



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105301253 A

(43) 申请公布日 2016.02.03

(21) 申请号 201510563063.2

(22) 申请日 2015.09.07

(71) 申请人 北京勤邦生物技术有限公司

地址 102206 北京市昌平区回龙观国际信息
产业基地高新四街 8 号

(72) 发明人 罗晓琴 张颖 龙光宗 马腊腊
崔海峰 何方洋 徐念琴 崔廷婷

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书2页 说明书6页 附图1页

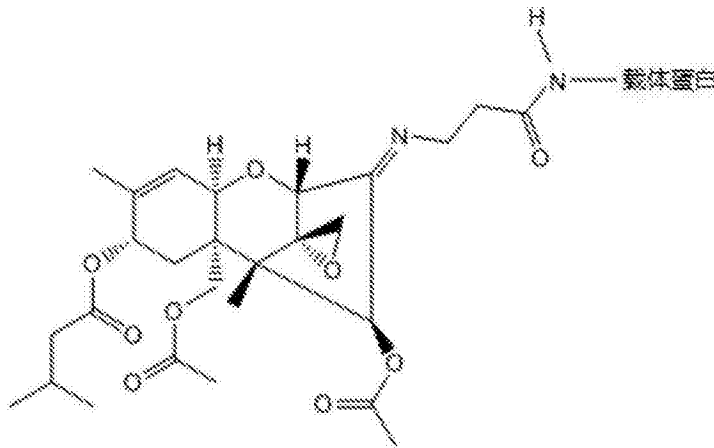
(54) 发明名称

富集 T-2 毒素的免疫磁珠及其制备方法与应用

(57) 摘要

本发明涉及一种富集 T-2 毒素的免疫磁珠及其制备方法和应用,它是以羧基磁珠为载体, T-2 毒素单克隆抗体为识别中间体,经过活化-偶联-洗涤-封闭的过程制备出偶联有 T-2 毒素单克隆抗体的免疫磁珠,在合适的缓冲液中于一定条件下孵育可以高效捕捉、富集检测样本中的 T-2 毒素。本发明富集 T-2 毒素的免疫磁珠具有浓缩待测样品中 T-2 毒素浓度、提高检测下限、排除杂质干扰、提高检测准确性和可靠性、减少样品处理时间达到快速检测的优点。

1. 一种富集 T-2 毒素的免疫磁珠,其特征在于:所述免疫磁珠上偶联有 T-2 毒素单克隆抗体;所述 T-2 毒素单克隆抗体是用 T-2 毒素人工抗原免疫白鼠所得到的;所述 T-2 毒素人工抗原是 T-2 毒素半抗原与载体蛋白的偶联物,其分子结构式如式 I 所示:



(式 I)。

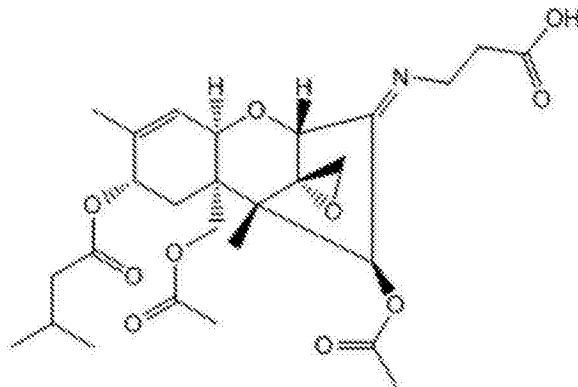
2. 根据权利要求 1 所述的免疫磁珠,其特征在于:所述 T-2 毒素人工抗原是按照如下方法制备得到的:

将 12mg T-2 毒素半抗原溶于 1mL N,N-二甲基甲酰胺中,将 30mg 二环己基碳二亚胺和 30mg N-羟基琥珀酰亚胺溶于 0.2mL N,N-二甲基甲酰胺后加入半抗原溶液中,室温搅拌 24h,称为 A 液;

将 50mg 载体蛋白溶于 3.8mL PBS 缓冲液 (pH 7.2) 中,称为 B 液;

将 A 液加入到 B 液中,室温搅拌 24h,离心取上清液,将得到的产物透析,得到所述 T-2 毒素人工抗原;

所述 T-2 毒素半抗原的分子结构式如式 II 所示:



(式 II)。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的免疫磁珠,其特征在于:所述 T-2 毒素半抗原是按照如下方法制备得到的: I、将 100mg T-2 毒素加乙腈溶解,再加入 200 μ L 乙酸和 200mg 重铬酸吡啶盐,70 $^{\circ}$ C 反应 4h,停止反应,旋蒸,除去乙腈,加水-乙酸乙酯萃取,干燥,蒸干,上硅胶柱,用三氯甲烷/甲醇 (10:1) 洗脱分离,得到中间产物; II、将中间产物加 3mL 乙醇溶解后,再加入 50mg 碳酸钾和 5mL 含有 200mg 氨基丙酸的水溶液,60 $^{\circ}$ C 反应 12h,停止反应,加水-乙酸乙酯萃取,除去有机相,水相加稀盐酸调节 pH 到 4,加乙酸乙酯萃取,除去水相,有机相干燥蒸干,乙醚重结晶,得到 T-2 毒素半抗原。

