

[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 200510109494.8

[51] Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

C12Q 1/02 (2006.01)

[43] 公开日 2006 年 6 月 14 日

[11] 公开号 CN 1786715A

[22] 申请日 2005.10.24

[21] 申请号 200510109494.8

[71] 申请人 中国海洋大学

地址 266003 山东省青岛市市南区鱼山路 5 号

[72] 发明人 米铁柱 亓海刚 孙 静 甄 毓
赵丽媛 何闪英 于志刚

[74] 专利代理机构 北京天平专利商标代理有限公司
代理人 王宏星

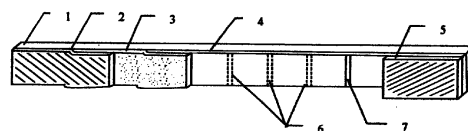
权利要求书 2 页 说明书 10 页 附图 3 页

[54] 发明名称

裸甲藻半定量检测试纸条及其制备使用方法

[57] 摘要

本发明描述了一种基于胶体金免疫层析分析技术 (gold immuno chromato graphy assay, GICA) 的半定量检测裸甲藻试纸条。包括塑料载体板、硝酸纤维素膜和玻璃纤维素膜。检测试纸条硝酸纤维层、玻璃纤维层分别用胶固定在塑料载体板上；检测试纸条硝酸纤维膜上设有裸甲藻抗原分级标记线、质控线；吸水玻璃纤维素膜层置于硝酸纤维膜检测层右端上方；该载体中部设有硝酸纤维膜检测层，在该检测层与加样端吸水层交界处，设有载有胶体金标记的兔抗裸甲藻抗体的玻璃纤维素膜抗体标记层。本发明为常规环境监测、渔业养殖水体检测、以及赤潮生效过程监测的现场实验，提供快速简便的对赤潮多发藻进行半定量的检测方法。



- 1、一种裸甲藻半定量检测试纸条，包括塑料载体板，玻璃纤维膜样品层、玻璃纤维膜抗体标记层、硝酸纤维膜检测层、玻璃纤维膜吸水层，其特征在于：所述检测试纸条玻璃纤维膜样品层、玻璃纤维膜抗体标记层、硝酸纤维膜检测层、玻璃纤维膜吸水层顺式胶合固定在塑料载体板一侧；所述检测试纸条硝酸纤维膜检测层上设有裸甲藻抗原分级检测线、二抗质控线；所述玻璃纤维膜吸水层胶合在硝酸纤维膜检测层右端之上；所述塑料载体板中部设有硝酸纤维膜检测层，在该检测层与玻璃纤维膜样品层交界处，设有载有胶体金标记的裸甲藻抗体的玻璃纤维膜抗体标记层，该层一端置于玻璃纤维膜样品层下，并与塑料载体板胶合，另一端设置在硝酸纤维膜检测层之上，并与硝酸纤维膜检测层胶合。
- 2、根据权利要求1所述裸甲藻半定量检测试纸条，其特征在于，所述裸甲藻半定量检测试纸条硝酸纤维膜检测层上的裸甲藻抗原分级标记线由检测浓度分别为 10^{10} 个/ m^3 、 10^8 个/ m^3 、 10^6 个/ m^3 的三条标记线组成。
- 3、根据权利要求1所述裸甲藻半定量检测试纸条，其特征在于，所述裸甲藻半定量检测试纸条硝酸纤维膜检测层上的二抗质控线包被有羊抗兔 IgG；裸甲藻半定量检测试纸条玻璃纤维膜抗体标记层上载有胶体金标记的兔抗裸甲藻抗体。
- 4、根据权利要求1、2或3所述裸甲藻半定量检测试纸条，其特征在于，所述裸甲藻半定量检测试纸条玻璃纤维膜抗体标记层上的胶体金标记的兔抗裸甲藻抗体制备方法如下：
 - (1) 胶体金的制备：鞣酸—柠檬酸三钠还原法制备 20~30nm 的胶体金，4℃保存；
 - (2) 兔抗裸甲藻抗体的制备：将生长旺盛的裸甲藻细胞培养溶液用终浓度为 1~3% 的甲醛固定过夜，8000~12000r/min 离心 10min，收集藻细胞沉淀；藻细胞团块再用蒸馏水清洗一次，PBS 清洗二次，每次均通过离心收集藻细胞，离心条件均为，8000~12000r/min，8~12min；将收集的藻细胞分装于 1.5ml Eppendorf 管，将裸甲藻藻细胞破碎物用灭菌的 0.3~0.6ml PBS 重悬，混匀，与等体积的弗氏完全佐剂混合乳化，乳化程度尽量

完全；初次免疫剂量分别约为 1×10^6 、 2×10^6 和 4×10^6 个细胞每只动物；静脉采血，采集的血液室温放置 2 小时，然后 $2000 \sim 6000 \text{r/min}$ ，离心 5min，分离血清， 4°C 冷藏保存。

