

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/552 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910096309.4

[43] 公开日 2009 年 10 月 28 日

[11] 公开号 CN 101566630A

[22] 申请日 2009.2.19

[74] 专利代理机构 宁波奥凯专利事务所

[21] 申请号 200910096309.4

代理人 白洪长

[71] 申请人 浙江海洋学院

地址 316000 浙江省舟山市定海区海院路 18
号

[72] 发明人 吴常文 于新秀 徐佳晶

权利要求书 1 页 说明书 5 页

[54] 发明名称

鮰状黄姑鱼细菌性烂鳃病的预警方法

[57] 摘要

本发明公开了鮰状黄姑鱼细菌性烂鳃病发生的预警方法，包括①制备荧光抗体、②纯化荧光抗体、③检测等步骤。本发明通过荧光抗体的制备和纯化可得到大量的免疫荧光探针分子，成本低廉，检测时间短，为疾病的及时预警和防治赢得了宝贵的时间，而且该方法还能够检测到带菌状态或未发病的被感染个体，在实践中此类潜伏状态更加具有风险。因此，定期采用本发明的方法检测可能具有细菌性烂鳃病病原的待测标的物，以及时采取规避手段，在较低成本的前提下能够极大帮助养殖户降低养殖风险。而且，在制得免疫荧光探针分子后保存条件比较普通，检测的操作也很方便，适于推广。

1、鮰状黄姑鱼细菌性烂鳃病的预警方法，其特征是具有以下步骤：

①制备荧光抗体：取患病鱼的血清加入佐剂，注射到体重为2kg至3kg的兔体内，制备兔抗鱼血清抗体，并用荧光色素对所述的抗体进行标记，得到标记溶液待用；

②纯化荧光抗体：首先将步骤①的标记溶液用透析法除去该标记溶液中游离的荧光素，再采用纤维素过柱法除去过度标记的蛋白质分子，将纯化产物冷冻保存；

③检测：选取待测标的物，并将所述的待测标的物铺设载玻片表面固定；将上述固定有待测标的物的载玻片上滴加步骤②所述的纯化产物。

2、根据权利要求1所述的鮰状黄姑鱼细菌性烂鳃病的预警方法，其特征是：在步骤③中，所述的待测标的物为鮰状黄姑鱼的血清液或体表粘液或鳃丝片段。

3、根据权利要求2所述的鮰状黄姑鱼细菌性烂鳃病的预警方法，其特征是：所述的佐剂的成分按照体积份数含有羊毛脂1份、石腊油2份至9份。

4、根据权利要求3所述的鮰状黄姑鱼细菌性烂鳃病的预警方法，其特征是：所述的佐剂的混匀为乳浊液，并经高温灭菌；所述的佐剂还含有3mg/ml至4mg/ml的卡介苗。

5、根据权利要求3或4所述的鮰状黄姑鱼细菌性烂鳃病的预警方法，其特征是：在步骤①中，所述的荧光色素为异硫氰酸荧光素；所述的标记的步骤包括：用pH9.5碳酸盐缓冲液将抗体液稀释至20mg/ml，得到蛋白液；再按质量份数异硫氰酸荧光素1分、抗体20份至100份称取异硫氰酸荧光素，并用pH9.5碳酸盐缓冲液溶解，得到荧光素液；然后，混合所述的蛋白液和荧光素液，用碳酸钠溶液调整pH，使蛋白液和荧光素液的混合液的pH大于或等于9。

6、根据权利要求5所述的鮰状黄姑鱼细菌性烂鳃病的预警方法，其特征是：在步骤②中，所述的透析法的透析液采用0.01Mol/L、pH7.6 PBS或生理盐水；透析的温度为3℃至5℃；透析的时间为4天至7天。

7、根据权利要求5所述的鮰状黄姑鱼细菌性烂鳃病的预警方法，其特征是：在步骤②中，所述的纤维素过柱法采用磷酸盐缓冲液液阶梯洗脱，洗脱阶梯数至少为4个。

8、根据权利要求7所述的鮰状黄姑鱼细菌性烂鳃病的预警方法，其特征是：所述的磷酸盐缓冲液还含有0.05Mol/L至0.2Mol/L的NaCl。

9、根据权利要求6或8所述的鮰状黄姑鱼细菌性烂鳃病的预警方法，其特征是：在步骤③中，所述的固定的步骤为：将铺设有待测标的物载玻片在火焰上通过3次；再放在密闭湿盒中，37℃恒温30分钟；然后用0.1Mol/L、pH为8的磷酸盐缓冲液，最后冷风吹干。

