



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102156191 A

(43) 申请公布日 2011.08.17

(21) 申请号 201110129084.5

(22) 申请日 2011.05.18

(71) 申请人 上海海洋大学

地址 201306 上海市浦东新区沪城环路 999 号

(72) 发明人 卢瑛 石良 王锡昌

(74) 专利代理机构 上海硕力知识产权代理事务所 31251

代理人 王法男

(51) Int. Cl.

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

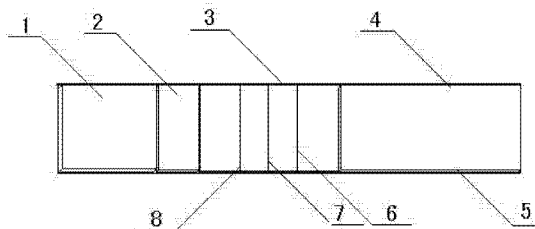
权利要求书 2 页 说明书 9 页 附图 4 页

(54) 发明名称

一种可同步检测 T_m 和 Pa 过敏原的磁性免疫层析方法

(57) 摘要

一种同步检测 T_m 和 Pa 过敏原的磁性免疫层析方法,其特征在于:将样品垫、结合了抗-T_m 和抗-Pa 免疫磁珠的结合垫、层析膜、吸水垫依次相互交错约 2mm 粘贴在底板上,然后在上层覆盖透明塑料密封膜,构建成一种可同步检测 T_m 和 Pa 过敏原的磁性免疫层析试纸条;其中所述的层析膜上预包被有 Pa 抗原检测线 T₁、T_m 抗原检测线 T₂ 和山羊抗小鼠 IgG 质控线 C,通过层析作用可以捕获免疫磁珠,依据样品层析后形成肉眼可见的 1-3 条显色条带,实现 T_m 和 Pa 过敏原的快速定性检测;或者将所构建的磁性免疫试纸条通过磁性分析仪进行检测,依据样品层析后形成的检测线和控制线的磁信号检测值来实现单一过敏原的定量分析,或两种过敏原的同步定量检测。



1. 一种同步检测 Tm 和 Pa 过敏原的磁性免疫层析方法,其特征在于:

将样品垫、结合了抗 -Tm 和抗 -Pa 免疫磁珠的结合垫、层析膜、吸水垫依次相互交错约 2mm 粘贴在底板上,然后在上层覆盖透明塑料密封膜,构建成一种可同步检测 Tm 和 Pa 过敏原的磁性免疫层析试纸条;其中所述的层析膜上预包被有 Pa 抗原检测线 T1、Tm 抗原检测线 T2 和山羊抗小鼠 IgG 质控线 C,通过层析作用可以捕获免疫磁珠,依据样品层析后形成肉眼可见的 1-3 条显色条带,实现 Tm 和 Pa 过敏原的快速定性检测;或者将所构建的磁性免疫试纸条通过磁性分析仪进行检测,依据样品层析后形成的检测线和控制线的磁信号检测值来实现单一过敏原的定量分析,或两种过敏原的同步定量检测。

2. 如权利要求 1 所述的一种同步检测 Tm 和 Pa 过敏原的磁性免疫层

析方法,其特征在于:所述的免疫磁珠是 Tm 过敏原的特异性鼠系单克隆抗体 修饰磁珠与 Pa 过敏原的特异性鼠系单抗修饰磁珠的混合物;所述的 Tm 特异性单抗是采用杂交瘤技术制备筛选所得,对甲壳类的 Tm 过敏原和部分软体动物的 Tm 过敏原都有特异性反应;所述的 Pa 特异性单抗是采用杂交瘤技术制备筛选所得,对鱼类的 Pa 过敏原具有特异性反应。

3. 如权利要求 1 所述的一种同步检测 Tm 和 Pa 过敏原的磁性免疫层

析方法,其特征在于:所述的磁珠为表面修饰有羧基的超顺磁性纳米颗粒,水力学平均尺寸为 50~200nm。

4. 如权利要求 1 所述的一种同步检测 Tm 和 Pa 过敏原的磁性免疫层

析方法,其特征在于:所述的甲壳类水产品为虾类和蟹类,所述的部分软体动物水产品为双足纲的牡蛎、蛤蜊、扇贝,头足纲的鱿鱼、章鱼等。

5. 如权利要求 1 所述的一种同步检测 Tm 和 Pa 过敏原的磁性免疫层

析方法,其特征在于,层析试纸条的制备方法包括以下步骤:

A、抗原的制备与纯化:Tm 过敏原以虾为原料,Pa 过敏原以鲫鱼为原料,采用实验室自行设计的方法分别进行制备与纯化;

B、抗体的制备与纯化:先将 Tm 和 Pa 过敏原的特异性抗体细胞株增殖培养,然后注射到 BALB/C 小鼠中制备腹水;

制备所得腹水经 50% 硫酸铵浓缩后再采用商业化的 protein-G 亲和层析柱,按照所附产品操作说明书进行纯化;

C、免疫磁珠的制备:选用直径为 50-200nm 的磁珠,使用碳二甲胺(EDC)和琥珀酰亚胺(NHS)共价交联的方式分别将抗 -Tm 单抗和抗 -Pa 单抗标记在磁珠上形成免疫磁珠,将抗 -Tm 免疫磁珠和抗 -Pa 免疫磁珠 1:1 均匀混合后待用;

D、结合垫的处理:将制备好的 Tm 和 Pa 的免疫磁珠混合液喷点在结合垫上以形成免疫磁珠标记结合垫,喷点时可以采用人工手动喷液或定量喷液装置来进行;

E、层析膜的包被:用 20mM PBS, pH7.0 包被缓冲液将纯化的 Tm 抗原、Pa 抗原、山羊抗小鼠 IgG 分别稀释到 0.05mg/mL、0.2mg/mL、2mg/mL 浓度,然后分别以 3-4 μ L/ 试纸条的量手工均匀喷点在层析膜上,进行层析膜的包被,以形成 Pa 抗原检测线 T1、Tm 抗原检测线 T2 和山羊抗小鼠 IgG 质控线 C,线与线间的间隔距离为 0.5-1.0cm,将包被后的层析膜于 37°C 的干燥箱中烘干 4-6 小时,置于干燥瓶中保存备用;

