



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102426222 B

(45) 授权公告日 2015. 04. 08

(21) 申请号 201110259579. X

审查员 吴菲

(22) 申请日 2011. 09. 05

(73) 专利权人 上海海洋大学

地址 201306 上海市浦东新区沪城环路 999 号

(72) 发明人 卢瑛 郑诚 刘源 王锡昌

(74) 专利代理机构 上海硕力知识产权代理事务  
所 31251

代理人 王法男

(51) Int. Cl.

G01N 33/12(2006. 01)

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

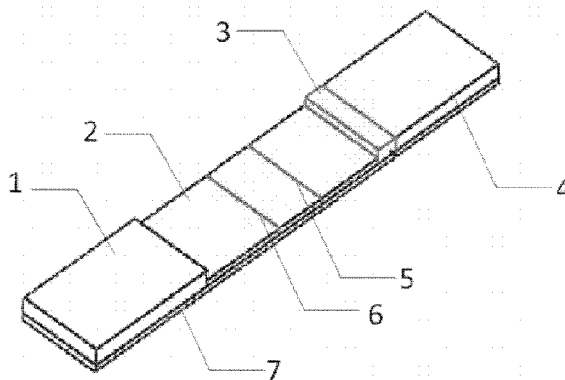
权利要求书2页 说明书7页 附图2页

(54) 发明名称

快速检测 TTX 的磁性免疫层析方法及检测试纸条的制备

(57) 摘要

本发明涉及一种快速检测 TTX 的磁性免疫层析方法及检测试纸条的制备,属于河豚毒素检测技术领域。将样品垫、经抗 TTX 特异性鼠系单克隆抗体修饰的磁珠标记的结合垫、预包被有 TTX-BSA 检测抗原的检测线 T 和山羊抗小鼠 IgG 的控制线 C 的层析膜、吸水垫依次相互交错约 1mm 粘贴在底板上,然后在上层覆盖透明塑料密封膜,组建成一种可快速检测 TTX 的磁性免疫层析试纸条;通过层析作用捕获免疫磁珠,依据样品层析后形成肉眼可见的 1~2 条显色条带,实现 TTX 的快速定性检测;将所构建的磁性免疫试纸条通过磁性分析仪进行检测,依据样品层析后形成的检测线和控制线的磁信号检测值可实现 TTX 的定量检测。



1. 一种快速检测 TTX 的磁性免疫层析试纸条,其特征在於:将样品垫、经抗 TTX 特异性鼠系单克隆抗体修饰的磁珠标记的结合垫、预包被有 TTX-BSA 检测抗原的检测线 T 和山羊抗小鼠 IgG 的控制线 C 的层析膜、吸水垫依次相互交错约 1mm 粘贴在底板上,然后在上层覆盖透明塑料密封膜,根据要求宽度切割即得到快速检测 TTX 的磁性免疫层析试纸条;其中,抗 TTX 特异性鼠系单克隆抗体修饰的磁珠称之为免疫磁珠;(1) 免疫磁珠的制备方法是选用直径为 50-200nm 的磁珠,使用 EDC 和 NHS 共价交联的方式将抗 TTX 特异性鼠系单克隆抗体标记在磁珠上;(2) 层析膜的包被方法是:用自动喷膜仪,以  $0.8 \mu\text{L}/\text{cm}$  的速度,将 TTX-BSA、山羊抗小鼠 IgG 溶液分别喷点在层析膜的检测线 T 和控制线 C 处,喷点时线与线间的间隔距离为 0.5-1.0cm;包被后的层析膜于  $37^{\circ}\text{C}$  的干燥箱中烘干 4-6 小时,置于干燥器中保存备用;检测时通过层析作用捕获免疫磁珠,样品层析后形成肉眼可见的 1~2 条显色条带;

其中, TTX-BSA 检测抗原制备方法是:将 TTX 与牛血清白蛋白 (BSA) 按 1 : 5 (w/w) 混合,加入 4% 甲醛溶液作为偶联剂,于  $30^{\circ}\text{C}$  下旋转反应 3d,反应完成后,将混合物取出后用商业化的 PD-10 脱盐柱,脱盐介质为 pH7.4 的 10mM PBS;所述 TTX 是指河豚毒素。

2. 一种快速检测 TTX 的磁性免疫层析方法,其特征在於:将样品垫、经抗 TTX 特异性鼠系单克隆抗体修饰的磁珠标记的结合垫、预包被有 TTX-BSA 检测抗原的检测线 T 和山羊抗小鼠 IgG 的控制线 C 的层析膜、吸水垫依次相互交错约 1mm 粘贴在底板上,然后在上层覆盖透明塑料密封膜,根据要求宽度切割即得到快速检测 TTX 的磁性免疫层析试纸条;其中,抗 TTX 特异性鼠系单克隆抗体修饰的磁珠称之为免疫磁珠;(1) 免疫磁珠的制备方法是选用直径为 50-200nm 的磁珠,使用 EDC 和 NHS 共价交联的方式将抗 TTX 特异性鼠系单克隆抗体标记在磁珠上;(2) 层析膜的包被方法是:用自动喷膜仪,以  $0.8 \mu\text{L}/\text{cm}$  的速度,将 TTX-BSA、山羊抗小鼠 IgG 溶液分别喷点在层析膜的检测线 T 和控制线 C 处,喷点时线与线间的间隔距离为 0.5-1.0cm;包被后的层析膜于  $37^{\circ}\text{C}$  的干燥箱中烘干 4-6 小时,置于干燥器中保存备用;(3) 检测过程是通过层析作用捕获免疫磁珠,依据样品层析后形成肉眼可见的 1~2 条显色条带,实现 TTX 的快速定性检测;将所构建的磁性免疫试纸条通过磁性分析仪进行检测,依据样品层析后形成的检测线 T 和控制线 C 的磁信号检测值实现 TTX 的定量检测;

