

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

G01N 33/569

C07K 16/08



# [12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 00131230.8

[45] 授权公告日 2003 年 8 月 20 日

[11] 授权公告号 CN 1118704C

[22] 申请日 2000.12.8 [21] 申请号 00131230.8

[71] 专利权人 中国科学院水生生物研究所

地址 430071 湖北省武汉市武昌珞珈山

[72] 发明人 戴和平 高宏 赵新颜 戴玲芬

张宪孔 赵若虹

韩明申 (SeamM Hanmingsen)

高坤山

审查员 石剑平

[74] 专利代理机构 武汉科宏专利事务所

代理人 王敏锋

权利要求书 3 页 说明书 8 页

[54] 发明名称 对虾白斑杆状病毒的诊断试剂盒及其检测方法

[57] 摘要

本发明提供了一种对虾白斑杆状病毒的诊断试剂盒及其检测方法，以单链抗体 A1 为主体设计的病毒检测试剂盒，实现了感染对虾白斑杆状病毒快速、简便、灵敏的检测需要，其检测方法利用诊断试剂盒可在 1 小时内快速、简便、灵敏地检测 100 个对虾样品，大大优于 PCR 和 DNA 杂交检测方法。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、一种对虾白斑杆状病毒的诊断试剂盒，其特征在于，该诊断试剂盒由下列部件构成：

(1)、1号小管，内装能识别对虾白斑杆状病毒的单链抗体 A1，为大肠杆菌培养液冻干粉或大肠杆菌周质空间提取液冻干粉；单链抗体 A1 的 DNA 序列如下：

```
GCGGCCAGCCGCCATGGCCGAGGTGAAGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGGCGAG
GCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTCCTGCAAAGTTTCTGGCTTCAACATTAAGACTACT
ATATGAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGGATGGATTTAT
CCTGACAATGGTAATACTATATATGACCCGAAGTTCAGGGCAAGGCCAGAATAACAGC
AGATACATCCTCCAACACAGCCTACCTGCAGTTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACTG
CCGTCTATTACTGTGCTAGTGGTGGTAACCCCTGGGTACTGGGGTCAAGGCACCACTCT
CTCCGTGTCACAGGTGGAGGCGGCTCTGGTGGCGGTGGCAGTGGCGGCGGAGGTTCTAG
ACGTCGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGC
GTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGTACTAATGTAGCCTGNTATCNACAGAAACC
AGGGCGATCTCCTAAAACACTGATTTACTCGGCATCCTACCGGTACAGTGGAGTCCCTG
ATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAATGTGCAG
TCTGAAGACTTGGCAGAGTATTTCTGTCAGCAATATAGCAGCTATCCTCTCACATTCCG
TGGTGGGACCAAGTTGGAATCAAGCGCGCGGCCGCA
```

(2)、2号小管，内装抗单链抗体 E-tag 的兔抗鼠免疫球蛋白 IgG / 辣根过氧化物酶与脱脂奶粉/PBS 的混合物；

- (3)、3号小管，内装纯化对虾白斑杆状病毒；
- (4)、4号小管，内装二氨基联苯胺；
- (5)、5号小管，内装10 X 三羟甲基氨基甲烷—盐酸(Tris-HCl),  
pH 7.6；
- (6)、6号小管，内装 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>；
- (7)、7号小管，内装重铬酸钾；
- (8)、8号小管，内装吐温-20；
- (9)、9号小袋，内装硝酸纤维素膜；
- (10)、10号小袋，内装 PBS 盐类组合；
- (11)、11号小袋，内装脱脂奶粉；
- (12)、长方体盒子；
- (13)、1块泡沫板，其大小与长方体盒子的底面相同，泡沫板的一边有8个孔，孔的大小正好可放入上述1~8号小管；

