

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410091369.4

[51] Int. Cl.

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/547 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

[43] 公开日 2006年5月31日

[11] 公开号 CN 1779462A

[22] 申请日 2004.11.24

[21] 申请号 200410091369.4

[71] 申请人 国家海洋环境监测中心

地址 116023 辽宁省大连市沙河口区凌河街
42号

[72] 发明人 樊景凤 宋立超 梁玉波

[74] 专利代理机构 北京三幸商标专利事务所

代理人 刘激扬

权利要求书2页 说明书7页 附图1页

[54] 发明名称

抗副溶血弧菌的高免血清及其制备方法和对
虾红体病原菌的检测方法

[57] 摘要

本发明提供一种抗副溶血弧菌的高免血清的制备方法, 以及用所得到的抗副溶血弧菌的高免血清进行对虾红体病原菌副溶血弧菌的快速检测方法。所述抗副溶血弧菌的高免血清的制备方法包括用副溶血弧菌菌悬液对雄兔进行免疫。所述检测方法的建立过程包括: 标准抗原的包被; 酶标板的封闭; 抗血清与待测抗原竞争反应; 酶标抗体反应; 显色反应; 终止反应; 吸光度值测定。该方法特异性高, 操作方便, 检测成本低, 检测时间短, 可以标准化为产品, 能够进行大批量样品检测, 可以满足有关质检部门、养殖企业、研究单位等批量检测对虾体内副溶血弧菌的需要。

1. 一种抗副溶血弧菌的高免血清的制备方法，该方法包括：

用浓度为 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^9$ cfu/mL的副溶血弧菌菌悬液免疫体重为1.5~2.5千克的雄兔，每次注射1~3mL菌悬液，首次免疫时，在菌悬液中加入等体积的弗氏完全佐剂，采用脚掌4~6点的注射方式，首次免疫15~20天后进行3~5次的再次免疫，免疫间隔为10~15天，再次免疫中的每次免疫在菌悬液中均加等体积的弗氏不完全佐剂，采用背部皮下4~6点的注射方式，最后一次免疫7~10天后采血，分离血清，得到抗副溶血弧菌的高免血清。

2. 根据权利要求1所述的抗副溶血弧菌的高免血清的制备方法，其中免疫抗原使用副溶血弧菌浓度为 1×10^8 cfu/mL的菌悬液，首次免疫20天后进行5次的再次免疫，再次免疫中每次免疫间隔为15天。

3. 根据权利要求1或2所述的制备方法得到的抗副溶血弧菌的高免血清。

4. 对虾红体病病原菌副溶血弧菌的检测方法，该方法包括：

- (1) 用包被液稀释抗原，包被酶标板，烘干；
- (2) 用洗涤液洗板；
- (3) 用封闭液封闭，洗板；
- (4) 加入待测抗原和1:6000~1:11000倍稀释的权利要求3所述的抗副溶血弧菌的高免血清于酶标板中，竞争反应，洗板；
- (5) 加上酶标二抗，洗板；
- (6) 加显色液，避光显色；
- (7) 用终止液终止显色；
- (8) 用酶标仪测定OD₄₉₂值。

5. 根据权利要求4所述的对虾红体病病原菌副溶血弧菌的检测方法,其中用包被液配制浓度为 10^6 cfu/mL的副溶血弧菌菌悬液,包被酶标板。

6. 根据权利要求4所述的对虾红体病病原菌副溶血弧菌的检测方法,其中所使用的抗副溶血弧菌的高免血清是1:10000倍稀释的,血清与待测抗原等量混合,于 37°C 竞争反应1小时。

7. 根据权利要求4所述的对虾红体病病原菌副溶血弧菌的检测方法,其中所使用的试剂分别为:

包被液: pH9~10的碳酸盐缓冲液;

封闭液: 含0.5%脱脂乳的pH7~8的磷酸盐缓冲液;

