

福建省水产学会 病害防控专业委员会 论文集（一）

FUJIANSHENG SHUICHANXUEHUI
BINGHAI FANGKONG ZHUANYE WEIYUANHUI
LUNWENJI

樊海平 主 编
马 平 周 宸 龚 晖 副主编

福建省水产学会病害防控专业 委员会论文集（一）

樊海平 主编

马 平 周 宸 龚 晖 副主编

海洋出版社

2011 年 · 北京

图书在版编目 (CIP) 数据

福建省水产学会病害防控专业委员会论文集. 1/樊海平主编. —北京: 海洋出版社, 2011. 1

ISBN 978 - 7 - 5027 - 7934 - 4

I. ①福… II. ①樊… III. ①水产动物—动物疾病—防治—福建省—文集 IV. ①S94 - 53

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2010) 第 241601 号

责任编辑: 唱学静

责任印制: 刘志恒

海洋出版社 出版发行

<http://www.oceanpress.com.cn>

北京市海淀区大慧寺路 8 号 邮编: 100081

北京画中华印刷有限公司印刷 新华书店北京发行所经销

2011 年 1 月第 1 版 2011 年 1 月第 1 次印刷

开本: 787 mm × 1092 mm 1/16 印张: 11.75

字数: 273 千字 定价: 45.00 元

发行部: 62147016 邮购部: 68038093 总编室: 62114335

海洋版图书印、装错误可随时退换

序

福建省是我国渔业大省，渔业产量及产值长期位居全国前列。水产养殖是渔业经济的重要组成部分，2009 年我省渔业生产总产值 563.31 亿元，其中全省淡水养殖 63.9 万吨，海水养殖 293.03 万吨，占据了渔业经济的重要份额，对渔业总产值贡献度很高。同时水产养殖及其相关配套产业的迅速发展也提供了大量就业机会，为我省渔民增收、渔区社会稳定做出了重要贡献。

福建省水产养殖品种除大宗淡水鱼类、牡蛎、花蛤、海带、紫菜等重要传统经济品种外，还有大黄鱼、鳗鱼、鲍鱼、甲鱼、梭子蟹等特种水产养殖品种，近年来一些引进新品种的养殖也显蓬勃之势。但随着水产养殖集约化程度的不断提高，受养殖环境自身污染、陆源工农业污染引起的流域水环境质量下降、沿岸围填海工程所带来的海洋生态环境损害等多重因素的影响，近年水产病害的种类、发生频率、导致的经济损失也不断攀升，尤其像刺激隐核虫病、对虾白斑病、桃拉病毒病、草鱼出血病、多子小瓜虫病等疫病时有发生，2009 年水产养殖病害测报区域养殖对象检测到的病害种类就达 100 多种，由病害造成的经济损失达 7 000 多万元，2009 年还发生了闽南牡蛎附苗后大量脱落死亡、罗源湾鲍鱼大量死亡、罗源湾海水养殖鱼类刺激隐核虫病导致大量死亡、棉花滩网箱养殖鱼类死亡等重大突发性病害，严重影响了我省水产养殖业的健康、稳定和可持续发展。

令人欣慰的是近年来我省广大水产科技工作者在病害检测、病害防控、渔药使用、健康养殖模式等领域开展了多方面的探索、研究及推广，有效减轻了病害造成的危害，也取得了一批科研成果。为了充分展示我省水产病害研究新成果，福建省水产学会病害防控专业委员会组织全省病害科技人员，撰写了部分研究论文，现将这些论文汇集成册出版，希望对水产养殖疾病控

制和研究有所裨益，更希望通过这种出版专业研究论文的形式，加强我省水产病害工作者之间的相互联系与沟通，使同行间能相互切磋，取长补短，共同分享我省病害学术前沿成果，为我省水产病害研究水平的不断提高而共同努力。

福建省水产学会理事长 

2010 年 12 月

前 言

2009 年 12 月，福建省水产学会第七次会员代表大会选举产生了新一届理事会，改选了病害防控专业委员会，近年福建省水产病害的种类、发生频率、导致的经济损失不断攀升，尤其像刺激隐核虫病、对虾白斑病、桃拉病毒病、草鱼出血病、多子小瓜虫病等疫病时有发生，针对这些疾病问题，福建省广大水产科技工作者近年在病害检测、病害防控、渔药使用、健康养殖模式等领域开展了多方面的探索，其中大部分研究成果已经通过各种渠道推广到生产基层，并在应用中取得了良好效果，为福建省水产养殖业的稳定发展起到了保驾护航作用。但是，部分研究成果，尤其是一些基础研究成果，由于各种原因难以及时发表，无限期延迟发表，显然不利于我省鱼病控制的发展。针对上述情况，经新一届专业委员会委员协商，决定出版福建省水产学会病害防控专业委员会论文集，将近年我省部分病害防控研究方面未发表的新论文汇集成册出版，希望通过这种形式，加强我省水产病害工作者间的交流与沟通，使专业委员会更具有凝聚力，同时也使我省专业人员能共同分享我省病害学术前沿成果。

