

[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 200710119213.6

[51] Int. Cl.

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C12N 5/12 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 12 月 26 日

[11] 公开号 CN 101093225A

[22] 申请日 2007.7.18

[21] 申请号 200710119213.6

[71] 申请人 清华大学

地址 100084 北京市海淀区清华园

[72] 发明人 何 苗 盛建武 施汉昌

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 关 畅 任凤华

权利要求书 1 页 说明书 13 页 附图 1 页

[54] 发明名称

一种微囊藻毒素酶联免疫检测试剂盒

[57] 摘要

本发明公开了一种微囊藻毒素酶联免疫检测试剂盒。该微囊藻毒素酶联免疫检测试剂盒，包括包被抗原、微囊藻毒素-LR 多克隆抗体或单克隆抗体以及酶标二抗；所述包被抗原为完全抗原 A；所述完全抗原 A 按照如下方法制备：在微囊藻毒素-LR 的第七位氨基酸残基 N-甲基脱氢丙氨酸上引入一个氨基，得到经氨基修饰的微囊藻毒素-LR；再将该经氨基修饰的微囊藻毒素-LR 与载体蛋白偶联得到所述微囊藻毒素-LR 与载体蛋白的偶联物，即完全抗原 A。本发明的微囊藻毒素酶联免疫检测试剂盒检测范围在 $0.10 \mu\text{g/L}$ - $30.00 \mu\text{g/L}$ 之间，定量检测区间在 $0.30 \mu\text{g/L}$ - $10.00 \mu\text{g/L}$ 之间，平均回收率 $(100.3 \pm 5.9)\%$ ，批内误差小于 15%，准确度和精密度符合要求，能进行环境样品中微囊藻毒素-LR 的大规模快速筛查和预警监测。

1、微囊藻毒素酶联免疫检测试剂盒，包括包被抗原、微囊藻毒素-LR 多克隆抗体或单克隆抗体以及酶标二抗；

所述包被抗原为完全抗原 A；所述完全抗原 A 按照如下方法制备：在微囊藻毒素-LR 的第七位氨基酸残基 N-甲基脱氢丙氨酸上引入一个氨基，得到经氨基修饰的微囊藻毒素-LR；再将该经氨基修饰的微囊藻毒素-LR 与载体蛋白偶联得到所述微囊藻毒素-LR 与载体蛋白的偶联物，即完全抗原 A。

2、根据权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于：所述微囊藻毒素-LR 多克隆抗体或单克隆抗体是以所述完全抗原 A 为免疫原得到的抗体；

所述微囊藻毒素-LR 单克隆抗体按照下述方法制备：用所述完全抗原 A 免疫小鼠，取免疫小鼠的脾细胞，与小鼠骨髓瘤细胞融合，筛选出阳性杂交瘤细胞株；培养所述阳性杂交瘤细胞株或将所述阳性杂交瘤细胞株注入同系小鼠腹腔诱生腹水，得到微囊藻毒素-LR 的单克隆抗体。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的试剂盒，其特征在于：所述载体蛋白为牛血清白蛋白；所述偶联方法为戊二醛法。

4、根据权利要求 2 所述的试剂盒，其特征在于：所述用于免疫的小鼠为 Balb/c 小鼠；免疫方法为：每只小鼠每次免疫所用的所述完全抗原剂 A 量为 15-40 μ g，两次免疫的间隔时间为 20-40 天；免疫方式为皮下多点注射；

所述步骤 2) 中的小鼠骨髓瘤细胞为小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0。

5、根据权利要求 2 所述的试剂盒，其特征在于：所述筛选阳性杂交瘤细胞株的方法为：先用包被抗原筛选，再用微囊藻毒素-LR 单体筛选至少 1 次；所述包被抗原为将所述步骤 1) 中的经氨基修饰的微囊藻毒素-LR 多肽与载体蛋白偶联得到的完全抗原 B；所述完全抗原 B 与所述完全抗原 A 中的载体蛋白不相同。

6、根据权利要求 5 所述的试剂盒，其特征在于：所述完全抗原 B 中的载体蛋白为卵清白蛋白。

7、根据权利要求 2 所述的试剂盒，其特征在于：所述阳性杂交瘤细胞株为能分泌抗 Microcystin-LR 单克隆抗体的小鼠杂交瘤细胞株 MC8C10，其保藏号为 CGMCC No. 2101。

8、根据权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于：所述微囊藻毒素-LR 单克隆抗体为由保藏号为 CGMCC No. 2101 的能分泌抗 Microcystin-LR 单克隆抗体的小鼠杂交瘤细胞株 MC8C10 产生的抗体。

