



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105403707 B

(45)授权公告日 2017.05.17

(21)申请号 201510632056.3

(22)申请日 2015.09.29

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105403707 A

(43)申请公布日 2016.03.16

(73)专利权人 南方医科大学
地址 510515 广东省广州市广州大道北
1838号南方医科大学

(72)发明人 李金峰 黎诚耀 张玲

(74)专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限公司 44102

代理人 邓义华 陈卫

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

(56)对比文件

CN 101865921 A,2010.10.20,权利要求1-8,说明书第5-106段.

EP 1301627 B1,2009.01.21,全文.

US 2005095645 A1,2005.05.05,全文.

CN 1500212 A,2004.05.26,全文.

CN 102227631 A,2011.10.26,全文.

曹成.胶体金核酸层析检测5种检疫性植物病毒的研究.《中国优秀硕士学位论文全文数据库(农业科技辑)》.2013,(第2期),D046-1.

审查员 周洋

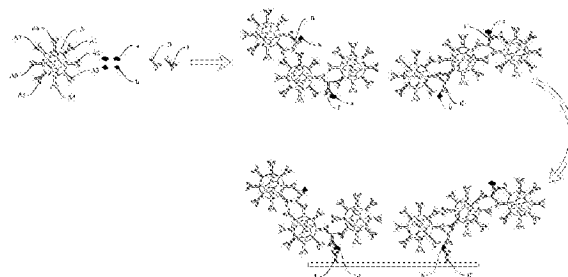
权利要求书2页 说明书9页 附图1页

(54)发明名称

一种检测靶物质的信号放大方法及使用该方法的免疫层析试纸和装置

(57)摘要

本发明公开了一种检测靶物质的信号放大方法,包括:将生物分子 I、生物分子 I I、生物分子 I I I...生物分子N分别与不同靶物质特异性结合;生物分子 I、生物分子 I I、生物分子 I I I...生物分子N均能与偶联在颗粒上的分子 A1、分子A2、分子A3...分子An中的任意一个结合,形成树枝状结构;通过能特异性结合不同靶物质的生物分子 I'、生物分子 I I'、生物分子 I I I'...生物分子N'分别捕获树枝状结构上的不同靶物质;其中, $N \geq 2$ 、 $N' \geq 2$ 和 $n \geq 1$ 。本发明还公开了使用该方法的免疫层析试纸和装置。该同时检测多种靶物质的信号放大方法不但能够高灵敏检测靶物质,而且实现了多种靶物质的同时检测。



1. 一种检测靶物质的信号放大方法,包括:

生物分子I、生物分子II、生物分子III...生物分子N分别与不同靶物质特异性结合;

生物分子I、生物分子II、生物分子III...生物分子N均能与偶联在颗粒上的分子A1、分子A2、分子A3...分子An中的任意一个结合,形成树枝状结构;

通过能特异性结合不同靶物质的生物分子I'、生物分子II'、生物分子III'...生物分子N'分别捕获树枝状结构上的不同靶物质;其中,

$N \geq 2$ 、 $N' \geq 2$ 和 $n \geq 1$;所述靶物质为蛋白质分子、蛋白质分子复合物、核酸复合物中的任意一种;所述生物分子I、生物分子II、生物分子III...生物分子N均为生物分子与半抗原分子的偶联物;所述生物分子I、生物分子II、生物分子III...生物分子N上具有至少两个与分子A1、分子A2、分子A3...分子An相结合的位点。

2. 根据权利要求1所述的检测靶物质的信号放大方法,其特征在于,所述生物分子I、生物分子II、生物分子III...生物分子N中的任意每一个生物分子上偶联有5~15个半抗原分子。

3. 一种检测靶物质的免疫层析试纸,包括依次搭接粘贴在底板上的样品垫、第一结合垫、层析膜、吸水垫;所述第一结合垫包被有偶联有分子A1、分子A2、分子A3...分子An的颗粒、及能特异性结合不同靶物质的生物分子I、生物分子II、生物分子III...生物分子N;所述层析膜上不同区域的检测线分别固定有能特异性结合不同靶物质的生物分子I'、生物分子II'、生物分子III'...生物分子N';其中, $N \geq 2$ 、 $N' \geq 2$ 和 $n \geq 1$;所述生物分子I、生物分子II、生物分子III...生物分子N均为生物分子与半抗原分子的偶联物;所述生物分子I、生物分子II、生物分子III...生物分子N上具有至少两个与分子A1、分子A2、分子A3...分子An相结合的位点。

4. 一种检测靶物质的免疫层析试纸,包括依次搭接粘贴在底板上的样品垫、第二结合垫、第三结合垫、层析膜、吸水垫;所述第二结合垫包被有能特异性结合不同靶物质的生物分子I、生物分子II、生物分子III...生物分子N,所述第三结合垫包被有偶联有分子A1、分子A2、分子A3...分子An的颗粒;所述层析膜上不同区域的检测线分别固定有能特异性结合不同靶物质的生物分子I'、生物分子II'、生物分子III'...生物分子N';其中, $N \geq 2$ 、 $N' \geq 2$ 和 $n \geq 1$;所述生物分子I、生物分子II、生物分子III...生物分子N均为生物分子与半抗原分子的偶联物;所述生物分子I、生物分子II、生物分子III...生物分子N上具有至少两个与分子A1、分子A2、分子A3...分子An相结合的位点。

5. 根据权利要求4所述的免疫层析试纸,其特征在于,所述第二结合垫和第三结合垫调换位置顺序。

6. 一种检测靶物质的免疫层析装置,包括反应微孔和免疫层析试纸,该免疫层析试纸包括依次搭接粘贴在底板上的样品垫、层析膜、吸水垫;所述反应微孔含有偶联有分子A1、分子A2、分子A3...分子An的颗粒、及能特异性结合不同靶物质的生物分子I、生物分子II、生物分子III...生物分子N;所述层析膜上不同区域的检测线固定有能特异性结合不同靶物质的生物分子I'、生物分子II'、生物分子III'...生物分子N';其中, $N \geq 2$ 、 $N' \geq 2$ 和 $n \geq 1$;所述生物分子I、生物分子II、生物分子III...生物分子N均为生物分子与半抗原分子的偶联物;所述生物分子I、生物分子II、生物分子III...生物分子N上具有至少两个与分子A1、分子A2、分子A3...分子An相结合的位点。

