

应用 Dot-ELISA 检测鱼类嗜水气单胞菌的试验研究

石存斌 吴淑勤 黄志斌 潘厚军

(中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广州 510380)

摘要 本文将 Dot-ELISA 应用于鱼类致病菌 Ah 菌的检测中, 对不同的抗原处理方法进行了比较, 认为采用反复冻融的方法处理抗原效果较好, 并对人工感染 Ah 菌的鱼类进行了检测。结果表明, Dot-ELISA 具有操作简便、特异性好、灵敏度较高的优点, 可用于鱼类 Ah 菌的快速检测。

关键词 斑点酶联免疫吸附法, 检测, 嗜水气单胞菌

近年来, 在我国许多地方出现了称之为“暴发病”的鱼类细菌性败血症, 许多研究^[1,2,3]表明, 该病主要由嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila* 简称 Ah) 所引起。一般认为, Ah 菌是一种条件致病菌, 有的研究则表明该菌可能有一定的侵袭力^[4], 而且有关该菌引起鱼类感染的报告日益增多, 因此, 对 Ah 菌的检测将越来越重要。

斑点酶联免疫吸附试验 (Dot-ELISA) 自 1982 年建立后, 由于采用硝酸纤维素膜或混合纤维素膜作为载体, 在膜上进行抗原或抗体的检测, 不需复杂的设备且操作简便、快速、结果易于保存, 目前已作为一种新的免疫酶技术在人兽医及鱼类病害研究等领域得到广泛应用^[5,6,8,9]。本文采用 Dot-ELISA 对鱼类 Ah 菌病的病原进行快速检测, 以期建立一种适于基层单位推广使用的鱼病诊断方法。

材料与方 法

(一) 菌株

嗜水气单胞菌 GX7 株, 爱德华氏菌 HD9 株由本室分离鉴定。

弧菌 E₃-11 株、荧光假单胞菌 56-10-12 株、点状产气单胞菌 (与嗜水气单胞菌属同种异名) 58-20-9 株, 购自中科院水生生物研究所。

浙江爱德华氏菌 E895205 株由浙江水产学院赠送。

(二) Ah 菌的不同抗原处理方法

实验所用菌株为 Ah 菌 GX7 株, 接种于普通营养琼脂培养基, 28℃ 培养 24h, 洗涤后菌浓度为: 10 倍稀释液 OD_{425nm} = 0.24, 按下列方法处理:

a: 反复冻融: 24h 内反复冻融 5 次。

b: 福尔马林灭活: 0.5% 福尔马林 4℃ 处理 24h。

c: SDS 提取: 0.01mol/L SDS 4℃处理 24h。

d: EDTA 提取: 0.01mol/L EDTA 4℃处理 24h。

e: 甘氨酸提取: 0.2mol/L 甘氨酸 (pH4) 4℃处理 24h。

f: 甘氨酸-氢氧化钠提取: 以 0.2N NaOH 调节 0.2mol/L 甘氨酸至 pH10, 4℃处理 24h。

处理完毕后离心取上清, 除反复冻融外, 其余上清液均在 0.02mol/L PBS (pH7.4) 中透析。

(三) 用于特异性检测中的抗原制备

前面 6 株细菌于 28℃培养 24h, 以灭菌盐水离心洗涤三次, 分别在冰水浴中超声波处理 5min 破碎细胞, 7500r/min 离心 15min, 取上清。

(四) 实验鱼组织中加菌法及人工感染法

(1) 实验鱼及其人工感染

实验鱼: 白鲢, 体重 20-32g; 鲤鱼, 体重 4-6g。来自本所试验场, 水泥池暂养观察一周以上。

(2) 组织中加菌法 取多尾白鲢和鲤鱼的肝脏混合, 加入等量 0.02ml/L PBS 匀浆, 匀浆液等分为 7 份, 每份中加入等量的一定浓度的 G×7 菌悬液, 使菌浓度分别为 10^3 CFU/ml- 10^8 CFU/ml, 对照加入等量灭菌盐水, 反复冻融, 待组织自然沉降后, 取上清检测。

(3) 人工感染 分为三个剂量组, 剂量分别为每克鱼体重 1×10^4 CFU、 5×10^4 CFU 和 2.5×10^5 CFU, 每个剂量组 3 尾白鲢和 3 尾鲤鱼, 腹腔注射; 对照组注射等量灭菌盐水。18h 后取肝脏, 加入 4 倍量 PBS 匀浆, 匀浆液反复冻融, 组织自然沉降后取上清检测。

