



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101900724 A

(43) 申请公布日 2010. 12. 01

(21) 申请号 200910260091. 1

(22) 申请日 2009. 12. 24

(71) 申请人 河北工程大学

地址 056038 河北省邯郸市光明南大街 199

申请人 中国农业大学

田向荣

(72) 发明人 刘彦威 苏敬良 韩博 田向荣

(74) 专利代理机构 北京安博达知识产权代理有

限公司 11271

代理人 徐国文

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

G01N 1/30 (2006. 01)

G01N 33/539 (2006. 01)

C07K 16/14 (2006. 01)

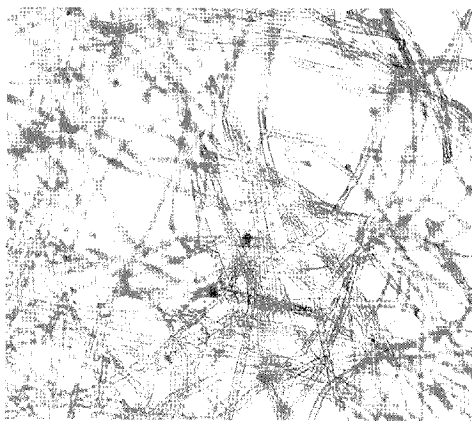
权利要求书 2 页 说明书 8 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种利用免疫组织化学鉴定冬虫夏草无性型的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种免疫组织化学鉴定冬虫夏草无性型的方法,包括以下步骤:菌丝体抗体的制备、染色、比较染色结果三个步骤;从染色图片就可直接看出,阳性染色(被染上颜色)即为冬虫夏草,若阴性染色(不被染上染色)就不是冬虫夏草无性型。本发明创造性地采用与冬虫夏草同源性最高的北虫草的菌丝对多价血清进行吸附,具有特异性强特点,而且该鉴定方法不需仪器,简单方便,易推广;染色时间短,比传统鉴定方法和分子生物学方法更快速费用更低,可用于冬虫夏草菌丝的无性型鉴定工作。



1. 一种免疫组织化学鉴定冬虫夏草无性型的方法,其特征在于所述鉴定是用免疫组织化学技术对菌丝进行鉴定。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于所述菌丝为冬虫夏草菌丝。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于所述鉴定包括以下步骤:菌丝体抗体的制备、染色、比较染色结果;

1). 菌丝体抗体的制备:

a). 取新鲜的冬虫夏草的菌丝体,用蒸馏水冲洗,干燥,研磨,称重研磨后的菌丝 30 ~ 60mg,接着将 20 ~ 30ml PBS 磷酸盐缓冲溶液与 10 ~ 20ml 青霉素和链霉素的混合溶液混合,最后用 30 ~ 50ml 含青霉素、链霉素、及 PBS 磷酸盐缓冲溶液的混合溶液稀释所称取的菌丝,作为菌丝体抗原,冰冻保存备用;

b). 取健康兔 2 ~ 4 只,观察 7 ~ 10 天,无异常反应后,用步骤 a) 得到的菌丝体抗原分别对其腹部进行多点注射菌丝体抗原,每只注射 3 ~ 7ml,7 ~ 10 天后进行 2 ~ 5 次免疫,共强化免疫 3 ~ 6 次;

c). 根据步骤 b). 所述方法得到的最后免疫 10 ~ 20 天后的健康兔,分别对其耳静脉部位采血,检测抗体效价,在琼脂扩散出现明显白色沉淀线者,取与之对应的兔子,对其心脏部位采血分离血清,把北冬虫夏草的菌丝粉加入分离的血清中,于 3 ~ 5℃ 静置 1.5 ~ 3h,使其吸附与北冬虫夏草结合的抗体;

d). 根据步骤 c). 所述方法对吸附与北冬虫夏草结合的抗体后的血清,对其进行离心;将离心后的血清,静置 10 ~ 25min 后,吸取其上清液,分装、冷冻保存备用;

2). 染色:

e). 准备待使用的载玻片 3 张,然后用 PBS 磷酸盐缓冲溶液清洗研磨后的菌丝,接着将清洗后的冬虫夏草菌丝分别涂在三张载玻片上,并分别标记为:菌丝体涂片 A、B、C;

f). 将 e) 步骤中的菌丝体涂片 A、B、C 放在湿盒内,用 0.3% 过氧化氢溶液封闭内源性过氧化氢酶,接着于室温条件下静置 25 ~ 40min,静置后用 PBS 磷酸盐缓冲溶液冲洗 3 ~ 5 次,每次 3 ~ 7 分钟;

g). 根据步骤 f) 所述方法封闭内源性过氧化氢酶后,在菌丝体涂片 A 上加入正常 10% 马血清 1 ~ 3 滴,于室温条件下静置 25 ~ 40min 后,防止非特异性蛋白结合,用 PBS 磷酸盐缓冲溶液冲洗 3 ~ 5 次,每次 3 ~ 7 分钟;接着加入稀释 40 倍后的根据步骤 d) 得到的抗菌丝体血清上清液 1 ~ 3 滴,于 32 ~ 40℃ 静置 50 ~ 70min,再用 PBS 磷酸盐缓冲溶液冲洗 3 ~ 5 次,每次 3 ~ 7 分钟;最后加入稀释 40 倍后的羊抗兔 HRP 标记血清 1 ~ 3 滴,于 35 ~ 40℃ 静置 40 ~ 55min 后,用 PBS 磷酸盐缓冲溶液冲洗 3 ~ 5 次,每次 3 ~ 7 分钟;在菌丝体涂片 B、C 上同样按上述步骤分别叠加上上述三种血清;

h). 根据步骤 g) 所述的方法,再在菌丝体涂片 A、B、C 上分别加入 DAB 溶液染色,显色 1 ~ 5min 或在显微镜下控制进行;

i). 根据步骤 h) 所述的方法,显色后用甘油作封剂封片,于显微镜下观察;

