



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103954775 B

(45) 授权公告日 2015. 08. 19

(21) 申请号 201410197209. 1

(22) 申请日 2014. 05. 12

(73) 专利权人 国家纳米科学中心

地址 100190 北京市海淀区中关村北一条
11 号

(72) 发明人 蒋兴宇 陈翊平 查瑞涛 张伟
曹丰晶

(74) 专利代理机构 北京品源专利代理有限公司
11332

代理人 巩克栋 杨晞

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/569(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101865984 A, 2010. 10. 20,

CN 102323408 A, 2012. 01. 18,

CN 103278521 A, 2013. 09. 04,

CN 103529225 A, 2014. 01. 22, 全文.

CN 102426229 A, 2012. 04. 25, 全文.

CN 103713134 A, 2014. 04. 09, 全文.

WO 2004092732 A1, 2004. 10. 28, 全文.

审查员 刘彦宁

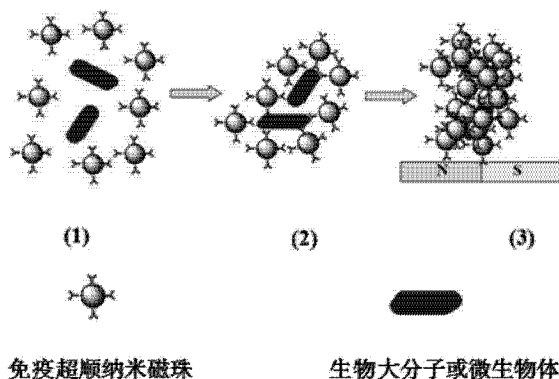
权利要求书1页 说明书5页 附图5页

(54) 发明名称

一种检测生物大分子或微生物体的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种检测生物大分子或微生物体的方法。所述方法包括如下步骤:使用生物大分子或微生物体的抗体包被的单分散超顺纳米磁珠与待检测样品接触进行孵育反应,生成多颗粒的超顺纳米磁珠团簇;反应后进行磁分离得到聚集物,根据所述聚集物的聚集程度确定待检测样品中生物大分子或微生物体的浓度。本发明的方法将免疫磁富集与可视化检测集于一体,操作简单,整个检测过程所需时间短,不需要特殊的仪器设备,而且本发明的方法对抗体的纯度要求不高,可以大大降低检测成本。



1. 一种检测生物大分子或微生物体的方法,包括如下步骤:使用生物大分子或微生物体的抗体包被的单分散超顺纳米磁珠与待检测样品接触进行孵育反应,生成多颗粒的超顺纳米磁珠团簇;反应后进行磁分离 0.5-5min 得到聚集物,根据所述聚集物的聚集程度确定待检测样品中生物大分子或微生物体的浓度。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述聚集物的聚集程度与所述生物大分子或微生物体的浓度呈正相关。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法,其特征在于,所述生物大分子为蛋白质、核酸或多糖。

4. 根据权利要求 3 所述的方法,其特征在于,所述生物大分子为蛋白质。

5. 根据权利要求 4 所述的方法,其特征在于,所述蛋白质为脂蛋白、糖蛋白、核蛋白或生物标志物。

6. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述微生物体为细菌、真菌或病毒。

7. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述待检测样品为环境、生物或食品来源的样品。

8. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述抗体为单克隆抗体和 / 或多克隆抗体。

9. 根据权利要求 8 所述的方法,其特征在于,所述抗体为多克隆抗体。

10. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述生物大分子或微生物体具有多个抗原决定簇。

11. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述孵育反应时间为 5-60min。

12. 根据权利要求 11 所述的方法,其特征在于,所述孵育反应时间为 15min。

13. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述磁分离的时间为 1min。

14. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,根据所述聚集物的聚集程度确定待检测样品中生物大分子或微生物体的浓度,具体为:

获取所述聚集物的照片,通过对照片灰度值进行定量来确定待检测样品中生物大分子或微生物体的浓度。

一种检测生物大分子或微生物体的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫检测分析技术领域,尤其涉及一种快速、灵敏和低成本的可视化检测生物大分子或微生物体的方法。

