



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1892223 B

(45) 授权公告日 2012.08.22

(21) 申请号 200610200333.4

审查员 滕文静

(22) 申请日 2006.04.10

(66) 本国优先权数据

200510200227.1 2005.04.11 CN

(73) 专利权人 兰州大学

地址 730000 甘肃省兰州市天水路 222 号

(72) 发明人 李红玉 张波

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/52(2006.01)

(56) 对比文件

CN 1220397 A, 1999.06.23, 全文.

CN 1260490 A, 2000.07.19, 全文.

CN 2618167 Y, 2004.05.26, 权利要求 1, 附图 1.

杨书豪等. 血清甲胎蛋白胶体金免疫层析快速检测法的建立及应用. <Journal of Practical Oncology>. 2004, 第 19 卷 (第 1 期), 48-50.

权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种胶体金半定量法的快速免疫诊断试纸条

(57) 摘要

本发明涉及一种胶体金半定量免疫诊断试纸条的制作和装配方法。该试纸条利用免疫层析原理,可迅速目检出纳米胶体金标记物和样品结合后的颜色,并通过测试区与平行参比区的颜色对比的强弱来判定检测的半定量结果,具有反应迅速,可迅速判定样品中待测物的有无及其含量高低的特性。

1. 一种胶体金半定量法的快速免疫诊断试纸条,该试纸条分为 4 个部分,包括了探样区,标记物结合区,对比检测区,吸水区,所有反应均在层析介质上完成,层析介质是硝酸纤维素膜、醋酸纤维素膜、玻璃纤维膜,支持物采用等宽度固体支持板,整个检测系统用胶固定在固体支持板上,金标记物垫作为标记物结合区,其特征在于该板伸出部分作为检测使用时的手柄,检测膜中间被挖掉了一窄条,窄条平行于试纸条侧边,将检测区分为对称的两个部分,使得两条检测线彼此不连接,一个是检验带,作为样品检验,另一个是半定量带,作为标准浓度显色对照,并兼作质控条带。

2. 根据权利要求 1 所述的一种胶体金半定量法的快速免疫诊断试纸条,其特征在于制作包括以下步骤:(1)试纸条的切割装配方式为选取无菌层析介质薄膜,裁剪成矩形长条,中间作一窄缝,要求窄缝平行于膜侧边,缝距两边等距,缝长长于检测条带点样宽度,检测区条带处于窄缝中间位置,(2)金标记物垫制备方式为用等试纸条宽度的无菌吸水薄海绵吸附做成金标记物垫,(3)半定量带同时又作为质控带的设计方式为检测带喷涂能与金标物特异结合的蛋白,半定量质控带涂参照用蛋白。

3. 根据权利要求 1 至 2 中任意一项所述的一种胶体金半定量法的快速免疫诊断试纸条,其特征在于检测方式分为两种类型:(1)包被抗体检测抗原,半定量条带为包被一定参考浓度的抗原物质,该抗原物质能特异结合胶体金标记的抗体;(2)包被抗原检测抗体,半定量条带为一定参考浓度的抗体物质,该抗体物质能特异结合胶体金标记的 SPA。

4. 根据权利要求 3 所述的一种胶体金半定量法的快速免疫诊断试纸条,其特征在于用于标记抗原或抗体的胶体金颗粒大小在 5nm-40nm 之间。

5. 根据权利要求 1 至 4 中任意一项所述的一种胶体金半定量法的快速免疫诊断试纸条,其特征在于所使用金标记物垫是由吸水海绵来制作并通过 Z 型的方式搭连探样区和检测区。

## 一种胶体金半定量法的快速免疫诊断试纸条

[0001] 技术领域 本发明涉及一种快速半定量检测病原物（抗体或抗原）的纳米胶体金试纸，还涉及到该试纸的设计和装配组织方式。

### 背景技术

[0002] 现有用于免疫诊断的试纸条 (test strip) 在免疫诊断试剂中最为方便和快捷，根据诊断类别，可分为传染性疾病、内分泌、肿瘤、药物检测等。但目前的这些试纸条从结果判断的方法学来看主要以胶体金定性检测为主，检测结果只能判定病原物的有无而不能判定其含量是否高于某种诊断标准。实际应用中，判断某种待检出物的含量多少对于临床诊断来说更具参考价值。对于需要检测传染疾病病原的感染程度、内分泌的失调与否、肿瘤标志物是否高于正常水平及违禁药物摄取量是否超标来说，定性类的胶体金免疫诊断试纸无法提供量化的检测结果。

