

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.  
G01N 33/558 (2006.01)  
G01N 33/53 (2006.01)



## [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810106529.6

[43] 公开日 2009年7月1日

[11] 公开号 CN 101470114A

[22] 申请日 2008.5.14

[21] 申请号 200810106529.6

[71] 申请人 中国检验检疫科学研究院

地址 100123 北京市朝阳区高碑店北路-甲3  
号中国检验检疫科学研究院

[72] 发明人 邹明强 李锦丰 金涌 薛强  
田世民 齐小花

[74] 专利代理机构 北京双收知识产权代理有限公司

代理人 解政文

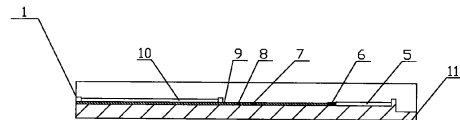
权利要求书1页 说明书10页 附图5页

### [54] 发明名称

胶体金免疫层析法的增敏检测方法及应用

### [57] 摘要

一种胶体金免疫层析法的增敏检测方法，在常规胶体金免疫层析法检测待测样本时，在加入待测样本后再在金标抗体层和检测线之间添加信号放大试剂 $10 \sim 80 \mu\text{l}$ ，对常规胶体免疫层析法得到的检测线进行处理使信号增强，室温下反应 $1 \sim 10$ 分钟后，如待测样本含有抗原则在检测载体上形成检测线、控制线双线为清楚的黑色或灰黑色，此为阳性，如不含有抗原则控制线呈黑色或灰黑色，检测线无颜色，此为阴性；使用本发明的方法，可以显著提高胶体金免疫层析试剂盒检测生物大分子的灵敏度，且显色迅速、背景干扰要比常规的银染色法小，具有十分广泛的应用前景和开发价值。



1. 一种用于胶体金免疫层析法的信号放大试剂，其特征在于：其为增敏试剂 A 和增敏试剂 B 按 1: 1~1: 5 的体积比混合的混合试剂，所述增敏试剂 A 为重量百分比浓度为 0.1%~10% 的氯金酸溶液，增敏试剂 B 为还原剂溶液。
2. 根据权利要求 1 所述的信号放大试剂，其特征在于：所述还原剂溶液为摩尔浓度为 0.1~10mM 的盐酸羟胺溶液或重量百分比浓度为 0.1~0.5% 的抗坏血酸溶液。
3. 根据权利要求 2 所述的信号放大试剂，其特征在于：所述氯金酸溶液的重量百分比浓度为 1~4%。
4. 根据权利要求 3 所述的信号放大试剂，其特征在于：所述盐酸羟胺溶液的摩尔浓度为 2~6 mM，或抗坏血酸溶液的重量百分比浓度为 0.15%~0.3%。
5. 一种胶体金免疫层析法的增敏检测方法，其特征在于：在常规胶体金免疫层析法检测待测样本时，在加入待测样本后再在金标抗体层和检测线之间添加权利要求 1~4 任一项所述的信号放大试剂 10~80 $\mu$ L，对常规胶体金免疫层析法得到的检测线进行处理使信号增强，室温下反应 1~10 分钟后，观察结果。
6. 根据权利要求 5 所述的方法，其特征在于：所述待测样品为动物分泌物、血清、组织脏器的提取液，对待测样品用常规前处理方法进行处理，取 40~80 $\mu$ L 处理液滴于常规胶体金免疫层析试剂盒的加样孔上，每个样本重复 2~3 次，室温下反应 1~10 分钟后，将 100 $\mu$ L 磷酸盐洗液 PBST 加入加样孔中，洗涤层析条上的残余物质；再将预先混合好的氯金酸溶液与还原剂溶液迅速取 10~80 $\mu$ L 滴于加样孔或加增敏试剂孔上；其中所述展开试剂为含有重量百分比浓度为 1~2% 的壬基酚聚氧乙烯醚 NP40 和 0.1~1% 的表面活性剂 Tween 20 的 0.1mM 的磷酸盐缓冲液 PB。
7. 权利要求 1~4 任一项所述的信号放大试剂在胶体金免疫层析法中的应用。
8. 权利要求 5~6 任一项所述的增敏检测方法在生物大分子检测或医疗诊断中的应用。

## 胶体金免疫层析法的增敏检测方法及应用

### 技术领域

本发明涉及一种大分子物质检测方法，特别是涉及生物大分子物质金标免疫层析检测的增敏方法及利用其制作试剂盒的方法。

### 背景技术

目前，能够对生物大分子物质进行简便、快捷、高选择性与高灵敏度的检测，始终是人们努力的方向，此在疾病的快速诊断、卫生检疫、动植物检疫、食品安全检测、环境监测等领域都具有重要意义。其中，基于抗原抗体特异性反应的免疫分析法（Immunoassay）因其具有极高的选择性和便捷性，同时其原理简单、不需大型实验设备或较大投资即可生产使用、平均样品测试成本远低于仪器分析方法等特点而使其成为诸多特定物质检测的首选手段。

氯金酸（ $\text{HAuCl}_4$ ）在还原剂如柠檬酸三钠、白磷、抗坏血酸、鞣酸等作用下，聚合成为特定大小的金颗粒，由于静电作用形成稳定的胶体状态，故称胶体金。由于胶体金表面带负电荷，可以与蛋白质等大分子的正电荷因静电吸附而牢固结合，同时不影响蛋白质的生物特性。1971年 Faulk 和 TAYTOR 将胶体金引入免疫分析法，形成了免疫金标记技术（Immunogold labeling technique），即将胶体金作为示踪物应用于抗原抗体标记，主要以硝酸纤维素膜为载体实现免疫检测。免疫金标记技术主要分为两种模式：（1）免疫渗滤分析（Flow through-immunofiltration assay, IFA）：免疫反应是通过垂直穿透固定有配体的硝酸纤维素膜而进行的（flow through type）；（2）侧流免疫层析分析（Lateral flow-immunochromatographic assay, ICA）：分析原理与 IFA 相同，只是反应液体的流动不是直向的穿透流动，而是通过毛细管现象而发生层析作用的横向流动（lateral flow type），在 1990 年开始应用。

上述两种方法虽然都是以硝酸纤维素膜为载体的免疫金标技术，但其检测原理有较大区别。主要表现在：ICA 加入试液后，在毛细管作用下试液层析扩散而实现了样本基质分离，检测线中几乎不存在样品基质干扰；而 IFA 靠垂直穿透的洗涤，检测斑点易扩散，难于辨认结果。所以，广泛使用的商品化试纸条（或试剂盒）产品大多采用免疫层析原理。

然而，免疫金标记检测方法的最大不足为检测灵敏度低，限制了实际应用范围。以往人们主要利用银染色技术以克服检测灵敏度低的问题。即用硝酸银和特定还原剂作为信号放大试剂来处理样品垫上的检测线。然而，该法信号放大效果不明显，主要因为检测信号本底模糊、背景颜色高，不易通过肉眼判断检测结果。因此目前几乎难以见到基于银染色技术的胶

