



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102346189 A

(43) 申请公布日 2012. 02. 08

(21) 申请号 201010245717. 4

(22) 申请日 2010. 08. 01

(71) 申请人 国家海洋环境监测中心

地址 116023 辽宁省大连市沙河口区凌河街
42 号

(72) 发明人 刘仁沿 梁玉波 刘磊 许道艳

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

快速检测麻痹性贝毒的免疫胶体金试纸条及其制法

(57) 摘要

本发明涉及检测赤潮毒素的检测器具。一种快速检测麻痹性贝毒的免疫胶体金试纸条,包括样本垫、胶金垫、赛多利斯 NC 膜、吸水垫和 PVC 背衬;其具体结构是在 PVC 背衬上按顺序依次粘附有样本垫、胶金垫、赛多利斯 NC 膜、吸水垫,胶金垫上包被有胶体金标记的抗麻痹性贝毒单克隆抗体,赛多利斯 NC 膜上分别包被有石房蛤毒素与牛血清蛋白偶联物构成的检测线和羊抗鼠抗体构成的质控线。本发明试纸条具有特异性强,检测灵敏度高,检测快速,前处理简单等优点,不需任何仪器设备,携带方便,检测成本低,操作简单易掌握,无需专业人员操作;试纸条储存方便,稳定性好,在室温下至少可保存六个月;检测结果准确性高,精度高。

1. 一种快速检测麻痹性贝毒的免疫胶体金试纸条,包括样本垫、胶金垫、赛多利斯 NC 膜、吸水纸和 PVC 背衬,其特征是:在 PVC 背衬上按顺序依次粘附有样本垫、胶金垫、赛多利斯 NC 膜、吸水垫,胶金垫为包被抗麻痹性贝毒单克隆抗体-胶体金标记物的胶金垫,赛多利斯 NC 膜上分别包被石房蛤毒素-蛋白偶联物构成的检测线和羊抗鼠抗体构成的质控线。

2. 根据权利要求 1 所述的一种快速检测麻痹性贝毒的免疫胶体金试纸条,其特征是:抗麻痹性贝毒单克隆抗体为用石房蛤毒素-血蓝蛋白偶联物免疫 Ba1b/c 小鼠,经细胞融合,筛选得到抗麻痹性贝毒单克隆抗体的杂交瘤细胞系分泌的。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的一种快速检测麻痹性贝毒的免疫胶体金试纸条,其特征是:样本垫、胶金垫、NC 膜、吸水垫按顺序依次粘附在 PVC 背衬上并装在试纸条卡里,上面开有加样孔和显色区。

4. 根据权利要求 1 或 2 所述的一种快速检测麻痹性贝毒的免疫胶体金试纸条,其特征是:其为检测麻痹性贝毒的试纸条。

5. 一种快速检测麻痹性贝毒的免疫胶体金试纸条的制备方法,其步骤包括:

(1) 将石房蛤毒素与载体蛋白偶联,制备得到石房蛤毒素-载体蛋白偶联物;

(2) 用石房蛤毒素-血蓝蛋白偶联物免疫 Ba1b/c 小鼠,经细胞融合,筛选得到分泌抗麻痹性贝毒单克隆抗体的杂交瘤细胞系;

(3) 制备抗麻痹性贝毒单克隆抗体;

(4) 用柠檬酸三钠与氯金酸反应制备胶体金;

(5) 将步骤 (3) 制得的抗麻痹性贝毒单克隆抗体加入步骤 (4) 制备得到的胶体金中,得到抗麻痹性贝毒单克隆抗体-胶体金标记物;

(6) 将抗麻痹性贝毒单克隆抗体-胶体金标记物喷点(包被)在胶金垫上;

(7) 将石房蛤毒素-牛血清蛋白偶联物喷点(包被)在 NC 膜上构成检测线,并将羊抗鼠抗体喷点(包被)在 NC 膜上构成质控线;

(8) 将样本垫、胶金垫、NC 膜、吸水垫按顺序依次粘附在 PVC 背衬上,并包装在试纸条卡里,上面开有加样孔和显色区,得到所述的检测麻痹性贝毒的免疫胶体金试纸条。

