

·研究简报·

对虾皮下及造血组织坏死杆状病毒单克隆抗体的 ELISA 快速检测

ELISA quick testing for monoclonal antibodies of hypodermal and hematopoietic necrosis baculovirus of shrimp

史成银 黄 健 宋晓玲

(中国水产科学研究院, 黄海水产研究所, 青岛 266071)

Shi Chengyin Huang Jie Song Xiaoling

(Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

关键词 酶联免疫吸附技术, 单克隆抗体, 杆状病毒, 对虾

Key words ELISA, monoclonal antibody, baculovirus, shrimp

对虾病毒性暴发病对我国对虾养殖业的危害十分严重, 其病原为皮下及造血组织坏死杆状病毒(hypodermal and hematopoietic necrosis baculovirus HHNBV)^[1]或称为对虾白斑综合征病毒(white spot syndrome baculovirus, WSSV)^[2]。为了对病原进行早期和快速检测, 我们研制了 HHNBV 的单克隆抗体^[3], 但常规 ELISA 检测方法反应时间较长, 一般需 20~24 h^[4], 不能满足生产上快速检测的要求, 用于实验室研究也较为不便。近年来, 一些学者将恒温振荡运用于夹心法 ELISA, 使检测时间大为缩短^[5,6]。我们尝试建立快速间接 ELISA 法并将其应用于筛选 HHNBV 单抗杂交瘤细胞株的研究中。现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒 毒种 HHNBV-957 系 1995 年 7 月从青岛市阳城区海西村对虾养殖场采集的发病对虾中分离, 病毒的扩增与纯化方法见文献^[7]。

1.1.2 小鼠 Balb/c 小鼠购自中国预防医学科学院实验动物中心。

1.1.3 骨髓瘤细胞株 sp 2/0 和 NS-1 细胞株购自中国科学院细胞生物研究所细胞库。

1.1.4 主要试剂 HRP-羊抗鼠 IgG 为军事医学科学院产品, 牛血清白蛋白(BSA)购自上海生物化学试剂公司, 脱脂奶粉为上海市牛奶公司产品, 鸡蛋清系用新鲜鸡蛋自制。

1.2 单克隆抗体杂交瘤细胞株的研制

小鼠按文献^[3]方法免疫, 取免疫小鼠脾脏与 sp 2/0 和 NS-1 两种骨髓瘤细胞分别融合, 并用 ELISA 方法筛选阳性孔, 用有限稀释法对阳性孔进行单克隆化^[3,8]。

1.3 ELISA 检测方法条件的比较

1.3.1 间接 ELISA 检测程序 常规 ELISA 按文献^[4]进行。

快速 ELISA 的过程为: 纯化的 HHNBV 悬液用包被液(0.01 mol/L 碳酸盐缓冲液, pH 9.6)稀释, 按 100 μ l/孔加入到酶标板上, 在酶标板振荡器上 37℃ 恒温振荡 30 min, 甩干包被液, 加入 PBST(0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液, 含 1% Tween-20, pH 7.4)静置 1 min, 甩干, 反复 2 次, 加入封闭液, 37℃ 恒温振荡 15 min, 甩干, 用 PBST 清洗 2 次, 各孔加入待测杂交瘤培养上清, 37℃ 恒温振荡 30 min, 甩干, 用 PBST 清洗 3 次; 各孔加入 HRP-羊抗鼠 IgG, 37℃ 恒温振荡 30 min, 甩干, 用 PBST 清洗 2 次; 各孔再加入 100 μ l 显色液(每 100 ml 含柠檬酸 0.73 g, Na₂HPO₄·2H₂O, 1.186 g, 邻苯二胺, 0.04 g; 30% H₂O₂, 0.1 ml), 37℃ 避光显色 15 min, 用 511 型酶标分析仪在 492 nm 处测定各孔的吸光度, 判定 ELISA 反应结果。

1.3.2 常规与快速 ELISA 方法检测 HHNBV 的比较 用 HHNBV(OD₂₆₀=0.005)包被 2 块酶标板, 用 1% BSA(以 PBST 配制)封闭各板的 1~4 列孔, 一抗为小鼠腹水单抗, 按常规与快速法分别进行 ELISA 测试。

