

文章编号:1000 - 0615(2001)06 - 0522 - 06

溶藻弧菌单克隆抗体的制备及应用

宋晓玲, 黄 健, 史成银

(中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071)

摘要:小鼠骨髓瘤细胞系 SP2/0 与经溶藻弧菌 (1.1587) 免疫的 BALB/C 雌鼠脾细胞在 PEG 条件下融合, 有 45.8% 的培养孔有杂交瘤细胞生长, 其培养上清液抗体阳性率为 77.4%。经反复有限稀释法克隆杂交瘤细胞, 获得 7 株抗溶藻弧菌的单克隆抗体杂交瘤细胞株, 分别为: AC₁-C₉, AC₁-C₁₁, BB₄-D₄, AD₁-A₃, AD₁-F₃, AD₂-E₇, AD₂-F₇。取 AD₁-F₃ 扩大培养, 注射小鼠, 制备了抗溶藻弧菌的单克隆抗体腹水, 滴度为 1:1000。该腹水与其他 3 株溶藻弧菌菌株有强交叉反应, 与其他 13 株标准菌株无交叉反应。利用制备的单抗腹水, 建立了检测溶藻弧菌的单抗-ELISA 技术。该反应系统可应用于溶藻弧菌的快速诊断, 反应时间为 6-7h, 检测灵敏度为 10⁴ cells ml⁻¹。并利用该检测方法进行了 11 份待测菌样本溶藻弧菌的检测。

关键词:单克隆抗体; 溶藻弧菌; 酶联免疫吸附试验

中图分类号: S948 **文献标识码:** A

Production and application of monoclonal antibodies of *Vibrio alginolyticus*

SONG Xiao-ling, HUANG Jie, SHI Cheng-yin

(Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Qingdao 266071, China)

Abstract: Monoclonal antibodies (Mab) raised against *Vibrio alginolyticus* strains (1.1587) by that primed spleen cells fused with SP2/0 myeloma cells using polyethyling glycol. The rate of fusion was 45.8% and the rate of positive in fusion was 77.4% by ELISA. Mabs, AC₁-C₉, AC₁-C₁₁, BB₄-D₄, AD₁-A₃, AD₁-F₃, AD₂-E₇, AD₂-F₇, were harvested using usable hybridomas clone twice by limiting dilution. Ascites with Mabs against *Vibrio alginolyticus* were harvested by injecting BALB/C mice. The titer of the ascites was 1:1000. In comparison, Mab AD₁-F₃ reacted with only four *Vibrio alginolyticus* strains. No cross-reactions were observed among thirteen non-*Vibrio alginolyticus*. Using this Mab ascites, an indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for rapid diagnosis of *Vibrio alginolyticus* has been developed. This method can detect 1 × 10⁴ bacteria per ml with in 6 - 7 h. After the method was optimized, 11 samples were detected for *Vibrio alginolyticus*.

Key words: monoclonal antibodies (Mab); *Vibrio alginolyticus*; Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

在世界的主要对虾养殖地区, 细菌性疾病仍是造成对虾大面积死亡的原因之一。从对虾育苗期、养

收稿日期: 2001-03-02

基金项目: 中国水产科学研究院科研基金资助 (95 - 011 号)

第一作者: 宋晓玲 (1962 -), 女, 河北宣化人, 副研究员, 主要从事水产养殖动物疾病学的研究。Tel: 0532 - 5823062, E-mail: aquadis @ public. qd. sd. cn

