

[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 200910027457.0

[51] Int. Cl.
G01N 33/552 (2006.01)
G01N 33/558 (2006.01)
G01N 33/531 (2006.01)
G01N 33/532 (2006.01)

[43] 公开日 2009年10月7日

[11] 公开号 CN 101551390A

[22] 申请日 2009.5.7

[21] 申请号 200910027457.0

[71] 申请人 江南大学

地址 214122 江苏省无锡市蠡湖大道1800号

[72] 发明人 胥传来 李灼坤 徐丽广 刘丽强

[74] 专利代理机构 无锡市大为专利商标事务所
代理人 时旭丹 刘品超

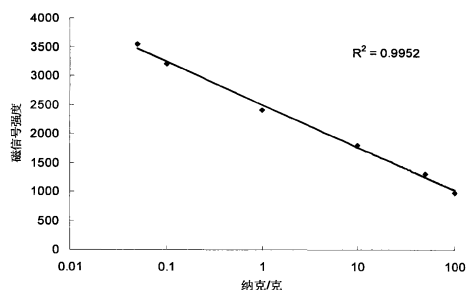
权利要求书2页 说明书5页 附图2页

[54] 发明名称

一种快速检测藻毒素的免疫磁珠层析试纸条及其制备方法

[57] 摘要

一种快速检测藻毒素的免疫磁珠层析试纸条及其制备方法，涉及藻毒素检测技术领域。该试纸条由衬板和衬板上依次衔接的样品垫、磁标结合垫、包被膜、吸水垫组成，磁标结合垫为吸附藻毒素磁标抗体的玻璃纤维棉，在包被膜上有用藻毒素偶联的载体蛋白溶液印制的隐形检测线T线、用羊抗兔IgG溶液印制的隐形对照线C线。将试纸条样品垫插入待测样品溶液，10~20秒后取出，于室温下反应15分钟，将试纸条放入磁信号检测仪检测，此检测仪将已转化成磁场信号的生物学反应信号进一步以电信号输出；绘制标准曲线后，依据标准曲线求出待测样品中藻毒素含量。本发明是基于纳米磁免疫技术进行藻毒素的检测方法、具有灵敏度高、反应时间短、仪器设备便宜、方便易用等特点。



1、一种藻毒素免疫磁珠层析检测试纸条，其特征是由衬板和在衬板上依次衔接的样品垫、磁标结合垫、包被膜、吸水垫组成，磁标结合垫为吸附藻毒素磁标抗体的玻璃纤维棉，在包被膜上有用藻毒素偶联的载体蛋白溶液印制的直线式隐形检测线 T 线，用羊抗兔 IgG 溶液印制的直线式隐形对照线 C 线；

所述的衬板为不吸水的硬质塑胶条或硬纸条；样品垫为玻璃纤维棉、尼龙膜、聚偏二氟乙烯膜、或聚酯膜；包被膜为硝酸纤维素膜、纯纤维素膜、或羧化纤维素膜；吸水垫为吸水滤纸或滤油纸；

所述的藻毒素磁标抗体为磁珠标记的藻毒素的多克隆抗体；

所述的磁珠为表面修饰有羧基的 Fe_3O_4 磁珠；

所述的偶联藻毒素的载体蛋白为：牛血清白蛋白 BSA、鸡卵清白蛋白 OVA。

2、权利要求 1 所述藻毒素免疫磁珠层析检测试纸条的制备方法，其特征是

1) 藻毒素全抗原的合成及鉴定：用碳化二亚胺法分别将 BSA, OVA 与藻毒素 MC-LR 进行偶联，得到藻毒素的全抗原 MC-LR-BSA 以及 MC-LR-OVA，并利用紫外扫描仪进行鉴定；

2) 多克隆抗体的制备与纯化：以 MC-LR-BSA 作为免疫原，免疫新西兰兔，按常规方法制备多克隆抗体并以硫酸铵纯化；

3) 免疫磁珠的制备：将 MC-LR 抗体与带羧基的纳米磁珠偶联，制备含 MC-LR 抗体的免疫磁珠，即藻毒素磁标抗体；以玻璃纤维棉吸附藻毒素磁标抗体制备磁标结合垫；