6. 快速检测麻痹性贝毒的免疫胶体金试纸条在检测麻痹性贝毒中的应用。

快速检测麻痹性贝毒的免疫胶体金试纸条及其制法

技术领域：

[0001] 本发明涉及检测赤潮毒素的检测器具，特别是涉及一种麻痹性贝毒 (Paralytic Shellfish Poisoning, PSP) 的快速检测试纸条，另外还涉及其制法。

背景技术：

[0002] 赤潮灾害日益严重，已成为一种全球性的海洋生态灾害。麻痹性贝毒 (Paralytic Shellfish Poisoning, PSP) 是我国近岸海域最常见的赤潮生物毒素或贝毒之一，在近岸海域贝类体内经常检出。Alexandrium tamarense 等多种藻可以产生麻痹性贝毒。麻痹性贝毒 (PSP) 是一类具有四氢嘌呤结构的化合物，呈碱性，易溶于水，在弱酸和低温条件下比较稳定，碱性条件下发生氧化。现已发现此类化合物有 20 多种，根据 R4 基团的不同可以分为四类，分别是①氨基甲酸酯类毒素 (Carbamate toxins)，包括石房蛤毒素 (Saxitoxin, STX)，新石房蛤毒素 (neosaxitoxin, neoSTX)，膝沟藻毒素 GTX1、GTX2、GTX3、GTX4；② N-磺酰胺甲酰基类毒素 (N-sulfocarbamoyl toxins)，包括 GTX5 (B1)、GTX6 (B2)、C1、C2、C3 和 C4；③脱胺甲酰基类毒素 (decarbamoyl toxins)，包括 dcSTX、dcneoSTX、dcGTX1、dcGTX2、dcGTX3、dcGTX4；④脱氧胺甲酰基类毒素 (deoxydecarbamoyl toxins)，包括 doSTX、doGTX1、doGTX2。在这些化合物中，STX、neoSTX、GTX1、GTX2、GTX3、GTX4 的毒性较大；dcSTX、dcneoSTX、dcGTX1、dcGTX2、dcGTX3、dcGTX4 毒性较小；GTX5 (B1)、GTX6 (B2)、C1、C2、C3 和 C4 毒性最小。麻痹性贝毒在全世界沿海都有分布，因赤潮生物种类及其地理分布不同，主要成分也不同，在温带海域最常见的毒素是 GTX2、GTX3 和 STX，我国南方海域麻痹性赤潮毒素组份与此相似。麻痹性贝毒可在滤食性贝类体内大量积累，贝类被人类食用后，会导致中毒，使人四肢面部肌肉麻痹、头痛恶心，甚至窒息死亡。这类毒素主要作用于神经细胞和肌肉细胞的钠离子通道，阻断钠离子内流，妨碍动作电位的形成，因此表现出神经中毒的特征。麻痹性贝毒是危害最大的海洋生物毒素，因此目前极受关注。目前国际上普遍使用的麻痹性贝毒分析方法是生物小鼠法，用盐酸在高温下提取藻类或贝体中的麻痹性毒素，然后对小鼠进行腹腔注射，根据小鼠的死亡时间判断毒性大小。小鼠法简便易行，适合于大规模、批量样品的检测，该法的缺点是不能区别毒素的种类和结构、干扰大、不精确。现在被广泛接受且较为完善的高效液相色谱衍生荧光分析方法在许多国家使用，可以准确分析确定毒素的含量和结构，检测限可低至 ng/g，缺点是样品前处理繁琐费时，仪器昂贵，对操作人员的技术要求较高，严重的阻碍了这种分析方法的普及推广，更无法实现现场检测。免疫化学方法是利用抗体对抗原的特异性结合建立的分析方法，具有灵敏度高，特异性强，仪器设备简单易操作、样品前处理相对简单等优点，适用于一定条件下的现场监测和大量样本快速筛查；目前德国、日本等公司生产的 ELISA 检测 PSP 的试剂盒，是以竞争性酶联免疫反应为检测原理，检测全过程需 2-4 小时，可一次检测多个样品，即可定性又可定量，但存在假阳性问题；由于 ELISA 是一种很敏感的技术，分析结果的变异性较大，不同分析人员的结果有差异，结果判断往往需要有经验的操作人员，容易发生误检和漏检，同时麻痹性贝毒组分化学结构较多，各异构体之间也存在一定的抗原性差异，且检测时间也比较长，实现

