

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/544 (2006.01)
G01N 33/531 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710070274.8

[43] 公开日 2008年4月30日

[11] 公开号 CN 101169414A

[22] 申请日 2007.8.9
[21] 申请号 200710070274.8
[71] 申请人 嘉兴博泰生物科技发展有限公司
地址 314006 浙江省嘉兴市中环南路北侧亚太路西南湖科创中心6号楼3楼
[72] 发明人 孟凡国 胡卫江 王叶菁 李海龙

[74] 专利代理机构 杭州九洲专利事务所有限公司
代理人 翁黎明

权利要求书1页 说明书4页 附图2页

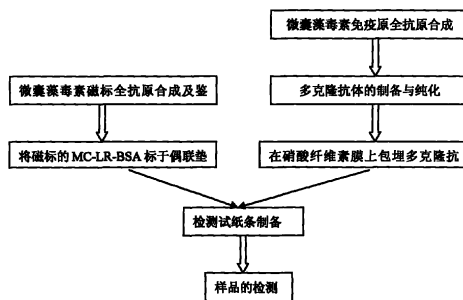
[54] 发明名称

水体中微囊藻毒素的检测方法

[57] 摘要

一种水体中微囊藻毒素的检测方法，它是：1) 微囊藻毒素全抗原的合成及鉴定；2) 多克隆抗体的制备与纯化：以微囊藻毒素全抗原 MC-LR-KLH 作为免疫原，免疫新西兰兔，按常规方法制备多克隆抗体并以硫酸铵纯化；3) 免疫磁珠的制备，将微囊藻毒素全抗原 MC-LR-BSA 与纳米磁珠偶联，制备含 MC-LR-BSA 的免疫磁珠；4) 包埋抗体至硝酸纤维素膜；5) 检测测试板的制作，将磁标 MC-LR-BSA 的偶联垫、包埋多克隆抗体的硝酸纤维素膜、样品垫、吸水垫、覆盖膜、测试板外卡组成测试板；6) 样品检测，将不同浓度的标准品以及检测样品分别加入测试板上样孔，样品通过层析作用从试纸条上流过，室温下反应 3-5 分钟以后，将测试板放入磁信号检测仪进行检测，并且此检测仪器可以将已经转化成磁场信号的生物学反应信号进一

步以电信号的方式输出；绘制标准曲线后，依据标准曲线求出待测样品微囊藻毒素含量的具体值。



1、一种水体中微囊藻毒素的检测方法，该方法是：1) 微囊藻毒素全抗原的合成及鉴定：以戊二醛作为双功能交联试剂，按常规方法分别将 BSA、KLH 与藻毒素 MC—LR 进行偶联，得到微囊藻毒素的全抗原 MC—LR—BSA 以及 MC—LR—KLH，并利用紫外分光光度计进行鉴定；2) 多克隆抗体的制备与纯化：以 MC—LR—KLH 作为免疫原，免疫新西兰兔，按常规方法制备多克隆抗体并以硫酸铵纯化；3) 免疫磁珠的制备：将 MC—LR—BSA 与纳米磁珠偶联，制备含 MC—LR—BSA 的免疫磁珠；4) 包埋抗体至硝酸纤维素膜：用喷膜仪将准备包被的目的抗体载于硝酸纤维素膜上，使目的抗体达到一定量，室温下干燥；用 3%牛血清蛋白—磷酸缓冲液 (BSA—PBS)，室温封闭 60 分钟；用 0.01%十二烷基硫酸钠—磷酸缓冲液 (SDS—PBS) 洗涤 15 分钟，共三次，室温干燥后，保存于 4~20℃；5) 检测测试板的制作：将磁标 MC—LR—BSA 的偶联垫、包埋多克隆抗体的硝酸纤维素膜、样品垫、吸水垫、覆盖膜、测试板外卡组成测试板；6) 样品检测：将不同浓度的标准品以及检测样品加入测试板上样孔，样品通过层析作用从试纸条上流过，室温下反应 3~5 分钟后，将测试板放入磁信号检测仪进行检测，并且此检测仪器可以将已经转化成磁场信号的生物学反应信号进一步以电信号方式输出；绘制标准曲线后，依据标准曲线求出待测样品的具体值。