成期到越冬期,细菌性疾病随时随地都有暴发的可能性^[1]。引起对虾类流行性细菌病的病原主要是弧菌、假单胞菌、气单胞菌及丝状细菌等。这些病原菌可引起对虾原发性、继发性疾病,影响对虾摄食、游泳、抵御外界不良环境等生理功能,最终导致死亡。在海水养殖环境中,弧菌属的细菌在各类细菌中占有很大的比重,其中又以溶藻弧菌、鳃弧菌和副溶血弧菌三种菌占有优势,并且在自然海区的海水中也广泛存在。弧菌是各种海洋动物普遍性的致病菌,鱼、虾、贝类从幼体到成体,不管是野生的还是人工养殖的都可因感染弧菌而出现大量死亡^[2]。开展对海洋弧菌的快速诊断研究,对于早期确诊并及时控制疾病,防止疾病进一步蔓延都具有十分重要的意义。应用抗原、抗体反应特性建立的酶联免疫吸附实验法(简称 ELISA 法),在国外已用于多种鱼类病毒病、细菌病的检测^[3,4];国内也先后开展了病毒、弧菌等的 ELISA 快速诊断研究^[5,6],但对溶藻弧菌的免疫检测还未见报道。本研究首先制备了抗溶藻弧菌单克隆抗体,建立了单抗-ELISA 检测溶藻弧菌技术,并进行了待测菌样本的诊断,现将内容与结果报道如下:

1 材料和方法

1.1 试验菌株

标准菌株共 17 株(见表 1),分别购自中国科学院菌种保藏中心、中国药品生物制品检定所、北京药品生物制品检定所和中国科学院水生生物研究所。

待测分离菌样本 11 份,由本所农业部新渔药临床试验中心提供。

1.2 培养基

2216 E 细菌培养基:蛋白胨 5g,酵母粉 1g,磷酸高铁 0.1g,陈海水 1000mL,pH7.6。

RPMI 1640 完全培养基:RPMI 1640 10.4mg·mL⁻¹,NaHCO₃ 2mg·mL⁻¹,2mM L-谷胺酰胺,50D·mL⁻¹青霉素,50μg·mL⁻¹硫酸链霉素,15%小牛血清。

HAT 选择性培养基:含次黄嘌呤 10⁻²M,胸腺嘧啶核苷 1.6×10⁻³M,氨基喋呤 4×10⁻⁵M 的 RPMI 1640 完全培养基。

1.3 小鼠的免疫

小鼠: BALB/C 品系小鼠购自中国药品生物制品鉴定所实验动物中心,免疫时选择 6~8 周龄的雌鼠。

抗原制备:将溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*) (1.1587)接种于 2216 E 琼脂斜面,28℃ 培养 24h,生理盐水洗脱后,制成 3×10⁷cells·mL⁻¹菌悬液,56℃ 30min 灭活。

免疫程序:上述抗原免疫小鼠,免疫剂量为每只小鼠腹腔注射 100μl 共计 3×10⁶菌细胞,每隔三周免疫一次。免疫三次后取尾血做 ELISA 测定抗血清效价,当效价达到足够值后以同样剂量加强免疫。

1.4 间接 ELISA 法检测血清效价

以溶藻弧菌为抗原包被酶标板,清洗并用牛血清白蛋白封闭后;加入待测小鼠血清,并作对比稀释(以未免疫的小鼠血清做阴性对照);加入辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 孵育,用含邻苯二胺的显色液显色;2M H₂SO₄ 终止显色反应,酶标仪在 290nm 处测 OD 值。以待测孔的 OD 值(P)与阴性对照孔的 OD 值(N)之比大于 2(即 P/N > 2)的最小值的血清稀释度为该血清的效价。

1.5 小鼠骨髓瘤细胞与免疫小鼠脾细胞的融合

小鼠骨髓瘤细胞系 SP2/0:购自中国科学院上海细胞库。

融合方法:加强免疫 4d 后的小鼠,无菌取脾,并制成脾细胞悬液。脾细胞与骨髓瘤细胞在 50% 聚乙二醇(PEG)条件下融合,移入预先接种饲养细胞的酶标板,HAT 培养基 37℃,5% CO₂ 培养,每日 OL YPASS 倒置显微镜下观察细胞生长情况,更换培养基。两周后去除培养基中的氨基喋呤,再一周后改用 RPMI 1640 完全培养基培养。

1.6 杂交瘤细胞上清及腹水的抗体检测

用 ELISA 间接法进行特异性抗体筛选及腹水效价测定:同方法 4,待测血清改为融合孔中细胞上清液或腹水,RPMI 1640 完全培养基或生理盐水做阴性对照; $P/N > 2$ 的待测孔为阳性孔。

