



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105353116 A

(43) 申请公布日 2016. 02. 24

(21) 申请号 201510757259. 5

(22) 申请日 2015. 11. 09

(71) 申请人 国家纳米科学中心

地址 100080 北京市海淀区中关村北一条
11 号

(72) 发明人 蒋兴宇 陈翊平 冉蓓 张晓青

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002

代理人 王文君

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

权利要求书2页 说明书9页 附图6页

(54) 发明名称

一种基于过氧化氢试纸条进行免疫分析的方法及其应用

(57) 摘要

本发明提供一种基于过氧化氢试纸条进行免疫分析的方法及其应用。该方法包括：(1) 将包被物质包被在固相载体上，孵育后用缓冲液冲洗；(2) 加入待测物标准品溶液，孵育后用缓冲液冲洗；(3) 加入葡萄糖氧化酶标记的二抗，孵育后用缓冲液冲洗；(4) 加入葡萄糖溶液反应，吸取反应后的溶液于过氧化氢试纸条上，显色后获得结果 I；(5) 将步骤 (2) 中的待测物标准品溶液换成待测样品溶液，重复 (1) ~ (4) 的操作，显色后获得结果 II，将结果 II 参比结果 I，判断待测样品溶液中待测物的浓度。本发明的方法灵敏度高，数据读取方式简便，无需检测仪器即可进行基本的可视化定性判断，若结合其手持式的定量检测仪器，即可进行精确定量检测。

1. 一种基于过氧化氢试纸条进行免疫分析的方法,其特征在于,其包括如下步骤:

(1) 将包被物质包被在固相载体上,孵育后用缓冲液进行冲洗;

(2) 加入具有不同浓度梯度的待测物标准品溶液,孵育后用缓冲液进行冲洗;

(3) 加入以葡萄糖氧化酶标记的二抗,孵育后用缓冲液进行冲洗,所述二抗为抗待测物的抗体;

(4) 加入葡萄糖溶液进行反应,吸取反应后的溶液于过氧化氢试纸条上,显色后获得结果 I;

(5) 将步骤(2)中所述的不同浓度梯度的待测物标准品溶液替换成待测样品溶液,重复进行步骤(1)~(4)的操作,显色后获得结果 II,将结果 II 参比结果 I,判断待测样品溶液中待测物的浓度;

其中,当待测物为完全抗原时,所述包被物质为能够与所述完全抗原对应结合且与所述二抗具有不同抗原结合位点的抗体,当待测物为抗体时,所述包被物质为与所述抗体对应的完全抗原或半抗原分子与蛋白质载体偶联形成的人工抗原。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤(1)中,所述的固相载体为酶标板;和/或,

所述孵育为将包被后的固相载体置于4~40℃放置0.5~12小时,更优选于37℃放置2小时;和/或,

所述缓冲液为PBS缓冲液,更优选含有1%吐温-20的PBS缓冲液,所述千分比指体积千分比。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤(2)中,所述孵育为将固相载体置于4~40℃放置0.5~12小时,更优选于37℃放置2小时;和/或,

所述缓冲液为PBS缓冲液,更优选含有1%吐温-20的PBS缓冲液,所述千分比指体积千分比。

4. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤(3)中,所述孵育为将固相载体置于4~40℃放置0.5~12小时,更优选于37℃放置2小时;和/或,

所述缓冲液为PBS缓冲液,更优选含有1%吐温-20的PBS缓冲液,所述千分比指体积千分比。

5. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤(4)中,所述葡萄糖溶液的浓度0.1~50mmol/L,更优选5mmol/L;和/或,

所述反应为于37℃反应10min;和/或,

所述过氧化氢试纸条为德国默克公司生产的过氧化氢试纸条。

6. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤(4)中,获得结果 I 借助于跟过氧化氢试纸条配套的手持检测仪进行,以获得精确的数据,在获得精确数据之后,制作反映待测物标准品浓度的标准曲线,为后续检测待测样品提供参比依据。

7. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤(3)以步骤(3')替代,所述步骤(3')包括子步骤(3')a、子步骤(3')b和子步骤(3')c;

所述子步骤(3')a为:加入以生物素或链霉亲和素标记的二抗,孵育后用缓冲液进行冲洗,所述二抗为抗待测物的抗体;

所述子步骤(3')b为:加入链霉亲和素或生物素,孵育后用缓冲液进行冲洗;

所述子步骤 (3')c 为 : 加入以 CAT 标记的生物素或链霉亲和素, 孵育后用缓冲液进行冲洗 ;

其中, 当子步骤 (3')a 中加入以生物素标记的二抗时, 则子步骤 (3')b 中加入链霉亲和素, 同时, 子步骤 (3')c 中加入以 CAT 标记的生物素 ; 当子步骤 (3')a 中加入以链霉亲和素标记的二抗时, 则子步骤 (3')b 中加入生物素, 同时, 子步骤 (3')c 中加入以 CAT 标记的链霉亲和素。

8. 根据权利要求 7 所述的方法, 其特征在于, 所述以生物素标记的二抗或链霉亲和素标记的二抗的制备方法如下 : 将二抗和生物素或链霉亲和素于 PBS 缓冲液中反应后, 除去未偶联的生物素或链霉亲和素, 即得 ; 和 / 或,

所述以 CAT 标记的生物素或以 CAT 标记的链霉亲和素以如下方法制备得到 : 将 CAT 和生物素或链霉亲和素于 PBS 缓冲液中反应后, 除去未偶联的生物素或链霉亲和素, 即得。

9. 根据权利要求 7 所述的方法, 其特征在于, 所述孵育为将固相载体置于 4 ~ 40℃ 放置 0.5 ~ 12 小时, 更优选于 37℃ 放置 2 小时 ; 和 / 或,

所述缓冲液为 PBS 缓冲液, 更优选含有 1% 吐温 -20 的 PBS 缓冲液, 所述千分比指体积千分比。

10. 权利要求 1 ~ 9 任一项所述方法在免疫检测领域的应用。

一种基于过氧化氢试纸条进行免疫分析的方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于免疫检测分析技术领域,具体涉及一种基于过氧化氢试纸条进行免疫分析的方法及其应用。

背景技术

[0002] 可视化快速检测技术具有信号读出简单、不需要任何仪器而可直接用裸眼进行观察等优点,特别适合现场、快速和床边的检测,因此在临床诊断、食品安全、环境监测等领域得到了广泛的应用。目前,可视化的快速检测技术主要包括:(1) 基于化学反应导致的颜色改变,例如 pH 试纸;(2) 基于纳米材料的本身颜色改变,实现可视化检测,最经典的是胶体金免疫层析试纸条,该方法具有成本低、快速、简便、无需仪器及携带方便、适合现场检测等优点,但是,该方法灵敏度较低,难以满足痕量目标物检测的需要。例如一些重要的传染病诊断、食品和环境中有毒、有害物质的超痕量检测等领域都需要高灵敏度的可视化分析方法。另外也有些研究表明分散状态的金颗粒,通过反应其状态从分散变成聚集后,颗粒间的等离子体耦合会发生改变,吸收峰发生红移,溶液的颜色由红色变为紫色或蓝色,从而实现目标物的检测,该检测方法具有简便快捷,成本低廉、选择性好、肉眼可见、无需大型仪器等优点,是一种具有应用潜力的分析检测方法。但这种依赖改变溶液中胶体金溶液状态改变的方法需要对胶体金表面进行特别的修饰,操作比较麻烦,适合检测简单的样品,例如水样中的重金属等等,但在复杂的生物样品中,该方法的抗干扰能力差,灵敏度仍然达不到实际样品的要求。(3) 基于酶和底物之间的显色反应,例如辣根过氧化物酶 (HRP) 和底物 TMB 之间的特异性酶促反应会有蓝色产生,根据蓝色的深浅可以判断样品中目标物的含量,其中应用最为广泛的酶联免疫分析方法 (ELISA) 就是基于 HRP 酶和底物之间的高效催化的免疫分析方法,该方法最大的优点是酶的催化效率很高,因此该方法的灵敏度比传统的胶体金免疫层析试纸条的灵敏度高一个数量级。但该方法酶和底物之间的反应需要添加终止液进行终止,操作比较繁琐,不利于快速检测,同时该方法的定量还需要一个酶标仪配套分析,但酶标仪比较笨重,一般不适合现场快速检测。因此,开发一种灵敏度高、读出方式简便的分析方法具有重要的现实意义。

