

文章编号: 1004 - 7271(2008)03 - 0274 - 06

抗哈维氏弧菌脂多糖单克隆抗体的制备及其鉴定

郝贵杰, 沈锦玉, 潘晓义, 曹 铮, 尹文林

(浙江省淡水水产研究所, 浙江 湖州 313001)

摘 要:以哈维氏弧菌 GYC1108 - 1 细菌颗粒性抗原免疫 8 周龄雌性 BALB/c 小鼠, 5 次免疫后取其脾细胞与 SP2/0 - Ag - 14 骨髓瘤细胞融合。用间接酶联免疫吸附试验 (ELISA) 对杂交瘤进行筛选, 阳性克隆经 3 次亚克隆后, 获得一株针对 GYC1108 - 1 脂多糖 (LPS) 的特异性单克隆抗体, 命名为 2 F 9。该株单抗细胞培养上清 ELISA 效价为 1:1 600, 腹水效价为 6.4×10^4 , 交叉反应结果表明 2 F 9 除了与测试的多株哈维氏弧菌发生免疫识别外, 还与溶藻弧菌、麦氏弧菌和副溶血弧菌代表株发生免疫交叉反应, 但不与拟态弧菌、鳃弧菌、嗜水气单胞菌代表株等发生交叉反应。用温和高碘酸氧化法对 LPS 处理后, GYC1108 - 1 的 LPS 与 2 F 9 的反应部分减弱, 免疫印迹结果表明 2 F 9 识别 LPS 的类脂 A 抗原。用抑制 ELISA 法半定量检测 GYC1108 - 1 培养上清的 LPS, 测得培养 48 h LPS 释放量不超过 $39 \mu\text{g}/\text{mL}$, 大大低于使鱼类致死所需的 LPS 的剂量。

关键词:哈维氏弧菌; 脂多糖; 间接 ELISA; 单克隆抗体; 免疫印迹; 抑制 ELISA; 交叉反应

中图分类号: S 941.4 文献标识码: A

Development and characterization of monoclonal antibody against *Vibrio harveyi* lipopolysaccharide

HAO Gui-jie, SHEN Jin-yu, PAN Xiao-yi, CAO Zheng, YIN Wen-lin

(Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001, China)

Abstract: The 8-week-old female BALB/c mice were immunized with a pathogenic *V. harveyi* GYC1108-1, which was isolated from diseased great yellow croaker in Zhejiang Province in 2003. Spleen cells collected from immunized mice after the fifth immunization were fused with SP2/0-Ag-14 myeloma cells. Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) was used to screen hybridoma cells and limited dilution method was performed to subclone the positive clones. After three cycles of subcloning, a McAb against the lipopolysaccharide (LPS) of GYC1108 - 1 was obtained, and was designated as 2F9. The obtained McAb 2F9 was proved to have high ELISA titers. The specificity test suggested that 2F9 reacted with *V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, but did not react with *V. mimicus*, *V. anguillarum*, *Aeromonas hydrophila* and other isolates among 14 bacteria species tested. 2F9 could recognize GYC1108 - 1 LPS, but the reaction was reduced after LPS oxidation by mild periodate acid. Immunoblotting after SDS-PAGE shows that 2F9 is specific for lipid A of GYC1108 - 1. The LPS released into cultured medium in 48 hours was not more than $39 \mu\text{g}/\text{mL}$ semiquantitated by inhibition ELISA, which is by far less than the amount necessary for fish lethality.

收稿日期: 2007-08-10

基金项目: 浙江省科技厅重点项目 (2005F12005)

作者简介: 郝贵杰 (1979 -), 女, 安徽六安人, 研究实习生, 硕士, 主要从事鱼类病害方面的研究。Tel: 0572 - 2041403, E-mail: melissa511@sina.com

Key words: *Vibrio harveyi*; lipopolysaccharide; indirect ELISA ; monoclonal antibody; immunoblotting; inhibition ELISA; cross reactivity

