



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101738482 A

(43) 申请公布日 2010.06.16

(21) 申请号 201010030819.4

(22) 申请日 2010.01.08

(71) 申请人 吉林大学

地址 130062 吉林省长春市西安大路 5333
号吉林大学畜牧兽医学院

(72) 发明人 李小兵 刘国文 孔涛 王哲
宋文学 杨威 孙佳 张燚 刘磊
唐佳

(74) 专利代理机构 吉林长春新纪元专利代理有
限责任公司 22100

代理人 陈宏伟

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种检测相思子毒素的免疫层析试纸及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开一种检测相思子毒素的免疫层析试纸及其制备方法,用特异性结合相思子毒素 A 链的鼠源单克隆抗体标记胶体金制成本发明中免疫层析试纸条的金胶垫,将兔源抗相思子毒素的多克隆抗体包被于硝酸纤维素膜上作为检测线(T线),同金胶垫一起装备成本发明的免疫层析试纸条。本发明试纸条适合于临床和突发事件的现场检测,适合流行病学调查,具有操作简单,灵敏度高、稳定性好、方便、快捷等特点,对相思子毒素中毒的鉴别诊断和及时救治具有重要意义和实际应用价值。

1. 一种检测相思子毒素的免疫层析试纸,其特征在于:以特异性结合相思子毒素 A 链的鼠源单克隆抗体标记胶体金制备金胶垫,将兔源抗相思子毒素的多克隆抗体包被于硝酸纤维素膜上作为检测线(T线),用羊抗鼠 IgG 的多克隆抗体包被于硝酸纤维素膜上作为质控线(C线)。

2. 权利要求 1 所述免疫层析试纸的制备方法,包括以下步骤:

(1) 将从相思子中纯化制备得到的相思子毒素用 1% 甲醛减毒处理后免疫 Balb/C 小鼠制备单克隆抗体;

(2) 采用 Westernblot 方法从步骤(1)中制备得到的单克隆抗体中筛选出特异性结合相思子毒素 A 链的单克隆抗体;

(3) 用(2)得到的单克隆抗体标记胶体金,制备成胶体金探针,把它喷在玻璃纤维膜上制成胶体金垫;

(4) 将从相思子中纯化制备得到的相思子毒素用 1% 甲醛减毒处理后免疫家兔制备兔源抗相思子毒素多克隆抗体;

(5) 用兔源抗相思子毒素的多克隆抗体包被于硝酸纤维素膜上作为检测线(T线);

(6) 用羊抗鼠 IgG 的多克隆抗体包被于硝酸纤维素膜上作为质控线(C线);

(7) 将样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水滤纸按从上到下依次固定于 PVC 膜板上,制备成免疫层析试纸。

一种检测相思子毒素的免疫层析试纸及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物检测技术领域,具体涉及一种检测相思子毒素的免疫层析试纸及其制备方法。

背景技术

[0002] 相思子毒素 (abrin) 是存在于豆科植物相思子 (*Abrus Precatorius* L.) 种子中的一种毒蛋白,它是迄今为止所发现的毒性最强的一种植物毒素,毒性是普通化学武器的几百倍,成年人摄入的致死剂量为 $5.0 \sim 7.0 \mu\text{g}/\text{Kg}$,只需嚼烂后吞服一粒种子即可被毒死,而且出现症状时已经造成机体严重的器质损害,给中毒的治疗及预防带来极大的困难,是一种潜在的生物毒素武器。相思子毒素由 A、B 两条多肽链经一个二硫链连接而成,其中相思子毒素 A 链具有 N 糖苷酶活性,可以专一水解核糖体 28S 第 4324 位腺苷酸的 N-C 糖苷键而使核糖体失活,进而影响蛋白质的合成。相思子毒素 B 链是一种对半乳糖具有特殊亲和力的凝集素,可以与细胞表面含半乳糖残基的受体结合。作为 II 型核糖体失活蛋白 (RIP) 成员之一,相思子毒素的毒性作用机制与蓖麻毒素相似,但其毒性却是蓖麻毒素的 75 倍,相思子毒素抗肿瘤活性也明显强于蓖麻毒素。利用相思子毒素及相思子毒素 A 链制备免疫毒素用于肿瘤的治疗是近来研究的热点,因此开展对相思子毒素检测技术的研究具有十分重要的意义。

