

[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 200810022246.3

[43] 公开日 2009年3月11日

[11] 公开号 CN 101382542A

[22] 申请日 2008.6.27

[21] 申请号 200810022246.3

[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

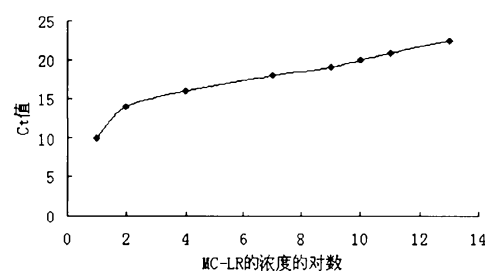
权利要求书4页 说明书7页 附图1页

### [54] 发明名称

一种微囊藻毒素-LR的免疫荧光PCR检测方法

### [57] 摘要

一种微囊藻毒素-LR的免疫荧光PCR检测方法,属于免疫分析化学技术领域。本发明包括包被原、免疫原、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,两种粒径的金纳米粒子制备,两种金纳米探针的制备,包被原的固定,流动注射系统中的免疫反应,实时荧光定量PCR检测和待测样品的检测;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PCR检测方法,其特征是包括免疫原、包被原、和抗体的制备,包被原的固定,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,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PCR的检测:

- (1) 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;
- (2) 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;
- (3) 抗体的制备: 将免疫源用常规方法制备特异性多克隆抗体;
- (4)磁性纳米粒子的修饰: 将制备的 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 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制备;
- (7) 两种金纳米探针的制备;
- (8) 包被原的固定: 将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) 流动注射荧光PCR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进行实时荧光定量PCR检测,得到关于微囊藻毒素-LR的浓度与Ct值的标准曲线;待测样品测得的Ct值与得到的标准曲线进行比对,得到待测样品中微囊藻毒素-LR的含量。

从而达到检测微囊藻毒素-LR的含量。

2.根据权利要求1所述的微囊藻毒素-LR的免疫荧光PCR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 $\mu\text{L}$  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 $\mu\text{L}$ 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,作为免疫原。

3.根据权利要求1所述的微囊藻毒素-LR的免疫荧光PCR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 $\mu\text{L}$ 的N,N-二甲基甲酰胺中,得C液;

② 取三正丁胺15 $\mu$ L溶于250 $\mu$ 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 $\mu$ L, 溶于500 $\mu$ L N,N-二甲基甲酰胺中, 4 $^{\circ}$ C搅拌下逐滴加入到A液中, 反应1h;

⑤ 取牛血清蛋白BSA 6mg溶于3mL pH 9.0、50mmol/L的碳酸钠溶液中, 将上述④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, 作为包被原。

4.根据权利要求1所述的微囊藻毒素-LR的免疫荧光PCR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  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  的溶液及氢氧化钠溶液, 将所配两种铁盐溶液混合, 在铁盐的混合溶液中  $\text{Fe}^{2+}$  离子的浓度为 0.12 mol/L,  $\text{Fe}^{3+}$  的浓度为 0.2 mol/L; 氢氧化钠溶液的浓度为 2.5 mol/L; 在剧烈搅拌下将一定体积的氢氧化钠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  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  种子; 将所得  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  种子 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  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  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PCR检测方法, 其特征是磁性纳米粒子与包被原的偶联: 取所得APTES修饰的 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 纳米颗粒10mg, N-羟基琥珀酰亚胺NHS 11.5mg, N,N-二环己基碳二亚胺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 pH 7.6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PCR检测方法, 其特征是金纳米粒子的制备: 制备时, 向洁净的三角烧瓶中加入100mL质量浓度为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 $^{\circ}$ C保藏。

7. 根据权利要求1所述的微囊藻毒素-LR的免疫荧光PCR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 $\mu$ 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个小时,再用含0.1M氯化钠的10mM的磷酸盐缓冲溶液调节pH值至7.0,盐陈40小时后于-4 $^{\circ}$ C下2000r.p.m离心30分钟,弃上清;红色沉淀物用含0.1M氯化钠10mM的磷酸盐缓冲溶液溶解,加入1.5 $\mu$ M的目标探针5'-cgcattcaggattgcatgaatgcctcgtcttaacggctctcaactcgta-3' 37 $^{\circ}$ C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氯化钠的10mM磷酸盐缓冲溶液中,得到羊抗兔抗体及双链DNA共同修饰的30nm金纳米探针,作为储备液4 $^{\circ}$ C保藏;

