



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102183633 B

(45) 授权公告日 2013.05.15

(21) 申请号 201110044743.5

(22) 申请日 2011.02.24

(73) 专利权人 南京基蛋生物科技有限公司
地址 211505 江苏省南京市六合区沿江工业
开发区博富路9号

(72) 发明人 苏恩本 王勇 王路海 颜彬

(74) 专利代理机构 南京天华专利代理有限责任
公司 32218
代理人 徐冬涛

(51) Int. Cl.

G01N 33/532(2006.01)

(56) 对比文件

- CN 101858916 A, 2010.10.13, 全文.
- CN 101609091 A, 2009.12.23, 全文.
- CN 102141567 A, 2011.08.03, 全文.
- CN 101949936 A, 2011.01.19, 全文.
- CN 101881769 A, 2010.11.10, 全文.
- CN 101858915 A, 2010.10.13, 全文.
- CN 101655496 A, 2010.02.24, 全文.

CN 101614740 A, 2009.12.30, 全文.

CN 101566634 A, 2009.10.28, 全文.

CN 101105497 A, 2008.01.16, 全文.

WO 2005069002 A1, 2005.07.28, 全文.

EP 1436420 A2, 2004.07.14, 全文.

US 5298135 A, 1994.03.29, 全文.

郝建秀. 人心肌钙蛋白 I 胶体金免疫层析试纸条的研制及初步应用. 《中国优秀硕士学位论文全文数据库 医药卫生科技辑》. 2011, (第 11 期), E060-70.

郝建秀等. 人心肌钙蛋白 I 胶体金免疫层析试纸条的研制. 《生物医学工程与临床》. 2010, 第 14 卷 (第 6 期), 1.2.3.2 部分 胶体金最佳工作 pH 的选择.

审查员 王晓媛

权利要求书1页 说明书4页

(54) 发明名称

一种胶体金标记方法

(57) 摘要

本发明属于免疫金标技术,公开了一种胶体金标记方法,该方法依次包括如下步骤:(1)制备胶体金颗粒溶液;(2)将制备好的胶体金颗粒溶液调节 pH 至 7.5,加入待标记蛋白或者待标记抗体,用 HCl 调节 pH 至酸性反应环境,反应 10~30 分钟;(3)冷却;(4)用 1% 的碱性溶液调节金标抗体或金标蛋白溶液的 pH 至碱性环境中稳定;其中步骤 (4) 所述的调节金标抗体或金标蛋白溶液的 pH 至碱性环境是用 1% 的碱性溶液每 5~15 秒加入一滴,使 10 滴 pH 变化量为 0.5~1.0 个 pH,将金标抗体溶液的 pH 从酸性调节到 7.5~8.0。本发明缓慢复碱的胶体金标记方法一方面提高了稳定性,另一方面相对又提高了灵敏度。

CN 102183633 B

1. 一种胶体金标记方法,依次包括如下步骤:(1)制备胶体金颗粒溶液;(2)将制备好的胶体金颗粒溶液调节 pH 至 7.5,加入待标记蛋白或者待标记抗体,用 HCl 调节 pH 至酸性反应环境,反应 10~30 分钟,所述的酸性反应环境为 pH=4-6.5;(3)冷却;(4)用 1% 的碱性溶液调节金标抗体或金标蛋白溶液的 pH 至碱性环境中稳定;其特征在于步骤(4)所述的调节金标抗体或金标蛋白溶液的 pH 至碱性环境是用 1% 的碱性溶液每 5~15 秒加入一滴,使 10 滴 pH 变化量为 0.5~1.0 个 pH,将金标抗体溶液的 pH 从酸性调节到 7.5~8.0;其中所述的待标记蛋白为链亲和素,所述待标记抗体为心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体 M155。

