

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/547

G01N 33/535 G01N 33/52

G01N 21/64



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410052856. X

[43] 公开日 2005 年 3 月 2 日

[11] 公开号 CN 1588073A

[22] 申请日 2004. 7. 15

[21] 申请号 200410052856. X

[71] 申请人 上海交通大学

地址 200240 上海市闵行区东川路 800 号

[72] 发明人 李荣秀 于志刚 亓海刚 辛泽毓
米铁柱

[74] 专利代理机构 上海交达专利事务所

代理人 王锡麟 王桂忠

权利要求书 2 页 说明书 7 页

[54] 发明名称 定量检测赤潮异弯藻的间接酶联免疫吸附试验方法

[57] 摘要

一种定量检测赤潮异弯藻的间接酶联免疫吸附试验方法，用于海洋生物技术领域。本发明以识别赤潮异弯藻的抗体为基础，首先以赤潮异弯藻标准样品和待检样品包被酶标板，37℃ 孵育后用脱脂奶粉溶液封闭，洗板后加入特异性抗赤潮异弯藻抗血清稀释溶液，37℃ 孵育后洗板，加入酶标二抗溶液，37℃ 孵育，洗板后加入酶反应底物，孵育后加入终止反应液终止反应；然后用酶标仪测定板上各孔的吸光值，经过数据转换后，得出赤潮异弯藻检测的标准曲线，其线形范围经过计算得出线性方程，对待测样品中的赤潮异弯藻进行定量。本发明可快速、简便的定量检测赤潮异弯藻，克服了赤潮异弯藻常规检测中的缺点。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种定量检测赤潮异弯藻的间接酶联免疫吸附试验方法，其特征在于，以识别赤潮异弯藻的抗体为基础，首先以赤潮异弯藻标准样品和待检样品包被酶标板，37℃孵育后用脱脂奶粉溶液封闭，洗板后加入特异性抗赤潮异弯藻抗血清稀释溶液，37℃孵育后洗板，加入酶标二抗溶液，37℃孵育，洗板后加入酶反应底物，孵育后加入终止反应液终止反应；然后用酶标仪测定板上各孔的吸光值，经过数据转换后，得出赤潮异弯藻检测的标准曲线，其线形范围经过计算得出线性方程，对待测样品中的赤潮异弯藻进行定量。

2. 根据权利要求1所述的定量检测赤潮异弯藻的间接酶联免疫吸附试验方法，其特征是，以下通过步骤作进一步的限定：

(1) 以赤潮异弯藻标准样品和待检样品包被酶标板，每孔100微升，37℃20-40分钟后用10%脱脂奶粉溶液封闭，37℃20-40分钟后洗板，加入特异性抗赤潮异弯藻抗血清稀释溶液，37℃孵育10-20分钟后洗板，加入酶标二抗溶液，37℃孵育10-20分钟，洗板后加入酶反应底物，孵育10-15分钟后加入终止反应液终止反应；

(2) 用酶标仪测定板上各孔的吸光值，然后计算出相应的吸光率%，计算公式为 $A/A_0 \times 100\%$ ， A_0 为饱和吸光值，取值3.5，A为各孔的吸光值，接着计算出各孔吸光率的Logit值，以之为纵坐标，以标准样品梯度稀释液中藻细胞密度的常用对数值为横坐标，绘制出赤潮异弯藻定量检测的标准曲线，找出其线性范围并计算出吸光率的Logit值和对应的藻细胞密度的常用对数值的直线相关方程，线性相关系数必须在0.99以上，根据得到的线性方程，代入待测样品孔吸光率的Logit值，即求出对应的藻细胞密度的常用对数值，经过指数运算完成对待测样品中赤潮异弯藻的定量。

3. 根据权利要求1所述的定量检测赤潮异弯藻的间接酶联免疫吸附试验方法，其特征是，所述的识别赤潮异弯藻的抗体，它能特异性地识别赤潮异弯藻，经由赤潮异弯藻细胞、细胞裂解物或细胞分离组分免疫实验动物获得。

4. 根据权利要求1所述的定量检测赤潮异弯藻的间接酶联免疫吸附试验方法，其特征是，所述的以赤潮异弯藻标准样品包被酶标板，是指：以经过精确光镜计数的含有赤潮异弯藻细胞的梯度稀释溶液包被酶标板。

