

[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 200810163904.0

[51] Int. Cl.

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2009年11月11日

[11] 公开号 CN 101576559A

[22] 申请日 2008.12.25

[21] 申请号 200810163904.0

[71] 申请人 浙江省海洋水产研究所

地址 316100 浙江省舟山市普陀区同济路小
西湖弄 25 号

[72] 发明人 许文军 谢建军 施 慧 张 静

[74] 专利代理机构 杭州杭诚专利事务所有限公司

代理人 林宝堂

权利要求书 2 页 说明书 12 页 附图 1 页

[54] 发明名称

一种血卵涡鞭虫兔抗血清及其应用

[57] 摘要

本发明公开一种血卵涡鞭虫兔抗血清，所述的血卵涡鞭虫兔抗血清是以取自病蟹含血卵涡鞭虫虫体的体液为抗原，经处理后获得免疫抗原即血卵涡鞭虫虫体悬液，然后对大白兔进行免疫获得兔抗血清；本发明还公开了所述兔抗血清在间接荧光抗体检测方法上的应用，所述的应用即将兔抗虫血清滴加到待测样品进行一抗孵育，然后再滴加异硫氰酸荧光标记羊抗兔抗体进行二抗孵育，经封片处理后做镜检；本发明检测血卵涡鞭虫的兔抗血清特异性强，灵敏度高，检测时间短，可用于血卵涡鞭虫潜在感染以及早期感染的诊断，本发明检测方法操作简单，可以对海产甲壳类动物是否感染血卵涡鞭虫进行定性定量检测。

1、一种血卵涡鞭虫兔抗血清，其特征在于，所述血卵涡鞭虫兔抗血清采用下述方法制备：

(1) 免疫原制备：

取患病后期含血卵涡鞭虫的病蟹体液，离心处理，离心获得的沉淀物经洗涤、固定处理后，再经洗涤、稀释处理，得到每毫升洗涤液含 $3.6 \times 10^7 \sim 3.6 \times 10^9$ 个虫体的溶液，反复冻融得到虫体悬液，备用；

(2) 抗血清制备：

取步骤(1)获得的虫体悬液免疫大白兔，免疫操作如下：首次免疫采用虫体悬液与福氏完全佐剂等比例乳化均匀而成的乳剂，大白兔脊柱两侧皮下注射，然后按照一定免疫间隔时间，采用虫体悬液加强免疫数次，最后一次免疫后，采血，收集血清，得到抗血清。

2、如权利要求1所述的血卵涡鞭虫兔抗血清，其特征在于，所述步骤(1)中离心处理为 3000-4000r/min 离心 8-10min，洗涤处理采用 pH 为 7.4 的 0.01M 的磷酸盐缓冲液作为洗涤液，固定处理为 37°C 下用 1%福尔马林溶液固定 1h；步骤(2)中免疫剂量为 1-2ml/只/次，免疫间隔时间为 18-24 天。

3、如权利要求1所述的血卵涡鞭虫兔抗血清，其特征在于，所述步骤(2)抗血清制备为：

取步骤(1)获得的虫体悬液免疫大白兔，免疫进行 3 次，操作如下：首次免疫采用虫体悬液与福氏完全佐剂等比例乳化均匀而成的乳剂，大白兔脊柱两侧皮下分 6 点注射，剂量 1ml/只；然后每隔 21 天后，采用虫体悬液加强免疫 2 次，每次剂量 1ml/只；最后一次免疫 14 天后，采血，收集血清，得到抗血清。

4、如权利要求1或3所述的血卵涡鞭虫兔抗血清，其特征在于，所述步骤(2)中的虫体悬液浓度为 3.6×10^8 个/ml。

5、如权利要求1所述的血卵涡鞭虫兔抗血清，其特征在于，所述方法还包括(3)抗血清纯化，即将步骤(2)获得的抗血清采用下述方法纯化：

(a) 取健康蟹血淋巴，用 1%福尔马林溶液固定后，于 3000~4000r/min 离心，弃去上清液，血细胞沉淀用含有 1%小牛血清的 0.1M 的磷酸盐缓冲液重悬，稀释成一定浓度的悬液；

(b) 于 4°C 将步骤(a)获得的悬液与步骤(2)制备的兔抗血清混合，反应过程中不

间断混匀，反应时间 12~24h；

(c) 将步骤 (b) 获得的悬液于 3000~4000r/min 离心 8~10min，收集上清液，得到纯化后的兔抗血清。

6、如权利要求 5 所述的血卵涡鞭虫兔抗血清，其特征在于，所述步骤 (b) 中反应时间为 12h。

7、权利要求 1 或 3 或 5 所述血卵涡鞭虫兔抗血清在间接荧光抗体检测方法上的应用，其特征在于，所述间接荧光抗体检测方法按如下操作：

将适度稀释的血卵涡鞭虫兔抗血清滴加到固定待检样品的载玻片上，进行一抗孵育，洗涤，然后再滴加适度稀释的异硫氰酸荧光标记羊抗兔抗体溶液，进行二抗孵育，洗涤，再经封片处理后镜检即可。

8、如权利要求 7 所述的应用，其特征在于，所述的适度稀释采用含 0.5%牛血清白蛋白 pH 为 7.4 的 0.01M 的磷酸盐缓冲液作为稀释剂；洗涤采用含 0.05% Tween-20 的 pH 为 7.4 的 0.01M 的磷酸盐缓冲液作为洗涤液；血卵涡鞭虫兔抗血清稀释度为 64~320、异硫氰酸荧光标记羊抗兔抗体溶液稀释度为 32~160。

9、如权利要求 7 所述的应用，其特征在于，所述的待检样品来自海水甲壳类动物，包括三疣梭子蟹、锯缘青蟹、脊尾白虾、海水龙虾或日本蟳的血淋巴并将其预处理，所述的预处理为：将血淋巴用 1%福尔马林溶液固定 1h，然后 3000~4000r/min 离心 8~10min，用磷酸盐缓冲液重悬 3 次后待检。