2. 根据权利要求 1 所述的胶体金标记方法,其特征在于所述的冷却温度为 0~4℃,冷却时间为 10~20 分钟。

3. 根据权利要求 2 所述的胶体金标记方法,其特征在于:所述的冷却温度为 4℃,冷却时间为 15 分钟。

4. 根据权利要求 1 所述的胶体金标记方法,其特征在于:所述的碱性溶液为碳酸钾、碳酸钠或氢氧化钾。

一种胶体金标记方法

技术领域

[0001] 本发明属于免疫金标技术,涉及一种胶体金标记方法,具体涉及一种胶体金标记链亲和素或抗体的方法。

背景技术

[0002] 免疫金标法是九十年代后发展起来的,因其快速,操作简便,试剂稳定,可室温储运,不易污染的特点得到广泛的应用。它是免疫亲和技术,印记技术,免疫标记和层析技术的组合。然而由于胶体金具有强烈的电荷性,通过静电吸附抗体或蛋白,在 pH 的变化下,很容易造成抗体或蛋白的脱离并且吸附抗体或蛋白后的胶体金不稳定。

发明内容

[0003] 本发明的目的是针对现有技术的上述不足,提供一种胶体金标记方法。

[0004] 一种胶体金标记方法,依次包括如下步骤:(1) 制备胶体金颗粒溶液;(2) 将制备好的胶体金颗粒溶液调节 pH 至 7.5,加入待标记蛋白或者待标记抗体,用 HCl 调节 pH 至酸性反应环境,反应 10 ~ 30 分钟;(3) 冷却;(4) 用 1% 的碱性溶液调节金标抗体或金标蛋白溶液的 pH 至碱性环境中稳定;其中步骤 (4) 所述的调节金标抗体或金标蛋白溶液的 pH 至碱性环境是用 1% 的碱性溶液每 5 ~ 15 秒加入一滴,使 10 滴 pH 变化量为 0.5 ~ 1.0 个 pH,将金标抗体溶液的 pH 从酸性调节到 7.5 ~ 8.0。

[0005] 所述的冷却温度优选 0 ~ 4℃,冷却时间优选 10 ~ 20 分钟。

[0006] 所述的冷却温度进一步优选 4℃,冷却时间进一步优选 15 分钟。

[0007] 所述的酸性反应环境为 pH = 4-6.5。

[0008] 所述待标记抗体为单克隆或多克隆抗体,待标记蛋白为链亲和素。

[0009] 所述的碱性溶液为碳酸钾、碳酸钠或氢氧化钾。

[0010] 有益效果:

[0011] 现有的胶体金标记方法中,胶体金连接了待标记抗体或待标记蛋白之后,很不稳定,很容易因电荷的变化使得抗体脱离,造成每个胶体金的标记抗体量大大减少,从而造成灵敏度的降低。本发明通过缓慢复碱的方法提高标记抗体或链亲和素的灵敏度。在胶体金结合抗体或链亲和素的过程中,先调节胶体金、待标记抗体或蛋白的混合液至反应的酸性 pH,使胶体金通过静电吸附将抗体或链亲和素最大量的吸附在胶体金颗粒上,然后通过冷却,使标记了抗体或链亲和素的胶体金电荷趋于不活跃的状态,在这样的情况下,缓慢调节反应体系的 pH 至碱性(即缓慢复碱)使标记了的抗体或蛋白的电荷在 pH 缓慢改变的情况下达到稳定的状态,从而不易使待标记抗体或待标记蛋白在剧烈的 pH 变化下脱离胶体金颗粒,一方面提高了稳定性,另一方面相对又提高了灵敏度。

具体实施方式

[0012] 实施例 1

[0013] 氯金酸水溶液的配制:将 10g 氯金酸 1000ml 的三蒸水溶解,配成 1%的水溶液,置于 4℃备用,有效期 3 个月。

[0014] 柠檬酸三钠的配制:用三蒸水溶解柠檬酸三钠,配成 1%的水溶液,用 0.22U 膜滤过,置于 4℃备用,有效期 7 天。

[0015] 1%碳酸钾水溶液的配制:将 1g 碳酸钾用 100ml 用三蒸水溶解,用 0.22U 膜滤过,置于 4℃备用,有效期为 7 天。

[0016] 0.5M 的 HCl 溶液的配制:将 5M 的 HCl 溶液用三蒸水稀释 10 倍,置于 4℃备用,有效期为 7 天。

[0017] 胶体金的颗粒的制备:用三蒸水将 1%氯金酸稀释成 0.01%,置于 95℃反应 10 分钟,加入 1ml 柠檬酸三钠,继续反应 15 分钟,待胶体金溶液颜色由蓝经紫变红后,冷却后加入 2ml 1%碳酸钾溶液备用。外观应纯净,透亮,无沉淀和漂浮物。

