



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103575893 A

(43) 申请公布日 2014. 02. 12

(21) 申请号 201310476637. 3

(22) 申请日 2013. 10. 14

(71) 申请人 广州市疾病预防控制中心

地址 510440 广东省广州市白云区嘉禾街启
德路一号

(72) 发明人 李军涛 陈守义 朱伟

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

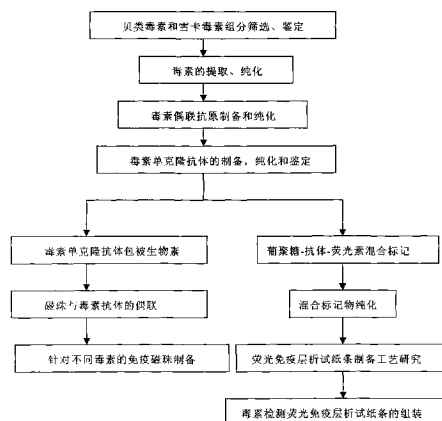
权利要求书4页 说明书14页 附图1页

(54) 发明名称

一种快速检测贝类毒素的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种快速检测贝类毒素的方法,所述方法包括以下步骤:1) 样品毒素的提取净化;2) 毒素的鉴定;3) 毒素-BSA 偶联抗原制备;4) 毒素单克隆抗体制备及纯化;5) 免疫磁性微球的制备;6) 制备葡聚糖-抗体-荧光素混合标记物;7) 混合标记物的纯化;8) 荧光免疫层析试纸条制备。所述方法特异性强、检测限低、并能实现抗原成分的定量检测。



1. 一种快速检测贝类毒素的方法,包括以下具体步骤:

1)、样品毒素的提取净化;

2)、毒素的鉴定;

3)、毒素-BSA 偶联抗原制备

采用碳二亚胺法进行毒素与载体蛋白偶联,毒素-BSA 完全抗原用于制备毒素单克隆抗体;

4)、毒素单克隆抗体制备及纯化;

5)、免疫磁性微球的制备:

5.1、水产品生物毒素单克隆抗体偶联生物素

将活化好的生物素溶解于 DMSO 中,使其浓度为 2.5mg/mL,分装后,置于 -20℃ 保存;每 2mL 浓度为 5mg/mL 的毒素单克隆抗体,在 0.1M pH8.5 的碳酸盐缓冲液中,透析过夜,第二天取出,备用;取透析好的毒素单克隆抗体 1.6mL,约 8mg,加 1M pH8.5 碳酸盐缓冲液 300uL,混匀后,再加生物素 500uL,室温搅拌 2h;加入饱和硫酸铵,使硫酸铵饱和度为 50%,4℃ 搅拌 0.5 小时;离心,弃上清,取沉淀,用 1×PBS 溶解后,再加入饱和硫酸铵,使硫酸铵饱和度为 50%,4℃ 搅拌 0.5 小时;弃上清,取沉淀,用 3.0mL 1×PBS 溶解,在 1×PBS 中透析 24h,终体积为 4mL, PAGE 及 ELISA 检测产物效价;

5.2、磁性微球的制备

把 0.01g Fe/C 纳米磁粉分散于 2mL 壳聚糖水溶液中,并逐滴滴入溶解有表面活性剂 AOT 的甲苯溶液中,机械搅拌乳化;滴入 25%戊二醛溶液,在 2000r/min 机械搅拌下反应 1 小时;反应后用乙醇、丙酮、蒸馏水反复洗涤洗去表面活性剂和有机溶剂,用磁分离架分离出磁性成分;使之分散在蒸馏水中 4℃ 保存,取出其中 1mL 真空干燥 48 小时计算其中固体含量,调节微球浓度使最终浓度为 1mg/mL,1mL 的悬浮液含有微球约 1×10^{10} ,由于戊二醛用作交联剂,磁性载体表面含有丰富的悬垂的醛基;

5.3、磁性微球与链霉亲和素的连接

在磁场作用下用 pH6.0 浓度为 10mmol/L 的 NaH_2PO_4 缓冲液洗涤 1mL 磁珠,在圆底小烧瓶中加入连接液,混匀,室温下摇床中震荡 15min,避免磁珠沉淀,并起混匀作用,磁场下用缓冲液 B: HCl 2mmol/L 洗涤,用缓冲液 C: NaH_2PO_4 或 Na_2HPO_4 , 20mmol/L, pH7.5 重悬磁珠,立即加入 100uL 链霉亲和素,重悬在 PBS 液中;连接有链霉亲和素的磁珠即可与偶联生物素的毒素单克隆抗体相结合;

6)、制备葡聚糖-抗体-荧光素混合标记物;

7)、混合标记物的纯化

7.1 葡聚糖-抗体-荧光素亲和层析;

7.2 用 Sephadex-G25 凝胶柱纯化荧光素标记的单克隆抗体:将亲和层析后的葡聚糖-抗体-荧光素混合标记物过 Sephadex-G25 凝胶柱进行层析,葡聚糖-抗体-荧光素混合标记物会因其大分子量而首先从纯化柱中洗脱出来,而相对分子量较小的单克隆抗体则在上述峰值之后才缓慢从纯化柱中洗脱出来;葡聚糖-抗体-荧光素混合标记物经透析后存放于缓冲液中,缓冲液配方为:0.5% (重量) BSA+3% (重量) 海藻糖+0.1% (重量) Tween-20, 10mM pH7.5 Tris-HCl;

8)、荧光免疫层析试纸条制备

作用原理 : 采用双抗体夹心法原理定量检测样品中生物毒素 ;

结果判断 : 用制备的试纸条检测样品中的生物毒素, 每一种毒素检测试纸条上均有对照线 C 和检测线 T, 不同毒素检测判断的原则相同。

2. 如权利要求 1 所述的方法, 其中, 步骤 1) 具体为 :

1. 1 提取

称取试样, 置于洁净的离心管中, 加入 80% (体积) 甲醇水溶液, 所述试样与所述甲醇水溶液的质量体积比为 2g : 10mL ; 超声提取数次后, 合并上层液, 用 80% (体积) 甲醇水溶液定容得定容液 ; 所述试样与所述定容液的质量体积比为 2g : 25mL ; 取二分之一的定容液于另一离心管中, 加入正己烷, 涡旋混匀, 分层, 弃去正己烷层, 所述试样与所述正己烷的质量体积比为 2g : 5mL ; 加入水和三氯甲烷, 涡旋混匀, 分层, 吸取水相于另一离心管中, 所述试样与所述水和所述三氯甲烷的质量体积比分别为 2g : 1mL : 6mL ; 用三氯甲烷重复萃取二次, 合并三氯甲烷层, 于 60℃ 水浴氮气吹干仪中用氮气流吹至近干 ; 残余物用 20% (体积) 正己烷丙酮溶液溶解, 待净化 ;

1. 2 净化

依次用 : 丙酮、甲醇和 20% (体积) 正己烷丙酮溶液活化固相萃取柱 ; 注入提取液, 然后分别用 20% (体积) 正己烷丙酮溶液和 3% (体积) 甲醇丙酮溶液淋洗, 抽干 ; 5min 后, 用 40% (体积) 甲醇丙酮溶液进行洗脱, 收集洗脱液 ; 洗脱液于 45℃ 水浴、氮气流中吹干 ; 残余物用 80% (体积) 甲醇水溶液溶解, 混匀。

3. 如权利要求 2 所述的方法, 其中, 步骤 3) 具体为 :

每 10mg 毒素溶于 2. 5ml 无水乙醇, 并与溶于 1ml 双蒸水的 2. 5mg 盐酸经胺混合 ; 在冰浴条件下反应 2. 5h, 其间滴入 0. 05mol/L 的 NaOH 溶液 1ml, 反应后滴入 0. 2mol/L、pH4 的醋酸盐缓冲液 1ml, 并加入碎冰约 4m g, 出现白色沉淀, 在 4℃ 下静置 1d ; 将反应液离心, 弃去上清液 ; 白色沉淀用 2. 5m l 二甲基甲酰胺溶解后, 加入 6m g 琥珀酸酐, 室温反应 2h, 加入三乙胺 100 μ l, 继续反应 1 h ; 称取 60mg BSA 溶于 10ml 的 PBS 溶液中, 加入 12. 5mg 水溶性碳二亚胺 ; 逐滴滴加上面反应好的酰化产物, 反应 1h 后, 再加 6m g E D C, 暗处搅拌反应并过夜 ; 用双蒸水透析 2d, 期间换液 4 次。

4. 如权利要求 3 所述的方法, 其中, 步骤 4) 具体为 :

4. 1、小鼠免疫及细胞融合

取制备所得毒素完全抗原偶联物与弗氏完全佐剂等体积混合均匀 ; 取 0. 3mL 混合液, 含 100 μ g 毒素 -BSA, 皮下注射 7 周龄、重量 20g 的 BALB/c 小鼠 ; 每隔 2 周用弗氏不完全佐剂与毒素 -BSA 混匀重复免疫, 加强免疫 7 天 ; 眼眶取血, 用酶联免疫吸附测定间接法测定其效价 ; 将免疫小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞 SP2/0 按 5 : 1 ~ 10 : 1 的比例混合, 用 PEG 快速融合 ; 加入含有次黄嘌呤、氨基喋呤和胸腺嘧啶核苷的培养基进行细胞筛选并铺于有准备好的饲养细胞的 96 孔细胞培养板, 置 37℃, 6% CO₂ 培养箱内培养 ;

