

DOI: 10.12264/JFSC2020-0224

鱼肠道弧菌胶体金快速检测试纸研制

绳秀珍¹, 王新趁¹, 李嘉文¹, 唐小千¹, 邢婧¹, 迟恒¹, 战文斌^{1,2}

1. 中国海洋大学水产动物病害与免疫学实验室, KLMME, 山东 青岛 266003;

2. 青岛海洋科学与技术国家实验室, 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266071

摘要: 鱼肠道弧菌(*Vibrio ichthyoenteri*)可引起多种养殖鱼类发病死亡, 给鱼类养殖业带来严重经济损失。为解决养殖过程中鱼肠道弧菌的现场快速检测问题, 本研究研制了鱼肠道弧菌胶体金快速检测试纸。通过制备兔抗鱼肠道弧菌多克隆抗体, 间接 ELISA 分析发现其与鱼肠道弧菌的外膜蛋白、鞭毛蛋白、胞外产物及全菌破碎蛋白发生阳性免疫反应, 与副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)、溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)、哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)的 4 种抗原蛋白发生程度不等的免疫交叉反应。制备胶体金标记鱼肠道弧菌抗体, 确定了鱼肠道弧菌 4 种抗原蛋白的划线浓度, 以 4 种抗原蛋白作为 4 条检测线, 羊抗兔 IgG 作为质控线, 基于竞争法免疫层析技术研制出鱼肠道弧菌快速检测试纸。对鱼肠道弧菌、副溶血弧菌、鳃弧菌、溶藻弧菌和哈维氏弧菌的检测结果显示, 该试纸可以准确鉴别出鱼肠道弧菌, 并能判别其他病原菌的交叉反应。该试纸对鱼肠道弧菌的最低检测限为 5×10^5 CFU/mL, 检测耗时为 10 min。对患病牙鲆组织的检测结果显示, 该试纸与 ELISA 结果一致, 表明具有较好的检测准确性。本研究为水产养殖现场鱼肠道弧菌快速、准确检测提供了有力工具。

关键词: 鱼肠道弧菌; 胶体金; 检测试纸; 竞争免疫层析法; 免疫交叉反应

中图分类号: S941

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2021)01-0001-11

鱼肠道弧菌(*Vibrio ichthyoenteri*)最早分离自患肠炎病的牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)^[1], 属革兰氏阴性菌, 可引起多种养殖鱼类发病死亡^[1-7], 有时还会与其他弧菌一起引发混合感染^[3,8], 给鱼类养殖业带来严重的经济损失。国内外学者对鱼肠道弧菌的病原特性^[1-6]、流行规律^[7]、疾病治疗^[9]、疫苗研筛^[10-11]、检测诊断^[12,13-16]等进行了研究。快速、准确的病原检测是疾病防治的重要前提。已报道的鱼肠道弧菌检测方法主要有检测病原核酸的多重 PCR(聚合酶链式反应)技术^[8]、电子微阵列技术^[13]、环介导等温扩增(LAMP)技术^[14]等, 可并行检测多种病原的核酸, 而 LAMP 技术利用简单的加热设备或者水浴锅可用于养殖现场检测^[14]; 鱼肠道弧菌的免疫学检测技术已有 ELISA 技术^[15]、

流式细胞术^[16]等, 但是尚未见关于鱼肠道弧菌胶体金快速检测试纸的报道。本实验室前期曾研制了鱼类病原性溶藻弧菌快速检测试纸^[17]和淋巴囊肿病毒快速检测试纸^[18], 操作简便快速, 不需要仪器设备, 5~10 min 获得直视结果, 为解决水产动物病原的现场快速检测问题提供了技术平台。

细菌的鞭毛、荚膜、菌毛等表面抗原及胞外产物可诱导机体产生抗体, 但是, 不同病原菌之间具有的共同抗原会导致免疫交叉反应^[19], 从而对免疫学技术检测结果的准确性产生干扰。通常通过筛选病原菌特有的抗原蛋白, 或者制备其特异性抗体来提高检测准确性。但是, 水产动物病原性弧菌种类繁多, 多种病原菌可能与鱼肠道弧菌具有共同抗原, 特异性抗原/抗体的筛选难度大,

收稿日期: 2020-07-28; 修订日期: 2020-09-05.

基金项目: 国家重点研发计划项目(2019YFD0900101); 国家自然科学基金项目(31872599, 31730101, 31672685); 山东省泰山学者特聘专家项目.

作者简介: 绳秀珍(1968-), 女, 博士, 教授, 主要从事水产动物病害与免疫学研究. E-mail: xzsheng@ouc.edu.cn

通信作者: 战文斌, 教授, 主要从事水产动物病害与免疫学研究. E-mail: wbzhan@ouc.edu.cn

工作量繁重。本实验室通过同时使用 4 种抗原蛋白作为检测线抗原研制的溶藻弧菌快速检测试纸,用兔抗溶藻弧菌多克隆抗体可实现溶藻弧菌的准确鉴别^[17]。为了解决养殖过程中鱼肠道弧菌的现场快速检测问题,本研究制备了兔抗鱼肠道弧菌多抗作为金标抗体,提取鱼肠道弧菌的外膜蛋白、鞭毛蛋白、胞外产物和全菌破碎蛋白作为检测线抗原,研制了鱼肠道弧菌胶体金快速检测试纸,通过 4 种抗原蛋白与鱼肠道弧菌竞争结合金标抗体实现鱼肠道弧菌的检测,对患病牙鲆组织的检测结果显示其能够准确鉴别鱼肠道弧菌感染,具有较好的特异性和准确性。

1 材料与方法

1.1 实验菌株与动物

实验所用鱼肠道弧菌(*Vibrio ichthyenteri*)、溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、鳗弧菌(*Vibrio anguillarum*)、哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)由本实验室保存。6 周龄纯种雌性新西兰大白兔购自青岛市药品检验所。

1.2 鱼肠道弧菌多抗制备及效价测定

1.2.1 鱼肠道弧菌多抗的制备与纯化 将鱼肠道弧菌接种到 LB 培养基中扩大培养,福尔马林灭活鱼肠道弧菌,使用 0.01 mol/mL 磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)将菌液浓度调节至 1×10^8 CFU/mL。灭活鱼肠道弧菌免疫 6 周龄纯种新西兰大白兔,第一次免疫混入弗氏完全佐剂(1:1, V/V),在背部选取 6 个点进行皮下注射,1 周后使用灭活菌液与弗氏不完全佐剂混合液(1:1, V/V),背部 6 点皮下注射免疫;2 周后重复免疫 1 次,并于 1 周后耳缘静脉再次注射灭活菌液。最后一次免疫 1 周以后取血,将血液置于干净的离心管中,室温静置 1 h 后,4 °C 下静置过夜。次日,4 °C、3500×g 离心 15 min,获得的上清为抗血清。

配制 0.06 mol/mL 乙酸缓冲液(pH 4.0)用来稀释兔抗血清,抗血清与乙酸缓冲液的比例为 1:4 (V/V),用 0.1 mol/mL NaOH 调整血清稀释液 pH 至 4.5;转移至室温下,缓慢滴加辛酸,用量为每 1 mL 血清稀释液中滴加 25 μ L 辛酸,用电磁搅拌器搅拌 30 min。将混合液于 4 °C、10000×g 离心

