

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410067110.6

[51] Int. Cl.
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/532 (2006.01)

[43] 公开日 2006年4月19日

[11] 公开号 CN 1760674A

[22] 申请日 2004.10.13

[21] 申请号 200410067110.6

[71] 申请人 中国海洋大学

地址 266003 山东省青岛市鱼山路五号

共同申请人 上海交通大学

[72] 发明人 于志刚 李荣秀 辛泽毓 亓海刚
米铁柱

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司
代理人 陶家蓉

权利要求书1页 说明书9页 附图2页

[54] 发明名称

一种定量检测诺氏海链藻的方法

[57] 摘要

公开了一种检测待测样品中诺氏海链藻数量的免疫学方法，包括步骤：(a)使固定有诺氏海链藻细胞裂解碎片的固相载体同时与待测样品以及抗诺氏海链藻抗体接触；(b)将固相载体与待测样品和抗诺氏海链藻抗体分开；(c)检测与固相载体结合的抗诺氏海链藻抗体的量，所述固定在固相载体上的诺氏海链藻细胞裂解碎片与待测样品中的诺氏海链藻细胞竞争结合抗诺氏海链藻抗体，而且存在于所述待测样品中的诺氏海链藻细胞数目是根据抗诺氏海链藻抗体与固定在固相载体上的诺氏海链藻细胞裂解碎片结合或不结合的相对程度测定的。还公开了用于该检测方法的试剂盒及其用途。

1. 一种检测待测样品中诺氏海链藻数量的免疫学方法，其特征在于，该方法包括步骤：

5 (a)使固定有诺氏海链藻细胞裂解碎片的固相载体同时与待测样品以及抗诺氏海链藻抗体接触；

(b)将固相载体与待测样品和抗诺氏海链藻抗体分开；

10 (c)检测与固相载体结合的抗诺氏海链藻抗体的量，所述固定在固相载体上的诺氏海链藻细胞裂解碎片与待测样品中的诺氏海链藻细胞竞争结合抗诺氏海链藻抗体，而且存在于所述待测样品中的诺氏海链藻细胞数目是根据抗诺氏海链藻抗体与固定在固相载体上的诺氏海链藻细胞裂解碎片结合或不结合的相对程度测定的。

2.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述抗诺氏海链藻抗体是多克隆或单克隆抗体。

15 3.如权利要求 2 所述的方法，其特征在于，所述多克隆抗体是通过用诺氏海链藻细胞、细胞裂解物或细胞分离组分免疫动物制备的，所述动物选自兔、鼠、豚鼠、鸡、羊、牛、马、狗、猪。

4.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，诺氏海链藻细胞裂解碎片以 10^6 - 10^7 细胞/毫升的浓度固定在固相载体上。

20 5.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述步骤(c)的检测是通过抗诺氏海链藻多克隆抗体的二抗，其中所述二抗与标记物偶联。

6.如权利要求 5 所述的方法，其特征在于，所述标记物选自放射性同位素、生物素、酶、荧光素或化学发光物质。

7.如权利要求 6 所述的方法，其特征在于，所述酶是辣根过氧化物酶。

25 8.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述固相载体是酶标板。

9.一种试剂盒，其特征在于，所述试剂盒含有：

(a)固定有诺氏海链藻细胞裂解碎片的固相载体；

(b)抗诺氏海链藻细胞的抗体；和

(c)偶联有标记物的二抗，针对抗诺氏海链藻细胞抗体。

30 10.权利要求 9 所述的试剂盒的用途，其特征在于，该试剂盒用于检测诺氏海链藻细胞。

一种定量检测诺氏海链藻的方法

5 技术领域

本发明属于利用免疫学方法检测海洋环境中微型生物的技术领域。具体地说，本发明涉及通过竞争性抗原抗体结合抑制检测诺氏海链藻的方法和试剂盒，及其用于检测诺氏海链藻的用途。

10 背景技术

诺氏海链藻(*Thalassiosira nordenskiöldi*)是一种在世界范围内广泛存在的浮游植物，也是我国近海常见的硅藻优势种之一。本种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、快速地检测诺氏海链藻，随时了解其在海洋中的动态变化具有重要意义。