7. 一种检测靶物质的免疫层析装置,包括反应微孔和免疫层析试纸;反应微孔中含有生物分子I、生物分子II、生物分子III...生物分子N;免疫层析试纸条由依次搭接粘贴到底板上的样品垫、第三结合垫、层析膜、吸水垫组成;所述第三结合垫包被有偶联有分子A1、分子A2、分子A3...分子An的颗粒;所述层析膜上不同区域的检测线固定有能特异性结合不同靶物质的生物分子I'、生物分子II'、生物分子III'...生物分子N';其中, $N \geq 2$ 、 $N' \geq 2$ 和 $n \geq 1$;所述生物分子I、生物分子II、生物分子III...生物分子N均为生物分子与半抗原分子的偶联物;所述生物分子I、生物分子II、生物分子III...生物分子N上具有至少两个与分子A1、分子A2、分子A3...分子An相结合的位点。

8. 一种检测靶物质的免疫层析装置,包括渗滤卡、封闭液、含有偶联有分子A1、分子A2、分子A3...分子An的颗粒的溶液、含有生物分子I、生物分子II、生物分子III...生物分子N的溶液、洗涤液;其中渗滤卡由卡底、吸水垫料、渗滤膜、卡盖组成;所述渗滤膜上不同检测区域分别固定有能特异性结合不同靶物质的生物分子I'、生物分子II'、生物分子III'...生物分子N';其中, $N \geq 2$ 、 $N' \geq 2$ 和 $n \geq 1$;所述生物分子I、生物分子II、生物分子III...生物分子N均为生物分子与半抗原分子的偶联物;所述生物分子I、生物分子II、生物分子III...生物分子N上具有至少两个与分子A1、分子A2、分子A3...分子An相结合的位点。

一种检测靶物质的信号放大方法及使用该方法的免疫层析试纸和装置

技术领域

[0001] 本发明涉及生物检测领域,涉及一种检测靶物质的信号放大方法及使用该方法的免疫层析试纸和装置。

背景技术

[0002] 简单、灵敏、有效的检测技术在疾病诊断、新药开发、生化防御等领域意义重大。中国专利CN 01822390.7公开了一种检测分析物的测试条测试法,该方法是首先对检测抗体(靶向试剂)进行生物素(配体)化修饰,示踪颗粒标记了抗生物素抗体(标记物),这样在检测过程中会形成“树枝状”结构,使检测信号得以放大。基于这一原理制备的乙肝表面抗原免疫层析试纸条的灵敏性得到大幅度提高,且基于这一原理制备的乙肝表面抗原检测试纸条较Abbott公司的乙肝表面抗原检测试纸条更为灵敏。中国专利CN200880132189公开了一种免疫层析测试中信号放大的方法以及使用该方法的免疫层析试剂盒,该方法采用两种不同粒径的偶联物超灵敏检测靶物质的信号方法,也是采用了树枝状信号放大技术。

[0003] 现有的检测靶物质(或分析物)的信号放大方法只能针对一种靶物质进行分析,但在检测领域,往往需要对样品中的多种靶物质进行检测,方可做出准确可靠的判断,现有的检测方法往往是每个项目单独检测,然后综合各个检测结果,得出检测结论,且需要准备多种试纸条并采用多份样品进行测试。现有的联检方法都是在各个单检体系中寻找一个折衷的体系建立起来的,这个折衷的体系往往是以牺牲检测灵敏性为代价的,所以目前已有的联合同时检测方法的灵敏性往往不够理想,无法满足现实需要。

发明内容

[0004] 本发明所要解决的技术问题是提供一种检测靶物质的信号放大方法及使用该方法的免疫层析试纸和装置,该方法不但能够高灵敏检测靶物质,而且实现了多种靶物质的同时检测。

[0005] 本发明所要解决的技术问题通过以下技术方案予以实现:

[0006] 一种检测靶物质的信号放大方法,包括:

[0007] 生物分子I、生物分子II、生物分子III...生物分子N分别与不同靶物质特异性结合;

[0008] 生物分子I、生物分子II、生物分子III...生物分子N均能与偶联在颗粒上的分子A1、分子A2、分子A3...分子An中的任意一个结合,形成树枝状结构;

[0009] 通过能特异性结合不同靶物质的生物分子I'、生物分子II'、生物分子III'...生物分子N'分别捕获树枝状结构上的不同靶物质;其中,

[0010] $N \geq 2$ 、 $N' \geq 2$ 和 $n \geq 1$ 。

[0011] 优选地,所述靶物质为蛋白质分子、蛋白质分子复合物、核酸、核酸复合物中的任意一种。

[0012] 优选地,所述生物分子I、生物分子II、生物分子III…生物分子N均为生物分子与半抗原分子的偶联物;所述生物分子I、生物分子II、生物分子III…生物分子N上具有至少两个与分子A1、分子A2、分子A3…分子An相结合的位点。

[0013] 优选地,所述生物分子I、生物分子II、生物分子III…生物分子N中的任意每一个生物分子上偶联有5~15个半抗原分子。

[0014] 一种检测靶物质的免疫层析试纸,包括依次搭接粘贴在底板上的样品垫、第一结合垫、层析膜、吸水垫;所述第一结合垫包被有偶联有分子A1、分子A2、分子A3…分子An的颗粒、及能特异性结合不同靶物质的生物分子I、生物分子II、生物分子III…生物分子N;所述层析膜上不同区域的检测线分别固定有能特异性结合不同靶物质的生物分子I'、生物分子II'、生物分子III'…生物分子N';其中, $N \geq 2$ 、 $N' \geq 2$ 和 $n \geq 1$ 。