[0018] 标记过程:用 1%碳酸钾水溶液调胶体金颗粒溶液 pH 值至 7.5,按照 15ug 链亲和素或抗体溶液/ml 胶体金的量加入链亲和素或心肌钙蛋白 I 单克隆抗体 M155 充分混匀,用 0.5M 的 HCl 溶液缓慢滴加调节至最合适反应 pH = 5,反应 10 分钟,放置 4℃,冷却 15 分钟后,取出,边搅拌边用 1%碳酸钾水溶液缓慢滴加(每隔 10 秒一滴,使 10 滴 pH 变化量为 0.5 个 pH)调节溶液 pH 至 7.5,稳定搅拌 10 分钟。

[0019] 实施例 2

[0020] 为了进一步说明运用在金标系统中的缓慢复碱法的优越性,我们采用了将同样的金标系统,将缓慢复碱改成快速复碱和不复碱两种不同的方法,运用到心肌钙蛋白 I 检测试剂卡的实际应用中,

[0021] 胶体金试纸条的具体制备方法如下:

[0022] 1) 包被膜的制备:所使用的抗体均购自 Fitzgerald 公司。

[0023] a) 包被缓冲液的制备:将 0.025M, pH7.4 的 PBS,用 0.22u 膜过滤,置于 4℃备用,有效期 7 天。

[0024] b) 封闭液的制备:将含 1% BSA, 1%蔗糖, 0.025M, pH7.5 的 PBS,用 0.22U 膜过滤,置于 4℃备用,有效期为 3 天。

[0025] c) 心肌钙蛋白 I 单克隆抗体检测线的制备:将心肌钙蛋白 I 单克隆抗体 4C2 按 4.5mg/ml 的浓度,蠕动泵授液量 0.4ml/min,划线速度 50m/20min,在硝酸纤维膜中部上划线,该线与检测线 6 平行,两线相隔 4mm,细致均匀在干燥箱内 20℃鼓风干燥 12 小时。

[0026] d) 控制线的制备:将兔抗鼠 IgG 抗体按 8mg/ml 的浓度,蠕动泵授液量 0.4ml/min,划线速度 50m/20min,在硝酸纤维膜上部划线,该线与检测线 7 平行,两线相隔 4mm,细致均匀,放入干燥箱内 20℃鼓风干燥 12 小时。

[0027] e) 用上述封闭液将含有检测线和控制线的硝酸纤维素膜于 37℃封闭 60 分钟,取出后置 37℃下烘干处理两个小时,封袋备用。

[0028] 2) 涂覆金标抗体的聚酯膜的制备:

[0029] a) 氯金酸水溶液的配制:将 10g 氯金酸 1000ml 的三蒸水溶解,配成 1%的水溶液,置于 4℃备用,有效期 3 个月。

[0030] b) 柠檬酸三钠的配制:用三蒸水溶解柠檬酸三钠,配成 1%的水溶液,用 0.22U 膜滤过,置于 4℃备用,有效期 7 天。

[0031] c) 1% 碳酸钾水溶液的配制 : 将 1g 碳酸钾用 100ml 用三蒸水溶解, 用 0.22U 膜滤过, 置于 4℃ 备用, 有效期为 7 天。

[0032] d) 金标抗体保存液的配制 : 将 15g 的蔗糖, 20u1 的叠氮钠, 在 100ml 的 pH = 7.4 的 1% BSA 溶解, 用 0.22U 膜滤过, 置于 4℃ 备用, 有效期为 7 天。

[0033] e) 胶体金的颗粒的制备 : 用三蒸水将 1% 氯金酸稀释成 0.01%, 置于 95℃ 反应 10 分钟, 加入 1ml 柠檬酸三钠, 继续反应 15 分钟, 待胶体金溶液颜色由蓝经紫变红后, 冷却后加入 2ml 1% 碳酸钾溶液备用。外观应纯净, 透亮, 无沉淀和漂浮物。

