



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104614513 B

(45) 授权公告日 2016. 05. 25

(21) 申请号 201510038729. 2

CN 103364428 A, 2013. 10. 23,

(22) 申请日 2015. 01. 26

CN 103954775 A, 2014. 07. 30,

CN 103865752 A, 2014. 06. 18,

(73) 专利权人 国家纳米科学中心

地址 100190 北京市海淀区中关村北一条  
11 号

Yi ping Chen. An immunosensorbased on  
magnetic relaxation switch and polystyrene  
microparticle-induced immune multivalency  
enrichment system for the detection  
of *Pantoea stewartii* subsp. *Stewartii*.

《Biosensors and Bioelectronics》. 2012, 第 43  
卷第 6-11 页.

(72) 发明人 蒋兴宇 陈翊平 曹丰晶 张晓青  
吴景 牛亚静

审查员 刘迎鸣

(74) 专利代理机构 北京品源专利代理有限公司  
11332

代理人 巩克栋 杨晞

(51) Int. Cl.

G01N 33/537(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 103278521 A, 2013. 09. 04,

CN 1176001 A, 1998. 03. 11,

WO 2012/044387 A2, 2012. 04. 05,

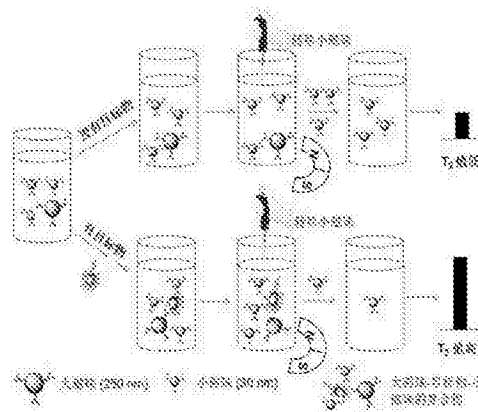
权利要求书2页 说明书9页 附图2页

(54) 发明名称

一种基于磁分离的弛豫时间免疫传感分析方法

(57) 摘要

本发明涉及一种基于磁分离的弛豫时间免疫传感分析方法,包括如下步骤:选取饱和磁化强度不同,在同一磁场中分离速度显著不同的两种磁珠(一种快速分离,另一种不能分离),因此两种磁珠能在磁场中实现分离;将两种磁珠分别偶联上识别同一目标物不同位点的抗体,制备成免疫磁珠;将两种免疫磁珠与待测样品进行免疫反应;将混合体系进行磁分离,磁分离后的上清液测量横向弛豫时间,根据横向弛豫时间的改变量,确定待测样品中生物大分子的浓度。本发明利用不同饱和磁化强度的免疫磁珠在同一磁场中分离速度不同,将磁分离与磁弛豫时间分析相结合,反应时间只需 30min,可用于细菌、病毒和蛋白的快速检测,在生物标志物检测方面有很大的应用前景。



1. 一种基于磁分离的弛豫时间免疫传感分析方法,其特征在于,所述方法包括如下步骤:

(1) 制备两种能够在磁场中实现分离,并偶联识别同一目标物不同位点的抗体的免疫磁珠;

(2) 将步骤(1)得到的两种免疫磁珠与待测样品混合,进行免疫反应;

(3) 将步骤(2)得到的混合体系进行磁分离;

(4) 将步骤(3)磁分离后的上清液测量横向弛豫时间,根据横向弛豫时间的改变量,确定待测样品中生物大分子的浓度。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述磁场的强度为0.001-1T。

3. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于,所述磁场的强度为0.01-0.8T。

4. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述两种免疫磁珠饱和磁化强度相差至少10emu/g。

5. 根据权利要求4所述的方法,其特征在于,所述两种免疫磁珠饱和磁化强度相差至少50emu/g。

6. 根据权利要求5所述的方法,其特征在于,所述两种免疫磁珠饱和磁化强度相差至少60emu/g。

7. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述两种免疫磁珠分别为粒径为200-2000nm的磁珠-抗体偶联物和粒径为10-50nm的磁珠-抗体偶联物。

8. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于,步骤(2)两种免疫磁珠与待测样品混合得到的混合溶液中,粒径为10-50nm的磁珠-抗体偶联物的浓度为0.01 $\mu$ g/mL-10 $\mu$ g/mL。

9. 根据权利要求8所述的方法,其特征在于,步骤(2)两种免疫磁珠与待测样品混合得到的混合溶液中,粒径为10-50nm的磁珠-抗体偶联物的浓度为0.5 $\mu$ g/mL。

10. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于,所述粒径为200-2000nm的磁珠-抗体偶联物与粒径为10-50nm的磁珠-抗体偶联物的体积比为1:0.5-5。

11. 根据权利要求10所述的方法,其特征在于,所述粒径为200-2000nm的磁珠-抗体偶联物与粒径为10-50nm的磁珠-抗体偶联物的体积比为1:1。

12. 根据权利要求8所述的方法,其特征在于,所述粒径为10-50nm的磁珠-抗体偶联物与待测样品的体积比为1:1-20。

13. 根据权利要求12所述的方法,其特征在于,所述粒径为10-50nm的磁珠-抗体偶联物与待测样品的体积比为1:6-12。

14. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述生物大分子包括细菌、真菌、病毒、蛋白质、核酸或多糖中的任意一种或者至少两种的组合。

15. 根据权利要求14所述的方法,其特征在于,所述的细菌为沙门氏菌。

16. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述免疫反应通过涡流震荡实现。

17. 根据权利要求16所述的方法,其特征在于,所述涡流震荡时间为20-50min。

18. 根据权利要求17所述的方法,其特征在于,所述涡流震荡时间为25-40min。

19. 根据权利要求18所述的方法,其特征在于,所述涡流震荡时间为30min。

20. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述磁分离时间为0.5-4min。

21. 根据权利要求20所述的方法,其特征在于,所述磁分离时间为0.5-2min。

22. 根据权利要求21所述的方法,其特征在于,所述磁分离时间为0.5min。

23. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述抗体为单克隆抗体或多克隆抗体。

24. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述方法包括如下步骤:

(1) 制备粒径分别为200-2000nm和10-50nm,并偶联识别同一目标物不同位点的抗体的磁珠-抗体偶联物,粒径为200-2000nm的磁珠-抗体偶联物和粒径为10-50nm的磁珠-抗体偶联物的体积比为1:1;

(2) 将步骤(1)得到的两种磁珠-抗体偶联物与待测样品混合在离心管中,在得到的混合溶液中,粒径为10-50nm的磁珠-抗体偶联物的浓度为0.01 $\mu$ g/mL-10 $\mu$ g/mL,粒径为10-50nm的磁珠-抗体偶联物与待测样品的体积比为1:10,室温下涡流震荡免疫反应20-50min,使其富集待测样品中的生物大分子;

