



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102998443 A

(43) 申请公布日 2013. 03. 27

(21) 申请号 201110270133. 7

(22) 申请日 2011. 09. 14

(71) 申请人 佳木斯大学

地址 154007 黑龙江省佳木斯市学府路 148 号

(72) 发明人 邱洪斌 张强 沙靖全 高志刚 关宝生

(74) 专利代理机构 北京神州华茂知识产权代理有限公司 11358

代理人 吴照幸

(51) Int. Cl.

G01N 33/544 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

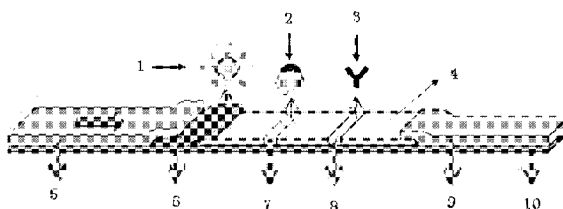
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 1 页

(54) 发明名称

尿液中尿酸检测免疫胶体金试纸条及制造方法

(57) 摘要

本发明提供了一种用于检测尿液中尿酸含量的试纸及其制造方法。这种试纸采用尿酸抗体作为特异性识别元件,采用金纳米颗粒作为试纸条显色试剂,其中尿酸-OVA 抗原作为试纸检测线(T 线),羊抗兔抗体作为试纸质控线(C 线),C 线与 T 线均喷涂于硝酸纤维素膜上,并在硝酸纤维素膜的 T 线侧叠加粘贴胶体金标垫,胶体金标垫和硝酸纤维素膜的 C 线侧分别叠加粘贴样品垫和吸收垫。本发明提供的试纸能随时快速检测尿液中尿酸浓度。



1. 一种检测尿液中尿酸的免疫胶体金试纸,包括背板及硝酸纤维素膜,其特征在于:尿酸-OVA 抗原作为试纸检测线 T 线,羊抗兔抗体作为试纸质控线 C 线,C 线与 T 线均喷涂于硝酸纤维素膜上,并在硝酸纤维素膜的 T 线侧叠加粘贴胶体金标垫,胶体金标垫和硝酸纤维素膜的 C 线侧分别叠加粘贴样品垫和吸收垫。

2. 根据权利要求 1 所述的胶体金试纸,其特征在于:所述的胶体金标垫由特异识别尿酸的兔源抗体所修饰。

3. 根据权利要求 1 所述的胶体金试纸,其特征在于:硝酸纤维素膜、胶体金垫、样品垫及吸收垫,依次粘贴在涂有胶层的白色塑料背板上,压紧后切割成条状。

4. 权利要求 1-3 任一项所述的胶体金试纸,其特征在于:所述试纸可直接用于尿液中尿酸的检测。

5. 权利要求 1-3 任一项所述试纸的制备方法,包括以下步骤:

(1) 通过尿酸半抗原与牛血清白蛋白 BSA 偶联,获得尿酸-BSA 人工抗原;

(2) 将尿酸-BSA 人工抗原免疫兔子,免疫后取兔血获得抗血清并纯化抗体,通过竞争 ELISA 法检测抗体对尿酸分子的特异性,得到尿酸抗体;

(3) 利用胶体金标记上述尿酸抗体,制备胶体金抗体探针液,通过浸泡玻璃棉膜,得到胶体金垫;

(4) 将尿酸-OVA 包被抗原和羊抗兔抗体,分别喷涂于硝酸纤维素膜上;

(5) 将硝酸纤维素膜、胶体金垫、样品垫以及吸收垫,依次粘贴在涂有胶层的白色塑料背板上,压紧后切割成条状。

尿液中尿酸检测免疫胶体金试纸条及制造方法

技术领域

[0001] 本发明设计一种免疫胶体金试纸条,用于检测尿液中尿酸的含量。

背景技术

[0002] 随着社会的进步,人们对其自身健康水平日益关注。生物分子尿酸是人体内嘌呤代谢的最终产物,分子式为 $C_5H_{14}N_4O_3$, MW 168.11,不溶于水,也难溶于酸。尿酸是一种含有嘌呤结构的化合物,也是嘌呤的最重要衍生物。尿酸含量与体内核酸的分解代谢速度、肾的排泄功能和食物中核酸的含量有关,血或尿中尿酸含量的升高可作为诊断痛风病、慢性白血病、多发性骨髓瘤、肾功能减退和由于中毒而产生的肝脏疾病等的主要指标。因此,近年来尿酸的检测和分析在疾病的临床诊断和治疗方面的应用日益广泛。

