



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103969431 A

(43) 申请公布日 2014. 08. 06

(21) 申请号 201410220924. 2

(22) 申请日 2014. 05. 23

(71) 申请人 广东海洋大学

地址 524000 广东省湛江市麻章区湖光岩东
广东海洋大学

(72) 发明人 王雅玲 吴朝金 孙力军 邱妹
徐德峰 刘颖

(74) 专利代理机构 广州市南锋专利事务所有限
公司 44228

代理人 刘广生

(51) Int. Cl.

G01N 33/531 (2006. 01)

G01N 33/551 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书7页

(54) 发明名称

一种用于隐蔽态 T-2 毒素富集净化的免疫磁珠的制备及应用

(57) 摘要

本发明涉及一种用于隐蔽态 T-2 毒素富集净化的免疫磁珠的制备及应用,它是以羧基磁珠为载体,抗 T-2 毒素母核多克隆抗体为识别中间体,经过活化-偶联-洗涤-封阻的过程制备出抗 T-2 毒素母核多克隆抗体免疫磁珠,在合适的缓冲液中于一定条件下孵育可以高效捕捉、富集检测样本中的隐蔽态 T-2 毒素。该方法特异性强,高效快速,操作简单,价格低廉,不需要大型仪器和特殊培训的专业操作人员,样品不需要特殊前处理,可广泛应用于食品、饲料及动物机体内隐蔽态 T-2 毒素的富集分离与检测。

1. 一种用于隐蔽态 T-2 毒素富集的 T-2 毒素母核抗体免疫磁珠的制备方法,其特征在于:包括如下步骤:以 500nm 粒径的羧基磁珠为载体,羧基磁珠末端具有有反应活性的羧基基团,在经过适量活化剂 EDC-NHS 组合处理后,活化磁珠可与抗 T-2 毒素母核的多克隆抗体进行偶联,制备成能够富集隐蔽态 T-2 毒素的免疫磁珠;

具体方法为:

(1)清洗: 分别取 0.4mg 羧基磁珠于 2mL 离心管中,500 μ L PBT 洗 2 次,洗涤后用 250 μ L PB 缓冲液超声分散重悬;

(2)活化: 分别加入 250 μ L 用 PB 缓冲液配制的活化剂 EDC 和 NHS,37 $^{\circ}$ C 活化 2h,保持悬浮状态;

(3)偶联: 磁分离,吸去上清液,同上 PBT 缓冲液洗涤三次,超声重悬,再分别将 200 μ g 的 T-2 毒素母核抗体加入到已活化磁珠中,37 $^{\circ}$ C 偶联 3h,15r/min 旋转保持悬浮状态;

(4)封闭: 磁分离,取出上清液,加入 100 μ L 的乙醇胺溶液和 BSA 封闭液,37 $^{\circ}$ C 封闭 2h,保持悬浮状态;

(5)保存: 用 PBT 洗涤磁珠 3 次,磁分离,弃上清液,用 250 μ L PB 重悬,存于 4 $^{\circ}$ C。

2. 根据权利要求 1 所述的一种用于隐蔽态 T-2 毒素富集的 T-2 毒素母核抗体免疫磁珠的制备方法,其特征在于:所述的 PBT 浓度为 0.02 mol/L, pH 7.4, 含 0.05% 吐温 -20。

3. 根据权利要求 1 所述的一种用于隐蔽态 T-2 毒素富集的 T-2 毒素母核抗体免疫磁珠的制备方法,其特征在于:所述的 PB 缓冲液浓度为 0.02 mol/L, pH 7.4。

4. 根据权利要求 1 所述的一种用于隐蔽态 T-2 毒素富集的 T-2 毒素母核抗体免疫磁珠的制备方法,其特征在于:所述的活化剂 EDC 和 NHS, 浓度均为 1-5 mg/mL, 用活化缓冲液 PB 溶解,添加顺序为先加入 EDC, 混匀后加入 NHS, 震荡均匀。

