

双抗体夹心 ELISA 法检测养殖对虾病毒的研究

宋思扬 罗文新 沈明山 陈晋安 苏文金

(厦门大学生物学系 厦门 361005)

摘要 用纯化的长毛对虾球状病毒(PPSV)和日本对虾中肠腺坏死杆状病毒(BMNV)制备新西兰兔抗 BMNV 和抗 PPSV 抗血清及 Balb/c 小鼠抗 BMNV 和抗 PPSV 抗血清,建立检测 PPSV 和 BMNV 的双抗体夹心 ELISA 检测法,结果表明,双抗体夹心 ELISA 法具有较高的灵敏度,可以从 100 μ l 待测组织匀浆液中检测到 50ng 的 PPSV 蛋白,以及 100ng 的 BMNV 蛋白。不同病毒抗血清无交叉反应性,用该 ELISA 技术检测养殖对虾和多种采自养殖虾池及其附近的近海岸生物,发现相当比例的外观正常的对虾和近海岸生物已呈阳性反应,电镜观察结果证实了检测的特异性及可靠性。

关键词 双抗体夹心 ELISA, 对虾病毒, 检测, 养殖对虾, 近海岸生物

分类号 Q939.4

对虾病毒的检测对对虾病毒病的防治具有重要作用^[1], 现已有光学和电子显微镜组织病理学检测法^[2,3]、分子生物学方法(如 PCR 或分子探针)^[4,5]、免疫生物学方法^[6,9]等对虾病毒检测法,其中以免疫生物学法具有简单、灵敏、快速、费用低等特点,并有成熟的临床医学检验技术可供借鉴,因而受到极大的重视。目前,虽然可用免疫生物学方法检测某些对虾病毒^[6~11],但对我国南方主要养殖对虾(日本对虾和长毛对虾)病毒的检测仍未见报道。本文在我们过去工作基础^[12~14]上,建立了日本对虾和长毛对虾病毒的 ELISA 检测技术,并将其应用于养殖虾池及其附近的近海岸生物中养殖对虾病毒的检测。

1 材料和方法

1.1 病毒的纯化

日本对虾中肠腺坏死杆状病毒(Baculoviral midgut gland necrosis: BMNV)和长毛对虾球状病毒(PPSV)的纯化见前文^[13]。其中 BMNV 的鉴定另文发表,PPSV 的鉴定见前文^[14]。

1.2 待检活体标本

均采自厦门市同安县养殖虾池及周围海区,其中对虾体长 3~6cm,无病毒感染的健康

对虾均经电镜观察加以证实。

1.3 双抗体夹心 ELISA 法检测纯化病毒

按照文献^[15]制备新西兰兔抗 BMNV 和抗 PPSV 抗血清及 Balb/c 鼠抗 BMNV 和抗 PPSV 抗血清,经饱和硫酸铵沉淀法初步纯化。纯化病毒样品用常规双抗体 ELISA 法^[15]检测,包被兔抗病毒抗体,二抗为鼠抗病毒抗体,抗抗体为羊抗鼠 IgG-HRP,病毒稀释液分别为 PBST(PBS-Tween-20)或 1:10 无病毒肝胰匀浆液,以 1:10 无病毒肝胰匀浆液作为阴性对照,以 TMB 溶液作为 HRP 的显色底物,于 M-3550 型酶标读数仪(Bio-Rad)测 OD₄₅₀值,以 OD₆₅₅作为参考,重复三次,用 OD₄₅₀平均值计算 P/N 值, P/N 值 > 2.0 为阳性, P/N 值 < 2.0 为阴性^[5]。

1.4 双抗体 ELISA 法检测病毒之间的交叉反应

用两种抗 PPSV 抗体检测 1:10 稀释的 BMNV, 1:10 稀释的 PPSV 作为阳性对照。用两种抗 BMNV 抗体检测 1:10 稀释的 PPSV, 1:10 稀释的 BMNV 作为阳性对照。

