



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 106153883 A

(43) 申请公布日 2016. 11. 23

(21) 申请号 201510144273. 8

(22) 申请日 2015. 03. 26

(71) 申请人 中国农业科学院油料作物研究所

地址 430000 湖北省武汉市武昌区徐东二路
2号

申请人 南京瑞启生物科技有限公司

(72) 发明人 吴刚 李均 武玉花 李晓飞

李允静 朱莉 王锐

(51) Int. Cl.

G01N 33/531(2006. 01)

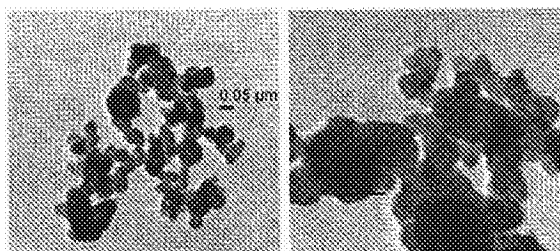
权利要求书1页 说明书3页 附图1页

(54) 发明名称

一种可用于快速诊断的免疫胶体碳的制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种可用于快速诊断的免疫胶体碳的制备方法,主要包括以下步骤:步骤一:向100g 碳粉中加入超纯水,定容至 500ml,搅拌溶解后静置 20 ~ 60 分钟放入离心机中离心,收集上清液于干净的烧杯中;步骤二:向步骤一的溶液中加入 0. 5g 的十六烷基三乙基溴化铵,并定容至 500ml,即溶液中碳粉的终浓度为 20%, CTAB 的终浓度为 0. 1%;步骤三:将步骤二所得溶液进行超声破碎,使之成为悬浮状的胶体碳纳米颗粒溶液,至电镜下观察颗粒直径覆盖范围由数十纳米至数百纳米不等为止;步骤四:向步骤三所得溶液中加入 100ml 的无水乙醇,充分搅匀后,加入 10ml 硅烷化试剂并搅拌,通入氮气情况下,50 ~ 60℃ 反应 4 ~ 10 小时;步骤五:待反应结束后,用无水乙醇清洗 3 ~ 5 次,然后再用 0. 02M PBS 缓冲液洗涤 3 ~ 5 次,至此,制备完成表面带有游离氨基基团的胶体碳纳米颗粒。



1. 一种可用于快速诊断的免疫胶体碳的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

步骤一:向 100g 碳粉中加入超纯水,定容至 500ml,搅拌溶解后静置 20 ~ 60 分钟放入离心机中离心,收集上清液于干净的烧杯中;

步骤二:向步骤一的溶液中加入 0.5g 的十六烷基三乙基溴化铵,并定容至 500ml,即溶液中碳粉的终浓度为 20%,CTAB 的终浓度为 0.1%;

步骤三:将步骤二所得溶液进行超声破碎,使之成为悬浮状的胶体碳纳米颗粒溶液,至电镜下观察颗粒直径覆盖范围由数十纳米至数百纳米不等为止;

步骤四:向步骤三所得溶液中加入 100ml 的无水乙醇,充分搅匀后,加入 10ml 硅烷化试剂并搅拌,通入氮气情况下,50 ~ 60℃反应 4 ~ 10 小时;

步骤五:待反应结束后,用无水乙醇清洗 3 ~ 5 次,然后再用 0.02M PBS 缓冲液洗涤 3 ~ 5 次,至此,制备完成表面带有游离氨基基团的胶体碳纳米颗粒。

