



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102109515 A

(43) 申请公布日 2011.06.29

(21) 申请号 201010258533.1

(22) 申请日 2010.08.13

(71) 申请人 许昌学院

地址 461000 河南省许昌市八一路 88 号

申请人 肖付刚

(72) 发明人 肖付刚 吕春霞 王德国 刘海英

高雪丽 张晓伟 郭卫芸 李凌乐

(51) Int. Cl.

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 30/00 (2006.01)

G01N 30/08 (2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 5 页

(54) 发明名称

一种节球藻毒素多抗免疫亲和柱的制备和使用方法

(57) 摘要

一种节球藻毒素 (NODLN) 多抗免疫亲和柱 (IAC) 的制备和使用方法, 属于免疫亲和层析及藻毒素检测技术领域。本发明所研制的 IAC 是将 NODLN 多抗固定于柱中, 从而吸附样品溶液中的 NODLN, 洗脱后起到富集和净化的效果, 然后进 HPLC 进行定性定量分析。作为前处理过程, IAC 富集优于现有的固相萃取 (SPE) 法。在 HPLC 图中显示 NODLN 多抗 IAC 能将 NODLN 的峰与其它杂质峰分开, 不至影响测定结果, 而 SPE 净化由于杂质太多, NODLN 峰甚至难以分辨。由于 NODLN 多抗与 NODLN 能够特异性结合使 IAC 有很好的特异性, 一次净化能除去绝大部分干扰物。而 SPE 无特异性, 不能除去干扰物, 从而影响最后的测定结果。

1. 一种节球藻毒素多抗免疫亲和柱的制备方法,其特征是:

(1) 以节球藻毒素,以下简称 NODLN,与牛血清白蛋白 BSA 偶联,偶联物以下简称 NODLN-BSA,作为人工抗原,免疫获得 NODLN 抗血清,再采用饱和硫酸铵二步沉淀法纯化获得 NODLN 多抗;

(2) 琼脂糖凝胶 Sepharose 4B 的活化:用溴化氰法活化 Sepharose 4B,活化过程如下:

(a) 取 10mL Sepharose 4B 放在布氏漏斗中抽干,用 30mL 水分两次洗涤后抽干,加少量的 0.1mol/L pH 8.3 的 NaHCO_3 洗涤,立即转入 100mL 烧杯中,冰浴下缓慢搅拌;

(b) 在通风橱内称取 1g 溴化氰,加水 10mL 溶解,然后分批加入 Sepharose 4B 中,边加边搅拌,同时测 pH 值,通过滴加 2mol/L NaOH,使 pH 保持在 10.5,待溴化氰反应完全,pH 保持不变,停止搅拌;

(c) 将活化的 Sepharose 4B 加入小冰块,迅速倒入布氏漏斗中,以冰水抽洗成中性,再迅速以 150mL 冷的 0.1mol/L pH 8.3 的 NaHCO_3 抽洗;

(3) 节球藻毒素多抗免疫亲和柱的制备:

NODLN 多抗与琼脂糖凝胶 Sepharose 4B 偶联得到亲和吸附剂,填入柱中制得 NODLN 多抗免疫亲和柱,操作步骤如下:

(d) 偶联

将上述制备纯化好的 NODLN 多抗置于 pH 8.3 含有 0.5M NaCl 的 0.1M NaHCO_3 的偶联缓冲液中透析 12h;将上述活化好的 Sepharose 4B 置于砂芯漏斗中用偶联缓冲液快速抽洗,然后迅速倒入 NODLN 多抗溶液中进行偶联,紫外扫描监控偶联过程;用 5 倍 NODLN 多抗溶液体积以上的偶联缓冲液洗去未偶联的 NODLN 多抗,得到琼脂糖-抗体偶联复合物;收集全部的洗脱液,通过测定其蛋白质的含量计算未偶联上 NODLN 多抗的量;