9、根据权利要求 1 至 8 中任一所述的试剂盒，其特征在于：所述还包括微囊藻毒素-LR 标准品溶液、显色剂、终止液、洗涤液和底物溶液。

10、权利要求 1 至 9 中任一所述的试剂盒在微囊藻毒素-LR 检测中的应用。

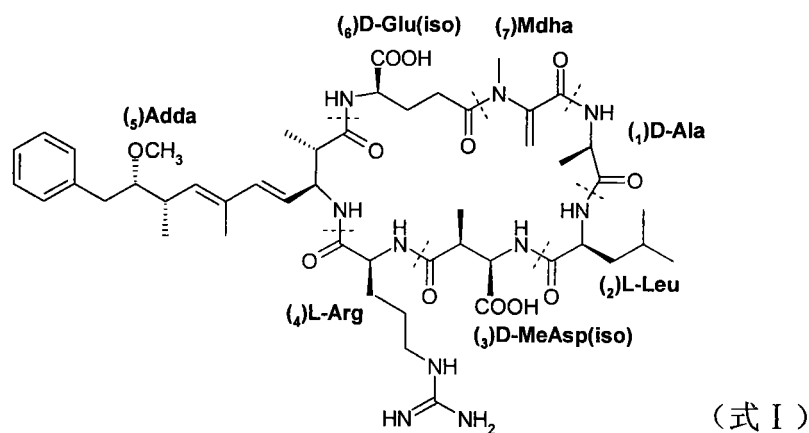
一种微囊藻毒素酶联免疫检测试剂盒

技术领域

本发明涉及一种微囊藻毒素酶联免疫检测试剂盒，特别涉及一种微囊藻毒素-LR 酶联免疫检测试剂盒。

背景技术

水体富营养化致使藻类异常增殖并释放微囊藻毒素 (Microcystins, MCs)，其中微囊藻毒素-LR (Microcystin-LR, MC-LR) 是目前已知急性毒性最强、危害最大的一种淡水蓝藻毒素。微囊藻毒素-LR 是一组环状七肽，其化学结构式如式 I 所示：



微囊藻毒素水华的频繁暴发严重威胁着生态安全和人类的饮水安全，对水中微囊藻毒素及时准确的监测非常重要。目前对水体中藻毒素检测技术的研究开发非常活跃，主要有高效液相色谱 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)、酶联免疫吸附试验 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) 以及蛋白磷酸酶抑制试验 (Protein Phosphatase Inhibition Assay, PPIA) 等。

常规的理化检测方法，特别是液相色谱和质谱分析仪器体积庞大、价格昂贵、需要环境条件较高的室内环境、而且还需要专门的技术人员操作、前处理复杂、检测费用昂贵；并且由于微囊藻毒素异构体众多，且性质近似，缺少相应标准品，成为微囊藻毒素大规模筛查的限制条件。而磷酸酶抑制试验和细胞试验虽然都能很好地检测出毒素，但是存在灵敏度不高或检测过程繁琐，样品通量小等不足。免疫检测是基于抗原-抗体特异性反应的分析方法，具有检测特异性强、灵敏度高、分析通量大、检测速度快、费用低廉等优点，能适应大规模样品的快速筛查和预警监测。

研制微囊藻毒素的 ELISA 试剂盒，对于微囊藻毒素的大规模样品的快速筛查和预警监测具有非常重要的经济和社会意义。

发明内容

本发明的目的是提供一种微囊藻毒素酶联免疫检测试剂盒。

本发明所提供的微囊藻毒素酶联免疫检测试剂盒，包括包被抗原、微囊藻毒素-LR 多克隆抗体或单克隆抗体和酶标二抗；

所述包被抗原为完全抗原 A；所述完全抗原 A 按照如下方法制备：在微囊藻毒素-LR 的第七位氨基酸残基 N-甲基脱氢丙氨酸上引入一个氨基，得到经氨基修饰的微囊藻毒素-LR；再将该经氨基修饰的微囊藻毒素-LR 与载体蛋白偶联得到所述微囊藻毒素-LR 与载体蛋白的偶联物，即完全抗原 A。

其中，所述载体蛋白可为任意一种常用的载体蛋白，如牛血清白蛋白（BSA）、人血清白蛋白（HSA）、钥孔虫戚血蓝蛋白（KLH）或卵清白蛋白（OVA）等大分子白蛋白，优选为牛血清白蛋白；所述偶联方法可采用常规的戊二醛法或 N-琥珀酰亚胺法等。用于包被抗原的固相载体物质可为聚苯乙烯、纤维素、聚丙烯酰胺、聚乙烯、聚丙烯、交联葡聚糖、玻璃、硅橡胶、琼脂糖凝胶等，载体的形式可以是试管、微量反应板凹孔、小珠、小圆片等。

所述微囊藻毒素-LR 多克隆抗体或单克隆抗体是以完全抗原 A 为免疫原得到的抗体。

所述微囊藻毒素-LR 单克隆抗体可按照下述方法制备：用完全抗原 A 免疫小鼠，取免疫小鼠的脾细胞，与小鼠骨髓瘤细胞融合，筛选出阳性杂交瘤细胞株；培养所述阳性杂交瘤细胞株或将所述阳性杂交瘤细胞株注入同系小鼠腹腔诱生腹水，得到微囊藻毒素-LR 的单克隆抗体。

所述用于免疫的小鼠具体可为 Balb/c 小鼠；免疫方法为：每只小鼠每次免疫所用的所述完全抗原剂 A 量为 15-40 μ g，两次免疫的间隔时间为 20-40 天；免疫方式为皮下多点注射；

所小鼠骨髓瘤细胞具体可为小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0。

所述筛选阳性杂交瘤细胞株的方法具体可为：先用包被抗原筛选 1-2 次，再用微囊藻毒素-LR 单体筛选至少 1 次；所述包被抗原为将所述步骤 1) 中的经氨基修饰的微囊藻毒素-LR 多肽与载体蛋白偶联得到的完全抗原 B；所述完全抗原 B 与所述完全抗原 A 中的载体蛋白不相同。