5. 根据权利要求 1 所述的一种用于隐蔽态 T-2 毒素富集的 T-2 毒素母核抗体免疫磁珠的制备方法,其特征在于:所述的偶联所用的偶联缓冲液为 pH 7.0 ~ 7.6, 0.01 ~ 0.1 mol/L 的 PB 缓冲液。

6. 根据权利要求 1 所述的一种用于隐蔽态 T-2 毒素富集的 T-2 毒素母核抗体免疫磁珠的制备方法,其特征在于:所述的 PBT 缓冲液为含 0.05% Tween-20 的 pH 7.0 ~ 7.6, 0.01 ~ 0.1 mol/L 的缓冲液。

7. 根据权利要求 1 所述的一种用于隐蔽态 T-2 毒素富集的 T-2 毒素母核抗体免疫磁珠的制备方法,其特征在于:所述的封闭液为以 PB 缓冲液配制 5%BSA 溶液或 5% 脱脂奶。

8. 根据权利要求 1 所述的一种用于隐蔽态 T-2 毒素富集的 T-2 毒素母核抗体免疫磁珠的制备方法,其特征在于:所述的免疫磁珠的富集净化隐蔽态 T-2 毒素富样本的方法,包括以下步骤:

(1) 样本中隐蔽态 T-2 毒素的提取

取样本溶于甲醇,充分提取,提取液经过浓缩过滤后以 PB 缓冲液稀释;

(2) 将上述步骤制得的免疫磁珠,磁分离,弃上清,加入捕获缓冲液,满足最大限度捕获样品中的隐蔽态 T-2 毒素;轻摇重悬,磁分离,弃上清;加入稀释后的隐蔽态 T-2 毒素样本,旋转重悬,37 $^{\circ}$ C 下,旋转捕获 2h;免疫磁珠捕获隐蔽态 T-2 毒素完成后,再经磁分离,从而实现隐蔽态 T-2 毒素样本的富集净化;去除磁分离后的上清,沉淀即为捕获了隐蔽态 T-2 毒素的免疫磁珠;

(3) 免疫磁珠的洗脱

步骤(2)中得到的免疫磁珠中加入洗脱液进行洗脱,室温震荡,磁性分离,上清即为富集净化后的隐蔽态 T-2 毒素样本。

9. 根据权利要求 8 所述的一种用于隐蔽态 T-2 毒素富集的 T-2 毒素母核抗体免疫磁珠的制备方法,其特征在于:所述的捕获缓冲液为 pH 7.4 ,0.02 mol/L 的含甲醇 10% 的 PB 缓冲液。

10. 根据权利要求 8 所述的一种用于隐蔽态 T-2 毒素富集的 T-2 毒素母核抗体免疫磁珠的制备方法,其特征在于:所述洗脱液采用无水甲醇,浓度为 5-20 mg/mL,洗脱后在室温下震荡 1-3 分钟。

一种用于隐蔽态 T-2 毒素富集净化的免疫磁珠的制备及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及隐蔽态 T-2 毒素(Masked T-2 toxin)样本的净化处理工艺,具体涉及一种用于净化隐蔽态 T-2 毒素样本的免疫磁珠及其制备、应用方法。

背景技术

[0002] 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。

[0003] 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。传统的真菌毒素净化方法,存在很大的安全问题,不仅需要使用大量的有毒有机溶剂进行提取检测,而且纯化过程操作比较繁琐,需要操作者实时操作,带来了很大的安全隐患;同时,传统的纯化方法对样品的粗提要求较高,以免疫亲和柱为例,亲和柱很容易因为样品颗粒较大而造成堵塞,纯化前需过 0.2 或 0.45 μm 的滤膜,这些因素也导致了以免疫亲和柱进行纯化,毒素的回收率较低。而以免疫磁珠进行纯化,却可避免这些问题。IMB 对目的毒素的富集具有明显的特点,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。与常规方法相比,IMS 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隐蔽态真菌毒素上的特征基团,从而减少漏检,减少安全隐患。

