



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105486854 B

(45)授权公告日 2017. 12. 05

(21)申请号 201510632072.2

(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 105486854 A

(43)申请公布日 2016.04.13

(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 黎诚耀 李金峰 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 33/53(2006.01)

(56)对比文件

CN 102227631 A,2011.10.26,说明书第
11-,4、18-21段,实施例2,附图图1,图2A-图2C.

CN 204556647 U,2015.08.12,

CN 1405564 A,2003.03.26,说明书第2页倒
数第3段-第3页第2段,说明书第4页第3-4段,说
明书第5页倒数第8段-倒数第2段.

WO 2015109255 A1,2015.07.23,权利要求
1-142,说明书具体实施方式,附图图1A-图10B.

WO 2009137055 A1,2009.11.12,全文.

审查员 廖叶子

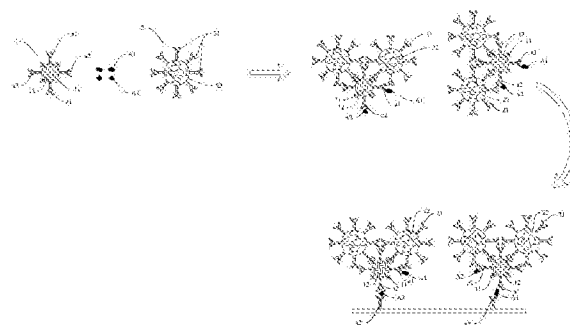
权利要求书1页 说明书10页 附图1页

(54)发明名称

一种信号放大方法及相关装置

(57)摘要

本发明公开了一种信号放大方法,其用于检测靶物质,包括:将具有能特异性结合不同靶物质的多种第一分子的偶联体与多种靶物质结合,偶联体还包括连接体、和与多种第一分子和连接体结合的第一颗粒;桥接体与偶联体的连接体结合,桥接体包括能特异性结合偶联体的连接体的第二分子;通过能特异性结合不同靶物质的多种第三分子分别捕获与桥接体结合后的偶联体上的多种靶物质。当桥接体的第二分子可与偶联体的第一分子结合,则偶联体上可不含有连接体。本发明还公开了使用该信号放大方法的相关装置。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. 一种同时检测艾滋病病毒P24蛋白和丙型肝炎病毒core蛋白的免疫层析试纸条,其特征在于,其制备方法为:

(1) 偶联体的制备:按照Frens法制备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艾滋病病毒P24蛋白单克隆抗体I、6 μ g丙型肝炎病毒core蛋白单克隆抗体I,室温反应15min;加入牛血清白蛋白,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重悬颗粒,其中所述重悬液为10mM PH8.0的Tris、0.5%Tween20、0.4%酪蛋白、2%蔗糖;

(2) 桥接体的制备:按照Frens法制备20nm胶体金颗粒;按照每毫升胶体金颗粒加入4 μ L 0.2M碳酸钾的量调节PH;按照每毫升胶体金颗粒加入10 μ gBSA的单克隆抗体室温反应15min;加入酪蛋白,使其终浓度为0.2%,室温静置15min;10000rpm离心10min;弃掉上清,加入与胶体金体积相同的重悬液重悬颗粒,其中所述重悬液为10mM PH8.0的Tris、0.5% Tween20、0.4%酪蛋白、8%蔗糖;

(3) 第三结合垫的制备:按照5 μ L/cm喷偶联体于奥斯龙8964玻璃纤维素膜上,置于37 $^{\circ}$ C烘干,裁成0.4cm宽,备用;

(4) 第二结合垫的制备:按照5 μ L/cm喷桥接体于奥斯龙8964玻璃纤维素膜上,置于37 $^{\circ}$ C烘干,裁成0.4cm宽,备用;

(5) 层析膜的制备:按照1 μ L/cm喷涂浓度为1mg/mL的艾滋病病毒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;

(6) 样品垫的制备:用100mM PH8.0Tris、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;

(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。

一种信号放大方法及相关装置

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于检测靶物质的信号放大方法及相关装置。

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超灵敏检测,方可作出准确可靠的判断,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用于检测靶物质的信号放大方法及相关装置,该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。

[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] 将具有能特异性结合不同靶物质的多种第一分子的偶联体与多种靶物质结合,偶联体还包括连接体、和与多种第一分子和连接体结合的第一颗粒;

