

研究简报

皱纹盘鲍幼鲍溃烂病病原菌的 ELISA 检测法

A elisa method for detecting the pathogenic bacteria
of fester disease in cultured juvenile abalone

叶 林 俞开康 王如才

(青岛海洋大学水产学院, 266003)

Ye Lin Yu Kaikang Wang Rucai

(Ocean University of Qingdao Fisheries College, 266003)

刘立洋 邹锋钢 刘光辉 梁永江

(山东荣成筑荣水产有限公司, 264317)

Liu Liyang Zou Fenggang Liu Guanghui Liang Yongjiang

(Rongcheng Zhurong Fisheries Company of Shandong Province, 264317)

关键词 皱纹盘鲍, 幼鲍, 溃烂病, 荧光假单胞菌, 病原菌, ELISA 检测

Key words *Haliotis discus*, Juvenile abalone, Fester disease, *Pseudomonas floresens*, Pathogenic bacteria, Detection by ELISA

近年来,在幼鲍的工厂化养成中常有幼鲍溃烂病的出现。经研究发现,引起该病的病原菌是荧光假单胞菌 IV^[15]。该病常年发病,一经发病很难治疗,死亡率较高,造成巨大经济损失。因而急需找出一种方法,对该病的病原进行早期诊断、检测,从而预防该病的发生。酶联免疫吸附检测法(ELISA)是一种灵敏性较高、操作简便的生物学检测方法。自六、七十年代创立以来,在医学、兽医方面都得到广泛应用。近几年,在水产动物病害研究中有报道^[3, 8, 10~14]。本次实验,制备了幼鲍溃烂病病原菌的抗血清,建立了该病的酶联免疫检测方法。并初步应用到生产中,用酶联免疫检测方法来检测、诊断鲍病。经文献检索,国内外未见报道。

1 材料和方法

1.1 病鲍致病菌来源

在山东荣成俚岛筑荣水产养殖公司幼鲍工厂化养成车间,取濒于死亡的患病幼鲍,进行细菌的分离纯化。经病原菌感染试验后,得到致病性病原菌。经细菌鉴定试验鉴定该病原菌为荧光假单胞菌 IV。

1.2 致病菌灭活菌液的制备

取经鉴定抗原性完整的菌性,接种于 2216E 海水斜面培养基上,32℃ 培养 24 h,每支斜面用 5 ml 灭菌生理盐水将菌苔洗下,制成浓悬液。经梯度稀释法测定菌液浓度后,将浓度定为 1×10^{10} /ml,并加入终浓

收稿日期:1997-04-09

度为 0.3% 的甲醛液,置 32℃ 温箱 24 h 杀菌。无菌试验后,放冰箱备用。

1.3 细菌抗血清制备

按常规方法,免疫医用健康家兔(*Oryctolagus cuniculus domestica*)雄兔 3 只。于末次免疫后 7d,耳静脉取血,分离血清。用玻板凝集反应测定抗血清的效价达 1:2000 左右时,即可放血。取抗血清用盐析法提纯抗体。

1.4 酶标记抗体制备

取提纯的兔 IgG(从抗血清中制备),用戊二醛一步法交联辣根过氧化物酶与 IgG 酶标羊抗兔(IgG-HRP,中国医学科学院流行病学研究所)。

1.5 ELISA 检测方法的建立、应用

1.5.1 ELISA 检测方法的选择与步骤 ELISA 检测方法是指在合适的载体上,酶标记抗体与相应的抗原形成酶标记的抗原抗体免疫复合物,在一定的底物参与下,复合物上的酶催化底物使其水解,氧化或还原成为另一种带色物质。在一定条件下,酶的降解底物量和呈现色泽是成正比的,因而可以用分光光度计进行测定,从而计算出参与反应的抗原含量。常用的 ELISA 有 3 种方法,即直接法、间接法与双重抗体法。本实验选择的是双重抗体法和间接法。

1.5.2 ELISA 双重抗体法和间接法的检测步骤

(1)ELISA 双重抗体法

a. 将 ELISA 检测板,每孔穴加入 100 μ l 荧光假单胞菌的抗血清,用灭菌生理盐水作阴性对照,放置冰箱(4℃)过夜。

b. 用 PBS-Tween 20 缓冲液,缓缓冲洗孔穴 3 次,每次 3 min。

c. 每孔穴加入 100 μ l 不同浓度的待测菌液并以生理盐水作对照,放 37℃ 孵育 1 h。PBS-Tween 20 液缓缓冲洗 3 次。

d. 每孔加入 100 μ l 兔 IgG 酶标记抗体稀溶液,37℃ 孵育 1 h。洗涤步骤同上。

e. 每孔加入底物(H_2O_2 和 OPD)100 μ l,室温孵育 20~30 min。

最后,每孔加入 2 mol/L H_2SO_4 100 μ l,终止反应。在 DG 3022A 酶联免疫检测仪上测定各孔 A_{450} 时的吸光度值。

(2)ELISA 间接法

a. 将细菌悬液加入酶标板,每孔 100 μ l。55℃ 烘干后甲醇固定 10 min, PBST 洗 3 次。

b. 加入兔抗体 IgG 100 μ l,37℃ 孵育 30 min。PBST 洗 3 次。

c. 加入 HRP-羊抗兔 IgG 100 μ l,37℃ 孵育 30 min。

d. 用 PBST 洗 3 次,邻苯二胺显色。2 mol/L H_2SO_4 液终止反应,用 DG 3022A 酶联免疫测定仪测定 A_{490} 时的样本 OD 值。为减少非特异性吸附,将一抗和二抗中加入 3% 的牛血清白蛋白。

