

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 1/28 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200710119210.2

[45] 授权公告日 2009年3月4日

[11] 授权公告号 CN 100465642C

[22] 申请日 2007.7.18

[21] 申请号 200710119210.2

[73] 专利权人 清华大学

地址 100084 北京市海淀区清华园

[72] 发明人 何苗 盛建武 施汉昌

[56] 参考文献

CN1449821A 2003.10.22

US4919889A 1990.4.24

CN1740793A 2006.3.1

US6534279B1 2003.3.18

CN1715920A 2006.1.4

审查员 吴江明

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 关畅 任风华

权利要求书 1 页 说明书 16 页 附图 14 页

[54] 发明名称

提高环境样品免疫检测抗基质效应的方法及其专用缓冲溶液

[57] 摘要

本发明公开了一种提高环境样品免疫检测抗基质效应的方法及其专用缓冲溶液。本发明所提供的环境样品免疫检测专用缓冲溶液，是在现有的浓度为 0.05 - 0.12mol/L、pH 为 7.0 - 8.0 的缓冲液中，加入下述 a)、b) 和 c) 的物质：a) NaCl，使其终浓度为 10 - 100g/L；b) 惰性蛋白或明胶，使其终浓度为 2 - 20g/L；所述惰性蛋白是不与免疫反应体系发生反应的蛋白；c) 乙二胺四乙酸二钠，使其终浓度为 2 - 20g/L。本发明的提高环境样品免疫检测抗基质效应的方法及其专用缓冲溶液可用于各种环境样品(如水样)的免疫检测中，可有效地减小或消除来自环境样品(如水样)中各种复杂基质在其自然界存在的边界范围内给免疫检测带来的干扰，使实际环境样品免疫检测的稳定性增强。

1、一种缓冲溶液，是在浓度为 0.05-0.12mol/L、pH 为 7.0-8.0 的磷酸盐缓冲液中，加入下述 a)、b) 和 c) 的物质：

a) NaCl，使其终浓度为 10-100g/L；

b) 惰性蛋白或明胶，使其终浓度为 2-20 g/L；所述惰性蛋白是不与免疫反应体系发生反应的蛋白；

c) 乙二胺四乙酸二钠，使其终浓度为 2-20 g/L。

2、根据权利要求 1 所述的缓冲溶液，其特征在于：所述磷酸盐缓冲液包括 KH_2PO_4 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 和 KCl。

3、根据权利要求 1 所述的缓冲溶液，其特征在于：所述 NaCl 的浓度为 50g/L。

4、根据权利要求 1 所述的缓冲溶液，其特征在于：所述惰性蛋白或明胶的浓度为 10g/L。

5、根据权利要求 1 所述的缓冲溶液，其特征在于：所述乙二胺四乙酸二钠的浓度为 5g/L。

6、根据权利要求 1 所述的缓冲溶液，其特征在于：所述惰性蛋白为牛血清白蛋白、鸡蛋白蛋白或兔血清白蛋白。

7、权利要求 1 至 6 中任一权利要求所述的缓冲溶液在环境样品免疫检测中的应用。

8、一种提高环境样品免疫检测抗基质效应的方法，是在环境样品免疫检测中，将权利要求 1 至 6 中任一权利要求所述的缓冲溶液作为缓冲体系，进行环境样品的免疫检测。

9、根据权利要求 8 所述的方法，其特征在于：所述基质效应由环境样品的酸碱度和/或水中硬度和/或腐殖质酸和/或重金属和/或有毒有机污染物和/或农药和/或叶绿素引起。

提高环境样品免疫检测抗基质效应的方法及其专用缓冲溶液

技术领域

本发明涉及环境样品免疫检测技术领域一种提高环境样品免疫检测抗基质效应的方法及其专用缓冲溶液。

背景技术

基质(Matrix)是指一种分析物(Alyte)的环境(Milieu),即指样品中除了目标分析物以外的一切成份及其物理、化学性质(例如粘度、pH、温度等)。

基质效应(Matrix Effect)在医学上按临床及实验室标准化组织的定义是指:(1)样品中除分析物以外的其他成份对分析物测定值的影响;(2)基质对分析方法准确测定分析物的能力的干扰。

环境样品中的各种基质与其它样本中(如医学上的血液样品)的基质有着较大的不同,这是环境样品免疫检测技术非常重要的特点之一。为了能实现对水样进行直接的免疫检测,减少或省略预处理步骤,因此,有必要考察水中的各种基质对免疫检测的影响,做出全面的评价,并对不利的影响和干扰提出解决方案,以保证免疫检测的稳定性、重复性和可靠性。

目前,环境样品的免疫检测研究中,有关环境样品中复杂基质对免疫检测的干扰规律以及对干扰的消除方法等尚未开展起来。而这些对保证免疫检测的稳定性、重复性和可靠性十分关键。

发明内容

本发明的目的是提供一种提高环境样品免疫检测抗基质效应的方法及其专用缓冲溶液。

本发明所提供的缓冲溶液,是在现有的浓度为0.05-0.12mol/L、pH为7.0-8.0的缓冲液中,加入下述a)、b)和c)的物质:

a) NaCl,使其终浓度为10-100g/L;

b) 惰性蛋白或明胶,使其终浓度为2-20 g/L;所述惰性蛋白是不与免疫反应体系发生反应的蛋白;

c) 乙二胺四乙酸二钠,使其终浓度为2-20 g/L。

所述现有的缓冲液具体可为磷酸盐缓冲液。

所述惰性蛋白包括但不限于牛血清白蛋白、鸡蛋白蛋白和兔血清白蛋白。

其中,所述NaCl的浓度优选为50g/L。

所述惰性蛋白或明胶的浓度优选为10g/L。

所述乙二胺四乙酸二钠的浓度优选为5g/L。

本发明所提供的提高环境样品免疫检测抗基质效应的方法,是在环境样品免疫

检测中，将上述任一种环境样品免疫检测专用缓冲溶液作为缓冲体系，进行境样品的免疫检测。

本发明的提高环境样品免疫检测抗基质效应的方法及其专用缓冲溶液可用于各种环境样品（如水样）的免疫检测中，可有效地减小或消除来自环境样品（如水样）中各种复杂基质在其自然界存在的边界范围内给免疫检测带来的干扰，使实际环境样品免疫检测的稳定性增强。

本发明的提高环境样品免疫检测抗基质效应的方法及其专用缓冲溶液能应用在各种环境样品各种免疫检测技术上，包括环境样品的酶联免疫吸附试验试剂盒(ELISA kit)、环境样品胶体金试纸检测、环境样品免疫传感器/抗体芯片(免疫芯片，抗体阵列)等检测技术方面，能显著提高上述免疫检测技术的稳定性和一致性。

附图说明

图 1 为添加普通缓冲液的不同 pH 值条件下的 ELISA 标准曲线

图 2 为图 1 标准曲线的最大吸光度 A_0 和 IC_{50} 的比较

图 3 为添加专用缓冲液 1 的不同 pH 值条件下的 ELISA 标准曲线

图 4 为图 3 标准曲线的最大吸光度 A_0 和 IC_{50} 的比较

图 5 为添加普通缓冲液的不同硬度下的 ELISA 标准曲线

图 6 为图 5 标准曲线的最大吸光度 A_0 和 IC_{50} 的比较

图 7 为添加专用缓冲液 1 的不同硬度下的 ELISA 标准曲线

图 8 为图 7 标准曲线的最大吸光度 A_0 和 IC_{50} 的比较

图 9 为添加普通缓冲液的不同腐殖酸浓度下的 ELISA 标准曲线

图 10 为图 10 标准曲线的最大吸光度 A_0 和 IC_{50} 的比较

图 11 为添加专用缓冲液 1 的不同腐殖酸浓度下的 ELISA 标准曲线

图 12 为图 11 标准曲线的最大吸光度 A_0 和 IC_{50} 的比较

图 13 为添加普通缓冲液的不同 $CuSO_4$ 浓度下 ELISA 标准曲线

图 14 为添加普通缓冲液的不同 $CuSO_4$ 浓度下 A_0 和 IC_{50} 值的变化

图 15 为添加专用缓冲液 1 的不同 $CuSO_4$ 浓度下 ELISA 标准曲线

图 16 为添加专用缓冲液 1 的不同 $CuSO_4$ 浓度下 A_0 和 IC_{50} 值的变化

图 17 为添加专用缓冲液 1 的不同 COD 浓度下的 ELISA 标准曲线

图 18 为添加专用缓冲液 1 的不同 COD 浓度下 A_0 和 IC_{50} 值的变化

图 19 为添加专用缓冲液 1 的不同叶绿素 a 浓度下的 ELISA 标准曲线

图 20 为添加专用缓冲液 1 的不同叶绿素 a 浓度下 A_0 和 IC_{50} 值的变化

图 21 为添加普通缓冲液的不同甲醇浓度下的 ELISA 标准曲线

图 22 为添加普通缓冲液的不同甲醇浓度下 A_0 和 IC_{50} 值的变化

图 23 为添加专用缓冲液 1 的不同甲醇浓度下的 ELISA 标准曲线

图 24 为添加专用缓冲液 1 的不同甲醇浓度下 A_0 和 IC_{50} 值的变化

图 25 为添加专用缓冲液 1 的不同甲苯浓度下的 ELISA 标准曲线

图 26 为添加专用缓冲液 1 的不同甲苯浓度下 A_0 和 IC_{50} 值的变化

图 27 为添加专用缓冲液 1 的不同 2,4-D 浓度下的 ELISA 标准曲线

图 28 为添加专用缓冲液 1 的不同 2,4-D 浓度下 A_0 和 IC_{50} 值的变化

图 29 为添加专用缓冲液 2 的不同 pH 值条件下 ELISA 标准曲线最大吸光度 A_0 和 IC_{50} 的比较

图 30 为添加专用缓冲液 2 的不同硬度条件下 ELISA 标准曲线最大吸光度 A_0 和 IC_{50} 的比较

图 31 为添加专用缓冲液 2 的不同腐殖质酸浓度下 ELISA 标准曲线最大吸光度 A_0 和 IC_{50} 的比较

图 32 为添加专用缓冲液 3 的不同 pH 值条件下 ELISA 标准曲线最大吸光度 A_0 和 IC_{50} 的比较

图 33 为添加专用缓冲液 3 的不同硬度条件下 ELISA 标准曲线最大吸光度 A_0 和 IC_{50} 的比较

图 34 为添加专用缓冲液 3 的不同腐殖质酸浓度下 ELISA 标准曲线最大吸光度 A_0 和 IC_{50} 的比较

具体实施方式

本发明通过全面分析和系统考察环境中的各种基质对免疫检测的影响，提出一种免疫检测反应过程中的缓冲体系。具体方法如下：

首先将环境样中有代表性的基质进行分类，以免疫检测为基础，综合分析了各类基质对免疫检测的影响规律及机理，并提出了相应的干扰减小或消除方案。本发明实验中选取的可能影响抗体性质或影响抗原抗体反应的代表性基质包括以下几类：

- (1) 水中的环境条件干扰因素：pH 值、硬度和无机盐浓度；
- (2) 水体综合污染指标：选取生活污水作为干扰基质；
- (3) 富营养化水体中普遍存在的物质：腐殖酸和叶绿素 a；
- (4) 水中可能存在的有毒污染物：选取甲苯作为有机干扰基质、选取 2,4-D 作为农药类干扰基质、选取铜离子作为重金属干扰基质。
- (5) 样品提取或浓缩过程、以及免疫检测过程可能引入的有机溶剂：甲醇、乙酸和表面活性剂。

考察环境样品中基质效应对免疫检测的干扰，并提出抗干扰解决方案，基本步骤如下：

- (1) 研究上述各基质在不同浓度条件下对免疫检测的影响规律。即比较干扰基质不同浓度条件下对免疫检测标准曲线的变化，观察标准曲线受不同浓度基质影响变化的趋势和程度，通过对比，定性描述各包括标准曲线的高低、旋转及偏移等在