- 5、 根据权利要求 1 所述裸甲藻半定量检测试纸条，其特征在于，所述裸甲藻半定量检测试纸条硝酸纤维膜检测层上的二抗质控线包被有羊抗鸡 IgG；裸甲藻半定量检测试纸条玻璃纤维膜抗体标记层上载有胶体金标记的鸡抗裸甲藻抗体。
- 6、 根据权利要求 1 所述裸甲藻半定量检测试纸条，其特征在于，所述裸甲藻半定量检测试纸条硝酸纤维膜检测层上的二抗质控线包被有羊抗鼠 IgG；裸甲藻半定量检测试纸条玻璃纤维膜抗体标记层上载有胶体金标记的鼠抗裸甲藻抗体。
- 7、 根据权利要求 1 所述裸甲藻半定量检测试纸条，其特征在于，所述裸甲藻半定量检测试纸条的检测范围是：藻细胞浓度检出下限为 10^6 个/ m^3 ，在藻细胞浓度 $10^6 - 10^{10}$ 个/ m^3 的范围内提供三级区分的半定量检测结果 10^{10} 个/ m^3 、 10^8 个/ m^3 、 10^6 个/ m^3 ；检测时间少于 30 分钟。
- 8、 一种裸甲藻半定量检测试纸条的使用方法，其特征在于，所述裸甲藻半定量检测试纸条的使用方法是：将被检测样品溶液过滤，滤膜对折放入 5ml 离心管中，加 3ml PBS 将滤膜完全浸泡，超声波破碎 5 分钟，去所得溶液 1ml，剩余 2ml 溶液加入到 2ml 的离心管中，将裸甲藻半定量检测试纸条玻璃纤维膜样品层插入离心管中，15~30 分钟后可观察结果。

裸甲藻半定量检测试纸条及其制备使用方法

技术领域

本发明属于基于胶体金免疫层析分析技术（gold immuno chromatography assay , GICA）的浮游藻类半定量免疫层析检测分析技术领域，特别涉及裸甲藻的半定量免疫层析检测分析试纸条及其制备检测方法领域，其属于免疫学和浮游生物学交叉技术领域。

背景技术

浮游植物的分类、鉴定和定量一直是藻类学和生态学研究中最基础的课题之一。对生态动力学、赤潮发生机制与预警预报、海水养殖水域常规检测等都有着重要意义。对于常规环境监测、渔业养殖水体检测等应用领域来说，需要一种对主要赤潮藻进行现场半定量检测的方法。本发明内容主要涉及海洋浮游植物的检测技术和胶体金免疫层析分析技术两个技术领域。

现有的检测方法主要有基于形态学特征的分析方法、基于细胞色素的检测方法、基于分子探针的检测技术，以及不同技术的交叉如流式细胞术和 FLOWCAM 技术等。这些技术极大地丰富了浮游植物观测技术，推动了相关研究的发展，各项技术均有着突出的优势也存在着难以克服的制约因素。现有的浮游藻类检测方法主要包括：

1、基于形态学特征的分析方法：传统的基于形态学的光镜和电镜观测技术是浮游植物鉴定与定量的基础，至今仍有着不可动摇的地位，发挥着很重要的作用。但其存在着耗时长，需要富有经验的专家、专业仪器设备等限制性因素。FLOWCAM 技术是形态学与流式细胞术的结合，利用计算机技术对捕获的照片进行识别分类。相对传统技术，这一技术加快了分析的速度，但是仍然存在需要专家干预，形态相似的种类无法区分的缺点。同时由于技术的限制，该技术获得的图像分辨率较差，更在一定程度上影响了识别的准确度。

2、流式细胞术：该技术通过逐个测量细胞的散射光、细胞自体荧光、染色荧光和免疫标记荧光等来检测其生理生化指标并对其分类、收集。现已成为环境微生物学中的十分有用的工具。该技术的限制主要是在环境变化的情况下，细胞的形态、大小及生理生化特性会发生显著变化，而这正是流式细胞术的检测基础，这将影响该技术对于各种类的正确区分。同时仪器成本较高，对工作环境要求严格，需要良好训练的专业技术人员等因素也限制了其应用。

3、基于细胞色素的检测方法：由于不同种属的浮游藻中含有不同的色素组成，或特征色素，基于细胞色素的检测方法就是藉由检测样品中各种色素的丰度（及特征色素）对不同的浮游植物类群加以区分和定量。依据对色素的检测方法不同而有化学分类学方法、

现场荧光、遥感反演等不同的技术。这些技术均可迅速的获取结果，但由于藻类色素的相似性，这些技术仅能提供浮游植物几种类群的分类数据，难以提供精确到种属结果。化学分类法是以分类对象各类群中化学成分的特征为分类依据。可以在藻纲一级进行较好的分类，甚至于对于某些形态学上十分相近的种类在标志化合物上也有着差异，可以借助这一方法区分鉴定。但在属或种之间的分类还不能完全实现。现场荧光方法是在光源的激发下，检测藻类中色素发出的荧光，借助光谱的差异可以区分不同的浮游植物类群。这一方法可以迅速测定，并可以在水下等现场环境连续测定，但此方法只能将浮游植物根据其色素分为几个类群。利用卫星遥感数据，对海域叶绿素含量进行测量。这一方法可以迅速提供广大区域的数据，但往往只能反演叶绿素含量，估算浮游植物总量，难以进一步提供浮游植物的类群等信息。同时，由于环境因素的变化、不同的生长周期，浮游植物的色素含量会发生变化，基于细胞色素的各种方法的检测结果也会受到影响。

