

文章编号: 1674-7054(2013)04-0369-05

测定无乳链球菌灭活疫苗浓度的分光光度法

张 晗, 周永灿, 赵光军, 蔡 岩, 谢珍玉, 郭伟良, 王世锋

(海南大学 海洋学院/热带生物资源可持续利用国家重点实验室培育基地, 海南 海口 570228)

摘 要: 以无乳链球菌灭活疫苗为研究对象, 利用分光光度计建立了快速准确测定该灭活疫苗浓度的方法。研究结果表明, 波长为 600 nm 处无菌生理盐水及稀释后的无乳链球菌灭活疫苗均无特征吸收峰, 吸光度变化平缓, 此时无乳链球菌灭活疫苗的吸光值(X) 与其浓度(Y) 呈正相关($r=0.998\ 3, df=6, P<0.01$), 其关系曲线为: $y=11.277x-2.022\ 9$ 。无乳链球菌菌液经 $\varphi=0.4\%$ 甲醛灭活 3 h 的 A_{600} 值基本稳定; 选择 4 名实验员对该方法进行重复检测, 结果显示所测疫苗 A_{600} 值的 RSD 为 $0.5\% \sim 1.2\%$, 且符合上述相关性方程; 说明利用分光光度计法测定经甲醛灭活的无乳链球菌疫苗浓度, 其结果较准确、重复性较好, 具有简单快速的特点。

关键词: 无乳链球菌; 灭活疫苗; 浓度测定; 分光光度法

中图分类号: S 942.5

文献标志码: A

无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*) 属于 B 群链球菌(group B Streptococcus, GBS)^[1], 该菌宿主范围广泛, 能够感染包括人、畜禽及水产动物等在内的多种陆生和水生动物。自 2009 年以来, 我国广东、广西、海南等罗非鱼主要养殖区每年均会暴发由无乳链球菌感染引起的链球菌病, 暴发范围广, 死亡率高, 对罗非鱼养殖造成了毁灭性的影响^[2-3]。目前, 罗非鱼链球菌病主要采用抗生素治疗和疫苗防治^[4-6], 但抗生素治疗存在病原易产生耐药性、微生物生态平衡被破坏、残留药物影响人体健康等诸多缺点, 而免疫防治安全、高效, 可有效克服抗生素防治存在的各种缺陷。因此, 研发和推广使用无乳链球菌疫苗已成为近年来罗非鱼链球菌病防治的热点之一^[7-8]。罗非鱼链球菌疫苗免疫接种的方法主要有注射法、口服法和浸泡法 3 种, 无论使用哪一种接种方法, 其免疫保护效果都与接种疫苗浓度直接相关^[9-10]: 疫苗浓度过低无法达到预期的免疫保护效果, 而疫苗浓度过高则会提高使用成本, 不利于疫苗的应用与推广。因此, 快速准确地确定疫苗浓度对经济高效地使用疫苗十分关键。无乳链球菌等细菌性疫苗浓度测定一般采用平板计数法和血球计数板计数法, 这两种方法虽然具有直观、容易和测定结果比较准确等优点, 但均存在耗时长、操作繁琐等缺点, 尤其不适合大批量样品的快速测定。为此, 笔者利用可见分光光度计建立了简便、快速、准确地测定无乳链球菌灭活疫苗浓度的方法, 旨在为罗非鱼无乳链球菌病的免疫防治研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料 罗非鱼致病性无乳链球菌为本实验室于 2009 年从海南琼海某罗非鱼养殖场采集的患病罗非鱼脑部分离获得, 经生理生化及分子生物学鉴定后, $-80\ ^\circ\text{C}$ 保存于本实验室。罗非鱼由海口吉诺玛公司提供, 体质量为 $(90 \pm 3)\text{ g}$, 于本实验室水族馆中暂养。岛津 UV-2450 紫外-可见分光光度计

收稿日期: 2013-08-13

基金项目: 海南省重点科技计划项目(ZDXM20120005); 海口市重点科技项目; 海南大学地方服务项目(海南重要淡水养殖品种健康养殖及其产品质量控制关键技术); 海南大学青年基金(qnjj1206); 海南大学研究生实践教学资助项目

