



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103235118 B

(45) 授权公告日 2015. 04. 08

(21) 申请号 201310100222. 6

(22) 申请日 2013. 03. 26

(73) 专利权人 中国检验检疫科学研究院
地址 100029 北京市朝阳区惠新西街惠新里
241 号

(72) 发明人 邓俊花 吴绍强 林祥梅 冯春燕
王彩霞

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002
代理人 王朋飞 张庆敏

CN 102253193 A, 2011. 11. 23,
CN 101724689 A, 2010. 06. 09,
US 2002/0137917 A1, 2002. 09. 26,
WO 2010/132263 A2, 2010. 11. 18,
赵会生. 水产品中微生物的快速检测方法探
讨. 《中国药物经济学》. 2012, (第 5 期),
invitrogen. Dynabeads[?]
Antibody Coupling Kit. 《invitrogen 官
网》. 2012,

审查员 舒霏霏

(51) Int. Cl.

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 1/34(2006. 01)

G01N 1/40(2006. 01)

G01N 33/577(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 102766209 A, 2012. 11. 07,

CN 101907556 A, 2010. 12. 08,

CN 102243234 A, 2011. 11. 16,

CN 101358979 A, 2009. 02. 04,

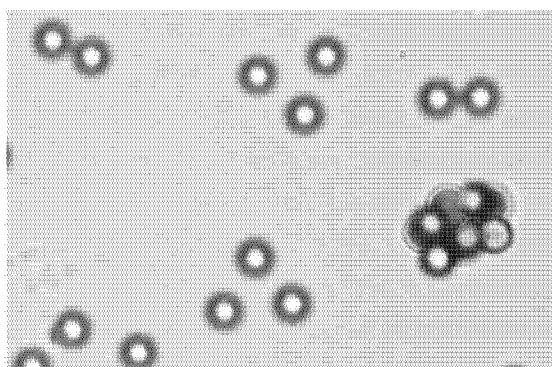
权利要求书1页 说明书9页 附图2页

(54) 发明名称

一种快速分离纯化及富集派琴虫的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种快速分离纯化及富集派琴虫的方法,所述方法包括如下步骤:(1)派琴虫免疫磁珠的制备;(2)分离纯化派琴虫;(3)荧光显微鉴定;(4)富集派琴虫。本发明还提供了所述方法在贝类样品派琴虫检测领域的应用。本发明所述方法对派琴虫感染样品具有较好的敏感性和特异性,可以检测到派琴虫感染样品中极少量的派琴虫,并能有效地将派琴虫从感染样品中分离纯化及富集出来。



1. 一种分离纯化及富集派琴虫的方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:

(1) 制备派琴虫免疫磁珠;

包括如下步骤:

(11) 取 5mg Dynabeads M-270beads 于 1.5mL 的新离心管中,加入 1mL C1 悬浮磁珠;

(12) 磁力收集磁珠,弃上清;在离心管中加入 220 μ L C1 悬浮磁珠,待用;

(13) 在磁珠悬液中加入 30 μ L 派琴虫细胞壁特异性单克隆抗体,混匀;再加入 250 μ L C2,混匀;所述抗体浓度为 1.5mg/mL;

(14) 将悬液在 37 $^{\circ}$ C,1000rpm 下孵育 20 ~ 25h;

(15) 孵育完毕,磁力收集磁珠,弃上清,分别用 HB、LB 及 SB 各洗涤 1 次,SB 再重复洗涤磁珠 1 次,洗涤完毕后收集磁珠,在磁珠中加入 800 μ L SB,室温,1000rpm 下吸附 15min;

(16) 吸附完毕,用 500 μ L SB 重悬磁珠,此溶液即为派琴虫免疫磁珠溶液,派琴虫免疫磁珠溶液的终浓度为 9 μ g McAb/mg beads;(2) 分离纯化派琴虫:所述派琴虫免疫磁珠与派琴虫进行特异吸附;将派琴虫与派琴虫样品中其它物质分离,获取纯化的派琴虫抗原抗体复合物与磁珠的结合物;

(3) 荧光显微鉴定:派琴虫抗原抗体复合物与磁珠的结合物通过吖啶橙染色,荧光显微镜检,观察分离效果;

(4) 富集派琴虫:当呈阳性反应时,将派琴虫抗原抗体复合物与磁珠的结合物在低盐低 pH 环境下分离磁珠与派琴虫抗原抗体复合物,获取富集后的派琴虫;

其中,步骤 (2) 包括如下步骤:

(A1) 制备好的免疫磁珠用 pH 为 7.4 的 PBS 洗涤一次后恢复原体积,备用;

(A2) 取派琴虫悬液 200 μ L,4000rpm 离心 5min,离心后弃上清,用 pH 为 7.4 的 PBS 洗涤一次,再加入 200 μ L PBS 溶解;

(A3) 取 20 μ L(A1) 中的免疫磁珠溶液,磁力收集磁珠后加入 (A2) 中的派琴虫悬液 200 μ L,混匀,在 37 $^{\circ}$ C,1000rpm 下结合反应 10 ~ 60min;

(A4) 磁力收集磁珠,并用 pH 为 7.4 的 PBS 洗涤磁珠 2 次,洗涤完毕后,加入 20 μ L pH 为 7.4 的 PBS 重悬磁珠。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,步骤 (A2) 中,派琴虫悬液为派琴虫培养液时,所述方法检测派琴虫培养液的最低检测限为 10^2 个/mL;派琴虫悬液为派琴虫阳性模拟液时,所述方法检测派琴虫阳性模拟液的最低检测限为 10^3 个/mL。

3. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,步骤 (A3) 中免疫磁珠捕获派琴虫的时间为 30min。

4. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,步骤 (4) 包括如下步骤:

(A1) 当呈阳性反应时,将含派琴虫抗原抗体复合物与磁珠的结合物溶液磁力收集磁珠,加入 100 μ L 0.1M pH 为 3.1 的柠檬酸盐溶液,混匀,室温放置 5min,分离 beads 与派琴虫;

(A2) 磁力收集磁珠,将含有派琴虫的上清在 4000rpm 下离心 5min,获得富集的派琴虫。

5. 权利要求 1 ~ 4 任一项所述方法在贝类样品派琴虫检测领域的应用。

一种快速分离纯化及富集派琴虫的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及环境监测及免疫诊断领域,特别涉及一种对贝类样品中派琴虫的快速分离纯化及富集的方法。

背景技术

[0002] 派琴虫是世界动物卫生组织(OIE)规定的必报水生动物疾病之一。目前在世界范围内广泛流行,对世界水产品生长繁殖带来了极大的危害,并对水产品养殖及贸易造成了严重的经济损失。2008年农业部首次将派琴虫病列入了蛤仔主要感染的寄生虫病。吴绍强等于2008年5月至2009年5月期间对我国东部沿海一带(其中包括青岛、山东、宁波和福州等监测点)的监测点海域采集菲律宾蛤仔,并对派琴虫感染情况进行调查,结果显示蛤仔派琴虫的感染率在43.75%-95.83%之间不等,几乎每只蛤仔体内都有派琴虫的感染(Shao-qiang Wu, Cai-xia Wang, Xiang-mei Lin, et al. Infection Prevalence and Phylogenetic Analysis of Perkinsus olseni in Ruditapes philippinarum from East China[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2011, 96(1):55-60)。

[0003] 鉴于派琴虫对水产品危害的严重程度,国内外开展了很多的研究工作。梁玉波等于2001年应用巯基醋酸盐培养基(FTM)培养法成功培养派琴虫(梁玉波. 菲律宾蛤仔体内寄生帕金虫的研究[D]. 大连:中国科学院海洋研究所. 2005. 1-131)。目前, OIE规定为“黄金标准”的检测方法是巯基醋酸盐培养基(FTM)培养法,该方法被广泛地应用于派琴虫的鉴定中,但是此类方法操作过程耗时过长,敏感性较低,只有当每克组织虫体数大于 10^3 个时方可检出虫体(Uchida E, Kogi M. Optimization of the virus concentration method using polyethyleneimine-conjugated magnetic beads and its application to the detection of human hepatitis A, B and C viruses[J]. J Virol Methods, 2007, 143(1):95-103.)。另外,派琴虫还有其它一些检测方法,如普通PCR、荧光PCR、原位杂交、组织切片以及环介导等温扩增(LAMP)等方法,感染率低的贝类样品极易出现假阴性。因此,研究一种快速分离纯化、富集及鉴定派琴虫的方法对我国贝类养殖则显得十分重要和迫切。

[0004] 磁性微球(Magnetic microspheres, MMS)是一种新型的功能材料,它通常由具有磁性的内核及核外包裹的高分子外壳两部分组成。磁性微球可与抗体、抗原、核酸等偶联,在反应体系中识别相应的抗原、抗体和核酸,从而达到分离或检测的目的。免疫磁性分离技术(Immunomagnetic Separation, IMS)是以抗体包被的磁珠为载体,通过抗体与反应介质中特异性抗原结合形成抗原-抗体复合物,此复合物在磁场的作用下定向移动,从而分离抗原。免疫磁性分离技术具有分离样品速度快、特异性强、操作简单、不需要昂贵的仪器设备等特点,而且不影响被分离细胞或其它生物材料的生物学性状和功能,目前已在医学和生物学的许多方面发挥了重要作用,尤其是在分离及鉴定病原体方面应用广泛。

[0005] 激光扫描共聚焦显微镜(Laser Scanning Confocal Microscope, LSCM)工作原理为同屏采集显示3个不同发射波长的荧光色及1个混合色图像,对研究2种及2种以上物

质的共存有明显优点。在显微镜的载物台上加一个微量步进马达控制载物台的升降,最小步进距离为 $0.1\ \mu\text{m}$,使焦平面依次位于标本的不同层面上,可以逐层获得标本的各个光学横断面的图像,实现“光学切片”的目的。通过不同的焦平面产生的光学切片,可得到一块较厚标本的三维图像,这是 LSCM 最重要的作用之一。将存储在计算机中的光学切片的焦平面信息结合起来,即可描述该标本的三维图像。目前 LSCM 最大有效解析厚度为 0.45mm ,扫描最小距离为 $0.1\ \mu\text{m}$ 。

[0006] 吖啶橙是最经典的灵敏的荧光染料,它可通过与 DNA 和 RNA 的连接碱基对和磷酸盐基团结合,使细胞中的 DNA 和 RNA 同时染色而显示不同颜色的荧光。吖啶橙在稀溶液中呈绿色;在浓溶液中,由于出现二聚体和多聚体而呈现橙红色。由于 DNA 是高度聚合物,吸收荧光物质的位置较少,故发绿色荧光;而 RNA 聚合度低,能和荧光物质结合的位置多,故发红色荧光。在荧光显微镜下,细胞核 DNA 为黄绿色均匀荧光,细胞质和核仁的 RNA 为桔黄或桔红色荧光。

[0007] 因此,结合以上各技术研究出一种快速分离纯化、富集及鉴定派琴虫的方法,对我国贝类养殖则显得十分重要和迫切,其能够对新鲜贝类及加工食品快速诊断和检测提供技术支持。