5、根据权利要求1所述的定量检测赤潮异弯藻的间接酶联免疫吸附试验方法，其特征是，所述的以赤潮异弯藻待检样品包被酶标板，是指：以待检天然海水样品或者天然海水样品浓缩溶液包被酶标板。

定量检测赤潮异弯藻的间接酶联免疫吸附试验方法

技术领域

本发明涉及一种定量检测赤潮异弯藻的方法，具体是一种定量检测赤潮异弯藻的间接酶联免疫吸附试验方法。用于海洋生物技术领域。

背景技术

赤潮异弯藻(*Heterosigma akashiwo*)是一种广泛分布于世界近岸海域的常见的有害藻类，也是我国近海常见的赤潮生物，曾经有多次引发赤潮的报道，给海洋渔业和人类健康带来巨大威胁。因此，及时、准确、快速地检测赤潮异弯藻，随时了解其在海洋中的动态变化具有重要意义。在分类学上，赤潮异弯藻属于黄藻门异弯藻属。传统的鉴别方法，即从形态学上区分赤潮异弯藻，主要是利用光学显微镜直接观察和计数，操作时存在一定困难，且过程烦琐、费时、费力，当样品量多时工作量极大，因此主要用于藻的定性和分离，而不适用于藻的定量研究。因此，发展用于快速检测赤潮异弯藻的新方法和新技术极具现实意义。但是，目前国内国际关于这方面的研究进展不大，尚未形成非常有效的对该藻进行定性和定量测定的成熟技术。基于抗体技术的间接性酶联免疫吸附试验方法具有特异、灵敏、高效、易操作、费用低廉等优点，且能同时分析大量的样本，是一种对目标抗原进行定性定量分析的有效手段。目前，间接酶联免疫吸附试验方法主要在医学检测和微生物学检测研究中应用，用于对整个藻细胞进行检测的报道则较少。另外，虽然藻细胞抗体的制备过程简单，但不易获得高特异性的抗体。

经对现有技术的检索发现，辛泽毓等在《高技术通讯》(2003.3，第13卷，74-79页)上发表的“两种角毛藻酶联免疫检测法的建立和应用”，该文介绍了制备了鼠抗旋链角毛藻和柔弱角毛藻多克隆抗体，结果发现两种抗体与三种角毛藻属海藻有很强的交叉反应，而与其他属海藻交叉反应很小或没有。应用这两种抗体分别建立了旋链和柔弱角毛藻的竞争型酶联免疫吸附试验检测方法，检测极限分别达到146个和521个藻细胞。该竞争酶联免疫吸附试验具有较高的检测灵敏度，但是该检测方法需要预先用较多的藻细胞裂解溶液包被酶标板，因此需要进行藻细胞的大

量连续培养，增加了检测过程的工作量。此外，没有获得具有种间高特异性的抗体使得检测的实际应用价值大大降低。

发明内容

本发明的目的在于针对现有技术中存在的不足和缺陷，提供一种借助高特异性多克隆抗体定量检测赤潮异弯藻的间接酶联免疫吸附试验方法，使其快速、简便定量，而且客观、准确地对该藻进行检测。

本发明是通过以下技术方案实现的，本发明提供的检测方法，即间接酶联免疫吸附试验法，以专一性地识别赤潮异弯藻的抗体作为基础，首先以赤潮异弯藻标准样品和待检样品包被酶标板，37℃孵育后用脱脂奶粉溶液封闭，洗板后加入特异性抗赤潮异弯藻抗血清稀释溶液，37℃孵育后洗板，加入酶标二抗溶液，37℃孵育，洗板后加入酶反应底物，孵育后加入终止反应液终止反应；然后用酶标仪测定板上各孔的吸光值，经过数据转换后，得出赤潮异弯藻定量检测的标准曲线，其线性范围经过计算得出直线方程，根据得到的方程对待测样品中的赤潮异弯藻进行定量。

以下通过步骤对本发明作进一步的具体限定：

(1)以赤潮异弯藻标准样品和待检样品包被酶标板，每孔100微升，37℃20-40分钟后用10%脱脂奶粉溶液封闭，37℃20-40分钟后洗板，加入特异性抗赤潮异弯藻抗血清稀释溶液，37℃孵育10-20分钟后洗板，加入酶标二抗溶液，37℃孵育10-20分钟，洗板后加入酶反应底物，孵育10-15分钟后加入终止反应液终止反应。

