(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106526201 B
(45)授权公告日 2018.03.06

(21)申请号 201610990866.0
(22)申请日 2016.11.10
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106526201 A
(43)申请公布日 2017.03.22
(73)专利权人 陕西师范大学
地址 710062 陕西省西安市长安南路199号
(72)发明人 刘伟 陈莹 褚伟茹 郭小艳
(74)专利代理机构 西安永生专利代理有限责任公司 61201
代理人 高雪霞
(51)Int.Cl.
G01N 33/68(2006.01)
G01N 33/574(2006.01)
G01N 33/558(2006.01)
G01N 33/535(2006.01)
(56)对比文件
CN 103954751 A,2014.07.30,全文.
CN 103792354 A,2014.05.14,全文.
CN 104215758 A,2014.12.17,全文.
CN 102221612 A,2011.10.19,全文.
CN 104937415 A,2015.09.23,全文.
CN 104991068 A,2015.10.21,全文.
CN 103529207 A,2014.01.22,全文.
郭玉梅.免疫纸芯片的设计和制作新方法研究.《中国优秀硕士学位论文全文数据库 工程科技I辑》.2016,(第02期),
David M. Cate,et al.Simple, distance-based measurement for paper analytical devices.《Lab Chip》.2013,第13卷
Mei Zhao,et al.Plasma treatment of paper for protein immobilization on paper-based chemiluminescence immunodevice.《Biosensors andBioelectronics》.2015,第79卷
审查员 许珊萍

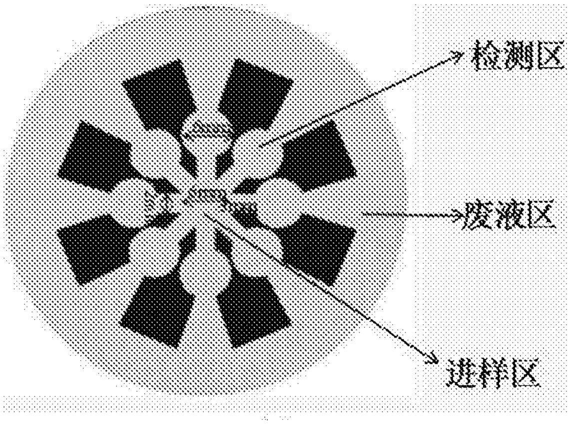
权利要求书1页 说明书4页 附图3页

(54)发明名称

一种基于纸芯片免疫反应距离定性半定量检测抗原的方法

(57)摘要

本发明公开了一种基于纸芯片免疫反应距离定性半定量检测抗原的方法，该方法根据竞争免疫反应完全后，剩余辣根过氧化物酶标记的抗体在Whatman滤纸条上与TMB反应，导致毛细作用力不同而引起的迁移距离不同，建立了基于纸芯片免疫反应距离定性半定量检测抗原的方法。本发明只需用尺子测量不同浓度分析物质产生的距离，即可对物质性质做出判断，其操作简单、成本低廉、绿色环保，无需昂贵的检测仪器、复杂步骤以及专业的操作人员，实现了癌胚抗原等的快速、简单、便捷的分析。



1.一种基于纸芯片免疫反应距离定性半定量检测抗原的方法，其特征在于它由下述步骤组成：

(1)利用画图软件设计出纸芯片模型，然后利用刻字机的切割刀按照纸芯片模型在Whatman滤纸上切割出纸芯片；

(2)将纸芯片经氧等离子体处理，使其表面生成用于固定抗体的醛基；

(3)将捕获抗体溶液滴加到纸芯片的检测区，室温孵育30分钟后，用pH＝7.4的PBS缓冲液洗涤，除去未反应的捕获抗体；然后在检测区滴加牛血清蛋白溶液，室温反应15分钟后，用pH＝7.4的PBS缓冲液洗涤，除去未反应的牛血清蛋白；再将抗原溶液滴加到检测区，室温孵育15分钟后，用pH＝7.4的PBS缓冲液洗涤，除去未反应的抗原；最后在检测区滴加辣根过氧化物酶标记的抗体溶液，室温孵育15分钟，形成抗体-抗原-酶标抗体复合物；