背景技术

[0002] 传染性动植物致病菌、病毒以及临床样品中的蛋白质等生物标志物的快速、灵敏、低成本的检测和诊断对保护人类健康及生命安全、保障环境和国家安全、维护社会稳定具有重要意义。目前比较成熟的检测方法主要包括分离培养检测、免疫学检测和分子生物学等方法。分离培养方法简单、易行,但由于其检测灵敏度低、耗时长,无法达到现场、快速的要求。免疫学方法主要包括酶联免疫分析和免疫层析试纸条的方法,酶联免疫方法具有简单、灵敏度比较高、成本低等优点,适合于大规模样品筛查,但其需要多步洗涤,比较耗时耗力,因此其使用也受到一定的限制。胶体金免疫层析试纸条具有快速、简单、低成本等优点,但其灵敏度相对比较低,不能实现定量检测。分子生物学方法主要是基于 PCR 的分析方法,具有检测灵敏度高,特异性好等优点,但需要昂贵的仪器和较高的专业技术人员操作,其应用受到一定的限制。因此,构建一种适合现场、快速、高灵敏和个性化诊断的分析方法,实现对环境、食品和生物样品中致病菌、病毒和蛋白质的检测具有重要的意义。

[0003] 超顺纳米磁珠具有饱和磁性强、单分散性好、粒径可控和多元颜色等优异的磁学和光学性质,因此基于超顺纳米磁珠的免疫磁性分离技术具有免疫反应的高度特异性和磁性分离的快速、简单和高效的优点,是目前应用最广泛的分离、富集技术,近几年已被广泛地应用于致病菌、病毒、蛋白、肿瘤细胞等生物大分子或微生物体的分离和富集。在免疫磁富集反应中,免疫磁珠和目标物的识别是在悬浮溶液中进行的,是一种均相的免疫反应模式,有利于抗体-抗原的充分反应,可以加快反应的速度,因此可以与其它很多技术结合起来,构建一系列新型的分析方法,例如磁分离-荧光免疫分析方法、磁分离-化学发光分析方法、富集-微流控芯片技术、磁分离-表面等离子共振生物传感器、磁富集-石英晶微天平生物传感器等方法。由于免疫磁分离技术的发展,大大促进了相关分析技术的发展,其应用潜力正在不断地发掘出来。

发明内容

[0004] 针对现有技术的不足,我们对免疫磁珠检测进行深入研究,发现通过免疫反应形成的多颗粒的超顺纳米磁珠团簇与单分散超顺纳米磁珠在磁场中的聚集状态不同,并且免疫超顺纳米磁珠的聚集程度与样品中的目标物的含量呈正相关性。

[0005] 因此,本发明的目的在于提供一种快速、灵敏和低成本的可视化检测生物大分子或微生物体的方法,所述方法中免疫超顺纳米磁珠既作为磁分离、富集的载体;同时由于其具有颜色,并且多颗粒的超顺纳米磁珠团簇与单分散超顺纳米磁珠在磁场中聚集程度不同,可作为可视化的信号报告标志,将免疫反应中的磁分离、富集和检测集于一步完成,实现对样品中目标物的快速、灵敏地检测。

[0006] 为实现本发明的目的,本发明提供以下技术方案:

[0007] 一种检测生物大分子或微生物体的方法,包括如下步骤:使用生物大分子或微生物体的抗体包被的单分散超顺纳米磁珠与待检测样品接触进行孵育反应,生成多颗粒的超顺纳米磁珠团簇;反应后进行磁分离得到聚集物,根据所述聚集物的聚集程度确定待检测样品中生物大分子或微生物体的浓度。

[0008] 在超顺纳米磁珠的表面偶联上相应生物大分子或微生物体的抗体,制备成免疫超顺纳米磁珠。在免疫反应中,生物大分子或微生物体具有多个抗原决定簇,通过抗体-抗原之间的特异性识别,可以连接多个单分散性的免疫超顺纳米磁珠。单分散性的免疫超顺纳米磁珠通过这种抗原的“桥梁”连接作用,变成团簇状的多颗粒的超顺纳米磁珠团簇。然后在外加磁场的作用下,变成聚集态的多颗粒超顺纳米磁珠团簇(聚集物),由于单分散超顺纳米磁珠与聚集的多颗粒超顺纳米磁珠在磁场中的分散状态不同,导致聚集程度不同,并且单分散性的免疫超顺纳米磁珠的聚集程度与样品中目标物(生物大分子或微生物体)的含量正相关,基于此,可以根据聚集物的聚集程度确定待检测样品中生物大分子或微生物体的浓度,从而构建检测生物大分子或微生物体的可视化分析方法。

[0009] 作为本发明的优选方案,所述聚集物的聚集程度与所述生物大分子或微生物体的浓度呈正相关。所述生物大分子或微生物体的浓度越高,则所述聚集物的颜色越深;因此可以预先使用标准样品构建生物大分子或微生物体的浓度与聚集物的聚集程度之间的曲线关系图,根据该曲线关系图可以确定一个特定颜色深度所对应的生物大分子或微生物体的浓度,实现样品中生物大分子或微生物体的浓度定量确定。

