



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103808926 A

(43) 申请公布日 2014. 05. 21

(21) 申请号 201410015610. 9

(22) 申请日 2014. 01. 14

(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 阎锡蕴 段德民 张德玺 杨东玲
冯静 宋丽娜

(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 33/558(2006. 01)

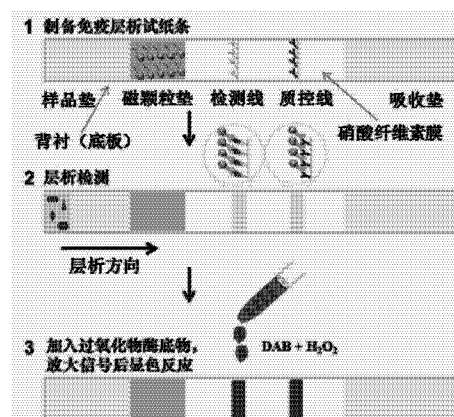
权利要求书1页 说明书7页 附图5页

(54) 发明名称

纳米模拟酶免疫层析检测方法

(57) 摘要

本发明提供一种用于检测液体样品中的待测物的纳米模拟酶免疫层析检测方法,所述方法依次包括以下步骤:1) 提供检测探针,所述检测探针通过将磁性纳米颗粒与能够与所述待测物特异性结合的第一分子偶联制备;2) 提供捕获探针,所述捕获探针是固定化的能够与所述待测物特异性结合的第二分子;3) 使所述液体样品与所述检测探针接触;4) 使与所述检测探针接触过的所述液体样品与所述捕获探针接触;以及5) 向经过步骤4)的所述捕获探针加入供氢底物和过氧化物进行显色反应。本发明还提供一种用于检测液体样品中的待测物的纳米模拟酶免疫层析检测装置。



1. 一种用于检测液体样品中的待测物的纳米模拟酶免疫层析检测方法,所述方法依次包括以下步骤:

1) 提供检测探针,所述检测探针通过将磁性纳米颗粒与能够与所述待测物特异性结合的第一分子偶联制备;

2) 提供捕获探针,所述捕获探针是固定化的能够与所述待测物特异性结合的第二分子;

3) 使所述液体样品与所述检测探针接触;

4) 使与所述检测探针接触过的所述液体样品与所述捕获探针接触;以及

5) 向经过步骤 4) 的所述捕获探针中加入供氢底物和过氧化物进行显色反应。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述磁性纳米颗粒的粒径在 10 纳米至 500 纳米范围内。

3. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述磁性纳米颗粒是 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒。

4. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述待测物是蛋白质、多肽或核酸。

5. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述待测物是蛋白质,并且所述第一分子和所述第二分子是针对所述蛋白质的特异性抗体,优选是单克隆抗体。

6. 根据权利要求 5 所述的方法,其中所述第一分子与所述磁性纳米颗粒通过 EDC-NHS 法偶联。

7. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述供氢底物包括四甲基联苯胺 (TMB)、四甲基联苯胺硫酸盐 (TMBS)、邻苯二胺 (OPD)、二氨基联苯胺 (DAB)、二氨基联苯胺四盐酸 (DAB-4HCl)、5-氨基水杨酸 (5-AS)、邻联甲苯胺 (OT) 或连氮二铵盐 (ABTS)。

8. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述过氧化物包括过氧化氢和过氧化脲。

9. 一种用于检测液体样品中的待测物的纳米模拟酶免疫层析检测装置,所述装置包括依次设置在底板上的以下各项:

样品垫,所述样品垫用于承接所述液体样品并滤过所述样品中的杂质;

磁性纳米颗粒垫,所述磁性纳米颗粒垫包含与能够与所述待测物特异性结合的第一分子偶联的磁性纳米颗粒;

检测线,所述检测线包含能够与所述待测物特异性结合的第二分子;

吸收垫,所述吸收垫由吸水材料制成,用于提供层析的动力,

其中所述磁性纳米颗粒的粒径优选在 10 纳米至 500 纳米范围内,

其中所述磁性纳米颗粒优选是 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒,

其中所述待测物优选是蛋白质、多肽或核酸,并且更优选地,所述待测物是蛋白质而所述第一分子和所述第二分子是针对所述蛋白质的特异性抗体,优选是单克隆抗体,

其中所述第一分子与所述磁性纳米颗粒优选通过 EDC-NHS 法偶联,

其中所述供氢底物优选包括四甲基联苯胺 (TMB)、四甲基联苯胺硫酸盐 (TMBS)、邻苯二胺 (OPD)、二氨基联苯胺 (DAB)、二氨基联苯胺四盐酸 (DAB-4HCl)、5-氨基水杨酸 (5-AS)、邻联甲苯胺 (OT) 或连氮二铵盐 (ABTS),并且

其中所述过氧化物优选包括过氧化氢和过氧化脲。

10. 根据权利要求 9 所述的检测装置,其中在所述检测线之后还设置有质控线,所述质控线固定有能够与所述第一分子特异性结合的第三分子。

纳米模拟酶免疫层析检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于纳米材料及生物医学纳米技术领域。本发明涉及磁性纳米颗粒模拟酶,并提供了其应用于免疫层析生物分子检测的方法。

背景技术

[0002] 胶体金免疫层析法是 20 世纪 90 年代初发展起来的以胶体金为标记物的检测方法,它把免疫亲和技术、印渍技术和斑点薄层层析技术组合在一起。由于用该层析条检测的时候,所有样品均经过较窄的纤维素膜的持续性反应,实际上对被测物质起到了浓缩、聚集作用,提高了反应的灵敏度,加快了反应速度,整个操作时间仅需 3~15 分钟。其原理是将特异的抗体(或抗原)先固定于硝酸纤维素膜的某一区带,当干燥的硝酸纤维素膜一端浸入样品后,由于毛细管作用,样品将沿着该膜向前移动(层析),当移动至固定有抗体、抗原的区域时,样品中相应的抗原即与该抗体发生特异性结合,若用免疫胶体金作标记物可使该区域显示一定的颜色,从而实现特异性的免疫诊断。传统的胶体金免疫层析技术具有操作简便、经济、快速等特点,但由于灵敏度相对较低,严重制约了其在生物分子检测方面的广泛应用,信号放大是解决免疫层析技术灵敏度低的关键所在。

