

溶藻弧菌的间接荧光抗体快速检测*

王 军¹ 鄢庆枇^{1,2} 苏永全¹ 张 纹¹

(¹ 厦门大学海洋学系, 厦门大学亚热带海洋研究所 361005)

(² 集美大学水产生物技术研究所, 水产学院 厦门 361021)

提要 建立了大黄鱼病原溶藻弧菌的间接荧光抗体检测方法。溶藻弧菌的特异性抗血清由新西兰兔制备, 试管凝集法测定抗血清及交叉反应效价, 吸附离心法去除交叉反应。荧光抗体为异硫氰酸荧光素标记的羊抗兔免疫球蛋白。现场检测对具典型弧菌病表症大黄鱼病原检出率为 100%, 表观健康大黄鱼病原检出率为 30%, 养殖海水检测结果均为阴性。结果表明, 间接荧光抗体检测法不仅可以用于已感染发病大黄鱼的快速检测, 而且还能用于已感染未发病大黄鱼的检测。

关键词 大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*), 溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*), 荧光抗体, 快速检测

大黄鱼(*Pseudosciaena crocea* (Richardson)) 是我国南方沿海最重要的海水网箱养殖鱼类之一。多年来, 弧菌病一直困扰着大黄鱼养殖业的健康发展, 在病害的防治过程中大量盲目施用药物不仅对养殖环境微生态造成严重影响, 而且养殖鱼体药物残留对人类健康产生的危害也已引起人们高度重视。建立准确、快速病原诊断方法、科学用药已成为当前水产养殖病害防治急需解决的问题。目前, 国内已在淡水鱼类和虾类的病原检测中成功地建立了酶联免疫检测(ELISA)、荧光抗体免疫检测及 PCR 检测等病原快速检测技术^[1-5], 作者在国家 863 项目资助下对大黄鱼弧菌病主要病原——副溶血弧菌和溶藻弧菌的快速检测进行研究, 建立起了 ELISA 等检测方法^[6,7]。本文在原有工作的基础上建立了养殖大黄鱼病原溶藻弧菌的间接荧光抗体免疫快速检测方法。

1 材料与方 法

1.1 药品和试剂配制

异硫氰酸荧光素标记的羊抗兔免疫球蛋白(FITC-IgG) 购自上海生物工程公司。

稀释缓冲液——0.01 mol/L PBS: NaCl 10 g, KCl 0.25 g, NaHPO₄·12H₂O 3.5 g, KH₂PO₄ 0.25 g, 蒸馏水定容至 1 000 ml, pH7.4。

洗涤缓冲液——PBST, 同上。

PBS 甘油缓冲液: PBS: 甘油 = 1:9。

1.2 病原菌

溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*) 于 1999 年分离自连江县厦宫乡新辉养殖场的患病大黄鱼, 经回归感染确定为大黄鱼弧菌病的病原菌^[8]。

1.3 实验菌株

标准菌株副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、河流弧菌 I (*V. Fluxialis* biotype I)、河流弧菌 II (*V. Fluxialis* biotype II)、坎普氏弧菌(*V. Campbellii*)、沙蚕弧菌(*V. nesiis*)、哈维氏弧菌(*V. hareyi*)、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。

1.4 实验兔

新西兰兔购自上海实验兔养殖场, 雄性, 体重 2~2.5 kg/只; 实验兔饲料购自厦门建发制药厂。

* 国家高技术研究发展计划资助项目 863-819-02012 号。
第一作者: 王军, 出生于 1953 年, 硕士, 副教授, 目前主要从事海水养殖病害及种质资源研究。通信地址: 福建省厦门市厦门大学海洋与环境学院, 361005。E-mail: xmsyq@public.xm.fj.cn

收稿日期: 2001-12-31; 修回日期: 2002-04-08

1.5 抗原制备

参照《免疫学常用实验方法》^[9]、《免疫学实验》^[10]方法稍加改进制备溶藻弧菌的菌体抗原(O抗原)和鞭毛抗原(H抗原)。免疫用菌苗浓度相当于麦氏比浊管3号管。

