

基于 IgY 的 ELISA 定量检测甲鱼系统性败血症球状病毒

夏小磊, 李登峰*, 彭 姣, 周永强, 郭安南, 刘联国, 陈 炯

(宁波大学 海洋学院, 浙江 宁波 315211)

摘要: 为了对甲鱼系统性败血症球状病毒(STSSSV)进行快速检测, 以抗 STSSSV 卵黄抗体(egg yolk immunoglobulin, IgY)为一抗, 以羊抗鸡 IgG(HRP-IgG)为二抗, 建立 STSSSV 检测的间接酶联免疫吸附(ELISA)与血凝抑制(HI)实验, 对两者进行了比较. 运用 ELISA 对感染病毒甲鱼的血清、肝脏、粪便、及饲养环境水样进行了 STSSSV 检测. 用 ELISA 分析了病毒稀释倍数及其 2 的对数值与 OD_{492nm} 值间的线性关系, 建立 STSSSV 的 ELISA 定量检测方法. 结果显示: ELISA 较 HI 更灵敏, 其对 STSSSV 的检测灵敏度为 3.98 ng·mL⁻¹, 能够在携带该病毒尚未显症的隐性感染的甲鱼血清和甲鱼粪便与养殖水中检测出 STSSSV. ELISA 对其他水产病毒无交叉反应, 特异性强. ELISA 定量检测限度范围为 0.031~4 μg·mL⁻¹. 本研究建立的间接 ELISA 方法为 STSSSV 的定性、定量提供了准确有效的检测手段.

关键词: 甲鱼系统性败血症球状病毒; 卵黄抗体; 酶联免疫吸附实验; 检测

中图分类号: S917.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2016) 04-0013-07

甲鱼系统性败血症(Turtle Systemic Sepsis, TSS)是近年来新出现的暴发性死亡病, 该病发病快, 传染性强, 致死率高, 发病频繁, 给甲鱼养殖造成了重大经济损失. 造成甲鱼系统系败血症的直接原因是一种球状病毒感染, 本实验室研究发现, 其形态、大小、核酸类型、致病情况均与以往报道的甲鱼病毒不同, 是一种新型甲鱼致病病毒, 将其命名为甲鱼系统性败血症球状病毒(Soft-shelled Turtle Systemic Septicemia Spherical Virus, STSSSV)^[1-3]. 如何快速、及时、准确地检测 STSSSV 成了迫切需要解决的问题.

酶联免疫试验(ELISA)灵敏度高、特异性好, 广泛运用于各种病原如草鱼呼肠孤病毒(GCRV)、链球菌、牙鲈淋巴囊肿病毒等的检测^[4-6]. 卵黄抗体(egg yolk immunoglobulin, IgY)作为检测抗体, 拥有较常规 IgG 抗体无可比拟的生物化学和免疫学方面的优势^[7]. 主要表现在与抗原反应的活性好, 检测灵敏度高^[8-9]; 同一家族抗原无交叉反应, 特异性高, 染色背景低^[10-11]; IgY 不激活补体, 不与

IgG 的 Fc 受体、类风湿因子(rheumatoid factor, RA)及葡萄球菌表面 A 蛋白结合^[12-13]. IgY 有较强的耐热、耐酸、抗离子强度和一定的抗酶降解能力^[12], 稳定性好; 用 IgY 作为检测试剂, 在免疫学检测中干扰小, 可避免上述因素所造成的假阳性或假阴性结果; 同时, IgY 制备简单, 无需取血等操作, 不对动物造成伤害, 而且通过免疫母鸡后获取的 IgY 的量远大于从免疫哺乳动物血清中获得的抗体的量, 使得以 IgY 为基础的检测试剂非常便于规模化生产和市场化^[14-15].

本研究以抗 STSSSV 的 IgY 作为一抗, 建立了对 STSSSV 的 ELISA 检测方法, 进行检测条件的优化, 对该方法的灵敏度、特异性进行了检验. 以此为基础, 建立了 STSSSV 的定量方法.

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

HRP-羊抗鸡 IgG(北京博奥森生物公司); 牛血清白蛋白(BSA, 上海生物工程有限公司); Solarbio

收稿日期: 2015-03-15.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://journalg.nbu.edu.cn/>

基金项目: 浙江省公益性技术应用研究计划项目(2011C32004); 宁波市农业攻关项目(2011C10004); 宁波大学王宽诚幸福基金.

