



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103412128 A

(43) 申请公布日 2013. 11. 27

(21) 申请号 201310385150. 4

(22) 申请日 2013. 08. 30

(71) 申请人 华中农业大学

地址 430070 湖北省武汉市洪山区狮子山街
1 号

(72) 发明人 张吉斌 王延英 张鼎楠 傅坚英
喻子牛

(74) 专利代理机构 武汉宇晨专利事务所 42001
代理人 王敏锋

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 33/569(2006. 01)

权利要求书2页 说明书7页 附图3页

(54) 发明名称

一种利用免疫芯片检测动物内脏中 T-2 毒素
的方法

(57) 摘要

本发明公开一种利用免疫芯片检测动物内脏中 T-2 毒素的方法,其步骤是:1)将 T-2 毒素完全抗原点制于芯片上;2)采用竞争法进行免疫芯片技术研究,即检测时将 T-2 毒素的单抗及标准品(或加标回收样品液)等体积混合后加到芯片上;3)再加入 Cy5 标记的二抗,形成待测物抗原-单抗-二抗的复合物,荧光信号随小分子浓度的增加而减弱,从而达到检测目的。该方法应用于猪肝中 T-2 毒素残留,在猪肝中的回收率平均加标回收率均在 69.91%~87.80% 内,变异系数 4.88%~12.56%,芯片免疫分析法简单快速、灵敏度高、高通量、上样量小,适用于动物肝脏中 T-2 毒素的残留分析。

1. 一种利用免疫芯片检测动物内脏中 T-2 毒素的方法,其步骤是:

A. T-2-HS-BSA 包被原的制备

1) T-2-HS 的制备:

将 2 mg T-2 毒素和 42 mg 琥珀酸酐置于 0.8 mL 吡啶中,在蒸气浴中反应 4 h,然后将反应混合物于氮气下吹干干燥,再溶于氯仿,用蒸馏水洗 4 次,将氯仿抽提物蒸发干燥,得 T-2-HS,用薄层层析 TLC 法以乙酸乙酯:丙酮:甲醇=50:50:1 为展开剂检测;

2) T-2-HS-BSA 偶联物的制备

将 2 mg T-2-HS 用 0.2 mL 二甲基甲酰胺溶解,制得 A 液;将 5 mg BSA、3 mg 碳二亚胺加 25 mL 蒸馏水溶解,制得 B 液;将 A 液逐滴加入 B 液中,边加边搅拌,10 min 后,加 1 mg 碳二亚胺,20-30℃、pH 值 5.5 条件下继续搅拌 18 h,然后用 0.01 mol L^{-1} , pH 值 7.2 的磷酸缓冲液透析 3 d,每天换液一次;透析后,分装 -20℃ 冷冻干燥保存;

B. T-2 毒素免疫芯片法标准曲线的建立

用点样液将包被原 T-2-HS-BSA 稀释成 $1/16 \text{ mg/mL}$,每区按 3×3 点阵于醛基化基片上点样,同时用 3% m/VBSA 做空白对照,点样后芯片置于 37℃ 培养箱过夜;洗涤液冲洗基片 3 次,5 min/次,甩干;每区依次加入 1% BSA, $30 \mu\text{L}/\text{区}$,37℃ 湿盒孵育 30 min;抗原抗体竞争反应;洗涤液冲洗基片 3 次,5 min/次,甩干;每区依次加入稀释度为 1:400 的抗 T-2 毒素单克隆抗体, T-2 毒素标品浓度梯度为 100 ng/mL 、 10 ng/mL 、 1 ng/mL 、 500 pg/mL 、 100 pg/mL 、 50 pg/mL 、 10 pg/mL 、 1 pg/mL ,单抗溶液与 T-2 毒素标品溶液等体积混合于 37℃ 湿盒预孵育 10 min,然后每区加入混合液 $30 \mu\text{L}$,37℃ 湿盒孵育 30 min;洗涤液冲洗基片 3 次,5 min/次,甩干;每区加入稀释度依次为 1:400 的 Cy5-IgG $30 \mu\text{L}$,37℃ 湿盒孵育 30 min,洗涤液冲洗基片 3 次,5 min/次,甩干备用;使用 Innoscan® 700 microarray laser scanner 扫描仪 633 nm 扫描通道进行扫描,再用 MAPIX® Software 软件进行图像和数据处理,得出标准曲线;

C. 动物内脏中加标回收样品的处理

① 用绞肉机将动物内脏绞碎呈肉糜状,作为样品基质;

② 将 T-2 毒素标品用 100% 甲醇溶解至 1 mg/mL ,然后用 PBS 液稀释 1000 倍作为母液;

③ 称取 2.0 g 样 5 份,1 份作为空白对照不添加母液,其余 5 份母液添加量分别为 $5 \mu\text{L}$ 、 $20 \mu\text{L}$ 、 $100 \mu\text{L}$ 、 $200 \mu\text{L}$,也就是每份样品按照 $2.5 \mu\text{g/kg}$ 、 $10 \mu\text{g/kg}$ 、 $50 \mu\text{g/kg}$ 、 $100 \mu\text{g/kg}$ 来添加,在添加了标品的样品中加 5 mL 的甲醇/水, $v/v=80:20$,充分振荡混匀 2 h, 120 r/min , 28°C , 8000 r/min 离心 15 min,去上清,2.5 mL 甲醇/水溶液重复洗涤残渣 2 次,离心收集上清;

