(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 102043055 A
(43)申请公布日 2011.05.04

(21)申请号 201010521189.0

(22)申请日 2010.10.27

(71)申请人 上海海洋大学
地址 201306 上海市浦东新区沪城环路 999 号

(72)发明人 卢瑛 王锡昌 郑诚 石良

(74)专利代理机构 上海硕力知识产权代理事务所 31251
代理人 王法男

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

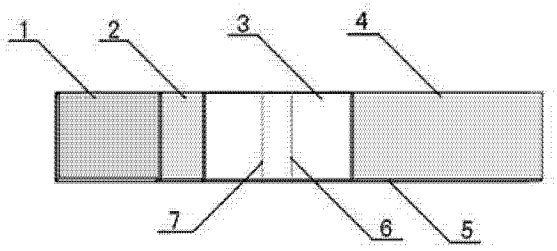
权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图 3 页

(54)发明名称

一种水产品中主要过敏原的快速免疫磁珠层析方法

(57)摘要

一种水产品中主要过敏原的快速免疫磁珠层析方法，采用杂交瘤技术制备筛选的、既能与食用甲壳类水生生物和食用软体水生生物 Tm 过敏原有特异性反应的鼠系单克隆抗体，和能对鱼类的小清蛋白和青蛙、大鼠、海龟脊椎动物的 Pa 具有特异性反应性的鼠系单克隆抗体作为特异性抗体，并通过化学结合方式将鼠系单克隆抗偶联到磁性纳米材料的表面作为标记物，制作成适用于磁珠层析法的特异性纳米检测探针；而后在过敏原的磁性免疫层析试纸条的样品垫上加入过敏原特异性纳米检测探针和样品液，室温下放置 20min 后，经层析作用被检测带和控制带所捕获，形成肉眼可见的有色条带，实现免疫层析；最后将测试卡放入磁信号检测仪上，依据标线求出待测样品的过敏原含量，进行比对后完成免疫层析。



CN 102043055 A

1. 一种水产品中主要过敏原的快速免疫磁珠层析方法，其特征在于：采用杂交瘤技术制备筛选的、分别能与食用甲壳类水生生物和食用软体水生生物 Tm 过敏原有特异性反应的鼠系单克隆抗体，和能对鱼类的小清蛋白和青蛙、大鼠、海龟脊椎动物的 Pa 具有特异性反应性的鼠系单克隆抗体作为特异性抗体，并通过化学结合方式将鼠系单克隆抗偶联到磁性纳米材料的表面作为标记物，制作成适用于磁珠层析法的特异性纳米检测探针；而后在过敏原的磁性免疫层析试纸条的样品垫上加入过敏原特异性纳米检测探针和样品液，室温下放置 20min 后，因抗原 - 抗体间特异性反应形成的免疫复合物经层析作用被检测带和控制带所捕获，形成肉眼可见的有色条带，实现免疫层析；最后将测试卡放入磁信号检测仪上，对免疫层析后形成的检测带和控制带进行检测以获取生物学反应信号，然后绘制待检样本的标准曲线，依据标线求出待测样品的过敏原含量，进行比对后得到最终免疫层析结果。

2. 如权利要求 1 所述的一种水产品中主要过敏原的快速免疫磁珠层析方法，其特征在于：所述特异性纳米检测探针的制备方法为：

A、吸取适量羧基磁珠于离心管中，用 500μL 0.01M 含 0.5% Tween-20，pH 为 5.0 的 MEST 溶液作为活化缓冲溶液清洗磁珠，将离心管置于磁分离架上使得磁珠与与活化溶液分离，重复清洗几次，最后重悬磁珠；

B、然后加入新鲜配制的 2.6M 碳化二亚胺和 2.2M N- 羟基琥珀酰亚胺加入磁珠悬液中活化羧基 30min，再用 MEST 缓冲液洗涤磁珠；随后再用 0.005M 硼酸盐吐温溶液作为偶联缓冲液洗涤磁珠 2 遍；

C、随后加入小清蛋白单克隆抗体，在旋转混合器上反应 3 小时；

D、然后用 1%(w/v)BSA 溶液对免疫磁珠表面没有完全反应的活化基团进行封闭，并且通过 BSA 的物理吸附，封闭其它的空间位点，以降低在以后试验中可能发生的非特异性吸附，室温下封闭反应 30min；所述 BSA 溶液事先溶解在 BST 缓冲液中；

E、最后用 BST 洗涤封闭后的免疫磁珠 4 次，弃去洗涤液，将磁珠重悬在保存液中。

3. 如权利要求 1 所述的一种水产品中主要过敏原的快速免疫磁珠层析方

法，其特征在于：所述的所述的食用甲壳类水生生物是指：虾类、蟹类和牡蛎，所述的食用软体水生生物是指海螺、属于腹足纲的鲍鱼、属于头足纲的鱿鱼、章鱼，以及双壳贝类蛤蜊。

4. 如权利要求 1 所述的一种水产品中主要过敏原的快速免疫磁珠层析方法，其特征在于：所述的磁性纳米材料为表面修饰有羧基的超顺磁性磁性纳米颗粒，粒径为 50~300nm。

一种水产品中主要过敏原的快速免疫磁珠层析方法

技术领域

[0001] 本发明涉及食物过敏原的检测方法，特别是涉及一种检测水产品中主要过敏原的免疫磁珠层析方法，该方法主要是使用甲壳类和贝类的主要过敏原原肌球蛋白(Tropomyosin，简称 Tm)、鱼类主要过敏原小清蛋白(Parvalbumin，简称 Pa)的免疫磁珠层析检测方法。