(3) 将步骤(2)得到的混合体系进行磁分离,磁分离时间为0.5min,将没有被磁体吸附的上清液转移到另外一个离心管中;

(4) 将步骤(3)转移后的上清液在核磁共振分析仪测量横向弛豫时间,根据测量横向弛豫时间的改变量,确定待测样品中生物大分子的浓度。

## 一种基于磁分离的弛豫时间免疫传感分析方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种磁弛豫时间免疫传感分析方法,尤其涉及一种基于磁分离的弛豫时间免疫传感分析方法。

### 背景技术

[0002] 传染性的植物性致病菌和动物性病毒是出入境检验检疫工作和公共卫生安全中重点监控对象,对这些传染性的有害物进行及时、准确、便捷的检测,对保护人类健康及生命安全、保障国门安全、维护社会稳定具有重要的意义。目前检测该致病菌和病毒的检测方法主要包括分离培养检测、免疫学检测和分子生物学等方法。分离培养方法简单、易行,但由于其检测灵敏度低、耗时长,需要占用大量的实验空间,无法达到检疫要求。免疫分析法主要包括酶联免疫和胶体金免疫层析试纸条的方法,酶联免疫具有灵敏度高,检测成本低等优点,但其检测时间比较长,难以实现现场快速检测。胶体金免疫层析试纸条的方法具有简单、快速、成本低等优点,适合于大规模样品现场筛查,但其灵敏度比较低,是一种半定量的方法,因此其在需要高灵敏度检测领域方面受到一定的限制。分子生物学方法检测灵敏度较高,特异性较好,但需要昂贵的仪器和较高的专业技术,因此其应用受到一定限制。因此,口岸检验检疫急需建立一种适合现场、快速、灵敏和个性化诊断的检测致病菌和病毒的方法。

[0003] 超顺纳米磁珠(Superparamagnetic beads, SMBs)是一种新型纳米磁性纳米材料,因其比表面积大以及在外界磁场下可定向运动,在免疫分离分析、核酸分离与杂交、靶向给药、核磁共振成像等领域到了广泛应用。一般大粒径的超顺纳米磁珠(200nm-2 $\mu$ m)作为磁免疫分离的载体,可以从复杂的生物或者环境样品中提取和富集待测目标物。由于其独特的磁分离优势,在免疫亲和富集领域已得到广泛应用。小粒径的纳米磁珠(10-50nm)由于饱和磁化强度小,不容易被磁分离,但其悬浮稳定性和生物相容性很好,一般作为一种磁信号探针,用于生物传感和体内成像等方面的研究。

[0004] J Perez等发现小粒径的SMBs在水溶液中当其状态(分散或者聚集)变化时会引起磁场均匀性发生改变,进而显著引起周围水分子质子的横向弛豫时间( $T_2$ )发生改变。SMBs经表面修饰,偶联上相关抗体/抗原或给体/受体后即可制备成特异性的磁弛豫时间传感探针(Magnetic relaxation switches, MRS),通过特异性亲和反应,使体系中免疫磁珠的状态发生改变,由于状态改变的程度与目标分子含量相关,通过弛豫时间的改变可间接得到目标分子的含量。目前,基于SMB的MRS传感技术具有处理简单、快速、灵敏、无损、适于现场检测等优点,在生物分子间相互作用研究、大分子/小分子目标物分析等方面得到了应用。但该方法是基于免疫磁珠状态的改变,而免疫磁珠状态的改变受到多方面因素的影响,例如纳米磁珠的大小和浓度,被分析物表面的结合位点数量、免疫反应时间等条件都会影响弛豫时间的改变,导致该方法的稳定性和可操作性比较差,限制了该方法的进一步应用。

[0005] CN 103278521 A公开了一种检测生物大分子的磁共振免疫传感方法,采用聚苯乙烯微球经偶联上特异性抗体后用以捕获样品中生物大分子抗原,可特异性结合基于超顺磁

纳米颗粒的弛豫时间传感探针,使其由原来的分散状态变为聚集的团簇状态,进而引起周围水分子质子的弛豫时间改变,根据改变量与生物大分子含量的函数关系使用低场核磁共振仪进行检测。

[0006] CN 103808923 A公开了一种可移动式磁分离荧光免疫检测分析及装置,其中所述装置包括移位器具及固定于其上的至少一个磁分离器具、用于分别盛放磁分离荧光免疫检测所需各种试剂的反应杯孔容器。该发明的可移动式磁分离荧光免疫检测分析及装置,其可通过磁分离器具与反应杯孔容器的相对位移运动实现磁微粒在不同反应杯孔容器溶液中的吸附/释放,相较于现有技术本发明可对反应杯孔容器溶液中磁微粒实施有效的快速吸附/释放。

## 发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供一种基于磁分离的弛豫时间免疫传感分析方法,构建一种适合现场、灵敏度高,稳定性强和可操作性好的磁分离-弛豫时间免疫传感分析方法。

[0008] 为达此目的,本发明采用以下技术方案:

[0009] 本发明提供了一种基于磁分离的弛豫时间免疫传感分析方法,所述方法包括如下步骤:

[0010] (1)制备两种能够在磁场中实现分离,并偶联识别同一目标物不同位点的抗体的免疫磁珠;

[0011] (2)将步骤(1)得到的两种免疫磁珠与待测样品混合,进行免疫反应,使其富集待测样品中的生物大分子;

[0012] (3)将步骤(2)得到的混合体系进行磁分离;

[0013] (4)将步骤(3)磁分离后的上清液测量横向弛豫时间,根据横向弛豫时间的改变量,确定待测样品中生物大分子的浓度。

[0014] 在本发明中,两种免疫磁珠能够被磁场分离,其中一种免疫磁珠在磁场的作用下能够富集,而另外一种免疫磁珠在磁场作用下仍悬浮在混合液中,这主要是由于两种免疫磁珠的饱和磁化强度有较大差别,导致其在磁场中分离时间有显著的差异,而且,由于两种不同的免疫磁珠偶联了可同时识别同一目标物不同位点的抗体,其能与待测样品中的生物大分子特异性的结合形成双抗夹心模式,所以能够被磁分离,而磁富集后的上清液存留有无法被磁分离的免疫磁珠,可作为探针检测磁弛豫时间,从而根据测量横向弛豫时间的改变量,通过横向弛豫时间与饱和磁化强度较小的免疫磁珠(即存在于上清液中的免疫磁珠)的浓度关系曲线确定待测样品中生物大分子的浓度:

[0015]  $\Delta T_2 = T_{2\text{sample}} - T_{2\text{blank}}$

[0016]  $\Delta T_2$ : 横向弛豫时间改变量;