第一作者: 夏小磊(1988-), 男, 安徽合肥人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 水产动物病害防治. E-mail: xi Xiaolei2010@126.com

*通信作者: 李登峰(1975-), 女, 湖南双峰人, 副教授, 主要研究方向: 水产动物病害防治. E-mail: lidengfeng@nbu.edu.cn

实验专用脱脂牛奶(北京索来宝科技有限公司); 普通市购脱脂奶粉(内蒙古伊利实业集团股份有限公司); 明胶、弗氏佐剂(Sigma, USA).

健康甲鱼购自宁波市天地甲鱼养殖场; 母鸡和鸡胚购自余姚市神农绿色农业有限公司; STSSSV 人工感染的甲鱼通过肌注病毒悬液获得; IgY 由实验室自制^[1], 效价为 1:64 000; STSSSV 病毒悬液由实验室自制^[1], 质量浓度为 $3.98 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$.

1.2 ELISA 方法的建立及其条件优化

运用方阵滴定法确定最适抗原包被浓度和一抗稀释度. 对质量浓度为 $3.98 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的病毒悬液及效价为 1:64 000 的一抗(抗 STSSSV 的 IgY)进行不同的稀释处理, 进行间接 ELISA 试验. 具体方法: 将病毒悬液用 CBS($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 为 9.6)的碳酸盐缓冲液(每 1 000 mL 含 Na_2CO_3 1.59 g, NaHCO_3 2.93 g, pH 9.6)按照 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 和 10^{-5} 倍稀释, 每个稀释度以每孔 $100 \mu\text{L}$ 包被, 设 CBS 包被的空白对照; 4°C 过夜后, 用 PBST(每 1 000 mL 含 NaCl 8 g, KCl 0.2 g, Na_2HPO_4 1.44 g, KH_2PO_4 0.24 g, Tween-20 10 mL, pH 7.4)洗涤 3 次; 加入 PBST 配置的 5% 脱脂牛奶, 37°C 封闭 1 h; PBST 洗涤 3 次; 抗 STSSSV IgY 和阴性对照 IgY 按照 1:200、1:500、1:1 000、1:2 000、1:4 000、1:8 000 的稀释倍数用封闭液进行稀释, 每个稀释度对应不同病毒浓度, 每孔 $100 \mu\text{L}$, 37°C 恒温箱孵育 1 h; PBST 洗板 3 次; 每孔加入 $100 \mu\text{L}$ 用封闭液按 1:10 000 比例稀释的 HRP 标记的羊抗鸡 IgG, 37°C 温育 1 h, 温育结束后 PBST 洗板 5 次, 蒸馏水洗涤 3 次; 每孔加入新配置好的 OPD 底物溶液(每 100 mL 含柠檬酸 0.73 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.186 g, 邻苯二胺 0.04 g, 30% H_2O_2 150 μL)100 μL , 37°C 暗处显色 15 min, 然后每孔加 $50 \mu\text{L}$ $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2SO_4 终止反应; 在酶标仪上读取各孔 492 nm 波长处的 OD 值. 重复上述试验 8 次, 取平均 OD 值, 比较测定孔 $\text{OD}_{492\text{nm}}(\text{P})$ /阴性对照孔 $\text{OD}_{492\text{nm}}(\text{N})$ 的值, 以 P/N 值 > 2.1 倍及以上者判定为阳性, P/N 值 < 2.1 则为阴性^[16], 以 P/N 值最大为首要原则^[17-18], 选择最佳的包被浓度和一抗稀释度.

以此为基础, 在 P/N 值最大的条件下, 依据节约实验时间和成本的原则, 进一步优化其他条件. 设立 6 种包被方法: 37°C 温育 1 h 后 4°C 过夜、 4°C 过夜、 37°C 温育 2 h、 37°C 温育 1 h、 37°C 温育

30 min 或 37°C 温育 15 min, 进行 ELISA, 依据结果确立最佳包被条件; 分别选用 4 种封闭液即 PBST 配制的 1%BSA、1%明胶、5%实验室用索来宝脱脂牛奶及 5%普通市购伊利脱脂牛奶, 进行 ELISA, 依据结果选择最佳封闭液; 分别设立 2 h、1 h、30 min、15 min 的一抗孵育时间, 进行 ELISA, 确定最佳一抗工作时间; 分别设立 3、5、10、15、30 min 的显色时间, 进行 ELISA, 最终确定最佳显色时间.

