

多抗间接 ELISA 方法的建立 及其在海洋细菌快速检测中的应用*

职通瑞^{1,2} 宋晓玲^{2,4} 张晓静^{2,3} 张盛静^{1,2} 黄 捷^{2,4}

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 农业部渔业资源可持续发展重点实验室
中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 3. 中国海洋大学 青岛 266003;
4. 青岛国家海洋科学重点实验室 青岛 266071)

摘要 为了从对虾体内分离出的菌株中快速筛选出蜡样芽孢杆菌和溶藻胶弧菌,将蜡样芽孢杆菌与溶藻胶弧菌作为抗原,免疫 SPF 新西兰大白兔,获得免疫血清,效价均高于 1:2000。将免疫兔血清作为一抗,HRP-羊抗兔血清作为二抗,建立了蜡样芽孢杆菌和溶藻胶弧菌快速检测的间接 ELISA 方法。此方法中,兔抗血清最佳稀释度为 1:10000,菌液最佳包被浓度为 10^6 CFU/ml; HRP-羊抗兔血清最佳稀释浓度为 1:1000,可检测细菌最低浓度为 10^4 CFU/ml。抗蜡样芽孢杆菌血清与苏云金芽孢杆菌有交叉反应,抗溶藻胶弧菌血清与其亲缘相近菌株无交叉反应,具有较强的特异性。2012 年和 2013 年,分别从斑节对虾、中国对虾、凡纳滨对虾等 9 批样本中分离纯化到 109 株海洋细菌,利用建立的多抗间接 ELISA 方法对其中部分菌株进行快速检测,共检测出 6 株溶藻胶弧菌,未检测出蜡样芽孢杆菌。

关键词 间接 ELISA; 蜡样芽孢杆菌; 溶藻胶弧菌; 兔抗血清; 对虾

中图分类号 Q522 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)02-0071-06

近些年,我国对虾养殖业迅速发展,正在由粗放型养殖模式转变为具有一定规模的集约化养殖模式,产量逐年提高。与此同时,对虾疾病呈现暴发性态势,疾病种类增多,危害增强,控制难度也在增大。目前,水产养殖业中控制疾病的方法主要有生物学方法、化学方法与物理方法。生物学方法控制水产动物疾病的有效性、可靠性已经被业内认可。在生物学方法中,微生态制剂在预防、控制对虾疾病方面有显著效果,在整个水产养殖业中有着广泛的应用。有关有益微生物的筛选、安全性及其应用效果的评价等仍是目前的研究热点。

芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)广泛应用于海水养殖内外环境中(柴鹏程等, 2013),芽孢杆菌属细菌对水产动

物极少有致病性,是较好的益生菌候选菌株。目前应用较多的有枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)、地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)、蜡样芽孢杆菌(*B. cereus*)、坚强芽孢杆菌(*B. firmus*)等。李永芹等(2013)向对虾养殖池塘泼洒蜡样芽孢杆菌,可以显著降低水体中氨氮、亚硝酸盐含量,改善水体养殖环境;李继秋等(2006)研究发现,蜡样芽孢杆菌对凡纳滨对虾无节幼体Ⅲ期到溞状幼体Ⅱ期的变态具有极显著促进作用;张玲等(2007)¹⁾发现,在对虾苗种期使用蜡样芽孢杆菌可以显著提高虾苗的成活率;李桂英等(2011)研究显示,凡纳滨对虾成虾摄食蜡样芽孢杆菌后,可以显著提高其非特异性免疫效应。

弧菌(*Vibrio* sp.)广泛分布于河口、海湾、近岸海

* 国家科技支撑计划“海洋水产病害综合防控技术的集成与示范”(2012BAD17B03)、国家自然科学基金青年科学基金项目“肠道共生菌的生物膜形式及其对对虾抗病的调控效应”(31202024)、山东省“泰山学者”建设工程专项经费和农业部科研杰出人才和创新团队专项经费共同资助。职通瑞, E-mail: zhitongrui@126.com