4. 一种权利要求 1 所述免疫磁珠的制备方法,其特征在于:以粒径 $2.8\ \mu\text{m}$ 的羧基磁珠为载体,羧基磁珠末端具有反应活性的羧基基团,在经过活化剂 EDC-NHS 组合处理后,活化磁珠可与 T-2 毒素单克隆抗体进行偶联,制备成能够富集净化 T-2 毒素的免疫磁珠。

5. 根据权利要求 4 所述免疫磁珠的制备方法,其特征在于:具体包括如下步骤:

(1) 清洗:取 $100\ \mu\text{L}$ 羧基磁珠于离心管中,用 $100\ \mu\text{L}$ 含 0.05% 吐温 -20 的 pH5.0、 25mmol/L 的 MES 溶液洗涤 2 次,磁分离后移除上清;

(2) 活化:用 4°C 贮存的 pH5.0、 25mmol/L MES 溶液分别配制 50mmol/L 的 EDC、NHS 溶液;分别加入 $50\ \mu\text{L}$ 新配制的 EDC 和 NHS 溶液到装有磁珠的离心管中,涡旋混匀,室温活化 30min,磁分离后移除上清,同 (1)MES 溶液洗涤 2-3 次;

(3) 偶联:将 T-2 毒素单克隆抗体溶解到 $60\ \mu\text{L}$ pH5.0、 25mmol/L MES 溶液中,用所述 MES 溶液调节总体积至 $100\ \mu\text{L}$,轻柔加入到已活化磁珠中,室温偶联 30min 或 4°C 偶联 2h,期间使磁珠保持混匀状态;

(4) 封闭:磁分离后移除上清,加入 $100\ \mu\text{L}$ 含 50mmol/L 乙醇胺的 pH8.0 的 PBS 溶液反应 15min 封闭磁珠;

(5) 保存:磁分离后移除上清,用 $100\ \mu\text{L}$ 含 0.1% - 0.3% 牛血清白蛋白、 0.1% 吐温 -20 的 PBS 溶液洗涤封闭好的磁珠 3-5 次,磁分离后移除上清,将磁珠复溶于含 0.1% - 0.5% 牛血清白蛋白、 0.01% - 0.1% 吐温 -20、 0.02% NaN_3 的 PBS 溶液中, $2-8^\circ\text{C}$ 保存备用。

6. 权利要求 1 所述免疫磁珠在富集净化 T-2 毒素中的应用。

富集 T-2 毒素的免疫磁珠及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及 T-2 毒素样本的富集净化处理工艺,具体涉及一种富集 T-2 毒素的免疫磁珠及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] T-2 毒素 (T-2toxin) 是 A 类单端孢霉烯族真菌毒素中毒性最强的一种,在自然界中广泛存在,其产生菌为镰孢菌属、木霉菌、胶枝霉菌和青霉菌等霉菌,主要污染小麦、大麦、玉米等谷物及其制品。T-2 毒素在动物体内代谢缓慢,主要危害造血组织和免疫器官,可造成免疫系统损伤及血液毒性,能够抑制动物细胞 DNA、RNA 及蛋白质合成,诱导细胞凋亡,引起白细胞缺乏等症状。人类误食大量污染该类毒素的谷物后,除表现呕吐、腹痛、腹泻等急性症状外,还可导致白细胞缺乏、坏死性咽喉炎、骨髓发育不良、食管和胃黏膜坏死等,严重的可导致死亡。我国 GB 21693-2008《配合饲料中 T-2 毒素的允许量》中规定猪配合饲料和禽配合饲料中 T-2 毒素的允许量 $\leq 1\text{mg/kg}$ 。

[0003] 目前食品中 T-2 毒素的主要提取方法包括有机溶剂萃取法、免疫亲和层析法等。有机溶剂萃取法是目前最普遍的提取方法,但有机溶剂的萃取存在过程复杂、毒性大、所需时间长等缺点,而且由于最终提取物中可能存在其他荧光物质、色素、结构类似物,从而对检测结果产生干扰;免疫亲和层析提高了试样的净化效果,同时可显著减少有毒有害试剂的使用,但样品前处理较复杂,所用设备价格昂贵,对操作人员的技术要求也比较高,不适合于大批量样本检测及大范围推广的应用。