(4)将步骤(3)形成抗体-抗原-酶标抗体复合物的检测区剪下固定在长60～80mm、宽2～3mm的Whatman滤纸条一端，用pH＝7.4的PBS缓冲液冲洗后，在检测区加入蓝色沉淀型TMB显色液，反应2～3分钟后，测量剩余辣根过氧化物酶标记的抗体与TMB反应后在Whatman滤纸条上的迁移距离；

(5)按照上述步骤(3)～(4)测量实际血清样品，根据剩余辣根过氧化物酶标记的抗体与TMB反应后在Whatman滤纸条上对应的迁移距离，即可实现实际血清样品中抗原的定性及半定量检测。

2.根据权利要求1所述的基于纸芯片免疫反应距离定性半定量检测抗原的方法，其特征在于：所述的纸芯片至少有4个圆形检测区，每个检测区的直径为5～6mm。

3.根据权利要求1所述的基于纸芯片免疫反应距离定性半定量检测抗原的方法，其特征在于：在步骤(2)中，所述氧等离子体处理的时间为3～5分钟，氧等离子体的频率为射频13.56MHz、功率为100W。

4.根据权利要求1所述的基于纸芯片免疫反应距离定性半定量检测抗原的方法，其特征在于：所述捕获抗体溶液是将捕获抗体加入到pH＝7.4的PBS缓冲液中配制而成，其中捕获抗体的浓度为15～25μg/mL。

5.根据权利要求1所述的基于纸芯片免疫反应距离定性半定量检测抗原的方法，其特征在于：所述牛血清蛋白溶液是将牛血清蛋白加入pH＝7.4的PBS缓冲液中配制而成，其中牛血清蛋白的浓度为0.1～0.5mg/100mL。

6.根据权利要求1所述的基于纸芯片免疫反应距离定性半定量检测抗原的方法，其特征在于：所述辣根过氧化物酶标记的抗体溶液是将辣根过氧化物酶标记的抗体加入pH＝7.4的PBS缓冲液中配制而成，其中辣根过氧化物酶标记的抗体的浓度为100～250μg/mL。

7.根据权利要求1所述的基于纸芯片免疫反应距离定性半定量检测抗原的方法，其特征在于：所述的蓝色沉淀型TMB显色液的加入量为辣根过氧化物酶标记的抗体溶液体积的12～15倍。

8.根据权利要求1所述的基于纸芯片免疫反应距离定性半定量检测抗原的方法，其特征在于：所述的纸芯片为Whatman 1号滤纸或Whatman 3号滤纸。

一种基于纸芯片免疫反应距离定性半定量检测抗原的方法

技术领域

[0001] 本发明属于癌症标记物检测技术领域，具体涉及一种根据辣根过氧化物酶(HRP)与沉淀型3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)反应在纸芯片上迁移距离不同，通过免疫法定性半定量检测抗原的方法。

背景技术

[0002] 纸质微流控芯片(μPADs)首次被Whitesides提出，由于其具有成本低、操作简单、化学相容性好等特点，为纸芯片的发展提供了广阔的平台。纸芯片是集固定、反应、分离、检测于一体的微型分析平台，方便快捷，已大量用到疾病标记物的检测，如前列腺蛋白、免疫球蛋白、癌胚抗原、甲胎蛋白等。对于纸芯片自身来说，它是一种常见的纤维材料，表面含有大量的羟基官能团，很容易进行功能化处理，修饰其它基团，比如传统的壳聚糖-戊二醛交联法、高碘酸钠改性法等，因此，比较易实现抗体或者蛋白质的固定，可以高效的用于生物分析和各种疾病检测。

[0003] 纸质微流控芯片可以直接用于检测，目前检测方法中，常见的有比色分析法、荧光、电化学、化学发光、电化学发光的方法。在这些分析方法中，比色法是其最常见的方法，通过纸芯片上颜色的改变来测定样品的含量，但该方法需要眼睛对颜色做出灵敏的辨别，而人眼睛的分辨率不超过4K，检测的灵敏度低，不利于低含量样品的测定，很难达到定性和定量的要求，且需要特定图片处理软件达到对样品检测的目的。荧光分析法灵敏度高，但在纸芯片中很难克服高的背景信号。电化学检测法中需要电极，成本高，操作复杂。化学发光和电化学发光的方法都需要特殊检测仪器和专业技术操作人员。因此，近年来新兴的距离检测法因其无需检测仪器、专业技术操作人员、操作简单、成本低廉等特点而受到了青睐，并发展成为纸芯片上的新兴检测方法。