F、试纸条的组装与制备:将样品垫、结合了抗 -Tm 和抗 -Pa 免疫磁珠的结合垫、包被膜、

吸水垫依次相互交错约 2mm 粘贴在底板上,然后在上层覆盖透明塑料密封膜;根据要求宽度切割即可得到适用的磁性免疫层析试纸条。

6. 如权利要求 3 一种同步检测 Tm 和 Pa 过敏原的磁性免疫层析方法,其特征在于:所述的 Tm 和 Pa 过敏原的同步快速免疫层析试纸条的制备方法,包括以下步骤:

1)、吸取 2mg 羧基磁珠于离心管中,用 500 μ L 0.01M 含 0.5% (v/v) Tween-20, pH 为 5.0 的 MES 溶液(简称 MEST)作为活化缓冲溶液清洗磁珠,将离心管置于磁分离架上使得磁珠与活化溶液分离,重复清洗几次,最后重悬磁珠;

2)、随后将新鲜配制的 2.6M EDC 和 NHS 加入磁珠悬液中活化羧基 30min,反应结束后先用 MEST 缓冲液洗涤磁珠,再用 0.005M 硼酸盐吐温溶液(简称 BST)作为偶联缓冲液洗涤磁珠 2 遍;

3)、加入 100 μ g 抗 Tm 单克隆抗体或 100 μ g 抗 Pa 单克隆抗体,在旋转混合器上反应 3 小时;

4)、然后用 1% (w/v) BSA 溶液对免疫磁珠表面没有完全反应的活化基团进行封闭,以降低在以后试验中可能发生的非特异性吸附,室温下封闭反应 30min;

5)、用 BST 溶液洗涤封闭后的免疫磁珠 4 次,弃去洗涤液,将磁珠重悬,4 $^{\circ}$ C 保存备用。

一种可同步检测 Tm 和 Pa 过敏原的磁性免疫层析方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种过敏原的磁性免疫检测技术,尤其是一种可同步检测 Tm 和 Pa 过敏原的磁性免疫层析方法,属于食品的检验领域,涉及食物过敏原的检测技术领域,也涉及过敏原的临床检测领域。

背景技术

[0002] 食物过敏是一个世界性公共卫生问题。调查显示世界上约 4% 的人口对食物过敏。为了保护易感者健康,部分国家和地区对食物过敏原的标签标注进行了严格规定,并列入立法范围,因此食物过敏原的检测越来越重要。食物过敏是由食物引起的机体对免疫系统的异常反应,食物过敏原为食物中引发或激起过敏反应的物质,通常是在特定食物中含有的含量丰富、天然存在的蛋白质。根据过敏原反应的速度、机制及临床特点将致敏机制分为 I 型、II 型、III 型、IV 型,其中大部分食物过敏是由 IgE 介导的 I 型超敏反应,一般症状包括呕吐、腹痛、腹泻等,也包括皮肤反应及呼吸道症状,严重情况下甚至会出现过敏性休克或死亡,目前尚无有效的治疗方法。为了保护易感者健康,部分国家和地区对食物过敏原的标签标注进行了严格规定并列入了立法范围。

[0003] 目前,已被确定的过敏性食物多达 180 种以上,联合国粮农组织(Food and Agriculture Organization, FAO)报告了 90% 以上食物过敏原存在于八大类食物中,即牛奶、鸡蛋、鱼、甲壳类水产品、花生、大豆、坚果类及小麦,其中就包括鱼类和甲壳类水产品及其制品。据调查,在我国 15 ~ 24 岁年龄段人群中,约 6% 的人有过食物过敏的经历,在我国青少年过敏人群中对鱼类等海产品过敏的约占 3~6%,位居其他致敏食物的首位。水产品的主要过敏原可分为两大类,一为贝类及虾蟹等甲壳类动物中的原肌球蛋白(Tropomyosin, 简称 Tm),另外一种则是鳕鱼等鱼类中的小清蛋白(Parvalbumin, 简称 Pa)。由于食物成分的复杂性,加之食品加工过程中使用各种配料和添加剂,传统的化学分析很难满足食物过敏原的检测要求,因此,食物过敏原的快速检测技术研究一直是国内外科学家的研究热点。

[0004] 目前,食物过敏原的检测技术以分析全蛋白或酶解后肽段氨基酸序列的质谱技术、检测编码过敏原 DNA 片段的聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)技术及分析过敏原性的免疫学检测技术为代表。质谱技术能精确测定全蛋白或酶解后肽段的氨基酸序列,再根据相应数据库来确定致敏蛋白,但是质谱技术存在着费时、所用仪器昂贵、检测费用相对较高等缺点。PCR 方法则在检测过程中易因操作不当受到污染而产生假阳性结果,存在操作要求技术性强、不能反映食物的真正过敏性即人们摄入该食物后会产生过敏反应等缺陷。食物过敏原的免疫学检测技术有酶联免疫吸附法(ELISA),生物传感器法和免疫层析法。其中 ELISA 法是目前技术较为成熟的方法,市场上已有杏仁、大豆、花生、甲壳类、芝麻、芥末、羽扇豆、牛奶等食物过敏原的 ELISA 检测试剂盒,这些试剂盒可在 30 ~ 60min 中内实现定性或半定量检测,但是存在假阳性和假阴性反应。

[0005] 生物传感器法是根据待测物质和分子识别元件特异性结合,发生生物化学反应,产生的生物学信息通过信号转换器转化为可以定量处理的电、光等信息,再经仪表放大和

输出,从而达到分析和检测的目的。目前,微型 SPR 生物检测器已应用于食品生产过程中花生过敏原的检测,该检测器可实现在线定量检测。但是生物传感器法需要特定的设备和配件,检测成本高,对硬件设施要求极高。由于食品工业界需要的是快速、简便、高效、特异性强且成本低廉的检测方法,因此,上述这些方法皆无法满足食品工业界的需求。

[0006] 免疫层析技术是 ELISA 技术原理的扩展应用,一般使用乳胶颗粒、胶体硒、胶体金、脂质体及上转磷等作为着色标记物。在层析时,标记物与待测物之间形成的复合物可被相应的配体所捕获而聚集于硝化纤维膜上的检测线并呈现出标记物所带有的颜色,因此可以通过纤维膜上显色条的有无、颜色深浅和反射光线等从而实现检测目的,具有操作简便、快速的优点。在目前公开的报道中,大都以胶体金作为指示剂,因此又被称为胶体金检测法。

[0007] 公开号为 101881769A 的中国专利文献公开了一种检测虾过敏原的免疫胶体金试纸条及其制备方法,可以实现过敏原的定性检测,但是难以进行定量检测,而且目视检测使检测结果不易记录和保存。

