

水产动物6种主要病原菌与抗血清的免疫交叉反应

战文斌, 齐继光, 刘洪明, 周丽, 邢婧

(中国海洋大学 海水养殖教育部重点实验室, 免疫与病害实验室, 山东 青岛 266003)

摘要:采用 ELISA、试管凝集、Western-blot 等方法, 分析了鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*)、哈维氏弧菌 (*V. harveyi*)、溶藻胶弧菌 (*V. alginolyticus*)、副溶血弧菌 (*V. parahaemolyticus*)、迟钝爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*) 和荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 等水产养殖中主要病原细菌与抗血清之间的免疫交叉反应。结果表明, 弧菌属细菌之间的交叉反应程度比较大, 而与其他两属的细菌之间存在的交叉反应程度小, 或不存在交叉反应; Western-blot 分析结果显示, 哈维氏弧菌、溶藻胶弧菌和副溶血弧菌抗血清分别与其他3种弧菌在分子量为 135.6 kD 和 121.5 kD; 95.6 kD, 48.4 kD, 39.2 kD 和 34.9 kD; 55.1 kD 的蛋白带处存在交叉反应, 而这些分子量的蛋白带与其他两属的抗血清均不发生反应。

关键词:弧菌; 爱德华氏菌; 假单胞菌; 抗血清; 免疫交叉

中图分类号: S941.42 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2004)01-0014-06

使用药物控制水产养殖病害的发生常会引起水产品的药物残留, 同时对渔业环境生态造成二次污染。而使用免疫分子生物学技术和手段对病原细菌快速、准确分类鉴定, 做到对症下药, 可避免滥用药物现象; 研制细菌疫苗控制细菌性疾病的发生也势在必行^[1]。

传统的疫苗多是1种疫苗针对1种抗原。亚单位疫苗的研究和发展为1种疫苗针对1种抗原的多个亚型或血清型, 甚至多种抗原提供了可能性。Bruschke 等^[2]1999 年发现牛腹泻病毒 (bovine virus diarrhea virus; BVDV) 的3个亚型均含有糖蛋白 E2, 并以其为材料生产了针对 BVDV 的亚单位疫苗, 发现这种疫苗对于3种亚型的病毒均有一定的保护作用; Newman 等^[3]发现含有 V-3 氨基酸序列的亚单位疫苗能诱导机体产生细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL), 而 CTL 能杀死被多个亚型人体免疫缺乏综合症病毒 (HIV) 感染的细胞, 从而抑制病毒繁殖。但对于1种疫苗针对同种菌的多个血清型或同属细菌的多个种的研究, 尚未见报道。

在以往研究中发现, 病原菌, 特别是同属的病原菌之间, 有较强的交叉反应, 而有交叉反应的蛋白组分, 可能形成病原菌间的共同抗原, 此类抗原为细菌亚单位疫苗的重要材料, 可用于生产针对多种病原

菌的多价疫苗, 达到一种疫苗对几种病原菌引起的细菌病具有免疫保护力。可为提取疫苗的有效成分、研究制备生物工程疫苗创造条件。

过去对于抗原抗体交叉反应的研究目的多为消除检测中出现的假阳性^[4-5], 对于交叉反应在分类上的利用未见有报道。本研究利用试管凝集、Western-blot、ELISA 等免疫分子生物学技术, 对水产养殖动物常见病原性细菌: 鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*)、哈维氏弧菌 (*V. harveyi*)、溶藻胶弧菌 (*V. alginolyticus*)、副溶血弧菌 (*V. parahaemolyticus*)、迟钝爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*) 和荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 抗血清间的免疫交叉反应进行比较分析, 以探讨水产动物主要病原细菌间免疫交叉反应规律, 为建立一种快速可行的细菌血清学诊断方法提供参考, 为水产养殖动物细菌病的防治奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌株 主要病原菌标准菌株鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*)、副溶血弧菌 (*V. parahaemolyticus*)、哈维氏弧菌 (*V. harveyi*)、溶藻胶弧菌 (*V. alginolyticus*) 和迟钝爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*) 由

收稿日期: 2003-05-26; 修订日期: 2003-10-13.