作者简介: 张晗(1987-), 男, 湖北宜昌人, 海南大学海洋学院 2011 级硕士研究生。

通信作者: 王世锋(1977-), 男, 副教授, E-mail: shifeng_15@163.com

购自日本岛津公司; 脑心浸萃液体培养基(BHI) 购自青岛日水生物技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 无乳链球菌灭活疫苗的制备、计数及安全性检测 取 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存的罗非鱼致病性无乳链球菌于脑心浸液(BHI) 固体培养基平板划线复活, $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后, 挑取单菌落接种于装有 50 mL BHI 液体培养基的 100 mL 三角瓶中, $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ $180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡培养 16 h。将培养后的菌液经 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $4\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 弃上清, 用无菌生理盐水($w=0.9\%$ 的 NaCl 溶液) 稀释重悬至原体积, 反复离心及重悬 3 次以彻底清除培养基后, 加入终质量分数 $\varphi=0.4\%$ 的甲醛于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 灭活 24 h, 经 BHI 平板划线检测彻底灭活后即成为无乳链球菌灭活疫苗。取 1 mL 灭活疫苗经无菌生理盐水稀释 100 倍后以血球计数板计数, 确定该灭活疫苗浓度。

取菌液浓度 $1\times 10^8\cdot\text{mL}^{-1}$ 灭活疫苗注射 20 尾健康罗非鱼, 每尾 0.1 mL; 取 10 尾健康罗非鱼作为空白对照, 每尾注射 $w=0.9\%$ 的生理盐水, 随后观察 20 d, 确定疫苗安全性。

1.2.2 分光光度法特异性测定波长的选择 将无菌生理盐水($w=0.9\%$ 的 NaCl 溶液) 与菌液浓度为 $1\times 10^8\cdot\text{mL}^{-1}$ 的无乳链球菌灭活疫苗进行 200~800 nm 全波长扫描, 然后依据全波长扫描结果, 选取疫苗和生理盐水都没有特征吸收峰, 且曲线平滑的波长作为测定波长。以选取的适合波长分别测定无菌生理盐水与分别经无菌生理盐水 20, 40, 80 倍稀释的无乳链球菌灭活疫苗溶液的吸光值, 每组测定 3 次, 取平均值以验证疫苗在该波长处的特异性。

1.2.3 疫苗浓度与吸光值之间的相关性测定 取制备的无乳链球菌灭活疫苗分别利用生理盐水稀释成菌液浓度为 0.5×10^7 , 1×10^7 , 2×10^7 , 4×10^7 , 6×10^7 , 8×10^7 , $1\times 10^8\cdot\text{mL}^{-1}$, 测定不同浓度菌液的吸光值(A_{600}), 每个浓度测定 4 次, 取平均值。以 Excel 软件分析细菌浓度与其吸光值之间的相关性, 并作出菌液浓度与吸光值之间的关系曲线。

1.2.4 疫苗浓度稳定性检测 将培养的无乳链球菌菌液用无菌生理盐水稀释成菌液浓度为 $1\times 10^8\cdot\text{mL}^{-1}$, 并分成 4 份, 取其中 1 份于 $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下振荡培养并每隔 1 h 测定 1 次吸光值 A_{600} , 共测定 3 次; 另外 3 份加入终浓度 $\varphi=0.4\%$ 甲醛灭活, 于 $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下振荡培养, 分别培养 1, 2, 3 h 后测定 A_{600} 值, 计算平均值及相对标准差(RSD), 检测测定结果的稳定性。

1.2.5 方法重复稳定性检测

选择 4 名实验员按照 1.2.1 培养无乳链球菌灭活疫苗, 将培养的疫苗用无菌生理盐水分别稀释成菌浓度为 5×10^7 , 6×10^7 , 7×10^7 , $8\times 10^7\cdot\text{mL}^{-1}$, 分别测定吸光值 A_{600} , 计算平均值及相对标准差(RSD), 检验检测方法重复稳定性。

2 结果与分析

2.1 无乳链球菌疫苗浓度检测波长的选择 无菌生理盐水与菌液浓度为 $1\times 10^8\cdot\text{mL}^{-1}$ 的无乳链球菌灭活疫苗以 200~800 nm 全波长扫描的结果见图 1, 结果表明, 波长为 600 nm 处无菌生理盐水及稀释后的无乳链球菌灭活疫苗均无特征吸收峰, 吸光度变化平缓。由表 1 可