其中,所述完全抗原 B 中的载体蛋白具体可为任意一种不同于完全抗原 A 中的载体蛋白的常用载体蛋白。

本发明利用上述免疫方法和筛选方法,用合成的完全抗原免疫小鼠,得到了只针对完全抗原上小分子微囊藻毒素-LR 的抗体。

所述阳性杂交瘤细胞株具体可为能分泌抗 Microcystin-LR 单克隆抗体的小鼠杂交瘤细胞株 MC8C10,其保藏号为 CGMCC No. 2101。

所述方法中还可包括纯化所述单克隆抗体的步骤,将上述腹水或上层培养液分离纯化后,即获得抗微囊藻毒素的单克隆抗体。

为提高单克隆抗体的纯度,可用免疫亲和层析方法对其进行纯化,尤以 HiTrap rProtein A FF 1mL 免疫亲和层析柱的纯化效果好。

所述微囊藻毒素-LR 的单克隆抗体,具体可由保藏号为 CGMCC No. 2101 的小鼠杂交瘤细胞株 MC8C10 产生。

能分泌抗 Microcystin-LR 单克隆抗体的小鼠杂交瘤细胞株 MC8C10,已于 2007 年 06 月 18 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简称 CGMCC,地址是中国北京市海淀区中关村北一条 13 号),保藏编号为 CGMCC No. 2101。

所述酶标二抗的标记酶可为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶。

为了方便现场监控和大量样本筛查,所述试剂盒还包括微囊藻毒素-LR 标准品溶液、显色剂、终止液、洗涤液和底物溶液等酶联免疫检测用溶液。

本检测试剂盒具体可包括:微囊藻毒素-LR 标准溶液试剂瓶;上述微囊藻毒素-LR 多克隆抗体或单克隆抗体溶液试剂瓶;酶标二抗溶液试剂瓶;洗涤液试剂瓶;底物溶液试剂瓶;显色剂溶液试剂瓶;终止液试剂瓶;可拆卸酶标板和试剂盒盒体。

试剂瓶和酶标板均安装在试剂盒盒体内。酶标板是包被了上述包被抗原的聚苯乙烯微量反应板,有 24 孔、或 48 孔、或 96 孔。

所用试剂的配制和酶标板的包被如下:

a) 标准溶液的配制:采用从 Sigma 或 Alexis 公司购买的微囊藻毒素-LR 作为标准品,采用高纯水分别配制成低浓度、中浓度、高浓度的微囊藻毒素标准溶液,分别灌装入微囊藻毒素标准品试剂瓶中。其中,中浓度应该接近标准曲线的半抑制浓度(IC_{50})、低浓度和高浓度应分别接近试剂盒的最低和最高检测浓度(检测限)。

b) 抗体溶液配制:将上述微囊藻毒素-LR 多克隆抗体或单克隆抗体用磷酸盐缓冲液稀释成工作浓度,并加入 0.5%-5%的牛血清白蛋白(BSA)和防腐剂,灌装入试剂

瓶中。

c) 酶标二抗溶液配制：辣根过氧化物酶-羊抗鼠（或兔）IgG 原液，灌装入试剂瓶中，使用时用洗涤液稀释成工作浓度。

d) 洗涤液配制：配制含吐温-20 的 PBS 干粉，或配制 n 倍含吐温-20 的磷酸盐缓冲液 (n=1-12)，灌装入试剂瓶中。使用时，将该溶液用纯水稀释成含 0.05% 吐温-20 和 8g/L 氯化钠的 0.01 mol/L pH=7.5 磷酸盐缓冲液。

e) 底物溶液配制：使用 0.1mol/L pH=5.0 的醋酸钠-柠檬酸缓冲液，每 1ml 缓冲液中加入适量 H_2O_2 溶液，灌装入试剂瓶中。

f) 显色剂溶液配制：用 0.1mol/L pH=5.0 的醋酸钠-柠檬酸缓冲液配制四甲基联苯胺溶液，灌装入试剂瓶中。

g) 终止液配制：2mol/L H_2SO_4 溶液，灌装入试剂瓶中。

h) 酶标板的包被：采用聚苯乙烯酶标板包被，包被抗原采用上述完全抗原 A；封闭采用大分子蛋白或明胶，真空封装。

本发明的微囊藻毒素-LR 竞争 ELISA 试剂盒的使用方法是：将标准溶液或样品溶液与适当稀释的抗微囊藻毒素抗体同时加入酶标板小孔中，同时设置空白和阴性对照孔，室温或 37℃ 温育 0.5-1h，倒出孔内液体，重复用洗涤液洗涤 2-5 次，将酶标板倒置在吸水纸上拍打；加入适当稀释度的酶标抗体溶液于酶标板小孔中，室温或 37℃ 温育 0.5-1h，用洗涤液重复洗 3-5 次，吸干；加入底物溶液和显色溶液到酶标板小孔中，室温下反应 10-15min，颜色显蓝色，再加入终止液，立即变成黄色；用酶标仪在波长 450nm 处测定吸光度 A，以不加抗体的小孔作为空白调零。

测定系列微囊藻毒素-LR 标准溶液孔的吸光度 A，以各浓度的吸光度 A 为纵坐标，以对应微囊藻毒素-LR 浓度的 log 值为横坐标，绘制半对数标准曲线图。以待测样品溶液的吸光度，在标准曲线上查出相应的微囊藻毒素-LR 浓度，再换算出样品中微囊藻毒素-LR 的含量。

本发明采用方阵试验，确定最佳的包被抗原浓度（0.25 μ g/mL）和抗体工作浓度（0.3 μ g/mL）。

本发明的微囊藻毒素酶联免疫检测试剂盒的检测原理是：使用时将标准品或样品和抗体混合后加入酶标板中，标准品或样品中的抗原和固相载体上的包被抗原一起竞争性地与溶液中的抗体结合，洗涤去除游离的抗原以及抗原抗体复合物，与固相载体上包被抗原结合的抗体再与酶标二抗结合，用酶底物进行测定，结合的酶标

