

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.  
G01N 33/532 (2006.01)



## [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710003023.8

[43] 公开日 2008年8月6日

[11] 公开号 CN 101236201A

[22] 申请日 2007.1.31

[21] 申请号 200710003023.8

[71] 申请人 储 宁

地址 100070 北京市丰台区花乡羊坊明春东  
园 17 号楼一门 302

[72] 发明人 储 宁

权利要求书 1 页 说明书 10 页 附图 1 页

### [54] 发明名称

一种提高以胶体金属或乳胶颗粒作为标记物的检测试剂灵敏度的方法

### [57] 摘要

本发明公开了一种能够提高以胶体金属(胶体金、胶体硒等)或乳胶颗粒作为标记物制做的快速检测试剂灵敏度的方法。本方法适用的范围是以双抗体夹心为原理,以胶体金属(胶体金、胶体硒等)或乳胶颗粒作为标记物制作的免疫层析检测试纸或渗滤试剂。其特点在于将标记有抗体并干燥后的胶体金属或乳胶颗粒不贴在样品垫和硝酸纤维素膜中间,将其干燥在另外的容器或者支持物上,检测时首先将标记有抗体并干燥后的胶体金属或乳胶颗粒和待检测样品混合。在试纸条上只粘贴样品垫、硝酸纤维素膜、吸水垫,样品垫用来加待检测的样品,硝酸纤维素膜上固定有抗体作为检测线,检测线可以是一条或者多条,硝酸纤维素膜上还固定有对照线。

---

1、一种能够提高以胶体金属（胶体金、胶体硒等）或乳胶颗粒作为标记物制做的快速检测试剂灵敏度的方法。其特点在于将标记有抗体并干燥后的胶体金属或乳胶颗粒不贴在样品垫和硝酸纤维素膜中间，将其干燥在另外的容器或者支持物上，检测时首先将标记有抗体并干燥后的胶体金属或乳胶颗粒和待检测样品混合。

## 一种提高以胶体金属或乳胶颗粒作为标记物的检测试剂灵敏度的方法

### 技术领域

本发明涉及一种能够提高以胶体金属（胶体金、胶体硒等）或乳胶颗粒作为标记物制作的快速检测试剂灵敏度的方法，本方法适用的范围是以双抗体夹心法为原理，以胶体金属（胶体金、胶体硒等）或乳胶颗粒作为标记物制做的免疫层析检测试纸或渗滤试剂。

### 背景技术

1971年 Faulk 和 Taylor 将胶体金引入免疫化学领域，此后免疫胶体金技术作为一种新的免疫学方法，在生物医学各领域得到了日益广泛的应用。目前在医学检验中的应用主要是免疫层析法(immunochromatography)和快速免疫金渗滤法(Dot-immuogold filtration assay DIGFA)，用于检测 HBsAg、HCG 和细菌、病毒等病原体，具有简单、快速、准确和无污染等优点。

#### （一）免疫胶体金技术的基本原理

氯金酸( $\text{HAuCl}_4$ )在还原剂作用下，可聚合成一定大小的金颗粒，形成疏水胶体溶液。由于静电作用而成为稳定的胶体状态，故称胶体金。

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。其吸附原理一般认为是由于金颗粒表面的负电荷与蛋白质的正电荷基团之间的静电作用——非共价键的范德华引力而相互吸收，而且这种静电引力较小而一般不影响蛋白质的活性。

用化学还原法可以方便地制备各种不同粒径、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，可以与单克隆抗体、多克隆抗体、葡萄球菌A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检测中成为非常有用的工具。

免疫胶体金技术与放射免疫（RIA）和酶联免疫（EIA）相比有着许多优越性。首先，它不需要酶联免疫法中所要求的底物（显色剂），因而可省去一些操作步骤，如洗涤、终止等，使操作简单化；其次，胶体金法无污染，不会危害操作者、以及污染环境，而这些问题在酶免法与放免法中常遇到；再次胶体金检测试剂通常室温储存相当稳定，即该类制品储存条件温和，效期远长于酶免法和放免法；此外胶体金技术还具有检测迅速、不需要复杂仪器设备、产物显色永久等优点。