1.7 有限稀释法克隆杂交瘤细胞

挑选分泌抗体的阳性杂交瘤细胞,稀释到 $7 \sim 10 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 个菌细胞分种于 96 孔培养板中,选择只有一个集落生长的培养孔,重复 2~3 次,获得单克隆杂交瘤细胞株。

1.8 单克隆抗体的制备

用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 扩大培养溶藻弧菌单抗杂交瘤细胞株。Balb/c 成年鼠预先注射液体石蜡,7d 后给每只小鼠注射 10^7 杂交瘤细胞,且小鼠在无特定病原环境下饲养。小鼠腹肿变瘦后,杀死小鼠收集腹水。储存于 4℃,用前以 PBST(含 1% 牛血清白蛋白)稀释 5 倍。

1.9 单克隆抗体特异性测定

选取 4 株不同来源的溶藻弧菌及 13 株其他标准弧菌菌株,间接 ELISA 法测定单克隆抗体的特异性。将每株菌预先增菌 18h,以无菌生理盐水稀释至约为 $10^8 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的菌悬液,包被酶标板,无菌生理盐水做阴性对照。试验步骤同融合孔阳性的测定。 P/N 值大于 2 的定为有交叉反应, P/N 值小于 2 的定为无交叉反应。

1.10 酶标二抗

辣根过氧化物标记的羊抗鼠 IgG 购自 Promega 公司,用前以 PBST(含 1% 牛血清白蛋白)稀释 1000 倍。

1.11 间接酶联免疫吸附试验(ELISA)

2216E 斜面 28 增菌 18h,用无菌生理盐水制成约 $3 \times 10^7 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的菌悬液,每孔 50 μL 包被酶标板,55℃ 烘干后甲醛固定 10min。PBST(含有 0.05% 吐温 20 的 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液)清洗,1% 牛血清白蛋白封闭 30min,再次清洗后加入稀释的小鼠腹水(滴度 1:200)每孔 50 μL ,室温放置 2~3h。清洗液清洗后,每孔加入 50 μL 稀释(含 5% 小牛血清)后的辣根过氧化物标记的羊抗鼠 IgG,37℃ 孵育 1h。再次清洗后,每孔加入 75 μL 显色液(柠檬酸,0.73mg;NaHPO₄·2H₂O,1.186mg;邻苯二胺,0.04mg;30% H₂O₂,0.1 μL)暗处显色,20~30min 后观察显色反应的强弱,每孔加入 25 μL 2M H₂SO₄ 终止反应,酶标仪在 290nm 处测 OD 值。以待测孔的 OD 值(P)与阴性对照孔的 OD 值(N)之比大于 2(即 $P/N > 2$)的定为阳性。

2 结果

2.1 小鼠血清的抗体效价

小鼠经溶藻弧菌(1.1587)腹腔多次免疫后,血清效价为 1:256;经腹腔加强免疫,3d 后取脾时效价达 1:512。

2.2 细胞融合率与抗体阳性率

将骨髓瘤细胞与免疫脾细胞按 1:12 的比率融合后,分装了 2 个 24 孔克隆板共计 48 孔。有杂交瘤细胞生长的孔数为 22 孔,占 45.8%;培养上清经间接 ELISA 检测为阳性的融合孔是 17 孔,阳性率为 77.3%。

2.3 单抗杂交瘤细胞株

选择阳性最强的 4 个阳性融合孔,经反复有限稀释法克隆杂交瘤细胞后,获得 7 株抗溶藻弧菌的单克隆抗体杂交瘤细胞株,分别为:AC₁-C₉,AC₁-C₁₁,BB₄-D₄,AD₁-A₃,AD₁-F₃,AD₂-E₇,AD₂-F₇。

