



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102135536 B

(45) 授权公告日 2013.09.04

(21) 申请号 201010565942.6

(22) 申请日 2011.01.29

(73) 专利权人 吉林大学

地址 130012 吉林省长春市前进大街 2699 号

(72) 发明人 李小兵 刘国文 杨威 张焱

孔涛 张志刚 张冰冰 唐佳佳

李冬娜 王哲

(74) 专利代理机构 吉林长春新纪元专利代理有

限责任公司 22100

代理人 陈宏伟

(51) Int. Cl.

G01N 33/566 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 101074959 A, 2007.11.21,

rong-hwa shyu. colloidal gold-based immunochromatographic assay for detection

of ricin. 《toxicol》. 2002, 第 40 卷 (第 3 期),  
王新卫. IBV 抗体的银加强金标免疫技术检测.  
《畜牧兽医科学》. 2007, 第 23 卷 (第 5 期),

审查员 刘迎鸣

权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

一种银染增强技术胶体金免疫层析试纸盒及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种银染增强技术胶体金免疫层析试纸盒,其特征主要在于主要由胶体金免疫层析试纸条;包被有银盐的底膜及含有参与银盐还原反应的还原剂的顶膜构成。具有操作简单,灵敏度高、稳定性好、检测快速、结果清楚,易于判断和保存,且无需任何仪器设备等优点,尤其适合于临床和突发事件的现场检测,适合流行病学调查大规模应用。

1. 一种银染增强技术胶体金免疫层析试纸盒,其特征主要在于主要由胶体金免疫层析试纸条;包被有硝酸银的底膜及含有对苯二酚的顶膜构成。

2、权利要求 1 所述的银染增强技术胶体金免疫层析试纸盒,其特征主要在于:

胶体金免疫层析试纸条结构为样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水滤纸按从上到下依次固定于 PVC 膜板上,其中结合垫包被有胶体金标记物,其结果的判定为硝酸纤维素膜上的检测线和质控线是否结合胶体金标记物为依据;

所述的包被底膜的硝酸银为易溶于水的银盐;

所述的包被顶膜的对苯二酚为可将包被于底膜的银盐还原为银的化合物。

3、权利要求 1 所述银染增强技术胶体金免疫层析试纸盒的制备方法,包括以下主要步骤:

1) 免疫层析试纸条的制备

将样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水滤纸按从上到下依次固定于 PVC 膜板上制备免疫层析试纸条,其中结合垫包被有胶体金标记物,硝酸纤维素膜上包被检测线和质控线;

2) 底膜和顶膜的制备

将底膜于银盐溶液中浸泡 1 分钟,60℃ 避光干燥,将处理好的底膜装于不透明的密封袋内保存;

将顶膜于还原剂中浸泡 1 分钟,60℃ 避光干燥,将处理好的顶膜装于不透明的密封袋内保存;

3) 银染增强胶体金免疫层析试纸盒的组装

将装有底膜的不透明的密封袋;装有底膜的不透明的密封袋;免疫层析试纸条;加样滴管和镊子装于试纸盒内。

## 一种银染增强技术胶体金免疫层析试纸盒及其制备方法

[0001] 技术领域

[0002] 本发明提供一种银染增强技术胶体金免疫层析试纸盒,用于提高胶体金免疫层析试纸条的检测性能,本发明还公开了上述试纸盒的制备方法及在试纸条检测中的应用,属于生物检测领域。

### 背景技术

[0003] 胶体金探针是 20 世纪 70 年代发展起来的一门新技术。特别引人注目的是以膜为固相载体的胶体金快速诊断技术,该技术是 20 世纪 80 年代在酶联免疫吸附试验、乳胶凝集试验、单克隆抗体技术、胶体金免疫技术和新材料技术基础上发展起来的一项新型体外诊断技术。近年来该技术已越来越受到人们的重视,其技术发展迅速,在生物医学领域特别是人类医学、兽医学检验中得到了广泛应用。