(e) 封闭活性基团

将琼脂糖-抗体偶联复合物转入 5 倍体积 pH 8.0 的含 0.5M NaCl 的 0.1M Tris-HCl 缓冲液中,保持 2h,以封闭琼脂糖凝胶中多余的活性基团;

(f) 洗涤

步骤 (e) 得到的琼脂糖-抗体偶联复合物依次用 5 倍偶联复合物体积的 pH 4.0 的含 0.5M NaCl 的 0.1M 醋酸缓冲液和 5 倍偶联复合物体积的 pH 8.0 的含 0.5M NaCl 的 0.1M Tris-HCl 缓冲液洗涤,此洗涤过程重复三次;然后用 5 倍偶联复合物体积的 PBS 洗涤两次;

(g) 防腐处理

步骤 (f) 制备好的琼脂糖-抗体偶联复合物如需放置一段时间,应使用含有 1/10000 叠氮钠的 PBS 缓冲液浸泡,然后沥去多余的溶液后放入包装袋或瓶中在 4℃ 中密闭保存;

(h) 装柱

将步骤 (f) 或 (g) 得到的琼脂糖-抗体偶联复合物填充入 2mL 或 5mL 固相萃取空柱管中,在负压下用 PBS 将凝胶压紧,制成 NODLN 多抗免疫亲和柱,即 NODLN 多抗 IAC;

(i) 保存

琼脂糖-抗体偶联复合物或填充好的 NODLN 多抗 IAC 切勿冷冻,保存在 4℃ 的冰箱内;

(j) 柱的再生

柱使用后,用 4-10 个柱床体积 pH 8.5 含 0.5M NaCl 的 0.1M Tris-HCl 缓冲液,和用 4-10

个柱床体积 pH4.5 含 0.5M NaCl 的 0.1M 醋酸钠缓冲液轮流清洗 IAC 两次,再用 PBS 缓冲液充分平衡 IAC 后保存在 4℃冰箱内供下次使用。

2. 权利要求 1 所述方法制备的 NODLN 多抗免疫亲和柱的使用方法,其特征是实际水样中 NODLN 的测定,取 0.2L 受蓝藻污染的水样先通过 0.45 μ m 微孔滤膜过滤;IAC 先依次用 5mL 甲醇,5mL 蒸馏水,5mL PBS 预处理;滤液过预处理后的 NODLN 多抗 IAC;再依次用 5mL PBS、5mL 蒸馏水、5mL 10% 甲醇淋洗杂质;最后用 5mL 纯甲醇洗脱;洗脱液减压蒸干,残留物用 0.2mL PBS 溶解后进 HPLC 分析;同时用固相萃取柱做对照实验。

一种节球藻毒素多抗免疫亲和柱的制备和使用方法

技术领域

[0001] 一种节球藻毒素多抗免疫亲和柱的制备和使用方法,属于免疫亲和层析及节球藻毒素检测技术领域。

背景技术

[0002] 近年来人类由于生产、生活活动的发展,向水体中大量排放废物废水,使得水体富营养化,藻类大量繁殖,其中有毒藻的数量也急剧增多。我国的饮用水源地如太湖、巢湖、滇池等湖泊,一些水库、河流等均受到蓝藻水华的侵袭。2007年4月发布的《长江保护与发展报告》称,2003年三峡库区蓄水至135米之后,12条长江一级支流在回水区不同程度地出现水华现象,并且近几年有加剧的趋势。

[0003] 自1878年Francis首次报道节球藻对牲畜的毒性作用后。在世界各地均有藻类水华引起家畜和野生动物死亡以及人群的肝损害、胃肠炎、腹泻和皮炎等事件的报道。