1.3 灵敏度检测

将已测定浓度的病毒悬液($3.98 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 pH 为 9.6 的碳酸盐缓冲液(CBS)梯度稀释成 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 倍, 每个稀释度设置 2 个平行孔和 2 个阴性对照孔共 4 孔, 采用 1.2 节优化的条件进行间接 ELISA 检测. 重复 10 次, 取平均 OD 值计算 P/N 值, 确定阳性反应的最低抗原浓度为 ELISA 的检测灵敏度.

1.4 特异性检测

为验证所建立的间接 ELISA 的特异性, 以 10^{-3} 倍稀释的, 浓度为 $3.98 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 STSSSV 悬液为阳性对照, 以水产养殖中常见的对虾白斑综合症病毒(WSSV)、三疣梭子蟹呼肠孤病毒(SCRV)、传染性肾脾坏死病毒(ISKNV)、草鱼呼肠孤病毒(GCRV)和健康甲鱼为样品, 按照 1.2 节优化的条件进行间接 ELISA, 重复检测 6 次. 样品的具体处理方法为: 将携带各病毒的组织样及健康甲鱼组织样, 按照质量体积 1:10 的比例加入 CBS, 彻底匀浆, 之后在 4°C 条件下, $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清作为检测样品.

1.5 血凝抑制试验及其与 ELISA 的比较

血凝抑制试验: 在血凝板中每孔加入 $50 \mu\text{L}$ 生理盐水, 之后每孔加入 $50 \mu\text{L}$ 用生理盐水 1:1 000 倍稀释的抗 STSSSV IgY, 再加入待检样品及空白对照样品, 每个样品加 2 孔, 每孔 $50 \mu\text{L}$; 再每孔加入生理盐水配制的 1%鸡红细胞悬液 $50 \mu\text{L}$, 轻轻振荡均匀, 后放于室温或 37°C 中静置 30 min, 肉眼判定结果. 分别用 ELISA 与血凝抑制试验对 20 份样品进行检测, 比较两者的阳性检出率和符合率.

1.6 定性 ELISA 的临床应用

取患病甲鱼组织, 按 1.4 节中样品处理方法处理后, 取上清作为待检样品; 取甲鱼血清, 用 PBS

100 倍稀释, 作为待检样品; 取感染的甲鱼粪便, 按 1.4 节中的样品处理方法处理后, 取上清作为待检样品; 取甲鱼养殖环境水样直接作为待检样品; 以 10^{-3} 倍稀释即浓度为 $3.98 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 STSSSV 病毒粒子重悬液作为阳性样品, 以相应的健康甲鱼组织、血清、粪便和养殖水样作为阴性对照, 按照 1.2 节优化的条件进行间接 ELISA 检测。

为了确定 ELISA 是否可以用于感染早期的检测, 用 STSSSV 悬液注射一批健康甲鱼, 分别于注射后 24, 48, 72 以及 96 h 随机取样, 采集甲鱼的血清、粪便、养殖水样, 运用间接 ELISA 检测。

1.7 STSSSV 的定量检测方法的建立

1.7.1 标准品的制备

将病毒悬液用 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 pH 为 9.6 的碳酸盐缓冲液(CBS)稀释成 $2^{-8}, 2^{-7}, 2^{-6}, 2^{-5}, 2^{-4}, 2^{-3}, 2^{-2}, 2^{-1}$, $1, 2, 2^2, 2^3, 2^4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 作为标准品。

1.7.2 标准曲线的绘制

按照 1.2 节优化的条件, 对标准品进行 ELISA 检测。计算 $\text{OD}_{492\text{nm}}$ 平均值和标准差, 以及变异系数。以变异系数小于 5% 为标准, 选择合适区间, 以 $\text{OD}_{492\text{nm}}$ 值为横坐标, 标准品浓度和浓度对数值为纵坐标, 建立 $\text{OD}_{492\text{nm}}$ 值—浓度和浓度对数曲线, 直线回归法确定线性方程和线性范围, 绘制 ELISA 定量的标准曲线。

1.7.3 定量 ELISA 的临床应用

取患病濒死甲鱼和感染 STSSSV 后未显症甲鱼血清, 进行 100 倍稀释后作为待检血清样品; 取患病濒死甲鱼肝脏组织, 参照 1.4 节方法处理, 其中组织与 CBS 的质量体积比为 1:100, 取上清作为待检肝脏样品; 取患病濒死甲鱼粪便样品, 按 1.4 节中的处理方法处理后, 取上清作为待检粪便样品; 取患病甲鱼养殖水样, 运用 1.7.1 节所建立的定量方法, 对这些样品的病毒载量进行测定。