[0017]  $T_{2\text{sample}}$ : 经过三次测量取平均值的样品横向弛豫时间;

[0018]  $T_{2\text{blank}}$ : 经过三次测量取平均值的阴性对照组的横向弛豫时间;

[0019]  $T_{2\text{blank}}$ 指的是指的是测量的阴性对照组中具有两种不同饱和磁化强度的免疫磁珠,但溶液中不含有待测液体,其余条件与 $T_{2\text{sample}}$ 一样。

[0020] 优选地,所述磁场的强度为0.001-1T,例如可以是0.001T、0.002T、0.005T、0.01T、0.02T、0.03T、0.05T、0.06T、0.08T、0.1T、0.2T、0.3T、0.4T、0.5T、0.6T、0.8T或1T,优选为

0.05-0.8T。

[0021] 饱和磁化强度不同的免疫磁珠在同一个磁场中分离的速度不一样,饱和磁化强度大的磁珠在磁场中1-2min就会分离,而饱和磁化强度小的磁珠不能被该磁场分离,进而使两种免疫磁珠在磁场中实现分离。优选地,在本发明中,两种免疫磁珠的饱和磁化强度的磁珠相差至少10emu/g,例如可以是10emu/g、20emu/g、30emu/g、40emu/g、50emu/g、55emu/g、60emu/g、70emu/g、75emu/g、80emu/g、85emu/g、90emu/g、100emu/g、200emu/g或300emu/g,优选相差至少50emu/g,进一步优选相差至少60emu/g。两种免疫磁珠的饱和磁化强度相差上述数值,可以使其两者在磁场中实现分离。

[0022] 一般情况下,不同的粒径的免疫磁珠具有不同的饱和磁化强度,通常情况下,饱和磁化强度与免疫磁珠的粒径成三次方关系,免疫磁珠的粒径越大,饱和磁化强度越大。因此,粒径大的免疫磁珠饱和磁化强度大,很容易被磁分离,粒径小的免疫磁珠饱和磁化强度小,不易被分离。在本发明中,优选地,两种免疫磁珠分别为粒径为200-2000nm的磁珠-抗体偶联物和粒径为10-50nm的磁珠-抗体偶联物,该粒径的两种免疫磁珠可以很容易得在磁场中实现分离。

[0023] 为了便于叙述,下文中,所述粒径为200-2000nm的磁珠-抗体偶联物记为大磁珠-抗体偶联物(SMB<sub>大</sub>-Ab1),粒径为200-2000nm的磁珠记为SMB<sub>大</sub>,所述粒径为10-50nm的磁珠-抗体偶联物记为小磁珠-抗体偶联物(SMB<sub>小</sub>-Ab2),粒径为10-50nm的磁珠记为SMB<sub>小</sub>。

[0024] 优选地,所述大磁珠-抗体偶联物的粒径为200-2000nm,例如可以是200nm、250nm、300nm、350nm、400nm、450nm、500nm、550nm、600nm、650nm、700nm、750nm、800nm、850nm、900nm、950nm、1000nm、1200nm、1500nm、1600nm、1800nm或2000nm。

[0025] 优选地,所述小磁珠-抗体偶联物的粒径为10-50nm,例如可以是10nm、15nm、18nm、20nm、22nm、25nm、28nm、30nm、32nm、35nm、38nm、40nm、42nm、45nm、48nm或50nm。

[0026] 本发明中,步骤(2)两种免疫磁珠与待测样品混合得到的混合溶液中,小磁珠-抗体偶联物的浓度为0.01μg/mL-10μg/mL,例如可以是0.01μg/mL、0.05μg/mL、0.08μg/mL、0.1μg/mL、0.2μg/mL、0.4μg/mL、0.5μg/mL、0.6μg/mL、0.7μg/mL、0.8μg/mL、1μg/mL、2μg/mL、3μg/mL、4μg/mL、5μg/mL、6μg/mL、7μg/mL、8μg/mL、9μg/mL或10μg/mL,优选为0.5μg/mL。当小磁珠-抗体偶联物的浓度过大时,参加免疫反应的小磁珠-抗体偶联物在混合溶液中所占的比例比较少,从而影响方法的灵敏度;当小磁珠-抗体偶联物的浓度过低时,参与免疫反应的小磁珠-抗体偶联物的量不够,影响整个方法的准确性。

[0027] 优选地,所述大磁珠-抗体偶联物与小磁珠-抗体偶联物的体积比为1:0.5-5,例如可以是1:0.5、1:1、1:2、1:3、1:4或1:5,优选为1:1。

[0028] 优选地,所述小磁珠-抗体偶联物与待测样品的体积比为1:1-20,例如可以是1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:8、1:10、1:12、1:15、1:16、1:18或1:20,优选为1:6-12。

[0029] 优选地,所述生物大分子包括细菌、真菌、病毒、蛋白质、核酸或多糖中的任意一种或者至少两种的组合。

[0030] 优选地,所述的细菌包括但不限于沙门氏菌。

[0031] 优选地,所述的病毒包括但不限于鸡胚囊液中新城疫病毒。

[0032] 优选地,所述的蛋白质包括但不限于血清中甲胎蛋白。

[0033] 优选地,所述免疫富集通过涡流震荡实现。

[0034] 优选地,所述涡流震荡时间为20-50min,例如可以是20min、25min、30min、35min、40min、45min或50min,优选为25-40min,进一步优选为30min。

[0035] 优选地,所述磁分离时间为0.5-4min,例如可以是0.5min、1min、1.5min、2min、2.5min、3min、3.5min或4min,优选为0.5-2min,进一步优选为0.5min。

[0036] 优选地,所述不同抗体为单克隆抗体或多克隆抗体。

[0037] 在本发明中,所述免疫磁珠制备包括活化与偶联的过程。

[0038] 在本发明中,大磁珠-抗体偶联物的制备方法,包括如下步骤:

[0039] (A)SMB<sub>大</sub>活化:将超顺磁纳米微球放到离心管中磁分离,加入去离子水混匀,SMB<sub>大</sub>与去离子水的体积比为1:3-8,室温下涡旋震荡反应1-5min,再加入质量浓度为50mg/mL的N-羟基硫代琥珀酰亚胺(N-Hydroxysulfosuccinimide sodium salt,NHS)和质量浓度为25mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基二亚胺盐酸盐(1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride,EDC),摇振后进行磁分离,磁分离后得到的液体溶于摩尔浓度为0.01M、pH=7.4的PBS溶液中,得到活化超顺磁纳米微球液;