取 AD₁ - F₃ 扩大培养,注射小鼠,生成腹水的滴度为 1 1000。其他细胞株加 10% 二甲基亚砷液氮冻存。

2.4 单克隆抗体的特异性

由表 1 可见,AD₁ - F₃ 单克隆抗体与 4 株溶藻弧菌均有较强烈反应,与 13 株其他弧菌标准菌株无交叉反应,说明所得单克隆抗体是对溶藻弧菌特异的。

表 1 间接 ELISA 技术检测 AD₁ - F₃ 单克隆抗体与其他标准弧菌菌株的交叉反应

Tab. 1 Cross reactions of mono-antibodys (AD₁ - F₃) with other strains of *Vibrio alginolyticus* and type strains of vibrio using indirect ELISA

细菌名称 Bacterial Species	菌号 Lab. code	来源 Source	交叉反应 Cross reaction
溶藻弧菌 <i>Vibrio alginolyticus</i>	1. 1587	中国科学院菌种保藏中心	+
溶藻弧菌 <i>Vibrio alginolyticus</i>	1. 1833	中国科学院菌种保藏中心	+
溶藻弧菌 <i>Vibrio alginolyticus</i>	1. 1607	中国科学院菌种保藏中心	+
坎普氏弧菌 <i>Vibrio campbellii</i>	1. 1596	中国科学院菌种保藏中心	-
哈维氏弧菌 <i>Vibrio harveyi</i>	1. 1593	中国科学院菌种保藏中心	-
副溶血弧菌 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1. 1614	中国科学院菌种保藏中心	-
河流弧菌 <i>Vibrio fluviatilis</i>	1. 1608	中国科学院菌种保藏中心	-
溶藻弧菌 <i>Vibrio alginolyticus</i>	91 - 1	北京药品生物制品检定所	+
副溶血弧菌 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	91 - 2	北京药品生物制品检定所	-
创伤弧菌 <i>Vibrio vulnificus</i>	91 - 4	北京药品生物制品检定所	-
河流弧菌 <i>Vibrio fluviatilis</i>	91 - 5	北京药品生物制品检定所	-
费尼斯弧菌 <i>Vibrio furnissii</i>	91 - 6	北京药品生物制品检定所	-
霍利斯弧菌 <i>Vibrio hollisae</i>	91 - 7	北京药品生物制品检定所	-
拟态弧菌 <i>Vibrio minicus</i>	91 - 8	北京药品生物制品检定所	-
非 O1 霍乱弧菌 <i>Vibrio cholerae non - O1</i>	17012	中国药品生物制品检定所	-
非 O1 霍乱弧菌 <i>Vibrio cholerae non - O1</i>	17048	中国药品生物制品检定所	-
鳃弧菌 <i>Vibrio anguillarum</i>	E3 - 11	中国科学院水生生物研究所	-

2.5 单抗 ELISA 敏感性试验

用不同的抗原浓度包被克隆板,间接 ELISA 法测定溶藻弧菌单克隆抗体 AD₁ - F₃ 的敏感性,结果见表 2。从表 2 可见,该单克隆抗体腹水间接 ELISA 方法的检测灵敏度为每毫升 10⁴ 个菌细胞。

表 2 单抗 ELISA 检测溶藻弧菌(1.1587)的敏感性试验

Tab. 2 P/N values in indirect ELISA using different dilutions of monoclonal antibodies (strain 1.1587)

	抗原浓度 (cells · mL ⁻¹)						
	10 ⁹	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³
P/N	82.34	76.47	49.33	16.29	5.37	2.84	1.53
+/-	+++	+++	+++	++	+	+	-

2.6 重复性试验

在相同条件下用单抗 ELISA 法分别检测溶藻弧菌各 10 份阳性和 10 份阴性样本,重复 3 次结果相同。

2.7 样本的检测

含抗溶藻弧菌的单克隆抗体的 Balb/c 小鼠腹水检测了 11 份待测分离菌样本,样本由本所农业部新渔药临床试验中心提供的,检测结果见表 3。

表 3 待测菌样本溶藻弧菌的检测结果

Tab. 3 The results of detection of *V. alginolyticus* in samples by indirect ELISA

