



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109342715 A

(43)申请公布日 2019.02.15

(21)申请号 201811174907.4

(22)申请日 2018.10.09

(71)申请人 浙江度安生物科技有限公司

地址 324000 浙江省衢州市凯旋南路6号1
幢C-309室

(72)发明人 鲍亦佳 方强 李俊

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/544(2006.01)

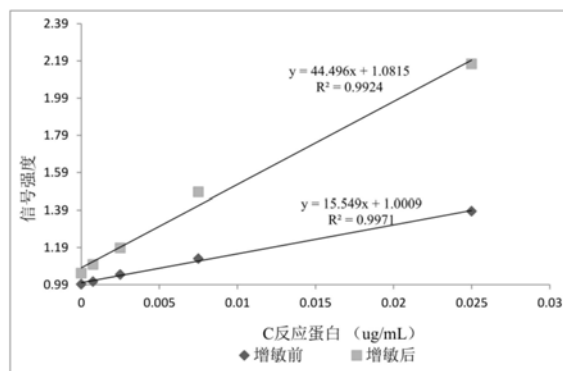
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

一种增强胶体金层析试纸信号强度的增敏试剂和使用增敏试剂的增敏方法

(57)摘要

本发明涉及胶体金层析法检测技术领域,为提高胶体金免疫层析试纸的检测的准确性,提供一种增强胶体金层析试纸信号强度的增敏试剂和使用增敏试剂的增敏方法。该增敏试剂包括混合时可在胶体金表面形成银颗粒沉淀的A试剂和B试剂,A试剂为硝酸银溶液,B试剂为对苯二酚,对苯二酚附在玻璃纤维膜或聚酯纤维膜上。在常规的层析免疫反应结束后,将增敏试剂滴加在层析试纸上,混合溶液通过毛细作用到达T线和C线,常温反应20~30min即可,然后扫描读数。本发明的增敏试剂通过在胶体金颗粒表面形成镀银颗粒增强胶体金信号灵敏性,提高检测的准确性,具有较广泛的应用场合,增敏方法简洁,容易操作。



1. 一种增强胶体金层析试纸信号强度的增敏试剂,其特征在于,所述增敏试剂包括混合时可在胶体金表面形成银颗粒沉淀的A试剂和B试剂,其中A试剂中含有银离子,B试剂为将银离子转化为银颗粒的还原试剂。

2. 根据权利要求1所述的增敏试剂,其特征在于,A试剂为硝酸银溶液,B试剂为对苯二酚。

3. 根据权利要求2所述的增敏试剂,其特征在于,对苯二酚附在玻璃纤维膜或聚酯纤维膜上。

4. 一种利用权利要求1的增敏试剂增强胶体金层析试纸信号强度的方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 在胶体金层析试纸样品口滴入待测样品,进行常规免疫层析反应;

(2) 待测样品反应结束后,将A试剂与B试剂混合后滴入胶体金层析试纸样品口反应;

(3) 待A试剂与B试剂反应完全后,拍照,扫描读数。

5. 根据权利要求4所述的方法,其特征在于,A试剂为硝酸银溶液,B试剂为对苯二酚。

6. 根据权利要求5所述的方法,其特征在于,在对苯二酚与硝酸银形成的混合液中,硝酸银溶液的浓度为1~500mmol/L,对苯二酚的浓度为1~500mmol/L。

7. 根据权利要求4所述的方法,其特征在于,所述对苯二酚经以下方法附着于多孔载体后使用:将表面积小于 200mm^2 的多孔薄膜置于1~200 μL 的对苯二酚溶液的中,将对苯二酚溶液吸收完全,然后干燥,对苯二酚溶液的浓度为1~500mmol/L。

8. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于,所述多孔薄膜为玻璃纤维膜或聚酯纤维膜。

9. 根据权利要求7或8所述的方法,其特征在于,使用时,在附着有对苯二酚的多孔载体上滴加10~200 μL 的硝酸银溶液,使对苯二酚充分溶解在硝酸银溶液中,然后滴入胶体金层析试纸反应。

