



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103293298 A

(43) 申请公布日 2013. 09. 11

(21) 申请号 201310280192. 1

(22) 申请日 2013. 07. 05

(71) 申请人 常熟理工学院

地址 215500 江苏省苏州市常熟市南三环路
99 号

(72) 发明人 王立梅 朱颖越 朱益波 齐斌

(74) 专利代理机构 江苏致邦律师事务所 32230

代理人 徐蓓

(51) Int. Cl.

G01N 33/535 (2006. 01)

G01N 33/543 (2006. 01)

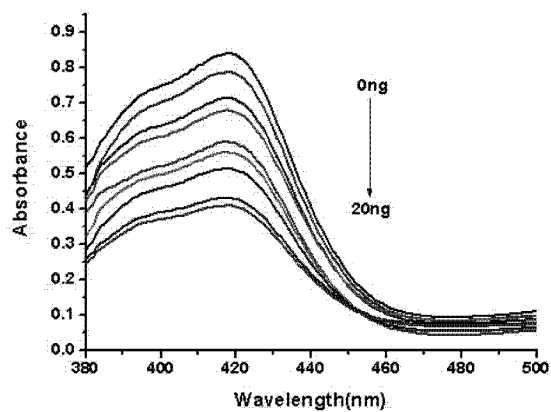
权利要求书2页 说明书6页 附图1页

(54) 发明名称

一种基于 G- 四链体核酸酶的毒素检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种基于 G- 四链体核酸酶的微囊藻毒素 (MC-LR) 检测方法, 属于免疫分析化学技术领域。本发明成功的制备了具有类似过氧化物酶活性的四链体-血晶素的复合物, 并把此复合物偶联到金纳米粒子表面, 用于信号放大的作用, 最后成功的把金纳米粒子-四链体的偶联物标记到抗体上去。利用此新的抗体标记物, 建立了基于 G- 四链体 DNA 酶的免疫检测新方法实现对藻毒素的检测。本发明的方法是一种简单、快速和便捷的方法, 此方法体现出了良好的灵敏性和选择性, 利用四链体的信号放大的作用, 提高了检测的灵敏度, 可实现水中藻毒素的简单、快速、高灵敏检测, 达到国际领先水平。



1. 一种基于 G- 四链体核酸酶的微囊藻毒素检测方法, 包括如下步骤:

(1) 金纳米粒子的合成;

参照 Frens 的柠檬酸三钠还原法合成直径为 25 纳米的金纳米粒子;

(2) 金纳米粒子的功能化;

将巯基修饰的 DNA 溶液加入到纳米金粒子溶液中, 缓慢加入氯化钠溶液, 室温反应 10-15 小时, 得金纳米粒子-核酸偶联物, 完成金纳米粒子的功能化;

(3) DNA 和血晶素复合物的制备;

向金纳米粒子-核酸偶联物中加入血晶素, 使偶联在金纳米粒子表面的 DNA 在血晶素作用下折叠形成四链体结构, 最终得到 DNA 和血晶素复合物, 即具有类过氧化物酶性质的四链体复合物 DNA-AuNPs;

(4) 四链体偶联抗体的探针的装配;

将金纳米粒子上的四链体复合物与抗体偶联得到最终的检测探针 DNA-AuNPs-Ab;

(5) 标准曲线的建立;

将抗藻毒素的抗体和稀释的藻毒素 MC-LR 的标准品溶液加入到含有包被原的酶标板孔里, 通过抗体、微囊藻毒素 MC-LR、包被原的竞争过程, 将 DNA-AuNPs-Ab 探针加入到孔里与藻毒素抗体反应, 最后四链体催化双氧水介导的氧化 ABTS 的反应, 反应结束后检测各个孔的有色产物的吸光值来绘制标准曲线;

运用 MC-LR 的浓度作为横坐标, 反应液的中信号分子的强度, 吸光值作为纵坐标建立抑制标准曲线; 检测限 (LOD) 通过公式 $LOD = 3.3SD/S$ 计算得出, SD 为变异系数, S 是标准曲线的斜率, 构建标准曲线;

(6) 对样品进行检测;

以待测样品取代步骤 (5) 中的藻毒素 MC-LR 的标准品进行同样的反应, 最后得到吸光值数值, 再根据检测标准曲线建立的标准曲线回归方程计算出待测样品中藻毒素的含量。

