



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103293295 A

(43) 申请公布日 2013. 09. 11

(21) 申请号 201310165906. 4

(22) 申请日 2013. 05. 07

(71) 申请人 上海爱纳玛斯医药科技有限公司
地址 200433 上海市杨浦区营口路 825 号 4 楼 407 室

(72) 发明人 崔正权

(74) 专利代理机构 上海智信专利代理有限公司
31002
代理人 薛琦 沈利

(51) Int. Cl.
G01N 33/531 (2006. 01)
G01N 33/576 (2006. 01)

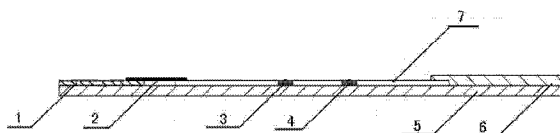
权利要求书2页 说明书11页 附图2页

(54) 发明名称

检测 HBV 的磁性生物探针、试纸条及其制备和使用方法

(57) 摘要

本发明公开了用于 HBV 检测的磁性纳米颗粒生物探针、试纸条及其制备和使用方法。该生物探针的制备方法为：对粒径为 50-300nm 的磁性纳米颗粒进行表面氨基化处理，再进行羧基化处理，在缓冲液中将表面羧基化的磁性纳米颗粒、碳化二亚胺和 N- 羟基琥珀酰亚胺混合反应，洗涤，得反应物 A；在偶联缓冲液中将反应物 A 和 HBV 标记物的抗体混合反应，得反应物 B；将反应物 B 与含氨基的化合物的溶液混合反应，洗涤，即得。该生物探针特异性强，信号灵敏且稳定性好，根据所选择的靶向标记物及其配套的抗体，适用于多种乙肝标记物的检测。该试纸条可经肉眼观察和 MAR 检测得到的磁信号进行二次判定，能够大大减少人为误差，准确性高。



1. 一种用于 HBV 检测的磁性纳米颗粒生物探针的制备方法,其包括下述步骤:(1)对粒径为 50-300nm 的磁性纳米颗粒进行表面氨基化处理,得表面氨基化的磁性纳米颗粒;对所述表面氨基化的磁性纳米颗粒进行羧基化处理,得表面羧基化的磁性纳米颗粒;(2)在缓冲液中将所述表面羧基化的磁性纳米颗粒、碳化二亚胺和 N- 羟基琥珀酰亚胺混合反应,反应后洗涤,得反应物 A;(3)在偶联缓冲液中将所述反应物 A 和 HBV 标记物的抗体混合反应,得反应物 B;(4)将所述反应物 B 与含氨基的化合物的溶液混合反应,反应后洗涤,即得。

2. 如权利要求 1 所述的制备方法,其特征在于,步骤(1)中,所述磁性纳米颗粒的比饱和磁化强度在 25-45emu/g;和/或,步骤(1)中,所述的磁性纳米颗粒为具有核壳结构的磁性粒子/氧化硅复合材料,所述的磁性纳米颗粒的内核为磁性粒子,所述的磁性纳米颗粒的壳层为氧化硅;和/或,步骤(1)中,所述表面羧基化的磁性纳米颗粒中的羧基含量为 0.35mmol/g 以上;

和/或,步骤(1)中,所述的磁性纳米颗粒采用下述方法制得:

1) 用溶剂热法制备磁性粒子:将无机铁盐、尿素、稳定剂和乙二醇混合,于 180-220℃ 下反应 8-24 小时,洗涤,即得磁性粒子;所述的稳定剂为柠檬酸钠或者聚丙烯酸;

2) 氧化硅包被磁性粒子:将所述磁性粒子和 0.8-1.2mol/L 的强酸溶液混合,超声 10-40 分钟,在磁分离的辅助下用去离子水洗涤 5-7 次,得活化后的磁性粒子;将所述活化后的磁性粒子和醇水混合液混合,在搅拌状态下加入碱和正硅酸烷基酯,所述正硅酸烷基酯的用量为 20-500 μL/100mg 所述磁性粒子,所述的碱使混合后体系的 pH 值在 8.0-10.5,反应 8-24 小时,在磁分离的辅助下用醇洗涤 3-5 次,即得;其中,醇水混合液中的醇水比例为 60:40-90:10。

3. 如权利要求 2 所述的制备方法,其特征在于,步骤(1)中,所述的磁性粒子为铁氧化物;所述磁性粒子/氧化硅复合材料的壳层的厚度为 5-50nm;和/或,步骤(1)中,所述表面羧基化的磁性纳米颗粒中的羧基含量为 0.35-5.0mmol/g。

4. 如权利要求 1 所述的制备方法,其特征在于,步骤(1)中,所述的表面氨基化处理采用硅烷偶联剂进行;和/或,步骤(1)中,所述表面羧基化处理采用酸酐进行;和/或,步骤(2)中,在所述的混合前还用缓冲液洗涤 2-3 次,再用缓冲液使所述表面羧基化的磁性纳米颗粒重悬;和/或,步骤(2)中,所述缓冲液的 pH 值为 4.5-5.5;和/或,步骤(2)中,所述的缓冲液为含 0.05-1.5v% 吐温的 2-(N-吗啉代)乙磺酸溶液;和/或,步骤(2)中,所述碳化二亚胺的用量为 1.2-1.4 μmol/1mg 所述表面羧基化的磁性纳米颗粒,所述 N-羟基琥珀酰亚胺的用量为 1.2-1.4 μmol/1mg 所述表面羧基化的磁性纳米颗粒;和/或,步骤(2)中,所述反应的时间为 30-60min;和/或,步骤(2)中,在所述反应后,所述的洗涤按下述操作进行:用含 0.05-1.5v% 的吐温-20 的 2-(N-吗啉代)乙磺酸溶液洗涤 2 次后,再用硼酸盐吐温溶液洗涤 2 次;和/或,步骤(3)中,所述的 HBV 标记物为 HBV 表面抗原、HBV 核心抗原、HBV 前 S1 抗原或 HBV e 抗原,所述的抗体是单抗和/或多抗;和/或,步骤(3)中,所述偶联缓冲液的 pH 值为 8.8-9.2;和/或,步骤(3)中,所述的偶联缓冲液为硼酸盐吐温溶液;和/或,步骤(3)中,所述反应的时间为 2-4 小时;和/或,步骤(4)中,所述含氨基的化合物的溶液为牛血清白蛋白溶液、Tris 缓冲液、甘氨酸溶液和多肽溶液中的一种或多种;和/或,步骤(4)中,所述反应的时间为 30-60min;和/或,步骤(4)中,所述的洗涤按下述操作进行:用硼酸盐吐温溶液洗涤 2-4 次。

5. 如权利要求 4 所述的制备方法,其特征在于,步骤(1)中,所述的表面氨基化处理按照下述操作进行:将所述的磁性纳米颗粒与醇水混合液混合,调节 pH 值至 8.0-11.0,得混合液 C;再将所述混合液 C 与氨丙基三乙氧基硅烷混合,所述氨丙基三乙氧基硅烷的用量为 15-50 μ L/15mg 所述磁性纳米颗粒,搅拌 1-3 小时后,于 60-85 $^{\circ}$ C 下继续搅拌 2-4h,洗涤后即得表面氨基化的磁性纳米颗粒;

和/或,步骤(1)中,所述的表面羧基化处理按照下述操作进行:将所述表面氨基化的磁性纳米颗粒、丁二酸酐和溶剂混合,所述丁二酸酐的用量为 20-60mg/100mg 所述表面氨基化的磁性纳米颗粒,所述的溶剂为 N,N-二甲基甲酰胺和/或二甲亚砜,反应 12-36 小时,反应后洗涤,即得表面羧基化的磁性纳米颗粒;

和/或,步骤(2)中,所述碳化二亚胺和所述 N-羟基琥珀酰亚胺的摩尔比为 1:0.9-0.9:1;