[0003] 磁性纳米颗粒具有良好的生物相容性,其既具有纳米材料所特有的性质,如粒径小、比表面积大、偶联容量高,又具有磁响应性及超顺磁性,可以在恒定磁场下聚集和定位、在交变磁场下吸收电磁波产热,利用这些特性,磁性纳米颗粒被广泛应用于磁共振对比剂、磁靶向药物载体、细胞与生物分子分离、生物传感与检测以及磁感应肿瘤热疗等生物学领域。

[0004] 最近几年,磁性免疫层析(Magnetic ImmunoChromatographic Test, MICT)作为一种新一代单人份快速定量检测技术逐渐发展起来,它是以超顺磁性纳米颗粒代替传统的标记物(胶体金,乳胶颗粒等)来进行免疫层析,最后通过磁信号阅读仪读取结合在检测线处磁颗粒的磁场强度,从而对所检样品进行定性定量判断。目前国内成型的磁信号阅读仪还没有上市,国际上也只有少数外国公司(如美国 MagnaBioSciences 公司)具有该项技术,但其价格昂贵,因而限制了磁性免疫层析的发展和推广。

[0005] 近年来,我们课题组研究发现磁纳米颗粒具有内在的模拟酶活性,可替代过氧化物酶进行免疫检测(阎锡蕴等, Nature Nanotechnology. 2007)。最近,我们课题组又研制了三功能(识别、催化、磁性)于一体的新型免疫组化检测试剂,发现磁颗粒表面包裹蛋白分子后仍然具有酶活性(阎锡蕴等, Nature Nanotechnology. 2012)。这种催化活性与辣根过氧化物酶相似,在过氧化氢存在下,磁性纳米颗粒可以催化辣根过氧化物酶的底物,如可以催化 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)生成蓝色的产物,催化二氨基联苯胺(DAB)生成棕色沉淀,催化邻苯二胺(OPD)生成橘红色产物,催化活性依赖于 pH 值、温度和过氧化氢浓度,其催化机理符合乒乓机制。同时还发现磁性纳米颗粒的催化活性随着颗粒粒径的减小而增强,颗粒的粒径越小,其催化活性越高。磁性颗粒的粒径达微米量级后,催化活性降低至接近零值。磁性纳米颗粒的模拟酶活性,相比蛋白制剂的辣根过氧化物酶

(horseradishperoxidase, HRP), 具有更多的优势:(1) 蛋白酶在极端 pH 和温度下容易变性, 同时也容易被蛋白酶降解, 而磁性纳米颗粒在极端条件下很稳定;(2) 蛋白酶的生产成本很高, 而磁性纳米颗粒制备简单、廉价;(3) 由于磁性纳米颗粒具有超顺磁性, 用磁铁可以回收反复利用; 同时基于磁性纳米颗粒的磁可控性, 拓展了其作为模拟酶的应用领域。

发明内容

[0006] 本发明的目的是克服现有免疫层析技术存在的不足, 提供一种纳米模拟酶免疫层析检测方法, 其基本原理同胶体金试纸条, 首先将某一特定抗原特异的抗体 A 与磁性纳米颗粒偶联, 制备磁颗粒垫, 然后将另一种针对此抗原的抗体 B 固定于硝酸纤维素膜的特定区带形成检测线 (T 线), 将抗抗体 A 的抗体 (二抗) 也固定于硝酸纤维素膜的特定区带形成质控线 (C 线), 与 T 线平行, 组装和制备磁性免疫层析试纸。当干燥的硝酸纤维素膜一端浸入样品后, 由于毛细管作用, 样品将沿着该膜向前移动, 当移动至磁颗粒垫时, 磁颗粒上的抗体 A 就会与抗原反应, 生成抗原-抗体 A-磁颗粒的复合物, 继续经毛细管作用移动到固定有另一抗体 B 的 T 线区域时, 样品中的抗原就会与这一抗体 B 发生反应, 最后生成抗体 B-抗原-抗体 A-磁颗粒复合物; 而没有结合抗原的磁颗粒抗体探针继续向前移动, 在 C 线处与二抗结合形成二抗-抗体 A-磁颗粒复合物, 磁颗粒就会在 T 线和 C 线处聚集。如果样品中的抗原浓度较高, 那么在 T 线处聚集的磁颗粒也多, 会显示出磁颗粒的颜色; 如果样品中的抗原浓度很低时, 则 T 线处聚集的磁颗粒很少, 不足以显示出磁颗粒的颜色, 这时加入过氧化物和供氢底物如 TMB、DAB 等, 利用磁颗粒的过氧化物酶催化作用产生大量沉淀而增强检测信号, 以检测出低浓度的抗原物质。该技术集磁性纳米颗粒过氧化物酶催化活性及磁分离特性于一体, 层析后通过加入过氧化物和供氢底物如邻苯二胺 (DAB) 等, 利用磁颗粒的酶催化作用产生棕色沉淀, 从而增强检测信号, 提高灵敏度, 使得检测结果通过肉眼观察即可以判定, 免除了对仪器的依赖性, 基于此新技术的生物样本检测, 简便快速、非常适合现场使用。

[0007] 本发明通过以下技术方案来实现:

[0008] 纳米模拟酶免疫层析检测方法, 所述方法包括: 1) 采用合适尺寸的磁性纳米颗粒, 将特异性结合待测抗原的生物分子偶联于其表面制备特异性纳米颗粒探针, 制备出磁颗粒垫; 2) 组装和制备磁性免疫层析试纸; 3) 层析反应, 待检抗原与磁纳米探针、检测线抗体、质控线抗体反应形成夹心复合物, 阳性样品会在 T 线处形成磁颗粒聚集; 4) 显色反应, 加入过氧化物和供氢底物如 TMB、DAB 等, 利用磁颗粒的酶催化作用产生大量沉淀而增强检测信号; 5) 根据实验结果, 实现对靶标分子的定性和半定量检测。

[0009] 进一步地, 本发明提供纳米模拟酶免疫层析检测方法, 其中所述组装和制备磁性免疫层析试纸条是将包被膜、结合了待检抗原所对应抗体的磁颗粒垫、样品垫、吸水垫以相互交错的形式依次粘贴在底板上, 然后在上层覆盖透明塑料密封膜组装而成, 其中所述的包被膜上预包被有待检抗原的检测线和质控线。