发明内容

[0003] 本发明的目的是针对目前胶体金免疫层析试纸条灵敏度低和酶联免疫分析方法在信号读出方面比较繁琐的问题,而提供一种基于过氧化氢试纸条进行免疫分析的方法及其应用。本发明的方法灵敏度高,数据读取方式简便,且无需检测仪器即可进行基本的可视化判断,若结合其手持式的定量检测仪器,即可进行精确定量检测。因此,本发明为疾病的早期诊断、环境监测、食品安全等领域提供了一种快速和高灵敏度的分析方法。

[0004] 为实现上述目的,本发明提供下述技术方案。

[0005] 本发明提供的技术方案之一是:一种基于过氧化氢试纸条进行免疫分析的方法,其包括如下步骤:

[0006] (1) 将包被物质包被在固相载体上, 孵育后用缓冲液进行冲洗;

[0007] (2) 加入具有不同浓度梯度的待测物标准品溶液, 孵育后用缓冲液进行冲洗;

[0008] (3) 加入以葡萄糖氧化酶标记的二抗, 孵育后用缓冲液进行冲洗, 所述二抗为抗待测物的抗体;

[0009] (4) 加入葡萄糖溶液进行反应, 吸取反应后的溶液于过氧化氢试纸条上, 显色后获得结果 I;

[0010] (5) 将步骤 (2) 中所述的不同浓度梯度的待测物标准品溶液替换成待测样品溶液, 重复进行步骤 (1) ~ (4) 的操作, 显色后获得结果 II, 将结果 II 参比结果 I, 判断待测样品溶液中待测物的浓度;

[0011] 其中, 当待测物为完全抗原时, 所述包被物质为能够与所述完全抗原对应结合且与所述二抗具有不同抗原结合位点的抗体, 当待测物为抗体时, 所述包被物质为与所述抗体对应的完全抗原或半抗原分子与蛋白质载体偶联形成的人工抗原。

[0012] 本发明中, 步骤 (1) 为: 将包被物质包被在固相载体上, 孵育后用缓冲液进行冲洗。

[0013] 如本领域常规, 所述的包被物质为捕获物质, 一般是抗体, 如果是半抗原分子, 则将半抗原分子与蛋白质载体偶联后再进行包被。所述的包被物质能够特异性结合步骤 (2) 中所述的待测物。

[0014] 所述的固相载体为免疫检测领域常规所述的各类固相载体, 其对于具体材质和规格并没有特殊的要求, 只要其适于包被以及进行其他常规免疫反应操作即可。优选地, 所述的固相载体为酶标板, 本领域各种常规材质和规格的酶标板均适用于本发明。

[0015] 所述孵育为本领域的常规操作, 一般是将包被后的固相载体置于合适的温度条件下放置数小时, 待包被物质牢固吸附于固相载体上即可。优选地, 所述孵育为将包被后的固相载体置于 4 ~ 40℃ 放置 0.5 ~ 12 小时, 更优选于 37℃ 放置 2 小时。

[0016] 所述缓冲液为本领域常规, 各类用于冲洗过量包被物质的缓冲液均适用于本发明, 可以视不同的检测反应体系而进行具体选择。优选地, 所述缓冲液为 PBS 缓冲液, 更优选含有 1% 吐温 -20 的 PBS 缓冲液, 所述千分比指体积千分比。

[0017] 所述冲洗为本领域的常规操作, 一般是往固相载体上加入缓冲液, 静置数分钟后甩净拍干, 一般冲洗数次。

[0018] 本发明中, 步骤 (2) 为: 加入具有不同浓度梯度的待测物标准品溶液, 孵育后用缓冲液进行冲洗。

[0019] 其中, 所述的待测物为待检测的物质, 其与步骤 (1) 中所述的包被物质能够发生特异性的结合, 其属性一般为完全抗原或者是抗体。所述抗体的来源没有特别限制, 如可以是步骤 (1) 中所述的包被物质免疫各类哺乳动物而获得的抗体, 如鼠抗或兔抗, 其类型也没有特殊要求, 既可以是单克隆抗体, 也可以是多克隆抗体。

[0020] 所述孵育同步步骤 (1), 其是本领域的常规操作, 一般是将固相载体置于合适的温度条件下放置数小时, 待添加物牢固吸附于固相载体上即可。优选地, 所述孵育为将固相载体置于 4 ~ 40℃ 放置 0.5 ~ 12 小时, 更优选于 37℃ 放置 2 小时。

[0021] 所述缓冲液同步步骤 (1), 其为本领域常规, 各类用于冲洗过量添加物的缓冲液均适用于本发明, 可以视不同的检测反应体系而进行具体选择。优选地, 所述缓冲液为 PBS 缓冲

液,更优选含有 1%吐温-20 的 PBS 缓冲液,所述千分比指体积千分比。

[0022] 所述冲洗同步步骤 (1),其为本领域的常规操作,一般是往固相载体上加入缓冲液,静置数分钟后甩净拍干,一般冲洗数次。

[0023] 本发明中,步骤 (3) 为:加入以葡萄糖氧化酶标记的二抗,孵育后用缓冲液进行冲洗,所述二抗为抗待测物的抗体。

[0024] 其中,所述葡萄糖氧化酶 (glucose oxidase) 也称 GOD 或 GOX,其可以催化葡萄糖生成过氧化氢。

[0025] 所述二抗的来源没有特别限制,如可以是将步骤 (2) 中所述的待测物免疫各类哺乳动物而获得的抗体,如羊抗、马抗等,其类型也没有特殊要求,既可以是单克隆抗体,也可以是多克隆抗体。

[0026] 所述孵育同步步骤 (1),其是本领域的常规操作,一般是将固相载体置于合适的温度条件下放置数小时,待添加物牢固吸附于固相载体上即可。优选地,所述孵育为将固相载体置于 4 ~ 40℃放置 0.5 ~ 12 小时,更优选于 37℃放置 2 小时。

[0027] 所述缓冲液同步步骤 (1),其为本领域常规,各类用于冲洗过量添加物的缓冲液均适用于本发明,可以视不同的检测反应体系而进行具体选择。优选地,所述缓冲液为 PBS 缓冲液,更优选含有 1%吐温-20 的 PBS 缓冲液,所述千分比指体积千分比。

[0028] 所述冲洗同步步骤 (1),其为本领域的常规操作,一般是往固相载体上加入缓冲液,静置数分钟后甩净拍干,一般冲洗数次。

[0029] 本发明中,步骤 (4) 为:加入葡萄糖溶液进行反应,吸取反应后的溶液于过氧化氢试纸条上,显色后获得结果 I。

[0030] 其中,所述葡萄糖溶液为本领域常规,即将一定量的葡萄糖溶于水即可,所述葡萄糖溶液的浓度优选 0.1 ~ 50mmol/L,更优选 5mmol/L。

[0031] 所述反应为本领域常规,优选于 37℃反应 10min。

[0032] 所述过氧化氢试纸条为本领域常规市售可得的产品,优选德国默克公司生产的过氧化氢试纸条,该试纸条还可跟与其配套的手持检测仪一起使用,从而达到快速准确定量检测待测物的目的。

