

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

G01N 21/64

G01N 33/558



## [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410010736.3

[43] 公开日 2005年1月12日

[11] 公开号 CN 1563951A

[22] 申请日 2004.3.19

[21] 申请号 200410010736.3

[71] 申请人 中国科学院长春应用化学研究所

地址 130022 吉林省长春市人民大街5625号

[72] 发明人 李景虹 李军 李迪

权利要求书2页 说明书6页 附图1页

[54] 发明名称 胶体金和半导体荧光纳米粒子双标记快速免疫检测试纸

[57] 摘要

本发明涉及一种胶体金和半导体荧光纳米粒子双标记快速免疫检测试纸的制备和应用。本发明在传统的胶体金免疫检测的基础上，又将半导体荧光纳米粒子与目标抗原的一种抗体形成的复合物固定在检测带上。既通过肉眼对检测带进行初步定性或半定量检测，又由于胶体金对荧光纳米粒子具有荧光淬灭作用，通过荧光信号的变化对该检测带进行定量检测。本发明将胶体金免疫技术和荧光纳米标记技术同时运用到快速检测试纸上，既能进行定性检测同时又能做定量测定，并且实现一项多检，省时省力，节约成本。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、一种胶体金和半导体荧光纳米粒子双标记快速免疫试纸的制备，步骤如下：

(1) 胶体金的制备，胶体金通过用柠檬酸三钠还原氯金酸制备得到，胶体金表面带有负电荷，粒径为 13—60nm；

(2) 胶体金与目标抗原的一种抗体形成免疫复合物 (I)，胶体金与目标抗原的一种抗体混合搅拌，带正电荷的抗体通过静电作用吸附在胶体金上；

(3) 免疫复合物 (I) 的固定与干燥，将所述的免疫复合物 (I) 用百德 (Bio-Dot) 仪的喷头喷到醋酸纤维素膜或硝酸纤维素膜上，形成胶体金垫，于 36℃—37℃干燥待用；

(4) 半导体荧光纳米粒子的制备，半导体荧光纳米粒子为 CdTe 水溶性纳米粒子，其粒径为 2-10nm；CdTe 纳米粒子用镉盐-硫醇 (MSH) 复合物与离子型碲源 NaHTe 在 100℃加热回流制得，控制回流时间，得到发光颜色不同的纳米粒子水溶胶；回流 5 分钟至 2 小时，得到绿色发光；回流 3 小时至 8 小时，得到黄色发光；回流 9 小时至 14 小时，得到橙色发光；回流 15—20 小时，得到红橙色发光；回流 21—24 小时，得到红色发光；

(5) 半导体荧光纳米粒子与目标抗原的另一种抗体形成免疫复合物 (II)，半导体荧光纳米粒子与目标抗原的另一种抗体混合搅拌；

(6) 免疫复合物 (II) 的固定，将所述的免疫复合物 (II) 用百

德 (Bio-Dot) 仪的喷头喷到醋酸纤维素膜或硝酸纤维素上形成检测带;

(7) 将抗抗体 (二抗) 喷到膜上形成对照带, 用中性蛋白封闭对照带, 在  $36^{\circ}\text{C}$ — $37^{\circ}\text{C}$  下干燥待用。

2、权利要求 1 制备的胶体金和半导体荧光纳米粒子双标记快速免疫试纸用于乙肝表面抗原, 人绒毛膜促性腺激素和艾滋病病毒的免疫检测。

## 胶体金和半导体荧光纳米粒子双标记快速免疫检测试纸

### 技术领域

本发明属于胶体金和半导体荧光纳米粒子双标记快速免疫检测试纸的制备和应用

### 背景技术

胶体金免疫检测试纸作为一种新的免疫学方法，发展极其迅速，在医学检测中得到了日益广泛的应用。它具有操作使用安全、简便、快速、适于单人份检测等优点。在某些项目中，在胶体金表明固定某一检测目标的特异性抗体作为标记物的胶体金免疫检测试纸，已经逐渐取代了传统的放射性免疫检测和酶联免疫检测。中国专利申请号94239768.1以表面吸附人绒毛膜促性腺激素抗体的胶体金为标记物，制备了用于早孕检测的胶体金免疫检测试纸；中国专利申请号99203566.X以表面吸附乙肝抗体的胶体金为标记物，制备了用于乙肝表面抗原检测地胶体金免疫检测试纸；中国专利申请号01135100.4以表面吸附有特异性艾滋病多肽抗体的胶体金为标记物，制备了用于艾滋病病毒的检测的胶体金免疫检测试纸。

