



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105137060 A

(43) 申请公布日 2015. 12. 09

(21) 申请号 201510493408. 1

(22) 申请日 2015. 08. 12

(71) 申请人 杨磊

地址 310051 浙江省杭州市滨江区滨安路
1180 号

(72) 发明人 杨磊

(74) 专利代理机构 杭州裕阳专利事务所(普通
合伙) 33221

代理人 冯燕青

(51) Int. Cl.

G01N 33/531(2006. 01)

权利要求书1页 说明书4页

(54) 发明名称

免疫彩色二氧化硅微球的制备方法、彩色试
纸及制备方法

(57) 摘要

本发明提供了一种新型免疫彩色二氧化硅微球的制备方法及应用该新型免疫彩色二氧化硅微球制备的彩色快速检测试纸和该试纸的制备方法。本发明的新型彩色免疫微球具有制作简单,生物活性好,粒径规则可控,颜色鲜艳,色泽稳定,分散性好,灵敏度高,分散性好且能显色多种颜色等优点,用其开发的产品新型彩色快速检测试纸产品具有检测速度快、操作方便、价格低廉、不仅可以对单一待测物的进行快速检测,也可实现一次性对多种待测物的同时检测。

1. 新型免疫彩色二氧化硅微球的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

步骤 a,将 0.1g 单分散彩色二氧化硅微球均匀分散在 10mL 无水乙醇中,然后加入硅烷偶联剂 APTES,进行反应;

步骤 b,反应后用无水乙醇清洗后再用超纯水清洗,得到氨基化的彩色二氧化硅微球;

步骤 c,将氨基化的彩色二氧化硅微球放入离心管,用 0.1M PBS 缓冲液清洗后加入质量分数为 10% 的戊二醛溶液,振荡搅拌,再用 0.1M PBS 缓冲液清洗,得到戊二醛化的修饰有醛基的彩色二氧化硅微球;

步骤 d,以 0.1M 的 PBS 溶液为偶联缓冲液,先用 0.1M PBS 缓冲液洗涤步骤 c 得到的微球,震荡均匀后分散到 0.1M 的 PBS 溶液中,并加入抗体进行反应,反应后清洗,再加入甘氨酸,混合反应;用缓冲液清洗后得到新型免疫彩色二氧化硅微球。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,步骤 a 中,彩色二氧化硅微球的制备方法包括以下步骤:以 triton-100 为表面活性剂,正己醇为助表面活性剂,己烷为有机溶剂,混合振荡至澄清,加入一定量水为分散相,形成微乳液,然后向微乳液中加入正硅酸乙酯,水解缩合形成微球,在反应过程中加入氨水为催化剂,同时加入染料对微球进行染色形成彩色二氧化硅微球,加入硅烷偶联剂在微球表面引入氨基,形成单分散彩色二氧化硅微球。

3. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,步骤 a 中反应时间为 4h。

4. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,步骤 a 中每克单分散彩色二氧化硅微球分散于 100mL 的无水乙醇中。

5. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,步骤 b 中,用无水乙醇清洗三次后再用超纯水清洗三次。

6. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,步骤 c 中,振荡搅拌 2h。

7. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,步骤 d 中,加入抗体反应时间为 4h,再加入甘氨酸,混合反应 15 分钟。

8. 一种新型彩色快速检测试纸,其特征在于,所述试纸上吸附有至少一种如权利要求 1 所述的新型免疫彩色二氧化硅微球。

9. 根据权利要求 8 所述的试纸,其特征在于,所述不同颜色的二氧化硅微球上标记有不同抗体。

10. 一种新型彩色快速检测试纸的制备方法,其特征在于,将特异性抗原或抗体以条带状固定在试纸设定位置上,标记有抗体或者单克隆抗体的新型彩色免疫二氧化硅微球吸附在结合垫上。

免疫彩色二氧化硅微球的制备方法、彩色试纸及制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于医学检测领域,涉及一种新型免疫彩色二氧化硅微球的制备方法及应用该新型免疫彩色二氧化硅微球制备的彩色快速检测试纸和该试纸的制备方法。

