



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104614518 A

(43) 申请公布日 2015. 05. 13

(21) 申请号 201510037654. 6

(22) 申请日 2015. 01. 26

(71) 申请人 珠海丽珠试剂股份有限公司

地址 519000 广东省珠海市南屏科技工业园
屏东三路一号珠海丽珠试剂有限公司

(72) 发明人 曾敏霞 李重阳 朱越谭

(74) 专利代理机构 广州三环专利代理有限公司
44202

代理人 牛丽霞

(51) Int. Cl.

G01N 33/532(2006. 01)

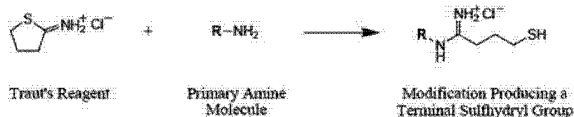
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

一种用于快速检测的胶体金共价标记方法

(57) 摘要

本发明提供免疫检测用纳米胶体金的标记方法,包括以下步骤:以柠檬酸钠还原法制备小粒径的纳米金颗粒,以小粒径的纳米金颗粒为种子金,缓慢匀速滴加氯金酸和弱还原剂,制备大粒径的胶体金颗粒,将待标记的抗体或蛋白用 Traut's 试剂处理以便于和所制备的胶体金偶联结合;或者,以小粒径的纳米金颗粒为种子金,缓慢匀速滴加氯金酸和含巯基的羧酸还原剂,制备表面带羧基的大粒径胶体金颗粒,将胶体金颗粒用交联剂活化得到功能化的胶体金颗粒,将抗体或蛋白与制备的胶体金颗粒偶联结合,形成金标记抗体蛋白复合物。本发明提高了金标复合物在复杂介质中的稳定性,对目标蛋白的选择性识别显著增强,从而相对提高了金标试纸条的灵敏度。



1. 免疫检测用纳米胶体金的共价标记方法,其特征在于,包括以下步骤:

S1、采用柠檬酸钠还原法制备小粒径的纳米胶体金;

S2、以小粒径的纳米金颗粒为种子金,缓慢匀速滴加氯金酸和弱还原剂,通过逐步生长的方法制备大粒径的胶体金颗粒,将所标记的抗体或蛋白用 Traut' s 试剂处理并透析掉未反应的试剂,引入更多的巯基;或者,以小粒径的纳米金颗粒为种子金,缓慢匀速滴加氯金酸和含巯基的羧酸还原剂,通过逐步生长的方法制备表面带羧基的大粒径胶体金颗粒,将制备好的胶体金颗粒用交联剂活化得到功能化的胶体金颗粒;

S3、通过条件摸索最佳量的标记抗体蛋白,加入待标记抗体或蛋白于胶体金溶液中,离心并用缓冲液重悬,形成金标记抗体蛋白复合物;

S4、将共价结合的金标抗体蛋白复合物涂匀在玻璃纤维纸上,干燥而成金标垫组装成试剂条。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在於:S1 中,所述小粒径的纳米胶体金粒径为 5 ~ 15nm,其采用传统的柠檬酸钠还原法方法制备而成;加热 0.01% (w/v)氯金酸溶液至沸腾,在搅拌下快速加入还原剂柠檬酸三钠溶液,待溶液颜色变为大红直至不再发生变化,继续加热沸腾 5 ~ 20 分钟后,冷却至室温备用。

3. 根据权利要求 2 所述小粒径的纳米胶体金粒径为 10 ~ 15nm, 优选 10nm。

4. 根据权利要求 2 所述小粒径的纳米胶体金加热沸腾时间为 5 分钟。

5. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在於:所述 S2 中,大粒径的标记纳米胶体金粒径在 35 ~ 45nm 之间。

6. 根据权利要求 5 所述的方法,其特征在於:所述大粒径的标记纳米胶体金粒径为 40nm。

7. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在於:所述 S2 中,所述弱还原剂为抗坏血酸、盐酸羟胺或对苯二酚其中的一种。

8. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在於:所述 S2 中,所述抗体或蛋白引入巯基处理所使用的试剂为 Traut' s 试剂(2-亚氨基氯化硫醇)。

9. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在於:所述 S2 中,所述巯基还原剂采用巯基丁二酸、巯基丙酸和巯基乙酸中至少一种。

10. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在於:所述 S2 中,所述交联剂为 EDC[1-乙基-3-(3-二甲基氨丙烷)碳二亚胺]和 NHS(N-羟基琥珀酰亚胺)的混合液。

11. 根据权利要求 10 所述的方法,其特征在於:所述 EDC 的浓度为 $1.0 \times 10^{-4} \text{mol/L} \sim 2.4 \times 10^{-4} \text{mol/L}$, NHS 的浓度 $2.0 \times 10^{-4} \text{mol/L} \sim 4.8 \times 10^{-4} \text{mol/L}$ 。

12. 根据权利要求 11 所述的方法,其特征在於:所述 EDC 的用量为 $100 \mu\text{L} \sim 1.0 \times 10^{-4} \text{mol/L}$, NHS 的用量为 $100 \mu\text{L} \sim 2.0 \times 10^{-4} \text{mol/L}$ 。

13. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在於:所述 S3 中,所述重悬缓冲溶液为磷酸盐缓冲液、硼酸盐缓冲液或 Tris(三羟甲基氨基甲烷)缓冲液中至少一种。

一种用于快速检测的胶体金共价标记方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物检测领域,具体涉及一种快速检测用纳米胶体金的共价标记方法。

背景技术

[0002] 胶体金是由氯金酸(HAuCl_4)在还原剂(如白磷、抗坏血酸、柠檬酸钠、鞣酸等)作用下被还原成金原子,得到的金原子会相互吸附聚集成金原子簇并进一步形成金纳米颗粒,这些颗粒由于静电排斥作用而在溶液中分散成为一种稳定的胶体状态。胶体金标记,实质上是蛋白质等高分子被吸附到胶体金颗粒表面的包被过程,吸附机理一部分是由于胶体金在弱碱环境下带负电荷,与蛋白质的正电荷基团因静电吸附而形成的结合。含有高度疏水性的氨基酸(如酪氨酸和色氨酸)的蛋白质也可通过疏水作用结合到金颗粒的表面。

[0003] 免疫胶体金技术是指:胶体金在弱碱环境下带负电荷,可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。胶体金除了与蛋白质结合以外,还可以与许多其它生物大分子结合,如 SPA、PHA、ConA 等。根据胶体金的一些物理性状,如高电子密度、颗粒大小、形状及颜色反应,加上结合物的免疫和生物学特性,因而使胶体金广泛地应用于免疫学、组织学、病理学和细胞生物学等领域。胶体金标记,实质上是蛋白质等高分子被吸附到胶体金颗粒表面的包被过程。吸附机理可能是胶体金颗粒表面负电荷,与蛋白质的正电荷基团因静电吸附而形成牢固结合。用还原法可以方便地从氯金酸制备各种不同粒径、也就是不同颜色的胶体金颗粒。这种球形的粒子对蛋白质有很强的吸附功能,可以与葡萄球菌 A 蛋白、免疫球蛋白、毒素、糖蛋白、酶、抗生素、激素、牛血清白蛋白多肽缀合物等非共价结合,因而在基础研究和临床实验中成为非常有用的工具。免疫金标记技术(Immunogold labelling technique)主要利用了金颗粒具有高电子密度的特性,在金标蛋白结合处,在显微镜下可见黑褐色颗粒,当这些标记物在相应的配体处大量聚集时,肉眼可见红色或粉红色斑点,因而用于定性或半定量的快速免疫检测方法中,这一反应也可以通过银颗粒的沉积被放大,称之为免疫金银染色。

[0004] 由于静电作用和疏水作用都是比较弱的作用力,因此金标复合物在层析涌动过程中,很不稳定,会产生分离,导致假阳或信号显色浅等问题。

[0005] 而考虑到巯基会与金颗粒表面的金原子形成 Au-S 配位键,而金硫键是由金和硫共用一个电子对而形成的牢固连接,金微粒与抗体或蛋白内的半胱氨酸残基上巯基的连接是吸附上抗体或抗原的最重要部分,可以有效增加金标结合物的稳定性。