4. 2、阳性杂交瘤细胞株的筛选及单克隆抗体的生产

用含 20% (体积) 小牛血清的 HAT 培养基稀释筛选出来的杂交瘤细胞至每毫升含 2. 5、15、和 50 个细胞三种不同的稀释度, 分别分装到 96 孔板, 每个稀释度 32 孔, 每孔 0. 1mL, 然后在每孔中加入 0. 1mL 的饲养细胞, 置 37℃, 5% (体积) CO₂ 培养箱内培养 ; 3 次克隆化后的结果均为阳性的为能稳定分泌抗毒素抗体的杂交瘤细胞, 采用小鼠腹腔接种法生产单克

隆抗体腹水 ; 选用标准 BALB/c 小鼠, 先用降植烷进行小鼠腹腔注射, 一周后每只老鼠按照 5×10^6 杂交瘤细胞接种到小鼠腹腔中去 ; 1 周后采集腹水, 可以连续采集 2-3 次 ; 将腹水置于 37°C 静置 2 小时后, 13000rpm 离心 10min , 除去细胞成分和其他的沉淀物, 收集上清 ; 过玻璃纤维柱, 收集到澄清的腹水 ;

4. 3、单克隆抗体的纯化

首先经过辛酸 - 硫酸铵沉淀法粗提纯小鼠腹水, 可除去白蛋白等绝大部分杂蛋白 ; 用葡萄球菌 G 蛋白与葡聚糖交联, 制备亲和层析柱将粗提抗体上样结合后洗脱, 葡萄球菌 G 蛋白可与 IgG1、IgG2a、IgG2b 和 IgG3 结合, 以达到纯化的目的 ; 洗脱液中的抗体浓度可用紫外光吸收法粗测, 毒素单克隆抗体溶液在 $A_{280\text{nm}}$ 时, 1.44 吸光单位相当于 1mg/ml 。

5. 如权利要求 4 所述的方法, 其中, 步骤 6) 具体为 :

6. 1 单克隆抗体的准备 : 取适量已知浓度的单克隆抗体溶液于烧杯中, 再加入生理盐水及碳酸盐缓冲液 $\text{pH}7.2$, 使最后浓度为 20mg/ml , 碳酸盐缓冲液容量为总量的 $1/10$, 混匀, 将烧瓶置电磁搅拌器上 $7 \sim 10\text{min}$;

6. 2 荧光素葡聚糖的准备 : 采用商品化的荧光素葡聚糖, 按每毫克单克隆抗体加 0.01mg 荧光素葡聚糖, 用分析天平准确称取所需的荧光素葡聚糖粉末 ;

6. 3 结合或标记 : 边搅拌边将称取的荧光素葡聚糖渐渐加入单克隆抗体溶液中, 避免将荧光素粘于烧瓶壁, 加完后, 继续避光搅拌 12h 左右 ; 结合期间应保持单克隆抗体溶液于 4°C 左右, 故需将烧杯和搅拌器一起移入 4°C 冰箱中 ;

6. 4 透析 : 结合完毕后, 将标记的单克隆抗体溶液离心, 除去其中少量的沉淀物, 装入透析袋中, 再置于烧杯中, 用 $\text{pH}8.0$ 缓冲盐水透析过夜 ;

6. 5 过柱 : 取透析过夜的标记物, 通过 G - 50 柱, 分离游离荧光素素葡聚糖, 收集标记的荧光葡聚糖抗体进行鉴定, 洗脱液 : 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液 $\text{pH}7.2$; 过滤量 : 12ml 标记全球蛋白液 ; 收集量 : 20ml , 稀释 1.7 倍。

6. 如权利要求 5 所述的方法, 其中, 步骤 8) 具体为 :

8. 1、免疫荧光层析试纸条生产步骤 :

以生产 10 万份免疫层析试纸条为例, 所需步骤如下 :

① 硝酸纤维膜 : 由美国 Millipore/NC 进口, 硝酸纤维膜的规格为 $30\text{cm} \times 3\text{m}$ / HAHY00010 : 一条金标试纸条所需硝酸纤维膜面积为 : $2.5\text{cm} \times 0.9\text{cm}$. 生产 10 万份高灵敏度荧光定量试纸条所需要硝酸纤维膜总面积为 : $2.5\text{cm} \times 0.9\text{cm} \times 10\text{万} = 2.25 \times 10^5\text{cm}^2$, 生产 10 万人份试纸条所需硝酸纤维膜的总卷数 : $2.25 \times 10^5\text{cm}^2 / 30 \times 300\text{cm}^2 = 25$ 卷 ;

② 检测 T 线上所需水产品毒素单克隆抗体 : 水产品毒素单克隆抗体的总量 : $0.5\text{mg/ml} \times 2.0\text{ul/cm} \times 0.3\text{cm} \times 10\text{万} = 30\text{mg}$;

③ 检测控制线 C 线上兔抗鼠 IgG : 兔抗鼠 IgG 的总量 : $1\text{mg/ml} \times 2.0\text{ul/cm} \times 0.3\text{cm} \times 10\text{万} = 60\text{mg}$;

④ 用于标记垫的葡聚糖 - 单克隆抗体 - 荧光素混合标记物 : 所需单克隆抗体的总量 : $0.01\text{mg/ml} \times 20\text{ul} \times 10\text{万} = 20\text{mg}$;

8. 2、荧光素混合标记物结合垫的制备

将葡聚糖 - 抗体 - 荧光素混合标记物 20mg 稀释于 2000ml 的 PBS 中, 制备上述混合标记物的浓度 0.01mg/ml , 再将抗体标记垫浸泡于 2000ml 的混合标记物中, 作用时间控制在

2-5 分钟,取出后 37℃气套式烘箱烘干,在 45%湿度下避光保存备用;

8.3、纤维膜上的 C、T 的喷制

将上述制备好的硝酸纤维膜分别喷制毒素单克隆抗体,以浓度为 0.5mg/ml,2.0ul/cm 喷射于硝酸纤维膜 T 线的位置;同时将兔抗鼠 IgG 以浓度为 1mg/ml,2.0ul/cm 喷射于硝酸纤维膜 C 线的位置;

8.4、标记物结合垫,样品垫的组装

将上述制备好的葡聚糖-抗体-荧光素标记混合物 20mg,制备浓度为 0.01mg/ml 浸泡处理结合垫材料,上述 20mg 和浓度 0.01mg/ml 是指混合标记物中抗体的总量和浓度,而不是荧光素,葡聚糖的总量和浓度;然后将浸泡好的标记物晾干后组装到上述硝酸纤维膜上结合垫的位置,此时硝酸纤维膜已喷射有 C 线, T 线;最后,同样原理,将样品垫组装到试纸条中样品垫的位置;

8.5、硝酸纤维膜的切割与产品的包装

用自动裁条机将上述喷制有抗体 C 线和 T 线,及附着有样品和样品垫,荧光标记物结合垫的硝酸纤维膜,按 0.3cm 进行切割,将检测不同毒素抗原的试纸条并排排列,塞入常用标准的多联试纸条的试纸板,装配成一板多联的荧光定量免疫试纸条。

一种快速检测贝类毒素的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测方法,具体涉及一种检测贝类毒素的方法。

背景技术

[0002] 贝类毒素属海洋天然有机物,它的形成与海洋中有毒藻类赤潮密切相关。有害赤潮已经成为世界性的问题,其发生的范围仍在不断扩大,能形成赤潮的有害藻类种类也在不断增加。据文献报道,能形成赤潮的微藻约有 184267 种,其中有毒微藻约为 60 ~ 78 种。有毒藻类产生的毒素往往通过食物链进入贝类体内,因而通常称这些毒素为贝毒,人们食用带有贝毒的贝类而造成食物中毒。我国四大海域中贝类毒素污染状况非常严重。调查发现,各大海域均存在广泛的贝类毒素污染情况,南北沿海均普遍存在。浙江省、中国台湾及广东省大亚湾均发生因食用染毒贝类而引起多人中毒或死亡事件。

[0003] 另一方面,贝毒污染的严重性和地域的广泛性已严重影响到相关水产品的出口贸易。由于出口到欧盟的贝类多次被检出含有麻痹性贝类毒素,而我方未能提供官方贝类卫生监控计划。因此,欧盟从 1997 年 7 月 1 日起禁止我国贝类海产品进入欧盟市场。为尽快恢复对欧盟的贝类出口,参照国外情况,我国有关部门于 1997 年 11 月建立了贝类生产环境卫生监督管理的相关规定,对供出口贝类加工厂做原料的或直接上市的活贝类提出了卫生标准。但由于各国毒素分布状况有一定差异,我国沿海贝类毒素分布情况并不十分清楚,因此卫生标准难以反映毒素实际存在情况;再加上没有建立相应的监督管理机构和完善的贝类监测、检测手段及标准毒素。所以贝类水产品的质量改观不大。在 2000-86-EC 决议中,贝类仍被列为“不满意”和需进一步努力的产品行列。

