

食品安全生物检测技术2

免疫

- 定义概念
 - 免疫：是人和动物机体的一种保护性反应，其作用是识别和排出抗原性异物，以维持机体生理的平衡和稳定。
 - 免疫系统：具有自身的运行机制并可与其他系统相互配合、相互制约，共同维持机体在生命过程中总的生理平衡
 - 免疫系统的生理功能：1.免疫防御-机体排斥外源性抗原异物的能力 2.免疫自稳-机体识别和清除自身衰老残损的组织、细胞，维持正常内环境稳定 3.免疫监视-机体杀伤和清除异常突变细胞，机体监视和抑制恶性肿瘤在体内生长。
- 抗原
 - 定义：凡是能刺激有机体（人或动物体）产生抗体，并能与相应抗体发生特异性结合的物质。两个基本内容：1.免疫原性：抗原刺激有机体产生特异性免疫反应的能力；2.反应原性：抗原与相应抗体在体内或体外发生特异性结合反应的能力（抗原性：免疫原性和反应原性的统称）基本性质：异物性、大分子量、特异性（由抗原表面的抗原决定簇决定其特异性，指抗原刺激机体后只能产生相应的抗体并能与之结合）、化学结构复杂
 - 分类：根据抗原性是否完整以及其在机体内刺激抗体产生的特点，分为两类：1.完全抗原和不完全抗原 完全抗原有免疫原性+反应原性，既能刺激机体产生抗体，并与产生的抗体在体内或体外发生反应的抗原（细菌、病毒、外毒素、血清蛋白、花粉蛋白） 不完全抗原：只有反应原性无免疫原性。不能单独刺激机体产生抗体，若与蛋白质或胶体颗粒结合，形成大分子复合物成为完全抗原，则可刺激机体产生抗体（低分子量的药物、脂类、多糖） 2.细菌抗原 分为菌体抗原（O抗原）、鞭毛抗原（H抗原）、表面抗原、菌毛抗原、外毒素和类毒素
- 抗原抗体反应
 - 定义：抗原与相应抗体之间在体内或体外发生的特异性结合反应 体外也称为血清学试验
 - 特点： 1.**特异性与交叉性**： 特异性指一种抗原只能与它相应的抗体结合；交叉性指两种不同的抗原分子上有**相同的抗原表位**，或抗原抗体间**构型部分相同**，就可出现交叉反应 2.**可逆性**： 抗体与抗原的结合是分子表面的一种物理结合即非共价键的结合，在一定条件下可以发生解离，分开后，二者性质不变。 3.**定比性**： 抗原物质是多价的，抗体是双价的。抗原抗体的结合是抗原-抗体-抗原-抗体这样顺次结合，只有两者比例合适时，聚集成较大的复合物才能出现可见反应。 4.**阶段性**： 第一阶段发生特异性反应：反应快，不被肉眼所见 第二阶段为可见阶段 是非特异性的。反应较慢，受到电解质、pH值和温度的影响。 5.**敏感性**： 高度的敏感性用于定性，还可用于定量和定位。
 - 影响反应的因素：1.电解质-0.85%的NaCl生理盐水 2.温度-37℃水浴 3.pH值-多数血清反应适宜pH为6-8 4.杂志异物
 - 主要的抗原抗体反应：凝聚反应、沉淀反应、免疫电泳、补体结合实验

ELISA

- 名词解释
 - 定义：酶联免疫吸附测定是一种基于抗原抗体反应的免疫测定技术 原理：将抗原抗体的特异性与酶反应的敏感性相结合，使得食品在未经分离提取的前提下，进行定性或者定量检测 1.使抗原或抗体结合到某种固相载体表面，并保持免疫活性 2.使抗原或抗体与某种酶连接成酶标抗原或抗体，这种酶标抗原或抗体保留其免疫活性和酶的活性
 - 类型：间接法 夹心法 竞争法 捕获法
- 类型
 - 间接法：将抗原包被在固相载体上，如样品中含有抗体，则结合为抗原抗体复合物，再加入酶标记抗抗体，则结合为抗原-抗体-酶标抗抗体复合物，酶催化底物并显色。间接法——测抗体
 - 双抗体夹心法：将抗体包被在固相载体上-如样品中含有抗原，则结合为抗原抗体复合物-再加入酶标记抗体，则结合为抗体-抗原-酶标记抗体复合物-酶催化底物并显色。——测抗原（适用于检验各种蛋白质等大分子抗原）
 - 酶标抗原竞争法：将抗体包被在固相载体上-如样品中含有抗原，则优先竞争结合抗体，形成抗原抗体复合物-同时加入酶标记抗原，抗原没有结合的位点由酶标记抗原占据，结合为酶标抗原-抗体复合物 -酶催化底物显色。——测小分子抗原（浓度和含量成反比）
 - 捕获法：将抗抗体包被在固相载体上-如样品中含有抗体，则结合为抗抗体-抗体复合物-加入抗原及酶标抗体，则结合为抗抗体-抗体-抗原-酶标抗体复合物-酶催化底物显色。——病毒性感染早期诊断
- 操作流程
 - 包被-封闭-加样-温育-洗涤-显色
 - 封闭：是继包被之后用高浓度的无关蛋白质溶液再包被的过程。封闭是让大量不相关的蛋白质填充这些空隙，从而排斥ELISA后的步骤中干扰物质的再吸附。所有的ELISA固相均需封闭。常用封闭剂：0.05-0.5%BSA，10%小牛血清，1%明胶，脱脂奶粉等
 - 洗涤：1.ELISA洗涤：分离游离和结合的**酶标记物**。清除残留在板孔中的**游离物质**和非特异性吸附的**干扰物质**，聚苯乙烯等塑料对蛋白质的吸附是普遍性的，洗涤时应把这种非特异性吸附的干扰物质洗涤下来。（在ELISA操作中，洗涤是最重要的关键技术） 2.手工洗板方法：吸去（不可触及板壁）或甩掉酶标板内的液体；在实验台上铺垫几层吸水纸，酶标板朝下用力拍几次，根据需要进行重复。 3.自动洗板机：可用自动洗板机进行操作
- 辣根过氧化物应用于ELISA优势：成本低、热稳定好、显色反应类型多
- 应用
 - 1.毒素检测-黄曲霉毒素、金黄色葡萄球菌肠毒素 2.农药残留检测 3.细菌污染检测-沙门氏菌、李斯特氏菌 4.肉类品质检测 5.动物性食品中药物残留检测 6.人畜共患疾病病原体检测 7.重金属污染检测 8.食品中其他成分检测