30 min,收集上清并用 45 μ m 微孔滤膜过滤,加入上清体积 10% 的无菌 PBS 溶液,用 5.0 mol/mL NaOH 调整 pH 至 7.4。冰浴条件下,向混合液中缓慢加入硫酸铵粉末并搅拌均匀,使终浓度为 0.277 g/mL,4 °C 静置过夜。次日,在 4 °C 下 5000×g 离心 15 min,弃上清,收集沉淀,用少量(10%初始血清体积)无菌 PBS 溶解,转入透析袋,于超纯水中透析 24 h,期间更换数次超纯水;透析完成后进行冻干,将冻干粉末用无菌 PBS 重悬至合适浓度,十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析纯化的兔多抗,-80 °C 保存。

1.2.2 鱼肠道弧菌多抗的效价测定 利用 ELISA 方法测定鱼肠道弧菌多抗的效价。在 96 孔酶标板中每孔加入 100 μ L 5×10^7 CFU/mL 鱼肠道弧菌菌液包被过夜。次日弃去板内液体,用含 0.05% Tween-20 的 PBS(PBST, pH 7.4)洗涤,每孔加入 200 μ L 的 3% BSA,37 °C 封闭 1 h;洗涤酶标板,依次加入 100 μ L 梯度稀释的鱼肠道弧菌多抗(表 2),设置 3 个平行,阴性对照加 100 μ L 0.01 mol/L PBS,37 °C 孵育 1 h;用 PBST 洗涤酶标板,每孔加入 100 μ L 碱性磷酸酶(AP)标记羊抗兔 IgG 抗体,37 °C 孵育 1 h;洗涤后,每孔加入 200 μ L 底物显色液(1 mg/mL pNPP, 0.5 mol/L 氯化镁以及 10% 二乙醇胺)避光发色 5 min,用酶标仪测定 OD₄₀₅ 值。

1.3 鱼肠道弧菌抗原组分的提取

1.3.1 鱼肠道弧菌外膜蛋白的提取 将鱼肠道弧菌扩大培养,参考熊焰等^[20]的方法,将菌液以 5000×g 离心 10 min,无菌 PBS 洗涤 3 次,用少量 PBS 重悬,加入 10% 蔗糖溶液混合均匀,在-20 °C 条件下反应 15 min;恢复至室温,加入等量 0.4% Triton-X100,混合搅拌一段时间后,10000×g 离心 30 min 取得上清,过滤掉上清中的杂质,加入 2.5 倍上清体积的无水冰乙醇,放置在-20 °C 条件下过夜;次日,4 °C、10000×g 离心 30 min 收集沉淀,沉淀经过 Tris-NaCl 洗涤后重悬,加入等体积碘化钾溶液,37 °C 条件下作用 60 min;收集上清液,加入 2.5 倍上清体积的冰无水乙醇,放置在-20 °C 条件下过夜;次日,4 °C 条件下离心混合溶液获取沉淀,使用无菌 PBS 溶液重悬沉淀,移至透析袋中进行梯度透析,冻干,得到鱼肠道弧菌外膜蛋

白。粉末溶于 PBS 中, Bradford 法^[21]测定蛋白浓度, -80°C 条件下保存。

1.3.2 鱼肠道弧菌鞭毛蛋白的提取 参考张晓佩等^[22]的方法, 将鱼肠道弧菌扩大培养, 离心富集, 无菌 PBS 溶液洗涤并重悬。用 1.0 mol/L HCl 溶液调整菌液 pH 至 2.0, 在室温条件下搅拌约 30 min, 4°C 、 $1500\times g$ 离心 30 min 并收集上清; 然后在 4°C 、 $533000\times g$ 条件下对上清液离心 1 h, 再次收集上清; 使用 1.0 mol/L NaOH 溶液将上清液 pH 调至中性, 缓慢地加入 $(\text{NH}_3)_2\text{SO}_4$ 至终浓度为 2.67 mol/L , 冰浴搅拌 30 min, 4°C 放置过夜; 低温超高速离心 (4°C , $533000\times g$) 15 min, 弃掉上清收集沉淀, 使用适量的无菌 PBS 溶液重悬沉淀, 移至透析袋中透析, 冻干, 得到鱼肠道弧菌鞭毛蛋白。将粉末溶于无菌 PBS 溶液, Bradford 法测定蛋白浓度, -80°C 保存。

1.3.3 鱼肠道弧菌胞外产物的提取 提取鱼肠道弧菌胞外产物参照 Inamura 等^[23]的方法。在 LB 液体培养基中接种适量鱼肠道弧菌, 于 37°C 恒温摇床中过夜培养。准备 LB 琼脂培养基, 在其上铺覆一层玻璃纸, 吸取 1 mL 菌液均匀涂布在 LB 琼脂平板上, 移入 37°C 恒温箱中培养 1~2 d, 使用少量无菌 PBS 溶液将平板上的菌体冲洗下来并收集菌体悬液, 4°C 、 $7000\times g$ 离心 30 min, 收集上清。将所得上清经微孔滤膜过滤掉杂质, 加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 固体至终浓度为 2.0 mol/mL , 室温下均匀搅拌 1 h, 4°C 放置过夜; 次日, 4°C 下 $10000\times g$ 离心 1 h, 使用无菌 PBS 溶液重悬沉淀, 移入透析袋中, 放入超纯水中透析 24 h, 然后冻干。使用无菌 PBS 将所得冻干蛋白调整至适宜浓度, Bradford 法测定蛋白浓度, -80°C 条件下保存。

1.3.4 鱼肠道弧菌全菌破碎蛋白的制备 将鱼肠道弧菌接种在 LB 液体培养基中培养, 将菌液浓度调整至 $1\times 10^8\text{ CFU/mL}$, 置于超声波破碎仪 (Sonics & Materials; 振幅 39%; pulse on, 3 s; pulse off, 3 s) 中低温破碎, 直至菌液澄清透亮, 所得混合液即为鱼肠道弧菌全菌破碎蛋白, 于透析袋中超纯水透析 24 h, 然后冻干。使用无菌 PBS 将冻干蛋白调至适宜浓度, -80°C 条件下保存。

1.4 间接 ELISA 法分析免疫交叉反应

将纯化的鳃弧菌、溶藻弧菌、哈维氏弧菌和

副溶血弧菌调整到适当浓度, 采用 1.3.4 的方法提取其外膜蛋白、鞭毛蛋白、胞外产物和全菌破碎蛋白。间接 ELISA 法检测鱼肠道弧菌多抗与上述病原菌的抗原蛋白的免疫反应: 将抗原蛋白分别包被于 96 孔酶标板中 4°C 过夜, 每种抗原蛋白设置 3 个平行, 以 0.01 mol/mL 无菌 PBS 溶液作为阴性对照; 次日, PBST 洗涤酶标板 3 次, 每孔加入 $200\text{ }\mu\text{L}$ 的 3% BSA, 于 37°C 恒温箱中封闭 1 h 后倒掉; 然后 PBST 洗涤 3 次, 加入鱼肠道弧菌多抗 (1 : 2000), 37°C 孵育 1 h, PBST 洗涤 3 次, 每孔加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ AP 标记的羊抗兔 IgG (1 : 8000), 37°C 条件下孵育 1 h; PBST 洗涤 3 次。每孔加入 $200\text{ }\mu\text{L}$ 底物显色液, 于暗处充分反应 10~20 min, 然后每孔加入 $50\text{ }\mu\text{L}$ 2 mol/mL NaOH 溶液终止显色反应, 于 405 nm 波长处检测 OD 值。计算各实验孔与阴性对照孔的光吸收值之比 (P/N), 当 $P/N\geq 2.1$ 时为阳性。计算 4 种抗原蛋白间的 P/N 值, 绘制“ P/N 值-抗原蛋白”直方图, 根据直方图分析是否存在免疫交叉反应。