体金免疫层析产品。

### 发明内容

本发明所解决的技术问题是提供一种胶体金免疫层析法的增敏检测方法，此方法是在常规胶体金免疫层析测定方法的基础上，采用氯金酸与还原剂反应生成的纳米金颗粒对常规胶体金免疫层析法得到的检测线进行处理使信号增强，能显著增强常规胶体金免疫层析法的检测信号且背景干净、本底值低，可提高检测灵敏度 8~200 倍，从而克服了传统胶体金免疫层析检测方法灵敏度低的问题。

本发明的另一个目的是提供一种胶体金免疫层析高灵敏度检测试剂盒的制备方法及其产品和应用，此试剂盒是利用上述胶体金免疫层析法的增敏检测方法来制备的。

一种用于胶体金免疫层析法的信号放大试剂，其为增敏试剂 A 和增敏试剂 B 按 1: 1~1: 5 的体积比混合的混合试剂，所述增敏试剂 A 为重量百分比浓度为 0.1%~10% 的氯金酸溶液，增敏试剂 B 为还原剂溶液。其中所述还原剂溶液较好为摩尔浓度为 0.1~10mM 的盐酸羟胺溶液或重量百分比浓度为 0.1~0.5% 的抗坏血酸溶液，也可以为其它还原剂，如柠檬酸三钠、白磷、鞣酸等。其中所述氯金酸溶液的重量百分比浓度优选为 1~4%。其中所述盐酸羟胺溶液的摩尔浓度优选为 2~6mM，或抗坏血酸溶液的重量百分比浓度优选为 0.15~0.3%。

一种胶体金免疫层析法的增敏检测方法，在常规胶体金免疫层析法检测待测样本时，在加入待测样本后再在金标抗体层和检测线之间添加所述的信号放大试剂 10~80 $\mu$ L，对常规胶体金免疫层析法得到的检测线进行处理使信号增强，室温下反应 1~10 分钟后，观察结果。

本发明的方法具体应用时，其中所述待测样品为动物分泌物、血清、组织脏器提取液，对待测样品用洗脱离心稀释等前处理方法进行处理，取 40~80 $\mu$ L 处理液滴于常规胶体金免疫层析试剂盒的加样孔上，每个样本重复 2~3 次，室温下反应 1~10 分钟后，将 100 $\mu$ L 磷酸盐洗液 PBST 加入加样孔中，洗涤层析条上的残余物质；再将预先混合好的氯金酸溶液与还原剂溶液迅速取 10~80 $\mu$ L 滴于加样孔或加增敏试剂孔上；其中所述展开试剂为含有重量百分比浓度为 1~2% 的壬基酚聚氧乙烯醚 NP40 和 0.1~1% 的表面活性剂 Tween 20 的 0.1mM 的磷酸盐缓冲液 PB。

根据本发明的方法可以制备出专用试纸条和/试剂盒，制备方法可以是以下的步骤：

在一塑料垫板的上表面的前端粘贴有一层加样端吸水纸层，所述加样端吸水纸层后连续搭接有金标抗体层和检测层直到塑料垫板的后端，所述检测层上表面的后端粘贴有一层至少可吸收 200  $\mu$ L 液体的吸水端吸水纸层，所述金标抗体层为包被有抗体的硝酸纤维素膜层，所述检测层为硝酸纤维素膜层，在其位于所述金标抗体层和吸水端吸水纸层之间的位置依次包被有检测线和控制线，制备好后，将其按 4 毫米宽、8 厘米长规格切条，再组装在塑料盒内。

可以多条设置在一个大盒子中，也可以一条设置在一个小盒子中，然后再配套所需试剂。所述盒子的上表面设置有三个开孔：加样孔、加增敏试剂孔和观察孔，所述加样孔正对加样端吸水纸层，所述加增敏试剂孔正对金标抗体层和检测线之间的位置，所述观察孔正对吸水端吸水纸层。

其中所述金标抗体层的制备方法包括下述步骤：

(1). 制备胶体金溶液

a. 制备胶体金溶液的试剂及其体积配比：

双蒸水	100mL
新鲜制备的重量百分比浓度为 1~5%的氯金酸水溶液	1mL
重量百分比浓度为 1~5%的柠檬酸三钠水溶液	1.0~1.5 mL;

b. 制备方法

将 100mL 上述双蒸水微波加热至 65℃，加入所需的新鲜制备的重量百分比浓度为 1~5%的氯金酸水溶液 1ml，微波加热至 95℃，迅速加入所需的重量百分比浓度为 1~5%的柠檬酸三钠水溶液，不断搅拌，氯金酸在柠檬酸钠还原剂的作用下，其胶体金液颜色由黑→蓝→紫→酒红，冷却后得到酒红色的 20~40nm 粒径的胶体金溶液，此时合成的胶体金，在 4℃下可保存 12 个月；

(2). 制备金标抗体层

取上述制备的胶体金溶液 10 mL，用重量百分比浓度为 1%的碳酸钾水溶液调节 pH 至 8.5~9.2（优选 8.7~9.2），用 800mL 蒸馏水溶解 0.2g 氯化钾、1.44g 磷酸氢二钠和 0.24g 磷酸二氢钾，用盐酸调节溶液的 pH 值至 7.4，加水至 1L，摇匀，制成 0.1mM 磷酸盐缓冲液 PB，用所述磷酸盐缓冲液 PB 将抗体稀释至蛋白含量为 0.1~1mg/mL，取 0.1~0.5mL，在 13000rpm、4℃下离心 30min，从离心后的上清液中取出相应体积使加入到胶体金溶液后液体的最小蛋白量为 10~20μg/mL（优选 10~16μg/mL），快速搅拌下将抗体缓慢逐滴加入到上述调节过 pH 的胶体金溶液中，室温放置 5min；再分别加入过滤后的重量百分比浓度为 10%的 BSA 溶液 1mL，继续搅拌 10~15 分钟，然后分别在 10000 rpm、4℃下离心 30min，弃去上清液，得到沉淀物；然后用 10 mL、浓度为 0.01mol/L、pH 8.2 且其中 BSA 的重量百分比浓度为 1%的三羟甲基氨基甲烷溶液(TBS，含 1%BSA)将沉淀物溶解，在 10000 rpm/min、4℃下离心 30 min，弃去上清液，分别用 10 mL 含有重量百分比浓度分别为 0.02%的叠氮钠、1%的蔗糖、1%的 BSA 且 pH 为 8.2 的三羟甲基氨基甲烷溶液重新悬浮底部疏松沉淀，得到金标抗体探针溶液；最后将金标抗体探针溶液用喷金仪器对硝酸纤维素膜喷金至液体开始渗出为止，在 37℃下 2 小时干燥形成金标抗体层。

其中所述检测层的制备方法包括：在硝酸纤维素膜上包被有针对待测样本的特异性的多克隆或单克隆抗体形成的检测线和针对金标抗体的特异性的 IgG 抗体形成的控制线：具体制备方法是取多抗或单抗，用展开试剂调浓度为 1mg/mL，用喷膜机在硝酸纤维素膜中段喷检测线；再取 IgG 抗体 1mg/mL，用喷膜机在硝酸纤维素膜中段、距检测线 0.5cm 处，喷控制线，按照 20 $\mu$ L/10cm 设置喷膜量，喷膜 37 $^{\circ}$ C 干燥 2 小时。

