



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106841625 A

(43)申请公布日 2017.06.13

(21)申请号 201710068006.6

(22)申请日 2017.02.07

(71)申请人 青岛农业大学

地址 266109 山东省青岛市城阳区长城路  
700号

(72)发明人 王文琪 徐申波 张玉娜 王鑫  
任贻超

(74)专利代理机构 北京科亿知识产权代理事务  
所(普通合伙) 11350

代理人 汤东风

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

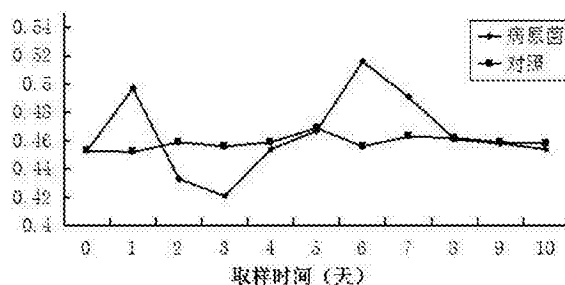
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

### (54)发明名称

三疣梭子蟹血细胞的酶联免疫检测试剂盒  
及其制备方法

### (57)摘要

本发明公开了一种三疣梭子蟹血细胞的酶联免疫检测试剂盒及其制备方法,三疣梭子蟹血细胞的酶联免疫检测试剂盒,包含酶标板、封闭液、洗涤液、酶标记抗体、pNPP底物显色液、磷酸盐缓冲液、血细胞抗凝剂和抗三疣梭子蟹血细胞的单克隆抗体;本发明将抗原、抗体的特异性反应与酶底物的高效催化作用相结合起来,其敏感度高,特异性强,精确度高,能够用于少量样品、多个样品的平行检测,重复性稳定性都大大提高。能够将三疣梭子蟹血细胞的变化直观的表现出来,起到监测三疣梭子蟹健康状况的作用。



1. 三疣梭子蟹血细胞的酶联免疫检测试剂盒,其特征在于:包含酶标板、封闭液、洗涤液、酶标记抗体、pNPP底物显色液、磷酸盐缓冲液、血细胞抗凝剂和抗三疣梭子蟹血细胞的单克隆抗体。

2. 根据权利要求1所述的三疣梭子蟹血细胞的酶联免疫检测试剂盒,其特征在于:所述抗三疣梭子蟹血细胞单克隆抗体是由杂交瘤细胞株3F4分泌的抗三疣梭子蟹血细胞的单克隆抗体。

3. 根据权利要求1所述的三疣梭子蟹血细胞的酶联免疫检测试剂盒,其特征在于:所述的封闭液为含2.0%牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液。

4. 根据权利要求1所述的三疣梭子蟹血细胞的酶联免疫检测试剂盒,其特征在于:所述的洗涤液为含0.1%Tween-20的磷酸盐缓冲液。

5. 根据权利要求1所述的三疣梭子蟹血细胞的酶联免疫检测试剂盒,其特征在于:所述的酶标记抗体为碱性磷酸酶标记的羊抗小鼠IgG抗体。

6. 根据权利要求1所述的三疣梭子蟹血细胞的酶联免疫检测试剂盒,其特征在于:所述的血细胞抗凝剂为含0.02M EDTA的磷酸盐缓冲液。

7. 一种三疣梭子蟹血细胞的酶联免疫检测试剂盒的制备方法,其特征在于:步骤如下:

(1)、制备三疣梭子蟹血细胞标准样品:从健康的三疣梭子蟹游泳足基部软膜处抽取血淋巴,离心后、得到的全血细胞沉淀用磷酸盐缓冲液重悬,制成单细胞悬液,调整细胞悬液浓度为 $10^6$  cells/mL,经超声破碎后,即为血细胞标准样,作为抗原使用;