对虾白斑杆状病毒的诊断试剂盒各部件按下列方式安置：1~8号小管顺序放在泡沫板的8个孔中，9~11号小袋放在泡沫板的另一边。

2、根据权利要求1所述的一种对虾白斑杆状病毒的诊断试剂盒用于对虾白斑杆状病毒的检测方法，其特征在于，该检测方法顺序按下列步骤进行：

- (1)、将待测样品对虾血淋巴液点于硝酸纤维素膜上；
- (2)、将膜放入4%脱脂奶粉/PBS中，于室温放置0.5~3分钟；
- (3)、再将膜浸入0.025mol/L重铬酸钾溶液中，室温放置9~11分钟，使对虾血淋巴中的氧化酶类失活；

- (4)、用 PBS 将膜洗 2~5 次；
- (5)、将膜与含有单链抗体 A1 的大肠杆菌培养液，在室温下保温 5~15 分钟；
- (6)、用 0.1%吐温-20/ PBS 将膜洗 2~5 次，再用 PBS 洗 2~5 次；
- (7)、将膜与 4%脱脂奶粉 / PBS 1:8000 倍稀释的抗单链抗体 E-tag 的兔抗鼠 IgG/辣根过氧化物酶在室温下保温 5~15 分钟；
- (8)、将膜用吐温-20/PBS 洗 2~5 次，再用 PBS 洗 2~5 次；
- (9)、将二氨基联苯胺和  $H_2O_2$  加入到 50 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷-盐酸 (Tris-HCl), PH 7.6 中，制成底物溶液，再将膜放入底物溶液中，反应 5~15 分钟，有褐色斑点即为病毒阳性。

## 对虾白斑杆状病毒的诊断试剂盒及其检测方法

本发明涉及水产养殖生物病毒的诊断试剂盒及其检测方法，更具体涉及对虾白斑杆状病毒的诊断试剂盒及其检测方法。

1993 年以来，我国虾病爆发性流行，引起养殖的对虾大面积死亡，经济损失惨重。研究表明，其主要是由一种新的没有包涵体的 C 型杆状病毒——对虾白斑杆状病毒所致。该病毒可以感染我国所有人工养殖的对虾种类，感染性强，发病快，死亡率高，给对虾养殖业带来极大的危害；据报道，其它国家和地区也有类似情况。目前，对对虾病毒病尚无有效的治疗方法，避免与病毒病源接触被认为是最有效的预防措施，而这主要依赖于早期的快速诊断。目前的诊断方法主要有多聚链反应（PCR）、核酸探针技术和酶联免疫吸附技术。PCR 技术虽然灵敏度高，但费用昂贵，只有少数有经济实力的单位可使用。核酸探针技术对技术条件要求高，检测时间长，广大虾农掌握此技术难度很大，难以推广；酶联免疫吸附技术虽可在养虾场应用，但由于此法所需的多克隆抗体和单克隆抗体制备麻烦、费用高，限制了该技术的应用和发展。

早期快速诊断对虾白斑杆状病毒是目前对虾养殖的主要预防措施和减少虾农损失的有效途径，因此，快速、方便的诊断试剂盒及其检测方法是广大虾农急切盼望的。

本发明的目的是提供一种由噬菌体抗体展示技术制备的能识别对虾白斑杆状病毒的单链抗体 A1，以及以此为主体设计的对虾白斑杆状病毒的诊断试剂盒及其检测方法，该试剂盒可批量生产、成本

