中华鳖对温和气单胞菌体液免疫应答规律的研究

沈锦玉[1] 张志育[2] 钱 冬[1] 刘 闯[1] 尹文林[1]
(1. 浙江省淡水水产研究所, 湖州 313001; 2. 晶美生物工程有限公司, 深圳 518034)

摘要: 从健康中华鳖血清中提取抗体并用 Sephadex 及 DEAE-52 进行了纯化, 再免疫新西兰白兔制备兔抗鳖抗体的抗血清, 纯化后以辣根过氧化物酶(HRP)标记酶标复合物, 方阵滴定法确定酶标复合物的最适稀释度为 1/3200。用温和气单胞菌 TL970424 株制成铝胶佐剂灭活苗免疫健康中华鳖, 经一次免疫和二次免疫后, 分别在不同时间采集血清, 用 ELISA 法测定血清抗体变化规律, 结果表明中华鳖对该菌苗产生良好的体液免疫应答, 免疫后 20d 抗体水平达到高峰, 在测定期间内二次免疫组的抗体水平高于一次免疫组, 表明中华鳖存在着二次免疫应答, 但与哺乳类相比, 中华鳖的二次应答则相对较弱。免疫后 90d 对一次免疫组的鳖进行了攻毒试验, 10d 后免疫鳖 100% 存活, 而非免疫对照组鳖则 100% 死亡, 表明温和气单胞菌 TL970424 株灭活苗免疫效果良好。

关键词: 体液免疫; 中华鳖; 温和气单胞菌
中图分类号: S947.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2003)01-0027-004

本研究用引起鳖病的温和气单胞菌 TL970424 株灭活苗诱导中华鳖产生抗体, 用间接 ELISA 法检测中华鳖血清抗体含量高低来评价该菌的免疫原性及抗体的变化规律, 为制备温和气单胞菌疫苗以及确立疫苗的免疫剂量、免疫途径提供科学论据。ELISA 具有快速、灵敏和特异性强的优点, 能够准确跟踪免疫鳖血清抗体的变化, 对于探索鳖的体液免疫应答规律是较为可靠的检测方法。同时对于快速、准确地诊断鳖病, 为鳖病的免疫防治及免疫学理论的研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 温和气单胞菌灭活苗的制备 温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*) TL970424 株由本实验室分离鉴定。将菌种按 1% 接种量接种于普通肉汤培养基, 摇床培养, 28℃, 140r/min, 培养 24h。比浊法测定细菌浓度为 6×10^9 个/mL。在培养 24h 的细菌培养物中加入福尔马林, 使其终浓度为 3.5%, 置 30℃作用 24h。将菌液 4000r/min 离心 30min, 加入氢氧化铝胶(浓度 1%, 南京药械厂生产), 使菌苗浓度为 6×10^9 个/mL。

1.2 中华鳖的免疫 体重150g左右的健康中华鳖(*Trionyx Sinensis* Wiegmann) 220 只由绍兴东浦中华鳖养殖场提供, 饲养在 $10m^2$ 的温室水泥池中, 水温 31℃。实验分 3 组, 分别为对照组 20 只, 一次免疫组 100 只和二次免疫组 100 只。一次免疫组和二次免疫组的中华鳖后肢肌肉注射温和气单胞菌灭活苗, 0.3mL/只, 对照组注射灭菌生理盐水。20d 后, 二次免疫组的中华鳖以同样剂量进行加强免疫。分别在免疫前、免疫后 10d、20d、30d、40d、50d、60d、90d 心脏采血, 每次每组采 4 只, 1.0mL/只, 分离血清后, 置 −20℃的冰箱中冻存。

1.3 鳖抗体的纯化 取10mL中华鳖血清, 用 10mL 生理盐水稀释, 在磁力搅拌器上缓慢滴加 pH7.2 的饱和硫酸铵 20mL(终饱和度为 50%), 加完后, 继续搅拌 10min, 4℃冰箱中静置 3h。4000r/min 离心 30min, 弃上清, 沉淀溶解于 20mL 的生理盐水中, 按上述方法加入饱和硫酸铵 10mL(终饱和度为 33.3%), 4℃冰箱中静置 3h。4000r/min 离心 30min, 取沉淀再用 33.3% 饱和度的硫酸铵提取一次。最后一次沉淀用少量生理盐水溶解, 先对蒸馏水透析 12h, 换液 2 次, 再对生理盐水透析, 即得抗体粗品。