内的影响规律；同时定量的评价各干扰基质对免疫检测最低检测能力和定量检测区间的影响。

(3) 通过配制相应的缓冲溶液用作反应稀释液，并在稀释液中添加不同的抗干扰物质来减小或消除这些不利的干扰因素。并重新进行标准曲线的测定，同时评价对不利干扰因素的抑制效果。

(4) 最后评价在稀释液中添加的抗干扰物质本身对免疫检测的影响。在系统考虑各基质的影响规律及消除方法的基础上，得出本发明的环境样品免疫检测专用缓冲溶液。

下述实施例中所用方法如无特别说明均为常规方法。

骨髓瘤细胞 SP2/0 种子来源于中国协和医科大学基础医学院细胞中心。6 周龄的 Balb/c 纯系雌性小鼠购自中国协和医科大学实验动物中心。新生牛血清(PAA, Lot B00104-0786), 细胞融合用 PEG 1500(Roche, 11423800), 50×HAT 储液(Sigma, H0262, Lot 093K8931), 50×HT 储液(Sigma H0137, Lot 064K8927), IMDM 培养基(Gibco, Invitrogen Corp. Lot 1272036), 氨苄青霉素钠(Amresco 0339), 硫酸链霉素(Amresco 0382), 8-Azaguanine(Sigma A5284), DMSO(Amresco 0231), 石蜡油, 无水乙醚、异丙醇(北京化学试剂公司)。MC-LR (Alexis 公司(Lausen, Switzerland), 产品编号 ALX-350-012)。BSA (Sigma, A7638)。OVA (Sigma, A5378)。

实施例 1、抗微囊藻毒素-LR 的单克隆抗体 MC8C10 的获得

一、杂交瘤细胞株 MC8C10 CGMCC No. 2101 的获得

1、微囊藻毒素-LR 完全抗原 MC-LR-BSA 的合成

将微囊藻毒素-LR 采用 2-巯基乙胺进行化学修饰，在其第七位氨基酸(Mdha)上引入一个活性基团——氨基，再采用戊二醛法将修饰后的微囊藻毒素-LR (MC-LR) 与牛血清白蛋白偶联，经过滤层析后得到完全抗原，经 MALDI-TOF/MS 确定完全抗原的偶联比。具体方法如下：

(1) 对微囊藻毒素-LR 进行氨基修饰

① 将 2-巯基乙胺和 MC-LR 按照摩尔比 3000:1 充分混和在碱性的碳酸盐缓冲液中(pH=8.0)；混合物充分摇匀，在 50℃反应 1.5 小时；

② 反应完毕，降到室温，加入与 2-巯基乙胺等摩尔的乙酸使反应停止；

③ 中间产物的纯化采用固相萃取技术，得到经氨基修饰的微囊藻毒素-LR。材料为 500mg 6mL C₁₈ BondElut cartridge (Varian, Walnut Creek, CA)，具体步骤如下：

活化：用 4mL 甲醇活化，并用 6mL 高纯水调整，分为 2-3 次使用；

上样：将水样以 5-10mL/min 的流速流过固相萃取柱进行富集浓缩。重力过滤；

淋洗：装样完毕后，用 5% 甲醇水溶液 6mL 淋洗以净化样品，分为 3 次使用；

洗脱：待固相萃取柱吹干后，以 4mL 甲醇(分为 2 次)将微囊藻毒素洗脱并收集。

(2) 半抗原多肽与载体蛋白偶联

选择牛血清白蛋白 (BSA) 作为载体蛋白，采用戊二醛法将步骤 (1) 获得的经氨基修饰的微囊藻毒素-LR 与载体蛋白进行偶联，具体方法包括以下步骤：

(a) 取 10mg BSA (1.5×10^{-7} 摩尔)，完全溶解于 5mL 0.01mol/L PBS

($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.96g, KH_2PO_4 0.2g, NaCl 8.0g 加水至 1000mL, pH 7.2) 中，再加入 4mg 步骤 (1) 获得的经氨基修饰的微囊藻毒素-LR (4×10^{-6} 摩尔)，使其完全溶解；

(b) 缓慢加入 5mL 0.2% 的戊二醛溶液，与步骤 (a) 获得的溶液混合，并在室温下，搅拌反应 2 小时；

(c) 加入 0.2mL 1M 甘氨酸，在室温下搅拌 1 小时，以终止反应；

(d) 将步骤 (c) 获得的溶液用 Sephadex G-25 凝胶层析柱 (Pharmacia) 进行过滤层析，得到微囊藻毒素-LR 完全抗原 MC-LR-BSA。MALDI-TOF/MS 检测，结果表明该完全抗原的偶联比为 5.12，符合要求。将纯化的完全抗原经 -40°C 冷冻后，真空浓缩干燥，保存于 -20°C 冰箱中。

2、免疫动物

选取 6 周龄的雌性 Balb/c 小鼠，采用低剂量长程免疫法进行免疫，方法为：皮下多点注射， $30 \mu\text{g}$ MC-LR-BSA/只，共免疫 4 次，初次免疫加福氏完全佐剂 (0.1mL/只)，后三次加强免疫加福氏不完全佐剂 (0.1mL/只)，免疫间隔时间为 30 天。在第三次加强免疫后的第 10 天，对小鼠进行尾部静脉取血，用间接 ELISA 法测定效价，其中，包被的 MC-LR-BSA 的浓度为 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。对抗血清效价达到 1×10^5 以上的小鼠，进行一次冲击免疫，即每只小鼠采用 $10 \mu\text{l}$ MC-LR-BSA+ $90 \mu\text{l}$ 生理盐水进行腹腔注射，3 天后取脾细胞进行细胞融合。

3、细胞融合

1) 免疫脾细胞的制备

将步骤 2 冲击免疫三天后的 BALB/c 小鼠处死，无菌状态下取出脾脏，去表面包膜及脂肪，剪碎，置于平皿中研磨，加 GKN 溶液 (NaCl 8g, KCl 0.4g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.77g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.69g, 葡萄糖 2g, 酚红 0.01g, 溶于 1000mL 水中) 制成单细胞悬液，用 200 目铜网过滤，去除大的细胞团块后，离心，用 GKN 溶液洗涤并重悬脾细胞，计活细胞数，约为 1×10^8 个/mL。

2) SP2/0 骨髓瘤细胞的处理

取指数生长期的 SP2/0 骨髓瘤细胞，离心，用 GKN 溶液洗一次并悬浮于其中，

计活细胞数，为 1×10^8 个/mL。

3) 免疫脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞的融合

将步骤 2) 的 SP2/0 骨髓瘤细胞与步骤 1) 的免疫脾细胞融合，具体过程包括以下步骤：

1. 聚乙二醇(PEG)的配制(50% PEG)：PEG (MW1500, Roche, 11423800) 10.0g 置于 30mL 容量小烧瓶中，高压 3.6×10^5 Pa 15min，冷却至 50℃ 后加入完全培养基 (IMDM 培养基(Gibco, Invitrogen Corp. Lot 1272036)) 10.0mL，混匀，分装 1.0mL/管，4℃ 保存。

2. 取 HAT 培养液 40mL (50×HAT 储液, Sigma, H0262, Lot 093K8931)，完全培养液 (IMDM 培养基) 15mL 和 50% PEG 分别放入 37℃ 水浴箱中预热，另将一只盛水的烧杯同时放入水浴箱中备用。

3. 分别吸取含 7.0×10^7 个骨髓瘤细胞 SP2/0 和 7.0×10^8 个脾细胞的悬液加入 50mL 离心管中，充分混匀，并加 IMDM 培养基至 40mL。

4. 1200rpm 离心 8min，弃去上清液，用吸管吸净残留液体，以免影响 PEG 的浓度。轻轻弹击离心管底，使两种细胞充分混匀，直至成糊状。

5. 将离心管置于预温的烧杯中，用 1mL 已用 7.5% NaHCO_3 调整 pH 值至 8.0 (7.8-8.2 均可) 的 PEG 0.8mL，将吸管插入管底，继而轻轻搅动沉淀，并缓缓滴加 PEG，1min 内加完，再在水浴中静置 90s。

6. 立即滴加 37℃ 预温的完全培养液 (IMDM 培养基) 15mL，使 PEG 稀释而失去作用。滴加的方法是在 30s 内加 1mL，次 30s 加 3mL，接下来 1min 加完。注意，当 PEG 溶液加入后，即可见细胞凝集成小团块状，此时操作宜轻柔，以免干扰细胞融合过程。

7. 补加完全培养液 (IMDM 培养基) 至 40mL，1000rpm 离心 10min，弃上清。

8. 将细胞沉淀轻悬于预温的 HAT 培养液 40mL 中，加到 4 块已有饲养细胞层(小鼠腹腔巨噬细胞)的 96 孔板内，每孔加 $100 \mu\text{l}$ 。继而将培养板移至 37℃、5% CO_2 饱和湿度恒温箱中培养。

4、融合细胞的筛选及克隆化培养

约 3 天后，当杂交瘤细胞长满孔底 1/4-1/2 时，培养基变黄，此时用常用的 ELISA 法检测培养基上清液中的抗体，具体方法包括以下步骤：

1. 吸取 96 孔板每孔的一半上清，采用 ELISA 法进行阳性杂交瘤细胞筛选(一筛)，具体方法为：

用 50mM 碳酸盐缓冲液 (pH 9.5) 稀释包被抗原至 2mg/L，加入到 96 孔酶联板中进行包被，每孔 $100 \mu\text{l}$ ，4℃ 包被 12-24 小时，无需封闭；每孔加入各个克隆孔上清液 $100 \mu\text{L}$ ，37℃ 温育 1h，充分洗涤后加入 $100 \mu\text{L}$ 1: 10000 的酶标二抗 (HRP-羊抗鼠 IgG)，37℃ 温育 1h 后，加入底物显色，10min 后终止，读取 $A_{450\text{nm}}$ ， $A_{450\text{nm}}$ 值为

阴性对照 2.1 倍的为阳性杂交瘤细胞。对于一筛呈阳性的克隆株，进一步培养后，按照同样方法进行第二次筛选。

其中，包被抗原为 MC-LR-OVA，它按照下述方法制备：取 3mL OVA，加入 0.3mg 上述氨基修饰后的 MC-LR，加入 0.1mL 1.25%戊二醛充分混合，室温反应 24h。

2. 吸取检测结果呈阳性的孔中的剩余上清，加入新鲜 HT 培养基（50×HT 储液（Sigma H0137, Lot 064K8927））做进一步培养；

3. 第二天用与步骤 1 相同的 ELISA 法复测第一次呈阳性的上清及吸取的剩余上清（二筛）；

4. 将 2 次 ELISA 检测均为阳性的克隆细胞吸出，转移至含 BALB/c 小鼠腹腔细胞的 HT 培养基制成的 24 孔（每孔 0.9mL HT 培养基）营养板的 3-4 个孔内，进行再克隆。然后吸取上清，采用与步骤 1 相同的 ELISA 法对阳性克隆株进行再次确定（三筛）。

对于三筛后的阳性克隆株，采用 MC-LR 单体、BSA 及 OVA 再进行一次筛选，包被浓度分别为 $5\mu\text{g/mL}$ ， $2\mu\text{g/mL}$ 及 $2\mu\text{g/mL}$ ， 4°C 包被过夜，其它条件同上。选取对 OVA 及 BSA 均为阴性、对 MC-LR 检测结果为阳性的克隆株。结果得到 4 株阳性克隆株。将其中一株阳性克隆株，名称为能分泌抗 Microcystin-LR 单克隆抗体的小鼠杂交瘤细胞株 MC8C10，于 2007 年 06 月 18 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心（简称 CGMCC，地址是中国北京市海淀区中关村北一条 13 号），保藏编号为 CGMCC No. 2101。

