

文章编号:1000-0615(2006)01-0113-05

凡纳滨对虾红体病原菌间接 ELISA 快速检测方法的研究

樊景凤^{1,2}, 梁玉波², 宋立超³, 王 斌³, 臧红梅³, 李文哲¹

(1. 东北农业大学, 黑龙江 哈尔滨 150030;

2. 国家海洋环境监测中心, 辽宁 大连 116023;

3. 大连水产学院, 辽宁 大连 116023)

摘要:以凡纳滨对虾红体病原菌副溶血弧菌为抗原, 免疫兔获得高免血清, 建立一种快速检测凡纳滨对虾红体病原菌副溶血弧菌的 ELISA 技术。采用棋盘滴定法确定抗原和抗血清的最适工作浓度分别为 10^6 CFU · mL⁻¹ 和 1 2 000; 病原菌检测灵敏度为每孔 10^4 CFU; 抗血清与其它细菌标准菌株的交叉反应结果均呈阴性; 阻断实验中的阻断率达 75.88%; 交叉反应和阻断实验结果表明该方法具有较高的特异性。将该方法标准化后检测了 30 份人工感染后的凡纳滨对虾和健康凡纳滨对虾, 阳性检测率分别为 93.3% 和 13.3%, 表明该技术不仅能够检测已发病的凡纳滨对虾, 而且能够检测带菌的凡纳滨对虾, 这对于水产养殖业中疾病的早期诊断有着重要意义。

关键词:凡纳滨对虾; 红体病; 副溶血弧菌; 间接 ELISA 技术

中图分类号: S945.1 **文献标识码:** A

Indirect ELISA method for detecting the pathogenic bacteria of *Litopenaeus vannamei* red body disease

FAN Jing-feng^{1,2}, LIANG Yu-bo², SONG Li-chao³, WANG Bin³, ZANG Hong-mei³, LI Wen-zhe¹

(1. Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;

2. National Marine Environmental Monitoring Center, Dalian 116023, China;

3. Dalian Fisheries University, Dalian 116023, China)

Abstract: An indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the rapid diagnosis of *Vibrio parahaemolyticus*, the pathogen of the red body disease of *Litopenaeus vannamei*, has been developed. The best working concentration of antigen and antiserum were 10^6 CFU · mL⁻¹ and 1 2000 separately, determined by using checkerboard titration. The sensitivity of the serum was tested, and the lowest *V. parahaemolyticus* suspension was 10^4 CFU. Cross reactions of antisera with other bacteria were detected, all results were negative. Inhibition rate was 75.88% in inhibition test. The cross assay and the inhibition assay indicate this method is differential. The method was optimized to detect the infected *Litopenaeus vannamei* and the normal ones, the positive detecting rate were 93.3% and 13.3% separately. The results indicated that this assay can be used to detect not only the infected unhealthiness of *L. vannamei*, but also the carriers. This is very important to diagnose the disease in the early stage.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; red body disease; *Vibrio parahaemolyticus*; indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

凡纳滨对虾是我国目前主要养殖虾类之一, 省凡纳滨对虾的养殖生产过程中, 大面积地暴发具有产量高、抗病力强的优点。但是, 2001 年辽宁 了一种被当地虾农称为“红体病”的流行病。其主

收稿日期: 2004-11-16

资助项目: 国家 863 高技术研究发展计划项目(2002AA639470); 国家海洋局重点青年基金项目资助(2001303)

作者简介: 樊景凤(1972-), 女, 黑龙江明水人, 助理研究员, 博士研究生, 从事海洋微生物学与水产动物病害学研究。Tel: 0411-84782602, E-mail: jffan@nmemc.gov.cn

要症状表现为虾全身发红,反应迟钝,摄食减少甚至停食,肝胰脏肿大,壳变硬等。该病传播快、流行广、死亡率高、经济损失严重。通过生理生化鉴定和 16S rRNA 基因序列同源性分析,确定其病原为副溶血弧菌。

