

# 鲆鲽类主要病原菌抗血清的制备及应用

甘玲玲<sup>1,2</sup>, 王蔚芳<sup>1</sup>, 高淳仁<sup>1</sup>, 雷霖霖<sup>1</sup>

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室, 山东青岛 266071;

2. 四川省富顺县水产渔政局, 四川富顺 643200)

**[摘要]** 用甲醛灭活8种鲆鲽类主要病原菌, 鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)、创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)、哈维弧菌(*Vibrio harveyi*)、溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、豚鼠气单胞菌(*Aeromonas caviae*)、迟缓爱德华菌(*Edwardsiella tarda*)、鲷爱德华菌(*Edwardsiella ictaluri*), 制备成灭活疫苗后肌肉注射大菱鲆获得各病原菌抗血清。结果显示, 抗鳃弧菌血清、抗哈维弧菌血清、抗豚鼠气单胞菌血清、抗鲷爱德华菌效价为1:6 400, 抗创伤弧菌血清、抗溶藻弧菌血清、抗嗜水气单胞菌血清效价为1:12 800, 抗迟缓爱德华菌血清效价为1:102 400。应用ELISA分析各抗血清与8种病原菌及迟缓爱德华菌蛋白的免疫交叉反应, 结果显示, 各病原菌与其本身的抗血清反应最为强烈, 而其他抗血清间有程度不等的交叉反应; 菌蛋白与其相应的菌抗血清反应最为强烈, 与其他病原菌抗血清反应较弱。本研究所制备的病原菌抗血清效价较高, 且具有特异性, 可应用于鲆鲽类病原菌的检测。

**[关键词]** 鲆鲽类; 疫苗; 抗血清; 病原菌

**[中图分类号]** S941 **[文章标识码]** A **[文章编号]** 1009-1742(2014)09-0021-05

## 1 前言

随着鲆鲽类养殖业的迅猛发展, 疾病问题日显突出, 其中细菌性疾病占到鲆鲽类病害发生率的50%以上, 包括各种弧菌, 如鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)<sup>[1,2]</sup>、创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)<sup>[3]</sup>、哈维弧菌(*Vibrio harveyi*)<sup>[4]</sup>、溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)<sup>[5]</sup>; 引起疖疮病的杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)<sup>[6]</sup>、豚鼠气单胞菌(*Aeromonas caviae*)<sup>[7]</sup>等; 引起腹水病的嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)<sup>[8]</sup>、迟缓爱德华菌(*Edwardsiella tarda*)<sup>[9]</sup>等。

抗血清是指动物经抗原物质刺激后所产生的含有相应抗体的血清, 包括抗毒素、抗细菌、抗病毒

血清<sup>[10]</sup>。抗血清在研究中可用作标准阳性血清, 在临床应用中则可作为一种良好的治疗性抗体。如伤寒菌的抗血清可用于伤寒病的诊断, 甲胎蛋白的抗血清可诊断原发性肝癌, 抗猪瘟血清能有效地控制猪瘟的疫情, 羊抗犬瘟热异源单血清对犬瘟热有独特的疗效<sup>[10-12]</sup>。相对于人、畜牧类的抗血清研究, 鱼类的抗血清研究应用几乎未见报道。本文用8种鲆鲽类常见病原菌制备灭活疫苗免疫大菱鲆获得抗血清, 采用酶联免疫吸附测定法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)测定各抗血清的效价, 并对8种病原菌、迟缓爱德华菌蛋白与各菌抗血清之间的免疫交叉反应进行分析, 基于此结果初步判断所得抗血清的质量, 为进一步探索鲆鲽类细菌