[0004] 免疫磁珠分离技术 (Immunomagnetic bead-based separation, IMS) 是近年来发展起来的一项新的免疫学技术。免疫磁珠 (Immunomagnetic bead, IMB) 既可结合活性蛋白质抗体,又可被磁铁吸引,经过处理后,可将抗体结合在磁珠上,使之成为抗体的载体,磁珠上抗体与特异性抗原物质结合后,则形成抗原-抗体-磁珠免疫复合物,这种复合物在磁力作用下发生力学移动,使复合物与其它物质分离,而达到分离特异性抗原的目的。免疫磁珠 (IMB) 是一个平台,凡是利用抗原抗体结合原理进行工作的领域都可以应用,并且已在医学和生物学的骨髓移植、分离干细胞、细胞器、癌细胞、激素、病原菌以及毒素等方面取得了显著成绩。近年来 IMB 以其高度的敏感性和特异性被广泛应用于食品、水、生物样品、环境等标本中真菌毒素的分离和检测工作中,显示出良好的开发应用前景。

[0005] 在分离真菌毒素方面,IMB 可有效地收集、浓缩大量样品中的少量真菌毒素,可避免有机溶剂萃取法、免疫亲和层析法提取时存在的缺点。IMB 对目的毒素的富集具有高分离率、高特异性、高稳定性、无污染、无毒性、操作简便、样品用量少且不会破坏毒素结构等优点,与常规方法相比,不需要多加纯化步骤去除杂质,可直接对真菌毒素产生富集分离纯化的效果,并可在 2-5h 内完成。并且磁珠上偶联的抗体可准确识别真菌毒素上的特征基团,从而减少漏检,减少安全隐患。

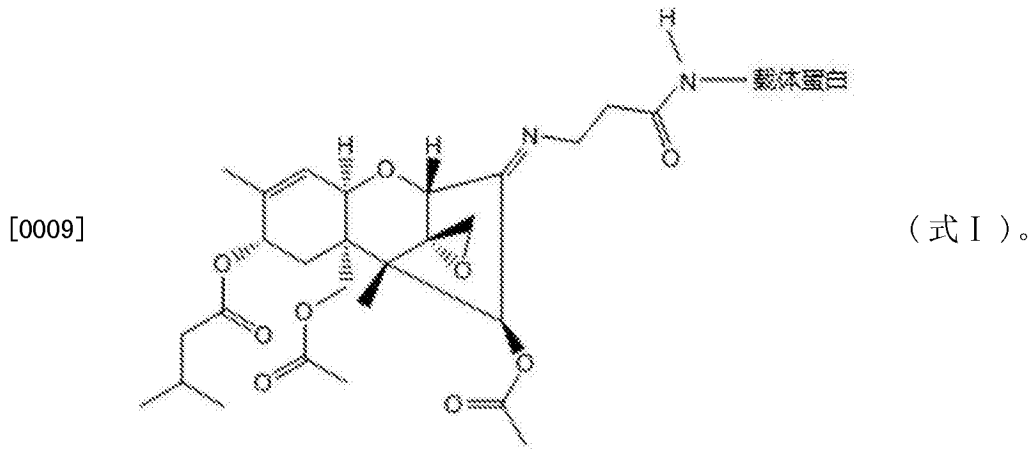
[0006] 本发明利用磁珠与抗体的偶联原理对可富集 T-2 毒素的免疫磁珠的制备工艺及应用条件进行了优化,大大提高了对 T-2 毒素的富集能力和检测灵敏度,同时凭借免疫磁

珠自身的快速方便、价格低廉的特点,将其应用于谷物及饲料中 T-2 毒素的分离与富集,可以进一步提高快速检测 T-2 毒素的效率。

发明内容

[0007] 本发明的目的是为了弥补现有技术存在的不足,提供一种富集 T-2 毒素的免疫磁珠及其制备方法和应用,以解决 T-2 毒素样品净化分离操作复杂、分离效率低、存在较大安全隐患的技术问题。

[0008] 为实现上述发明目的,本发明采取的技术方案是:提供一种富集 T-2 毒素的免疫磁珠,所述免疫磁珠上偶联有 T-2 毒素单克隆抗体;所述 T-2 毒素单克隆抗体是用 T-2 毒素人工抗原免疫白鼠所得到的;所述 T-2 毒素人工抗原是 T-2 毒素半抗原与载体蛋白的偶联物,其分子结构式如式 I 所示:



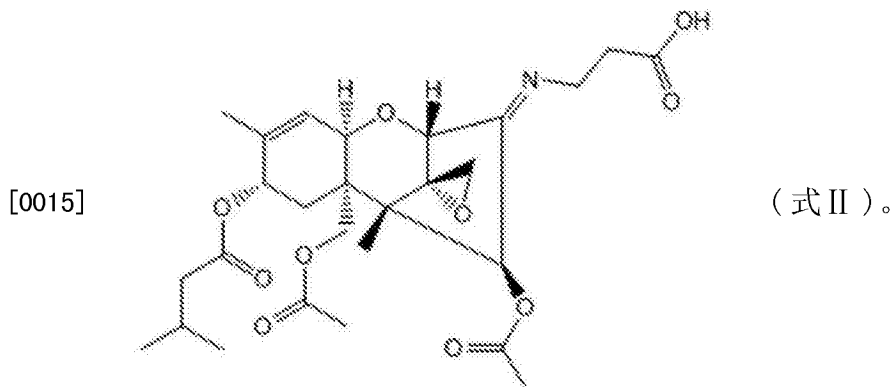
[0010] 所述 T-2 毒素人工抗原是按照如下方法制备得到的:

[0011] 将 12mg T-2 毒素半抗原溶于 1mL N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 中,将 30mg 二环己基碳二亚胺 (DCC) 和 30mg N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 溶于 0.2mL DMF 后加入半抗原溶液中,室温搅拌 24h,称为 A 液;

[0012] 将 50mg 载体蛋白溶于 3.8mL PBS 缓冲液 (pH 7.2) 中,称为 B 液;

[0013] 将 A 液加入到 B 液中,室温搅拌 24h,离心取上清液,将得到的产物透析,得到所述 T-2 毒素人工抗原。

[0014] 所述 T-2 毒素半抗原的分子结构式如式 II 所示:



[0016] 所述 T-2 毒素半抗原是按照如下方法制备得到的: I、将 100mg T-2 毒素加乙腈溶解,再加入 200 μL 乙酸和 200mg 重铬酸吡啶盐,70℃反应 4h,停止反应,旋蒸,除去乙腈,加

水-乙酸乙酯萃取,干燥,蒸干,上硅胶柱,用三氯甲烷/甲醇(10:1)洗脱分离,得到中间产物;II、将中间产物加3mL乙醇溶解后,再加入50mg碳酸钾和5mL含有200mg氨基丙酸的水溶液,60℃反应12h,停止反应,加水-乙酸乙酯萃取,除去有机相,水相加稀盐酸调节pH到4,加乙酸乙酯萃取,除去水相,有机相干燥蒸干,乙醚重结晶,得到T-2毒素半抗原。

[0017] 本发明还提供了一种上述免疫磁珠的制备方法,是以粒径2.8 μm的羧基磁珠为载体,羧基磁珠末端具有反应活性的羧基基团,在经活化剂EDC-NHS组合处理后,活化磁珠可与T-2毒素单克隆抗体进行偶联,制备成能够富集净化T-2毒素的免疫磁珠;

[0018] 上述免疫磁珠的制备方法具体描述如下:

[0019] (1) 清洗:取100 μL羧基磁珠于离心管中,用100 μL含0.05%吐温-20的pH5.0、25mmol/L的MES溶液洗涤2次,磁分离后移除上清;

[0020] (2) 活化:用4℃贮存的pH5.0、25mmol/L MES溶液分别配制50mmol/L的EDC、NHS溶液;分别加入50 μL新配制的EDC和NHS溶液到装有磁珠的离心管中,涡旋混匀,室温活化30min,磁分离后移除上清,同(1)MES溶液洗涤2-3次;

[0021] (3) 偶联:将T-2毒素单克隆抗体溶解到60 μL pH5.0、25mmol/L MES溶液中,用所述MES溶液调节总体积至100 μL,轻柔加入到已活化磁珠中,室温偶联30min或4℃偶联2h,期间使磁珠保持混匀状态;

[0022] (4) 封闭:磁分离后移除上清,加入100 μL含50mmol/L乙醇胺的pH8.0的PBS溶液反应15min封闭磁珠;

[0023] (5) 保存:磁分离后移除上清,用100 μL含0.1%-0.3%牛血清白蛋白(BSA)、0.1%吐温-20的PBS溶液洗涤封闭好的磁珠3-5次,磁分离后移除上清,将磁珠复溶于含0.1%-0.5% BSA、0.01%-0.1%吐温-20、0.02% NaN₃的PBS溶液中,2-8℃保存备用。

[0024] 本发明同时提供了上述免疫磁珠在富集净化T-2毒素中的应用。

[0025] 实验证明,本发明富集T-2毒素的免疫磁珠对T-2毒素有很高的富集率和回收率,对T-2毒素的富集率为40ng/mg(每毫克免疫磁珠可以捕获40ng T-2毒素),对T-2毒素的回收率达到85%以上。本发明富集T-2毒素的免疫磁珠可以高效、准确、可靠、快速、简便地把待检样品中的T-2毒素富集起来,以便进一步应用于化学分析仪器检测(HPLC,高效液相色谱法)、酶联免疫吸附法检测和胶体金测试条的快速测试,具有浓缩待测样品中T-2毒素浓度、提高检测下限、排除杂质干扰、提高检测准确性和可靠性、减少样品处理时间达到快速检测的优点。

附图说明

[0026] 图1 T-2毒素半抗原合成路线图

[0027] 图2 T-2毒素半抗原核磁共振氢谱图

具体实施方式

[0028] 下面结合附图和具体实施例进一步详细说明本发明。下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法;所使用的材料、试剂等,如无特殊说明,为可从商业途径得到的试剂和材料。