收稿日期: 2002-04-30; 修订日期: 2002-07-20
基金项目: 浙江省自然科学基金(399439)资助项目
作者简介: 沈锦玉(1963—), 女, 浙江省湖州市人; 副研究员; 主要从事水生动物病害研究。E-mail: zjfdlab@mail.huptt.zj.cn. 沈智华和曹铮进行部分实验, 张念慈和于涟教授对本研究提供了有益建议, 特此表示感谢

用Sephadex G-200对抗体粗品进行层析,以0.05mol/L PBS(pH7.4)为洗脱液,流速4mL/15min,收集含抗体部分的洗脱液。再用阴离子交换剂DEAE-52进一步纯化,先用0.05mol/L PBS(pH8.0)为洗脱液,然后用0.015mol/L PBS(pH8.0)+0.5mol/L NaCl进行洗脱,流速0.25mL/min,收集含抗体部分的洗脱液。

1.4 兔抗鳖抗血清的制备 将纯化的鳖抗体与弗氏完全佐剂混匀,按照于涟的混合免疫法[1],首次在兔两后足皮下肌注入0.5mL中华鳖抗体—弗氏完全佐剂乳剂。两周后,在两侧后肢肿大的淋巴结内各注入0.5mL乳剂。第二周末耳静脉采血1.0mL/只,琼脂扩散试验测抗体效价,效价为1∶32。心脏采血,分离血清,分装后置-20℃冻存。

1.5 兔抗鳖抗血清的提取 将效价为1∶32的兔抗鳖的抗血清,按上述1.3方法进行纯化,最后的蛋白溶液用PEG—6000浓缩至10mg/mL。

1.6 酶标兔抗鳖抗血清的制备及最适浓度 按照王世若的方法[2],制备酶—抗体结合物。在751型分光光度计上分别测定OD_{430}和OD_{280}值,并计算出酶与抗体摩尔比和酶结合率。并用不同浓度中华鳖抗体从1∶200对倍稀释到1∶25 600及不同浓度的酶复合物从1∶400对倍稀释到1∶12 800,在酶标仪上测λ=490nm时的OD值。

1.7 温和气单胞菌**ELISA**抗原的制备 将培养的温和气单胞菌4 000r/min离心30min,取菌体加少量生理盐水悬浮,超声波破碎菌体。在输出功率350w,3s/time,2s/interval的条件下,处理40次制备全菌抗原,在751型分光光度计上测其OD280和OD260,Lowry—kalokar计算蛋白浓度为4.0mg/mL。将测定好的全菌抗原以1mL/管分装于Eppendorf管中,置-20℃冰箱中冻存。

1.8 **ELISA**法测中华鳖免疫后血清中抗体变化 用间接ELISA法[3]对上述1.2中待检鳖血清进行检测。在最适工作条件下,每个样品设2个重复,波长490nm处测定OD值,每次测定设阳性血清、阴性血清及空白对照孔。

1.9 攻毒试验 实验组:免疫后90d的一次免疫组鳖10只,体重500g左右。对照组:非免疫健康鳖10只,体重500g左右。攻毒用菌株:温和气单胞菌TL970424株,28℃培养24h,4000r/min离心30min收集菌体,加灭菌生理盐水,使细菌浓度为1×10^8个/mL。实验组每只鳖腹腔注射温和气单胞菌活菌液0.3mL,对照组每只鳖腹腔注射灭菌生理盐水0.3mL,分别放入暂养池中观察10d。

2 结果

2.1 中华鳖血清抗体的纯化 用硫酸铵沉淀制备的鳖血清抗体粗品,再经Sephadex G-200进一步纯化,结果见图1。用凝集试验测到第一个峰中含有抗体,其他峰不存在抗体。为进一步纯化抗体,对第一峰再经过DEAE-52阴离子交换层析,结果见图2。用凝集试验法测到抗体在第二个峰中。