本论文集包括了福建省近年 26 篇研究论文，其中药物检测及代谢动力学 3 篇；病原、病因研究论文 9 篇；免疫学研究论文 6 篇；病理学研究论文 2 篇；病害控制技术研究论文 6 篇。

福建省水产学会病害防控专业委员的主任委员及副主任委员单位，如福建省淡水水产研究所、福建省水产技术推广总站、福建省水产研究所、福建省农业科学研究院生物技术研究所承担了国家、省、市各部门的多项研究项目，本论文集得到了公益性行业（农业）科研专项经费项目：鳗鱼药残控制技术与环保高效配合饲料技术（nyhyzx07-043）、对虾养殖管理信息系统研究与建立（nyhyzx07-042）等项目的经费支持，同时，论文集得到了海洋出版

社的大力支持，对论文在初审基础上重新进行了审定；福建省水产学会组织了论文的征稿，理事长李祥春副厅长为论文集作了序，正是由于这些帮助，使论文集顺利出版及时与全省同人见面，在此一并表示感谢。

由于编者水平有限，尤其是首次组织汇编论文集缺乏经验，错误之处在所难免，望读者不吝指教，以期在以后的工作中改进。

福建省水产学会病害防控专业委员会

2010年10月10日

目 次

鳗鲡迟缓爱德华菌抗独特型疫苗的制备及免疫效果研究	
..... 吴斌,樊海平,辛志明,钟全福,林煜,苏跃中(1)	
嗜水气单胞菌的间接 ELISA 快速检测方法研究	
..... 辛志明,樊海平,杨燕燕,吴斌(10)	
嗜水气单胞菌气溶素单克隆抗体制备与特性分析	
..... 龚晖,张晓佩,杨金先,林天龙(16)	
6 株嗜水气单胞菌主要黏附素基因克隆分析	
..... 吴学敏,郑在予,杨金先(24)	
无乳链球菌表面免疫相关蛋白基因的克隆与原核表达	
..... 张新艳,樊海平(31)	
鳗鲡小瓜虫血清分型初步研究	
..... 杨金先,刘晓东,龚晖,陈强,许斌福,林天龙(37)	
SYBR Green I 荧光定量 PCR 鉴定简单异尖线虫	
..... 龚艳清,郑洋妹,陈信忠(42)	
鳗鲡真菌性烂鳃病病原菌的初步研究	
..... 曾占壮(50)	
一例引起鳗鲡死亡的病原分离鉴定	
..... 王凡(60)	
寄生于暗纹东方鲀的异沟盘虫属一新种	
..... 樊海平,卓玉琛,林煜(65)	
几种养殖贝类中副溶血弧菌的分离与鉴定	
..... 何丽斌,周宸,林克冰(73)	
坛紫菜叶状体病烂的病理学初步研究	
..... 周宸,林克冰,何丽斌,林琪,吴建绍,叶金聪,方琼珊(79)	
大黄鱼肝胆综合征组织病理学观察	
..... 谢友全,刘振勇,林小金,施学文(85)	
福州琅岐池塘养殖草鱼出血病诊断	