背景技术

[0002] 免疫层析法因具有操作简便、结果清晰等优点,已成为临床快速诊断领域的热点。现有的试纸检测产品主要是在胶体金免疫层析技术的基础上制成的胶体金免疫层析试纸等系列产品,该试纸条操作简单,阳性结果能显示清晰的红色,是目前最主要的免疫层析产品;另一种是在乳胶凝集基础上出现的彩色乳胶层析诊断试纸条,该试纸条可以用不同颜色的乳胶颗粒替代胶体金,使检测结果除了显示红色外也可以显示别的颜色。

[0003] 而胶体金免疫层析试纸主要存在的缺陷有:

(1) 胶体金显色单一,通常只能显示单一的红色,其检测结果无论何种样本显色的颜色都一样,不能根据不同的品质或要求改变颜色,因此无法实现一根试纸条对多种检测物一次性同时检测。(2) 胶体金粒径控制不易,很难依据试纸的需要调整粒径的大小。(3) 胶体金标记过程有用到强还原剂,对人体健康有一定影响。(4) 胶体金表面没有生物活性基团,其生物活性较差。(5) 胶体金粒径较小时是圆形,粒径较大时为椭圆形,形状不稳定。

[0004] 乳胶免疫层析试纸的缺陷有:

(1) 乳胶颗粒形状往往不规则,大小难以控制。(2) 乳胶微粒的粒径较大,不利于微球在免疫层析试纸运动,试纸中的微球粒径往往在 40nm 左右时运动和显色效果最佳。(3) 乳胶微球的显色是通过把染料包裹在乳胶颗粒中,染料在微球里面使得颜色不够艳丽,往往造成染料的泄露,使显色效果变差,因此乳胶免疫层析试纸因颜色不够清晰很难做到多种颜色的判别,不利于对多样本的同时检测。(4) 乳胶微球因自身较为脆弱,容易受到各种理化因素的影响而出现自凝现象,最终造成结果的误判,对检测造成干扰。(5) 乳胶微球与抗体的结合能力及敏感度不高。

[0005] 因此,乳胶层析试纸条虽然能使检测结果显示不同的颜色,但显色效果差,不同颜色的区分度不明显,且乳胶颗粒与抗体的结合能力差,再加上自身的自凝现象,很容易出现检测结果的误判,且难以实现对多样本的同时检测。

发明内容

[0006] 本发明的目的是通过选择、改进和优化制备条件,研制出生物相容性好、色彩鲜明、色泽稳定的新型彩色免疫微球,开发一种更加直观灵敏、简便稳定的多功能新型彩色免疫检测试纸产品及制备方法,实现不仅可以检测单一样本而且可以通过显示不同的颜色实现一根试纸条一次性对多样本同时检测的目的。

[0007] 为实现上述目的,本发明采取下述技术方案来实现:

本发明提供一种新型免疫彩色二氧化硅微球的制备方法,包括以下步骤:

步骤 a, 将单分散彩色二氧化硅微球均匀分散在无水乙醇中,然后加入硅烷偶联剂

3- 氨丙基三乙氧基硅烷 (APTES), 进行反应 ;

步骤 b, 反应后用无水乙醇清洗后再用超纯水清洗, 得到氨基化的彩色二氧化硅微球 ;

步骤 c, 将氨基化的彩色二氧化硅微球放入离心管, 用 0. 1MPBS 缓冲液清洗后加入质量分数为 10% 的戊二醛溶液, 振荡搅拌, 再用 0. 1M PBS 缓冲液清洗, 得到戊二醛化的修饰有醛基的彩色二氧化硅微球 ;

步骤 d, 以 0. 1M 的 PBS 溶液为偶联缓冲液, 先用 PBS 缓冲液洗涤步骤 c 得到的微球, 震荡均匀后分散到 0. 1M 的 PBS 溶液中, 并加入抗体进行反应, 反应后清洗, 再加入甘氨酸, 混合反应 ; 用缓冲液清洗后得到新型免疫彩色二氧化硅微球。

