



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104198715 A

(43) 申请公布日 2014. 12. 10

(21) 申请号 201410465242. 8

(22) 申请日 2014. 09. 12

(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 冯玲倩 王颖 陈飞雄

(74) 专利代理机构 青岛海昊知识产权事务所有  
限公司 37201

代理人 王铎

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

权利要求书1页 说明书4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

本发明涉及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。所述检测试剂盒包括酶标板、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,其特征在于所述试剂盒还包括抗三疣梭子蟹血细胞的单克隆抗体。其中所述的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,所述单抗能与三疣梭子蟹血细胞特异性结合。本发明的优点是将抗原、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. 一种三疣梭子蟹血细胞的酶联免疫检测试剂盒,包括: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,其特征在于所述试剂盒还包括抗三疣梭子蟹血细胞的单克隆抗体。

2. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于所述的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. 一种如权利要求 1 所述试剂盒的制备方法,其特征在于包括以下步骤:

(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,Balb/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] 本发明涉及一种应用单克隆抗体定量检测三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)血细胞的酶联免疫(ELISA)检测试剂盒及其制备方法,属于甲壳类分子免疫学技术领域。

### 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、包囊、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囊。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。此外,研究表明,蟹类受外来病原和环境刺激时,其血细胞总数会发生显著变化,以三疣梭子蟹血细胞单克隆抗体为基础建立酶联免疫检测技术,可以通过监测水产养殖生产中蟹类血细胞数量的变化,进而评估生产实践中三疣梭子蟹体质及抗逆状况。

### 发明内容

[0004] 本发明的一个目的是提供一种精确度高、特异性强、重复性强且成本低、效价高的应用抗三疣梭子蟹血细胞单抗来检测血细胞数量变化的酶联免疫(ELISA)检测试剂盒,通过检测三疣梭子蟹血细胞数量变化,来监测三疣梭子蟹健康状况。

[0005] 本发明的另一个目的是提供上述三疣梭子蟹血细胞 ELISA 检测试剂盒的制备方法。

[0006] 本发明的 ELISA 检测试剂盒包括: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,其特征在于所述试剂盒还包括抗三疣梭子蟹血细胞的单克隆抗体。

[0007] 其中所述的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,所述单抗能与三疣梭子蟹血细胞特异性结合。

[0008] 所述的封闭液为含 2.0% (w/v) 牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液。

[0009] 所述的洗涤液为含 0.1% (v/v) Tween-20 的磷酸盐缓冲液。

[0010] 所述的酶标记抗体为碱性磷酸酶标记的羊抗小鼠 IgG 抗体。

[0011] 所述的血细胞抗凝剂为含 0.02M EDTA 的磷酸盐缓冲液。

[0012] 本发明的 ELISA 检测试剂盒的制备方法包括以下步骤：

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，Balb/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。

[0013] 本发明的优点是将抗原、抗体的特异性反应与酶底物的高效催化作用结合起来，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

[0014] 图 1 为本发明的单抗 3F4 与三疣梭子蟹血细胞反应的间接免疫荧光检测结果。

[0015] 图 2 为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。

[0016] 图 1 所示：(A) 为原视野下血细胞的观察图；(B) 为激光共聚焦显微镜下细胞核呈蓝色；(C) 血细胞与单抗 MAb 3F4 反应后出现绿色荧光；(D) 为 B 和 C 的 Merge 图。

## 具体实施方式

[0017] 下面结合附图并通过具体实施例对本发明作进一步说明。

[0018] 实施例 1：三疣梭子蟹血细胞 ELISA 检测试剂盒的制备

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, 18gC<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>, 38.426gC<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>, 8.823gC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 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。

[0019] 2、制备抗三疣梭子蟹血细胞的单克隆抗体

(1) Balb/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 Balb/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,Balb/c 免疫小鼠脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞的融合。

[0020] (2) 细胞融合并筛选血细胞的阳性杂交瘤细胞:Balb/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 (图 1)。

[0021] (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。

[0022] 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  $2^0, 2^{-1}$  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  $2^0, 2^{-1}$  到  $2^{-5}$  的梯度稀释,每孔 100u1 按棋盘滴定法加入相应的血细胞标准样中,37℃孵育 1.5h;加 100u1 酶标记抗体作为 AP 二抗,37℃孵育 1h;加 100u1 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  $2^{-2}2^{-2}$ ) 为最佳使用比例。

