

# 大黄鱼病原菌——溶藻弧菌的 ELISA 快速检测研究\*

鄢庆枇<sup>1,2</sup> 王 军<sup>1</sup> 苏永全<sup>1</sup> 皮灵宝<sup>2</sup> 刘成荣<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>厦门大学海洋学系, 亚热带海洋研究所 361005)

(<sup>2</sup>集美大学水产学院养殖系 厦门 361021)

(<sup>3</sup>莆田高等技术专科学校 351100)

**摘要** 以灭活溶藻弧菌(0.05%甲醛, 30℃, 8h)制成菌苗, 注射免疫实验兔获得抗血清。该抗血清经吸附后与副溶血弧菌、河流弧菌等 10 株对照菌株无交叉反应。用该抗血清进行溶藻弧菌 ELISA 检测, 其最低检测极限为 97 000 cfu/ml。将该方法应用于养殖现场, 检测结果为: 海水中溶藻弧菌浓度均低于最低检测限、外观健康大黄鱼肝脏中溶藻弧菌的阳性检出率为 20%、患病大黄鱼的阳性检出率为 80%, 表明 ELISA 法不仅可以用于诊断大黄鱼的溶藻弧菌病, 也可以检测无病症带菌大黄鱼。

**关键词** 大黄鱼, 溶藻弧菌, ELISA 检测

近年来, 大黄鱼养殖业发展迅猛, 仅福建省 2000 年育苗量超过  $1.3 \times 10^9$  尾, 网箱养殖大黄鱼就超过 500 000 箱, 产量近 40 000 t。但是, 随着养殖规模的扩大, 病害发生也日益频繁, 严重制约着大黄鱼养殖业的健康发展<sup>[1]</sup>。面对不断增多的病原种类, 单靠传统的微生物培养方法已经不能满足病害防治的需要。因此, 建立灵敏、快速、准确的病原检测技术已是当务之急。近年来, 已有 ELISA 技术、荧光抗体技术及 PCR 技术等应用于鲍<sup>[2]</sup>、对虾<sup>[3]</sup>和草鱼<sup>[4]</sup>等水产养殖动物的病原检测, 但尚未有大黄鱼病原菌快速检测的报道。本文以网箱养殖大黄鱼的病原菌——溶藻弧菌为研究对象, 建立起该病原菌的 ELISA 检测法, 以期为大黄鱼病害防治提供依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验菌株

溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 于 1999 年分离自患败血症大黄鱼, 经回归感染确定为大黄鱼病原菌(另文发表)。用于交叉反应试验的菌株: 副溶血弧菌 (*V. parahaemolyticus*)、河流弧菌 I (*V. fluvialis* biotype I)、河流弧菌 II (*V. fluvialis* biotype II)、坎普氏弧菌 (*V. campbellii*)、沙蚕弧菌 (*V. neresis*)、哈维氏弧菌 (*V. harveyi*)、嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 和枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*) 购自中国科学院微生物研究所。

### 1.2 抗原制备

#### 1.2.1 病原菌的灭活 溶藻弧菌用甲醛及加

热两种方法灭活, 用菌落计数法检测灭活效果。

1.2.2 抗原制备 病原菌用 0.05% 甲醛, 30℃ 灭活 8 h。免疫用菌苗浓度相当于麦氏比浊管 3 号管。

### 1.3 抗血清制备

1.3.1 实验兔 实验用新西兰兔购自上海实验兔养殖场; 实验兔饲料购自厦门建发制药厂。

1.3.2 实验兔免疫与抗血清制备 实验兔按常规方法<sup>[5]</sup>进行耳静脉注射免疫, 末次注射后 7 d 检测抗血清效价, 达到 1:1 280 以上即可从颈动脉放血提取抗血清。

### 1.4 抗血清效价及特异性测定

采用试管凝集法测定抗血清效价及交叉反应效价。凡有交叉反应的菌株, 在抗血清中加入过量的该菌细胞充分吸附后, 离心、过滤除菌。吸附后如无交叉反应, 即分装保存于 -80℃ 低温冰箱备用。