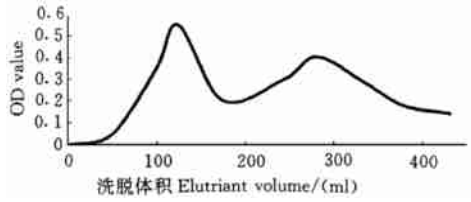

图1 鳖血清抗体的sephadex G-200的层析图

Fig. 1 Chromatogram of soft-shelled turtle anti-serum from sephadex G-200 column

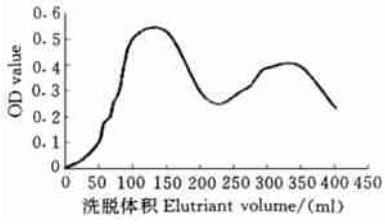

图2 鳖血清抗体用阴离子交换剂进一步纯化

Fig. 2 Chromatogram of anti serum purified with anion exchange reagent column

2.2 酶标兔抗鳖抗血清制备及最适浓度 酶复合物4倍稀释的OD_{403}和OD_{280}值为:$OD_{403}=0.596$,$OD_{280}=1.310$

复合物中HRP浓度(mg/mL)=$OD_{403}\times0.4\times$稀释倍数=$0.569\times0.4\times4=0.910$mg/mL

复合物中兔抗鳖γ球蛋白的浓度(mg/mL)=$(OD_{280}-OD_{403}\times0.3)\times0.62\times$稀释倍数=$(1.310-0.569\times0.3)\times0.62\times4=2.82$mg/mL

$$\text{酶/抗体(mol/L比)}=\frac{\text{HRP浓度}\times4}{\text{IgG浓度}}=\frac{0.910\times4}{2.82}=1.3$$

$$\text{酶结合率}=\frac{\text{复合物中酶量}}{\text{加入的酶量}}=\frac{0.910\times5}{10}=45.5\%$$

不同稀释度酶复合物与鳖抗体的结合效率如图3所示,当酶复合物稀释度为1∶3200时,鳖抗体上下两个稀释度的OD值差异最大,此时的浓度最灵敏,因此取1∶3200酶复合物的稀释度作为最适工作浓度。

2.3 中华鳖免疫后血清中抗体变化 免疫后10d,即从鳖血清中检测到抗温和气单胞菌抗体,免疫后20d,抗体水平达到高峰,此后缓慢下降,至90d时抗

体仍维持在较高水平, 且二次免疫组抗体水平高于一次免疫组(图 4) 。

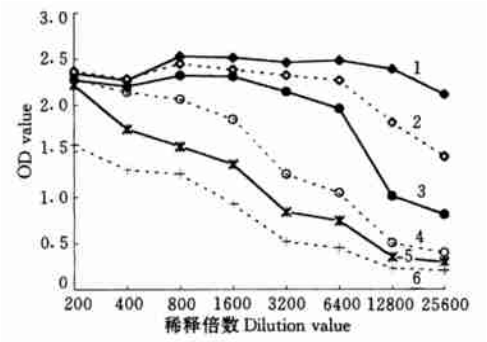

图 3　不同稀释度酶复合物与鳖抗体的结合效率

Fig. 3　Binding efficacy of enzyme complex at different dilutionled coupled to turtle antibody

1—6 分别代表 400×; 800×; 1600×; 3200×; 6400×; 1200×

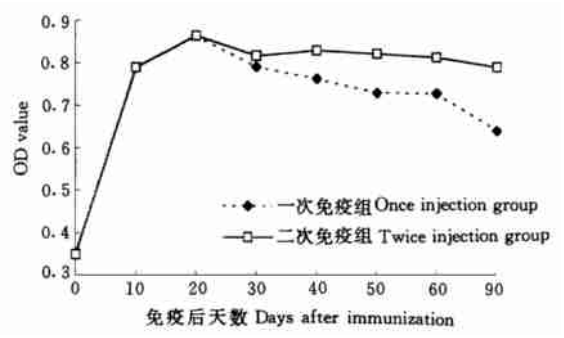

图 4　一次免疫组与二次免疫组抗体变化规律

Fig. 4　Variation of antibody level between once injection group and twice injection group

