



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107677806 A

(43)申请公布日 2018.02.09

(21)申请号 201711001412.7

(22)申请日 2017.10.24

(71)申请人 天津大学

地址 300072 天津市南开区卫津路92号天津大学

(72)发明人 常津 张博 宫晓群 高玮辰

(74)专利代理机构 天津市北洋有限责任专利代理事务所 12201

代理人 王丽

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

权利要求书1页 说明书7页 附图3页

(54)发明名称

基于磁富集的荧光定量高灵敏可视化联检免疫层析试纸条的制备和检测方法

(57)摘要

本发明涉及基于磁富集的荧光定量高灵敏可视化联检免疫层析试纸条的制备和检测方法；利用高分子聚乳酸-羟基乙酸共聚物通过超声乳化法多包裹Fe3O4磁性纳米颗粒，可使靶物质迅速有效地结合到磁性微球上，新生成的复合物在磁场中磁响应性相同，用来富集待检样本，增强检测灵敏度，同时实现联合检测，依托免疫层析试纸条检测平台，进行双抗夹心免疫反应，并通过磁纳米颗粒在特定条件下可以淬灭荧光信号的反应机理，达到裸眼条件下快速定性，暗场测试下精准定量的宽范围双模态检测，同时应用磁纳米颗粒的超顺磁性富集待检血清，通过对乳腺癌肿瘤标志物CEA和CA153的联合检测来提高乳腺癌早期诊断的准确性及社区筛查的普适性。



CN 107677806 A

1. 基于磁富集的荧光定量高灵敏可视化联检免疫层析试纸条的制备方法,其特征是步骤如下:

1) 高分子多包裹磁性纳米球免疫探针的制备:将PLGA包裹后的带有羧基的水溶性磁纳米球,乳腺癌相关标志物CA153标记抗体或CEA标记抗体,EDC(1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐)溶解于反应溶液涡旋仪上以50-60r/min的速度旋转混匀,然后将混合溶液置于旋转混合架上,室温悬培,活化磁纳米球表面的羧基,离心,最后偶联上抗体的磁纳米颗粒用BSA封闭过夜;

2) 试纸条的组装:从样品池往上依次是样品垫,在硝酸纤维素膜的特定区域喷有用荧光素Cy5标记的CA153抗体即检测线1,用荧光素Cy5标记的CEA抗体即检测线2,喷有IgG抗体的区域即质控线以及末端的吸水垫。

2. 如权利要求1所述的方法,其特征是所述步骤1)中,高分子PLGA与 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒用量的质量分数配比是10-20:1。

3. 如权利要求1所述的方法,其特征是所述步骤1)中,磁纳米颗粒和EDC用量的质量分数配比是40-80:1。

4. 如权利要求1所述的方法,其特征是所述步骤1)中,磁纳米颗粒和CA153抗体用量的质量分数配比是15-35:1;磁纳米颗粒和CEA抗体用量的质量分数配比是8-20:1。

5. 如权利要求1所述的方法,其特征是所述步骤1)中,磁纳米颗粒偶联抗体悬培1.5~2h后,离心,洗涤。

6. 如权利要求1所述的方法,其特征是所述步骤1)中,BSA封闭液用量为1%~3%。

7. 如权利要求1所述的方法,其特征是所述步骤2)中,结合垫预处理液是蔗糖、牛血清白蛋白BSA、聚乙二醇PEG、聚氧乙烯山梨醇单月桂酸酯Tween-20的混合溶液。

8. 基于权利要求1的磁富集的荧光定量高灵敏可视化联检免疫层析试纸条的检测方法,其特征是定性检测方法是:根据双抗夹心免疫反应的原理,用高分子多包裹磁性纳米球富集待检血清,将富集后的待检物滴到样品池,在毛细管力的作用下向吸水垫方向发生免疫层析反应,当待检物流经检测区域和控制区域后,反应2-3min就可肉眼定性判断,样本中含有目标抗原时,复合物将同时被T线和C线捕获,磁纳米颗粒在检测区域和控制区域聚集显色,检测结果肉眼可见为阳性;反之,检测样本中不含目标抗原时,则磁纳米颗粒只在C线位置聚集显色,检测结果为阴性;如果T线和C线都不显色则说明检测结果无效。

9. 如权利要求8所述的方法,其特征是定量检测方法是:在组装好的塑料底板的样品池里滴加富集后的磁纳米探针和抗原的混合物,持续免疫15-20min后放入分析仪中进行拍照,然后用photoshop计算照片荧光密度值,根据反应前后荧光密度值变化即荧光差值作为读出信号;建立此发明检测技术的标准曲线。

10. 如权利要求9所述的方法,其特征是所述标准曲线中:CEA标准曲线抗原不同浓度选择为:0.01-10ng/ml;CA153标准曲线抗原不同浓度选择为0.01-10ng/ml。

基于磁富集的荧光定量高灵敏可视化联检免疫层析试纸条的 制备和检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及医药诊断技术领域,更具体的是涉及一种基于磁富集的荧光定量高灵敏可视化联检免疫层析试纸条的制备和检测方法。