① 通讯作者: 宋晓玲, 研究员, E-mail: songxl@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2014-03-28, 收修改稿日期: 2014-04-16

1) 张玲. 一株对虾肠道益生菌的筛选及其作用机理和应用效果的研究. 中国海洋大学博士学位论文, 2007

域海水和海洋动物体内(蔡林婷等, 2013; 张晓君等, 2014)。溶藻胶弧菌(*Vibrio alginolyticus*)是养殖对虾各生长阶段的优势菌株。Vandenbergh等(1999)在厄瓜多尔凡纳滨对虾育苗场的研究表明, 溶藻胶弧菌作为优势弧菌存在于凡纳滨对虾幼体各阶段, 特别存在于无节期和蚤状期健康幼体上。刘君等(2012)最新的研究报道显示, 在对虾饲料中添加低浓度的溶藻胶弧菌, 可以显著提高凡纳滨对虾非特异性免疫效应, 增强对虾抗病力。

目前海洋细菌的鉴定主要采用16S rDNA序列分析法、微生物脂肪酸气相色谱法、ATB微生物生化指标鉴定分析法、Biolog微生物糖代谢鉴定分析法等。由于鉴定系统后台数据库的资料有限或流程繁琐, 造成这些方法检测时间长、灵敏度较低。血清学方法具有特异、灵敏、准确、快速、高效的优点, 广泛应用于微生物的检测与鉴定。本研究建立了蜡样芽孢杆菌与溶藻胶弧菌的间接ELISA检测方法, 为准确、快速地筛选这两株海洋细菌提供可靠的试验方法, 可提高微生物筛选效率与准确度。

1 材料与方法

1.1 材料

蜡样芽孢杆菌、溶藻胶弧菌由本实验室于2007年从中国对虾肠道内分离、鉴定。地衣芽孢杆菌(*B. lincheniformis*)、短芽孢杆菌(*B. pumilus*)、巨大芽孢杆菌(*B. megenterium*)、坚强芽孢杆菌(*B. firmus*)、枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)、苏云金芽孢杆菌(*B. thuringiensis*)、哈维氏弧菌(*V. harveyi*)、施罗氏弧菌(*V. shilonii*)、副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)、创伤弧菌(*V. vulnificus*)、需钠弧菌(*V. natriegens*)、鳗弧菌(*V. anguillarum*)由本实验室从不同对虾样本中分离获得。SPF新西兰大白兔购于山东省青岛市动物卫生监督所, BSA(牛血清白蛋白)、HRP-羊抗兔血清购于上海生物工程有限公司, TMB底物显色液购于天根生化科技(北京)有限公司。

1.2 制备两株细菌的灭活抗原

冷冻保存的蜡样芽孢杆菌PC465和溶藻胶弧菌PC773分别接种于2216E固体培养基, 于37℃复苏24 h。挑取单菌落接种于2216E液体培养基, 放置于37℃摇床, 160 r/min振荡, 扩大培养20 h。加入终浓度为0.5%的甲醛(培养液总体积的0.5%)于4℃灭活24 h, 通过菌液涂布法(使用前取100 μl涂布2216E固体平板, 37℃恒温培养箱倒置培养24-48 h, 观察有无菌落生长)检测灭活效果。待完全灭菌后, 倾入50 ml无菌离心管, 在4℃下10000 g离心10-30 min。

取沉淀, 无菌1×PBS缓冲液洗涤菌体3次以除去甲醛; 无菌1×PBS重悬菌体制成 1×10^8 CFU/ml灭活抗原, 4℃保存备用, 采用注射器混合法乳化抗原。

1.3 免疫SPF新西兰大白兔

选取两只体重约2.5 kg的SPF新西兰大白兔。注射抗原前, 先通过凝集试验检测试验兔血清, 结果呈阴性, 该血清作为阴性血清, 保存于-80℃冰箱。采取背部皮下多点注射抗原的方式免疫试验兔, 免疫4次, 初次免疫14 d后加强免疫1次, 此后每隔7 d加强免疫1次。第4次免疫7 d后, 耳缘静脉采血, 凝集试验检测血清抗体效价, 效价高于1:2000, 心脏采血。血液室温放置1 h, 4℃过夜。4℃下, 2500 g离心15 min, 收集血清, 分装后添加等量甘油, 保存于-80℃冰箱。