厦门市重大课题招标项目资助

1997-03-24 收稿

1.5 双抗体夹心 ELISA 法检测外观正常对虾和近海岸生物组织

分别取待检生物的有关组织制成匀浆液，检测方法 & 结果判断同 1.3。

1.6 电子显微镜观察

取 ELISA 法检测为阳性及阴性的对虾或近海岸生物的肝胰组织，按前文方法制片和电镜观察^[14]。

2 结果

2.1 ELISA 法测定对虾病毒抗原的敏感性

用双抗体夹心 ELISA 法分别测定纯化的 PPSV 和 BMNV 蛋白抗原，结果表明，双抗体夹心 ELISA 法可以从 100μl PBST 溶液中检测到 25ng 的 PPSV 蛋白，以及 100ng 的 BMNV 蛋白。从 100μl 1:10 用无病毒肝胰匀浆稀释的病毒溶液中检测到 50ng 的 PPSV 蛋白，以及 100ng 的 BMNV 蛋白。

2.2 双抗体夹心 ELISA 法测定对虾病毒的特异性

用双抗体夹心 ELISA 法检测病毒之间的交叉反应，结果(表 1)表明，抗一种病毒的抗体不与另一种病毒产生交叉反应。即抗 PPSV 抗体不与 BMNV 发生特异性反应，抗 BMNV 抗体不与 PPSV 发生特异性反应。

表1 抗体抗病毒特异性测定

| 抗体种类 | OD ₄₅₀ | |
|---------|-------------------|-------|
| | PPSV | BMNV |
| 抗PPSV抗体 | 0.378 | 0.085 |
| 抗BMNV抗体 | 0.067 | 0.627 |

2.3 双抗体夹心 ELISA 法检测养殖对虾标本

养殖对虾的检测结果总结于表 2。长毛对虾肝胰组织在 PPSV 的检测中均为阳性，在 BMNV 检测中亦有部分呈轻微阳性，而肌肉组织则均为阴性。日本对虾肝胰组织在 BMNV 检测中大都呈阳性，在 PPSV 检测中亦大部分呈阳性，肌肉组织的检测结果均为阴性。由此推测，一种病毒可以感染不只一种对虾，只是在不同对虾中的感染程度不同。

取 ELISA 法检测为阳性而外观正常的长毛对虾和日本对虾肝胰组织切片进行电镜观察以验证 ELISA 检测结果，发现在一些长毛对虾肝胰细胞的细胞质中发现了很多成熟的球形病毒粒子(见图 1A)，直径为 80~100nm，与本课题组曾获得的电镜观察结果一致^[14]。在日本对虾肝胰组织中也发现大量的杆状病毒，感染严重者细胞核解体，细胞中充满成熟病毒粒子(图 1B)。

表2 养殖对虾标本中对虾病毒的ELISA检测结果

| 病毒种类 | 长毛对虾 | | 日本对虾 | |
|------|------|-----|------|-----|
| | 肝胰 | 肌肉 | 肝胰 | 肌肉 |
| PPSV | 5/5* | 0/2 | 6/6 | 0/1 |
| BMNV | 3/5 | 0/2 | 5/6 | 0/1 |

*分母表示被检标本数，分子表示阳性标本数

2.4 双抗体夹心 ELISA 法检测近海岸生物标本

对采自养殖虾池及其附近海域的 7 种生物进行了两种病毒抗原的检测，结果总结于表 3。根据病毒蛋白测定中的阳性阈值可推测，每一种生物都已可能不同程度地感染了对虾病毒，

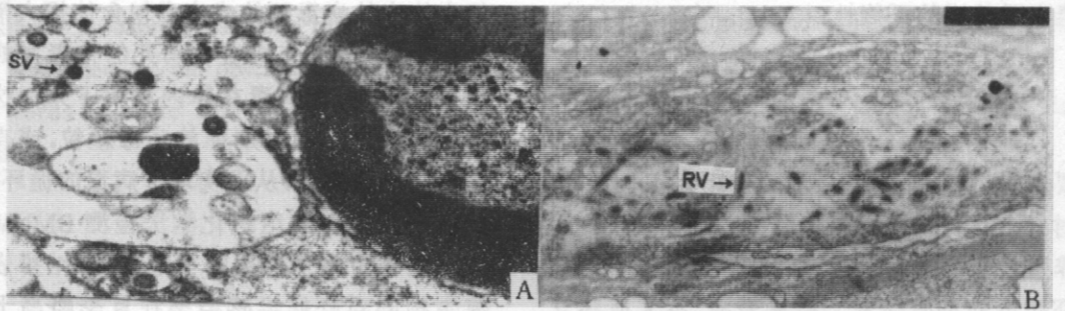


图1 ELISA检测阳性的长毛对虾(A)和日本对虾(B)肝胰细胞中病毒的电镜观察

A: 示细胞质中成熟的球状病毒(SV, ×29000); B: 示具有囊膜结构的杆状病毒(RV, ×14000)

