



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101963614 A

(43) 申请公布日 2011. 02. 02

(21) 申请号 201010277323. 7

(22) 申请日 2010. 09. 03

(71) 申请人 青岛科技大学

地址 266042 山东省青岛市四方区郑州路
53 号

(72) 发明人 李雪梅 葛安青 李晓琳 张召香
梅振华 张书圣

(51) Int. Cl.

G01N 33/543 (2006. 01)

G01N 27/447 (2006. 01)

G01N 33/535 (2006. 01)

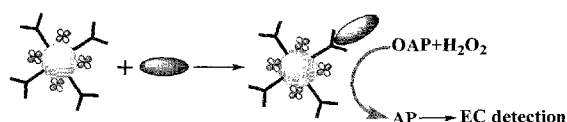
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 2 页

(54) 发明名称

毛细管电泳电化学酶联免疫分析检测雪卡毒素的方法

(57) 摘要

本发明描述了一种测定贝类样品中遗忘性贝类毒素的新型毛细管电泳电化学酶联免疫方法。制备了胶体金 HRP 酶标雪卡毒素抗体探针, 采用非竞争模式, 样品溶液与胶体金酶标雪卡毒素抗体反应, 胶体金酶标抗体过量。胶体金酶标抗体-抗原结合物和剩余胶体金酶标抗体探针根据迁移速率不同在分离毛细管中分成不同的区带, 并顺次进入反应毛细管中, 经毛细管电泳分离后, 分别在反应毛细管中催化缓冲液中的过氧化氢底物邻氨基酚, 生成具有电化学活性的物质 3-氨基吩噻嗪, 进入电化学检测池进行检测。雪卡毒素标准品溶液检测的线性范围为 1. 0-50. 0pg/mL, 检测限为 0. 3pg/mL。



1. 毛细管电泳电化学酶联免疫分析检测雪卡毒素的方法,其特征在于:

以生物酶作为标记物,将酶催化反应、免疫技术和电化学检测相结合,利用毛细管电泳分离技术检测邻氨基酚-H₂O₂-辣根过氧化物酶(HRP)体系中的 HRP 含量,从而间接检测贝类样品中的雪卡毒素。

2. 按照权利要求 1 所述检测雪卡毒素的方法,其特征在于胶体金酶标抗体探针的制备:利用胶体金作为固相载体,将酶和抗体同时固定在其表面,增加酶的固定量,提高检测灵敏度。将 3 μ L 5.0mg/mL HRP 加入 100 μ L 含有 0.04% 柠檬酸三钠、0.26mM K₂CO₃、0.02% NaN₃ 的胶体金标记的抗体溶液中,室温下搅拌 2h 后,加入 1mL 1% BSA 溶液反应 30min, 15,000rpm 转速下离心 20min,通过直径 0.22 μ m 的聚丙烯微孔滤膜过滤,4℃ 冰箱保存备用。

3. 按照权利要求 1 所述检测雪卡毒素的方法,其特征在于采用非竞争免疫分析法:将雪卡毒素标准品与过量胶体金酶标抗体探针进行孵化反应,由于胶体金酶标抗体探针过量,样品溶液在孵育后既含有胶体金酶标抗体-抗原结合物,又含有未反应的胶体金酶标抗体探针。

4. 按照权利要求 1 所述检测雪卡毒素的方法,其特征在于采用毛细管电泳-电化学酶联免疫分析法检测:将权利要求 3 中的混合液中进样,胶体金酶标抗体-抗原结合物和剩余胶体金酶标抗体探针根据迁移速率不同在分离毛细管中分成不同的区带,并顺次进入反应毛细管中,催化缓冲液中的过氧化氢氧化底物,生成具有电化学活性的物质,进入电化学检测池进行检测。

