



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105116151 A

(43) 申请公布日 2015. 12. 02

(21) 申请号 201510541301. X

(22) 申请日 2015. 08. 28

(71) 申请人 中国农业科学院兰州兽医研究所

地址 730050 甘肃省兰州市城关区盐场堡徐家坪 1 号

(72) 发明人 蒋韬 宋阳 孙燕燕 刘湘涛
林跃和

(74) 专利代理机构 兰州振华专利代理有限责任
公司 62102

代理人 张晋

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

权利要求书2页 说明书6页 附图2页

(54) 发明名称

一种免疫层析试纸及其制备、使用方法

(57) 摘要

本发明公开一种具备氧化还原酶活性的、由合金纳米粒子为生物标记物的免疫层析试纸,以及这种试纸的制备及使用方法。本发明试纸是在底板依次线性排列地设置样品吸收垫、包被有 Au-Pt 合金纳米粒子标记蛋白的玻璃纤维材料构成的连接垫、硝酸纤维膜和吸水垫,在硝酸纤维素膜上包被有质控线与检测线。本发明试纸再加上加入苯胺类、酚或吡唑类显色剂即可构成相应的检测试剂盒。本发明可避免现有胶体金检测技术的缺点和不足,能提高检测灵敏度 2-3 个数量,且实验过程的简便,可操作性强,不仅产品有巨大的市场潜力,而且也为检测科学提供了一种新的更为有效的手段。

1. 一种具备氧化还原酶活性的合金纳米材料为标记物的免疫层析试纸的制备方法,其特征在于:

a. 将超纯水依次加入 HAuCl_4 、 H_2PtCl_6 溶液和柠檬酸三钠,搅拌混匀后再在混合液中缓慢滴加 NaBH_4 ,使其颜色由无色变紫色最终变为深红色,得到 Au-Pt 合金纳米粒子溶液;

b. 调整 Au-Pt 合金纳米粒子溶液的 pH 使其适合于将要标记的蛋白等电点,再在其中加入所用的抗体或抗原蛋白,得到免疫 Au-Pt 合金纳米粒子标记蛋白的溶液;

c. 将 Au-Pt 合金纳米粒子标记蛋白用玻璃纤维材料吸附,得到包被有标记抗原的垫;

d. 分别确定用作质控带和检测带的抗原或抗体;

e. 在不透水材料的底板上依次线性固定有吸水材料制成的样品吸收垫、包被有 Au-Pt 合金纳米粒子标记蛋白的玻璃纤维材料构成的连接垫、硝酸纤维膜和吸水材料制成的吸水垫,并确保:样品吸收垫与连接垫间、连接垫与硝酸纤维膜间和硝酸纤维素膜和吸水垫间相互重叠,形成良好连接;

f. 在硝酸纤维膜上分别喷上用作质控带的抗原或抗体的质控线和用作检测带的抗原或抗体的检测线,其中检测线与质控线两线间距离保持在一合适的距离,得到试纸;

g. 再将试纸切割成所需要宽度的条状。

2. 根据权利要求 1 所述的制备方法,其特征在于:首先在超纯水 40.0 mL 中依次加入 $490 \mu\text{L } 2.9 \times 10^{-2} \text{ mol/L HAuCl}_4$ 和 $10 \mu\text{L } 2.9 \times 10^{-2} \text{ mol/L H}_2\text{PtCl}_6$ 溶液,及 3.5 mL 10 mg/mL 的柠檬酸三钠并搅拌混匀,再向混合液中缓慢滴加 3.5 mL 新配制的 0.5 mg/mL NaBH_4 ,最后用水定容至 50 mL,得到 Au-Pt 合金纳米粒子溶液。

3. 权利要求 1 或 2 制备方法制备的试纸。

4. 权利要求 3 所述的试纸使用方法,其特征在于先将含有被检测物抗原或抗体的溶液滴在样品吸收垫上,使其与试纸上的包被有 Au-Pt 合金纳米粒子标记蛋白的玻璃纤维材料的区域以及硝酸纤维膜区域进行反应,待反应结束后,再向硝酸纤维膜区域加入苯胺类、酚或咪唑类显色剂进行显色,即可根据试纸上是否同时显现蓝黑色的质控带和检测带确定被检样品的阴阳性,或者再利用呈色分析仪或其它读取设备进行分析,得出定量或半定量的检测结果。

