

大黄鱼病原副溶血弧菌单克隆抗体制备及其应用

池信才¹, 王 军¹, 鄢庆枇², 苏永全¹

(1. 厦门大学 海洋环境学院, 福建 厦门 361005; 2. 集美大学 水产学院, 福建 厦门 361021)

摘要:用甲醛灭活副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)和溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)制成免疫原免疫 BALB/c 小鼠,利用淋巴细胞杂交瘤技术,获得 1 株特异的针对副溶血弧菌的单克隆抗体,命名为 D6F3H5。腹水及培养上清液抗体的 ELISA 效价分别为:1 5 120 和 1 1 280,该单克隆抗体与其它细菌没有明显的交叉反应。利用该单克隆抗体和兔抗副溶血弧菌多克隆抗体,建立了检测副溶血弧菌的双抗体夹心 ELISA 方法。该方法对副溶血弧菌的最小检出量为 5×10^4 个/mL。用双抗体夹心 ELISA 检测大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)样品,14 尾患病大黄鱼中有 11 尾检出副溶血弧菌,而 10 尾健康大黄鱼都没有检出副溶血弧菌。由此可见,本试验制备的高特异性的抗副溶血弧菌单克隆抗体,可以用于患病大黄鱼副溶血弧菌的快速诊断。

关键词:大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*);副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*);单克隆抗体
中图分类号:S941.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-3096(2007)08-0001-05

大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)是中国近海特有的主要经济鱼类和当前最主要海水养殖鱼类之一、也是中国六大优势出口水产品之一。近年来,病害成为困扰中国大黄鱼养殖业的主要问题,其中副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)和溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)是养殖大黄鱼最常见的病原菌^[1,2]。目前,对病原弧菌所引起的养殖大黄鱼疾病的诊断主要靠临床观察和细菌学检查,难以及时、准确地确定病原的种类,因此无法满足疾病防治的要求。

疾病的正确诊断是科学防治的基础,而免疫检测是病原快速检测的最有效技术之一。虽然鄢庆枇等^[3]、王军等^[4]已制备了溶藻弧菌和副溶血弧菌的兔抗血清用于大黄鱼疾病的快速诊断,并得到较好的效果,但是由于这些多克隆抗血清具有明显的异质性,而且特异性较差。单克隆抗体在这些方面大大优于多克隆抗血清。自 20 世纪 80 年代初以来在各国兴起了单克隆抗体研究热潮,每年有近万篇关于单抗的研究报道。现在单抗技术已从初期的探索性研究进入大量开发、应用阶段。如果能够建立产生大黄鱼病原弧菌单克隆抗体的杂交瘤细胞株并大量制备高特异性均质单克隆抗体,对于大黄鱼弧菌病的防治将具有重要的意义。正是由于单克隆抗体在细菌性鱼病的诊断中具有良好的应用前景,国内外学者都很重视鱼类病原菌单克隆抗体的研制。

Austin^[5]制备了抗耶尔森氏菌和杀鲑气单胞菌的单克隆抗体,并把它们应用于鲑鳟鱼类红嘴病及疔疮病的快速诊断中。伊丹利明、高桥幸则^[6]将鳃弧菌 J-0-6 型菌株的菌悬液与弗氏完全佐剂等量混合,每隔两周接种一次 BALB/C 鼠,共接种 3 次,再将该免疫鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞 NS-1 用 PEG1500 融合,并进行 3 次以上克隆,最后获得抗鳃弧菌的单克隆抗体。在国内,陈红燕等^[7]制备了嗜水气单胞菌的单克隆抗体并进行了特性研究;夏永娟等^[8]研制了抗鳃弧菌单克隆抗体;金晓航等^[9]制备了迟缓爱德华菌抗独特型单克隆抗体;宋晓玲等^[10]制备了溶藻弧菌单克隆抗体,并进行初步应用。

作者以大黄鱼的病原菌——副溶血弧菌和溶藻弧菌为研究对象,制备其单克隆抗体并进行双抗体夹心 ELISA 检测,以期为养殖大黄鱼弧菌病的病原检测建立一种快速、敏感、特异性高的单抗检测方法。