鮰状黄姑鱼细菌性烂鳃病的预警方法

技术领域

本发明涉及一种水产动物疾病的预警方法，尤其涉及鮰状黄姑鱼细菌性烂鳃病的预警方法。

背景技术

鮰状黄姑鱼 (*Nibea micthioides* Chu Lo& Wu) 隶属于石首鱼科黄姑鱼属，闽、粤沿海渔民俗称鮰鲈，体重可达 25 至 30 kg，肉味鲜美，鱼鳔还具有药用价值，畅销于国际市场。鮰状黄姑鱼主要采用的是海水网箱养殖的方法，鮰状黄姑鱼虽然抗病能力较强，但随着养殖规模的不断扩大，其发生疾病的问题也日趋严重，给养殖户造成了极大的经济损失。有效地防治细菌性鱼病是提高生产经营效益的必要措施。

细菌性鱼病对鱼类养殖业危害广，威胁严重。由于鱼类生活在水中，直观性不及陆上动物；水又是很好的媒介体，病菌的传染较空气中更为容易，因此预防工作十分重要，尤其是监测健康鱼及病菌携带者，是有效防治鱼病的关键。鮰状黄姑鱼的细菌性烂鳃病的病原为杆状细菌，主要表现症状为病鱼体色发黑，游动缓慢，外界刺激反应迟钝，食欲减退，鱼体消瘦。捕起病鱼观察，可见病鱼鳃盖内表皮肤充血发炎，鳃丝粘液增多、肿胀，部分呈淡红色，淤血处呈紫红色，并可见小出血点。池水温达到 25 至 30℃ 时，易发生此病，各生长阶段鱼均有发生，发病率约 5% 至 10%。迅速、准确地诊断该鱼病，检测出细菌病原，是有效防治的关键。

发明内容

本发明所要解决的技术问题是提供一种人工养殖鮰状黄姑鱼细菌性烂鳃病发生的预警方法，达到提前预知，及时采取必要手段进行预防和处理以达到避免重大经济损失的目的。

本发明解决上述技术问题所采用的技术方案为：鮰状黄姑鱼细菌性烂鳃病的预警方法，其具有以下步骤：

①制备荧光抗体：取患病鱼的血清加入佐剂，注射到体重为 2kg 至 3kg 的兔体内，制备兔抗鱼血清抗体，并用荧光色素对抗体进行标记，得到标记溶液待用；

②纯化荧光抗体：首先将步骤①的标记溶液用透析法除去该标记溶液中游离的荧光素，再采用纤维素过柱法除去过度标记的蛋白质分子，将纯化产物冷冻保存；

③检测：选取待测标的物，并将待测标的物铺设载玻片表面固定；将上述固定有待测标的物的载玻片上滴加步骤②纯化产物。

为优化上述技术方案，本发明所采取的措施还包括：待测标的物为鮰状黄姑鱼的血清液或体表粘液或鳃丝片段。

佐剂的成分按照体积份数含有羊毛脂1份、石腊油2份至9份。

佐剂的混匀为乳浊液，并经高温灭菌；佐剂还含有3mg/ml至4mg/ml的卡介苗。

在步骤①中，荧光色素为异硫氰酸荧光素；标记的步骤包括：用pH9.5碳酸盐缓冲液将纯抗体液稀释至20mg/ml，得到蛋白液；再按质量份数异硫氰酸荧光素1分、抗体20份至100份称取异硫氰酸荧光素，并用pH9.5碳酸盐缓冲液溶解，得到荧光素液；然后，混合蛋白液和荧光素液，用碳酸钠溶液调整pH，使蛋白液和荧光素液的混合液的pH大于或等于9。

在步骤②中，透析法的透析液采用0.01Mol/L pH7.6 PBS或生理盐水；透析的温度为3℃至5℃；透析的时间为4天至7天。

在步骤②中，纤维素过柱法采用磷酸盐缓冲液(PBS)液阶梯洗脱，洗脱阶梯数至少为4个。

磷酸盐缓冲液(PBS)液还含有0.05Mol/L至0.2Mol/L的NaCl。

在步骤③中，固定的步骤为：将铺设有待测标的物载玻片在火焰上通过3次；再放在密闭湿盒中，37℃恒温30分钟；然后用0.1Mol/L、pH为8的磷酸盐缓冲液(PBS)，最后冷风吹干。

本发明的优点是通过荧光抗体的制备和纯化可到大量的免疫荧光探针分子，成本低廉，采用本发明的免疫荧光的检测方法不仅能快速检测病原，检测的时间一般不超过3h，为疾病的及时预警和防治赢得了宝贵的时间，而且该方法还能够检测到带菌状态或未发病的被感染个体，在实践中此类潜伏状态更加具有风险。携带病原的鱼由于个体免疫性状的差异性，如果其自身免疫力超出一般水平则可能终生不发病，然而其具有传播病原的风险。在免疫能力一般的鱼接触病原后，经短时期的潜伏就会大规模爆发，造成惨重的经济损失。因此，定期采用本发明的方法检测可能具有细菌性烂鳃病病原的待测标的物，以及时采取规避手段，在较低成本的前提下能够极大帮助养殖户降低养殖风险。而且，在制得免疫荧光探针分子后保存条件比