发明内容

[0004] 本发明所要解决的技术问题在于提供一种操作简便、成本低、无需复杂仪器，根据HRP与沉淀型TMB反应产生距离长短变化对抗原进行定性半定量检测的方法。

[0005] 解决上述技术问题所采用的技术方案由下述步骤组成：

[0006] 1、利用画图软件设计出纸芯片模型，然后利用刻字机的切割刀按照纸芯片模型在Whatman滤纸上切割出纸芯片。

[0007] 2、将纸芯片经氧等离子体处理，使其表面生成用于固定抗体的醛基。

[0008] 3、将捕获抗体溶液滴加到纸芯片的检测区，室温孵育30分钟后，用pH＝7.4的PBS缓冲液洗涤，除去未反应的捕获抗体；然后在检测区滴加牛血清蛋白溶液，室温反应15分钟后，用pH＝7.4的PBS缓冲液洗涤，除去未反应的牛血清蛋白；再将抗原溶液滴加到检测区，室温孵育15分钟后，用pH＝7.4的PBS缓冲液洗涤，除去未反应的抗原；最后在检测区滴加辣根过氧化物酶标记的抗体溶液，室温孵育15分钟，形成抗体-抗原-酶标抗体复合物。

[0009] 4、将步骤3形成抗体-抗原-酶标抗体复合物的检测区剪下固定在长60～80mm、宽2

～3mm的Whatman滤纸条一端，用pH＝7.4的PBS缓冲液冲洗后，在检测区加入蓝色沉淀型TMB显色液，反应2～3分钟后，测量剩余辣根过氧化物酶标记的抗体与TMB反应后在Whatman滤纸条上的迁移距离。

[0010] 5、按照上述步骤3～4测量实际血清样品，根据剩余辣根过氧化物酶标记的抗体与TMB反应后在Whatman滤纸条上对应的迁移距离，即可实现实际血清样品中抗原的定性及半定量检测。

[0011] 上述步骤1中，优选纸芯片至少有4个圆形检测区，每个检测区的直径为5～6mm。

[0012] 上述步骤2中，优选氧等离子体处理的时间为3～5分钟，氧等离子体的频率为射频13.56MHz、功率为100W。

[0013] 上述的抗原为癌胚抗原、甲胎蛋白抗原、前列腺蛋白抗原、免疫球蛋白抗原等中的任意一种。

[0014] 上述的捕获抗体溶液是将捕获抗体加入到pH＝7.4的PBS缓冲液中配制而成，其中捕获抗体的浓度为15～25μg/mL。

[0015] 上述的牛血清蛋白溶液是将牛血清蛋白加入pH＝7.4的PBS缓冲液中配制而成，其中牛血清蛋白的浓度为0.1～0.5mg/100mL。

[0016] 上述的辣根过氧化物酶标记的抗体溶液是将辣根过氧化物酶标记的抗体加入pH＝7.4的PBS缓冲液中配制而成，其中辣根过氧化物酶标记的抗体的浓度为100～250μg/mL。

[0017] 上述的蓝色沉淀型TMB显色液的加入量优选为辣根过氧化物酶标记的抗体溶液体积的12～15倍。

[0018] 上述的纸优选Whatman 1号滤纸或Whatman 3号滤纸。

[0019] 本发明根据竞争免疫反应完全后，剩余辣根过氧化物酶标记的抗体在Whatman滤纸条上与TMB反应，导致毛细作用力不同而引起的迁移距离不同，首次提出HRP与沉淀型TMB反应能产生距离长短变化，并且利用距离变化检测抗原，无需检测仪器即可实现不同浓度癌症标记物的定性及半定量检测，该方法只需用普通测量长度的工具尺子测量不同浓度分析物质产生的距离，即可对物质性质做出判断，真正实现了简单快速、成本低廉的分析，在普通的化学及生物相关实验室均可进行，克服了传统比色分析法眼睛对颜色识别的局限性，以及荧光、化学发光、电化学分析方法等需要昂贵检测仪器、操作复杂、需要专业操作等不足，非常适合于个体对自我癌症早期预防与监测，在人们的日常生活中也展现出了独特的优势。