背景技术

[0002] 食物过敏是由食物引起的机体对免疫系统的异常反应，近几十年来，世界范围内食物过敏反应症患者呈现逐年上升趋势，据 WHO 报道，到 2010 年，全球可能有 40％到 50％的人患有过敏症，食物过敏现已成为一个新兴的食品安全问题。食物过敏原为食物中引发或激起过敏反应的物质，通常是在特定食物中含有的含量丰富、天然存在的蛋白质。根据过敏原反应的速度、机制及临床特点将致敏机制分为Ⅰ型、Ⅱ型、Ⅲ型、Ⅳ型，其中大部分食物过敏是由 IgE 介导的Ⅰ型超敏反应，一般症状包括呕吐、腹痛、腹泻等，也包括皮肤反应及呼吸道症状，严重情况下甚至会出现过敏性休克或死亡，目前尚无有效的治疗方法。为了保护易感者健康，部分国家和地区对食物过敏原的标签标注进行了严格规定并列入了立法范围。

[0003] 鱼类和甲壳类水产品及其制品是联合国粮农组织公认的两类易引起食物过敏的主要致敏食物。据调查，在我国 15 ～ 24 岁年龄段人群中，约 6％的人有过食物过敏的经历，在我国青少年过敏人群中对鱼类等海产品过敏的约占 3-6％，位居其它致敏食物的首位。水产品的主要过敏原可分为两大类，一为贝类及虾蟹等甲壳类动物中的原肌球蛋白(Tropomyosin)，另外一种则是鳕鱼等鱼类中的小清蛋白(Parvalbumin)。由于食物成分的复杂性，加之食品加工过程中使用各种配料和添加剂，传统的化学分析很难满足食物过敏原的检测要求，因此，食物过敏原的快速检测技术研究一直是国内外科学家的研究热点。

[0004] 目前，食物过敏原的检测技术以分析全蛋白或酶解后肽段氨基酸序列的质谱技术、检测编码过敏原 DNA 片段的聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction，PCR)技术及分析过敏原性的免疫学检测技术为代表。

[0005] 质谱技术能精确测定全蛋白或酶解后肽段的氨基酸序列，再根据相应数据库来确定致敏蛋白，但是质谱技术存在着费时、所用仪器昂贵、检测费用相对较高等缺点。

[0006] PCR 方法则在检测过程中易因操作不当受到污染而产生假阳性结果，存在操作要求技术性强、不能反映食物的真正过敏性即人们摄入该食物后会产生过敏反应等缺陷。

[0007] 食物过敏原的免疫学检测技术有酶联免疫吸附法(ELISA)、生物传感器法和免疫层析法。其中 ELISA 法是目前技术较为成熟的方法，市场上已有杏仁、大豆、花生、甲壳类、芝麻、芥末、羽扇豆、牛奶等食物过敏原的 ELISA 检测试剂盒，这些试剂盒可在 30 ～ 60min 中内实现定性或半定量检测，但是存在假阳性和假阴性反应。此外，公开号 CN101285840A 专利申请公开了一种食品中过敏原的固相免疫检测方法，采用可拆式酶标板作为检测载体，利用双抗夹心模式，直接在过敏原特异性单抗上标记酶，再通过底物显色反应来实现检

测。该方法检测原理同ELISA法，与双抗夹心ELISA的唯一区别是不需要使用酶标二抗。因此虽然具有多样本同时检测优点，但也存在着假阴性或假阳性反应，检测结果易于受到外界因素的影响(如食品基质，食品的加工程度等)等缺点。

[0008] 生物传感器法是根据待测物质和分子识别元件特异性结合，发生生物化学反应，产生的生物学信息通过信号转换器转化为可以定量处理的电、光等信息，再经仪表放大和输出，从而达到分析和检测的目的。目前，微型SPR生物检测器已应用于食品生产过程中花生过敏原的检测，该检测器可实现在线定量检测。但是生物传感器法需要特定的设备和配件，检测成本高，对硬件设施要求极高。食品工业界需要的是快速、简便、高效、特异性强且成本低廉的检测方法，上述这些方法皆无法满足食品工业界的需求。

[0009] 免疫层析技术是ELISA技术原理的扩展应用，一般使用乳胶颗粒、胶体硒、胶体金以及脂质体等作为着色标记物。在层析时，标记物与待测物之间形成的复合物可被相应的配体所捕获而聚集于硝化纤维膜上的检测线并呈现出标记物所带有的颜色，因此可以通过纤维膜上显色条的有无、颜色深浅和反射光线等从而实现检测目的，具有操作简便、快速的优点。在目前公开的报道中，大都以胶体金作为指示剂，因此又被称为胶体金检测法。已公开文献中涉及了一种检测水产品食物过敏的免疫胶体金层析方法，可以实现过敏原的定性检测，但是难以进行定量检测，而且目视检测使检测结果不易记录和保存。

[0010] 此外，在免疫层析检测技术中，除了采用胶体金作为标记物外，也有采用其它标记物作为指示剂的报道。专利号为US5753517的专利公开了一种使用乳胶颗粒作为标记物的定量免疫层析方法和仪器。公开号CN1480391A的专利申请公开了一种在常温下制备胶体纳米硒颗粒及其以此材料作为标记物的免疫层析检测方法，获得了高于胶体金方法的灵敏度的检测方法。公开号CN1645146A公开了一种用荧光稀土纳米颗粒作为标记物的免疫层析方法及其检测试纸条，可用于定量的新型免疫层析检测。