[0004] 贝类毒素是由海洋中的有毒藻类通过食物链传递给藻食性的贝类,并在其体内蓄积、放大、转化形成的有毒高分子化合物,食用含有贝类毒素的贝类可能导致食源性疾,根据中毒症状及机制的不同,贝类毒素主要分为 4 类:即腹泻性贝类毒素 (diarrhetic shellfish poisoning, DSP) 麻痹性贝类毒素 (paralytic shellfish poisoning, PSP) 遗忘性贝类毒素 (amnesic shellfish poisoning, ASP) 及神经性贝类毒素 (neurotoxic shellfish poisoning, NSP)。据统计,全球由藻毒素引起的中毒事件中,87% 是由麻痹性贝类毒素引起的,而第二位的腹泻性贝类毒素也占 5% 的比例,我国海洋赤潮毒素中最常见的也是麻痹性贝类毒素和腹泻性贝类毒素。国际上普遍接受的麻痹性贝类毒素和腹泻性贝类毒素的最大限量分别为 80ug/100g 贝肉以及 20ug/100g 贝肉。

[0005] 目前贝类毒素的检测方法主要有:小鼠生物法、高效液相色谱法以及一些免疫化学方法。小鼠生物法简便易行,适合于大规模、批量样品的检测,但不能区别毒素的种类和结构,干扰大、不精确。高效液相色谱法 (HPLC),特别是液-质联用技术,虽然可准确分析毒素的含量和种类,检出限可低至 ng/g,但样品前处理繁琐费时,且仪器昂贵。只有一些大型实验室才具备此仪器,因此,适于现场监测和大量样本快速筛查。免疫化学方法是基于抗体对抗原的特异性结合的一种分析方法,因此具有特异性强,仪器设备简单,方法易掌握,样品前处理相对简单等优点。常见的利用免疫学方法进行毒素检测主要有酶联免疫吸附试验

法 (ELISA) 和金标免疫试纸条。但酶联免疫吸附试验法涉及加样、温浴、洗涤、显色、终止等多个步骤,至少需要 3 小时,另外酶联免疫吸附试验法灵敏度只能达到 10ng/ml,如果要对 10ng/ml 以下的物质进行检测,就会产生假阴性的结果,即漏检。这也是现在使用这种方法检测毒素的最大困扰之一。免疫胶体金技术是以胶体金作为示踪标志物的一种免疫技术。相比之下,胶体金技术的敏感性比酶联免疫吸附试验法更差,只能达到 50ng/ml,要对海产品中生物毒素的微量检测几乎是不可能的,另外目前国内胶体金技术尚属于起步阶段,基本上不能对毒素检测进行定量。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于解决上述现有技术的不足,提供一种能快速、准确检测贝类毒素的方法,所述方法特异性强、检测限低、并能实现抗原成分的定量检测。

[0007] 为实现上述目的,本发明采用以下技术方案。

[0008] 一种快速检测贝类毒素的方法,包括以下具体步骤:

[0009] 1、毒素的提取净化

[0010] 1.1 提取

[0011] 称取试样,置于洁净的离心管中,加入 80% (体积) 甲醇水溶液,优选所述试样与所述甲醇水溶液的质量体积比为 2g :10mL。

[0012] 超声提取 5min 后,6000r/min 离心 10min,重复提取一次。

[0013] 合并上层液,用 80% (体积) 甲醇水溶液定容得定容液,优选所述试样与所述定容液的质量体积比为 2g :25mL。

[0014] 取二分之一的定容液于另一离心管中,加入正己烷,涡旋混匀,分层,弃去正己烷层,优选所述试样与所述正己烷的质量体积比为 2g :5mL。

[0015] 加入水和三氯甲烷,涡旋混匀,分层,吸取水相于另一离心管中,优选所述试样与所述水和所述三氯甲烷的质量体积比分别为 2g :1mL :6mL。

[0016] 用三氯甲烷重复萃取二次,合并三氯甲烷层,于 60℃ 水浴氮气吹干仪中用氮气流吹至近干。

[0017] 残余物用 20% (体积) 正己烷丙酮溶液溶解,待净化。

[0018] 1.2 净化

[0019] 依次用:丙酮、甲醇和 20% (体积) 正己烷丙酮溶液活化固相萃取柱。

[0020] 注入提取液,然后分别用 20% (体积) 正己烷丙酮溶液和 3% (体积) 甲醇丙酮溶液淋洗,抽干。

[0021] 5min 后,用 40% (体积) 甲醇丙酮溶液进行洗脱,收集洗脱液。

[0022] 洗脱液于 45℃ 水浴、氮气流中吹干。

[0023] 残余物用 80% (体积) 甲醇水溶液溶解,混匀。

[0024] 2、毒素的鉴定

[0025] 通过 HPLC 和 HPLC-MS 分析,以标准化合物相对保留指数以及质谱碎片断裂规律鉴定关键组成并同时含量测定。

[0026] 3、毒素-BSA 偶联抗原制备

[0027] 采用碳二亚胺法进行毒素与载体蛋白偶联。毒素-BSA 完全抗原用于制备毒素单

克隆抗体。

[0028] 每 10mg 毒素溶于 2.5ml 无水乙醇,并与溶于 1ml 双蒸水的 2.5mg 盐酸经胺混合。

[0029] 在冰浴条件下反应 2.5h,其间滴入 0.05mol/L 的 NaOH 溶液 1ml。反应后滴入 0.2mol/L、pH4 的醋酸盐缓冲液 1ml,并加入碎冰约 4mg,出现白色沉淀,在 4℃下静置 1d。

[0030] 将反应液离心(优选转速 10000r/min,10min),弃去上清液。

[0031] 白色沉淀用 2.5ml 二甲基甲酰胺溶解后,加入 6mg 琥珀酸酐,室温反应 2h,加入三乙胺 100μl,继续反应 1h。

[0032] 称取 60mg BSA 溶于 10ml(约为酰化物体积的两倍)的 PBS(0.01mol/L, pH5.0) 溶液中,加入 12.5mg 水溶性碳二亚胺(EDC)。

[0033] 逐滴(10滴/min)滴加上面反应好的酰化产物。反应 1h 后,再加 6mg EDC,暗处搅拌反应并过夜。

[0034] 用双蒸水透析 2d(透析袋用 PBS 处理 24h),期间换液 4 次。

[0035] 4、毒素单克隆抗体制备及纯化

[0036] 4.1、小鼠免疫及细胞融合

[0037] 取制备所得毒素完全抗原偶联物与弗氏完全佐剂等体积混合均匀。

[0038] 取 0.3mL 混合液(含 100μg 毒素-BSA)皮下注射 7 周龄、重量 20g 左右的 BALB/c 小鼠。

[0039] 每隔 2 周用弗氏不完全佐剂与毒素-BSA 混匀重复免疫,加强免疫 7 天。

[0040] 眼眶取血,用酶联免疫吸附测定间接法(ELISA, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)测定其效价。

[0041] 将免疫小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞 SP2/0 按 5:1~10:1 的比例混合,用 PEG 快速融合。

[0042] 加入含有次黄嘌呤(hypoxanthine,H)、氨基喋呤(aminopterin,A)和胸腺嘧啶核苷(thymidine,T)的培养基(HAT)进行细胞筛选并铺于有准备好的饲养细胞的 96 孔细胞培养板,置 37℃,6% CO₂ 培养箱内培养。

[0043] 4.2、阳性杂交瘤细胞株的筛选及单克隆抗体的生产

[0044] 用含 20%(体积)小牛血清的 HAT 培养基稀释筛选出来的杂交瘤细胞至每毫升含 2.5、15、和 50 个细胞三种不同的稀释度,分别分装到 96 孔板,每个稀释度 32 孔,每孔 0.1mL,然后在每孔中加入 0.1mL 的饲养细胞,置 37℃,5%(体积)CO₂ 培养箱内培养。

[0045] 3 次克隆化后的结果均为阳性的为能稳定分泌抗毒素抗体的杂交瘤细胞,采用小鼠腹腔接种法生产单克隆抗体腹水。

[0046] 选用标准 BALB/c 小鼠,先用降植烷进行小鼠腹腔注射,一周后每只老鼠按照 5×10⁶ 杂交瘤细胞接种到小鼠腹腔中去。

[0047] 1 周后采集腹水,可以连续采集 2-3 次。

[0048] 将腹水置于 37℃静置 2 小时后,13000rpm 离心 10min,除去细胞成分和其他的沉淀物,收集上清。

[0049] 过玻璃纤维柱,收集到澄清的腹水。

[0050] 4.3、单克隆抗体的纯化

[0051] 首先经过辛酸-硫酸铵沉淀法粗提纯小鼠腹水,可除去白蛋白等绝大部分杂蛋

白。

[0052] 用葡萄球菌 G 蛋白与葡聚糖 (Sephrose CL-4B) 交联, 制备亲和层析柱将粗提抗体上样结合后洗脱。葡萄球菌 G 蛋白可与 IgG1、IgG2a、IgG2b 和 IgG3 结合, 以达到纯化的目的。

[0053] 洗脱液中的抗体浓度可用紫外光吸收法粗测, 毒素单克隆抗体溶液在 A280nm 时, 1.44(吸光单位) 相当于 1mg/ml。

[0054] 经低 pH 洗脱后, 在收集管内预置中和液可保持纯化抗体的活性。亲和层析法具有特异性高、纯度高的特点。通过上述整套工艺, 腹水纯化后的单抗抗体纯度超过 95%, 且具有稳定效价。

