



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103048449 B

(45) 授权公告日 2015.06.24

(21) 申请号 201310012751.0

(22) 申请日 2013.01.14

(73) 专利权人 谭蔚泓

地址 410082 湖南省长沙市湖南大学化学化工学院逸夫南楼 205

(72) 发明人 谭蔚泓 常荣山 蒋健晖

(74) 专利代理机构 长沙正奇专利事务所有限责任公司 43113

代理人 马强

(51) Int. Cl.

G01N 33/566(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

(56) 对比文件

CN 101942386 A, 2011.01.12,

CN 101942387 A, 2011.01.12,

CN 101851667 A, 2010.10.06,

Hui Xu et al. Aptamer-Functionalized Gold Nanoparticles as Probes in a Dry-Reagent Strip Biosensor for Protein Analysis. 《Analytical Chemistry》. 2008, 第 81 卷 (第 2 期), 第 669-675 页.

仲志鸿 等. 以分子信标为报告分子的凝血酶检测新方法. 《生命科学研究》. 2006, 第 10 卷 (第 3 期), 206-209.

Xun Mao et al. Disposable nucleic acid biosensors based on gold nanoparticle probes and lateral strip. 《Analytical Chemistry》. 2009, 第 81 卷 (第 4 期), 1660-1668.

审查员 周洋

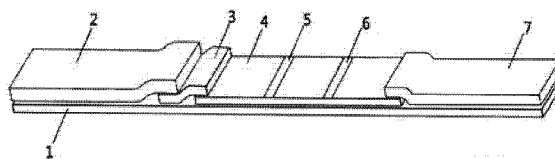
权利要求书1页 说明书7页  
序列表2页 附图1页

(54) 发明名称

基于核酸适配体的层析法检测试剂盒及其制备方法和检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种基于核酸适配体的层析法检测试剂盒及其制备方法和检测方法,该试剂盒的检测试纸包括底板,粘合在底板上且依次搭接的样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫;所述硝酸纤维素膜上靠近结合垫的一侧设有检测线,硝酸纤维素膜上靠近吸水垫的一侧设有质控线;结合垫上涂有胶体金标记的 A 核酸适配体;检测线上涂有 B 核酸适配体与链霉亲和素的复合物;质控线上涂有链霉亲和素;A 核酸适配体与 B 核酸适配体均为能特异性识别同一检测物的被生物素标记的核酸适配体。该试剂盒只需直接将待测样品稀释后滴入加样孔,五分钟内即可出结果,具有简单、快速、灵敏等特点,无需使用抗体和仪器设备、操作简单、特异性好、结果容易判读、制做方便易行。



1. 一种基于核酸适配体的胶体金免疫层析法检测试剂盒,包括检测试纸;所述检测试纸包括底板(1),粘合在底板(1)上且依次搭接的样品垫(2)、结合垫(3)、硝酸纤维素膜(4)和吸水垫(7);所述硝酸纤维素膜(4)上靠近结合垫(3)的一侧设有检测线(5),硝酸纤维素膜(4)上靠近吸水垫(7)的一侧设有质控线(6);其特征在于,所述结合垫(3)上涂有胶体金标记的A核酸适配体;所述检测线(5)上涂有B核酸适配体与链霉亲和素的复合物;所述质控线(6)上涂有链霉亲和素;所述A核酸适配体与B核酸适配体均为能特异性识别同一检测物的被生物素标记的核酸适配体;所述A核酸适配体的DNA序列5'端被巯基标记,3'端被生物素标记;所述B核酸适配体的DNA序列3'端被生物素标记;所述A核酸适配体的DNA序列如SEQ ID NO. 1所示,所述B核酸适配体的DNA序列如SEQ ID NO. 2所示;或者所述A核酸适配体的DNA序列如SEQ ID NO. 3所示,所述B核酸适配体的DNA序列如SEQ ID NO. 4所示。

2. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述底板(1)为PVC板;样品垫(2)的材料为聚酯酸膜;所述结合垫(3)的材料为玻璃纤维;所述吸水垫(7)为吸水滤纸。

3. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述检测试纸由硬质塑料卡包装。

4. 制备权利要求1至3任一项所述试剂盒的方法,包括如下步骤:

(1) 用胶体金标记A核酸适配体;

(2) 将样品垫放入含有BSA、和吐温的PBS的样品垫处理液中浸泡1h以上,烘干备用;

(3) 将步骤(1)被胶体金标记的A核酸适配体重新分散于含有蔗糖、BSA和吐温的PBS缓冲稀释液中,并喷于结合垫上,烘干备用;