1.4 间接ELISA方法检测血清

用0.01 mol/L碳酸盐缓冲液(pH 9.6)稀释目的菌株, 加入96孔酶标板, 每孔100 μl包被酶标板, 37℃放置1 h, 4℃过夜; 再向每孔中加入50 μl 0.01 mol/L PBS稀释的戊二醛(0.05% V/V), 37℃放置20 min, 每孔用200 μl PBST(0.01 mol/L PBS+0.5%吐温20)清洗3次。每孔加入100 μl 1% BSA(牛血清白蛋白)-PBS封闭, 37℃放置1 h, PBST缓冲液清洗3次。每孔加入100 μl稀释后的阳性血清、阴性血清, 37℃放置1 h, PBST缓冲液清洗4次。每孔加入0.01 mol/L PBS稀释的HRP-羊抗兔血清100 μl, 37℃孵育1-2 h, PBST缓冲液清洗5次。每孔加入100 μl TMB底物显色液, 反应8-10 min; 再加入50 μl 2 mol/L H₂SO₄终止反应, 酶标仪检测酶标板各孔在450 nm处的吸光值OD, 分析数据, 判定结果。

1.4.1 确定免疫血清最佳稀释度 用浓度为 10^8 CFU/ml菌液包被96孔酶标板, 每孔加100 μl, 37℃放置1 h, 再放于4℃冰箱过夜。0.01 mol/L PBS缓冲液稀释阳性血清和阴性血清, 稀释梯度为1:2500、1:5000、1:10000、1:20000、1:40000, 每孔加100 μl, 每个稀释度3个平行, HRP-羊抗兔血清按1:1000稀释, 进行间接ELISA试验。以出现 OD_{450nm} 值接近1.0且P/N值(阳性对照 OD_{450nm} -空白对照 OD_{450nm} /阴性对照 OD_{450nm} -空白对照 OD_{450nm} 值)最大的血清稀释度为最佳稀释度。

1.4.2 确定细菌最佳稀释度(最佳包被浓度) 0.01 mol/L碳酸盐缓冲液稀释原菌液, 稀释后菌液浓度梯度为 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 CFU/ml, 每孔加100 μl稀释液, 每个稀释液设3个平行。100 μl阳性血清和阴性血清最佳稀释液加入酶标板, 37℃放置1 h; HRP-羊抗兔血清按1:1000稀释, 进行间接ELISA试验。以出现

OD_{450nm} 值接近 1.0 且 P/N 值最大时的菌液浓度为最佳稀释度。

1.4.3 免疫血清抗体效价 将细菌最佳稀释液包被酶标板, 将阳性血清和阴性血清从 1:10000 按两倍梯度稀释至 2-6, P/N 值 ≥ 2.1 判为阳性, 血清最小稀释度为血清效价。

1.4.4 两株细菌最低检测量 0.01 mol/L 碳酸盐缓冲液稀释蜡样芽孢杆菌和溶藻胶弧菌, 稀释后菌液浓度梯度为 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 CFU/ml, 每孔加 100 μ l 稀释液, 每个稀释液设 3 个平行。100 μ l 阳性血清和阴性血清最佳稀释液加入酶标板, 间接 ELISA 检测。 P/N 值 ≥ 2.1 判为阳性, 菌液最低浓度时为细菌最小检测量。

1.4.5 血清特异性检测 将蜡样芽孢杆菌、溶藻胶弧菌和其同源性相近的细菌按菌液最佳稀释度包被酶标板, 用免疫血清最佳稀释液检测是否存在交叉反应。

1.4.6 样本检测 2012 年和 2013 年, 本实验室从浙江、河北、天津、山东等地带回 9 批对虾样本, 经

检测未携带 WSSV 与 IHNV, 分别从凡纳滨对虾、中国对虾、斑节对虾肠道和鳃组织分离纯化到 109 株优势菌。使用弧菌选择性培养基(TCBS)和芽孢杆菌选择性培养基(MYP)预筛, 再利用建立的多抗间接 ELISA 方法对已筛选的菌株进行检测。