[0055] 5、免疫磁性微球的制备

[0056] 5.1、水产品生物毒素单克隆抗体偶联生物素

[0057] 将活化好的生物素溶解于 DMSO 中, 使其浓度为 2.5mg/mL, 分装后, 置于 -20℃ 保存;

[0058] 每 2mL 浓度约为 5mg/mL 的毒素单克隆抗体, 在 0.1M PHS.5 的碳酸盐缓冲液中, 透析过夜, 第二天取出, 备用;

[0059] 取透析好的毒素单克隆抗体 1.6mL, 约 8mg, 加 1M PH8.5 碳酸盐缓冲液 300uL, 混匀后, 再加生物素 500uL, 室温搅拌 2h;

[0060] 加入饱和硫酸铵, 使硫酸铵饱和度为 50%, 4℃ 搅拌 0.5 小时;

[0061] 离心, 弃上清, 取沉淀, 用 1×PBS 溶解后, 再加入饱和硫酸铵, 使硫酸铵饱和度为 50%, 4℃ 搅拌 0.5 小时;

[0062] 弃上清, 取沉淀, 用 3.0mL 1×PBS 溶解, 在 1×PBS 中透析 24h, 终体积为 4mL, PAGE 及 ELISA 检测产物效价。

[0063] 5.2、磁性微球的制备

[0064] 把 0.01g Fe/C 纳米磁粉分散于 2ml 壳聚糖水溶液中, 并逐滴滴入溶解有表面活性剂 AOT 的甲苯溶液中, 机械搅拌乳化。

[0065] 滴入 25% 戊二醛溶液, 在 2000r/min 机械搅拌下反应 1 小时。

[0066] 反应后用乙醇、丙酮、蒸馏水反复洗涤洗去表面活性剂和有机溶剂, 用磁分离架分离出磁性成分。

[0067] 使之分散在蒸馏水中 4℃ 保存, 取出其中 1ml 真空干燥 48 小时计算其中固体含量, 调节微球浓度使最终浓度为 1mg/ml。1ml 的悬浮液含有微球约 1×10^{10} , 由于戊二醛用作交联剂, 磁性载体表面含有丰富的悬垂的醛基。

[0068] 5.3、磁性微球与链霉亲和素的连接

[0069] 在磁场作用下用 pH6.0 浓度为 10mmol/L 的 NaH_2PO_4 缓冲液洗涤 1ml 磁珠, 在圆底小烧瓶中加入连接液, 混匀, 室温下摇床中震荡 15min, 避免磁珠沉淀, 并起混匀作用, 磁场下用缓冲液 B (HCl , 2mmol/L) 洗涤, 用缓冲液 C ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, 20mmol/L, pH7.5) 重悬磁珠, 立即加入 100uL 链霉亲和素, 重悬在 PBS 液中。连接有链霉亲和素的磁珠即可与偶联生物素的毒素单克隆抗体相结合。

[0070] 6、葡聚糖 - 抗体 - 荧光素混合标记

[0071] 葡聚糖 - 抗体 - 荧光素混合标记技术是世界上在诊断试剂领域里的最先进的标记

技术,同时也是本项目的核心技术。葡聚糖的分子量在 20,000-2,000,000 之间,每个葡聚糖分子能含有 1000 个 divinylsulfone 活性基团,除少部分的 divinylsulfone 活性基团自身偶联之外(形成类似口罩的结构)。而每个葡聚糖分子中绝大部分的 divinylsulfone 活性基团可与荧光素或抗体分别进行偶联,因而该项目所涉及的葡聚糖-抗体-荧光素混合标记是分两部完成:第一,荧光素分子可共价结合到亲水性糖链为骨架的葡聚糖分子上;第二,上述结合有荧光素的葡聚糖分子在与所涉及的单克隆抗体进行结合。本项目采用葡聚糖-抗体-荧光素混合标记技术,可以极大提升阳性信号/背景信号之间的读数比值约 100 倍。使得本项目开发的诊断试剂产品的敏感性从常规的 10-100ng/ml 推进到 0.1-1ng/ml 的水平。

[0072] 6.1 单克隆抗体的准备取适量已知浓度的单克隆抗体溶液于烧杯中,再加人生理盐水及碳酸盐缓冲液(pH7.2),使最后浓度为 20mg/ml,碳酸盐缓冲液容量为总量的 1/10,混匀,将烧瓶置电磁搅拌器上 7~10min。

[0073] 6.2 荧光素葡聚糖的准备采用商品化的荧光素葡聚糖,按每毫克单克隆抗体加 0.01mg 荧光素葡聚糖,用分析天平准确称取所需的荧光素葡聚糖粉末。也可用下述公式计算出单克隆抗体、荧光素葡聚糖的量,还可以算出需加缓冲液的量。

[0074] a. 单克隆抗体溶液:含量 A mg/ml;容积 B ml。

[0075] b. 总蛋白量 $(A \times B) = C$ mg。

[0076] c. $C/20 \sim C/10 = D$ mg(如单克隆抗体含量低于 20mg/ml,用 C/10;如高于 20mg/ml,用 C/20)。

[0077] d. 荧光素葡聚糖的量: $(1/50 \sim 2/100) \times C = E$ mg。

[0078] e. 0.5mol/L(pH9.5)碳酸盐缓冲液 $D/10 = F$ ml。

[0079] f. PBS 量 $D - (B + F) = G$ ml。

[0080] 注:A 为蛋白含量,mg/ml;B 为蛋白质溶液的容积;C 为蛋白总量,mg;D 为常数,mg;E 为荧光素的量,mg;F 为碳酸盐缓冲液的容积,ml;G 为 PBS 的容积,ml。

[0081] 6.3 结合(或标记)边搅拌边将称取的荧光素葡聚糖渐渐加入单克隆抗体溶液中,避免将荧光素粘于烧瓶壁(大约在 5-10min 内加完),加完后,继续避光搅拌 12h 左右。结合期间应保持单克隆抗体溶液于 4℃左右,故需将烧杯和搅拌器一起移入 4℃冰箱中。

[0082] 6.4 透析结合完毕后,将标记的单克隆抗体溶液离心(2500r/min)20min,除去其中少量的沉淀物,装入透析袋中,再置于烧杯中,用 pH8.0 缓冲盐水透析(0~4~C)过夜。

[0083] 6.5 过柱取透析过夜的标记物,通过 G-50 柱,分离游离荧光素葡聚糖,收集标记的荧光葡聚糖抗体进行鉴定。洗脱液:0.01mol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.2);过滤量:12ml 标记球蛋白液(过滤前未透析);收集量:20ml(稀释 1.7 倍左右)。

[0084] 7、混合标记物的纯化

[0085] 混合标记物的纯化由两个工艺步骤组成:

[0086] ①葡萄球菌 G 蛋白亲和层析:该工艺的特点是利用混合标记物中含有抗体的特点,而抗体又可以与葡萄球菌 G 蛋白进行结合,以达到纯化的初步目的。遗憾的是:初步纯化产生的标记物尚含有未标记的抗体分子,因而需要对初步纯化的标记物采取进一步的纯化。

[0087] ②用 Sephadex-G25 凝胶柱纯化荧光素标记的单克隆抗体:上述纯化的葡聚糖-抗

体-荧光素混合标记物与尚未标记的单克隆抗体两者之间分子量存在明显差别,因而可以用分子筛纯化材料,即 Sephadex-G25 凝胶柱进行层析。葡聚糖-抗体-荧光素混合标记物会因其大分子量而首先从纯化柱中洗脱出来,而相对分子量较小的单克隆抗体则在上述峰值之后才缓慢从纯化柱中洗脱出来。上述葡聚糖-抗体-荧光素混合标记物经透析后存放于缓冲液中,缓冲液配方为:0.5% BSA+3%海藻糖+0.1% Tween-20,10m M pH7.5Tris-HCL。

[0088] 8、荧光免疫层析试纸条制备工艺研究

[0089] 作用原理:本项目产品采用双抗体夹心法原理定量检测样品中生物毒素。

[0090] 结果判断:本项目由试纸条组成,检测样品中的生物毒素。每一种毒素检测试纸条上均有对照线 C(Control) 和检测线 T(Test),不同毒素检测判断的原则相同,均参见图 7。在工艺上,免疫荧光试纸条和免疫金标试纸条大体上是一致的。主要差别在于免疫荧光试纸条工艺中所用的是葡聚糖-抗体-荧光素混合标记物,而金标试纸条所用的是抗体-胶体金之间的混合标记物。另外一个微小的差别是金标试纸条是用肉眼进行判断,而荧光试纸条需要荧光检测系统来检测阳性标本中的荧光强度,进而得出定量结果,而目前国内已经有数家公司生产手提式荧光检测仪。

[0091] 8.1、免疫荧光层析试纸条生产工艺流程:

[0092] 以生产 10 万份免疫层析试纸条为例,现将所需材料及工艺流程概述如下:

[0093] ①硝酸纤维膜:由美国 Millipore/NC 进口,硝酸纤维膜的规格为

[0094] 30cm×3m/HAHY00010:

[0095] 一条金标试纸条所需硝酸纤维膜面积为:2.5cm×0.9cm.