此方法及其制备的试纸条等产品可以广泛应用在生物大分子检测或医疗诊断中。

本发明的方法，采用增敏试剂增敏，利用氯金酸与盐酸羟胺发生氧化还原反应生成金原子可被胶体金吸附的特点，来定位胶体金沉积部位进行显色加强，提高了待检生物大分子的检测灵敏度。使用本发明的方法，可以显著提高胶体金免疫层析试剂盒检测生物大分子的灵敏度，且显色迅速、背景干扰要比常规的银染色法小，具有十分广泛的应用前景和开发价值。采用本发明的增敏试剂进行一次或多次处理，与原有胶体金免疫层析测定法相比，灵敏度可显著提高 8—200 倍，且操作简便、快捷、不需要特殊的仪器设备，可以广泛用于临床诊断，抗体、抗原的检测、卫生检疫、环境检测等领域，具有十分广泛的应用前景与开发价值。

#### 附图说明

图 1 为实施例 7 中制备的试剂盒的俯视图；

图 2 为图 1 的 A-A 剖视图；

图 3 为实施例 2 中市售胶体金试纸条检测禽流感病毒 NP 表达蛋白的结果；

图 4 为实施例 2 中利用本发明胶体金增敏方法检测禽流感病毒 NP 表达蛋白的结果；

图 5 为实施例 3 中市售胶体金试纸条检测鸡胚尿囊液中禽流感病毒的结果；

图 6 为实施例 3 中利用本发明胶体金增敏方法检测鸡胚尿囊液中禽流感病毒的结果；

图 7 为实施例 4 中市售胶体金试纸条检测感染鸡禽流感病毒的结果；

图 8 为实施例 4 中利用本发明胶体金增敏方法检测感染鸡禽流感病毒的结果；

图 9 为实施例 5 中市售胶体金试纸条检测孕妇尿样的结果；

图 10 为实施例 5 中利用本发明胶体金增敏方法检测孕妇尿样的结果；

图 11 为实施例 6 中市售胶体金试纸条检测肠炎沙门氏菌培养液的结果；

图 12 为实施例 6 中利用本发明胶体金增敏方法检测肠炎沙门氏菌培养液的结果；

图 13 为实施例 10 中自制胶体金试纸条检测新城疫病毒活毒的结果；

图 14 为实施例 10 中利用本发明的试剂盒检测新城疫病毒活毒时其中的试纸条的结果。

#### 具体实施方式

实施例 1：各种试剂的配制

1. 氯金酸水溶液：称取 1.0g 氯金酸，溶解于 100mL 双蒸水中，形成重量百分比浓度为 1%的氯金酸水溶液，摇匀。
2. 柠檬酸三钠水溶液：称取 1.0~1.5g 柠檬酸三钠，溶解于 100mL 双蒸水中，形成重量百分比浓度为 1~1.5%的柠檬酸三钠水溶液，摇匀。
3. 磷酸盐缓冲液 (PBS)：用 800mL 蒸馏水溶解 8g 氯化钠 (NaCl)，0.2g 氯化钾 (KCl)，1.44g 磷酸氢二钠 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 和 0.24g 磷酸二氢钾 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )，用盐酸 (HCl) 调节溶液的 pH 值至 7.4，加水至 1L，摇匀。
4. 磷酸盐缓冲液 (PB)：用 800mL 蒸馏水溶解 0.2g 氯化钾 (KCl)，1.44g 磷酸氢二钠 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 和 0.24g 磷酸二氢钾 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )，用盐酸 (HCl) 调节溶液的 pH 值至 7.4，加水至 1L，摇匀。
5. 磷酸盐洗液(PBST)：用 800mL 蒸馏水溶解 8g 氯化钠 (NaCl)，0.2g 氯化钾 (KCl)，1.44g 磷酸氢二钠 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 和 0.24g 磷酸二氢钾 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )，用盐酸 (HCl) 调节溶液的 pH 值至 7.4，加水至 1L，再加入 200 $\mu\text{L}$  的表面活性剂 Tween20，摇匀。
6. 多抗或单抗：用 PBS 稀释使溶液中多抗或单抗重量百分比浓度为 1mg/mL。
7. 展开试剂：加入用 800mL 蒸馏水溶解 0.2g 氯化钾(KCl)，1.44g 磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 和 0.24g 磷酸二氢钾 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )，用盐酸 (HCl) 调节溶液的 pH 值至 7.4，加水至 1L，摇匀，制成 0.1mM 的磷酸盐缓冲液 (PB, Phosphate Buffer)。加入重量百分比浓度为 1%的壬基酚聚氧乙烯醚 (NP40) 和 0.5%的 Tween 20 表面活性剂。
8. 增敏试剂：

增敏试剂 A：配制重量百分比浓度为 0.1%~10%的氯金酸，以展开试剂稀释；氯金酸水溶液中氯金酸的优选重量百分比浓度为 1~4%；

增敏试剂 B：配制摩尔浓度大于 0.1~10mM 的盐酸羟胺或重量百分比浓度大于 0.1~0.5%的抗坏血酸水溶液，以展开试剂稀释。盐酸羟胺的优选摩尔浓度为 5 mM，抗坏血酸水溶液中抗坏血酸的优选重量百分比浓度为 0.15%。
9. IgG 抗体：用 PBS 稀释使溶液中 IgG 抗体重量百分比浓度为 1mg/mL。
10. BSA (牛血清白蛋白) 溶液：用双蒸水稀释使溶液中 BSA 重量百分比浓度为 10%。

#### 实施例 2：禽流感病毒 NP 表达蛋白增敏检测对比试验

将人工表达禽流感病毒 NP 蛋白用展开剂稀释 200 倍，后进行连续倍比稀释，直至稀释至  $200 \times 2^8$  倍，用市售禽流感病毒通用型金标检测试纸条 (Anigen 公司) 对各个浓度样品进行测定，每个样品测定 2 次，每批测定留取 1 条作为阴性对照。在检测中，检测线、控制线

显示清楚的深红色为样品阳性。

利用本发明提供的增敏检测方法，将增敏试剂 A（0.5%的氯金酸）与增敏试剂 B（10mM 的盐酸羟胺）按照 1: 5 的体积比混合，制成信号放大试剂，分别取信号放大试剂 50 $\mu$ L 处理，具体处理方法为在试纸条的金标抗体层和检测线之间添加此信号放大试剂。对阴性对照处理呈阴性结果后，平行增敏处理各个浓度样品的 1 条检测试纸条。检测线、控制线显示清楚的灰黑色为样品阳性。在使用试纸条检测时，最低 1600 倍稀释样品可见反应条带（见图 3），对检测试纸条进行增敏处理后，最低 25600 倍稀释样品可见反应条带（见图 4），该金标增敏方法可以使禽流感病毒 NP 蛋白检测底线提高 16 倍。