2 结果

2.1 制备抗两株细菌的兔血清

两只兔第 4 次免疫 7 d 后, 耳缘静脉采血, 凝集反应分别检测抗蜡样芽孢杆菌、溶藻胶弧菌兔血清的效价。结果显示, 血清效价均高于 1:2000, 达到实验要求, 可以作为一抗进行间接 ELISA 实验。

2.2 抗两株细菌的兔血清最佳稀释度(最佳工作浓度)

用浓度为 10^8 CFU/ml 菌液包被酶标板, 两种血清稀释度为 1:10000 时, OD_{450nm} 最接近于 1 且 $P/N > 2.1$ 。因此, 确定两种血清最佳稀释度为 1:10000(表 1、表 2)。

表 1 抗蜡样芽孢杆菌血清最佳稀释度测定

Tab.1 Determination of the optimum anti-*B. cereus* serum concentration

血清 Serum	抗蜡样芽孢杆菌血清稀释度 Anti- <i>B. cereus</i> serum concentration					
	1:2500	1:5000	1:10000	1:20000	1:40000	对照 Control
阳性血清 Positive serum	1.480	1.107	0.998	0.804	0.696	0.169
阴性血清 Negative serum	0.241	0.208	0.206	0.158	0.162	0.161

表 2 抗溶藻胶弧菌血清最佳稀释度测定

Tab.2 Determination of the optimum anti-*V. alginolyticus* serum concentration

血清 Serum	抗溶藻胶弧菌血清稀释度 Anti- <i>V. alginolyticus</i> serum concentration					
	1:2500	1:5000	1:10000	1:20000	1:40000	对照 Control
阳性血清 Positive serum	1.376	1.250	1.080	0.864	0.536	0.058
阴性血清 Negative serum	0.117	0.089	0.079	0.066	0.067	0.060

2.3 两株细菌菌液最佳包被浓度

原菌液稀释后菌液浓度梯度为 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 CFU/ml, 两种血清按 1:10000 最佳稀释度孵育酶标板, 两株海洋细菌浓度为 10^6 CFU/ml 时, OD_{450nm} 最接近于 1 且 $P/N > 2.1$ 。因此, 确定两种海洋细菌菌液最佳包被浓度为 10^6 CFU/ml(表 3、表 4)。

表 3 蜡样芽孢杆菌最佳包被浓度测定

Tab.3 Determination of the optimum *B. cereus* concentration

血清 Serum	蜡样芽孢杆菌包被浓度 <i>B. cereus</i> concentration (CFU/ml)				
	10^8	10^7	10^6	10^5	对照 Control
阳性血清 Positive serum	2.035	1.777	1.174	0.531	0.087
阴性血清 Negative serum	0.287	0.252	0.229	0.185	0.075

表 4 溶藻胶弧菌最佳包被浓度测定

Tab.4 Determination of the optimum
V. alginolyticus concentration

血清 Serum	溶藻胶弧菌包被浓度 <i>V. alginolyticus</i> concentration (CFU/ml)				
	10^8	10^7	10^6	10^5	对照 Control
阳性血清 Positive serum	2.165	1.813	1.289	0.460	0.111
阴性血清 Negative serum	0.196	0.140	0.111	0.110	0.102

2.4 免疫血清抗体效价

以 10^6 CFU/ml 菌液浓度包被酶标板, 血清按 1:10000、1:20000、1:40000、1:80000、1:160000、1:320000、1:640000 梯度稀释, 两种血清稀释度为 1:160000 时, $P/N > 2.1$ 为阳性。

2.5 两株细菌最低检测量

蜡样芽孢杆菌和溶藻胶弧菌菌液以 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 CFU/ml 包被酶标板, 两种血清按最佳稀释度 1:10000 稀释后孵育, P/N 值 ≥ 2.1 判为阳性, 两株细菌菌液最低检测浓度均为 10^4 CFU/ml。