[0040] (B)包被抗体与SMB<sub>大</sub>的偶联:将上述活化微球液转移到离心管,再加入Ab1,活化微球液与Ab1的体积质量比为500-800 $\mu$ L:1mg,避光摇振1h,磁分离去除没有反应完全的抗体,倒掉废液,再加入PBS重悬,再磁分离,进行三次后,用含有0.1%BSA的PBS复溶,得到已固定化生物大分子抗体的大磁珠-抗体偶联物。

[0041] 在本发明中,小磁珠-抗体偶联物的制备方法,包括如下步骤:

[0042] (a)SMB<sub>小</sub>活化:将超顺磁纳米微球200-500 $\mu$ L放涡旋振荡器中,室温下涡旋震荡反应1-5min,再加入质量浓度为50mg/mL的N-羟基硫代琥珀酰亚胺(N-Hydroxysulfosuccinimide sodium salt,NHS)和质量浓度为25mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基二亚胺盐酸盐(1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride,EDC),摇振20min后进行磁分离,磁分离后得到的液体溶于摩尔浓度为0.01M、pH=7.4的PBS溶液中,得到活化超顺磁纳米微球液;

[0043] (b)包被抗体与SMB<sub>小</sub>的偶联:将上述活化微球液转移到离心管,再加入Ab2,活化微球液与Ab2的体积质量比为800-1200 $\mu$ L:1mg,避光摇振1h,磁分离去除没有反应完全的抗体,倒掉废液,再加入PBS重悬,再磁分离,进行三次后,用含有0.1%BSA的PBS复溶,得到已固定化生物大分子抗体的SMB<sub>大</sub>-Ab1-抗体偶联物。

[0044] 作为优选方案,本发明提供了一种基于磁分离的弛豫时间免疫传感分析方法,包括如下步骤:

[0045] (1)制备粒径分别为200-2000nm和10-50nm,并偶联能够识别同一目标物不同位点的抗体的磁珠-抗体偶联物,SMB<sub>大</sub>-Ab1与SMB<sub>小</sub>-Ab2的体积比为1:1;

[0046] (2)将步骤(1)得到的SMB<sub>大</sub>-Ab1、SMB<sub>小</sub>-Ab2和待测样品混合在离心管中,在得到的混合液中,SMB<sub>小</sub>-Ab2的质量浓度为0.01 $\mu$ g/mL-10 $\mu$ g/mL,SMB<sub>小</sub>-Ab2与待测样品的体积比为1:10,室温下涡流震荡免疫反应20-50min,使其富集待测样品中的生物大分子;

[0047] (3)将步骤(2)得到的混合体系进行磁分离,磁分离时间为0.5min,然后将没有被磁体吸附的上清液转移到另外一个离心管中;

[0048] (4)将步骤(3)转移后的上清液在核磁共振分析仪测量横向弛豫时间,根据测量横向弛豫时间的改变量,通过横向弛豫时间与饱和磁化强度较小的免疫磁珠的浓度关系曲线

确定待测样品中生物大分子的浓度：

[0049] 其中仪器参数：磁场强度：59.095MHz(1H)，CPMG序列：Carr-Purcell-Meiboom-Gill pulse sequence,1500个自旋回波，回旋时间为3ms，重复时间为3s，每个浓度重复测三次：

[0050]  $\Delta T_2 = T_{2\text{sample}} - T_{2\text{blank}}$

[0051]  $\Delta T_2$ ：横向弛豫时间改变量；

[0052]  $T_{2\text{sample}}$ ：经过三次测量取平均值的样品横向弛豫时间；

[0053]  $T_{2\text{blank}}$ ：经过三次测量取平均值的阴性对照组的横向弛豫时间；

[0054]  $T_{2\text{blank}}$ 指的是指的是测量的阴性对照组中具有SMB<sub>大</sub>-Ab1和SMB<sub>小</sub>-Ab2，但溶液中不含有待测液体，其余条件与 $T_{2\text{sample}}$ 一样。

[0055] 对于本领域技术人员来说，即使不明了本发明的检测原理，同样能够实施、再现本发明，即本发明的检测原理是否清楚明了，都不影响本发明的实施和再现。本发明的基于磁分离的弛豫时间免疫传感分析方法，其检测原理在于：

[0056] 图1示出了本发明磁分离和磁弛豫时间传感结合的原理，具体如下：本发明选取不同饱和和磁化强度的磁珠，制备出两种不同饱和磁化强度并偶联不同抗体的免疫磁珠，SMB<sub>大</sub>-Ab1、SMB<sub>小</sub>-Ab2和待测样品中的生物大分子形成双抗夹心模式，即“SMB<sub>大</sub>-目标物-SMB<sub>小</sub>”的复合物，由于SMB<sub>大</sub>-Ab1能够在1-2min被磁场分离，而SMB<sub>小</sub>-Ab2不会被该磁场分离，该复合物会在30s被磁分离，没有反应的SMB<sub>小</sub>-Ab2不会被磁分离，可以作为弛豫时间传感的信号探针。同时，因为横向弛豫时间与未被分离的SMB<sub>小</sub>-Ab2的浓度呈负相关，且SMB<sub>小</sub>-Ab2的总量是一定的，SMB<sub>小</sub>-Ab2的浓度越高，横向弛豫时间的值越小。横向弛豫时间与待测样品中的生物大分子浓度呈正相关，SMB<sub>小</sub>-Ab2的量和待测样品中的生物大分子的含量成一一对应的关系，因此该方法中，横向弛豫时间的改变量只和待测样品中的生物大分子的含量相关，即仅和本发明中待测样品中的生物大分子的浓度相关。

[0057] 与现有技术相比，本发明具有如下有益效果：

[0058] (1)本发明基于不同饱和磁化强度的免疫磁珠在同样的磁场条件下，饱和磁化强度大的免疫磁珠容易被磁分离，而饱和磁化强度小的免疫磁珠不容易被磁分离的原理，使待测样品中的生物大分子与两种免疫磁珠发生免疫反应，形成双抗夹心，能够被磁富集，而上清液中未结合的饱和磁化强度较小的免疫磁珠则可作为磁弛豫时间检测的探针，这样就将磁富集与磁弛豫时间结合起来，使得整个检测更加稳定，更加精准，整个方法操作简单，时间短，反应时间只需30min；

[0059] (2)本发明将免疫磁分离的优势和传统的磁弛豫时间传感方法的优点结合起来，与传统的磁弛豫时间传感相比，因为该方法的磁信号只与目标物的含量相关，提高了该方法的可操作性；灵敏度和线性范围有了很大地提高；比传统的磁弛豫时间传感的分析方法在细菌检测方面提高了提高了2个数量级，比经典的酶联免疫的分析方法提高了1个数量级；