低，操作简单、方便，能在实验室或养虾现场用于对虾白斑杆状病毒的检测；该检测方法可快速、方便地检测出对虾待测样品是否感染对虾白斑杆状病毒。

本发明的一种对虾白斑杆状病毒的诊断试剂盒由下列部件构成：

(1)、1号小管，内装能识别对虾白斑杆状病毒的单链抗体 A1，为大肠杆菌培养液冻干粉或大肠杆菌周质空间提取液冻干粉。

(2)、2号小管，内装抗单链抗体 E-tag 的兔抗鼠免疫球蛋白 IgG / 辣根过氧化物酶与脱脂奶粉/PBS 的混合物。

(3)、3号小管，内装纯化对虾白斑杆状病毒。

(4)、4号小管，内装二氨基联苯胺。

(5)、5号小管，内装 10 X 三羟甲基氨基甲烷—盐酸(Tris-HCl)，pH 7.6

(6)、6号小管，内装  $H_2O_2$

(7)、7号小管，内装重铬酸钾。

(8)、8号小管，内装吐温-20

(9)、9号小袋，内装硝酸纤维素膜。

(10)、10号小袋，内装 PBS 盐类组合。

(11)、11号小袋，内装脱脂奶粉。

(12)、长方体盒子。

(13)、1块泡沫板，其大小与长方体盒子的底面相同，泡沫板的一边有8个孔，孔的大小正好可放入上述1~8号小管。

对虾白斑杆状病毒的检测装置的各部件按下列方式安置： 1~8

号小管顺序放在泡沫板的 8 个孔中， 9~11 号小袋放在泡沫板的另一边。

对虾白斑杆状病毒的检测方法按下列步骤进行：

- 1) 将待测样品对虾血淋巴液点于硝酸纤维素膜上。
- 2) 将膜放入 4% 脱脂奶粉/PBS 中，于室温放置 0.5~3 分钟。
- 3) 再将膜浸入 0.025mol/L 重铬酸钾溶液中，室温放置 9~11 分钟，使对虾血淋巴中的氧化酶类失活。
- 4) 用 PBS 将膜洗 2~5 次。
- 5) 将膜与含有单链抗体 A1 的大肠杆菌培养液，在室温下保温 5~15 分钟。
- 6) 用 0.1%吐温-20/ PBS 将膜洗 2~5 次，再用 PBS 洗 2~5 次。
- 7) 将膜与 4%脱脂奶粉 / PBS 1:8000 倍稀释的抗单链抗体 E-tag 的免抗鼠 IgG/辣根过氧化物酶在室温下保温 5~15 分钟。
- 8) 将膜用吐温-20/PBS 洗 2~5 次，再用 PBS 洗 2~5 次。
- 9) 将二氨基联苯胺和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 加入到 50 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷-盐酸 (Tris-Hcl), PH 7.6 中，制成底物溶液，再将膜放入底物溶液中，反应 5~15 分钟，有褐色斑点即为病毒阳性。

其中 1 号小管中 A1 单链抗体的 DNA 序列如下：

**GCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAGGTGAAGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGGCGAG  
GCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTCCTGCAAAGTTTCTGGCTTCAACATTAAGACTACT**

ATATGAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGGATGGATTTAT  
CCTGACAATGGTAATACTATATATGACCCGAAGTTCCAGGGCAAGGCCAGAATAACAGC  
AGATACATCCTCCAACACAGCCTACCTGCAGTTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACTG  
CCGTCTATTACTGTGCTAGTGGTGGTAACCCCTGGGTACTGGGGTCAAGGCACCACTCT  
CTCCGTGTCACAGGTGGAGGCGGCTCTGGTGGCGGTGGCAGTGGCGGCGGAGGTTCTAG  
ACGTCGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTTCAGC  
GTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTACTAATGTAGCCTGNTATCNACAGAAACC  
AGGGCGATCTCCTAAAACACTGATTTACTCGGCATCCTACCGGTACAGTGGAGTCCCTG  
ATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAATGTGCAG  
TCTGAAGACTTGGCAGAGTATTTCTGTCAGCAATATAGCAGCTATCCTCTCACATTCGG  
TGGTGGGACCAAGTTGGAATCAAGCGC**GCGGCCGCA**