④ 用 $0.22 \mu\text{m}$ 的滤膜过滤,得到的滤液用于后续检测;

D. 免疫芯片法检测动物内脏 T-2 毒素加标回收样品具体步骤

① 点样:用点样液将包被原 T-2-HS-BSA 稀释成 $1/16 \text{ mg/mL}$,每区按 2×3 点阵于醛基化基片上点样,同时用 3% BSA 做空白对照,点样后芯片置于 37℃ 培养箱过夜;

② 封阻:洗涤液冲洗基片 3 次,5 min/次,甩干;每区依次加入 1% BSA, $30 \mu\text{L}/\text{区}$,37℃ 湿盒孵育 30 min;

③ 抗原抗体竞争反应:洗涤液冲洗基片 3 次,5 min/次,甩干;每区依次加入等体积稀

释度为 1:400 的抗 T-2 毒素单克隆抗体和等体积加标回收样品液,混合后 37℃湿盒预孵育 10 min,每区加入体积为 30 μ L,37℃湿盒孵育 30 min;

④加二抗反应:洗涤液冲洗基片 3 次,5 min/次,甩干;每区加入稀释度依次为 1:400 的 Cy5 标记羊抗鼠 IgG 20 μ L,37℃湿盒孵育 30 min,洗涤液冲洗基片 3 次,5 min/次,甩干备用;

⑤扫描与分析:使用扫描仪扫描,数据用 Microsoft Excel 软件分析,根据线性方程计算回收率及变异系数。

一种利用免疫芯片检测动物内脏中 T-2 毒素的方法

技术领域

[0001] 本发明属于免疫芯片领域,具体涉及一种利用免疫芯片检测动物内脏中 T-2 毒素的方法。

背景技术

[0002] T-2 毒素,单端孢霉烯族化合物中 A 族的重要代表,是一种真菌毒素,主要是由三线镰刀菌在特定条件下产生的有毒次级代谢产物。主要污染谷类粮食作物及其制品,危害神经系统、血液系统、消化系统、免疫系统等,并影响生殖和发育,对人类健康及畜牧业的发展构成了极大威胁。

[0003] 鉴于其毒性之大、分布之广,联合国粮农组织(FAO)和世界卫生组织(WHO)即规定面粉、大米等禾谷类作物中 T-2 毒素含量 $\leq 100 \mu\text{g/kg}$ (林妮妮等,2012);欧盟食品科学委员会(SCF)则限制 T-2 毒素与 HT-2 毒素之和的每日摄入量 $\leq 0.06\text{g/kg bw/day}$ (SCF,2001);我国目前有关 T-2 毒素的国家标准(基于 ELISA 法)为猪(禽)配合饲料中 T-2 毒素的允许量 $\leq 1\text{mg/kg}$ (中华人民共和国国家标准,2008)。

[0004] 目前已报道的检测方法主要有:①生物学检测方法——皮肤毒性试验、致呕吐试验、培养细胞毒性试验、植物细胞抑制试验等(徐达道,1998);②仪器检测方法——薄层层析法(TLC)、高效液相色谱法(HPLC)、气相色谱法(GC)、气质联用法(GC-MS)、液质联用法(LC-MS)(曹艳红,2008;Kong,2012);③免疫学检测方法——酶联免疫吸附法(ELISA)、化学发光法(CLEIA)、时间分辨荧光法(TR-FIA)、表面等离子体共振法(SPR)、浸渍法、试纸条等(Ildiko,1994;徐娟,2010;杨润琳,2010;Alexandra,2008)。尽管 T-2 毒素的检测方法如此之多,较常见的还是液相法、气相法和免疫学方法。

[0005] 免疫芯片法是将抗原-抗体结合反应的特异性与电子芯片高密度集成原理相结合而产生的一种全新概念的生物芯片检测技术,已经广泛应用于生命科学研究各个领域,如高通量药物筛选、环境和农业检测、食品卫生、生物武器战争等诸多方面。本发明采用免疫芯片法检测 T-2 毒素,快速、高通量、上样量小、灵敏度高、检测范围宽,与已有检测方法相比检测限及灵敏度均大大提高。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供了一种利用免疫芯片检测动物内脏中 T-2 毒素的方法,该方法集合了芯片的制备和样品的处理方式,选用琼脂糖修饰的基片和 Cy5 标记的二抗,采用微量点样毛细管点样法,建立间接竞争免疫芯片免疫分析法,用于检测 T-2 毒素在猪肝等动物肝脏中的残留。与前人 ELISA 法结果研究成果相比,免疫芯片免疫分析法最低检测限降低了 2 个数量级,检测范围增大了 2 个数量级,大大地凸显了其高灵敏度的优势。本实验建立的免疫芯片法简单快速、高灵敏度、高通量、上样量小,能够用于猪肝等动物肝脏中 T-2 毒素的残留,丰富了真菌毒素检测的手段。

[0007] 为了实现上述的目的,本发明采用以下技术措施:

[0008] 一种利用免疫芯片检测动物内脏中 T-2 毒素的方法：

[0009] 1. T-2 毒素检测的免疫芯片检测方法建立：

[0010] A. T-2-HS-BSA 包被原的制备

[0011] 1) T-2-HS 的制备：

[0012] 将 2mg T-2 毒素和 42mg 琥珀酸酐置于 0.8mL 吡啶中，在蒸气浴中反应 4h，然后将反应混合物于氮气下吹干干燥，再溶于氯仿，用蒸馏水洗 4 次，将氯仿抽提物蒸发干燥，得 T-2HS，用薄层层析 TLC 法以乙酸乙酯：丙酮：甲醇 = 50：50：1 为展开剂检测；