5. 按照权利要求 1 所述检测雪卡毒素的方法,其特征在于将雪卡毒素标准品加入鱼类样品中模拟实际样品检测:将鱼肉和内脏样品在 70℃ 水浴中温育 15min,匀浆机匀浆后,加入一定量雪卡毒素标准品,依次用丙酮(3L/kg 样品)和 80% 丙酮(0.5L/Kg 样品)提取,过滤,丙酮提取液用旋转蒸发仪蒸馏干,残留物以 90% 甲醇(0.5L/Kg 样品)和正己烷(1 : 1v : v₂) 萃取,甲醇相再次用旋转蒸发仪蒸馏干,残留物以 25% 乙醇(0.5L/Kg 样品)和乙醚(1 : 1 v : v) 萃取,收集乙醚组分,旋转蒸发仪蒸馏干,残留物以氯仿-甲醇(97 : 3 v : v) 溶解,氮气浓缩仪吹干得到毒素粗提物,毒素粗提物溶于 1mL 氯仿,以 3mL 氯仿-甲醇(9 : 1 v : v) 洗脱,收集洗脱液,氮气吹干,加入 1mL 甲醇溶解,0.22 μ m 滤膜过滤。

6. 按照权利要求 1 所述检测雪卡毒素的方法,其特征在于:所述缓冲液为 BR 缓冲液,其配制方法为:取磷酸、醋酸、硼酸溶解稀释,用氢氧化钠调 pH 后加入过氧化氢溶液定容。

7. 按照权利要求 4 所述检测雪卡毒素的方法,其特征在于:所述底物为邻氨基酚。

8. 按照权利要求 4 所述检测雪卡毒素的方法,其特征在于:所述酶为辣根过氧化物酶。

毛细管电泳电化学酶联免疫分析检测雪卡毒素的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及毛细管电泳电化学酶联免疫分析技术,具体地说是毛细管电泳酶联免疫分析法检测雪卡毒素。

背景技术

[0002] 雪卡毒素 (Ciguatoxin, CTX),又名西加鱼毒素,是一种危害性较为严重的海洋藻类毒素,主要来源于一种腰鞭毛藻 2 冈比尔盘藻。人摄食了含有雪卡毒素的珊瑚鱼而引起的食源性疾病称为雪卡鱼中毒,是目前世界上报道最多的海洋生物毒素性疾病。由于雪卡毒素在鱼体内含量很低,而且 CTX 污染鱼类在感观、嗅觉和味觉上均没有什么异常,不易用简单的常规方法检测到。因此,至今尚未建立一种简便、快速的可信赖的检测方法。目前国内外已有多种检测方法,但是每种方法都有其优缺点,主要的方法有:小鼠生物法、细胞毒性试验、高效液相色谱-质谱分析、免疫测定法等。

[0003] 小鼠生物法具有可靠性强、能表达出样品中实际毒性、不需复杂设备等优点,但其缺点是特异性差、灵敏度低、准确性和重现性差、不能断定个体毒素成分、操作要求较高技巧、对试验动物的种系及体重要求苛刻。细胞毒性试验的缺点是特异性差,不能确定毒素的准确成分,实验配置及操作人员的技术要求高。高效液相色谱-质谱分析需要昂贵的设备及高素质的操作人员,样品前处理要求较高,毒素标准品价格昂贵,不能同时检测大量样品等。免疫学检测技术利用抗原与抗体专一、特异结合的特点,对毒素进行定性定量的检测,具有准确、灵敏、便利等优点,但普通免疫测定法耗时较长,灵敏度不够。由于目前缺乏一种简便、准确的检测方法,因此对雪卡鱼中毒没有很好的预防措施,为了保证鱼类食用的安全性,需要建立合适的雪卡毒素的检测技术。

[0004] 毛细管电泳免疫分析法将毛细管电泳技术引入免疫分析中来,使其具有以下三个方面的突出优点:实现了极低的检测量的检测;由于扩散路径缩短,使得免疫反应孵化时间大大减少,对于 25 μ L 毛细管,从管中心到表面的扩散距离约是 0.0125cm,而一般的免疫板,这个距离为 0.35cm,由于时间与距离具有平方的关系,所以后者的扩散时间大约是前者的 784 倍;酶催化产物的稀释极大减小,可以大大缩短酶催化放大时间。几个方面改进的综合结果,使得由原来几个小时的测定时间缩短到了十几分钟甚至更短。但目前为止,基于毛细管电泳电化学酶联免疫分析的检测雪卡毒素的方法还未见报道。