生物芯片

- 优势：
 - 1.可以在很小面积上并行分析成千上万种生物分子 2.分析结果的可比性好 3.试剂的消耗量少 4.自动化程度高 5.成本低、效率高
- 基因芯片：
 - 将高密度DNA片段阵列通过高速机器人或原位结合方式以一定顺序或排列方式使其附着在玻璃片等固相表面，根据碱基互补配对原理，与标记的样品分子进行杂交，通过检测杂交信号强度及分布获取样品中靶分子的数量和序列信息
- 蛋白质芯片：
 - 又称为蛋白质阵列或蛋白质微阵列，是指以蛋白质分子作为配基，将其有序地固定在固相载体表面形成**微阵列**；用标记荧光蛋白质（抗体、抗原、受体、配体、酶、底物）与之作用，洗去未结合成分，经荧光扫描等检测方式测定芯片上各点的荧光强度，来分析蛋白之间或蛋白与其他分子之间的相互作用关系。
 - 特点：高通量筛选，简化样品前处理，灵敏度高，有助于了解药物/毒物与其效应相关蛋白质的相互作用
- 芯片制作方法：
 - 接触点样法：将样品直接点在基体上，优点是仪器结构简单、容易研制，是一种快速、经济、多功能的仪器，可以在3.6平方厘米的面积内点上10000个cDNA。不足之处是每个样品都必须合成好，经过纯化、事先保存的。
 - 喷墨法：以定量供给的方式，通过压电晶体或其他推进形式从很小的喷嘴内把生物样品喷射到玻璃载体上，同样需要合成好的纯样品，包括cDNA、染色体DNA和抗体。在1平方厘米面积上可以喷射10000个点。
 - 原位合成法（原位光解保护基合成法）：是指利用光导合成的方法在载体表面上逐个合成寡核苷酸。具体操作：活化载体上的基团并偶联光保护基团，然后在载体表面上覆盖一层具有半透明区和不透明区间隔的掩体物-用光束照射，光线透过半透明区照射到载体上，使被照射部位光解保护基团脱落，**被保护基团**激活-不透明区的光解保护基团不脱落，被保护基团不激活-**被激活的基团**和**带有光解保护基团的单核苷酸**反应结合-重复上述过程逐步增加载体上核苷酸的数量，就可以合成适当长度的**特异性的寡核苷酸片段**。
- 制备及检测
 - DNA芯片的检测内容：1.检测原理：DNA碱基互补配对和序列互补原理 2.检测步骤：芯片方阵的构建（原位合成/预先合成后点样）-待测样品制备（基因分离-RNA 基因组DNA、 探针的制备和标记、PCR扩增）-生物分子反应（生物芯片和样品探针杂交）-信号的检测及分析（磷感屏成像系统、荧光芯片扫描仪、基因芯片上各克隆荧光信号的分析原理）
 - 芯片制备：载体材料。载体材料要求：1.载体表面必须具有可以进行化学反应的活性基团，以便与生物分子进行偶联 2.使单位载体上结合的生物分子达到最佳容量 3.载体应当是惰性的和有足够的稳定性，包括机械的、物理的和化学的稳定性。 实性材料：硅芯片、玻片和瓷片，需进行预处理，使其表面衍生出羟基、氨基活性基团。 膜性材料：聚丙烯膜、尼龙膜、硝酸纤维素膜，通常包被氨基硅烷或多聚赖氨酸。
- 应用
 - 1.生物芯片在食品安全控制中的应用 2.基因测序 3.基因表达水平的检测 4.基因诊断