和/或,步骤(2)中,在所述的混合前,所述洗涤时用的所述缓冲液为含 0.05-1.5v% 吐温的 2-(N-吗啉代)乙磺酸溶液,所述重悬后体系的 pH 值为 4.5-5.5;

和/或,步骤(2)中,在所述的反应后,所述洗涤时用的所述含 0.05-1.5v% 的吐温-20 的 2-(N-吗啉代)乙磺酸溶液的 pH 值为 4.5-5.5。

6. 一种由权利要求 1-5 任一项所述的制备方法制得的用于 HBV 检测的磁性纳米颗粒生物探针。

7. 一种用于 HBV 检测的磁性免疫层析试纸条,其包括一样品垫、一结合垫、一层析膜、一吸水垫和一底板,所述的结合垫上喷点有如权利要求 6 所述的用于 HBV 检测的磁性纳米颗粒生物探针,所述的层析膜上有一检测线和一质控线,所述的样品垫、所述的结合垫、所述的层析膜和所述吸水垫依次衔接于所述的底板上,所述的检测线位于靠近所述结合垫的一侧,所述的质控线位于靠近所述吸水垫的一侧,所述的检测线含有 HBV 标记物的抗体,所述的质控线含有 IgG 二抗;所述的用于 HBV 检测的磁性纳米颗粒生物探针上的 HBV 标记物的抗体和所述的检测线含有的 HBV 标记物的抗体不为相同的单抗。

8. 如权利要求 7 所述的用于 HBV 检测的磁性免疫层析试纸条,其特征在于,所述的用于 HBV 检测的磁性纳米颗粒生物探针的含量为 4-12 μ g;和/或,其中,所述的层析膜为硝酸纤维素膜;和/或,所述的 HBV 标记物为 HBV 表面抗原、HBV 核心抗原、HBV 前 S1 抗原或 HBV e 抗原,所述的 HBV 标记物的抗体是单抗和/或多抗。

9. 一种如权利要求 7 或 8 所述的用于 HBV 检测的磁性免疫层析试纸条的制备方法,其包括下述步骤:将如权利要求 6 所述的用于 HBV 检测的磁性纳米颗粒生物探针喷点于所述的结合垫上,将所述的 HBV 标记物的抗体固定于所述的检测线上,将所述的 IgG 二抗固定于所述的质控线上,将所述的样品垫、所述的结合垫、所述的层析膜和所述吸水垫依次衔接在所述的底板上,并使所述的检测线位于靠近所述结合垫的一侧,使所述的质控线位于靠近所述吸水垫的一侧,即得。

10. 一种如权利要求 7 或 8 所述的用于 HBV 检测的磁性免疫层析试纸条的使用方法,其包括下述步骤:将样本于所述的样品垫处加入,静置 5-15min 后,观察所述检测线和所述质控线处的颜色;在静置 35min 后,用磁性分析仪检测所述的用于 HBV 检测的磁性免疫层析试纸条在所述检测线和所述质控线处的磁信号值,即可。

检测 HBV 的磁性生物探针、试纸条及其制备和使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术与纳米材料技术领域,尤其涉及一种用于乙型肝炎病毒检测的磁性纳米颗粒生物探针、磁性免疫层析试纸条及其制备方法和使用方法。

背景技术

[0002] 乙型病毒性肝炎,简称乙肝,是一种由乙型肝炎病毒(简称 HBV)感染机体后所引起的疾病。乙型肝炎病毒是一种嗜肝病毒,主要存在于肝细胞内并损害肝细胞,引起肝细胞炎症、坏死、纤维化。据世界性卫生组织报道,全球约 20 亿人曾感染过 HBV,其中 3.5 亿人为慢性感染者,每年约有 100 万人死于 HBV 感染所致肝肝衰竭、肝硬化和原发性肝癌(HCC)。我国于 2006 年进行的乙型肝炎流行病毒调查结果表明,我国 1-59 岁人群乙肝表面抗原携带率为 7.18%,5 岁以下儿童的 HBsAg 携带率仅为 0.96%,据此推算,我国现有的慢性 HBV 感染者约 9300 万人,其中有症状需要治疗的活动性乙型肝炎患者约为 2000 多万。

[0003] 乙型肝炎是我国当前流行最为广泛、危害性最严重的重大传染病,HBV 携带者有 1.3 亿以上,其中 10% 以上转为慢性肝炎,部分演变为肝硬化,进而引发肝癌。因此,对 HBV 在体内是否有复制的准确判断及抗病毒治疗后的准确监测就显得特别重要。

[0004] 乙肝核心抗原(HBcAg)存在于乙肝病毒颗粒中,而不是以游离状态存在于血液中,是乙肝病毒活动的直接指标。但长期以来,临床医生是根据“两对半”五种试剂盒检验结果判断乙肝患者的病情,根据 HBV-DNA PCR 荧光定量试剂盒对血清乙肝病毒 DNA 测定了解药物疗效。但“两对半”试剂不能很好的反映乙肝病毒的存在状况,不能定量。

[0005] HBV-DNA 定量 PCR 检测是目前 HBV 诊断的金标准,但是该技术对实验操作人员的技术要求高以及实验成本高、耗时长(一般需要 3 天以上才能得到检测结果),使其在所有医院的推广使用受到了限制,而 HBV 核心抗原和前 S1 抗原都出现在急性 HBV 感染的最早期,目前被认为是乙肝病毒存在和复制的标志,而且与 HBV-DNA 复制水平高度正相关,因此 HBV 核心抗原和前 S1 抗原的联合检测可以相互补充,对于乙型肝炎诊断、治疗和预后等方面具有重要的临床指导意义。

[0006] 磁性纳米材料是以具有超顺磁性的铁氧化物(多为四氧化三铁)为内核,以氧化硅为壳层,当该铁氧化物颗粒体积减小到某一数值时,热扰动能将总的磁晶各向异性性能相当,这样,颗粒内的磁矩方向就可能随着时间的推移,整体保持平行地在一个易磁化方向和另一个易磁化方向之间反复变化。从单畴颗粒集合体看,就具有超顺磁性。在单畴颗粒集合体出现超顺磁性的温度范围内,分别在不同的温度下测量其磁化曲线,这些磁化曲线必定是重合在一起的。且不会出现磁滞,即集合体的剩磁和矫顽力都为零。这种超顺磁性也是磁性纳米材料的生物医学应用的基本保障。

发明内容

[0007] 本发明所解决的技术问题在于克服了“两对半”试剂不能很好的反映乙肝病毒的存在状况,不能定量检测 HBV,而 HBV-DNA 定量 PCR 检测实验成本高、耗时长缺陷,提供一

种用于乙型肝炎病毒检测的磁性纳米颗粒生物探针及其制备方法,以及一种用于 HBV 检测的磁性免疫层析试纸条及其制备方法和使用方法。本发明的磁性纳米颗粒生物探针特异性强,信号灵敏且稳定性好。本发明的磁性免疫层析试纸条既可以实现对乙肝单一标记物的检测,也可以实现对乙肝多种标记物的检测,并且能够通过定量的磁信号实现快速检测 HBV。

[0008] 本发明通过以下技术方案解决上述技术问题。

[0009] 本发明提供了一种用于 HBV 检测的磁性纳米颗粒生物探针的制备方法,其包括下述步骤:(1)对粒径为 50-300nm 的磁性纳米颗粒进行表面氨基化处理,得表面氨基化的磁性纳米颗粒;对所述表面氨基化的磁性纳米颗粒进行羧基化处理,得表面羧基化的磁性纳米颗粒;(2)在缓冲液中将所述表面羧基化的磁性纳米颗粒、碳化二亚胺(EDC,又称碳二亚胺)和 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)混合反应,反应后洗涤,得反应物 A;(3)在偶联缓冲液中将所述反应物 A 和 HBV 标记物的抗体混合反应,得反应物 B;(4)将所述反应物 B 与含氨基的化合物的溶液混合反应,反应后洗涤,即得。

