

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03143428.2

G01N 33/569

G01N 33/535

G01N 33/543

G01N 33/577

[43] 公开日 2005 年 4 月 6 日

[11] 公开号 CN 1603830A

[22] 申请日 2003.9.30 [21] 申请号 03143428.2

[71] 申请人 浙江省淡水水产研究所

地址 313001 浙江省湖州市南门外中庚村

[72] 发明人 钱冬 刘问 杨国梁

[74] 专利代理机构 杭州丰禾专利事务所有限公司

代理人 王鹏举

权利要求书 1 页 说明书 3 页

[54] 发明名称 罗氏沼虾肌肉白浊病病毒酶联免疫
诊断试剂盒及其检测方法

[57] 摘要

本发明涉及罗氏沼虾肌肉白浊病病毒酶联免疫诊断试剂盒及其检测方法，本发明诊断试剂盒由酶标板、病毒阳性对照、病毒阴性对照、抗病毒单克隆抗体、酶标抗小鼠抗体、酶显色液、终止液、样品稀释及冲洗液组成，其中的酶标板为抗罗氏沼虾诺达病毒抗体包被的酶标板，病毒阳性对照为含有罗氏沼虾诺达病毒的罗氏沼虾苗研磨液，抗病毒单克隆抗体为对罗氏沼虾诺达病毒有高度特异性和结合力的小鼠单克隆抗体，通过使用本诊断试剂盒可以快速有效的检测出罗氏沼虾虾苗中的肌肉白浊病病毒，对罗氏沼虾肌肉白浊病病毒的防治具有重大意义。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、罗氏沼虾肌肉白浊病病毒酶联免疫诊断试剂盒，由酶标板、病毒阳性对照、病毒阴性对照、抗病毒单克隆抗体、酶标抗小鼠抗体、酶显色液、终止液、样品稀释及冲洗液组成，其特征在于其中的酶标板为抗罗氏沼虾诺达病毒抗体包被的酶标板，病毒阳性对照为含有罗氏沼虾诺达病毒的罗氏沼虾苗研磨液，抗病毒单克隆抗体为对罗氏沼虾诺达病毒有高度特异性和结合力的小鼠单克隆抗体。

2、根据权利要求1所述的罗氏沼虾肌肉白浊病病毒酶联免疫诊断试剂盒，其特征在于酶显色液为四甲基联苯胺(TMB)。

3、根据权利要求1所述的罗氏沼虾肌肉白浊病病毒酶联免疫诊断试剂盒，其特征在于终止液为 H_2SO_4 。

4、根据权利要求1所述的罗氏沼虾肌肉白浊病病毒酶联免疫诊断试剂盒，其特征在于样品稀释及冲洗液为磷酸盐缓冲液(PBS)。

5、一种罗氏沼虾肌肉白浊病病毒检测方法，其特征在于包括如下步骤：(1)、取待测的虾苗于EP管中，加入磷酸盐缓冲液，充分研磨，离心；

(2)、取上清液加入已包被好抗病毒抗体的酶标板中(固相载体)，同时加入阳性对照、阴性对照及空白对照，在 $37^{\circ}C$ 孵育 60min，用冲洗液冲洗、拍干；

(3)、在各孔中加入小鼠单克隆抗体， $37^{\circ}C$ 孵育 60min，用冲洗液冲洗、拍干；

(4)、每孔加入酶标抗体， $37^{\circ}C$ 孵育 60min，冲洗、拍干；

(5)、每孔中加入显色液，混匀、置于暗处若干分钟；

(6)、每孔中加入硫酸数滴，终止反应，观察色泽变化。

罗氏沼虾肌肉白浊病病毒酶联免疫诊断试剂盒及其检测方法

技术领域

本发明涉及病毒酶联免疫诊断试剂盒，尤其涉及罗氏沼虾肌肉白浊病病毒酶联免疫诊断试剂盒及其检测方法。

背景技术

罗氏沼虾肌肉白浊病又称白体病、白尾病，主要危害罗氏沼虾苗种，发生于虾苗淡化后放养到池塘 3—5 周内，病虾表现为肌肉白斑或呈白浊状，病虾可在较短时间内大量死亡，特别是对于高密度养殖的育苗池内，死亡率可高达 40—90%。该病最早于 1996 年前后被发现，现已蔓延到全国主要罗氏沼虾养殖场，造成了罗氏沼虾养殖业的重大经济损失。2001 年起，在每年 4 月后在许多罗氏沼虾苗种场流行，一旦发生，便造成当年发病苗场育苗失败，成为罗氏沼虾养殖业的主要威胁。

该病的病原是罗氏沼虾诺达病毒 (*Macrobrachium rosenbergii Nodavirus*, MrNV)，这是一种直径为 24-25nm 的廿面体球状病毒，由两个单链 RNA 分子组成，分别为 3.0kb 和 1.3kb，分类上属诺达病毒科，但不同于已知的两个属，病毒的分类地位还未最终确定。病毒主要感染罗氏沼虾的肌肉细胞，引起肌肉坏死，导致虾的死亡。该病毒的传染性较强，以浸泡感染健康虾苗即可引起发病。由于罗氏沼虾苗种业属于投入高、利润和风险均很大的产业，该病目前业已成为罗氏沼虾种苗业的主要威胁。目前除肉眼观察外，还没有简便易行的方法供养殖场使用，进行疾病及病毒的确诊。