[0004] 近年来,免疫磁珠技术对真菌毒素分离的研究主要集中在黄曲霉毒素上,如酱油和植物油内黄曲霉毒素 B₁ 的富集检测。根据免疫磁珠的制备原理,首先要制备这些毒素的单克隆抗体或多克隆抗体,然后将抗体与磁珠偶联,从而对真菌毒素进行分离。因此,免疫磁珠的分离效果(准确度和灵敏度)直接受到抗体纯度的影响。本发明提及的隐蔽态 T-2 毒素免疫磁珠制备的原理是利用暴露了 T-2 毒素母核的抗原免疫新西兰种兔子,五次加强免疫制备得到的 T-2 毒素母核抗体,具有可特异性识别 T-2 毒素母核能力,因此 T-2 毒素母核抗体能够识别具有母核结构的隐蔽态 T-2 毒素。将 T-2 毒素母核抗体与磁珠偶联制成免疫磁珠便可以用于分离隐蔽态 T-2 毒素。同时,磁珠的制备及纯化的技术现已成熟,为高质量低成本的免疫磁珠制备提供了条件。

[0005] 中国专利,公开号: CN102426229A,一种用于富集金黄色葡萄球菌的人 IgG 免疫磁珠的制备方法及应用,它是以磁珠为载体,人 IgG 为识别中间体,经过活化-偶联-洗

涤-封阻的过程制备出人 IgG 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、富集检测样本中的金黄色葡萄球菌。该方法能富集并检测金黄色葡萄球菌,但是不能用于检测 T-2 毒素。

[0006] 目前,虽有利用免疫磁珠富集分离黄曲霉毒素的报道,但是免疫磁珠在 T-2 毒素上的应用,特别是在隐蔽态 T-2 毒素上的应用却未见报道。本发明利用磁珠与抗体的偶联原理对可用于富集隐蔽态 T-2 毒素的免疫磁珠的制备工艺及富集应用条件进行了优化,大大提高了对隐蔽态 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,将其应用于食品、饲料和对虾中的隐蔽态 T-2 毒素的分离与富集,可以进一步提高快速检测隐蔽态 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,提供一种用于隐蔽态 T-2 毒素富集净化的免疫磁珠的制备、应用方法,以解决隐蔽态 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。磁珠经过适量活化剂(EDC-NHS 组合)处理后与 T-2 毒素母核抗体在合适的条件下进行偶联,制成 T-2 毒素母核抗体免疫磁珠,将 T-2 毒素母核抗体免疫磁珠加入待测经过前处理的样品中,在一定的条件下捕获隐蔽态 T-2 毒素。

[0008] 为实现上述发明目的,本发明采取的技术方案是:

以 500nm 粒径的羧基磁珠为载体,羧基磁珠末端具有有反应活性的羧基(可与蛋白质反应)基团,在经过适量活化剂(EDC-NHS 组合)处理后,活化磁珠可与抗 T-2 毒素母核的多克隆抗体进行偶联,制备成能够富集隐蔽态 T-2 毒素的免疫磁珠;

一种制备上述免疫磁珠的具体方法为:

(1)清洗:分别取 0.4mg 羧基磁珠于 2 mL 离心管中,500 μ L PBT(0.02 mol/L, pH 7.4, 含 0.05% 吐温-20)洗 2 次,洗涤后用 250 μ L PB 缓冲液(0.02 mol/L, pH 7.4)超声分散重悬;

(2)活化:分别加入 250 μ L 用 PB 缓冲液(0.02 mol/L, pH 7.4)配制的 EDC 和 NHS, 37 $^{\circ}$ C 活化 2h, 保持悬浮状态;

(3)偶联:磁分离,吸去上清液,同上 PBT 缓冲液洗涤三次,超声重悬。再分别将 200 μ g 的 T-2 毒素母核抗体加入到已活化磁珠中,37 $^{\circ}$ C 偶联 3h, 15 r/min 旋转保持悬浮状态;

(4)封闭:磁分离,取出上清液(上清液中的蛋白含量待检),加入 100 μ L 的乙醇胺溶液和 BSA 封闭液,37 $^{\circ}$ C 封闭 2h, 保持悬浮状态;