[0010] 步骤(1)中,所述的磁性纳米颗粒可为纳米材料领域中常规的磁性纳米颗粒。所述的磁性纳米颗粒具有超顺磁性。所述磁性纳米颗粒的比饱和磁化强度较佳地在 25-45emu/g。所述的磁性纳米颗粒较佳地为具有核壳结构的磁性粒子/氧化硅复合材料,即:所述的磁性纳米颗粒的内核为磁性粒子,所述的磁性纳米颗粒的壳层为氧化硅。所述的磁性粒子较佳地为铁氧化物,如四氧化三铁。所述磁性粒子/氧化硅复合材料的壳层的厚度较佳地为 5-50nm。

[0011] 其中,所述的磁性粒子可按现有文献制备,例如:Magnetite Nanocrystal Clusters with Ultra-High Sensitivity in Magnetic Resonance Imaging (Fangjie Xu, Changming Cheng, Du-Xing Chen, Hongchen Gu, Chemphyschem, 2012, 13, 336-341)。所述的磁性粒子/氧化硅复合材料可按现有文献制备,例如:Synthesis of Magnetic Microspheres with Immobilized Metal Ions for Enrichment and Direct Determination of Phosphopeptides by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry(Xiuqing Xu, Chunhui Deng, Mingxia Gao, Wenjia Yu, Pengyuan Yang, and Xiangmin Zhang, Advanced Materials, 2006, 18, 3289-3293.)。

[0012] 本发明中,所述的磁性纳米颗粒优选采用下述方法制得:

[0013] 1)用溶剂热法制备磁性粒子:将无机铁盐、稳定剂和乙二醇混合,于 180-220℃下反应 8-24 小时,洗涤,即得磁性粒子;所述的稳定剂为柠檬酸钠或聚丙烯酸(PAA);其中,所述的洗涤较佳地是在磁分离的辅助下用乙醇和/或去离子水洗涤多次;其中,所述的溶剂热法为本领域常规的制备磁性粒子的方法;按本领域常识,所述的反应在弱碱性条件下进行,当所述的稳定剂为聚丙烯酸时,在所述的混合时较佳地还添加尿素以控制反应体系的 pH 值;

[0014] 2)氧化硅包被磁性粒子:将所述磁性粒子和 0.8-1.2mol/L 的强酸溶液混合,超声 10-40 分钟,在磁分离的辅助下用去离子水洗涤 5-7 次,得活化后的磁性粒子;将所述活化后的磁性粒子和醇水混合液混合,在搅拌状态下加入碱和正硅酸烷基酯,所述正硅酸烷基酯的用量为 20-500 μL/100mg 所述磁性粒子,所述的碱使混合后体系的 pH 值在 8.0-10.5,反应 8-24 小时,在磁分离的辅助下用醇洗涤 3-5 次,即得;所述醇水混合液中的醇水比例为

60:40-90:10。其中,所述的强酸为本领域常规使用的酸,一般为盐酸;其中,所述的碱为本领域常规使用的碱,较佳地为 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$;所述的醇水混合液中的醇可为本领域常规使用的任意醇;所述的醇可为本领域常规使用的醇,较佳地为乙醇。按本领域常识,所述的正硅酸烷基酯可以分多批添加,例如,可以在反应初期加入部分,在反应一段时间后加入剩余部分。

[0015] 步骤(1)中,所述的表面氨基化处理的方法和条件为本领域常规的方法和条件。所述的表面氨基化处理较佳地采用硅烷偶联剂进行。本发明中,所述的表面氨基化处理优选按照下述操作进行:将所述的磁性纳米颗粒与醇水混合液混合,调节 pH 值至 8.0-11.0,得混合液 C;再将所述混合液 C 与氨丙基三乙氧基硅烷(APTES)混合,所述氨丙基三乙氧基硅烷的用量为 15-50 μL /15mg 所述磁性纳米颗粒,搅拌 1-3 小时后,于 60-85 $^{\circ}\text{C}$ 下继续搅拌 2-4h,洗涤后即得表面氨基化的磁性纳米颗粒。其中,所述醇水混合液可为本领域常规使用的醇水混合液,所述醇水混合液中的醇含量较佳地为 60-90v%。所述醇水混合液中的醇较佳地为乙醇。所述调节 pH 值较佳地采用氨水进行。

[0016] 步骤(1)中,所述的表面羧基化处理的方法和条件为本领域常规的方法和条件。所述表面羧基化处理较佳地采用酸酐进行。本发明中,所述的表面羧基化处理优选按照下述操作进行:将所述表面氨基化的磁性纳米颗粒、丁二酸酐和溶剂混合,所述丁二酸酐的用量为 20-60mg/100mg 所述表面氨基化的磁性纳米颗粒,所述的溶剂为 N,N-二甲基甲酰胺和/或二甲亚砜,反应 12-36 小时,反应后洗涤,即得表面羧基化的磁性纳米颗粒。本发明中,所述表面羧基化的磁性纳米颗粒中的羧基含量较佳地为 0.35mmol/g 以上,更佳地为 0.35-5.0mmol/g。

[0017] 步骤(2)中,在所述的混合前较佳地还用缓冲液洗涤 2-3 次,再用缓冲液使所述表面羧基化的磁性纳米颗粒重悬。所述重悬的方法和条件为本领域常规的方法和条件,一般是为了使颗粒在液体中形成胶体溶液。在所述的混合前,所述洗涤时用的所述的缓冲液较佳地为含 0.05-1.5v% 吐温的 2-(N-吗啉代)乙磺酸溶液(简称 MEST 溶液)。所述重悬后体系的 pH 值较佳地为 4.5-5.5。

[0018] 步骤(2)中,所述的缓冲液可为本领域常规使用的缓冲液。所述缓冲液的 pH 值较佳地为 4.5-5.5。所述的缓冲液较佳地为含 0.05-1.5v% 吐温的 2-(N-吗啉代)乙磺酸溶液(简称 MEST 溶液)。

[0019] 步骤(2)中,所述 EDC 的用量较佳地为 1.2-1.4 μmol /1mg 所述表面羧基化的磁性纳米颗粒,更佳地为 1.25 μmol /1mg 所述表面羧基化的磁性纳米颗粒。所述 NHS 的用量较佳地为 1.2-1.4 μmol /1mg 所述表面羧基化的磁性纳米颗粒,更佳地为 1.25 μmol /1mg 所述表面羧基化的磁性纳米颗粒。所述 EDC 和所述 NHS 的摩尔比较佳地为 1:0.9-0.9:1。

[0020] 步骤(2)中,所述的反应以反应完全为准。所述反应的时间较佳地为 30-60min。

[0021] 步骤(2)中,在所述的反应后,所述洗涤的方法和条件为本领域常规的方法和条件。所述的洗涤优选按下述操作进行:用含 0.05-1.5v% 的吐温-20 的 MEST 溶液洗涤 2 次后,再用硼酸盐吐温溶液(简称 BST 溶液)洗涤 2 次。其中,所述的 MEST 溶液的 pH 值较佳地为 4.5-5.5。

[0022] 步骤(3)中,所述的 HBV 标记物的抗体可为生物学领域常规使用的 HBV 标记物的抗体。所述的 HBV 标记物较佳地为 HBV 表面抗原、HBV 核心抗原、HBV 前 S1 抗原或 HBV e 抗原。所述的抗体可以是单克隆抗体(简称单抗)和/或多克隆抗体(简称多抗)。按照本领域