[0029] 实施例1 富集T-2毒素的免疫磁珠的制备

[0030] 本实施例给出了由 T-2 毒素单克隆抗体和含羧基的免疫磁珠偶联得到的偶联物作为富集 T-2 毒素的免疫磁珠的制备方法。该方法包括：

[0031] 一、T-2 毒素单克隆抗体的制备

[0032] 1、T-2 毒素半抗原的合成（合成路线见附图 1）及鉴定

[0033] 将 100mg T-2 毒素加乙腈溶解，再加入 200 μ L 乙酸和 200mg 重铬酸吡啶盐，70 $^{\circ}$ C 反应 4h，停止反应，旋蒸，除去乙腈，加水 - 乙酸乙酯萃取，干燥，蒸干，上硅胶柱，用三氯甲烷 / 甲醇 (10:1) 洗脱分离，得到中间产物。

[0034] 将上述中间产物加 3mL 乙醇溶解后，再加入 50mg 碳酸钾和 5mL 含有 200mg 氨基丙酸的水溶液，60 $^{\circ}$ C 反应 12h，停止反应，加水 - 乙酸乙酯萃取，除去有机相，水相加稀盐酸调节 pH 到 4，加乙酸乙酯萃取，除去水相，有机相干燥蒸干，乙醚重结晶，得到 T-2 毒素半抗原原。

[0035] 取上述半抗原经核磁共振氢谱鉴定，结果见附图 2。 $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3, 300\text{MHz}) \delta$: 11.0 (s, 1H, COOH), 5.37 (d, 1H, C = CH), 4.83 (s, 1H, CH-O), 4.43 (s, 1H, -CH-O-OC-), 4.13 (m, 2H, CH₂), 3.9 (d, 1H, CH), 3.29 (m, 1H, -CH-), 2.59 (m, 2H, -CH₂-), 1.69 (t, 2H, -CH₂-), 1.04 (s, 3H, -CH₃)。图谱中化学位移 $\delta = 11$ 的为羧基氢，化学位移 $\delta = 1.6$ 、2.3 的为氨基丙酸上的氢，说明间隔臂偶联成功，T-2 毒素半抗原结构正确。

[0036] 2、T-2 毒素人工抗原的合成及鉴定

[0037] 将 12mg T-2 毒素半抗原溶于 1mL DMF 中，将 30mg DCC 和 30mg NHS 溶于 0.2mL DMF 后加入半抗原溶液中，室温搅拌 24h，称为 A 液；

[0038] 将 50mg BSA 溶于 3.8mL PBS 缓冲液 (pH 7.2) 中，称为 B 液；

[0039] 将 A 液逐滴缓慢滴加到 B 液中，室温搅拌 24h，离心取上清液转移到透析袋中，用 0.01mol/L pH7.2 的 PBS 缓冲液于 4 $^{\circ}$ C 透析 3 天，每天换 3 次透析液；透析后，离心除去残余的沉淀，取上清液得到 T-2 毒素人工抗原，分装后 -20 $^{\circ}$ C 保存。

[0040] 按合成 T-2 毒素人工抗原反应所用半抗原、载体蛋白与偶联产物的比例，进行紫外 (200nm ~ 400nm) 扫描测定，通过比较三者分别在 260nm 和 280nm 的吸光值计算其结合比。偶联物 T-2 毒素半抗原 -BSA 的最大吸收峰与 T-2 毒素半抗原、BSA 的最大吸收峰相比发生了明显的变化，表明 T-2 毒素半抗原 -BSA 的合成是成功的。经计算，半抗原与 BSA 的结合比为 15:1。

[0041] 3、T-2 毒素单克隆抗体的制备

[0042] (1) 杂交瘤细胞的获得

[0043] 1) 首次免疫：将 T-2 毒素半抗原 -BSA 偶联物（免疫原）与等量的弗氏完全佐剂充分乳化，皮下注射 6 周龄的 Balb/c 小鼠，每只 0.2mL；

[0044] 2) 加强免疫两次：从首次免疫开始，每两周加强免疫一次，用弗氏不完全佐剂代替弗氏完全佐剂，方法和剂量同首次免疫；

[0045] 3) 最后一次加强免疫一周后眼底静脉采血测效价和抑制，有抑制且效价达到 1:10000 以上时进行如下末次免疫：腹腔注射不加任何佐剂的免疫原溶液 0.1mL，三天后处死小鼠，取其脾脏与骨髓瘤细胞融合；

[0046] 4) 采用间接竞争酶联免疫分析方法测定细胞上清液，筛选阳性孔。利用有限稀释法对阳性孔进行克隆化，得到并建立稳定分泌 T-2 毒素单克隆抗体的杂交瘤细胞株，取处

