

文章编号:1673-1689(2007)03-0085-05

副溶血弧菌多克隆抗体的制备及其特性分析

窦勇, 宁喜斌

(上海水产大学 食品学院, 上海 200090)

摘要: 确定了副溶血弧菌多克隆抗体的制备方法:用体积分数0.05%甲醛于30℃灭活副溶血弧菌4h制备抗原,并将此抗原分多次,以不同剂量免疫新西兰大白兔获得特异性多克隆抗体,以山羊抗兔IgG-HRP作为酶标二抗,通过间接ELISA法测定其多克隆抗体的效价、敏感性和特异性。结果表明:在免疫的第5周产生大量高效价抗体,效价最高可达 1.6×10^5 ;此多克隆抗体对副溶血弧菌检测灵敏度为 1×10^5 CFU/mL;交叉反应和阻断试验结果显示,此多克隆抗体具有很强的特异性。

关键词: 间接ELISA;副溶血弧菌;多克隆抗体;效价;特性

中图分类号: Q 813.2

文献标识码: A

The Polyclonal Antibody Preparation of *Vibrio parahaemolyticus* and the Analysis of It's Character

DOU Yong, NING Xi-bin

(College of Food Science, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: The preparation method of the polyclonal antibody of *Vibrio parahaemolyticus* was established. The antigen was prepared by using formalin (0.05%, V/V) to inactivate *V. parahaemolyticus* at 30℃ for 4 h, then the polyclonal antibody specific for *V. parahaemolyticus* was produced by injecting the antigen to New Zealand rabbits in several times with increasing dose. The goat anti-rabbit IgG-HRP was used as the second antibody marked with enzyme, and to determine the titer, specificity, and sensitivity of the polyclonal antibody in an indirect ELISA detection. The results indicated that after five weeks, the antibody produced obviously, and the titer reached at 1.6×10^5 . The sensitivity dosage of the polyclonal antibody to *V. parahaemolyticus* was 1×10^5 CFU/mL; Furthermore, the crossing test and inhibition test demonstrated that the polyclonal antibody was strongly special.

Key words: indirect ELISA; *V. parahaemolyticus*; polyclonal antibody; titer; character

副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, 简称VP)是一种广泛分布于海洋与盐湖中的嗜盐性细

菌,海产品中常有此菌,它是引起食源性疾病的主要病原之一,是我国沿海地区食物中毒和夏季腹泻

收稿日期:2006-09-14.

基金项目:上海市重点学科项目(T1102).

作者简介:窦勇(1979-),男,安徽巢湖人,食品生物技术硕士研究生. Email: ydou@stmail.shfu.edu.cn

通讯作者:宁喜斌(1964-),男,黑龙江鹤岗人,教授,工学博士,硕导,主要从事微生物与食品安全研究.

Email: xbning@shfu.edu.cn

的重要病原。为有效控制病原的发生扩散,准确即时的检测手段是预防控制、传播的关键所在。酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay,简称ELISA)是将抗原、抗体的特异性免疫反应及酶的高效催化反应性有机结合起来的一项技术^[1],与其他检测方法相比,它具有特异性强、敏感性高、检测时间短等优点,可以在短时间内准确测出抗原、抗体的效价。作者利用间接ELISA法快速测定多克隆抗体效价,确定获得高效价副溶血弧菌多克隆抗体的最佳制备方案,为以后采用ELISA法快速检测水产品中副溶血弧菌提供高特异性多克隆抗体,为食品中副溶血弧菌的ELISA快速检测法的建立奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 试验菌株 副溶血弧菌 1.2164(简称VP1.2164)购于中国科学院普通菌种保藏中心,属于动物致病菌;溶藻弧菌、鳃弧菌、嗜水气单胞菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、藤黄微球菌均由作者所在实验室保存。

1.1.2 试验兔 试验用新西兰大白兔购于复旦大学医学院动物实验部。

1.1.3 主要试剂和仪器 山羊抗兔IgG-HRP(上海华美生物工程公司产品),TCBS培养基(上海高信化玻仪器有限公司产品),邻苯二胺(国药集团上海化学试剂有限公司产品);全自动酶标仪 Stat Fax3200(美国 Awareness Technology Inc. 产品),微量移液枪 Nichpet EX(日本 NICHIRYO 公司产品),紫外可见分光光度计 UV2300(上海天美科学仪器有限公司产品),加拿大 JET 96 孔高结合力可拆卸酶标板(上海天呈医流科技有限公司产品)。