[0013] 2) T-2-HS-BSA 偶联物的制备

[0014] 将 2mg T-2-HS 用 0.2mL 二甲基甲酰胺溶解，制得 A 液；将 5mg BSA、3mg、碳二亚胺加 25mL 蒸馏水溶解，制得 B 液；将 A 液逐滴加入 B 液中，边加边搅拌，10min 后，加 1mg 碳二亚胺，20-30℃、pH 值 5.5 条件下继续搅拌 18h，然后用 0.01mol·L⁻¹，pH 值 7.2 的磷酸缓冲液透析 3d，每天换液一次。透析后，分装 -20℃ 冷冻干燥保存；

[0015] B. 将 T-2 毒素完全抗原点制于芯片上，使其扩散到琼脂糖网络中，共价偶联于芯片表面；

[0016] C. 采用竞争法进行免疫芯片技术研究，即检测时将 T-2 毒素的单抗及标准品（或加标回收样品液）等体积混合后加到芯片上，使相应的待测 T-2 毒素抗原与包被的牛血清白蛋白（BSA）偶联的 T-2 毒素竞争 T-2 毒素单克隆抗体；

[0017] D. 再加入 Cy5 标记的二抗，形成待测物抗原-单抗-二抗的复合物，荧光信号随小分子浓度的增加而减弱，通过免疫芯片各个检测条件参数的优化，获得最优条件的芯片检测方法。

[0018] 2. T-2 毒素检测的免疫芯片检测方法其步骤是：

[0019] 用点样液将包被原（T-2-HS-BSA）（HS：琥珀酸酐；BSA：牛血清白蛋白）稀释成 2mg/mL、1mg/mL、0.5mg/mL、0.25mg/mL、0.125mg/mL、1/16mg/mL、1/32mg/mL、1/64mg/mL，每区按 3×3 阵列于醛基化基片上点样，同时用 3%BSA 做空白对照，点样后芯片置于 37℃ 培养箱过夜；洗涤液冲洗基片 3 次，5min/次，甩干；每区依次加入 3%OVA、2%OVA、1%OVA、3%BSA、2%BSA、1%BSA、3%酪蛋白、2%酪蛋白、1%酪蛋白、5%脱脂奶粉、3%脱脂奶粉、1%脱脂奶粉，30μL/区，37℃湿盒孵育 30min；洗涤液冲洗基片 3 次，5min/次，甩干；将抗 T-2 毒素单克隆抗体按照稀释度为 1:50、1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600、1:3200、1:6400、1:12800、1:25600 依次稀释，配制 T-2 毒素标品溶液浓度依次为 1μg/mL、100ng/mL、10ng/mL、1ng/mL、100pg/mL、10pg/mL、1pg/mL、100fg/mL、10fg/mL、1fg/mL，单抗溶液与 T-2 毒素标品溶液等体积混合于 37℃湿盒预孵育 10min，然后每区加入混合液 30μL，37℃湿盒孵育 30min；洗涤液冲洗基片 3 次，5min/次，甩干；每区加入稀释度依次为 1:100、1:200、1:300、1:400、1:500、1:600、1:700、1:800 的 Cy5-IgG30μL，37℃湿盒孵育 30min，洗涤液冲洗基片 3 次，5min/次，甩干备用；使用 Innoscan[®] 700microarray laser scanner 扫描仪 633nm 扫描通道进行扫描，再用 MAPIX[®] Software 软件进行图像和数据处理，比较各参数的信号值，确定最佳反应条件。T-2 毒素免疫芯片法反应中各参数的最佳反应条件为：T-2 毒素包被抗原最佳浓度 1/16mg/mL（图 1），T-2 毒素单克隆抗体稀释度为 1:400（图 2），最佳封阻蛋白及浓度：1%牛血清白蛋白（BSA）（图 3），Cy5 标记的二抗（Cy5-IgG）稀释度为 1:400（图 4）。建立了 T-2 毒素免疫芯片法标准曲线，其 R² 达到 0.999，经计算半抑制浓度（IC₅₀）为 0.22ng/mL，检

测范围(IC_{20} - IC_{80})为0.005ng/mL-9.58ng/mL,最低检测限(IC_{10})为0.001ng/mL。

[0020] 一种利用免疫芯片检测动物内脏中 T-2 毒素的方法,其步骤是:

[0021] 1. T-2-HS-BSA 包被原的制备

[0022] 1) T-2-HS 的制备:

[0023] 将2mg T-2 毒素和42mg 琥珀酸酐置于0.8mL吡啶中,在蒸气浴中反应4h,然后将反应混合物于氮气下吹干干燥,再溶于氯仿,用蒸馏水洗4次,将氯仿抽提物蒸发干燥,得T-2-HS,用薄层层析TLC法以乙酸乙酯:丙酮:甲醇=50:50:1为展开剂检测;

[0024] 2) T-2-HS-BSA 偶联物的制备

[0025] 将2mg T-2-HS用0.2mL二甲基甲酰胺溶解,制得A液;将5mg BSA、3mg、碳二亚胺加25mL蒸馏水溶解,制得B液;将A液逐滴加入B液中,边加边搅拌,10min后,加1mg碳二亚胺,20-30℃、pH值5.5条件下继续搅拌18h,然后用0.01mol·L⁻¹,pH值7.2的磷酸缓冲液透析3d,每天换液一次。透析后,分装-20℃冷冻干燥保存;