发明内容

[0008] 本发明的一个目的是提供一种派琴虫免疫磁珠及其制备方法。

[0009] 本发明的另一目的是提供一种快速分离纯化及富集派琴虫的方法,所述方法灵敏度高,可以检测到贝类样品及加工食品中极少量的派琴虫。

[0010] 本发明的又一目的是提供所述快速分离纯化及富集派琴虫的方法在贝类样品派琴虫检测领域的应用。

[0011] 本发明提供了一种派琴虫免疫磁珠的制备方法,所述方法为将派琴虫单克隆抗体与磁珠共价结合,通过包被和洗涤获得派琴虫免疫磁珠。

[0012] 具体地,所述方法包括如下步骤:

[0013] (1) 取 5mg Dynabeads M-270beads ($6-7 \times 10^7$ 个/mg) 于 1.5mL 的新离心管中,加入 1mL C1 悬浮磁珠;

[0014] (2) 磁力收集磁珠,弃上清;在离心管中加入 $(250-V_0)\ \mu\text{L}$ C1 悬浮磁珠,待用;

[0015] (3) 在磁珠悬液中加入 $V_0\ \mu\text{L}$ 派琴虫细胞壁特异性单克隆抗体,混匀;再加入 $250\ \mu\text{L}$ C2,混匀;

[0016] (4) 将悬液在 37°C , 1000rpm 下孵育 $20 \sim 25\text{h}$;

[0017] (5) 孵育完毕,磁力收集磁珠,弃上清,分别用 HB、LB 及 SB 各洗涤 1 次,SB 再重复洗涤磁珠 1 次,洗涤完毕后收集磁珠,在磁珠中加入 $800\ \mu\text{L}$ SB,室温, 1000rpm 下吸附 15min ;

[0018] (6) 吸附完毕,用 $500\ \mu\text{L}$ SB 重悬磁珠,此溶液即为派琴虫免疫磁珠溶液。

[0019] 所述派琴虫免疫磁珠溶液在 4°C 保存。

[0020] 优选地,步骤(3)中在磁珠悬液中加入 $30\ \mu\text{L}$ 派琴虫细胞壁特异性单克隆抗体,所述抗体浓度为 1.5mg/mL 。

[0021] 优选地,步骤(6)中派琴虫免疫磁珠溶液的终浓度为 $9\ \mu\text{gMcAb/mg beads}$ 。

[0022] 本发明还提供了所述方法制备的派琴虫免疫磁珠。

[0023] 本发明还提供了一种快速分离纯化及富集派琴虫的方法,所述方法包括以下步骤:

[0024] (1) 派琴虫免疫磁珠的制备;

[0025] (2) 分离纯化派琴虫:所述派琴虫免疫磁珠与派琴虫进行特异吸附;将派琴虫与派琴虫样品中其它物质分离,获取纯化的派琴虫抗原抗体复合物与磁珠的结合物;

[0026] (3) 荧光显微鉴定:派琴虫抗原抗体复合物与磁珠的结合物通过吖啶橙染色,荧光显微镜检,观察分离效果;

[0027] (4) 富集派琴虫:当呈阳性反应时,将派琴虫抗原抗体复合物与磁珠的结合物在低盐低 pH 环境下分离磁珠与派琴虫抗原抗体复合物,获取富集后的派琴虫。

[0028] 其中,步骤(1)派琴虫免疫磁珠的制备参见前述制备派琴虫免疫磁珠的方法。

[0029] 优选地,步骤(2)包括如下步骤:

[0030] (A1) 制备好的免疫磁珠用 pH 为 7.4 的 PBS 洗涤一次后恢复原体积,备用;

[0031] (A2) 取派琴虫悬液 200 μ L, 4000rpm 离心 5min, 离心后弃上清,用 pH 为 7.4 的 PBS 洗涤一次,再加入 200 μ L PBS 溶解;

[0032] (A3) 取 20 μ L (A1) 中的免疫磁珠溶液,磁力收集磁珠后加入 (A2) 中的派琴虫悬液 200 μ L, 混匀,在 37 $^{\circ}$ C, 1000rpm 下结合反应 10 ~ 60min;

[0033] (A4) 磁力收集磁珠,并用 pH 为 7.4 的 PBS 洗涤磁珠 2 次,洗涤完毕后,加入 20 μ L pH 为 7.4 的 PBS 重悬磁珠。

[0034] 本发明还提供了所述快速分离纯化方法的敏感性评价,具体如下:

[0035] 其中,步骤(2)中步骤(A2)中,派琴虫悬液为派琴虫培养液时,所述方法检测派琴虫培养液的最低检测限为 10^2 个/mL。

[0036] 其中,步骤(2)中步骤(A2)中,派琴虫悬液为派琴虫阳性模拟液时,所述方法检测派琴虫阳性模拟液的最低检测限为 10^3 个/mL。

[0037] 其中,步骤(2)中步骤(A2)中,派琴虫培养悬液的制备方法如下:

[0038] (B1) 选取已感染派琴虫的垂死的新鲜贝类样品,将其贝壳弃掉,取腮、套膜及闭合肌研碎;

[0039] (B2) 将样品置于含 5mL FTM 培养基的灭菌试管中,加 250 μ L 2.5% 的氯霉素摇匀,用 1mL 1% 制霉菌素覆盖在液面,盖好盖子,22 $^{\circ}$ C ~ 24 $^{\circ}$ C 黑暗条件下培养 4 ~ 7d;

[0040] (B3) 将培养后的样品 4000r/min 离心 10min, 弃上清液,加 6mL 2mol/L NaOH, 涡旋混匀后在 60 $^{\circ}$ C 下消化过夜;