2. 根据权利要求 1 所述的检测方法, 其特征在于: 所述步骤 1 具体为: 将配制的 1.0 mM 氯金酸溶液 50 mL 加到锥形瓶中, 置于恒温电磁搅拌器上加热至沸腾后持续 5-10 分钟, 迅速加入 0.6 mL, 38.8 mM 的柠檬酸三钠溶液, 继续搅拌加热 4-6 分钟, 溶液的颜色由淡黄色转变到酒红色, 此时金纳米粒子生成, 继续加热 10-15 分钟后停止, 继续搅拌使其冷却, 4℃ 保存备用。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的检测方法, 其特征在于: 所述步骤 2 中金纳米粒子的功能化具体操作步骤为: 将 10-20 μ L 100 mM 巯基修饰的 DNA 溶液加入到 980 μ L 的金纳米粒子溶液中, 充分震荡混匀; 缓慢加入氯化钠溶液至在上述溶液中的终浓度达到 20-50 mM, 室温反应 10-15 小时, 接着将金纳米粒子-核酸偶联物 12000 g, 离心 30 分钟, 去除未结合到金纳米粒子上去的核酸, 沉淀重悬在 10 mM pH 7.4 的 Tris-HAc 缓冲液中, 所述缓冲液中含有 5 mM KAc 和体积浓度为 0.002% 的 TritonX-100。

4. 根据权利要求 1-3 任一项所述的检测方法, 其特征在于: 所述步骤 3 中 DNA 和血晶素复合物的制备具体为: 将 DNA 浓度为 2 μ M 的金纳米粒子-核酸偶联物 () 分散在 10 mM, pH 7.4 的 Tris-HAc 缓冲液中, 该缓冲液中含有 5 mM KAc 和体积浓度为 0.002% 的 TritonX-100, 将溶液加热到 90℃ 保持 5 分钟, 后冷却到室温反应 30 分钟; 将 2 μ M 血晶素加入到以上的混合溶液中去, 充分混匀, 继续室温孵育 1 小时, 形成 DNA 和血晶素复合物即

四链体复合物 DNA-AuNPs。

5. 根据权利要求 1-4 任一项所述的检测方法,其特征在于:所述步骤 4 具体为:将 20 μL 经纯化的 1 mg/mL 的羊抗兔多抗加入到 1 mL 四链体复合物 DNA-AuNPs 溶液中,用 0.1M 的碳酸钾将 pH 调节到 8.0-8.5;经过 15 分钟温和的震荡混匀,加入 20 μL , 质量体积浓度为 10% 的小牛血清 BSA 溶液,封闭金纳米粒子上未结合抗体的部位,继续搅拌 30 分钟;混合物 4 $^{\circ}\text{C}$ 在反应 2 小时,8000 g 离心 30 分钟以去除多余的抗体;最后沉淀重复离心两次,每次重悬在 10 mM pH 7.4 的 Tris-HAc 缓冲液中,所述缓冲液中含有 10 mM KAc 和 体积浓度为 0.002% 的 TritonX-100;最终,DNA-AuNPs-Ab 探针储存在 Tris-HAc 缓冲液中,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存,备用。

6. 根据权利要求 1-5 任一项所述的检测方法,其特征在于:所述步骤 5 标准曲线的建立为:首先,酶标板包被 50 mM, pH 9.6 碳酸盐缓冲液稀释 MC-LR-OVA 包被原,包被原浓度为 2.5 mg/mL, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 2 小时,用含有 0.2% 明胶的碳酸盐缓冲液封闭微孔板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 2 小时;用 0.01 M、pH 7.4 的包含 0.2% 明胶的 PBS 和 0.05% Tween-20 稀释的 MC-LR 多抗和稀释的各种浓度的标准品溶液同时加入到酶标板中每个孔内,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 分钟;接着向酶标板加入用稀释缓冲液稀释的 DNA-AuNPs-Ab 溶液,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 分钟;反应结束后,向酶标板中加入 ABTS 溶液 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 15 分钟,用酶标仪测量每孔的紫外吸收光密度值;

运用 MC-LR 的浓度作为横坐标,反应液的中信号分子的强度,峰面积作为纵坐标建立抑制标准曲线;检测限 (LOD) 通过公式 $\text{LOD}=3.3\text{SD}/\text{S}$ 计算得出,SD 为变异系数,S 是标准曲线的斜率。

7. 根据权利要求 6 所述的检测方法,其特征在于:所述标准品溶液中藻毒素浓度分别为 0.1、0.2、0.5、1、2、5 和 10ng/mL。

8. 根据权利要求 6 所述的检测方法,其特征在于:所述步骤 5 中 MC-LR 多抗和标准品溶液的加入量为 50 μL / 孔,羊抗兔溶液和 ABTS 溶液的加入量为 100 μL / 孔。