资助项目: 国家重点基础研究发展规划项目“973”(G1999012002); 国家“863”高技术研究发展计划资助项目(2001AA620203); 国家自然科学基金(30271016); 教育部海水养殖重点实验室开放课题(200211); 山东省自然科学基金项目(032070104)。

作者简介: 战文斌(1960-), 男, 教授, 博导。E-mail: wzhan@ouc.edu.cn

联合国教科文组织中国生物工程中心(UNESCO·BAC)提供;荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)由中国科学院水生生物研究所鱼病室细菌组提供。

1.1.2 培养基及培养条件 所有弧菌于2216E固体培养基上26℃培养24 h。

迟钝爱德华氏菌于爱德华氏培养基(NaCl 1.5 g,牛肉膏1.5 g,酵母膏1.5 g,胰蛋白胨5 g,葡萄糖1 g, K_2HPO_4 4.8 g, KH_2PO_4 1.32 g,琼脂15 g)上28~32℃培养24 h。

荧光假单胞菌于肉浸膏培养基上26℃培养24 h。

1.1.3 大鼠 Wistar 鼠(200 g左右),购于中国药检所(青岛)。

1.2 抗血清的制备

全菌用PBS(0.01 mol/L, pH 7.4)洗脱,McFarland比浊法将菌的浓度定为 1.0×10^7 mL⁻¹,0.2%福尔马林灭活24 h,用涂布平板法检测无活菌,然后4℃离心(6 000 r/min,20 min)去除福尔马林,最后用pH 7.4的PBS重悬,并用上述比浊法将菌液浓度定为 1×10^7 mL⁻¹,备用。

第1周,将备用菌液与福氏完全佐剂按2:1充分混合,0.3 mL/只,腹腔注射免疫大鼠;第3周和第4周尾静脉0.2 mL/只加强免疫2次。7 d后心脏采血,离心得抗血清,测定效价。

1.3 试管凝集反应^[6]

上述6种菌的备用菌液分别加入6只试管中,每种细菌的6支试管里分别加入6种抗体(1:1 000),摇匀,37℃水浴4 h,观察结果。

1.4 SDS-PAGE

6种细菌的全菌加入sample buffer,加热2~3 min,作为跑胶用样品。采用解离非连续缓冲系统垂直板电泳。丙烯酰胺浓度:分离胶10%,浓缩胶4.75%。每孔加15 μL样品,浓缩胶部分恒定电流为30 mA,分离胶部分恒定电流为60 mA。至前沿线跑至板最下端为止。

1.5 WESTERN-BLOT

上述全菌样品,分两板重复点样,一板加商品化低分子量标准的Marker(Sigma),进行SDS-PAGE,结束后,将凝胶用稳压稳流型电泳仪转移至孔径为0.45 μm的硝酸纤维素膜上,200 V恒压转移5 h。硝酸纤维素膜分为2组,加点Marker的一块染色以计算分子量。另一块用含有2%~3%牛血清白蛋白的PBS缓冲液封闭30 min,用PBST(含

有0.05% Tween 20的PBS)洗涤3次,每次5 min。然后将膜分别浸在1:1 000(v/v)的6种细菌的抗血清中(pH 7.4 PBS稀释)37℃孵育1 h。PBST洗涤3次,每次5 min。于1:500(v/v)碱性磷酸酶标记的羊抗大鼠IgG(Sigma)/PBS中37℃孵育45 min。PBS洗涤3次,每次5 min。将膜于含有0.2 mg/mL DAB,0.015%的H₂O₂的PBS(0.01 mol/L, pH 5.0)中发色2~5 min。晾干,计算各主要蛋白条的相对分子量。