10. 根据权利要求4所述的方法,其特征在于,步骤(2)中,将A试剂与B试剂混合滴入胶体金检测试纸条样品口后常温反应20~30min。

一种增强胶体金层析试纸信号强度的增敏试剂和使用增敏试剂的增敏方法

技术领域

[0001] 本发明涉及胶体金层析法检测技术领域,具体涉及一种增强胶体金层析试纸信号强度的增敏试剂和使用增敏试剂的增敏方法。

背景技术

[0002] 胶体金层析试纸是在免疫渗透技术的基础上建立的一种快捷简单的免疫学检测技术,采用胶体金免疫层析技术研制而成。其中胶体金是氯金酸 HAuCl_4 的水溶胶,氯金酸在还原剂如柠檬酸盐、鞣酸-柠檬酸盐等作用下聚合成为特定大小的金颗粒,并由于静电作用成为一种稳定的胶体状态。胶体金颗粒具有双层电结构,中心为许多金原子组成的带正电的胶金核,其外为带负电的 AuO^{2-} 及部分反粒子所形成的吸附层。胶体金在碱性条件下带负电荷,蛋白质分子带正电荷,二者极易静电结合形成大的聚合物,由于这种结合是静电结合不影响蛋白质的生物特性,可做示踪标记物应用于生物行业各领域中,进行定性或半定量快速免疫检测。

[0003] 胶体金层析试纸包括PVC板,样品口(样品垫)、胶体金垫、NC膜、吸水滤纸,其中NC膜上设置测试线T线、质控线C线,通过T线和C线颜色变化确定检测结果。因此当T线或C线颜色变化不明显时将影响胶体金层析试纸的检测准确性和精度,所以提高胶体金免疫层析试纸的检测灵敏性具有重要意义。

[0004] 中国专利CN201210359920.3,专利名称一种快速检测铜离子的胶体金增敏层析试纸,公开了一种由样品垫、金标结合垫、增敏垫、包被膜和吸水垫组成的增敏层析试纸,其中金标结合垫为吸附小金标记铜离子抗体的玻璃纤维棉,增敏垫为吸附大金标记羊抗鼠IgG的玻璃纤维棉,在包被膜上依次有用铜离子偶联载体蛋白的溶液印制的直线式隐形检测线T线,同时用羊抗鼠IgG溶液印制的直线式隐形控制线C线。但是该胶体金增敏层析试纸仅适用于铜离子检测的增敏性,对其他物质的检测不具有适用性。

发明内容

[0005] 为提高胶体金免疫层析试纸的检测的准确性,本发明的目的在于提供一种增强胶体金层析试纸信号强度的增敏试剂,能够明显增强胶体金层析试纸信号强度,而且具有较广泛的应用场合,同时方便操作和使用。

[0006] 本发明的另一目的在于提供使用增敏试剂增强胶体金免疫层析试纸检测灵敏性的增敏方法。

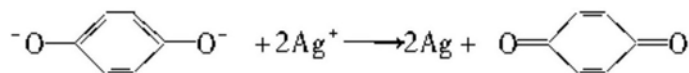
[0007] 本发明提供如下的技术方案:

一种增强胶体金层析试纸信号强度的增敏试剂,所述增敏试剂包括混合时可在胶体金表面形成银颗粒沉淀的A试剂和B试剂,其中A试剂中含有银离子,B试剂为将银离子转化为银颗粒的还原试剂。

[0008] 作为本发明的优选,A试剂为硝酸银溶液,B试剂为对苯二酚。

[0009] 作为本发明的优选,对苯二酚附在玻璃纤维膜或聚酯纤维膜上。

[0010] 本发明的增敏试剂中A试剂在B试剂的作用下转化为银颗粒沉淀在胶体金颗粒表面,使胶体金颗粒变成体积增大的镀银颗粒,形成相对胶体金标记物的二级信号反应,通过增加胶体金颗粒的体积增强胶体金颗粒的信号灵敏性。其中所用A试剂为硝酸银溶液,所用B试剂为对苯二酚,两者的反应过程如下:



这里需要进行说明的是,对苯二酚还原银离子生成银沉淀的反应过程是较为缓慢的。但是由于层析试纸中存在胶体金颗粒,胶体金颗粒的金核带正电,而表层则带负电,形成表面带正负电的双层带电结构,而这种双层带电结构能够诱导溶液状态的银离子在胶体颗粒表面发生还原反应,强化对苯二酚对还原反应,加快银颗粒在胶体金表面的沉淀。同时由于本发明所用的对苯二酚可以是对苯二酚溶液、对苯二酚固体或者对苯二酚固态试剂。由于对苯二酚活性较高,将对苯二酚附着在玻璃纤维膜或者聚酯膜上形成固态试剂,稳定性大大增强,可以在室温下保存至少一年。而且固态对苯二酚的活性与稳定性使得试剂条信号灵敏度及重复性明显改进。因此本发明优选采用将对苯二酚附着在玻璃纤维膜或者聚酯膜上。本发明的增敏试剂等通过A试剂与B试剂反应在胶体金颗粒表面形成镀银,增加胶体金颗粒的体积而明显增强胶体金的信号灵敏性,而且具有较广泛的应用场合,可应用于蛋白质、肽、DNA分子、RNA分子、寡核苷酸、细菌、细胞、病毒、脂质分子、碳水化合物分子、有机小分子和药物分子的检测,而且操作和使用方便。

[0011] 一种利用上述增敏试剂增强胶体金层析试纸信号强度的方法,包括如下步骤:

- (1) 在胶体金层析试纸样品口滴入待测样品,进行常规免疫层析反应;
- (2) 待测样品反应结束后,将A试剂与B试剂混合后滴入胶体金层析试纸样品口并反应;
- (3) 待A试剂与B试剂反应完全后,拍照,扫描读数。

[0012] 作为本发明方法的优选,A试剂为硝酸银溶液,B试剂为对苯二酚。

[0013] 作为本发明方法的优选,在对苯二酚与硝酸银形成的混合液中,硝酸银溶液的浓度为1~500mmol/L,对苯二酚的浓度为1~500mmol/L。

[0014] 作为本发明方法的优选,所述对苯二酚经以下方法附着于多孔载体后使用:将表面积小于200mm²的多孔薄膜置于1~200μL的对苯二酚溶液的中,将对苯二酚溶液吸收完全,然后干燥,对苯二酚溶液的浓度为1~500mmol/L。

[0015] 作为本发明方法的优选,所述多孔薄膜为玻璃纤维膜或聚酯纤维膜。

[0016] 作为本发明方法的优选,使用时,在附着有对苯二酚的多孔载体上滴加10~200μL的硝酸银溶液,使对苯二酚充分溶解在硝酸银溶液中,然后滴入胶体金层析试纸反应。

[0017] 作为本发明方法的优选,步骤(2)中,将A试剂与B试剂混合滴入胶体金检测试纸条样品口后常温反应20~30min。

[0018] 本发明的增强胶体金层析试纸灵敏度的方法中采用硝酸银溶液和对苯二酚作为增敏试剂,在常规的层析免疫反应结束后,将增敏试剂滴加在层析试纸上,混合溶液通过毛细作用到达T线和C线常温反应20~30min即可,然后扫描读数。其中硝酸银在对苯二酚的作用下还原成银颗粒而沉积在胶体金颗粒表面形成相对胶体金标记物的二级信号反应,通过增加胶体金颗粒的体积增强胶体金颗粒的信号灵敏性。对苯二酚还原银离子生成银沉淀的

反应过程是较为缓慢的,但是层析试纸中的胶体金颗粒的金核带正电,而表层则带负电形成表面带正负电的双层带电结构,而这种双层带电结构能够诱导溶液状态的银离子在胶体颗粒表面发生还原反应,强化对苯二酚对还原反应,加快银颗粒在胶体金表面的沉淀。同时本发明的对苯二酚优选使用附着在多孔载体如玻璃纤维膜或聚酯膜上的固态对苯二酚,这是因为对比二酚活性较高,将对苯二酚附着在玻璃纤维膜或者聚酯膜上形成固态试剂,稳定性大大增强,可以在室温下保存至少一年。使用时将硝酸银溶液滴加载附着对苯二酚的多孔载体上,使对苯二酚充分溶解在硝酸银溶液中,由于固态对苯二酚的体积可以忽略,因此形成的混合溶液的体积即为滴加的硝酸银溶液的体积,混合溶液中硝酸银的浓度即为硝酸银溶液的浓度。而当用等体积的对苯二酚溶液制作固态对苯二酚时,得到的混合溶液中的对苯二酚的浓度即为对苯二酚溶液的浓度。本发明的增敏剂使用方法简洁,方便操作,能够明显增强层析试纸的信号灵敏性,提高检测的准确性,并且应用场合广泛,可应用于蛋白质、肽、DNA分子、RNA分子、寡核苷酸、细菌、细胞、病毒、脂质分子、碳水化合物分子、有机小分子和药物分子的检测。