## （二）胶体金属在免疫层析快速诊断技术中的应用

免疫层析法(immuno chromatography)是近几年来国外兴起的一种快速诊断技术，其原理和通常的组分如附图 1 所示。

- 附图 1 说明：
- （1）吸水纸
  - （2）硝酸纤维素膜
  - （3）胶体金属结合物垫
  - （4）样品垫（加样位置）
  - （5）对照线
  - （6）检测线
  - （7）支持物（如塑料背衬）
  - （8）加样后的样品流动方向

附图 1 所示（3）胶体金属结合物垫实物为胶体金属，在胶体金属上标记有抗体，附图 1 所示（6）检测线位置固定有另外抗体。附图 1 所示（4）加样孔位置为滴加样品的位置。附图 1 所示（5）对照线位置固定有第二抗体。

在检测过程中，将检测样品加在（4）加样孔位置，样品由于虹吸作用按照示意图中箭头所示的方向流动。当样品到达（3）胶体金属结合物垫时，样品中的抗原和标记有抗体的胶体金属由于抗原抗体反应会结合，形成的结合物继续向前流动，到达（6）检测线位置时，检测线位置固定有另外的抗体，刚刚形成的结合物中由于结合有抗原，而这个抗原又会和（6）检测线位置的抗体反应而停留在检测线位置，所以会在检测线位置显示胶体金属的颜色。

免疫层析法检测试剂检测速度快，一般 10 分钟左右可出结果。

传统的用胶体金、乳胶或胶体硒作为标记物所制作的检测试纸其主要特征为：

- （1）在同一支持物上粘贴样品垫、标记物垫、硝酸纤维素膜、吸水垫。
- （2）样品垫用来加待检测的样品，标记物垫上干燥有已结合抗体的以上三种标记物的其中一种或多种，硝酸纤维素膜上固定有抗体作为检测线，检测线可以是一条或者多条（只图示一条），硝酸纤维素膜上还固定有对照线。

(3) 标记物垫位于样品垫和硝酸纤维素膜中间。

### (三) 胶体金在快速斑点渗滤技术中的应用

ELISA 法在临床实验室已得到普遍的应用，特别是用于各型肝炎标志物的检测。但 ELISA 法由于操作程序复杂，时间较长，给实验室带来不便。ELISA 法需时较长的主要原因，是由于液相中的抗原（或抗体）需经扩散才能与固相上的抗原或抗体反应不适当地缩短反应时间，将使灵敏度降至临床要求以下。为满足临床快速检测的需要，近年来发展了多种简便、快速的免疫学检测方法，快速斑点渗滤法即为其中一种，其标记物质用胶体金即称为快速斑点免疫金渗滤法 (Dot-immunogold filtration assay)，又称滴金免疫法。

快速斑点渗滤法的基本原理仍是间接法或夹心法。双抗体夹心法测抗原：固定于膜上的多克隆抗体+标本中待测抗原+金标记的特异性单克隆抗体显色。

**结果判断：**快速斑点免疫金渗滤法在操作完成后即可直接观察结果。根据测定模式的不同可有以下不同的判定结果。

快速斑点免疫金渗滤法检测速度快，结果观察一目了然，已应用于多种临床检测项目。

### (四) 免疫胶体金属技术

随着胶体金技术的广泛应用和发展，人们将其他金属也引入免疫快速检测领域，出现了胶体硒、胶体银、胶体铁等技术，统称为胶体金属技术。

### (五) 免疫胶体金属技术所面临的问题

用胶体金属或乳胶颗粒作为标记物所制作的检测试纸或渗滤试剂盒最大的优点是检测快速，在 10 分钟左右可知道结果，但有出现假阴性结果等的弊端，也正是因为检测快速，抗原和抗体反应的时间短，造成检测灵敏度低。