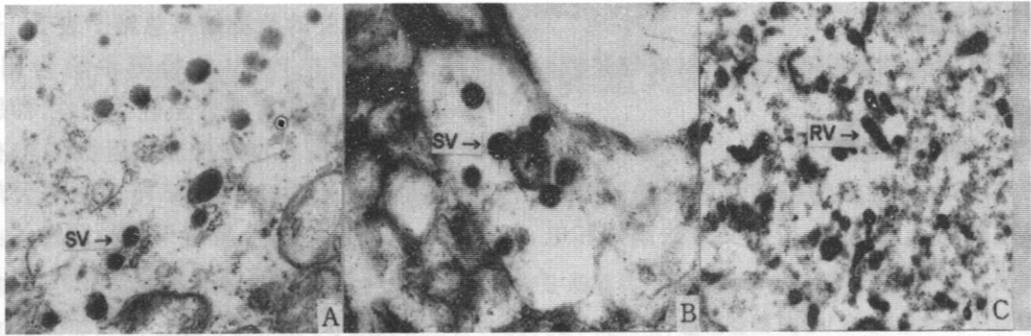


图2 ELISA阳性检测标本的电镜观察.

A.花蛤中的球状病毒样粒子 (SV, ×29000); B.珠带拟蟹宋螺中的球状病毒样粒子 (SV, ×29000) C.花蛤中
●成熟的杆状病毒样粒子 (RV, ×19000).

且不少个体同时受到长毛对虾球状病毒和日本对虾杆状病毒的感染,其中以黄口荔枝螺感染程度最高。

对花蛤和珠带拟蟹宋螺等的肝肠组织进行电镜观察,结果发现了大量的球状病毒(图2A、B)。在花蛤的少数病变细胞中亦发现有成熟的杆状病毒(图2C),在有的花蛤细胞中则还同时发现了球状病毒和杆状病毒样粒子。电镜检测结果证实了双抗体夹心ELISA在近海岸生物病毒检测中的可靠性,进一步暗示了两种

测阳性的养殖对虾标本,也发现了相应病毒的存在,说明双抗体夹心ELISA检测法的可靠性。与光学显微镜组织病理学检测法相比,该法敏感性高,特异性更强,即使病毒不形成包含体也可检出。从操作角度看,ELISA检测仪器要求不高,操作简单,所需时间少,费用低,一般实验室均可应用。

在前文工作中,我们证实了在实验室条件下,BMNV可通过食物进行水平传播^[12]。本工作进一步证实了BMNV和PPSV均可通过水平途径进行传播,而那些生活在同一个环境中的生物则无形中充当了中间宿主的作用。病虾通过排泄作用把病毒排入周围水体环境,或水中病虾的遗骸,很容易使水体被病毒粒子所污染。我们检测的近海岸生物以软体动物为主,而软体动物摄食的一大特点是通过滤水,腹足纲的生物还可能刨食水生动植物的遗骸,这就可能把水体中的病毒颗粒或病毒包含体摄入消化系统,也可能通过直接摄食病死的带毒对虾遗骸而摄入病毒,使病毒在体内滞留下来。这些动物或通过适当的时期释放病毒颗粒,或直接被健康对虾所摄食,从而实现了病毒的循环感染。我们还用免疫酶组织化学法检测BMNV在近海岸生物中水平传播的季节变化,结果表明多数生物的对虾病毒感染率在夏季略高于冬季(结果另文发表)。由于混养模式是目前对虾养殖的主要模式之一,因此在选择混养品种时,就