[0008] 进一步, 步骤 a 中, 彩色二氧化硅微球的制备方法包括以下步骤 : 以 triton-100 为表面活性剂, 正己醇为助表面活性剂, 己烷为有机溶剂, 混合振荡至澄清, 加入一定量水为分散相, 形成微乳液, 然后向微乳液中加入正硅酸乙酯, 水解缩合形成微球, 在反应过程中加入氨水为催化剂, 同时加入染料对微球进行染色形成彩色二氧化硅微球, 加入硅烷偶联剂在微球表面引入氨基, 形成单分散彩色二氧化硅微球。

[0009] 进一步, 步骤 a 中反应时间为 4h。

[0010] 进一步, 步骤 a 中每克单分散彩色二氧化硅微球分散于 100mL 的无水乙醇中。硅烷偶联剂 APTES 的加入量为单分散彩色二氧化硅微球质量的 5%。

[0011] 进一步, 步骤 b 中, 用无水乙醇清洗三次后再用超纯水清洗三次。

[0012] 进一步, 步骤 c 中, 振荡搅拌 2h。

[0013] 进一步, 步骤 d 中, 加入抗体反应时间为 4h, 再加入甘氨酸, 混合反应 15 分钟。

[0014] 本发明还提供一种新型彩色快速检测试纸, 所述试纸上吸附有至少一种前述新型免疫彩色二氧化硅微球。

[0015] 进一步, 所述不同颜色的二氧化硅微球上标记有不同抗体。

[0016] 本发明还提供一种新型彩色快速检测试纸的制备方法, 将特异性抗原或抗体以条带状固定在试纸设定位置上, 标记有抗体或者单克隆抗体的新型彩色免疫二氧化硅微球吸附在结合垫上。

[0017] 本发明的新型彩色检测试纸可以有效诊断早孕的人绒毛促性腺激素 (hCG)、检测排卵的促黄体生成素 (LH) 和促卵泡激素 (FSH) 等, 而且通过显色条带的控制亦可实现对异位妊娠的检测, 还可对尿液中的吗啡、可卡因、海洛因、大麻、苯丙胺等多种毒品实现一次性同时检测。另外, 该新型彩色检测试纸对其它传染病的快速诊断同样适用, 包括各种病毒的相应抗原及抗体, 如各种病毒性肝炎、风疹病毒抗体、肾综合症出血抗体、各种流感病毒的相应抗原及抗体、登革热病毒抗体及轮状病毒菌等 ; 性病, 如艾滋病毒抗体、梅毒螺旋体抗体、淋球菌及泌尿生殖系统的衣原体等 ; 细菌类, 如结核杆菌抗体、沙门菌等 ; 寄生虫, 如疟原虫、血吸虫抗体、弓形虫抗体等 ; 对肿瘤, 包括对肿瘤进行筛查和早期诊断有意义的肿瘤标志物、心血管病、自家免疫病, 食品安全包括食源性致病, 农兽药残留, 违禁添加剂, 生物毒素及食品中重金属离子的快速检测, 及环境污染、生物制剂的快速检测、兽医学及法医学等方面都具有较好的应用前景。

[0018] 与现有技术相比, 本发明具有以下优点 :

用该方法制备的新型彩色免疫二氧化硅微球克服了传统的彩色二氧化硅微球产量低, 粒径难以控制, 分散性差, 显色效果不好, 免疫效果不理想等缺点, 同时也克服了胶体金显

色单一及乳胶微球粒径不规则、显色效果差,与蛋白结合不理想等缺点,通过选择、改进和优化制备条件,制备的新型彩色免疫二氧化硅微球粒径大小可控、不溶胀、稳定耐储、不自凝、表面光滑、形状规则、生物相容性好、色彩鲜明、色泽稳定、并能制成多种颜色的新型彩色免疫微球,是制备彩色检测试纸条理想的新材料。

