(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 101893627 B
(45)授权公告日 2014.12.17

(21)申请号 201010222447.5

(22)申请日 2010.07.08

(73)专利权人 崔亚丽
地址 710069 陕西省西安市太白北路 229 号西北大学 386 号信箱

(72)发明人 崔亚丽 石峰 惠文利

(74)专利代理机构 西安智邦专利商标代理有限公司 61211
代理人 徐平

(51)Int.Cl.
G01N 33/558(2006.01)
G01N 33/531(2006.01)
G01N 33/76(2006.01)
G01N 33/72(2006.01)
G01N 33/577(2006.01)

(56)对比文件
CN 1245625 C,2006.03.15, 摘要及权利要求.
CN 1268930 C,2006.08.09, 摘要及权利要求.
CN 101165487 A,2008.04.23, 实施例 1 权利要求.
CN 101740191 A,2010.06.16, 摘要及权利要求.
CN 101694492 A,2010.04.14, 摘要及权利要求.
CN 101566636 A,2009.10.28, 摘要 说明书 3-6 页 实施例 6 附图 1.

审查员 杨光

权利要求书2页 说明书9页 附图2页

(54)发明名称

金磁微粒标记免疫层析快速检测方法

(57)摘要

本发明提供一种金磁微粒标记免疫层析快速检测方法，旨在解决传统免疫层析分析法的检测方法在临床实践中易造成主观差异化、检测精度和灵敏度低、操作繁复、适用领域窄的问题。该检测方法的基本思想是：金磁微粒偶联抗体或配体或抗原以后在与之匹配的工作液和免疫层析装置中能够快速，定量的高灵敏度地检测被分析物。本发明既可以通过金磁微粒的特征颜色进行可目视化的判读也可通过金磁微粒磁信号的强弱对被测物进行定量检测，方法简单，成本低，能够实现人体与动植物的疾病检测，环境的检测，食品安全检测、以及毒品和药物滥用检测等。

CN 101893627 B

1. 基于夹心法应用金磁微粒标记快速免疫层析检测方法，该方法用于非疾病诊断治疗目的，包括以下环节：

1) 金磁微粒标记待检目标物的抗体或者配体或者抗原，并溶解在层析工作液中：

1.1) 取金磁微粒，用 pH = 7,0.01M 的磷酸盐缓冲液平衡 3 次，将待检目标物的抗体或配体或抗原按 200μg/mg 金磁微粒的比例加入经 pH = 7,0.01M 的磷酸盐缓冲液的平衡处理的金磁微粒中，置于 35℃、180rpm 的恒温振荡器中充分反应 30min；

1.2) 反应完毕，在磁性分离器上分离 3min，弃上清，用 pH = 7,0.01M 的磷酸盐缓冲液含有 0.5% Tween20 清洗，去除未结合在金磁微粒表面的蛋白分子；重复以上步骤三次；

1.3) 封闭：加入 1ml 的封闭剂到表面已固定待检目标物的抗体或配体或抗原的金磁微粒中，置于 35℃、180rpm 的空气恒温振荡器中充分混匀 2h 进行封闭；封闭剂为含有 5%的牛血清白蛋白 (BSA)、脱脂奶粉的 pH = 7,0.01M 的磷酸盐缓冲液；

1.4) 反应完毕，在磁性分离器上分 3min，弃上清，用 pH = 7,0.01M 的磷酸盐缓冲液含有 0.5% Tween 20 清洗，去除未结合在金磁微粒表面的蛋白分子；重复以上步骤三次；最后溶解在层析工作液中；这里的层析工作液是 pH = 7,0.01M 的磷酸盐缓冲液其中含有以下效应物 (1)BSA, 最终浓度为 1%，(2) 脱脂奶粉，最终浓度为 2%；(3) 蔗糖，最终浓度为 5%，(4)Tween20，最终浓度为 5%；

2) 免疫层析装置的各个组件的处理

2.1) 样品垫为聚酯纤维，样品垫处理程序为：将聚酯纤维裁剪成 5cm×5cm 然后浸泡于样品垫处理液中 0.5 分钟，然后 30℃烘干，置于 4℃待用，样品垫处理液是：pH = 7,0.01M 的磷酸盐缓冲液含有蔗糖，最终浓度 5%；

2.2) 结合垫的材质为，亲水的玻璃纤维；结合垫处理程序为：将结合垫裁剪成 5cm×5cm 然后浸泡于层析工作液中 0.5 分钟，然后 30℃烘干，然后将 0.5ml 步骤 1) 中溶解在层析工作液中金磁微粒标记待检目标物的抗体或配体或抗原喷涂在 5cm×5cm 的结合垫上；然后 30℃烘干，置于 4℃待用；

2.3) 免疫层析膜的材质为硝酸纤维素膜；免疫层析膜的处理首先将 20ul 浓度为 2.5mg/ml 的待检目标物的抗体或配体或抗原喷涂成线在长度为 30 厘米的免疫层析膜上形成检测带，和将 20ul 浓度为 2.5mg/ml 羊抗鼠 IgG 多克隆抗体喷涂成线在长度为 30 厘米的免疫层析膜上形成质检带，检测带与质检带相隔 4 毫米；然后 35℃到 60℃烘干或冷冻干燥；

封闭：将包被有抗体的免疫层析膜置于封闭剂中，30℃烘干，置于 4℃待用；封闭剂为含有 5%的牛血清白蛋白 (BSA)、5%的脱脂奶粉的 pH = 7,0.01M 的磷酸盐缓冲液；

2.4) 将样品垫、结合垫和吸水垫裁剪成一定大小 5cm×3cm，在带有不干胶的支撑板上依次贴上免疫层析膜、样品垫、结合垫和吸水垫，免疫层析膜设于底衬上的中部，样品垫和吸水垫分别设于支撑板上的两边，结合垫设于加样垫与层析膜之间，层析膜的另一端接吸水垫，然后用不干胶彻底固定；最后，将其裁剪宽度为 4 毫米的试纸条；

2.5) 样品测试和结果判读

利用双抗夹心法，对被测样品进行目视化判读或磁信号定量检测。

2. 基于夹心法应用金磁微粒标记快速免疫层析检测方法，该方法用于非疾病诊断治疗目的，包括以下环节：

1) 金磁微粒标记待检目标物的抗体或配体或抗原，并溶解在层析工作液中：

1.1) 取金磁微粒 1mg，用 pH = 7，0.01M 的磷酸盐缓冲液平衡 3 次，将 1mg/ml 的待检目标物的抗体或配体或抗原，200μg 加入金磁微粒中，置于 35℃、180rpm 的恒温振荡器中充分反应 30min；

1.2) 反应完毕，在磁性分离器上分离 3min，吸去上清，用 pH = 7，0.01M 的磷酸盐缓冲液含有 0.5% Tween20 清洗，去除未标记的待检目标物的抗体或配体或抗原；重复以上步骤三次；