(5)保存:同上 PBT 洗涤磁珠 3 次,磁分离,弃上清液,用 250 μ L PB 缓冲液(0.02 mol/L, pH 7.4, 含 0.02% NaN_3 和 0.5% BSA)重悬,存于 4 $^{\circ}$ C。

[0009] 上述步骤中所述活化剂:EDC 和 NHS, 浓度均为 1-5 mg/mL, 用活化缓冲液溶解, 添加顺序为先加入 EDC, 混匀后加入 NHS, 震荡均匀;

上述制备免疫磁珠的方法中,偶联缓冲液优选 pH 7.4, 0.02 mol/L 的 PB 缓冲液;洗涤液优选含 0.05% Tween-20 的 pH 7.4, 0.02 mol/L 的 PBT 缓冲液;活化剂以 PB 缓冲液配制;封闭液优选以 PB 缓冲液配制的 5% BSA 溶液;

基于上述免疫磁珠的富集净化隐蔽态 T-2 毒素富样本的方法,包括以下步骤:

(1) 样本中隐蔽态 T-2 毒素的提取

取样本溶于甲醇,充分提取,提取液经过浓缩过滤后以 PB 缓冲液稀释;

(2) 将上述步骤制得的免疫磁珠,磁分离,弃上清,加入捕获缓冲液,满足最大限度捕获样品中的隐蔽态 T-2 毒素;轻摇重悬,磁分离,弃上清;加入稀释后的隐蔽态 T-2 毒素样本,旋转重悬,37 °C 下,旋转捕获 2 h;免疫磁珠捕获隐蔽态 T-2 毒素完成后,再经磁分离,从而实现隐蔽态 T-2 毒素样本的富集净化;去除磁分离后的上清,沉淀即为捕获了隐蔽态 T-2 毒素的免疫磁珠;

本步骤中采用的捕获缓冲液优选为 pH 7.4,0.02 mol/L 的含甲醇 10% 的 PB 缓冲液;

(3) 免疫磁珠的洗脱

步骤(2)中得到的免疫磁珠中加入洗脱液进行洗脱,室温震荡,磁性分离,上清即为富集净化后的隐蔽态 T-2 毒素样本;

上述步骤中,免疫磁珠富集净化隐蔽态 T-2 毒素的最佳反应条件为,37 °C 下, pH 7.4,

0.02 mol/L 的含甲醇 10% 的 PB 缓冲液中旋转捕获 2 h;

上述步骤中,洗脱液采用无水甲醇,免疫磁珠在洗脱液中的浓度采用 5-20 mg/mL;室温震荡 1-3 分钟为宜;

偶联缓冲液采用 pH 7.4,0.02 mol/L 的含甲醇 10% 的 PB 缓冲液,洗涤液采用含 0.05% Tween-20 的 pH 7.4,0.02 mol/L 的 PBT 缓冲液。

[0010] 本发明相对于现有技术的有益效果是:

本发明首次将活化剂(EDC 和 NHS)活化后的磁珠应用于 T-2 毒素母核抗体免疫磁珠的制备,根据具有母核结构的隐蔽态 T-2 毒素与免疫磁珠上 T-2 毒素母核抗体特异性结合的原理富集隐蔽态 T-2 毒素,特异性强,高效快速,提高了隐蔽态 T-2 毒素的净化效率。目前羧基磁珠的制备已经商品化,纯度高,性能稳定,成本低廉;制备出的免疫磁珠稳定性好,分离效率高,价格低。本发明采用的方法可以在很短的时间内将样品中的隐蔽态 T-2 毒素富集。利用 T-2 毒素母核抗体免疫磁珠富集隐蔽态 T-2 毒素,避免了常规有机溶剂提取方法中隐蔽态 T-2 毒素逃避分离纯化与检测的危害,并且本身与磁场力学相结合应用,无需进行提取后的纯化步骤,操作简便可行。本发明用于隐蔽态 T-2 毒素富集的 T-2 毒素母核抗体免疫磁珠的制备方法操作简单,不需要大型仪器和特殊培训的专业人员,样品不需要特殊前处理,可广泛应用于食品、饲料以及动物机体内隐蔽态 T-2 毒素的富集分离。