收稿日期:2006-12-24;修回日期:2007-05-22

基金项目:国家 863 计划项目(2004AA623010,2002AA603021);厦门市科技局项目

作者简介:池信才(1962-),男,福建闽清人,副研究员,博士研究生, E-mail:cxc_hyj@xm.gov.cn;苏永全,通讯作者, E-mail:yqsu@xmu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

副溶血弧菌和溶藻弧菌分离自患病大黄鱼^[1]。嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、鳃弧菌(*V. anguillarum*)、创伤弧菌(*V. vulnificus*)、河流弧菌(*V. fluvialis*)、河流弧菌(*V. fluvialis*)、坎普氏弧菌(*V. campbellii*)、沙蚕弧菌(*V. neresis*)、哈维氏弧菌(*V. harveyi*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)和枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)购自中国科学院微生物研究所。

1.1.2 细胞株

小鼠骨髓瘤细胞株 SP2/0 引自中国科学院细胞生物学研究所细胞库。用高糖 DMEM 培养基传代培养。

1.1.3 培养基、试剂

DMEM、HAT、HT 培养基、PEG6000 购自 Gibco 公司;胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司。

1.1.4 试验动物

BALB/C 小鼠和昆明种小鼠及其饲料购自厦门大学抗癌中心实验动物房。采用 6~8 周龄 BALB/C 小鼠。免疫用的小鼠和诱生抗体的小鼠饲养在厦门市水产研究所水产中试基地实验室。

健康和已经染病的大黄鱼均来自厦门西海域火烧屿养殖网箱,健康大黄鱼暂养在厦门市水产研究所水产中试基地备用。

1.2 方法

1.2.1 抗原制备与小鼠免疫

副溶血弧菌和溶藻弧菌在含 2% NaCl 营养肉汤 28 培养 24 h 后,4 000 r/min 离心 10 min 收集菌体,用 0.01 mol/L pH 7.2 PBS 洗涤 2 次,1% 甲醛处理 12 h,离心、洗涤后用比浊法调节菌浓度至 2×10^9 个/mL。

免疫 BALB/C 小鼠时,每只小鼠腹腔注射 0.2 mL 细菌悬液,每隔 1 周加强免疫 1 次,免疫 3 次后取小鼠尾血作抗体效价测试,具有明显阳性反应的小鼠再加强免疫,注射菌体悬液 0.1 mL,3 d 后无菌操作取小鼠脾细胞作细胞融合。

1.2.2 细胞融合及克隆化培养

按大约 5:1 的比例取免疫小鼠脾细胞和 SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞,混合在 50 mL 圆底离心管中。用无血清的 DMED 培养液清洗两次后,慢慢加入加热

融化的 50% 聚乙二醇 DMSO 混合液。用吸管慢慢拨动细胞,使得细胞和融合剂充分作用 1 min。缓缓滴入无血清 DMED 培养液,5 min 内加至 20 mL 细胞悬液,融合后的细胞经过洗涤后,用含 20% 胎牛血清的 DMED 培养液培养在预先培养好饲养细胞的 96 孔培养板中,每孔 0.1 mL。24 h 后每孔再加入 0.1 mL 含 HAT 的上述培养液。当杂交瘤长满 1/3 孔时,取其培养上清,以间接 ELISA 法筛选,通过有限稀释法对阳性杂交瘤进行克隆化 3 次。选择对目标抗原具有特异性的阳性杂交瘤细胞株保存于液氮。

1.2.3 间接 ELISA 法筛选抗体

将细菌抗原稀释至 2×10^7 个/mL,取 100 μ L 至酶标板各孔,阴性对照孔中加入 100 μ L 生理盐水,60 $^{\circ}$ C 烘干包被,用含 0.05% Tween20 的 0.01 mol/L PBST(pH 7.4)洗涤液满孔洗涤 3 次,每次 3 min,然后用含 10% 小牛血清的 PBS 于 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h,同上洗涤 3 次,各孔依次加入杂交瘤细胞培养上清液 100 μ L 37 $^{\circ}$ C 温育 1 h,同上洗涤 3 次,每孔加入 100 μ L 兔抗鼠 IgG HRP(北京华美,稀释 1 000 倍),37 $^{\circ}$ C 温育 1 h,同上洗涤 3 次,每孔加入 100 μ L 新鲜配置的 OPD-H₂O₂ 底物溶液,于避光处反应 30 min,然后每孔加入 50 μ L 2 mol/L 硫酸溶液中止反应,于 492 nm 下检测每孔 OD 值。用同样方法检测这些阳性杂交瘤细胞株所分泌的抗体对 13 株细菌的特异性。