(2)用酶标仪测定板上各孔的吸光值，然后计算出相应的吸光率%，计算公式为 $A/A_0 \times 100\%$ ， A_0 为饱和吸光值，取值3.5，A为各孔的吸光值，接着计算出各孔吸光率的Logit值，以之为纵坐标，以标准样品梯度稀释液中藻细胞密度的常用对数值为横坐标，绘制出赤潮异弯藻定量检测的标准曲线，找出其线性范围并计算出吸光率的Logit值和对应的藻细胞密度的常用对数值的直线相关方程，线性相关系数必须在0.99以上，根据得到的线性方程，代入待测样品孔吸光率的Logit值，即求出对应的藻细胞密度的常用对数值，经过指数运算完成对待测样品中赤潮异弯藻的定量。

本发明的原理是特异性的抗体可以专一地识别特定的抗原决定簇，因而可对抗原进行定性和定量检测，在37℃孵育的条件下，标准样品和待检样品中的藻细胞会被高吸附力的酶标板所吸附，多余的蛋白吸附位点通过封闭过程去除，加入高亲和

力的特异性抗血清稀释溶液之后，酶标板上的藻细胞会和溶液中的抗体结合，通过检测酶标板上结合的抗体量即可算出相应的待检样本中的藻细胞含量，因此可准确地对未知样品进行定量测定。

本发明所述的抗体，它可以经由赤潮异弯藻免疫实验动物而获得，这些实验动物通常包括（但不局限于）兔、鼠、猪、狗、牛、羊、马等。特异性的抗体可以直接使用，另一方面抗体的特异性可以经由一些常规的手段，如本领域内技术人员熟知的抗体封闭技术等，得到提高，另外，抗体本身也可以用放射性同位素、生物素、酶、荧光素或其他化学发光物质进行标记而进行使用。

本发明所述的抗赤潮异弯藻抗体具有较好的种特异性。利用间接酶联免疫吸附试验测定所述的抗体与其它藻之间的交叉反应，结果表明它只能识别赤潮异弯藻而不识别其它藻，故可用于赤潮异弯藻的定性鉴别。

所述的以赤潮异弯藻标准样品包被酶标板，是指：以经过精确光镜计数的含有赤潮异弯藻细胞的梯度稀释溶液包被酶标板。所述的以赤潮异弯藻待检样品包被酶标板，是指：以待检天然海水样品或者天然海水样品浓缩溶液包被酶标板。

这种方法不仅克服了赤潮异弯藻常规检测中的缺点，而且分析所需的样品量少，检出极限低，灵敏度高。

由于本发明提供了快速、简便定量检测该藻的方法，使监测某海区或养殖场内海水中赤潮异弯藻的动态变化成为可能。通过监测到的动态数据，可以掌握海水中该种藻的数量，并及时做出调整以减少经济损失；同时，将这些动态数据与其他数据（诸如营养盐、其他物种的数量、水文气象资料等）结合，可为科学研究海洋生态中各因素之间的相互影响关系提供一些有益帮助。

具体实施方式

以下结合实施例对本发明方法作进一步的理解：

实施例 1. 用于检测赤潮异弯藻的抗体的制备

本发明所用的赤潮异弯藻藻种由中国海洋大学生命科学与技术学部提供。通过反复在显微镜下挑取单个藻细胞获得纯培养物。所用的培养基是常规的 f/2 培养基，培养条件为：光照/黑暗周期为 14h/10h，光照强度为 3000 Lx，培养温度为 18℃-22℃。

处于对数生长期的赤潮异弯藻培养液，用甲醛固定（终浓度 0.5-1%）后，

10000r/min 离心 10min 收集藻细胞,再用蒸馏水清洗一遍,磷酸缓冲盐溶液清洗两遍,每步均通过离心收集藻细胞,离心条件均为 10000r/min, 10min。将藻细胞转入 1.5ml 离心管,甩去残余水分, -20°C 保存备用。临用前取出,每管用 0.6ml 灭菌的磷酸缓冲盐溶液重悬浮,混匀,与等体积的福氏完全佐剂(Sigma 公司)混合乳化,乳化程度尽量完全,乳化物用于免疫家兔,选择皮下注射和肌肉注射方式,剂量为 10^7 个细胞/兔。间隔两周后加强免疫,除佐剂换为福氏不完全佐剂外,其它步骤不变,之后每隔两周加强免疫一次。从第 3 次加强免疫后一周,兔耳静脉取血,分离血清,用常规酶联免疫吸附试验检测血清效价,当血清效价到达较高水平时,不再免疫,采集家兔全血清,检验后分装保存于 -20°C 。最后获得的抗赤潮异弯藻抗血清效价为 1:22000。