[0003] 国内外有关相思子毒素的生物检定法和物理化学检定法报导较少,免疫学检测主要有放射性免疫法 (RIA) 和酶联免疫吸附试验 (ELISA)。RIA 技术主要是通过使用放射性元素 ^{125}I 标记的抗体来定量检测血液等样品中的相思子毒素,检测灵敏度高,血浆中相思子毒素最小可测浓度达 $50 \sim 100\text{pg}/\text{mL}$ 。其缺点是存在放射污染问题。ELISA 法检测相思子毒素具有较高的灵敏性和特异性但操作过程繁琐,结果判定耗时长,不适合用于现场检测。因此,迫切需要快速,灵敏,特异性高的检测相思子毒素的方法。

发明内容

[0004] 本发明提供了一种检测相思子毒素的免疫层析试纸,具有特异性强、灵敏度高、操作简单方便等特点。

[0005] 本发明还提供了上述免疫层析试纸的制备方法,适用工业化生产。

[0006] 本发明的检测相思子毒素免疫层析试纸,其特征在于:

[0007] 是以特异性结合相思子毒素 A 链的鼠源单克隆抗体标记胶体金制备本发明中免疫层析试纸条的金胶垫,将兔源抗相思子毒素的多克隆抗体包被于硝酸纤维素膜上作为检测线 (T 线),用羊抗鼠 IgG 的多克隆抗体包被于硝酸纤维素膜上作为质控线 (C 线),同金胶垫一起装备成本发明的免疫层析试纸条。

[0008] 本发明检测相思子毒素免疫层析试纸的制备方法如下:

[0009] 用特异性结合相思子毒素 A 链的鼠源单克隆抗体标记胶体金制备金胶垫;用兔源抗相思子毒素的多克隆抗体包被于硝酸纤维素膜上作为检测线 (T 线);用羊抗鼠 IgG 的多

克隆抗体包被于硝酸纤维素膜上作为质控线 (C 线), 即得检测试纸。

[0010] 主要包括以下步骤:

[0011] (1) 将从相思子中纯化制备得到的相思子毒素用 1% 甲醛减毒处理后免疫 Balb/C 小鼠制备单克隆抗体;

[0012] (2) 采用 Westernblot 方法从步骤 (1) 中制备得到的单克隆抗体中筛选出特异性结合相思子毒素 A 链的单克隆抗体;

[0013] (3) 用 (2) 得到的单克隆抗体标记胶体金, 制备成胶体金探针, 把它喷在玻璃纤维膜上制成胶体金垫;

[0014] (4) 将从相思子中纯化制备得到的相思子毒素用 1% 甲醛减毒处理后免疫家兔制备兔源抗相思子毒素多克隆抗体;

[0015] (5) 用兔源抗相思子毒素的多克隆抗体包被于硝酸纤维素膜上作为检测线 (T 线);

[0016] (6) 用羊抗鼠 IgG 的多克隆抗体包被于硝酸纤维素膜上作为质控线 (C 线);

[0017] (7) 将样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水滤纸按从上到下依次固定于 PVC 膜板上, 制备成免疫层析试纸。

[0018] 本发明涉及的上述相思子毒素免疫层析试纸, 其中相思子毒素的制备方法: 相思子去壳处理, 去种仁 200g, 浸于 1L 5% 冷醋酸中, 4℃ 过夜, 高速匀浆处理, 10000g/min 离心 20min, 上清用 35%~95% 硫酸铵分级沉淀, 沉淀溶解于 5mmol/L PB (pH8.0) 溶液中, 用 Sepharose 4B 亲和层析纯化, 纯化产物过 DEAE-Sepharose FF 离子交换柱, 收集第一个洗脱峰即为相思子毒素, 经脱盐处理后加入终浓度为 0.01% 硫柳汞钠盐, -20℃ 保存。