1.2 实验方法

1.2.1 病原菌灭活条件筛选 结合甲醛和加热法灭活,甲醛体积分数设置为 0%、0.025%、0.05%、0.1%、0.2%;热灭活温度设置为 4, 30, 45, 60 °C;灭活时间设置为:1, 2, 4, 8, 24, 48, 96 h;将制备好 VP1.2164 菌悬液分装于 6 支无菌大试管,每支 10 mL,并按照不同的体积分数分别加入甲醛,置于 4 °C 冰箱,并于 30, 45, 60 °C 的恒温水浴箱进行灭活,按设置的时间,分别吸取灭活后的菌悬液 0.1 mL 均匀涂布于 TCBS 平板中,培养 48 h,平板菌落计数,筛选出副溶血弧菌的最佳灭活条件^[2]。

1.2.2 疫苗制备 将 VP1.2164 接种于 TCBS 培养基上,30 °C 培养 24 h。将在 TCBS 平板上培

养 18 h 后的 VP1.2164 用 0.85% 的生理盐水洗脱至无菌大试管,加体积分数 0.025% 甲醛,30 °C 下作用 4 h,制成灭活病原,5 000 r/min 转速离心 10 min,再用生理盐水洗涤 3 次,重复离心,采用平板计数结合 McFarland 比浊法将疫苗浓度定为 10⁸ CFU/mL。分装后于 4 °C 冰箱保存备用。

1.2.3 多克隆抗体制备 选购健康雄性新西兰大白兔,体重 2~2.5 kg,饲养观察一周,确定无异样后,从耳静脉采血 2 mL 制备阴性血清,同时与 VP1.2164 抗原做试管凝集试验,出现凝集反应的淘汰不用。家兔免疫步骤为:用体积分数 0.05% 甲醛、30 °C 将副溶血弧菌灭活 4 h,制备免疫抗原,注射浓度为 1×10⁹ CFU/mL(注射剂量见表 1),分多次、剂量递增进行耳静脉注射,基础免疫两周后进行第一次加强免疫,之后每隔一周进行一次加强免疫,在最后一次免疫结束后一周,耳动脉大量采血,采血后立即放入大试管,室温下置斜面 2~3 h,移至 4 °C 冰箱过夜,吸取上清液即多克隆抗体,如有血红细胞以 3 000 r/min 转速离心 10 min,制备的多克隆抗体分装于无色聚丙烯冷冻管中,-20 °C 冰箱保藏备用。

表 1 家兔免疫剂量

Tab.1 The immune dosage of rabbits

注射次数	注射剂量/mL
第一次	0.5
第二次	1.0
第三次	1.5
第四次	2.0
第五次	2.5
第六次	3.0

1.2.4 间接ELISA法实验步骤 用包被液(0.05 mol/L,pH 9.6 碳酸盐缓冲液)将抗原稀释成 10⁷ CFU/mL,每孔加入 100 μL 进行包被,37 °C 水浴 2 h;弃去多余的包被液,用 PBST(含 0.05% Tween-20 的 0.01 mol/L,pH 7.4 的柠檬酸-柠檬酸盐缓冲液)注满各孔,静置 5 s,甩干,重复 5 次后拍干。每孔加入 100 μL,5% 的小牛血清封闭抗原,板封口,37 °C 孵育 2 h。取出酶标板,恢复至室温,弃去封闭液,用 PBST 注满各孔,静置 5 s,甩干,重复 5 次后拍干。每孔分别加入 100 μL 用 PBS(0.01 mol/L,pH 7.4 柠檬酸-柠檬酸盐缓冲液)稀释的抗血清和阴性血清,同时以 PBST 代替血清设置空白对照,37 °C 孵育 75 min;每孔加入 100 μL IgG-

HRP(体积比 1 : 1000 稀释), 37 °C 培养 75 min, PBST 洗涤扣干 3 次; 每孔加入 100 μL 底物溶液, 30 °C 保温, 避光反应 20 min ; 每孔加入 50 μL 2 mol/L 的 H₂SO₄, 轻轻摇匀; 酶标仪测量波长设置为 492 nm, 参比波长为 630 nm, 以空白对照孔调零, 测定其 OD₄₉₂ 值。

1.2.5 多克隆抗体效价测定 采用间接 ELISA 法测定免疫血清效价, 多克隆抗体和阴性血清稀释度由 1 : 1 × 10⁴ 倍比稀释至 1 : 3.2 × 10⁵[3]。多克隆抗体效价定义为: 以多克隆抗体的吸光值 2.1 倍于阴性血清吸光值时, 多克隆抗体最大稀释倍数的倒数[4]。