[0008] 桥接体与偶联体的连接体结合,桥接体包括能特异性结合偶联体的连接体的第二分子;

[0009] 通过能特异性结合不同靶物质的多种第三分子分别捕获与桥接体结合后的偶联体上的多种靶物质。

[0010] 一种检测靶物质的信号放大方法,包括:

[0011] 将具有能特异性结合不同靶物质的多种第一分子的偶联体与多种靶物质结合,偶联体还包括与多种第一分子结合的第一颗粒;

[0012] 桥接体与偶联体的第一分子结合,所述桥接体包括能特异性结合偶联体的多种第一分子的第二分子;

[0013] 通过能特异性结合不同靶物质的多种第三分子分别捕获与桥接体结合后的偶联

体上的多种靶物质。

[0014] 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。

[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、第一结合垫、层析膜、吸水垫;所述第一结合垫包被有偶联体和桥接体,其中该偶联体包括能特异性结合不同靶物质的多种第一分子、连接体及与多种第一分子和连接体结合的第一颗粒,桥接体包括能特异性结合偶联体的连接体的第二分子;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多种第三分子。

[0016] 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体和桥接体,其中该偶联体包括能特异性结合不同靶物质的多种第一分子、和与多种第一分子结合的第一颗粒,桥接体包括能特异性结合偶联体的连接体的第二分子;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多种第三分子。

[0017] 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;所述第三结合垫包被有偶联体,该偶联体包括能特异性结合不同靶物质的多种第一分子、连接体及与多种第一分子和连接体结合的第一颗粒,所述第二结合垫包被有具有能特异性结合偶联体的连接体的第二分子的桥接体;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多种第三分子。

[0018] 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;所述第三结合垫包被有偶联体,该偶联体包括能特异性结合不同靶物质的多种第一分子、和与多种第一分子结合的第一颗粒;所述第二结合垫包被有具有能特异性结合偶联体的多种第一分子的第二分子的桥接体;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多种第三分子。

[0019] 优选地,所述第二结合垫与第三结合垫调换位置顺序。

[0020] 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、第四结合垫、层析膜、吸水垫;所述反应微孔含有偶联体,该偶联体包括能特异性结合不同靶物质的多种第一分子、连接体及与多种第一分子和连接体结合的第一颗粒;所述第四结合垫包被有具有能特异性结合偶联体的连接体的第二分子的桥接体,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多种第三分子。

[0021] 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、第四结合垫、层析膜、吸水垫;所述反应微孔含有偶联体,该偶联体包括能特异性结合不同靶物质的多种第一分子、和与多种第一分子结合的第一颗粒;所述第四结合垫包被有具有能特异性结合偶联体的多种第一分子的第二分子的桥接体,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多种第三分子。

[0022] 一种靶物质的免疫渗滤装置,由渗滤卡、封闭液、偶联体、桥接体、洗涤液组成,其中渗滤卡由卡底、吸水垫料、渗滤膜、卡盖依次叠加组成,该免疫渗滤装置的检测方法包括以下步骤:

- [0023] 1) 往渗滤膜上滴加一滴封闭液；
- [0024] 2) 液体滤过之后，滴加一滴血清样本；
- [0025] 3) 血清滤完之后，滴加一滴洗涤液；
- [0026] 4) 滤完之后滴加一滴权利要求1或2所述的偶联体、一滴权利要求1或2所述的桥接体；
- [0027] 5) 等液体滤完之后，滴加一滴洗涤液；
- [0028] 6) 滤完之后，观察结果；
- [0029] 其中，渗滤膜上不同区域的检测点固定有能特异性结合不同靶物质的多种第三分子。
- [0030] 本发明具有如下有益效果：
- [0031] 本发明的信号放大方法将具有能特异性结合不同靶物质的多种第一分子与样品中不同靶物质结合后与桥接体结合，随后由位于固相上的能特异性结合不同靶物质的多种第三分子捕获固定，从而得到信号放大效果，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

- [0032] 图1为本发明同时检测两种靶物质的信号放大的原理示意图；
- [0033] 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；
- [0034] 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