1.5.3 最佳反应条件的选择 采用方阵滴定法,找出兔抗体 IgG(一抗)和 HRP-羊抗兔(二抗)的最佳工作浓度。细菌与兔抗体、细菌与兔抗体酶标抗体的最佳浓度比例。细菌浓度为 1×10^9 /ml。

1.5.4 用 ELISA 双重抗体法和间接法测定抗原的有效测定浓度 按 1.5.2 的测定步骤,选用抗体与酶标抗体的最适反应浓度,将荧光假单胞菌液浓度首先 10 倍稀释后,按二等分 1/2、1/4、1/8、1/2¹⁵ 稀释。以灭菌生理盐水作阴性对照。最后测定吸光度值,算出抗原的有效测定浓度。

1.5.5 用 ELISA 检测法检测发病鲍养殖用水中的细菌量 从患有幼鲍溃烂病的鲍养成车间,取几个养殖池中的水样,清洁海水做阴性对照,患病幼鲍的患病组织液为阳性对照。用 ELISA 间接法进行检测。

1.6.6 测定抗血清的特异性 选用经鉴定的几种菌种,产气弧菌(*V. gazogenes*)、豚鼠气单胞菌(*A. caviae*)(本实验室),迟钝爱德华氏菌(*E. tarda*)、鳃弧菌(*V. anguillarum*)(北京药品生物制品检定所),嗜水气单胞菌(*A. hydrophila*)(中科院水生所),进行玻片凝集试验,ELISA 测定试验,检测幼鲍溃烂病原菌抗血清的特异性。

2 结果

2.1 抗体效价测定结果

经试管凝集法测定, 抗体的最高凝集稀释倍数是 2^{12} , $1/2048$ 。

ELISA 最佳反应条件的选择采用方阵滴定法, 抗原浓度为 $1 \times 10^9/\text{ml}$, 抗体浓度作二等分 $1/2$ 、 $1/4$ 、 $1/8$ 、 $\dots$ 、 $1/2^{16}$ 稀释, 目测抗体稀释度在 $1/8 \sim 1/32$ 时凝集量最大。同理, 测定的酶标抗体以 $1/20$ 、 $1/40$ 、 $1/80$ 、 $\dots$ 、 $1/2560$ 稀释, 当抗体在 $1/80 \sim 1/320$ 稀释度时 OD 值较高。最终选取的抗血清和酶标抗体的最佳稀释度分别为 $1/16$ 、 $1/160$ 。根据测定结果, 被检细菌菌液的 OD 值在 0.75 以上, 为阳性。这是根据阳性血清的光吸收值/阴性对照的光吸收值 > 2.1 , 为阳性⁽⁵⁾ (阴性对照的光吸收值为 0.35)。

2.2 细菌抗原检测

用 $1 \times 10^9/\text{ml}$ 的细菌菌液从 1:10 开始倍比稀释, 作 ELISA 检测。

2.2.1 用 ELISA 间接法测定的结果 见表 1。间接法测定, 呈现阳性反应的最大菌液稀释度为 1:20 480, 可检测出的细菌量为 $4.8 \times 10^4/\text{ml}$ 。

表 1 细菌抗原的 ELISA 间接法检测

Table 1 Detection of bacteria antigen by indirect ELISA method

稀释度 Dilution step	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120	1/10240	1/20480	1/40960
OD 值	2.24	1.76	1.25	1.10	1.16	1.05	1.12	0.93	0.98	0.89	0.80	0.78	0.70
+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

表 2 细菌抗原的 ELISA 双重抗体法检测

Table 2 Detection of bacteria antigen by two-antibody ELISA method

稀释度 Dilution step	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120
OD 值	1.43	1.41	1.29	0.95	1.04	1.16	1.05	0.94	0.83	0.65
+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

表 3 几种细菌的 ELISA 间接法检测

Table 3 Several different bacteria antigen detected by ELISA method

被检细菌 Different bacteria	嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>	豚鼠气单胞菌 <i>A. caviae</i>	爱德华氏菌 <i>E. tarda</i>	鳃弧菌 <i>V. anguillarum</i>	产气弧菌 <i>V. gazogenes</i>
细菌浓度 Bacteria density	10^8	10^8	10^8	10^8	10^8
OD 值	0.48	0.52	0.42	0.39	0.44
+/-	-	-	-	-	-

2.2.2 用 ELISA 双重抗体法测定的结果 见表 2。双重抗体法测定, 呈现阳性反应的最大菌液稀释度为 1:2 560, 可检测出的细菌量为 $3.9 \times 10^5/\text{ml}$ 。