[0023] 表 1 不同稀释梯度的抗原和抗体结合的  $OD_{405nm}$ ,粗体为  $OD_{405nm} \geq 0.408$

	$2^0$ 抗原	$2^{-1}$ 抗原	$2^{-2}$ 抗原	$2^{-3}$ 抗原	$2^{-4}$ 抗原	$2^{-5}$ 抗原	$2^{-6}$ 抗原
$2^0$ 抗体	0.350	0.408	0.496	0.433	0.295	0.264	0.227
$2^{-1}$ 抗体	0.282	0.483	0.204	0.317	0.230	0.325	0.233
$2^{-2}$ 抗体	0.328	0.275	0.475	0.209	0.266	0.224	0.245
$2^{-3}$ 抗体	0.222	0.199	0.230	0.298	0.242	0.220	0.351
$2^{-4}$ 抗体	0.195	0.206	0.191	0.195	0.223	0.194	0.199
$2^{-5}$ 抗体	0.202	0.175	0.186	0.293	0.172	0.221	0.177

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  $5^0, 5^{-1}$  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 100u1 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 100u1 酶标记抗体作为 AP 二抗,37℃孵育 1h;加 100u1 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,  $OD_{405nm}$ / 阴性对照  $\geq 2$ , 还是阳性;但当稀释度为  $5^{-5}$  时,其  $OD_{405nm}$  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。

[0024] 表 2 抗原稀释不同浓度梯度后的  $OD_{405nm}$  值

	抗原 (5mg/ml) 稀释度						阴性对照
	$5^0$	$5^{-1}$	$5^{-2}$	$5^{-3}$	$5^{-4}$	$5^{-5}$	
抗体	0.42293	0.36358	0.30132	0.24168	0.18976	0.01047	0.0753

实施例 2:三疣梭子蟹血细胞 ELISA 检测试剂盒的具体使用方法

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。

[0025] 2、抗原包被:将上述待测样用 PBS 稀释到  $2^{-2}$ ,每孔 100u1 加到 96 孔板的孔中,4℃ 包被过夜;

3、封闭:倒去孔内液体,每孔中加 200u1 洗涤液(PBST),轻轻摇晃 5min,倒掉,反复 3 次。洗完后,在每孔中加入 200u1 封闭液,37℃ 孵育 1h;

4、一抗孵育:倒去孔内液体,每孔中加 200u1 洗涤液,5 min/次,洗 3 次。每孔中再加入 100u1 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;

5、二抗孵育:倒去孔内液体,每孔中加 200u1 洗涤液,5min/次,洗 3 次。每孔中再加入 100u1 酶标记抗体,37℃ 孵 1h;

6、显色读数:倒去孔内液体,每孔中加 200u1 洗涤液,5min/次,洗 3 次。每孔中再加入 100u1pNPP 底物显色液,37℃ 孵育 30min,在酶标仪 405 nm 处读数,即可分析待检样品中颗粒细胞的含量。

[0026] 实施例 3: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

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;

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 3000 r/min,4℃ 离心 10min,抗凝剂重悬,超声波破碎,分装,-80℃ 冻存;