15

在分类学上，诺氏海链藻属于硅藻门海链藻属。传统的鉴别方法，即从形态学上区分诺氏海链藻，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，主要用于藻的定性和分离，而不适用于藻的定量研究。因此，发展用于快速检测诺氏海链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藻类进行定性和定量测定的成熟技术。

20

基于抗体技术的竞争性 ELISA 方法具有特异、灵敏、高效、易操作、造价低廉等优点，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，竞争性 ELISA 方法主要在医学检测和微生物学检测研究中应用，尚未用于对整个藻细胞进行检测的报道。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。

25

因此，本领域迫切的需要一种快速检测诺氏海链藻的方法。

发明内容

30

因此，在本发明的第一个方面，公开了一种检测待测样品中诺氏海链藻数量的免疫学方法，包括步骤：

(a)使固定有诺氏海链藻细胞裂解碎片的固相载体同时与待测样品以及抗诺氏

海链藻抗体接触；

(b)将固相载体与待测样品和抗诺氏海链藻抗体分开；

(c)检测与固相载体结合的抗诺氏海链藻抗体的量，所述固定在固相载体上的诺氏海链藻细胞裂解碎片与待测样品中的诺氏海链藻细胞竞争结合抗诺氏海链藻抗体，而且存在于所述待测样品中的诺氏海链藻细胞数目是根据抗诺氏海链藻抗体与固定在固相载体上的诺氏海链藻细胞裂解碎片结合或不结合的相对程度测定的。

在该方面的一个优选实施方式中，抗诺氏海链藻抗体是多克隆或单克隆抗体。更优选的，多克隆抗体是通过用诺氏海链藻细胞、细胞裂解物或细胞分离组分免疫动物制备的，优选动物选自兔、鼠、豚鼠、鸡、羊、牛、马、狗、猪。

在该方面的另一个优选实施方式中，诺氏海链藻细胞裂解碎片以 10^6 - 10^7 细胞/毫升的浓度固定在固相载体上。

在该方面的另一个优选实施方式中，步骤(c)的检测是通过抗诺氏海链藻多克隆抗体的二抗，其中二抗与标记物偶联。优选标记物选自放射性同位素、生物素、酶、荧光素或化学发光物质。更优选的酶是辣根过氧化物酶。

在该方面的还有一个优选实施方式中，固相载体是酶标板。

在本发明的第二个方面，公开了一种试剂盒，含有：

(a)固定有诺氏海链藻细胞裂解碎片的固相载体；

(b)抗诺氏海链藻细胞的抗体；和

(c)偶联有标记物的二抗，针对抗诺氏海链藻细胞抗体。

在本发明的第三个方面，公开了上述试剂盒的用途，用于检测诺氏海链藻细胞。

附图说明

图 1 显示了抗诺氏海链藻抗血清效价测定曲线，分别用不同稀释比例稀释的包被物包被酶标板，经过常规 ELISA 步骤后分别获得的结果。

图 2 显示了实施例 3 中用已知浓度的系列稀释的诺氏海链藻定标绘制的标准曲线。

图 3 显示了实施例 3 中根据图 2 的标准曲线绘制的直线方程。

30

具体实施方式

本发明的目的是提供诺氏海链藻免疫学检测的方法，它可以客观、准确地对该藻进行检测。具体包括：本发明提供的检测方法，即竞争性间接 ELISA 法，以专一性地识别诺氏海链藻的抗体作为基础。

抗体的产生

5 本发明所述的抗体可以经由诺氏海链藻免疫实验动物而获得，这些实验动物是本领域技术人员所熟知的，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，如抗体封闭技术等，得到提高，这也是为本领域内技术人员熟知的，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
10 发光物质进行标记而进行使用。

本发明所述的抗诺氏海链藻抗体具有较好的种特异性。利用竞争 ELISA 测定所述的抗体与其它藻之间的交叉反应率，结果表明它只能识别诺氏海链藻而不识别其它藻，故可用于诺氏海链藻的定性鉴别。