[0096] 生产 10 万份高灵敏度荧光定量试纸条所需要硝酸纤维膜总面积为:

[0097] $2.5\text{cm} \times 0.9\text{cm} \times 10\text{万} = 2.25 \times 10^5 \text{cm}^2$

[0098] 生产 10 万人份试纸条所需硝酸纤维膜的总卷数:

[0099] $2.25 \times 10^5 \text{cm}^2 / 30 \times 300 \text{cm}^2 = 25\text{卷}$

[0100] ②检测 T 线上所需水产品毒素单克隆抗体:水产品毒素单克隆抗体的总量:
 $0.5\text{mg/ml} \times 2.0\text{ul/cm} \times 0.3\text{cm} \times 10\text{万} = 30\text{mg}$

[0101] ③检测控制线 C 线上兔抗鼠 IgG:兔抗鼠 IgG 的总量: $1\text{mg/ml} \times 2.0\text{ul/cm} \times 0.3\text{cm} \times 10\text{万} = 60\text{mg}$

[0102] ④用于标记垫的葡聚糖-单克隆抗体-荧光素混合标记物:所需单克隆抗体的总量: $0.01\text{mg/ml} \times 20\text{ul} \times 10\text{万} = 20\text{mg}$

[0103] 8.2、荧光素混合标记物结合垫的制备

[0104] 将葡聚糖-抗体-荧光素混合标记物 20mg 稀释于 2000ml 的 PBS 中,制备上述混合标记物的浓度 0.01mg/ml。再将抗体标记垫(玻璃纤维膜或聚酯膜)浸泡于 2000ml 的混合标记物中,作用时间控制在 2-5 分钟。取出后 37℃气套式烘箱烘干,在 45%湿度下避光保存备用。

[0105] 8.3、纤维膜上的 C(控制线)、T(检测线)的喷制

[0106] 将上述制备好的硝酸纤维膜分别喷制毒素单克隆抗体,以浓度为 0.5mg/ml, 2.0ul/cm 喷射于硝酸纤维膜 T 线的位置。同时将兔抗鼠 IgG 以浓度为 1mg/ml, 2.0ul/cm 喷射于硝酸纤维膜 C 线的位置。

[0107] 8.4、标记物结合垫,样品垫的组装

[0108] 将上述制备好的葡聚糖-抗体-荧光素标记混合物 20mg,制备浓度为 0.01mg/ml 浸泡处理结合垫材料(为避免产生混淆,特此解释:上述 20mg 和浓度 0.01mg/ml 是指混合标记物中抗体的总量和浓度。而不是荧光素,葡聚糖的总量和浓度)。然后将浸泡好的标记物晾干后组装到上述硝酸纤维膜上结合垫的位置(此时硝酸纤维膜已喷射有 C 线, T 线)。最后,同样原理,将样品垫组装到试纸条中样品垫的位置。

[0109] 8.5、硝酸纤维膜的切割与产品的包装

[0110] 用自动裁条机将上述喷制有抗体 C 线和 T 线,及附着有样品和样品垫,荧光标记物结合垫的硝酸纤维膜,按 0.3cm 进行切割。将检测不同毒素抗原的试纸条并排排列,塞入常用标准的多联试纸条的试纸板,装配成一板多联的荧光定量免疫试纸条。

[0111] 9、荧光免疫层析试纸条技术指标研究

[0112] (1) 敏感性研究:本项目将已知浓度的标准生物毒素混入 10ml 正常贝类的样品处理液中,置于离心管中,加入 50 μ l 免疫磁珠(磁珠偶联特异的生物毒素单克隆抗体),振摇 20 ~ 30min;加 300 μ l PBS-T 重悬浮、混匀,取 100 μ l 滴加到荧光定量毒素检测试纸条加样孔膜上并展开,将试纸条放入荧光检测仪进行检测,检测其灵敏性指标。

[0113] (2) 特异性研究:用制备的荧光试纸条检测其它生物毒素,如:微囊藻毒素、西加鱼毒素、软骨藻酸、短裸甲藻毒素等其它毒素样品,检测荧光试纸条与这些毒素有没有交叉反应。

[0114] (3) 实际场地应用性研究:将开发的荧光试纸条进行实地测试。其中包括对质量监督部门人员,卫生系统人员,水产品生产、销售从业人员进行技术培训和宣传。预计样品处理比较容易展开,然而怎样使用荧光试纸条读数仪是上述场地检测的关键。

[0115] 在诊断试剂领域,衡量诊断试剂优劣是由四大指标组成,即特异性;敏感性;快速性;简便性,有趣的是在英文上,上述四大因素都是以字母 S 开头,即 Specificity; Sensitivity; Speed; Simple,因而在检验领域有个常规的 4S 法则对诊断试剂进行评估。随着科技的进步和人民生活水平的提高,在上述 4S 的基础上,提出了更苛刻的标准。新的内容包括:新型诊断试剂或仪器应该能够进行定量研究和在疾病发生的场地进行场地快速检测。以糖尿病为例,每年美国用于糖尿病快速场地诊断的开支为 54 亿美金。许多诊断试剂公司因为及时的开发出适合于场地快速诊断糖尿病试纸条而获得丰厚的利润。具体在医学方面,糖尿病病人因为使用胰岛素等降血糖药物,对血糖的高低十分敏感。血糖过高,会导致因为高血糖的并发症致死;血糖过低,又可能因为血糖低而脑部缺糖缺氧而致死。因而对糖尿病病人血糖快速跟踪定量是医学界一个十分棘手的问题。另外美国住院开支昂贵,不可能,也不必要由医院检验科对糖尿病病人血糖进行 24 小时实验室检测,否则因此而产生的医疗费用是一个十分庞大的天文数字。因而糖尿病病人只能依赖于病人本身或病人家属在病人床前进行血糖的快速定量检测。依据上述糖尿病特点和诊断试剂在世界范围内的发展趋势,以糖尿病为代表的诊断试剂产品得到了迅猛的发展,已经成为诊断试剂最重大的进展。因此现代诊断试剂的标准应该是在原有 4S 原则的基础上,增加精确定量和场地检测。

[0116] 本发明的优点是:高灵敏度荧光定量免疫层析试纸条结合免疫磁珠富集技术,既满足 4S 原则,又能精确定量和实现场地检测,具体而言:

[0117] 1、特异性,利用抗原与抗体特异反应原理检测生物毒素,其相对特异性可达到95.0%以上;

[0118] 2、敏感性,检测样品中的生物毒素首先经免疫磁珠富集之后,使之浓缩100倍,之后再应用葡聚糖-抗体-荧光素混合标记信号放大技术,可将诊断试剂的敏感范围从10-100ng/mL推进到0.1ng/mL,并且可实现毒素定量检测;

[0119] 3、快速性,使用该方法检测毒素时间可以缩短至数小时,弥补了传统检验方法耗时长、特异性差的不足,特别适合大量样本快速筛查;

[0120] 4、简便性,本项目开发产品操作简便,不需要专业人员操作;

[0121] 5、定量性,本项目开发的产品可实现抗原成分的定量检测。因此本项目开发产品符合现代诊断试剂的标准和发展趋势,具有十分明显的先进性。

附图说明

[0122] 图1是本发明方法的流程图。

[0123] 图2是单项荧光免疫试纸条结果判断的模拟图。

具体实施方式

[0124] 实施例1:

[0125] 本实施例的制备流程见图1。

[0126] 1、毒素的提取净化

[0127] 1.1 提取

[0128] 称取试样,置于洁净的离心管中,加入80%(体积)甲醇水溶液,优选所述试样与所述甲醇水溶液的质量体积比为2g:10mL。

[0129] 超声提取5min后,6000r/min离心10min,重复提取一次。

[0130] 合并上层液,用80%(体积)甲醇水溶液定容得定容液,优选所述试样与所述定容液的质量体积比为2g:25mL。

[0131] 取二分之一的定容液于另一离心管中,加入正己烷,涡旋混匀,分层,弃去正己烷层,优选所述试样与所述正己烷的质量体积比为2g:5mL。

[0132] 加入水和三氯甲烷,涡旋混匀,分层,吸取水相于另一离心管中,优选所述试样与所述水和所述三氯甲烷的质量体积比分别为2g:1mL:6mL。

[0133] 用三氯甲烷重复萃取二次,合并三氯甲烷层,于60℃水浴氮气吹干仪中用氮气流吹至近干。

[0134] 残余物用20%(体积)正己烷丙酮溶液溶解,待净化。

[0135] 1.2 净化

[0136] 依次用10mL丙酮、10mL甲醇和10mL20%(体积)正己烷丙酮溶液活化固相萃取柱。

[0137] 注入提取液,然后分别用1mL20%(体积)正己烷丙酮溶液和10mL3%甲醇丙酮溶液淋洗,抽干。

[0138] 5min后,用10mL40%(体积)甲醇丙酮溶液进行洗脱,收集洗脱液。

[0139] 洗脱液于45℃水浴、氮气流中吹干。

[0140] 残余物用 1.0mL80% 甲醇水溶液溶解,混匀。

[0141] 2、毒素的鉴定

[0142] 通过 HPLC 和 HPLC-MS 分析,以标准化合物相对保留指数以及质谱碎片断裂规律鉴定关键组成并同时含量测定。

[0143] 3、毒素-BSA 偶联抗原制备

[0144] 采用碳二亚胺法进行毒素与载体蛋白偶联。毒素-BSA 完全抗原用于制备毒素单克隆抗体。

[0145] 每 10mg 毒素溶于 2.5ml 无水乙醇,并与溶于 1ml 双蒸水的 2.5mg 盐酸经胺混合。

[0146] 在冰浴条件下反应 2.5h,其间滴入 0.05mol/L 的 NaOH 溶液 1ml。反应后滴入 0.2mol/L、pH4 的醋酸盐缓冲液 1ml,并加入碎冰约 4m g,出现白色沉淀,在 4℃ 下静置 1d。