[0041] (B4) 4000r/min 离心 10min, 弃上清液,加 2mL ddH₂O 洗涤,4000r/min 离心 10min, 弃上清液,重复上述步骤 2 ~ 4 次;

[0042] (B5) 将上述样品置于 2mL ddH₂O 中摇匀,加入 80 μ L 卢戈氏碘液染色后,取 40 μ L 于载玻片上,盖上盖玻片后,在显微镜(10 \times 10)下观察。显微镜下,经过 FTM 培养后,派琴虫发育为休眠孢子,呈圆形,蓝黑色,直径大多在 30 ~ 80 μ m。调整派琴虫培养悬液至适当浓度。

[0043] 进一步优选地,(B5)中借助细胞计数方法调整派琴虫培养悬液中派琴虫的最终浓度为 10^7 个/mL。

[0044] 进一步优选地,步骤(2)中步骤(A3)中免疫磁珠捕获派琴虫最佳时间为 30min。

[0045] 优选地,步骤(3)中,派琴虫抗原抗体复合物与磁珠的结合物 10 μ L,加入 10 倍稀释的吖啶橙染色液 2 μ L,混匀,涂片,荧光显微镜检,观察分离效果。

[0046] 优选地,步骤(4)包括如下步骤:

[0047] (A1) 当呈阳性反应时,将含派琴虫抗原抗体复合物与磁珠的结合物溶液磁力收集磁珠,加入 100 μ L 0.1M pH 为 3.1 的柠檬酸盐溶液,混匀,室温放置 5min,分离 beads 与派琴虫;

[0048] (A2) 磁力收集磁珠,将含有派琴虫的上清在 4000rpm 下离心 5min,获得富集的派琴虫。

[0049] 富集后的派琴虫可加入培养基或者 pH 为 7.4 的 PBS 进行后续检测试验。

[0050] 另外,本发明富集的派琴虫可采用荧光 PCR 方法进行鉴定:按照 QIAGEN 公司的商品化试剂盒(Dneasy Blood and Tissue kit)提取富集的派琴虫 DNA,用 NanoDrop (ND-1000) (USA) 分光光度计测定浓度,然后采用荧光 PCR 方法进行鉴定,具体参照申请号为 200810224654.7 (用于派琴虫检测的实时荧光 PCR 引物和探针)的专利。

[0051] 本发明还提供了所述方法在贝类样品派琴虫检测领域的应用。

[0052] 具体地,本发明提供了所述方法在新鲜贝类及加工食品快速诊断和检测派琴虫中的应用。

[0053] 本发明的快速分离纯化及富集派琴虫的方法对派琴虫感染样品具有较好的敏感性和特异性,可以检测到派琴虫感染样品中极少量的派琴虫,并能有效的将派琴虫从感染样品中分离纯化及富集出来,还可对富集的派琴虫进行鉴定。

附图说明

[0054] 图 1 为免疫磁珠捕获派琴虫的荧光显微图;

[0055] 图 2 为聚集成堆的磁珠在显微镜下的观测图;其中,图(左)为聚集成堆的磁珠在荧光显微镜下(100 \times)的观察图;图(右)为聚集成堆的磁珠在显微镜下(100 \times)的观察图,对照(左)图。

[0056] 图 3 为富集得到的派琴虫进行荧光 PCR 的鉴定图。

具体实施方式

[0057] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。在不背离本发明精神和实质的情况下,对本发明方法、步骤或条件所作的修改或替换,均属于本发明的范围。

[0058] 若未特别指明,本发明实施例中所用的实验材料、试剂和仪器等均可市售获得;若未具体指明,实施例中所用的技术手段均为本领域技术人员所熟知的常规手段。

[0059] 实验材料:

[0060] Dynabeads Antibody Coupling Kit 购自 Invitrogen (USA) 公司;

[0061] 派琴虫细胞壁特异性单克隆抗体(即,抗派琴虫膜蛋白的单克隆抗体,Perkinsus CB5D4McAb)由中国检科院动物检疫研究所实验室制备(其制备方法具体见专利申请号为 201210231140.0 的专利),浓度 1.5mg/mL, -20 $^{\circ}$ C 保存;

[0062] 吖啶橙(acridine orange, AO)染料购自 sigma 公司。

[0063] 实验试剂:

[0064] 1、PBS (pH=7.4) 磷酸盐缓冲液的制备：

[0065] 磷酸二氢钾 (KH_2PO_4) :0.27g；

[0066] 磷酸氢二钠 (Na_2HPO_4) :1.42g；

[0067] 氯化钠 (NaCl) :8g；

[0068] 氯化钾 (KCl) :0.2g；

[0069] 加去离子水约 800mL 充分搅拌溶解,然后加入浓盐酸调 pH 至 7.4,最后定容到 1L,高温高压灭菌后室温保存。

[0070] 2、吖啶橙(acridine orange, AO) 储存液的制备：

[0071] 吖啶橙 :10mg；

[0072] PBS (pH=7.4) :100mL；

[0073] 过滤,4℃ 避光保存。

[0074] 注 :进行染色时,储存液用 PBS (pH=7.4) 进行 10 倍稀释。

[0075] 实施例 1 派琴虫免疫磁珠的制备

[0076] 派琴虫细胞壁特异性单克隆抗体以环氧基与磁珠共价结合,通过包被过程和洗涤过程,制备获取派琴虫免疫磁珠。

[0077] 参照 Dynabeads Antibody Coupling Kit 进行操作,具体方法如下：

[0078] (1) 室温称量 Dynabeads M-270beads ($6-7 \times 10^7$ 个 /mg) 5mg 于 1.5mL 的新离心管中,加入 1mL C1,轻柔吹打使磁珠充分悬浮；

