

论著

蛋白质芯片检测牛乳中乳铁蛋白条件的优化研究

殷继永, 马欣欣, 孙静, 黄建, 朴玮, 李瑾, 陈颀, 曹秋野, 霍军生

(中国疾病预防控制中心营养与健康所, 北京 100050)

摘要:目的 优选并确定蛋白质芯片检测牛乳中乳铁蛋白(lactoferrin, Lf)的检测条件。方法 利用蛋白质芯片技术,采用双抗夹心的方式,通过点样探针选择试验、点样一致性试验、棋盘滴定试验、浓度倍比试验、生物检测限试验及检测下限试验最终优化出针对目标蛋白的最佳检测条件。结果 最终确定以Lf鼠单抗75[#]为点样探针,预点样46点,46点至90点为点样一致性区段;点样探针浓度为0.5 mg/ml,检测抗体效价为1:2 000,在0.6~612 ng/ml之间剂量-反应关系呈现S型曲线,其线性范围在9.56~306 ng/ml之间;检测下限为1.68 ng/ml,生物检测限为3.59 ng/ml;建立了对Lf具有最佳回归系数($r=0.998$)的回归方程与标准曲线。结论 此研究优化了利用蛋白质芯片技术检测Lf的试验条件,为建立定量检测Lf的蛋白质芯片平台奠定了基础。

关键词:蛋白质芯片;乳铁蛋白;优化;检测;牛乳;检测条件

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2016)06-0720-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2016.06.007

The optimizing study of protein microarray detection conditions for bovine lactoferrin in milk

YIN Ji-yong, MA Xin-xin, SUN Jing, HUANG Jian, PIAO Wei, LI Jin, CHEN Di,

CAO Qiu-ye, HUO Jun-sheng

(Institute for Nutrition and Health, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100050, China)

Abstract: Objective To optimize and determine the protein microarray detection condition for bovine lactoferrin (Lf) in milk. **Methods** Protein microarray technology and sandwich method was used to optimize the detection condition by probe experiment, homogeneity of the spots of the probes experiment, chessboard titration experiment, concentration dilution experiment, limit of detection and biologic limit of detection experiment. **Results** The 75[#] mouse monoclonal antibody was chosen as the printing probe, the pre-printing number was 46 points and the printing stable zone was from 46th to 90th point; the concentration of probe is 0.5 mg/ml, the valence of detection antibody was 1: 2 000; the dose-response relationship appeared the S curve from 0.6 to 612 ng/ml and the linearity range was from 9.56 to 306 ng/ml, respectively; the limit of detection and biologic limit of detection was 1.68 and 3.59 ng/ml, respectively; finally, the regression equation with an optimum determination coefficient ($r=0.998$) and the standard curve were established. **Conclusion** This study optimized the protein microarray detection condition for bovine Lf in milk, and these detection conditions were the basis of the further study for establishing the relevant protein microarray plat.

Key words: Protein microarray; lactoferrin; optimizing; detection; cow milk; detection condition

乳铁蛋白(lactoferrin, Lf)也称为乳运铁蛋白,1938年首次从牛乳中分离出来。现已证实,乳铁蛋白是一种重要的生理活性物质,不仅具有增强铁的传递和吸收、广谱抗菌性、免疫、抗氧化、促进肠道菌群平衡等作用,还具有抗炎症、抗病毒、抗癌症等

生物活性,且已广泛应用于婴儿配方食品、生化及化妆品等。这些特点决定了乳铁蛋白可以作为评价牛乳营养价值的标志蛋白之一^[1]。

目前有许多方法应用于牛乳蛋白的检测,如分光光度法^[1]、电泳法^[2]、酶联免疫吸附法(ELISA)^[3]、液相色谱法^[4]、乳胶凝集法^[5-7]、高效亲和色谱法^[8]等。但这些方法检测过程复杂、不易于掌握和操作、对仪器要求高,使人们在日常生活中饮用的牛乳质量不能得到及时稳定的检测保证。因此,现在亟待一个适应新环境的快速、高效、准确、高灵敏度和操作性强的乳铁蛋白检测方法。

收稿日期:2016-10-17

基金项目:中国疾病预防控制中心青年基金(2015A202)