真正的野外现场操作有困难。

[0003] 近年来,我国每年均有在贝中检测出麻痹性贝毒的报道,而且时有中毒甚至死亡的事件发生,已严重影响了贝类出口贸易,引起了各级政府及研究领域的极大关注。建立麻痹性贝毒的快速灵敏准确的检测方法和产品,对确保海产品食用安全和维持水产养殖经济健康可持续发展具有十分重要的意义。

发明内容:

[0004] 本发明的目的是克服上述麻痹性贝毒检测技术的不足,提供一种特异、敏感和简便的快速检测麻痹性贝毒的免疫胶体金试纸条;研制灵敏的抗麻痹性贝毒抗体,用胶体金标记抗体,通过竞争免疫反应,快速检测贝类中的麻痹性贝毒;简单易操作,快速,不需任何其他仪器设备,非专业人员可现场使用,产品性能稳定。

[0005] 本发明为实现上述目的所采用的技术方案是:一种快速检测麻痹性贝毒的免疫胶体金试纸条,包括样本垫、胶金垫、赛多利斯 NC 膜、吸水垫和 PVC 背衬;其具体结构是在 PVC 背衬上按顺序依次粘附有样本垫、胶金垫、赛多利斯 NC 膜、吸水垫,胶金垫上包被有胶体金标记的抗麻痹性贝毒单克隆抗体,赛多利斯 NC 膜上分别包被有石房蛤毒素 STX 与蛋白偶联物构成的检测线和羊抗鼠抗体(多抗或单抗)构成的质控线。

[0006] 所述抗麻痹性贝毒单克隆抗体为用石房蛤毒素-血蓝蛋白偶联物免疫 Balb/C 小鼠,经细胞融合,筛选得到抗麻痹性贝毒单克隆抗体的杂交瘤细胞系分泌的。

[0007] 所述样本垫、胶金垫、NC 膜、吸水垫按顺序依次粘附在 PVC 背衬上并装在试纸条卡里,上面开有加样孔和显色区。

[0008] 所述试纸条为检测麻痹性贝毒主要成分 STX、dcSTX、GTX5、GTX2/3、dcGTX2/3、C1/C2 的试纸条。

[0009] 所述快速检测麻痹性贝毒的免疫胶体金试纸条的制法,其步骤包括:

[0010] 1、将石房蛤毒素 STX 与载体蛋白偶联,制备得到 STX-载体蛋白偶联物;

[0011] 2、用 STX-血蓝蛋白偶联物免疫 Balb/C 小鼠,经细胞融合,筛选得到分泌抗麻痹性贝毒单克隆抗体的杂交瘤细胞系;

[0012] 3、制备抗麻痹性贝毒单克隆抗体;

[0013] 4、用柠檬酸三钠与氯金酸反应制备胶体金;

[0014] 5、将步骤 3 制得的抗麻痹性贝毒单克隆抗体加入步骤 4 制备得到的胶体金中,得到抗麻痹性贝毒单克隆抗体-胶体金标记物;

[0015] 6、将抗麻痹性贝毒单克隆抗体-胶体金标记物喷点(包被)在胶金垫上;

[0016] 7、将 STX-牛血清蛋白偶联物喷点(包被)在 NC 膜上构成检测线,并将羊抗鼠多抗(或单抗)喷点(包被)在 NC 膜上构成质控线。

[0017] 8、将样本垫、胶金垫、NC 膜、吸水垫按顺序依次粘附在 PVC 背衬上,并包装在试纸条卡里,上面开有加样孔和显色区,得到检测麻痹性贝毒的免疫胶体金试纸条。