[0147] 将反应液离心(优选转速 10000r/min,10min),弃去上清液。

[0148] 白色沉淀用 2.5m l 二甲基甲酰胺溶解后,加入 6m g 琥珀酸酐,室温反应 2h,加入三乙胺 100 μ l,继续反应 1h。

[0149] 称取 60mg BSA 溶于 10ml(约为酰化物体积的两倍)的 PBS(0.01mol/L, pH5.0) 溶液中,加入 12.5mg 水溶性碳二亚胺(EDC)。

[0150] 逐滴(10 滴/min)滴加上面反应好的酰化产物。反应 1h 后,再加 6mgEDC,暗处搅拌反应并过夜。

[0151] 用双蒸水透析 2d(透析袋用 P B S 处理 24h),期间换液 4 次。

[0152] 4、毒素单克隆抗体制备及纯化

[0153] 将上述偶联完全抗原免疫标准的 BALB/c 小鼠,经检验以后得到高滴度的血清,是产生杂交瘤的重要前提。将上述高滴度的小鼠脾脏与骨髓瘤细胞 SP2/0 进行融合又是获得高质量的单克隆抗体重要前提。细胞融合是杂交瘤技术的中心环节,基本步骤是将两种细胞混合后加入聚乙二醇使细胞彼此融合。聚乙二醇的作用原理是,将骨髓瘤细胞和小鼠脾脏细胞通过化学的方法进行细胞融合。本项目使用美国进口公司 Sigma 的聚乙二醇,经融合以后可产生大量阳性集团。

[0154] 单克隆抗体的筛选是我国诊断试剂原料企业发展的瓶颈。目前国内大多采用传统的有限稀释法对单克隆抗体进行筛选,该筛选方法主要缺点是费时、费力,不适合批量生产。本项目发展了磁珠-甲基纤维素-抗原亲和三种筛选技术的联合筛选技术。联合筛选技术集合了上述三大技术的优点,体现出省时、省力,适合成批量单克隆抗体筛选的优点。

[0155] ①传统的有限稀释法需要 60 天的时间才能筛选出阳性细胞株,而本项目的联合筛选技术大大缩减了筛选时间,只需要 30 天即可筛选出阳性单克隆抗体株。②其中磁珠筛选技术是利用杂交瘤细胞表面抗体,与磁珠结合的抗原进行结合,结合后形成杂交瘤细胞表面抗体-抗原-磁珠的混合物,利用磁场原理将上述阳性混合物从大量细胞集合中筛选出阳性细胞集合。

[0156] ③采用甲基纤维素筛选技术,使细胞彼此分离,呈集落生长,相互不产生干扰、不混杂,一步即可完成单克隆的分离工作。此细胞融合技术平台,融合率可达 70%,单克隆抗体成功率可达 95%,上述技术指标为成批量制备出单克隆抗体奠定坚实的基础。

[0157] 单克隆抗体的鉴定指标有:

[0158] ①单克隆抗体的亲和性:单克隆抗体的亲和性是决定抗体用于诊断试剂敏感性最

重要的指标,本项目用 ELISA 法来确定生产的单克隆抗体是否能与相应抗原呈现高亲和力的结合,同时将本公司生产的单克隆抗体与进口商业用的同种单克隆抗体进行亲和性对照试验,以确定本公司单克隆抗体的亲和性;

[0159] ②特异性鉴定:将抗体与其他成分相关抗原进行交叉试验,检测该抗体是否具有特异性;3、纯度鉴定:一般用于诊断性抗体纯度达到 95%以上;4、单克隆抗体的亚型鉴定:本项目所制备的单克隆抗体属于鼠抗人血红蛋白,属于 IgG 类抗体,但 IgG 类抗体又分为 IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 等亚型。采用不同针对上述四种亚型的酶标二抗可对本项目产生的 IgG 单抗进行亚基的鉴定。

[0160] 4.1、小鼠免疫及细胞融合

[0161] 取制备所得毒素完全抗原偶联物与弗氏完全佐剂等体积混合均匀。

[0162] 取 0.3mL 混合液(含 100 μ g 毒素-BSA)皮下注射 7 周龄 20g 的 BALB/c 小鼠。

[0163] 每隔 2 周用弗氏不完全佐剂与毒素-BSA 混匀重复免疫,加强免疫 7 天。

[0164] 眼眶取血,用酶联免疫吸附测定间接法(ELISA, Enzyme-Linked

[0165] Immunosorbent Assay)测定其效价。

[0166] 将免疫小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞 SP2/0 按 5:1 ~ 10:1 的比例混合,用 PEG 快速融合。

[0167] 加入含有次黄嘌呤(hypoxanthine, H)、氨基喋呤(aminopterin, A)和胸腺嘧啶核苷(thymidine, T)的培养基(HAT)进行细胞筛选并铺于有准备好的饲养细胞的 96 孔细胞培养板,置 37℃, 6% CO₂ 培养箱内培养。

[0168] 4.2、阳性杂交瘤细胞株的筛选及单克隆抗体的生产

[0169] 单克隆抗体批量生产最普遍的是采用小鼠腹腔接种法。小鼠腹腔具有营养丰富环境。腹腔接种之后,阳性杂交瘤细胞株可快速生长并大量分泌本项目所需的单克隆抗体,一般每只小鼠可收集 5 ~ 10 毫升的腹水,多时甚至超过 30 毫升,每毫升单克隆抗体浓度可达数毫克甚至数十毫克水平。此外,腹水中的杂蛋白也较少,便于抗体的纯化。

[0170] 用含 20% (体积)血清的 HAT 培养基稀释筛选出来的杂交瘤细胞至每毫升含 2.5、15、和 50 个细胞三种不同的稀释度,分别分装到 96 孔板,每个稀释度 32 孔,每孔 0.1mL,然后在每孔中加入 0.1mL 的饲养细胞,置 37℃, 5% (体积)CO₂ 培养箱内培养。

[0171] 3 次克隆化后的结果均为阳性的为能稳定分泌抗毒素抗体的杂交瘤细胞,采用小鼠腹腔接种法生产单克隆抗体腹水。

[0172] 选用标准 BALB/c 小鼠,先用降植烷进行小鼠腹腔注射,一周后每只老鼠按照 5×10^6 杂交瘤细胞接种到小鼠腹腔中去。

[0173] 1 周后采集腹水,可以连续采集 2-3 次。

[0174] 将腹水置于 37℃ 静置 2 小时后,13000rpm 离心 10min,除去细胞成分和其他的沉淀物,收集上清。

[0175] 过玻璃纤维柱,收集到澄清的腹水。

[0176] 4.3、单克隆抗体的纯化

[0177] 首先经过辛酸-硫酸铵沉淀法粗提纯小鼠腹水,可除去白蛋白等绝大部分杂蛋白。

[0178] 用葡萄球菌 G 蛋白与葡聚糖(Sephrose CL-4B)交联,制备亲和层析柱将粗提抗

体上样结合后洗脱。葡萄球菌 G 蛋白可与 IgG1、IgG2a、IgG2b 和 IgG3 结合,以达到纯化的目的。

[0179] 洗脱液中的抗体浓度可用紫外光吸收法粗测,毒素单克隆抗体溶液在 A280nm 时,1.44(吸光单位)相当于 1mg/ml。

[0180] 经低 pH 洗脱后,在收集管内预置中和液可保持纯化抗体的活性。亲和层析法具有特异性高、纯度高的特点。通过上述整套工艺,腹水纯化后的单抗抗体纯度超过 95%,且具有稳定效价。

[0181] 5、免疫磁性微球的制备

[0182] 基本技术路线:水产品生物毒素单克隆抗体与生物素偶联后,除去游离的生物素,纯化后的经生物素偶联后的毒素单克隆抗体再与链霉亲和素连接的磁珠混合,即形成生物毒素免疫富集磁珠,用于水产品生物毒素检测的富集浓缩。5.1、水产品生物毒素单克隆抗体偶联生物素

[0183] 将活化好的生物素溶解于 DMSO 中,使其浓度为 2.5mg/mL,分装后,置于 -20℃ 保存;

[0184] 取 2mL 浓度约为 5mg/mL 的毒素单克隆抗体,在 0.1M PH8.5 的碳酸盐缓冲液中,透析过夜,第二天取出,备用;

[0185] 取透析好的毒素单克隆抗体 1.6mL,约 8mg,加 1M PH8.5 碳酸盐缓冲液 300uL,混匀后,再加生物素 500uL,室温搅拌 2h;

[0186] 加入饱和硫酸铵,使硫酸铵饱和度为 50%,4℃ 搅拌 0.5 小时;

[0187] 离心,弃上清,取沉淀,用 1×PBS 溶解后,再加入饱和硫酸铵,使硫酸铵饱和度为 50%,4℃ 搅拌 0.5 小时;