[0008] 另外,在待测物质的高通量快速检测方面,也多以胶体金为标记物,如公开号为 CN101358972 中国专利文献公开了检测一种或多种猪病毒性腹泻疾病抗体的试纸条。公开号为 CN101363856 中国专利文献公开了一种同时检测麻疹、风疹病毒特异性抗体 IgG 抗体的快速检测试纸条。公开号为 CN1866021 中国专利文献,提出了一种同时快速检测霍乱弧菌 01 群、0139 群及霍乱毒素的试纸条。公开号为 CN1904615 的中国专利文献提供了一种能同时检测流感 A、B 病毒抗原的快速检测试纸条。

[0009] 在免疫层析检测技术中,除了采用胶体金作为标记物外,也有采用其它标记物作为指示剂的报道。专利号为 US5753517 的美国专利公开了一种使用乳胶颗粒作为标记物的定量免疫层析方法和仪器。公开号为 CN201429607 的中国专利文献公开了一种以上转磷为标记物检测病毒的免疫层析方法。公开号为 CN1645146A 中国专利文献公开了一种用荧光稀土纳米颗粒作为标记物的免疫层析方法及其检测试纸条,可用于定量的新型免疫层析检测。

[0010] 此外,以磁性纳米颗粒(简称磁珠)作为标记物的免疫层析检测报道近年来也陆续出现。如公开号为 CN101750494A 中国专利文献,公开的是乙肝表面抗体的磁性免疫层析试纸条。公开号 CN101762690A 中国专利文献,公开的是一种定量检测血液中 C 反应蛋白的磁性免疫层析试纸条及制备方法。公开号 CN101551391 中国专利文献,公开的是用于检测氯霉素的免疫磁珠层析试纸条技术。公开号 US2008/013884A1 美国专利文献,公开了在标记物上偶联生物素,利用亲和素与生物素之间的亲和作用在结合双抗夹心模式设计的试纸条检测方法,包括磁性颗粒标记物层析法。另外,近些年在实现待测物质的高通量检测方面也取得一定进展,如公开号 CN101566631A 中国专利文献,公开的是用于联合检测 HIV-1+2 抗体和 P24 抗原的磁颗粒标记层析试纸条。

[0011] 上述这些公开的专利技术皆采用了磁性免疫层析技术,它以超顺磁性颗粒代替传统的标记物来进行免疫层析,通过检测结合在超顺磁性纳米颗粒上的目标物来提供对生物样本的定量检测数据,再利用被磁颗粒标记抗体所捕获的免疫复合物与磁信号之间的线性关系即可实现对生物样本的快速定量检测目的,磁性免疫层析技术具有灵敏度高、稳定性强、线性范围宽、操作简便、快速等优点。

[0012] 目前,市场上至少有 14 种商业免疫层析检测试剂盒,检测物质包括牛奶、花生、榛子、甲壳类水产品等过敏原的产品,但是这些产品一般采用的都是胶体金免疫层析法,只能进行单一物质的定性或半定量监测,目前国内外尚无可以实现同时检测水产品中甲壳类和鱼类的主要过敏原的快速现场检测技术。

发明内容

[0013] 本发明的目的:针对现有技术不能同时检测过敏原 Tm 和 Pa 的不足和缺陷,提供一种以免疫磁珠为标记物的免疫层析方法,既可单独捕获 Tm 或 Pa 过敏原,也可同时捕获 Tm 和 Pa 过敏原,从而实现同步检测水产品主要过敏原 Tm 和 Pa 目的。

[0014] 本发明提出的这种可同步检测 Tm 和 Pa 过敏原的磁性免疫方法,其技术解决方案为:

将样品垫、结合了抗 -Tm 和抗 -Pa 免疫磁珠的结合垫、层析膜、吸水垫依次相互交错约 2mm 粘贴在底板上,然后在上层覆盖透明塑料密封膜,构建一种可同步检测 Tm 和 Pa 过敏原的磁性免疫层析试纸条;其中所述的层析膜上预包被有 Pa 抗原检测线 T1、Tm 抗原检测线 T2 和山羊抗小鼠 IgG 质控线 C,通过层析作用可以捕获免疫磁珠,依据样品层析后形成肉眼可见的 1-3 条显色条带,实现 Tm 和 Pa 过敏原的快速定性检测,或者将所构建的磁性免疫层析试纸条通过磁性分析仪进行检测,依据样品层析后形成的检测线和控制线的磁信号检测值来实现单一过敏原的定量分析,或两种过敏原的同步定量检测。

[0015] 其中:所述的免疫磁珠是 Tm 过敏原的特异性鼠系单克隆抗体(简称单抗)修饰磁珠与 Pa 过敏原的特异性鼠系单抗修饰磁珠的混合物;所述的 Tm 特异性单抗是采用杂交瘤技术制备筛选所得,对甲壳类的 Tm 过敏原和部分软体动物的 Tm 过敏原都有特异性反应;所述的 Pa 特异性单抗是采用杂交瘤技术制备筛选所得,对鱼类的 Pa 过敏原具有特异性反应。

[0016] 所述的磁珠为表面修饰有羧基的超顺磁性纳米颗粒,水力学平均尺寸为 50~200nm。

[0017] 所述的甲壳类水产品为虾类和蟹类,所述的部分软体动物水产品为双足纲的牡蛎、蛤蜊,头足纲的鱿鱼、章鱼等。

[0018] 所述的底板为不吸水的硬质塑胶条,单面有背胶;所述的样品垫为玻璃纤维膜;所述的结合垫为玻璃纤维膜;所述的层析膜可以选用尼龙膜、聚偏二氟乙烯膜、聚酯膜、硝酸纤维素膜、醋酸纤维素膜;所述的吸水垫为吸水滤纸。

[0019] 可同步检测 Tm 和 Pa 过敏原的磁性免疫层析试纸条的制备方法包括以下步骤:

A、 抗原的制备与纯化:Tm 过敏原以虾为原料,Pa 过敏原以鲫鱼为原料,采用实验室自行设计的方法分别进行制备与纯化。

[0020] B、 抗体的制备与纯化:先将 Tm 和 Pa 过敏原的特异性抗体细胞株增殖培养,然后注射到 BALB/C 小鼠中制备腹水;制备所得腹水经 50% (w/v) 硫酸浓缩后再采用商业化的 protein-G 亲和层析柱,按照所附产品操作说明书进行纯化。

