



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102305854 A

(43) 申请公布日 2012.01.04

(21) 申请号 201110204157.2

(22) 申请日 2011.07.20

(71) 申请人 汤凌霄

地址 518049 广东省深圳市福田区梅林一村
24 栋 902

申请人 深圳市易瑞生物技术有限公司

(72) 发明人 汤凌霄 李金峰 付辉 王西丽

(51) Int. Cl.

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 3 页

(54) 发明名称

一种超灵敏、定量免疫层析装置及检测方法

(57) 摘要

本发明属生物医学技术领域,公开了一种免疫层析装置及检测方法,该免疫层析装置由免疫层析试纸条和反应池两部分组成。该免疫层析装置以稀土荧光纳米颗粒作为标记物,借助时间分辨检测设备可以实现目标物质的快速、超灵敏、定量检测。该方法与传统的免疫层析试纸条相比,灵敏性更高。该装置可广泛应用于生物学、医学、食品安全等领域的快速、定性及定量检测项目。

1. 一种免疫层析检测装置,包括免疫层析检测试纸条和反应池两部分。所述试纸条包括背衬,以及在背衬上依次搭接粘贴的样品垫、硝酸纤维素膜及吸收垫,其中硝酸纤维素膜上喷涂有检测区和参比区,还可有质控区。参比区喷涂有稀土荧光纳米颗粒。通过测定检测区的荧光信号强度与参比区荧光信号强度比值来实现定量检测。所述反应池内含有稀土荧光纳米颗粒-抗体/抗原/其它特异性结合物质的复合物及缓冲体系。

2. 如权利 1 所述的免疫层析试纸条,其特征是参比区固定有稀土荧光纳米颗粒。

3. 如权利 1 所述的免疫层析试纸条,其特征是检测结果可用时间分辨检测设备进行定量检测,还可用于定性检测。

4. 如权利 1 所述的反应池,其特征是稀土荧光纳米颗粒与抗体/抗原/半抗原/其它特异性结合物质之间可以通过共价键、分子间作用力、疏水作用力等方式偶联在一起。所述的特异性结合物质是抗原、抗体、半抗原意外的特异性结合物质,如链霉亲和素、生物素、蛋白 A、蛋白 G。

5. 如权利 1 所述的反应池,其特征是其中含有适合生物分子反应的缓冲体系,该缓冲体系的 pH 在 1-13 之间。

6. 如权利 1 所述的反应池,其特征是内容物是冻干的粉末,还可以是液体。

7. 如权利 2 所述稀土荧光纳米颗粒,其特征是用聚合材料或氧化硅包裹或者吸附稀土元素(如:Eu³⁺、Sm³⁺、Dy³⁺、Tb³⁺等)与螯合剂形成的螯合物,该螯合物可以在紫外光激发下发射出明亮的特征性荧光。

8. 如权利 2 所述的稀土荧光纳米颗粒,其特征是颗粒粒径在 10nm-10000nm 之间;

9. 一种检测方法,其特征是样品中的目标物质首先在反应池内与抗原/抗体/半抗原/其它特异性结合物质发生充分反应,再进行免疫层析检测。

10. 如权利 9 所述的检测方法,其特征是加入样品后,样品中的目标物质与反应池内的抗原/抗体/半抗原/其它特异性物质在 15-60°C 之间反应 0-1h。

一种超灵敏、定量免疫层析装置及检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物医学领域,具体涉及一种定性和定量检测样品中目标物质含量的免疫层析检测装置及检测方法。

背景技术

[0002] 免疫层析技术是上世纪 80 年代初期的一种简便快速检测技术,由该技术制成的免疫层析试纸条通常由以下几部分组成:背衬及粘贴在背衬上的样品垫、结合垫、纤维素膜、吸收垫等。检测时,将样品滴加到样品垫上,样品会通过毛细作用在层析条上迁移,在迁移的过程中,与结合垫上的标记物发生特异性反应,产生免疫复合物,该免疫复合物继续迁移,与纤维素膜上检测区域的相应抗原/抗体发生特异性结合,形成肉眼可见的检测带。现有的免疫层析试纸条产品常用的示踪标记粒子有纳米金、纳米硒、乳胶等等,其中以纳米金应用最为广泛。目前,免疫层析试纸条产品已在疾病最为成熟的免疫层析产品已在医学检测、食品安全、药物滥用等领域得到广泛应用。