[0004] 节球藻毒素(以下简称NODLN)是蓝藻水华腐烂后释放于水中的毒素之一。NODLN为环状五肽肝毒素,是丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶1(PP1)和蛋白磷酸酶2A(PP2A)的抑制剂。最新的研究表明,NODLN同时为肿瘤诱发剂和促进剂,而微囊藻毒素-LR(以下简称MC-LR)仅为肿瘤促进剂。因为MC-LR毒性强于NODLN,因此MC-LR研究较多,WHO和我国GB 5749-2006生活饮用水卫生标准规定饮用水中MC-LR的限量为 $1\mu\text{g/L}$ 。而饮用水中还未有NODLN的限量标准。鉴于NODLN促肿瘤作用强于MC-LR,饮用水中NODLN的限量标准应低于MC-LR。

[0005] 免疫亲和柱(IAC)是利用免疫亲和层析原理制作的分离分析预装柱。由于抗体与抗原作用具有高度专一性,因此通过IAC净化能够去除绝大部分杂质。IAC技术已日渐成熟,在与藻毒素类似的真菌毒素的检测中已广泛应用,其中黄曲霉毒素的免疫亲和层析已被列入国标中(GB18980-2003和GB18979-2003)。

[0006] 目前NODLN的毒性和促肿瘤作用还未引起足够重视,检测方法只见于外文报道。我们的前期研究表明,水中NODLN的检测可用HPLC和LC-MS法,因含量低,在进样前,一般用固相萃取柱(SPE)富集,但是SPE无特异性,水中杂质多,富集后会引入许多杂质,干扰检测结果,特别是HPLC法,有时测定值与实际值相去甚远。LC-MS法虽然检测限低,测定结果较准确,但是价格昂贵,一般实验室没有。

[0007] 利用本发明所研制的IAC,通过一次净化即可除去绝大部分杂质,直接进HPLC就能获得准确的结果,能够满足NODLN日常监测的需求。

发明内容

[0008] 本发明的目的是提供一种NODLN多抗免疫亲和柱的制备和使用方法,所研制的IAC是将NODLN的多抗固定于柱中,从而吸附样品溶液中的NODLN,洗脱后起到富集和净化的效果,然后进HPLC进行定性定量分析。作为前处理过程,IAC富集优于现有的SPE法。

[0009] 本发明的技术方案:一种NODLN多抗免疫亲和柱的制备方法:

[0010] (1) 以 NODLN 与牛血清白蛋白 (BSA) 偶联,得到的偶联物 (以下简称 NODLN-BSA) 作为人工抗原,免疫获得 NODLN 抗血清,再采用饱和硫酸铵二步沉淀法纯化获得 NODLN 多抗;

[0011] (2) 琼脂糖凝胶 Sepharose 4B 的活化:用溴化氰法活化琼脂糖凝胶 Sepharose 4B,活化过程如下:

[0012] (a) 取 10mL Sepharose 4B 放在布氏漏斗中抽干,用 30mL 水分两次洗涤后抽干,加少量的 0.1mol/L pH 8.3 的 NaHCO_3 洗涤,立即转入 100mL 烧杯中,冰浴下缓慢搅拌;

[0013] (b) 在通风橱内称取 1g 溴化氰,加水 10mL 溶解,然后分批加入 Sepharose 4B 中,边加边搅拌,同时测 pH 值,通过滴加 2mol/L NaOH,使 pH 保持在 10.5,待溴化氰反应完全,pH 保持不变,停止搅拌;

[0014] (c) 将活化的 Sepharose 4B 加入小冰块,迅速倒入布氏漏斗中,以冰水抽洗成中性,再迅速以 150mL 冷的 0.1mol/L pH 8.3 的 NaHCO_3 抽洗;

[0015] (3) NODLN 多抗免疫亲和柱的制备:

[0016] NODLN 多抗与琼脂糖凝胶 Sepharose 4B 偶联得到亲和吸附剂,填入柱中制得 NODLN 多抗免疫亲和柱,操作步骤如下:

[0017] (d) 偶联

[0018] 将上述制备纯化好的 NODLN 多抗置于 pH8.3 含有 0.5M NaCl 的 0.1M NaHCO_3 的偶联缓冲液中透析 12h;将上述活化好的 Sepharose 4B 置于砂芯漏斗中用偶联缓冲液快速抽洗,然后迅速倒入 NODLN 多抗溶液中进行偶联,紫外扫描监控偶联过程;用 5 倍 NODLN 多抗溶液体积以上的偶联缓冲液洗去未偶联的 NODLN 多抗,得到琼脂糖-抗体偶联复合物;收集全部的洗脱液,通过测定其蛋白质的含量计算未偶联上 NODLN 多抗的量;

[0019] (e) 封闭活性基团

[0020] 将琼脂糖-抗体偶联复合物转入 5 倍体积 pH8.0 的含 0.5M NaCl 的 0.1M Tris-HCl 缓冲液中,保持 2h,以封闭琼脂糖凝胶中多余的活性基团;

[0021] (f) 洗涤

[0022] 步骤 (e) 得到的琼脂糖-抗体偶联复合物依次用 5 倍偶联复合物体积的 pH4.0 的含 0.5M NaCl 的 0.1M 醋酸缓冲液和 5 倍偶联复合物体积的 pH8.0 的含 0.5M NaCl 的 0.1M Tris-HCl 缓冲液洗涤,此洗涤过程重复三次;然后用 5 倍偶联复合物体积的 PBS 洗涤两次;

[0023] (g) 防腐处理

[0024] 步骤 (f) 制备好的琼脂糖-抗体偶联复合物如需放置一段时间,应使用含有 1/10000 叠氮钠的 PBS 缓冲液浸泡,然后沥去多余的溶液后放入包装袋或瓶中在 4℃ 密闭保存;

[0025] (h) 装柱

[0026] 将步骤 (f) 或 (g) 得到的琼脂糖-抗体偶联复合物填充入 2mL 或 5mL 固相萃取空柱管中,在负压下用 PBS 将凝胶压紧,即制成 NODLN 多抗 IAC;

[0027] (i) 保存

[0028] 琼脂糖-抗体偶联复合物或填充好的 NODLN 多抗 IAC 切勿冷冻,保存在 4℃ 的冰箱内;

[0029] (j) 柱的再生

[0030] 柱使用后,用 4-10 个柱床体积 pH8.5 含 0.5M NaCl 的 0.1M Tris-HCl 缓冲液,和用 4-10 个柱床体积 pH4.5 含 0.5M NaCl 的 0.1M 醋酸钠缓冲液轮流清洗 IAC 两次,再用 PBS 缓冲液充分平衡 IAC 后保存在 4℃ 冰箱内供下次使用。

[0031] 用所述方法制备的 NODLN 多抗 IAC,应用于实际水样中 NODLN 的测定。取 0.2L 受蓝藻污染的水样先通过 0.45 μm 微孔滤膜过滤;IAC 先依次用 5mL 甲醇,5mL 蒸馏水,5mL PBS 预处理;滤液过预处理后的 NODLN 多抗 IAC;再依次用 5mL PBS、5mL 蒸馏水、5mL 10% 甲醇淋洗杂质;最后用 5mL 纯甲醇洗脱;洗脱液减压蒸干,残留物用 0.2mL PBS 溶解后进 HPLC 分析;同时用 SPE 做对照实验;

[0032] HPLC 的测定条件:仪器为 Waters 600 高效液相色谱仪配合 Waters 996 二极管阵列检测器;色谱柱为 Kromasil 100-5C₁₈,150×4.6mm,5 μm;流动相为含 0.05% 甲酸的去离子水:乙腈体积比为 60:40,流速为 1mL/min;柱温为 30℃;进样量 20 μL;检测波长为 240nm。