2. 根据权利要求 1 所述的可用于快速诊断的免疫胶体碳的制备方法,其特征在于,步骤一中搅拌溶解之后静置 30 分钟放入离心机中离心。

3. 根据权利要求 1 所述的可用于快速诊断的免疫胶体碳的制备方法,其特征在于,步骤一中离心机的离心力为 12000g,离心时间为 30 分钟。

4. 根据权利要求 1 所述的可用于快速诊断的免疫胶体碳的制备方法,其特征在于,步骤四中加入 10ml 硅烷化试剂后搅拌时,搅拌速度为 200 转 / 分钟。

5. 根据权利要求 1 所述的可用于快速诊断的免疫胶体碳的制备方法,其特征在于,步骤四中反应温度为 55℃,反应时间为 8 小时。

6. 根据权利要求 1 所述的可用于快速诊断的免疫胶体碳的制备方法,其特征在于,步骤四中 PBS 缓冲液选用 PH7.4 的缓冲液。

7. 根据权利要求 1 所述的可用于快速诊断的免疫胶体碳的制备方法,其特征在于,步骤三中的超声破碎选用的破碎机参数:超声变幅杆直径 6,输出功率 60%,破碎时间:超声开时 3 秒,关时 3 秒,总时长 5 分钟。

一种可用于快速诊断的免疫胶体碳的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫化学技术领域,具体的涉及一种可用于快速诊断的免疫胶体碳的制备技术。

背景技术

[0002] 研究表明,金或者碳的纳米颗粒或者胶体可具有与其块体形式显著不同的化学及物理性质。最初,胶体金技术被应用于电镜水平研究、光显微细胞化学、免疫共沉淀以及蛋白质染色免疫检测类试剂领域,后续被引入免疫诊断领域中,尤其在医学检验的快速诊断领域中显现出巨大的应用价值。

[0003] 本发明所制备胶体碳相较于胶体金而言,具备一系列优越性:较胶体金更易制备,更易实现规模化生产且批间差小;胶体碳黑白信噪比更高,而胶体金红白对照不易辨别且易受全血检测的影响;检测动力学范围更广,大大降低了胶体金易出现的HOOK效应的可能性;较胶体金更稳定,可于室温下保存更久;固态碳对环境友好,避免了胶体金技术出现的环境重金属污染的情况;另,碳来源广泛,价格低廉,而金属属于稀有金属,来源受限,价格昂贵。综上所述,胶体碳技术克服了胶体金技术的众多缺点,胶体碳可成为胶体金的完美替代。

发明内容

[0004] 针对上述情况,本发明提供一种可用于快速诊断的免疫胶体碳制备方法,制备出表面带有游离氨基基团的胶体碳纳米颗粒,胶体碳相对胶体金具备一系列优越性:胶体碳较胶体金更易制备,更易实现规模化生产且批间差小;胶体碳黑白信噪比更高,而胶体金红白对照不易辨别且易受全血检测的影响;检测动力学范围更广,大大降低了胶体金易出现的HOOK效应的可能性;较胶体金更稳定,可于室温下保存更久;固态碳对环境友好,避免了胶体金技术出现的环境重金属污染的情况;另外,碳来源广泛,价格低廉,而金属属于稀有金属,来源受限,价格昂贵。综上所述,胶体碳技术克服了胶体金技术的众多缺点,其可作为新的技术替代胶体金技术,应用于免疫诊断领域,尤其是医学快速检测领域。

[0005] 为了实现上述目的,本发明的技术方案如下:

[0006] 一种可用于快速诊断的免疫胶体碳制备方法,以碳粉作为原料进行胶体碳的制备。采用十六烷基三乙基溴化铵(CTAB)作为保护剂,可以充分阻止碳颗粒聚集,从而保证其以弥散状态存在。后续引入超声破碎步骤,可进一步形成纳米级碳颗粒,同时进一步分散碳颗粒。另外,考虑到胶体碳最终的用途(需偶联大分子),本发明所制备胶体碳携带游离氨基,便于其与生物大分子(如抗体等蛋白质)形成稳定的偶联物。

[0007] 本发明所提供的可用于快速诊断的免疫胶体碳的制备方法,主要包括以下步骤:

[0008] 步骤一:向100g碳粉中加入超纯水,定容至500ml,搅拌溶解后静置20~60分钟放入离心机中离心,收集上清液于干净的烧杯中;

[0009] 步骤二:向步骤一的溶液中加入0.5g的十六烷基三乙基溴化铵(CTAB),并定容至

500ml,即溶液中碳粉的终浓度(质量体积比)为20%,CTAB的终浓度(质量体积比)为0.1%;

