

[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 200410066928.6

G01N 33/569

G01N 33/547

G01N 33/543

G01N 33/536

G01N 1/28

G01N 33/535

G01N 21/31

[43] 公开日 2005 年 5 月 18 日

[11] 公开号 CN 1616968A

[22] 申请日 2004.9.30

[21] 申请号 200410066928.6

[71] 申请人 浙江大学

地址 310029 浙江省杭州凯旋路 268 号浙江
大学动物科学学院

[72] 发明人 吴信忠 孙敬锋

[74] 专利代理机构 杭州中成专利事务所有限公司

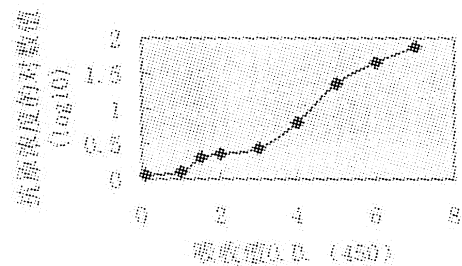
代理人 陈祯祥

权利要求书 3 页 说明书 4 页 附图 1 页

[54] 发明名称 间接 ELISA 方法快速检测近江牡蛎病原类立克次氏体

[57] 摘要

间接 ELISA 方法快速检测近江牡蛎病原类立克次氏体。主要解决能简单、快速、敏感性高、特异性强、重复性好的检测出引起近江牡蛎发病死亡的类立克次氏体。其检测步骤依次如下：待检材料的制备、抗原的制备、免疫血清的制备及非特异性抗体的吸收、间接 ELISA 工作浓度的确定、间接 ELISA 方法的敏感性和特异性验证，最后进行近江牡蛎类立克次氏体病原的检测。本发明能有效检出感染材料中的类立克次氏体病原，适用于大批量发病样品的检测，可用于类立克次氏体感染的早期快速诊断及流行病学研究。



ISSN 1008-4274

1、间接 ELISA 方法快速检测近江牡蛎病原类立克次氏体,其特征在于检测步骤依次如下:

一、待检材料的准备

分别取近江牡蛎的鳃,外套膜,肝胰腺研磨后加入 3 倍体积的生理盐水,离心取上清液检测;

二、抗原的制备

1. 类立克次氏体的初步分离:取近江牡蛎鳃组织,剪碎后加入 pH 为 7.4 的 PBS,于匀浆器内匀浆 10min,重复匀浆三次,先低速离心除渣,4℃下 500g 离心 10min,取上清液,沉淀加入 PBS 后重新研磨匀浆,4℃下 400g 离心 20min,取上清液,弃沉淀,将上两步的上清液收集后 4℃下 11000g 离心 60min,用吸管吸去浮在管壁上的脂肪,弃掉上清液,沉淀加入 PBS 后,重新匀浆,4℃下 500g 离心 20min,取上清液置于 23%蔗糖和 10%泛影葡胺的混合溶液之上,4℃下 25000g 离心 60min,将沉淀轻微匀浆后,PBS 稀释,4℃下 400g 离心 10min,取上清液,4℃下 11000g 离心 60min,取沉淀,用 9mlPBS 稀释为类立克次氏体粗提液,离心后的每一步含有类立克次氏体的液体涂片,Giemsa 染色,光学显微镜观察;

2. 泛影葡胺密度梯度离心纯化类立克次氏体:用国产泛影葡胺(60%)配制 15%、20%、25%、30%、35%的泛影葡胺,按浓度由高到低依次加入离心管中,形成非连续梯度,将类立克次氏体粗提液加在泛影葡胺密度梯度上,4℃下 90000g 离心 60min,形成 5 条窄的乳白色的条带,分别取出经电镜观察,证明 20%与 25%之间和 25%与 30%之间基本上为纯净的类立克次氏体;

三、免疫血清的制备及非特异性抗体的吸收

1. 多克隆抗血清的制备:

类立克次氏体经超声处理后,用 PBS 调整为 1 μ g 蛋白/ μ l,加等量的弗氏完全佐剂进行乳化,在 Balb/c 小鼠 4 个位点分别皮下注射 100 μ l 免疫乳化剂,4 周后作加强免疫,腹腔注射 100 μ l 不加佐剂的抗原,10 天后在小鼠尾静脉采血,检测抗体;

