



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107543933 A

(43)申请公布日 2018.01.05

(21)申请号 201610474422.1

(22)申请日 2016.06.24

(71)申请人 江苏雷森生物科技有限公司

地址 221116 江苏省徐州市铜山区大学路
99号高新区大学创业园B区六层

(72)发明人 秦雷 朱丹丹 张旭东 沙森
秦允震 谭影影 彭雪婷

(51)Int.Cl.

G01N 33/76(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

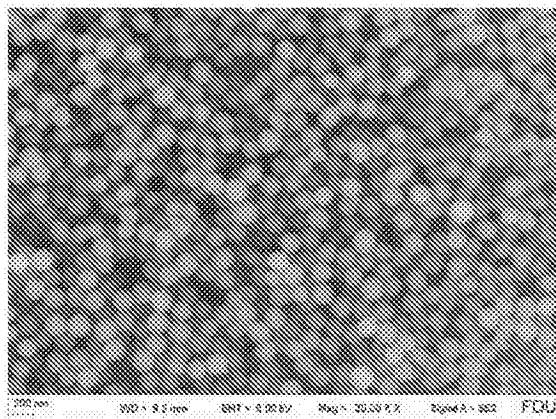
权利要求书2页 说明书6页 附图2页

(54)发明名称

一种抗体标记的碳纳米颗粒的制备方法及其使用其制备的早孕试纸条

(57)摘要

本发明提供了一种抗体标记的碳纳米颗粒方法及其使用其制备的早孕试纸条,本发明以人绒毛膜促性腺激素(Human chorionic gonadotropin,简称HCG)为目标物,以化学共价法制备了相应的碳纳米颗粒标记的抗体,建立了碳纳米颗粒标记的免疫层析方法,应用于早孕检测中。本发明制备的碳纳米颗粒抗体及试纸条,检测线条显色为明亮的黄色,测试结果更为清晰且稳定性较高,可在室温下保存较长时间。



1. 一种抗体标记的碳纳米颗粒的制备方法,包括以下步骤:

(1)将碳纳米颗粒加到浓硫酸:浓硝酸:蒸馏水的比例为3:1:6的混合液中形成分散液,在室温下缓慢搅拌作用2h。

(2)反应结束后,分散液在13000rpm下离心5min,移除上清液,用去离子水多次清洗,直到分散液的pH值达到7.0,最终重悬至10mg/mL。

(3)取步骤(2)中的碳纳米颗粒分散液置于离心管中,超声处理1.5min,随后加入缓冲溶液低速震荡10s。

(4)向步骤(3)中的碳纳米颗粒缓冲溶液中迅速滴入活化剂,快速置于涡旋振荡器上低速震荡1min后,固定在涡旋振荡器上,室温下震荡活化30min。

(5)活化结束后,将步骤(4)中的碳纳米颗粒分散液在26℃,14000rpm下,离心12min后移去上清液,用缓冲溶液清洗,再次以相同条件离心后,弃去上清液,用缓冲溶液复溶重悬。

(6)取 β -HCG单克隆抗体,加入缓冲溶液稀释至0.06mg/mL。

(7)将步骤(5)中的复溶纳米颗粒分散液加入到步骤(6)中的抗体稀释液中,立刻在涡旋振荡器上震荡1.5min,随后超声1.5min,然后固定在涡旋振荡器上在室温下震荡反应1h。

(8)反应结束后,将步骤(7)中溶液超声1min,在26℃,14000rpm下,离心12min后移去上清液,加入封闭液,同样然后固定在涡旋振荡器上在室温下震荡反应1h。

(9)将步骤(8)中溶液离心后再次加入封闭液清洗,在26℃,14000rpm下,离心12min后移去上清液,可得到碳纳米颗粒标记的抗体。

2. 根据权利要求1所述的一种抗体标记的碳纳米颗粒的制备方法,其特征在于:步骤(1)中碳纳米颗粒的酸混合液浓度为1mg/mL。

3. 根据权利要求1或权利要求2所述的一种抗体标记的碳纳米颗粒的制备方法,其特征在于:步骤(3)以及步骤(5)中的清洗的缓冲溶液是2-(N-吗啡啉)乙磺酸缓冲溶液,其pH为5.6。