2. 4　攻毒试验　攻毒后3d对照组即开始发病, 从第 4d 开始陆续出现死亡, 发病鳖呈现典型穿孔病症状, 病鳖的体表出现灰白色疖疮。到第 10d, 对照组已全部发生死亡, 而试验组无一发病(表 1) 。

表 **1**　攻毒试验结果

Tab. 1　Result of challenge test

攻毒后天数 Day after treatment	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	死亡率 Mortality
试验组 Treatment	0/ 10	0/ 10	0/ 10	0/10	0/ 10	0/ 10	0/ 10	0/ 10	0/10	0/ 10	0%
对照组 Control	0/ 10	0/ 10	0/ 10	3/10	5/ 10	7/ 10	8/ 10	9/ 10	9/10	10/ 10	100%

3　讨论

3. 1　关于酶标二抗　据报道, 用于 ELISA 的酶复合物, 酶量为400μg/ mL时效果一般, 500μg/ mL 时效果较好, 达 1 000μg/ mL 时效果最为满意; 复合物中酶与抗体的摩尔比为 0. 7 时效果一般, 1. 0 时效果较好, 1. 5—2. 0 时效果最好; 酶结合率为 7% 时效果一般, 9% —10% 时效果较好, 30% 以上时效果最好[3]。本试验用改良过碘酸钠法制作的酶标二抗, 酶含量为910μg/ mL, 酶与抗体摩尔比为 1. 3, 酶结合率为 45. 5%, 标记效果很好。

3. 2　关于中华鳖对温和气单胞菌灭活苗的抗体应答规律　中华鳖能对温和气单胞菌灭活苗产生良好的体液免疫应答, 首免后10d就产生较高水平的抗体, 而且持续时间很长, 到免疫后 90d 仍能保持较高的抗体水平, 并能对温和气单胞菌的攻击提供100%的保护, 表明中华鳖具有较强的体液免疫应答。关于龟鳖类是否存在二次应答, 应答规律如何, 不同作者由于试验材料、试验条件以及选择的抗原、免疫方法的不同, 所得出的结论也不尽相同, 有的检测到了二次应答[4—6], 有的检测不到[7,8]。据杨先乐报道, 中华鳖对多种抗原的刺激都能产生较好的特异性抗体, 其免疫应答的强弱与抗原种类、免疫途径和环境条件的不同有关, 也与鳖的体重、年龄及营养状况有关[9]。本试验在首免后 20d 加强免疫, 在检测的 90d 内, 二次免疫组比一次免疫组产生的抗体量要高, 可能存在二次应答, 但与哺乳类的二次应答表现为加强免疫后抗体量迅速急剧的升高相比, 中华鳖的二次应答相对比较微弱。

3. 3　温和气单胞菌灭活苗的免疫效果　有关温和气单胞菌引起水产动物疾病的已有报道。在鱼类, 孙其焕[10]报道过温和气单胞菌引起异育银鲫溶血性腹水病。在鳖类, 沈锦玉等报道了由温和气单胞菌引起鳖的肠道出血性败血症、穿孔病、腐皮病、红底板病, 孙佩芳等报道了由温和气单胞菌引起鳖的腐皮病, 孙红祥等报道了由温和气单胞菌引起鳖的溶血性腹水病。本试验中所用温和气单胞菌 TL970424 分离自临床上呈现典型穿孔病症状的病

鳖,此菌株毒力较强,用 1×10^8 个/mL 的活菌攻击,受试鳖死亡率 100%。用此菌株制备的福尔马林铝胶佐剂灭活菌苗,在浓度为 6×10^9 个/mL 时,对 3 两左右的鳖后肢肌肉注射 0.3mL/只,可诱导鳖产生较高的抗体水平,20d 加强免疫后可诱导鳖产生二次免疫应答,且抗体持续时间较长,在免疫后 90d 仍能对同源菌株的攻击产生 100%的保护。从鳖免疫后抗体变化规律及攻毒试验结果看,两者较吻合,此菌苗免疫效果好,可建议推广应用。

参考文献:

[1] Yu L, Technique of Immunology [M]. HangZhou: Zhejiang University Press, 1992. [于涟. 免疫学实验技术. 杭州: 浙江大学出版社, 1992]