[0010] 作为本发明的优选方案,所述生物大分子包括蛋白质、核酸和多糖,优选蛋白质。由于蛋白质、核酸和多糖都可能具有相应的抗原表位,供相应抗体结合,实现多颗粒的超顺纳米磁珠团簇的生成,因此均可作为本发明的生物大分子检测对象。

[0011] 优选地,所述蛋白质包括脂蛋白、糖蛋白、核蛋白和生物标志物。

[0012] 作为本发明的优选方案,所述微生物体包括细菌、真菌和病毒。由于细菌、真菌和病毒表面的蛋白具有抗原表位,能够与相应抗体结合,实现多颗粒的超顺纳米磁珠团簇的生成,因此均可作为本发明的微生物体检测对象。上述微生物体可以是致病菌或非致病菌,但是本发明排除疾病诊断的情况。

[0013] 作为本发明的优选方案,所述待检测样品为环境、生物或食品来源的样品。来源于环境的样品比如可以是来源于污染水体的样品,其中含有待检测的生物大分子或微生物体,通过使用本发明的方法,对这些物质进行定量,实现污染状况的评估。来源于食品的样品比如可以是来源于人工加工的熟食或包装食品的样品,其中含有待检测的生物大分子或微生物体,通过使用本发明的方法,对这些物质进行定量,实现食品安全评估。

[0014] 作为本发明的优选方案,所述抗体为单克隆抗体和/或多克隆抗体,优选多克隆抗体。由于待检测样品中的生物大分子或微生物体表面可能具有多个抗原决定簇,在有相同或相似抗原决定簇的情况下使用单克隆抗体也能够实现“桥梁”连接作用;多克隆抗体由于具有各种抗原决定簇的结合位点,能够很容易实现“桥梁”连接作用。毫无疑问,本发明也可以使用单克隆抗体和多克隆抗体的混合,并且本发明对单克隆抗体的纯度要求不高,即使含有杂质,对于本发明的影响也可以忽略。

[0015] 作为本发明的优选方案,所述生物大分子或微生物体具有多个抗原决定簇。同一

生物大分子或微生物体的多个抗原决定簇分别与不同免疫超顺纳米磁珠表面的抗体结合,实现“桥梁”连接作用,生成超顺纳米磁珠团簇。

[0016] 作为本发明的优选方案,所述孵育反应时间为 5-60min,例如 5min、6min、10min、12min、15min、20min、25min、30min、40min、45min、50min、55min、58min、10-40min、10-30min、5-20min、15-30min,优选 15min。

[0017] 作为本发明的优选方案,所述磁分离的时间为 0.5-5min,例如 0.5min、1min、1.5min、2min、2.5min、3min、4min、4.5min、4.8min,优选 1min。

[0018] 作为本发明的优选方案,根据所述聚集物的聚集程度确定待检测样品中生物大分子或微生物体的浓度,具体为:

[0019] 获取所述聚集物的照片,通过对照片灰度值进行定量来确定待检测样品中生物大分子或微生物体的浓度。

[0020] 相比现有技术,本发明的有益效果为:

[0021] 本发明的检测生物大分子或微生物体的方法,基于超顺纳米磁珠的优异磁学和光学性能,将免疫磁富集与可视化检测集于一体,操作简单,整个检测过程所需时间短,不需要特殊的仪器设备,只需要一种抗体,避免了传统的免疫检测对两种抗体(捕获抗体和检测抗体)的需要,而且本发明的方法对抗体的纯度要求不高,可以大大降低检测成本。此外,本发明的方法具有普遍适用性,可以检测细菌、真菌、病毒和蛋白质等,适合现场检测,具有很大的应用前景。

附图说明

[0022] 图 1 为本发明的基于免疫超顺纳米磁珠聚集的可视化方法检测生物大分子或微生物体的反应原理示意图。其中,(1)表示单分散免疫超顺纳米磁珠与样品中的生物大分子或微生物体之间的免疫反应;(2)表示通过抗原的“桥梁”作用形成的多颗粒的免疫超顺纳米磁珠团簇;(3)表示多颗粒的免疫超顺纳米磁珠团簇在外加磁场的的作用下,形成聚集的免疫超顺纳米磁珠聚集物;样品中目标物(生物大分子或微生物体)越多,免疫超顺纳米磁珠的聚集程度就越大,其颜色就越深。