尤其是应用于临床检验领域时，由于患者病变部位的抗原（如病毒、细菌等）含量少，很多用胶体金属或乳胶颗粒作为标记物所制作的检测试纸或渗滤试剂盒不能准确检出病原体的存在而影响了这些试剂的应用。

如何提高这些试剂的检测灵敏度成为关键的问题。

## 发明内容

本发明的目的是提供一种能提高以胶体金属（胶体金、胶体硒等）或乳胶颗粒作为标记物的检测试剂灵敏度的方法。

为了上述目的，本发明采取的方案如下：

将标记有抗体并干燥后的胶体金属或乳胶颗粒不贴在样品垫和硝酸纤维素膜中间，将其干燥在另外的容器或者支持物上，检测时首先将标记有抗体并干燥后的胶体金属或乳胶颗粒和待检测样品混合。

在试纸条上只粘贴样品垫、硝酸纤维素膜、吸水垫，样品垫用来加待检测的样品，硝酸纤维素膜上固定有抗体作为检测线，检测线可以是一条或者多条（只图示一条），硝酸纤维素膜上还固定有对照线。

采用本发明后的检测试纸模式图见附图 2。

附图 2 说明：（1）吸水纸

（2）硝酸纤维素膜

（4）样品垫（加样位置）

（5）对照线

（6）检测线

（7）支持物（如塑料背衬）

检测时首先将待检测样品和标记有抗体并干燥后的胶体金属或乳胶颗粒混合，这样有利于抗原抗体充分反应，然后将以上混合物加入样品垫上或者将样品垫部分侵入以上混合物中进行检测。

本发明的优点是：

（1）能够明显增加检测的灵敏度。

（2）能够消除用胶体金、乳胶还是用胶体硒作为标记物所制作的检测试纸常见的假阳性反应，提高检测试剂的特异性。

（3）检测仍然快速，在 10 分钟内即可知道检测结果。

为了进一步理解本发明的实质，下面结合具体实施方式对本发明做进一步的说明。

## 具体实施方式

### 实施例 1：呼吸道合胞病毒乳胶法检测试剂盒

（1）购买颗粒大小合适的乳胶颗粒。

（2）乳胶颗粒的标记

按照**乳胶颗粒**使用说明书的步骤进行标记，将抗呼吸道合胞病毒单克隆抗体标记到**乳胶颗粒**上。以合适的速度离心纯化标记后的**乳胶颗粒**，小心吸去上清，用保存液悬浮沉淀，即制成**乳胶颗粒-抗体结合物**。

#### (3) **乳胶颗粒-抗体结合物**的干燥

取**乳胶颗粒-抗体结合物**溶液，用工作液稀释成合适的浓度，分装到2毫升小瓶或小管中。放入冷冻干燥机上冻干过夜，至完全干燥。封口后，密闭干燥保存。

#### (4) **硝酸纤维素膜**的抗体包备

- ① 将抗呼吸道合胞病毒单克隆抗体稀释成合适浓度。用喷膜机以合适的速度喷于**硝酸纤维素膜**上（检测线）。
- ② 将羊抗鼠 IgG 多克隆抗体用稀释成合适浓度。用喷膜机以合适的速度喷于**硝酸纤维素膜**上（对照线）。和检测线有一定的间隔。
- ③ 把固定有抗体的**硝酸纤维素膜**置 37℃烤箱中干燥充分干燥。
- ④ 置干燥环境中保存。

#### (5) **试纸条**组装

- ① 在塑料板（作为支持物）中间位置粘贴包备有抗体的**硝酸纤维素膜**。
- ② 在塑料板上固定**硝酸纤维素膜**位置的顶端，粘附吸水垫，吸水垫覆盖**硝酸纤维素膜**边沿约 1 毫米左右。
- ③ **硝酸纤维素膜**下方粘附样品垫，样品垫覆盖**硝酸纤维素膜**约 1 毫米。
- ④ 压平整后，在切条机上切成合适宽度的检测试纸条。
- ⑤ 干燥密闭保存。

