

水产养殖病原微生物检测技术研究进展*

THE PROGRESS OF THE DETECTION OF PATHOGENIC MICROORGANISMS IN AQUACULTURE

陈师勇 莫照兰 徐永立 张培军

(中国科学院海洋研究所实验海洋生物学开放研究实验室 青岛 266071)

随着我国海水、淡水养殖集约化程度的提高,水产养殖中疾病的危害出现了日益严重的趋势。为了对各种暴发病、流行病进行深入研究和监控,将现代生物技术应用用于各种病原诊断和防治,建立灵敏、准确、快速的病原检测技术已迫在眉睫。本文简要对目前的水产养殖病原微生物检测技术进行介绍。

1 免疫学检测技术

免疫学检测技术利用抗原抗体间能发生特异性免疫反应的原理来检测病原,是运用较为广泛、成熟

的检测技术。在抗原抗体反应当中,应用的抗体有多

* 国家重点基础研究专项 G1 99901 2003 号。中国科学院海洋研究所调查研究报告第 4374 号。实验海洋生物学开放研究实验室研究报告第 271 号。

第一作者:陈师勇,出生于 1976 年,博士生。通讯地址:山东青岛南海路 7 号中国科学院海洋研究所开放室 266071。电子邮件:chenshiyong@chinaren.com

收稿日期:2001-02-18;修回日期:2001-09-18

抗(抗血清)及单抗。抗血清制备相对简便易行,然而易发生血清交叉反应,需利用吸附法除去产生交叉反应的一部分抗体。单抗的优点在于它对抗原决定位点的特异性及保持细胞系重复获得相同抗体的能力,它的特异性、敏感性比多抗高得多。但单抗对抗原决定簇的高度特异性有时也成为缺点——多抗可与包括变异抗原在内的抗原决定簇特异性结合,而单抗有时不与变异抗原反应,导致误诊。

1.1 免疫荧光技术

免疫荧光技术是利用某些荧光素通过化学方法与特异性抗体结合制成荧光抗体,荧光抗体与被检抗原特异性结合后,形成的免疫复合物在一定波长光的激发下可产生荧光,借助荧光显微镜可检测或定位被检抗原。免疫荧光技术将免疫化学和血清学的高度特异性和敏感性与显微术的高度精确性相结合,在水产养殖病原的检测上得到一定应用^[3,14]。张晓华等^[5]报道了利用副溶血弧菌免疫家兔制备多克隆血清,建立中国对虾病原菌-副溶血弧菌的间接荧光抗体检测技术,不仅可用于诊断发病的感染对虾,也可用于检测带菌状态或未发病的感染对虾。

免疫荧光技术的主要特点是:特异性强、速度快、灵敏度高。但也存在缺点:如非特异性染色问题难以完全解决;操作程序较繁琐;需要特殊的昂贵仪器(荧光显微镜);染色标本不能长期保存等。

1.2 免疫酶技术

免疫酶技术也是免疫学诊断的一条新途径,与免疫荧光技术相比,它只需普通光学显微镜即可进行观察。它利用了抗原-抗体反应的高度特异性和酶促反应的高度敏感性,通过肉眼或显微镜观察及分光光度计测定,达到在细胞或亚细胞水平上示踪抗原或抗体的部位,以及对其进行定量的目的。该方法具有高效、经济、方便等特点。按是否将抗原或抗体结合到固相载体上,免疫酶技术可分为固相、均相和双抗体酶免疫测定技术。酶联免疫吸附试验(ELISA)是目前应用最广泛的固相免疫酶测定技术。Snow等^[28]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。作者利用人工感染实验确定了VHSV在海水中的传播及感染模式,从死亡实验鱼的肾、脾、脑组织均检测出了VHSV,实验结果对于重要经济鱼品种(如大菱鲆)的VHSV感染的防治具有重要参考价值。

