

[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 200410091370.7

[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 1779463A

[22] 申请日 2004.11.24

[21] 申请号 200410091370.7

[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 梁玉波 宋立超 张喜昌

[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

[54] 发明名称

抗帕金虫的高免血清及制备方法和贝类体内
帕金虫的检测方法

[57] 摘要

本发明提供一种抗帕金虫的高免血清的制备方法，并提供检测贝类体内帕金虫的方法。本发明采用纯化的液体巯基醋酸盐培养基培养并纯化帕金虫，通过免疫制备高免血清，并使用所制备的抗帕金虫的高免血清建立间接 ELISA 方法检测贝类体内帕金虫。本发明所需仪器设备简单，检测成本低、检测时间短、可以进行大批量样品检测，能够满足有关研究单位、质检部门批量检测贝类体内帕金虫的要求。

1. 一种抗帕金虫的高免血清的制备方法，该方法包括：

帕金虫的培养与纯化步骤，在该步骤中，取出贝类软体部分，研磨，加入液体巯基醋酸盐培养基，在室温黑暗状态下培养1周后，分别使用网目数为30~140的纱绢以网目数由高至低的方式对培养液进行3~4次帕金虫纯化；

免疫及分离血清步骤，在该步骤中，将培养液中的帕金虫定量到 $10^5 \sim 10^7$ 个/mL，在体重为1.5~2.5千克的雄兔背部采用4~6点注射的方式免疫，共免疫3~5次，免疫间隔为8~12天，在最后一次免疫的7天后采血，分离血清，得到抗帕金虫的高免血清。

2. 根据权利要求1所述的抗帕金虫的高免血清的制备方法，其中，在帕金虫的培养与纯化步骤中，使培养液分别通过网目为135、75、40的纱绢进行帕金虫的纯化。

3. 根据权利要求1所述的抗帕金虫的高免血清的制备方法，其中，在免疫及分离血清步骤中，将培养液中的帕金虫定量到 10^6 个/mL，共免疫5次，免疫间隔为10天。

4. 根据权利要求1~3中任一项所述的制备方法得到的抗帕金虫的高免血清。

5. 贝类体内帕金虫的间接 ELISA 检测方法，该方法包括：

(1) 取贝类的软体组织，研磨得到匀浆液，加入包被液，将所得混合液加入到酶标反应板的反应孔内，湿盒过夜；

(2) 用洗涤液洗板；

(3) 用封闭液封闭，洗涤；

(4) 加上 1:3000~1:5000 倍稀释的权利要求 4 所述的抗帕金虫的高免血清，洗涤；

- (5) 加上酶标二抗，洗涤；
- (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。

6. 根据权利要求 5 所述的贝类体内帕金虫的间接 ELISA 检测方法，其中所使用的抗帕金虫的高免血清是 1:4000 倍稀释的。

7. 根据权利要求 5 所述的贝类体内帕金虫的间接 ELISA 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 5 所述的贝类体内帕金虫的间接 ELISA 检测方法，其中所使用的阳性对照为经液体巯基醋酸盐培养基培养的已纯化的帕金虫，阴性对照为贝类的组织匀浆液，按 1000 单位/mL 加青霉素和链霉素，无菌过滤得到。

抗帕金虫的高免血清及制备方法和 贝类体内帕金虫的检测方法

技术领域

本发明涉及一种检测贝类体内帕金虫的方法，具体地说，涉及一种抗帕金虫的高免血清及其制备方法，以及间接 ELISA(酶联免疫吸附测定法)检测贝类体内帕金虫的方法。

背景技术

帕金虫(*perkinsus marinus*)是寄生在贝类体内的一种原生动物，是导致海水养殖贝类病害最常见的病原生物之一。最初于 1946 年在美洲牡蛎体内发现，而在我国直到 1997 年才在栉孔扇贝、虾夷扇贝、皱纹盘鲍、菲律宾蛤仔体内检测到帕金虫。帕金虫属于原生动物亚界中的顶复门、帕金虫纲、帕金虫目、帕金虫科、帕金虫属。

Ray 的液体巯基醋酸盐培养基检测法(Fluid Thioglycollate Medium, FTM) (A culture technique for the diagnosis of infections with *Dermocystidium marinum*. Mackin, Owen, and Collier, in oyster. Science, 1952b, 116:360-361)是目前广泛应用的帕金虫检测技术。将活贝类样品称重后，取全部或部分软体部，匀浆，放到 50mL 三角烧瓶中，加入 20mL 灭菌的液体巯基醋酸盐培养基和 100 μ L 氯霉素混匀，然后在培养基表面轻轻覆盖 2mL 制霉菌素，室温下黑暗培养 7 天；培养结束后，在 1500r/min 条件下离心 10 分钟，去掉上清液，加入 20mL、2mol/L 的 NaOH，60℃ 恒温消化 2-6 小