[0003] 目前已报道的尿酸测定方法重量法、滴定法、还原法和酶法等。重量法和滴定法操作繁琐,而且准确度低,不适于尿酸的精确测定。临床上通常采用还原法和酶比色法。还原法的检测原理是,尿酸在碱性条件下被磷钨酸氧化成尿素,磷钨酸被还原成钨蓝,其生成量与尿酸含量成正比。此法的检测缺点是,血样中的抗坏血酸易干扰检测效果,样品必须事先进行脱蛋白处理,需要昂贵设备和专业分析人员。酶法常用于医院的自动生化分析仪,适于大批量试样的分析作业,但是血液分析前经离心分离为血清或血浆,要求专业人员和专门的试剂,不适于家庭中使用。此外,这些方法绝大多数属血尿酸检测方法,病人样本采集有疼痛且有感染危险。

[0004] 技术方案

[0005] 针对上述尿酸检测技术的发展和现状,本发明基于抗体识别和纳米尺寸效应的免疫胶体金技术,结合试纸的廉价和便捷优势,建立一种能够便捷直观地测定尿液中尿酸含量的免疫胶体金速测试纸条。此试纸条无需仪器设备和专业操作人员,避免了取血的痛苦和可能的感染危险,检测快速现象直观,是一种非常适合病人家庭和小型医疗机构使用的高效尿液尿酸检测方法。

[0006] 本发明采用以下技术方案:

[0007] 一种检测尿液中尿酸的免疫胶体金试纸,包括背板及硝酸纤维素膜,尿酸-OVA 抗原作为试纸检测线 T 线,羊抗兔抗体作为试纸质控线 C 线,C 线与 T 线均喷涂于硝酸纤维素膜上,并在硝酸纤维素膜的 T 线侧叠加粘贴胶体金标垫,胶体金标垫和硝酸纤维素膜的 C 线侧分别叠加粘贴样品垫和吸收垫。

[0008] 所述的胶体金标垫由特异识别尿酸的兔源抗体所修饰。

[0009] 硝酸纤维素膜、胶体金垫、样品垫及吸收垫,依次粘贴在涂有胶层的白色塑料背板上,压紧后切割成条状。

[0010] 所述试纸可直接用于尿液中尿酸的检测。

[0011] 所述试纸的制备方法,包括以下步骤:

[0012] (1) 通过尿酸半抗原与牛血清白蛋白 BSA 偶联,获得尿酸-BSA 人工抗原;

[0013] (2) 将尿酸-BSA 人工抗原免疫兔子,免疫后取兔血获得抗血清并纯化抗体,通过

竞争 ELISA 法检测抗体对尿酸分子的特异性,得到尿酸抗体;

[0014] (3) 利用胶体金标记上述尿酸抗体,制备胶体金抗体探针液,通过浸泡玻璃棉膜,得到胶体金垫;

[0015] (4) 将尿酸-OVA 包被抗原和羊抗兔抗体,分别喷涂于硝酸纤维素膜上;

[0016] (5) 将硝酸纤维素膜、胶体金垫、样品垫以及吸收垫,依次粘贴在涂有胶层的白色塑料背板上,压紧后切割成条状。

[0017] 本发明优选以下技术方案:尿酸免疫胶体金速测试纸条(图1),是在一块涂有胶层的塑料背板上粘贴喷有尿酸-OVA(鸡卵清蛋白)包被抗原(T线)和羊抗兔抗体(C线)的硝酸纤维素膜,并在硝酸纤维素膜的T线侧叠加粘贴特异识别尿酸兔源抗体修饰的胶体金垫,胶体金垫和硝酸纤维素膜的C线侧分别叠加粘贴样品垫和吸收垫,切割成条状。

[0018] 尿液中尿酸免疫胶体金速测试纸条制造方法的全过程包括以下步骤:

[0019] 1) 采柠檬酸盐还原法制备胶体金颗粒,颗粒直径为 $15 \pm 3.5 \text{nm}$;