1.3 Western 印迹法

Western 印迹,也称免疫印迹或转移印迹技术。该技术是以生物物理学方法(凝胶电泳高效分离)和特异性免疫反应(固相免疫测定)相结合而建立的技术。它借助高分辨率的PAGE电泳将混合蛋白质样品有效分离成许多蛋白区带,分离后的蛋白经电转移至固相支持物,通过与特异性抗体的结合,即可定性或定量检测靶蛋白。利用Western印迹法进行诊断,可直接观察到抗血清与特异性抗原的反应,减少了假阳性的出现。张晓华等^[6]在1997年报道利用Western印迹法对13株不同来源的副溶血弧菌的外膜蛋白及其抗原性进行了比较研究,发现它们有相似的SDS-PAGE图谱,其中一条44kDa的免疫反应带几乎是所有副溶血弧菌菌株共有的,推测极有可能与副溶血弧菌抗原的特异性有关。Western印迹法还被应用于鳗弧菌、假单胞菌、霍乱弧菌、创收弧菌等流行病学诊断检测上^[16,20,22,23]。

2 核酸检测技术

核酸检测技术是以病原的核酸为研究对象,通过鉴定病原的核酸分子来证实病原。近几年,运用核酸技术对环境中的病原进行检测的发展非常迅速,尤其是DNA分离技术的提高、PCR技术的日趋完善、各种探针标记方法的发展,使得核酸检测技术检测各种病原微生物更为方便、安全、快捷。

2.1 直接核酸杂交技术

核酸杂交是利用特异性的标记DNA片断为指示探针,与其互补链退火杂交,从而达到检查核酸样品中特定基因序列的检测。按杂交的方式可分为点杂交、Southern转移杂交、原位杂交等。核根据酸分子探针的来源和性质可分为基因组DNA探针、cDNA探针、RNA探针及人工合成的寡核苷酸探针等。探针的标记包括同位素标记以及非同位素标记,由于后者具有较多优越性,已成为研究的热点。

直接核酸杂交技术一般是根据病原DNA所具有的特异碱基排列顺序,人工合成一段能与病原DNA碱基序列互补的特异性探针,再经标记后与待测组织中提取的核酸进行杂交,或直接在取样组织切片上进行原位杂交,确定病原在组织、细胞内外的分布,进而分析病原的侵染途径。目前,核酸杂交检测方法已经在多种病原检测中应用^[10,11,25],也成为多种核酸检测方法的基础。

2.2 特定基因片段的 PCR 检测技术

聚合酶链式反应(PCR)技术,又称 DNA 体外扩增技术。自 80 年代初发明以来,PCR 及其相关技术的发展速度是惊人的,没有一种技术的发展与应用之快能与 PCR 相比,在多种核酸检测技术中均有它的运用。

当我们知道待检病原具有某一特定基因片段时,即可利用特异的引物对样品中微量的目标 DNA 进行 PCR 扩增,通过电泳检测扩增出的特定片段,即可确定感染的病原。战文斌等^[4]采用 Kimura 引物,用 PCR 技术对不同生长期的中国对虾进行了白斑病毒 WSSV 的检测,同时检测了对虾发病时养殖池中多见的野生厚蟹和矛尾刺鲷虎鱼。结果表明 WSSV 感染的亲虾有可能是病毒的宿主,而野生厚蟹则有可能是病毒中间宿主或病毒的携带者,对 WSSV 的感染、传播中起了重要的作用。夏春等^[1]根据鱼源嗜水气单胞菌 β -溶血素基因序列设计了两对引物,采用 Nested-PCR 法证实了我国嗜水气单胞菌流行株亦存在 β -溶血素的基因,并建立了 PCR 检测产 β -溶血素嗜水气单胞菌的方法。

2.3 DNA 指纹技术

所谓 DNA 指纹是指限制性酶消化产物在电泳图谱或 Southern 杂交中产生的一系列带纹,不同带纹代表了在染色体不同位置上的不同长度的 DNA 序列。目前在病原微生物检测上应用的 DNA 指纹技术主要包括 RFLP, AFLP 和 RAPD 等技术。