[0021] C、免疫磁珠的制备:选用直径为 50-200nm 的磁珠,使用碳二甲胺(EDC)和琥珀酰亚胺(NHS)共价交联的方式分别将抗 -Tm 单抗和抗 -Pa 单抗标记在磁珠上形成免疫磁珠,将抗 -Tm 免疫磁珠和抗 -Pa 免疫磁珠 1:1 均匀混合后待用。

[0022] D、结合垫的处理:将制备好的 Tm 和 Pa 的免疫磁珠混合液喷点在结合垫上以形成

免疫磁珠标记结合垫,喷点时可以采用人工手动喷液或定量喷液装置来进行。

[0023] E、进行层析膜的包被:用 20mM PBS, pH7.0 包被缓冲液将纯化的 Tm

抗原、Pa 抗原、山羊抗小鼠 IgG 分别稀释到 0.05mg/mL、0.2mg/mL、2mg/mL 浓度;然后分别以 3-4 μ L/ 试纸条的量手工均匀喷点在层析膜上,进行层析膜的包被,形成 Pa 抗原检测线 T1、Tm 抗原检测线 T2 和山羊抗小鼠 IgG 质控线 C;包被时线与线间的间隔距离为 0.5-1.0cm;包被后的层析膜(简称包被膜)于 37°C 的干燥箱中烘干 4-6 小时,置于干燥瓶中保存备用。

[0024] F、试纸条的组装与制备:将样品垫、结合了抗-Tm 和抗-Pa 免疫磁珠的结合垫、包被膜、吸水垫依次相互交错约 2mm 粘贴在底板上,然后在上层覆盖透明塑料密封膜;根据要求宽度切割即可得到磁性免疫层析试纸条。

[0025] 所述步骤 A 中 Tm 和 Pa 过敏原的纯化方法:

1) 甲壳类主要过敏原 Tm 的纯化:取虾的肌肉组织制备成丙酮粉,

按 1:10~1:15 的比例在丙酮粉中加入含 1 mol/L KCl 的 20mmol/L Tris-HCl (pH 7.5) 溶液过夜抽提,离心后取上清液置于 100 °C 水浴中煮 10min,然后离心回收上清液;所得上清液经 PI 4.5 等电点沉淀处理,将沉淀溶于 20mmol/L Tris-HCl (pH 7.5),用 1 mol/L NaOH 调节 pH 至 7.5 后,进行 40% 硫酸铵盐析,离心后回收上清重复等电点操作并进行 60% 硫酸铵盐析,离心后所得沉淀溶于 PBS 中,-20 度冷冻保存备用。

[0026] 2) 鱼类主要过敏原 Pa 的纯化:取新鲜鲫鱼白肌,搅碎后加入小清蛋

白提取缓冲液(10mM CaCl₂,100mM PMSF,10mM Tris-HCl, pH7.5),匀浆、离心后回收上清液;在上清液中缓慢加入 100% (w/v)三氯乙酸(简称 TCA),使 TCA 终浓度达到 3% (v/v),冰浴下搅拌 10min。然后用 6M NaOH 溶液调节 pH 到 5.2,冰浴下搅拌 1h,再离心回收上清液,在上清液中再次加入 3% TCA,搅拌 10 分钟,离心后取沉淀用 PBS 溶解,-20 度保存备用。

[0027] 所述 C 中免疫磁珠的制备方法为:

1)、吸取 2mg 羧基磁珠于离心管中,用 500 μ L 0.01M 含 0.5% (v/v) Tween-20, pH 为 5.0 的 MES 溶液(简称 MEST)作为活化缓冲溶液清洗磁珠,将离心管置于磁分离架上使得磁珠与活化溶液分离,重复清洗几次,最后重悬磁珠。

[0028] 2)、随后将新鲜配制的 2.6M EDC 和 NHS 加入磁珠悬液中活化羧基 30min,反应结束后先用 MEST 缓冲液洗涤磁珠,再用 0.005M 硼酸盐吐温溶液(简称 BST)作为偶联缓冲液洗涤磁珠 2 遍。

[0029] 3)、加入 100 μ g 抗 Tm 单克隆抗体或 100 μ g 抗 Pa 单克隆抗体,在旋转混合器上反应 3 小时。

[0030] 4)、然后用 1% (w/v) BSA 溶液对免疫磁珠表面没有完全反应的活化基团进行封闭,以降低在以后试验中可能发生的非特异性吸附,室温下封闭反应 30min。

[0031] 5)、用 BST 溶液洗涤封闭后的免疫磁珠 4 次,弃去洗涤液,将磁珠重悬,4°C 保存备用。

本发明与现有技术相比具有以下优点:

(1) 通过对结合垫的 Tm 和 Pa 免疫磁珠的双标记处理、以及在层析膜上预设两条检测线这些改进措施,实现了 Tm 和 Pa 的同步检测。

[0032] (2) 将超顺磁性纳米材料、免疫层析技术和磁性检测仪相结合,通过构建以免疫磁

珠为标记物的免疫层析试纸条,既可满足定性检测需求,又能实现快速定量检测。定量检测结果稳定性强、准确可靠。

附图说明

[0033] 图 1 为以免疫磁珠作为标记物的免疫层析试纸条的结构示意图。

[0034] 图 1 所示的磁性免疫层析试纸条由依序排列的样品垫 1、结合垫 2、层析膜 3(硝酸纤维素膜)、吸水垫 4 及 PVC 底板 5 组成。层析膜 3 上包被有三条线,其中检测线 T1 处喷点的是纯化的鱼类主要过敏原 Pa,检测线 T2 处喷点的是纯化的甲壳类主要过敏原 Tm,控制线 C 处喷点的是山羊抗小鼠 IgG。

[0035] 图 2-5 为应用所构建磁性免疫层析试纸条进行过敏原 Tm 和 Pa 的检测结果设定示意图。

[0036] 其中:

图 2 为采用所述磁性免疫层析试纸条对阴性样品的检测结果:即检测线 T1、检测线 T2 和控制线 C 均有显色条带。

[0037] 图 3 为采用所述磁性免疫层析试纸条对过敏原 Pa 的强阳性检测结果:即检测线 T2 和控制线 C 有显色条带,而检测线 T1 处为无显色条带。

[0038] 图 4 为采用所述磁性免疫层析试纸条对过敏原 Tm 的强阳性检测结果:即检测线 T1 和控制线 C 有显色条带,而检测线 T2 处为无显色条带。

[0039] 图 5 为采用所述磁性免疫层析试纸条对过敏原 Pa 和 Tm 的强阳性同步检测结果:即检测线 T1 和检测线 T2 处为无显色条带,控制线 C 有显色条带。

