

蝦類弧菌病免疫點漬法之改進

宋延齡 張維仁

臺灣大學動物學系

兔 Anti-*Vibrio vulnificus* 血清經 33% 硫鉍及 DEAE-cellulose 離子交換樹脂純化。每毫克抗體加入不等量的 N-hydroxysuccinimide biotin。單位抗體上所連接生物素的量由 avidin-HABA 試劑測得每莫耳抗體上連接的生物素由 2.5 至 9.6 莫耳。由直接酵素連結免疫分析法得到下列的結果：(1) 每一莫耳抗體上平均連接 9 莫耳的生物素分析效果最好；(2) 9 莫耳以下或以上，並沒有更好的分析效果；(3) 直接酵素免疫點漬法其靈敏度與間接酵素免疫點漬法一樣，但只須要 5 個步驟及 4.5 小時即可判讀結果。單株抗體仿照兔抗血清步驟進行生物素偶合，每莫耳單株抗體連接生物素的量與多株抗體連接的數目並不相同，顯示兔子的多株抗體與老鼠的單株抗體對生物素的親和力不同。

前 言

酵素免疫點漬法 (immunodot blot assay) 配合使用卵白素-生物素複合體 (avidin-biotin complex)，在診斷魚、蝦、貝類細菌性疾病上較傳統的細菌培養法有許多的優點：第一，免除配製特定培養基及生化分析等繁瑣的工作，第二，節省時間。一套完整的生化性質分析至少約須一星期，而過去我們開發的間接酵素免疫點漬法配合使用卵白素-生物素複合體只須要 6 個步驟及 5.5 小時，靈敏度可達 1,000 個細菌。專一性由於使用單株抗體也都相當良好。雖然如此，6 個步驟仍稍嫌複雜 5.5 小時也略嫌長。因此我們嘗試將生物素連接在一次抗體上，將間接酵素免疫點漬法改為直接酵素免疫點漬法。此等改進可簡化手續及縮短時間，俾便於推廣至養蝦場使用。

材 料 及 方 法

試藥：

主要試藥有：Biotinamidocaproate N-hydroxysuccinimide ester (B-cap-NHS, Sigma), 4-Hydroxyazobenzene-2'-carboxylic acid (HABA, Pierce), Avidin (Pierce), A.B.C. Kit (Pierce), ABTS (2,2-azino-di-(3-ethyl-benzthiazoline sulfonate) diammonium salt, BM), AEC (3 amino-9-ethylcarbazole, Pierce)。

抗體之純化：

兔抗血清 (Rabbit anti-*V. vulnificus* TG617) 以 33% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 鹽析作初步純化，再以 DEAE-cellulose 陰離子交換樹脂做更進一步的純化。所得純化後的抗體冷凍乾燥備用。老鼠腹水含單株抗體 P3C3 以 50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 鹽析作初步純化，其餘步驟與純化兔抗血清相同。

生物素連接上抗體：

生物素連接抗體的步驟參考 Miralles *et al.*, (1991)，而做少許修改。簡言之，冷凍乾燥後的抗體加入 Sodium borate buffer (0.1M, pH 8.0)，使抗體最後濃度約為 1 mg/ml。將 B-cap-NHS 溶入 DMSO，濃度為 10 mg/ml。不等量的 B-cap-NHS 分別加入 300 μl 純化的兔多株抗體，室溫下反應 4 小時。反應後依每 250 mg B-cap-NHS 加入 20 μl NH_4Cl (1M) 的比例，將 NH_4Cl 加入各實驗組以終止反應。最後在 4°C 下以 PBS 透析去掉未連接上抗體的生物素，雖然生物素分子量不大 (244 Da)，但因透析速度慢，故至少透析 24 小時。透析完後取出生物素連接之抗體 (biotin-conjugated antibody) 備用。

測量連接到抗體上生物素的數量：

測量抗體上所連接生物素的數量根據 Green (1970) 的呈色法。簡言之，利用 HABA 染劑對 avidin 的親和力較 biotin 對 avidin 來得低之特性，測量游離態 HABA 之濃度以換算 biotin 之濃度。當 biotin-conjugated antibody 的溶液加入 avidin-HABA 試劑時，抗體上連接之 biotin 取代 HABA 而與 avidin 結合，而釋放出 HABA，會產生顏色的變化，由分光光度計在波長 500 nm 吸光值變化情形，換算出生物素的量。配製 avidin-HABA 試劑，其濃度為 500 nm 波長之吸光值接近 0.9。生物素連接抗體之溶液 100 ml 加入 900 μl avidin-HABA 試劑，測 500 nm 波長的吸光值。每莫耳抗體連接上生物素的莫耳數 = (吸光值差/3.4) / 抗體濃度。

