

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910017831.9

[51] Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/552 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

[43] 公开日 2010年1月20日

[11] 公开号 CN 101629954A

[22] 申请日 2009.8.7

[21] 申请号 200910017831.9

[71] 申请人 中国海洋大学

地址 266100 山东省青岛市崂山区松岭路 238 号

[72] 发明人 绳秀珍 徐晓丽 战文斌

[74] 专利代理机构 青岛海昊知识产权事务所有限公司

代理人 王 铎

权利要求书 2 页 说明书 10 页 附图 1 页

[54] 发明名称

对虾白斑症病毒免疫检测芯片及其制备方法与应用

[57] 摘要

本发明公开了一种对虾白斑症病毒免疫检测芯片,其结构包括芯片载体、铺覆于芯片载体上的琼脂糖凝胶层、琼脂糖凝胶层上固定有多个 4×4 的抗体微阵列,各个微阵列之间用芯片专用围栏或 Super PAP Pen 划线隔开。本发明采用夹心法检测抗原,在芯片片基上固定病原的多克隆抗体(多抗),取待检个体的靶器官组织制备待检样品液,直接将待测样品液与固定有多抗的芯片孵育,以捕获抗原使其结合在芯片上,再加上荧光标记的特异性单抗探针,通过 CCD 芯片扫描仪读取结果。其优点在于能同时检测多个样品中的白斑症病毒,用于养殖生产中虾类/蟹类白斑症病毒病的快速、准确检测,及进出口虾类/蟹类中 WSSV 的检疫。

1、一种对虾白斑症病毒免疫检测芯片，其特征在于它包括芯片载体、铺覆于芯片载体上的琼脂糖凝胶层，琼脂糖凝胶层上固定有多个抗体微阵列，各个微阵列之间用芯片专用围栏或 Super PAP Pen 划线隔开。

2、根据权利要求 1 所述的对虾白斑症病毒免疫检测芯片，其特征在于所述的芯片载体为标准载玻片，所述芯片载体具有经过亲和硅烷处理后，并用琼脂糖凝胶修饰的玻璃表面，该表面为三维多孔结构，经 NaIO_4 活化后，可以使抗体以物理吸附和共价连接两种方式固定在其上。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的对虾白斑症病毒免疫检测芯片，其特征在于所述的抗体是兔抗白斑症病毒抗体、兔抗鼠 Ig 的抗体。

4、根据权利要求 1 所述的对虾白斑症病毒免疫检测芯片的制备方法，其特征是它包括如下步骤：

(1) 抗体的制备及纯化

制备兔抗白斑症病毒抗体，兔抗鼠 Ig 的抗体，鼠抗白斑症病毒单克隆抗体（单抗），亲和层析法纯化所得抗体；

(2) Cy3 标记单克隆抗体探针的制备

将亲和层析纯化后的鼠抗白斑病毒单抗用 Cy3 标记，并过凝胶柱纯化；

(3) 载玻片的预处理

将载玻片分别用强碱和浓硫酸浸洗，双蒸水冲洗，晾干；将清洗后的载玻片浸入 0.4% 的亲和硅烷的乙酸溶液中，调 pH 至 4.5，室温下作用 1h，双蒸水冲洗，晾干；

(4) 琼脂糖凝胶基片的制备

配制 0.6~1.4% 的琼脂糖溶液，微波炉煮沸 3min，使其完全溶解，将 2ml 琼脂糖溶液铺覆在经 60℃ 预热的亲和硅烷处理过的清洁载玻片上；待琼脂糖凝固后，将玻片在 37℃ 下过夜干燥；使用前在室温下用 0.02mol/L NaIO_4 溶液活化 30min，超纯水冲洗 3 遍，用氮气流吹干，室温干燥处保存；

(5) 抗体的固定

① 用 pH 7.4 的含 10%~60% 甘油的 PBS 缓冲液稀释兔抗白斑症病毒抗体，使其浓度为 0.5~0.0001mg/mL、稀释兔抗鼠 Ig 的抗体，使其浓度为 0.1mg/mL；

② 用点样仪将此抗体稀释液在琼脂糖凝胶基片的不同区域点样，点样量为 50~70nL，点直径为 500~600 μm 。每张芯片两排四列共 8 个 4×4 亚阵列，每个亚阵列所点样品一致，第一列所点样品为磷酸盐甘油缓冲液作为阴性对照，第二、三列所点样品为兔抗白斑症病毒抗体，第四

列为质量控制点，所点样品为兔抗鼠 Ig 的抗体作为阳性对照及固定对照。各个亚阵列之间用芯片专用围栏或 Super PAP Pen 隔开，形成独立的反应单元。37°C 饱和湿度放置 0.5~2.5h，洗涤，晾干；

③向载玻片上点有抗体的区域滴加 1~5% 牛血清白蛋白，或 5% 脱脂奶粉，或 1% 明胶，或甘氨酸，或谷氨酸，或酪氨酸等封闭液进行封闭，37°C 饱和湿度放置 0.25~2h，洗涤，晾干，4°C 密封保存，得到对虾白斑症病毒免疫检测芯片。