2、根据权利要求 1 所述的体中微囊藻类毒素的检测方法，其特征在于所述的免疫磁珠的制备是：吸取 20 微升磁珠至小试管中，置于磁场中使磁珠与贮存液分离，用 40 微升 MES 清洗缓冲液清洗磁珠两次，重悬浮磁珠于 20 微升 MES 清洗缓冲液中；分别将 60 微克左右的碳化二亚胺 (EDC) 和 81 微克 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 加入至磁珠溶液中，37℃ 震荡孵育 1 小时。随后分别用 40 微升 MES 清洗缓冲液清洗磁珠两次，用 20 微升硼酸清洗缓冲液清洗磁珠两次后，重悬浮磁珠于 20 微升硼酸清洗缓冲液中；将 5 微升左右的 MC—LR—BSA (8 毫克/毫升) 加入至磁珠悬液中，37℃ 震荡孵育 3 小时；再加入 3 微升的 10% 牛血清白蛋白封闭液，37℃ 震荡孵育 1 小时；用 20 微升硼酸清洗缓冲液清洗磁珠两次，并将磁珠转移至新管中；弃掉硼酸清洗缓冲液，用 30 微升偶联缓冲液重悬浮磁珠；用定量加样装置将已经标记有 MC—LR—BSA 抗原的磁珠加入磁珠偶联垫。

水体中微囊藻毒素的检测方法

技术领域

本发明涉及一种能快速灵敏检测水体中微囊藻毒素（MC）的检测方法，用于自然环境中水体、饮用水中微囊藻毒素含量的检测。

背景技术

日趋严重的水体富营养化使水体污染成为全球性的环境问题，蓝绿藻是我国多数淡水湖泊中形成水华的优势藻种，这些藻类可产生具有明显肝毒性的肽类物质，称为微囊藻毒素。其毒性在自然界已知的毒素中排名第二，仅次于二恶英。微囊藻毒素有多种不同的异构体，其中 MC—LR 是目前已知的毒性最强、急性危害最大的一种淡水蓝藻毒素。

水体中微囊藻毒素的检测方法主要有生物分析法、化学分析法、生化分析法以及免疫分析法等。生物分析法是利用小鼠腹腔注射或口腔灌喂评价微囊藻毒素的毒性，该法操作简单，但灵敏度较差，且无法确定毒素类型及结构；化学分析法是目前应用最多的方法，主要包括气相色谱（GC）、薄层色谱（TLC）、高效液相色谱（HPLC）、液相色谱/质谱分析（LC/MS）及毛细管电泳（CE）等，此类方法有良好的灵敏度和选择性，但仪器体积庞大、价格昂贵、需要环境条件较高的室内环境，以及专门的技术人员操作，检测费用昂贵；生化分析法，主要包括酶活性抑制检测技术，其原理是利用微囊藻毒素对蛋白磷酸酶活性的抑制程度通过比色法检测，此法灵敏度太低，且存在内源性酶的干扰。免疫分析法是美国国家环保局优先推选的检测微囊藻毒素的方法，最常用的是竞争性非匀相酶联免疫检测法，该法操作简单，但反应时间长，不能定量，灵敏度偏低，不能现场检测结果。

发明内容

本发明的目的在于克服上述各方法的不足，提供一种基于纳米磁免疫技术的、灵敏度高、反应时间短、仪器设备便宜、可用于现场检测水体中微囊藻类毒素的检测方法。

本发明的目的通过如下技术方案完成：

1) 微囊藻毒素全抗原的合成及鉴定：以戊二醛作为双功能交联试剂，按常规方法分别将 BSA、KLH 与藻毒素 MC—LR 进行偶联，得到微囊藻毒素的全抗原 MC—LR—BSA 以及 MC—LR—KLH，并利用紫外分光光度计进行鉴定；