[0079] (2) 将离心管置于磁力收集器(MPC)上 2min,待磁珠完全吸附于离心管壁上,溶液澄清后,用移液器小心吸出溶液并弃去,取下离心管,在离心管中分别加入 240 μL 、230 μL 、220 μL 、210 μL 、200 μL 、190 μL C1 悬浮磁珠,待用；

[0080] (3) 在磁珠悬液中加入派琴虫细胞壁特异性单克隆抗体到洗涤好的磁珠溶液中,抗体加入体积分别是 :10 μL 、20 μL 、30 μL 、40 μL 、50 μL 、60 μL ,即抗体包被浓度分别是 :3 $\mu\text{g}/\text{mg beads}$ 、6 $\mu\text{g}/\text{mg beads}$ 、9 $\mu\text{g}/\text{mg beads}$ 、12 $\mu\text{g}/\text{mg beads}$ 、15 $\mu\text{g}/\text{mg beads}$ 、18 $\mu\text{g}/\text{mg beads}$ 。再加入 250 μL C2,混匀。

[0081] (4) 将悬液置于微量振荡器中,在 37℃,1000rpm 下孵育 25h；

[0082] (5) 孵育结束后,悬液置磁力收集器(MPC)上收集磁珠 2min,收集上清,上清溶液命名为 W1,其含有 McAb 的浓度由 NanoDrop (ND-1000) (USA) 分光光度计进行测定。按照以下公式计算 beads 与 McAb 的结合率。

[0083] 结合率 = $(C_0 \times V_0 - C_{W1} \times V_{W1}) / (C_0 \times V_0) \times 100\%$

[0084] 其中, V_0 代表加入派琴虫单克隆抗体的体积; C_0 表示派琴虫单克隆抗体的浓度; C_{W1} 表示上清溶液中 McAb 的浓度; V_{W1} 表示上清溶液的体积。

[0085] 由以上公式得到,当抗体加入量为 30uL 时,磁珠与抗体的结合条件最佳。表 1 为不同 McAb 量的磁珠与抗体的结合率。

[0086] 表 1

McAb 量 ($\mu\text{g}/\text{mg beads}$)	3	6	9	12	15	18
[0087] 结合率 (%)	90.1	90.5	90.4	80.5	60.3	42.8
	88.7	90.7	89.9	81.2	61	43.1
结合率平均值	89.4	90.6	90.15	80.85	60.65	42.95

[0088] 由表 1 可以看出,不同包被浓度的派琴虫单克隆抗体包被量与磁珠结合率的数据显示,一开始磁珠充足,所以抗体几乎全部结合到磁珠上,结合率均在 90% 左右。随着抗体加入量的增加,抗体出现富足,导致二者结合率逐渐降低。但抗体的加入量为 $30 \mu\text{L}$,即磁珠包被抗体浓度为 $9 \mu\text{g McAb}/\text{mg beads}$ 时,二者处于最佳结合比例。

[0089] (6) 弃上清,取下离心管,重新将磁珠悬浮在 $800 \mu\text{L}$ HB 洗涤;洗涤完毕,用磁力收集器收集磁珠,再用 $800 \mu\text{L}$ LB 洗涤磁珠;洗涤完毕,用磁力收集器收集磁珠,在离心管中加入 $800 \mu\text{L}$ SB 洗涤;SB 重复洗涤磁珠 1 次。洗涤完毕,用磁力收集器收集磁珠,加入 $800 \mu\text{L}$ LSB,置于微量振荡器中,室温,1000rpm,吸附 15min。

[0090] (7) 吸附完毕,用磁力收集器收集磁珠,并用 $500 \mu\text{L}$ SB 重悬,此时溶液为派琴虫免疫磁珠溶液, 4°C 保存。

[0091] 实施例 2 分离纯化及富集派琴虫方法的建立

[0092] (一) 派琴虫培养悬液的制备

[0093] (1) 选取已感染派琴虫的垂死的新鲜贝类样品,将其贝壳弃掉,取腮、套膜及闭合肌 25mg 置于灭菌的研钵,研磨以破坏组织,释放派琴虫;

[0094] (2) 将样品分别置于含 5mL FTM 培养基的灭菌试管中,加 $250 \mu\text{L}$ 2.5% 的氯霉素摇匀,用 1mL 1% 制霉菌素覆盖在液面,盖好盖子, 24°C 暗室中培养 6d;

[0095] (3) 将培养后的样品在 $4000\text{r}/\text{min}$ 离心 10min,弃上清液,加 6mL $2\text{mol}/\text{L}$ NaOH,涡旋混匀后置于 60°C 烘箱内消化过夜;

[0096] (4) $4000\text{r}/\text{min}$ 离心 10min,弃上清液,加 2mL ddH_2O 洗涤, $4000\text{r}/\text{min}$ 离心 10min,弃上清液,重复上述步骤 4 次;

[0097] (5) 将上述纯化的样品置于 2mL ddH_2O 中摇匀,加入 $80 \mu\text{L}$ 卢戈氏碘液染色后,取 $40 \mu\text{L}$ 于载玻片上,盖上盖玻片后,在显微镜 (10×10) 下观察。显微镜下,经过 FTM 培养后,派琴虫发育为休眠孢子,呈圆形,蓝黑色,直径大多在 $30\text{--}80 \mu\text{m}$ 。派琴虫培养悬液通过细胞计数,确定最终浓度为 10^7 个 /mL。

[0098] (二) 免疫磁珠分离纯化及富集派琴虫

[0099] 1、分离纯化派琴虫

[0100] (1) 制备好的免疫磁珠用 PBS ($\text{pH}=7.4$) 洗涤一次后恢复原体积,备用;