发明内容

[0006] 有鉴于背景技术所述,本发明的目的是提供制备免疫检测用纳米胶体金共价结合蛋白质的方法,通过巯基与纳米金表面形成的 Au-S 配位键,共价偶联金颗粒和抗体或蛋白,从而增加金标结合物的稳定性。

[0007] 本发明的目的是通过以下技术方案实现的:

一种免疫检测用纳米胶体金的标记方法,包括以下步骤:

S1、制备小粒径的纳米胶体金；

S2、方法(一)：以小粒径的纳米金颗粒为种子金，缓慢匀速滴加氯金酸和弱还原剂，通过逐步生长的方法制备大粒径的胶体金颗粒，将所标记的抗体或蛋白用 Traut's 试剂处理并透析掉未反应的试剂，以引入更多的巯基；方法(二)：以小粒径的纳米金颗粒为种子金，缓慢匀速滴加氯金酸和含巯基的羧酸还原剂，通过逐步生长的方法制备表面带羧基的大粒径胶体金颗粒，将制备好的胶体金颗粒用交联剂活化得到功能化的胶体金颗粒；

S3、通过条件摸索最佳量的标记抗体蛋白，加入待标记抗体或蛋白于胶体金溶液中，离心并用缓冲液重悬，形成金标记抗体蛋白复合物；

S4、将共价结合的金标抗体蛋白复合物涂匀在玻璃纤维纸上，干燥制成金标垫，再组装成试剂条，用于临床快速检测。

[0008] 优选的，所述 S1 中，所述小粒径的纳米胶体金粒径为 10 ~ 15nm，其采用传统的柠檬酸钠还原法方法制备而成：加热搅拌 0.01% (w/v) 氯金酸溶液至沸腾，快速加入还原剂柠檬酸三钠溶液，待溶液颜色变为大红直至不再变化后，继续加热沸腾 5 分钟，停止搅拌，冷却至室温，备用。

[0009] 优选的，所述 S2 方法(一)中，所述标记的抗体或蛋白处理试剂为 Traut's 试剂。

[0010] 优选的，所述 S2 方法(二)中，所述巯基还原剂采用巯基丁二酸、巯基丙酸和巯基乙酸中至少一种。

[0011] 优选的，所述 S2 方法(二)中，所述交联剂为 EDC[1-乙基-3-(3-二甲基氨丙烷)碳二亚胺] 和 NHS(N-羟基琥珀酰亚胺) 的混合液。

[0012] 与现有技术相比，本发明具备如下优点：

本发明的胶体金共价标记方法提高了金标复合物在复杂介质中的稳定性，对目标蛋白的选择性识别显著增强，从而相对提高了金标试纸条的灵敏度。

附图说明

[0013] 图 1 是本发明的实施方式中，方法(一)纳米金颗粒共价标记的技术路线示意图。

[0014] 图 2 是本发明的实施方式中，方法(二)纳米金颗粒共价标记的技术路线示意图。

具体实施方式

[0015] 本发明的实施方式为如下步骤：

(1)、胶体金的制备：

a、采用传统的柠檬酸钠还原法方法制备 10 ~ 15nm 小粒径的胶体金颗粒：加热搅拌 0.01% (w/v) 氯金酸溶液至沸腾，快速加入还原剂柠檬酸三钠溶液，待溶液颜色变为大红直至不再变化后，继续加热沸腾 5 分钟，停止搅拌，冷却至室温备用；

b、方法(一)：技术路线如图 1 所示，用 Traut's 试剂与抗体或蛋白上的氨基反应引入巯基，从而可以与金纳米粒子形成 Au-S 配位键：稀释小粒径的胶体金颗粒于一定浓度作为晶种液置于三口烧瓶中，常温搅拌，通过两个加料管分别向晶种液中缓慢匀速滴加氯金酸溶液和弱还原剂抗坏血酸溶液，随着氯金酸和还原剂的加入，溶液颜色逐渐变深，待颜色变为深红直至不再发生变化时，停止搅拌，通过紫外可见分光光度计扫描溶液波长，即得到大粒径的纳米金粒子；