2 结果

2.1 定性 ELISA 方法的建立及条件优化

图 1 显示的是不同抗原和抗体情况下, 测定孔 $\text{OD}_{492\text{nm}}$ (P) 和阴性对照孔 $\text{OD}_{492\text{nm}}$ (N) 比值曲线。其中, 一抗稀释度在 1:200、1:500 和 1:1 000 时, OD 值较其他曲线高。在这 3 条曲线中, 当抗原稀释度为 10^{-3} , 即抗原浓度为 $3.98 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, P/N 达最高

值。抗原稀释度增加或减少时, P/N 值降低。由此确定抗原最佳包被浓度为 $3.98 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 亦即每孔包被抗原 $0.398 \mu\text{g}$ 。由于一抗稀释度在 1:200、1:500 和 1:1 000 时, P/N 值变化规律较一致, 以节约生物材料原则, 确定一抗的最佳稀释浓度应为 1:1 000。

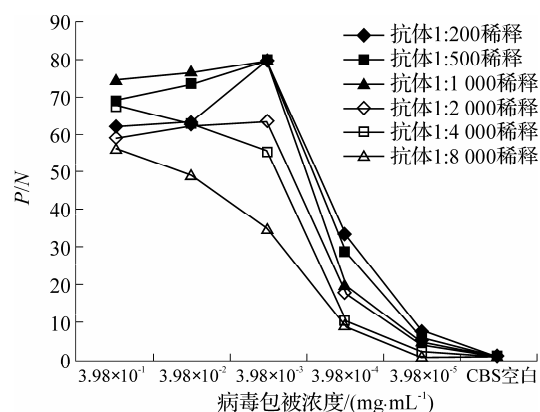


图1 不同抗原和抗体下 P/N 值曲线

其他反应条件的最终优化结果为: 抗原在 4°C 包被过夜, 封闭液为 5% Solarbio 实验专用脱脂牛奶, 37°C 下一抗工作 1 h, 显色时间 10 min。

2.2 ELISA 的灵敏度测定

在病毒悬液稀释到 10^{-6} 倍时检测结果仍为阳性, 继续稀释后检测结果为阴性, 阳性反应的最低抗原浓度为 $3.98 \times 10^{-6} \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。所以该方法的灵敏度约为 $3.98 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.3 ELISA 的特异性检测

特异性检测显示, 水产养殖中常见的 WSSV、ISKNV、GCRV、CRV 检测结果为阴性, 表明所建立的间接 ELISA 检测方法对这几种病毒均无交叉反应; 正常甲鱼组织的检测结果呈阴性, 表明抗 STSSSV IgY 不与甲鱼组织蛋白发生交互作用。实验结果证明该检测方法具有良好的特异性。

2.4 ELISA 与血凝抑制试验(HI)的比较

对实验室采集保存的 20 份样品的检测试验结果显示(表 1), 间接 ELISA 与 HI 均能检测到患病甲鱼和感染早期尚未显证的甲鱼组织和血清中的 STSSSV。间接 ELISA 检测与 HI 的符合率为 95%, ELISA 阳性检出率要高于 HI, 主要区别是 ELISA 能够检测出感染甲鱼生活水样(EW4)中的 STSSSV, 而 HI 不可以。

2.5 定性 ELISA 的临床应用

对各个组织样、粪便样品、水样的检测结果见

表1 间接 ELISA 方法与 HI 检测的符合率

样品	ELISA(+/-)	HI(+/-)
DS1	+	+
DS2	+	+
DS3	+	+
DS4	+	+
IPS1	+	+
IPS2	+	+
IPS3	+	+
IPS4	+	+
HS1	-	-
HS2	-	-
HS3	-	-
HS4	-	-
DM1	+	+
DM2	+	+
HM1	-	-
HM2	-	-
EW1	-	-
EW2	-	-
EW3	-	-
EW4	+	-

注: 间接 ELISA 方法的阳性检出率为 55%; HI 检测方法的阳性检出率为 50%; 间接 ELISA 方法与 HI 检测方法的符合率为 95%。表中 DS1~DS4 为患病濒死甲鱼血清样, IPS1~IPS4 为感染 STSSSV 未显症甲鱼血清样, HS1~HS4 为健康甲鱼血清样, DM1、DM2 为患病濒死甲鱼肌肉组织样, HM1、HM2 为健康甲鱼肌肉组织样, EW1~EW3 为感染 STSSSV 后无显症甲鱼的饲养环境水样, EW4 为已显症甲鱼的饲养环境水样; + 为阳性, - 为阴性, 下表同。

