



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102353776 A

(43) 申请公布日 2012. 02. 15

(21) 申请号 201110151215. X

(22) 申请日 2011. 06. 07

(71) 申请人 中国科学院武汉病毒研究所
地址 430071 湖北省武汉市武昌小洪山

(72) 发明人 张先恩 王殿冰 田博 危宏平
张治平

(74) 专利代理机构 武汉宇晨专利事务所 42001
代理人 王敏锋

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种定量检测炭疽芽孢的磁性免疫层析试纸条及制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种定量检测样品中炭疽芽孢的磁性免疫层析试纸条及制备方法,硝酸纤维素膜上预包被有炭疽芽孢检测线和质控线,粘贴于底板上的第一层为硝酸纤维素膜,硝酸纤维素膜靠近检测线的一端粘贴有结合垫,另一端粘贴有吸收垫,结合垫远离硝酸纤维素膜的一端上粘贴有样品垫,三层之间相互交错,试纸条装入卡板中,通过卡板的加样孔加入样品。其步骤是:A、抗体的制备;B、抗体偶联超顺磁颗粒的制备;C、将制备好的抗体偶联磁颗粒使用定量喷液于结合垫上;D、硝酸纤维素膜的包被;E、试纸条的组装。简单可靠,操作简易,方便实用。检测下限可达 10^3 个芽孢;方便快捷,20分钟可进行信号读取,适合现场检测;信号稳定性好,便于长期保存。

1. 一种定量检测样品中炭疽芽孢的磁性免疫层析试纸条,该试纸条由底板(1)、硝酸纤维素膜(6)、结合垫(3)、样品垫(2)及吸收垫(7)构成,其特征在于:硝酸纤维素膜(6)上预包被有炭疽芽孢检测线(4)和质控线(5),粘贴于底板(1)上的第一层为硝酸纤维素膜(6),硝酸纤维素膜(6)靠近检测线(4)的一端粘贴有结合垫(3)第二层,另一端粘贴有吸收垫(7)第二层,结合垫(3)远离硝酸纤维素膜(6)的一端上粘贴有样品垫(2)第三层,三层之间相互交错 2.5mm,试纸条装入卡板(9)中,通过卡板(9)的加样孔(8)加入样品。

2. 根据权利要求 1 所述的一种定量检测样品中炭疽芽孢的磁性免疫层析试纸条,其特征在于:所述的底板为 98mm,硝酸纤维素膜为 25mm,结合垫为结合有炭疽芽孢抗体偶联的超顺磁颗粒的 8mm,样品垫为 22mm,吸收垫为 29mm。

3. 权利要求 1 所述的一种定量检测样品中炭疽芽孢的磁性免疫层析试纸条的制备方法,其步骤是:

A、抗体的制备:采用标准 B 淋巴细胞杂交瘤技术制备两种针对炭疽芽孢表面 EA1 蛋白的单克隆抗体,并用正辛酸-饱和硫酸铵沉淀法对制备出的抗体进行纯化;

B、抗体偶联超顺磁颗粒的制备:选用直径为 100-300 nm 的超顺磁颗粒,使用碳二亚胺和琥珀酰亚胺共价偶联的方式将针对炭疽芽孢表面蛋白的单克隆抗体共价交联到超顺磁颗粒上,交联后的超顺磁颗粒用 BSA 封闭;

C、将制备好的抗体偶联磁颗粒使用定量喷液装置以 10 μ l/cm-20 μ l/cm 的量喷涂于结合垫上;

D、硝酸纤维素膜的包被:使用包被缓冲液将针对炭疽芽孢表面蛋白的单克隆抗体以及羊抗小鼠 IgG 稀释到 0.5-2 mg/ml 浓度,使用定量喷液装置分别将二者以 0.4-0.8cm 的间隔喷印于硝酸纤维素膜上,晾干后于干燥处封存备用,保存温度为 4℃至 25℃,避免阳光直射;

E、试纸条的组装:在底板上依次相互交错 2.5mm 地贴上包被有抗体的硝酸纤维素膜、磁颗粒结合垫、样品垫、吸收垫,然后根据要求宽度切割即得到试纸条。

一种定量检测炭疽芽孢的磁性免疫层析试纸条及制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于感染性疾病检测技术领域。特别是涉及到一种定量检测样品中炭疽芽孢的磁性免疫层析试纸条,同时还涉及一种定量检测样品中炭疽芽孢的磁性免疫层析试纸条的制备方法。