[0040] 图 6 为采用所述磁性免疫层析试纸条对甲壳类和软体动物类水产品主要过敏原 Tm 的定量检测曲线。

[0041] 图 7 为采用所述磁性免疫层析试纸条检测鱼类水产品主要过敏原 Pa 的定量检测曲线。

[0042] 图 8 为采用所述磁性免疫层析试纸条检测甲壳类、软体动物和鱼类水产品的定性检测结果。

[0043] 其中:

- ①号检测样品为阴性对照;
- ②号为鲫鱼的肌肉蛋白提取液样品;
- ③号为虾的肌肉蛋白提取液样品;
- ④号为蛤蜊的肌肉蛋白提取液样品;
- ⑤号为虾和鲫鱼肌肉蛋白提取液的混合样品。

[0044] 为进一步说明本发明可同步检测甲壳类和部分软体动物主要过敏原 Tm 和鱼类主要过敏原 Pa 的磁性免疫层析试纸条及其制备方法,特举以下的实施例进行说明,该实施例是为了解释而不是以任何方式限制本发明。

具体实施方式

[0045] 本发明所述的这种可同步检测 Tm 和 Pa 过敏原的磁性免疫层析方法如下:

将样品垫、结合了抗-Tm 和抗-Pa 免疫磁珠的结合垫、层析膜、吸水垫依次相互交错约 2mm 粘贴在底板上,然后在上层覆盖透明塑料密封膜,构建成一种可同步检测 Tm 和 Pa 过敏原的磁性免疫层析试纸条;其中所述的层析膜上预包被有 Pa 抗原检测线 T1、Tm 抗原检测线 T2 和山羊抗小鼠 IgG 质控线 C,通过层析作用可以捕获免疫磁珠,依据样品层析后形成肉眼可见的 1-3 条显色条带,实现 Tm 和 Pa 过敏原的快速定性检测;或者将所构建的磁性免疫试纸条通过磁性分析仪进行检测,依据样品层析后形成的检测线和控制线的磁信号检测值来实现单一过敏原的定量分析,或两种过敏原的同步定量检测。

[0046] 所述的免疫磁珠是 Tm 过敏原的特异性鼠系单克隆抗体(简称单抗)修饰磁珠与 Pa 过敏原的特异性鼠系单抗修饰磁珠的混合物;所述的 Tm 特异性单抗是采用杂交瘤技术制备筛选所得,对甲壳类的 Tm 过敏原和部分软体动物的 Tm 过敏原都有特异性反应;所述的 Pa 特异性单抗是采用杂交瘤技术制备筛选所得,对鱼类的 Pa 过敏原具有特异性反应。

[0047] 所述的磁珠为表面修饰有羧基的超顺磁性纳米颗粒,水力学平均尺寸为 50~200nm。

[0048] 所述的甲壳类水产品为虾类和蟹类,所述的部分软体动物水产品为双足纲的牡蛎、蛤蜊、扇贝,头足纲的鱿鱼、章鱼等。

[0049] 所述的底板为不吸水的硬质塑胶条,单面有背胶;所述的样品垫为玻璃纤维膜;所述的结合垫为玻璃纤维膜;所述的层析膜可以选用尼龙膜、聚偏二氟乙烯膜、聚酯膜、硝酸纤维素膜、醋酸纤维素膜;所述的吸水垫为吸水滤纸。

[0050] 可同步检测 Tm 和 Pa 过敏原的磁性免疫层析试纸条的制备方法包括以下步骤:

C、 抗原的制备与纯化:Tm 过敏原以虾为原料,Pa 过敏原以鲫鱼为原料,采用实验室自行设计的方法分别进行制备与纯化。

[0051] D、 抗体的制备与纯化:先将 Tm 和 Pa 过敏原的特异性抗体细胞株增殖培养,然后注射到 BALB/C 小鼠中制备腹水;制备所得腹水经 50% (w/v) 硫酸浓缩后再采用商业化的 protein-G 亲和层析柱,按照所附产品操作说明书进行纯化。

[0052] C、免疫磁珠的制备:选用直径为 50-200nm 的磁珠,使用碳二甲胺(EDC)和琥珀酰亚胺(NHS)共价交联的方式分别将抗-Tm 单抗和抗-Pa 单抗标记在磁珠上形成免疫磁珠,将抗-Tm 免疫磁珠和抗-Pa 免疫磁珠 1:1 均匀混合后待用。

[0053] D、结合垫的处理:将制备好的 Tm 和 Pa 的免疫磁珠混合液喷点在结合垫上以形成免疫磁珠标记结合垫,喷点时可以采用人工手动喷液或定量喷液装置来进行。

[0054] E、进行层析膜的包被:用 20mM PBS, pH7.0 包被缓冲液将纯化的 Tm

抗原、Pa 抗原、山羊抗小鼠 IgG 分别稀释到 0.05mg/mL、0.2mg/mL、2mg/mL 浓度;然后分别以 3-4 μ L/ 试纸条的量手工均匀喷点在层析膜上,进行层析膜的包被,形成 Pa 抗原检测线 T1、Tm 抗原检测线 T2 和山羊抗小鼠 IgG 质控线 C;包被时线与线间的间隔距离为 0.5-1.0cm;包被后的层析膜(简称包被膜)于 37°C 的干燥箱中烘干 4-6 小时,置于干燥瓶中保存备用。

[0055] F、试纸条的组装与制备:将样品垫、结合了抗-Tm 和抗-Pa 免疫磁珠的结合垫、包被膜、吸水垫依次相互交错约 2mm 粘贴在底板上,然后在上层覆盖透明塑料密封膜;根据要求宽度切割即可得到磁性免疫层析试纸条。

[0056]

所述步骤 A 中 Tm 和 Pa 过敏原的纯化方法：

3) 甲壳类主要过敏原 Tm 的纯化：取虾的肌肉组织制备成丙酮粉，

按 1:10~1:15 的比例在丙酮粉中加入含 1 mol/L KCl 的 20mmol/L Tris-HCl (pH 7.5) 溶液过夜抽提，离心后取上清液置于 100 °C 水浴中煮 10min，然后离心回收上清液；所得上清液经 PI 4.5 等电点沉淀处理，将沉淀溶于 20mmol/L Tris-HCl (pH 7.5)，用 1 mol/L NaOH 调节 pH 至 7.5 后，进行 40% 硫酸铵盐析，离心后回收上清重复等电点操作并进行 60% 硫酸铵盐析，离心后所得沉淀溶于 PBS 中，-20 度冷冻保存备用。