1.3.3 不同封闭剂封闭效果的比较 用 PBST 配制 0.5% 和 1% BSA, 1%、3% 和 20% 脱脂奶粉, 1% 地高辛 DNA 标记和检测试剂盒封闭剂, 10% 蛋清, 以紫外吸收曲线法测定各溶液的蛋白质浓度。以上封闭剂用于封闭未加抗原的酶标板, 再按上述快速 ELISA 方法进行测试。

2 结果与讨论

2.1 单克隆抗体杂交瘤细胞株的筛选

取免疫小鼠脾脏进行细胞融合, 小鼠血清中的 HHNBV 抗体滴度为 20:1。

sp 2/0 融合板 24 孔中 8 孔有细胞生长, 融合率为 33.3%, 其中培养上清阳性 2 孔, 阳性率 25.0%; NS-1 融合板 24 孔中全部有细胞生长, 融合率 100%, 其中培养上清阳性有 4 孔, 阳性

收稿日期: 1997-08-04

率 16.7%。

经有限稀释法筛选后,初步得到 4 株抗 HHNV 的单克隆杂交瘤细胞株,其中由 sp 2/0 融合的 1 株,由 NS-1 融合的 3 株。

2.2 常规与快速 ELISA 方法的比较

2.2.1 常规与快速 ELISA 检测时间的比较 从实验过程可以看出,常规 ELISA 总过程耗时约 20~24 h,而快速 ELISA 则能在 5 h 内完成。它们各步骤在试剂上的差异如图 1 所示。

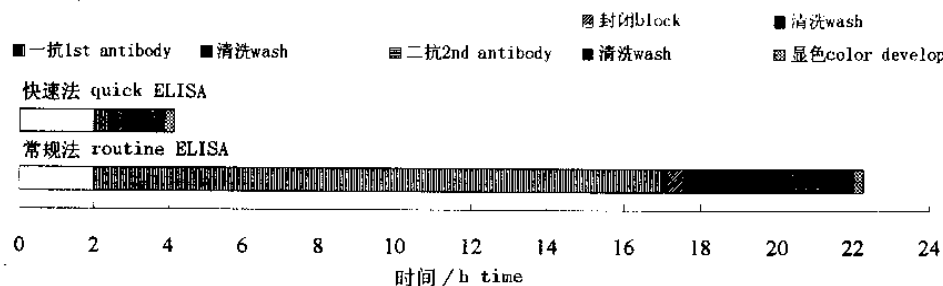
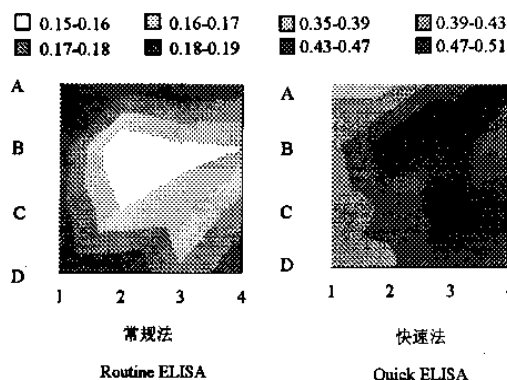


图 1 常规法与快速法 ELISA 检测时间上的比较

Fig.1 Comparison of testing time between routine method and quick ELISA

2.2.2 常规与快速 ELISA 反应结果的比较 常规 ELISA 方法中酶标板周边显色较中央强,即存在明显的“边缘效应”,而快速法没有边缘效应。另外,快速法显色强度明显高于常规法,说明快速法可提高反应的灵敏度。见图 2。



图标所示数值为 492 nm 吸光度值;A, B, C, D 和 1, 2, 3, 4 为酶标板各孔的坐标。The values labeled in the top indicate OD₄₉₂; A, B, C, D and 1, 2, 3, 4 are wells coordinates of microwell plate.

图 2 常规与快速 ELISA 反应结果的比较

Fig.2 Comparison of results between routine and quick ELISA

常规 ELISA 方法中,样品包被及各步反应均在静置状态下进行,抗原及封闭剂与酶标板的结合、抗原抗体结合等均依赖于生物大分子的布朗运动,反应与温度有关,作用时间长,并因为酶标板周边各孔较中间各孔的反应受温度影响大,导致“边缘效应”的产生。快速间接 ELISA 方法通过微量震荡,使酶标板孔内反应成分充分混合,在短时间内使各种成分接触的几率显著增加,大大加快了反应速度,缩短了测试时间。我们在实验中发现,用常规法,有时包被样品的粘度都会对反应结果造成影响,而快速法则消除了这一可能性。对于“边缘效应”的消除,皮国华^[5]认为是由于快速法使反应时间缩短,各孔从而能受热均匀。我们认为这是由于快速法以强制震荡运动减低了反应对布朗运动的依赖,使反应受温度的影响减小,加强了反应的同步性,从而消除了“边缘效应”,提高了实验的精密性。