一种基于 G- 四链体核酸酶的毒素检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于 G- 四链体核酸酶的微囊藻毒素 (MC-LR) 检测新方法, 属于免疫分析化学技术领域。

背景技术

[0002] G- 四链体是含有丰富鸟嘌呤的核酸序列, 由 Hoogsteen 类型碱基配对形成的四条高度有序的核酸链的稳定结构。这些四链体结构曾因为其具有深远意义的生物学活性而被作为基因的启动子。最近几年来, 基于 G- 四链体的 DNA 酶, 由血晶素和 G- 四链体形成的复合物, 体现出了令人惊讶生物催化能力。先前的研究已经发现基于 G- 四链体的 DNA 酶具有类似于过氧化物酶的性质, 能够有效的催化双氧水参与的氧化 ABTS 或者 TMB 的反应, 最终形成有色的产物。因此, 基于 G- 四链体的 DNA 酶被广泛的应用于生物医学和生物催化领域, 如用于对核酸的检测、蛋白质的检测、金属离子的检测和有机分子的检测等。

[0003] 酶联免疫反应 (The enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 是一种传统的免疫检测方法普遍的应用在生命科学里, 应用包括进行疾病的诊断、检测生物活性分子等。但是, 此方法仍有一些问题没有解决。修饰到抗体上的酶对试验中的温度和 pH 非常敏感, 且此方法的灵敏度还有待进一步提高。寻找酶的替代物用于检测方法一直是活跃的研究内容。有文献报道, 磁纳米粒子 (Magnetic nanoparticles, MNPs) 因其拥有内在的模拟酶的活性而被应用于免疫检测法。尽管磁纳米粒子在检测上具有一些优势, 如稳定性较高, 并且易于分离, 但是磁纳米粒子的制备比较复杂且需要专门的技术人员。

[0004] 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中其它生物的安全。其中微囊藻毒素 (Microcystins, MCs) 分布最广、危害最大, 近年来, 许多大型的中毒事件都以藻毒素污染相关, 因此, 它受到了公众的广泛关注。但目前未见其用于微囊藻毒素 (MC-LR) 的检测。

[0005] 为了人体健康和安全考虑, 世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 要求藻毒素在日常饮用水中的含量必须小于 $1 \mu\text{g/L}$ 。因此, 提出一种科学、合理且快速的检测方法具有重大的实际意义。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种基于 G- 四链体核酸酶的微囊藻毒素 (MC-LR) 检测方法, 选用基于 G- 四链体的 DNA 酶作为一种新型标记物来开发针对藻毒素的免疫检测法。G- 四链体结合到血晶素上后展示出优秀的类似过氧化物酶活性。金纳米粒子 (gold nanoparticles, AuNPs) 作为载体, 偶联 G- 四链体又可以大大提高检测方法的检测限。所述方法可实现水中藻毒素的简单、快速、高灵敏检测。

[0007] 为实现上述目的, 本发明采用如下技术方案: 本发明的技术方案: 一种基于 G- 四链体核酸酶的微囊藻毒素 (MC-LR) 检测方法, 包括金纳米粒子 (AuNPs) 的合成及其功能化、

四链体(DNA和血晶素复合物)的制备、四链体偶联抗体的探针(DNA-AuNPs-antibody (Ab))的装配、反应条件的优化和抑制曲线的建立及实际样本的检测。

[0008] 工艺步骤为：

(1) 金纳米粒子的合成；

参照 Frens 的柠檬酸三钠还原法合成直径为 25 纳米的金纳米粒子；

(2) 金纳米粒子的功能化；

将巯基修饰的 DNA 溶液加入到纳米金粒子溶液中，缓慢加入氯化钠溶液，室温反应 10-15 小时，得金纳米粒子-核酸偶联物，完成金纳米粒子的功能化；

(3) DNA 和血晶素复合物的制备；

向金纳米粒子-核酸偶联物中加入血晶素，使偶联在金纳米粒子表面的 DNA 在血晶素作用下折叠形成四链体结构，最终得到 DNA 和血晶素复合物，即具有类过氧化物酶性质的四链体复合物；