[0004] 胶体金免疫层析测试条是结合免疫胶体金与对应抗原(抗体)的反应特异性和层析技术而制成的。一个胶体金免疫层析测试条通常由加样区、反应区和吸附区三部分组成。加样区含有免疫胶体金颗粒,通常由玻璃纤维将免疫胶体金颗粒吸附在该区;反应区则喷涂或点加两条反应线,一条为检测线,一条为质控线。检测线用以检测此处(抗原)物质与免疫胶体金颗粒的包被抗原(抗体或抗体携带的抗原)的反应性;质控线则用以检测免疫胶体金颗粒上的包被蛋白质的活性及程度,免疫胶体金颗粒由加样区释放后,经反应区,部分继续到吸附区,完成层析,从而达到快速检测的目的。

[0005] 银染增强技术主要成分是还原剂和银盐溶液。在还原剂的作用下,银离子容易以纳米金颗粒为核心,聚集在纳米金颗粒的表面还原成银原子,这样,纳米级大小的颗粒通过银离子的聚集和还原就可以变成毫米级的颗粒,因此,纳米金颗粒的信号得到放大。

[0006] 经检索未见有本银染增强技术应用于胶体金免疫层析试纸条,以增强其检测性能公开的文献报道。

### 发明内容

[0007] 本发明的目的是公开一种银染增强技术胶体金免疫层析试纸盒,适合现场快速检测,具有特异性强,灵敏度高,操作简便特点。

[0008] 本发明还提供了上述免疫层析试纸盒的制备方法,适用于批量生产。

[0009] 本发明的银染增强技术胶体金免疫层析试纸盒,包含:一个胶体金免疫层析试纸条;两片底膜,其中含有银盐溶液;两片顶膜,其中含有参与银盐还原反应的还原剂;一个塑料滴管和一个塑料镊子。

[0010] 本发明免疫层析试纸盒的胶体金免疫层析试纸条可为所有胶体金免疫层析试纸条,其结构为样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水滤纸按从上到下依次固定于 PVC 膜板上,其中结合垫包被有胶体金标记物,其结果的判定为硝酸纤维素膜上的检测线和质控线是否结合胶体金标记物为依据。

[0011] 本发明免疫层析试纸盒的底膜是将未处理过的玻璃纤维素膜于硝酸银溶液中浸

泡 1 分钟,取出后避光干燥处理,干燥后的底膜裁成适当大小密封避光保存。

[0012] 本发明免疫层析试纸盒的顶膜是将未处理过的玻璃纤维素膜于对苯二酚溶液中浸泡 1 分钟,取出后避光干燥处理,干燥后的顶膜裁成适当大小密封避光保存。

[0013] 本发明银染增强技术胶体金免疫层析试纸盒的制备方法,包括以下主要步骤:

[0014] 1) 免疫层析试纸条的制备

[0015] 将样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水滤纸按从上到下依次固定于 PVC 膜板上制备免疫层析试纸条,其中结合垫包被有胶体金标记物,硝酸纤维素膜上包被检测线和质控线。

[0016] 2) 底膜和顶膜的制备

[0017] 将底膜于硝酸银溶液中浸泡 1 分钟,60℃ 避光干燥,将处理好的底膜装于不透明的密封袋内保存。

[0018] 将顶膜于对苯二酚溶液中浸泡 1 分钟,60℃ 避光干燥,将处理好的顶膜装于不透明的密封袋内保存。

[0019] 3) 银染增强胶体金免疫层析试纸盒的组装

[0020] 将装有底膜的不透明的密封袋;装有底膜的不透明的密封袋;免疫层析试纸条;加样滴管和镊子装于试纸盒内。

[0021] 本发明的积极效果在于:利用胶体金免疫层析技术和银染技术制备免疫层析试纸盒,既增强了胶体金免疫层析试纸条的检测灵敏度,也保留了其特异性强的特点。本发明免疫层析试纸盒其中银染增强技术可适用于所有胶体金免疫层析试纸条,本发明免疫层析试纸盒适合于临床和突发事件的现场检测,适合流行病学调查,具有操作简单,灵敏度高、稳定性好、检测快速、结果清楚,易于判断和保存,且无需任何仪器设备等优点,尤其适合于临床和突发事件的现场检测,适合流行病学调查大规模应用。