4) 包埋 MC-LR-OVA 和羊抗兔 IgG 至硝酸纤维素膜：用喷膜仪将选定浓度的包被原 MC-LR-OVA 以及羊抗兔 IgG 分别喷载于包被膜的 T 线和 C 线上，37°C 烘箱干燥 10min 备用；

5) 检测试纸条的制作：将样品垫、磁标 MC-LR 抗体的结合垫、包埋包被原 MC-LR-OVA 和羊抗兔 IgG 的包被膜、吸水垫依次衔接在衬板上，组成藻毒素免疫磁珠层析检测试纸条；

6) 样品检测：将试纸条样品垫插入待测样品溶液，样品溶液将通过层析作用从试纸条上从下而上流过，10~20 秒后取出试纸条，再于室温下反应 15 分钟后，将测试板放入 Envisio™ System 的 Magnetic Assay Reader 进行检测，此检测仪器将已经转化成磁场信号的生物学反应信号进一步以电信号方式输出；绘制标准曲线后，依据标准曲线求出待测样品的藻毒素含量。

3、根据权利要求 2 所述的制备方法，其特征在于所述的免疫磁珠的制备：将多克隆 MC-LR 抗体与纳米磁珠偶联，制备含 MC-LR 抗体的免疫磁珠：吸取适量磁珠至小试管中，离心使磁珠与贮存液分离，去除贮存液并加入乙磺酸 MES

清洗缓冲液涡旋和超声清洗并离心，重复几次，最后重悬磁珠，将一定体积的新鲜配置的水溶性碳化二亚胺EDC和N-羟基琥珀酰亚胺NHS加入磁珠悬液中活化羧基，使磁珠表面羧基与EDC和NHS的摩尔比为 1 : 4 : 3，涡旋混合后于室温低速搅拌孵育反应2小时，分别用MES清洗缓冲液及硼酸清洗缓冲液清洗磁珠，随后将MC-LR抗体缓慢滴加入磁珠悬液中低速搅拌孵育反应过夜，再逐滴加入质量浓度5% BSA，使BSA的终浓度为1%，持续搅拌5 min，以饱和游离的磁珠，低速离心去除凝聚的磁珠沉淀，然后再用硼酸清洗缓冲液清洗磁珠去除未结合的蛋白质，将磁珠转移至新管，弃掉硼酸清洗缓冲液，并用偶联缓冲液重悬浮，放4°C冰箱存放，用定量加样装置将已经标记有MC-LR抗体的磁珠加入磁标结合垫，并放入37°C烘箱干燥10min备用组成检测试纸条。

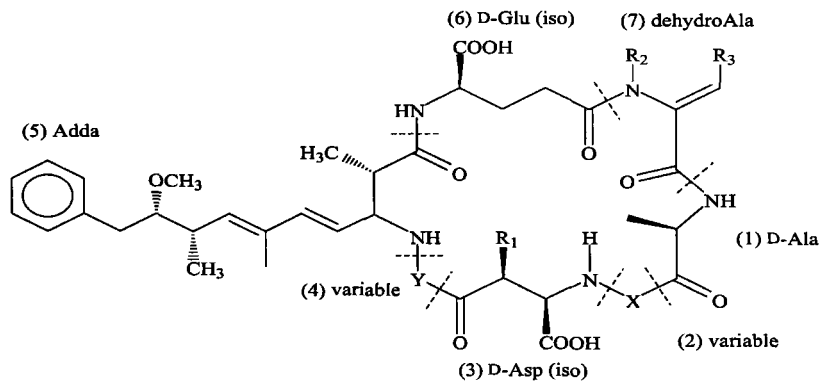
一种快速检测藻毒素的免疫磁珠层析试纸条及其制备方法

技术领域

一种快速检测藻毒素的纳米免疫磁珠层析试纸条及其制备方法，涉及藻毒素检测技术领域。

背景技术

随着经济的发展，含有大量的氮、磷营养物质的污水进入湖泊、水库，使水体富营养化，致使藻类异常增殖，释放次级代谢物藻毒素 (Algae Toxins)，威胁人类的饮用水的安全和水体中其它生物的安全。其中微囊藻毒素 (Microcystins, MCs) 的分布广、危害大更应引起重视，其是由某些种属的淡水蓝藻，主要是铜绿微囊藻产生的一个结构相似的环七肽家族，已知有60余种异构体。其结构如下：