[0023] 图 2 为本发明的免疫超顺纳米磁珠磁聚集的机理图。其中,(a)表示免疫超顺纳米磁珠与样品混合在一起,反应 15min 之后,没有外加磁场下的状态图;(b)表示免疫超顺纳米磁珠与样品混合在一起,反应 15min 之后,在磁场下的状态图;(c)表示将外加磁场去掉,将聚集状态的免疫超顺纳米磁珠重悬,然后放在没有外加磁场的试管架上,所述免疫超顺纳米磁珠在重力单独作用下的状态图。数字表示生物大分子或微生物体的浓度(cfu/mL)。

[0024] 图 3 为本发明的方法检测大肠杆菌的结果图。其中,(a)表示免疫超顺纳米磁珠与大肠杆菌样品混合在一起,反应之后,在磁场下的状态图;样品中大肠杆菌浓度(cfu/mL)越高,免疫超顺纳米磁珠的聚集程度就越大,其颜色就越深;(b)表示聚集物照片灰度值与样品中大肠杆菌浓度梯度(图中 1-6 分别表示大肠杆菌浓度 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、0cfu/mL)的关系图;大肠杆菌浓度越高,灰度值越大。

[0025] 图 4 为本发明的方法检测胎癌蛋白(CEA)的结果图。其中,(a)表示免疫超顺纳米磁珠与 CEA 样品混合在一起,反应之后,在磁场下的状态图;样品中 CEA 浓度(ng/mL)越高,免疫超顺纳米磁珠的聚集程度就越大,其颜色就越深;(b)表示聚集物照片灰度值与样

品中 CEA 浓度 (ng/mL) 的关系图 ;CEA 浓度越高,灰度值越大。

[0026] 图 5 为本发明的方法检测甲胎蛋白 (AFP) 的结果图。其中 1-6 分别表示 AFP 浓度分别为 40、20、10、5、2.5 和 0ng/mL 的样品与免疫超顺纳米磁珠混合在一起,反应之后,在磁场下的状态图 ;样品中 AFP 浓度 (ng/mL) 越高,免疫超顺纳米磁珠的聚集程度就越大,其颜色就越深。

具体实施方式

[0027] 下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述。本领域技术人员将会理解,以下实施例仅为本发明的优选实施例,以便于更好地理解本发明,因而不应视为限定本发明的范围。

[0028] 下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法 ;所用的实验材料,如无特殊说明,均为自常规生化试剂厂商购买得到的。

[0029] 本发明的反应原理示意图如图 1 所示,(1) 表示单分散免疫超顺纳米磁珠与样品中的生物大分子或微生物体之间的免疫反应 ;(2) 表示通过抗原的“桥梁”作用形成的多颗粒的免疫超顺纳米磁珠团簇 ;(3) 表示多颗粒的免疫超顺纳米磁珠团簇在外加磁场的作用下,形成聚集的免疫超顺纳米磁珠聚集物 ;样品中目标物 (生物大分子或微生物体) 越多,免疫超顺纳米磁珠的聚集程度就越大,其颜色就越深。

[0030] 下列实施例中所用的试剂仪器设备来源如下 :大肠杆菌购自美国菌种保存中心,大肠杆菌抗体 (多抗) 购自美国 Genway ;甲胎蛋白、胎癌蛋白及其相关抗体购自北京热景生物技术有限公司 ;磁分离架购自上海奥润微纳新材料有限公司 ;涡流振荡器购自德国 IKA 公司。

[0031] 实施例 1

[0032] 免疫超顺纳米磁珠的制备和磁聚集可视化免疫检测,具体步骤如下 :

[0033] (1) 免疫超顺纳米磁珠的制备 :

[0034] 将一定量的表面修饰有羧基的超顺纳米磁珠 (0.2-0.5mg) 分散在一定体积的 MES 缓冲溶液中 (pH = 5.6, 0.01M), 然后加入一定量的碳二亚胺 (EDC, 0.01-0.1mg) 和 N- 羧基琥珀酰亚胺 (NHS, 0.01-0.1mg), 在涡流振荡器上轻轻地振荡反应 0.5h, 然后磁分离, 再用 pH = 7.4 的 PBS 缓冲液重悬, 然后加入一定量的抗体 (0.1-0.5mg), 反应 2h, 再加入 5% BSA (100-500 μ L) 反应 0.5h, 最后磁分离, 去掉上清液, 然后加入一定量的 PBST 洗涤液重悬超顺纳米磁珠, 然后再磁分离, 去掉上清液, 重复洗 3 次, 最后得到的免疫超顺纳米磁珠, 用 PBS 缓冲液重悬, 在 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