5. 权利要求 4 所述的试纸使用方法用于非疾病诊断的检测方法。

6. 一种具备氧化还原酶活性的合金纳米材料为标记物的免疫层析检测盒,其特征在于检测盒包括有权利要求 3 所述的试纸,以及苯胺类或酚或咪唑类的显色剂。

7. 一种可定量检测 O 型口蹄疫病毒的免疫层析试纸,包括:底板、设置于底板上依次线性排列的样品吸收垫、包被有 Au-Pt 合金纳米粒子标记蛋白的玻璃纤维材料构成的连接垫、硝酸纤维膜和吸水纸,在硝酸纤维素膜上包被有质控线与检测线,样品吸收垫与连接垫间、连接垫与硝酸纤维膜间和硝酸纤维素膜和吸水纸间相互重叠连接,其特征在于:包被有 Au-Pt 合金纳米粒子标记蛋白的玻璃纤维材料构成的连接垫蛋白为与 Au-Pt 合金纳米粒子相结合的 O 型标准株豚鼠纯化抗体,检测线包被的是口蹄疫 O 型流行株兔纯化抗体,质控线为羊抗豚鼠抗体。

8. 一种可定量检测 p53 的免疫层析试纸,包括:底板、设置于底板上依次线性排列的样品吸收垫、包被有 Au-Pt 合金纳米粒子标记蛋白的玻璃纤维材料构成的连接垫、硝酸纤维膜和吸水纸组成,在硝酸纤维素膜上包被有质控线与检测线,样品吸收垫与连接垫间、连接

垫与硝酸纤维膜间和硝酸纤维素膜和吸水纸间相互重叠连接,其特征在于:包被有 Au-Pt 合金纳米粒子标记蛋白的玻璃纤维材料构成的连接垫上的蛋白为与 Au-Pt 合金纳米粒子相结合的兔抗 p53 抗体,检测线包被的是鼠抗 p53 单克隆抗体,质控线为羊抗兔抗体。

9. 权利要求 7 或 8 所述的试纸使用方法,其特征在于先将含有被检测物抗原或抗体的溶液滴在该试纸上的样品吸收垫,使其在包被有 Au-Pt 合金纳米粒子的玻璃纤维材料的区域和硝酸纤维素膜的区域进行反应,待反应结束后,再向硝酸纤维素膜上的反应区加入苯胺类、酚或吡唑类显色剂进行显色,即可根据试纸上是否同时显现蓝黑色的质控带和检测带确定被检样品的阴阳性,或者再利用呈色分析仪或其它读取设备进行分析,得出定量或半定量的检测结果。

一种免疫层析试纸及其制备、使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种免疫层析试纸及其制备、使用方法,特别是涉及一种具备氧化还原酶活性的、由合金纳米粒子为生物标记物的免疫层析试纸,以及这种试纸的制备及使用方法。

背景技术

[0002] 以胶体金为代表的层析技术已发展了 20 多年,目前仍然广泛应用,但由于只能用于定性或半定量的检测,难以满足临床检测指标定量化的要求;同时检测结果靠肉眼判断,特别是在检测结果呈弱阳性时,极易造成人为漏检现象,因此存在灵敏度较低等问题,需要进一步完善。而新型的一些免疫层析技术不存在胶体金需大量聚集才能显色的缺点,以其特有的信号放大系统可以提高检测灵敏度,减少样品的本底干扰,拥有传统标记物所无法比拟的优势。

[0003] 免疫层析技术作为 POCT 应用最为广泛的技术已深入到疾病、毒品、环境等各个方面,它最大的优势就是快速、简便适用于室内和野外检测。胶体金作为标志物一直是目前应用的主流。它可以直接肉眼观察结果,不需要任何设备。新型的荧光、上转换材料、量子点也是发展趋势,它们提高了灵敏度,但需要特定的设备与专业人员。

[0004] 免疫层析快速检测技术的主要发展方向有: 1. 提高检测的灵敏度,缩小与相应的定量免疫分析之间的差距。提高灵敏度无疑会拓宽免疫层析分析的检测范围,而采用信号聚集放大系统或采用一些新标记物,并结合一些相应的简单检测仪器可能是最有希望的途径之一。2. 实现半定量和量化。定性检测的结果只有阳性和阴性,而一些物质的含量常于一定的范围变动,仅给出阳性或阴性,结果不能令人满意。因此免疫层析技术正朝着定量、高灵敏度等方向发展。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种可克服现有技术不足、不仅可以实现肉眼观察的定性检测,也可以利用读取设备完成实验结果的定量检测的免疫层析试纸,及其制备方法和使用方法。

[0006] 本发明的这种免疫层析试纸的制备方法是:

- a. 将超纯水依次加入 HAuCl_4 、 H_2PtCl_6 溶液和柠檬酸三钠,搅拌混匀后再在混合液中缓慢滴加 NaBH_4 ,使其颜色由无色变紫色最终变为深红色,得到 Au-Pt 合金纳米粒子溶液;
- b. 调整 Au-Pt 合金纳米粒子溶液的 pH 使其适合于将要标记的蛋白等电点,再在其中加入所用的抗体或抗原蛋白,得到免疫 Au-Pt 合金纳米粒子标记蛋白的白溶液;
- c. 将 Au-Pt 合金纳米粒子标记蛋白用玻璃纤维材料吸附,得到免疫 Au-Pt 合金纳米粒子包被有标记抗原的垫;
- d. 分别确定用作质控带和检测带的抗原或抗体;
- e. 在不透水材料的底板上依次线性固定有吸水材料制成的样品吸收垫(通常采用的

吸水材料为玻璃纤维材料)、包被有 Au-Pt 合金纳米粒子标记蛋白的玻璃纤维材料构成的连接垫、硝酸纤维膜和吸水材料制成的吸水纸,并确保:样品吸收垫与连接垫间、连接垫与硝酸纤维膜间和硝酸纤维素膜和吸水垫间相互重叠,形成良好连接;

f. 在硝酸纤维膜上分别喷上用作质控带的抗原或抗体的质控线和用作检测带的抗原或抗体的检测线,其中检测线与质控线两线间距离保持在一合适的距离,得到试纸;

g. 再将试纸切割成所需要宽度的条状。

[0007] 本发明制备方法中 Au-Pt 合金纳米粒子溶液制备的优选方法是:在超纯水 40.0 mL 中依次加入 490 μ L 2.9×10^{-2} mol/L HAuCl_4 和 10 μ L 2.9×10^{-2} mol/L H_2PtCl_6 溶液,及 3.5 mL 10 mg/mL 的柠檬酸三钠并搅拌混匀,再向混合液中缓慢滴加 3.5 mL 新配制的 0.5 mg/mL NaBH_4 ,最后用水定容至 50 mL,得到 Au-Pt 合金纳米粒子溶液。

[0008] 在确定具体的标记蛋白、及检测线、质控线抗原或抗体后,依据前述的制备方法即可制备出相应的试纸。

[0009] 本发明的试纸使用方法是:先将含有被检测物抗原或抗体的溶液滴在试纸上包被有 Au-Pt 合金纳米粒子标记蛋白的玻璃纤维材料区域和硝酸纤维膜区域进行反应,待反应结束后,再向硝酸纤维膜上的反应区加入苯胺类、酚或吡啶类显色剂进行显色,即可根据试纸上是否同时显现蓝黑色的质控带和检测带确定被检样品的阴阳性,或者再利用呈色分析仪或其它读取设备进行分析,得出定量或半定量的检测结果。

[0010] 前述的本发明试纸使用方法可作为一种用于非疾病诊断的检测方法。

[0011] 用本发明所述的试纸,再加上苯胺类或酚或吡啶类的显色剂,即可构成一种具备氧化还原酶活性的合金纳米材料为标记物的免疫层析检测盒。

[0012] 作为本发明的试纸的一个具体的检测试纸是一种可定量检测 O 型口蹄疫病毒的免疫层析试纸,它包括:底板、设置于底板上依次线性排列的样品吸收垫、包被有 Au-Pt 合金纳米粒子标记蛋白的玻璃纤维材料构成的连接垫、硝酸纤维膜和吸水纸,在硝酸纤维素膜上包被有质控线与检测线,样品吸收垫与连接垫间、连接垫与硝酸纤维膜间和硝酸纤维素膜和吸水纸间相互重叠连接,其中:包被有 Au-Pt 合金纳米粒子标记蛋白的玻璃纤维材料构成的连接垫蛋白为与 Au-Pt 合金纳米粒子相结合的 O 型标准株豚鼠纯化抗体,检测线包被的是口蹄疫 O 型流行株兔纯化抗体,质控线为羊抗豚鼠抗体。

[0013] 本发明的另一个具体的检测试纸是一种可定量检测 p53 的免疫层析试纸,它包括:底板、设置于底板上依次线性排列的样品吸收垫、包被有 Au-Pt 合金纳米粒子标记蛋白的玻璃纤维材料构成的连接垫、硝酸纤维膜和吸水纸组成,在硝酸纤维素膜上包被有质控线与检测线,样品吸收垫与连接垫间、连接垫与硝酸纤维膜间和硝酸纤维素膜和吸水纸间相互重叠,其中:包被有 Au-Pt 合金纳米粒子标记蛋白的玻璃纤维材料构成的连接垫上的蛋白为与 Au-Pt 合金纳米粒子相结合的兔抗 p53 抗体,检测线包被的是鼠抗 p53 单克隆抗体,质控线为羊抗兔抗体。

