



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101382541 B

(45) 授权公告日 2012. 07. 11

(21) 申请号 200810022245. 9

CN 1932519 A, 2007. 03. 21, 全文.

(22) 申请日 2008. 06. 27

孔小丽等. 抗体和寡核苷酸双标记纳米金生物探针的制备及性能分析. 《中国生物化学和分子生物学报》. 2008, 第 24 卷 (第 5 期), 全文.

(73) 专利权人 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

审查员 易方方

(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 32104

代理人 时旭丹 刘品超

(51) Int. Cl.

G01N 33/543 (2006. 01)

G01N 33/532 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101169414 A, 2008. 04. 30, 全文.

CN 1546991 A, 2004. 11. 17, 全文.

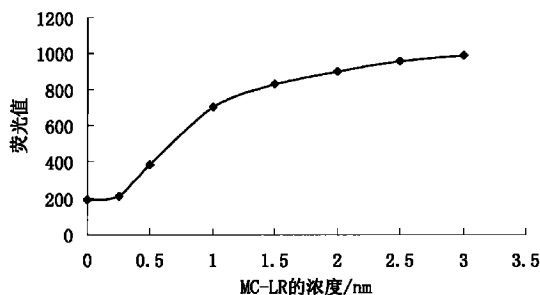
权利要求书 3 页 说明书 6 页 附图 1 页

(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;

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;

(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;

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 μ L 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;

(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-氨基丙基三乙氧基硅烷修饰;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 0.12mol/L, Fe^{3+} 的浓度为 0.2mol/L;NaOH 溶液的浓度为 2.5mol/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 $^{\circ}$ C 干燥 24 小时,备用;

(5) 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°C 保存备用;

(6) 两种粒径的金纳米粒子的制备: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°C 保藏;

(7) 两种金纳米探针的制备:

30nm 金纳米探针的制备:首先,30nm 金纳米粒子与 1.5 μg 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'-tacgagttgagaccgttaagacgaggcaatcatgcaatcctgaatgcgt(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°C 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 μM 的目标探针 5'-cgcatcaggattgcatgaatgcctcgtcttaacggctctcaactcgta-3' 37°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 NaCl 的 10mM 磷酸盐缓冲溶液,作为储备液 4°C 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°C 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°C 保藏;

(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;

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 μL 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 μL/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;

(9) 流动注射系统中的免疫反应:将预孵育的 50 μL 抗体和 50 μL 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 μL/s 的速度注入 400 μL 含 0.1M NaCl 的 pH7.0、0.01M 磷酸盐缓冲液洗液,之后,将 100 μL 的羊抗兔抗体及双链 DNA 共同修饰的 30nm 金探针的溶液以 1 μL/s 的速度注入反应池,反应 6 分钟,冲洗;以 2 μL/s 的速度注入 100 μL 的双蒸水,60°C 反应 6 分钟,最后再注入 100 μL 的双蒸水,收集所需单链 DNA,撤去磁场,洗涤柱子以备再用;

(10) 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 μL pH9.6 的亲和素碳酸钠缓冲溶液,4°C 孵育过夜,用 PBS 清洗后,备用;

(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;

将收集的单链 DNA 与 10 μL 的生物素标记的捕获探针 25 μM,5' - 生物素 -a(10)

TACGAGTTGAGACCGTTAAGACGA-3' 混合,再加入含 0.3M NaCl,0.02% SDS pH7.420 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