洗涤液: 含0.05%Tween-20的pH7~8的磷酸盐缓冲液;

显色液: Na_2HPO_4 溶液、柠檬酸溶液与邻苯二胺的混合液,临用时加 H_2O_2 ;

终止液: H_2SO_4 。

8. 根据权利要求4所述的对虾红体病病原菌副溶血弧菌的检测方法,其中所使用的阳性对照为纯培养的副溶血弧菌,所使用的阴性对照为灭菌生理盐水,由根据阳性对照得到的标准曲线换算出待测样品的副溶血弧菌含量。

抗副溶血弧菌的高免血清及其制备方法和 对虾红体病病原菌的检测方法

技术领域

本发明涉及一种检测对虾红体病病原菌的方法，具体地说，涉及一种抗副溶血弧菌的高免血清的制备方法，以及使用所制备的高免血清用酶联免疫吸附测定法(竞争 ELISA)检测对虾体内副溶血弧菌的方法。

背景技术

副溶血弧菌(*V.parahaemolyticus*)所引起的红体病，在对虾中从虾苗到成虾各阶段都有发生，病程长，累积死亡率高。由于对虾发生该病后的一种明显表现是“红体”，在没有科学的检测方法条件下，养殖业者经常把该病同“桃拉综合症”等同样具有“红体”表现的疾病相混淆并作出错误判断，进而由于采用的措施不对症，贻误了治疗时机，造成更加严重的损失。对虾在发生细菌性的弧菌病、病毒性的“桃拉综合症”、以及环境因子突变等情况下，外观上都可表现出红体现象。因此，建立快速准确的病原检测方法，准确判断及鉴别对虾不同病原，做到对症下药，是控制对虾疾病的有效措施之一。

迄今为止，对虾红体病病原副溶血弧菌的检测技术主要分为三个方面：一是运用细菌学常规分离及鉴定方法。通过反复纯化培养，取菌落进行生理生化鉴定，或者进行 16S rRNA 基因序列同源性分析，将结果分别在细菌学手册和基因数据库中查找比对进行判定，该方法所需时间长，成本高，不具备实际推广应用的

价值。二是 PCR 检测技术，设定该菌的特异性引物，在合适的反应体系内进行扩增，进而分析扩增结果。该方法具有灵敏高、特异强等特点，但是费用高以及对人员的实验技能要求较高等限制了该方法在实际中的应用。三是根据抗原抗体反应具有高度特异性建立的免疫学检测技术。其中有荧光抗体检测技术，以荧光素为标记物，与已知抗体结合作为标准试剂，用于检测未知抗原，可在荧光显微镜下呈现荧光的特异性抗原抗体复合物及其存在部位。该技术具有特异性强、灵敏度高的特点，但是目前荧光显微镜价格较高，很难在实际生产的基层单位推广。另外就是酶联免疫吸附测定法，该技术以酶作为标记物，与抗原或抗体结合，形成酶标记物，酶遇到相应底物形成有色产物，从而反映抗原或抗体的存在。该技术特异性强、灵敏度高，所需仪器设备简单，检测样品成本低，适于在广大生产基层单位推广应用，应用该方法，对于对虾红体病病原早期诊断，有效控制疾病发生，降低和清除对虾副溶血弧菌感染等方面具有比其它方法更突出的实际应用价值。

发明内容

本发明的目的在于提供一种检测对虾红体病病原菌副溶血弧菌的酶联免疫吸附测定法。

为了完成上述目的，本发明首先提供一种抗副溶血弧菌的高免血清的制备方法，该方法包括：用浓度为 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^9$ cfu/mL 的副溶血弧菌菌悬液免疫体重为 1.5~2.5 千克的雄兔，每次注射 1~3mL 菌悬液，首次免疫时，在菌悬液中加入等体积的弗氏完全佐剂，采用脚掌 4~6 点的注射方式，首次免疫 15~20 天后进行 3~5 次的再次免疫，免疫间隔为 10~15 天，再次免疫中的每次免疫在菌悬液中均加等体积的弗氏不完全佐剂，采用背部皮下 4~6 点的