(五) 抗血清的制备

Ah 菌 G×7 株接种普通营养琼脂, 28℃培养 24h, 用灭菌盐水洗下并离心洗涤三次, 配成菌量为 20mg/ml 的悬液, 加入弗氏完全佐剂, 采用耳缘静脉注射的方法, 免疫实验用成年雄性新西兰兔, 共注射 6 次, 每次 1ml, 间隔时间为 3 天。最后一次注射后一星期, 抽血测定效价后, 颈动脉放血分离血清, 加入 0.01%NaN₃, -20℃保存。抗血清效价为 1:256。

(六) Dot-ELISA 操作程序

(1) 点样: 约 2μl 抗原样品以毛细玻璃管点样于硝酸纤维素膜上。

(2) 封闭: 样品自然干燥后, 将膜浸入封闭液 (0.02mol/L pH7.4PBS-0.1%吐温-20-0.5%明胶) 中, 室温下作用 60min。

(3) 充分漂洗后, 在相应稀释度的抗血清中作用 60min。

(4) 充分漂洗后于 1:40 的 HRP-SPA (上海生物制品研究所生产) 液中作用 60min。

(5) 显色: 充分漂洗后, 显色液 (15mgDAB 溶于 50ml 0.02mol/L pH7.4PBS 中, 加入终浓度为 0.03%的 H₂O₂) 中约 2min, 以蒸馏水终止反应。

(6) 结果判定: 不出现斑点判为 (-), 斑点不清晰判为 (±), 斑点清晰依颜色由浅至深依次判为 (+)、(++)、(+++)。

结 果

(一)抗血清工作浓度的确定

将 Ah 菌 GX7 株 6 种不同方法处理的抗原以 1:4-1:128 稀释后点样, 采用 Dot-ELISA 分别用 1:20、1:40、1:80 和 1:160 稀释度的抗血清处理, 其中经 1:40 和 1:80 稀释度的抗血清处理的样品显色较好, 即以 1:40 稀释度的抗血清作为最佳工作浓度。

(二)GX7 株 6 种不同方法处理效果比较

以倍比稀释法将 Ah 菌 GX7 株用 6 种不同方法处理的抗原样品点样, Dot-ELISA 予以检测, 结果见表 1。

表 1 GX7 菌 6 种抗原处理方法效果比较

Table 1 Comparison among the six methods of antigen treatment

方法 Methods	结果 Results									
	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048
反复冻融 Freezing-melting repeatedly	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	+	±
福尔马林灭活 Treatment with formalin	+++	+++	+++	++	++	++	+	+	±	-
SDS 提取 Treatment with SDS	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	+	±
EDTA 提取 Treatment with EDTA	+++	+++	+++	++	++	++	+	+	±	-
甘氨酸提取 Treatment with Glycine	+++	+++	+++	++	++	+	+	+	±	±
甘氨酸-氢氧化钠提取 Treatment with Gly-NaOH	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	+	±

从表 1 中可看出, GX7 株不同方法处理的抗原, 采用 Dot-ELISA 均可检测出来, 可检测的最高稀释度在 1:512-1:1024 之间, 彼此差异不大。其中反复冻融法为 1:1024, 且采用该法处理样品方法简便易行, 确定为最佳抗原处理方法。

(三)特异性

表 2 中的结果显示, GX7 株和 58-20-9 株呈阳性反应, 而 4 株非气单胞菌均呈阴性反应, 说明 Dot-ELISA 检测 Ah 菌具有较强的特异性。

(四)组织中最低可测菌浓度的测定

从表 3 中可看出, 当肝脏组织中 Ah 菌含量达到相当于 10^5 CFU/g 水平时, 应用 Dot-ELISA 即基本上可检测出来。

表 2 Dot-ELISA 检测 6 种菌株情况

Table 2 The results of detecting six strains with Dot-ELISA

菌株 Strains	E3-11	56-10-12	E895205	HD9	58-20-9	GX7
结果 Results	-	-	-	-	+	+++

表 3 Dot-ELISA 对组织中加菌的检测

Table 3 Detection of bacteria added in tissue with Dot-ELISA

菌含量 Concentration	对照 Control	10^3 CFU/ml	10^4 CFU/ml	10^5 CFU/ml	10^6 CFU/ml	10^7 CFU/ml	10^8 CFU/ml
结果 Results	±	±	±	+	+	++	++