1.5 最适胶体金标记 pH 及蛋白标记浓度的确定

利用前期制备胶体金的方法^[10], 准备 100 mL 浓度为 0.01% 的氯金酸溶液, 放入微波炉中用高火煮沸 2 min, 快速加入少量浓度为 1% 的柠檬酸三钠溶液, 中火继续加热 3 min, 取出后放在室温下冷却, 并补充适量水分。用 0.1 mol/mL 碳酸钾溶液和 0.1 mol/mL 盐酸溶液将制得的 20 nm 胶体金的 pH 调至 $8.4^{[18]}$ 。为了确定胶体金的最适标记 pH, 用 0.1 mol/mL 碳酸钾溶液和 0.1 mol/mL 盐酸将胶体金溶液调整为不同的 pH, 各取 1.5 mL 胶体金, 分别加入 $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ 鱼肠道弧菌多抗 $100\text{ }\mu\text{L}$, 快速混合均匀, 室温下静置 30 min。加入 5% NaCl 溶液混合均匀, 于室温下静置 2 h。使用分光光度计测定波长 520 nm 处每个 pH 梯度的 OD 值, 以 OD 值为纵轴、pH 为横轴制作曲线图, 取曲线中 OD 值最大处对应的 pH 为稳定胶体金的最适 pH。

用 0.1 mol/L 碳酸钾溶液和 0.1 mol/mL 盐酸溶液将胶体金 pH 调至最适值, 将胶体金设置成 10 个浓度梯度, 从每个浓度梯度分出 1 mL 胶体金, 分别加入 $10\text{ }\mu\text{L}$ 不同浓度的鱼肠道弧菌多抗, 迅

速混合均匀, 室温下静置 30 min 后加入 5% NaCl 溶液, 混合均匀后室温静置 2 h。使用分光光度计测定每个浓度梯度在波长 520 nm 处的 OD 值, 以 OD 值为纵轴、蛋白浓度为横轴绘制曲线图, 取曲线中 OD 值最大处对应的蛋白浓度为稳定胶体金的最低蛋白量, 在此基础上加 20% 的蛋白量即是最适合的蛋白标记浓度。

1.6 金标抗体的制备

在确定了最适 pH 和最合适蛋白标记浓度后, 将胶体金调整至最适 pH, 按照最适合蛋白标记浓度加入鱼肠道弧菌多抗, 连续搅拌 20 min 后, 于室温下静置 10 min。用 BSA 溶液调整胶体金的终浓度为 1%, 然后搅拌 15 min, 室温下静置 10 min; 4 °C 下 1200×g 离心 15 min, 弃掉沉淀收集上清, 上清液经 13500×g (4 °C) 离心 30 min。弃掉上清收集沉淀, 使用金标多抗洗涤液(含 1% BSA 的 0.01 mol/L PBS, pH 8.4)洗涤沉淀。洗涤后离心, 再收集沉淀, 金标多抗保存液(0.01 mol/L PBS 溶液中含 3% 蔗糖, 1% BSA, 0.2% Tween-20 和 0.02% NaN₃, pH 8.4)重悬沉淀至原来体积的 1/10, 即为金标鱼肠道弧菌抗体。

1.7 检测线抗原蛋白特异性及划线浓度的确定

利用间接 ELISA 法测定鱼肠道弧菌 4 种抗原蛋白在 T1~T4 检测线上的划线浓度。在 96 孔酶标板中分别加入鱼肠道弧菌的 4 种抗原蛋白, 每种抗原蛋白设置 3 个平行, 无菌 PBS 作为阴性对照, 每孔添加 100 μL, 4 °C 包被过夜; 次日, 用 PBST 洗涤酶标板 3 次, 甩掉多余液体, 每孔加入 200 μL 无菌 PBS 配制的 BSA 封闭液, 37 °C 条件下封闭 1 h; 倒掉 BSA, PBST 洗涤 3 次后, 加入 100 μL 鱼肠道弧菌多抗(1 : 2000), 37 °C 孵育 1 h; 倒掉鱼肠道弧菌多抗, PBST 洗涤 3 次后, 加入 100 μL AP 标记的羊抗兔 IgG(1 : 8000)于 37 °C 孵育 1 h; 然后 PBST 洗涤 3 次去掉多余的羊抗兔 IgG; 加入 200 μL 新配制的底物显色液, 黑暗处反应 10~20 min, 加入 NaOH 溶液终止显色反应, 于 405 nm 处检测 OD 值, 计算各实验孔与阴性对照孔的光吸收值之比(P/N), $P/N \geq 2.1$ 时为阳性。计算 4 种抗原蛋白间的 P/N 值的比值, 并根据 P/N 比值和蛋白包

被浓度来确定划线浓度。

1.8 鱼肠道弧菌胶体金快速检测试纸的结构设计与制备

1.8.1 鱼肠道弧菌快速检测试纸的结构设计 当病原菌的多种抗原组分排列在一起时, 它们能够同时与该病原菌的抗体结合发生阳性反应, 而其他菌只有个别的共同抗原会与抗体发生交叉反应。由此, 将鱼肠道弧菌的 4 种抗原排列在一起作为 4 条检测线(T1~T4), 并将 T4 线设计为全菌蛋白, 用金标鱼肠道弧菌抗体制备金标垫, 羊抗兔 IgG 作为质控抗体, 设计鱼肠道弧菌快速检测试纸。利用竞争免疫层析法进行检测, 待检样品中含有鱼肠道弧菌时, 会与 4 条检测线上的抗原蛋白竞争结合金标垫上的金标鱼肠道弧菌抗体, 使检测线上的抗原蛋白无法与金标鱼肠道弧菌抗体反应, 则 4 条检测线全部不显色; 若待检样品中不含鱼肠道弧菌时, 4 条检测线上的抗原能够与金标鱼肠道弧菌抗体结合, 则 4 条检测线全部显色; 若待检样品中含有其他病原菌, 只有共同抗原与检测线上的鱼肠道弧菌抗原竞争结合金标抗体, 则部分检测线不显色。

1.8.2 金标垫及检测层的制备 将玻璃纤维膜裁成大小适宜的小条, 用喷膜仪(Biodot, XYZ3060)将制备好的金标鱼肠道弧菌多抗均匀地喷涂在玻璃纤维膜小条上, 即为金标垫, 冷冻干燥, 避光 4 °C 封存备用。

用 0.01 mol/L 的无菌 PBS 将鱼肠道弧菌外膜蛋白、鞭毛蛋白、胞外产物和全菌破碎蛋白的浓度分别调整至 1.5 中所确定的最适宜浓度, 使用喷膜仪分别将各蛋白喷涂于硝酸纤维素膜上作为检测线 T1、T2、T3 和 T4, 4 条检测线之间相距 1.5 mm。用 0.01 mol/L PBS 调整羊抗兔 IgG 浓度至 0.5 mg/mL, 将其喷涂于硝酸纤维素膜上作为质控线(C 线), 质控线与检测线 T4 之间的距离约为 5 mm, 质控线接近吸水垫(图 1-4), 检测线 T1 接近样品垫(图 1-1)。将包被好的硝酸纤维素膜室温干燥后, 在 37 °C 下用 BSA 封闭液浸泡 1 h, PBST 漂洗 3 次, 每次 5 min, 晾干。