常识,所述 HBV 标记物的抗体的用量相对于所述反应物 A 是饱和的或者是过量的。

[0023] 步骤(3)中,所述的偶联缓冲液可为本领域常规使用的偶联缓冲液。所述偶联缓冲液的 pH 值较佳地为 8.8-9.2,更佳地为 9.0。所述的偶联缓冲液较佳地为 BST 溶液。

[0024] 步骤(3)中,所述的反应以反应完全为准。所述反应的时间较佳地为 2-4 小时。

[0025] 步骤(4)中,所述含氨基的化合物的溶液可为生物学领域中常规使用的含有氨基的物质的溶液,较佳地为牛血清白蛋白溶液(BSA 溶液)、Tris 缓冲液、甘氨酸溶液和多肽溶液中的一种或多种。

[0026] 步骤(4)中,所述的反应以反应完全为准。所述反应的时间较佳地为 30-60min。

[0027] 步骤(4)中,所述洗涤的方法和条件为本领域常规的方法和条件。所述的洗涤优选按下述操作进行:用 BST 溶液洗涤 2-4 次。

[0028] 本发明还提供了一种由上述制备方法制得的用于乙型肝炎病毒检测的磁性纳米颗粒生物探针,其为一种表面连接有 HBV 标记物的抗体的磁性纳米颗粒。

[0029] 本发明中,所述的用于乙型肝炎病毒检测的磁性纳米颗粒生物探针需要在保存液中重悬,于 2-8°C 下储存。所述的保存液一般可采用所述步骤(4)中所使用的洗涤液。

[0030] 本发明还提供了一种用于 HBV 检测的磁性免疫层析试纸条,其包括一样品垫、一结合垫、一层析膜、一吸水垫和一底板,所述的结合垫上喷点有所述的用于 HBV 检测的磁性纳米颗粒生物探针,所述的层析膜上有一检测线(简称 T 线)和一质控线(简称 C 线),所述的样品垫、所述的结合垫、所述的层析膜和所述吸水垫依次衔接于所述的底板上,所述的 T 线位于靠近所述结合垫的一侧,所述的 C 线位于靠近所述吸水垫的一侧,所述的 T 线含有 HBV 标记物的抗体,所述的 C 线含有 IgG 二抗;所述的用于 HBV 检测的磁性纳米颗粒生物探针上的 HBV 标记物的抗体和所述的检测线含有的 HBV 标记物的抗体不为相同的单抗。

[0031] 其中,所述的用于乙型肝炎病毒检测的磁性纳米颗粒生物探针的含量较佳地为 4-12 μ g。

[0032] 其中,所述的层析膜可为本领域常规使用的层析膜,较佳地为硝酸纤维素膜。

[0033] 其中,所述的 HBV 标记物的抗体可为生物学领域常规使用的 HBV 标记物的抗体。所述的 HBV 标记物较佳地为 HBV 表面抗原、HBV 核心抗原、HBV 前 S1 抗原或 HBV e 抗原。所述的 HBV 标记物的抗体可以是单抗和/或多抗;按照本领域常识,当所述的用于 HBV 检测的磁性纳米颗粒生物探针上的 HBV 标记物的抗体和所述的 T 线含有的 HBV 标记物的抗体均为单抗时,该两种单抗不相同,其应当为针对 HBV 有特异性反应的不同抗原表位的单抗。

[0034] 其中,所述的 IgG 二抗为本领域常规使用的 IgG 二抗,较佳地为羊抗鼠 IgG 二抗或兔抗鼠 IgG 二抗。

[0035] 其中,所述的衔接为本领域常规意义上的衔接,按本领域常识,所述的样品垫和所述的结合垫,所述的结合垫和所述的层析膜,以及所述的层析膜和所述的吸水垫的衔接处一般有 1mm 左右的叠合。

[0036] 按本领域常识,所述的 T 线和所述的 C 线之间有一定间距,所述的间距范围为本领域常规的间距范围,一般在 0.8cm 左右。

[0037] 本发明的用于 HBV 检测的磁性免疫层析试纸条的规格可为磁性免疫层析领域中常规的规格,能够适用于磁性分析仪(MAR)进行读卡分析即可。所述的用于 HBV 检测的磁性免疫层析试纸条的宽度一般在 0.5cm 左右。

[0038] 本发明还提供了一种所述用于 HBV 检测的磁性免疫层析试纸条的制备方法,其包括下述步骤:将所述的用于 HBV 检测的磁性纳米颗粒生物探针喷点于所述的结合垫上,将所述的 HBV 标记物的抗体固定于所述的 T 线上,将所述的 IgG 二抗固定于所述的 C 线上,将所述的样品垫、所述的结合垫、所述的层析膜和所述吸水垫依次衔接在所述的底板上,并使所述的 T 线位于靠近所述结合垫的一侧,使所述的 C 线位于靠近所述吸水垫的一侧,即得。

[0039] 其中,所述的用于 HBV 检测的磁性纳米颗粒生物探针的用量较佳地为 4-12 μg 。

[0040] 其中,所述的用于 HBV 检测的磁性纳米颗粒生物探针在喷点前较佳地还进行重悬的步骤。所述的重悬较佳地采用层析缓冲液进行。所述的层析缓冲液可为本领域常规使用的层析缓冲液,较佳地为含有 0.1-1wt% 的 BSA、0.05-0.5v% 的 Tween-20 和 0.02-0.2wt% 的蔗糖的硼酸盐缓冲液或含有 0.1-1wt% 的 BSA、0.05-0.5v% 的 Tween-20 和 0.02-0.2wt% 的蔗糖的磷酸盐缓冲液。所述的层析缓冲液的 pH 值较佳地为 6.5-9.0。

[0041] 其中,所述喷点的方法和条件可为本领域常规的方法和条件。

[0042] 其中,所述固定的方法和条件可为本领域常规的方法和条件,一般可用点膜仪进行。对于所述 HBV 标记物的抗体的固定较佳地按下述操作进行:用点膜仪以 0.75-0.85 $\mu\text{L}/\text{cm}$ 的速度将浓度为 0.5-2mg/mL 的所述 HBV 标记物的抗体的溶液喷点在所述 T 线上。对于所述 IgG 二抗的固定较佳地按下述操作进行:用点膜仪以 0.75-0.85 $\mu\text{L}/\text{cm}$ 的速度将浓度为 1-2mg/mL 的所述 IgG 二抗的溶液喷点在所述 C 线上。

[0043] 其中,所述的衔接为本领域常规意义上的衔接,按本领域常识,所述的样品垫和所述的结合垫,所述的结合垫和所述的层析膜,以及所述的层析膜和所述的吸水垫的衔接处一般有 1mm 左右的叠合。

[0044] 本发明中,所制得的用于 HBV 检测的磁性免疫层析试纸条可以根据实际情况,在后续使用时进行裁剪,以适用于磁性分析仪(MAR)进行读卡分析。

[0045] 本发明还提供了所述用于 HBV 检测的磁性免疫层析试纸条的使用方法,其包括下述步骤:将样本于所述的样品垫处加入,静置 5-15min 后,观察所述 T 线和所述 C 线处的颜色;在静置 35min 后,用磁性分析仪检测所述的用于 HBV 检测的磁性免疫层析试纸条在所述 T 线和所述 C 线处的磁信号值,即可。

[0046] 其中,所述的磁性分析仪(MAR)可为本领域常规使用的磁性分析仪。

[0047] 按本领域常识,所述 T 线和所述 C 线处的颜色变化和判断标准如下:以肉眼观察,若 T 线和 C 线处有两条明显的条带或者 T 线的条带浅于 C 线条带,则样本为阳性;若仅 C 线处出现一条条带, T 线处无条带,则样本为阴性。检测时若 C 线处无条带,则试纸条体系有问题,其检测结果视为无效。