其中, TTX-BSA 检测抗原制备方法是:将 TTX 与牛血清白蛋白 (BSA) 按 1 : 5 (w/w) 混合,加入 4% 甲醛溶液作为偶联剂,于  $30^{\circ}\text{C}$  下旋转反应 3d,反应完成后,将混合物取出后用商业化的 PD-10 脱盐柱,脱盐介质为 pH7.4 的 10mM PBS,所述 TTX 是指河豚毒素。

3. 如权利要求 2 所述的磁性免疫层析方法,其特征在於:所述的抗 TTX 特异性鼠系单克隆抗体是采用杂交瘤技术制备筛选所得、对 TTX 有特异性反应的单克隆抗体。

4. 如权利要求 2 所述的磁性免疫层析方法,其特征在於:

A. 单克隆抗体的制备与纯化:以 TTX-KLH 作为免疫原,免疫 BALB/C 小鼠,按常规的杂交瘤技术和极限稀释法制备和筛选单克隆抗体细胞株,然后将抗 TTX 的特异性抗体单克隆细胞株增殖培养,注射到 BALB/C 小鼠中制备腹水,制备所得腹水经 50% (w/v) 硫酸浓缩后,采用商业化的 Protein-G 亲和层析柱进行抗体的纯化;

B. 结合垫的处理方法是:将制备好的免疫磁珠悬浮液喷点在结合垫上以形成免疫磁珠标记结合垫。

5. 如权利要求 2 所述的磁性免疫层析方法,其特征在于,免疫磁珠的制备方法如下:

1) 吸取 2mg 羧基磁珠于离心管中,用 500  $\mu$ L, 0.01M 含 0.5% (v/v) Tween-20, pH 为 5.0 的 MES 溶液作为活化缓冲溶液清洗磁珠,将离心管置于磁分离架上使得磁珠与活化缓冲液分离,重复清洗几次,最后重悬磁珠;

2) 将新鲜配制的 EDC 和 NHS 加入磁珠悬液中活化羧基 30min,反应结束后先用上述 MES 溶液洗涤磁珠,再用 0.005M 硼酸盐吐温溶液作为偶联缓冲液洗涤磁珠 2 遍;

3) 加入 150  $\mu$ g 抗 TTX 特异性鼠系单克隆抗体,在旋转混合器上反应 3 小时;

4) 加入 1% (w/v) BSA 溶液室温下反应 30min;

5) 用硼酸盐吐温溶液洗涤免疫磁珠 4 次,将磁珠重悬,4 $^{\circ}$ C 保存备用。

## 快速检测 TTX 的磁性免疫层析方法及检测试纸条的制备

### 技术领域

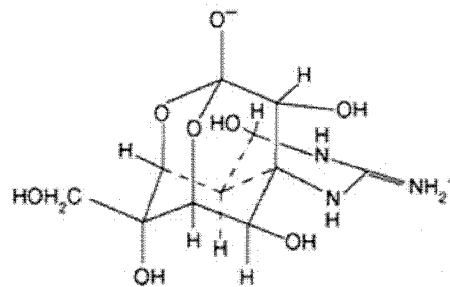
[0001] 本发明属于食品检验领域,特别是涉及一种快速检测 TTX 的磁性免疫层析方法及检测试纸条的制备,属于检测技术类。

### 背景技术

[0002] 河豚鱼肉味鲜美,营养丰富,中国、日本等亚洲居民素有食用的习惯,但河豚鱼的卵巢、肝脏、肠道等内脏却富含河豚毒素 (Tetrodotoxin, 简称 TTX),由于该毒素性质稳定,加之中毒后缺乏有效的解救措施,所以每年均有因误食有毒河豚鱼而中毒的报道,严重威胁消费者的生命安全。

[0003] TTX 是毒性最强的天然神经毒素之一,在自然界分布非常广泛。除存在于鲀形目鱼种中外,在某些蝾螈、蟾蜍、章鱼、海螺、海星等海水、淡水动物中,以及诸如扁形虫等微生物体内也曾检测出该毒素。TTX 理化性质稳定,能溶于水,不溶于无水乙醇和普通有机溶剂。对热、日光、酶类、盐类及酸稳定,易溶于稀醋酸中。TTX 的化学结构式如下图所示:

[0004]