5、根据权利要求 4 所述的对虾白斑症病毒免疫检测芯片的制备方法，其特征在于用 Cy3 标记亲和层析纯化后的鼠抗白斑症病毒单抗作为抗体探针，并使用兔抗鼠 Ig 的抗体作为阳性对照及固定对照。

6、根据权利要求 5 所述的对虾白斑症病毒免疫检测芯片的制备方法，其特征在于 Cy3 标记的抗体探针所用单抗是由两株杂交瘤细胞分别分泌的鼠抗白斑症病毒核衣壳单抗 D 和鼠抗白斑症病毒囊膜单抗 E。

7、根据权利要求 1 所述的对虾白斑症病毒免疫检测芯片在养殖对虾白斑症病毒检测中的应用。

8、根据权利要求 7 所述的对虾白斑症病毒免疫检测芯片的应用，其特征在于它包括如下步骤：

(1) 用于检测的样品包括：虾/蟹等的鳃、血淋巴等或桡足类等，取样后与缓冲液约按 1:10 (W/V) 的比例混合，匀浆，再沉降 5~10min，取上清作为检测样品，待检；

(2) 将待检样品加到上述芯片的不同亚阵列中，37°C 饱和湿度放置 0.25~2h，洗涤，再加稀释的 Cy3 标记的鼠抗白斑症病毒单抗探针，37°C 饱和湿度放置 0.25~2h，洗涤，晾干；

(3) 激光扫描

玻片用晶芯®EcoScan™ -100 CCD 扫描仪扫描成像，图像用专业分析软件分析，根据荧光信号的强弱，得到样品中对虾白斑症病毒含量的定性定量分析结果。

9、根据权利要求 8 所述的对虾白斑症病毒免疫检测芯片的应用，其特征在于所用待检样品为水产动物组织匀浆液上清，所述抗体芯片与待检样品中白斑症病毒反应形成的复合体，被高特异性的 Cy3 标记的抗体探针所识别，在 532nm 的激光下呈现绿色荧光。

10、根据权利要求 8 所述的对虾白斑症病毒免疫检测芯片的应用，其特征在于待检样品滴加到芯片上后，37°C 饱和湿度放置 15~30min，玻片上加稀释的荧光抗体探针后，37°C 饱和湿度放置 15~30min。

对虾白斑症病毒免疫检测芯片及其制备方法与应用

技术领域

本发明涉及海水养殖动物病原检测技术的改进，具体涉及一种用于检测对虾白斑症病毒(white spot syndrome virus, WSSV)的免疫检测芯片或微阵列、制备方法及其应用，其属于免疫学、病毒学及生物芯片技术交叉领域。

背景技术

疾病严重威胁对虾养殖业的发展，各种病害给对虾养殖造成了重大损失，而病害控制中的不合理用药，造成耐药性、药物残留和在环境中的扩散问题，严重影响了食品安全和环境公共卫生，因此，养殖对虾疾病的早期准确检测诊断对疾病的预防和控制尤为重要。由白斑症病毒(WSSV)引起的白斑症病毒病是对虾养殖中危害严重的疾病之一，导致很高的对虾死亡率，给对虾养殖业造成了巨大的损失。WSSV 可以自然感染对虾(中国对虾、日本对虾、斑节对虾、凡纳滨对虾、刀额新对虾等)、蟹类(天津厚蟹、日本大眼蟹、三疣梭子蟹等)、桡足类等，主要感染宿主的鳃、上皮、造血组织、皮下组织、淋巴器官等。

鉴于目前白斑症病毒病尚无有效的治疗方法，快速准确的病毒检测技术已成为各国学者研究的焦点之一。白斑症病毒病的诊断主要是依靠实验室内对白斑症病毒检测来确诊，常用检测技术有电镜技术，PCR 法，DNA 探针原位杂交法，免疫荧光抗体技术，免疫组织化学技术，酶联免疫吸附检测法，斑点免疫印迹技术等。电镜技术使用可靠但耗时长；PCR 法灵敏度高，可用于无症状水产动物的病原检测，但易污染且易出现假阳性；DNA 探针原位杂交法具有高度的特异性和敏感性，但是，应用同位素标记核酸探针作分子杂交有放射性，操作复杂，而非放射性标记探针往往敏感性较差；酶联免疫吸附检测法及斑点免疫印迹技术是目前常用的检测方法，但被检组织的内源酶会对其检测结果产生干扰，导致假阳性的出现。这些检测技术都存在一定的局限性，效率低，耗时长，实用性较差。因此，建立一种适用于对虾白斑症病毒的快速、准确、简便的检测诊断技术势在必行，以期达到早发现、早预防的目的，而新发展起来的生物芯片技术为其提供了强有力的技术平台，对虾白斑症病毒单克隆抗体的成功研制，为利用 WSSV 单克隆抗体建立对虾白斑症病毒病的免疫芯片检测诊断技术奠定了基础。白斑症病毒病多样品检验并行处理的免疫芯片技术，在对虾养殖过程中病毒的检测上具有广阔的应用前景。