#### (6) **样品稀释液**的分装

将**样品稀释液**以合适的量分装入小瓶或管中，封口备用。

#### (7) **试剂盒**组装

取 20 条**检测试纸条**，放入外包装盒中。取 20 瓶步骤（3）干燥后的**乳胶颗粒-抗体结合物**放入外包装盒中，取 20 瓶步骤（6）分装的**样品稀释液**放入外包装盒中，放入**取样棉签**，放入使用说明书。封外包装盒。

#### (8) **试剂盒**使用说明

##### ① 取样

用**取样棉签**或其他合适工具取患者病变部位分泌物，将分泌物溶于**样品稀释液**中，取合适量的溶有患者分泌物的**样品稀释液**加入**乳胶颗粒-抗体结合物**中，充分混匀。

##### ② 检测

打开试纸条包装，取出检测试纸，将样品垫部分侵入取样步骤①中的液体，20分钟时观察结果。

### ③ 结果判断

阳性：在检测线（T）和对照线（C）位置各出现一条色带。

阴性：只在对照线（C）位置有一条色带出现。

无色带出现或仅在检测线位置出现一条色带，说明检测无效，应重新检测。

## 实施例 2：甲、乙型流感病毒胶体金检测试剂盒

(1) 胶体金的制备采用化学还原法或其他适宜的方法制备 20 至 50nm 胶体金颗粒。

### (2) 胶体金的标记

将步骤（1）制备的胶体金溶液用 0.2M  $K_2CO_3$  调节至合适 PH 值。将抗甲型流感病毒单克隆抗体以合适标记量加入以上溶液中，室温搅拌。加入合适浓度的 BSA、PEG 等稳定剂，室温搅拌。以合适的速度离心至上清基本无色，小心吸去上清，用胶体金保存液悬浮沉淀。

将步骤（1）制备的胶体金溶液用 0.2M  $K_2CO_3$  调节至合适 PH 值。将抗乙型流感病毒单克隆抗体以合适标记量加入以上溶液中，室温搅拌。加入合适浓度的 BSA、PEG 等稳定剂，室温搅拌。以合适的速度离心至上清基本无色，小心吸去上清，用胶体金保存液悬浮沉淀。

将以上步骤获得的紫红色液体以合适比例混合即制成胶体金-抗体结合物。

### (3) 胶体金-抗体结合物的干燥

取胶体金-抗体结合物溶液，用胶体金工作液稀释成合适的浓度，分装到 2 毫升小瓶或小管中。放入冷冻干燥机上冻干过夜，至完全干燥。封口后，密闭干燥保存。

### (4) 硝酸纤维素膜的抗体包被

① 将抗甲型流感病毒抗体稀释成合适浓度。用喷膜机以合适的速度喷于硝酸纤维素膜上（甲型检测线）。

② 将抗乙型流感病毒抗体稀释成合适浓度。用喷膜机以合适的速度喷于硝酸纤维素膜上（乙型检测线），和甲型检测线间隔合适的距离。

③ 将羊抗鼠 IgG 多克隆抗体用稀释成合适浓度。用喷膜机以合适的速度喷于硝酸纤维素膜上（对照线）。和乙型检测线有一定的间隔。

④ 把固定有抗体的硝酸纤维素膜置 37℃ 烤箱中干燥充分干燥。

⑤置干燥环境中保存。

#### (5) 试纸条组装

- ① 在塑料板（作为支持物）中间位置粘贴包备有抗体的硝酸纤维素膜。
- ② 在塑料板上固定硝酸纤维素膜位置的顶端，粘附吸水垫，吸水垫覆盖硝酸纤维素膜边沿约 1 毫米左右。
- ③ 硝酸纤维素膜下方粘附样品垫，样品垫覆盖硝酸纤维素膜约 1 毫米。
- ④ 压平整后，在切条机上切成合适宽度的检测试纸条。
- ⑤ 干燥密闭保存。