较普通，检测的操作也很方便，为本发明方法大量的推广使用创造了有利条件。

具体实施方式

以下结合附实施例对本发明作进一步详细描述。

实施例：

鮰状黄姑鱼细菌性烂鳃病的预警方法，具有以下步骤：

①制备荧光抗体：取患病鱼的血清加入佐剂，注射到体重为3kg的纯种新西兰兔体内，制备兔抗鱼血清抗体，并用荧光色素对上述抗体进行标记，得到标记溶液待用。

上述佐剂的成分按照体积份数含有羊毛脂1份、石蜡油5份。

佐剂配制方法：按比例将羊毛脂与石蜡油置容器内，用超声波使之混匀，高压灭菌，置4℃下保存备用。免疫前取等容积佐剂与免疫原溶液混合，用振荡器混匀成乳浊液。可以在免疫前取需要量佐剂置乳钵中研磨，均匀后再边磨边滴加入等体积抗原液（其中加卡介苗4mg/ml或者不加入卡介苗），加完后再继续研磨成乳剂，滴于冰水上5~10min内完全不扩散为止。为避免损失抗原，亦可用一注射器装抗原液，另一注射器装佐剂，二者以聚乙烯塑料管连接，然后二者来回反复抽吸，约数分钟后即能完全乳化。检查合格后即以其中一注射器作注射用。

取患细菌性烂鳃病的鮰状黄姑鱼的血清加入上述佐剂，注射到体重为3kg的纯种新西兰兔体内，制备家兔抗鱼血清抗体，并用荧光色素标记。

制备家兔抗鱼血清抗体：首次注射剂量为300μg，加强免疫的剂量约为首次剂量为1/4左右。每2周加强免疫一次。首次免疫时皮下注射百日咳疫苗0.5ml，加强免疫时不必注射百日咳疫苗。在第2次加强免疫后2周，从兔耳缘静脉取血，制备血清，用抑菌试验方式检测抗体效价。如未达到预期效价，需再进行加强免疫，直到满意时为止。当抗体效价达到预期水平时，即耳缘静脉或耳动脉取血。收集的血液置于室温下1h左右，凝固后，置4℃下，过夜析出血清，离心，4000rpm，10min。在无菌条件，吸出血清，加入荧光色素标记抗体。

上述荧光色素优选为异硫氰酸荧光素；异硫氰酸荧光素常用的标记法可用搅拌法，步骤为：

- a) 取一定量的抗体液，用0.5Mol/L pH9.5碳酸盐缓冲液稀释至20mg/ml。
- b) 按荧光素与抗体质量比一般用1:100称取异硫氰酸荧光素，用pH9.5碳酸

盐缓冲液溶解。

c) 将球蛋白液置于电磁搅拌器上，启动开关，轻轻搅拌，以不起沫为准。逐滴加入荧光素液（约 10min~15min 加完）。加完后，随时用试纸测定搅拌液的 pH 值，若低于 9.0，则应以碳酸钠溶液调整。置 4℃ 搅拌 12h 即可。

②纯化荧光抗体：首先将步骤①的标记溶液用透析法除去该标记溶液中游离的荧光素，再采用纤维素过柱法除去过度标记的蛋白质分子，将纯化产物冷冻保存。

标记后溶液是一个混合体，它包括蛋白质与荧光素的结合体，还有游离的荧光素、游离的蛋白质以及结合过多的蛋白质。

去除游离的荧光素：将标记好的抗体放入透析袋中于 0.01Mol/L、pH7.6 的磷酸盐缓冲液（PBS）或生理盐水中 4℃ 透析 5 天，每天换液 3 次，直至透析液中无游离色素为止。

去除过度标记的蛋白质分子：用 DEAE 纤维素过柱。利用阶梯洗脱进行，具体方法如下：

- a) 以 0.01Mol/L pH 7.6 PBS 液洗脱。
- b) 以 0.01 Mol/L pH 7.6 PBS 液（含有 0.05Mol/L NaCl）洗脱。
- c) 以 0.01 Mol/L pH7.6 PBS（含有 0.1Mol/L NaCl）洗脱。
- d) 以 0.01 Mol/L PH 7.6PBS（含有 0.2Mol/L NaCl）洗脱。