(4) 在硝酸纤维素膜上检测线位置喷点B核酸适配体与链霉亲和素的复合物,在质控线位置喷点链霉亲和素,烘干备用;

(5) 将样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫依次搭接并粘合于底板上,切成检测试纸条,将检测试纸条用硬质塑料卡包装。

5. 如权利要求4所述的方法,其特征在于,所述步骤(1)是用直径为13—40nm的胶体金颗粒标记A核酸适配体。

6. 如权利要求5所述的方法,其特征在于,步骤(4)中所述喷点于检测线位置的B核酸适配体与链霉亲和素的复合物是将B核酸适配体浓度为0.5—1.5 $\mu$ M的溶液与浓度为0.5—1.5mg/mL的链霉亲和素按体积比1:8—12混合制备而成;所述喷点于质控线位置的链霉亲和素是浓度为1.5—2.5mg/mL的链霉亲和素稀释液。

7. 如权利要求6所述的方法,其特征在于,步骤(4)中所述喷点于检测线位置的B核酸适配体与链霉亲和素的复合物是将B核酸适配体浓度为1 $\mu$ M的溶液与浓度为1mg/mL的链霉亲和素按体积比1:10混合制备而成;所述喷点于质控线位置的链霉亲和素是浓度为2mg/mL的链霉亲和素稀释液。

## 基于核酸适配体的层析法检测试剂盒及其制备方法和检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种医疗检测产品及其制作方法,尤其涉及一种基于核酸适配体的层析法检测试剂盒及其制备方法和检测方法。

### 背景技术

[0002] 普通的免疫检测法是将特异的标记抗体先固定于固相支持物,与待测物特异结合后,再与另一个抗体结合,这样通过肉眼或特定的检测仪器,就可以定性检测待测物,从而实现特异性的免疫诊断。

[0003] 常用的免疫层析法所用的特异识别检测物的生物大分子都是抗体,通过抗原抗体特异识别反应,标记在抗原或抗体上的免疫胶体颗粒使检测线和质控线显示一定的颜色,从而实现特异性的免疫诊断。但是该方法检测不够快速和灵敏,而且用抗体检测还需要用到相应的仪器设备,操作不简便。

### 发明内容

[0004] 本发明旨在克服现有技术的不足,一种基于核酸适配体的层析法检测试剂盒及其制备方法和检测方法。通过提供一种能通过核酸适配体特异识别检测物,在常规胶体金免疫层析试剂盒基础上,制作胶体金免疫层析检测试剂盒,通过在检测线和质控线上显色,来实现检测。

[0005] 为实现上述发明目的,本发明提供的技术方案为:

[0006] 本发明提供了一种基于核酸适配体的层析法检测试剂盒,包括检测试纸;所述检测试纸包括底板,粘合在底板上且依次搭接的样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫;所述硝酸纤维素膜上靠近结合垫的一侧设有检测线,硝酸纤维素膜上靠近吸水垫的一侧设有质控线;所述结合垫上涂有纳米粒子标记的 A 核酸适配体;所述检测线上涂有 B 核酸适配体与链霉亲和素的复合物;所述质控线上涂有链霉亲和素;所述 A 核酸适配体与 B 核酸适配体均为能特异性识别同一检测物的被生物素标记的核酸适配体;其中,所述纳米粒子为纳米金、四氧化三铁或乳胶。

[0007] 其中,所述 A 核酸适配体的 DNA 序列 5' 端被巯基标记,3' 端被生物素标记;所述 B 核酸适配体的 DNA 序列 3' 端被生物素标记。

[0008] 所述 A 核酸适配体与 B 核酸适配体的序列可根据待检测物进行设计和调整,在本发明的一种实施例中所述 A 核酸适配体的 DNA 序列如 SEQ ID NO. 1 所示,所述 B 核酸适配体的 DNA 序列如 SEQ ID NO. 2 所示;在本发明的另一种实施例中所述 A 核酸适配体的 DNA 序列如 SEQ ID NO. 3 所示,所述 B 核酸适配体的 DNA 序列如 SEQ ID NO. 4 所示;在本发明的另一种实施例中所述 A 核酸适配体的 DNA 序列如 SEQ ID NO. 5 所示,所述 B 核酸适配体的 DNA 序列如 SEQ ID NO. 4 所示。

