

嗜水气单胞菌单克隆抗体的制备及特性分析

陈红燕¹, 林天龙¹, 陈日升¹, 杨金先¹, 陈强²

(1. 福建省农业科学院 畜牧兽医研究所, 福建 福州 350013;

2. 福建省农业科学院 地热农业利用研究所, 福建 福州 350003)

摘要:利用杂交瘤单克隆抗体技术制备了 AHYT-1 和 AH10501 2 株嗜水气单胞菌的菌体单抗, 筛选出 11 个能稳定分泌抗嗜水气单胞菌单克隆抗体的细胞株, 并对这些单抗进行了特性分析。经单抗类型测定, 这些单抗分属 IgM、IgG_{2a} 2 个亚类, 且均具有 ELISA 反应特性, 腹水抗体效价在 $1:10^4 \sim 1:10^6$, 其中单抗 4G4、2H4、GH9 具有免疫荧光特性。ELISA 特异性分析结果表明, 4G4、2H4、FA4、GH9、CF2 为嗜水气单胞菌血清型特异性单抗, 4G4、2H4 识别同一种血清型的嗜水气单胞菌分离株, 而 FA4、GH9、CF2 却识别另外一种血清型的嗜水气单胞菌, 并且与其他血清型的嗜水气单胞菌、温和气单胞菌以及鳃弧菌、爱德华氏菌、克鲁氏耶尔森菌、大肠杆菌、荧光假单胞菌均不反应。Western-blot 结果表明, 单抗 4G4、2H4、FA4 所针对的抗原是菌体脂多糖(LPS), 且它们所识别的 LPS 抗原表位不同。菌体单抗研究结果表明, 4G4、2H4 和 GH9 3 株单抗可应用于嗜水气单胞菌的诊断和血清分型。本研究目的旨在建立一种快速诊断鱼类嗜水气单胞菌病的方法和血清分型方法。

关键词:嗜水气单胞菌; 单克隆抗体; 酶联免疫吸附试验; 免疫印迹; 免疫荧光

中图分类号: S948

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2003)02-0121-05

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*, AH)是引发病害鱼类细菌性败血症的重要致病菌之一^[1-2], 对水产养殖业危害极大。目前, 对嗜水气单胞菌病的临床诊断还是依赖临床观察、解剖及一般细菌学检查方法, 其检测速度和准确性均受到一定的限制。常规的血清学方法存在灵敏度低、非特异性反应多等缺点, 而单克隆抗体应用在致病性细菌的诊断、血清分型和抗原分析上有其他血清学方法所无法比拟的优越性。国外在 AH 菌体单抗(McAb)方面已经展开研究, 应用于临床检测、水环境监测、血清分型以及鱼体内抗原的吸收和提呈^[3-5], 国内陈琼等^[6]在嗜水气单胞菌溶血素单抗方面做了一些探讨, 但尚未见有关该菌菌体单抗的研究。本研究制备了 AHYT-1 和 AH10501 2 株嗜水气单胞菌的菌体单抗并对其部分特性及应用进行探讨, 旨在建立一种快速、准确的鱼类嗜水气单胞菌病诊断方法和血清分

型方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料

Balb/C 小鼠 6~8 周龄(购自上海西浦尔必凯实验动物有限公司); SP2/O 小鼠骨髓瘤细胞(北京病毒所); AHYT-1, AH10501, 参考菌株 21 株(见表 1)。

丙烯酰胺、二甲叉丙烯酰胺(Bioasia)、0.45 μ m 硝酸纤维素膜(Schleicher & Schuell)、DMEM、HAT、HT 培养基、羊抗鼠 IgG(Fab2)碱性磷酸酶标记物、羊抗鼠异硫氰酸荧光标记物、羊抗鼠亚级份、融合剂 PEG/DMSO 均购自 Sigma 公司, 新生牛血清购自杭州四季青生物材料有限公司。