(2)、制备单抗:以血细胞标准样品为抗原免疫小鼠,BaIb/c免疫小鼠脾细胞与SP2/0骨髓瘤细胞的融合、克隆,制备三疣梭子蟹血细胞单克隆抗体;用间接免疫荧光法选取1株免疫荧光反应结果为强阳性,且能与颗粒细胞特异性结合的单克隆抗体作为抗三疣梭子蟹血细胞单克隆抗体;

(3)、优化抗原与抗体的最佳使用比例:分别用PBS将上述血细胞标准样品与上述血细胞单克隆抗体稀释不同的浓度梯度,通过ELISA棋盘滴定法获取抗原抗体的最适反应比例,从而确定抗原抗体的最佳使用比例;

(4)、建立检测结果的评估标准:上述的血细胞标准样用考马斯亮蓝测定其蛋白浓度,用PBS稀释血细胞标准样为不同的浓度梯度,及不经稀释的血细胞单克隆抗体3F4作为第一抗体,用ELISA法测定各个稀释度的OD值,来确定试剂盒的最低检测限度。

## 三疣梭子蟹血细胞的酶联免疫检测试剂盒及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及的是甲壳类分子免疫学技术领域,具体的说是一种三疣梭子蟹血细胞的酶联免疫检测试剂盒及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 蟹等甲壳动物缺乏脊椎动物那样完整的特异性免疫防御系统,不具有免疫球蛋白,其免疫防御反应机制主要依赖于血细胞(透明细胞和颗粒细胞)及血淋巴中体液因子,血细胞通过吞噬、包裹、凝集、胞吐、结节形成、伤口修复、细胞凝块等完成细胞免疫过程,大量研究证明透明细胞和颗粒细胞在机体免疫系统中都发挥重要作用,但功能不同,其中透明细胞主要参与血淋巴的凝集反应,颗粒细胞含有酚氧化酶和水解酶,主要参与对外来异物的吞噬和包裹。当机体受到重金属、低温、高温、饥饿及病原侵害等胁迫时,血细胞会发生显著变化。因此,血细胞是反应蟹类免疫防御功能和健康状况的重要指标之一。

[0003] 但目前有关三疣梭子蟹血细胞酶的功能、血细胞结构、血细胞参与免疫防御反应的机理在国内外研究较少,主要是由于没有合适的分子标记物研究其发生及反应机理,而单克隆抗体由于具有高灵敏度、高特异性、重复性强等特点常被应用于免疫细胞的定位和病原的定量研究中。目前已有中国对虾血细胞,扇贝血细胞单克隆抗体的研究报道,主要应用于研究识别、鉴定、检测血细胞变化等方面。因此,三疣梭子蟹血细胞单克隆抗体的制备为进一步研究三疣梭子蟹血细胞类型、不同血细胞之间的关系以及蟹类血细胞在三疣梭子蟹非特异性免疫系统中的作用提供了有力工具。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的在于针对现有技术的缺陷和不足,提供了一种三疣梭子蟹血细胞的酶联免疫检测试剂盒及其制备方法。

[0005] 为实现上述目的,本发明采用的技术方案是:一种三疣梭子蟹血细胞的酶联免疫检测试剂盒,包含酶标板、封闭液、洗涤液、酶标记抗体、pNPP底物显色液、磷酸盐缓冲液、血细胞抗凝剂,还包含抗三疣梭子蟹血细胞的单克隆抗体。

[0006] 进一步,所述抗三疣梭子蟹血细胞单克隆抗体是由杂交瘤细胞株3F4分泌的抗三疣梭子蟹血细胞的单克隆抗体。

[0007] 进一步,所述的封闭液为含2.0%牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液。

[0008] 进一步,所述的洗涤液为含0.1%Tween-20的磷酸盐缓冲液。

[0009] 进一步,所述的酶标记抗体为碱性磷酸酶标记的羊抗小鼠IgG抗体。

[0010] 进一步,所述的血细胞抗凝剂为含0.02M EDTA的磷酸盐缓冲液。

[0011] 一种三疣梭子蟹血细胞的酶联免疫检测试剂盒的制备方法,其步骤如下:

[0012] 1、制备三疣梭子蟹血细胞标准样品:从健康的三疣梭子蟹游泳足基部软膜处抽取血淋巴,离心后、得到的全血细胞沉淀用磷酸盐缓冲液重悬,制成单细胞悬液,调整细胞悬液浓度为 $10^6$ cells/mL,经超声破碎后,即为血细胞标准样,作为抗原使用;

[0013] 2、制备单抗：以血细胞标准样品为抗原免疫小鼠，BaIb/c免疫小鼠脾细胞与SP2/0骨髓瘤细胞的融合、克隆，制备三疣梭子蟹血细胞单克隆抗体；用间接免疫荧光法选取1株免疫荧光反应结果为强阳性，且能与颗粒细胞特异性结合的单克隆抗体作为抗三疣梭子蟹血细胞单克隆抗体；

[0014] 3、优化抗原与抗体的最佳使用比例：分别用PBS将上述血细胞标准样品与上述血细胞单克隆抗体稀释不同的浓度梯度，通过ELISA棋盘滴定法获取抗原抗体的最适反应比例，从而确定抗原抗体的最佳使用比例；

[0015] 4、建立检测结果的评估标准：上述的血细胞标准样用考马斯亮蓝测定其蛋白浓度，用PBS稀释血细胞标准样为不同的浓度梯度，及不经稀释的血细胞单克隆抗体3F4作为第一抗体，用ELISA法测定各个稀释度的OD值，来确定试剂盒的最低检测限度。

[0016] 本发明的有益效果为：本发明将抗原、抗体的特异性反应与酶底物的高效催化作用相结合起来，其敏感度高，特异性强，精确度高，能够用于少量样品、多个样品的平行检测，重复性稳定性都大大提高。能够将三疣梭子蟹血细胞的变化直观的表现出来，起到监测三疣梭子蟹健康状况的作用。

## 附图说明

[0017] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案，下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍，显而易见地，下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例，对于本领域普通技术人员来讲，在不付出创造性劳动的前提下，还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0018] 图1是本发明用于检测三疣梭子蟹经病原菌感染后血细胞数变化的结果。

## 具体实施方式

[0019] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白，以下结合附图及具体实施方式，对本发明进行进一步详细说明。应当理解，此处所描述的具体实施方式仅用以解释本发明，并不用于限定本发明。

[0020] 实施例1：

[0021] 三疣梭子蟹血细胞ELISA检测试剂盒的制备

[0022] 1、制备血细胞标准样：取3-4只正常健康的三疣梭子蟹，无菌注射器从游泳足基部软膜处抽取血淋巴，4℃预冷抗凝剂（29.835g NaCl，18gC6H12O6，38.426gC6H8O7，8.823gC6H5Na2O7，3.7224g EDTA-2Na，调整pH=7.3，双蒸水定容至1000mL）按体积比1:2混匀，4℃，1500rpm，离心6min，沉淀用磷酸盐缓冲液重悬，调整细胞悬液浓度为 $10^6$ cells/mL，超声破碎后，即为血细胞标准样，作为抗原使用，分装，-80℃冻存。

[0023] 2、制备抗三疣梭子蟹血细胞的单克隆抗体：

[0024] (1) BaIb/c小鼠的免疫：取上述制备好的血细胞抗原与等体积弗氏完全佐剂混合，完全乳化，取0.1mL腹腔注射4周龄雌性BaIb/c小鼠；2周后加强免疫，腹腔注射抗原0.1mL（佐剂改为弗氏不完全佐剂）；1周后二次加强免疫，尾静脉注射抗原0.1mL；1周后扩增免疫，尾静脉注射抗原0.1mL；三天后，BaIb/c免疫小鼠脾细胞与SP2/0骨髓瘤细胞的融合。