作者简介:殷继永 男 副研究员 研究方向为营养与食品卫生学

E-mail: jyyin7579@163.com

通信作者:霍军生 男 研究员 研究方向为营养与食品卫生学

E-mail: jshuo@263.net.cn

本研究中所要使用的是生物型蛋白质抗体检测芯片,其基本原理是将针对抗原的特异性识别抗体点布于基片上,用于捕获样品中的待测抗原;待其与待测的样品中的抗原结合后,加入检测抗体使检测抗体与抗原发生结合反应,最后用荧光标记的抗体与检测抗体结合,从而反应捕获抗原的水平。蛋白质芯片技术虽只有十多年的发展历程,但其已在蛋白质间相互作用、蛋白质与小分子相互作用等多个研究领域发挥出巨大的作用。目前蛋白质芯片技术在食品检测方面主要有对食品中病原微生物、真菌毒素、抗生素、食品原料中农残等的检测^[9-10],但利用蛋白质芯片对牛乳中相关蛋白进行检测方面的研究鲜见报道。

在建立一个蛋白质芯片平台时,单克隆抗体的特异性、探针的种类、点样方式、点样一致性、探针浓度、检测抗体浓度等都将影响检测结果^[11-12]。因此,本研究的主要目的是比较与优化以上这些影响因素,进而为建立一个能定量检测牛乳 Lf 的蛋白质芯片平台奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 主要仪器与试剂

LuxScanTM10K Microarray Scanner 芯片扫描仪、Personal ArrayerTM16 Microarray Spotter 蛋白质芯片点样仪均购自博奥生物有限公司。

牛乳 Lf 标准品 (PCode 1002101934, 美国 Sigma), Lf 鼠单抗与兔多抗 (北京华大蛋白质研发中心有限公司), Cy3 标记的羊抗兔多抗与羊抗鼠多抗 (code 111-165-003、115-165-003, 美国 Jackson Immuno Research), 阴性兔 IgG, 蛋白质芯片点样液 A (code 440015)、晶芯^R 高分子三维基片 (code 420040) 均购自博奥生物有限公司, 磷酸盐缓冲液 (PBS), Tween20。

1.2 方 法

1.2.1 蛋白质芯片检测

将牛乳 Lf 的抗体探针 Lf 鼠单抗或 Lf 兔多抗和质控 (阳性控制为无关兔 IgG, 阴性控制为 1 × 点样 buffer, 空白控制为 PBS) 分别三点重复点样在三维基片的每一个阵列中。经 37 °C 固定 18.5 h 后的试验方法类似于夹心 ELISA。

先在各阵列中加入抗原 Lf 蛋白稀释液 (30 μl/阵列, 37 °C, 1 h), 待反应完全后进行芯片洗涤 (1% PBST, 5 min/次, 5 次) 与甩干 (1 000 r/min, 2 min), 之后各阵列加入检测抗体 Lf 鼠单抗或 Lf 兔多抗 (30 μl/阵列, 37 °C, 1 h), 待反应完全后进行芯片洗涤 (1% PBST, 5 min/次, 5 次) 与甩干

(1 000 r/min, 2 min), 最后加入 Cy3 标记的二抗 (30 μl/阵列, 37 °C, 1 h), 待反应完全后进行芯片洗涤 (1% PBST, 5 min/次, 5 次) 与甩干 (1 000 r/min, 2 min); 将甩干的芯片在相应波长下进行扫描, 获取检测图像与检测数据。

1.2.2 Lf 鼠单抗的筛选

将 Lf 鼠单抗 1[#]、35[#]、75[#] 均以 0.5 mg/ml 的浓度点样于蛋白质芯片的不同阵列中, 抗原分别为高、低两个浓度 (2、0.2 μg/ml) 的 Lf 标准品, PBS 阵列为阴性对照。检测抗体为效价 1:1 000 的 Lf 兔多抗, 二抗为效价 1:600 的羊抗兔多抗, 试验步骤同 1.2.1。