表2. 由表2可见, STSSSV 感染的不同检测样品均呈现阳性, 表明 ELISA 方法能很好地从这些样品中检测出病毒。

对甲鱼感染后未显症的 24 h, 48 h, 72 h 以及在已有甲鱼显症的第 96 h 的血清、粪便及养殖环境水样进行检测的结果表明(表3): 感染后 4 个时段所取的血清样品检测结果均为阳性, 而粪便及水样只在已有甲鱼患病的第 96 h 所取样品检测出阳性结果, 其他均为阴性。

2.6 定量 ELISA 的建立

2.6.1 标准曲线的绘制

用 STSSSV 病毒悬液制备的 $2^{-8} \sim 2^4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 共 13 个梯度标准品, 进行 ELISA 实验, 试验重复 6

表2 ELISA 方法的样品检测范围

项目	空白	病毒稀释液	正常甲鱼组织	患病甲鱼组织
<i>P</i>	0.064	3.298	0.063	2.131
<i>N</i>	0.058	0.043	0.049	0.064
<i>P/N</i>	1.03	76.70	1.29	33.30
+/-	-	+	-	+
项目	养殖水样	感染鸡胚组织	患病甲鱼粪便	患病甲鱼血清
<i>P</i>	0.126	2.462	1.637	3.096
<i>N</i>	0.048	0.063	0.059	0.048
<i>P/N</i>	2.625	39.08	27.75	64.50
+/-	+	+	+	+

注: 表中的 $\text{OD}_{492\text{nm}}$ 值均为 4 次重复的平均值; 一抗稀释度为 1: 1 000; *P* 为实验组 $\text{OD}_{492\text{nm}}$ 值; *N* 为阴性对照 $\text{OD}_{492\text{nm}}$ 值。

表3 间接 ELISA 方法的临床检测

感染后 时数/h	血清样品 (+/-)	粪便样品 (+/-)	养殖水样 (+/-)
24	+	-	-
48	+	-	-
72	+	-	-
96 ¹⁾	+	+	+

注: 1) 在感染后的第 96 h 池内已有甲鱼显症。

次, 计算 $\text{OD}_{492\text{nm}}$ 平均值和标准差以及变异系数。

阴性对照孔符合 $\text{OD}_{492\text{nm}}$ 小于 0.1 的要求, 当病毒浓度为 2^{-6} 、 2^{-7} 和 $2^{-8} \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, $\text{OD}_{492\text{nm}}$ 的变异系数均大 5%, 不符合标准曲线要求。因此选择 $2^{-5} \sim 2^4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 间共 10 个梯度浓度建立 $\text{OD}_{492\text{nm}}$ 值—病毒浓度曲线和 $\text{OD}_{492\text{nm}}$ 值—病毒浓度对数曲线, 分别在病毒浓度 $2^{-5} \sim 2^{-1} \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $2^{-1} \sim 2^2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的区间找到 2 个回归方程(图2)。如图所示, 区间重叠部分选择趋势线拟合程度高的方程, 建立的标准曲线分为两部分:

$$y = 0.558x - 0.076, \quad (1)$$

式中, x 表示 ELISA- $\text{OD}_{492\text{nm}}$ 值, $0.266 \leq x \leq 1.037$; y 即病毒浓度 C_{virus} , 相关系数 $R_1^2 = 0.9968$ (图 2(a))。

$$y = 1.5497x - 2.7207, \quad (2)$$

式中, x 表示 ELISA- $\text{OD}_{492\text{nm}}$ 值; y 表示病毒浓度的对数值; 相关系数 $R_2^2 = 0.9907$ (图 2(b))。

病毒浓度公式如下:

$$C_{\text{virus}} = 2(1.5489x - 2.7161),$$

式中, x 表示 ELISA- $\text{OD}_{492\text{nm}}$ 值, $1.037 < x \leq 3.019$ 。

病毒浓度的定量检测范围为 $0.031 \sim 4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,

最低检出限为 $0.031\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

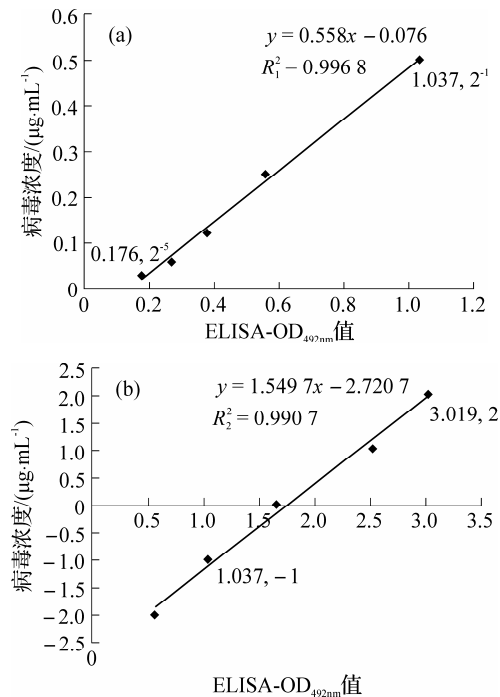


图 2 STSSSV 定量检测的标准曲线

2.6.2 ELISA 定量检测样品中的 STSSSV

运用所建立的定量方法对所取样品进行病毒载量的测定, 表 4 结果显示, 在患病濒死甲鱼的血清病毒量最高, 其次为肝脏, 粪便中的病毒含量最低. 濒死甲鱼血清中的 STSSSV 最高达 $2.739\times 10^2\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. 感染 24 h 的甲鱼虽然尚未显症, 血清中病毒载量已达 $1.100\times 10^2\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

表 4 样品中 STSSSV 的定量检测

样品 ID 值	OD _{492nm} 值	病毒浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
DS1	2.692	2.739
DS2	2.379	1.957
DS3	2.373	1.944
DS5	2.210	1.632
IPS1	1.845	1.100
IPS4	2.039	1.359
DL1	1.025	0.496
DL2	0.940	0.449
DF4	1.707	0.949
DF5	1.637	0.880

注: 表中 DS1~DS3、DS5 为患病濒死甲鱼血清的 100 倍稀释样品, IPS1、IPS4 分别为感染后 24 h、96 h 未显症甲鱼血清的 100 倍稀释样品; DL1 和 DL2 为患病濒死甲鱼肝脏组织和缓冲液的 1: 100 匀浆上清液; DF4 和 DF5 为患病濒死甲鱼粪便和缓冲液的 1:10 匀浆上清液.

3 讨论

在疾病的检测、诊断方面, IgY 因免疫学特性独特, 具有高特异性和灵敏度, 是近年来新兴的研究领域, 已被广泛运用于志贺毒素、雪卡霉素、碱性磷酸酶等检测中^[15,19-20], 亦被应用于多种病毒定性检测, 如甲肝病毒^[21]、乙肝病毒^[22]、轮状病毒、诺如病毒^[23]和鸭坦布苏病毒^[24]. 本研究, 首次利用 IgY 对病毒进行定量检测.

此外, 在水产动物病害中关于 IgY 的研究更多运用于免疫保护和疾病治疗方面, 对病原检测的研究尚未见报道. 本研究首次运用 IgY 作为第一抗体, 建立了间接 ELISA 检测 STSSSV 的方法, 结果表明其性能优异.

在 ELISA 测定步骤中, 任何影响抗原抗体反应和显色的因素都会影响测定结果的准确性和可重复性^[25], 通常要求阴性对照的 OD 值小于 0.1^[26]. 本研究对抗原包被时间、封闭液种类、抗原抗体稀释倍数、抗体反应时间和显色时间这些主要条件都进行了优化, 取得了较好的效果, 完全符合标准, 并且多次重复的测定结果稳定可靠.

在病毒特异性实验中, 本研究选择了几种常见水产病毒作为检测对象, 实验结果显示所建立的检测方法对其均没有交叉反应, 特异性高. 与宿主蛋白作用的吸光值接近于阴性对照, 其远低于病毒结合作用的吸光值, 说明抗 STSSSV IgY 不会与甲鱼组织蛋白发生交互作用.

本研究测定灵敏度结果很高, 为 $3.98\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$. 临床检测实验中对携带该病毒尚未显症的隐性感染甲鱼均出现阳性结果. 隐性感染是养殖的“地雷”, 容易被忽略而造成大规模交叉感染, 造成无可挽回的巨大损失. 本研究成果可以作为亲鳖选种、稚鳖购买流通、养殖过程中的病原监测手段, 为杜绝、预防疾病的传播、爆发提供有力的工具.

ELISA 测定的标本十分广泛, 体液、分泌物和排泄物均可作为测定对象. 实验中分别用 STSSSV 阳性的组织、粪便、血清和环境水样进行实验, 结果表明其能很好地从各种病料组织中检测出病毒. 临床应用结果显示: 血清中能够较早地检测出病毒, 而粪便与水样需甲鱼显症时才能检测到阳性结果. 表明在利用该方法进行常规病原监测时, 应

该取甲鱼血清作为检测样品. 而对于发病甲鱼病原的诊断, 则只需取粪便或水样作为样品, 这使得采样过程更加简捷. 而且, 本研究结果直接表明了 STSSSV 不仅仅通过甲鱼间相互撕咬传播, 粪便和水体都是重要的传播途径, 这也为 STSSSV 的预防工作提供了理论基础.

