

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810022245.9

[43] 公开日 2009年3月11日

[11] 公开号 CN 101382541A

[22] 申请日 2008.6.27

[21] 申请号 200810022245.9

[71] 申请人 江南大学

地址 214122 江苏省无锡市蠡湖大道1800号
江南大学食品学院

[72] 发明人 胥传来 徐丽广 彭池方 陈伟
马伟 李灼坤

[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 刘品超

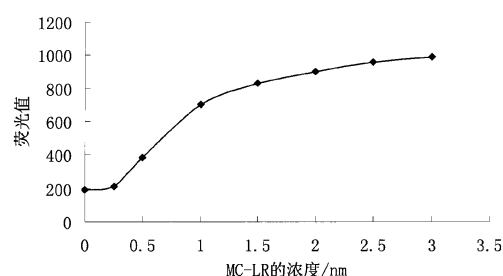
权利要求书4页 说明书7页 附图1页

[54] 发明名称

一种微囊藻毒素-LR的免疫荧光猝灭检测方法

[57] 摘要

一种微囊藻毒素-LR的免疫荧光猝灭检测方法,属于免疫分析化学技术领域。本发明包括免疫原、包被原、和抗体的制备,磁性纳米粒子的修饰,磁性纳米粒子与包被原的偶联,金纳米粒子的制备,金纳米探针的制备,包被原的固定,流动注射系统中的免疫反应,荧光酶标板的包被和流动注射荧光猝灭的检测;本发明大大提高了微囊藻毒素-LR检测的灵敏度,且操作更加简便,达到了高通量的目的,而且以磁性粒子作为固相载体,具有清洗和分离方便,操作简单的优点,用DNA修饰的金纳米粒子作为探针代替传统的HRP进行免疫反应,简化了反应的条件。



1. 一种微囊藻毒素-LR的免疫荧光猝灭检测方法,其特征是包括免疫原、包被原、和抗体的制备,磁性纳米粒子的修饰,磁性纳米粒子与包被原的偶联,金纳米粒子的制备,金纳米探针的制备,包被原的固定,流动注射系统中的免疫反应,荧光酶标板的包被和流动注射荧光猝灭的检测;工艺步骤为:

- (1) 包被原的制备: 将微囊藻毒素-LR与卵清蛋白相偶联得到包被原;
- (2) 免疫原的制备: 将微囊藻毒素-LR与牛血清蛋白相偶联得到免疫原;
- (3) 抗体的制备: 用所得免疫原按常规方法免疫得到特异性多克隆抗体;
- (4) 磁性纳米粒子的修饰: 将制备的 Fe_3O_4 种子用3-氨丙基三乙氧基硅烷修饰;
- (5) 磁性纳米粒子与包被原的偶联;
- (6) 两种粒径的金纳米粒子的制备;
- (7) 两种金纳米探针的制备;
- (8) 包被原的固定: 用所得包被原与磁性微粒偶联,并固定于玻璃微通道内;
- (9) 流动注射系统中的免疫反应;
- (10) 荧光酶标板的包被;

(11) 流动注射荧光猝灭的检测: 利用间接竞争免疫检测将微囊藻毒素-LR和多克隆抗体通过玻璃微通道内,竞争结合后的多克隆抗体与经羊抗兔抗体及双链DNA共同修饰的金纳米探针反应,变性得到单链DNA并将其收集,收集得到的单链DNA一端与互补DNA修饰的金纳米探针反应,另一端与生物素修饰的互补DNA反应,并用亲和素固定于酶标板上,加入异硫氰酸荧光素,用荧光酶标仪检测荧光信号从而检测微囊藻毒素-LR含量。

2. 根据权利要求1所述的微囊藻毒素-LR的免疫荧光猝灭检测方法,其特征是免疫原的制备:

- ① 取 0.25mL 溶解有微囊藻毒素-LR 的乙醇溶液,加入 0.75mL 去离子水,加入 150 μL 的碳二亚胺,得 A 液;
- ② 用 1mL 25% 的乙醇溶液溶解 2mg 的牛血清蛋白 BSA,得 B 液;
- ③ 将 A 液逐滴加入到 B 液中,再加入 150 μL 的碳二亚胺,混匀,4 $^{\circ}\text{C}$ 反应 12h,得到微囊藻毒素-LR-BSA 偶联物的混合液;
- ④ 将微囊藻毒素-LR-BSA 偶联物的混合液移入透析袋中,用 6 \times 1L 的去离子水透析 4-6 天,最后使用冻干法将透析袋中的液体制成粉末,即得到人工抗原:微囊藻毒素-LR-BSA,用作免疫原。

3. 根据权利要求1所述的微囊藻毒素-LR的免疫荧光猝灭检测方法,其特征是包被原的制备:

- ① 取微囊藻毒素-LR 0.5mg 溶于 250 μL 的 N,N-二甲基甲酰胺中,得 C 液;

② 取三正丁胺15 μ L溶于250 μ L的N,N-二甲基甲酰胺中, 得D液;

③ 将D液加入到C液中;

④ 取氯甲酸异丁酯12 μ L, 溶于500 μ L N,N-二甲基甲酰胺中, 4 $^{\circ}$ C搅拌下逐滴加入到C液中, 反应1h;