[0011] 近些年，以磁性纳米颗粒作为标记物的免疫层析检测报道也陆续出现。如公开号CN101566636A公开的是针对血液中甲胎蛋白的磁性颗粒标记层析试纸条，公开号CN101551390A公开的是一种快速检测藻毒素的免疫磁珠层析试纸条，公开号CN101566631A公开的是用于联合检测HIV-1+2抗体和P24抗原的磁颗粒标记层析试纸条，公开号CN101561437A公开的是用于检测苯酚类肾上腺素激素莱克多巴胺的免疫磁珠层析试纸条技术。公开号US2008/013884A1公开了在标记物上偶联生物素，利用亲和素与生物素之间的亲和作用在结合双抗夹心模式设计的试纸条检测方法，包括磁性颗粒标记物层析法。

[0012] 上述这些公开的技术均采用了磁性免疫层析技术，它以超顺磁性颗粒代替传统的标记物来进行免疫层析，通过检测结合在超顺磁性纳米颗粒上的目标物来提高对生物样本的定量检测数据，再利用被磁颗粒标记抗体所捕获的免疫复合物与磁信号之间的线性关系即可实现对生物样本的快速定量检测目的，具有灵敏度高、特异性强、操作简便、快速等优点。

[0013] 目前，市场上至少有14种检测包括牛奶、花生、榛子、甲壳类水产品等过敏原的商业免疫层析检测试剂盒，但是这些产品采用的都是胶体金免疫层析法，只能进行定性或半定量监测，目前国内外尚无可以对水产品主要过敏原实现定量检测的快速现场检测技术。

发明内容

[0014] 本发明的目的：旨在解决目前市场上缺少水产品主要过敏原的快速定量现场检测技术这一缺陷，提供一种比胶体金试纸条更具灵敏度、并且可实现定量检测的新型免疫层析检测方法；同时提供一种用过敏原特异性的磁性纳米检测探针标记物制作的免疫层析检测试纸条，以达到快速、灵敏且可现场定量检测水产品主要过敏原 Tm 和 Pa 的目的。

[0015] 本发明的技术解决方案为：

这种水产品中主要过敏原的快速免疫磁珠层析方法，采用杂交瘤技术制备筛选的、既能与食用甲壳类水生生物和食用软体水生生物 Tm 过敏原有特异性反应的鼠系单克隆抗体，分别能对鱼类的小清蛋白和青蛙、大鼠、海龟脊椎动物的 Pa 具有特异性反应性的鼠系单克隆抗体作为特异性抗体，并通过化学结合方式将鼠系单克隆抗偶联到磁性纳米材料的表面作为标记物，制作成适用于磁珠层析法的特异性纳米检测探针；而后在过敏原的磁性免疫层析试纸条的样品垫上加入过敏原特异性纳米检测探针和样品液，室温下放置 20min 后，因抗原 - 抗体间特异性反应形成的免疫复合物经层析作用被检测带和控制带所捕获，形成肉眼可见的有色条带，实现免疫层析；最后将测试卡放入磁信号检测仪（MAR 仪：Magnetic Assay Reader）上，对免疫层析后形成的检测带和控制带进行检测以获取生物学反应信号，然后绘制待检样本的标准曲线，依据标线求出待测样品的过敏原含量，进行比对后完成免疫层析。

[0016] 所述特异性纳米检测探针的制备方法为：

A、吸取适量羧基磁珠于离心管中，用 500μL 0.01M 含 0.5%v/v Tween-20，pH 为 5.0 的 MEST 溶液作为活化缓冲溶液清洗磁珠，将离心管置于磁分离架上使得磁珠与与活化溶液分离，重复清洗几次，最后重悬磁珠；

B、然后加入新鲜配制的 2.6M 碳化二亚胺（EDC）和 2.2M N- 羟基琥珀酰

亚胺（NHS）加入磁珠悬液中活化羧基 30min，再用 MEST 缓冲液洗涤磁珠；随后再用 0.005M 硼酸盐吐温（简称 BST）溶液作为偶联缓冲液洗涤磁珠 2 遍；

C、随后加入小清蛋白单克隆抗体，在旋转混合器上反应 3 小时；

D、然后用 1%w/v BSA 溶液（BSA 事先溶解在 BST 缓冲液中）对免疫磁珠表面没有完全反应的活化基团进行封闭，并且通过 BSA 的物理吸附，封闭其它的空间位点，以降低在以后试验中可能发生的非特异性吸附，室温下封闭反应 30min；

E、最后用 BST 洗涤封闭后的免疫磁珠 4 次，弃去洗涤液，将磁珠重悬在

保存液中备用。

[0017] 所述的食用甲壳类水生生物是指：虾类、蟹类、牡蛎等，所述的食用软体

水生生物是指海螺、鲍鱼、鱿鱼、章鱼、蛤蜊等。

[0018] 所述的磁性纳米材料为表面修饰有羧基的超顺磁性磁性纳米颗粒，粒径为 50~300nm。

[0019] 本发明由于采用杂交瘤技术制备筛选的、分别能与食用甲壳类水生生物、

也能和食用水生软体动物类中的 Tm 过敏原有特异性反应的鼠系单克隆抗体，同时也能对鱼类的小清蛋白和青蛙、大鼠、海龟等脊椎动物的 Pa 具有特异性反应性的鼠系单克隆抗作为检测用特异性抗体，与现有技术相比具有以下优点：