时；消化后在 1500r/min 条件下离心 10 分钟，去掉上清液；用去离子水 10mL 溶解，混匀，1500r/min 条件下离心 10min；如此清洗 3 次后，样品可以在 0.2%的 NaN_3 中冷藏储存。帕金虫计数前，加入 1mL 的卢哥氏染液，充分混匀，帕金虫被染成黑色。此时在光学显微镜下，清晰可见黑色帕金虫。在液体巯基醋酸盐培养基中，帕金虫只生长而不繁殖，所以可以对贝类体内的帕金虫进行定量。

Dangan 和 Roberson 应用抗体标记和荧光染色技术，发展了一种比液体巯基醋酸盐培养基技术更灵敏的方法 (Binding specificities of mono- and polyclonal antibodies to the protozoan oyster pathogen *Perkinsus marinus*. *Disease of Aquatic Organism*, 1993, 15:9-22)，可以将少量的帕金虫检测出来，甚至可以检测环境水体中帕金虫的存在。Fong 等提供了一种合成帕金虫 DNA 探针的方法 (Small subunit ribosomal RNA gene sequence of the oyster parasite *Perkinsus marinus*. *Molecule Marine Biology Biotechnology*, 1993, 2:346-350)，这一技术具有种的特异性，能够将帕金虫同其他微生物区分开来。这些技术固然精确，但都不如液体巯基醋酸盐培养基方法简便，易于操作，但是液体巯基醋酸盐培养基方法工作量比较大。

发明内容

本发明的目的是提供一种贝类体内帕金虫的快速检测方法。

为完成上述目的，本发明首先提供一种抗帕金虫的高免血清的制备方法，该方法包括：帕金虫的培养与纯化步骤，在该步骤中，取出贝类软体部分，研磨，加入液体巯基醋酸盐培养基，在室温黑暗状态下培养 1 周后，分别使用网目数为 30~140 的纱绢以

网目数由高至低的方式对培养液进行 3~4 次帕金虫纯化；免疫及分离血清步骤，在该步骤中，将培养液中的帕金虫定量到 $10^5 \sim 10^7$ 个/mL，在体重为 1.5~2.5 千克的雄兔背部采用 4~6 点注射的方式免疫，共免疫 3~5 次，免疫间隔为 8~12 天，在最后一次免疫的 7 天后采血，分离血清，得到抗帕金虫的高免血清。

在上述制备方法的帕金虫的培养与纯化步骤中，优选使培养液分别通过网目为 135、75、40 的纱绢进行帕金虫的纯化。

在上述制备方法的免疫及分离血清步骤中，优选将培养液中的帕金虫定量到 10^6 个/mL，共免疫 5 次，免疫间隔为 10 天。

本发明还提供根据上述制备方法得到的抗帕金虫的高免血清。

根据本发明的方法制备的抗帕金虫的高免血清，可以用于检测贝类体内的帕金虫。

本发明建立的间接 ELISA 检测方法，首先是在培养和纯化帕金虫，以及制备抗帕金虫的高免血清的基础上进行的。本发明所提供的贝类体内帕金虫的间接 ELISA 检测方法包括：

(1) 取贝类的软体组织，研磨得到匀浆液，加入包被液，将所得混合液加入到酶标反应板的反应孔内，湿盒过夜；

(2) 用洗涤液洗板；

(3) 用封闭液封闭，洗涤；

(4) 加上 1:3000~1:5000 倍稀释的按上述方法制备的抗帕金虫的高免血清，洗涤；

(5) 加上酶标二抗，洗涤；

(6) 加显色液，避光显色；

(7) 终止液终止显色；

(8) 酶标仪测定 OD_{492} 值。

在本发明的检测方法中所使用的抗帕金虫的高免血清优选是1:4000倍稀释的。

在本发明的贝类体内帕金虫的间接ELISA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。

在上述贝类体内帕金虫的间接ELISA检测方法中，所使用的阳性对照为经液体巯基醋酸盐培养基培养的已纯化的帕金虫，阴性对照为贝类的组织匀浆液，按1000单位/mL加青霉素和链霉素，无菌过滤得到。

本发明的贝类体内帕金虫的间接ELISA检测方法可用于大批量检测贝类体内帕金虫。

本发明的产品优点体现在：

检测帕金虫的高免血清特异性强、反应效价高；检测时间短，一般15个小时即可检出结果；样品无需无菌化处理；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。

具体实施方式

本发明优选采用的贝类体内帕金虫的间接ELISA检测方法包括：

(1) 取贝类的软组织，研磨得到匀浆液，加入与该匀浆液等体

积的包被液，将所得混合液加入到酶标反应板的反应孔内，加入量 100 μ L/孔，于 4℃湿盒过夜；

(2) 用洗涤液洗板三次，每次震荡洗涤 1 分钟；

(3) 用 200 μ L/孔的封闭液封闭，于 37℃封闭 1 小时，洗涤；

(4) 加上 1:4000 倍稀释的由上述方法制得的抗帕金虫的高免血清，100 μ L/孔，于 37℃经 1 小时，洗涤；

(5) 加上酶标二抗，100 μ L/孔，于 37℃经 1 小时，洗涤；

(6) 加显色液，100 μ L/孔，于 37℃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。

在本发明的贝类体内帕金虫的间接 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%的 Tween-20 的 pH7.4、0.01M 的磷酸盐缓冲液；