筛选标准是能使抗原呈现剂量-反应关系, 同时既要满足与 Lf 抗原反应信号值最大, 又要满足阴性对照信号值较低 (即芯片背景较干净)。

1.2.3 Lf 探针的选择

Lf 的鼠单抗与兔多抗分别作为探针点样于蛋白质芯片的不同阵列中, 分别使用 Lf 的兔多抗与鼠单抗作为 Lf 抗原的检测抗体。Lf 鼠单抗和其兔多抗作为探针时的浓度均为 0.5 mg/ml, Lf 抗原浓度为 2 μg/ml。检测抗体效价均为 1:1 000, 二抗为羊抗鼠与羊抗兔时的效价均为 1:600, 试验步骤同 1.2.1。结果判断标准为阳性值与阴性值间的差值最大, 阴性值最低。

1.2.4 Lf 探针浓度与检测抗体浓度的选择

对 Lf 探针浓度与检测抗体浓度以棋盘滴定试验进行优化选择。不同浓度的 Lf 探针 (1、0.5、0.25 mg/ml) 被点样在每一个阵列中。Lf 抗原分别选择高、中、低 (1、0.1、0.02 μg/ml) 三个浓度, 以 PBS 作为阴性对照。Lf 检测抗体效价分别选用 1:2 000、1:6 000、1:9 000, 二抗为效价 1:600 的羊抗兔多抗, 试验步骤同 1.2.1。结果判断标准是高抗原浓度时信号不饱和 (信号值 < 65 535), 低抗原浓度检测值与阴性对照检测值的差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 同时芯片背景比较干净且信号值较低。

1.2.5 点样一致性的确定

将 Lf 的鼠单抗以接触式点样的方法点样 462 点。点样液中所含有的游离 Cy3 信号能直接反映芯片上所点抗体的点样体积, 因此能在芯片点样后通过芯片扫描所获得的结果直接进行点样一致性的比较。Lf 的点样探针浓度为 0.5 mg/ml。

1.2.6 检测下限与生物检测限

Lf 抗原按 2 倍比的稀释比例从高浓度 (14.38 ng/ml) 稀释至低浓度 (0.89 ng/ml), 阴性对照选择 PBS。Lf 的点样探针浓度为 0.5 mg/ml, 检测抗体的效价为 1:2 000, 二抗为效价 1:600 的羊抗

兔多抗。试验重复12次,试验步骤同1.2.1。

以冯仁丰的研究方法为依据^[13],用阴性对照组信号值均数的2倍标准差(2SD)的值所对应的浓度值为检测下限,以减去2SD后高于检测下限2SD的信号值所对应的浓度值为生物检测限。

1.2.7 S型曲线的建立与线性范围的判断

选择11个Lf抗原浓度(612.00、306.00、153.00、76.50、38.25、19.13、9.56、4.78、2.39、1.20和0.60 ng/ml)分别加入11个不同的阵列中,以PBS作为阴性对照。Lf的点样探针浓度为0.5 mg/ml,检测抗体效价1:2 000,二抗为效价1:600的羊抗兔多抗,试验步骤同1.2.1。

按检测信号值与抗原浓度之间的对应关系绘制散点图,建立检测Lf的S型曲线,确定出浓度与检测信号值呈线性关系的范围。

1.2.8 标准曲线与回归方程的建立

选择Lf抗原检测线性范围内的5个浓度(0、11、30、92、184、230 ng/ml)作为标准点,配制相应抗原,分别加入5个不同的阵列中,以PBS做为阴性对照。Lf的点样探针浓度为0.5 mg/ml,检测抗体效价1:2 000,二抗为效价1:600的羊抗兔多抗,试验步骤同1.2.1。

按检测信号值与抗原浓度之间的对应关系绘制Lf的标准曲线,并获得决定系数、建立回归方程。

1.3 统计学分析

所有数据用Excel 2007与SPSS 13.0进行分析处理。Lf鼠单抗的筛选使用方差分析,三个均数的两两比较使用SNK法;Lf探针种类的选择与Lf探针浓度、检测抗体浓度选择时低浓度抗原与阴性控制间的比较均使用两样本比较的t检验。检验水准选定 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 鼠单抗的筛选