1.2.4 小鼠腹水抗体制备

对最后筛选出的阳性单克隆杂交瘤细胞株进行扩大培养,并将 1×10^7 个/mL 细胞悬液与液体石蜡预处理,接种于同系小鼠腹腔,待小鼠腹腔明显鼓胀,牵引致使脊椎脱臼休克,抽取腹水测定其抗体效价并保存于 4 $^{\circ}$ C,用于鱼体病原检测。

1.2.5 兔抗副溶血弧菌多克隆抗血清的制备

新西兰大白兔饲养两周后进行免疫,通过耳缘静脉注射副溶血弧菌甲醛灭活菌苗免疫实验兔。每隔 5 d 注射 1 次,总共注射 4 次,第 1 次注射 0.5 mL,每次递增 0.5 mL。第 4 次注射后第 7 天从实验兔耳中央静脉抽血 1 mL,分离血清,用试管凝集法测定其效价。如测得血清的凝集价 $> 1:1280$,可以进行大量采血。

1.2.6 双抗夹心 ELISA 检测

采用双抗夹心 ELISA 法^[11]测定单克隆抗体对副溶血弧菌的检测灵敏度并将其用于鱼体副溶血弧菌检测。

副溶血弧菌经系列稀释制成不同浓度悬液。兔抗副溶血弧菌多克隆抗体用 pH 9.6 碳酸盐缓冲液

稀释 200 倍后取 100 μL 于酶标板各孔,4 过夜包被,用含 0.05% Tween20 的 0.01 mol/L PBST (pH 7.4) 洗涤液满孔洗涤 3 次,每次 3 min,然后用含 10% 小牛血清的 PBS 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h,同上洗涤 3 次;各孔加入不同稀释度副溶血弧菌悬液 100 μL ,阴性对照加 PBS,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,同上洗涤 3 次;然后各孔依次加入小鼠腹水 100 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h,同上洗涤 3 次;每孔加入 100 μL 兔抗鼠 IgG HRP(北京华美,稀释 1 000 倍),37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h,同上洗涤 3 次;每孔加入 100 μL 新鲜配置的 OPD- H_2O_2 底物溶液,于避光处反应 30 min,然后每孔加入 50 μL 2 mol/L 硫酸溶液中止反应,于 492 nm 下检测每孔 OD 值。

待测的健康和发病的大黄鱼组织在 5 倍体积无菌生理盐水中研磨,静置沉淀后吸取上清液备检。同上方法,以上清液代替副溶血弧菌悬液,检测鱼体中的副溶血弧菌。

2 结果

2.1 细胞融合及抗体检测

在进行的两种细菌抗原融合试验中,以副溶血弧菌为抗原的 4 个 96 孔培养板有 58 孔杂交瘤细胞生长,杂交瘤形成率为 15%;以溶藻弧菌为抗原的 4 个培养板有 12 个孔培养出杂交瘤细胞。经 ELISA 法筛选,得到 2 孔具有特异性抗副溶血弧菌杂交瘤细胞,占杂交瘤 3.45%。以溶藻弧菌为抗原的杂交瘤细胞未检测出阳性细胞株。

2.2 杂交瘤细胞的克隆培养及抗体诱导

2 孔具有抗体分泌能力的杂交瘤细胞,在克隆化及扩大培养过程中有 1 株失去分泌抗体能力,余 1 株经 3 次克隆后阳性克隆率为 100%。这个杂交瘤细胞株定名为 D6F3H5。经过扩大培养和 BALB/C 小鼠腹腔注射,腹水及培养上清液抗体的 ELISA 效价分别为 1 5 120 和 1 1 280。

2.3 单克隆抗体特异性检测

用 ELISA 法将单克隆抗体分别与副溶血弧菌、溶藻弧菌、嗜水气单胞菌、金黄色葡萄球菌、鳃弧菌、创伤弧菌、河流弧菌、坎普氏弧菌、沙蚕弧菌、哈维氏弧菌、大肠杆菌和枯草杆菌作交叉反应,结果可见单克隆抗体能与副溶血弧菌特异性反应,显色明显,而与其他各种细菌无明显的交叉反应(表 1)。