3). 比较染色结果;

j). 对照用 PBS 磷酸盐缓冲溶液代替抗菌丝体血清。

4. 根据权利要求3所述的方法,其中步骤 a) 的特征在于青霉素和链霉素的混合液配制过程为:将 100 万单位青霉素和 100 万单位链霉素溶解于灭菌的 100ml 三次蒸馏水或 PBS

磷酸盐缓冲溶液中,使每 ml 含青霉素 1 万单位和链霉素 1 万单位;所述冷冻,其温度范围为: $-20 \sim -15^{\circ}\text{C}$ 。

5. 根据权利要求 3 所述的方法,其中步骤 c) 的特征在于检测抗体效价的依次步骤包括:

I). 用生理盐水配制质量分数为 1% 的琼脂,将其放入水浴锅中加热溶化,溶化后倒入灭菌清洁后的平皿中,所倒琼脂量约 3 ~ 5mm,冷却凝固;

II). 在凝固的琼脂上打孔,将孔内琼脂挑出;

III). 在琼脂的中央孔内加根据步骤 a) 得到的菌丝体抗原,周围孔加待检测的根据步骤 c) 方法对心脏部位采血分离得到的兔血清;

IV). 将平皿水平放在密封、潮湿的容器中,置温箱中 12 ~ 24h,观察结果;

V). 当加兔血清的琼脂孔与加菌丝体抗原的孔之间出现明显白色沉淀线者,即为阳性。

6. 根据权利要求 3 所述的方法,其中步骤 d) 的特征在于离心的速率为:4000 ~ 6000 转/min;所述冷冻,其温度范围为: $-20 \sim -15^{\circ}\text{C}$ ;步骤 f) 的特征在于所用湿盒是指一般的盒子加一些自来水,0.3%过氧化氢溶液配制是由 1ml30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,99ml 一次或二次蒸馏水配制而成;步骤 g) 的特征在于所用的稀释溶液为 PBS 磷酸盐缓冲溶液;正常 10% 马血清是由血清:蒸馏水或 PBS 磷酸盐缓冲溶液按 1 : 9 的体积比配制而成。

7. 根据权利要求 3 所述的方法,其中步骤 h) 的特征在于所述 DAB 为:3,3-二氨基联苯胺,其溶液的配制过程为:取 5mg3,3-二氨基联苯胺,溶于 10mlpH7.4 的 PBS 磷酸盐缓冲溶液中,过滤,过滤后再加入 20ul、30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液,此液临用前配制;步骤 j) 的特征在于所述对照用 PBS 磷酸盐缓冲溶液代替抗菌丝体血清,具体是指对照中其他步骤与步骤 2) 所述的染色步骤相同,只是在 g) 步骤中滴加抗菌丝体血清这一步改为滴加 PBS 磷酸盐缓冲溶液,即所谓“对照用 PBS 代替抗菌丝体血清”。

8. 根据权利要求 3 所述的方法,其特征在于步骤 a)、e)、f)、g)、j) 中所用 PBS 磷酸盐缓冲溶液的浓度均为:0.01mol/ml, pH 值均为:7.2。

9. 根据权利要求 5 所述的方法,其中步骤 I) 的特征在于所使用的琼脂质量分数为 1% 的琼脂,即琼脂和生理盐水的质量比为 1 : 99;步骤 II) 的特征在于所述孔孔径为:0.3 ~ 0.5cm,孔距为:0.5 ~ 0.8cm。

10. 根据权利要求 4 或 6 所述的方法,其特征在于所用 PBS 磷酸盐缓冲溶液的浓度均为:0.01mol/ml, pH 值均为:7.2。

## 一种利用免疫组织化学鉴定冬虫夏草无性型的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及冬虫夏草的鉴定方法,更具体地说是涉及一种免疫组织化学鉴定的方法。

### 背景技术

[0002] I、冬虫夏草(*Cordyceps sinensis*)是一种子囊菌,在其生活史中具有分生孢子阶段(无性型)和子囊孢子阶段(有性型)。在人工培养、液体发酵等实际生产中使用的冬虫夏草菌种均为无性阶段。国内学者对冬虫夏草无性型的分离培养进行了广泛研究,不同的研究者分离不同的菌株,且均声称为冬虫夏草的无性型。然而冬虫夏草有几种无性型?冬虫夏草真正无性型为何?这给以形态结构为主的传统分类方法提出挑战,而分子生物学方法创立,为此提供了新的解决途径。

[0003] II、冬虫夏草无性型结构描述

[0004] 由于分离菌株不同,对无性型结构的描述也存在差异。刘锡进等(刘锡进,郭英兰,俞永信等.冬虫夏草无性阶段的分离和鉴定[J].真菌学报.1989;8(1):35-40)经过多途径多批次分离确定冬虫夏草的无性型命名为中国被毛孢,后来一些研究者用分子生物学和微循环产孢等方法均证明无性型为中国被毛孢。中国被毛孢的结构特点:菌丝体(在1%胨PDA)稀疏发生,表生,较少基生,无色,有隔膜,分枝,平滑或具微疣,宽22~43 $\mu$ m。分生孢子梗无色,单生或2-8本簇生于无色球形细胞组成的小子座上,不分枝,但不形成孢梗束,最简单的仅为无柄产孢细胞单生于营养菌丝的顶端或作为侧枝几乎呈直角伸出,或为1产孢细胞和1-6支撑细胞组成,有的弯曲,产孢细胞系瓶形小梗,无色,单点内壁产孢,平滑或具微疣,针形或钻形,逐渐向上尖削成一狭窄的颈部。分生孢子无色,无隔膜,平滑,肾形或长椭圆形,粘被膜柠檬形。