背景技术

[0002] 炭疽芽孢杆菌 (*Bacillus anthracis*) 是一种可产生芽孢的需氧杆菌,竹节状排列,为革兰氏阳性。该菌可引起人畜共患的炭疽病,且在草食性动物中发病率最高,人类通过接触土壤中,皮毛上的芽孢也可导致感染。由于炭疽芽孢对高温,高压,干燥、电离辐射以及一些化学物质具有极强的抵抗能力,故而可在环境中生存数十年,甚至数百年。为此,炭疽芽孢一直被列为头号生物战斗剂。2001年,发生在美国的炭疽恐怖事件再次让全世界震惊,无论是自然感染还是生物反恐,在掌握炭疽芽孢杆菌致病机制的同时如何快速准确的检验、鉴定炭疽芽孢杆菌是当今人类必须要解决的难题。

[0003] 针对炭疽芽孢的现有检测方法包括:利用免疫学技术的酶标法或荧光抗体染色法,利用分子生物学技术的 PCR 法,以及多种传统的检测方法,包括细菌分离培养、溶血性实验、荚膜染色、噬菌体裂解实验、串珠实验等。上述方法耗时较长,而且需要纯化工作或购买复杂的仪器,操作繁琐,多数只能进行定性检测而不能实验定量检测。

[0004] 磁性免疫层析 (Magnetic Immuno-chromatography Testing, MICT) 是以胶体金技术为基础发展出的一种单人份快速定量检测技术。此免疫层析以超顺磁颗粒 (superPMPs) 代替传统的标记物进行免疫层析,通过超顺磁颗粒捕获的生化物质来定量判断样品中的待测物含量,采用磁标记免疫复合物 - 磁场强度标准曲线来进行定量测定。该技术与传统技术相比具有下述优势:a) 比各类目测快速诊断法灵敏 10-100 倍;b) 加样后 30 分钟内可得到数据,且可实现多重检测;c) 在 3 到 4 个数量级浓度范围内呈线性;d) 所用磁性检测仪器采用固相元件,微型化设计自成一体,独立运行,体积小,操作简便;e) 超顺磁颗粒由聚合物包被,不会随时间而衰变。该技术继承了传统免疫层析技术简便快速、单人份操作的优点,又弥补了传统免疫层析技术灵敏度低、只能定性不能定量的缺点,从而成为替代传统免疫层析技术的首选。

[0005] 磁免疫层析法是以超顺磁颗粒标记抗体进行免疫反应检测,通过检测磁性强度提供针对生物样品的定量检测数据,采用标记的免疫复合物 - 磁场强度的标准曲线来计算待测物质的含量。用作标记物的超顺磁颗粒,在没有外加磁场的情况下不具有任何磁性,只有在外加磁场作用下才会表现出磁性,商品化的超顺磁颗粒都经过表面修饰,大大方便了标记过程,标记简便,重复性好。

发明内容

[0006] 本发明的目的是在于提供了一种定量检测样品中炭疽芽孢的磁性免疫层析试纸条,此试纸条可实现针对炭疽芽孢的快速、定量的现场检测。

[0007] 本发明的另一个目的是在于提供了一种定量检测样品中炭疽芽孢的磁性免疫层析试纸条的制备方法,采用此方法制备出的磁性免疫试纸条可用于针对炭疽芽孢的快速、定量检测,且信号稳定性强,可长期保存。

[0008] 为达到上述目的,本发明采用以下技术方案:

[0009] 将磁性免疫层析技术应用在炭疽芽孢定量检测试纸条中,将一株针对炭疽芽孢表面蛋白的单克隆抗体共价偶联于超顺磁颗粒上,将另一株针对炭疽芽孢表面蛋白的单克隆抗体包被于硝酸纤维素膜上作为检测线捕获固相,将羊抗小鼠 IgG 包被于硝酸纤维素膜上作为质控线捕获固相,按照常规免疫层析法的原理进行标本检测,结合磁性检测仪进行检测,在高灵敏度检测的同时大大缩短了检测时间,并且可以即时给出定量结果,测量仪器简单可靠,便携实用。

[0010] 一种定量检测样品中炭疽芽孢的磁性免疫层析试纸条,该试纸条由 98mm 长的底板 (millipore 公司生产级底板)、25mm 长的硝酸纤维素膜 (millipore 公司实验级 135kit 硝酸纤维素膜)、结合有炭疽芽孢抗体偶联的超顺磁颗粒的 8mm 长的结合垫 (millipore 公司生产级 Au-pad)、22mm 长的样品垫 (millipore 公司生产级样品垫) 以及 29mm 长的吸收垫 (millipore 公司生产级吸收垫) 构成,硝酸纤维素膜上预包被有炭疽芽孢检测线 T 和质控线 C。构成该试纸条的所有部件长度不同,宽度均为 5mm。粘贴于底板上的第一层为硝酸纤维素膜,硝酸纤维素膜靠近检测线的一端粘贴有结合垫 (第二层),另一端粘贴有吸收垫 (第二层),结合垫远离硝酸纤维素膜的一端上粘贴有样品垫 (第三层),三层之间相互交错 2.5mm。

