

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 21/27 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610041452.X

[43] 公开日 2007年3月21日

[11] 公开号 CN 1932519A

[22] 申请日 2006.9.5

[21] 申请号 200610041452.X

[71] 申请人 江苏省微生物研究所有限责任公司

地址 214063 江苏省无锡市钱荣路7号

[72] 发明人 赵晓联 孙蔚榕 陆茂林 赵春城

龚燕 蔡建荣 张东升 蔡正森

时瑾 沈雯琰

[74] 专利代理机构 无锡市大为专利商标事务所

代理人 时旭丹

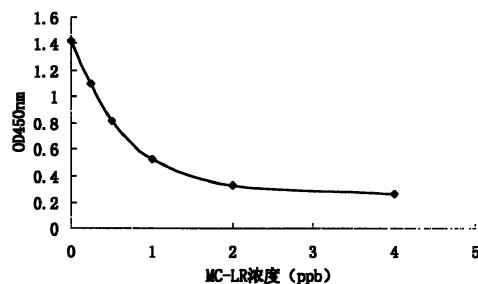
权利要求书2页 说明书6页 附图1页

[54] 发明名称

一种检测微囊藻毒素 MC-LR 的酶联免疫试剂盒及其检测方法

[57] 摘要

一种检测微囊藻毒素 MC-LR 的酶联免疫分析试剂盒及其检测方法,属于酶联免疫分析(ELISA)技术领域,用于对水体、饮用水和藻类制品中微囊藻毒素(MC-LR)含量的检测。本试剂盒测定的基础是标记免疫反应,微孔板包被有 MC-LR-BSA,加入 MC-LR 标准或样品,再加入 MC-LR 抗体。游离的 MC-LR 与微孔板上的 MC-LR-BSA 竞争 MC-LR 抗体,没有连接的 MC-LR 抗体被洗涤除去,加入 HRP-羊抗兔抗体,标记免疫反应后没有连接的 HRP-羊抗兔抗体被洗涤除去。加显色液、终止液后,用酶标仪测定其吸光度,吸光度的值与样品中的 MC-LR 浓度成反比,对照标准曲线即可确定被测样品中 MC-LR 的含量。本试剂盒结构简单,使用方便、廉价、灵敏度高,可以达到 0.25ng/ml。



1、一种检测微囊藻毒素 MC-LR 的酶联免疫分析试剂盒，其特征是由 96 或 48 或 24 孔包被板 (1)，微囊藻毒素标准品 (2)，抗微囊藻毒素的抗体冻干品 (3)，酶标记的羊抗兔抗体冻干品 (4)，洗涤液 (5)，显色液 A (6)，显色液 B (7) 和终止液 (8) 所组成；所述的酶标记的羊抗兔抗体冻干品为辣根过氧化物酶-羊抗兔抗体冻干品，洗涤液为含有吐温和 NaN_3 的磷酸盐缓冲溶液，显色液 A 为含有过氧化氢的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液，显色液 B 为四甲基联苯二胺的乙醇溶液，终止液为硫酸溶液。

2、根据权利要求 1 所述的试剂盒，其中的包被板(1)包被固相抗原，用 50mmol/L pH9.6 Na_2CO_3 - NaHCO_3 的缓冲液将微囊藻毒素-牛血清白蛋白稀释至 10mg/L 做为包被液，96 或 48 或 24 孔微孔板各孔加 100 μl ，4 $^\circ\text{C}$ 放置过夜，弃去包被液，冲洗三次，加 200 μl 含 3g/L 牛血清白蛋白的上述 Na_2CO_3 - NaHCO_3 缓冲液封闭，4 $^\circ\text{C}$ 放置过夜，弃去封闭液，吹干，板条密封后置-20 $^\circ\text{C}$ 冷冻保存。