对于常规环境监测、渔业养殖水体检测来说，需要一种对主要赤潮藻进行现场快速简易低成本的检测方法。在现有浮游植物检测方法中尚未有完全适用的方法。而临床检测中的 GICA 技术由于具有不需仪器，操作简单，检测快速，并且可以给出半定量的结果而成为满足这一领域需求的最佳选择。目前国际国内在应用免疫学方法检测浮游植物的研究，多以制备抗体和 ELISA 检测居多，未有采用 GICA 技术检测浮游植物的研究。与 ELISA 不同处是 GICA 反应时间大大缩短，不需要仪器设备，仅需要数十分钟就完成了 ELISA 需数小时才能显示的结果。因为在 GICA 中，高浓度的抗体集中固定在纤维素的微孔中，待测抗原在层析时，流经微孔与固定的高浓度抗体紧密接触，很快完成免疫结合反应。这就是以膜为基础的胶体金快速免疫结合分析中的免疫浓缩作用（immunoconcentration）。在 ELISA 中，待测抗原要在液相中经过扩散作用，逐渐与吸附在固相表面的抗体结合。同时，标记抗体也需要同样的扩散结合过程形成抗体-抗原-标记抗体复合物，故需时间较长。

本发明通过免疫学技术，以藻细胞或提取物免疫实验动物，制备浮游藻的多抗，利用抗体，建立 GICA 的免疫分析方法。不需仪器，操作简单，检测快速，并且可以给出半定量的结果。

发明内容

胶体金标记技术 (Immunogold labeling technique) 是以胶体金作为示踪标记物，应用于抗原抗体反应的一种新型免疫标记技术；胶

体金是由氯金酸在还原剂如白磷、抗坏血酸、枸橼酸钠和鞣酸等作用下，聚合成特定大小的金颗粒，并由于静电作用成为一种稳定的胶体状态，故称为胶体金。利用它在碱性环境中带负电荷的性质，与蛋白质分子的正电荷基团藉静电吸引而形成牢固结合，除抗体蛋白外，胶体金还可与其他多种生物大分子结合。根据胶体金的一些物理特性，如高电子密度、颗粒大小、形状及颜色反应，加上结合物所具有的免疫-生物学特性，使其在免疫学、组织学、病理学及细胞生物学标记研究工作中得到广泛应用。

本发明的内容是首先制备抗体金探针，以 GICA（胶体金免疫层析技术）技术为基础，通过精确控制膜上捕捉配体的量，使用多条不同浓度的平行捕捉配体线的方法，以显色条带的数目，判断分析物的浓度区间，建立对裸甲藻的半定量检测试纸条。本发明主要分为九个部分：

1、抗体金探针（胶体金标记的抗体）的制备。采用常用的胶体金（如抗坏血酸还原法、鞣酸—柠檬酸三钠还原法、乙醇超声波还原法）制备方法，优化胶体金标记实验条件，取得稳定高效的抗体金探针。透析纯化目标藻抗体。检验制备的胶体金的颗粒直径、均匀度等指标，选择稳定的方法制备 20~30 nm 的胶体金，4℃ 保存。

2、藻类半定量免疫层析分析技术的建立。以 GICA 技术为基础，通过精确控制膜上捕捉配体的量，使用多条不同浓度的平行捕捉配体线的方法，通过显色条带的数目，判断分析物的浓度区间，建立对目标藻的半定量 GICA 技术。

3、免疫原的制备。将生长旺盛的裸甲藻细胞培养溶液用终浓度为 2% 的甲醛固定过夜，10000r/min 离心 10min，收集藻细胞沉淀。藻细胞团块再用蒸馏水清洗一次，PBS 清洗二次，每次均通过离心收集藻细胞，离心条件均为，10000r/min，10min。将收集的藻细胞分装于 1.5ml Eppendorf 管，甩去残余水分，-20℃ 保存备用。临用前取出，用灭菌的 5ml PBS 重新悬浮均匀。将藻细胞标准溶液通过超声波和冷热交替处理（-75℃，15min；100℃，5min，三次循环）后得到已知细胞密度的破碎藻细胞标准溶液。

4、多克隆抗体的制备及纯化。将处理好的藻细胞用 0.5ml PBS 重悬，混匀，与等体积的弗氏完全佐剂混合乳化，乳化程度尽量完全。家兔通过腹腔注射、肌肉注射和背部皮下多点注射的方式进行免疫。初次免疫剂量分别约为每只家兔 1×10^6 、 2×10^6 和 4×10^6 个细胞，通过耳缘静脉采

血。采集的血液室温放置 2 小时，然后离心（4000r/min, 5min）分离血清。为提高测定的稳定性与专一性，需要对抗体纯化。对兔抗血清进行亲和层析柱纯化处理后，可以去除大部分血清杂蛋白从而 IgG 得到富集，纯化后抗血清效价有较大的提高，对于需要包被 IgG 抗体或者对抗体进行标记十分必要。

5、待标记抗体的预处理。透析除盐，由于过高的盐类物质会降低胶体金颗粒的 Zeta 电位，影响蛋白质的吸附，需要透析除去蛋白质溶液内多余的电解质。去除沉淀，蛋白质的聚合物对标记过程及抗体金探针的稳定性有一定影响，标记之前须离心以除去这些聚合物。优化胶体金标记抗体的实验条件：调整 pH 值：将胶体金溶液的 pH 值调至待标记蛋白质的等电点略偏碱。通过实验确定胶体金：抗体最适用量比例。