### 实施例 3: H9N2 亚型禽流感病毒胶体金增敏检测试验

用 H9N2 亚型禽流感病毒接种鸡胚，收获鸡胚尿囊液用展开剂进行连续倍比稀释，直至稀释至  $2^{12}$  倍，用市售禽流感病毒通用型金标检测试纸条（Anigen 公司）对各个稀释度尿囊液样品进行测定，每个样品测定 2 次，每批测定留取 1 条作为阴性对照。在检测中，检测线、控制线显示清楚的深红色为样品阳性。

利用本发明提供的增敏检测方法，将增敏试剂 A（1%的氯金酸）与增敏试剂 B（10mM 的盐酸羟胺）按照 1: 2 的体积比混合，制成信号放大试剂，分别取信号放大试剂 40 $\mu$ L 处理，具体处理方法为在试纸条的金标抗体层和检测线之间添加此信号放大试剂。对阴性对照处理呈阴性结果后，平行增敏处理各个浓度样品的 1 条检测试纸条。检测线、控制线显示清楚的灰黑色为样品阳性。在使用试纸条检测时，即增敏前检测底限为血凝素效价（HAU）为  $2^{-5}$ （见图 5），对检测试纸条进行增敏处理后 HAU 为  $2^{-12}$ ，而且还没有到底限（见图 6），对比试验结果表明，对 H9N2 亚型禽流感病毒胶体金检测可增敏  $2^7$  倍以上。

### 实施例 4: 病毒感染样品中 H9N2 亚型禽流感病毒胶体金增敏检测试验

用 H9N2 亚型禽流感病毒接种鸡，后采集咽拭子和泄殖腔拭子进行检测。将采集样品洗脱离心后用展开剂进行稀释，用市售禽流感病毒通用型金标检测试纸条（Anigen 公司）对各个浓度样品进行测定，每个样品测定 2 次，每批测定留取 1 条作为阴性对照。在检测中，检测线、控制线显示清楚的深红色为样品阳性。

利用本发明提供的增敏检测方法，将增敏试剂 A（5%的氯金酸）与增敏试剂 B（5mM 的盐酸羟胺）按照 1: 1 的体积比混合，制成信号放大试剂，分别取信号放大试剂 80 $\mu$ L 处理，具体处理方法为在试纸条的金标抗体层和检测线之间添加此信号放大试剂。检测线、控制线显示清楚的灰黑色为样品阳性。在使用试纸条检测时，即增敏前只有 10 号鸡咽拭子可见条带

(见图 7)，对检测试纸条进行增敏处理后 1、2、3、6、8、10 号鸡咽拭子均可看到明显条带(见图 8)，提高了检测灵敏度，在实际应用中可以尽早发现病毒感染。

#### 实施例 5: 对胶体金早早孕检测试纸的增敏试验

取怀孕 4 个月孕妇尿用展开剂进行倍比稀释，用市售胶体金早早孕检测试纸(蓝十字生物药业有限公司生产)对各个浓度样品进行测定，每个样品测定 2 次，每批测定留取 1 条作为阴性对照。在检测中，检测线、控制线显示清楚的深红色为样品阳性。

利用本发明提供的增敏检测方法，将增敏试剂 A (0.1%的氯金酸)与增敏试剂 B (0.1%的抗坏血酸)按照 1: 5 的体积比混合，制成信号放大试剂，分别取信号放大试剂 10 $\mu$ L 处理，具体处理方法为在试纸条的金标抗体层和检测线之间添加此信号放大试剂。检测线、控制线显示清楚的灰黑色为样品阳性。在使用试纸条检测时，未增敏时稀释到 2<sup>9</sup> 时肉眼能见阳性带，余后皆为阴性(见图 9)。对检测试纸条进行增敏处理后稀释到 2<sup>15</sup> 时肉眼可见到阳性带，增敏倍数为 2<sup>6</sup> 倍(见图 10)。

#### 实施例 6: 沙门氏菌增敏检测对比试验

将肠炎沙门氏菌肉汤培养液进行连续倍比稀释，直至稀释至 2<sup>4</sup> 倍，用市售沙门氏菌通用型金标检测试纸条(大连普瑞康公司)对各个稀释度样品进行测定，每个样品测定 2 次，每批测定留取 1 条作为阴性对照。在检测中，检测线、控制线显示清楚的深红色为样品阳性。

利用本发明提供的增敏检测方法，将增敏试剂 A (1%的氯金酸)与增敏试剂 B (0.5%的抗坏血酸)按照 1: 3 的体积比混合，制成信号放大试剂，分别取信号放大试剂 60 $\mu$ L 处理，具体处理方法为在试纸条的金标抗体层和检测线之间添加此信号放大试剂。检测线、控制线显示清楚的灰黑色为样品阳性。在使用试纸条检测时，只有原液样品(ID 标记为 0)可见反应条带(见图 11)，对检测试纸条进行增敏处理后，最低 8 倍稀释样品(ID 标记为-3)可见反应条带(见图 12)，该金标增敏方法可以使肠炎沙门氏菌检测底线提高 8 倍。

#### 实施例 7: 胶体金免疫层析高灵敏检测试剂盒的制备及其应用

如图 1 和图 2 所示，一种胶体金免疫层析高灵敏检测试剂盒，包括盒体 1 和置于其内的试纸条，所述盒体 1 上表面设置有三个开孔：加样孔 2、加增敏试剂孔 3 和观察孔 4，所述试纸条包括塑料垫板 11，在塑料垫板 11 的上表面的前端粘贴有一层加样端吸水纸层 5，所述加样端吸水纸层 5 后连续搭接有金标抗体层 6 和检测层 9 直到塑料垫板 11 的后端，所述检测层 9 上表面的后端粘贴有一层至少可吸收 200  $\mu$ L 液体的吸水端吸水纸层 10，所述金标抗体层 6

为包被有抗体的硝酸纤维素膜层，所述检测层 9 为硝酸纤维素膜层，在其位于所述金标抗体层 6 和吸水端吸水纸层 10 之间的位置依次包被有检测线 7 和控制线 8，所述加样孔 2 正对加样端吸水纸层 5，所述加增敏试剂孔 3 正对金标抗体层 6 和检测线 7 之间的位置，所述观察孔 4 正对吸水端吸水纸层 10。

其中所述金标抗体层 6 的制备方法包括下述步骤：

(1). 制备胶体金溶液

a. 制备胶体金溶液的试剂及其体积配比：

双蒸水	100mL
新鲜制备的重量百分比浓度为 1~5%的氯金酸水溶液	1mL
重量百分比浓度为 1~5%的柠檬酸三钠水溶液	1.0~1.5 mL;

b. 制备方法

将 100mL 上述双蒸水微波加热至 65℃，加入所需的新鲜制备的重量百分比浓度为 1~5%的氯金酸水溶液 1ml，微波加热至 95℃，迅速加入所需的重量百分比浓度为 1~5%的柠檬酸三钠水溶液，不断搅拌，氯金酸在柠檬酸钠还原剂的作用下，其胶体金液颜色由黑→蓝→紫→酒红，冷却后得到酒红色的 20~40nm 粒径的胶体金溶液，此时合成的胶体金，在 4℃下可保存 12 个月；