抗原的製備：

將 *V. vulnificus* TG617 培養在 tryptic soy broth (TSB, 2.5% NaCl, Difco) 約 18 hr，所得細菌以 Gram stain 檢驗是否為純菌，再以 rabbit α -*V. vulnificus* serum 做凝集試驗 (agglutination test) 進一步確認。再將細菌離心 (11,000 g, 20 min, Hitachi, RPR 10-2) 後吸去上清液，細菌沉澱以 PBS 沖洗，如此重覆三次，最後將細菌懸浮於 PBS 中，置入 water bath (65°C) 一小時，去除細菌之活性。最後調整細菌懸浮液的濃度，在 525 nm 波長吸光值為 1.916，此時細菌濃度相當於 10^8 cells/ml。

連接在抗體上最適量生物素的測量：

1. 直接酵素免疫分析法 (direct ELISA)

取 96 槽微量滴定盤 (Griner)，每槽加入 100 μ l 抗原 (*V. vulnificus* TG617, 10^9 cells/ml)。37°C 下作用一小時，以 PBST 洗去未吸附槽面之抗原。再以明膠 NET 溶液 200 ml 填塞未被抗原吸附的部份，37°C 作用一小時。PBST 清洗數次後，連接生物素之抗體以 2 倍連續稀釋依序加入各槽 100 μ l，負對照組中加入明膠 NET 溶液 100 μ l，37°C 下作用一小時，再以 PBST 清洗數次。每槽再加入 ABC (Avidin-horseradish peroxidase conjugated biotin complex) 100 μ l，此溶液必須在使用前 30 分鐘配製，37°C 下作用一小時。PBST 清洗過後每槽加含呈色劑 ABTS 之受質溶液 200 μ l，37°C 下作用 10~15 min，由 ELISA reader (Molecular Devices) 讀 405 nm 波長之吸光值。將各槽所讀出之數據除以負對照組，以此值做 Y 軸，每莫耳抗體上連接生物素的數目做 X 軸製圖。

2. 間接酵素免疫分析法 (indirect ELISA)：

間接酵素免疫分析法與直接酵素免疫分析比較，觀察抗體經生物素連接後活性是否降低。抗原吸附及填塞未被抗原吸附之處的步驟與直接酵素免疫分析法相同。PBST 清洗過後，未連接生物素之抗體以二倍連續稀釋依序加入各槽 100 μ l，負對照組加入明膠 NET 溶液 100 μ l，37°C 下作用一小時。再以 PBST 洗去未與抗原作用的抗體。各槽再加入生物素連接之二次抗體 (Biotinylated goat α -Rabbit Ig, 以明膠 NET 溶液稀釋 220 倍, Pierce) 100 μ l。37°C 下作用一小時，再以 PBST 清洗數次。每槽再加入 ABC，呈色劑

方法皆與直接酵素免疫法相同。將各槽所讀出之數據除以負對照組，所得數值與直接酵素免疫分析法比較，觀察抗體連接生物素後是否失去活性。

酵素免疫點漬法 (Immunodot blot assay) 測量生物素連接抗體之靈敏度：

PVDF 膜使用前以甲醇浸潤 15 sec，以降低其厭水性 (hydrophobicity)，再以純水洗淨。再將膜轉浸至 PBS (1 M, pH 7.0) 15 min。完畢後以純水清洗。再將膜夾入過濾裝置 (Hybrid Dot 96-well Filtration Manifold, BRL)，將十倍連續稀釋之抗原 (10^8 cells/ml) 100 μ l 加入凹槽內，用抽氣馬達將抽乾，使抗原吸附至 PVDF 膜。以 PBST 清洗膜數次，將膜置入明膠 NET 溶液內室溫下震盪 30 min，填塞未與抗原作用的部份。直接酵素免疫點漬法：取每莫耳抗體上連接 6~9 莫耳生物素之生物素連接抗體，100 X 稀釋。約 3 ml 稀釋後抗體均云覆在膜上，37°C 下作用一小時，以 PBST 清洗數次。將膜浸入 ABC 溶液中，室溫下震盪 30 min，再以 PBST 清洗數次。最後加入呈色劑 AEC，待呈色後，取出膜以 PBS 洗去多餘的呈色劑，陰乾後保存。間接酵素免疫點漬法：100 X 稀釋純化之抗體約 3 ml 均云覆在已吸附抗原並完成填塞的膜上，37°C 下作用一小時，以 PBST 清洗數次。將膜浸入 biotinylated goat anti-rabbit Ab (220 X, Pierce)，室溫下震盪 1 hr，PBST 洗淨後加入 ABC 溶液及呈色方法與直接酵素免疫點漬法相同。

結 果

兔多株抗體連接生物素的情況可由 Table 1 看出，B-cap-biotin 的數量愈多，每莫耳抗體上所連接的生物素也就愈多，其範圍為 2.5~9.6 mol biotin/mol Ab。但從直接酵素免疫分析法 (Fig. 1) 得到以下結果：(1) 每一莫耳抗體上平均連接 9 莫耳的生物素效果最好。(2) 9 莫耳以上生物素連接在抗體上並沒有更好的呈色結果。(3) 連接未超過 9 莫耳，抗體連接生物素越多則呈色效果越好。直接比間接酵素免疫分析法操作步驟減少一步，所須時間也減少 1 hr。Table 2 與 圖 1 比較，在低倍稀釋時，直接酵素免疫分析法較間接法有高的呈色比值 (ELISA ratio)。高倍稀釋時 (512 X 以上) 反之，間接法有較高的呈色比值，但經生物素連接之抗體活性並未消失。由酵素免疫點漬法 (圖 2)，直接酵素免疫點漬法與間接酵素免疫點漬法其靈敏度一樣，皆為 10 cells。但直接酵素免疫點漬法比間接法少一個步驟，所須時間也由 6.5 hr 減為 5.5 hr。

蝦類弧菌病免疫點漬法之改進

Table 1. Determination of moles of biotin conjugated to a mole of polyclonal antibody.