13nm金纳米探针的制备:直接向13nm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氯化钠的10mM磷酸盐缓冲溶液调节pH值至7.0,盐陈40小时后于-4 $^{\circ}$ C下2000r.p.m离心30分钟,弃上清;红色沉淀物用含0.1M氯化钠的10mM磷酸盐缓冲溶液溶解,4 $^{\circ}$ C保藏。

8. 根据权利要求1所述的微囊藻毒素-LR的免疫荧光PCR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pH7.0、含0.1M氯化钠的0.01M磷酸盐缓冲液作洗液清洗微管和免疫反应池,然后将40 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ L抗体和50 $\mu$ 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pH 7.4含0.05% Tween-20 的0.01M PBST中,浓度从1pg/mL~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 $\mu$ L/s的速度注入400 $\mu$ L pH 7.0、含0.1M氯化钠的0.01M PBS洗液;之后,将100 $\mu$ 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 $\mu$ L/s的速度注入反应池,反应6分钟,冲洗;以2 $\mu$ L/s的速度注入100 $\mu$ L的双蒸水,60 $^{\circ}$ C反应6分钟,最后再注入100 $\mu$ 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PCR检测方法,其特征是实时荧光定量PCR检测:设计正义引物F为:5'-cgcattcaggattgcatga-3',反义引物R为5'-cgagttgagaccgtaagacga-3';其次,配制总体积为20 $\mu$ L的反应溶液,各组分分别为:TOYOBO SYBR Green Real-time PCR Master Mix10.0 $\mu$ L;超纯水6.8 $\mu$ L;正义引物F 0.6 $\mu$ L;反义引物R 0.6 $\mu$ L;所收集的单链DNA 2.0  $\mu$ L;将此混合溶液放入实时荧光PCR仪,进行如下操作:95 $^{\circ}$ C / 30 s 预变性;进行扩增,

95°C/5s, 60°C/5s, 72°C/10s, 共45个循环; 进行熔点曲线分析: 95°C/0s, 45°C/15s, 95°C/0s, 0.1°C/s连续收集荧光, 1个循环; 最终得到关于微囊藻毒素-LR的浓度与Ct值的标准曲线。

10. 根据权利要求1所述的微囊藻毒素-LR的免疫荧光PCR检测方法, 其特征是待测样品的检测: 待测样品测得的Ct值与得到的标准曲线进行比对, 得到待测样品中微囊藻毒素-LR的含量。

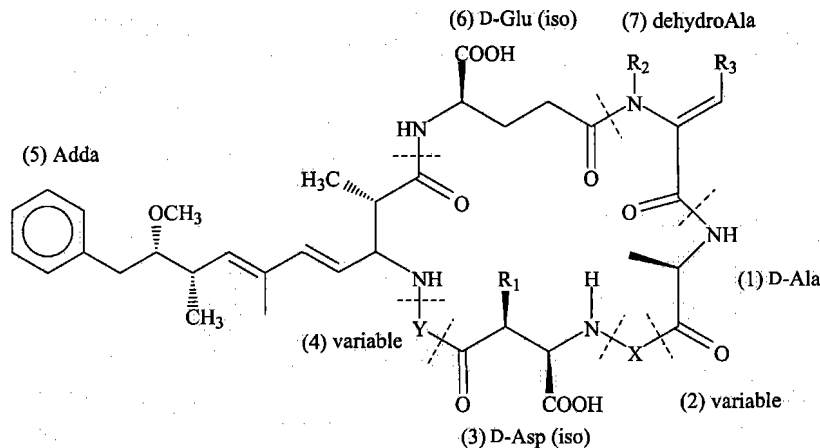
## 一种微囊藻毒素-LR 的免疫荧光 PCR 检测方法

## 技术领域

一种微囊藻毒素-LR 的免疫荧光 PCR 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)推荐的饮用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， $0.001\text{mg/L}$ )和地表水环境质量标准(GB3838-2002，微囊藻毒素-LR， $0.001\text{mg/L}$ )。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，并利用实时荧光 PCR 技术进行检测，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 PCR 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PCR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PCR的检测：