(2). 制备金标抗体层 6

取上述制备的胶体金溶液 10 mL，用重量百分比浓度为 1%的碳酸钾水溶液调节 pH 至 8.5~9.2，用 800mL 蒸馏水溶解 0.2g 氯化钾、1.44g 磷酸氢二钠和 0.24g 磷酸二氢钾，用盐酸调节溶液的 pH 值至 7.4，加水至 1L，摇匀，制成 0.1mM 磷酸盐缓冲液 PB，用所述磷酸盐缓冲液 PB 将抗体稀释至蛋白含量为 0.1~1mg/mL，取 0.1~0.5mL，在 13000rpm、4℃下离心 30min，从离心后的上清液中取出相应体积使加入到胶体金溶液后液体的最小蛋白量为 10~20μg/mL，快速搅拌下将抗体缓慢逐滴加入到上述调节过 pH 的胶体金溶液中，室温放置 5min；再分别加入过滤后的重量百分比浓度为 10%的 BSA 溶液 1mL，继续搅拌 10~15 分钟，然后分别在 10000 rpm、4℃下离心 30min，弃去上清液，得到沉淀物；然后用 10 mL、浓度为 0.01mol/L、pH 8.2 且其中 BSA 的重量百分比浓度为 1%的三羟甲基氨基甲烷溶液(TBS，含 1%BSA)将沉淀物溶解，在 10000 rpm/min、4℃下离心 30 min，弃去上清液，分别用 10 mL 含有重量百分比浓度分别为 0.02%的叠氮钠、1%的蔗糖、1%的 BSA 且 pH 为 8.2 的三羟甲基氨基甲烷溶液重新悬浮底部疏松沉淀，得到金标抗体探针溶液；最后将金标抗体探针溶液用喷金仪器对硝酸纤维素膜喷金至液体开始渗出为止，在 37℃下 2 小时干燥形成金标抗体层 6。

其中所述检测层 9 的制备方法包括：在硝酸纤维素膜上包被有针对待测样本的特异性的多克隆或单克隆抗体形成的检测线 7 和针对金标抗体的特异性的 IgG 抗体形成的控制线 8：具体制备方法是取多抗或单抗，用展开试剂调浓度为 1mg/mL，用喷膜机在硝酸纤维素膜中段喷检测线 7；再取 IgG 抗体 1mg/mL，用喷膜机在硝酸纤维素膜中段、距检测线 0.5cm 处，喷控制线 8，按照 20 $\mu$ L/10cm 设置喷膜量，喷膜 37 $^{\circ}$ C 干燥 2 小时。

在使用该试剂盒时，取鸡器官或肛门分泌物溶解液、血清、全血、肝脾等脏器提取液，用展开剂试剂稀释成 40~80 $\mu$ L，滴于免疫层析试剂盒的加样孔 2 上，每个样本重复 2~3 次；室温下反应 1~10 分钟后，预先将增敏试剂 A 和 B 按照 1:1~1:5 的体积比混合，迅速取 10~80 $\mu$ L 滴于加增敏试剂孔 3 上，室温下反应 1~10 分钟后，如上述分泌物、血清、全血或脏器含有抗原则在检测载体上形成检测线、控制线双线为清楚的黑色则为阳性，否则控制线呈黑色，检测线无颜色则为阴性。

**实施例 8：** 实施例 7 中的胶体金免疫层析高灵敏检测试剂盒的胶体金标记最适 pH 值的确定

取若干个 5mL 试管，分别加入 1mL 胶体金溶液，用 0.1 mol/L HCl、25mmol/L K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 和 1-10mol/L KOH 将溶液的 pH 值分别调为 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14；取一 96 孔培养板，按 pH 值从低到高将上述胶体金溶液各取 100 $\mu$ L 加入孔中，重复三次；每孔分别加入 3 $\mu$ L 重量百分比浓度为 1mg/mL 的纯化好的单克隆抗体，孔内混合均匀，室温下放置 15min；每孔分别加入 20 $\mu$ L 浓度为 10% NaCl，孔内混合均匀，室温下放置 10min；观察胶体金的颜色变化，并分别测定其 OD<sub>520 nm</sub> 和 OD<sub>580 nm</sub>，记录在 OD<sub>520 nm</sub> 和 OD<sub>580 nm</sub> 差值最大时的 pH(X)；重复前面的步骤，再进一步细化 pH 值梯度，将 pH 值梯度设定为 X-0.6；X-0.3；X；X+0.3；X+0.6；X+1，观察胶体金颜色变化，直到室温下放置 2 小时，分别测定其 OD<sub>520 nm</sub> 和 OD<sub>580 nm</sub> 值，记录在 OD<sub>520 nm</sub> 与 OD<sub>580 nm</sub> 差值最大时的 pH 值，据此判断标记时的适宜 pH 值为 8.5~9.2，优选 pH 值为 8.7~9.2。

**实施例 9：** 实施例 7 中的胶体金免疫层析高灵敏检测试剂盒的胶体金标记最低蛋白稳定量的确定

盐沉淀测定法：利用比色法确定金标记最适 pH，用 0.1mol/L K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 调节胶体金 pH 值至 8.7~9.2，抗体经 10000rpm/min 高速离心除去聚集物，抗原或抗体用 0.01mol/L 的 PB 缓冲液 (pH 8.0) 稀释至 0.2mg/mL，稀释后的抗原、抗体与其他试剂按表 1 操作。

表1 盐沉淀法测定稳定胶体金最小蛋白计量

试剂	试验管									对照管
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
禽流感单抗 ( $\mu\text{L}$ )	90	80	70	60	50	40	30	20	10	100( $\text{H}_2\text{O}$ )
0.01MPB 缓冲液 ( $\mu\text{L}$ )	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
胶体金 (mL)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
摇匀, 放置 2min										
10%NaCl ( $\mu\text{L}$ )	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0

按上表加入试剂, 静止 1~2 小时, 含蛋白质质量小的管呈现出由红变蓝的聚沉现象, 而加入蛋白质达到或超过最低稳定量的试管中的溶液则保持红色不变。使红色保持不变的蛋白含量即为蛋白质最适保护量, 在此基础上增加 20% 为稳定胶体金的蛋白质的实际用量。结果显示, 当蛋白含量为 10~20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 即认为合适; 当蛋白含量为 10~16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 更为合适。

**实施例 10:** 实施例 7 中的胶体金免疫层析高灵敏检测试剂盒的检测实例: 新城疫病毒活毒增敏检测对比试验

用新城疫病毒接种鸡胚, 收获鸡胚尿囊液用展开剂进行连续倍比稀释, 直至稀释至  $2^{12}$  倍, 用自行制备的新城疫病毒金标检测试纸条 (包被抗体为兔高免血清, 标记抗体为特异性单克隆抗体) 对各个稀释度尿囊液样品进行测定, 每个样品测定 2 次, 每批测定留取 1 条作为阴性对照。在检测中, 检测线、控制线显示清楚的深红色为样品阳性 (见图 13)。