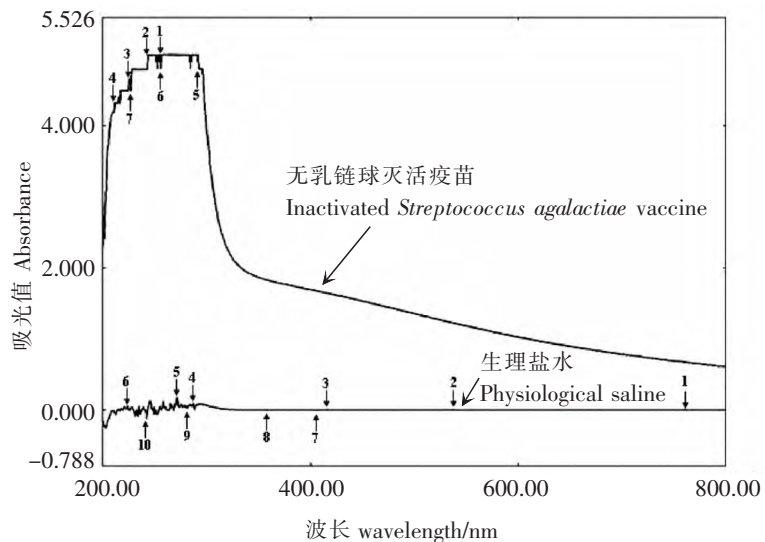


图 1 无菌生理盐水与经 20 倍稀释的无乳链球菌灭活疫苗在波长为 200~800 nm 的吸光值(数字编号表示该处有波动)

Fig. 1 The absorbance values of physiological saline and 1:20 diluted inactivated vaccine against *S. agalactiae* scanned at 200–800 nm wavelength (the numbers show the fluctuations)

表 1 无菌生理盐水与无乳链球菌灭活疫苗经不同浓度稀释后的 A_{600} 值

Tab. 1 A_{600} value of different dilutions of physiological saline and inactivated vaccine against *S. agalactiae*

待测样品 Test samples	经不同浓度稀释后的 A_{600} 值		
	A_{600} after diluted to different concentrations		
	1 : 20	1 : 40	1 : 80
无菌生理盐水 Physiological saline(I)	0. 001	0. 000	0. 001
无乳链球菌灭活疫苗(II) Inactivated vaccine against <i>S. agalactiae</i> (II)	0. 620	0. 405	0. 201
A_{600} (I) / A_{600} (II)	0. 2%	0	0. 5%

知,无菌生理盐水与无乳链球菌灭活疫苗分别经不同浓度(1 : 20,1 : 40 和 1 : 80) 稀释后,在相同稀释度下两者吸光值 A_{600} 之比均小于 1%,说明无菌生理盐水的干扰非常微弱,可以忽略不计。因此,初步选择用于无乳链球菌疫苗浓度检测的光波波长为 600 nm。

取菌液浓度 $1 \times 10^8 \cdot \text{mL}^{-1}$ 灭活疫苗注射 20 尾健康罗非鱼,以注射 $w = 0.9\%$ 生理盐水的 10 尾健康罗非鱼作为空白对照,随后观察 20 d 注射灭活疫苗及空白对照的罗非鱼均健康存活,未观察到患病迹象,表明该灭活疫苗对罗非鱼是安全的。

2.2 无乳链球菌灭活疫苗浓度与 A_{600} 值的相关性 由图 2 可知,在无乳链球菌灭活疫苗浓度为 $0.5 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8 \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内,疫苗浓度与其 A_{600} 值的相

关性如下: 相关系数 $r = 0.998\ 3$, $df = 6$, $t = 54.350 > t_{0.01(6)} = 3.143$, $P < 0.01$; 无乳链球菌灭活疫苗浓度与其 A_{600} 值之间呈正相关,这表明选择疫苗吸光度的测定波长为 600 nm 是合适的。此外,本研究选择疫苗浓度范围在 $0.5 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8 \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,其 A_{600} 值范围为 $0.231 \sim 1.072$,位于分光光度计检测的敏感范围内,检测结果可靠。

2.3 疫苗浓度的稳定性检测 无乳链球菌经 $\varphi = 0.4\%$ 甲醛灭活前后不同时间的吸光度 A_{600} 值检测结果表明(见表 2),未经甲醛灭活的无乳链球菌 A_{600} 值稳定性较差,2 h 内测定的 A_{600} 值的相对标准差(RSD) 为 17.8%;而经过甲醛灭活 3 h 的无乳链球菌菌液的 A_{600} 值基本稳定,2 h 内测定的 A_{600} 值的 RSD 为 0.5%。