1.8.3 试纸条的组装 在载体底板上依次粘贴硝

酸纤维素膜、金标垫、样品垫和吸水垫, 组装成试纸整板。其中硝酸纤维膜上端边缘对齐叠放于吸水垫边缘之下, 硝酸纤维素膜下端边缘则位于金标垫上边缘之下, 样品垫的上端边缘对齐叠放在金标垫的下端边缘之上(图 1)。将组装好的试纸整板用切条机裁成 3.75 mm 宽的试纸条, 装入包装卡壳中, 密封保存于有干燥剂的铝箔袋中。

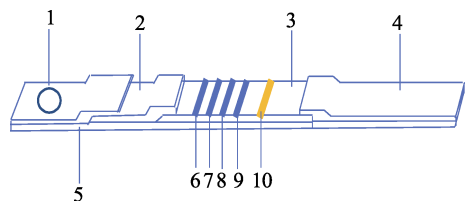


图 1 鱼肠道弧菌快速检测试纸结构设计示意图

1. 样品垫; 2. 金标垫; 3. 硝酸纤维素膜(NC 膜); 4. 吸水垫;
5. PVC 底板; 6-9. 检测线 T1-T4(T 线); 10. 质控线(C 线).
- Fig. 1 Schematic of colloidal gold strip for rapid detection of *Vibrio ichthyenteri*
1. Sample pad; 2. Gold label pad (glass fiber containing anti-*Vibrio ichthyenteri* polyclonal antibody); 3. Nitrocellulose membrane; 4. Absorption pad; 5. PVC board; 6-9. Test lines 1-4 (T line); 10. Control line (C line).

1.9 检测试纸的特异性和灵敏性

将鱼肠道弧菌、鳃弧菌、副溶血弧菌、溶藻弧菌、哈维氏弧菌分别进行离心纯化, 用无菌 PBS (pH 7.4)调整菌液浓度至 1×10^7 CFU/mL, 无菌 PBS 作为阴性对照, 使用制备的鱼肠道弧菌快速检测试纸进行检测, 反应 10 min 后观察检测结果并拍照, 确定试纸的检测特异性。

用 0.01 mol/mL 无菌 PBS (pH 7.4)将纯化的鱼肠道弧菌稀释为 5×10^7 CFU/mL、 5×10^6 CFU/mL、 5×10^5 CFU/mL、 5×10^4 CFU/mL 4 个浓度梯度, 使用制备的鱼肠道弧菌快速检测试纸进行检测, 10 min 后肉眼观察结果并拍照, 确定试纸的检测灵敏性。

1.10 牙鲆组织中鱼肠道弧菌的检测

取感染了鱼肠道弧菌并发病的牙鲆肝、脾、肾组织, 每 1 g 组织样品用 5 mL 无菌 PBS 在冰浴条件下充分研磨 3~5 min, 用细密的筛绢过滤得到的研磨液作为检测样品液, 使用制备的鱼肠道弧菌检测试纸进行检测。健康的牙鲆肝、脾、肾组织液和无菌 PBS 分别作为阴性对照。

采用 ELISA 技术作为对照, 上述患病牙鲆的

检测样品液为包被液, 健康牙鲆组织液作为阴性对照, 检测牙鲆组织中的鱼肠道弧菌, 以确定快速检测试纸的检测准确性。

2 结果与分析

2.1 鱼肠道弧菌兔多抗的纯化及效价

经过纯化的兔抗鱼肠道弧菌多抗进行 SDS-PAGE 分析, 结果显示(图 2), 鱼肠道弧菌多抗包括 IgG 的重链和轻链蛋白, 表明纯化后的鱼肠道弧菌多抗符合要求, 可以用于后续实验。

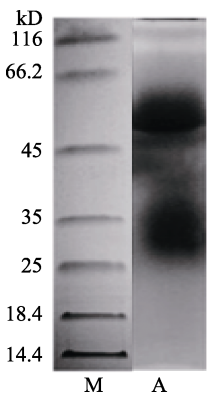


图 2 兔抗鱼肠道弧菌多抗纯化后的 SDS-PAGE 分析

M: 蛋白质分子量标准; A: 鱼肠道弧菌兔多抗.

Fig. 2 SDS-PAGE analyses of anti-*Vibrio ichthyenteri* polyclonal antibody

M: marker, A: anti-*V. ichthyenteri* polyclonal antibody.

ELISA 检测结果显示, 当鱼肠道弧菌多抗的稀释倍数低于或等于 1×10^5 时, OD_{405} 值大于 2 倍的 PBS 阴性对照的 OD_{405} 值。当抗体稀释倍数大于 2×10^5 时, OD_{405} 值小于 2 倍的 PBS 阴性对照的 OD_{405} 值, 得出鱼肠道弧菌兔多抗的效价为 1×10^5 (表 1)。

表 1 鱼肠道弧菌兔多抗的效价(OD_{405})

Tab. 1 Titers of anti- <i>Vibrio ichthyenteri</i> polyclonal antibody										
抗体稀释倍数 antibody dilution ratio (1 : X)										PBS
800	1600	3200	6400	12800	25600	51200	1×10^5	2×10^5		
1.582	1.269	1.038	0.946	0.781	0.675	0.423	0.210	0.149	0.097	

2.2 鱼肠道弧菌抗原组分 SDS-PAGE 分析结果

SDS-PAGE 结果显示(图 3), 鱼肠道弧菌外膜蛋白主要条带分子量为 44 kD、38 kD 和 35 kD; 鞭

毛蛋白主要条带分子量为 38 kD、33 kD 和 18.4 kD; 胞外产物蛋白主要条带分子量为 36 kD、26 kD、20 kD 和 18 kD。选取这些主要条带用作检测线抗原蛋白。

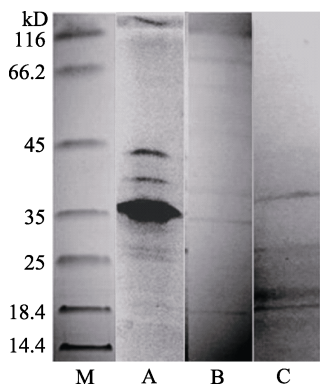


图 3 鱼肠道弧菌抗原蛋白的 SDS-PAGE 分析

M: 蛋白质分子量标准; A: 外膜蛋白;
B: 鞭毛蛋白; C: 胞外产物。

Fig. 3 Analysis of the extracted antigen protein of *Vibrio ichthyenteri* by SDS-PAGE

M: marker; A: outer membrane protein; B: flagellin protein;
C: extracellular products of *V. ichthyenteri*.