1.6 抗血清制备

采用耳缘静脉注射法对实验兔进行免疫注射,第1天注射剂量0.5 ml,每间隔5 d增加剂量0.5 ml再注射1次,共注射4次,最后一次注射7 d后检测抗血清,当其效价达到1:1280以上即可从颈动脉放血提取抗血清。每种抗原注射实验兔2只。

1.7 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反应菌细胞,混合均匀后置冰箱过夜,离心去除交叉反应菌,上清液用孔径0.22 μm的微孔滤膜过滤。吸附后再测定其交叉反应,如果没有凝集,即可分装保存于-80℃低温冰箱中备用。

1.8 间接荧光抗体检测法的建立

按《免疫学常用实验方法》^[9]稍加修改:(1)将溶藻弧菌涂片于载玻片上,置于37℃烘干,并在火焰上过火2~3次固定,PBST洗涤3次,每次3~4 min。(2)将抗血清滴加在玻片上,将玻片置于铺有湿布的塑料盒内在37℃培养箱内温育1 h后,以PBST洗涤,方法同(1)。(3)加异硫氰酸荧光素标记的羊抗兔免疫球蛋白,在37℃培养箱内温育1 h,以PBST洗涤,方法同(1)。(4)加PBS甘油,加盖玻片封固。(5)在盖玻片上加无自发荧光香柏油一滴,用落射荧光显微镜观察,汞灯100 W,激发滤光片490 nm,荧光滤光片510~520 nm。

1.9 间接荧光抗体检测法的现场检测

取患病大黄鱼、表观正常大黄鱼肝脏以及养殖海水各10份按上述步骤进行病原检测,肝脏匀浆后进行检测。

2 结果

2.1 抗血清效价

每只实验兔获得血清30~40 ml。从两个不同组别获得的O抗血清效价均为1:5120,H抗血清效价均为1:2560,O抗原效价高于H抗原(表1)。

2.2 抗血清特异性

为了检验抗血清的特异性,选择了分属于弧菌、

表1 溶藻弧菌免疫诊断血清吸附处理前后的效价

Tab.1 Titers of *V. alginolyticus* antisera before and after being absorbed

血清种类	组别	吸附前效价	吸附后效价
O抗血清	1	1:5120	1:2560
	2	1:5120	1:2560
H抗血清	1	1:2560	1:1280
	2	1:2560	1:1280

肠杆菌等不同类群的8株菌进行交叉反应试验,结果表明,诊断抗血清与其它菌株间存在轻微交叉反应,除O抗血清分别与副溶血弧菌、坎普氏弧菌和沙蚕弧

表2 溶藻弧菌免疫诊断O抗血清吸附处理前后的交叉反应结果

Tab.2 Cross reactivity of *V. alginolyticus* O antisera before and after being absorbed

细菌名称	抗原种类	交叉反应效价			
		第1组		第2组	
		吸附前	吸附后	吸附前	吸附后
副溶血弧菌	O抗	1:80	—	1:160	—
	H抗	1:40	—	1:20	—
坎普氏弧菌	O抗	1:160	—	1:80	—
	H抗	<1:10	—	<1:10	—
哈唯氏弧菌	O抗	1:10	—	1:40	—
	H抗	<1:10	—	<1:10	—
沙蚕弧菌	O抗	1:160	—	1:160	—
	H抗	1:40	—	1:20	—
河流弧菌	O抗	1:20	—	1:20	—
	生物I型H抗	<1:10	—	<1:10	—
河流弧菌	O抗	1:20	—	1:40	—
	生物II型H抗	<1:10	—	1:10	—
嗜水气单胞菌	O抗	<1:10	—	1:20	—
	H抗	<1:10	—	1:10	—
大肠杆菌	O抗	1:10	—	1:10	—
	H抗	<1:10	—	1:10	—
枯草杆菌	O抗	1:10	—	1:10	—
	金黄色葡萄球菌	<1:10	—	<1:10	—

注:“—”表示没有凝集反应。

菌的O抗原、H抗血清与坎普氏弧菌的H抗原的交叉反应效价为1:160,其余的均不高于1:80,多为1:10~1:20(表2.3)。通过吸附处理后,免疫诊断抗血清与其它菌株不产生交叉反应,特异性大大提高,而