弧菌是海洋环境中常见的细菌类群之一,其中某些种类会使水产动物致病,给渔业生产造成损失,其致病性受宿主的生理状态及水质环境条件等综合因素的影响较大,属条件致病菌。近年来,由于养殖水域生态环境的恶化,弧菌已成为海水养殖动物的主要病原菌之一,其中哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)^[1-2]、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)^[3]、溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)^[4]最为多见,常会导致鱼体发生出血性败血症而大批死亡。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是弧菌及其他革兰氏阴性菌细胞壁外层镶嵌的内毒素,由核心多糖、O-多糖和类脂质 A 三部分组成。关于哈维氏弧菌 LPS 的报道不多,陈超然等^[5]分析了哈维氏弧菌脂多糖的化学成分,发现哈维氏弧菌粗脂多糖以己糖为主要多糖,还含有约 3% 的蛋白质和氨基酸类物质。陈昌福等^[6]用哈维氏弧菌 LPS 免疫同腹异育银鲫,发现免疫后头肾和血液中的吞噬细胞和杀菌活性明显高于对照,同时还发现哈维氏弧菌、鳗弧菌和溶藻弧菌三者脂多糖有部分相同抗原。为了更深入研究哈维氏弧菌内毒素的结构、致病机理及对生物体的免疫作用的关键机理,本研究选取一株分离自患病大黄鱼(浙江台州深水网箱养殖大黄鱼)的病原菌哈维氏弧菌 GYC1108-1 作为抗原,首次制备了哈维氏弧菌 LPS 的单克隆抗体,为进一步开展对哈维氏弧菌 LPS 的研究提供了必要的条件。

1 材料和方法

1.1 抗原的制备

1.1.1 颗粒性抗原的制备

将哈维氏弧菌 GYC1108-1 接种于含 1.5% NaCl 的 TSA 培养基中,30 ℃ 培养 24 h,加入 0.5% 甲醛,4 ℃ 静置过夜灭活细菌。离心弃上清,沉淀用灭菌生理盐水(0.85% NaCl)洗涤三次,重悬于灭菌生理盐水中,测定 OD₅₅₀,根据公式计算浓度,保存 -20 ℃ 中备用。

1.1.2 LPS 的提取及多糖测定

细菌的制备同上,LPS 的制备参照 Westphal 等^[7]的热酚-水法。多糖定量及标准曲线的制作采用苯酚-硫酸法^[8]。以糖含量为横坐标,OD₄₉₀ 值为纵坐标,制作标准曲线。取待测多糖按上述方法测得 OD₄₉₀ 值,在标准曲线上找出相应的多糖含量。

1.2 动物免疫

8 周龄雌性 BALB/c 小鼠及 ICR 小鼠购自浙江大学医学院实验动物中心。取约 10⁹ cell/mL 的 GYC1108-1 颗粒性抗原,与弗氏完全佐剂按 1:1 的比例混合乳化,腹腔注射 BALB/c 小鼠,0.1 mL/次。初次免疫后两周,抗原与弗氏不完全佐剂混合乳化,同法免疫。以后免疫不再加佐剂,分别在 4 周、6 周后各加强免疫一次,融合前 3 d 腹腔及尾静脉途径再加强免疫一次。

1.3 细胞融合

细胞融合按文献[9]进行,取免疫小鼠的脾细胞与 SP2/0 混合于融合管内,1 000 r/min,离心 10 min,弃去上清,轻振融合管底,使沉淀细胞松散均匀,置 37 ℃ 水浴中预热。然后在 45 s 内缓慢滴加预热的 PEG4000 溶液 1 mL,边加边轻转搅拌,然后在 90 s 内缓慢加入不完全 DMEM 培养基,终止融合。静置 10 min 后,1 000 r/min,离心 10 min,弃上清,加入 HAT 培养基,使细胞悬浮并混匀。加入适量饲养细胞分装至 96 孔细胞培养板,放于 6% CO₂ 培养箱内培养。第 4 至 5 天各孔补加一滴 HAT 培养基,第 9 至 10 天用 HT 培养基换出全部 HAT 培养基,并可开始检测筛选。

1.4 阳性克隆的筛选、建立及腹水制备

融合后待杂交瘤细胞长满孔底 1/3 ~ 1/2 时换液,3 ~ 4 d 后即可取细胞培养上清进行检测。用间接

ELISA 法检测细胞上清中的 LPS 抗体,按常规方法进行。将阳性孔中的细胞扩大培养并及时冻存,同时按有限稀释法进行亚克隆,至阳性率为 100% 时,即可定株。然后,按 Golding 方法^[10]进行腹水的制备。