[0020] 2) 将尿酸半抗原通过水溶性碳化二亚胺(EDC)法将尿酸分子与牛血清白蛋白(BSA)偶联,获得尿酸-BSA人工抗原;所述的尿酸半抗原的特征是,在尿酸分子中一个羟基位点添加一个戊酸的改造分子;

[0021] 3) 将尿酸-BSA人工抗原免疫雄性新西兰大白兔,免疫后取兔血获得抗血清并纯化抗体,通过竞争ELISA法检测抗体对尿酸分子的特异性;

[0022] 4) 1.3mg尿酸抗体与50mL胶体金溶液混合,制备胶体金抗体探针。将玻璃棉膜浸泡与此探针溶液中,37°C干燥,得到胶体金垫;

[0023] 5) 采用单向喷点仪将尿酸-OVA包被抗原和羊抗兔抗体,喷在硝酸纤维素膜上,37°C干燥;

[0024] 6) 将硝酸纤维素膜、胶体金垫、样品垫以及吸收垫,依次粘贴在涂有胶层的白色塑料背板上,压紧后切割成条状。

附图说明

[0025] 图1尿酸抗体胶体金速测试纸条的构造图;

[0026] 图2尿酸抗体胶体金速测试纸条的检测原理图;

[0027] 其中:1尿酸抗体胶体金,2尿酸-OVA,3羊抗兔抗体,4硝酸纤维素膜,5样品垫,6胶体金标垫,7T线,8C线,9吸收垫,10背板,11尿酸。

具体实施例

[0028] 实施例1胶体金的制备

[0029] 本发明中胶体金的制备过程如下:

[0030] 采用柠檬酸钠还原法制备胶体金颗粒。取0.01%氯金酸100mL,置于烧瓶中加热至沸腾,磁力加热搅拌下加入1%柠檬酸三钠水溶液2mL,继续加热直至溶液呈葡萄酒色为止。冷却后于棕色瓶中,4°C保存。

[0031] 实施例2尿酸-BSA人工抗原和尿酸-OVA包被抗原的制备

[0032] 本发明中尿酸-BSA人工抗原的制作过程如下:

[0033] 200mg BSA、100mg尿酸半抗原和100mg碳化二亚胺(EDC)分别溶于5mL、2mL和

3mL 的 PBS 中,然后向 BSA 溶液中边搅拌边慢慢滴加 2mL 的尿酸半抗原溶液和 2mL 的 EDC 溶液,于 4℃ 冰浴下遮光搅拌反应 4h,再向混和溶液中滴加剩下的 1mL EDC 溶液,继续于 4℃ 冰浴下遮光搅拌反应 24h。反应结束后以 4000r/min 离心 5min,取上清液装入透析袋,于 0.01mol/L、pH7.4 的磷酸缓冲液中 4℃ 下透析 5d,每天更换 2 次透析液。透析完毕分装, -20℃ 下冷冻保存。

[0034] 本发明中尿酸-OVA 包被抗原的制作过程同尿酸-BSA 人工抗原的制作过程。

[0035] 实施例 3 尿酸抗体的制备及纯化

[0036] 本发明中尿酸抗体的制备过程如下:

[0037] 尿酸抗血清的制备:选 3 只 3 月龄、体重 1.5 ~ 2.0kg 的健康雄性新西兰大白兔,免疫前 1 周,于兔耳缘静脉采血留作阴性对照。将一定量的尿酸-BSA 人工抗原同等量的弗氏完全佐剂充分乳化后进行第 1 次基础免疫,于兔背部多点注射,每兔注射 1mL;半月后再进行第 2 次基础免疫,剂量与第 1 次基础免疫相同。以后每 2 个星期进行一次加强免疫,剂量加倍,于兔背部和大腿肌肉处交叉进行。从第 4 次加强免疫开始,每次免疫后 1 星期,于兔耳缘静脉采血测抗体效价。当效价达到要求时对兔子进行心脏取血,于 4℃ 下静置过夜,3000r/min 离心 5min,取血清分装,于 -20℃ 下保存。