二、单克隆抗体 MC8C10 的获得及亚型鉴定

1、获取抗体腹水

选取 10 周龄 BALB/C 小鼠，接种细胞前 7-10 天，预先腹腔注射液体石蜡 0.5mL / 只。用生理盐水调整杂交瘤细胞株 MC8C10 CGMCC No. 2101 浓度至 2×10^6 个 / mL，腹腔接种杂交瘤细胞，接种细胞数为 1×10^6 个 / 只，7-10 天后采集腹水。

2、腹水的纯化

采用 HiTrap rProtein A FF 1mL 免疫亲和层析柱（Bio-Science AB, Sweden. Lot No. 309591）来纯化步骤 1 获得的小鼠单克隆抗体腹水，得到 MC8C10。该层析柱所含的 1mL 介质最多能结合 23mg 由小鼠产生的 IgG2b 型单克隆抗体，并且对于 IgG2b 型抗体的结合能力是最高的，而对于小鼠产生的其它抗体亚类（如 IgG1、IgG2a、IgG3 等）的结合能力较弱。偶联缓冲液为 0.2mol/L、pH 7 的磷酸盐缓冲液（将 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.216g， $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 4.369g 溶解于 100mL 双蒸水中）。洗脱缓冲液采用 0.1M 柠檬酸钠溶液（pH 3.5）。结果得到 3mg 固态的 MC8C10。将纯化的抗体分装， -20°C 保存。

3、抗体亚型鉴定

采用单克隆抗体亚型检测试剂盒（ImmunoType™ Kit, Sigma）对步骤 2 获得的抗体进行免疫球蛋白亚型的鉴定，具体方法为：用 PBS 以 1:1000 比例稀释各类抗体（小鼠 IgG₁、IgG_{2a}、IgG_{2b}、IgG₃、IgA 及 IgM），然后用稀释抗体包被 96 孔酶联板（每孔

0.1mL, 每类抗体两个孔), 37°C温育1小时后, 弃包被液, 洗涤3次, 按0.1mL/孔的量加入步骤2纯化的抗体, 室温温育1小时后洗涤3次, 按0.1mL/孔的量加入辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠IgG(购自邦定生物公司), 室温温育30分钟后, 洗涤3次, 按0.1mL/孔的量加入辣根过氧化物酶底物反应液(1mg/mL TMB), 室温10-15分钟, 出现褐色即为阳性结果, 最后按0.05mL/孔的量加入2mol/L H₂SO₄终止反应。结果表明杂交瘤细胞MC8C10分泌的抗体为IgG2b亚类。

这里配制缓冲液均使用双蒸水, 化学试剂纯度为分析纯或更高。最后配制的缓冲液采用0.45 μm的滤器过滤。

实施例2、利用专用缓冲溶液1提高环境样品免疫检测抗基质效应

所用的专用缓冲液1是在0.1mol/L、pH为7.4的PBS(配置方法: KCl 2.0g; KH₂PO₄ 2.4g; Na₂HPO₄•12H₂O 29g; 双蒸水加至1000mL。)中, 加入下述a)、b)和c)的物质: a) NaCl, 使其终浓度为50g/L; b) 牛血清白蛋白, 使其终浓度为10g/L; b) 乙二胺四乙酸二钠, 使其终浓度为5g/L。

一、消除水中酸碱度给免疫检测带来的影响

采用竞争ELISA方法检测待测水样中的微囊藻毒素-LR。实验设两个处理: 抗体溶液1和抗体溶液2处理。

所用的试剂和酶标板按照如下方法制备:

1、待测水样的配制:

- a. 浓盐酸中HCl含量为36%-38%, 用纯水稀释10倍配制成1mol/L的标准溶液, pH=0.0;
- b. 称取4g NaOH, 溶于100mL纯水中, 配制成浓度为1mol/L的标准溶液, pH=14.0;
- c. 利用a和b的两种标准溶液的不同配比, 配制如下pH梯度溶液: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10共8个梯度。利用pH计校正。
- d. 用c中的溶液配制pH分别为3、4、5、6、7、8、9和10, 以及浓度(单位: μg/L)分别为1000、300、90、27、8.1、2.43、0.729、0.219、0.0656、0.020、0.006、0的MC-LR标准溶液, 共96个待测水样。每个pH的待测水样采用2个平行, 测定不同pH条件下MC-LR间接竞争ELISA标准曲线。

2、抗体溶液配制:

A、抗体溶液1的配制

单克隆抗体MC8C10的稀释采用0.01mol/L pH=7.4的磷酸盐缓冲溶液(配置方法: NaCl 8g; KCl 0.2g; KH₂PO₄ 0.24g; Na₂HPO₄•12H₂O 2.9g; 蒸馏水加至1000mL。), 即普通缓冲液, 稀释度1: 6000。

B、抗体溶液2的配制

将单克隆抗体MC8C10改用专用缓冲液1进行稀释, 稀释度1: 6000。重复试验, 以确定本发明的专用缓冲液对pH值干扰的抑制效果。

3、酶标二抗溶液配制：辣根过氧化物酶-羊抗鼠 IgG 原液，灌装入试剂瓶中，使用时用洗涤液按 1: 10000 配制成工作浓度。

4、洗涤液配制(10×PBST)：含 0.5% (体积百分含量) 吐温-20 和 80g/L 氯化钠的 0.1 mol/L pH=7.5 磷酸盐缓冲液，灌装入试剂瓶中。使用时，将该溶液用纯水稀释 10 倍再用。

5、底物溶液配制：使用 0.1mol/L pH5.0 的醋酸钠-柠檬酸缓冲液，每 1ml 缓冲液中加入 50 μL 0.1% 的 H₂O₂ 溶液，灌装入试剂瓶中。

6、显色剂溶液配制：用丙酮配制成 10mg/mL 的四甲基联苯胺溶液，用 0.1mol/L pH5.0 的醋酸钠-柠檬酸缓冲液配制成 0.2mg/mL 的四甲基联苯胺溶液，灌装入试剂瓶中。

7、终止液配制：2mol/L H₂SO₄ 溶液，灌装入试剂瓶中。

8、酶标板是包被了包被抗原的 96 孔聚苯乙烯微量反应板。

酶标板的包被：包被抗原采用实施例 1 的 MC-LR-BSA，包被浓度 0.25 μg/mL，取 120 μL 包被抗原加入反应板孔中，4℃冰箱中过夜，倒出孔内液体，用洗涤液 1×PBST 洗涤 3-5 次，将酶标板倒置在吸水纸上拍打，吸干，在已包被抗原的酶标板小孔中加入 150 μL 1% 的 BSA (质量百分含量) 封闭，37℃温育 1h，用洗涤液 1×PBST 洗涤 3-5 次，用吸水纸吸干，真空封装。

具体测定方法如下：将待测水样与抗体溶液同时加入酶标板小孔中，同时设置空白孔（将添加的抗体换成高纯水，其它一致）和阴性对照孔（待测水样用高纯水代替，即不含 MC-LR，其它一致），37℃温育 0.5h，倒出孔内液体，重复用洗涤液 (10×PBST) 洗涤 2-5 次，将酶标板倒置在吸水纸上拍打；加入酶标二抗溶液于酶标板小孔中，37℃温育 0.5h，用洗涤液重复洗 3-5 次，吸干；加入底物溶液和显色溶液到酶标板小孔中，室温下反应 10-15min，用酶标仪在波长 450nm 处测定吸光度 A，以不加抗体的小孔作为空白调零。以各浓度的吸光度 A 为纵坐标，以对应 MC-LR 浓度的 log₁₀ 值为横坐标，绘制半对数标准曲线图。

对各标准曲线进行模型拟合及评价，采用 4 参数 Logistic 模型：

$$A = A_2 + \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p} \quad (4 \text{ 参数 Logistic 模型})$$

其中：

x: 未标记抗原浓度(质量浓度或物质的量浓度)，自变量；

A: x 对应的吸光度(Absorbance)，因变量；

A₁: 上端渐近线(x=0)，常数；

A₂: 下端渐近线(x→∞)，常数；

p: 与曲线的斜率有关，常数；

x_0 : 曲线的中点, 或称拐点, 常数;

(1) 半抑制浓度 IC_{50} 是竞争 ELISA 一个很重要的评价指标。在竞争 ELISA 中, $IC_{50} \equiv x_0$ 。

(2) 在竞争 ELISA 中, 依据上述 Logistic 模型, 定义最大吸光度 A_0 如下式。

$$A_0 = A_1$$

添加普通缓冲液的不同 pH 值条件下的标准曲线如图 1 所示, 各标准曲线的最大吸光度 A_0 和 IC_{50} 的比较如图 2 所示。表明酸性条件对免疫反应有强烈的影响, 而在碱性条件下则有利于反应的进行; 随着 pH 值的增大, 最大吸光度有所增加, 但幅度不大; pH 值对 IC_{50} 的值影响比较大, 因此而直接影响 ELISA 的灵敏度。pH 值在 7-8 之间时, IC_{50} 值达到最小值, 随着酸度或碱度的增加, IC_{50} 都会增加, 灵敏度下降。抗原抗体之间的氢键结合力以及离子化抗体配位受体受 pH 值影响较大, pH 值同时又可能影响抗原和抗体的分子结构。说明 pH 值接近中性或动物体液环境时 (pH=7.4), 最利于抗原抗体的结合反应。

为了消除 pH 值对抗原抗体反应的影响, 采用本发明的专用缓冲液 1, 加大对酸碱度的缓冲能力。添加专用缓冲液 1 的各标准曲线如图 3 所示, 进一步结合图 4 表明, 该方法是有用的。各标准曲线一致性良好, 最大吸光度 A_0 和 IC_{50} 值都没有明显变化, 说明 pH 值的影响已经消除。结果表明, 采用专用缓冲液 1 作为抗体稀释液, 该缓冲液 pH 值为 7.4 左右, 最有利于抗原抗体的反应, 并且还能消除样品中的酸或碱 (pH=3-10) 带来的干扰。

二、消除水中硬度给免疫检测带来的影响

采用竞争 ELISA 方法检测待测水样中的微囊藻毒素-LR。实验设两个处理: 抗体溶液 1 和抗体溶液 2 处理。除了待测水样外, 实验方法和实验材料同步骤一。

(一) 待测水样的配制:

1. 称取 1.11g 无水 $CaCl_2$, 溶解于 10mL 纯水中, 配制 1mmol/L 的 Ca^{2+} 溶液。
2. 称取 2.03g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 溶解于 10mL 纯水中, 配制 1mmol/L 的 Mg^{2+} 溶液。
3. 用纯水配制如下浓度梯度的 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 混合液 (摩尔比 1: 1, 单位: mmol/L): 20、15、10、8、6、4、2、0, 对应的硬度梯度为 (单位: 德国度 H_g): 112、84、56、44.8、33.6、22.4、11.2、0。

4. MC-LR 的贮备液浓度为 100mg/L, 用步骤 3 的溶液分别配制不同硬度条件下的 MC-LR 标准溶液, 作为待测水样: 梯度如下 ($\mu g/L$): 0, 0.006, 0.02, 0.0656, 0.22, 0.729, 2.43, 8.1, 27, 90, 300, 1000。共 96 个待测水样。每个硬度条件下采用 2 个平行, 测定不同硬度下 MC-LR 间接竞争 ELISA 标准曲线。

(二) 结果分析

添加普通缓冲液的硬度对 ELISA 反应有一定的影响, 实验结果如图 5 及 6 所示。

结果表明,当钙镁离子浓度大于等于 8mmol/L 时(对应的硬度为 44.8H_G°),会较大程度上影响间接竞争 ELISA 的抗原抗体结合反应,标准曲线部分变形,本底值升高,重复性降低,标准偏差增大,无法进行定量计算。

为了降低样品中的硬度带来的影响,抗体稀释液采用本发明的专用缓冲液 1,实验结果如图 7 及 8 所示。结果表明,此时硬度对免疫检测的影响明显地被消除。当钙镁离子浓度小于等于 20mmol/L (对应的硬度为 112H_G°)时,各标准曲线的一致性良好,最大吸光度和半抑制浓度都没有明显的变化。