[0015] 一种检测靶物质的免疫层析试纸,包括依次搭接粘贴在底板上的样品垫、第二结合垫、第三结合垫、层析膜、吸水垫;所述第二结合垫包被有能特异性结合不同靶物质的生物分子I、生物分子II、生物分子III…生物分子N,所述第三结合垫包被有偶联有分子A1、分子A2、分子A3…分子An的颗粒;所述层析膜上不同区域的检测线分别固定有能特异性结合不同靶物质的生物分子I'、生物分子II'、生物分子III'…生物分子N';其中, $N \geq 2$ 、 $N' \geq 2$ 和 $n \geq 1$ 。

[0016] 优选地,所述第二结合垫和第三结合垫调换位置顺序。

[0017] 一种检测靶物质的免疫层析装置,包括反应微孔和免疫层析试纸,该免疫层析试纸包括依次搭接粘贴在底板上的样品垫、层析膜、吸水垫;所述反应微孔含有偶联有分子A1、分子A2、分子A3…分子An的颗粒、及能特异性结合不同靶物质的生物分子I、生物分子II、生物分子III…生物分子N;所述层析膜上不同区域的检测线固定有能特异性结合不同靶物质的生物分子I'、生物分子II'、生物分子III'…生物分子N';其中, $N \geq 2$ 、 $N' \geq 2$ 和 $n \geq 1$ 。

[0018] 一种检测靶物质的免疫层析装置,包括反应微孔和免疫层析试纸;反应微孔中含有生物分子I、生物分子II、生物分子III…生物分子N;免疫层析试纸条由依次搭接粘贴到底板上的样品垫、第三结合垫、层析膜、吸水垫组成;所述第三结合垫包被有偶联有分子A1、分子A2、分子A3…分子An的颗粒;所述层析膜上不同区域的检测线固定有能特异性结合不同靶物质的生物分子I'、生物分子II'、生物分子III'…生物分子N';其中, $N \geq 2$ 、 $N' \geq 2$ 和 $n \geq 1$ 。

[0019] 一种检测靶物质的免疫层析装置,包括渗滤卡、封闭液、含有偶联有分子A1、分子A2、分子A3…分子An的颗粒的溶液、含有生物分子I、生物分子II、生物分子III…生物分子N的溶液、洗涤液;其中渗滤卡由卡底、吸水垫料、渗滤膜、卡盖组成;所述渗滤膜上不同检测区域分别固定有能特异性结合不同靶物质的生物分子I'、生物分子II'、生物分子III'…生物分子N';其中, $N \geq 2$ 、 $N' \geq 2$ 和 $n \geq 1$ 。

[0020] 本发明具有如下有益效果:

[0021] 本发明的信号放大方法不但能够高灵敏检测靶物质,而且实现了多种靶物质的同时检测。同样,也使用该信号放大方法制造出了高灵敏度且同时检测多种靶物质的免疫层析试纸条或免疫层析装置,其层析膜上不同区域上设有多个检测线,各个检测线上的夹心反应不会相互影响,达到了一份液体样品同时检测多种靶物质,且在同样条件下进行,既节约了检测时间,也减小了检测误差,同时降低了检测成本。

附图说明

[0022] 图1为本发明同时检测两种靶物质I、II的信号放大的原理示意图；

[0023] 图2为本发明一种使用该信号放大方法同时检测多种靶物质的免疫层析试纸的结构示意图；

[0024] 图3为本发明另一种使用该信号放大方法同时检测多种靶物质的免疫层析试纸的结构示意图。

具体实施方式

[0025] 下面结合实施例对本发明进行详细的说明,实施例仅是本发明的优选实施方式,不是对本发明的限定。

[0026] 本发明的信号放大方法中,包括偶联有分子A1、分子A2、分子A3…分子An ($n \geq 1$)的颗粒、能特异性结合不同靶物质的生物分子I、生物分子II、生物分子III…生物分子N ($N \geq 2$)、以及位于固相上不同区域的且能特异性结合不同靶物质的生物分子I'、生物分子II'、生物分子III'…生物分子N' ($N' \geq 2$),其中,生物分子I与生物分子I'能够夹心检测特定的靶物质I,生物分子II与生物分子II'能够夹心检测特定的靶物质II,以此类推;生物分子I、生物分子II、生物分子III…生物分子N能够与分子A1、分子A2、分子A3…分子An中的任意一个结合。同时检测不同靶物质时,将生物分子I、生物分子II、生物分子III…生物分子N分别与不同靶物质特异性结合;同时生物分子I、生物分子II、生物分子III…生物分子N与偶联在颗粒上的分子A1、分子A2、分子A3…分子An中的任意一个结合,形成结合有不同靶物质的树枝状结构;通过能特异性结合不同靶物质的生物分子I'、生物分子II'、生物分子III'…生物分子N'分别捕获树枝状结构上的不同靶物质,最后在固相上形成强烈的信号。

[0027] 所述分子A1、分子A2、分子A3…分子An为单克隆抗体或多克隆抗体,还可以是其他可与所述生物分子I、生物分子II、生物分子III…生物分子N结合的分子。

[0028] 所述颗粒为金属颗粒、彩色乳胶颗粒、荧光颗粒中的任一种,或者其他任何一种可以作为信号标记物的颗粒。所述颗粒的形状为球形、管状、棒状、或多面体中的任一种,但不局限于此。

[0029] 所述靶物质为蛋白质分子、蛋白质分子复合物、核酸、核酸复合物中的任意一种,还可以是其他能够发生特异性结合分子。

[0030] 所述生物分子I、生物分子II、生物分子III…生物分子N均为生物分子与半抗原分子的偶联物,如单克隆抗体与生物素分子的偶联物、抗原与异硫氰酸荧光素的偶联物。所述生物分子I、生物分子II、生物分子III…生物分子N上具有至少两个与分子A1、分子A2、分子A3…分子An相结合的位点。所述生物分子I、生物分子II、生物分子III…生物分子N中的任意一种分子的每一个分子上偶联有5~15个半抗原分子。

[0031] 请参考图1,其显示了本发明同时检测两种靶物质a、b的信号放大的过程,将生物分子I、生物分子II分别与不同靶物质a、b特异性结合;同时生物分子I、生物分子II与偶联在颗粒上的分子A1、分子A2、分子A3…分子An中的任意一个结合,形成结合有不同靶物质的树枝状结构;通过位于固相上不同区域且能特异性结合不同靶物质a、b的生物分子I'、生物分子II'分别捕获树枝状结构上的不同靶物质a、b,最后在固相上形成强烈的信号。