### 发明内容

[0003] 本发明的目的是为了克服当前免疫诊断的试纸条在实际推广使用中存在的不足和缺陷，提供一种不需要特定仪器设备辅助的、能迅速判定检测结果并能对检测结果进行半定量水平检测（高于或等于或低于标准对比样品的浓度）的免疫诊断试纸，同时提供该试纸的制作和装配方法。

[0004] 半定量法的胶体金快速免疫诊断试纸条的制作和装配方法：该试纸条分为 4 个部分，包括了探样区，标记物结合区，对比检测区，吸水区。所有反应均在层析介质上完成，层析介质可以是硝酸纤维膜 (NC 膜)、醋酸纤维膜、玻璃纤维膜。支持物采用等宽度 PVC 塑料板。整个检测系统用胶固定在 PVC 板上，该板伸出部分作为检测使用时的手柄。检测膜中间被挖掉了一窄条，将检测区分为对称的两个部分，使得两条检测线彼此不连接。一个作为样品检验，另一个作为标准浓度显色对照，并兼作质控条带。

[0005] 该试纸的制备装配方法包括以下步骤：(1) 选择所标记蛋白最适纳米金颗粒大小 (5nm-40nm)。(2) 将所需金标记蛋白测定最适蛋白标记量。(3) 大量制备所选粒度的纳米金蛋白溶胶。(4) 裁剪层析膜（硝酸纤维素膜或醋酸纤维素膜或玻璃纤维素膜）成规定大小，中间作一窄缝，要求平行于膜侧边，缝距两边等距。(5) 固定膜于 PVC 板，固定海绵吸水端，固定探样区海绵吸水垫。(6) 点样在膜的检测区 and 对比质控区。(7) 最后将加入金标蛋白的吸水海绵装配上 PVC 板。

[0006] 本发明的积极意义和效果在于：生产简单，成本低，在原有的金标记体外免疫诊断方法上进一步实现了对临床检测更有意义的半定量检测。检测全过程在 10 分钟内判定结果，可以方便的实现家庭检测和现场检测。具有特异性高，检测程序简单，结果准确可靠。操作人员无需专业培训，按说明书指导即可得到半定量的检测结果。

[0007] 具体实施例一

[0008] (1) 购买甲胎蛋白 (AFP) 免疫小鼠，分别得到抗 AFP 的鼠源性特异单克隆抗体 McAb2B 和 McAb3H。(2) 选择 McAb2B 作为金标记抗体，使用柠檬酸钠还原法制备并测定其

最适标记纳米金颗粒大小为 5nm, 9500rpm/min 转速离心 20 分钟, 制备储液。将 5nm 胶体金和标记单抗进行蛋白最适量测定, PH9.0 硼酸盐缓冲液将标记单抗做 5-50Ug/ml 的梯度液, 加入金储液后再加入 10% NaCl 作稳定实验, 5 分钟后离心静止测 OD580nm, 得光密度稳定时得蛋白浓度为 17ug/ml。制备好后, 加入 PEG 作成胶体金稳定液。(3) 将标记好的金标抗体 McAb2B 用 1cm 宽 1.5cm 长 0.08cm 厚度的无菌吸水海绵吸附作成金标记物垫, 4℃ 黑暗环境, 氮气缓慢吹干待用。(4) 选取无菌硝酸纤维素薄膜, 裁剪成 1cm 宽, 5cm 长的矩形条, 中间作 1mm 窄缝, 要求平行于膜侧边, 缝距两边等距, 缝长 15mm。检测区条带距膜探样端 2.2cm, 处于窄缝中间位置。检测带喷涂 30ug/ml 的 McAb3H, 半定量质控带涂 10ug/ml 甲胎蛋白, 两条带长 0.2cm, 宽 0.05cm。4℃ 黑暗环境过夜, 5% BSA 封闭 10 小时, CO<sub>2</sub> 缓慢吹干。(5) 裁剪同硝酸纤维素膜宽度的洁净 PVC 塑料板, 要求在吸水端多 2cm 作为检测用手柄, 在对应硝酸纤维素膜探样区外多延伸 1.2cm 用强力双面胶将处理好的硝酸纤维素膜固定在 PVC 板上。硝酸纤维素膜吸水区用固定等宽 1.5cm 长 0.25cm 厚度的无菌吸水海绵。探样区固定 1cm 长等宽高级滤纸, 距固定硝酸纤维素膜 0.2cm。中间用制备好的金标记物垫按 Z 型方式压在滤纸和硝酸纤维素膜下面。搭在硝酸纤维素膜上面的用胶贴牢。整个过程要求避免其它蛋白的沾染。即制备成了半定量检测人甲胎蛋白的试纸条。铝箔袋密封 4℃ 度干燥保存备用。