近年来,关于凡纳滨对虾红体病发生与防治方面的研究报道较多^[1,2],但尚没有见到有关该病病原菌副溶血弧菌快速检测技术的研究报道。本研究以凡纳滨对虾病原菌——副溶血弧菌为研究对象,建立了快速、灵敏、准确检测该病原菌的间接 ELISA 检测技术,为早期诊断凡纳滨对虾红体病病原提供了一条有效途径,并能在该病的防治工作中发挥巨大作用。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验用菌株——副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 自行分离并鉴定。用于交叉实验的菌株溶藻弧菌 (*V. alginolyticus*)、河流弧菌 (*V. fluvialis biotype*)、哈维氏弧菌 (*V. harveyi*)、嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 均购自中国科学院微生物研究所;实验用新西兰兔购自大连医科大学实验动物中心;酶标抗体购自上海华美生物工程公司,工作浓度为 1 1 000。回归感染实验用的凡纳滨对虾由辽宁省庄河市对虾养殖厂提供。

1.2 抗原的制备

将副溶血弧菌接种于 2% NaCl 的营养琼脂平板培养基上,28℃ 培养 24 h,无菌生理盐水洗脱、离心、洗涤后加热灭活(60℃,1 h),通过菌落计数法检测灭活效果。用 McFarland 比浊法,配制出浓度约为 1×10^8 CFU \cdot mL⁻¹ 的菌悬液作为免疫抗原。

1.3 免疫血清的制备

选择 3 只健康的 2 kg 左右的新西兰雄兔,背部皮下多点注射免疫,分 5 次免疫,免疫间隔期为 2 周,最后一次免疫 7 d 后,耳静脉采血,分离血清,用试管凝集法测定抗体效价及交叉反应效价,效价达到 1 1 280 以上即可使用,有交叉反应的菌株,在免疫血清中加入过量的该菌细胞,混匀,4℃ 过夜,离心、过滤除菌。吸附后的血清经测定如无交叉反应,即可以分装,保存于 - 80℃ 备用。

1.4 ELISA 方法的建立

ELISA 检测程序流程 用 pH 9.6 的碳酸盐缓冲液稀释副溶血弧菌抗原,加入 96 孔聚苯乙烯酶标反应板孔内,每孔 100 μ L,60℃ 烘干;用 PBST 缓冲液洗涤 3 次;每孔加入 5% 脱脂乳 - PBST 封闭液,每孔 300 μ L,37℃ 封闭 1 h;洗涤 3 次;每孔加入适当稀释的阳性血清和阴性血清,每孔 100 μ L,37℃ 感作 1 h;洗涤 3 次;每孔加入 100 μ L 的羊抗兔 IgG-HRP 酶标抗体,37℃ 感作 1 h;洗涤 3 次;加新配制的 OPD-H₂O₂ 底物溶液,每孔 100 μ L,37℃ 避光感作 10 min;以 2 mol L⁻¹ H₂SO₄ 终止反应;用酶标检测仪读取 OD₄₉₂ 值,以判定结果。

抗原最适包被浓度的确定 用棋盘式滴定法确定。将 10^8 CFU \cdot mL⁻¹ 浓度的副溶血弧菌从 1 10 至 1 10 000 做系列稀释,每个稀释度包被 2 孔,每孔 100 μ L,60℃ 烘干,固定阳性血清浓度(1 2 000),酶标抗体作 1 1 000 稀释,进行间接 ELISA 测定。以能产生 OD₄₉₂ 值为 1.0 左右,且 P/N 值(阳性对照 OD₄₉₂ 值 - 空白对照 OD₄₉₂ 值/阴性对照 OD₄₉₂ 值 - 空白对照 OD₄₉₂ 值)最大的抗原稀释度为最佳稀释度。

免疫血清最适稀释度的确定 副溶血弧菌抗原按最适工作浓度包被,将阳性血清和阴性血清分别按 1 5 000、1 10 000、1 15 000、1 20 000、1 25 000、1 30 000 进行系列稀释,每孔 100 μ L,每个稀释度 2 孔;酶标抗体作 1 1 000 稀释,用间接 ELISA 方法测定。选择阳性血清的 OD₄₉₂ 值接近 1.0,P/N 值最大的稀释度为最适稀释度。

免疫血清敏感性实验 将副溶血弧菌菌悬液稀释成 10^6 CFU \cdot mL⁻¹,而后进行一系列双倍稀释至 2 ~ 10,将血清稀释到最适工作浓度,以确定最小的抗原检测浓度。以产生 OD₄₉₂ 值接近 1.0,P/N 值 > 2.1 判为阳性。

