

用低龄动物制备高效价 *Et* 免疫血清的探讨

朱壮春¹, 陈阳¹, 郝东升², 王艳茹¹, 马玉妹¹, 曹向可¹, 穆良良¹, 李金坤¹, 史相国³ (1. 华北煤炭医学院生物科学系, 河北唐山 063000; 2. 华北煤炭医学院附属医院, 河北唐山 063000; 3. 河北省唐山陡河水库管理处, 河北唐山 063000)

摘要 [目的] 建立一种用低龄日本大耳白兔制备高效价迟钝爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*, *Et*)免疫血清的方法。[方法] 先制备迟钝爱德华氏菌(*Et*)抗原。用日本大耳白兔作免疫动物, 分2组试验, 一组是2月龄(T组), 另一组是6月龄(S组)。采取耳缘静脉注射的方法, 小剂量连续多次免疫日本大耳白兔, 免疫后, 收集免疫血清, 然后用微量凝集反应法测定免疫血清抗体效价。[结果] 凝集反应显示, 在免疫剂量相同的情况下, 第1次试血测 *Et* 免疫血清效价, S组的血清效价比T组的血清效价高, 但在第2次试血测 *Et* 免疫血清效价时T组的血清效价与S组的血清效价一致。[结论] 试验中所采用的T组动物(日本大耳白兔)月龄较小, 免疫后仍产生了与S组一致的高效价抗血清, 说明用低龄日本大耳白兔制备高效价 *Et* 免疫血清的方法可行。

关键词 迟钝爱德华氏菌; 免疫; 免疫血清; 日本大耳白兔

中图分类号 S852.5 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)34-16861-02

Research on Preparation of High Titer *Et* Immune Serum by Low Age Animals

ZHU Zhuang-chun et al (Biology Science Department, North China Coal Medical College, Tangshan, Hebei 063000)

Abstract [Objective] The study aimed to establish an approach that prepared high titer *Et* immune serum by low age Japanese rabbits. [Method] Antigen of *Et* was prepared at first, taking Japanese rabbits as immunized animal, dividing two groups of experiments, one is two-month-old group (T group), another is six-month-old group (S group). Using auricular intravenous method, Japanese rabbits were continuously immunized with low-dose, then collecting immune sera. Immune serum antibody titer was determined with micro-agglutination reaction method. [Result] Agglutination reaction showed that the *Et* serum titer of S group is higher than the T in the first testing with the same dose. But in the second testing, the serum titer of the T group and S group was consistent. [Conclusion] The animals in the T group (Japanese rabbits) have smaller months, and produced high titer antiserum was consistent with S group, which indicated that the method of preparation of high titer *Et* immune serum by low age Japanese rabbits was feasible.

Key words *Edwardsiella tarda*; Immunity; Immune serum; Japanese rabbit

在水产养殖业中, 迟钝爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*, *Et*)是引起一些淡、海水养殖鱼类大批、快速死亡的一种主要病原菌, 在世界不少国家和地区均有由该菌引起水产养殖动物病害的不同程度发生与流行, 且损失严重^[1-3]。在我国, 牙鲆养殖近年来发展迅速, 经济效益十分显著。但病害问题十分突出, 其中, 由迟钝爱德华氏菌引起的感染症是使牙鲆养殖遭受严重损失的病害之一^[4]。2003~2004年, 笔者在对唐山沿海牙鲆工厂化养殖场的病害研究中, 对5起牙鲆腹水病进行了全面研究, 发现所有病例均由迟钝爱德华氏菌单独感染引起, 说明迟钝爱德华氏菌是引起牙鲆腹水病的主要病原^[5]。该研究旨在建立一种用低龄日本大耳白兔制备高效价迟钝爱德华氏菌免疫血清的方法, 为该病菌引起的鱼类感染性疾病的诊断和治疗奠定基础。

1 材料与方

1.1 材料 供试迟钝爱德华氏菌2个菌株(TH030908-5、LN031012-8)是笔者2003~2004年从河北唐山沿海牙鲆养殖场爆发牙鲆腹水病病鱼体内分离, 并经过鉴定的代表株^[5]。供试2月龄和6月龄雄性日本大耳白兔来自北京维通利华实验动物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 动物饲养。将供试日本大耳兔单只分笼饲养于屏障环境动物实验室, 饲喂北京科澳协力饲料有限公司的家兔全价颗粒饲料。免疫前7 d, 观察动物的各种生理性状, 记录生理指标与参考指标进行对照, 以评价动物是否符合试验