记物将无色的显色剂转化为有色的产物。加入反应终止液后用酶标仪测量吸光度，吸光度与样品中的微囊藻毒素-LR 浓度成反比。

本发明的微囊藻毒素酶联免疫检测试剂盒，具有灵敏度高、结构简单、使用方便、快速、准确的特点。并适用于水中、动物源水产品(如鱼类、蚌壳类等)及植物源水产品中微囊藻毒素-LR 的定量检测。例如实施例 3 中的微囊藻毒素-LR 竞争 ELISA 检测试剂盒，其检测范围在 $0.10\ \mu\text{g/L}$ - $30.00\ \mu\text{g/L}$ 之间，定量检测区间在 $0.30\ \mu\text{g/L}$ - $10.00\ \mu\text{g/L}$ 之间。检测时间小于 3 小时，可同时检测上百个样品。本发明的微囊藻毒素酶联免疫检测试剂盒平均回收率($100.3\pm 5.9\%$)，批内误差小于 15%，准确度和精密度符合要求，能进行环境样品中微囊藻毒素-LR 的大规模快速筛查和预警监测。

下面结合具体实施例对本发明作进一步详细说明。

附图说明

图 1 为实施例 3 的微囊藻毒素-LR 竞争 ELISA 试剂盒标准曲线

具体实施方式

下述实施例中所用方法如无特别说明均为常规方法。

骨髓瘤细胞 SP2/0 种子来源于中国协和医科大学基础医学院细胞中心。6 周龄的 Balb/c 纯系雌性小鼠购自中国协和医科大学实验动物中心。新生牛血清(PAA, Lot B00104-0786)，细胞融合用 PEG 1500(Roche, 11423800)，50×HAT 储液(Sigma, H0262, Lot 093K8931)，50×HT 储液(Sigma H0137, Lot 064K8927)，IMDM 培养基(Gibco, Invitrogen Corp. Lot 1272036)，氨苄青霉素钠(Amresco 0339)，硫酸链霉素(Amresco 0382)，8-Azaguanine(Sigma A5284)，DMSO(Amresco 0231)，石蜡油，无水乙醚、异丙醇(北京化学试剂公司)。MC-LR (Alexis 公司(Lausen, Switzerland)，产品编号 ALX-350-012)。BSA(Sigma, A7638)。OVA(Sigma, A5378)。

实施例 1、杂交瘤细胞株 MC8C10 CGMCC No. 2101 的获得及其产生的抗微囊藻毒素-LR 的单克隆抗体 MC8C10 的鉴定

一、杂交瘤细胞株 MC8C10 CGMCC No. 2101 的获得

1、微囊藻毒素-LR 完全抗原 MC-LR-BSA 的合成

将微囊藻毒素-LR 采用 2-巯基乙胺进行化学修饰，在其第七位氨基酸(Mdha)上引入一个活性基团——氨基，再采用戊二醛法将修饰后的微囊藻毒素-LR 与牛血清白蛋白偶联，经过滤层析后得到完全抗原，经 MALDI-TOF/MS 确定完全抗原的偶联比。具体方法如下：

(1) 对微囊藻毒素-LR 进行氨基修饰

① 将 2-巯基乙胺和 MC-LR 按照摩尔比 3000:1 充分混和在碱性的碳酸盐缓冲液中 (pH=8.0); 混合物充分摇匀, 在 50℃ 反应 1.5 小时;

② 反应完毕, 降到室温, 加入与 2-巯基乙胺等摩尔的乙酸使反应停止;

③ 中间产物的纯化采用固相萃取技术, 得到经氨基修饰的微囊藻毒素-LR。材料为 500mg 6mL C₁₈ BondElut cartridge (Varian, Walnut Creek, CA), 具体步骤如下:

活化: 用 4mL 甲醇活化, 并用 6mL 高纯水调整, 分为 2-3 次使用;

上样: 将水样以 5-10mL/min 的流速流过固相萃取柱进行富集浓缩。重力过滤;

淋洗: 装样完毕后, 用 5% 甲醇水溶液 6mL 淋洗以净化样品, 分为 3 次使用;

洗脱: 待固相萃取柱吹干后, 以 4mL 甲醇 (分为 2 次) 将微囊藻毒素洗脱并收集。

(2) 半抗原多肽与载体蛋白偶联

选择牛血清白蛋白 (BSA) 作为载体蛋白, 采用戊二醛法将步骤 (1) 获得的经氨基修饰的微囊藻毒素-LR 与载体蛋白进行偶联, 具体方法包括以下步骤:

(a) 取 10mg BSA (1.5×10^{-7} 摩尔), 完全溶解于 5mL 0.01mol/L PBS ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.96g, KH_2PO_4 0.2g, NaCl 8.0g 加水至 1000mL, pH 7.2) 中, 再加入 4mg 步骤 (1) 获得的经氨基修饰的微囊藻毒素-LR (4×10^{-6} 摩尔), 使其完全溶解;

(b) 缓慢加入 5mL 0.2% 的戊二醛溶液, 与步骤 (a) 获得的溶液混合, 并在室温下, 搅拌反应 2 小时;

(c) 加入 0.2mL 1M 甘氨酸, 在室温下搅拌 1 小时, 以终止反应;

(d) 将步骤 (c) 获得的溶液用 Sephadex G-25 凝胶层析柱 (Pharmacia) 进行过滤层析, 得到微囊藻毒素-LR 完全抗原 MC-LR-BSA。MALDI-TOF/MS 检测, 结果表明该完全抗原的偶联比为 5.12, 符合要求。将纯化的完全抗原经 -40℃ 冷冻后, 真空浓缩干燥, 保存于 -20℃ 冰箱中。