10、如权利要求 7 所述的应用，其特征在于，所述的间接荧光抗体检测方法中封片处理采用甘油与 0.5M 碳酸盐缓冲液等比混合制备的 pH 为 9.6 的缓冲液作为封片液；一抗孵育为 37℃免疫湿盒温育 1h；二抗孵育为 37℃免疫湿盒温育 40min。

一种血卵涡鞭虫兔抗血清及其应用

技术领域

本发明涉及海产甲壳类动物寄生虫检测，具体涉及血卵涡鞭虫的检测。

背景技术

血卵涡鞭虫 (*Hematodinium*) 是一类危害海水甲壳动物的重要病原性寄生虫，致病性强。可引起挪威龙虾 (*N. norvegicus*)、兰蟹 (*C. Sapidus*)、白氏雪蟹 (*C. bairdi*)、珠雪蟹 (*C. opilo*) 等许多重要经济甲壳类发病，导致大规模死亡。包括澳大利亚、苏格兰、加拿大以及美国东部沿岸等地均有该寄生虫流行报道，由于该虫体造成宿主死亡率高，严重危害着甲壳类动物的生产。

血卵涡鞭虫 (*Hematodinium* sp.) 是近年来危害浙江省三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatu*)、锯缘青蟹 (*Scylla serrata*) 养殖的主要寄生性原生动物，该虫体对宿主感染时间长，流行范围广、死亡率高，给梭子蟹、青蟹产业带来巨大经济损失^[1]。许文军等^{[2][3]} 国内首次在养殖梭子蟹、养殖青蟹，海捕日本蟳 (*Charybdis japonica*) 中发现该寄生虫，经过系统研究，并与国外研究结果比较后鉴定为 *Hematodinium* sp.，经过后续研究证实该寄生虫为引起养殖梭子蟹大规模死亡的重大疾病“牛奶病”的主要病原之一。

感染血卵涡鞭虫宿主后期表现为：游泳足关节膜白浊，血淋巴呈浊白色或浊黄色，正常血细胞大量减少，血淋巴中大部分为与血细胞大小形态近似的寄生虫体，在普通显微镜下可分辨出虫体。但是在潜在感染或初期感染时，由于虫体量少而且某些阶段与海产蟹血细胞形态差异很小，普通显微镜下很难准确区分虫体与正常血细胞，容易造成漏检及误检。国外学者检测血卵涡鞭虫主要采取以下几种方法：血淋巴吉姆萨、HE 染色结合显微镜观察，ELISA、western-blot、荧光抗体、PCR 等。PCR 检测技术仅能定性研究，无法对寄生虫形态以及存在形式进行说明，因此开展该寄生虫的其他检测技术研究尤为必要。国外有 Field 和 Appleton 对寄生于挪威龙虾的一种 *Hematodiniu* sp. 进行了间接荧光抗体的检测方法研究，但是其采用的免疫原为人工培养虫体，抗体制备时间很长，而且仅进行了间接荧光抗体定性检测研究。

发明内容

为解决现有技术存在的上述问题和缺点,本发明的目的首先是提供一种血卵涡鞭虫兔抗血清。

由于血卵涡鞭虫的体外培养较为困难,因此要取得纯的血卵涡鞭虫抗原具有较大的难度。针对感染末期的病蟹(如梭子蟹)血淋巴中几乎很少有正常血细胞,其被大量血卵涡鞭虫所取代这一特点,本发明人采用这种“血淋巴”作为抗原制备了血卵涡鞭虫多克隆血清抗体。

本发明人提供的技术方案是:

一种血卵涡鞭虫兔抗血清,采用下述方法制备:

(1) 免疫原制备:

取患病后期含血卵涡鞭虫的病蟹体液,离心处理,离心获得的沉淀物经洗涤、固定处理后,再经洗涤、稀释处理,得到每毫升洗涤液含 $3.6 \times 10^7 \sim 3.6 \times 10^9$ 个虫体的溶液,反复冻融得到虫体悬液,备用;

(2) 抗血清制备:

取步骤(1)获得的虫体悬液免疫大白兔,免疫操作如下:首次免疫采用虫体悬液与福氏完全佐剂等比例乳化均匀而成的乳剂,大白兔脊柱两侧皮下注射,然后按照一定免疫间隔时间,采用虫体悬液加强免疫数次,最后一次免疫后,采血,收集血清,得到抗血清。

优选的方案是,上述步骤(1)中离心处理为 3000-4000r/min 离心 8-10min,洗涤处理采用 pH 为 7.4 的 0.01M 的磷酸盐缓冲液(PBS)作为洗涤液,固定处理为 37℃下用 1%福尔马林溶液固定 1h;步骤(2)中免疫剂量为 1-2ml/只/次,免疫间隔时间为 18-24 天,免疫次数 3-4 次。

本发明上述方法中病蟹选用的是感染血卵涡鞭虫后期的三疣梭子蟹、锯缘青蟹或日本蟳等;大白兔选用的是新西兰大白兔(雄性,体重 1.5-2.5kg)。

本发明所述的血卵涡鞭虫兔抗血清,优选的方案是,上述步骤(2)抗血清制备为:

取步骤(1)获得的虫体悬液免疫大白兔,免疫进行 3 次,操作如下:首次免疫采用虫体悬液与福氏完全佐剂等比例乳化均匀而成的乳剂,大白兔脊柱两侧皮下分 6 点注射,剂量 1ml/只;然后每隔 21 天后,采用虫体悬液加强免疫 2 次,每次剂量 1ml/只;最后一次免疫 14 天后,从兔耳静脉采血,收集血清,得到抗血清,加入其体积 20%的甘油,于 -70℃冻藏备用。

本发明所述的血卵涡鞭虫兔抗血清,优选的方案是,所述步骤(2)中的虫体悬液浓度为 3.6×10^8 个/ml,即每毫升洗涤液中含 3.6×10^8 个虫体,以 pH 为 7.4 的 0.01M 的磷酸盐缓冲液(PBS)作为洗涤液。

