

文章编号: 1000-0615(2003)06-0606-04

·研究简报·

# 海水养殖真鲷弧菌病病原菌外毒素的点酶法检测

吴后波, 潘金培

(中国科学院南海海洋研究所, 广东 广州 510301)

关键词: 真鲷; 弧菌病; 最小弧菌; Vm-Pm 毒素; 点酶法

中图分类号: S941.42 文献标识码: A

## A dot immunobinding assay (DIA) to detect the exotoxin produced by the pathogenic bacteria of the vibriosis in marine cage-cultured *Pagrus major*

WU Hou-bo, PAN Jin-pei

(South China Sea Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China)

**Abstract:** Vibriosis, caused by *Vibrio mimicus*, became a major cause of serious economic losses in the farming of red sea bream along the coast of southern China. It has been demonstrated that the pathogenicity of *V. mimicus* for red sea bream is due to the production of a heat-labile exotoxin. In the present paper, a dot immunobinding assay (DIA) to detect the toxin produced by *V. mimicus* was developed. The lowest concentration of the toxin the DIA could detect was  $0.025 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . The DIA could detect the toxin in the supernatant of liver and spleen of the diseased red sea bream *Pagrus major*, even if the supernatant was diluted by 1000 times. It was concluded that the DIA would be useful for rapid and effective detection of the toxin in large samples.

**Key words:** *Pagrus major*; vibriosis; *Vibrio mimicus*; Vm-Pm toxin; dot immunobinding assay (DIA)

弧菌病(vibriosis)是我国南方沿海地区养殖真鲷(*Pagrus major*)中经常发生的主要细菌性疾病,该病的暴发性流行给整个真鲷养殖业造成了巨大的经济损失。在明确其病原菌是最小弧菌(*Vibrio mimicus*)基础上<sup>[1]</sup>,对该菌的致病机理进行了深入的研究,并取得了重要的进展。已经证明真鲷弧菌病真正的致病因子是最小弧菌在致病的过程中产生的一种外毒素,这种毒素是单一多肽,不具备典型的细菌毒素的A、B亚基结构,不耐热,具有溶血性、细胞毒性和动物致死性等多种生物学活性,该外毒素性质独特,是最小弧菌产生的一类新的毒力因子,作者将这种毒素命名为Vm-Pm毒素<sup>[2]</sup>。为

收稿日期:2002-12-02

资助项目:中国科学院知识创新工程资助项目(KSCX2-1-04);“十五”国家高技术研究发展计划(863计划)资助项目(2001AA622050);广东省“科技创新百项工程”资助项目(99B06201G)

作者简介:吴后波(1967-),男,湖北洪湖人,博士,副研究员,主要从事海洋生物病害研究。E-mail: hbw@netease.com

进一步弄清最小弧菌产生 Vm - Pm 毒素的环境调控机制,作者在室内对培养条件如何影响 Vm - Pm 毒素的产生进行了模拟与探讨<sup>[3]</sup>。此外,为了能快速准确地对该毒素进行检测,同时也为该病的诊断提供了一个灵敏而又可靠的手段,建立了用于检测最小弧菌 Vm - Pm 毒素的点酶法,本文就是有关 Vm - Pm 毒素点酶法检测的研究报道。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌种

最小弧菌 96 - 6 - 3 株,系从福建省平潭县某海水网箱养殖场患暴发性传染病的真鲷中分离到的强毒株,可产生 Vm - Pm 毒素。

普通海水营养琼脂成分:牛肉膏 3.0g,蛋白胨 5.0g,酵母浸膏 1.0g,琼脂 20.0g,陈海水 1000mL,pH 调至 7.2。

### 1.2 毒素的点酶法检测

毒素样品 10 倍稀释,每一稀释度取 2 $\mu$ L 点在硝酸纤维素(NC)膜上(孔径 0.45 $\mu$ m),37 $^{\circ}$ C 烘干,置于 NC 膜封闭液中,37 $^{\circ}$ C 作用 1 h 后用 PBST 洗涤 5 次,每次 2 min。在 1:20 的抗血清中 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,用上述方法洗涤后,置于 37 $^{\circ}$ C 的按 1:10 稀释的 PPA 溶液中 30 min。同法洗涤后,于酶质液中显色 15 ~ 30 min,用去离子水洗涤中止反应。取培养基作阴性对照。

PBST 洗涤液:0.05% Tween20 0.02 mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>磷酸盐缓冲液(PBS)(pH7.4)。

封闭液:1%牛血清白蛋白(BSA) 0.02 mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>PBS (pH7.4)。