[0014] 本发明这两种具体的检测试纸使用时,先将含有被检测物抗原或抗体的溶液滴在该试纸层析膜上的反应区进行反应,待反应结束后,再向硝酸纤维膜的反应区加入苯胺类、酚或吡啶类显色剂进行显色,即可根据试纸上是否同时显现蓝黑色的质控带和检测带确定被检样品的阴阳性,或者再利用呈色分析仪或其它读取设备进行分析,得出定量或半定量的检测结果。

[0015] 需说明的是本发明的试纸在用于非疾病诊断的检测时,当被检测物在试纸层析膜上的反应区反应结束后,在试纸上并不出现相应的显色,但再向层析膜上的反应区加入苯胺类、酚或咪唑类显色剂进行显色后,即可使质控带或 / 和检测带显现极明显的蓝黑色,使其不仅可以实现肉眼观察的定性检测,也可以利用读取设备完成实验结果的定量或半定量检测。本发明的这一特点即可克服现有胶体金试纸检测技术的缺点和不足,同时又有现有胶体金试纸检测技术所不能实现的定量或半定量检测功能。

[0016] 当前新型示踪材料发展迅猛,包括稀土元素、荧光乳胶、荧光微球、量子点、磁珠等。

[0017] 虽然合金的类酶性质被广泛的了解,但其常规多应用于电化学领域,由于它无色,无发射光谱,因此没有人选择它作为免疫层析试纸的标志物。因为既不能肉眼观察,也不能用设备检测。

[0018] 本发明利用合金代替纳米金作为标记物,建立了这种新型的免疫层析试纸。这种试纸应用时即可继续保持胶体金试纸检测快速、简便、不需要设备与技术人员的特点,又可以比传统金胶显色提高 100-1000 倍,同时它为未来合金材料在免疫层析技术领域的应用提供了崭新的思路。本发明的优点在于:首次利用合金氧化还原酶活性,将其创造性应用于免疫层析试纸实验。通过 TMB 显色后使检测结果有明显的显色放大效应。不仅可以实现肉眼观察的定性检测,也可以利用读取设备实现实验结果的定量。由于光谱仪是通过颜色深浅来定量,不需要特别的设计,因此目前任何商品化检测胶体金的试纸读取设备都可以在它上面进行应用。改发明方法的建立打破传统的试纸建立模式,开创了免疫层析标志物选择新方向,也使传统胶体金试纸的应用模式有了跨越式的发展。通过 TMB 显色后使检测结果得到明显的显色放大效应。避免现有胶体金检测技术的缺点和不足,利用本发明可提高肉眼可见的定性分析灵敏度,能实现灵敏度 2-3 个数量级的提高。由于其实验过程的简便与可操作性,相信未来该发明可作为替代胶体金检测方法的替代方法和替代检测试剂盒,不仅将会具有巨大的市场潜力,而且也为检测科学提供了一种新的更为有效的检测手段。

附图说明

[0019] 图 1 为本发明试纸结构示意图,其中:底衬 -1,硝酸纤维素膜 -2,吸水纸 -3,包被有合金标记抗原的玻璃纤维膜的连接垫 -4,样品吸收垫 -5,质控带 -6 和检测带 -7。

[0020] 图 2 为 Au-Pt 合金纳米粒子透射电镜图(左图)和扫描电镜图(右图)。

[0021] 图 3 为实施例 1 试纸结果示意图。

[0022] 图 4 为实施例 2 试纸结果示意图。

具体实施方式

[0023] 本发明以下结合两个实际的检测试纸实例进行解说。

[0024] 实施例 1_ 以 Au-Pt 合金纳米材料为标记物定量检测 p53 的免疫层析试纸的制备及使用

1. Au-Pt 合金纳米材料的制备

将超纯水 40.0 mL 置于洁净的锥形瓶内,在搅拌下依次加入 490 μ L 2.9×10^{-2} mol/L HAuCl₄和 10 μ L 2.9×10^{-2} mol/L H₂PtCl₆溶液,及 3.5 mL 10 mg/mL 的柠檬酸三钠于锥形

瓶中，搅拌混匀，向混合液中缓慢滴加 3.5mL 新配制的 0.5 mg/mL NaBH_4 ，其颜色由无色变紫色最终变为深红色，继续搅拌 10 min。用水定容至 50mL，得到金铂纳米合金。