2) 多克隆抗体的制备与纯化：以 MC—LR—KLH 作为免疫原，免疫新西兰兔，按常

规方法制备多克隆抗体并以硫酸铵纯化；得到兔抗 MC—LR—KLH 的 IgG。

3) 免疫磁珠的制备：将 MC—LR—BSA 与纳米磁珠偶联，制备含 MC—LR—BSA 的免疫磁珠；具体方法是：吸取适量磁珠至小试管中，置于磁场中使磁珠与贮存液分离，MES 清洗缓冲液清洗并重悬磁珠，将尽可能小体积的碳化二亚胺（EDC）和 N—羟基琥珀酰亚胺（NHS）加入磁珠溶液中，使 EDC 与 NHS 的分子比为 1: 1~1: 3，并使之分子数量为磁珠表面羧基的 5~19 倍，37℃ 震荡孵育 1 小时，分别用 MES 清洗缓冲液及硼酸清洗缓冲液清洗磁珠，随后将适量 MC—LR—BSA 加入至磁珠悬液中，使蛋白质在磁珠中达到一定浓度，37℃ 震荡孵育 1 小时，用硼酸清洗缓冲液清洗磁珠，将磁珠转移至新管，弃掉硼酸清洗缓冲液，并用偶联缓冲液重悬浮，用定量加样装置将已经标记有 MC—LR—BSA 抗原的磁珠加入磁珠偶联垫；

4) 包埋抗体至硝酸纤维素膜：用喷膜仪将准备包被的目的抗体载于硝酸纤维素膜上，使目的抗体达到一定量，与磁标抗原之间的反应达到最佳，室温干燥。用 3% 牛血清蛋白—磷酸缓冲液（BSA—PBS），室温封闭 60 分钟；用 0.01% 十二烷基硫酸钠—磷酸缓冲液（SDS—PBS）洗涤 15 分钟，共三次，室温干燥后，保存于 4—20℃。

5) 检测测试板的制作：分别将磁标 MC—LR—BSA 的偶联垫、包埋多克隆抗体的硝酸纤维素膜、样品垫、吸水垫、覆盖膜、测试板外卡组成测试板（此装置与金标装置相似）。

6) 样品检测：将不同浓度的标准品以及检测样品加入测试板上样孔，样品通过层析作用从试纸条上流过，室温下反应 3~5 分钟以后，将测试板放入磁信号检测仪进行检测，并且此检测仪器可以将已经转化成磁场信号的生物学反应信号进一步以电信号的方式输出；绘制标准曲线后，依据标准曲线求出待测样品内微囊藻毒素含量的具体值。

本发明是基于一种纳米磁免疫技术进行水体中微囊藻类毒素的检测方法、它具有灵敏度高、反应时间短、仪器设备便宜、可用于现场检测等特点。

附图说明

图 1 是本发明所述的检测方法工艺流程框图。

图 2 是本发明所用测试板结构示意图。

图 3 是本发明的 MC-LR 的浓度为 0.001ppb 测试结果图。

图 4 是本发明的 MC-LR 的浓度为 0.1ppb 测试结果图。

图 5 是本发明的 MC-LR 的浓度为 1ppb 测试结果图。

图 6 是本发明的 MC-LR 的浓度为 50ppb 测试结果图。

图 7 是本发明当 MC-LR 的浓度为 0.001-50 ppb 时磁信号强度的标准曲线图。

具体实施方式

下面将结合附图及具体实施例对本发明作详细的介绍：如图 1 所示，本发明所述的水体中微囊藻类毒素的检测方法是：

1) 微囊藻毒素全抗原的合成及鉴定：以戊二醛作为双功能交联试剂，按常规方法分别将 BSA、KLH 与藻毒素 MC-LR 进行偶联，得到微囊藻毒素的全抗原 MC-LR-BSA 以及 MC-LR-KLH，并利用紫外分光光度计进行鉴定；波谱扫描显示 MC-LR-BSA 与 0.2% BSA 相比，吸收峰发生蓝移现象，说明我们已有的材料中，MC-LR 与 BSA 已经偶联。