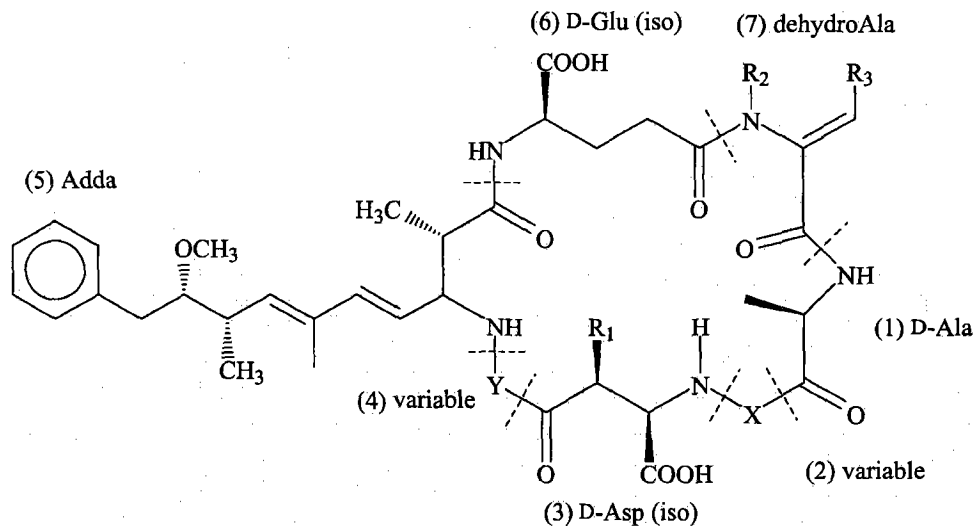
技术领域

[0001] 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

[0002] 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:

[0003]



[0004] 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 μg/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。

[0005] 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

[0006] 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。

[0007] 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:

[0008] (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;

[0009] (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;

[0010] (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;

[0011] (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;

[0012] (5) 磁性纳米粒子与包被原的偶联;

[0013] (6) 两种粒径的金纳米粒子的制备;

[0014] (7) 两种金纳米探针的制备;

[0015] (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;

[0016] (9) 流动注射系统中的免疫反应;

[0017] (10) 荧光酶标板的包被;

[0018] (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。

[0019] 免疫原的制备:

[0020] 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;

[0021] ②用 1mL25% 的乙醇溶液溶解 2mg 的牛血清蛋白 BSA,得 B 液;

[0022] 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;

[0023] 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。

[0024] 包被原的制备:

[0025] 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;

[0026] ②取三正丁胺 15 μL 溶于 250 μL 的 N,N- 二甲基甲酰胺中,得 D 液;

[0027] ③将 D 液加入到 C 液中;

[0028] 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;

[0029] 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;

[0030] 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。

[0031] 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 0.12mol/L, Fe^{3+} 的浓度为 0.2mol/L; NaOH 溶液的浓度为 2.5mol/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。

[0032] 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。

[0033] 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 $^{\circ}$ C 保藏。

[0034] 金纳米探针的制备:

[0035] 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'-tacgagttgagaccgttaagacgaggcaatcatgcaatcctgaatgcgt(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 $^{\circ}$ C 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'-cgattcaggattgcatgaatgcctcgtctttaacgggtctcaactcgta-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 NaCl 的 10mM 磷酸盐缓冲溶液, 作为储备液 4 $^{\circ}$ C 保藏;

[0036] 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°C 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°C 保藏。

[0037] 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 $40\ \mu\text{L}$ 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 $5\ \mu\text{L}/\text{s}$ 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 $50\ \mu\text{L}$ 抗体和 $50\ \mu\text{L}$ 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 pH 7.40.01M 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 $20\ \mu\text{L}/\text{s}$ 的速度注入 $400\ \mu\text{L}$ 含 0.1M NaCl 的 pH 7.0、0.01M 磷酸盐缓冲液洗液, 之后, 将 $100\ \mu\text{L}$ 的羊抗兔抗体及双链 DNA 共同修饰的 30nm 金探针的溶液以 $1\ \mu\text{L}/\text{s}$ 的速度注入反应池, 反应 6 分钟, 冲洗; 以 $2\ \mu\text{L}/\text{s}$ 的速度注入 $100\ \mu\text{L}$ 的双蒸水, 60°C 反应 6 分钟, 最后再注入 $100\ \mu\text{L}$ 的双蒸水, 收集所需单链 DNA, 撤去磁场, 洗涤柱子以备再用。

[0038] 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 $100\ \mu\text{L}$ pH 9.6 的亲和素碳酸钠缓冲溶液, 4°C 孵育过夜, 用 PBS 清洗后, 备用。