- (1) 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；
- (2) 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；
- (3) 抗体的制备：将免疫源用常规方法制备特异性多克隆抗体；
- (4)磁性纳米粒子的修饰：将制备的 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 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制备；
- (7) 两种金纳米探针的制备；
- (8) 包被原的固定：将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) 流动注射荧光PCR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进行实时荧光定量PCR检测，得到关于微囊藻毒素-LR的浓度与Ct值的标准曲线；待测样品测得的Ct值与得到的标准曲线进行比对，得到待测样品中微囊藻毒素-LR的含量。

从而达到检测微囊藻毒素-LR的含量。

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 $\mu\text{L}$  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 $\mu$ 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，作为免疫原。

包被原的制备：

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

② 取三正丁胺15 $\mu$ L溶于250 $\mu$ 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 $\mu$ L，溶于500 $\mu$ L N,N-二甲基甲酰胺中，4 $^{\circ}$ C搅拌下逐滴加入到A液中，反应1h；

⑤ 取牛血清蛋白BSA 6mg溶于3mL pH 9.0、50mmol/L的碳酸钠溶液中，将上述④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，作为包被原。

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  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  的溶液及氢氧化钠溶液，将所配两种铁盐溶液混合，在铁盐的混合溶液中  $\text{Fe}^{2+}$  离子的浓度为 0.12 mol/L， $\text{Fe}^{3+}$  的浓度为 0.2 mol/L；氢氧化钠溶液的浓度为 2.5 mol/L；在剧烈搅拌下将一定体积的氢氧化钠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  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  种子；将所得  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  种子 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  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  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：取所得 APTES 修饰的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米颗粒 10mg，N-羟基琥珀酰亚胺 NHS 11.5mg，N,N-二环己基碳二亚胺 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 pH 7.6 的 Tris 缓冲液，4 $^{\circ}$ C 保存备用。

金纳米粒子的制备：制备时，向洁净的三角烧瓶中加入 100mL 质量浓度为

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1.5μg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个小时，再用含0.1M 氯化钠的10mM 的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 氯化钠10mM的磷酸盐缓冲溶液溶解，加入1.5μM的目标探针

5'-cgcattcaggattgcatgaatgcctcgtcttaacggctcaactcgta-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氯化钠的10mM磷酸盐缓冲溶液中，得到羊抗兔抗体及双链DNA共同修饰的30nm金纳米探针，作为储备液4℃保藏；

13nm金纳米探针的制备：直接向13nm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 氯化钠的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 氯化钠的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pH7.0、含0.1M 氯化钠的0.01M磷酸盐缓冲液作洗液清洗微管和免疫反应池，然后将40μL 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5μL/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50μL抗体和50μL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pH 7.4含0.05% Tween-20 的0.01M PBST中，浓度从1pg/mL~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20μL/s的速度注入400μL pH 7.0、含0.1M 氯化钠的0.01M PBS洗液；之后，将100μL的羊抗兔抗体及双链DNA共同修饰的30nm金探针的溶液以1μL/s的速度注入反应池，反应6分钟，冲洗；以2μL/s的速度注入100μL的双蒸水，60℃反应6分钟，最后再注入100μL的双蒸水，收集所需单链DNA，撤去磁场，洗涤柱子以备再用。

实时荧光定量PCR检测：设计正义引物F为：5'-cgcattcaggattgcatga-3'，反义引物R为5'-cgagttgagaccgtaagacga-3'；其次，配制总体积为20μL的反应溶液，各组分别为：TOYOBO SYBR Green Real-time PCR Master Mix10.0μL；超纯水6.8μL；正义引物F 0.6μL；反义引物R 0.6μL；所收集的单链DNA 2.0 μL；将此

混合溶液放入实时荧光PCR仪,进行如下操作:95℃/30s预变性;进行扩增,95℃/5s,60℃/5s,72℃/10s,共45个循环;进行熔点曲线分析:95℃/0s,45℃/15s,95℃/0s,0.1℃/s连续收集荧光,1个循环;最终得到关于微囊藻毒素-LR的浓度与Ct值的标准曲线。

待测样品的检测:待测样品测得的Ct值与得到的标准曲线进行比对,得到待测样品中微囊藻毒素-LR的含量。

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PCR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 $\mu$ 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 $\mu$ L的碳二亚胺(EDC),混匀,4℃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。

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。

##### (2) 包被原的制备:

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

② 取三正丁胺15 $\mu$ L溶于250 $\mu$ 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 $\mu$ L,溶于500 $\mu$ L N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中,4℃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℃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。