2) 多克隆抗体的制备与纯化：以 MC-LR-KLH 作为免疫原，免疫新西兰兔，按常规方法制备多克隆抗体并以硫酸铵纯化；SDS-PAGE 电泳结果显示具备抗体特异性条带。

3) 免疫磁珠的制备 将 MC-LR-BSA 与纳米磁珠偶联，制备含 MC-LR-BSA 的免疫磁珠。具体方法：吸取 20 微升磁珠至小试管中，置于磁场中使磁珠与贮存液分离，用 40 微升 MES 清洗缓冲液清洗磁珠两次，重悬浮磁珠于 20 微升 MES 清洗缓冲液中。分别将 60 微克左右的碳化二亚胺 (EDC) 和 80 微克左右 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 加入至磁珠溶液中，37℃ 震荡孵育 1 小时。随后分别用 40 微升 MES 清洗缓冲液清洗磁珠两次，用 20 微升硼酸清洗缓冲液清洗磁珠两次后，重悬浮磁珠于 20 微升硼酸清洗缓冲液中。将 5 微升左右的 MC-LR-BSA (8 毫克/毫升) 加入至磁珠悬液中，37℃ 震荡孵育 3 小时；再加入 3 微升的 10% 牛血清白蛋白封闭液，37℃ 震荡孵育 1 小时；用 20 微升硼酸清洗缓冲液清洗磁珠两次，并将磁珠转移至新管中；弃掉硼酸清洗缓冲液，用 15 微升偶联缓冲液重悬浮磁珠；用定量加样装置将已经标记有 MC-LR-BSA 抗原的磁珠加入磁珠偶联垫。

4) 包埋抗体至硝酸纤维素膜：用喷膜仪将准备包被的目的抗体载于硝酸纤维素膜上，使目的抗体达到一定量，室温下干燥。用 3% 牛血清蛋白-磷酸缓冲液 (BSA-PBS)，室温封闭 60 分钟；用 0.01% 十二烷基硫酸钠-磷酸缓冲液 (SDS-PBS) 洗涤 15 分钟，共三次，室温干燥后，保存于 4—20℃。

5) 检测测试板的制作：将磁标 MC-LR-BSA 的偶联垫、包埋多克隆抗体的硝酸纤维素膜、样品垫、吸水垫、覆盖膜、测试板外卡组成测试板 (此装置与金标装置相似)。

6) 样品检测：将不同浓度的标准品以及检测样品加入测试板上样孔，样品通过层析作用从试纸条上流过，室温下反应 3—5 分钟后，将测试板放入磁信号检测仪进行检测，

并且此检测仪器可以将已经转化成磁场信号的生物学反应信号进一步以电信号方式输出；绘制标准曲线后，依据标准曲线求出待测样品的具体值。

纯净水样品检测：其具体检测结果与 0.001ppb 基本一致，具体如图 3 所示。

不同浓度 MC-LR 标准参考品检测：具体如图 3、4，5，6 所示。

待测样品检测：用明确的阴性样品以及不同浓度的阳性样本进行测试，测试线的峰值高低与阳性样品的浓度呈现一定的相关性，具体如图 7。分别取太湖不同水域的水体样本进行测试，明显可以看出在 2007 年 5-6 月份的太湖水样存在严重的污染。而且出水口的水质稍好于进水口。