收集每部分有荧光抗体的洗脱液管，于 495nm 测荧光素的 OD 值，再于 280nm 测蛋白的 OD 值，查标准曲线，算出各管荧光素和蛋白质的浓度，并计算出 F/P 比值，浓缩后分装小瓶备用。层析柱上滞留的过度标记的蛋白质，可以用 1Mol/L 的 NaCl 洗脱。

去除交叉反应等非特异性染色因素：非特异性染色的干扰因素，包括免疫血清的不纯、类属抗原以及荧光色素的质量不高、标本处理不当等。可以以脏粉进行吸收。具体做法如下：每 1ml 标记抗体中加入脏器干粉 100mg，充分混合，于室温中振荡约 1 h，然后以 10 000 r/min 离心 30min，吸取标记抗体。必要时可减半脏粉用量再处理一次。脏器干粉优选免肝脏干燥后冻干粉碎制成。

经过脏粉吸收后的荧光抗体必须加 0.1% 叠氮钠防腐。分装小瓶冷冻保存。

③检测：选取待测标的物，并将上述待测标的物铺设载玻片表面固定；将上述固定有待测标的物的载玻片上滴加步骤②上述纯化产物。上述待测标的物为鮰状黄姑鱼的血清液或体表粘液或鳃丝片段。

在载玻片上，放上待检测鱼的待测标的物，让其自然铺开，冷风吹干，在火焰上通过3次固定，放在密闭湿盒中，37℃恒温30分钟，然后用0.1Mol/L、pH为8的PBS轻轻冲洗3次，再按顺序依次浸泡于PBS液的三个缸中，每缸5分钟，取出再经冲洗3次，冷风吹干。

在上述载玻片上滴加家兔抗鱼血清荧光抗体，令其盖满标本，置密闭湿盒中，37℃恒温30分钟，用0.1Mol/L、pH为8.0的PBS液轻轻冲洗3次，再按顺序依次浸泡于PBS液的三个缸中，每缸5分钟，取出再经冲洗3次，冷风吹干。然后再用蒸馏水轻轻漂洗3次，冷风吹干，加1滴缓冲甘油液，盖上盖玻片封片。

在荧光显微镜下观察，如果出现荧光，则鮰状黄姑鱼携带的细菌性烂鳃病的病原体超标，应具有潜在爆发的风险，应立即采取措施避免损失。

此检测方法的优点：免疫荧光技术不仅能快速检测患病动物的病原，检测的时间一般不超过3h，为疾病的及时预警和防治赢得了宝贵的时间，而且该方法还能够检测到带菌状态或未发病的被感染个体，在实践中此类潜伏状态更加具有风险。携带病原的鱼由于个体免疫性状的差异性，如果其自身免疫力超出一般水平则可能终生不发病，然而其具有传播病原的风险。在免疫能力一般的鱼接触病原后，经短时期的潜伏就会大规模爆发，造成惨重的经济损失。因此，定期采用本发明的方法检测可能具有细菌性烂鳃病病原的待测标的物，以及时采取规避手段，在较低成本的前提下能够极大帮助养殖户降低养殖风险。而且，在制得免疫荧光探针分子后保存条件比较普通，检测的操作也很方便，为本发明方法大量的推广使用创造了有利条件。

尽管已结合优选的实施例描述了本发明，然其并非用以限定本发明，任何本领域技术人员，在不脱离本发明的精神和范围的情况下，能够对在这里列出的主题实施各种改变、同等物的置换和修改，因此本发明的保护范围当视所提出的权利要求限定的范围为准。

专利名称(译)	状黄姑鱼细菌性烂鳃病的预警方法		
公开(公告)号	CN101566630A	公开(公告)日	2009-10-28
申请号	CN200910096309.4	申请日	2009-02-19
[标]申请(专利权)人(译)	浙江海洋学院		
申请(专利权)人(译)	浙江海洋学院		
当前申请(专利权)人(译)	浙江海洋学院		
[标]发明人	吴常文 于新秀 徐佳晶		
发明人	吴常文 于新秀 徐佳晶		
IPC分类号	G01N33/552 G01N33/533		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明公开了状黄姑鱼细菌性烂鳃病发生的预警方法，包括①制备荧光抗体、②纯化荧光抗体、③检测等步骤。本发明通过荧光抗体的制备和纯化可到大量的免疫荧光探针分子，成本低廉，检测时间短，为疾病的及时预警和防治赢得了宝贵的时间，而且该方法还能够检测到带菌状态或未发病的被感染个体，在实践中此类潜伏状态更加具有风险。因此，定期采用本发明的方法检测可能具有细菌性烂鳃病病原的待测标的物，以及时采取规避手段，在较低成本的前提下能够极大帮助养殖户降低养殖风险。而且，在制得免疫荧光探针分子后保存条件比较普通，检测的操作也很方便，适于推广。