



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108872611 A

(43)申请公布日 2018.11.23

(21)申请号 201810498754.2

(22)申请日 2018.05.23

(71)申请人 浙江安吉赛安芙生物科技有限公司

地址 313300 浙江省湖州市安吉县递铺街  
道永福商厦3F

(72)发明人 王钦 郑砚超

(51)Int.Cl.

G01N 33/74(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

权利要求书1页 说明书3页

(54)发明名称

一种胶体金利用标记羊抗鼠二抗后间接连接鼠抗标记的金标免疫层析试纸条的制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种胶体金利用标记羊抗鼠二抗后间接连接鼠抗标记的金标免疫层析试纸条的制备方法,包括以下步骤:(1)利用柠檬酸三钠还原氯金酸制备胶体金溶液;(2)利用胶体金溶液标记羊抗鼠二抗;(3)将需要标记的鼠抗加入到上述标记羊抗鼠二抗的胶体金溶液;(4)将上述间接标记鼠抗的胶体金溶液处理在结合垫上;(5)将对应抗原处理在硝酸纤维素膜上;(6)将硝酸纤维素膜、吸水纸、结合垫、样品垫贴于PVC塑料底板上;(7)将制备好的金标免疫层析试纸条按照产品质量标准进行质量鉴定。本发明的优点是提高了金标免疫层析试纸条的检测灵敏度并减少了标记使用的抗体量,在减少成本的同时能提高试纸的性能,且检测结果稳定可靠。

1. 一种胶体金利用标记羊抗鼠二抗后间接连接鼠抗标记的金标免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 利用柠檬酸三钠还原氯金酸制备胶体金溶液,制备的胶体金粒径在20nm~30nm范围内;

(2) 利用胶体金溶液标记羊抗鼠二抗,使用0.1M碳酸钾溶液调整胶体金溶液的PH接近羊抗鼠二抗的等电点,从而使胶体金溶液与羊抗鼠二抗形成牢固结合,由于这种结合是静电结合,所以不影响抗体的生物特性。

2. 除此之外,标记过程中还需注意体系中的离子浓度以及蛋白质纯度,并在标记后通过离心浓缩的方式对胶体金溶液进行纯化及浓缩;

(3) 将需要标记的鼠抗加入到上述标记羊抗鼠二抗的胶体金溶液,由于胶体金溶液上标记了羊抗鼠二抗,所以鼠抗加入后能通过羊抗鼠二抗间接标记在胶体金溶液上;

(4) 将上述间接标记鼠抗的胶体金溶液处理在结合垫上,需要注意处理的均一性以及干燥保存条件;

(5) 将对应抗原处理在硝酸纤维素膜上,将对应的抗原用1×PBS溶液稀释到合适浓度后,使用划膜仪处理在硝酸纤维素膜上;

(6) 将硝酸纤维素膜、吸水纸、结合垫、样品垫贴于PVC塑料底板上,切条并干燥保存。

3. 如果是卡壳或笔型试纸,则需要将试纸条放置在卡壳的指定槽内;

(7) 将制备好的金标免疫层析试纸条按照产品质量标准进行质量鉴定。

4. 根据权利要求1所述的一种胶体金利用标记羊抗鼠二抗后间接连接鼠抗标记的金标免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于,所述步骤(1)中使用的还原剂为柠檬酸三钠。

5. 根据权利要求1所述的一种胶体金利用标记羊抗鼠二抗后间接连接鼠抗标记的金标免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于,所述步骤(2)中胶体金直接标记的抗体是羊抗鼠二抗。

6. 根据权利要求1所述的一种胶体金利用标记羊抗鼠二抗后间接连接鼠抗标记的金标免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于,所述步骤(3)中待标记鼠抗是利用羊抗鼠间接连接在胶体金溶液上。

7. 根据权利要求1所述的一种胶体金利用标记羊抗鼠二抗后间接连接鼠抗标记的金标免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于,所述步骤(4)中结合垫为聚酯膜。

## 一种胶体金利用标记羊抗鼠二抗后间接连接鼠抗标记的金标免疫层析试纸条的制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药领域的体外诊断试剂技术领域,更具体地说,它涉及一种胶体金利用标记羊抗鼠二抗后间接连接鼠抗标记的金标免疫层析试纸条的制备方法。

### 背景技术

[0002] 1971年Faulk和Taylor将胶体金引入免疫化学,此后免疫胶体金技术作为一种新的免疫学方法。胶体金标记,实质上是蛋白质等高分子被吸附到胶体金颗粒表面的包被过程。吸附机理可能是胶体金颗粒表面负电荷,与蛋白质的正电荷基团因静电吸附而形成牢固结合。用还原法可以方便地从氯金酸制备各种不同粒径、也就是不同颜色的胶体金颗粒。这种球形的粒子对蛋白质有很强的吸附功能,可以与葡萄球菌A蛋白、免疫球蛋白、毒素、糖蛋白、酶、抗生素、激素、牛血清白蛋白多肽缀合物等非共价结合,因而在基础研究和临床实验中成为非常有用的工具。