[0033] 本发明的有益效果:NODLN 多抗免疫亲和柱能将 NODLN 与其它杂质分离,使杂质不至影响测定结果,而一般 SPE 净化由于杂质太多,使 NODLN 难以准确测定。由于 NODLN 多抗与 NODLN 能够特异性结合使 IAC 有很好的特异性,一次净化能除去绝大部分干扰物。而 SPE 无特异性,不能除去干扰物,会影响最后的测定结果。

具体实施方式

[0034] NODLN 与牛血清白蛋白 (BSA) 偶联物,以下简称 NODLN-BSA;NODLN 与卵清蛋白 (OVA) 偶联物,以下简称 NODLN-OVA。

[0035] 实施例 1:NODLN 多抗的制备

[0036] 1、完全抗原的合成

[0037] (1)NODLN-BSA 免疫原的合成

[0038] 完全抗原 NODLN-BSA 的合成采用水溶性碳二亚胺法,利用 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺 (EDC) 作为“桥联剂”,使 NODLN 的羧基 (-COOH) 与 EDC 反应生成中间产物,再与 BSA 蛋白分子上的氨基反应,制成完全抗原 NODLN-BSA 偶联物作为免疫原。合成方法如下:

[0039] 0.4mg NODLN 溶于 0.5mL 甲醇,分为 0.25mL 的两等份,通氮气,在 35℃ 下挥发至干。一份含有 0.2mg NODLN 的残余物溶于 1mL PBS (pH7.4) 缓冲液中,加入 5mg EDC,振荡至完全溶解,用 0.1M 盐酸溶液将 pH 值调至 5,室温下缓慢搅拌 5min。将 1.4mg BSA 溶于 3mL PBS 缓冲液中,振荡至完全溶解,然后逐滴加入上述 NODLN 溶液中,在室温下保持 1h。然后 4℃ 下过夜。将混合物于 4℃ 下在 0.1mol/L pH7.4 的 PBS 中透析 72h,每隔 6h 换透析液 1 次。冷冻干燥后于 -20℃ 保存。

[0040] (2)NODLN-OVA 检测抗原的合成

[0041] 用混合酸酐法完成 NODLN 与载体蛋白 OVA 的交联,合成 NODLN-OVA 完全抗原作为检测抗原。合成方法如下:

[0042] 一份含有 0.2mg NODLN 的残余物加入 0.5mL 1,4-dioxane,振荡使其溶解,再加入 7 μL 氯甲酸异丁酯和 12 μL 三丁胺,将此混合物轻微振荡然后在 4℃ 下保持 30min。0.9mg OVA 溶于 3mL 碳酸氢钠缓冲液 (pH 9.0) 中。将上述 NODLN 溶液逐滴加入到溶解的 OVA 中,

并于 4℃ 轻微搅拌 4h, 整个过程维持 pH 在 9.0。然后, 将混合物于 4℃ 下在 0.1mol/L pH7.4 的 PBS 中透析 72h, 每隔 6h 换透析液 1 次。冷冻干燥后于 -20℃ 保存。

[0043] 2、NODLN 多抗的制备与纯化

[0044] 用合成的 NODLN-BSA 作为免疫原, 免疫得到 NODLN 抗血清。

[0045] 采用饱和硫酸铵二步沉淀法纯化得到的抗血清, 操作如下:

[0046] (1) 取 10mL 抗血清与等体积的 PBS (pH7.4) 混合, 搅拌下逐滴加入 10mL 饱和硫酸铵, 4℃ 过夜, 使免疫球蛋白充分沉淀。

[0047] (2) 4000g 离心 20min, 弃去上清。用 10mL PBS 溶解沉淀, 再逐滴加入 5mL 饱和硫酸铵溶液, 4℃ 过夜。

[0048] 重复第二步过程一次。用 10mL PBS 溶解末次离心所得沉淀物装入透析袋。4℃ 透析三天充分除盐 (每天换液 4 次)。透析纯化的蛋白质冷冻干燥后即为 NODLN 多抗, 将其保存在 -20℃ 下。