[0010] 步骤三:将步骤二所得溶液进行超声破碎,使之成为悬浮状的胶体碳纳米颗粒溶液,至电镜下观察颗粒直径覆盖范围由数十纳米至数百纳米不等为止;

[0011] 步骤四:向步骤三所得溶液中加入100ml的无水乙醇,充分搅匀后,加入10ml硅烷化试剂并搅拌,通入氮气情况下,50~60℃反应4~10小时;

[0012] 步骤五:待反应结束后,用无水乙醇清洗3~5次,然后再用0.02M PBS缓冲液洗涤3~5次,至此,制备完成表面带有游离氨基基团的胶体碳纳米颗粒。

[0013] 优选的,步骤一种搅拌溶解之后静置30分钟放入离心机中离心。

[0014] 优选的,步骤一中离心机的离心力为12000g,离心时间为30分钟。

[0015] 优选的,步骤三中的超声破碎选用的破碎机参数:超声变幅杆Φ6,输出功率60%,破碎时间:超声开时3秒,关时3秒,总时长5分钟。

[0016] 优选的,步骤三中的超声破碎机采用宁波新芝超声波细胞粉碎机,型号:Scientz-11D液。

[0017] 优选的,步骤四中加入10ml硅烷化试剂后搅拌时,搅拌速度为200转/分钟。

[0018] 优选的,步骤四中加入硅烷化试剂购于Thermo公司,货号48927。

[0019] 优选的,步骤四中反应温度为55℃,反应时间为8小时。

[0020] 优选的,步骤四中PBS缓冲液选用PH7.4的PBS缓冲液。

[0021] 本发明的优点是:制备出表面带有游离氨基基团的胶体碳纳米颗粒,胶体碳相对胶体金具备一系列优越性:胶体碳较胶体金更易制备,更易实现规模化生产且批间差小;胶体碳黑白信噪比更高,而胶体金红白对照不易辨别且易受全血检测的影响;检测动力学范围更广,大大降低了胶体金易出现的HOOK效应的可能性;较胶体金更稳定,可于室温下保存更久;固态碳对环境友好,避免了胶体金技术出现的环境重金属污染的情况;另外,碳来源广泛,价格低廉,而金属属于稀有金属,来源受限,价格昂贵。综上所述,胶体碳技术克服了胶体金技术的众多缺点,其可作为新的技术替代胶体金技术,应用于免疫诊断领域,尤其是医学快速检测领域。

附图说明

[0022] 图1为制备出的免疫胶体碳在电镜下胶体碳粒子大小示意图。

[0023] 图2为胶体碳试纸条检测重组蛋白的检测结果图。

[0024] 图3为市售同类试纸条检测上述重组蛋白的检测结果图。

具体实施方式

[0025] 为了使本发明实现的技术手段、创作特征、达成目的与功效易于明白了解,下面结合具体图示,进一步阐述本发明。

[0026] 参见图1~图3,一种可用于快速诊断的免疫胶体碳制备方法,以碳粉作为原料进行胶体碳的制备。采用十六烷基三乙基溴化铵(CTAB)作为保护剂,可以充分阻止碳颗粒聚集,从而保证其以弥散状态存在。后续引入超声破碎步骤,可进一步形成纳米级碳颗粒,同时进一步分散碳颗粒。另外,考虑到胶体碳最终的用途(需偶联大分子),本发明所制备胶

体碳携带游离氨基,便于其与生物大分子(如抗体等蛋白质)形成稳定的偶联物。

[0027] 本发明所提供的可用于快速诊断的免疫胶体碳的制备方法,主要包括以下步骤:

[0028] 步骤一:向 100g 碳粉中加入超纯水,定容至 500ml,搅拌溶解后静置 20 ~ 60 分钟放入离心机中离心,收集上清液于干净的烧杯中;

[0029] 步骤二:向步骤一的溶液中加入 0.5g 的十六烷基三乙基溴化铵 (CTAB),并定容至 500ml,即溶液中碳粉的终浓度(质量体积比)为 20%,CTAB 的终浓度(质量体积比)为 0.1%;

