

文章编号:1000-0615(2000)06-0554-06

抗迟缓爱德华菌单克隆抗体的应用

金晓航¹, 黄威权¹, 夏永娟¹, 李元², 李别虎², 张荣庆¹, 姚兵¹
姜国良³, 刘云³, 杨栋³, 刘允坤³

(1. 第四军医大学组织学与胚胎学教研室, 陕西 西安 710032;

2. 第四军医大学微生物学教研室, 陕西 西安 710032; 3. 青岛海洋大学生命学院, 山东 青岛 266003)

摘要:检测了抗迟缓爱德华菌单抗对牙鲆的保护性。从10株自制单抗中筛选出一株对牙鲆具有较强保护性的单抗3F7。与仅以该菌感染的对照组相比,该抗体可显著提高牙鲆感染迟缓爱德华菌后的存活率。在以每条鱼0.1mL (10^9 CFU)菌量做攻击保护时,其保护率可达80%。另外,利用所制单克隆抗体以免疫组织化学SABC法检查了迟缓爱德华菌经腹腔感染牙鲆后细菌的侵袭途径,结果显示牙鲆对该菌易感的器官为肝、肾、脾等,而胃、肠等器官并不易被感染。

关键词:迟缓爱德华菌;单克隆抗体;牙鲆;检测;保护作用

中图分类号:S942.1;Q813.2 **文献标识码:**A

Application of monoclonal antibody against *Edwardsiella tarda*

JIN Xiao-hang¹, HUANG Wei-quan¹, XIA Yong-juan¹, LI Yuan², LI Bie-hu²,
ZHANG Rong-qing¹, YAO Bing¹, JIANG Guo-liang³, LIU Yun³, YANG Dong³, LIU Yun-kun³

(1. Dept of History and Embryology, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China;

2. Dept of Microbiology, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China;

3. College of Marine Life Science, Qindao Ocean University, Qindao 266003, China)

Abstract: Protection of monoclonal antibody against *Edwardsiella tarda* was evaluated in flounder. One mAb 3F7 was selected from 10 hybridoma cell lines, which could significantly enhance flounder resistance against *E. tarda* and prolonged their survival time compared with fish in control group administrated only with *E. tarda*. Protection rate of this mAb could reach 80% when flounder were challenged with *E. tarda* with dose of 0.1mL (10^9 CFU). Furthermore, tissues of flounder died of *E. tarda* were detected following an immunohistochemical SABC method and the results suggested that liver, kidney, spleen were all easily infected by *E. tarda*, except for stomach and intestine.

Key words: *Edwardsiella tarda*; monoclonal antibody; flounder; detection; protection

爱德华菌病是养殖渔业中暴发性的一类细菌性疾病,流行于叉尾鮰科、鳊鲃科、丽鱼科及牙鲆、鲤等经济养殖鱼类^[1-6],发病于春夏之交至秋季等高水温期,夏季达到高峰,其死亡率较高,危害十分严重;并且已有许多该菌对人致病致死的报道,该菌被确定为爱德华菌属中唯一一种条件致病菌^[7]。对迟缓

收稿日期:2000-02-03

资助项目:国家海洋“863”计划资助项目(816-02-06)

作者简介:金晓航(1975-),男,陕西岐山人,硕士研究生,主要从事免疫学研究。Tel: 029-3374511, E-mail: dbe123@fmmu.edu.cn

爱德华菌(*Edwardsiella tarda*)病的鉴定,目前主要局限于细菌学检查或病理观察^[1,2];对该菌病的防治主要使用抗生素,在日本、台湾有关于该菌灭活疫苗的报道。国内外均已有一些关于病原微生物学、病理组织学的研究,认为该菌主要导致鱼类的肝、肾病^[8,9]。为了便于对该菌病的检测和防治,我们制备了抗迟缓爱德华菌单克隆抗体^[10],本文对自制单抗在该菌的检测和防治中的初步应用作以介绍。