[0010] 更进一步地, 上述的纳米模拟酶免疫层析检测方法, 其特征在于: 所述磁性纳米颗粒可以是球形、棒形、立方形、三角形、多角形等形状中的任意一种; 其粒径在 10 纳米至 500 纳米范围内; 其可以是裸露的磁颗粒、也可以是蛋白外壳如病毒外壳、转铁蛋白外壳、铁蛋白外壳包被的磁颗粒; 其可以是 Fe_3O_4 磁颗粒, 也可以是外层修饰有二价铁离子试剂的 Fe_2O_3

磁颗粒。

[0011] 更进一步地,上述的纳米模拟酶免疫层析检测方法,其特征在于:所述供氢底物包括四甲基联苯胺 TMB、四甲基联苯胺硫酸盐 TMBS、邻苯二胺 OPD、二氨基联苯胺 DAB、二氨基联苯胺四盐酸 DAB-4HCl、5-氨基水杨酸 5-AS、邻联甲苯胺 OT 或连氮二铵盐 ABTS;所述过氧化物包括过氧化氢或过氧化脲等。

[0012] 更进一步地,上述的纳米模拟酶免疫层析检测方法,其特征在于:所述特异性生物分子包括蛋白、核酸、多肽;所述的靶标分子存在于溶液或体液中。

[0013] 本发明技术方案突出的实质性特点和显著的进步主要体现在:

[0014] 本发明针对目前胶体金无信号放大功能、灵敏度相对较低的不足,结合最新的科学发现,提供一种纳米模拟酶免疫层析检测方法,该技术集磁性纳米颗粒过氧化物酶催化活性及磁分离特性于一体,层析后通过加入过氧化物和供氢底物如邻苯二胺(DAB)等,利用磁颗粒的酶活性产生大量棕色沉淀,放大检测信号 10-100 倍,使得检测结果通过肉眼观察即可以判定,免除了对仪器的依赖性,基于此新技术的生物样本检测,简便快速、灵敏度高、非常适合现场使用,是一项具有新颖性、创造性、实用性的新技术。

[0015] 更具体地,本发明提供以下各项:

[0016] 1. 一种用于检测液体样品中的待测物的纳米模拟酶免疫层析检测方法,所述方法依次包括以下步骤:

[0017] 1) 提供检测探针,所述检测探针通过将磁性纳米颗粒与能够与所述待测物特异性结合的第一分子偶联制备;

[0018] 2) 提供捕获探针,所述捕获探针是固定化的能够与所述待测物特异性结合的第二分子;

[0019] 3) 使所述液体样品与所述检测探针接触;

[0020] 4) 使与所述检测探针接触过的所述液体样品与所述捕获探针接触;以及

[0021] 5) 向经过步骤 4) 的所述捕获探针中加入供氢底物和过氧化物进行显色反应。

[0022] 2. 根据 1 所述的方法,其中所述磁性纳米颗粒的粒径在 10 纳米至 500 纳米范围内。

[0023] 3. 根据 1 所述的方法,其中所述磁性纳米颗粒是 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒。

[0024] 4. 根据 1 所述的方法,其中所述待测物是蛋白质、多肽或核酸。

[0025] 5. 根据 1 所述的方法,其中所述待测物是蛋白质,并且所述第一分子和所述第二分子是针对所述蛋白质的特异性抗体,优选是单克隆抗体。

[0026] 6. 根据 5 所述的方法,其中所述第一分子与所述磁性纳米颗粒通过 EDC-NHS 法偶联。

[0027] 7. 根据 1 所述的方法,其中所述供氢底物包括四甲基联苯胺(TMB)、四甲基联苯胺硫酸盐(TMBS)、邻苯二胺(OPD)、二氨基联苯胺(DAB)、二氨基联苯胺四盐酸(DAB-4HCl)、5-氨基水杨酸(5-AS)、邻联甲苯胺(OT)或连氮二铵盐(ABTS)。

[0028] 8. 根据 1 所述的方法,其中所述过氧化物包括过氧化氢和过氧化脲。

[0029] 9. 一种用于检测液体样品中的待测物的纳米模拟酶免疫层析检测装置,所述装置包括依次设置在底板上的以下各项:

[0030] 样品垫,所述样品垫用于承接所述液体样品并滤过所述样品中的杂质;

- [0031] 磁性纳米颗粒垫,所述磁性纳米颗粒垫包含与能够与所述待测物特异性结合的第一分子偶联的磁性纳米颗粒;
- [0032] 检测线,所述检测线包含能够与所述待测物特异性结合的第二分子;
- [0033] 吸收垫,所述吸收垫一般由较厚的滤纸或类似的吸水材料制成,用于提供层析的动力,
- [0034] 其中所述磁性纳米颗粒的粒径优选在 10 纳米至 500 纳米范围内,
- [0035] 其中所述磁性纳米颗粒优选是 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒,
- [0036] 其中所述待测物优选是蛋白质、多肽或核酸,并且更优选地,所述待测物是蛋白质而所述第一分子和所述第二分子是针对所述蛋白质的特异性抗体,优选是单克隆抗体,
- [0037] 其中所述第一分子与所述磁性纳米颗粒优选通过 EDC-NHS 法偶联,
- [0038] 其中所述供氢底物优选包括四甲基联苯胺 (TMB)、四甲基联苯胺硫酸盐 (TMBS)、邻苯二胺 (OPD)、二氨基联苯胺 (DAB)、二氨基联苯胺四盐酸 (DAB-4HCl)、5-氨基水杨酸 (5-AS)、邻联甲苯胺 (OT) 或连氮二铵盐 (ABTS),并且
- [0039] 其中所述过氧化物优选包括过氧化氢和过氧化脲。
- [0040] 10. 根据 9 所述的检测装置,其中在所述检测线之后还设置有质控线,所述质控线固定有能够与所述第一分子特异性结合的第三分子。

附图说明

- [0041] 下面结合附图对本发明技术方案作进一步说明:
- [0042] 图 1:胶体金免疫层析法示意图
- [0043] 图 2:根据本发明纳米模拟酶免疫层析法的一个实施方案的示意图;
- [0044] 图 3:酶联免疫 (ELISA) 方法筛选高亲和力的相思子毒素单克隆抗体;
- [0045] 图 4:相思子毒素单克隆抗体的亚型鉴定;
- [0046] 图 5:免疫印迹 (Western blotting) 方法鉴定抗体识别相思子毒素的抗原表位;
- [0047] 图 6:双抗夹心酶联免疫 (ELISA) 方法筛选相思子毒素的配对抗体;
- [0048] 图 7:磁性纳米颗粒的制备;
- [0049] 图 8:磁颗粒抗体探针的制备及点印迹 (Dot blot) 检验;
- [0050] 图 9:磁颗粒纳米模拟酶免疫层析方法与胶体金免疫层析方法检测相思子毒素灵敏度的比较。

