



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101382542 B

(45) 授权公告日 2012. 11. 07

(21) 申请号 200810022246. 3

CN 1877328 A, 2006. 12. 13, 全文.

(22) 申请日 2008. 06. 27

CN 1629312 A, 2005. 06. 22, 全文.

(73) 专利权人 江南大学

审查员 张彬

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 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 1356551 A, 2002. 07. 03, 全文.

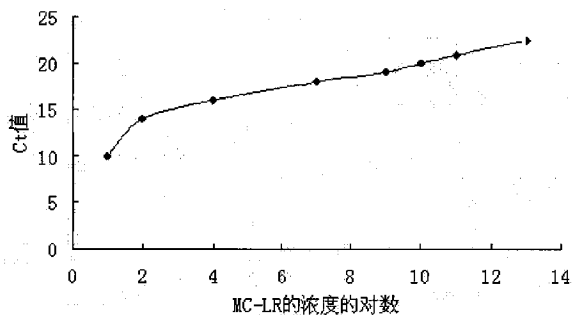
权利要求书 3 页 说明书 6 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种微囊藻毒素 -LR 的免疫荧光 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,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;

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 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,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;

(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;

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取卵清蛋白 OVA 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 搅拌下逐滴加入到卵清蛋白溶液中,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;

(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 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 Fe^{2+} 离子的浓度为 0.12mol/L, Fe^{3+} 的浓度为 0.2mol/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 $^{\circ}$ 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;将所得 Fe_3O_4 种子 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:

取所得 APTES 修饰的 Fe_3O_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℃保存备用;

(6) 两种粒径的金纳米粒子制备;

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;

(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 pH 9.1 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'-TACGAGTTGA GACCGTTAAG ACGAGGCAAT CATGCAATCCTGAATGCGTT TTTTTTTT-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 1.5 μM 的目标探针 5'-CGCATTTCAGG ATTGCATGAA TGCCTCGTCTTAACGGTCTC AACTCGTA-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'-GGCAATCATG CAATCCTGAA TGCGAAAAAAAAA-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;

(8) 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 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;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 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 μL/s 的速度注入 400 μL pH 7.0、含 0.1M 氯化钠的 0.01M PBS 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℃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;

(9) 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;

设计正义引物 F 为:5'-cgcatttcaggattgcatga-3',反义引物 R 为 5'-cgagttgagaccgttaagacga-3';其次,配制总体积为 20 μL 的反应溶液,各组分别为:TOYOBO SYBR Green Real-time PCR Master Mix 10.0 μL;超纯水 6.8 μL;正义引物 F 0.6 μL;反义引物 R 0.6 μL;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

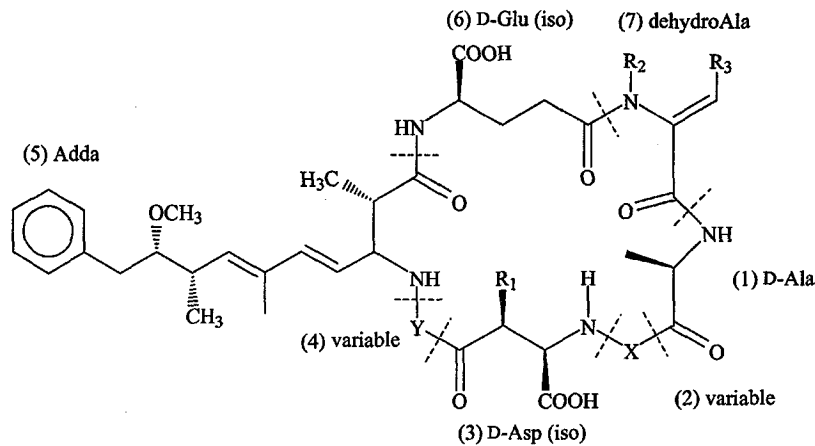
技术领域

[0001] 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

[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 $1.0 \mu\text{g/L}$,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。

[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

[0006] 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。

[0007] 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:

[0008] (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;

[0009] (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;

[0010] (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;

[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制备;

[0014] (7) 两种金纳米探针的制备;

[0015] (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;

[0016] (9) 流动注射系统中的免疫反应

[0017] (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。

[0018] 从而达到检测微囊藻毒素 -LR 的含量。

[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 1mL 25% 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,作为免疫原。