1.2 抗原的制备

AHYT-1 和 AH10501 用营养肉汤 30 $^{\circ}$ C 培养 24 h 后, 5 000 r/min 离心, 收集菌体, 平板计数法活菌计数后, 0.5% 福尔马林灭活 24 h, 再用灭菌 PBS 洗涤 3 次并测菌体 OD₆₀₀ 吸光值, -20 $^{\circ}$ C 冻存。

1.3 动物免疫和杂交瘤细胞株的制备

收稿日期: 2002-08-26。

资助项目: 福建省科技项目资助(20002077)。

作者简介: 陈红燕(1976-), 女, 硕士, 主要从事水产养殖动物病原微生物研究。

AHYT-1 和 AH10501 灭活菌体免疫 Balb/C 小鼠(8 周龄,雌性),初次免疫以菌数 3.9×10^7 CFU/0.5 mL 腹腔注射,14 d、28 d 各以菌数为 1×10^9 CFU/0.5 mL 腹腔注射加强免疫,3 d 后按文献[7]方法进行融合、筛选、克隆化、腹水制备及 McAb 亚级分测定,其中筛选和亚级分测定用 ELISA 方法,免疫菌用灭菌 PBS 重悬至 OD₆₀₀ 值为 0.5,超声波破碎后包被 ELISA 板。

1.4 单克隆抗体 ELISA 效价和特异性测定

间接 ELISA 法^[7]测定。ELISA 效价测定中单抗腹水抗体以 10 倍体积比稀释,上清抗体以体积 1 倍比稀释。单抗特异性测定选取的 2 株免疫菌和 21 株参考菌株,每株菌用营养肉汤 30 ℃ 培养 24 h 后,离心洗涤,灭菌 PBS 稀释至 OD₆₀₀ 约为 0.5,超声波破碎处理后包被酶标板,灭菌 PBS 包被做阴性对照。单抗腹水按体积比 1:1 000 稀释。

1.5 SDS-PAGE 和 Western-blot 分析

AH10501 菌、AHYT-1 菌经 Proteinase K (1mg/mL 菌液)60 ℃ 消化 1 h 的菌体裂解液和未经 Proteinase K 消化的菌体裂解液(反复冻融 3 次裂解)加样品缓冲液,按文献常规方法^[8]进行 SDS-PAGE 和 Western-blot 分析,浓缩胶质量分数为 5%,分离胶质量分数为 12%,McAb 4G4、2F9 和 FA4 腹水抗体按体积比 1:1 000 稀释反应。设空白对照。

1.6 间接免疫荧光实验

将 AH10501、ML316、JT-3、B-AH6、B-AH12、YT-715 和 YT-1 共 7 株菌接种营养肉汤,30 ℃、120 r/min 摇床培养 30 h,灭菌 PBS 洗涤 3 次,10 000 r/min 离心 10 min。加 50 μL 菌液于 PCR 小管,然后分别加入用 PBS 1:1 000 稀释的 4G4、2H4、FA4、GH9 共 4 株 McAb 各 100 μL,室温作用 1 h,用 PBS 洗涤 3 次。加羊抗鼠异硫氰酸荧光标记物(按体积比 1:100 稀释),室温反应 1 h 后,用 PBS 洗 3 次,最后封片,置荧光显微镜下观察,设非相关单抗腹水为阴性对照。

2 结果与分析

2.1 杂交融合

本研究共进行了 3 次细胞融合,以 AH10501 菌体为免疫原融合 2 次,获得 3 株 McAb,命名为 2F9、

4G4、2H4;以 AHYT-1 菌体为免疫原融合 1 次,获得 8 株 McAb,分别命名为 AF11、FA4、AG4、CA4、EE8、CF2、DC5、GH9。11 株 McAb 的亚类分属 IgM(2F9、AF11、FA4、AG4、CA4、EE8、CF2、DC5、GH9),IgG_{2a}(2H4、4G4)。11 株杂交瘤细胞株培养上清及腹水抗体的 ELISA 效价分别为 $1:10 \sim 1:10^3$ 和 $1:10^4 \sim 1:10^6$ 。