1.3) 封闭：加入 1ml 的封闭剂到表面已固定待检目标物的抗体或配体或抗原的金磁微粒中，置于 35℃、180rpm 的空气恒温振荡器中充分混匀 2h 进行封闭；封闭剂为含有 5%的牛血清白蛋白 (BSA)、5%脱脂奶粉、5%小牛血的 pH = 7，0.01M 的磷酸盐缓冲液；

1.4) 反应完毕，在磁性分离器上分离 3min，弃上清，用 pH = 7，0.01M 的磷酸盐缓冲液含有 0.5% Tween20 清洗，去除未结合在金磁微粒表面的抗体分子；重复以上步骤三次；最后溶解在层析工作液中；这里的层析工作液是 pH = 7，0.01M 的磷酸盐缓冲液其中含有以下效应物：浓度为 2%的柠檬酸，浓度为 1%的 BSA，浓度 2%的脱脂奶粉，浓度为 0.5%的叠氮化钠，浓度为 2%的聚乙烯吡咯烷酮，浓度为 2%的分子量 6000 的聚乙二醇，浓度 5%的蔗糖，浓度 5%的 Tween20；

2) 免疫层析装置的各个组件的处理

2.1) 样品垫为玻璃纤维膜；样品垫处理程序为：将玻璃纤维膜裁剪成 5cm×5cm，然后浸泡于样品垫处理液中 0.5 分钟取出，然后 30℃烘干，置于 4℃待用；样品垫处理液是：pH = 7，0.01M 的硼酸盐缓冲液，缓冲液还含有 (1)5%的聚乙烯吡咯烷酮，(2) 浓度为 5%的聚乙二醇 6000，(3) 浓度为 5%蔗糖，(4) 浓度为 5%的 Tween20；

2.2) 结合垫的材质选用聚酯纤维膜；结合垫处理程序为：首先将聚酯纤维膜裁剪成 5cm×5cm 浸泡于层析工作液中 0.5 分钟取出，然后 30℃烘干，然后将 0.5ml 金磁微粒标记待检目标物的抗体或配体或抗原喷涂在 5cm×5cm 的结合垫上；然后 30℃烘干，置于 4℃待用；

2.3) 层析膜的制备：选用硝酸纤维素膜；免疫层析膜的处理首先将浓度为 2.5mg/ml，20ul 待检目标物的抗体或配体或抗原喷涂成线在长度 30cm 免疫层析膜上形成检测带，和羊抗鼠 IgG 多克隆抗体喷涂成线在长度 30cm 免疫层析膜上形成质检带，检测带与质检带相隔 5 毫米；然后 35℃到 60℃烘干或冷冻干燥；

封闭：将包被有抗体的免疫层析膜置于封闭剂中，30℃烘干，置于 4℃待用；封闭剂为含有 5%的牛血清白蛋白 (BSA)、5%脱脂奶粉、5%小牛血的 pH = 7，0.01M 的磷酸盐缓冲液；

2.4) 在支撑板上依次贴上层析膜、样品垫、结合垫和吸水垫，免疫层析膜设于底衬上的中部，样品垫和吸水垫分别设于支撑板上的两边，结合垫设于加样垫与层析膜之间，层析膜的另一端接吸水垫，最后用不干胶固定；然后裁剪成宽 4 毫米宽的试纸条；

2.5) 样品测试和结果判读

利用双抗夹心法，对被测样品进行目视化判读或磁信号定量检测。

金磁微粒标记免疫层析快速检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种免疫层析分析法，具体涉及采用金磁微粒标记免疫层析的快速检测方法，主要应用于激素、蛋白质、病毒、毒品、细菌、药物分子、毒素、重金属等检测领域。

背景技术

[0002] 现有的胶体金和乳胶颗粒标记的免疫层析分析法已经在临床医学检验中得到了广泛的应用，其基本原理是以微孔膜为固相载体，包被目标物（即被测物）的抗原或抗体，加入待检样本后，经微孔膜的渗滤作用或毛细作用是标本中的目标物语膜上的包被的抗原或抗体结合，通过胶体金与之反应形成胶体金本身的颜色（红色）或者乳胶颗粒的（蓝色），可通过肉眼观察检测结果。但是对于某些抗原或抗体含量极低的样本，标记物的颜色很淡几乎用肉眼难以判断结果，同时由于每个检测人视觉上的差异，也很难得到统一的判断效果，同时对一些待检测样本的定量检测也有很大困难，虽然目前市场上有针对胶体金等标记的免疫层析试纸条判读的仪器来减少人为原因的差异，但是这种仪器仅能对在固相载体表面的标记物颜色检测，而对固相载体内部的标记物很难检测到，因此检测的灵敏度受到很大限制。同时检测的生物样本中可能含有颜色物质会严重影响检测的结果和灵敏度。

发明内容

[0003] 本发明提出应用金磁微粒标记免疫层析检测条的快速检测方法，旨在解决传统免疫层析分析法的检测方法在临床实践中易造成主观差异化、检测精度和灵敏度低、操作繁复、适用领域窄的问题。

[0004] 本发明的基本指导思想是：金磁微粒偶联抗体或配体或抗原以后在与之匹配的工作液和免疫层析装置中能够快速，定量的高灵敏度地检测被分析物。

[0005] 本发明提出的金磁微粒标记免疫层析快速检测方法，包括以下步骤：

[0006] 1）金磁微粒标记待检目标物的抗体或者配体或者抗原，并溶解在层析工作液中；

[0007] 1.1）取金磁微粒，用偶联缓冲液平衡 3 次，然后将待检目标物的抗体或配体或抗原按照与金磁微粒质量比 10 ～ 500μg ： 1mg 加入经平衡处理后的金磁微粒中，置于 0 ～ 50℃、50 ～ 220rpm 的空气恒温振荡器中充分反应 10min ～ 12h；

[0008] 所述偶联缓冲液为 pH ＝ 4-9，0.005-0.5M 的磷酸盐缓冲液、pH ＝ 3-6，0.1-3M 的三羟甲基氨基甲烷－盐酸溶液或 pH ＝ 6-9，0.01-3M 的醋酸盐缓冲液中的一种，所述金磁微粒为核壳结构、组装结构、磁性氧化铁组装在核壳结构外层的金磁微粒或者基于以上三种结构进行表面功能化修饰的金磁微粒；

[0009] 1.2）于空气恒温振荡器中反应完毕，在磁性分离器上分离 2 ～ 3min，弃上清，用清洗缓冲液清洗，去除非特异性结合的分子，得到表面已固定抗体或配体或抗原的金磁微粒；