[0060] (3)本发明是一种灵敏度高，可操作性强，稳定性好的免疫传感分析方法，用于环境、临床和食品样品中细菌，病毒、蛋白的快速、灵敏地检测，达到适合现场、大规模样品筛查的目的，在生物标志物检测方面有很大的应用前景。

## 附图说明

[0061] 图1是本发明磁分离-磁弛豫时间免疫传感分析方法的示意图。

[0062] 图2是本发明粒径大小不同的磁珠在同一磁场中分离速度的对比图。

[0063] 图3是本发明SMB<sub>小</sub>-的浓度和弛豫时间值的关系图。

[0064] 图4是本发明磁分离-弛豫时间免疫传感分析方法和传统的弛豫时间免疫传感分析方法检测牛奶中沙门氏菌的结果对比图；

[0065] 其中,图a表示磁分离-弛豫时间免疫传感分析方法检测的灵敏度,图b表示传统的弛豫时间免疫传感分析方法检测的灵敏度。

[0066] 图5是本发明磁分离-磁弛豫时间免疫传感分析方法和传统的弛豫时间免疫传感分析方法检测新城疫病毒的结果对比图；

[0067] 其中,图a表示磁分离-弛豫时间免疫传感分析方法检测新城疫病毒的灵敏度,图(b)表示传统的弛豫时间免疫传感分析方法检测新城疫病毒的灵敏度。

## 具体实施方式

[0068] 为更进一步阐述本发明所采取的技术手段及其效果,以下结合附图并通过具体实施方式来进一步说明本发明的技术方案,但本发明并非局限在实施例范围内。

[0069] 下述实施例中的试验方法,如无特殊说明,均为常规方法;所用的实验材料,如无特殊说明,均为常规生化试剂厂商购买得到。

[0070] 本发明的反应原理示意图如图1所示,将SMB<sub>大</sub>-Ab1、SMB<sub>小</sub>-Ab2与待测样品中的生物大分子进行免疫反应,形成一种双抗夹心的模式,即“SMB<sub>大</sub>-目标物-SMB<sub>小</sub>”的复合物,在外加磁场的作用下,SMB<sub>大</sub>-Ab1容易被分离,而没结合的SMB<sub>小</sub>-Ab2由于饱和磁强度比较小,不容易被分离,SMB<sub>小</sub>-Ab2作为弛豫时间传感探针,与待测样品中生物大分子的含量成反比,而SMB<sub>小</sub>-Ab2的浓度和横向弛豫时间的值成反比,可通过测量横向弛豫时间来计算待测样品中生物大分子的含量。

[0071] 下述实施例中所用的试剂仪器设备来源:

[0072] (1)小型核磁共振仪(1.5T):上海寰彤科技设备有限公司;

[0073] (2)大粒径的超顺纳米磁珠:德国默克公司,小粒径的超顺纳米磁珠:美国大洋纳米科技公司;

[0074] (3)沙门氏菌及相关的细菌:美国国家菌种储存公司;

[0075] (4)新城疫病毒及相关的抗体:东莞汉诺生物技术公司;

[0076] (5)甲胎蛋白及相关的抗体:北京热景生物技术有限公司;

[0077] (6)磁分离架:上海奥润微纳新材料科技有限公司。

[0078] 实施例1大磁珠-抗体偶联物(SMB<sub>大</sub>-Ab1)的制备

[0079] (1)SMB<sub>大</sub>活化:取200 $\mu$ L颗粒直径为350nm的超顺磁纳米微球放到离心管中,磁分离,然后加入1000 $\mu$ L的去离子水,放入涡旋振荡器中振荡2min;再加入15 $\mu$ L质量浓度为50mg/mL的NHS和15 $\mu$ L质量浓度为25mg/mL EDC,摇振20min进行活化;过量的EDC,NHS和副产物通过磁分离,再溶于200 $\mu$ L摩尔浓度为0.01M、pH=7.4的PBS溶液中,得到活化超顺磁纳米微球液。

[0080] (2)包被抗体(Ab1)和大粒径的超顺纳米磁珠的偶联:取上述活化微球液80 $\mu$ L,加入到离心管中,再加入0.2mg抗生物大分子的抗体(Ab1),避光摇振1小时,经磁分离架分离去除没有反应完全的抗体,倒掉废液;然后用1000 $\mu$ L的PBS溶液重悬,然后再用普通的磁分离架进行磁分离,该步骤重复三次,最后用含0.1%BSA的PBS复溶该复合物,得到已固定化生物大分子抗体的超顺磁纳米磁珠,保存在4 $^{\circ}$ C。

[0081] 实施例2小磁珠-抗体偶联物(SMB<sub>小</sub>-Ab1)的制备

[0082] (1)SMB<sub>小</sub>活化:取400 $\mu$ L颗粒直径为30nm的超顺磁纳米磁珠放入涡旋振荡器中振荡2min;再加入10 $\mu$ L质量浓度为50mg/mL的NHS和10 $\mu$ L质量浓度为25mg/mL EDC,摇振20min进行活化;再加入1000 $\mu$ L摩尔浓度为0.01M、pH=7.4的PBS溶液中,得到活化超顺磁纳米磁珠溶液。

[0083] (2)识别沙门氏菌的捕获抗体(Ab2)和小粒径的超顺纳米磁珠的偶联:向上述活化好的超顺纳米磁珠中加入0.1mg抗生物大分子的抗体(Ab2),避光摇振1小时,经梯度磁场分离柱分离去除没有反应完全的抗体,倒掉废液;再用含0.1%BSA的PBS复溶该复合物,得到已固定化生物大分子抗体的超顺磁纳米磁珠溶液,保存在4 $^{\circ}$ C。

[0084] 实施例3不同粒径大小的磁珠在同一个磁场中的不同分离速度对比图

[0085] 选用粒径大小分别为250nm和30nm的超顺纳米磁珠作为比较对象,同时放在磁场为0.01T的磁分离架上。观察磁珠的聚集情况。

[0086] 如图2所示,在同一个磁场条件下(0.01T),粒径为250nm的SMB<sub>大</sub>-Ab1很快在30s时间内因为磁场的的作用而聚成到底部,而粒径为30nm的SMB<sub>小</sub>-Ab2由于饱和磁化强度小,经过12h仍然不被磁场所分离,依然在玻璃瓶中处于悬浮状态。

[0087] 实施例4横向弛豫时间与粒径磁颗粒的浓度关系图

[0088] 取直径30nm的磁颗粒稀释一定的浓度梯度0.005 $\mu$ g/mL,0.01 $\mu$ g/mL,

[0089] 0.025 $\mu$ g/mL,0.05 $\mu$ g/mL,0.1 $\mu$ g/mL,0.2 $\mu$ g/mL,0.5 $\mu$ g/mL和1 $\mu$ g/mL,然后分别测量横向弛豫时间T<sub>2</sub>的值。以磁颗粒的浓度为横坐标,以横向弛豫时间的值为纵坐标,绘制一个曲线。

