



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102798714 A

(43) 申请公布日 2012. 11. 28

(21) 申请号 201110133963. 5

(22) 申请日 2011. 05. 24

(71) 申请人 中国人民解放军军事医学科学院卫
生学环境医学研究所

地址 300050 天津市和平区大理道 1 号

(72) 发明人 高志贤 王莹 刘楠 柳明
宁保安 李君文

(51) Int. Cl.

G01N 33/545 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 9 页 附图 4 页

(54) 发明名称

一种多真菌毒素检测的免疫芯片及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开一种在一张芯片上同时检测多种真菌毒素(黄曲霉毒素 B1、黄曲霉毒素 M1、呕吐毒素、赭曲霉毒素 A、T-2 毒素、玉米赤霉烯酮)的免疫芯片制备方法及其检测技术。将各毒素完全抗原点制于芯片上,使其以扩散方式进入活化醛基的琼脂糖聚合物层,共价偶联于芯片表面。采用竞争法进行免疫芯片技术研究,即检测时将多种毒素的单抗及标准品混合后加到芯片上,使相应的待测物抗原与小分子竞争单抗,再加入 Cy3 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。该技术灵敏度达 pg ~ ng 级,结果稳定可靠,且样品用量少,简便、快速,为多种毒素的检测提供新方法。

1. 一种多真菌毒素定量检测的免疫芯片,由 3D 活化醛基琼脂糖芯片和阵列式点制于芯片上的蛋白检测指标及各种对照指标组成。其特征在于,所述的芯片表面上的蛋白检测指标包括:黄曲霉毒素总量、黄曲霉毒素 M1、呕吐毒素、赭曲霉毒素 A、T-2 毒素、玉米赤霉烯酮共六种真菌毒素的完全抗原,通过活化共价偶联于芯片表面。

2. 权利要求书 1 所述的琼脂糖芯片是在玻片表面上修饰了一层极薄的含有活化醛基的 3D 结构聚合物,即琼脂糖凝胶。点样后,完全抗原蛋白探针样品通过扩散的方式进入琼脂糖凝胶聚合物层,并与活化醛基共价偶联包被于玻片上。由于其表面的聚合物为固定于基片表面的蛋白分子提供了亲水环境,有利于保持蛋白分子的活性。

3. 根据权利要求 1 所述的六种真菌毒素的完全抗原,即六种小分子与牛血清白蛋白(BSA)或卵清白蛋白(OVA)的偶联物,依次为:黄曲霉毒素总量完全抗原(AFT-BSA)、黄曲霉毒素 M1 完全抗原(AFM1-BSA)、呕吐毒素完全抗原(DON-BSA)、赭曲霉毒素 A 完全抗原(OTA-OVA)、T-2 毒素完全抗原(T-2-BSA)、玉米赤霉烯酮完全抗原(ZEN-BSA)。

所述的三种对照液依次为:BSA-Cy3 工作液(点样对照,兼有定位作用)、点样液(空白对照)、0.5mg/mL mouse-IgG 工作液(杂交对照)。

4. 根据权利要求 1 所述的小分子鼠源单克隆抗体依次为:抗黄曲霉毒素总量单克隆抗体(AFT-Ab)、抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体(AFM1-Ab)、抗呕吐毒素单克隆抗体(DON-Ab)、抗赭曲霉毒素 A 单克隆抗体(OTA-Ab)、抗 T-2 毒素单克隆抗体(T-2-Ab)、抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体(ZEN-Ab)。

5. 根据权利要求 3 所述的六种真菌毒素半抗原依次是黄曲霉毒素 B1(AFB1)、黄曲霉毒素 M1(AFM1)、呕吐毒素(DON)、赭曲霉毒素 A(OTA)、T-2 毒素(T-2)、玉米赤霉烯酮(ZEN)。

6. 制备权利要求 1 所述的免疫芯片的方法包括以下步骤:

(1) 按实验设计的浓度配制各毒素完全抗原的包被液,并配制三种对照液(即点样对照、空白对照、杂交对照)的工作液,即配制好探针包被液;

(2) 将探针包被液转移至 384 孔板中,通过点样仪的特定程序对其进行点制;

(3) 在高洁净度的专门工作间对点样后的芯片进行真空干燥,以对其固定。固定后的芯片抽真空包装后,可 4℃ 存放 6 个月。

7. 根据权利要求 5,免疫芯片使用时,应先将芯片储存盒从 4℃ 冰箱取出,使其恢复至室温后再启用。

8. 本发明所采用的是竞争免疫分析法,主要分为四个阶段的工作:

(1) 确定六种真菌毒素抗原的最佳包被浓度。

(2) 确定六种真菌毒素抗体的最佳工作浓度及抗原抗体的特异性检测。

(3) 同时检测六种真菌毒素标准曲线的绘制。

(4) 待测样品中多种真菌毒素的测定。

9. 一种同时检测多种真菌毒素的免疫芯片制备方法,其特征包括:

(1) 竞争结合免疫反应

竞争结合免疫反应是指将多种真菌毒素的各一抗与标准品的混合工作液(20 ~ 40 μ L/ 亚阵列)同时加到芯片上,使多种真菌毒素的完全抗原与小分子标准品竞争结合相应的单克隆抗体。

当确定多种真菌毒素抗原抗体的最佳包被和工作浓度时,所加液体为各一抗的工作

液；当绘制多种真菌毒素的标准曲线以及自来水中各毒素的加标检测时，将多种真菌毒素的一抗与标准品的混合液先孵育 10 ~ 20min，然后加至芯片上，并于 37℃ 恒温恒湿孵育 30 ~ 60min。清洗并干燥芯片，备用。

(2) 免疫反应的信标

信标是指在芯片上加入 Cy3 标记的二抗。按 1 : 400 (V : V) 的比例配制二抗工作液（叙述不清楚），按 20 ~ 40 μ L/ 亚阵列加入，并于 37℃ 恒温恒湿孵育 20 ~ 40min。清洗并干燥芯片，备用。

(3) 扫描芯片及结果分析

用 LuxScan™ 10K-A 微阵列芯片扫描仪对杂交后的芯片进行扫描，提取数据并对其进行处理和分析。

一种多真菌毒素检测的免疫芯片及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及了一种免疫芯片的制备方法,特别是涉及到一种检测多种真菌毒素的免疫芯片检测技术。

背景技术

[0002] 真菌毒素 (Mycotoxin) 是生物毒素中的一种,是丝状的小型真菌(这些真菌对动物和人类的疾病构成严重威胁)产生的次级代谢产物。目前,已知有 350 多种不同的真菌毒素。通常,真菌毒素污染粮食作物和动物饲料,进而污染肉、蛋、奶等动物性食品,进入人类生物链,不仅可导致农产品霉败变质、营养成分损失以及产品品质的降低,还可通过对人和动物机体内 DNA、RNA、蛋白质和各种酶类的合成抑制以及对细胞结构的破坏而造成致畸、致突变和致癌等严重危害。因此,在全球环境与食品安全问题中备受关注。

