



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104991058 A

(43) 申请公布日 2015. 10. 21

(21) 申请号 201510390430. 3

G01N 33/58(2006. 01)

(22) 申请日 2015. 07. 06

(71) 申请人 宋晓峰

地址 100176 北京市大兴区北京经济技术开
发区兴业街 2 号 3 幢四层 402 室

申请人 余强华

(72) 发明人 宋晓峰

(74) 专利代理机构 北京中海智圣知识产权代理
有限公司 11282

代理人 杨树芬

(51) Int. Cl.

G01N 33/558(2006. 01)

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

权利要求书1页 说明书4页

(54) 发明名称

一种胶体金和乳胶微球联合标记的金标免疫
层析试纸条的制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种胶体金和乳胶微球联合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) 用胶体金溶液标记蛋白分子; (3) 直接购买或制备 50nm 的红色乳胶微球; (4) 用乳胶微球标记蛋白分子; (5) 对于上述步骤中得到的标记胶体金溶液和乳胶标记溶液进行质量鉴定; (6) 将硝酸纤维素膜贴于 PVC 塑料底板上; (7) 将样品垫、结合垫、吸水垫、手柄纸、Max 胶组装于 PVC 塑料垫板上; (8) 将制备好的金标试纸条按照产品的质量标准进行质检。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和检测范围, 从而扩大了胶体金免疫诊断的应用领域和定量应用。

1. 一种胶体金和乳胶微球联合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 30nm ~ 40nm 范围内;

(2) 用胶体金溶液标记蛋白分子,因为蛋白的吸附主要取决于 pH 值,在接近蛋白质的等电点或偏碱的条件下,胶体金溶液和蛋白分子这二者容易形成牢固的结合物,如果胶体金的 pH 值低于蛋白质的等电点时,则会聚集而失去结合能力,除此以外胶体金颗粒的大小、离子强度、蛋白质的分子量都影响胶体金溶液与蛋白质的结合,因此标记前应调节胶体金的 pH 值,并选择合适的离子浓度条件标记蛋白分子,标记之前应对待标记的蛋白溶液进行透析,以除去聚合物,胶体金标记蛋白以后应通过离心重悬的方式进行纯化,得到标记胶体金溶液;

(3) 直接购买或制备 50nm 的红色乳胶微球;

(4) 用乳胶微球标记蛋白分子,标记时先将待标记蛋白在 pH 值为 6 的 2-(N- 吗啡啉) 乙磺酸 (MES) 缓冲液中进行透析;透析后对待标记蛋白进行合适的处理,主要是除去缓冲液中游离的氨基;用 1- 乙基 -3-(3- 二甲基氨丙基) 碳二亚胺 (EDC) 和 N- 羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 缓冲体系活化乳胶微球上的羧基,调整乳胶和待标记蛋白溶液的 pH 值后,将两者混合,用磁力搅拌器搅拌 2 ~ 8 小时,利用抗体蛋白分子表面的氨基与乳胶微球上的羧基发生酰胺缩合反应完成偶联,然后将标记物离心,离心分离后弃掉上清液,留取沉淀物,此时的沉淀物即为乳胶 - 蛋白分子标记物,用缓冲液将该沉淀物调至所需浓度得到含表面活性剂及防腐剂的乳胶标记溶液;

(5) 对于上述步骤中得到的标记胶体金溶液和乳胶标记溶液进行质量鉴定,质量鉴定合格后将标记胶体金溶液和乳胶标记溶液按照体积比 1:1 的方式混合,将该混合液用划膜喷金机喷涂于结合垫上烘干;

(6) 将硝酸纤维素膜贴于 PVC 塑料底板上,将对照线和检测线要包被的蛋白分子分别用适宜的稀释液稀释后,用划膜喷金机将其分别喷涂于硝酸纤维素膜上烘干;

(7) 将样品垫、结合垫、吸水垫、手柄纸、Max 胶组装于 PVC 塑料垫板上,切条、密封加干燥剂保存,如果是卡型或笔型试纸,还需要将试纸条扣到卡塞中再进行包装;

(8) 将制备好的金标试纸条按照产品的质量标准进行质检。

2. 根据权利要求 1 所述的一种胶体金和乳胶微球联合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 (5) 中的烘干温度为 $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 。