[0005] 莫名和等(莫名和,迟胜起,张克勤等.循环产孢及其无性型的分离[J].菌物系统.2001;20(4):482~485.)用改良的微循环产孢证明冬虫夏草无性型,在萨式培养基上18 $^{\circ}$ C培养60d,菌落直径1.5cm,呈柱状隆起,深褐色,边缘整齐并可见一圈淡白色菌丝体,菌落由致密的菌丝体组成,硬实,不易挑取,背面墨黑色,有黑色色素向周围扩散。在CMA上或簇生,一般不分枝,瓶梗光滑或有疣,瓶梗和分生孢子的大小与上述的相似。这些培养特征和产孢结构与子囊孢子的微循环产孢特征基本吻合,说明他们分离到的纯培养是冬虫夏草的无性阶段。

[0006] 章卫民等(章卫民,李泰辉,陈月琴等.西藏冬虫夏草无性型的分子生物学研究[J].微生物学通报.2002;29(3)54~58.)用分子生物学的方法证明西藏冬虫夏草无性型,用C8培养基,在18 $^{\circ}$ C下虫体上的菌肉组织在一个星期后长出白色继而转为棕黄色的稀疏菌丝体;组织块由白色转变成黄褐色至黑褐色,并有黑色色素渗入培养基内;纯化后,接种体也会变黑,并有黑色色素渗入培养基内。菌落生长极为缓慢,约三个月后长成蚯蚓粪状隆起的白色至灰白色的子座组织、致密、肉质、脆、内部空心,背面黑褐色。转管后在25 $^{\circ}$ C下容易失活。

[0007] 从上述对冬虫夏草无性型结构的描述中,很难找出哪个特异结构与无性型是密切相关的,因此,仅凭形态学很难确定无性型,但形态学对确定冬虫夏草无性型发挥了必要的辅助作用。

### [0008] III、判定无性型的标准

[0009] 由于冬虫夏草子实体形成条件苛刻,大量的无性型菌株在人工培养的条件下不形成有性子实体。为此,Kobayasi(小林义雄,清水大典.冬虫夏草菌图谱[M].大阪:保育社1983,163~165.)在总结前人研究的基础上确定了虫草无性型的5个标准:1)由虫草子子座的一部分或分枝的无性产孢结构;2)在形成虫草子实体的菌丝体上同时形成的无性产孢结构;3)与虫草子实体同时出现在同一寄生昆虫体上的无性产孢结构;4)在同一地区,在长虫草子实体的同种昆虫的不同虫体上同时观察到的无性产孢结构;5)虫草的子囊孢子接种在培养基上形成的无性产孢阶段。虽然这些标准对目前尚不能人工培养的虫草比较实用,但这个方法并不能充分验证分离菌种与冬虫夏草的确切关系,无性型的误定常有发生,因为其他方法并非真正冬虫夏草分离物也有可能无法完全被排除。然而,这些建议为认识虫草属菌物的无性型提供了一些证据和线索,对无性型的确定起积极的作用,因此这些原则和方法至今仍有重要价值(蒋毅,姚一键冬虫夏草研究概况[J].菌物系统.2003;22(1):161~176.,梁宗琦.虫草的无性型及其确定.西南农业学报[J].1991;4(4):1~8.)。

### [0010] 1、国内分离的菌株

[0011] 国内迄今已报道与冬虫夏草有关的丝胞菌多大10属16种。沈南英等(沈南英,曹璐,张显耻等冬虫夏草真菌的分离[J].食用菌1983;5:1~3.)率先从虫草子实体上分离出一种丝胞菌,命名该菌为头孢霉。刘锡进等(刘锡进,郭英兰,俞永信.冬虫夏草无性阶段的分离和鉴定[J].真菌学报.1989;8(1):35-40.)从四川康定产的冬虫夏草的子座和菌核上分离获得的菌株,他们将此菌株定名为中国被毛孢。

### [0012] 2、虫草子实体的人工诱发

[0013] 按柯赫法则(Koch's postulate)确定冬虫夏草无性型最可靠的方法是在实验条件下,将用各种途径分离获得的假定无性型,人工感染寄生昆虫,诱发形成具有成熟子囊壳的虫草子实体。在自然条件下,冬虫夏草生长在4000m左右的高原,从幼虫到幼虫感染菌直到长出子实体需要4~5年(陈仕江,扎西,李黎等.缩短冬虫夏草有性阶段初报[J].中药材.2003;26(4):242~243)。到目前为止,国外有一家,国内仅有两家报道人工诱导子实体获得成功,其难度不言而喻。Kobayasi(Kobayasi, Y. Keys to taxa of the genera *Cordyceps* and *Torrubiella*[J]. Trans. Mycol. soc. jpn 1982;23, 329~364.)报道 *Stachybotrys*. SP 为冬虫夏草的无性型。国内沈南英(沈南英,曹璐,张显耻等冬虫夏草真菌的分离[J].食用菌1983;5:1~3.)率先从虫草子子实体实体上分离出一种丝胞菌,并在固体培养基上多次形成子座,其形态与自然状态下长出的子座近似。四川中药研究所在产区康定,调查1000余个,采集样本1200余份,观察幼虫20万余头,实验1500余次,终于用康定虫草菌接种人工饲养的蝠蛾幼虫,成功地完成世代繁衍,人工培养出冬虫夏草(陈仕江,尹定华,李黎等.西藏那曲冬虫夏草无性型的研究[J].中国中药杂志.2001;26(7):453~454)。虽然用人工诱发子实体的方法最可靠,但难度较大,在无性型鉴定中很难推广应用。