1.5 相加实验

用相加实验确定筛选出来的单克隆抗体是否识别同一个抗原决定簇。取上述包被好的 LPS 抗原酶标孔,每两株阳性单克隆孔的细胞培养上清为一抗,进行间接 ELISA 反应。用酶标仪测定它们反应显色后的 490 nm 波长的吸光值,按下列公式计算它们的相加系数: $AI = [2A_{1+2}/(A_1 + A_2) - 1] \times 100\%$,其中 A_{1+2} 为相加孔的吸光值, A_1, A_2 为非相加孔的吸光值。AI 接近 100%,则两个单克隆抗体识别不同的抗原决定簇, AI 接近 0,则两个单克隆抗体识别同样的抗原决定簇^[11]。

1.6 交叉反应

挑选 14 株不同的菌株扩增,并用甲醛灭活菌体作为包被抗原,用间接 ELISA 的方法,检测单抗 2F9 与它们的交叉反应性。各菌株的名称及来源见结果中表 1。

表 1 单克隆抗体 2F9 与一些菌株的免疫交叉反应
Tab.1 Cross reactivity of McAb 2F9 with some bacteria strains

菌株名称	来源	交叉反应结果
哈维氏弧菌标准株 1.1593	购自中科院微生物所	+
哈维氏弧菌 GYC1108-1	本实验室分离自大黄鱼	+
哈维氏弧菌 BK-1	本实验室分离自黑鲷	+
哈维氏弧菌 NS	本实验室分离自南美白对虾	+
哈维氏弧菌 NB 株	宁波大学赠送	+
副溶血弧菌 a 株	宁波大学赠送	+
副溶血弧菌 b 株	上海水产大学赠送	-
溶藻弧菌 NB 株	宁波大学赠送	+
鳃弧菌 E3-1	购自中科院水生所	-
拟态弧菌 CL98116	本实验室分离自河蟹	-
麦氏弧菌 GYC910	本实验室分离自大黄鱼	+
嗜水气单胞菌 BSK-10	本实验室分离自鲫鱼	-
嗜水气单胞菌 QXL-1	本实验室分离自青虾	-
草鱼肠炎致病菌 58-20-9	购自中科院水生所	-

1.7 免疫印迹杂交

取约 20 μg 的 LPS 作 SDS—聚丙烯酰胺凝胶电泳,浓缩胶为 5%,分离胶为 12%。LPS 的染色为银染,电泳及免疫印迹参考《蛋白质技术手册》进行^[12]。

1.8 高碘酸氧化免疫反应

取包被好的 LPS 的酶标孔,各取三孔分别加入 100 μL 、200 μL 高碘酸缓冲液(0.01 mol/L 高碘酸溶于 0.05 mol/L 乙酸钠缓冲液中, pH 4.5)室温氧化 2 h(编号分别为 1 和 2),另取三孔同样包被好的 LPS 的酶标孔(编号为 3)不加高碘酸缓冲液,同时进行间接 ELISA,一抗为 1:1 000 稀释的单抗腹水^[13]。

1.9 GYC1108-1 培养上清中 LPS 的检测

用抑制 ELISA 方法对 GYC1108-1 培养上清中的 LPS 进行定性和半定量测定^[14]。取 LPS 包被好的酶标孔,用细菌培养基稀释所提取的 LPS,使其在每 100 μL 中含量分别为 6 μg 、3 μg 、1.5 μg 、0.75 μg 、0.36 μg 、0.18 μg 、0.09 μg 和 0。每个稀释度各加两个酶标孔,100 μL /孔。并同时加入 1:500 稀释的单抗腹水(100 μL /孔)进行抑制 ELISA 的检测,根据 490 nm 吸光值制定标准曲线。同时将在 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 h 活化的 GYC1108-1 接种于含 1.5% NaCl 的 TSA 培养基中,30 $^{\circ}\text{C}$ 、110 r/min 振荡培养 24 h 和 48 h,5 000 r/min 离心 20 min,吸取上清,分别各加 100 μL 于两个酶标孔中,同时各孔分别加入 1:500 稀释的单抗腹水(100 μL /孔)进行抑制 ELISA 的检测,根据 490 nm 吸光值及制定的标准曲线算

出培养上清中的 LPS。

2 结果

2.1 LPS 的提取及多糖测定结果

用热酚-水法提取 GYC1108 - 1 的 LPS 后,取离心后的水相置透析袋中对蒸馏水透析,直到透析水溶液的酚试剂反应为阴性止,然后用 PEG6000 浓缩获得较纯的 LPS。采用苯酚-硫酸法制作的标准曲线(图 1),经测定,从标准曲线找出含糖量为 280 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