背景技术

[0002] 乳腺癌是现代女性最常见最多发的一种恶性肿瘤,目前已占妇女恶性肿瘤发病率的首位,并且发病率每年都在递增,据统计,在大多数发达国家中,恶性肿瘤在居民死亡原因中居首位或第二位。其中乳腺癌的发病率位居国内八大癌症第五,在经济快速发展的同时,乳腺癌病人也在突飞猛进”。乳腺癌术后是否发生远处转移是决定患者生存时间的主要因素,早发现、早诊断及早治疗是延长患者生存时间、降低病死率的关键。然而肿瘤转移的诊断依靠肿瘤扩散的临床表现或者图像分析,往往为时已晚。因此需要一种敏感性较高的诊断方法来协助临床医生判断术后是否出现转移,这将直接关系到患者的后期治疗和生存时间。目前肿瘤标志物的研究有助于尽早发现术后是否转移,并且将理想的乳腺癌肿瘤标志物用于治疗疗效评价和预后评估,将有很高的临床应用价值。

[0003] 乳腺癌抗原(CA153)是一种大分子粘液性糖蛋白,主要存在于乳腺上皮管腔面细胞膜上,当细胞恶变时,血清水平明显升高,是目前应用最普遍的对乳腺癌较为特异的一项肿瘤标志物,其含量的变化与治疗效果密切相关,是诊断乳腺癌和监测术后转移、观察疗效的最佳指标。癌胚抗原(CEA)是一种酸性糖蛋白,是一种广谱肿瘤标志物,有文献表明血清CEA在晚期乳腺癌阳性率可高达71.43%,在乳腺癌有远处转移现象发生的患者中出现CEA含量升高的比例高达50%—70%。目前单一肿瘤标志物的相关报道和研究已有很多,但单独检测用于乳腺癌的诊断灵敏度较低,临床上常采用联合检测多种肿瘤标志物来提高检测的灵敏度。因此,同时将CA153和CEA作为肿瘤标志物,对高危人群进行筛查,对乳腺癌的早期诊断、病情发展和预后监测等工作将大有帮助。因此,对生物体内的肿瘤标志物实现高灵敏度的检测是生命科学领域研究的一项重要课题,发展一种新的高灵敏的检测方法也是目前研究者们努力的目标。

[0004] 试纸条技术是一种操作简单,无需专业培训,方便快捷,结果直观的免疫学检测技术。其检测原理是将特异的抗体(或抗原)作为捕获试剂固定于硝酸纤维素膜的特定区域,加入待测样品后,在毛细作用力的推动下,待测样品沿着膜向前移动,当移动至固定有捕获试剂的区域时,样品中的抗原(或抗体)与捕获试剂发生特异性结合,标记试剂则显示出一定的颜色从而实现特异性检测的免疫分析方法。目前已经商品化的免疫层析试纸条多用胶体金作为标记物,虽然检测结果通过肉眼可见,但无法完成精准定量检测,且抗原浓度略高于临界值的样本检测条带颜色太浅往往无法用肉眼识别;荧光免疫层析试纸条检测技术是胶体金免疫层析试纸条技术后为实现定量检测兴起的新技术,但在研究过程中发现,背景荧光是限制荧光免疫层析技术检测灵敏度的一个重要因素,这其中包括来自硝酸纤维素膜和样品本身的自发荧光。因此如何降低荧光免疫层析检测中背景荧光的影响,成为了提高

荧光免疫层析试纸条检测技术灵敏度亟需解决的课题。

[0005] 免疫磁性纳米微球由于它的超顺磁性即在外加磁场的作用下可以分离富集目标分子,此外,磁纳米颗粒具有一定的荧光淬灭性能。本技术将结合超顺磁性纳米颗粒试纸条的可视化检测特性以及荧光检测灵敏度高的优势,利用磁纳米颗粒在特定条件下可以淬灭荧光信号的反应机理,拟构建一种可视化的荧光定量检测免疫层析试纸条,通过荧光的信号强度变化及磁纳米颗粒的聚集显色,达到裸眼条件下快速定性,暗场测试下精准定量的宽范围双模态检测,同时应用磁纳米颗粒的超顺磁性富集待检血清,通过对乳腺癌肿瘤标志物CEA和CA153的联合检测来提高乳腺癌早期诊断的准确性及社区筛查的普适性。

发明内容

[0006] 为了解决现有技术的问题,本发明提出一种基于磁富集的荧光定量高灵敏可视化联检免疫层析试纸条的制备方法和检测方法;将高分子聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)通过超声乳化法多包裹 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒,由于这种包被功能基团的球形磁性纳米微粒的大小和形状具有良好的均一性,因此可使靶物质迅速且有效地结合到磁性微球上,同时新生成的复合物在磁场中磁响应性相同,行为一致,可以用来富集待检样本,增强检测灵敏度,同时可以实现联合检测,本课题将结合超顺磁性纳米颗粒试纸条检测结果肉眼可见以及荧光检测高灵敏度的优势,根据抗体抗原的特异性反应机理,依托免疫层析试纸条检测平台,进行双抗夹心免疫反应,并通过磁纳米颗粒在特定条件下可以淬灭荧光信号的反应机理,达到裸眼条件下快速定性,暗场测试下精准定量的宽范围双模态检测,同时应用磁纳米颗粒的超顺磁性富集待检血清,通过对乳腺癌肿瘤标志物CEA和CA153的联合检测来提高乳腺癌早期诊断的准确性及社区筛查的普适性。

[0007] 本发明的技术方法如下:

[0008] 基于磁富集的荧光定量高灵敏可视化联检免疫层析试纸条的制备方法,步骤如下:

[0009] 1) 高分子多包裹磁性纳米球免疫探针的制备:将PLGA包裹后的带有羧基的水溶性磁纳米球,乳腺癌相关标志物CA153标记抗体或CEA标记抗体,EDC(1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐)溶解于反应溶液涡旋仪上以50-60r/min的速度旋转使其混匀,然后将上述混合溶液置于旋转混合架上,室温悬培,活化磁纳米球表面的羧基,离心,最后偶联上抗体的磁纳米颗粒用BSA封闭过夜;

[0010] 2) 试纸条的组装:普通的试纸条是由样品垫,结合垫,硝酸纤维素膜,吸水垫组成,本发明的检测技术由于用到磁富集,磁纳米颗粒和抗原在EP管中先混匀,省掉了结合垫的使用,因此本发明中试纸条其从样品池往上依次是样品垫,在硝酸纤维素膜的特定区域喷有用荧光素Cy5标记的CA153抗体即检测线1,用荧光素Cy5标记的CEA抗体即检测线2,喷有IgG抗体的区域即质控线以及末端的吸水垫。

[0011] 所述步骤1)中,高分子PLGA与 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒用量的质量分数配比是10-20:1。

[0012] 所述步骤1)中,磁纳米颗粒和EDC用量的质量分数配比是40-80:1。

[0013] 所述步骤1)中,磁纳米颗粒偶联抗体悬培1.5~2h后,离心,洗涤。

[0014] 所述步骤1)中,BSA封闭液用量为1%~3%。

[0015] 所述步骤2)中,结合垫预处理液是蔗糖、牛血清白蛋白BSA、聚乙二醇PEG、聚氧乙

烯山梨醇单月桂酸酯Tween-20的混合溶液。

[0016] 基于磁富集的荧光定量高灵敏可视化联检免疫层析试纸条的检测方法：

[0017] 定性检测方法：根据双抗夹心免疫反应的原理，用上述高分子多包裹磁性纳米球富集待检血清，将富集后的待检物滴到样品池，在毛细管力的作用下向吸水垫方向发生免疫层析反应，当待检物流经检测区域和控制区域后，反应2-3min就可肉眼定性判断，一旦样本中含有目标抗原时，复合物将同时被T线和C线捕获，磁纳米颗粒在检测区域和控制区域聚集显色，检测结果肉眼可见为阳性；反之，检测样本中不含目标抗原时，则磁纳米颗粒只在C线位置聚集显色，检测结果为阴性；如果T线和C线都不显色则说明检测结果无效。

[0018] 定量检测方法：反应步骤同上，即在组装好的塑料底板的样品池里滴加富集后的磁纳米探针和抗原的混合物，持续免疫15-20min后放入分析仪中进行拍照，然后用photoshop计算照片荧光密度值，根据反应前后荧光密度值变化即荧光差值作为读出信号。建立此发明检测技术的标准曲线。

[0019] 所述标准曲线中：CEA标准曲线抗原不同浓度选择为：0.01-10ng/ml；CA153标准曲线抗原不同浓度选择为0.01-10ng/ml。

[0020] 本发明制备的基于磁富集的荧光定量高灵敏可视化联检免疫层析试纸条的优势在于：

[0021] 1. 磁纳米颗粒的超顺磁性可以富集待检血清，有望实现对全血的检测。

[0022] 2. 磁纳米颗粒在特定条件下可以淬灭荧光，通过对淬灭荧光信号的反应机理，消除背景荧光的干扰，实现高灵敏检测。

[0023] 3. 磁纳米颗粒在检测线和控制线的聚集显色，可以实现裸眼条件下快速定性。

[0024] 4. 通过对乳腺癌相关标志物CEA和CA153的联合检测可以提高乳腺癌早期诊断的准确性。

附图说明

[0025] 图1制备的基于磁富集的联检免疫层析试纸条高分子多包裹磁性纳米球的透射电镜照片。

[0026] 图2制备的基于磁纳米颗粒的联检免疫层析试纸条的磁富集过程。

[0027] 图3制备的基于磁富集的联检免疫层析试纸条的特异性实验数值。

[0028] 图4制备的基于磁富集的联检免疫层析试纸条关于CA153的灵敏性实验数值。

[0029] 图5制备的基于磁富集的联检免疫层析试纸条关于CEA的灵敏性实验数值。

具体实施方式

[0030] 下面的实施案例中将对本发明作进一步的阐述，但本发明不限于此。

[0031] 本发明的新型试纸条检测技术用高分子(PLGA)通过超声乳化法多包裹油溶性磁纳米颗粒，其包裹后的纳米颗粒在水溶液中的分散情况良好，大小基本均一，粒径在80nm左右，如图1所示；其次用图1的纳米粒子偶联抗体并富集待检物，富集过程如图2所示，在外加磁场的作用下分离目标分子；最后在组装好的塑料底板的样品池里滴加不同种类抗原，反应一段时间后放入分析仪中进行信号读出，其特异性实验数值如图3所示，在含有特异性目标分子CEA/CA153的实验组中荧光强度变化要远高于非特异性抗原(CA125, HCG, PSA, AFP)