[0026] 2. 动物内脏中加标回收样品的处理

[0027] 从市场购买动物内脏用绞肉机绞碎至肉糜,作为样品基质。将T-2 毒素标品用100% 甲醇溶解至1mg/mL,然后用PBS液稀释1000倍作为母液。称取2.0g样5份,1份作为空白对照不添加母液,其余5份母液添加量分别为5μL、20μL、100μL、200μL,也就是每份样品按照2.5μg/kg、10μg/kg、50μg/kg、100μg/kg来添加,在添加了标品的样品中加5mL的甲醇/水(v/v,80:20),充分振荡混匀2h,8000r/min离心15min,去上清,2.5mL甲醇/水溶液重复洗涤残渣2次,离心收集上清。用0.22μm的滤膜过滤,得到的滤液用于后续检测。

[0028] 3. T-2 毒素免疫芯片法标准曲线的建立

[0029] 选用1/16mg/mL的点样浓度,1%BSA封阻,单抗稀释度为1:400,Cy5-IgG稀释度为1:400,标品浓度分别为0、1pg/mL、10pg/mL、100pg/mL、500pg/mL、1ng/mL、5ng/mL、10ng/mL、100ng/mL、1μg/mL,进行间接竞争免疫芯片法建立T-2 毒素标准曲线。

[0030] 扫描信号如图10-1所示,免疫芯片法检测结果经处理所得的标准曲线见图10-2。X轴为对应T-2 毒素浓度的lg值,Y轴为FI/FI₀,式中FI₀为最大结合率的荧光信号值,即零标品孔的荧光信号值。线性方程为:Y=-0.183X+0.3796,R²=0.9994,根据线性方程可得半抑制浓度IC₅₀为0.22ng/mL,检测范围(IC₂₀-IC₈₀)为0.005-9.58ng/mL,最低检测限LOD(IC₁₀)为0.001ng/mL,达到T-2 毒素有关限量标准(图5)。

[0031] 4. T-2 毒素免疫芯片法标准曲线的建立动物内脏 T-2 毒素加标回收样品检测

[0032] 用点样液将包被原(T-2-HS-BSA)稀释成1/16mg/mL,每区按3×3点阵于醛基化基片上点样,同时用3%BSA做空白对照,点样后芯片置于37℃培养箱过夜;洗涤液冲洗基片3次,5min/次,甩干;每区依次加入1%BSA,30μL/区,37℃湿盒孵育30min;抗原抗体竞争反应:洗涤液冲洗基片3次,5min/次,甩干;每区依次加入稀释度为1:400的抗T-2 毒素单克隆抗体,T-2 毒素标品浓度梯度为100ng/mL、10ng/mL、1ng/mL、500pg/mL、100pg/mL、50pg/mL、10pg/mL、1pg/mL,单抗溶液与加标回收样品液等体积混合于37℃湿盒预孵育10min,然后每区加入混合液30μL,37℃湿盒孵育30min;洗涤液冲洗基片3次,5min/次,甩干;每区加入稀释度依次为1:400的Cy5-IgG30μL,37℃湿盒孵育30min,洗涤液冲洗基片3次,5min/次,甩干备用;使用Innoscan® 700microarray laser scanner扫描仪633nm扫描通道

进行扫描,再用 **MAPIX®** Software 软件进行图像和数据处理,得出线性方程并计算最低检测限(LOD)、检测范围、半抑制浓度(IC_{50})及回收率、变异系数。

[0033] 所述的动物内脏为各类动物的肝脏。

[0034] 本发明与现有技术相比,具有以下优点和效果:

[0035] 本发明为国内首次报道针对动物内脏中 T-2 毒素的免疫芯片检测方法及其应用,高分子三维基片具有较高的键合容量及优异的反应环境。本专利中使用的芯片在玻片表面修饰了一层极薄的含活化醛基的三维结构高分子聚合物,为固定于基片表面的蛋白分子提供了亲水环境,有利于保持蛋白样品活性。点样后的样品通过扩散方式进入聚合物层,芯片上固定的抗原(T-2-HS-BSA)是经过改进的方法合成的偶联比高,有利于提高竞争法的灵敏度。通过共价连接将其固定在芯片上,蛋白样品在点样前不需要进行特别的修饰或前处理。该发明在芯片上通过竞争法,采用高灵敏度的 Cy5 标记,检测样品中的 T-2 毒素,芯片免疫分析法与常规 ELISA 相比快速、灵敏度更高、高通量、上样量小,T-2 毒素在畜禽中主要存在于肝脏,本发明的免疫芯片适用于动物肝脏中 T-2 毒素的残留分析。

附图说明

[0036] 图 1 为 T-2 毒素包被抗原浓度的优化

[0037] 纵坐标 FI 表示:荧光信号值;横坐标表示:包被原(T-2-HS-BSA)的浓度

[0038] 图 2 为 T-2 毒素单克隆抗体稀释度的优化

[0039] 纵坐标 FI 表示:荧光信号值;横坐标表示:T-2 毒素单克隆抗体稀释度

[0040] 图 3 为封阻蛋白及浓度的优化

[0041] 纵坐标 FI 表示:荧光信号值;横坐标表示:不同封阻物质及浓度

[0042] 图 4 为 Cy5 标记的二抗(Cy5-IgG)稀释度的优化

[0043] 纵坐标 FI 表示:荧光信号值;横坐标表示: Cy5 标记的二抗(Cy5-IgG)稀释度

[0044] 图 5 为 T-2 毒素免疫芯片法标准曲线的建立

[0045] X 轴为对应 T-2 毒素浓度的 lg 值;Y 轴为 FI/FI_0 , 式中 FI 为荧光信号值, FI_0 为最大结合率的荧光信号值,即零标品孔的荧光信号值。