**[收稿日期]** 2014-07-09

**[基金项目]** 现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-50)

**[作者简介]** 雷霖霖, 1935年出生, 男, 福建宁化县人, 中国工程院院士, 研究员, 博士生导师, 主要从事海水鱼类生态繁殖和养殖理论与技术研究; E-mail: leijl@ysfri.ac.cn

性疾病的预防、诊断及治疗奠定基础。

## 2 材料与方法

### 2.1 试验鱼及饲养条件

试验用健康大菱鲂购自青岛通用水产有限公司,体重 500 g,水温 15 °C,暂养一周后发现无任何异常情况即开始进行试验,免疫接种前后按常规养殖程序管理。

### 2.2 菌株来源及接种培养

试验用菌株来自中国海洋大学生命学院,共 8 株,分别为鳃弧菌、创伤弧菌、哈维弧菌、溶藻弧菌、嗜水气单胞菌、豚鼠气单胞菌、鲷爱德华菌和迟缓爱德华菌。取弧菌接种于 2216E 平板 28 °C 培养 24 h,鲷爱德华菌接种于脑心浸液培养基(BHI)中 20 °C 恒温振荡培养 48 h,其他非弧菌接种于 Luria-Bertani(LB)平板 28 °C 培养 24 h。然后将弧菌接种于胰蛋白胨大豆肉汤 28 °C 恒温振荡培养 12 h,鲷爱德华菌接种于 BHI 液体培养基中 20 °C 恒温振荡培养 24 h,其他非弧菌接种于 LB 液体培养基中 28 °C 恒温振荡培养 12 h(迟缓 24 h)。

### 2.3 灭活疫苗的制备

将培养的细菌倒入离心管中,4 000 r/min,20 min 后,弃上清,收集菌体。用 0.85 % 无菌生理盐水重悬菌体,按表 1 进行细菌灭活<sup>[13-20]</sup>。用无菌生理盐水洗脱甲醛,4 °C,4 000 r/min,20 min,反复两次,后重悬于无菌生理盐水,并调整浓度为 10<sup>9</sup> cfu/mL,以平板培养法检测灭活效果。将弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂分别与灭活各菌液等体积混匀,使用超声波破碎仪进行乳化。制备好的疫苗 4 °C 保存备用。

表 1 菌灭活条件

Table 1 The conditions of bacterial inactivation

| 菌名     | 甲醛终浓度/% | 甲醛用量/ $\mu\text{L}$ | 温度/ $^{\circ}\text{C}$ | 时间/h |
|--------|---------|---------------------|------------------------|------|
| 鳃弧菌    | 0.5     | 135.14              | 28                     | 48   |
| 创伤弧菌   | 1.0     | 270.28              | 28                     | 24   |
| 哈维弧菌   | 0.4     | 108.10              | 28                     | 24   |
| 溶藻弧菌   | 0.1     | 27.04               | 28                     | 24   |
| 嗜水气单胞菌 | 0.2     | 54.06               | 28                     | 24   |
| 豚鼠气单胞菌 | 0.8     | 216.22              | 28                     | 24   |
| 鲷爱德华菌  | 0.5     | 135.14              | 28                     | 48   |
| 迟缓爱德华菌 | 0.2     | 54.08               | 28                     | 24   |

### 2.4 大菱鲂的免疫与采血

试验用鱼随机分为 9 组,每种疫苗接种三尾,对照组注射等量无菌生理盐水,免疫程序见表 2。分别于免疫前及免疫后第 2 周、第 4 周、第 6 周、第 8 周、第 10 周、第 12 周对免疫鱼进行尾静脉采血,分离血清,分装后 -20 °C 保存备用。

表 2 免疫程序

Table 2 The immunization schedule

| 免疫次数   | 疫苗剂量/ $(1\text{G}\mu\text{L}\cdot\text{尾}^{-1})$ | 佐剂      | 注射方式 |
|--------|--------------------------------------------------|---------|------|
| 基础免疫   | 200                                              | 弗氏完全佐剂  | 肌肉注射 |
| 加强免疫   | 200                                              | 弗氏不完全佐剂 | 肌肉注射 |
| 二次加强免疫 | 200                                              | 弗氏不完全佐剂 | 肌肉注射 |

### 2.5 菌蛋白来源

试验用迟缓爱德华菌蛋白来自华东理工大学,是一种迟缓爱德华菌免疫保护性抗原,为迟缓爱德华菌鞭毛相关蛋白,专利号:201110095826.7<sup>[21]</sup>。

### 2.6 ELISA

1) 包被:用磷酸缓冲液将各灭活菌液( $10^7$  cfu/mL)及迟缓爱德华菌蛋白( $2\ \mu\text{g}/\text{mL}$ )包被于酶标板,每孔 50  $\mu\text{L}$ ,置 4 °C 过夜。