[0039] 荧光猝灭检测: 将收集的单链 DNA 与 $10\ \mu\text{L}$ 的生物素标记的捕获探针 25 μM , 5' - 生物素 -a(10) TACGAGTTGAGACCGTTAAGACGA-3' 混合, 再加入含 0.3M NaCl, 0.02% SDS pH 7.420 μL 、0.01M PBS, 37°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 $100\ \mu\text{L}$ PBS 缓冲液洗涤, 加入 $100\ \mu\text{L}$ 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。

[0040] 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

[0041] 图 1 免疫原的紫外扫描图。

[0042] 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

[0043] 实施例 1

[0044] (1) 免疫原的制备:

[0045] 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 $150\ \mu\text{L}$ 的碳二亚胺 (EDC), 得 A 液。

[0046] ②用 1mL 25% 的乙醇溶液溶解 2mg 的牛血清蛋白 (BSA), 得 B 液。

[0047] ③将 A 液逐滴加入到 B 液中, 再加入 $150\ \mu\text{L}$ 的碳二亚胺 (EDC), 混匀, 4°C 反应 12h。得到微囊藻毒素 -LR-BSA 偶联物的混合液。

[0048] ④将微囊藻毒素 -LR-BSA 偶联物的混合液移入透析袋中, 用 $6\times 1\text{L}$ 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。

[0049] 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。

[0050] (2) 包被原的制备:

[0051] ①取微囊藻毒素-LR(MC-LR) 0.5mg 溶于 250 μL 的 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中,得 C 液。

[0052] ②取三正丁胺 15 μL 溶于 250 μL 的 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中,得 D 液。

[0053] ③将 D 液加入到 C 液中。

[0054] ④取氯甲酸异丁酯 12 μL,溶于 500 μL 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。

[0055] 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。

[0056] 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。

[0057] 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。

[0058] (3) 磁性纳米粒子的修饰:

[0059] 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 0.12mol/L, Fe^{3+} 的浓度为 0.2mol/L;NaOH 溶液的浓度为 2.5mol/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。

[0060] 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 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。

[0061] (4) 磁性纳米粒子与包被原的偶联:

[0062] 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 1mL 0.02mol/L pH7.6 的 Tris 缓冲液, 4℃保存备用。

[0063] (5) 金纳米粒子的制备:

[0064] 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。

[0065] (6) 金纳米探针的制备:

[0066] 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'-tacgagttgagaccgttaagacgaggcaatcatgcaatcctgaatgcgt(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 μM 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 (0.3MNaCl),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'-GGCAATCATGCAATCCTGAATGC Ga(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。

[0067] (7) 流动注射系统中的免疫反应:

[0068] 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 μL 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 μL/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 μL 抗体;50 μL MC-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 μL/s 的速度注入 400 μL 0.01M PBS (pH7.0,0.1M NaCl) 的洗液。之后,将 100 μL 的 30nm 金探针 (含有二抗和 DNA) 的溶液以 1 μL/s 的速度注入反应池,反应 6 分钟,冲洗。以 2 μL/s 的速度注入 100 μL 的双蒸水,60℃反应 6 分钟,最后再注入 100 μL 的双蒸水,收集所需单链 DNA,撤去磁场,洗涤柱子以备再用。

[0069] (8) 荧光酶标板的包被:

[0070] 用亲和素包被荧光酶标板,向酶标板每孔中加入 100 μL 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。

[0071] (9) 荧光猝灭检测:

[0072] 步骤 (9) 收集的单链 DNA 与 10 μL 的生物素标记的捕获探针 (25 μM,5'-生物素-a(10)TACGAGTTGAGACCGTTAAGACGA-3') 混合,再加入 20 μL (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 μL PBS 缓冲液洗涤,加入 100 μL FITC,震荡,荧光检测,荧光强度可以通过 Wallac1420 工作站在线观测。

