

现代生物检测技术及其应用于对虾病毒诊断中的评介*

EVALUATION OF MODERN BIO-TECHNIQUE FOR DIAGNOSIS AND ITS APPLICATION IN PENAEID SHRIMP VIRUSES

丁 李光友 王 雷

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

* 为了预防对虾病毒性流行病的发生,首先必须建立病原的早期检测和疾病的早期诊断技术。随着生物技术的发展,一些灵敏的检测技术已在对虾病毒性疾病防治中得以应用。概括地讲,用于诊断的现代生物技术主要包括免疫学和核酸分子生物学两方面,现分别综述如下。

1 免疫学技术

1.1 单克隆抗体和多克隆抗体

多抗技术在医学中很早就得到应用,80年代以来才在对虾病原中得以应用。多克隆抗体来源于抗血清,含所有抗原决定簇的抗体,易发生交叉反应,出现假阳性,特异性依赖于抗原制剂的纯度,通过有限稀释或非特异性抗原吸收可以改善。另外就是不同个体针对同一抗原产生的多抗存在着差异,同时多抗具有多个决定簇使标记困难,因此在酶联免疫吸附中应用多抗效果不够理想。

单克隆抗体技术是随杂交瘤细胞建立而发展起来的,可以产生对特异决定簇的特异抗体。优点是制备抗体时抗原不须高度纯化,特异性强,且产生一种单抗的细胞可以连续使用,然而获取大量的单克隆是一项费时的的工作,且实验条件严格。另外就是细胞融合后产生何种抗体不易预测,筛选工作非常复杂,经验也非常重要。

当今的检测一般采用单抗,按标记物的不同,免疫分析法包括放射免疫分析、荧光免疫分析、酶联免疫分析、化学发光免疫分析、浊度免疫分析等,荧光免疫分析和酶联免疫分析的进展如下。

1.2 荧光免疫分析

即用荧光素标记抗体或第二抗体,一般采用间接法,可以避免各种抗体都要分别进行标记。抗原与抗体(或还有第二抗体)形成复合物后在荧光显微镜下发光,结果很直观,费时少,相当灵敏,只是分析样品

有限,还需昂贵的荧光显微镜,实验时要设立对照,除去本底的影响,随着计算机的应用将大大改善。

这方面主要进展是时间分辨荧光免疫分析法的建立及其改进,这里不是用荧光素标记,而是用稀土元素,与放射免疫比较,具完全相似的特异性、精密度,而标准曲线范围和最小检出值远超出放射免疫,且标记物设备简便、取样少、标记快、可长期保存,无衰变,荧光信号强,非特异干扰小,将是最有前途的超微检测手段之一。魏文清等^[4]用此法测定人血清铁蛋白采用钨标记抗体,灵敏度达 2 ng/ml ,测量速度快。

1.3 酶联免疫吸附分析(ELISA)

它是目前发展最快的免疫标记技术,且得到广泛应用。由于多抗在包被时需一定浓度和数量,且制备时需高纯的抗原,故一般采用单抗,ELISA具有灵敏、易操作、快速、可以定量等优点,采用夹心法灵敏度更高。单抗的使用关键是样品的处理,使抗原更易释放出来且不被酶消化。样品处理的自动化以便多样品分析,实行野外检测及试剂盒化等,这是研究的热点。

近年来对多糖等抗原利用真空过滤技术直接吸附到醋酸纤维素膜上,避免化学修饰,细胞表面抗原先用戊二醛固定改善了包被技术。采用酶级联放大系统,简化操作程序等可进一步提高ELISA灵敏度。双特异单抗的产生,使酶直接与抗体结合,省去化学交联,简化了标记过程,染色本底低,又由于此单抗由细胞产生,效价高可连续生产,对ELISA十分有利。此外,随着基因工程的发展,可利用克隆的方法直接在植物体和细菌里表达单抗,这样单抗制备更为简单,产率高,适于ELISA法的兴起。检测时选择适当的抗体组合、血清的预处理、ELISA与其他技术结合(如层析)、采用构象型单抗及纯化抗体和冰冻样品处理等可以避免

* 国家攀登计划B, 85080704号。
中国科学院海洋研究所调查报告第3223号。
收稿日期:1997年6月9日

非特异反应发生,提高特异性。邹岳奇等利用高级 BASIC 语言开发了一种微机程序,对 ELISA 数据进行微机分析,准确地将所测数据转化成抗原的实际浓度,对大量样品进行自动化测定特别有用。