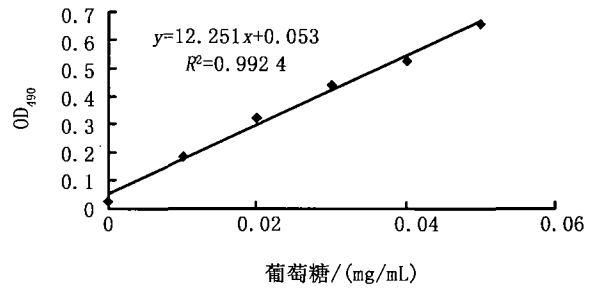


图 1 糖含量测定的标准曲线

Fig. 1 Standard curve of glucose concentration

2.2 单抗筛选及杂交瘤细胞系的建立

采用上述免疫和融合方法,用间接 ELISA 检测细胞培养上清,结果获得了 2 株抗 GYC1108 - 1 脂多糖(LPS)的特异性单克隆抗体细胞株,分别命名为 2F9 和 5E10。杂交瘤细胞经 3 次亚克隆,100% 的检测孔保持了分泌抗 LPS 的能力,经连续传代培养后,依然能够稳定分泌抗体。2F9 和 5E10 细胞培养上清 LPS 抗体的 ELISA 效价分别为 1:1 600 和 1:1 000。

2.3 相加实验结果与腹水制备

测得两株单克隆抗体细胞 2F9 和 5E10 培养上清的相加系数接近于 0,表明它们识别同一个抗原决定簇。选择细胞培养上清效价高的 2F9 细胞株制备腹水单抗,测得腹水 ELISA 效价为 1: (6.4 $\times 10^4$)。

2.4 单抗的特异性鉴定

交叉反应结果表明 2F9 能与多株弧菌科细菌发生交叉反应(见表 1)。2F9 除了与受试的 5 株哈维氏弧菌发生反应外,还与副溶血弧菌 a 株、溶藻弧菌 NB 株和麦氏弧菌 GYC910 发生交叉反应,但不与副溶血弧菌 b 株、鳃弧菌 E3 - 1、拟态弧菌 CI98116、嗜水气单胞菌 BSK - 10 及 QXL - 1 和草鱼肠炎致病菌 58 - 20 - 9 发生交叉反应。

2.5 电泳和免疫印迹杂交结果

哈维氏弧菌 GYC1108 - 1 的 LPS 电泳及与 2F9 的腹水单抗(1:200 稀释)进行免疫印迹反应结果见图 2。从 LPS 的电泳图谱中可以看到,脂多糖经电泳之后,银染染色只在 19 ku 形成一条清晰梯形条带,在分离胶的最上部及 19 ku 下方出现片状堆积,不能形成明显的条带,电泳结果与脂多糖的组成成分相对吻合,类脂 A 部分由于分子量较大,所带电荷的原因不容易跑开,聚集在凝胶上部,核心多糖由于分子量较小则快速迁移至胶的底部, O-侧链未完全展开呈现出梯形状。从免疫印迹图谱中可以看到,2 F 9 主要与 GYC1108 - 1 的高分子量的 LPS 识别反应,这一区域属于 LPS 的类脂 A 部分。

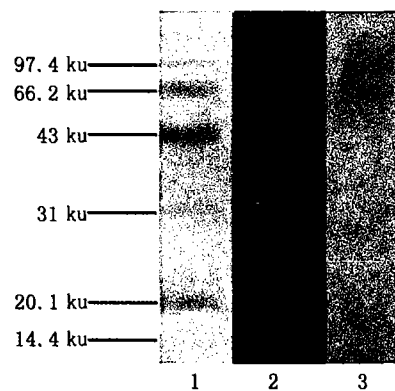


图 2 GYC1108 - 1 LPS 的 SDS-PAGE 鉴定及单抗 2F9 的 Western-blot 特异性分析

Fig. 2 Identification of LPS with SDS-PAGE and specificity of 2F9 by Western-blot

2.6 高碘酸氧化免疫反应

测定各酶标孔 OD₄₉₀ 值,分别取其平均值,编号为 1 和 2 的平均值分别为 0.756 和 0.645,而未加入高碘酸缓冲液氧化编号为 3 的平均值为 1.398。由