### [0014] 3、子囊孢子的微循环产孢

[0015] 微循环产孢 (Microcycle conidiation) 是丝状真菌中分生孢子萌发后无菌丝生长阶段的一种重复产孢现象。梁宗琦 (梁宗琦. 虫草的无性型及其确定. 西南农业学报 [J]. 1991 ;4(4) :1 ~ 8.) 提出, 根据子囊孢子微循环产孢的方法确定虫草的无性型不仅简便、可靠, 且具有很高的实用性。刘作易等 (刘作易, 梁宗琦, 刘爱英. 冬虫夏草子囊孢子萌发及其无性型观察 [J]. 贵州农业科学. 2003 ;31(1) :3 ~ 5.) 用微循环产孢的产孢结构证明冬虫夏草与中国被毛孢的产孢结构相似, 由此证明冬虫夏草的无性型应是中国被毛孢, 中华束丝孢为中国被毛孢的同物异名。

[0016] 利用子囊孢子的微循环产孢确定虫草无性型, 的确操作方法简便, 具有很好的实用性。但不同种的虫草菌次生子囊孢子萌发和微循环产孢的条件各不相同, 因此在只获得少量子囊孢子的情况下未必能实现微循环产孢的操作。因此, 用子囊孢子的微循环产孢确定无性型同样是辅助手段。

### [0017] 4、其他传统方法

[0018] 王伟等 (王伟, 陈特灿, 李琼英等. 中国虫草研究 [J]. 食用菌学报, 1998 ;5(4) :17 ~ 22.) 在研究中国虫草无性型的过程中总结出一套方法, 主要包括以下几项: (1) 用罹病虫体、内菌核和子座作组织分离并纯化, 多批次多途径分离培养后相互验证为同一种真菌; (2) 成熟的子座发射子囊孢子, 反复洗净后挑取萌发的单孢子进行纯化培养; (3) 同时进行组织分离和子囊孢子分离, 培养物相互验证; (4) 小试发酵后的培养产物与天然中国虫草比较, 具有相似的功能成分和化学组成, 聚丙烯酰胺凝胶电泳后呈相同的蛋白区带, 火箭线状免疫电泳证明两者具有相同的抗原性和交叉的血清学关系; (5) 纯培养产物与天然中国虫草在药理上比较的一致性。按照严格的理论, 这些间接的方法当然不能最终确定冬虫夏草有性、无性的真实关系, 但将这些方法同时交替使用并严格验证 (尤其是第 1, 2 和 3 项方法), 可以很大程度上避免错判。

[0019] 刘锡进 (刘锡进, 郭英兰, 俞永信. 冬虫夏草无性阶段的分离和鉴定 [J] 真菌学报. 1989 ;8(1) :35-40.) 提出多途径多批次的培养方法, 这种方法对获得正确无性形有一定的帮助。不过, 在分离中反复出现的同一种菌并不能确定就是冬虫夏草的无性型, 而未分离到的菌种也可能是真正的无性型。有些研究者根据药理和化学成分与天然冬虫夏草的相似性来支持冬虫夏草无性型的确定。显然这些并不能说明分离菌种与冬虫夏草的确切关系, 均为一些间接手段。

### [0020] 6、分子生物学方法

[0021] 上述传统方法包括多途径多批次分离确定、微循环产孢和诱发子实体的等, 存在鉴定时间长或不能完全排除互生, 伴生, 混合感染其他菌株的可能性等缺点, 而 DNA 分子标记技术的出现, 可提供一种从分子水平快速、高效、可靠地鉴定冬虫夏草无性型的方法 (宋郭伦, 张军, 陈建新. DNA 分子标记及其在冬虫夏草研究中应用. [J] 食用菌学报, 2002 ;9(1) :52 ~ 56)。90 年代后期分子生物学开始应用于冬虫夏草的研究。目前对冬虫夏草无性型鉴定的分子生物学方法主要有两种: rDNA 测序和随机扩增多态性 DNA (RAPD)。赵锦等 (赵锦, 王宁, 陈月琴等. 冬虫夏草无性型的分子鉴别 [J]. 中山大学学报. 1999 ;38(1) :121 ~ 123.) 采用分子生物学手段, 以 rDNA ITS1 为分子指标, 对采自西藏冬虫夏草的有性和无性阶段进行比较分析, 从分子水平证明冬虫夏草的无性阶段是中国被毛孢。