(4) 四链体偶联抗体的探针(DNA-AuNPs-antibody (Ab))的装配；

将金纳米粒子上的四链体复合物与抗体偶联得到最终的检测探针(DNA-AuNPs-antibody (Ab))；

(5) 检测标准曲线的建立；

采用基于 G- 四链体的间接竞争免疫检测方法来分析藻毒素，将抗藻毒素的抗体和稀释的藻毒素的标准品溶液加入到含有包被原的酶标板孔里，通过抗体、微囊藻毒素 MC-LR、包被原的竞争过程，将 DNA-AuNPs-Ab 探针加入到孔里与藻毒素抗体反应，最后四链体催化双氧水介导的氧化 ABTS 的反应，反应结束后检测各个孔的有色产物的吸光值来绘制标准曲线；

运用 MC-LR 的浓度作为横坐标，反应液的中信号分子的强度，峰面积作为纵坐标建立抑制标准曲线。检测限(LOD)通过公式 $LOD=3.3SD/S$ 计算得出，SD 为变异系数 和 S 是标准曲线的斜率，构建标准曲线；

(6) 对样品进行检测；

含有藻毒素的样品用检测标准曲线的建立描述的方法进行检测分析，唯一的区别的是把其中的标准品换成检测样品，最后得到吸光值数值，再根据检测标准曲线建立的标准曲线回归方程计算出样品中藻毒素的含量。

[0009] 其中，所述步骤 1 具体为：将配制的 1.0 mM 氯金酸溶液 50 mL 加到锥形瓶瓶中，置于恒温电磁搅拌器上加热至沸腾后持续 5-10 分钟，迅速加入 0.6 mL, 38.8 mM 的柠檬酸三钠溶液，继续搅拌加热 4-6 分钟，溶液的颜色由淡黄色转变到酒红色，此时金纳米粒子生成，继续加热 10-15 分钟后停止，继续搅拌使其冷却，4℃ 保存备用。

[0010] 所述步骤 2 中金纳米粒子的功能化具体操作步骤为：将 20 μ L 100 mM 巯基修饰的 DNA 溶液加入到 980 μ L 5 nM 的金纳米粒子溶液中，充分震荡混匀；缓慢加入氯化钠溶液至在上述溶液中的终浓度达到 50 mM，室温反应 10-15 小时，接着将金纳米粒子-核酸偶联物 12000 g 离心 30 分钟，去除未结合到金纳米粒子上去的核酸，沉淀重悬在 10 mM pH 7.4 的 Tris-HAc 缓冲液中，所述，备用。

[0011] 所述步骤 3 中 DNA 和血晶素复合物的制备具体为：将 DNA 浓度为 2 μ M 的金纳米粒子-核酸偶联物分散在 10 mM, pH 7.4 的 Tris-HAc 缓冲液中，该缓冲液中含有 5 mM KAc

和体积浓度为 0.002% 的 TritonX-100, 将溶液加热到 90℃ 保持 5 分钟, 后冷却到室温反应 30 分钟, 将 2 μM 血晶素加入到以上的混合溶液中去, 充分混匀, 继续室温孵育 1 小时, 形成 DNA 和血晶素复合物即四链体复合物。

[0012] 所述步骤 4 四链体偶联抗体的探针的装配具体为: 将 20 μL 经纯化的 1 mg/mL 的羊抗兔多抗加入到 1 mL 四链体复合物 DNA-AuNPs 溶液中, 用 0.1M 的碳酸钾将 pH 调节到 8.0-8.5; 经过 15 分钟温和的震荡混匀, 加入 20 μL, 10% (w/v) 的小牛血清 BSA 溶液, 封闭金纳米粒子上未结合抗体的部位, 继续搅拌 30 分钟; 混合物 4℃ 在反应 2 小时, 8000 g 离心 30 分钟以去除多余的抗体; 最后沉淀重复离心两次, 每次重悬在 10 mM pH 7.4 的 Tris-HAc 缓冲液中, 所述缓冲液中含有 10 mM KAc 和体积浓度为 0.002% 的 TritonX-100; 最终, DNA-AuNPs-Ab 探针储存在 Tris-HAc 缓冲液中, 4℃ 保存, 备用。

[0013] 所述步骤 5 标准曲线的建立为:

首先, 酶标板包被 50 mM, pH 9.6 碳酸盐缓冲液稀释的 MC-LR-OVA 包被原, 包被原浓度为 2.5 mg/mL。37℃ 反应 2 小时, 用含有 0.2% 明胶的碳酸盐缓冲液 (即封闭液) 封闭微孔板, 37℃ 反应 2 小时; 用 0.01 M、pH 7.4 的包含 0.2% 明胶的 PBS 和 0.05% Tween-20 稀释的 MC-LR 多抗和稀释的各种浓度的标准品溶液同时加入到酶标板中每个孔内, 37℃ 反应 30 分钟; 接着向酶标板加入用稀释缓冲液稀释的 DNA-AuNPs-Ab 溶液, 37℃ 反应 30 分钟; 反应结束后, 向酶标板中加入 ABTS 溶液 37℃ 反应 15 分钟, 用酶标仪测量每孔的紫外吸收光密度值;

运用 MC-LR 的浓度作为横坐标, 反应液的中信号分子的强度, 峰面积作为纵坐标建立抑制标准曲线; 检测限 (LOD) 通过公式 $LOD = 3.3SD/S$ 计算得出, SD 为变异系数, S 是标准曲线的斜率。

[0014] 其中, 所述标准品溶液中藻毒素浓度分别为 0.1、0.2、0.5、1、2、5 和 10 ng/mL。

[0015] 所述步骤 5 中 MC-LR 多抗和标准品溶液的加入量为 50 μL/孔, 羊抗兔溶液和 ABTS 溶液的加入量为 100 μL/孔。

[0016] 以下对本发明技术方案作进一步详细介绍:

在 ELISA 检测中, 辣根过氧化物酶 (Horseradish Peroxidase, HRP) 通常用来催化底物, 最后根据有色产物的光密度值的差异来计算出不同样品分析物的浓度。在本发明的研究中, 采用 G-四链体 DNA 酶替代辣根过氧化物酶并应用于传统的 ELISA 方法中进行毒素的检测。整个检测流程和 ELISA 方法较为类似。采用竞争法来进行检测。实验的主要原理是利用 G-四链体 DNA 酶来有效的催化 H_2O_2 介导的氧化 ABTS 来形成有色产物。如果目标分析物添加到检测体系, 分析物和抗体同时竞争包在酶标板里的包被原, 随着抗原抗体复合物的检测, 最终被 G-四链体 DNA 酶催化的有色产物逐渐降低。

[0017] 为验证该方法的可行性针对太湖水中的实际样本进行添加回收实验。

[0018] 实际样本是来自于无锡不同区域的太湖水。本发明通过对实际样本的添加回收率实验来验证所述方法的可靠性。太湖水中的含有的原始的微囊藻毒素通过传统的 ELISA 进行测定。在搅拌的条件下添加微囊藻毒素 MC-LR 至预先采集的实际样本太湖水中, 添加的浓度为 0.2, 0.5, 1, 5 ng/mL。添加后将太湖水在 4 摄氏度静置两个小时以达到水中藻毒素的含量达到一致。而后通过本专利建立的检测方法测定 MC-LR 的浓度计算回收率。通过对数据分析得到回收率在 93.33% 和 104.5% 之间。两组平行试验的变异系数均小于 3.63

%。通过这个结果可以得出本发明建立的检测方法是可行的并且简单、快速和省力的一种方法。

附图说明

[0019] 图 1 添加不同浓度藻毒素后采用 ABTS-H₂O₂ 比色法检测有色产物的紫外 - 可见吸收光谱 (藻毒素浓度自上到下分别为 0, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20ng/mL);

图 2 藻毒素检测的标准曲线。

具体实施方式

[0020] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。若未特别指明,实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段,所用原料均为市售商品。

[0021] 实施例 1

(1) 金纳米粒子的合成;

试验用直径为 25 纳米的金纳米粒子参照 Frens 的柠檬酸三钠还原法合成。具体操作步骤如下:将配制的 1.0 mM 氯金酸溶液 50 mL 加到锥形瓶瓶中,置于恒温电磁搅拌器上加热至沸腾后持续 5 分钟,迅速加入 0.6 mL,38.8 mM 的柠檬酸三钠溶液,继续搅拌加热 6 分钟,溶液的颜色由淡黄色转变到酒红色,此时金纳米粒子生成,继续加热 10 分钟后停止,继续搅拌使其冷却,4℃ 保存备用。

[0022] (2) 金纳米粒子的功能化;