[0032] 请参考图2,其显示了一种使用该信号放大方法同时检测多种靶物质的免疫层析试纸,包括依次搭接粘贴在底板1上的样品垫11、第一结合垫12、层析膜13、吸水垫14;所述第一结合垫12包被有偶联有分子A1、分子A2、分子A3…分子An的颗粒及能特异性结合不同靶物质的生物分子I、生物分子II、生物分子III…生物分子N;所述层析膜13上设置质控线C及在不同区域的检测线T(优选不重叠的多个检测线T1、T2…Tm, $m \geq 2$)分别固定有能特异性结合不同靶物质的生物分子I'、生物分子II'、生物分子III'…生物分子N';其中, $N \geq 2$ 、 $N' \geq 2$ 和 $n \geq 1$ 。

[0033] 请参考图3,其显示了另一种使用该信号放大方法同时检测多种靶物质的免疫层析试纸,包括依次搭接粘贴在底板2上的样品垫21、第二结合垫22、第三结合垫23、层析膜24、吸水垫25;所述第二结合垫22包被有能特异性结合不同靶物质的生物分子I、生物分子II、生物分子III…生物分子N;所述第三结合垫23包被有偶联有分子A1、分子A2、分子A3…分子An的颗粒;所述层析膜24上设置质控线C及在不同区域的检测线T固定有能特异性结合不同靶物质的生物分子I'、生物分子II'、生物分子III'…生物分子N',其中, $N \geq 2$ 、 $N' \geq 2$ 和 $n \geq 1$ 。

[0034] 本发明还提供了一种使用该信号放大方法同时检测多种靶物质的免疫层析装置,包括反应微孔和免疫层析试纸,该免疫层析试纸包括依次搭接粘贴在底板上的样品垫、层析膜、吸水垫;所述反应微孔含有偶联有分子A1、分子A2、分子A3…分子An的颗粒及能特异性结合不同靶物质的生物分子I、生物分子II、生物分子III…生物分子N;所述层析膜上设置质控线及在不同区域的检测线分别固定有能特异性结合不同靶物质的生物分子I'、生物分子II'、生物分子III'…生物分子N',其中, $N \geq 2$ 、 $N' \geq 2$ 和 $n \geq 1$ 。

[0035] 本发明还提供了一种使用该信号放大方法同时检测多种靶物质的免疫层析装置,该装置还可以是由渗滤卡、封闭液、含有偶联有分子A1、分子A2、分子A3…分子An的颗粒的溶液、含有生物分子I、生物分子II、生物分子III…生物分子N的溶液、洗涤液组成,其中渗滤卡由卡底、吸水垫料、渗滤膜、卡盖组成;所述渗滤膜上不同检测区域分别固定有能特异性结合不同靶物质的生物分子I'、生物分子II'、生物分子III'…生物分子N';其中, $N \geq 2$ 、 $N' \geq 2$ 和 $n \geq 1$ 。

[0036] 上述所提及的样品垫、结合垫、层析膜及吸收垫、和反应微孔、渗滤卡均属于现有技术,在此不再赘述。

[0037] 以下结合实施例对本发明做进一步描述。

[0038] 实施例1

[0039] 免疫层析试纸条同时检测艾滋病病毒P24蛋白和丙型肝炎病毒core蛋白

[0040] 1. 按照Frens法(1973)制备40nm胶体金颗粒;按照每毫升胶体金颗粒加入3 μ L 0.2M碳酸钾的量调节PH;按照每毫升胶体金颗粒加入8 μ g抗生物素单克隆抗体,室温反应15min;加入牛血清白蛋白(BSA),使其终浓度为1%,室温静置15min;10000rpm离心10min;弃掉上清,加入1/10胶体金体积的重悬液[10mM Tris(PH8.0),0.5%Tween20、0.4%酪蛋白、2%蔗糖]重悬颗粒。

[0041] 2. 按照IgG与SuIfo-NHS-LC-LC-Biotin比例为1:1~1:20制备生物素标记的HIV P24和HCV core单克隆抗体;透析,去掉杂质,将两者等量混到一起,配成蛋白浓度为0.3mg/mL的溶液。

[0042] 3. 第二结合垫的制备:按照5 μ L/cm喷胶体金标记的抗生物素单克隆抗体于奥斯龙8964玻璃纤维素膜上,置于37 $^{\circ}$ C烘干,裁成0.4cm宽,备用。

[0043] 4. 第三结合垫的制备:按照1 μ L/cm喷生物素化的P24单克隆抗体和生物素化的core单克隆抗体混合液于奥斯龙8964玻璃纤维素膜上,置于37 $^{\circ}$ C烘干,裁成0.4cm宽,备用。

[0044] 5. 层析膜的制备:按照1 μ L/cm喷涂浓度为1mg/mL的艾滋病毒P24蛋白单克隆抗体II'作为检测线T1,按照1 μ L/cm喷涂浓度为2mg/mL的丙型肝炎病毒core蛋白多克隆抗体II'作为检测线T2,按照1 μ L/cm喷涂浓度为0.2mg/mL的羊抗鼠IgG作为质控线,置于室温晾干,备用。

[0045] 6. 样品垫的制备:用[100mM Tris(PH8.0),0.5%Tween20]浸泡聚酯纤维素膜,置于37 $^{\circ}$ C烘干,裁成1.2cm宽,备用。

[0046] 7. 试纸条的组装:将样品垫、第二结合垫、第三结合垫、层析膜、吸水垫依次搭接粘贴到PVC底板上,裁成3.5mm宽的试纸条,干燥保存,备用。

[0047] 8. 试纸条的使用:1)样品处理:取血清样品,加入等体积样品处理液(0.3M 甘氨酸,1%Triton X100),置于56 $^{\circ}$ C 30min;2)取80 μ L处理后的产物于样品垫上,10min后观察结果(质控线不显色判定检测无效,否则只要检测线有红色出现即判定为阳性)。