[0022] Chen 等 (Yue Qin Chen, Ning Wang, Liang Hu Qu et al. Determination of the Anamorph of *Cordyceps sinensis* of the ribosomal DNA interal transcribed spacers and 5.8SrDNA [J]. *Biochemical Systematics and Ecology* 2001, 29 :597 ~ 607.) 对不同来源虫草 ITS1 间区 5.8SrDNA 和 ITS2 间区扩增并进行全序列的测定,也证明冬虫夏草的无性型为中国被毛孢,并认为冬虫夏草应该只有一种无性型,其他的则可能只是一些同时(或随后)生长在虫体上的嗜昆虫生真菌,或者是其他长在或附在虫草菌上的杂菌。人们之所以能重复分离出某些杂菌,原因可能是冬虫夏草在自然界中主要分布于喜马拉雅山附近,海拔 3000 ~ 5000m 的高山草地上或较为寒冷的北方地区,分离者按一般的习惯将分离物放在较高温的地方培养,造成冬虫夏草菌丝死亡,而培养出那些经常与冬虫夏草一起生长的真菌种类而被误认为是冬虫夏草的无性型。Kang 等 (KANG Ji-Chuan, LIANG Zong-Qi, LIU Ai-Yang et al. Molecular Evidence of polymorphism in *Cordyceps* Based on 5.8SrDNA and ITS2 Sequences [J]. *Mycosystema*. 2000 ;19(4) :492 ~ 497.) 用真菌通用引物 ITS1、ITS2、ITS3、ITS4 对冬虫夏草、甘肃虫草及蛹虫草的 5.8SrDNA 和 ITS2 间区进行扩增,然后测序并进行了同源分析,结果显示冬虫夏草与甘肃虫草同源率为 100%,与蛹虫草同源率 75%。形态学研究发现冬虫夏草的孢子为纤维状,而甘肃虫草的孢子为椭圆形。因此仅通过孢子的形状对虫草菌分类显然是不准确的。张云武等(张云武,陈永久,沈发荣等.滇西北冬虫夏草和阔孢虫草的遗传分化研究[J].菌物系统.1999;18(2):176 ~ 183.)利用 18 个随机引物获得来自高黎贡山、玉龙雪山的冬虫夏草和来自德钦地区的阔孢虫草的 RADP 谱带多态性,遗传距离分析认为冬虫夏草与阔孢虫草间存在显著的遗传差异。Kang et al. (KANG Ji-Chuan, LIANG Zong-Qi, LIU Ai-Yang et al. Molecular Evidence of polymorphism in *Cordyceps* Based on 5.8SrDNA and ITS2 Sequences [J]. *Mycosystema*. 2000 ;19(4) :492 ~ 497.) 对 5.8SrRNA 基因及 ITS2 间区 DAN 序列的分析认为甘肃虫草与冬虫夏草的 DNA 序列相同,属于同一种。冬虫夏草与阔孢虫草是 2 个种,还是同一种的不同地理群? 这个问题仍有待利用更多适当的方法和依据去验证。

[0023] 分子生物学技术的迅速发展并应用于真菌的种质鉴定,无疑给冬虫夏草的无性型确定提供了更客观的科学依据。运用现代分子生物学方法从基因水平证明应该是现阶段最先进、最可信的方法之一,但中国被毛孢是否为冬虫夏草真正的、唯一的无性型,还需要深入研究。另外,在应用分子生物学手段对菌物无性型鉴定时,除了实验操作必须十分严格外,还需要考虑方法本身和所涉及菌物的特点。不同的分子生物学方法往往显示不同的分子变异水平,每种方法都有其适用的范围,如何解释实验结果对所做的结论十分重要。

[0024] 综上所述,冬虫夏草无性型的鉴定方法可分为两种:传统方法和分子生物学方法,前者包括子实体的诱导、微循环产孢和多途径多批次培养等方法。这些方法虽然简单,操作方便,但存在鉴定时间长,且不能完全排除互生、伴生、混合感染其他菌株的可能性等缺点,即特异性差;后者包括 rDNA 测序和随机扩增多态性 DNA (RAPD) 等,这些方法虽然特异性强,但需要名贵仪器和药品,费用高,不易推广应用。

[0025] 本发明克服了上述现有技术存在的缺陷如:1. 传统的鉴定方法不具有特异性;2. 传统的鉴定方法从无性型分离到菌丝的生长以及孢子的萌发都需要无菌条件和只有专业人员才能掌握的操作技能;4. 传统鉴定方法完成一次鉴定时间长、费用高;3. 分子生物学鉴定方法要求无菌条件,且均为微量操作,也必须经过专门的技术培训人员才能完成操

作;5. 分子生物学方法鉴定从 DNA 的提取,到 PCR 扩增以及基因序列的测定同样存在时间长,仪器设备昂贵和高价药品一系列缺陷问题。

## 发明内容

[0026] 因此,人们对冬虫夏草的无性型鉴定方法仍然存在需求。至今为止,还没有发现任何有关本发明免疫组织化学鉴定冬虫夏草无性型的方法的报道。本发明人经过反复研究,终于找到了一种特异性强、快速有效、易推广的冬虫夏草无性型的鉴定方法,从而完成了本发明。

[0027] 本发明目的是提供一种特异性强,简单、方便、快速、费用低、易推广的冬虫夏草无性型的鉴定方法。

[0028] 本发明的另一个目的是提供一种利用免疫组织化学技术对菌丝进行鉴定的方法。

[0029] 本发明还有一个目的是提供一种利用免疫组织化学技术鉴定冬虫夏草无性型的方法。

[0030] 本发明所选用的菌丝为冬虫夏草菌丝。

[0031] 本发明的免疫组织鉴定冬虫夏草无性型的方法,包括以下步骤:菌丝体抗体的制备、染色、比较染色结果;

[0032] 1). 菌丝体抗体的制备:

[0033] a). 取新鲜的冬虫夏草的菌丝体,用蒸馏水冲洗,干燥,研磨,称重研磨后的菌丝 30 ~ 60mg,接着将 20 ~ 30ml PBS 磷酸盐缓冲溶液与 10 ~ 20ml 青霉素和链霉素的混合溶液混合,最后用 30 ~ 50ml 含青霉素、链霉素、及 PBS 磷酸盐缓冲溶液的混合溶液稀释所称取的菌丝,作为菌丝体抗原,冰冻保存备用;

[0034] b). 取健康兔 2 ~ 4 只,观察 7 ~ 10 天,无异常反应后,用步骤 a) 得到的菌丝体抗原分别对其腹部进行多点注射菌丝体抗原,每只注射 3 ~ 7ml,7 ~ 10 天后进行 2 ~ 5 次免疫,共强化免疫 3 ~ 6 次;