其含有五个固定成分的氨基酸，两个可变的氨基酸X、Y。其中X和Y分别为Leu和Arg的最为常见、毒性也最大。基于此，世界卫生组织(WHO)推荐的饮水中的藻毒素标准为 $1.0\mu\text{g/L}$ ，我国现颁布执行的生活应用水水质卫生规范(2001)藻毒素为 0.001mg/L 、地表水环境质量标准(GB3838-2002)微囊藻毒素-LR为 0.001mg/L 。故对藻毒素准确有效监测尤为重要。

常用的检测藻毒素的方法主要有仪器分析方法、生物化学法及免疫检测法等几大类。仪器分析方法主要包括高效液相色谱法(HPLC)、质谱、液质联用等，这些方法虽然灵敏但其需要昂贵的仪器设备，专业的操作人员，对检材的要求也比较高，并且需要进一步的样本前处理才能进行，这已经不能达到现代检测对快速、方便、准确的要求。生物化学法主要是蛋白磷酸酶抑制试验法，优点是快速，数小时即可实现对大量样品的检测，但其最大的不足之处在于特异性蛋白磷酸酶等没有商品供应、特异性差。免疫分析化学方法具有快速，灵敏度高，操作简单，专一性好等优点。酶联免疫吸附试验(Enzyme-linked

Immuno-sorbent Assay, 简称为ELISA)和胶体金免疫层析法(Colloidal Gold Immuno-Chromatography Assay, 简称为GICA)由于其廉价, 特异, 灵敏和快速等特点, 被广泛地使用于药物残留的快速筛查中。但ELISA试剂需要专用的实验室和专业人员进行检验, 操作复杂, 时间较长; 胶体金类试剂操作简便、快速、适于现场检测, 但灵敏度稍低, 结果用肉眼直接观察会产生误差, 亦不能记录。

纳米免疫磁珠是含有铁元素的超顺磁纳米颗粒, 外面包覆着聚乙烯类高分子物质, 并可带有羧基或氨基, 用于和蛋白质分子交联。免疫磁珠在细胞和大分子分离、纯化及诊断上都已得到应用。

此纳米免疫磁珠检测试纸基本原理如下: 采用竞争法, 即样品中的藻毒素 MC-LR 和固定在包被膜上的包被抗原 MC-LR-OVA 竞争磁珠标记的抗藻毒素多克隆抗体。

利用免疫磁珠标记一种抗体, 在试纸的 NC 膜上包被相应的包被抗原和羊抗兔二抗。当试纸条以样品垫末端浸入样本后, 样品溶液沿着试纸条通过毛细管作用从下往上泳动, 溶解磁标垫上干燥的磁标抗体, 当待测样品中不存在待测药物, 则磁标抗体会直接泳动到检测线 (T 线) 和硝酸纤维膜上的包被原 MC-LR-OVA 发生免疫反应, 从而使磁珠颗粒发生聚集, 形成黑色的线条, 然后其他未结合的磁标抗体继续通过毛细管作用向前泳动, 与控制线 (C 线) 上的羊抗兔二抗发生第二次免疫反应, 同样形成黑色线条, 这样包被膜上就会有两条黑色线条, 表示样品为阴性。当待测样品中存在待测药品, 则磁标抗体首先会和样品中的检测物发生免疫反应, 当未发生反应的磁标抗体有剩余时, 才会在检测线上与 MC-LR-OVA 发生免疫反应, 形成黑色线条, 其颜色强度弱于阴性时的线条强度; 而当磁标抗体全部和样品中的待测药品藻毒素 MC-LR 发生免疫结合时, 就不会再有抗体与检测线包被原结合, 从而检测线就不会有黑色线条出现。控制线是为检验磁标免疫层析方法本身是否有效而设定的, 所以无论样品中是否存在待测药物藻毒素 MC-LR, 控制线都应该显现。如果控制线不显色, 则说明试纸条失效。最后通过测定检测线上捕获磁珠的含量实现结果的判定。和胶体金试纸类相比, 免疫磁珠检测试纸最大的不同在于将标记胶体金改为标记磁珠, 检测结果时用 Magnetic Assay Reader 对检测线上的磁珠含量进行检测并把磁信号转变为电信号, 而不是依靠肉眼去总判定, 这样可使得结果判定更为精确、灵敏、客观和便于记录保存。利用纳米免疫磁珠研制藻毒素抗体检测快速诊断试纸尚无报道。