[0030] 步骤三:将步骤二所得溶液进行超声破碎,使之成为悬浮状的胶体碳纳米颗粒溶液,至电镜下观察颗粒直径覆盖范围由数十纳米至数百纳米不等为止;

[0031] 步骤四:向步骤三所得溶液中加入 100ml 的无水乙醇,充分搅匀后,加入 10ml 硅烷化试剂并搅拌,通入氮气情况下,50 ~ 60℃反应 4 ~ 10 小时;

[0032] 步骤五:待反应结束后,用无水乙醇清洗 3 ~ 5 次,然后再用 0.02M PBS 缓冲液洗涤 3 ~ 5 次,至此,制备完成表面带有游离氨基基团的胶体碳纳米颗粒。

[0033] 优选的,步骤一种搅拌溶解之后静置 30 分钟放入离心机中离心。

[0034] 优选的,步骤一中离心机的离心力为 12000g,离心时间为 30 分钟。

[0035] 优选的,步骤三中的超声破碎选用的破碎机参数:超声变幅杆 $\Phi 6$,输出功率 60%,破碎时间:超声开时 3 秒,关时 3 秒,总时长 5 分钟。

[0036] 优选的,步骤四中加入 10ml 硅烷化试剂后搅拌时,搅拌速度为 200 转/分钟。

[0037] 优选的,步骤四中反应温度为 55℃,反应时间为 8 小时。

[0038] 优选的,步骤四中 PBS 缓冲液选用 PH7.4 的缓冲液。

[0039] 胶体碳及胶体金侧向层析快速检测试纸条比较:

[0040] 利用本发明制备的胶体碳制出的 PCT(降钙素原)快速检测试纸条,与市售同类 PCT 胶体金产品进行检测性能比较。

[0041] PCT 胶体碳快速检测试纸条与市售 PCT 胶体金试纸条比较:

[0042] 用 20mm 磷酸盐缓冲液 (PBS) 将 PCT 重组蛋白(购买于 Hytest 公司,1mg/mL) 分别稀释至 0.5ng/mL、5ng/mL、50ng/mL、100ng/mL 以及 500ng/mL,磷酸盐缓冲液 (PBS) 作为阴性对照。将本发明制备的胶体碳试纸条与市售同类试纸条分别检测上述重组蛋白,检测结果见图 2 和图 3,可见胶体碳检测试纸条较胶体金检测试纸条具备更好的信噪比及灵敏度。

[0043] 以上显示和描述了本发明的基本原理、主要特征和本发明的优点。本行业的技术人员应该了解,本发明不受上述实施例的限制,上述实施例和说明书中描述的只是本发明的原理,在不脱离本发明精神和范围的前提下本发明还会有各种变化和改进,这些变化和改进都落入要求保护的本发明的范围内。本发明要求的保护范围由所附的权利要求书及其等同物界定。