1 材料和方法

1.1 迟缓爱德华菌对牙鲆的致死实验

迟缓爱德华菌菌种由青岛海洋大学生命学院生物系姜国良教授提供,普通琼脂培养基 37℃培养 24~36h 后以 0.85% 无菌生理盐水洗脱适度稀释使用,记数用血球记数板。牙鲆购自山东威海海珍品公司,无病史,体长(5.0±0.5)cm,体重(2.0±0.4)g。水族箱水体为 30cm×30cm×10cm,新鲜海水臭氧消毒 10min 后备用,实验期间注意换水保持水质清新,自动增氧机使氧气充分,温度(20.0±1.0)℃。所有鱼均先适应水族箱一周后使用,实验期间鱼不进食。每次实验将鱼分为 6 组,第 1 组为参照组,设等量鱼不加任何处理;第 2 组为对照组,每次以等量消毒生理盐水处理;第 3、4、5、6 组用细菌攻击,每组用梯度浓度的迟缓爱德华菌经腹腔注射感染,0.10mL·尾⁻¹。

1.2 抗迟缓爱德华菌单克隆抗体在细菌病理学检查中的应用

免疫组织化学组织取材于致死实验及保护实验中对照组内 1~2h 内将死去的垂危牙鲆,分别取肝、肾、脾、及胃肠。新鲜取材以无菌生理盐水洗涤后,Bouin 氏固定液固定 24h,常规方法石蜡包埋,4μm 厚切片,免疫组织化学 SABC 法染色, DAB + H₂O₂ 显色系统显色后以苏木精复染,再脱水以中性树胶封片,OLYMPUS 光学显微镜油镜下观察照相。第一抗体为 1:1 000 稀释的自制腹水型单克隆抗体,第二抗体为 1:200 稀释的华美生物公司产品羊抗鼠抗体。实验时设以下阴性对照:以 PBS 分别替代第一、第二抗体进行孵育;另取相应正常牙鲆组织以同样方法制成石蜡切片按同样程序作免疫组化染色。

1.3 抗迟缓爱德华菌单克隆抗体对牙鲆的保护作用

单克隆抗体为自制 Balb/c 小鼠腹水型抗体。对每种抗体每次实验处理方法相同,分 3 组进行:第 1 组以 0.10mL 无菌生理盐水处理作为参照;第 2 组以 0.05mL 无菌生理盐水 + 0.05mL 菌液处理,作为对照;第 3 组以 0.05mL 腹水型单克隆抗体 + 0.05mL 菌液混合物处理。对第 2、3 组做组间 t 检验分析,查看组间存活率的差异。本实验所有统计图表均以统计软件 Origin 5.0 制作。单抗保护率计算方法:

$$\text{抗体保护率}(\%) = [(\text{试验组成活率} - \text{对照组成活率}) / \text{对照组死亡率}] \times 100$$

2 结果

2.1 单抗在检测中的应用

SABC 法染色结果显示,细菌侵染鱼有多种组织呈阳性反应。肝、脾、肾等组织器官有较强阳性反应,而在胃、肠反应结果呈阴性。油镜下观察,可看到阳性区由杆状棕色颗粒形成,该颗粒边缘为棕色,而中央色淡。在一些肝大、小血管,血窦,肝细胞等组织中都可发现散在或成堆的短杆状细菌;在受感染且结构比较完整的细胞一般是单个或少数细菌,在细胞解体组织往往有成堆成团的细菌大量存在(图版-1~3)。在脾阳性反应分布与肝类似,散在或成团沿血窦、血管分布(图版-4)。在后肾阳性反应多分布在泌尿小管周围结缔组织中,在肾单位血管球中也有散在分布。所设阴性对照和正常牙鲆组织均为阴性反应。该结果与以前的病理研究报道相一致,证明肝、肾、脾为易感器官。

2.2 迟缓爱德华菌对牙鲆的致死实验

牙鲆感染迟缓爱德华菌后出现肝肾病症状,严重者导致死亡。体表观察主要症状是腹部肿大,腹部皮肤软化;有时鳃或沿脊柱大血管至鳍条有充血现象。解剖时一般腹腔有脓液流出。也有部分鱼症状并不明显就已死亡。未加任何处理的参照组鱼和仅以无菌生理盐水注射腹腔的对照组鱼均无死亡。