15 本发明所述的二抗可以经由直接购买通用的二抗或由一种动物的 IgG 免疫另一种实验动物而获得，这一技术是本领域技术人员所熟知的。

与二抗偶联的标记物可以是一直接可检测基团，如金属溶胶（如金溶胶）、发色团或荧光团（如花青、酞菁、部花青、三苯基甲基、马菁）等的结合位点，见应用化学论题，红外吸收发色团、M. Matsuoka 编，Plenum Press, New York, NY, 1990，应用化学论题，染料的化学和应用，Waring 等，Plenum Press, New York, 20 NY, 1990，和荧光探针和研究化学手册，Haugland, Molecular Probes, Inc. 1996，和放射性标记、酶、磁性颗粒，浊度诱导剂等的结合位点，或它可已携带这样的可直接检测的基团。

酶联免疫检测技术

25 酶联免疫检测技术具有灵敏度高（可百倍于常规检测技术）、操作简便、步骤可控、高效快速等优点，且能同时分析大量的样本，是一种对目标抗原进行定量分析的有效手段。

标准曲线的确定

30 (1)以诺氏海链藻细胞裂解液包被酶标板，过夜后用 BSA 溶液封闭，孵育后洗板，加入已知数量的诺氏海链藻悬浮液，加入诺氏海链藻的抗体稀释液，孵育后洗板，加入酶标二抗溶液，孵育，洗板后加入酶反应底物，孵育后加入终止液

终止反应；

(2)用酶标仪测定板上各孔的吸光值，经过数据转换后，得出诺氏海链藻定量检测的标准曲线，其线形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诺氏海链藻进行定量。

- 5 用酶标仪测定板上各孔的吸光值，然后计算出相应的抑制率%，计算公式为 $A/A_0 \times 100\%$ ，其中 A_0 为最大值，即加入的已知浓度的藻细胞系列梯度稀释液中，藻细胞数为 0 时的吸光值；A 为其它各孔的吸光值，接着计算出各孔抑制率的自然对数值，以之为纵坐标，以藻细胞系列梯度稀释液中藻细胞数目的常用对数值为横坐标，绘制出诺氏海链藻定量检测的标准曲线，找出其线性范围并计算出抑制率的自然对数值和对应的藻细胞数目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。
- 10

本发明的最主要理论基础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。该方法的基本原理如下：一定量的藻细胞经破碎后，裂解物包被于固相载体上（如酶标板等），经封闭后，同时加入抗体和竞争抗原（即含有目标藻的标准品或待检测样品），这样，固相上的藻细胞和液相中的藻细胞就会竞争结合抗体，通过检测固相上竞争到的抗体量即可算出相应的竞争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。

15

20 这种分析方法不仅克服了诺氏海链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。

本发明首次提供了快速、简便、大批量定量检测该藻的方法，使监测某海区或养殖场内海水中诺氏海链藻的动态变化成为可能。通过监测到的动态数据，可以掌握海水污染状况，并即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、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。

25

以下通过实施例进一步说明本发明：

实施例 1

30 本发明所用的诺氏海链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 12h/12h，光照强度为 4000 Lx，培养

温度为 22℃~25℃。

处于对数生长期的诺氏海链藻培养液，用甲醛固定（终浓度 1.5~2%）后，10000r/min 离心 10min 收集藻细胞，再用蒸馏水清洗一遍，PBS 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 Eppendorf 管，甩去残余水分，-20℃ 保存备用。临用前取出，每管用 0.6ml 灭菌的 PBS 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，乳化物用于免疫新西兰大白兔(购自中科院上海生物工程研究中心动物房)，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(购自 SIGMA 公司)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 ELISA 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℃。如图 1 所示，最后获得的抗诺氏海链藻抗血清效价为 1: 64000。

15 实施例 2

本实施例选用了胶州湾常见的几株优势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*)、中肋骨条藻 (*Skeletonema costatum*)、米氏裸甲藻 (*Gymnodinium mikimotoi*)、裸甲藻 (*Gymnodinium sp*)、塔玛亚历山大藻 (*Alexandrium tamarens*)、尖刺伪菱形藻(*Pseudonitzschia pungens*)、新月菱形藻 (*Nitzschia closterium*)、膜质舟形藻(*Navicula membranacea*)，它们均分离自胶州湾天然海水，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。