[0005] 纳米技术的飞速发展纳米粒子在生物传感器和生物分析中的应用开辟了新的方向。由于独特的物理、化学性质,纳米粒子引起了纳米科学工作者极大兴趣。这些性质使其在化学和生物传感方面具有广阔的应用前景。胶体金和半导体量子点纳米粒子在生物分析中应用得尤其广泛。纳米粒子放大标记以及纳米粒子-生物分子的自组装产生极大的信号增强作用,为构建超灵敏的光学和电学检测奠定了基础,其灵敏度可与聚合物酶链反应 (PCR) 相媲美。

[0006] 本发明将毛细管电泳电化学方法和酶联免疫分析相结合,以 HRP 为标记酶,制备了胶体金酶标抗体作为探针,选择高灵敏度的供氢体为底物,酶催化反应产物经毛细管电

泳分离后用微电极进行安培检测,可实现雪卡毒素的快速在线检测,检测时间由常规免疫分析 1d 以上缩短至几分钟,操作简便,试剂消耗量少,可用于定性、定量检测海洋贝类及鱼类中的雪卡毒素。

发明内容

[0007] 本发明的目的是提供一种检测雪卡毒素的方法,该方法简化了样品处理过程、操作简单、选择性好、灵敏快速,特别适用于鱼类样品中雪卡毒素含量的快速检测。

[0008] 本方法所用仪器装置为:实验采用柱端式安培检测;毛细管电泳-电化学检测系统购自西安瑞迈分析仪器有限公司,包括一台高压电源(MPI-A型),一台电化学分析仪(MPI-A型),三维检测池;三电极系统:铂工作电极,Ag-AgCl 参比电极,铂对电极;数字式恒温水浴箱(浙江余姚工业仪表二厂)。聚丙烯酰胺脂内涂层毛细管(50 μm ID, 375 μm OD) 购自美国赛分科技有限公司。分离管长度为 30cm,反应管长度为 6cm。

[0009] 所用试剂为:邻氨基酚、磷酸、硼酸、醋酸、氢氧化钠、辣根过氧化物酶(上海雪满生物科技有限公司),雪卡毒素诊断试剂条(美国, Abraxis 公司),其他试剂为分析纯,所有溶液均用二次蒸馏水配制,所有缓冲液及样品溶液在使用前均需用 0.22 μm 微孔滤膜滤过,且在临用前进行超声脱气处理。

[0010] 本发明所述的溶液配制方法具体陈述如下: H_2O_2 溶液:取市售 30% 的 11.3 μL ,用二次水稀释到 100mL,浓度为 $1.0 \times 10^{-3} \text{mol/L}$,用时现配;OAP 溶液:准确称取邻氨基酚(分析纯)0.109g,用 10mL 乙醇溶解并用水定容至 100mL,浓度为 $1.0 \times 10^{-2} \text{mol/L}$,使用时可用二次蒸馏水再稀释; $1.0 \times 10^{-2} \text{mol/L}$ BR 缓冲溶液。

[0011] 本发明采用的技术方案为:

[0012] 1) 胶体金酶标抗体探针的制备

[0013] 利用胶体金作为固相载体,将酶和抗体同时固定在其表面,增加酶的固定量,提高检测灵敏度。将 3 μL 5.0mg/mL HRP 加入 100 μL 含有 0.04% 柠檬酸三钠、0.26mM K_2CO_3 、0.02% NaN_3 的胶体金标记的抗体溶液中,室温下搅拌 2h 后,加入 1mL 1% BSA 溶液反应 30min,15,000rpm 转速下离心 20min,通过直径 0.22 μm 的聚丙烯微孔滤膜过滤,4℃ 冰箱保存备用。