[0019] 本发明的有益效果如下:

本发明的增敏试剂通过在胶体金颗粒表面形成镀银颗粒,形成相对胶体金标记物的二级信号反应而增加胶体金的体积,增强胶体金信号灵敏性,能够明显增强胶体金层析试纸的信号强度,提高检测的准确性,具有较广泛的应用场合,而且所采用的固态对苯二酚试剂的稳定性强,增敏方法简洁,容易操作。

附图说明

[0020] 图1是同一增敏剂用量下以C反应蛋白作为待测物的信号增强曲线图。

[0021] 图2是相对图1的未使用增敏剂和使用增敏剂的C反应蛋白显色变化对比图。

[0022] 图中,图2a为未使用增敏剂的C反应蛋白显色图,图2b为使用增敏剂的C反应蛋白显色图,图2a和图2b中,CRP浓度从左向右依次为0.025 $\mu\text{g/L}$ 、0.0075 $\mu\text{g/L}$ 、0.0025 $\mu\text{g/L}$ 、0.00075 $\mu\text{g/L}$ 和0 $\mu\text{g/L}$ 。

具体实施方式

[0023] 下面就本发明的具体实施方式作进一步说明。

[0024] 如无特别说明,本发明中所采用的原料均可从市场上购得或是本领域常用的,如无特别说明,下述实施例中的方法均为本领域的常规方法。

[0025] 本发明的增强胶体金层析试纸信号强度的增敏试剂应用范围广泛,可应用于蛋白质、肽、DNA分子、RNA分子、寡核苷酸、细菌、细胞、病毒、脂质分子、碳水化合物分子、有机小分子和药物分子的检测。

[0026] 实施例1

一种增强胶体金层析试纸信号强度的增敏试剂,包括混合时可在胶体金表面形成银颗粒沉淀的A试剂和B试剂,其中A试剂中含有银离子,B试剂为将银离子转化为银颗粒的还原试剂,所用A试剂为硝酸银溶液,B试剂为对苯二酚;所用的对苯二酚经以下过程附着在玻璃纤维膜或聚酯膜上:将表面积为100 mm^2 的玻璃纤维膜置于1 μL 的对苯二酚溶液的中,对苯二酚溶液的浓度为500 mmol/L ,对苯二酚溶液吸收完全后常温干燥。

[0027] 一种利用上述增敏试剂增强胶体金层析试纸信号强度的方法,包括如下步骤:

- (1) 在胶体金层析试纸样品口滴入待测样品,进行常规免疫层析反应;
- (2) 待测样品反应结束后,在附着有对苯二酚的玻璃纤维膜上滴加10 μ L的硝酸银溶液,硝酸银溶液的浓度为500mmol/L,使对苯二酚充分溶解在硝酸银溶液中得到10 μ L的混合液,然后滴入胶体金层析试纸的样品口,使混合溶液藉由毛细管作用上移至T线与C线,进行胶体金信号常温放大反应20min;
- (3) 待A试剂与B试剂反应完全后,拍照,扫描读数。

[0028] 实施例2

一种增强胶体金层析试纸信号强度的增敏试剂,包括混合时可在胶体金表面形成银颗粒沉淀的A试剂和B试剂,其中A试剂中含有银离子,B试剂为将银离子转化为银颗粒的还原试剂,所用A试剂为硝酸银溶液,B试剂为对苯二酚;所用的对苯二酚经以下过程附着在玻璃纤维膜或聚酯膜上:将表面积为100mm²的玻璃纤维膜置于10 μ L的对苯二酚溶液的中,对苯二酚溶液的浓度为400mmol/L,对苯二酚溶液吸收完全后常温干燥。