关于免疫荧光及 ELISA 在对虾病毒检测中的应用列于表 1。

表 1 免疫学技术在对虾病毒检测中的应用

方 法	病 毒	文 献
免 疫 荧 光 技 术	IHHNV ¹⁾	[12]
	BMN(中肠腺坏死病毒)	[16]
	BPV(对虾杆状病毒)	[8]
	MBV(草虾杆状病毒)	[2]
ELISA	IHHNV	[12]
	BPV	[12]
	中国对虾杆状病毒	[3]

1) 为传染性皮下及造血组织坏死性病毒。

2 核酸分子生物学技术

包括酶切图谱,限制性片段长度多态分析,电泳,核酸杂交,聚合酶链反应(PCR)等,这里就核酸杂交及 PCR 进行阐述。

2.1 DNA 杂交

DNA 探针制备可以克隆筛选和人工合成,已知序列的情况下采用后者。此法灵敏度与 ELISA 相当,达 0.01 ng 至 1 ng 之间,优点是不须多的样品处理,提高了灵敏度。

DNA 杂交的改进主要在探针标记上,标记包括同位素标记以及非同位素标记,由于后者的优越性,它成为研究的热点。生物素标记法如采用光生物素标记,简便易行,且探针为红色,易观察。标记时如果交联臂和生物桥越长,碱性大分子越小,灵敏度就越高,故用链霉亲和素-生物素化多聚碱性磷酸酶可以提高灵敏度,且预处理时用蛋白酶消化其背景会进一步减轻。荧光标记检测特定序列最为有效,克服了酶标记的灵敏度低、不能定量的缺点。汞化探针的采用又避免了在生物素、荧光素标记时目的基因的影响,使特异性,灵敏度又提高,原理是嘧啶第 5 位碳汞化后可以与巯基结合,这样探针易制备,重复性好。地高辛标记探针灵敏、经济、实用,相对生物素标记而言,降低了本底,灵敏度提高,实践表明如果用随机引物法标记地高辛,标记效率进一步提高,标记反应不受琼脂糖抑制等,标记也稳定。

DNA 杂交发展的另一方面就是在简化标记程序上。Keller 将探针的制备、回收和纯化等操作简化合

并,省去繁琐的 DNA 片段回收纯化过程,操作方便,减少了探针的损失。李柏青等探索了切口平移制备生物素标记探针的简便方法,标记重复性好,制备探针易保存,省去分离步骤,探针浓度大,使杂交时间缩短。另外,对 DNA 探针杂交条件进行了全面的试验,表明探针浓度在 0.1~0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之间,杂交时间 16 h 比较合适,并且在杂交液中加入一定量的硫酸葡聚糖可使检测敏感性进一步提高。用脱脂干奶粉代替鱼精 DNA 等作预杂交试剂,不仅降低了成本而且特异杂交信号增强。各种改进方法有着不同的优点,具体应用时可以选择适当的方法。

在对虾病毒检测方面,DNA 杂交的应用列表如下,由此看来 DNA 杂交进展最快,应用也最广泛。

表 2 DNA 杂交在对虾病毒检测中的应用

病 毒	探针大小 (kb)	标记物	效 果	文 献
IHHNV	4.1	地高辛	最灵敏	[12]
BPV	3.9	化学发光	可区分株系	[7,5]
	4.2	/	原位杂交特异性	[9]
MBV	0.67	/	特异性好	[13]
	/	地高辛	特异性强	[14]
HPV	7.9	光敏生物素	灵敏度达 2.9 pg	[1]
BMNV	/	放射性标记	可分型	[15]

2.2 聚合酶链反应(PCR)

PCR 法自 80 年代初发明以来得以广泛的应用,基本思路是基因扩增,可以使引物间的核酸片段扩增 10^6 以上,至关重要是合成引物,引物又分保守片段和特异片段引物。将此法用于诊断,公认是最灵敏的,十分简单,可以商品化自动化,不过较昂贵,直接检测效果有待提高。

PCR 技术现已得到很大扩展,成熟的方法包括重组环 PCR、不对称 PCR、倒转 PCR、多重 PCR、荧光 PCR、差别 PCR 等^[11]。其中荧光 PCR,可以直接分析,灵敏度提高;差别 PCR 可以测基因的拷贝数,在遗传学上有着很大用途。