6、抗体金探针的制备。采用上述选择的条件标记抗体金探针；将标记好的抗体金探针在蔗糖或硅胶中浓缩保存。选用凝胶过滤法纯化抗体金探针，用牛血清白蛋白作稳定剂，除去其中未标记的抗体，未反应的胶体金以及在标记过程中可能形成的各种聚合物。对纯化后免疫金探针的特异性，敏感性进行鉴定，判断其是否仍保持很好的生物学活性。

7、胶体金探针玻璃纤维素膜的制备。将玻璃纤维素膜在免疫金探针溶液中浸泡后晾干。

8、固定捕获抗体的硝酸纤维素膜(NC)的制备。取制备的裸甲藻细胞破碎物、羊抗兔抗体用固定液稀释。用裸甲藻细胞破碎物固定溶液在硝酸纤维素膜上划三条平行线作为捕获抗原检测线。再用羊抗兔抗体固定溶液在三条平行线后划一条平行的作为二抗质控线。将固相抗体硝酸纤维素膜置封闭液中孵育后洗去未结合的抗体，晾干备用。

9、半定量检测及试纸制备。通过已知裸甲藻浓度样品试验，确定检测 10^{10} 个 / m^3 、 10^8 个 / m^3 、 10^6 个 / m^3 的藻细胞样品需要的捕获抗原（检测线）浓度。据此在膜上划三条平行的不同浓度的检测线，对应于不同的检测物浓度，制作半定量检测试纸条。

本发明为一种裸甲藻半定量检测试纸条，包括塑料载体板，玻璃纤维膜样品层、玻璃纤维膜抗体标记层、硝酸纤维素膜检测层、玻璃纤维膜吸水层。所述检测试纸条玻璃纤维膜样品层、玻璃纤维膜抗体标记层、硝酸纤维素膜检测

层、玻璃纤维膜吸水层顺式胶合固定在塑料载体板一侧；所述检测试纸条硝酸纤维膜检测层上设有裸甲藻抗原分级检测线、二抗质控线；所述玻璃纤维膜吸水层胶合在硝酸纤维膜检测层右端之上；所述塑料载体板中部设有硝酸纤维膜检测层，在该检测层与玻璃纤维膜样品层交界处，设有载有胶体金标记的裸甲藻抗体的玻璃纤维膜抗体标记层，该层一端置于玻璃纤维膜样品层下，并与塑料载体板胶合，另一端设置在硝酸纤维膜检测层之上，并与硝酸纤维膜检测层胶合。

所述裸甲藻半定量检测试纸条硝酸纤维膜检测层上的裸甲藻抗原分级标记线由检测浓度分别为 10^{10} 个/ m^3 、 10^8 个/ m^3 、 10^6 个/ m^3 的三条标记线组成。

所述裸甲藻半定量检测试纸条硝酸纤维膜检测层上的二抗质控线包被有羊抗兔 IgG；裸甲藻半定量检测试纸条玻璃纤维膜抗体标记层上载有胶体金标记的兔抗裸甲藻抗体。

所述裸甲藻半定量检测试纸条玻璃纤维膜抗体标记层上的胶体金标记的兔抗裸甲藻抗体制备方法如下：

胶体金的制备：鞣酸—柠檬酸三钠还原法制备 20~30nm 的胶体金，4℃保存；

兔抗裸甲藻抗体的制备：将生长旺盛的裸甲藻细胞培养溶液用终浓度为 1~3% 的甲醛固定过夜，8000~12000r/min 离心 10min，收集藻细胞沉淀；藻细胞团块再用蒸馏水清洗一次，PBS 清洗二次，每次均通过离心收集藻细胞，离心条件均为 8000~12000r/min，8~12min；将收集的藻细胞分装于 1.5ml Eppendorf 管，将裸甲藻藻细胞破碎物用灭菌的 0.3~0.6ml PBS 重悬，混匀，与等体积的弗氏完全佐剂混合乳化，乳化程度尽量完全；初次免疫剂量分别约为 1×10^6 、 2×10^6 和 4×10^6 个细胞每只动物；静脉采血，采集的血液室温放置 2 小时，然后 2000~6000r/min，离心 5min，分离血清，4℃冷藏保存。

本发明的另一种应用为所述裸甲藻半定量检测试纸条硝酸纤维膜检测层上的二抗质控线包被有羊抗鸡 IgG；裸甲藻半定量检测试纸条玻璃纤维膜抗体标记层上载有胶体金标记的鸡抗裸甲藻抗体。

本发明的再一种应用为所述裸甲藻半定量检测试纸条硝酸纤维膜检测层上的二抗质控线包被有羊抗鼠 IgG；裸甲藻半定量检测试纸条玻璃纤维膜抗体标记层上载有胶体金

标记的鼠抗裸甲藻抗体。

所述裸甲藻半定量检测试纸条的检测范围是:藻细胞浓度检出下限为 10^6 个/ m^3 , 在藻细胞浓度 10^6-10^{10} 个/ m^3 的范围内提供三级区分的半定量检测结果 10^{10} 个/ m^3 、 10^8 个/ m^3 、 10^6 个/ m^3 ; 检测时间少于 30 分钟。