[0090] 如图3所示,横向弛豫时间值和SMB<sub>小</sub>-Ab2的浓度成良好的线性关系,SMB<sub>小</sub>-Ab2的浓度越大,其横向弛豫时间值越小,随着小粒径磁颗粒浓度的增大,T<sub>2</sub>值减少,说明小粒径磁颗粒的浓度与横向弛豫时间的值成反比。

[0091] 实施例5磁分离-弛豫时间免疫传感分析方法的构建

[0092] (1)磁富集和免疫反应

[0093] 100 $\mu$ L SMB<sub>大</sub>-Ab1,100 $\mu$ L SMB<sub>小</sub>-Ab2和800 $\mu$ L不同浓度梯度的生物大分子分别混合在1.5mL的离心管中,其中生物大分子的浓度为107cfu/mL,106cfu/mL,105cfu/mL,104cfu/mL,103cfu/mL,102cfu/mL,10cfu/mL和0cfu/mL。将混合体系在室温下,涡流震荡免疫反应30min,再在磁分离架进行磁分离,将没有被磁体吸附的上清液(SMB<sub>小</sub>-Ab2溶液)转移到另外一个离心管,待测。

[0094] (2)横向弛豫时间的测量

[0095] 将上述最终的上清液转移到7.5-mm核磁共振试管中分别测量横向弛豫时间T<sub>2</sub>。每个浓度重复测三次,通过计算横向弛豫时间的改变量,从而得出样品中生物大分子的含量。

[0096]  $\Delta T_2 = T_{2\text{sample}} - T_{2\text{blank}}$

- [0097]  $\Delta T_2$ : 横向弛豫时间改变量;
- [0098]  $T_{2\text{sample}}$ : 经过三次测量取平均值的样品横向弛豫时间;
- [0099]  $T_{2\text{blank}}$ : 经过三次测量取平均值的阴性对照组的横向弛豫时间。
- [0100] 实施例6磁分离-磁弛豫时间免疫传感分析方法检测牛奶中沙门氏菌
- [0101] 100 $\mu\text{L}$   $\text{SMB}_{\text{大}}\text{-Ab1}$ 和100 $\mu\text{L}$ 已经用PBS缓冲液稀释10倍的牛奶样品混合。然后再加入100 $\mu\text{L}$   $\text{SMB}_{\text{小}}\text{-Ab2}$ ,在室温下,涡流震荡免疫反应30min,再在磁分离架进行磁分离,将没有被磁体吸附的上清液( $\text{SMB}_{\text{小}}\text{-Ab2}$ 溶液)转移到另外一个离心管中,待测。
- [0102] 将上述最终的上清液转移到7.5-mm核磁共振试管中分别测量横向弛豫时间 $T_2$ 。每个浓度重复测三次,通过计算横向弛豫时间改变的改变量,从而得出样品中生物大分子的含量。
- [0103] 对比例1传统的磁弛豫时间传感的分析方法检测牛奶中沙门氏菌
- [0104] 100 $\mu\text{L}$   $\text{SMB}_{\text{大}}\text{-Ab1}$ 和100 $\mu\text{L}$ 已经用PBS缓冲液稀释10倍的牛奶样品混合。然后再加入100 $\mu\text{L}$   $\text{SMB}_{\text{小}}\text{-Ab2}$ ,在室温下,涡流震荡免疫反应30min,得到反应混合液。
- [0105] 将上述得到的混合液转移到7.5-mm核磁共振试管中分别测量横向弛豫时间 $T_2$ 。每个浓度重复测三次,通过计算横向弛豫时间改变的改变量,从而得出样品中生物大分子的含量。
- [0106] 从图4(a)可以得出,磁分离-横向弛豫时间免疫传感分析方法对沙门氏菌检测的最低检出限为100cfu/mL,从图4(b)可以得出,传统的磁弛豫时间传感的分析方法对沙门氏菌检测的最低检出限为 $10^4$ cfu/mL。最低检出限比传统的弛豫时间方法降低了2个数量级。
- [0107] 实施例7磁分离-弛豫时间免疫传感分析方法检测鸡胚囊液中新城疫病毒
- [0108] 100 $\mu\text{L}$   $\text{SMB}_{\text{大}}\text{-Ab1}$ 和100 $\mu\text{L}$ 已经用PBS缓冲液稀释10倍的鸡胚囊液样品混合。然后再加入100 $\mu\text{L}$   $\text{SMB}_{\text{小}}\text{-Ab2}$ ,在室温下,涡流震荡免疫反应30min,再在磁分离架进行磁分离,将没有被磁体吸附的上清液( $\text{SMB}_{\text{小}}\text{-Ab2}$ 溶液)转移到另外一个离心管中,待测。
- [0109] 将上述最终的上清液转移到7.5-mm核磁共振试管中分别测量横向弛豫时间 $T_2$ 。每个浓度重复测三次,通过计算横向弛豫时间改变的改变量,从而得出样品中生物大分子的含量。
- [0110] 对比例2传统的弛豫时间免疫传感分析方法检测鸡胚囊液中新城疫病毒
- [0111] 100 $\mu\text{L}$   $\text{SMB}_{\text{大}}\text{-Ab1}$ 和100 $\mu\text{L}$ 已经用PBS缓冲液稀释10倍的鸡胚囊液样品混合。然后再加入100 $\mu\text{L}$   $\text{SMB}_{\text{小}}\text{-Ab2}$ ,在室温下,涡流震荡免疫反应30min,得到反应混合液。
- [0112] 将上述得到的反应混合液转移到7.5-mm核磁共振试管中分别测量横向弛豫时间 $T_2$ 。每个浓度重复测三次,通过计算横向弛豫时间改变的改变量,从而得出样品中生物大分子的含量。
- [0113] 从图5(a)可以得出,磁分离-磁弛豫时间免疫传感分析方法对新城疫病毒检测的最低检出限为100copy/mL,从图5(b)可以得出,传统的横向弛豫时间传感的分析方法对沙门氏菌检测的最低检出限为 $10^3$ copy/mL。最低检出限比传统的弛豫时间方法降低了1个数量级。
- [0114] 实施例8磁分离-弛豫时间免疫传感分析方法检测血清中甲胎蛋白
- [0115] 100 $\mu\text{L}$   $\text{SMB}_{\text{大}}\text{-Ab1}$ 和1000 $\mu\text{L}$ 已经用PBS缓冲液稀释10倍的血清样品混合。然后再加入100 $\mu\text{L}$   $\text{SMB}_{\text{小}}\text{-Ab2}$ ,在室温下,涡流震荡免疫反应30min,再在磁分离架进行磁分离,取走没