[0003] 随着国际国内对食品安全重视程度的日益加强,并鉴于真菌毒素所带来的危害,在农产品与食品安全指标中,真菌毒素的含量已经成为重要的检测指标。国内外研究主要集中在农产品及饲料中常见的、对人类危害较大的十几种真菌毒素上,它们一般同时具有毒性强和污染频率高等特点。根据此,本发明所研究的靶标物为六种真菌毒素,包括黄曲霉毒素 B1 (Aflatoxin B1, AFB1),它被公认为是致癌性和毒性最强的毒素,靶器官是肝脏,可抑制动物生长、致畸等;黄曲霉毒素 M1 (Aflatoxin M1, AFM1),其毒性主要表现为致癌、致突变性等;呕吐毒素,又名脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (Deoxynivalenol, DON),具有很强的细胞毒性,抑制蛋白质的合成,还可引起生殖发育毒性、免疫毒性、致癌性等;赭曲霉毒素 A (Ochratoxin A, OTA),其靶器官为肾脏,表现在肾小管变性和机能损伤,致癌致畸等;T-2 毒素 (T-2 toxin, T-2),它可抑制蛋白质、DNA 的合成,强免疫毒性,致癌致畸,有致死作用和对皮肤细胞以及遗传的毒性;玉米赤霉烯酮,又名 F-2 毒素 (Zearalenone, ZEN) 主要作用于生殖系统,可引起人畜发生雌激素亢进症,具有较强生殖毒性和致畸作用等。

[0004] 目前,国内外检测真菌毒素最常用的方法是高效液相色谱法 (HPLC) 和酶联免疫吸附法 (ELISA),前者检测灵敏度高,但样品前处理繁琐、操作复杂、时间长,所需设备较昂贵;后者操作简便、快速,但每次只能完成一种真菌毒素的检测,对于多种毒素的检测费时、费力,工作量巨大。

[0005] 免疫芯片 (Immuno chip) 是蛋白质芯片中的一种,由固定于不同支持介质上的抗原或抗体微阵列组成,阵列中固定分子的位置及组成是已知的,用相应的抗体或抗原与芯片上的探针进行反应,再将标记有荧光物质、酶或化学发光物等的二抗进行第二次反应,然后通过特定的扫描装置进行检测,提取扫描结果数据,并用 Origin 8.0 软件对其进行处理分析,从而达到对待测物进行检测的目的。

[0006] 制备的多种真菌毒素检测的免疫芯片具有高通量、操作简便、重复性好、灵敏度高等优点,适用于对真菌毒素小分子化学污染物的快速定量检测,在环境与食品安全有毒有害物质的检测领域具有广阔的应用前景。

发明内容

[0007] 本发明的目的是针对现有检测方法存在的缺陷,提供一种操作简单、灵敏快速的六种真菌毒素的免疫芯片检测技术。

[0008] 本发明的另一个目的是提供了同时检测六种真菌毒素时免疫芯片的制备方法。

[0009] 本发明的技术方案概述如下:

[0010] (1) 确定六种真菌毒素抗原的最佳工作浓度。

[0011] (2) 确定六种真菌毒素抗体的最佳工作浓度及抗原抗体特异性的检测。

[0012] (3) 同时检测六种真菌毒素标准曲线的绘制。

[0013] (4) 待测样品中多种真菌毒素的测定。

[0014] 优选的是步骤(1)确定六种真菌毒素抗原的最佳工作浓度为:将六种真菌毒素完全抗原的工作浓度各设定为六种不同的浓度梯度,并与三种对照同时点制于芯片上,制备此阶段的免疫芯片,通过扫描仪进行鉴定;再将所述的六种真菌毒素的鼠源单克隆抗体进行竞争结合免疫反应,得到六种真菌毒素抗原的最佳工作浓度以及抗体较优的工作浓度,为下步确定六种真菌毒素抗体的最佳工作浓度做准备。

[0015] 所述步骤(2)确定六种真菌毒素抗体的最佳工作浓度及抗原抗体特异性的检测为:先配制六种真菌毒素抗原的最佳工作浓度溶液,与三种对照液同时点制于芯片上,制备此阶段的免疫芯片,通过扫描仪进行鉴定;再将所述的六种真菌毒素抗体较优的工作浓度溶液(各四个浓度梯度)进行免疫反应,得到六种真菌毒素抗体的最佳工作浓度,为下步同时检测六种真菌毒素时标准曲线的绘制做准备。并且,结合步骤(1)得出的结果,对六种真菌毒素抗原抗体的特异性进行分析。

[0016] 所述步骤(3)同时检测六种真菌毒素标准曲线的绘制为:先配制六种真菌毒素抗原的最佳工作浓度溶液,与三种对照液同时点制于芯片上,制备此阶段的免疫芯片,通过扫描仪进行鉴定;再将所述的六种真菌毒素抗体最佳的工作浓度溶液进行竞争结合免疫反应,得到在一张芯片上同时检测六种真菌毒素的标准曲线,为下步待测样品中多种真菌毒素的测定做准备。

[0017] 所述步骤(4)待测样品中多种真菌毒素的测定为:先配制六种真菌毒素抗原的最佳工作浓度溶液,与三种对照液同时点制于芯片上,制备此阶段的免疫芯片,通过扫描仪进行鉴定;再将所述的六种真菌毒素抗体最佳的工作浓度溶液进行竞争结合免疫反应,得到在在一张芯片上对自来水中六种真菌毒素进行加标检测。

[0018] 通过一系列的优化实验,本发明可以简便、有效地检测水中六种真菌毒素的加标含量,灵敏度可达 pg ~ ng 级,检测区间为 2 ~ 3 个数量级,结果与实际值相比偏差较小。

附图说明

[0019] 图 1 为每张芯片的布局图和亚阵列的设计。

[0020] 其中,A 图为琼脂糖修饰后的芯片布局图,每张芯片含有 12 个独立的亚阵列;B 图为第一阶段工作即确定六种真菌毒素抗原最佳浓度时各探针的设计图,探针主要包括:六种真菌毒素完全抗原(AFT-BSA, AFM1-BSA, DON-BSA, OTA-OVA, T-2-BSA, ZEN-BSA)工作溶液和三种对照工作液(Cy3-BSA, Blank, mouse-IgG);C 图为后三个阶段工作时各探针的设计图,此时探针为六种真菌毒素完全抗原的最佳浓度工作液和三种对照工作液,各毒素抗

原的最佳工作浓度依次为 :AFT-BSA 0.2mg/mL、AFM1-BSA 0.1mg/mL、DON-BSA 2.0mg/mL、OTA-OVA 2.0mg/mL、T-2-BSA 0.2mg/mL、ZEN-BSA 1.0mg/mL。