将一定量的 Traut's 试剂溶解于磷酸盐缓冲液,加入一定量的待标记抗体或蛋白,保持 Traut's 试剂与待标记抗体或蛋白的物质的量比为 50:1,常温下摇床上混匀反应 2 小时,将反应产物置于 4℃ 下用去离子纯化水透析处理 12 小时,以除去多余的 Traut's 试剂,从而得到巯基化修饰的抗体或蛋白;

方法(一):技术路线如图 2 所示,表面带羧基的纳米金与抗体或蛋白上的氨基生成共价酰胺键;稀释小粒径的胶体金颗粒于一定浓度作为晶种液置于三口烧瓶中,常温搅拌,通过两个加料管分别向晶种液中缓慢匀速滴加氯金酸溶液和还原剂巯基丁二酸溶液,随着氯金酸和还原剂的加入,溶液颜色逐渐变深,待颜色变为深红直至不再发生变化时,停止搅拌,通过紫外可见分光光度计扫描溶液波长,即得到表面带羧基的大粒径纳米金粒子;

取适量的表面带羧基的大粒径纳米金胶体金溶液加入 100 μ L 1.0 $\times 10^{-4}$ mol/L 的 EDC 和 100 μ L 2.0 $\times 10^{-4}$ mol/L 的 NHS,恒温(例如 37℃)下摇床上混匀反应 10 小时,将反应产物离心,用去离子纯化水重悬洗涤 2 次,得到表面活化的纳米金颗粒;

(2)、确定胶体金与待标记蛋白的用量比,即取 10-20 管 1mL 的胶体金,分别加入 5-40mg 待标记蛋白,混匀,室温下静置 10 分钟后加入总体积的 1/10 的氯化钠(NaCl)溶液,室温放置 1 小时左右,观察颜色变化,记下未变色管中所加最少待标记抗体量,实际标记中以此量增加 10% ~ 20% 为实验用量。

[0016] (3)、取 5.0mL 表面活化的纳米胶体金溶液,加入已确定量的最佳待标记抗体蛋白,摇匀,并加入 5% 的 BSA,封闭非特异性结合,离心后弃上清,将沉淀重悬于 pH7.5 的 PBS 磷酸缓冲溶液,得到金标结合物。

[0017] (4)、将金标结合物涂匀在玻璃纤维纸上,12 小时过夜烘干后,裁成合适长度大小组装成试剂条。

[0018] 以下列举一种具体的实施例:

一、金标结合物的制备:

例 1

1、用二次去离子纯化水将 1% (w/v) 氯金酸稀释成 100mL 0.01% 的溶液,加热氯金酸至沸腾,快速加入 4.0mL 1% (w/v) 柠檬酸三钠溶液,待溶液颜色变为大红直至不再变化后,继续加热沸腾 5 分钟,冷却至室温加纯化水定容到 100mL,即得到小粒径的胶体金颗粒;

2、方法(一):取 30mL 小粒径胶体金用去离子纯化水稀释至 100mL 于三口烧瓶中,通过一个加料管滴加 2.0mL 1% (w/v) 氯金酸,控制滴加速度为 0.8mL/min;另一个加料管滴加 1.2mL 的抗坏血酸溶液,控制滴加速度为 0.5mL/min,待颜色稳定后,通过紫外可见分光光度计扫描粒径分布和大小,得到 40nm 左右的胶体金颗粒,即大粒径的胶体金颗粒;

将 1.0mg Traut's 试剂溶于 2.0mL 磷酸缓冲液中,加入 10 μ L 待标记抗体或蛋白,常温下摇床上混匀反应 2 小时,将混合液置于透析袋中,4℃ 下用去离子纯化水透析 12 小时,去除多余的试剂;