三、消除水中腐殖质酸给免疫检测带来的影响

采用竞争 ELISA 方法检测待测水样中的微囊藻毒素-LR。实验设两个处理:抗体溶液 1 和抗体溶液 2 处理。除了待测水样外,实验方法和实验材料同步骤一。

(一) 待测水样的配制:

1. 用纯水配制 0.3 倍浓度梯度的腐殖酸(HA)(北京化学试剂公司)溶液如下(单位:mg/L):1000、300、90、27、8.1、2.43、0.729、0。

2. MC-LR 的贮备液浓度为 100mg/L,分别用步骤 1 的溶液配制不同腐殖酸浓度条件下的 MC-LR 标准溶液,作为待测水样:梯度如下(μ g/L):0,0.006,0.02,0.0656,0.22,0.729,2.43,8.1,27,90,300,1000。共 96 个待测水样。每个腐殖酸浓度采用 2 个平行,测定不同硬度下 MC-LR 间接竞争 ELISA 标准曲线。

(二) 结果分析

添加普通缓冲液的不同浓度的腐殖酸溶液条件下 ELISA 标准曲线如图 9 所示,各标准曲线的空白样品吸光度(最大吸光度, A₀)及半抑制浓度 IC₅₀ 的比较如图 10 所示。实验结果表明,HA 浓度大于 1g/L 时,便明显地影响间接竞争 ELISA 反应,致使反应没有梯度产生。腐殖酸的溶解度随着 pH 升高而增加,实验观察发现,腐殖酸溶解度在纯水中较难溶解,当配制浓度为 1g/L 时,仍然可见沉淀。当有沉淀存在时,可能因为没有溶解的腐殖酸能吸附微囊藻毒素或者抗体,并一起吸附到酶标板上,导致免疫反应失败。当腐殖酸浓度大于等于 27mg/L 时,会较大程度上影响间接竞争 ELISA 的抗原抗体结合反应,标准曲线部分变形,重复性降低,标准偏差增大,曲线变得不可预测,也无法拟合,因而无法进行定量计算。另外,随着腐殖酸浓度的升高,空白样品的吸光度(A₀)下降,而非特异性吸附并没有明显的提高;IC₅₀ 值也不断增加。

腐殖酸的影响不仅是其酸性带来的影响,结果表明,即使采用 10×PBS 也未能彻底消除其酸度的影响,可见腐殖酸还有其它的影响途径。进一步分析得出,腐殖酸分子量由数千到数万,分子结构非常复杂,属于大分子聚合物。其分子上存在很多不同直径的空间或洞穴,这些空隙中可以容纳吸收有机污染物和重金属离子等。有可能 MC-LR 分子被其吸附,而无法与抗体结合,即竞争性的有利半抗原浓度降低,会导致 ELISA 吸光度下降和半抑制浓度的升高。

为了消除腐殖酸带来的影响,采用本发明的专用缓冲液 1 来稀释抗体,并进行间接竞争 ELISA 实验,结果如图 11 及 12 所示。结果表明,BSA 能有效地抑制腐殖酸带来的影响。但当腐殖酸浓度为 1000mg/L 时,IC₅₀略有上升,达到了 6.6 μg/L。说明对于腐殖质适用的边界条件为 0-300mg/L。

四、消除水中重金属给免疫检测带来的影响

采用竞争 ELISA 方法检测待测水样中的微囊藻毒素-LR。实验设两个处理:抗体溶液 1 和抗体溶液 2 处理。除了待测水样外,实验方法和实验材料同步骤一。

(一) 待测水样的配制:

1. 用纯水配制 CuSO₄·5H₂O (北京化学试剂公司) 溶液如下(单位: mg/L): 5000、1000、200、40、8、1.6、0.32。

2. MC-LR 的贮备液浓度为 100mg/L, 分别用步骤 1 的溶液配制不同硫酸铜浓度条件下的 MC-LR 标准溶液, 作为待测水样: 梯度如下(μg/L): 0, 0.006, 0.02, 0.0656, 0.22, 0.729, 2.43, 8.1, 27, 90, 300, 1000。共 96 个待测水样。每个硫酸铜浓度采用 2 个平行, 测定不同硫酸铜浓度下 MC-LR 间接竞争 ELISA 标准曲线。

(二) 结果分析

添加普通缓冲液的不同浓度的硫酸铜溶液条件下 ELISA 标准曲线如图 13 所示, 各标准曲线的空白样品吸光度(最大吸光度, A₀)及半抑制浓度 IC₅₀ 的比较如图 14 所示。实验表明, 当 CuSO₄ 浓度为 5g/L 时, 加入一抗后溶液即变蓝, 出现混浊, 并有蓝色沉淀; 显色后, 该浓度条件下的吸光度比其它浓度条件下高许多, 梯度不明显, 数据不可拟合。可能原因是抗体被铜离子沉淀下来并吸附到酶标板上, 3 次洗涤液没有将其洗脱下来。

另外, 随着铜离子浓度的升高, 本底值也有升高趋势, 表明部分抗体被铜离子沉淀下来; 并且, 标准曲线变形严重, 说明抗原抗体反应受到了明显地影响。

为了降低样品中铜离子带来的影响, 采用本发明的专用缓冲液 1 来稀释抗体, 并进行间接竞争 ELISA 实验, 结果如图 15 及 16 所示。结果表明, 此时铜离子对免疫检测的影响明显地受到抑制。当硫酸铜浓度小于等于 1000mg/L 时, 各标准曲线的一致性良好, 最大吸光度和半抑制浓度都没有明显的跳跃; 当样品中的硫酸铜浓度为 5000mg/L 时, 由于浓度太高, 对免疫反应的影响仍然很严重。所以对于硫酸铜适用的边界条件为 0-1000mg/L。

五、消除水中综合污染物给免疫检测带来的影响

采用竞争 ELISA 方法检测待测水样中的微囊藻毒素-LR。实验只设抗体溶液 2 处理。除了待测水样外, 实验方法和实验材料同步骤一。

(一) 待测水样的配制:

1. 生活污水取自清华大学学生宿舍 1 号楼下水道, 水样采集后采用普通滤纸过滤, 滤液 COD_{Cr} 测定结果为 469mg/L。用纯水梯度稀释生活污水如下: 100%、80%、60%、

50%、40%、20%、10%、0。

2. MC-LR 的贮备液浓度为 100mg/L, 采用步骤 1 的溶液配制不同生活污水浓度条件下的 MC-LR 标准溶液, 作为待测水样: 梯度如下 ($\mu\text{g/L}$): 0, 0.006, 0.02, 0.0656, 0.22, 0.729, 2.43, 8.1, 27, 90, 300, 1000。共 96 个待测水样。每个样品采用 2 个平行, 测定不同生活污水浓度条件下 MC-LR 间接竞争 ELISA 标准曲线。

(二) 结果分析

添加专用缓冲液 1 的不同污染程度的生活污水对 ELISA 检测的影响结果如图 17 及图 18 所示, 可以看出, 生活污水对 ELISA 的影响比较明显, 随着污水浓度的升高, 其中的基质会明显地影响 ELISA 的吸光度, 使吸光度整体下降。而且标准曲线的 IC_{50} 值也会有起伏的变化。当 COD_{Cr} 浓度高于 200mg/L 时, A_0 值有明显的下降, 曲线的上平台吸光度从 0.6 下降到 0.45 左右。当 COD_{Cr} 浓度高于 375mg/L 时, 曲线的形状与标准的反 S 型相差较大, 变得不规则, 因而不能进行定量检测。综上所述, 本研究确定的 COD_{Cr} 边界条件为 0-200mg/L。

六、消除水中叶绿素给免疫检测带来的影响

采用竞争 ELISA 方法检测待测水样中的微囊藻毒素-LR。实验只设抗体溶液 2 处理。除了待测水样外, 实验方法和实验材料同步骤一。

(一) 待测水样的配制:

1. 用纯水配制 0.3 倍梯度稀释的叶绿素 a (Fluka 44014, 分离自 *Cyanobacteria* sp., 纯度 $\geq 96.0\%$) 溶液如下 (mg/L): 1000、300、90、27、8.1、2.43、0.729、0。

2. MC-LR 的贮备液浓度为 100mg/L, 采用步骤 1 的溶液配制不同叶绿素 a 浓度条件下的 MC-LR 标准溶液, 作为待测水样: 梯度如下 ($\mu\text{g/L}$): 0, 0.006, 0.02, 0.0656, 0.22, 0.729, 2.43, 8.1, 27, 90, 300, 1000。共 96 个待测水样。每个样品采用 2 个平行, 测定不同叶绿素 a 浓度条件下 MC-LR 间接竞争 ELISA 标准曲线。

(二) 结果分析

添加专用缓冲液 1 的叶绿素 a 对 MC-LR 免疫检测的影响结果如图 19 及图 20 所示, 由图可知, 采用本发明的专用缓冲液, 叶绿素 a 对 ELISA 的影响不明显。即使叶绿素 a 浓度达到了 1000mg/L 时, 标准曲线的形状仍然符合标准的反 S 型, 并且各条标准曲线一致性良好。进一步分析 A_0 和 IC_{50} 值的变化趋势, 结果表明, 叶绿素 a 浓度达到了 1000mg/L 后, 各标准曲线的最大吸光度和半抑制浓度都没有明显的变化。因此, 本研究确定的叶绿素 a 的边界条件为 0-1000mg/L。

七、消除水中有机溶剂给免疫检测带来的影响

采用竞争 ELISA 方法检测待测水样中的微囊藻毒素-LR。实验设两个处理: 抗体溶液 1 和抗体溶液 2 处理。除了待测水样外, 实验方法和实验材料同步骤一。

(一) 待测水样的配制:

1. 用纯水配制梯度浓度的甲醇 (北京化学试剂公司) 溶液如下 (体积百分比):

50%、40%、30%、20%、15%、10%、5%、0。

2. MC-LR 的贮备液浓度为 100mg/L，分别用步骤 1 的溶液配制不同甲醇浓度条件下的 MC-LR 标准溶液，作为待测水样：梯度如下 ($\mu\text{g/L}$): 0, 0.006, 0.02, 0.0656, 0.22, 0.729, 2.43, 8.1, 27, 90, 300, 1000。共 96 个待测水样。每个甲醇浓度采用 2 个平行，测定不同甲醇浓度下 MC-LR 间接竞争 ELISA 标准曲线。

(二) 结果分析

添加普通缓冲液的不同浓度的甲醇溶液条件下 ELISA 标准曲线如图 21 所示，各标准曲线的空白样品吸光度(最大吸光度, A_0)及半抑制浓度 IC_{50} 的比较如图 22 所示。由图可以看出，甲醇对于免疫反应的影响是明显的。随着甲醇浓度的提高，最大吸光度下降， IC_{50} 值降低，ELISA 的灵敏度降低。当样品中甲醇的浓度超过 40% (v/v) 时，曲线发生明显地变形，ELISA 被明显地干扰。研究表明，若不采取其它措施，样品中甲醇的允许浓度最高为 15%。

有机溶剂主要来自于固体样品的提取过程，有机溶剂可能破坏抗原-抗体之间的范德华键和疏水作用力，使抗原-抗体复合物解离，可大大降低检测的灵敏度。

为了降低样品中甲醇带来的影响，采用本发明的专用缓冲液 1 来稀释抗体，实验结果如图 23 及 24 所示。结果表明，此时甲醇对免疫检测的影响明显地受到抑制。即使样品中的甲醇浓度为 50% 时，尽管最大吸光度略有上升，但 IC_{50} 值没有明显变化，方法的灵敏度因而也没有很大变化。综合分析，甲醇的边界条件为体积百分比 0-20%。

八、消除水中有毒有机污染物给免疫检测带来的影响

采用竞争 ELISA 方法检测待测水样中的微囊藻毒素-LR。实验只设抗体溶液 2 处理。除了待测水样外，实验方法和实验材料同步骤一。

(一) 待测水样的配制：

1. 用纯水配制 0.3 倍梯度稀释的甲苯（北京化学试剂公司）溶液如下(单位： mg/L): 500、150、45、13.5、4.05、1.215、0.36、0。