此部分结果显示,三种Lf鼠单抗均可与三维基片结合,且鼠单抗1[#]、35[#]和75[#]分别与高、低两个浓度的Lf抗原的结合呈现了剂量-反应趋势,说明三种鼠单抗在芯片平台上均具有生物学活性。依据1.2.2中的判断标准,最终选择75[#]作为点样鼠单

抗,详见表1和图1。

表1 三株Lf鼠单抗与Lf结合的信号值比较 (n=3, $\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of the signal value of three Lf mouse monoclonal antibodies reacting with Lf

| 组别 | Lf鼠单抗1 [#] | Lf鼠单抗35 [#] | Lf鼠单抗75 [#] |
|-----------|---------------------|----------------------|----------------------|
| Lf抗原(高浓度) | 57 769 ± 30 *▲ | 52 606 ± 23 * | 57 676 ± 28 |
| Lf抗原(低浓度) | 64 097 ± 35 | 33 595 ± 6 652 | 36 375 ± 4 476 |
| 阴性对照组 | 3 536 ± 483 *▲ | 880 ± 514 | 634 ± 168 |

注: *表示Lf鼠单抗1[#]与Lf鼠单抗35[#]比较, P < 0.05; ▲表示Lf鼠单抗1[#]与Lf鼠单抗75[#]比较, P < 0.05; ★表示Lf鼠单抗35[#]与Lf鼠单抗75[#]比较, P < 0.05

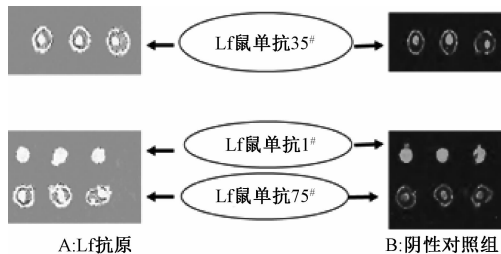


图1 三支Lf鼠单抗与Lf结合扫描图

Figure 1 Image of three Lf mouse monoclonal antibodies reacting with Lf

2.2 点样探针的筛选

对鼠单抗与兔多抗的探针优选结果显示, Lf鼠单抗75[#]做点样探针时,抗原信号值大于Lf兔多抗做点样探针时的信号值,且抗原与阴性信号值的差值大于兔多抗做探针时的结果。因此,本研究最后选定以Lf鼠单抗75[#]作为点样探针,详见表2。

表2 Lf不同点样探针结果比较(n=3, $\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of the signal value of Lf for different probe

| 抗原 | 探针 Lf鼠单抗 检测抗体 Lf兔多抗 | 探针 Lf兔多抗 检测抗体 Lf鼠单抗 |
|-----|------------------------|------------------------|
| Lf | 60 399 ± 4 456 * | 50 830 ± 2 585 |
| PBS | 6 722 ± 700 * | 34 888 ± 624 |
| 差值 | 53 677 | 15 942 |

注: *表示与Lf兔多抗为探针时比较, P < 0.05

2.3 Lf探针浓度、检测抗体浓度的选择

棋盘滴定结果显示, Lf鼠单抗75[#]做点样探针时浓度为0.5 mg/ml,检测抗体Lf兔多抗取1:2 000效价时强阳性最高且阴性值较为理想,详见表3。

2.4 点样一致性的确定

点样一致性试验结果显示, Lf鼠单抗75[#]在第

表3 Lf固定探针与检测抗体浓度选择棋盘试验结果

Table 3 Concentration choosing of probe and detection antibody for Lf by chessboard titration experiment

| 检测抗体效价 | 固定探针 1 mg/ml | | | | 固定探针 0.5 mg/ml | | | | 固定探针 0.25 mg/ml | | | |
|---------|--------------|--------|--------|--------|----------------|--------|--------|-------|-----------------|--------|-------|-------|
| | 1 | 0.1 | 0.02 | PBS | 1 | 0.1 | 0.02 | PBS | 1 | 0.1 | 0.02 | PBS |
| 1:2 000 | 61 175 | 35 623 | 17 801 | 10 129 | 61 254 | 28 084 | 11 372 | 3 542 | 61 005 | 18 065 | 6 884 | 1 608 |
| 1:6 000 | 57 066 | 19 515 | 14 358 | 9 177 | 40 772 | 12 863 | 6 062 | 3 507 | 35 408 | 9 123 | 4 751 | 1 967 |
| 1:9 000 | 36 248 | 17 179 | 16 279 | 9 477 | 32 579 | 15 260 | 7 207 | 3 597 | 23 186 | 7 976 | 5 046 | 2 214 |