### 1.5 ELISA 检测法的建立与应用

#### 1.5.1 间接 ELISA 法的检测步骤

##### (1) 间接 ELISA 检测法

a. 将溶藻弧菌悬液稀释成  $1 \times 10^8$  菌落形成单位/ml (cfu/ml), 尔后进行一系列的双倍稀释至  $2^{-15}$ ;

b. 在酶标板各孔依次加入不同稀释度的菌液 100  $\mu$ l, 以灭菌生理盐水作阴性对照, 放置 4℃ 冰箱 24 h 进行包被, 用 PBS-Tween 洗涤孔穴 3 次, 每次 3 min;

c. 每孔加入 100  $\mu$ l 小牛血清, 于 37℃ 封闭 1 h

\* 国家 863 计划资助项目 819-02-012 和福建省科技项目“大黄鱼养殖病害防治”资助。

收稿日期: 2001-01-05; 修回日期: 2001-04-28

后用 PBS-Tween 洗涤孔穴 3 次;

d. 每孔加入 100  $\mu$ l 溶藻弧菌抗血清稀释液, 37  $^{\circ}$ C 温育 1 h 后用 PBST 洗涤孔穴 3 次;

e. 每孔加入 100  $\mu$ l HRP-羊抗兔 IgG, 37  $^{\circ}$ C 温育 1 h 后用 PBST 洗涤孔穴 3 次;

f. 每孔加入新配制的 OPD-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 底物溶液 100  $\mu$ l, 置于室温暗处作用 30 min;

g. 每孔加入 50  $\mu$ l 2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应;

h. 用酶标仪 (CliniBio 128 C) 于 492 nm 波长测定每孔的 A 值。

(2) 改良间接 ELISA 检测法

将包被改用烘箱在 60  $^{\circ}$ C 烘干, 其他的步骤与上述间接 ELISA 法相同。

1.5.2 ELISA 法的现场检测

应用改良间接 ELISA 技术检测网箱养殖大黄鱼和养殖水体中的溶藻弧菌。大黄鱼肝脏于 5 倍体积的无菌生理盐水中研磨, 取上清液检测。

2 结果与分析

2.1 溶藻弧菌的灭活条件

溶藻弧菌的灭活时间与其灭活所用的温度及甲醛浓度有密切关系。在试验范围内, 温度和甲醛浓度越高, 灭活所需的时间越短。在不加甲醛的情况下, 60  $^{\circ}$ C 作用 1 h 就能达到完全灭活的效果, 而在 30  $^{\circ}$ C 和 4  $^{\circ}$ C 下没有灭活作用。当甲醛浓度较低 (低于 0.2%) 时, 温度越低, 灭活所需时间越长。试验结果表明, 甲

表 1 不同温度及甲醛终浓度对溶藻弧菌的灭活效果

Tab.1 The inactivating effect of *Vibrio alginolyticus* in different concentrations of formaldehyde and at different temperature

灭活温度 ( $^{\circ}$ C)	甲醛浓度 (%)	效果					
		1 h	8 h	24 h	48 h	72 h	96 h
60	0.4	-	-				
	0.2	-	-				
	0.1	-	-				
	0.05	-	-				
	0	-	-				
30	0.4	-	-				
	0.2	-	-				
	0.1	+++	-	-			
	0.05	+++	-	-			
	0	+++	+++	+++	+++	+++	+++
4	0.4	+++	-	-			
	0.2	+++	+	-			
	0.1	+++	+++	++	-		
	0.05	+++	+++	+++	++		
	0	+++	+++	+++	+++	+++	+++