2) 封闭:磷酸盐-吐温溶液洗涤,将酶标板扣干,加入 5 % 脱脂牛奶,每孔 200  $\mu\text{L}$ ,37 °C 恒温封闭 1 h。

3) 与抗血清的反应:同上洗涤后,加入从 1:100 开始二倍系列稀释(磷酸盐作稀释液)的各抗血清,每孔 50  $\mu\text{L}$ ,37 °C 恒温孵育 30 min。

4) 与单抗及酶标二抗的反应:同样洗涤后,加入用 5 % 脱脂牛奶稀释的鼠抗大菱鲂免疫球蛋白单克隆抗体腹水(本实验室制备并保存)1:25 000 稀释液,每孔 50  $\mu\text{L}$ ,37 °C 恒温孵育 30 min;同上洗涤,加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠抗体(5 % 脱脂牛奶 1:2 000 稀释,50  $\mu\text{L}$ ),37 °C 恒温孵育 30 min。

5) 显色及终止:洗涤后每孔加入可溶性单组分四甲基联苯胺底物溶液 50  $\mu\text{L}$  并显色 10 min,然后每孔加终止液( $2\text{M H}_2\text{SO}_4$ ) 50  $\mu\text{L}$ ,最后用酶标仪测定 450 nm 处的 optical density(OD)值(5 min 内读数, $P/N \geq 2.1$  时判定为阳性,其中  $P$  为实验孔读值, $N$  为对照孔读值)。

### 3 结果

#### 3.1 迟缓爱德华菌抗血清效价变化

迟缓爱德华菌灭活疫苗免疫大菱鲆后第4周开始产生特异性抗体,抗体效价为1:3 200;之后抗体水平逐步升高;第10周抗体水平升高到1:102 400,并维持这一水平至第12周(见表3)。

表3 间接ELISA法测定迟缓爱德华菌灭活疫苗免疫大菱鲆后血清抗体效价的变化

Table 3 Antibody titer of turbot serum vaccinated with *Edwardsiella tarda* by indirect ELISA

| 时间/周 | 抗血清效价     |
|------|-----------|
| 0    | 0         |
| 2    | 0         |
| 4    | 1:3 200   |
| 6    | 1:25 600  |
| 8    | 1:51 200  |
| 10   | 1:102 400 |
| 12   | 1:102 400 |

