



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101825630 A

(43) 申请公布日 2010.09.08

(21) 申请号 201010187786.4

(22) 申请日 2010.05.23

(71) 申请人 青岛科技大学

地址 266061 山东省青岛市崂山区松岭路
69号

(72) 发明人 张召香 李晓琳 葛安青 李雪梅
梅振华 张书圣

(51) Int. Cl.

G01N 33/561 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 27/447 (2006.01)

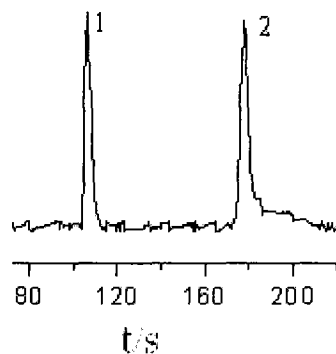
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种检测腹泻性贝毒的方法

(57) 摘要

本发明描述了一种测定贝类样品中腹泻性贝毒的新型毛细管电泳电化学免疫分析方法。贝类样品中的腹泻性贝毒与酶标腹泻性贝毒同有限抗体竞争反应后在毛细管内分离,分离后的酶标腹泻性贝毒和酶标腹泻性贝毒-抗体复合物分别在反应管内同底物反应后进入电化学检测池进行柱端电化学检测,根据酶标腹泻性贝毒-抗体复合物峰的降低程度计算贝类样品中腹泻性贝毒的含量。该方法简化了样品处理过程,选择性好,准确度高,是检测贝类样品中腹泻性贝毒的理想方法。



1. 一种检测贝类样品中腹泻性贝毒的方法,其特征在于:

(1) 贝类样品处理:将贝类样品去除贝壳,贝肉用蒸馏水浸洗,匀浆,用盐酸调至 pH 2.0 ~ 5.0,离心,倾去上层清液,加入甲醇萃取,收集上层萃取液,在热水浴下减压蒸发萃取液至甲醇挥发完毕,用十二烷基硫酸钠胶束溶液溶解析出物;

(2) 在上述处理的贝类样品中加入过量酶标腹泻性贝毒和一定量的抗体进行孵化反应;

(3) 上述孵化反应混合液进样后在分离毛细管中分成不同的区带,顺次进入反应毛细管中,酶标腹泻性贝毒-抗体复合物和剩余酶标腹泻性贝毒上标记的酶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。

2. 按照权利要求 1 所述检测贝类样品中腹泻性贝毒的方法,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。

3. 按照权利要求 1 所述检测贝类样品中腹泻性贝毒的方法,其特征在于:所述底物为邻氨基酚。

4. 按照权利要求 1 所述检测贝类样品中腹泻性贝毒的方法,其特征在于:所述酶为辣根过氧化物酶。

一种检测腹泻性贝毒的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及毛细管电泳技术,具体地说是一种检测贝类样品中腹泻性贝毒的毛细管电泳电化学免疫分析方法。

背景技术

[0002] 近年来,不断加剧的海洋环境污染导致有害赤潮爆发的数量和规模不断增加,由赤潮生物产生的大量赤潮毒素或贝毒不仅严重破坏海洋渔业资源和水产养殖、恶化海洋环境,而且可以通过食物链向上层积累,危害人体健康。

[0003] 腹泻性贝毒主要来自甲藻鳍藻属和原甲藻属生物,至少包括 15 种化合物,其中 13 种已确定结构。腹泻性贝毒为具有多个环状醚的脂肪酸衍生物,为不饱和烃,其典型化学结构式如图 1 和图 2 所示。

[0004] 腹泻性贝毒可分为三类:

[0005] 1) 聚醚类毒素:如大田软海绵酸及其衍生物鳍藻毒素-1、鳍藻毒素-2、鳍藻毒素-3;

[0006] 2) 大环聚醚内酯毒素:如扇贝毒素及其衍生物;

[0007] 3) 融合聚醚毒素:如虾夷扇贝毒素等。

[0008] 在这些化合物中,软海绵酸和鳍藻毒素-3 的毒性最强。腹泻性贝毒广泛分布于全球沿岸海域,可在贝类体内积累,被人食用后产生腹泻、呕吐、恶心、腹痛和头痛等中毒症状,还具有肿瘤促进剂的慢性效应。目前,许多国家对腹泻性贝毒的含量有严格规定,如加拿大规定,食品中的腹泻性贝毒的含量不得超过 200ng/g。