[0009] 所述底板为 PVC 板;样品垫的材料为聚酯酸膜;所述结合垫的材料为玻璃纤维;所

述吸水垫为吸水滤纸；所述检测试纸由硬质塑料卡包装。

[0010] 本发明还提供了一种制备上述试剂盒的方法，包括如下步骤：

[0011] (1) 用纳米粒子标记 A 核酸适配体；

[0012] (2) 将样品垫放入含有 BSA、和吐温的 PBS 的样品垫处理液中浸泡 1h 以上，烘干备用；

[0013] (3) 将步骤(1)被纳米粒子标记的 A 核酸适配体重新分散与含有蔗糖、BSA 和吐温的 PBS 缓冲稀释液中，并喷于结合垫上，烘干备用；

[0014] (4) 在硝酸纤维膜上检测线位置喷点 B 核酸适配体与链霉亲和素的复合物，在质控线位置喷点链霉亲和素，烘干备用；

[0015] (5) 将样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫依次搭接并粘合于底板上，切成检测试纸条，将检测试纸条用硬质塑料卡包装。

[0016] 其中，所述步骤(1)是用直径为 10—40nm 的纳米粒子标记 A 核酸适配体；步骤(4)中所述喷点于检测线位置的 B 核酸适配体与链霉亲和素的复合物是将 B 核酸适配体浓度为 0.5—1.5  $\mu$ M，优选 1  $\mu$ M 的溶液与浓度为 0.5—1.5mg/mL，优选 1mg/mL 的链霉亲和素按体积比 1:8—12，优选 1:10 混合制备而成；所述喷点于质控线位置的链霉亲和素是浓度为 1.5—2.5mg/mL，优选 2mg/mL 的链霉亲和素稀释液。

[0017] 本发明还提供了一种基于核酸适配体的检测方法：

[0018] 所述方法采用识别同一检测物的两个核酸适配体，在常规层析试剂盒基础上，制作上述层析法检测试剂盒，通过 A 核酸适配体和 B 核酸适配体与待测物特异结合后在检测线和质控线上显色来实现无抗体的层析检测；若质控线不显色，则测试结果均无效；若检测线显色而质控线不显色也视为无效；若质控线和检测线均显色，则表示在检测样品中有待测物。

[0019] 下面结合试剂盒的详细制作过程及原理对本发明作进一步说明：

[0020] 本发明试剂盒的具体制作过程如下：

[0021] (1) 用直径为 10—40nm 的纳米粒子标记核酸适配体 1，用无菌水把纳米粒子稀释，再加入核酸适配体，10000rpm 离心 15 分钟，去除上清液，胶体复溶到 0.1 M PBS 缓冲液中，这样反复操作三次，最后将标记好的核酸适配体 1 复溶在含 20mM  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ，1%PEG6000 的 0.01 M pH7.4 的 PBS 缓冲液中；

[0022] (2) 选用聚醋酸膜作为样品垫材料，将其放入含 3%BSA、0.05%吐温 20 的 0.01 M pH7.4PBS 缓冲液的样品垫处理液中浸泡 1 小时后，37 $^{\circ}$ C 烘干 2 小时烘干，4 $^{\circ}$ C 保存备用；

[0023] (3) 选用玻璃纤维作为结合垫材料，将步骤(1)制备的胶体金标记 A 核酸适配体重新分散于含 5%蔗糖、1%BSA、0.05%吐温 20 的 0.01 M PBS 缓冲液中，再用点膜机喷于玻璃纤维材质的结合垫上，37 度烘干 2 小时，4 $^{\circ}$ C 保存备用；

[0024] (4) 硝酸纤维素膜上点样：用合成的标记有生物素的 B 核酸适配体溶解在无菌水中，浓度为 1  $\mu$ M，与浓度为 1mg/ml 的链酶亲和素 1:10 的体积比混合，室温反应一小时后，再加入一倍体积的 0.01M pH7.4 的 PBS 缓冲液，然后移入截留分子量 30000 的离心超滤管，6000rpm 离心 15 分钟，再加入和上述相同体积的 0.01M pH7.4 的 PBS 缓冲液，6000rpm 离心 15 分钟，这样反复操作三次，得到相当于原体积的 B 核酸适配体链酶亲和素复合物；将链酶亲和素溶解于无菌水中，制成浓度为 2mg/ml 的包被质控线用链酶亲和素稀释液。点膜机将

B 核酸适配体链酶亲和素复合物以及链酶亲和素稀释液分别点在硝酸纤维素膜上的检测线(检测线位于整条检测试纸的中线位置)及质控线位置,两线相隔三毫米,然后将此硝酸纤维素膜置真空干燥器,干燥半小时,再 37℃ 烘干 1 小时,密封好并置于室温备用;