利用本发明提供的胶体金免疫层析高灵敏检测试剂盒, 将增敏试剂 A (4% 的氯金酸) 与增敏试剂 B (0.15 的抗坏血酸) 按照 1: 3 的体积比混合, 制成信号放大试剂, 分别取信号放大试剂 20 $\mu\text{L}$  处理滴入试剂盒上的加增敏试剂孔, 反应 10 分钟后观察观察孔 4。检测线、控制线显示清楚的灰黑色为样品阳性。试验结果表明, 使用本发明提供的胶体金免疫层析高灵敏检测试剂盒检测新城疫病毒活毒, 可增敏  $2^7$  倍以上 (见图 14)。

以上所述的实施例仅仅是对本发明的优选实施方式进行了描述, 并非对本发明的范围进行限定, 在不脱离本发明设计精神的前提下, 本领域普通工程技术人员对本发明的技术方案作出的各种变形和改进, 均应落入本发明的权利要求书确定的保护范围内。

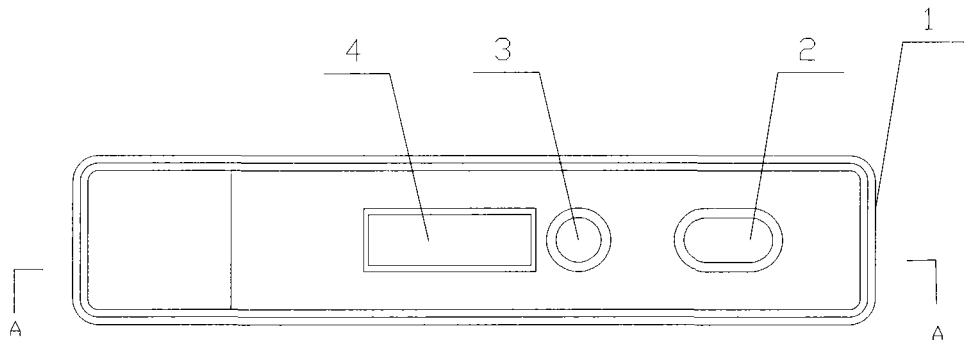


图1

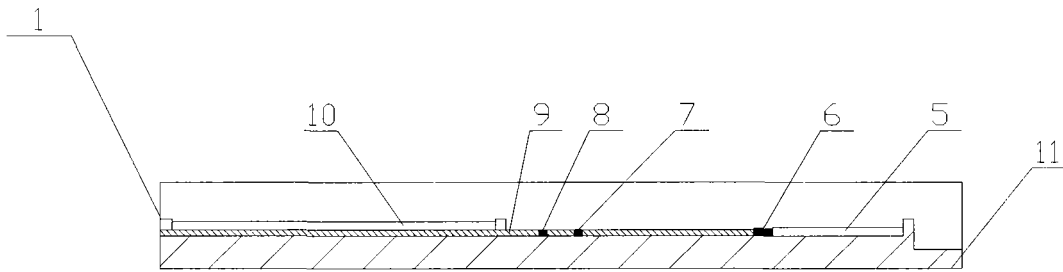
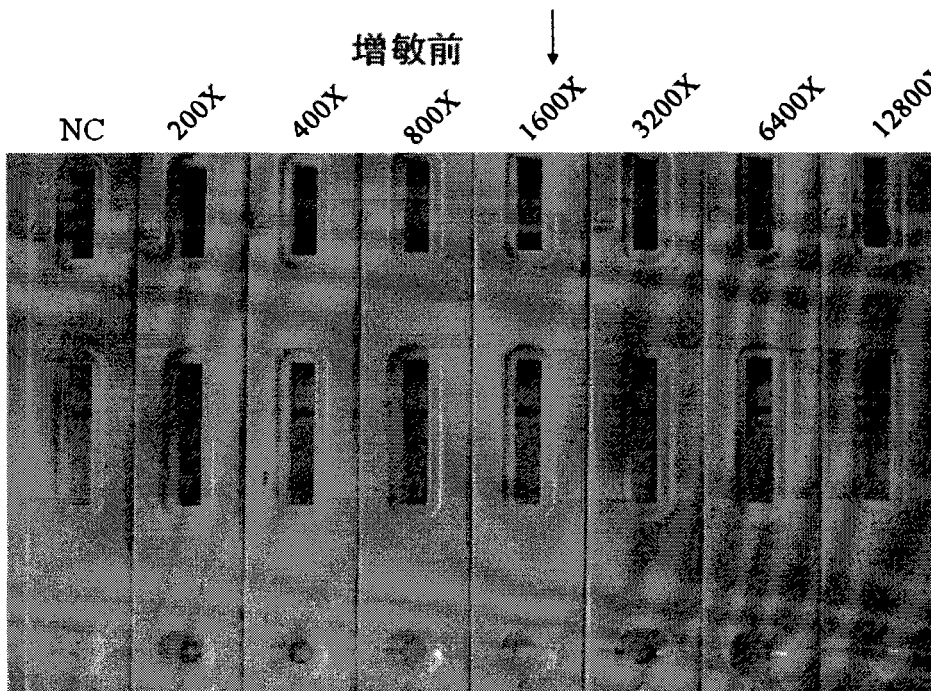
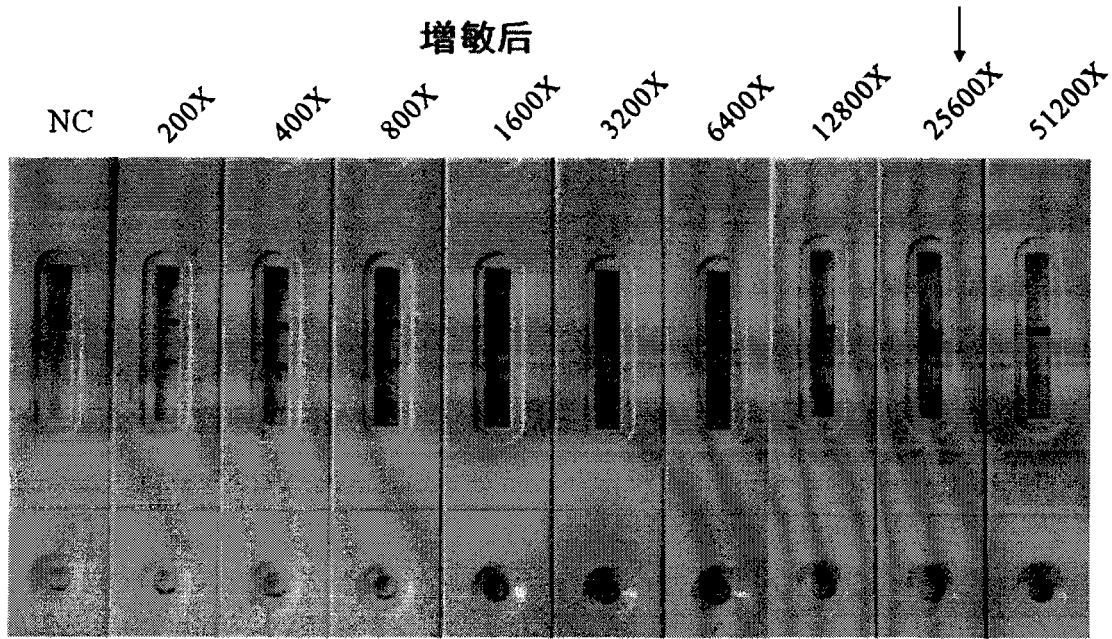