[0009] 腹泻性贝毒化合物种类繁多,化学性质和结构复杂,测定分析贝毒的种类和含量比较困难。目前国际上普遍使用的贝毒检测方法是生物小鼠法、高效液相色谱法和免疫学法。生物小鼠法,是用盐酸在高温下提取藻类或贝体中的腹泻性贝毒,然后对小鼠进行腹腔注射,根据小鼠的死亡时间判断毒性大小;但在提取过程中有可能导致贝毒化合物的结构转化而改变毒性,且具有误差大、重现性差、可比性低的缺点。高效液相色谱法是目前分析鉴定贝毒的最准确有效的方法,其原理是将贝类组织经前处理后,以高效液相色谱分离,结合质谱仪完成结构鉴定和含量分析;缺点是前处理麻烦,仪器及分析试剂昂贵,操作复杂,需要专门的分析技术人员。免疫学法是目前比较流行的简单快速检测腹泻性贝毒的方法,利用抗体对腹泻性贝毒的结合反应,按照酶联免疫分析方法制成检测试剂盒,用于腹泻性贝毒的分析检测,该方法简便快速,所用的仪器简单,易于应用于现场监测,且国内有售成品试剂盒,但检测灵敏度较低,试剂价格昂贵。

[0010] 毛细管电泳是近几年发展起来的海洋生物毒素分离检测技术之一,以其快速、灵敏、消耗样品量少而在贝类毒素的分离分析中发挥重要作用。贝类样品基体中干扰物质多,常对腹泻性贝毒的分析造成干扰。通过毛细管电泳分离、电化学酶联免疫分析可排除干扰,有选择的针对目标毒素进行检测。但目前为止,基于毛细管电泳电化学酶联免疫分析的检测腹泻性贝毒的装置及检测方法还未见报道。

发明内容

[0011] 本发明的目的是提供一种检测腹泻性贝毒的方法,该方法简化了样品处理过程、操作程序简单、选择性好、灵敏快速,特别适用于贝类样品中腹泻性贝毒的快速检测。

[0012] 为实现上述目的,本发明采用的技术方案为:

[0013] 一种检测贝类样品中腹泻性贝毒的方法,操作如下:

[0014] (1) 贝类样品处理:将贝类去除贝壳,贝肉浸洗、匀浆后,用盐酸调 pH,离心,倾去上清液,加入甲醇萃取,收集上层萃取液,减压蒸发萃取液至甲醇挥发完毕,用十二烷基硫酸钠胶束溶液溶解析出物;

[0015] (2) 在上述处理的贝类样品溶液中加入过量酶标腹泻性贝毒和一定量的抗体进行孵化反应;

[0016] (3) 上述孵化反应混合液进样后在分离毛细管中分成不同的区带,顺次进入反应毛细管中,酶标腹泻性贝毒-抗体复合物和剩余酶标腹泻性贝毒上标记的酶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。

[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、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,用于贝类样品中腹泻性贝毒的检测,避免了贝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腹泻性贝毒的检测,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、利用免疫反应的专一性,将不同结构的腹泻性贝毒免疫体系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同时测定多种腹泻性贝毒化合物。

附图说明

[0023] 图 1 为腹泻性贝毒酸性成分的化学结构,软海绵酸: $R_1 = H$ 、 $R_2 = CH_3$ 、 $R_3 = H$,鳍藻毒素-1: $R_1 = H$ 、 $R_2 = CH_3$ 、 $R_3 = CH_3$,鳍藻毒素-2: $R_1 = H$ 、 $R_2 = H$ 、 $R_3 = CH_3$,鳍藻毒素-3: $R_1 =$ 酰基、 $R_2 = CH_3$ 、 $R_3 = CH_3$;

[0024] 图 2 为腹泻性贝毒中性成分的化学结构,蛤毒素-1: $R = CH_2OH$,蛤毒素-2: $R = CH_3$,蛤毒素-3: $R = CHO$,蛤毒素-6: $R = COOH$;

[0025] 图 3 为本发明一个实施例中酶+标腹泻性贝毒的毛细管电泳谱图;