RFLP 称为限制性片段长度多态性,是指用某一种限制性内切酶切割来自不同个体的基因组 DNA 或某一个基因,会得到不同长度的 DNA 片段。RFLP 在基因组分析上有很大的应用价值,可作为一种广泛的遗传标记,特别适合于作遗传分析、构建遗传连锁图,目前在病原微生物的区分种群、分型中应用较广^[17]。Urakawa^[30]等利用 HhaI 限制性内切酶消化分析用 PCR 扩增出的 16S rDNA,依此区分发光细菌种属和弧菌种群。结果显示发光细菌种属基因型的独特性,与弧菌种属可以明确地区分开来。RFLP 实验方法简单,不需要其它的诸如 Southern 转移、探针杂交之类的程序,提供了一个可以在日常鉴定系统中快速区分发光细菌与弧菌种群的工具,其缺点则是提供的信息量少。

AFLP 是扩增片段长度多态性的简称。它首先是把基因组 DNA 用特定的限制性内切酶消化,将产生的限制性片段与特异设计的接头连接,当用专一设计的引物进行 PCR 反应,经电泳染色即可呈现片断长

度的多态性。与 RFLP 分析相比,用 PCR 反应检测 DNA 的多态性有一些明显优点:需要的基因组 DNA 量少,对制备 DNA 的纯度要求不高,操作的程序简单、分析的周期大大减少。AFLP 继承了 RFLP 的可靠性和 PCR 的优势,可以提供较丰富的信息,有较好的发展前途,在水产养殖病害微生物的检测上已开始运用^[7,31]。实际应用中,AFLP 的最大限制因素是必需根据基因组中被扩增的 DNA 片段两端的序列设计合成相应的引物。Johan 等^[31]利用 BioLog 系统及 AFLP 指纹技术研究了在孵化场及虾池中不同发育时期对虾感染和环境中的病原微生物动力学变化。结果发现溶藻弧菌主要出现仔虾的无节幼体与蚤状期;哈维氏弧菌则与仔虾后期、孵化期病症相关;一未知弧菌和另一未鉴定菌种被怀疑是仅在仔虾后期才出现的病原,而副溶血弧菌、美人鱼发光杆菌和最小弧菌则与仔虾后期及成虾期病症相关。

RAPD 技术,即随机扩增多态性 DNA 技术。它是利用一系列随机排列碱基顺序的引物(通常为十聚体),对所研究的目的 DNA 进行 PCR 扩增,通过电泳分离、染色或放射自显影来检测扩增产物的多态性,得到模板 DNA 核酸序列的多态性。RAPD 技术无需事先了解所研究的目的 DNA 序列,也不需要制作特异的探针进行杂交检测,减少了多态性分析的预备性工作。目前,它主要运用于微生物种属特异性鉴定、分型、遗传关系的确定、基因图谱的构建及基因定位和分离等方面,在水产病原微生物的鉴定分类上已有许多成功的例子^[19,21,24]。RAPD 技术操作简单快速,节省时间和经费,但也有不足,即每个 RAPD 标记提供的信息量少,检测受反应条件如模板 DNA 质量、引物浓度等因素的影响较大,稳定性重现性差。

2.4 16S rRNA 检测技术

rRNA 为所有生物体生存所必需的基因序列并且也是较保守的序列之一。16S rRNA 的序列检测已被成功地建立为一种鉴定微生物种、属、家族种类的标准方法。同时,由于种间 16S~23S rRNA 之间的间隔区(ITS)在长度、序列上具有相对多态性,利用 16S 及 23S rRNA 基因中的保守区为引物,对此间隔区进行克隆和分析,就能为病原微生物各菌株、种、属的鉴定、分型提供依据。

