

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910016820.9

[51] Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 21/31 (2006.01)

[43] 公开日 2009年12月16日

[11] 公开号 CN 101603964A

[22] 申请日 2009.7.10

[21] 申请号 200910016820.9

[71] 申请人 中国海洋大学

地址 266100 山东省青岛市崂山区松岭路 238 号

[72] 发明人 曹立民 许旭林 洪隋建新

权利要求书 1 页 说明书 4 页

[54] 发明名称

海产品中异尖线虫的酶联免疫检测方法

[57] 摘要

本发明公开了一种海产品中异尖线虫的酶联免疫检测方法，该方法分离纯化异尖属幼虫的虫体抗原，利用生物免疫技术制备特异性多克隆抗体；以 96 孔聚苯乙烯板为固相载体，事先以相应的完全抗原进行包被、载体蛋白进行封闭；检测时同时以不含有待测物的提取液为阴性对照，以异尖线虫抗原的标准液建立标准曲线；利用常规间接竞争酶联免疫吸附 (ELISA) 检测样品的吸光值并计算相应的抑制率，进而根据标准曲线测定样本中待测物 (以虫体抗原计) 的浓度。本发明灵敏度高、准确性好；操作简便快速，有效缩短了分析时间，可应用于鱼类等海产品中异尖线虫的快速筛选检测。

1. 一种利用免疫试剂盒检测海产品中异尖线虫的方法，其特征在于包括以下步骤：
 - (1) 从海产鱼类中采集分离异尖线虫并制备虫体抗原；
 - (2) 利用生物免疫技术制备并纯化异尖线虫的特异性抗体；
 - (3) 以虫体抗原包被 96 孔酶标板并进行封闭处理；
 - (4) 对待测样本中的异尖线虫进行分离提取；
 - (5) 将工作浓度的抗体溶液与样品提取液同时加入 96 孔板中，按照常规间接竞争酶联免疫 (ELISA) 的步骤和方法进行反应，最终利用酶标仪测定 OD450 值；
 - (6) 同时以不含有待测物的提取液代替样品液，同样条件下反应后作为阴性对照；以系列浓度的虫体抗原标准液代替样品液，同样条件下反应后建立标准曲线；
 - (7) 样本与阴性对照进行比较，引起吸光值降低 10%以上即判断为阳性样本，即含有待测异尖线虫，否则为阴性样本；并根据所建立的标准曲线进行回归分析测定待测样本中异尖线虫（以虫体抗原计）的浓度。
2. 根据权利要求 1 所述的检测方法，其特征是首先制备异尖线虫的虫体抗原并形成系列浓度的标准液 (3)。
3. 根据权利要求 1 所述的检测方法，其特征是首先利用生物免疫技术制备针对虫体抗原的特异性多克隆抗体 (4)。
4. 根据权利要求 5 所述的检测方法，其特征在于未知样中异尖线虫在测定前需要进行提取分离。
5. 根据权利要求 1 所述的检测方法，其特征在于检测结果通过吸光值判读，可以结合标准曲线定量测定样本中待测物的浓度。

海产品中异尖线虫的酶联免疫检测方法

技术领域

本发明涉及一种检测海产品中致病性寄生虫的检测方法，具体地说是涉及一种检测异尖线虫的酶联免疫检测方法。本发明由国家 863 项目（No. 2007AA091806）以及现代农业产业技术体系建设专项资金（nycytx-50-G09）资助完成。

背景技术

异尖线虫(anisakid larvae)为蛔目异尖科线虫，是目前海产品中对人体危害性最大的一类寄生虫，其致病性三期幼虫主要寄生于海栖鱼类，目前致病性较强、分布较为广泛的主要是异尖属线虫和伪新地蛔线属线虫。随着海产品生食方式的逐渐兴起，今后该寄生虫极有可能成为影响我国海产品食用安全性的重要危害因素之一。

目前对于海产品中异尖线虫的检测主要有灯检法和酶消化法，前者漏检率较高，而且无法准确定性，后者则存在着检测时间长，操作繁琐问题。因此研究一种准确灵敏而又更为简便快速的检测方法具有较高的学术价值和应用前景。