（1） 在将超顺磁性纳米材料、免疫层析技术和磁性分析系统相结合，通

过制备检测试纸条，可满足既能定性又能定量的现场检测需求。

[0020] （2）使用本发明技术制备的试纸条，操作简便、检测快速，只需 10~20min 即可给出结果。

[0021] （3） 检测灵敏度高、特异性强。对水产品主要过敏原 Tm 的检测限为 0.15μg/mL，Pa 检测限为 0.16μg/mL。

[0022]

附图说明

[0023] 图 1 为过敏原特异性纳米检测探针作为标记物的磁性免疫层析试纸条的结构示意图；

分别由样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜（NC 膜）、吸水纸及底板组成。

[0024] 图 2 为采用竞争法检测水产品主要过敏原 Tm 的定性检测结果；

阴性结果呈现两条带，而阳性结果呈现一条带。由图中可见，过敏原 Tm 在 10mg/mL 时，T 线颜色还是明显比阴性条带浅。

[0025] 图 3 为采用竞争法检测水产品主要过敏原 Pa 的定性检测结果；

阴性结果呈现两条带，而阳性结果呈现一条带。由图中可见，过敏原 Pa 在 10mg/mL 时，T 线颜色还是明显比阴性条带浅。

[0026] 图 4 为用过敏原特异性纳米检测探针作为标记物，采用竞争法检测水产品主要过敏原 Tm 的定量标准曲线。

[0027] 图 5 为用过敏原特异性纳米检测探针作为标记物，采用竞争法检测水产品主要过敏原 Pa 的定量标准曲线。

[0028] 图中：1- 样品垫 2- 结合垫 3-NC 膜 4- 吸水纸 5- 底板 6-C 线 7-T 线。

具体实施方式

[0029] 这种水产品中主要过敏原的快速免疫磁珠层析方法，采用杂交瘤技术制备筛选的既能与食用甲壳类水生生物和食用软体水生生物 Tm 过敏原有特异性反应的鼠系单克隆抗体，和能对鱼类的小清蛋白和青蛙、大鼠、海龟脊椎动物的 Pa 具有特异性反应性的鼠系单克隆抗体作为特异性抗体，并通过化学结合方式将鼠系单克隆抗偶联到磁性纳米材料的表面作为标记物，制作成适用于磁珠层析法的特异性纳米检测探针；而后在过敏原的磁性免疫层析试纸条的样品垫上加入过敏原特异性纳米检测探针和样品液，室温下放置 20min 后，因抗原 - 抗体间特异性反应形成的免疫复合物经层析作用被检测带和控制带所捕获，形成肉眼可见的有色条带，实现免疫层析；最后将测试卡放入磁信号检测仪（MAR 仪：Magnetic Assay Reader）上，对免疫层析后形成的检测带和控制带进行检测以获取生物学反应信号，然后绘制待检样本的标准曲线，依据标线求出待测样品的过敏原含量，进行比对后得到最终免疫层析结果。

[0030] 所述的食用甲壳类水生生物是指：虾类、蟹类和牡蛎等，所述的食用软体水生生物是指海螺、属于腹足纲的鲍鱼、属于头足纲的鱿鱼、章鱼，以及双壳贝类蛤蜊等。

[0031] 所述的磁性纳米材料为表面修饰有羧基的超顺磁性磁性纳米颗粒，粒径为

50~300nm。

[0032] 所述的层析膜为尼龙膜、聚偏二氟乙烯膜、聚酯膜、硝酸纤维素膜、醋酸纤维素膜或硝酸纤维素与醋酸纤维素的混合膜等中的一种。

[0033] 所述的抗原或抗体包被是指通过点膜器将捕捉抗体或抗原呈线状划到层析膜上作为免疫层析试纸的 T 线，一般通过机器自动完成；在检测带的下游，通过点膜仪将与抗体特异性反应的二抗（如羊抗鼠或兔抗鼠 IgG）呈线状或带状划到层析膜上，作为免疫层析试纸的 C 线， 一般通过机器自动完成。

[0034] 所述特异性纳米检测探针的制备方法为：

A、吸取适量羧基磁珠于离心管中，用 500μL 0.01M 含 0.5%（v/v）Tween-20，pH5.0 的 MEST 溶液作为活化缓冲溶液清洗磁珠，将离心管置于磁分离架上使得磁珠与与活化溶液分离，重复清洗几次，最后重悬磁珠；

B、然后加入新鲜配制的 2.6M 碳化二亚胺（EDC）和 2.2M N- 羟基琥珀酰

亚胺（NHS）加入磁珠悬液中活化羧基 30min，再用 MEST 缓冲液洗涤磁珠；随后再用 0.005M 硼酸盐吐温（简称 BST）溶液作为偶联缓冲液洗涤磁珠 2 遍；

C、随后加入小清蛋白单克隆抗体，在旋转混合器上反应 3h;

D、然后用 1% w/v BSA 溶液（BSA 事先溶解在 BST 缓冲液中）对免疫磁珠表面没有完全反应的活化基团进行封闭，并且通过 BSA 的物理吸附，封闭其它的空间位点，以降低在以后试验中可能发生的非特异性吸附，室温下封闭反应 30min；