[0101] (2) 取派琴虫培养悬液 $200 \mu\text{L}$, 4000rpm 离心 5min,去除上清,用 PBS ($\text{pH}=7.4$) 溶液洗涤 1 次,最终加入 $200 \mu\text{L}$ PBS ($\text{pH}=7.4$) 溶解;

[0102] (3) 取 $20 \mu\text{L}$ (1) 中制备好的免疫磁珠溶液置于磁力收集器上收集磁珠,加入 (2) 中处理好的派琴虫培养悬液 $200 \mu\text{L}$,混匀,置于微量振荡器中,吸附反应于 37°C , 1000rpm ,吸附时间分别:10min,15min,20min,25min,30min,40min,50min,60min;

[0103] (4) 反应完毕后将悬液置于磁力收集器 (MPC) 上 2min;

[0104] (5) 吸出上清,取下离心管,将磁珠重悬在 PBS ($\text{pH}=7.4$) 中洗涤磁珠 2 次;

[0105] (6) 洗涤完毕后,加入 20 μ L PBS (pH=7.4) 重悬磁珠。

[0106] 2、荧光显微鉴定

[0107] 取 10 μ L 派琴虫抗原抗体复合物与磁珠的结合物溶液,加入 10 倍稀释的吖啶橙染色液 2 μ L,混匀,涂片,借助激光扫描共聚焦显微镜(Olympus IX81)进行镜检(100X),以观察免疫磁珠捕获派琴虫的效果。

[0108] 参照免疫磁珠分离派琴虫结果的计分评价(Lund A, Hellemann AL, Vartdal F. Rapid isolation of K88+Escherichia coli by using immunomagnetic particles[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1988, 26(12) :2572-2575),免疫磁珠捕获派琴虫后,用吖啶橙染色镜检,结果计分如下:

[0109] 无磁珠结合有虫体..... 0 分..... 阴性反应(-)

[0110] 1-5% 磁珠结合有虫体..... 1 分..... 阳性反应(+)

[0111] 5-20% 磁珠结合有虫体..... 2 分..... 阳性反应(+)

[0112] 20-50% 磁珠结合有虫体..... 3 分..... 阳性反应(+)

[0113] 50-90% 磁珠结合有虫体..... 4 分..... 阳性反应(+)

[0114] 90-100% 磁珠结合有虫体..... 5 分..... 阳性反应(+)

[0115] 免疫磁珠捕获派琴虫的荧光显微图如图 1 所示。显微镜下,没有结合派琴虫的免疫磁珠处于散落状态,捕获派琴虫的免疫磁珠成堆聚集,大量显示发荧光的派琴虫与磁珠交错结合在一起。

[0116] 图 2 为聚集成堆的磁珠在显微镜下的观测图;其中,图(左)为聚集成堆的磁珠在荧光显微镜下(100 \times)的观察图,派琴虫发出明亮荧光;图(右)为聚集成堆的磁珠在显微镜下(100 \times)的观察图,对照(左)图。

[0117] 表 2 为不同捕获时间的免疫磁珠分离派琴虫结果的计分。

[0118] 表 2

[0119]	免疫磁珠捕获派琴虫时间 (min)	10	15	20	25	30	40	50	60
	计分平均值	2	2	3	4	5	5	5	5

[0120] 由表 2 可以看出,不同时间免疫磁珠捕获派琴虫的计分数据显示,吸附时间为 30min 时,免疫磁珠捕获派琴虫的效果评价计分值最高,因此,免疫磁珠与派琴虫在一定量的情况下,吸附 30min,可以达到理想的捕获效果。

[0121] 3、富集派琴虫

[0122] (1)通过免疫磁珠捕获派琴虫以后,用磁力收集器(MPC)收集磁珠,吸出上清,加入 100 μ L 0.1M 柠檬酸盐溶液(pH=3.1),混匀,放置 5min,以分离 beads 与派琴虫。

[0123] (2)用磁力收集器吸附磁珠,将含有派琴虫的上清吸置另一离心管中,4000rpm 下离心 5min,获取富集的派琴虫,加入培养基或者 PBS (pH=7.4)进行后续检测试验。

[0124] 实施例 3 免疫磁珠分离派琴虫的敏感性评价

[0125] (1)免疫磁珠从派琴虫培养悬液中分离派琴虫的检测限测定

[0126] 处理好的 9 μ g/mg beads 浓度的免疫磁珠,与浓度分别为 10^7 个/mL、 10^6 个/mL、 10^5 个/mL、 10^4 个/mL、 10^3 个/mL、 10^2 个/mL 的派琴虫培养悬液进行反应,吖啶橙染色镜检考察反应效果,并计分,确定产生阳性反应的最低派琴虫培养物的浓度,即此为最低检测限。

[0127] 显微镜检可见,随着反应溶液中派琴虫浓度逐级降低,反应后磁珠分散程度增大,与之相对应,磁珠捕获派琴虫的效果降低。同时,多个磁珠与多个派琴虫交错结合在一起的现象减少,到 10^2 个 /mL 浓度时,镜下只能看到少量单个磁珠结合单个派琴虫。零分反应的磁珠在镜下完全分散,全部视野中未发现有派琴虫结合磁珠。

[0128] 表 3 为不同派琴虫培养悬液浓度下吡啶橙染色镜检计分。如表 3 所示,由数据结果显示,在该试验条件下,当派琴虫培养液浓度为 10^2 个 /mL 时,免疫磁珠无法分离到派琴虫。因此,用纯化抗体 $9 \mu\text{g}/\text{mgbeads}$ 浓度包被磁珠从派琴虫培养液中分离派琴虫的检测限约为 10^2 个 /mL。

