



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108333536 A

(43)申请公布日 2018.07.27

(21)申请号 201710051839.1

G01N 33/573(2006.01)

(22)申请日 2017.01.20

(71)申请人 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

(74)专利代理机构 北京市英智伟诚知识产权代理事务所(普通合伙) 11521

代理人 刘丹妮

(51)Int.Cl.

G01R 33/00(2006.01)

G01N 27/72(2006.01)

G01N 27/74(2006.01)

G01N 33/50(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

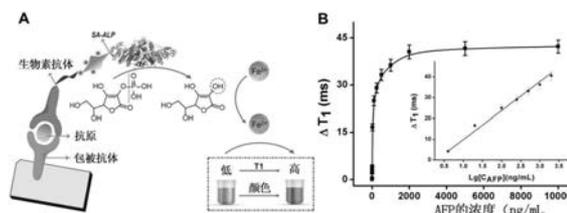
权利要求书1页 说明书6页 附图3页

(54)发明名称

基于纵向弛豫时间信号读出的磁传感器及其构建方法、用途

(57)摘要

本发明提供一种基于纵向弛豫时间信号读出的磁传感器,其所述磁传感器以纵向弛豫时间(T1)作为读出信号。本发明还提供了一种基于纵向弛豫时间信号读出的磁传感器的构建方法,以及该磁传感器在生化分析和免疫分析及食品安全,环境检测等领域的用途。



1. 一种基于纵向弛豫时间信号读出的磁传感器,其特征在于,所述磁传感器以纵向弛豫时间(T_1)作为读出信号。

2. 根据权利要求1所述的磁传感器,其特征在于,所述纵向弛豫时间(T_1)的读出信号变化是通过氧化还原反应引起 Fe^{2+}/Fe^{3+} 浓度转化而引起的。

3. 一种基于纵向弛豫时间信号读出的磁传感器的构建方法,其特征在于,所述方法包括如下步骤:

(1) 制备 Fe^{2+} 或 Fe^{3+} 水溶液;

(2) 将步骤(1)溶液与待测样品混合,进行免疫和/或生化反应;

(3) 测量步骤(2)所得到的混合体系的纵向弛豫时间,根据纵向弛豫时间的改变量,确定待测样品中目标物的含量。

4. 根据权利要求3所述的方法,其特征在于,所述 Fe^{2+} 或 Fe^{3+} 的溶液为水溶液。

5. 根据权利要求3或4所述的方法,其特征在于,所述目标物包括细菌、真菌、病毒、蛋白质、多糖、单糖或核酸中的一种或多种。

6. 根据权利要求5所述的方法,其特征在于,所述蛋白质为血清中的甲胎蛋白和/或抗线粒体抗体。

7. 一种检测碱性磷酸酶、葡萄糖氧化酶和/或血液葡萄糖的方法,其特征在于,所述方法将碱性磷酸酶、葡萄糖氧化酶和/或血液葡萄糖作为标记物催化或参与 Fe^{3+}/Fe^{2+} 氧化还原反应,从而通过权利要求1或2所述的磁传感器以纵向弛豫时间(T_1)作为读出信号来测定所述标记物。

8. 权利要求1或2所述的磁传感器在制备用于诊断、恢复和/或体育训练心脏疾病、心肌疾病及神经疾病的产品的用途。

9. 权利要求1或2所述的磁传感器在制备用于检测食品药物残留、兽药残留、食品添加剂和/或激素的产品中的用途。

10. 一种用于检测碱性磷酸酶、葡萄糖氧化酶和/或血液葡萄糖的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括含有权利要求1或2所述的磁传感器。