[0005] 该毒素毒性比氰化钠强 1000 倍,毒素除直接作用于胃肠道引起局部刺激症状外,并被机体吸收进入血液中,可迅速使神经末梢及神经中枢发生麻痹。首先受害的是感觉神经麻痹,其次为各随机的运动神经末梢麻痹,使机体物理运动不能运动。毒量增大时则导致迷走神经麻痹,呼吸减少,脉搏迟缓,严重时体温及血压下降,最后发生血管运动神经中枢或横膈肌及呼吸神经中枢麻痹,引起呼吸停止,迅速死亡。

[0006] TTX 的检测技术研究始自 20 世纪 60 年代,传统的检测技术主要包括以小鼠检测法 (mouse bioassay, MBA) 为代表的生物检测技术;以荧光分光光度法 (fluorescence spectrophotometry)、液相色谱检测 (high pressure liquid chromatography, HPLC) 法为代表的仪器检测技术;以及以酶联免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 和免疫层析法 (lateral flow immunoassay, LFIA) 为代表的免疫分析技术等。

[0007] (1) TTX 的生物检测技术中,小鼠生物法是国际公认的检测方法,而且在日本被定为 TTX 的官方检测方法并广泛应用。小鼠生物法检测河豚毒素具有直观、快速、症状典型易于判断、易于操作、费用低等优点,且不需要特殊设备,其检测精度能满足水产品安全监测要求等特点,是一种广泛应用于检测河豚毒素的常规方法。该方法基于一定重量的小鼠经腹腔注射毒素后,其死亡时间的倒数与毒素剂量之间存在线性关系,可通过小鼠的死亡时间推断毒素毒力,用小鼠单位 (mouse unit, MU) 表示。目前 1MU 的定义是指在 30min 内杀

死一只 20g 左右的雄性 ddy 小鼠的毒素量,即 1MU 相当于 0.22  $\mu\text{g}$  TTX。但由于其费时费力,重复性差且易受到共存氨基酸和无机离子的影响而导致结果偏低等缺点,在国内并未广泛普及。

[0008] (2) TTX 的仪器分析检测技术包括了荧光、紫外分光光度分析和色谱分析等。荧光分光光度法是最早建立起来的定量检测 TTX 的仪器方法,其原理是通过检测荧光化合物  $\text{C}_9$  碱来测定 TTX 的量。检出限为 0.3mg/ml。TTX 在碱性条件下生成  $\text{C}_9$  碱的同时,也定量生成草酸钠,后者在 230nm 处有明显的吸收峰,根据此建立的紫外分光光度法检出限为 0.02 ~ 0.1mg/ml。荧光法和紫外分光光度法操作简便,但灵敏度低,专一性差。

[0009] 在色谱法中,目前国内多用液相色谱法 (HPLC) 检测 TTX,该方法灵敏度较高 (0.2 ~ 9.6  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )。我国已制定了相应的国标《GB/T 23217-2008 水产品中河豚毒素的测定——液相色谱-荧光检测法》。但该方法的样品前处理比较麻烦,需要进行柱后碱水解然后用荧光检测器测定,且所用仪器昂贵、检测费用相对较高。

[0010] 此外,日本学者曾采用液相-串联质谱 (LC/MS/MS) 分析法和液相-飞行时间质谱 (LC/TOF-MS) 分析法检测 TTX,检测限分别达到 10ng/ml 和 0.02  $\mu\text{g}/\text{g}$ 。气相色谱-质谱 (GC/MS) 联用分析法也曾被用于检测 TTX,检测限与 LC/MS/MS 一致,为 10ng/ml。由于色谱分析法检测过程简单、快速,同时配有高灵敏度的检测器,比较灵敏,是常用的检测方法之一,但对样品纯度要求较高。其缺点在于样品处理比较麻烦,所用仪器设备昂贵,检测成本高。

[0011] (3) 免疫分析方法由于其快速、灵敏,操作相对简单且专一性好等优点,在现代检测领域得到了快速发展。多数免疫分析法是基于 TTX 特异性单克隆抗体,也有基于抗血清开发的。目前应用最广泛的是 ELISA 法,该方法是以固-液抗原抗体反应体系为基础的检测方法,以国标《GB/T 5009.206-2007 鲜河豚鱼中河豚毒素的测定》为代表,目前国内已有市售的 TTX ELISA 检测试剂盒。该方法不仅保证了抗原、抗体反应的特异性及定量关系,且检测灵敏度高 (检测限为 10ng/ml),但其操作过程需要专用设备和专业人员进行检测,操作步骤较为繁琐,检测时间一般需 ~ 3 小时。LFIA 技术是 ELISA 技术原理的扩展应用,一般使用乳胶颗粒、胶体硒、胶体金、脂质体及上转磷等作为着色标记物。在层析时,标记物与待测物之间形成的复合物可被相应的配体所捕获而聚集于硝化纤维膜上的检测线并呈现出标记物所带有的颜色,因此可以通过纤维膜上显色条的有无、颜色深浅和反射光线等从而实现检测目的,由于一般不需要特殊大型设备,从而具有操作简便、快速灵敏的优点。是一种适用于现场的快速检测方法,在目前公开的报道中,大都以胶体金颗粒作为标记物,因此又被称为胶体金免疫层析法。2010 年, Yu Zhou 等人报道了一种“基于胶体金免疫层析的河豚鱼组织中河豚毒素的检测方法”,但目前国内外尚未见河豚毒素免疫层析检测试纸条的专利报道。