[0011] 一种定量检测样品中炭疽芽孢的磁性免疫层析试纸条,共包括:起支撑作用的底板;粘贴在底板上,包被有检测线抗体 (针对炭疽芽孢的单克隆抗体) 与质控线抗体 (商品化羊抗小鼠 IgG) 的硝酸纤维素膜;粘贴在底板上,并有 2.5mm 长的部分与硝酸纤维素膜交错重叠 (覆盖硝酸纤维素膜的靠近检测线一端),用于储存磁颗粒的结合垫;粘贴在底板上,并有 2.5mm 长的部分与结合垫交错重叠 (覆盖结合垫的远离硝酸纤维素膜的一端),起承载与释放样品作用的样品垫;粘贴在底板上,并有 2.5mm 长的部分与硝酸纤维素膜交错重叠 (覆盖硝酸纤维素膜的靠近质控线一端),用于吸收样品以提供展层动力的吸收垫;包被在硝酸纤维素膜上,用于捕获样品中的炭疽芽孢的检测线 (T 线);包被在硝酸纤维素膜上,用于捕获多余的磁颗粒并指示反应的完全程度的质控线 (C 线)。

[0012] 一种定量检测样品中炭疽芽孢的磁性免疫层析试纸条的制备方法,其步骤是:

[0013] A、抗体的制备:采用标准 B 淋巴细胞杂交瘤技术制备两种针对炭疽芽孢表面 EA1 蛋白的单克隆抗体,并用正辛酸-饱和硫酸铵沉淀法对制备出的抗体进行纯化;

[0014] B、抗体偶联超顺磁颗粒的制备:选用直径为 100-300 nm 的超顺磁颗粒,使用碳二亚胺 (EDC) 和琥珀酰亚胺 (NHS) 共价偶联的方式将针对炭疽芽孢表面蛋白的单克隆抗体共价交联到超顺磁颗粒上,交联后的超顺磁颗粒用 BSA 封闭;

[0015] C、将制备好的抗体偶联磁颗粒使用定量喷液装置以 $10 \mu\text{l}/\text{cm}$ - $20 \mu\text{l}/\text{cm}$ 的量喷涂于结合垫上;

[0016] D、硝酸纤维素膜的包被:使用包被缓冲液将针对炭疽芽孢表面蛋白的单克隆抗体以及羊抗小鼠 IgG 稀释到 0.5-2mg/ml 浓度,使用定量喷液装置分别将二者以 0.4-0.8cm 的间隔喷印于硝酸纤维素膜上,晾干后于干燥处 (湿度 20% 至 40%) 封存备用,保存温度为

4℃至 25℃,避免阳光直射;

[0017] E、试纸条的组装:在底板上依次相互交错 2.5mm 地贴上包被有抗体的硝酸纤维素膜、磁颗粒结合垫、样品垫、吸收垫,然后根据要求宽度切割即得到试纸条。

[0018] 本发明与现有技术相比,具有以下优点和效果:

[0019] 可对样品中的炭疽芽孢浓度进行定量检测,在高灵敏度检测的同时大大缩短了检测时间,并且可以即时给出定量结果,测量仪器简单可靠,操作简易,方便实用。检测下限可达 10^3 个芽孢;方便快捷,20 分钟可进行信号读取;磁性分析仪可靠且便携,适合现场检测;信号稳定性好,便于长期保存。

附图说明

[0020] 图 1 为一种定量检测样品中炭疽芽孢的磁性免疫层析试纸条结构示意图。

[0021] 图 2 为一种装入卡板后的试纸条结构示意图。

[0022] 其中:底板 1、样品垫 2、结合垫 3、检测线 4、质控线 5、硝酸纤维素膜 6、吸收垫 7。

具体实施方式

[0023] 实施例 1:

[0024] 根据图 1、图 2 可知,一种定量检测样品中炭疽芽孢的磁性免疫层析试纸条,该试纸条由 98mm 长的底板 1、25mm 长的硝酸纤维素膜 6、结合有炭疽芽孢抗体偶联的超顺磁颗粒的 8mm 长的结合垫 3、22mm 长的样品垫 2 以及 29mm 长的吸收垫 7 构成,硝酸纤维素膜 6 上预包被有炭疽芽孢检测线 4(T) 和质控线 5(C)。构成该试纸条的所有部件长度不同,宽度均为 5mm。粘贴于底板 1 上的第一层为硝酸纤维素膜 6,硝酸纤维素膜 6 靠近检测线 4 的一端粘贴有结合垫 3(第二层),另一端粘贴有吸收垫 7(第二层),结合垫 3 远离硝酸纤维素膜 6 的一端上粘贴有样品垫 2(第三层),三层之间相互交错 2.5mm。制作完成的试纸条装入卡板 9 中,使用时通过卡板 9 的加样孔 8 加入约 100 微升样品即可。在具体实施中,所采用的抗体为单克隆抗体技术所制备的单抗,以及购买的商品化的二抗。利用双抗体夹心检测炭疽芽孢表面抗原的原理检测样品,当待测样品中含有炭疽芽孢抗原时,抗原展层到结合垫 3 时会与磁颗粒上偶联的抗体结合,随着层析作用的继续,磁颗粒-免疫复合物随溶液移动到包被了另一种炭疽单抗的检测线 4(T) 处,抗原会再次发生免疫反应形成双抗体夹心复合物聚集在检测线 4(T) 处,而剩余的抗体偶联磁颗粒及未被捕获的过量磁颗粒-免疫复合物会继续展层至质控线 5(C) 处,磁颗粒上偶联的单抗被质控线 5(C) 处包被的二抗捕获而使质控线 5(C) 处同样出现磁颗粒聚集。整个反应在 40 分钟内进行完全,一般反应 20 分钟后即可进行仪器读数,通过分析检测线 4(T) 及质控线 5(C) 处的磁性信号来确定结果。整个读数、分析的过程已经完整程序化,磁性分析仪会直接给出结果。

[0025] 实施例 2:

[0026] 一种定量检测样品中炭疽芽孢的磁性免疫层析试纸条的制备方法,其步骤是:

[0027] A、抗体制备:采用标准 B 淋巴细胞杂交瘤技术 [Kohler G, Milstein C(1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 256:495-497] 制备抗炭疽芽孢表面单克隆抗体 [Wang DB, et al(2009). Detection of B.anthraxis spores and vegetative cells with the same

monoclonal antibodies. Plos One 4(11):e7810],并用正辛酸-饱和硫酸铵沉淀法对制备出的抗体进行纯化 [Perosa F, Carbone R, Ferrone S, Dammacco F(1990) Purification of human immunoglobulins by sequential precipitation with caprylic acid and ammonium sulphate. J Immunol Methods 128:9-16.]

[0028] B、包被膜的制备:用包被缓冲液(0.01M PBS, pH7.2-7.5均适用)将炭疽芽孢单抗稀释为2mg/ml,将二抗稀释为1mg/ml,使用定量喷膜装置以 $2\mu\text{l}/\text{cm}$ 的量将二者以0.6-0.7cm的间隔均匀喷印于35cm长2.5cm宽的硝酸纤维素膜上,室温(20-25°C以下相同)晾干。

[0029] C、炭疽芽孢单克隆抗体偶联磁颗粒的制备:使用含0.1%(体积/体积)Tween20的50mM、pH4.7的醋酸钠缓冲液洗涤磁颗粒,加入EDC和NHS使终浓度均为20mmol,室温反应一小时,洗涤磁珠后,加入炭疽芽孢单克隆抗体使其与磁颗粒含有的羧基的数量比例是1:300到1:400,37°C摇床120rpm反应2小时,洗涤磁颗粒后加入含有5%(质量/体积)BSA的0.02M、pH7.2的PBS,37°C摇床120rpm封闭2小时,使用含0.1%(体积/体积)Tween20的50mM、pH4.7的醋酸钠缓冲液反复洗涤磁颗粒,并将抗体偶联磁颗粒转移至含1%(质量/体积)PVP、1%(质量/体积)BSA、0.5%(体积/体积)Tween20、5%(质量/体积)蔗糖的50mM pH8.5硼酸缓冲液中保存,置于4°C备用。

[0030] D、结合垫的喷涂:使用BioDot喷膜仪将一定比例稀释过的抗体偶联磁颗粒以 $20\mu\text{l}/\text{cm}$ 的量均匀喷涂于0.9cm宽的结合垫上,4-25°C干燥备用。

[0031] E、试纸条的组装及切割:将2.5cm包被有抗体的硝酸纤维素膜,0.8cm喷涂有抗体偶联磁颗粒的结合垫,2.2cm样品垫,2.9cm吸收垫组装于9.8cm宽底板上,并将组装好的试纸板切成0.5cm宽的成品试纸条,如图1所示。