[0035] c). 根据步骤 b). 所述方法得到的最后免疫 10 ~ 20 天后的健康兔,分别对其耳静脉部位采血,检测抗体效价,在琼脂扩散出现明显白色沉淀线者,取与之对应的兔子,对其心脏部位采血分离血清,把北冬虫夏草的菌丝粉加入分离的血清中,于 3 ~ 5°C 静置 1.5 ~ 3h,使其吸附与北冬虫夏草结合的抗体;

[0036] d). 根据步骤 c). 所述方法对吸附与北冬虫夏草结合的抗体后的血清,对其进行离心;将离心后的血清,静置 10 ~ 25min 后,吸取其上清液,分装、冷冻保存备用;

[0037] 2). 染色:

[0038] e). 准备待使用的载玻片 3 张,然后用 PBS 磷酸盐缓冲溶液清洗研磨后的菌丝,接着将清洗后的冬虫夏草菌丝分别涂在三张载玻片上,并分别标记为:菌丝体涂片 A、B、C;

[0039] f). 将 e) 步骤中的菌丝体涂片 A、B、C 放在湿盒内,用 0.3% 过氧化氢溶液封闭内源性过氧化氢酶,接着于室温条件下静置 25 ~ 40min,静置后用 PBS 磷酸盐缓冲溶液冲洗 3 ~ 5 次,每次 3 ~ 7 分钟;

[0040] g). 根据步骤 f) 所述方法封闭内源性过氧化氢酶后,在菌丝体涂片 A 上加入正常 10% 马血清 1 ~ 3 滴,于室温条件下静置 25 ~ 40min 后,防止非特异性蛋白结合,用 PBS 磷酸盐缓冲溶液冲洗 3 ~ 5 次,每次 3 ~ 7 分钟;接着加入稀释 40 倍后的根据步骤 d) 得到的

抗菌丝体血清上清液 1 ~ 3 滴,于 32 ~ 40℃ 静置 50 ~ 70min,再用 PBS 磷酸盐缓冲溶液冲洗 3 ~ 5 次,每次 3 ~ 7 分钟;最后加入稀释 40 倍后的羊抗兔 HRP 标记血清 1 ~ 3 滴,于 35 ~ 40℃ 静置 40 ~ 55min 后,用 PBS 磷酸盐缓冲溶液冲洗 3 ~ 5 次,每次 3 ~ 7 分钟;在菌丝体涂片 B、C 上同样按上述步骤分别叠加上述三种血清;

[0041] h). 根据步骤 g) 所述的方法,再在菌丝体涂片 A、B、C 上分别加入 DAB 溶液染色,显色 1 ~ 5min 或在显微镜下控制进行;

[0042] i). 根据步骤 h) 所述的方法,显色后用甘油作封剂封片,于显微镜下观察;

[0043] 3). 比较染色结果;

[0044] j). 对照用 PBS 磷酸盐缓冲溶液代替抗菌丝体血清。

[0045] 优选地,步骤 a) 中青霉素和链霉素的混合液配制过程为:将 100 万单位青霉素和 100 万单位链霉素溶解于灭菌的 100ml 三次蒸馏水或 PBS 磷酸盐缓冲溶液中,使每 ml 含青霉素 1 万单位和链霉素 1 万单位;所述冷冻,其温度范围为: -20 ~ -15℃。

[0046] 优选地,步骤 c) 的特征在于检测抗体效价的依次步骤包括:

[0047] I). 用生理盐水配制质量分数为 1% 的琼脂,将其放入水浴锅中加热溶化,溶化后倒入灭菌清洁后的平皿中,所倒琼脂量约 3 ~ 5mm,冷却凝固;

[0048] II). 在凝固的琼脂上打孔,将孔内琼脂挑出;

[0049] III). 在琼脂的中央孔内加根据步骤 a) 得到的菌丝体抗原,周围孔加待检测的根据步骤 c) 方法对心脏部位采血分离得到的兔血清;

[0050] IV). 将平皿水平放在密封、潮湿的容器中,置温箱中 12 ~ 24h,观察结果;

[0051] V). 当加兔血清的琼脂孔与加菌丝体抗原的孔之间出现明显白色沉淀线者,即为阳性。

[0052] 优选地,步骤 d) 中离心的速率为:4000 ~ 6000 转/min;所述冷冻,其温度范围为: -20 ~ -15℃;步骤 f) 的特征在于所用湿盒是指一般的盒子加一些自来水,0.3% 过氧化氢溶液配制是由 1ml 30%  $H_2O_2$ , 99ml 一次或二次蒸馏水配制而成;

[0053] 优选地,步骤 g) 的特征在于所用的稀释溶液为 PBS 磷酸盐缓冲溶液;正常 10% 马血清是由血清:蒸馏水或 PBS 磷酸盐缓冲溶液按 1 : 9 的体积比配制而成。

[0054] 优选地,步骤 h) 中 DAB 为:3,3'-二氨基联苯胺,其溶液的配制过程为:取 5mg 3,3'-二氨基联苯胺,溶于 10ml pH7.4 的 PBS 磷酸盐缓冲溶液中,过滤,过滤后再加入 20ul、30%  $H_2O_2$  溶液,此液临用前配制;

[0055] 优选地,步骤 j) 所述对照用 PBS 磷酸盐缓冲溶液代替抗菌丝体血清,具体是指对照中其他步骤与步骤 2) 所述的染色步骤相同,只是在 g) 步骤中滴加抗菌丝体血清这一步改为滴加 PBS 磷酸盐缓冲溶液,即所谓“对照用 PBS 代替抗菌丝体血清”。

[0056] 优选地,步骤 I) 所使用的琼脂质量分数为 1% 的琼脂,即琼脂和生理盐水的质量比为 1 : 99;步骤 II) 的特征在于所述孔孔径为:0.3 ~ 0.5cm,孔距为:0.5 ~ 0.8cm。