附图说明

[0020] 图1是实施例1设计的纸芯片的实际效果图。

[0021] 图2是实施例1中经过夹心免疫反应后不同浓度癌胚抗原与沉淀型TMB反应距离变化实际效果图。

[0022] 图3是实施例1中经过夹心免疫反应后不同浓度实际血清样品中癌胚抗原与沉淀型TMB反应距离变化实际效果图。

[0023] 图4是沉淀型TMB与HRP反应产生距离变化图。

[0024] 图5是非沉淀型TMB与HRP反应产生距离变化图。

具体实施方式

[0025] 下面结合附图和实施例对本发明进一步详细说明，但本发明的保护范围不仅限于这些实施例。

[0026] 实施例1

[0027] 1、利用CorelDraw X6画图软件设计出纸芯片模型，如图1所示，该纸芯片模型具有8个直径为6mm的圆形检测区、1个直径为6mm的进样区和废液区，各个区之间经流通通道连接，流通通道宽为2mm、长为3mm；然后利用日图CE5000-40-CRP刻字机的切割刀按照上述纸芯片模型在Whatman 1号滤纸上切割出纸芯片。

[0028] 2、将纸芯片放入PDC-32G型氧等离子体清洗机中处理4分钟，氧等离子体的频率为射频13.56MHz、功率为100W，处理完后纸芯片表面生成用于固定抗体的醛基。

[0029] 3、将2.5μL 20μg/mL癌胚抗原的捕获抗体溶液(将捕获抗体加入到pH=7.4的PBS缓冲液中配制而成)滴加到纸芯片的检测区，室温孵育30分钟后，用pH=7.4的PBS缓冲液在环炉(环炉结构与文献Ring-Oven Washing Technique Integrated Paper-based Immunodevice for Sensitive Detection of Cancer Biomarker(Anal.Chem.2015,87,7951-7957)中公开的相同)上洗涤5分钟，除去未反应的抗体；然后在检测区滴加2.5μL 0.1mg/100mL牛血清蛋白溶液(将牛血清蛋白加入pH=7.4的PBS缓冲液中配制而成)，室温反应15分钟，以封闭纸芯片上未反应的结合位点，减少非特异性吸附，反应完后再用pH=7.4的PBS缓冲液在环炉上洗涤5分钟，除去未反应的牛血清蛋白；再分别将浓度为0ng/mL、5ng/mL、20ng/mL、40ng/mL的癌胚抗原溶液(癌胚抗原(CEA)来自癌胚抗原定量检测试剂盒)滴加到检测区，室温孵育15分钟后，用pH=7.4的PBS缓冲液在环炉上洗涤5分钟，除去未反应的抗原；最后在检测区滴加2.5μL 200μg/mL辣根过氧化物酶标记的癌胚抗体溶液(将辣根过氧化物酶标记的癌胚抗体加入pH=7.4的PBS缓冲液中配制而成)，室温孵育15分钟，形成抗体-抗原-酶标抗体复合物。

[0030] 4、将步骤3形成抗体-抗原-酶标抗体复合物的检测区剪下固定在长70mm、宽2mm的Whatman1号滤纸一端，用10μL pH=7.4的PBS缓冲液冲洗后，在检测区加入20μL蓝色沉淀型TMB显色液，反应2分钟后，测量剩余辣根过氧化物酶标记的抗体与TMB反应后在Whatman滤纸条上的迁移距离，结果见图2及表1。

[0031] 表1

[0032]

癌胚抗原浓度 \ 样品编号	1	2	3	平均迁移距离
0 ng/mL	26.4 mm	25.4 mm	24.4 mm	25.4 mm
5 ng/mL	20.1 mm	19.5 mm	20.3 mm	19.6 mm
20 ng/mL	15.9 mm	16.0 mm	16.0 mm	16.0 mm
40 ng/mL	10.2 mm	11.4 mm	11.3 mm	11.0 mm