[0048] 9. 结果1:随着IgG上标记的生物素的数量的增加,检测信号先增强,达到每个IgG含有11个生物素时,检测信号最强,低于5个检测信号没有明显差异,高于15个,会出现假阳性信号。

[0049] 结果2:检测5648份血浆样本,本方法与美国Ortho公司的丙型肝炎Core抗原检测试剂盒(ELISA)的符合率达到97.4%,与ZeptoMetrix公司的P24酶联免疫试剂盒的符合率达到99.5%。

[0050] 实施例2

[0051] 免疫层析试纸条同时检测布鲁氏菌脂多糖和大肠杆菌O157脂多糖

[0052] 1. 取100 μ L浓度为10mg/mL的稀土荧光纳米颗粒(粒径约110nm)于900 μ L MES(50mM,PH6.1)中,涡旋混匀;加入20mg NHS、20mg EDC,涡旋混匀;室温反应30min;10000rpm离心10min,弃上清;涡旋重悬颗粒;加入抗异硫氰酸荧光素(FITC)单克隆抗体100 μ g。

[0053] 2. 室温反应2-4h;加入酪蛋白,使其终浓度为0.1%,继续反应2-4h;10000rpm离心10min,弃上清;用PBST洗涤颗粒三次;加入20mL 颗粒重悬液(10mM Tris-HCl,1%BSA,5%海藻糖),重悬颗粒,备用。

[0054] 3. FITC标记布鲁氏菌脂多糖抗体I、大肠杆菌O157脂多糖单克隆抗体I,具体步骤参见QuickTag FITC Conjugation Kit.最终用PBS将标记好的布鲁氏菌脂多糖抗体I和大肠杆菌O157脂多糖单克隆抗体I按照质量比为1:6的比例配成混合液,混合液的蛋白浓度为1mg/mL,备用。

[0055] 4. 第二结合垫的制备:按照2 μ L/cm喷FITC标记好的布鲁氏菌脂多糖抗体I、大肠杆菌O157脂多糖单克隆抗体I于聚酯玻璃纤维素膜上,置于37 $^{\circ}$ C烘干,裁成0.4cm宽,备用。

[0056] 5. 第三结合垫的制备:按照5 μ L/cm喷荧光颗粒标记的抗FITC单克隆抗体于聚酯纤维素膜上,置于37 $^{\circ}$ C烘干,裁成0.4cm宽,备用。

[0057] 6. 层析膜的制备:按照1 μ L/cm喷涂浓度为1.5mg/mL的大肠杆菌O157单克隆抗体II'作为检测线T1,按照1 μ L/cm喷涂浓度为1.2mg/mL的布鲁氏菌单克隆抗体II'作为检测线

T2,按照1 μ L/cm喷涂浓度为0.2mg/mL的羊抗鼠IgG作为质控线,置于室温晾干,备用。

[0058] 7. 样品垫的制备:用[100mM Tris (PH8.0),0.5%Tween20]浸泡聚酯纤维素膜,置于37 $^{\circ}$ C烘干,裁成1.2cm宽,备用。

[0059] 8. 试纸条的组装:将样品垫、第二结合垫、第三结合垫、层析膜、吸水垫依次搭接粘贴到PVC底板上,裁成3.5mm宽的试纸条,干燥保存,备用。

[0060] 9. 试纸条的使用:1)样品处理:取牛奶样品20mL,用0.45 μ M滤膜过滤,用生理盐水洗下滤膜上的菌体,置于100 $^{\circ}$ C沸水浴10min;2)取80 μ L处理后的产物于样品垫上,15min后观察结果(质控线不显色判定检测无效,否则只要检测线有红色出现即判定为阳性)。

[0061] 10. 本方法与检测梯度稀释的羊布鲁氏菌和大肠杆菌0157,其检测下限分别达到10²CFU/ML和10¹CFU/ML,显著优于目前现有检测方法。

[0062] 实施例3

[0063] 免疫层析试纸条检测禽流感病毒

[0064] 1. 取100 μ L浓度为10mg/mL的彩色乳胶颗粒,加入100 μ g抗生物素单克隆抗体,涡旋混匀;4 $^{\circ}$ C结合过夜;加入加入牛血清白蛋白(BSA),使其终浓度为1%,室温静置120min;10000rpm离心10min;弃掉上清;PBST洗涤颗粒三次;入1mL悬液[10mM Tris (PH8.0),0.5% Tween20、0.4%酪蛋白、2%蔗糖]重悬颗粒。

[0065] 2. 生物素化抗体的制备:取H5型禽流感病毒单克隆抗体I15 μ g、H7型禽流感病毒单克隆抗体I 25 μ g、H9型禽流感病毒单克隆抗体I 12 μ g,将三者混合到一起;加入相当于10倍抗体分子数的SuIflo-NHS-LC-Biotin,室温反应2h;透析,去掉杂质,稀释成0.3mg/mL的溶液。

[0066] 3. 第一结合垫的制备:按照8 μ L/cm喷彩色乳胶颗粒标记的抗生物素抗体于聚酯玻璃纤维纤维素膜上,置于37 $^{\circ}$ C烘干;裁成0.4cm宽;按照1 μ L/cm喷生物素化抗体,置于37 $^{\circ}$ C烘干;备用。

[0067] 4. 层析膜的制备:按照1 μ L/cm喷涂浓度为1.5mg/mL的H5禽流感单克隆抗体II'作为检测线T1,按照1 μ L/cm喷涂浓度为1.2mg/mL的H7禽流感单克隆抗体II'作为检测线T2,按照1 μ L/cm喷涂浓度为2mg/mL的H9禽流感多克隆抗体II'作为检测线T3,按照1 μ L/cm喷涂浓度为0.2mg/mL的羊抗鼠IgG作为质控线,置于室温晾干,备用。

[0068] 5. 样品垫的制备:用[100mM Tris (PH8.0)、0.5%Tween20]浸泡聚酯纤维素膜,置于37 $^{\circ}$ C烘干,裁成1.2cm宽,备用。