综合致死实验和保护实验数据发现,在其它条件控制相同的情况下,牙鲆死亡速度和死亡率与攻击所用细菌浓度相关,浓度越大,对牙鲆的致死越快,死亡率越高(图1)。当迟缓爱德华菌液浓度低于 10^2 CFU·mL⁻¹时,7天内无鱼死亡,而当菌液浓度提高到 10^{10} CFU·mL⁻¹时,则2天内全死亡。当菌液浓度为 10^7 CFU·mL⁻¹左右时,3天内鱼全部死亡。参考 Read-Muench 计算方法计算该菌以腹腔注射方式对牙鲆的半致死剂量 LD₅₀为 $10^{7.70}$ CFU。

2.3 单克隆抗体保护实验

抗迟缓爱德华菌感染单克隆抗体保护实验中,不同单抗处理的组出现不完全相同的情况,有的存活时间增长,有的与对照组无差异。经实验筛选出一株单抗 3F7,在不同浓度迟缓爱德华菌攻击下,以该抗体处理过的保护组鱼平均存活时间均比未经抗体处理的对照组鱼存活时间长(图2)。以等量该单抗处理,鱼存活率与细菌攻击剂量呈负相关(图3)。就对照组与单抗处理的保护组总体做分组 t 检验统计分析,以该单克隆抗体处理的鱼比对照组存活时间显著提高,差异显著($P < 0.05$)。对以 10^9 CFU·mL⁻¹攻击时做保护率计算,保护率可达 80%。

3 讨论

迟缓爱德华菌对鱼类有较强的毒性,Suprpto 等^[11]对其毒性成分已有研究报道,包括外毒素 ECP 和内毒素 ICC。据报道该菌对细胞的损害主要是由热不稳定的外毒素引起的,目前研究报道较多的是溶血素。牙鲆对该菌毒素较其它鱼更为敏感,Suprpto 等^[11]测定的菌液经肌肉注射牙鲆(0.05mL·尾⁻¹)半致死剂量 LD₅₀为 $10^{1.1}$ CFU,而韩先朴等^[12]报道以 9×10^8 CFU 经口人工感染即致死鳗鲡。我们以腹腔注射方法,证明迟缓爱德华菌对牙鲆的半致死剂量 $10^{7.70}$ CFU。以上的实验结果不尽一致,推测该菌感染结果与多种因素相关,主要有鱼的大小,体质强弱,温度,菌株毒力等。在保护实验中,为了严格控制其它病原的污染,我们的水族箱消毒较严格,并且在实验期间给牙鲆鱼苗不进食,这就要求缩短实验周期,所以我们攻击牙鲆所用的菌液浓度较大,在 10^7 CFU 以上,对牙鲆的致死很快,都在 3d 之内。观察时间也相应截止在 7d 之内。

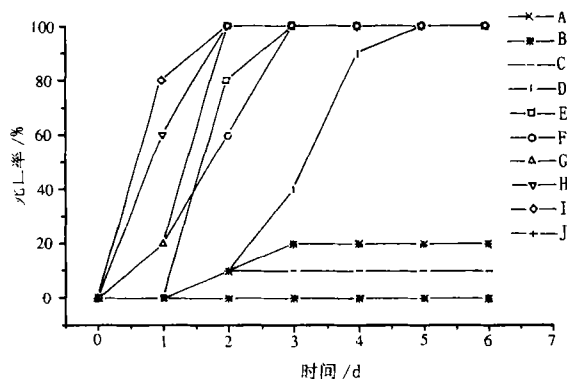


图1 不同浓度迟缓爱德华菌感染牙鲆后的致死作用
Fig.1 Effect of different dose of *E. tarda* challenge in flounder
各组所用浓度分别为:

B. 1.2×10^2 CFU; C. 1.2×10^3 CFU; D. 1.2×10^4 CFU;
E. 1.2×10^5 CFU; F. 3.2×10^7 CFU; G. 3.2×10^8 CFU;
H. 5.0×10^9 CFU; I. 5.5×10^9 CFU; J. 1.0×10^{10} CFU,
腹腔注射 0.10 mL·尾⁻¹,以无菌生理盐水处理的 A 组
为对照,0.10mL·尾⁻¹

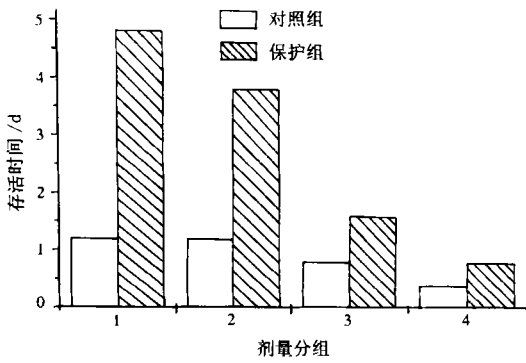


图2 单抗保护组与对照组牙鲆用迟缓爱德华菌攻击后平均存活时间的比较

Fig.2 Comparison of average survival times of flounders in control group with that in protected group

对照组鱼经腹腔注射不同剂量菌液:

(第1组. 3.2×10^7 CFU; 第2组. 3.2×10^8 CFU;

第3组. 5.0×10^9 CFU; 第4组. 5.5×10^9 CFU;

0.05mL 菌液 + 0.05mL 无菌生理盐水)

保护组处理每条鱼时以 0.05mL 单抗 3F7 代替

对照组中相应的无菌生理盐水

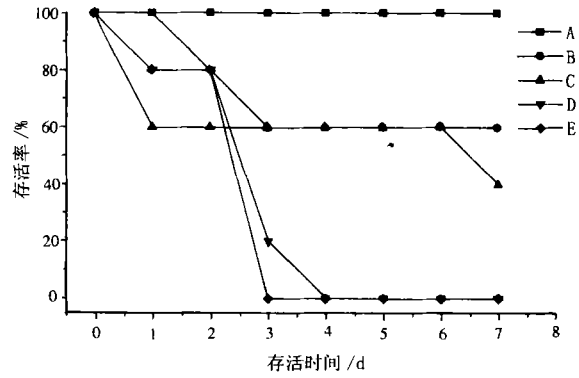


图3 单抗 3F7 (0.05mL, 约 $0.1 \text{mg} \cdot \text{尾}^{-1}$) 增强牙鲆对迟缓爱德华菌攻击的抵抗力

Fig.3 Effect of mAb 3F7 (0.05 mL, about 0.1mg per fish) on resistance to different dose of *E. tarda* challenge in flounder

各组浓度分别为: B. 3.2×10^7 CFU; C. 3.2×10^8 CFU;

D. 5.0×10^9 CFU; E. 5.5×10^9 CFU; $0.05 \text{mL} \cdot \text{尾}^{-1}$

单抗和细菌同时经腹腔注入,以无菌生理盐水处理的

A 组为对照, $0.10 \text{mL} \cdot \text{尾}^{-1}$

水产养殖要减少和防治鱼的病害,重要的一点就是能及时准确的检测病原体,采取相应的对策。目前对迟缓爱德华菌的判断主要依据肉眼观察鱼的发病症状来下结论,不易区分爱德华氏菌病与它如赤鳍病等差异,容易造成错误判断,延误防治时机。人们已经发展了一些快速方便的免疫检测方法,Busch等1981年用ELISA法检测爱德华菌病;吴淑勤等1993年应用间接荧光抗体技术(IFTA)对鳗鲡混合感染迟缓爱德华菌和嗜水气单胞菌进行了检测。但是这两种方法第一抗体均采用迟缓爱德华菌抗血清,也就是多克隆抗体,难以避免一定的非特异性或交叉反应。因此,我们制备了抗迟缓爱德华菌单克隆抗体,建立了免疫组织化学SABC法对该鱼病进行检测,在腹水型抗体1:1000工作浓度下,能够很明确地在鱼患病器官检测到病菌。同时,我们观察了该菌的感染途径,为研究该菌的致病机理提供了便利。