- [0035] 下面结合附图及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。
- [0036] 本发明所提及的术语“连接体”表示通过特异性反应(如：抗原-抗体反应、核酸杂交反应)与第三分子特异性结合使得偶联体与桥接体结合的材料；术语“桥接体”表示通过特异性反应(如：抗原-抗体反应、核酸杂交反应)与偶联体上的连接体或第一分子进行特异性结合将偶联体桥接在一起形成树枝状结构的材料。
- [0037] 本发明的信号放大方法中，偶联体包括多种第一分子、连接体及与多种第一分子和连接体结合的第一颗粒，多种第一分子能分别特异性结合不同的靶物质；桥接体包括能特异性结合偶联体的连接体的第二分子；在检测时，偶联体上多种第一分子与样品中的不同靶物质结合，随后桥接体的第二分子与偶联体的连接体结合将偶联体桥接在一起形成多个树枝状结构，该树枝状结构上含有多种不同的靶物质，位于固相上的能特异性结合不同靶物质的多种第三分子捕获该树枝状结构上的多种靶物质(偶联体的第一分子与位于固相上的第三分子分别结合同一靶物质上的不同位点)，进而达到放大信号的目的。当桥接体的

第二分子可与偶联体的第一分子结合,则偶联体上可不含有连接体。

[0038] 所述靶物质可以为蛋白质分子、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。

[0039] 多种第一分子包括至少两种能特异性结合不同靶物质的单克隆抗体或多克隆抗体,但不局限于抗体。多种第三分子包括至少两种能特异性结合不同靶物质的单克隆抗体或多克隆抗体,但不局限于抗体。所述第一分子和第三分子可以相同或不同。

[0040] 连接体可以是蛋白质、核酸、多糖、肽等可以与桥接体发生特异性结合的材料。

[0041] 桥接体可以是能特异性结合偶联体的连接体或第一分子的第二分子,还可以是偶联有能特异性结合偶联体的连接体或第一分子的第二分子的第二颗粒。第一颗粒或第二颗粒为金属颗粒、彩色乳胶颗粒、荧光颗粒中的一种,或者其他任何一种可以作为信号标记物的颗粒。第一颗粒或第二颗粒的形状为球形、管状、棒状,或者多面体状中的任一种。第一颗粒与第二颗粒可相同或不同。第一颗粒的粒径小于或等于第二颗粒的粒径。

[0042] 图1显示了本发明同时检测两种靶物质A1、A2的信号放大的原理,其中偶联体包括连接体。参考图1,两种第一分子a1、a2和连接体11与第一颗粒12结合形成偶联体1,第二分子21和第二颗粒22结合形成桥接体2,两种第三分子a1'、a2'分别位于固相上的不同区域的检测位点或检测线上。检测时,偶联体1的两种第一分子a1、a2分别与样品中的两种靶物质A1、A2结合,随后偶联体1的连接体11与桥接体2的第二分子结合形成含有靶物质A1、A2的树枝状结构,流经测试条时,树枝状结构上的靶物质A1、A2与检测位点上的第三分子a1'、a2'结合以放大信号。

[0043] 请参考图2,本发明的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3上的样品垫31、第一结合垫32、层析膜33、吸水垫34;所述第一结合垫32包被有偶联体及桥接体,其中偶联体包括能特异性结合不同靶物质的多种第一分子、连接体及与多种第一分子和连接体结合的第一颗粒,桥接体包括能特异性结合偶联体的连接体的第二分子;所述层析膜33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...Tn, $n \geq 2$)分别固定有能特异性结合不同靶物质的多种第三分子。若桥接体的第二分子可与偶联体的第一分子结合,则偶联体上可不含有连接体。

[0044] 请参考图3,本发明的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,偶联体和桥接体分别位于不同的结合垫上,该免疫层析试纸包括依次搭接粘贴在底板4上的样品垫41、第二结合垫42、第三结合垫43、层析膜44、吸水垫45;所述第三结合垫43包被有偶联体,该偶联体包括能特异性结合不同靶物质的多种第一分子、连接体及与多种第一分子和连接体结合的第一颗粒;所述第二结合垫42包被有桥接体,该桥接体包括能特异性结合偶联体的连接体的第二分子;所述层析膜44上设置质控线C及在不同区域的检测线T分别固定有能特异性结合不同靶物质的多种第三分子。若桥接体的第二分子可与偶联体的第一分子结合,则偶联体上可不含有连接体。在该免疫层析试纸上,第二结合垫42与第三结合垫43的位置顺序可调换。

[0045] 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、第四结合垫、层析膜、吸水垫;所述反应微孔含有偶联体,该偶联体包括能特异性结合不同靶物质的多种第一分子、连接体及与多种第一分子和连接体结合的第一颗粒;所述第四结合