⑤ 取牛血清蛋白6mg溶于3mL pH 9.0、50mmol/L的碳酸钠溶液, 将上述反应液于18 $^{\circ}$ C搅拌下逐滴加入到牛血清蛋白质溶液中, 室温反应12h, 即得到微囊藻毒素-LR-OVA偶联物的混合液;

⑥ 将微囊藻毒素-LR-OVA偶联物的混合液移入透析袋中, 用6 \times 1L的去离子水透析4-6天, 最后使用冻干法将透析袋中的液体制成粉末, 即得到人工抗原: 微囊藻毒素-LR-OVA, 用作包被原。

4.根据权利要求1所述的微囊藻毒素-LR的免疫荧光猝灭检测方法, 其特征是磁性纳米粒子的修饰: 用二次蒸馏水分别配制 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 的溶液及 NaOH 溶液, 将所配两种铁盐溶液混合, 在铁盐的混合溶液中 Fe^{2+} 离子的浓度为 0.12 mol/L, Fe^{3+} 的浓度为 0.2 mol/L; NaOH 溶液的浓度为 2.5 mol/L, 在剧烈搅拌下将一定体积的 NaOH 溶液缓慢滴加到混合铁盐溶液中, 将所得的沉淀在 60 $^{\circ}$ C 陈化 2 小时, 用二次蒸馏水将沉淀物清洗数次, 过滤后再在 60 $^{\circ}$ C 干燥 24 小时, 在玛瑙研钵中研磨后所得产物为 Fe_3O_4 种子; 将微囊藻毒素-LR-OVA 0.125g 用 100mL 乙醇和 1mL 水溶解, 超声 30min, 滴加 0.4mL 3-氨丙基三乙氧基硅烷 APTES, 室温搅拌 7 小时, 以 8000r/min 离心 30min, 将 APTES 修饰的 Fe_3O_4 纳米颗粒从反应介质中分离, 并用乙醇溶液对其清洗 5 次, 过滤后再在 60 $^{\circ}$ C 干燥 24 小时, 备用。

5.根据权利要求1所述的微囊藻毒素-LR的免疫荧光猝灭检测方法, 其特征是磁性纳米粒子与包被原的偶联: 取修饰的磁性纳米粒子10mg, N-羟基琥珀酰亚胺NHS 11.5mg, N,N-二环己基二亚胺DCC 20.63mg, 加入到3mL N,N-二羟基甲酰胺中, 室温搅拌反应过夜, 离心去沉淀, 上清液再与3mL含60mg卵清蛋白OVA的溶液在4 $^{\circ}$ C下搅拌反应过夜, 离心, 上清液用超纯水透析3天, 对透析袋中溶液进行磁性分离, 弃上清, 加入含2%明胶的封闭液封闭, 再加入PBST洗涤液, 洗涤后磁分离, 去上清, 最后向磁性分离过的离心管中加入1mL 0.02mol/L pH7.6的Tris缓冲液, 4 $^{\circ}$ C保存备用。

6.根据权利要求1所述的微囊藻毒素-LR的免疫荧光猝灭检测方法, 其特征是金纳米粒子的制备: 所有的玻璃仪器都强酸浸泡, 双蒸水清洗, 晾干备用; 制备时, 向洁净的三角烧瓶中加入100mL浓度为0.01%的氯金酸, 加热, 煮沸, 紧接着加入1%的柠檬酸三钠溶液3.5mL 或1mL, 边加热边搅拌, 溶液颜色从淡黄色变成红色, 反应持续6-8分钟柠檬酸三钠使金纳米粒子完全沉降, 所得金纳米粒子粒径对应分别为13nm或30nm, 最后, 溶液分别冷却至室温, 稀释到100mL,

4℃保藏。

7. 根据权利要求1所述的微囊藻毒素-LR的免疫荧光猝灭检测方法，其特征是金纳米探针的制备：

30nm金纳米探针的制备：首先，30nm金纳米粒子与1.5 μ g的羊抗兔在pH9.1碱性水溶液中搅拌反应，紧接着，向溶液中加入巯基修饰的寡核苷酸5'-tacgagttgagaccgtaagacgaggcaatcatgcaatcctgaatgcgt(10)-SH-3'，室温反应20小时，再用含0.1M NaCl的10mM磷酸盐缓冲溶液调节pH值至7.0，盐陈40小时后于-4℃下2000r.p.m离心30分钟，弃上清，红色沉淀物用含0.1M NaCl的10mM磷酸盐缓冲溶液溶解，加入1.5 μ M的目标探针

5'-cgcattcaggattgcatgaatgcctcgtcttaacggtctcaactcgta-3' 37℃杂交4小时，再次离心去上清，杂交过程重复4次，沉淀最后溶解于含0.3M NaCl的10mM磷酸盐缓冲溶液，作为储备液4℃保藏；

13nm金纳米探针的制备：直接向金纳米溶液中加入巯基寡核苷酸5'-GGCAATCATGCAATCCTGAATGCGa(10)-SH-3'，室温反应20小时，再用含0.1M NaCl的10mM磷酸盐缓冲溶液调节pH值至7.0，盐陈40小时后于-4℃下2000r.p.m离心30分钟，弃上清，红色沉淀物用含0.1M NaCl的10mM磷酸盐缓冲溶液溶解，4℃保藏。