本发明还包括一种裸甲藻半定量检测试纸条的使用方法, 所述裸甲藻半定量检测试纸条的使用方法制备检测样品的过程是: 将被检测样品溶液过滤, 滤膜对折放入 5ml 离心管中, 加 3ml PBS 将滤膜完全浸泡, 超声波破碎 5 分钟, 去所得溶液 1ml, 剩余 2ml 溶液加入到 2ml 的离心管中, 将裸甲藻半定量检测试纸条玻璃纤维膜样品层插入离心管中, 15 分钟后可观察结果。

本发明为常规环境监测、渔业养殖水体检测、以及赤潮生效过程监测的现场实验, 提供快速简便的在现场对赤潮多发藻进行半定量的检测方法, 对于我国海洋环境资源、尤其是生物资源的评价和管理有极大的促进作用, 为海洋环境管理和海水养殖提供最直接的技术基础。在环境检测、海洋养殖、港口检疫等行业均有着对赤潮生物半定量检测的需求, 上述行业蕴藏着大量的潜在用户。在国内各海洋科研和监测单位也有着实际的应用价值, 可以更好地促进我国的海洋学研究和环境学研究。

附图说明

图 1 为裸甲藻半定量检测试纸条的立体结构示意图。图中标号分别为:

1、塑料载体板, 2、玻璃纤维膜样品层, 3、附有抗体金标记的裸甲藻抗体玻璃纤维膜抗体标记层, 4、硝酸纤维素膜检测层, 5、玻璃纤维膜吸水层, 6、三种浓度的抗原检测线, 7、二抗质控线。

图 2 为裸甲藻半定量检测试纸条的侧视图。图中标号分别为:

1、塑料载体板, 2、玻璃纤维膜样品层, 3、附有抗体金标记的裸甲藻抗体玻璃纤维膜抗体标记层, 4、硝酸纤维素膜检测层, 5、玻璃纤维膜吸水层, 6、三种浓度的抗原检测线, 7、二抗质控线。

图 3 为裸甲藻半定量检测试纸条梯度实验检测结果照

片。梯度实验中，按量取 100ml 藻溶液计算，各藻溶液的梯度浓度分别为：

- 1、 阴性对照
- 2、 6×10^6 个/立方米
- 3、 4×10^8 个/立方米
- 4、 8×10^9 个/立方米

图 4 为裸甲藻半定量检测试纸条特异性实验检测结果照片。异性实验检测中，按量取 100ml 藻溶液计算，各编号分别代表：

- C1、中肋骨条藻
- C2、角毛藻
- C3、赤潮异湾藻
- C4、原甲藻

图 5 为抗裸甲藻抗血清与其他海藻的交叉反应曲线。由图 5 可以看出，塔玛亚历山大藻和米氏裸甲藻与抗裸甲藻抗血清存在交叉反应，但这两种海藻在五万多个细胞时和一千多个裸甲藻细胞所产生的竞争抑制作用效果类似，因此可以初步判断它们与抗血清的交叉反应很小，不会超过 5%。交叉反应率是通过计算抑制率 50%时裸甲藻的细胞数目与其他海藻细胞数目的比值得出的。

具体实施方式

实施方式一：免疫原的制备

将生长旺盛的裸甲藻细胞培养溶液用终浓度为 2%的甲醛固定过夜，10000r/min 离心 10min，收集藻细胞沉淀。藻细胞团块再用蒸馏水清洗一次，PBS 清洗二次，每次均通过离心收集藻细胞，离心条件均为，10000r/min，10min。将收集的藻细胞分装于 1.5ml Eppendorf 管，甩去残余水分，-20℃保存备用。临用前取出，用灭菌的 5ml PBS 重新悬浮均匀。将藻细胞标准溶液通过超声波和冷热交替处理（-75℃，15min；100℃，5min，三次循环）后得到已知细胞密度的破碎藻细胞标准溶液。

实施方式二：抗体效价的测定。

采用间接 ELISA 法测定抗体的效价，主要步骤如下：

- (1) 海藻或海藻粗提液包被（ 10^5 - 10^6 个细胞/ml），100

μ l/孔, 4℃湿盒过夜;

(2) 洗板, 0.5%PBST洗3次, 蒸馏水冲2次, 甩干残存液体;

(3) 封闭, 用1%的BSA, 包被缓冲溶液稀释, 120 μ l/孔, 37℃, 3h或者4℃过夜;

(4) 洗板, 0.5%PBST洗3次, 蒸馏水冲2次, 甩干残存液体;

(5) 加入海藻的多克隆抗体梯度稀释溶液, 100 μ l/孔, 37℃, 1.5h;

(6) 洗板, 0.5%PBST洗6次, 蒸馏水冲2次, 甩干残存液体;

(7) 加入酶标二抗的稀释溶液, 100 μ l/孔, 37℃, 1.5h;

(8) 洗板, 0.5%PBST洗6次, 蒸馏水冲2次, 甩干残存液体;

(9) 加入底物TMB溶液, 100 μ l/孔, 37℃, 15min;

(10) 2mol/L H₂SO₄终止反应, 50 μ l/孔;