发明内容

本发明的目的: 针对现有检测藻毒素的技术的不足和缺陷, 提供一种基于纳米磁珠免疫技术的、灵敏度高、反应时间短、仪器设备便宜的可快速检测藻毒素的检测方法, 使其能更加快速、灵敏、简便地检测藻毒素的残留。

本发明的技术方案是：一种藻毒素免疫磁珠层析检测试纸条，由衬板和衬板上依次衔接的样品垫、磁标结合垫、包被膜、吸水垫组成，磁标结合垫为吸附藻毒素磁标抗体的玻璃纤维棉，在包被膜上有用藻毒素偶联的载体蛋白溶液印制的直线式隐形检测线 T 线，用羊抗兔 IgG 溶液印制的直线式隐形对照线 C 线；

所述的衬板为不吸水的硬质塑胶条或硬纸条；样品垫为玻璃纤维棉、尼龙膜、聚偏二氟乙烯膜、或聚酯膜；包被膜为硝酸纤维素膜、纯纤维素膜、或羧化纤维素膜；吸水垫为吸水滤纸或滤油纸；

所述的藻毒素磁标抗体为磁珠标记的藻毒素的多克隆抗体；

所述的磁珠为表面修饰有羧基的 Fe_3O_4 磁珠；

所述的偶联藻毒素的载体蛋白为：牛血清白蛋白 BSA、鸡卵清白蛋白 OVA。

所述藻毒素免疫磁珠层析检测试纸条的制备方法：

1) 藻毒素全抗原的合成及鉴定：用碳化二亚胺法分别将 BSA, OVA 与藻毒素 MC-LR 进行偶联，得到藻毒素的全抗原 MC-LR-BSA 以及 MC-LR-OVA，并利用紫外扫描仪进行鉴定；

2) 多克隆抗体的制备与纯化：以 MC-LR-BSA 作为免疫原，免疫新西兰兔，按常规方法制备 MC-LR 多克隆抗体并以硫酸铵纯化；

3) 免疫磁珠的制备：将 MC-LR 抗体与带羧基的纳米磁珠偶联，制备含 MC-LR 抗体的免疫磁珠，即藻毒素磁标抗体；以玻璃纤维棉吸附藻毒素磁标抗体制备磁标结合垫；

4) 包埋 MC-LR-OVA 和羊抗兔 IgG 至硝酸纤维素膜：用喷膜仪将选定浓度的包被原 MC-LR-OVA 以及羊抗兔 IgG 分别喷载于包被膜的 T 线和 C 线上，37°C 烘箱干燥 10min 备用；

5) 检测试纸条的制作：将样品垫、磁标 MC-LR 抗体的结合垫、包埋包被原 MC-LR-OVA 和羊抗兔 IgG 的包被膜、吸水垫依次衔接在衬板上，组成藻毒素免疫磁珠层析检测试纸条；

6) 样品检测：将试纸条样品垫插入待测样品溶液，样品溶液将通过层析作用从试纸条上从下而上流过，10~20 秒后取出试纸条，再于室温下反应 15 分钟后，将测试板放入 Enviso™ System 的 Magnetic Assay Reader 进行检测，此检测仪器将已经转化成磁场信号的生物学反应信号进一步以电信号方式输出；绘制标准曲线后，依据标准曲线求出待测样品的藻毒素含量。