8. 根据权利要求1所述的微囊藻毒素-LR的免疫荧光猝灭检测方法，其特征是包被原固定及流动注射系统中的免疫反应：先用含0.1M NaCl、pH 7.0的0.01M磷酸盐缓冲液作为洗液清洗微管和免疫反应池，然后将40 μ L 0.5mg/mL抗原修饰的超顺磁纳米粒子溶液吸入螺线管中，再以5 μ L/s的速率注入免疫反应池内，电磁铁通电，吸附磁珠，将其固定在反应池内；将预孵育的50 μ L抗体和50 μ L微囊藻毒素-LR混合溶液吸入螺线管中，其中，微囊藻毒素-LR溶解于含0.05% Tween-20 pH7.4 0.01M PBST中，浓度从1pg/ml到100pg/ml。然后，将混合溶液注入免疫反应池中室温反应10分钟，再以20 μ L/s的速度注入400 μ L含0.1M NaCl的pH7.0、0.01M磷酸盐缓冲液洗液，之后，将100 μ L的羊抗兔抗体及双链DNA共同修饰的30nm金探针的溶液以1 μ L/s的速度注入反应池，反应6分钟，冲洗；以2 μ L/s的速度注入100 μ L的双蒸水，60℃反应6分钟，最后再注入100 μ L的双蒸水，收集所需单链DNA，撤去磁场，洗涤柱子以备再用。

9. 根据权利要求1所述的微囊藻毒素-LR的免疫荧光猝灭检测方法，其特征是荧光酶标板的包被：用亲和素包被荧光酶标板，向酶标板每孔中加入100 μ L pH9.6的亲和素碳酸钠缓冲溶液，4℃孵育过夜，用PBS清洗后，备用。

10. 根据权利要求1所述的微囊藻毒素-LR的免疫荧光猝灭检测方法，其特征是荧光猝灭检测：将收集的单链DNA与10 μ L的生物素标记的捕获探针25 μ M，5'-生物素-a(10)TACGAGTTGAGACCGTTAAGACGA-3'混合，再加入含

0.3M NaCl, 0.02%SDS pH7.4 20 μ L、0.01M PBS, 37 $^{\circ}$ C 孵育 10 分钟后, 再加入 13nm 金纳米探针 20nM 进一步杂交 10 分钟后, 将杂交液转移到亲和素包被的荧光酶标板上, 室温孵育 30 分钟, 最后, 用 100 μ L PBS 缓冲液洗涤, 加入 100 μ L 异硫氰酸荧光素 FITC, 震荡, 荧光检测, 荧光强度可以通过 Wallac1420 工作站在线观测。

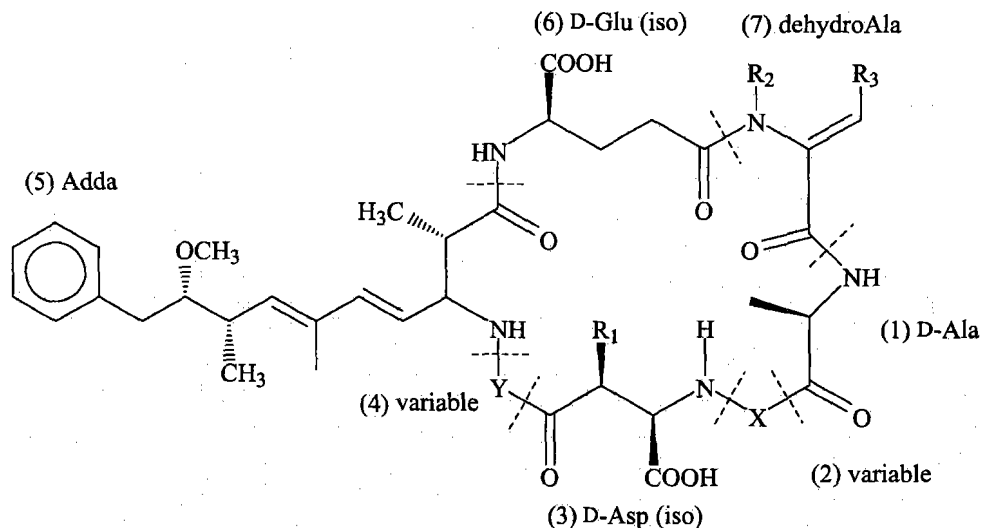
一种微囊藻毒素-LR 的免疫荧光猝灭检测方法

技术领域

一种微囊藻毒素-LR 的免疫荧光猝灭检测方法，属于免疫分析化学技术领域。

背景技术

随着经济的发展，含有大量的氮、磷营养物质的污水进入湖泊、水库，使水体富营养化，致使藻类异常增殖，释放次级代谢物藻毒素 (Algae Toxins)，威胁人类的饮用水的安全和水体中其它生物的安全。其中微囊藻毒素 (Microcystins, MCs) 的分布广、危害大更应引起重视，其是由某些种属的淡水蓝藻，主要是铜绿微囊藻产生的一个结构相似的环七肽家族，已知有60余种异构体。其结构如下：