3. 根据权利要求 1 所述的一种胶体金和乳胶微球联合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 (6) 中的烘干温度为 $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 。

4. 根据权利要求 1 所述的一种胶体金和乳胶微球联合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 (7) 中的样品垫为玻璃纤维纸。

一种胶体金和乳胶微球联合标记的金标免疫层析试纸条的 制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种胶体金和乳胶微球联合标记的金标免疫层析试纸条的制备方法，属于生物医药领域的体外诊断试剂技术领域。

背景技术

[0002] 目前，传统的胶体金标记技术的研究最早始于上世纪 60 年代初，胶体金是由氯金酸 (HAuCl_4) 在还原剂如白磷、抗坏血酸、枸橼酸钠、鞣酸作用下，聚合成为特定大小的金颗粒，并由于静电作用成为一种稳定的胶体状态，称为胶体金。胶体金在弱碱环境下带负电荷，能够与蛋白质分子的正电荷基团形成牢固的结合，由于这种结合是静电结合，所以不影响蛋白质的生物特性。因为胶体金颜色比较明显，肉眼即可辨别，因此无需任何仪器。胶体金除了与蛋白质结合以外，还能够与许多其它生物大分子结合，如 SPA、PHA、ConA。

[0003] 胶体金免疫层析法试纸条的研制原理是将特异性的抗原或抗体以条带状固定在硝酸纤维素膜上，胶体金标记试剂（抗体或单克隆抗体）吸附在结合垫上，当待检样本加到试纸条一端的样本垫上后，在吸水材料的牵引下，通过毛细作用向前移动，溶解结合垫上的胶体金标记试剂后，样本中的被测抗原或抗体首先与金标抗体结合成抗原抗体复合物，抗原抗体复合物上行到检测线时，被测抗原的另一结合位点与包被在此处的单抗结合，形成两个抗体结合一个抗原（双抗体夹心）的金标复合物，因有金颗粒在此沉积，故检测线显红色。未结合抗原的金标抗体上行到对照线时，与“抗金标抗体”结合，所以对照线也显红色。如果待测标本中无被测抗原即阴性样本，试纸条上只有金标抗体上行并与对照线处的抗体结合，因而检测线不显线，对照线显红色。

[0004] 现在传统的广泛应用的胶体金免疫层析法试纸条多为用单一胶体金标记，典型的层析法检测试剂的组成成份分为三个部分，其一是多孔材料，包括样品垫、吸水垫、结合垫及硝酸纤维素膜；其二是试剂，如抗体、金标结合物；其三是层压结构及卡塞，如 PVC 板、双面胶、卡塞。

[0005] 基于胶体金标记技术的免疫层析法体外诊断试剂目前已经有了很广泛大应用，但是仅以胶体金作为标记物和显色剂需要较高浓度的标记物，耗费抗体或抗原的量较多，而且需要较大直径的金颗粒，例如 40nm 的粒径，才能获得较高的灵敏度，检测低浓度样本时，容易发生假阴性，而当金颗粒过大时，标记物又不稳定，长期贮存容易发生自动聚集。这些缺点导致胶体金标记的免疫层析试纸多集中在定性检测领域，在定量、半定量检测领域没有得到广泛应用。

[0006] 乳胶标记蛋白一般都是使用羧基和氨基的偶联方法进行偶联的，乳胶表面有羧基，经过活化后和蛋白的氨基结合形成共价键，乳胶标记主要用于胶乳增强免疫比浊法检测，主要是将通常是 50nm ~ 500nm 粒径的高分子颗粒的乳胶颗粒偶联上抗体，通过抗体的反应，相互交联，通过生化仪的投射或散射光进行扫描，比较反应前后的光路变化，检测抗原的量。主要适用于全自动生化仪，检测结果快速，单个样本检测只需要 10min 左右，能够

大通量检测,灵敏度比较高,能够定量检测。但是因为检测过程中需要全自动生化仪这种大型仪器,因此不利于在诊所或床旁检验推广。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供一种能够克服上述技术问题的胶体金和乳胶微球联合标记的金标免疫层析试纸条的制备方法;本发明的一种胶体金和乳胶微球联合标记的金标免疫层析试纸条的制备方法包括以下步骤:

[0008] (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 30nm ~ 40nm 范围内;