[0014] 2)、雪卡毒素标准品的检测

[0015] 采用非竞争模式,将一系列不同浓度的雪卡毒素标准品和胶体金酶标抗体探针加入微富集管,于 37℃ 水浴中孵育 30min,取出后用缓冲溶液稀释到 200 μL ,压力进样,运行电泳并记录。

[0016] 2)、鱼类样品处理:将鱼肉和内脏样品在 70℃ 水浴中温育 15min,匀浆机匀浆后,加入一定量雪卡毒素标准品,依次用丙酮(3L/kg 样品)和 80% 丙酮(0.5L/Kg 样品)提取,过滤,丙酮提取液用旋转蒸发仪蒸馏干,残留物以 90% 甲醇(0.5L/Kg 样品)和正己烷(1 : 1v : v2) 萃取,甲醇相再次用旋转蒸发仪蒸馏干,残留物以 25% 乙醇(0.5L/Kg 样品)和乙醚(1 : 1 v : v) 萃取,收集乙醚组分,旋转蒸发仪蒸馏干,残留物以氯仿-甲醇(97 : 3 v : v) 溶解,氮气浓缩仪吹干得到毒素粗提物。毒素粗提物溶于 1mL 氯仿,以 3mL 氯仿-甲醇(9 : 1 v : v) 洗脱,收集洗脱液,氮气吹干,加入 1mL 甲醇溶解,0.22 μm 滤膜过滤。在上述处理的贝类样品溶液中加入一定量的胶体金酶标抗体孵育 30min;取出后用

缓冲溶液稀释到 200 μ L, 在最佳检测条件下运行电泳并记录。

[0017] 所述缓冲液为 BR 缓冲液, 由磷酸、醋酸、硼酸加过氧化氢溶液配制而成。

[0018] 所述底物为邻氨基酚; 所述酶为辣根过氧化物酶。

[0019] 本发明的优点:

[0020] 1、本发明将毛细管电泳、酶催化反应、电化学检测和免疫分析结合起来, 既具有毛细管电泳的高分离效率、电化学分析的高灵敏度, 又具有免疫分析的高选择性和专一性, 用于鱼类样品中雪卡毒素的检测, 避免了鱼类样品前处理中需要过离子交换柱的烦琐程序, 简化了操作步骤。

[0021] 2、将毛细管电泳电化学酶联免疫分析法应用于雪卡毒素的检测, 检测时间由常规免疫分析 1 天以上缩短至几分钟, 操作简便快速, 试剂消耗量少。

[0022] 3、采用双重放大技术, 提高检测灵敏度。结合纳米技术, 制备胶体金酶标抗体探针, 利用胶体金作为固相载体, 将酶和抗体同时固定在其表面, 增加酶的固定量, 提高每个结合过程标记物的数量, 从而放大信号; 利用酶的高特殊活性, 可以在短时间内将大量底物分子转化为产物, 使信号放大。

[0023] 4、雪卡毒素免疫混合物在分离过程中使用缓冲液池和底物液池确保分离毛细管两端压力平衡, 整个分离过程只有电场驱动力, 分离效率高, 同时由于压力的作用也确保底物进入反应毛细管。

[0024] 4、利用免疫反应的专一性, 将雪卡毒素免疫复合物及游离的胶体金酶标抗体探针经毛细管电泳分离后, 可实现毛细管电泳电化学酶联免疫分析法测定雪卡毒素。

附图说明

[0025] 图 1 为雪卡毒素 CTX3C 的化学结构;

[0026] 图 2 为本发明检测雪卡毒素的反应原理示意图;

[0027] 图 3 为本发明一个实施例中胶体金酶标抗体探针的毛细管电泳谱图; 峰 1 为溶液中过量的 HRP 催化底物形成的电泳峰, 峰 2 为胶体金酶标抗体探针催化底物形成的电泳峰;