2.3 不同封闭剂在快速 ELISA 中使用效果的比较

经测定,1% BSA 的蛋白质浓度与 3% 脱脂奶粉或 10% 蛋清的蛋白质浓度相当。在无抗原包被的封闭剂比较实验中,各种封闭剂在封闭效果上表现出一定差异:20% 脱脂奶粉最好,1% BSA 较好,其他较差。见表 1。

表 2 对 3 种封闭剂进行了综合比较,从封闭效果、成本和贮存条件等方面综合评价,20% 的脱脂奶粉都是最好的封闭剂。

表 1 几种封闭剂在小鼠腹水单抗 ELISA 测试中封闭效果的比较

Table 1 Comparison of effects of several blocking reagents in ELISA of MAbs in mice ascites

封闭剂 blocking reagent	BSA		脱脂奶粉 non-fat dry milk powder			地高辛 DIG kit	蛋清 egg albumen
	0.5%	1%	1%	3%	20%	1%	10%
平均吸光值 average OD ₄₉₂	0.347	0.285	0.392	0.328	0.271	0.371	0.356

表 2 3 种 ELISA 封闭剂的综和比较

Table 2 Composite comparisons of three kinds of blocking reagents used in ELISA

比较项目 comparative item	封闭剂 blocking reagents		
	BSA	脱脂奶粉 non-fat dry milk powder	蛋清 egg albumen
封闭效果 blocking effect	较好 better	最好 best	差 bad
成本 cost	高 high	低 low	低 low
贮存条件 store condition	苛刻(-20℃) very severe	即用即配 勿需贮存 none	较苛刻 (4℃, 短时间) severe

综上所述,我们认为,以脱脂奶粉作封闭剂的快速间接 ELISA 方法具有大大缩短检测时间、提高检测灵敏度、降低或消除酶标板“边缘效应”、降低测试成本等优点,在对虾病毒检测的实验室研究和生产实践上都有广泛的应用前景。

参 考 文 献

- 1 黄 健,等. 杆状病毒性的皮下及造血组织坏死 - 对虾暴发性流行病

的病原和病理学. 海洋水产研究, 1995, 16:1~10

- 2 Lightner D V, et al. Shrimp diseases and current diagnostic methods. Aquaculture, 1998, 164:201~220
- 3 于 佳,等. 对虾皮下及造血组织坏死杆状病毒单克隆抗体的研制. 海洋水产研究, 1995, 16:381~382
- 4 黄 健,等. 单克隆抗体酶联免疫技术检测对虾皮下及造血组织坏死病的病原及其传播途径. 海洋水产研究, 1995, 16:40~50
- 5 皮国华,等. 快速 ELISA 的建立和应用. 病毒学报, 1995, 11:381~382
- 6 Muthens RE, et al. A fast and efficient method for quantification of monoclonal antibodies in an ELISA using a novel incubation system. J Immunological Methods, 1990, 131:83~89
- 7 黄 健,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, 16:11~23
- 8 杜 平,等. 医用实验病毒学. 北京:人民军医出版社, 1985. 217~219

《海洋渔业》2000 年征订启事

《海洋渔业》是中国水产学会和中国水产科学研究院东海水产研究所主办的中级水产科技期刊。主要刊登海洋渔业管理、资源开发与利用、繁殖保护、捕捞技术、鱼虾贝藻类增殖、海洋环境保护、水产品加工利用、保鲜技术、渔业机械仪器等各类文章。

《海洋渔业》杂志为国内外公开发行,国内统一刊号:CN31-1341/S,国际标准刊号:ISSN1004-2490。2000 年为季刊,16 开 48 页,逢季末月 25 日出版。每期定价 4.50 元,全年 18.00 元。2000 年恢复邮局发行,邮发代号:4-630,全国各地邮局均可订阅;也可直接汇款到编辑部订阅。地址:上海市军工路 300 号,邮编:200090,联系人:邱卫华,电话:(021)65684690-95。