2.3 免疫交叉分析结果

ELISA 结果显示(图 4), 鱼肠道弧菌多抗与其外膜蛋白、鞭毛蛋白、胞外产物和全菌破碎蛋白的反应呈现出强阳性; 而鱼肠道弧菌多抗与其他几种病原菌抗原的反应中, 溶藻弧菌的全菌破碎蛋白, 鳗弧菌的外膜蛋白、鞭毛蛋白和全菌破碎蛋白, 副溶血弧菌的外膜蛋白、鞭毛蛋白和全菌破碎蛋白呈现不同程度的弱阳性, 表明兔抗鱼肠道弧菌多抗与这些抗原存在较弱的免疫交叉。

2.4 胶体金标记鱼肠道弧菌多抗的最适宜 pH 和蛋白结合浓度

通过 OD 曲线值法确定最适宜的胶体金标记鱼肠道弧菌多抗的 pH, 发现 OD 值随 pH 升高而升高, 达到峰值后呈现下降趋势, 其最大值处对应的 pH 为 8, 因此胶体金标记鱼肠道弧菌多抗的最适宜 pH 为 8(图 5)。

测定了胶体金与不同浓度鱼肠道弧菌多抗结合的 OD 值, 结果表明, 随着鱼肠道弧菌多抗蛋白浓度的升高, OD 值出现先升高后降低的趋势, 蛋白浓度为 2 $\mu\text{g/mL}$ 时 OD 值最高, 即稳定胶体金的最低蛋白量为 2 $\mu\text{g/mL}$, 在此基础上加 20%

蛋白量, 即 2.4 $\mu\text{g/mL}$ 为胶体金标记鱼肠道弧菌多抗的最适蛋白结合浓度(图 6)。

2.5 检测线抗原蛋白的浓度确定

ELISA 结果显示(表 2), 鱼肠道弧菌的外膜蛋白、鞭毛蛋白、胞外产物及全菌蛋白与阴性对照

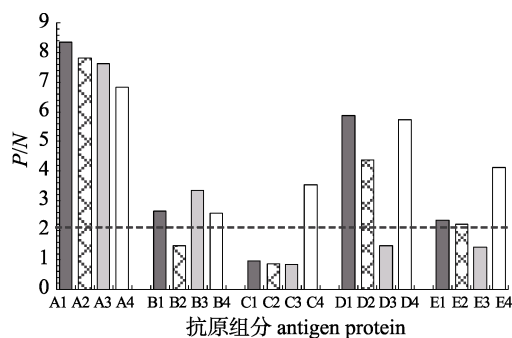


图 4 鱼肠道弧菌兔多抗与 5 种病原菌
抗原组分的免疫反应

A1-A4: 鱼肠道弧菌外膜蛋白、鞭毛蛋白、胞外产物和全菌蛋白; B1-B4: 哈维氏弧菌外膜蛋白、鞭毛蛋白、胞外产物和全菌蛋白; C1-C4: 溶藻弧菌外膜蛋白、鞭毛蛋白、胞外产物和全菌蛋白; D1-D4: 鳗弧菌外膜蛋白、鞭毛蛋白、胞外产物和全菌蛋白; E1-E4: 副溶血弧菌外膜蛋白、鞭毛蛋白、胞外产物和全菌蛋白; 虚线: $P/N=2.1$ 。

Fig. 4 Analysis of cross-reactivity between anti-*Vibrio ichthyenteri* polyclonal antibody and the antigen proteins of five bacteria by ELISA

A1-A4: outer membrane protein, flagellum protein, extracellular products and whole-cell bacterial protein of *V. ichthyenteri*; B1-B4: outer membrane protein, flagellum protein, extracellular products and whole-cell bacterial protein of *V. harveyi*; C1-C4: outer membrane protein, flagellum protein, extracellular products and whole-cell bacterial protein of *V. alginolyticus*; D1-D4: outer membrane protein, flagellum protein, extracellular products and whole-cell bacterial protein of *V. anguillarum*; E1-E4: outer membrane protein, flagellum protein, extracellular products and whole-cell bacterial protein of *V. parahaemolyticus*. The dashed line represented $P/N = 2.1$.

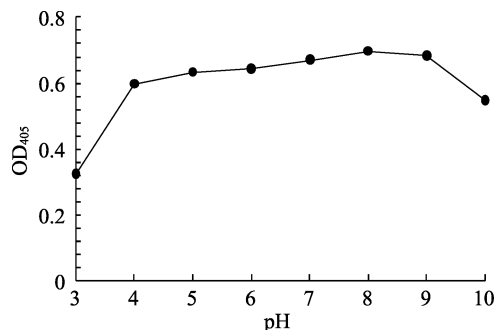


图 5 胶体金标记鱼肠道弧菌多抗的最佳 pH 确定

Fig. 5 Confirmation of optimum pH of colloidal gold for label of polyclonal antibody of *Vibrio ichthyenteri*

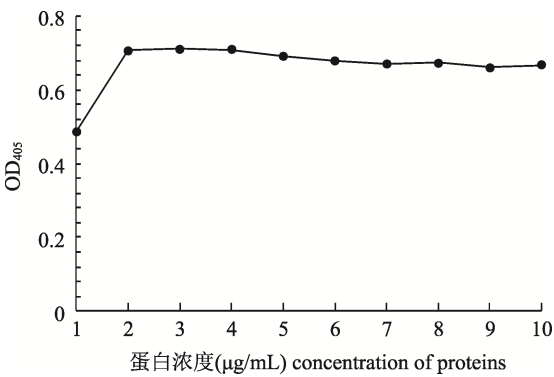


图 6 胶体金标记鱼肠道弧菌多抗的最适蛋白浓度确定
Fig. 6 Confirmation of optimum amount of anti-*Vibrio ichthyenterii* antibody labelled with colloidal gold

PBS 的 OD_{405} 值比值(P/N 值)皆大于 2.1, 表明 4 种抗原蛋白均可与鱼肠道弧菌抗体发生特异性结合。根据抗原蛋白间 P/N 值的比值, 确定检测线

抗原蛋白的浓度为: 外膜蛋白 0.8 mg/mL(T1 线)、鞭毛蛋白 0.3 mg/mL(T2 线)、胞外产物 1.0 mg/mL (T3 线)、全菌蛋白 0.4 mg/mL(T4 线)。

2.6 检测结果的判定

鱼肠道弧菌快速检测试纸检测结果的判读方法如图 7 所示: (1)若质控线(C 线)显色, 4 条检测线 T1~T4 均不显色, 说明检测结果为阳性; (2)若质控线显色, 4 条检测线 T1~T4 也全部显色, 说明检测结果为阴性; (3)若质控线显色, 检测线 T4 线呈现红色, 而检测线 T1、T2、T3 中个别条带不显色, 则说明检测样品中不含鱼肠道弧菌, 但含有与鱼肠道弧菌具有共同抗原的其他病原菌, 结果判定为其他菌的交叉反应; (4)若 C 线和检测线 T1~T4 均不显色, 说明该试纸条失效或操作不当, 检测结果无效。

表 2 鱼肠道弧菌检测线抗原的蛋白浓度确定

Tab. 2 The dispensed concentration of four antigens of <i>Vibrio ichthyenterii</i> determined by ELISA					
项目 item	外膜蛋白 outer membrane protein	鞭毛蛋白 flagellum protein	胞外产物 extracellular product	全菌蛋白 whole-cell bacterium protein	PBS
OD_{405}	1.906	1.830	1.425	1.396	0.215
P/N	6.880	6.529	4.639	4.505	—
划线浓度/(mg/mL) dispensed concentration	0.3	0.5	1.0	0.4	—

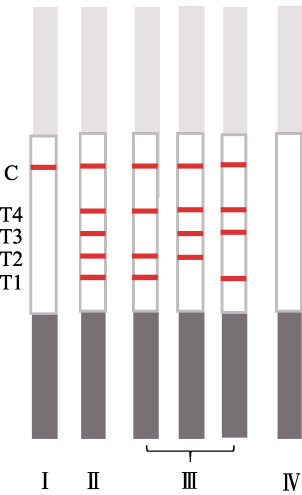


图 7 鱼肠道弧菌快速检测试纸检测结果判读示意图
I: 阳性结果; II: 阴性结果; III: 交叉反应; IV: 试纸失效.
Fig. 7 Diagram of colloidal gold test strip for rapid detection of *Vibrio ichthyenterii*
I: positive results; II: negative results; III: cross reaction; IV: invalid results.