但胶体金免疫检测试纸在运用上具有以下缺点：单纯依靠显色深浅来判断结果的胶体金快速免疫检测试纸，只能作定性或半定量检测而不能做定量检测；由于方法学的限制，只使用胶体金为标记物的快

速免疫检测试纸，其灵敏度较低；对于某些抗原含量较低的样品，由于胶体金免疫检测试纸受灵敏度限制，会造成假阴性，因而检出率较低。

#### 发明内容

本发明的目的是提供一种胶体金和半导体荧光纳米粒子双标记快速免疫检测试纸的制备方法；

本发明的另一目的是提供一种胶体金和半导体纳米荧光粒子双标记快速免疫检测试纸的应用。

由于半导体纳米荧光粒子的激发谱在吸收阈值以上几乎是连续的，谱峰较宽，利于多波长激发；高强度的荧光发射，谱峰窄，峰形对称；发射波长随着粒径的增大而有规律的红移，只需改变粒径即可获得多色发光；纳米晶的发光稳定性好，不容易被光分解和漂白。因此，有关半导体纳米粒子作为新一代荧光生物标记物研究已经逐渐开展。当胶体金与半导体纳米粒子接近时，胶体金能有效淬灭 CdTe 半导体纳米粒子的荧光。这种淬灭作用极其灵敏，而且是定量的。

检测试纸条的制作步骤如下：

(1) 胶体金的制备，胶体金通过用柠檬酸三钠还原氯金酸制备得到，胶体金表面带有负电荷，粒径为 13—60nm；

(2) 胶体金与目标抗原的一种抗体形成免疫复合物 (I)，胶体金与目标抗原的一种抗体混合搅拌，带正电荷的抗体通过静电作用吸附在胶体金上；

(3) 免疫复合物 (I) 的固定与干燥，将所述的免疫复合物 (I) 用

百德 (Bio-Dot) 仪的喷头喷到醋酸纤维素膜或硝酸纤维素膜上, 形成胶体金垫, 于  $36^{\circ}\text{C} - 37^{\circ}\text{C}$  干燥待用;

(4) 半导体荧光纳米粒子的制备, 半导体荧光纳米粒子为 CdTe 水溶性纳米粒子, 其粒径为 2-10nm; CdTe 纳米粒子用镉盐-硫醇 (MSH) 复合物与离子型碲源 NaHTe 在  $100^{\circ}\text{C}$  加热回流制得, 控制回流时间, 得到发光颜色不同的纳米粒子水溶胶; 回流 5 分钟至 2 小时, 得到绿色发光; 回流 3 小时至 8 小时, 得到黄色发光; 回流 9 小时至 14 小时, 得到橙色发光; 回流 15-20 小时, 得到红橙色发光; 回流 21-24 小时, 得到红色发光;

(5) 半导体荧光纳米粒子与目标抗原的另一种抗体形成免疫复合物 (II), 半导体荧光纳米粒子与目标抗原的另一种抗体混合搅拌;

(6) 免疫复合物 (II) 的固定, 将所述的免疫复合物 (II) 用百德 (Bio-Dot) 仪的喷头喷到醋酸纤维素膜或硝酸纤维素上形成检测带;

(7) 将抗抗体 (二抗) 喷到膜上形成对照带, 用中性蛋白封闭对照带, 在  $36^{\circ}\text{C} - 37^{\circ}\text{C}$  下干燥待用。

#### 附图说明

附图 1 是胶体金和半导体荧光纳米粒子双标记快速免疫检测试纸的示意图。

图中 (1) 样品垫; (2) 金垫, 免疫复合物 (I) 固定于此; (3) 层析方向; (4) 检测带, 免疫复合物 (II) 固定于此; (5) 对照带, 固定有二抗。

在实际检测应用中, 被测样品滴在样品垫上。当免疫复合物 (I)

与样品中目标抗原结合后，层析至膜的检测带时，被免疫复合物（II）捕获，通过肉眼对检测带进行初步定性或半定量检测。又由于胶体金对半导体荧光纳米粒子具有荧光淬灭作用，通过荧光信号的变化对该检测带进行定量检测。在检测灵敏度要求较低的分析样时，先根据肉眼判断，并根据需要对试纸条作定量检测。同时只改变半导体荧光纳米粒子的粒径，即获得多色发光，实现用不同粒径的半导体荧光纳米粒子标记物进行多项指标检测。

本发明将传统的胶体金标记和半导体荧光纳米粒子标记技术同时应用于免疫检测试纸的制备中。制备的检测试纸，具有高灵敏度和高检测率的特点。该检测试纸能用于一项多检的快速检测；能检测全血、血清、血浆、尿液等样本；能用于乙肝表面抗原、人绒毛膜促性腺激素、艾滋病病毒的检测。