[0009] (2) 用胶体金溶液标记蛋白分子,因为蛋白的吸附主要取决于 pH 值,在接近蛋白质的等电点或偏碱的条件下,胶体金溶液和蛋白分子这二者容易形成牢固的结合物,如果胶体金的 pH 值低于蛋白质的等电点时,则会聚集而失去结合能力,除此以外胶体金颗粒的大小、离子强度、蛋白质的分子量都影响胶体金溶液与蛋白质的结合,因此标记前应调节胶体金的 pH 值,并选择合适的离子浓度条件标记蛋白分子,标记之前应对待标记的蛋白溶液进行透析,以除去聚合物,胶体金标记蛋白以后应通过离心重悬的方式进行纯化,得到标记胶体金溶液;

[0010] (3) 直接购买或制备 50nm 的红色乳胶微球;

[0011] (4) 用乳胶微球标记蛋白分子,标记时先将待标记蛋白在 pH 值为 6 的 2-(N-吗啡啉)乙磺酸(MES)缓冲液中进行透析;透析后对待标记蛋白进行合适的处理,主要是除去缓冲液中游离的氨基;用 1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)碳二亚胺(EDC)和 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)缓冲体系活化乳胶微球上的羧基,调整乳胶和待标记蛋白溶液的 pH 值后,将两者混合,用磁力搅拌器搅拌 2~8 小时,利用抗体蛋白分子表面的氨基与乳胶微球上的羧基发生酰胺缩合反应完成偶联,然后将标记物离心,离心分离后弃掉上清液,留取沉淀物,此时的沉淀物即为乳胶-蛋白分子标记物,用缓冲液将该沉淀物调至所需浓度得到含表面活性剂及防腐剂的乳胶标记溶液;

[0012] (5) 对于上述步骤中得到的标记胶体金溶液和乳胶标记溶液进行质量鉴定,质量鉴定合格后将标记胶体金溶液和乳胶标记溶液按照体积比 1:1 的方式混合,将该混合液用划膜喷金机喷涂于结合垫上烘干,所述烘干温度为 $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$;

[0013] (6) 将硝酸纤维素膜贴于 PVC 塑料底板上,将对照线和检测线要包被的蛋白分子分别用适宜的稀释液稀释后,用划膜喷金机将其分别喷涂于硝酸纤维素膜上烘干,所述烘干温度为 $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$;

[0014] (7) 将样品垫、结合垫、吸水垫、手柄纸、Max 胶组装于 PVC 塑料垫板上,切条、密封加干燥剂保存,如果是卡型或笔型试纸,还需要将试纸条扣到卡塞中再进行包装;所述样品垫为玻璃纤维纸;

[0015] (8) 将制备好的金标试纸条按照产品的质量标准进行质检。

[0016] 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和检测范围,从而扩大了胶体金免疫诊断的应用领域和定量应用,本发明选择的胶体金颗粒是粒径约为 30nm ~ 40nm 的红色胶体金,乳胶是选择的粒径约为 50nm 的红色乳胶微球,该乳胶微球分散性好,粒径分布窄,色彩鲜艳,成本低廉,胶体金和乳胶混合标记后,硝酸纤维素膜上 C、T 线的颜

色变得更为鲜艳,产品灵敏度提高,梯度更加明显,应用本发明制备的检测试剂盒,能够实现对被测物质的定性、半定量或定量检测,以 C- 反应蛋白胶体金法免疫层析检测试纸条为例,目前市场上已有多种 C- 反应蛋白定性或半定量的胶体金免疫层析法检测试纸,但是检测的 CRP (C- 反应蛋白, C-Reactive Protein) 灵敏度多低于 5mg/l,应用本发明的胶体碳和乳胶微球联合标记的技术后,能将金标免疫层析法检测试纸的灵敏度提高到 0.5mg/l 以上;因此,本发明具有较强的实用价值和现实意义。

具体实施方式

[0017] 下面对本发明的实施方式进行详细描述。本发明的一种胶体金和乳胶微球联合标记的金标免疫层析试纸条的制备方法包括以下步骤:

[0018] (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 30nm ~ 40nm 范围内;