发明内容

针对上述现状和对虾不具备获得性免疫功能的特点，本发明的目的是提供一种能同时检测多个样品中的白斑症病毒的免疫检测芯片，用于养殖生产中虾类/蟹类白斑症病毒病的快速、准确检测，及进出口虾类/蟹类中 WSSV 的检疫。

本发明的另一个目的是提供上述白斑症病毒免疫检测芯片的制备方法。

本发明还有一个目的是提供上述免疫检测芯片在养殖对虾白斑症病毒检测中的应用。

本发明的目的是由以下技术方案实现的：

一种对虾白斑症病毒免疫检测芯片，其结构包括芯片载体、铺覆于芯片载体上的琼脂糖凝胶层、琼脂糖凝胶层上固定有多个 4×4 的抗体微阵列，各个微阵列之间用芯片专用围栏或 Super PAP Pen 划线隔开。A 液：渗透压小于 360mOsm/kg 的低渗液；B 液：吐温-磷酸盐缓冲液 (PBST)；C 液：Cy3 标记的鼠抗白斑症病毒单克隆抗体 (单抗) 探针，探针所用单抗是由两株杂交瘤细胞分别分泌的鼠抗白斑症病毒核衣壳单抗 D 和鼠抗白斑症病毒囊膜单抗 E (简称为：单抗 D、E)，单抗 D 和 E 杂交瘤细胞的保藏号分别为：CCTCC-C200422 和 CCTCC-C200421，保藏日期：2004 年 12 月 14 日。

本发明以现有技术的特点：由于其一，对虾不具备获得性免疫功能，体内无抗体的形成，因此不能用间接法检测样品中的抗体；其二，对养殖对虾疾病的检测诊断是一个群体的概念，可以通过对多个个体的检测达到对群体做出诊断的目的。因此，本发明根据这些特点，采用夹心法检测抗原，在芯片片基上固定病原的多克隆抗体 (多抗)，取待检个体的靶器官组织制备待检样品液，直接将待测样品液与固定有多抗的芯片孵育，以捕获抗原使其结合在芯片上，再加上荧光标记的特异性单抗探针，通过 CCD 芯片扫描仪读取结果。

对虾白斑症病毒免疫检测芯片的制备方法，包括如下步骤：

(1) 抗体的获得及纯化

从患白斑症病毒病对虾的鳃等靶器官中提取 WSSV，常规方法免疫纯种新西兰白兔，采血制备血清，得到兔抗 WSSV 抗体。

复苏并培养小鼠杂交瘤细胞株单抗 D 和单抗 E，注射小鼠腹腔生产腹水，得到大量高效价、高特异性的鼠抗 WSSV 单抗。

取亲和层析纯化后的单抗 D 和单抗 E，混合后，常规方法免疫纯种新西兰白兔，采血制备血清，得到兔抗鼠抗 WSSV 单抗的抗体 (兔抗鼠 Ig 的抗体)。

使用 Amersham Pharmacia Biotech 公司的亲和层析柱 (HiTrap Protein G Sepharose Column) 纯化所得抗体。

(2) Cy3 标记的抗体探针的制备

按照 Amersham Phamacia Biotech 公司的产品说明书, 使用荧光素 Cy3 对亲和层析纯化后的鼠抗 WSSV 单抗进行标记, 并过凝胶柱纯化。

(3) 载玻片的预处理

将载玻片分别用强碱和浓硫酸浸洗, 双蒸水冲洗, 晾干; 将清洗后的载玻片浸入 0.4% 的亲硅烷的乙酸溶液中, 调 pH 至 4.5, 室温作用 1h, 双蒸水冲洗, 晾干。

(4) 琼脂糖凝胶基片的制备

配制 0.6~1.4% 的琼脂糖溶液, 微波炉煮沸 3min, 使其完全溶解, 将 2mL 琼脂糖溶液铺覆在 60℃ 预热的亲硅烷处理过的清洁玻片上; 琼脂糖凝固后, 载玻片在 37℃ 下过夜干燥; 使用前用 0.02mol/L NaIO₄ 溶液室温下活化 30min, 超纯水彻底冲洗 3 遍, 并用氮气流吹干, 室温干燥处保存。

(5) 抗体的固定

① 用 pH7.4 的含 10%~60% 甘油的磷酸盐缓冲液 (PBS) 稀释兔抗 WSSV 抗体, 使其浓度为 0.5~0.0001mg/mL; 稀释兔抗鼠 Ig 的抗体, 使其浓度为 0.1mg/mL。

