

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105301239 A

(43) 申请公布日 2016. 02. 03

(21) 申请号 201410283244. 5

(22) 申请日 2014. 06. 23

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所
地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号

(72) 发明人 张先恩 王殿冰 田博 张治平

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

代理人 王旭

(51) Int. Cl.

G01N 33/569(2006. 01)

G01N 33/558(2006. 01)

权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54) 发明名称

颗粒阻滞型磁性免疫层析试纸条及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种颗粒阻滞型新型磁免疫层析方法,包括混合待测样品和抗原特异抗体偶联超顺磁颗粒,并孵育;磁分离获得捕获的抗原-超顺磁颗粒复合体并在样品垫上展层;和读取结果的步骤。与已有免疫层析试纸条不同,本发明的方法无结合垫,无固定于硝酸纤维素膜的捕获蛋白等,并可同时实现光信号、磁信号及裸眼检测。本发明不仅适用于炭疽芽孢杆菌芽孢的现场检测,而且可用于其它大尺寸分析物的检测。

1. 一种颗粒阻滞型磁性免疫层析方法,其包括以下步骤:
 - 1) 混合待测样品和抗原特异抗体偶联超顺磁颗粒,并孵育;
 - 2) 磁分离获得捕获的抗原-超顺磁颗粒复合体;
 - 3) 将捕获的抗原-超顺磁颗粒复合体在样品垫上展层;
 - 4) 读取结果。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述抗原为大小为0.1-20 μm 的颗粒,优选0.5-2 μm 的颗粒。
3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述抗原为芽孢,细菌营养体,病毒。
4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述孵育在反应缓冲液中进行,所述展层在展层缓冲液中进行。
5. 根据权利要求4所述的方法,其中所述反应缓冲液的成分为40mM BS(pH9.7)1% BSA,所述展层缓冲液的成分为10mM PBS(pH7.2)0.5% Tween-201% BSA。
6. 根据权利要求1所述的方法,其中所述抗体为单克隆抗体或多克隆抗体。
7. 根据权利要求1-6任一项所述的方法,其中在步骤4)中通过肉眼直接观察或检测光学、磁学信号读取结果。
8. 一种颗粒阻滞型磁性免疫层析试纸条,其包括底板、粘附于底板上的硝酸纤维素膜、粘贴在硝酸纤维素膜一端的样品垫和另一端的吸收垫,其特征在于:所述试纸条不包含结合垫,且硝酸纤维素膜上无捕获抗体。
9. 制备权利要求8所述的试纸条的方法,其包括如下步骤:在底板上粘贴硝酸纤维素膜作为第一层,在硝酸纤维素膜一端粘贴样品垫作为第二层,另一端粘贴吸收垫作为第二层,两层之间相互交错2.5mm,组装完毕后根据需要切割至一定宽度即得到试纸条。
10. 权利要求8所述的颗粒阻滞型磁性免疫层析试纸条用于定性和/或定量检测目的抗原的用途。

颗粒阻滞型磁性免疫层析试纸条及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物检测技术领域。特别涉及一种颗粒阻滞型磁性免疫层析试纸条，及其用途和制备方法。

背景技术

[0002] 炭疽芽孢杆菌 (*Bacillus anthracis*) 是一种可产生芽孢的需氧杆菌，竹节状排列，为革兰氏阳性。该菌可引起人畜共患的炭疽病，且在草食性动物中发病率最高，人类通过接触土壤中、皮毛上的芽孢也可导致感染。由于炭疽芽孢对高温、高压、干燥、电离辐射以及一些化学物质具有极强的抵抗能力，故而可在环境中生存数十甚至数百年。因此，炭疽芽孢一直被列为头号生物战剂。2001年，发生在美国的炭疽恐怖事件再次让全世界震惊，无论是自然感染还是生物反恐，在掌握炭疽芽孢杆菌致病机制的同时如何快速准确的检验、鉴定炭疽芽孢杆菌是当今人类必须要解决的难题。