[0021] 图 2 为免疫芯片检测技术的操作流程。

[0022] 图 3 为优化六种真菌毒素抗原的最佳浓度结果。

[0023] 其中,3-1A(AFT)、3-2A(AFM1)、3-3A(DON)、3-4A(OTA)、3-5A(T-2)、3-6A(ZEN)分别为六种真菌毒素六种不同浓度的抗体工作液与各探针杂交后扫描图;3-1B(AFT)、3-2B(AFM1)、3-5B(T-2)图分别为六种不同浓度的抗体与对应的抗原杂交曲线图。

[0024] 图 4 为优化六种真菌毒素抗体的最佳浓度结果。

[0025] 其中,4-1A(AFT)、4-2A(AFM1)、4-3A(DON)、4-4A(OTA)、4-5A(T-2)、4-6A(ZEN)是各真菌毒素四种不同浓度的且较优的抗体工作液杂交后扫描图。对应地,4-1B(AFT)、4-2B(AFM1)、4-3B(DON)、4-4B(OTA)、4-5B(T-2)、4-6B(ZEN)是各抗原抗体杂交曲线图。

[0026] 图 5 为六种真菌毒素抗原抗体的特异性检测结果。

[0027] 图 6 为免疫芯片法同时检测六种真菌毒素标准曲线的绘制。

[0028] 其中,A图是免疫芯片法同时检测六种真菌毒素时真菌毒素小分子与完全抗原竞争免疫反应结果扫描图;B图是运用 Origin 8.0 软件绘制出的六种标准曲线。

具体实施方式

[0029] 下面结合附图和具体实施例对本发明做进一步阐述。以下的实施例是为了便于更好地理解本发明,但并不限定本发明。

[0030] 实施例 1:

[0031] 实验材料如下:

[0032] 黄曲霉毒素 B1(Aflatoxin B1, AFB1)、呕吐毒素(Deoxynivalenol, DON)、赭曲霉毒素 A(Ochratoxin A or Benaene Free, OTA)、T-2 毒素(T-2 Toxin, T-2)、玉米赤霉烯酮(Zearalenone, ZEN):Fermentek Ltd.;黄曲霉毒素 M1(Aflatoxin M, AFM1):Supelco 公司;黄曲霉毒素 M1 完全抗原(AFM1-BSA):Sigma 公司;黄曲霉毒素总量完全抗原(AFT-BSA)、呕吐毒素完全抗原(DON-BSA)、赭曲霉毒素 A 完全抗原(OTA-OVA)、T-2 毒素完全抗原(T-2-BSA)、玉米赤霉烯酮完全抗原(ZEN-BSA)、抗黄曲霉毒素总量单克隆抗体(AFT-Ab)、黄曲霉毒素 M1 抗体(AFM1-Ab)、抗呕吐毒素单克隆抗体(DON-Ab)、抗赭曲霉毒素 A 单克隆抗体(OTA-Ab)、抗 T-2 毒素单克隆抗体(T-2-Ab)、抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体(ZEN-Ab):北京华安麦科生物技术有限公司;山羊抗小鼠 IgG(H+L), Cy3:北京康为世纪生物技术有限公司;晶芯®蛋白芯片点样液-A:北京博奥生物有限公司;抗体稀释液、100%羊血清、mouse-IgG、BSA-Cy3 均有博奥公司提供。其它化学试剂均为国产分析纯,所用纯水均为 Milli-Q 超纯水。

[0033] 脱色摇床:海门市其林贝尔仪器制造有限公司;晶芯®高分子三维基片 G(即琼脂糖芯片)、晶芯®PersonalArrayer™ 16 个人点样仪、晶芯®LuxScan™ 10K-A 微阵列芯片扫描仪、晶芯®SlideWasher™ 8 芯片洗干仪:北京博奥生物有限公司。

[0034] (1) 确定六种真菌毒素抗原的最佳工作浓度

[0035] 1) 芯片的制备

[0036] ①使六种真菌毒素完全抗原的浓度 0.00625 ~ 0.2000mg/mL 进行配制,并配制三

种对照液 (Cy3-BSA, 点样液, 0.5mg/mL mouse-IgG)。然后, 将其转入 384 孔板中, 低温避光保存, 备用。

[0037] ②对 PersonalArrayer™ 16 个人点样仪的操作程序进行设置, 保证其温度为 24 ~ 26℃, 湿度为 22 ~ 37%。通过点样仪将各个探针点制于琼脂糖修饰后的芯片上。

[0038] ③将点样后的芯片于高洁净度的车间过夜处理, 使探针固定于芯片上, 为免疫反应做准备。

[0039] ④将固定后的芯片进行扫描, 对其进行鉴定, 以确保探针排布按设计方案进行。然后, 放置于芯片储存盒中, 抽真空包装后于 4℃ 冰箱保存, 可保存 6 个月。启用时, 应先将其恢复至室温。

[0040] 2) 免疫反应

[0041] ①封闭

[0042] 取出芯片杂交盒, 向杂交盒内加入 200 μL 蒸馏水或自来水, 以便为杂交反应提供湿环境。

[0043] 从恢复至室温后的芯片储存盒中取出欲杂交的芯片, 将芯片正面向上小心放于杂交盒的托架上。从芯片中每个亚阵列的一角缓缓加入 20 ~ 40 μL 封闭液 (即 100% 羊血清), 盖上反应盒盖, 于 37℃ 恒温箱中孵育 30 ~ 60min。

[0044] ②芯片的清洗与干燥

[0045] 取出孵育后的芯片, 将多余的液体甩掉, 并将芯片放于装有 1% PBST 溶液的芯片清洗盒中, 洗去残留的封闭液, 取出芯片, 倒掉用过的 PBST 溶液; 将干净的 1% PBST 溶液倒入清洗盒中, 放入芯片, 并将其放置于摇床上摇晃清洗 5 ~ 10min, 取出芯片以备离心干燥。

[0046] 将芯片放于 Slide Washer™ 8 芯片洗干仪中甩干, 离心条件为 1500rpm, 5min。放置时, 应将芯片标签向内放于离心机中, 并注意配平。

[0047] ③第一步免疫反应

[0048] 将离心甩干后的芯片放置于芯片杂交盒中, 并将已配制的六种真菌毒素一抗工作液 0.3125 ~ 10.0000 μg/mL 按 20 ~ 40 μL/亚阵列添加, 于 37℃ 恒温箱中孵育 30 ~ 60min。

[0049] ④芯片的清洗与干燥

[0050] 同操作步骤②。

[0051] ⑤第二步免疫反应

[0052] 按一定比例配制二抗工作液, 于暗环境下将 20 ~ 40 μL/亚阵列添加, 放入杂交反应盒中, 盖上盒盖, 并于 37℃ 恒温箱中孵育 30 ~ 60min。