[0048] 本发明中,将测得的样本在所述 T 线 3 处的定量磁信号与一阴性样本在所述 T 线 3 处的定量磁信号进行比较,也可对检测结果进行评价, $T_{\text{样本}}/T_{\text{阴}} \geq 2.1$ 的样品其结果视为阳性, $T_{\text{样本}}/T_{\text{阴}} < 2.1$ 的样品其结果视为阴性。

[0049] 在符合本领域常识的基础上,上述各优选条件,可任意组合,即得本发明各较佳实例。

[0050] 本发明所用试剂和原料均市售可得。

[0051] 本发明的积极进步效果在于:

[0052] 本发明以表面修饰有羧基的磁性纳米颗粒为载体,通过 EDC 和 NHS 将乙肝标记物

的抗体连接到颗粒表面建立了乙肝的磁性纳米颗粒生物探针制备方法。并以此生物探针为标记物,以靶向标记物的抗体为捕获抗体,建立了三明治夹心式免疫层析检测体系。本发明的磁性纳米颗粒生物探针特异性强,信号灵敏且稳定性好,根据所选择的靶向标记物及其配套的抗体,可适用于多种乙肝标记物的检测,也适用于乙肝的高通量检测方法研究和产品开发。本发明的磁性免疫层析试纸条一方面可通过肉眼观察实现乙肝的快速定性检测,另一方面通过所捕获探针的定量磁信号实现乙肝病毒的快速检测。并且,在使用所述用于 HBV 检测的磁性免疫层析试纸条时可以通过肉眼观察和 MAR 检测得到的磁信号进行二次判定,能够大大减少人为误差,准确性高。

附图说明

[0053] 图 1 为实施例 1 的磁性纳米颗粒的 TEM 照片。

[0054] 图 2 为实施例 1 的磁性纳米颗粒的磁滞曲线。

[0055] 图 3 为本发明的用于 HBV 检测的磁性免疫层析试纸条的结构示意图。

[0056] 图 4 为采用本发明的用于 HBV 检测的磁性免疫层析试纸条对 HBV 阳性血清标准品的检测结果(磁信号值)与 ELISA 法的检测结果(OD 值)的对比。

[0057] 图 5 为采用本发明的用于 HBV 检测的磁性免疫层析试纸条对 HBV 阳性血清标准品的定性检测图片。其中,1-8 分别代表浓度由高到低的 HBV 阳性血清标准品的系列稀释样品。

具体实施方式

[0058] 下面通过实施例的方式进一步说明本发明,但并不因此将本发明限制在所述的实施例范围之中。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,按照常规方法和条件,或按照商品说明书选择。

[0059] 下述实施例中,所制得的或采用的磁性纳米颗粒的粒径均在 50-300nm 的范围内。

[0060] 实施例 1 磁性纳米颗粒

[0061] 磁性纳米颗粒的制备方法,其包括下述步骤:

[0062] 1) 用溶剂热法制备磁性粒子:将 0.85g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和 0.4033g PAA 分别溶解在 40ml 乙二醇中,再加入尿素 1.2g 溶解,混合后加入带四氟乙烯内胆的不锈钢反应釜中,旋紧反应釜,在 220℃ 下加热反应 16h 后,在磁分离辅助下,用乙醇和去离子水各洗涤 3 次,得到平均粒径为 90nm 的磁性粒子;

[0063] 2) 氧化硅包被磁性粒子:将 90mg 磁性粒子和 1.0mol/L 的盐酸溶液混合,超声 30 分钟,在磁分离辅助下,用去离子水洗涤 5 次,然后将磁性粒子与醇水体积比为 70:30 的醇水混合液 125mL 混合,在搅拌下加入正硅酸乙酯 200 μL 和氨水 2.1mL,反应 18 小时,在磁分离的辅助下用乙醇洗涤 3 次,真空干燥,即得。

[0064] 该些磁性纳米颗粒为具有核壳结构的磁性粒子/氧化硅复合材料,其内核为磁性粒子,其壳层为氧化硅。磁性纳米颗粒的 TEM 照片见图 1,其平均粒径为 100nm,比饱和磁化强度为 29.2emu/g (见图 2)。

[0065] 实施例 2 磁性纳米颗粒

[0066] 磁性纳米颗粒的制备方法,其包括下述步骤:

[0067] 1)用溶剂热法制备磁性粒子:将 0.81g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和 2.66g 柠檬酸钠分别溶解在 30ml 乙二醇中,混合后加入带四氟乙烯内胆的不锈钢反应釜中,旋紧反应釜,在 200℃ 下加热反应 24h 后,在磁分离辅助下,用乙醇和去离子水各洗涤 3 次,得到平均粒径为 250nm 的磁性粒子;

[0068] 2)氧化硅包被磁性粒子:将 110mg 磁性粒子和 1.0mol/L 的盐酸溶液混合,超声 15 分钟,在磁分离辅助下,用去离子水洗涤 7 次,然后将磁性粒子与醇水体积比为 90:10 的醇水混合液 125mL 混合,在搅拌下加入正硅酸乙酯 100 μL 和氨水 2.1mL,反应 12 小时,然后再加入 80 μL 的正硅酸乙酯,继续反应 12 小时,在磁分离的辅助下用乙醇洗涤 3 次,真空干燥,即得。

[0069] 这些磁性纳米颗粒为具有核壳结构的磁性粒子/氧化硅复合材料,其内核为磁性粒子,其壳层为氧化硅。这些磁性纳米颗粒的平均粒径为 280nm,比饱和磁化强度为 42emu/g,氧化硅壳层的平均厚度为 15nm。

[0070] 实施例 3 用于 HBV 检测的磁性纳米颗粒生物探针

[0071] 用于 HBV 检测的磁性纳米颗粒生物探针的制备方法,其包括下述步骤:

[0072] (1)在 50g 醇水体积比为 70:30 的乙醇水溶液中加入 15mg 实施例 1 或 2 所制得的磁性纳米颗粒,加入 50 μL 氨水和 35 μL 氨丙基三乙氧基硅烷,常温下搅拌 2h,于 70℃ 水浴条件下继续搅拌 3h,用乙醇洗涤,得表面氨基化的磁性纳米颗粒;将表面氨基化的磁性纳米颗粒与二甲亚砜(DMSO)混合,加入 5.5mg 丁二酸酐反应 24h,在磁分离辅助下用 DMSO 洗涤 3 次,再用去离子水洗涤 3 次,得表面羧基化的磁性纳米颗粒,这些表面羧基化的磁性纳米颗粒的羧基含量为 0.9-1.5mmol/g;

[0073] (2)用 500 μL 的 MEST 溶液(该 MEST 溶液中含 0.25v% 的吐温-20, pH 为 5.0-5.5)洗涤 2mg 表面羧基化的磁性纳米颗粒,该洗涤具体地为:将该 MEST 溶液和表面羧基化的磁性纳米颗粒置于 2mL 离心管中,在漩涡振荡器上混合均匀,然后磁分离;洗涤 2 次后,将表面羧基化的磁性纳米颗粒、0.5mol/L 的 EDC 溶液 5 μL 和 0.25mol/L 的 NHS 溶液 10 μL 混合,反应 30min,用 MEST 溶液(组分同前)洗涤 2 次,再用 pH 值为 9.0 的 BST 溶液(该 BST 溶液中含 0.07v% 的吐温-20)洗涤 2 次,得反应物 A;

[0074] (3)在 BST 溶液(组分同前)中,将反应物 A 和 150 μg 的 HBV 前 S1 抗原的特异性单抗混合,室温下反应 3h,得反应物 B;

[0075] (4)将反应物 B 与 500 μL 的 0.5 ~ 1mg/mL 的 BSA 溶液于室温下封闭反应 30min,反应后用 BST 溶液(组分同前)洗涤 3 次,即得。