[0003] 针对炭疽芽孢的现有检测方法包括：利用免疫学技术的酶标法或荧光抗体染色法，利用分子生物学技术的 PCR 法，以及多种传统的检测方法，包括细菌分离培养、溶血性实验、荚膜染色、噬菌体裂解实验、串珠实验等。上述方法耗时较长，而且需要纯化工作或购买复杂的仪器，操作繁琐，多数只能进行定性检测而不能实验定量检测。

[0004] 磁性免疫层析 (Magnetic Immuno-chromatography Testing, MICT) 是以胶体金技术为基础发展出的一种单人份快速定量检测技术。此免疫层析以超顺磁颗粒 (superPMPs) 代替传统的标记物进行免疫层析，通过超顺磁颗粒捕获的生化物质来定量判断样品中的待测物含量，采用磁标记免疫复合物 - 磁场强度标准曲线来进行定量测定。该技术与传统技术相比具有下述优势：a) 比各类目测快速诊断法灵敏 10-100 倍；b) 加样后 30 分钟内可得到数据，且可实现多重检测；c) 在 3 到 4 个数量级浓度范围内呈线性；d) 所用磁性检测仪器采用固相元件，微型化设计自成一体，独立运行，体积小，操作简便；e) 超顺磁颗粒由聚合物包被，不会随时间而衰变。该技术继承了传统免疫层析技术简便快速、单人份操作的优点，又弥补了传统免疫层析技术灵敏度低、只能定性不能定量的缺点，从而成为替代传统免疫层析技术的首选。

[0005] 利用目前已有的免疫层析技术（包括磁性免疫层析技术）检测大尺寸的分析物，例如芽孢，都需要较长的层析时间。检测结果易受外界环境，特别是固体物质的干扰。

发明内容

[0006] 为了克服上述缺陷，我们以炭疽芽孢杆菌芽孢为例，发展了一种颗粒阻滞型新型磁免疫层析技术。本发明提供颗粒阻滞型磁性免疫层析试纸条及其制备方法，并提供所述试纸条用于定量检测样品中的抗原颗粒，比如炭疽芽孢。