[0053] ⑥芯片的清洗与干燥

[0054] 同操作步骤②。

[0055] ⑦扫描及结果分析

[0056] 用芯片扫描仪对杂交后的芯片进行扫描, 提取数据并对其进行处理和分析。扫描时, 激发波长为 532nm, 分辨率为 10 μm, 可调的扫描参数为光电倍增管 PMT (450 ~ 950 连续可调), 功率 Power (1 ~ 100%)。

[0057] 结合 ELISA 检测结果 (见表 1), 可推断各抗原最佳浓度分别为: AFT-BSA 0.2mg/mL、AFM1-BSA 0.1mg/mL、DON-BSA 2.0mg/mL、OTA-OVA 2.0mg/mL、T-2-BSA 0.2mg/mL、ZEN-BSA 1.0mg/mL, 各抗体的较优浓度依次为 AFT-Ab 0.04 ~ 5.00 μg/mL、AFM1-Ab 0.04 ~

5.00 μ g/mL、DON-Ab 0.08 ~ 10.00 μ g/mL、OTA-Ab 0.16 ~ 20.00 μ g/mL、T-2-Ab 0.08 ~ 10.00 μ g/mL、ZEN-Ab 0.16 ~ 20.00 μ g/mL。

[0058] (2) 确定六种真菌毒素抗体的最佳工作浓度及抗原抗体特异性的检测

[0059] 1) 芯片的制备

[0060] ①将六种真菌毒素的完全抗原按最佳浓度进行配制,即 AFT-BSA 0.2mg/mL、AFM1-BSA 0.1mg/mL、DON-BSA 2.0mg/mL、OTA-OVA 2.0mg/mL、T-2-BSA 0.2mg/mL、ZEN-BSA 1.0mg/mL,并配制三种空白对照液 (Cy3-BSA,

[0061] ^a表 1 六种真菌毒素的 ELISA 检测结果

分析物	稀释范围 (ng/mL)		IC ₅₀ (ng/mL)
	完全抗原	抗体	
AFB1	23.6~2360	190~1900	0.3~0.7
AFM1	125~1250	53.2~532	0.2~0.5
DON	400~4000	35~3500	15~60
OTA	125~1250	200~400	0.5
T-2	13.28~66.4	0.182~1.82	0.4
ZEN	50.1~5010	50.6~506	0.2

[0063] a:此结果由北京华安麦科生物有限公司提供。

[0064] 点样液,0.5mg/mL mouse-IgG)。然后,将其转入 384 孔板中,低温避光保存,备用。

[0065] ②对点样仪的操作程序进行设置,保证其温度为 24 ~ 26℃,湿度为 22 ~ 37%。通过点样仪将各个探针点制于琼脂糖修饰后的芯片上。

[0066] ③将点样后的芯片于高洁净度的车间过夜处理,使探针固定于芯片上,为免疫竞争反应做准备。

[0067] ④将固定后的芯片进行扫描,对其进行鉴定,以确保探针排布按设计的方案进行。然后,放置于芯片储存盒中,抽真空后于 4℃冰箱保存,可保存 6 个月。启用时,应先将其恢复至室温。

[0068] 2) 免疫竞争反应

[0069] ①封闭

[0070] 取出芯片杂交盒,向杂交盒内加入 200 μ L 蒸馏水或自来水,以便为杂交反应提供湿环境。

[0071] 从恢复至室温后的芯片储存盒中取出欲杂交的芯片,将芯片正面向上小心放于杂交盒的托架上。从芯片中每个亚阵列的一角缓缓加入 20 ~ 40 μ L 封闭液 (即 100% 羊血清),盖上反应盒盖,于 37℃恒温箱中孵育 30 ~ 60min。

[0072] ②芯片的清洗与干燥

[0073] 取出孵育后的芯片,将多余的液体甩掉,并将芯片放于装有 1% PBST 溶液的芯片清洗盒中,洗去残留的封闭液,取出芯片,倒掉用过的 PBST 溶液;将干净的 1% PBST 溶液倒入清洗盒中,放入芯片,并将其放置于摇床上摇晃清洗 5min,取出芯片以备离心干燥。

[0074] 将芯片放于 SlideWasher™ 8 芯片洗干仪中甩干,离心条件为 1500rpm,5min。放置时,应将芯片标签向内放于离心机中,并注意配平。

[0075] ③第一步免疫反应

[0076] 将离心甩干后的芯片放置于芯片杂交盒中,并将已配制的六种真菌毒素一抗的较

优浓度的工作液按 20 ~ 40 μ L/ 亚阵列添加,于 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中孵育 30 ~ 60min。

[0077] ④芯片的清洗与干燥

[0078] 同操作步骤②。

[0079] ⑥第二步免疫反应

[0080] 按一定比例配制二抗工作液,于暗环境下将 20 ~ 40 μ L/ 亚阵列添加,放入杂交反应盒中,盖上盒盖,并于 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中孵育 30 ~ 60min。

[0081] ⑥芯片的清洗与干燥

[0082] 同操作步骤②。

[0083] ⑦扫描及结果分析

[0084] 用芯片扫描仪对杂交后的芯片进行扫描,提取数据并对其进行处理和分析。扫描时,激发波长为 532nm,分辨率为 10 μ m,可调的扫描参数为光电倍增管 PMT(450 ~ 950 连续可调),功率 Power(1 ~ 100%)。

[0085] 由结果分析可知,六种真菌毒素抗体的最佳工作浓度依次为:AFT-Ab 1.00 μ g/mL、AFM1-Ab 0.50 μ g/mL、DON-Ab 1.00 μ g/mL、OTA-Ab 0.10 μ g/mL、T-2-Ab 1.00 μ g/mL、ZEN-Ab 1.00 μ g/mL。

[0086] 结合(1)阶段的结果可知,六种真菌毒素抗原抗体之间的特异性见说明书附图 5。由此可知:除 AFT-BSA 与 AFM1-Ab、AFM1-BSA 与 AFT-BSA 有交叉反应外,其它抗原抗体特异性好。但 AFT-BSA 与 AFM1-Ab 交叉反应率仅有 57.10%,故本发明采用 AFT 抗原抗体检测 AFB1,AFM1 抗原抗体检测 AFM1。

[0087] (3)同时检测六种真菌毒素标准曲线的绘制

[0088] 1) 芯片的制备

[0089] 同实施例 1 中(2)中的 1)。

[0090] 2) 免疫竞争反应

[0091] ①封闭

[0092] 取出芯片杂交盒,向杂交盒内加入 200 μ L 蒸馏水或自来水,以便为杂交反应提供湿环境。

[0093] 从恢复至室温后的芯片储存盒中取出欲杂交的芯片,将芯片正面向上小心放于杂交盒的托架上。从芯片中每个亚阵列的一角缓缓加入 20 ~ 40 μ L 封闭液(即 100% 羊血清),盖上反应盒盖,于 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中孵育 30 ~ 60min。