1.6 酶联免疫吸附测定(ELISA)

用ELISA法,分析了6种细菌和6种抗体的交叉反应,方法如下:将细菌于固体平板上培养24 h, PBS洗脱,离心(6 000 r/min,20 min)洗3次, PBS重悬。用比色法将细菌浓度定至 1×10^7 mL⁻¹。100 μm/孔加入96孔酶标板上,37℃,3 h。用PBST每孔200 μm洗涤,每次3 min,洗3次。2%~3%的牛血清白蛋白(BSA)37℃封闭1 h。同上法洗涤3次。将抗体稀释1 000倍,100 μm/孔加入至酶标板。37℃温箱孵育1 h。同上法洗涤3次。75 μL/孔加入HRP标记的羊抗大鼠二抗(1:1 000)。37℃温箱孵育45 min。同上法洗涤3次。每孔加入100 μL TMB应用液,暗处反应5~20 min,每孔加入50 μL 2 mol/L的H₂SO₄,反应孔由蓝变黄,稳定3~5 min,在450 nm工作波长测定OD值。根据阳性判定公式判定阳性(当P/N≥2.1时为阳性)。

2 结果

2.1 试管凝集反应

由表1可见,不同抗体与不同种属细菌之间存在着交叉反应,虽程度不同,但却有一定的规律可循,即:弧菌属细菌之间抗体与细菌的交叉反应较大,而其他属细菌之间免疫交叉较小,或不存在交叉反应。

2.2 SDS-PAGE

将6种病原菌标准菌株全菌进行SDS-PAGE,结果见图1。由于采用全菌点样,所以细菌经SDS-PAGE后,蛋白条带较多,但也可以看出不同菌株所显示的蛋白条带有很大差异。所有细菌的主要蛋白条带一般有10条左右,分子量25~142 kD,其中4种弧菌间有相同的蛋白条带,而4种弧菌与荧光假单胞菌和爱德华氏菌的SDS-PAGE图谱明显不同。但具体的有差异的蛋白带的分子量却不易分清,需进行进一步的试验分析。

表1 不同抗体对同一种菌的免疫反应结果
Table 1 Results of the same antisera reacting with different strains

抗体 Antibody	实验菌株 Strain	结果 Result	抗体 Antibody	实验菌株 Strain	结果 Result
抗哈维氏 弧菌血清 <i>V. Harveyi</i> antiserum	哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	++++	抗溶藻胶 弧菌血清 <i>V. alginolyticus</i> antiserum	哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	++
	溶藻胶弧菌 <i>V. alginolyticus</i>	+++		溶藻胶弧菌 <i>V. alginolyticus</i>	++++
	鳃弧菌 <i>V. anguillarum</i>	+		鳃弧菌 <i>V. anguillarum</i>	++
	副溶血弧菌 <i>V. heamolyticus</i>	++		副溶血弧菌 <i>V. heamolyticus</i>	++++
	荧光假单胞菌 <i>P. fluorescens</i>	-		荧光假单胞菌 <i>P. fluorescens</i>	+
	抗爱德华氏菌 <i>E. tarda</i>	-		抗爱德华氏菌 <i>E. tarda</i>	-
抗副溶血 弧菌血清 <i>V. heamolyticus</i> antiserum	哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	++	抗荧光假单 胞弧菌血清 <i>P. fluorescens</i> antiserum	哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	-
	溶藻胶弧菌 <i>V. alginolyticus</i>	++		溶藻胶弧菌 <i>V. alginolyticus</i>	-
	鳃弧菌 <i>V. anguillarum</i>	+		鳃弧菌 <i>V. anguillarum</i>	-
	副溶血弧菌 <i>V. heamolyticus</i>	++++		副溶血弧菌 <i>V. heamolyticus</i>	-
	荧光假单胞菌 <i>P. fluorescens</i>	-		荧光假单胞菌 <i>P. fluorescens</i>	+++
	抗爱德华氏菌 <i>E. tarda</i>	+		抗爱德华氏菌 <i>E. tarda</i>	++
抗鳃弧菌 血清 <i>V. anguillarum</i>	哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	++	抗迟钝爱德华 氏菌血清 <i>E. tarda</i> antiserum	哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	+
	溶藻胶弧菌 <i>V. alginolyticus</i>	++		溶藻胶弧菌 <i>V. alginolyticus</i>	-
	鳃弧菌 <i>V. anguillarum</i>	+++		鳃弧菌 <i>V. anguillarum</i>	+
	副溶血弧菌 <i>V. heamolyticus</i>	+		副溶血弧菌 <i>V. heamolyticus</i>	+
	荧光假单胞菌 <i>P. fluorescens</i>	+		荧光假单胞菌 <i>P. fluorescens</i>	++
	抗爱德华氏菌 <i>E. tarda</i>	+		抗爱德华氏菌 <i>E. tarda</i>	++++