[0018] 所述快速检测麻痹性贝毒的免疫胶体金试纸条在检测麻痹性贝毒中的应用。

[0019] 本发明借助胶体金标记显色的免疫层析反应,用以制备快速检测麻痹性贝毒 9 种主要成分的免疫胶体金试纸条,结构更加合理,应用胶体金标记抗麻痹性贝毒单克隆抗体,选用石房蛤毒素 STX-载体蛋白偶联物作为检测线,建立竞争免疫层析快速检测待测样品

中是否含有麻痹性贝毒。通过待检样品中的麻痹性贝毒与包被于 NC 膜上的 STX- 载体蛋白偶联物共同竞争抗麻痹性贝毒单克隆抗体 - 胶体金标记物, 在检测线处出现深浅不同的红色条带或不出现条带, 质控线处出现红色条带。若待测样品试纸条检测线无色, 同时质控线上出现红色条带则判断为阳性样品, 即待测样品中麻痹性贝毒的浓度高于 110ng/mL; 若待测样品试纸条检测线有红色出现, 同时质控线上出现红色条带则判断为阴性样品, 即待测样品中麻痹性贝毒的浓度小于 110ng/mL; 如果质控线上没有出现红色条带, 则该试纸条失效。

[0020] 与现有技术相比, 本发明具有以下突出优点:

[0021] 1、本发明的检测麻痹性贝毒的免疫胶体金试纸条, 具有特异性强, 检测灵敏度高 (可达 110ng/mL), 检测快速 (只需 15min), 前处理简单等优点;

[0022] 2、本发明的试纸条不需任何仪器设备, 携带方便, 检测成本低;

[0023] 3、本发明的试纸条操作简单易掌握, 无需专业人员操作;

[0024] 4、本发明的试纸条储存方便, 稳定性好, 在室温下至少可保存六个月;

[0025] 5、本发明的试纸条检测结果准确性高, 精度高。

附图说明:

[0026] 图 1 为本发明检测试纸条结构示意图

[0027] 图中 1 为样品垫, 2 为胶金垫, 3 为赛多利斯 NC 膜, 4 为吸水垫, 5 为 PVC 背衬, 6 为检测线, 7 为质控线, 8 为试纸条卡, 9 为加样孔, 10 为显色区

[0028] 图 2 为本发明的检测试纸条结果判定示意图

[0029] 图中 A 为阴性标准品结果, B 为阴性样品结果, C、D 为阳性样品结果, E、F 为试纸条失效

具体实施方式:

[0030] 实施例 1 (制备实施例)

[0031] 检测麻痹性贝毒的免疫胶体金试纸条制备方法

[0032] 1、石房蛤毒素 - 载体蛋白偶联物的制备

[0033] 将石房蛤毒素 (STX) 溶于 0.002M 的乙酸钠缓冲液中, 加入溶于磷酸盐缓冲液 (pH7.0) 的血蓝蛋白 (KLH) 或牛血清蛋白 (BSA) 及少量甲醛, 25°C 反应 72 小时, 再 4°C 过夜。将反应混合物透析 3d, 4°C, 每 12h 换液 1 次。制备得到 STX-KLH 和 STX-BSA 偶联物备用。

[0034] 2、抗麻痹性贝毒单克隆抗体的制备

[0035] 利用制备的石房蛤毒素 - 血蓝蛋白偶联物 (STX-KLH) 作为免疫原, 免疫 6 ~ 8 周龄的雌性 BALB/c 小鼠。首次免疫用 150 μ g STX-KLH 与等体积完全弗氏佐剂, 充分乳化后, 腹腔注射小鼠, 第 3、5、7、9、11 周取同量 STX-KLH 与等体积不完全弗氏佐剂充分乳化, 腹腔注射。取尾血测定小鼠血清效价, 待效价大于要求值后, 用同量 STX-KLH 的 PBS 溶液腹腔注射进行加强免疫, 三天后取脾细胞融合。

[0036] 取生长状态良好的骨髓瘤 SP2/0 细胞与免疫的小鼠脾细胞按 1 : 8 的比例混合, 加入 PEG 进行细胞融合。融合后接种于 96 孔细胞培养板中, 在 15% 血清的 HAT 培养基中选择培养, 7-10 天后换 HT 培养液, 取细胞培养液上清 ELISA 检测。选取阳性细胞孔, 用有