[0188] 弃上清,取沉淀,用 3.0mL 1×PBS 溶解,在 1×PBS 中透析 24h,终体积为 4mL, PAGE 及 ELISA 检测产物效价。

[0189] 5.2、磁性微球的制备

[0190] 把 0.01g Fe/C 纳米磁粉分散于 2mL 壳聚糖水溶液中,并逐滴滴入溶解有表面活性剂 AOT 的甲苯溶液中,机械搅拌乳化。

[0191] 滴入 25% (体积) 戊二醛溶液,在 2000r/min 机械搅拌下反应 1 小时。

[0192] 反应后用乙醇、丙酮、蒸馏水反复洗涤洗去表面活性剂和有机溶剂,用磁分离架分离出磁性成分。

[0193] 使之分散在蒸馏水中 4℃ 保存,取出其中 1mL 真空干燥 48 小时计算其中固体含量,调节微球浓度使最终浓度为 1mg/mL。1mL 的悬浮液含有微球约 1×10^{10} ,由于戊二醛用作交联剂,磁性载体表面含有丰富的悬垂的醛基。

[0194] 5.3、磁性微球与链霉亲和素的连接

[0195] 在磁场作用下用 pH6.0 浓度为 10mmol/L 的 NaH_2PO_4 缓冲液洗涤 1mL 磁珠,在圆底小烧瓶中加入连接液,混匀,室温下摇床中震荡 15min,避免磁珠沉淀,并起混匀作用,磁场下用缓冲液 B(HCl, 2mmol/L) 洗涤,用缓冲液 C($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, 20mmol/L, pH7.5) 重悬磁珠,立即加入 100uL 链霉亲和素,重悬在 PBS 液中。连接有链霉亲和素的磁珠即可与偶联生物素的毒素单克隆抗体相结合。

[0196] 6、葡聚糖 - 抗体 - 荧光素混合标记

[0197] 葡聚糖-抗体-荧光素混合标记技术是世界上在诊断试剂领域里的最先进的标记技术,同时也是本项目的核心技术。葡聚糖的分子量在 20,000-2,000,000 之间,每个葡聚糖分子能含有 1000 个 divinylsulfone 活性基团,除少部分的 divinylsulfone 活性基团自身偶联之外(形成类似口罩的结构)。而每个葡聚糖分子中绝大部分的 divinylsulfone 活性基团可与荧光素或抗体分别进行偶联,因而该项目所涉及的葡聚糖-抗体-荧光素混合标记是分两部完成:第一,荧光素分子可共价结合到亲水性糖链为骨架的葡聚糖分子上;第二,上述结合有荧光素的葡聚糖分子在与所涉及的单克隆抗体进行结合。

[0198] 本项目采用葡聚糖-抗体-荧光素混合标记技术,可以极大提升阳性信号/背景信号之间的读数比值约 100 倍。使得本项目开发的诊断试剂产品的敏感性从常规的 10-100ng/ml 推进到 0.1-1ng/ml 的水平。

[0199] ①单克隆抗体的准备取适量已知浓度的单克隆抗体溶液于烧杯中,再加入生理盐水及碳酸盐缓冲液(pH7.2),使最后浓度为 20mg/ml,碳酸盐缓冲液容量为总量的 1/10,混匀,将烧瓶置电磁搅拌器上 7~10min。

[0200] ②荧光素葡聚糖的准备采用商品化的荧光素葡聚糖,按每毫克单克隆抗体加 0.01mg 荧光素葡聚糖,用分析天平准确称取所需的荧光素葡聚糖粉末。也可用下述公式计算出单克隆抗体、荧光素葡聚糖的量,还可以算出需加缓冲液的量。

[0201] a. 单克隆抗体溶液:含量 A mg/ml;容积 B ml。

[0202] b. 总蛋白量 $(A \times B) = C$ mg。

[0203] c. $C/20 \sim C/10 = D$ mg(如单克隆抗体含量低于 20mg/ml,用 C/10;如高于 20mg/ml,用 C/20)。

[0204] d. 荧光素葡聚糖的量: $(1/50 \sim 2/100) \times C = E$ mg。

[0205] e. 0.5mol/L(pH9.5)碳酸盐缓冲液 $D/10 = F$ ml。

[0206] f. PBS 量 $D - (B + F) = G$ ml。

[0207] 注:A 为蛋白含量,mg/ml;B 为蛋白质溶液的容积;C 为蛋白总量,mg;D 为常数,mg;E 为荧光素的量,mg;F 为碳酸盐缓冲液的容积,ml;G 为 PBS 的容积,ml。

[0208] ③结合(或标记)边搅拌边将称取的荧光素葡聚糖渐渐加入单克隆抗体溶液中,避免将荧光素粘于烧瓶壁(大约在 5-10min 内加完),加完后,继续避光搅拌 12h 左右。结合期间应保持单克隆抗体溶液于 4℃左右,故需将烧杯和搅拌器一起移入 4℃冰箱中。

[0209] ④透析结合完毕后,将标记的单克隆抗体溶液离心(2500r/min)20min,除去其中少量的沉淀物,装入透析袋中,再置于烧杯中,用 pH8.0 缓冲盐水透析(0~4~C)过夜。

[0210] ⑤过柱取透析过夜的标记物,通过 G-50 柱,分离游离荧光素葡聚糖,收集标记的荧光葡聚糖抗体进行鉴定。洗脱液:0.01mol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.2);过滤量:12ml 标记全球蛋白液(过滤前未透析);收集量:20ml(稀释 1.7 倍左右)。

[0211] 7、混合标记物的纯化

[0212] 混合标记物的纯化由两个工艺步骤组成:

[0213] ①葡萄球菌 G 蛋白亲和层析:该工艺的特点是利用混合标记物中含有抗体的特点,而抗体又可以与葡萄球菌 G 蛋白进行结合,以达到纯化的初步目的。遗憾的是:初步纯化产生的标记物尚含有未标记的抗体分子,因而需要对初步纯化的标记物采取进一步的纯化。

[0214] ②用 Sephadex-G25 凝胶柱纯化荧光素标记的单克隆抗体：上述纯化的葡聚糖-抗体-荧光素混合标记物与尚未标记的单克隆抗体两者之间分子量存在明显差别，因而可以用分子筛纯化材料，即 Sephadex-G25 凝胶柱进行层析。葡聚糖-抗体-荧光素混合标记物会因其大分子量而首先从纯化柱中洗脱出来，而相对分子量较小的单克隆抗体则在上述峰值之后才缓慢从纯化柱中洗脱出来。上述葡聚糖-抗体-荧光素混合标记物经透析后存放于缓冲液中，缓冲液配方为：0.5% BSA+3% 海藻糖+0.1% Tween-20, 10m M pH7.5 Tris-HCL。

[0215] 8、荧光免疫层析试纸条制备工艺研究

[0216] 作用原理：本项目产品采用双抗体夹心法原理定量检测样品中生物毒素。

[0217] 结果判断：本项目由试纸条组成，检测样品中的生物毒素。每一种毒素检测试纸条上均有对照线 C(Control) 和检测线 T(Test)，不同毒素检测判断的原则相同，均参见图 7。在工艺上，免疫荧光试纸条和免疫金标试纸条大体上是一致的。主要差别在于免疫荧光试纸条工艺中所用的是葡聚糖-抗体-荧光素混合标记物，而金标试纸条所用的是抗体-胶体金之间的混合标记物。另外一个微小的差别是金标试纸条是用肉眼进行判断，而荧光试纸条需要荧光检测系统来检测阳性标本中的荧光强度，进而得出定量结果，而目前国内已经有数家公司生产手提式荧光检测仪，如图 2 所示。

[0218] 8.1、免疫荧光层析试纸条生产工艺流程：

[0219] 以生产 10 万份免疫层析试纸条为例，现将所需材料及工艺流程概述如下：

[0220] ①硝酸纤维膜：由美国 Millipore/NC 进口，硝酸纤维膜的规格为

[0221] 30cm×3m/HAHY00010：

[0222] 一条金标试纸条所需硝酸纤维膜面积为：2.5cm×0.9cm。

[0223] 生产 10 万份高灵敏度荧光定量试纸条所需要硝酸纤维膜总面积为：

[0224] $2.5\text{cm} \times 0.9\text{cm} \times 10\text{万} = 2.25 \times 10^5 \text{cm}^2$

[0225] 生产 10 万人份试纸条所需硝酸纤维膜的总卷数：

[0226] $2.25 \times 10^5 \text{cm}^2 / 30 \times 300 \text{cm}^2 = 25\text{卷}$

[0227] ②检测 T 线上所需水产品毒素单克隆抗体：

[0228] 水产品毒素单克隆抗体的总量： $0.5\text{mg/ml} \times 2.0\text{ul/cm} \times 0.3\text{cm} \times 10\text{万} = 30\text{mg}$

[0229] ③检测控制线 C 线上兔抗鼠 IgG：

[0230] 兔抗鼠 IgG 的总量： $1\text{mg/ml} \times 2.0\text{ul/cm} \times 0.3\text{cm} \times 10\text{万} = 60\text{mg}$

[0231] ④用于标记垫的葡聚糖-单克隆抗体-荧光素混合标记物：

[0232] 所需单克隆抗体的总量： $0.01\text{mg/ml} \times 20\text{ul} \times 10\text{万} = 20\text{mg}$