E、最后用 BST 洗涤封闭后的免疫磁珠 4 次，弃去洗涤液，将磁珠重悬在

保存液中备用。

[0035] 本发明所述的免疫层析检测试纸条由衬板、样品垫、结合垫、层析膜和吸水垫组成。将样品垫、结合垫、层析膜和吸水垫依次衔接在衬板上，层析膜置于衬板的中部，样品垫和吸水垫分别置于衬板的两边，标记物垫置于样品垫和层析膜之间，组装成水产品主要过敏原的磁性免疫层析检测试纸条。所述的衬板为不吸水的硬质塑胶条，单面有背胶。样品垫和结合垫均为；玻璃纤维膜；吸水垫为吸水滤纸；

本发明所述的免疫层析检测试纸条的制备步骤如下：

（1）制备过敏原特异性纳米检测探针；

（2）在层析膜上固定捕捉抗原或抗体和控制线抗体；

（3）组装试纸条；

（4）在标记物垫点上过敏原特异性纳米检测探针。

[0036] 实施例 1：水产品主要过敏原 Tm 快速检测试纸条的制备

该实施例以 Tm 为检测对象，选用表面修饰有羧基的磁性纳米颗粒（粒径为 200nm），采用既能检测甲壳类食用水生生物如虾、蟹和蛤蜊的 Tm，也能检测海螺、鲍鱼、鱿鱼和章鱼等软体类食用水生生物中的 Tm 过敏原有特异性反应的鼠系单克隆制备海产品主要过敏原 Tm 的特异性探针，利用竞争性反应原理来设计检测线。

[0037] （1）过敏原 Tm 的特异性纳米检测探针制备

EDC/NHS 偶联

将 Tm 的特异性单克隆抗体与羧基修饰的纳米磁珠（粒径为 200nm）进行偶联，制备含 Tm 单克隆抗体的免疫磁珠，即 Tm 磁标抗体。以 pH5.0 的 MEST 溶液（0.05%Tween-20）作为

活化缓冲溶液，取 2mg 羧基磁珠于 2mL 离心管中，加入 500μL 活化缓冲液，在漩涡振荡器上混合均匀，再将离心管放置于磁分离架上，待磁珠完全被吸附，用微型台式真空泵抽提上清液；用 500μL 活化缓冲液重新洗涤磁珠两遍后，EDC 与 NHS 溶液，用活化缓冲液调整体积至 500μL，在漩涡振荡器上混合均匀，室温活化 30min。活化后，用活化缓冲液洗涤磁珠两遍，以除去未反应的活化剂。以 pH9.0 的硼酸盐吐温缓冲液（0.05%Tween-20）溶液作偶联缓冲液，以偶联缓冲液洗涤磁珠两遍；然后加入 150μg 已纯化的抗 -Pa 单克隆抗体，使磁珠表面活化的羧基与抗体的氨基室温反应 5h，将抗体偶联于磁珠表面，得到免疫磁珠。偶联完成后，加入 500μL 的 1%BSA（w/v），对免疫磁珠表面没有完全反应的活化基团进行封闭，室温下封闭反应 30min 即可。最后，用偶联缓冲液洗涤封闭后的磁珠四遍后，保存于 500μL 保存液中。

[0038] (2)Tm 纳米探针的固相化

悬浮态保存法

将制备好的磁标抗体以含 1%（w/v）蔗糖的偶联缓冲液重悬，于离心管中保存于 4℃，在检测前取 1.5~2μL 过敏原特异性免疫磁珠加于结合垫处。

[0039] （3）捕获试剂的包被

用点膜仪以 1μL/cm 的速度将捕获试剂包被于硝酸纤维素膜上。T 线上 Tm 包被有浓度为 0.05mg/mL；在距 T 线 7mm，靠近吸水纸处为 C 线，包被有浓度为 2mg/mL 山羊抗小鼠 IgG。包被完成后，于 37℃烘箱中烘干 2 小时。

[0040] （4）试纸条的装配

将样品垫、结合垫、包埋有 T 线和 C 线的硝酸纤维素膜、吸水垫依次衔接在衬板上，并剪裁成 0.5cm 宽的 Tm 免疫磁珠层析检测试纸条。各部件之间均有 1mm 的重叠部分。

[0041] （5）样品检测

首先在试纸条的结合垫上滴加 1.5μL 免疫磁珠，然后在试纸条的样品垫上加 100μL 的待测样品。等待 20min 后，观察结果。阴性结果呈两条明显的条带，而阳性结果仅出现一条条带，或 T 线条带较阴性样品浅。也可将试纸条装入专用的试纸条卡槽，插入磁信号阅读器 MAR 中阅读磁信号进行定量分析，与标准曲线比对，得出样品中抗原物质的浓度。

[0042] 实施例 2：水产品主要过敏原 Pa 快速检测试纸条的制备

该实施例以 Pa 为检测对象，选用表面修饰有羧基的磁性纳米颗粒（粒径为 100nm），结合对鱼类的小清蛋白和青蛙、大鼠、海龟等脊椎动物的 Pa 具有特异性反应的鼠系单克隆抗体制备鱼类主要过敏原 Pa 的特异性纳米探针，再利用竞争性反应原理来设计检测线。