[0025] 2. Au-Pt 合金纳米粒子标记 p53 蛋白的制备

将步骤A中制得的Au-Pt合金纳米粒子溶液用0.1 mol/L HCl或0.02mol/L K_2CO_3 调整PH为2-9,然后在最适浓度20ug/ml的Au-Pt合金纳米粒子溶液中按6.5ug/ml的最佳标记量加入兔抗p53抗体,室温搅拌1h,然后加入10%BSA孵育30min,混合物用含1%BSA的PBS缓冲液洗涤,以8000r/min离心10min后弃上清得到沉淀,将沉淀悬浮于1/10初始Au-Pt合金纳米粒子溶液体积的缓冲液(pH 8.5含10mM PBS, 0.25% Tween-20, 10%蔗糖, 5%BSA)中,悬浮溶解,备用,以涂覆玻璃纤维膜4。

[0026] 3. 含有质控带6和检测带7的硝酸纤维素膜2的制备

将鼠抗p53单克隆抗体调整至1mg/ml,羊抗兔抗体调整至0.5 mg/ml的工作浓度,分别喷涂于硝酸纤维素膜2上,形成检测带7与质控带6,37°C干燥2h,保存备用。

[0027] 4. 涂覆有 Au-Pt 合金纳米粒子的玻璃纤维膜 4 的制备

取玻璃纤维膜4,将Au-Pt合金纳米粒子标记好的兔抗p53抗体喷涂于玻璃纤维膜4上,形成结合垫,37°C干燥2h,保存备用。

[0028] 5. 样品吸收垫 5 的制备

样品吸收垫5需要先用含有10mM PBS, 0.1% (w/v) Tween-20, 和1% (w/v) PVP(聚乙烯吡咯烷酮)pH 8.5的缓冲液预先处理,37°C干燥2h,保存备用。

[0029] 6. 试纸的组装

在底衬(1),一般采PVS材料,上顺次相互搭接地粘贴样品吸收垫5、涂覆有Au-Pt合金纳米粒子的玻璃纤维膜4、硝酸纤维素膜2以及吸水纸3,按照要求切割成4mm宽度的试纸,即制成以Au-Pt合金纳米材料为标记物定量检测p53的免疫层析试纸。

[0030] 7. 样品检测

取3条免疫层析试纸,分别为胶体金标记免疫层析试纸1条和Au-Pt合金纳米粒子标记免疫层析试纸2条。将50u1的样品溶液分别滴加在这些试纸的样品吸收垫上,在硝酸纤维素膜上完成抗原抗体反应后,直接在其中1条Au-Pt合金纳米粒子标记免疫层析试纸的反应区(T LINE与C LINE)加入经20×稀释的TMB溶液,10-20min后,观察结果参见附图3。

附图3中A、B、C、D各图为在不同的p53蛋白浓度条件下的反应结果,其中:(A) 0ng/ml, (B) 10ng/ml, (C) 100ng/ml, (D) 500ng/ml。图3的A、B、C、D各图中均有三条试纸,其中左侧一条是现有的胶体金标记免疫层析试纸,中间一条是本发明的Au-Pt合金纳米粒子标记免疫层析试纸在与被检物反应后不加TMB显色时的情形,右侧一条为本发明的Au-Pt合金纳米粒子标记免疫层析试纸在与被检物反应后加入TMB显色后的情形,各试纸的上部条带为质控带;下部条带为检测带。

[0031] 8. 对比检测结果:

对于阴性样品,无论胶体金试纸还是本发明的试纸均只有质控带显色,检测带均不显色,且胶体金试纸的质控带呈浅红色,而本发明的试纸则呈蓝黑色。

[0032] 对于阳性样品,当其浓度为10ng/ml时,胶体金试纸仍只有质控带显浅红色,而检测带不显色,本发明的质控带与检测均带都会明显的蓝黑色;当被检浓度为100ng/ml时,

胶体金试纸的质控带与检测带会显浅红色,但其检测带显色不十分明显,而本发明的质控带与检测带均呈现明显的蓝黑色;当被检样品的浓度为 250ng/ml 时,胶体金试纸的质控带与检测带均会显浅红色,但其质控带显色不十分明显,而本发明的质控带与检测带均会呈现明显的蓝黑色。

[0033] 通过一个简便的呈色分析仪分析结果可得,用 Au-Pt 合金纳米粒子标记免疫层析试纸的检测范围是胶体金标记免疫层析试纸和蓝色乳胶颗粒标记免疫层析试纸的 1000 倍,是普通磁性纳米粒子标记免疫层析试纸的 100 倍。