垫包被有能特异性结合偶联体的连接体的第二分子的桥接体,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多种第三分子。若桥接体的第二分子可与偶联体的第一分子结合,则偶联体上可不含有连接体。

[0046] 免疫层析用的垫可以是任何天然多孔材料或任何合成多孔材料,如硝酸纤维素或聚酯纤维素形成的垫。

[0047] 样品垫用于吸收含有多种靶物质的液体样品,并经毛细作用将靶物质转移至结合垫上;吸水垫可以是任何能充分吸收反应后残液的垫。

[0048] 第一结合垫上含有已干燥的偶联体和桥接体,偶联体与桥接体不相互接触。

[0049] 层析膜上不同区域上设有多个检测线或检测位点,且检测线或检测位点在垂直方向上不重叠。每个检测位点或检测线固定有能特异性结合一种靶物质的第三分子。质控线位于检测线与吸水垫之间的层析膜上。

[0050] 以下结合实施例对本发明做进一步描述。

[0051] 实施例1

[0052] 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

[0053] 1、偶联体的制备: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艾滋病病毒P24蛋白单克隆抗体I、6 μ g丙型肝炎病毒core蛋白单克隆抗体I,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。

[0054] 2. 桥接体的制备:按照Frens法(1973)制备20nm胶体金颗粒;按照每毫升胶体金颗粒加入4 μ L 0.2M碳酸钾的量调节PH;按照每毫升胶体金颗粒加入10 μ g BSA的单克隆抗体室温反应15min;加入酪蛋白,使其终浓度为0.2%,室温静置15min;10000rpm离心10min;弃掉上清,加入与胶体金体积相同的虫悬液(10mM Tris(PH8.0)、0.5%Tween20、0.4%酪蛋白、8%蔗糖)重悬颗粒。

[0055] 3. 第三结合垫的制备:按照5 μ L/cm喷偶联体于奥斯龙8964玻璃纤维素膜上,置于37 $^{\circ}$ C烘干,裁成0.4cm宽,备用。

[0056] 4. 第二结合垫的制备:按照5 μ L/cm喷桥接体于奥斯龙8964玻璃纤维素膜上,置于37 $^{\circ}$ C烘干,裁成0.4cm宽,备用。

[0057] 5. 层析膜的制备:按照1 μ L/cm喷涂浓度为1mg/mL的艾滋病病毒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。

[0058] 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。

[0059] 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。

[0060] 8. 试纸条的使用:1)样品处理:取血清样品,加入等体积的样品处理液(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)。

[0061] 9. 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95.4%,与ZeptoMetrix公司的P24酶联免疫试剂盒的符合率达到98.5%。

[0062] 实施例2

[0063] 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

[0064] 1. 偶联体的制备:取100 μ L浓度为10mg/mL的稀土荧光纳米颗粒(粒径:300nm)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;加入布鲁氏菌脂多糖抗体I20 μ g、大肠杆菌O157脂多糖单克隆抗体I55 μ g,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。

[0065] 2. 第三结合垫的制备:按照5 μ L/cm喷偶联体与聚酯玻璃纤维素膜上,置于37 $^{\circ}$ C烘干,裁成0.4cm宽,备用。

[0066] 3. 第二结合垫的制备:按照5 μ L/cm喷桥接体(酪蛋白单克隆抗体,浓度为10ng/mL)与聚酯纤维素膜上,置于37 $^{\circ}$ C烘干,裁成0.4cm宽,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。

[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。

[0070] 7. 试纸条的使用:1)样品处理:取牛奶样品20 μ L,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)。

[0071] 8. 本方法与检测梯度稀释的羊布鲁氏菌和大肠杆菌O157,其检测下限分别达到102CFU/ML和101CFU/ML,显著优于目前的方法。

[0072] 实施例3

[0073] 免疫层析试纸条检测禽流感病毒

[0074] 1. 偶联体的制备:取100 μ L浓度为10mg/mL的彩色乳胶颗粒,涡旋混匀;加入H5型禽流感病毒单克隆抗体I15 μ g、H5型禽流感病毒单克隆抗体I25 μ g、H9型禽流感病毒单克隆抗体I12 μ g,4 $^{\circ}$ C过夜;加入BSA,使其终浓度为1%,37 $^{\circ}$ C孵育2h;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%酪蛋白,3%海藻糖),重悬颗粒,备用。