#### 附图说明

[0022] 图 1 为胶体金试纸盒的检测结果图;

[0023] 其中,1、1ng/mL 毒素样品检测结果;2、100 pg/mL 毒素样品检测结果;3、阴性结果。

#### 具体实施方式

[0024] 下列实施例旨在进一步举例说明,而不是限制本发明。本领域技术人员可以理解到,在不背离本发明的精神和原则的前提下,对本发明的任何平行改变和改动都将落入本发明的待批权利要求范围内。

[0025] 实施例 1

[0026] 胶体金探针的制备

[0027] 1、胶体金颗粒的制备

[0028] 取硅化过的 250mL 三角瓶一个,加 100mL 去离子水及 1mL 1% 氯金酸,加热沸腾;搅动下准确加入 1.5mL1% 柠檬酸三钠,继续煮沸 15min,冷却后用去离子水恢复到原体积即可得到粒径 25 nm 的胶体金颗粒。通过调节加入 1 ~ 2mL1% 柠檬酸三钠的量可制备出粒径 15 ~ 40nm 的胶体金颗粒。

[0029] 2、胶体金标记鼠抗相思子毒素单克隆抗体的制备

[0030] 取硅化过的 250mL 三角瓶一个,加入 100mL 粒径 25 nm 或 30nm 胶体金;加入适量 0.2mol/L  $K_2CO_3$  调 pH 为 8.0 ~ 9.0,最优选 8.7,逐滴加单克隆抗体至抗体终浓度为 1 ~ 1.5mg/mL,最优选 1.1mg/mL,室温摇床上放置 15 ~ 25min;加入 10% BSA 至终浓度为 5%,防止抗体蛋白和胶体金聚合和沉淀。

[0031] 3、金标垫的制备

[0032] 把玻璃纤维素膜在生物安全柜内剪成 0.8×30cm/ 条,4℃真空抽干后待用。将纯化好的胶体金探针按 4mL/ 条的量均匀涂布在玻璃纤维素膜上,在生物安全柜内通风干燥过夜,干燥条件下保存备用。

[0033] 检测相思子毒素的免疫层析试纸条组装

[0034] 1、硝酸纤维素膜上检测线和质控线的制备

[0035] 将纯化好的兔抗相思子毒素多克隆抗体和羊抗鼠 IgG 多克隆抗体用 PBS (0.01mol/mL. pH7.5) 溶液分别稀释至终浓度为 1mg/mL 和 1.5mg/mL。将稀释好的相思子毒素多克隆抗体溶液装入 BIODOT 划膜机喷头 2,固定在距硝酸纤维素膜下边缘 1.1cm 的位置上,稀释好的羊抗鼠 IgG 多克隆抗体装入 BIODOT 划膜机喷头 1,固定在距硝酸纤维素膜下边缘 1.6cm 的位置上。参数均为 1.0μL/cm 喷在硝酸纤维素膜上。