[0019] 本发明涉及的上述相思子毒素免疫层析试纸, 其中兔源抗相思子毒素的多克隆抗体制备方法: 相思子毒素经甲醛减毒处理, 分三次免疫家兔, 首次免疫剂量为 500 μg/只, 加强免疫于首次免疫 2 周后进行, 剂量为 300 μg/只, 加强免疫每间隔 2 周进行一次, 8 周后用不含佐剂的类毒素溶液经耳静脉注射作超强免疫, 剂量为 800 μg/只, 一周后心脏穿刺采血, 分离血清, 血清经 50% 硫酸铵盐析沉淀法处理, 5000g/min 离心 20min, 弃上清, 沉淀用 PBS (0.02mol/L pH7.0) 重悬, 即为粗提的多克隆抗体, 粗提物用 Hitrap rProtein A FF 或 Hitrap rProtein G FF 预装柱制备高纯度的抗体。

[0020] 本发明涉及的上述相思子毒素免疫层析试纸, 其中特异性结合相思子毒素 A 链的鼠源单克隆抗体制备方法: 相思子毒素用 1% 甲醛减毒处理, 对 6~8 周龄的 Balb/C 小鼠免疫, 通过细胞融合, ELISA 筛选, 克隆, 并采用 Westernblot 法鉴定其特异性, 取经 Westernblot 鉴定为能分泌特异性结合相思子毒素 A 链的鼠源单克隆抗体的细胞株, 采用体外诱导法, 将单克隆抗体细胞株扩大培养后注入 6~8 周龄 Balb/C 小鼠腹腔内制备腹水, 制备的腹水经硫酸铵盐析法粗提后, 用 Hitrap rProtein A FF 凝胶亲和层析柱进一步纯化, 即得到高纯度的单克隆抗体。

[0021] 本发明用特异性结合相思子毒素 A 链的鼠源单克隆抗体制备胶体金探针, 用兔源抗相思子毒素多克隆抗体作为检测线, 采用双抗体夹心法原理检测相思子毒素, 既增强了其检测灵敏度, 也保留了其特异性强的特点。

[0022] 本发明检测相思子毒素的免疫层析试纸的积极效果在于: 检测特异性高、灵敏度高、稳定性好、方便、快捷。具有操作简单、检测快速、结果易于判断和方便保存, 且无需任何

仪器设备等优点,尤其适合于临床和突发事件的现场检测,适合流行病学调查大规模应用。

附图说明

[0023] 图 1 为相思子毒素单克隆抗体 Westernblot 鉴定结果图。

[0024] 其中第 1 泳道为低分子量 Marker ;第 2、3 泳道为完整的相思子毒素 Westernblot 检测显色结果 ;第 4、5 泳道为相思子毒素经 β -巯基乙醇处理后,相思子毒素 A 链 Westernblot 检测显色结果。

[0025] 图 2 为胶体金试纸条的检测结果图。

[0026] 1、阴性结果 ;2、5ng/mL 毒素样品检测结果 ;3、50ng/mL 毒素样品检测结果。

具体实施方式

[0027] 下列实施例旨在进一步举例说明,而不是限制本发明。本领域技术人员可以理解到,在不背离本发明的精神和原则的前提下,对本发明的任何平行改变和改动都将落入本发明的待批权利要求范围内。