② 用点样仪将此抗体稀释液在琼脂糖凝胶基片的不同区域点样, 点样量为 50~70nL, 点直径为 500~600μm。每张芯片两排四列共 8 个 4×4 亚阵列, 每个亚阵列所点样品一致, 第一列所点样品为磷酸盐甘油缓冲液作为阴性对照, 第二、三列所点样品为兔抗 WSSV 抗体, 第四列为质量控制点, 所点样品为兔抗鼠 Ig 的抗体作为阳性对照及固定对照。各个亚阵列之间用芯片专用围栏或 Super PAP Pen 隔开, 形成独立的反应单元。37℃ 饱和湿度放置 0.5~2.5h, 洗涤, 晾干。

③ 向载玻片上点有抗体的区域分别滴加不同的封闭液 (1~5% 牛血清白蛋白、5% 脱脂奶粉、1% 明胶、甘氨酸、谷氨酸、酪氨酸) 进行封闭, 37℃ 饱和湿度放置 0.25~2h, 洗涤, 晾干, 4℃ 密封保存, 得到对虾白斑症病毒免疫检测芯片。

本发明的对虾 WSSV 免疫检测芯片的应用, 所述该应用的步骤如下:

(1) 用于检测的样品包括: 虾/蟹等的鳃、血淋巴等或桡足类等, 取样, 与 A 液约按 1: 10 (W/V) 的比例混合, 匀浆, 再沉降 5~10min, 取上清作为检测样品, 待检。

(2) 将待检样品加到上述芯片的不同亚阵列中, 加样量为 10μL/阵列, 一张芯片可同时检测八个样品, 注意避免不同亚阵列间的液体混合。37℃ 饱和湿度放置 0.25~2h, 洗涤, 再加稀释的 C 液 (Cy3 标记的鼠抗 WSSV 单抗), 10μL/阵列, 37℃ 饱和湿度放置 0.25~2h, 洗涤, 晾干。

(3) 激光扫描

上述检测芯片用晶芯®EcoScan™ -100 CCD 扫描仪扫描成像, 激发波长为 532nm,

检测波长为 585nm，荧光信号用 Lab-chipscanner 2.0 软件分析。

检测结果分析与判定：扫描得到的图像亚阵列中，第一列阴性对照的信号强度代表实验的本底值大小；第二、三列出现绿色荧光亮点的为阳性，表明所检测样品中有 WSSV，无绿色荧光亮点的为阴性，表明所检测样品中无 WSSV。信号强弱与样品中病毒浓度有关；第四列质量控制点出现绿色荧光为正常，如果没有绿色荧光，说明检测操作有问题或者抗体蛋白发生变性，检测结果为无效。

(4) 病毒的定量检测及最低检测限

分离纯化的 WSSV 稀释至 25.6 μ g/mL，再按二倍比稀释所得的 8 个抗原浓度分别与检测芯片上的 8 个亚阵列孵育，经抗体探针检测，扫描分析后结果如图 3 所示，随抗原浓度变化，荧光信号呈现梯度的变化。信号强度分析显示相对信号强度和抗原浓度之间有良好的线性关系，提示所构建的抗体微阵列在一定的病毒浓度范围内可以进行定量分析。此抗体微阵列所能检测到的最低抗原浓度为 0.8 μ g/mL。

所述芯片载体具有经过亲和硅烷处理后，并用琼脂糖凝胶修饰的玻璃表面，该表面为三维多孔结构，经 NaIO₄ 活化后，可以使抗体以物理吸附和共价连接两种方式固定在其上，同时，其亲水环境还有利于保持固定在上方的抗体蛋白的活性。所述的抗体是兔抗 WSSV 抗体、兔抗鼠 Ig 的抗体，但不仅仅限于这两种抗体。

所述的琼脂糖浓度为 1.2% 为宜。

所述的磷酸盐甘油缓冲液甘油浓度为 50%。

所用于点样的亲和层析纯化后兔抗 WSSV 抗体最适浓度为 0.1mg/mL。

所述的用点样仪将抗体稀释液在琼脂糖凝胶基片表面的不同区域点样，其放置温度为 37 $^{\circ}$ C，饱和湿度下放置 2h。

所述的封闭液为 3% 牛血清白蛋白，封闭时间为 60min。

所述的待检样品加到芯片上后，37 $^{\circ}$ C 饱和湿度放置 15~30min；芯片上加稀释的抗体探针后，37 $^{\circ}$ C 饱和湿度下放置 15~30min。

所述芯片单张玻片点有 8 个亚阵列，可以根据实际需要增加亚阵列数量，能够实现更多样品的同时检测。

本发明的优点在于可以同时检测多个样品或同一个体的多个不同组织中的 WSSV，它结构简单，成本低廉，通量易于扩充，实现多样品的同时平行检测，增加了不同标本数据之间的可比性，可简便、快速、准确地检测水产养殖动物如：虾类和蟹类中的 WSSV。对样品要求简单，少量样品即可满足检测需要，并大大简化了现有检测技术的样品处理步骤。同时由于阳性控制及阴性控制的设置及捕获抗体的重复点样，增加了实验结果的可靠性。反应相对较快，整个检测过程不超过 2h，操作过程便捷，一般人员即可操作，