特异性实验 交叉实验:用浓度均为 10^6 CFU \cdot mL⁻¹ 的副溶血弧菌、哈维氏弧菌、嗜水气单胞菌、河流弧菌、溶藻弧菌、大肠杆菌包被酶标反应板,血清采用最适稀释度,检测是否有交叉反应情况。阻断实验:将 10^6 CFU \cdot mL⁻¹ 的副溶血弧菌菌液包被酶标反应板,将阳性血清从 1 200 开始倍比稀释,各稀释度分别加入等量的副溶血弧菌菌液,混匀后于 37℃ 放置 1 h,同时设不做任何处理的抗副溶血弧菌阳性血清和阴性血清作为对

照,进行 ELISA 测定,测定其阻断率。其抑制率按公式 $(N - T/N)$ 计算统计, N 为未经处理阳性血清的 OD_{492} 值, T 为经副溶血弧菌菌液处理的阳性血清的 OD_{492} 值。

重复性实验 取 3 份已知阳性血清,1 200 稀释,加到抗原包被孔中每份 8 孔,作 ELISA 测定,由每份血清的 OD 值计算出平均 OD 值与标准差(SD),进而计算出每份血清的板内变异系数(CV), $CV(\%) = SD/\text{平均 OD 值} \times 100$ 。重复 3 次。用同样 3 份血清在 5 块板上作实验,每份血清 2 孔,根据 OD 值可以计算出每份血清的板间变异系数。

1.5 ELISA 检测方法的应用

回归感染实验 将体长为 8 ~ 11.5 cm 的凡纳滨对虾饲养在 50 L 的桶内,每天正常投饵,换水,水温为 23 ,盐度为 11 ~ 14, pH 为 8.05 ~

8.16。将 28 培养 24 h 的副溶血弧菌用 0.85 % 生理盐水洗脱,制成 1.2×10^9 CFU \cdot mL⁻¹ 的菌悬液,于每尾虾的第二、三腹节之间注射,每尾 0.1 mL,对照组注射生理盐水。

病原菌的检测 人工感染实验后第 2 天开始取发病凡纳滨对虾的鳃、肌肉、肝、肾等组织,于 5 倍体积的无菌生理盐水中匀浆,离心取上清备检。

2 结果

2.1 ELISA 检测方法的标准化

抗原最适包被浓度的确定 对抗原作不同稀释度处理所测得的阳性血清和阴性血清的 OD_{492} 值如表 1 所示,由于抗原在作 1 100 稀释时 OD_{492} 值接近 1.0,且 P/N 值最大,所以确定抗原的最适包被浓度为 10^6 CFU \cdot mL⁻¹。

表 1 抗原最适包被浓度的确定

Tab.1 Determination of the optimum antigen concentration

抗原稀释度 antigen concentration	1 10	1 100	1 1 000	1 10 000	对照 control
阳性血清 OD_{492} positive sera OD_{492}	3.119	1.335	0.789	0.357	0.051
阴性血清 OD_{492} negative sera OD_{492}	0.093	0.067	0.063	0.058	0.051

免疫血清最适稀释度的确定 不同稀释度的血清测定结果见表 2。当免疫血清作 1 10 000 稀释时, OD_{492} 值接近 1.0,且产生最大 P/N 值,因

此检测用免疫血清的最适稀释度确定为 1 10 000。

表 2 最适血清工作浓度的确定

Tab.2 Determination of the optimum antisera concentration

血清稀释度 sera concentration	1 5 000	1 10 000	1 15 000	1 20 000	1 25 000	1 30 000	对照 control
阳性血清 OD_{492} positive sera OD_{492}	2.579	1.457	0.795	0.439	0.357	0.334	0.048
阴性血清 OD_{492} negative sera OD_{492}	0.077	0.063	0.058	0.058	0.049	0.045	0.048

免疫血清敏感性实验 用最适稀释度的血清(1 10000v/v)检测抗原的灵敏度,结果见表 3。测定结果为菌悬液为 10^5 CFU \cdot mL⁻¹ 时即可检出,即每孔 10^4 CFU。