实施例 2. 抗赤潮异弯藻抗血清特异性的鉴定

本实施例选用了我国近海常见的几株浮游植物作为参照藻,它们是:旋链角毛藻(*Chaetoceros curvisetus*)、柔弱角毛藻(*Chaetoceros debilis*)、纤细角毛藻(*Chaetoceros gracilis*)、微型角毛藻(*Chaetoceros minutissimus*)、中肋骨条藻(*Skeletonema costatum*)、诺氏海链藻(*Thalassiosira nordenskioldi*)、膜质舟形藻(*Navicula membranacea*)、尖刺伪菱形藻(*Pseudo-nitzschia pungens*)、新月菱形藻(*Nitzschia closterium*)、米氏裸甲藻(*Gymnodinium mikimotoi*)、裸甲藻(*Gymnodinium sp.*)、红色裸甲藻(*Gymnodinium sanguineum*)、塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarens*)、微型原甲藻(*Prorocentrum minimum*)、海洋原甲藻(*Prorocentrum micans*)、东海原甲藻(*Prorocentrum donghaiense*)。它们均分离自天然海水,通过反复在显微镜下挑取单个藻细胞获得纯培养物。按实施例 1 所述的方法培养和收集这些藻。

按权利要求所述的间接酶联免疫吸附试验步骤进行抗赤潮异弯藻抗血清的特异性鉴定。所有藻用 1ml 磷酸缓冲盐溶液重悬浮,显微镜计数后,取相同细胞量(2.0×10^4)悬浮于磷酸缓冲盐溶液(终体积 1ml),用不含藻细胞的磷酸缓冲盐溶液溶液作为阴性对照,数据结果列于表 1。从表中可以看出,赤潮异弯藻吸光值/阴性对照吸光值(P/N) >2.1 ,其他海藻的 P/N 值都在 1.5 以下,说明抗赤潮异弯藻抗血清有很高的特异性,可以专一地识别赤潮异弯藻,因此可用于赤潮异弯藻的定性检测。

因此,对于某待检样品,以本实施例所述的步骤进行间接酶联免疫吸附试验反

应，如果 P/N 值大于 2.1，即可判定该样品中有赤潮异弯藻的存在；如果该样品为纯培养物，则可判定该纯培养物为赤潮异弯藻。这种定性测定方法的优点是，由于使用的是赤潮异弯藻的专一性抗血清，因此能非常准确地检测样品中是否存在赤潮异弯藻。

实施例 3. 对赤潮异弯藻的定量测定

1. 按实施例 1 所述的方法培养和收集赤潮异弯藻。

2. 以含有 0、38、192、960、4800、24000、120000、600000 个细胞/毫升的赤潮异弯藻细胞标准溶液和待检测样品溶液包被酶标板，每孔 100 微升，37℃温育 20 分钟后用 10%脱脂奶粉溶液封闭，37℃温育 20 分钟后洗板，加入抗赤潮异弯藻血清稀释液(1:15000)，37℃孵育 15 分钟后洗板，加入酶标二抗溶液(羊抗兔 IgG-辣根过氧化物酶，稀释 12000 倍)，37℃孵育 15 分钟，洗板后加入酶反应底物 TMB 基质液，孵育 10 分钟后加入 2 mol/L 硫酸终止反应，读取板上各孔 450nm 处的吸光值。

3. 标准曲线：以赤潮异弯藻标准样品溶液中藻细胞数目的常用对数值为横坐标，以标准样品的吸光率(%)，即标准样品孔吸光值 $A/A_0 \times 100$ ，为纵坐标，作标准曲线。以赤潮异弯藻标准样品溶液中藻细胞密度的常用对数值为横坐标，以吸光率的 Logit 值，即 $\ln[A/(A_0-A)]$ ，为纵坐标，建立标准曲线线性检测范围的直线方程。其线性方程为 $\ln[A/(A_0-A)] = 0.7927 \times \log \text{藻细胞密度} - 5.1664$ ，相关系数为 $R = 0.9954$ ，线性检测范围在 192~480000 个细胞/毫升之间。

4. 定量计算和分析：

根据待测样品的吸光值，首先计算出各自的吸光率，接着计算出吸光率的 Logit 值，代入标准曲线的线性方程，求出相应的 log 藻细胞密度值，即可方便地计算出待测样品中赤潮异弯藻细胞的密度，对应的原始水样中赤潮异弯藻的密度也可经过简单计算得出结果。