具体实施方式如下

#### 实施例 1

直径为 13nm 的胶体金与乙肝表面抗原（HBsAg）的一种单克隆抗体结合形成免疫复合物（I），将免疫复合物（I）用百德（Bio-Dot）仪的喷头喷到醋酸纤维素膜上，形成胶体金垫，于 36℃干燥；直径为 2nm 的 CdTe 纳米晶与乙肝表面抗原的另一种单克隆抗体结合形成免疫复合物（II），将免疫复合物（II）用百德（Bio-Dot）仪的喷头喷到醋酸纤维素膜上形成检测带；将抗抗体（二抗）喷到膜上形成对照带，以中性蛋白封闭后，在 36℃下干燥待用，制得本发明所述胶体金和半导体荧光纳米粒子双标记快速免疫检测试纸。

## 实施例 2

胶体金的直径为 30nm，CdTe 的直径为 7nm，干燥温度为 37℃，试纸材料为硝酸纤维膜，其它制备条件与实施例 1 相同，制得本发明所述胶体金和半导体荧光纳米粒子双标记快速免疫检测试纸。

## 实施例 3

胶体金的直径 40nm，CdTe 的直径为 5nm，所用抗体为人绒毛膜促性腺激素（HCG）的两种单克隆抗体，其它制备条件与实施例 1 相同，制得本发明所述胶体金和半导体荧光纳米粒子双标记快速免疫检测试纸。

## 实施例 4

胶体金的直径为 60nm，CdTe 的直径为 10nm，所用抗体为艾滋病病毒（HIV）的两种单克隆抗体，干燥温度为 37℃，其它制备条件与实施例 1 相同，制得本发明所述胶体金和半导体荧光纳米粒子双标记快速免疫检测试纸。

## 实施例 5

胶体金和半导体荧光纳米粒子双标记快速免疫检测试纸对检测灵敏度要求较低的 HCG 分析样检测示意图，如附图 2 所示。先根据肉眼判断阴阳性，检测带和对照带同时显红紫色，表明为阳性，再对结果为阳性的试纸用荧光信号作进一步定量检测。

## 实施例 6

胶体金和半导体荧光纳米粒子双标记快速免疫检测试纸对初步筛选结果为阴性的 HIV 分析样检测示意图，如附图 3 所示，检测带不显



色，对照带显红紫色。用荧光信号对检测带做进一步检测，检出含量较低的抗原。如果检测带不显示金的红紫色，荧光信号也没有淬灭，表明样品为阴性。

#### 实施例 7

一项多检的胶体金和半导体荧光纳米粒子双标记快速检测试纸示意图，如附图 4 所示。图中（4）为固定有发绿色光的 CdTe 纳米晶和检测指标 HIV 所对应的抗体组成的免疫复合物（I）；（5）为固定有发黄色光的 CdTe 纳米晶和检测指标 HCG 所对应的抗体组成的免疫复合物（II）；（6）为固定有发橙色光的 CdTe 纳米晶和检测指标 HBsAg 对应的免疫抗体所组成的免疫复合物（III）；（7）为对照带；其它区域与附图 1 相同。若（4）显红紫色，则可确诊检测样中指标 HIV 为阳性。对（4）处的荧光信号检测，对样品中指标 HIV 定量检测。若（5）显红紫色，则可确诊检测样中指标 HCG 为阳性。若（6）显红紫色，则可确诊检测样中指标 HBsAg 为阳性。若同时有多条检测带显色，可根据上面的原则判断样品中多个指标为阳性，并利用荧光信号进行定量检测。

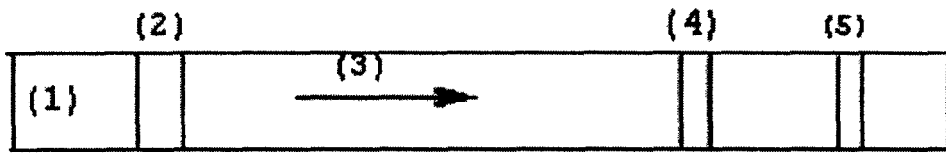


图 1



图 2



图 3

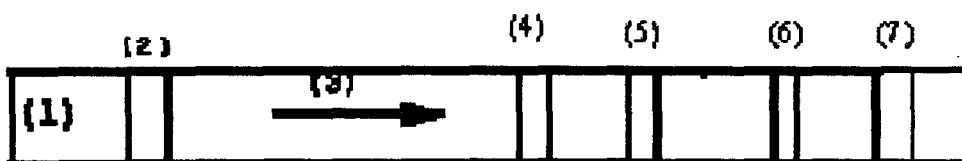


图 4