[0003] 羊抗鼠二抗是由鼠源性抗原注射到羊体内产生的抗体,同时具有能与胶体金结合且能免疫鼠源性抗体的特性。

[0004] 胶体金免疫层析技术目前已经在体外诊断技术领域广泛运用,但现在传统胶体金标记技术多为直接将待标记抗体直接标记在胶体金溶液上,耗费抗体过多且标记方法复杂,从而影响胶体金免疫层析技术的发展及推广。

### 发明内容

[0005] 针对现有技术存在的不足,本发明的目的在于提供一种能解决上述胶体金标记问题的制备方法,以解决上述背景技术中提出的问题。

[0006] 为实现上述目的,本发明提供如下技术方案:

一种胶体金利用标记羊抗鼠二抗后间接连接鼠抗标记的金标免疫层析试纸条的制备方法,包括以下步骤:

(1) 利用柠檬酸三钠还原氯金酸制备胶体金溶液,制备的胶体金粒径在20nm~30nm范围内;

(2) 利用胶体金溶液标记羊抗鼠二抗,使用0.1M碳酸钾溶液调整胶体金溶液的PH接近羊抗鼠二抗的等电点,从而使胶体金溶液与羊抗鼠二抗形成牢固结合,由于这种结合是静电结合,所以不影响抗体的生物特性。除此之外,标记过程中还需注意体系中的离子浓度以及蛋白质纯度,并在标记后通过离心浓缩的方式对胶体金溶液进行纯化及浓缩;

(3) 将需要标记的鼠抗加入到上述标记羊抗鼠二抗的胶体金溶液,由于胶体金溶液上标记了羊抗鼠二抗,所以鼠抗加入后能通过羊抗鼠二抗间接标记在胶体金溶液上;

(4) 将上述间接标记鼠抗的胶体金溶液处理在结合垫上,需要注意处理的均一性以及干燥保存条件;

(5) 将对应抗原处理在硝酸纤维素膜上,将对应的抗原用1×PBS溶液稀释到合适浓度

后,使用划膜仪处理在硝酸纤维素膜上;

(6)将硝酸纤维素膜、吸水纸、结合垫、样品垫贴于PVC塑料底板上,切条并干燥保存。如果是卡壳或笔型试纸,则需要将试纸条放置在卡壳的指定槽内;

(7)将制备好的金标免疫层析试纸条按照产品质量标准进行质量鉴定。

[0007] 进一步的,所述步骤(1)中使用的还原剂为柠檬酸三钠。

[0008] 进一步的,所述步骤(2)中胶体金直接标记的抗体是羊抗鼠二抗。

[0009] 进一步的,所述步骤(3)中待标记鼠抗是利用羊抗鼠二抗间接连接在胶体金溶液上。

[0010] 进一步的,所述步骤(4)中结合垫为聚酯膜。

[0011] 综上所述,本发明与现有技术相比具有以下有益效果:

1.本发明具有标记羊抗鼠二抗后可以用于其他任何鼠源性抗体的间接标记,且只需要将带标记的鼠源性抗体加入已标记羊抗鼠二抗的胶体金中混匀即可,不需要每种抗体重复标记过程,节省了多个产品的标记时间;

2.本发明通过标记羊抗鼠二抗从而间接标记鼠抗的方法能大幅度减少标记时所使用的鼠抗量,且市场上鼠抗价格远远高于羊抗鼠二抗;

3.发明通过标记羊抗鼠二抗从而间接标记鼠抗的方法能大幅度提高产品灵敏度,以孕酮胶体金免疫层析试纸条为例,目前市场上已有多种孕酮胶体金免疫层析试纸条,但灵敏度多低于2ng/ml,应用本发明的胶体金标记羊抗鼠二抗后间接标记抗体的方法后,能将胶体金免疫层析试纸条的灵敏度提高到0.5ng/ml以上;

4.本发明所制备的胶体金免疫层析试纸条,操作简便,原料节省,检测结果准确且灵敏度高,具有较强的实用价值和显示意义。

[0012] 为更清楚地阐述本发明的结构特征和功效,下面结合具体实施例来对本发明进行详细说明。

## 具体实施方式

[0013] 下面结合具体实施例对本发明的技术方案做进一步的说明,但所举实例不作为对本发明的限定。

[0014] 本发明的一种胶体金利用标记羊抗鼠二抗后间接连接鼠抗标记的金标免疫层析试纸条的制备方法,包括以下步骤:

1)利用柠檬酸三钠还原氯金酸制备胶体金溶液,制备的胶体金粒径在20nm~30nm范围内;