注：“-”“-”“-”“++”“+++”表示试管凝集反应的5种程度。

Note: “-”“-”“-”“++”“+++” indicate five degrees of the tube agglutination.

2.3 WESTERN-BLOT

所得交叉反应的结果见图2~8。如图所示,抗哈维氏弧菌的抗体与其中5种细菌存在交叉反应的蛋白带的分子量分别为:哈维氏弧菌142.1 kD、135.6 kD、121.5 kD、110.7 kD、101.5 kD、58.3 kD;溶藻胶弧菌135.6 kD、121 kD、94.3 kD;鳃弧菌58.3 kD;副溶血弧菌135.6 kD、121 kD、58.3 kD;荧光假单胞菌110.7 kD;它与迟钝爱德华氏菌不发生交叉反应。抗溶藻胶弧菌的抗体与其中5种细菌存在交叉反应的蛋白带的分子量分别为:哈维氏弧菌96.5 kD、48.4 kD、39.2 kD、34.9 kD;溶藻胶弧菌63.8 kD、96.5 kD、48.4 kD、39.2 kD、34.9 kD、29.6 kD;鳃弧菌96.5 kD、48.4 kD、39.2 kD、34.9 kD;副溶血弧菌96.5 kD、48.4 kD、39.2 kD、34.9 kD;它与荧光假单胞菌和迟钝爱德华氏菌均无交叉反应。抗鳃弧菌抗体与6种病原菌发生交叉反应的蛋白组分,分子量在27.7 kD和51.4 kD之间,可以看出鳃弧菌的蛋白带比其他细菌明显多。抗副溶血弧菌抗体与6种细菌存在交叉反应的蛋白带的分子量分别为:哈维氏弧菌55.1 kD、48.2 kD;溶藻胶弧菌60.5

kD、48.2 kD;鳃弧菌55.1 kD、48.2 kD;副溶血弧菌55.1 kD、48.2 kD;荧光假单胞菌48.2 kD;迟钝爱德华氏菌48.2 kD。抗荧光假单胞菌的抗体与弧菌基本无交叉反应,但与迟钝爱德华氏菌的交叉反应程度非常大。抗迟钝爱德华氏菌的抗体与6种细菌存在交叉反应的蛋白带的分子量分别为:哈维氏弧菌34.1 kD;溶藻胶弧菌40.7 kD、34.1 kD;鳃弧菌34.1 kD;副溶血弧菌34.1 kD;荧光假单胞菌116.7 kD、71.2 kD、54.9 kD、40.7 kD、34.1 kD;迟钝爱德华氏菌97.5 kD、71.2 kD、54.9 kD、34.1 kD。

2.4 酶联免疫吸附测定(ELISA)