具体实施方式

- [0051] 以下结合具体实施例来描述本发明,要理解本发明的范围不受限于具体实施例。
- [0052] 实施例:纳米模拟酶免疫层析检测方法检测相思子毒素
- [0053] 1) 杂交瘤细胞的制备
- [0054] 相思子毒素是豆科植物相思子种子中的成分,是迄今为止所发现的毒性最强的植物毒素之一,对人、动物和昆虫都有很大的毒性,嚼服一粒相思子种子足以致人死亡,本发明以检测相思子毒素(相思子毒素以及下文中提到的蓖麻毒素均由军事医学科学院提供)为例来说明纳米模拟酶免疫层析检测方法的灵敏度和实用性。实验中使用的抗相思子毒素的单克隆抗体 Abrin-1、Abrin-2、Abrin-3、Abrin-4,分别来自分泌单克隆抗体 Abrin-1、

Abrin-2、Abrin-3、Abrin-4 的杂交瘤细胞（单克隆抗体的制备方法是本领域中已知的，并且可以参见例如 Kohler 和 Milstein, Nature 256:495, 1975; Yeh 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979; Yeh 等, Int. J. Cancer, 1982），具体为：采用硫酸铵沉淀法获得相思子种子中的粗毒素，再通过分子筛柱层析、离子交换柱层析、冷冻干燥等步骤获得高纯度的毒素；经甲醛灭活后的相思子毒素全毒素作为免疫原对 BALB/C 小鼠进行免疫接种，每次皮下注射 20 μ g 蛋白 / 每只鼠，每两星期一次，共三次。取脾细胞之前加强免疫一次。加强免疫之后三天，取脾脏，并将脾细胞悬浮于 RPMI 培养基中。在聚乙二醇 (PEG) 存在下，将脾细胞和 SP2/0-Ag14 鼠骨髓瘤细胞进行融合，并用 HAT 选择性培养基（含次黄嘌呤 hypoxanthin、氨基蝶呤 aminopterin 和胸腺嘧啶脱氧核苷 thymidin 的培养基）对杂交瘤进行筛选，获得杂交瘤细胞。用 ELISA 的方法筛选与天然相思子毒素有强结合能力的抗体，获得四株抗体，分别命名为 Abrin-1、Abrin-2、Abrin-3、Abrin-4，同时获得分泌这些抗体的杂交瘤细胞，依次是 Abrin-1、Abrin-2、Abrin-3、Abrin-4。

[0055] 2) ELISA 方法鉴定单克隆抗体 Abrin-1、Abrin-2、Abrin-3、Abrin-4 对相思子毒素的亲合力

[0056] 具体方法如下：首先在 96 孔 ELISA 板中过夜包被 50 μ l 的 2 μ g/ml 的相思子毒素蛋白；用 PBST 洗三遍，加入 5%BSA-PBS 封闭 1h；分别加入单克隆抗体的杂交瘤细胞培养上清，37 $^{\circ}$ C 孵育 1h；用 PBST 洗三遍，加入 HRP 标记的山羊抗小鼠抗体孵育 1h；用 PBST 洗三遍，加入 TMB 显色底物（200ng/ml 的 TMB, 0.03% 的 H₂O₂, pH4.5）显色，50 μ l / 孔，37 $^{\circ}$ C 反应 15min，加入 50 μ l / 孔 2M 的硫酸溶液终止反应，酶标仪 450nm 读数。从 ELISA 结果可以看出，Abrin-3、Abrin-4 的亲合力可以达到 1:5000，而 Abrin-1、Abrin-2 的亲合力高达 1:50000（如图 3）。

[0057] 3) 亲和层析纯化单克隆抗体

[0058] 具体方法如下：大量培养扩增杂交瘤细胞 Abrin-1、Abrin-2、Abrin-3、Abrin-4，分别制成细胞悬液，取六周龄 BALB/C 小鼠腹腔注射降植烷 (Sigma-Aldrich) 0.5ml / 只，约十天后，收集腹水，离心取上清液。通过蛋白 G 亲和层析 (Roche)，从腹水中纯化单克隆抗体。纯化好的单克隆抗体无菌过滤，冷藏或冷冻保存。

[0059] 4) 单克隆抗体亚型鉴定

[0060] 采用鼠抗体亚型鉴定试剂盒 (BD Pharmingen)，按照说明书操作，鉴定出抗体 Abrin-1 属于 IgG2a，Abrin-2、Abrin-3、Abrin-4 属于 IgG1 亚型（如图 4）。

[0061] 5) 免疫印迹 (Western blotting) 方法对抗体识别相思子毒素抗原表位的鉴定

[0062] 具体方法是：用 0.1M 的二硫苏糖醇 (DTT) 将相思子毒素 A、B 链的二硫键还原打开，利用 Western blotting 方法鉴定抗体识别相思子毒素的表位。结果发现，Abrin-1、Abrin-2、Abrin-3、Abrin-4 均在 26kD 的位置出现条带，而在 34kD 位置没有条带如图 5)，这说明这四种抗体均识别相思子毒素的 A 链（分子量大小约为 30kD）。

[0063] 6) 双抗夹心 ELISA 方法筛选配对抗体

[0064] 具体方法是：首先将过氧化物酶 HRP 通过戊二醛二步法或过碘酸钠法标记到抗体 Abrin-1 上，然后将 Abrin-2、Abrin-3、Abrin-4 抗体以 0.02M 的 PBS (pH7.2) 稀释至 2 μ g/ml，然后以 50 μ l / 孔的量加入到 96 孔板中，4 $^{\circ}$ C 包被过夜；用 PBST 洗三遍，加入 5%BSA-PBS 封闭 1h；分别加入 100、10、1、0.1ng/ml 的相思子毒素以及 10ng/ml 的蓖麻毒