1.2.6 特异性试验

1) 交叉试验: 用 McFarland 比浊法将浓度定为 10⁷ CFU/mL 的 VP1. 2164、溶藻弧菌、鳃弧菌、嗜水气单胞菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、藤黄微球菌于 37 °C 水浴包被酶标板, 阴性血清和阳性血清均采用稀释度 1:4000 的稀释度, 进行间接 ELISA 检测, 确定交叉反应情况;

2) 阻断试验: 将 10⁷ CFU/mL 的 VP1. 2164 菌悬液于 37 °C 水浴包被酶标板, 将阳性血清从 1 : 500 开始倍比稀释至 1 : 32000, 各稀释度分别加入等量浓度为 10⁷ CFU/mL 的 VP1. 2164 菌悬液, 混匀后于 37 °C 水浴反应 1 h, 同时将不做任何处理的阳性血清和阴性血清作为对照, 进行间接 ELISA 测定阻断前后 OD₄₉₂ 值, 按公式 (N - T) / N (N 为未经处理阳性血清的 OD₄₉₂ 值, T 为经 VP1. 2164 菌液处理的阳性血清的 OD₄₉₂ 值) 计算其阻断率, 以阻断

率大于 50% 作为阻断阳性, 即具有阻断效果[5]。

1.2.7 敏感性试验 将 VP1. 2164 菌悬液稀释成 10⁷ CFU/mL, 而后进行一系列 10 倍梯度稀释至 10² CFU/mL, 将待测血清及阴性血清按 1 : 4000 稀释, 山羊抗兔-IgG 稀释度为厂商推荐最佳比例 1 : 1000 稀释, 通过间接 ELISA 法试验, 确定最小抗原检测浓度[6]。以所产生的 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)) 大小作为判断标准, 当 P/N 值 ≥ 2.1 判为阳性。

2 实验结果

2.1 VP1. 2164 的灭活

表 2 为不同外界条件对 VP1. 2164 灭活效果的比较, 只就温度而言, 60 °C 条件下, 1 h 就可以完全灭活; 45 °C 条件下, 8 h 可以完全灭活; 而 30 °C 和 4 °C 条件下, 基本不能达到灭活效果, 可见 VP1. 2164 对热比较敏感。仅就甲醛而言, 在试验设定的几个温度下, 体积分数 0.2% 的甲醛 4 h 可以将其完全灭活, 而体积分数 0.1%, 0.05%, 0.025% 的甲醛则分别需要 8, 24, 48 h 才能完全灭活; 总的来说, 温度越高, 甲醛体积分数越大, 灭活时间越短。试验结果表明, 对于甲醛灭活法, 可以使用体积分数为 0.2% 甲醛灭活 4 h, 而采用热灭活法, 60 °C 灭活 1 h 或 45 °C 灭活 8 h。在本实验条件下, 结合甲醛灭活和热灭活法, 作者筛选出 VP1. 2164 的最佳灭活条件为: 甲醛体积分数为 0.05%, 30 °C 的条件下灭活 4 h。

表 2 不同条件对 VP1. 2164 灭活效果的比较

Tab. 2 Comparison of inactivating effect on VP1. 2164 at different conditions

灭菌温度/°C	甲醛体积分数/%	灭活时间/h						
		1	2	4	8	24	48	96
60	0.2	-	-	-	-	-	-	-
	0.1	-	-	-	-	-	-	-
	0.05	-	-	-	-	-	-	-
	0.025	-	-	-	-	-	-	-
	0	-	-	-	-	-	-	-
45	0.2	-	-	-	-	-	-	-
	0.1	-	-	-	-	-	-	-
	0.05	-	-	-	-	-	-	-
	0.025	+	-	-	-	-	-	-
	0	+++	++	+	-	-	-	-
30	0.2	-	-	-	-	-	-	-
	0.1	-	-	-	-	-	-	-
	0.05	++++	+	-	-	-	-	-
	0.025	+++++	+++++	+	-	-	-	-
	0	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++

续表 2

灭菌温度/℃	甲醛体积分数/%	灭活时间/h						
		1	2	4	8	24	48	96
4	0.2		+	+	-	-	-	-
	0.1	+++++	+++++	+	-	-	-	-
	0.05	+++++	+++++	+++++	++	-	-	-
	0.025	+++++	+++++	+++++	+++++	+	-	-
	0	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++

注：“+++++”表示菌落数>400;“++++”表示 300<菌落数<400;“+++”表示 200<菌落数<300;“++”表示 100<菌落数<200;“+”表示菌落数<100;“-”表示没有菌落形成。