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。

[0027] 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(图 2)。

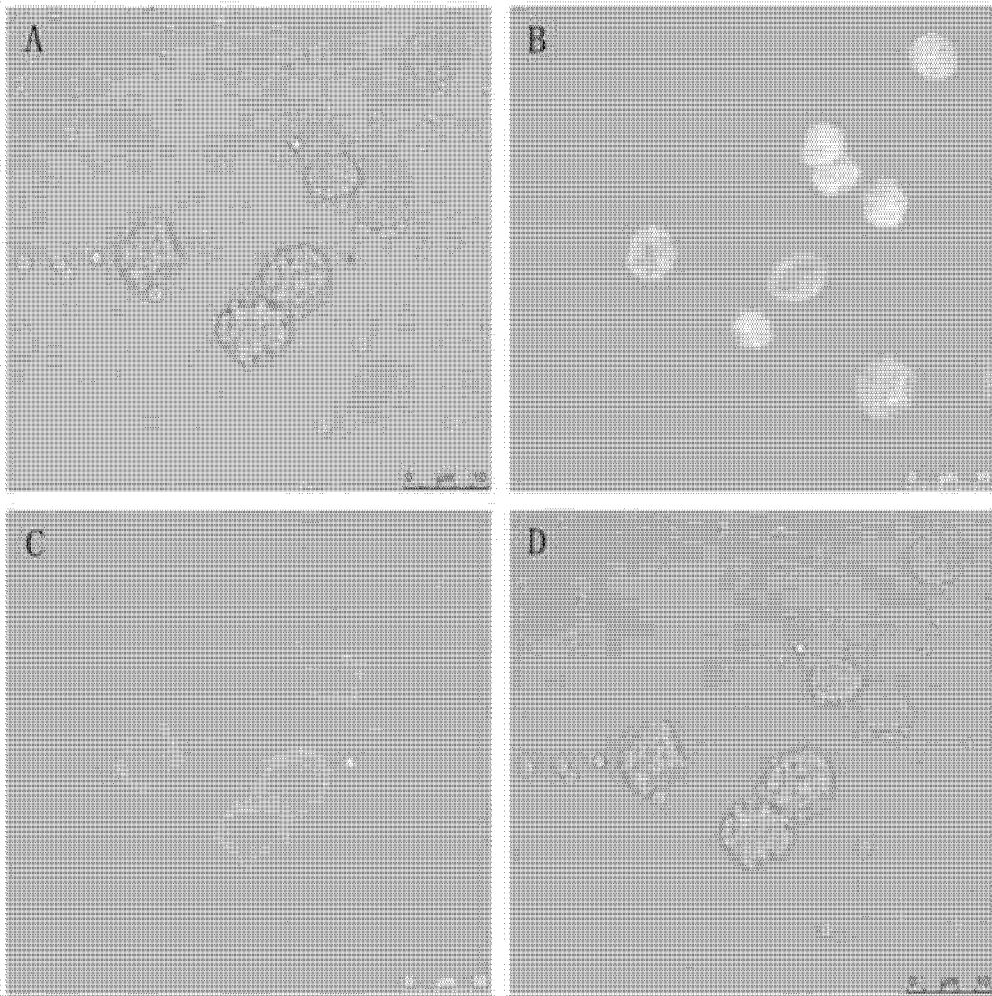


图 1

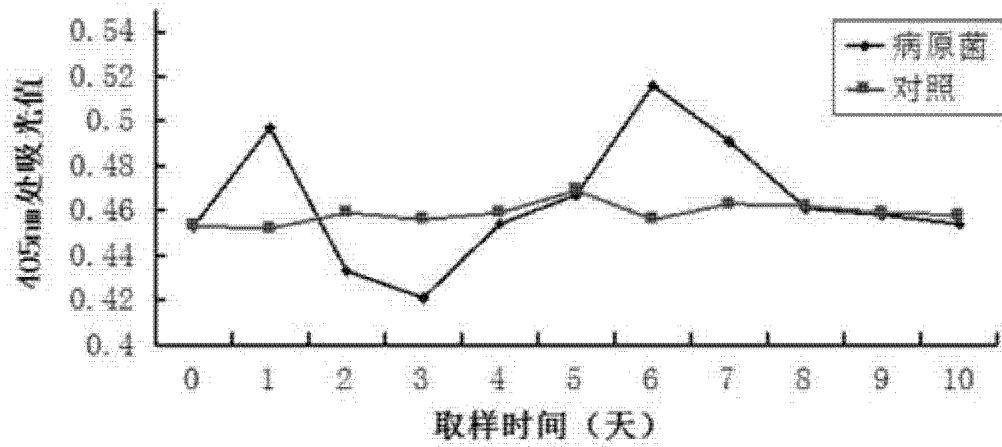


图 2

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="#">CN104198715A</a>	公开(公告)日	2014-12-10
申请号	CN201410465242.8	申请日	2014-09-12
[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 冯玲倩 王颖 陈飞雄		
发明人	王文琪 冯玲倩 王颖 陈飞雄		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/577 G01N33/535		
代理人(译)	王铎		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及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。所述检测试剂盒包括酶标板、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，其特征在于所述试剂盒还包括抗三疣梭子蟹血细胞的单克隆抗体。其中所述的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，所述单抗能与三疣梭子蟹血细胞特异性结合。本发明的优点是将抗原、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。