#### (6) 样品稀释液的分装

将样品稀释液以合适的量分装入小瓶或管中，封口备用。

#### (7) 试剂盒组装

取 20 条检测试纸条，放入外包装盒中。取 20 瓶步骤（3）干燥后的胶体金-抗体结合物放入外包装盒中，取 20 瓶步骤（6）分装的样品稀释液放入外包装盒中，放入取样棉签，放入使用说明书。封外包装盒。

#### (8) 试剂盒使用说明

##### ① 取样

用取样棉签或其他合适工具取患者病变部位分泌物，将分泌物溶于样品稀释液中，取合适量的溶有患者分泌物的样品稀释液加入胶体金-抗体结合物中，充分混匀。

##### ② 检测

打开试纸条包装，取出检测试纸，将样品垫部分侵入取样步骤①中的液体，20 分钟时观察结果。

##### ③ 结果判断

甲型流感病毒阳性：在甲型检测线和对照线位置各出现一条红色色带。

乙型流感病毒阳性：在乙型检测线和对照线位置各出现一条红色色带。

阴性：只在对照线（C）位置有一条红色带出现。

如果对照线位置无红色带出现，不管甲型检测线和乙型检测线是否有色带出现都是检测无效，应重新检测。

### 实施例 3：梅毒螺旋体胶体硒检测试剂盒

- (1) 购买或制备颗粒大小合适的胶体硒溶液。

## (2) 胶体硒的标记

按照合适的步骤进行标记，将抗梅毒螺旋体单克隆抗体标记到胶体硒颗粒上。以合适的速度离心纯化标记后的乳胶颗粒，小心吸去上清，用保存液悬浮沉淀，即制成胶体硒-抗体结合物。

## (3) 胶体硒-抗体结合物的干燥

取胶体硒-抗体结合物溶液，用工作液稀释成合适的浓度。

将玻璃纤维或者 PE 复合膜平铺于玻璃板上，将稀释后的胶体硒-抗体结合物溶液均匀的滴加到上面。放入冷冻干燥机冻干过夜，至完全干燥。

将干燥后的玻璃纤维或者 PE 复合膜切成合适大小的小片，放入取样瓶中，封口后，密闭干燥保存。

## (4) 硝酸纤维素膜的抗体包备

① 将抗梅毒螺旋体抗体稀释成合适浓度。用喷膜机以合适的速度喷于硝酸纤维素膜上（检测线）。

② 将羊抗鼠 IgG 多克隆抗体用稀释成合适浓度。用喷膜机以合适的速度喷于硝酸纤维素膜上（对照线）。和检测线有一定的间隔。

③ 把固定有抗体的硝酸纤维素膜置 37℃ 烤箱中干燥充分干燥。

④ 置干燥环境中保存。

## (5) 试纸条组装

① 在塑料板（作为支持物）中间位置粘贴包备有抗体的硝酸纤维素膜。

② 在塑料板上固定硝酸纤维素膜位置的顶端，粘附吸水垫，吸水垫覆盖硝酸纤维素膜边沿约 1 毫米左右。

③ 硝酸纤维素膜下方粘附样品垫，样品垫覆盖硝酸纤维素膜约 1 毫米。

④ 压平整后，在切条机上切成合适宽度的检测试纸条。

⑤ 干燥密闭保存。

## (6) 样品稀释液的分装

将样品稀释液以合适的量分装入小瓶或管中，封口备用。

## (7) 试剂盒组装

取 20 条检测试纸条，放入外包装盒中。取 20 瓶步骤（3）干燥后的胶体硒-抗体结合物放入外包装盒中，取 20 瓶步骤（6）分装的样品稀释液放入外包装盒中，放入取样棉签，放入使用说明书。封外包装盒。