基于纵向弛豫时间信号读出的磁传感器及其构建方法、用途

技术领域

[0001] 本发明属于生物分子识别技术领域,具体而言,本发明涉及一种基于纵向弛豫时间信号读出的磁传感器及其构建方法、用途。

背景技术

[0002] 磁弛豫时间传感器,作为一类新型的磁传感器技术,已经在临床诊断,环境监测,食品安全等领域得到了广泛地应用。磁传感分析最大的优势是:因为生物样品和环境样品本的磁信号基本可以忽略不计,因此该方法不需要复杂的样品前处理步骤,目前,磁弛豫时间传感器主要包括:(1)基于磁颗粒状态改变的横向弛豫时间(T_2)免疫传感器;(2)将磁分离和磁弛豫时间相结合的磁弛豫时间免疫传感器:基于粒径大小不同的超顺纳米磁珠在同一磁场中分离速度的显著差异,从而将免疫磁富集和磁弛豫时间免疫分析方法结合起来,实现磁分离和磁信号检测一步完成。该新型的磁弛豫时间传感分析方法在检测食品中致病菌的灵敏度比传统的磁弛豫时间免疫分析方法提高了2个数量级。这些方法,都需要制备“纳米磁颗粒-抗体”的偶联物,会浪费大量的抗体,操作比较繁琐。同时该方法只能利用免疫反应的高度特异性,仅仅适用于免疫分析。如果用于生化分析,则需要其相应的抗体,造成分析复杂,成本高,因此传统的磁弛豫时间传感器不适合生化分析。传统的磁弛豫时间传感器都是将纳米磁颗粒作为信号探针,但该磁探针存在如下两个问题:(1)纳米磁颗粒的比表面积大,容易造成非特异性吸附,因此容易造成假阳性;(2)纳米磁颗粒在复杂的生物或者食品样品中,本身容易自身聚集,造成假阳性信号。因此开发一种稳定性更好,不需要磁颗粒,可以同时实现生化分析和免疫分析的新型磁传感器对提高体外诊断的效率和准确性拓宽其在其他领域的应用具有重要的现实意义。

发明内容

[0003] 因此,为克服现有技术中的上述缺点和不足,本发明的目的在于提供一种稳定性更好,不需要磁颗粒,并且可以同时实现生化分析和免疫分析的基于纵向弛豫时间信号读出的磁传感器的构建方法。

[0004] 具体地,为达到此目的,本发明提供以下技术方案:

[0005] 本发明的第一方面提供了一种基于纵向弛豫时间信号读出的磁传感器,所述磁传感器以纵向弛豫时间(T_1)作为读出信号。

[0006] 根据本发明第一方面的磁传感器,其中,所述 T_1 的读出信号变化是通过氧化还原反应引起二价铁离子(Fe^{2+})/三价铁离子(Fe^{3+})浓度转化而引起的。

[0007] 本发明的第二方面提供了一种基于 T_1 信号读出的磁传感器的构建方法,所述方法包括如下步骤:

[0008] (1) 制备一定浓度的二价铁离子或者三价铁离子的溶液;

[0009] (2) 将步骤(1)得到的混合液与待测样品混合,进行免疫和/或生化反应;

[0010] (3) 测量步骤(2)所得到的混合体系的 T_1 ,根据 T_1 的改变量,确定待测样品中目标物

的含量。

[0011] 根据本发明第二方面的构建方法,其中,所述 Fe^{2+} 或者 Fe^{3+} 的溶液为水溶液。

[0012] 根据本发明第二方面的构建方法,其中,所述目标物包括细菌、真菌、病毒、蛋白质、多糖、单糖或核酸中的一种或多种。

[0013] 根据本发明第二方面的构建方法,其中,所述蛋白质为血清中的甲胎蛋白和/或抗线粒体抗体。

[0014] 本发明的第三方面提供了一种检测碱性磷酸酶、葡萄糖氧化酶和/或血液葡萄糖等生化分析指标的方法,所述方法将碱性磷酸酶、葡萄糖氧化酶和/或血液葡萄糖作为标记物催化或参与 $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ 氧化还原反应,从而通过前述的磁传感器以 T_1 作为读出信号来测定所述标记物。

[0015] 本发明的第四方面提供了第一方面所述的磁传感器在制备用于诊断、恢复和/或体育训练心脏疾病、心肌疾病及神经疾病的产品的用途。

[0016] 本发明的第五方面提供了第一方面所述的磁传感器在制备用于检测食品药物残留、兽药残留、食品添加剂和/或激素的产品中的用途。

[0017] 本发明的第六方面提供了一种用于检测碱性磷酸酶、葡萄糖氧化酶和/或血液葡萄糖的试剂盒,所述试剂盒包括含有第一方面的磁传感器。

[0018] 现结合本发明的构思,对本发明具体技术方案进一步阐述如下:

[0019] 本发明将纵向弛豫时间(T_1)作为一种信号读出信号,引入到传统的磁弛豫时间传感器中,基于 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 两种离子对水分子质子 T_1 的影响具有显著差异这个现象,通过特定的氧化还原反应,实现 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 两种离子之间的转换,从而实现目标物和 T_1 之间的转换,由于氧化还原反应的多样性,并且很多生化分析指标本身具有氧化/还原的性质,因此可以直接通过氧化还原反应,实现生化分析。同时,很多酶可以做为免疫标记酶,并且酶可以催化其底物产生具有氧化性或者还原性的物质,进而可以实现免疫分析。

[0020] 本发明的技术方案具有但不限于以下有益效果:

[0021] 本发明将 T_1 作为信号读出系统引入生化分析系统中,解决了传统的基于 T_2 作为磁信号磁传感器方法稳定性不足的问题。同时,通过氧化还原反应,可以调节水溶液中 Fe^{3+} 和 Fe^{2+} 浓度,由于 Fe^{3+} 和 Fe^{2+} 引起水分子的质子的 T_1 改变的能力存在显著的差异,因此一方面可以实现生化分析,同时又可以实现免疫分析,可以对同一个样品中待检测的生化指标和免疫分析指标同时用基于 T_1 信号的磁传感方法进行分析,大大拓宽了基于 T_2 信号的磁弛豫时间传感器检测范围的限制,极大地提高了分析效率,进而为重大疾病的早期诊断、提供一种有力的工具。

[0022] 更为重要的是,基于 T_1 的磁传感器是采用的铁离子的信号,克服了传统的磁传感器都需要纳米磁颗粒的这个缺点,因为配置一定浓度的 Fe^{3+} 和 Fe^{2+} 水溶液,比合成粒径均匀,悬浮稳定性好的纳米磁颗粒更加简单,成本更低,稳定性更好。因此,本发明方法可以克服传统的磁传感器大部分依赖于纳米磁颗粒的这个缺点,进而大大简化了整个磁信号分析过程,提高了整个方法的稳定性。

[0023] 该方法可以应用于临床诊断中的生化分析和免疫分析领域,可以应用于食品安全,环境监测等领域。

附图说明

- [0024] 以下,结合附图来详细说明本发明的实施方案,其中:
- [0025] 图1示出了 T_1 值的改变量随维生素C浓度变化的示意图;
- [0026] 图2示出了 T_1 值的改变量随ALP浓度变化的示意图;
- [0027] 图3示出了 T_1 值的改变量随 H_2O_2 浓度变化的示意图;
- [0028] 图4示出了 T_1 值的改变量随葡萄糖浓度变化的示意图;
- [0029] 图5A示出了基于碱性磷酸酶作为免疫标记酶实现 T_1 信号应用于免疫分析的示意图;
- [0030] 图5B示出了 T_1 值的改变量随AFP浓度变化的示意图;
- [0031] 图6A和图6B分别示出了用 T_1 信号免疫分析方法同时检测血清样品中的抗线粒体抗体和碱性磷酸酶的含量。

具体实施方式

[0032] 下面通过具体的实施例进一步说明本发明,但是,应当理解为,这些实施例仅仅是用于更详细具体地说明之用,而不应理解为用于以任何形式限制本发明。

[0033] 本部分对本发明试验中所使用到的材料以及试验方法进行一般性的描述。虽然为实现本发明目的所使用的许多材料和操作方法是本领域公知的,但是本发明仍然在此作尽可能详细描述。本领域技术人员清楚,在上下文中,如果未特别说明,本发明所用材料和操作方法是本领域公知的。

[0034] 本实施例中使用的试剂和材料、溶液、仪器如下:

[0035] 试剂和材料:

[0036] 三氯化铁($FeCl_3$)和氯化亚铁($FeCl_2$)均来自西龙化学试剂有限公司,碳酸钠(Na_2CO_3)、碳酸氢钠($NaHCO_3$)、碱性磷酸酶(ALP)、抗坏血酸磷酸酯钠和维生素C来自Sigma-Aldrich公司,30%过氧化氢(H_2O_2)溶液(北京化工厂,北京),PBS片(Amresco,USA),吐温-20(Amresco,USA),96孔酶标板(Corning,USA),牛血清白蛋白(Amresco,USA),甲胎蛋白和识别甲胎蛋白的抗体均来自北京热景生物有限公司,生物素化试剂,碱性磷酸酶标记的链霉亲和素(SA-ALP)偶联物、葡萄糖氧化酶(GOD,glucose oxidase)均来自Abcam公司,识别抗线粒体抗体试剂盒购自欧蒙公司。

[0037] 溶液配置

[0038] 磷酸盐缓冲液(PBS):取5片PBS片溶于500ml水中,摇匀;

[0039] 封闭液:称取1.2g BSA于40ml水中,摇匀,配成3%BSA封闭液;

[0040] 包被液(碳酸盐缓冲液):称取碳酸钠1.59g、碳酸氢钠2.93g溶于1000ml水中;

[0041] 洗涤液:取5片PBS片溶于500ml水中,再加入2.5ml吐温-20,摇匀,配成PBST洗涤液;

[0042] 葡萄糖溶液:称取360mg葡萄糖于30mL水中,配成100mmol/L葡萄糖溶液。

[0043] 仪器:

[0044] 1.5T小型核磁共振仪购自上海寰彤科教设备有限公司。

[0045] 实施例1

[0046] 碱性磷酸酶 (ALP) 是免疫分析中的一种重要的标记酶,同时碱性磷酸酶可以催化其底物(抗坏血酸酯)产生具有还原性的维生素C (Vc),该Vc介导的氧化还原反应可以实现 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 两种离子之间的转换,一方面实现了ALP的检测,因为ALP本身也是一种重要的生物标志物。同时,其又是一种应用最为广泛的免疫标记酶,进而该基于 T_1 信号的磁传感器可以实现免疫分析和生化分析的结合。

[0047] 在免疫分析方面,碱性磷酸酶 (ALP) 通过酶促反应,可以将抗坏血酸酯去掉一个磷酸基团,变成抗坏血酸 (Vc),Vc可以将 Fe^{3+} 变成 Fe^{2+} ,从而实现了基于 T_1 信号的免疫分析,通过免疫分析,可以实现对多种目标物的检测。

[0048] T_1 磁传感器检测维生素C (Vc)

[0049] 分别将20 μL 浓度为 $10^{-2}\mu\text{M}$ 、 $10^{-1}\mu\text{M}$ 、 $1\mu\text{M}$ 、 $10\mu\text{M}$ 、 $10^2\mu\text{M}$ 、 $10^3\mu\text{M}$ 及 $10^4\mu\text{M}$ 的维生素C加入到20 μL 的4mM Fe^{3+} 溶液中,反应30min,最后取20 μL 混合液,用小型核磁共振仪测 T_1 信号,其结果如图1所示, T_1 值的改变量随着维生素C浓度的升高而变大,两种存在良好的线性关系。

[0050] T_1 磁传感器检测碱性磷酸酶 (ALP)

[0051] 将碱性磷酸酶 (ALP) 用纯水或者Tris-HCl (pH=8.0) 分别稀释至5U/L、50U/L、75U/L、125U/L、250U/L、500U/L和750U/L,加入100 μL 抗坏血酸磷酸酯 (20mM) 于37 $^\circ\text{C}$ 孵化1小时。然后取上述混合液100 μL 加入到100 μL 的 FeCl_3 (4mM) 中,混合液于37 $^\circ\text{C}$ 孵化30分钟。最后取20 μL 反应液,利用小型核磁共振仪 (NMR) 测定 T_1 值。实验结果如图2,可以看到 T_1 值的变化量与ALP的浓度有良好的线性关系。