[2] Wang S R. Modern Animal Immunology [M]. Jielin: Jielin Science and Technology Press. 1996. [王世若. 现代动物免疫学. 长春: 吉林科学技术出版社, 1996]

[3] Xu Y W. Detecting Technique of Immunology(second edition) [M]. Beijing: Science Press. 1997. [徐宜为. 免疫检测技术[M]. 北京: 科学出版社, 1997]

[4] Yang X L, Zhou J G, Chai W Q, et al. Studien on the memory immune response of soft-shelled turtle to T3 bacterin [J]. *J. of Aquaculture*, 2000, **24**(2): 156—160. [杨先乐, 周剑光, 蔡完其等. 中华鳖对 T3 菌苗的回忆应答[J]. 水产学报, 2002, **24**(2): 156—160]

[5] Grey H M. Phylogeny of the immune response. Studies on some physical, chemical and serological characteristics of antibody production in Turtles[J]. *J Immunol*, 1963, **91**: 819—825

[6] Chartrand S L. The evolution of the immune response-The immunoglobulins of the Turtles. Molecular requirements for biologic activity of the 5.7S immunoglobulin[J]. *J Immunol*, 1971, **107**: 1—11

[7] Maung H T. Immunity in the tortoise, Testudo ibera[J]. *J Pathol Bacteriol*, 1963, **85**: 51—66

[8] Jian J C, Wu T T, Yang H et al. Prielimary studies of humoral immune response of soft-shelled turtle[J]. *J. of Fishery Science of China*, 1998, **5**(4): 6—10. [简纪常, 吴婷婷, 杨弘, 等. 中华鳖体液免疫应答的初步研究. 中国水产科学, 1998, **5**(4): 6—10]

[9] Yang Xianle, J G Zhou, X H Ei, et al. Studies on effect of weight, age, nutrion of sotf shelled turtle to immune response [J]. *J. of Aquaculture*, 1999, **24**(4): 375—380. [杨先乐, 周剑光, 艾晓辉等. 鳖的体重、年龄及营养状况对中华鳖免疫应答的影响. 水产学报, 1999, **24**(4) 375—380]

[10] Sun Qihuan, Sun Peifang, Jin Lihua et al. On the Pathogen Bacteria of the Hemolytic Ascitesosis of Allogynogenetic Crucian Carp[J]. *J. of Aquaculture*, 1991, **15**(2): 130—139. [孙其焕, 孙佩芳, 金丽华, 等. 异育银鲫溶血性腹水病病原的研究. 水产学报, 1991, **15**(2): 130—139]

STUDIES ON HUMORAL IMMUNE RESPONSE OF *TRIONYX SINENSIS* TO *AEROMONAS SOBRIA* INACTIVED VACCINE

SHEN Jin-yu[1], ZHANG Zhi-yu[2], QIAN Dong[1], LIU Wen[1] and YIN Wen-lin[1]

(1. Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001; 2. Jingmei Biotech Co. Ltd., Shenzhen 518034)

Abstract: An enzyme linked immunosorbent assay(ELISA) for detection of *Aeromonas sobria (As)* antibody in Chinese soft-shelled turtle (*Trionyx sinensis*, Ts) was developed. Chinese soft-shelled turtle antibody was purified by sephadex and DEAE-52. Then inoculated into the New Zealand white rabbit with Freund complete adjuvant. Rabbit anti-turtle IgG was also purified and coagulated with Horseradish peroxidase(HRP). It was determined by square titration method that a dilution of 1∶3200 of this enzyme complex was optimal in terms of test sensitivity. Immune serum was collected at different time after the turtles were immunized with *Aeromonas sobria*(As)-TL970424 inactived vaccine once or twice. ELISA methods were applied to detecting the change of antibody in serum. The result indicated that Chinese soft-shelled turtle could mount good humoral immune response as well as the second immune response to As inactived vaccine. However this second immune response is weak when compared to that of mammals. Challenge test was carried out 90 days after immunization. No mortality was recorded with turtles injected once whereas there was 100% mortality from group of non-immunized turtles. This result indicated that As inactived vaccine was effective in protecting immunized turtles from attack of this bacteria within 3 monthes post immunization.

Key words: Humoral immune; *Trionyx sinensis*; *Aeromonas sobria*