[0025] (5) 将处理好的样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水滤纸分别按顺序粘贴在 PVC 片材上后,再切成四毫米宽度的检测条装入塑料卡中,组装成层析法检测试剂盒。

[0026] 使用时,将待测标本加入到点样孔,待测标本在毛细作用下沿着样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜向吸水滤纸端方向层析,在层析过程中,待测标本中的检测物先与玻璃纤维结合垫上的纳米粒子-A 核酸适配体复合物特异结合并使之复溶,复溶后的混合物继续层析到硝酸纤维素膜上,与硝酸纤维素膜上检测线区域包被的 B 核酸适配体发生免疫反应,在一定浓度的检测物的作用下,显现出相应的颜色的线条;多余的纳米粒子-A 核酸适配体复合物继续向前,A 核酸适配体上标记的生物素到达质控线区域时,与包被的链酶亲和素发生结合,纳米粒子发生富集,显现出纳米粒子的颜色线条。如果样品中不存在分析物时,纳米粒子-A 核酸适配体复合物与 B 核酸适配体不会在检测线区域作用,而继续向前层析通过生物链酶亲和素反应。因此检测线无色,而质控线显纳米粒子的颜色。质控线用于判断试剂盒的质量情况:当样品中的检测物浓度过高,或者有高盐,会造成纳米粒子-A 核酸适配体全部富集在检测线,没有多余的胶体金继续向前,质控线就不会有纳米粒子金富集,显示为无色,说明检测的微环境超出了本检测盒的适用范围,结果是无效的。当核酸适配体从纳米粒子表面脱离或被降解,或其它原因导致试剂盒质量发生变化,都会导致检测线和质控线上都不会出现纳米粒子,检测线和质控线均无色,表明检测结果无效。因此,在检测中,检测线和质控线同时显纳米粒子的颜色,才表明检测结果的可信。

[0027] 本发明免疫层析法显示的质控线和测试线均为纳米粒子的颜色。核酸适配体也能特异识别检测物,两条能特异识别同一检测物的分别包被在胶体金免疫层析中的玻璃纤维结合垫及硝酸纤维素膜上的核酸适配体。与现有技术相比,本发明使用常规的层析检测条,实现无抗体层析:标记的 A 核酸适配体和检测物结合后,在毛细管作用下,样品将沿着硝酸纤维素膜向前移动,当移动至固定有另一个也能特异识别检测物的硝酸纤维素上检测线(包被有 B 核酸适配体区域)时,样品中结合了 A 核酸适配体的检测物再与 B 核酸适配体发生特异性结合,以此,纳米粒子金标记的 A 核酸适配体、检测物、另一个也能特异识别检测物的 B 核酸适配体形成复合物,为可见的纳米粒子的颜色,这样就实现了特异性的免疫层析法检测。本发明制备试纸条时,无需使用抗体,检测时也不需要其他试剂,只需直接将待测样品加水稀释后取 0.12mL 滴入加样孔,五分钟后即可出结果,具有简单、快速、灵敏等特点,该检测试剂盒无需使用抗体,不使用仪器设备、操作简单、特异性好、结果容易判读、制做方便易行。

## 附图说明

[0028] 图 1 为本发明试剂盒中检测试纸结构示意图;

[0029] 图 2 为本发明的原理示意图,其中,有检测物:表示检测物浓度高于最低检测浓度,检测线为纳米粒子的颜色(图中为深色);无检测物:表示检测物浓度高于最低检测浓度,检测线位置无色(图中为空白);

[0030] 图 3 为本发明免疫层析法检测结果判定图,其中,T 表示检测线,C 表示质控线。

[0031] 图中:1、底板;2、样品垫;3、结合垫;4、硝酸纤维素膜;5、检测线;6、质控线;7 吸水垫。

### 具体实施方式

[0032] 以下结合具体实施例对本发明做进一步的说明:

[0033] 实施例 1

[0034] 参见图 1 至图 3,一种基于核酸适配体的胶体金免疫层析法检测试剂盒,包括检测试纸,所述检测试纸包括底板 1,粘合在底板 1 上且依次搭接的样品垫 2、结合垫 3、硝酸纤维素膜 4 和吸水垫 7;所述硝酸纤维素膜 4 上靠近结合垫 3 的一侧设有检测线 5,硝酸纤维素膜 4 上靠近吸水垫 7 的一侧设有质控线 6;所述结合垫 3 上涂有纳米粒子标记的 A 核酸适配体;所述检测线 5 上涂有 B 核酸适配体与链霉亲和素的复合物;所述质控线 6 上涂有链霉亲和素;所述 A 核酸适配体与 B 核酸适配体均为能特异性识别同一检测物的被生物素标记的核酸适配体;其中,所述纳米粒子为胶体金。