(11) 酶标仪读取A450值。

将满足条件 P (待检血清) / N (阴性对照血清) ≥ 2.1 , 且 P (待检血清) > 0.2 的显色孔判为阳性, 并将抗血清的效价定义为与50%固相抗原结合时抗血清的稀释倍数。如图5所示, 兔抗血清的效价从初始免疫后第3-4周开始显著增加, 第7周达基本达到峰值, 之后维持在这一高水平, 不再有明显的上升趋势。免疫过程结束后, 抗血清效价维持在较高水平一段时间, 至第16周时开始有下降趋势。兔抗血清的最高效价约为16000。

实施方式三: 抗体特异性的测定。

采用间接ELISA法测定抗体的特异性, 具体步骤为:

(1) a类海藻或海藻粗提液包被 (10^5 - 10^6 个细胞/ml), 100 μ l/孔, 4℃湿盒过夜;

(2) 洗板, 0.5%PBST洗3次, 蒸馏水冲2次, 甩干残存液体;

(3) 封闭, 用1%的BSA, 包被缓冲溶液稀释, 120 μ l/孔, 37℃, 3h或者4℃过夜;

(4) 洗板, 0.5%PBST洗3次, 蒸馏水冲2次, 甩干残存液体;

(5) 加入b类海藻的多克隆抗体稀释溶液, 100 μ l/孔, 37℃, 1.5h;

(6) 洗板, 0.5%PBST 洗 6 次, 蒸馏水冲 2 次, 甩干残存液体;

(7) 加入酶标二抗的稀释溶液, $100\ \mu\text{l}/\text{孔}$, 37°C , 1.5h;

(8) 洗板, 0.5%PBST 洗 6 次, 蒸馏水冲 2 次, 甩干残存液体;

(9) 加入底物 TMB 溶液, $100\ \mu\text{l}/\text{孔}$, 37°C , 15min;

(10) $2\text{mol/L H}_2\text{SO}_4$ 终止反应, $50\ \mu\text{l}/\text{孔}$;

(11) 酶标仪读取 A450 值。

将满足条件 $P(\text{待检海藻})/N(\text{阴性对照}) \geq 2.1$, 且 $P(\text{待检海藻}) > 0.2$ 的显色孔判为阳性, 根据阳性信号的强弱判断交叉反应的强弱。

实施方式四: 抗体特异性测定的另一方法。

采用间接竞争 ELISA 法测定抗体特异性, 具体步骤为:

(1) 海藻或海藻粗提液包被 (10^5 - 10^6 个细胞/ml), $100\ \mu\text{l}/\text{孔}$, 4°C 湿盒过夜;

(2) 洗板, 0.5%PBST 洗 3 次, 蒸馏水冲 2 次, 甩干残存液体;

(3) 封闭, 用 1%的 BSA, 包被缓冲溶液稀释, $120\ \mu\text{l}/\text{孔}$, 37°C , 3h 或者 4°C 过夜;

(4) 洗板, 0.5%PBST 洗 3 次, 蒸馏水冲 2 次, 甩干残存液体;

(5) 加入各类海藻细胞的梯度稀释溶液 $50\ \mu\text{l}/\text{孔}$ 和海藻的多克隆抗体稀释溶液 $50\ \mu\text{l}/\text{孔}$, $100\ \mu\text{l}/\text{孔}$, 37°C , 1.5h;

(6) 洗板, 0.5%PBST 洗 6 次, 蒸馏水冲 2 次, 甩干残存液体;

(7) 加入酶标二抗的稀释溶液, $100\ \mu\text{l}/\text{孔}$, 37°C , 1.5h;

(8) 洗板, 0.5%PBST 洗 6 次, 蒸馏水冲 2 次, 甩干残存液体;

(9) 加入底物 TMB 溶液, $100\ \mu\text{l}/\text{孔}$, 37°C , 15min;

(10) $2\text{mol/L H}_2\text{SO}_4$ 终止反应, $50\ \mu\text{l}/\text{孔}$;

(11) 酶标仪读取 A450 值。

根据各孔的吸光值绘制竞争抑制曲线, 交叉反应率通过计算抑制率 50%时抗原量与近似抗原量的比值获得。硅藻门裸甲藻属 4 种海藻与 4 种抗裸甲藻抗血清之间具有强烈的交叉反应, $P(\text{待测样本})/N(\text{空白对照}) \geq 4$, 与其他种属的海藻几乎没有交叉反应, 所以抗裸甲藻抗血清具有较好的属特异性, 可以用于海洋浮游微型裸甲藻类的检

测。

实施方式五：样品的检测方法

现场样品提取：将被检测样品溶液过滤，滤膜对折放入 5ml 离心管中，加 3ml PBS 将滤膜完全浸泡，超声波破碎 5 分钟，去所得溶液 1ml，剩余 2ml 溶液加入到 2ml 的离心管中，将裸甲藻半定量检测试纸条玻璃纤维膜样品层插入离心管中，15 分钟后可观察结果。