[0075] 2. 第一结合垫的制备:按照8 μ L/cm喷偶联体与聚酯玻璃纤维素膜上,置于37 $^{\circ}$ C烘干;裁成0.4cm宽;按照5 μ L/cm喷桥接体(BSA单克隆抗体,浓度10ng/mL),置于37 $^{\circ}$ C烘干;备用。

[0076] 3. 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H7禽流感多克隆抗体作为检测线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。

[0077] 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1.2cm宽,备用。

[0078] 5. 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。

[0079] 6. 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)。

[0080] 7. 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。

[0081] 实施例4

[0082] 免疫层析装置同时检测布鲁氏菌BP26蛋白和OMP31蛋白

[0083] 1. 偶联体的制备:取100 μ L浓度为10mg/mL的金纳米棒,涡旋混匀;加入BP26单克隆抗体15 μ g、OMP31单克隆抗体15 μ g,4 $^{\circ}$ C过夜;加入BSA,使其终浓度为1%,室温孵育2h;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%酪蛋白,3%海藻糖),重悬颗粒,备用。

[0084] 2. 反应微孔的制备:取25 μ L偶联体,加入微孔中,冻干,密封,备用。

[0085] 3. 第四结合垫的制备:按照5 μ L/cm喷桥接体(BSA单克隆抗体,浓度10ng/mL),裁成0.4cm宽;置于37 $^{\circ}$ C烘干;备用。

[0086] 4. 层析膜的制备:按照1 μ L/cm喷涂浓度为1.5mg/mL的BP26单克隆抗体II作为检测线T1,按照1 μ L/cm喷涂浓度为1.8mg/mL的OMP31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。

[0087] 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。

[0088] 6. 试纸条的组装:将样品垫、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。

[0089] 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)。

[0090] 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阳性),与布鲁氏菌分离培养法的吻合率达到100%。

[0091] 实施例5

[0092] 免疫层析试纸同时检测HIV 抗体和HCV 抗体

[0093] 1. 偶联体的制备:按照Frens法(1973)制备30nm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 HIV检测抗原(深圳菲鹏生物)、11 μ g HCV检测抗原(深圳菲鹏生物),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。

[0094] 2. 桥接体的制备：按照Frens法(1973)制备20nm胶体金颗粒；按照每毫升胶体金颗粒加入4 μ L 0.2M碳酸钾的量调节PH；按照每毫升胶体金颗粒加入10 μ g BSA的单克隆抗体室温反应15min；加入酪蛋白，使其终浓度为0.2%，室温静置15min；10000rpm离心10min；弃掉上清，加入与胶体金体积相同的重悬液[10mM Tris (PH8.0)，0.5%Tween20，0.4%酪蛋白、2%蔗糖]重悬颗粒。

[0095] 3. 第三结合垫的制备：按照5 μ L/cm喷偶联体于奥斯龙8964玻璃纤维素膜上，置于37 $^{\circ}$ C烘干，裁成0.4cm宽，备用。

[0096] 4. 第二结合垫的制备：按照5 μ L/cm喷桥接体于奥斯龙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。

[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。

[0100] 8. 试纸条的使用：取2 μ L血清或血浆于样品垫上，加80 μ L 生理盐水于样品垫上，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)。

[0101] 9. 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%。

[0102] 实施例6

[0103] 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

[0104] 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)。

[0105]

pathogens	primers&probes
S. aureus	5' -Biotin-TGTCGGTACACGATATTCTT -3'
	5' -DIG-CACGACTAAATAGACGCTCATTTCGCGATTTT-3'
E. coli 0157	5' -FITC-AGTACATTGGCATCGTGTGGA-3'
	5' -RB-TTTCGATGAGTTTATCTGCAAGGTGATTCCCTTAA-3'
L. monocytogenes	5' -Cy5-CAAGCATGGACAAATGCACCAGTAAA -3'
	5' -HEX-AATGTGACTGGCGCTTTAATTGC-3'
Salmonella	5' -FAM-GCTCGTTTACGACCTGAATTAC-3'
	5' -Cy3-TTCTACATTGACAGAATCCTC-3'

[0106] 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，加水至23 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。