.....	杨小强,江小斌,刘年锋,张善霖,王伟(92)
水产致病性迟钝爱德华氏菌的快速分离鉴定研究	
.....	杨金先,陈强,龚晖(97)
磺胺甲噁唑在欧洲鳗鲡血浆和肌肉中的 RP-HPLC 检测方法	
.....	林丽聪,樊海平,余培建,廖碧钗(103)
噻啉酸在花尾胡椒鲷体内的代谢动力学及残留的研究	
.....	林克冰,刘海新,吴建绍,周宸,何丽斌,叶玫(109)
黄芪多糖对罗非鱼白细胞吞噬能力和免疫器官重量的影响	
.....	林旋,张伟妮,王寿昆,黄文焱,陈佳铭,赵董(117)
人工感染嗜水气单胞菌对日本鳗鲡血清酶活力的影响	
.....	张伟妮,林旋,王寿昆,陈威力(125)
生物学安全——零交换水系统在鲍病防治中应用的初步研究	
.....	陈月忠,黄万红,冯旭,李振华,杨火盛,周宸,林琪(132)
淡水养殖鱼类疫病防控技术措施探讨	
.....	吴金石(139)
曼氏无针乌贼对溶解氧耐受力的研究	
.....	刘振勇,谢友仨,林小金(147)
草鱼寄生指环虫的分期防治技术	
.....	李光照(153)
高效液相柱前衍生法测定麻痹性贝类毒素的方法研究	
.....	王雪虹,宋振荣,林文燕(158)
高温期罗源湾养殖皱纹盘鲍死亡原因分析与防治措施	
.....	宋振荣,陈月忠,马平,黄健,杨小强,任保卫(165)
日本鳗鲡腐皮病致病真菌原绵霉控菌药物筛选和治疗技术研究	
.....	樊海平,陈灵,曾占壮,卓玉琛(172)

鳗鲡迟缓爱德华菌抗独特型疫苗的制备及免疫效果研究

吴斌¹，樊海平¹，辛志明¹，钟全福¹，林煜¹，苏跃中²

(1. 福建省淡水水产研究所，福建 福州 350002; 2. 福建省水产技术推广总站，福建 福州 350003)

摘要：以抗迟缓爱德华氏菌菌株 AL60306NA1 的单克隆抗体 McAb3A7 为抗原免疫 Balb/c 小鼠，采用杂交瘤技术制备抗迟缓爱德华氏菌的抗独特型抗体 (AId McAb)，获得了 3 株可持续分泌抗迟缓爱德华氏菌 AId McAb 的杂交瘤细胞株 4C1、2D1、1C9；腹水效价分别达 1:8 000、1:32 000、1:16 000；细胞亚型均为 IgG₃；竞争抑制实验表明 2D1、1C9 能模拟迟缓爱德华氏菌的抗原表位；以所制的 Ab2 β 型 AId McAb 2D1 制备成抗独特型疫苗，疫苗免疫欧洲鳗鲡，疫苗免疫保护率最高达 60%，受免欧洲鳗鲡血清特异性抗体产生水平高，为鳗鲡爱德华菌病的免疫防治提供了新的方法。

关键词：鳗鲡；迟缓爱德华氏菌；杂交瘤技术；抗独特型抗体；疫苗

鳗鲡爱德华菌病 (Edwardsiellosis)，亦称肝肾病，病原菌为迟缓爱德华氏菌^[1-4]。养殖鳗鲡主要发病于春季和夏季，从白仔到成鳗均有发生，在黑仔和养成期发病率较高时，死亡率可高达 50% 以上。患病鳗鲡主要症状为体表前腹肝区部位肿大，甚至溃烂穿孔，肝脏露出，肛门红肿，皮肤和鳍条充血；解剖发现肝、肾肿大，瘀血，有白色脓溃病灶，有时胃肠充血，少量的腹水，胃肠充满白色黏稠状液体^[3]。该病在亚洲、非洲、美洲均有发生，给我国的台湾、广东、福建的养鳗业带来较大的损失。

针对迟缓爱德华氏菌已开展了全菌灭活疫苗对小鼠和剑尾鱼的免疫保护^[5]、全菌灭活疫苗对日本比目鱼的免疫效果^[6]、无致病力菌株对日本比目鱼的免疫测试^[7]、鞭毛蛋白的免疫原性^[8]、抗原蛋白 ESeD 和 ET18 的表达与免疫效果^[9]等免疫功能研究；已研制出了弱毒活疫苗^[10]、OMP-LPS 偶联亚单位疫苗^[11]；同时，还有针对爱德华氏菌病灭活疫苗不同储存条件下的稳定性和免疫原性等相关研究^[12]。免疫学方法逐渐成为爱德华菌病防治的重要措施。

具有抗原位点“内影像”结构的抗独特型抗体可作为替代抗原制备疫苗^[13]。福建省

基金项目：福建省科技计划项目 (项目编号: 2007N0014)；福建省科技创新平台建设项目 (2009N2003)，闽发改高技 [2008] 796 号。

作者简介：吴斌 (1978—)，男，福建建瓯人，工程师，硕士，主要从事水产病害分子免疫学研究。电话: 0591-83732002，E-mail: wubinfire@126.com

