



(21)申请号 201711389611.X

(22)申请日 2017.12.21

(71)申请人 济南品鑫生物科技有限公司

地址 250200 山东省济南市章丘市明水经
济开发区济王路北侧山东博科工业园
综合楼4单元103

(72)发明人 罗维晓 胡晓飞 王美丽

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图4页

(54)发明名称

一种抗干扰能力强的酶法尿酸检测试剂

(57)摘要

本发明涉及一种抗干扰能力强的酶法尿酸检测试剂,其特征在于,试剂R1中包括缓冲液、4-氨基安替比林、亚硝酸钠、离子平衡剂、抗坏血酸氧化酶、重金属离子螯合剂、牛血清白蛋白、十二烷基三甲基甜菜碱、曲拉通-305、防腐剂;试剂R2中包括缓冲液、F-DAOS(N-乙基-N-(2-羟-3-磺丙)-3,5-二甲氧-4-氟苯胺)、尿酸酶、牛血清白蛋白、过氧化物酶、防腐剂等组成成分,本发明具有非常好的抗干扰能力,特别是针对新生儿的样本,能够实现非常准确的检测。

1. 一种抗干扰能力强的酶法尿酸检测试剂检测试剂, 其特征在于, 包括试剂R1和试剂R2, 组成为:

试剂1 (R1):

缓冲液	20mmol/L
4-氨基安替比林	1.2mmol/L
亚硝酸钠	4mmol/L - 8mmol/L
离子平衡剂	5mmol/L-10 mmol/L
抗坏血酸氧化酶	3KU/L-5 KU/L
重金属离子螯合剂	1mmol/L-2 mmol/L
牛血清白蛋白	1g/L-5 g/L
十二烷基三甲基甜菜碱	1ml/L- 3ml/L
曲拉通-305	1ml/L- 3ml/L
防腐剂	0.2g/L-0.5g/L

试剂2 (R2):

缓冲液	100mmol/L
F-DAOS (N-乙基-N-(2-羟-3-磺丙)-3,5-二甲氧-4-氟苯胺)	8mmol/L - 12mmol/L
尿酸酶	1KU/L - 2KU/L
牛血清白蛋白	1g/L -5 g/L
过氧化物酶	5KU/L-10 KU/L
防腐剂	0.2g/L -0.5 g/L。

2. 根据权利要求1所述的一种抗干扰能力强的酶法尿酸检测试剂, 其特征在于试剂R1中缓冲液为25℃, PH=6.0的 浓度为20mmol/L的哌嗪-1,4-二乙磺酸缓冲液缓冲液。

3. 根据权利要求1所述的一种抗干扰能力强的酶法尿酸检测试剂, 其特征在于试剂R2中缓冲液为25℃, PH=8.5的 浓度为100mmol/L的三羟甲基氨基甲烷缓冲液。

4. 根据权利要求1所述的一种抗干扰能力强的酶法尿酸检测试剂, 其特征在于所述防腐剂为MIT.HCL。

5. 根据权利要求1所述的一种抗干扰能力强的酶法尿酸检测试剂, 其特征在于所述表面活性剂1和表面活性剂2分别为十二烷基三甲基甜菜碱和曲拉通-305。

6. 根据权利要求1所述的一种抗干扰能力强的酶法尿酸检测试剂, 其特征在于试剂R1中所述重金属离子螯合剂为硫脲。

7. 根据权利要求1-6中任一项所述的一种抗干扰能力强的酶法尿酸检测试剂, 来检测血尿酸, 其特征在于使用全自动生化分析仪利用终点法进行测定, 检测主波长为546nm。

一种抗干扰能力强的酶法尿酸检测试剂

技术领域

[0001] 本发明涉及一种抗干扰能力强的酶法尿酸检测试剂,属于临床体外检测技术领域。

背景技术

[0002] 尿酸(UA)是嘌呤代谢的最终产物,体内产生嘌呤后,会在肝脏中再次氧化为2,6,8--三氧嘌呤又称为尿酸,它具有清除氧自由基、抗氧化的作用,但亦有刺激平滑肌增殖的作用。尿酸是血中主要非蛋白氮(NPN)类代谢产物之一,正常情况下,体内的尿酸大约有1200毫克,每天新生成约600毫克,同时排泄掉600毫克,处于平衡的状态。但如果体内产生过多来不及排泄或者尿酸排泄机制退化,体内尿酸则会滞留过多,当血液尿酸浓度大于7毫克/分升,将导致人体体液变酸,影响人体细胞的正常功能,长期置之不理将会引发痛风。另外过于疲劳或是休息不足亦可导致代谢相对迟缓导致痛风发病。近年的研究表明血清中尿酸的浓度还与甘油三酯、肌酐的浓度呈正相关性,与心脏损害有关联,因此尿酸的检测和分析对临床诊断,了解病情进展,有重要参考价值。