的对照组信号强度变化;图4展示了本免疫层析试纸条技术对CA153抗原的检测线性拟合实验数值,其灵敏度可以达到0.09U/mL,远低于临床临界值28U/mL;图5展示了本免疫层析试纸条技术对CEA抗原的检测线性拟合实验数值,其灵敏度可以达到0.06ng/mL,远低于临床临界值5ng/mL。

[0032] 本发明的实施过程步骤如下:

[0033] 1) 精确称取定量的EDC,高分子多包裹的磁性纳米颗粒和乳腺癌相关标志物CEA和CA153标记抗体混合溶于2ml的EP管中,EP管放在旋转培养器上室温旋转约1.5h。然后将上述液体转移到尖头EP管,充分收集沉淀物,设定转速离心洗涤至少三次,用1%–3%的BSA溶液与4℃冰箱封闭过夜。

[0034] 2) 用Cy5荧光素标记乳腺癌相关标志物CA153包被抗体和CEA包被抗体,将荧光标记后的抗体喷在硝酸纤维素膜上,分别作为检测线1和检测线2,将1mg/ml的羊抗鼠抗体溶液喷在检测线的上方,作为质控线,检测线和质控线喷好后放入37℃烘箱烘干;切割玻璃纤维素膜宽度约为2cm,浸没在含有0.5% Tween-20的0.01M的PH=7.4的Tris-HCl缓冲液作为样品垫的处理液,浸润10–15min后,放入37℃烘箱烘干;将处理好的样品垫,粘贴在试纸条上,装入用公司定制的塑料底板进行组装。

[0035] 3) 用移液枪取200 μ L的不同浓度的抗原加入CEA和CA153标记探针,用永久性磁铁富集待检血清,弃掉160 μ L上清,将剩余溶液滴加到组装好的塑料底板的样品池里,反应2–3分钟后,根据检测线区域是否有磁性纳米粒子聚集进行肉眼快速定性检测。

[0036] 4) 继续反应15–20min后,放到凝胶分析仪进行拍照并统计和计算荧光变化值。

[0037] 以上反应为制备基于磁富集的荧光定量高灵敏可视化联检免疫层析试纸条检测技术的一般步骤,在实施例中不作详述。

[0038] 实施案例1:

[0039] 基于磁富集的荧光定量高灵敏可视化联检免疫层析试纸条检测技术的制备方法:将荧光素Cy5标记的乳腺癌相关标志物CEA和CA153包被抗体喷于硝酸纤维素膜的检测线位置,将羊抗鼠抗体溶液喷于硝酸纤维素膜的质控线位置,高分子PLGA和磁纳米颗粒的质量分数配比是15:1,EDC与磁纳米颗粒用量的质量分数配比是1:60,BSA封闭液用量为2%,富集浓度为50U/mL的CA153和浓度为10ng/mL的CEA的混合抗原200 μ L于样品池,做三个重复。定性检测方法如下:滴加上述样品试纸条反应2min中后,肉眼观察阅读框,检测线1(CEA)和检测线2(CA153)以及控制线均有黑色磁纳米粒子聚集呈现黑色条带,2.5min后检测线1(CEA)和检测线2(CA153)以及控制线区域条带颜色接近2min时条带颜色,3min后检测线1(CEA)和检测线2(CA153)以及控制线区域条带颜色较2min时颜色加深一点点。定量检测方法如下:上述样品继续反应15min后,放入分析仪中进行信号读出,统计滴加样品前后荧光差值(ΔF)结果为检测线1(CEA)荧光差值为115231,检测线2(CA153)荧光差值为86741;继续反应18min后,统计滴加样品前后荧光差值(ΔF)结果为检测线1(CEA)荧光差值为115366,检测线2(CA153)荧光差值为86931;继续反应20min后,统计滴加样品前后荧光差值(ΔF)结果为检测线1(CEA)荧光差值为115803,检测线2(CA153)荧光差值为87002。

[0040] 实施案例2:

[0041] 基于磁富集的荧光定量高灵敏可视化联检免疫层析试纸条检测技术的制备方法:将荧光素Cy5标记的乳腺癌相关标志物CEA和CA153包被抗体喷于硝酸纤维素膜的检测线位

置,将羊抗鼠抗体溶液喷于硝酸纤维素膜的质控线位置,高分子PLGA和磁纳米颗粒的质量分数配比是10:1,EDC与磁纳米颗粒用量的质量分数配比是1:60,BSA封闭液用量为2%,富集浓度为50U/mL的CA153和浓度为10ng/mL的CEA的混合抗原200 μ L于样品池,做三个重复。定性检测方法如下:滴加上述样品试纸条反应2min中后,肉眼观察阅读框,检测线1(CEA)和检测线2(CA153)以及控制线均有黑色磁纳米粒子聚集呈现黑色条带,2.5min后检测线1(CEA)和检测线2(CA153)以及控制线区域条带颜色接近2min时条带颜色,3min后检测线1(CEA)和检测线2(CA153)以及控制线区域条带颜色较2min时颜色加深一点点。定量检测方法如下:上述样品继续反应15min后,放入分析仪中进行信号读出,统计滴加样品前后荧光差值(ΔF)结果为检测线1(CEA)荧光差值为95231,检测线2(CA153)荧光差值为83007;继续反应18min后,统计滴加样品前后荧光差值(ΔF)结果为检测线1(CEA)荧光差值为96248,检测线2(CA153)荧光差值为83919;继续反应20min后,统计滴加样品前后荧光差值(ΔF)结果为检测线1(CEA)荧光差值为96904,检测线2(CA153)荧光差值为84047。