其含有五个固定成分的氨基酸，两个可变的氨基酸X、Y。其中X和Y分别为Leu和Arg的最为常见、毒性也最大。基于此，世界卫生组织(WHO)推荐的饮水中的藻毒素标准为 $1.0\mu\text{g/L}$ ，我国现颁布执行的生活饮用水水质卫生规范(2001，微囊藻毒素-LR， 0.001mg/L)和地表水环境质量标准(GB3838-2002，微囊藻毒素-LR， 0.001mg/L)。故对藻毒素准确有效监测尤为重要。

常用的检测藻毒素的方法主要有仪器分析方法、生物化学法及免疫检测法等几大类。仪器分析方法主要包括高效液相色谱法(HPLC)、质谱、液质联用等，这些方法虽然灵敏但其需要昂贵的仪器设备，专业的操作人员，对检材的要求也比较高，并且需要进一步的样本前处理才能进行，这已经不能达到现代检测对快速、方便、准确的要求。生物化学法主要是蛋白磷酸酶抑制试验法，优点是快速，数小时即可实现对大量样品的检测，但其最大的不足之处在于特异性

蛋白磷酸酶等没有商品供应、特异性差。免疫分析化学方法具有快速，灵敏度高，操作简单，专一性好等优点。与传统的ELISA方法相比，本发明利用纳米磁性粒子作为固相载体，在流动注射系统中进行免疫反应，用DNA修饰的金纳米粒子作为探针，免疫反应后，收集DNA，并将其固定于金纳米粒子表面，加入异硫氰酸荧光素，检测荧光信号从而达到检测微囊藻毒素-LR的目的，该方法大大提高了检测的灵敏度，且操作更加简便，达到了高通量的目的，而且以磁性粒子作为固相载体，具有清洗和分离方便，操作简单的优点，用DNA修饰的金纳米粒子作为探针代替传统的HRP进行免疫反应，简化了反应的条件，提高了检测的灵敏度。

发明内容

本发明的目的是提供一种微囊藻毒素-LR的免疫荧光猝灭检测方法，灵敏度高，操作方便，线性范围宽。

本发明的技术方案：一种微囊藻毒素-LR的免疫荧光猝灭检测方法，包括免疫原、包被原、和抗体的制备，磁性纳米粒子的修饰，磁性纳米粒子与包被原的偶联，金纳米粒子的制备，金纳米探针的制备，包被原的固定，流动注射系统中的免疫反应，荧光酶标板的包被和流动注射荧光猝灭的检测；工艺步骤为：

- (1) 包被原的制备：将微囊藻毒素-LR与卵清蛋白相偶联得到包被原；
- (2) 免疫原的制备：将微囊藻毒素-LR与牛血清蛋白相偶联得到免疫原；
- (3) 抗体的制备：用所得免疫原按常规方法免疫得到特异性多克隆抗体；
- (4) 磁性纳米粒子的修饰：将制备的 Fe_3O_4 种子用3-氨丙基三乙氧基硅烷修饰；
- (5) 磁性纳米粒子与包被原的偶联；
- (6) 两种粒径的金纳米粒子的制备；
- (7) 两种金纳米探针的制备；
- (8) 包被原的固定：用所得包被原与磁性微粒偶联，并固定于玻璃微通道内；
- (9) 流动注射系统中的免疫反应；
- (10) 荧光酶标板的包被；

(11) 流动注射荧光猝灭的检测：利用间接竞争免疫检测将微囊藻毒素-LR和多克隆抗体通过玻璃微通道内，竞争结合后的多克隆抗体与经羊抗兔抗体及双链DNA共同修饰的金纳米探针反应，变性得到单链DNA并将其收集，收集得到的单链DNA一端与互补DNA修饰的金纳米探针反应，另一端与生物素修饰的互补DNA反应，并用亲和素固定于酶标板上，加入异硫氰酸荧光素，用荧光酶标仪检测荧光信号从而检测微囊藻毒素-LR含量。

免疫原的制备：

① 取 0.25mL 溶解有微囊藻毒素-LR 的乙醇溶液，加入 0.75mL 去离子水，加入 150 μL 的碳二亚胺，得 A 液；

② 用 1mL25%的乙醇溶液溶解 2mg 的牛血清蛋白 BSA，得 B 液；

③ 将A液逐滴加入到B液中，再加入150 μ L的碳二亚胺，混匀，4 $^{\circ}$ C反应12h，得到微囊藻毒素-LR-BSA偶联物的混合液；

④将微囊藻毒素-LR-BSA 偶联物的混合液移入透析袋中，用 6 \times 1L 的去离子水透析 4-6 天，最后使用冻干法将透析袋中的液体制成粉末，即得到人工抗原：微囊藻毒素-LR-BSA，用作免疫原。

包被原的制备：

① 取微囊藻毒素-LR 0.5mg溶于250 μ L的N,N-二甲基甲酰胺中，得C液；

② 取三正丁胺15 μ L溶于250 μ L的N,N-二甲基甲酰胺中，得D液；

③ 将D液加入到C液中；

④ 取氯甲酸异丁酯12 μ L，溶于500 μ L N,N-二甲基甲酰胺中，4 $^{\circ}$ C搅拌下逐滴加入到C液中，反应1h；

⑤ 取牛血清蛋白6mg溶于3mL pH 9.0、50mmol/L的碳酸钠溶液，将上述反应液于18 $^{\circ}$ C搅拌下逐滴加入到牛血清蛋白质溶液中，室温反应12h，即得到微囊藻毒素-LR-OVA偶联物的混合液；