[0035] 其中,所述 A 核酸适配体的 DNA 序列 5' 端被巯基标记,3' 端被生物素标记;所述 B 核酸适配体的 DNA 序列 3' 端被生物素标记;所述 A 核酸适配体的 DNA 序列如 SEQ ID NO. 1 所示,所述 B 核酸适配体的 DNA 序列如 SEQ ID NO. 2 所示;所述底板 1 为 PVC 板;样品垫 2 的材料为聚醋酸膜;所述结合垫 3 的材料为玻璃纤维;所述吸水垫 7 为吸水滤纸;所述检测试纸由硬质塑料卡包装。

[0036] 实施例 2

[0037] 制备实施例 1 所述试剂盒的方法:

[0038] (1)核酸适配体 1 标记胶体金颗粒:将合成的 13 纳米胶体金溶液 10000rpm 离心 15 分钟,吸出上清,加入原体积的无菌水,重复操作两次,按照每毫升胶体金加入 0.5 O D 核酸适配体的比例,A 核酸适配体 DNA 序列为:5' -SHC6-ATC AGG GCT AAA GAG TGC AGA GTT ACT TAG TTT TTT TTT T-3'Biotin (SEQ ID NO. 1),该适配体能特异识别溶菌酶,在磁力搅拌下缓慢加入到胶体金溶液中,室温放置 24 小时后,加入 0.1 M PB 溶液,调节 PB 终浓度至 10mM;再加 PBS 缓冲液,调节溶液中 NaCl 浓度为 0.1M,室温下老化 24 小时;最后加 PBS 缓冲液,调节溶液中 NaCl 终浓度为 0.3M,室温下老化 24 小时后 10000rpm 离心,去上清液,胶体复溶到 0.1 M PBS 缓冲液中;这样反复操作三次,将标记好的核酸适配体 1 复溶在含 20mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>,1%PEG 6000 的 0.01 M pH7.4 的 PBS 缓冲液中;

[0039] (2)选用聚醋酸膜作为样品垫材料,将聚醋酸膜放入含 3%BSA、0.05%吐温 20 的 0.01 M pH7.4PBS 缓冲液的样品垫处理液中浸泡 1 小时后,37℃烘干 2 小时烘干,4℃保存备用;

[0040] (3)结合垫的制备:使用时,将步骤(1)制备的胶体金重新分散于含 5%蔗糖、5%BSA、1%PEG20000、0.05%吐温 20 的 0.01 M pH7.4PBS 缓冲液中,再用点膜机喷于玻璃纤维材质的结合垫上,37 度烘干 2 小时,4℃保存备用;

[0041] (4)硝酸纤维素膜上点样:用合成的标记有生物素的 B 核酸适配体,其 DNA 序列为:5' -GCA GCT AAG CAG GCG GCT CAC AAA ACC ATT CGCATG CGG CTT TTT TTT TT-3'Biotin (SEQ ID NO. 2),溶解在无菌水中,浓度为 1 μM,与浓度为 1mg/ml 的链霉亲和素 1:10 的体积比混合,室温反应一小时后,再加入一倍体积的 0.01M pH7.4 的 PBS 缓冲液,然后移入

截留分子量 30000 道尔顿的离心超滤管,6000rpm 离心 15 分钟,再加入和上述相同体积的 0.01M pH7.4 的 PBS 缓冲液,6000rpm 离心 15 分钟,这样反复操作三次,得到相当于原体积的 B 核酸适配体链酶亲和素复合物;将链酶亲和素溶解于无菌水中,制成浓度为 2mg/ml 的包被质控线用链酶亲和素稀释液。点膜机将核酸适配体 2 链酶亲和素复合物以及链酶亲和素稀释液分别点在硝酸纤维素膜上的检测线(检测线位于整条检测试纸的中线位置)及质控线位置,两线相隔三毫米,然后将此硝酸纤维素膜置真空干燥器,干燥半小时,再 37℃ 烘干 1 小时,密封好并置于室温备用;

[0042] (5) 将处理好的样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水滤纸分别按顺序粘贴在 PVC 片材上后,再切成四毫米宽度的检测条装入塑料卡中,组装成层析法检测试剂盒;