用竞争 ELISA 步骤进行抗诺氏海链藻抗血清的特异性鉴定。所有藻用 1ml PBS 重悬浮，显微镜计数后，取相同细胞量 (3.2×10^6) 悬浮于 PBS(终体积 1ml)。各个海藻分别用 PBS 稀释成浓度梯度。

以诺氏海链藻细胞裂解液包被酶标板，每孔 50—100 微升，4℃ 过夜或 37℃，3—5 小时后用 1—3% BSA 溶液封闭，孵育 1—2 小时后洗板，加入各海藻稀释液，加入诺氏海链藻的抗体稀释液，37℃ 或室温孵育 30—60 分钟后洗板，加入酶标二抗溶液，37℃ 或室温孵育 30—60 分钟，洗板后加入酶反应底物，孵育 10 分钟后加入终止反应液终止反应。分别作竞争抑制曲线，根据结果算出各个海藻与抗诺氏海链藻抗血清之间的交叉反应率，结果列于表 1。

表 1 各海藻与抗诺氏海链藻抗血清的交叉反应率(%)

藻种名称	交叉反应率 (%)
柔弱角毛藻	0.1
旋链角毛藻	0.1
纤细角毛藻	0
中肋骨条藻	0.5
尖刺伪菱形藻	2.3
新月菱形藻	0.9
诺氏海链藻	100
膜质舟形藻	0
裸甲藻	1.7
米氏裸甲藻	1.6
塔玛亚历山大藻	1.0

从表中可以看出，以诺氏海链藻的交叉反应率为标准（100%），其他海藻的交叉率都在 5%以下，这样的反应率是非常低的，说明抗诺氏海链藻抗血清有很高的特异性，可以专一地识别诺氏海链藻，因此可用于诺氏海链藻的定性检测。

因此，对于某待检样品，以本实施例所述的步骤进行竞争 ELISA 反应，如果有明显较高的交叉反应率，即可判定该样品中有诺氏海链藻的存在；如果该样品为纯培养物，则可判定该纯培养物为诺氏海链藻。这种定性测定方法的优点是，由于使用的是诺氏海链藻的专一性抗血清，因此能非常准确地检测样品中是否存在诺氏海链藻。

实施例 3

- 按实施例 1 所述的方法培养和收集诺氏海链藻。
- 以 $10^6 \sim 10^7$ 个细胞/毫升的诺氏海链藻细胞裂解液包被酶标板（每孔 100 微升），4℃过夜后用 2%BSA 溶液封闭，37℃孵育 2 小时后洗板，加入分别含有 $40 \sim 6.25 \times 10^6$ 个细胞的诺氏海链藻梯度稀释液，加入抗体稀释液(1:10000)，37℃孵育 45 分钟后洗板，加入酶标二抗溶液(羊抗兔 IgG-HRP, 稀释 10000 倍)，37℃孵育 45 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：以诺氏海链藻标准梯度稀释液中藻细胞数目的常用对数值为横

坐标, 以标准样品的抑制率(%), 即标准样品孔吸光值(A)/最大吸光值(A_0) \times 100, 为纵坐标, 作标准曲线(见图 2)。以诺氏海链藻标准梯度稀释液中藻细胞数目的常用对数值为横坐标, 以抑制率的自然对数值, 即 $\ln(A/(A_0-A))$, 为纵坐标, 建立标准曲线线性范围的直线方程(见图 3)。

5

4. 定量计算和分析:

如步骤 2 所述, 加入待测样品。根据待测样品的吸光值, 首先计算出各自的抑制率, 接着计算出抑制率的自然对数值, 代入标准曲线的线性方程, 求出相应的 $\lg[\text{藻细胞数}]$ 值, 即可方便地计算出待测样品中诺氏海链藻细胞的数目, 对应的原始水样中诺氏海链藻的浓度也可经过简单计算得出结果。

10

实施例 4.