2.6 血清特异性

检测地衣芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、坚强芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌与抗蜡样芽孢杆菌兔血清是否存在交叉反应; 哈维氏弧菌、施罗氏弧菌、副溶血弧菌、创伤弧菌、需钠弧菌、鳗弧菌与抗溶藻胶弧菌兔血清是否存在交叉反应。上述细菌均以 10^8 CFU/ml 菌液包被酶标板, 阳性血清和阴性血清按 1:10000 稀释, 间接 ELISA 方法检测血清特异性。

表 5 显示, 蜡样芽孢杆菌作为阳性对照, PBS 缓冲液作为空白对照, 蜡样芽孢杆菌抗血清与苏云金芽孢杆菌呈阳性, 其余均呈阴性。表 6 显示, 溶藻胶弧菌作为阳性对照, PBS 缓冲液作为空白对照, 溶藻胶弧菌呈阳性, 其余均呈阴性。两种血清均有较高的特异性。

表 5 抗蜡样芽孢杆菌血清的特异性

Tab.5 Specificity of the optimum anti-*B. cereus* serum

菌株 Bacterium	阳性血清 Positive serum	阴性血清 Negative serum	交叉反应 Cross reaction
蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i>	1.289	0.196	+
短小芽孢杆菌 <i>B. pumilus</i>	0.147	0.113	-
地衣芽孢杆菌 <i>B. lincheniformis</i>	0.238	0.109	-
巨大芽孢杆菌 <i>B. megeterium</i>	0.226	0.141	-
枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	0.117	0.100	-
坚强芽孢杆菌 <i>B. firmus</i>	0.175	0.149	-
苏云金芽孢杆菌 <i>B. thuringiensis</i>	1.140	0.185	+
空白对照 Blank control	0.109	0.099	

2.7 检测 9 批对虾样本中分离纯化的优势菌株

采用间接 ELISA 方法对 9 批对虾样本中分离纯化的部分菌株进行检测。结果显示, 35 株弧菌选择性培养基分离到的优势菌中检测到 6 株溶藻胶弧菌

表 6 抗溶藻胶弧菌血清的特异性

Tab.6 Specificity of the optimum anti-*V. alginolyticus* serum

菌株 Bacterium	阳性血清 Positive serum	阴性血清 Negative serum	交叉反应 Cross reaction
溶藻胶弧菌 <i>V. alginolyticus</i>	1.193	0.150	+
哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	0.096	0.094	-
施罗氏弧菌 <i>V. shilonii</i>	0.162	0.129	-
副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	0.089	0.087	-
创伤弧菌 <i>V. vulnificus</i>	0.336	0.383	-
需钠弧菌 <i>V. natriegens</i>	0.095	0.089	-
鳗弧菌 <i>V. anguillarum</i>	0.163	0.188	-
空白对照 Blank control	0.092	0.084	

(表 7), 11 株芽孢杆菌选择性培养基分离到的优势菌中未检测到蜡样芽孢杆菌(表 8)。将检测到的 6 株菌进行 16S rDNA 测序, 与 NCBI 数据库进行序列比对, 均为溶藻胶弧菌。

3 讨论

目前, 间接 ELISA 方法广泛用于病原微生物的鉴定。有学者对哈维氏弧菌、鳗弧菌、副溶血弧菌、嗜水气单胞菌等水产主要致病菌建立了间接 ELISA 快速检测方法。白方方等(2009)制备了抗迟缓爱德华氏菌的兔血清, 具有较高的特异性与灵敏度, 使用间接 ELISA 方法快速检测了分离得到的致病菌, 多株致病菌呈阳性, 结果显示间接 ELISA 方法具有准确、特异、快速的优点, 可以广泛用于微生物检测。进一步的研究与利用, 可以开发出以间接 ELISA 技术为基础的快速检测试剂盒。间接 ELISA 方法很少应用于有益微生物的筛选, 本研究制备的抗蜡样芽孢杆菌的血清和抗溶藻胶弧菌的血清具有较高效价, 且特异性和灵敏度也非常高, 与亲缘较近的菌株极少存在交叉, 两株细菌最低检测浓度达到 10^4 CFU/ml。该方法可用于有益微生物的高通量筛选, 从而提高筛选效率与准确度。