目前 16S rRNA 技术在人医及兽医开始得到广泛应用,在水产病害方面也开始运用^[11,38,29],并将快速发展。Carlos 等^[9]通过对 26 株不同地理及不同来源菌株的 16S rRNA 基因进行了分析,确定了鱼出血性败

血症病原美人鱼发光杆菌的分类地位,并建立了基于 16S rRNA 基因的巢式 PCR 病原检测方法。利用此方法可检测到被感染鱼组织里病原菌 10 fg 至 1 pg DNA (20 ~ 200 个菌),可以从怀疑带菌但又无症状的鱼体检测出病原,具有较高的选择性和特异性。

3 核酸技术与免疫学相结合方法

3.1 免疫 PCR

荧光标记、酶标记和放射性同位素标记这三大抗体标记技术是目前应用最广泛的常规抗原检测手段。但是,在某些极微量抗原检测上,荧光标记及酶标记技术还缺乏足够的灵敏度,而放射性同位素标记技术由于需要特殊的设备和防护措施,在实际操作中受到限制。Sano 等^[26]在 1992 年首创的免疫 PCR (Immuno-PCR) 弥补了它们的不足之处。免疫 PCR 关键在于用一个连接分子将一段特定的 DNA 序列连接到抗体上,通过普通 ELISA 的抗原抗体反应,在抗原和 DNA 分子之间建立相对应关系,将对蛋白质的检测转化为对核酸的检测,从而可以运用 PCR 的高度敏感性来放大抗原抗体反应的特异性,由 PCR 反应产物的量反映抗原分子的量。免疫 PCR 结合了抗原抗体反应的特异性和 PCR 的高度敏感性,成为了一种极为敏感的抗体依赖的抗原检测技术,在理论上可检测到一至数个抗原分子,使免疫检测技术达到了一个新的高度。

Kakizaki 等人^[15]报道了在感染的鲈鱼中运用免疫 PCR 检测病原巴斯德氏菌。结果表明,利用它可检测出 34 cfu/ml 的病原菌,而对照使用的 ELISA 方法只能检测出 3.4×10^4 cfu/ml 的菌。徐平西等^[2]用戊二醛作连接剂,将蛋白质高效率包被在普通 PCR 管内壁,使免疫 PCR 反应用普通 PCR 仪得以在管中连贯地进行。实验结果与 ELISA 方法比较敏感度高出约 10^5 。这一改良法的建立可望促进免疫 PCR 的普及应用。

3.2 PCR-ELISA

PCR-ELISA 法是 PCR 技术与 ELISA 技术结合的又一检测方法,主要是用于检测样品中的特定基因。它引入地高辛(或生物素)标记的 dNTP 进行 PCR 扩增,利用酶标抗地高辛抗体(或酶标记亲和素)进行 ELISA 检测,代替了用于常规 PCR 产物检测的电泳方法,方便快捷,易于处理大量样品,且其灵敏度比使用琼脂糖凝胶电泳检测方法高 100 倍。当有适当的标准品时,还可进行定量测定^[10]。

Gonzalez 等^[12]描述了一种基于 *la mB* 基因的 PCR-ELISA 快速分析牡蛎中大肠杆菌的检测手段。分析感染大肠杆菌的牡蛎样品时,该方法检测范围可达 $10 \sim 10^5$ cfu/g 样品。实验结果说明 PCR-ELISA 法是一种快速、精确、可定量的检测感染抗原的方法,并且将来可以进行自动化操作。

4 评价

可以看出,病原的检测方法多种多样,各种方法都有其优缺点,提高灵敏度和去除假阳性是检测方法发展的趋势。

在考虑选择何种检测方法时,应该考虑到自身拥有的实际条件,检测所要求达到的灵敏度。使用免疫学方法需要制备抗体,单抗与多抗的不同选择意味着工作量大小的不同;核酸检测方法则需提前制备特异性探针或引物等等。为了弥补各自方法的不足,进一步提高灵敏度及特异性,可以采用多种方法结合使用的策略。例如文献中的免疫 PCR、PCR-ELISA 等。又如在作核酸杂交时,可利用 PCR 法扩增探针,使其量增加;把荧光标记技术应用于 PCR 产物的检测,可以使观测的结果更加直观等等。总之,应根据自己的实际情况选取符合实际、易于应用的方法,不能过于死板,拘泥于教科书和文献,也不可一味追求技术的先进。