4. 根据权利要求1所述的一种抗体标记的碳纳米颗粒的制备方法,其特征在于:步骤(4)中活化剂是EDC&NHS活化剂。

5. 根据权利要求1以及权利要求3所述的一种抗体标记的碳纳米颗粒的制备方法,其特征在于:步骤(5)中复溶的缓冲溶液以及步骤(6)的缓冲溶液均是磷酸缓冲溶液,其pH值为7.4。

6. 一种使用权利要求1~5任何一项所述制备方法制备抗体标记的碳纳米颗粒制备的试纸条,包括以下步骤:

(1)抗体标记的碳纳米颗粒中加入重悬液,反复吹打,随后超声5min直至沉淀完全溶解。

(2)将步骤(1)中的抗体标记的碳纳米颗粒溶液用划膜喷金机喷涂于结合垫,随后在烘箱中37℃下烘干1h。

(3)将对照线和检测线要包被的抗体,分别用适宜的稀释液稀释后,用划膜喷金机将其分别喷涂于硝酸纤维素膜上,37℃烘干1h。

(4)组装粘贴结合垫、样品垫,密封过夜,使之充分粘合。

7. 根据权利要求6所述的试纸条的制备方法,其特征在于:步骤(2)中碳纳米颗粒标记的抗体溶液的浓度为2mg/mL,涂覆量为5 μ L/cm。

8. 根据权利要求6所述的试纸条的制备方法, 其特征在于: 步骤(3)中硝酸纤维素膜的对照线包被的抗体为抗鼠IgG多克隆抗体, 稀释倍数为11倍, 涂覆量为0.9 μ L/cm; 检测线包被的抗体为 α -HCG单克隆抗体, 稀释倍数为10倍, 涂覆量为0.9 μ L/cm。

9. 如权利要求1~5任一项所述的制备方法制备的抗体标记的碳纳米颗粒在早孕检测中的应用。

10. 如权利要求6~8任一项所述的试纸条在早孕检测中的应用。

一种抗体标记的碳纳米颗粒的制备方法及使用其制备的早孕试纸条

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于早孕检测的抗体标记的碳纳米颗粒的制备方法及其试纸条的制备,属于医学检验领域。

背景技术

[0002] 早孕(早期妊娠)指怀孕的时间在怀孕13周末之前。约有半数妇女在停经6周左右出现畏寒、头晕、流涎、乏力、嗜睡、食欲缺乏,厌恶油腻、恶心、晨起呕吐等症状,称为早孕反应,这种早孕反应在12周左右自行消失。而对于怀孕在6~8周前的女性没有明显的早孕反应,此时就需要一种快捷方便、经济简单的方法来判断是否怀孕。对希望优生的妇女来说,早孕检测可注意避免接触有害物质或滥用药物;对暂时不想怀孕的妇女来说,可及时采取适当方式终止妊娠。因此,早孕检测是十分必要的,是对自身健康负责的表现。

[0003] 早孕试纸是人们设计出来的一种方便女性检测自己是否怀孕的产品。从妊娠的第7天开始,孕妇的尿液中就能测出一种特异性的激素--人绒毛膜促性腺激素(Human chorionic gonadotropin,简称HCG),早孕试纸的工作原理是检测HCG值。免疫层析法因其操作简便,效率高、用量少、成本低廉,近年来在早孕检测领域得到了快速发展。目前市场上大多数的早孕试纸是采用胶体金方法检测的,但胶体金的生产成本相对较高,且当金颗粒过大时,标记物又不稳定,长期贮存容易发生自动聚集,信号较弱等限制了其应用。因此需要一种稳定的,灵敏度高,易制备,价格低廉的纳米颗粒替代胶体金用于早孕检测的免疫层析。