[0028] 实施例 1

[0029] 相思子毒素抗体制备及鉴定

[0030] 1、相思子毒素的制备

[0031] 采用 5% 醋酸抽提粗毒,经高速离心 (10,000g,20min) 后弃沉淀物,上清液用 35%~95% 饱和硫酸铵分级沉淀,将沉淀物用 PBS 充分透析 72h,所得毒素粗提物采用 Sepharose 6B 或 Sepharose 4B 琼脂糖亲和层析柱、DEAE-Sepharose FF 阴离子交换柱及 Hi load 26/60Superdex75 凝胶过滤层析预装柱进一步分离,结果采用 SDS-PAGE 电泳法分析分子量,凝胶薄层扫描测定纯度,N 末端氨基酸序列测定及质谱肽指纹图谱分析鉴定,结果表明制备得到高纯的相思子毒素。

[0032] 2、特异性结合相思子毒素 A 链的鼠源单克隆抗体的制备

[0033] 相思子毒素经 1% 甲醛磷酸盐缓冲液减毒处理 24h 后,免疫 Balb/C 小鼠制备单克隆抗体。免疫免疫程序为:首次免疫:每只取 100 μ L 抗原 (50 μ g) 与 100 μ L 完全费氏佐剂混匀,皮下多点注射。加强免疫:于首免后 2 周进行,每只取 100 μ L 抗原 (30 μ g) 与等量不完全费氏佐剂混匀后,腹腔注射。此后每 2 周免疫一次,共免四次,最后一次免疫后 7 天断尾采血分离血清,以 2 μ g/mL 原毒 (未经醛化减毒处理) 包被酶标板,用间接 ELISA 法检测抗相思子毒素血清抗体效价。若效价高于 1×10^{-4} 即可用于细胞融合。超强免疫:于细胞融合前 3~4d 尾静脉各注射无佐剂抗原 50 μ g,200 μ L/ 只。采用小鼠杂交瘤细胞技术制备抗相思子毒素的单克隆抗体杂交瘤细胞株,采用体内诱导法,分别将杂交瘤细胞接种于 Balb/c 小鼠制备了腹水;用小鼠 mAb 亚类鉴定试剂盒检测 mAb 的亚类,腹水经硫酸铵盐析法粗提后,采用 Hitrap rProtein A FF 亲和层析柱或 Hitrap rProtein G FF 亲和层析柱纯化,SDS-PAGE 凝胶电泳鉴定纯度,BCA 法测定其浓度;间接 ELISA 法检测腹水效价为 1:3.2 $\times 10^5$,且与相思子凝集素、蓖麻毒素及蓖麻凝集素三种类似物均无交叉反应;采用 Westernblot 法鉴定其特异性,结果表明所制备得到的单克隆抗体可特异性结合相思子毒素 A 链,与相思子凝集素、蓖麻毒素和蓖麻凝集素等均无交叉反应,表明该单克隆抗体特异性高。见图 1:图中,第 1 泳道,低分子量 Marker ;第 2、3 泳道,完整的相思子毒素

Westerblot 检测显色结果;第 4、5 泳道,相思子毒素经 β -巯基乙醇处理后,相思子毒素 A 链 Westerblot 检测显色结果。

[0034] 3、兔源抗相思子毒素多克隆抗体的制备

[0035] 相思子毒素经甲醛减毒处理,制备得相思子毒素类毒素。用此类毒素经皮下及肌肉注射免疫家兔,首次免疫剂量为 500 μ g/只,取等体积完全弗氏佐剂与类毒素溶液混合并完全乳化后经皮下注射免疫,强化免疫于首次注射 2 周后进行,免疫间隔时间为两周,剂量为 300 μ g/只,取等体积不完全弗氏佐剂与类毒素溶液混合并充分乳化后经皮下或肌肉注射免疫,免疫 8 周后,用不含佐剂的类毒素溶液经耳静脉注射作超强免疫,最后一次免疫 1 周后经心脏采血制备抗血清。血清经 50%硫酸铵沉淀法处理,5000g/min 离心 20min,弃上清,沉淀用 PBS(0.02mol/L pH7.0)重悬,即为粗提的多克隆抗体,粗提物用 Hitrap rProtein A FF 或 Hitrap rProtein G FF 凝胶亲和层析制备高纯度的抗体。兔源抗相思子毒素多克隆抗体采用琼脂免疫扩散试验及 ELISA 法进行鉴定,结果表明与相思子凝集素、蓖麻毒素和蓖麻凝集素均无交叉反应。