图2



增敏前检测线为稀释1600X

图3



增敏后检测线为稀释25600X，增敏效果 $2^4$

图 4

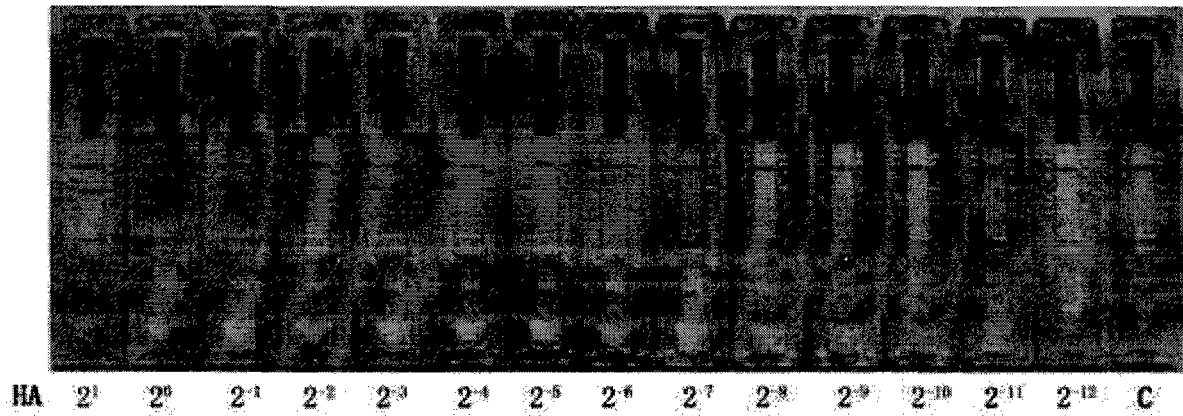


图 5

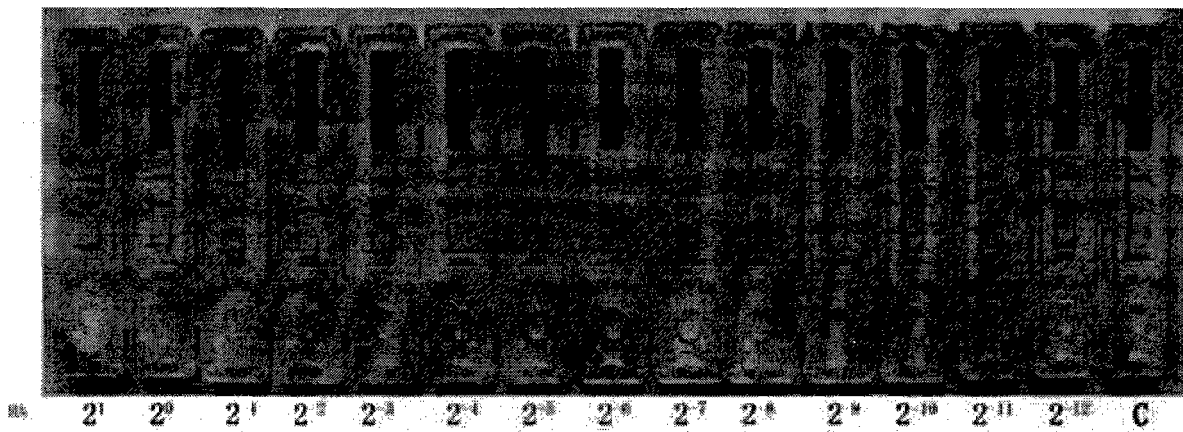


图 6

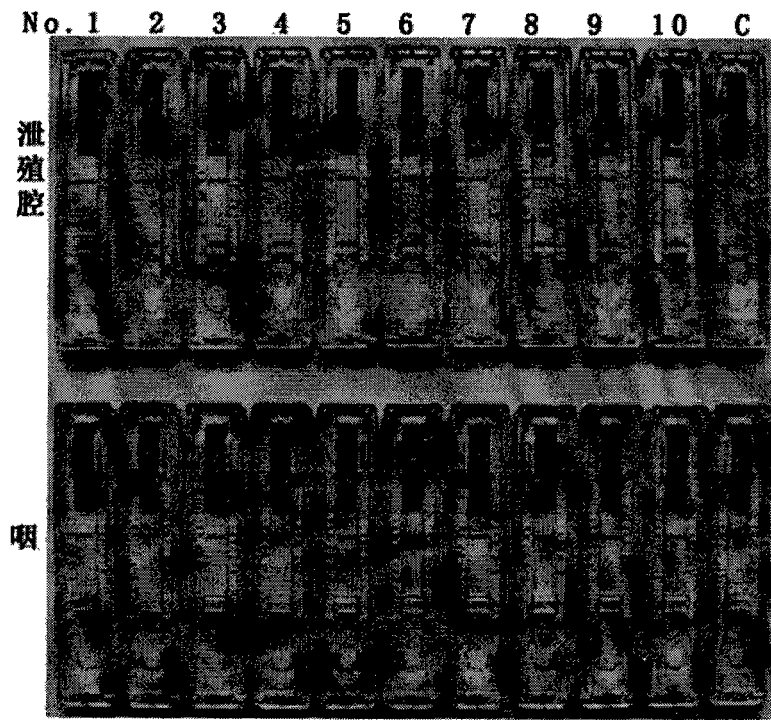


图 7

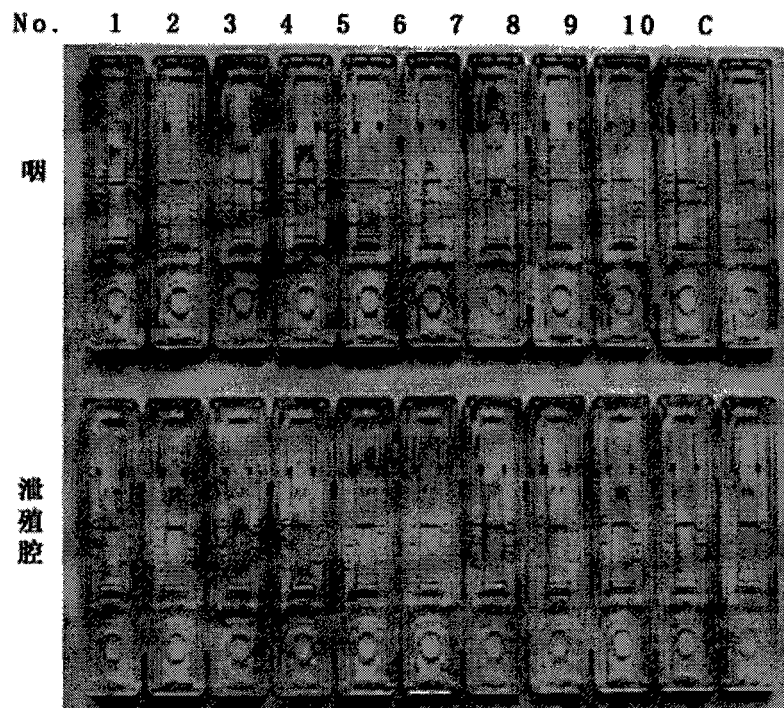


图 8

原倍 1/2 1/4 1/8 1/16 1/32 1/64 1/128 1/256 1/512 1/1024 1/2048 1/4096 1/8192 1/16384 1/32678 1/65476 1/130952