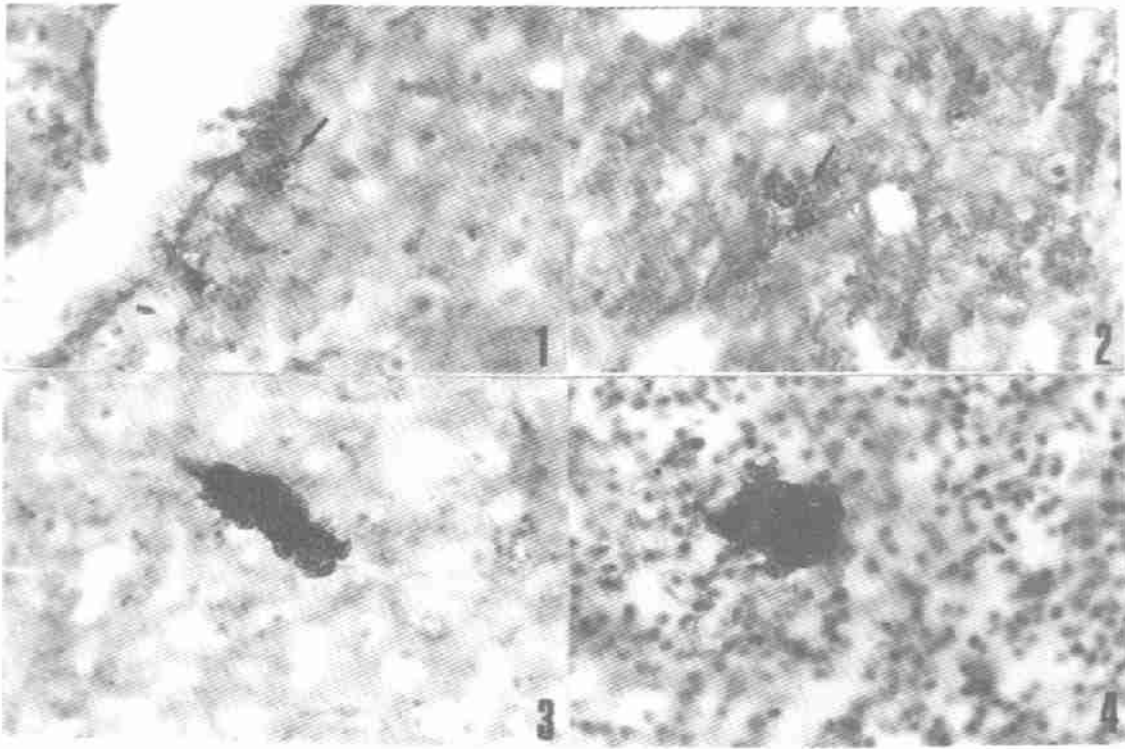
为保护养殖鱼类,增强鱼类抗迟缓爱德华菌感染力,人们已有多种尝试。迄今为止对鱼病的治疗主要采用抗生素或化学药物治疗。迟缓爱德华菌对抗生素的敏感性研究人们已做了许多,发现该菌较为敏感的抗生素有青霉素、新盘尼西林、喹诺酮、新生霉素、四环素、氨比西林、磺胺甲基异恶唑,而有较高抗性的为多黏菌素B和黏菌素等^[13-15],该菌抗药性产生也已有报道^[16]。另外国内发展的鱼用新药“康达富”对福建迟缓爱德华菌有极强的杀灭作用^[17]。本实验用特异性单克隆抗体对鱼病进行防治,得到了较好效果,说明该抗体能很好地阻断细菌对鱼的感染或能较好地降低细菌的毒性。特异性抗体不会对环境造成污染,细菌也不可能产生抗性,是一种有前途的对鱼病防治较好的途径。