交叉实验 检测哈维氏弧菌、嗜水气单胞菌、河流弧菌、溶藻弧菌、大肠杆菌与抗副溶血弧

菌阳性血清交叉反应情况,副溶血弧菌作对照,结果显示只有副溶血弧菌呈阳性,其余细菌均呈阴性(表 4)。

阻断实验 由表 5 可知,副溶血弧菌处理后的阳性血清随着稀释度的增加,OD 值明显下降,并逐渐接近阴性水平;而未经副溶血弧菌处理

的阳性血清随着稀释度的增加下降缓慢。阻断率最高可达 75.88%，说明阳性血清对副溶血弧菌具有特异性。

表 3 免疫血清敏感性实验结果

Tab. 3 The result of antisera sensitivity

抗原稀释度 antigen concentration	OD 值 value of OD	- / +
阴性对照 negative control	0.051	
2 ⁻¹	2.376	+
2 ⁻²	1.530	+
2 ⁻³	1.143	+
2 ⁻⁴	1.002	+
2 ⁻⁵	0.553	+
2 ⁻⁶	0.324	+
2 ⁻⁷	0.252	-
2 ⁻⁸	0.220	-
2 ⁻⁹	0.162	-
2 ⁻¹⁰	0.143	-
空白对照 blank control	0.045	

重复实验结果 板内变异系数 (CV) 值为 0.0196, SD = 0.0014, 平均 OD 值 = 0.051,

CV = 2.746%。板间变异系数 (CV) 值为 0.0353, SD = 0.0018, 平均 OD 值 = 0.051, CV = 3.53%。板内变异系数和板间变异系数均小于 10%, 说明酶标板的吸附稳定性很好。

2.2 ELISA 检测方法的临床应用

回归感染实验结果 肌肉注射 6 h 后副溶血弧菌的实验组凡纳滨对虾开始出现症状, 表现为不活跃, 大部分凡纳滨对虾卧于缸底, 18 h 后个别凡纳滨对虾出现红体现象, 19 h 后有 1 尾凡纳滨对虾死亡, 其它凡纳滨对虾陆续出现红体症状并逐渐加重。30 h 死亡数超过 50%, 余者有的也出现红体现象, 至 72 h 实验组凡纳滨对虾全部死亡。

临床检测结果 取发病的凡纳滨对虾与健康的凡纳滨对虾各 30 尾进行 ELISA 检测, 以无菌生理盐水为阴性对照。发病的凡纳滨对虾阳性检出率为 93.3%, 健康的凡纳滨对虾阳性检出率为 13.3% (表 6)。

表 4 免疫血清交叉实验结果

Tab. 4 The result of antisera cross test

抗原 antigen	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	溶藻弧菌 <i>V. alginolyticus</i>	河流弧菌 <i>V. fluvialis biotype</i>	嗜水气单胞菌 <i>Aeromonas hydrophila</i>	哈维氏菌 <i>V. harveyi</i>	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>
(+)	1.461	0.228	0.423	0.248	0.249	0.23
(-)	0.083	0.077	0.082	0.077	0.079	0.077
P/N	+	-	-	-	-	-

表 5 免疫血清阻断实验结果

Tab. 5 The result of antisera inhibition test

稀释度 dilution	200	400	800	1000	2000	4000	8000	16000
阻断前 fore-inhibition	4.443	4.411	4.238	4.189	3.659	2.771	1.561	0.796
阻断后 after-inhibition	4.106	3.701	2.893	2.727	1.711	0.921	0.443	0.192
阻断率 (%) inhibition ratio	7.581	6.093	1.743	4.905	4.226	6.777	1.627	5.88

表 6 凡纳滨对虾的间接 ELISA 检测结果

Tab. 6 Detection of *Litopenaeus vannamei* by indirect ELISA

样品 samples	检测样品数 the total of samples	阳性样品数 number of positive samples	阳性检出率 (%) positive rate
患病的凡纳滨对虾 suffering <i>L. vannamei</i>	30	28	93.3
健康的凡纳滨对虾 healthy <i>L. vannamei</i>	30	4	13.33