[0003] 但是现有的免疫层析产品普遍存在以下缺点:1) 不能定量检测,只能定性检测。2) 由于示踪粒子的信号弱、反应不完全等因素导致灵敏性低,限制了其在一些需要高灵敏检测领域的应用。3) 信号单一,不适合联检。

[0004] 一些稀土元素(如:Eu³⁺、Sm³⁺、Dy³⁺、Tb³⁺等)与某些螯合剂形成的螯合物可在在外光激发下发射出明亮的特征性荧光。此类荧光具有寿命长、Stokes 位移大、激发谱较宽而发射峰尖锐等特点。基于稀土元素螯合物作为标记物的时间分辨荧光分析技术(Time resolved fluoroimmunoassay, TRFIA)以其高灵敏性等优势,已在医学检测领域得到广泛应用。用稀土元素螯合物制成的荧光纳米颗粒除具有荧光寿命长、Stokes 位移大、激发谱较宽而发射峰尖锐等特点外,还具有荧光信号更强、抗光漂白性更强、生物相容性好等突出优势。

发明内容

[0005] 本发明的目的旨在针对现有免疫层析技术的缺陷,提供一种灵敏度高、操作简便的定性和定量免疫层析检测装置及检测方法。

[0006] 为了实现上述目的,本发明采取三种手段来提高检测的灵敏性:1) 以荧光纳米颗粒作为标记物;2) 用时间分辨定量检测设备来进行超灵敏检测;3) 提供一种反应池,使免疫反应得到更为彻底进行。

[0007] 本发明的一个技术方案是:

[0008] 提供一种免疫层析检测试纸条,该试纸条包括背衬,以及在背衬上依次搭接粘贴的样品垫、硝酸纤维素膜及吸收垫,其中硝酸纤维素膜上喷涂有检测区和参比区,还可有质控区。参比区喷涂有稀土荧光纳米颗粒。通过测定检测区的荧光信号强度与参比区荧光信号强度比值来实现定量检测。

[0009] 提供一种反应池,反应池内含有稀土荧光纳米颗粒-抗体/抗原/半抗原/其它

特异性结合物质的复合物及缓冲体系。所述的特异性结合物质是抗原、抗体、半抗原意外的特异性结合物质,如链霉亲和素、生物素、蛋白 A、蛋白 G。

[0010] 如上所述的免疫层析试纸条,其特征是参比区固定有稀土荧光纳米颗粒。

[0011] 如上所述稀土荧光纳米颗粒,其特征是用聚合材料或氧化硅包裹或者吸附稀土元素(如:Eu³⁺、Sm³⁺、Dy³⁺、Tb³⁺等)与螯合剂形成的螯合物,该螯合物可以在紫外光激发下发射出明亮的特征性荧光。

[0012] 如上所述的稀土荧光纳米颗粒,其特征是颗粒粒径在 10nm-10000nm 之间;

[0013] 如上所述的反应池,其特征是稀土荧光纳米颗粒与抗体/抗原/半抗原/其它特异性结合物质之间可以通过共价键、分子间作用力、疏水作用力等方式偶联在一起。

[0014] 如上所述的反应池,其特征是其中含有适合生物分子反应的缓冲体系,该缓冲体系的 pH 在 1-13 之间。

[0015] 如上所述的反应池,其特征是内容物是冻干的粉末,还可以是液体。

[0016] 本发明还提供了一种检测方法,其特征是样品中的目标物质首先在反应池内与抗原、抗体或其它结合物质发生充分反应。

[0017] 如上所述的检测方法,其特征是加入样品后,样品中的目标物质与反应池内的抗原、抗体或其它结合物质在 15-60°C 之间反应 0-1h。

[0018] 如上所述的检测方法,其特征是目标物质与反应池内的抗体/抗原/半抗原/其它特异性结合物质-稀土荧光纳米颗粒形成的复合物发生充分反应后,再用免疫层析试纸条进行检测。

[0019] 本发明与现有技术相比具有以下技术优势:

[0020] 1) 用稀土荧光纳米颗粒代替传统的纳米金、乳胶、纳米硒等示踪粒子,制备免疫层析试纸条,既适合定性检测,又能进行定量检测。

[0021] 2) 检测灵敏性大幅度提高。

[0022] 3) 既适合单重检测,又适合多重检测。

具体实施方式

[0023] 尽管本发明的内容是结合本实例进行说明,但是不能认为是对本发明专利的限制,本发明的范围由所附权利要求书限定。另外,本领域的技术人员在所附权利要求书限定的范围内对本发明进行各种改动或修饰,这些改动或修饰形式同样属本发明的保护范围。

[0024] 实施例 1 稀土荧光纳米颗粒-抗体偶联物制备

[0025] 1) 取 100 μL 浓度为 10mg/mL 的稀土荧光纳米颗粒(粒径:300nm)于 900 μL MES(50mM, Ph6.1)中,涡旋混匀;

[0026] 2) 加入 20mg NHS、20mg EDC,涡旋混匀;

[0027] 3) 室温反应 30min;

[0028] 4) 10000rpm 离心 10min,弃上清;

[0029] 5) 涡旋重悬颗粒;

[0030] 6) 加入氯霉素单克隆抗体,室温反应 2-4h;

[0031] 7) 加入等体积的 2% BSA,继续反应 2-4h;

[0032] 8) 10000rpm 离心 10min,弃上清;

- [0033] 9) 加入 20mL 颗粒重悬液 (10mM Tris-HCl, 1% 脱脂奶粉, 5% 海藻糖), 重悬颗粒, 备用。
- [0034] 实施例 2 反应池的制备
- [0035] 1) 按照 100 μ L/ 孔的量, 往 96 孔微孔板中加入荧光纳米颗粒 - 氯霉素抗体偶联物;
- [0036] 2) -80°C 冷冻 24h;
- [0037] 3) 冷冻干燥孔内的荧光纳米颗粒 - 氯霉素抗体偶联物;
- [0038] 4) 将冻干后的荧光纳米颗粒 - 氯霉素抗体偶联物置于干燥环境中保存。
- [0039] 实施例 3 免疫层析试纸条的制备
- [0040] 样品垫的制备: 将纤维素膜剪成 1.5 \times 30cm 规格的条带, 备用;
- [0041] 样品垫的制备: 将硝酸纤维素膜剪成 2.5 \times 30cm 规格的条带, 在 NC 膜的不同位置喷涂氯霉素-BSA 偶联物 (检测线)、羊抗鼠二抗 (质控线)、荧光纳米颗粒 (参比线), 室温晾干;
- [0042] 吸收垫的制备: 将吸水纸裁成 3.5 \times 30cm 的条带, 备用;
- [0043] 试纸条的组装: 将吸收垫、硝酸纤维素膜、样品垫依次贴在底板上, 并切成 5mm 宽的试纸条, 2-8 $^{\circ}\text{C}$ 干燥保存。
- [0044] 实施例 4 检测氯霉素残留
- [0045] 1) 取 200 μ L 鲜奶于反应池中, 缓慢吹打 10 次;
- [0046] 2) 于 40 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 3min;
- [0047] 3) 将试纸条的样品垫一端插入反应池中;
- [0048] 4) 继续孵育 3min;
- [0049] 5) 取出试纸条, 置于时间分辨检测设备中, 读取检测区、质控区和参比区的光信号, 通过测定检测区与参比区的荧光信号强度的比值来确定样品中目标物质 (氯霉素) 的含量; 或在紫外光下, 观察硝酸纤维素膜上的荧光信号, 荧光信号越弱, 氯霉素残留量越高。

专利名称(译)	一种超灵敏、定量免疫层析装置及检测方法		
公开(公告)号	CN102305854A	公开(公告)日	2012-01-04
申请号	CN201110204157.2	申请日	2011-07-20
[标]申请(专利权)人(译)	深圳市易瑞生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	深圳市易瑞生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	深圳市易瑞生物技术有限公司		
[标]发明人	汤凌霄 李金峰 付辉 王西丽		
发明人	汤凌霄 李金峰 付辉 王西丽		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/533 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属生物医学技术领域，公开了一种免疫层析装置及检测方法，该免疫层析装置由免疫层析试纸条和反应池两部分组成。该免疫层析装置以稀土荧光纳米颗粒作为标记物，借助时间分辨检测设备可以实现目标物质的快速、超灵敏、定量检测。该方法与传统的免疫层析试纸条相比，灵敏性更高。该装置可广泛应用于生物学、医学、食品安全等领域的快速、定性及定量检测项目。