2. 非特异性抗体的吸收:取正常贝的闭壳肌,加入 TN 缓冲液其中含有 PMSF1mmol/dm³,匀浆 8000rpm,10min,经 3000rpm 离心 5 min,取上清液再经 5000rpm 离心 20min,上清液经 10000rpm 离心 1h,取沉淀用于非特异性抗体的吸收,方法参照 Sambrook 等;

四、间接 ELISA 工作浓度的确定

1、免疫血清抗体的效价

固定抗原的浓度 $10 \mu\text{g/ml}$ ，系列稀释抗血清的浓度 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400, 1:12800 用间接 ELISA 技术测定抗体效价及最佳工作浓度；

2、采用交叉连续稀释法确定免疫血清的最佳工作浓度，抗原浓度恒定 $100 \mu\text{g/ml}$ ，调节免疫血清的稀释度 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400, 1:12800。经间接 ELISA 反应后，获得在 $\lambda=450$ 处的吸收值；

制备的免疫血清用间接 ELISA 测定的效价为 1:6400v/v，最佳工作浓度取最大和最小吸收值的中间值，为 0.6，对应的血清稀释度为 1:3200；

五、间接 ELISA 方法的敏感性和特异性验证

1、敏感性

根据确定的一抗最佳工作浓度和二抗推荐的工作浓度，系列稀释抗原浓度，以确定最小检测的抗原浓度；

免疫血清抗体的浓度恒定 1:3200V/V；酶标二抗的工作浓度恒定 1:20000V/V，而抗原的浓度改变范围为 $1\text{ng/ml} - 50 \mu\text{g/ml}$ ，测定免疫血清对抗原的灵敏度；

2、特异性

选择溶藻弧菌 *V.Alginolyticus*、嗜水气单胞菌 *Aeromonas Hydrophila*、大肠杆菌 *Eschenrichia Coli*、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus Aureus*、枯草杆菌 *Bacillus Subtilis* 与多克隆抗血清交叉反应来判断抗血清的特异性，实验细菌的浓度为 $10^6/\text{ml}$ ；

由类立克次氏体免疫 Balb/c 小鼠所得的抗血清与类立克次氏体的效价为 1:12800，与其它菌的效价较低，都低于 1:200，通过吸附处理后，抗血清对类立克次氏体的效价降低至 1:6400，与其它菌无交叉反应，为高度专一的抗类立克次氏体血清；

六、近江牡蛎类立克次体病原的检测

于发病高峰期取近江牡蛎，取其外套膜和鳃部位组织，用无菌 PBS 匀浆，离心取上清液， 100°C 煮沸 10min， 4°C 保存；

用碳酸缓冲液 pH9.6 0.01M 将可溶性抗原稀释成蛋白含量为 $100\mu\text{g/ml}$ ，于微量反应板各孔加 $100\mu\text{l}$ 稀释的可溶性抗原， 4°C 18 小时后取出，弃去包被液，用 PBST 洗涤一次，加入 3% 牛血清白蛋白-0.02%T， 37°C 作用 2 小时后，甩干封闭液，用 PBST 洗涤三次，10min/次，并甩干；

加入被检血清：用 PBS 把血清用倍比稀释后加入反应孔，每孔 $100\mu\text{l}$ ， 37°C 作用 1 小时后

用 PBST 洗涤三次, 10min/次, 并甩干;

加入酶标二抗, 每孔 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 作用 1 小时后用 PBST 洗涤三次, 3min/次, 并甩干;

加入四甲基联苯胺 TMB 显色液, 每孔 100 μ l, 室温作用 15min 后加 3M NaOH 终止反应, 测定 OD450 值, 或根据阳性及阴性对照直接判定结果;

其中显色液配方:

碳酸缓冲液 (pH9.6): NaHCO₃ 2.93g, Na₂CO₃ 1.59g 蒸馏水 1L;

封闭液: 3%牛血清白蛋白-0.02%Tween20;

稀释液: PBS (pH 7.4) -0.05%Tween20, 配方为:

NaCl 8g, Na₂HPO₄-12H₂O 20g, KH₂PO₄ 0.2g, KCl 0.2g, H₂O 1L;

底物溶液: 0.2M Na ₂ HPO ₄	28.4g/L	25.7ml,
0.1M 柠檬酸	19.2g/L	24.3ml
H ₂ O		50ml
30% H ₂ O ₂	临用前加入	15 μ l
TMB	临用前加入	40mg。