⑥将微囊藻毒素-LR-OVA偶联物的混合液移入透析袋中，用6 \times 1L的去离子水透析4-6天，最后使用冻干法将透析袋中的液体制成粉末，即得到人工抗原：微囊藻毒素-LR-OVA，用作包被原。

磁性纳米粒子的修饰：用二次蒸馏水分别配制 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 的溶液及 NaOH 溶液，将所配两种铁盐溶液混合，在铁盐的混合溶液中 Fe^{2+} 离子的浓度为 0.12 mol/L, Fe^{3+} 的浓度为 0.2 mol/L; NaOH 溶液的浓度为 2.5 mol/L, 在剧烈搅拌下将一定体积的 NaOH 溶液缓慢滴加到混合铁盐溶液中，将所得的沉淀在 60 $^{\circ}$ C 陈化 2 小时，用二次蒸馏水将沉淀物清洗数次，过滤后再在 60 $^{\circ}$ C 干燥 24 小时，在玛瑙研钵中研磨后所得产物为 Fe_3O_4 种子；将微囊藻毒素-LR-OVA 0.125g 用 100mL 乙醇和 1mL 水溶解，超声 30min，滴加 0.4mL 3-氨丙基三乙氧基硅烷 APTES，室温搅拌 7 小时，以 8000r/min 离心 30min，将 APTES 修饰的 Fe_3O_4 纳米颗粒从反应介质中分离，并用乙醇溶液对其清洗 5 次，过滤后再在 60 $^{\circ}$ C 干燥 24 小时，备用。

磁性纳米粒子与包被原的偶联：取修饰的磁性纳米粒子10mg，N-羟基琥珀酰亚胺NHS 11.5mg，N,N-二环己基二亚胺DCC 20.63mg，加入到3mL N,N-二羟基甲酰胺中，室温搅拌反应过夜，离心去沉淀，上清液再与3mL含60mg卵清蛋白OVA的溶液在4 $^{\circ}$ C下搅拌反应过夜，离心，上清液用超纯水透析3天，对透析袋中溶液进行磁性分离，弃上清，加入含2%明胶的封闭液封闭，再加入PBST洗涤液，洗涤后磁分离，去上清，最后向磁性分离过的离心管中加入1mL 0.02mol/L pH7.6的Tris缓冲液，4 $^{\circ}$ C保存备用。

金纳米粒子的制备：所有的玻璃仪器都强酸浸泡，双蒸水清洗，晾干备用；制备时，向洁净的三角烧瓶中加入100mL浓度为0.01%的氯金酸，加热，煮沸，紧接着加入1%的柠檬酸三钠溶液3.5mL 或1mL，边加热边搅拌，溶液颜色从淡黄色变成红色，反应持续6-8分钟柠檬酸三钠使金纳米粒子完全沉降，所得金纳米粒子粒径对应分别为13nm或30nm，最后，溶液分别冷却至室温，稀释到100mL，4℃保藏。

金纳米探针的制备：

30nm金纳米探针的制备：首先，30nm金纳米粒子与1.5 μ g的羊抗兔在pH9.1碱性水溶液中搅拌反应，紧接着，向溶液中加入巯基修饰的寡核苷酸5'-tacgagttgagaccgtaagacgaggcaatcatgcaatcctgaatgcgt(10)-SH-3'，室温反应20小时，再用含0.1M NaCl的10mM磷酸盐缓冲溶液调节pH值至7.0，盐陈40小时后于-4℃下2000r.p.m离心30分钟，弃上清，红色沉淀物用含0.1M NaCl的10mM磷酸盐缓冲溶液溶解，加入1.5 μ M的目标探针

5'-cgcattcaggattgcatgaatgcctcgtcttaacggtctcaactcgta-3' 37℃杂交4小时，再次离心去上清，杂交过程重复4次，沉淀最后溶解于含0.3M NaCl的10mM磷酸盐缓冲溶液，作为储备液4℃保藏；

13nm金纳米探针的制备：直接向金纳米溶液中加入巯基寡核苷酸5'-GGCAATCATGCAATCCTGAATGCGa(10)-SH-3'，室温反应20小时，再用含0.1M NaCl的10mM磷酸盐缓冲溶液调节pH值至7.0，盐陈40小时后于-4℃下2000r.p.m离心30分钟，弃上清，红色沉淀物用含0.1M NaCl的10mM磷酸盐缓冲溶液溶解，4℃保藏。

包被原固定及流动注射系统中的免疫反应：先用含0.1M NaCl、pH 7.0的0.01M磷酸盐缓冲液作为洗液清洗微管和免疫反应池，然后将40 μ L 0.5mg/mL抗原修饰的超顺磁纳米粒子溶液吸入螺线管中，再以5 μ L/s的速率注入免疫反应池内，电磁铁通电，吸附磁珠，将其固定在反应池内；将预孵育的50 μ L抗体和50 μ L微囊藻毒素-LR混合溶液吸入螺线管中，其中，微囊藻毒素-LR溶解于含0.05% Tween-20 pH7.4 0.01M PBST中，浓度从从1pg/ml到100pg/ml。然后，将混合溶液注入免疫反应池中室温反应10分钟，再以20 μ L/s的速度注入400 μ L含0.1M NaCl的pH7.0、0.01M磷酸盐缓冲液洗液，之后，将100 μ L的羊抗兔抗体及双链DNA共同修饰的30nm金探针的溶液以1 μ L/s的速度注入反应池，反应6分钟，冲洗；以2 μ L/s的速度注入100 μ L的双蒸水，60℃反应6分钟，最后再注入100 μ L的双蒸水，收集所需单链DNA，撤去磁场，洗涤柱子以备再用。