本文采用单克隆抗体建立了该菌病的免疫组织化学检测方法,证实了利用抗体治疗鱼病的可能性,并为我们下一步制备抗迟缓爱德华菌抗独特型单克隆抗体疫苗奠定了基础。

参考文献:

- [1] 华鼎可,吴定虎. 鱼虾类疾病诊断[M]. 北京:中国农业出版社,1992.73~74.
- [2] 黄琪瑛(主编). 鱼病防治实用技术(第二版)[M]. 北京:中国农业出版社,1992.89~92.
- [3] 陈昌福,吴志新,高汉娇. 日本鳗鲡爱德华氏菌病原菌的分离与鉴定[J]. 华中农业大学学报,1998,17(4):382~388.
- [4] 卢全章,朱心玲. 鳗鲡肝肾病原菌研究[J]. 水生生物学报,1995,19(1):76~83.

- [5] 陈昌福,赵建培. 日本关于鳎弧菌爱德华氏菌的研究概况[J]. 鱼类病害研究,1994,16(4):6~11.
- [6] Sakazaki R, Tamura k. Priority of the specific epithet *anquillimortiferum* over the specific epithet *tarda* in the name of the organism presently known as *Edwardsiella tarda*[J]. Int J Syst Bacteriol, 1975, 25(2): 219~220.
- [7] Janda J M, Abbott S L. Infections associated with the genus *Edwardsiella*: the role of *Edwardsiella tarda* in human disease[J]. Clin Infect Dis, 1993, 17(4): 742~748.
- [8] 郭琼林,卢全章. 鳎弧菌爱德华氏菌的组织病理学研究[J]. 水生生物学报,1995,19(1):56~60.
- [9] Teruo M, Syuzo E. Histopathological studies of *Edwardsielliasis* of the Japanese Eel (*Anguilla japonica*) I. Suppurative interstitial nephritis from [J]. Fish pathology, 1976, 11(1): 33~43.
- [10] 金晓航,黄威权,夏永娟,等. 抗迟缓爱德华菌单克隆抗体的制备及初步鉴定[J]. 细胞与分子免疫学, 2000, 2: 65.
- [11] Suprpto H, Nakai T. Muroga K. Toxicity of extracellular products and intracellular components of *Edwardsiella tarda* in the Japanese eel and flounder[J]. J Aquat Anium Heal, 1995, 7(4), 292~297.
- [12] 韩先朴,李伟,潘金培. 爱德华氏菌人工经口感染及病理观察[J]. 水生生物学报,1995,19(3):245~249.
- [13] Waltman W D, Shotts E B, Hsu TL, et al. Antimicrobial susceptibility of *Edwardsiella tarda* from the United States and Taiwan[J]. Vet Microbiol, 1986, 12(3): 277~282.
- [14] Reinhardt J F, Fowlston S, Jones J, et al. Comparative in vitro activities of selected antimicrobial agents against *Edwardsiella tarda*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1985, 27(6): 966~967.
- [15] Clark R B, Lister P D, Janda J M. In vitro susceptibilities of *Edwardsiella tarda* to 22 antibiotics and antibiotic-beta-lactamase-inhibitor agents [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 1991, 14(2): 173~175.
- [16] DePaola A, Peeler J T, Rodrick G E. Effect of oxytetracycline-medicated feed on antibiotic resistance of gram-negative bacteria in catfish ponds [J]. Appl Environ Microbiol, 1995, 61(6): 2335~2340.
- [17] 曾令兵,肖永坚,李金玲. 鱼用新药“康达富”对鳎弧菌和福建迟缓爱德华菌的杀灭作用[J]. 水产科技情报,1997, 24(2):76~79.



1. 肝脏, 示肝血管内及其附近的细菌, $\times 400$; 2. 肝脏, 示肝细胞内及细胞间的细菌, $\times 400$; 3. 肝脏, 示肝组织内增殖成团的细菌, $\times 400$; 4. 脾脏, 示脾血窦内增殖成团的细菌, $\times 400$.