[0129] 表 3

[0130]	派琴虫培养悬液浓度 (个/mL)	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7
	计分平均值	1	1	2	3	4	5

[0131] (2) 免疫磁珠从派琴虫模拟阳性病料中分离派琴虫的检测限测定

[0132] A1、派琴虫模拟阳性病料制备

[0133] 取新鲜的无感染的贝类样品,将贝壳弃掉,取腮、套膜及闭合肌 25mg 置于灭菌的研钵,研磨器研碎,加入 PBS (pH=7.4) 溶液 1mL, 130rpm, 离心 1min, 上清留用。取 1mL 派琴虫培养悬液, 4000rpm 离心 5min, 虫体加入上清, 混匀。调节此派琴虫阳性模拟溶液至 10^7 个 /mL、 10^6 个 /mL、 10^5 个 /mL、 10^4 个 /mL、 10^3 个 /mL、 10^2 个 /mL 的不同浓度。

[0134] A2、处理好的 $9 \mu\text{g}/\text{mg}$ beads 浓度的免疫磁珠,与浓度分别为 10^7 个 /mL、 10^6 个 /mL、 10^5 个 /mL、 10^4 个 /mL、 10^3 个 /mL、 10^2 个 /mL 的派琴虫阳性模拟溶液进行反应,吡啶橙染色镜检考察反应效果,并计分,确定产生阳性反应的最低派琴虫模拟溶液的浓度,即此为最低检测限。

[0135] 随着派琴虫模拟阳性病料浓度的降低,免疫磁珠捕获派琴虫的镜检现象同“免疫磁珠从派琴虫培养悬液中分离派琴虫”。

[0136] 表 4 为不同派琴虫模拟阳性病料浓度下吡啶橙染色镜检计分。如表 4 所示,并结合镜检结果得出,在该试验条件下,当派琴虫阳性模拟病料浓度为 10^3 个 /mL 时,镜下只能看到少量单个磁珠结合单个派琴虫。因此,用纯化抗体 $9 \mu\text{g}/\text{mg}$ beads 浓度包被磁珠从派琴虫阳性模拟病料中分离派琴虫的检测限约为 10^3 个 /mL。

[0137] 表 4

[0138]	派琴虫模拟阳性病料浓度 (个/mL)	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7
	计分平均值	0	1	1	2	3	4

[0139] 实施例 4 免疫磁珠从贝类样品中分离派琴虫、富集及鉴定

[0140] (1) 贝类样品的处理

[0141] 选取垂死的新鲜贝类样品 5 份,分别编号 P1、P2、P3、P4、P5。取腮、套膜及闭合肌等组织 25mg 置于灭菌的研钵研碎,加入 PBS (pH=7.4) 溶液 $500 \mu\text{L}$, 130rpm 离心,收集上清于另一 EP 管中。4000rpm, 5min, 用 PBS (pH=7.4) 溶液洗涤 1 次。最终用 $200 \mu\text{L}$ PBS (pH=7.4) 重悬虫体。

[0142] (2) 免疫磁珠分离派琴虫

[0143] 处理好的免疫磁珠加入虫体, 37℃ 吸附。吸附完毕, 用磁力收集器收集磁珠, 洗涤后加入 PBS (pH=7.4) 溶液重悬, 取适量染色镜检。

[0144] (3) 洗脱及富集派琴虫

[0145] 吸附派琴虫的免疫磁珠, 加入 100 μ L 0.1M 柠檬酸盐溶液 (pH=3.1) 洗脱, 磁珠用磁力收集器 (MPC) 去除, 含有虫体的上清 4000rpm 离心后, 加入 200 μ L PBS (pH=7.4) 重悬。

[0146] (4) 荧光 PCR 方法鉴定

[0147] 上述 5 份贝类样品用本发明所述方法富集后, 将富集得到的派琴虫进行荧光 PCR 方法鉴定, 同时设立阳性对照和空白对照: 阳性对照为派琴虫阳性模拟溶液, 空白对照为新鲜无感染的贝类样品组织处理上清。按照 QIAGEN 公司的商品化试剂盒 (Dneasy Blood and Tissue kit) 提取富集得到的派琴虫的 DNA。然后采用荧光 PCR 方法进行鉴定。具体参照申请号为 200810224654.7 (用于派琴虫检测的实时荧光 PCR 引物和探针) 的专利。

[0148] 图 3 为富集得到的派琴虫进行荧光 PCR 的鉴定图, 其中, 样品 P2 和 P3 扩增曲线基本重合。如图 3 所示, 上述 5 份样品均出现扩增现象, 并且与镜检结果相符。

[0149] 虽然, 上文中已经用一般性说明、具体实施方式及试验, 对本发明作了详尽的描述, 但在本发明基础上, 可以对之作一些修改或改进, 这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此, 在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进, 均属于本发明要求保护的