金纳米粒子的功能化是指通过核酸的巯基和金粒子表面的金硫键把 DNA 修饰金纳米粒子。具体操作步骤如下:20 μL 100 mM 巯基修饰的 DNA 溶液加入到 980 μL 5 nM 的金纳米粒子溶液中,充分震荡混匀。接着,缓慢加入氯化钠溶液至在上述溶液中的终浓度达到 50 mM,室温反应 12 小时。接着金纳米粒子 - 核酸偶联物 12000 g 离心 30 分钟,去除未结合到金纳米粒子上去的核酸,沉淀重悬在 Tris-HAc 缓冲液中 (10 mM, pH 7.4) 包含 5 mM KAc 和 0.002% (v/v) TritonX-100,备用。

[0023] (3) 四链体 (DNA 和血晶素复合物 DNA-AuNPs) 的制备;

金纳米粒子 - 核酸偶联物 (DNA 2 μM) 分散在 Tris-HAc 缓冲液中 (10 mM, pH 7.4) 包含 5 mM KAc 和 0.002% (v/v) TritonX-100。溶液加热到 90℃ 保持 5 分钟,分离核酸之间的分子间的互相作用。冷却到室温反应 30 分钟,血晶素 (2 μM) 加入到以上的混合溶液中去,充分混匀,继续室温孵育 1 小时,形成 DNA 和血晶素复合物,即具有类过氧化物酶性质的四链体复合物 DNA-AuNPs。

[0024] (4) 四链体偶联抗体的探针的装配;

20 μL 经纯化的羊抗兔多抗 (1 mg/mL) 加入到 1 mL DNA-AuNPs 溶液中,pH 用 0.1M 的碳酸钾调节到 8.0-8.5。经过 15 分钟温和的震荡混匀,20 μL, 10% (w/v) 的小牛血清 (bovine serum albumin, BSA) 溶液加入到上述的金纳米粒子溶液中,封闭金纳米粒子上未结合抗体的部位,继续搅拌 30 分钟。混合物 4℃ 在反应 2 小时,8000 g 离心 30 分钟以去除多余的抗体。最后沉淀重复离心两次,每次重悬在 Tris-HAc 缓冲液中 (10 mM, pH 7.4) 包含 10 mM KAc 和 0.002% (v/v) TritonX-100。最终, DNA-AuNPs-Ab 探针储存在 Tris-HAc 缓冲液中,4℃ 保存,备用。

[0025] (5) 标准曲线的建立；

首先, 酶标板包被碳酸盐缓冲液稀释的 (50 mM, pH 9.6), 100 μ L, 2.5 mg/mL MC-LR-OVA 包被原, 37 $^{\circ}$ C 反应 2 小时, 用 200 μ L 封闭液 (含有 0.2% 明胶的碳酸盐缓冲液) 封闭微孔板, 37 $^{\circ}$ C 反应 2 小时。用 PBS (0.01 M, pH 7.4) 包含 0.2% 明胶和 0.05% Tween-20 (稀释缓冲液) 稀释的 MC-LR 多抗 (50 μ L/孔) 和稀释的标准品溶液 (0.1、0.2、0.5、1、2、5 和 10 ng/mL) (50 μ L/孔) 同时加入到酶标板中每个孔内, 37 $^{\circ}$ C 反应 30 分钟。接着酶标板加入用稀释缓冲液稀释的 G- 四链体标记的羊抗兔溶液 (100 μ L/孔), 37 $^{\circ}$ C 反应 30 分钟。酶标板在上面每个步骤之间用 PBS 包含 0.05% Tween-20 的洗涤缓冲液洗 3 遍以去除非特异性吸附。最终, 酶标板中加入 ABTS 溶液 (100 μ L/孔) 37 $^{\circ}$ C 反应 15 分钟。为了检测有色产物的生成, 本发明用酶标仪测量每孔的紫外吸收光密度值。

[0026] 运用 MC-LR 的浓度作为横坐标, 反应液的中信号分子的强度, 峰面积作为纵坐标建立抑制标准曲线 (见图 2, 从图中可以看出, 在检测范围中, 标准曲线具有良好的线性关系 ($R^2=0.994$)。检测藻毒素的线性范围在 0.1-10 ng/mL, 此范围也符合在大多数场合检测藻毒素污染的要求)。检测限 (LOD) 通过公式 $LOD=3.3SD/S$ 计算得出, SD 为变异系数, S 是标准曲线的斜率。