进行检测时，使用微量移液器吸取一定体积的样品溶液，滴加在玻璃纤维膜样品层 2 上，样品溶液在毛细作用的拉动下做横向层析流动：样品向玻璃纤维膜吸水层 5 方向流动，途径载有抗体金标记的裸甲藻抗体的玻璃纤维膜抗体标记层 3 后，将抗体金探针完全复溶，抗原与抗体金探针形成抗体金探针——抗原复合物，抗体金探针——抗原复合物与未结合的抗体金探针继续向前流动至硝酸纤维素膜检测层 4 上固定有捕捉抗体金探针的捕获抗原线 6 处。当样品中不含有检测物时，抗体金探针就会在 6 处形成抗体金探针——捕获抗原复合物，胶体金聚合，呈现红色阴性条带；如样品中有抗原，则抗原会在吸附抗体金标记的裸甲藻抗体的玻璃纤维层 3 处形成抗原——抗体复合物，未复合的抗体金探针以及抗原——抗体复合物继续向前流动至硝酸纤维素膜条 4 上，抗原——抗体复合物不被捕获，就不显色。只有未复合的抗体金探针会在 6 处形成抗体金探针——捕获抗原复合物，胶体金聚合，呈现弱红色阳性条带，但条带颜色会因抗体金探针数量的减少而减弱；若待测裸甲藻抗原过量，则抗体金探针全部形成抗原——抗体复合物，而没有游离的抗体金探针，故捕获抗原线 6 处不显色，结果为阳性。形成的抗原——抗体复合物继续前移至固定有抗体金探针二抗的质控线 7 处，被固定呈现红色的阳性条带，表明该检测试纸条未失效。