2、免疫动物

选取 6 周龄的雌性 Balb/c 小鼠, 采用低剂量长程免疫法进行免疫, 方法为: 皮下多点注射, 30 μg MC-LR-BSA/只, 共免疫 4 次, 初次免疫加福氏完全佐剂 (0.1mL/只), 后三次加强免疫加福氏不完全佐剂 (0.1mL/只), 免疫间隔时间为 30 天。在

第三次加强免疫后的第 10 天, 对小鼠进行尾部静脉取血, 用间接 ELISA 法测定效价, 其中, 包被的 MC-LR-BSA 的浓度为 $5 \mu\text{g/mL}$ 。对抗血清效价达到 1×10^5 以上的小鼠, 进行一次冲击免疫, 即每只小鼠采用 $10 \mu\text{L}$ MC-LR-BSA + $90 \mu\text{L}$ 生理盐水进行腹腔注射, 3 天后取脾细胞进行细胞融合。

3、细胞融合

1) 免疫脾细胞的制备

将步骤 2 冲击免疫三天后的 BALB/c 小鼠处死, 无菌状态下取出脾脏, 去表面包膜及脂肪, 剪碎, 置于平皿中研磨, 加 GKN 溶液 (NaCl 8g, KCl 0.4g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.77g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.69g, 葡萄糖 2g, 酚红 0.01g, 溶于 1000mL 水中) 制成单细胞悬液, 用 200 目铜网过滤, 去除大的细胞团块后, 离心, 用 GKN 溶液洗涤并重悬脾细胞, 计活细胞数, 约为 1×10^8 个/mL。

2) SP2/0 骨髓瘤细胞的处理

取指数生长期的 SP2/0 骨髓瘤细胞, 离心, 用 GKN 溶液洗一次并悬浮于其中, 计活细胞数, 为 1×10^8 个/mL。

3) 免疫脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞的融合

将步骤 2) 的 SP2/0 骨髓瘤细胞与步骤 1) 的免疫脾细胞融合, 具体过程包括以下步骤:

1. 聚乙二醇(PEG)的配制(50% PEG): PEG (MW1500, Roche, 11423800) 10.0g 置于 30mL 容量小烧瓶中, 高压 $3.6 \times 10^5 \text{ Pa}$ 15min, 冷却至 50°C 后加入完全培养基 (IMDM 培养基(Gibco, Invitrogen Corp. Lot 1272036)) 10.0mL, 混匀, 分装 1.0mL/管, 4°C 保存。

2. 取 HAT 培养液 40mL (50×HAT 储液, Sigma, H0262, Lot 093K8931), 完全培养液 (IMDM 培养基) 15mL 和 50% PEG 分别放入 37°C 水浴箱中预热, 另将一只盛水的烧杯同时放入水浴箱中备用。

3. 分别吸取含 7.0×10^7 个骨髓瘤细胞 SP2/0 和 7.0×10^8 个脾细胞的悬液加入 50mL 离心管中, 充分混匀, 并加 IMDM 培养基至 40mL。

4. 1200rpm 离心 8min, 弃去上清液, 用吸管吸净残留液体, 以免影响 PEG 的浓度。轻轻弹击离心管底, 使两种细胞充分混匀, 直至成糊状。

5. 将离心管置于预温的烧杯中, 用 1mL 已用 7.5% NaHCO_3 调整 pH 值至 8.0 (7.8–8.2 均可) 的 PEG 0.8mL, 将吸管插入管底, 继而轻轻搅动沉淀, 并缓缓滴

加 PEG, 1min 内加完, 再在水浴中静置 90s。

6. 立即滴加 37℃ 预温的完全培养液 (IMDM 培养基) 15mL, 使 PEG 稀释而失去作用。滴加的方法是在 30s 内加 1mL, 次 30s 加 3mL, 接下来 1min 加完。注意, 当 PEG 溶液加入后, 即可见细胞凝集成小团块状, 此时操作宜轻柔, 以免干扰细胞融合过程。

7. 补加完全培养液 (IMDM 培养基) 至 40mL, 1000rpm 离心 10min, 弃上清。

8. 将细胞沉淀轻悬于预温的 HAT 培养液 40mL 中, 加到 4 块已有饲养细胞层 (小鼠腹腔巨噬细胞) 的 96 孔板内, 每孔加 100 μ L。继而将培养板移至 37℃、5%CO₂ 饱和湿度恒温箱中培养。

4、融合细胞的筛选及克隆化培养

约 3 天后, 当杂交瘤细胞长满孔底 1/4-1/2 时, 培养基变黄, 此时用常用的 ELISA 法检测培养基上清液中的抗体, 具体方法包括以下步骤:

1. 吸取 96 孔板每孔的一半上清, 采用 ELISA 法进行阳性杂交瘤细胞筛选 (一筛), 具体方法为:

用 50mM 碳酸盐缓冲液 (pH 9.5) 稀释包被抗原至 2mg/L, 加入到 96 孔酶联板中进行包被, 每孔 100 μ L, 4℃ 包被 12-24 小时, 无需封闭; 每孔加入各个克隆孔上清液 100 μ L, 37℃ 温育 1h, 充分洗涤后加入 100 μ L 1: 10000 的酶标二抗 (HRP-羊抗鼠 IgG), 37℃ 温育 1h 后, 加入底物显色, 10min 后终止, 读取 A_{450nm}, A_{450nm} 值为阴性对照 2.1 倍的为阳性杂交瘤细胞。对于一筛呈阳性的克隆株, 进一步培养后, 按照同样方法进行第二次筛选。