表 1 D3F3H5 杂交瘤细胞株产生的单克隆抗体的特异性

Tab. 1 The speciality of monoclonal antibody secreted by D3B3H5

菌株	效价
副溶血弧菌	1 5 120
溶藻弧菌	-
嗜水气单胞菌	-
金黄色葡萄球菌	-
鳃弧菌	-
创伤弧菌	-
河流弧菌	-
坎普氏弧菌	-
沙蚕弧菌	-
哈维氏弧菌	-
大肠杆菌	-
枯草杆菌	-

注:“-”表示阴性

2.4 双抗夹心 ELISA 的灵敏度

双抗夹心 ELISA 能够灵敏地检测副溶血弧菌,其最低检出浓度为 5×10^4 个/mL,最低检出量为 5×10^3 个。

表 2 基于单克隆抗体的双抗夹心 ELISA 对不同浓度副溶血弧菌的检测结果

Tab. 2 The result of different concentrations of *V. parahaemolyticus* detected by sandwich ELISA based on monoclonal antibody

副溶血弧菌浓度(个/mL)	检测结果
5×10^3	-
1×10^4	-
5×10^4	+
1×10^5	+
5×10^5	+
1×10^6	+

注:“+”表示阳性,“-”表示阴性

2.5 双抗夹心 ELISA 对大黄鱼样品的检测

用双抗夹心 ELISA 检测了 14 尾具有典型弧菌病症状的大黄鱼和 10 尾健康大黄鱼的样品,结果从 11 尾患病大黄鱼中检出副溶血弧菌,检出率为 78%,而 10 尾健康大黄鱼都没有检出副溶血弧菌(表 3)。

表 3 基于单克隆抗体的双抗夹心 ELISA 对大黄鱼样品的检测结果

Tab. 3 The result of *Pseudosciaena crocea* specimen detected by sandwich ELISA based on monoclonal antibody

病鱼编号	检测结果	健康鱼编号	检测结果
1	+	1	-
2	-	2	-
3	+	3	-
4	-	4	-
5	+	5	-
6	+	6	-
7	+	7	-
8	+	8	-
9	+	9	-
10	+	10	-
11	+		
12	+		
13	-		
14	+		

注：“+”表示阳性，“-”表示阴性

3 讨论

本试验以副溶血弧菌甲醛灭活菌苗为抗原,运用单克隆抗体技术,筛选、克隆到 1 株产生抗副溶血弧菌单克隆抗体的杂交瘤细胞(D6F3H5)。共进行了 3 次有限稀释克隆,最后一次克隆阳性孔率为 100%,确保所筛选的细胞株为单克隆。本试验筛选的阳性杂交瘤细胞株较少,但幸运的是该细胞株所分泌的单克隆抗体具有很好的特异性,对副溶血弧菌表现阳性反应,对其他 12 株细菌都没有交叉反应,可以用于副溶血弧菌相关病害的快速诊断。本试验使用两种弧菌免疫小鼠,结果只有一种弧菌得到特异性的抗体,这可能与两种细菌的抗原性不同以及本工作所筛选的小鼠数量有限有关。

本试验之所以采用双抗体夹心 ELISA 法测定所制备的单克隆抗体对溶藻弧菌的检测灵敏度和鱼体样品,是由于该方法较之抗原包被间接 ELISA 有明显的优势:细菌的包被通常采用 60℃ 烘干,包被过程耗时数小时,而双抗体夹心 ELISA 的包被是在准备工作中完成,可以缩短样品检测时间。本试验的双抗体夹心 ELISA 的检测时间可以控制在 4 h 之内,可以满足疾病快速诊断的要求;鱼体样品的研磨上清

液中含有许多组织碎片,烘干包被时这些组织碎片也包被到酶标板上,影响检测效果。如果离心去除组织碎片容易导致细菌也随之沉淀,容易引起漏检。双抗体夹心 ELISA 能够克服这些问题,提高检测灵敏度。所建立的双抗体夹心 ELISA 对副溶血弧菌的最低检出量为 5×10^3 个,具有较高的早期快速诊断价值。