于对数生长期的杂交瘤细胞用冻存液制成细胞悬液,分装于冻存管,在液氮中长期保存。

[0047] (2) 单克隆抗体的制备

[0048] 1) 细胞复苏:取出 T-2 毒素单克隆抗体杂交瘤细胞株冻存管,立即放入 37℃ 水浴中速融,离心去除冻存液后,移入培养瓶内培养;

[0049] 2) 制备腹水与抗体纯化:采用体内诱生法,将 Ba1b/c 小鼠(8 周龄)腹腔注入灭菌石蜡油 0.5mL/只,7 天后腹腔注射杂交瘤细胞 5×10^5 个/只,7 天后采集腹水。用辛酸-饱和硫酸铵法进行纯化,得到 T-2 毒素单克隆抗体溶液(-20℃ 保存)。

[0050] (3) 单克隆抗体效价的测定

[0051] 用竞争 ELISA 法测定抗体的效价为 1:(10000 ~ 50000)。

[0052] 竞争 ELISA 方法:用 T-2 人工抗原包被酶标板,加入 T-2 标准品溶液、辣根过氧化物酶标记的 T-2 毒素单克隆抗体,25℃ 反应 10min,倒出孔内液体,用去离子水洗涤 3 ~ 5 次,用吸水纸拍干;加入底物显色液,25℃ 反应 5min 后,加入终止液终止反应;设定酶标仪于波长 450nm 处测定每孔吸光度值。

[0053] (4) 单克隆抗体特异性的测定

[0054] 抗体特异性是指它同特异性抗原结合的能力与同该类抗原类似物结合能力的比较,常用交叉反应率作为评价标准。交叉反应越小,抗体的特异性则越高。

[0055] 本实验将 T-2 毒素、赭曲霉毒素 A、黄曲霉毒素 B₁、黄曲霉毒素 M₁、呕吐毒素、玉米赤霉烯酮、展青霉素做系列稀释,分别与单克隆抗体进行竞争 ELISA,制作标准曲线,分析得到 IC₅₀,然后按下式计算交叉反应率:

[0056]

$$\text{交叉反应率}(\%) = \frac{\text{引起 50\%抑制的 T-2 毒素浓度}}{\text{引起 50\%抑制的其他真菌毒素浓度}} \times 100\%$$

[0057] 结果显示各类似物的交叉反应率为:T-2 毒素 100%、赭曲霉毒素 A < 1%、黄曲霉毒素 B₁ < 1%、黄曲霉毒素 M₁ < 1%、呕吐毒素 < 1%、玉米赤霉烯酮 < 1%、展青霉素 < 1%。本发明抗体对赭曲霉毒素 A、黄曲霉毒素 B₁、黄曲霉毒素 M₁、呕吐毒素、玉米赤霉烯酮、展青霉素等其他真菌毒素无交叉反应,只针对 T-2 毒素有特异性结合。

[0058] 二、免疫磁珠的制备

[0059] 该过程以粒径 2.8 μm 的羧基磁珠为载体,羧基磁珠末端具有反应活性的羧基基团,在经活化剂 EDC-NHS 组合处理后,活化磁珠可与 T-2 毒素单克隆抗体进行偶联,制备成能够富集净化 T-2 毒素的免疫磁珠。具体步骤如下:

[0060] (1) 清洗:取 100 μL 羧基磁珠(购于 DYNAL,粒径为 2.8 μm,含量是 0.15eq/g)于离心管中,用 100 μL 含 0.05%吐温-20 的 pH5.0、25mmol/L 的 MES 溶液洗涤 2 次,磁分离后移除上清;

[0061] (2) 活化:用 4℃ 贮存的 pH5.0、25mmol/L MES 溶液分别配制 50mmol/L 的 EDC、NHS 溶液;分别加入 50 μL 新配制的 EDC 和 NHS 溶液到装有磁珠的离心管中,涡旋混匀,室温活化 30min,磁分离后移除上清,同(1)MES 溶液洗涤 2-3 次;

[0062] (3) 偶联:将 T-2 毒素单克隆抗体溶解到 60 μL pH5.0、25mmol/L MES 溶液中,用所述 MES 溶液调节总体积至 100 μL,轻柔加入到已活化磁珠中,室温偶联 30min 或 4℃ 偶联 2h,期间使磁珠保持混匀状态;

[0063] (4) 封闭:磁分离后移除上清,加入 100 μ L 含 50mmol/L 乙醇胺的 pH8.0 的 PBS 溶液反应 15min 封闭磁珠;

[0064] (5) 保存:磁分离后移除上清,用 100 μ L 含 0.1% -0.3% BSA、0.1% 吐温-20 的 PBS 溶液洗涤封闭好的磁珠 3-5 次,磁分离后移除上清,将磁珠复溶于含 0.1% -0.5% BSA、0.01% -0.1% 吐温-20、0.02% NaN₃ 的 PBS 溶液(浓度为 10mg/mL)中,2-8℃ 保存备用。

