

用 ELISA 检测中国对虾的白斑 综合症病毒(WSSV)*

汪 岷 戴继勋 张士瑾 包振民 李红岩 王 旭

(青岛海洋大学海洋生命学院, 青岛 266003)

关键词 中国对虾 WSSV ELISA

中图分类号: R151.2

1 引言

随着对虾养殖业的发展,对虾疾病越来越受到人们的关注,尤其对虾病毒性疾病已成为各国学者研究的焦点之一.由于没有有效的抗病毒药物,早期预防就显得更为重要,而这依赖于快速、敏感的诊断方法.

酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)是1972年由 Engvall 等在酶免疫试验(enzyme immunoassay, EIA)的基础上发展起来的.目前,在病毒等疾病有关的抗原抗体系统的定性或定量测定领域内已被广泛应用.

本文通过病毒纯化,免疫新西兰兔,获得多克隆抗血清,并对抗体进行纯化、酶标记,建立了双抗体夹心直接 ELISA 的检测方法.

2 实验材料和方法

2.1 病虾及正常虾

病虾于1996年6月采自青岛红岛发病虾池,正常虾为4月的海捕虾.

2.2 实验动物

健康雄性新西兰兔由青岛大学医学院动物房提供.

2.3 病毒的分离和纯化

将25g冰虾头胸部,去除肝胰腺,加入200 cm³TN缓冲液中(0.01 mol/dm³ Tris-HCl, 0.1 mol/dm³ NaCl, pH 8.0),其中含有PMSF(苯甲基磺酰氟)1 mmol/dm³,经8 000 r/min匀

本文1998-12-30收到,修改稿于1999-03-21收到.

* '863'课题资助项目(编号:819-04-04).

第一作者简介:汪 岷,女,29岁,讲师,博士,从事对虾病毒分子生物学研究.

浆 10 min 后, 3 000 r/min 离心 5 min, 5 000 r/min 离心 20 min, 再取上清液 10 000 r/min 离心 1 h, 沉淀用少量 TN 缓冲液重悬, 经 30% ~ 50% 蔗糖密度梯度离心, 20 000 r/min, 2 h 后, 分取各带离心回收, 用 2% 的磷钨酸 (pH 7.4) 负染, 在 JEM-1200EX (日立) 透射电子显微镜中观察。

2.4 病毒抗血清的制备

按常规方法免疫健康雄性新西兰兔 5 只, 免疫程序见表 1。

表 1 家兔免疫程序

免疫次数	时间/d	剂量/cm ³	佐 剂	注 射 部 位	血清效价
初次	第 1 天	0.1 cm ³	福氏完全佐剂	局部皮下注射	
第 2 次	第 2 天	0.4 cm ³	福氏完全佐剂	皮下多点注射	
第 3 次	第 9 天	0.6 cm ³	福氏完全佐剂	皮下多点注射	
第 4 次	第 16 天	0.8 cm ³	福氏完全佐剂	皮下多点注射	
第 5 次	第 23 天	0.2 cm ³	无	静脉	
第 6 次	第 26 天	0.5 cm ³	无	静脉	
第 7 次	第 29 天	0.4 cm ³	福氏完全佐剂	腋窝腹股沟淋巴结	
第 8 次	第 43 天	1.5 cm ³	无	静脉	1:800
第 9 次	第 49 天	1.5 cm ³	无	静脉	1:1 600

第 49 天用微量试管沉淀法测血清效价大于 1:1 000, 3 d 以后由心脏抽兔血, 分离血清。

2.5 免疫球蛋白的纯化

用盐析法提纯抗体^[1]。本文选用硫酸铵溶液对抗体进行纯化。

2.6 非特异性抗体的吸收

取正常虾的头胸部, 去除肝胰腺, 加入 TN 缓冲液中 (其中含有 PMSF 1 mmol/dm³), 匀浆 8 000 r/min, 10 min, 经 3 000 r/min, 离心 5 min, 取上清液再经 5 000 r/min, 离心 20 min, 上清液经 10 000 r/min, 离心 1 h, 取沉淀用于非特异性抗体的吸收。方法参照 Sambrook 等^[2]的方法。

