生物研究所提供, 同一种菌不同的菌号代表不同的来源。测定其与所制备的鳃弧菌 SMP1 兔抗血清的交叉反应来判断抗血清的特异性。

1.7 间接 ELISA 灵敏度

包被抗原, 抗原浓度分别是 10^8 , 2×10^7 , 10^7 , 2×10^6 , 10^5 , 10^4 个/mL, 每孔加入 100 μ L, 每个浓度设 3 个平行。60℃ 烘箱 7 h, 加入一抗后 37℃ 温育 1 h。其余步骤见文献 [11]。

1.8 间接 ELISA 对人工感染大菱鲆的检测

将 SMP1 接种于新鲜的 2216E 斜面上, 培养 22 h, 无菌生理盐水下洗, 并稀释至 10^8 个/mL, 取 0.1 mL 注射到健康的大菱鲆肌肉中, 3 d 后无菌操作取濒死大菱鲆的肾脏, 加入 0.7 mL 无菌生理盐水于均浆器内研磨, 加入终浓度为 0.5% 的甲醛。肝的组织匀浆液 4℃ 3 000 r/min 离心 2 min; 肾的组织匀浆液 60℃ 加热 30 min 后, 4℃ 700 r/min 离心 5 min。离心的上清液滤纸过滤。同时取健康的未感染的大菱鲆的肝肾组织作对照。每个抗原稀释度设 2 个平行, 结果取平均值。

2 结果与讨论

2.1 免疫血清抗体的最佳工作浓度

采用交叉连续稀释分析法 [12] 确定免疫血清的最佳工作浓度。抗原浓度恒定 (10^7 个/mL), 调节免疫血清抗体的稀释体积比 1: 500~1: 8 000, 酶标二抗的工作浓度采用厂家推荐的稀释体积比 1: 1 000。经间接 ELISA 反应后, 在 $\lambda = 492$ nm 的吸收值见图 1。

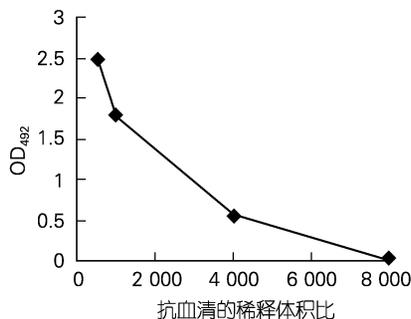


图 1 间接 ELISA 技术测定不同稀释度的免疫血清的吸收值

Fig. 1 The determination of OD₄₉₂ of different titers of antiserum by indirect ELISA method

由图 1 可见, 制备的兔免疫血清用间接 ELISA 测定的效价为 1: 8 000, 最佳工作浓度取最大和最小吸收值的中间值, 为 OD₄₉₂ = 1.25, 即抗血清的稀释度为 1: 3 000。

2.2 特异性的测定

用间接 ELISA 测得的免疫血清与弧菌属的其他菌的交叉反应见表 1。从表 1 可以看出, SMP1 的兔抗血清与表中列出的菌不发生交叉反应, 说明制备的抗血清特异性较好。

表 1 不同弧菌对抗血清的交叉反应

Tab 1 The specificity of the antiserum

细菌名称	菌号	交叉反应
坎贝氏弧菌 (<i>Vibrio campbelli</i>)	1.1597	-
坎贝氏弧菌	1.1596	-
哈维氏弧菌 (<i>Vibrio harveyi</i>)	1.1593	-
哈维氏弧菌	1.1601	-
灿烂弧菌 (<i>Vibrio splendidus</i>)	1.1604	-
灿烂弧菌	1.1606	-
溶藻胶弧菌 (<i>Vibrio alginolyticus</i>)	1.1607	-
河流弧菌 (<i>Vibrio fluvialis</i>)	1.1608	-
河流弧菌	1.1609	-
河流弧菌	1.1610	-
鳃弧菌 (<i>Vibrio anguillarum</i>)	M3	-

2.3 间接 ELISA 的灵敏度

如表 2 所示,当菌体浓度大于等于 10^5 个/mL 时, OD_{492} 大于对照值的 2 倍,故判定为阳性。当菌体浓度为 10^4 个/mL 时, OD_{492} 小于对照值的 2 倍,故判定为阴性。所以间接 ELISA 可检测的菌体浓度大于等于 10^5 个/mL,由于加样量为 0.1 mL,所以其灵敏度为 10^4 个。

表 2 间接 ELISA 的灵敏度

Tab. 2 The sensitivity of indirect ELISA

菌体浓度(个/mL)	OD_{492}
10^8	3.33
2×10^7	3.07
10^7	2.76
2×10^6	1.07
10^5	0.3
10^4	0.17
0	0.11

2.4 间接 ELISA 对大菱鲆肾脏中 SMP1 的检测

在对 30 条人工感染的大菱鲆的肝和肾组织进行检测,发现肝组织的检测阳性率达 90%,肾组织的阳性率为 87.7% (表 3)。

3 讨论

快速、准确地确定大菱鲆病原种类是进行“对症下药、及时治疗”的先决条件。作者建立了检测鱼类弧菌病重要病原——鳃弧菌 SMP1 的间接 ELISA 技术。该技术检测的灵敏度可达 10^4 个,与余俊红^[13]的方法检测的灵敏度一致,并利用建立的间接 ELISA 技术从大菱鲆的肝脏和肾脏中检测出 SMP1。对鱼组织进行检测的关键,除了免疫血清要具有高度特异性以减少非特异性吸附外,对组织匀浆液的处理也是很关键的。匀浆液中有相对较大组织块,需要离心去除,但离心速度不能太大,否则病原菌也会被离心去除,影响检测效果。另外,匀浆液中的酶也需要灭活。作者对余俊红的方法进行了改进,经过多次实验,采用对组织匀浆液 0.5% 甲醛固定,肝组织匀浆液 4°C 3 000 r/min 离心 2 min;肾的组织匀浆液 60°C 加热 30 min 后, 4°C 700 r/min 离心 5 min;并将离心的上清液用滤纸过滤,对肝和肾分别取得了 90% 和 87.7% 的阳性检测率,表明所建立的间接 ELISA 方法可以较好地用于检测由 SMP1 引起的大菱鲆疾病,对于大菱鲆疾病的防治有重要意义。