[0033] 所述获得结果 I 的方式为本领域常规,如在吸取反应后的溶液于过氧化氢试纸条上后,不借助任何检测仪器而仅凭肉眼即可观察结果,一定浓度的待测物标准品溶液对应于特定深浅度的显色,可以为后续检测待测样品提供参比依据,达到定性或者简单定量的目的。获得结果 I 还可以借助于跟过氧化氢试纸条配套的手持检测仪进行,以获得精确的数据,或者进一步地,还可以在获得精确数据之后,制作反映待测物标准品浓度的标准曲线,从而为后续检测待测样品提供参比依据,达到快速检测和精确定量的目的。

[0034] 本发明中,步骤 (5) 为:将步骤 (2) 中所述的不同浓度梯度的待测物标准品溶液替换成待测样品溶液,重复进行步骤 (1) ~ (4) 的操作,显色后获得结果 II,将结果 II 参比结果 I,判断待测样品溶液中待测物的浓度。

[0035] 如本领域常规,一般而言,在获得对照的参比数据之后进行待测样品的实质性检测。在本发明中,一般的操作是重复进行步骤 (1) ~ (4) 的操作,只是将步骤 (2) 中所述的不同浓度梯度的待测物标准品溶液替换成待测样品溶液,显色后获得结果 II。所述获得结果 II 的方式与获得结果 I 的方式相同,如可以在吸取反应后的溶液于过氧化氢试纸条上

后,不借助任何检测仪器而仅凭肉眼即可观察结果,参比结果 I,即可对待测样品进行定性检测或者简单定量。同时,获得结果 II 也可以是借助于跟过氧化氢试纸条配套的手持检测仪进行,以获得精确的数据,同样地,参比结果 I(较佳地可以是参比标准曲线),达到精确定量检测待测样本的目的。

[0036] 在具体操作中,当检测的物质为肺支原体抗体等无标准品的物质时,本发明的方法较佳地包括如下步骤:

[0037] (1) 将包被物质包被在固相载体上,孵育后用缓冲液进行冲洗;

[0038] (2) 加入待测物,孵育后用缓冲液进行冲洗;

[0039] (3) 加入以葡萄糖氧化酶标记的二抗,孵育后用缓冲液进行冲洗,所述二抗为抗待测物的抗体;

[0040] (4) 加入葡萄糖溶液进行反应,吸取反应后的溶液于过氧化氢试纸条上,显色后读取结果;

[0041] 其中,当待测物为完全抗原时,所述包被物质为能够与所述完全抗原对应结合且与所述二抗具有不同抗原结合位点的抗体,当待测物为抗体时,所述包被物质为与所述抗体对应的完全抗原或半抗原分子与蛋白质载体偶联形成的人工抗原。

[0042] 对于传染病等疾病的检测,最重要的是需要快速、灵敏,因为在实际检测中,我们首先需要进行定性检测,即以最快、最简单的方法确定疑似病人是否感染。以上技术方案,省却了读取标准品结果的步骤,直接读取待测样品的结果,进行定性检测,在传染病检测方面具有很大的应用前景。

[0043] 本发明中,步骤(3)还可以步骤(3')进行替代,所述步骤(3')包括子步骤(3')a、子步骤(3')b和子步骤(3')c;

[0044] 所述子步骤(3')a为:加入以生物素或链霉亲和素标记的二抗,孵育后用缓冲液进行冲洗,所述二抗为抗待测物的抗体;

[0045] 所述子步骤(3')b为:加入链霉亲和素或生物素,孵育后用缓冲液进行冲洗;

[0046] 所述子步骤(3')c为:加入以 CAT 标记的生物素或链霉亲和素,孵育后用缓冲液进行冲洗;

[0047] 其中,当子步骤(3')a中加入以生物素标记的二抗时,则子步骤(3')b中加入链霉亲和素,同时,子步骤(3')c中加入以 CAT 标记的生物素;当子步骤(3')a中加入以链霉亲和素标记的二抗时,则子步骤(3')b中加入生物素,同时,子步骤(3')c中加入以 CAT 标记的链霉亲和素。

[0048] 所述以生物素标记的二抗或链霉亲和素标记的二抗的制备方法优选如下:将二抗和生物素或链霉亲和素于 PBS 缓冲液中反应后,除去未偶联的生物素或链霉亲和素,即得。

[0049] 所述 CAT 指过氧化氢酶(catalase),所述以 CAT 标记的生物素或以 CAT 标记的链霉亲和素优选以如下方法制备得到:将 CAT 和生物素或链霉亲和素于 PBS 缓冲液中反应后,除去未偶联的生物素或链霉亲和素,即得。

[0050] 子步骤(3')a、(3')b和(3')c中所述的孵育同步步骤(1),其是本领域的常规操作,一般是将固相载体置于合适的温度条件下放置数小时,待添加物牢固吸附于固相载体上即可。优选地,所述孵育为将固相载体置于 4~40℃放置 0.5~12 小时,更优选于 37℃放置 2 小时。

[0051] 子步骤 (3')a、(3')b 和 (3')c 中所述的缓冲液同步骤 (1), 其为本领域常规, 各类用于冲洗过量添加物的缓冲液均适用于本发明, 可以视不同的检测反应体系而进行具体选择。优选地, 所述缓冲液为 PBS 缓冲液, 更优选含有 1% 吐温-20 的 PBS 缓冲液, 所述千分比指体积千分比。

[0052] 子步骤 (3')a、(3')b 和 (3')c 中所述的冲洗同步骤 (1), 其为本领域的常规操作, 一般是往固相载体上加入缓冲液, 静置数分钟后甩净拍干, 一般冲洗数次。

[0053] 在子步骤 (3')a、(3')b 和 (3')c 结束后, 照常进行步骤 (4) 的操作。

[0054] 本发明所述方法的原理为: 商业化的过氧化氢试纸条对过氧化氢 (H_2O_2) 具有很高的敏感性, 可以检测低至 0.5mg/L 浓度的 H_2O_2 , 并且可以实现可视化的检测。因此, 本发明将其作为一个可视化的信号读出系统, 结合酶联免疫分析方法, 通过免疫标记酶, 例如葡萄糖氧化酶 (GOD) 或者过氧化氢酶 (Catalase) 产生或者消耗 H_2O_2 , 通过 H_2O_2 含量的变化可以反映出样品中目标物的含量, 而 H_2O_2 的含量可以通过过氧化氢试纸条进行高灵敏、快速的检测。本发明分别通过将葡萄糖氧化酶 (GOD) 和过氧化氢酶 (Catalase, CAT) 作为免疫分析中的标记酶, 通过免疫分析反应, 分别实现了对生物大分子 (如 IgG) 和毒品小分子 (如吗啡) 的检测。

[0055] 本发明提供的技术方案之二是: 前述方法在免疫检测领域的应用。

[0056] 必须说明的是, 上述应用可能涉及医学领域所指的疾病诊断和治疗, 也可能涉及非疾病的诊断和治疗的情况, 比如检测环境中的微生物、检测食品中有害物质的含量等, 本发明对应的权利要求仅限于非疾病的诊断和治疗方法的范围, 涉及疾病的诊断和治疗方法的技术方案不在本发明所请求保护的范围内。

[0057] 在符合本领域常识的基础上, 上述各优选条件, 可任意组合, 即得本发明各较佳实例。

[0058] 本发明所用试剂和原料均市售可得。

[0059] 本发明的积极进步效果在于:

[0060] 本发明将商业化的过氧化氢试纸条作为免疫分析方法的可视化信号读出系统, 一方面具有操作简单, 检测速度快的优点, 另外一方面本发明的检测方法具有极高的灵敏度, 在毒品等小分子的检测中, 该方法的灵敏度比传统的胶体金试纸条的灵敏度提高了两个数量级。此外, 本发明的方法操作简单, 无需借助任何复杂和笨重的仪器, 即可凭肉眼进行定性或简单定量, 或者借助便携的配套仪器即可完成灵敏度极高的精确定量检测。本发明解决了传统的免疫分析信号读出相对复杂或者灵敏度比较低的问题, 将为现场、快速检测提供极大的方便, 具有良好的应用前景。

附图说明

[0061] 图 1 为实施例 1 中试纸条反应区的结果显示图, 图中各条带从左至右分别对应 100、50、25、12.5、6.25、3、1.5 和 0 μM 浓度的 H_2O_2 , 试纸条下端的显色区显示其颜色深浅。

[0062] 图 2 为实施例 2 中以试纸条检测兔抗人 IgG 标准品的结果图, 图中各条带从左至右分别对应 40、20、10、5、2.5、1.25、0.625 和 0 μM 浓度的兔抗人 IgG, 随着兔抗人 IgG 浓度的降低, 试纸条下端显色区的颜色逐渐变浅。

[0063] 图 3 为默克公司配套的手持检测仪器。

[0064] 图 4 为实施例 2 中兔抗人 IgG 浓度和信号值（吸光度）的关系图。

[0065] 图 5 为实施例 2 实验结果的标准曲线。

[0066] 图 6 为实施例 4 中以试纸条检测兔抗人 IgG 标准品实验的结果图，图中各条带从左至右分别对应 40、20、10、5、2.5、1.25、0.625 和 0 μ M 浓度的兔抗人 IgG，随着兔抗人 IgG 浓度的升高，试纸条下端显色区的颜色逐渐变浅。

[0067] 图 7 为实施例 4 中兔抗人 IgG 浓度和信号值（吸光度）的关系图。

[0068] 图 8 为实施例 4 实验结果的标准曲线。

[0069] 图 9 为实施例 6 中吗啡标准品实验的结果图，图中各条带从左至右分别对应 900、225、56、14、3.5、0.9、0.22 和 0 μ M 浓度的吗啡，随着吗啡浓度的降低，试纸条下端显色区的颜色逐渐变深。

[0070] 图 10 为实施例 6 中吗啡标准品浓度和信号值（吸光度）的关系图。

[0071] 图 11 为实施例 6 实验结果的标准曲线。

具体实施方式

[0072] 以下实施例用于说明本发明，但并不用来限制本发明的范围。除特殊说明的之外，各实施例中所用的设备和试剂均常规市售可得。

[0073] 各实施例中，部分材料和试剂的来源如下：30% 过氧化氢溶液（北京化工厂，北京），PBS 片（Amresco, USA），葡萄糖氧化酶（Sigma, USA），过氧化氢酶（CAT），链霉亲和素（SA，购自北京索莱宝科技有限公司），生物素（Biotin，购自 Sigma 公司），Tris-HCl（LANYI REAGENT, USA），牛血清白蛋白（Amresco, USA），碳酸钠（Sigma, USA），碳酸氢钠（Sigma, USA），吐温-20（Amresco, USA），吗啡-BSA 偶联物、吗啡标准品、小鼠抗吗啡单克隆抗体、葡萄糖氧化酶标记的羊抗鼠二抗均购自北京沫之东生物技术有限公司，人 IgG（翊圣生物，上海），兔抗人 IgG、羊抗兔 IgG 均购自上海博士德生物公司，葡萄糖（Sigma, USA），96 孔酶标板（Corning, USA），过氧化氢试纸条（Millipore, Germany），30kd 超滤管（Millipore, Germany）。

[0074] 部分实验溶液配制方法如下：

[0075] 磷酸盐缓冲液（PBS, 0.01M, pH = 7.4）：

[0076] （1）先配 0.2M PB (pH = 7.4, 100mL) 的母液：取 19mL 0.2mol/L 的 NaH_2PO_4 ，81mL 0.2mol/L 的 Na_2HPO_4 ，混合即可。

[0077] （2）0.01M PB (pH = 7.4)：取 50mL 0.2M PB，加水稀释至 1000mL，并且加入 NaCl 至 0.9% (g/100mL) 即可。

[0078] 封闭液：称取 1.2g BSA 于 40mL 水中，摇匀，配成 3% BSA 封闭液。

[0079] 包被液（碳酸盐缓冲液）：称取碳酸钠、碳酸氢钠各 1.59g、2.93g 溶于 1000mL 水中。

[0080] 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。

[0081] 葡萄糖溶液：称取 18mg 葡萄糖溶于 30mL 水中，配成 5mmol/L 葡萄糖溶液。

[0082] 实施例 1 过氧化氢试纸条对不同浓度过氧化氢的响应结果

[0083] 将过氧化氢溶液从 100 μ M 开始进行 2 倍倍比稀释至 640000 倍，吸取 10 μ L 于过

氧化氢试纸条上,等待 10s,观察其颜色的改变,结果见图 1,从图 1 可以看出,随着 H_2O_2 的浓度的升高,试纸条反应区的颜色逐渐加深。

[0084] 实施例 2 利用过氧化氢试纸条对兔抗人 IgG 进行免疫分析

[0085] 1、实验操作流程

[0086] (1) 将人 IgG 用包被液(碳酸盐缓冲液, pH 9.6) 稀释至 $1.25 \mu\text{g/mL}$, 加入至 ELISA 酶标板孔中, $100 \mu\text{L/孔}$ 。置于 37°C , 2h。

[0087] (2) 甩净孔内溶液, 拍干。加入含 1% (体积) Tween-20 的 PBS 溶液, $150 \mu\text{L/孔}$, 静置 1min, 甩净孔内洗涤液, 拍干。重复洗涤 4 次。

[0088] (3) 封闭: 加入 $100 \mu\text{L/孔}$ 的 3% 的 BSA, 置于 37°C , 2h。

[0089] (4) 室温下, 甩净孔内溶液, 拍干。加入含 1% (体积) Tween-20 的 PBS, $150 \mu\text{L/孔}$, 甩净孔内洗涤液, 拍干, 重复洗涤 4 次, -20°C 保存, 待用。

[0090] (5) 向包被好的 ELISA 板中加入 $100 \mu\text{L/孔}$ 的 PBS, 置于室温 10min, 甩净。

[0091] (6) 用含 0.1% (质量体积比) BSA 的 PBS 对兔抗人 IgG (40mg/mL) 从 1000 倍开始进行 2 倍系列稀释, 将稀释倍数分别为 1000、2000、4000、8000、16000、32000、64000 的兔抗人 IgG 以 $100 \mu\text{L/孔}$ 的加入量加入至 ELISA 板中, 设置加入含 0.1% BSA 的 PBS 而不加入兔抗人 IgG 的孔作为阴性对照, 置于 37°C 孵育 1h。

[0092] (7) 室温下, 甩净孔内溶液, 拍干。加入含 1% (体积) Tween-20 的 PBS, $150 \mu\text{L/孔}$, 甩净孔内洗涤液, 拍干, 重复洗涤 4 次。

[0093] (8) 将偶联的 GOD-羊抗兔二抗稀释 1000 倍后分别取 $100 \mu\text{L}$ 加入各孔中, 置于 37°C 孵育 1h。

[0094] (9) 室温下, 甩净孔内溶液, 拍干。加入含 1% (体积) Tween-20 的 PBS, $150 \mu\text{L/孔}$, 甩净孔内洗涤液, 拍干, 重复洗涤 4 次。

[0095] (10) 配制葡萄糖溶液 (5mmol/L), 以 $100 \mu\text{L/孔}$ 加入至 ELISA 板, 置于 37°C 10min。

[0096] (11) 吸取每孔中的 $10 \mu\text{L}$ 溶液于过氧化氢试纸条, 观察颜色反应, 结果如图 2 所示。图 2 的结果表明, 随着兔抗人 IgG 浓度的升高, 试纸条下端显色区的颜色逐渐变深, 可作为后续检测的参比数据。