[0003] 目前,测定尿酸的方法主要有酶法、伏安法、磷钨酸还原法、毛细管电泳法、液相色谱法和同位素稀释质谱法等。伏安法、磷钨酸还原法、毛细管电泳法三种方法在临床中的应用较少;而液相色谱法和同位素稀释质谱法两种方法具有准确度高,特异性强等优势,但是对仪器要求高,检测成本高,对人员的操作要求也很高,只有较大的医院或者科研单位才有使用;随着国内酶类提取技术的不断提高,以及酶类产品的稳定性的提高,使得酶法检测血液尿素有了很大的发展,成为目前临床中应用最广发的检测血尿酸的方法,但在临床应用的过程中出现新生儿样本检测结果不准确度的问题,其检测结果出现级低的结果甚至0值或者负值的情况,严重影响临床的检测和应用。由于新生儿血液成分非常的复杂,有区别于正常人的样本,并且新生儿样本多出现黄疸、溶血等问题,导致常规的酶法UA检测试剂在使用时出现干扰情况。因此根据酶法检测血UA抗干扰能力差这个问题,发明了一种抗干扰能力强的酶法UA检测试剂。

发明内容

[0004] 本发明旨在提供一种抗干扰能力强的酶法尿酸检测试剂,特别是针对新生儿的样本,能够实现非常准确的检测。

[0005] 检测原理为:

尿酸在尿酸酶作用下,生成尿囊素和过氧化氢(H_2O_2),再利用Trinder反应系统,过氧化氢在过氧化物酶(POD)催化下,与4-氨基安替比林(4-AAP)和色原,生成红紫色色素。反应液的颜色与尿酸浓度成正比。反应图解见图6。

[0006] 本发明采用以下技术方案:

一种抗干扰能力强的酶法尿酸检测试剂,包括试剂R1和试剂R2,所述试剂R1和试剂R2的组成如下:

试剂1(R1):

缓冲液	20mmol/L
4-氨基安替比林	1.2mmol/L
亚硝酸钠	4mmol/L - 8mmol/L
离子平衡剂	5mmol/L-10 mmol/L
抗坏血酸氧化酶	3KU/L-5 KU/L
重金属离子螯合剂	1mmol/L-2 mmol/L
牛血清白蛋白	1g/L-5 g/L
十二烷基三甲基甜菜碱	1ml/L- 3ml/L
曲拉通-305	1ml/L- 3ml/L
防腐剂	0.2g/L-0.5g/L

试剂2(R2):

缓冲液	100mmol/L
F-DAOS (N-乙基-N-(2-羟-3-磺丙)-3,5-二甲氧-4-氟苯胺)	8mmol/L - 12mmol/L
尿酸酶	1KU/L - 2KU/L
牛血清白蛋白	1g/L -5 g/L
过氧化物酶	5KU/L-10 KU/L
防腐剂	0.2g/L -0.5 g。

[0007] 一种抗干扰能力强的酶法尿酸检测试剂,所述试剂R1中缓冲液为25℃,pH为6.0的100mmol/L的哌嗪-1,4-二乙磺酸缓冲液。

[0008] 一种抗干扰能力强的酶法尿酸检测试剂,所述试剂R2中缓冲液为25℃,pH为8.5的10mmol/L的三羟甲基氨基甲烷缓冲液。

[0009] 一种抗干扰能力强的酶法尿酸检测试剂,所述防腐剂为2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮盐酸盐。

[0010] 一种抗干扰能力强的酶法尿酸检测试剂,所述试剂R1中离子平衡剂为氯化锂。

[0011] 一种抗干扰能力强的酶法尿酸检测试剂,所述试剂R1中重金属离子螯合剂为硫脲。

[0012] 一种抗干扰能力强的酶法尿酸检测试剂,所述试剂R1中表面活性剂1为十二烷基三甲基甜菜碱(北京阿匹斯)。

[0013] 一种抗干扰能力强的酶法尿酸检测试剂,所述试剂R1中表面活性2为曲拉通-305(SIGMA)。

[0014] 一种抗干扰能力强的酶法尿酸检测试剂,所述的一种抗干扰能力强的酶法试剂来检测尿酸的检测方法,使用全自动生化分析仪利用两点终点法进行测定,检测主波长为546nm。

[0015] 所述的检测方法,R1试剂和R2试剂的比例为4:1。

[0016] 本发明的有益效果:

1)本发明试剂R1中优先选择了哌嗪-1,4-二乙磺酸缓冲液作为缓冲液,试剂R2中选取三羟甲基氨基甲烷作为缓冲液,在保证基本的缓冲能力的情况下,且能够保证不干扰反应的进行。

[0017] 2) 本发明优先选择了2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮盐酸盐作为防腐剂,能有效的放置试剂中的蛋白酶不会发生生菌腐败,且有效的避免了普通防腐剂对酶的活性产生抑制的弊端。

[0018] 3) 试剂R1中添加了抗坏血酸氧化酶、亚硝酸盐、表面活性剂十二烷基三甲基甜菜碱和曲拉通-305,抗坏血酸氧化酶能有效的去除维生素C的干扰,亚硝酸盐对去除胆红素特别是黄疸样本效果非常的好,而表面活性剂十二烷基三甲基甜菜碱和曲拉通-305的同时加入,则较好的溶解新生儿样本中其他干扰成分的影响,从而将样本对主反应的干扰降低到最低。