素作为阴性对照 (Ctrl), 37℃ 孵育 1h; 用 PBST 洗三遍, 加入 1 μg/ml 浓度的 HRP 标记的 Abrin-1 抗体孵育 1h; 用 PBST 洗三遍, 加入 TMB 显色底物 (200ng/ml 的 TMB, 0.03% 的 H₂O₂, pH4.5) 显色, 50 μl/孔, 37℃ 反应 15min, 加入 50 μl/孔 2M 的硫酸溶液终止反应, 酶标仪 450nm 读数。从 ELISA 结果可以看出 (如图 6), Abrin-1 与 Abrin-2 配对后效果最好。

[0065] 7) Fe₃O₄ 磁性纳米颗粒的制备

[0066] 在王水浸泡过的烧杯中, 分别加入 0.3g 的 CoCl₂·6H₂O、0.675g 的 FeCl₃·6H₂O 和 20mL 的乙二醇, 搅拌至完全溶解; 加入 1.5g 无水 NaAc, 0.15g PAA, 继续搅拌 30min; 置于反应釜中 200℃ 反应 14h; 降温, 将其中溶液倒入离心管中, 磁分离并去除上清, 加入乙醇超声洗 4 次, 50-60℃ 干燥, 制备的磁颗粒 MNPs 粒径约 350nm 左右 (如图 7)。

[0067] 8) 磁颗粒探针的制备

[0068] 首先采用 EDC-NHS (EDC: 碳化二亚胺盐酸盐; NHS: 羟基丁二酰亚胺) 将磁颗粒表面的羧基活化, 然后将相思子毒素单克隆抗体 Abrin-1 偶联于 350nm 四氧化三铁磁性颗粒上形成 MNPs@Abrin-1。具体步骤如下: 称取适量四氧化三铁磁性颗粒, 加入 50mg/ml 的 NHS, EDC 各 50 μl, 室温孵育 30 分钟, 用去离子水清洗, 除去多余的 NHS/EDC。加入 1ml、pH6.0 的乙酸钠溶液, 加入 100 μg 的 Abrin-1 抗体, 混匀, 4℃ 孵育 2 小时, PBS 洗涤, 加入 50mM pH 7.4 Tris-Cl 封闭活化的羧基, PBS 重悬, 4℃ 保存; 偶联效果采用点印迹 (Dot blot) 方法检测, 即在硝酸纤维素膜上分别点上 1mg/ml 的羊抗鼠抗体、相思子毒素 Abrin、蓖麻毒素各 1 μl, 待干燥后加入 MNPs@Abrin-1 溶液, 反应后的实验结果显示这种磁颗粒探针只与羊抗鼠抗体、相思子毒素 Abrin 结合, 而不与蓖麻毒素 Ricin 结合, 这说明偶联的 MNPs@Abrin-1 抗体探针特异性很好 (如图 8)。

[0069] 9) 纳米模拟酶免疫层析法试纸条的组装 (如图 2)

[0070] a. 包被膜的制备: 用包被缓冲液 (0.02M 磷酸盐缓冲液, pH 7.2) 将相思子毒素的抗体 Abrin-2、公司购买的羊抗鼠抗体 (二抗) 分别稀释为 0.5mg/ml 与 1mg/ml, 使用定量喷膜装置以 1 μl/cm 的量按前后顺序将二者以 0.8cm 的间隔均匀喷印于 3.5cm 宽度的硝酸纤维素膜上, 分别形成检测线 (T 线) 抗体带与质控线 (C 线) 抗体带。室温晾干 30min 后于封闭液 (含有 0.5%BSA 的 0.02M PBS, pH 7.2) 中浸泡 10min 后于 25-35℃ 烘干 8 小时, 加入干燥剂封存备用。

[0071] b. 磁颗粒探针垫的制备: 使用喷膜仪的专用喷头将处理好的磁颗粒探针 (如 8) 中所制备的) 以 50 μl/cm 的量均匀喷涂于 0.8cm 宽度的玻璃纤维垫上, 过夜冷冻干燥, 加入干燥剂封存备用。

[0072] c. 样品垫的处理: 将 1.8cm 宽度的样品垫 (亲水性的玻璃纤维) 浸入样品垫处理液 (1-5%Casein (酪蛋白), 0.1-1%PVA (聚乙烯醇), 0.01-0.2%Tween 20, 0.02M PBS, pH 7.2) 处理 1 小时, 取出后于 25-35℃ 烘干 8 小时。

[0073] d. 试纸条的组装及切割: 将 3.5cm 包被膜、0.8cm 磁颗粒探针垫、1.8cm 样品垫、2.5cm 吸水垫以相互交错 2mm 的形式依次粘贴在背衬 (底板) 上 (层叠顺序如图 2 所示), 覆盖一层透明塑料密封膜, 组装成试纸板; 使用切条机将组装好的试纸板切成 0.5cm 宽的成品试纸条; 将切割好的试纸条置于塑料低卡上的卡槽内, 盖上上盖, 使用压卡机将上下两片塑料卡压紧, 加入干燥剂室温封存备用 (上述包被膜、磁颗粒探针垫、样品垫、吸水垫的尺寸以及相互交错的宽度可以根据实际需要由本领域技术人员适当调整)。

[0074] 10) 加样检测

[0075] 微量移液器取 50 μ l 含有梯度浓度的相思子毒素样品溶液 (浓度依次是 100ng/ml、10ng/ml、1ng/ml、0ng/ml) 加入检测卡上的样品垫上, 再加入 50 μ l 层析缓冲液 (1%Tween 20, 0.5%Triton X-100, 1%NP-40, 0.05%NaN₃, 20mM PBS, pH 7.2), 等待反应进行 15min。由于磁颗粒上偶联有相思子毒素的单克隆抗体 Abrin-1, 它与样品溶液中的相思子毒素结合后形成的复合物继续先前移动时, 会与检测线 (T 线) 处相思子毒素的另一抗体 Abrin-2 结合形成磁颗粒的聚集, 而没有结合相思子毒素的磁颗粒 Abrin-1 抗体探针会继续移动到质控线 (C 线) 处通过与其二抗作用形成磁颗粒的聚集。

[0076] 11) 酶催化放大检测信号

[0077] 在检测线 T 线 (Abrin-2 抗体带) 和质控线 C 线 (羊抗鼠抗体带) 处加入 50 μ l 的显色溶液 (过氧化氢 H₂O₂ 浓度为 530mM; 过氧化物酶的生色底物二氨基联苯胺 (3, 3'-diaminobenzidine, DAB) 浓度为 816mM), 反应 5min; 由于磁颗粒的过氧化物模拟酶活性, 会在磁颗粒聚集的 T 线和 C 线处生成大量棕褐色的不溶性沉淀物, 从而将检测信号放大, 其检测灵敏度是传统胶体金试纸条检测法的 100 倍 (如图 9 所示)。