[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 μL ,溶于 500 μL N,N- 二甲基甲酰胺中,4 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌下逐滴加入到 C 液中,反应 1h;

[0029] ⑤取卵清蛋白 OVA 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℃ 搅拌下逐滴加入到卵清蛋白溶液中, 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 6×1L 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。

[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 Fe^{2+} 离子的浓度为 0.12mol/L, Fe^{3+} 的浓度为 0.2mol/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 Fe_3O_4 种子; 将所得 Fe_3O_4 种子 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。

[0032] 磁性纳米粒子与包被原的偶联: 取所得 APTES 修饰的 Fe_3O_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℃ 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℃ 保存备用。

[0033] 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。

[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 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 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 1.5 μM 的目标探针 5'-cgattcaggattgcatgaatgcctcgtcttaacgggtctcaactcgta-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;

[0036] 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。

[0037] 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 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 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 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 μ L/s 的速度注入 400 μ L pH 7.0、含 0.1M 氯化钠的 0.01M PBS 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 $^{\circ}$ C 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。

[0038] 实时荧光定量 PCR 检测:设计正义引物 F 为:5' -cgattcaggattgcatga-3',反义引物 R 为 5' -cgagttgagaccgttaagacga-3';其次,配制总体积为 20 μ L 的反应溶液,各组分分别为:TOYOBO SYBR Green Real-time PCR Master Mix 10.0 μ L;超纯水 6.8 μ L;正义引物 F 0.6 μ L;反义引物 R 0.6 μ L;所收集的单链 DNA 2.0 μ L;将此混合溶液放入实时荧光 PCR 仪,进行如下操作:95 $^{\circ}$ C /30s 预变性;进行扩增,95 $^{\circ}$ C /5s,60 $^{\circ}$ C /5s,72 $^{\circ}$ C /10s,共 45 个循环;进行熔点曲线分析:95 $^{\circ}$ C /0s,45 $^{\circ}$ C /15s,95 $^{\circ}$ C /0s,0.1 $^{\circ}$ 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。

[0039] 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。

[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 PCR 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 μ 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 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。

[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 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。

[0049] 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。

[0050] (2) 包被原的制备：

[0051] 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。

[0052] 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

[0053] ③将 D 液加入到 C 液中。

[0054] 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。

[0055] ⑤取卵清蛋白 (OVA) 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。

[0056] ④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。

[0057] 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。

[0058] (3) 制备多抗

[0059] 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。

[0060] (4) 抗体效价的测定：

[0061] 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 1.28×10^6 。

[0062] (5) 磁性纳米粒子的修饰：

[0063] 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，混合所配的二种铁盐溶液。在混合溶液中 Fe^{2+} 离子的浓度为 0.12mol/L， Fe^{3+} 的浓度为 0.2mol/L；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 $^{\circ}$ 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。

[0064] 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 $^{\circ}$ C 干燥 24 小时，备用。

[0065] (6) 磁性纳米粒子与包被原的偶联：

[0066] 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C 保存备用。

[0067] (7) 金纳米粒子的制备：

[0068] 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。

[0069] (8) 金纳米探针的制备:

[0070] 用 30nm 金纳米粒子与 1.5 μg 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'-tacgagttgagaccgттаagacgaggcaatcatgcaatcctgaatgcgt (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 1.5 μM 的目标探针 (5'-cgattcaggattgcatgaatgcctcgtcttaacggtctcaactcgta-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。

[0071] (9) 包被原固定及流动注射系统中的免疫反应:

[0072] 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 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 氯化钠) 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。

[0073] (10) 实时荧光定量 PCR 检测:

[0074] 设计出正义引物 (F) 为 5'-cgattcaggattgcatga-3', 反义引物 (R) 为 5'-cgagttgagaccgттаagacga-3'。其次, 配制总体积为 20 μL 的反应溶液, 各组分分别为: TOYOBO SYBR Green Real-time PCR Master Mix 10.0 μL; 超纯水 6.8 μL; 正义引物 (F) 0.6 μL; 反义引物 (R) 0.6 μL; 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℃ /30s 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。