方法(二):取 30mL 小粒径胶体金用去离子纯化水稀释至 100mL 于三口烧瓶中,通过一个加料管滴加 2mL 1% (w/v) 氯金酸,控制滴加速度为 0.8mL/min;另一个加料管滴加 1.2mL 的巯基丁二酸,控制滴加速度为 0.5mL/min,待颜色稳定后,通过紫外可见分光光度计扫描粒径分布和大小,得到 40nm 左右的胶体金颗粒,即大粒径的胶体金颗粒;

取 5.0mL 粒径为 40nm 的胶体金颗粒,加入 250 μ L 1.0 $\times 10^{-4}$ mol/L 的 EDC 和

250 μ L 2.0 \times 10⁻⁴mol/L 的 NHS, 恒温(例如 37 $^{\circ}$ C) 摇床混匀反应 10 小时, 离心并用去离子纯化水重悬洗涤 2 次, 得到表面活化的纳米金颗粒;

3、取 5.0mL40nm 胶体金溶液, 加入已确定量的最佳待标记抗体蛋白, 摇匀, 并加入 5% 的 BSA, 封闭非特异性结合, 4 $^{\circ}$ C 下 6000rpm 离心, 吸掉上清液, 将沉淀重悬于含有 1%BSA 和 0.05%NaN₃的 pH7.4 的 PBS 缓冲溶液, 得到金标结合物。

[0019] 4、将金标结合物涂匀在玻璃纤维纸上, 12 小时过夜烘干后, 裁成合适长度大小组装机成试剂条。例 2

1、用二次去离子纯化水将 1% (w/v) 氯金酸稀释成 100mL0.01% 的溶液, 加热氯金酸至沸腾, 快速加入 4.0mL1% (w/v) 柠檬酸三钠溶液, 待溶液颜色变为大红直至不再变化后, 继续加热沸腾 5 分钟, 冷却至室温加纯化水定容到 100mL, 即得到小粒径的胶体金颗粒;

2、方法(-): 取 30mL 小粒径胶体金用去离子纯化水稀释至 100mL 于三口烧瓶中, 通过一个加料管滴加 2.0mL1%(w/v) 氯金酸, 控制滴加速度为 0.8mL/min; 另一个加料管滴加 2.5mL 的盐酸羟胺溶液, 控制滴加速度为 0.6mL/min, 待颜色稳定后, 通过紫外可见分光光度计扫描粒径分布和大小, 得到 40nm 左右的胶体金颗粒, 即大粒径的胶体金颗粒;

将 1.0mgTraut's 试剂溶于 2.0mL 磷酸缓冲液中, 加入 10 μ L 待标记抗体或蛋白, 常温下摇床上混匀反应 2 小时, 将混合液置于透析袋中, 4 $^{\circ}$ C 下用去离子纯化水透析 12 小时, 去除多余的试剂;

方法(=): 取 30mL 小粒径胶体金用去离子纯化水稀释至 100mL 于三口烧瓶中, 通过一个加料管滴加 2.0mL1% (w/v) 氯金酸, 控制滴加速度为 0.8mL/min; 另一个加料管滴加 2.0mL 的巯基丙酸, 控制滴加速度为 0.5mL/min, 待颜色稳定后, 通过紫外可见分光光度计扫描粒径分布和大小, 得到 40nm 左右的胶体金颗粒, 即大粒径的胶体金颗粒;

取 5.0mL 粒径为 40nm 的胶体金颗粒, 加入 250 μ L 1.0 \times 10⁻⁴mol/L 的 EDC 和 250 μ L 2.0 \times 10⁻⁴mol/L 的 NHS, 恒温(例如 37 $^{\circ}$ C) 摇床混匀反应 10 小时, 离心并用去离子纯化水重悬洗涤 2 次, 得到表面活化的纳米金颗粒;

3、取 5.0mL40nm 胶体金溶液, 加入已确定量的最佳待标记抗体蛋白, 摇匀, 并加入 5% 的 BSA, 封闭非特异性结合, 4 $^{\circ}$ C 下 6000rpm 离心, 吸掉上清液, 将沉淀重悬于含有 1%BSA 和 0.05%NaN₃的 pH7.4 的 PBS 缓冲溶液, 得到金标结合物。