[0029] 一种利用上述增敏试剂增强胶体金层析试纸信号强度的方法,包括如下步骤:

- (1) 在胶体金层析试纸样品口滴入待测样品,进行常规免疫层析反应;
- (2) 待测样品反应结束后,在附着有对苯二酚的玻璃纤维膜上滴加10 μ L的硝酸银溶液,硝酸银溶液的浓度为400mmol/L,使对苯二酚充分溶解在硝酸银溶液中得到10 μ L的混合液,然后滴入胶体金层析试纸的样品口,使混合溶液藉由毛细管作用上移至T线与C线,进行胶体金信号常温放大反应20min;
- (3) 待A试剂与B试剂反应完全后,拍照,扫描读数。

[0030] 实施例3

一种增强胶体金层析试纸信号强度的增敏试剂,包括混合时可在胶体金表面形成银颗粒沉淀的A试剂和B试剂,其中A试剂中含有银离子,B试剂为将银离子转化为银颗粒的还原试剂,所用A试剂为硝酸银溶液,B试剂为对苯二酚;所用的对苯二酚经以下过程附着在玻璃纤维膜或聚酯膜上:将表面积为100mm²的玻璃纤维膜置于50 μ L的对苯二酚溶液的中,对苯二酚溶液的浓度为200mmol/L,对苯二酚溶液吸收完全后常温干燥。

[0031] 一种利用上述增敏试剂增强胶体金层析试纸信号强度的方法,包括如下步骤:

- (1) 在胶体金层析试纸样品口滴入待测样品,进行常规免疫层析反应;
- (2) 待测样品反应结束后,在附着有对苯二酚的玻璃纤维膜上滴加50 μ L的硝酸银溶液,硝酸银溶液的浓度为200mmol/L,使对苯二酚充分溶解在硝酸银溶液中得到50 μ L的混合液,然后滴入胶体金层析试纸的样品口,使混合溶液藉由毛细管作用上移至T线与C线,进行胶体金信号常温放大反应25min;
- (3) 待A试剂与B试剂反应完全后,拍照,扫描读数。

[0032] 实施例4

一种增强胶体金层析试纸信号强度的增敏试剂,包括混合时可在胶体金表面形成银颗粒沉淀的A试剂和B试剂,其中A试剂中含有银离子,B试剂为将银离子转化为银颗粒的还原试剂,所用A试剂为硝酸银溶液,B试剂为对苯二酚;所用的对苯二酚经以下过程附着在聚酯膜或聚酯膜上:将表面积为100mm²的聚酯膜置于100 μ L的对苯二酚溶液的中,对苯二酚溶液的浓度为300mmol/L,对苯二酚溶液吸收完全后常温干燥。

[0033] 一种利用上述增敏试剂增强胶体金层析试纸信号强度的方法,包括如下步骤:

(1) 在胶体金层析试纸样品口滴入待测样品,进行常规免疫层析反应;

(2) 待测样品反应结束后,在附着有对苯二酚的聚酯膜上滴加100 μ L的硝酸银溶液,硝酸银溶液的浓度为300mmol/L,使对苯二酚充分溶解在硝酸银溶液中得到100 μ L的混合液,然后滴入胶体金层析试纸的样品口,使混合溶液藉由毛细管作用上移至T线与C线,进行胶体金信号常温放大反应25min;

(3) 待A试剂与B试剂反应完全后,拍照,扫描读数。

[0034] 实施例5

一种增强胶体金层析试纸信号强度的增敏试剂,包括混合时可在胶体金表面形成银颗粒沉淀的A试剂和B试剂,其中A试剂中含有银离子,B试剂为将银离子转化为银颗粒的还原试剂,所用A试剂为硝酸银溶液,B试剂为对苯二酚;所用的对苯二酚经以下过程附着在聚酯膜或聚酯膜上:将表面积为100mm²的聚酯膜置于200 μ L的对苯二酚溶液的中,对苯二酚溶液的浓度为500mmol/L,对苯二酚溶液吸收完全后常温干燥。

[0035] 一种利用上述增敏试剂增强胶体金层析试纸信号强度的方法,包括如下步骤:

(1) 在胶体金层析试纸样品口滴入待测样品,进行常规免疫层析反应;

(2) 待测样品反应结束后,在附着有对苯二酚的聚酯膜上滴加200 μ L的硝酸银溶液,硝酸银溶液的浓度为500mmol/L,使对苯二酚充分溶解在硝酸银溶液中得到200 μ L的混合液,然后滴入胶体金层析试纸的样品口,使混合溶液藉由毛细管作用上移至T线与C线,进行胶体金信号常温放大反应30min;

(3) 待A试剂与B试剂反应完全后,拍照,扫描读数。

[0036] 实施例6

一种增强胶体金层析试纸信号强度的增敏试剂,包括混合时可在胶体金表面形成银颗粒沉淀的A试剂和B试剂,其中A试剂中含有银离子,B试剂为将银离子转化为银颗粒的还原试剂,所用A试剂为硝酸银溶液,B试剂为对苯二酚;所用的对苯二酚经以下过程附着在聚酯膜或聚酯膜上:将表面积为100mm²的聚酯膜置于200 μ L的对苯二酚溶液的中,对苯二酚溶液的浓度为1mmol/L,对苯二酚溶液吸收完全后常温干燥。

[0037] 一种利用上述增敏试剂增强胶体金层析试纸信号强度的方法,包括如下步骤:

(1) 在胶体金层析试纸样品口滴入待测样品,进行常规免疫层析反应;

(2) 待测样品反应结束后,在附着有对苯二酚的聚酯膜上滴加200 μ L的硝酸银溶液,硝酸银溶液的浓度为1mmol/L,使对苯二酚充分溶解在硝酸银溶液中得到200 μ L的混合液,然后滴入胶体金层析试纸的样品口,使混合溶液藉由毛细管作用上移至T线与C线,进行胶体金信号常温放大反应30min;

(3) 待A试剂与B试剂反应完全后,拍照,扫描读数。

[0038] 实际应用

下面以C反应蛋白CRP为例

不同浓度CRP分别在胶体金层析试纸上进行常规的免疫层析反应,然后将增敏剂中硝酸银溶液(体积50 μ L,浓度200mmol/L)滴加在负载对苯二酚的聚酯膜上(聚酯膜表面积100mm²,对苯二酚溶液体积50 μ L,浓度200mmol/L),形成混合溶液后滴加到胶体金层析试纸的样品口,常温反应25min,然后扫描、读数,结果如图1和图2所示。

[0039] 图1表示同一增敏剂用量下以C反应蛋白作为待测物的信号增强曲线图,图2是未使用增敏剂和使用增敏剂的C反应蛋白显色变化对比图。

[0040] 图2中图2a为未使用增敏剂的C反应蛋白显色图,图2b为使用增敏剂的C反应蛋白显色图。图2a和图2b中,CRP浓度从左向右依次为0.025 $\mu\text{g/L}$ 、0.0075 $\mu\text{g/L}$ 、0.0025 $\mu\text{g/L}$ 、0.00075 $\mu\text{g/L}$ 和0 $\mu\text{g/L}$ 。

[0041] 从图1中可以看出,检测信号与CRP浓度成正比。而加入本发明的增敏剂后,检测信号增强,并且仍同CRP浓度成正比,且随CRP浓度增加,增敏剂使用前和使用后的信号强度差异增加。从图2可以看出,使用增敏剂后的图2b中的显色成黑色,与图2a中尤其是T线相比,颜色加深,更加容易识别和判断。