[0057] 优选地,步骤 a)、e)、f)、g)、j) 所用 PBS 磷酸盐缓冲溶液的浓度均为:0.01mol/ml, pH 值均为:7.2。

[0058] 与现有技术相比,本发明具有以下优点:

[0059] 1. 特异性强:本发明是采用冬虫夏草菌丝直接免疫,菌丝有多种抗原,因此获得的血清为多价血清,为了防止非特异性染色,本发明采用与冬虫夏草源性最高的北虫草

的菌丝对多价血清进行吸附,这样排除非特异性染色,血清抗体能特异与冬虫夏草菌丝的抗原结合,所以本方法具有特异性;这与分子生物学的方法特异性相当。

[0060] 2. 简单、方便、易推广:本发明鉴定方法直接挑取菌丝涂片,即可直接染色,不需仪器,结果在显微镜下一目了然,是冬虫夏草就染成褐色,不是冬虫夏草就不染色,不会造成结果误判,容易掌握,便于推广;

[0061] 3. 快速、费用低:本发明鉴定方法染色需要的总时间为2h,即2h后就可以出结果,该鉴定方法较为贵重的是兔抗冬虫夏草血清,其他均为样本药品价格,较为便宜,而且免疫一只兔可得到上百毫升的血清,染色前进行40倍稀释,而每次染色数微升稀释后的血清即可。因此,本发明鉴定方法不仅快速,且费用低廉(其成本不足1元)。

[0062] 另外,本方法主要鉴定是通过颜色对结果进行判断,使鉴定结果一目了然,不产生歧义,另外,该过程简单,容易掌握,只要会染色就能做出正确鉴定。冬虫夏草无性型即人工培养的菌丝,而菌丝不需要用石蜡切片,没有石蜡切片繁琐的制作过程,直接用菌丝涂片即可。

### 附图说明

[0063] 用菌丝抗体进行免疫组化染色,发现体外培养的菌丝体(图1),而对照染色均为阴性,即不着色(图2)。

[0064] 图1是:菌丝免疫组化染色阳性(40×);

[0065] 图2是:菌丝免疫组化染色阴性对照(40×);

### 具体实施方式

[0066] 通过借助以下实施例将更详细说明本发明,以下实施例仅是说明性的,应该明白,本发明并不受实施例的限制。

[0067] 实施例1

[0068] 实验材料:马血清(Sigma试剂公司),辣根过氧化氢酶(Horseradish peroxidase, HRP)(Sigma试剂公司),羊抗兔HRP标记血清(Sigma试剂公司),健康兔,30%过氧化氢溶液(北京化工厂)

[0069] 实验步骤:

[0070] 1). 菌丝体抗体的制备:

[0071] a). 取新鲜的冬虫夏草的菌丝体,用蒸馏水冲洗,干燥,研磨,称重研磨后的菌丝40mg,接着将20ml PBS磷酸盐缓冲溶液与10ml青霉素和链霉素混合溶液混合,最后用30ml含青霉素、链霉素、及PBS磷酸盐缓冲溶液的混合溶液稀释所称取的菌丝,作为菌丝体抗原,冰冻保存备用;

[0072] b). 取健康兔2只,观察1周,无异常反应后,用步骤a)得到的菌丝体抗原分别对其腹部进行多点注射,每只注射4ml菌丝体抗原,10天后进行2次免疫,共强化免疫3次;

[0073] c). 根据步骤b). 所述方法得到的最后免疫10天后的健康兔,分别对其耳静脉部位采血,检测抗体效价,在琼脂扩散出现明显白色沉淀线者,取与之对应的兔子,对其心脏部位采血分离血清,把北冬虫夏草的菌丝粉加入分离的血清中,于4℃下静置2h,使其吸附与北冬虫夏草结合的抗体;

[0074] d). 根据步骤 c). 所述方法对吸附与北冬虫夏草结合的抗体后的血清, 对其进行离心, 离心速率: 5000 转 /min; 将离心后的血清, 静置 10min 后, 吸取其上清液, 分装、冷冻保存备用;

[0075] 2). 染色:

[0076] e). 准备待使用的载玻片 3 张, 然后用 PBS 磷酸盐缓冲溶液清洗研磨后的菌丝, 接着将清洗后的冬虫夏草菌丝分别涂在三张载玻片上, 并分别标记为: 菌丝体涂片 A、B、C;

[0077] f). 将 e) 步骤中的菌丝体涂片 A、B、C 放在湿盒内, 用 0.3% 过氧化氢溶液封闭内源性过氧化氢酶, 接着于室温条件下静置 30min, 静置后用 PBS 磷酸盐缓冲溶液冲洗 3 次, 每次 5min;

[0078] g). 根据步骤 f) 所述方法封闭内源性过氧化氢酶后, 在菌丝体涂片 A 上加入正常 10% 马血清 2 滴, 室温静置 30min 后, 防止非特异性蛋白结合, 用 PBS 磷酸盐缓冲溶液冲洗 3 次, 每次 5min; 接着加入稀释 40 倍后的根据步骤 d) 得到的抗菌丝体血清上清液 2 滴, 于 37°C 静置 1h, 再用 PBS 磷酸盐缓冲溶液冲洗 3 次, 每次 5min; 最后加入稀释 40 倍后的羊抗兔 HRP 标记血清 2 滴, 于 37°C 静置 45min 后, 用 PBS 磷酸盐缓冲溶液冲洗 3 次, 每次 5min; 在菌丝体涂片 B、C 上同样按上述步骤分别叠加上上述三种血清;

[0079] h). 根据步骤 g) 所述的方法, 再在菌丝体涂片 A、B、C 上分别加入 DAB 溶液染色, 显色 5min;