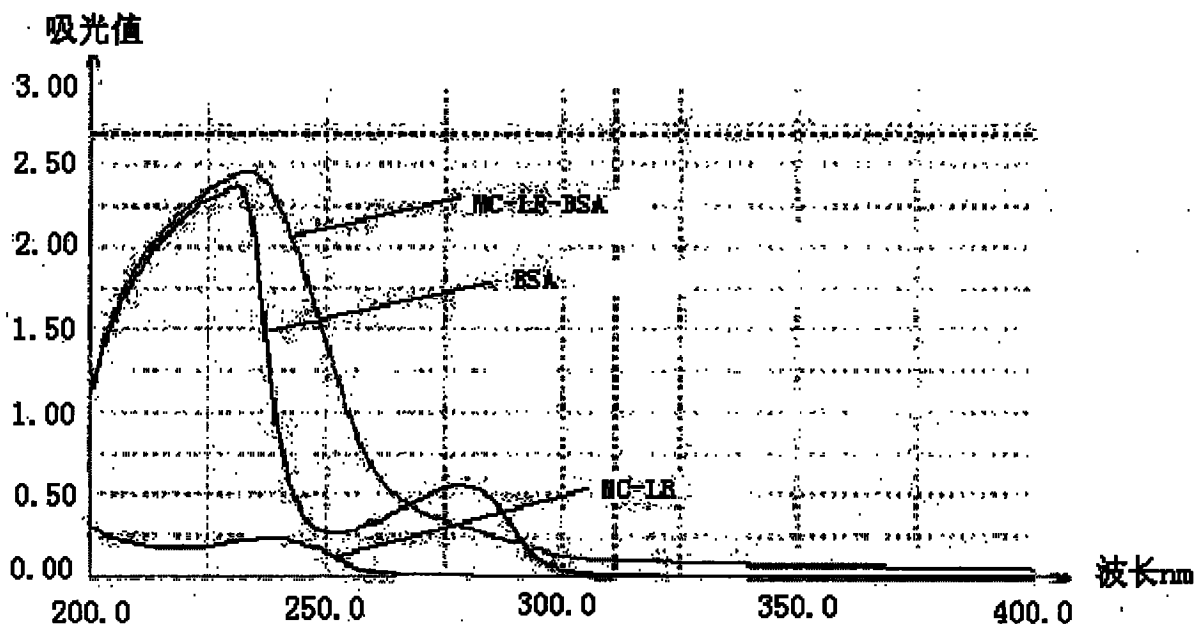


图 1

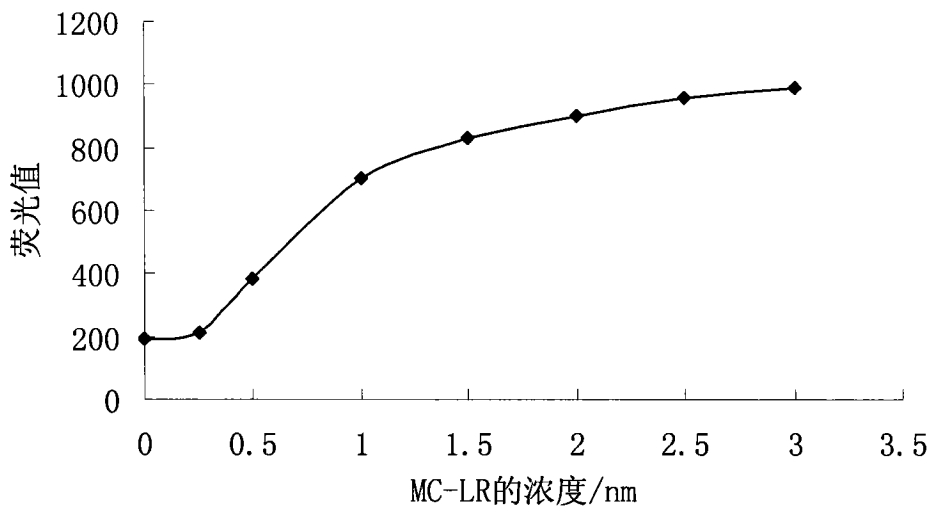


图 2

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	CN101382541B	公开(公告)日	2012-07-11
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	CN101382541A		
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。