[0094] ②芯片的清洗与干燥

[0095] 取出孵育后的芯片,将多余的液体甩掉,并将芯片放于装有 1% PBST 溶液的芯片清洗盒中,洗去残留的封闭液,取出芯片,倒掉用过的 PBST 溶液;将干净的 1% PBST 溶液倒入清洗盒中,放入芯片,并将其放置于摇床上摇晃清洗 5min,取出芯片以备离心干燥。

[0096] 将芯片放于 SlideWasherTM 8 芯片洗干仪中甩干,离心条件为 1500rpm,5min。放置时,应将芯片标签向内放于离心机中,并注意配平。

[0097] ③第一步免疫反应

[0098] 按六种真菌毒素的一抗混合工作液按各自的终浓度 AFT-Ab 1.00 μ g/mL、AFM1-Ab 0.50 μ g/mL、DON-Ab 1.00 μ g/mL、OTA-Ab 0.10 μ g/mL、T-2-Ab 1.00 μ g/mL、ZEN-Ab 1.00 μ g/mL 进行配制。六种真菌毒素的标准品混合工作液按一定浓度梯度进行配制。取

20 ~ 40 μ L 一抗混合工作液与标准品混合工作液混匀,于 37 $^{\circ}$ C 恒温恒湿条件下提前孵育 10 ~ 20min。

[0099] 将离心甩干后的芯片放置于芯片杂交盒中,再将孵育后的混合工作液按 20 ~ 40 μ L/ 亚阵列添加,于 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中孵育 30 ~ 60min。

[0100] ④芯片的清洗与干燥

[0101] 同操作步骤②。

[0102] ⑤第二步免疫反应

[0103] 按一定比例配制二抗工作液,于暗环境下将 20 ~ 40 μ L/ 亚阵列添加,放入杂交反应盒中,盖上盒盖,并于 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中孵育 30 ~ 60min。

[0104] ⑥芯片的清洗与干燥

[0105] 同操作步骤②。

[0106] ⑦扫描及结果分析

[0107] 用芯片扫描仪对杂交后的芯片进行扫描,提取数据并对其进行处理和分析。扫描时,激发波长为 532nm,分辨率为 10 μ m,可调的扫描参数为光电倍增管 PMT (450 ~ 950 连续可调),功率 Power (1 ~ 100%)。其结果如表 2 和说明书附图 6 所示。

[0108] 由此可知:曲线方程中除 AFB1、AFM1、ZEN 竞争标准曲线决定系数 $R^2 < 0.99$ 外,其他线性拟合良好。本方法检测灵敏度可达到 pg ~ ng 级水平,检测区间为 2 ~ 3 个数量级。

[0109] 表 2 免疫芯片法同时检测六种真菌毒素时竞争结果

[0110]

靶标物	标准曲线方程	IC ₅₀ (ng/mL)	最低检测 限 (ng/mL)	检测范围 (ng/mL)
AFB1	$y_{AFB1} = -3985.20 + 42205.46/[1 + (x/0.40)^{0.6735}]$, $R^2 = 0.9867$	0.31	0.01	0.04~1.69
AFM1	$y_{AFM1} = -10099.62 + 39272.40/[1 + (x/2.41)^{0.8749}]$, $R^2 = 0.9826$	1.49	0.24	0.45~3.90
DON	$y_{DON} = 2057.32 + 6344.38/[1 + (x/27.80)^{3.1420}]$, $R^2 = 0.9936$	34.54	15.45	20.20~69.23
OTA	$y_{OTA} = -4851.67 + 20012.06/[1 + (x/228.54)^{0.9291}]$, $R^2 = 0.9988$	134.06	15.39	35.68~363.18
T-2	$y_{T-2} = -1967.30 + 22780.24/[1 + (x/0.58)^{0.8878}]$, $R^2 = 0.9969$	0.49	0.05	0.11~1.81
ZEN	$y_{ZEN} = -17918.75 + 25964.81/[1 + (x/131.00)^{0.3919}]$, $R^2 = 0.9774$	1.54	0.01	0.08~7.47

[0111] (4) 自来水中六种真菌毒素的加标检测

[0112] 1) 芯片的制备

[0113] 同实施例 1 中 (2) 中的 1)。

[0114] 2) 免疫竞争反应

[0115] ①封闭

[0116] 取出芯片杂交盒,向杂交盒内加入 200 μ L 蒸馏水或自来水,以便为杂交反应提供

湿环境。

[0117] 从恢复至室温后的芯片储存盒中取出欲杂交的芯片,将芯片正面向上小心放于杂交盒的托架上。从芯片中每个亚阵列的一角缓缓加入 20 ~ 40 μ L 封闭液(即 100% 羊血清),盖上反应盒盖,于 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中孵育 30 ~ 60min。

[0118] ②芯片的清洗与干燥

[0119] 取出孵育后的芯片,将多余的液体甩掉,并将芯片放于装有 1% PBST 溶液的芯片清洗盒中,洗去残留的封闭液,取出芯片,倒掉用过的 PBST 溶液;将干净的 1% PBST 溶液倒入清洗盒中,放入芯片,并将其放置于摇床上摇晃清洗 5min,取出芯片以备离心干燥。

[0120] 将芯片放于 SlideWasherTM 8 芯片洗干仪中甩干,离心条件为 1500rpm,5min。放置时,应将芯片标签向内放于离心机中,并注意配平。

[0121] ③竞争结合免疫反应

[0122] 按六种真菌毒素的一抗混合工作液按各自的终浓度 AFT-Ab 1.00 μ g/mL、AFM1-Ab 0.50 μ g/mL、DON-Ab 1.00 μ g/mL、OTA-Ab 0.10 μ g/mL、T-2-Ab 1.00 μ g/mL、ZEN-Ab 1.00 μ g/mL 进行配制。六种真菌毒素的标准品混合工作液按样品 1(空白样品,即自来水)、样品 2(含 AFB1 1.5ng/mL、AFM1 1.5ng/mL、DON 60ng/mL、OTA 120ng/mL、T-2 3ng/mL、ZEN 3ng/mL)、样品 3(含 AFB1 3ng/mL、AFM1 3ng/mL、DON 120ng/mL、OTA 240ng/mL、T-2 6ng/mL、ZEN 12ng/mL)进行配制,此时稀释液为自来水。取一抗混合工作液与标准品混合工作液(总体积 40 ~ 60 μ L)混匀,于 37 $^{\circ}$ C 恒温恒湿条件下提前孵育 10 ~ 20min。