并且能够相对定量检测病原，适用于对虾、蟹类等的养殖过程中白斑症病毒病的快速、简便、准确的检测及水产动物的出入境检验检疫等。

附图说明

图 1 对虾白斑症病毒免疫检测芯片结构示意图及点样分布图。

1-芯片载体，2-琼脂糖凝胶层，3-抗体微阵列，4-芯片专用围栏或 Super PAP Pen 划线，5-标签区域。点样分布：①含 50%甘油的 PBS，作为阴性对照；②、③为兔抗 WSSV 抗体；④兔抗鼠 Ig 的抗体，作为阳性对照及固定对照等质量控制。

图 2 抗原浓度与信号强度的关系及免疫芯片的检测限。

a-h 所检测的抗原浓度依次为 25.6、12.8、6.4、3.2、1.6、0.8、0.4、0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

图 3：用对虾白斑症病毒免疫检测芯片检测不同来源对虾样品中 WSSV 的 CCD 扫描图（扫描仪的荧光强度设定为 88%）。

A1、A2 表明样品中 WSSV 浓度较高，A3、A4、B1、B2、B4 表明样品中未检出 WSSV，B3 表明样品中 WSSV 含量较低。

具体实施方式

下面结合附图并通过具体实施例来详细说明本发明。

本发明所用仪器及试剂如下：

小型手动芯片点样系统（购自 Whatman 公司）；晶芯[®]EcoScan[™]-100 CCD 扫描仪（购自北京博奥生物公司）；Cy3 抗体标记试剂盒（购自 GE 公司）；HiTrap Protein G Sepharose Column（购自 GE 公司）；1640（购自 GIBCO 公司）；胎牛血清（购自 HYCLONE 公司）；牛血清白蛋白（购自 SIGMA 公司）；Tween-20（购自 SIGMA 公司）；二甲基亚砜（购自 SIGMA 公司）。

实施例 1：

1. 抗体的获得及纯化

从白斑症病毒病的对虾靶器官提取 WSSV，常规方法免疫纯种新西兰白兔，采血制备血清，得到兔抗 WSSV 抗体。

复苏并培养小鼠杂交瘤细胞株单抗 D 和单抗 E，注射小鼠腹腔生产腹水，得到大量高效价、高特异性的鼠抗 WSSV 单抗。

取亲和层析纯化后的单抗 D 和单抗 E，混合后，常规方法免疫纯种新西兰白兔，采血制备血清，得到兔抗鼠 Ig 的抗体。

使用 Amersham Phamacia Biotech 公司的亲和层析柱 (HiTrap Protein G Sepharose Column) 纯化所得抗体。

2. Cy3 标记的抗体探针的制备

按照 Amersham Phamacia Biotech 公司的 Cy3 产品说明书, 使用荧光素 Cy3 对亲和层析纯化后的鼠抗 WSSV 单抗进行标记, 并过凝胶柱纯化。

3. 载玻片的预处理

将玻片分别用强碱和浓硫酸浸洗, 双蒸水冲洗, 晾干; 将清洗后的玻片浸入 0.4% 的亲和硅烷的乙酸溶液中, 调 pH 至 4.5, 室温作用 1h, 双蒸水冲洗, 晾干。

4. 芯片结构设计

该芯片结构如图 1 所示, 包括芯片载体 (1)、铺覆于芯片载体 (1) 上的琼脂糖凝胶层 (2), 琼脂糖凝胶层 (2) 上固定有两排四列共 8 个 4×4 的抗体微阵列 (3), 点样量为 50-70nL, 点直径为 500~600 μ m。各个微阵列之间用芯片专用围栏或 Super PAP Pen 划线 (4) 隔开。所述的芯片载体为标准载玻片, 在玻片一端可以留出标签区域 (5)。

5. 琼脂糖凝胶基片的制备

配制 0.6%、0.8%、1.0%、1.2%、1.4% 的琼脂糖溶液, 微波炉煮沸 3min 完全溶解, 将 2mL 琼脂糖溶液铺覆在 60 $^{\circ}$ C 预热的亲和硅烷处理过的清洁玻片上; 琼脂糖凝固后, 玻片在 37 $^{\circ}$ C 下过夜干燥; 使用前用 0.02mol/L NaIO₄ 溶液室温下活化 30min, 超纯水彻底冲洗 3 遍, 并用氮气流吹干, 室温干燥处保存。