3、根据权利要求 1 所述的试剂盒，其中的微囊藻毒素标准品 (2)，从 MC-LR 纯品中稀释得到，稀释液为去离子水，共 6 瓶，MC-LR 浓度分别为：0ng/ml，0.25ng/ml，0.5ng/ml，1ng/ml，2ng/ml，4ng/ml。

4、根据权利要求 1 所述的试剂盒，其中的微囊藻毒素的抗体冻干品 (3)，用弗氏完全佐剂或弗氏不完全佐剂 1.2ml 混合 1mg 微囊藻毒素-匙孔血蓝蛋白，用匀浆器混合 2 小时，制得油包水抗原乳化剂，取 600 μl 制备好的油包水抗原乳化剂，在新西兰大白兔身上多位点地进行皮下注射，在免疫 3~4 次后，可进行鉴定，血清合格后稀释、分装、冻干备用。

5、一种用权利要求 1 所述的试剂盒检测微囊藻毒素的方法，其特征是取包被有微囊藻毒素-牛血清白蛋白的微孔包被板，加入 MC-LR 标准品或处理好的样品到各自的微孔中，再加入 MC-LR 抗体，振荡反应，洗涤液洗涤，加酶标记的羊抗兔抗体，进行标记免疫反应，洗涤液洗涤，加显色液 A 和显色液 B，暗处静置后加终止液，在 450nm 处测量吸光度，对照标准曲线计算样品中的 MC-LR 含量。

6、根据权利要求 5 所述的检测微囊藻毒素的方法，其操作为：取包被有微囊藻毒素-牛血清白蛋白的微孔包被板，加入 50 μl 的 MC-LR 标准品或处理好的样品到各自的微孔中，加 50 μl 抗 MC-LR 抗体，37 $^\circ\text{C}$ 孵育 1 小时，洗涤液洗三次，加 100 μl 辣根过氧化物酶-羊抗兔抗体，37 $^\circ\text{C}$ 孵育 1 小时，用洗涤液洗六次，加 50 μl 显色液 A 和 50 μl 显色液 B，暗处静置 15 分钟后加终止液，在 450nm 处测其吸光

度值，从标准曲线计算样品中的 MC-LR 含量。

7、根据权利要求 6 所述的检测微囊藻毒素的方法，其中的样品水样处理：10000g 高速离心 30min，取上清液为待测样品；或者用 0.22um 超滤膜过滤，滤液为待测样液。

一种检测微囊藻毒素 MC-LR 的酶联免疫试剂盒及其检测方法

技术领域

一种检测微囊藻毒素 MC-LR 的酶联免疫分析试剂盒及其检测方法，属于酶联免疫分析（ELISA）技术领域，用于自然环境中水体、饮用水和藻类制品中微囊藻毒素（简称 MC-LR）含量的检测。

背景技术

藻毒素（Microcystins，简称 MCYST 或 MC）已成为环境水体中被普遍关注的污染物之一，中国科学院《2002 年科学发展报告》中专门论述了淡水中“水华”造成的最大危害是饮用水源受到威胁。藻毒素通过食物链影响人类的健康，蓝藻“水华”的次生代谢产物 MC 能损害肝脏，具有促癌效应，直接威胁人类的健康和生存。100 多年来，藻毒素引起的人畜中毒事件引起了世界范围内的关注，加拿大，英国，美国，澳大利亚，南非等国都有报道。我国环境白皮书公布的《环境问题的现状资料》中资料十：达赉湖“祸水”揭秘，指出近 30 年来达赉湖地区的人畜中毒死亡事件都是“微囊藻毒素”引起的。国内外许多文献都报道了藻毒素与原发性肝癌的相关性。

由于目前缺乏防止藻类“水华”发生的有效措施，因此要预防和消除藻毒素对人畜的危害，监测和控制藻毒素在饮用水中的限量是行之有效的方法。国家《生活饮用水水质卫生规范》中规定 MC-LR 的限值为 0.001 mg/L，而要保证饮用水中藻毒素的限值，建立快速，灵敏的藻毒素分析方法至关重要。