[0123] 将离心甩干后的芯片放置于芯片杂交盒中,再将孵育后的混合工作液按 20 ~ 40 μ L/亚阵列添加,于 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中孵育 30 ~ 60min。

[0124] ④芯片的清洗与干燥

[0125] 同操作步骤②。

[0126] ⑤免疫反应的信标

[0127] 按一定比例配制二抗工作液,于暗环境下将 20 ~ 40 μ L/亚阵列添加,放入杂交反应盒中,盖上盒盖,并于 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中孵育 30 ~ 60min。

[0128] ⑥芯片的清洗与干燥

[0129] 同操作步骤②。

[0130] ⑧扫描及结果分析

[0131] 用芯片扫描仪对杂交后的芯片进行扫描,提取数据并对其进行处理和分析。扫描时,激发波长为 532nm,分辨率为 10 μ m,可调的扫描参数为光电倍增管 PMT(450 ~ 950 连续可调),功率 Power(1 ~ 100%)。

[0132] 由结果分析:自来水中六种真菌毒素的加标检测结果见表 3。

[0133] 表 3 自来水中六种真菌毒素的加标检测结果汇总表

样品 编号	靶标物	加标浓度 (ng/mL)	检测浓度 (ng/mL)	加标回收率 (%)	变异系数 (%)
样品 1	AFB1	0	0	-	-
	AFM1	0	0	-	-
	DON	0	0	-	-
	OTA	0	0	-	-
	T-2	0	0	-	-
	ZEN	0	0	-	-
[0134] 样品 2	AFB1	1.5	1.54	102.0	13.50
	AFM1	1.5	1.47	98.0	4.21
	DON	60	81.52	135.9	11.85
	OTA	120	136.97	114.1	3.47
	T-2	3	2.78	92.8	4.02
	ZEN	3	3.20	106.7	14.10
样品 3	AFB1	3	2.43	81.0	1.26
	AFM1	3	2.53	84.2	13.50
	DON	120	73.13	60.9	9.65
	OTA	240	145.07	60.4	5.40
	T-2	6	6.13	102.2	7.90
	ZEN	12	12.87	107.3	8.90

[0135] - :未检出。

[0136] 由表 3 可知,除了样品 2 和 3 中 DON 的加标回收率分别为 135.9%和 60.9%、样品 3 中 OTA 的加标回收率为 60.4%外,其他样品中各种靶标物的加标回收率均在 80 ~ 120%。由此可见,免疫芯片同时检测样品中六种真菌毒素的加标回收率较好,可初步用于对实际样品的检测。