[0028] 图 4 为本发明一个实施例中标准样品中不同浓度免疫复合物的毛细管电泳谱图, 峰 1 为溶液中过量的 HRP 催化底物形成的电泳峰, 峰 2 为胶体金酶标抗体探针催化底物形成的电泳峰; 峰 3 为胶体金酶标抗体-抗原复合物催化底物形成的电泳峰;

[0029] 图 5 为本发明一个实施例中模拟鱼类样品中的雪卡毒素与胶体金酶标抗体反应后的毛细管电泳谱图, 峰 1 为溶液中过量的 HRP 催化底物形成的电泳峰, 峰 2 为胶体金酶标抗体探针催化底物形成的电泳峰; 峰 3 为胶体金酶标抗体-抗原复合物催化底物形成的电泳峰。

具体实施方式

[0030] 以下为实施本发明的具体示例, 其作用在于进一步阐明本发明的内容, 使读者更容易理解, 但不构成对本发明要求的保护范围的限定或限制。

[0031] 实施例一毛细管电泳电化学酶联免疫分析法检测标准样品中的雪卡毒素

[0032] 所用仪器及试剂如前所述。

[0033] 利用胶体金作为固相载体,将酶和抗体同时固定在其表面,增加酶的固定量,提高检测灵敏度。为了使每个胶体金上负载更多的酶分子,胶体金与酶反应时,HRP 保持过量。图 3 为胶体金酶标抗体探针的毛细管电泳谱图,峰 1 为溶液中过量的 HRP 催化底物形成的电泳峰,峰 2 为胶体金酶标抗体探针催化底物形成的电泳峰,说明酶成功标记在胶体金上。

[0034] 采用非竞争模式,将一系列不同浓度的雪卡毒素标准品和胶体金酶标抗体加入微富集管,于 37℃ 水浴中孵育 30min,取出后用缓冲溶液稀释到 200 μ L,压力进样 (9cm, 20s),运行电泳并记录。采用非竞争模式,胶体金酶标抗体 (AuNP-Ab*) 过量,样品溶液在孵育后既含有胶体金酶标抗体-抗原结合物 (Ag-AuNP-Ab*),又含有未反应的胶体金酶标抗体探针 (AuNP-Ab*)。胶体金酶标抗体-抗原结合物 (Ag-AuNP-Ab*) 和剩余胶体金酶标抗体探针根据迁移速率不同在分离毛细管中分成不同的区带,并顺次进入反应毛细管中,分别在反应毛细管中催化缓冲液中的过氧化氢氧化底物邻氨基酚,生成具有电化学活性的物质 3-氨基吩噻嗪,进入电化学检测池进行检测,可检测到三个电泳峰 (图 4),分别为溶液中过量的 HRP 催化底物形成的电泳峰,胶体金酶标抗体探针催化底物形成的电泳峰;胶体金酶标抗体-抗原复合物催化底物形成的电泳峰。雪卡毒素的浓度不同,形成的雪卡抗原抗体结合物的量不同,催化过氧化氢氧化邻氨基酚生成氧化产物 3-氨基吩噻嗪的浓度就不同,产生不同的电化学信号,由此可对酶标雪卡毒素-抗体复合物以及鱼类样品中的雪卡毒素进行定量分析。

[0035] 考察了运行缓冲溶液浓度和 pH 值、分离电压、检测电势、进样时间和电压对雪卡毒素检测的影响,确定最佳检测条件是: 1.0×10^{-2} mol/L BR 缓冲溶液 (pH 5.0);分离电压 15kV;检测电势 -350mV;压力进样 (9cm, 20s)。

[0036] 在最佳检测条件下,雪卡毒素标准品溶液检测的线性范围为 1.0-50.0pg/mL,检测限为 0.3pg/mL。工作曲线的线性回归方程为 $y = -0.0277x + 1.4825$ (其中 x 为雪卡毒素浓度,pg/mL, y 为峰面积, μ C, $n = 5$),其相关系数 $r = 0.9914$ 。