[0069] 6. 试纸条的组装:将样品垫、第一结合垫、层析膜、吸水垫依次搭接粘贴到PVC底板上,裁成3.5mm宽的试纸条,干燥保存,备用。

[0070] 7. 试纸条的使用:1)样品处理:取咽拭子,于2mL生理盐水中洗下上面的病毒;2)取80 μ L病毒样品于样品垫上,15min后观察结果(质控线不显色判定检测无效,否则只要检测线有红色出现即判定为阳性)。

[0071] 8. 用本试纸条检测97份禽流感咽拭子样本,从中检测出12份阳性,其中H7 2份, H9 3份, H5 7份。上述阳性样本经病毒培养检测均为阳性。采用IDEXX禽流感抗体检测试剂盒检测,从中检测出53份禽流感阳性样本,经病毒培养检测,7份为阳性。

[0072] 实施例4

[0073] 同时检测布鲁氏菌BP26蛋白和OMP31蛋白

[0074] 1. 按照Frens法(1973)制备40nm胶体金颗粒;按照每毫升胶体金颗粒加入3 μ L 0.2M碳酸钾的量调节PH;按照每毫升胶体金颗粒加入15 μ g兔抗鼠IgG,室温静置15min;加入1/10体积的10%BSA,室温静置15min;10000rpm离心10min;弃掉上清,加入1/10胶体金体积的重悬液[10mM Tris(PH8.0),0.5%Tween20、0.4%酪蛋白、2%蔗糖]重悬颗粒。

[0075] 2. 反应微孔的制备:取25 μ L抗体混合液(BP26单克隆抗体I:0.5mg/mL,OMP31单克隆抗体I:1.6mg/mL),加入微孔中,冻干,密封,备用。

[0076] 3. 第三结合垫的制备:按照5 μ L/cm喷胶体金标记的兔抗鼠IgG,裁成0.4cm宽;置于37 $^{\circ}$ C烘干;备用。

[0077] 4. 层析膜的制备:按照1 μ L/cm喷涂浓度为1.5mg/mL的BP26多克隆抗体(兔)II'作为检测线T1,按照1 μ L/cm喷涂浓度为1.8mg/mL的OMP31多克隆抗体(兔)II'作为检测线T2,按照1 μ L/cm喷涂浓度为0.2mg/mL的羊抗兔IgG作为质控线,置于室温晾干,备用。

[0078] 5. 样品垫的制备:用[100mM Tris(PH8.0)、0.5%Tween20]浸泡聚酯纤维素膜,置于37 $^{\circ}$ C烘干,裁成1.2cm宽,备用。

[0079] 6. 试纸条的组装:将样品垫、第三结合垫、层析膜、吸水垫依次搭接粘贴到PVC底板上,裁成3.5mm宽的试纸条,干燥保存,备用。

[0080] 7. 试纸条的使用:1)样品处理:取牛奶样品20mL,用0.45 μ M滤膜过滤,用生理盐水洗下滤膜上的菌体,置于100 $^{\circ}$ C沸水浴10min;2)取200 μ L处理后的产物于反应微孔中,混匀,40 $^{\circ}$ C孵育3min,将试纸条的样品垫端插入反应微孔,15min后观察结果(质控线不显色判定检测无效,否则只要检测线有红色出现即判定为阳性)。

[0081] 8. 本方法检测150份牛奶样品(其中23份经分离培养法检测为布鲁氏菌阳性),与布鲁氏菌分离培养法的吻合率达到100%。

[0082] 实施例5 同时检测HIV 抗体和HCV 抗体

[0083] 1. 取100 μ L浓度为10mg/mL的金纳米棒,分别加入80 μ g 抗myc单克隆抗体、120 μ g 抗 HA单克隆抗体,涡旋混匀,4 $^{\circ}$ C过夜;加入牛血清白蛋白(BSA),使其终浓度为1%,室温静置65min;10000rpm离心10min;弃掉上清,加入10mL重悬液[10mM Tris(PH8.0),0.5% Tween20、0.4%酪蛋白、2%蔗糖]重悬颗粒。

[0084] 2. 反应微孔的制备:取10 μ L 上述金纳米棒标记的抗myc/HA单克隆抗体、80ng HIV检测抗原(带有HA标签)、20ng HCV检测抗原(带有myc标签)于反应微孔中,冻干密封保存;

[0085] 3. 层析膜的制备:按照1 μ L/cm喷涂浓度为1mg/mL的HIV包被抗体作为检测线T1,按照1 μ L/cm喷涂浓度为2mg/mL的HCV包被抗体作为检测线T2,按照1 μ L/cm喷涂浓度为0.2mg/mL的羊抗鼠IgG作为质控线,置于室温晾干,备用。

[0086] 4. 样品垫的制备:用[100mM Tris(PH8.0)、0.5%Tween20]浸泡聚酯纤维素膜,置于37 $^{\circ}$ C烘干,裁成0.8cm宽,备用。

[0087] 5. 试纸条的组装:将样品垫、层析膜、吸水垫依次搭接粘贴到PVC底板上,裁成3.5mm宽的试纸条,干燥保存,备用。

[0088] 6. 试纸条的使用:取200 μ L血清或血浆于反应微孔中,40 $^{\circ}$ C 3min;将试纸条样品垫一端插入微孔中,5min后观察结果(质控线不显色判定检测无效,否则只要检测线有红色出现即判定为阳性)。

[0089] 7. 检测2546份血浆样本,本方法与Abbott公司的丙型肝炎HCV抗体检测微粒发光试剂盒吻合率达到99.6%以上,与上海科华HIV抗体酶联免疫试剂盒吻合率达到99.3%。

[0090] 实施例6

[0091] 同时检测沙门氏菌、大肠杆菌0157、单增李斯特菌、金黄色葡萄球菌

[0092] 1. 引物序列如下表所示:上下游引物的5'端分别有不同的半抗原分子标记(如生物素)。

[0093]

pathogens	primers
S. aureus	5' -Biotin-TGTCGGTACACGATATTCTT -3'
	5' -DIG-CACGACTAAATAGACGCTCATTCCGCGATTTT-3'
E. coli 0157	5' -FITC-AGTACATTGGCATCGTGTGGA-3'
	5' -Biotin-TTTCGATGAGTTTATCTGCAAGGTGATTCCTTAA-3'
L. monocytogenes	5' -Biotin-CAAGCATGGACAAATGCACCAGTAAA -3'
	5' -HEX-AATGTGACTGGCGCTTTAATTGC-3'
Salmonella	5' -FAM-GCTCGTTTACGACCTGAATTAC-3'
	5' -Biotin-TTCTACATTGACAGAATCCTC-3'