发明内容

针对传统检测方法存在的问题，本发明的目的在于提供一种样品前处理简单，而且简便、快速、灵敏、准确、经济的海产品中异尖线虫检测方法。

本发明的目的通过以下步骤实现：

- (1) 从海产鱼类体内收集异尖线虫属三期幼虫，经分离纯化后制备成虫体抗原；
- (2) 以所制备的虫体抗原，利用生物免疫技术免疫小鼠来制备异尖线虫抗体；
- (3) 96 孔聚苯乙烯酶标板预先包被完全抗原并进行封闭处理；
- (4) 对样品进行提取分离后，取 50 μ L 样品液加入 96 孔板中，再加入 50 μ L 工作浓度的抗体稀释液，37 $^{\circ}$ C 反应 90min，取出后用含 0.1%吐温-20 的磷酸盐缓冲液（0.01mol/L，pH7.4，PBS）振荡洗涤 3 次，每次 5min；
- (5) 取工作浓度的酶标二抗溶液，取 100 μ L 加入到 96 孔板中，37 $^{\circ}$ C 孵育 90min，取出后用含 0.1%吐温-20 的 PBS（0.01mol/L，pH7.4）振荡洗涤 3 次，每次 5min；
- (6) 加入 100 μ L 底物显色剂（3,3',5,5'-四甲基联苯胺，0.1mg/mL）到 96 孔板中，在室温暗处孵育 20min，再加入 50 μ L 反应停止液（H₂SO₄，2 mol/L）。
- (7) 同时以不含有待测物的提取液代替样品液，同样条件下反应后作为阴性对照；

以系列浓度的虫体抗原标准液代替样品液，同样条件下反应后建立标准曲线；根据标准曲线进行回归分析测定待测样本中异尖线虫（以虫体抗原计）的浓度。

与现有灯检、酶消化等寄生虫检测技术相比较，本发明的主要优点在于：

(1) 有效缩短了分析时间，操作更为简便快速，酶标板预先进行包被封闭处理后一般可以在4小时内完成检测，明显优于酶消化检测方法；

(2) 灵敏度和准确度较高，可以从海产品样品中检测到微量的异尖线虫；

(3) 今后容易组装形成便于携带和操作的检测试剂盒，用于适合大量样品的快速筛选处理。

具体实施方式

下面通过具体实施例来详细说明本发明。

实施例1：海产鱼片中异尖线虫的快速检测

1、异尖线虫虫体抗原的制备

利用酶消化法从鱼片中分离收集异尖线虫并利用形态学观察进行种属鉴定，将分离出的异尖属线虫的虫体用生理盐水洗净，置于玻璃匀浆器中，加入0.01 mol/L的PBS后4℃下匀浆，9700g离心15min，取上清。然后加入上清液1/2体积的正己烷脱脂。提取液在4℃下以重蒸水透析过夜，冻干，-20℃保存。

2、特异性抗体的制备及纯化

选取健康的6—8周龄雌性BALB/C小鼠20只，采用腹腔注射的方法进行免疫试验，0.3mg/只（以蛋白计），每隔10d免疫一次，连续免疫5次，最后一次免疫7d后摘眼球取血，12000g离心30min，取上清，-80℃保存备用。

取柱体积为1mL的HiTrap Protein A HP亲和层析柱，以10倍柱体积的结合缓冲液（20mM的磷酸三钠，pH7.0）过柱冲洗，速度为1mL/min。然后取异尖线虫抗血清1mL，以15mL结合缓冲液稀释，过柱，1mL/min；之后再次以10倍柱体积的结合缓冲液过柱冲洗，以除去未结合的蛋白；以三倍柱体积的洗脱液（0.1 mol/L的柠檬酸，pH3.6）过柱洗脱结合到柱上的蛋白，并以盛有300 μL Tris-HCl（1mol/L，pH9.0）的试管收集洗脱液。洗脱液在4℃下以重蒸水透析过夜。并以聚乙二醇20000浓缩至1mL，Bradford法测定蛋白含量。-80℃保存备用。

3、酶标板的包被与封闭

用碳酸盐缓冲液（0.05 mol/L, pH 9.6, CBS）溶解异尖线虫虫体抗原（2 μg/mL），加到96孔酶标板内（每孔100 μL），4℃过夜。然后用含0.1%Tween-20的的PBS（pH=7.4, 0.01 mol/L, PBST）充分洗涤，将酶标板各孔内注满1%牛血清白蛋白（BSA，溶于PBST），37℃下封闭1.5h，洗涤三次后拍干。

4、加标样品前处理

取狭鳕和鲈鱼作为加标对象，分别将0.5, 1, 2条异尖属线虫和伪新地蛔线属幼虫加入到100g鱼肉中，按照鱼肉：PBS（g/mL）=1：7的比例充分匀浆，用磁力搅拌器继续搅拌10分钟后，匀浆液以9000r/min离心15min，上清液经n-正己烷脱脂，稀释到700mL，4℃保存备用。