[0025] (2) 细胞融合并筛选血细胞的阳性杂交瘤细胞：BaIb/c免疫小鼠脾细胞与SP2/0骨

髓瘤细胞用常规方法进行细胞融合,培养;采用间接酶联免疫吸附法初步筛选阳性杂交瘤细胞株;采用有限稀释法克隆阳性杂交瘤细胞株3-4次,培养8-10天后,采用间接免疫荧光抗体法再次检测筛选阳性杂交瘤细胞株3F4。

[0026] (3) 血细胞单抗的收集与纯化:收集细胞培养板中的阳性杂交瘤细胞上清液,2000rpm,离心10min,弃血细胞沉淀,收集上清即为三疣梭子蟹血细胞单克隆抗体,过亲和层析柱,浓缩、透析、冻干,PBS重悬,分装,-80℃冻存。

[0027] 3、确定抗原与抗体的最佳使用比例:血细胞标准样品用PBS按照20,2-1到2-6的梯度稀释、包被4℃过夜;加以PBS配置的2%的牛血清蛋白溶液(封闭液)封闭1h;将血细胞单抗(一抗)按照20,2-1到2-5的梯度稀释,每孔100uI按棋盘滴定法加入相应的血细胞标准样品中,37℃孵育1.5h;加100uI酶标记抗体作为AP二抗,37℃孵育1h;加100uI pNPP底物显色液37℃孵育30min,酶标仪于405nm处读数。最后为节约成本并结合实际用量确定稀释度在抗原稀释4倍,单抗稀释4倍(即2-22-2)为最佳使用比例。

[0028] 表1不同稀释梯度的抗原和抗体结合的OD405nm,粗体为OD405nm≥0.408

[0029]

|  | 20<br>抗原 | 2-1 抗<br>原 | 2-2<br>抗原 | 2-3 抗<br>原 | 2-4 抗<br>原 | 2-5 抗<br>原 | 2-6<br>抗原 |
|--|----------|------------|-----------|------------|------------|------------|-----------|
|--|----------|------------|-----------|------------|------------|------------|-----------|

[0030]

|            |           |       |       |       |       |       |       |
|------------|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 20 抗体      | 0.35      | 0.408 | 0.496 | 0.433 | 0.295 | 0.264 | 0.227 |
| 2-1 抗<br>体 | 0.28<br>2 | 0.483 | 0.204 | 0.317 | 0.23  | 0.325 | 0.233 |
| 2-2 抗<br>体 | 0.32<br>8 | 0.275 | 0.475 | 0.209 | 0.266 | 0.224 | 0.245 |
| 2-3 抗<br>体 | 0.22<br>2 | 0.199 | 0.23  | 0.298 | 0.242 | 0.22  | 0.351 |
| 2-4 抗<br>体 | 0.19<br>5 | 0.206 | 0.191 | 0.195 | 0.223 | 0.194 | 0.199 |
| 2-5 抗<br>体 | 0.20<br>2 | 0.175 | 0.186 | 0.293 | 0.172 | 0.221 | 0.177 |

[0031] 4、建立检测结果的评估标准:取正常健康的三疣梭子蟹抽取血淋巴,制作血细胞破碎液,用考马斯亮蓝法测定、并调整到一致的蛋白浓度5mg/mL。将血细胞破碎液用PBS按照50,5-1到5-5的浓度梯度稀释后包被,4℃过夜;加封闭液封闭1h;将颗粒细胞单抗

(一抗),不经稀释,每孔100uI按棋盘滴定法加入相应的血细胞标准样中(阴性对照为骨髓瘤细胞培养上清液代替单抗),37℃孵育1.5h;加100uI酶标记抗体作为AP二抗,37℃孵育1h;加100uI pNPP底物显色液37℃孵育30min,再用酶标仪于405nm处读数。最后结果如表二所示当细胞破碎液稀释到5-4时,OD405nm/阴性对照 $\geq 2$ ,还是阳性;但当稀释度为5-5时,其OD405nm值基本与阴性对照无差异;这表示5-4为最低稀释度,即试剂盒的最低评估标准为8ug/ml。

