



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102735835 B

(45) 授权公告日 2015.03.04

(21) 申请号 201110094975.1

(22) 申请日 2011.04.15

(73) 专利权人 佳木斯大学

地址 154007 黑龙江省佳木斯市学府街 148 号佳木斯大学科技处 11080 信箱

(72) 发明人 邱洪斌 关宝生 张强 刘爽
白雪 魏巍 王柏欣 徐辉
王景涛

(74) 专利代理机构 北京神州华茂知识产权有限
公司 11358

代理人 吴照幸

(51) Int. Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

审查员 刘彦宁

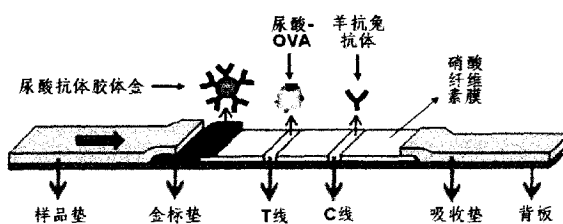
权利要求书1页 说明书3页 附图1页

(54) 发明名称

一种一次性全血尿酸检测试纸条及其制造方法

(57) 摘要

本发明提供了一种一次性全血尿酸检测试纸条,还提供了该检测试纸条的制造方法。这种试纸条采用了先进的免疫胶体金技术,检测时无需专业人员,也不依赖大型仪器设备,病人或其家人即可操作,能随时快速检测血液中尿酸浓度,该试纸条的检测范围为 5 ~ 25mg/dL,检测时间 < 60s。



1. 一种免疫胶体金尿酸检测试纸,其特征在于该试纸是一块切割成条状的涂有胶层的塑料背板,塑料背板上粘贴喷有尿酸-OVA(鸡卵清蛋白)包被抗原构成的T线和羊抗兔抗体构成的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;

其中制备尿酸抗体所用的抗原是通过以下过程制备的: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;

其中尿酸抗体是通过以下过程制备的: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。

2. 如权利要求1所述的尿酸检测试纸,其特征在于该试纸的检测范围为5~25mg/dL,检测时间<60s。

3. 如权利要求1所述的尿酸检测试纸的制备方法,其特征在于包括以下步骤:

1) 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;

2) 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;

3) 采用柠檬酸盐还原法制备胶体金颗粒,颗粒直径为15±3.5nm;

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,将玻璃棉膜浸泡于此探针溶液中,37℃干燥,得到胶体金垫;

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℃干燥;

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。

4. 如权利要求3所述的方法制备的尿酸检测试纸,其特征在于该试纸的检测范围为5~25mg/dL,检测时间<60s。

一种一次性全血尿酸检测试纸条及其制造方法

技术领域

[0001] 本发明设计一种检测试纸条,特别是一种一次性全血尿酸检测试纸条。

背景技术

[0002] 尿酸作为一种小分子化合物,其检测方法也同其他小分子化合物一样,经历着相似的发展过程,由初期的酶法或化学法,到各种仪器法,再到生物检测法。随着科技的发展及血尿酸检测要求的不断提高,早期利用尿酸酶和过氧化物酶建立的尿酸酶法检测(如全血尿酸浓度检测试纸条 CN 1456892A, 2003. 11. 19),由于操作复杂、成本高等缺点已不被广泛使用,取而代之的是以伏安法为代表的传感器法(如一次性全血尿酸检测电极试条及制造方法 CN 1952653A, 2007. 04. 25)和以高效液相色谱、毛细管电泳、液相色谱-质谱为代表的仪器法,这些方法虽然具有较好的检测特异性和灵敏度,但在实际检测过程中却存在着许多缺点。例如,这些方法均依赖高端检测设备和专业操作人员,很难实现现场检测;检测时往往需要进行样品前处理,消耗大量的有机溶剂,增加了检测成本和环境净化压力。相比之下,以 ELISA 为代表的免疫学分析技术已成为目前小分子化合物分析的主要手段,其优点是灵敏度高、特异性好、操作简单等。但是,ELISA 仍需专业化的操作和仪器读取数据,不能用于尿酸的家庭检测,因此不利于尿酸相关疾病的及时预防和治疗。并且检测试纸在使用方便的同时,对于其检测范围和检测时间也是具有严格的要求的,有的方法虽然方法简便,但是试纸的检测范围,检测时间达不到要求,会对检测结果的准确度有很大影响。免疫胶体金方法虽然是一种比较成熟的方法,但是具体到每种具体的检测物质,其检测效果仍然各有不同。

[0003] 技术方案

[0004] 针对上述尿酸检测技术的发展和应用现状,本发明旨在为病人家庭和小型医疗机构提供一种能够快速便捷测定血液中尿酸含量的免疫胶体金速测试纸条,利用这种试纸条检测时无需专业人员,也不依赖大型仪器设备,是一种由病人或其家人即可操作,随时快速检测血液中尿酸浓度的高效方法。

[0005] 采用该试纸条检测时,只需微量血液并能在短时间内测出血液中尿酸的含量是否超标(此处可设置最低血尿酸控制线 $UA_{357} \mu mol/L$ 和血尿酸超标临界线 $UA_{477} \mu mol/L$)。该试纸的检测范围为 $5 \sim 25mg/dL$,检测时间 $< 60s$,其检测既快速又灵敏。

[0006] 本发明的目的是这样实现的: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免疫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。血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:

[0007] 1) 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;

- [0008] 2) 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;
- [0009] 3) 采柠檬酸盐还原法制备胶体金颗粒, 颗粒直径为 $15 \pm 3.5 \text{ nm}$;
- [0010] 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;
- [0011] 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;
- [0012] 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。
- [0013] 下面结构附图和具体实施例对本发明作进一步的说明。