限稀释法克隆,筛选可稳定分泌抗麻痹性贝毒 (PSP) 单克隆抗体的杂交瘤细胞株。取 8 周龄健康 BALB/c 雌性小鼠或杂交一代鼠,腹腔注射液体石蜡 0.5mL/ 每只,待用。1500r/min 离心收集对数生长期的阳性杂交瘤细胞,悬浮于生理盐水中,浓度为 10^6 /mL。在石蜡油处理的小鼠腹腔内注射 0.5mL 杂交瘤细胞悬液诱生腹水,收集腹水,3000r/min 离心 10min,收集上清液即为含单克隆抗体腹水。腹水用辛酸硫酸氨方法得到粗制抗体蛋白,再用 0.01M 的 PBS 缓冲液 (pH7.4) 透析 3 天。取出用紫外分光光度计测得蛋白浓度为 2.7mg/mL。

[0037] 3、抗麻痹性贝毒单克隆抗体 - 胶体金标记物的制备及包被胶金垫

[0038] 用柠檬酸三钠与氯金酸反应制备胶体金;取 40nm 的胶体金于干净的烧杯中,用 1M 的 K_2CO_3 调节其 pH 值为 8.2,加入抗麻痹性贝毒单克隆抗体,使其在胶体金中终浓度为 $13 \mu g/mL$,搅拌 1h,加入胶体金 1/10 体积的 10% BSA 溶液,搅拌 30min,5000rpm 离心 30min,取沉淀,用 0.01M 的 PBS 缓冲液复溶,用喷点仪包被到经预处理的胶金垫上。真空干燥备用。

[0039] 4、偶联抗原包被 NC 膜

[0040] 石房蛤毒素 - 牛血清蛋白偶联抗原用 0.01M 的 PBS 缓冲液稀释 4 倍,包被到经预处理的 NC 膜上。37°C 干燥 1 小时备用。并将羊抗鼠多抗 (或单抗) 包被在 NC 膜上构成质控线。

[0041] 5、试纸条的组装

[0042] 将处理好的样本垫、包被有抗麻痹性贝毒单克隆抗体 - 胶体金标记物的胶金垫、包被有石房蛤毒素 - 牛血清蛋白偶联抗原作为检测线和包被有羊抗鼠抗体作为质控线的 NC 膜、吸水垫按顺序依次粘附在 PVC 背衬上,安装在试纸条卡里,上面开有加样孔和显色区。阳性 110ng/mL 完全抑制,无条带出现;加样量为 $80 \mu l$ / 孔;判断时间为 15min;最低检测限为小于 110ng/mL。真空封装,常温保存,有效期至少 6 个月。

[0043] 实施例 2 (应用实施例)

[0044] 检测麻痹性贝毒的免疫胶体金试纸条使用方法

[0045] 1、贝类等样品的预处理

[0046] 称取贝类匀浆 3g,加 3ml (稀 HCL 稀, pH = 4),搅匀,煮沸 5min,3000r/min 离心 10min,取上清液进行分析。

[0047] 2、检测

[0048] 上述的贝类萃取液,用微量移液枪取 $80 \mu L$ 于加样孔中,放置 15min 观察显色情况。同时分别取 $80 \mu l$ 0.01M PBS 和 $80 \mu L$ 110ng/mL 的石房蛤毒素 STX 标准溶液于另两个试纸条的加样孔中,做阴性空白和阳性标准品对照实验。

[0049] 3、结果判定

[0050] 如图 2 所示,若待测样品试纸条检测线颜色比阴性空白试纸条检测线颜色浅,同时质控线上出现红色条带,则判断为阳性样品,即样品中麻痹性贝毒的浓度小于 110ng/mL;若待测样品试纸条检测线无颜色,同时质控线上出现红色条带,则判断为阳性样品,即样品中麻痹性贝毒的浓度大于或等于 110ng/mL;若待测样品试纸条检测线颜色与阴性空白试纸条检测线颜色一致,同时质控线上出现红色条带,则判断为阴性样品,即样品中不含麻痹性贝毒;若质控线上无颜色,则该试纸条失效。