间接 ELISA 方法检测结果显示, 上述制备的血卵涡鞭虫兔抗血清效价最高可达 10240, 其对应 OD_{492nm} 值为 0.2596, P/N 值为 2.32, 符合间接荧光抗体检测用抗体效价的要求。

本发明采用的从病蟹中抽取的“血淋巴”(即含血卵涡鞭虫虫体的体液)作为抗原制备了多克隆血清抗体, 此抗体成分虽然大部分为血卵涡鞭虫抗体, 但是不可避免带有小部分蟹源蛋白成分的抗体, 因此本发明对上述获得的兔抗血清做了进一步的纯化处理, 以期获得更好的特异性和更高的效价。

本发明所述的血卵涡鞭虫兔抗血清, 优选的方案是, 所述血卵涡鞭虫的制备方法还包括(3)抗血清纯化, 即将上述步骤(2)获得的抗血清采用下述方法纯化:

(a) 取健康蟹血淋巴, 用 1%福尔马林溶液固定后, 于 3000~4000r/min 离心, 弃去上清液, 血细胞沉淀用含有 1%小牛血清的 pH 为 7.4 的 0.1M 磷酸盐缓冲液重悬(比如 3 次), 稀释成一定浓度的悬液后 4℃保存备用, 稀释浓度可根据预试验来调整;

(b) 于 4℃将步骤(a)获得的悬液与步骤(2)制备的兔抗血清混合, 反应过程中不间断混匀, 反应时间 12~24h;

(c) 将步骤(b)获得的悬液于 3000~4000r/min 离心 8~10min, 弃去沉淀物, 收集上清液, 得到纯化后的兔抗血清, 加入其体积 20%的甘油, 于-70℃冻藏备用。

其中, 上述步骤(a)中健康蟹选自三疣梭子蟹、锯缘青蟹或日本蟳等; 上述步骤(b)中优选的反应时间是 12h。

采用健康蟹血淋巴对兔抗血清进行充分吸附处理后, 间接 ELISA 方法检测结果显示, 经过吸附后的兔抗血清抗体具有更高的特异性和效价, 效价最高可达 7680, 其对应 OD_{492nm} 值为 0.3673, P/N 值为 2.26, 符合间接荧光抗体检测用抗体效价的要求。与未经纯化处理的兔抗血清相比, 其效价降低了, 原因在于除去了部分可能存在的蟹源蛋白的兔抗体干扰。此外, 发明人通过试验也验证了纯化处理后的兔抗血清其特异性更高, 而且效价也能满足间接荧光抗体检测用对抗体的要求, 因此, 本发明具体实施例中间接荧光抗体检测方法中选用的都是纯化处理后的血卵涡鞭虫兔抗血清。

本发明的另一个目的是还提供了上述血卵涡鞭虫兔抗血清在间接荧光抗体检测方法上的应用。间接荧光抗体检测是一种操作简单、时效性强的免疫快速检测技术, 可以对病原进行快速定性定量检测, 能将病原形态标记上荧光, 可非常直观方便的实现对血卵涡鞭虫的准确检测以及虫体不同生活史时期的形态确定, 可为血卵涡鞭虫的防控以及生活史研究, 提供科学依据。本发明为实现发明目的提供的技术方案如下:

本发明所述的血卵涡鞭虫兔抗血清在间接荧光抗体检测方法上的应用, 其中, 所述间接荧光抗体检测方法按如下操作:

将适度稀释的血卵涡鞭虫兔抗血清滴加到固定待检样品的载玻片上，进行一抗孵育，洗涤，然后再滴加适度稀释的异硫氰酸荧光标记羊抗兔抗体溶液，进行二抗孵育，洗涤，再经封片处理后镜检即可。

本发明所述的应用，优选的方案是，间接荧光抗体检测方法中所述的适度稀释采用含1%牛血清白蛋白 pH 为 7.4 的 0.01M 的磷酸盐缓冲液作为稀释剂；洗涤采用含 0.05% Tween-20 的 pH 为 7.4 的 0.01M 的磷酸盐缓冲液作为洗涤液；血卵涡鞭虫兔抗血清稀释度为 64~320、荧光标记羊抗兔抗体溶液稀释度为 32~160（视试剂质量调整）。

更优选的方案是，上述间接荧光抗体检测方法中兔抗血清稀释度为 160，FITC-羊抗兔抗体稀释度为 100，在此浓度下进行反应，几乎没有非特异性荧光染色，虫体被染上明亮荧光，背景呈黑色。吸收试验及阻断试验结果均呈现黑色背景，证明抗体特异性较强。当兔抗血清抗体稀释度过低，荧光二抗稀释度过低（如稀释度为 32）时容易出现非特异性荧光。

本发明所述的应用，优选的方案是，所述的待检样品来自海水甲壳类动物，包括三疣梭子蟹、锯缘青蟹、脊尾白虾、海水龙虾或日本蟳的血淋巴，并将其预处理，所述的预处理为：将血淋巴用 1%福尔马林溶液固定 1h，然后 3000r/min 离心 8min，用 0.1M pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲液重悬 3 次，备用。

本发明所述的应用，优选的方案是，所述的间接荧光抗体检测方法中封片采用甘油与 0.5M 碳酸盐缓冲液等比混合制备的 pH 为 9.6 的缓冲液作为封片液；一抗孵育为 37℃免疫湿盒温育 1h；二抗孵育为 37℃免疫湿盒温育 40min。