表3 近海岸生物标本中对虾病毒的ELISA检测结果*

| 病毒种类 | 生物种类* | | | | | | |
|------|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Vv | Ss | Tl | Ts | Ny | Nm | Lcg |
| PPSV | 3/4** | 3/3 | 3/3 | 2/3 | 2/3 | 2/2 | 3/3 |
| BMNV | 4/4 | 3/3 | 3/3 | 2/3 | 1/3 | 2/2 | 1/3 |

*: Vv:花蛤; Ss:牡蛎; Tl:黄口荔枝螺; Ts:珠带拟蟹宋螺; Ny:齿纹延螺; Nm:斑玉螺; Lcg:粒花冠小月螺; +: 阳性; -: 阴性 **: 同表2

病毒水平传播的可能性。

3 讨 论

在我们过去工作基础上,建立了我国南方主要养殖对虾种类——日本对虾BMNV和长毛对虾PPSV的ELISA检测技术,并将其应用于养殖虾池及其附近海域近海岸生物携带养殖对虾病毒的调查研究。结果表明,本文所建立的双抗体夹心ELISA法具有较高的灵敏度,不同抗血清之间也无交叉反应性。用电镜观察检

必须考虑其有无携带对虾病毒的可能性。

参 考 文 献

- [1] 蔡心一、苏永全, 现代渔业信息, 1993, 8(9): 11~18.
- [2] Lightner D V, Redman R M, Moore D W *et al.* Aquaculture, 1993, 116: 15~23.
- [3] Chantanachookin U, Boonyaratpalin S, Kasornchandra J *et al.* Dis Aquat Org, 1993, 17: 145~157.
- [4] Wang S Y, Hong C, Lotz J M. Dis Aquat Org, 1996, 25: 123~131.
- [5] Mari J, Lightner D V, Poulos B T *et al.* Dis Aquat Org, 1995, 22: 129~134.
- [6] Lewis D H. J Fish Dis, 1986, 9: 519~522.
- [7] 陈秀男, 张朴性, 养虾全集. 台湾: 养鱼世界出版社, 1989, 73.
- [8] Poulos B T, Lightner D V, Trumper B *et al.* J Aquat Anim Health, 1994, 6: 149~154.
- [9] Lu Y, Tapay L M, Loh P C. J Fish Dis., 1996, 19: 9~13.
- [10] Sun X, Wang W, Shao J *et al.* Chin J Oceanol Limol, 1993, 11: 245~248.
- [11] 黄捷, 于佳, 宋晓玲等. 海洋水产研究, 1995, 16: 89~96.
- [12] 宋思扬, 张驰, 沈明山等. 厦门大学学报(自然科学版), 1994, 33: 696~700.
- [13] 张驰, 陈晋安, 孙昌博等. 微生物学通报, 1995, 22: 328~331.
- [14] 陈晋安, 张驰, 许宏毅等. 厦门大学学报(自然科学版), 1996, 35: 645~647.
- [15] Voller A, Bidwell D E, Bartlett A(ed). The enzyme linked immunosorbent assay(ELISA), a guide with abstract of microplate applications, London: The Authors, 1979.

THE DETECTION OF THE VIRUSES IN CULTURED PENAEID SHRIMPS BY DOUBLE ANTIBODY SANDWICH ELISA

Song Siyang Luo Wenxin Shen Mingshan Chen Jinan Su Wenjin

(Department of Biology, Xiamen University, Xiamen 361005)

Abstract The antisera against *P. penicillatus* spheroid-virus(PPSV) and baculoviral midgut gland necrosis virus (BMNV) have been obtained from rabbits and mice by immunizing the animals respectively with purified viruses and a double antibody sandwich ELISA procedure has been established to detect PPSV and BMNV from cultured shrimp and from beachy animals surrounding the culture farms. The results showed that the double antibody sandwich ELISA was high sensitive and 50ng protein of PPSV and 100ng protein of BMNV could be detected from 100 μ l of hepatopancreatic homogenate. Viral detection in the cultured *P. penicillatus* and *P. japonicus* and beachy animals indicated that a high rate of the cultured shrimp and beachy animals with normal appearance probably have been infected by viruses. The high specificity and reliability of the detection were confirmed by the observations of TEM.

Key words Double antibody sandwich ELISA, Penaeid virus, Detection, Cultured shrimp, Beachy animals