[0051] 实施例 3 (应用实施例)

[0052] 检测麻痹性贝毒的免疫胶体金试纸条的应用

[0053] 样品中的麻痹性贝毒模拟检测实验

[0054] 分别向贝肉中添加麻痹性贝毒石房蛤毒素标准品,按实施例 2 制成 0ng/ml、200ng/ml 和 110ng/ml 的样品待测液,以及 3 个阴性样品和 12 个阳性样品(小白鼠生物法),并按实施例 2 所述方法,用本发明试纸条对 0ng/ml、200ng/ml 和 110ng/ml 的样品检测,重复实验 3 次,结果显示 0ng/ml 样品的试纸条检测线与阴性空白检测线颜色一致,同时质控线出现红色条带,判断为阴性样品;而 200ng/ml 和 110ng/ml 的样品的试纸条检测线无颜色或颜色极浅(大于 30min),同时质控线出现红色条带,判断为阳性样品。对于生物小鼠法检测的 3 个阴性样品和 12 个阳性样品,按实施例 2 分析,结果与小鼠法结果一致。说明本发明试纸条可以用来检测贝类样品。

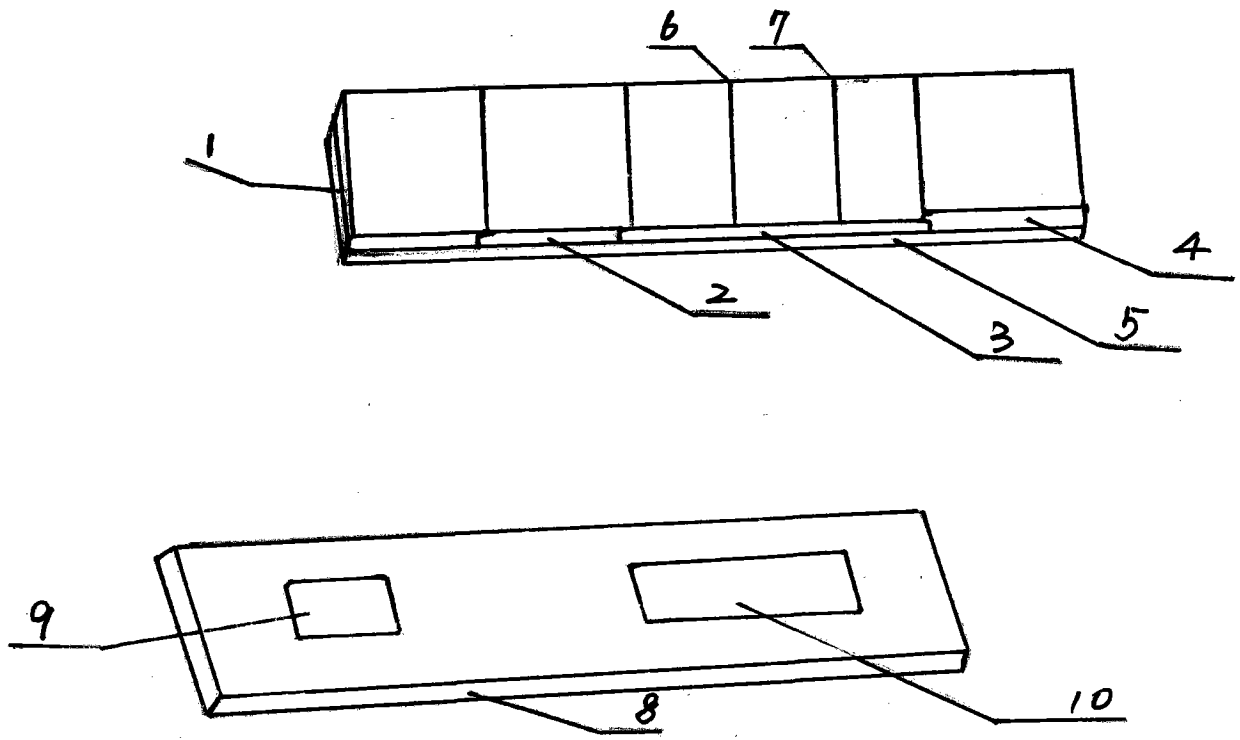


图 1

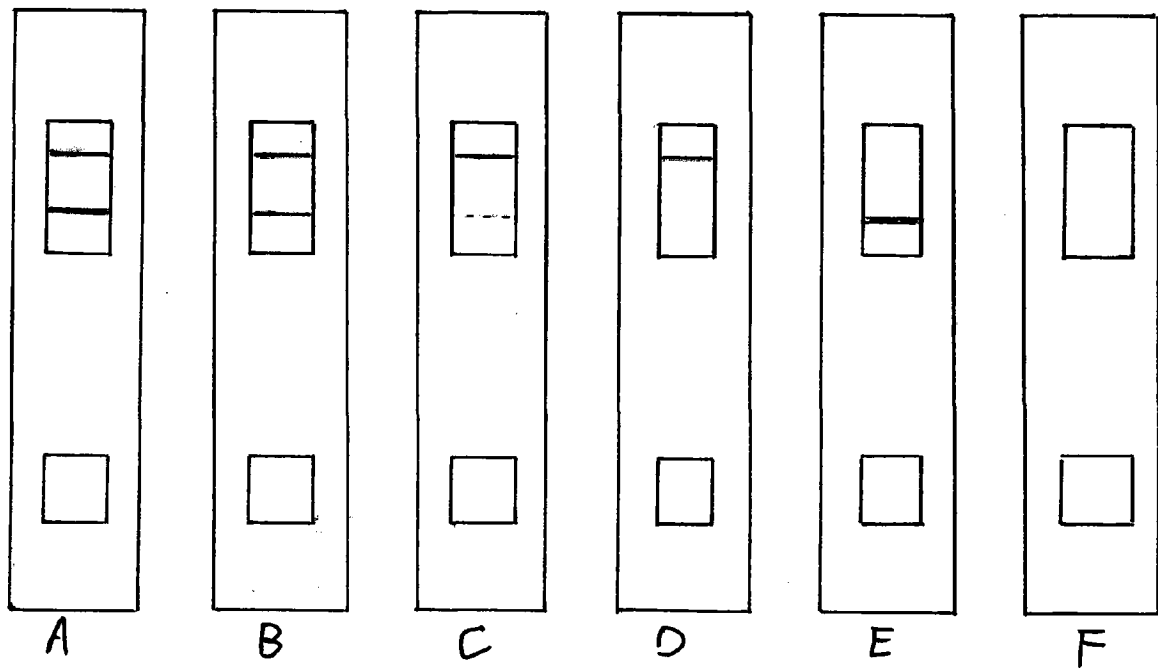