[0010] 所述清洗缓冲液为下列任一溶液：pH ＝ 4-9，0.005-0.5M，且含有 0.5-5％ Tween20

或者 0.5-5% Triton X-100 的磷酸盐缓冲液 ;pH = 6-9,0.1-3M 且含有 0.5-5% Tween20 或者 0.5-5% Triton X-100 的三羟甲基氨基甲烷 - 盐酸溶液 ;pH = 3-6,0.01-3M 且含有 0.5-5% Tween20 或者 0.5-5% Triton X-100 的醋酸盐缓冲液 ;pH = 6-9,0.1-10M 且含有 0.5-5% Tween20 或者 0.05-2% Triton X-100 的硼酸盐缓冲液 ;pH = 2-5,0.01-1M 且含有 0.5-5% Tween20 或者 0.5-5% TritonX-100 的甘氨酸 - 盐酸缓冲液 ;

[0011] 1.3) 封闭 :加入 500ul ～ 2ml 的封闭剂到表面已固定抗体或配体或抗原的金磁微粒中,置于 20 ～ 80℃、50 ～ 220rpm 的恒温振荡器中充分混匀 5min ～ 12h 进行封闭 ;

[0012] 所述封闭剂是采用上述偶联缓冲液溶解了以下物质的一种或多种 :牛血清白蛋白 (BSA)、赖氨酸 (Lys)、脱脂奶粉、乙醇胺、小牛血清、山羊血清 ;上述组分的终浓度均为 0.05% -10% ;

[0013] 1.4) 将偶联抗体且封闭完毕的金磁微粒在磁性分离器上分离 2 ～ 3min,弃上清,用清洗缓冲液清洗,去除未结合的生物分子,最后将此偶联有抗体且封闭完成的金磁微粒溶解在层析工作液中 ;

[0014] 所述层析工作液是缓冲液基液加上效应物,其中缓冲液基液为下列任一溶液 :pH = 4-9,0.005-0.5M 的磷酸盐缓冲液 ;pH = 6-9,0.1-3M 三羟甲基氨基甲烷 - 盐酸溶液 ;pH = 3-6,0.01-3M 醋酸盐缓冲液 ;pH = 6-9,0.1-10M 的硼酸盐缓冲液 ;pH = 2-5,0.01-1M 甘氨酸 - 盐酸缓冲液 ;效应物是以下的一种或者几种 :(1) 柠檬酸,终浓度为 0.1% -5%,(2) 三羟甲基氨基甲烷,终浓度为 0.1% -5%,(3) 脱脂奶粉,终浓度为 0.01% -20%,(4) 叠氮化钠,终浓度为 0.01% -5%,(5) 分子量 4000-20000 的聚乙二醇,终浓度为 0.01% -5%,(6)Tween20,终浓度为 0.5-5% ;

[0015] 2) 制作免疫层析检测条 ;该免疫层析检测条包括样品垫,结合垫,免疫层析膜,吸水纸和支撑板 ;

[0016] 2.1) 免疫层析检测条的各部件的准备和处理

[0017] 所述样品垫的材质为疏水性或亲水的玻璃纤维或聚酯纤维 ;样品垫处理程序为 :将样品垫浸泡于样品垫处理液中 0.5 分钟到 2 分钟后取出,或者按照 0.5ul/20cm^2-20ul/20cm^2 的比例将样品垫处理液均匀喷涂于样品垫上,然后 15℃～ 60℃烘干或冷冻干燥,待用 ;所述样品垫处理液为缓冲液基液加上效应物 ;所述缓冲液基液为下列溶液中任一溶液 :pH = 4-9,0.005-0.2M 的磷酸盐缓冲液 ;pH = 6-9,0.01-3M 三羟甲基氨基甲烷 - 盐酸溶液 ;pH = 3-6,0.01-3M 醋酸盐缓冲液 ;pH = 6-9,0.1-10M 的硼酸盐缓冲液 ;pH = 2-5,0.01-1M 甘氨酸 - 盐酸缓冲液 ;所述效应物是以下的一种或者几种 :(1) 分子量 4000-20000 的聚乙二醇,终浓度为 0.01% -5%,(2) 蔗糖或者海藻糖,终浓度为 5% -80%,(3)Triton X-100,终浓度为 :0.5-5% ;

[0018] 所述结合垫的材质为疏水性或亲水的玻璃纤维或聚酯纤维 ;结合垫处理程序为 :首先将玻璃纤维或聚酯纤维裁剪成型 ;然后将其浸泡于步骤 1) 所述的最初的层析工作液中 0.5 分钟到 2 分钟,或者采用非浸泡方式,而是按照 0.5ul/20cm^2-20ul/20cm^2 的比例将样品垫处理液均匀喷涂于裁剪成型的玻璃纤维或聚酯纤维裁上 ;然后 15℃到 60℃烘干或冷冻干燥 ;然后取经过步骤 1.4) 所得的含有偶联抗体或配体或抗原且封闭金磁微粒的层析工作液按照 0.5ul/20cm^2-20ul/20cm^2 的比例喷涂于的结合垫上 ;最后 15℃～ 60℃烘干或冷冻干燥,待用 ;

[0019] 所述免疫层析膜的材质为硝酸纤维素膜、尼龙膜、醋酸纤维素膜、聚酯膜，或硝酸纤维素与醋酸纤维素的混合膜之一；针对偶联抗体或配体或抗原选择的不同，免疫层析膜的处理程序分别为：

[0020] 若检测抗原，则金磁微粒偶联与检测抗原特异结合的抗体，首先取与待检目标物特异结合的另一抗体，按照 0.1ul/20cm-20ul/20cm 的比例喷涂成线在免疫层析膜上形成检测带，取多克隆抗体按照 0.1ul/20cm-20ul/20cm 的比例喷涂成线在免疫层析膜上形成与所述检测带平行的质检带，然后 15℃～ 60℃烘干或冷冻干燥；之后将包被有抗体的免疫层析膜置于所述封闭剂中浸泡 0.5 秒到 30 分钟，然后 15℃～ 60℃烘干或冷冻干燥，待用；

[0021] 若检查抗体，则金磁微粒偶联检测抗体特异结合的抗原，则首先取与待检目标物特异结合的另一抗原，按照 0.1ul/20cm-20ul/20cm 的比例喷涂成线在免疫层析膜上形成检测带，取多克隆抗体按照 0.1ul/20cm-20ul/20cm 的比例喷涂成线在免疫层析膜上形成与所述检测带平行的质检带，然后 15℃～ 60℃烘干或冷冻干燥；之后将包被有抗体的免疫层析膜置于所述封闭剂中浸泡 0.5 秒到 30 分钟，然后 15℃～ 60℃烘干或冷冻干燥，待用；

[0022] 若检测小分子受体，则金磁微粒偶联与待检目标物特异结合的配体，则首先取与待检目标物特异结合的另一配体，按照 0.1ul/20cm-20ul/20cm 的比例喷涂成线在免疫层析膜上形成检测带，然后 15℃～ 60℃烘干或冷冻干燥；之后将包被有抗体的免疫层析膜置于所述封闭剂中浸泡 0.5 秒到 30 分钟，然后 15℃～ 60℃烘干或冷冻干燥，待用；