实施例 4. 应用本法对海水样品的实际定量

根据实施例 3 所述的方法，对 5 份海水样品进行了赤潮异弯藻细胞的定量检测。对这 5 份海水样品，分别用间接酶联免疫吸附试验法和显微计数法检测后，结果列于表 2。经比较分析，发现间接酶联免疫吸附试验法和显微计数法检测的结果基本吻合。

表1 各海藻与抗赤潮异弯藻抗血清的交叉反应检测

海藻名称	吸光值	P/N 值
赤潮异弯藻	0.403	4.7
旋链角毛藻	0.103	1.2
柔弱角毛藻	0.121	1.4
纤细角毛藻	0.117	1.4
微型角毛藻	0.108	1.3
中肋骨条藻	0.114	1.3
诺氏海链藻	0.129	1.5
膜质舟形藻	0.131	1.5
尖刺伪菱形藻	0.092	1.1
新月菱形藻	0.058	0.7
米氏裸甲藻	0.131	1.5
裸甲藻	0.097	1.1
红色裸甲藻	0.104	1.2
塔玛亚历山大藻	0.094	1.1
微型原甲藻	0.115	1.4
海洋原甲藻	0.074	0.9
东海原甲藻	0.113	1.3
阴性对照	0.085	1.0

表2 海水样品中赤潮异弯藻密度的检测结果。表中样品为赤潮异弯藻的纯种培养物加天然海水稀释而成。密度（个细胞/毫升）的测定结果均为6份平行样品测定结果的平均值±标准差。

样品编号	间接酶联免疫吸附试验测定结果	显微计数结果
1	$(6.4 \pm 1.1) \times 10^2$	$(7.5 \pm 0.4) \times 10^2$
2	$(2.0 \pm 0.2) \times 10^3$	$(2.6 \pm 0.4) \times 10^3$

3	$(6.1 \pm 0.6) \times 10^3$	$(6.6 \pm 0.2) \times 10^3$
4	$(1.7 \pm 0.2) \times 10^4$	$(1.5 \pm 0.3) \times 10^4$
5	$(4.9 \pm 0.5) \times 10^5$	$(5.3 \pm 0.1) \times 10^5$

本发明成功地制备了抗赤潮异弯藻的抗体，并建立了间接酶联免疫吸附试验检测方法，应用该方法可定性定量地检测赤潮异弯藻。发明人在世界上首次运用高特异性多克隆抗体对赤潮异弯藻细胞进行间接酶联免疫吸附试验定性定量检测，并取得了较好的结果。本方法的优点：能同时进行定量和定性检测，通过该方法既可知待检样品中是否有赤潮异弯藻存在，还可同时知道该藻的数目有多少。本方法的另一个明显的优点是快速，整个过程在数个小时之内可以完成，同时检测结果比较准确。

专利名称(译)	定量检测赤潮异弯藻的间接酶联免疫吸附试验方法		
公开(公告)号	CN1588073A	公开(公告)日	2005-03-02
申请号	CN200410052856.X	申请日	2004-07-15
[标]申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
当前申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
[标]发明人	李荣秀 于志刚 亓海刚 辛泽毓 米铁柱		
发明人	李荣秀 于志刚 亓海刚 辛泽毓 米铁柱		
IPC分类号	G01N21/64 G01N33/52 G01N33/535 G01N33/547		
代理人(译)	王锡麟 王桂忠		
其他公开文献	CN1256589C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种定量检测赤潮异弯藻的间接酶联免疫吸附试验方法，用于海洋生物技术领域。本发明以识别赤潮异弯藻的抗体为基础，首先以赤潮异弯藻标准样品和待检样品包被酶标板，37°C孵育后用脱脂奶粉溶液封闭，洗板后加入特异性抗赤潮异弯藻抗血清稀释溶液，37°C孵育后洗板，加入酶标二抗溶液，37°C孵育，洗板后加入酶反应底物，孵育后加入终止反应液终止反应；然后用酶标仪测定板上各孔的吸光值，经过数据转换后，得出赤潮异弯藻检测的标准曲线，其线形范围经过计算得出线性方程，对待测样品中的赤潮异弯藻进行定量。本发明可快速、简便的定量检测赤潮异弯藻，克服了赤潮异弯藻常规检测中的缺点。