标准。

1.2.2 抗原制备和抗原灭活鉴定。用接种环取 *Et* 涂布于扩培细菌的LB培养基上, 37℃, 过夜。在超净工作台内, 用PBS(0.1 mol/L, pH值7.4)将培养基上的细菌用棉签轻轻洗脱下来, 收集于锥形瓶中。4℃下, 4 000 r/min离心20 min, 弃上清, 将离心管中细菌用PBS(0.1 mol/L, pH值7.4)洗脱后, 收集于100 ml锥形瓶中。采用麦氏比浊法^[6], 确定 *Et* 菌液的浓度, 然后加入0.5%甲醛PBS(0.1 mol/L, pH值7.4)调整菌液浓度为 1.8×10^9 个/ml, 锥形瓶置于37℃恒温水浴箱中18 h。

无菌条件下, 取100 μl 灭活的菌液划线培养于LB培养基上, 37℃恒温培养48 h, 观察有无细菌生长。

1.2.3 天然抗体的检测。免疫前7 d, 每只大耳白兔通过耳缘静脉采血2.0 ml, 分装于一次性试管中。置37℃水浴箱中30 min, 然后4 000 r/min离心20 min, 取血清。对每只大耳白兔的血清分别进行玻片凝集试验。

1.2.4 免疫血清的制备。取出4℃保存的 *Et* 抗原保存液, 摇匀。在超净工作台内, 用微量移液器吸取1 ml 菌悬液装入1.5 ml Ep管中, 4 000 r/min离心5 min。用微量移液器弃上清, 补生理盐水至1 ml 刻度, 混匀, 即可除去保存液中的甲醛, 成为免疫注射用应用液。若欲增加菌浓度, 只需根据要求重复上述步骤而保持最终菌液体积不变即可。

采用的免疫途径是耳缘静脉注射, 具体免疫方案见表1。

1.2.5 测定免疫血清抗体效价。在微量反应板纵向12个孔中, 分别加入PBS(0.1 mol/L, pH值7.4)25 μl, 之后在第1孔中再加入待测血清25 μl, 充分混合后, 取出25 μl 加入第2孔, 混合后再取25 μl 加入第3孔, 如此倍比稀释至第11孔, 第12孔不稀释作为对照, 纵向各孔再加入甲醛灭活的迟

基金项目 唐山市科技局科技攻关项目(06125401A-3)。

作者简介 朱壮春(1963-), 男, 山西朔州人, 高级实验师, 从事水产动物营养与病害研究。E-mail: zhzchun@126.com。

收稿日期 2009-07-28

钝爱德华氏菌液 (1×10^9 个/ml) 25 μ l, 置 37 $^{\circ}$ C 湿盒过夜后观察结果。根据待测血清的份数, 选择纵向孔的列数。

1.2.6 第 1 次试血, 测定抗体效价。第 6 次 (表 1 中第 33 天) 免疫后第 7 天, 进行第 1 次试血, 采用 1:20 抗血清, 用微量反应板采用凝集反应测抗血清效价。

表 1 免疫方案

Table 1 Immunization program

免疫时间 Immunization time	免疫途径 Immune way	免疫剂量/ml Immunization dose	Et 浓度 $\times 10^9$ 个/ml Concentration of Et
第 1 天 1 st day	耳缘静脉 Ear vein	0.2	1.8
第 7 天 7 th day	耳缘静脉 Ear vein	0.2	3.6
第 14 天 14 th day	耳缘静脉 Ear vein	0.25	3.6
第 21 天 21 st day	耳缘静脉 Ear vein	0.2	7.2
第 27 天 27 th day	耳缘静脉 Ear vein	0.25	7.2
第 33 天 33 rd day	耳缘静脉 Ear vein	0.3	7.2
第 41 天 41 st day	耳缘静脉 Ear vein	0.4	7.2