[0078] 综上所述, 本发明为一种纳米模拟酶免疫层析检测方法, 该技术集磁性纳米颗粒过氧化物酶催化活性及磁分离特性于一体, 免疫层析后通过加入过氧化物和供氢底物如邻苯二胺 (DAB) 等, 利用磁颗粒的酶活性产生大量棕色沉淀, 放大检测信号 10-100 倍, 使得检测结果通过肉眼观察即可以判定, 免除了对仪器的依赖性。该方法操作步骤简单、快捷、灵敏度高、非常适合现场检测使用, 粒过氧化物酶的功能, 具有十分广阔的应用前景, 是一项具有新颖性、创造性、实用性的新技术。

[0079] 以上仅是本发明的具体应用范例。应理解, 这些实施例仅用于说明本专利而不用来限制本发明的范围。

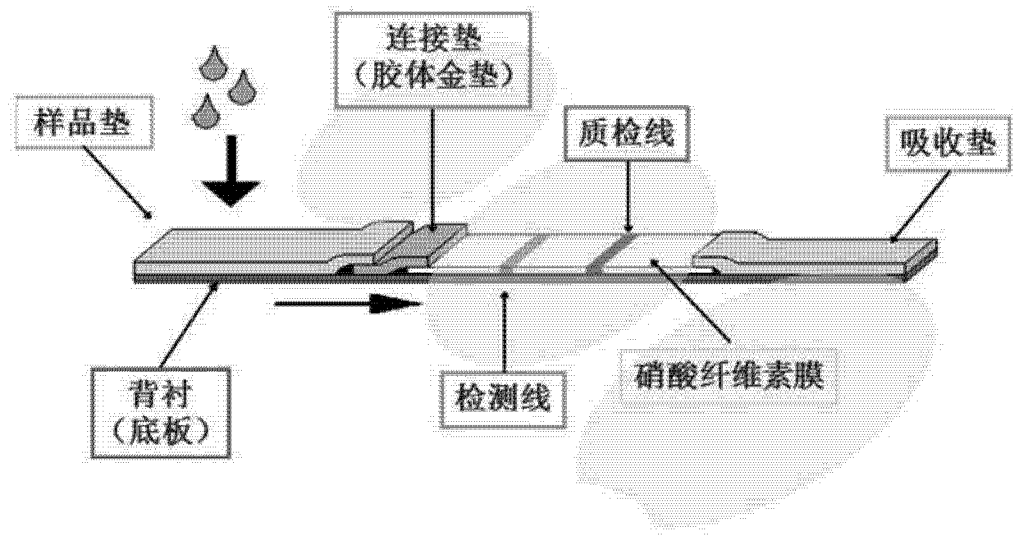