2012 年和 2013 年, 本实验室分别从全国不同对虾养殖地区带回 9 批样本, 分离获得 109 株优势菌株。使用间接 ELISA 方法检测芽孢杆菌选择性培养基分离到的 11 株优势菌, 未检测到蜡样芽孢杆菌阳性菌

表 7 抗溶藻胶弧菌血清检测待测菌株
Tab.7 Detection of the bacterial strains with anti-*V. alginolyticus* serum

样本编号 Sample number	OD_{450nm}	结果 Result	样本编号 Sample number	OD_{450nm}	结果 Result
溶藻胶弧菌	1.153	+	TJLV051410	0.111	-
ZJLV070501	0.072	-	TJLV051432	0.127	-
ZJLV070502	0.081	-	YTLV051104	1.187	+
ZJLV070505	0.071	-	YTLV051110	0.448	+
ZJLV070507	0.070	-	YTLV051112	0.099	-
CYPC041901	0.098	-	YTPC051102	0.880	+
CYPC041904	0.125	-	YTPC051104	0.105	-
CYM041901	0.081	-	YTPC051110	0.080	-
RZPC041602	0.089	-	YTPC051111	0.576	+
RZPC041605	0.079	-	RZPM071340	0.102	-
RZPC041608	0.436	+	RZPM071341	0.089	-
RZPC052103	0.072	-	RZPC071103	0.120	-
RZPC052110	0.079	-	RZPC071106	0.113	-
RZPC052111	0.840	+	RZPC071107	0.096	-
RZPC052112	0.074	-	RZPM071301	0.124	-
RZPC052113	0.063	-	RZPM071302	0.107	-
RZPC052119	0.070	-	RZPM071310	0.082	-
TJLV051401	0.439	+	空白对照 Blank control	0.069	
TJLV051409	0.098	-			

表 8 抗蜡样芽孢杆菌血清检测待测菌株
Tab.8 Detection of the bacterial strains with anti-*B. cereus* serum

样本编号 Sample number	OD_{450nm}	结果 Result	样本编号 Sample number	OD_{450nm}	结果 Result
蜡样芽孢杆菌	1.270	+	RZPM071314	0.070	-
RZPC071101	0.083	-	RZPM071319	0.069	-
RZPC071102	0.077	-	RZPM071320	0.068	-
RZPC071104	0.078	-	CYPC041902	0.072	-
RZPM071304	0.075	-	CYM041906	0.071	-
RZPM071309	0.080	-	YTPC051106	0.073	-
			空白对照 Blank control	0.065	

株。蜡样芽孢杆菌作为有益菌在对虾养殖中使用较多,但其作为对虾体内的非优势菌,数量较少,经芽孢杆菌选择性培养基在初步筛选可能较难分离到蜡样芽孢杆菌。同时,从对虾体内分离纯化到蜡样芽孢杆菌的相关文章鲜有报道。在弧菌选择性培养基分离到的 35 株优势菌中检测到 6 株溶藻胶弧菌阳性菌株,上述菌株主要分离自山东日照的中国对虾、烟台的中国对虾、烟台的凡纳滨对虾以及天津大港的凡纳滨对虾,且这些对虾样品经 PCR 检测, WSSV、IHHNV、YHV 等对虾主要病毒呈阴性;表明溶藻胶弧菌可能作为优势菌株存在于健康对虾虾苗体内。李筠等

(2002)¹⁾研究显示,溶藻胶弧菌总是在虾苗健康时出现或成为优势,与本研究结果相同。上述菌株的基因型特征和化学分类学、生理生化等表性特征以及病原性分析和可能存在的益生作用将做进一步分析研究。