[0034] 实施例 2_ 以 Au-Pt 合金纳米材料为标记物定量检测 O 型口蹄疫病毒的免疫层析试纸的制备及使用

1. Au-Pt 合金纳米材料的制备

将超纯水 40.0 mL 置于洁净的锥形瓶内,在搅拌下依次加入 490 μ L 2.9×10^{-2} mol/L H₂AuCl₄和 10 μ L 2.9×10^{-2} mol/L H₂PtCl₆溶液,及 3.5 mL 10 mg/mL 的柠檬酸三钠于锥形瓶中,搅拌混匀,向混合液中缓慢滴加 3.5mL 新配制的 0.5 mg/mL NaBH₄,其颜色由无色变紫色最终变为深红色,继续搅拌 10 min。用水定容至 50mL,得到金铂纳米合金。

[0035] 2. Au-Pt 合金纳米粒子标记 O 型口蹄疫病毒蛋白及纯化抗体的制备

将步骤 A 中制得的 Au-Pt 合金纳米粒子溶液用 0.1 mol/L HCl 或 0.02mol/L K₂CO₃调整 PH 为 2-9,然后在最适浓度 20ug/ml 的 Au-Pt 合金纳米粒子溶液中按 80ug/ml 的最佳标记量加入 O 型标准株豚鼠纯化抗体,室温搅拌 1h,然后加入 10%BSA 孵育 30min,混合物用含 1%BSA 的 PBS 缓冲液洗涤,以 8000r/min 离心 10min 后弃上清得到沉淀,将沉淀悬浮于 1/10 初始 Au-Pt 合金纳米粒子溶液体积的缓冲液 (pH 8.5 含 10mM PBS, 0.25% Tween-20, 10% 蔗糖, 5% BSA) 中,悬浮溶解,备用,以涂覆玻璃纤维膜 4。

[0036] 3. 含有质控带 6 和检测带 7 的硝酸纤维素膜 2 的制备

将口蹄疫 O 型流行株兔纯化抗体调整至 1.0-2.0mg/ml,羊抗豚鼠抗体调整至 0.5-1.0 mg/ml 的工作浓度,分别喷涂于硝酸纤维素膜 2 上,形成检测带 7 与质控带 6,37°C 干燥 2h,保存备用。

[0037] 4. 涂覆有 Au-Pt 合金纳米粒子的玻璃纤维膜 4 的制备

取玻璃纤维膜 4,将 Au-Pt 合金纳米粒子标记好的 O 型标准株豚鼠纯化抗体喷涂于玻璃纤维膜 4 上,形成结合垫,37°C 干燥 2h,保存备用。

[0038] 5. 样品吸收垫 5 的制备

样品吸收垫 5 需要先用含有 10mM PBS, 0.1% (w/v) Tween-20, 和 1% (w/v) PVP(聚乙烯吡咯烷酮) pH 8.5 的缓冲液预先处理,37°C 干燥 2h,保存备用。

[0039] 6. 试纸的组装

在底衬 1 上顺次相互搭接地粘贴样品吸收垫 5、涂覆有 Au-Pt 合金纳米粒子的玻璃纤维膜 4、硝酸纤维素膜 2 以及吸水纸 3,按照要求切割成 4mm 宽度的试纸,即制成以 Au-Pt 合金纳米材料为标记物定量检测 O 型口蹄疫病毒的免疫层析试纸。

[0040] 7. 样品检测

取 3 条免疫层析试纸,分别为胶体金标记免疫层析试纸 1 条和 Au-Pt 合金纳米粒子标记免疫层析试纸 2 条。将 50 μ l 的样品溶液分别滴加在这些试纸的样品吸收垫上,在完成抗原抗体硝酸纤维素膜上反应后,直接在其中 1 条 Au-Pt 合金纳米粒子标记免疫层析试纸的

反应区(T LINE 与 C LINE)加入经 20× 稀释的 TMB 溶液,10-20min 后,观察结果参见附图 4。附图 4 中 A、B、C、各图为在不同的 O 型口蹄疫病毒浓度条件下的反应结果,其中:(A) 0ng/ml, (B) 100ng/ml, (C) 200ng/ml。图 4 的 A、B、C 各图中均有三条试纸,其中左侧一条是现有的胶体金标记免疫层析试纸,中间一条是本发明的 Au-Pt 合金纳米粒子标记免疫层析试纸在与被检物反应后不加 TMB 显色时的情形,右侧一条为本发明的 Au-Pt 合金纳米粒子标记免疫层析试纸在与被检物反应后加入 TMB 显色后的情形,各试纸的上部条带为质控带;下部条带为检测带。

[0041] 8. 结果判定:

阳性:质控带与检测带都会显色;阴性:只有质控带显色。

[0042] 对比检测结果:

对于阴性样品,无论胶体金试纸还是本发明的试纸均只有质控带显色,检测带均不显色,且胶体金试纸的质控带呈浅红色,而本发明的试纸则呈蓝黑色。

[0043] 对于阳性样品,当其浓度为 100ng/ml 时,胶体金试纸仍只有质控带显浅红色,而检测带不显色,本发明的质控带与检测均带都会明显的蓝黑色;当被检浓度为 200ng/ml 时,胶体金试纸的质控带与检测带均会显浅红色,但其质控带显色不十分明显,而本发明的质控带与检测带均会呈现明显的蓝黑色。

[0044] 通过一个简便的呈色分析仪分析结果可得,用 Au-Pt 合金纳米粒子标记免疫层析试纸的检测范围是胶体金标记免疫层析试纸和蓝色乳胶颗粒标记免疫层析试纸的 1000 倍,是普通磁性纳米粒子标记免疫层析试纸的 100 倍。

[0045] 通过实施例 1 和 2 还可看出,当被检蛋白浓度增大时,其检测带的色度随之加深,由此可见,利用本发明通过相应的分析仪,如 CHR-100 呈色分析仪,即可实现定量或半定量检测。