有被磁体吸附的上清液(SMB<sub>小</sub>-Ab2溶液),再加入200 $\mu$ L的PBS缓冲液重悬SMB<sub>大</sub>-Ab1-目标物-SMB<sub>小</sub>-Ab2复合物,再在磁分离架进行磁分离,将上清液加入到原来的上清液中混匀,取200 $\mu$ L转移到另外一个离心管中,待测。

[0116] 将上述最终的上清液转移到7.5-mm核磁共振试管中分别测量横向弛豫时间 $T_2$ 。每个浓度重复测三次,通过计算横向弛豫时间改变的改变量,从而得出样品中生物大分子的含量。

[0117] 实施例5-8和对比例1-2中的横向弛豫时间 $T_2$ 测量均是在1.5T的磁场核磁共振分析仪中进行的测量,核磁共振分析仪的仪器参数如下:磁场强度:59.095MHz(1H);检测温度:40 $^{\circ}$ C;CPMG序列:Carr-Purcell-Meiboom-Gill pulse sequence;1500个自旋回波,回旋时间为3ms,重复时间为3s。

[0118] 综合实施例1-8和对比例1-2,本发明方法磁分离-横向弛豫时间免疫传感分析方法对沙门氏菌检测的最低检出限比传统的横向弛豫时间方法降低了2个数量级;对新城疫病毒检测的最低检出限比传统的横向弛豫时间方法降低了1个数量级。本发明将磁分离、检测和磁信号检测结合,一步完成,整个方法操作简单,反应时间只需30min,检测快速稳定;用于环境、临床和食品样品中细菌,病毒、蛋白的快速、灵敏地检测,达到适合现场、大规模样品筛查的目的,在生物标志物检测方面有很大的应用前景。

[0119] 申请人声明,本发明通过上述实施例来说明本发明的详细方法,但本发明并不局限于上述详细方法,即不意味着本发明必须依赖上述详细方法才能实施。所属技术领域的技术人员应该明了,对本发明的任何改进,对本发明产品各原料的等效替换及辅助成分的添加、具体方式的选择等,均落在本发明的保护范围和公开范围之内。