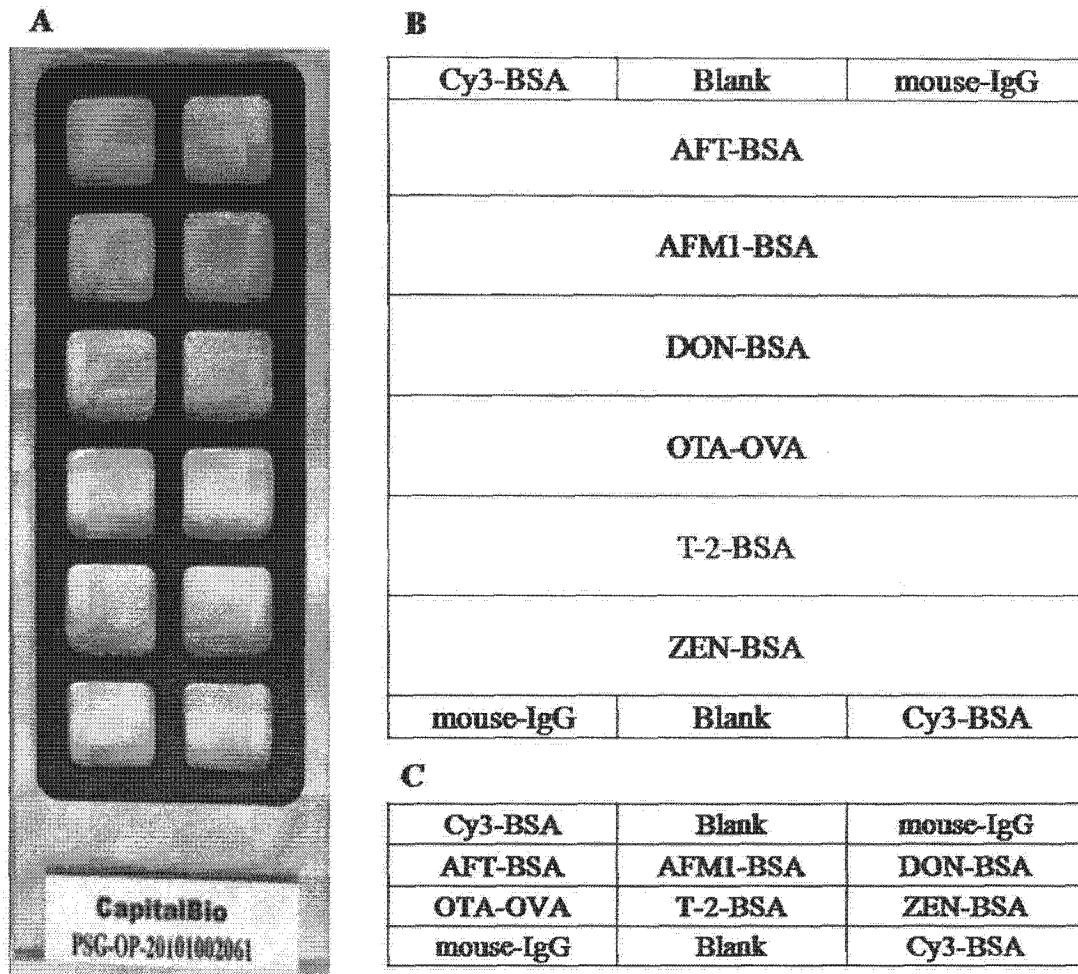


图 1

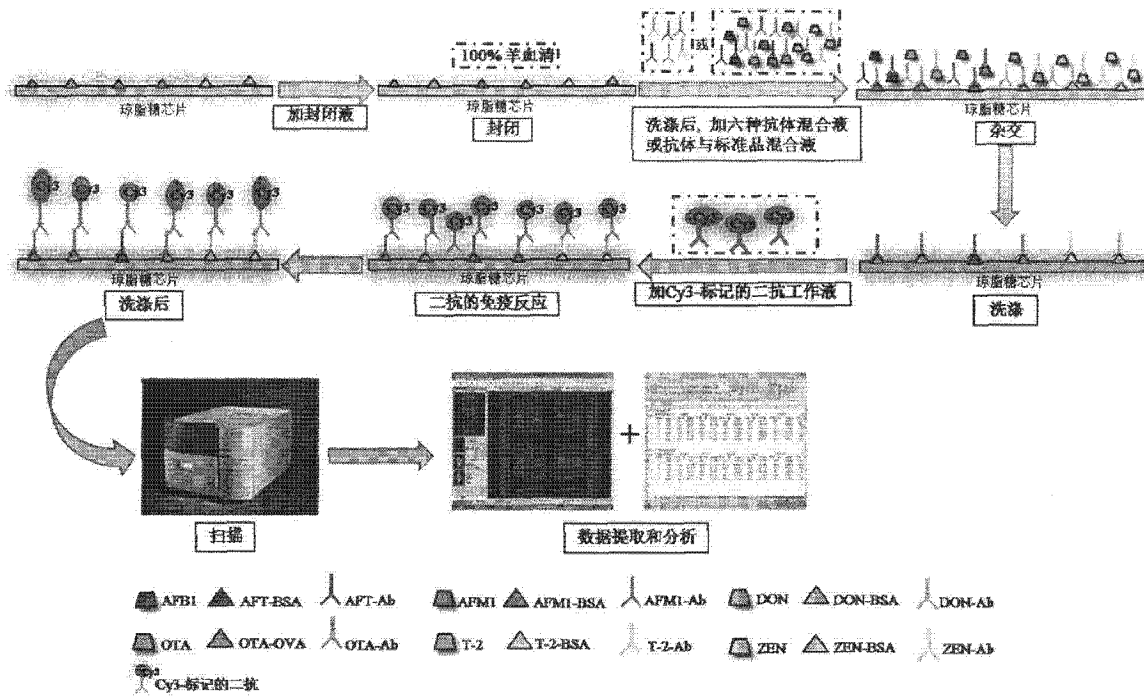


图 2

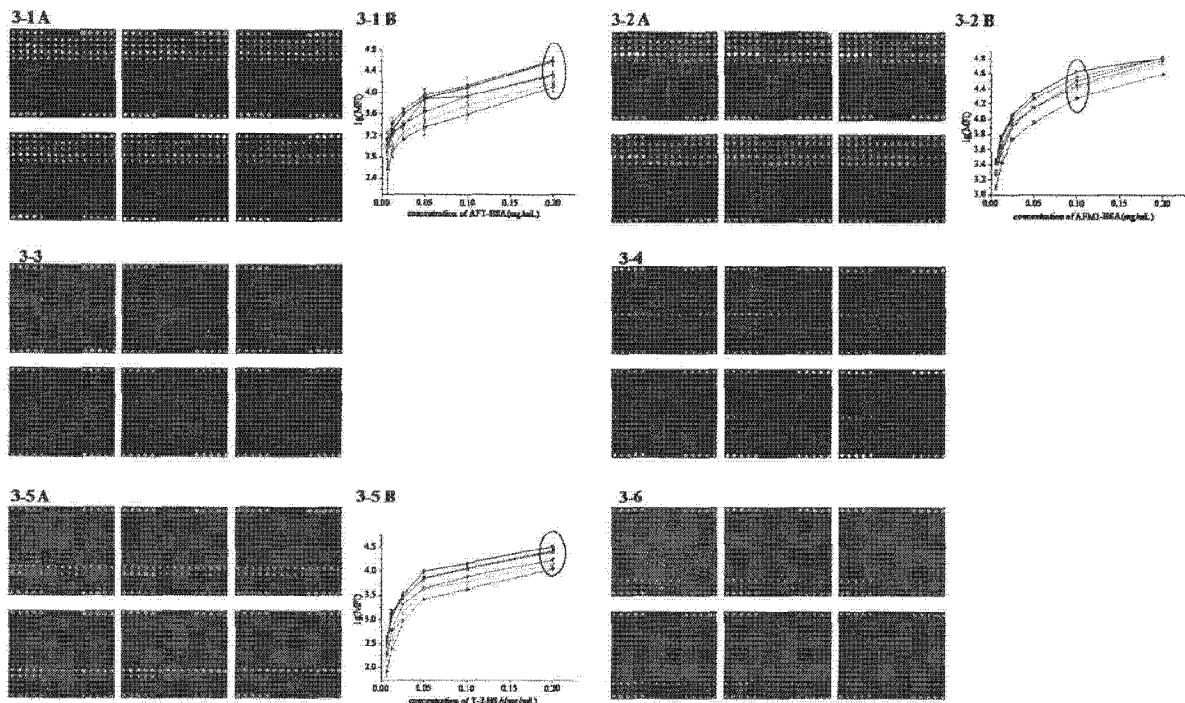


图 3

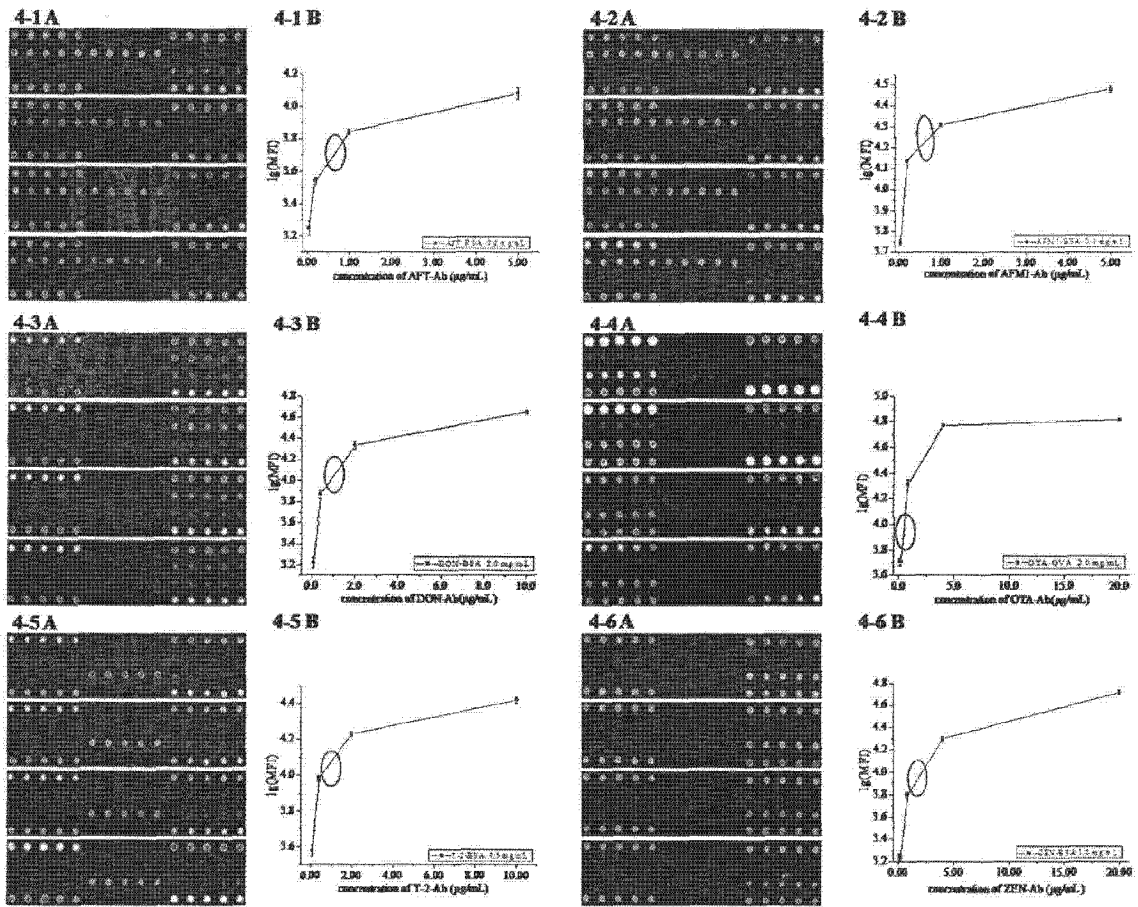


图 4

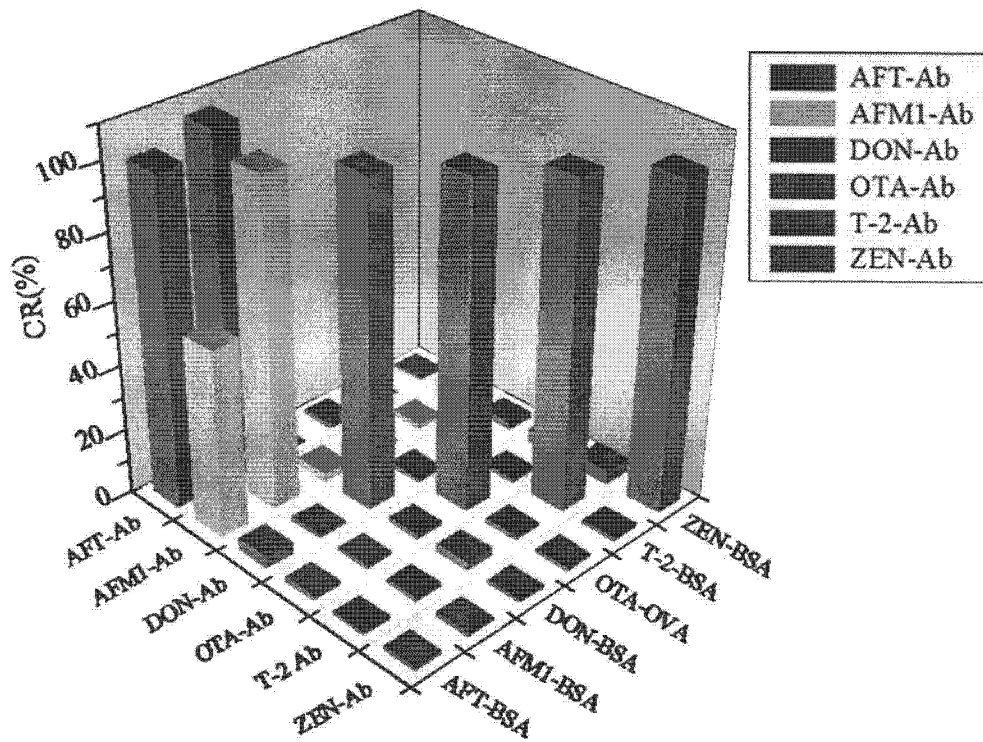


图 5

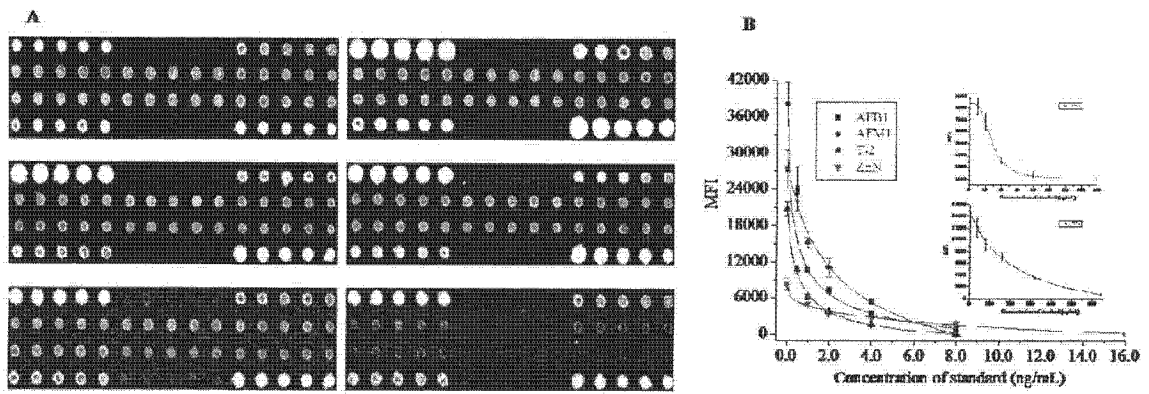


图 6

专利名称(译)	一种多真菌毒素检测的免疫芯片及其制备方法		
公开(公告)号	CN102798714A	公开(公告)日	2012-11-28
申请号	CN201110133963.5	申请日	2011-05-24
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院卫生学环境医学研究所		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院卫生学环境医学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院卫生学环境医学研究所		
[标]发明人	高志贤 王莹 刘楠 柳明 宁保安 李君文		