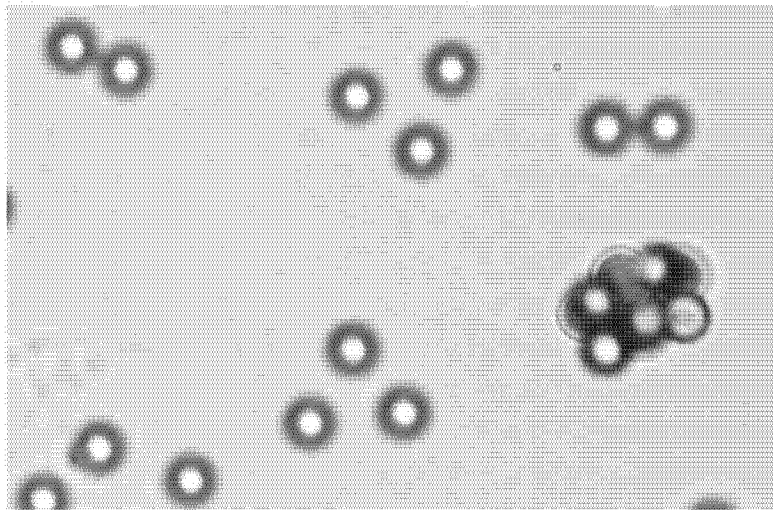


图 1

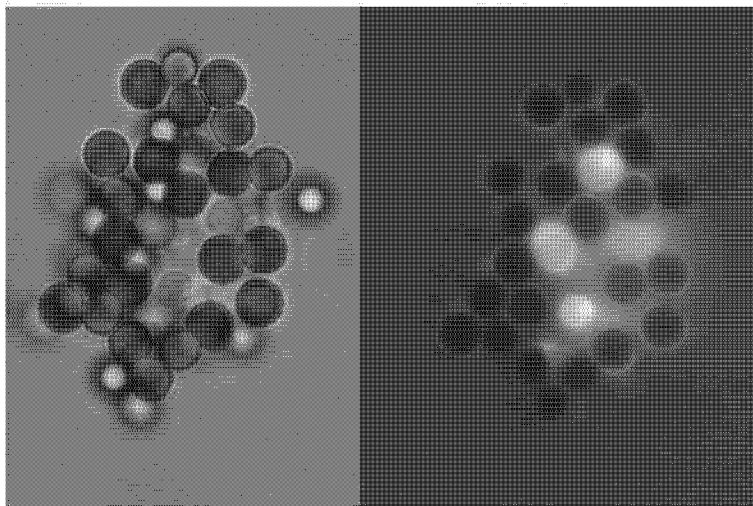


图 2

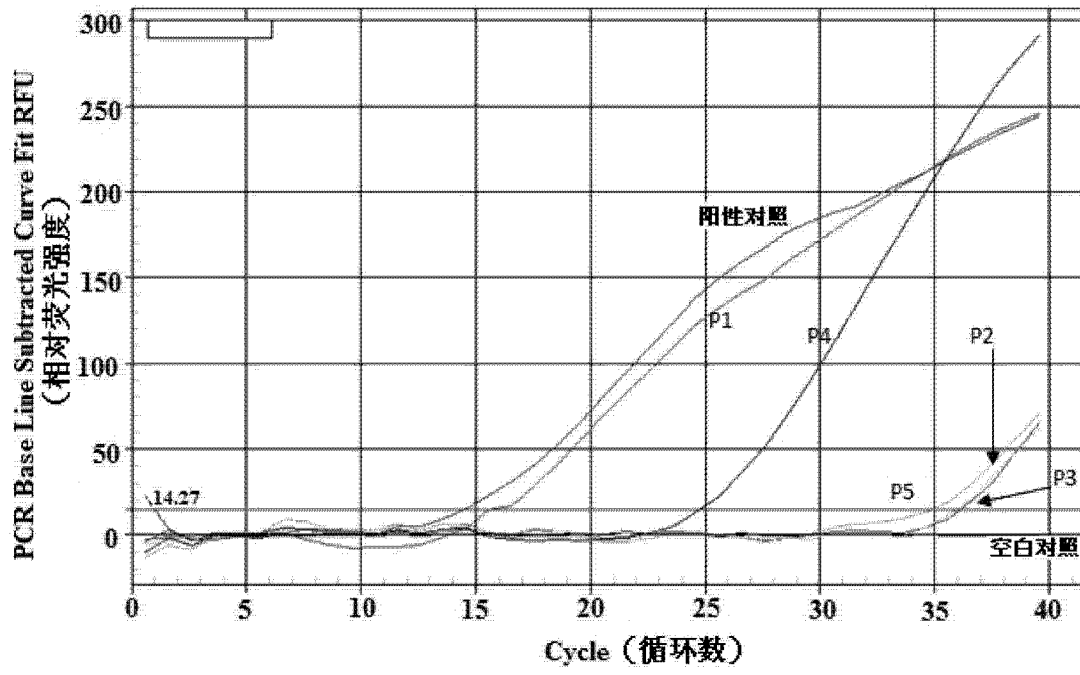


图 3

专利名称(译)	一种快速分离纯化及富集派琴虫的方法		
公开(公告)号	CN103235118B	公开(公告)日	2015-04-08
申请号	CN201310100222.6	申请日	2013-03-26
申请(专利权)人(译)	中国检验检疫科学研究院		
当前申请(专利权)人(译)	中国检验检疫科学研究院		
[标]发明人	邓俊花 吴绍强 林祥梅 冯春燕 王彩霞		
发明人	邓俊花 吴绍强 林祥梅 冯春燕 王彩霞		
IPC分类号	G01N33/531 G01N1/34 G01N1/40 G01N33/577		
代理人(译)	王朋飞 张庆敏		
其他公开文献	CN103235118A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种快速分离纯化及富集派琴虫的方法，所述方法包括如下步骤：(1)派琴虫免疫磁珠的制备；(2)分离纯化派琴虫；(3)荧光显微鉴定；(4)富集派琴虫。本发明还提供了所述方法在贝类样品派琴虫检测领域的应用。本发明所述方法对派琴虫感染样品具有较好的敏感性和特异性，可以检测到派琴虫感染样品中极少量的派琴虫，并能有效地将派琴虫从感染样品中分离纯化及富集出来。