[0026] 图 4 为本发明一个实施例中过量酶标腹泻性贝毒与酶标腹泻性贝毒-抗体复合物的毛细管电泳谱图,峰 1 为过量酶标腹泻性贝毒催化底物形成的电泳峰,峰 2 为酶标腹泻性贝毒-抗体复合物催化底物形成的电泳峰;

[0027] 图 5 为本发明一个实施例中贝类样品中的腹泻性贝毒与酶标腹泻性贝毒同一定量的抗体竞争反应后的毛细管电泳谱图。

具体实施方式

[0028] 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,使阅读者更容易理解,但不构成对本发明要求的保护范围的限定或限制。

[0029] 实验条件:

[0030] MPI-A 型毛细管电泳数控高压电源、MPI-A 型毛细管电泳电化学分析仪(西安瑞迈分析仪器有限公司),三电极体系:铂盘工作电极、铂丝辅助电极和银/氯化银参比电极,PHS-3D 型 pH 计(上海雷磁科学仪器有限公司)。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),腹泻性贝毒诊断试剂盒(美国,Abraxis 公司),其他试剂为分析纯,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。

[0031] 具体操作过程:

[0032] 将贝类(扇贝或牡蛎)去除贝壳,贝肉用蒸馏水浸洗 3 次,匀浆 10min,冰水浴超声 10min,用 6mol/L 盐酸调至 pH 3.4 ~ 4.0,离心 5min,倾去上层清液,加入甲醇搅匀,超声萃取 5min,离心 5min,收集上层萃取液,在 35 ~ 50℃ 水浴下减压蒸发萃取液至甲醇挥发完毕,用十二烷基硫酸钠胶束溶液溶解析出物;

[0033] 在上述处理的贝类样品溶液中加入过量酶标腹泻性贝毒和一定量的抗体,在 37℃ 孵化反应 30min,贝类样品中的腹泻性贝毒和酶标腹泻性贝毒竞争一定量的抗体:

[0034] 腹泻性贝毒 + 酶标腹泻性贝毒(过量) + 抗体(一定量) = 腹泻性贝毒 - 抗体复合物 + 酶标腹泻性贝毒 - 抗体复合物 + 剩余酶标腹泻性贝毒;

[0035] 将上述孵化反应混合液置于毛细管入口端,在分离毛细管两端加 14kV 电压,电动进样 5s 后,混合液中的腹泻性贝毒 - 抗体复合物、酶标腹泻性贝毒 - 抗体复合物和剩余酶标腹泻性贝毒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,在反应毛细管中,标记在腹泻性贝毒上的辣根过氧化物酶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;

[0036] 酶标腹泻性贝毒 - 抗体复合物和剩余酶标腹泻性贝毒上的辣根过氧化物酶的浓度不同,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,由此可对酶标腹泻性贝毒 - 抗体复合物以及贝类样品中的腹泻性贝毒进行定性定量分析。

[0037] 其实验结果:

[0038] 如图 3 所示,酶标腹泻性贝毒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,电泳峰出现在 100s 附近。

[0039] 如图 4 所示,过量的酶标腹泻性贝毒与抗体溶液在 37℃ 孵化反应 30min,形成酶标腹泻性贝毒 - 抗体复合物,将混合溶液 14kV 电动进样 5s 后进行电泳分离检测,峰 1 为过量酶标腹泻性贝毒催化底物形成的电泳峰,峰 2 为酶标腹泻性贝毒 - 抗体复合物催化底物形成的电泳峰,两个电泳峰峰形较好,可以达到基线分离。

[0040] 如图 5 所示,在上述过量酶标腹泻性贝毒与抗体混合溶液中加入扇贝样品,扇贝样品中的腹泻性贝毒同酶标腹泻性贝毒竞争一定量的抗体,生成未标记的腹泻性贝毒 - 抗体复合物,使得孵化后混合溶液中酶标腹泻性贝毒 - 抗体复合物的浓度降低,过量酶标腹

泻性贝毒浓度增大,因此,同图 4 相比,图 5 中酶标腹泻性贝毒的电泳峰(峰 1)升高,酶标腹泻性贝毒-抗体复合物的电泳峰(峰 2)降低,说明扇贝样品中含有腹泻性贝毒。