发明人	高志贤 王莹 刘楠 柳明 宁保安 李君文		
IPC分类号	G01N33/545 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开一种在一张芯片上同时检测多种真菌毒素(黄曲霉毒素B1、黄曲霉毒素M1、呕吐毒素、赭曲霉毒素A、T-2毒素、玉米赤霉烯酮)的免疫芯片制备方法及其检测技术。将各毒素完全抗原点制于芯片上,使其以扩散方式进入活化醛基的琼脂糖聚合物层,共价偶联于芯片表面。采用竞争法进行免疫芯片技术研究,即检测时将多种毒素的单抗及标准品混合后加到芯片上,使相应的待测物抗原与小分子竞争单抗,再加入Cy3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。该技术灵敏度达pg~ng级,结果稳定可靠,且样品用量少,简便、快速,为多种毒素的检测提供新方法。

分析物	稀释范围 (ng/mL)		IC ₅₀ (ng/mL)
	完全抗原	抗体	
AFB1	23.6~2360	190~1900	0.3~0.7
AFM1	125~1250	53.2~532	0.2~0.5
DON	400~4000	35~3500	15~60
OTA	125~1250	200~400	0.5
T-2	13.28~66.4	0.182~1.82	0.4
ZEN	50.1~5010	50.6~506	0.2