间接 ELISA 方法快速检测近江牡蛎病原类立克次氏体

技术领域

本发明属水产学科生物技术领域，即应用现代免疫学技术——间接 ELISA 技术来解决海水养殖近江牡蛎(拉丁学名为 *Crassostrea ariakensis* Gould)发生的类立克次氏体病的病原检测问题，本发明就是创造了检测引起近江牡蛎发病死亡的类立克次氏体(英文名称 rickettsia-like prokaryote, 简称 RLP 或者又称为 rickettsia-like organism, 简称 RLO)的间接 ELISA (英文名称 Enzyme-linked immunosorbent assay, 简称 ELISA) 检测方法。

背景技术

海水养殖近江牡蛎是一种浅海养殖的重要经济贝类，在我国广东、广西、福建、海南等南方诸省有大规模养殖，其味美肉细，营养丰富，在正常情况下，产量高，经济效益好。但自 1992 年以来，养殖牡蛎常有大规模的爆发性死亡，广东和广西两省尤其严重，一般发生在每年的 3-5 月份和 10-12 月份，死亡率达 80-90%，这造成了巨大的经济损失。2000 年我们首次报道了近江牡蛎的类立克次氏体感染，发现类立克次氏体是引起近江牡蛎发病的病原。在本发明之前，迄今在国内、外尚未见用间接 ELISA 方法来检测近江牡蛎的类立克次氏体。

在本发明之前，为了检测近江牡蛎的发病情况，原来已有的技术仍然是停留在组织学切片和电子显微镜超薄切片的水平上，通过光学显微镜来检查类立克次氏体的包涵体或通过电子显微镜来直接观察寻找病原体，这种方法费时费力，试剂及设备昂贵。

发明内容：

本发明为了克服现有技术的不足，提供一种能早期、快速、有效地检测出引起近江牡蛎爆发性死亡病原类立克次氏体的方法。

为实现上述目的采取技术方案的操作步骤依次如下：

第一、待检材料的准备：

分别取近江牡蛎的鳃, 外套膜, 肝胰腺研磨后加入 3 倍体积的生理盐水, 离心取上清液检测。

第二、抗原的制备：

1. 类立克次氏体的初步分离：取近江牡蛎鳃组织，剪碎后加入 pH 为 7.4 的 PBS，于匀

浆器内匀浆 10min, 重复匀浆三次。先低速离心除渣。4℃下 500g 离心 10min, 取上清液。沉淀加入 PBS 后重新研磨匀浆, 4℃下 400g 离心 20min, 取上清液, 弃沉淀。将上两步的上清液收集后 4℃下 11000g 离心 60min。用吸管吸去浮在管壁上的脂肪, 弃掉上清液。沉淀加入 PBS 后, 重新匀浆(动作要缓慢), 4℃下 500g 离心 20min, 取上清液置于 23%蔗糖和 10%泛影葡胺的混合溶液之上, 4℃下 25000g 离心 60min, 将沉淀轻微匀浆后, PBS 稀释, 4℃下 400g 离心 10min, 取上清液后, 4℃下再 11000g 离心 60min, 取沉淀, 用 9ml PBS 稀释为类立克次氏体粗提液。离心后的每一步含有类立克次氏体的液体涂片, Giemsa 染色, 光学显微镜观察。

2. 泛影葡胺密度梯度离心纯化类立克次氏体: 用国产泛影葡胺(60%)配制 15%、20%、25%、30%、35%的泛影葡胺, 按浓度由高到低依次加入离心管中, 形成非连续梯度。将类立克次氏体粗提液加在泛影葡胺密度梯度上, 4℃下 90000g 离心 60min, 形成 5 条窄的乳白色的条带, 分别取出经电镜观察, 证明 20%与 25%之间和 25%与 30%之间基本上为纯净的类立克次氏体。

第三、免疫血清的制备及非特异性抗体的吸收

1. 多克隆抗血清的制备:

类立克次氏体经超声处理后, 用 PBS 调整为 $1\mu\text{g}$ 蛋白/ μl , 加等量的弗氏完全佐剂进行乳化。在 Balb/c 小鼠 4 个位点分别皮下注射 $100\mu\text{l}$ 免疫乳化剂, 4 周后作加强免疫, 腹腔注射 $100\mu\text{l}$ 不加佐剂的抗原, 10 天后在小鼠尾静脉采血, 检测抗体。