藻毒素是一种七肽，为单环结构，1 位是 D-丙氨酸，2，4 位是可变的左旋氨基酸基团，6 位是 γ 连接的 D-氨基酸，3 位是特殊的氨基酸： β 连接的 D-红细胞- β -甲基天门冬氨酸（MeAsp），5 位是（2S，3S，8S，9S）-3-氨基-9-甲氧基-2，6，8-三甲基-10-苯基-4，6-二烯酸（Adda），7 位是 N-甲基脱氢丙氨酸（Mdha），整个结构可写作（-D-Ala-L-D-MeAsp-L-Z-Adda-D-Glu-Mdha-）。不同种类的 MC 的化学组成主要区别在于 2，4 位的 2 种左旋氨基酸的不同和 MeAsp、Mdha 基团的甲基化或去甲基化。2，4 位氨基酸也是不同亚型的藻毒素的命名依据，最常见的是 MC-LR，其中 L 代表亮氨酸、R 代表精氨酸，因此，分析方法的研究也主要针对 MC-LR 来建立的。

目前，国内外检测 MC-LR 的方法有以下几类。（一）化学分析法：包括薄层

色谱法 (TLC), 液相色谱法 (LC), 液-质联用法 (HPLC-MS), 毛细管电泳法 (CE) 以及示差脉冲极谱法。(二) 生物法: 包括生物鉴定法、微毒素检测法和蛋白磷酸 (PP1/PP2) 抑制法。(三) 免疫化学法, 包括放射免疫法 (RIA), 间接竞争酶联免疫法 (idc-ELISA), 直接竞争酶联免疫法 (dc-ELISA), 夹心免疫法 (Sandwich-ELISA)。在国内应用较广泛的是高效液相色谱法, 最低检测浓度为 $0.01\mu\text{g/mL}$ 。酶联免疫分析法 (ELISA), 由于其特异性强, 灵敏度高, 操作简便, 不需直接接触毒素, 且特别适于大批量样品的检测等优点而越来越被人们所重视和采用。尽管如此, 国内在 MC-LR 的 ELISA 方法到试剂盒的转化中技术不成熟, 检测的灵敏度和试剂的稳定性还无法达到要求, 致使无法实际应用, 所以目前为止没有一个国产的 MC-LR 的 ELISA 试剂盒面市。

发明内容

本发明的目的在于提供一种检测微囊藻毒素 MC-LR 的酶联免疫分析试剂盒及其检测方法, 用于自然环境中水体、饮用水和藻类制品中微囊藻毒素 (MC-LR) 含量的检测。

本发明的技术方案: 该检测 MC-LR 的试剂盒是由 1、96 或 48 孔或 24 孔包被板, 2、微囊藻毒素 MC-LR 标准品, 3、微囊藻毒素 MC-LR 的抗体冻干品, 4、酶标记的羊抗兔抗体冻干品, 5、洗涤液, 6、显色液 A, 7、显色液 B 和 8、终止液所组成。

包被板包被固相抗原, 用 50mmol/L pH9.6 $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ 的缓冲液将微囊藻毒素-牛血清白蛋白 (MC-LR-BSA) 稀释至 10mg/L 做为包被液, 96 或 48 或 24 孔微孔板各孔加 $100\mu\text{l}$, 4°C 放置过夜, 弃去包被液, 冲洗三次, 加 $200\mu\text{l}$ 含 3g/L BSA 的上述 $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ 缓冲液封闭, 4°C 放置过夜, 弃去封闭液, 吹干, 板条密封后置 -20°C 冷冻保存。

微囊藻毒素标准品从 MC-LR 纯品中稀释得到, 稀释液为去离子水, 共 6 瓶, MC-LR 浓度分别为: 0ng/ml , 0.25ng/ml , 0.5ng/ml , 1ng/ml , 2ng/ml , 4ng/ml 。