淡水水产研究所水生动物病害防控研究室针对鳗鲡爱德华氏菌病的强致病菌株 AL60306NA1，制备了单克隆抗体 McAb3A7，本文以 McAb3A7 为免疫原，利用杂交瘤技术制备迟缓爱德华氏菌抗独特型单克隆抗体 Anti-Idiotypic McAb (AId McAb)，筛选出具有模拟抗原结构的 Ab2 β ，制备成鳗鲡爱德华氏菌病抗独特型疫苗，并进行免疫效果初步研究。

1 材料与方法

1.1 菌株、细胞株

迟缓爱德华氏菌野生型 (AL60306NA1) 由福建省淡水水产研究所水生动物病害防控研究室分离保存；分泌抗迟缓爱德华氏菌的单克隆抗体杂交瘤细胞株 3A7 为福建省淡水水产研究所水生动物病害防控研究室建株保存；骨髓瘤细胞 Sp2/0 由第四军医大学组织学与胚胎学教研室提供。

1.2 试剂与培养基

RPMI-1640 培养液、HAT 培养液、HAT 储存液、HRP 标记的羊抗兔 IgG、HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体、Ig 亚类鉴定试剂盒购自华美生物工程公司；抗体纯化试剂盒购自 PIERCE 公司；OPD 底物、牛血清白蛋白、完全（不完全）弗氏佐剂 (CFA、IFA) 购自 Sigma 公司；PEG (MW4000) 购自 Merck 公司；8-氮杂鸟嘌呤购自 Gibco 公司；细菌培养基均购自北京陆桥公司；佐剂 IMS1312 由法国 SEPPIC 公司惠赠。

1.3 抗迟缓爱德华氏菌兔多克隆抗体的制备

取甲醛灭活的迟缓爱德华氏菌用无菌生理盐水将菌体浓度调整为 1×10^8 cfu/mL，取 0.5 mL 于皮下、肌内多点注射免疫新西兰兔（重约 2 kg，购自上海斯莱克实验动物有限责任公司），14 d 后耳静脉同量追加免疫，第二次免疫后每间隔 7 d 耳静脉同法免疫一次，第四次免疫后 3 d 由耳静脉采血 2 mL，检测血清效价，效价达到要求后，采用颈动脉放血，5 000 r/min 离心 10 min，取上清分装，-80℃ 保存备用。

1.4 McAb3A7 抗原的纯化

根据葡萄球菌蛋白 A 亲和层析纯化法，McAb3A7 小鼠腹水经 0.22 μ m 无菌滤膜过滤后，每次取 1 mL 用等量的 PBS (pH 值为 7.2) 稀释后上样，然后用 10 倍柱体积的 PBS (pH 值为 8.0) 通过，以 1 mL/min 的速度洗脱未结合蛋白，以 1 mL 为单位分步收集洗脱液；再用 10 倍柱体积的甘氨酸-盐酸缓冲液 (pH 值为 2.5) 洗脱结合蛋白，以 1 mL 为单位分步收集洗脱液于含 50 μ L Tris-HCl (pH 值为 10.5) 中和液中，使 pH 值调至 8.0 左右。纯化后抗体于 PBS (pH 值为 7.2) 中 4℃ 透析，换透析液 4 次，紫外分光光度法测定抗体蛋白质浓度，并对抗体蛋白溶液进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测纯化效果。冷冻干燥浓缩至浓度为 2 mg/mL 分装，-80℃ 保存备用。

1.5 Balb/c 小鼠的免疫

取纯化后的 McAb3A7, 调整浓度约 200 $\mu\text{g/mL}$, 加等体积完全弗氏佐剂充分乳化, 以 0.5 mL/只的剂量腹腔注射免疫 8 周龄的 Balb/c 小鼠 (购自上海斯莱克实验动物有限责任公司), 分别于初次免疫后的第 2、第 4、第 6 周以等量 McAb3A7 追加免疫。

1.6 迟缓爱德华氏菌 Aid McAb 细胞系的建立

根据杂交瘤技术步骤, 筛选建立抗 AL60306NA1、McAb3A7 的 Aid McAb 细胞株, 并制备 Aid McAb 细胞株小鼠腹水^[14]。迟缓爱德华氏菌 Aid McAb 阳性克隆用双抗夹心 ELISA 法筛选, 应用于检测筛选的酶标板包被纯化后的兔抗迟缓爱德华氏菌多克隆抗体蛋白。