图 1

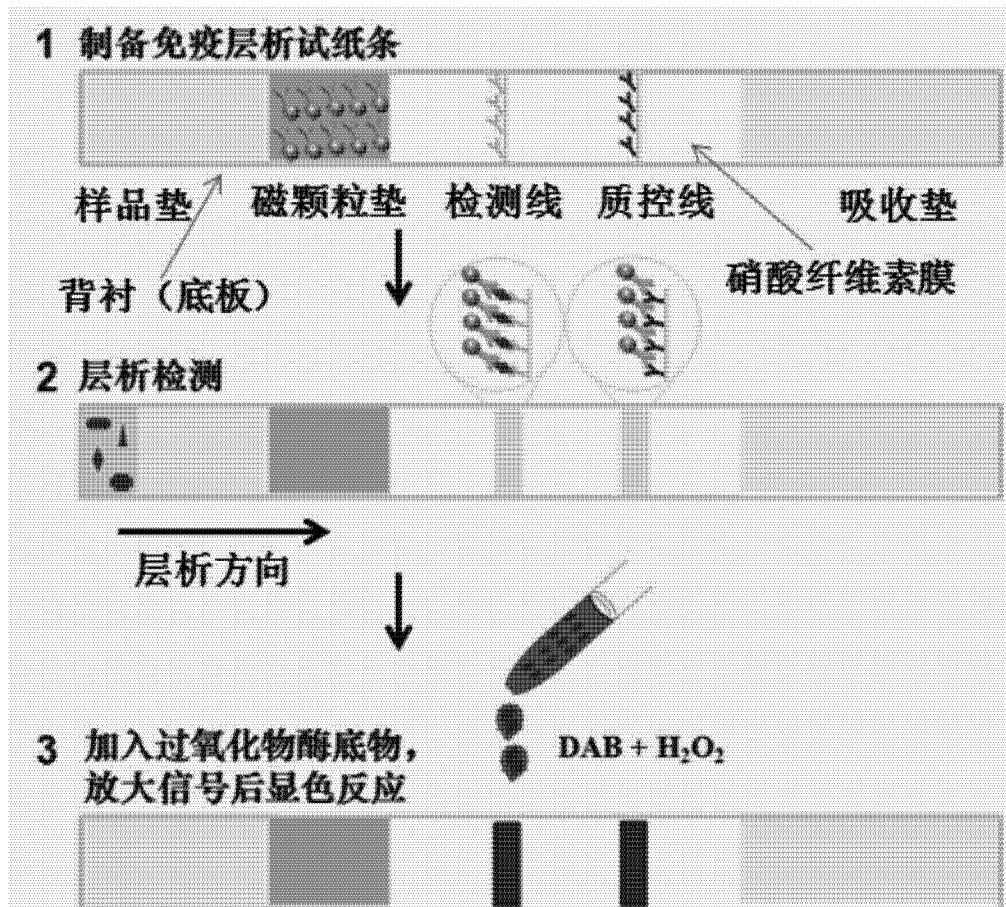


图 2

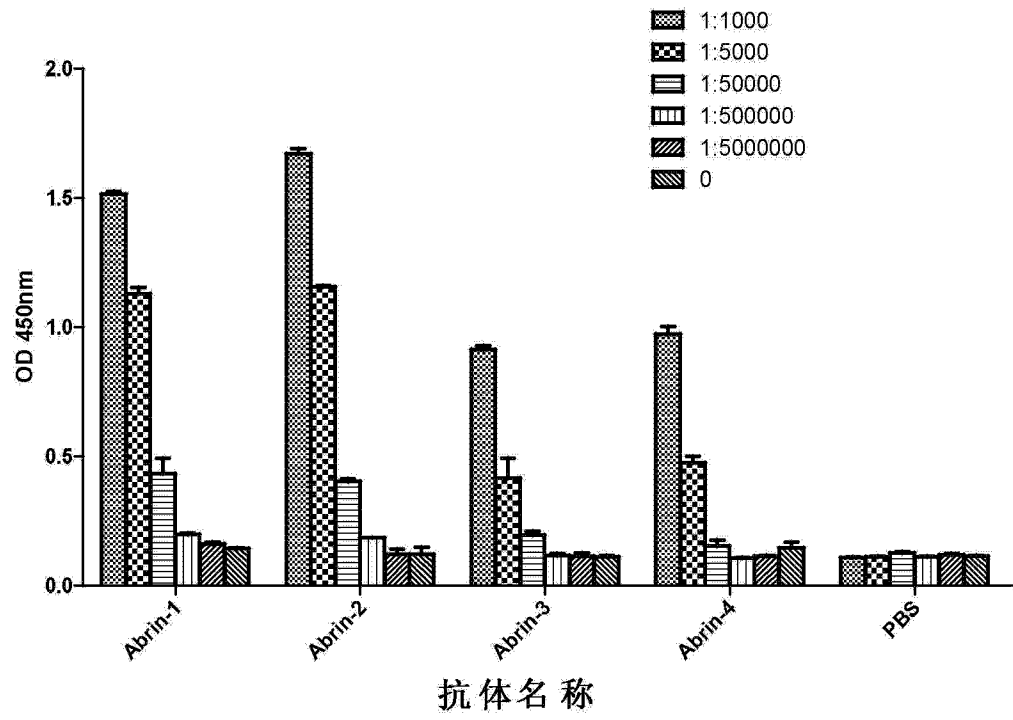


图 3

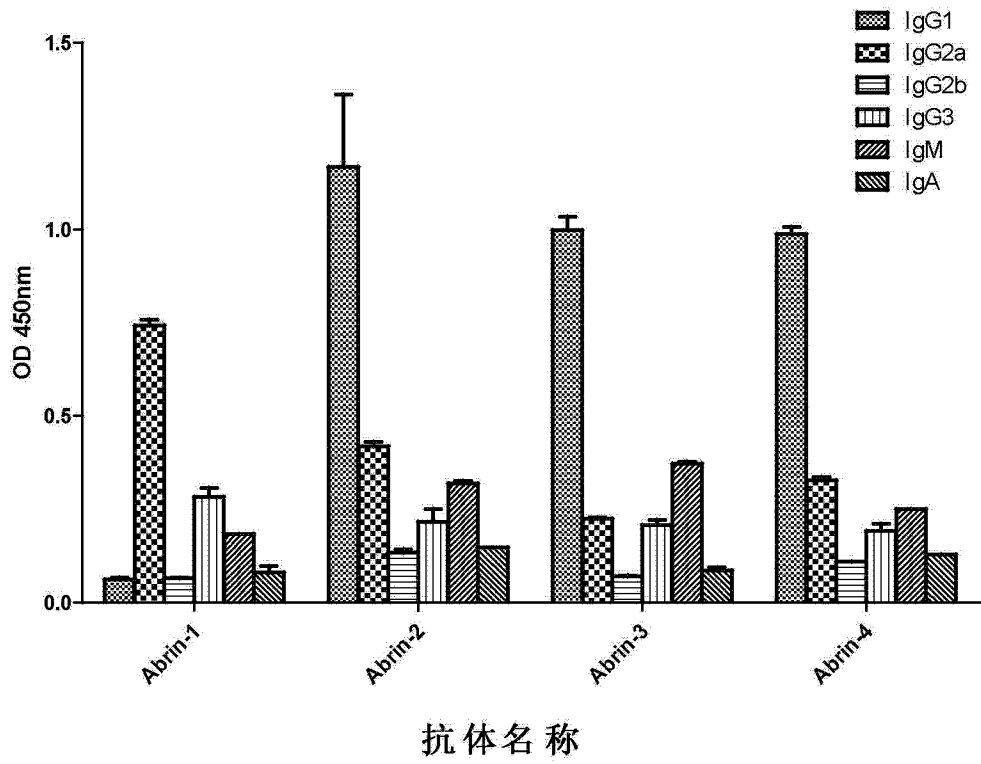


图 4

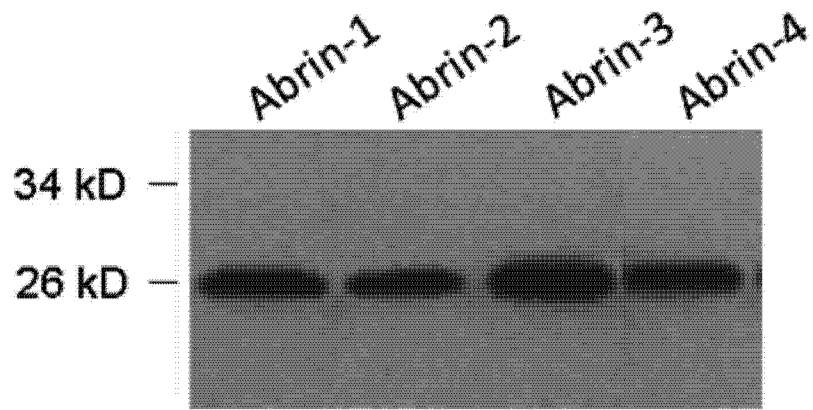


图 5

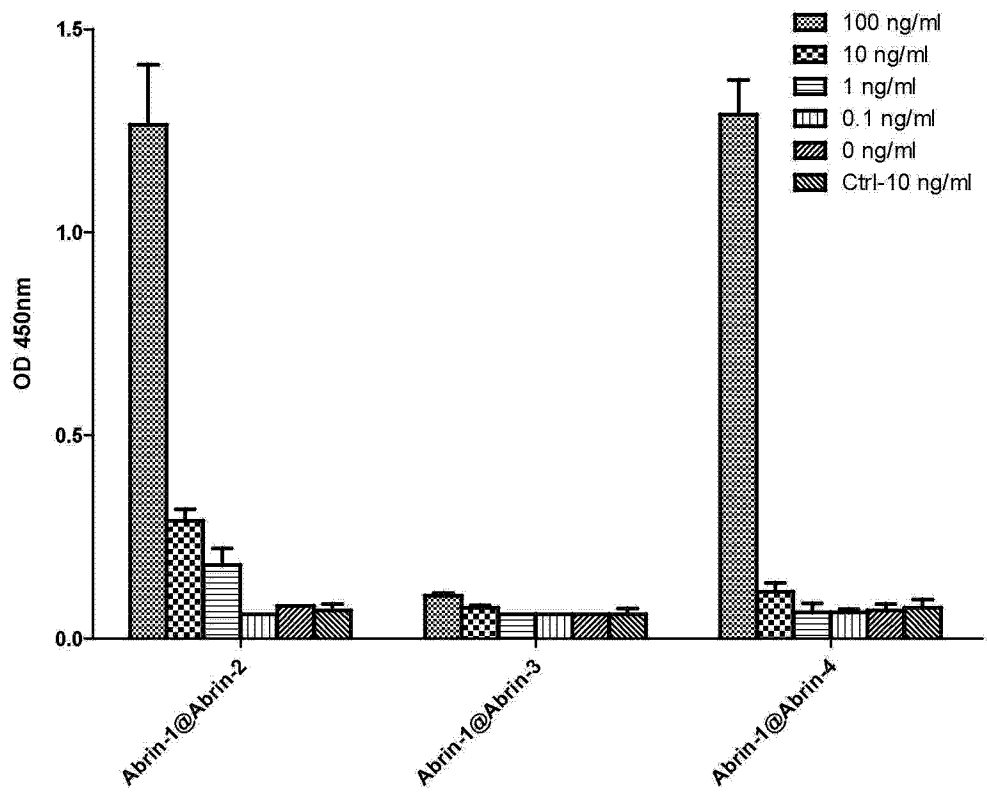


图 6

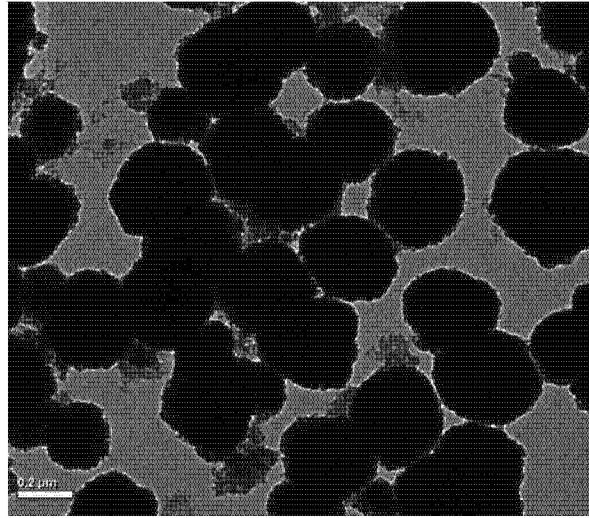


图 7

点印迹(Dot blot)点样示意图

加上MNPs@Abrin-1后