④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。

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)制备多抗

将微囊藻毒素-LR-BSA偶联物常规方法免疫白兔制得微囊藻毒素-LR多克隆抗体。

### (4) 抗体效价的测定：

采用间接ELISA方法对抗MC-LR的抗体监测效价，采用OD值在1.0左右时的抗体的稀释倍数为抗体的效价结果显示为 $1.28 \times 10^6$ 。

### (5) 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  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  的溶液及氢氧化钠溶液，混合所配的两种铁盐溶液。在混合溶液中  $\text{Fe}^{2+}$  离子的浓度为 0.12 mol/L,  $\text{Fe}^{3+}$  的浓度为 0.2 mol/L；氢氧化钠溶液的浓度为 2.5mol/L。在剧烈搅拌下将一定体积的氢氧化钠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  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  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 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 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。

### (6) 磁性纳米粒子与包被原的偶联：

取步骤(5)所得最终产物10mg, N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 11.5mg, N,N-二环己基碳二亚胺 (DCC) 20.63mg, 加入到3mL N,N-二甲基甲酰胺(DMF), 室温搅拌反应过夜，离心取上清液与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，再加入含有0.05% Tween-20的磷酸盐缓冲液(PBST)的洗涤液，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℃保存备用。

### (7) 金纳米粒子的制备：

制备时，向洁净的三角烧瓶中加入100mL浓度为0.01%的氯金酸，煮沸，加入1%的柠檬酸三钠溶液(30nm粒子需1mL，13nm粒子需3.5mL)，搅拌加热，溶液由淡黄色变成红色，反应持续6-8分钟。最后，溶液分别冷却至室温，稀释到

100mL 4℃保藏。

(8) 金纳米探针的制备:

用30nm金纳米粒子与1.5μg的羊抗兔在pH 9.1的水溶液中搅拌反应后向溶液中加入巯基修饰的寡核苷酸

(5'-tacgagttgagaccgtaagacgaggcaatcatgcaatcctgaatgcgt(10)-SH-3'), 室温反应20h, 用10mM的磷酸盐缓冲溶液(0.1M 氯化钠)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10mM的磷酸盐缓冲溶液(0.1M 氯化钠)溶解, 加入1.5μM的目标探针

(5'-cgcattcaggattgcatgaatgcctcgtcttaacgggtctcaactcgta-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 氯化钠), 4℃保藏作为储备液。

(9)包被原固定及流动注射系统中的免疫反应:

先用0.01M PBS(pH7.0, 0.1M 氯化钠)的洗液清洗微管和免疫反应池, 然后将40μL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5μL/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(50μL抗体; 50μLMC-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20μL/s的速度注入400μL 0.01M PBS(pH7.0, 0.1M 氯化钠)的洗液。之后, 将100μL的30nm金探针(含有二抗和DNA)的溶液以1μL/s的速度注入反应池, 反应6分钟, 冲洗。以2μL/s的速度注入100μL的双蒸水, 60℃反应6分钟, 最后再注入100μL的双蒸水, 收集所需单链DNA, 撤去磁场, 洗涤柱子以备再用。

(10) 实时荧光定量PCR检测:

设计出正义引物(F)为 5'-cgcattcaggattgcatga-3', 反义引物(R)为 5'-cgagttgagaccgtaagacga-3'。其次, 配制总体积为 20μL 的反应溶液, 各组分分别为: TOYOBO SYBR Green Real-time PCR Master Mix10.0μL; 超纯水 6.8μL; 正义引物(F)0.6μL; 反义引物(R)0.6μL; 步骤(9)收集的单链 DNA 2.0 μL。将此混合溶液放入实时荧光 PCR 仪, 进行如下操作: 95℃ / 30 s 预变性; 进行扩增, 95℃/5s, 60℃/5s, 72℃/10s(收集荧光), 共 45 个循环; 进行熔点曲线分析: 95℃/0s, 45℃/15s, 95℃/0s(0.1℃/s, 连续收集荧光), 1 个循环。最终得到关于微囊藻毒素-LR 的标准曲线, 达到了检测的目的。