[0097] 2、制作标准曲线

[0098] 将图 2 所示试纸条采用配套的手持检测仪器(默克公司, RQflex10, 如图 3 所示) 读取数据, 绘制兔抗人 IgG 浓度和信号值(吸光度) 的关系图(如图 4 所示), 并制作标准曲线和线性方程(如图 5 所示)。通过试纸条上颜色的深浅可以得到可定量的信号值(吸光度), 结合标准曲线中的线性方程, 即可计算得出未知样品中兔抗人 IgG 浓度。

[0099] 实施例 3 利用过氧化氢试纸条对未知浓度兔抗人 IgG 进行定量检测

[0100] 检测步骤同实施例 2 中实验的操作流程, 在颜色反应后, 将结果与实施例 2 中的图 2 参比数据进行对照, 确定待测物中兔抗人 IgG 的浓度, 其落在一定区间, 即可定性或者简单定量。或者将试纸条用配套仪器读取数据, 将数据运用实施例 2 的标准曲线(如图 5 所示) 的线性方程进行换算, 从而确定其精确含量。

[0101] 实施例 4 基于 CAT 酶和 H_2O_2 试纸条对兔抗人 IgG 进行免疫分析

[0102] 1、实验的操作流程

[0103] (1) 生物素化过氧化氢酶 (CAT-Biotin) 和生物素化的羊抗兔 IgG 的制备: 取

CAT (5mg/mL) 74.62 μ L、羊抗兔 IgG (10mg/mL) 40 μ L, 分别和 Biotin (5mg/mL) 4 μ L 于 400 μ L PBS 中混合反应 1.5h, 用 10kd 超滤管离心 (9000rpm, 20min), 除去未偶联的 Biotin, CAT 最终浓度为 9.33mg/mL, 羊抗兔 IgG 最终浓度为 12mg/mL。

[0104] (2) 在 ELISA 板中包被一定浓度为 20 μ g/mL 的人 IgG, 4℃ 过夜, 加入 100 μ L/ 孔的 PBS, 置于室温 10min, 甩净。

[0105] (3) 用含 0.1% (质量体积比) BSA 的 PBS 对兔抗人 IgG (40mg/mL) 从 1000 倍开始进行 2 倍系列稀释, 将稀释倍数分别为 1000、2000、4000、8000、16000、32000、64000 的兔抗人 IgG 以 100 μ L/ 孔加入至 ELISA 板中, 设置加入含 0.1% BSA 的 PBS 而不加入兔抗人 IgG 的孔作为阴性对照, 置于 37℃ 孵育 1h。

[0106] (4) 室温下, 甩净孔内溶液, 拍干。加入含 1‰ (体积) Tween-20 的 PBS, 150 μ L/ 孔, 甩净孔内洗涤液, 拍干, 重复洗涤 4 次。

[0107] (5) 将生物素化的羊抗兔 IgG 稀释 5000 倍, 然后往 ELISA 板中每孔加入 100 μ L 的该溶液, 然后在 37℃ 孵育 90min, 甩净孔内溶液, 拍干, 用 PBST 缓冲溶液重复洗涤 4 次。

[0108] (6) 将链霉亲和素 SA 稀释 4000 倍, 分别取 100 μ L 加入各孔中, 置于 37℃ 孵育 40min。

[0109] (7) 室温下, 甩净孔内溶液, 拍干。加入含 1‰ (体积) Tween-20 的 PBS, 150 μ L/ 孔, 甩净孔内洗涤液, 拍干, 重复洗涤 4 次。

[0110] (8) 将偶联的 CAT-Biotin 稀释 1000 倍后分别取 100 μ L 加入各孔中, 置于 37℃ 孵育 1h。

[0111] (9) 室温下, 甩净孔内溶液, 拍干。加入含 1‰ (体积) Tween-20 的 PBS, 150 μ L/ 孔, 甩净孔内洗涤液, 拍干, 重复洗涤 4 次。

[0112] (10) 配制过氧化氢溶液 (25mg/L), 以 100 μ L/ 孔加入至 ELISA 板中, 置于 37℃ 10min。

[0113] (11) 吸取每孔中的 10 μ L 于过氧化氢试纸条, 观察颜色反应, 实验结果如图 6。图 6 的结果表明, 随着兔抗人 IgG 浓度的升高, 试纸条下端显色区的颜色逐渐变浅, 可作为后续检测的参比数据。

[0114] 2、制作标准曲线

[0115] 将图 6 所示试纸条采用配套的手持检测仪器读取数据, 绘制兔抗人 IgG 浓度和信号值 (吸光度) 的关系图 (如图 7 所示), 并制作标准曲线和线性方程 (如图 8 所示)。通过标准曲线中的线性方程和试纸条上颜色的深浅, 可以计算出未知样品中兔抗人 IgG 浓度。

[0116] 实施例 5 利用过氧化氢试纸条对未知浓度兔抗人 IgG 进行定量检测

[0117] 检测步骤同实施例 4 中标准品实验的操作步骤, 在颜色反应后, 将结果与实施例 4 中的图 6 参比数据进行对照, 确定待测物中兔抗人 IgG 的浓度, 其落在一定区间, 即可定性或者简单定量。或者将试纸条用配套的手持检测仪读取数据, 将数据与实施例 4 的标准曲线 (如图 8 所示) 进行对比, 从而确定其精确含量。

[0118] 实施例 6 基于过氧化氢试纸条对小分子 (毒品 - 吗啡) 进行免疫分析

[0119] 1、可视化定性实验的操作步骤

[0120] (1) 将吗啡-BSA 偶联物 (11.80mg/mL) 用包被液 (碳酸盐缓冲液, pH 9.6) 稀释至 0.25 μ g/mL, 加入至 ELISA 酶标板孔中, 100 μ L/ 孔。置于 37℃, 2h。

[0121] (2) 甩净孔内溶液, 拍干。加入含 1% (体积) Tween-20 的 PBS, 150 μ L/孔, 静置 1min, 甩净孔内洗涤液, 拍干。重复洗涤 4 次。

[0122] (3) 加入 100 μ L/孔的 3% 的 BSA, 置于 37 $^{\circ}$ C, 2h。

[0123] (4) 室温下, 甩净孔内溶液, 拍干。加入含 1% (体积) Tween-20 的 PBS, 150 μ L/孔, 甩净孔内洗涤液, 拍干, 重复洗涤 4 次, -20 $^{\circ}$ C 保存, 待用。

[0124] (5) 用含 0.1% (质量体积比) BSA 的 PBS 对吗啡标准品 (900ng/mL) 进行 4 倍系列稀释, 将稀释倍数分别为 4^0 、 4^1 、 4^2 、 4^3 、 4^4 、 4^5 、 4^6 的吗啡标准品 50 μ L 加入 50 μ L 稀释 20000 倍的鼠抗吗啡单克隆抗体中, 设置仅含有抗吗啡单克隆抗体而不加入吗啡标准品作为阴性对照, 置于 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min。

[0125] (6) 将步骤 (5) 反应后的溶液 100 μ L 移至包被好的 ELISA 板中, 置于 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min。

[0126] (7) 室温下, 甩净孔内溶液, 拍干。加入含 1% (体积) Tween-20 的 PBS, 150 μ L/孔, 甩净孔内洗涤液, 拍干, 重复洗涤 4 次。

[0127] (8) 用含 0.1% BSA 的 PBS 稀释葡萄糖氧化酶 (GOD) 标记的羊抗鼠抗体 1000 倍, 以 100 μ L/孔加入至 ELISA 板, 置于 37 $^{\circ}$ C, 1h。