[0043] (6) 检测:吸取待测标本加水稀释后取 0.12mL 滴入加样孔。若质控线不显色,测试结果均无效,若检测线显红色而质控线不显色也视为无效;若质控线和检测线均出现红色,表示在检测样品中有高于最低检测浓度(1 μM) 的溶菌酶。

[0044] 实施例 3

[0045] 参见图 1 至图 3,一种基于核酸适配体的胶体金免疫层析法检测试剂盒,包括检测试纸,所述检测试纸包括底板 1,粘合在底板 1 上且依次搭接的样品垫 2、结合垫 3、硝酸纤维素膜 4 和吸水垫 7;所述硝酸纤维素膜 4 上靠近结合垫 3 的一侧设有检测线 5,硝酸纤维素膜 4 上靠近吸水垫 7 的一侧设有质控线 6;所述结合垫 3 上涂有纳米粒子标记的 A 核酸适配体;所述检测线 5 上涂有 B 核酸适配体与链霉亲和素的复合物;所述质控线 6 上涂有链霉亲和素;所述 A 核酸适配体与 B 核酸适配体均为能特异性识别同一检测物的被生物素标记的核酸适配体;其中,所述纳米粒子为胶体金。

[0046] 其中,所述 A 核酸适配体的 DNA 序列 5' 端被巯基标记,3' 端被生物素标记;所述 B 核酸适配体的 DNA 序列 3' 端被生物素标记;所述 A 核酸适配体的 DNA 序列如 SEQ ID NO. 3 所示,所述 B 核酸适配体的 DNA 序列如 SEQ ID NO. 4 所示;所述底板 1 为 PVC 板;样品垫 2 的材料为聚醋酸膜;所述结合垫 3 的材料为玻璃纤维;所述吸水垫 7 为吸水滤纸;所述检测试纸由硬质塑料卡包装。

[0047] 实施例 4

[0048] 制备实施例 3 所述试剂盒的方法:

[0049] (1) 核酸适配体 1 标记胶体金颗粒:将合成的 10 纳米胶体金溶液 10000rpm 离心 15 分钟,吸出上清,加入原体积的无菌水,重复操作两次,按照每毫升胶体金加入 0.5 OD 核酸适配体 1 的比例,特异识别人凝血酶的 A 核酸适配体 DNA 序列为:5' SH C6-TTT TTT TTT TGG TTG GTG TGG TTG GTT TTTTTT TT3'Biotin (SEQ ID NO. 3),在磁力搅拌下缓慢加入到胶体金溶液中,室温放置 24 小时后,加入 100mM PB 溶液,调节终浓度至 10mM;再加 PBS 缓冲液,调节溶液中 NaCl 浓度为 0.1M,室温下老化 24 小时;最后加 PBS 缓冲液,调节溶液中 NaCl 终浓度为 0.3M,室温下老化 24 小时后 10000rpm 离心,去上清液,胶体复溶到 0.1 M PBS 缓冲液中,这样反复操作三次,最后将标记好的核酸适配体 1 复溶在含 20mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 1%PEG6000 的 0.01 M pH7.4 的 PBS 缓冲液中;

[0050] (2) 选用聚醋酸膜作为样品垫材料,将聚醋酸膜放入含 3%BSA、0.05%吐温 20 的 0.01 M pH7.4 PBS 缓冲液的样品垫处理液中浸泡 1 小时后,37℃ 烘干 2 小时烘干,4℃ 保存备用;

[0051] (3) 结合垫的制备:使用时,将步骤(1)制备的胶体金重新分散于含 5%蔗糖、2%BSA、2%Dextran、0.05%吐温 20 的 0.01 M pH7.2PBS 缓冲液中,再用点膜机喷于玻璃纤维结合垫上,37℃烘干 2 小时,4℃保存备用;

[0052] (4) 硝酸纤维素膜上点样:用合成的一端标记有生物素的特异识别人凝血酶 B 核酸适配体,其 DNA 序列为:5'-AGT CCG TGG TAG GGC AGG TTGGGG TGA CTT TTT TTT TTT-3' Biotin (SEQ ID NO.4),溶解在无菌水中,浓度为 1 μM,与浓度为 1mg/ml 的链酶亲和素以 1:10 的体积比混合,室温反应一小时,在加入一倍体积的 0.02M pH7.2 的 PBS 缓冲液,然后移入截留分子量 30000 道尔顿的离心超滤管,6000rpm 离心 15 分钟,再加入和上述相同体积的 0.02M pH7.2 的 PBS 缓冲液,6000rpm 离心 15 分钟,这样反复操作三次,得到相当于原体积的核酸适配体 2 链酶亲和素复合物;将链酶亲和素溶解于无菌水中,包被质控线用链酶亲和素稀释液浓度为 2mg/ml。点膜机将核酸适配体 2 和链酶亲和素复合物以及链酶亲和素稀释液分别点在硝酸纤维素膜上的检测线(检测线位于整个检测试纸条中线位置)及质控线位置,两线相隔三毫米,然后将硝酸纤维素膜置于 37℃烘干 2 小时,密封好并置于室温备用;