图 2

专利名称(译)	快速检测麻痹性贝毒的免疫胶体金试纸条及其制法		
公开(公告)号	CN102346189A	公开(公告)日	2012-02-08
申请号	CN201010245717.4	申请日	2010-08-01
申请(专利权)人(译)	国家海洋环境监测中心		
[标]发明人	刘仁沿 梁玉波 刘磊 许道艳		
发明人	刘仁沿 梁玉波 刘磊 许道艳		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及检测赤潮毒素的检测器具。一种快速检测麻痹性贝毒的免疫胶体金试纸条，包括样本垫、胶金垫、赛多利斯NC膜、吸水垫和PVC背衬；其具体结构是在PVC背衬上按顺序依次粘附有样本垫、胶金垫、赛多利斯NC膜、吸水垫，胶金垫上包被有胶体金标记的抗麻痹性贝毒单克隆抗体，赛多利斯NC膜上分别包被有石房蛤毒素与牛血清蛋白偶联物构成的检测线和羊抗鼠抗体构成的质控线。本发明试纸条具有特异性强，检测灵敏度高，检测快速，前处理简单等优点，不需任何仪器设备，携带方便，检测成本低，操作简单易掌握，无需专业人员操作；试纸条储存方便，稳定性好，在室温下至少可保存六个月；检测结果准确性高，精度高。