[0128] (9) 室温下, 甩净孔内溶液, 拍干。加入含 1% (体积) Tween-20 的 PBS, 150 μ L/孔, 甩净孔内洗涤液, 拍干, 重复洗涤 4 次。

[0129] (10) 配制葡萄糖溶液 (5mmol/L), 以 100 μ L/孔加入至 ELISA 板, 置于 37 $^{\circ}$ C, 10min。

[0130] (11) 吸取每孔中的 10 μ L 溶液于过氧化氢试纸条, 观察颜色反应, 实验结果如图 9 所示。图 9 的结果表明, 随着吗啡标准品浓度的升高, 试纸条下端显色区的颜色逐渐变浅, 可作为后续检测的参比数据。

[0131] 2、精确定量标准曲线的制作

[0132] 将图 9 所示试纸条采用配套的手持检测仪器读取数据, 绘制反映吗啡标准品含量和试纸条上颜色深浅所对应的吸光度的关系图 (如图 10 所示), 并制作标准曲线和线性方程 (如图 11 所示)。通过标准曲线中的线性方程和试纸条上颜色的深浅, 可以计算出未知样品中兔抗人 IgG 浓度。

[0133] 实施例 7 利用过氧化氢试纸条对未知浓度小分子 (毒品 - 吗啡) 进行定量检测

[0134] 检测步骤同实施例 6 中可视化定性实验的操作步骤, 在颜色反应后, 将结果与实施例 6 中的图 9 参比数据进行对照, 确定待测物中吗啡的浓度, 其落在一定区间, 即可简单判断是否为阳性, 若为阳性, 还可简单定量。或者将试纸条用配套仪器读取数据, 将数据与实施例 6 的标准曲线 (如图 11 所示) 进行对比, 从而确定待测物中吗啡的精确含量。

[0135] 实施例 2 ~ 7 说明, 本发明的方法灵敏度高, 检测方便, 适合现场快速检测, 可以在食品安全, 环境监测, 临床诊断等领域发挥重要作用, 在食品中农、兽药残留的快速分析以及涉毒人员的吸毒快速检测等方面有很好的应用前景。

[0136] 虽然, 上文中已经用一般性说明、具体实施方式及试验, 对本发明作了详尽的描述, 但在本发明的基础上, 可以对之作一些修改或改进, 这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此, 在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进, 均属于本发明要求保护的