[0107] 3. 偶联体的制备:按照Frens法(1973)制备30nm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4 μ g地高辛单克隆抗体、3 μ g罗丹明B单克隆抗体、3 μ g HEX单克隆抗体、4 μ g Cy3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。

[0108] 4. 桥接体的制备:按照Frens法(1973)制备20nm胶体金颗粒;按照每毫升胶体金颗粒加入4 μ L 0.2M碳酸钾的量调节PH;按照每毫升胶体金颗粒加入10 μ g BSA的单克隆抗体室温反应15min;加入酪蛋白,使其终浓度为0.2%,室温静置15min;10000rpm离心10min;弃掉上清,加入与胶体金体积相同的重悬液[10mM Tris (PH8.0)、0.5%Tween20、0.4%酪蛋白、2%蔗糖]重悬颗粒。

[0109] 5. 第三结合垫的制备:按照3 μ L/cm喷偶联体于奥斯龙8964玻璃纤维素膜上,置于37 $^{\circ}$ C烘干,裁成0.4cm宽,备用。

[0110] 6. 第二结合垫的制备:按照5 μ L/cm喷桥接体于奥斯龙8964玻璃纤维素膜上,置于37 $^{\circ}$ C烘干,裁成0.4cm宽,备用。

[0111] 7. 层析膜的制备:按照1 μ L/cm喷涂浓度为1mg/mL的抗生物素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Cy5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。

[0112] 8. 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。

[0113] 9. 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。

[0114] 10. 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)。

[0115] 11. 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.coIi 0157:H7)、102CFU/mL(L.monocytogenes)、100CFU/mL(沙门氏菌)。

[0116] 实施例6

[0117] 免疫渗滤法检测流感病毒

[0118] 1. 偶联体的制备: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5 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流感A病毒单克隆抗体I、12 μ g流感B病毒单克隆抗体I,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,加入等胶体金体积的重悬液[10mM PB (PH7.4)、0.4%酪蛋白、5%蔗糖]重悬颗粒。

[0119] 2. 桥接体的制备:按照Frens法(1973)制备20nm胶体金颗粒;按照每毫升胶体金颗粒加入4 μ L 0.2M碳酸钾的量调节PH;按照每毫升胶体金颗粒加入10 μ g BSA的单克隆抗体室温反应15min;加入酪蛋白,使其终浓度为0.2%,室温静置15min;10000rpm离心10min;弃

掉上清,加入两倍胶体金体积的重悬液[10mM PB(PH7.4)、0.4%酪蛋白、5%蔗糖]重悬颗粒。

[0120] 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作为检测点1,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作为检测点2,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。

[0121] 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。

[0122] 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)滤完之后滴加一滴偶联体、一滴桥接体;5)等液体滤完之后,滴加一滴洗涤液(PBST);6)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)。