[0076] 制得的用于 HBV 检测的磁性纳米颗粒生物探针用保存液重悬,于 4℃ 下储存备用。

[0077] 实施例 4 用于 HBV 检测的磁性免疫层析试纸条

[0078] 图 3 为用于 HBV 检测的磁性免疫层析试纸条的结构示意图,该磁性免疫层析试纸条包括一样品垫 1、一结合垫 2、一层析膜 7、一吸水垫 6 和一底板 5,结合垫 2 上喷点有实施例 3 所制得的用于 HBV 检测的磁性纳米颗粒生物探针,层析膜 7 上有一 T 线 3 和一 C 线 4,样品垫 1、结合垫 2、层析膜 7 和吸水垫 6 依次衔接于底板 5 上,T 线 3 位于靠近结合垫 2 的一侧,C 线 4 位于靠近吸水垫 6 的一侧,T 线 3 和 C 线 4 相距 0.8cm;T 线 3 含有 HBV 表面抗原的特异性单抗,C 线 4 含有山羊抗兔 IgG 抗体,层析膜 7 为硝酸纤维素膜。

[0079] 该用于 HBV 检测的磁性免疫层析试纸条的制备方法,其包括下述步骤:将实施例

3 所制得的用于 HBV 检测的磁性纳米颗粒生物探针用保存液 2 倍体积的层析缓冲液进行重悬,该层析缓冲液为含有 0.1-1wt% 的 BSA、0.05-0.5wt% 的 Tween-20 和 0.02-0.2wt% 的蔗糖的硼酸盐缓冲液,该层析缓冲液的 pH 值为 6.5-9.0 均可;取 5 μ L 重悬后的悬浮液喷点于结合垫 2 上,该悬浮液中的用于 HBV 检测的磁性纳米颗粒生物探针的含量为 5 μ g;用点膜仪以 0.8 μ L/cm 的速度将 1mg/mL 的 HBV 表面抗原的特异性单抗固定在层析膜 7 的 T 线 3 上,用点膜仪将 2mg/mL 的山羊抗兔 IgG 抗体固定在层析膜 7 的 C 线 4 上,该层析膜 7 为硝酸纤维素膜,T 线 3 和 C 线 4 相距 0.8cm;将样品垫 1、结合垫 2、层析膜 7 和吸水垫 6 依次衔接于底板 5 上,样品垫 1 和结合垫 2,结合垫 2 和层析膜 7,层析膜 7 和吸水垫 6 的衔接处有 1mm 左右的叠合 T 线 3 位于靠近结合垫 2 的一侧,C 线 4 位于靠近吸水垫 6 的一侧,即得。

[0080] 该用于 HBV 检测的磁性免疫层析试纸条可以根据实际情况,在使用时进行裁剪,如剪裁至 0.5cm 宽,以适用于磁性分析仪(MAR)进行读卡分析。

[0081] 该用于 HBV 检测的磁性免疫层析试纸条的使用方法,其包括下述步骤:将样本于样品垫 1 处加入,静置 5-15min 后,观察 T 线 3 和 C 线 4 处的颜色;在静置 35min 后,用磁性分析仪检测所述的用于 HBV 检测的磁性免疫层析试纸条在 T 线 3 和 C 线 4 处的磁信号值,即可。

[0082] T 线 3 和 C 线 4 处的颜色变化和判断标准如下:以肉眼观察,若 T 线和 C 线处有两条明显的条带或者 T 线的条带浅于 C 线条带,则样本为阳性;若仅 C 线处出现一条条带,T 线处无条带,则样本为阴性。检测时若 C 线处无条带,则试纸条体系有问题,其检测结果视为无效。

[0083] 此外,将测得的样本在 T 线 3 处的定量磁信号与一阴性样本在 T 线 3 处的定量磁信号进行比较,也可对检测结果进行评价, $T_{\text{样本}}/T_{\text{阴}} \geq 2.1$ 的样品其结果视为阳性, $T_{\text{样本}}/T_{\text{阴}} < 2.1$ 的样品其结果视为阴性。

[0084] 采用该用于 HBV 检测的磁性免疫层析试纸条对一血清样本 X 进行检测,测得其在 T 线处的磁信号为 234;对另一血清样本 Y 进行检测,测得其在 T 线处的磁信号为 89。对一乙肝阴性血清样本进行检测,测得其在 T 线处的磁信号为 47。依据定量检测值进行计算,则 $T_{\text{样本 X}}/T_{\text{阴}} = 4.97$,该值大于 2.1,因而该血清样本 X 为阳性;而 $T_{\text{样本 Y}}/T_{\text{阴}} = 1.89$,该值小于 2.1,因而该血清样本 Y 为阴性。

[0085] 实施例 5 用于 HBV 检测的磁性纳米颗粒生物探针

[0086] 该实施例中的磁性粒子按文献,如文献①:Magnetite Nanocrystal Clusters with Ultra-High Sensitivity in Magnetic Resonance Imagin (Fangjie Xu, Changming Cheng, Du-Xing Chen, Hongchen Gu, Chemphyschem, 2012, 13, 336-341) 进行制备。该实施例中的磁性纳米颗粒按文献,如文献②:Synthesis of Magnetic Microspheres with Immobilized Metal Ions for Enrichment and Direct Determination of Phosphopeptides by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry (Xiuqing Xu, Chunhui Deng, Mingxia Gao, Wenjia Yu, Pengyuan Yang, and Xiangmin Zhang, Advanced Materials, 2006, 18, 3289-3293.) 进行制备。所制得的磁性纳米颗粒的粒径均在 50-300nm 的范围内。这些磁性纳米颗粒为具有核壳结构的磁性粒子/氧化硅复合材料,其内核为磁性粒子,壳层为氧化硅。

[0087] 用于 HBV 检测的磁性纳米颗粒生物探针的制备方法,其包括下述步骤:

[0088] (1) 在 50g 醇水体积比为 70:30 的醇水混合液中加入 15mg 平均粒径为 150nm 的磁性纳米颗粒(制备方法参见文献①和文献②, 这些磁性纳米颗粒的氧化硅壳层的平均厚度为 10nm, 比饱和磁化强度为 36emu/g), 加入 50 μ L 氨水和 35 μ L 氨丙基三乙氧基硅烷, 常温下搅拌 1h, 于 70 $^{\circ}$ C 水浴条件下继续搅拌 2h, 用乙醇洗涤, 得表面氨基化的磁性纳米颗粒; 将表面氨基化的磁性纳米颗粒与 N, N- 二甲基甲酰胺(DMF) 混合, 加入 7.0mg 丁二酸酐反应 24h, 在磁分离辅助下用 DMF 洗涤 3 次, 再用去离子水洗涤 3 次, 得表面羧基化的磁性纳米颗粒, 该表面羧基化的磁性纳米颗粒的羧基含量约为 1.5mmol/g;

[0089] (2) 用 500 μ L 的 MEST 溶液(该 MEST 溶液中含 0.05v% 的吐温 -20, pH 为 5.0-5.5) 洗涤 2mg 表面羧基化的磁性纳米颗粒, 该洗涤具体地为: 将该 MEST 溶液和表面羧基化的磁性纳米颗粒置于 2mL 离心管中, 在漩涡振荡器上混合均匀, 然后磁分离; 洗涤 2 次后, 将表面羧基化的磁性纳米颗粒、0.5mol/L 的 EDC 溶液 5 μ L 和 0.25mol/L 的 NHS 溶液 10 μ L 混合, 反应 30min, 用 MEST 溶液(组分同前) 洗涤 2 次, 再用 pH 值为 9.0 的 BST 溶液(该 BST 溶液中含 0.1v% 的吐温 -20) 洗涤 2 次, 得反应物 A;

[0090] (3) 在 BST 溶液(组分同前) 中, 将反应物 A 和 150 μ g 的 HBV 前 S1 抗原的特异性单抗混合, 室温下反应 3h, 得反应物 B;