较好的是，本发明提供的间接荧光抗体检测方法按以下步骤进行：

(A) 载玻片处理与待检样品处理：

新载玻片经铬酸洗液浸泡，乙醇浸泡，晾干后用热的明胶甲醛溶液（35% 甲醛 2.5ml，明胶 0.5g，蒸馏水 100ml）浸泡 10min，烘干备用。

从患病甲壳类动物体内抽取血淋巴，用 1%福尔马林溶液固定 1h，3000r/min 离心 8min，PBS 洗涤液重悬 3 次后得到待检样品。

(B) 间接荧光抗体检测过程：

将步骤 (A) 得到的待检样品滴加于载玻片上，均匀涂布成圆面，室温晾干，55℃固定 5min；固定处理后的待检样品滴加上述制备的适度稀释后的血卵涡鞭虫兔抗血清，37℃免疫湿盒温育，一抗孵育产物用洗涤液洗涤 3 次后晾干；再滴加适度稀释的荧光标记羊抗兔抗体，37℃免疫湿盒温育，二抗孵育产物用洗涤液洗涤 3 次后用 pH 为 9.6 的甘油碳酸盐缓冲液做封片处理，得到玻片标本；最后将玻片标本在 495nm 激发光下做镜检。

上述间接荧光抗体检测方法步骤 (B) 中优选以下参数：所用血卵涡鞭虫兔抗血清稀释

度为 160；荧光标记羊抗兔抗体稀释度为 100；待检抗原点样 5 μL ，则滴加相应抗血清 50 μL ，37 $^{\circ}\text{C}$ 免疫湿盒温育 1h；滴加荧光标记抗体 30 μL ，37 $^{\circ}\text{C}$ 免疫湿盒温育 40min。

上述间接荧光抗体检测方法步骤 (A) 和步骤 (B) 中使用的试剂为：

抗体稀释液：含 0.5%的牛血清白蛋白 pH 为 7.4 的 0.01M 磷酸盐缓冲液。

洗涤液：含 0.05%Tween-20 的 pH 为 7.4 的 0.1M 磷酸盐缓冲液。

封片液：pH 为 9.6 的甘油碳酸盐缓冲液(是由 0.5M 碳酸盐缓冲液与甘油按体积比 1 : 1 混合制备而得)。

本发明间接荧光抗体检测方法中，以福尔马林溶液固定的血卵涡鞭虫虫体为标准阳性样本、健康梭子蟹血细胞为阴性样本，以待检样本荧光呈现清晰虫体形态为阳性、无荧光或明显比阳性对照显色暗的样本为阴性。

利用本发明提供的血卵涡鞭虫兔抗血清即间接荧光抗体检测方法，可检测到血卵涡鞭虫营养体、腰鞭孢子及合孢体阶段等不同生活阶段的虫体。

本发明的优点表现在：

检测血卵涡鞭虫的兔抗血清特异性强，灵敏度高，检测时间短，一般 3~4h 可出检测结果；可用于血卵涡鞭虫潜在感染以及早期感染的诊断，与 PCR 检测技术相互补，可为血卵涡鞭虫的流行监控与防控提供较为方便的技术保障。

本发明检测方法操作简单，可以对海产甲壳类动物是否感染血卵涡鞭虫进行批量定性定量检测；可用于多种样品的检测，对海水甲壳类动物如三疣梭子蟹、锯缘青蟹、脊尾白虾、海水龙虾、日本蟳等均可检测是否感染血卵涡鞭虫，并且可以对血卵涡鞭虫形态进行辨别，从而对研究血卵涡鞭虫生活史及其致病机理提供研究依据。因此本发明应用广泛，适合水产动物疾病的流行病学调查与监测。

附图简要说明

图1 是PCR检测血卵涡鞭虫结果，图中M为DNA marker，1-15分别对应表格1中1-15号样品，16是阳性对照；

图 2 是本发明间接荧光抗体检测方法检测三疣梭子蟹血淋巴中血卵涡鞭虫检测结果的图片，图 2-A 是在普通光源与荧光光源下的观察结果（标尺=20 μm ）；图 2-B 是荧光光源下的观察结果（标尺=45 μm ）；

图 3 是本发明兔抗血清间接荧光抗体检测血卵涡鞭虫结果图片（标尺=20 μm ），

A. 是阳性血淋巴在激发光下观察结果；B. 是阳性血淋巴普通光学显微镜下观察结果；C. 是阳性血淋巴在激发光下和普通光下观察结果；

D. 营养体阶段、E. 大腰鞭孢子阶段、F. 孢子体阶段，三个不同生活阶段血卵涡鞭虫荧光抗体检测结果，右上角显示虫体在相差显微下的形态，

图中箭头 a 显示带荧光血卵涡鞭虫营养体，箭头 b 显示梭子蟹血细胞。

具体实施方式

下面结合实施例，更具体地说明本发明的内容。应当理解，本发明的实施并不局限于下面的实施例，对本发明所做的任何形式上的变通和/或改变都将落入本发明保护范围。

本发明实施例提供的间接荧光抗体检测方法，是在纯化处理过的血卵涡鞭虫兔抗血清基础上进行的，其中：

1、载玻片处理与待检样品处理：新载玻片经铬酸洗液浸泡 24h，乙醇浸泡 1h，晾干后用热的明胶甲醛溶液(35%甲醛 2.5ml，明胶 0.5g，蒸馏水 100ml)浸泡 10min，55℃烘干备用。从患病甲壳类体内抽取血淋巴，0.5%福尔马林固定 1h，PBS 洗涤液重悬 3 次后，待检。