[0019] 使用本发明的新型彩色免疫二氧化硅微球制备的新型彩色检测试纸更加直观、灵敏、经济 准确、稳定、简便,且该产品不仅可以检测单一样本而且可以通过显示不同的颜色实现一根试纸条一次性对多种样本同时检测。

具体实施方式

[0020] 下面结合具体实施例对本发明进行详细阐述。

[0021] 实施例 1

单分散新型彩色二氧化硅微球的制备

将 2 mL Triton-100、0.6 mL 正己醇、2 mL 己烷分别作为表面活性剂、助表面活性剂和有机溶剂,混合振荡至澄清,加入一定量的水作为分散相,形成透明且稳定的微乳液,再将 1 mL TEOS 加入到微乳液反应体系中作为反应前提。为促进 TEOS 更快的水解缩合反应形成微球,在反应过程中加入一定量的 1 mL 氨水作为催化剂。为使合成的微球显示,在反应中加入染料,并可根据需要选择不同颜色的染料对微球进行染色以形成多种颜色的彩球。为减小微球之间的团聚,加入一定量的硅烷偶联剂 5%KH-550 或其他硅烷偶联剂在微球表面引入氨基,增大微球表面电位以促进微球之间的分散,形成单分散微球。经试验证明,染料一部分以包埋的形式被包裹在微球中,另一部分通过硅烷偶联剂 KH-550 或其它偶联剂键合在微球上,显示稳定的颜色。

[0022] 实施例 2 :

将抗体修饰在彩球表面,制备单分散新型彩色免疫二氧化硅微球。

[0023] 对合成好的单分散新型彩色二氧化硅微球进行官能团修饰及活化后,并对其表面相应的抗体修饰,制备出色泽艳丽、灵敏度高、特异性较强的单分散新型彩色免疫微球。

[0024] 对单分散新型彩色微球表面的硅羟基进行氨基化修饰,将 0.1g 制备好的彩色微球加入到 10mL 的无水乙醇中,在烧杯中搅拌 30min 使其均匀分散在乙醇中,加入 4%~5% 的 APTES 或 KH-550,反应 4h ;用无水乙醇清洗 3 次后再用超纯水清洗 3 次,即可得到氨基化的单分散的新型彩色微球。

[0025] 取上述氨基化的彩色微球在离心管中,用 0.1M PBS 缓冲液清洗 3 次后加入 10% 的戊二醛溶液,在烧杯中振荡搅拌 2h,再用 0.1M PBS 清洗 3 次,即可制备出戊二醛化的修饰有醛基的彩色微球 ;以 0.1M 的 PBS (pH7.3) 作为偶联缓冲液,先用 0.1M PBS 溶液洗涤微球 3 次,震荡均匀后分散到 10mLPBS 溶液中,并加入 5-20 μ L 1 μ g/mL 的阪崎肠杆菌抗体或肠炎沙门氏菌抗体,室温下反应 4h。清洗后加入 50 μ l 甘氨酸,混合反应 15min,用 PBS 清洗 3 次后即可得到均匀修饰的单分散新型免疫彩色二氧化硅微球,用此免疫彩色二氧化硅微球可同时检测出奶粉中多种致病菌,也可修饰其它抗体用于相应样本中致病菌的检测。

[0026] 实施例 3 :

用新型彩色免疫二氧化硅微球制备检测单一样本的新型彩色免疫层析试纸条。

[0027] 将特异性抗原或抗体以条带状固定在试纸设定位置(T 线区)上,标记有抗体或者

单克隆抗体的一种颜色的新型彩色免疫二氧化硅微球吸附在结合垫上。

[0028] 在检测样本时,将待测样品滴加在结合垫上,待测样品中有抗原存在时就会与彩色免疫二氧化硅微球结合,在 T 线区会大量聚集,形成清晰的显色条带,而无抗原结合的彩球则分散在试纸条上继续向前运动,到 C 线区聚集成显色带。也可用不同颜色的试纸条去检测同一样本,该样本中若含有多种待测抗原时,可以实现用不同的试纸条对多样本一次性检测。