所述的免疫磁珠的制备：将多克隆 MC-LR 抗体与纳米磁珠偶联，制备含 MC-LR 抗体的免疫磁珠：吸取适量磁珠至小试管中，离心使磁珠与贮存液分离，去除贮存液并加入乙磺酸 MES 清洗缓冲液涡旋和超声清洗并离心，重复几次，最后重悬磁珠，将一定体积的新鲜配置的水溶性碳化二亚胺 EDC 和 N-羟基琥珀

酰亚胺 NHS 加入磁珠悬液中活化羧基,使磁珠表面羧基与 EDC 和 NHS 的摩尔比为 1:4:3,涡旋混合后于室温低速搅拌孵育反应 2 小时,分别用 MES 清洗缓冲液及硼酸清洗缓冲液清洗磁珠,随后将 MC-LR 抗体缓慢滴加入磁珠悬液中低速搅拌孵育反应过夜,再逐滴加入质量浓度 5% BSA,使 BSA 的终浓度为 1%,持续搅拌 5 min,以饱和游离的磁珠,低速离心去除凝聚的磁珠沉淀,然后再用硼酸清洗缓冲液清洗磁珠去除未结合的蛋白质,将磁珠转移至新管,弃掉硼酸清洗缓冲液,并用偶联缓冲液重悬浮,放 4°C 冰箱存放,用定量加样装置将已经标记有 MC-LR 抗体的磁珠加入磁标结合垫,并放入 37°C 烘箱干燥 10min 备用组成检测试纸条。

本发明的有益效果:本发明是基于一种纳米磁免疫技术进行藻毒素的检测方法、它具有灵敏度高、反应时间短、仪器设备便宜、方便易用等特点。

附图说明

图 1、磁珠的 TEM 电镜图。

图 2、免疫磁珠试剂条结构示意图。

图 3、阳性样品的磁信号检测示意图。最高的尖峰代表检测信号,第二高的尖峰代表空白对照信号。

图 4、藻毒素 0.05~100ppb 时磁信号强度的标准曲线图。

具体实施方式

要制成藻毒素的免疫磁珠检测试纸条,首先需要制备偶联藻毒素载体蛋白,用于制备相应的检测线(T线)和抗体;而且需要制备藻毒素磁标抗原,用于制备相应的磁标抗原纤维棉;另外需要制备羊抗兔 IgG 抗体,用于制备对照线(C线)。

1) 藻毒素的全抗原的合成及鉴定:先将藻毒素溶解在乙醇溶液中,再采用碳化二亚胺(EDC)法合成抗原,并使用牛血清白蛋白 BSA 作为免疫抗原偶联载体,卵清蛋白 OVA 作为包被抗原偶联载体,分别得到藻毒素的全抗原 MC-LR-BSA 和 MC-LR-OVA,并利用紫外扫描仪进行鉴定;

2) 多克隆抗体的制备与纯化:以 MC-LR-BSA 作为免疫原,采用新西兰大白兔作为被免疫的动物,首次免疫时将免疫源与等量的弗氏完全佐剂混合制成乳化剂,在大白兔背部皮下多点注射,免疫剂量为 1mg/只,间隔 2-4 周后,用相同剂量免疫源加等量弗氏不完全佐剂混合制成乳化剂,加强免疫,免疫期间监测抗体效价及特异性,最后一次免疫不加佐剂。最后一次免疫 7 天后心脏放血,经硫酸铵分级沉淀得纯化的 MC-LR 多克隆抗体。并以硫酸铵沉淀法纯化抗体;得到兔抗 MC-LR 的 IgG。