其制备方法为：首先从感病斑节对虾的血淋巴液中分离纯化白斑杆状病毒，将抗体片段的基因克隆到丝状噬菌体 N-末端第三蛋白基因区域，表达的融合蛋白在噬菌体尾尖表面展示。具有抗原结合活力的抗体片段若由重链和轻链的可变区域组成，由一可弯曲的小肽连接成为氨基酸单链的形式，称为单链抗体。单链抗体片段的获得是通过 PCR 技术对免疫过或未免疫的小白鼠脾脏 mRNA 进行反转录和扩增，克隆到噬菌体表达载体上。具有抗原结合活力的噬菌体抗体可直接利用抗原亲和性从重组噬菌体抗体文库中淘选，通过再感染大肠杆菌及菌体扩增培养，可获得本发明所述的单链抗体 A1。

其具体制备方法包括如下步骤：

- 1、采用蔗糖密度梯度超速离心法，用电镜检测，从感病斑节对虾的血淋巴液中分离纯化白斑杆状病毒。

2、用蛋白量为 20~150 $\mu$ g 纯化的完整对虾白斑杆状病毒粒子注射小鼠,用 Titremax 佐剂或福氏佐剂或氢氧化铝等常用佐剂,经 17~26 天进行二次或三次免疫,再经 3~5 天用酶联免疫印迹法和酶联免疫吸附法测定抗体效价,取抗体效价最高的小鼠脾脏,从中提取 mRNA。

3、将此 mRNA 反转录为 cDNA,再用对应于重链和轻链抗体可变部位 DNA 的引物通过 PCR 技术将抗体的重链和轻链的可变片段的 DNA 扩增。

4、用一编码可弯曲小肽的 DNA 小片段将重链和轻链 DNA 片段连接起来组成单链抗体 DNA,再用对应单链抗体 DNA 的引物用 PCR 技术将整个片段扩增。

5、将单链抗体 DNA 片段两端的限制性内切酶位点(SfiI 和 NotI)酶切,再与具同样酶切位点的噬菌体表达载体连接,电转移至大肠杆菌中,可获得较高效价的噬菌体抗体 cDNA 文库。

6、用吸附在塑料管壁上的对虾白斑杆状病毒对上述噬菌体抗体文库进行 1~4 次淘选,用酶联免疫吸附法筛选可得到抗原结合专一性的阳性克隆,该阳性克隆分泌的单链抗体可专一性识别对虾白斑杆状病毒。

7、选取具有较强 ELISA 信号的菌株,用于制备可溶性单链抗体,可得到专一识别对虾白斑杆状病毒的单链抗体 A1。

本发明的优点与效果:

单链抗体 A1 可直接用于诊断对虾白斑杆状病毒,适合对虾病毒病的早期检测,其制备方法比多克隆抗体和单克隆抗体要简便和便宜的多,且可大量制备。以单链抗体 A1 为主体设计的病毒检测试剂盒,实现了感染对虾白斑杆状病毒快速、简便、灵敏的检测需要,1 小时内可检测 100 个样品,大大快于 PCR 和 DNA 杂交检测方法。

## 实施例 1

对虾白斑杆状病毒的诊断试剂盒，该试剂盒由下列部件组成：

(1)、1 号塑料小管，内装能识别对虾白斑杆状病毒的 A1 单链抗体，用 3ml 大肠杆菌培养液冻干粉或 100 $\mu$ l 大肠杆菌周质空间提取液冻干粉。

(2)、2 号塑料小管，内装 0.5  $\mu$ l 抗单链抗体 E-tag 的兔抗鼠免疫球蛋白 IgG / 辣根过氧化物酶 (Pharmarcia 公司购得) 与脱脂奶粉/PBS 混合的冻干粉。