[0042] 实施案例3:

[0043] 基于磁富集的荧光定量高灵敏可视化联检免疫层析试纸条检测技术的制备方法:将荧光素Cy5标记的乳腺癌相关标志物CEA和CA153包被抗体喷于硝酸纤维素膜的检测线位置,将羊抗鼠抗体溶液喷于硝酸纤维素膜的质控线位置,高分子PLGA和磁纳米颗粒的质量分数配比是20:1,EDC与磁纳米颗粒用量的质量分数配比是1:60,BSA封闭液用量为2%,富集浓度为50U/mL的CA153和浓度为10ng/mL的CEA的混合抗原200 μ L于样品池,做三个重复。定性检测方法如下:滴加上述样品试纸条反应2min中后,肉眼观察阅读框,检测线1(CEA)和检测线2(CA153)以及控制线均有黑色磁纳米粒子聚集呈现黑色条带,2.5min后检测线1(CEA)和检测线2(CA153)以及控制线区域条带颜色接近2min时条带颜色,3min后检测线1(CEA)和检测线2(CA153)以及控制线区域条带颜色较2min时颜色加深一点点。定量检测方法如下:上述样品继续反应15min后,放入分析仪中进行信号读出,统计滴加样品前后荧光差值(ΔF)结果为检测线1(CEA)荧光差值为90507,检测线2(CA153)荧光差值为80725;继续反应18min后,统计滴加样品前后荧光差值(ΔF)结果为检测线1(CEA)荧光差值为90978,检测线2(CA153)荧光差值为81019;继续反应20min后,统计滴加样品前后荧光差值(ΔF)结果为检测线1(CEA)荧光差值为91914,检测线2(CA153)荧光差值为81337。

[0044] 实施案例4:

[0045] 基于磁富集的荧光定量高灵敏可视化联检免疫层析试纸条检测技术的制备方法:将荧光素Cy5标记的乳腺癌相关标志物CEA和CA153包被抗体喷于硝酸纤维素膜的检测线位置,将羊抗鼠抗体溶液喷于硝酸纤维素膜的质控线位置,高分子PLGA和磁纳米颗粒的质量分数配比是15:1,EDC与磁纳米颗粒用量的质量分数配比是1:40,BSA封闭液用量为2%,富集浓度为50U/mL的CA153和浓度为10ng/mL的CEA的混合抗原200 μ L于样品池,做三个重复。定性检测方法如下:滴加上述样品试纸条反应2min中后,肉眼观察阅读框,检测线1(CEA)和检测线2(CA153)以及控制线均有黑色磁纳米粒子聚集呈现黑色条带,2.5min后检测线1(CEA)和检测线2(CA153)以及控制线区域条带颜色接近2min时条带颜色,3min后检测线1(CEA)和检测线2(CA153)以及控制线区域条带颜色较2min时颜色加深一点点。定量检测方法如下:上述样品继续反应15min后,放入分析仪中进行信号读出,统计滴加样品前后荧光差值(ΔF)结果为检测线1(CEA)荧光差值为98915,检测线2(CA153)荧光差值为81165;继续

反应18min后,统计滴加样品前后荧光差值(ΔF)结果为检测线1(CEA)荧光差值为99211,检测线2(CA153)荧光差值为81791;继续反应20min后,统计滴加样品前后荧光差值(ΔF)结果为检测线1(CEA)荧光差值为99984,检测线2(CA153)荧光差值为82004.

[0046] 实施案例5:

[0047] 基于磁富集的荧光定量高灵敏可视化联检免疫层析试纸条检测技术的制备方法:将荧光素Cy5标记的乳腺癌相关标志物CEA和CA153包被抗体喷于硝酸纤维素膜的检测线位置,将羊抗鼠抗体溶液喷于硝酸纤维素膜的质控线位置,高分子PLGA和磁纳米颗粒的质量分数配比是15:1,EDC与磁纳米颗粒用量的质量分数配比是1:80,BSA封闭液用量为2%,富集浓度为50U/mL的CA153和浓度为10ng/mL的CEA的混合抗原200 μ L于样品池,做三个重复。定性检测方法如下:滴加上述样品试纸条反应2min中后,肉眼观察阅读框,检测线1(CEA)和检测线2(CA153)以及控制线均有黑色磁纳米粒子聚集呈现黑色条带,2.5min后检测线1(CEA)和检测线2(CA153)以及控制线区域条带颜色接近2min时条带颜色,3min后检测线1(CEA)和检测线2(CA153)以及控制线区域条带颜色较2min时颜色加深一点点。定量检测方法如下:上述样品继续反应15min后,放入分析仪中进行信号读出,统计滴加样品前后荧光差值(ΔF)结果为检测线1(CEA)荧光差值为92833,检测线2(CA153)荧光差值为82721;继续反应18min后,统计滴加样品前后荧光差值(ΔF)结果为检测线1(CEA)荧光差值为93088,检测线2(CA153)荧光差值为82974;继续反应20min后,统计滴加样品前后荧光差值(ΔF)结果为检测线1(CEA)荧光差值为93774,检测线2(CA153)荧光差值为83001.