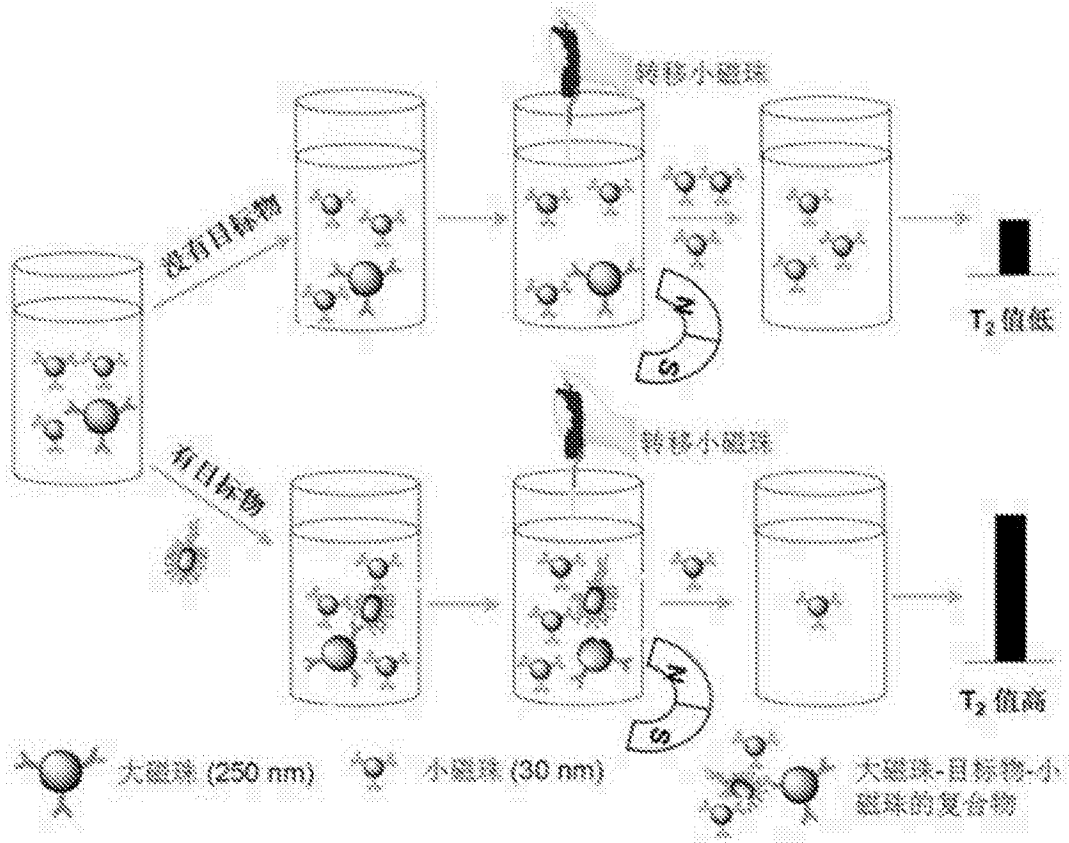


图1

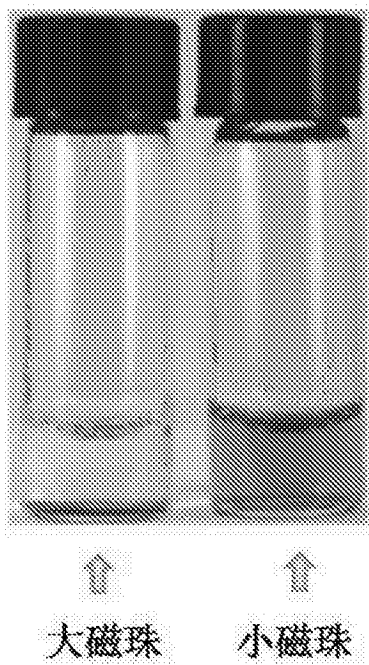


图2

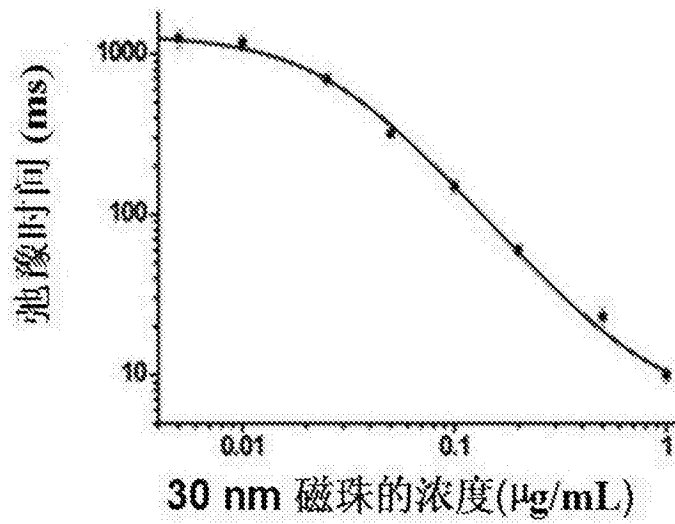


图3

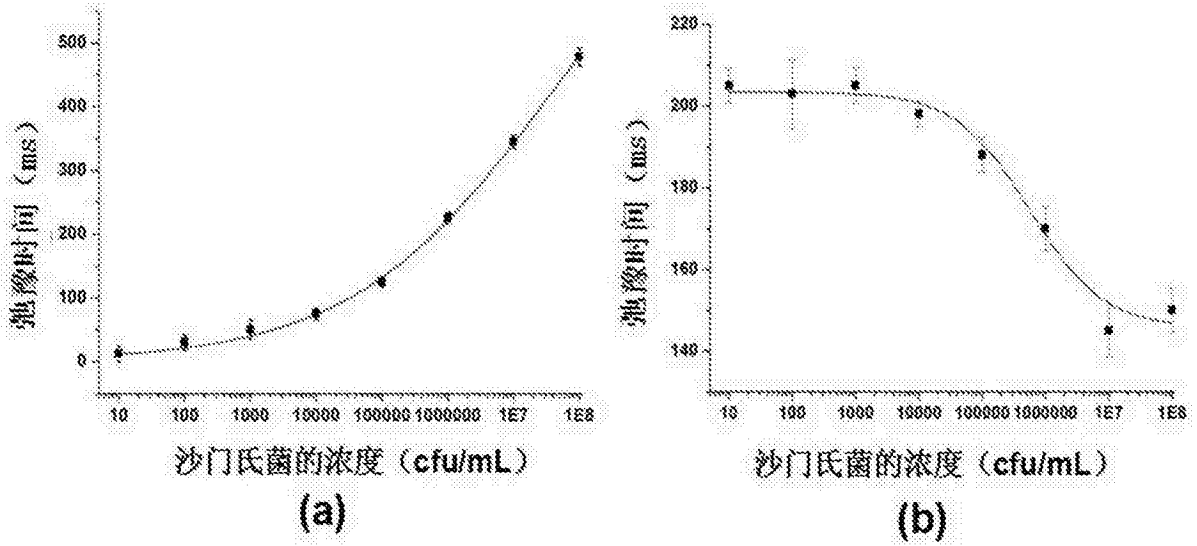


图4

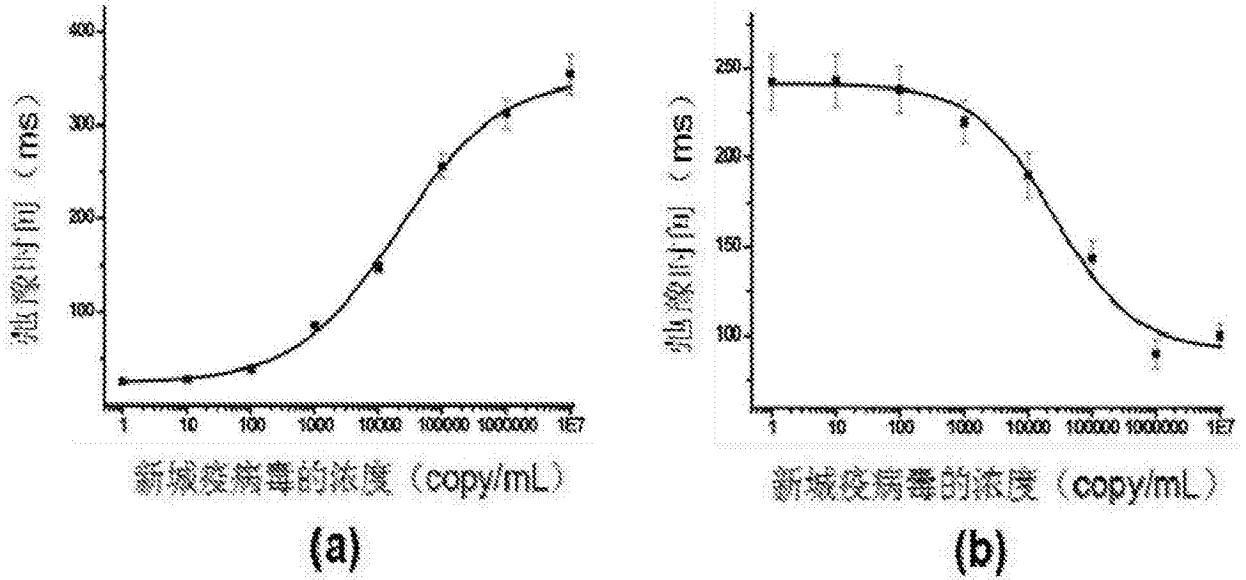


图5

专利名称(译)	一种基于磁分离的弛豫时间免疫传感分析方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN104614513B</a>	公开(公告)日	2016-05-25
申请号	CN201510038729.2	申请日	2015-01-26
[标]申请(专利权)人(译)	国家纳米科学中心		
申请(专利权)人(译)	国家纳米科学中心		
当前申请(专利权)人(译)	国家纳米科学中心		
[标]发明人	蒋兴宇 陈翊平 曹丰晶 张晓青 吴景 牛亚静		
发明人	蒋兴宇 陈翊平 曹丰晶 张晓青 吴景 牛亚静		
IPC分类号	G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/54333 G01N33/569 G01N33/6803		
代理人(译)	杨晞		
其他公开文献	CN104614513A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种基于磁分离的弛豫时间免疫传感分析方法，包括如下步骤：选取饱和磁化强度不同，在同一磁场中分离速度显著不同的两种磁珠(一种快速分离，另一种不能分离)，因此两种磁珠能在磁场中实现分离；将两种磁珠分别偶联上识别同一目标物不同位点的抗体，制备成免疫磁珠；将两种免疫磁珠与待测样品进行免疫反应；将混合体系进行磁分离，磁分离后的上清液测量横向弛豫时间，根据横向弛豫时间的改变量，确定待测样品中生物大分子的浓度。本发明利用不同饱和磁化强度的免疫磁珠在同一磁场中分离速度不同，将磁分离与磁弛豫时间分析相结合，反应时间只需30min，可用于细菌、病毒和蛋白的快速检测，在生物标志物检测方面有很大的应用前景。