具体实施方式

[0011] 下面通过实施例对本发明做进一步详细说明,这些实施例仅用来说明本发明,并不限制本发明的范围,本发明具体实施方式是通过制备和应用两方面进行实施的。

[0012] 实施例 1

一、抗 T-2 毒素母核抗体免疫磁珠的制备:

1. 取磁珠放入离心管中,加入活化缓冲液洗涤磁珠,反复三次,每次间隔 3 分钟,除去活化缓冲液后加入活化剂 EDC 和 NHS 各 250 μ L,混匀,于 37 °C 重悬旋转孵育 2 小时,进行磁珠活化;

2. 用偶联缓冲液洗涤磁珠三遍,每次间隔 3 分钟,加入 T-2 毒素母核抗体,混匀,于 37 °C 重悬旋转孵育 3 小时,制备成 T-2 毒素母核抗体免疫磁珠;

3. 用洗涤缓冲液洗涤免疫磁珠反复三次,每次间隔 3 分钟。用封阻缓冲液于 37 °C 重悬旋转孵育 2 小时,置于保存缓冲液中 4°C 保存待用;

4. 按照国标法的样品前处理方法处理样品,取 T-2 毒素母核抗体免疫磁珠加入样品中,混匀,于 37 °C 重悬旋转孵育 2 小时,使得免疫磁珠与样品充分接触,于磁力架上对隐蔽态 T-2 毒素进行富集;

二、抗 T-2 毒素母核抗体免疫磁珠对样品中隐蔽态 T-2 毒素富集的应用:

以无菌吸管吸取 2 mL 液体类食品样品至 20 mL 磷酸盐缓冲液(含 10% 甲醇)中,充分混匀,制成样品匀液。将免疫磁珠加入合适浓度的样品中,充分混匀后于 37 °C 孵育 2 小时,作用完毕后,置于磁力架上捕获磁珠,除去上清液,以无水甲醇解离出免疫磁珠上的隐蔽态 T-2 毒素,将得到的甲醇洗脱液氮吹浓缩,所得样即为纯化后的隐蔽态 T-2 毒素(样品冻存,留待利用 LC-MS/MS 和 ELISA 对隐蔽态 T-2 毒素进行鉴定检测)。

[0013] 实施例 2

一、抗 T-2 毒素母核抗体免疫磁珠的制备:

1. 取磁珠放入离心管中,加入活化缓冲液洗涤磁珠反复三次,每次间隔 4 分钟,除去活化缓冲液后加入活化剂 EDC 和 NHS 各 200 μ L,混匀,于 37 °C 重悬旋转孵育 2 小时,进行磁珠活化;

2. 用偶联缓冲液洗涤磁珠三遍,每次间隔 4 分钟,加入 T-2 毒素母核抗体,混匀,于 37 °C 重悬旋转孵育 3 小时,制备成 T-2 毒素母核抗体免疫磁珠;

3. 用洗涤缓冲液洗涤免疫磁珠反复三次,每次间隔 4 分钟。用封阻缓冲液于 37 °C 重悬旋转孵育 2 小时,置于保存缓冲液中 4 °C 保存待用;

4. 按照国标法的样品前处理方法处理样品,取 T-2 毒素母核抗体免疫磁珠加入样品中,混匀,于 37 °C 重悬旋转孵育 2 小时,使得免疫磁珠与样品充分接触,于磁力架上对隐蔽态 T-2 毒素进行富集;

二、抗 T-2 毒素母核抗体免疫磁珠对样品中隐蔽态 T-2 毒素富集的应用:

称取 2 g 半固体类食品待测样品至 20 mL 磷酸盐缓冲液(含 10% 甲醇)中,8 000 r/min ~ 10 000 r/min 均质 1 ~ 2 分钟,制成样品匀液。将 T-2 毒素母核抗体免疫磁珠加入经处理的样品中,充分混匀后于 37 °C 孵育 2 小时,置于磁力架上捕获磁珠,除去上清液,以无水甲醇解离出免疫磁珠上的隐蔽态 T-2 毒素,将得到的甲醇洗脱液氮吹浓缩,所得样即为纯化后的隐蔽态 T-2 毒素(样品冻存,留待利用 LC-MS/MS 和 ELISA 对隐蔽态 T-2 毒素进行鉴定检测)。