参 考 文 献

- 白方方, 兰建新. 迟缓爱德华氏菌间接 ELISA 快速检测法. 中国水产科学, 2009, 16(4): 619-625
孙艳, 刘飞, 宋晓玲. 饲料中添加益生菌对凡纳滨对虾非特异免疫基因表达量和抗病力的影响. 海洋与湖沼, 2012, 43(4): 845-850

1) 李筠. 与海水养殖相关的细菌多样性的研究及方法评价. 中国海洋大学博士学位论文, 2002

- 刘君, 宋晓玲, 刘莉. 2 株消化道优势菌对凡纳滨对虾免疫酶活性和抗 WSSV 感染力的影响. 水产学报, 2012, 36(3): 444-450
- 张晓君, 毕可然, 阎斌伦, 等. 中国对虾糠虾幼体病原哈氏弧菌的鉴定及毒力基因检测. 渔业科学进展, 2014, 35(3): 105-111
- 李永芹, 许乐乐, 陈克卫. 一株芽孢杆菌的筛选鉴定及其净水效果研究. 水生态学杂志, 2013, 34(1): 96-99
- 李桂英, 宋晓玲, 孙艳. 几株肠道益生菌对凡纳滨对虾非特异免疫力和抗病力的影响. 中国水产科学, 2011, 18(6): 1358-1367
- 李继秋, 谭北平. 一株水产益生菌的鉴定. 中国海洋大学学报, 2006, 36(3): 434-438
- 柴鹏程, 宋晓玲. 饲料中添加芽孢杆菌 PC465 对凡纳滨对虾生长和 STAT 基因表达的影响. 渔业科学进展, 2013, 34(3): 97-103
- 蔡林婷, 李思源, 葛明峰, 等. 3 种致病弧菌感染对大黄鱼血液生化指标的影响. 渔业科学进展, 2013, 34(2): 65-72
- Vandenbergh J, Verdonck L, Robles AR, *et al.* Vibrios associated with *Litopenaeus vannamei* larvae, postlarvae, broodstock, and hatchery probiotics. Appl Environ Microbiol, 1999, 65(6): 2592-2597

(编辑 冯小花)

Establishment of Polyclonal Antibody Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and the Application in the Rapid Detection of Marine Bacteria

ZHI Tongrui^{1,2}, SONG Xiaoling^{2,4}①, ZHANG Xiaojing^{2,3}, ZHANG Shengjing^{1,2}, HUANG Jie^{2,4}

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 3. Ocean University of China, Qingdao 266003; 4. National Oceanographic Center, Qingdao 266071)

Abstract In order to rapidly detect *Bacillus cereus* and *Vibrio alginolyticus* from shrimp, we immunized the specific pathogen free (SPF) of New Zealand white rabbits with *V. alginolyticus* and *B. cereus* and collected the antisera. The titer of the polyclonal antibody was higher than 1: 2000. The antisera were used as the primary antibody and the goat anti-rabbit IgG-HRP was used as the secondary antibody in indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the rapid detection of *V. alginolyticus* and *B. cereus*. The optimum dilution of the antiserum was determined to be 1:10000 in indirect ELISA. The optimum coated concentration of the antigen was determined to be 10^6 CFU/ml. The goat anti-rabbit IgG-HRP was determined to be 1: 1000. We tested the sensitivity of the serum and the lowest detectable concentration of the two strains was 10^6 CFU/ml. The anti-*B. cereus* serum had cross reaction only with *B. thuringiensis*. The cross reaction of the anti-*V. alginolyticus* serum with other bacterial species in the genus of *Vibrio* showed negative results. We purified 109 strains of marine bacteria from 9 sample batches including *Penaeus monodon*, *Fenneropenaeus chinensis* and *Penaeus vannamei*, and these strains were timely identified using the established indirect ELISA method. Six strains of *Vibrio* were detected and no *Bacillus* was identified.

Key words Indirect ELISA; *Bacillus cereus*; *Vibrio alginolyticus*; Antisera; Shrimp

① Corresponding author: SONG Xiaoling, E-mail: songxl@ysfri.ac.cn