[0007] 具体的，本发明包括以下各项：

[0008] 1. 一种颗粒阻滞型磁性免疫层析方法，其包括以下步骤：

[0009] 1) 混合待测样品和抗原特异抗体偶联超顺磁颗粒，并孵育；

- [0010] 2) 磁分离获得捕获的抗原-超顺磁颗粒复合体;
- [0011] 3) 将捕获的抗原-超顺磁颗粒复合体在样品垫上展层;
- [0012] 4) 读取结果。
- [0013] 2. 根据 1 所述的方法,其中所述抗原为大小为 0.1-20 μm 的颗粒,优选 0.5-2 μm 的颗粒。
- [0014] 3. 根据 1 所述的方法,其中所述抗原为芽孢,营养体,病毒。
- [0015] 4. 根据 1 所述的方法,其中所述孵育在反应缓冲液中进行,所述展层在展层缓冲液中进行。
- [0016] 5. 根据 4 所述的方法,其中所述反应缓冲液的成分为 40mM BS (pH9.7) 1% BSA,所述展层缓冲液的成分为 10mM PBS (pH7.2) 0.5% Tween-20 1% BSA。
- [0017] 6. 根据 1 所述的方法,其中所述抗体为单克隆抗体或多克隆抗体。
- [0018] 7. 根据 1-6 任一项所述的方法,其中在步骤 4) 中通过肉眼直接观察或检测光学、磁学信号读取结果。
- [0019] 8. 一种颗粒阻滞型磁性免疫层析试纸条,包括底板、粘附于底板上的硝酸纤维素膜、粘贴在硝酸纤维素膜一端的样品垫和另一端的吸收垫,其特征在于:所述试纸条不包含结合垫,且硝酸纤维素膜上无捕获抗体。
- [0020] 9. 制备 8 所述的试纸条的方法,其包括如下步骤:在底板上粘贴硝酸纤维素膜作为第一层,在硝酸纤维素膜一端粘贴样品垫作为第二层,另一端粘贴吸收垫作为第二层,两层之间相互交错 2.5mm,组装完毕后根据需要切割至一定宽度即得到试纸条。
- [0021] 10. 8 所述的颗粒阻滞型磁性免疫层析试纸条用于定性和 / 或定量检测目的抗原的用途。
- [0022] 本发明涉及的试纸条制作简单,无需制作结合垫,无需将捕捉蛋白(抗原、抗体)、二抗固定于硝酸纤维素膜,检测过程中不会形成检测带和质控带。该技术可同时实现光信号、磁信号及肉眼检测,可对分析物,如炭疽芽孢进行肉眼定性检测,检测下限达 10^3 个芽孢;可借助光学或磁学检测仪器对炭疽芽孢进行定量检测,检测下限达 500 个芽孢;无需样品预处理,即可快速、高灵敏检测高浓度白色粉末样品中的炭疽芽孢。整个检测流程仅需 20min,其中层析时间为 5min,因试纸条不需抗体喷涂,保质期长;磁信号于生物体内少见,不易受到信号干扰;超顺磁颗粒性质稳定,适于长期保存。
- [0023] 发明详述
- [0024] 以下对本发明的技术方案做进一步详细阐述。应当指出,本发明的各实施方案可以根据需要以任何方式组合。
- [0025] 本发明的第一个方面,提供了一种颗粒阻滞型磁性免疫层析方法,此方法可用于分析物,如炭疽芽孢的快速现场检测。
- [0026] 在一个实施方案中,所述方法包括如下步骤:
- [0027] 1) 混合待测样品和抗原特异抗体偶联超顺磁颗粒,并孵育;
- [0028] 2) 磁分离获得捕获的抗原-超顺磁颗粒复合体;
- [0029] 3) 将捕获的抗原-超顺磁颗粒复合体在样品垫上展层;和
- [0030] 4) 读取结果。
- [0031] 在一个优选的实施方案中,所述捕获的抗原为尺寸为微米级的分析物,在此级别

大小的抗原与所述抗体偶联超顺磁颗粒结合形成复合体之后能够被阻滞在靠近展层起始段。在一个更优选的实施方案中,所述捕获的抗原大小为 0.1-20 μm , 优选 0.5-2 μm 。

[0032] 在另一个优选的实施方案中,所述捕获的抗原为芽孢。

[0033] 在另一个优选的实施方案中,所述抗原特异抗体可以是单克隆抗体或多克隆抗体,或其抗原结合部分或衍生物,本领域技术人员知晓,只要能够有效捕获所述抗原的抗原结合物质均可以用来实现本发明。

[0034] 在进一步的实施方案中,在步骤 4) 中,可以使用肉眼半定量检测,或依靠磁性或光学仪器定量检测读取结果。由于抗原特异抗体偶联超顺磁颗粒本身具有一定颜色,因此,大量富集后将形成有色的阻滞带,从而使用肉眼即可以获得检测结果。在优选的实施方案中,可以利用复合物的磁性性质和颜色性质,利用磁性或光学仪器更精确地定量检测读取结果。

[0035] 因此,在最优选的实施方案中,所述方法为检测测试样品中芽孢的方法,其包括如下步骤:将待测炭疽芽孢样品与抗体偶联超顺磁颗粒以一定比例混合于反应缓冲液,室温静置 10min 进行孵育;磁力架分离出免疫复合物,并用展层缓冲液清洗两遍,最终用展层缓冲液重悬恢复至原体积的 50%,取 50 μl 重悬后的样品加入检测试纸的样品垫;经 5min 展层,用数字化层析检测仪和磁性分析仪分别检测试纸条上阻滞条带的光学信号与磁信号。