[0036] 实施例 2

[0037] 胶体金探针的制备

[0038] 1、胶体金颗粒的制备

[0039] 取硅化过的 250mL 三角瓶一个,加 100mL 去离子水及 1mL 1%氯金酸,加热沸腾;搅动下准确加入 1.5mL 1%柠檬酸三钠,继续煮沸 15min,冷却后用去离子水恢复到原体积即可得到粒径 25nm 的胶体金颗粒。通过调节加入 1~2mL 1%柠檬酸三钠的量可制备出粒径 15~40nm 的胶体金颗粒。

[0040] 2、胶体金标记特异性结合相思子毒素 A 链的鼠源单克隆抗体

[0041] 取硅化过的 250mL 三角瓶一个,加入 100mL 粒径 25nm 胶体金;加入适量 0.2mol/L K₂CO₃ 把 pH 调整为 8.7,慢慢逐滴加特异性结合相思子毒素 A 链的鼠源单克隆抗体至抗体终浓度为 1mg/mL,室温摇床上放置 15~25min;加入 10% BSA 至终浓度为 5%,防止抗体蛋白和胶体金聚合和沉淀。

[0042] 3、金标垫的制备

[0043] 把玻璃纤维素膜在生物安全柜内剪成 0.8×30cm/条,4℃真空抽干后待用。将纯化好的胶体金探针按 4mL/条的量均匀涂布在玻璃纤维素膜上,在生物安全柜内通风干燥过夜,干燥条件下保存备用。

[0044] 实施例 3

[0045] 检测相思子毒素的免疫层析试纸组装及测试

[0046] 1、硝酸纤维素膜上检测线和质控线的制备

[0047] 将纯化好的兔源抗相思子毒素多克隆抗体和羊抗鼠 IgG 多克隆抗体用 PBS(0.01mol/mL pH7.5)溶液分别稀释至终浓度为 1mg/mL、1.5mg/mL。将稀释好的兔源抗相思子毒素多克隆抗体溶液装入 BIODOT 划膜机喷头 2,固定在距硝酸纤维素膜下边缘 1.1cm 的位置上,稀释好的羊抗鼠 IgG 多克隆抗体装入 BIODOT 划膜机喷头 1,固定在距硝酸纤维素膜下边缘 1.6cm 的位置上。参数均为 1.0 μ L/cm 喷在硝酸纤维膜上。将已喷好的硝酸纤维膜真空干燥 2 小时(24℃相对湿度 40%以下),经检查外观、长度和干燥情况等,合格后铝箔袋密封,标明半成品批号,放置材料暂存区保存。

[0048] 2、免疫层析试纸的组装

[0049] 免疫层析试纸的组装方法：一切操作均无灰尘、无菌、无大颗粒的情况下进行，取大小为 30cm×80mm 的 PVC 底板，将包被抗体的硝酸纤维素膜 (30cm×25mm) 组装到粘性 PVC 底板上，要求其下边缘一定要对齐模具上的黑色标记线，并小心抹平膜面。将吸水垫 (30cm×35mm) 紧靠模具上边缘组装到粘性底板上，并小心抹平。将包被有金标抗体玻璃纤维素膜 (30cm×8mm) 紧靠标尺下边缘组装到粘性底板上，并小心抹平。将样品垫 (30cm×25mm) 紧靠模具下边缘组装到粘性底板上，并小心抹平。用切条机切成 4.5mm 宽的试纸，在装配区将切好的试纸合并 0.5g 干燥剂一包放入包装袋内，-20℃ 保存。