显色液：将 10.3mL 的 0.2M 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。

以下通过实施例的方式具体说明本发明抗帕金虫的高免血清的制备方法以及使用所制备的抗帕金虫的高免血清间接 ELISA 检测贝类体内帕金虫的方法。

制备实施例(抗帕金虫的高免血清的制备)

帕金虫的培养与纯化：取出贝类软体部分，研磨，加入液体

巯基醋酸盐培养基，在室温黑暗状态下培养 1 周后，使培养液分别通过网目为 135、75、40 的纱绢进行帕金虫的纯化。

免疫及分离血清：将培养液中的帕金虫采用液体巯基醋酸盐培养基检测法定量到 10^6 个/mL，在 2 千克左右的新西兰雄兔背部采用 6 点注射的方式免疫，共免疫 5 次，免疫间隔为 10 天，在最后一次免疫的 7 天后采血，分离血清，得到抗帕金虫的高免血清，备用。

应用实施例(贝类体内帕金虫的间接 ELISA 检测)

取 5 个贝类样品(样品 1~5)进行体内帕金虫检测，每个贝类的处理方法和检测方法相同。从 1 个贝类体内取 1 克软体组织，研磨得到约 1mL 匀浆液，加上 1mL 碳酸盐缓冲液(pH9.6, 0.05M)，将所得混合液加入到聚乙烯酶标反应板的反应孔内，每个样品重复两个孔，100 μ L/孔，4℃湿盒过夜。

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，于 37℃经 1 小时，洗板三次。

用含 0.5%脱脂乳的 pH7.4、0.01M 的磷酸盐缓冲液将上述制备实施例得到的抗帕金虫的高免血清进行 1:4000 倍稀释，100 μ L/孔，于 37℃经 1 小时，洗板三次。

加上酶标二抗，100 μ L/孔，于 37℃经 1 小时，洗板三次。

加上邻苯二胺-过氧化氢显色液，100 μ L/孔，于 37℃避光显色 10 分钟。

用 50 μ L/孔的 2M H_2SO_4 终止液终止显色。

用酶标仪测定 OD₄₉₂ 值，结果见表 1。

对于每一个样品，整个检测过程 15 小时即可完成。

在同一块酶标板上同时进行空白对照、阳性对照、阴性对照与样品的检测。其中，空白对照是在孔内不加入抗帕金虫的高免血清，阳性对照是使用经液体巯基醋酸盐培养基培养的已纯化的帕金虫，阴性对照是使用贝类的组织匀浆液，按 1000 单位/mL 加青霉素和链霉素，无菌过滤得到。本次实验中空白对照 OD₄₉₂ 值为 0.054，阴性对照 OD₄₉₂ 值为 0.212。

表 1 贝类样品的 OD₄₉₂ 值

样品	样品 1	样品 2	样品 3	样品 4	样品 5
OD ₄₉₂ 值	0.549	0.628	0.583	0.652	0.764

帕金虫检测的结果判定

根据所得到的 OD₄₉₂ 值，使用下述公式判定样品中帕金虫的存在：

$$(\text{样品 OD}_{492} \text{ 值} - \text{空白 OD}_{492} \text{ 值}) / (\text{阴性 OD}_{492} \text{ 值} - \text{空白 OD}_{492} \text{ 值}) \geq 2$$

上述比值大于或等于 2 者表明样品为阳性，即样品内存在帕金虫。根据本发明实施例的检测方法，当样品 OD₄₉₂ 值大于或等于 0.37 时即为阳性。

另外，在根据本发明进行的实验中，空白对照、样品、阳性对照和阴性对照可以在同一酶标板上完成，每块酶标板可在 15 小时内同时检测至少 40 个样品，因此可以用很短的时间进行大批量的检测。

专利名称(译)	抗帕金虫的高免血清及制备方法和贝类体内帕金虫的检测方法		
公开(公告)号	CN1779463A	公开(公告)日	2006-05-31
申请号	CN200410091370.7	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 梁玉波 宋立超 张喜昌		
发明人	樊景凤 梁玉波 宋立超 张喜昌		
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)

本发明提供一种抗帕金虫的高免血清的制备方法，并提供检测贝类体内帕金虫的方法。本发明采用纯化的液体巯基酸盐培养基培养并纯化帕金虫，通过免疫制备高免血清，并使用所制备的抗帕金虫的高免血清建立间接ELISA方法检测贝类体内帕金虫。本发明所需仪器设备简单，检测成本低、检测时间短、可以进行大批量样品检测，能够满足有关研究单位、质检部门批量检测贝类体内帕金虫的要求。