[0009] 在检测前将试纸连包装拿出, 室温放置 5 分钟左右。取出试纸, 将探样区浸于样品溶液中, 液面不要过探样区。2-5 秒后拿出, 水平放置在干净操作台上。6-10 分钟内即可肉眼见到结果。如果样品检测带和半定量带均出现红色, 证明检测阳性。检测带颜色高于半定量带表明样品中存在的人甲胎蛋白高于 10ug/ml 水平。颜色差异不大则样品中存在的人甲胎蛋白接近于 10ug/ml 水平。如果检测带颜色低于半定量带则表明样品中存在的人甲胎蛋白低于 10ug/ml 水平。如果检测带没有看到红色而半定量带看见红色说明待测样品没有检出规定水平上 (10ug/ml) 的人肝细胞肝癌标志物甲胎蛋白, 试纸条装置质量完好。如果检测带没有看到红色而半定量带也没有看见红色说明试纸条装置失效, 已经不能用于检测。

[0010] 具体实施例二

[0011] (1) 购买甲三型流感病毒特异抗原神经氨酸酶 (NA) 和血凝素蛋白免疫小鼠, 分保得到抗两种抗原的鼠源性特异单克隆抗体 IgG1 和 IgG2。(2) 选择 IgG1 作为金标记抗体, 使用柠檬酸钠还原法制备并测定其最适标记纳米金颗粒大小为 15nm, 7300rpm/min 转速离心 20 分钟, 制备储液。将 15nm 胶体金和标记单抗进行蛋白最适量测定, PH9.0 硼酸盐缓冲液将标记单抗作 5-50Ug/ml 的梯度, 加入金储液后再加入 10% NaCl 作稳定实验, 5 分钟后离心静止测 OD580nm, 得光密度稳定时得蛋白浓度为 10ug/ml。制备好后, 加入 PEG 作成胶体金稳定液。(3) 将标记好的金标抗体 IgG1 用 1cm 宽 1.5cm 长 0.08cm 厚度的无菌吸水海绵吸附作成金标记物垫, 4℃ 黑暗环境, 氮气缓慢吹干待用。(4) 选取无菌玻璃纤维膜, 裁剪成 1cm 宽, 5cm 长的矩形条, 中间作 0.8-1mm 窄缝, 要求平行于膜侧边, 缝距两边等距, 缝长 10-15mm。检测区条带距膜探样端 2.2cm, 处于窄缝中间位置。检测带喷涂 30ug/ml 的 IgG2, 半定量质控带涂 20ug/ml 甲三型流感病毒裂解液 (已经用甲醛溶液灭活甲三型流感病毒), 两条带长 0.2cm, 宽 0.05cm。4℃ 黑暗环境过夜, 5% BSA 封闭 10 小时, CO<sub>2</sub> 缓慢吹干。(5) 裁剪同玻璃纤维膜宽度的洁净 PVC 塑料板, 要求在吸水端多 2cm 作为检测用手柄, 在对应玻璃纤维膜探样区外多延伸 1.2cm 用强力双面胶将处理好的玻璃纤维膜固定在 PVC 板上。玻璃纤维膜吸水区用固定等宽 1.5cm 长 0.25cm 厚度的无菌吸水海绵。探样区固定 1cm 长等宽