[0038] 尿酸抗体的粗制备:取 5mL 尿酸抗血清加 5mL 生理盐水,逐滴加入 2.5mL 饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液,使 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 饱和终浓度达到 20%,边加边搅拌,充分混匀后静置 30min。3000r/min,离心 20min,弃去沉淀。将上清液转至小烧杯中继续加饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液,使其饱和终浓度为 50%,搅拌 3h。3000r/min,离心 20min,弃上清。沉淀用 5mL 生理盐水溶解,再加逐滴加入 2.5mL 饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液,使其终浓度为 33%,充分混匀后静置 30min。3000r/min,离心 20min,弃上清,重复一次。2.5mL 生理盐水溶解沉淀并透析除盐(48h,中间换液 3 次)。以 1% BaCl_2 检测透析液至无 SO_4^{2-} 。离心去沉淀,上清液即为粗提尿酸 IgG 抗体。

[0039] 尿酸抗体的纯化:采用 protein G 蛋白亲和纯化柱(Amersham Bioscience 公司)进一步纯化抗体。粗提抗体于 20mmol/L PBS(pH7.0) 缓冲液中透析过夜。以此缓冲液平衡 protein G 柱(流速为 1mL/min),将透析后的粗提抗体载入柱中,以 0.1mol/L 甘氨酸溶液(pH 2.7)洗涤柱子,收集样品并加入等体积 1mol/L Tris-HCl(pH9.0)。15% PEG 20000 浓缩至原体积。

[0040] 实施例 4 胶体金尿酸抗体探针的制备

[0041] 本发明中胶体金尿酸抗体探针的制备过程如下:

[0042] 量取胶体金 50mL,将胶体金调节 pH7.3,搅拌下加入尿酸抗体 1.3mg,继续搅拌 30min,加入 20% 的 PEG 终止反应,10000r/min 离心 10min,沉淀物用 0.02mol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 溶液(含 1% BSA,0.01% NaN_3)稀释,4℃ 保存备用。

[0043] 实施例 5 速测试纸条的组装

[0044] 本发明中尿酸抗体胶体金速测试纸条的组装过程如下:

[0045] 硝酸纤维素膜的处理:由 25mm×30cm 硝酸纤维素膜切割而成,分为检测线(T 线)和质控线(C 线),两线距离为 5mm。将浓度为 1mg/mL 的尿酸-OVA 包被抗原液放于 X-only 单向喷点仪贮存池 A,将浓度为 1mg/mL 的羊抗兔抗体液放于贮存池 B,开机后将尿酸-OVA 包被抗原和羊抗兔抗体分别点射于膜中央,自然干燥密封,4℃ 保存备用。

[0046] 样品垫 :由 17mm×30cm 的纤维素膜切割而成,经缓冲液 (50mmol/L Tris-HCl, 0.25% Triton X-100,0.15mmol/L NaCl, pH 8.0) 浸泡,室温干燥,密封保存。

[0047] 金标垫 :由 8mm×30cm 的玻璃棉膜切割而成,将金标适体和金标质控序列用 X-only 单向喷点仪均匀喷洒于玻璃棉上,37℃干燥,密封,4℃保存。

[0048] 吸收垫 :由 20mm×30cm 的纤维素膜切割而成。

[0049] 背板 :为涂有胶层的白色塑料板。

[0050] 组装及切割 :将样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜、吸收垫依次贴在背板上,相互之间存在 2mm 重叠,放入 CM 4000 切割机槽内,切割成长为 60mm 宽为 5mm 的试纸条 (图 1),注明日期和批次,密封,4℃保存备用。

[0051] 实施例 6 速测试纸条的使用

[0052] 使用人可自行采集尿液 (尿液量 > 100 μL 即可),将速测试纸条的样品垫端分别浸入尿液中,静置 5~10min,观察速测试纸条上的红色 T 线是否出现,出现红色 T 线表明尿中尿酸含量正常,不出现红色 T 线表明尿中尿酸含量超标。