[0012] 磁性免疫层析技术以超顺磁性颗粒代替传统的标记物来进行免疫层析,通过检测结合在超顺磁性纳米颗粒上的目标物来提供对生物样本的定量检测数据,再利用被磁颗粒标记抗体所捕获的免疫复合物与磁信号之间的线性关系即可实现对生物样本的快速定量检测目的,磁性免疫层析技术具有灵敏度高、稳定性强、线性范围宽、操作简便、快速等优点。

## 发明内容

[0013] 本发明的目的:针对现有检测技术不能快速、简便地检测 TTX 的不足和缺陷,提供一种以免疫磁珠为标记物的快速检测 TTX 的磁性免疫层析方法及磁珠标记层析试纸条的制备。从而实现快速、简便且可定量检测 TTX 目的。

[0014] 本发明提出的这种快速检测 TTX 的磁性免疫层析方法,其特征在于:

[0015] 将样品垫、经抗 TTX 特异性鼠系单克隆抗体修饰的磁珠标记的结合垫、预包被有 TTX-BSA 检测抗原的检测线 T 和山羊抗小鼠 IgG 的控制线 C 的层析膜、吸水垫依次相互交错约 1mm 粘贴在底板上,然后在上层覆盖透明塑料密封膜,组建成一种可快速检测 TTX 的磁性免疫层析试纸条;通过层析作用捕获免疫磁珠,依据样品层析后形成肉眼可见的 1~2 条显色条带,实现 TTX 的快速定性检测;或者将所构建的磁性免疫试纸条通过磁性分析仪进行检测,依据样品层析后形成的检测线和控制线的磁信号检测值可实现 TTX 的定量检测。

[0016] 所述的抗 TTX 特异性单抗是采用杂交瘤技术制备筛选所得、对 TTX 有特异性反应的特异性单抗体。

[0017] 所述的层析试纸条的制备方法如下:

[0018] A. 检测抗原 TTX-BSA 偶联物的制备:

[0019] 将 TTX 与牛血清白蛋白 (BSA) 按 1:5 重量比 (W/W) 混合,加入 4% 甲醛溶液作为偶联剂,于 30°C 下旋转反应 3d,反应完成后,将混合物取出后用商业化的 PD-10 脱盐柱,脱盐介质为 pH 7.4 的 10mM PBS;脱盐处理时按照所附产品操作说明书对 TTX-BSA 偶联物进行脱盐。

[0020] B. 抗体的制备与纯化:

[0021] 以 TTX-KLH 作为免疫原,免疫 BALB/C 小鼠,按常规的杂交瘤技术和极限稀释法制备和筛选单抗细胞株,然后将抗 TTX 的特异性抗体细胞株增殖培养,注射到 BALB/C 小鼠中制备腹水,制备所得腹水经 50% (w/v) 硫酸浓缩后,采用商业化的 Protein-G 亲和层析柱进行抗体的纯化;具体进行亲和层析纯化处理时,按照所附产品操作说明书进行。

[0022] C. 免疫磁珠的制备:

[0023] 选用直径为 50-200nm 的磁珠,使用碳二甲胺 (EDC) 和琥珀酰亚胺 (NHS) 共价交联的方式将抗 TTX 单抗标记在磁珠上形成免疫磁珠;

[0024] D. 结合垫的处理:

[0025] 将制备好的免疫磁珠悬浮液喷点在结合垫上以形成免疫磁珠标记结合垫;喷点时也可以采用人工手动喷液或定量喷液装置来进行。

[0026] E. 层析膜的包被:

[0027] 用自动喷膜仪,以 0.8  $\mu$ L/cm 的速度,将选定浓度的 TTX-BSA、山羊抗小鼠 IgG 分别喷点在层析膜的 T 线和 C 线处,喷点时线与线间的间隔距离为 0.5-1.0cm;包被后的层析膜于 37°C 的干燥箱中烘干 4-6 小时,置于干燥器中保存备用;

[0028] F. 试纸条的组装与制备:

[0029] 将样品垫、结合了抗 TTX 免疫磁珠的结合垫、包被膜、吸水垫依次相互交错约 1mm 粘贴在底板上,然后在上层覆盖透明塑料密封膜;根据要求宽度切割即可得到磁性免疫层析试纸条。

[0030] 免疫磁珠的制备方法如下:

[0031] 1) 吸取 2mg 羧基磁珠于离心管中,用 500  $\mu$ L 0.01M 含 0.5% (v/v) Tween-20, pH 为 5.0 的 MES 溶液作为活化缓冲溶液清洗磁珠,将离心管置于磁分离架上使得磁珠与活化溶液分离,重复清洗几次,最后重悬磁珠;

[0032] 2) 将新鲜配制的 EDC 和 NHS 加入磁珠悬液中活化羧基 30min,反应结束后先用 MEST 缓冲液洗涤磁珠,再用 0.005M 硼酸盐吐温溶液(简称 BST)作为偶联缓冲液洗涤磁珠 2 遍;