高级滤纸,距固定玻璃纤维膜 0.2cm。中间用制备好的金标记物垫按 Z 型方式压在滤纸和玻璃纤维膜下面。搭在玻璃纤维膜上面的用胶贴牢。整个过程要求避免其它蛋白的沾染。即制备成了半定量检测人甲三型流感病毒的试纸条。铝箔袋密封 4℃ 度干燥保存备用。

[0012] 在检测前将试纸连包装拿出,室温放置 5 分钟左右。取出试纸,将探样区浸于样品溶液中,液面不要过探样区。2-5 秒后拿出,水平放置在干净操作台上。6-10 分钟内即可肉眼见到结果。如果样品检测带和半定量带均出现红色,证明检测阳性。检测带颜色高于半定量带表明样品中存在的甲三型流感病毒含量高于 20ug/ml 水平。颜色差异不大则样品中存在的甲三型流感病毒含量接近于 20ug/ml 水平。如果检测带颜色低于半定量带则表面样品中存在的甲三型流感病毒含量低于 20ug/ml 水平。如果检测带没有看到红色而半定量带看见红色说明待测样品没有检出规定水平上 (20ug/ml) 含量的甲三型流感病毒,试纸条装置质量完好。如果检测带没有看到红色而半定量带也没有看见红色说明试纸条装置失效,已经不能用于检测。