注:抗体效价为血清稀释倍数的倒数,血清以1:100开始倍比稀释, $P/N \geq 2.1$ 时判定为阳性

#### 3.2 各病原菌抗血清效价

免疫后第10周各病原菌抗血清效价见表4。

#### 3.3 病原菌及菌蛋白与各抗血清的免疫交叉反应

##### 3.3.1 病原菌

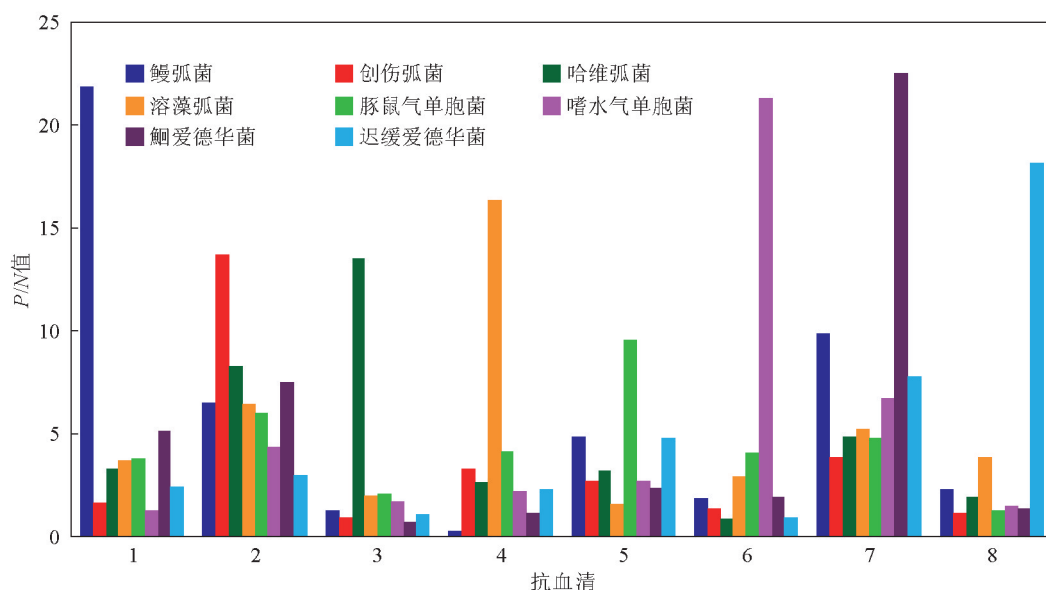
运用ELISA法,对8种病原菌与8种病原菌抗

血清的免疫交叉反应进行了分析。由图1可以看出,各病原菌抗血清与其对应的病原菌反应最强烈;鳃弧菌抗血清与鲷爱德华菌反应较强,与创伤弧菌、嗜水气单胞菌、迟缓爱德华菌反应较弱;创伤弧菌抗血清与其他7种菌的反应相对较强;哈维弧菌抗血清与其他菌反应都比较弱;溶藻弧菌抗血清与创伤弧菌、豚鼠气单胞菌的反应相对较强,与鳃弧菌、哈维弧菌、嗜水气单胞菌、鲷爱德华菌、迟缓爱德华菌的反应较弱;豚鼠气单胞菌抗血清与鳃弧菌、迟缓爱德华菌的反应较强,与创伤弧菌、哈维弧菌、溶藻弧菌、嗜水气单胞菌、鲷爱德华菌的反应较弱;嗜水气单胞菌抗血清与其他7种菌的反应较弱;鲷爱德华菌与其他7种菌的反应较强;迟缓爱德华菌抗血清与其他7种菌的反应较弱。

表4 8种病原菌抗血清效价

Table 4 The titer of anti-serum against eight bacterium

| 大菱鲆抗血清 | 抗血清效价     |
|--------|-----------|
| 鳃弧菌    | 1:6 400   |
| 创伤弧菌   | 1:12 800  |
| 哈维弧菌   | 1:6 400   |
| 溶藻弧菌   | 1:12 800  |
| 豚鼠气单胞菌 | 1:6 400   |
| 嗜水气单胞菌 | 1:12 800  |
| 鲷爱德华菌  | 1:6 400   |
| 迟缓爱德华菌 | 1:102 400 |



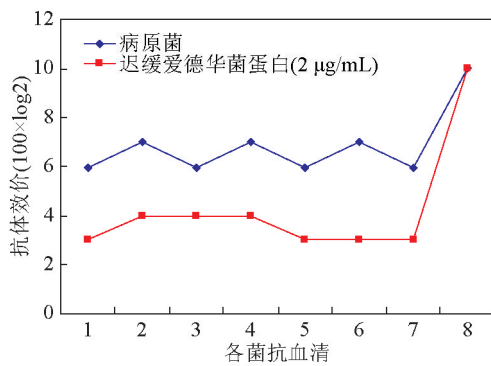
1—抗鳃弧菌血清;2—抗创伤弧菌血清;3—抗哈维弧菌血清;4—抗溶藻弧菌血清;5—抗豚鼠气单胞菌血清;6—抗嗜水气单胞菌血清;7—抗鲷爱德华菌血清;8—抗迟缓爱德华菌血清

图1 ELISA检测8种病原菌抗血清与8种病原菌的交叉反应

Fig. 1 The result of eight anti-serum react with eight bacterium

### 3.2.2 迟缓爱德华菌蛋白

运用ELISA法,检测迟缓爱德华菌蛋白与各细菌抗血清的免疫交叉反应,结果显示,仅迟缓爱德华菌抗血清的效价高,并且效价水平与用迟缓爱德华菌检测结果一致,而其他7种菌的抗血清效价均下降(见图2)。



1—抗鳃弧菌血清;2—抗创伤弧菌血清;3—抗哈维弧菌血清;4—抗溶藻弧菌血清;5—抗豚鼠气单胞菌血清;6—抗嗜水气单胞菌血清;7—抗鲷爱德华菌血清;8—抗迟缓爱德华菌血清