表 3 溶藻弧菌免疫诊断 H 抗血清吸附处理前后的交叉反应结果

Tab.3 Cross reactivity of *V. alginolyticus* H antisera before and after being absorbed

细菌名称	抗原种类	交叉反应效价			
		第 1 组		第 2 组	
		吸附前	吸附后	吸附前	吸附后
副溶血弧菌	O 抗	<1:10	—	<1:10	—
	H 抗	1:40	—	1:20	—
坎普氏弧菌	O 抗	1:20	—	1:10	—
	H 抗	1:160	—	1:80	—
哈唯氏弧菌	O 抗	<1:10	—	1:10	—
	H 抗	1:80	—	1:40	—
沙蚕弧菌	O 抗	<1:10	—	1:10	—
	H 抗	1:80	—	1:80	—
河流弧菌 生物 I 型	O 抗	<1:10	—	<1:10	—
	H 抗	1:20	—	1:20	—
河流弧菌 生物 II 型	O 抗	<1:10	—	<1:10	—
	H 抗	1:20	—	1:10	—
嗜水气	O 抗	1:10	—	1:10	—
单胞菌	H 抗	1:10	—	<1:10	—
大肠杆菌	O 抗	<1:10	—	<1:10	—
	H 抗	<1:10	—	<1:10	—
枯草杆菌	O 抗	1:10	—	1:10	—
金黄色葡萄球菌	O 抗	<1:10	—	<1:10	—

注：“—”表示没有凝集反应。

效价仍保持在 1:1280 以上。本实验制备的溶藻弧菌抗血清的专一性符合免疫检测要求(表 1)。

2.3 现场检测

现场检测中,将镜检片置于荧光显微镜下,镜检片的背景为黑色,菌体为黄绿色。10 个具有典型弧菌病表症大黄鱼肝脏样品中全部检出大量溶藻弧菌,10 个外观健康大黄鱼肝脏样品中有 3 个检出溶藻弧菌,10 份养殖海水样品检测结果均为阴性(表 4)。

表 4 间接荧光抗体法现场检测结果

Tab.4 The detection of *V. alginolyticus* by indirect fluorescent antibody

样品	检测样品数	阳性样品数	阳性检出率(%)
患病大黄鱼	10	10	100
健康大黄鱼	10	3	30
养殖海水	10	0	0

3 讨论

荧光抗体检测技术根据抗原抗体反应具有高度特异性,以荧光素为标记物,与已知抗体结合作为标准试剂,用于检测未知抗原,可在荧光显微镜下呈现荧光的特异性抗原抗体复合物及其存在部位。这项技术将免疫反应的特异性、灵敏性与显微镜技术的精确性相结合,是现代标记免疫检测的重要方法之一。国外早在 80 年代就有将荧光抗体技术用于检测水产养殖病原菌的报道^[12,13]。20 世纪 90 年代以来,国内学者也相继进行了水产养殖病原菌荧光抗体检测研究^[1~5]。荧光抗体检测法不仅能快速检测患病动物的病原,检测时间一般不超过 3 h,为疾病的及时对症治疗赢得了宝贵的时间,而且该方法还能够检测到带菌状态或未发病的被感染个体,本实验也在 30% 表观健康大黄鱼体内检测出病原弧菌。姚斐^[1]等报道了利用间接免疫荧光抗体技术还可检出处于活的非可培养状态的细菌,由于活的非可培养状态的细菌仍具有毒性,并可在一定条件下复苏造成疾病的暴发流行,因此加强活的非可培养状态病原菌的检测在水产养殖病情预测预报上是很有意义的。此外,利用荧光抗体检测技术还可以研究病原菌在宿主体内各组织器官的分布,有助于了解病原菌侵入途径、在体内的转移以及其主要作用部位等^[1]。由此可见,荧光抗体检测技术在水产病害病原检测上具有广泛的用途。