2.2 McAb 的 ELISA 特异性

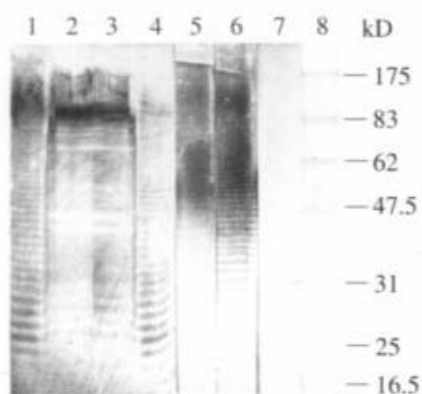
菌体单抗与气单胞菌属、鳃弧菌、爱德华氏菌、克鲁氏耶尔森菌、大肠杆菌、荧光假单胞菌的特异性反应结果见表 1,McAb 2H4、4G4 与同一血清型的 5 株 AH 菌出现阳性反应,McAb FA4、GH9 和 CF2 与另外一个血清型的 2 株菌发生阳性反应。McAb DC5 仅与免疫菌 AHYT-1 阳性反应。其他单抗都和非气单胞菌属有交叉反应。

2.3 Western-blot 结果

图 1、2 显示,McAb 4G4、2H4 与 Proteinase K 消化的 AH10501 菌体裂解液显示相同的反应,均在 20 ~ 70 kD 出现阶梯状条带,而 McAbFA4 与 Proteinase K 消化的菌体裂解液反应在 30 ~ 80 kD 出现阶梯状条带,暗示这株单抗与前 2 株单抗所识别的抗原表位可能不同。考马斯亮蓝 R-250 染色结果显示,Proteinase K 消化后菌体裂解液均未出现蛋白条带,表明这 3 株单抗所针对的抗原不是菌体蛋白,应为脂多糖(LPS)。这一结果与 Faude^[9]等报道的 PU7718AH 菌体 McAb 结果相似。因为革兰氏阴性菌菌体表面上大量的脂多糖分子(O-抗原多糖侧链)上通常包含由 4 ~ 6 个寡糖组成的不变重复单元,许多革兰氏阴性菌脂多糖免疫印迹中都出现阶梯状条带。另外,单抗和未消化的菌体裂解液的 Western-blot 反应还出现了不清晰的块状反应,这完全有可能是单抗所识别的 LPS 抗原位点部分或完全被菌体蛋白封闭所导致的。

2.4 免疫荧光结果

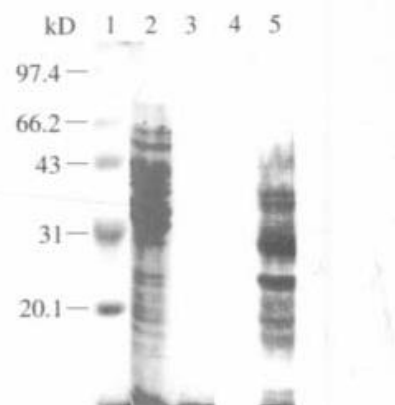
免疫荧光结果见表 2。从表中可见 McAb 2H4、4G4、GH9 具有荧光特性,且特异性较好,与 ELISA 结果相符。4G4 免疫荧光反应最强;而 FA4 无荧光反应特性,可能是 FA4 识别的抗原位点不在菌体表面,或菌体表面拷贝数太少,因此未能见明显荧光。阴性对照无荧光反应特性。



1~2: McAb 2H4; 3~4: McAb 4G4; 5~6: McAb FA4;
7: 空白对照 Blank control; 8: 标准蛋白 Protein markers;
1,4: 经 Proteinase K 消化的 AH10501 菌体裂解液 AH10501.
The lysate of the bacterial AH10501 digested by proteinase K;
6: 经 Proteinase K 消化的 AHYT-1 菌体裂解液. The lysate of the bacterial AHYT-1 digested by proteinase K.

图1 单抗 Western-blot 图谱

Fig. 1 Western-blot of monoclonal antibodies



1. 标准蛋白(NEB) Protein markers.
2. AH10501 菌体裂解液 The lysate of the bacterial AH10501.
3. 经 Proteinase K 消化 AH10501 的菌体裂解液 The lysate of the bacterial AH10501 digested by Proteinase K.
4. 经 Proteinase K 消化的 AHYT-1 菌体裂解液 The lysate of the bacterial AHYT-1 digested by proteinase K.
5. AHYT-1 菌体裂解液 The lysate of the bacterial AHYT-1.