[0036] 本发明的另一方面提供了颗粒阻滞型磁性免疫层析试纸条、其制备方法及其在定性定量检测分析物中的用途,采用此方法制备出的磁性免疫试纸条可用于针对炭疽芽孢的快速检测,制作简单,信号稳定性高,抗干扰能力强。

[0037] 与已有免疫层析试纸条不同,该试纸条无需制作结合垫,无需将捕捉蛋白(抗原、抗体)、二抗固定于硝酸纤维素膜,检测过程中不会形成检测带和质控带。该技术可同时实现光信号、磁信号及裸眼检测。5 分钟内即可在硝酸纤维素膜上完成层析,最终达到裸眼定性检测灵敏度 10^4 个芽孢/毫升,磁性分析仪检测灵敏度 5×10^3 个芽孢/毫升,光分析仪检测灵敏度 7×10^3 个芽孢/毫升。此外,不需要额外的样品处理,该技术即可直接用于高灵敏检测 0-25% (w/v) 奶粉样品,0-10% (w/v) 淀粉样品、0-10% (w/v) 小苏打样品中的炭疽芽孢。目前,尚无层析技术具有相同的抗干扰能力,在上述粉末中的检测灵敏度也明显低于本发明。

附图说明

[0038] 图 1 颗粒阻滞型磁性免疫层析检测技术原理图。其中,样品垫 1、硝酸纤维素膜 2、吸收垫 3、底板 4。

[0039] 图 2 芽孢杆菌芽孢/营养体-抗体偶联超顺磁颗粒复合物的结果显示。其中,滞留带 5。

具体实施方式

[0040] 为达到本发明的目的,本发明以炭疽芽孢为例,采用以下技术方案进行:

[0041] 试剂、仪器和方法:

[0042] 1) 试剂:

[0043] 颗粒阻滞型磁性免疫层析试纸条;抗体偶联超顺磁颗粒;反应缓冲液;展层缓冲

液。

[0044] 2) 仪器：

[0045] 数字化层析检测仪（用于检测条带的光学信号，BestHealth, Wuhan, China）；磁性分析仪（magnetic assay reader, 用于检测条带的磁性信号，MagnaBioScience, CA, USA）。

[0046] 3) 方法：

[0047] 抗体的制备：采用标准 B 淋巴细胞杂交瘤技术 [Kohler G, Milstein C (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 256:495 - 497] 制备针对炭疽芽孢表面 EA1 蛋白的单克隆抗体，并用正辛酸-饱和硫酸铵沉淀法对制备出的抗体进行纯化 [Perosa F, Carbone R, Ferrone S, Dammacco F (1990) Purification of human immunoglobulins by sequential precipitation with caprylic acid and ammonium sulphate. J Immunol Methods 128:9 - 16.]；

[0048] 抗体偶联超顺磁颗粒的制备：选用直径为 100-300nm 的羧基超顺磁颗粒（Ademtech 公司, Pessac, France），使用碳二亚胺（EDC）和琥珀酰亚胺（NHS）共价偶联的方式将针对炭疽芽孢表面蛋白的单克隆抗体共价交联到超顺磁颗粒上，交联后的超顺磁颗粒用 BSA 封闭（EDC、NHS、BSA 均购自 Sigma 公司, St. Louis, MO）；

[0049] 颗粒阻滞型磁性免疫层析试纸条的制备：该试纸条由 98mm 长的底板（millipore 公司生产级底板, Billerica, MA）、25mm 长的硝酸纤维素膜（millipore 公司实验级 135kit 硝酸纤维素膜）、18mm 长的样品垫（millipore 公司生产级样品垫）以及 25mm 长的吸收垫（millipore 公司生产级吸收垫）构成。粘贴于底板上的第一层为硝酸纤维素膜，硝酸纤维素膜一端粘贴有样品垫（第二层），另一端粘贴有吸收垫（第二层），两层之间相互交错 2.5mm。构成该试纸条的所有部件长度不同，宽度均为 5mm，组装完毕后根据需要切割至一定宽度即得到试纸条；