表 2 无乳链球菌经不同处理后 A_{600} 稳定性检测结果

Tab. 2 The stability of A_{600} of *S. agalactiae* after different treatments

测定次数 Test times	未加甲醛 Formaldehyde free	加甲醛后 After adding formaldehyde		
		1 h	2 h	3 h
1	1. 075	1. 089	1. 082	1. 080
2(1 h)	1. 022	1. 072	1. 076	1. 074
3(2 h)	0. 759	1. 000	1. 075	1. 069
$\bar{x} \pm s$	0.952 ± 0.169	1.054 ± 0.047	1.078 ± 0.004	1.074 ± 0.006
RSD / %	17. 8	4. 5	0. 4	0. 5

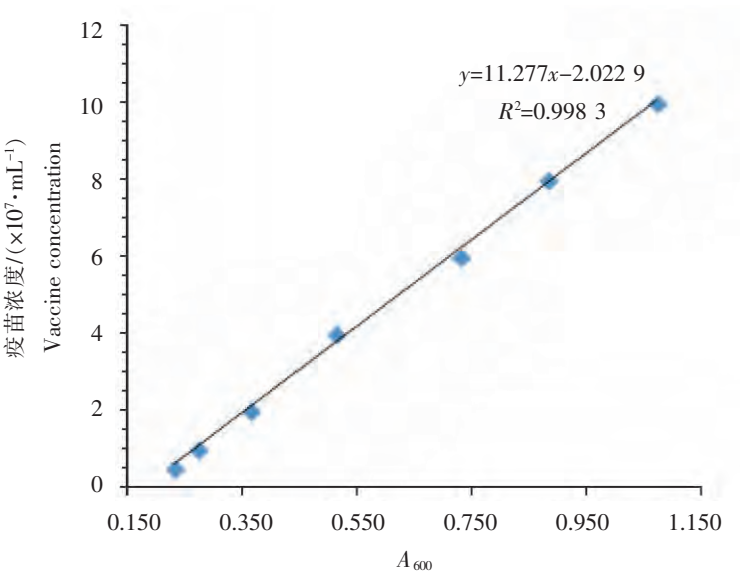


图 2 疫苗浓度与其 A_{600} 的相关性

Fig. 2 Correlation between the concentrations of inactivated vaccine against *S. agalactiae* and their A_{600} value

2.4 方法的重复性检测结果 4 名实验员各自制备浓度为 5×10^7 , 6×10^7 , 7×10^7 和 8×10^7 的无乳链球菌灭活疫苗并测定吸光值 A_{600} , 每人对各自制备的样品重复检测 5 次, 所测疫苗 A_{600} 值的 RSD 为 0.5% ~ 1.2% (表 3), 符合 2.2 结果中相关性方程, 说明该方法的重复性较好。

表 3 分光光度法检测无乳链球菌灭活疫苗浓度的重复性检测结果

Tab. 3 The repeatability of spectrophotometry for testing the concentrations of vaccine against *S. agalactiae*

疫苗浓度 Vaccine concentration/ ($\cdot \text{mL}^{-1}$)	A_{600}					$\bar{x} \pm s$	$RSD/\%$
	1	2	3	4	5		
5×10^7	0.609	0.619	0.615	0.622	0.629	0.619 ± 0.007	1.2
6×10^7	0.727	0.730	0.728	0.722	0.721	0.726 ± 0.004	0.5
7×10^7	0.822	0.805	0.801	0.811	0.797	0.807 ± 0.010	1.2
8×10^7	0.882	0.886	0.878	0.880	0.865	0.878 ± 0.08	0.9

