[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
C01B 19/02
G01N 33/532

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02129360.0

[43] 公开日 2004 年 3 月 10 日

[11] 公开号 CN 1480391A

[22] 申请日 2002.9.6 [21] 申请号 02129360.0

[71] 申请人 中国人民解放军军事医学科学院野战输血研究所

地址 100850 北京市海淀区太平路 27 号

[72] 发明人 刘晓达 李保昌 王全立 彭剑淳 周锡鹏 孙 萍 杨淑华

权利要求书 1 页 说明书 4 页

[54] 发明名称 胶体纳米硒颗粒的制备方法

[57] 摘要

本发明涉及一种在常温下制备胶体纳米硒颗粒的方法。它在常温下以亚硒酸和抗坏血酸为原料进行制备。该方法需要时间短，产量高，采用本发明方法的标记物用于免疫层析检测的灵敏度高，在医疗卫生的快速检测中有广阔的应用前景。

ISSN 1008-4274

知识产权出版社出版

1. 一种胶体硒颗粒的制备方法，包括以下步骤：

（1）在反应器中依次加入抗坏血酸、亚硒酸和抗坏血酸；

（2）从反应开始第四分钟起间隔滴加亚硒酸和抗坏血酸，然后进行光谱扫描，以500～600nm间出现最大吸收峰为宜；

（3）加入10％葡聚糖终止反应；

（4）收集产物备用。

# 胶体纳米硒颗粒的制备方法

## 技术领域

本发明涉及一种在常温下制备胶体纳米硒颗粒的方法。

## 背景技术

在许多情况下需要快速检测，如急诊、现场大规模筛查、现场血液检验和家庭自检等。在现有的诸多快速检验方法中，首推免疫层析的灵敏度高、特异性强、所需时间最短。较为常用的是胶体金标记免疫层析检测方法，该方法的关键技术有胶体颗粒的合成、蛋白的标记和层析装置的制作处理工艺。胶体金颗粒可以通过柠檬酸钠对氯化金的还原反应制备，胶体金颗粒的大小可以通过调整柠檬酸钠的浓度来改变。国外也有用胶体金颗粒与胶体硒颗粒混合标记免疫层析检测方法（WO9723774）。国外制备胶体硒颗粒所使用的原料为 $SeO_2$，需要在加热条件下进行，反应需要 1 小时左右，时间较长，OD520 达到 1.457，产量低（US5348891），标记物用于免疫层析的灵敏度较低，检测乙型肝炎表面抗原（HBsAg）的检测下限为 2.5ng/mL。

## 发明内容

本发明为一种胶体硒颗粒的制备方法，其特征是在常温下以亚硒酸和抗坏血酸为原料进行制备。其制备方法，包括以下步骤：

（1）在反应器中依次加入抗坏血酸、亚硒酸和抗坏血酸；

（2）从反应开始第四分钟起间隔滴加亚硒酸和抗坏血酸，然后进行光谱扫描，以 500－600nm 间出现最大吸收峰为宜；

（3）加入 10％葡聚糖终止反应；

（4）收集产物备用。

本法明所述胶体硒制备方法采用的原料为亚硒酸，反应在常温下进行，不需要加热。反应只需要 20 分钟，产量 OD520 可达 30 以上，缩短了时间。采用本发明方法的标记物用于免疫层析检测的灵敏度较高，检测乙型肝炎表面抗原的检测下限为 0.2ng/mL。

本发明的胶体硒制备方法具有方便、省时、灵敏度高、产量高，标记蛋白质用量比常规方法用量低 10 倍；冷冻干燥技术使标记物的稳定性大大增强，可室温保存一年以上。

**具体实施方式**

实施例一 **胶体纳米硒合成方法**

1．试剂

3.3％亚硒酸，10％抗坏血酸，10％葡聚糖 T70

2．合成步骤：以合成 100ml 胶体硒为例。

2.1 去离于水 100ml 置于洁净的玻璃器皿中（有条件可硅化），选用适合大小的搅拌子，中速搅拌。

2.2 依顺序加入抗坏血酸、亚硒酸、抗坏血酸各 1ml。

2.3 从第四分钟起间隔滴加 0.5ml 亚硒酸和 1ml 抗坏血酸，共重复滴加 20 次。然后进行光谱扫描，以 500～600nm 间出现最大吸收峰为宜。

2.4 加入 1ml 的 10％葡聚糖 T70 终止反应。

3．产物的处理：产物 4℃可保存 2 个月。

实施例二 **免疫层析法检测 HBsAg**

1．抗体标记

1.1 试剂

0.2mol/L $K_2CO_3$，10% PEG20000，10%BSA，TBS 保存液（0.02 mol/L Tris，0.15 mmol/L NaCl，1%BSA，0.05% $NaN_3$）

1.2 胶体硒的处理

1.2.1 1000r/min 离心 1 分钟，去大颗粒。

1.2.2 用去离子水调整胶体硒 OD 值为 15.0。

1.2.3 以 0.2mol/L $K_2CO_3$ 调整胶体硒 pH＝7.5。

1.3 抗体的标记

1.3.1 在 1ml 胶体硒溶液中加入 5～20μg 的待标记抗体，混匀，标记 10 分钟。

1.3.2 加入 10% 的 BSA 至终浓度为 1%，混匀，放置 10 分钟。

1.3.3 7000r/min 离心 5 分钟，弃上清，用 TBS 液洗涤 1 次。

1.3.4 用与原胶体硒等体积的 TBS 重悬。

2．标记物的冻干保存

2.1 在上述重悬液中加入终浓度为 0.5%的酪蛋白和 0.15mol/L 的海藻糖。

2.2 在 0.3×0.5cm 大小的玻璃毡上加标记物 15μl / 条，－70℃冷冻 30 分钟，负压抽干 2 小时。

3．抗体的包被

3.1 在硝酸纤维素膜上用特异性抗体喷点或线，1μl / 条。37℃放置 15 分钟，然后封闭。

3.2 封闭：将层析膜浸于封闭液中，37℃封闭 30 分钟。

3.3 用漂洗液漂洗两次，每次 5 分钟，最后用蒸馏水漂洗五次，37℃干燥 30 分钟。

3.4 4℃干燥密封保存。

3.5 用于检测 HBsAg：用 100μl 血清或全血，用时不多于 15 分钟，灵敏度可达 0.2ng / ml。

| | | | |
|---|---|---|---|
| 专利名称(译) | 胶体纳米硒颗粒的制备方法 | | |
| 公开(公告)号 | CN1480391A | 公开(公告)日 | 2004-03-10 |
| 申请号 | CN02129360.0 | 申请日 | 2002-09-06 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 中国人民解放军军事医学科学院野战输血研究所 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 中国人民解放军军事医学科学院野战输血研究所 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 中国人民解放军军事医学科学院野战输血研究所 | | |
| [标]发明人 | 刘晓达<br>李保昌<br>王全立<br>彭剑淳<br>周锡鹏<br>孙萍<br>杨淑华 | | |
| 发明人 | 刘晓达<br>李保昌<br>王全立<br>彭剑淳<br>周锡鹏<br>孙萍<br>杨淑华 | | |
| IPC分类号 | C01B19/02 G01N33/532 | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |


摘要(译)

本发明涉及一种在常温下制备胶体纳米硒颗粒的方法。它在常温下以亚硒酸和抗坏血酸为原料进行制备。该方法需要时间短，产量高，采用本发明方法的标记物用于免疫层析检测的灵敏度高，在医疗卫生的快速检测中有广阔的应用前景。