荧光酶标板的包被：用亲和素包被荧光酶标板，向酶标板每孔中加入100 μ L pH9.6的亲和素碳酸钠缓冲溶液，4℃孵育过夜，用PBS清洗后，备用。

荧光猝灭检测：将收集的单链DNA与10 μ L的生物素标记的捕获探针

25 μ M, 5'-生物素-a(10)TACGAGTTGAGACCGTTAAGACGA-3'混合, 再加入含 0.3M NaCl, 0.02%SDS pH7.4 20 μ L、0.01M PBS, 37 $^{\circ}$ C 孵育 10 分钟后, 再加入 13nm 金纳米探针 20nM 进一步杂交 10 分钟后, 将杂交液转移到亲和素包被的荧光酶标板上, 室温孵育 30 分钟, 最后, 用 100 μ L PBS 缓冲液洗涤, 加入 100 μ L 异硫氰酸荧光素 FITC, 震荡, 荧光检测, 荧光强度可以通过 Wallac1420 工作站在线观测。

本发明的有益效果: 本发明大大提高了微囊藻毒素-LR 检测的灵敏度, 且操作更加简便, 达到了高通量的目的, 而且以磁性粒子作为固相载体, 具有清洗和分离方便, 操作简单的优点, 用 DNA 修饰的金纳米粒子作为探针代替传统的 HRP 进行免疫反应, 简化了反应的条件。

附图说明

图1 免疫原的紫外扫描图。

图2 微囊藻毒素-LR 的免疫荧光猝灭检测结果。

具体实施方式

实施例 1

(1) 免疫原的制备:

① 取 0.25mL 溶解有微囊藻毒素-LR(MC-LR)的乙醇溶液, 加入 0.75mL 去离子水, 加入 150 μ L 的碳二亚胺(EDC), 得 A 液。

② 用 1mL 25%的乙醇溶液溶解 2mg 的牛血清蛋白(BSA), 得 B 液。

③ 将A液逐滴加入到B液中, 再加入150 μ L的碳二亚胺(EDC), 混匀, 4 $^{\circ}$ C 反应12h。得到微囊藻毒素-LR-BSA偶联物的混合液。

④将微囊藻毒素-LR-BSA 偶联物的混合液移入透析袋中, 用 6 \times 1L 的去离子水透析 4-6 天。最后使用冻干法将透析袋中的液体制成粉末, 即得到人工抗原: 微囊藻毒素-LR-BSA, 作为免疫原。

透析袋前处理: 取10cm的透析袋, 煮沸5min, 再用60 $^{\circ}$ C的去离子水冲洗3min, 保存在4 $^{\circ}$ C去离子水中备用。

(2) 包被原的制备:

① 取微囊藻毒素-LR(MC-LR)0.5mg溶于250 μ L的N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中, 得C液。

② 取三正丁胺15 μ L溶于250 μ L的N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中, 得D液。

③ 将D液加入到C液中。

④ 取氯甲酸异丁酯12 μ L, 溶于500 μ L N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中, 4 $^{\circ}$ C 搅拌下逐滴加入到C液中, 反应1h。

⑤ 取牛血清蛋白(BSA) 6mg 溶于3mL pH=9.0、50mmol/L的碳酸钠溶液, 将上述反应液与18 $^{\circ}$ C 搅拌下逐滴加入到蛋白质溶液中, 室温反应12h。即得到微

囊藻毒素-LR-OVA偶联物的混合液。

⑥将微囊藻毒素-LR-OVA 偶联物的混合液移入透析袋中，用 6×1L 的去离子水透析 4-6 天。最后使用冻干法将透析袋中的液体制成粉末，即得到人工抗原：微囊藻毒素-LR-OVA，作为包被原。

透析袋前处理：取10cm的透析袋，煮沸5min，再用60℃的去离子水冲洗3min，保存在4℃去离子水中备用。

(3) 磁性纳米粒子的修饰：

用二次蒸馏水分别配制 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 的溶液及 NaOH 溶液，将所配两种铁盐溶液混合。在铁盐的混合溶液中 Fe^{2+} 离子的浓度为 0.12 mol/L， Fe^{3+} 的浓度为 0.2 mol/L；NaOH 溶液的浓度为 2.5 mol/L。在剧烈搅拌下将一定体积的 NaOH 溶液缓慢滴加到混合铁盐溶液中，将所得的沉淀在 60℃陈化 2 小时，用二次蒸馏水将沉淀物清洗数次，过滤后再在 60℃干燥 24 小时，在玛瑙研钵中研磨后所得产物为 Fe_3O_4 种子。

将上步产物0.125g用100mL乙醇和1mL水溶解，超声30min，滴加0.4mL 3-氨基丙基三乙氧基硅烷(APTES)，室温搅拌7小时，以8000r/min离心30min，将APTES修饰的 Fe_3O_4 纳米颗粒从反应介质中分离，并用乙醇溶液对其清洗5次，过滤后再在60℃干燥24小时，备用。