具体实施方式

[0046] 实施例 1:T-2 毒素免疫芯片法检测条件的优化

[0047] 1.1T-2 毒素包被抗原浓度的优化

[0048] 使用的点样浓度为 2mg/mL、1mg/mL、0.5mg/mL、0.25mg/mL、1/8mg/mL、1/16mg/mL、1/32mg/mL、1/64mg/mL,每区内浓度相同,3×3 阵列共 9 个重复,从图 1 可以看出,随着浓度降低,荧光信号值(FI)也降低,在点样浓度为 1/16mg/mL 后下降趋势更明显,综合考虑荧光信号值与实验成本,故选用 1/16mg/mL 的点样浓度用于后续实验(图 1)。

[0049] 1.2T-2 毒素单克隆抗体工作浓度的优化

[0050] 本研究对各单抗稀释度 1:50、1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600、1:3200、1:6400、1:12800、1:25600 进行了比较,结果图 2 所示,稀释度越大信号值越小,而且下降趋势明显,在稀释度为 1:400 后荧光信号值(FI)很低,综合考虑单抗的稀释度选用 1:400。

[0051] 1.3 封阻蛋白及浓度的优化

[0052] 使用的封阻物质及其浓度分别为 3%BSA、2%BSA、1%BSA、3%OVA、2%OVA、1%OVA、5% 脱脂奶粉、3% 脱脂奶粉、1% 脱脂奶粉(Skimmed milk powder)、3% 酪蛋白、2% 酪蛋白、1% 酪蛋白(Casein),结果如图 3 所示,使用 OVA 和脱脂奶粉封阻的实验组荧光信号值(FI)相对比较低,使用酪蛋白封阻的实验组荧光信号值稍高于 BSA,但酪蛋白需要经 NaOH 处理后才能溶解,已有报道 pH 值会影响荧光信号值(曹巧玲,2007),故选用 1%BSA 进行封阻。

[0053] 1.4 二抗使用浓度的优化

[0054] 同时还对实验中使用的荧光二抗 Cy5-IgG 的稀释度 1:100、1:200、1:300、1:400、1:500、1:600、1:700、1:800 进行了优化,结果如图 4 所示,随着稀释度的增加信号值逐渐变小,综合考虑荧光信号值(FI)与实验成本,选用 1:400Cy5-IgG 稀释度进行实验。

[0055] 实施例 2:

[0056] 一种利用免疫芯片检测猪肝中 T-2 毒素的方法,其步骤是:

[0057] 1. T-2 毒素免疫芯片法标准曲线的建立

[0058] T-2-HS-BSA 包被原的制备

[0059] 1) T-2-HS 的制备:

[0060] 参照文献(Zhang1986)的 T-2-HS 的制备方法并进行了改进,将 2mg T-2 毒素(T-2 毒素购自 Sigma 公司)和 42mg 琥珀酸酐(HS)置于 0.8mL 吡啶中,在蒸气浴中反应 4h。然后将反应混合物于氮气下吹干干燥,再溶于适量氯仿。用蒸馏水洗 4 次,将氯仿抽提物蒸发干燥,得 T-2-HS,用(薄层层析)TLC 法以乙酸乙酯:丙酮:甲醇(50:50:1)为展开剂检测。本方法在蒸气浴条件下,T-2 毒素与琥珀酸酐(HS)反应,并将反应产物用氮气吹干干燥,避免氧化,能够较好地制备人工抗原,偶联比较好。

[0061] 2) T-2-HS-BSA 偶联物的制备

[0062] 将 2mg T-2-HS 用 0.2mL 二甲基甲酰胺(DMF)溶解,制得 A 液;将 5mg BSA、3mg、碳二亚胺(EDPC)加 25mL 蒸馏水溶解,制得 B 液;将 A 液(逐滴加入 B 液中,边加边搅拌,10min 后,加 1mg EDPC,室温(20-30℃)、pH 值 5.5 条件下继续搅拌 18h,然后用磷酸缓冲液(PBS)溶液(0.01mol·L⁻¹,pH 值 7.2)透析 3d,每天换液一次。透析后,分装冷冻(-20℃)干燥保存。

[0063] 标准曲线建立

[0064] 用点样液将包被原(T-2-HS-BSA)稀释成 1/16mg/mL,每区按 3×3 点阵于醛基化基片(购自博奥生物有限公司)上点样,同时用 3% (m/V) BSA 做空白对照,点样后芯片置于 37℃培养箱过夜;洗涤液冲洗基片 3 次,5min/次,甩干;每区依次加入 1%BSA,30 μL/区,37℃湿盒孵育 30min;抗原抗体竞争反应:洗涤液冲洗基片 3 次,5min/次,甩干;每区依次加入稀释度为 1:400 的抗 T-2 毒素单克隆抗体(购自北京华安麦科生物技术有限公司),T-2 毒素标品浓度梯度为 100ng/mL、10ng/mL、1ng/mL、500pg/mL、100pg/mL、50pg/mL、10pg/mL、1pg/mL,单抗溶液与标品溶液等体积混合于 37℃湿盒预孵育 10min,然后每区加入混合液 30 μL,37℃湿盒孵育 30min;洗涤液冲洗基片 3 次,5min/次,甩干;每区加入稀释度依次为 1:400 的 Cy5-IgG (购自 EarthOx 公司)30 μL,37℃湿盒孵育 30min,洗涤液冲洗基片 3 次,5min/次,甩干备用;使用 Innoscan® 700microarray laser scanner 扫描仪 633nm 扫描通道进行扫描,再用 MAPIX® Software 软件进行图像和数据处理,得出标准曲线。