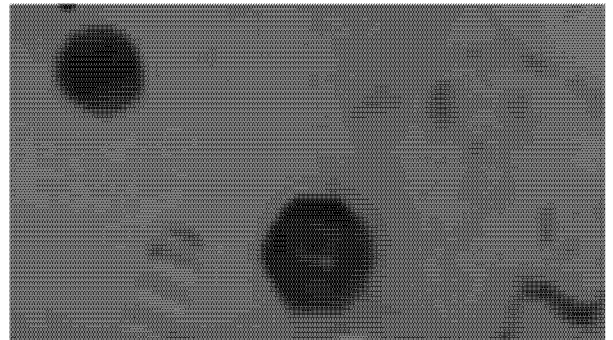
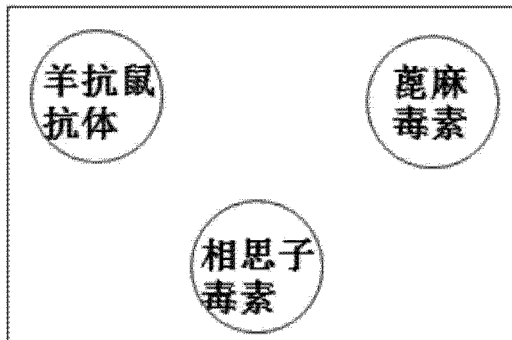
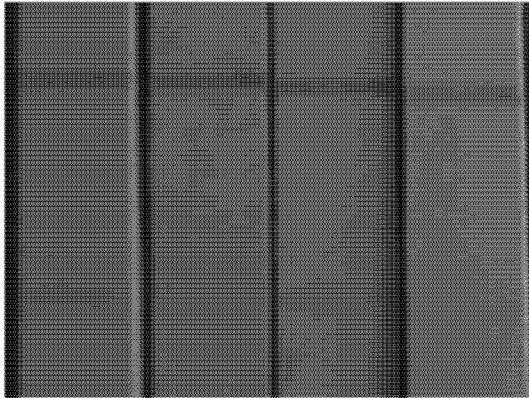


图 8

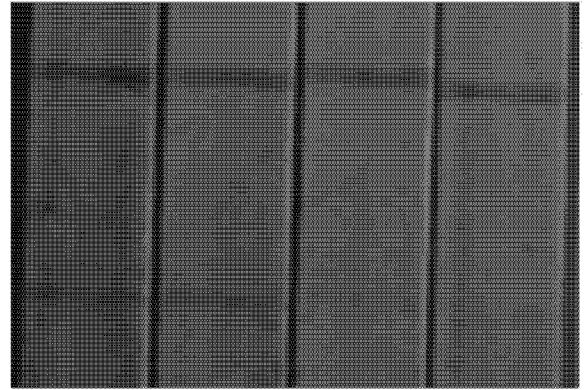
传统的胶体金试纸条



Abrin=
100 ng/ml Abrin=
10 ng/ml Abrin=
1 ng/ml buffer

灵敏度为 100 ng/ml

磁颗粒模拟酶试纸条



Abrin=
100 ng/ml Abrin=
10 ng/ml Abrin=
1 ng/ml buffer

灵敏度为 1 ng/ml

图 9