附图说明

- [0014] 图 1 尿酸抗体胶体金速测试纸条的构造图。
- [0015] 图 2 尿酸抗体胶体金速测试纸条的检测原理图。

具体实施例

- [0016] 实施例 1 尿酸-BSA 人工抗原和尿酸-OVA 包被抗原的制备
- [0017] 本发明中尿酸-BSA 人工抗原的制作过程如下:
- [0018] 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°C 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°C 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°C 下透析 5d, 每天更换 2 次透析液。透析完毕分装, -20°C 下冷冻保存。
- [0019] 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。
- [0020] 实施例 2 尿酸抗体的制备及纯化
- [0021] 本发明中尿酸抗体的制备过程如下:
- [0022] 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°C 下静置过夜, 3000r/min 离心 5min, 取血清分装, 于 -20°C 下保存。
- [0023] 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% BaCl₂ 检测透析液至无 SO₄²⁻。离心去沉淀,上清液即为粗提尿酸 IgG 抗体。

[0024] 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(pH 7.0) 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(pH 9.0)。15% PEG 20000 浓缩至原体积。

[0025] 实施例 3 胶体金的制备

[0026] 本发明中胶体金的制备过程如下:

[0027] 取 0.01% 氯金酸 100mL,置于带冷凝装置的烧瓶中加热至沸腾,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℃ 保存。

[0028] 实施例 4 胶体金尿酸抗体探针的制备

[0029] 本发明中胶体金尿酸抗体探针的制备过程如下:

[0030] 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 Na₂B₄O₇ 溶液(含 1% BSA,0.01% NaN₃) 稀释,4℃ 保存备用。

[0031] 实施例 5 速测试纸条的制备

[0032] 本发明中尿酸抗体胶体金速测试纸条的制备过程如下:

[0033] 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。

[0034] 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。

[0035] 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。

[0036] 吸收垫:由 20mm×30cm 的纤维素膜切割而成。

[0037] 背板:为涂有胶层的白色塑料板。

[0038] 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 4),注明日期和批次,密封,4℃ 保存备用。

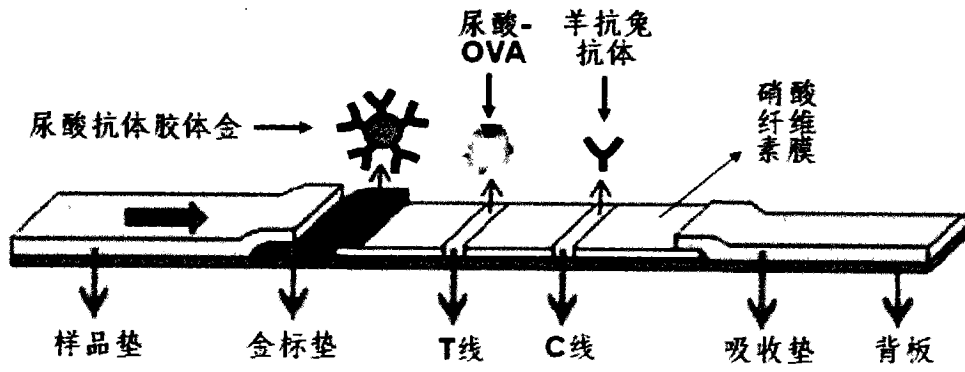


图 1

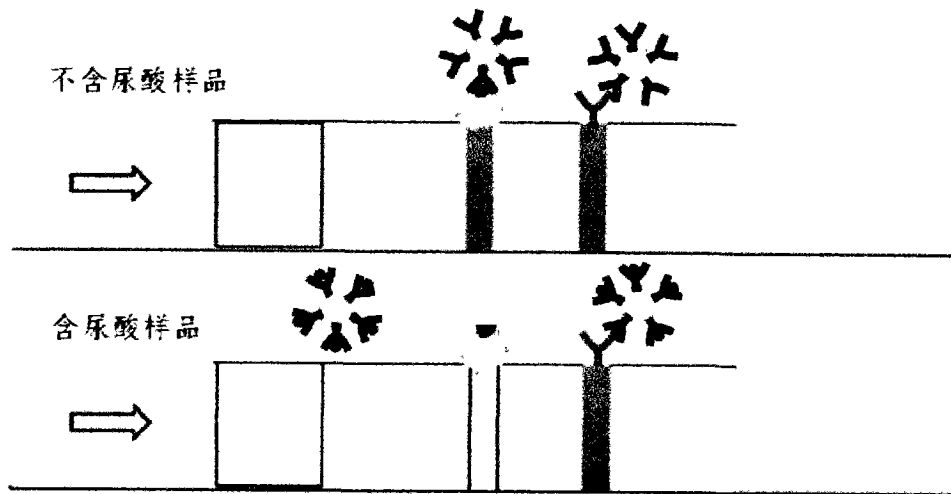


图 2

专利名称(译)	一种一次性全血尿酸检测试纸条及其制造方法		
公开(公告)号	CN102735835B	公开(公告)日	2015-03-04
申请号	CN201110094975.1	申请日	2011-04-15
[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 关宝生 张强 刘爽 白雪 魏巍 王柏欣 徐辉 王景涛		
发明人	邱洪斌 关宝生 张强 刘爽 白雪 魏巍 王柏欣 徐辉 王景涛		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/531		
审查员(译)	刘彦宁		
其他公开文献	CN102735835A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种一次性全血尿酸检测试纸条，还提供了该检测试纸条的制造方法。这种试纸条采用了先进的免疫胶体金技术，检测时无需专业人员，也不依赖大型仪器设备，病人或其家人即可操作，能随时快速检测血液中尿酸浓度，该试纸的检测范围为5~25mg/dL，检测时间<60s。