[0049] 实施例 2: 琼脂糖凝胶 Sepharose 4B 的活化

[0050] 用溴化氰法活化琼脂糖凝胶 Sepharose 4B。溴化氰法活化效果好、偶联率高、对抗体影响小, 活化过程如下:

[0051] (1) 取 10mL Sepharose 4B 放在布氏漏斗中抽干, 用 30mL 水分两次洗涤后抽干, 加少量的 0.1mol/L pH8.3 的 NaHCO₃ 洗涤, 立即转入 100mL 烧杯中, 冰浴下缓慢搅拌。

[0052] (2) 在通风橱内称取 1g 溴化氰, 加水 10mL 溶解, 然后分批倒入琼脂糖中, 边加边搅拌, 同时测 pH 值, 通过滴加 2mol/L NaOH, 使 pH 保持在 10.5 左右。待溴化氰完全反应完全, pH 基本保持不变, 即可停止搅拌。

[0053] (3) 将活化的 Sepharose 4B 加入小冰块, 迅速倒入布氏漏斗中, 以冰水抽洗成中性, 再迅速以 150mL 冷的 0.1mol/L pH 8.3 的 NaHCO₃ 抽洗。

[0054] 实施例 3: NODLN 多抗 IAC 的制备

[0055] NODLN 多抗与琼脂糖凝胶 Sepharose 4B 偶联得到亲和吸附剂, 填入柱中制得 NODLN 多抗 IAC, 操作步骤如下:

[0056] (1) 偶联

[0057] 将上述制备纯化好的 NODLN 多抗置于 pH 8.3 含有 0.5M NaCl 的 0.1M NaHCO₃ 缓冲液的偶联缓冲液中透析 12h。将上述活化好的 Sepharose 4B 凝胶置于砂芯漏斗中用偶联缓冲液快速抽洗, 然后迅速倒入 NODLN 多抗溶液中进行偶联, 紫外扫描监控偶联过程。用 5 倍体积以上的偶联缓冲液洗去未偶联的抗 NODLN 多抗, 得到琼脂糖-抗体偶联复合物。收集全部的洗脱液, 通过测定其蛋白质的含量计算未偶联上 NODLN 多抗的量。

[0058] (2) 封闭活性基团

[0059] 将琼脂糖-抗体偶联复合物转入 5 倍体积 pH 8.0 的含 0.5M NaCl 的 0.1M Tris-HCl 缓冲液中, 保持 2h, 以封闭琼脂糖凝胶中多余的活性基团。

[0060] (3) 洗涤

[0061] 步骤 (2) 得到的琼脂糖-抗体偶联复合物用 5 倍偶联复合物体积的 pH 4.0 的含 0.5M NaCl 的 0.1M 醋酸缓冲液和 5 倍偶联复合物体积的 pH 8.0 的含 0.5M NaCl 的 0.1M Tris-HCl 缓冲液洗涤, 此洗涤过程重复三次。然后用 5 倍偶联复合物体积的 PBS 洗涤两次。

[0062] (4) 防腐处理

[0063] 步骤 (3) 制备好的琼脂糖 - 抗体偶联复合物如需放置一段时间, 应使用含有 1/10000 叠氮钠的 PBS 缓冲液浸泡, 然后沥去多余的溶液后放入包装袋或瓶中在 4℃ 密闭保存。

[0064] (5) 装柱

[0065] 将步骤 (3) 或 (4) 得到的琼脂糖 - 抗体偶联复合物填充入 2mL 或 5mL 固相萃取空柱管中, 在一定负压下用 PBS 将凝胶压紧, 即制成 NODLN 多抗 IAC。