血凝抑制试验(HI)是一种临床上常用的病毒检测手段, 在章雪明等^[27]对禽流感病毒的研究以及贾杏林等^[28]对猪乙型脑炎的研究中, 均将其与 ELISA 检测方法做比较, 认为 ELISA 和 HI 具有较强相关性, ELISA 比 HI 更灵敏. 在本研究中, 2 种检测方法检测样本的符合率为 95%, 区别主要在于 ELISA 能够检测出感染甲鱼养殖水样中的 STSSSV, 而 HI 则不能, 进一步验证了 ELISA 的优越性.

在建立 ELISA 定量方法时, 数据稳定的情况下选取了 2 个方程建立的标准曲线, 实现了标准曲线的高拟合程度, 使得定量数据更加准确, 同时也大大拓宽了其定量范围. 其检测范围为 $0.031\sim 4\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 区间很广, 实验中初步应用于阳性肝脏组织、血清、粪便的定量. 甲鱼血清在感染后 24 h 即有很高的病毒载量, 说明该方法用于 STSSSV 早期监测的可靠性很高. 本研究成果为 STSSSV 的诊断、抗原生物学特性及致病机制研究等奠定了基础.

参考文献:

- [1] 李登峰, 周永强, 刘联国, 等. 抗甲鱼系统性败血症球状病毒的卵黄抗体及其制备方法和应用: 中国, CN 103073640[P]. 2015-07-15.
- [2] 李登峰, 周永强, 刘联国, 等. 甲鱼系统性败血症球状病毒的鸡胚培养方法: 中国, CN102628031[P]. 2013-10-02.
- [3] 李登峰, 周永强, 刘联国, 等. 一种甲鱼系统性败血症球状病毒灭活疫苗及其制备方法: 中国, CN102626514[P]. 2013-10-02.
- [4] HONG L J, LI F Z, ZHEN Z F, et al. Detection of grass carp reovirus (GCRV) with monoclonal antibodies[J]. Archives of Virology, 2014, 159(4):649-655.
- [5] NISHIKI I, MINAMI T, ITAMI T, et al. Cloning and expression of a surface immunogenic protein in *Streptococcus dysgalactiae* isolated from fish and its application in enzyme-linked immunosorbent assays to diagnose *S. dysgalactiae* infections in fish[J]. Journal of Fish Diseases, 2014, 37(12):1031-1039.
- [6] 程顺峰. 牙鲆淋巴囊肿病毒双抗体夹心 ELISA 检测方法的建立[J]. 水产科学, 2009, 28(7):374-377.
- [7] 陈连颐. 卵黄抗体的特性、应用及开发前景[J]. 中国禽业导刊, 2007, 24(21):36-37.
- [8] CARLANDER D, STALBERG J, LARSSON A. Chicken antibodies: a clinical chemistry perspective[J]. Upsala Journal of Medical Sciences, 1999, 104(3):179-189.
- [9] DILONARDO A D, MARCANTE M L, POGGIALI F, et al. Egg yolk antibodies against the E7 oncogenic protein of human papillomavirus type 16[J]. Archives of Virology, 2001, 146(1):117-125.
- [10] CIPOLLA A, CORDEVIOLA J, TERZOLO H, et al. Campylobacter fetus diagnosis: Direct immunofluorescence comparing chicken IgY and rabbit IgG conjugates [J]. Alternatives to Animal Experimentation, 2001, 18(3): 165-170.
- [11] WU C, YANG R, ZHOU J, et al. Production and characterisation of a novel chicken IgY antibody raised against C-terminal peptide from human thymidine kinase[J]. Journal of Immunological Methods, 2003, 277(1):157-169.
- [12] SCHADE R, CALZADO E G, SARMIENTO R, et al. Chicken egg yolk antibodies(IgY-technology): A review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine[J]. Alternatives to Laboratory Animals, 2005, 33(2):129-154.
- [13] 尤昕, 时娜, 赵秀文, 等. 心肌特异表达基因 p93 的原核表达及鸡卵黄抗体的制备[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28(10):1060-1063.
- [14] DAI Y C, WANG Y Y, ZHANG X F, et al. Evaluation of anti-norovirus IgY from egg yolk of chickens immunized with norovirus P particles[J]. Journal of Virological Methods, 2012, 186(1):126-131.
- [15] PARMA Y R, CHACANA P A, LUCCHESI P M, et al. Detection of Shiga toxin-producing Escherichia coli by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay using chicken egg yolk IgY antibodies[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2012, 84(2):1-8.
- [16] 张晓华, ROBERTSON P, AUSTIN B, 等. 检测海洋弧菌的酶联免疫吸附实验研究[J]. 青岛海洋大学学报, 1997, 27(3):326-331.
- [17] 柴顺秀, 马花, 韩英, 等. 牛病毒性腹泻病毒重组 E2 蛋白 PPA-ELISA 方法的建立及临床应用[J]. 动物医学进展, 2013, 34(6):106-110.
- [18] 吴晓春, 邓灯, 程顺峰, 等. 鱼肠道弧菌间接 ELISA 快速检测法的建立[J]. 水产科学, 2013, 32(5):284-288.
- [19] CHEN C C, TAI Y C, SHEN S C, et al. Detection of alkaline phosphatase by competitive indirect ELISA using