本发明主要采用酶联免疫分析法 (ELISA) 来检测 MC-LR。采用 ELISA 的技术主要有两个方面: 特异性多克隆抗体的制备, 利用抗原免疫家兔, 获得含有抗体的血清, 经过生化提纯分离免疫球蛋白; 第二, MC-LR 的 ELISA 试剂盒的制备。

微囊藻毒素的抗体冻干品, 用弗氏完全佐剂或弗氏不完全佐剂 1.2ml 混合 1mg 微囊藻毒素-匙孔血蓝蛋白, 用匀浆器混合 2 小时, 制得油包水抗原乳化剂, 取 $600\mu\text{l}$ 制备好的油包水抗原乳化剂, 在新西兰大白兔身上多位点地进行皮下注射, 在免疫 3~4 次后, 可进行鉴定, 血清合格后稀释、分装、冻干备用。

测定方法为：测定的基础是标记免疫反应。取包被有 MC-BSA 的微孔包被板，加入 MC-LR 标准品或处理好的样品到各自的微孔中，再加入 MC-LR 抗体，振荡反应，洗涤液洗涤，加酶标记的羊抗兔抗体，进行标记免疫反应，洗涤液洗涤，加显色液 A 和显色液 B，暗处静置后加终止液，在 450nm 处测量吸光度，对照标准曲线计算样品中的 MC-LR 含量。

其操作为：取包被有 MC-BSA 的微孔包被板，加入 50 μ l 的 MC-LR 标准品或处理好的样品到各自的微孔中，加 50 μ l 抗 MC-LR 抗体，37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时，洗涤液洗三次，加 100 μ l 辣根过氧化物酶 (HRP) -羊抗兔抗体，37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时，用洗涤液洗六次，加 50 μ l 显色液 A 和 50 μ l 显色液 B，暗处静置 15 分钟后加终止液，在 450nm 处测其吸光度值，从标准曲线计算样品中的 MC-LR 含量。

本发明的有益效果：该试剂盒结构简单，使用方便、廉价、灵敏度高，可以达到 0.25ng/ml。

附图说明

图 1：检测微囊藻毒素的试剂盒示意图。1、96 或 48 或 24 孔包被板，2、微囊藻毒素标准品，3、微囊藻毒素的抗体冻干品，4、酶标记的羊抗兔抗体冻干品，5、洗涤液，6、显色液 A，7、显色液 B，8、终止液。

图 2：微囊藻毒素 MC-LR 标准曲线图

具体实施方式

实施例 1 制备试剂盒和检测水样

MC-LR 是典型的半抗原，故在免疫反应中具有反应原性，但需与大分子物质结合后才有免疫原性，MC-LR 中的羧基为活性基团，可与蛋白质的氨基结合。因此可用碳二亚胺法，使 MC-LR 与大分子蛋白匙孔血蓝蛋白 (KLH) 结合，以合成的 MC-LR-KLH 作为人工合成的免疫抗原进行动物免疫。

MC-LR-KLH 抗原的制备：

- 1、用 1ml 二甲基甲酰胺 (DMF) 溶解 1-2mg MC-LR；
- 2、用 1ml 的 0.13mol/L NaHCO₃ 偶联缓冲液溶解 1-2mg KLH 载体蛋白；
- 3、取 0.4-0.8mg MC-LR 的溶液加到 KLH 的溶液中；
- 4、溶解 2-4mg 碳二亚胺 (EDC) 于 1mL 双蒸水，并取 50-100 μ L 加入到上述混合液中，室温作用 2 小时 (避光)；
- 5、离心后取上清液上柱 (Sephadex G-25) 分离，进行紫外扫描检测。