运用ELISA法,对6种细菌与6种抗体的交叉反应作了分析,结果和程度如图9所示,y轴表示P/N的值,其中P/N≥2.1的为阳性,空白对照为只加二抗孔。柱形越高,说明该细菌与该血清之间的交叉反应越大。可以看出,弧菌属细菌的抗体与弧菌的交叉反应较大,而于其他属细菌之间交叉反应较小,或不存在交叉反应。与上述其他方法的结果吻合。

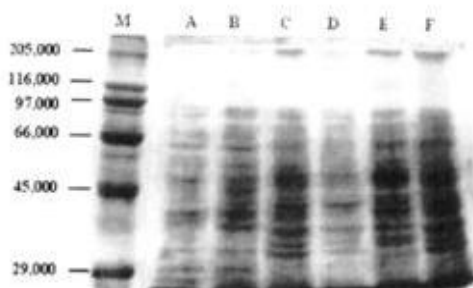


图1 6种病原细菌标准菌株的SDS-PAGE图谱

Fig.1 SDS-PAGE of the six pathogenic strains

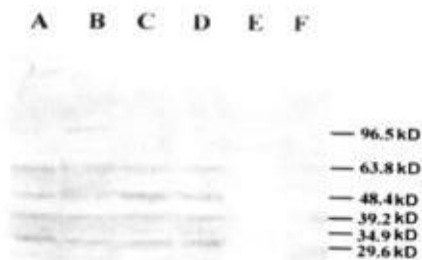


图3 抗溶藻胶弧菌血清与6种细菌的反应

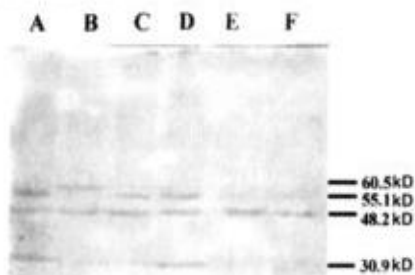
Fig.3 Reactions between anti - *V. alginolyticus* serum and the six strains

图5 抗副溶血弧菌血清与6种细菌的反应

Fig.5 Reactions between anti - *V. heamolyticus* serum and the six strains

图7 抗爱德华氏菌血清与6种细菌的反应

Fig.7 Reactions between anti - *E. tarda* serum and the six strains

A. 哈维氏弧菌; B. 溶藻胶弧菌; C. 鳗弧菌; D. 副溶血弧菌; E. 荧光假单胞菌; F. 爱德华氏菌

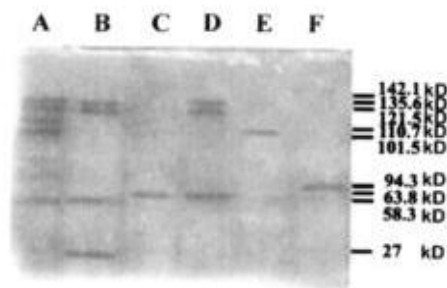
A. *V. hareyi*; B. *V. alginolyticus*; C. *V. anguillarum*; D. *V. heamolyticus*; E. *P. fluorescens*; F. *E. tarda*

图2 抗哈维氏弧菌血清与6种细菌的反应

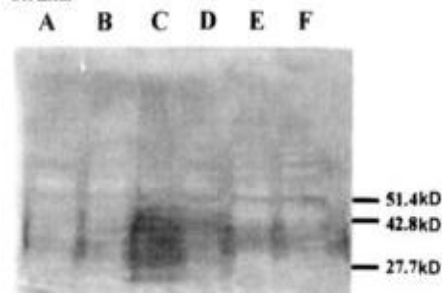
Fig.2 Reactions between anti - *V. hareyi* serum and the six strains

图4 抗鳗弧菌血清与6种细菌的反应

Fig.4 Reactions between anti - *V. anguillarum* serum and the six strains

图6 抗荧光假单胞菌血清与6种细菌的反应

Fig.6 Reactions between anti - *P. fluorescens* serum and the six strains

图8 空白对照(不加一抗,只加二抗)

Fig.8 Control (without first anti-body, only second anti-body was added in)