[0048] 实施案例6:

[0049] 基于磁富集的荧光定量高灵敏可视化联检免疫层析试纸条检测技术的制备方法:将荧光素Cy5标记的乳腺癌相关标志物CEA和CA153包被抗体喷于硝酸纤维素膜的检测线位置,将羊抗鼠抗体溶液喷于硝酸纤维素膜的质控线位置,高分子PLGA和磁纳米颗粒的质量分数配比是15:1,EDC与磁纳米颗粒用量的质量分数配比是1:60,BSA封闭液用量为1%,富集浓度为50U/mL的CA153和浓度为10ng/mL的CEA的混合抗原200 μ L于样品池,做三个重复。定性检测方法如下:滴加上述样品试纸条反应2min中后,肉眼观察阅读框,检测线1(CEA)和检测线2(CA153)以及控制线均有黑色磁纳米粒子聚集呈现黑色条带,2.5min后检测线1(CEA)和检测线2(CA153)以及控制线区域条带颜色接近2min时条带颜色,3min后检测线1(CEA)和检测线2(CA153)以及控制线区域条带颜色较2min时颜色加深一点点。定量检测方法如下:上述样品继续反应15min后,放入分析仪中进行信号读出,统计滴加样品前后荧光差值(ΔF)结果为检测线1(CEA)荧光差值为123431,检测线2(CA153)荧光差值为88711;继续反应18min后,统计滴加样品前后荧光差值(ΔF)结果为检测线1(CEA)荧光差值为123977,检测线2(CA153)荧光差值为88997;继续反应20min后,统计滴加样品前后荧光差值(ΔF)结果为检测线1(CEA)荧光差值为124284,检测线2(CA153)荧光差值为89002.

[0050] 实施案例7:

[0051] 基于磁富集的荧光定量高灵敏可视化联检免疫层析试纸条检测技术的制备方法:将荧光素Cy5标记的乳腺癌相关标志物CEA和CA153包被抗体喷于硝酸纤维素膜的检测线位置,将羊抗鼠抗体溶液喷于硝酸纤维素膜的质控线位置,高分子PLGA和磁纳米颗粒的质量分数配比是15:1,EDC与磁纳米颗粒用量的质量分数配比是1:60,BSA封闭液用量为3%,富集浓度为50U/mL的CA153和浓度为10ng/mL的CEA的混合抗原200 μ L于样品池,做三个重复。

定性检测方法如下：滴加上述样品试纸条反应2min中后，肉眼观察阅读框，检测线1 (CEA) 和检测线2 (CA153) 以及控制线均有黑色磁纳米粒子聚集呈现黑色条带。2.5min后检测线1 (CEA) 和检测线2 (CA153) 以及控制线区域条带颜色接近2min时条带颜色，3min后检测线1 (CEA) 和检测线2 (CA153) 以及控制线区域条带颜色较2min时颜色加深一点点。定量检测方法如下：上述样品继续反应15min后，放入分析仪中进行信号读出，统计滴加样品前后荧光差值 (ΔF) 结果为检测线1 (CEA) 荧光差值为93006，检测线2 (CA153) 荧光差值为81545。继续反应18min后，统计滴加样品前后荧光差值 (ΔF) 结果为检测线1 (CEA) 荧光差值为93778，检测线2 (CA153) 荧光差值为81974；继续反应20min后，统计滴加样品前后荧光差值 (ΔF) 结果为检测线1 (CEA) 荧光差值为94021，检测线2 (CA153) 荧光差值为82107。

[0052] 本发明利用高分子聚乳酸-羟基乙酸共聚物通过超声乳化法多包裹 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒，且这种包被功能基团的球形磁性纳米微粒的大小和形状具有良好的均一性，可使靶物质迅速有效地结合到磁性微球上，新生成的复合物在磁场中磁响应性相同，行为一致，可以用来富集待检样本，增强检测灵敏度，同时可以实现联合检测，本课题将结合超顺磁性纳米颗粒试纸条检测结果肉眼可见以及荧光检测高灵敏度的优势，根据抗体抗原的特异性反应机理，依托免疫层析试纸条检测平台，进行双抗夹心免疫反应，并通过磁纳米颗粒在特定条件下可以淬灭荧光信号的反应机理，达到裸眼条件下快速定性，暗场测试下精准定量的宽范围双模态检测，同时应用磁纳米颗粒的超顺磁性富集待检血清，通过对乳腺癌肿瘤标志物CEA和CA153的联合检测来提高乳腺癌早期诊断的准确性及社区筛查的普适性。