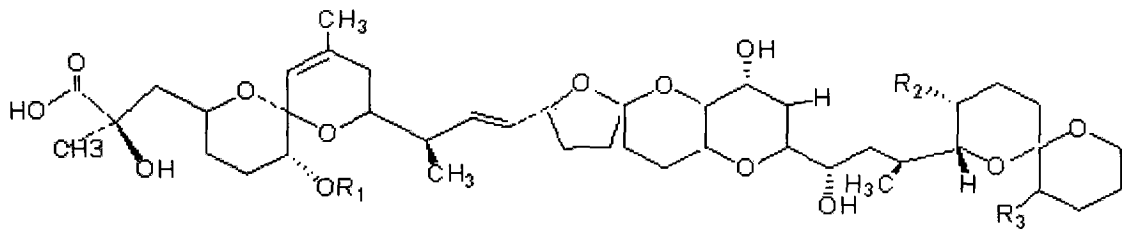


图 1

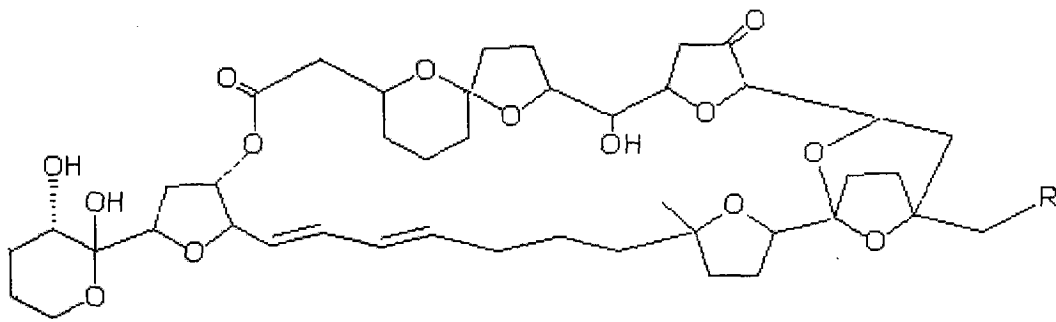


图 2



图 3

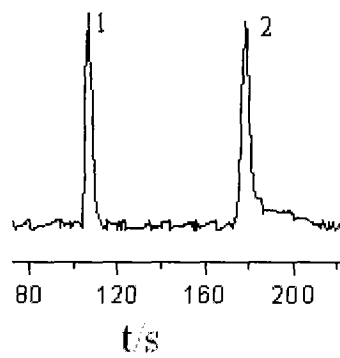


图 4

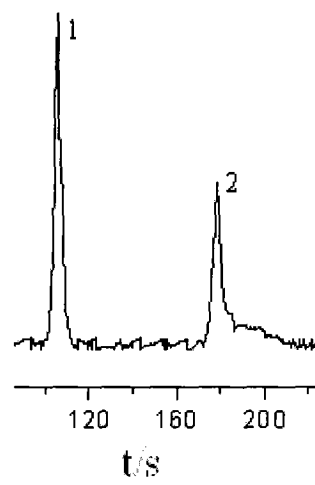


图 5

专利名称(译)	一种检测腹泻性贝毒的方法		
公开(公告)号	CN101825630A	公开(公告)日	2010-09-08
申请号	CN201010187786.4	申请日	2010-05-23
[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	张召香 李晓琳 葛安青 李雪梅 梅振华 张书圣		
发明人	张召香 李晓琳 葛安青 李雪梅 梅振华 张书圣		
IPC分类号	G01N33/561 G01N33/53 G01N27/447		
其他公开文献	CN101825630B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明描述了一种测定贝类样品中腹泻性贝毒的新型毛细管电泳电化学免疫分析方法。贝类样品中的腹泻性贝毒与酶标腹泻性贝毒同有限抗体竞争反应后在毛细管内分离，分离后的酶标腹泻性贝毒和酶标腹泻性贝毒-抗体复合物分别在反应管内同底物反应后进入电化学检测池进行柱端电化学检测，根据酶标腹泻性贝毒-抗体复合物峰的降低程度计算贝类样品中腹泻性贝毒的含量。该方法简化了样品处理过程，选择性好，准确度高，是检测贝类样品中腹泻性贝毒的理想方法。