发明内容

本发明的目的在于提供一种检测方便、灵敏度高的罗氏沼虾肌肉白浊病病毒酶联免疫诊断试剂盒。

本发明的另一目的在于提供上述诊断试剂盒的检测方法。

为了克服现有技术中的缺陷，及时检测出罗氏沼虾肌肉白浊病病毒，减少损失，本发明一种罗氏沼虾肌肉白浊病病毒诊断试剂盒，由酶标板、病毒阳性对照、病毒阴性对照、抗病毒单克隆抗体、酶标抗小鼠抗体、酶显色液、终止液、样品稀释及冲洗液组成，其特征在于其中的酶标板为抗罗氏沼虾诺达病毒抗体包被的酶标板，病毒阳性对照为含有罗氏沼虾诺达病毒的罗氏沼虾研磨液，抗病毒单克隆抗体为对罗氏沼虾诺达病毒有高度特异性和结合力的小鼠单克隆抗体；其中所述的酶显色液为四甲基联苯胺(TMB)；终止液为 H_2SO_4 ；样品稀释及冲洗液为磷酸缓冲液(PBS)；

本发明还提供一种罗氏沼虾肌肉白浊病病毒检测方法，包括如下步骤：

- (1)、取待测的虾苗于 EP 管中，加入，充分研磨，摇匀，离心；
- (2)、取上清液加入已包被好抗病毒抗体的酶标板中(固相载体)，同时加入阳性对照、阴性对照及空白对照，在 $37^{\circ}C$ 孵育 60min，用冲洗液冲洗、拍干；
- (3)、各孔中加入小鼠单克隆抗体， $37^{\circ}C$ 孵育 60min，用冲洗液冲洗、拍干；
- (4)、每孔加入酶标抗体， $37^{\circ}C$ 孵育 60min，冲洗、拍干；
- (5)、每孔中加入显色液，混匀、置于暗处若干分钟；
- (6)、每孔中加入硫酸数滴，终止反应，观察色泽变化，如显黄色说明已感染肌肉白浊病病毒，否则没有感染。

本发明提供了专门用于引起罗氏沼虾肌肉白浊病的诺达病毒的测定方法和相应的诊断试剂盒，有极高的特异性和灵敏度，所采用的方法简便易行，许多苗种场可就地使用本方法进行病毒的诊断，可以预防罗氏沼虾肌肉白浊病病毒的大面积蔓延、扩散。

具体实施方式

下面通过实施例对本发明作进一步的说明。

实施例：本发明一种罗氏沼虾肌肉白浊病病毒检测试剂由酶标板、病毒阳性对照、病毒阴性对照、抗病毒单克隆抗体、酶标抗小鼠抗体、酶显色液、终止液、样品稀释及冲洗液组成，其中的酶标板为抗罗氏沼虾诺达病毒抗体包被的酶标板，病毒阳性对照为含有罗氏沼虾诺达病毒的罗氏沼虾疫苗研磨液，抗病毒单克隆抗体为对罗氏沼虾诺达病毒有高度特异性和结合力的小鼠单克隆抗体，酶显色液采用四甲基联苯胺(TMB)，终止液为 2M H₂SO₄，样品稀释及冲洗液(X10)10X 磷酸盐缓冲液(PBS)。

测虾苗时，按如下步骤操作：

(1)、取待测虾苗 1~2 尾于 1.5ml EP 管中，加入 10X 磷酸盐缓冲液 0.3 毫升，充分研磨，摇匀，9000rpm,离心 5min；

(2)、取 0.1ml 离心上清，加入已包被好抗病毒抗体的酶标板中(固相载体)，同时设阳性对照、阴性对照及空白对照(加冲洗液 0.1ml)各 1 孔，37℃ 孵育 60min，用冲洗液 10X 磷酸盐缓冲液冲洗三次，每次拍干。

(3)、每孔加入小鼠抗病毒抗体 0.1ml，37℃ 孵育 60min，用冲洗液 10X 磷酸盐缓冲液冲洗三次，每次拍干；

(4)、每孔加入酶标抗体 0.1ml，37℃ 孵育 60min，用冲洗液 10X 磷酸盐缓冲液冲洗三次，每次拍干；

(5)、将显色液 TMB 0.05ml 加入到 10ml 底物稀释液中，底物稀释液为 pH5.0 的磷酸-柠檬酸缓冲液中，加入 15μL 30%过氧化氢，混匀，每孔加入 0.1ml，黑暗中显色 15min；

(6)、加入 2M 硫酸 1-2 滴，终止反应。

观察结果：样品中呈明显的黄色，表示感染了罗氏沼虾肌肉白浊病病毒。

专利名称(译)	罗氏沼虾肌肉白浊病病毒酶联免疫诊断试剂盒及其检测方法		
公开(公告)号	CN1603830A	公开(公告)日	2005-04-06
申请号	CN03143428.2	申请日	2003-09-30
[标]申请(专利权)人(译)	浙江省淡水水产研究所		
申请(专利权)人(译)	浙江省淡水水产研究所		
当前申请(专利权)人(译)	浙江省淡水水产研究所		
[标]发明人	钱冬 刘问 杨国梁		
发明人	钱冬 刘问 杨国梁		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/543 G01N33/569 G01N33/577		
代理人(译)	王鹏举		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及罗氏沼虾肌肉白浊病病毒酶联免疫诊断试剂盒及其检测方法，本发明诊断试剂盒由酶标板、病毒阳性对照、病毒阴性对照、抗病毒单克隆抗体、酶标抗小鼠抗体、酶显色液、终止液、样品稀释及冲洗液组成，其中的酶标板为抗罗氏沼虾诺达病毒抗体包被的酶标板，病毒阳性对照为含有罗氏沼虾诺达病毒的罗氏沼虾苗研磨液，抗病毒单克隆抗体为对罗氏沼虾诺达病毒有高度特异性和结合力的小鼠单克隆抗体，通过使用本诊断试剂盒可以快速有效的检测出罗氏沼虾虾苗中的肌肉白浊病病毒，对罗氏沼虾肌肉白浊病病毒的防治具有重大意义。