其中, 包被抗原为 MC-LR-OVA, 它按照下述方法制备: 取 3mL OVA, 加入 0.3mg 上述氨基修饰后的 MC-LR, 加入 0.1mL 1.25%戊二醛充分混合, 室温反应 24h。

2. 吸取检测结果呈阳性的孔中的剩余上清, 加入新鲜 HT 培养基 (50×HT 储液 (Sigma H0137, Lot 064K8927)) 做进一步培养;

3. 第二天用与步骤 1 相同的 ELISA 法复测第一次呈阳性的上清及吸取的剩余上清 (二筛);

4. 将 2 次 ELISA 检测均为阳性的克隆细胞吸出, 转移至含 BALB/c 小鼠腹腔细胞的 HT 培养基制成的 24 孔 (每孔 0.9mL HT 培养基) 营养板的 3-4 个孔内, 进行再克隆。然后吸取上清, 采用与步骤 1 相同的 ELISA 法对阳性克隆株进行再次确定 (三筛)。

对于三筛后的阳性克隆株,采用 MC-LR 单体、BSA 及 OVA 再进行一次筛选,包被浓度分别为 $5\mu\text{g/mL}$, $2\mu\text{g/mL}$ 及 $2\mu\text{g/mL}$, 4°C 包被过夜,其它条件同上。选取对 OVA 及 BSA 均为阴性、对 MC-LR 检测结果为阳性的克隆株。结果得到 4 株阳性克隆株。将其中一株阳性克隆株,名称为 MC8C10,于 2007 年 06 月 18 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简称 CGMCC,地址是中国北京市海淀区中关村北一条 13 号),保藏编号为 CGMCC No.2101。

二、单克隆抗体 MC8C10 的获得及亚型鉴定

1、获取抗体腹水

选取 10 周龄 BALB/C 小鼠,接种细胞前 7-10 天,预先腹腔注射液体石蜡 0.5mL / 只。用生理盐水调整杂交瘤细胞株 MC8C10 CGMCC No.2101 浓度至 2×10^6 个 / mL ,腹腔接种杂交瘤细胞,接种细胞数为 1×10^6 个 / 只,7-10 天后采集腹水。

2、腹水的纯化

采用 HiTrap rProtein A FF 1mL 免疫亲和层析柱(Bio-Science AB, Sweden. Lot No. 309591)来纯化步骤 1 获得的小鼠单克隆抗体腹水,得到 MC8C10。该层析柱所含的 1mL 介质最多能结合 23mg 由小鼠产生的 IgG2b 型单克隆抗体,并且对于 IgG2b 型抗体的结合能力是最高的,而对于小鼠产生的其它抗体亚类(如 IgG1、IgG2a、IgG3 等)的结合能力较弱。偶联缓冲液为 0.2mol/L 、 $\text{pH } 7$ 的磷酸盐缓冲液(将 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.216g , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 4.369g 溶解于 100mL 双蒸水中)。洗脱缓冲液采用 0.1M 柠檬酸钠溶液($\text{pH } 3.5$)。结果得到 3mg 固态的 MC8C10。将纯化的抗体分装, -20°C 保存。

3、抗体亚型鉴定

采用单克隆抗体亚型检测试剂盒(ImmunoType™ Kit, Sigma)对步骤 2 获得的抗体进行免疫球蛋白亚型的鉴定,具体方法为:用 PBS 以 1:1000 比例稀释各类抗体(小鼠 IgG₁、IgG_{2a}、IgG_{2b}、IgG₃、IgA 及 IgM),然后用稀释抗体包被 96 孔酶联板(每孔 0.1mL ,每类抗体两个孔), 37°C 温育 1 小时后,弃包被液,洗涤 3 次,按 0.1mL /孔的量加入步骤 2 纯化的抗体,室温温育 1 小时后洗涤 3 次,按 0.1mL /孔的量加入辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG(购自邦定生物公司),室温温育 30 分钟后,洗涤 3 次,按 0.1mL /孔的量加入辣根过氧化物酶底物反应液(1mg/mL TMB),室温 10-15 分钟,出现褐色即为阳性结果,最后按 0.05mL /孔的量加入 2mol/L H_2SO_4 终止反应。结果表明杂交瘤细胞 MC8C10 分泌的抗体为 IgG2b 亚类。

这里配制缓冲液均使用双蒸水，化学试剂纯度为分析纯或更高。最后配制的缓冲液采用 $0.45\ \mu\text{m}$ 的滤器过滤。

实施例2、抗微囊藻毒素-LR的多克隆抗体的制备及其鉴定

1、抗微囊藻毒素-LR 的多克隆抗体的制备

体重 1.5-2kg 临床健康的雄性新西兰大白兔，用实施例 1 制备的微囊藻毒素-LR 完全抗原 MC-LR-BSA 按 1.2mg 免疫原/只的剂量，免疫途径选用背部 6 点皮下注射。首次免疫采用弗氏完全佐剂，此后每间隔四周用含弗氏不完全佐剂的免疫原加强免疫，前后共四次，最后一次免疫后 10 天，宰杀、采血、分离血清后冷藏备用。