注射方式，最后一次免疫 7~10 天后采血，分离血清，得到抗副溶血弧菌的高免血清。

在上述抗副溶血弧菌高免血清的制备步骤中，优选使用副溶血弧菌浓度为 1×10^8 cfu/mL 的菌悬液，首次免疫 20 天后进行 5 次的再次免疫，再次免疫中每次免疫间隔为 15 天。

本发明还提供根据上述制备方法得到的抗副溶血弧菌的高免血清。

根据本发明的方法制备的抗副溶血弧菌的高免血清，可以用于检测对虾体内的副溶血弧菌。

本发明建立的竞争 ELISA 检测方法，首先是在制备抗副溶血弧菌高免血清的基础上进行的。本发明所提供的对虾体内副溶血弧菌的竞争 ELISA 检测方法包括：

- (1) 用包被液稀释抗原，包被酶标板，烘干；
- (2) 用洗涤液洗板；
- (3) 用封闭液封闭，洗板；

(4) 加入待测抗原和 1:6000~1:11000 倍稀释的根据上述制备方法制得的抗副溶血弧菌的高免血清于酶标板中，竞争反应，洗板；

- (5) 加上酶标二抗，洗板；
- (6) 加显色液，避光显色；
- (7) 用终止液终止显色；
- (8) 用酶标仪测定 OD_{492} 值。

在上述检测方法中，优选用包被液配制浓度为 10^6 cfu/mL 的副溶血弧菌菌悬液，包被酶标板。

在上述检测方法中，所使用的抗副溶血弧菌的高免血清优选是 1:10000 倍稀释的，血清与待测抗原等量混合，于 37℃ 竞争反应 1 小时。

在上述检测方法中，所使用的试剂分别为：

包被液：pH9~10的碳酸盐缓冲液；

封闭液：含0.5%脱脂乳的pH7~8的磷酸盐缓冲液；

洗涤液：含0.05%Tween-20的pH7~8的磷酸盐缓冲液；

显色液：Na₂HPO₄溶液、柠檬酸溶液与邻苯二胺的混合液，
临用时加H₂O₂；

终止液：H₂SO₄。

在上述检测方法中，所使用的阳性对照为纯培养的副溶血弧菌，所使用的阴性对照为灭菌生理盐水，由根据阳性对照得到的标准曲线换算出待测样品的副溶血弧菌含量。

本发明的对虾体内副溶血弧菌的竞争ELISA检测方法可用于大批量检测对虾体内的副溶血弧菌。

本发明的产品优点体现在：

检测副溶血弧菌的高免血清特异性强、反应效价高；检测时间短，一般10个小时即可检出结果；操作简便易行，可以标准化为产品；检测成本低廉，适于推广；可以进行大批量检测，用于流行病学调查。

附图说明

图1为样品OD₄₉₂值的标准曲线，以吸光度值为纵坐标，以标样浓度的对数值为横坐标。

具体实施方式

本发明建立的对虾体内副溶血弧菌的竞争ELISA检测方法，首先是在制备抗副溶血弧菌的高免血清的基础上进行的。本发明优选采用的对虾体内副溶血弧菌的竞争ELISA检测方法包括：

(1) 用包被液配制浓度为10⁶cfu/mL的副溶血弧菌菌悬液，

包被酶标板，100 μ L/孔，60 $^{\circ}$ C烘干；

(2) 用洗涤液洗板三次，每次震荡洗涤1分钟；

(3) 用封闭液封闭反应板，200 μ L/孔，37 $^{\circ}$ C封闭1小时，洗板；

(4) 以无菌方式取对虾的肌肉组织，加等体积生理盐水研磨，向已包被好的每孔加入50 μ L研磨液，另外加入50 μ L用封闭液稀释为1:10000倍的用本发明方法制备的抗副溶血弧菌的高免血清，同时设定阳性对照和阴性对照，37 $^{\circ}$ C竞争反应1小时，洗板；