以 $10^3 \sim 10^4$ 个细胞/毫升的诺氏海链藻细胞裂解液包被酶标板(每孔 100 微升), 按实施例 3 所述的竞争 ELISA 步骤操作, 最后获得的竞争抑制曲线相关方程为: $\ln(A/(A_0-A)) = -1.4596 \times \lg(\text{藻细胞数}) + 5.3111$, 线性相关系数为 $R^2 = 0.9774$, 竞争抑制的线性范围在 250000~5000000 个细胞之间。

15

实施例 5.

以 $10^6 \sim 10^7$ 个细胞/毫升的诺氏海链藻细胞裂解液包被酶标板(每孔 100 微升), 按实施例 3 所述的竞争 ELISA 步骤操作, 最后获得的竞争抑制曲线相关方程为: $\ln(A/(A_0-A)) = -1.0931 \times \lg(\text{藻细胞数}) + 4.8318$, 线性相关系数为 $R^2 = 0.9982$, 竞争抑制的线性范围在 40~6250000 个细胞之间。

20

实施例 6.

以 $10^9 \sim 10^{10}$ 个细胞/毫升的诺氏海链藻细胞裂解液包被酶标板(每孔 100 微升), 按实施例 3 所述的竞争 ELISA 步骤操作, 最后获得的竞争抑制曲线相关方程为: $\ln(A/(A_0-A)) = -1.3784 \times \lg(\text{藻细胞数}) + 4.5572$, 线性相关系数为 $R^2 = 0.9800$, 竞争抑制的线性范围在 8000~6250000 个细胞之间。

25

实施例 7

以 $10^6 \sim 10^7$ 个细胞/毫升的诺氏海链藻细胞裂解液包被酶标板(每孔 100 微升), 按实施例 3 所述的竞争 ELISA 步骤操作, 加入分别含有 $0 \sim 10^8$ 个细胞的诺

30

氏海链藻梯度稀释液时，最后获得的竞争抑制曲线相关方程： $\ln(A/(A_0-A)) = -1.6549 \times \lg(\text{藻细胞数}) + 5.7789$ ，线性相关系数为 $R^2 = 0.9608$ 。

实施例 8.

- 5 以 $10^6 \sim 10^7$ 个细胞/毫升的诺氏海链藻细胞裂解液包被酶标板(每孔 100 微升)，按实施例 3 所述的竞争 ELISA 步骤操作，加入分别含有 $40 \sim 7 \times 10^6$ 个细胞的诺氏海链藻梯度稀释液时，最后获得的竞争抑制曲线相关方程为： $\ln(A/(A_0-A)) = -1.0931 \times \lg(\text{藻细胞数}) + 4.8318$ ，线性相关系数为 $R^2 = 0.9982$ 。

10 实施例 9.

以 $10^6 \sim 10^7$ 个细胞/毫升的诺氏海链藻细胞裂解液包被酶标板(每孔 100 微升)，按实施例 3 所述的竞争 ELISA 步骤操作，加入分别含有 $0 \sim 10^4$ 个细胞的诺氏海链藻梯度稀释液时，最后获得的竞争抑制曲线相关方程： $\ln(A/(A_0-A)) = -1.4538 \times \lg(\text{藻细胞数}) + 5.0026$ ，线性相关系数为 $R^2 = 0.9604$ 。

15

根据实施例 4-9 的实验结果，优选 $10^6 \sim 10^7$ 个细胞/毫升的诺氏海链藻细胞裂解液包被酶标板；用分别含有 $40 \sim 7 \times 10^6$ 个细胞的诺氏海链藻梯度稀释液作为标准竞争抗原。

20 实施例 10.