2)利用胶体金溶液标记羊抗鼠二抗,使用0.1 M碳酸钾溶液调整胶体金溶液的PH接近羊抗鼠二抗的等电点,从而使胶体金溶液与羊抗鼠二抗形成牢固结合,由于这种结合是静电结合,所以不影响抗体的生物特性。除此之外,标记过程中还需注意体系中的离子浓度以及蛋白质纯度,并在标记后通过离心浓缩的方式对胶体金溶液进行纯化及浓缩;

3)将需要标记的鼠抗加入到上述标记羊抗鼠二抗的胶体金溶液,以孕酮胶体金免疫层析试纸为例,由于胶体金溶液上标记了羊抗鼠二抗,所以鼠源性孕酮抗体加入后能通过羊抗鼠二抗间接标记在胶体金溶液上;

4)将上述间接标记鼠源性孕酮抗体的胶体金溶液处理在结合垫上,需要注意处理的均

一性以及干燥保存条件；

5) 将孕酮重组抗原处理在硝酸纤维素膜上,将对应的抗原用 $1 \times$  PBS溶液稀释到合适浓度后,使用划膜仪处理在硝酸纤维素膜上；

6) 将硝酸纤维素膜、吸水纸、结合垫、样品垫贴于PVC塑料底板上,切条并干燥保存。如果是卡壳或笔型试纸,则需要将试纸条放置在卡壳的指定槽内；

7) 将制备好的金标免疫层析试纸条按照产品质量标准进行质量鉴定。

[0015] 优选的,在本实施例中,进一步的,所述步骤1)中使用的还原剂为柠檬酸三钠。

[0016] 进一步的,所述步骤2)中胶体金直接标记的抗体是羊抗鼠二抗。

[0017] 进一步的,所述步骤3)中待标记鼠抗是利用羊抗鼠二抗间接连接在胶体金溶液上进一步的,所述步骤4)中结合垫为聚酯膜。

[0018] 本发明具有以下优点：

1. 本发明具有标记羊抗鼠二抗后可以用于其他任何鼠源性抗体的间接标记,且只需要将带标记的鼠源性抗体加入已标记羊抗鼠二抗的胶体金中混匀即可,不需要每种抗体重复标记过程,节省了多个产品的标记时间；

2. 本发明通过标记羊抗鼠二抗从而间接标记鼠抗的方法能大幅度减少标记时所使用的鼠抗量,且市场上鼠抗价格远远高于羊抗鼠二抗；

3. 发明通过标记羊抗鼠二抗从而间接标记鼠抗的方法能大幅度提高产品灵敏度,以孕酮胶体金免疫层析试纸条为例,目前市场上已有多种孕酮胶体金免疫层析试纸条,但灵敏度多低于 $2\text{ng/ml}$ ,应用本发明的胶体金标记羊抗鼠二抗后间接标记抗体的方法后,能将胶体金免疫层析试纸条的灵敏度提高到 $0.5\text{ng/ml}$ 以上；

4. 本发明所制备的胶体金免疫层析试纸条,操作简便,原料节省,检测结果准确且灵敏度高,具有较强的实用价值和显示意义。

[0019] 以上所述方法及实例仅为充分说明本发明的具体实施方式,本发明的保护范围不限于此。本技术领域的技术人员在本发明基础上所做的变换和替换,都在本发明的保护范围内。

[0020] 以上结合具体实施例描述了本发明的技术原理,仅是本发明的优选实施方式。本发明的保护范围并不仅局限于上述实施例,凡属于本发明思路下的技术方案均属于本发明的保护范围。本领域的技术人员不需要付出创造性的劳动即可联想到本发明的其它具体实施方式,这些方式都将落入本发明的保护范围之内。

专利名称(译)	一种胶体金利用标记羊抗鼠二抗后间接连接鼠抗标记的金标免疫层析试纸条的制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN108872611A</a>	公开(公告)日	2018-11-23
申请号	CN201810498754.2	申请日	2018-05-23
[标]发明人	王钦 郑砚超		
发明人	王钦 郑砚超		
IPC分类号	G01N33/74 G01N33/58 G01N33/558 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/532 G01N33/558 G01N33/587 G01N33/743		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了一种胶体金利用标记羊抗鼠二抗后间接连接鼠抗标记的金标免疫层析试纸条的制备方法，包括以下步骤：（1）利用柠檬酸三钠还原氯金酸制备胶体金溶液；（2）利用胶体金溶液标记羊抗鼠二抗；（3）将需要标记的鼠抗加入到上述标记羊抗鼠二抗的胶体金溶液；（4）将上述间接标记鼠抗的胶体金溶液处理在结合垫上；（5）将对应抗原处理在硝酸纤维素膜上；（6）将硝酸纤维素膜、吸水纸、结合垫、样品垫贴于PVC塑料底板上；（7）将制备好的金标免疫层析试纸条按照产品质量标准进行质量鉴定。本发明的优点是提高了金标免疫层析试纸条的检测灵敏度并减少了标记使用的抗体量，在减少成本的同时能提高试纸的性能，且检测结果稳定可靠。