[0019] (2) 用胶体金溶液标记蛋白分子,因为蛋白的吸附主要取决于 pH 值,在接近蛋白质的等电点或偏碱的条件下,胶体金溶液和蛋白分子这二者容易形成牢固的结合物,如果胶体金的 pH 值低于蛋白质的等电点时,则会聚集而失去结合能力,除此以外胶体金颗粒的大小、离子强度、蛋白质的分子量都影响胶体金溶液与蛋白质的结合,因此标记前应调节胶体金的 pH 值,并选择合适的离子浓度条件标记蛋白分子,标记之前应对待标记的蛋白溶液进行透析,以除去聚合物,胶体金标记蛋白以后应通过离心重悬的方式进行纯化,得到标记胶体金溶液;

[0020] (3) 直接购买或制备 50nm 的红色乳胶微球;

[0021] (4) 用乳胶微球标记蛋白分子,标记时先将待标记蛋白在 pH 值为 6 的 2-(N- 吗啡啉) 乙磺酸 (MES) 缓冲液中进行透析;透析后对待标记蛋白进行合适的处理,主要是除去缓冲液中游离的氨基;用 1- 乙基 -3-(3- 二甲基氨丙基) 碳二亚胺 (EDC) 和 N- 羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 缓冲体系活化乳胶微球上的羧基,调整乳胶和待标记蛋白溶液的 pH 值后,将两者混合,用磁力搅拌器搅拌 2 ~ 8 小时,利用抗体蛋白分子表面的氨基与乳胶微球上的羧基发生酰胺缩合反应完成偶联,然后将标记物离心,离心分离后弃掉上清液,留取沉淀物,此时的沉淀物即为乳胶 - 蛋白分子标记物,用缓冲液将该沉淀物调至所需浓度得到含表面活性剂及防腐剂的乳胶标记溶液;

[0022] (5) 对于上述步骤中得到的标记胶体金溶液和乳胶标记溶液进行质量鉴定,质量鉴定合格后将标记胶体金溶液和乳胶标记溶液按照体积比 1:1 的方式混合,将该混合液用划膜喷金机喷涂于结合垫上烘干,所述烘干温度为 $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$;

[0023] (6) 将硝酸纤维素膜贴于 PVC 塑料底板上,将对照线和检测线要包被的蛋白分子分别用适宜的稀释液稀释后,用划膜喷金机将其分别喷涂于硝酸纤维素膜上烘干,所述烘干温度为 $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$;

[0024] (7) 将样品垫、结合垫、吸水垫、手柄纸、Max 胶组装于 PVC 塑料垫板上,切条、密封加干燥剂保存,如果是卡型或笔型试纸,还需要将试纸条扣到卡塞中再进行包装;所述样品垫为玻璃纤维纸;

[0025] (8) 将制备好的金标试纸条按照产品的质量标准进行质检。

[0026] 以上所述,仅为本发明的具体实施方式,但本发明的保护范围并不局限于此,任何

熟悉本技术领域的技术人员在本发明公开的范围内,能够轻易想到的变化或替换,都应涵盖在本发明权利要求的保护范围内。

专利名称(译)	一种胶体金和乳胶微球联合标记的金标免疫层析试纸条的制备方法		
公开(公告)号	CN104991058A	公开(公告)日	2015-10-21
申请号	CN201510390430.3	申请日	2015-07-06
[标]申请(专利权)人(译)	宋晓峰 余强华		
申请(专利权)人(译)	宋晓峰 余强华		
当前申请(专利权)人(译)	宋晓峰 余强华		
[标]发明人	宋晓峰		
发明人	宋晓峰		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/68 G01N33/531 G01N33/58		
CPC分类号	G01N33/558 G01N33/531 G01N33/585 G01N33/6803 G01N2333/4737		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种胶体金和乳胶微球联合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)用胶体金溶液标记蛋白分子;(3)直接购买或制备50nm的红色乳胶微球;(4)用乳胶微球标记蛋白分子;(5)对于上述步骤中得到的标记胶体金溶液和乳胶标记溶液进行质量鉴定;(6)将硝酸纤维素膜贴于PVC塑料底板上;(7)将样品垫、结合垫、吸水垫、手柄纸、Max胶组装于PVC塑料垫板上;(8)将制备好的金标试纸条按照产品的质量标准进行质检。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和检测范围,从而扩大了胶体金免疫诊断的应用领域和定量应用。