2、间接荧光抗体检测过程：

(1) 待检样品 5 μ l 滴加于载玻片，均匀涂布成圆面，室温晾干，55℃固定 5min。以血卵涡鞭虫虫体为阳性对照，健康梭子蟹血细胞为阴性对照。

(2) 滴加稀释比例为 1: 160 的海产甲壳类寄生虫血卵涡鞭虫兔抗血清 50 μ l，37℃免疫湿盒温育 1h，洗涤液洗涤 3 次。

(3) 滴加稀释比例为 1: 100 的 FITC 标记羊抗兔抗体，37℃免疫湿盒温育 40min，洗涤液洗涤 3 次后用甘油碳酸盐缓冲液封片，

(4) 荧光显微镜 495nm 激发光下镜检。以能显示清晰亮绿色荧光虫体为阳性，无颜色黑暗背景为阴性。

上述检测过程中使用试剂为：

抗体稀释液：含 0.5%的牛血清白蛋白 pH 为 7.4 的 0.01M 磷酸盐缓冲液。

洗涤液：含 0.05%Tween-20 的 pH 为 7.4 的 0.1M 磷酸盐缓冲液。

封片液：pH 为 9.6 的甘油碳酸盐缓冲液(0.5M 碳酸盐缓冲液与甘油按体积比 1:1 混合制备而成)。

以血卵涡鞭虫虫体为标准阳性对照，健康梭子蟹血细胞为标准阴性对照，待检样本荧光呈现清晰虫体形态为阳性，无荧光或明显比阳性对照显色暗的样本为阴性。

试剂和仪器

福氏完全佐剂购于 Sigma 公司；FITC-羊抗兔 IgG、羊抗兔 IgG 购于武汉博士德生物公

司；新西兰大白兔（雄性，2kg）购于浙江省医学科学院实验动物中心；Nikon 80i 显微镜。

实施例 1-1

取浙江舟山桃花某养殖池处于患病末期的三疣梭子蟹体液，3000r/min 离心 8min，弃上清液，将离心获得的沉淀物用 pH 为 7.4 的 0.1M 的磷酸盐缓冲液（PBS）洗涤三次，然后在 37℃ 下用 0.5% 的福尔马林溶液固定 1h，再用 pH 为 7.4 的 0.1M 的 PBS 洗涤 3 次，通过显微计数，用 PBS 适当稀释后获得每毫升洗涤液含 3.6×10^7 个虫体的溶液，反复冻融 4 次，获得虫体悬液。

然后用上述获得的虫体悬液免疫新西兰大白兔（雄性，体重 2.0kg 左右）。免疫分 4 次：第一次免疫用福氏完全佐剂与虫体悬液等比例乳化均匀而成的乳剂，大白兔脊柱两侧皮下分 6 点注射，剂量 1mL；第一次免疫间隔 24 天后，同法操作再注射 1mL 虫体悬液加强免疫；第二次免疫间隔 24 天后，同法操作再注射 1mL 虫体悬液再次加强免疫一次；第三次免疫间隔 24 天后，同法操作再注射 1mL 虫体悬液再次加强免疫一次；最后一次免疫 14 天后，从兔耳静脉采血，收集血清，得到兔抗血清。用间接 ELISA 方法对获得的抗血清进行效价测定，测得效价为 7680。抗血清中加入其体积 20% 的甘油，-70℃ 冻藏备用。

实施例 1-2

将实施例 1-1 获得的兔抗血清做进一步的纯化处理，如下：

取健康梭子蟹血淋巴，经 0.5% 福尔马林溶液固定 1h 后，用含有 0.5% 小牛血清的 pH 为 7.4 的 0.1M 的 PBS 洗涤，用此血细胞悬液与实施例 1-1 获得的兔抗血清混合，4℃ 黑暗条件下反应，反应过程中不间断混匀，反应时间 24h。获得的溶液 3000r/min 离心 8min 除去沉淀物即血淋巴，收集上清液，得到纯化后的兔抗血清。用间接 ELISA 方法对吸附处理后的兔抗血清抗体再次进行效价测定，测得效价为 2560。纯化后的抗血清中加入其体积 20% 的甘油，-70℃ 冻藏备用。

实施例 2-1

取浙江舟山桃花某养殖池处于患病末期的三疣梭子蟹体液，4000r/min 离心 10min，弃上清液，将离心获得的沉淀物用 pH 为 7.4 的 0.1M 的磷酸盐缓冲液（PBS）洗涤三次，然后在 37℃ 下用 0.5% 的福尔马林溶液固定 1h，再用 pH 为 7.4 的 0.1M 的 PBS 洗涤 3 次，通过显微计数，用 PBS 适当稀释后获得每毫升洗涤液含 3.6×10^8 个虫体的溶液，反复冻融 4 次，获得虫体悬液。

然后用上述获得的虫体悬液免疫新西兰大白兔(雄性, 体重 1.5kg 左右)。免疫分 3 次: 第一次免疫用福氏完全佐剂与虫体悬液等比例乳化均匀而成的乳剂, 大白兔脊柱两侧皮下分 6 点注射, 剂量 1mL; 第一次免疫间隔 21 天后, 同法操作再注射 1mL 虫体悬液加强免疫; 第二次免疫间隔 21 天后, 同法操作再注射 1mL 虫体悬液再次加强免疫一次; 最后一次免疫 14 天后, 从兔耳静脉采血, 收集血清, 获得兔抗血清。用间接 ELISA 方法对获得的抗血清进行效价测定, 测得效价为 10240。抗血清中加入其体积 20%的甘油, -70°C 冻藏备用。

实施例 2-2

将实施例 2-1 获得的兔抗血清做进一步的纯化处理, 如下:

取健康梭子蟹血淋巴, 经 0.5%福尔马林溶液固定 1h 后, 用含有 0.5%小牛血清的 pH 为 7.4 的 0.1M 的 PBS 洗涤, 用此血细胞悬液与实施例 1-1 获得的兔抗血清混合, 4°C 黑暗条件下反应, 反应过程中不间断混匀, 反应时间 16h。获得的溶液 4000r/min 离心 10min 除去沉淀物即血淋巴, 收集上清液, 得到纯化后的兔抗血清。用间接 ELISA 方法对吸附处理后的兔抗血清抗体再次进行效价测定, 测得效价为 7680。纯化后的抗血清中加入其体积 20%的甘油, -70°C 冻藏备用。

实施例 3 -1

取浙江舟山桃花某养殖池处于患病末期的锯缘青蟹体液, 4000r/min 离心 10min, 弃上清液, 将离心获得的沉淀物用 pH 为 7.4 的 0.1M 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤三次, 然后在 37°C 下用 0.5%的福尔马林溶液固定 1h, 再用 pH 为 7.4 的 0.1M 的 PBS 洗涤 3 次, 通过显微计数, 适当稀释后获得每毫升洗涤液含 3.6×10^9 个虫体的溶液, 反复冻融 4 次, 获得虫体悬液。