## (8) 试剂盒使用说明

### ① 取样

用取样棉签或其他合适工具取患者病变部位分泌物，将分泌物溶于样品稀

释液中，取合适量的溶有患者分泌物的样品稀释液加入胶体硒-抗体结合物中，充分混匀。

### ② 检测

打开试纸条包装，取出检测试纸，将样品垫部分侵入取样步骤①中的液体，20分钟时观察结果。

### ③ 结果判断

阳性：在检测线（T）和对照线（C）位置各出现一条色带。

阴性：只在对照线（C）位置有一条色带出现。

无色带出现或仅在检测线位置出现一条色带，说明检测无效，应重新检测。

## 实施例 4：腺病毒胶体金检测试剂（渗滤法）

1) 胶体金的制备采用化学还原法或其他适宜的方法制备 20 至 50nm 胶体金颗粒。

### (2) 胶体金的标记

将步骤（1）制备的胶体金溶液用 0.2M  $K_2CO_3$  调节至合适 PH 值。将抗梅毒螺旋体抗体以合适标记量加入以上溶液中，室温搅拌。加入合适浓度的 BSA、PEG 等稳定剂，室温搅拌。以合适的速度离心至上清基本无色，小心吸去上清，用胶体金保存液悬浮沉淀，即制成胶体金-抗体结合物。

### (3) 胶体金-抗体结合物的干燥

取胶体金-抗体结合物溶液，用胶体金工作液稀释成合适的浓度，分装到 2 毫升小瓶或小管中。放入冷冻干燥机上冻干过夜，至完全干燥。封口后，密闭干燥保存。

### (4) 硝酸纤维素膜的抗体包被

- ① 将抗梅毒螺旋体抗体稀释成合适浓度，点到硝酸纤维素膜上（检测点）。
- ② 将羊抗鼠 IgG 多克隆抗体用稀释成合适浓度。点到检测点旁边（对照点）。
- ③ 把固定有抗体的硝酸纤维素膜置 37℃ 烤箱中干燥充分干燥。
- ④ 置干燥环境中保存。

### (5) 检测卡组装

- ① 在检测卡低托上放合适厚度的吸水纸。
- ② 将固定有抗体的硝酸纤维素膜放于吸水纸上方，扣上检测卡上盖。
- ③ 干燥密闭保存。

### (6) 样品稀释液的分装

将样品稀释液以合适的量分装入小瓶或管中，封口备用。

#### (7) 试剂盒组装

取 20 个检测卡，放入外包装盒中。取 20 瓶步骤 (3) 干燥后的胶体金-抗体结合物放入外包装盒中，取 20 瓶步骤 (6) 分装的样品稀释液放入外包装盒中，放入取样棉签，放入使用说明书。封外包装盒。