[0065] 实施例 2 免疫磁珠的特性检测

[0066] 取按照实施例 1 制备的富集 T-2 毒素的免疫磁珠 0.1mL(浓度为 10mg/mL)于 10mL 离心管中,用 5mL 去离子水润洗磁珠 2 次,磁分离后移除上清;然后加入 1mL 待测样品(将 T-2 毒素标准品用 PBS 缓冲液分别配制成浓度为 10ng/mL、20ng/mL、30ng/mL、40ng/mL、50ng/mL、60ng/mL 的 T-2 毒素溶液作为待测样品,并以 PBS 缓冲液作为空白待测样品),混匀,25℃ 捕获 20min,期间 5min 混匀一下磁珠;磁分离后移除上清,用 5mL 去离子水润洗磁珠 2 次,除去干扰杂质。最后加入 1mL 甲醇洗脱,收集洗脱液,用 HPLC 法按照 GB/T28718-2012 检测待测样品中 T-2 毒素的含量。结果见表 1。

[0067] 表 1 免疫磁珠的特性检测结果

[0068]

标准品量 (ng)	0	10	20	30	40	50	60
检测结果 (ng)	0	9.35	18.36	26.76	36.12	36.95	42.36
回收率 (%)	—	93.5	91.8	89.2	90.3	73.9	70.6

[0069] 结果表明:①空白待测样品用洗脱液洗脱,未检出 T-2 毒素;②当标准品量在 10ng ~ 40ng 之间时,用洗脱液洗脱出的 T-2 毒素分别为 9.35ng、18.36ng、26.76ng、36.12ng,回收率均达到了 85% 以上;③当标准品量大于 40ng 时,免疫磁珠偶联上的 T-2 毒素趋向饱和,回收率反而下降。说明富集 T-2 毒素的免疫磁珠对 T-2 毒素的富集率为 40ng/mg(每毫克免疫磁珠可以捕获 40ng T-2 毒素),对 T-2 毒素的回收率达到 85% 以上。

[0070] 实施例 3 免疫磁珠的使用方法

[0071] 1、样品前处理

[0072] 谷物、饲料样品:用均质器均质样品;称取 5g(精确到 0.01g)样品至样品瓶中,加入 1.5g 氯化钠和 30mL 60% 甲醇溶液,用涡旋仪涡旋 5min,或者摇床震荡 20min,3000g 以上,室温(20-25℃ /68-77 ℉)离心 5min;吸取 5mL 离心上清液,加入 5mL 去离子水,混匀,待用。

[0073] 2、免疫磁珠捕获

[0074] 取 T-2 毒素免疫磁珠 0.2mL 于 10mL 离心管中,用 5mL 去离子水润洗 2 次,每次用磁分离架分离洗液(每次在磁分离架上静置 3min,确保磁珠全部吸附);向润洗好的 T-2 毒素免疫磁珠中加入处理好的样品 5mL,混匀,25℃ 捕获 20min,期间 5min 混匀一下磁珠;用磁分离架分离免疫磁珠,用 5mL 去离子水润洗免疫磁珠 2 次(方法同前)。

[0075] 3、免疫磁珠洗脱

[0076] 用 1mL 甲醇洗免疫磁珠,混匀,静置 1min,用磁分离架分离免疫磁珠,回收甲醇液,即为富集净化后的 T-2 毒素样品,可应用于化学分析仪器检测(HPLC,高效液相色谱法)、酶联免疫吸附法检测或胶体金测试条的快速测试。