(4) 磁性纳米粒子与包被原的偶联：

取步骤(3)所得最终产物10mg，N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 11.5mg，N,N-二环己基二亚胺 (DCC) 20.63mg，加入到3mL N,N-二羟基甲酰胺(DMF)，室温搅拌反应过夜，离心去沉淀，上清液再与3mL卵清蛋白 (OVA) (60mg) 溶液在4℃下搅拌反应过夜，离心，上清液用超纯水透析3天，对透析袋中溶液进行磁性分离，弃上清，加入含2%明胶的封闭液封闭，再加入PBST洗涤液，洗涤后磁分离，去上清，最后向磁性分离过的离心管中加入1mL0.02mol/L pH7.6的Tris缓冲液，4℃保存备用。

(5) 金纳米粒子的制备：

所有的玻璃仪器都强酸浸泡，双蒸水清洗，晾干备用。制备时，向洁净的三角烧瓶中加入100mL浓度为0.01%的氯金酸，加热，煮沸，紧接着加入1%的柠檬酸三钠溶液(13nm粒子需3.5mL；30nm粒子需1mL)，边加热边搅拌，溶液颜色从淡黄色变成红色，反应持续6-8分钟以使柠檬酸三钠完全沉降。最后，溶液分别冷却至室温，稀释到100mL，4℃保藏。

(6) 金纳米探针的制备：

首先，30nm金纳米粒子与1.5 μg 的羊抗兔在碱性水溶液中搅拌反应(pH9.1)，紧接着，向溶液中加入巯基修饰的寡核苷酸(5'-tacgagttgagaccgtaagacgaggcaatcatgcaatcctgaatgcgt(10)-SH-3')，室温反应20小

时,再用10mM的磷酸盐缓冲溶液(0.1M NaCl)调节pH值至7.0,盐沉40小时后于-4℃下2000r.p.m离心30分钟,弃上清。红色沉淀物用10mM的磷酸盐缓冲溶液(0.1M NaCl)溶解,加入1.5 μ M的目标探针

(5'-cgcattcaggattgcatgaatgcctcgtcttaacggctctcaactcgta-3')37℃杂交4小时,再次离心去上清,杂交过程重复4次,沉淀最后溶解于10mM的磷酸盐缓冲溶液(0.3M NaCl),作为储备液4℃保藏;13nm金纳米探针的制备直接向金纳米溶液中加入巯基寡核苷酸(5'-GGCAATCATGCAATCCTGAATGCGa(10)-SH-3'),室温反应20个小时,再用10mM的磷酸盐缓冲溶液(0.1M NaCl)调节pH值至7.0,盐沉40小时后于-4℃下2000r.p.m离心30分钟,弃上清。红色沉淀物用10mM的磷酸盐缓冲溶液(0.1M NaCl)溶解,4℃保藏。

(7) 流动注射系统中的免疫反应:

先用0.01M PBS(pH7.0, 0.1M NaCl)的洗液清洗微管和免疫反应池,然后将40 μ L抗原修饰的超顺磁纳米粒子溶液(0.5mg/ml)吸入螺线管中,再以5 μ L/s的速率注入免疫反应池内,电磁铁通电,吸附磁珠,将其固定在反应池内。将预孵育的混合溶液(50 μ L抗体;50 μ LMC-LR)吸入螺线管中,其中,MC-LR溶解于0.01M PBST(pH7.4, 0.05%Tween-20)中,浓度从1pg/ml到100pg/ml。然后,将混合溶液注入免疫反应池中室温反应10分钟,再以20 μ L/s的速度注入400 μ L 0.01M PBS(pH7.0, 0.1M NaCl)的洗液。之后,将100 μ L的30nm金探针(含有二抗和DNA)的溶液以1 μ L/s的速度注入反应池,反应6分钟,冲洗。以2 μ L/s的速度注入100 μ L的双蒸水,60℃反应6分钟,最后再注入100 μ L的双蒸水,收集所需单链DNA,撤去磁场,洗涤柱子以备再用。

(8) 荧光酶标板的包被:

用亲和素包被荧光酶标板,向酶标板每孔中加入100 μ L亲和素的碳酸钠缓冲溶液(pH9.6),4℃孵育过夜,用PBS清洗后,备用。

(9) 荧光猝灭检测:

步骤(9)收集的单链DNA与10 μ L的生物素标记的捕获探针(25 μ M, 5'-生物素-a(10)TACGAGTTGAGACCGTTAAGACGA-3')混合,再加入20 μ L(0.3M NaCl, 0.02%SDS, 0.01M PBS, pH7.4),37℃孵育10分钟后,再加入13nm金纳米探针(20nM)进一步杂交10分钟后,将杂交液转移到亲和素包被的荧光板上,室温孵育30分钟。最后,用100 μ L PBS缓冲液洗涤,加入100 μ L FITC,震荡,荧光检测,荧光强度可以通过Wallac1420工作站在线观测。