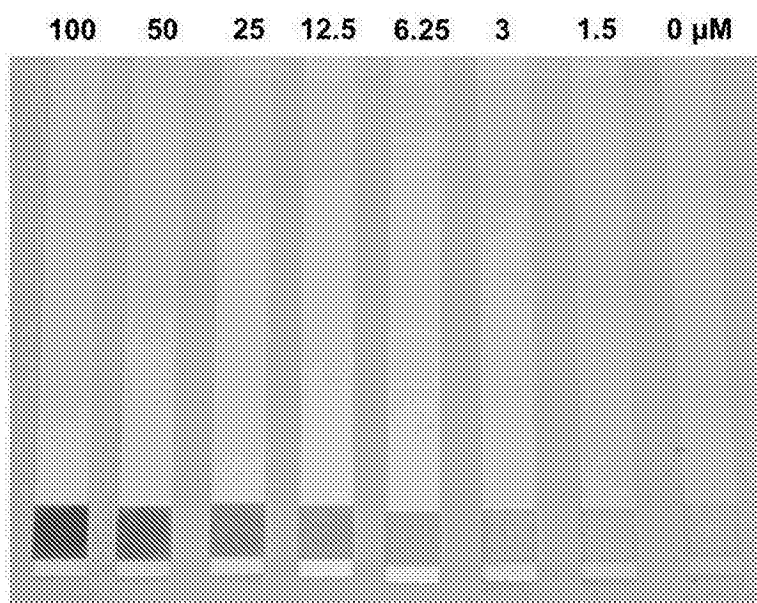


图 1

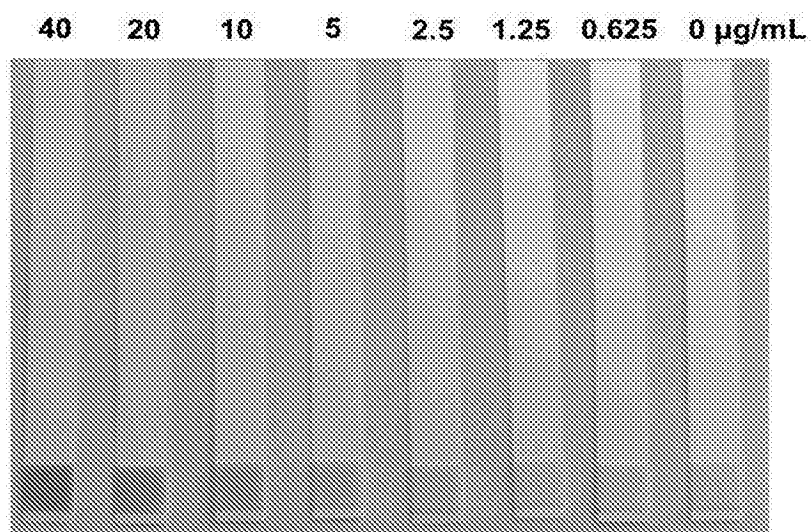


图 2

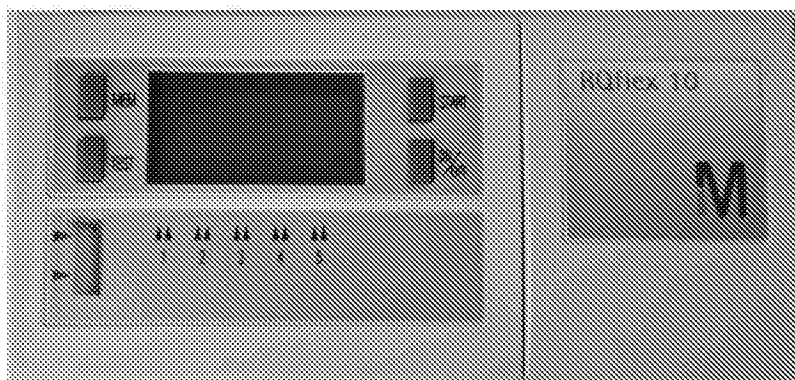


图 3

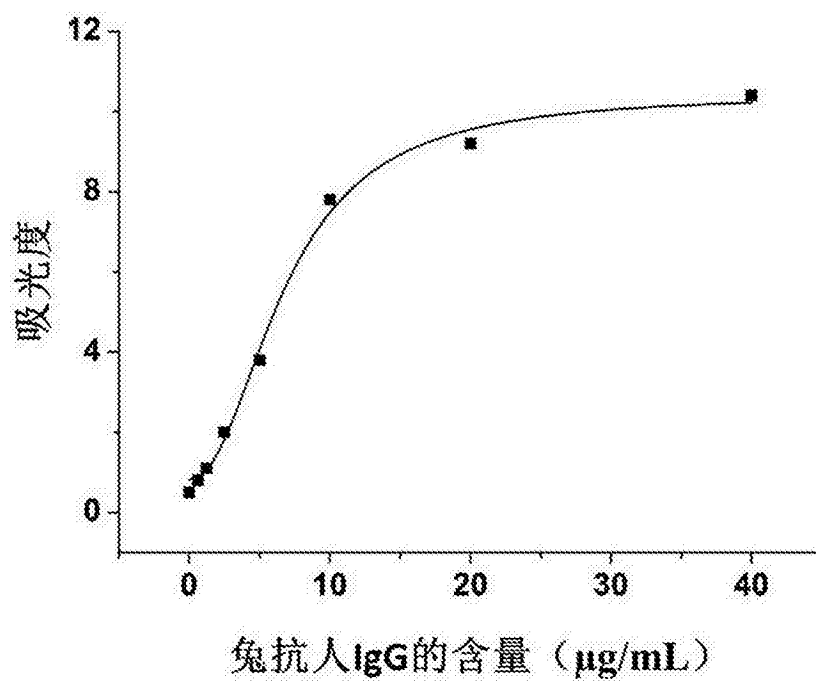


图 4

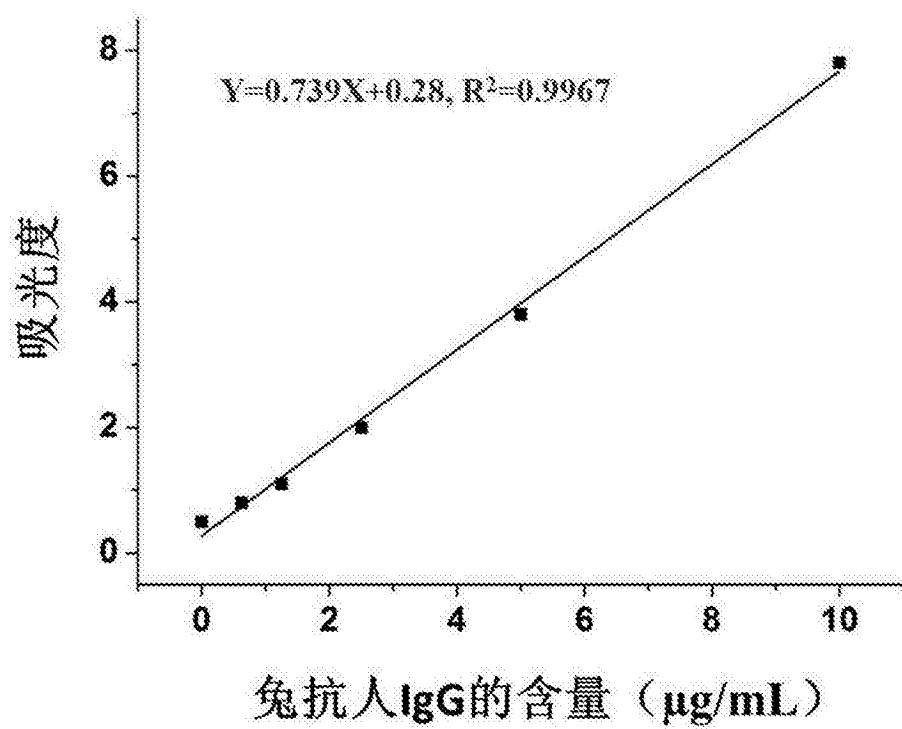


图 5

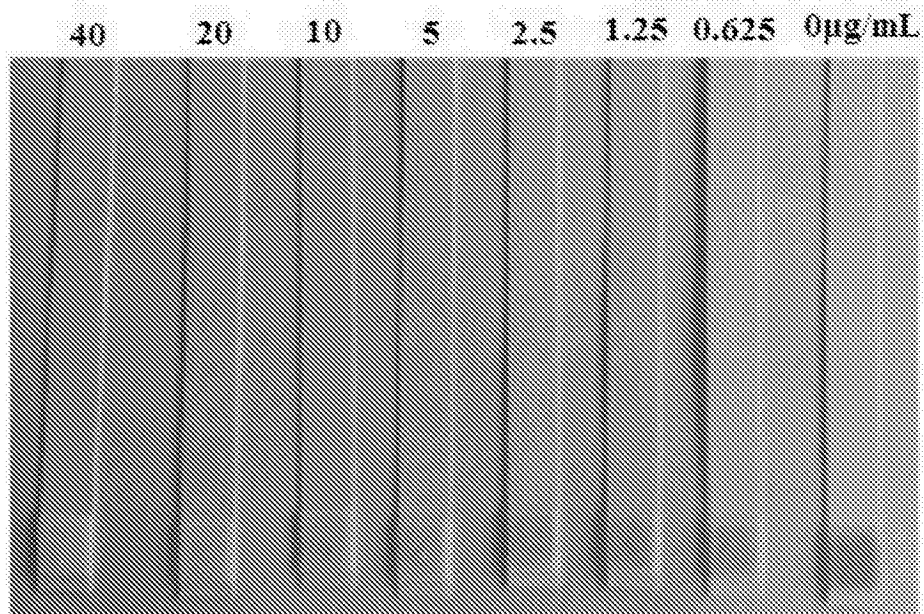


图 6

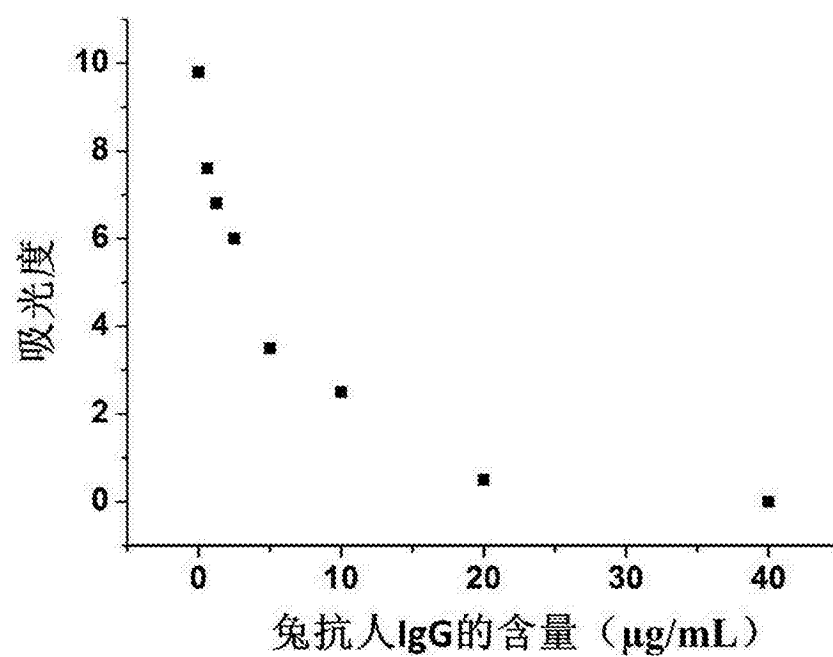


图 7

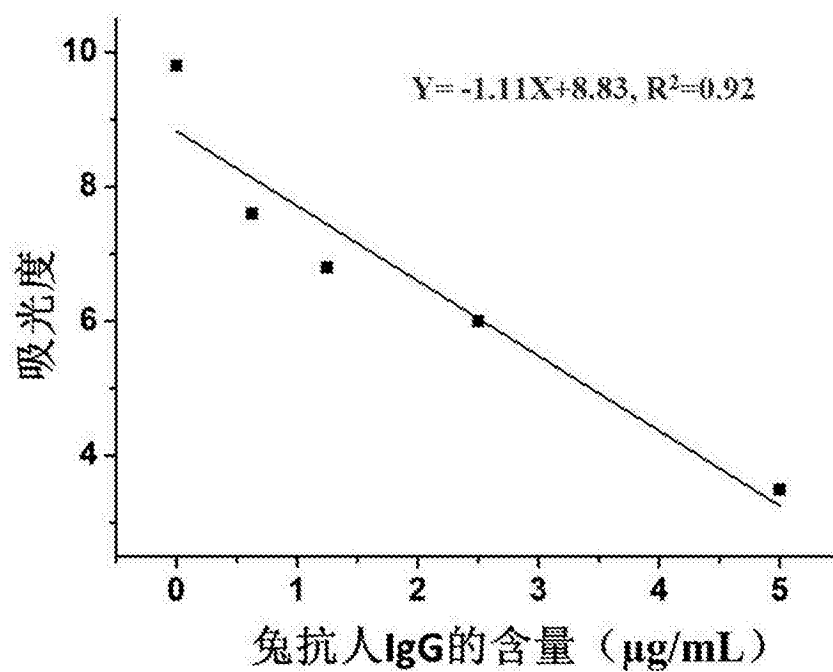


图 8

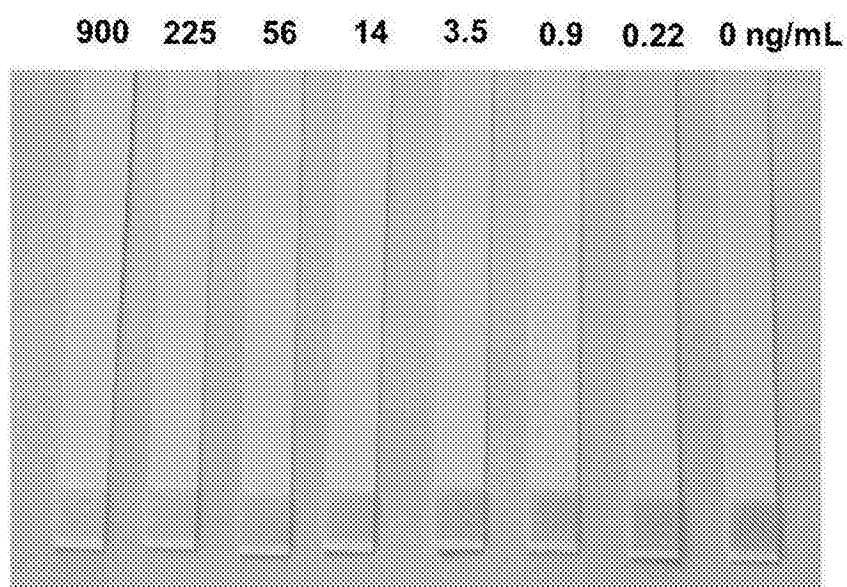


图 9

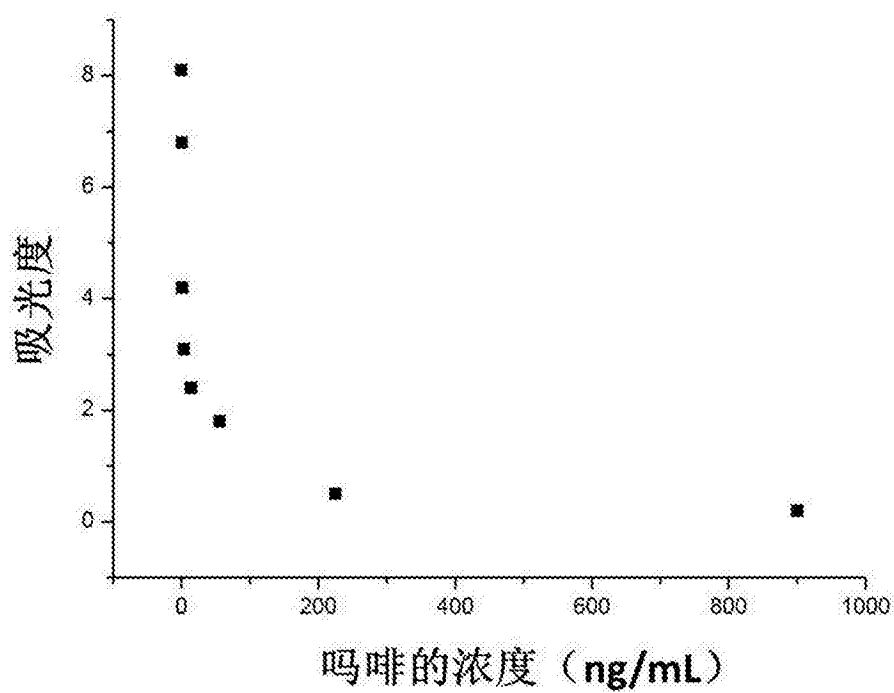


图 10

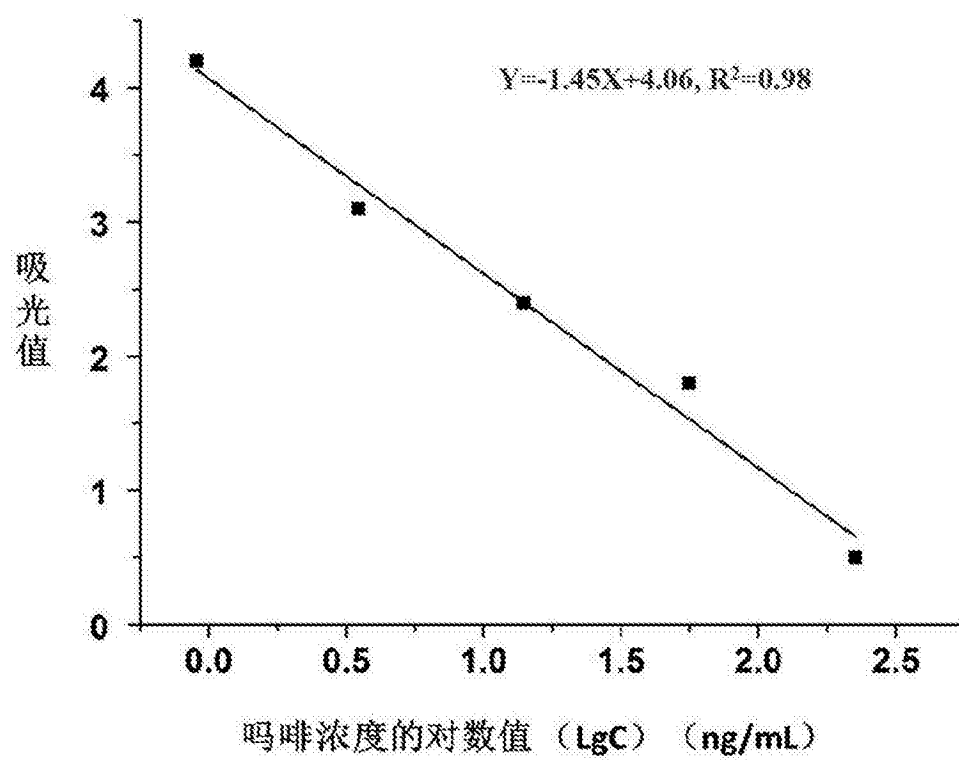


图 11

专利名称(译)	一种基于过氧化氢试纸条进行免疫分析的方法及其应用		
公开(公告)号	CN105353116A	公开(公告)日	2016-02-24
申请号	CN201510757259.5	申请日	2015-11-09
[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 冉蓓 张晓青		
发明人	蒋兴宇 陈翊平 冉蓓 张晓青		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/53 G01N33/535		
代理人(译)	王文君		
其他公开文献	CN105353116B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种基于过氧化氢试纸条进行免疫分析的方法及其应用。该方法包括：(1)将包被物质包被在固相载体上，孵育后用缓冲液冲洗；(2)加入待测物标准品溶液，孵育后用缓冲液冲洗；(3)加入葡萄糖氧化酶标记的二抗，孵育后用缓冲液冲洗；(4)加入葡萄糖溶液反应，吸取反应后的溶液于过氧化氢试纸条上，显色后获得结果I；(5)将步骤(2)中的待测物标准品溶液换成待测样品溶液，重复(1)~(4)的操作，显色后获得结果II，将结果II参比结果I，判断待测样品溶液中待测物的浓度。本发明的方法灵敏度高，数据读取方式简便，无需检测仪器即可进行基本的可视化定性判断，若结合其手持式的定量检测仪器，即可进行精确定量检测。