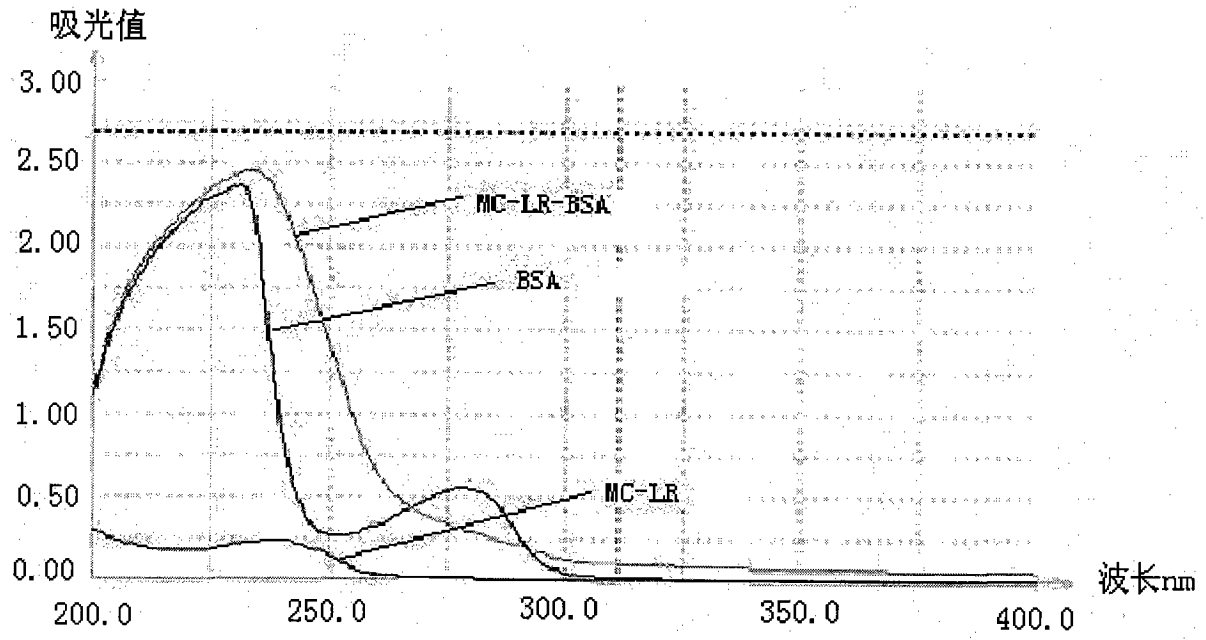


图 1

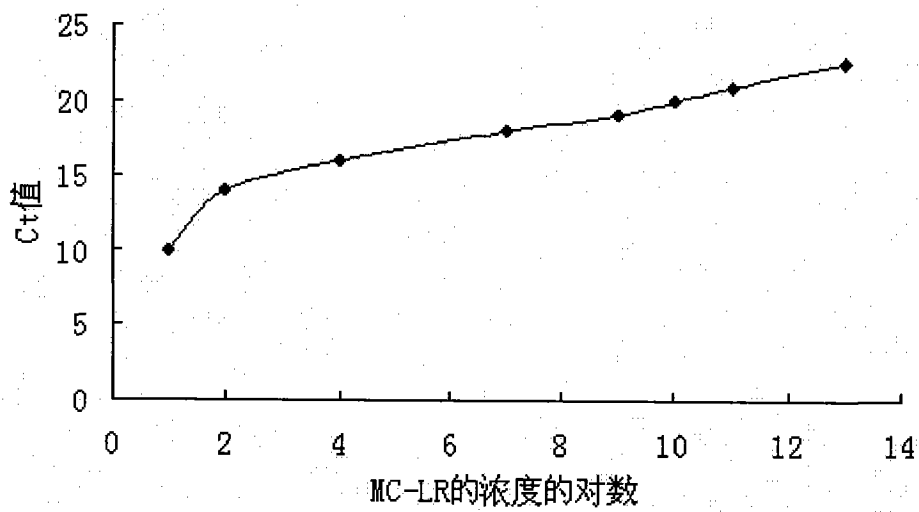


图 2

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	CN101382542B	公开(公告)日	2012-11-07
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		
审查员(译)	张彬		
其他公开文献	CN101382542A		
外部链接	Espacenet SIPO		

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。