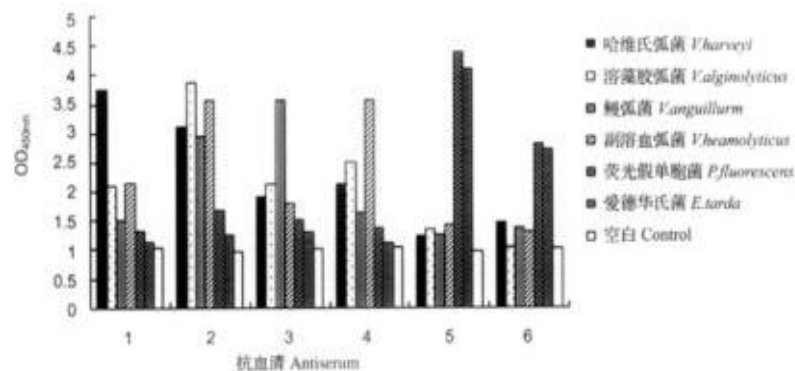


图9 ELISA 法检测 6 种细菌抗血清与 6 种细菌交叉反应结果

Fig.9 Cross-reactions between six sera and the six strains

1: 抗哈维氏弧菌血清; 2: 抗溶藻弧菌血清; 3: 抗鳃弧菌血清; 4: 抗副溶血弧菌血清; 5: 抗荧光假单胞菌血清; 6: 抗爱德华氏菌血清
1, *V. harveyi* antiserum; 2, *V. alginolyticus* antiserum; 3, *V. anguillarum* antiserum; 4, *V. heamolyticus* antiserum; 5, *P. fluorescens* antiserum; 6, *E. tarda* antiserum

3 讨论

运用试管凝集反应、Western-blot、ELISA 等方法,对 6 种病原菌进行交叉反应的检测,其结果有一致性,即弧菌属细菌间抗原抗体交叉反应较大,而 4 种弧菌与迟钝爱德华氏菌和荧光假单胞菌交叉反应较小或没有。所以,可运用免疫交叉反应对弧菌病原进行初步的检测,而且利用这种方法可以对其他属的细菌进行交叉反应实验,从而建立对细菌鉴定的一种新方法。但这种方法对细菌只能鉴定到属,对细菌种的鉴定,可进一步利用 Western-blot,直接观察抗体与抗原的特异性反应,减少假阳性,达到诊断的准确性。

Western-blot 法比试管凝集和 ELISA 更为特异且直观。病原细菌经 SDS-PAGE 电泳,将样品中的蛋白质组分进行初步的分离,经 Western-blot 转印,可将电泳后的蛋白带转移至硝酸纤维素膜上,显示出不同病原菌的特异性抗原决定簇,并可计算出特异性蛋白带的分子量。病原细菌各有其特异的抗原决定簇,这决定了病原菌种的抗原特异性。虽在同属细菌间存在交叉反应的比较大,但通过 Western-blot 可以直观地看出各细菌抗原决定簇的多少和特异性蛋白带分子量大小。所以用 Western-blot 法鉴定细菌的种类可以对病原细菌特异性蛋白进行量化,是一种值得深入研究的快速检测病原细菌的方法,在病原细菌的鉴定上有一定的意义。

由 Western-blot 还可以看出,鳃弧菌、哈维氏弧

菌、溶藻弧菌和副溶血弧菌 4 种弧菌间有交叉反应的蛋白条带出现,并拥有相同的分子量。菌株间有相同分子量的蛋白带,可能形成弧菌间的共同抗原。此类抗原可作为弧菌亚单位疫苗的重要材料,以此抗原决定簇生产针对多种弧菌的多价疫苗,可达到一种弧菌疫苗对几种病原弧菌引起的弧菌病具有免疫保护力的目的。虽然 Bruschke 等^[2,7]利用 BVDV 的糖蛋白 E2 作为亚单位疫苗的材料生产了针对多个亚型的 BVDV 的疫苗,取得了一定进展,但由于病毒和细菌本身所具有的抗原决定簇并非单一,所以这给找寻不同亚型、不同血清型和不同种的抗原所拥有的共同抗原决定簇造成了一定的困难^[8-9]。因此在以往的研究中,均未获得非常理想的结果。我们旨在以现有研究为基础,对找寻共同抗原决定簇的新方法再做进一步的研究,并生产出针对同属多种细菌均具有较强免疫保护性的疫苗。