根据实施例 3 所述的方法，对采自青岛胶州湾水域的几份海水样品进行了诺氏海链藻的竞争 ELISA 定量检测。对这 4 份海水样品，分别用竞争 ELISA 法和显微计数法检测后，结果列于表 2。

25

表 2 海水样品中诺氏海链藻数目的定量结果

样品编号	竞争 ELISA 结果	显微计数结果
A	345±9	350±16
B	411±10	440±18
C	324±14	350±11
D	481±6	450±17

表 2 中数据为 50 微升加样液（相当于 100 毫升原始海水样品）中诺氏海链藻的细胞数目（个），均为 5 次测定结果的平均值±标准差。经比较分析表 2 中

的数据，发现这两种方法所获的定量结果基本相同。说明用竞争 ELISA 检测诺氏海链藻，可获得与常规定量方法一样准确的效果。

5 本发明中，发明人成功地制备了高特异性的抗诺氏海链藻多克隆抗体，并建立了竞争 ELISA 方法，应用该方法可定性定量地检测诺氏海链藻。发明人在世界上首次将竞争 ELISA 方法用于藻细胞的定性定量检测，并取得了好的结果。

10 本方法的优点：本方法最大的优点是能同时进行定量和定性检测，通过该方法既可知道待检样品中是否有诺氏海链藻存在，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定量结果准确。