[0033] 注：当CEA含量≤5ng/mL时判为阴性；当CEA含量在5ng/mL～20ng/mL时判为弱阳性；当CEA含量≥20ng/mL时判为阳性。

[0034] 5、按照上述步骤3和4的方法测定在1～6号实际血清样品(其中癌胚抗原采用标准ELlSA方法测定的浓度分别为2.63ng/mL、18.55ng/mL、1.27ng/mL、14.28ng/mL、4.12ng/mL、19.26ng/mL)加入蓝色沉淀型TMB显色液后，剩余辣根过氧化物酶标记的抗体与TMB反应后在Whatman滤纸条上的迁移距离，结果见图3。

[0035] 由图3的结果可见，1号、3号、5号对应的迁移距离小于正常人体中癌胚抗原(CEA)对应的迁移距离，即这三个实际血清样品中癌胚抗原的浓度小于5ng/mL，说明该人体内癌胚抗原的值在正常范围内，2号、4号、6号对应的迁移距离大于正常人体中CEA对应的迁移距离，但小于表1中癌胚抗原浓度为20ng/mL对应的迁移距离，说明这三个实际血清样品中癌胚抗原的浓度大于5ng/mL小于20ng/mL，建议定期动态观察。由此可见，本发明方法实现了癌胚抗原的定性及半定量分析。

[0036] 发明人分别采用沉淀型TMB、非沉淀型TMB与不同浓度的HRP进行反应，具体试验方法如下：

[0037] 将酶标板用二次水洗干净并烘干，然后向一个酶标板每孔加入100μL蓝色沉淀型TMB显色液和不同浓度HRP，另一个酶标板每孔加入100μL非沉淀型TMB和不同浓度HRP(HRP的浓度分别为25μg/mL、15μg/mL、10μg/mL、6μg/mL、1μg/mL、500ng/mL)，反应20秒后，将得到的纸芯片用镊子竖直插入到酶标孔中，反应30min观察区别，结果见图4和图5。由图可见，沉淀型TMB与HRP反应可以产生距离长短变化，而非沉淀型TMB与HRP反应不能产生距离长短变化。