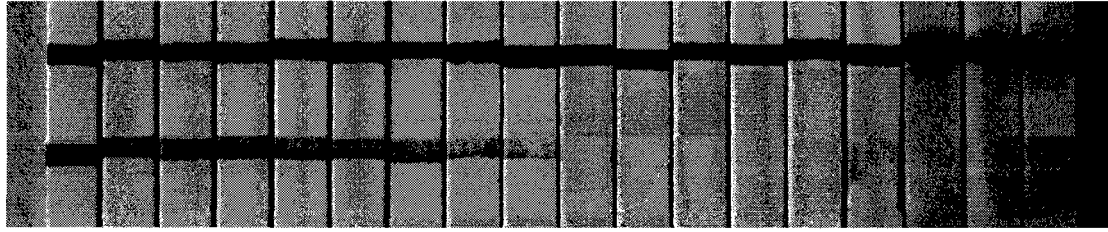


图 9

原倍 1/2 1/4 1/8 1/16 1/32 1/64 1/128 1/256 1/512 1/1024 1/2048 1/4096 1/8192 1/16384 1/32678 1/65476 1/130952 阴性

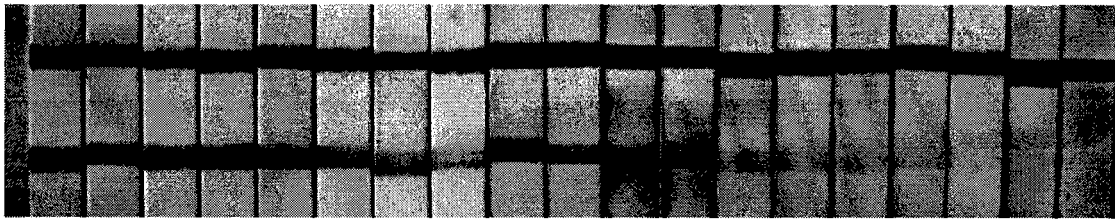


图 10

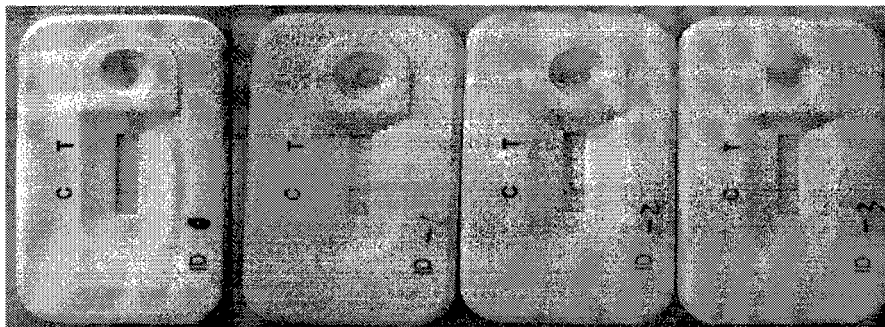


图 11

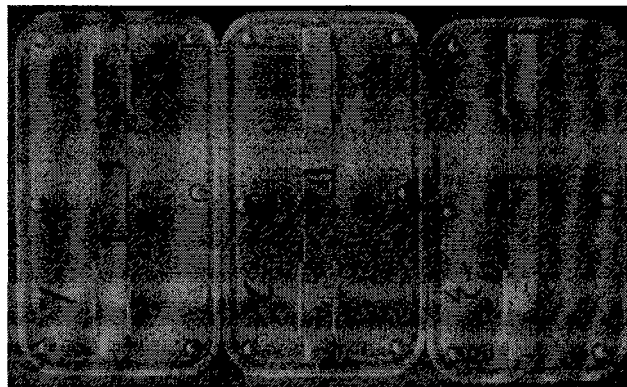


图 12

HA 2<sup>0</sup> 2<sup>-1</sup> 2<sup>-2</sup> 2<sup>-3</sup> 2<sup>-4</sup> 2<sup>-5</sup> 2<sup>-6</sup> 2<sup>-7</sup> 2<sup>-8</sup> 2<sup>-9</sup> 2<sup>-10</sup> 2<sup>-11</sup> 2<sup>-12</sup> C

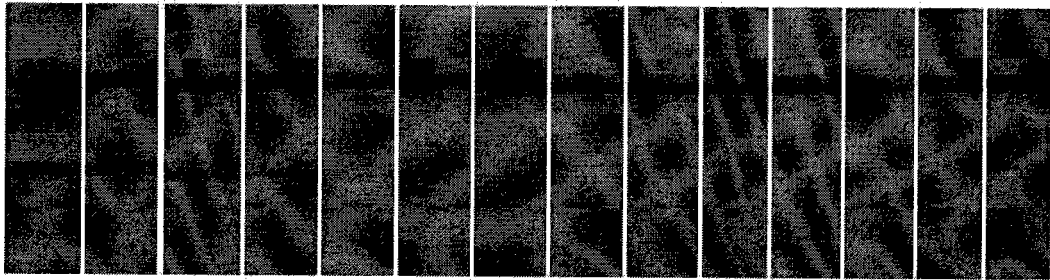


图 13

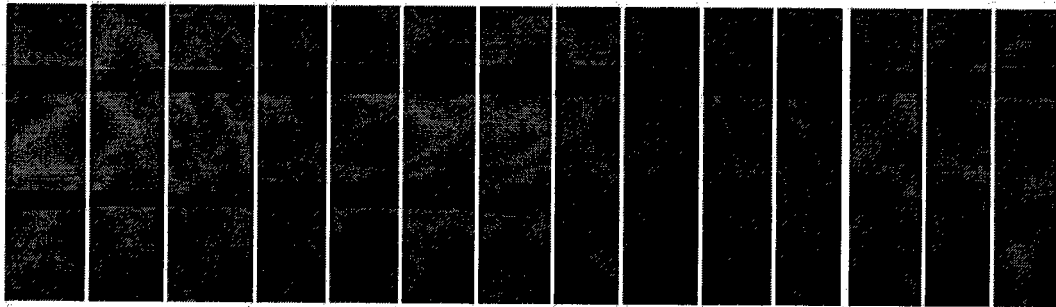


图 14