[0033] 3) 加入 150  $\mu$ g 抗 TTX 单克隆抗体,在旋转混合器上反应 3 小时;

[0034] 4) 加入 1% (w/v) BSA 溶液室温下反应 30min;

[0035] 5) 用 BST 溶液洗涤免疫磁珠 4 次,将磁珠重悬,4 $^{\circ}$ C 保存备用。

[0036] 本发明与现有技术相比具有如下优点:

[0037] 将超顺磁性纳米材料、免疫层析技术和磁性检测仪相结合,通过构建以免疫磁珠为标记物的免疫层析试纸条,既可满足定性检测需求,又能实现快速定量检测,具有灵敏度高、耗时短、方便易用等特点。

## 附图说明

[0038] 图 1 为以免疫磁珠为标记物的磁性免疫层析试纸条的结构示意图。

[0039] 图 1 所示的磁性免疫层析试纸条由依序排列的吸水垫 1、层析膜 2(硝酸纤维素膜)、结合垫 3、样品垫 4 及 PVC 底板 7 组成。层析膜 2 上包被有两条线,其中 5 为检测线 T,喷点有 TTX-BSA;6 为控制线 C,喷点有山羊抗小鼠 IgG。

[0040] 图 2 ~ 5 为应用所构建磁性免疫层析试纸条进行 TTX 检测的结果设定示意图。

[0041] 其中:

[0042] 图 2 为采用所述磁性免疫层析试纸条对 TTX 阴性样品的检测结果:即检测线 T 和控制线 C 均有显色条带。

[0043] 图 3 为采用所述磁性免疫层析试纸条对 TTX 的强阳性检测结果:即检测线 T 处无显色条带,控制线 C 处有显色条带。

[0044] 图 4 为采用所述磁性免疫层析试纸条对 TTX 检测无效的结果:即检测线 T 处有显色条带,而控制线 C 处无显色条带。

[0045] 图 5 为采用所述磁性免疫层析试纸条对 TTX 检测无效的结果:即检测线 T 和控制线 C 均无显色条带。

[0046] 图 6 为采用所述磁性免疫层析试纸条对河豚鱼肌肉组织中标 TTX 的定量检测曲线。

[0047] 图 7 为采用所述磁性免疫层析试纸条对河豚鱼肝脏组织中标 TTX 的定量检测曲线。

[0048] 图 8 为采用所述磁性免疫层析试纸条对 TTX 检测河豚鱼样品的定性检测结果。

[0049] 其中:

[0050] ①号为阴性肌肉对照;

[0051] ②号为阴性肝脏对照;

[0052] ③号为野生暗纹东方豚肌肉样品;

[0053] ④号为野生菊黄东方豚肌肉样品;

[0054] ⑤号为野生黄鳍东方豚肌肉样品；

[0055] ⑥号为野生菊黄东方豚肝脏样品；

[0056] ⑦号为野生菊黄东方豚卵巢样品。

[0057] 为进一步说明本发明的快速检测 TTX 的磁性免疫层析试纸条及其制备方法,特举以下的实施例进行说明,该实施例是为了解释而不是以任何方式限制本发明。

### 具体实施方式

[0058] 本发明所述的快速检测 TTX 的磁性免疫层析试纸条如图 1 所示,该试纸条是在底板 7 上依次交错 1mm 地粘贴上层析膜 2、免疫磁珠标记结合垫 3、样品垫 4、吸水垫 1,并在上层覆盖透明塑料密封膜组装而成的试纸条,层析膜上预包被有 TTX-BSA 检测线 T 和控制性 C。

[0059] 在具体实施例中所采用的 TTX-BSA 检测抗原及抗 TTX 特异性单抗都是非商业化产品。利用所述的磁性免疫层析试纸条进行 TTX 检测时采用的是竞争法检测原理,当待测样本中含有 TTX 分子时,TTX 分子先与结合垫上的免疫磁珠结合。随着层析作用的进行,当经过检测线 T 时,未结合 TTX 分子的免疫磁珠与 T 线处的 TTX-BSA 检测抗原结合从而停留在 T 线处,未被检测抗原捕获的免疫磁珠则继续前行;当经过控制线 C 时,C 线处的二抗与免疫磁珠结合从而同样使磁珠停留在该处。整个层析反应在 30 分钟内完成,一般反应 15 分钟后,在检测线 T 和控制线 C 上出现肉眼清晰可见的显色条带。将试纸条放入磁性分析仪的读卡槽中,即可在 T 线处获得相应的磁信号检测值。阳性样品的 T 处磁信号值一般弱于阴性样品,差别越大就表示阳性反应越强。

[0060] 实施例 1:磁性免疫层析法检测肌肉提取液中的 TTX

[0061] (1) 检测抗原 (TTX-BSA 偶联物) 的制备:将 TTX 与牛血清白蛋白 (BSA) 按 1:5 (w/w) 混合,加入 4% 甲醛溶液作为偶联剂,于 30℃ 下旋转反应 3d。反应完成后,将混合物取出后用商业化的 PD-10 脱盐柱,按照所附产品操作说明书对 TTX-BSA 偶联物进行脱盐,脱盐介质为 10mMPBS (pH 7.4)。