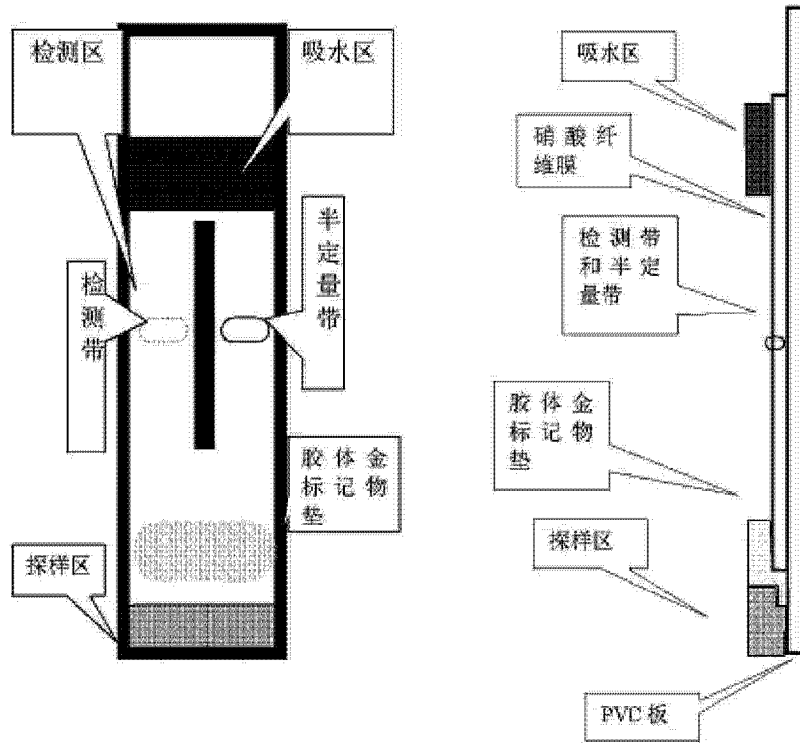
[0013] 具体实施例三

[0014] (1) 购买葡萄球菌蛋白 A (SPA) 纯品测定蛋白含量 (2) 使用柠檬酸钠还原法测定所用 SPA 的最适标记纳米金颗粒大小为 40nm, 2000rpm/min 转速离心 30 分钟, 制备储液。将 40nm 胶体金和 SPA 进行蛋白最适量测定, PH9.0 硼酸盐缓冲液将标记 SPA 作 5-50Ug/ml 的梯度, 加入金储液后加入 10% NaCl 作稳定实验, 5 分钟后离心静止测 OD580nm, 得光密度稳定时得 SPA 蛋白浓度为 4.6ug/ml。制备好后, 加入 PEG 作成胶体金稳定液。(3) 将标记好的金标 SPA 用 1cm 宽 1.5cm 长 0.08cm 厚度的无菌吸水海绵吸附作成金标记物垫, 4℃ 黑暗环境, 氮气缓慢吹干待用。(4) 选取无菌醋酸纤维素薄膜, 裁剪成 1cm 宽, 5cm 长的矩形条, 中间作 0.8-1mm 窄缝, 要求平行于膜侧边, 缝距两边等距, 缝长 10-15mm。检测区条带距膜探样端 2.2cm, 处于窄缝中间位置。检测带喷涂 30ug/ml 的 HCMV 特异性膜抗原 (如 gp52 等), 半定量质控带涂 13.5ug/ml 人血清 IgG, 两条带长 0.2cm, 宽 0.05cm。4℃ 黑暗环境过夜, 5% BSA 封闭 10 小时, CO<sub>2</sub> 缓慢吹干。(5) 裁剪同醋酸纤维素膜宽度的洁净 PVC 塑料板, 要求在吸水端多 2cm 作为检测用手柄, 在对应醋酸纤维素膜探样区外多延伸 1.2cm 用强力双面胶将处理好的醋酸纤维素膜固定在 PVC 板上。醋酸纤维素膜吸水区用固定等宽 1.5cm 长 0.25cm 厚度的无菌吸水海绵。探样区固定 1cm 长等宽高级滤纸, 距固定醋酸纤维素膜 0.2cm。中间用制备好的金标记物垫按 Z 型方式压在滤纸和醋酸纤维素膜下面。搭在醋酸纤维素膜上面的用胶贴牢。整个过程要求避免其它蛋白的沾染。即制备成了半定量检测人巨细胞病毒 (HCMV) 的试纸条。铝箔袋密封 4℃ 度干燥保存备用。

[0015] 在检测前将试纸连包装拿出, 室温放置 5 分钟左右。取出试纸, 将探样区浸于样品溶液中, 液面不要过探样区。2-5 秒后拿出, 水平放置在干净操作台上。6-10 分钟内即可肉眼见到结果。如果样品检测带和半定量带均出现红色, 证明检测阳性。检测带颜色高于半定量带表明样品中存在的抗巨细胞病毒的多抗体高于 13.5ug/ml 水平。颜色差异不大则样品中存在的抗巨细胞病毒的多抗体接近于 13.5ug/ml 水平。如果检测带颜色低于半定量带则表面样品中存在的抗巨细胞病毒的多抗体低于 13.5ug/ml 水平。如果检测带没有看到红色而半定量带看见红色说明待测样品没有检出抗巨细胞病毒的多抗体, 试纸条装置质量完好。如果检测带没有看到红色而半定量带也没有看见红色说明试纸条装置失效, 已经不能用于检测。

附图说明：

[0016] 附图为一种胶体金半定量法的快速免疫诊断试纸条正视图（左图）、侧视图（右图）。



专利名称(译)	一种胶体金半定量法的快速免疫诊断试纸条		
公开(公告)号	<a href="#">CN1892223B</a>	公开(公告)日	2012-08-22
申请号	CN200610200333.4	申请日	2006-04-10
[标]申请(专利权)人(译)	兰州大学		
申请(专利权)人(译)	兰州大学		
当前申请(专利权)人(译)	兰州大学		
[标]发明人	李红玉 张波		
发明人	李红玉 张波		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/52		
审查员(译)	滕文静		
优先权	200510200227.1 2005-04-11 CN		
其他公开文献	CN1892223A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种胶体金半定量免疫诊断试纸条的制作和装配方法。该试纸条利用免疫层析原理，可迅速目检出纳米胶体金标记物和样品结合后的颜色，并通过测试区与平行参比区的颜色对比的强弱来判定检测的半定量结果，具有反应迅速，可迅速判定样品中待测物的有无及其含量高低的特性。