[0036] 2、免疫层析试纸条的组装

[0037] 免疫层析试纸条的组装方法:一切操作均无灰尘、无菌、无大颗粒的情况下进行,取大小为 30cm×80mm 的 PVC 底板,将包被抗体的硝酸纤维素膜(30cm×25mm) 组装到粘性 PVC 底板上,要求其下边缘一定要对齐模具上的黑色标记线,并小心抹平膜面。将吸水垫(30cm×35mm) 紧靠模具上边缘组装到粘性底板上,并小心抹平。将包被有金标抗体玻璃纤维素膜(30cm×8mm) 紧靠标尺下边缘组装到粘性底板上,并小心抹平。将样品垫(30cm×25mm) 紧靠模具下边缘组装到粘性底板上,并小心抹平。用切条机切成 4.5mm 宽的试纸,在装配区将切好的试纸条分装于适当大小的密封袋内,每袋可装 1-2 个试纸条,也可将切好的试纸条装于免疫层析用塑料卡内。

[0038] 相思子毒素的免疫层析试纸盒的组装

[0039] 1、底膜的处理

[0040] 将未处理过的玻璃纤维素膜于硝酸银溶液中浸泡 1 分钟,取出后避光干燥处理,干燥后的底膜裁成适当大小:如试纸条为裸条底膜的宽度应与试纸条宽度相同,长度以能良好的同时覆盖检测线和质控线为宜;如试纸条装于塑料卡内,底膜的大小与塑料卡的结果显示窗口大小相同即可,切好的底膜分装于适当大小的密封袋内,每袋 2 片。

[0041] 2、顶膜的处理

[0042] 将未处理过的玻璃纤维素膜于对苯二酚溶液中浸泡 1 分钟,取出后避光干燥处理,干燥后的顶膜裁成与底膜相同大小即可,切好的顶膜分装于适当大小的密封袋内,每袋 2 片。

[0043] 3、相思子毒素的免疫层析试纸盒的组装

[0044] 将分装好的试纸条 1 袋或装有试纸条的塑料卡 1 个、底膜 1 袋、顶膜 1 袋、塑料滴管 1 个和塑料镊子 1 个装于塑封袋内密封后即可。

[0045] 试验例

[0046] 相思子毒素免疫层析试纸性能的测定及实践

[0047] 1、测试结果

[0048] (1) 样品处理

[0049] 检测液体乳样制品：视样品浓度及粘稠度用 0.01mol/L PBS (pH7.5) 溶液做适当稀释, 所得溶液即可作为检测液。

[0050] 检测血液样品：1 体积血液样品加入 1 体积的 0.01mol/L PBS (pH7.5) 溶液, 混匀静置 10 分钟, 离心处理后取上清即可作为检测液。

[0051] 检测食物样品：将食物做粉碎处理后加入适当量的 0.01mol/L PBS (pH7.5) 溶液混匀, 室温下静置 30min, 离心处理后取上清即可作为检测液。

[0052] (2) 样本检测

[0053] 取一滴待检毒素样本滴加在制备好的试纸条的加样区, 样品开始在硝酸纤维素膜上扩散, 待金标垫释放完全后, 硝酸纤维素膜上出现清晰的 T 线和 C 线, 此反应大约需要 5-10 分钟。待反应结束后, 用镊子将底膜放到硝酸纤维素膜上, 使其紧贴硝酸纤维素膜并覆盖 T 线和 C 线, 再将顶膜覆盖于底膜上, 将水滴加于顶膜上使顶膜和底膜足够湿润即可, 静置反应 5-10 分钟或底膜边缘出现黑色沉淀既可, 将底膜和顶膜取走并观察 T 线和 C 线, 当样品中不含相思子毒素时, 用该试纸盒检测时 T 线无色而 C 线有颜色, 见图 1。

[0054] 2、检测相思子毒素免疫层析试纸盒特异性的测定

[0055] 应用制备的检测相思子毒素免疫层析试纸检测与相思子毒素分子结构的性质较近的相思子凝集素、蓖麻毒素、蓖麻凝集素时, 结果均为阴性, 表明与它们之间没有交叉反应, 试纸条特异性良好。