2.2 多克隆抗体效价

图1结果显示,4只兔子均产生了较好的抗体,从免疫的第30日开始有很明显的抗体产生,免疫的第35日抗体产生量达到最高峰,此状态维持1周左右,其效价最高可达 1.6×10^5 。随着免疫剂量的增加,免疫45d后,抗体效价略有下降趋势。

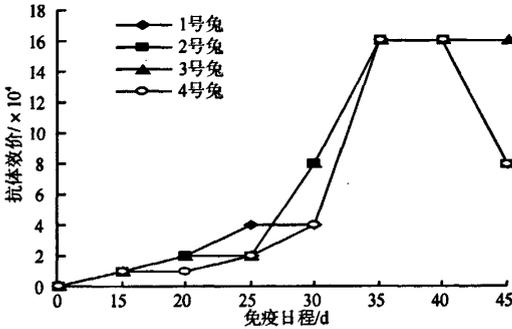


图1 副溶血弧菌多克隆抗体产生进程曲线

Fig. 1 Time-course of production the polyclonal antibody of *Vibrio parahaemolyticus*

2.3 特异性

2.3.1 交叉试验 通过间接ELISA实验,检测待测菌株与抗副溶血弧菌阳性血清交叉反应情况,VP1.2164作对照,结果显示只有VP1.2164的OD₄₉₂值为1.102,呈强阳性,而其它几株菌OD₄₉₂值均低于0.1,呈明显阴性(见表3),可见此多克隆抗体与其它菌均无交叉反应,具有良好的特异性。

2.3.2 阻断试验 由图2可知,经VP1.2164处理后的阳性血清随着稀释度的增加,OD₄₉₂值下降较明显,当稀释度为1:4000时,下降趋势最显著,且此时阻断率达最大值,为86.53%,而后随着稀释度的增加,其OD₄₉₂值逐渐接近阴性水平;而未经处理的阳性血清的OD₄₉₂值随着稀释度的增加下降缓慢。总体来看,不同的稀释度阻断率大都在50%以上,阻断率为阳性,即说明阳性血清对副溶血弧菌具有较高的特异性。

2.4 敏感性

用最适稀释度的多克隆抗体(体积比1:

4000),通过间接ELISA实验,测定抗原检测的灵敏度,结果见表4。测定结果为菌悬液浓度为 10^5 CFU/mL时即可检出,即每孔 10^4 CFU/mL。

表3 交叉反应实验结果

Tab. 3 The result of polyclonal antibody specificity

抗原	阳性血清 OD ₄₉₂	阴性血清 OD ₄₉₂	空白对照 OD值	交叉反应 (+/-)
副溶血弧菌 1.2164	1.102	0.136	0.063	+
溶藻弧菌	0.067	0.053	0.024	-
鳗弧菌	0.073	0.055	0.033	-
嗜水气单胞菌	0.058	0.046	0.032	-
金黄色葡萄球菌	0.098	0.078	0.043	-
大肠杆菌	0.049	0.045	0.038	-
枯草芽孢杆菌	0.088	0.064	0.034	-
藤黄微球菌	0.087	0.059	0.026	-

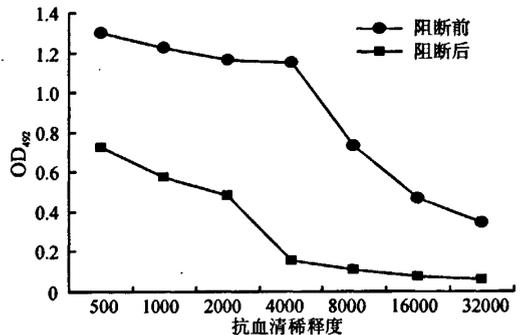


图2 阻断实验结果

Fig. 2 The results of polyclonal antibody cross test

表4 多克隆抗体敏感性实验结果

Tab. 4 The results of polyclonal antibody sensitivity

抗原稀释度	OD ₄₉₂ 值	+/-
阴性对照	0.115	
空白对照	0.039	
102	0.156	-
103	0.160	-
104	0.174	-
105	0.192	+
106	0.223	+
107	0.670	+