[0023] 2.2) 免疫层析检测条各部件组装成型，即：

[0024] 在带有不干胶的支撑板上依次贴上免疫层析膜、样品垫、结合垫和吸水垫，免疫层析膜设于底衬上的中部，样品垫和吸水垫分别设于支撑板上的两边，结合垫设于加样垫与层析膜之间，层析膜的另一端接吸水垫，然后用不干胶彻底固定，最后裁切成免疫层析检测条；

[0025] 3) 利用双抗夹心法或竞争法，对被测样品进行目视化判读或磁信号定量检测。

[0026] 上述样品垫，结合垫和免疫层析膜在制作时，经过 15℃到 60℃烘干或冷冻干燥后，最好置于 4℃待用。

[0027] 上述步骤 3) 在临床实践过程中，一般对被测样品定性地可目视化判读的同时，也进行高灵敏度的定量检测。

[0028] 上述步骤 3) 采用双抗夹心法或竞争法检测方法，对样品进行目视化判读或磁信号定量检测，其检测原理为：

[0029] 待测目标物在点样带与金磁微粒标记抗体形成免疫复合物，该复合物在膜上移动与固定在膜另一端的特异抗体或者配体发生特异结合，形成固定化的免疫复合物，由于该免疫复合物携带由标记的金磁微粒，因此形成了检测带的金磁标记信号。与此同时，部分游离的金磁微粒标记的抗体可以越过固定化抗体或配体或抗原带，结合到远端的包被抗抗体（二抗）质检带，形成新的金磁微粒结合带，质检带的金磁信号。

[0030] 将样品滴加在样品垫上或者将试纸条的样品垫段浸泡于测试液 0.5 分钟到 1 分钟后取出（样品液切勿没过结合垫带域），检测包括可目视化和磁信号的检测。在双抗夹心法检测中在检测带和控制带有可见的红色或淡红色线表示阳性，如果在控制带有可见的红色线表示阴性，如果出现控制带无颜色显现则表示测试无效。利用磁信号检测需要使用磁性免疫阅读仪，在在检测带和控制带有明显的磁信号出现表示阳性，如果在控制带有明显的

磁信号表示阴性，如果出现控制带没有明显磁信号显现则表示测试无效。

[0031] 利用竞争法的检测中在检测带和控制带有可见的红色或淡红色线表示阴性，如果在控制带有可见的红色线表示阳性，如果出现控制带无颜色显现则表示测试无效。利用磁信号检测需要使用磁性免疫阅读仪，在在检测带和控制带有明显的磁信号出现表示阴性，如果在控制带有明显的磁信号表示阳性，如果出现控制带没有明显磁信号显现则表示测试无效。

[0032] 另外，在临床实践总结出，对于一些特殊抗原和物质检测需要应用在偏酸或偏碱值，比如在消化道疾病方面的，需要在偏酸性的环境中，而在一些药物滥用者的直肠分泌物的检查可能需要偏碱性的环境，因此需要针对不同的检测对象（样本），选择适宜值的各种缓冲液。

[0033] 同理，由于检测样本形式多样，如血清、尿样、唾液。这些多种样本组分复杂，可能会影响层析的效果。所以，在缓冲液的浓度，以及相应效应物的浓度的选择上，也需要充分考虑样本形式对免疫层析的干扰。例如，在病人代谢失调的尿液中，一些盐离子浓度会很高使金磁微粒表面电荷发生变化，影响层析的效果，所以相应要使用较高的表面活性剂的用量，Tween20 的用量可能达到 3％以上。再如，环境检测中一些特殊的水溶液样本，可能含有多种金属成分，这些金属成分或影响配体活性，就需要低缓冲液浓度，比如 0.005 的磷酸盐缓冲液。

[0034] 本发明对金磁微粒的使用，主要是考虑到其如下优点：

[0035] 1、金磁微粒作为一种超顺磁性纳米微粒，只有在磁场中才具有磁响应性。这就使得磁性微粒在溶液中可以自由混合而不会因相互作用而发生聚合。所以在标记或偶联抗体，封闭过程中省去的离心的复杂过程。

[0036] 2、金磁微粒物理性质非常稳定，在持续一定时间之后仍然可以重复实验测量结果。是存档备案的理想选材。

[0037] 3、磁场的信号强弱与磁性微粒的磁性强度呈线性关系。这一磁性检测固有的线性特点保证了分析的高灵敏度和准确性，以及宽广的检测区间。

[0038] 4、生物材料及生物体内极少有磁性物质存在．这一特性克服了常规检测中样品颜色的干扰。

[0039] 基于上述理论，本发明将免疫反应的高特异性与金磁微粒良好的光学和磁学性质有机的结合，利用金磁微粒的具有胶体金特殊颜色和聚磁性微粒的超顺磁性，建立快速、特异、简便、灵敏的免疫层析检测方法，既可以通过金磁微粒的特征颜色进行可目视化的判读也可通过金磁微粒磁信号的强弱对被测物进行定量检测，方法简单，成本低，适用于血样、尿样、唾液等样本，应用于激素、蛋白质、病毒、毒品、细菌、环境污染等检测，可在医院、海关、机场、家庭等场所使用，实现人体与动植物的疾病检测，环境的检测，食品安全检测、以及毒品和药物滥用检测等。

附图说明

[0040] 图 1 是利用磁免疫色谱分析系统对试纸条上金磁微粒的磁信号的强弱检测阴性的结果；

[0041] 图 2 是在免疫试纸条上金磁微粒的可见的颜色检测阳性与阴性的结果；

[0042] 图 3 为金磁微粒标记快速免疫层析试纸条结构示意图。

[0043] 从图 1，可以看出检测带的磁信号与周围背景相似，而质控带的磁信号明显高于周围背景显示出阴性结果。

[0044] 附图标号说明：

[0045] 1- 金磁标结合垫，2- 检测线 T，3- 质控线 C，4- 吸水材料，5-PVC 胶板，6- 层析膜 (NC 硝酸纤维素膜)，7- 样品垫。

具体实施方式

[0046] 本发明利用金磁微粒的磁学性质和特征颜色和易于偶联生物分子的特性，将金磁微粒标记抗体或配体或抗原，用然后将此标记物涂覆于一定材质的结合垫上，目标物的另一抗体（单抗或多抗）包被在免疫层析膜上形成检测带，在此包被膜上同时平行包被抗抗体（二抗）形成质控带。再将处理过的样品垫，结合垫，免疫层析膜，和吸水垫依次粘贴在支撑板板上，利用双抗体夹心法和竞争法检测样品中是否含有目标物和定量检测目标物。当待测样品中含有目标物时，目标物先与金磁微粒标记抗体结合，由于层析作用反应结合物沿包被层析膜向前移动，当遇到包被抗体时形成抗体一抗原（目标物）一金磁微粒抗体复合物而富集在检测带上，多余的金磁微粒标记物继续移动到控制带位置，由于二抗与金磁微粒标记的抗体发生免疫反应，又富集在控制带上，0.5-20 分钟后，取出试纸条，用肉眼在检测带和质控带上观察结果也可以通过磁性免疫色谱阅读进行结果的定量判读。如果质控带处都没有颜色或者没有明显的磁信号，说明试纸条有质量问题，测试无效。