1.2.7 加强免疫。耳缘静脉注射, 菌浓度为 7.2×10^9 个/ml, 注射剂量为 0.4 ml (表 1 中第 41 天)。

1.2.8 第 2 次试血, 测定抗体效价。加强免疫后第 8 天 (表 1 中第 41 天), 进行第 2 次试血, 采用 1:40 抗血清, 用微量反应板采用凝集反应测抗血清效价。

2 结果与分析

2.1 抗原灭活鉴定 无菌条件下, 取灭活的菌液划线培养于固体培养基上, 37 $^{\circ}$ C 恒温培养 48 h, 无细菌生长。说明 PBS (0.1 mol/L, pH 值 7.4) 菌液 (1.8×10^9 个/ml) 加甲醛 (0.5%) 后, 经 37 $^{\circ}$ C 恒温水浴 18 h 灭活, 已无活菌存留, 抗原灭活效果良好, 可用于动物免疫。

2.2 天然抗体检测 试验结果表明, 免疫前 2 组日本大耳白兔血清与 Et 的玻片凝集反应结果均为阴性。说明 2 组试验动物均无天然 Et 抗体, 可用于制备 Et 免疫血清试验。

2.3 第 1 次试血测 Et 免疫血清效价 由表 2 可知, 2 月龄组 T₂ 血清效价最高为 1:640, 6 月龄组 S₁、S₂ 和 S₄ 血清效价均达 1:1280。说明第 1 次试血 2 月龄组的体液免疫应答反应弱于 6 月龄组。

表 2 第 1 次试血测 Et 免疫血清效价

Table 2 The first measured Et immune serum titer

免疫动物 Immune animals	稀释度 Dilution							
	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120
T ₁	P	P	P	P	N	N	N	N
T ₂	P	P	P	P	P	N	N	N
T ₃	P	P	P	P	N	N	N	N
T ₄	P	P	P	P	N	N	N	N
S ₁	P	P	P	P	P	P	N	N
S ₂	P	P	P	P	P	P	N	N
S ₃	P	P	P	P	P	N	N	N
S ₄	P	P	P	P	P	P	N	N

注: P 为在此稀释度时出现阳性凝集反应, N 为阴性。

Note: P appears in agglutination positive at this dilution, and N is negative.

2.4 第 2 次试血测 Et 免疫血清效价 由表 3 可见, 2 月龄组的 T₁、T₂、T₃ 和 6 月龄组的 S₁、S₂、S₄ 免疫血清效价均高达 1:5120。表明在加强免疫接受相同剂量 Et 抗原刺激后, 2 月

龄组和 6 月龄组的体液免疫应答反应已趋相同。

表 3 第 2 次试血测 Et 免疫血清效价

Table 3 The second measured Et immune serum titer

免疫动物 Immune animals	稀释度 Dilution							
	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	1:10240
T ₁	P	P	P	P	P	P	P	N
T ₂	P	P	P	P	P	P	P	N
T ₃	P	P	P	P	P	P	P	N
T ₄	P	P	P	P	P	P	N	N
S ₁	P	P	P	P	P	P	P	N
S ₂	P	P	P	P	P	P	P	N
S ₃	P	P	P	P	P	P	N	N
S ₄	P	P	P	P	P	P	P	N

注: P 为在此稀释度时出现阳性凝集反应, N 为阴性。

Note: P appears in agglutination positive at this dilution, and N is negative.

3 讨论

兔子性情温顺, 抗原刺激机体后, 体液免疫应答反应强烈, 故被广泛用于制备高效价的特异性强的免疫血清。一般选择月龄 6 个月以上, 个体健壮、无感染的雄性兔子, 作为免疫动物。月龄太小的个体, 容易产生免疫耐受性; 月龄太大或营养不良的个体, 则免疫功能低下, 不易产生高效价的抗体^[7-9]。为探讨用低龄动物制备高效价 Et 免疫血清的方法和效果, 该研究选用日本大耳白兔, 分 2 月龄组 (幼年组) 和 6 月龄组 (成年组), 低浓度免疫注射, 第 1 次试血测 Et 免疫血清效价, 2 月龄组 T₂ 血清效价最高为 1:640, 6 月龄组 S₁、S₂ 和 S₄ 血清效价均达 1:1280, 显示 6 月龄组的体液免疫应答反应强于 2 月龄组; 经继续免疫 8 d 后, 第 2 次试血测 Et 免疫血清效价可见, 2 月龄组的 T₁、T₂、T₃ 和 6 月龄组的 S₁、S₂、S₄ 免疫血清效价一样, 均高达 1:5120。表明, 此时在接受相同剂量 Et 抗原刺激后, 2 月龄组和 6 月龄组的体液免疫应答反应已趋相同。从而说明, 用低龄动物制备高效价 Et 免疫血清是可行的。