1.7 迟缓爱德华氏菌 Aid McAb 小鼠腹水效价、细胞株亚类测定

迟缓爱德华氏菌 Aid McAb 的效价测定按双抗夹心 ELISA 法进行; Aid McAb 细胞株 Ig 亚类鉴定参照 Ig 亚类鉴定试剂盒步骤进行。

1.8 迟缓爱德华氏菌 Aid McAb 竞争性抑制实验及 Aid McAb 类型分析

灭活迟缓爱德华氏菌菌株 AL60306NA1 以浓度 1×10^8 cfu/mL 包被酶标板, 将兔抗迟缓爱德华氏菌多克隆血清 (1:10 000) 与系列浓度梯度 Aid McAb 等体积混匀, 37℃ 预反应 1 h 后, 间接 ELISA 法检测混合液中兔多抗血清 OD 值并计算抑制率。

抑制率计算公式为

$$\text{抑制率} = \frac{\text{基点对照 OD 值} - \text{相关对照 OD 值}}{\text{基点对照 OD 值}} \times 100\%$$

基点对照 OD 值——兔多抗血清与抗体稀释液混匀反应所测的 OD 值;

相关对照 OD 值——兔多抗血清与系列浓度梯度 Aid McAb 混匀反应所测的 OD 值。

将具有模拟原始抗原“内影像”特性的 Aid McAb 腹腔注射免疫 Balb/c 小鼠, 方法同 1.5, 制备小鼠多抗血清, 应用间接 ELISA 法测定 Aid McAb (Ab2) 诱导的 Ab3 与原始抗原 AL60306NA1 结合能力, 进一步分析 Aid McAb 类型。

1.9 迟缓爱德华氏菌抗独特型疫苗的制备

以制备的 Ab2 β 型 Aid McAb 杂交瘤细胞株腹腔注射小鼠, 大量制备 Ab2 β 型抗独特性单克隆抗体蛋白, 硫酸铵沉淀法进行蛋白纯化, 纯化后抗体于 PBS (pH 7.2) 中 4℃ 透析, 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 紫外分光光度法测定抗独特性单克隆抗体蛋白质浓度, 冷冻干燥法浓缩成为白色粉末状迟缓爱德华氏菌抗独特型疫苗, 疫苗为注射剂 (冻干粉), 采用西林瓶包装, 以 5 mg/瓶分装, 2~8℃ 保存。经稳定性、安全性和免疫原性测试后方可使用。

1.10 迟缓爱德华氏菌抗独特型疫苗免疫效果测试

以所研制的迟缓爱德华氏菌抗独特型疫苗。取 120 只重约 50 g 的欧洲鳎鲷, 分 4 组,

每组 30 尾，暂养 1 周。迟缓爱德华氏菌抗独特型疫苗采用注射免疫方式（表 1）。第 1 组注射等量生理盐水；第 2 组在疫苗与佐剂 IMS1312 乳化后，进行一次注射免疫；第 3 组在疫苗与完全弗氏佐剂（CFA）乳化后，进行一次注射免疫；第 4 组在疫苗与完全弗氏佐剂（CFA）乳化后，进行第一次免疫，并于 28 d 后，在疫苗与不完全弗氏佐剂（IFA）乳化后，进行第二次加强免疫。

表 1 迟缓爱德华氏菌抗独特型疫苗免疫欧洲鳗鲡

实验组	第一次免疫	第二次免疫（第 28 d）	佐剂	鳗鲡数/尾
1	生理盐水	无	无	30
2	疫苗	无	IMS1312	30
3	疫苗	无	CFA	30
4	疫苗	疫苗	CFA（IFA）	30

1.10.1 细菌攻毒实验

于第一免疫后第 42 d 取 10 尾欧洲鳗鲡做攻毒实验，攻毒 2 周后计算保护率，对照组亦同。相对百分存活率（relative percent survival）按下列公式计算： $RPS = \{1 - (\text{免疫组死亡率} / \text{对照组死亡率})\} \times 100\%$ 。

1.10.2 特异性抗体动态变化检测

于第一免疫后 2~6 周取欧洲鳗鲡血清进行特异性抗体产生水平动态变化检测。检测方法按间接 ELISA 法进行，灭活迟缓爱德华氏菌包被酶标板，一抗为实验欧洲鳗鲡血清，二抗为抗欧洲鳗鲡 Ig McAb（福建省农业科学院鱼病研究中心赠送），三抗为抗 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体。

2 结果

2.1 抗迟缓爱德华氏菌兔多克隆抗体的制备

灭活迟缓爱德华氏菌第四次免疫新西兰兔后，获取兔抗迟缓爱德华氏菌多克隆血清约 100 mL，间接 ELISA 法检测迟缓爱德华氏菌兔多抗血清的效价为 $1:10^6$ ，可用于迟缓爱德华氏菌的检测。