参考文献

- 1 夏春等. 聚合酶链反应(PCR)法检测产 β -溶血素嗜水气单胞菌,水生生物学报,1999,23(3):288~289
- 2 徐平西等. 一种简易的免疫 PCR 方法的建立,生物化学与生物物理进展,1999,26(4):393~395
- 3 姚斐等. 间接免疫荧光抗体技术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
- 4 战文斌等. 聚合酶链反应(PCR)检测养殖对虾的白斑症病毒(WSSV)感染,中国水产科学,2000,7(1):51~54
- 5 张晓华等. 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
- 6 张晓华等. 副溶血弧菌的外膜蛋白及其抗原性研究,中国水产科学,1997,4(4):49~53
- 7 Benediktsdottir E. et al.. Characterization of *Vibrio tiscostis* and *Vibrio vulnificans* isolated at different geographical locations: a proposal for reclassification of *Vibrio tiscostis* as *Moritella tiscostis* comb. nov., Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2000, 50(2):479~488
- 8 Borrow R. et al.. siaD PCR-ELISA for confirmation and identification of serogroup Y and W135 meningococcal infections, FEMS Microbiol. Lett., 1998, 159(2):

- 209 ~ 214
- 9 Carlos R. *et al.* . 16S rRNA gene sequence analysis of *Photobacterium damsela* and nested PCR method for rapid detection of the causative agent of fish pasteurellosis , *Appl. Environ. Microbiol.* ,1999 ,**65**(7) :2 942 ~ 2 946
 - 10 Eilers H. *et al.* . Culturability and in situ abundance of pelagic bacteria from the North Sea , *Appl. Environ. Microbiol.* ,2000 ,**66**(7) :3 044 ~ 3 051
 - 11 Giuliano L. *et al.* . Identification of culturable oligotrophic bacteria within naturally occurring bacterioplankton communities of the Ligurian Sea by 16S rRNA sequencing and probing , *Microb. Ecol.* ,1999 ,**37**(2) :77 ~ 85
 - 12 Gonzalez I. *et al.* . Rapid enumeration of *Escherichia coli* in oysters by a quantitative PCR-ELISA , *J. Appl. Microbiol.* ,1999 ,**86**(2) :231 ~ 236
 - 13 Jiang S.C. *et al.* . Genetic diversity of *Vibrio cholerae* in Chesapeake Bay determined by a amplified fragment length polymorphism fingerprinting , *Appl. Environ. Microbiol.* , 2000 ,**66**(1) :140 ~ 147
 - 14 Largo D.B. *et al.* . Immunofluorescent detection of ice-ice disease-promoting bacterial strain *Vibrio* sp. P11 of the farmed macroalga , *Kappaphycus alvarezii* (Gigartinales , Rhodophyta) , *J. Mar. Biotechnol.* , 1998 ,**6**(3) :178 ~ 182
 - 15 Kakizaki E. *et al.* . Detection of bacterial antigens using immunoprecipitation , *Lett. Appl. Microbiol.* ,1996 ,**23**(2) : 101 ~ 103
 - 16 Lee S.E. *et al.* . *Vibrio vulnificus* has the transmembrane transcription activator ToxRS stimulating the expression of the hemolysin gene *vvhA* , *J. Bacteriol.* ,2000 ,**182**(12) : 3 405 ~ 3 415
 - 17 Lunder T. *et al.* . Phenotypic and genotypic characterization of *Vibrio viscosus* sp. nov. and *Vibrio wadensis* sp. nov. isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar*) with ' winter ulcer' , *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* ,2000 ,**50**(2) : 427 ~ 450
 - 18 Maeda T. *et al.* . Structural variation in the 16S/23S rRNA intergenic spacers of *Vibrio parahaemolyticus* , *FEMS Microbiol. Lett.* ,2000 ,**192**(1) :73 ~ 77