(5) 加上酶标二抗，100 μ L/孔，37 $^{\circ}$ C感作1小时，洗板；

(6) 加上显色液，100 μ L/孔，37 $^{\circ}$ C避光显色10分钟；

(7) 用50 μ L/孔的终止液终止显色；

(8) 用酶标仪测定OD₄₉₂值，用阳性对照OD₄₉₂值绘制标准曲线；根据样品稀释倍数和所测OD₄₉₂值，由标准曲线换算出待测样品的副溶血弧菌含量。

在本发明的对虾体内副溶血弧菌的竞争ELISA检测方法中所使用的试剂优选分别为：

包被液：pH9.6、0.05M的碳酸盐缓冲液；

封闭液：含0.5%脱脂乳的pH7.4、0.01M的磷酸盐缓冲液；

洗涤液：含0.05%Tween-20的pH7.4、0.01M的磷酸盐缓冲液；

显色液：将10.3mL、0.2M的Na₂HPO₄溶液和9.7mL的0.1M柠檬酸溶液混合，加上10mg的邻苯二胺，临用时加15 μ L的30%的H₂O₂；

终止液：2M的H₂SO₄。

在上述对虾体内副溶血弧菌的竞争ELISA检测方法中，所使用的阳性对照为经过营养琼脂培养基纯培养的副溶血弧菌，阴

性对照为灭菌生理盐水。

作为阳性对照的纯培养的副溶血弧菌，浓度分别设定为： 10^1 cfu/mL， 10^2 cfu/mL， 10^3 cfu/mL， 10^4 cfu/mL， 10^5 cfu/mL， 10^6 cfu/mL，根据阳性对照 OD₄₉₂ 值，以吸光度值为纵坐标，以标样浓度的对数值为横坐标，做标准曲线，参见图 1。

以下通过实施例的方式具体说明本发明抗副溶血弧菌的高免血清的制备方法以及使用所制备的抗副溶血弧菌的高免血清竞争 ELISA 检测对虾体内副溶血弧菌的方法。

制备实施例(抗副溶血弧菌的高免血清的制备)

用浓度为 1×10^8 cfu/mL 的副溶血弧菌菌悬液免疫体重为 2 千克左右的雄兔，每次注射 2mL 菌悬液。首次免疫时，菌悬液加等体积的弗氏完全佐剂，采用脚掌 4 点注射的方式，首次免疫 20 天后进行 5 次的再次免疫，免疫间隔为 15 天，再次免疫的每次免疫中，菌悬液均加等体积的弗氏不完全佐剂，采用背部皮下 6 点注射的方式免疫，最后一次免疫的 7 天后采血，分离血清，得到抗副溶血弧菌的高免血清，备用。

应用实施例(对虾体内副溶血弧菌的竞争 ELISA 检测)

取 5 尾对虾(样品 1~5)，每一样品中无菌取 1 克对虾的肌肉组织，加 1mL 生理盐水研磨，待用。用包被液(pH9.6、0.05M 的碳酸盐缓冲液)将标准副溶血弧菌菌悬液稀释为 10^6 cfu/mL，包被酶标板，100 μ L/孔，60 $^{\circ}$ C 烘干；用含 0.05%Tween-20 的 pH7.4、0.01M 的磷酸盐缓冲液洗板三次，300 μ L/孔，每次震荡洗涤 1 分钟，将板甩干；用含 0.5%脱脂乳的 pH7.4、0.01M 的磷酸盐缓冲液封闭反应板，200 μ L/孔，37 $^{\circ}$ C 封闭 1 小时，洗板三次；无菌取对虾的肌肉组织，加等体积生理盐水研磨，向已包被好的每孔加