[0029] 以早孕检测试纸条为例,在试纸条的结合垫上涂覆新型彩色二氧化硅微球标记的鼠抗 β -HCG 单克隆抗体浓度为 1.0-2.0 mg/mL,涂覆量 0.17-0.25 μ l/cm,

检测区包被鼠抗 α -HCG 单克隆抗体的浓度为 1.0-2.0mg/ml,包被参数为 0.17-0.25 μ l/cm ;所述控制区包被的抗鼠 IgG 多克隆抗体的浓度为 1.0-2.0 mg/ml,包被参数为 0.17-0.25 μ l/cm。当所检测样本中含有促腺素人绒毛膜(hCG)时,样本中的hCG抗原与彩色二氧化硅纳米微球标记的 β -HCG 单克隆抗体结合,在层析作用下,到达包被有 α -hCG 单克隆抗体的检测区(T),反应形成三者的复合物,当样本中 hCG 浓度不小于 20mIU/ml,彩色免疫二氧化硅纳米微球在此处于大量聚积时,形成肉眼可见的可显不同颜色条带。在质控线和检测线均出现彩色条带时,可以判断样本阳性,即受检者怀孕。检测线不出现显色条带,而质控线出现显色条带则表示阴性,即受检者未怀孕。若质控线未出现显色条带,则试纸条无效。

[0030] 实施例 4

将大麻抗体、吗啡抗体及其他毒品抗体分别以条带状固定在 T 线区不同位置上,标记有相应的抗体或单克隆抗体的新型彩色免疫微球分别染成不同颜色,然后吸附在结合垫上,当待测样本加到试纸条一端的结合垫上时,通过毛细作用向前移动,溶解结合垫上的新型彩色免疫微球后相互反应,再移动至固定的抗原或抗体的区域时,待测物与相应的新型彩色免疫微球的结合物又与之发生特异性结合而被截留,聚集在检测带上,并形成一条条清晰的显色带,不同的检测物可形成不同颜色的检测带,可通过肉眼清晰的观察到显色结果。即可在短时间内对尿液中多种毒品进行同时检测,结合适当的阴、阳性对照,可判断受检者是否吸食哪种毒品。通过彩色试纸上的显色条数和显示的特定颜色,不仅可以判断所检测的样本中含有几种检测物而且可以准确判定是何种检测物,实现了一次性对多种被测物的同时检测。

[0031] 由于彩色二氧化硅微球具有较好的生物活性,可以很好地吸附核酸,还可制备新型彩色核酸检测试纸产品。

[0032] 本发明虽然已以较佳实施例公开如上,但其并不是用来限定本发明,任何本领域技术人员在不脱离本发明的精神和范围内,都可以利用上述揭示的方法和技术内容对本发明技术方案做出可能的变动和修改,因此,凡是未脱离本发明技术方案的内容,依据本发明的技术实质对以上实施例所做的任何简单修改、等同变化及修饰,均属于本发明技术方案的保护范围。

专利名称(译)	免疫彩色二氧化硅微球的制备方法、彩色试纸及制备方法		
公开(公告)号	CN105137060A	公开(公告)日	2015-12-09
申请号	CN201510493408.1	申请日	2015-08-12
[标]申请(专利权)人(译)	杨磊		
申请(专利权)人(译)	杨磊		
当前申请(专利权)人(译)	杨磊		
[标]发明人	杨磊		
发明人	杨磊		
IPC分类号	G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种新型免疫彩色二氧化硅微球的制备方法及应用该新型免疫彩色二氧化硅微球制备的彩色快速检测试纸和该试纸的制备方法。本发明的新型彩色免疫微球具有制作简单，生物活性好，粒径规则可控，颜色鲜艳，色泽稳定，分散性好，灵敏度高，分散性好且能显色多种颜色等优点，用其开发的产品新型彩色快速检测试纸产品具有检测速度快、操作方便、价格低廉、不仅可以对单一待测物的进行快速检测，也可实现一次性对多种待测物的同时检测。