[0057] 4) 鱼类主要过敏原 Pa 的纯化：取新鲜鲫鱼白肌，搅碎后加入小清蛋

白提取缓冲液(10mM CaCl₂, 100mM PMSF, 10mM Tris-HCl, pH7.5)，匀浆、离心后回收上清液；在上清液中缓慢加入 100% (w/v) 三氯乙酸(简称 TCA)，使 TCA 终浓度达到 3% (v/v)，冰浴下搅拌 10min。然后用 6M NaOH 溶液调节 pH 到 5.2，冰浴下搅拌 1h，再离心回收上清液，在上清液中再次加入 3% TCA，搅拌 10 分钟，离心后取沉淀用 PBS 溶解，-20 度保存备用。

[0058] 所述 C 中免疫磁珠的制备方法为：

1)、吸取 2mg 羧基磁珠于离心管中，用 500 μL 0.01M 含 0.5% (v/v) Tween-20，pH 为 5.0 的 MES 溶液(简称 MEST)作为活化缓冲溶液清洗磁珠，将离心管置于磁分离架上使得磁珠与活化溶液分离，重复清洗几次，最后重悬磁珠。

[0059] 2)、随后将新鲜配制的 2.6M EDC 和 NHS 加入磁珠悬液中活化羧基 30min，反应结束后先用 MEST 缓冲液洗涤磁珠，再用 0.005M 硼酸盐吐温溶液(简称 BST)作为偶联缓冲液洗涤磁珠 2 遍。

[0060] 3)、加入 100 μg 抗 Tm 单克隆抗体或 100 μg 抗 Pa 单克隆抗体，在旋转混合器上反应 3 小时。

[0061] 4)、然后用 1% (w/v) BSA 溶液对免疫磁珠表面没有完全反应的活化基团进行封闭，以降低在以后试验中可能发生的非特异性吸附，室温下封闭反应 30min。

[0062] 5)、用 BST 溶液洗涤封闭后的免疫磁珠 4 次，弃去洗涤液，将磁珠重悬，4°C 保存备用。

[0063] 在具体实施例中所采用的 Tm 和 Pa 抗原及其特异性单抗都是非商业化产品，由单抗细胞株自己制备纯化所得。所述的磁性免疫层析试纸条采用的是竞争法检测原理，当待测样本中含有 Tm 或 Pa 过敏原时，过敏原先被结合垫上的免疫磁珠所捕获，随着层析作用的进行，当经过检测线 T1 和 T2 时，未结合过敏原的免疫磁珠即可分别被 T1 或 T2 线上的过敏原所捕获从而停留在检测线处，未被检测线捕获的免疫磁珠会继续前行到达质控线 C 时，被 C 线上的二抗所捕获而停留在 C 线处。整个层析反应在 30 分钟内完成，一般反应 20 分钟后在检测线和质控线上肉眼可清晰见到显色条带。将试纸条放入磁性分析仪的读卡槽中，即可在 T1、T2 和 C 线处获得相应的磁信号检测值。阳性样品的 T1 和 T2 处磁信号值一般弱于阴性样品，差别越大就表示阳性反应越强。

[0064] 实施例 1：磁性免疫层析法检测甲壳类主要过敏原 Tm

(1) 甲壳类主要过敏原 Tm 和鱼类主要过敏原 Pa 的制备与纯化：取虾丙酮

粉 2g，加入 30mL 含 1 mol/L KCl 的 20mmol/L Tris-HCl (pH 7.5) 溶液过夜抽提，离心后取上清置于 100 °C 水浴中煮 10min，然后离心回收上清。所得上清经 PI 4.5 等电点沉淀处理，将沉淀溶于 20mmol/L Tris-HCl (pH 7.5)，用 1 mol/L NaOH 调节 pH 至 7.5

后,进行40%硫酸铵盐析,离心后回收上清液重复等电点操作并进行60%硫酸铵盐析,离心后所得沉淀溶于PBS中,-20度冷冻保存备用。

[0065] 鱼类主要过敏原 Pa 的纯化方法为:取新鲜鲫鱼白肌,搅碎后加入小清蛋白提取缓冲液((10mM CaCl₂,100mM PMSF,10mM Tris-HCl, pH7.5)),匀浆、离心后回收上清。在上清中缓慢加入100%三氯乙酸(简称TCA),使TCA终浓度达到3%,冰浴下搅拌10min。然后用6M NaOH溶液调节pH到5.2,冰浴下搅拌1h,再离心回收上清液,在上清液中再次加入3% TCA,搅拌10分钟,离心后取沉淀用PBS溶解,-20度保存备用。

[0066] (2) 抗体的制备与纯化:先将Tm和Pa过敏原的特异性抗体细胞株增殖培养,然后注射到BALB/C小鼠中制备腹水。制备所得腹水经50%硫酸浓缩后再采用商业化的protein-G亲和层析柱,按照所附产品操作说明书进行纯化。

[0067] (3) 免疫磁珠的制备:选用直径为200nm的磁珠,吸取2mg羧基磁珠于离心管中,用500μL 0.01M含0.5%(v/v) Tween-20, pH为5.0的MES溶液(简称MEST)作为活化缓冲溶液清洗磁珠,将离心管置于磁分离架上使得磁珠与活化溶液分离,重复清洗几次后重悬磁珠。随后将新鲜配制的2.6M EDC和NHS加入磁珠悬液中活化羧基30min,反应结束后先用MEST缓冲液洗涤磁珠,再用0.005M硼酸盐吐温溶液(简称BST)作为偶联缓冲液洗涤磁珠2遍。接着加入100μg抗Tm单克隆抗体或100μg抗Pa单克隆抗体,在旋转混合器上反应3小时。然后用1%(w/v) BSA溶液对免疫磁珠表面没有完全反应的活化基团进行封闭,以降低在以后试验中可能发生的非特异性吸附,室温下封闭反应30min。反应结束后用BST溶液洗涤封闭后的免疫磁珠4次,弃去洗涤液,将磁珠重悬,4℃保存备用。