参考文献:

- [1] 吴后波,潘金培. 弧菌属细菌及其所致海水养殖动物疾病[J]. 中国水产科学, 2001, 8(1): 89-93.
- [2] Bruschke C J M, van Oirschot J T. An experimental multivalent bovine virus diarrhea virus E2 subunit vaccine and two experimental conventionally inactivated vaccines induce partial fetal protection in sheep[J]. Vaccine, 1999, 17: 1 983-1 991.
- [3] Newman M J, Wu J-Y. Induction of cross-reactive cytotoxic T-lymphocyte responses specific for HIV-1 gp120 using saponin adjuvant (QS-21) supplemented subunit vaccine formulations[J]. Vaccine, 1997, 15: 1 001-1 007.

- [4] Stuart F A, Corbel M J. Identification of a serological cross - reaction between *Brucella abortus* and *Escherichia coli* O157 [J]. Vet Rec, 1982, 110: 202 - 203.
- [5] Biswas T, Chakrabarti M K. Antigenicity and antigenic cross - reactivity of outer membrane proteins from *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Internat J Med Microbiol Virol Parasitol Infect Dis, 1994, 281(4): 475 - 480.
- [6] 范秀容, 李广武, 沈 萍. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 1980. 223.
- [7] Bruschke C J M, Moormann R J M. A subunit vaccine based on glycoprotein E2 of bovine virus diarrhea virus induces fetal protection in sheep against homologous challenge [J]. Vaccine, 1997, 15: 1 940 - 1 945.
- [8] McKenna T St C, Rieder E. Strategy for producing new foot-and-mouth disease vaccines that display complex epitopes [J]. J Biotechnol, 1996(44): 83 - 89.
- [9] Karl Albert Brakstad, Cox R J. Cross-reaction but no avidity change of the serum antibody response after influenza vaccination [J]. Vaccine, 1995, 13: 1 522 - 1 528.

Cross reactions between six pathogenic bacteria and their antisera

ZHAN Wen-bin, QI Ji-guang, LIU Hong-ming, ZHOU Li, XING Jing

(Laboratory of Immunology and Pathology of Aquatic Animals, LMMEC, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: Agglutination, SDS - PAGE, Western-blot and ELISA methods were used to analyze the cross-reactions between *Vibrio anguillarum*, *V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *Edwardsiella tarda*, and *Pseudomonas fluorescens* with their anti-sera. The *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi*, *V. alginolyticus* and *E. tarda* were presented by Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences. The cultivated temperature and time were 26 °C and 24 h, respectively. The results show that there are high-level cross-reactions in the same category and low-level or even no cross-reactions between different ones. By western-blot method, it shows that in many protein belts having antigenicity hold the same molecule weight, especially in the same category. Most of the vibrios have the protein bands with molecule weights of 135.6 kD and 121.5 kD which can react with *Vibrio harveyi* antiserum, 96.5 kD, 48.4 kD, 39.2 kD and 34.9 kD with *V. alginolyticus* antiserum, 55.1 kD with *V. parahaemolyticus* antiserum, but these protein belts can't react with the sera of the other two categories. If the cross proteins are the specific epitopes possessed by vibrios, they could be used to produce the subunit vaccine against vibriosis of aquatic animals.

Key words: *Vibrio*; *Edwardsiella tarda*; *Pseudomonas fluorescens*; anti-serum; cross reaction