然后用上述获得的虫体悬液免疫新西兰大白兔(雄性, 体重 2.0kg 左右)。免疫分 3 次: 第一次免疫用福氏完全佐剂与虫体悬液等比例乳化均匀而成的乳剂, 大白兔脊柱两侧皮下分 6 点注射, 剂量 2mL; 第一次免疫间隔 21 天后, 同法操作再注射 2mL 虫体悬液加强免疫; 第二次免疫间隔 21 天后, 同法操作再注射 2mL 虫体悬液再次加强免疫一次; 最后一次免疫 14 天后, 从兔耳静脉采血, 收集血清, 得到兔抗血清。用间接 ELISA 方法对获得的抗血清进行效价测定, 测得效价为 5120。抗血清中加入其体积 20%的甘油, -70°C 冻藏备用。

实施例 3-2

将实施例 3-1 获得的兔抗血清做进一步的纯化处理, 如下:

取健康锯缘青蟹血淋巴, 经 0.5%福尔马林溶液固定 1h 后, 用含有 0.5%小牛血清的 pH 为 7.4 的 0.1M 的 PBS 洗涤, 用此血细胞悬液与实施例 3-1 获得的兔抗血清混合, 吸附处理反应过程中不间断混匀, 反应时间 24h。获得的溶液 4000r/min 离心 10min, 收集上清液,

得到纯化后的兔抗血清。用间接 ELISA 方法对吸附处理后的兔抗血清抗体再次进行效价测定，测得效价为 2560。纯化后的抗血清中加入其体积 20% 的甘油，-70℃ 冻藏备用。

实施例 4

间接 ELISA 检测实施例 1-1~实施例 3-2 获得的兔抗血清效价，检测结果见表 1。

表 1

检测项目 实施例编号	效价	OD _{492nm} 值	P/N 值
1-1	7680	0.2015	2.40
1-2	2560	0.1863	2.21
2-1	10240	0.2596	2.32
2-2	7680	0.3673	2.26
3-1	5120	0.1974	2.44
3-2	2560	0.2104	2.30

从表 1 结果可以看出，上述实施例制备的兔抗血清完全符合间接荧光抗体检测用抗体效价要求。

实施例 5 兔抗血清抗体最佳稀释度筛选及特异性试验

1、最佳抗体稀释度筛选

将实施例 2-2 制备的血清抗体按比例稀释 1:64 到 1:1280，FITC-羊抗兔 IgG 稀释 1:32 到 1:256，对已知阳性样本进行检测，根据染色强度筛选最佳的一抗、二抗稀释比例。确定较好的是血卵涡鞭虫兔抗血清稀释度为 64~320、异硫氰酸荧光标记羊抗兔抗体溶液稀释度为 32~160。确定血卵涡鞭虫血清抗体稀释度 160，FITC-羊抗兔 IgG 稀释度 100 为最佳反应浓度。在最佳反应浓度下几乎没有非特异性荧光染色，虫体被染上明亮荧光，背景呈黑色。血清抗体稀释度过低，荧光二抗稀释度过低(如稀释度 32)时容易出现非特异性荧光。

2、抗体特异性检测

以最佳抗体稀释度进行阻断实验，吸收实验。阻断实验即用羊抗兔 IgG 代替荧光标记的羊抗兔 IgG 进行反应。吸收实验，用过量血卵涡鞭虫虫体抗原对抗体(实施例 1-2、实施例 2-2、实施例 3-2 的抗血清)进行吸附，然后用吸附过的抗体对阳性样本进行检测。吸收试验及阻断试验结果均呈现黑色背景，证明抗体特异性较强。

实施例 6

用实施例 2-2 制备的抗血清按如下方法对从某养殖塘疑似血卵涡鞭虫感染的脊尾白虾和三疣梭子蟹进行间接荧光抗体检测:

待检梭子蟹 5 只, 脊尾白虾 3 尾, 用无菌 1mL 注射器抽取 0.5%福尔马林 0.5mL, 然后从梭子蟹游泳足基部抽取 0.5ml 梭子蟹血淋巴, 37℃固定 1h; 将脊尾白虾用酒精棉球擦拭头胸甲, 用已抽取 0.1mL 0.5%福尔马林的注射器从心脏处抽取 0.1mL 血淋巴, 混匀。样品收集于 1.5ml 离心管中, 37℃固定 1h; 同时取血卵涡鞭虫虫体阳性样本, 健康梭子蟹血淋巴进行同样操作; 4000r/min 离心 10min, 用 pH7.4 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 重悬 3 次, 最后一次浓缩至 100 μ L。

待检样品 5 μ L 滴加于载玻片, 均匀涂布成 1cm 大小的圆面, 室温晾干, 55℃固定 5min。每片载玻片点样 4 个样品。以血卵涡鞭虫虫体为阳性对照, 健康梭子蟹血细胞为阴性对照。以 pH7.4 的 PBS 轻轻洗涤 3 次, 甩干多余液体, 稍晾干; 每个点样点滴加稀释比例为 1: 160 的血卵涡鞭虫兔抗血清 50 μ L, 37℃免疫湿盒温育 1h, 洗涤液洗涤 3 次, 甩去多余液体; 每个点样点滴加 30 μ L 稀释比例为 1: 100 的 FITC 标记羊抗兔抗体, 37℃免疫湿盒温育 40min, 洗涤液洗涤 3 次后, 每个点样点滴加甘油碳酸盐缓冲液 30 μ L 左右, 盖上盖玻片。于荧光显微镜 495nm 激发光下镜检。以能显示清晰亮绿色荧光虫体为阳性, 无颜色黑暗背景为阴性。