[0027] (6) 实际样本的检测。

[0028] 实际样本是来自于无锡不同区域的太湖水。本发明通过对实际样本的添加回收率实验来验证本发明方法的可靠性。太湖水中的含有的原始的微囊藻毒素通过传统的 ELISA 进行测定。在搅拌的条件下添加微囊藻毒素 MC-LR 至预先采集的实际样本太湖水中, 添加的浓度为 0.2, 0.5, 1, 5 ng/mL。添加后将太湖水在 4 摄氏度静置两个小时以达到水中藻毒素的含量达到一致。而后通过本发明建立的检测方法测定 MC-LR 的浓度计算回收率。通过对数据分析得到回收率在 93.33% 和 104.5% 之间。两组平行试验的变异系数均小于 3.63 %。试验结果见表 1 和图 1:

表 1 藻毒素水样品的测定

水样品	原始浓度 ^a (ng/mL)	添加浓度 (ng/mL)	检测出的浓度 Mean $\pm$ SD ^b (ng/mL)	回收率 (%) Mean $\pm$ SD
太湖水	3.56	0.2	3.69 $\pm$ 0.04	98.40 $\pm$ 1.7
		0.5	4.11 $\pm$ 0.09	101.20 $\pm$ 2.8
		1	4.26 $\pm$ 0.14	93.33 $\pm$ 1.5
		5	8.94 $\pm$ 0.32	104.50 $\pm$ 3.5

a. 藻毒素原始浓度由 ELISA 方法测定。

b. SD 计算基于每个实验的三次重复数据

通过这个结果可以得出本发明建立的检测方法是可行的并且简单、快速和省力的一种方法。

[0029] 实施例 2

与实施例 1 相比,区别点仅在于步骤 1 不同,具体为:

将配制的 1.0 mM 氯金酸溶液 50 mL 加到锥形瓶瓶中,置于恒温电磁搅拌器上加热至沸腾后持续 5 分钟,迅速加入 0.6 mL,38.8 mM 的柠檬酸三钠溶液,继续搅拌加热 4 分钟,溶液的颜色由淡黄色转变到酒红色,此时金纳米粒子生成,继续加热 10 分钟后停止,继续搅拌使其冷却,4℃保存备用。

[0030] 实施例 3

与实施例 1 相比,区别点仅在于步骤 1 不同,具体为:

将配制的 1.0 mM 氯金酸溶液 50 mL 加到锥形瓶瓶中,置于恒温电磁搅拌器上加热至沸腾后持续 10 分钟,迅速加入 0.6 mL,38.8 mM 的柠檬酸三钠溶液,继续搅拌加热 6 分钟,溶液的颜色由淡黄色转变到酒红色,此时金纳米粒子生成,继续加热 15 分钟后停止,继续搅拌使其冷却,4℃保存备用。

[0031] 实施例 4

与实施例 1 相比,区别点仅在于步骤 2 不同,具体为:

将 10 μ L 100 mM 巯基修饰的 DNA 溶液加入到 980 μ L 的金纳米粒子溶液中,充分震荡混匀;缓慢加入氯化钠溶液至在上述溶液中的终浓度达到 20 mM,室温反应 10 小时,接着将金纳米粒子-核酸偶联物 12000 g,离心 30 分钟,去除未结合到金纳米粒子上去的核酸,沉淀重悬在 10 mM pH 7.4 的 Tris-HAc 缓冲液中,所述缓冲液中含有 5 mM KAc 和体积浓度为 0.002% 的 TritonX-100。

[0032] 实施例 5

与实施例 1 相比,区别点仅在于步骤 2 不同,具体为:

将 15 μ L 100 mM 巯基修饰的 DNA 溶液加入到 980 μ L 的金纳米粒子溶液中,充分震荡混匀;缓慢加入氯化钠溶液至在上述溶液中的终浓度达到 30 mM,室温反应 15 小时,接着将金纳米粒子-核酸偶联物 12000 g,离心 30 分钟,去除未结合到金纳米粒子上去的核酸,沉淀重悬在 10 mM pH 7.4 的 Tris-HAc 缓冲液中,所述缓冲液中含有 5 mM KAc 和体积浓度为 0.002% 的 TritonX-100。