[0035] (2) 磁聚集可视化免疫检测步骤 :

[0036] 将一定量的免疫超顺纳米磁珠和一系列浓度的生物大分子 (如蛋白质) 或微生物体 (如细菌、真菌或病毒) 混合在一起, 在振荡器上反应 10-20min, 然后将装有免疫超顺纳米磁珠的试管放在磁分离架上, 1min 后观察免疫超顺纳米磁珠的聚集状态。

[0037] 上述步骤之后的结果如图 2 所示, (a) 表示免疫超顺纳米磁珠与样品混合在一起, 反应 15min 之后, 没有外加磁场下的状态图 ;(b) 表示免疫超顺纳米磁珠与样品混合在一起, 反应 15min 之后, 在磁场下的状态图 ;(c) 表示将外加磁场去掉, 将聚集状态的免疫超顺纳米磁珠重悬, 然后放在没有外加磁场的试管架上, 所述免疫超顺纳米磁珠在重力单独作

用下的状态图。可见,样品中目标物(如大肠杆菌)越多,免疫超顺纳米磁珠的聚集程度就越大,其颜色就越深;重悬后,在重力单独作用下的沉降速度和程度越大。

[0038] 实施例 2

[0039] 检测水样中的大肠杆菌,具体实验步骤如下:

[0040] (1) 将一系列不同浓度的大肠杆菌(10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 和 0cfu/mL)各 900 μ L 和一定量的超顺纳米磁珠(100 μ L)混合在一起,在涡流振荡器上振荡反应 15min;

[0041] (2) 将上述反应完的免疫混合物放在磁分离架上,磁分离 1min;

[0042] (3) 肉眼观察超顺纳米磁珠的状态,可见样品中大肠杆菌浓度(cf u/mL)越高,免疫超顺纳米磁珠的聚集程度就越大,其颜色就越深(图 3a);用相机拍照,并用相关的图形处理软件对其灰度值进行定量,结果显示:大肠杆菌浓度越高,灰度值越大(图 3b)。

[0043] 实施例 3

[0044] 检测鸡胚囊液中的新城疫病毒,具体实验步骤如下:

[0045] (1) 将一系列不同浓度的新城疫病毒(10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 和 0copy/mL)各 900 μ L 和一定量的超顺纳米磁珠(100 μ L)混合在一起,在涡流振荡器上振荡反应 15min;

[0046] (2) 将上述反应完的免疫混合物放在磁分离架上,磁分离 1min;

[0047] (3) 肉眼观察超顺纳米磁珠的状态,用相机拍照,并用相关的图形处理软件对其灰度值进行定量。结果类似于图 3。

[0048] 实施例 4

[0049] 检测尿液中的胎癌蛋白(CEA)的含量,具体实验步骤如下:

[0050] (1) 将一系列不同浓度的 CEA(20、10、5、2、1、0ng/mL)各 900 μ L 和一定量的超顺纳米磁珠(100 μ L)混合在一起,在涡流振荡器上振荡反应 15min;

[0051] (2) 将上述反应完的免疫混合物放在磁分离架上,磁分离 1min;

[0052] (3) 肉眼观察超顺纳米磁珠的状态,可见样品中 CEA 浓度(ng/mL)越高,免疫超顺纳米磁珠的聚集程度就越大,其颜色就越深(图 4a);用相机拍照,并用相关的图形处理软件对其灰度值进行定量,结果显示:CEA 浓度越高,灰度值越大(图 4b)。

[0053] 实施例 5

[0054] 检测尿液中的甲胎蛋白(AFP)的含量,具体实验步骤如下:

[0055] (1) 将一系列不同浓度的 AFP(40、20、10、5、2.5 和 0ng/mL)各 900 μ L 和一定量的超顺纳米磁珠(100 μ L)混合在一起,在涡流振荡器上振荡反应 15min;

[0056] (2) 将上述反应完的免疫混合物放在磁分离架上,磁分离 1min;

[0057] (3) 肉眼观察超顺纳米磁珠的状态,样品中 AFP 浓度(ng/mL)越高,免疫超顺纳米磁珠的聚集程度就越大,其颜色就越深(图 5)。用相机拍照,并用相关的图形处理软件对其灰度值进行定量,显示灰度值与 AFP 浓度呈正相关。