[0050] 用于为超顺磁颗粒和炭疽芽孢提供反应环境的反应缓冲液的成分：40mM BS (pH9.7) 1% BSA；

[0051] 用于洗涤、重悬免疫反应产物并在展层时作为流动相的展层缓冲液的成分：10mM PBS (pH7.2) 0.5% Tween-20 1% BSA。

[0052] 本发明所述的颗粒阻滞型磁性免疫层析的工作原理如图 1 所示：

[0053] 颗粒阻滞型磁性免疫层析系统由两个部分组成，第一部分为样品的纯化与富集，第二部分为样品展层与信号读取。待测样品与抗体偶联超顺磁颗粒以 1:20（体积 / 体积）的比例混合，孵育一段时间后用磁力架进行分离。经过反复清洗，将磁分离获得的超顺磁颗粒及其捕获的抗原用一定量的展层缓冲液重悬并加入检测条带的样品垫。展层过程中，样品中的炭疽芽孢杆菌芽孢 / 营养体 - 抗体偶联超顺磁颗粒复合物由于体积过大而不能顺利展层，在靠近展层起始段形成阻滞条带，阻滞条带为黄色（如图 2 所示），可肉眼直接观察，也可用仪器检测其光学、磁学信号。

[0054] 以下实施例将对本发明作进一步说明，其目的仅在于更好地理解本发明的目的，而不是限制本发明的保护范围。

[0055] 实施例 1：使用颗粒阻滞型磁性免疫层析法检测奶粉样品中的炭疽芽孢。

[0056] 在 0-15% 的奶粉样品中，炭疽芽孢的检测下线为 2×10^4 spores/g；当奶粉溶液为 25% 时，可检测的炭疽芽孢浓度低至 6×10^4 spores/g。已有检测技术在直接检测低浓度奶

粉用品中的芽孢时 ($\leq 10\%$), 灵敏度均低于本发明。此外, 目前尚无检测技术可直接检测 25% 奶粉样品中的炭疽芽孢, 该浓度已经接近饱和浓度。

[0057] 操作步骤如下:

[0058] 将炭疽芽孢 - 奶粉样品用反应缓冲液混合, 制成 0-25% 的奶粉乳浊液作为待测样品;

[0059] 将 $100 \mu\text{l}$ 的待检测样品与 $5 \mu\text{l}$ 抗体偶联超顺磁颗粒工作液混合, 室温静置孵育 10min;

[0060] 磁力架分离出免疫复合物, 并用展层缓冲液清洗两遍, 最终用展层缓冲液重悬恢复至 $50 \mu\text{l}$ 体积并将其加入检测试纸的样品垫;

[0061] 经 5min 展层, 目测观察试纸条上是否存在阻滞条带以定性判断奶粉样品中炭疽芽孢的含量, 或利用光学检测仪器或磁性分析仪器, 通过获取阻滞条带的光学信号或磁性信号来定量检测奶粉样品中炭疽芽孢的含量。

[0062] 该方法所用组分及其制备方法如下:

[0063] 抗体的制备: 采用标准 B 淋巴细胞杂交瘤技术 [Kohler G, Milstein C (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 256: 495 - 497] 制备针对炭疽芽孢表面 EA1 蛋白的单克隆抗体, 并用正辛酸 - 饱和硫酸铵沉淀法对制备出的抗体进行纯化 [Perosa F, Carbone R, Ferrone S, Dammacco F (1990) Purification of human immunoglobulins by sequential precipitation with caprylic acid and ammonium sulphate. J Immunol Methods 128: 9 - 16.];