[0032] 表2抗原稀释不同浓度梯度后的OD405nm值

[0033]

|  | 抗原 (5mg/ml) 稀释度 |     |     |     |     |     |     |
|--|-----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|  | 50              | 5-1 | 5-2 | 5-3 | 5-4 | 5-5 | 阴性对 |

[0034]

|    |        |        |        |        |        |        |        |
|----|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|    |        |        |        |        |        |        | 照      |
| 抗体 | 0.4229 | 0.3635 | 0.3012 | 0.2416 | 0.1879 | 0.0104 | 0.0753 |
|    | 3      | 8      | 3      | 8      | 6      | 7      |        |

[0035] 实施例2:

[0036] 三疣梭子蟹血细胞ELISA检测试剂盒的具体使用方法

[0037] 1、待测样品处理:取3-4只正常健康的三疣梭子蟹,无菌注射器从游泳足基部软膜处抽取血淋巴,与4℃预冷抗凝剂按体积比1:2混匀,混合液于4℃,1500rpm,离心6min,用磷酸盐缓冲液重悬,调整全血细胞悬液浓度为 $10^6$ cells/mL,经超声破碎后,即为待测样品。

[0038] 2、抗原包被:将上述待测样用PBS稀释到2-2,每孔100uI加到96孔板的孔中,4℃包被过夜;

[0039] 3、封闭:倒去孔内液体,每孔中加200uI洗涤液(PBST),轻轻摇晃5min,倒掉,反复3次。洗完后,在每孔中加入200uI封闭液,37℃孵育1h;

[0040] 4、一抗孵育:倒去孔内液体,每孔中加200uI洗涤液,5min/次,洗3次。每孔中再加入100uI用PBS稀释至2-2的抗三疣梭子蟹血细胞的单抗,37℃孵育1.5h;

[0041] 5、二抗孵育:倒去孔内液体,每孔中加200uI洗涤液,5min/次,洗3次。每孔中再加入100uI酶标记抗体,37℃孵育1h;

[0042] 6、显色读数:倒去孔内液体,每孔中加200uI洗涤液,5min/次,洗3次。每孔中再加入100uIpNPP底物显色液,37℃孵育30min,在酶标仪405nm处读数,即可分析待检样品中颗粒细胞的含量。

[0043] 实施例3:

[0044] 应用试剂盒检测三疣梭子蟹经病原菌感染后血细胞数的变化

[0045] 1、病原菌感染:将暂养的三疣梭子蟹分成两组,每组40只。感染组以 $5 \times 10^8$ CFU/mL病原菌悬液为病原菌感染液,注射三疣梭子蟹游泳足基部软膜处,每只0.1mL,对照组则注射同计量的无菌生理盐水。注射后24h,每天分别在感染组和对照组随机采集三疣梭子

蟹3-4只,共采集10天;

[0046] 2.待检样品的制备:将采集的三疣梭子蟹用无菌注射器从游泳足基部软膜处抽取血淋巴,立即与预冷血细胞抗凝剂按体积比为1:2混匀。混合液于3000r/min,4℃离心10min,抗凝剂重悬,超声波破碎,分装,-80℃冻存;

[0047] 3.试剂盒检测:将采集的病原菌感染组和对照组10天的待检样品,统一检测。检测步骤参见实施例2中所提供的本试剂盒的具体使用方法。

[0048] 应用本发明的试剂盒检测结果表明:三疣梭子蟹经病原菌感染后,第1天的血细胞数较对照值显著升高;之后的第2-3天急剧下降,并于第3天达到最低值;从第4天开始有所回升,并于第6,7天又显著高于对照组;最后恢复到对照组;而对照组的血细胞数10天内基本保持不变(如图1所示)。