图2 菌体裂解液 SDS-PAGE 考马斯兰染色图

Fig.2 SDS-PAGE of coomassie-blue-staining the bacterial lysates

3 讨论

革兰氏阴性菌菌体脂多糖 O 侧链多糖与菌体血清型之间有密切的关系,不少研究^[10-11]证实,同一血清型的气单胞菌拥有近似的 O 特异性多糖侧链,在血清分型中我们对部分 AH 菌株的脂多糖进行研究,也得出类似结果(待发表)。本实验中 Western-blot 分析也表明 McAb 4G4、2H4 与 FA4 这 2 类 McAb 所针对的抗原代表不同的多糖侧链,ELISA 反应结果也证明 McAb 4G4、2H4 与 FA4 所识别的 AH 隶属 2 种不同的血清型,进一步证实这 2 组 McAb 作用于 LPS 分子上不同的抗原决定簇。另外,免疫转印中 McAb 2H4、4G4 还与 AH10501 菌的外膜蛋白反应,反应条带的分子量为 43 kD 和 45 kD (未列数据),其原因可能是革兰氏阴性菌菌体成分 S-层蛋白、外膜蛋白、LPS 三者是紧密相联的,其中, LPS 部分穿过外膜暴露在细胞壁外层,在提取的外膜蛋白中有一部分蛋白质仍然与脂多糖相连,有文

献报道 AH 中的 39 kD 外膜蛋白和温和气单胞菌中的 43 kD 外膜蛋白均是糖结合蛋白^[12-13],同时在粗提的外膜蛋白中含有一定的 LPS 也是可能的,所以推测 McAb 2H4、4G4 与 43 kD 和 45 kD 外膜蛋白反应是识别联结外膜蛋白的多糖,而不是针对外膜蛋白抗原的其他抗原位点,我们把样品经反复冻融几次后,这种反应条带就消失了,可能由于在冻融过程中,多糖从蛋白中脱落或降解所致。

在免疫检测技术中,可以根据检测的目的选择检测方法,就 AH 临床检测技术而言,间接免疫荧光技术比 ELISA 更快速、直观,还能直接检测鱼体和水环境中的致病菌,是快速诊断 AH 的首选方法之一。McAb 4G4、2H4、GH9 具有型特异性免疫荧光特性,然而,这 3 株单抗无法识别其他血清型的 AH 菌,在临床检测中存在一定的局限性,若能制备出识别更多血清型的特异性单抗或种特异性单抗,用几种单抗混合使用将提高临床检测的检出率。

表 1 单克隆抗体 ELISA 特异性测定结果
Table 1 Determination of specificity of monoclonal antibodies

菌株 Strain ¹⁾ (种类 Species)	来源 Sources	单抗 Monoclonal antibody ²⁾											
		2F9	2H4	4G4	FA4	GH9	AF11	AC4	CA4	EE8	CF2	DC5	
AH10501(<i>A. hydrophila</i>)	北京陆桥公司, 不明	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
ML316(<i>A. hydrophila</i>)	福建, 日本鳗	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
JT-3(<i>A. hydrophila</i>)	福建, 欧鳗	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
B-AH12(<i>A. hydrophila</i>)	福建, 中华鳖	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
B-AH6(<i>A. hydrophila</i>)	福建, 中华鳖	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
9617(<i>A. hydrophila</i>)	湖北, 白鲢	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
9809(<i>A. hydrophila</i>)	湖北, 草鱼	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
9805(<i>A. hydrophila</i>)	湖北, 鲤鱼	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
NN13(<i>A. hydrophila</i>)	广东珠江所, 白鲢	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
YT-1(<i>A. hydrophila</i>)	福建, 欧鳗	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	
YT-715(<i>A. hydrophila</i>)	福建, 欧鳗	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	
BS-1(<i>A. hydrophila</i>)	福建, 欧鳗	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
CW10-1(<i>A. hydrophila</i>)	福建, 欧鳗	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
CHS-3(<i>A. hydrophila</i>)	福建, 欧鳗	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
HB405(<i>A. hydrophila</i>)	福建, 欧鳗	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
CR79-1-1(<i>A. sobria</i>)	中科院水生所, 不明	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ZY005(<i>A. sobria</i>)	福建, 欧鳗	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
S8-20-9(<i>A. spp</i>)	中科院水生所, 不明	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
E-3-11(<i>Vibrio anguillarum</i>)	中科院水生所, 不明	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	
<i>Edwardsiella</i>	福建省卫生防疫站, 不明	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
<i>Escherichia coli</i>	福建省卫生防疫站, 不明	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
S6-12-10(<i>Pseudomonas fluorescen</i>)	中科院水生所, 不明	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	
SC90-20-4(<i>Yersinia ruckeri</i>)	中科院水生所, 不明	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	