1. 蛋白质 Marker; 2. GYC1108 - 1 的 LPS; 3. LPS 与 2F9 的免疫印迹图

此可看出,1和2的吸光值比3号大大减弱,说明GYC1108-1的LPS被温和的高碘酸氧化后,其免疫反应性受到较大影响。而且加入200 μL 比100 μL 的高碘酸缓冲液氧化后,其吸光值也随着降低。

2.7 GYC1108-1 培养上清中 LPS 的检测结果

在抑制 ELISA 检测中,加入 GYC1108-1 的 LPS 的量为 6 μg 、3 μg 、1.5 μg 、0.75 μg 、0.36 μg 、0.18 μg 、0.09 μg 和 0 的反应孔的 490 nm 的吸光值分别为 0.747、0.791、0.946、1.124、1.707、2.427、2.760 和 2.953,所绘制的标准曲线见图 2。哈维氏弧菌 GYC1108-1 在含 1.5% NaCl 的 TSA 培养基中培养 24 h,其培养上清的 490 nm 的吸光值为 2.362,估算其 LPS 含量约为 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$,培养 48 h 的 490 nm 的吸光值为 1.663,估算其 LPS 含量约为 39 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

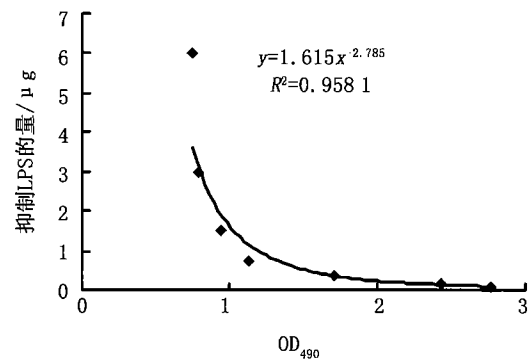


图3 抑制 ELISA 检测 LPS 的标准曲线

Fig. 3 Standard curve of LPS by inhibition ELISA

3 讨论

本文首次成功制备了哈维氏弧菌 LPS 的单克隆抗体杂交瘤细胞株 2F9,并对其部分生物学特性做了初步研究。从本实验的 GYC1108-1 的 LPS 电泳结果可看出,其图谱与脂多糖的组成成分相对吻合,类脂 A 部分由于分子量较大,所带电荷的原因不容易跑开,聚集在凝胶上部,核心多糖由于分子量较小则快速迁移至胶的底部,O-多糖侧链未完全展开呈现出梯形状,这也是经典脂多糖结构的 O 特异性侧链部分^[15]。从 LPS 的电泳图谱还可以看到,哈维氏弧菌的 LPS 包含一系列呈梯度排列的、分子量大小不一的 O-特异性多糖链,表明它属于光滑型的 LPS。从免疫印迹图谱中可以看到,2F9 主要与 GYC1108-1 的高分子量的 LPS 识别反应,这一区域属于 LPS 的类脂 A 部分。由于 LPS 分子具有异质性,在电泳图谱上表现为一系列的分子量大小不一的多糖链条带,类脂 A 也一样呈现出片状结构。所以免疫印迹显色图谱也呈现出片状结构,这与董传甫等^[15]的免疫印迹图谱有一致的特点。

交叉反应实验结果表明,哈维氏弧菌 LPS 与溶藻弧菌 NB 株、麦氏弧菌 GYC910 和副溶血弧菌 a 株的表面抗原拥有相似的抗原决定基,而与鳗弧菌 E3-1、拟态弧菌 CL98116、嗜水气单胞菌 BSK-10 等菌株抗原差异较大。值得注意的是,副溶血弧菌 b 株不与 2F9 发生免疫识别反应,而 a 株却与 2F9 发生免疫识别反应,说明这两个菌株抗原性差异较大,还需进一步探讨。