待测菌样本编号	分离宿主	采集地点	检测结果
L97 - 1	鲈鱼	莱州市	-
J98 - 2	金枪鱼	青岛市小麦岛基地	-
H97 - 1	黑鲷	莱州市	-
T98 - 1	条纹鲈	青岛市小麦岛基地	+
S98 - 1	中国对虾	日照市石白港	-
S98 - 2	中国对虾	日照市石白港	+
S98 - 3	中国对虾	日照市石白港	+
S98 - 4	中国对虾	日照市石白港	+
S98 - 5	中国对虾	日照市石白港	-
RHL - 1	黄鱼	荣城市靖海镇	-
ZY - 1	鲢鱼	招远市	-

3 讨论

免疫学方法近年来广泛应用于水产动物疾病诊断,如葡萄球菌 A 蛋白协同凝集反应、荧光抗体技术、间接 ELISA 技术等,但用来诊断的关键试剂—抗血清的制备是通过多次免疫动物(如新西兰兔)收集、分离血清而获得^[7,8]。成本高,产量少,并易受到鱼、虾组织及其它病原体干扰而出现假阳性,给实际应用带来不便。单克隆抗体通过体外细胞融合的方法将小鼠骨髓瘤细胞与免疫的脾细胞进行融合,获得杂交瘤细胞株产生特异性抗体。单克隆抗体特异性识别单一抗原决定簇,且经过多次克隆与筛选获得,从而避免了交叉反应带来的假阳性,提高了检测的准确性;单克隆抗体能够在实验室通过细胞培养而得到批量生产,在诊断上具有专一性强、重复性好、操作简便等优点,有较高的使用价值^[9,10]。

本文用溶藻弧菌标准菌株免疫 Balb/c 小鼠,由于细菌是完整的细胞性抗原,其表面抗原具有高度免疫原性,因而在免疫程序中未使用任何佐剂,取得了较好的免疫效果。造成脾细胞与骨髓瘤细胞融合率较低的原因主要有骨髓瘤细胞的状态未达到最佳,PEG 的毒性等。另外在培养过程中观察到,只有在巨噬细胞活跃的培养孔中,才能得到培养上清呈抗体阳性的杂交瘤细胞克隆,饲养细胞在融合中起的作用不可忽视。在得到分泌单克隆抗体的细胞克隆后,可用组织培养法或接种动物体内繁殖法来生产单克隆抗体^[11]。其中接种动物体内繁殖法较组织培养法生产力高出许多,腹水中含有高浓度的单克隆抗体,但它不是纯的单克隆抗体制剂。单克隆抗体的进一步提纯及 Ig 类型的鉴定待今后完成。

由于细菌属细胞类微生物,不仅直接包被效果较差,而且在洗涤过程中易被冲洗掉,降低了检测灵敏度。张晓华等^[12]在包被液中加入 0.5% 甲醛溶液,4 过夜自然晾干后,用 3% 脱脂牛奶封闭。本试验参考童裳亮等^[13]报道的方法将细菌悬液 55 烘干,再用甲醛固定,达到了很好的包被效果。同时每次清洗后,都用含 0.25% 的牛血清白蛋白封闭,并在—抗和二抗中加入了小牛血清,防止非特异性吸附,提高了检测灵敏度;由于抗原不需要包被过夜,大大缩短了整个试验过程所需时间。

作为海洋弧菌三大优势种之一的溶藻弧菌可引发海产鱼、虾、贝类多种疾病的发生。仅就对虾而言,溶藻弧菌是养殖对虾主要细菌性疾病—对虾败血症、红腿病和对虾黑鳃、褐斑综合症的主要病原菌^[14]。作者应用建立的单抗 ELISA 法对 11 份待测菌样本进行了检测,结果显示其中有 4 份样本呈溶藻弧菌阳性。但结果的准确性有待于常规方法的进一步证实。