2. 非特异性抗体的吸收:

取正常贝的闭壳肌, 加入 TN 缓冲液(其中含有 $\text{PMSF}1\text{mmol}/\text{dm}^3$), 匀浆 8000rpm, 10min, 经 3000rpm 离心 5 min, 取上清液再经 5000rpm 离心 20min, 上清液经 10000rpm 离心 1h, 取沉淀用于非特异性抗体的吸收。方法参照 Sambrook 等。

第四、间接 ELISA 工作浓度的确定:

1. 免疫血清抗体的效价

固定抗原的浓度 $10\mu\text{g}/\text{ml}$, 系列稀释抗血清的浓度 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400, 1:12800 用间接 ELISA 技术测定抗体效价及最佳工作浓度。

2. 采用交叉连续稀释法确定免疫血清的最佳工作浓度。抗原浓度恒定 $100\mu\text{g}/\text{ml}$, 调节免疫血清的稀释度 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400, 1:12800。经间接 ELISA 反应后, 在 $\lambda=450$ 处的吸收值见图 1。

由图 1 可见, 制备的免疫血清用间接 ELISA 测定的效价为 1:6400 (v/v), 最佳工作浓

度取最大和最小吸收值的中间值，为 0.6，对应的血清稀释度为 1: 3200；过高和过低的稀释度都会增加非特异吸附。

第五、间接 ELISA 方法的敏感性和特异性验证

(1) 敏感性实验

根据确定的一抗最佳工作浓度和二抗推荐的工作浓度，系列稀释抗原浓度，以确定最小检测的抗原浓度。

实验中，免疫血清抗体的浓度恒定（1: 3200V/V）；酶标二抗的工作浓度恒定（1: 20000V/V）。而抗原的浓度改变（1ng/ml -50 μg/ml），测定免疫血清对抗原的灵敏度，结果如图 2，由图 2 可见，用此方法可测得 50ng 的抗原蛋白量。

(2) 特异性实验 选择溶藻弧菌 (*V.Alginolyticus*)、嗜水气单胞菌 (*Aeromonas Hydrophila*)、大肠杆菌 (*Eschenrichia Coli*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus Aureus*)、枯草杆菌 (*Bacillus Subtilis*) 与多克隆抗血清交叉反应来判断抗血清的特异性。实验细菌的浓度为 10^6 /ml。

由类立克次氏体免疫 Balb/c 小鼠所得的抗血清与类立克次氏体的效价为 1: 12800，与其它菌的效价较低，都低于 1: 200，通过吸附处理后，抗血清对类立克次氏体的效价降低至 1: 6400，与其它菌无交叉反应，为高度专一的抗类立克次氏体血清。

第六、近江牡蛎类立克次氏体病原的检测：

于发病高峰期取近江牡蛎，取其外套膜和鳃部位组织，用无菌 PBS 匀浆，离心取上清液，100℃煮沸 10min，4℃保存。

用碳酸缓冲液 (pH9.6, 0.01M) 将可溶性抗原稀释成蛋白含量为 100μg /ml。于微量反应板各孔加 100μl 稀释的可溶性抗原，4℃18 小时后取出，弃去包被液，用 PBST 洗涤一次，加入 3%牛血清白蛋白-0.02%T，37℃作用 2 小时后，甩干封闭液，用 PBST 洗涤三次，10min/次，并甩干。

加入被检血清：用 PBS 把血清用倍比稀释后加入反应孔，每孔 100μl，37℃作用 1 小时后用 PBST 洗涤三次，10min/次，并甩干。

加入酶标二抗，每孔 100μl，37℃作用 1 小时后用 PBST 洗涤三次，3min/次，并甩干。

加入四甲基联苯胺 TMB 显色液，每孔 100μl，室温作用 15 min 后加 3M NaOH 终止反应。测定 OD450 值，或根据阳性及阴性对照直接判定结果。

显色液配方：

碳酸缓冲液 (pH9.6): NaHCO_3 2.93g, Na_2CO_3 1.59g 蒸馏水 1L。

封闭液: 3%牛血清白蛋白-0.02%Tween20。

稀释液: PBS (pH 7.4) -0.05%Tween20, 配方为:

NaCl 8g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 20g, KH_2PO_4 0.2g, KCl 0.2g, H_2O 1L。

底物溶液: 0.2M Na_2HPO_4 (28.4g/L)	25.7ml,
0.1M 柠檬酸 (19.2g/L)	24.3ml
H_2O	50ml
30% H_2O_2 (临用前加入)	15 μl
TMB (临用前加入)	40mg

本发明的优点:

本发明建立的间接ELISA方法,简单,快速,经济,敏感性高,特异性强,重复性好,便于推广应用,能有效的检出感染材料中的类立克次氏体病原,适用于大批量发病样本的检测,可用于类立克次氏体感染的早期快速诊断及流行病学研究。

附图说明:

图1为间接ELISA技术测定不同稀释度的免疫血清

由图1可见,制备的免疫血清用间接ELISA测定的效价为1:6400 (v/v),最佳工作浓度取最大和最小吸收值的中间值,为0.6,对应的血清稀释度为1:3200;过高和过低的稀释度都会增加非特异吸附。

图2为不同抗原稀释度的ELISA检测结果

免疫血清抗体的浓度恒定 (1:3200V/V);酶标二抗的工作浓度恒定 (1:20000V/V)。而抗原的浓度改变 (1ng/ml -50 $\mu\text{g/ml}$),测定免疫血清对抗原的灵敏度,结果如图2可见,用此方法可测得50ng的抗原蛋白量。

具体实施方式

按上述技术方案的实际操作步骤进行的实施例的检测结果,表明采用本发明是有效的:

利用建立的ELISA方法对患病近江牡蛎的鳃组织进行检测,以经过组织学和透射电镜检测为类立克次氏体阴性的健康近江牡蛎做阳性对照,对50份自然发病的近江牡蛎鳃组织进行检测,结果是ELISA检测阳性率为89%。

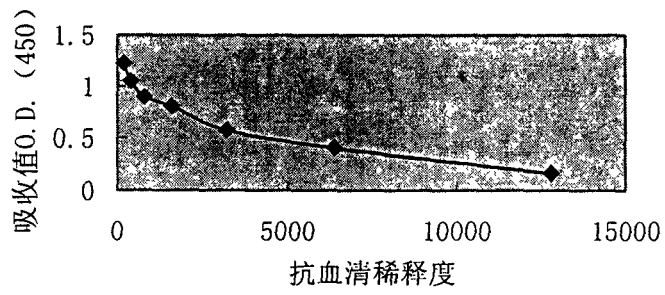


图 1

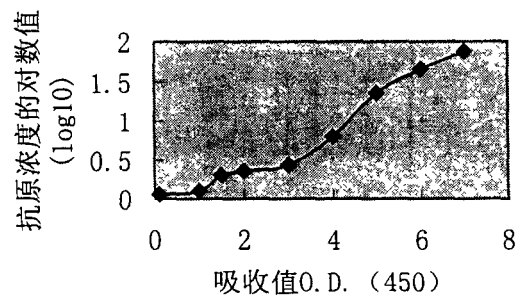


图 2

专利名称(译)	间接ELISA方法快速检测近江牡蛎病原类立克次氏体		
公开(公告)号	CN1616968A	公开(公告)日	2005-05-18
申请号	CN200410066928.6	申请日	2004-09-30
[标]申请(专利权)人(译)	浙江大学		
申请(专利权)人(译)	浙江大学		
当前申请(专利权)人(译)	浙江大学		
[标]发明人	吴信忠 孙敬锋		
发明人	吴信忠 孙敬锋		
IPC分类号	G01N1/28 G01N21/31 G01N33/535 G01N33/536 G01N33/543 G01N33/547 G01N33/569		
代理人(译)	陈祯祥		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

间接ELISA方法快速检测近江牡蛎病原类立克次氏体。主要解决能简单、快速、敏感性高、特异性强、重复性好的检测出引起近江牡蛎发病死亡的类立克次氏体。其检测步骤依次如下：待检材料的制备、抗原的制备、免疫血清的制备及非特异性抗体的吸收、间接ELISA工作浓度的确定、间接ELISA方法的敏感性和特异性验证，最后进行近江牡蛎类立克次氏体病原的检测。本发明能有效检出感染材料中的类立克次氏体病原，适用于大批量发病样本的检测，可用于类立克次氏体感染的早期快速诊断及流行病学研究。