[0065] 免疫芯片法检测结果经处理所得的标准曲线见图 5。X 轴为对应 T-2 毒素浓度的

lg 值, Y 轴为 FI/FI_0 , 式中 FI_0 为最大结合率的荧光信号值, 即零标品孔的荧光信号值。线性方程为: $Y = -0.183X + 0.3796$, $R^2 = 0.9994$, 根据线性方程可得半抑制浓度 IC_{50} 为 0.22 ng/mL , 检测范围 ($IC_{20} \sim IC_{80}$) 为 $0.005 \sim 9.58 \text{ ng/mL}$, 最低检测限 LOD (IC_{10}) 为 0.001 ng/mL (图 5)。

[0066] 2. 猪肝中标回收样品的处理

[0067] ①从市场购买猪肝, 用绞肉机绞碎呈肉糜状, 作为样品基质;

[0068] ②将 T-2 毒素标品(购自 Sigma 公司)用 100% 甲醇溶解至 1 mg/mL , 然后用 PBS 液稀释 1000 倍作为母液;

[0069] ③称取 2.0 g 样 5 份, 1 份作为空白对照不添加母液, 其余 5 份母液添加量分别为 $5 \mu\text{L}$ 、 $20 \mu\text{L}$ 、 $100 \mu\text{L}$ 、 $200 \mu\text{L}$, 也就是每份样品按照 $2.5 \mu\text{g/kg}$ 、 $10 \mu\text{g/kg}$ 、 $50 \mu\text{g/kg}$ 、 $100 \mu\text{g/kg}$ 来添加, 在添加了标品的样品中加 5 mL 的甲醇 / 水 (v/v, 80:20), 充分振荡混匀 2h (120 r/min , 28°C), 8000 r/min 离心 15min, 去上清, 2.5 mL 甲醇 / 水溶液重复洗涤残渣 2 次, 离心收集上清。

[0070] ④用 $0.22 \mu\text{m}$ 的滤膜过滤, 得到的滤液用于后续检测。

[0071] 3. 免疫芯片法检测猪肝 T-2 毒素加标回收样品具体步骤

[0072] ①点样: 用点样液将包被原 (T-2-HS-BSA) 稀释成 $1/16 \text{ mg/mL}$, 每区按 2×3 点阵于醛基化基片上点样, 同时用 3%BSA 做空白对照, 点样后芯片置于 37°C 培养箱过夜;

[0073] ②封阻: 洗涤液冲洗基片 3 次, 5 min/次 , 甩干; 每区依次加入 1%BSA, $30 \mu\text{L/区}$, 37°C 湿盒孵育 30min;

[0074] ③抗原抗体竞争反应: 洗涤液冲洗基片 3 次, 5 min/次 , 甩干; 每区依次加入等体积稀释度为 1:400 的抗 T-2 毒素单克隆抗体和等体积加标回收样品液, 混合后 37°C 湿盒预孵育 10min, 每区加入体积为 $30 \mu\text{L}$, 37°C 湿盒孵育 30min;

[0075] ④加二抗反应: 洗涤液冲洗基片 3 次, 5 min/次 , 甩干; 每区加入稀释度依次为 1:400 的 Cy5 标记羊抗鼠 IgG $20 \mu\text{L}$, 37°C 湿盒孵育 30min, 洗涤液冲洗基片 3 次, 5 min/次 , 甩干备用;

[0076] ⑤扫描与分析: 使用扫描仪扫描, 数据用 Microsoft Excel 软件分析, 根据线性方程计算回收率及变异系数。

[0077] 本研究采用免疫芯片法对猪肝 T-2 毒素加标回收样品进行检测, 结果如表 1 所示。平均加标回收率均在 $69.91\% \sim 87.80\%$ 内, 变异系数 $4.88\% \sim 12.56\%$, 达到免疫学检测的要求 (表 1)。

[0078] 表 1 免疫芯片法检测猪肝样品中 T-2 毒素加标回收率

	T-2毒素 加标量 (μg/kg)	免疫芯片法	
		平均回收率 (%)	变异系数 (%)
[0079]	2.5	71.71	4.88
	10	69.91	10.57
	50	74.70	12.56
	100	87.80	8.04

[0080] 试剂配方：

[0081] 包被液缓冲液(0.05mol/L 碳酸盐缓冲液, pH9.6, 4℃保存): Na_2CO_3 1.59g, NaHCO_3 2.93g, 溶于 1L 蒸馏水中；

[0082] 磷酸盐缓冲液(0.01mol/L PBS, pH7.4, 室温保存): KH_2PO_4 0.2g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g, NaCl 8.0g, KCl 0.2g, 溶于 1L 蒸馏水中；

[0083] 洗涤液(0.05%Tween-20PBS, 即 PBST, 现配现用): 于 1L PBS 中加入 0.5mL Tween-20, 上下颠倒混匀即可；