[0047] 各种金磁微粒：组装型磁性复合微粒和核 / 壳型超顺磁性复合微粒，以及对金磁微粒进行的各种表面功能化修饰。

[0048] 以下结合本发明的技术方案提供实施例。

[0049] 实施例一：

[0050] 基于夹心法应用金磁微粒标记快速免疫层析试纸条对早孕检测（健康检测领域）

[0051] 1、金磁微粒标记人绒毛膜促性腺激素 HCG 的 β - 抗体，并溶解在层析工作液中：

[0052] 1.1) 取金磁微粒，用 pH ＝ 7，0.01M 的磷酸盐缓冲液平衡 3 次，将人绒毛膜促性腺激素 HCG 的 β - 抗体按 200μg/mg 金磁微粒的比例加入经 pH ＝ 7，0.01M 的磷酸盐缓冲液的平衡处理的金磁微粒中，置于 35℃、180rpm 的恒温振荡器中充分反应 30min；

[0053] 1.2) 反应完毕，在磁性分离器上分离 3min，弃上清，用 pH ＝ 7，0.01M 的磷酸盐缓冲液含有 0.5% Tween20 清洗，去除未结合在金磁微粒表面的蛋白分子；重复以上步骤三次。

[0054] 1.3) 封闭：加入 1ml 的封闭剂到表面已固定 HCG 抗体的金磁微粒中，置于 35℃、180rpm 的空气恒温振荡器中充分混匀 2h 进行封闭。封闭剂为含有 5% 的牛血清白蛋白 (BSA)、脱脂奶粉的 pH ＝ 7，0.01M 的磷酸盐缓冲液。

[0055] 1.4) 反应完毕，在磁性分离器上分 3min，弃上清，用 pH ＝ 7，0.01M 的磷酸盐缓冲液含有 0.5% Tween 20 清洗，去除未结合在金磁微粒表面的蛋白分子；重复以上步骤三次；最后溶解在层析工作液中。这里的层析工作液是 pH ＝ 7，0.01M 的磷酸盐缓冲液其中含有以下效应物 (1)BSA，最终浓度为 1%。(2) 脱脂奶粉，最终浓度为 2%。(3) 蔗糖，最终浓度为 5%。(4)Tween20，最终浓度为 5%。

[0056] 2、免疫层析装置的各个组件的处理。

[0057] 2.1) 样品垫为聚酯纤维。样品垫处理程序为：将聚酯纤维裁剪成 5cm×5cm 然后浸泡于样品垫处理液中 0.5 分钟，然后 30℃烘干，置于 4℃待用，样品垫处理液是：pH ＝ 7，0.01M 的磷酸盐缓冲液含有蔗糖，最终浓度 5％

[0058] 2.2) 结合垫的材质为，亲水的玻璃纤维。结合垫处理程序为：将结合垫裁剪成 5cm×5cm 然后浸泡于层析工作液中 0.5 分钟，然后 30℃烘干，然后将 0.5ml 步骤 1 中溶解在层析工作液中金磁微粒标记人绒毛膜促性腺激素 HCG 的 β－抗体喷涂在 5cm×5cm 的结合垫上。然后 30℃烘干，置于 4℃待用。

[0059] 2.3) 免疫层析膜的材质为，硝酸纤维素膜。免疫层析膜的处理首先将 20ul 浓度为 2.5mg/ml 的人绒毛膜促性腺激素 HCG 的 α－抗体喷涂成线在长度为 30 厘米的免疫层析膜上形成检测带，和将 20ul 浓度为 2.5mg/ml 羊抗鼠 IgG 多克隆抗体喷涂成线在在长度为 30 厘米的免疫层析膜上形成质检带，检测带与质检带相隔 4 毫米。然后 35℃到 60℃烘干或冷冻干燥。

[0060] 封闭：将包被有抗体的免疫层析膜置于封闭剂中，30℃烘干，置于 4℃待用。封闭剂为含有 5％的牛血清白蛋白 (BSA)、5％的脱脂奶粉的 pH ＝ 7，0.01M 的磷酸盐缓冲液。

[0061] 2.4) 将样品垫，结合垫，和吸水垫裁剪成一定大小 5cm×3cm，在带有不干胶的支撑板上依次贴上层析膜、样品垫、结合垫和吸水垫，免疫层析膜设于底衬上的中部，样品垫和吸水垫分别设于支撑板上的两边，结合垫设于加样垫与层析膜之间，层析膜的另一端接吸水垫，然后用不干胶彻底固定。最后，将其裁剪宽度为 4 毫米的试纸条。

[0062] 2.5) 样品测试和结果判读。

[0063] 将待检测的妇女尿样滴加在样品垫上 3 分钟后判读结果，检测包括可目视化和磁信号的检测。检测中在检测带和控制带有可见的红色或淡红色线表示阳性，如果在控制带有可见的红色线表示阴性，如果出现控制带无颜色显现则表示测试无效。检测结果如图 1 和图 2。利用磁信号检测需要使用磁性免疫阅读仪，在检测带和控制带有明显的磁信号出现表示阳性，如果在控制带有明显的磁信号表示阴性，如果出现控制带明显磁信号显现则表示测试无效

[0064] 实施例二：

[0065] 基于夹心法应用金磁微粒标记快速免疫层析试纸条检测心肌钙蛋白（疾病检测领域）

[0066] 1、金磁微粒标记心肌钙蛋白单克隆抗体，并溶解在层析工作液中：

[0067] 1.1) 取金磁微粒 1mg，用 pH ＝ 7，0.01M 的磷酸盐缓冲液平衡 3 次，将 1mg/ml 的心肌钙蛋白单克隆抗体 mAb2-19C7，200μg 加入金磁微粒中，置于 35℃、180rpm 的恒温振荡器中充分反应 30min；

[0068] 1.2) 反应完毕，在磁性分离器上分离 3min，吸去上清，用 pH ＝ 7，0.01M 的磷酸盐缓冲液含有 0.5％ Tween20 清洗，去除未标记的心肌钙蛋白抗体 I 分子；重复以上步骤三次。

