

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C07K 16/18 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200610044508.7

[43] 公开日 2006 年 11 月 8 日

[11] 公开号 CN 1858065A

[22] 申请日 2006.5.27

[21] 申请号 200610044508.7

[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 隋正红 孙宁波 包振民 茅云翔
郭 皓 张冬宝 韩 茵

[74] 专利代理机构 青岛海昊知识产权事务所有限公司

代理人 崔清晨

权利要求书 1 页 说明书 3 页

[54] 发明名称

一种链状亚历山大藻特异性抗体的制备方法和应用

[57] 摘要

一种链状亚历山大藻特异性抗体的制备方法，其特征是先进进行藻体的培养和收获，将藻细胞处理后，与等体积的弗氏完全佐剂混合乳化，对家兔进行四肢的腋下注射、背部皮下多点注射的初次免疫和加强免疫，而获得抗体，最后进行非特异性吸附。该链状亚历山大藻特异性抗体可在定性地检测赤潮生物中应用。本发明的方法具有操作简便，产品易于保存，使用时定性准确的优点，对环境检测、环境保护和养殖业具有重要的应用价值。

-
- 1、一种链状亚历山大藻特异性抗体的制备方法，其特征是先进行藻体的培养和收获，将藻细胞处理后，与等体积的弗氏完全佐剂混合乳化，对家兔进行四肢的腋下注射、背部皮下多点注射的初次免疫和加强免疫，而获得抗体，最后进行非特异性吸附。
 - 2、权利要求 1 所述的链状亚历山大藻的特异性抗体在定性地检测赤潮生物中的应用。

一种链状亚历山大藻特异性抗体的制备方法和应用

技术领域

本发明涉及一种链状亚历山大藻特异性抗体的制备方法和应用。

背景技术

随着全球工业化的发展，环境状况日益恶化，赤潮频繁发生。赤潮生物或者大量繁殖，覆盖水面，占有生存空间，消耗能量，造成水体中溶氧的匮乏，引起其他海洋生物的死亡，或者产生毒素，直接毒杀其他生物，因此造成了重大的经济、生态损失及公共安全危机，如何控制赤潮已成为全球关注热点，而控制赤潮的首要问题是了解赤潮的性质，即赤潮是由什么生物物种引起，由此才可了解该物种是否有生物毒害等相关重要信息，以采取应对措施。定性赤潮生物的方法常采用的有显微观察、核酸探针等，但存在人为错误、需要昂贵或复杂设备或复杂操作等问题。

发明内容

本发明的目的是提供一种链状亚历山大藻特异性抗体的制备方法和应用，它能弥补现有技术的上述不足。

一种链状亚历山大藻特异性抗体的制备方法，其特征是先进行藻体的培养和收获，将藻细胞处理后，与等体积的弗氏完全佐剂混合乳化，对家兔进行四肢的腋下注射、背部皮下多点注射的初次免疫和加强免疫，而获得抗体，最后进行非特异性吸附。

上述链状亚历山大藻的特异性抗体在定性地检测赤潮生物中的应用。

本发明的方法具有操作简便，产品易于保存，使用时定性准确的优点，对环境检测、环境保护和养殖业具有重要的应用价值。

具体实施方式

一种链状亚历山大藻特异性抗体的制备方法，其特征是先进行藻体的培养和收获，将藻细胞处理后，与等体积的弗氏完全佐剂混合乳化，对家兔进行四肢的腋下注射、背部皮下多点注射的初次免疫和加强免疫，而获得抗体，最后进行非特异性吸附。

本链状亚历山大藻 (*Alexandrium catenella*) 特异性抗体，可通过如下的步骤来制备：(1) 藻体的培养和收获及处理。将链状亚历山大藻分离纯化后用 f/2 液体培养基培养，温度为 16-22℃，光照强度为 2500-5000 Lx，光照周期为 12h/12h (光/暗)，得到藻细胞培养液；10000r/min 离心 10min，收获藻细胞；然后进行如下的藻细胞处理，用终浓度体积分数为 1-3% 的甲醛固定过夜，10000r/min 离心 10min，收集藻细胞，该藻细胞沉淀再用蒸馏水清洗一次，用 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。(2) 抗体的获得。将上述处理好的藻细胞用 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。对纯种新西兰家兔通过四肢的腋下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动物 2×10^5 个链状亚历山大藻细胞，加强免疫过程中，除将佐剂换为弗氏不完全佐剂并且免疫剂量减半外，其它步骤不变。每间隔十天加强免疫一次，共注射 80 天。利用肥达氏反应测得两种抗体的效价后，放血，收集血液，4℃ 静置血块收缩，2000r/min 离心 5min，提取抗体。(3) 制备链状亚历山大藻特异性抗体。取上述链状亚历山大藻的抗体依次分别与 10^8 个共生甲藻和 10^8 个赤潮异弯藻的细胞混合放置于 20℃ 振动孵育，与两种藻的孵育时间均为 24h，然后 12000r/min 离心 10min，收集上清液，即得链状亚历山大藻特异性抗体。

本链状亚历山大藻的特异性抗体通过荧光标记二抗参与的免疫反应可定性地检测赤潮生物。具体方法为：(1) 离心收集藻细胞样品于 1.5ml 离心管内，加入体积分数为 2-5% 甲醛水溶液 0.5ml 固定，缓缓

悬起细胞，4℃过夜。(2)离心去固定液，用PBS洗两次，每次3min。洗涤期间可以用手或摇床轻轻晃动。(3)最后一次离心后吸去大部分液体保留约50 μl液体，再缓缓悬起细胞，滴加至载玻片上，尽量使细胞分布均匀。稍晾干，使细胞贴在载玻片上不易随液体流动。(4)将藻细胞与不同稀释倍数的链状亚历山大藻特异性抗体反应60min。(5)用含质量分数为5%BSA的TBSTx封闭60min。去封闭液，用含质量分数为5%BSA的TBSTx溶液稀释的链状亚历山大藻特异性抗体作用，4℃过夜。(6)去除链状亚历山大藻特异性抗体，用TBSTx洗涤三次，每次5min。(7)去除洗涤液，加入稀释好的荧光标记的羊抗兔IgG作用60min。(8)用TBSTx洗涤三次，每次5min。滴一滴抗荧光淬灭封片液于载玻片上，盖上盖玻片，尽量避免气泡。(9)在荧光显微镜下观察结果，有荧光的为相应赤潮藻。

专利名称(译)	一种链状亚历山大藻特异性抗体的制备方法和应用		
公开(公告)号	CN1858065A	公开(公告)日	2006-11-08
申请号	CN200610044508.7	申请日	2006-05-27
[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		
[标]发明人	隋正红 孙宁波 包振民 茅云翔 郭皓 张冬宝 韩茵		
发明人	隋正红 孙宁波 包振民 茅云翔 郭皓 张冬宝 韩茵		
IPC分类号	C07K16/18 G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种链状亚历山大藻特异性抗体的制备方法，其特征是先进行藻体的培养和收获，将藻细胞处理后，与等体积的弗氏完全佐剂混合乳化，对家兔进行四肢的腋下注射、背部皮下多点注射的初次免疫和加强免疫，而获得抗体，最后进行非特异性吸附。该链状亚历山大藻特异性抗体可在定性地检测赤潮生物中应用。本发明的方法具有操作简便，产品易于保存，使用时定性准确的优点，对环境检测、环境保护和养殖业具有重要的应用价值。