[0064] 抗体偶联超顺磁颗粒工作液的制备: 使用含 0.1% (体积/体积) Tween20 的 50mM、pH4.7 的醋酸钠缓冲液洗涤超顺磁颗粒 (直径 300nm), 加入 EDC 和 NHS 使终浓度均为 20mM, 室温反应一小时, 洗涤超顺磁颗粒, 加入针对炭疽芽孢表面 EA1 蛋白的特异性单克隆抗体使其与超顺磁颗粒含有的羧基的数量比例是 1:300 到 1:400, 37°C 摇床 120rpm 反应 2 小时, 洗涤超顺磁颗粒, 加入含有 5% (质量/体积) BSA 的 0.02M、pH7.2 的 PBS, 37°C 摇床 120rpm 封闭 2 小时, 使用含 0.1% (体积/体积) Tween20 的 50mM、pH4.7 的醋酸钠缓冲液反复洗涤超顺磁颗粒, 并将抗体偶联超顺磁颗粒转移至含 1% (质量/体积) PVP、1% (质量/体积) BSA、0.5% (体积/体积) Tween20、5% (质量/体积) 蔗糖的 50mM pH8.5 硼酸缓冲液中保存, 使抗体偶联超顺磁颗粒的浓度达到 3mg/ml, 置于 4°C 备用, 即为抗体偶联超顺磁颗粒工作液;

[0065] 检测试纸条的制备: 该试纸条由 98mm 长的底板 (millipore 公司生产级底板)、25mm 长的硝酸纤维素膜 (millipore 公司实验级 135kit 硝酸纤维素膜)、18mm 长的样品垫 (millipore 公司生产级样品垫) 以及 25mm 长的吸收垫 (millipore 公司生产级吸收垫) 构成。粘贴于底板上的第一层为硝酸纤维素膜, 硝酸纤维素膜一端粘贴有样品垫 (第二层), 另一端粘贴有吸收垫 (第二层), 两层之间相互交错 2.5mm。构成该试纸条的所有部件长度不同, 宽度均为 5mm, 组装完毕后根据需要切割至一定宽度即得到试纸条;

[0066] 用于为超顺磁颗粒和炭疽芽孢提供反应环境的反应缓冲液的成分: 40mM BS (pH9.7) 1% BSA;

[0067] 用于洗涤、重悬免疫反应产物并在展层时作为流动相的展层缓冲液的成分: 10mM PBS (pH7.2) 0.5% Tween-20 1% BSA。

[0068] 实施例 2 :使用颗粒阻滞型磁性免疫层析法检测淀粉样品中的炭疽芽孢。

[0069] 在 $\leq 5\%$ 淀粉样品中,炭疽芽孢的检测下线约为 2×10^4 spores/g ;当淀粉粉溶液为 10% 时,可检测的炭疽芽孢浓度低至 2×10^5 spores/g。已有检测技术在直接检测低浓度奶粉用品中的芽孢时($\leq 5\%$),灵敏度均低于本发明。此外,目前尚无检测技术可直接检测 10% 淀粉样品中的炭疽芽孢,该浓度已经接近饱和浓度。

[0070] 操作步骤如下:

[0071] 将炭疽芽孢-淀粉样品用反应缓冲液混合,制成 $0-10\%$ 的淀粉悬浊液作为待测样品;

[0072] 将 $100 \mu\text{l}$ 的待检测样品与 $5 \mu\text{l}$ 抗体偶联超顺磁颗粒工作液混合,室温静置孵育 10min ;

[0073] 磁力架分离出免疫复合物,并用展层缓冲液清洗两遍,最终用展层缓冲液重悬恢复至 $50 \mu\text{l}$ 体积并将其加入检测试纸的样品垫;

[0074] 经 5min 展层,目测观察试纸条上是否存在阻滞条带以定性判断奶粉样品中炭疽芽孢的含量,或利用光学检测仪器或磁性分析仪器,通过获取阻滞条带的光学信号或磁性信号来定量检测奶粉样品中炭疽芽孢的含量。