发明内容

[0004] 基于此,本发明的目的在于提供了一种抗体标记的碳纳米颗粒并快速检测早孕的免疫层析方法及其试纸条的制备,实现早孕的快速检测并解决胶体金成本高,信号较弱,测试线显色不明显等问题。本发明的抗体标记的碳纳米颗粒早孕试纸条的制备方法包括以下步骤:

[0005] 与现有技术相比,本发明提供了一种可替代胶体金的纳米颗粒,纳米碳球(carbon spheres)。此碳纳米颗粒是一种无定形碳,易制备,价格低廉,用于免疫侧向层析检测比胶体金更稳定、更敏感、灵敏度更高。制备方法成熟、简单:以价格低廉的葡萄糖为原料,以水热合成法制备分散性较好的碳纳米颗粒,调节相应的反应温度和时间,可调节其粒径在200nm左右。具体步骤包括:

[0006] (1)将葡萄糖溶解在去离子水中(葡萄糖溶液的浓度为6%),搅拌至其完全溶解。将溶液加入到水热反应釜中,密封后置于180℃烘箱内反应4h。

[0007] (2)反应结束后,降至室温,取出反应釜,将釜内褐色溶液抽滤(用40μm有机滤膜),用95%乙醇清洗多次至滤液为无色,最终用去离子水清洗。

[0008] (3)将产物置于70℃干燥烘箱中干燥12h,得到的产物以5~10mg/mL的浓度分散在

去离子水中,以分散液在室温下储存在阴凉干燥处。

[0009] 本发明还涉及了一种抗体标记的碳纳米颗粒的制备方法,包括以下步骤:

[0010] (1)将碳纳米颗粒加到浓硫酸:浓硝酸:蒸馏水的比例为3:1:6的混合液中形成分散液,在室温下缓慢搅拌作用2h。

[0011] (2)反应结束后,分散液在13000rpm下离心5min,移除上清液,用去离子水多次清洗,直到分散液的pH值达到7.0,最终重悬至10mg/mL。

[0012] (3)取步骤(2)中的碳纳米颗粒分散液置于离心管中,超声处理1.5min,随后加入缓冲溶液低速震荡10s。

[0013] (4)向步骤(3)中的碳纳米颗粒缓冲溶液中迅速滴入活化剂,快速置于涡旋振荡器上低速震荡1min后,固定在涡旋振荡器上,室温下震荡活化30min。

[0014] (5)活化结束后,将步骤(4)中的碳纳米颗粒分散液在26℃,14000rpm下,离心12min后移去上清液,用缓冲溶液清洗,再次以相同条件离心后,弃去上清液,用缓冲溶液复溶重悬。

[0015] (6)取 β -HCG单克隆抗体,加入缓冲溶液稀释至0.06mg/mL。

[0016] (7)将步骤(5)中复溶的纳米颗粒分散液加入到步骤(6)中的抗体稀释液中,立刻在涡旋振荡器上震荡1.5min,随后超声1.5min,然后固定在涡旋振荡器上在室温下震荡反应1h。

[0017] (8)反应结束后,将步骤(7)中溶液超声1min,在26℃,14000rpm下,离心12min后移去上清液,加入封闭液,同样然后固定在涡旋振荡器上在室温下震荡反应1h。

[0018] (9)将步骤(8)中溶液离心后再次加入封闭液清洗,在26℃,14000rpm下,离心12min后移去上清液,可得到抗体标记的碳纳米颗粒。

[0019] 步骤(1)中碳纳米颗粒的酸混合液浓度为1mg/mL。

[0020] 步骤(3)以及步骤(5)中的清洗的缓冲溶液是2-(N-吗啡啉)乙磺酸缓冲溶液,其pH为5.6。

[0021] 步骤(4)中活化剂是EDC&NHS活化剂。

[0022] 步骤(5)中复溶的缓冲溶液以及步骤(6)的缓冲溶液均是磷酸缓冲溶液,其pH值为7.4。

[0023] 本发明还提供了一种基于上述方法制备的抗体标记的碳纳米颗粒的试纸条,包括以下组装步骤:

[0024] (1)抗体标记的碳纳米颗粒中加入重悬液,反复吹打,随后超声5min直至沉淀完全溶解。

[0025] (2)将步骤(1)中的抗体标记的碳纳米颗粒溶液用划膜喷金机喷涂于结合垫,随后在烘箱中37℃下烘干1h。

[0026] (3)将对照线和检测线要包被的抗体,分别用适宜的稀释液稀释后,用划膜喷金机将其分别喷涂于硝酸纤维素膜上,37℃下在烘箱中烘干1h。

[0027] (4)组装粘贴结合垫、样品垫,密封过夜,使之充分粘合。

[0028] 步骤(2)中碳纳米颗粒标记的抗体溶液的浓度为2mg/mL,涂覆量为5 μ L/cm。

[0029] 步骤(3)中硝酸纤维素膜的对照线包被的抗体为抗鼠IgG多克隆抗体,稀释倍数为11倍,涂覆量为0.9 μ L/cm;检测线包被的抗体为 α -HCG单克隆抗体,稀释倍数为10倍,涂覆量

为0.9 μ L/cm。

[0030] 本发明还提供了上述制备方法制备的抗体标记的碳纳米颗粒在早孕检测中的应用以及上述试纸条在早孕检测的应用。

[0031] 相对于现有技术,本发明提出的碳纳米颗粒标记抗体的制备方法和试纸条,又有以下优势:

[0032] (1)本发明所述的碳纳米颗粒的制备方法是以葡萄糖为原料,水热合成相应的纳米颗粒。葡萄糖成本远低于氯金酸,降低了检测成本。

[0033] (2)本发明所述的抗体标记的方法是利用碳纳米颗粒表面丰富的功能基团,采用化学共价键合的方式与抗体结合,使得抗体标记的碳纳米颗粒更为稳定。

[0034] (3)本发明所述的碳纳米颗粒标记抗体的试纸用于早孕检测时,会出现明亮的黄色对照线和检测线,测试结果观测更为清晰。

附图说明

[0035] 本发明的附图用来提供对本发明的进一步理解,本发明中的示意实施例用于说明本发明,并不对本发明构成限定。

[0036] 图1为本发明实施例一中的抗体标记的碳纳米颗粒的扫描电镜图。

[0037] 图2为本发明实施例一中的碳纳米颗粒的分散性验证结果。

[0038] 图3为本发明实施例二中的碳纳米颗粒标记抗体的早孕试纸盒的测试结果。

具体实施方式

[0039] 以下对本发明进行详细说明,但不用来限制本发明的范围。

[0040] 实施例一

[0041] 一种分散性较好的碳纳米颗粒的制备方法,包括以下步骤:

[0042] (1)将葡萄糖溶解在去离子水中(葡萄糖溶液的浓度为6%),搅拌至其完全溶解。将溶液加入到水热反应釜中,密封后置于180 $^{\circ}$ C烘箱内反应4h。

[0043] (2)反应结束后,降至室温,取出反应釜,将釜内褐色溶液抽滤(用40 μ m有机滤膜),用95%乙醇清洗多次至滤液为无色,最终用去离子水清洗。

[0044] (3)将产物置于70 $^{\circ}$ C干燥烘箱中干燥12h,得到的产物以5~10mg/mL的浓度分散在去离子水中,以分散液在室温下储存在阴凉干燥处。

[0045] 一种抗体标记的碳纳米颗粒的制备方法,包括以下步骤:

[0046] (1)将碳纳米颗粒加到浓硫酸:浓硝酸:蒸馏水的比例为3:1:6的混合液中形成分散液,在室温下缓慢搅拌作用2h。

[0047] (2)反应结束后,分散液在13000rpm下离心5min,移除上清液,用去离子水多次清洗,直到分散液的pH值达到7.0,最终重悬至10mg/mL。

[0048] (3)取步骤(2)中的碳纳米颗粒分散液置于离心管中,超声处理1.5min,随后加入缓冲溶液低速震荡10s。

[0049] (4)向步骤(3)中的碳纳米颗粒缓冲溶液中迅速滴入活化剂,快速置于涡旋振荡器上低速震荡1min后,固定在涡旋振荡器上,室温下震荡活化30min。

[0050] (5)活化结束后,将步骤(4)中的碳纳米颗粒分散液在26 $^{\circ}$ C,14000rpm下,离心

12min后移去上清液,用缓冲溶液清洗,再次以相同条件离心后,弃去上清液,用缓冲溶液复溶重悬。

[0051] (6)取 β -HCG单克隆抗体,加入缓冲溶液稀释至0.06mg/mL。

[0052] (7)将步骤(5)中的复溶纳米颗粒分散液加入到步骤(6)中的抗体稀释液中,立刻在涡旋振荡器上震荡1.5min,随后超声1.5min,然后固定在涡旋振荡器上在室温下震荡反应1h。

[0053] (8)反应结束后,将步骤(7)中溶液超声1min,在26℃,14000rpm下,离心12min后移去上清液,加入封闭液,同样然后固定在涡旋振荡器上在室温下震荡反应1h。

[0054] (9)将步骤(8)中溶液离心后再次加入封闭液清洗,在26℃,14000rpm下,离心12min后移去上清液,可得到抗体标记的碳纳米颗粒。

[0055] 步骤(1)中碳纳米颗粒的酸混合液浓度为1mg/mL。

[0056] 步骤(3)以及步骤(5)中的清洗的缓冲溶液是2-(N-吗啡啉)乙磺酸缓冲溶液,其pH为5.6。

[0057] 步骤(4)中活化剂是EDC&NHS活化剂。

[0058] 步骤(5)中复溶的缓冲溶液以及步骤(6)的缓冲溶液均是磷酸缓冲溶

[0059] 液,其pH值为7.4。

[0060] 实验结果

[0061] 1.制备的抗体标记的碳纳米颗粒的表征,如图1所示,本实例制备的抗体标记的碳纳米颗粒的扫描电镜图。图中,抗体标记的碳纳米颗粒以单分散的球体存在,碳纳米球之间相互并不交联,分散性良好,其平均粒径为200nm左右。

[0062] 2.所制备的碳纳米颗粒的分散性能的验证:所制备的碳纳米颗粒无需任何处理,就可以得到分散性较好的碳纳米颗粒胶体。将碳纳米颗粒以10mg/mL的浓度加入到去离子水中,超声10min就可以得到褐色的均匀碳纳米颗粒分散液。此分散液可在室温下保存,分散状态稳定,一周后也未发现沉淀,如图2所示。长期静置,出现的沉淀只需轻微摇晃,即可快速重新分散。

[0063] 实施例二

[0064] 一种分散性较好的碳纳米颗粒的制备方法,包括以下步骤:

[0065] (1)将葡萄糖溶解在去离子水中(葡萄糖溶液的浓度为6%),搅拌至其完全溶解。将溶液加入到水热反应釜中,密封后置于180℃烘箱内反应4h。

[0066] (2)反应结束后,降至室温,取出反应釜,将釜内褐色溶液抽滤(用40 μ m有机滤膜),用95%乙醇清洗多次至滤液为无色,最终用去离子水清洗。

[0067] (3)将产物置于70℃干燥烘箱中干燥12h,得到的产物以5~10mg/mL的浓度分散在去离子水中,以分散液在室温下储存在阴凉干燥处。

[0068] 一种抗体标记的碳纳米颗粒的制备方法,包括以下步骤:

[0069] (1)将碳纳米颗粒加到浓硫酸:浓硝酸:蒸馏水的比例为3:1:6的混合液中形成分散液,在室温下缓慢搅拌作用2h。

[0070] (2)反应结束后,分散液在13000rpm下离心5min,移除上清液,用去离子水多次清洗,直到分散液的pH值达到7.0,最终重悬至10mg/mL。

[0071] (3)取步骤(2)中的碳纳米颗粒分散液置于离心管中,超声处理1.5min,随后加入

缓冲溶液低速震荡10s。

[0072] (4)向步骤(3)中的碳纳米颗粒缓冲溶液中迅速滴入活化剂,快速置于涡旋振荡器上低速震荡1min后,固定在涡旋振荡器上,室温下震荡活化30min。

[0073] (5)活化结束后,将步骤(4)中的碳纳米颗粒分散液在26℃,14000rpm下,离心12min后移去上清液,用缓冲溶液清洗,再次以相同条件离心后,弃去上清液,用缓冲溶液复溶重悬。