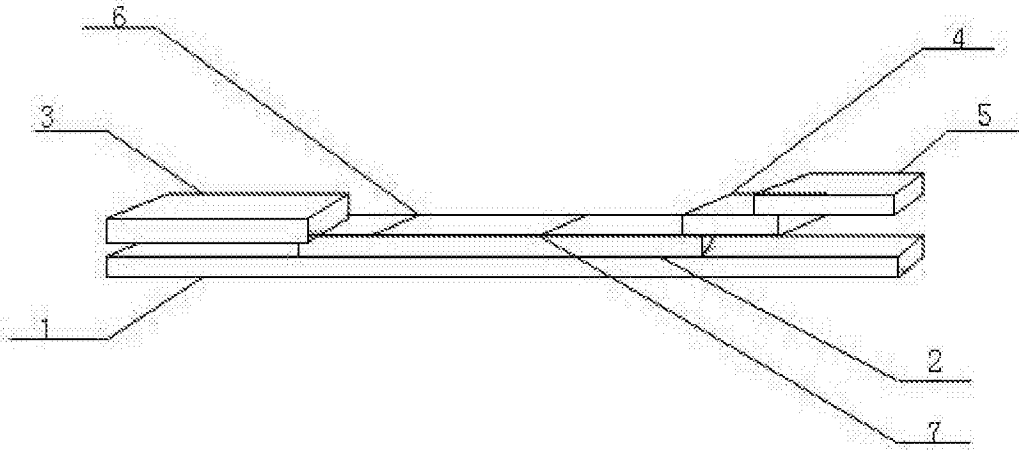


图 1

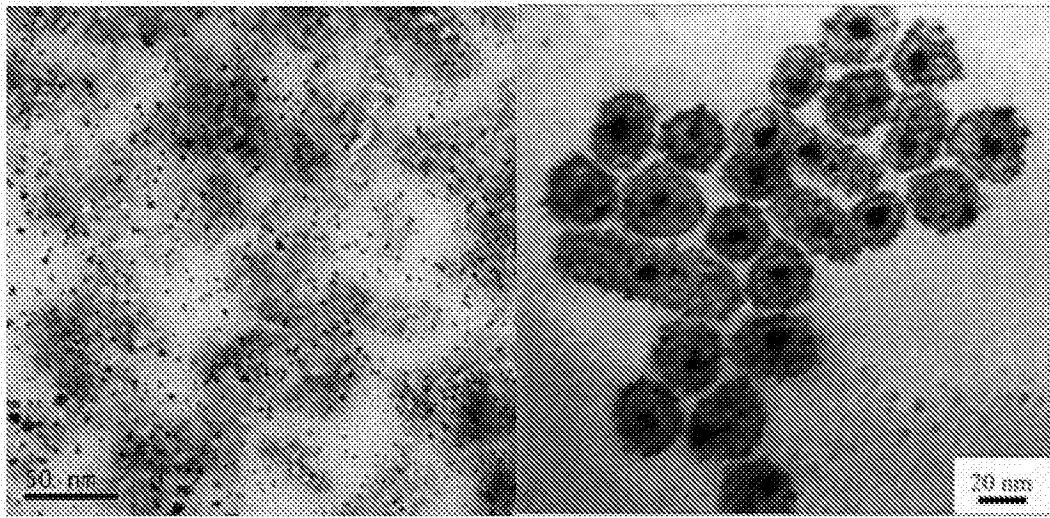


图 2

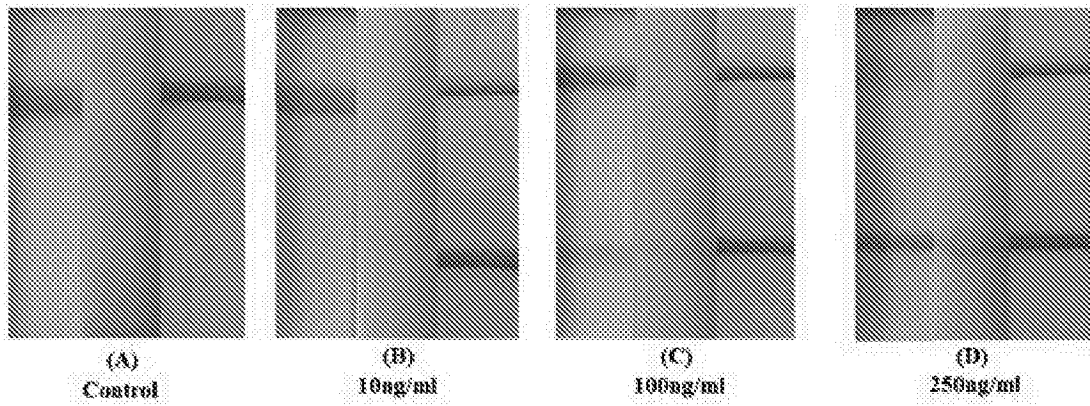


图 3

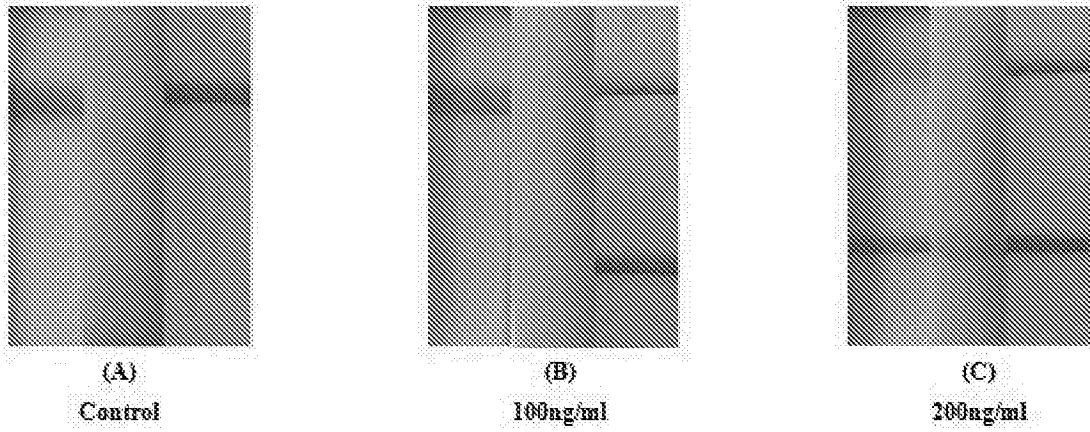


图 4

专利名称(译)	一种免疫层析试纸及其制备、使用方法		
公开(公告)号	CN105116151A	公开(公告)日	2015-12-02
申请号	CN201510541301.X	申请日	2015-08-28
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业科学院兰州兽医研究所		
申请(专利权)人(译)	中国农业科学院兰州兽医研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业科学院兰州兽医研究所		
[标]发明人	蒋韬 宋阳 孙燕燕 刘湘涛 林跃和		
发明人	蒋韬 宋阳 孙燕燕 刘湘涛 林跃和		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/532 G01N33/577		
代理人(译)	张晋		
其他公开文献	CN105116151B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开一种具备氧化还原酶活性的、由合金纳米粒子为生物标记物的免疫层析试纸，以及这种试纸的制备及使用方法。本发明试纸是在底板依次线性排列地设置样品吸收垫、包被有Au-Pt合金纳米粒子标记蛋白的玻璃纤维材料构成的连接垫、硝酸纤维膜和吸水垫，在硝酸纤维素膜上包被有质控线与检测线。本发明试纸再加上加入苯胺类、酚或吡啶类显色剂即可构成相应的检测试剂盒。本发明可避免现有胶体金检测技术的缺点和不足，能提高检测灵敏度2-3个数量，且实验过程的简便，可操作性强，不仅产品有巨大的市场潜力，而且也为检测科学提供了一种新的更为有效的手段。