2. MC-LR 的贮备液浓度为 100mg/L，采用步骤 1 的溶液配制不同甲苯条件下的 MC-LR 标准溶液，作为待测水样：梯度如下 ($\mu\text{g/L}$): 0, 0.006, 0.02, 0.0656, 0.22, 0.729, 2.43, 8.1, 27, 90, 300, 1000。共 96 个待测水样。每个样品采用 2 个平行，测定不同甲苯浓度条件下 MC-LR 间接竞争 ELISA 标准曲线。

(二) 结果分析

添加专用缓冲液 1 的甲苯对 MC-LR 免疫检测的影响结果如图 25 及 26 所示，尽管在抗体缓冲液中已经加入惰性蛋白即 1% BSA，但当甲苯浓度超过 1mg/L 时，免疫反应仍然受到明显的影响，即最大吸光度随着甲苯浓度的升高而降低； IC_{50} 值随着甲苯浓度的升高而升高，但幅度都不是很大， IC_{50} 值最高可达 $10\mu\text{g/L}$ 。综上所述，本研究提出的甲苯边界条件为 0-1mg/L。

九、消除水中农药给免疫检测带来的影响

采用竞争 ELISA 方法检测待测水样中的微囊藻毒素-LR。实验只设抗体溶液 2 处理。除了待测水样外，实验方法和实验材料同步骤一。

(一) 待测水样的配制：

1. 用纯水配制 0.3 倍梯度稀释的 2,4-D (北京化学试剂公司) 溶液如下(单位: mg/L): 2000、600、180、54、16.2、4.86、1.46、0。

2. MC-LR 的贮备液浓度为 100mg/L，采用步骤 1 的溶液配制不同 2,4-D 浓度条件下的 MC-LR 标准溶液，作为待测水样：梯度如下($\mu\text{g/L}$): 0, 0.006, 0.02, 0.0656, 0.22, 0.729, 2.43, 8.1, 27, 90, 300, 1000。共 96 个待测水样。每个样品采用 2 个平行，测定不同 2,4-D 浓度条件下 MC-LR 间接竞争 ELISA 标准曲线。

(二) 结果分析

添加专用缓冲液 1 的不同 2,4-D 浓度对免疫检测的影响如图 27 及图 28 所示。可以看出，2,4-D 的影响不是很明显，当 2,4-D 浓度超过 100mg/L 时， IC_{50} 值有缓慢增加的趋势，而最大吸光度没有明显的变化，研究得出 2,4-D 的边界条件为 0-100mg/L。

本发明针对环境样品中各种基质条件所适合的边界如下：pH: 3-10；硬度：0-112 H_G ；腐殖酸：0-300mg/L；重金属离子：以 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 作为研究对象，浓度范围 0-1000mg/L；综合污染指标：以 COD_{Cr} 为指标，浓度范围 0-200mg/L；叶绿素 a: 0-1000mg/L；有机溶剂：以甲醇为例，体积百分比范围 0-20%；有毒有机污染物：以甲苯为例，边界为 0-1mg/L；农药：以 2,4-D 为例浓度范围 0-100mg/L。

实施例 3、利用专用缓冲溶液 2 提高环境样品免疫检测抗基质效应

所用的专用缓冲液 2 是在 0.05mol/L、pH 为 7.0 的 PBS (配置方法：KCl 1.0g； KH_2PO_4 1.4g； $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 13g；双蒸水加至 1000mL) 中，加入下述 a)、b) 和 c) 的物质：a) NaCl，使其终浓度为 10g/L；a) 牛血清白蛋白，使其终浓度为 2 g/L；c) 乙二醇四乙酸二钠，使其终浓度为 2 g/L。

采用竞争 ELISA 方法检测待测水样中的微囊藻毒素-LR。除了专用缓冲溶液替换为专用缓冲溶液 2 外，实验方法和实验材料同实施例 2 的步骤一、二和三。

一、消除水中酸碱度给免疫检测带来的影响

添加普通缓冲液的实验结果同实施例 2 的步骤一。

添加专用缓冲溶液 2 的实验结果如图 29 所示，结果表明该方法是有用的。各标准曲线一致性良好，最大吸光度 A_0 和 IC_{50} 值都没有明显变化，说明 pH 值的影响已经消除。结果表明，采用专用缓冲液 2 作为抗体稀释液，能消除样品中的酸或碱 (pH=4-10) 带来的干扰。

二、消除水中硬度给免疫检测带来的影响

添加普通缓冲液的实验结果同实施例 2 的步骤二。

添加专用缓冲溶液 2 的实验结果如图 30 所示。结果表明，此时硬度对免疫检测

的影响明显地被消除。当硬度为 $112\text{H}_\text{C}^\circ$ 时，各标准曲线的一致性良好，最大吸光度和半抑制浓度都没有明显的变化。

三、消除水中腐殖质酸给免疫检测带来的影响

添加普通缓冲液的实验结果同实施例 2 的步骤二。

添加专用缓冲溶液 2 的实验结果如图 31 所示。结果表明，BSA 能有效地抑制腐殖酸带来的影响。但当腐殖酸浓度为 300mg/L 时， IC_{50} 有较大变化

实施例 4、利用专用缓冲溶液 3 提高环境样品免疫检测抗基质效应

所用的专用缓冲液 3 是在 0.12mol/L 、 pH 为 8.0 的 PBS（配置方法：KCl 2.4g； KH_2PO_4 2.5g； $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 38g；双蒸水加至 1000mL。）中，加入下述 a)、b) 和 c) 的物质：a) NaCl，使其终浓度为 100g/L ；a) 牛血清白蛋白，使其终浓度为 20g/L ；c) 乙二胺四乙酸二钠，使其终浓度为 20g/L 。

采用竞争 ELISA 方法检测待测水样中的微囊藻毒素-LR。除了专用缓冲溶液替换为专用缓冲溶液 2 外，实验方法和实验材料同实施例 2 的步骤一、二和三。

一、消除水中酸碱度给免疫检测带来的影响

添加普通缓冲液的实验结果同实施例 2 的步骤一。

添加专用缓冲溶液 2 的实验结果如图 32 所示，结果表明，该方法是有用的。各标准曲线一致性良好，最大吸光度 A_0 和 IC_{50} 值都没有明显变化，说明 pH 值的影响已经消除。结果表明，采用专用缓冲液 2 作为抗体稀释液，能消除样品中的酸或碱 ($\text{pH}=4-9$) 带来的干扰。

二、消除水中硬度给免疫检测带来的影响

添加普通缓冲液的实验结果同实施例 2 的步骤二。

添加专用缓冲溶液 2 的实验结果如图 33 所示。结果表明，此时硬度对免疫检测的影响明显地被消除。当水中的硬度为 $112\text{H}_\text{C}^\circ$ 时，各标准曲线的一致性良好，最大吸光度和半抑制浓度都没有明显的变化。

三、消除水中腐殖质酸给免疫检测带来的影响

添加普通缓冲液的实验结果同实施例 2 的步骤二。

添加专用缓冲溶液 2 的实验结果如图 34 所示。结果表明，BSA 能有效地抑制腐殖酸带来的影响。即使当腐殖酸浓度为 1000mg/L 时， IC_{50} 变化很小。