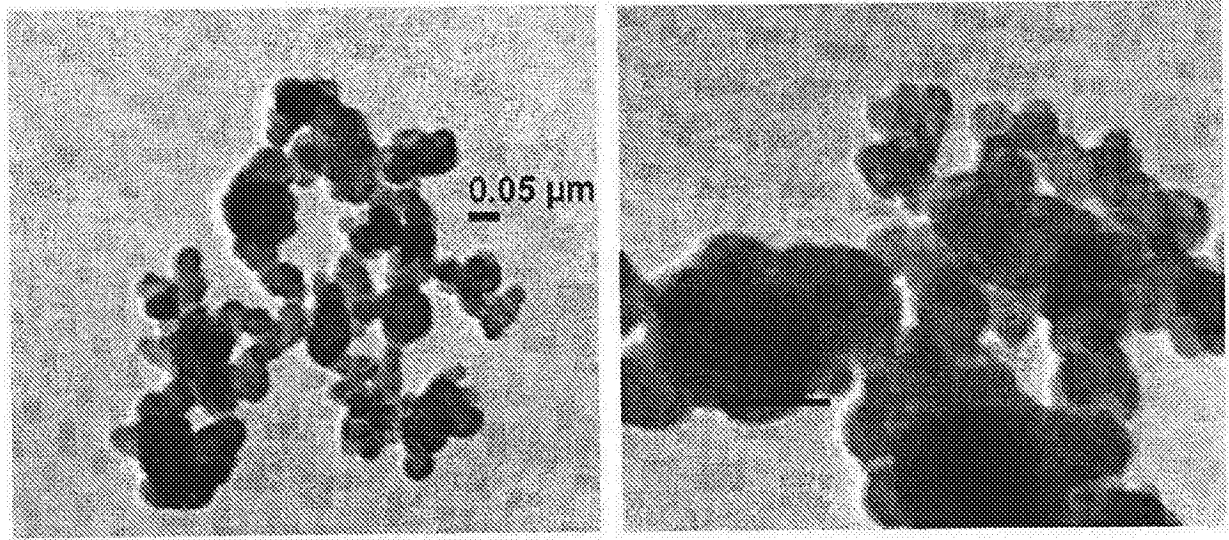


图 1

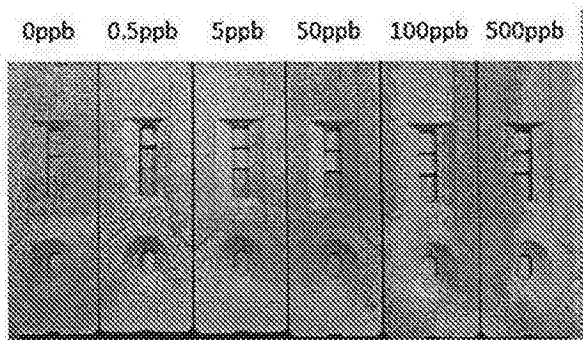


图 2

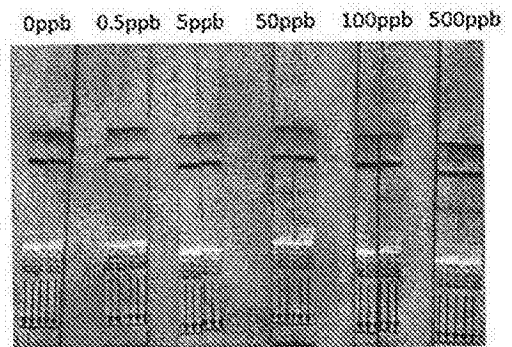


图 3

专利名称(译)	一种可用于快速诊断的免疫胶体碳的制备方法		
公开(公告)号	CN106153883A	公开(公告)日	2016-11-23
申请号	CN201510144273.8	申请日	2015-03-26
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业科学院油料作物研究所 南京瑞启生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	中国农业科学院油料作物研究所 南京瑞启生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业科学院油料作物研究所 南京瑞启生物科技有限公司		
[标]发明人	吴刚 李均 武玉花 李晓飞 李允静 朱莉 王锐		
发明人	吴刚 李均 武玉花 李晓飞 李允静 朱莉 王锐		
IPC分类号	G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种可用于快速诊断的免疫胶体碳的制备方法，主要包括以下步骤：步骤一：向100g碳粉中加入超纯水，定容至500ml，搅拌溶解后静置20~60分钟放入离心机中离心，收集上清液于干净的烧杯中；步骤二：向步骤一的溶液中加入0.5g的十六烷基三乙基溴化铵，并定容至500ml，即溶液中碳粉的终浓度为20%，CTAB的终浓度为0.1%；步骤三：将步骤二所得溶液进行超声破碎，使之成为悬浮状的胶体碳纳米颗粒溶液，至电镜下观察颗粒直径覆盖范围由数十纳米至数百纳米不等为止；步骤四：向步骤三所得溶液中加入100ml的无水乙醇，充分搅匀后，加入10ml硅烷化试剂并搅拌，通入氮气情况下，50~60℃反应4~10小时；步骤五：待反应结束后，用无水乙醇清洗3~5次，然后再用0.02M PBS缓冲液洗涤3~5次，至此，制备完成表面带有游离氨基基团的胶体碳纳米颗粒。