3 讨论

分光光度法在测定溶液中物质的含量上具有广泛的应用范围^[1-14], 但在实际应用中首先需要选择合适的测定波长^[15-17], 波长选择不当会导致溶液中物质的干扰而影响测定结果; 其次要检测建立的测定方法的重复性及其测定结果的稳定性, 重复性较差或稳定性较弱的实验方法不能准确重复测定溶液中所含物质的含量。目前, 已有多人建立了测定疫苗浓度的分光光度法, 如魏东等建立了检测鼠疫疫苗浓度和炭疽疫苗浓度的分光光度法, 该方法确定的检测波长为 600 nm, 其重复测定结果相对标准差分别为 0 ~ 4.3% 和 2.1% ~ 3.1%^[18-19]; 李恪梅等建立的测定布氏菌疫苗浓度的分光光度法确定的合适检测波长也为 600 nm, 其重复实验误差为 0 ~ 4.8%^[20]。此外, 陈寅儿利用分光光度法建立了一种铜绿假单胞菌浓度测定的新方法^[21], 该方法确定的最佳检测波长为 585 nm, 其 OD 值与菌液浓度的相关系数达 96% 以上; 李冬阳等综合考虑了紫外段仪器光源的稳定性和 200 nm 附近菌液的干扰吸收, 建立了一种快速检测细菌总数的方法^[22], 确定 240 nm 为 H_2O_2 检测波长, 发现大肠杆菌单位细胞浓度酶活的速率常数与细菌浓度呈现良好的线性关系。目前已建立的分光光度法主要集中在测定人用疫苗及人类病原菌的浓度, 鲜见该方法测定渔用无乳链球菌疫苗浓度的报道。

笔者在对无菌生理盐水和 $1 \times 10^8 \cdot \text{mL}^{-1}$ 的无乳链球菌灭活疫苗进行 200 ~ 800 nm 全波长扫描的基础上, 通过测定无乳链球菌灭活疫苗浓度与其 A_{600} 值之间的相关性, 建立了适合无乳链球菌灭活疫苗浓度测定的分光光度法, 该方法的合适检测波长为 600 nm, 4 名实验员的重复测定结果的相对标准差为 0.5% ~ 1.2%, 该相对标准差小于魏东等建立的鼠疫疫苗浓度测定分光光度法^[18] 和李恪梅等建立的布氏菌疫苗浓度测定分光光度法的^[20], 说明笔者建立的无乳链球菌疫苗浓度测定分光光度法具有良好的稳定性、重复性, 具有准确、快速和方便的特点, 适合于该疫苗浓度的快速测定。

魏东等的研究还表明, 利用生理盐水稀释 1 h 后的炭疽杆菌菌液其吸光值可降低 17.8%; 而利用终质量分数 $\varphi = 1\%$ 的甲醛处理后, 样品放置 3 h 的吸光值也仅降低 0.5%, 说明甲醛灭活处理对菌液的吸光度具有较好的稳定作用^[19]。本实验对无乳链球菌经 $\varphi = 0.4\%$ 甲醛灭活处理前后 A_{600} 值变化的测定结果与魏东等对炭疽杆菌的研究结果相似, 在不加入终质量分数 $\varphi = 0.4\%$ 的甲醛灭活前, 无乳链球菌在 1 h 后的 A_{600} 值可降低 3.3%, 2 h 后的 A_{600} 值则进一步降低 29.4%, 相对标准差达 17.8%; 而无乳链球菌经终质量分数 $\varphi = 0.4\%$ 的甲醛灭活处理 2 h 后, 其吸光值仅降低 1.0%, 相对标准差为 0.5%, A_{600} 值的稳定性明显提高。

参考文献:

- [1] EVANS J J, KLESIUS P H, GILBERT P M, et al. Characterization of beta-haemolytic group B *Streptococcus agalactiae* in cultured seabream, *Sparus auratus* (L) and wild mullet, *Liza klunzingeri* (Day) in Kuwait [J]. Journal of Fish Disease, 2002, 25 (9): 505 - 513.