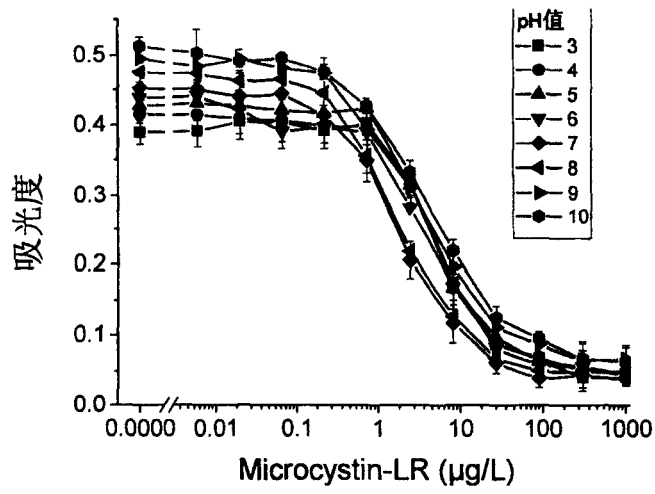


图 1

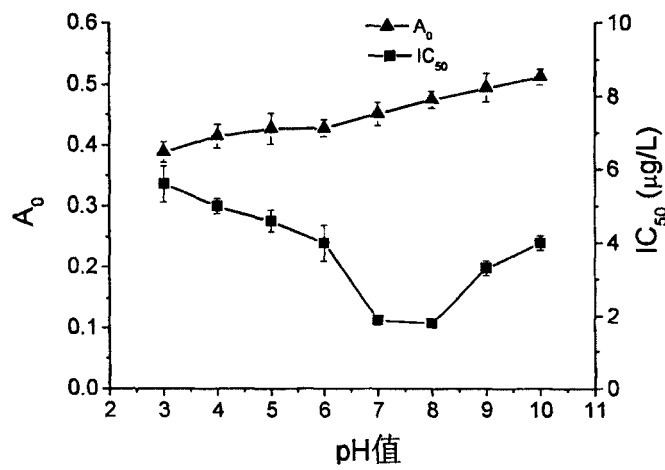


图 2

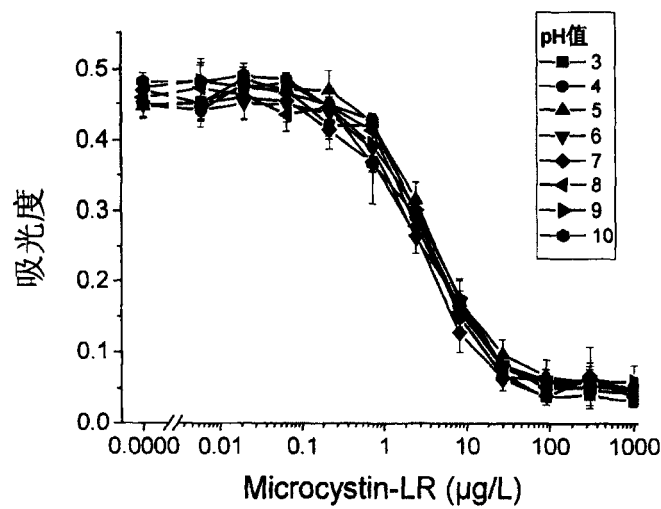


图 3

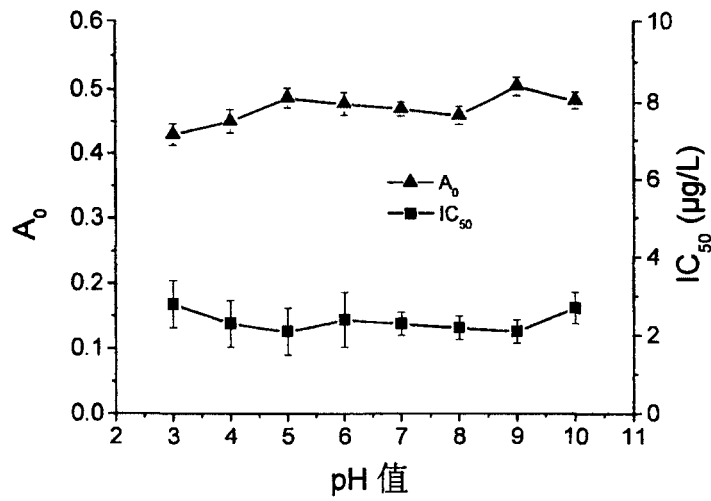


图 4

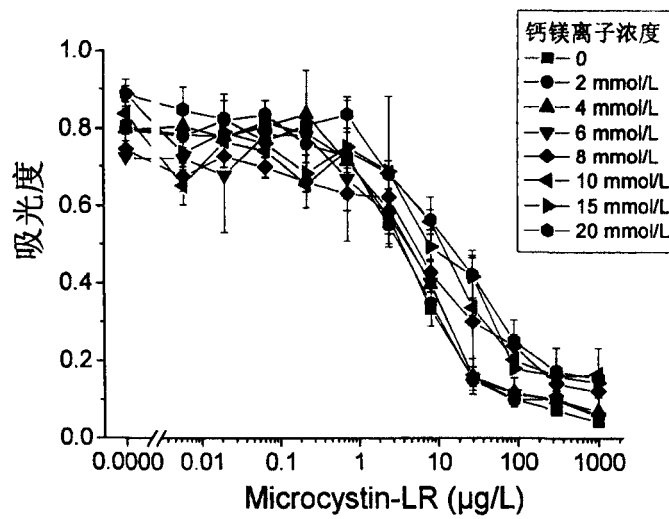


图 5

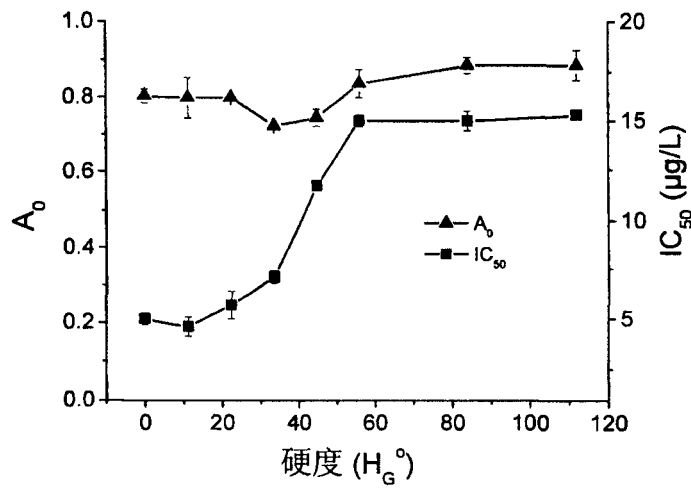


图 6

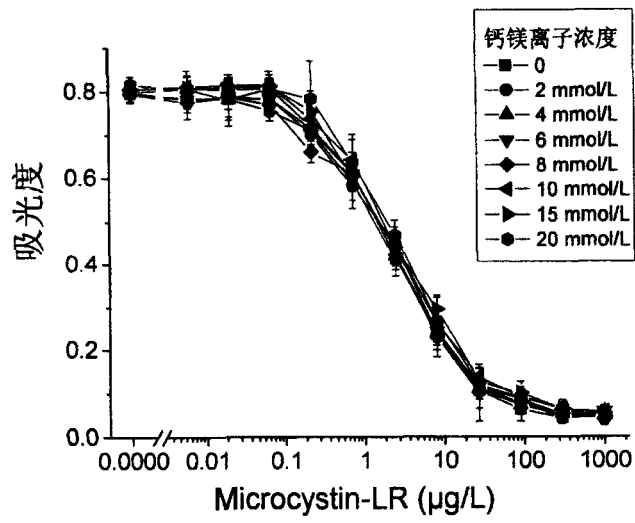


图 7

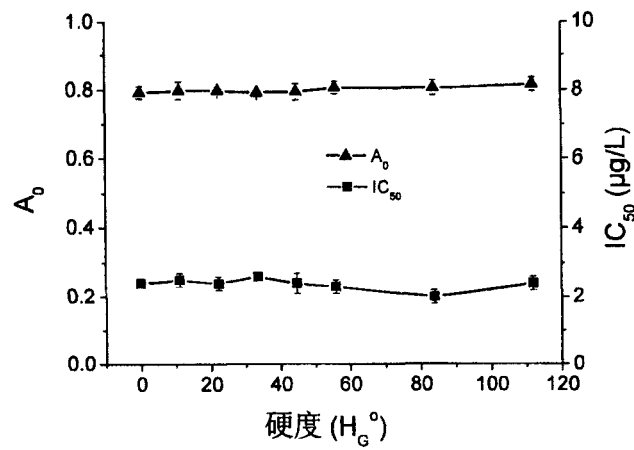


图 8

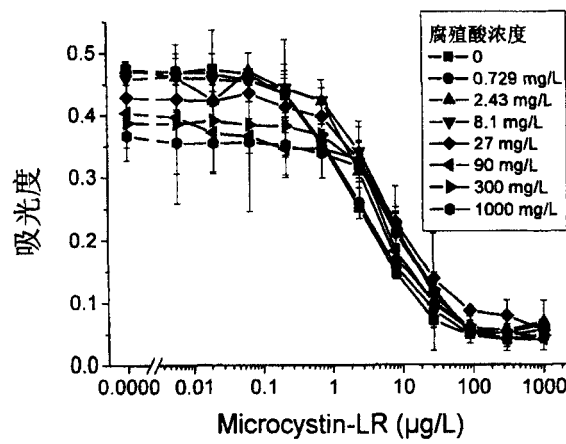


图 9

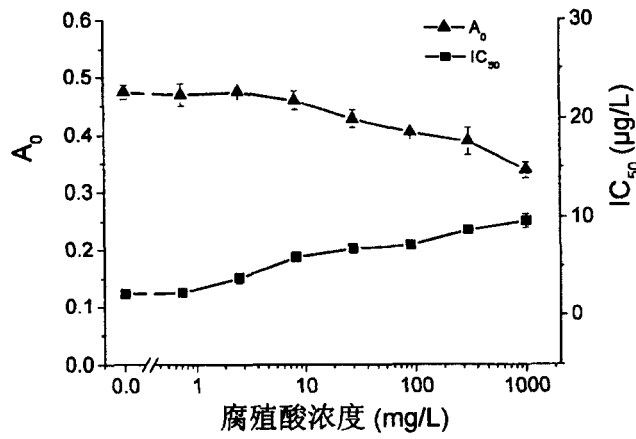


图 10

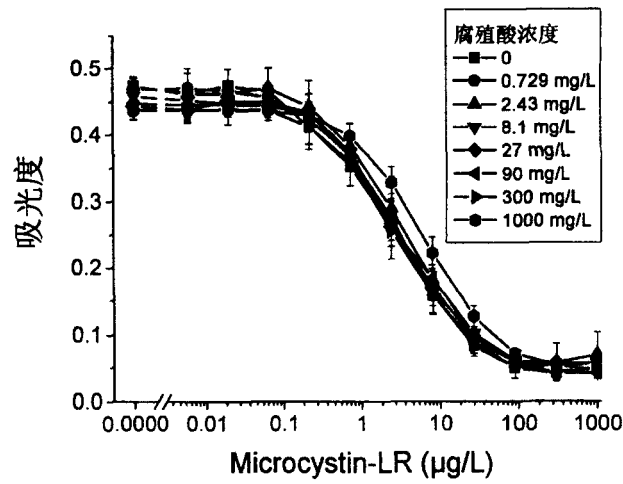


图 11

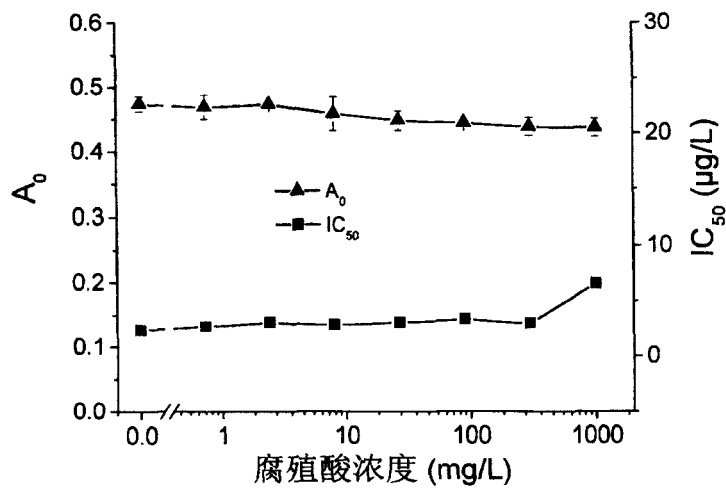


图 12

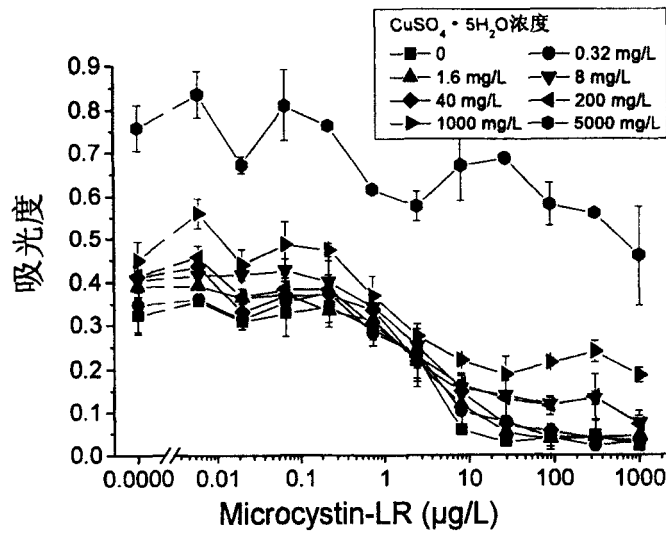


图 13

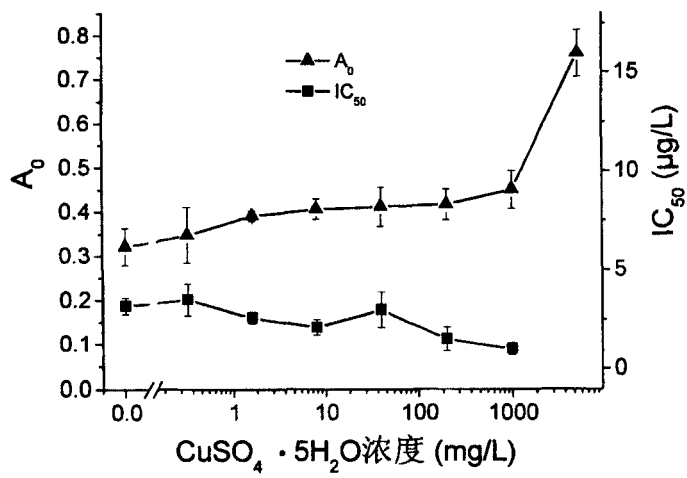


图 14

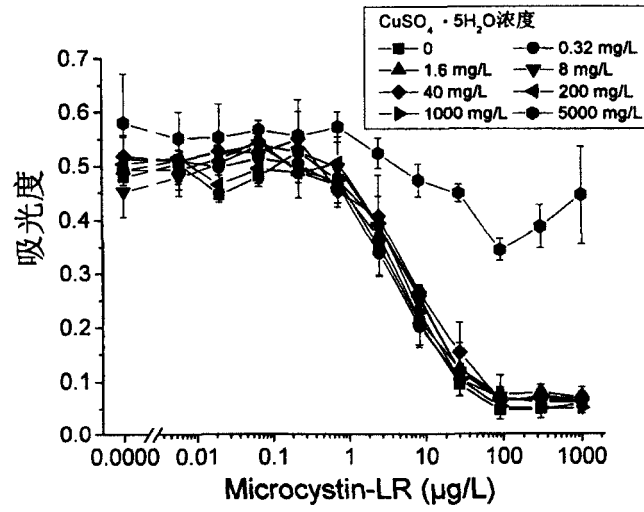


图 15

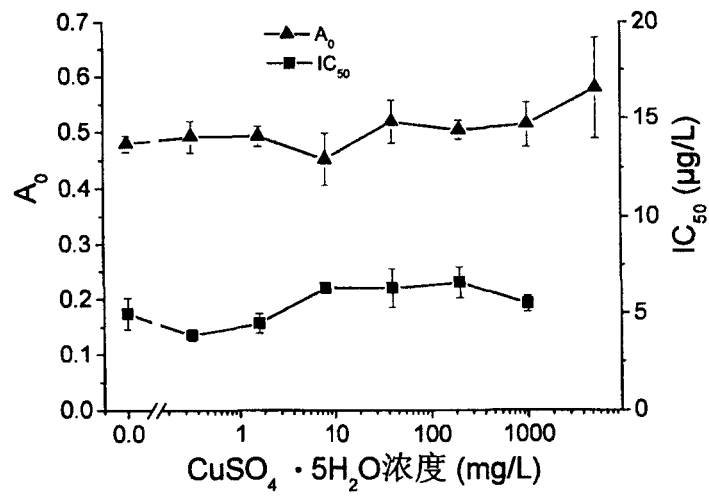


图 16