6. 抗体的固定

① 用 pH 7.4 的 PBS 甘油缓冲液稀释兔抗 WSSV 抗体、兔抗鼠 Ig 的抗体, 使其浓度为 0.1mg/mL。

② 用点样仪将此抗体稀释液在不同浓度琼脂糖修饰的载玻片表面的不同区域点样, 芯片结构及点阵分布如图 1 所示, 每张芯片两排四列共 8 个 4×4 亚阵列, 每个亚阵列所点样品一致, 第一列所点样品为磷酸盐甘油缓冲液作为阴性对照, 第二、三列所点样品为兔抗 WSSV 抗体, 第四列为质量控制点, 所点样品为兔抗鼠 Ig 的抗体作为阳性对照及固定对照。各个亚阵列之间用芯片专用围栏或 Super PAP Pen 隔开, 形成独立的反应单元。37 $^{\circ}$ C 饱和湿度放置 2h, 洗涤, 晾干。

③ 向载玻片上点有抗体的区域滴加 3% 牛血清白蛋白进行封闭, 37 $^{\circ}$ C 饱和湿度放置 1h, 洗涤, 晾干, 4 $^{\circ}$ C 密封保存, 得到对虾白斑症病毒免疫检测芯片。

实施例 2:

步骤 1、2、3、4 同实施例 1。

5. 琼脂糖凝胶基片的制备

配制 1.2% 的琼脂糖溶液，微波炉煮沸 3min 完全溶解，将 2mL 琼脂糖溶液铺覆在 60℃ 预热的亲和硅烷处理过的清洁玻片上；琼脂糖凝固后，玻片在 37℃ 下过夜干燥；使用前用 0.02mol/L NaIO₄ 溶液室温下活化 30min，超纯水彻底冲洗 3 遍，并用氮气流吹干，室温干燥处保存。

6. 抗体的固定

① 用 pH 7.4 的分别含 10%、20%、30%、40%、50%、60% 甘油的 PBS 缓冲液稀释兔抗 WSSV 抗体、兔抗鼠 Ig 的抗体，使其浓度为 0.1mg/mL。

② 用点样仪将此抗体稀释液在载玻片表面的不同区域点样，每张芯片两排三列共 6 个 4×4 亚阵列，每个亚阵列所点样品一致，为含不同浓度甘油的 PBS 缓冲液稀释的抗体。其中第一列所点样品为磷酸盐甘油缓冲液作为阴性对照，第二、三列所点样品为兔抗 WSSV 抗体，第四列为质量控制点，所点样品为兔抗鼠 Ig 的抗体作为阳性对照及固定对照。各个亚阵列之间用芯片专用围栏或 Super PAP Pen 隔开，形成独立的反应单元。37℃ 饱和湿度放置 2h，洗涤，晾干。

③ 向载玻片上点有抗体的区域滴加 3% 牛血清白蛋白进行封闭，37℃ 饱和湿度放置 1h，洗涤，晾干，4℃ 密封保存，得到对虾白斑症病毒免疫检测芯片。

实施例 3:

步骤 1、2、3、4、5 同实施例 2。

6. 抗体的固定

① 用 pH 7.4 的含 50% 甘油的 PBS 缓冲液稀释兔抗 WSSV 抗体，使其浓度为 0.5、0.1、0.05、0.01、0.005、0.001、0.0005、0.0001mg/mL。

② 用点样仪将不同浓度抗体稀释液在载玻片表面的不同区域点样，每张芯片两排四列共 8 个 4×4 亚阵列，每个亚阵列为不同浓度的兔抗 WSSV 抗体，各个亚阵列之间用芯片专用围栏或 Super PAP Pen 隔开，形成独立的反应单元。37℃ 饱和湿度放置 2h，洗涤，晾干。

③ 向载玻片上点有抗体的区域滴加 3% 牛血清白蛋白进行封闭，37℃ 饱和湿度放置 1h，洗涤，晾干，4℃ 密封保存，得到对虾白斑症病毒免疫检测芯片。

实施例 4:

步骤 1、2、3、4、5 同实施例 2。

6. 抗体的固定

① 用 pH 7.4 的含 50%甘油的 PBS 缓冲液稀释兔抗 WSSV 抗体、兔抗鼠 Ig 的抗体，使其浓度为 0.1mg/mL。

② 用点样仪将此抗体稀释液在载玻片表面的不同区域点样，点阵分布如图 1 所示，每张芯片两排四列共 8 个 4×4 亚阵列，每个亚阵列所点样品一致，第一列所点样品为磷酸盐甘油缓冲液作为阴性对照，第二、三列所点样品为兔抗 WSSV 抗体，第四列为质量控制点，所点样品为兔抗鼠 Ig 的抗体作为阳性对照及固定对照。各个亚阵列之间用芯片专用围栏或 Super PAP Pen 隔开，形成独立的反应单元。37℃ 饱和湿度分别放置 0.5h、1h、1.5h、2h、2.5h，洗涤，晾干。

③ 向载玻片上点有抗体的区域滴加 3%牛血清白蛋白进行封闭，37℃ 饱和湿度放置 1h，洗涤，晾干，4℃ 密封保存，得到对虾白斑症病毒免疫检测芯片。

实施例 5:

步骤 1、2、3、4、5 同实施例 2。

6. 抗体的固定

① 用 pH 7.4 的含 50%甘油的 PBS 缓冲液稀释兔抗 WSSV 抗体、兔抗鼠 Ig 的抗体，使其浓度为 0.1mg/mL。

② 用点样仪将此抗体稀释液在载玻片表面的不同区域点样，点阵分布如图 1 所示，每张芯片两排四列共 8 个 4×4 亚阵列，每个亚阵列所点样品一致，第一列所点样品为磷酸盐甘油缓冲液作为阴性对照，第二、三列所点样品为兔抗 WSSV 抗体，第四列为质量控制点，所点样品为兔抗鼠 Ig 的抗体作为阳性对照及固定对照。各个亚阵列之间用芯片专用围栏或 Super PAP Pen 隔开，形成独立的反应单元。37℃ 饱和湿度放置 2h，洗涤，晾干。

③ 向载玻片上点有抗体的区域分别滴加 1%~5%牛血清白蛋白、5%脱脂奶粉、1%明胶、甘氨酸、谷氨酸、酪氨酸等封闭液进行封闭，37℃ 饱和湿度放置 15min、30min、45min、60min、90min、120min，洗涤，晾干，4℃ 密封保存，得到对虾白斑症病毒免疫检测芯片。

实施例 6:

检测对虾白斑症病毒采用的是夹心法。

步骤 1、2、3、4、5 同实施例 2。

6. 抗体的固定

① 用 pH 7.4 的含 50%甘油的 PBS 缓冲液稀释兔抗 WSSV 抗体、兔抗鼠 Ig 的抗体，

使其浓度为 0.1mg/mL。

② 用点样仪将此抗体稀释液在载玻片表面的不同区域点样，点阵分布如图 1 所示，每张芯片两排四列共 8 个 4×4 亚阵列，每个亚阵列所点样品一致，第一列所点样品为磷酸盐甘油缓冲液作为阴性对照，第二、三列所点样品为兔抗 WSSV 抗体，第四列为质量控制点，所点样品为兔抗鼠 Ig 的抗体作为阳性对照及固定对照。各个亚阵列之间用芯片专用围栏或 Super PAP Pen 隔开，形成独立的反应单元。37℃ 饱和湿度放置 2h，洗涤，晾干。

③ 向载玻片上点有抗体的区域滴加 3% 牛血清白蛋白进行封闭，37℃ 饱和湿度放置 1h，洗涤，晾干，4℃ 密封保存，得到对虾白斑症病毒免疫检测芯片。

7. 病原的检测

① 取待检样品（虾/蟹等的鳃或血淋巴或桡足类等），与 A 液约按 1: 10 (W/V) 的比例混合，匀浆，再沉降 5-10min，取上清液作为检测样品，待检。

② 将待检样品加入上述芯片同一载体不同亚阵列中，加样量为 10 μ L/阵列，一张芯片可同时检测八个样品，注意避免不同亚阵列间的液体混合。37℃ 饱和湿度孵育 15min、30min、45min、60min、90min、120min，洗涤，在玻片上加稀释的 C 液，10 μ L/阵列，37℃ 饱和湿度放置孵育 15min、30min、45min、60min、90min、120min，洗涤，晾干。

③ 激光扫描

上述检测芯片用晶芯[®]EcoScan[™]-100 CCD 扫描仪扫描成像，激发波长为 532nm，检测波长为 585nm，荧光信号用 Lab-chipscanner 2.0 软件分析。

检测结果分析与判定：扫描得到的图像亚阵列中，第一列阴性对照的信号强度代表实验的本底值大小；第二、三列出现绿色荧光亮点的为阳性，表明所检测样品中有 WSSV，无绿色荧光亮点的为阴性，表明所检测样品中无 WSSV。信号强弱与样品中病毒浓度有关；第四列阳性对照及质量控制出现绿色荧光为正常，如果没有绿色荧光，说明检测操作有问题或者抗体蛋白发生变性，检测结果无效。

实施例 7:

抗原的定量分析及最低检测限:

取制备好的对虾 WSSV 免疫检测芯片，将纯化的 WSSV 稀释至 25.6 μ g/mL，再按二倍比稀释所得的 8 个抗原浓度分别与玻片上的抗体微阵列孵育，经抗体探针检测后，扫描结果利用计算机软件处理。结果显示，随抗原浓度变化，荧光信号呈现梯度的变化。信号强度分析显示相对信号强度和抗原浓度之间有良好的线性关系，由此可见所构建的抗体微阵列在一定的病毒浓度范围内可以进行定量分析，根据标准曲线，即可算出待检

样品的病毒含量。此抗体微阵列所能检测到的病毒最低浓度为 $0.8 \mu\text{g/mL}$ 。

实施例 8:

对虾白斑症病毒免疫检测芯片的特异性检测:

取正常虾/蟹鳃、血淋巴等, 经 PCR 检测未感染 WSSV, 组织匀浆后沉降, 取上清, 与对虾白斑症病毒免疫检测芯片上的抗体微阵列孵育, 经抗体探针检测后扫描, 无荧光信号, 证实所制备的白斑症病毒检测芯片与组织无交叉反应。