[0014] 实施例 3

一、抗 T-2 毒素母核抗体免疫磁珠的制备:

1. 取磁珠放入离心管中,加入活化缓冲液洗涤磁珠反复三次,每次间隔 5 分钟,除去活化缓冲液后加入活化剂 EDC 和 NHS 各 180 μ L,混匀,于 37 °C 重悬旋转孵育 2 小时,进行磁珠活化;

2. 用偶联缓冲液洗涤磁珠三遍,每次间隔 4 分钟,加入 T-2 毒素母核抗体,混匀,于 37 °C 重悬旋转孵育 3 小时,制备成 T-2 毒素母核抗体免疫磁珠;

3. 用洗涤缓冲液洗涤免疫磁珠反复三次,每次间隔 5 分钟。用封阻缓冲液于 37 °C 重悬旋转孵育 2 小时,置于保存缓冲液中 4 °C 保存待用;

4. 按照国标法的样品前处理方法处理样品,取 T-2 毒素母核抗体免疫磁珠加入样品中,混匀,于 37 °C 重悬旋转孵育 2 小时,使得免疫磁珠与样品充分接触,于磁力架上对隐蔽态 T-2 毒素进行富集。

[0015] 二、抗 T-2 毒素母核抗体免疫磁珠对样品中隐蔽态 T-2 毒素富集的应用:

称取 2 g 固体类食品待测样品至 20 mL 磷酸盐缓冲液(含 10% 甲醇)中,8 000 r/min ~ 10 000 r/min 均质 1 ~ 2 分钟,制成样品匀液。将 T-2 毒素母核抗体免疫磁珠加入经处理的样品中,充分混匀后于 37 °C 孵育 2 小时,置于磁力架上捕获磁珠,除去上清液,以无水甲醇解离出免疫磁珠上的隐蔽态 T-2 毒素,将得到的甲醇洗脱液氮吹浓缩,所得样即为纯化后的隐蔽态 T-2 毒素(样品冻存,留待利用 LC-MS/MS 和 ELISA 对隐蔽态 T-2 毒素进行鉴定检测)。

[0016] 实施例 4

一、抗 T-2 毒素母核抗体免疫磁珠的制备:

1. 取磁珠放入离心管中,加入活化缓冲液洗涤磁珠反复三次,每次间隔 3 分钟,除去活化缓冲液后加入活化剂 EDC 和 NHS 各 220 μL,混匀,于 37 °C 重悬旋转孵育 1.5 小时,进行磁珠活化;

2. 用偶联缓冲液洗涤磁珠三遍,每次间隔 3 分钟,加入 T-2 毒素母核抗体,混匀,于 37 °C 重悬旋转孵育 2.5 小时,制备成 T-2 毒素母核抗体免疫磁珠;

3. 用洗涤缓冲液洗涤免疫磁珠反复三次,每次间隔 4 分钟。用封阻缓冲液于 37 °C 重悬旋转孵育 1.5 小时,置于保存缓冲液中 4 °C 保存待用;

4. 按照国标法的样品前处理方法处理样品,取 T-2 毒素母核抗体免疫磁珠加入样品中,混匀,于 37 °C 重悬旋转孵育 2 小时,使得免疫磁珠与样品充分接触,于磁力架上对隐蔽态 T-2 毒素进行富集;

二、抗 T-2 毒素母核抗体免疫磁珠对样品中隐蔽态 T-2 毒素富集的应用:

以无菌吸管吸取 2 mL 液体类饲料待测样品至 20 mL 磷酸盐缓冲液(含 10% 甲醇)中,充分混匀,制成样品匀液。将免疫磁珠加入合适浓度的样品中,充分混匀后于 37 °C 孵育 2 小时。作用完毕后,置于磁力架上捕获磁珠,除去上清液,以无水甲醇解离出免疫磁珠上的隐蔽态 T-2 毒素,将得到的甲醇洗脱液氮吹浓缩,所得样即为纯化后的隐蔽态 T-2 毒素(样品冻存,留待利用 LC-MS/MS 和 ELISA 对隐蔽态 T-2 毒素进行鉴定检测)。