酶基质液:3',3' - 二氨基联苯胺(DAB,Sigma),20mg 溶于 40mL 50mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> Tris - HCl (pH7.6),用前按每 10mL 加入 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20 $\mu$ L。

酶结合物:辣根过氧化物酶标记葡萄球菌 A 蛋白(PPA)。

抗血清的制备:按常规方法免疫健康家兔,用琼扩试验检测抗体效价,当效价达到 1:16 时采血取血清。

### 1.3 溶血价的测定方法

按 Kirov 等<sup>[4]</sup>的方法进行,毒素用 50 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup>的 PBS 缓冲液(pH7.4)在 96 孔板上倍比稀释,然后加等量的 1% 人红细胞,于 37 $^{\circ}$ C 放置 1 h,再于 4 $^{\circ}$ C 放置 1 h,判断结果。以溶解 50% 红细胞的最高稀释度为溶血价。

### 1.4 点酶法及溶血性实验检测外毒素纯化过程中各步骤的毒素

#### 1.4.1 菌种的活化及细菌培养

病原菌接种普通海水营养培养基后,30 $^{\circ}$ C 培养 24 h 活化。活化菌种接种普通海水营养培养基后,于 30 $^{\circ}$ C 用 200 r $\cdot$ min<sup>-1</sup>摇床培养 18 ~ 20 h,培养物经 10 000 r $\cdot$ min<sup>-1</sup>离心 30 min,取上清,利用点酶法检测毒素,溶血性实验测定溶血价。

#### 1.4.2 外毒素的纯化

硫酸铵分级盐析:离心上清中加入固体硫酸铵至 20% 的饱和度,置于 4 $^{\circ}$ C 静置 4 h,10 000 r $\cdot$ min<sup>-1</sup>离心 30 min,弃沉淀,再于上清中加固体硫酸铵至 60% 的饱和度,置于 4 $^{\circ}$ C 静置 4 h,10 000 r $\cdot$ min<sup>-1</sup>离心 30 min,去上清,沉淀溶于 50 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup>的 Tris-HCl(pH7.8)缓冲液中,对相同缓冲液透析过夜,收集即为粗提外毒素 T1,利用点酶法检测毒素,溶血性实验测定溶血价。

DEAE - 纤维素离子交换层析:粗提外毒素 T1 加入已平衡的 DEAE - 纤维素柱上(Pharmacia 产品,2.6cm $\times$ 30cm)。用浓度为 0 ~ 1 mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>的 NaCl 以及浓度为 50mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup>的 Tris - HCl(pH7.8)缓冲液梯度洗脱,流速为 5mL $\cdot$ cm<sup>-2</sup> $\cdot$ h<sup>-1</sup>,每 4 mL 收集一管,同时测定每管的溶血价。合并蛋白峰洗脱液,用浓度为 50 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup>的 Tris - HCl(pH7.8)缓冲液透析过夜。用聚乙二醇(PEG100)浓缩胶浓缩,然后再对浓度为 50mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup>的 Tris - HCl(pH7.8)缓冲液透析过夜,即为粗提外毒素 T2,利用点酶法检测毒素,溶血性实验测定溶血价。

Sephadex - G100 层析:粗提外毒素 T2 加入已平衡的 Sephadex-G100 层析柱中(Pharmacia 产品,1.6cm $\times$ 100cm),用浓度为 50 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup>的 Tris - HCl(pH7.8)缓冲液洗脱,流速为 6 mL $\cdot$ cm<sup>-2</sup> $\cdot$ h<sup>-1</sup>,每 4 mL 收集一管,同时测定每管的溶血价。合并蛋白峰,用 PEG100 浓缩胶浓缩,然后再对浓度为 50 mL $\cdot$ cm<sup>-2</sup> $\cdot$ h<sup>-1</sup>的 Tris - HCl(pH7.8)缓冲液透析过夜,即为纯化外毒素 T3,利用点酶法检测毒素,溶血性实验测定溶血价。

以上层析过程中均采用核酸蛋白记录仪(上海自动化仪表二厂)记录蛋白峰,蛋白质含量通过 UV - 754 分光光度计

(上海第三分析仪器厂)280nm 下测定。

### 1.5 点酶法及溶血性实验检测病鱼组织匀浆上清中的毒素

分别取患病真鲷的肝、肾组织,匀浆后,10 000 r·min<sup>-1</sup>离心 30 min,取上清,并将上清 10 倍稀释,利用点酶法检测毒素,溶血性实验测定溶血价。用毒素作阳性对照,健康真鲷肝、肾组织作阴性对照。