2.7 试纸的特异性

为了确定快速检测试纸的特异性, 对纯化的

鱼肠道弧菌、溶藻弧菌、鳃弧菌、哈维氏弧菌和副溶血弧菌进行了检测, 结果表明(图 8), 鳃弧菌、溶藻弧菌、哈维氏弧菌、副溶血弧菌检测组

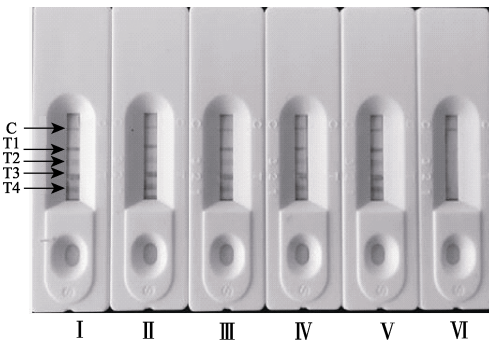


图 8 鱼肠道弧菌快速检测试纸的特异性检测
I: 鳃弧菌检测结果; II: 溶藻弧菌检测; III: 哈维氏弧菌检测结果; IV: 副溶血弧菌检测结果; V: PBS 阴性对照; VI: 鱼肠道弧菌检测结果(阳性).
Fig. 8 Specificity test of colloidal gold strip for rapid detection of *Vibrio ichthyenterii*
I: *V. anguillarum*; II: *V. alginolyticus*; III: *V. harveyi*; IV: *V. parahaemolyticus*; V: PBS; VI: *V. ichthyenterii*, positive.

的质控线和 T4 检测线皆显色, T3 线显色较浅(图 8-I、II、III、IV), 说明有交叉反应存在; 阴性对照 PBS 组的质控线 C 及 4 条检测线皆显色, 表明结果为阴性(图 8-V); 鱼肠道弧菌组只有质控线 C 显色, T1~T4 检测线均不显色, 即检测结果为阳性(图 8-VI)。

2.8 试纸的灵敏性

使用制备的快速检测试纸检测 5×10^7 CFU/mL、 5×10^6 CFU/mL、 5×10^5 CFU/mL、 5×10^4 CFU/mL 4 个不同浓度梯度的鱼肠道弧菌, 发现当浓度为 5×10^7 CFU/mL、 5×10^6 CFU/mL、 5×10^5 CFU/mL 时, T1~T4 线不显色, C 线显色, 表明结果为阳性; 当浓度为 5×10^4 CFU/mL 时, C 线和 T1~T4 线皆显色, 检测结果为阴性, 因此, 鱼肠道弧菌快速检测试纸的最低检测限为 5×10^5 CFU/mL, 低于该浓度则无法检测到病原菌(图 9)。

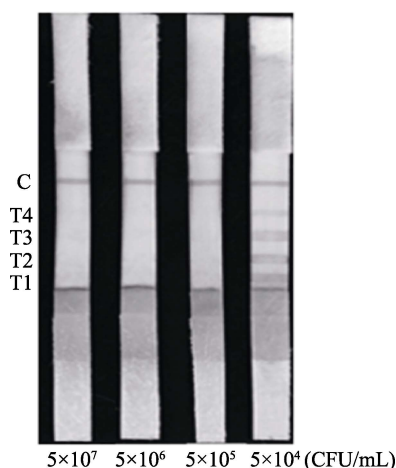


图 9 鱼肠道弧菌快速检测试纸灵敏度检测

Fig. 9 Sensitivity test of colloidal gold strip for rapid detection of *Vibrio ichthyenter*

2.9 鱼肠道弧菌快速检测试纸的检测准确性

使用制备的快速检测试纸检测感染了鱼肠道弧菌发病的牙鲆肝、脾、肾的混合样品, 结果显示, T1~T4 检测线皆不显色, 只有质控线 C 显色, 结果判定为阳性(图 10A-iii); 而健康牙鲆的肝、脾、肾混合样品和 PBS 使 4 条检测线 T1~T4 和质控线 C 皆显色, 结果判定为阴性(图 10A-i, ii)。

运用 ELISA 法检测相同样品, 结果表明, 发病牙鲆组织与阴性对照的 OD₄₀₅ 值的比值大于 2.1, 说明检测结果为阳性(图 10B), 与试纸的检测结果一致。

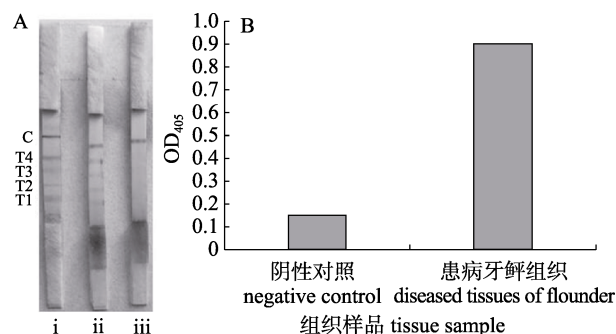


图 10 快速检测试纸(A)和 ELISA 法(B)检测牙鲆组织样品中的鱼肠道弧菌

Fig. 10 Detection of *Vibrio ichthyenter* in tissues of *Paralichthys olivaceus* using colloidal gold strip (A) and ELISA (B)

3 讨论

传统的核酸检测法和酶联免疫法是常用的检测病原的手段, 但大多存在耗时、操作复杂等问题, 不适合在养殖现场对病原进行检测。根据细菌包含多种抗原组分的特性, 利用抗原-抗体特异性结合可同步检测病原菌的多种抗原, 所有抗原同时与病原菌抗体反应则为阳性, 个别抗原反应则为交叉反应, 由此可以准确鉴别阳性结果与交叉反应。本实验室前期利用 4 种不同抗原蛋白作为检测线抗原研制的溶藻弧菌快速检测试纸, 使用溶藻弧菌多抗即可准确鉴别病原感染与免疫交叉^[17]。为了满足在养殖现场快速检测鱼肠道弧菌的产业需求, 本研究制备了鱼肠道弧菌多抗作为金标抗体, 选取不同浓度的 4 种鱼肠道弧菌抗原蛋白作为检测线抗原, 并将 T4 线设置为全菌蛋白, 羊抗兔 IgG 作为质控线, 研制了鱼肠道弧菌快速检测试纸, 4 种抗原蛋白同时与检测样品中的鱼肠道弧菌竞争结合金标抗体, 4 条检测线同时不显色时检测结果为阳性, 4 条线同时显色则检测结果为阴性。对发病牙鲆组织的检测结果证明, 该试纸可以准确鉴别鱼肠道弧菌, 在无需筛选特异性抗体和抗原的情况下, 实现了鱼肠道弧菌的现场、快速、准确检测。

本实验室曾研制了副溶血弧菌、鱼肠道弧菌、鳃弧菌、溶藻弧菌、哈维氏弧菌和河流弧菌(*Vibrio fluvialis*)的血清学诊断抗原芯片, 利用抗原芯片多靶标同步检测的优势有效避免了交叉反应对阳性结果判定的干扰, 无需筛选特异性抗原/抗体即