2.3 幼鲍溃烂病抗血清的特异性检查

采用玻片凝集法检查发现被检细菌不与抗血清发生凝集反应。用 ELISA 间接法测定被检细菌的 OD 值见表 3, OD 值 0.75 以上, 结果为阳性。

2.4 发病池水样检测

取发病幼鲍养殖池中水样, 进行 ELISA 间接法检测。OD 值 0.75 为阳性, 阳性检出率为 66.6%。结

果见表 4。

表 4 发病鲍池养殖水样的 ELISA 检测

Table 4 Detection of bacteria antigen in diseased culture water by ELISA method

发病鲍池 Ponds of diseased	1	2	3	4	5	6	未发病池 Ponds of health	病鲍组织 Disease tissue
OD 值	1.56	1.67	0.82	0.41	0.73	0.85	0.48	2.34
+ / -	+	+	+	-	-	+	-	+

3 讨论

ELISA 是一种特异性较强,灵敏性较高的检测方法^[4,5]。该方法自六、七十年代创立以来,在医学、兽医临床上得到广泛应用。由于该法操作简便,价格便宜,检测结果较为灵敏,特别适于基层具体工作实践中。在水产病害研究中 ELISA 检测法的运用较少,起步较晚。作为水产养殖动物来说,由于生活在水环境当中,水环境的变化直接影响到水产养殖动物疾病的发生。因而,能够找出一种简便、可行的检测方法,监测养殖用水中有害微生物的变化情况,从而采取相应的预防措施,就显得极其重要。ELISA 检测方法在水产养殖方面的应用,给水产动物病害的防治带来新的途径。经初步应用,ELISA 检测法对幼鲍溃烂病原菌的检测结果较为理想。

ELISA 检测法在具体应用时有许多不同的检测方法,能寻找到一种操作最简便、检测效果较好的方法是非常关键的。因本文所用的 ELISA 检测法,检测的抗原是细菌,细菌作为一种颗粒性的抗原,如果想直接使之吸附于检测板上就较为困难。因而,实验中首选了双重抗体法^[4,5,9](又称双重抗体夹心法)是将被测抗原包被于两层抗体之间,使得细菌的吸附量明显增多,可测定的细菌含量值较为理想。同时,应用双重抗体法除标记酶较贵外,其他所需药品、设备都为实验室常备。ELISA 改良间接法^[14],是在原有间接检测法^[4,5]基础上的改进,该法应用温箱烘干,甲醇固定,使细菌在检测板上的吸附量大大增加。细菌抗原的阳性检出量可达 $10^4/\text{ml}$,比双重抗体法更加灵敏。但是,该法所用的酶标抗体价格较贵。为缩短检测时间还需一定的特殊设备,如带鼓风式恒温温箱等。因而在实际工作中如何使用适当的 ELISA 检测法,要根据实际条件加以选择。

ELISA 检测具有一定的检测特异性,为了进一步提高该法的特异性,可将一抗、二抗中加入 3%~5% 的牛血清白蛋白^[4,5,14]。经实验应用,该法效果很好。

本实验室所建立的幼鲍溃烂病检测法,在生产中已得到初步应用,效果较好。但是阳性检测率还未能达到较高水平,因而需进一步的改进。

参 考 文 献

- [1] 朱培坤. 免疫酶技术. 山东科学技术出版社, 1983
- [2] 刘彦仿主编. 免疫组织化学. 人民卫生出版社, 1989
- [3] 吴淑勤等. 应用 DOT-ELISA 检测鱼类嗜水气单胞菌的试用研究. 中国水产科学, 1995, 2(5): 82~86
- [4] 宋大新等. 微生物学实验技术教程. 复旦大学出版社, 1993. 303~335
- [5] 李建武等. 生物化学实验原理和方法. 北京大学出版社, 1994. 391~398
- [6] 李成文编注. 现代免疫化学技术. 上海科学技术出版社, 1992. 191~238
- [7] 林学颜. 免疫学基础. 福建科学技术出版社, 1980. 124~131
- [8] 陈月英等. 用酶免疫测定法检测鱼害粘球菌的试验. 水产学报, 1981. 5(1): 75~79
- [9] 周得庆主编. 微生物学实验手册. 上海科学技术出版社, 1986. 532~536
- [10] 邵建忠等. 应用 DOT-ELISA 技术检测草鱼出血病毒研究. 水产学报, 1996, 20(1): 6~12
- [11] 涂小林等. 中国对虾一种杆状病毒的 ELISA 检测方法. 水产学报, 1995, 19(4): 315~321

-
- [12] 赵志壮等. 应用 ELISA 方法快速检测 IHNV-B 病毒. 水产学报, 1993, 17(1): 60-63
 - [13] 钱 冬等. 应用酶联免疫吸附法检测暴发病病原-嗜水气单胞菌的研究. 水产养殖, 1993(4): 4-17
 - [14] 董袁亮等. 杀鲑气单胞菌的快速检测. 动物检疫, 1993, 10(5): 17-18
 - [15] 叶林等. 皱纹盘鲍幼鲍溃烂病原菌的研究. 中国水产科学, 1997, 4(4): 43-48