2.7 酶标记抗体的制备

采用过碘酸钠法对纯化抗体进行辣根过氧化物酶标记^[1]。

2.8 酶标抗体标记率的测定

取标记物做 1:20 稀释, 终体积 2 cm³, 用紫外分光光度仪测 280 nm, 403 nm 处的 OD 值。

2.9 样品处理

取单个虾头胸部, 去除肝胰腺, 用剪刀绞碎, 加入 2 cm³ TN 缓冲液 (含有 1 mmol/dm³ PMSF), 用研钵充分研磨, 再放入 1.5 cm³ 塑料离心管中, 3 000 r/min 离心 5 min, 再 5 000 r/min, 离心 25 min, 取上清液用于 ELISA 检测。阴性对照为正常的海捕虾, 也以同样的方法处理。阳性对照为纯化病毒。

2.10 经预实验选定将抗体做 1:300 稀释, 抗原做 1:10 稀释, 阳性对照抗原即纯化病毒做 1:400 稀释用于 ELISA 检测。

2.11 ELISA

纯化病毒抗体按 1:300 比例用 PBS 缓冲液稀释, 每孔加入 100 mm³ 包板, 37 ℃ 2 h, 倾去

反应液, 拍干, 用 PBST 洗板, 每次振荡 5 min, 倾去洗涤液, 拍干, 重复 3 次; 用含 10% 的小牛血清的 PBS 封板, 每孔加满, 37 °C 反应 45 min, 按前法洗板, 每孔加入 100 mm³ 按 1:10 稀释的待测样品, 37 °C 反应 90 min, 按前法洗板; 每孔加入 100 mm³ 稀释的酶标抗体, 37 °C 反应 90 min, 按前法洗板; 加入反应底物, 室温下作用 30 min, 每孔加入 100 mm³ 反应终止液 (2 mol/dm³ H₂SO₄); 用酶标仪测定 492 nm 处的 OD 值, 结果判定以样品 OD 值 (P) 比阴性对照 OD 值 (N) 大于 2.1 为阳性, P/N 值小于 2.1 而大于等于 1.5 疑, P/N 值小于 1.5 为阴性。

3 结果

3.1 血清效价的测定

5 只家兔血清效价分别为: 1:3 200, 1:4 800, 1:3 200, 1:6 400, 1:2 400。

3.2 酶标记抗体标记率的测定

经紫外分光光度仪测得 280 nm 处 OD 值为 1.687, 403 nm 处 OD 值为 0.461。

酶量 (mg/cm³) = OD 值 (403 nm) × 0.4 × 稀释倍数 = 0.461 × 0.4 × 20 = 3.688,

IgG 量 (mg/cm³) = [OD 值 (280 nm) - OD 值 (403 nm) × 0.42] × 0.62 × 稀释倍数 = (1.687 - 0.461) × 0.62 × 20 = 15.202 4, 克分子比值 = 酶量 (mg/cm³) × 4 / IgG 量 = 0.97。

3.3 ELISA

通过测定 34 份标本中, 有 21 份为阳性, 检出率为 61.8%。结果见表 2。

表 2 ELISA 检测结果

标本号	OD 值	P/N	结果判断	标本号	OD 值	P/N	结果判断
1	0.781	1.51	可疑	19	1.368	2.65	+
2	1.906	3.69	+	20	1.173	2.27	+
3	1.492	2.89	+	21	1.381	2.68	+
4	1.614	3.13	+	22	0.603	1.17	-
5	0.913	1.77	可疑	23	0.678	1.31	-
6	1.995	3.87	+	24	0.826	1.60	可疑
7	1.497	2.9	+	25	1.14	2.16	+
8	1.798	3.48	+	26	1.085	2.10	+
9	0.678	1.31	-	27	1.197	2.32	+
10	1.406	2.72	+	28	1.463	2.84	+
11	0.794	1.54	可疑	29	1.532	2.97	+
12	0.437	0.78	-	30	1.493	2.89	+
13	1.205	2.34	+	31	1.046	2.03	可疑
14	1.914	3.75	+	32	1.839	3.56	+
15	0.732	1.42	-	33	0.725	1.41	-
16	1.287	2.49	+	34	0.874	1.69	-
17	1.861	3.61	+	阳性对照	1.762	3.4	
18	0.679	1.32	-	阴性对照	0.516		