[0043] （1）过敏原 Pa 的特异性纳米探针制备

EDC/NHS 偶联

将小清蛋白单克隆抗体与羧基修饰的纳米磁珠进行偶联，制备含小清蛋白单克隆抗体的免疫磁珠，即小清蛋白磁标抗体。以 pH5.0 的 MEST 溶液（0.05%Tween-20）作为活化缓冲溶液，取 2mg 羧基磁珠于 2mL 离心管中，加入 500μL 活化缓冲液，在漩涡振荡器上混合均匀，再将离心管放置于磁分离架上，待磁珠完全被吸附，用微型台式真空泵抽提上清液；用 500μL 活化缓冲液重新洗涤磁珠两遍后，EDC 与 NHS 溶液，用活化缓冲液调整体积至 500μL，在漩涡振荡器上混合均匀，室温活化 30min。活化后，用活化缓冲液洗涤磁珠两遍，

以除去未反应的活化剂。以 pH9.0 的硼酸盐吐温缓冲液（0.05%Tween-20）溶液作偶联缓冲液，以偶联缓冲液洗涤磁珠两遍；然后加入 150μg 已纯化的抗 -Pa 单克隆抗体，使磁珠表面活化的羧基与抗体的氨基室温反应 3h，将抗体偶联于磁珠表面，得到免疫磁珠。偶联完成后，加入 500μL 的 1%BSA(w/v)，对免疫磁珠表面没有完全反应的活化基团进行封闭，室温下封闭反应 30min 即可。最后，用偶联缓冲液洗涤封闭后的磁珠四遍后，保存于 500μL 保存液中。

[0044] (2)Pa 纳米探针的固相化

悬浮态保存法

将制备好的磁标抗体以含 1%（w/v）蔗糖的偶联缓冲液重悬，于离心管中保存于 4℃。在检测前取 1~2μL 免疫磁珠加于结合垫处。

[0045] （3）捕获试剂的包被

用点膜仪以 1μL/cm 的速度将捕获试剂包被于硝酸纤维素膜上。T 线上包被有浓度为 0.2mg/mL 的 Pa；在距 T 线 7mm，靠近吸水纸处为 C 线，包被有浓度为 2mg/mL 山羊抗小鼠 IgG。包被完成后，于 37℃烘箱中烘干 2h。

[0046] （4）试纸条的装配

将样品垫、结合垫、包埋有 T 线和 C 线的硝酸纤维素膜、吸水垫依次衔接在衬板上，并剪裁成 0.5cm 宽的小清蛋白免疫磁珠层析检测试纸条。各部件之间均有 1mm 的重叠部分。

[0047] （5）样品检测

首先在试纸条的结合垫上滴加 2μL 免疫磁珠，然后在试纸条的样品垫上加 100μL 的待测样品。等待 20min 后，观察结果。阴性结果呈两条明显的条带，而阳性结果仅出现一条条带，或 T 线条带较阴性样品浅。也可将试纸条装入专用的试纸条卡槽，插入磁信号阅读器 MAR 中阅读磁信号进行定量分析，与标准曲线比对，得出样品中抗原物质的浓度。

[0048] 下表为用过敏原特异性纳米检测探针作为标记物的检测试纸条与市售商业化胶体金检测试纸条（日本日水制药公司）对水产品主要过敏原 Tm 的检测结果对比分析表。由表可知，两种方法的一致性为 90%。

No.	Samples	Colloidal gold-LFA product	IMNP-LFA
1	squid	++	++
2	shrimp	++	++
3	spotted silver carp	—	—
4	carp	—	—
5	ribbonfish	+	—
6	abalone	—	—
7	codfish	—	—
8	chicken	—	++
9	pork	++	—