[0066] (6) 保存

[0067] 琼脂糖 - 抗体偶联复合物或填充好的藻毒素 IAC 切勿冷冻, 保存在 4℃ 的冰箱内。

[0068] (7) 柱的再生

[0069] 柱使用后, 用 4-10 个柱床体积 pH8.5 含 0.5M NaCl 的 0.1M Tris-HCl 缓冲液, 和用 4-10 个柱床体积 pH4.5 含 0.5M NaCl 的 0.1M 醋酸钠缓冲液轮流清洗 IAC 两次, 再用 PBS 缓冲液充分平衡 IAC 后保存在 4℃ 冰箱内供下次使用。

[0070] 实施例 4 : 水样中 NODLN 的检测

[0071] 1、HPLC 的测定条件

[0072] 高效液相色谱仪为 Waters 600 配合 Waters 996 二极管阵列检测器, 色谱柱为 Kromasil 100-5C₁₈(150×4.6mm, 5 μ m), 流动相为含 0.05% 甲酸的去离子水 : 乙腈 = 60 : 40 (v/v), 流速为 1mL/min, 柱温为 30℃, 进样量 20 μ L, 检测波长为 240nm。

[0073] 2、实际水样中 NODLN 的测定

[0074] 0.2L 受蓝藻污染的水样先通过 0.45 μ m 微孔滤膜过滤, 滤液过制备的 NODLN 的多抗 IAC (柱子分别用 5mL 甲醇, 5mL 蒸馏水, 5mL PBS 预处理)。分别用 5mL PBS、5mL 蒸馏水、5mL 10% 甲醇淋洗杂质, 最后用 5mL 纯甲醇洗脱。洗脱液减压蒸干, 残留物用 0.2mL PBS 溶解后进 HPLC 分析。同时用 SPE 做对照实验。

[0075] 一次净化的效果, IAC 明显优于 SPE。在 HPLC 中 NODLN 多抗 IAC 能将 NODLN 的峰与其它杂质峰分开, 不至影响测定结果, 而 SPE 净化由于杂质太多, NODLN 峰甚至难以分辨。由于 NODLN 多抗与 NODLN 能够特异性结合使 IAC 有很好的特异性, 一次净化能除去绝大部分干扰物。而 SPE 无特异性, 不能除去干扰物, 而影响最后的测定结果。

[0076] 一份水样, HPLC 法检测其中 NODLN 的含量。IAC 净化, 两次平行测定结果为 0.209 μ g/L 和 0.224 μ g/L, SPE 净化测定结果为 0.032 μ g/L, 测定结果偏差较大。

专利名称(译)	一种节球藻毒素多抗免疫亲和柱的制备和使用方法		
公开(公告)号	CN102109515A	公开(公告)日	2011-06-29
申请号	CN201010258533.1	申请日	2010-08-13
[标]申请(专利权)人(译)	许昌学院 肖付刚		
申请(专利权)人(译)	许昌学院 肖付刚		
当前申请(专利权)人(译)	许昌学院 肖付刚		
[标]发明人	肖付刚 吕春霞 王德国 刘海英 高雪丽 张晓伟 郭卫芸 李凌乐		
发明人	肖付刚 吕春霞 王德国 刘海英 高雪丽 张晓伟 郭卫芸 李凌乐		
IPC分类号	G01N33/531 G01N30/00 G01N30/08		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种节球藻毒素(NODLN)多抗免疫亲和柱(IAC)的制备和使用方法,属于免疫亲和层析及藻毒素检测技术领域。本发明所研制的IAC是将NODLN多抗固定于柱中,从而吸附样品溶液中的NODLN,洗脱后起到富集和净化的效果,然后进HPLC进行定性定量分析。作为前处理过程,IAC富集优于现有的固相萃取(SPE)法。在HPLC图中显示NODLN多抗IAC能将NODLN的峰与其它杂质峰分开,不至影响测定结果,而SPE净化由于杂质太多,NODLN峰甚至难以分辨。由于NODLN多抗与NODLN能够特异性结合使IAC有很好的特异性,一次净化能除去绝大部分干扰物。而SPE无特异性,不能除去干扰物,从而影响最后的测定结果。