[0094] 2. PCR扩增体系:2.5 μ L 10 \times PCR Buffer,0.1 μ L上下游引物(100nM),2U Taq酶,加水补足至25 μ L;加入模板(DNA)2 μ L;扩增条件:95 $^{\circ}$ C 5min;94 $^{\circ}$ C 5s,55 $^{\circ}$ C 40s,72 $^{\circ}$ C 40s;30个循环。

[0095] 3. 按照Frens法(1973)制备40nm胶体金颗粒;按照每毫升胶体金颗粒加入3 μ L 0.2M碳酸钾的量调节PH;按照每毫升胶体金颗粒加入8 μ g抗生物素单克隆抗体,室温反应15min;加入牛血清白蛋白(BSA),使其终浓度为1%,室温静置15min;10000rpm离心10min;弃掉上清,加入1/10胶体金体积的重悬液(10mM Tris(PH8.0),0.5%Tween20、0.4%酪蛋白、2%蔗糖)重悬颗粒。

[0096] 4. 第一结合垫的制备:按照3 μ L/cm喷胶体金标记的抗生物素单克隆抗体于奥斯龙8964玻璃纤维素膜上,置于37 $^{\circ}$ C烘干,裁成0.4cm宽,备用。

[0097] 5. 层析膜的制备:按照1 μ L/cm喷涂浓度为1mg/mL的抗地高辛(DIG)单克隆抗体作为检测线T1,按照1 μ L/cm喷涂浓度为2mg/mL的抗异硫氰酸荧光素(FITC)单克隆抗体作为检测线T2,按照1 μ L/cm喷涂浓度为1mg/mL的抗HEX单克隆抗体作为检测线T3,按照1 μ L/cm喷涂浓度为2mg/mL的抗FAM单克隆抗体作为检测线T4,按照1 μ L/cm喷涂浓度为0.2mg/mL的羊抗鼠IgG作为质控线,置于室温晾干,备用。

[0098] 6. 样品垫的制备:用[100mM Tris(PH8.0)、0.5%Tween20]浸泡聚酯纤维素膜,置于37 $^{\circ}$ C烘干,裁成0.8cm宽,备用。

[0099] 7. 试纸条的组装:将样品垫、第一结合垫、层析膜、吸水垫依次搭接粘贴到PVC底板上,裁成3.5mm宽的试纸条,干燥保存,备用。

[0100] 8. 试纸条的使用:将PCR产物用生理盐水稀释5倍,取80 μ L于样品垫上,5min后观察结果(质控线不显色判定检测无效,否则只要检测线有红色出现即判定为阳性)。

[0101] 9. 本方法与检测用生理盐水梯度稀释的菌体的灵敏性分别达到10⁰cfu/mL(金黄色葡萄球菌)、10¹CFU/mL(E. coli 0157:H7)、10²CFU/mL(L. monocytogenes)、10⁰CFU/mL(沙门氏菌)。

[0102] 实施例6

[0103] 免疫渗滤法检测流感病毒

[0104] 1. 按照Frens法(1973)制备40nm胶体金颗粒;按照每毫升胶体金颗粒加入3 μ L 0.2M碳酸钾的量调节PH;按照每毫升胶体金颗粒加入8 μ g抗生物素单克隆抗体,室温反应15min;加入牛血清白蛋白(BSA),使其终浓度为1%,室温静置15min;10000rpm离心10min;弃掉上清,加入1/10胶体金体积的重悬液[10mM Tris(PH8.0),0.5%Tween20、0.4%酪蛋白、2%蔗糖]重悬颗粒。

[0105] 2. 生物素化抗体的制备:取流感A病毒单克隆抗体I 15 μ g、流感B病毒单克隆抗体I 25 μ g,将二者者混合到一起;加入相当于10倍抗体分子数的SuIfo-NHS-LC-Biotin,室温反应2h;透析,去掉杂质,稀释成0.3mg/ml的溶液。

[0106] 3. 渗滤膜的制备:按照0.5 μ L/点喷涂浓度为1mg/mL的流感A病毒单克隆抗体II',按照0.5 μ L/点喷涂浓度为1.5mg/mL的流感B病毒单克隆抗体II',按照1 μ L/点喷涂浓度为0.3mg/mL的羊抗鼠IgG作为质控点,置于37 $^{\circ}$ C晾干,备用。

[0107] 4. 渗滤卡的组装:按照卡底、吸水垫料、渗滤膜、卡盖的次序组装渗滤卡,备用。

[0108] 5. 检测:1)往滤膜上滴加一滴封闭液(20mM PB、0.5%酪蛋白);2)液体滤过之后,滴加一滴血清样本;3)血清滤完之后,滴加一滴洗涤液(PBST);4)滤完之后滴加一滴生物素化抗体、一滴胶体金标记的抗生物素单克隆抗体;4)等液体滤完之后,滴加一滴洗涤液(PBST);5)滤完之后,观察结果(质控点不显色判定检测无效,否则只要检测点有红色出现即判定为阳性)。

[0109] 6. 分别采用上述流感病毒检测方法和北京万泰生物药业股份有限公司的甲型/乙型流感病毒抗原检测试剂盒检测梯度稀释的流感A和流感B病毒阳性样本。检测结果显示,本发明所公开的方法在灵敏性上具有明显优势。将流感A病毒阳性样本用生理盐水倍比稀释,稀释512倍后本发明所公开的方法检测结果仍为阳性,而万泰的检测试剂盒检测稀释到128倍的样本,检测结果为阴性。同样将流感B病毒阳性样本用生理盐水倍比稀释,稀释256倍后本发明所公开的方法检测结果仍为阳性,而万泰的检测试剂盒检测稀释到64倍的样本,检测结果为阴性。