通过体外免疫获得免疫脾细胞,利用细胞融合技术和细胞克隆技术,制备抗溶藻弧菌的单克隆抗体,并建立单克隆抗体 ELISA 快速检测溶藻弧菌的检测技术,该技术可检测到 $10^4 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$,与其它弧菌无交叉反应。本检测方法简单,灵敏度高,特异性强,并且检测时间短,有很强的实际应用前景。

参考文献:

- [1] Lightner D V. *Vibrio* diseases of shrimps [A]. *Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture* [C], Elsevier: Amsterdam, 1977, 19 - 26.
- [2] 孟庆显. 对虾疾病防治手册[M]. 青岛:青岛海洋大学出版社, 1992.
- [3] Rockey D D, Dungan C F, Lunder T, et al. Monoclonal antibodies against *Aeromonas salmonicida* lipopolysaccharide identify differences among strains[J]. *Dis Aquat Org*, 1991, 10: 115 - 120.
- [4] Song Y L, Lee S P, Lin Y T, et al. Enzyme immunoassay for shrimp vibriosis[J]. *Dis Aquat Org*, 1992, 14: 43 - 50.
- [5] 黄 健, 于 佳, 王秀华, 等. 单克隆抗体酶联免疫技术检测对虾皮下及造血组织坏死病的病原及其传播途径[J]. *海洋水产研究*, 1995, 16(1): 40 - 49.
- [6] 张晓华, 徐怀恕, 许 兵, 等. 中国对虾弧菌病的间接荧光抗体诊断技术研究[J]. *海洋与湖沼*, 1997, 28(6): 604 - 610.
- [7] 薛清刚. 对虾疾病的病理与诊治[M]. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1992: 75 - 84.
- [8] Robertson P A W, Xu H S, Austin B. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of *Vibrio harveyi* in penaeid shrimp and water[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 1998, 34: 31 - 39.
- [9] Espelid S, Holm K O, Hjelmeland K, et al. Monoclonal antibodies against *Vibrio Salmonicida*; the causative agent of coldwater vibriosis (Hitra disease) in Atlantic salmon *Salmon salar* L [J]. *Fish Disease*, 1988, 11(3): 207 - 214.
- [10] Zhan W B, Wang Y H, Fryer J L, et al. Production of Monoclonal antibodies (Mabs) against White Spot Syndroms Virus (WSSV) [J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 1999, 11: 17 - 22.
- [11] 张和君, 许以盛, 石连发, 等. 单克隆抗体及细胞免疫实验技术[M]. 昆明: 云南科技出版社, 1986.
- [12] 张晓华, Robertson P, Austin B, 等. 快速检测副溶血弧菌的间接酶联免疫吸附试验研究[J]. *青岛海洋大学学报*, 1997, 27(3): 327 - 332.
- [13] 童裳亮, 王作云, 周建玲. 杀鲑气单胞菌的快速检测[J]. *动物检疫*, 1993, 10(5): 7 - 8.
- [14] Lee K K, Yu S R, Yang T I, et al. Isolation and characterisation of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased kuruma prawn, *penaeus japonicus* [J]. *Lett. Appl. Microbiol*, 1996, 22: 111 - 114.

欢迎订阅 2002 年《河南水产》

《河南水产》杂志是由河南省水产科学研究所主办的科技期刊。设有实用技术, 试验研究, 经营管理, 综述·专论·调研等 8 个栏目。主要刊登水产养殖、病害防治等实用技术, 传播先进科学养鱼知识, 介绍新品种、新技术引进、推广的成功经验, 面向基层, 服务于生产和科研, 是水产行业干部和群众的良师益友。本刊承办各类广告, 使您以最少的付出, 获得最大的收益。

本刊为季刊, 大 16 开本, 国内统一刊号 CN41-1198/S。每期定价 3.00 元, 全年 12.00 元。读者可通过邮局直接汇款到《河南水产》编辑部, 请写清您的地址和邮编。

联系人: 朱文锦; 电话 0371-3988699

联系地址: 郑州市南阳路北段 170 号付 11 号 河南省水产研究所 《河南水产》编辑部

邮编: 450044

电子信箱: hnsi @public 2. zz. ha. cn