[0056] 3、检测相思子毒素免疫层析试纸盒敏感性

[0057] 用本发明检测相思子毒素免疫层析试纸盒, 不应用银染技术时, 样品中相思子毒素浓度低于 12.5ng/mL 时试纸条检测显色不清晰; 当毒素样品浓度在 12.5 ~ 100ng/mL 之间时检测线显色清晰但比质控线颜色浅; 当毒素样品浓度在 100ng/mL 以上时检测线的颜色比质控线颜色深。当应用银染技术毒素样品为 100pg/mL 时检测结果仍为阳性。

[0058] 4、检测相思子毒素免疫层析试纸盒重复性

[0059] 取同一样品进行五次重复试验, 检测结果相一致, 说明该方法具有可重复性。

[0060] 5、检测相思子毒素免疫层析试纸盒稳定性

[0061] (1) 同一批次的免疫层析试纸于 37°C 破坏试验期间, 每天都进行试纸条的检测, 在第 12 天时试纸条颜色的强度有所降低。说明试纸条在 37°C 可保存 11 天。

[0062] (2) 同一批次的免疫层析试纸于 4°C 保存 6 个月期间, 每周测定的结果显色条带的颜色均很清晰, 在第六个月时颜色强度有所降低; 说明试纸条在 4°C 可保存 5 个月, 第 6 个月后灵敏度有所下降。

[0063] (3) 同一批次的免疫层析试纸于 -20°C 保存 11 个月期间, 分别每半个月一检测, 在第 10 个月时颜色强度有所降低; 说明试纸条在 -20°C 可保存 10 个月, 第 11 个月灵敏度有所下降。

[0064] 实施例 2

[0065] 蓖麻毒素免疫层析试纸条

[0066] 蓖麻毒素免疫层析试纸条其中胶金垫包被有胶体金标记鼠抗蓖麻毒素单克隆抗

体,硝酸纤维素膜上检测线包被有兔抗蓖麻毒素多克隆抗体,质控线上包被有羊抗鼠 IgG。

[0067] 蓖麻毒素免疫层析试纸性能的测定及实践

[0068] (1) 样品处理

[0069] 检测液体乳样制品:视样品浓度及粘稠度用 0.01mol/L PBS (pH7.5) 溶液做适当稀释,所得溶液即可作为检测液。

[0070] 检测血液样品:1 体积血液样品加入 1 体积的 0.01mol/L PBS (pH7.5) 溶液,混匀静止 10 分钟,离心处理后取上清即可作为检测液。

[0071] 检测食物样品:将食物做粉碎处理后加入适当量的 0.01mol/L PBS (pH7.5) 溶液混匀,室温下静止 30min,离心处理后取上清即可作为检测液。

[0072] (2) 样本检测

[0073] 取一滴待检毒素样本滴加在试纸条的加样区,样品开始在硝酸纤维素膜上扩散,待金标垫释放完全后,硝酸纤维素膜上出现清晰的 T 线和 C 线,此反应大约需要 5-10 分钟。待反应结束后,用镊子将底膜放到硝酸纤维素膜上,使其紧贴硝酸纤维素膜并覆盖 T 线和 C 线,再将顶膜覆盖于底膜上,将水滴加于顶膜上使顶膜和底膜足够湿润即可,静置反应 5-10 分钟或底膜边缘出现黑色沉淀既可,将底膜和顶膜取走并观察 T 线和 C 线,当样品中不含相思子毒素时,用该试纸盒检测时 T 线无色而 C 线有颜色。

[0074] 检测蓖麻毒素免疫层析试纸盒敏感性

[0075] 用本发明检测蓖麻毒素免疫层析试纸盒,不应用银染技术时,样品中蓖麻毒素的最低检测限为 50ng/m,当应用银染技术毒素样品为 500pg/mL 时检测结果仍为阳性。

[0076] 实施例 3

[0077] 犬瘟热病毒免疫层析试纸条

[0078] 犬瘟热免疫层析试纸条其中胶金垫包被有胶体金标记鼠抗犬瘟热病毒单克隆抗体,硝酸纤维素膜上检测线包被有兔抗犬瘟热病毒多克隆抗体,质控线上包被有羊抗鼠 IgG。