[0020] 4、将金标结合物涂匀在玻璃纤维纸上, 12 小时过夜烘干后, 裁成合适长度大小组装机成试剂条。

[0021] 例 3

1、用二次去离子纯化水将 1% (w/v) 氯金酸稀释成 100mL0.01% 的溶液, 加热氯金酸至沸腾, 快速加入 4.0mL1% (w/v) 柠檬酸三钠溶液, 待溶液颜色变为大红直至不再变化后, 继续加热沸腾 5 分钟, 冷却至室温加纯化水定容到 100mL, 即得到小粒径的胶体金颗粒;

2、方法(-): 取 30mL 小粒径胶体金用去离子纯化水稀释至 100mL 于三口烧瓶中, 通过一个加料管滴加 2.0mL1%(w/v) 氯金酸, 控制滴加速度为 0.8mL/min; 另一个加料管滴加 2.8mL 的对苯二酚溶液, 控制滴加速度为 0.5mL/min, 待颜色稳定后, 通过紫外可见分光光度计扫描粒径分布和大小, 得到 40nm 左右的胶体金颗粒, 即大粒径的胶体金颗粒;

将 1.0mgTraut's 试剂溶于 2.0mL 磷酸缓冲液中, 加入 10 μ L 待标记抗体或蛋白, 常温下摇床上混匀反应 2 小时, 将混合液置于透析袋中, 4 $^{\circ}$ C 下用去离子纯化水透析 12 小时, 去

除多余的试剂；

方法(一):取 30mL 小粒径胶体金用去离子纯化水稀释至 100mL 于三口烧瓶中,通过一个加料管滴加 2.0mL1% (w/v) 氯金酸,控制滴加速度为 0.8mL/min;另一个加料管滴加 2.5mL 的巯基乙酸,控制滴加速度为 0.5mL/min,待颜色稳定后,通过紫外可见分光光度计扫描粒径分布和大小,得到 40nm 左右的胶体金颗粒,即大粒径的胶体金颗粒;

取 5.0mL 粒径为 40nm 的胶体金颗粒,加入 250 μ L 1.0×10^{-4} mol/L 的 EDC 和 250 μ L 2.0×10^{-4} mol/L 的 NHS,恒温(例如 37 $^{\circ}$ C)摇床混匀反应 10 小时,离心并用去离子纯化水重悬洗涤 2 次,得到表面活化的纳米金颗粒;

3、取 5.0mL40nm 胶体金溶液,加入已确定量的最佳待标记抗体蛋白,摇匀,并加入 5% 的 BSA,封闭非特异性结合,4 $^{\circ}$ C 下 6000rpm 离心,吸掉上清液,将沉淀重悬于含有 1%BSA 和 0.05%NaN₃的 pH7.4 的 PBS 缓冲溶液,得到金标结合物。

[0022] 4、将金标结合物涂匀在玻璃纤维纸上,12 小时过夜烘干后,裁成合适长度大小组装成试剂条。

[0023] 二、胶体金试纸条的组装:

将样品垫、金标结合物涂匀的玻璃纤维纸、包被硝酸纤维素 NC 膜及吸水纸依次搭接粘贴成试纸带,用切割机将试纸带切割成合适宽度的试纸条,即可用于临床样本的快速检测。

[0024] 将两种不同标记方法金标试纸条用 HCG 参考品检测,进行灵敏度和稳定性对比,对比数据如下:

灵敏度的比较

	0mIU/mL	0.625mIU/mL	1.25mIU/mL	2.5mIU/mL	5mIU/mL	10mIU/mL	20mIU/mL	50mIU/mL
现有标记方法	-	-	±	±	±	+	++	+++
共价标记方法(一)	-	±	+	+	++	++	+++	++++
共价标记方法(二)	-	±	+	+	++	++	+++	++++