[0033] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。

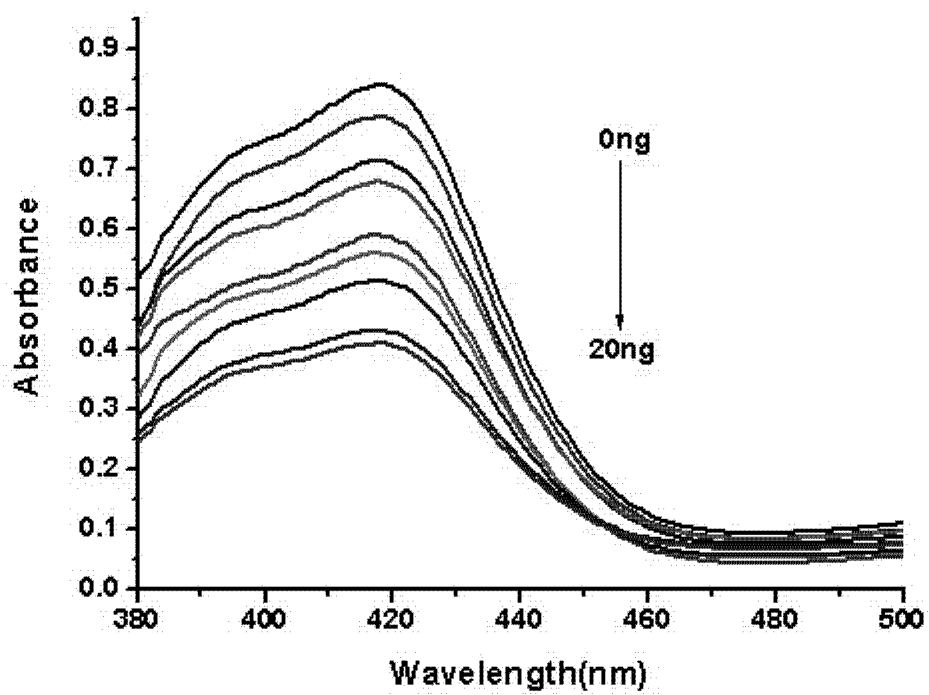


图 1

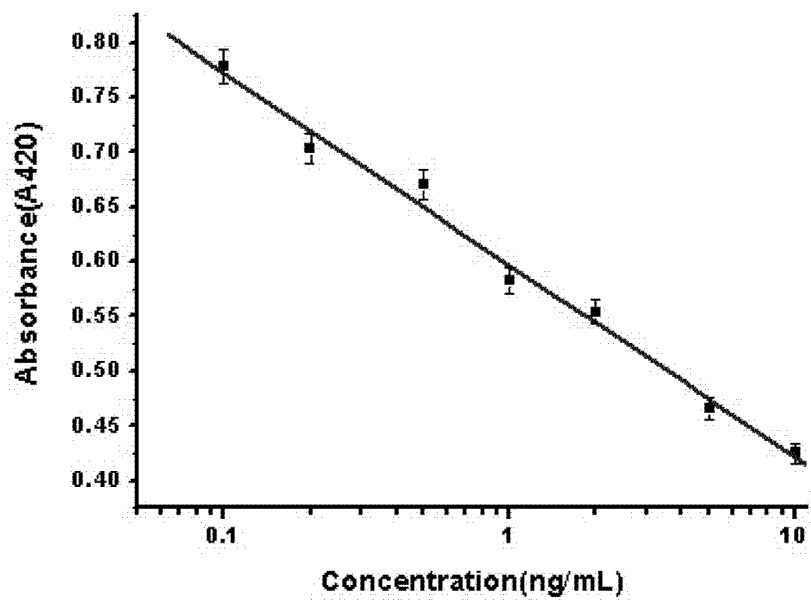


图 2

专利名称(译)	一种基于G-四链体核酸酶的毒素检测方法		
公开(公告)号	CN103293298A	公开(公告)日	2013-09-11
申请号	CN201310280192.1	申请日	2013-07-05
[标]申请(专利权)人(译)	常熟理工学院		
申请(专利权)人(译)	常熟理工学院		
当前申请(专利权)人(译)	常熟理工学院		
[标]发明人	王立梅 朱颖越 朱益波 齐斌		
发明人	王立梅 朱颖越 朱益波 齐斌		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/543		
代理人(译)	徐蓓		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种基于G-四链体核酸酶的微囊藻毒素(MC-LR)检测方法,属于免疫分析化学技术领域。本发明成功的制备了具有类似过氧化物酶活性的四链体-血晶素的复合物,并把此复合物偶联到金纳米粒子表面,用于信号放大的作用,最后成功的把金纳米粒子-四链体的偶联物标记到抗体上去。利用此新的抗体标记物,建立了基于G-四链体DNA酶的免疫检测新方法实现对藻毒素的检测。本发明的方法是一种简单、快速和便捷的方法,此方法体现出了良好的灵敏性和选择性,利用四链体的信号放大的作用,提高了检测的灵敏度,可实现水中藻毒素的简单、快速、高灵敏检测,达到国际领先水平。