图2 ELISA法检测8种病原菌抗血清与迟缓爱德华菌蛋白的免疫反应

Fig. 2 The result of *Edwardsiella tarda* protein react with eight kinds of anti-serum

## 4 结语

本试验利用福尔马林灭活病原菌制备灭活疫苗,肌肉注射大菱鲆获得抗血清,并运用ELISA方法检测各菌抗血清的效价在1:6 400~1:102 400。本研究表明,各菌抗血清具有较高效价,但其效价不同可能是由于大菱鲆对各菌的敏感性不同或抗血清中含有的杂蛋白质等因素造成的,也与各种病原菌本身构成的复杂性相关。

运用ELISA检测方法对8种病原菌与抗血清进行了免疫反应分析,发现8种菌与各自对应的抗血清间的免疫反应最为强烈,但与其他细菌的抗血清亦有微弱的交叉反应;而在应用迟缓爱德华菌蛋白与各抗血清的免疫反应进行分析时,发现仅迟缓爱德华菌的抗血清效价高,其他菌的抗血清效价均大幅下降。本结果表明,各菌抗血清具有特异性,可用于鲆鲽类病原菌及迟缓爱德华菌蛋白的检测,但各病原菌与其他病原菌抗血清之间不同程度的交叉反应为抗血清的应用带来一定的影响。

特异性抗血清在临床应用中可用作治疗性抗体,广泛应用于疫病流行早期对未感染动物的短期

预防及疫病的早期治疗;在研究中还可用作标准阳性血清用于微生物鉴定及疾病诊断。但是,抗血清的研究和应用中存在以下问题需要解决。

1)抗血清的安全性。新制备的抗血清必须保证没有外源病原,而抗血清中的外源病原如何清除是一个难题。一般情况下,抗血清中的外源病原主要是病毒,清除病毒一般需要进行病毒排除、病毒去除及病毒灭活三个方面的程序,而有效的病毒处理技术还需进一步发展。

2)抗血清的效价。影响抗血清效价的因素主要包括抗原、动物的选择、免疫剂量、次数、间隔时间、血清处理以及保存血清的温度、期限等。因此如何获得高效价特异性抗血清以及如何避免抗血清效价降低是以后的一个研究方向。

鲆鲽类虽然在我国养殖时间较短,但已成为我国海水养殖鱼类的重要组成部分。鲆鲽类养殖以高密度的工厂化养殖模式为主,其疾病问题日益加剧,相关研究也越来越多。本试验制备了鲆鲽类常见病原菌的抗血清并将其应用于检测病原菌及菌蛋白。但抗血清存在着安全性、效价降低、质量等问题,对其研究及应用带来了困扰,目前,还没有有效的方法解决这些问题。在今后的研究中可在如何清除抗血清中外源病原、血清处理及保存方法、提高抗血清质量等方面进行深入研究。

## 参考文献

- [1] 莫照兰,茅云翔,陈师勇,等.一株牙鲆皮肤溃烂症病原菌的鉴定[J].微生物学报,2002,43(3):263-269.
- [2] Novoa B, Nunez S, Fernandez P, et al. Epizootic study in a turbot farm: bacteriology, virology, parasitology and histology [J]. Aquaculture, 1992(107): 253-258.
- [3] 于兰萍,王斌,李艳,等.大菱鲆出血性败血症病原菌的分离与鉴定[J].大连水产学院学报,2008,23(5):335-339.
- [4] 范文辉,黄健,王秀华,等.养殖大菱鲆溃疡症病原菌的分离鉴定及系统发育分析[J].生物学报,2005,45(5):665-670.
- [5] 陈晓凤,常建波,蔡道财.牙鲆“体表出血病”病原的研究[J].集美大学学报(自然科学版),2008,13(1):12-17.
- [6] Pedersen K, Larsen J L. First report of an outbreak of furunculosis in turbot, *Scophthalmus maximus* caused by *Aeromonas salmonicida* subspecies *salmonicida* in Denmark [J]. Bull Eur. Assoc Fish Pathol, 1996 (16): 129-133.
- [7] 张正,王印庚,杨官品,等.大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)细菌性疾病的研究现状[J].海洋湖沼通报,2004(3):83-87.
- [8] 孙祎敏,李楠,宋杰,等.褐牙鲆腹水症病原菌的分离鉴定及其灭活疫苗的研制[J].水产科学,2009,28(11):613-617.
- [9] 朱壮春,史相国,张淑杰,等.牙鲆腹水病病原研究[J].水产科学,2006,25(7):325-329.
- [10] 王占伟,邵国青,陈笑娟.动物抗血清及其制备技术要点与应用进展[J].江西农业报,2009,21(7):149-152.
- [11] 郭建辉,吴世华,余学明,等.抗血清疗法的应用现状[J].中