[0052] 实施例2

[0053] 构建基于纵向弛豫时间信号读出的磁传感器可以检测血液中的葡萄糖,葡萄糖在葡萄糖氧化酶 (GOD) 作用下产生双氧水 (H_2O_2), H_2O_2 具有氧化性,可以将 Fe^{2+} 转换为 Fe^{3+} ,从而导致 T_1 信号的改变,通过 T_1 信号间接地反映了目标物(葡萄糖)的含量。也就是说通过这种氧化还原可以实现对很多种生化分析指标进行检测。或者将葡萄糖氧化酶 (GOD) 作为免疫分析中的标记酶,产生 H_2O_2 , H_2O_2 通过氧化还原反应,可以 $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ 转变,进而引起磁信号 T_1 信号的改变,最终将样品中目标物的含量信号转换为 T_1 信号的改变。

[0054] T_1 传感器对不同浓度 H_2O_2 的响应结果

[0055] 分别将20 μL 浓度为0.078mM、0.156mM、0.325mM、0.65mM、1.25mM、2.5mM、5mM、10mM、12.5mM、25mM、50mM、5mM、125mM、250mM及500mM的 H_2O_2 溶液加入到96孔的微孔中,然后每个微孔中加入20 μL 的4mM FeCl_2 ,于37 $^\circ\text{C}$ 孵化30分钟。每孔取20 μL 反应液,利用小型核磁共振仪 (NMR) 测定 T_1 值。实验结果如图3,可以看到 T_1 值的改变量与 H_2O_2 的含量有良好的线性关系。

[0056] T_1 传感器对不同浓度葡萄糖的响应结果

[0057] 分别将100 μL 浓度为0、0.1mM、0.2mM、0.39mM、0.78mM、1.56mM、3.12mM、6.25mM、12.5mM、25mM、50mM及100mM的葡萄糖溶液加入到96孔的酶标板中,然后每孔加入100 μL 的葡萄糖氧化酶于37 $^\circ\text{C}$ 孵化1小时。取50 μL 的反应液,加入100 μL 4mM FeCl_2 于37 $^\circ\text{C}$ 孵化30分钟,最后取20 μL 反应液,利用小型核磁共振仪 (NMR) 测定 T_1 值。实验结果如图4,可以看到 T_1 值的改变量与葡萄糖的含量有良好的正相关。

[0058] 实施例3

[0059] 通过免疫分析反应,实现了对血清中的甲胎蛋白 (AFP) 的检测。

[0060] 实验步骤:

[0061] (1) 将识别AFP的捕获抗体用包被液(碳酸盐缓冲液, pH 9.6) 稀释至5 μ g/mL, 加入至ELISA酶标板孔中, 100 μ L/孔。置于37 $^{\circ}$ C, 反应2h。

[0062] (2) 室温下, 甩净孔内溶液, 拍干。加入含0.5% (体积) Tween-20的PBS溶液, 150 μ L/孔, 静置1min, 甩净孔内洗涤液, 拍干。重复洗涤3次。

[0063] (3) 封闭: 加入100 μ L/孔的3% BSA, 置于37 $^{\circ}$ C, 2h。

[0064] (4) 室温下, 甩净孔内溶液, 拍干。加入含0.5% (体积) Tween-20的PBS, 150 μ L/孔, 甩净孔内洗涤液, 拍干, 重复洗涤3次, -20 $^{\circ}$ C保存, 待用。

[0065] (5) 用PBS对AFP (1000ng/mL) 进行2倍倍比稀释至7.8125ng/mL, 以100 μ L/孔加入包被好的ELISA板中, 置于37 $^{\circ}$ C孵育1h。

[0066] (6) 室温下, 甩净孔内溶液, 拍干。加入含0.5% (体积) Tween-20的PBS, 150 μ L/孔, 甩净孔内洗涤液, 拍干, 重复洗涤3次。

[0067] (7) 将识别AFP的生物素化的二抗稀释到2 μ g/mL, 以100 μ L/孔加入至ELISA板, 置于37 $^{\circ}$ C孵化1h。