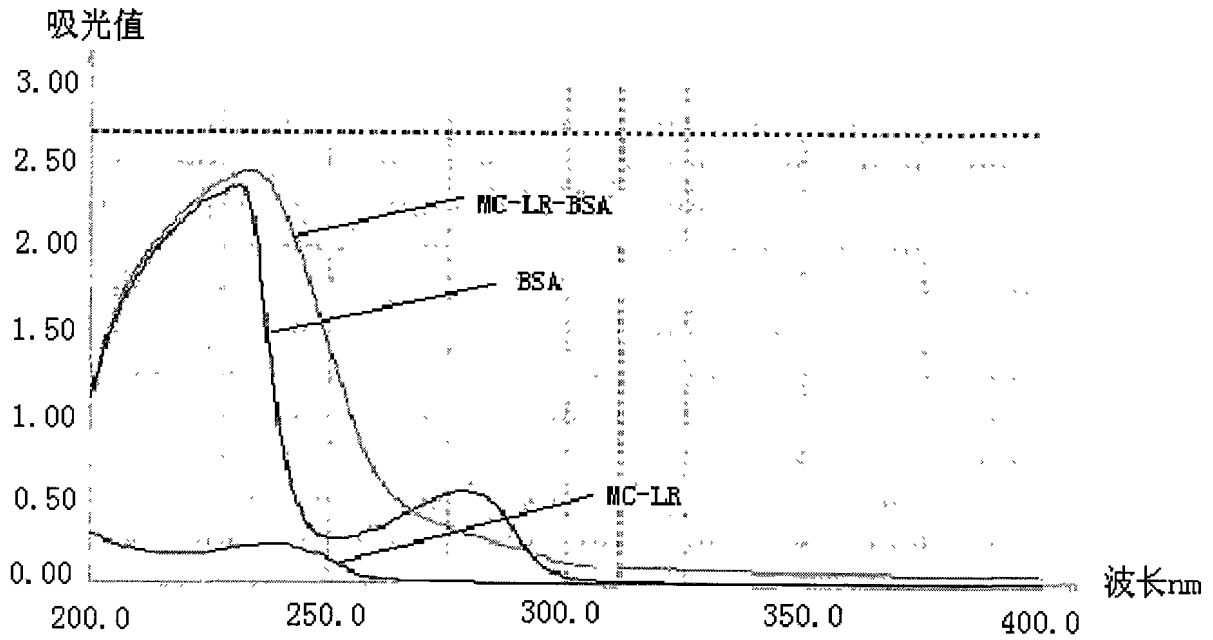


图 1

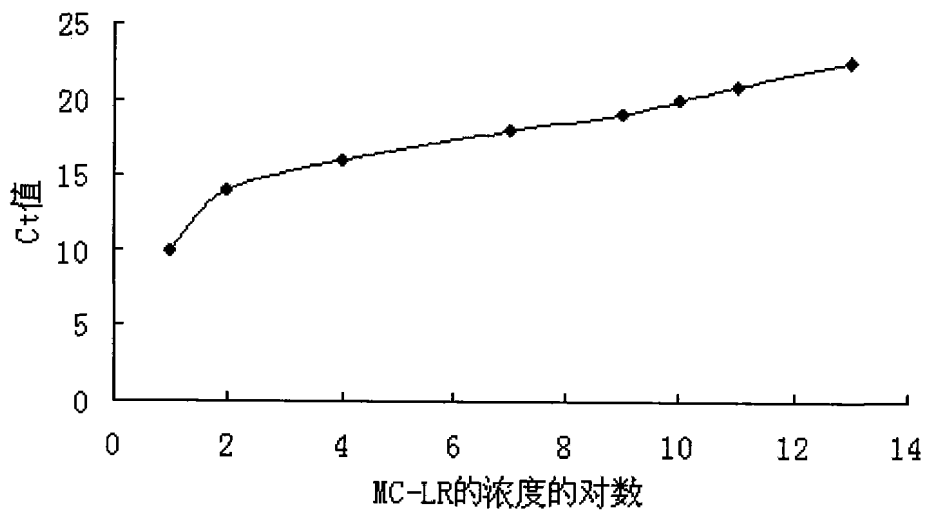


图 2

专利名称(译)	一种微囊藻毒素 - LR的免疫荧光PCR检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101382542A</a>	公开(公告)日	2009-03-11
申请号	CN200810022246.3	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	CN101382542B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

一种微囊藻毒素 - LR的免疫荧光PCR检测方法，属于免疫分析化学技术领域。本发明包括包被原、免疫原、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，两种粒径的金纳米粒子制备，两种金纳米探针的制备，包被原的固定，流动注射系统中的免疫反应，实时荧光定量PCR检测和待测样品的检测；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。