[0049] 对于本领域技术人员而言,显然本发明不限于上述示范性实施例的细节,而且在不背离本发明的精神或基本特征的情况下,能够以其他的具体形式实现本发明。因此,无论从哪一点来看,均应将实施例看作是示范性的,而且是非限制性的,本发明的范围由所附权利要求而不是上述说明限定,因此旨在将落在权利要求的等同要件的含义和范围内的所有变化囊括在本发明内。不应将权利要求中的任何附图标记视为限制所涉及的权利要求。

[0050] 此外,应当理解,虽然本说明书按照实施方式加以描述,但并非每个实施方式仅包含一个独立的技术方案,说明书的这种叙述方式仅仅是为清楚起见,本领域技术人员应当将说明书作为一个整体,各实施例中的技术方案也可以经适当组合,形成本领域技术人员可以理解的其他实施方式。

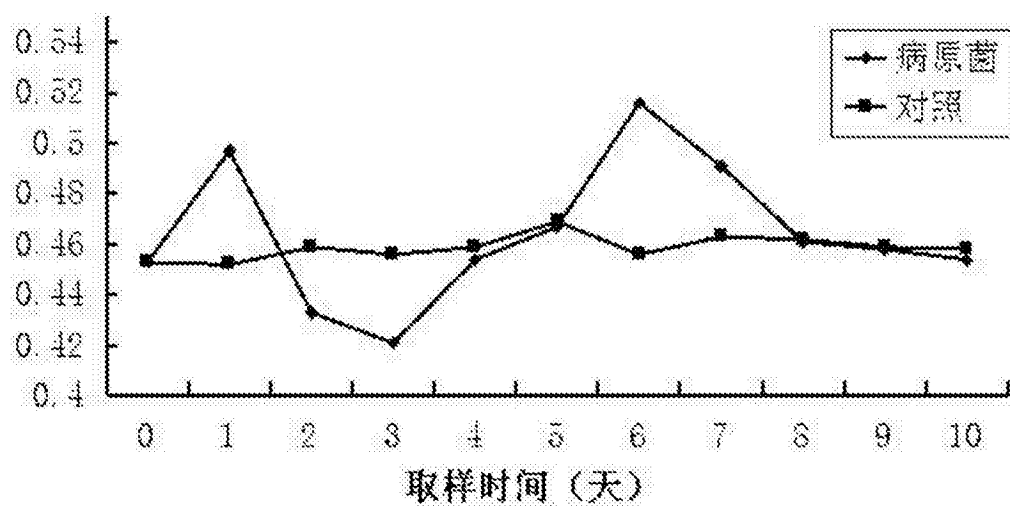


图1



|                |                                                |         |            |
|----------------|------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 三疣梭子蟹血细胞的酶联免疫检测试剂盒及其制备方法                       |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN106841625A</a>                   | 公开(公告)日 | 2017-06-13 |
| 申请号            | CN2017110068006.6                              | 申请日     | 2017-02-07 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 青岛农业大学                                         |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 青岛农业大学                                         |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 青岛农业大学                                         |         |            |
| [标]发明人         | 王文琪<br>徐申波<br>张玉娜<br>王鑫<br>任贻超                 |         |            |
| 发明人            | 王文琪<br>徐申波<br>张玉娜<br>王鑫<br>任贻超                 |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/577 G01N33/535                          |         |            |
| CPC分类号         | G01N33/577 G01N33/535                          |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a> |         |            |

# 摘要(译)

本发明公开了一种三疣梭子蟹血细胞的酶联免疫检测试剂盒及其制备方法，三疣梭子蟹血细胞的酶联免疫检测试剂盒，包含酶标板、封闭液、洗涤液、酶标记抗体、pNPP底物显色液、磷酸盐缓冲液、血细胞抗凝剂和抗三疣梭子蟹血细胞的单克隆抗体；本发明将抗原、抗体的特异性反应与酶底物的高效催化作用相结合起来，其敏感度高，特异性强，精确度高，能够用于少量样品、多个样品的平行检测，重复性稳定性都大大提高。能够将三疣梭子蟹血细胞的变化直观的表现出来，起到监测三疣梭子蟹健康状况的作用。