[0110] 以上所述实施例仅表达了本发明的实施方式,其描述较为具体和详细,但并不能因此而理解为对本发明专利范围的限制,但凡采用等同替换或等效变换的形式所获得的技术方案,均应落在本发明的保护范围之内。

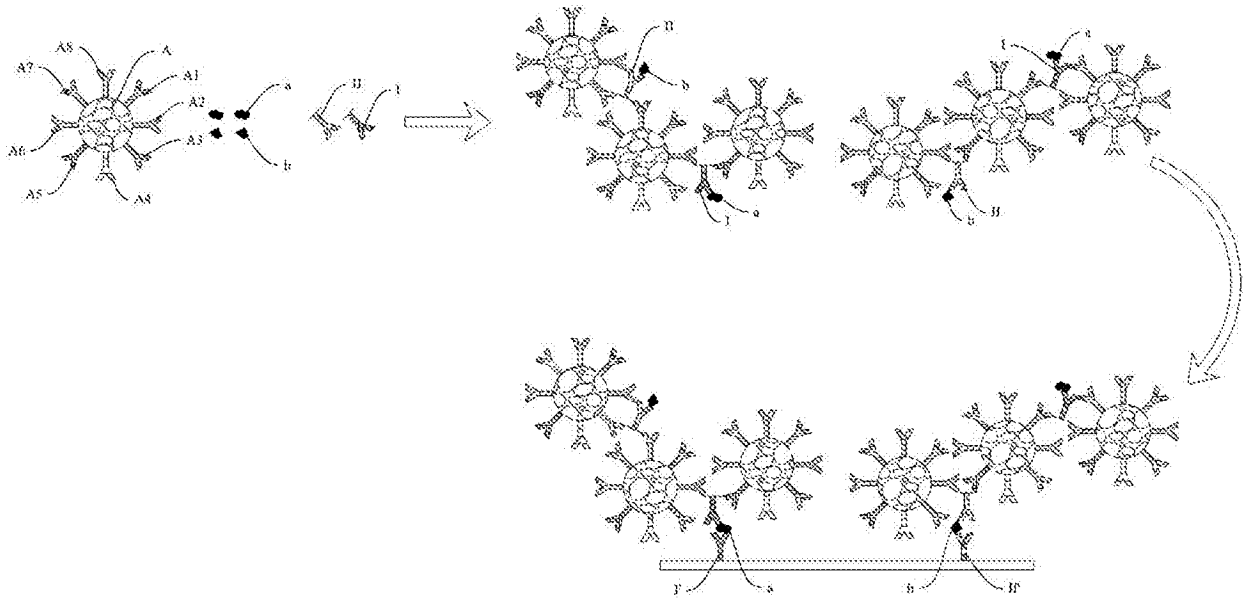


图1

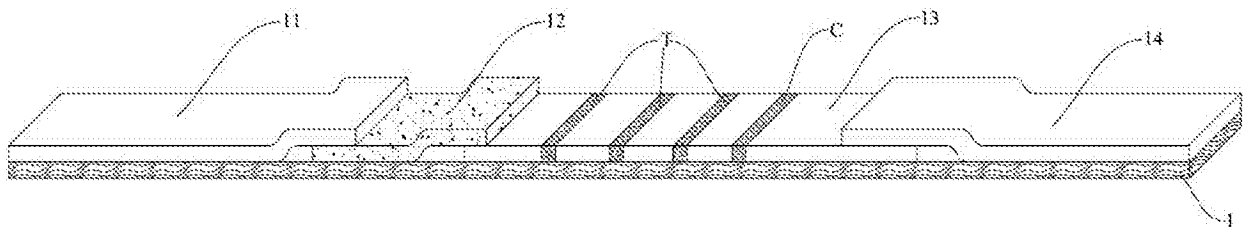


图2

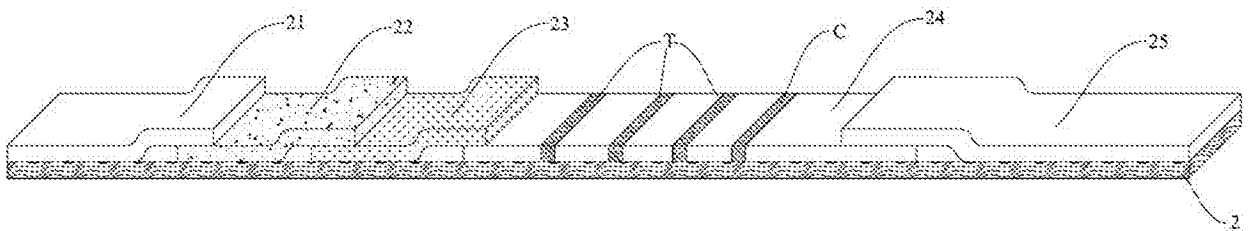


图3

专利名称(译)	一种检测靶物质的信号放大方法及使用该方法的免疫层析试纸和装置		
公开(公告)号	CN105403707B	公开(公告)日	2017-05-17
申请号	CN201510632056.3	申请日	2015-09-29
[标]申请(专利权)人(译)	南方医科大学		
申请(专利权)人(译)	南方医科大学		
当前申请(专利权)人(译)	南方医科大学		
[标]发明人	李金峰 黎诚耀 张玲		
发明人	李金峰 黎诚耀 张玲		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/53 G01N33/5308 G01N33/68 G01N33/6803		
代理人(译)	陈卫		
审查员(译)	周洋		
其他公开文献	CN105403707A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测靶物质的信号放大方法，包括：将生物分子I、生物分子II、生物分子III...生物分子N分别与不同靶物质特异性结合；生物分子I、生物分子II、生物分子III...生物分子N均能与偶联在颗粒上的分子A1、分子A2、分子A3...分子An中的任意一个结合，形成树枝状结构；通过能特异性结合不同靶物质的生物分子I'、生物分子II'、生物分子III'...生物分子N'分别捕获树枝状结构上的不同靶物质；其中， $N \geq 2$ 、 $N' \geq 2$ 和 $n \geq 1$ 。本发明还公开了使用该方法的免疫层析试纸和装置。该同时检测多种靶物质的信号放大方法不但能够高灵敏检测靶物质，而且实现了多种靶物质的同时检测。