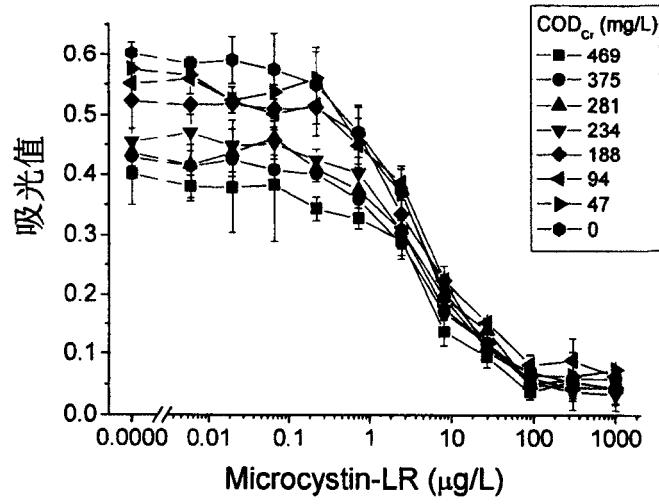


图 17

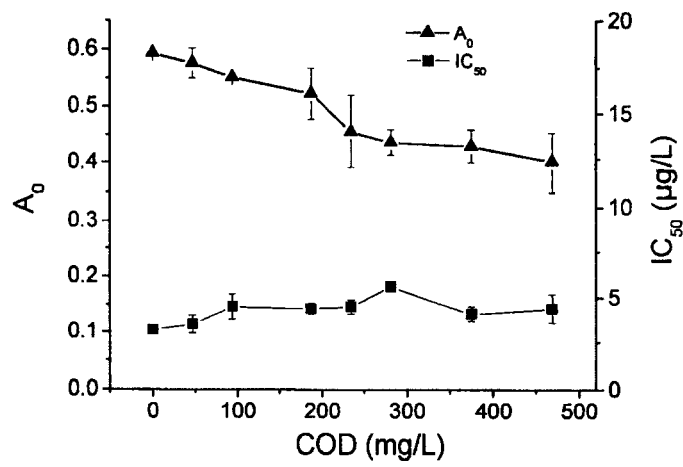


图 18

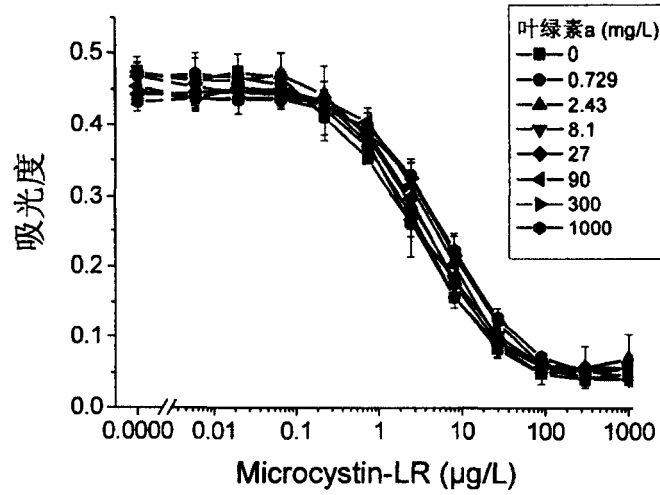


图 19

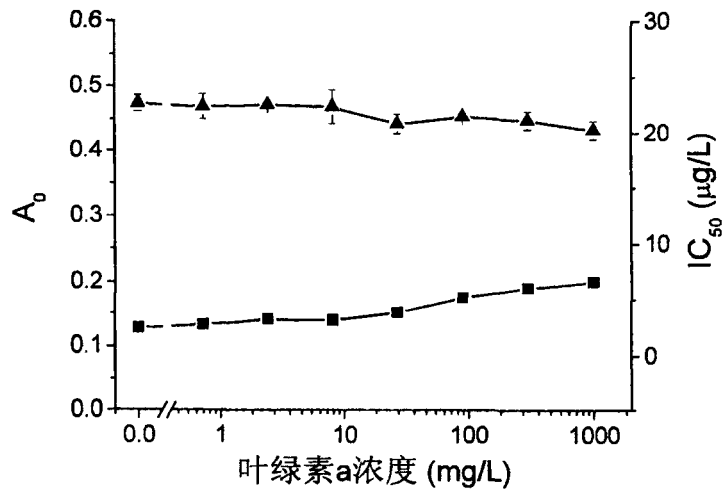


图 20

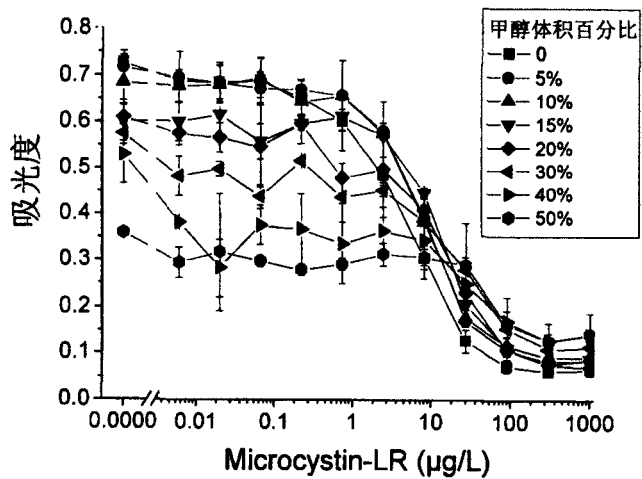


图 21

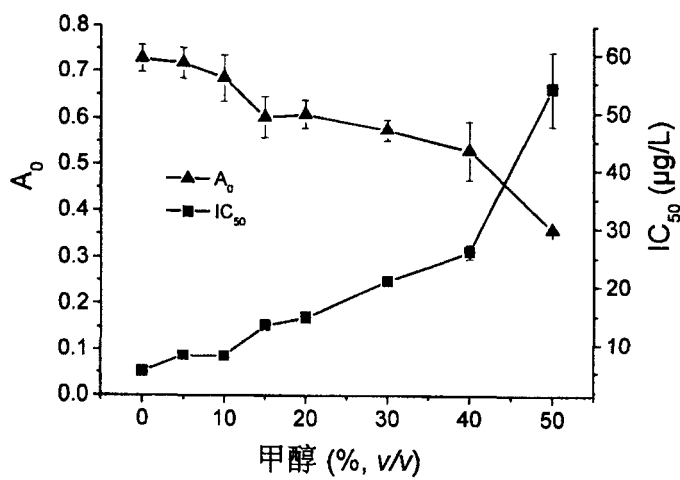


图 22

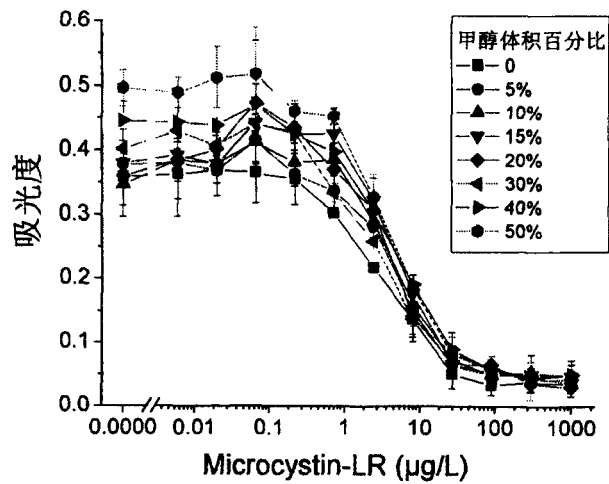


图 23

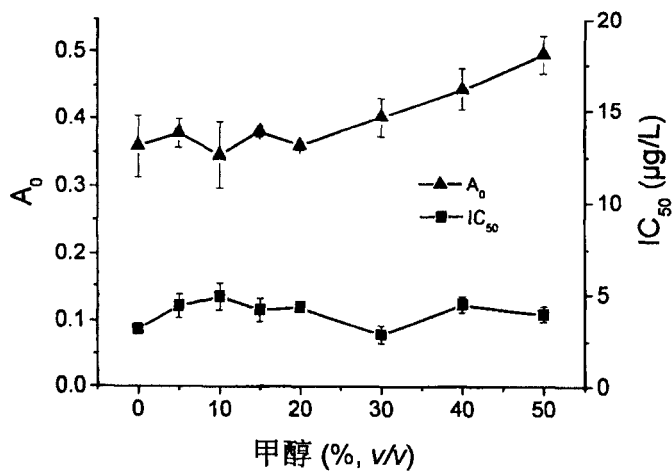


图 24

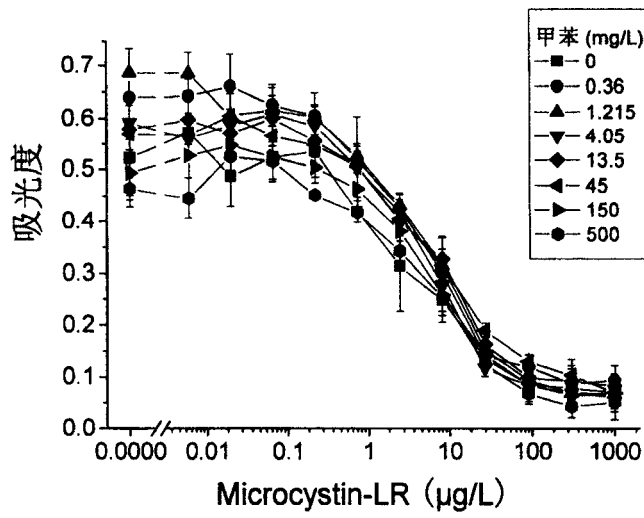


图 25

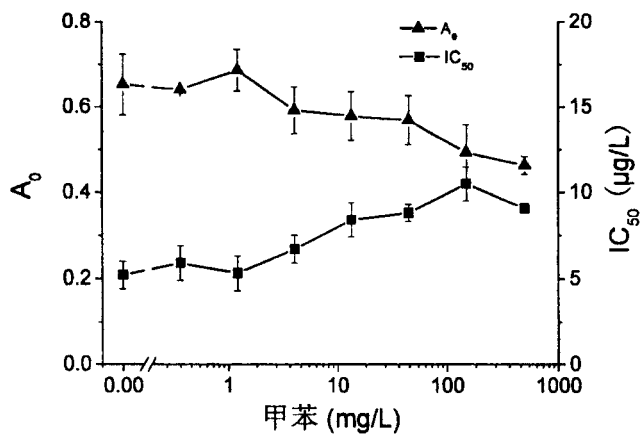


图 26

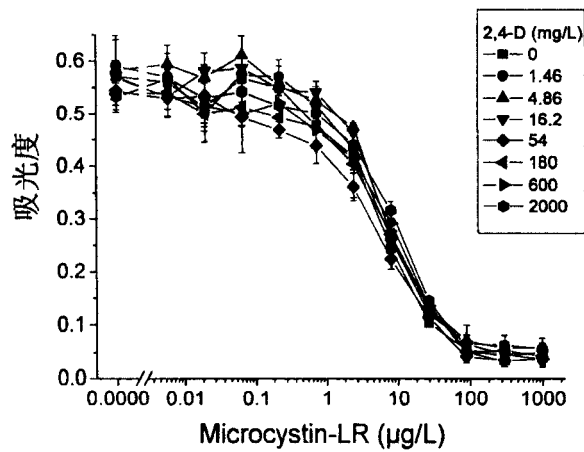


图 27

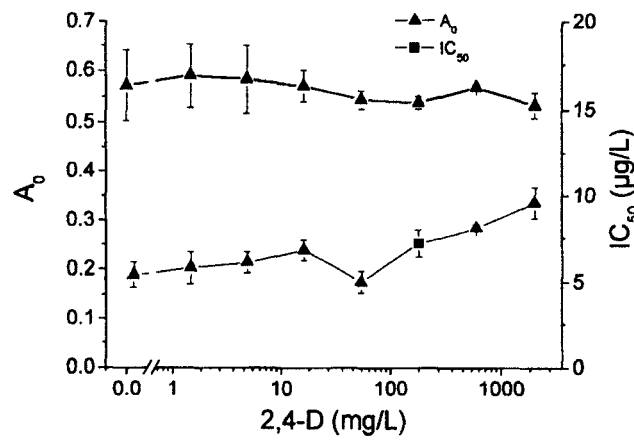


图 28

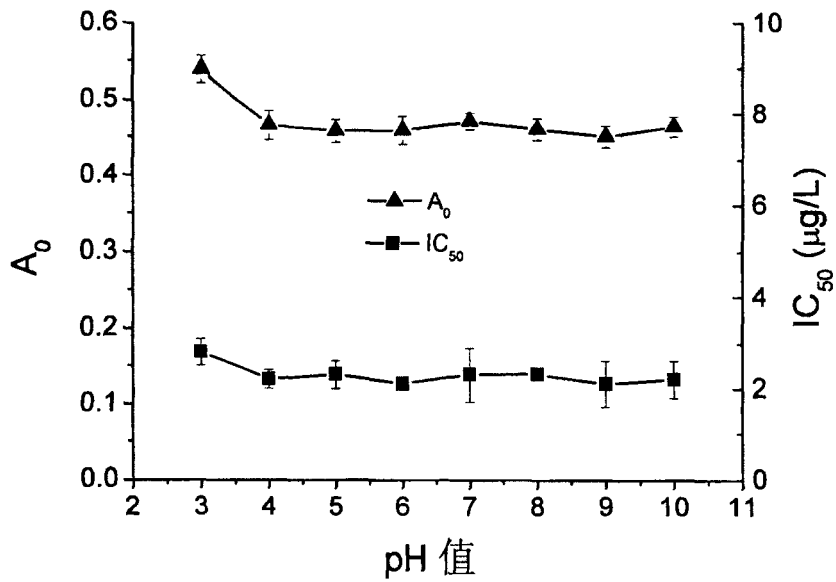


图 29

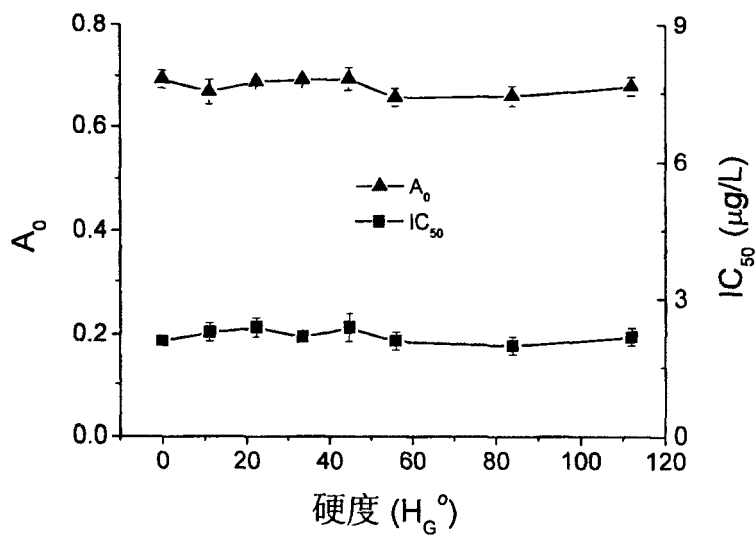


图 30

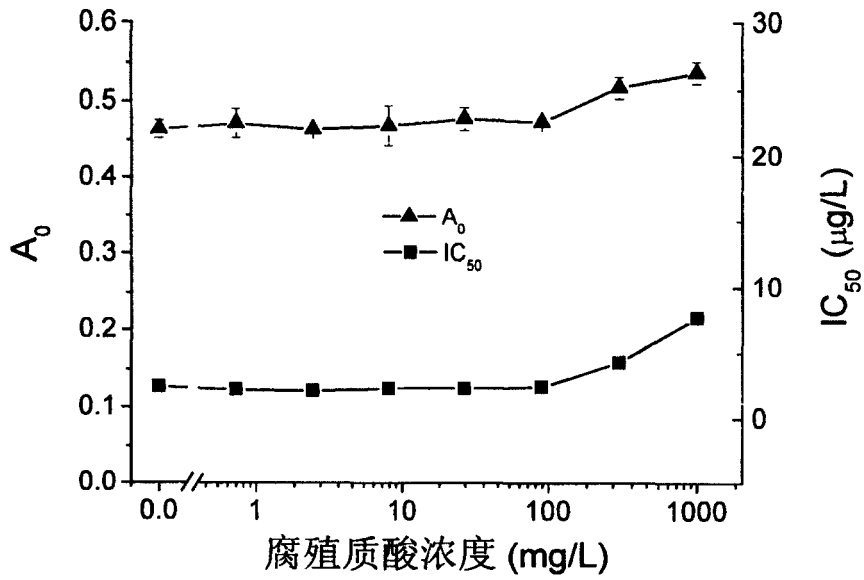


图 31

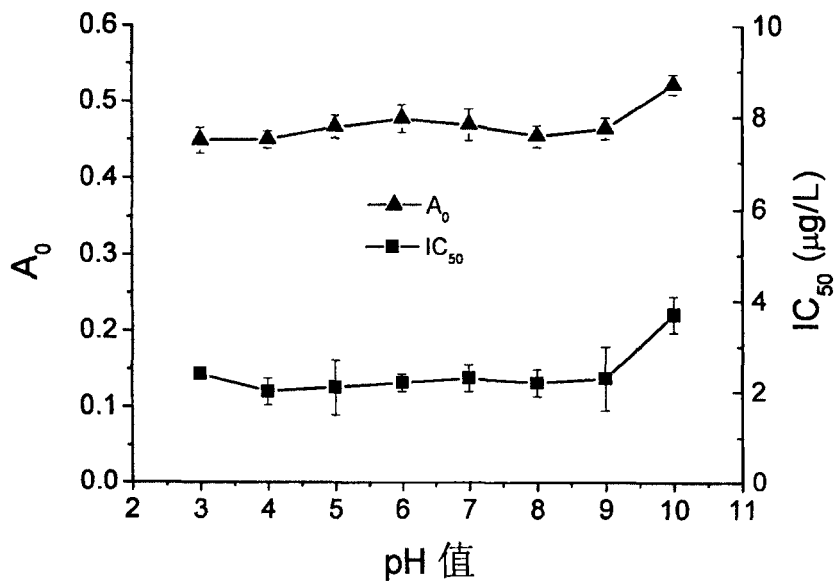


图 32

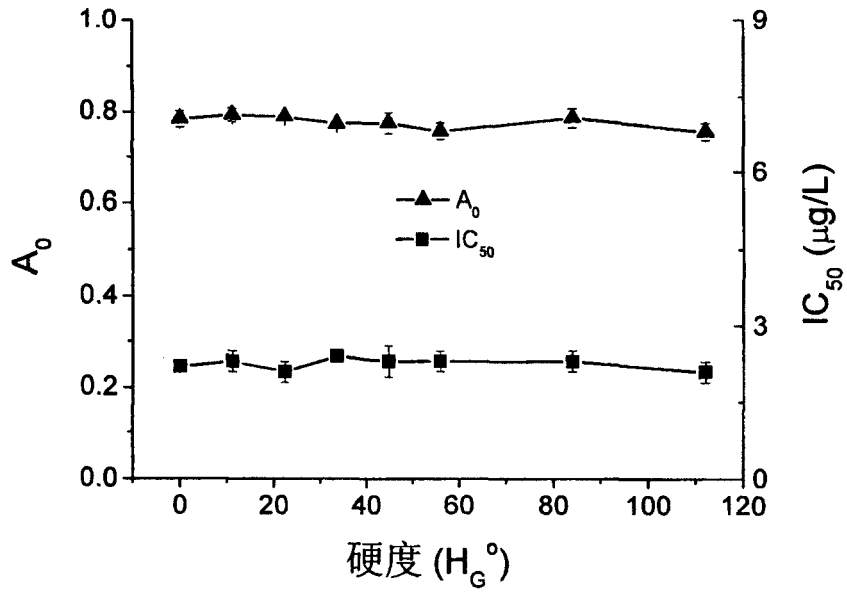