值得一提的是 PCR 方法的改进,现在一般 PCR 操作分三步温控,即有三个温度的变化。刘学锋等对 PCR 进行了改良,实行两步控温法,这样缩短了反应时间,简化了操作程序,使扩增仪降低成本。PCR 的局限是反应时存在着 10^{-4} 错配,对小片段而言问题不大,但对大片段就困难了,大片段的 PCR 技术是目前要解决的首要问题,以达到特异性提高,目标产物更精确。

最近又发展了一种新的检测技术,即磁性免疫

PCR(Magnetic immuno PCR),在医学上研究较多。此法是用一种磁性颗粒包被第二抗体,待单抗与被检样品结合后,加入第二抗体,一起作用后形成复合物;通过磁力将复合物分离,分离将复合物悬浮加热后可释放抗原,稍离心后,上清则可用于PCR检验^[10,17]。这种方法非常灵敏,免去了杂交时的转膜手续,并且不需用作单纯PCR时DNA的精细纯化,使实验容易、迅速,整个过程不超过7h。这是一种很有前途的方法,各个细节有待进一步研究,有望在对虾病毒检测中应用。

PCR技术在对虾病毒检测中应用还不是很多,一方面是利用PCR扩增DNA探针^[2],另一方面是用PCR检测。上海生化所制得的中国对虾杆状病毒PCR诊断试剂盒,灵敏度达0.125 μg,在上海、浙江等地应用时具有特异性。也有人用昆虫杆状病毒保守片段作引物,来检测对虾病毒,效果也较明显,但特异性不强。

3 评价与展望

总的来讲,对虾病毒的检测集中在DNA杂交及免疫学方法上。一般PCR比DNA杂交,荧光标记比酶免疫标记要灵敏,但由于条件限制,用DNA杂交、酶联免疫法不失为好的方法,况且PCR限于实验室操作^[6],荧光免疫需特殊仪器,故采用何法可视条件而定。

检测趋势无疑是要提高灵敏度,为弥补各自的不足,应采用多种方法的结合使用,如制备DNA探针时,可利用PCR法扩增探针使探针量增加^[13]。又如DNA杂交与ELISA也可结合使用,即采用酶标记探针的方法,使两种技术结合。PCR技术也可与DNA杂交结合使用,用DNA杂交检测PCR产生的结果,荧光标记也可用于PCR产物的检测,使观察结果更直观。总之,随着方法的改进,病毒的检测将进一步微量化。

4 结语

对虾病毒的现代生物检测技术还不是很成熟,仅有DNA杂交试验进展最快,应用最多,其他方法需进一步探索。

参考文献

- [1] 张晓燕,1993. 生物技术 4: 44~46.
- [2] 陈秀男,1990. 养虾世界. 养殖世界杂志社, 63~71.
- [3] 黄,1995. 海洋科学 1: 29~34.
- [4] 魏文清,1992. 生物化学与生物物理进展 19(5): 373~377.
- [5] Bonam i, J. R., 1993. *J. General Virology* 74: 2 637-2 643.
- [6] Boondeekhun, H. S., 1993. *J. Med. Microbiol.* 38: 384-387.
- [7] Bruce, L. D., 1993. *Dis. Aquat. Org.* 17: 45-47.
- [8] Bruce, L. D., 1994. *J. Aqua. Anim Health.* 6(4): 355-359.
- [9] Chaimarong W., et al., 1996. *Aquaculture* 143: 23-32.
- [10] Fluit, A. C., 1993. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1 342-1 346.
- [11] Jones D. H., et al., 1990. *Nature* 344(6 246): 793-798.
- [12] Lightner, D. V. et al., 1993. *Aquaculture* 116: 15-23.
- [13] Lu C. C. et al., 1993. *J. Fish Dis.* 5: 551-559.
- [14] Lu C. C., 1995. *J. Fish Diseases* 18(4): 337-345.
- [15] M isao A rim oto, et al., 1995. *Aquaculture* 132: 213-220.
- [16] M om oyam a, K., et al., 1988. *Nippon Suisan Gakkaishi* 54: 45-48.
- [17] W idjoatm odjo, M. N., et al., 1992. *J. Clin. Microbiol.* 30: 3 195-3 199.