注: 1.0、0.1、0.02为抗原浓度,单位 $\mu\text{g/ml}$

46点以后呈现出点样平稳的区段,在第47~90点之间为第一点样平稳区段。因此确定出在对Lf鼠单抗75[#]进行接触式点样时,预点样数应为47点,单次取样的最大点样数不超过43点,见图2、3。

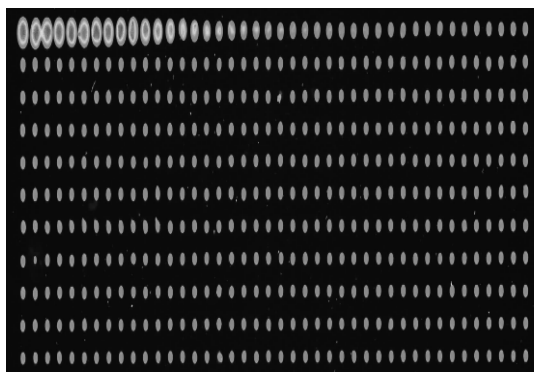


图2 Lf鼠单抗(0.5 mg/ml)点样扫描图

Figure 2 Scan picture of the Lf mouse monoclonal antibody print point(0.5 mg/ml)

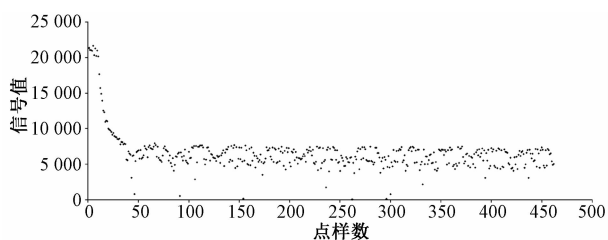


图3 Lf鼠单抗(0.5 mg/ml)462点点样值比较

Figure 3 Scan picture of the Lf mouse monoclonal antibody print point(0.5 mg/ml)

2.5 检测下限与生物检测限

试验结果显示,蛋白质芯片技术检测Lf时检测下限为1.68 ng/ml,生物检测限为3.59 ng/ml,具体内容见表4。

表4 Lf生物检测限

Table 4 BDL of Lf on protein chip detection

| 浓度/(ng/ml) | n | \bar{x} | s | $\bar{x} - 2s$ | 与检测下限对应值的比较 |
|------------|----|-----------|-----|----------------|-------------|
| 14.38 | 12 | 3 156 | 560 | 2 036 | — |
| 7.19 | 12 | 1 866 | 416 | 1 034 | — |
| 3.59 | 12 | 715 | 177 | 361 | >2 × 167 |
| 1.79 | 12 | 350 | 117 | 116 | <2 × 167 |
| 0.89 | 12 | 346 | 283 | -220 | — |
| 0.00 | 12 | 0 | 167 | — | — |

注:—表示无需计算或无需比较

2.6 S型曲线的建立与线性范围的判断

倍比试验结果显示,Lf抗原随着浓度的变化呈现出了具有S型曲线特征的剂量-反应关系,在9.56 ng/ml之前为下平台期,在306 ng/ml之后进入上平台期;在9.56~306 ng/ml之间呈现出线性范围,见图4。

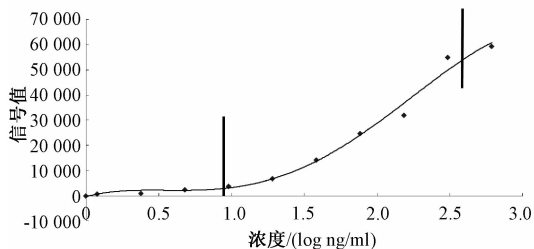


图4 Lf倍比试验S型曲线与线性范围

Figure 4 S curve and linear range of the multiple proportions experiment for Lf

2.7 Lf标准曲线的建立

最终选定0、11、30、92、184、230 ng/ml作为标准浓度点,构建的标准曲线回归方程为 $y = 29.88x + 4.67$, $r = 0.998$ 。