[0233] 8.2、荧光素混合标记物结合垫的制备

[0234] 将葡聚糖-抗体-荧光素混合标记物 20mg 稀释于 2000ml 的 PBS 中，制备上述混合标记物的浓度 0.01mg/ml。再将抗体标记垫（玻璃纤维膜或聚酯膜）浸泡于 2000ml 的混合标记物中，作用时间控制在 2-5 分钟。取出后 37℃ 气套式烘箱烘干，在 45% 湿度下避光保存备用。

[0235] 8.3、纤维膜上的 C（控制线）、T（检测线）的喷制

[0236] 将上述制备好的硝酸纤维膜分别喷制毒素单克隆抗体，以浓度为

[0237] 0.5mg/ml, 2.0ul/cm 喷射于硝酸纤维膜 T 线的位置。同时将兔抗鼠 IgG 以浓度为

1mg/ml, 2.0ul/cm 喷射于硝酸纤维膜 C 线的位置。

[0238] 8.4、标记物结合垫,样品垫的组装

[0239] 将上述制备好的葡聚糖-抗体-荧光素标记混合物 20mg,制备浓度为 0.01mg/ml 浸泡处理结合垫材料(为避免产生混淆,特此解释:上述 20mg 和浓度 0.01mg/ml 是指混合标记物中抗体的总量和浓度。而不是荧光素,葡聚糖的总量和浓度)。然后将浸泡好的标记物晾干后组装到上述硝酸纤维膜上结合垫的位置(此时硝酸纤维膜已喷射有 C 线, T 线)。最后,同样原理,将样品垫组装到试纸条中样品垫的位置。

[0240] 8.5、硝酸纤维膜的切割与产品的包装

[0241] 用自动裁条机将上述喷制有抗体 C 线和 T 线,及附着有样品和样品垫,荧光标记物结合垫的硝酸纤维膜,按 0.3cm 进行切割。将检测不同毒素抗原的试纸条并排排列,塞入常用标准的多联试纸条的试纸板,装配成一板多联的荧光定量免疫试纸条。

[0242] 9、荧光免疫层析试纸条技术指标研究

[0243] (1) 敏感性研究:本项目将已知浓度的标准生物毒素混入 10ml 正常贝类的样品处理液中,置于离心管中,加入 50 μ l 免疫磁珠(磁珠偶联特异的生物毒素单克隆抗体),振摇 20 ~ 30min;加 300 μ l PBS-T 重悬浮、混匀,取 100 μ l 滴加到荧光定量毒素检测试纸条加样孔膜上并展开,将试纸条放入荧光检测仪进行检测,检测其灵敏性指标。

[0244] (2) 特异性研究:用制备的荧光试纸条检测其它生物毒素,如:微囊藻毒素、西加鱼毒素、软骨藻酸、短裸甲藻毒素等其它毒素样品,检测荧光试纸条与这些毒素有没有交叉反应。

[0245] (3) 实际场地应用性研究:将开发的荧光试纸条进行实地测试。其中包括对质量监督部门人员,卫生系统人员,水产品生产、销售从业人员进行技术培训和宣传。预计样品处理比较容易展开,然而怎样使用荧光试纸条读数仪是上述场地检测的关键。

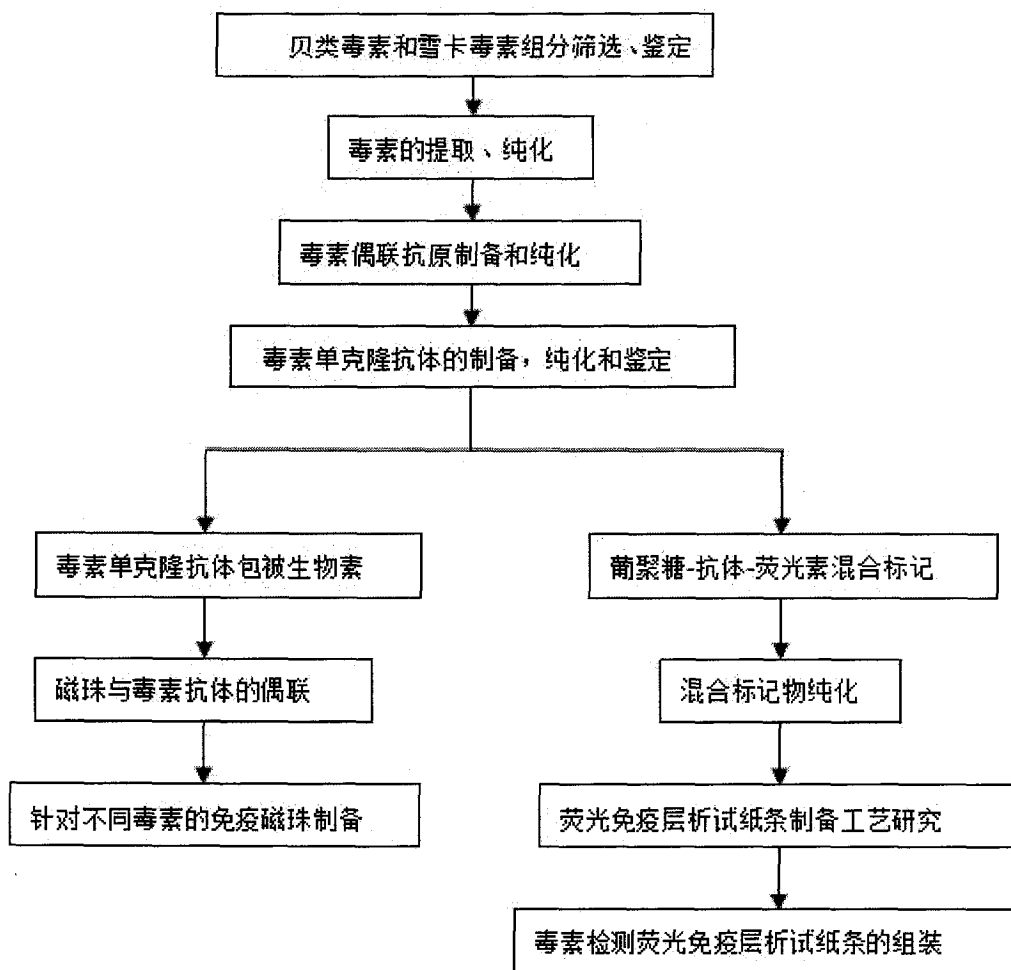


图 1

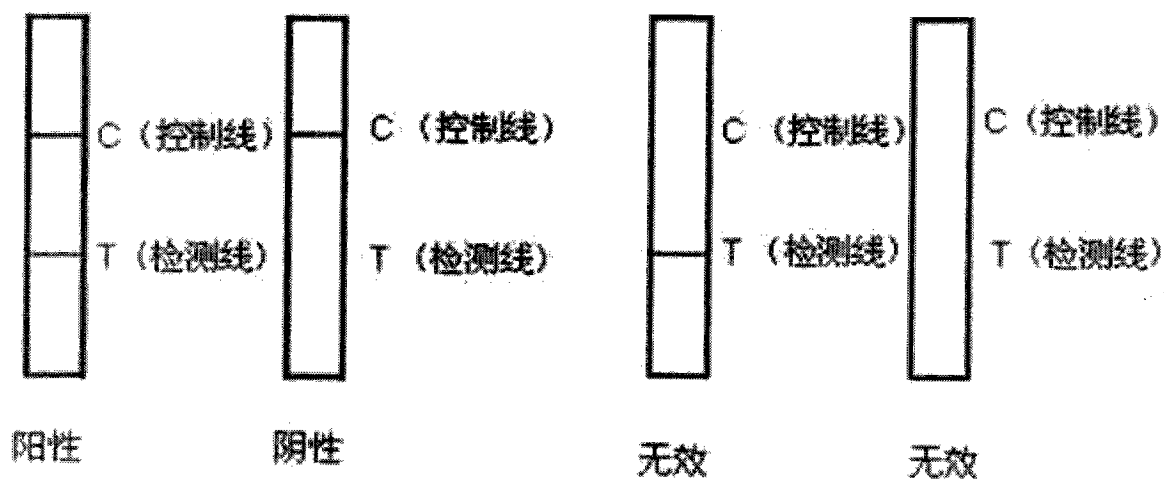


图 2

专利名称(译)	一种快速检测贝类毒素的方法		
公开(公告)号	CN103575893A	公开(公告)日	2014-02-12
申请号	CN201310476637.3	申请日	2013-10-14
[标]申请(专利权)人(译)	广州市疾病预防控制中心		
申请(专利权)人(译)	广州市疾病预防控制中心		
当前申请(专利权)人(译)	广州市疾病预防控制中心		
[标]发明人	李军涛 陈守义 朱伟		
发明人	李军涛 陈守义 朱伟		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/54326 G01N33/577		
其他公开文献	CN103575893B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种快速检测贝类毒素的方法，所述方法包括以下步骤：

1)样品毒素的提取净化；2)毒素的鉴定；3)毒素-BSA偶联抗原制备；4)毒素单克隆抗体制备及纯化；5)免疫磁性微球的制备；6)制备葡聚糖-抗体-荧光素混合标记物；7)混合标记物的纯化；8)荧光免疫层析试纸条制备。所述方法特异性强、检测限低、并能实现抗原成分的定量检测。