[0123] 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。

[0124] 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。

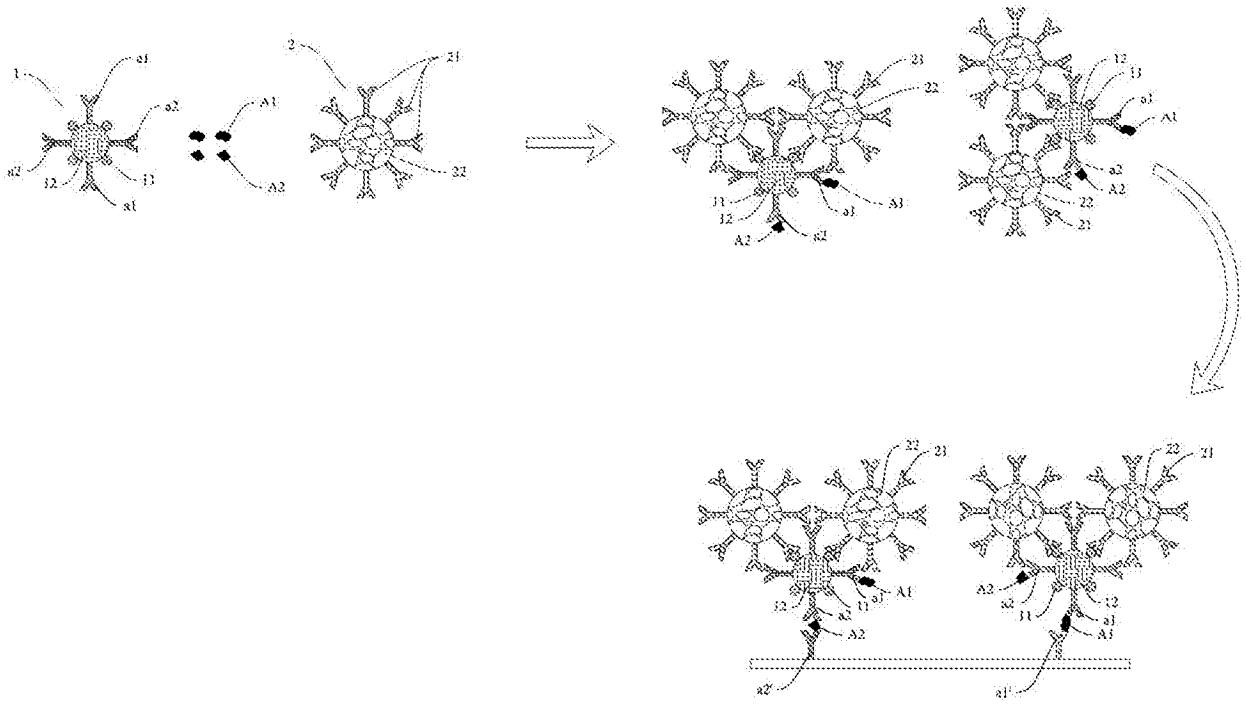


图1

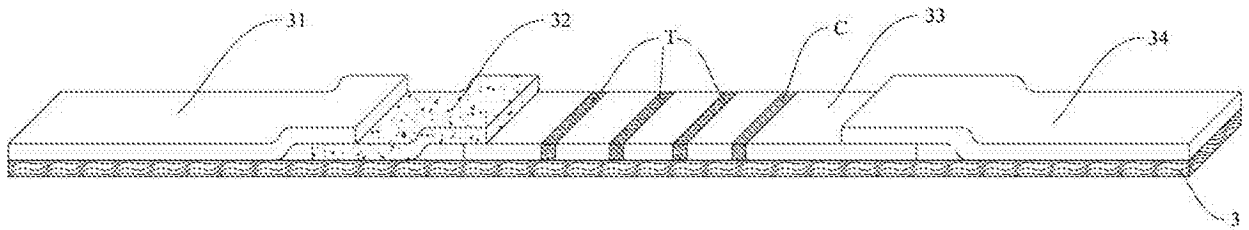


图2

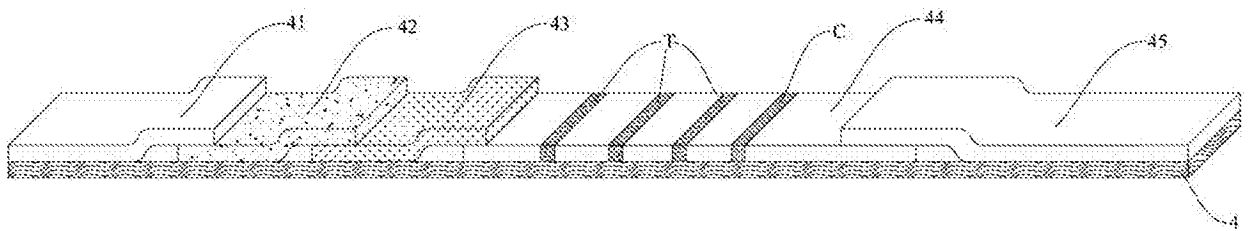


图3

专利名称(译)	一种信号放大方法及相关装置		
公开(公告)号	CN105486854B	公开(公告)日	2017-12-05
申请号	CN201510632072.2	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	黎诚耀 李金峰 张玲		
发明人	黎诚耀 李金峰 张玲		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/5302		
代理人(译)	陈卫		
其他公开文献	CN105486854A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种信号放大方法，其用于检测靶物质，包括：将具有能特异性结合不同靶物质的多种第一分子的偶联体与多种靶物质结合，偶联体还包括连接体、和与多种第一分子和连接体结合的第一颗粒；桥接体与偶联体的连接体结合，桥接体包括能特异性结合偶联体的连接体的第二分子；通过能特异性结合不同靶物质的多种第三分子分别捕获与桥接体结合后的偶联体上的多种靶物质。当桥接体的第二分子可与偶联体的第一分子结合，则偶联体上可不含有连接体。本发明还公开了使用该信号放大方法的相关装置。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。