可实现病原菌的准确鉴别^[24]。本研究分析了鱼肠道弧菌多抗与鱼肠道弧菌、溶藻弧菌、副溶血弧菌、鳃弧菌和哈维氏弧菌各抗原蛋白的免疫交叉反应,发现鱼肠道弧菌多抗与自身的 4 种抗原蛋白反应最强烈,但与其他 4 种弧菌的个别抗原蛋白发生较弱的免疫交叉反应,这些结果为解决交叉反应干扰问题提供了基础。本研究将鱼肠道弧菌的 4 种抗原蛋白排列在一起作为 4 条检测线 T1~T4,检测线 T4 特别设计为全菌蛋白,4 条检测线上喷涂不同浓度的抗原蛋白,采用竞争法进行检测,待测样品中的鱼肠道弧菌优先结合金标抗体,阻止金标抗体与 4 种检测线抗原结合,则 T1~T4 线皆不显色,判断为阳性结果;若样品中不含鱼肠道弧菌,金标抗体则与 4 条检测线上的抗原蛋白结合, T1~T4 线皆显色,结果判定为阴性;若样品中存在与鱼肠道弧菌有共同抗原的其他病原菌,金标鱼肠道弧菌抗体与共同抗原结合,使 T1~T3 线中的某条线不显色或者变浅,则为交叉反应; T4 线上设置全菌蛋白,因其含有除共同抗原以外的其他抗原,使 T4 线一定出现红色,避免了在含有较多共同抗原的其他菌感染时出现 T1~T4 线全部不显色的情况,从而避免了假阳性的产生。另外,因为鱼肠道弧菌中不同抗原组分的含量不同,本研究确定了 4 种抗原蛋白的不同划线浓度,在检测限以上浓度的鱼肠道弧菌感染时,能够保证 4 条检测线同时不显色,避免产生有的显色有的不显色的假阴性结果。这种试纸设计方式为本实验室首次使用,通过在溶藻弧菌快速检测试纸^[7]和本研究中的应用,证明其能够通过一步式反应实现一种病原菌的多靶标同步检测,从而解决了免疫交叉干扰问题。对牙鲆组织中鱼肠道弧菌的检测结果显示与 ELISA 结果一致,证明制备的快速检测试纸具有较好的检测准确性。但是,对于鱼肠道弧菌与其他菌混合感染的情况,使用该试纸只能检测出鱼肠道弧菌,不能鉴定其他菌,需要联合使用其他病原菌的快速检测试纸或者多病原高通量检测技术鉴别混合感染。已报道的 6 种弧菌血清学诊断抗原芯片^[24],同步检测鳃弧菌、海豚链球菌(*Streptococcus iniae*)、杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas*

fluorescens)、迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)及海分支杆菌(*Mycobacterium marinum*)的检测免疫芯片^[25],以及上述多病原核酸检测技术^[8,13-14]等,适于混合感染情况下的多病原鉴别。

目前,检测病原菌的胶体金免疫层析试纸的灵敏度一般在 $10^5 \sim 10^6$ CFU/mL^[26-27]。本研究制备的鱼肠道弧菌快速检测试纸的最低检测限为 5×10^5 CFU/mL,灵敏度达到了同类试纸的检测水平。但是,当鱼肠道弧菌浓度低于该检测限浓度时,则 4 条检测线会显色,出现假阴性结果,限制了该试纸在感染早期的病原检测中的应用。因此,有待于通过优化抗体及其他实验条件参数等提高检测的灵敏度。虽然胶体金快速检测试纸的灵敏度达不到核酸检测技术的灵敏度水平($10^2 \sim 10^3$ CFU/mL)^[14],但其样品处理更简单,比 LAMP 技术^[14]更加简便、快捷,适用于养殖现场或动物检疫中大量样品的病原初筛,与病原核酸检测技术配合使用,可大大提高检测效率。

参考文献:

- [1] Ishimaru K, Akagawa-Matsushita M, Muroga K. *Vibrio ichthyenteri* sp. nov., a pathogen of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) larvae[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1996, 46(1): 155-159.
- [2] Chen C Z, Fang H, Zhang X J, et al. Infection and characterization of *Vibrio ichthyenteri* isolated from flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. Journal of Tropical Oceanography, 2006, 25(5): 80-86. [陈翠珍, 房海, 张晓君, 等. 牙鲆鱼肠道弧菌感染症及病原特性研究[J]. 热带海洋学报, 2006, 25(5): 80-86.]
- [3] Zhang X J, Chen C Z, Yan B L, et al. Studies on biological characteristics of pathogenic *Vibrio ichthyenteri* isolated from pufferfish (*Takifugu rubripes* L.)[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2009, 33(6): 1118-1125. [张晓君, 陈翠珍, 阎斌伦, 等. 红鳍东方鲀病原鱼肠道弧菌的生物学特性研究[J]. 水生生物学报, 2009, 33(6): 1118-1125.]
- [4] Lv J C, Li X, Han Y, et al. Isolation and identification of *Vibrio ichthyenteri* in farmed turbot (*Scophthalmus maximus*) and histopathology study of the diseased fish[J]. Journal of Fisheries of China, 2009, 33(2): 311-317. [吕俊超, 李轩, 韩茵, 等. 养殖大菱鲆中牙鲆肠弧菌的分离鉴定及组织病理学[J]. 水产学报, 2009, 33(2): 311-317.]
- [5] Han H J, Lee D C, Kim D H, et al. Phenotypic diversity of *Vibrio ichthyenteri* isolated from the gastrointestinal tract of larval olive flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. Fisheries and Aquatic Sciences, 2013, 16(2): 125-129.