本领域的普通技术人员都会理解，在本发明的保护范围内，对于上述实施例进行无显著特点和实质性进步的修改，添加和替换都是可能的，这些改动都没有超出本发明的保护范围。

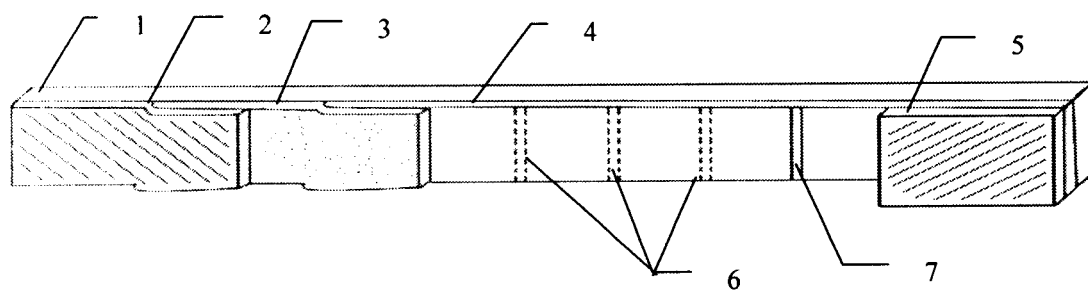


图 1

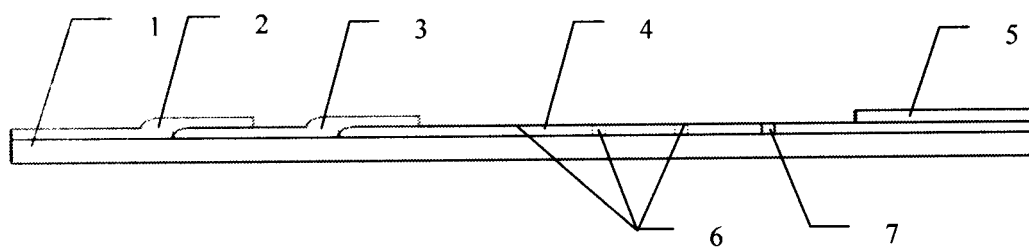


图 2

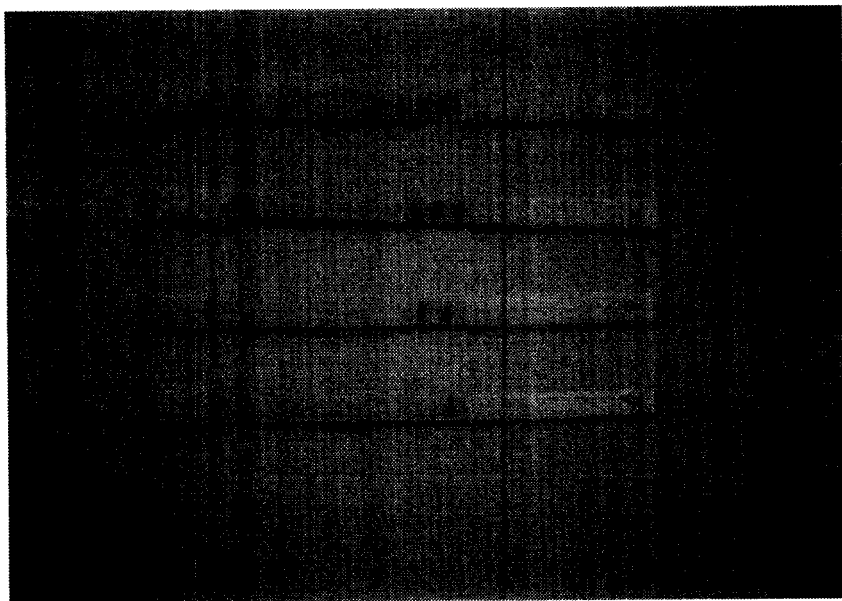


图 3

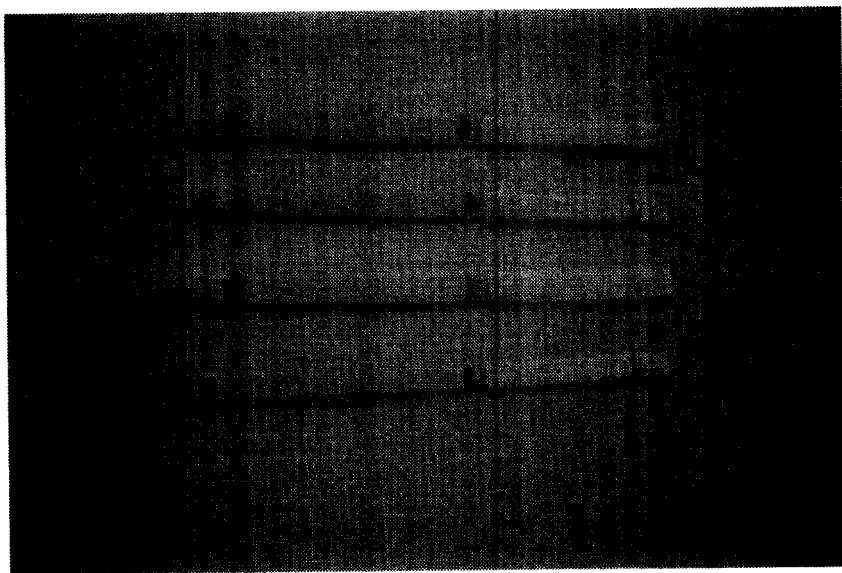


图 4

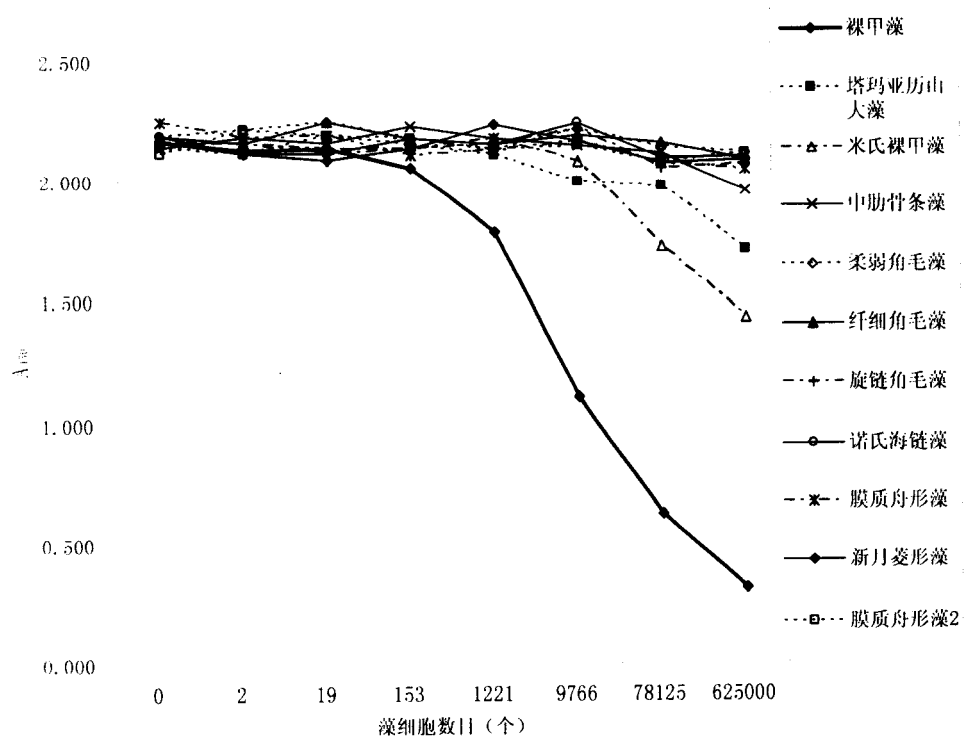


图 5

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 裸甲藻半定量检测试纸条及其制备使用方法 | | |
| 公开(公告)号 | CN1786715A | 公开(公告)日 | 2006-06-14 |
| 申请号 | CN200510109494.8 | 申请日 | 2005-10-24 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 中国海洋大学 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 中国海洋大学 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 中国海洋大学 | | |
| [标]发明人 | 米铁柱 亓海刚 孙静 甄毓 赵丽媛 何闪英 于志刚 | | |
| 发明人 | 米铁柱 亓海刚 孙静 甄毓 赵丽媛 何闪英 于志刚 | | |
| IPC分类号 | G01N33/569 C12Q1/02 G01N33/531 G01N33/558 | | |
| 代理人(译) | 王宏星 | | |
| 其他公开文献 | CN100357740C | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明描述了一种基于胶体金免疫层析分析技术(gold immuno chromatography assay, GICA)的半定量检测裸甲藻试纸条。包括塑料载体板、硝酸纤维素膜和玻璃纤维素膜。检测试纸条硝酸纤维层、玻璃纤维层分别用胶固定在塑料载体板上;检测试纸条硝酸纤维膜上设有裸甲藻抗原分级标记线、质控线;吸水玻璃纤维素膜层置于硝酸纤维膜检测层右端上方;该载体中部设有硝酸纤维膜检测层,在该检测层与加样端吸水层交界处,设有载有胶体金标记的免抗裸甲藻抗体的玻璃纤维素膜抗体标记层。本发明为常规环境监测、渔业养殖水体检测、以及赤潮生效过程监测的现场实验,提供快速简便的对赤潮多发藻进行半定量的检测方法。