2.2 McAb3A7 抗原的纯化

抗迟缓爱德华氏菌单克隆抗体蛋白 McAb3A7 小鼠腹水经葡萄球菌蛋白 A 亲和层析纯化法纯化后，SDS-PAGE 结果如图 1 所示，纯化后的抗体纯度较高，其重链分子质量约为 50 kD，轻链分子质量约为 25 kD。可作为免疫原应用于抗独特型单克隆抗体的制备。

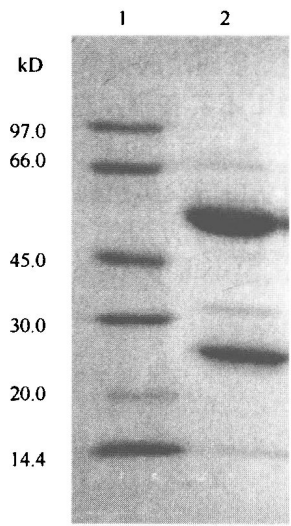


图1 抗体 McAb3A7 纯化电泳图

Lane 1: Protein marker; Lane 2: purified IgG of 3A7

2.3 迟缓爱德华氏菌 AId McAb 细胞系的建立

以单克隆抗体蛋白 3A7 为免疫原，制备迟缓爱德华氏菌 AId McAb 杂交瘤细胞株系的过程共进行 4 次细胞融合，融合率约为 40.0%。筛选出阳性杂交瘤细胞孔后，对细胞孔中的细胞进行 3 次以上的单克隆化，获得 3 株能稳定分泌 AId McAb 的阳性细胞株，分别命名为：4C1、2D1、1C9。

2.4 迟缓爱德华氏菌 AId McAb 小鼠腹水效价、细胞株亚类测定

制备 3 株迟缓爱德华氏菌 AId McAb 小鼠腹水各约 20 mL，3 株 AId McAb 的效价测定、Ig 亚类鉴定结果见表 2。

表 2 3 株 McAb 亚型及效价鉴定

细胞株	亚型	腹水效价
4C1	IgG ₃	1:8 000
2D1	IgG ₃	1:32 000
1C9	IgG ₃	1:16 000

2.5 迟缓爱德华氏菌 AId McAb 竞争性抑制实验 AId McAb 类型分析

随着迟缓爱德华氏菌抗独特型单克隆抗体 2D1、1C9 浓度的增加，迟缓爱德华氏菌兔多抗与原始抗原迟缓爱德华氏菌免疫反应的 OD 值均逐渐下降，迟缓爱德华氏菌 AId McAb 2D1、1C9 的竞争抑制率最高达 60.66%、48.89%，表明这 2 株 AId McAb 具有抗原

模拟性，能与迟缓爱德华氏菌兔多抗结合，从而竞争抑制了迟缓爱德华氏菌与兔多抗的反应，即 2D1、1C9 能模拟迟缓爱德华氏菌的抗原表位。而 AId McAb 4C1 不能抑制迟缓爱德华氏菌与兔多抗的反应，即 4C1 不具备模拟迟缓爱德华氏菌的抗原表位的功能。竞争抑制实验结果见表 3。

AId McAb 2D1、1C9 免疫小鼠获得的鼠多抗血清，ELISA 法测定结果表明 AId McAb 2D1 能诱导出与原始抗原有较强的结合能力的 Ab3；AId McAb 1C9 诱导出的 Ab3 与原始抗原不能结合。该结果说明 AId McAb 2D1 属于 Ab2 β 型抗独特型抗体，可应用于抗独特型抗体疫苗制备。

表 3 迟缓爱德华氏菌 AId McAb 竞争抑制实验结果

抗独特型抗体	抑制率		
	1:10	1:100	1:1 000
4C1	4.56	4.43	2.85
2D1	60.66	45.23	20.65
1C9	48.89	37.12	13.88

2.6 迟缓爱德华氏菌抗独特型疫苗的制备

以制备的 Ab2 β 型 AId McAb 2D1 为基础，制备出白色粉末状迟缓爱德华氏菌抗独特型疫苗，西林瓶包装，5 mg/瓶分装。经检测，无菌无毒，安全性高；于 2~8℃ 保存，稳定性好；免疫原性强，可应用于鱼类免疫。