[0017] 实施例 5

一、抗 T-2 毒素母核抗体免疫磁珠的制备:

1. 取磁珠放入离心管中,加入活化缓冲液洗涤磁珠反复三次,每次间隔 4 分钟,除去活化缓冲液后加入活化剂 EDC 和 NHS 各 250 μL,混匀,于 37 °C 重悬旋转孵育 3 小时,进行磁珠活化;

2. 用偶联缓冲液洗涤磁珠三遍,每次间隔 4 分钟,加入 T-2 毒素母核抗体,混匀,于 37 °C 重悬旋转孵育 3 小时,制备成 T-2 毒素母核抗体免疫磁珠;

3. 用洗涤缓冲液洗涤免疫磁珠反复三次,每次间隔 4 分钟。用封阻缓冲液于 37 °C 重悬旋转孵育 3 小时,置于保存缓冲液中 4 °C 保存待用;

4. 按照国标法的样品前处理方法处理样品,取 T-2 毒素母核抗体免疫磁珠加入样品中,混匀,于 37 °C 重悬旋转孵育 3 小时,使得免疫磁珠与样品充分接触,于磁力架上对隐蔽

态 T-2 毒素进行富集；

二、抗 T-2 毒素母核抗体免疫磁珠对样品中隐蔽态 T-2 毒素富集的应用：

称取 2g 半固体类饲料待测样品至 20 mL 磷酸盐缓冲液(含 10% 甲醇)中, 8 000 r/min ~ 10 000 r/min 均质 1 ~ 2 分钟, 充分混匀, 制成样品匀液。将免疫磁珠加入合适浓度的样品中, 充分混匀后于 37 °C 孵育 2 小时, 作用完毕后, 置于磁力架上捕获磁珠, 除去上清液, 以无水甲醇解离出免疫磁珠上的隐蔽态 T-2 毒素, 将得到的甲醇洗脱液氮吹浓缩, 所得样即为纯化后的隐蔽态 T-2 毒素(样品冻存, 待利用 LC-MS/MS 和 ELISA 对隐蔽态 T-2 毒素进行鉴定检测)。

[0018] 实施例 6

一、抗 T-2 毒素母核抗体免疫磁珠的制备：

1. 取磁珠放入离心管中, 加入活化缓冲液洗涤磁珠反复三次, 每次间隔 4 分钟, 除去活化缓冲液后加入活化剂 EDC 和 NHS 各 180 μ L, 混匀, 于 37 °C 重悬旋转孵育 2 小时, 进行磁珠活化；

2. 用偶联缓冲液洗涤磁珠三遍, 每次间隔 4 分钟, 加入 T-2 毒素母核抗体, 混匀, 于 37 °C 重悬旋转孵育 3 小时, 制备成 T-2 毒素母核抗体免疫磁珠；

3. 用洗涤缓冲液洗涤免疫磁珠反复三次, 每次间隔 4 分钟。用封阻缓冲液于 37 °C 重悬旋转孵育 2 小时, 置于保存缓冲液中 4 °C 保存待用；

4. 按照国标法的样品前处理方法处理样品, 取 T-2 毒素母核抗体免疫磁珠加入样品中, 混匀, 于 37 °C 重悬旋转孵育 2 小时, 使得免疫磁珠与样品充分接触, 于磁力架上对隐蔽态 T-2 毒素进行富集；

二、抗 T-2 毒素母核抗体免疫磁珠对样品中隐蔽态 T-2 毒素富集的应用：

称取 2 g 固体类饲料待测样品至 20 mL 磷酸盐缓冲液(含 10% 甲醇)中, 8 000 r/min ~ 10 000 r/min 均质 1 ~ 2 分钟, 充分混匀, 制成样品匀液。将免疫磁珠加入合适浓度的样品中, 充分混匀后于 37 °C 孵育 2 小时。作用完毕后, 置于磁力架上捕获磁珠, 除去上清液, 以无水甲醇解离出免疫磁珠上的隐蔽态 T-2 毒素, 将得到的甲醇洗脱液氮吹浓缩, 所得样即为纯化后的隐蔽态 T-2 毒素(样品冻存, 留待利用 LC-MS/MS 和 ELISA 对隐蔽态 T-2 毒素进行鉴定检测)。

