

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200510081658.0

[51] Int. Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 21/31 (2006.01)

[43] 公开日 2007年1月10日

[11] 公开号 CN 1892224A

[22] 申请日 2005.7.6

[21] 申请号 200510081658.0

[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 许道艳 梁玉波

权利要求书1页 说明书2页

[54] 发明名称

赤潮毒素失去记忆性贝毒的酶联免疫检测试剂盒

[57] 摘要

一种能够快速灵敏检测环境样品中的赤潮毒素失去记忆性贝毒的酶联免疫检测试剂盒。它是利用合成的高分子比的抗原 DA - KLH, 经多次免疫 BLAB/c 鼠, 通过细胞融合, 筛选、诱生腹水和蛋白柱提纯得到特异性的抗软骨藻酸(失去记忆性贝毒的主要成分)的单克隆抗体, 选择 1:1000 的包被比例和 1:8000 的抗体稀释度, 研制出间接竞争酶联免疫分析赤潮毒素失去记忆性贝毒软骨藻酸的检测试剂盒, 该试剂盒成本低廉、价格便宜, 操作简便快速, 适合大批量样品的分析, 灵敏度可达 10ng/ml。

---

一种快速简易分析检测赤潮毒素失去记忆性贝毒的试剂盒，在包装盒内有已包被检测抗原的可拆 96 孔酶标板、浓缩洗液、特异性检测抗体、酶标二抗、失去记忆性贝毒标准品、稀释液、显色剂、终止液，其特征是按说明书制得的待分析样品和系列稀释的标准品分别加在不同孔中与检测抗体反应，经孵育、洗涤，顺序与酶标二抗、显色液和终止液反应，在酶标仪上测得各孔的吸光值，将标准品的吸光值回归分析得到方程，计算得出样品中的毒素含量。

## 赤潮毒素失去记忆性贝毒的酶联免疫检测试剂盒

### 所属技术领域

本发明涉及一种利用抗失去记忆性贝毒的单克隆抗体与失去记忆性贝毒抗原结合，而分析检测环境样品中的失去记忆性贝毒含量的快速方便检测试剂盒。

### 背景技术

目前失去记忆性贝毒的分析方法有生物小鼠法、高效液相色谱法和免疫化学方法。生物小鼠法是将藻或贝等生物组织的萃取液注射进小鼠腹腔内，根据小鼠死亡时间，对照标准表，查得失去记忆性贝毒的含量，该方法误差大、重现性差、费时麻烦；高效液相色谱法是将藻或贝等生物组织的萃取液经前处理后，进行液相色谱分离，结合紫外或质谱检测器，经与标准品的值对照，计算得出失去记忆性贝毒的含量，该方法准确、成熟，并能分析鉴定不同的异构体，但缺点是前处理麻烦，仪器昂贵，需要专门的分析技术人员，不适合现场及大批量样品的分析；免疫化学方法是通过免疫动物制得特异性抗体（多克隆抗体或单克隆抗体），利用抗体对失去记忆性贝毒的结合反应，按照酶联免疫分析方法制成检测试剂盒，用于失去记忆性贝毒的分析检测，该方法简便、快速，可同时分析大批量样品，国外有售成品试剂盒，但价格昂贵。

### 发明内容

为了解决失去记忆性贝毒的现场、快速、大批量样品的分析问题，本技术发明提供一种国产、利用抗失去记忆性贝毒的单克隆抗体研制的间接竞争酶联免疫分析失去记忆性贝毒的试剂盒，价格比同类进口试剂盒便宜 5-10 倍，适于现场、快速、大批量样品的检测。

本技术发明解决其技术问题所采用的技术方案是：用水溶性碳二亚胺方法，将失去记忆性贝毒的主要成分软骨藻酸（DA）偶联到血蓝蛋白（KLH）上，加佐剂免疫 BALB/c 小鼠，取免疫小鼠脾细胞和 SP2/0 骨髓瘤细胞融合，筛选稳定分泌抗软骨藻酸单克隆抗体（MAb-DA）的细胞株，扩大培养，小鼠体内诱生腹水，蛋白 G 柱纯化，制得抗软骨藻酸的单克隆抗体，用合成的软骨藻酸-卵清蛋白（DA-OVA）包被 96 孔酶标板，加入 DA 标准品或样品，再加入 MAb-DA，包被抗原 DA 与自由的 DA 竞争抗体 MAb-DA，自由的 DA 和抗体复合物被洗去，与包被抗原 DA 结合的抗体 MAb-DA 再与酶标记的二抗结合，经底物显色，终止反应，用酶标仪测定各孔的吸光值（OD），OD 值越大，样品中自由的 DA 含量越少，对照标准品回归的方程，计算样品 DA 的含量。

本技术发明的有益效果是：利用得到的阳性细胞可大量制得抗软骨藻酸的单克隆抗体，所研制的试剂盒成本低廉、价格便宜，该试剂盒的灵敏度可达 10ng/mL。

#### 具体实施方式

以过量的碳二亚胺和 DA 与 KLH 反应的方法，制得高分子比的 DA-KLH 偶联物，多次免疫，得到免疫良好的脾细胞，融合后，应尽早检测，筛选分泌抗体能力强的细胞株以得到优良的抗体，选择合适的包被比例（1：1000）和抗体稀释度（1：8000），以得到最佳的检测灵敏度（10ng/mL）。

专利名称(译)	赤潮毒素失去记忆性贝毒的酶联免疫检测试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN1892224A</a>	公开(公告)日	2007-01-10
申请号	CN200510081658.0	申请日	2005-07-06
申请(专利权)人(译)	国家海洋环境监测中心		
当前申请(专利权)人(译)	国家海洋环境监测中心		
[标]发明人	刘仁沿 许道艳 梁玉波		
发明人	刘仁沿 许道艳 梁玉波		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/531 G01N21/31		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

一种能够快速灵敏检测环境样品中的赤潮毒素失去记忆性贝毒的酶联免疫检测试剂盒。它是利用合成的高分子比的抗原DA - KLH，经多次免疫BLAB/c鼠，通过细胞融合，筛选、诱生腹水和蛋白柱提纯得到特异性的抗软骨藻酸(失去记忆性贝毒的主要成分)的单克隆抗体，选择1:1000的包被比例和1:8000的抗体稀释度，研制出间接竞争酶联免疫分析赤潮毒素失去记忆性贝毒软骨藻酸的检测试剂盒，该试剂盒成本低廉、价格便宜，操作简便快速，适合大批量样品的分析，灵敏度可达10ng/ml。