[0053] (5) 将处理好的样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水滤纸分别按顺序粘贴在 PVC 片材上后,再切成四毫米宽度的检测条装入塑料卡中,组装成层析法检测试剂盒;

[0054] (6) 检测:吸取待测标本加水稀释后取 0.12mL 滴入加样孔。若质控线不显色,测试结果均无效,若检测线显红色而质控线不显色也视为无效;若质控线和检测线均出现红色,表示在检测样品中有高于最低检测浓度(1 μM)的溶菌酶。

#### [0055] 实施例 5

[0056] 参见图 1 至图 3,一种基于核酸适配体的胶体金免疫层析法检测试剂盒,包括检测试纸,所述检测试纸包括底板 1,粘合在底板 1 上且依次搭接的样品垫 2、结合垫 3、硝酸纤维素膜 4 和吸水垫 7;所述硝酸纤维素膜 4 上靠近结合垫 3 的一侧设有检测线 5,硝酸纤维素膜 4 上靠近吸水垫 7 的一侧设有质控线 6;所述结合垫 3 上涂有纳米粒子标记的 A 核酸适配体;所述检测线 5 上涂有 B 核酸适配体与链霉亲和素的复合物;所述质控线 6 上涂有链霉亲和素;所述 A 核酸适配体与 B 核酸适配体均为能特异性识别同一检测物的被生物素标记的核酸适配体;其中,所述纳米粒子为四氧化三铁纳米颗粒。

[0057] 其中,所述 A 核酸适配体的 DNA 序列 5' 端被巯基标记;所述 B 核酸适配体的 DNA 序列 3' 端被生物素标记;所述 A 核酸适配体的 DNA 序列如 SEQ ID NO.5 所示,所述 B 核酸适配体的 DNA 序列如 SEQ ID NO.4 所示;所述底板 1 为 PVC 板;样品垫 2 的材料为聚醋酸膜;所述结合垫 3 的材料为玻璃纤维;所述吸水垫 7 为吸水滤纸;所述检测试纸由硬质塑料卡包装。

#### [0058] 实施例 6

[0059] 制备实施例 5 所述试剂盒的方法:

[0060] (1) 核酸适配体 1 标记四氧化三铁纳米颗粒:将表面带有羧基的粒径 10 纳米的褐色四氧化三铁纳米颗粒溶液 14000rpm 离心 10 分钟,吸出上清,加入浓度为 10mM EDC 的 MES 溶液中,常温搅拌 30 分钟,离心去上清,按照每毫升纳米颗粒溶液加入 0.5 O D 核酸适配体 1 的比例,加入 10mM pH7.4 的 PBS 缓冲液溶解的特异识别人凝血酶的 A 核酸适配体 DNA 序列为:5'-TGG TTGGTG TGG TTG GTT TTT TTT TT-3' NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO.5),在磁力搅拌下缓

慢加入到四氧化三铁纳米颗粒中,室温放置 2 小时后,离心去上清,再用 10mM pH7.4 的 PBS 缓冲液洗涤两次,最后将标记好的核酸适配体 1 复溶在含 20mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>,1%PEG6000 的 0.01 M pH7.4 的 PBS 缓冲液中;

[0061] (2) 选用聚醋酸膜作为样品垫材料,将聚醋酸膜放入含 3%BSA、0.05%吐温 20 的 0.01 M pH7.4PBS 缓冲液的样品垫处理液中浸泡 1 小时后,37℃烘干 2 小时烘干,4℃保存备用;

[0062] (3) 结合垫的制备:使用时,将步骤(1)制备的四氧化三铁纳米颗粒重新分散于含 5%蔗糖、2%BSA、2%Dextran、0.05%吐温 20 的 0.01 M pH7.2PBS 缓冲液中,再用点膜机喷于玻璃纤维结合垫上,37℃烘干 2 小时,4℃保存备用;