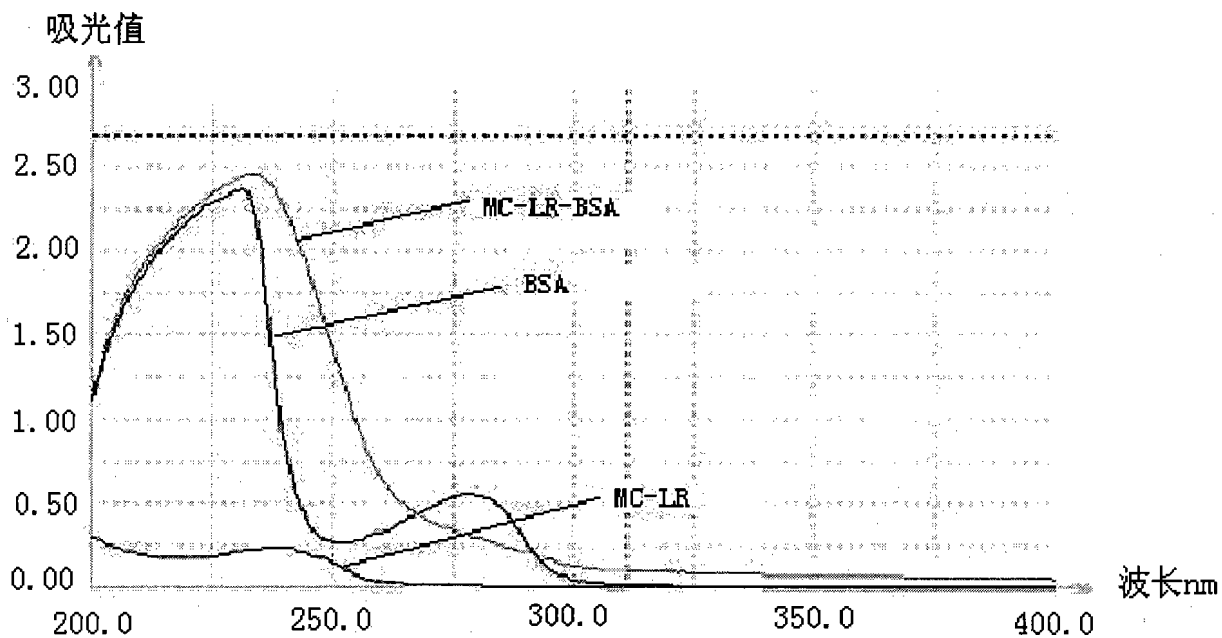


图 1

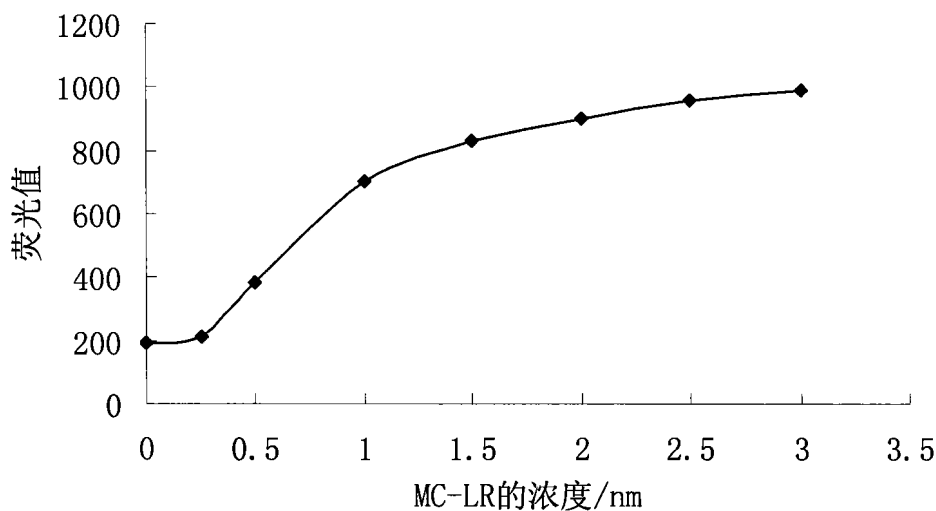


图 2

专利名称(译)	一种微囊藻毒素 - LR的免疫荧光猝灭检测方法		
公开(公告)号	CN101382541A	公开(公告)日	2009-03-11
申请号	CN200810022245.9	申请日	2008-06-27
[标]申请(专利权)人(译)	江南大学		
申请(专利权)人(译)	江南大学		
当前申请(专利权)人(译)	江南大学		
[标]发明人	胥传来 徐丽广 彭池方 陈伟 马伟 李灼坤		
发明人	胥传来 徐丽广 彭池方 陈伟 马伟 李灼坤		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/532		
其他公开文献	CN101382541B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种微囊藻毒素 - LR的免疫荧光猝灭检测方法，属于免疫分析化学技术领域。本发明包括免疫原、包被原、和抗体的制备，磁性纳米粒子的修饰，磁性纳米粒子与包被原的偶联，金纳米粒子的制备，金纳米探针的制备，包被原的固定，流动注射系统中的免疫反应，荧光酶标板的包被和流动注射荧光猝灭的检测；本发明大大提高了微囊藻毒素 - LR检测的灵敏度，且操作更加简便，达到了高通量的目的，而且以磁性粒子作为固相载体，具有清洗和分离方便，操作简单的优点，用DNA修饰的金纳米粒子作为探针代替传统的HRP进行免疫反应，简化了反应的条件。