[0058] 申请人声明,本发明通过上述实施例来说明本发明的详细特征以及详细方法,但本发明并不局限于上述详细特征以及详细方法,即不意味着本发明必须依赖上述详细特征以及详细方法才能实施。所属技术领域的技术人员应该明了,对本发明的任何改进,对本发明选用组分的等效替换及辅助成分的添加、具体方式的选择等,均落在本发明的保护范围和公开范围之内。

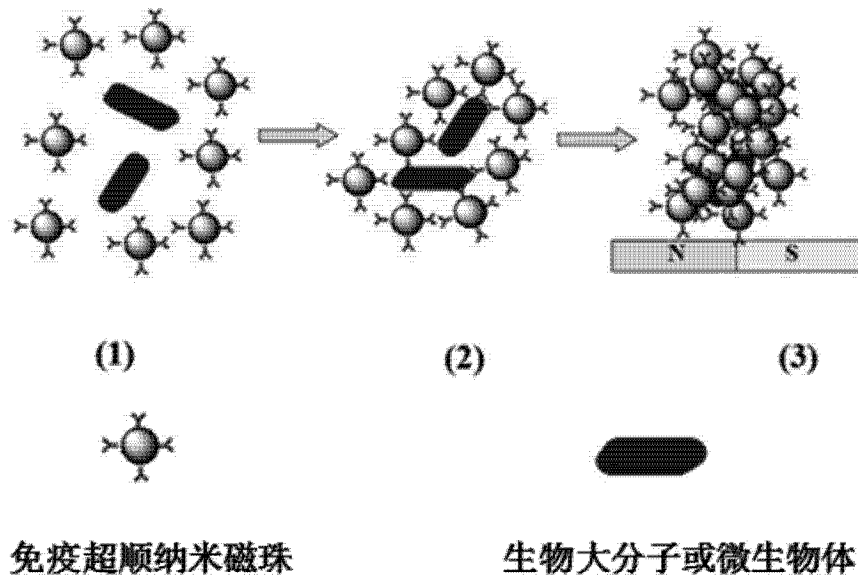


图 1

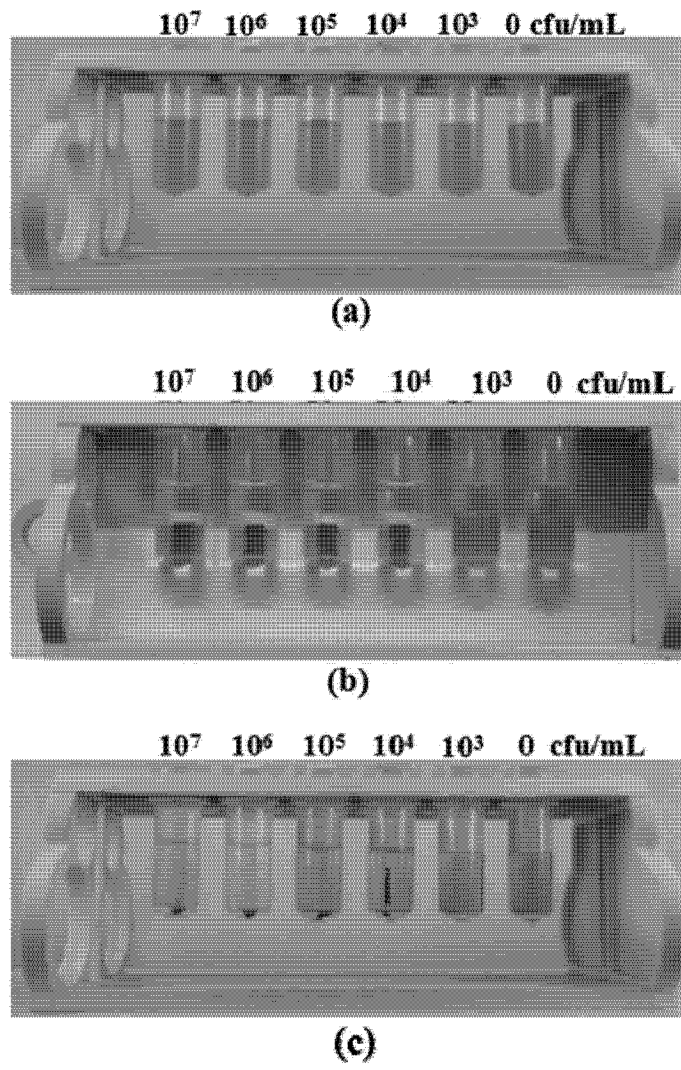
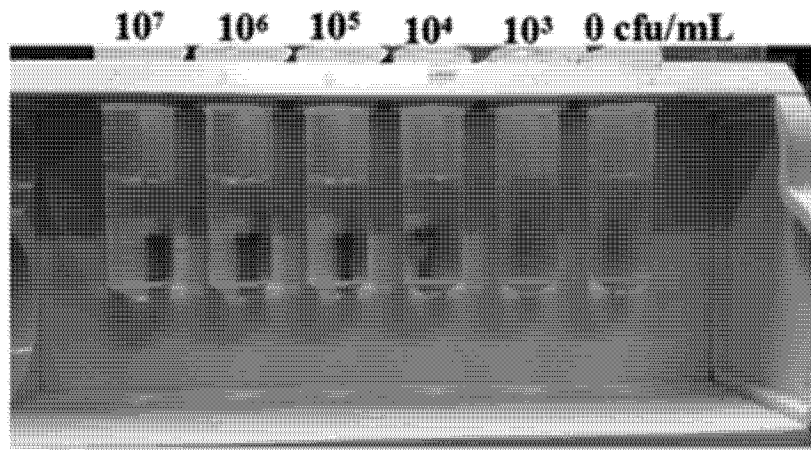
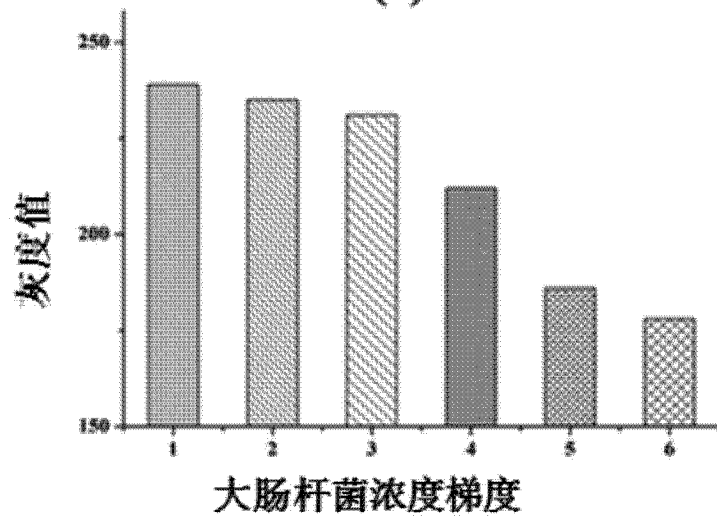