3 讨论

作者选择雄性健康,无天然凝集素的新西兰大白兔进行多次剂量递增的免疫方法获得高效价副溶血弧菌多克隆抗体。抗原的纯度、浓度、剂量和免疫时间间隔是制备高效价多克隆抗体的关键因素^[3]。本株副溶血弧菌是通过选择性培养基进行培养,多次纯化后,在完全无菌条件下制备副溶血弧菌抗原;通过平板计数结合 McFarland 比浊法准确确定免疫用抗原浓度;通过耳缘静脉注射,提高机体对抗原的吸收效率。免疫时,基础免疫采用较低剂量以激活家兔免疫系统,此时机体免疫细胞对抗原的识别阶段。间隔两周左右,家兔免疫机能激活,随后每隔一周,采取剂量递增的方法进行加强免疫,以刺激免疫系统逐步产生高效价抗体。在免疫的第35天抗体产生量达到最高峰,此状态维持1周左右,其效价最高可达 1.6×10^5 ,随后由于免疫剂量的增加,可能导致机体的免疫抑制使多克隆抗体效价有所下降,此时及时采血以便获得高效价多克隆抗体。

副溶血弧菌是微生物抗原,属于具有较强的免疫原性和免疫反应性的完全抗原,副溶血弧菌抗原包括菌体抗原和鞭毛抗原,据报道其菌体抗原(O

抗原)有12型,胞外多糖抗原(K抗原)有59型,并且所有菌株都有相同的鞭毛抗原(H抗原)^[7]。作者制备了副溶血弧菌菌体抗原,它能强烈刺激家兔免疫系统做出免疫应答,产生相应的特异性多克隆抗体。副溶血弧菌抗原也属于颗粒抗原,它不同于普通蛋白质抗原,抗原悬液直接包被不易吸附于酶标板上,而且吸附后稳定性不高,作者采用鄢庆枇^[2]等所用的60℃烘干包被法,并对普通包被和烘干包被结果进行比较,结果显示烘干包被OD₄₉₂值明显高于普通包被法,因此在利用间接ELISA法测定多克隆抗体效价及特性时,采用60℃烘干包被以提高检测的准确性。

作者制备的VP1.2164多克隆抗体,其效价达到 1.6×10^5 ,其中含有大量的多克隆抗体。其与溶藻弧菌、鳃弧菌、嗜水气单胞菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、藤黄微球菌均无交叉反应,且阻断实验均呈阳性,阻断率最高可达86.53%,敏感性实验所得对副溶血弧菌的检测阈为 10^5 CFU/mL,由此可见所制备的多克隆抗体具有很强的特异性和敏感性,此种多克隆抗体制备方案可以为副溶血弧菌的ELISA检测提供特异性高、敏感性强的高效价多克隆抗体,从而为水产品中副溶血弧菌的ELISA快速检测法的建立打下基础。

参考文献(References):

- [1] 焦奎,张书圣.酶联免疫分析技术及应用[M].北京:化学工业出版社,2004.
- [2] 王军,鄢庆枇,苏永全,等.养殖大黄鱼副溶血弧菌的酶联免疫吸附法研究[J].台湾海峡,2001,20(3):346-350.
WANG Jun, YAN Qing-pi, SU Yong-quan, et al. Study on indirect ELISA method for detecting *Vibrio parahaemolyticus* in cultured *Pseudosciaena crocea*[J]. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*, 2001, 20(3):346-350.
- [3] C F PENG, K HAO, Z Y JIN, et al. Synthesis and identification of immunogen medroxyprogesterone acetate residues in edible foods and preparation of the antisera[J]. *Slovak Academy of Sciences*, 2006, 60(1):61-64.
- [4] 陈福生,高志贤,王建华.食品安全检测与现代生物技术[M].北京:化学工业出版社,2004:8.
- [5] 樊景凤,梁玉波.凡纳滨对虾红体病原菌间接ELISA快速检测方法的研究[J].水产学报,2006,30(1):113-117.
FAN Jing-feng, LIANG Yu-bo. Indirect ELISA method for detecting the pathogenic bacteria of *Litopenaeus vannamei* red body disease[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2006, 30(1):113-117.
- [6] 张晓华, Peter Robertson, Brain Austin, 等.检测海洋弧菌的酶联免疫吸附试验研究[J].青岛海洋大学学报,1997,27(3):326-331.
ZHANG Xiao-hua, Peter Robertson, Brain Austin, et al. An indirect enzyme-linked immunosorbent assay for rapid diagnosis of marine *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Journal of Ocean University of Qindao*, 1997, 27(3):326-331.
- [7] Kasthuri V. The association of *V. parahaemolyticus* serotypes with zooplankton and its relationship with bacterial indicators of pollution[J]. *System Appl Microbiol*, 1989, 11:194-201.

(责任编辑:李春丽)