[0049] 备注：IMNP-LFA：免疫磁珠探针标记层析试纸条；LFA：层析试纸条。

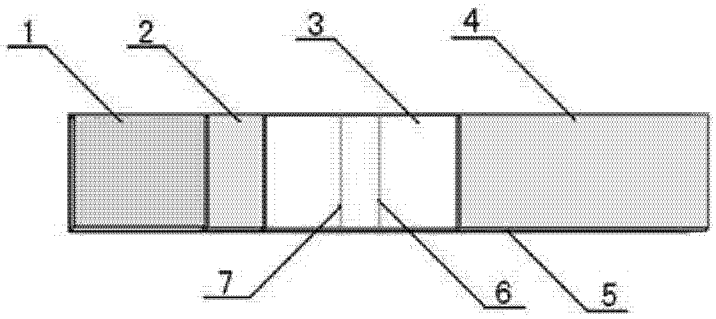


图 1

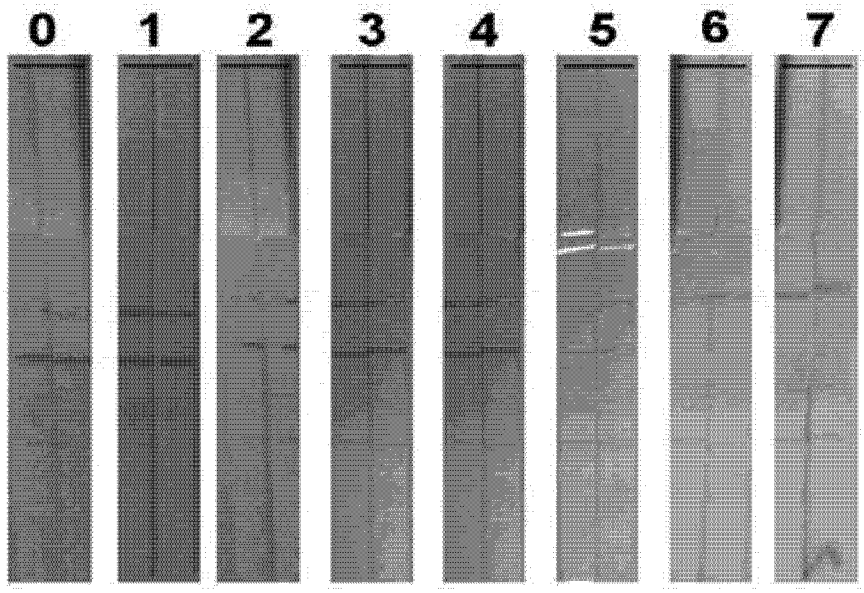


图 2

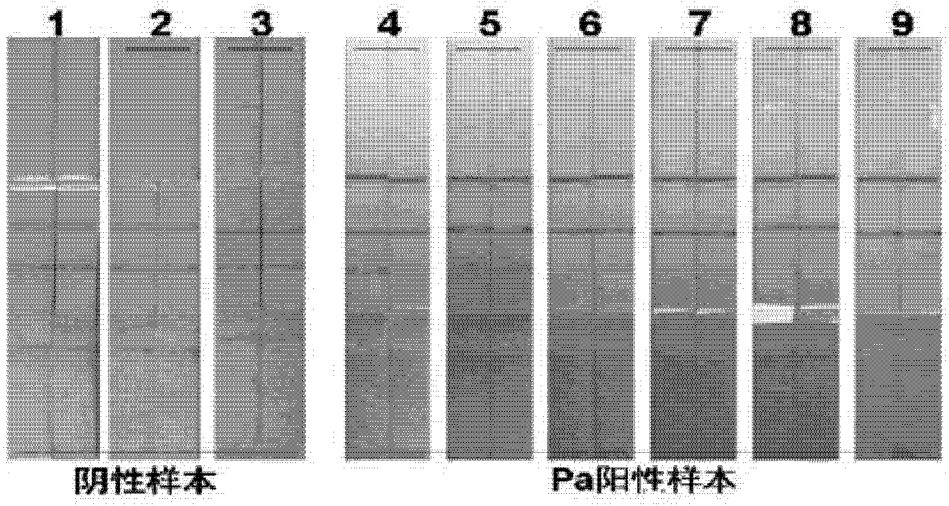

1
2
3
4
5
6
7
8
9
阴性样本
Pa阳性样本

图 3

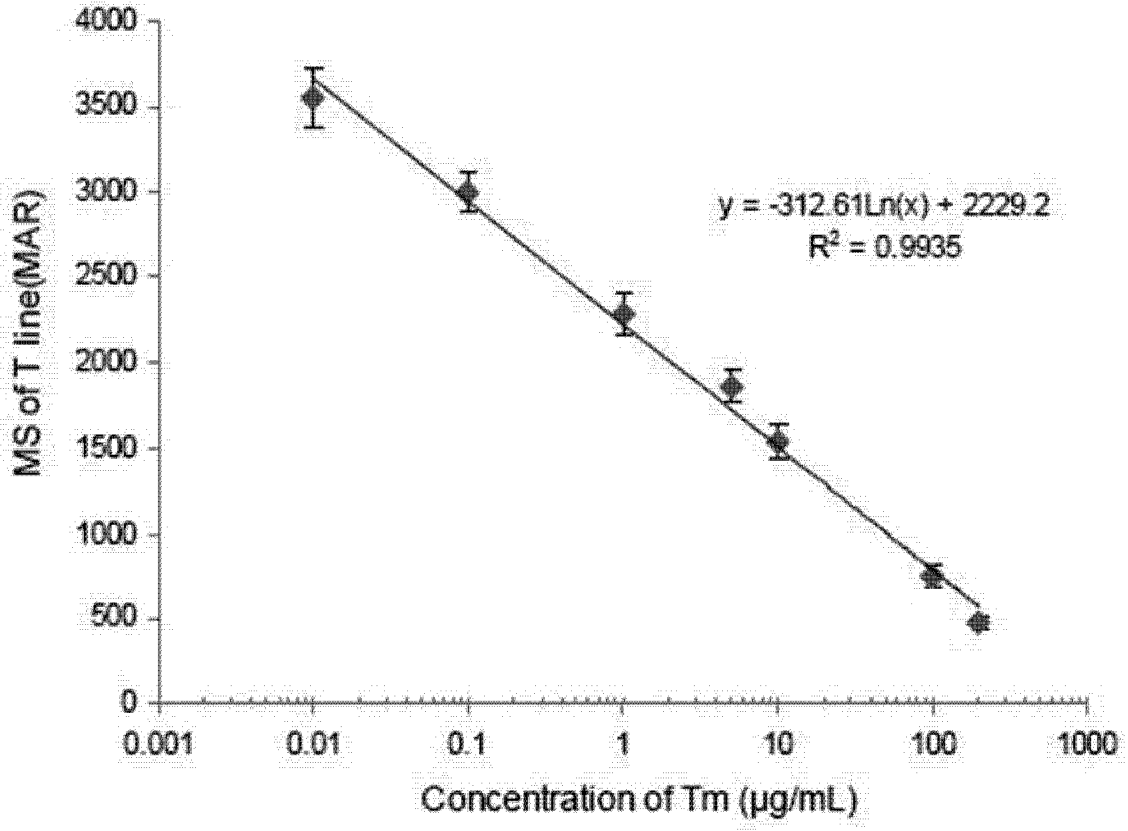

y = -312.61Ln(x) + 2229.2
R2 = 0.9935
MS of T line(MAR)
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
Concentration of Tm (μg/mL)