多克隆微囊藻毒素抗体冻干品的制备：

1. 选取 4 周大的,体重约 1.5Kg 的健康新西兰大白兔。MC-LR 是一种半抗原，

将 MC-LR 和 KLH 相连接作为抗原。

2. 油包水抗原乳化剂的制备：用弗氏完全佐剂或弗氏不完全佐剂 1.2ml 混合 2mg MC-LR-KLH，用匀浆器混合 2 小时。将制好的乳化剂滴入盛有冷水的烧杯中，以油滴状态能完整地停留在水面上，而不扩散，表明是稳定的。

3. 免疫兔子及抽血：先将兔子背部的毛小心剪去，然后取 600 μ L 制备好的油包水抗原乳化剂，多位点地进行皮下注射，使抗原能缓慢扩散，每隔 1~2 周免疫一次，共需六次，在免疫 3~4 次后，从兔子的耳缘静脉抽血约 1 ml，离心 10min 后，得血清可进行鉴定。合格后稀释至适当浓度，按需分装，冻干备用，即为抗 MC-LR 抗体冻干品。

包被板固相抗原制备：

将 MC-LR-BSA 用 50mmol/L Na_2CO_3 - NaHCO_3 pH9.6 缓冲液稀释至 10mg/L 的包被液，96（或 48 或 24）孔微孔板各孔加 100 μ L，4 $^\circ\text{C}$ 放置过夜。弃去包被液，冲洗三次，加 200 μ L 含 1g/L 卵清蛋白（OVA）的上述 Na_2CO_3 - NaHCO_3 缓冲液封闭，4 $^\circ\text{C}$ 放置过夜。弃去封闭液，吹干，板条密封后置 -20 $^\circ\text{C}$ 冷冻保存。

试剂的配制：

（1）标准微囊藻毒素（MC-LR）：（0ng/ml, 0.25ng/ml, 0.5ng/ml, 1ng/ml, 2ng/ml, 4ng/ml），从 MC-LR 纯品中稀释得到，稀释液为去离子水。

（2）辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体冻干品（HRP-羊抗兔抗体）：市售，珠海百奥生物科技有限公司生产。

（3）洗涤液：14.5mmol/L NaCl、0.2ml/L Tween-80 和 0.2% NaN_3 的 50mmol/L 磷酸盐缓冲液 pH7.4。

（4）显色液 A 的配制：0.2M Na_2HPO_4 25.7ml, 0.1M 柠檬酸 24.3ml, 50ml 30% H_2O_2 。

（5）显色液 B 的配制：称取 5mg 四甲基联苯二胺（TMB）加入 2.5ml 无水乙醇中，可加热至 37 $^\circ\text{C}$ ~40 $^\circ\text{C}$ 直到 TMB 完全溶解。

（6）终止液 2mol/L 的 H_2SO_4

以 48 孔测试盒为例，每一个盒中的试剂足够进行 48 个测量，盒中的材料如下：

(1) 1 \times 48 孔板（4 条 \times 12 孔，可以拆分为单孔）包被有 MC-LR-BSA。

(2) 6 \times MC-LR 标准液, 1.0ml/瓶, 标准液浓度为：0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 ng/ml。

(3) 1 \times MC-LR 抗体冻干品，用时 3ml 去离子水溶解。

(4) 1 \times HRP-羊抗兔抗体冻干品，用时 8ml 去离子水溶解。

(5) 1 \times 洗涤液：20 ml，用时以去离子水 1：15 稀释。

(6) 1×显色液 A: 4.5ml 。

(7) 1×显色液 B: 4.5ml。

(8) 1×终止液: 4.5ml

实验室应自备的试剂

蒸馏水或去离子水。

测定之前注意事项

1.使用之前将所有试剂回升至室温(18-30℃)。

2.使用之后立即将所有试剂放回 2-8 ℃。

3.如果样品量大建议使用多通道移液器。

4.在所有恒温孵育过程中,避免光线照射。

5.取出需用数量的微孔板及框架,将不用的微孔板放进原锡箔袋中并且与提供的干燥剂一起重新密封,保存于 2-8℃。

具体检测步骤如下:

先将样品进行处理: 将太湖水样 1000g 高速离心 20min, 取上清为待测样液。,

取 MC-LR-BSA 板条, 加入 50 μ l 的 MC-LR 标准或处理好的样品到各自的微孔中, 每个标准和样品必须使用新的吸头, 加 MC-LR 抗体 50 μ l, 移液器管尖千万不要接触到放进孔中的液体, 37℃孵育 1 小时, 洗涤液洗三次, 加 HRP-羊抗兔抗体 100 μ l, 37℃孵育 1 小时, 用洗涤液洗三次, 加 50 μ l 显色液 A 和 50 μ l 显色液 B, 暗处静置 15 分钟后加终止液, 在 450nm 处测量吸光度, 从标准曲线计算样品中的 MC-LR 含量。见表 1, 该例的样品中 MC-LR 的含量为 0.31 ng/ml。

表 1

MC-LR 标准点							太湖水样
MC-LR 浓度 (ng/ml)	0	0.25	0.5	1	2	4	0.27
吸光度 (OD ₄₅₀)	1.414	1.091	0.813	0.523	0.326	0.260	1.081

实施例 2,

试剂盒提供的试剂与实施例 1 相同, 用于检测藻制品。

具体检测步骤如下:

先将藻制品进行处理: 将藻制品样品粉碎至 20 目, 取 5 克样品放在试管中, 加入 25ml 0.01mol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲液。加塞振荡 3 分钟, 过滤, 滤纸采用新华 1 号纸。取 1ml 滤液用 9ml 蒸馏水或去离子水进行稀释, 备用。

取 MC-LR-BSA 板条，加入 50 μ l 的 MC-LR 标准或处理好的样品到各自的微孔中，每个标准和样品必须使用新的吸头，加 MC-LR 抗体 50 μ l，移液器管尖千万不要接触到放进孔中的液体，37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时，洗涤液洗三次，加 HRP-羊抗兔抗体 100 μ l，37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时，用洗涤液洗三次，加 50 μ l 显色液 A 和 50 μ l 显色液 B，暗处静置 15 分钟后加终止液，在 450nm 处测量吸光度，从标准曲线计算样品中的 MC-LR 含量。见表 2，该例的样品中 MC-LR 的含量为 190 ng/g。

表 2

MC-LR 标准点							藻制品
MC-LR 浓度 (ng/ml)	0	0.25	0.5	1	2	4	3.8
吸光度 (OD ₄₅₀)	1.414	1.091	0.813	0.523	0.326	0.260	0.270