本实验在所制备抗血清特异性的检测中,所选择的标准菌株大部分是与病原菌同属的弧菌。此外,还有代表肠杆菌的大肠杆菌,分别代表革兰氏阳性杆菌和球菌的枯草杆菌和金黄色葡萄球菌。交叉反应结果表明,与抗血清交叉反应较强的抗原都是弧菌属的菌株,这是由于弧菌属各菌株之间亲缘关系比较近,共同抗原比较多的缘故。从与各标准菌株交叉反应效价多不超过 1:80 的实验结果表明采用本实验方法制备抗血清是成功的。

目前,已经建立起来的水产养殖病害病原快速检测方法虽然已在实验阶段取得了很好的结果,但在生产实践中的推广应用尚少,如何尽快将这些有价值的科研成果转化为生产力,将是今后的工作重点之一。

主要参考文献

1 张晓华、徐怀恕、许兵等.中国对虾弧菌病的间接荧光

- 抗体诊断技术研究,海洋与湖沼,1997,28(6):604~610
- 2 王铁辉,李军,周立冉等.用逆转录聚合酶链式反应检测草鱼出血病病毒的研究,海洋与湖沼,1997,28(1):1~6
- 3 叶林,俞开康,王如才等.皱纹盘鲍幼鲍溃烂病病原菌的ELISA检测法,中国水产科学,1998,5(2):118~122
- 4 夏春.间接荧光抗体法快速检测中国淡水鱼主要病原菌,中国兽医学报,1998,18(5):466~468
- 5 殷战,徐伯亥.应用荧光抗体染色技术对感染鲢鱼组织中病原菌的观察,水生生物学报,1994,18(1):95~96
- 6 鄢庆枇,王军,苏永全等.大黄鱼病原菌——溶藻弧菌ELISA快速检测研究,海洋科学,2001,25(9):47~49
- 7 王军,鄢庆枇,苏永全等.养殖大黄鱼副溶血弧菌酶联免疫吸附法研究,台湾海峡,2001,20(3):346~351
- 8 鄢庆枇,王军,苏永全等.网箱养殖大黄鱼弧菌病研究,集美大学学报,2001,6(3):191~196
- 9 朱立平,陈学清.免疫学常用实验方法.北京:人民军医出版社,2000.1~19,365~370
- 10 林清华.免疫学实验.武汉:武汉大学出版社,1999.24~44
- 11 姚斐,寇运同,陈刚等.间接免疫荧光抗体检测活的非可培养状态的副溶血弧菌,海洋科学,2000,24(9):10~12
- 12 Banner C. R., Rohovec J. S., Fryer L. . A rapid method for labeling rabbit immunoglobulin with fluorescent for use in detection of fish pathogens, Bull Eur. Assoc. Fish Pathol., 1992,2:35~37
- 13 Baxa D. V., Dawai K., Kusuda R. . Detection of *Flexibacter mntimus* by fluorescent antibody technique in experimentally infected black sea bream fry, Fish Pathology, 1988, 23(3):29~32

STUDIES ON THE RAPID DETECTION OF *Vibrio alginolyticus* BY INDIRECT FLUORESCENT ANTIBODY STAINING

WANG Jun¹ YAN Qingpi² SU Yongquan¹ ZHANG Wen¹

(¹ Department of Oceanography, Xiamen University, 361005)

(² Institute of Aquaculture Biotechnology & Fisheries College, Jimei University, Xiamen, 361021)

Received: Dec., 31, 2001

Key Words: *Pseudosciaena crocea*, *Vibrio alginolyticus*, Fluorescent antibody, Rapid detection

Abstract

A rapid detection of *Vibrio alginolyticus* infecting the Large yellow croaker *Pseudosciaena crocea* by indirect fluorescent antibody staining has been developed. The specific antisera for *V. alginolyticus* was prepared with New Zealand rabbit, and cross-reactive efficacy was tested by coagulation in tube. It seemed that the goat anti-rabbit IgG had been marked by fluorescent isothiocyanate (FITC). The results showed that the positive reaction detected in situ from the typical symptom *P. crocea* infected by *Vibrio* was 100%, 30% from the healthy ones also suffered by this pathogen, but negative detection from its aquaculture seawater. It demonstrated that the rapid detection by indirect fluorescent antibody could be not only used for testing the ill yellow croaker infected by pathogen *Vibrio*, but also for those healthy ones with little pathogen.

(本文编辑:刘珊珊)