- [2] 李波, 陈明, 李莉萍, 等. 广西罗非鱼链球菌病原的生化鉴定及药敏试验 [J]. 中国畜牧兽医, 2008, 35(10): 93-95.
- [3] 张新艳, 樊海平, 钟全福, 等. 罗非鱼无乳链球菌的分离、鉴定及致病性研究 [J]. 水产学报, 2008, 32(5): 772-778.
- [4] 卢迈新. 罗非鱼链球菌并研究进展 [J]. 南方水产, 2010, 6(1): 75-79.
- [5] STOFFREGEN D A, BACKMAN S C, PERHAM R E, et al. Initial disease report of *Streptococcus iniae* infection in hybrid striped (Sunshine) bass and successful therapeutic intervention with the fluoroquinolone antibacterial enrofloxacin [J]. Journal of the World Aquaculture Society, 1996, 27(4): 420-434.
- [6] AGNEW W, BARNES A C. *Streptococcus iniae*: an aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination [J]. Veterinary Microbiology, 2007, 122(1/2): 1-15.
- [7] EVANS J J, KLESIUS P H, SHOEMAKER C A. Efficacy of *Streptococcus agalactiae* (group B) vaccine in tilapia (*Oreochromis niloticus*) by intraperitoneal and bath immersion administration [J]. Vaccine, 2004(22): 3769-3773.
- [8] KLESIUS P H, EVANS J J, Shoemaker C A. Warmwater fish vaccinology in catfish production [J]. Animal Health Research Reviews, 2004(5): 305-311.
- [9] 马爱敏, 闫茂仓, 胡利华, 等. 灿烂弧菌灭活菌苗对美国红鱼免疫效果的研究 [J]. 水生态学杂志, 2010, 3(3): 137-141.
- [10] 邓显文, 谢芝勋, 刘加波. 嗜水气单胞菌、爱德华氏菌灭活菌苗免疫保护剂药物治疗实验 [J]. 广西农业科学, 2010, 41(3): 266-269.
- [11] 杜明权, 李东, 阳宇, 等. 紫外分光光度法测定盐酸莫西沙星片的含量 [J]. 中国现代药物应用, 2008, 2(2): 6-7.
- [12] 杨锡祥. 紫外-可见分光光度法测定药物含量不确定度评定 [J]. 安徽医药, 2008, 12(1): 29-30.
- [13] 魏桂林, 赖庆文, 廖志宪. 紫外分光光度法测定茶碱的血药浓度 [J]. 中国现代药物应用, 2008, 2(6): 9-10.
- [14] 邓丽华. 分光光度法测定饮用水中铁的含量 [J]. 科技资讯, 2010(2): 241-242.
- [15] 刘岗, 范志超, 张志琪. HPLC 同时测定成药中 4 种乌头类生物碱含量 [J]. 药物分析杂志, 2010, 30(2): 236-239.
- [16] 刘善新, 候立静, 靳光乾, 等. 藕节中鞣质的含量测定研究 [J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(2): 238-240.
- [17] 菜顺香. 紫外分光光度法测定芦柑中的还原型维生素 C [J]. 光谱实验室, 2009, 26(5): 1091-1094.
- [18] 魏东, 王秉翔, 李格梅, 等. 分光光度法测定鼠疫疫苗浓度方法的建立 [J]. 中国医药生物技术, 2009, 4(2): 119-121.
- [9] 魏东, 王秉翔, 李格梅, 等. 分光光度法测定炭疽疫苗的浓度 [J]. 中国生物制品学杂志, 2010, 23(8): 894-905.
- [20] 李格梅, 魏东, 王秉翔, 等. 人用布氏菌疫苗浓度测定分光光度法的建立 [J]. 中国药事, 2011, 25(3): 233-235.
- [21] 陈寅儿. 分光光度法测定铜绿假单胞菌浓度的初步研究 [J]. 水生态学杂志, 2010, 3(4): 150-152.
- [22] 李冬阳, 茹柿平, 吴坚, 等. 分光光度法快速检测细菌 [J]. 分析化学研究简报, 2010, 38(4): 573-576.

Establishment of Spectrophotometric Method for Concentration Determining of the Inactivated Vaccine Against *Streptococcus agalactiae*

ZHANG Han, ZHOU Yongcan, ZHAO Guangjun, CAI Yan, XIE Zhenyu, GUO Weiliang, WANG Shifeng

(College of Marine Sciences, Hainan University/State Key Laboratory Breeding Base for Sustainable Utilization of Tropical Bioresource, Haikou 570228, China)

Abstract: A method for rapid determination of the concentration of inactivated vaccine against the bacteria, *Streptococcus agalactiae* was established by spectrophotometry. At the wavelength of 600 nm both physiological saline and inactivated vaccine showed smooth absorbance change and no characteristic absorption peak wavelength. The A_{600} value (X) was positively correlated with the concentration of the vaccine (Y) ($r=0.998\ 3$, $df=6$, $P<0.01$), as revealed by the equation $y=11.277x-2.022\ 9$; the A_{600} value of vaccine remained stable when it was inactivated by 0.4% formaldehyde for 3 h. The determination was repeated by 4 laboratory technicians, and the results showed the A_{600} value was in accordance with the above correlation equation and its RSD ranged between 0.5%—1.2%. This indicates that this method for determination of the concentration of inactivated vaccine against the bacteria was very stable, repeatable, easy to handle and rapid.

Key words: *Streptococcus agalactiae*; inactivated vaccine; concentration determination; spectrophotometry