[0032] F、检测卡的组装:所述的组装好的试纸条置于塑料底卡的卡槽内,盖上上盖,使用压卡器将上下卡压紧,确保试纸条位置固定且处于紧绷状态如图2,放入铝箔袋中抽真空封存备用。

[0033] G、检测卡的使用方法:

[0034] 1、处理样品:将待测样品用层析缓冲液溶解或稀释;

[0035] 2、加样:取出单人份的检测卡,用微量移液器取 $100\mu\text{l}$ 样品加入检测卡表面的加样孔内,等待反应进行20分钟;

[0036] 3、测量:将检测卡插入磁性分析仪,运行后仪器会自行读取检测卡上的信息。层析缓冲液配方为:0.01M PBS,0.1% Tween20,0.5% BSA, pH7.5(pH7.2-7.6均适用)。

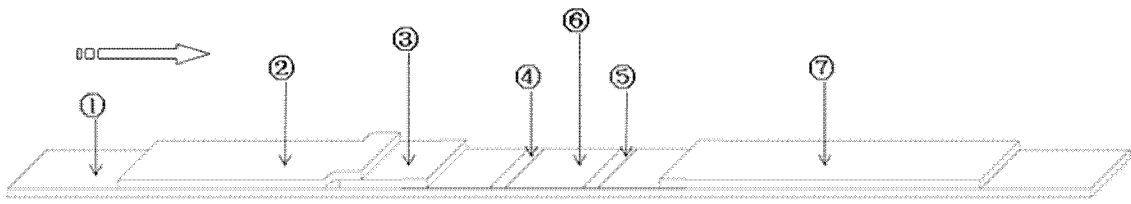


图 1

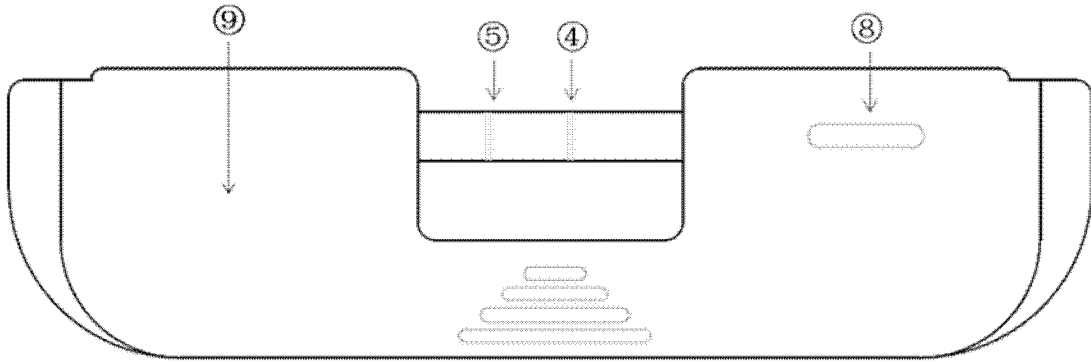


图 2

专利名称(译)	一种定量检测炭疽芽孢的磁性免疫层析试纸条及制备方法		
公开(公告)号	CN102353776A	公开(公告)日	2012-02-15
申请号	CN201110151215.X	申请日	2011-06-07
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学院武汉病毒研究所		
申请(专利权)人(译)	中国科学院武汉病毒研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学院武汉病毒研究所		
[标]发明人	张先恩 王殿冰 田博 危宏平 张治平		
发明人	张先恩 王殿冰 田博 危宏平 张治平		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531		
代理人(译)	王敏锋		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种定量检测样品中炭疽芽孢的磁性免疫层析试纸条及制备方法，硝酸纤维素膜上预包被有炭疽芽孢检测线和质控线，粘贴于底板上的第一层为硝酸纤维素膜，硝酸纤维素膜靠近检测线的一端粘贴有结合垫，另一端粘贴有吸收垫，结合垫远离硝酸纤维素膜的一端上粘贴有样品垫，三层之间相互交错，试纸条装入卡板中，通过卡板的加样孔加入样品。其步骤是：A、抗体的制备；B、抗体偶联超顺磁颗粒的制备；C、将制备好的抗体偶联磁颗粒使用定量喷液于结合垫上；D、硝酸纤维素膜的包被；E、试纸条的组装。简单可靠，操作简易，方便实用。检测下限可达103个芽孢；方便快捷，20分钟可进行信号读取，适合现场检测；信号稳定性好，便于长期保存。