免疫原的注射剂量应考虑其抗原性的强弱、分子量大小、动物的个体状态和免疫时间。抗原分子必须具备一定的相对分子质量和结构, 分子越小在进入机体后越容易被排除, 抗原须纯化, 且具备一定的浓度, 才有可能制备出高效价的特异性抗血清。赵香汝等研究表明, 在一定范围内抗原的用量越大, 所产生的效价越高, 但是剂量过高反而会产生免疫抑制, 导致抗体的效价显著降低^[10]。初次免疫, 静脉注射菌液量大多在 1 ml (菌液浓度 1×10^{10} 个/ml) 左右^[11]。该试验探讨用低龄动物制备高效价 Et 免疫血清, 考虑动物月龄小, 为防止产生免疫耐受性, 静脉注射细菌数比通常用量少, 初次免疫, 静注菌液 0.2 ml (菌液浓度 1.8×10^9 个/ml)。

免疫间隔时间也是重要因素, 间隔时间短, 起不到再次免疫的作用; 太长, 则免疫时间长, 影响血清的特异性。第 1 次免疫后, 因动物机体正处于识别抗原和 B 细胞增殖阶段, 如很快接着第 2 次注入抗原, 极易造成免疫抑制。细菌性抗原, 一般间隔 3~4 d^[11]。该试验中, 考虑到动物较小, 因而确定免疫间隔为 6~8 d。

抗原注射途径可根据不同抗原及试验要求, 选用皮内、

(下转第 16896 页)

2.4 生理生化反应 将 6 株致病菌株和 HS028 菌株分别接种培养,发现其生理生化反应较一致(表 1):MR、VP 试验呈

阴性,可还原硝酸盐,产氨但不产硫化氢,不能利用淀粉、液化明胶,不产生吲哚,氧化酶和接触酶反应呈阳性。

表 1 致病菌株的生理生化反应试验结果

Table 1 Physiological and biological tests reaction test results of pathogenic strain

菌株 Strain	MR 试验 MR test	VP 试验 VP test	硝酸盐还原 Nitrate reduction	氨产生 Ammonia production	硫化氢产生 H ₂ S production	明胶液化 Gelatine liquefaction	吲哚产生 Indole production	淀粉水解 Starch hydrolyzation	氧化酶 Oxidase	接触酶 Contact enzyme	石蕊牛乳反应 Litmusmilk reaction
QS2	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	脓化
QS6	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	脓化
QS7	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	脓化
QS10	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	脓化
QS14	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	脓化
QS15	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	脓化

2.5 生物型鉴定 试验中 6 株致病性菌株均能利用甘露醇、山梨醇和甜醇,但不能利用麦芽糖、乳糖和纤维二糖(表 2),按照 Hayward 的分型标准,可确定其生物型为 IV 型。

表 2 致病性菌株对三糖和三醇的利用情况

Table 2 Situation of utilizing carbohydrate and other compounds by the pathogenic strain

菌株 Strain	麦芽糖 lactose	乳糖 Maltose	纤维二糖 Cellobiose	甘露醇 Mannitol	山梨醇 Sorbiol	甜醇 Melampyrite	生物型 Biotype
QS2	-	-	-	+	+	+	VI
QS6	-	-	-	+	+	+	VI
QS7	-	-	-	+	+	+	VI
QS10	-	-	-	+	+	+	VI
QS14	-	-	-	+	+	+	VI
QS15	-	-	-	+	+	+	VI