[0074] (6)取 β -HCG单克隆抗体,加入缓冲溶液稀释至0.06mg/mL。

[0075] (7)将步骤(5)中的复溶纳米颗粒分散液加入到步骤(6)中的抗体稀释液中,立刻在涡旋震荡器上震荡1.5min,随后超声1.5min,然后固定在涡旋振荡器上在室温下震荡反应1h。

[0076] (8)反应结束后,将步骤(7)中溶液超声1min,在26℃,14000rpm下,离心12min后移去上清液,加入封闭液,同样然后固定在涡旋振荡器上在室温下震荡反应1h。

[0077] (9)将步骤(8)中溶液离心后再次加入封闭液清洗,在26℃,14000rpm下,离心12min后移去上清液,可得到抗体标记的碳纳米颗粒。

[0078] 步骤(1)中碳纳米颗粒的酸混合液浓度为1mg/mL。

[0079] 步骤(3)以及步骤(5)中的清洗的缓冲溶液是2-(N-吗啡啉)乙磺酸缓冲溶液,其pH为5.6。

[0080] 步骤(4)中活化剂是EDC&NHS活化剂。

[0081] 步骤(5)中复溶的缓冲溶液以及步骤(6)的缓冲溶液均是磷酸缓冲溶液,其pH值为7.4。

[0082] 一种基于上述方法制备的抗体标记的碳纳米颗粒的试纸条,包括以下组装步骤:

[0083] (1)碳纳米颗粒标记的抗体中加入重悬液,反复吹打,随后超声5min直至沉淀完全溶解。

[0084] (2)将步骤(1)中的碳纳米颗粒标记的抗体溶液用划膜喷金机喷涂于结合垫,随后在烘箱中37℃下烘干1h。

[0085] (3)将对照线和检测线要包被的抗体,分别用适宜的稀释液稀释后,用划膜喷金机将其分别喷涂于硝酸纤维素膜上,37℃烘干1h。

[0086] (4)组装粘贴结合垫、样品垫,密封过夜,使之充分粘合。

[0087] 步骤(2)中抗体标记的碳纳米颗粒溶液的浓度为2mg/mL,涂覆量为5 μ L/cm。

[0088] 步骤(3)中硝酸纤维素膜的对照线包被的抗体为抗鼠IgG多克隆抗体,稀释倍数为11倍,涂覆量为0.9 μ L/cm;检测线包被的抗体为 α -HCG单克隆抗体,稀释倍数为10倍,涂覆量为0.9 μ L/cm。

[0089] 本发明还提供了抗体标记的碳纳米颗粒早孕测试盒的使用方法:使用移液枪,取适量体积的尿液样品加入到样品槽中,测试等待时间3~6min。到达时间后,若只有对照线先出黄色线条,表明测试结果为阴性,未怀孕;若对照线和测试线均显现出黄色线条,测试结果为阳性,已怀孕。

[0090] 实验与验证结果

[0091] 1.使用本案例碳纳米颗粒标记的抗体制备的试纸条组装得到早孕测试盒。如图3所示,阴性和阳性都进行量两组平行测试,两组测试均成功。阳性样品检测结果出现两条黄

色线条,而阴性样品检测结果只有对照线出现黄色线条。本发明所述的碳纳米颗粒标记的抗体的早孕试纸条可以灵敏地定性检测早孕情况。

[0092] 2.使用本案例抗体标记的碳纳米颗粒制备的试纸条的稳定性验证:组装后的试纸条,分别在两周、四周、八周后取出,取同样的测试样品跑条,观察试纸的显色情况,并未发生太大变化,表明此试纸条具有良好的稳定性。