3 讨论

利用蛋白质芯片实现对样品中特定物质含量进行测定是一种新兴的检测技术,目前国外尚未见有利用此技术对牛乳中Lf进行研究的报道。本研究对蛋白质芯片平台检测LF的技术条件进行了优化与确定。

本研究之初,在华大蛋白公司订制了牛乳Lf鼠单抗,共获得27株单克隆细胞株,经ELISA优选最终选出1[#]、35[#]、75[#]细胞株为最优结果,由这三株细胞株分别生产制备获得三支分别针对Lf的鼠单抗1[#]、35[#]、75[#]。这三支鼠单抗都是针对Lf所生产的单克隆抗体,区别在于他们是针对不同抗原决定簇所产生的特异性不同的抗体。蛋白分子作为抗原时,会因为自身结构的不同,具有多个不同的抗原决定簇,每个抗原决定簇会产生一个与之相对应的单克隆抗体。但每个单克隆抗体与其所针对的抗原决定簇的特异性结合能力各不相同,有的抗原决定簇结构特异性好,针对它的单克隆抗体的结合能力就会较好。在前期抗体制备阶段中1[#]、35[#]、75[#]抗体都体现出了较好的工作能力,但并不一定会在芯片上也产生相同的结合能力。对此,在芯片水平进行了三支单克隆抗体优选试验。结果显示三支鼠单抗针对不同浓度的抗原,均呈现出了剂量-反应关系,但其中1[#]鼠单抗如作为最优点样抗体,可能在抗原浓度为200 ng/ml~2 μg/ml之间存在勾状效应,这意味着1[#]鼠单抗可能会导致检测抗原时的线性范围较窄。对三支鼠单抗与Lf抗原结合信号值进行方差分析的结果显示:Lf三支鼠单抗均数间差异均有统计学意义($P < 0.05$);对三株鼠单抗的阴性对照信号值使用方差分析的结果显示:除35[#]与75[#]之间差异没有统计学意义($P > 0.05$)外,其他各组均

数间差异均有统计学意义($P < 0.05$);结合阳性值高且阴性值最低的判断标准,最终选择 Lf 鼠单抗 75[#]作为最优抗体。

在研究中分别选择了 Lf 的小鼠单克隆抗体 75[#]与兔多克隆抗体进行点样。结果显示二者均能与芯片结合,但 Lf 小鼠单克隆抗体与芯片结合时的阳性与阴性结果的检测信号差值更高,预示此时的检测范围更广,灵敏度更高,结果更为理想。Lf 兔多抗作为点样抗体时虽然在强阳性抗原时取得了较好的结果,但在阴性抗原时背景值高于鼠单抗 75[#],其原因可能是兔多抗产生的非特异性结合高于鼠单抗。因此,最终选择 Lf 的小鼠单克隆抗体 75[#]作为点样探针。

棋盘滴定结果显示,在点样抗体与检测抗体各种组合的不同检测条件下,抗原浓度与检测信号值之间都呈现出了剂量-反应关系。在 Lf 鼠单抗 0.5 mg/ml、检测抗体 1:2 000 时的强阳性结果与 Lf 鼠单抗 1 mg/ml、检测抗体 1:2 000 时的结果较为接近,但两种检测条件下阴性结果差异较大,因此最终选择 Lf 鼠单抗 75[#] 0.5 mg/ml、检测抗体 1:2 000 做为最终的检测条件。

关于点样一致性,不同的研究^[11-12,14]有不同的建议。在本研究中,当 Lf 鼠单抗 75[#]0.5 mg/ml 时,预点样点数为 46 点。这种区别的主要原因在于不同蛋白质在不同浓度条件下的粘度各不相同,通常来说粘度越大,预点样数越少。

检测下限与生物检测限的结果显示,蛋白质芯片水平检测 Lf 时,1.68 ng/ml 的检测下限与 3.59 ng/ml 的生物检测限均优于 ELISA 水平检测时的相应结果,这表明蛋白质芯片平台检测乳铁蛋白可以获得更精准的检测结果。