表 3 间接 ELISA 技术对大菱鲆肝组织和肾组织中鳃弧菌 SMP1 的检测结果

Tab. 3 The test of *Vibrio anguillarum* on the liver and kidney of turbot

样品编号	肝 脏		肾 脏	
	OD_{492}	结果	OD_{492}	结果
010	2.581	+	0.119	-
011	0.926	+	1.805	+
012	2.075	+	0.588	+
013	2.727	+	1.091	+
014	2.225	+	0.159	+
015	1.623	+	0.955	+
016	2.300	+	1.870	+
017	1.426	+	1.391	+
018	2.377	+	1.206	+
019	2.569	+	1.099	+
020	1.732	+	0.249	+
021	1.873	+	0.102	-
022	1.905	+	0.460	+
023	1.016	+	0.601	+
024	2.088	+	1.618	+
025	1.356	+	0.806	+
026	0.09	-	0.528	+
027	1.272	+	0.909	+
028	1.561	+	0.490	+
029	1.807	+	0.551	+
030	1.342	+	0.809	+
031	1.546	+	0.742	+
032	1.025	+	0.558	+
033	1.451	+	0.465	+
034	0.107	-	0.09	-
035	1.111	+	0.875	+
036	1.362	+	0.741	+
037	1.004	+	0.663	+
038	1.654	+	0.468	+
039	0.097	-	0.105	-

注:均已扣除对照 OD 值

参考文献:

[1] 王印庚,张正,秦蕾,等. 养殖大菱鲆主要疾病及防治技术[J]. 海洋水产研究, 2004, 25(6): 61-68.

[2] 邹玉霞,张培军,莫照兰,等. 大菱鲆出血症病原菌的分离和鉴定[J]. 高技术通讯, 2004, 14(4): 89-93.

[3] Sorensen U B, Larsen J L. Serotyping of *Vibrio anguillarum* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1986, 51: 593.

[4] 倪灿荣. 免疫组织化学实验新技术及应用[M]. 北京: 北京科技出版社, 1993.

[5] Dixon P E, Hill B J. The enzyme linked immunosor

- bent assay (ELISA) as a rapid means of detecting IPN virus in tissue cultures and diseased fish [J]. **Bull Eur Assoc Fish Pathol**, 1981, 1: 34-36.
- [6] Austin B, Bishop I, Gray C, *et al.* Monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for the rapid diagnosis of clinical cases of enteric redmouth and furunculosis in fish farm [J]. **J Fish Dis**, 1986, 9: 469-474.
- [7] Dixon P F. Detection of *Renibacterium salmoninarum* by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [J]. **J Appl Ichthyol**, 1987, 3: 77-80.
- [8] Rose A S, Ellis A E, Adams A, *et al.* An assessment of routine *Aeromonas salmonicida* carrier detection by ELISA [J]. **Bull Eur Assoc Fish Pathol**, 1989, 9: 65-67.
- [9] Romestand B, Dragesoo A, Breuil G, *et al.* An ELISA technique for rapid diagnosis of vibriosis in sea bass *Dicentrarchus labrax* [J]. **Dis Aquat Org**, 1993, 15: 137-143.
- [10] Snow M, Smail D A. Experimental susceptibility of turbot *Scophthalmus maximus* to viral haemorrhagic septicaemia virus isolated from cultivated turbot [J]. **Dis Aquat Organ**, 1999, 38: 163-168.
- [11] 朱立平, 陈学清. 免疫学常用方法 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2000.
- [12] 奥斯伯 F. 精编分子生物学实验指南 [M]. 颜子颖, 王海林译. 北京: 科学出版社, 1998.
- [13] 余俊红, 姚斐, 王宝坤, 等. 应用间接 ELISA 技术快速检测花鲈病原菌——鳃弧菌 [J]. 高技术通讯, 2001, 7: 23-27.

Use of indirect ELISA to detect pathogenic bacterium *Vibrio anguillarum* SMP1

ZOU Yuxia¹, MO Zhao-lan¹, GAO Guang², LIU Ting^{1,3}, ZHANG Perjun¹

(1. Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Graduate School, the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Marine Biology Institute, Shantou University, Shantou 515063, China)

Received: Oct. 18, 2004

Key words: indirect ELISA; *Vibrio anguillarum*; detection; *Scophthalmus maximus*

Abstract: An indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for rapid diagnosis of pathogenic *Vibrio anguillarum* has been developed. Antiserum specific for the *V. anguillarum* SMP1 was produced from a New Zealand white rabbit and used in indirect ELISA. The specificity and sensitivity of the antiserum were tested on the liver and kidney tissues of turbot, in which 87.7% out of 30 kidney samples and 90% of liver samples were positive, respectively.

(本文编辑: 刘珊珊)