[0075] 该方法所用组分及其制备方法如下:

[0076] 同实施例 1 中所列组分及其制备方法。

[0077] 实施例 3 :使用颗粒阻滞型磁性免疫层析法检测小苏打样品中的炭疽芽孢。

[0078] 在 5% 小苏打溶液中,炭疽芽孢的检测下线为 4×10^4 spores/g ;在 10% 小苏打和溶液中,炭疽芽孢的检测下线为 5×10^4 spores/g。目前尚无检测技术可直接检测小苏打溶液中的炭疽芽孢,通常需要复杂的样品预处理步骤。

[0079] 操作步骤如下:

[0080] 将炭疽芽孢-小苏打样品用反应缓冲液混合,制成 $0-10\%$ 的小苏打溶液作为待测样品;

[0081] 将 $100 \mu\text{l}$ 的待检测样品与 $5 \mu\text{l}$ 抗体偶联超顺磁颗粒工作液混合,室温静置孵育 10min ;

[0082] 磁力架分离出免疫复合物,并用展层缓冲液清洗两遍,最终用展层缓冲液重悬恢复至 $50 \mu\text{l}$ 体积并将其加入检测试纸的样品垫;

[0083] 经 5min 展层,撕去样品垫,目测观察试纸条上是否存在阻滞条带以定性判断奶粉样品中炭疽芽孢的含量,或利用光学检测仪器或磁性分析仪器,通过获取阻滞条带的光学信号或磁性信号来定量检测奶粉样品中炭疽芽孢的含量。

[0084] 该方法所用组分及其制备方法如下:

[0085] 同实施例 1 中所列组分及其制备方法。

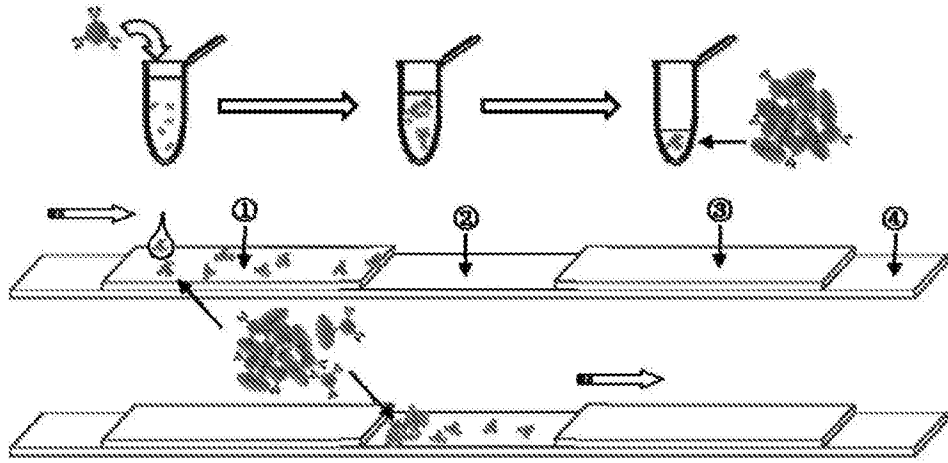


图 1

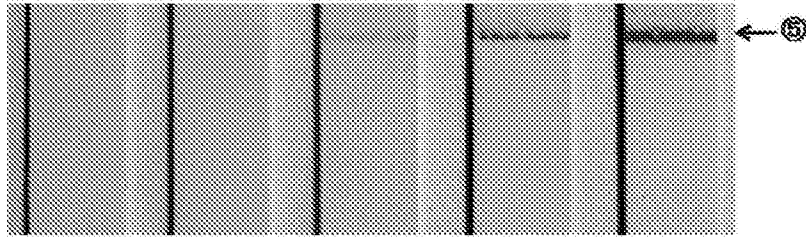


图 2