入 50 μ L 研磨液,另外加入 50 μ L 用含 0.5%脱脂乳的 pH7.4、0.01M 的磷酸盐缓冲液稀释为 1:10000 倍的上述制备实施例制备的抗副溶血弧菌的高免血清,同时设定标准副溶血弧菌菌悬液为阳性对照和生理盐水为阴性对照,37 $^{\circ}$ C 竞争反应 1 小时,洗板三次;加上酶标二抗,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 感作 1 小时,洗板三次;加上邻苯二胺-过氧化氢显色液,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 避光显色 10 分钟;用 50 μ L/孔的 2M H₂SO₄ 终止液终止显色,用酶标仪测定 OD₄₉₂ 值,根据样品稀释倍数,以及 OD₄₉₂ 值(见表 1)由标准曲线换算出待测样品的副溶血弧菌含量。

表 1 被测样品 OD₄₉₂ 值

样品	样品 1	样品 2	样品 3	样品 4	样品 5
OD ₄₉₂ 值	0.197	0.240	0.882	1.043	1.247

根据样品的 492nm 吸光度值可以从曲线上读出相应样品的浓度,再根据稀释倍数计算出各自浓度分别为:

样品 1: 每克肌肉组织内有 6.32×10^5 个副溶血弧菌;

样品 2: 每克肌肉组织内有 3.99×10^5 个副溶血弧菌;

样品 3: 每克肌肉组织内有 2×10^2 个副溶血弧菌;

样品 4: 每克肌肉组织内有 16 个副溶血弧菌;

样品 5: 每克肌肉组织内小于 10 个副溶血弧菌。

整个检测过程 10 小时完成。

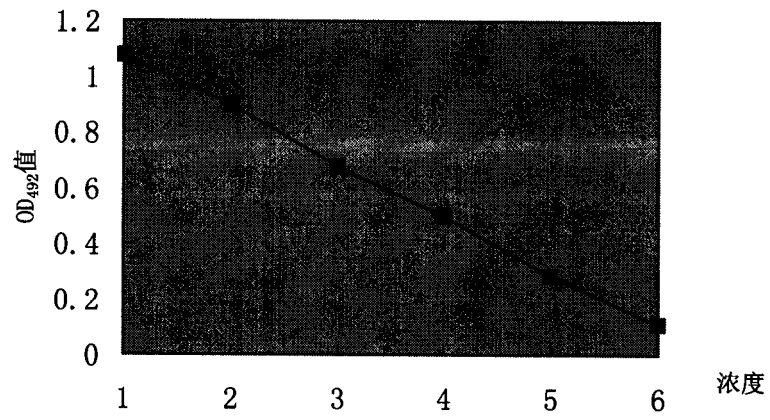


图 1

专利名称(译)	抗副溶血弧菌的高免血清及其制备方法和对虾红体病病原菌的检测方法		
公开(公告)号	CN1779462A	公开(公告)日	2006-05-31
申请号	CN200410091369.4	申请日	2004-11-24
申请(专利权)人(译)	国家海洋环境监测中心		
[标]发明人	樊景凤 宋立超 梁玉波		
发明人	樊景凤 宋立超 梁玉波		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/52 G01N33/547 G01N33/569		
代理人(译)	刘激扬		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种抗副溶血弧菌的高免血清的制备方法，以及用所得到的抗副溶血弧菌的高免血清进行对虾红体病病原菌副溶血弧菌的快速检测方法。所述抗副溶血弧菌的高免血清的制备方法包括用副溶血弧菌菌悬液对雄兔进行免疫。所述检测方法的建立过程包括：标准抗原的包被；酶标板的封闭；抗血清与待测抗原竞争反应；酶标抗体反应；显色反应；终止反应；吸光度值测定。该方法特异性高，操作方便，检测成本低，检测时间短，可以标准化为产品，能够进行大批量样品检测，可以满足有关质检部门、养殖企业、研究单位等批量检测对虾体内副溶血弧菌的需要。