3 讨论

3.1 凡纳滨对虾的红体病

副溶血弧菌所引起的红体病,在凡纳滨对虾中从虾苗到成虾各阶段都有发生,病程长,累积死亡率高。由于凡纳滨对虾发生该病后的一种明显表现是“红体”,在没有科学的检测方法条件下,养殖业者经常把该病同“桃拉综合征(Taura syndrome, TS)”等同样具有“红体”表现的疾病相混淆并作出错误判断,进而由于采用的措施不对症,贻误了治疗时机,造成更加严重的损失。凡纳滨对虾在发生细菌性的弧菌病、病毒性的“桃拉综合征”以及环境因子突变等情况下,外观上都可表现出红体现象。因此,建立快速准确的病原检测方法,准确判断及鉴别凡纳滨对虾不同病原,做到对症下药,是控制凡纳滨对虾疾病的有效措施之一。

3.2 凡纳滨对虾红体病病原——副溶血弧菌的检测方法

综合近年来国内外相关研究资料显示,凡纳滨对虾红体病病原副溶血弧菌的检测研究,主要分为两个方面:一是运用常规方法,以虾体内细菌分离培养为基础的研究。该方法的相关研究较多^[3],而且也是迄今为止最常用的方法。但由于此方法为确诊而进行的细菌学鉴定需要几天才能得出结果,因此不具备实际推广应用的价值。二是采用 PCR 技术的检测研究,国内外有关这方面的报道也比较多^[4]。该方法具有灵敏高、特异强等特点,但是费用高以及对人员的实验技能要求较高等限制了该方法在实际中的应用。ELISA 技术应用于其它水产病害方面的报道很多^[5,6],但是用于检测凡纳滨对虾红体病病原菌的方法在国内尚属首次报道。该方法的建立在凡纳滨对虾红体病病原早期诊断,有效控制疾病发生,降低和清除凡纳滨对虾副溶血弧菌感染等方面具有比其它方法更突出的实际应用价值。

细菌属于颗粒性抗原,若将其直接包被在酶标反应板上,吸附量少,效果不理想,鄢庆枇等^[7]对传统的间接 ELISA 方法进行了改良,即将抗原

包被在酶标板上后进行烘干,取得了较好效果。本实验对烘干前后的结果进行了比较,结果显示烘干法灵敏度要高于未烘干法大约 102 倍。建立检测方法的过程中,若包被液的蛋白量过大,则会造成蛋白质分子的多层化,会因抗原蛋白分子之间的相互作用而影响载体对蛋白质的吸附,在洗涤时一部分蛋白分子容易被洗掉;若浓度太低,则敏感性下降。因此,确定血清工作浓度之前进行抗原最佳工作浓度的测定,能够提高整个体系的特异性和灵敏性。

在将该技术标准化后,检测 30 份人工感染后的凡纳滨对虾和健康凡纳滨对虾各 30 只。有发病症状的凡纳滨对虾中,检测结果 28 只阳性,2 只为阴性。分析原因,一种可能是由于受到对虾自身免疫的影响,另一种可能是建立的方法检测灵敏度还不够,需要通过进一步改进抗原包被条件以提高其检测灵敏度。在健康的没有症状的 30 只对虾中 4 只呈阳性,说明该方法可以检测到尚未发病但体内已经带菌的情况,这对于水产养殖中进行疾病的早期诊断有着重要意义。同时,ELISA 检测方法具有快速、灵敏、容易操作的优点,通过进一步的完善,可以制备出该病原的快速检测试剂盒,将会使该技术为水产养殖业创造更大的经济效益。

参考文献:

- [1] 沈文英,阳会军,尹军霞.南美白对虾的病害及防治研究现状[J].水利渔业,2004,24(1):58-60.
- [2] 陈爱平.2002 年我国南美白对虾养殖及病害情况综述(中)[J].科学养鱼,2003,11:41-42.
- [3] 周永灿,张木,陈雪芬,等.养殖对虾细菌性红体病的初步研究[J].海洋科学,2003,27(5):61-65.
- [4] 寇运同,马洪明,刘晨光.用 PCR 方法快速检测水产品中的副溶血弧菌[J].海洋科学,2002,26(9):66-69.
- [5] 王崇明,杨冰,宋晓玲,等.应用双抗夹心 ELISA 法检测皱纹盘鲍致病病原——创伤弧菌的研究[J].海洋水产研究,1999,20(1):30-34.
- [6] Tamplin M L, Martin A L, Ruple A D, et al. Enzyme immunoassay for identification of *Vibrio vulnificus* in seawater and oysters[J]. Appl Environ Microbiol, 1991, 57:1235-1240.
- [7] 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):47-50.