(五) 人工感染的检测

表 4 Dot-ELISA 检测 Ah 菌感染情况

Table 4 Bacteria of artificial infecting fish were detected by Dot-ELISA

菌含量 Concentration	对照 Control		1×10^4 CFU/g				5×10^4 CFU/g				2.5×10^5 CFU/g									
	鲢 Silver carp	鲤 Common carp	鲢 Silver carp	鲤 Common carp	鲢 Silver carp	鲤 Common carp	鲢 Silver carp	鲤 Common carp	鲢 Silver carp	鲤 Common carp	鲢 Silver carp	鲤 Common carp	鲢 Silver carp	鲤 Common carp						
结果 Results	-	-	-	±	+	-	±	-	++	+	+	-	-	-	+	+++	++	-	-	+

从表 4 中可知, 在人工感染的 18 尾鱼中有 8 尾检测结果为阳性, 且随着感染剂量增大, 检出阳性率亦上升, 特别是 5×10^4 CFU/g 和 2.5×10^5 CFU/g 两个剂量组中所有白鲢均呈阳性。

讨 论

1. 在人工感染的检测中, 对鲤鱼的检测结果基本全部呈阴性, 这可能是因为鲤鱼对 Ah 菌 GX7 株有较强抵抗力, 病菌难以在鲤鱼体内增殖甚至被排斥, 加上感染时间不很长, 在肝脏组织中尚未达到可检测的菌浓度, 对白鲢的检测大多呈明显的阳性反应, 即在白鲢处于感染期尚未发病死亡时可在组织中检测到 Ah 菌。据报道, Dot-ELISA 对某些菌在鱼类组织中的最低可测浓度可达 10^2 CFU/g 左右^[8], 本次试验结果与此尚有一定差距, 而与王乐元等^[7]报道的结果接近, 主要原因可能是所制备的抗血清效价不很高, 从而影响了检测结果。尽管如此, 本次 Dot-ELISA 检测结果仍基本能满足潜伏期感染鱼和发病鱼组织中常有菌浓度的检测。

2. 对 Dot-ELISA 来说, 与其他血清学技术一样, 检测血清的效价和特异性等因素对检

测结果有较大影响。我们制备的 Ah 菌抗血清, 与多株非气单胞菌不反应, 说明特异性基本符合要求。但由于 Ah 菌的血清型极其复杂, 在实际检测中仅以 GX7 株的抗血清作为检测血清, 会造成漏检; 采用多种血清型的混合血清作检测用, 可提高检出率, 也是解决 Ah 菌多血清型的途径之一。因此, 如何制备效价高、特异性强及多效价的 Ah 菌抗血清, 满足实际检测的需要, 有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 陈怀青, 陆承平, 1991. 中国人兽共患病杂志, 7: 21-23.
- [2] 吴建农, 孙其煊, 1993. 鲢细菌性败血症的病原研究. 鱼类病害研究, 15(3-4): 21.
- [3] 王玉佩等, 1993. 天津地区“暴发性”鱼病病原及流行病学的调查与研究. 鱼类病害研究, 15(3-4): 27.
- [4] 樊俊杰等, 1989. 中华微生物学和免疫学杂志, 9(4): 242.
- [5] 徐乌榕等, 1989. 免疫酶斑点法检测脑脊液中的IgG, IgA及IgM. 中华医学检验杂志, 12(3): 143-144.
- [6] 杨宝华等, 1994. 应用Dot-ELISA快速检测传染性法氏囊病病毒. 畜牧与兽医, 26(2): 56-57.
- [7] 王乐元, 甘孟候, 1994. 间接法Dot-ELISA检测副鸡嗜血杆菌的研究. 中国兽医杂志, 20(1): 3-5.
- [8] M. Sakai, et al., 1989. Comparison of methods used to detect *Renibacterium salmoninarum*, the causative agent of Aquatic bacterial kidney disease. *Journal of Aquatic Animal Health*, 1(1): 21-24.
- [9] E. -M. Bernoth, 1991. Identification of cultured *Aeromonas salmonicida* by an indirect dot blot immunoassay. *Journal of Fish Diseases*, 14: 419-422.

PRELIMINARY STUDIES ON DETECTING FISH *AEROMONAS HYDROPILA* WITH DOT-ELISA

Shi Cunbin, Wu Shuqin, Huang Zhibin, Pan Houjun

(Pearl River Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380)

ABSTRACT The comparison among the six methods of Ah antigen treatment with Dot-ELISA suggested that the method of freezing-melting repeatedly has something to recommend it. Artificial infected fish were also detected. The results show that Dot-ELISA is good in sensitivity and specificity and is easy to operate, which is suitable to detect Ah rapidly in practice.

KEYWORDS Dot-ELISA, Detection, *Aeromonas hydrophila*