[0019] 实施例 7

一、抗 T-2 毒素母核抗体免疫磁珠的制备：

1. 取磁珠放入离心管中, 加入活化缓冲液洗涤磁珠反复三次, 每次间隔 3 分钟, 除去活化缓冲液后加入活化剂 EDC 和 NHS 各 150 μ L, 混匀, 于 37 °C 重悬旋转孵育 2 小时, 进行磁珠活化；

2. 用偶联缓冲液洗涤磁珠三遍, 每次间隔 3 分钟, 加入 T-2 毒素母核抗体, 混匀, 于 37 °C 重悬旋转孵育 3 小时, 制备成 T-2 毒素母核抗体免疫磁珠；

3. 用洗涤缓冲液洗涤免疫磁珠反复三次, 每次间隔 3 分钟。用封阻缓冲液于 37 °C 重悬旋转孵育 2 小时, 置于保存缓冲液中 4 °C 保存待用；

4. 按照国标法的样品前处理方法处理样品, 取 T-2 毒素母核抗体免疫磁珠加入样品中, 混匀, 于 37 °C 重悬旋转孵育 2 小时, 使得免疫磁珠与样品充分接触, 于磁力架上对隐蔽态 T-2 毒素进行富集。

[0020] 二、抗 T-2 毒素母核抗体免疫磁珠对样品中隐蔽态 T-2 毒素富集的应用：

将待检对虾样品匀浆并冻干制成粉末，称取 2 g 对虾粉末样品至 20 mL 磷酸盐缓冲液（含 10% 甲醇）中，8 000 r/min ~ 10 000 r/min 均质 1 ~ 2 分钟，充分混匀，制成样品匀液。将免疫磁珠加入合适浓度的样品中，充分混匀后于 37 °C 孵育 2 小时，作用完毕后，置于磁力架上捕获磁珠，除去上清液，以无水甲醇解离出免疫磁珠上的隐蔽态 T-2 毒素，将得到的甲醇洗脱液氮吹浓缩，所得样即为纯化后的隐蔽态 T-2 毒素（样品冻存，留待利用 LC-MS/MS 和 ELISA 对隐蔽态 T-2 毒素进行鉴定检测）。

专利名称(译)	一种用于隐蔽态T-2毒素富集净化的免疫磁珠的制备及应用		
公开(公告)号	CN103969431A	公开(公告)日	2014-08-06
申请号	CN201410220924.2	申请日	2014-05-23
[标]申请(专利权)人(译)	广东海洋大学		
申请(专利权)人(译)	广东海洋大学		
当前申请(专利权)人(译)	广东海洋大学		
[标]发明人	王雅玲 吴朝金 孙力军 邱妹 徐德峰 刘颖		
发明人	王雅玲 吴朝金 孙力军 邱妹 徐德峰 刘颖		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/551		
CPC分类号	G01N1/34 G01N33/54326 G01N33/553 G01N33/56961		
代理人(译)	刘广生		
其他公开文献	CN103969431B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种用于隐蔽态T-2毒素富集净化的免疫磁珠的制备及应用，它是以羧基磁珠为载体，抗T-2毒素母核多克隆抗体为识别中间体，经过活化-偶联-洗涤-封阻的过程制备出抗T-2毒素母核多克隆抗体免疫磁珠，在合适的缓冲液中于一定条件下孵育可以高效捕捉、富集检测样本中的隐蔽态T-2毒素。该方法特异性强，高效快速，操作简单，价格低廉，不需要大型仪器和特殊培训的专业操作人员，样品不需要特殊前处理，可广泛应用于食品、饲料及动物机体内隐蔽态T-2毒素的富集分离与检测。