图 4

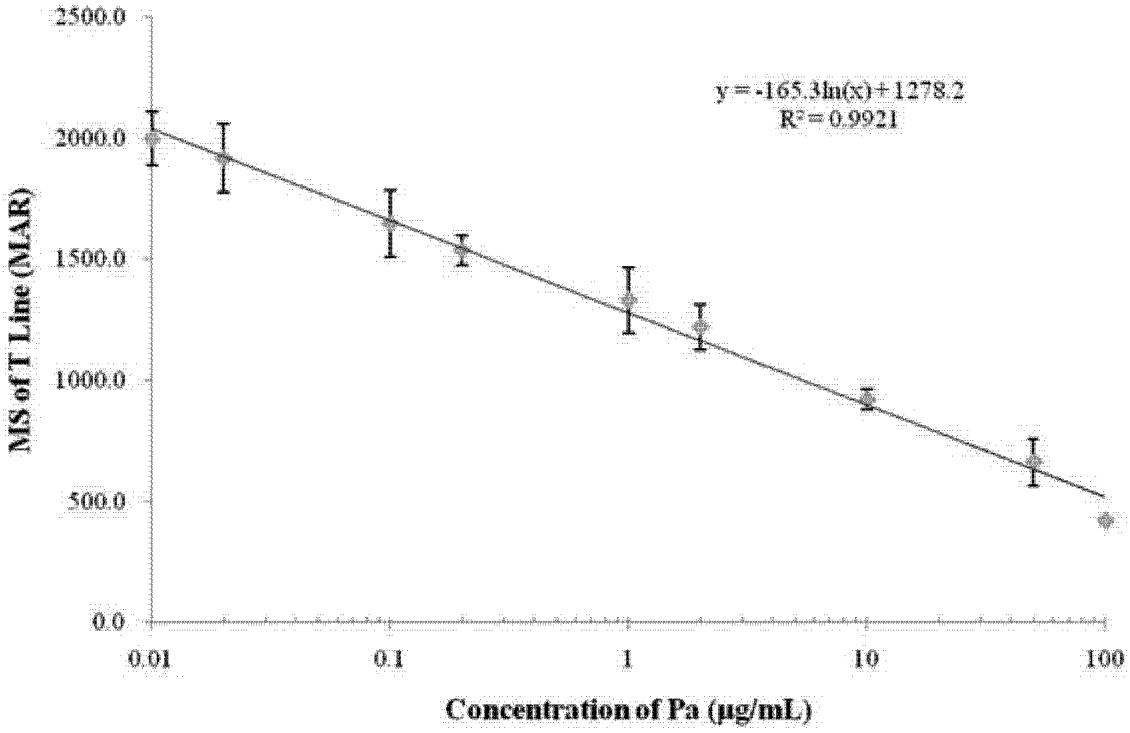
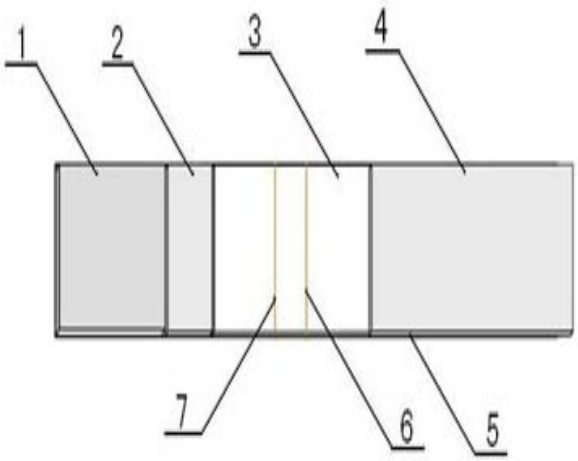

2500.0
2000.0
1500.0
1000.0
500.0
0.0
MS of T Line (MAR)
y = -165.3ln(x) + 1278.2
R² = 0.9921
0.01
0.1
1
10
100
Concentration of Pa (μg/mL)

图 5

专利名称(译)	一种水产品中主要过敏原的快速免疫磁珠层析方法		
公开(公告)号	CN102043055A	公开(公告)日	2011-05-04
申请号	CN201010521189.0	申请日	2010-10-27
[标]申请(专利权)人(译)	上海海洋大学		
申请(专利权)人(译)	上海海洋大学		
当前申请(专利权)人(译)	上海海洋大学		
[标]发明人	卢瑛 王锡昌 郑诚 石良		
发明人	卢瑛 王锡昌 郑诚 石良		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531		
其他公开文献	CN102043055B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种水产品中主要过敏原的快速免疫磁珠层析方法，采用杂交瘤技术制备筛选的、既能与食用甲壳类水生生物和食用软体水生生物Tm过敏原有特异性反应的鼠系单克隆抗体，和能对鱼类的小清蛋白和青蛙、大鼠、海龟脊椎动物的Pa具有特异性反应性的鼠系单克隆抗体作为特异性抗体，并通过化学结合方式将鼠系单克隆抗偶联到磁性纳米材料的表面作为标记物，制作成适用于磁珠层析法的特异性纳米检测探针；而后在过敏原的磁性免疫层析试纸条的样品垫上加入过敏原特异性纳米检测探针和样品液，室温下放置20min后，经层析作用被检测带和控制带所捕获，形成肉眼可见的有色条带，实现免疫层析；最后将测试卡放入磁信号检测仪上，依据标线求出待测样品的过敏原含量，进行比对后完成免疫层析。