注: +++: 菌落数大于 300; ++: 菌落数在 100~300 之间; +: 菌落数小于 100; -: 没有菌落形成。

醛浓度 0.05%、温度为 30  $^{\circ}$ C、作用时间 8 h 为溶藻弧菌最佳灭活条件(表 1)。

2.2 抗血清效价及其特异性

由溶藻弧菌免疫新西兰兔所得的抗血清与溶藻弧菌的效价为 1:2 560, 与其他菌的效价, 除了副溶血弧菌达到 1:640 外, 其余的都低于 1:100。应用吸附法去除抗血清中的交叉反应后, 抗血清对溶藻弧菌的效价有所降低, 但与其他菌都没有交叉反应, 因此具有高度的专一性, 符合免疫学检测的要求, 可用于大黄鱼病原菌的检测。吸附前后抗血清的效价与交叉反应见表 2。

表 2 溶藻弧菌抗血清吸附处理前后效价及交叉反应情况  
Tab.2 Titer and cross reactivity titer of *V. alginolyticus* antisera before and after being absorbed

菌株	吸附前效价	吸附后效价
溶藻弧菌	1:2 560	1:1 280
副溶血弧菌	1:640	-
河流弧菌 I	1:20	-
河流弧菌 II	1:4	-
坎普氏弧菌	1:4	-
沙蚕弧菌	1:16	-
哈维氏弧菌	1:32	-
嗜水气单胞菌	1:10	-
大肠杆菌	1:80	-
金黄色葡萄球菌	1:20	-
枯草杆菌	1:4	-

注:“-”表示没有凝集反应。

2.3 ELISA 法对菌悬液的检测

间接 ELISA 检测法在溶藻弧菌浓度高达  $5 \times 10^7$  cfu/ml 时的检测结果仍是阴性, 而在养殖现场检测时样品中的菌浓度不会如此之高。用改良后的间接 ELISA 技术的检测结果在菌浓度为 97 000 cfu/ml 时就为阳性。由此可见, 改良后的间接 ELISA 检测法的检测效果更灵敏。表 3 为改良前后间接 ELISA 检测法对不同稀释度菌悬液的检测结果。

2.4 大黄鱼与养殖水体的现场检测

取网箱养殖大黄鱼病鱼与健康鱼各 10 尾以及 10 份水样进行 ELISA 检测, 以无菌生理盐水为阴性对照。养殖水体没有检出阳性结果, 病鱼的阳性率为 80%, 健康鱼的阳性检出率为 20%(表 4)。

表3 改良前后间接 ELISA 法检测溶藻弧菌悬液结果的比较

Tab.3 Comparison of the detecting results of suspension of *V. alginolyticus* by indirect ELISA method before and after improved

稀释度	间接 ELISA		改良间接 ELISA	
	OD 值	- / +	OD 值	- / +
无菌生理盐水	0.764	-	0.244	-
2 <sup>-1</sup>	1.107	-	3.699	+
2 <sup>-2</sup>	1.071	-	3.235	+
2 <sup>-3</sup>	1.068	-	2.786	+
2 <sup>-4</sup>	1.111	-	3.057	+
2 <sup>-5</sup>	1.105	-	2.749	+
2 <sup>-6</sup>	0.954	-	2.014	+
2 <sup>-7</sup>	1.020	-	1.250	+
2 <sup>-8</sup>	0.842	-	0.705	+
2 <sup>-9</sup>	0.779	-	0.469	+
2 <sup>-10</sup>	0.725	-	0.400	-
2 <sup>-11</sup>	0.748	-	0.293	-
2 <sup>-12</sup>	0.679	-	0.327	-
2 <sup>-13</sup>	0.792	-	0.413	-
2 <sup>-14</sup>	0.722	-	0.377	-
2 <sup>-15</sup>	0.717	-	0.350	-

注:溶藻弧菌悬液原浓度为  $1 \times 10^8$  cfu/ml。空白孔的 OD 值为 0.040。(样品 OD 值 - 空白 OD 值)/(阴性对照 OD 值 - 空白 OD 值) > 2 者为阳性;(样品 OD 值 - 空白 OD 值)/(阴性对照 OD 值 - 空白 OD 值) ≤ 2 者为阴性。