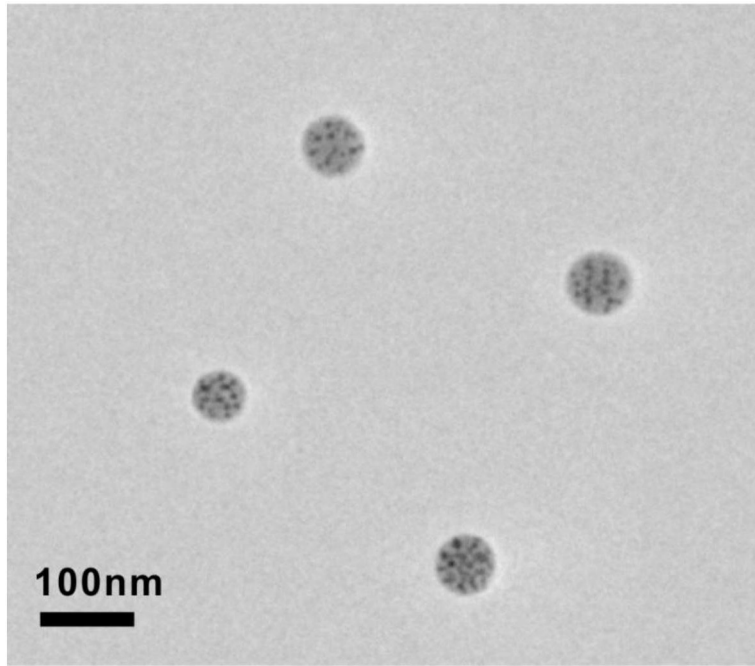


图1



图2

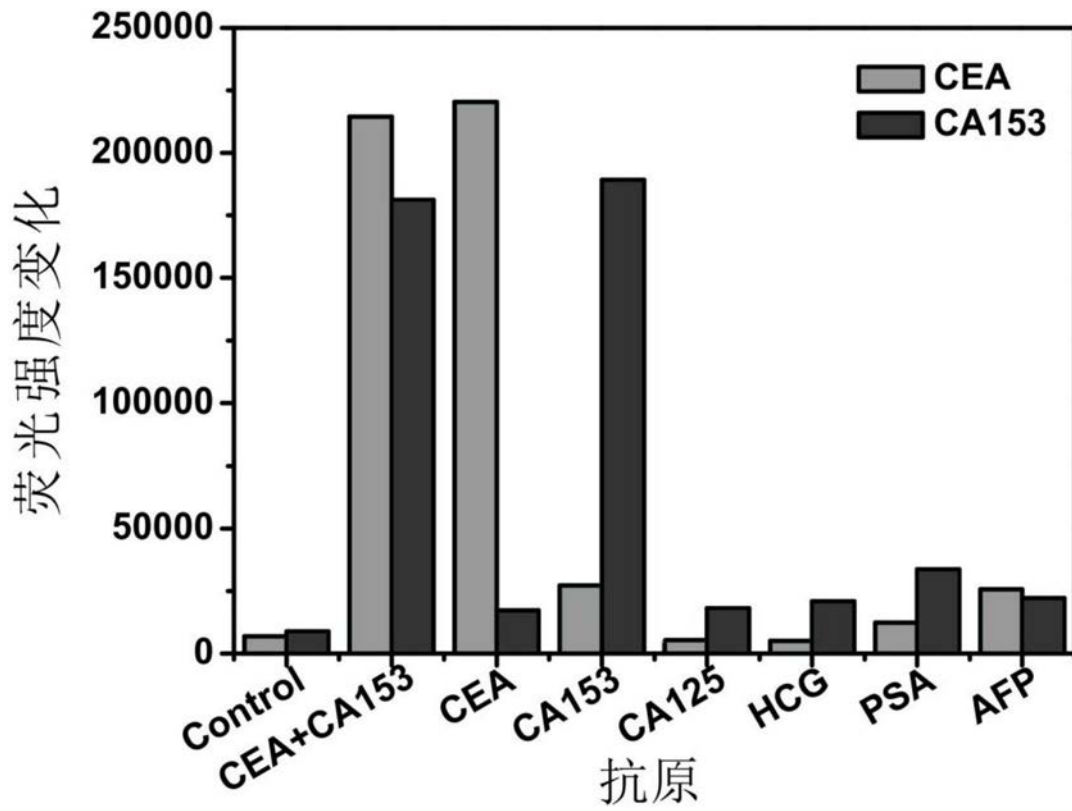


图3

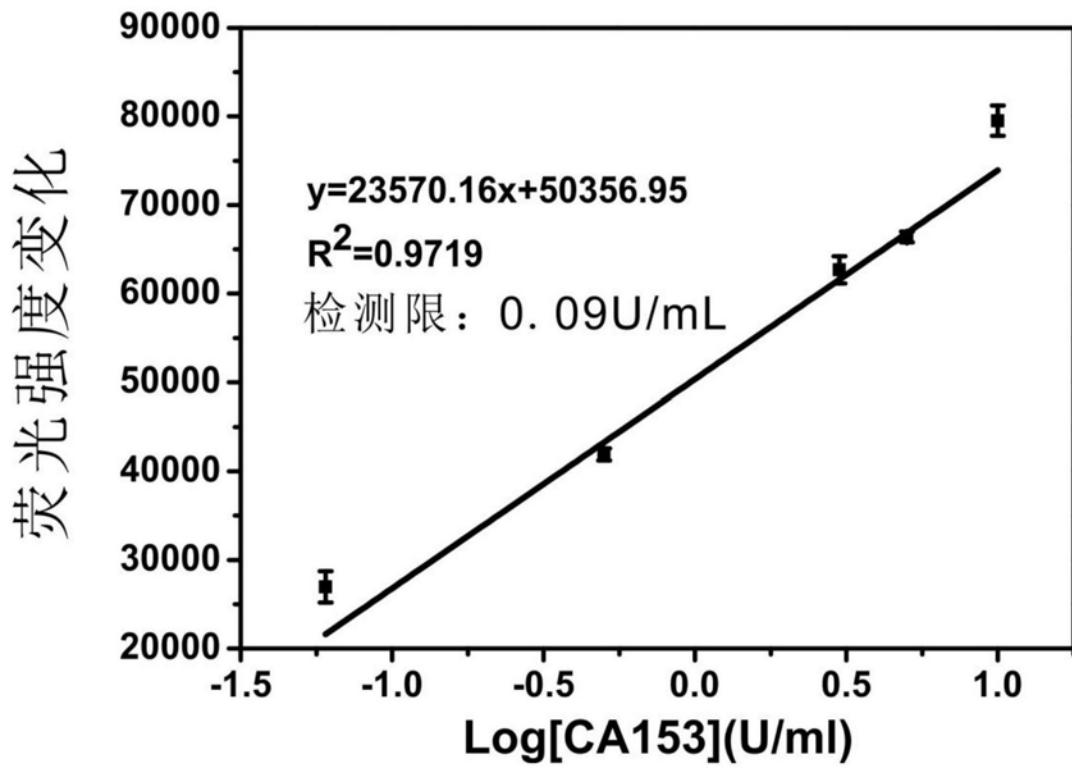


图4

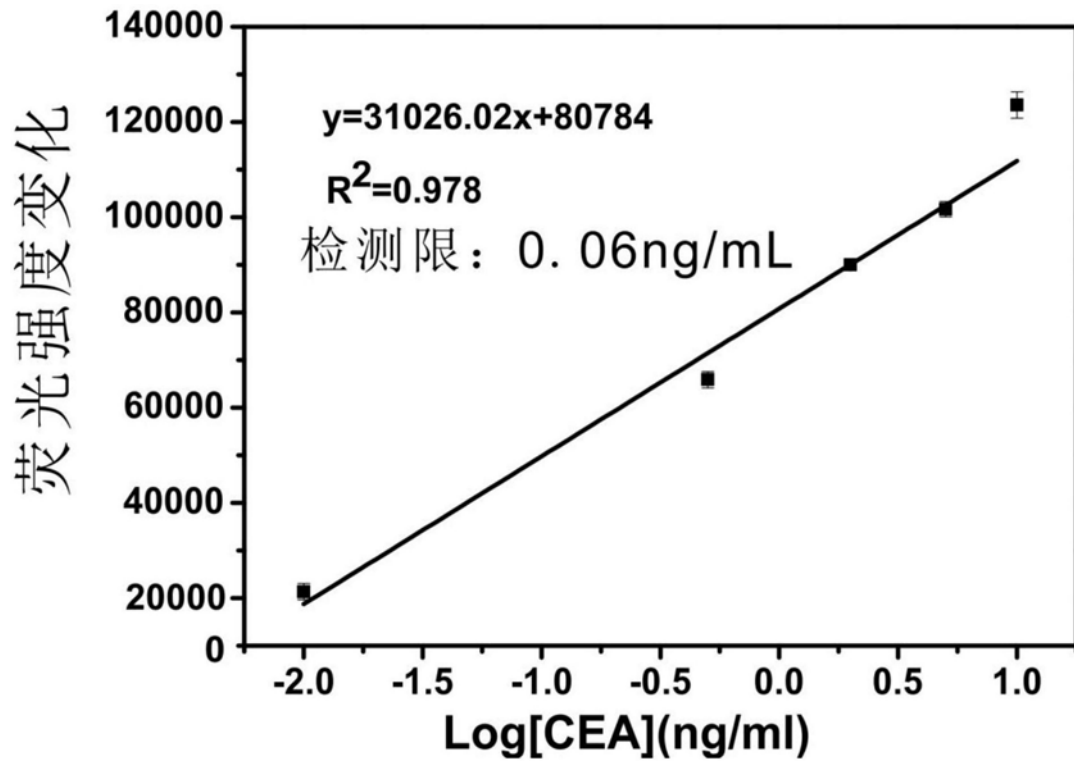


图5

专利名称(译)	基于磁富集的荧光定量高灵敏可视化联检免疫层析试纸条的制备和检测方法		
公开(公告)号	CN107677806A	公开(公告)日	2018-02-09
申请号	CN2017111001412.7	申请日	2017-10-24
[标]申请(专利权)人(译)	天津大学		
申请(专利权)人(译)	天津大学		
当前申请(专利权)人(译)	天津大学		
[标]发明人	常津 张博 宫晓群 高玮辰		
发明人	常津 张博 宫晓群 高玮辰		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/558 G01N33/574		
代理人(译)	王丽		
其他公开文献	CN107677806B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及基于磁富集的荧光定量高灵敏可视化联检免疫层析试纸条的制备和检测方法；利用高分子聚乳酸-羟基乙酸共聚物通过超声乳化法多包裹Fe₃O₄磁性纳米颗粒，可使靶物质迅速有效地结合到磁性微球上，新生成的复合物在磁场中磁响应性相同，用来富集待检样本，增强检测灵敏度，同时实现联合检测，依托免疫层析试纸条检测平台，进行双抗夹心免疫反应，并通过磁纳米颗粒在特定条件下可以淬灭荧光信号的反应机理，达到肉眼条件下快速定性，暗场测试下精准定量的宽范围双模态检测，同时应用磁纳米颗粒的超顺磁性富集待检血清，通过对乳腺癌肿瘤标志物CEA和CA153的联合检测来提高乳腺癌早期诊断的准确性及社区筛查的普适性。