在大黄鱼样品检测中,10 尾健康大黄鱼都没有检出副溶血弧菌,14 尾患弧菌病的大黄鱼有 11 尾检出副溶血弧菌,这说明本试验制备的单克隆抗体检测实际样品副溶血弧菌的假阳性很低,灵敏度较高。用 TCBS 平板检测 14 尾患病大黄鱼,都长出大量绿色菌落,也进一步验证了检测结果的可信度。14 尾患病大黄鱼同一时间取自同一养殖渔排,其病原很可能都是副溶血弧菌,但有 3 尾病鱼没有检出副溶血弧菌,这说明在实际样品检测中要尽可能多检测几个样品,以免出现漏检。

参考文献:

- [1] 鄢庆枇,苏永全,王军,等. 网箱养殖大黄鱼弧菌病研究[J]. 集美大学学报(自然科学版), 2001, 6(3): 191-196.
- [2] 林克冰,周宸,刘家富,等. 海水网箱养殖大黄鱼弧菌病的病原菌[J]. 台湾海峡, 1999, 18: 342-346.
- [3] 鄢庆枇,王军,苏永全,等. 大黄鱼病原菌——溶藻弧菌的 ELISA 快速检测研究[J]. 海洋科学, 2001, 25(9): 47-50.
- [4] 王军,鄢庆枇,苏永全,等. 养殖大黄鱼副溶血弧菌的酶联免疫吸附法研究[J]. 台湾海峡, 2001, 20(3): 346-351.
- [5] Austin B. Monoclonal antibody-based enzyme-linked immuno sorbent assays for the rapid diagnosis of clinical cases of enteric red mouth furunculosis in fish farms [J]. *Journal of Fish Diseases*, 1986, 9: 469-474.
- [6] 伊丹利明,高桥幸则. 免疫学的手法による鱼病细菌の迅速分类法[J]. 细菌性鱼病迅速诊断技术の開発, 1994, 1: 51-58.
- [7] 陈红燕,林天龙,陈日升,等. 嗜水气单胞菌单克隆抗体的制备及特性分析[J]. 中国水产科学, 2003, 10(2): 121-125.
- [8] 夏永娟,黄威权,李元,等. 抗鳃弧菌单克隆抗体的研制及鉴定[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2000, 16(1): 81-85.
- [9] 金晓航,黄威权,夏永娟,等. 迟缓爱德华菌抗独特型单克隆抗体的制备及鉴定[J]. 水生生物学报, 2005, 29(3): 340-343.
- [10] 宋晓玲,黄健,史成银. 溶藻弧菌单克隆抗体的制备及应用[J]. 水产学报, 2001, 25(6): 521-527.
- [11] 朱正美,刘辉. 简明免疫学技术[M]. 北京: 科学出版社, 2002. 163-165.

Preparation and applications of monoclonal antibody against the pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* from *Pseudosciaena crocea*

CHI Xin-cai¹, WANG Jun¹, YAN Qing-pi², SU Yong-quan¹

(1. School of Oceanography and Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. School of Fisheries, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Received: Dec. , 24, 2006

Key words: *Pseudosciaena crocea*; *Vibrio parahaemolyticus*; monoclonal antibody

Abstract : *Vibrio parahaemolyticus* and *V. alginolyticus* were inactivated by formaldehyde to prepare antigens for the immunizing of BALB/c mice. 1 strain of hybridoma (D6F3H5), secreting McAb against *V. parahaemolyticus*, was obtained by means of hybridoma technique. The ELISA titers of McAb in ascites and culture liquid were 1 5 120 and 1 1 280, respectively. The McAb had no cross reaction to 12 strains of other bacteria. Sandwich ELISA was established to detect *V. parahaemolyticus* based on the McAb and rabbit against *V. parahaemolyticus* multi-clone antibody. The lowest detectable concentration of *V. parahaemolyticus* detected by sandwich ELISA was 5×10^4 cells/mL. Sandwich ELISA was used for detecting *V. parahaemolyticus* in large yellow croacker, *Pseudosciaena crocea*, *V. parahaemolyticus* was detected from 11 fish among 14 diseased *P. crocea*, no *V. parahaemolyticus* was detected from 10 healthy *P. crocea*. The results indicated that the McAb specially against *V. parahaemolyticus* could be used for the rapid diagnosis of diseased *P. crocea*.

(本文编辑:刘珊珊)