[0079] 犬瘟热病毒免疫层析试纸性能的测定及实践

[0080] 1、样本检测

[0081] 取一滴待检样本滴加在试纸条的加样区,样品开始在硝酸纤维素膜上扩散,待金标垫释放完全后,硝酸纤维素膜上出现清晰的 T 线和 C 线,此反应大约需要 5-10 分钟。待反应结束后,用镊子将底膜放到硝酸纤维素膜上,使其紧贴硝酸纤维素膜并覆盖 T 线和 C 线,再将顶膜覆盖于底膜上,将水滴加于顶膜上使顶膜和底膜足够湿润即可,静置反应 5-10 分钟或底膜边缘出现黑色沉淀既可,将底膜和顶膜取走并观察 T 线和 C 线,当样品中不含相思子毒素时,用该试纸盒检测时 T 线无色而 C 线有颜色。

[0082] 2、检测犬瘟热病毒免疫层析试纸盒敏感性

[0083] 用本发明检测犬瘟热病毒免疫层析试纸盒,不应用银染技术时,犬瘟热病毒的最低检测限为  $10^4$ TCID<sub>50</sub>,当应用银染技术样品病毒浓度为  $10^3$ TCID<sub>50</sub> 时检测结果仍为阳性。

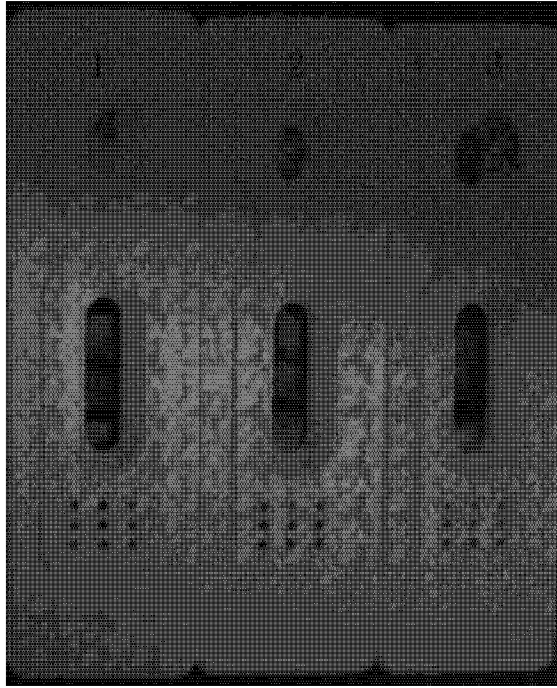


图 1

专利名称(译)	一种银染增强技术胶体金免疫层析试纸盒及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN102135536B</a>	公开(公告)日	2013-09-04
申请号	CN201010565942.6	申请日	2011-01-29
[标]申请(专利权)人(译)	吉林大学		
申请(专利权)人(译)	吉林大学		
当前申请(专利权)人(译)	吉林大学		
[标]发明人	李小兵 刘国文 杨威 张燧 孔涛 张志刚 张冰冰 唐佳佳 李冬娜 王哲		
发明人	李小兵 刘国文 杨威 张燧 孔涛 张志刚 张冰冰 唐佳佳 李冬娜 王哲		
IPC分类号	G01N33/566 G01N33/558 G01N33/532		
代理人(译)	陈宏伟		
其他公开文献	CN102135536A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及一种银染增强技术胶体金免疫层析试纸盒，其特征在于主要由胶体金免疫层析试纸条；包被有银盐的底膜及含有参与银盐还原反应的还原剂的顶膜构成。具有操作简单，灵敏度高、稳定性好、检测快速、结果清楚，易于判断和保存，且无需任何仪器设备等优点，尤其适合于临床和突发事件的现场检测，适合流行病学调查大规模应用。