2.7 迟缓爱德华氏菌抗独特型疫苗免疫保护率测试

以欧洲鳗鲡为模式动物，迟缓爱德华氏菌抗独特型疫苗采取腹腔注射方式免疫，配合佐剂 IMS1312、CFA、IFA 进行免疫效果测试。第一次免疫后 42 d，迟缓爱德华氏菌 AL60306NA1 腹腔注射攻毒，计算疫苗的保护率（表 4）。结果显示，在 3 个免疫组中，第 4 组免疫作用效果最好，保护率达 60%；第 3 组免疫保护率为 40%；第 2 组免疫保护率为 30%，对照组鳗鲡均死亡。

表 4 迟缓爱德华氏菌抗独特型疫苗免疫保护率测试结果

实验组	鳗鲡数	鳗鲡死亡数/2 周	保护率/%
1	10	10	0
2	10	7	30
3	10	6	40
4	10	4	60

2.8 受免欧洲鳗鲡血清特异性抗体产生动态变化规律

通过间接 ELISA 法测定血清特异性抗体免疫应答水平，各组受免欧洲鳗鲡特异性抗

体产生动态变化情况见图 2, 各免疫组血清检测 OD_{450} 值均高于第 1 组; 各免疫组血清 OD_{450} 值与阴性对照组血清 OD_{450} 值 $P/N > 2.0$, 差异显著。3 个免疫组在第一次免疫后 14 ~ 35 d 时, 血清特异性抗体产生逐渐增多; 在 35 ~ 42 d 期, 血清特异性抗体产生水平维持在较高的水平; 第 4 组特异性抗体产生最快, 而且第 42 d 后仍处于上升趋势; 第 3 组特异性抗体较第 2 组特异性抗体产生快, 受免 35 d 后第 3 组特异性抗体产生水平几乎没有变化, 而第 2 组却下降较快。

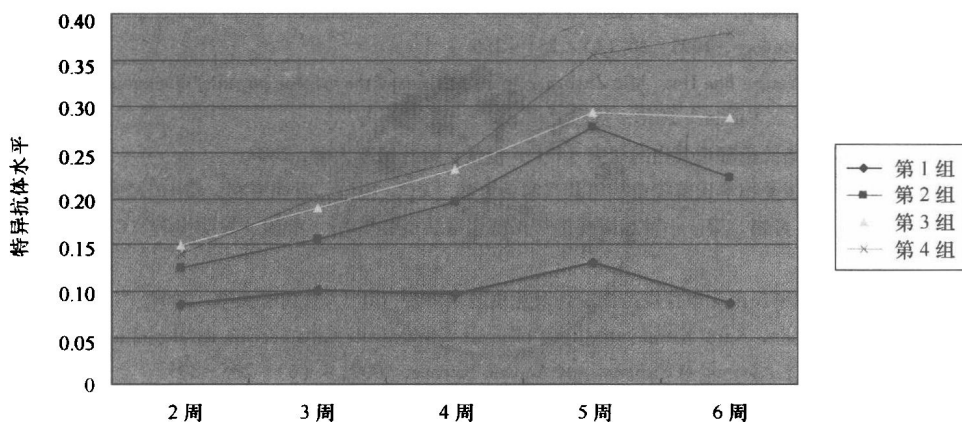


图2 受免欧洲鳎血清特异性抗体动态变化规律

3 讨论

免疫网络学说^[15]提出免疫系统内部调节的独特型 (idiotype) 和抗独特型 (anti-idiotypic) 的网络理论, Nisonoff 等^[13]提出具有抗原“内影像”的抗独特型抗体可作为替代抗原制备抗传染病疫苗的设想后, 抗独特型抗体疫苗成为一个研究新热点和水产疾病预防的新方向。牙鲆鱼溶藻弧菌、鳎弧菌、迟缓爱德华菌病多联抗独特型抗体疫苗已经研制成功, 并核发了《新兽药注册证书》。金晓航^[16]等以迟缓爱德华氏菌标准株制备的单抗 3F7 为抗原, 制备的抗独特型抗体疫苗配合佐剂使用后, 对受免牙鲆免疫保护率显著提高, 体现了较好的免疫效果。秦红^[17]等克隆并分析迟缓爱德华菌抗独特型单克隆抗体 VH 基因, 为进一步构建迟缓爱德华菌抗独特型抗体基因工程疫苗奠定了基础。

由于迟缓爱德华氏菌毒力因子多, 血清型复杂, 不同地域、不同鱼种分离到的致病性迟缓爱德华氏菌毒力差异大。在疫苗制备中, 根据养殖区域特点、主要养殖鱼种类别选择特定的毒株就显得尤为重要。本文以患爱德华菌病的欧洲鳎肝脏分离得到的强毒力菌株 AL60306NA1 为疫苗制备的基础, 应用两步法, 在制备 Ab1 的前提下, 进一步制备出 Ab2 β 型抗独特型抗体, 研制的抗独特型抗体疫苗对欧洲鳎免疫保护效果好, 为鳎肝肾病的免疫防治提供了新的方法。

参考文献:

- [1] 韩先朴, 李伟, 陈光辉. 鳎爱德华氏病的研究 [J]. 水生生物学报, 1989, 13 (3): 259-264.