### 3 讨论

快速、准确地确定大黄鱼病害的病原种类是进行“对症下药、及时治疗”的先决条件。传统的病原培养鉴定方法耗时较长,一般要几天乃至几个星期才能确定病原种类,贻误了治疗时间,无法满足病害防治的需要。ELISA 检测法是一种能快速、灵敏、准确的病原检测方法。在国外,Austin 等、Romestanel 等已将 ELISA 技术应用于水产病害的快速检测。近年来,邵健忠、涂

小林、钱冬等也将 ELISA 技术应用于在国内的水产养殖病害检测。

本文在应用 ELISA 技术检测养殖大黄鱼溶藻弧菌病原研究中,对间接 ELISA 技术进行了包被技术的改良,将原来的在冰箱 4℃ 下 24 h 的包被改为在烘箱中 60℃ 烘干。经改良后的 ELISA 用于病原检测,其灵敏度明显提高,这是由于检测所用的聚苯乙烯酶标板对蛋白质的吸附效果较好,而对颗粒性物质如细菌等的吸附较差<sup>[5]</sup>,而加热烘干、甲醇固定等措施能有效促进细菌在酶标板的吸附。

表4 大黄鱼与养殖水体的 ELISA 检测结果

Tab.4 Detection of *Pseudosciana crocea* and culture seawater by ELISA

样品	检测样品数	阳性样品数	阳性检出率(%)
患病大黄鱼	10	8	80
健康大黄鱼	10	2	20
养殖海水	10	0	0

改良大黄鱼溶藻弧菌病原 ELISA 检测法现场检测中,养殖水体溶藻弧菌的检出率为零,患病大黄鱼的检出率为 80%,外观健康大黄鱼的检出率为 20%,表明改良后的 ELISA 法不仅可以用于诊断发病的大黄鱼,也可以检测无症状带菌大黄鱼,在养殖生产上具有很好的应用价值。

### 参考文献

- 1 林克冰、刘家富. 海洋科学, 1999, 4: 58~62
- 2 叶林、俞开康、王如才等. 中国水产科学, 1998, 5(2): 118~122
- 3 张晓华、徐怀恕、许兵等. 海洋与湖沼, 1997, 28(6): 604~610
- 4 王铁辉、李军、周立冉等. 海洋与湖沼, 1997, 28(1): 1~6
- 5 林清华. 免疫学实验, 武汉: 武汉大学出版社, 1999, 254~260

## STUDIES ON ELISA METHOD FOR DETECTING *Vibrio alginolyticus*, THE PATHOGENIC BACTERIA OF *Pseudosciana crocea*

YAN Qing-pi<sup>1,2</sup> WANG Jun<sup>1</sup> SU Yong-quan<sup>1</sup> PI Ling-bao<sup>2</sup> LIU Cheng-rong<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>Department of Oceanography & Institute of Subtropical Oceanography, Xiamen University 361005)

(<sup>2</sup>Department of Aquaculture, Jimei University, Xiamen 361021)

(<sup>3</sup>Senior Technical Training School of Putian 351100)

Received: Jan., 5, 2001

Key Words: *Pseudosciana crocea*, *Vibrio alginolyticus*, ELISA method

### Abstract

*Vibrio alginolyticus*, the pathogenic bacteria of *Pseudosciana crocea* was inactivated by the addition of formaldehyde to 0.05% (30℃, 8 h) for vaccine. Anti-*V. alginolyticus* serum was obtained from rabbits by injecting vaccine. The anti

serum has no cross reaction to *V. parahaemolyticus* and other nine strains after being absorbed. Anti serum was used for *V. alginolyticus* detecting by ELISA method. The lowest *V. alginolyticus* suspension detectable was 97 000 cfu/ ml. This ELISA method was used for pathogenic bacteria detecting in aquatic farming *P. crocea*. The results showed that *V. alginolyticus* in seawater was undetectable; 80% liver of diseased *P. crocea* were positive in *V. alginolyticus* while in the normal, 20%. The results indicated that ELISA method could be used not only to diagnose the clinically diseased *P. crocea*, but also to recognize the carrier.

(本文编辑:刘珊珊)