图 33

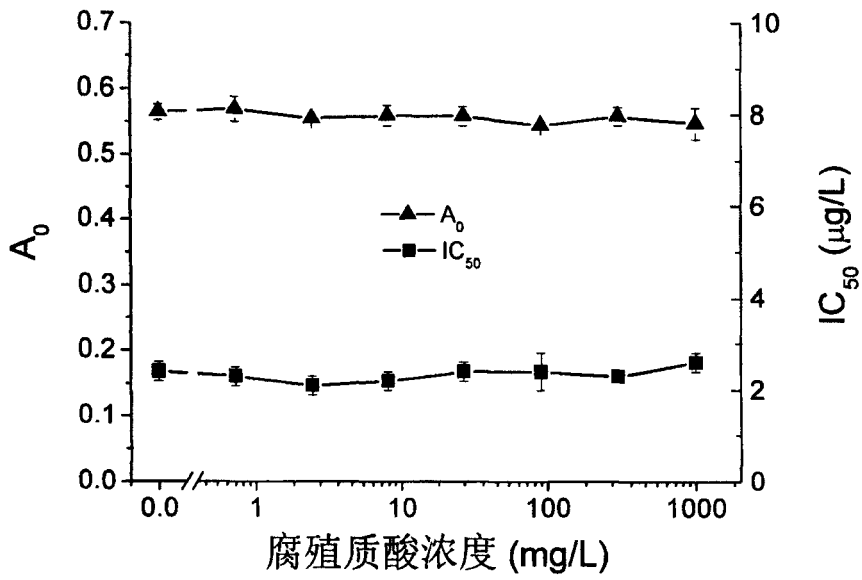


图 34

专利名称(译)	提高环境样品免疫检测抗基质效应的方法及其专用缓冲溶液		
公开(公告)号	CN100465642C	公开(公告)日	2009-03-04
申请号	CN200710119210.2	申请日	2007-07-18
[标]申请(专利权)人(译)	清华大学		
申请(专利权)人(译)	清华大学		
当前申请(专利权)人(译)	清华大学		
[标]发明人	何苗 盛建武 施汉昌		
发明人	何苗 盛建武 施汉昌		
IPC分类号	G01N33/53 G01N1/28		
代理人(译)	关畅		
审查员(译)	吴江明		
其他公开文献	CN101093223A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种提高环境样品免疫检测抗基质效应的方法及其专用缓冲溶液。本发明所提供的环境样品免疫检测专用缓冲溶液，是在现有的浓度为0.05-0.12mol/L、pH为7.0-8.0的缓冲液中，加入下述a)、b)和c)的物质：a)NaCl，使其终浓度为10-100g/L；b)惰性蛋白或明胶，使其终浓度为2-20g/L；所述惰性蛋白是不与免疫反应体系发生反应的蛋白；c)乙二胺四乙酸二钠，使其终浓度为2-20g/L。本发明的提高环境样品免疫检测抗基质效应的方法及其专用缓冲溶液可用于各种环境样品(如水样)的免疫检测中，可有效地减小或消除来自环境样品(如水样)中各种复杂基质在其自然界存在的边界范围内给免疫检测带来的干扰，使实际环境样品免疫检测的稳定性增强。

$$A = A_2 + \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p}$$