[0062] (2) 抗体的制备与纯化:以 TTX-KLH 作为免疫原,免疫 BALB/C 小鼠,按常规的杂交瘤技术和极限稀释法制备和筛选单抗细胞株。然后将抗 TTX 的特异性抗体细胞株增殖培养,注射到 BALB/C 小鼠中制备腹水。制备所得腹水经 50% (w/v) 硫酸浓缩后,采用商业化的 Protein-G 亲和层析柱,按照所附产品操作说明书进行抗体的纯化。

[0063] (3) 免疫磁珠的制备:选用直径为 200nm 的磁珠,吸取 2mg 羧基磁珠于离心管中,用 500  $\mu$ L 0.01M MEST 作为活化缓冲溶液清洗磁珠,将离心管置于磁分离架上使得磁珠与活化溶液分离,重复清洗几次后重悬磁珠。随后将 EDC 和 NHS 加入磁珠悬液中活化羧基 30min,反应结束后先用 MEST 缓冲液洗涤磁珠,再用 0.005M BST 作为偶联缓冲液洗涤磁珠 2 遍。接着加入 150  $\mu$ g 抗 TTX 单克隆抗体,在旋转混合器上反应 3 小时。然后加入 1% (w/v) BSA 溶液室温下封闭反应 30min。反应结束后用 BST 溶液洗涤封闭后的免疫磁珠 4 次,弃去洗涤液,将磁珠重悬,4℃ 保存备用。

[0064] (4) 将制备好的免疫磁珠人工手动喷点在结合垫上制备成免疫磁珠标记结合垫。

[0065] (5) 层析膜的包被:用 10mM PBS, pH7.4 的包被缓冲液将 TTX-BSA 检测抗原、山羊抗小鼠 IgG 分别稀释到 0.4mg/ml、1mg/ml。然后用自动喷膜仪,以 0.8  $\mu$ L/cm 的速度均匀喷

点在层析膜上,进行层析膜的包被,形成 TTX-BSA 检测线 T,和山羊抗小鼠 IgG 控制线 C;包被时线与线间的间隔距离为 0.5-1.0cm;包被后的层析膜(简称包被膜)于 37℃ 的干燥箱中烘干 4-6 小时,置于干燥器中保存备用。

[0066] (6) 试纸条的制备:将样品垫、免疫磁珠标记结合垫、包被膜、吸水垫依次相互交错约 1mm 粘贴在底板上,然后在上层覆盖透明塑料密封膜;切割成 0.5cm 宽的试纸条备用。

[0067] (7) 样品的检测:用经确认无毒的河豚鱼肌肉提取液梯度稀释 TTX 标准品作为样品。在试纸条的样品垫上加 100  $\mu$ L 样品,层析 20min 后观察结果。阴性结果为 T 线和 C 线均出现明显的条带;阳性结果为 T 线颜色较浅或不出现条带,而 C 线出现明显条带。也可将滴有待测样品液的磁性免疫层析试纸条装入专用的试纸条卡槽,插入磁信号阅读器 MAR 仪中阅读磁信号进行定量分析,绘制标准曲线。

[0068] 实施例 2:磁性免疫层析法检测河豚鱼内脏组织中的 TTX

[0069] 除了样品检测步骤中,检测样品为用经确认无毒的肝脏提取液梯度稀释 TTX 标准品。其它步骤同实例 1。

[0070] 实施例 3:磁性免疫层析法检测野生河豚鱼组织中的 TTX

[0071] (1) 河豚鱼组织的样品制备

[0072] 以河豚鱼肌肉组织为例。取 5g 河豚鱼肌肉组织,剪碎,加入 25ml 0.1% 的乙酸,煮沸搅拌 10min。冷却至室温后 4000rpm 离心 10min,上清转移入新的 50ml 离心管。沉淀再加入 20ml 0.1% 乙酸,再煮沸 3min。冷却至室温后,所有的液体及煮沸的样品都加到离心管中,4000rpm 离心 10min。取上清,量体积,置分液漏斗中,加入等体积乙醚,脱脂 2 次。将水层放入 50ml 容量瓶中。用 1M 氢氧化钠调节提取液中的 pH 值至 6.5 ~ 7.4,然后加入 PBS 至 50ml,提取液 4℃ 保存备用。

[0073] (2) 样品检测

[0074] 在构成免疫层析检测试纸条的样品垫上加 100  $\mu$ L 样品,层析 20min 后观察结果。阴性结果为 T 线和 C 线均出现明显的条带;阳性结果为 T 线颜色较浅或不出现条带,而 C 线出现明显条带。也可将滴有待测样品液的磁性免疫层析试纸条装入专用的试纸条卡槽,插入磁信号阅读器 MAR 仪中阅读磁信号进行定量检测,结合标准曲线,计算出待测样品中 TTX 的浓度。

[0075] 所构建的磁性免疫层析试纸条用磁性分析仪 (Magnetic Assay Reader,简称 MAR 仪)进行检测,依据样品层析后形成的检测线和控制线的磁信号检测值,可实现 TTX 的定量检测。