[0063] (4) 硝酸纤维素膜上点样:用合成的一端标记有生物素的特异识别人凝血酶 B 核酸适配体,其 DNA 序列为:5' -AGT CCG TGG TAG GGC AGG TTGGGG TGA CTT TTT TTT TTT-3' Biotin (SEQ ID NO.4),溶解在无菌水中,浓度为 1 μM,与浓度为 1mg/ml 的链酶亲和素以 1:10 的体积比混合,室温反应一小时,在加入一倍体积的 0.02M pH7.2 的 PBS 缓冲液,然后移入截留分子量 30000 道尔顿的离心超滤管,6000rpm 离心 15 分钟,再加入和上述相同体积的 0.02M pH7.2 的 PBS 缓冲液,6000rpm 离心 15 分钟,这样反复操作三次,得到相当于原体积的核酸适配体 2 链酶亲和素复合物;将链酶亲和素溶解于无菌水中,包被质控线用链酶亲和素稀释液浓度为 2mg/ml。点膜机将核酸适配体 2 和链酶亲和素复合物以及链酶亲和素稀释液分别点在硝酸纤维素膜上的检测线(检测线位于整个检测试纸条中线位置)及质控线位置,两线相隔三毫米,然后将硝酸纤维素膜置于 37℃烘干 2 小时,密封好并置于室温备用;

[0064] (5) 将处理好的样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水滤纸分别按顺序粘贴在 PVC 片材上后,再切成四毫米宽度的检测条装入塑料卡中,组装成层析法检测试剂盒;

[0065] (6) 检测:吸取待测人血清加无菌水稀释后,取 0.12mL 滴入加样孔,若质控线不显色为无效,若检测线显褐色而质控线不显色也视为无效,若质控线和检测线均出现褐色,表示在检测样品中有高于最低检测浓度(100nM)的人凝血酶。

[0001]

SEQ ID NO. 1—5.txt  
SEQUENCE LISTING

- <110> 谭蔚泓
- <120> 基于核酸适配体的层析法检测试剂盒及其制备方法和检测方法
- <130> 1
- <160> 5
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- <211> 40
- <212> DNA
- <213> 人工合成
- <400> 1  
atcagggcta aagagtgcag agttacttag ttttttttt 40
- <210> 2
- <211> 50
- <212> DNA
- <213> 人工合成
- <400> 2  
gcagctaagc aggcggctca caaaaccatt cgcgatgggc ttttttttt 50
- <210> 3
- <211> 35
- <212> DNA
- <213> 人工合成
- <400> 3  
tttttttttt ggttggtgtg gttggttttt ttttt 35
- <210> 4
- <211> 39
- <212> DNA
- <213> 人工合成
- <400> 4  
agtccgtggg agggcagggtt ggggtgactt ttttttttt 39
- <210> 5
- <211> 26
- <212> DNA
- <213> 人工合成
- <400> 5  
tggttggtgt ggttggttttt ttttttt 26

[0002]

SEQ ID NO. 1—5.txt



专利名称(译)	基于核酸适配体的层析法检测试剂盒及其制备方法和检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN103048449B</a>	公开(公告)日	2015-06-24
申请号	CN201310012751.0	申请日	2013-01-14
[标]申请(专利权)人(译)	谭蔚泓		
申请(专利权)人(译)	谭蔚泓		
当前申请(专利权)人(译)	谭蔚泓		
[标]发明人	谭蔚泓 常荣山 蒋健晖		
发明人	谭蔚泓 常荣山 蒋健晖		
IPC分类号	G01N33/566 G01N33/531 G01N33/558		
代理人(译)	马强		
审查员(译)	周洋		
其他公开文献	CN103048449A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种基于核酸适配体的层析法检测试剂盒及其制备方法和检测方法，该试剂盒的检测试纸包括底板，粘合在底板上且依次搭接的样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫；所述硝酸纤维素膜上靠近结合垫的一侧设有检测线，硝酸纤维素膜上靠近吸水垫的一侧设有质控线；结合垫上涂有胶体金标记的A核酸适配体；检测线上涂有B核酸适配体与链霉亲和素的复合物；质控线上涂有链霉亲和素；A核酸适配体与B核酸适配体均为能特异性识别同一检测物的被生物素标记的核酸适配体。该试剂盒只需直接将待测样品稀释后滴入加样孔，五分钟内即可出结果，具有简单、快速、灵敏等特点，无需使用抗体和仪器设备、操作简单、特异性好、结果容易判读、制做方便易行。