[0037] 实施例二使用毛细管电泳电化学酶联免疫分析方法检测模拟鱼类样品中的雪卡毒素

[0038] 将雪卡毒素标准品加入鱼类样品中模拟实际样品检测:将鱼肉和内脏样品在 70℃ 水浴中温育 15min,匀浆机匀浆后,加入一定量雪卡毒素标准品,依次用丙酮 (3L/kg 样品) 和 80% 丙酮 (0.5L/Kg 样品) 提取,过滤,丙酮提取液用旋转蒸发仪蒸馏干,残留物以 90% 甲醇 (0.5L/Kg 样品) 和正己烷 (1 : 1 v : v) 萃取,甲醇相再次用旋转蒸发仪蒸馏干,残留物以 25% 乙醇 (0.5L/Kg 样品) 和乙醚 (1 : 1 v : v) 萃取,收集乙醚组分,旋转蒸发仪蒸馏干,残留物以氯仿-甲醇 (97 : 3 v : v) 溶解,氮气浓缩仪吹干得到毒素粗提物。毒素粗提物溶于 1mL 氯仿,以 3mL 氯仿-甲醇 (9 : 1 v : v) 洗脱,收集洗脱液,氮气吹干,加入 1mL 甲醇溶解,0.22 μ m 滤膜过滤。

[0039] 在上述处理的鱼类样品溶液中加入过量胶体金酶标抗体,在 37℃ 孵化反应 30min,鱼类样品中的雪卡毒素和胶体金酶标抗体反应,进行电泳分离检测。

[0040] 实验采用非竞争模式,由于胶体金酶标抗体探针过量,样品溶液在孵育后既含有胶体金酶标抗体-抗原结合物 (Ag-AuNP-Ab*),又含有未反应的胶体金酶标抗体探针 (AuNP-Ab*) 及游离的 HRP。

[0041] 经毛细管电泳分离后,分别在反应毛细管中催化底物溶液反应,可检测到三个电

泳峰,分别为溶液中过量的 HRP 催化底物形成的电泳峰,胶体金酶标抗体探针催化底物形成的电泳峰;胶体金酶标抗体-抗原复合物催化底物形成的电泳峰。

[0042] 其实验结果:

[0043] 如图 3 所示,胶体金酶标抗体探针从毛细管入口端进样,在 14kV 高压电场下向阴极迁移,进入电化学检测池进行检测,出现 2 个电泳峰,峰 1 为溶液中过量的 HRP 催化底物形成的电泳峰(150s 附近),出现在 200s 附近的峰 2 为胶体金酶标抗体探针催化底物形成的电泳峰。

[0044] 如图 4 所示,雪卡毒素与过量的胶体金酶标抗体溶液在 37℃ 孵化反应 30min,形成胶体金酶标抗体-抗原结合物结合物,将混合溶液 14kV 电动进样 5s 后进行电泳分离检测。峰 1 为溶液中过量的 HRP 催化底物形成的电泳峰(150s 附近),峰 2 为胶体金酶标抗体探针催化底物形成的电泳峰(200s 附近);峰 3 为胶体金酶标抗体-抗原复合物催化底物形成的电泳峰(250s 附近)。三个电泳峰峰形较好,可以达到基线分离。随着雪卡毒素抗原浓度的增大,峰 2 逐渐变小,峰 3 逐渐变大,根据非竞争免疫分析的原理,峰 2 为胶体金酶标抗体探针催化底物形成的电泳峰;峰 3 为胶体金酶标抗体-抗原复合物催化底物形成的电泳峰。

[0045] 如图 5 所示,将雪卡毒素加入鱼类样品模拟实际样品检测,鱼类样品中的雪卡毒素同胶体金酶标抗体反应,生成胶体金酶标抗体-抗原复合物(峰 3),说明本方法可用于实际样品检测,样品中的物质不会干扰本方法。