[0068] (8) 室温下, 甩净孔内溶液, 拍干。加入含0.5% (体积) Tween-20的PBS, 150 μ L/孔, 甩净孔内洗涤液, 拍干, 重复洗涤3次。

[0069] (9) 将链霉亲和素标记的碱性磷酸酶 (SA-ALP) 稀释1000倍, 别取100 μ L加入各孔中, 置于37 $^{\circ}$ C孵育1h。

[0070] (10) 室温下, 甩净孔内溶液, 拍干。加入含0.5% (体积) Tween-20的PBS, 150 μ L/孔, 甩净孔内洗涤液, 拍干, 重复洗涤3次。

[0071] (11) 配制抗坏血酸磷酸酯溶液 (20mM), 以100 μ L/孔加入至ELISA板, 置于37 $^{\circ}$ C 1h。

[0072] (12) 将FeCl₃ (4mM) 以100 μ L/孔加入至ELISA板, 置于37 $^{\circ}$ C孵化30分钟。

[0073] (13) 最后取20 μ L反应液, 利用小型核磁共振仪 (NMR) 测定T₁值, 实验结果如图5, 图5A示出了通过碱性磷酸酶标记的二抗, 可以进行相关的免疫分析, 因为检测磷酸酶标记的二抗的含量和目标物的浓度成正相关, 因此引起的T₁信号的改变和样品中目标物的含量成正相关, 从而实现定量分析。图5B示出了T₁值的改变量随着AFP浓度变化的示意图, 并且该方法对AFP的检测具有很好的灵敏度和线性范围。

[0074] 实施例4

[0075] 通过免疫分析反应, 实现了对血清中的抗线粒体抗体的检测。

[0076] T₁信号同时实现碱性磷酸酶和抗线粒体抗体的检测

[0077] 将疑似肝硬化的血清样品, 每个样品分成两份, 取20 μ L样品用于碱性磷酸酶的分析, 20 μ L样品用于分析抗线粒体抗体的含量。操作步骤分别与实施例3中测AFP的量的步骤方法相同。从图6可知, 同一个血清样品中的碱性磷酸酶和抗线粒体抗体的浓度具有很大的相关性。本发明人发现血清中碱性磷酸酶的含量高出阈值的样品中抗线粒体抗体的浓度也高出阈值, 而碱性磷酸酶和抗线粒体抗体都和肝病有关, 是两个不同的指标, 碱性磷酸酶是生化指标, 抗线粒体抗体是免疫分析指标。这个结果, 说明了在一个系统中同时实现生化分析和免疫分析具有很大的现实意义, 而我们构建的这个T₁sensor可以同时实现生化分析和免疫检测。

[0078] 尽管本发明已进行了一定程度的描述, 明显地, 在不脱离本发明的精神和范围的前提下, 可进行各个条件的适当变化。可以理解, 本发明不限于所述实施方案, 而归于权利