[0034] f) 金标抗体的制备 : 用 1% 碳酸钾溶液调节胶体金 pH 值至 7.5, 加入适合的心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体 M155 溶液充分混匀, 调节 pH 至 5.0, 反应 10 ~ 30 分钟后, 冷却后, 分成两份, 一份快速复碱, 另一份按照实施例 1 方法缓慢复碱, 然后将两份置于 25℃ 水浴反应 30 分钟后再加入 5% BSA, 封闭 20 分钟后, 离心取沉淀, 用 BSA 恢复其终浓度为 1%, 4℃ 保存备用。

[0035] g) 将标记好抗体胶体金均匀的铺在聚酯膜上, 喷量为 1.0u1/cm*3 道, 干燥, 封袋, 备用。

[0036] 3) 样品垫的处理

[0037] 将样品垫用 100mM PBS 缓冲液浸泡数小时, 取出干燥后。

[0038] 4) 胶体金试纸条的组装 :

[0039] 底衬 1, 样品垫 2 和吸水纸 5 是本领域通用的部件。将上述样品垫 2、涂覆有金标抗体的聚酯膜 3、包被膜 4 及吸水纸 5 顺次相互搭接粘贴得到试纸板, 最后将试纸板切割成不同宽度的试纸条即可。

[0040] 将两种不同复碱情况制备好的试纸条进行灵敏度和稳定性的对比。对比数据如下 :

[0041] 灵敏度的比较

[0042]

	1ng/ml	4ng/ml	8ng/ml	16ng/ml	32ng/ml
缓慢复碱法	+	++	+++	++++	+++++
快速复碱法	-	+-	+	++	+++
不复碱	由于不复碱, 在离心过程中出现沉淀或变黑的现象。在金标系统中不能被利用, 故不采用这种方法。				

[0043] 稳定性的比较

[0044]

16ng/ml					
	1 天	1 个月	3 个月	6 个月	12 个月
缓慢复碱法	++++	++++	++++	++++	+++
快速复碱法	++	+	+-	-	-
不复碱	由于不复碱, 在离心过程中出现沉淀或变黑的现象。在金标系统中不能被利用, 故不采用这种方法。				

[0045] 备注：“-”表示不显色，呈阴性结果。“+”表示显色程度，+ 越多，显色程度越深，阳性程度越严重。

[0046] 在以上的实施例中，未详细描述的各种过程和方法是本领域中公知的常规方法。

[0047] 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，任何熟悉本专业的技术人员可能利用上述揭示的技术内容加以变更或改型为等同变化的等效实施例。但是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。

专利名称(译)	一种胶体金标记方法		
公开(公告)号	CN102183633B	公开(公告)日	2013-05-15
申请号	CN201110044743.5	申请日	2011-02-24
[标]申请(专利权)人(译)	基蛋生物科技股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	南京基蛋生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	南京基蛋生物科技有限公司		
[标]发明人	苏恩本 王勇 王路海 颜彬		
发明人	苏恩本 王勇 王路海 颜彬		
IPC分类号	G01N33/532		
审查员(译)	王晓媛		
其他公开文献	CN102183633A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于免疫金标技术，公开了一种胶体金标记方法，该方法依次包括如下步骤：(1)制备胶体金颗粒溶液；(2)将制备好的胶体金颗粒溶液调节pH至7.5，加入待标记蛋白或者待标记抗体，用HCl调节pH至酸性反应环境，反应10~30分钟；(3)冷却；(4)用1%的碱性溶液调节金标抗体或金标蛋白溶液的pH至碱性环境中稳定；其中步骤(4)所述的调节金标抗体或金标蛋白溶液的pH至碱性环境是用1%的碱性溶液每5~15秒加入一滴，使10滴pH变化量为0.5~1.0个pH，将金标抗体溶液的pH从酸性调节到7.5~8.0。本发明缓慢复碱的胶体金标记方法一方面提高了稳定性，另一方面相对又提高了灵敏度。

	1ng/ml	4ng/ml	8ng/ml	16ng/ml	32ng/ml
缓慢复碱法	+	++	+++	++++	++++
快速复碱法	-	+	+	++	+++
不复碱	由于不复碱，在离心过程中出现沉淀或变黑的现象。在金标系统中不能被利用，故不采用这种方法。				