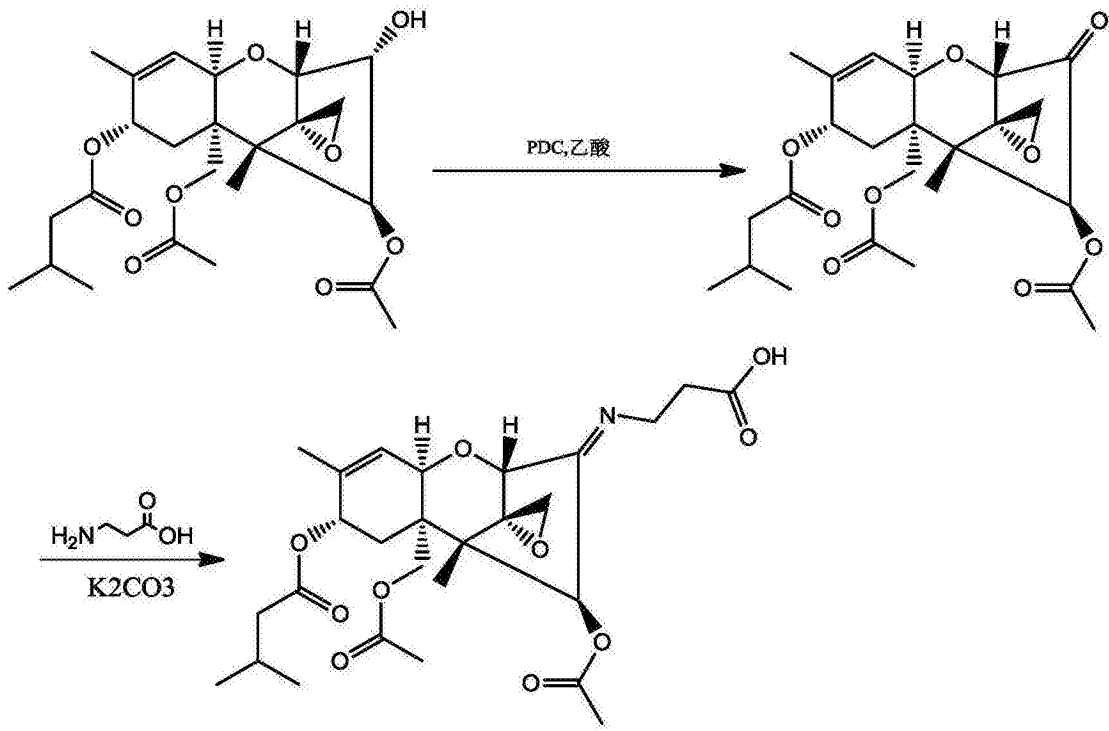


图 1

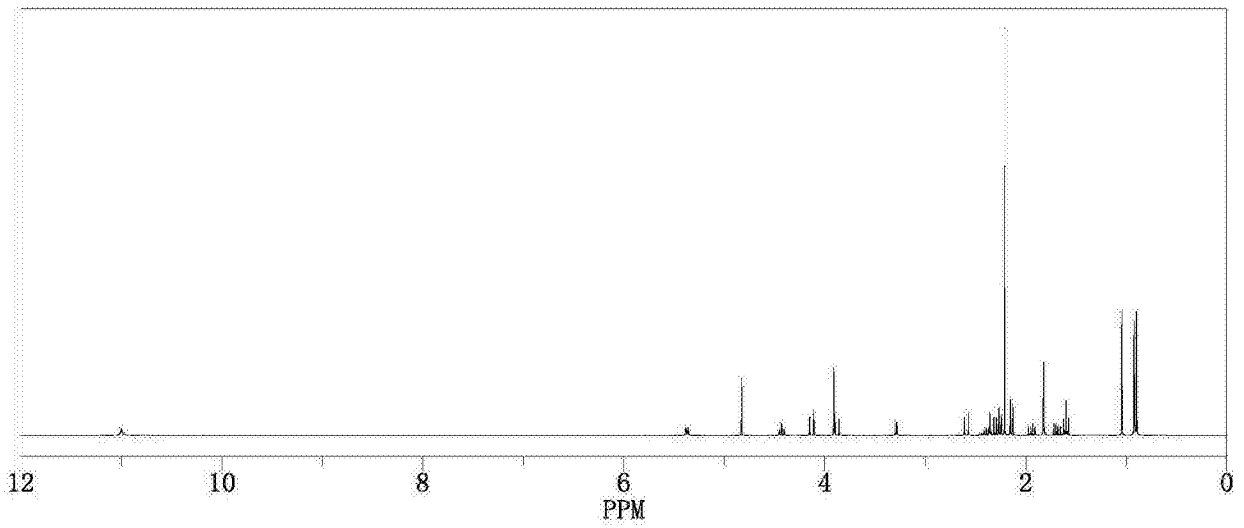


图 2

专利名称(译)	富集T-2毒素的免疫磁珠及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN105301253A	公开(公告)日	2016-02-03
申请号	CN201510563063.2	申请日	2015-09-07
[标]申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
[标]发明人	罗晓琴 张颖 龙光宗 马腊腊 崔海峰 何方洋 徐念琴 崔廷婷		
发明人	罗晓琴 张颖 龙光宗 马腊腊 崔海峰 何方洋 徐念琴 崔廷婷		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/577		
其他公开文献	CN105301253B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种富集T-2毒素的免疫磁珠及其制备方法和应用，它是以羧基磁珠为载体，T-2毒素单克隆抗体为识别中间体，经过活化-偶联-洗涤-封闭的过程制备出偶联有T-2毒素单克隆抗体的免疫磁珠，在合适的缓冲液中于一定条件下孵育可以高效捕捉、富集检测样本中的T-2毒素。本发明富集T-2毒素的免疫磁珠具有浓缩待测样品中T-2毒素浓度、提高检测下限、排除杂质干扰、提高检测准确性和可靠性、减少样品处理时间达到快速检测的优点。

$$\text{交叉反应率}(\%) = \frac{\text{引起50\%抑制的T-2毒素浓度}}{\text{引起50\%抑制的其他真菌毒素浓度}} \times 100\%$$