3 结论与讨论

(1)该试验结果表明,从潜山县生姜瘟病病株中分离到的 16 株菌株中有 6 株菌株可致病,且致病症状与姜瘟病病症一致;其培养性状、染色及生理生化反应与已知青枯罗尔氏菌(*Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi, et al)的相应性状相同。据此,可初步确定潜山县生姜瘟病的病原体为青枯罗尔氏菌。这与承河元等的研究结果一致^[1,3]。

(2)根据 Hayward 的分型标准和三糖三醇利用试验,确定感染潜山生姜并致瘟病的青枯罗尔氏菌全部为生物 VI 型。这与承河元^[2]、陈莉等^[3]的研究结果不同。其原因可能是:①潜山县五庙乡处于大别山深处,气候(如气温、光照和降水量等)和土壤条件与承河元^[2]、陈莉等^[3]的研究存在较大差异;②近年来,潜山县姜农改变了过去传统的耕作方式,所有姜田均采用隔 3 年轮作。但生姜生理和进化方面的原因还有待于进一步研究。

参考文献

[1] 承河元,徐晓明,黄慧琴,等.安徽省姜瘟病菌鉴定[J].安徽农学院学报,1988(1):34-40.
 [2] 承河元.安徽省姜青枯假单胞菌生物型鉴定初报[J].安徽农业科学,1992,20(3):276-277.
 [3] 陈莉,高智谋,杨自保,等.安徽省姜瘟病原细菌鉴定及有效药剂筛选[J].安徽农业科学,2007,35(18):5479,5516.
 [4] 沈萍,陈向东.微生物学实验[M].北京:高等教育出版社,2007.
 [5] 刘小阳,徐德聪,李红侠.潜山生姜脱毒种姜快繁体系的建立[J].安徽农业科学,2009,37(32):15699-15700.
 [6] 袁红莉.农业微生物学及实验指导[M].北京:中国农业大学出版社,2009.
 [7] 任欣正.植物病原细菌的分类与鉴定[M].北京:中国农业出版社,1994.
 [8] HAYWARD A C. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*[J]. Appl Bact,1964,27:265-277.

(上接第 16862 页)

皮下、肌肉、静脉或淋巴结内等不同途径注入抗原进行免疫。颗粒性抗原如细菌、红细胞等,通常不用佐剂注射途径,一般以静脉注射产生抗体为好。该试验中所采用的抗原为全菌颗粒性抗原,所采用的免疫途径为耳缘静脉注射。

参考文献

[1] CASTRO N, TORANZO A E, BARJA J L, et al. Characterization of *Edwardsiella tarda* strains isolated from turbot, *Psetta maxima*[J]. Journal of Fish Diseases, 2006, 29(7):541-547.
 [2] WAKABAYASHI H, EGUSA S. *Edwardsiella tarda* associated with pond-culture eel disease[J]. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 1973,39(9):931-936.
 [3] PANANGALA V S, VAN SANTEN V L, SHOEMAKER C A, et al. Analysis of 16S-23S intergenic spacer regions of the rRNA operons in *Edwardsiella ictaluri* and *Edwardsiella tarda* isolates from fish[J]. Journal of Ap-

plied Microbiology, 2005, 99(8):657-669.
 [4] 张晓君,战文斌,陈翠珍,等.牙鲈迟钝爱德华氏菌感染症及其病原的研究[J].水生生物学报,2005,29(1):31-37.
 [5] 朱壮春,史相国,张淑杰,等.牙鲈腹水病病原研究[J].水产科学,2006,25(7):325-329.
 [6] J F 麦克法丁.医学细菌生化试验鉴定手册[M].北京:人民卫生出版社,1985:375-376.
 [7] 冯仁青,郭振泉,宓捷波.现代抗体技术及其应用[M].北京:北京大学出版社,2006:51-54.
 [8] 管远志,王艾琳,李坚.医学微生物学实验技术[M].北京:化学工业出版社,2006:174-179.
 [9] 王廷华,李官成,周欣福.抗体理论与技术[M].北京:科学出版社,2005:80-87.
 [10] 赵香汝,徐彤,靳喜鹏,等.接种不同剂量的新城疫疫苗对鸡免疫应答的影响[J].中国兽医杂志,2005,41(7):17-19.
 [11] 杜玉萍.四种常见食物中毒病菌胶体金免疫渗滤法快速诊断的初步研究[D].广州:第一军医大学,2006:8-10.