注: 1) AH10501、ML316、JT-3、BAH12、BAH6、9617、9809、9805、NN13、YT-1、YT-715、CHS-3、HB405、CW10-1、BS-1 分属于 5 种不同血清型的嗜水气单胞菌。2) “+”表示阳性结果;“-”表示阴性结果;“A. spp.”未定种气单胞菌。

Notes: 1) *Aeromonas hydrophila* isolates AH10501, ML316, JT-3, BAH12, BAH6; 9617, 9809, 9805, NN13; YT-1, YT-715; CHS-3, HB405, CW10-1; BS-1 belong to five serotypes. 2) “+” indicates positive result; “-” indicates negative result; A. spp. - *Aeromonas* whose species are undefined in this research.

表 2 单抗的间接免疫荧光反应

Table 2 Indirect immunofluorescence screening of AH isolates by using monoclonal antibodies

菌株 Strain	单抗 Monoclonal antibody			
	2H4	4G4	FA4	GH9
AH10501	+	+	ND	ND
ML316	+	+	ND	ND
JT-3	+	+	ND	ND
B-AH6	+	+	ND	ND
B-AH12	+	+	-	-
YT-1	ND	ND	-	+
YT-715	-	-	-	+
<i>Edwardsiella</i>	-	-	-	-

注: “+”表示阳性结果,“-”表示阴性结果,“ND”表示未测定。

Note: “+” indicates positive result; “-” indicates negative result; ND indicates missing result.

本研究获得了 McAb 4G4、2H4、GH9 3 株针对本地区 AH 主要血清型的型特异性 McAb, 利用这些

McAbs 可以建立 ELISA 或间接免疫荧光显微技术等快速诊断方法, 对于 AH 的血清分型、早期确诊、养殖水环境的监测并及时防治疾病都具有十分重要的意义。同时, 还可进一步分析 AH 的 LPS 抗原成分的免疫保护原性, 细菌 LPS 是重要的保护性抗原, 陈昌福等^[14]研究表明, LPS 疫苗对 AH 菌有很好的保护力, 但提纯方法复杂, 不同的提纯方法其成分不同, 免疫原性也不同。McAb 2H4、4G4、FA4 等是针对 AH 的 LPS 抗原位点, 可用于提取纯化 AH 的 LPS 或与 LPS 相关联的抗原复合物, 并测定这些抗原在诱导宿主保护性免疫方面的作用, 为制备 AH 的亚单位疫苗提供科学依据。

参考文献:

- [1] Egusa S. Infectious Diseases of Fish [in Japanese] [M]. Tokyo: Kouseisha Kouseikaku, 1978. 554.
- [2] Schüerlaus W, Kulow H, Schreckenbach K. Infectious abdominal