#### (8) 试剂盒使用说明

##### ① 取样

用取样棉签或其他合适工具取患者病变部位分泌物，将分泌物溶于样品稀释液中，取合适量的溶有患者分泌物的样品稀释液加入胶体金-抗体结合物中，充分混匀。

##### ② 检测

打开试纸卡包装，取出检测试纸卡，将取样步骤①中的液体滴入试纸卡加样孔中，10 至 15 分钟时观察结果。

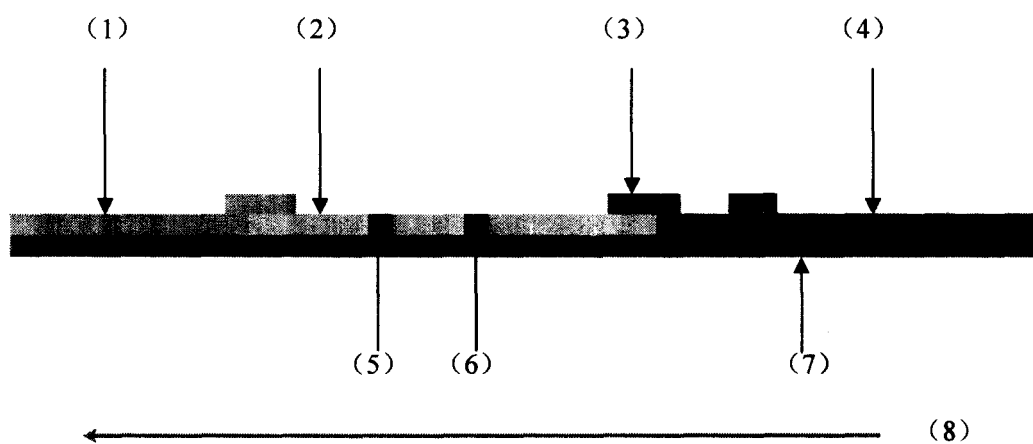
##### ③ 结果判断

阳性：在检测点和对照点位置各出现一个红色圆点。

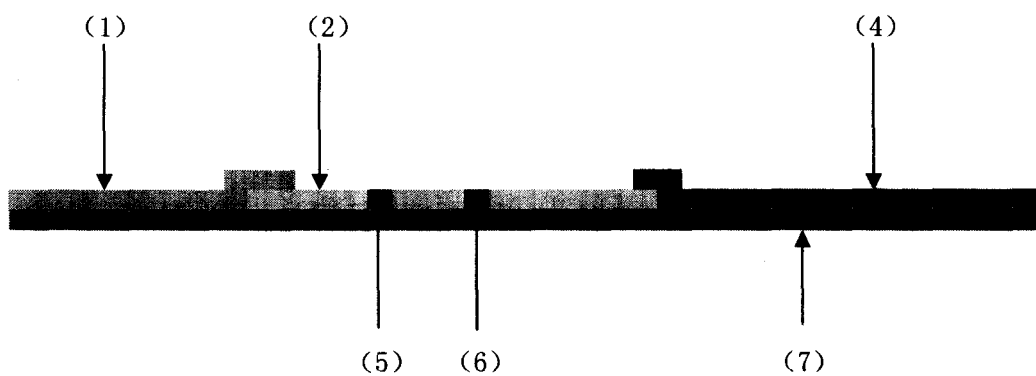
阴性：只在对照点位置有一个红色圆点出现。

无红色圆点出现或仅在检测点位置出现一个红色圆点，说明检测无效，应重新检测。

附图 1：免疫层析法原理和通常组分模式图



附图 2：采用本发明后的检测试纸模式图



专利名称(译)	一种提高以胶体金属或乳胶颗粒作为标记物的检测试剂灵敏度的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101236201A</a>	公开(公告)日	2008-08-06
申请号	CN200710003023.8	申请日	2007-01-31
[标]申请(专利权)人(译)	储宁		
申请(专利权)人(译)	储宁		
当前申请(专利权)人(译)	储宁		
[标]发明人	储宁		
发明人	储宁		
IPC分类号	G01N33/532		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种能够提高以胶体金属(胶体金、胶体硒等)或乳胶颗粒作为标记物制做的快速检测试剂灵敏度的方法。本方法适用的范围是以双抗体夹心为原理，以胶体金属(胶体金、胶体硒等)或乳胶颗粒作为标记物制作的免疫层析检测试纸或渗滤试剂。其特点在于将标记有抗体并干燥后的胶体金属或乳胶颗粒不贴在样品垫和硝酸纤维素膜中间，将其干燥在另外的容器或者支持物上，检测时首先将标记有抗体并干燥后的胶体金属或乳胶颗粒和待检测样品混合。在试纸条上只粘贴样品垫、硝酸纤维素膜、吸水垫，样品垫用来加待检测的样品，硝酸纤维素膜上固定有抗体作为检测线，检测线可以是一条或者多条，硝酸纤维素膜上还固定有对照线。