## 2 结果

### 2.1 利用点酶法及溶血性实验检测外毒素提取过程中各步骤毒素

病原菌培养物的离心上清,经硫酸铵沉淀、DEAE-纤维素离子交换层析及 Sephadex-G100 层析进行分离纯化,每一步都测其蛋白质含量、溶血价,并对病原菌培养物上清、T1、T2、T3 分别作 10 倍稀释后,利用点酶法进行毒素的检测,结果见表 1。纯化毒素经 100 000 倍稀释后仍可检测出,这表明点酶法可检测出毒素的最低含量可达 0.025 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。而用溶血性实验检测同样的纯化毒素,其溶血价可达 1:256,也就是说溶血性实验可检测的毒素的最低含量为 9.77 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。由此可见,同时利用点酶法和溶血性实验检测纯化毒素,点酶法的敏感度比溶血试验高出 400 倍左右。

表 1 点酶法及溶血性实验检测毒素提取过程中各步骤毒素含量

Tab.1 Purification steps and hemolytic activities of the toxin and dot immunobinding assay (DIA) for the detection of the toxin

| 提纯步骤<br>purification step                   | 体积<br>(mL)<br>volume | 蛋白含量<br>( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )<br>protein content | 溶血价<br>hemolytic activity titer | 稀释度 dilutions   |                 |                 |                 |                 |                 | 点酶法可检测浓度<br>( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )<br>lowest content detected by DIA |                 |
|---|----------------------|---|---------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|--|-----------------|
|   |                      |   |                                 | 10 <sup>0</sup> | 10 <sup>1</sup> | 10 <sup>2</sup> | 10 <sup>3</sup> | 10 <sup>4</sup> | 10 <sup>5</sup> |  | 10 <sup>6</sup> |
| 离心上清<br>culture supernatant                 | 5000                 | 0.69  | 64                              | +               | +               | +               | +               | +               | -               | -  | 0.069           |
| 硫酸铵沉淀<br>ammonium sulfate                   | 50                   | 7.72  | 2048                            | +               | +               | +               | +               | +               | +               | -  | 0.077           |
| DEAE-纤维素层析<br>DEAE cellulose                | 20                   | 6.05  | 1024                            | +               | +               | +               | +               | +               | +               | -  | 0.061           |
| Sephadex-G100 层析<br>Sephadex-G100           | 10                   | 2.5   | 256                             | +               | +               | +               | +               | +               | +               | -  | 0.025           |
| PEG100 浓缩处理<br>PEG100 concentrated solution | 5                    | 5   | 512                             | +               | +               | +               | +               | +               | +               | -  | 0.050           |
| 阴性对照<br>negative contrast                   | 0                    | 0   | 0                               | -               | -               | -               | -               | -               | -               | -  | -               |

注:“+”表示毒素检测阳性,“-”表示毒素检测阴性

Notes: + means positive reaction by DIA, - means negative reaction by DIA

### 2.2 病鱼组织匀浆上清外毒素的检测

对患病真鲷肝、肾组织上清各稀释度的毒素点酶法检测及溶血性检测结果见表 2。由表 2 可知,点酶法和溶血性检测皆可检测到毒素存在,但病鱼组织上清稀释 100 倍后,溶血性实验阴性,而点酶法还能检测到毒素的存在。由表 2 还可以看出,即使病鱼组织稀释 1000 倍,点酶法仍能检测到毒素的存在。

## 3 讨论

目前用于证实外毒素存在的方法大多依赖对外毒素生物学活性的检测,如溶血性实验、肠毒性实验及细胞毒性实验等<sup>[5-7]</sup>,但这些方法既不简便,也不精确,因此急需建立敏感、特异、快速的检测方法。近年来,在细菌外毒素快速检测方面已经有了一些探索性的研究工作,如利用抗原抗体之间特异性反应的原理,建立了通过夹心 ELISA 法检测霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*)NMDCY 毒素 (non-membrane-damaging cytotoxin)的方法<sup>[8]</sup>,利用毒素基因的特异性,建立了通过 PCR 的手段检测霍乱弧菌溶血素<sup>[9]</sup>及鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*)溶血素<sup>[10]</sup>的方法。