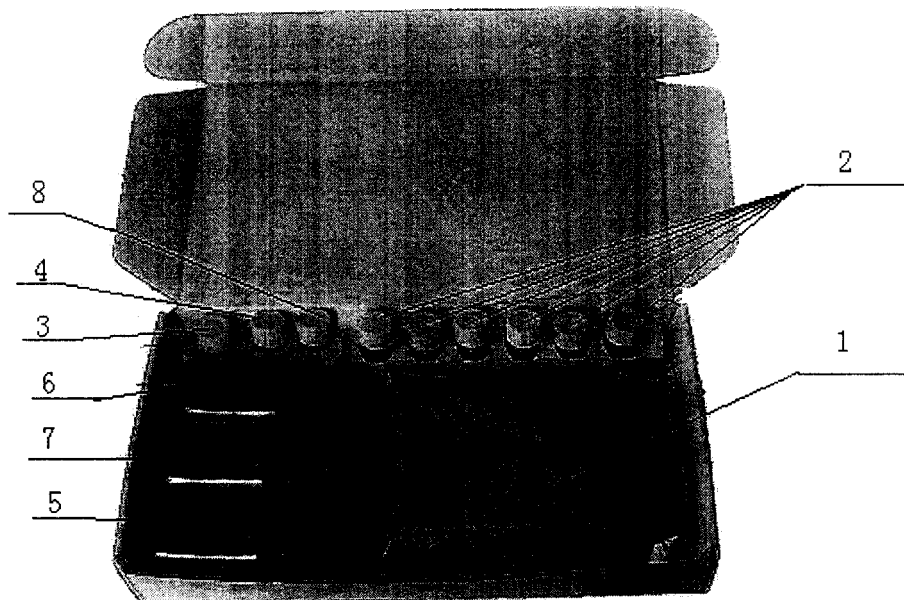


图 1

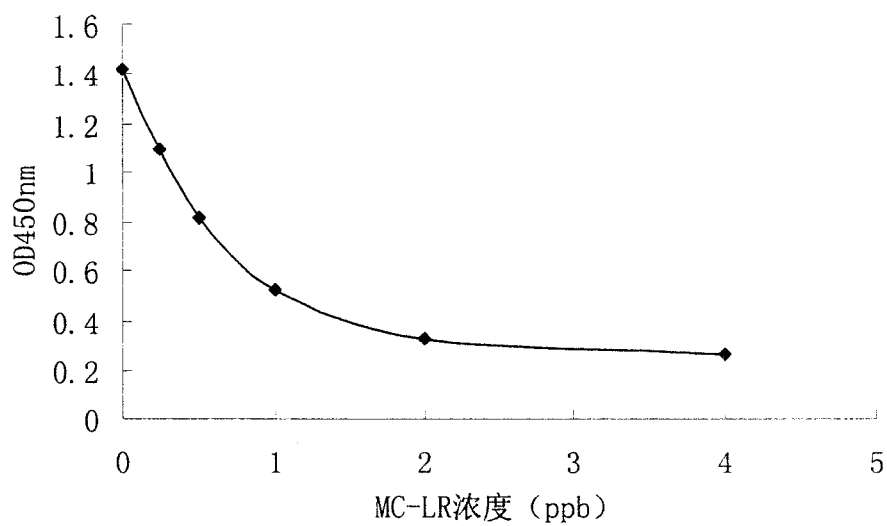


图 2

专利名称(译)	一种检测微囊藻毒素MC - LR的酶联免疫试剂盒及其检测方法		
公开(公告)号	CN1932519A	公开(公告)日	2007-03-21
申请号	CN200610041452.X	申请日	2006-09-05
[标]申请(专利权)人(译)	江苏省微生物研究所有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	江苏省微生物研究所有限责任公司		
当前申请(专利权)人(译)	江苏省微生物研究所有限责任公司		
[标]发明人	赵晓联 孙蔚榕 陆茂林 赵春城 龚燕 蔡建荣 张东升 蔡正森 时瑾 沈雯琰		
发明人	赵晓联 孙蔚榕 陆茂林 赵春城 龚燕 蔡建荣 张东升 蔡正森 时瑾 沈雯琰		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/531 G01N21/27		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种检测微囊藻毒素MC - LR的酶联免疫分析试剂盒及其检测方法，属于酶联免疫分析(ELISA)技术领域，用于对水体、饮用水和藻类制品中微囊藻毒素(MC - LR)含量的检测。本试剂盒测定的基础是标记免疫反应，微孔板包被有MC - LR - BSA，加入MC - LR标准或样品，再加入MC - LR抗体。游离的MC - LR与微孔板上的MC - LR - BSA竞争MC - LR抗体，没有连接的MC - LR抗体被洗涤除去，加入HRP - 羊抗兔抗体，标记免疫反应后没有连接的HRP - 羊抗兔抗体被洗涤除去。加显色液、终止液后，用酶标仪测定其吸光度，吸光度的值与样品中的MC - LR浓度成反比，对照标准曲线即可确定被测样品中MC - LR的含量。本试剂盒结构简单，使用方便、廉价、灵敏度高，可以达到0.25ng/ml。