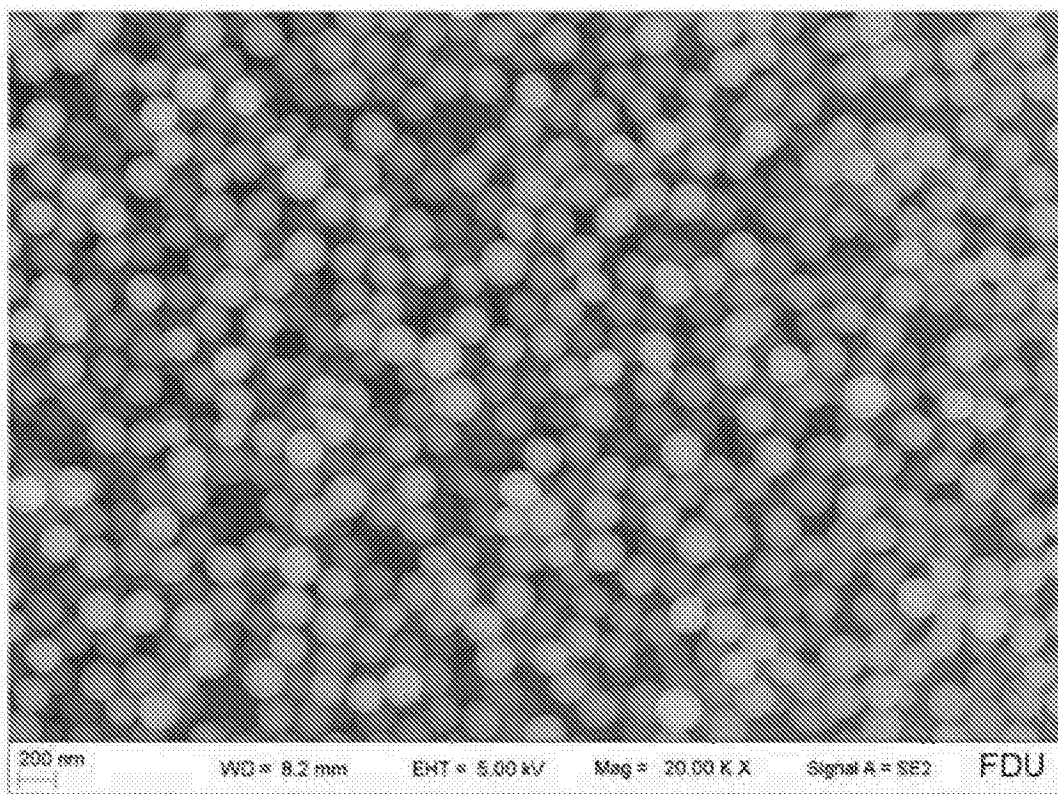


图1



图2



图3

专利名称(译)	一种抗体标记的碳纳米颗粒的制备方法及使用其制备的早孕试纸条		
公开(公告)号	CN107543933A	公开(公告)日	2018-01-05
申请号	CN201610474422.1	申请日	2016-06-24
[标]申请(专利权)人(译)	江苏雷森生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	江苏雷森生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	江苏雷森生物科技有限公司		
[标]发明人	秦雷 朱丹丹 张旭东 沙森 秦允震 谭影影 彭雪婷		
发明人	秦雷 朱丹丹 张旭东 沙森 秦允震 谭影影 彭雪婷		
IPC分类号	G01N33/76 G01N33/577 G01N33/558 G01N33/532		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种抗体标记的碳纳米颗粒方法及使用其制备的早孕试纸条，本发明以人绒毛膜促性腺激素(Human chorionic gonadotropin，简称HCG)为目标物，以化学共价法制备了相应的碳纳米颗粒标记的抗体，建立了碳纳米颗粒标记的免疫层析方法，应用于早孕检测中。本发明制备的碳纳米颗粒抗体及试纸条，检测线条显色为明亮的黄色，测试结果更为清晰且稳定性较高，可在室温下保存较长时间。