Biotin (mg) added to per mg of Ab	30	60	120	240	360	480	600	900
Moles of biotin /per mole of Pab	2.5	2.8	4.5	5.3	6.3	7.0	9.0	9.6

Table 2. The ELISA Ratio of indirect ELISA

Pab dilution	10	40	160	640	2,560
ELISA ratio (positive/negative control)	3.6	3.2	2.8	2.4	2.1

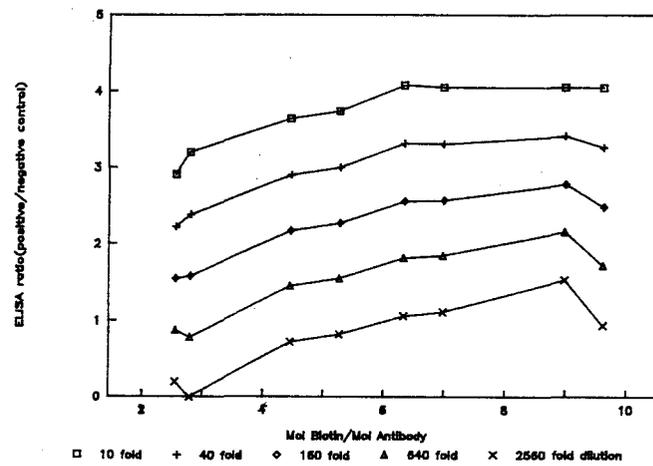


Figure 1 : Determination of the biotin-conjugated Pab activity with the direct ELISA.

Log Cells	immunodot blot	
	indirect	direct
7	-	6.3 7.0 9.0
6		
5		
4		
3		
2		
1		
C		

Figure 2 : Sensitivity of ABC immunodot blot assay for *Vibrio vulnificus*.

討 論

經由胺基酸殘基 (amino acid residues) 將生物素連接上抗體，可供連接的有 tyrosine, lysine, glutamic acid, aspartic acid，可供連接的基團相當多，但過飽和的連接可能使抗體上 Antigen-binding fraction (Fab) 的部位也被連接上生物素的分子，因而失去抗體活性，純化的兔多株抗體連接 9 莫耳以下生物素分子時，活性隨生物素分子連接的數目呈正相關，連接 9 莫耳以上生物素分子時，活性即不再增加，且有下降的趨勢，可能就是過飽和的生物素連接所致。不論是在 ELISA 或是酵素免疫點漬法，直接法都較間接法減少一個步驟，也縮短所須時間約 1 hr。活性及靈敏度也與間接法相同。

致 謝

此計劃承行政院農委會補助經費 (82 科技-2.11-漁-05(11))，謹申謝忱。實驗期間承化學系陸天堯教授給予有機化學方面的指導，深表感謝。

參 考 文 獻

- Green, N.M., (1970). Spectrophotometric determination of avidin and biotin. *Methods Enzymol.* 18A, 418
- Miralles, F., Y. Takeda, M.J. Escibano (1991). Comparison of carbohydrate and peptide biotinylation on the immunological activity of IgG1 murine monoclonal antibodies. *J. Immunol. Methods* 140:191-196
- Song, Y.L., S.P. Lee, Y.T. Lin and C.C. Chen (1992). Enzyme immunoassay for shrimp viriosis. *Dis. Aquat. Org.* 14:43-50

Improvement of Enzyme Immunoassay for Shrimp Vibriosis

Yen-Ling Song Wei-Jen Chang

Department of Zoology, College of Science, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, R. O. C.

Rabbit anti-*Vibrio vulnificus* serum was purified with 33% Amonium sulfate and DEAE-cellulose ion exchange column. Different amount of N-hydroxysuccinimide biotin were added to the immunoglobulin solution. The amount of biotin covalently bound to one mole of Ig was determined with the Avidin-HABA reagent. It was estimated to be 2.5 to 9.6 moles biotin per mole Ig. Results were obtained from the ELISA : (1) the best result was obtained when 9 moles of biotin bound to one mole of Ig; (2) better result was not obtained when less or more than 9 moles of biotin bound to one mole of Ig;(3) the sensitivities of direct and indirect immunodot blot assays were same, but the former took 5 steps and the result was reading after 4.5 hours. Purified monoclonal antibodies (Mabs) were biotinylated with the same protocol as the rabbit antiserum. However, the numbers of biotin conjugated to one mole of Mab were different from those conjugated to polyclonal antibodies (Pabs). This result shows that the affinity of Mab to the biotin molecules is different from that of Pab.