本领域的普通技术人员都会理解, 在本发明的保护范围内, 对于上述实施例进行修改、添加和替换都是可能的, 其都没有超出本发明的保护范围。

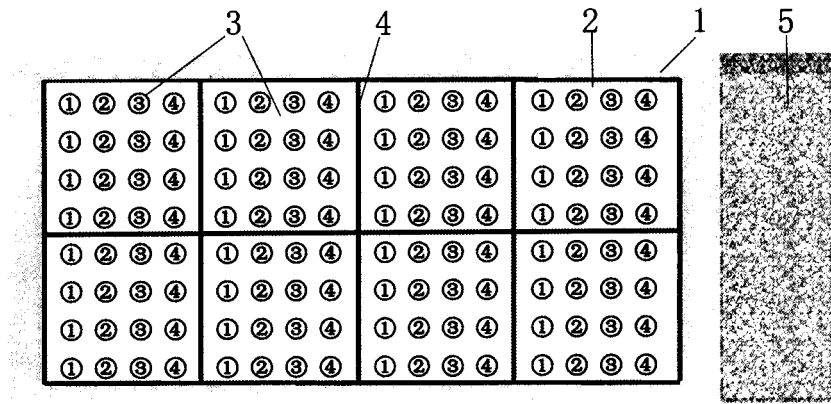


图 1

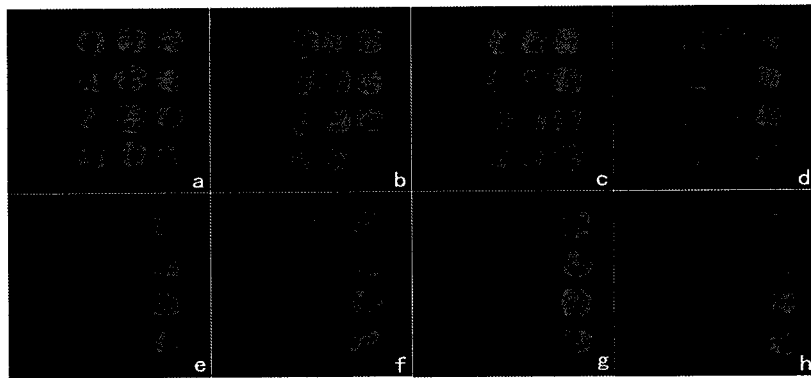


图 2

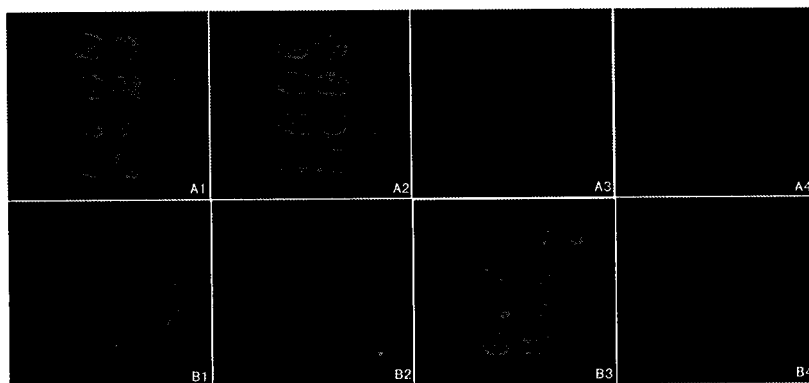


图 3

专利名称(译)	对虾白斑症病毒免疫检测芯片及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN101629954A	公开(公告)日	2010-01-20
申请号	CN200910017831.9	申请日	2009-08-07
[标]申请(专利权)人(译)	中国海洋大学		
申请(专利权)人(译)	中国海洋大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国海洋大学		
[标]发明人	绳秀珍 徐晓丽 战文斌		
发明人	绳秀珍 徐晓丽 战文斌		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/577 G01N33/552 G01N33/532 G01N21/64		
代理人(译)	王铎		
其他公开文献	CN101629954B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种对虾白斑症病毒免疫检测芯片，其结构包括芯片载体、铺覆于芯片载体上的琼脂糖凝胶层、琼脂糖凝胶层上固定有多个4×4的抗体微阵列，各个微阵列之间用芯片专用围栏或Super PAP Pen划线隔开。本发明采用夹心法检测抗原，在芯片片基上固定病原的多克隆抗体(多抗)，取待检个体的靶器官组织制备待检样品液，直接将待测样品液与固定有多抗的芯片孵育，以捕获抗原使其结合在芯片上，再加上荧光标记的特异性单抗探针，通过CCD芯片扫描仪读取结果。其优点在于能同时检测多个样品中的白斑症病毒，用于养殖生产中虾类/蟹类白斑症病毒病的快速、准确检测，及进出口虾类/蟹类中WSSV的检疫。