大部分具有相邻羟基的非还原糖分子结构被温和的高碘酸氧化后,其免疫反应性足以受到影响。在本实验中,LPS 包被孔分别加入 100 μL 和 200 μL 高碘酸缓冲液作用 2 h 后,再加 2F9 腹水稀释液,所做的间接 ELISA 结果有所下降,其 OD 值由原来未加高碘酸缓冲液的 1.398 下降到 0.756 和 0.645。这与陈晓燕等^[13]的结果不同,她所制备的溶藻弧菌 LPS 单克隆抗体是针对核心多糖的,所以 LPS 被温和高碘酸氧化后与单抗的免疫识别被破坏,其 OD 值降为 0。而本实验所获得的单抗是针对类脂 A 的,之所以 OD 值下降,可能是因为在加入高碘酸作用后,由于糖分子被氧化,导致 LPS 的抗原结构的破坏,从而影响了单抗分子与类脂 A 的结合。

LPS 被认为是细菌胞外产物的一个组分,但本文的研究表明,哈维氏弧菌在含 1.5% NaCl 的 TSA 培养基中培养时,释放到培养基中的游离 LPS 的含量不高,培养 48 h 其含量不超过 39 $\mu\text{g}/\text{mL}$,这种剂量的 LPS 对鱼没有毒性。Kodama 等^[16]对鳗弧菌的研究指出,714 $\mu\text{g}/\text{g}$ 鱼的粗制 LPS 对石斑鱼没有致死作用。细菌感染鱼时,鱼体对 LPS 还会进行代谢,在鱼体中细菌释放的游离 LPS 含量不会比在培养基培养条件下高,由此推断,哈维氏弧菌 LPS 对细菌所感染的鱼不起内毒素致死效应,但 LPS 可能在其他方面参与细菌的感染过程。

参考文献:

- [1] 毛芝娟,剂国勇,陈昌福,等. 大黄鱼溃疡病致病菌的分离与鉴定[J]. 安徽农业大学学报,2001,20(4):435-438.
- [2] 林克冰,周 宸,刘家富,等. 海水网箱养殖大黄鱼病原菌研究[J]. 海洋科学,1999,(4):58-62.
- [3] 许斌福,林能锋,杨金先,等. 大黄鱼副溶血弧菌的分离、鉴定及致病力分析[J]. 福建农业学报,2002,17(3):174-177.
- [4] 胡学峰,石存斌,潘厚军. 海水养殖斜带石斑鱼溃疡病病原菌(溶藻弧菌)的初步研究[J]. 中国海洋大学学报,2005,35(2):232-236.
- [5] 陈超然,毛芝娟,吴建军,等. 哈维氏弧菌粗脂多糖的化学成分分析[J]. 华中农业大学学报,2003,2(5):488-489.
- [6] 陈昌福,陈超然. 鱼类三种致病菌的粗脂多糖对异育银鲫的免疫原性[J]. 水生生物学报,2002,2(5):483-488.
- [7] Westphal O, Jann K. Bacterial lipopolysaccharides: Extraction with phenol-water and further applications of the procedure[M]. 1965:83-91.
- [8] 张龙翔,张庭芳,李令媛. 生化实验方法和技术(第二版)[M]. 北京:高等教育出版社,1997.
- [9] 刘秀梵. 单克隆抗体在农业上的应用[M]. 合肥:安徽科学技术出版社,1994.
- [10] Golding J W. Monoclonal antibodies: principle and practice[M]. New York: Academic press, 1983.
- [11] Friguet B, Diavadi-Ohanian L, Pages J, et al. A convenient enzyme-linked immunosorbent assay for testing whether monoclonal antibodies recognize different epitopes[J]. Immunol Method, 1983, 60:351.
- [12] 汪家政,范 明. 蛋白质技术手册[M]. 北京:科学出版社,2000.
- [13] 陈晓燕,胡超群,任春华. 溶藻弧菌脂多糖单克隆抗体的制备、鉴定及初步应用[J]. 高技术通讯,2002,11:90-95.
- [14] Peborde J P, Laporte M, Samain D. An inhibition enzyme-linked immunosorbent assay technique for the detection of endotoxins in proteins extracted from *Escherichia coli* K12 recombinant DNA[J]. Immunol Methods, 1989, 120(2):259-263.
- [15] 董传甫,林天龙,许斌福. 电泳和免疫印迹分析副溶血弧菌和溶藻弧菌主要外膜蛋白和多糖抗原[J]. 中国人兽共患病杂志,2004,20(7):619-623.
- [16] Kodama H, Yamada F, Kurosawa T, et al. Quantitative measurement of endotoxin in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) serum by the chromogenic substrate method[J]. Applied Bacteriology, 1987, 63(3):255-260.