- immunoglobulin in yolk (IgY) specific against bovine milk alkaline phosphatase[J]. Food Chemistry, 2006, 95(2):213-220.
- [20] EMPEY C C, HOKAMA Y, YABUSAKI K, et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of ciguatoxin in fish tissue using chicken immunoglobulin Y[J]. Journal of Clinical Laboratory Analysis, 2008, 22(4):239-245.
- [21] BENTES G A, LANZARINI N M, LIMA L R, et al. Using immunoglobulin Y as an alternative antibody for the detection of hepatitis a virus in frozen liver sections[J]. Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz, 2015, 110(4):577-585.
- [22] NAFEA N M, SABBAAH M A, ALSUHAIL R, et al. Development of hen antihepatitis B antigen IgY-based conjugate for ELISA assay[J]. Advanced Biomedical Research, 2015, 11:2197-2207.
- [23] DAI Y C, ZHANG X F, TAN M, et al. A dual chicken IgY against rotavirus and norovirus[J]. Antiviral Research, 2013, 97(3):293-300.
- [24] 施少华, 傅光华, 万春和, 等. 检测鸭坦布苏病毒卵黄抗体间接 ELISA 方法的建立[J]. 养禽与禽病防治, 2012(2):2-4.
- [25] 张艳, 吴旭干, 杨帆, 等. 三疣梭子蟹卵黄磷蛋白纯化及其 ELISA 测定方法[J]. 水产学报, 2011, 35(8): 1146-1157.
- [26] 李培育, 刁晓明, 盛晓洒, 等. 瓦氏黄颡鱼卵黄脂磷蛋白(Lv)的纯化、性质鉴定及其抗血清的研制[J]. 水产学报, 2010, 34(1):116-125.
- [27] 章雪明, 胡仁莉, 俞小红. 间接 ELISA 和 HI 方法检测禽流感[J]. 养禽与禽病防治, 2010(6):8-10.
- [28] 贾杏林, 陈焕春, 王祥, 等. 猪乙型脑炎间接 ELISA 与血凝抑制试验方法的比较[J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(2):157-159.

Development of ELISA for Quantitative Detection of Soft-shelled Turtle Systemic Sepsis Spherical Virus (STSSSV)

XIA Xiao-lei, LI Deng-feng^{*}, PENG Jiao, ZHOU Yong-qiang, GUO An-nan, LIU Lian-guo, CHEN Jiong
(School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: Based on chicken immunoglobulin of yolk (IgY), we have developed an indirect ELISA for detection of soft-shelled turtle systemic sepsis spherical virus (STSSSV). Chicken IgY against STSSSV is used as the primary antibody, while an HRP conjugated goat anti-chicken IgG is used as the secondary antibody. By comparing ELISA with hemagglutination inhibition test (HI), the linear relationship between OD_{492nm} values and the dilution of STSSSV, as well as log 2 of the dilutions is established and analyzed, base on which a quantitative ELISA is developed. The presented method has been applied to test various infected samples including sera, liver, feces and culturing water. The results show that the minimum detection limit of the developed ELISA method is 3.98 ng·mL⁻¹, and there has been no cross-reaction to other aquatic virus. The detection range of quantitative ELISA is limited to 0.031~4 μg·mL⁻¹. Sera contains the highest viral load. Even in latent period, STSSSV in sera can be detected, which is helpful for early diagnosis.

Key words: soft-shelled turtle systemic sepsis spherical virus; IgY; ELISA; detection

(责任编辑 章践立)