结果显示 5 个梭子蟹样本中 3 个梭子蟹样本发现被染成明亮黄绿色的血卵涡鞭虫虫体 (检测结果见图 2); 3 脊尾白虾样本中没有发现血卵涡鞭虫感染。

在 NIKON-80i 荧光显微镜下 40 倍物镜视野下对点样区域的荧光虫体进行计数。每个样品计数 20 个视野, 取平均值, 得到一个视野下带荧光的虫体数量。NIKON-80i 显微镜 40 倍下视野直径为 540 μ m, 而样品涂布圆形区域直径为 1000 μ m。这样样品涂布面积约为视野面积的 3.2 倍。通过此换算关系可以算出原始样品中感染虫体的量。对于浓度较高的样本需要进行稀释, 虫体含量较少的样本需要进行浓缩。

3 个感染血卵涡鞭虫的梭子蟹样品 1、3、4 中血卵涡鞭虫浓度分别为 3.4×10^5 cells/mL、 1.8×10^7 cells/mL、 8.2×10^4 cells/mL。其中样本 3 这种感染严重的样本中虫体计数需要进行适当稀释后重新检测计数。

实施 7

用实施例 3-2 制备的抗血清按如下方法对疑似感染血卵涡鞭虫的锯缘青蟹进行间接荧

光抗体检测:

待检锯缘青蟹 4 只, 用无菌 1mL 注射器抽取 0.5%福尔马林 0.3mL, 然后从梭子蟹游泳足基部抽取 0.2ml 锯缘青蟹血淋巴, 37℃固定 1h; 同时取血卵涡鞭虫虫体, 健康梭子蟹血细胞进行同样操作; 3000r/min 离心 10min, 用 pH7.4 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 重悬 3 次, 最后一次浓缩至 200 μ L。

待检样品 5 μ L 滴加于载玻片, 均匀涂布成圆面, 室温晾干, 55℃固定 5min。每片载玻片点样 4 个样品。以血卵涡鞭虫虫体为阳性对照, 健康梭子蟹血细胞为阴性对照。以 pH7.4 的 PBS 轻轻洗涤 3 次, 甩干多余液体, 稍晾干; 每个点样点滴加稀释比例为 1: 160 的海产甲壳类寄生虫血卵涡鞭虫兔抗血清 40 μ L, 37℃免疫湿盒温育 1h, 洗涤液洗涤 3 次, 甩去多余液体; 每个点样点滴加稀释比例为 1: 100 的 FITC 标记羊抗兔抗体 20 μ L, 37℃免疫湿盒温育 40min, 洗涤液洗涤 3 次后, 每个点样点滴加甘油碳酸盐缓冲液 30 μ L 左右, 盖上盖玻片。于荧光显微镜 495nm 激发光下镜检。以能显示清晰亮绿色荧光虫体为阳性, 无颜色黑暗背景为阴性。结果显示 4 个锯缘青蟹样本均感染血卵涡鞭虫。

实施例 8 显微镜检、PCR 与 IFAT 检测血卵涡鞭虫结果比较

用实施例 2-2 制备的兔抗血清做 IFAT, 操作方法同实施例 6。

PCR 按参考文献^[4]记载的方法操作。

检测样品 18 份, 三种检测方法检测结果见表 2, 其中用显微镜直接检测阳性率仅 33.3%, 而 PCR 及 IFAT 检测结果则达到 77.8%。PCR 检测样品部分结果见图 1, 阳性结果均出现不同亮度的 586bp 特异性条带, 阴性结果则不见特异性条带。IFAT 检测结果见图 3: 阳性血淋巴样品均可观察到黄绿色荧光虫体, 而蟹血细胞未被染色, 在落射 495nm 激发光和普通光照下, 可以同时观察到染上荧光的虫体和蟹血颗粒细胞与透明细胞 (图 3 A、B、C); 间接荧光抗体还检测到了不同生活阶段的血卵涡鞭虫虫体: 营养体、大腰鞭孢子、合孢体 (图 3 D、E、F)。

表2 显微镜检、PCR和IFAT检测血卵涡鞭虫结果比较

样品 编号	样品种类及来源	检测结果			样品 编号	样品种类及来源	检测结果		
		M	PCR	IFAT			M	PCR	IFAT
1	青 蟹-三门	-	+	+	11	梭子蟹-舟山马目	-	-	-
2	青 蟹-三门	-	+	+	12	梭子蟹-舟山马目	-	-	-
3	青 蟹-三门	+	+	+	13	梭子蟹-舟山马目	-	+	+
4	梭子蟹-大沙渔场	-	-	-	14	梭子蟹-舟山桃花	+	+	+
5	梭子蟹-舟山普陀	+	+	+	15	梭子蟹-舟山桃花	-	+	+
6	梭子蟹-舟山桃花	+	+	+	16	梭子蟹-舟山普陀	+	+	+
7	梭子蟹-舟山岙山	-	+	+	17	梭子蟹-舟山普陀	-	-	-
8	梭子蟹-舟山岙山	-	+	+	18	梭子蟹-舟山桃花	+	+	+
9	梭子蟹-舟山岙山	-	+	+	19	梭子蟹阴性血淋巴	-	-	-
10	青 蟹-舟山桃花	+	+	+	20	青蟹阴性血淋巴	-	-	-

注：M 代表普通光学显微镜镜检；“+”代表阳性，“-”代表阴性。

参考文献：

- [1] 许文军, 徐汉祥, Jeff Shield 等, 海产甲壳类血卵涡鞭虫病研究进展[J], 中国水产科学, 2007, 14(4):695-702。
- [2] 许文军, 施慧, 徐汉祥等, 养殖梭子蟹血卵涡鞭虫感染的初步研究[J], 水生生物学报, 2007, 31(5):27-32。
- [3] 许文军, 绳秀珍, 徐汉祥等, 血卵涡鞭虫在养殖锯缘青蟹中的寄生[J], 中国海洋大学学报, 2007, 37(6):916-920。
- [4] 施慧, 许文军, 李鹏飞等, 应用 PCR 方法检测患“黄水病”锯缘青蟹中的血卵涡鞭虫 [J], 海洋渔业, 2008, 30(1):74-79。