4 讨论

本文用纯化的中国对虾的 WSSV, 免疫新西兰兔获得多克隆抗血清, 并将多克隆抗血清纯化, 进行酶标记, 建立了直接双抗体夹心 ELISA 的诊断方法. 用于 ELISA 的抗体有两种, 一种是单克隆抗体, 一种是多克隆抗体, 单克隆抗体主要针对抗原的某一特异的抗原决定簇, 因此特异性较高, 有报道用单克隆抗体检测 IHNV 和 HHNV^[3,4], 但单克隆抗体因特异性过高, 有时在检测某些不含有共同决定簇抗原时, 因无反应, 可能遗漏; 有些单克隆抗体因对抗原的亲合力低, 在使用标记抗原时, 可能因固相板上抗体抗原结合标记物减少, 影响到结果准确性; 抗天然表位的单克隆抗体只与正确折叠的蛋白质起反应; 以上因素影响到单克隆抗体的敏感性. 与单克隆抗体相比, 多克隆抗血清可与某一蛋白质的所有形式起反应, 因此本文选用多克隆抗体可用于大批量标本的筛选, 但多克隆抗体中可能存在针对宿主蛋白的抗体, 与宿主蛋白发生交叉反应, 影响到结果的特异性. 本文用正常的对虾组织对多克隆抗血清进行了吸收, 用 ELISA 对正常虾组织进行检测, 可以看到反应的 OD 值较感染病毒的对虾组织明显低, 因此本实验具有较高的特异性.

ELISA 分为间接 ELISA 和直接 ELISA 两种方法. 两种方法各有优缺点, 间接 ELISA 由于二抗的放大作用, 敏感性较高, 而且不用特异性抗体进行酶标记, 直接 ELISA 反应时间较间接 ELISA 短, 但需要对特异性抗体进行酶标记, 因为没有二抗的扩大作用, 敏感性在一定程度上有所下降. 本文采用直接 ELISA 的方法, 检测时间在 6 h 左右即可完成, 并且通过双抗体夹心法, 用抗体对抗原进行捕捉, 来提高反应的敏感性. 双抗体夹心直接 ELISA 法用于对虾病毒的检测在国内外尚未见报道.

本文对来源于同一发病虾池的 34 份标本进行检测, 检出率达 61.8%, 表明同一发病虾池中, 并非所有的对虾均带有病毒, 但也不排除某些对虾中的带毒量较低, 超过实验方法的检出范围的可能. 本文在提纯抗体过程中只提取了 IgG 抗体, 原因有两点: (1) Lightner 等^[4]报道用 IHNV 单抗对长期冰冻样品进行间接 ELISA 检测时, 可得出很好的结果, 但对新鲜样品检测, 则与正常虾组织发生假阳性反应, 这可能是 IgM 与对虾血淋巴内凝集素的非特性吸附, 选择 IgG 型的单抗或将第二抗体改用抗鼠 IgG 的抗体后, 检测结果的假阳性问题可得到解决. 本文所制备的多克隆抗体, 通过提纯得到 IgG 型抗体, 可以排除这种假阳性反应的可能. (2) 在病毒免疫初期, 家兔主要产生 IgM 型抗体, 到免疫后期, IgM 水平降低, IgG 型抗体水平升高. 因此在长达 50 d 的免疫过程结束时, 家兔血液中主要为 IgG 型抗体.

在家兔免疫过程中, 本文对 1 号家兔进行了两次效价的测定, 分别为 1:1 600, 1:3 200, 表明抗体滴度正在升高, 因此有可能采血时并非家兔产生抗体的最高峰. 其他 4 只家兔在免疫过程中未进行血清效价的滴定, 采血时有可能在其产生抗体高峰期前后或正达高峰期.

参考文献

- 1 黄祯祥, 洪涛, 刘崇柏. 医学病毒学基础及实验技术. 北京: 科学出版社, 1990
- 2 Samrook J, Fristch E F, Maniatis T. Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 3 黄健, 于佳, 李晓玲等. 对虾皮下及造血组织坏死杆状病毒的精细结构、核酸、多肽及血清学研究. 海洋水产研究, 1995, 16(1): 11~23

- 4 Lightner D V, Poulos B T, Bruce L, et al. New developments in penaeid virology: application of biotechnology in research and disease diagnosis for shrimp viruses of concern in the Americas. In: Fulks W, Main K L ed, Disease of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States, Honolulu, Hawaii, 1992. 233~253

Detection of the white spot syndrome virus (WSSV) of shrimps, *Penaeus chinensis* by ELISA

Wang Min,¹ Dai Jixun,¹ Zhang Shicui,¹ Bao Zhenmin,¹ Li Hongyan,¹ Wang Kui¹

1. Marine Life College of Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003

Key words WSSV, ELISA, *P. chinensis*