[0080] i). 根据步骤 h) 所述的方法, 显色后用甘油作封剂封片, 于显微镜下观察;

[0081] 3). 比较染色结果;

[0082] j). 对照用 PBS 磷酸盐缓冲溶液代替抗菌丝体血清。

[0083] 结果表明:

[0084] 本发明的鉴定方法是用染色鉴定冬虫夏草无性型, 从染色图片就可直接看出, 阳性染色 (被染上颜色) 即为冬虫夏草, 若阴性染色 (不被染上颜色) 就不是冬虫夏草无性型。

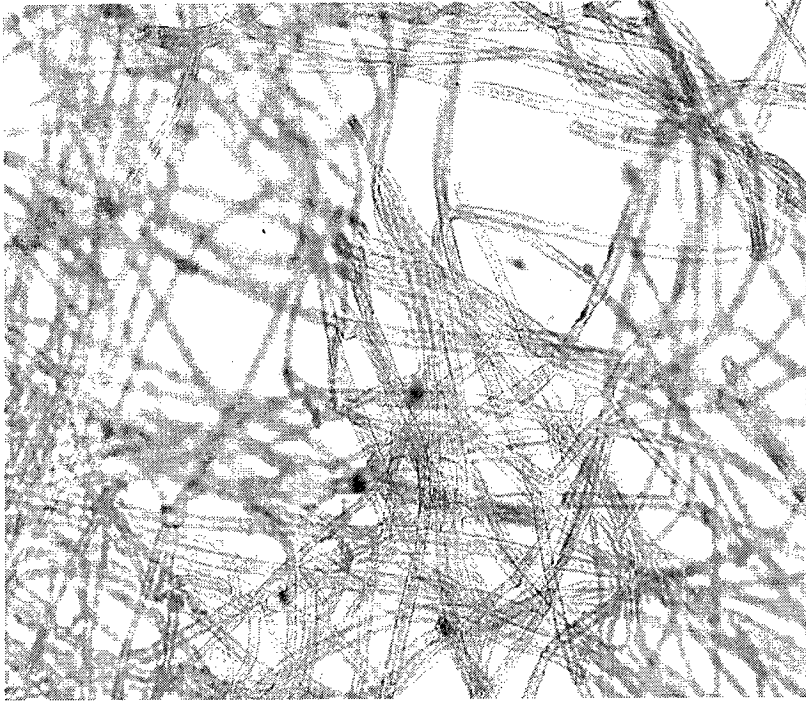


图 1

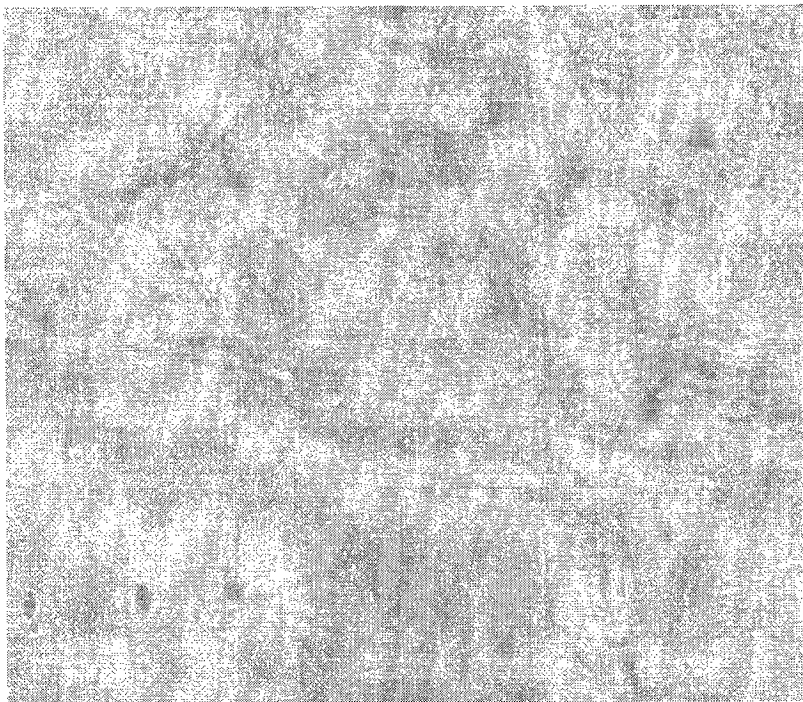


图 2

专利名称(译)	一种利用免疫组织化学鉴定冬虫夏草无性型的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101900724A</a>	公开(公告)日	2010-12-01
申请号	CN200910260091.1	申请日	2009-12-24
[标]申请(专利权)人(译)	河北工程大学 中国农业大学 田向荣		
申请(专利权)人(译)	河北工程大学 中国农业大学 田向荣		
当前申请(专利权)人(译)	河北工程大学 中国农业大学 田向荣		
[标]发明人	刘彦威 苏敬良 韩博 田向荣		
发明人	刘彦威 苏敬良 韩博 田向荣		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531 G01N1/30 G01N33/539 C07K16/14		
代理人(译)	徐国文		
其他公开文献	CN101900724B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种免疫组织化学鉴定冬虫夏草无性型的方法，包括以下步骤：菌丝体抗体的制备、染色、比较染色结果三个步骤；从染色图片就可直接看出，阳性染色(被染上颜色)即为冬虫夏草，若阴性染色(不被染上染色)就不是冬虫夏草无性型。本发明创造性地采用与冬虫夏草同源性最高的北虫草的菌丝对多价血清进行吸附，具有特异性强特点，而且该鉴定方法不需仪器，简单方便，易推广；染色时间短，比传统鉴定方法和分子生物学方法更快速费用更低，可用于冬虫夏草菌丝的无性型鉴定工作。