稳定性的比较

	5mIU/mL							
	4 $^{\circ}$ C				37 $^{\circ}$ C			
	1个月	3个月	6个月	12个月	5天	10天	15天	20天
现有标记方法	±	±	±	±	±	±	-	-
共价标记方法(一)	+	+	+	+	+	+	+	+
共价标记方法(二)	+	+	+	+	+	+	+	+

(备注:“-”阴性;“+”阳性,越多“+”表示显色程度越深,阳性越强;“±”弱阳性,肉眼隐约可见)

在以上的实施例中,未详细描述的各种方法过程和方法是本领域中公知的常规方法。

[0025] 以上所述,仅是本发明的较佳实施例而已,并非是对本发明作其它形式的限制,任何熟悉本领域的专业人员可能利用上述所述的技术内容加以变更或改型为同等变化的等效实施例,但凡是未脱离本发明技术方案内容,依据本发明的技术实质对以上实施例所作的任何简单修改、等同变化与改型,仍属于本发明技术方案的保护范围。

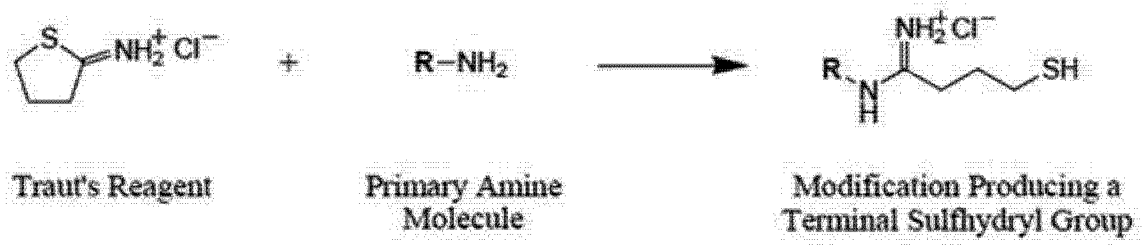


图 1

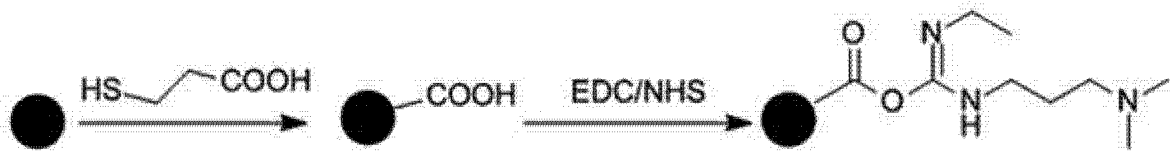


图 2

专利名称(译)	一种用于快速检测的胶体金共价标记方法		
公开(公告)号	CN104614518A	公开(公告)日	2015-05-13
申请号	CN201510037654.6	申请日	2015-01-26
[标]申请(专利权)人(译)	珠海丽珠试剂股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	珠海丽珠试剂股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	珠海丽珠试剂股份有限公司		
[标]发明人	曾敏霞 李重阳 朱越谭		
发明人	曾敏霞 李重阳 朱越谭		
IPC分类号	G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/532		
代理人(译)	牛丽霞		
其他公开文献	CN104614518B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供免疫检测用纳米胶体金的标记方法，包括以下步骤：以柠檬酸钠还原法制备小粒径的纳米金颗粒，以小粒径的纳米金颗粒为种子金，缓慢匀速滴加氯金酸和弱还原剂，制备大粒径的胶体金颗粒，将待标记的抗体或蛋白用Traut's试剂处理以便于和所制备的胶体金偶联结合；或者，以小粒径的纳米金颗粒为种子金，缓慢匀速滴加氯金酸和含巯基的羧酸还原剂，制备表面带羧基的大粒径胶体金颗粒，将胶体金颗粒用交联剂活化得到功能化的胶体金颗粒，将抗体或蛋白与制备的胶体金颗粒偶联结合，形成金标记抗体蛋白复合物。本发明提高了金标复合物在复杂介质中的稳定性，对目标蛋白的选择性识别显著增强，从而相对提高了金标试纸条的灵敏度。