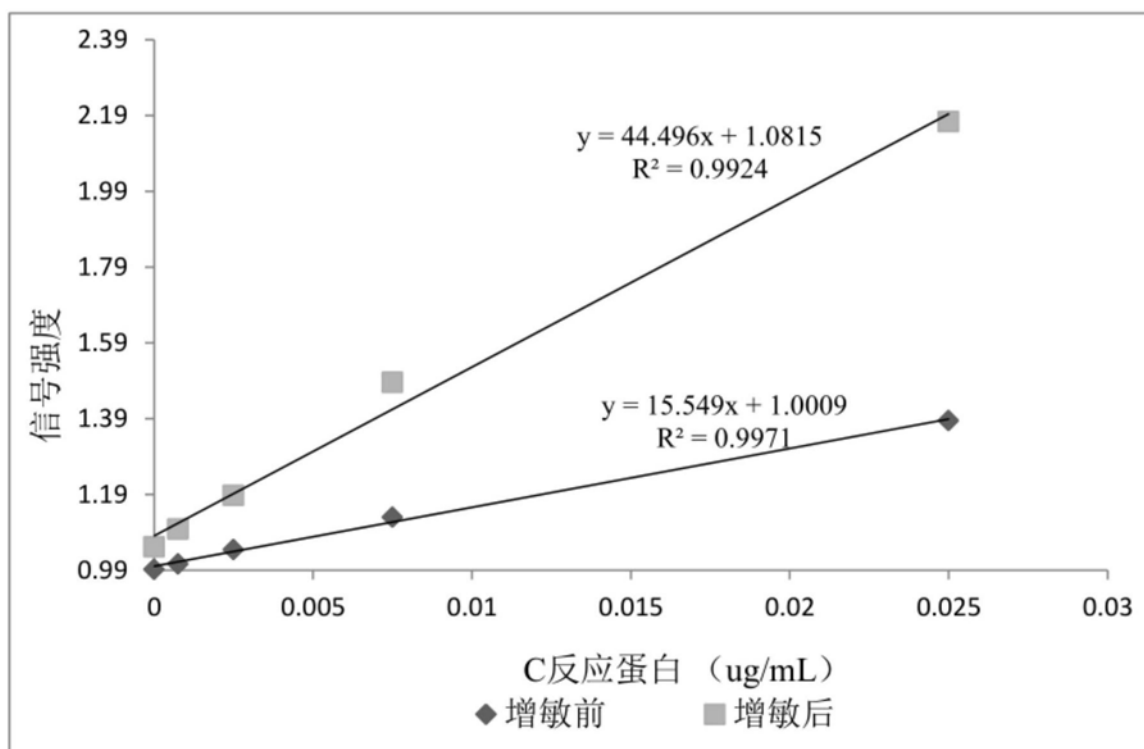
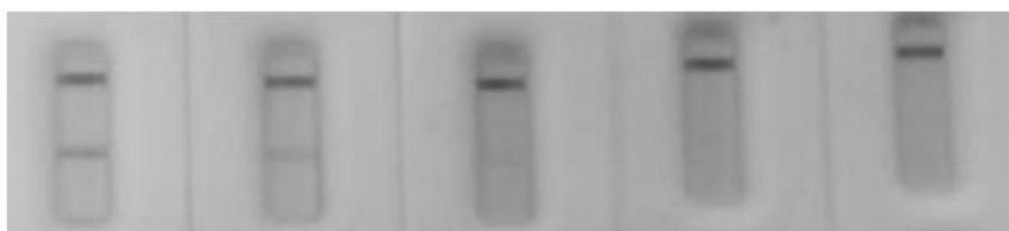


图1



2a



2b

图2

专利名称(译)	一种增强胶体金层析试纸信号强度的增敏试剂和使用增敏试剂的增敏方法		
公开(公告)号	CN109342715A	公开(公告)日	2019-02-15
申请号	CN201811174907.4	申请日	2018-10-09
[标]发明人	鲍亦佳 方强 李俊		
发明人	鲍亦佳 方强 李俊		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/544		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/544		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及胶体金层析法检测技术领域，为提高胶体金免疫层析试纸的检测的准确性，提供一种增强胶体金层析试纸信号强度的增敏试剂和使用增敏试剂的增敏方法。该增敏试剂包括混合时可在胶体金表面形成银颗粒沉淀的A试剂和B试剂，A试剂为硝酸银溶液，B试剂为对苯二酚，对苯二酚附在玻璃纤维膜或聚酯纤维膜上。在常规的层析免疫反应结束后，将增敏试剂滴加在层析试纸上，混合溶液通过毛细作用到达T线和C线常温反应20~30min即可，然后扫描读数。本发明的增敏试剂通过在胶体金颗粒表面形成镀银颗粒增强胶体金信号灵敏性，提高检测的准确性，具有较广泛的应用场合，增敏方法简洁，容易操作。