[0068] (4) 将制备好的免疫磁珠手动喷涂在结合垫上制备成磁性结合垫。

[0069] (5) 进行层析膜的包被:用20mM PBS, pH7.0包被缓冲液将纯化的Tm抗原、Pa抗原、山羊抗小鼠IgG分别稀释到0.05mg/mL、0.2mg/mL、2mg/mL浓度。然后分别以3-4μL/试纸条的量手工均匀喷点在层析膜上,进行层析膜的包被,以形成Pa抗原检测线T1、Tm抗原检测线T2和山羊抗小鼠IgG质控线C,线与线间的间隔距离为0.5-1.0cm。包被后的层析膜(简称包被膜)于37℃的干燥箱中烘干4-6小时,置于干燥瓶中保存备用。

[0070] (6) 试纸条的组装与制备:将样品垫、结合了抗-Tm和抗-Pa免疫磁珠的结合垫、包被膜、吸水垫依次相互交错约2mm粘贴在底板上,然后在上层覆盖透明塑料密封膜,裁切成1cm宽的试纸条。

[0071] (7) 样品的检测:在构成免疫层析检测试纸条的样品垫上加100μL的以PBS-T(1%Tween-20)梯度稀释Tm纯化样品。层析20min后,观察结果。阴性结果呈三条明显的条带;Tm阳性结果在T1线,控制线C处出现条带或者T2线,T1线,控制线C均出现条带,但T2线处条带较阴性样品处颜色较浅;也可将滴有待测样品液的磁性免疫层析试纸条装入专用的试纸条卡槽,插入磁信号阅读器MAR仪中阅读磁信号进行定量分析,绘制标准曲线。

实施例2:磁性免疫层析法检测鱼类主要过敏原 Pa

除了样品检测步骤中,检测样品为纯化的鱼类主要过敏原 Pa 外,其它步骤同实例1。

[0072]

实施例3:磁性免疫层析法检测水产品中的过敏原 Tm 和 Pa

(1) 食物样品抽提液的制备

以水产品中的甲壳类中的虾、鱼类中的鲫鱼、软体动物类的蛤蜊为例。分别取 2g 水产品的肌肉组织,与 40mL PBS-T 搅匀后,沸水煮 15min, 10,000g 离心 20min 后取上清,冷冻保存 -20℃,待用。

[0073] (2) 样品检测

在试纸条的样品垫上加 100 μ L 的待测食物样品。层析 20min 后,观察结果。阴性结果呈三条明显的条带;Tm 阳性结果在 T1 线、控制线 C 处出现条带或者 T2 线、T1 线、控制线 C 均出现条带,但 T2 线处条带较阴性样品处颜色较浅;也可将滴有待测样品液的磁性免疫层析试纸条装入专用的试纸条卡槽,插入磁信号阅读器 MAR 中阅读磁信号进行定量检测,结合标准曲线,计算出待测样品中 Tm 或者 Pa 的浓度。

[0074] 所构建的磁性免疫层析试纸条通过用磁性分析仪(Magnetic Assay Reader,简称 MAR 仪)进行检测,依据样品层析后形成的检测线和控制线的磁信号检测值,可实现单一过敏原的定量分析或两种过敏原的同步定量检测。