[0069] 1.3) 封闭：加入 1ml 的封闭剂到表面已固定心肌钙蛋白抗体 I 的金磁微粒中，置于 35℃、180rpm 的空气恒温振荡器中充分混匀 2h 进行封闭。封闭剂为含有 5％的牛血清白蛋白 (BSA)、5％脱脂奶粉、5％小牛血的 pH ＝ 7，0.01M 的磷酸盐缓冲液。

[0070] 1.4) 反应完毕，在磁性分离器上分离 3min，弃上清，用 pH ＝ 7，0.01M 的磷酸盐缓冲液含有 0.5％ Tween20 清洗，去除未结合在金磁微粒表面的抗体分子；重复以上步骤三次；最后溶解在层析工作液中。这里的层析工作液是 pH ＝ 7，0.01M 的磷酸盐缓冲液其中含有以下效应物浓度为 2％的柠檬酸，浓度为 1％的 BSA，浓度 2％的脱脂奶粉，浓度为 0.5％的叠氮化钠，浓度为 2％的聚乙烯吡咯烷酮，浓度为 2％的分子量 6000 的聚乙二醇，浓度 5％的蔗糖，浓度 5％的 Tween20。

[0071] 2、心肌钙蛋白免疫层析装置的各个组件的处理。

[0072] 2.1) 样品垫为玻璃纤维膜。样品垫处理程序为：将玻璃纤维膜裁剪成 5cm×5cm，然后浸泡于样品垫处理液中 0.5 分钟取出，然后 30℃烘干，置于 4℃待用。样品垫处理液是：pH ＝ 7，0.01M 的硼酸盐缓冲液，缓冲液还含有 (1)5％的聚乙烯吡咯烷酮，。(2) 浓度为 5％的聚乙二醇 6000。(3) 浓度为 5％蔗糖。(4) 浓度为 5％的 Tween20。

[0073] 2.2) 结合垫的材质选用聚酯纤维膜。结合垫处理程序为：首先将聚酯纤维膜裁剪成 5cm×5cm 浸泡于层析工作液中 0.5 分钟取出，然后 30℃烘干，然后将 0.5ml 金磁微粒标记心肌钙蛋白抗体喷涂在 5cm×5cm 的结合垫上。然后 30℃烘干，置于 4℃待用。

[0074] 2.3) 层析膜的制备：心肌钙蛋白检测中层析膜选用硝酸纤维素膜。免疫层析膜的处理首先将浓度为 2.5mg/ml，20ul 将心肌钙蛋白单克隆抗体 mAb1-16A11 喷涂成线在长度 30cm 免疫层析膜上形成检测带，和羊抗鼠 IgG 多克隆抗体喷涂成线在长度 30cm 免疫层析膜上形成质检带，检测带与质检带相隔 5 毫米。然后 35℃到 60℃烘干或冷冻干燥。

[0075] 封闭：将包被有抗体的免疫层析膜置于封闭剂中，30℃烘干，置于 4℃待用。封闭剂为含有 5％的牛血清白蛋白 (BSA)、5％脱脂奶粉、5％小牛血的 pH ＝ 7，0.01M 的磷酸盐缓冲液。

[0076] 2.4) 在支撑板上依次贴上层析膜、样品垫、结合垫和吸水垫，免疫层析膜设于底衬上的中部，样品垫和吸水垫分别设于支撑板上的两边，结合垫设于加样垫与层析膜之间，层析膜的另一端接吸水垫，最后用不干胶固定。然后裁剪成宽 4 毫米宽的试纸条。

[0077] 2.5) 样品测试和结果判读。

[0078] 将待检病人的血清样品滴加在样品垫上 3 分钟后判读结果，检测包括可目视化和磁信号的检测。检测中在检测带和控制带有可见的红色或淡红色线表示阳性，如果在控制带有可见的红色线表示阴性，如果出现控制带无颜色显现则表示测试无效。利用磁信号检测需要使用磁性免疫阅读仪，在检测带和控制带有明显的磁信号出现表示阳性，如果在控制带有明显的磁信号表示阴性，如果出现控制带明显磁信号显现则表示测试无效。

[0079] 实施例三：

[0080] 基于竞争法利用金磁微粒检测食品中的黄曲霉素（食品安全检测领域）

[0081] 1、金磁微粒标记抗黄曲霉素单克隆抗体 clone 3A7，并溶解在层析工作液中：

[0082] 1.1) 取金磁微粒 1mg，用 pH ＝ 7，0.01M 的磷酸盐缓冲液平衡 3 次，将 1mg/ml 的抗黄曲霉素单克隆抗体 clone 3A7，200μg 加入金磁微粒中，置于 35℃、180rpm 的恒温振荡器中充分反应 30min；

[0083] 1.2) 反应完毕，在磁性分离器上分离 3min，吸去上清，用 pH ＝ 7，0.01M 的磷酸盐缓冲液含有 0.5％ Tween20 清洗，去除未标记的抗黄曲霉素单克隆抗体 clone 3A7；重复以上步骤三次；

[0084] 1.3) 封闭：加入 1ml 的封闭剂到表面已固定心肌钙蛋白抗体 I 的金磁微粒中，置于 35℃、180rpm 的空气恒温振荡器中充分混匀 2h 进行封闭。封闭剂为含有 5％的牛血清白蛋白 (BSA)、5％脱脂奶粉、5％小牛血的 pH ＝ 7，0.01M 的磷酸盐缓冲液；

[0085] 1.4) 反应完毕，在磁性分离器上分离 3min，弃上清，用 pH ＝ 7，0.01M 的磷酸盐缓冲液含有 0.5％ Tween20 清洗，去除未结合在金磁微粒表面的抗体分子；重复以上步骤三次；最后溶解在层析工作液中。这里的层析工作液是 pH ＝ 7，0.01M 的磷酸盐缓冲液其中含有以下效应物浓度为 2％的柠檬酸，浓度为 1％的 BSA，浓度 2％的脱脂奶粉，浓度为 0.5％的叠氮化钠，浓度为 2％的聚乙烯吡咯烷酮，浓度为 2％的分子量 6000 的聚乙二醇，浓度 5％的蔗糖，浓度 5％的 Tween20。

[0086] 2、黄曲霉素检测免疫层析装置的各个组件的处理。

[0087] 2.1) 样品垫为玻璃纤维膜。样品垫处理程序为：将玻璃纤维膜裁剪成 5cm×5cm，然后浸泡于样品垫处理液中 0.5 分钟取出，然后 30℃烘干，置于 4℃待用。样品垫处理液是：pH ＝ 7，0.01M 的硼酸盐缓冲液，缓冲液还含有 (1)5％的聚乙烯吡咯烷酮，。(2) 浓度为 5％的聚乙二醇 6000。(3) 浓度为 5％蔗糖。(4) 浓度为 5％的 Tween20。