本发明的其它实施例在上述范围内可以任意选择，并且本领域的技术人员在了解本发明内容的基础上，结合现有公开的技术，如专利公报等，能够充分实施本发明。

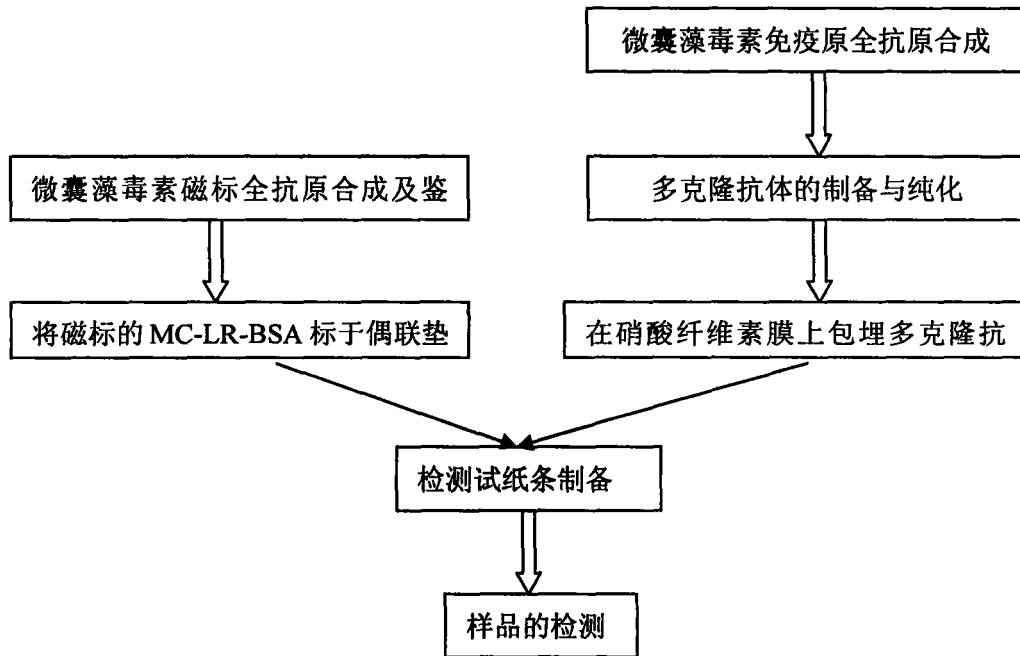


图 1

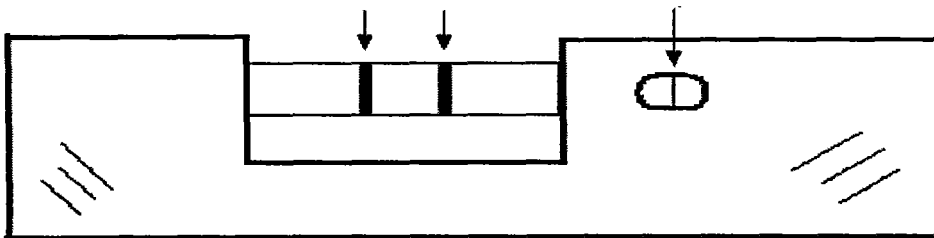


图 2

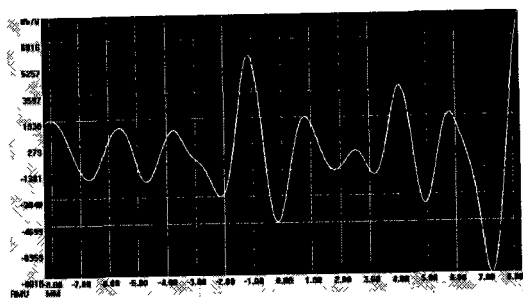


图 3

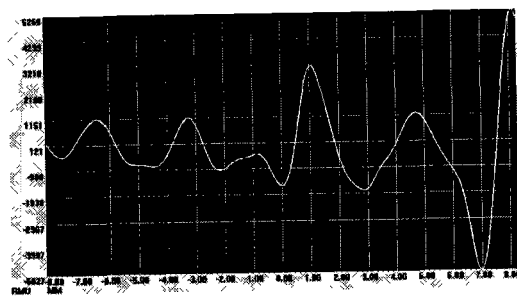


图 4

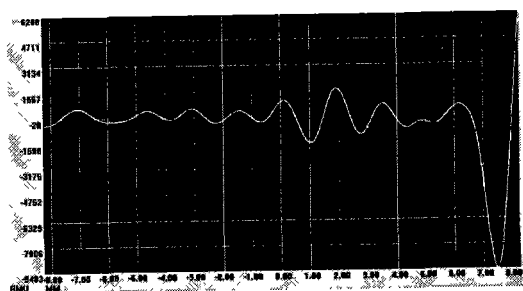


图 5

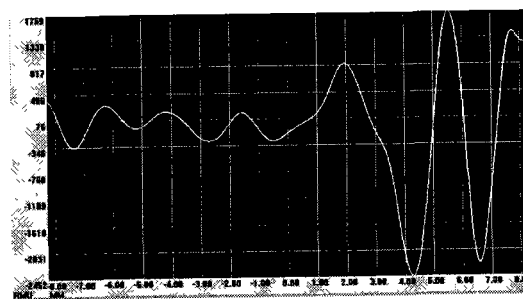


图 6

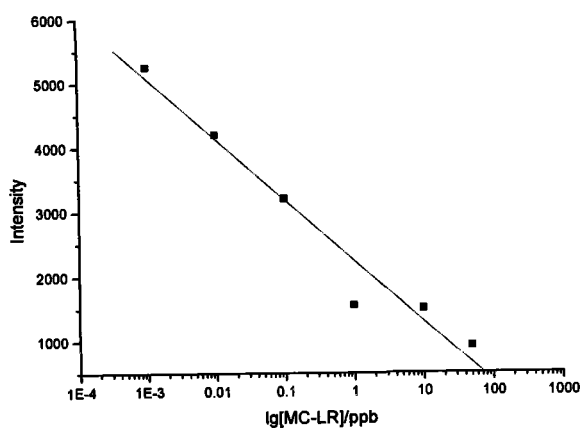


图 7

专利名称(译)	水体中微囊藻毒素的检测方法		
公开(公告)号	CN101169414A	公开(公告)日	2008-04-30
申请号	CN200710070274.8	申请日	2007-08-09
[标]申请(专利权)人(译)	嘉兴博泰生物科技发展有限公司		