[0076] (3)ELISA 试剂盒法检测

[0077] 采用市售的 ELISA 试剂盒(中国疾病预防控制中心),按照产品说明书处理样品、制备标线,依据标线计算 TTX 的含量。

[0078] 两种方法的检测结果如下表所示:

[0079]

| 序号 | 样品名称  | ELISA 法检测值<br>( $\mu\text{g/g}$ ) | ELISA 法毒性<br>报告 | 试纸条法检测值<br>( $\mu\text{g/g}$ ) | 试纸条法毒性<br>报告 |
|----|-------|-----------------------------------|-----------------|--------------------------------|--------------|
| 1  | 暗纹-肌肉 | N.D                               | 无毒              | N.D                            | 无毒           |
| 2  | 菊黄-肌肉 | $0.18 \pm 0.03$                   | 无毒              | $0.30 \pm 0.14$                | 无毒           |
| 3  | 黄鳍-肌肉 | N.D                               | 无毒              | $0.14 \pm 0.03$                | 无毒           |
| 4  | 菊黄-肝脏 | $560.21 \pm 0.05$                 | 剧毒              | $713.19 \pm 14.35$             | 剧毒           |
| 5  | 菊黄-卵巢 | $816.33 \pm 0.32$                 | 剧毒              | $966.27 \pm 1.06$              | 剧毒           |