[0088] 2.2) 结合垫的材质选用聚酯纤维膜。结合垫处理程序为：首先将聚酯纤维膜裁剪成 5cm×5cm 浸泡于层析工作液中 0.5 分钟取出，然后 30℃烘干，然后将 0.5ml 金磁微粒标记抗黄曲霉素单抗体喷涂在 5cm×5cm 的结合垫上。然后 30℃烘干，置于 4℃待用。

[0089] 2.3) 层析膜的制备：黄曲霉素检测中层析膜选用硝酸纤维素膜。免疫层析膜的处理首先将浓度为 2.5mg/ml，20ul 将黄曲霉素与牛血清白蛋白的共价偶联物喷涂成线在长度 30cm 免疫层析膜上形成检测带，和羊抗鼠 IgG 多克隆抗体喷涂成线在长度 30cm 免疫层析膜上形成质检带，检测带与质检带相隔 5 毫米。然后 35℃到 60℃烘干或冷冻干燥。

[0090] 封闭：将包被有抗体的免疫层析膜置于封闭剂中，30℃烘干，置于 4℃待用。封闭剂为含有 5％的牛血清白蛋白 (BSA)、5％脱脂奶粉、5％小牛血的 pH ＝ 7，0.01M 的磷酸盐缓冲液。

[0091] 2.4) 在支撑板上依次贴上层析膜、样品垫、结合垫和吸水垫，免疫层析膜设于底衬上的中部，样品垫和吸水垫分别设于支撑板上的两边，结合垫设于加样垫与层析膜之间，层析膜的另一端接吸水垫，最后用不干胶固定。然后裁剪成宽 4 毫米宽的试纸条。

[0092] 2.5) 样品测试和结果判读。

[0093] 将待检样品滴加在样品垫上 3 分钟后判读结果，检测包括可目视化和磁信号的检测。检测中在检测带和控制带有可见的红色或淡红色线表示阴性，如果在控制带有可见的红色线表示阳性，如果出现控制带无颜色显现则表示测试无效。利用磁信号检测需要使用磁性免疫阅读仪，在检测带和控制带有明显的磁信号出现表示阴性，如果在控制带有明显的磁信号表示阳性，如果出现控制带明显磁信号显现则表示测试无效。

[0094] 实施例四：

[0095] 基于竞争法利用金磁微粒检测吗啡（毒品和药物滥用检测领域）

[0096] 1、金磁微粒标记抗吗啡的单克隆抗体，并溶解在层析工作液中

[0097] 1.1) 取金磁微粒 1mg，用 pH ＝ 7，0.01M 的磷酸盐缓冲液平衡 3 次，将 1mg/ml 的抗吗啡的单克隆抗体 200ug 加入金磁微粒中，置于 35℃、180rpm 的恒温振荡器中充分反应 30min；

[0098] 1.2) 反应完毕，在磁性分离器上分离 3min，吸去上清，用 pH ＝ 7，0.01M 的磷酸盐缓冲液含有 0.5% Tween20 清洗，去除未标记的抗吗啡的单克隆抗体；重复以上步骤三次。

[0099] 1.3) 封闭：加入 1ml 的封闭剂到表面已固定心肌钙蛋白抗体 I 的金磁微粒中，置于 35℃、180rpm 的空气恒温振荡器中充分混匀 2h 进行封闭。封闭剂为含有 5%的牛血清白蛋白 (BSA)、5%脱脂奶粉、5%小牛血的 pH ＝ 7，0.01M 的磷酸盐缓冲液。

[0100] 1.4) 反应完毕，在磁性分离器上分离 3min，弃上清，用 pH ＝ 7，0.01M 的磷酸盐缓冲液含有 0.5% Tween20 清洗，去除未结合在金磁微粒表面的抗体分子；重复以上步骤三次；最后溶解在层析工作液中。这里的层析工作液是 pH ＝ 7，0.01M 的磷酸盐缓冲液其中含有以下效应物浓度为 2%的柠檬酸，浓度为 1%的 BSA，浓度 2%的脱脂奶粉，浓度为 0.5%的叠氮化钠，浓度为 2%的聚乙烯吡咯烷酮，浓度为 2%的分子量 6000 的聚乙二醇，浓度 5%的蔗糖，浓度 5%的 Tween20。

[0101] 2、吗啡检测层析装置的各个组件的处理。

[0102] 2.1) 样品垫为玻璃纤维膜。样品垫处理程序为：将玻璃纤维膜裁剪成 5cm×5cm，然后浸泡于样品垫处理液中 0.5 分钟取出，然后 30℃烘干，置于 4℃待用。样品垫处理液是：pH ＝ 7，0.01M 的硼酸盐缓冲液，缓冲液还含有 (1)5%的聚乙烯吡咯烷酮，。(2) 浓度为 5%的聚乙二醇 6000。(3) 浓度为 5%蔗糖。(4) 浓度为 5%的 Tween20。

[0103] 2.2) 结合垫的材质选用聚酯纤维膜。结合垫处理程序为：首先将聚酯纤维膜裁剪成 5cm×5cm 浸泡于层析工作液中 0.5 分钟取出，然后 30℃烘干，然后将 0.5ml 金磁微粒标记抗吗啡单克隆抗体喷涂在 5cm×5cm 的结合垫上。然后 30℃烘干，置于 4℃待用。

[0104] 2.3) 层析膜的制备：吗啡检测中层析膜选用硝酸纤维素膜。免疫层析膜的处理首先将浓度为 2.5mg/ml，20ul 将吗啡与牛血清白蛋白的共价偶联物喷涂成线在长度 30cm 免疫层析膜上形成检测带，和羊抗鼠 IgG 多克隆抗体喷涂成线在长度 30cm 免疫层析膜上形成质检带，检测带与质检带相隔 5 毫米。然后 35℃到 60℃烘干或冷冻干燥。

[0105] 封闭：将包被有抗体的免疫层析膜置于封闭剂中，30℃烘干，置于 4℃待用。封闭剂为含有 5%的牛血清白蛋白 (BSA)、5%脱脂奶粉、5%小牛血的 pH ＝ 7，0.01M 的磷酸盐缓冲液。

[0106] 2.4) 在支撑板上依次贴上层析膜、样品垫、结合垫和吸水垫，免疫层析膜设于底衬上的中部，样品垫和吸水垫分别设于支撑板上的两边，结合垫设于加样垫与层析膜之间，层析膜的另一端接吸水垫，最后用不干胶固定。然后裁剪成宽 4 毫米宽的试纸条。

[0107] 2.5) 样品测试和结果判读。

[0108] 将待检样品滴加在样品垫上 3 分钟后判读结果，检测包括可目视化和磁信号的检测。检测中在检测带和控制带有可见的红色或淡红色线表示阴性，如果在控制带有可见的红色线表示阳性，如果出现控制带无颜色显现则表示测试无效。利用磁信号检测需要使用磁性免疫阅读仪，在检测带和控制带有明显的磁信号出现表示阴性，如果在控制带有明显的磁信号表示阳性，如果出现控制带明显磁信号显现则表示测试无效。