[0091] (4) 将反应物 B 与 500 μ L 的 1mg/mL% 的 BSA 溶液于室温下封闭反应 30min, 反应后用 BST 溶液(组分同前) 洗涤 3 次, 即得。

[0092] 制得的用于 HBV 检测的磁性纳米颗粒生物探针用保存液重悬, 于 4 $^{\circ}$ C 下储存备用。

[0093] 实施例 6 用于 HBV 检测的磁性免疫层析试纸条

[0094] 该用于 HBV 检测的磁性免疫层析试纸条的结构示意图见图 3, 该磁性免疫层析试纸条的结构同实施例 4, 不同之处在于结合垫 2 上喷点有实施例 5 所制得的用于 HBV 检测的磁性纳米颗粒生物探针。

[0095] 该用于 HBV 检测的磁性免疫层析试纸条的制备方法同实施例 4, 不同之处在于使用实施例 5 所制得的用于 HBV 检测的磁性纳米颗粒生物探针喷点于结合垫 2 上。

[0096] 该用于 HBV 检测的磁性免疫层析试纸条可以根据实际情况, 在使用时进行裁剪, 如剪裁至 0.5cm 宽, 以适用于磁性分析仪(MAR) 进行读卡分析。

[0097] 该用于 HBV 检测的磁性免疫层析试纸条的使用方法和判断方法同实施例 4。

[0098] 效果实施例 1

[0099] 采用实施例 4 和实施例 6 的用于 HBV 检测的磁性免疫层析试纸条对待测样品进行检测。将待测样本于样品垫 1 处加入, 静置 5-15min 后, 观察 T 线 3 和 C 线 4 处的颜色; 在静置 35min 后, 用磁性分析仪检测所述的用于 HBV 检测的磁性免疫层析试纸条在 T 线 3 处的磁信号值, 即为表 1 中的磁信号值。同时, 被测样本用常规 ELISA 法进行检测后的吸光值即为表 1 中的 OD 值。检测所用阴性样品为已知是乙肝阴性患者血清, 阳性血清为已经确认为乙肝阳性的患者血清。通常, 阳性和待检测样本的定量检测所得磁信号与阴性样本的比值即 S/N 值, 即为 $T_{\text{样本}}/T_{\text{阴}}$ 值, 因此 S/N 值 >2.1 的样本为阳性。

[0100] 表 1 为采用本发明的磁性免疫层析试纸条及 ELISA 法对不同样品的检测结果。从表 1 中可以看出, 采用本发明的磁性免疫层析试纸条对于 HBV 进行检测, 其测定结果的变异系数低, 误差小。

[0101] 表 1 采用本发明的磁性免疫层析试纸条及 ELISA 法对不同样品的检测结果

[0102]

样品	OD 值(ELISA)	磁信号值	CV(%)	S/N
阴性对照血清	0.026-0.039	43.7±0.9	2.10	/
阳性对照血清	/	775.1±15.0	1.9	17.7
患者血清 A	1.285	1961.3±12.0	0.6	44.9
患者血清 B	1.311	1858.5±107.0	5.8	42.5
患者血清 C	1.355	1834.2±100.3	5.5	42
患者血清 D	1.477	2512.9±29.0	1.2	57.5

[0103] 效果实施例 2

[0104] 检测方法同效果实施例 1。

[0105] 表 2 和图 4 为采用本发明的用于 HBV 检测的磁性免疫层析试纸条及 ELISA 法对乙肝阳性血清标准品的系列梯度检测结果。其中,阳性血清标准品 1-8 分别为浓度由高到低的乙肝阳性血清标准品。从表 2 和图 4 中可以看出,其测定结果与 ELISA 法的测定结果相吻合,其 $R^2=0.9834$,线性关系好,说明本发明的用于 HBV 检测的磁性免疫层析试纸条检测准确性高,特异性强。根据表 2 和图 4 数据,采用本发明的磁性免疫层析试纸条对 HBV 阳性标准品 8 的定量检测结果的 S/N 值 >2.1 。根据本发明前面所述的 $T_{\text{样本}}/T_{\text{阴}}$ 值判定方法,该检测结果为阳性。

[0106] 图 5 为采用本发明的磁性免疫层析试纸条对乙肝阳性血清标准品 1-8 的系列梯度检测的定性结果,图中箭头 C 指示的为 C 线处,箭头 T 指示的为 T 线处。由图可见,随着标准品浓度的降低,试纸条 T 线处的检测线亦逐渐由深变浅,最后肉眼观察不到,但是由表 2 的定量检测结果可知,虽然肉眼观察不到检测线,但是其定量检测结果依然有效。由此可见,采用本发明的磁性免疫层析试纸条对 HBV 进行检测,灵敏度高,且可有效避免因单纯的肉眼观察而出现的假阴性现象。

[0107] 表 2 用于 HBV 检测的磁性免疫层析试纸条及 ELISA 法对不同梯度 HBV 阳性血清标准样品的检测结果

样品	T 线磁信号值	CV (%)	S/N	OD 值 (ELISA 法)
阴性对照血清	36.8±2.6	6.9	/	/
阳性血清标准品 1	1230.5±41.1	3.30	33.4	1.247
阳性血清标准品 2	923.1±53.4	5.80	25.1	0.983
阳性血清标准品 3	555.2±1.8	0.30	15.1	0.552
阳性血清标准品 4	446.6±48.1	10.80	12.1	0.341
阳性血清标准品 5	218.1±5.9	2.70	5.93	0.249
阳性血清标准品 6	147.1±6.6	4.50	4.0	0.217
阳性血清标准品 7	126.8±9.1	7.10	3.4	0.150
阳性血清标准品 8	110.4±4.2	3.8	3.0	0.096

[0109] 效果实施例 3

[0110] 检测方法同效果实施例 1。

[0111] 表 3 用于 HBV 检测的磁性免疫层析试纸条的检测稳定性

[0112]

样品	T _{平均1}	T _{平均2}	T _{平均3}	T 线磁信号 平均值	CV (%)	3 天间的 磁信号 变化率 (%)
阴性对照血清	20.7	22.7	25.2	22.87±1.84	8.1	0.7-10.2
阳性血清标准品 1	922.8	875.2	891.9	900.40±21.11	2.3	0.9-2.8
阳性血清标准品 2	647.4	633	761.9	680.77±57.67	8.5	4.9-11.9
阳性血清标准品 3	422.2	418.7	456.5	432.47±17.05	3.9	2.4-5.6
HBV 患者血清 A	1105.1	1187.4	1157	1149.83±33.98	3	0.6-3.9

[0113] 表 3 为采用本发明的用于 HBV 检测的磁性免疫层析试纸条对乙肝血清样品的稳定性评价实验结果。表 3 中的阳性血清标准品 1-3 分别为浓度由高到低的 HBV 阳性血清标准品，T_{平均1-3} 分别为采用本发明的用于 HBV 检测的磁性免疫层析试纸条对表中的样品的第 1 天、第 2 天和第 3 天检测时的试纸条 T 线处的磁信号平均值。由表 3 可知，3 次检测的磁信号的最大变化率为 11.9%，小于 15%，说明本发明的用于 HBV 检测的磁性免疫层析试纸条的检测稳定性较好。