要求的范围,其包括所述每个因素的等同替换。

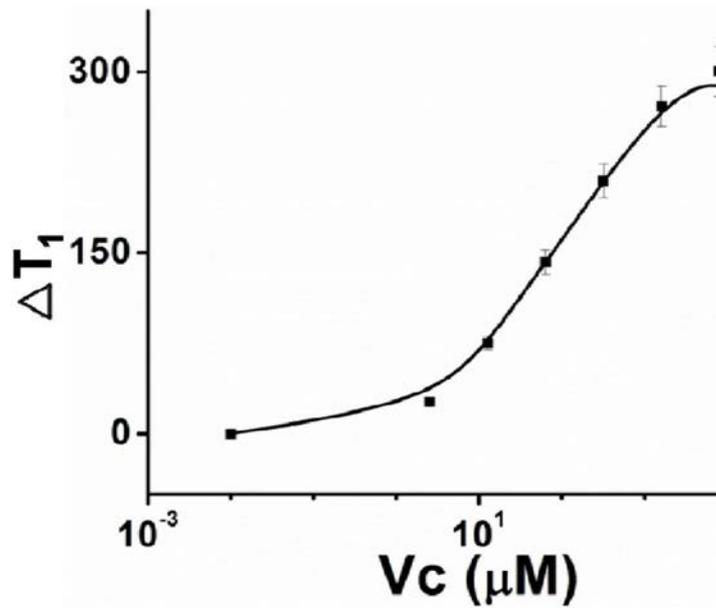


图1

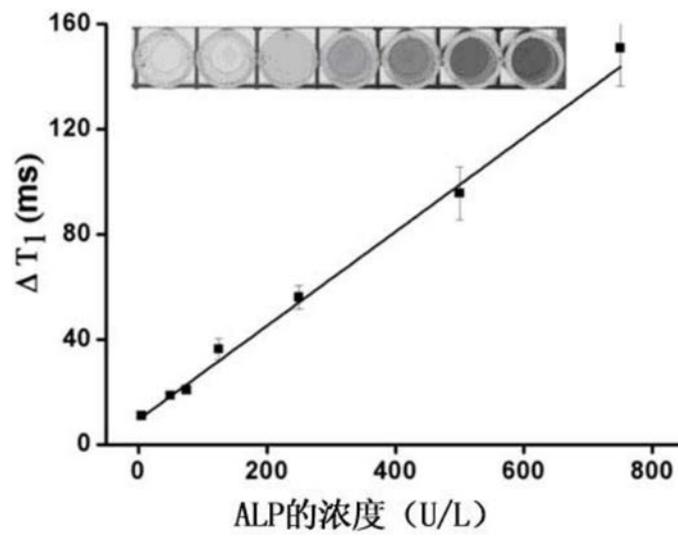


图2

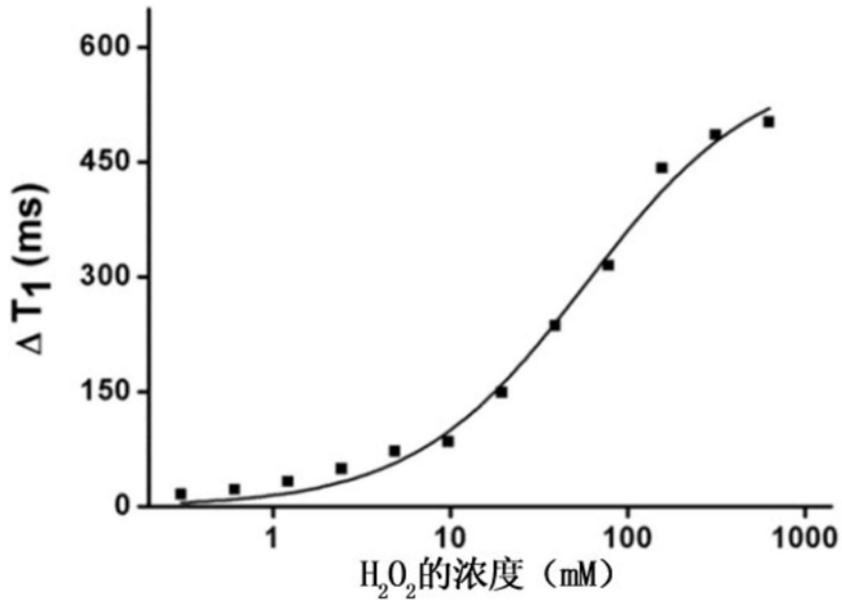


图3

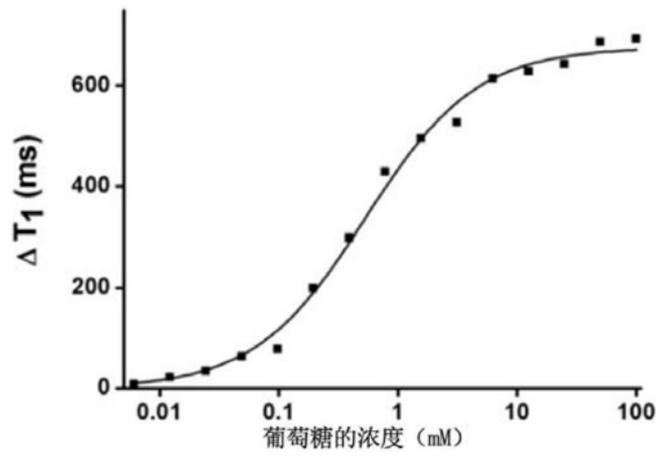


图4

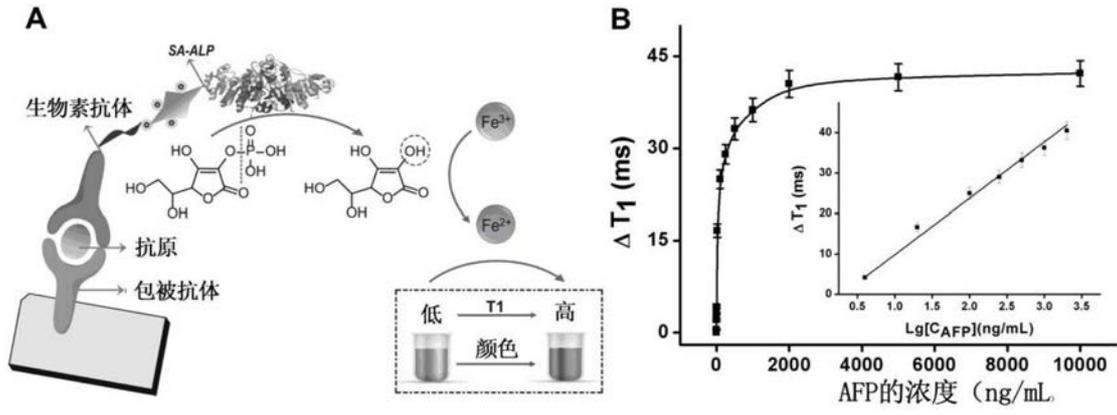


图5

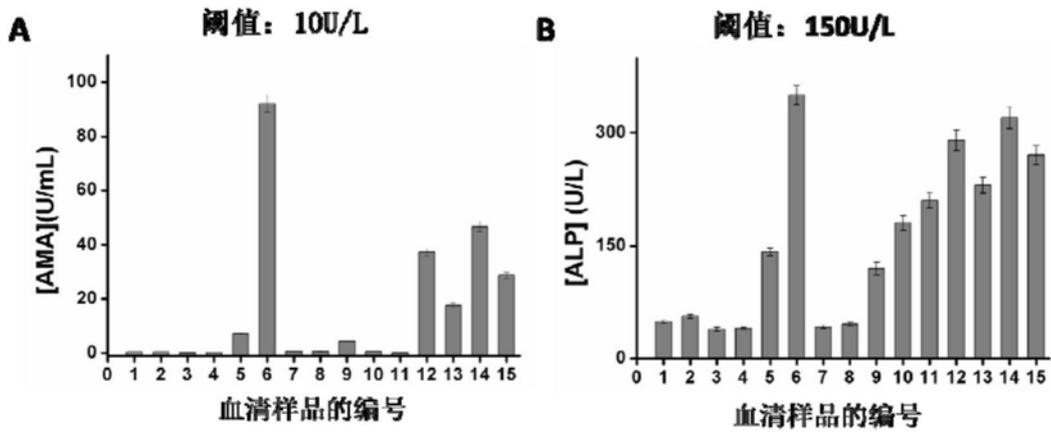


图6

专利名称(译)	基于纵向弛豫时间信号读出的磁传感器及其构建方法、用途		
公开(公告)号	CN108333536A	公开(公告)日	2018-07-27
申请号	CN201710051839.1	申请日	2017-01-20
[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		
发明人	蒋兴宇 陈翊平		
IPC分类号	G01R33/00 G01N27/72 G01N27/74 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/573		
CPC分类号	G01R33/0023 G01N27/72 G01N27/74 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/573		
代理人(译)	刘丹妮		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种基于纵向弛豫时间信号读出的磁传感器，其所述磁传感器以纵向弛豫时间(T1)作为读出信号。本发明还提供了一种基于纵向弛豫时间信号读出的磁传感器的构建方法，以及该磁传感器在生化分析和免疫分析及食品安全，环境检测等领域的用途。