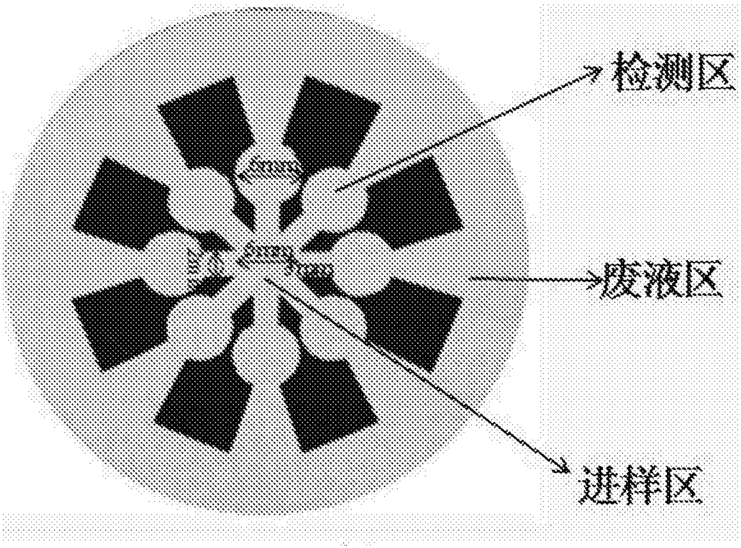


图1

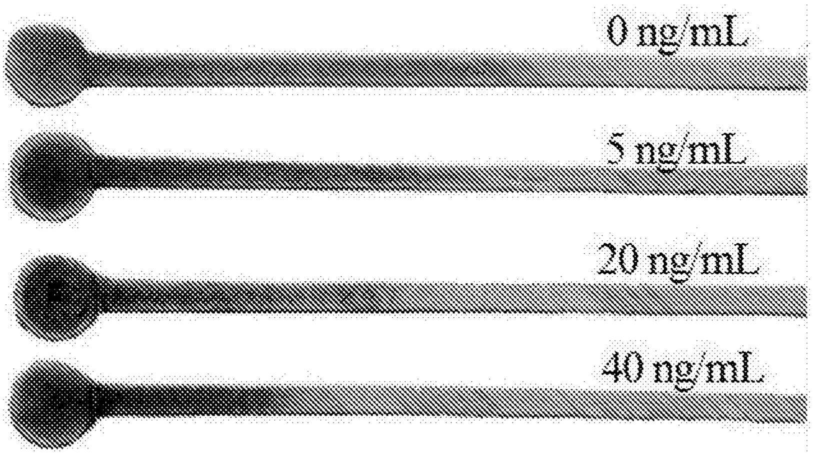


图2

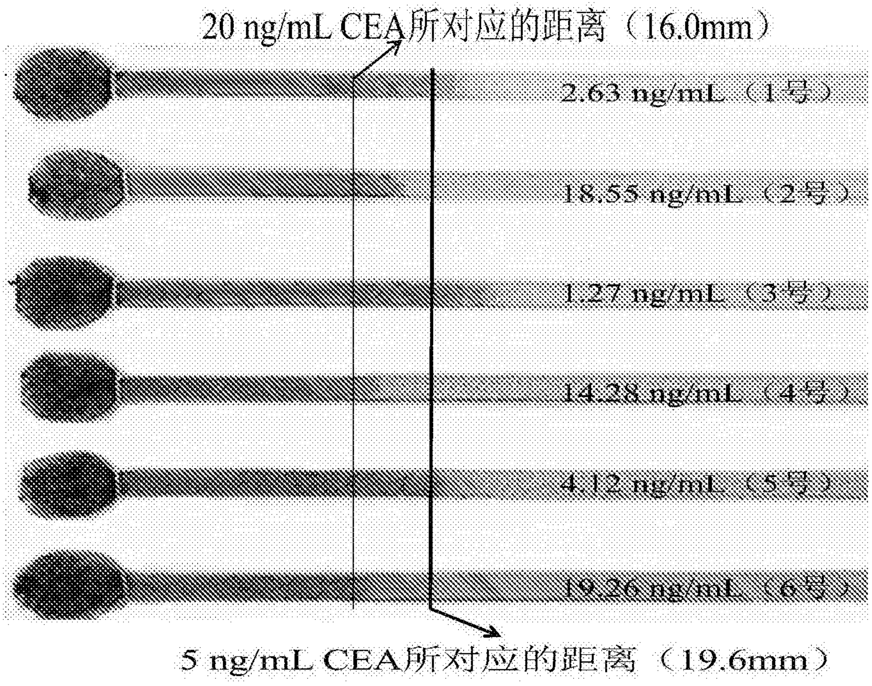

20 ng/mL CEA所对应的距离（16.0mm）
2.63 ng/mL（1号）
18.55 ng/mL（2号）
1.27 ng/mL（3号）
14.28 ng/mL（4号）
4.12 ng/mL（5号）
19.26 ng/mL（6号）
5 ng/mL CEA所对应的距离（19.6mm）