[0050] 3、测试结果

[0051] (1) 样品处理

[0052] 检测液体乳样品：视样品浓度及粘稠度用 0.01mol/L PBS (pH7.5) 溶液做适当稀释，所得溶液即可作为检测液。

[0053] 检测血液样品：1 体积血液样品加入 1 体积的 0.01mol/L PBS (pH7.5) 溶液，混匀静止 10 分钟，离心处理后取上清即可作为检测液。

[0054] 检测食物样品：将食物做粉碎处理后加入适当量的 0.01mol/L PBS (pH7.5) 溶液混匀，室温下静止 30min，离心处理后取上清即可作为检测液。

[0055] (2) 样本检测

[0056] 取一滴待检毒素样本滴加在制备好的试纸条的加样区，样品开始在硝酸纤维素膜上扩散，待金标垫释放完全后，硝酸纤维素膜上出现清晰的 T 线和 C 线。当样品中不含相思子毒素时，用该试纸条检测时检测线无色而质控线有颜色。见图 2。

[0057] 图 2 中，试纸 1：阴性对照；试纸 2：5ng/mL；试纸 3：50ng/mL。其中 a 为检测线；b 为质控线。

[0058] 实施例 4

[0059] 相思子毒素免疫层析试纸性能的测定及实践

[0060] 1、检测相思子毒素免疫层析试纸特异性的测定

[0061] 应用制备的检测相思子毒素免疫层析试纸检测与相思子毒素分子结构的性质较近的相思子凝集素、蓖麻毒素、蓖麻凝集素时，结果均为阴性，表明与它们之间没有交叉反应，试纸条特异性良好。

[0062] 2、检测相思子毒素免疫层析试纸敏感性

[0063] 应用上述两种抗体，采用双抗体夹心 ELISA 法检测相思子毒素样品时，最低检测限为 1ng/mL。用本发明检测相思子毒素免疫层析试纸，样品中相思子毒素浓度低于 5ng/mL 时试纸条检测显色不清晰；当毒素样品浓度在 5 ~ 40ng/mL 之间时检测线显色清晰但比质控线颜色浅；当毒素样品浓度在 40ng/mL 以上时检测线的颜色比质控线颜色深。免疫层析试纸的灵敏度略低于 ELISA 法。

[0064] 3、检测相思子毒素免疫层析试纸重复性

[0065] 取同一样品进行五次重复试验，检测结果相一致，说明该方法具有可重复性。

[0066] 4、检测相思子毒素免疫层析试纸稳定性

[0067] (1) 同一批次的免疫层析试纸于 37℃ 破坏试验期间，每天都进行试纸条的检测，在第 12 天时试纸条颜色的强度有所降低。说明试纸条在 37℃ 可保存 11 天。

[0068] (2) 同一批次的免疫层析试纸于 4℃ 保存 6 个月期间,每周测定的结果显色条带的颜色均很清晰,在第六个月时颜色强度有所降低;说明试纸条在 4℃ 可保存 5 个月,第 6 个月后灵敏度有所下降。

[0069] (3) 同一批次的免疫层析试纸于 -20℃ 保存 11 个月期间,分别每半个月一检测,在第 10 个月时颜色强度有所降低;说明试纸条在 -20℃ 可保存 10 个月,第 11 个月后灵敏度有所下降。

[0070] 5、检测相思子毒素免疫层析试纸人工模拟样本检测

[0071] 对人工模拟香肠毒素样品检测用 ELISA 试验和制备的免疫层析试纸进行鉴别试验,结果显示当毒素样品浓度大于 5ng/mL 时,两种检测方法的符合率为 100%。

[0072] 对人工模拟牛奶毒素样品检测用 ELISA 试验和制备的免疫层析试纸进行鉴别试验,结果显示当毒素样品浓度大于 5ng/mL 时,两种检测方法的符合率为 100%。