申请(专利权)人(译)	嘉兴博泰生物科技发展有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	嘉兴博泰生物科技发展有限公司		
[标]发明人	孟凡国 胡卫江 王叶菁 李海龙		
发明人	孟凡国 胡卫江 王叶菁 李海龙		
IPC分类号	G01N33/544 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种水体中微囊藻毒素的检测方法，它是：1)微囊藻毒素全抗原的合成及鉴定；2)多克隆抗体的制备与纯化：以微囊藻毒素全抗原MC - LR - KLH作为免疫原，免疫新西兰兔，按常规方法制备多克隆抗体并以硫酸铵纯化；3)免疫磁珠的制备，将微囊藻毒素全抗原MC - LR - BSA与纳米磁珠偶联，制备含MC - LR - BSA的免疫磁珠；4)包埋抗体至硝酸纤维素膜；5)检测测试板的制作，将磁标MC - LR - BSA的偶联垫、包埋多克隆抗体的硝酸纤维素膜、样品垫、吸水垫、覆盖膜、测试板外卡组成测试板；6)样品检测，将不同浓度的标准品以及检测样品分别加入测试板上样孔，样品通过层析作用从试纸条上流过，室温下反应3 - 5分钟以后，将测试板放入磁信号检测仪进行检测，并且此检测仪器可以将已经转化成磁场信号的生物学反应信号进一步以电信号的方式输出；绘制标准曲线后，依据标准曲线求出待测样品微囊藻毒素含量的具体值。