[0080] 注 :N. D :低于该检测方法的最低检测限。

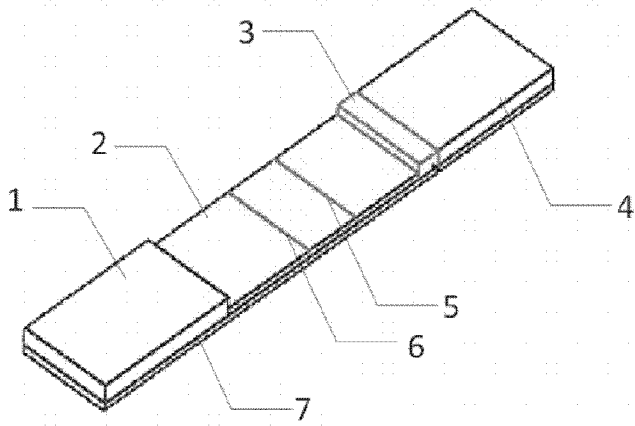


图 1

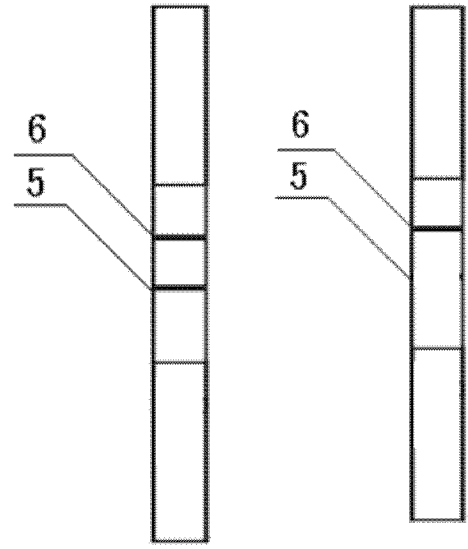


图 2

图 3

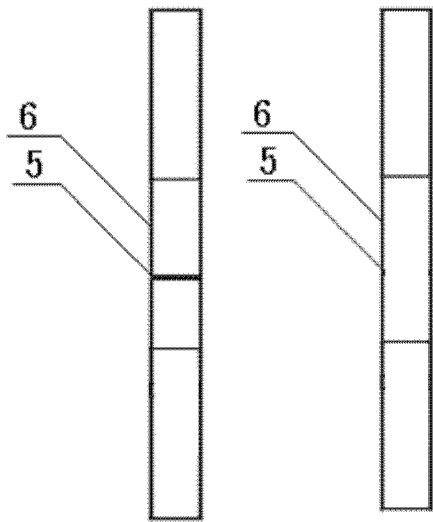


图 4

图 5

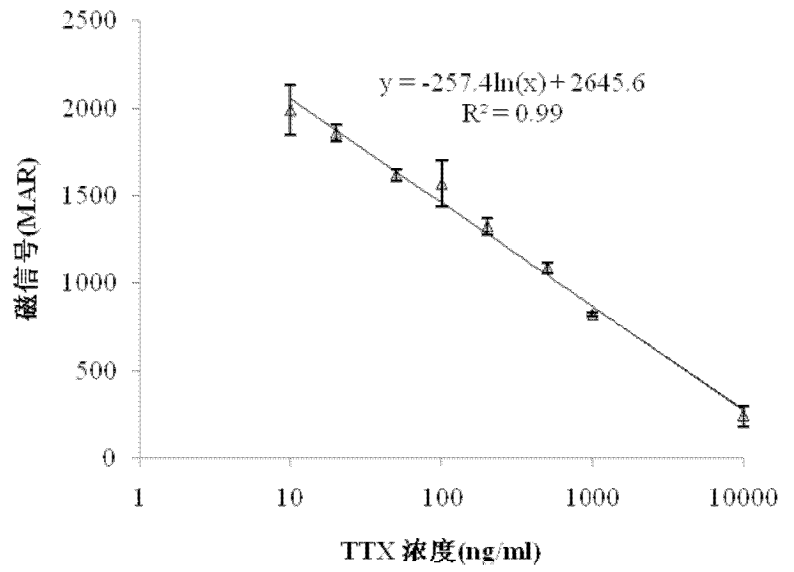


图 6

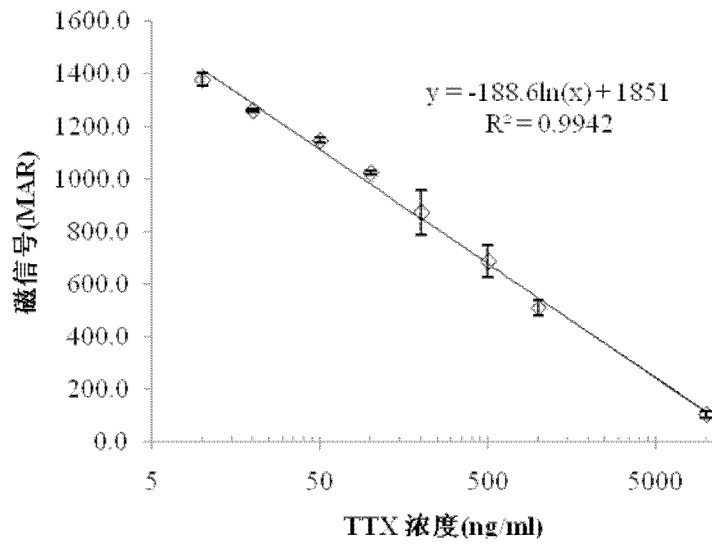


图 7

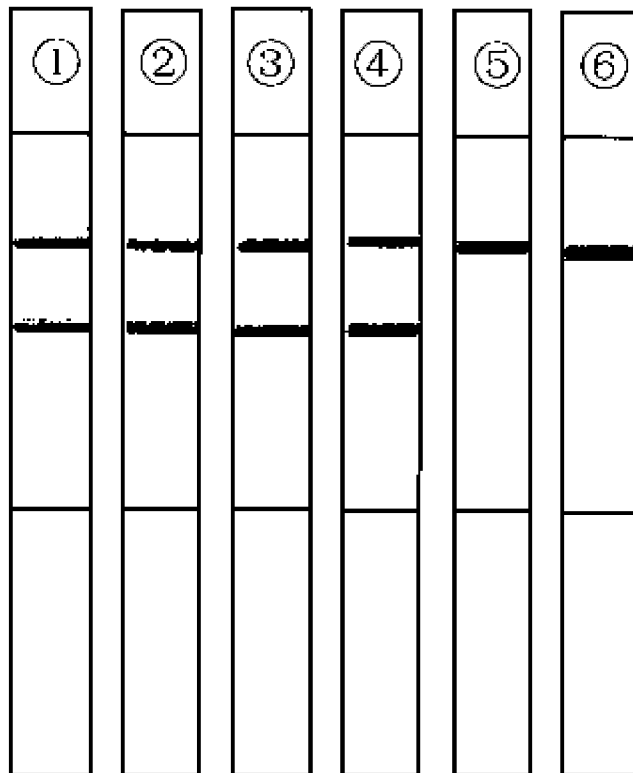


图 8

|                |  |         |            |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 快速检测TTX的磁性免疫层析方法及检测试纸条的制备                      |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN102426222B</a>                   | 公开(公告)日 | 2015-04-08 |
| 申请号            | CN201110259579.X                               | 申请日     | 2011-09-05 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 上海海洋大学   |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 上海海洋大学   |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 上海海洋大学   |         |            |
| [标]发明人         | 卢瑛<br>郑诚<br>刘源<br>王锡昌                          |         |            |
| 发明人            | 卢瑛<br>郑诚<br>刘源<br>王锡昌                          |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/12 G01N33/577 G01N33/531                |         |            |
| 审查员(译)         | 吴菲   |         |            |
| 其他公开文献         | CN102426222A                                   |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a> |         |            |

摘要(译)

本发明涉及一种快速检测TTX的磁性免疫层析方法及检测试纸条的制备，属于河豚毒素检测技术领域。将样品垫、经抗TTX特异性鼠系单克隆抗体修饰的磁珠标记的结合垫、预包被有TTX-BSA检测抗原的检测线T和山羊抗小鼠IgG的控制线C的层析膜、吸水垫依次相互交错约1mm粘贴在底板上，然后在上层覆盖透明塑料密封膜，组建成一种可快速检测TTX的磁性免疫层析试纸条；通过层析作用捕获免疫磁珠，依据样品层析后形成肉眼可见的1~2条显色条带，实现TTX的快速定性检测；将所构建的磁性免疫试纸条通过磁性分析仪进行检测，依据样品层析后形成的检测线和控制线的磁信号检测值可实现TTX的定量检测。