图 2

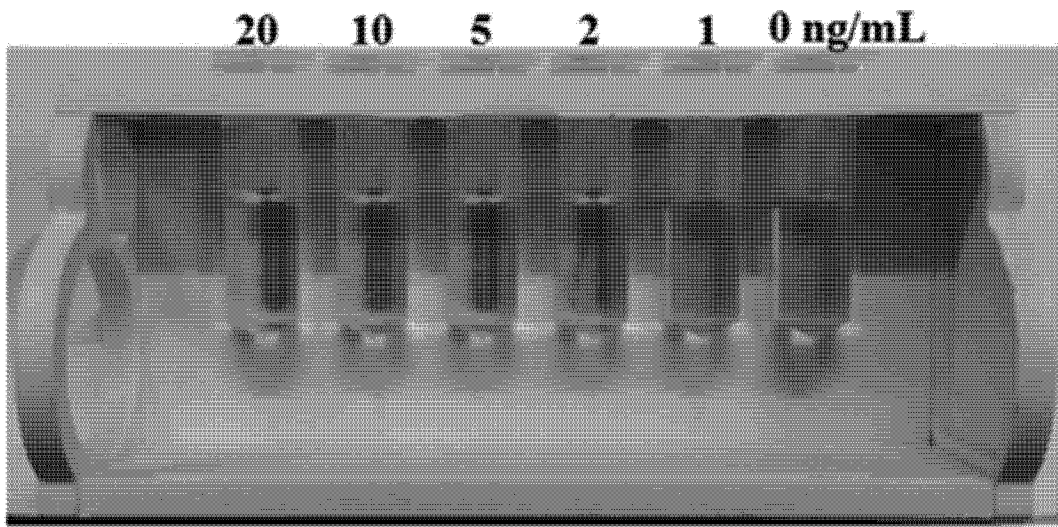


(a)