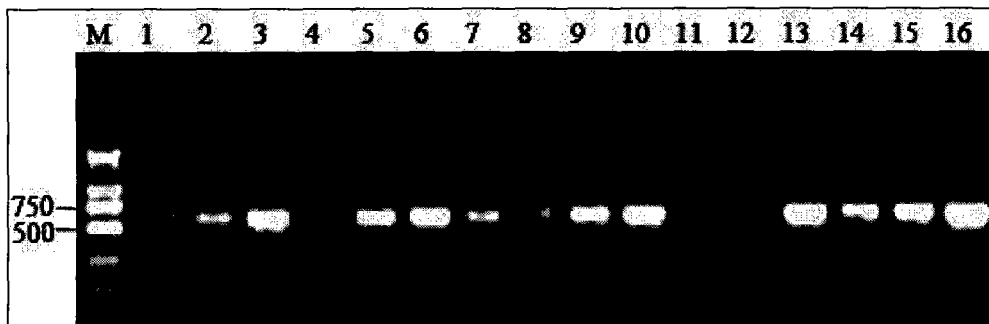


图1

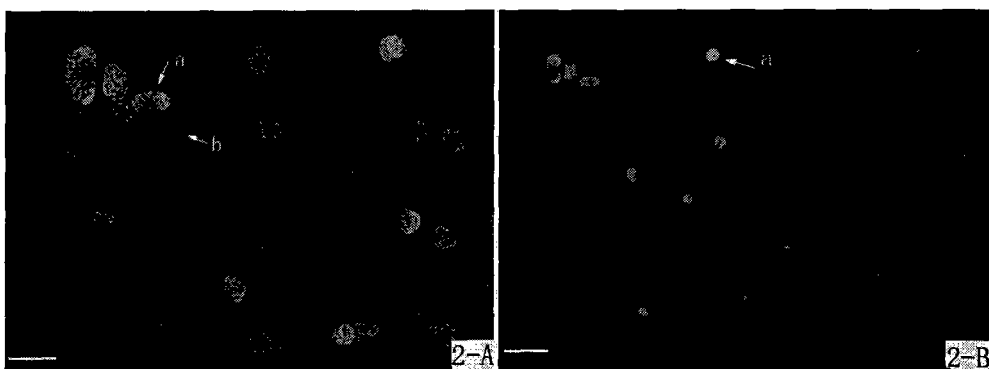


图2

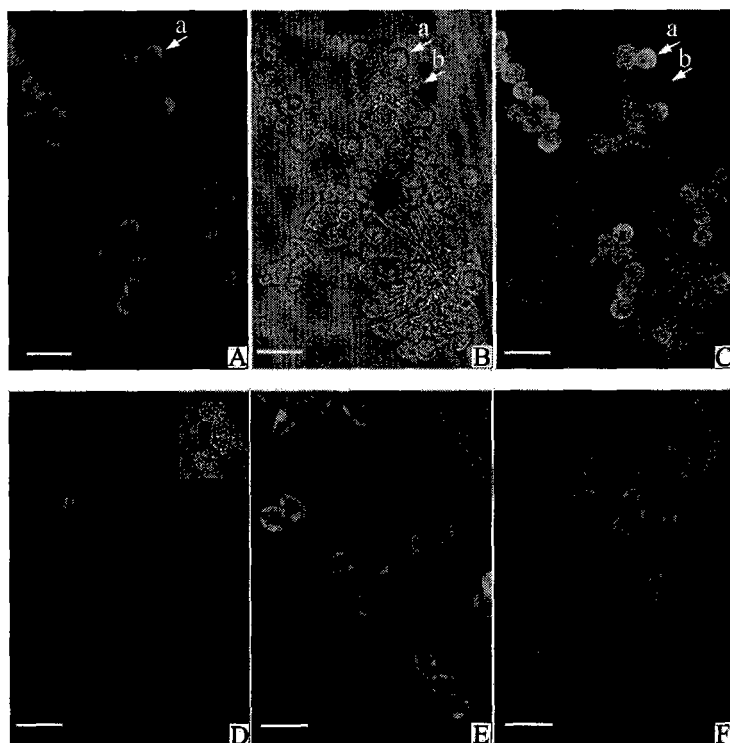


图3

专利名称(译)	一种血卵涡鞭虫免抗血清及其应用		
公开(公告)号	CN101576559A	公开(公告)日	2009-11-11
申请号	CN200810163904.0	申请日	2008-12-25
申请(专利权)人(译)	浙江省海洋水产研究所		
当前申请(专利权)人(译)	浙江省海洋水产研究所		
[标]发明人	许文军 谢建军 施慧 张静		
发明人	许文军 谢建军 施慧 张静		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/533 G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开一种血卵涡鞭虫免抗血清，所述的血卵涡鞭虫免抗血清是以取自病蟹含血卵涡鞭虫虫体的体液为抗原，经处理后获得免疫抗原即血卵涡鞭虫虫体悬液，然后对大白兔进行免疫获得免抗血清；本发明还公开了所述免抗血清在间接荧光抗体检测方法上的应用，所述的应用即将免抗血清滴加到待测样品进行一抗孵育，然后再滴加异硫氰酸荧光标记羊抗兔抗体进行二抗孵育，经封片处理后做镜检；本发明检测血卵涡鞭虫的免抗血清特异性强，灵敏度高，检测时间短，可用于血卵涡鞭虫潜在感染以及早期感染的诊断，本发明检测方法操作简单，可以对海产甲壳类动物是否感染血卵涡鞭虫进行定性定量检测。

检测项目 实施例编号	效价	OD _{490nm} 值	P/N值
1-1	7680	0.2015	2.40
1-2	2560	0.1863	2.21
2-1	10240	0.2596	2.32
2-2	7680	0.3673	2.26
3-1	5120	0.1974	2.44
3-2	2560	0.2104	2.30