(3)、3 号塑料小管，内装纯化对虾白斑杆状病毒，冻干粉 2 $\mu$ g。

(4)、4 号塑料小管，内装二氨基联苯胺 (DAB, 华美公司购得)，固体 6mg。

(5)、5 号塑料小管，内装 10 X 三羟甲基氨基甲烷 (Tris-HCl)，pH 7.6, 1 ml

(6)、6 号塑料小管，内装 10  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

(7)、7 号塑料小管，内装重铬酸钾，固体 37 mg。

(8)、8 号塑料小管，内装吐温-20, 0.1 ml 液体。

(9)、9 号塑料小袋，内装 50mm X 80 mm 两片硝酸纤维素膜 (国产)。

(10)、10 号塑料小袋，内装 PBS 盐类组合 3g。

(11)、11 号塑料小袋，内装脱脂奶粉 1g。

(12)、长方体盒子 (11 $\times$ 7 $\times$ 3.5cm)。

(13)、1 块泡沫板，其大小与长方体盒子的底面相同，泡沫板

的一边有 8 个孔，孔的大小正好可放入上述 1~8 号小管。

对虾白斑杆状病毒的检测装置的各部件按下列方式安置：1~8 号小管顺序放在泡沫板的 8 个孔中，9~11 号小袋放在泡沫板的另一边。

## 实施例 2

对虾白斑杆状病毒的检测方法，该方法按下列步骤进行（以下所用的塑料小管和塑料小袋的号均指实施例 1 中的号码）：

1、将 3 号塑料小管中的冻干粉溶于 5 ml 纯净水中与 5  $\mu$ l 待测样品对虾血淋巴液分别点在 9 号塑料小袋中的硝酸纤维素膜上的不同位置，干后再放回 9 号塑料小袋中。

2、将 300 ml 纯净水加入 10 号塑料小袋中，使 PBS 盐类完全溶解；再取 25 ml PBS 加入 11 号塑料小袋中，制成 4% 脱脂奶粉/PBS。取 5 ml 4% 脱脂奶粉/PBS 放入 9 号塑料小袋中，于室温下保温 1 分钟，将液体倒出。

3、将 7 号塑料小管中的重铬酸钾溶于 5 ml 纯净水中，再加入 9 号塑料小袋中，使硝酸纤维素膜浸入 10 分钟，使对虾血淋巴液中的氧化酶类失活。

4、用 10 ml PBS 将膜清洗，将液体倒出，这样反复清洗 3 次。

5、将 1 号塑料小管中的单链抗体溶于 3 ml 纯净水中，再将其加入 9 号小袋中，与膜在室温下保温 10 分钟。

6、将 8 号塑料小管中的吐温-20 溶于 100 ml PBS，用其 15 ml  $\times$  3 将膜洗 3 次，再用 10 ml  $\times$  3 PBS 洗三次。

- 
- 7、将 2 号塑料小管中的二抗溶于 3 ml 纯净水中，再将其加入 7 号小袋中，与膜在室温下保温 10 分钟。
  - 8、将膜用吐温—20/PBS 洗 3 次，再用 PBS 洗 3 次。
  - 9、将 5 号塑料小管中的液体稀释 10 倍至 10 ml，再将其与 4 号和 6 号塑料小管中之物混合，制成底物溶液，再将膜放入底物溶液中，反应 10 分钟，有褐色斑点即为病毒阳性。

专利名称(译)	对虾白斑杆状病毒的诊断试剂盒及其检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN1118704C</a>	公开(公告)日	2003-08-20
申请号	CN00131230.8	申请日	2000-12-08
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学院水生生物研究所		
申请(专利权)人(译)	中国科学院水生生物研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学院水生生物研究所		
[标]发明人	戴和平 高宏 赵新颜 戴玲芬 张宪孔 赵若虹 韩明申SEAMMHANMINGSEN 高坤山		
发明人	戴和平 高宏 赵新颜 戴玲芬 张宪孔 赵若虹 韩明申(SEAMMHANMINGSEN) 高坤山		
IPC分类号	C07K16/08 G01N33/53 G01N33/569		
代理人(译)	王敏锋		
其他公开文献	CN1356550A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明提供了一种对虾白斑杆状病毒的诊断试剂盒及其检测方法，以单链抗体A1为主体设计的病毒检测试剂盒，实现了感染对虾白斑杆状病毒快速、简便、灵敏的检测需要，其检测方法利用诊断试剂盒可在1小时内快速、简便、灵敏地检测100个对虾样品，大大优于PCR和DNA杂交检测方法。