3) 免疫磁珠的制备:将 MC-LR 多克隆抗体与纳米磁珠偶联,制备含 MC-LR 抗体的免疫磁珠;具体方法是:吸取适量磁珠至小试管中,离心使磁珠与贮存

液分离，去除贮存液并加入乙磺酸（MES）清洗缓冲液涡旋和超声清洗并离心，重复几次，最后重悬磁珠，将一定体积的新鲜配置的水溶性碳化二亚胺(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)加入磁珠溶液中活化羧基，使磁珠表面羧基与EDC和NHS的摩尔比为1:4:3，涡旋混合后于室温震荡孵育反应2小时，分别用MES清洗缓冲液及硼酸清洗缓冲液清洗磁珠，随后将MC-LR抗体缓慢滴加入磁珠悬液中低速搅拌孵育反应过夜，再逐滴加入质量浓度5% BSA，使BSA的终浓度为1%，持续搅拌5 min，以饱和游离的磁珠。低速离心去除凝聚的磁珠沉淀，然后再用硼酸清洗缓冲液清洗磁珠，即高速离心，保留底部可流动的暗黑色沉淀而去除含有未结合的蛋白质的上清液，重复几次，最好将磁珠转移至新管，弃掉硼酸清洗缓冲液，并用偶联缓冲液重悬浮，放4°C冰箱存放。用定量加样装置将已经标记有MC-LR抗体的磁珠加入磁珠结合垫，并放入37°C烘箱干燥10min备用以组成检测试纸条。

4) 包被MC-LR-OVA抗原和羊抗兔IgG至硝酸纤维素膜（NC膜）：分别用喷雾仪将一定浓度的MC-LR-OVA喷载于硝酸纤维素膜（NC膜）的检测线（T线）、羊抗兔IgG喷载于硝酸纤维素膜（NC膜）的控制线（C线）上，37°C烘箱干燥10min备用。

5) 检测试纸条的制作：分别将磁珠MC-LR多克隆抗体的偶联垫、包埋抗原和羊抗兔IgG的硝酸纤维素膜（NC膜）、样品垫、吸水垫、覆盖膜、测试板外卡组组成检测试纸条(与金标试纸条相似)。

6) 样品检测：将藻毒素免疫磁珠层析检测试纸条的样品端插入待测样品液中，插入深度不超过标记线，样品将通过毛细管层析作用从试纸条上流过，10~20秒后取出试纸条，在室温下反应15分钟以后，将测试板放入Enviso™ System的Magnetic Assay Reader进行检测，并且此检测仪器可以将已经转化成磁场信号的生物学反应信号进一步以电信号的方式输出；绘制标准曲线后，依据标准曲线求出待测样品内藻毒素含量的具体值。得到该方法的检测限为0.05ppb。

实施例1

称取40mg太湖蓝藻，然后用1.5mL的甲醇水溶液（体积比为75:25）超声提取10分钟，再用10000rpm离心10分钟，提取上清液。如此重复提取三次。将这三次上清提取液混合，并用0.2μm的微孔滤膜过滤，然后用氮气吹干，最后用缓冲液溶解吹干后的残留物作为待测样品液备用。最终用藻毒素的免疫磁珠层析试纸条检测待测的样品液，插入深度不超过标记线，样品将通过毛细管层析作用从试纸条上流过，10~20秒后取出试纸条，在室温下反应15分钟以后，将测试试纸条放入Enviso™ System的Magnetic Assay Reader进行检测磁场信号。根据事先用藻毒素标准品测出的标准曲线求出待测样品内藻毒素的含量为6ppb。