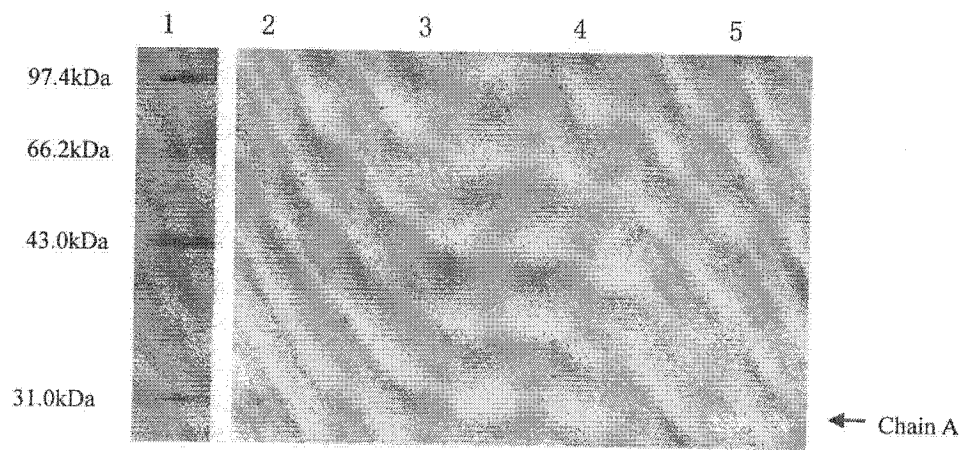


图 1

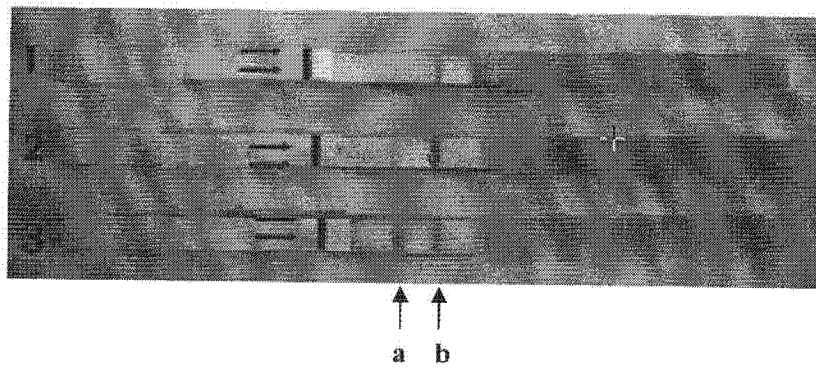


图 2

专利名称(译)	一种检测相思子毒素的免疫层析试纸及其制备方法		
公开(公告)号	CN101738482A	公开(公告)日	2010-06-16
申请号	CN201010030819.4	申请日	2010-01-08
[标]申请(专利权)人(译)	吉林大学		
申请(专利权)人(译)	吉林大学		
当前申请(专利权)人(译)	吉林大学		
[标]发明人	李小兵 刘国文 孔涛 王哲 宋文学 杨威 孙佳 张燧 刘磊 唐佳		
发明人	李小兵 刘国文 孔涛 王哲 宋文学 杨威 孙佳 张燧 刘磊 唐佳		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531		
代理人(译)	陈宏伟		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开一种检测相思子毒素的免疫层析试纸及其制备方法，用特异性结合相思子毒素A链的鼠源单克隆抗体标记胶体金制成本发明中免疫层析试纸条的金胶垫，将免源抗相思子毒素的多克隆抗体包被于硝酸纤维素膜上作为检测线(T线)，同金胶垫一起装备成本发明的免疫层析试纸条。本发明试纸条适合于临床和突发事件的现场检测，适合流行病学调查，具有操作简单，灵敏度高、稳定性好、方便、快捷等特点，对相思子毒素中毒的鉴别诊断和及时救治具有重要意义和实际应用价值。