- [2] 陈会波, 翁燕玲, 王励. 鳗鲡肝肾病原菌的研究 [J]. 汕头大学学报 (自然科学版), 1991, 6 (1): 65 - 72.
- [3] 卢全章, 朱心玲. 鳗鲡肝肾病原菌的研究 [J]. 水生生物学报, 1994, 18 (4): 360 - 368.
- [4] 陈昌福, 高志新, 高汉娇. 日本鳗鲡爱德华氏菌病原菌的分离与鉴定 [J]. 华中农业大学学报, 1998, 17 (4): 282 - 287.
- [5] 陆承平. 迟缓爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*) 对小鼠和剑尾鱼的免疫保护试验 [J]. 中国兽医学报, 2002, 22 (3): 251 - 253.
- [6] Mekuchi T T, Kiyokawa K, Honda T, et al. Vaccination trials in the Japanese flounder against Edwardsiellosis (in Japanese) [J]. Fish Pathology, 1995, 30 (4): 251 - 256.
- [7] Shuang Chenga, b, Yong - hua Hua, Min Zhanga, et al. Analysis of the vaccine potential of a natural avirulent Edwardsiellatarda isolate [J]. Vaccine, 2010, Jan 25.
- [8] 张晓佩. 迟缓爱德华氏菌鞭毛蛋白的研究 [D]. 福州: 福建师范大学, 2008.
- [9] 孙黎, 侯进慧. 迟缓爱德华氏菌疫苗抗原及其制备方法 [P]. 中国, 发明专利, CN101319009. 2008. 12. 10.
- [10] 莫照兰, 茅云翔, 肖鹏, 等. 一种迟缓爱德华氏菌弱毒活疫苗 [P]. 中国, 发明专利, CN101342367. 2009. 01. 14.
- [11] 潘鸿涌. 迟钝爱德华氏菌亚单位疫苗的制备及免疫效果评价 [D]. 石河子大学, 2008.
- [12] Mer Mosharraf Hossain, Kenji Kawai. Stability of effective Edwardsiella tarda vaccine developed for Japanese Eel (*Anguilla japonica*) [J]. Journal of Fisheries and Aquatic Science, 2009, 4 (6): 296 - 305.
- [13] Nisonoff A, Lamoyi E. Implications of the presence of an internal image of the antigen anti - idiotype antibodies: possible application to vaccine production [J]. Clin Immunol Immunopathol, 1981, 21: 397.
- [14] 徐志凯. 实用单克隆抗体技术 [M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1992: 27 - 102.
- [15] Jerne N K. Towards a network theory of the immune system [M]. Annual Immunology, 1974, 125C: 373.
- [16] 金晓航, 黄威权, 夏永娟, 等. 迟缓爱德华氏菌抗独特型单克隆抗体的制备及鉴定 [J]. 水生生物学报, 2005, 29 (3): 340 - 343.
- [17] 秦红, 黄威权, 杨向民, 等. 抗迟缓爱德华氏菌独特型单克隆抗体重链可变区基因的克隆及序列分析 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2007, 23 (2): 155 - 156.

Preparation anti - idiotypic antibody vaccine against *Edwardsiella tarda* and its immune effect in European eel

WU Bing¹, FAN Hai - ping¹, XIN Zhi - ming¹, ZHONG Quan - fu¹, LIN Yu¹, SU Yue - zhong²

(1. The Freshwater Fisheries Research Institute of Fujian Province, Fuzhou 350002, China; 2. The Fishery Technical Extension Center of Fujian Province, Fuzhou 350001, China)

Abstract: Balb/c mice were immunized by monoclonal antibody (McAb) 3A7 which against *Edwardsiella tarda*. AL60306NA1 anti - idiotypic McAbs were prepared by using hybridoma technique. 3 strains of hybridomas secreting AId McAbs against McAb 3A7 named 4C1, 2D1, 1C9 were obtained, the ascites titers of AId McAbs were 1:8 000, 1:32 000 and 1:16 000, respectively; the isotype of the three AId McAbs were IgG₃; by Competitive - inhibitive experiment of