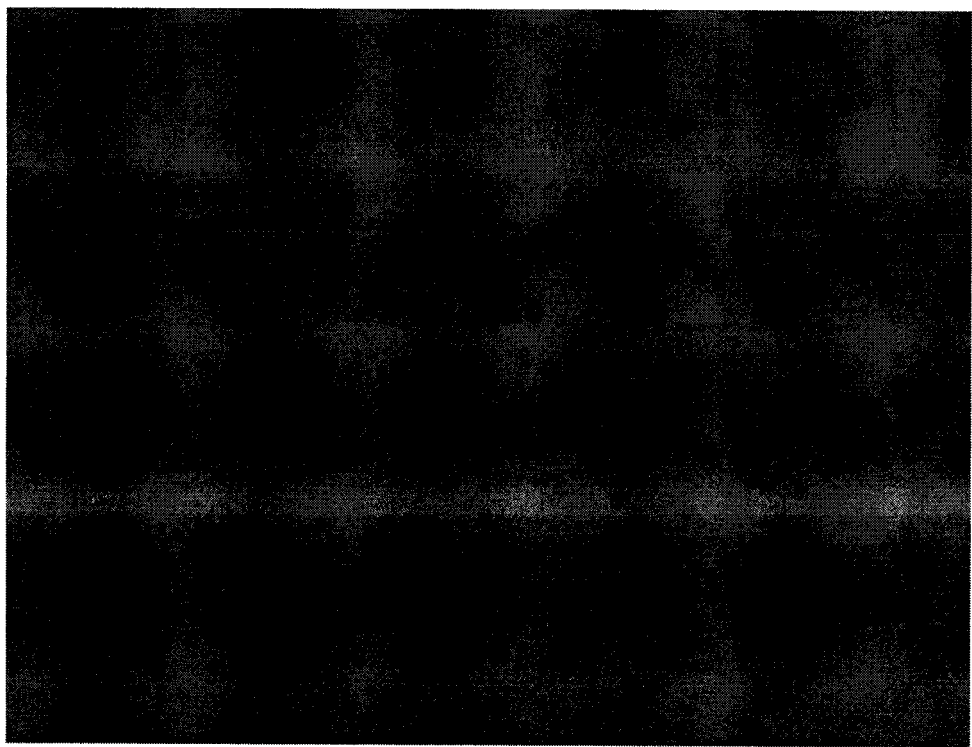


图 1

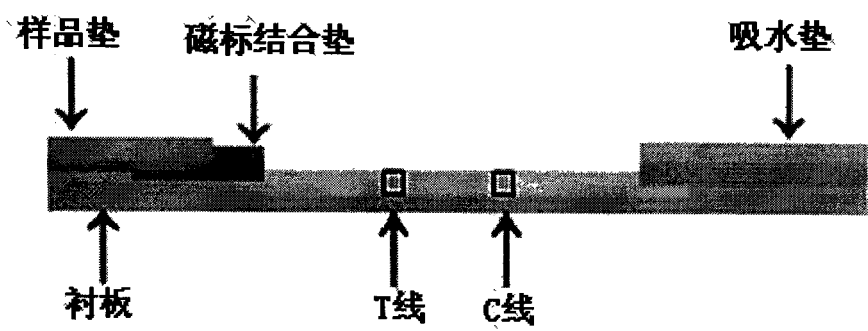


图 2

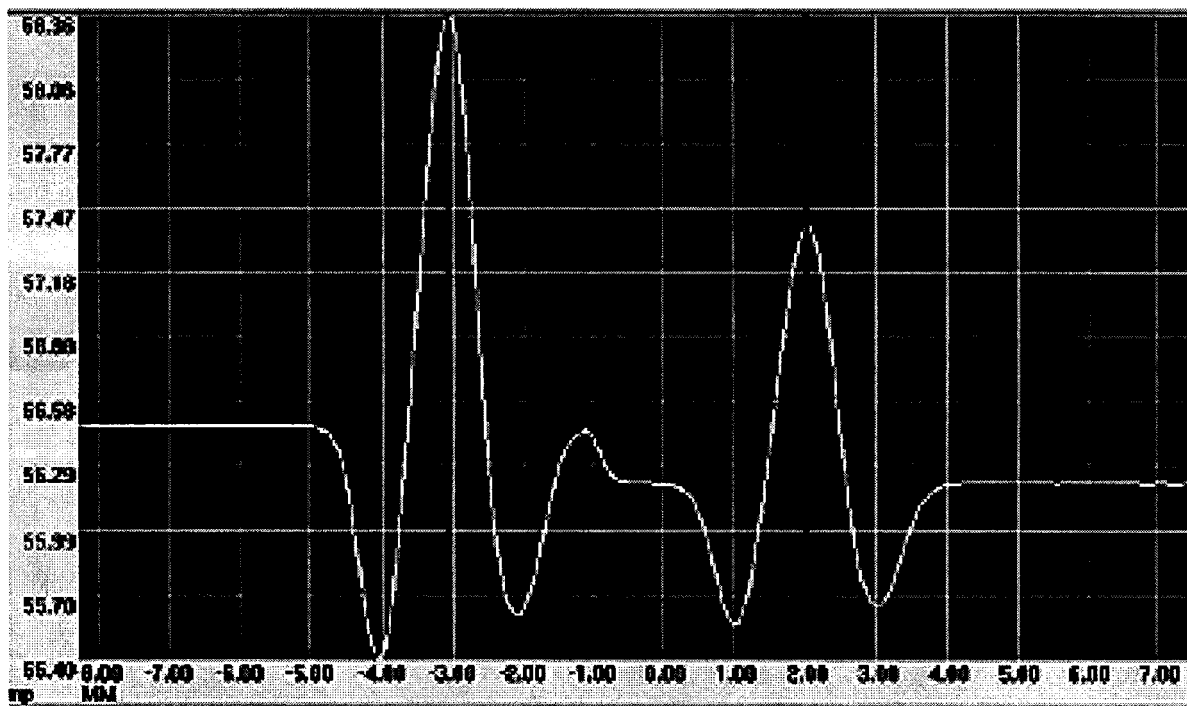


图 3

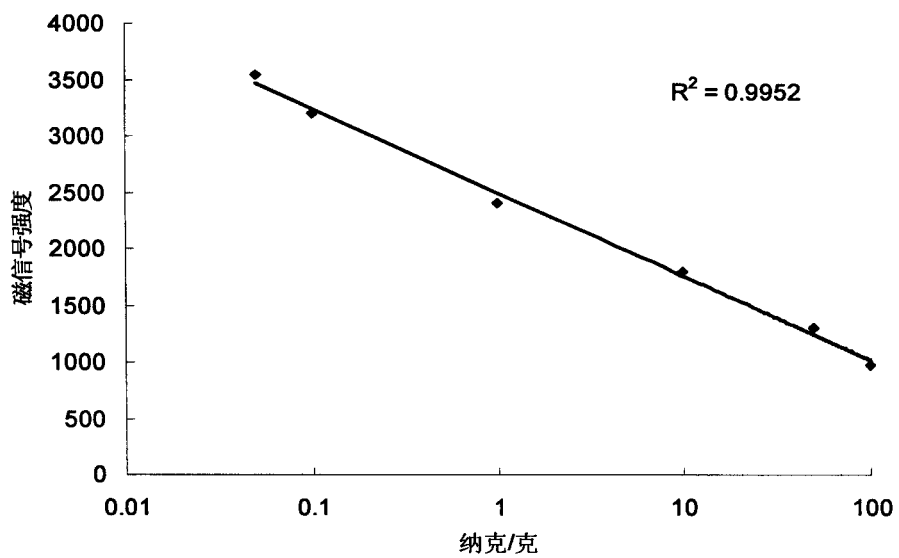


图 4

专利名称(译)	一种快速检测藻毒素的免疫磁珠层析试纸条及其制备方法		
公开(公告)号	CN101551390A	公开(公告)日	2009-10-07
申请号	CN200910027457.0	申请日	2009-05-07
[标]申请(专利权)人(译)	江南大学		
申请(专利权)人(译)	江南大学		
当前申请(专利权)人(译)	江南大学		
[标]发明人	胥传来 李灼坤 徐丽广 刘丽强		
发明人	胥传来 李灼坤 徐丽广 刘丽强		
IPC分类号	G01N33/552 G01N33/558 G01N33/531 G01N33/532		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种快速检测藻毒素的免疫磁珠层析试纸条及其制备方法，涉及藻毒素检测技术领域。该试纸条由衬板和在衬板上依次衔接的样品垫、磁标结合垫、包被膜、吸水垫组成，磁标结合垫为吸附藻毒素磁标抗体的玻璃纤维棉，在包被膜上有用藻毒素偶联的载体蛋白溶液印制的隐形检测线T线、用羊抗兔IgG溶液印制的隐形对照线C线。将试纸条样品垫插入待测样品溶液，10~20秒后取出，于室温下反应15分钟，将试纸条放入磁信号检测仪检测，此检测仪将已转化成磁场信号的生物学反应信号进一步以电信号输出；绘制标准曲线后，依据标准曲线求出待测样品中藻毒素含量。本发明是基于纳米磁免疫技术进行藻毒素的检测方法、具有灵敏度高、反应时间短、仪器设备便宜、方便易用等特点。