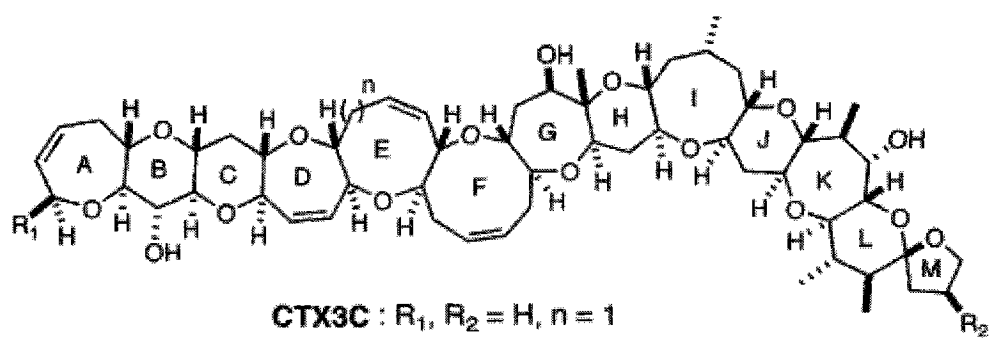


图 1

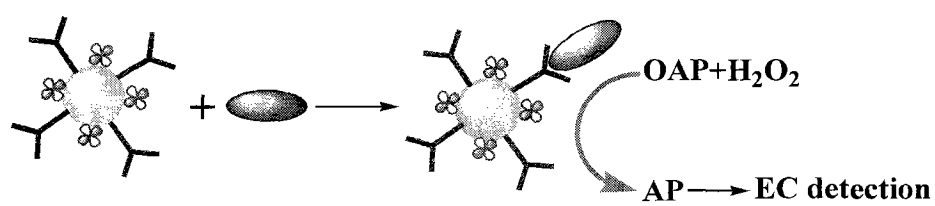


图 2

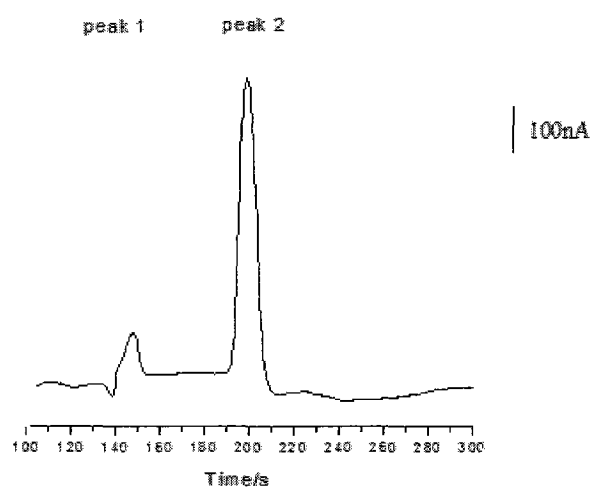


图 3

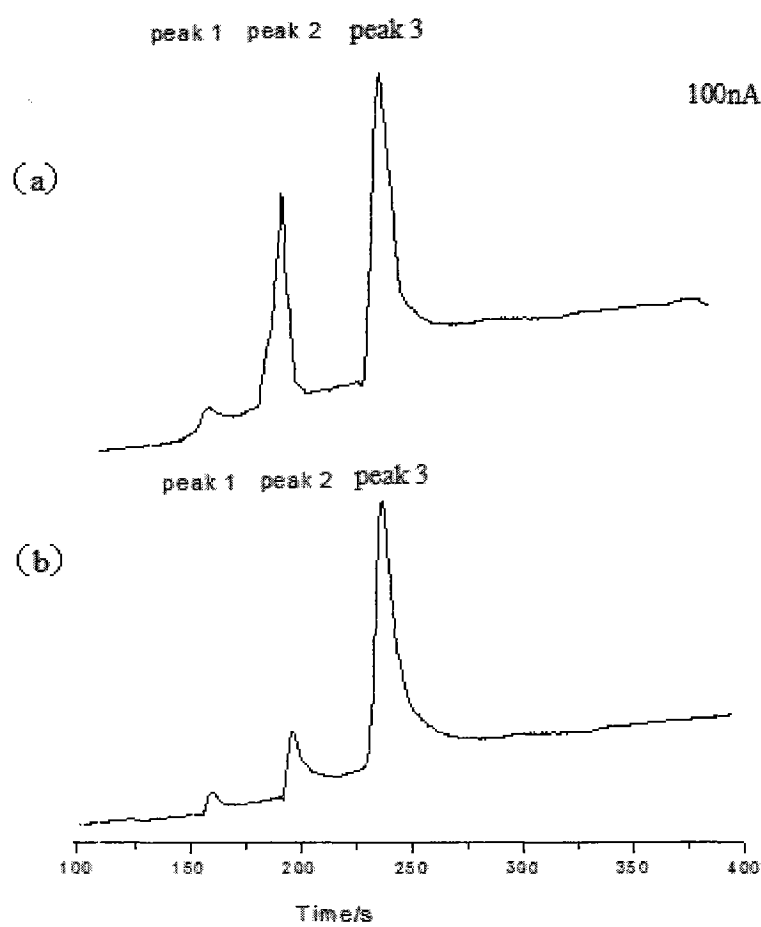


图 4

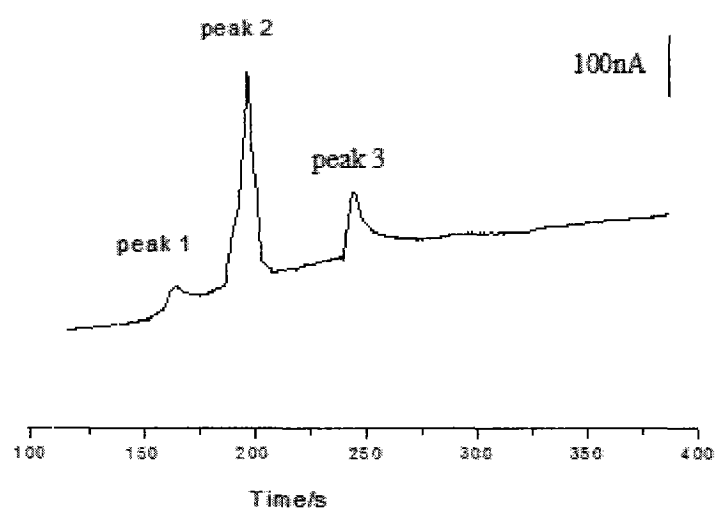


图 5

专利名称(译)	毛细管电泳电化学酶联免疫分析检测雪卡毒素的方法		
公开(公告)号	CN101963614A	公开(公告)日	2011-02-02
申请号	CN201010277323.7	申请日	2010-09-03
[标]申请(专利权)人(译)	青岛科技大学		
申请(专利权)人(译)	青岛科技大学		
当前申请(专利权)人(译)	青岛科技大学		
[标]发明人	李雪梅 葛安青 李晓琳 张召香 梅振华 张书圣		
发明人	李雪梅 葛安青 李晓琳 张召香 梅振华 张书圣		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/535 G01N27/447		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明描述了一种测定贝类样品中遗忘性贝类毒素的新型毛细管电泳电化学酶联免疫方法。制备了胶体金HRP酶标雪卡毒素抗体探针，采用非竞争模式，样品溶液与胶体金酶标雪卡毒素抗体反应，胶体金酶标抗体过量。胶体金酶标抗体-抗原结合物和剩余胶体金酶标抗体探针根据迁移速率不同在分离毛细管中分成不同的区带，并顺次进入反应毛细管中，经毛细管电泳分离后，分别在反应毛细管中催化缓冲液中的过氧化氢氧化底物邻氨基酚，生成具有电化学活性的物质3-氨基吩噻嗪，进入电化学检测池进行检测。雪卡毒素标准品溶液检测的线性范围为1.0-50.0pg/mL，检测限为0.3pg/mL。