实施例 3、微囊藻毒素-LR 竞争 ELISA 试剂盒

1、微囊藻毒素-LR 竞争 ELISA 试剂盒的组成

该试剂盒包括安装在试剂盒盒体内的下述试剂和酶标板：

a) 抗微囊藻毒素-LR 标准溶液的配制：采用 Alexis 公司 (Lausen, Switzerland) 购买的 MC-LR 作为标准品 (产品编号 ALX-350-012)，采用高纯水分别配制成 MC-LR 标准溶液，浓度分别为 $0.5\ \mu\text{g/L}$ 、 $2\ \mu\text{g/L}$ 和 $8\ \mu\text{g/L}$ ，分别灌装入 MC-LR 标准品试剂瓶中。

b) 抗体溶液配制：将实施例 1 的单克隆抗体 MC8C10 (1mg 固体) 用磷酸盐缓冲液稀释成工作浓度 1: 6000，再加入 1% (质量百分含量) 的牛血清白蛋白 (BSA) 和 0.1% 的硫柳汞 (质量百分含量)，灌装入试剂瓶中。

c) 酶标二抗溶液配制：辣根过氧化物酶-羊抗鼠 IgG 原液，灌装入试剂瓶中，使用时用洗涤液按 1: 10000 配制成工作浓度。

d) 洗涤液配制 (10×PBST)：含 0.5% (体积百分含量) 吐温-20 和 80g/L 氯化钠的 $0.1\ \text{mol/L}$ pH=7.5 磷酸盐缓冲液，灌装入试剂瓶中。使用时，将该溶液用纯水稀释 10 倍再用。

e) 底物溶液配制：使用 $0.1\ \text{mol/L}$ pH5.0 的醋酸钠-柠檬酸缓冲液，每 1ml 缓冲液中加入 $50\ \mu\text{L}$ 0.1% 的 H_2O_2 溶液，灌装入试剂瓶中。

f) 显色剂溶液配制：用丙酮配制成 10mg/mL 的四甲基联苯胺溶液，用 $0.1\ \text{mol/L}$ pH5.0 的醋酸钠-柠檬酸缓冲液配制成 0.2mg/mL 的四甲基联苯胺溶液，灌装入试剂瓶中。

g) 终止液配制： $2\ \text{mol/L}$ H_2SO_4 溶液，灌装入试剂瓶中。

h) 酶标板是包被了包被抗原的 96 孔聚苯乙烯微量反应板。

酶标板的包被：包被抗原采用实施例 1 的 MC-LR-BSA，包被浓度 $0.25 \mu\text{g/mL}$ ，取 $120 \mu\text{L}$ 包被抗原加入反应板孔中， 4°C 冰箱中过夜，倒出孔内液体，用洗涤液 $1\times\text{PBST}$ 洗涤 3-5 次，将酶标板倒置在吸水纸上拍打，吸干，在已包被抗原的酶标板小孔中加入 $150 \mu\text{L}$ 1%（质量百分含量）的 BSA 封闭， 37°C 温育 1h，用洗涤液 $1\times\text{PBST}$ 洗涤 3-5 次，用吸水纸吸干，真空封装。

2、MC-LR 竞争 ELISA 试剂盒标准曲线的获得及分析

（1）微囊藻毒素竞争 ELISA 试剂盒标准曲线的获得

针对每一批试剂盒都必须测定其检测微囊藻毒素的标准曲线，以确定和评价试剂盒的各项性能参数。

溶液的配制同实施例 1，不同的是 MC-LR 标准溶液的浓度，在标准曲线中 MC-LR 标准溶液的浓度梯度如下（单位： $\mu\text{g/L}$ ）：1000、300、90、27、8.1、2.43、0.729、0.219、0.0656、0.020、0.006、0。采用 12 组平行试验（ $n=12$ ）。

将标准溶液与抗体溶液同时加入酶标板小孔中，同时设置空白孔（将添加的抗体换成高纯水，其它一致）和阴性对照孔（标准溶液用高纯水代替，即不含 MC-LR，其它一致）， 37°C 温育 0.5h，倒出孔内液体，重复用洗涤液（ $10\times\text{PBST}$ ）洗涤 2-5 次，将酶标板倒置在吸水纸上拍打；加入酶标二抗溶液于酶标板小孔中， 37°C 温育 0.5h，用洗涤液重复洗 3-5 次，吸干；加入底物溶液和显色溶液到酶标板小孔中，室温下反应 10-15min，用酶标仪在波长 450nm 处测定吸光度 A，以不加抗体的小孔作为空白调零。以各浓度的吸光度 A 为纵坐标，以对应 MC-LR 浓度的 $\log_{10}$ 值为横坐标，绘制半对数标准曲线图。结果如图 1 所示，表明标准曲线具有完整的反 S 形状，并具有上平台和下平台，标准曲线的平行测定次数 12 次，误差线为 $n=12$ 次平行实验的标准偏差，实验重复性良好，相对标准偏差（变异系数）均在 15% 以内，表明精密度良好。

对试剂盒半抑制浓度、检测限、定量检测区间等描述，基于对图 1 的标准曲线进行模型拟合后进一步评价。采用 4 参数 Logistic 模型作为水环境样品 ELISA 检测试剂盒数据分析和评价的基础，模型如下：

$$A = A_2 + \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p} \quad (4 \text{ 参数 Logistic 模型})$$

其中：

x ：未标记抗原浓度（质量浓度或物质的量浓度），自变量；

A : x 对应的吸光度(Absorbance), 因变量;

A_1 : 上端渐近线($x=0$), 常数;

A_2 : 下端渐近线($x \rightarrow \infty$), 常数;

p : 与曲线的斜率有关, 常数;

x_0 : 曲线的中点, 或称拐点, 常数;

对于图 1 的标准曲线, 0.453, A_2 为 0.029, p 为 0.78, x_0 为 1.8。

(3) 半抑制浓度 IC_{50} 是竞争 ELISA 一个很重要的评价指标。在竞争 ELISA 中, $IC_{50} \equiv x_0$ 。

(4) 在竞争 ELISA 中, 依据上述 Logistic 模型, 定义结合率 Y 如下式。

$$Y = \frac{A - A_2}{A_1 - A_2} \times 100\%$$

(5) 竞争 ELISA 标准曲线最低检测限和最高检测限的确定采用结合率法, 即最低和最高检测限分别为 $Y=90\%$ 和 $Y=10\%$ 时对应的目标物质(待测物)的浓度。