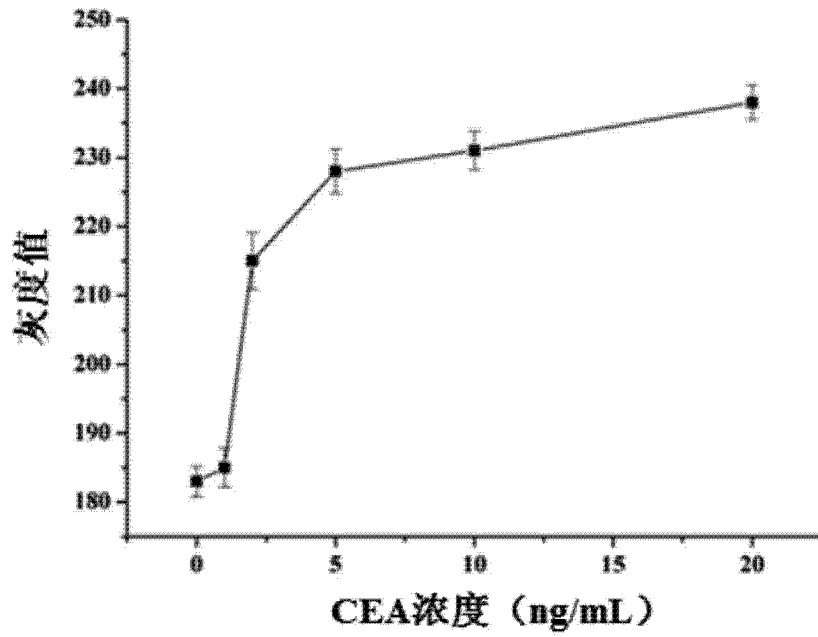


(b)

图 3



(a)



(b)

图 4

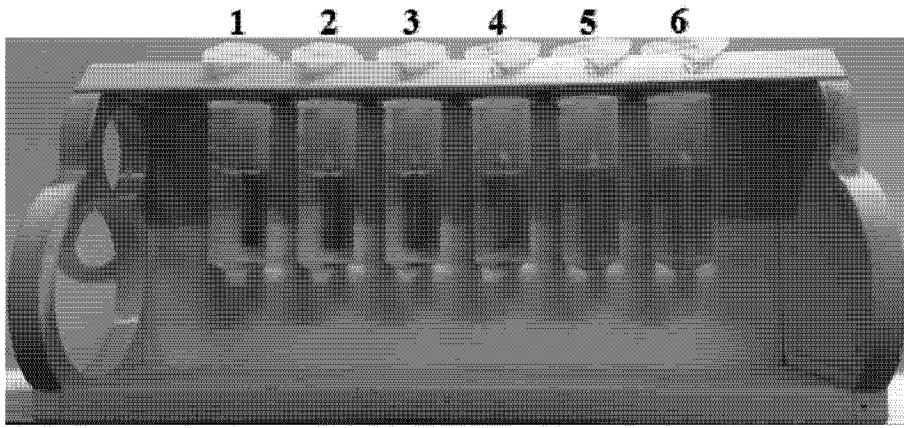


图 5

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 一种检测生物大分子或微生物体的方法 | | |
| 公开(公告)号 | CN103954775B | 公开(公告)日 | 2015-08-19 |
| 申请号 | CN201410197209.1 | 申请日 | 2014-05-12 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 国家纳米科学中心 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 国家纳米科学中心 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 国家纳米科学中心 | | |
| [标]发明人 | 蒋兴宇 陈翊平 查瑞涛 张伟 曹丰晶 | | |
| 发明人 | 蒋兴宇 陈翊平 查瑞涛 张伟 曹丰晶 | | |
| IPC分类号 | G01N33/68 G01N33/569 G01N33/532 | | |
| CPC分类号 | G01N33/54326 G01N33/54346 G01N33/569 G01N33/6803 G01N33/6875 G01N33/92 G01N2405/00 | | |
| 代理人(译) | 杨晞 | | |
| 审查员(译) | 刘彦宁 | | |
| 其他公开文献 | CN103954775A | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明涉及一种检测生物大分子或微生物体的方法。所述方法包括如下步骤：使用生物大分子或微生物体的抗体包被的单分散超顺纳米磁珠与待检测样品接触进行孵育反应，生成多颗粒的超顺纳米磁珠团簇；反应后进行磁分离得到聚集物，根据所述聚集物的聚集程度确定待检测样品中生物大分子或微生物体的浓度。本发明的方法将免疫磁富集与可视化检测集于一体，操作简单，整个检测过程所需时间短，不需要特殊的仪器设备，而且本发明的方法对抗体的纯度要求不高，可以大大降低检测成本。