- [6] Zhang M W, Tang X Q, Sheng X Z, et al. Antigenic analysis of total protein of *Vibrio ichthyenteri* using mice and flounder antisera[J]. Periodical of Ocean University of China, 2016, 46(10): 24-31. [张铭伟, 唐小千, 绳秀珍, 等. 利用鱼抗血清及鼠抗血清分析鱼肠道弧菌全菌蛋白抗原性[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2016, 46(10): 24-31.]
- [7] Hatje E, Neuman C, Stevenson H, et al. Population dynamics of *Vibrio* and *Pseudomonas* species isolated from farmed Tasmanian Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): A seasonal study[J]. Microbial Ecology, 2014, 68(4): 679-687.
- [8] Kim M S, Cho J Y, Choi H S. Identification of *Vibrio harveyi*, *Vibrio ichthyenteri*, and *Photobacterium damsela* isolated from olive flounder *Paralichthys olivaceus* in Korea by multiplex PCR developed using the *rpoB* gene[J]. Fisheries Science, 2014, 80(2): 333-339.
- [9] Lee D C, Han H J, Choi S Y, et al. Antibigrams and the estimation of epidemiological cut off values for *Vibrio ichthyenteri* isolated from larval olive flounder, *Paralichthys olivaceus*[J]. Aquaculture, 2012, 342-343: 31-35.
- [10] Tang X Q, Wang H X, Liu F G, et al. Recombinant outer membrane protein T (OmpT) of *Vibrio ichthyenteri*, a potential vaccine candidate for flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. Microbial Pathogenesis, 2019, 126: 185-192.
- [11] Tang X Q, Wang H Y, Liu F G, et al. Outer membrane protein A: An immunogenic protein induces highly protective efficacy against *Vibrio ichthyenteri*[J]. Microbial Pathogenesis, 2017, 113: 152-159.
- [12] Tarazona E, Pérez-Cataluña A, Lucena T, et al. Multilocus sequence analysis of the redefined clade *scophthalmi* in the genus *Vibrio*[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2015, 38(3): 169-175.
- [13] Barlaan E A, Sugimori M, Furukawa S, et al. Electronic microarray analysis of 16S rDNA amplicons for bacterial detection[J]. Journal of Biotechnology, 2005, 115(1): 11-21.
- [14] Zhou S, Gao Z X, Zhang M, et al. Development of a quadruplex loop-mediated isothermal amplification assay for field detection of four *Vibrio* species associated with fish disease[J]. SpringerPlus, 2016, 5(1): 1104.
- [15] Wu X C, Deng D, Cheng S F, et al. Development of indirect ELISA for rapid detection of bacterium *Vibrio ichthyenteri*[J]. Fisheries Science, 2013, 32(5): 284-288. [吴晓春, 邓灯, 程顺峰, 等. 鱼肠道弧菌间接 ELISA 快速检测法的建立[J]. 水产科学, 2013, 32(5): 284-288.]
- [16] Deng D, Wu X C, Cheng S F, et al. Detection of bacterial pathogen *Vibrio ichthyenteri* by monoclonal antibody and flow cytometry[J]. Fisheries Science, 2015, 34(2): 113-117. [邓灯, 吴晓春, 程顺峰, 等. 鱼肠道弧菌单克隆抗体流式细胞术检测技术的研究[J]. 水产科学, 2015, 34(2): 113-117.]
- [17] Li J W, Sheng X Z, Tang X Q, et al. Development of a competitive gold immunochromatography test strip for rapid detection of *Vibrio alginolyticus* in fish[J]. Periodical of Ocean University of China, 2017, 47(9): 46-54. [李嘉文, 绳秀珍, 唐小千, 等. 运用抗原芯片原理与竞争免疫层析技术制备鱼类病原性溶藻弧菌快速检测试纸[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2017, 47(9): 46-54.]
- [18] Sheng X Z, Song J L, Zhan W B. Development of a colloidal gold immunochromatographic test strip for detection of lymphocystis disease virus in fish[J]. Journal of Applied Microbiology, 2012, 113(4): 737-744.
- [19] Zhan W B, Qi J G, Liu H M et al. Cross reactions between six pathogenic bacteria and their antisera[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2004, 11(1): 14-19. [战文斌, 齐继光, 刘洪明, 等. 水产动物 6 种主要病原菌与抗血清的免疫交叉反应[J]. 中国水产科学, 2004, 11(1): 14-19.]
- [20] Xiong Y, Sun X, Gou L. Study on SDS-PAGE and immunogenicity of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain MY-99 membrane protein[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2004, 35(1): 74-78. [熊焰, 孙霞, 苟琳. 猪肺炎支原体 MY-99 株膜蛋白 SDS-PAGE 分析及免疫原性研究[J]. 畜牧兽医学报, 2004, 35(1): 74-78.]
- [21] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1-2): 248-254.
- [22] Zhang X P, Gong H, Chen R J, et al. Purification and analysis of *Edwardsiella tarda* flagellin[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2008, 23(1): 35-38. [张晓佩, 龚晖, 陈如敬, 等. 迟钝爱德华氏菌鞭毛蛋白的提取与分析[J]. 福建农业学报, 2008, 23(1): 35-38.]
- [23] Inamura H, Muroga K, Nakai T. Toxicity of extracellular products of *Vibrio anguillarum*[J]. Fish Pathology, 1984, 19(2): 89-96.
- [24] Sheng X Z, Li W T, Wang X X, et al. Construction of serological diagnostic chip for pathogenic vibrio in fish[J]. China Animal Health Inspection, 2019, 36(12): 88-97. [绳秀珍, 李文涛, 王欣欣, 等. 鱼类病原性弧菌血清学诊断芯片技术构建[J]. 中国动物检疫, 2019, 36(12): 88-97.]
- [25] Li Y Q, Sheng X Z, Zhan W B, et al. Construction of immunochip for detection of six fish bacterial pathogens[J]. Periodical of Ocean University of China, 2010, 40(8): 48-54. [李永芹, 绳秀珍, 战文斌, 等. 6 种鱼类病原菌的免疫反应分析及其检测免疫芯片的构建[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2010, 40(8): 48-54.]
- [26] Song C M, Liu C, Wu S Y, et al. Development of a lateral flow colloidal gold immunoassay strip for the simultaneous detection of *Shigella boydii* and *Escherichia coli* O157: H7 in bread, milk and jelly samples[J]. Food Control, 2016, 59: 345-351.
- [27] Xia S Q, Yu Z B, Liu D F, et al. Developing a novel immunochromatographic test strip with gold magnetic bifunctional nanobeads (GMBN) for efficient detection of *Salmonella choleraesuis* in milk [J]. Food Control, 2016, 59: 507-512.

Development of a competitive gold immunochromatography test strip for rapid detection of *Vibrio ichthyenter* in fish

SHENG Xiuzhen¹, WANG Xinchun¹, LI Jiawen¹, TANG Xiaoqian¹, XING Jing¹, CHI Heng¹, ZHAN Wenbin^{1,2}

1. Laboratory of Pathology and Immunology of Aquatic Animals, KLMME, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;
2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071, China

Abstract: *Vibrio ichthyenter* is one of the most common pathogenic bacteria in marine-cultured fish that can infect many fish species, causing serious economic losses in fish aquaculture. Rapid diagnostic testing is critical for disease prevention and control. This study was performed in order to produce a method to detect *V. ichthyenter* on-site easily, rapidly, and accurately. First, rabbit anti-*V. ichthyenter* antibody was prepared, and the outer membrane protein, flagellum protein, extracellular products, and whole-cell bacterial protein were extracted from *V. ichthyenter*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus*, and *Vibrio harveyi*. The immunoreaction between the anti-*V. ichthyenter* antibody and the antigen proteins were subsequently analyzed; the results showed a strong positive immunoreaction between the anti-*V. ichthyenter* antibody and the four antigens of *V. ichthyenter*. However, cross-immunoreaction was observed between the anti-*V. ichthyenter* antibody and antigens of other vibrios. Thereafter, the anti-*V. ichthyenter* antibody was labeled with colloidal gold nanoparticles, and the concentration of the four specific antigens of *V. ichthyenter* for preparation of test lines were confirmed by ELISA. To avoid the interference of cross-reactivity, the four specific antigens of *V. ichthyenter* were dispensed on nitrocellulose membrane at different concentrations as four test lines (T1–T4); the whole-cell bacterial protein was set on the line T4, and goat-anti-rabbit IgG was used as the control line. A test strip for rapid detection of *V. ichthyenter* was thus developed based on competitive immunochromatography. The presence of *V. ichthyenter*, *V. parahaemolyticus*, *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, and *V. harveyi* could be detected with this test strip, and the results showed that it could specifically distinguish *V. ichthyenter* and exclude the interference of cross-reactivity of the other four bacteria, indicating good specificity. The detection limit of the test strip was determined to be 5×10^5 CFU/mL for *V. ichthyenter*, and the detection time was 10 min. To ensure the accuracy of the detection, tissues of flounder (*Paralichthys olivaceus*) infected by *V. ichthyenter* were detected using the test strip and ELISA simultaneously, and positive results were obtained with both methods. This study provides a promising on-site tool for rapid detection of *V. ichthyenter* in fish aquaculture.

Key words: *Vibrio ichthyenter*; colloidal gold; test strip; competitive immunochromatography; immune cross-reactivity

Corresponding author: ZHAN Wenbin. E-mail: wbzhan@ouc.edu.cn