图3

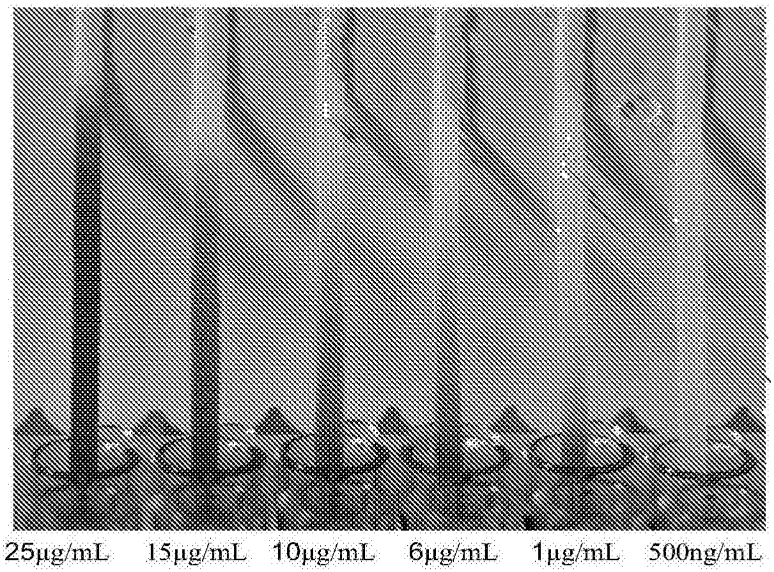

25μg/mL 15μg/mL 10μg/mL 6μg/mL 1μg/mL 500ng/mL

图4

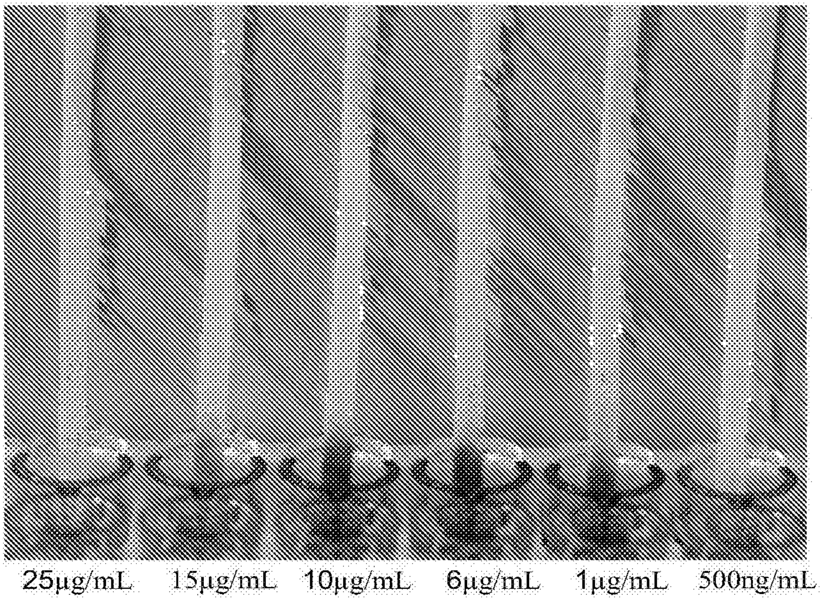
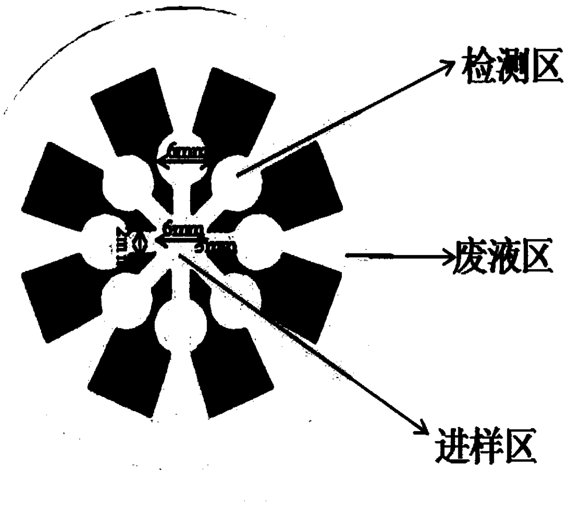


图5

专利名称(译)	一种基于纸芯片免疫反应距离定性半定量检测抗原的方法		
公开(公告)号	CN106526201B	公开(公告)日	2018-03-06
申请号	CN201610990866.0	申请日	2016-11-10
[标]申请(专利权)人(译)	陕西师范大学		
申请(专利权)人(译)	陕西师范大学		
当前申请(专利权)人(译)	陕西师范大学		
[标]发明人	刘伟 陈莹 褚伟茹 郭小艳		
发明人	刘伟 陈莹 褚伟茹 郭小艳		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/574 G01N33/558 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/558 G01N33/57473 G01N33/57484 G01N33/68 G01N2333/47		
代理人(译)	高雪霞		
其他公开文献	CN106526201A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种基于纸芯片免疫反应距离定性半定量检测抗原的方法，该方法根据竞争免疫反应完全后，剩余辣根过氧化物酶标记的抗体在Whatman滤纸条上与TMB反应，导致毛细作用力不同而引起的迁移距离不同，建立了基于纸芯片免疫反应距离定性半定量检测抗原的方法。本发明只需用尺子测量不同浓度分析物质产生的距离，即可对物质性质做出判断，其操作简单、成本低廉、绿色环保，无需昂贵的检测仪器、复杂步骤以及专业的操作人员，实现了癌胚抗原等的快速、简单、便捷的分析。