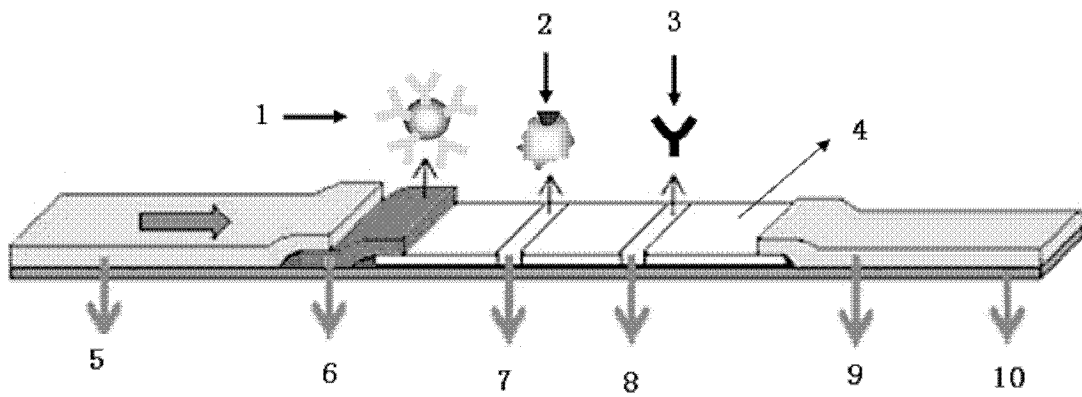


图 1

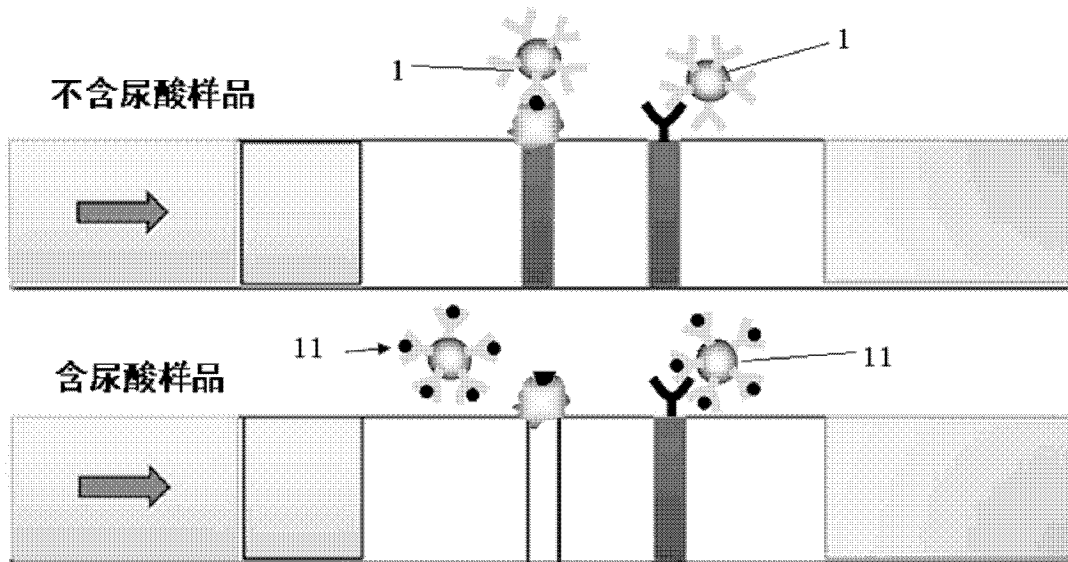


图 2

专利名称(译)	尿液中尿酸检测免疫胶体金试纸条及制造方法		
公开(公告)号	CN102998443A	公开(公告)日	2013-03-27
申请号	CN201110270133.7	申请日	2011-09-14
[标]申请(专利权)人(译)	佳木斯大学		
申请(专利权)人(译)	佳木斯大学		
当前申请(专利权)人(译)	佳木斯大学		
[标]发明人	邱洪斌 张强 沙靖全 高志刚 关宝生		
发明人	邱洪斌 张强 沙靖全 高志刚 关宝生		
IPC分类号	G01N33/544 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种用于检测尿液中尿酸含量的试纸及其制造方法。这种试纸采用尿酸抗体作为特异性识别元件，采用金纳米颗粒作为试纸条显色试剂，其中尿酸-OVA抗原作为试纸检测线(T线)，羊抗兔抗体作为试纸质控线(C线)，C线与T线均喷涂于硝酸纤维素膜上，并在硝酸纤维素膜的T线侧叠加粘贴胶体金标垫，胶体金标垫和硝酸纤维素膜的C线侧分别叠加粘贴样品垫和吸收垫。本发明提供的试纸能随时快速检测尿液中尿酸浓度。