 - 19 Magarinos B. *et al.* . Existence of two geographically linked clonal lineages in the bacterial fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* evidenced by random amplified polymorphic DNA analysis , *Epidemiol. Infect.* ,2000 ,**125** (1) :213 ~ 219
 - 20 Ochsner U.A. *et al.* . *Pseudomonas aeruginosa* fur overlaps with a gene encoding a novel outer membrane lipoprotein , OmlA , *J. Bacteriol.* ,1999 ,**181**(4) :1 099 ~ 1 109
 - 21 O'Neil B. *et al.* . Genetic diversity of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* demonstrated by random amplified polymorphic DNA and pulsed-field gel electrophoresis analyses , *Dis. Aquat. Organ.* ,2000 ,**39**(2) :109 ~ 119
 - 22 Pedersen K. *et al.* . Extended serotyping scheme for *Vibrio anguillarum* with the definition and characterization of seven provisional Oserogroups , *Curr. Microbiol.* ,1999 ,**38**(3) : 183 ~ 189
 - 23 Provenzano D. *et al.* . The virulence regulatory protein ToxR mediates enhanced bile resistance in *Vibrio cholerae* and other pathogenic *Vibrio* species , *Infect. Immun.* , 2000 , **68**(3) :1 491 ~ 1 497
 - 24 Romalde J.L. *et al.* . Genetic analysis of turbot pathogenic *Streptococcus paucibacillus* strains by ribotyping and random amplified polymorphic DNA , *FEMS Microbiol. Lett.* ,1999 , **179**(2) :297 ~ 304
 - 25 Sawabe T. *et al.* . *Vibrio halioticoli* sp. nov. , a non-motile alginate marine bacterium isolated from the gut of the abalone *Haliotis discus hannai* , *Int. J. Syst. Bacteriol.* , 1998 ,**48**(2) :573 ~ 580
 - 26 Sano T. *et al.* . Immunoprecipitation: very sensitive antigen detection by means of specific antibody-DNA conjugates , *Science* ,1992 ,**258**(5 079) :120 ~ 122
 - 27 Snow M. *et al.* . Susceptibility of juvenile Atlantic cod *Gadus morhua* to viral haemorrhagic septicaemia virus isolated from wild-caught Atlantic cod , *Dis. Aquat. Organ.* , 2000 ,**41**(3) :225 ~ 229
 - 28 Snow M. *et al.* . Experimental susceptibility of turbot *Scophthalmus maximus* to viral haemorrhagic septicaemia virus isolated from cultivated turbot , *Dis. Aquat. Organ.* , 1999 ,**38**(3) :163 ~ 168
 - 29 Tan C.K. *et al.* . Infectivity, transmission and 16S rRNA sequencing of a rickettsia , *Coxiella chemxi* sp. nov. , from the freshwater crayfish *Chemx quadricarinatus* , *Dis. Aquat. Organ.* ,2000 ,**41**(2) :115 ~ 122
 - 30 Urakawa H. *et al.* . A new approach to separate the genus *Photobacterium* from *Vibrio* with RFLP patterns by HhaI digestion of PCR-amplified 16S rDNA , *Curr. Microbiol.* , 1998 ,**36**(3) :171 ~ 174
 - 31 Vandenberghe J. *et al.* . *Vibrios* associated with *Litopenaeus vannamei* larvae , postlarvae , broodstock , and hatchery probionts , *Appl. Environ. Microbiol.* ,1999 ,**65** (6) :2 592 ~ 2 597

(本文编辑 :刘珊珊)