另外本方法操作过程简单、省时，整个过程数小时内即可全部完成，可以实现海区中诺氏海链藻的动态跟踪监测。

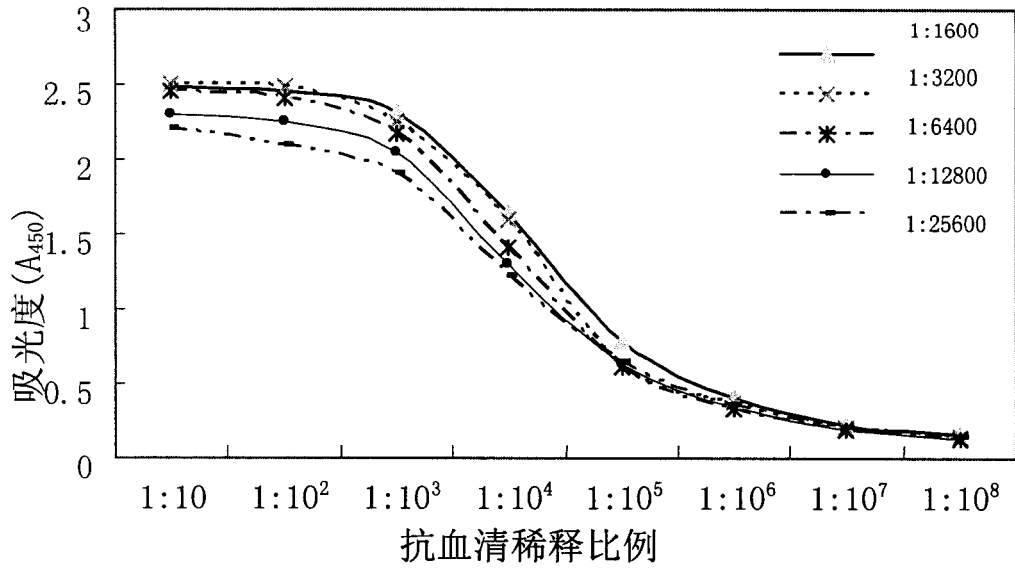


图 1

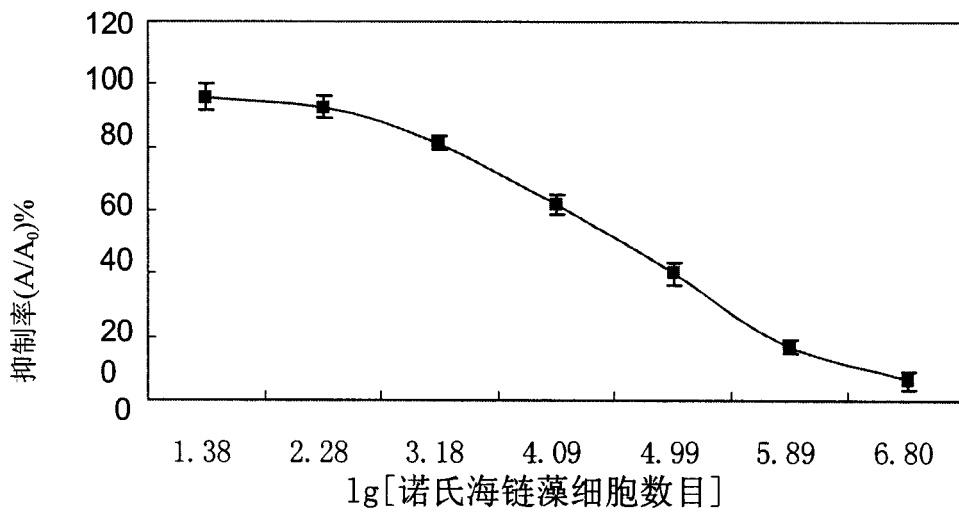


图 2

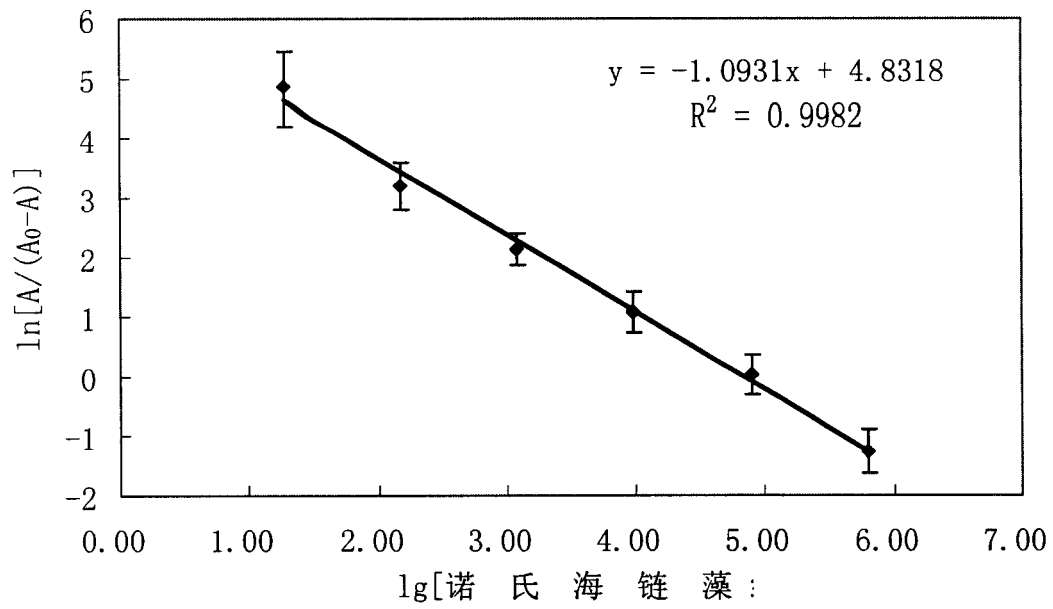


图 3

专利名称(译)	一种定量检测诺氏海链藻的方法		
公开(公告)号	CN1760674A	公开(公告)日	2006-04-19
申请号	CN200410067110.6	申请日	2004-10-13
[标]申请(专利权)人(译)	中国海洋大学 上海交通大学		
申请(专利权)人(译)	中国海洋大学 上海交通大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国海洋大学 上海交通大学		
[标]发明人	于志刚 李荣秀 辛泽毓 亓海刚 米铁柱		
发明人	于志刚 李荣秀 辛泽毓 亓海刚 米铁柱		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/532		
其他公开文献	CN100595586C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

公开了一种检测待测样品中诺氏海链藻数量的免疫学方法，包括步骤：
 (a)使固定有诺氏海链藻细胞裂解碎片的固相载体同时与待测样品以及抗诺氏海链藻抗体接触；
 (b)将固相载体与待测样品和抗诺氏海链藻抗体分开；
 (c)检测与固相载体结合的抗诺氏海链藻抗体的量，所述固定在固相载体上的诺氏海链藻细胞裂解碎片与待测样品中的诺氏海链藻细胞竞争结合抗诺氏海链藻抗体，而且存在于所述待测样品中的诺氏海链藻细胞数目是根据抗诺氏海链藻抗体与固定在固相载体上的诺氏海链藻细胞裂解碎片结合或不结合的相对程度测定的。还公开了用于该检测方法的试剂盒及其用途。