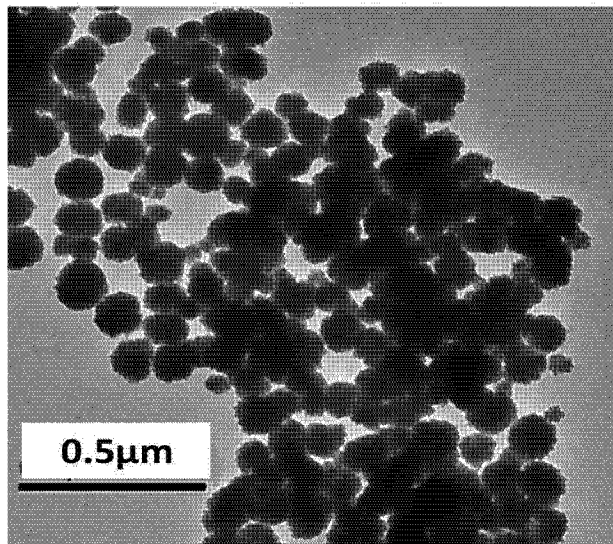


图 1

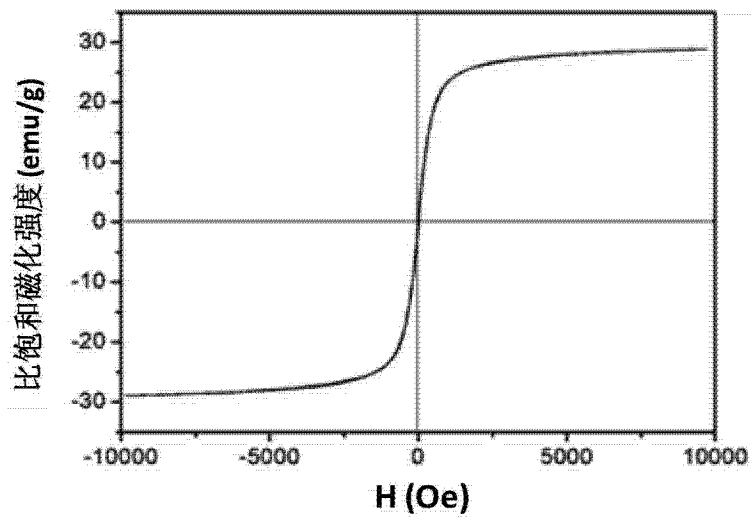


图 2

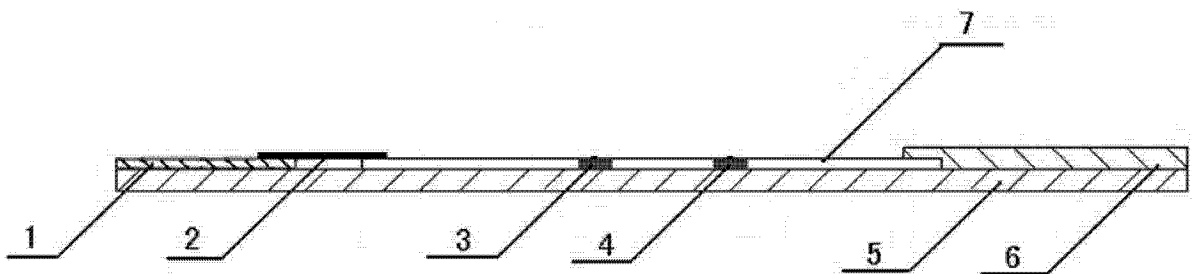


图 3

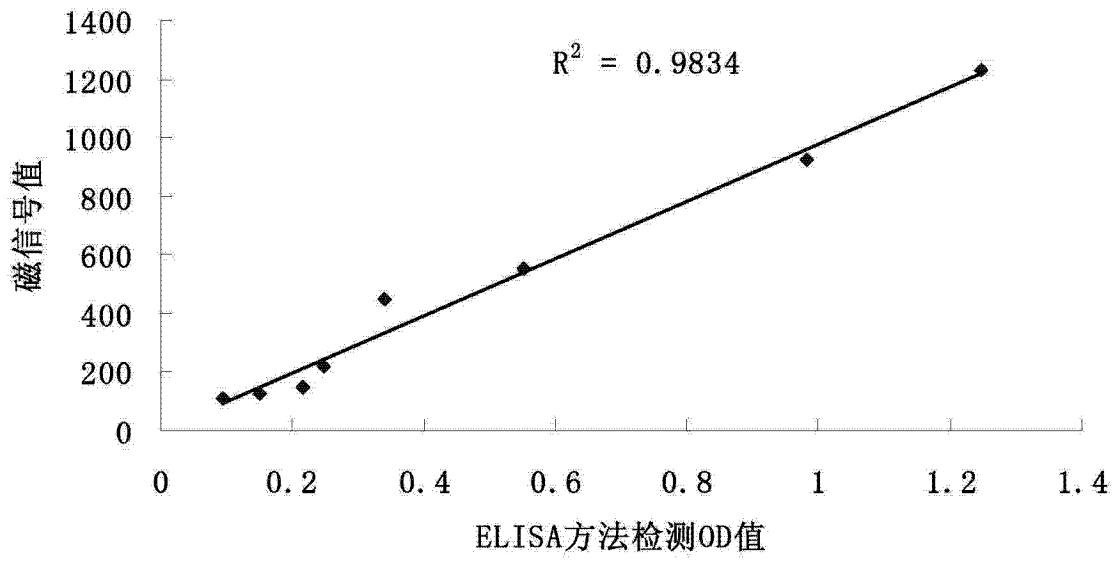


图 4

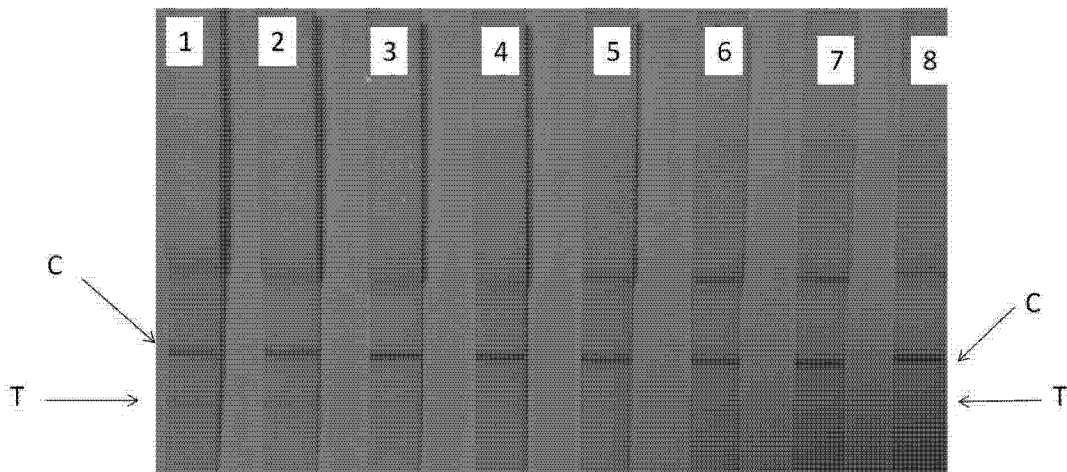


图 5

专利名称(译)	检测HBV的磁性生物探针、试纸条及其制备和使用方法		
公开(公告)号	CN103293295A	公开(公告)日	2013-09-11
申请号	CN201310165906.4	申请日	2013-05-07
[标]发明人	崔正权		
发明人	崔正权		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/576		
代理人(译)	薛琦 沉利		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了用于HBV检测的磁性纳米颗粒生物探针、试纸条及其制备和使用方法。该生物探针的制备方法为：对粒径为50-300nm的磁性纳米颗粒进行表面氨基化处理，再进行羧基化处理，在缓冲液中将表面羧基化的磁性纳米颗粒、碳化二亚胺和N-羧基琥珀酰亚胺混合反应，洗涤，得反应物A；在偶联缓冲液中将反应物A和HBV标记物的抗体混合反应，得反应物B；将反应物B与含氨基的化合物的溶液混合反应，洗涤，即得。该生物探针特异性强，信号灵敏且稳定性好，根据所选择的靶向标记物及其配套的抗体，适用于多种乙肝标记物的检测。该试纸条可经肉眼观察和MAR检测得到的磁信号进行二次判定，能够大大减少人为误差，准确性高。