- dropsy[J]. *Schäperclaus, Fish Disease*. 1992, 1: 401-458.
- [3] Azad I S, Shankar K M, Mohan C V, et al. Uptake and processing of biofilm and free-cell vaccines of *Aeromonas hydrophila* in indian major carps and common carp following oral vaccination-antigen localization by a monoclonal antibody[J]. *Dis Aquat Organ*, 2000, 43: 103-108.
- [4] Lutwyche P, Exner M M, Hancock R E, et al. Conserved *Aeromonas salmonicida* porin provides protective immunity to rainbow trout[J]. *Infect Immun*, 1995, 63: 3 137-3 142.
- [5] Shankar K M, Mohan C V, Anil T M, et al. Monoclonal antibodies in fish and shellfish health management in India[J]. *Naga*, 2000, 23(4): 10-12.
- [6] 陈琼, 陆承平. 嗜水气单胞菌 HEC 毒素单克隆抗独特型抗体研究[J]. *南京农业大学学报*, 1994, 17(3): 86-90.
- [7] 林天龙, 陈强, 龚晖, 等. 欧洲鳗免疫球蛋白单克隆抗体的制备与特性[J]. *水产学报*, 2001, 25(6): 532-537.
- [8] Frederick M A, Roger B, Robert E K, et al. Current protocols in molecular biology (Volume 2)[M]. New York: Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, 1987. 1 011-1 021.
- [9] Faude U C, Manfred H G. Development and application of monoclonal antibodies for in situ detection of indigenous bacterial strains in aquatic ecosystems[J]. *Appl Env Micro*, 1997, 63: 4 534-4 542.
- [10] Kokka R P, Janda J M, Oshiro L S, et al. Biochemical and genetic characterization of autoagglutinating phenotypes of *aeromonas* species associated with invasive and noninvasive disease[J]. *J Inf Dis*, 1991, 163: 890-894.
- [11] Esteve C, Carmen Amaro, Toranzo E. O-Serogrouping and surface components of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas jandoei* pathogenic for eels[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1994, 117: 85-90.
- [12] Quinn D, Wong C Y E, Atkinson H M, et al. Isolation of carbohydrate-reactive outer membrane proteins of *aeromonas hydrophila* [J]. *Infect Immun*, 1993, 61: 371-377.
- [13] Cartwright G A, Chen D, Hanna P J, et al. Immunodiagnosis of virulent strains of associated with epizootic ulcerative syndrome (EUS) using a monoclonal antibody[J]. *J Fish Dis*, 1994, 17: 123-133.
- [14] 陈昌福, 楠田理一. 接种不同种类病原菌脂多糖对翘嘴鲈细菌性败血症的免疫保护力比较[J]. *华中农业大学学报*, 2000, 19(4): 377-380.

Preparation and characterization of monoclonal antibodies to *Aeromonas hydrophila*

CHEN Hong-yan¹, LIN Tian-long¹, CHEN Ri-sheng¹, YANG Jin-xian¹, CHEN Qiang²

(1. Animal Husbandry and Veterinary Medicine Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, China;

2. Geothermic Utilization Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China)

Abstract: By using hybridoma-monoclonal antibody technology, eleven hybridoma cell lines which secrete monoclonal antibodies (McAb) against the bacterial AHYT-1 and AH10501 were established, and the characteristics of these McAbs were described. Isotyping analysis demonstrates that these McAbs belong to IgM or IgG_{2a} subclasses. The ELISA titers of these McAbs ranged from 10⁴ to 10⁶, and McAb GH9, 2H4 and FA4 were tested successfully in terms of their ability to be used for detection of homologous serotype strains by immunofluorescence microscopy. The specificity analysis proves that McAb 4G4 and 2H4 only recognize the *Aeromonas hydrophila* isolates belonging to one serotype, while the McAb FA4, GH9 and CF2 can react with the bacteria belonging to the other serotypes. None of them has cross reaction with *A. sobria*, *Vibrio anguillarum*, *Edwardsiella*, *Yersinia ruckeri*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens*. Western-blot assay demonstrates that McAb 4G4, 2H4 and FA4 belong to different lipopolysaccharide (LPS) fraction of *Aeromonas hydrophila*. All results indicate that McAb 4G4, 2H4 and GH9 have great feasibility to be applied to clinical diagnosis and identify serotype of *Aeromonas hydrophila*.

Key words: *Aeromonas hydrophila*; monoclonal antibody; ELISA; Western-blot; immunofluorescence