(6) 竞争 ELISA 标准曲线的定量检测区间的确定采用结合率法, 定量检测区间即 $Y=80\%-20\%$ 对应的目标物质(待测物)的浓度区间。

进一步对图 1 中的标准曲线采用四参数的 Logistic 模型拟合, 分析结果表明该间接竞争 ELISA 试剂盒半抑制浓度 $IC_{50}=1.8 \pm 0.1 \mu g/L$; 该间接竞争 ELISA 试剂盒对 MC-LR 的最低检测限为 $0.10 \mu g/L$; 对 MC-LR 进行检测的定量检测区间为 $0.30 \mu g/L-10.00 \mu g/L$ 。

3、采用本发明的试剂盒对某地几处富营养化水体中的 MC-LR 进行检测
对富营养化水体中的 MC-LR 检测方法同步骤 2。

样品 1-6 由于浊度较高, 采用普通滤纸对水样过滤后用本试剂盒进行测定, 得到原水样测定结果, 每个样品平行测定 5 次, 计算变异系数, 用变异系数确认本试剂盒的稳定性; 对水样添加 $3 \mu g/L$ MC-LR 标准品后用本试剂盒进行测定, 得到加标准品后测定结果, 并测定回收率, 用回收率确认本试剂盒的准确度。其中, 回收率测定方法如下: 样品添加浓度(最终浓度)用 X 表示, 未添加标准品的样品测定平均值为 x_1 , 添加了标准品的样品测定平均值为 x_2 , 每个样品平行测定 3 次, 则回收率计算如下式。

$$\text{回收率}(\%) = \frac{x_2 - x_1}{X} \times 100\%$$

结果如表 1 所示, 结果表明上述样品检测结果的变异系数都在 15% 以内, 精密度良好; 检测结果的回收率为 $(100.3 \pm 5.9)\%$, 准确度良好。因此本发明的微囊藻

毒素免疫检测试剂盒可以满足实际水样检测的需要。

表1、典型地表水体MC-LR的ELISA测定结果

样品编号	原水样测定结果 ($\mu\text{g/L}$)	变异系数 (%)	加标准品后测定结果 ($\mu\text{g/L}$)	变异系数 (%)	回收率 (%)
1	1.94	7.5	4.88	9.3	98.0
2	2.28	10.3	5.23	8.5	98.3
3	1.82	5.8	5.02	13.3	106.7
4	2.35	9.4	5.39	4.9	101.3
5	2.33	12.7	5.43	11.5	103.3
6	0.67	7.4	3.69	7.9	100.7

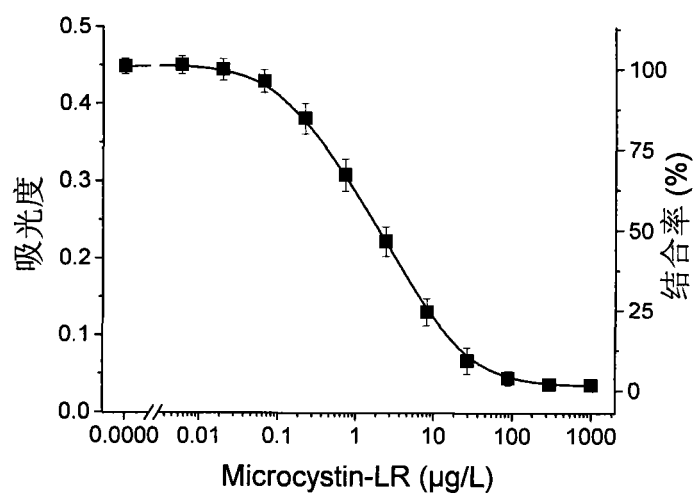


图 1

专利名称(译)	一种微囊藻毒素酶联免疫检测试剂盒		
公开(公告)号	CN101093225A	公开(公告)日	2007-12-26
申请号	CN200710119213.6	申请日	2007-07-18
[标]申请(专利权)人(译)	清华大学		
申请(专利权)人(译)	清华大学		
当前申请(专利权)人(译)	清华大学		
[标]发明人	何苗 盛建武 施汉昌		
发明人	何苗 盛建武 施汉昌		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531 G01N33/53 C12N5/12		
代理人(译)	关畅		
其他公开文献	CN100465645C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种微囊藻毒素酶联免疫检测试剂盒。该微囊藻毒素酶联免疫检测试剂盒，包括包被抗原、微囊藻毒素 - LR多克隆抗体或单克隆抗体以及酶标二抗；所述包被抗原为完全抗原A；所述完全抗原A按照如下方法制备：在微囊藻毒素 - LR的第七位氨基酸残基N - 甲基脱氢丙氨酸上引入一个氨基，得到经氨基修饰的微囊藻毒素 - LR；再将该经氨基修饰的微囊藻毒素 - LR与载体蛋白偶联得到所述微囊藻毒素 - LR与载体蛋白的偶联物，即完全抗原A。本发明的微囊藻毒素酶联免疫检测试剂盒检测范围在0.10μg/L - 30.00μg/L之间，定量检测区间在0.30μg/L - 10.00μg/L之间，平均回收率(100.3±5.9)%，批内误差小于15%，准确度和精密度符合要求，能进行环境样品中微囊藻毒素 - LR的大规模快速筛查和预警监测。

$$A = A_2 + \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p}$$