表2 利用点酶法及溶血性实验检测病鱼组织上清毒素

Tab.2 Dot immunobinding assay (DIA) for the detection of the toxin and the hemolytic activities of the toxin in the supernatant from the tissues of diseased fish

| 检测方法<br>methods               | 病鱼肝组织上清稀释度<br>supernatant from liver of diseased fish |                 |                 |                 |                 | 病鱼肾组织上清稀释度<br>supernatant from kidney of diseased fish |                 |                 |                 |                 | 阴性对照<br>negative contrast | 阳性对照<br>positive contrast |
|-------------------------------|---|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|--|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------------------|---------------------------|
|                               | 10 <sup>0</sup>                                       | 10 <sup>1</sup> | 10 <sup>2</sup> | 10 <sup>3</sup> | 10 <sup>4</sup> | 10 <sup>0</sup>  | 10 <sup>1</sup> | 10 <sup>2</sup> | 10 <sup>3</sup> | 10 <sup>4</sup> |                           |                           |
| 点酶法检测 DIA                     | +   | +               | +               | +               | -               | +  | +               | +               | +               | -               | -                         | +                         |
| 溶血性检测<br>hemolytic activities | +   | +               | -               | -               | -               | +  | +               | -               | -               | -               | -                         | +                         |

注:“+”表示毒素检测阳性,“-”表示毒素检测阴性

Notes: + means positive reaction, - means negative reaction

本实验建立了用于检测最小弧菌外毒素的点酶法,该方法可在最小弧菌培养上清检出毒素,可检出的最低含量为 $0.025\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,而溶血性实验可检测毒素的最低含量为 $9.77\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,由此可见,同时利用点酶法和溶血性实验检测纯化毒素,点酶法的敏感度比溶血性试验高出400倍左右,因此,点酶法显示出极高的灵敏度。此外,点酶法可检测出患病真鲷肝、肾匀浆组织上清中毒素的存在,而溶血性实验则未必能检测出,这进一步证明点酶法的灵敏度比溶血性实验高,同时也预示着点酶法在生产实践中应用的可行性,这将为真鲷弧菌病的诊断提供了一个快速、敏感而又可靠的手段,显示出广阔的应用前景。

在南京农业大学动物医学院院长陆承平教授亲自指导完成,谨致谢忱!

#### 参考文献:

- [1] Wu H B, Pan J P. Studies on the pathogenic bacteria of the vibriosis of marine cage-cultured red sea bream (*Pagrus major*) [A]. The collection of papers presented at the 2000 symposium by Chinese Fishery Society [C]. Beijing: Ocean Press, 2000. 672-677. [吴后波,潘金培.海水网箱养殖真鲷弧菌病原生物学[A].中国水产学会2000年度学术交流会议论文集[C].北京:海洋出版社,2000,672-677.]
- [2] Wu H B, Pan J P. Purification and characterization of the exotoxin Vm-Pm produced by *Vibrio mimicus* [J]. *Oceanol et Limnol Sin*, 2002, 33(1): 83-89. [吴后波,潘金培.海水养殖真鲷弧菌病原菌外毒素的分离、纯化及生物学活性[J].海洋与湖沼,2002,33(1):83-89.]
- [3] Wu H B, Pan J P. Effects of cultural conditions on the production of toxin by *Vibrio mimicus* [J]. *Acta Hydrobiol Sin*, 2003, 27(1): 30-32. [吴后波,潘金培.培养条件对养殖真鲷弧菌病原菌毒素产生的影响[J].水生生物学报,2003,27(1):30-32.]
- [4] Kirov S M, Rees B, Wellock R C, et al. Virulence characteristic of *Aeromonas* spp. in relation to source and biotype [J]. *J Clin Microbiol*, 1986, 24: 827-834.
- [5] Chowdhury M A R, Aziz K M S, Kay B A, et al. Toxin produced by *Vibrio mimicus* strains isolated from human and environmental sources in Bangladesh [J]. *J Clin Microbiol*, 1987, 25: 2200-2203.
- [6] Eun-Gyoung O, Tamanoi Y, Toyoda A, et al. Simple purification method for a *Vibrio vulnificus* hemolysin by a hydrophobic column chromatography in the presence of a detergent [J]. *Microbiol Immunol*, 1993, 37: 975-978.
- [7] Gray L D, Kreger A S. Purification and characterization of an extracellular cytolysin produced by *Vibrio vulnificus* [J]. *Infect Immun*, 1985, 48: 62-72.
- [8] Saha P K, Nair G B. Production of monoclonal antibodies to the non-membrane-damaging cytotoxin (NMDCY) purified from *Vibrio cholerae* O26 and distribution of NMDCY among strains of *Vibrio cholerae* and other enteric bacteria determined by monoclonal-polyclonal sandwich enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *Infect Immun*, 1997, 65:801-805.
- [9] Lyon W J. TaqMan PCR for detection of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1, and non-O139 in pure cultures, raw oysters, and synthetic seawater [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67: 4685-4693.
- [10] Ikuo Hirono, Tsutomu Masuda, Takashi Aoki. Cloning and detection of the hemolysin gene of *Vibrio anguillarum* [J]. *Microbial Pathogenesis*, 1996, 21: 173-182.