- 国动物检疫, 2011, 28(1): 79-81.
- [12] 金海玉, 王晓华, 梁晚枫, 等. 羊抗犬瘟热异源单血清治疗犬瘟热的临床观察 [J]. 吉林畜牧兽医, 2005(12): 60.
- [13] 朱开玲, 陈吉祥, 李 筠, 等. 鳃弧菌灭活疫苗对海水养殖大菱鲆的免疫预防研究 [J]. 高技术通讯, 2004: 76-80.
- [14] 熊清明, 陆承平. 迟缓爱德华菌对小鼠和剑尾鱼的免疫保护实验 [J]. 中国兽医学报, 2002, 22(3): 251-252.
- [15] 鄢庆枇, 王 军, 苏永全, 等. 大黄鱼病原菌——溶藻弧菌的ELISA快速检测研究 [J]. 海洋科学, 2001, 25(9): 47-49.
- [16] 庞晓雯, 秦 红, 师建国. 抗创伤弧菌mAb的制备与鉴定 [J]. 第四军医大学学报, 2008, 29(6): 532-534.
- [17] 毛芝娟, 楼 丹, 杨 波, 等. 用灭活哈维弧菌苗浸泡免疫大黄鱼的研究 [J]. 华中农业大学学报, 2004, 23(3): 326-330.
- [18] 黄艺丹, 汪开毓, 郑 建. 鱼类致病性豚鼠气单胞菌单克隆抗体-胶体金检测方法的建立 [J]. 水生生物学报, 2010, 34(3): 509-516.
- [19] 张玉芬, 张秀军, 何生美. 嗜水气单胞菌疫苗用菌液培养条件及灭活方法的研究 [J]. 江西农业大学学报, 2009, 31(1): 31-40.
- [20] 肖 丹, 罗远会, 方 芳, 等. 一种预防黄颡鱼红头病的疫苗: 中国, 101829321 [P]. 2012-12-12.
- [21] 吴海珍, 张 萌, 李小勇, 等. 迟钝爱德华氏菌免疫保护性抗原、相关表达载体、疫苗和应用: 中国, 201110095826.7 [P]. 2011-04-15.

# The preparation and application of inactivated vaccine and its antiserum from eight common pathogens of Flatfish

Gan Lingling<sup>1,2</sup>, Wang Weifang<sup>1</sup>, Gao Chunren<sup>1</sup>, Lei Jilin<sup>1</sup>

(1. Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, Shandong 266071, China; 2. Fishery Administration Bureau of Fushun, Fushun, Sichuan 643200, China)

**[Abstract]** In this study, formal dehyde was used to inactivate *Edwardsiella tarda*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio alginolyticus*, *Aeromonas caviae*, *Edwardsiella ictaluri*, *Aeromonas hydrophila*, in order to prepare the inactivated vaccine. Then vaccine was used to immune turbot by intramuscular injection. In this way, we got the antiserum of all bacterium above. Enzyme-linked immunosorbent assay was used to determine the content of antibody in serum. The antibody can be detect after four week in the immune, and the level of antibody is research highest in the tenth week which is inoculated inactivated vaccine of *Edwardsiella tarda*, and the highest titer of other vaccines are 1:102 400, 1:6 400, 1:6 400, 1:12 800, 1:12 800, 1:6400, 1:6 400, 1:12 800. The results of cross reaction of the bacteria and their anti-serum shows that the effect is most intense when the bacteria react with its own antiserum, and it is very weak when the bacteria react with other antiserum.

**[Key words]** Flatfish; vaccine; antiserum; pathogen