[0084] 标品稀释液: 用 100% 甲醇溶解标品至 1mg/mL, 然后再用 PBS 稀释至实验所需浓度, 现配现用；

[0085] 点样液: 含 20% 甘油的包被缓冲液；

[0086] 一抗、二抗稀释液: 0.01mol/L, pH7.4 的 PBS。

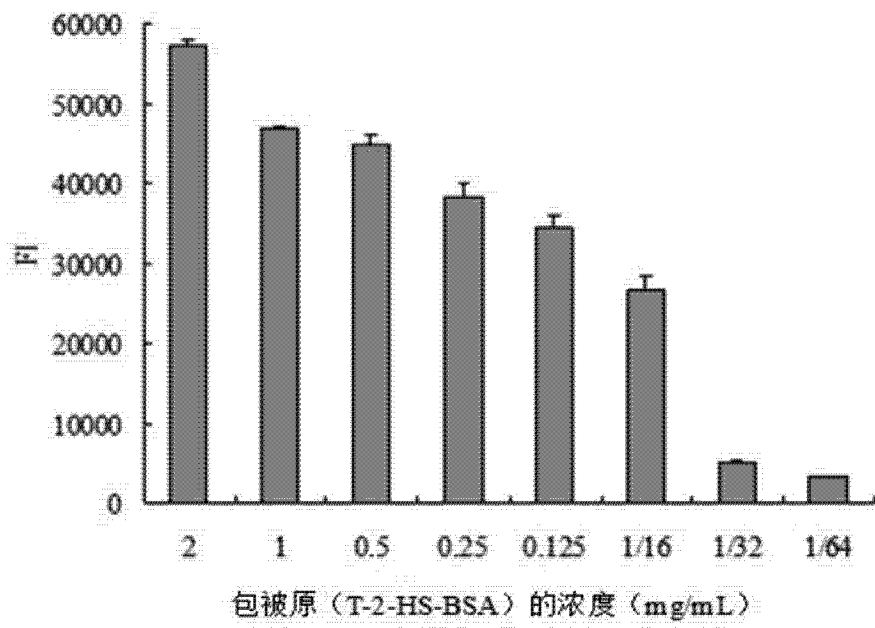


图 1

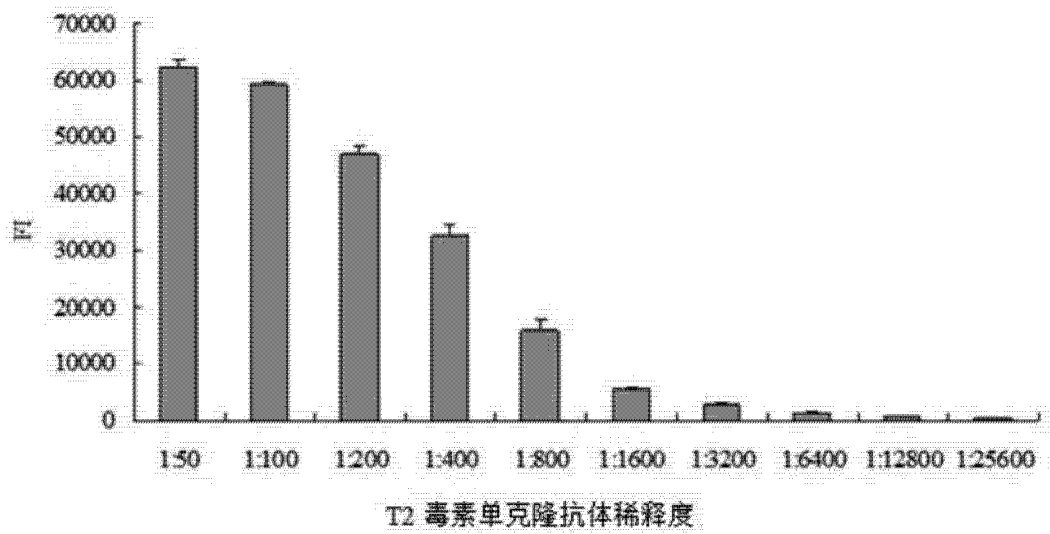


图 2

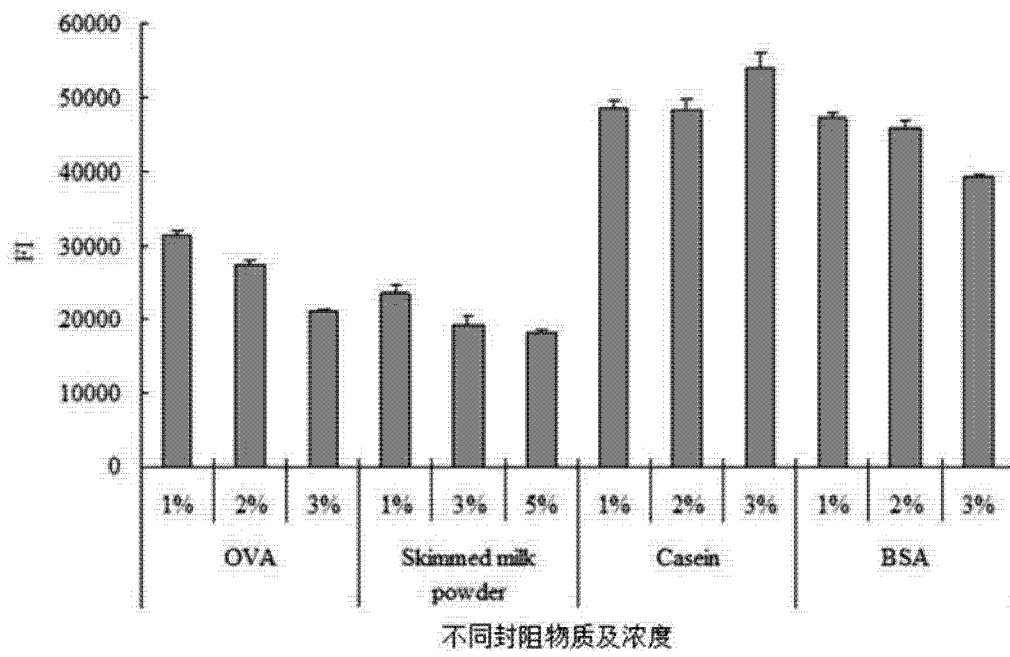


图 3

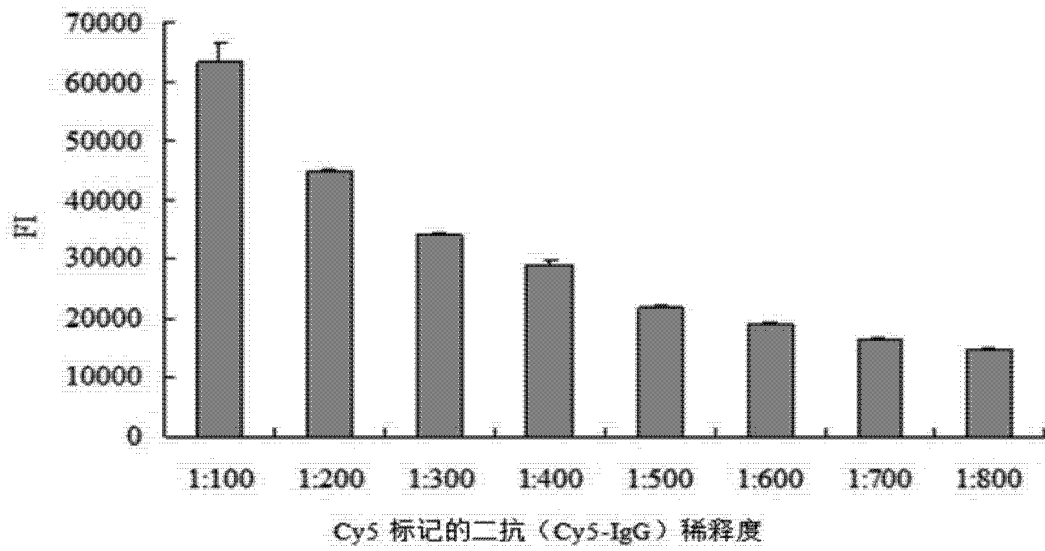


图 4

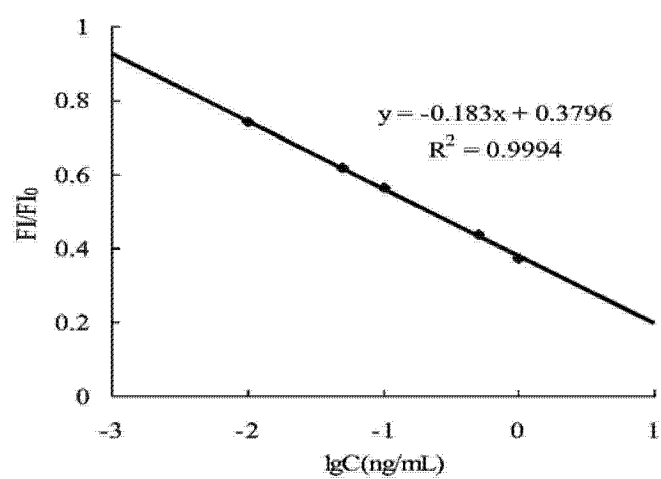


图 5

专利名称(译)	一种利用免疫芯片检测动物内脏中T-2毒素的方法		
公开(公告)号	CN103412128A	公开(公告)日	2013-11-27
申请号	CN201310385150.4	申请日	2013-08-30
[标]申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
[标]发明人	张吉斌 王延英 张鼎楠 傅坚英 喻子牛		
发明人	张吉斌 王延英 张鼎楠 傅坚英 喻子牛		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531 G01N33/569		
代理人(译)	王敏锋		
其他公开文献	CN103412128B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开一种利用免疫芯片检测动物内脏中T-2毒素的方法，其步骤是：1) 将T-2毒素完全抗原点制于芯片上；2) 采用竞争法进行免疫芯片技术研究，即检测时将T-2毒素的单抗及标准品（或加标回收样品液）等体积混合后加到芯片上；3) 再加入Cy5标记的二抗，形成待测物抗原-单抗-二抗的复合物，荧光信号随小分子浓度的增加而减弱，从而达到检测目的。该方法应用于猪肝中T-2毒素残留，在猪肝中的回收率平均加标回收率均在69.91%~87.80%内，变异系数4.88%~12.56%，芯片免疫分析法简单快速、灵敏度高、高通量、上样量小，适用于动物肝脏中T-2毒素的残留分析。

T-2毒素 加标量 (μg/kg)	免疫芯片法	
	平均回收率 (%)	变异系数 (%)
2.5	71.71	4.88
10	69.91	10.57
50	74.70	12.56
100	87.80	8.04