5、加标样品检测

首先进行棋盘滴定实验，根据其结果对抗体溶液和商品化酶标二抗（羊抗鼠抗体）溶液进行适当稀释以达到工作浓度的要求；分别取50 μL样品液及系列浓度的抗原标准液（0, 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 2000, 单位均为ng/mL，分别溶于相应的空白鱼肉提取液），加入到各自的微孔中，标准液和样品均做3个平行实验；加入50 μL抗体溶液到每个微孔中，37℃孵育90分钟；甩出孔中的液体，以PBST充分洗涤3次；加入100 μL酶标二抗溶液，37℃孵育90分钟，甩出孔中的液体，以PBST洗涤3次；加入100 μL新配制的3,3',5,5'-四甲基联苯胺（TMB）底物（0.1mg/mL）到微孔中，在室温暗处孵育20分钟；加入50 μL H₂SO₄（2mol/L）到各微孔中中止反应，以未加抗体的第一列为空白用酶标仪在450nm处测量吸光值。

实验结束后根据抗原标准液的检测结果，以异尖线虫虫体抗原的浓度（以可溶性蛋白浓度计，ng/mL）和吸光值绘制标准曲线，根据标准曲线测定样本中异尖线虫的浓度（以虫体抗原计），按照每条线虫（7mg）含可溶性蛋白300 μg计算回收率并进行精密度的计算。

检测结果如表1所示。当加入异尖线虫和伪新地蛔线属线虫为0.5—2条/100g鱼肉时，两属线虫的回收率分别达到65.2%—99%和71.9%—88.1%，变异系数小于15%，随着加入量的增加，回收率有升高的趋势。这表明该方法的主要性能如准确度、灵敏度和精密度完全可以满足实际检测的要求；检测时间明显少于酶消化检测技术，操作较为简便，1张酶标板上可以同时进行检测，非常适合于大量样品的定性快速筛选检测。

表 1 加标试验结果 (n=3)

异尖线虫	鱼片	线虫加入量(条 /100g 鱼肉)	虫体抗原测定值 (ng/mL)	平均回收 率(%)	RSD (%)
		0.5	145.9	68.1	1.9
	鲈鱼	1	366.4	85.5	14.7
		2	848.8	99.0	4.1
异尖属幼虫		0.5	139.8	65.2	5.4
	狭鳕	1	340.9	79.6	2.3
		2	679.5	79.3	13.6
		0.5	175.1	72.1	5.4
	鲈鱼	1	368.2	75.8	1.0
伪新地蛔线属		2	779.6	80.3	3.3
线虫		0.5	174.6	71.9	7.5
	狭鳕	1	386.0	79.5	5.3
		2	855.3	88.1	5.6

专利名称(译)	海产品中异尖线虫的酶联免疫检测方法		
公开(公告)号	CN101603964A	公开(公告)日	2009-12-16
申请号	CN200910016820.9	申请日	2009-07-10
[标]申请(专利权)人(译)	中国海洋大学		
申请(专利权)人(译)	中国海洋大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国海洋大学		
[标]发明人	曹立民 许旭 林洪 隋建新		
发明人	曹立民 许旭 林洪 隋建新		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/543 G01N33/531 G01N21/31		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种海产品中异尖线虫的酶联免疫检测方法，该方法分离纯化异尖属幼虫的虫体抗原，利用生物免疫技术制备特异性多克隆抗体；以96孔聚苯乙烯板为固相载体，事先以相应的完全抗原进行包被、载体蛋白进行封闭；检测时同时以不含有待测物的提取液为阴性对照，以异尖线虫抗原的标准液建立标准曲线；利用常规间接竞争酶联免疫吸附(ELISA)检测样品的吸光值并计算相应的抑制率，进而根据标准曲线测定样本中待测物(以虫体抗原计)的浓度。本发明灵敏度高、准确性好；操作简便快速，有效缩短了分析时间，可应用于鱼类等海产品中异尖线虫的快速筛选检测。

异尖线虫	鱼片	线虫加入量(条 /100g 鱼肉)	虫体抗原测定值 (ng/mL)	平均回收 率(%)	RSD (%)
异尖属幼虫	鳕鱼	0.5	145.9	68.1	1.9
		1	366.4	85.5	14.7
	狭鳕	2	848.8	99.0	4.1
		0.5	139.8	65.2	5.4
		1	340.9	79.6	2.3
		2	679.5	79.3	13.6
伪新地蛭线属	鳕鱼	0.5	175.1	72.1	5.4
		1	368.2	75.8	1.0
	线虫	2	779.6	80.3	3.3
		0.5	174.6	71.9	7.5
狭鳕	1	386.0	79.5	5.3	
	2	855.3	88.1	5.6	