关于 Lf 的 S 型曲线、线性范围、标准曲线建立的结果显示,选择 0、11、30、92、184、230 ng/ml 作为标准浓度点,建立了 $r = 0.998$ 的检测平台;表明利用优化后的蛋白质芯片技术定量检测 Lf 的检测平台已被建立,且这一平台在进一步的研究中可被用于定量检测牛乳样品中的 Lf。

如何在样本用量少的情况下,简便、快速的评价营养状况是营养学检测的发展目标,也是目前牛乳产业发展所必须解决的重要问题。目前检测牛乳中蛋白质所使用的方法虽然较多,但普遍存在耗时较长、检测速度较慢、用样量较多等问题。蛋白质芯片检测平台所利用的抗原抗体间特异性结合的原理可使检测结果具有更好的检测灵敏度,例如

本研究中所获得的检测下限与生物检测限均优于目前常用的高效液相法,同时相对其他检测方法,本检测平台的点样与扫描均由专用仪器自动完成,芯片固定后全部试验操作时间为 6 h,每阵列加样量仅为 30 μ l,这些更快速、便捷且节省样本(每次检测只需要 30 μ l 体积)的特点,有望解决目前牛乳检测所面对的重要问题。

参考文献

- [1] 卢蓉蓉,许时婴. 乳铁蛋白测定方法的比较[J]. 中国乳品工业,2002,30(5):123-125.
- [2] 李珊珊,王加启,魏宏阳,等. 乳及乳制品中乳铁蛋白定量测定法 SDS-PAGE 法的建立[J]. 中国乳业,2008(9):42-46.
- [3] Dupont D, Arnould C, Rolet R D, et al. Determination of bovine lactoferrin concentrations in cheese with specific monoclonal antibodies [J]. International Dairy Journal, 2006, 16(9): 1081-1087.
- [4] Palmano K P, Elgar D F. Detection and quantitation of lactoferrin in bovine whey samples by reversed-phase highperformance liquid chromatography on polystyrene-divinylbenzene [J]. Journal of Chromatography A, 2002, 947(2):307-311.
- [5] Namba S, Ishii T, Okuda Y, et al. Development of latex agglutination turbidimetric immunoassay for the quantitative measurement reagents of human and bovine lactoferrin[J]. Foods and Food Ingredients Journal of Japan, 2006, 211(5):387.
- [6] Soejima T, Yamauchi K, Yamamoto T, et al. Determination of bovine lactoferrin in lactoferrin-supplemented dairy products and raw milk by an automated latex assay [J]. Journal of Dairy Research, 2007, 74(1):100-105.
- [7] Yamauchi K, Soejima T, Ohara Y, et al. Rapid determination of bovine lactoferrin in dairy products by an automated quantitative agglutination assay based on latex beads coated with F(ab')₂ fragments[J]. Biometals, 2004, 17(3):349-352.
- [8] 陈晓旭,宋桂雪,童玉,等. 高效亲和色谱法检测液体奶和奶制品中乳铁蛋白的质量浓度[J]. 中国乳品工业, 2013, 41(12):40-42.
- [9] Rowe C A, Scruggs S B, Feldstem M J. An array immunosensor for simultaneous detections of clinical analytes [J]. Anal Chem, 1999, 71(2):433-439.
- [10] Rowe C A, Tenler L M, Feldstem M J. Array biosensor for simultaneous identification of bacterial, viral, and protein analytes [J]. Anal Chem, 1999, 71(17):3846-3852.
- [11] 殷继永,霍军生,孙静,等. 蛋白质芯片检测可溶性转铁蛋白受体条件的优化研究[J]. 卫生研究, 2011, 40(1):91-94.
- [12] 殷继永,孙静,黄建,等. 蛋白质芯片快速诊断铁缺乏的准确性分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2014, 26(2):145-149.
- [13] 冯仁丰. 分析灵敏度(检测限)[J]. 检验医学, 2002, 17(3):133-136.
- [14] 江凌晓,郭兆彪,陈泽良,等. 蛋白质芯片制作条件的优化[J]. 第一军医大学学报, 2004, 24(11):1230-1232.