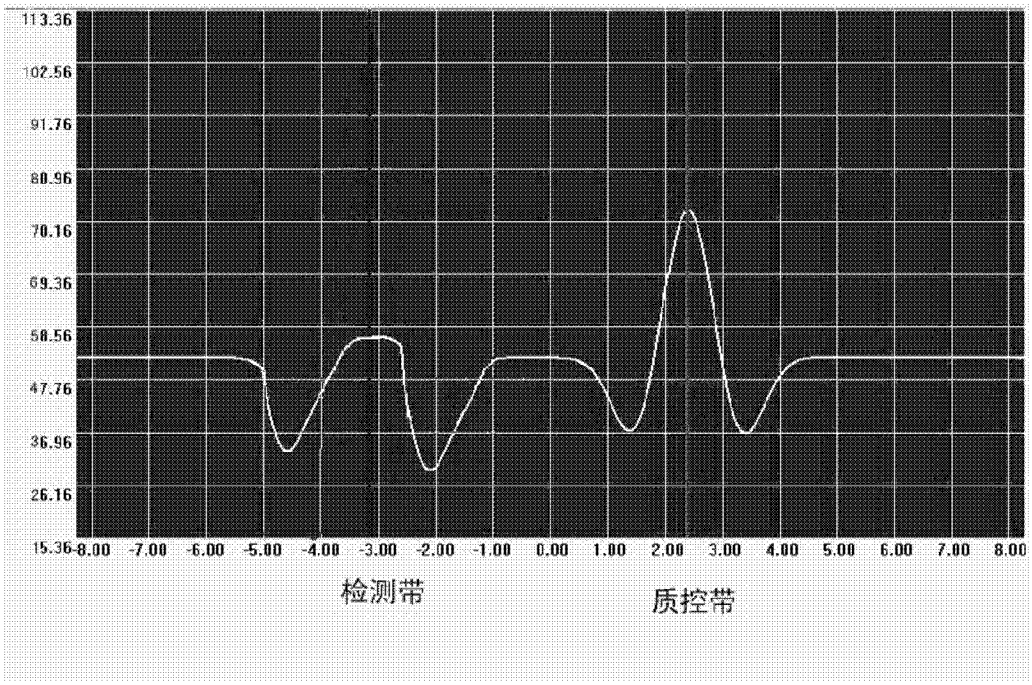

113.36
102.56
91.76
80.96
70.16
59.36
58.56
47.76
36.96
26.16
15.36
-8.00 -7.00 -6.00 -5.00 -4.00 -3.00 -2.00 -1.00 0.00 1.00 2.00 3.00 4.00 5.00 6.00 7.00 8.00
检测带
质控带

图 1

图 2

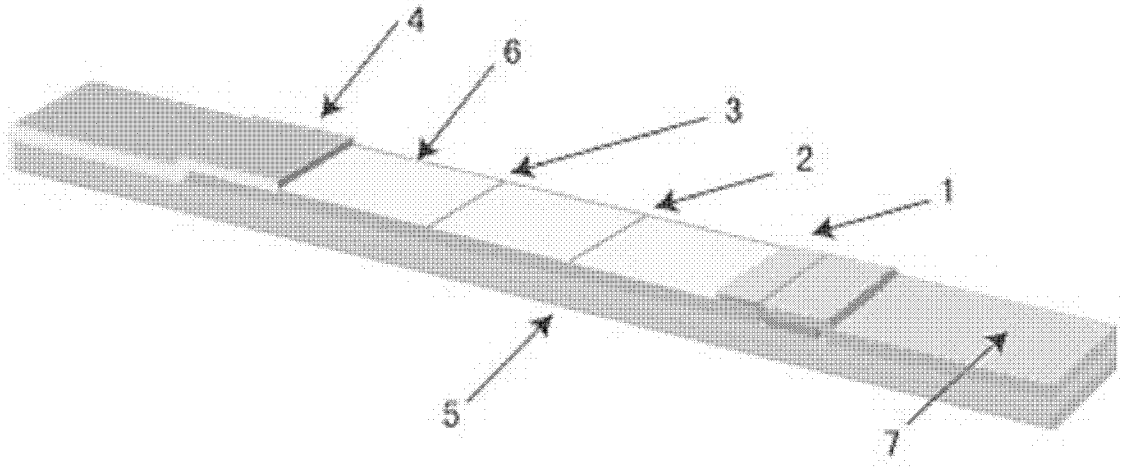
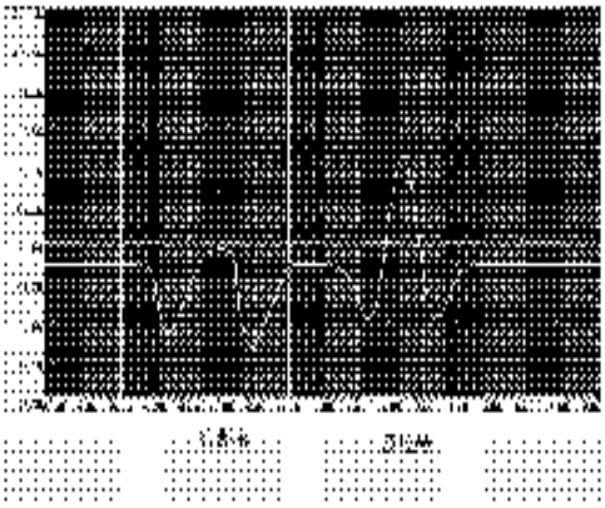


图 3

专利名称(译)	金磁微粒标记免疫层析快速检测方法		
公开(公告)号	CN101893627B	公开(公告)日	2014-12-17
申请号	CN201010222447.5	申请日	2010-07-08
[标]申请(专利权)人(译)	崔亚丽		
申请(专利权)人(译)	崔亚丽		
当前申请(专利权)人(译)	西安金磁纳米生物技术有限公司		
[标]发明人	崔亚丽 石峰 惠文利		
发明人	崔亚丽 石峰 惠文利		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/577 G01N33/76 G01N33/72 G01N33/558		
代理人(译)	徐平		
审查员(译)	杨光		
其他公开文献	CN101893627A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种金磁微粒标记免疫层析快速检测方法，旨在解决传统免疫层析分析法的检测方法在临床实践中易造成主观差异化、检测精度和灵敏度低、操作繁复、适用领域窄的问题。该检测方法的基本思想是：金磁微粒偶联抗体或配体或抗原以后在与之匹配的工作液和免疫层析装置中能够快速，定量的高灵敏度地检测被分析物。本发明既可以通过金磁微粒的特征颜色进行可目视化的判读也可通过金磁微粒磁信号的强弱对被测物进行定量检测，方法简单，成本低，能够实现人体与动植物的疾病检测，环境的检测，食品安全检测、以及毒品和药物滥用检测等。