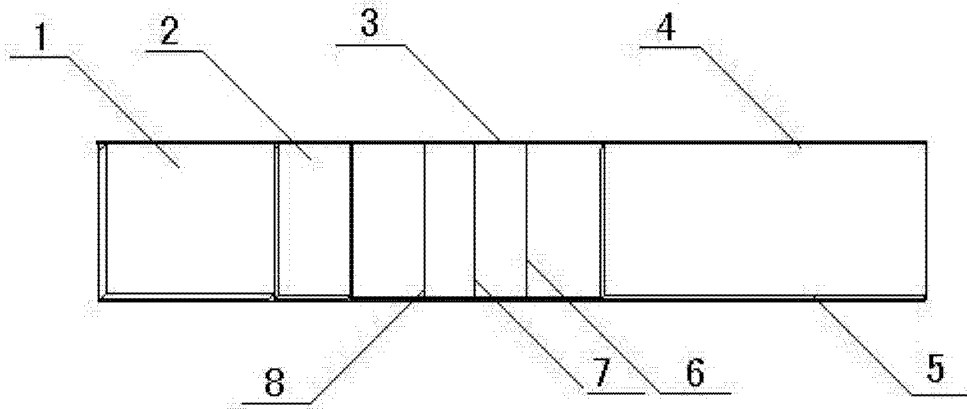


图 1



图 2



图 3



图 4

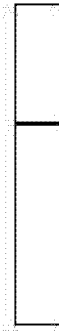


图 5

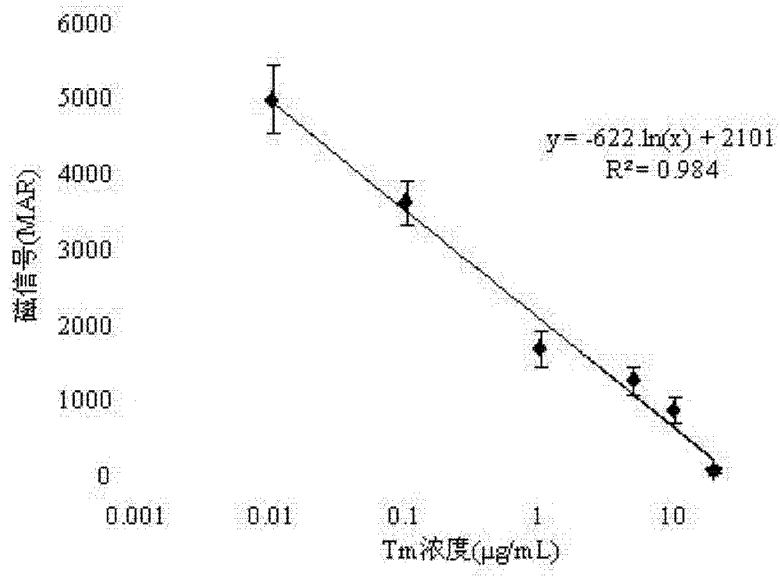


图 6

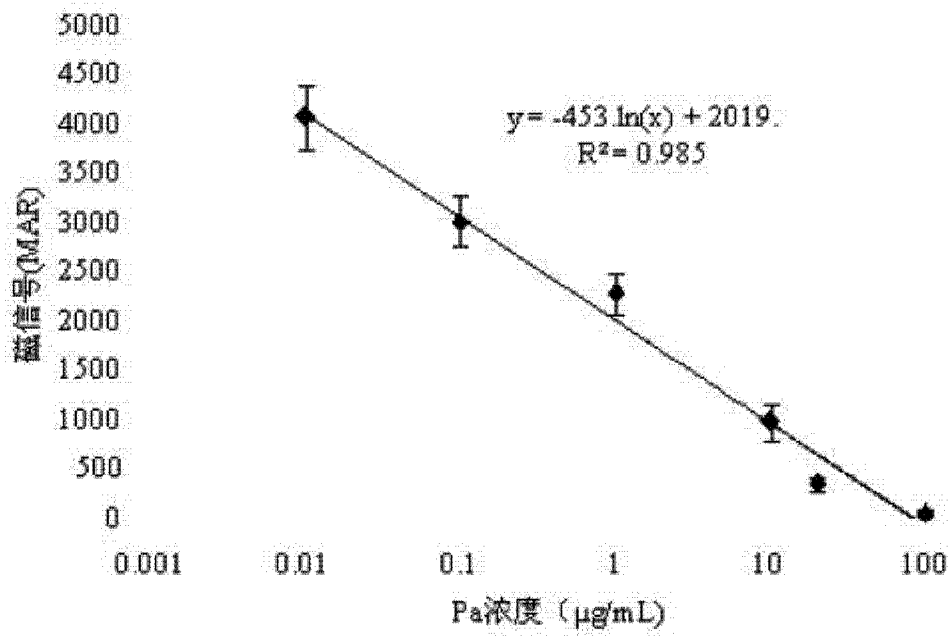
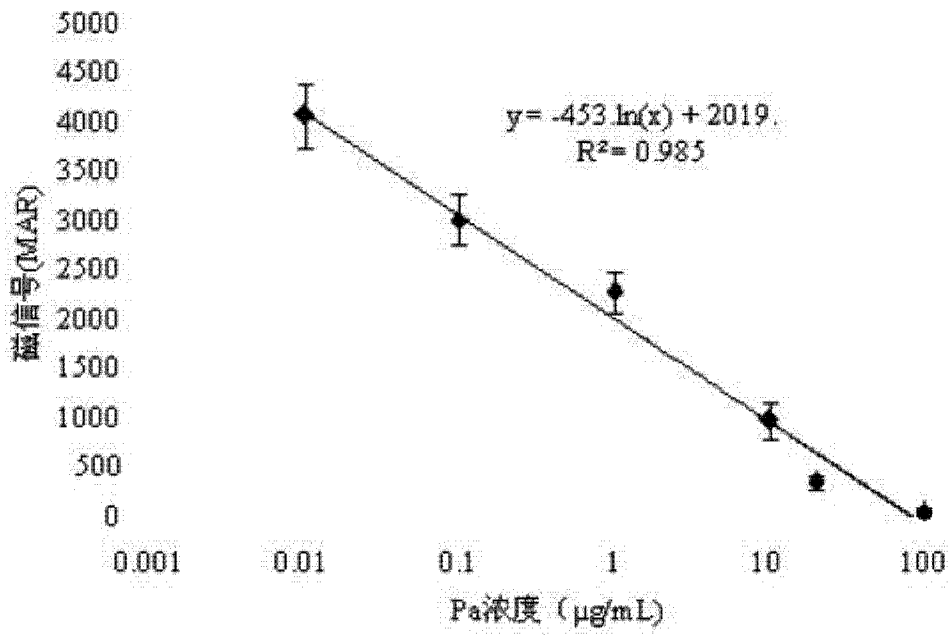


图 7

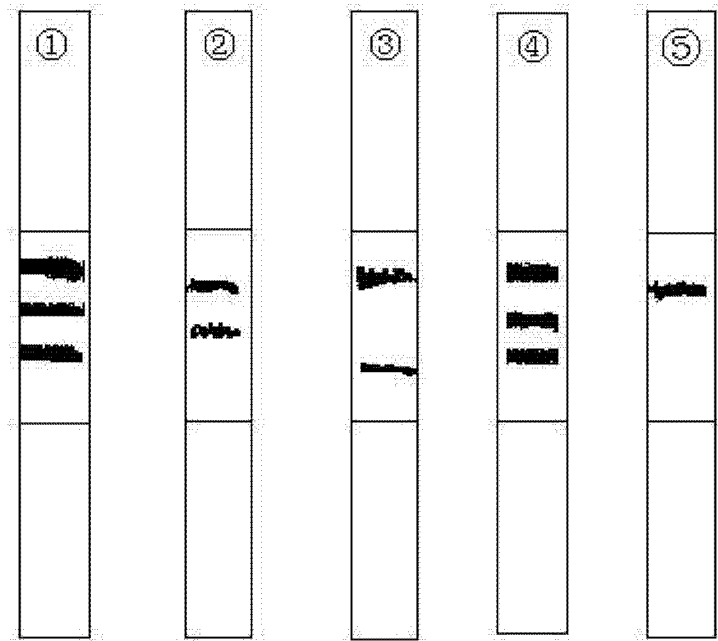


图 8

专利名称(译)	一种可同步检测Tm和Pa过敏原的磁性免疫层析方法		
公开(公告)号	CN102156191A	公开(公告)日	2011-08-17
申请号	CN201110129084.5	申请日	2011-05-18
[标]申请(专利权)人(译)	上海海洋大学		
申请(专利权)人(译)	上海海洋大学		
当前申请(专利权)人(译)	上海海洋大学		
[标]发明人	卢瑛 石良 王锡昌		
发明人	卢瑛 石良 王锡昌		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/532 G01N33/543		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种同步检测Tm和Pa过敏原的磁性免疫层析方法，其特征在于：将样品垫、结合了抗-Tm和抗-Pa免疫磁珠的结合垫、层析膜、吸水垫依次相互交错约2mm粘贴在底板上，然后在上层覆盖透明塑料密封膜，构建成为一种可同步检测Tm和Pa过敏原的磁性免疫层析试纸条；其中所述的层析膜上预包被有Pa抗原检测线T1、Tm抗原检测线T2和山羊抗小鼠IgG质控线C，通过层析作用可以捕获免疫磁珠，依据样品层析后形成肉眼可见的1-3条显色条带，实现Tm和Pa过敏原的快速定性检测；或者将所构建的磁性免疫试纸条通过磁性分析仪进行检测，依据样品层析后形成的检测线和控制线的磁信号检测值来实现单一过敏原的定量分析，或两种过敏原的同步定量检测。