[0019] 4) 在试剂中加入了硫脲作为重金属离子螯合剂,从而有效的去除重金属离子对酶类的抑制作用。

[0020] 5) 本方案优先选择了F-DAOS作为最后一步主反应的色原,发挥其色原自身的较强的抗干扰能力的效果。

附图说明

[0021] 图1 实施例1试剂检测方法;

图2 实施例2试剂检测方法;

图3 实施例3试剂检测方法;

图4 实施例1-3试剂抗干扰性能实验检测结果;

图5 实施例1-3试剂尿素检测结果与液相色谱法尿素检测结果对比;

图6 该发明试剂检测原理反应图解。

具体实施方式

[0022] 下面结合具体实施例对本发明进行进一步说明:

实施例1

一种现有的酶法UA检测试剂及检测方法:

试剂R1

磷酸盐缓冲液 100mmol/L

4-氨基安替比林 1.2mmol/L

过氧化物酶 2KU/L

试剂2 (R2):

磷酸盐缓冲液 100mmol/L

DHBS 8mmol/L

尿酸酶 1000U/L。

[0023] 本实施例试剂的使用方法:

本实施例描述的一种现有的酶法UA检测试剂,在使用时采用具有双试剂功能的全自动生化分析仪,如日立7180全自动分析仪等,利用两点终点法进行测定。将R1和R2按照4:1的比例放置到对应的试剂位上,在样品盘的对应位置放置好蒸馏水、标准品和样本,操作如图1。

[0024] 实施例2

一种新发明的抗干扰能力强的酶法UA检测试剂,其特征在于,包括试剂R1和试剂R2,试剂组分如下:

试剂1(R1):

哌嗪-1,4-二乙磺酸缓冲液	20mmol/L
4-氨基安替比林	1.2mmol/L
亚硝酸钠	4mmol/L
氯化锂	5mmol/L
抗坏血酸氧化酶	3KU/L
硫脲	1mmol/L
牛血清白蛋白	1g/L
十二烷基三甲基甜菜碱	1ml/L
曲拉通-305	1ml/L
MIT.HCL	0.2g/L

试剂2(R2):

三羟甲基氨基甲烷缓冲液	100mmol/L
F-DAOS (N-乙基-N-(2-羟-3-磺丙)-3,5-二甲氧-4-氟苯胺)	12.5mmol/L
尿酸酶	1000U/L
牛血清白蛋白	1g/L
过氧化物酶	5KU/L
MIT.HCL	0.2g/L。

[0025] 本实施例试剂的使用方法:

本实施例试剂在使用时采用具有双试剂功能的全自动生化分析仪,如日立7180全自动分析仪等,利用两点终点法进行测定。将R1和R2按照4:1的比例放置到对应的试剂位上,在样品盘的对应位置放置好蒸馏水、标准品和样本,操作如图2。

[0026] 实施例3

本实施例描述的是一种新发明的抗干扰能力强的关键原材料增加后的酶法UA检测试剂,包括试剂R1和R2,其组分如下:

试剂1(R1):

哌嗪-1,4-二乙磺酸缓冲液	20mmol/L
4-氨基安替比林	1.2mmol/L
亚硝酸钠	8mmol/L
氯化锂	10mmol/L
抗坏血酸氧化酶	5KU/L
硫脲	2mmol/L
牛血清白蛋白	5g/L
十二烷基三甲基甜菜碱	3ml/L
曲拉通-305	3ml/L
MIT.HCL	0.5g/L

试剂2(R2):

三羟甲基氨基甲烷缓冲液	100mmol/L
F-DAOS (N-乙基-N-(2-羟-3-磺丙)-3,5-二甲氧-4-氟苯胺)	12mmol/L
尿酸酶	2000U/L
牛血清白蛋白	15g/L
过氧化物酶	10KU/L
MIT.HCL	0.5g/L。

本实施例试剂的使用方法：

本实施例试剂在使用时采用具有双试剂功能的全自动生化分析仪，如日立7180全自动分析仪等，利用两点终点法进行测定。将R1和R2按照4:1的比例放置到对应的试剂位上，在样品盘的对应位置放置好蒸馏水、标准品和样本，操作如图3。

[0027] 干扰性试验：

1)取新鲜混合血清，分成2等份，然后将每等份再分成5等份，根据图4要求加入不同的干扰物质。然后分别用实施例1、2、3试剂同时对比测定血清中的尿酸的含量，对照组测定结果与加入不同干扰物质后各组的测定结果见图5。相对偏差(%)=(干扰样本的测定均值-对照样本的测定均值)/对照样本的测定均值×100%。

[0028] 由图4可以看出，实施例2和3试剂使用抗坏血酸≤5000μmol/L、甘油三酯≤22.6mmol/L、血红蛋白≤2000mg/dL、胆红素≤684μmol/L时对测试结果没有明显干扰，而实施例1试剂则对于上述干扰物质则有不同程度的干扰，说明本发明的UA检测试剂具有良好的抗干扰能力。

[0029] 1)选出20个新生儿的临床样本，将实施例1、2、3试剂尿素检测结果同液相色谱法尿素检测结果进行对比，结果如图5。

[0030] 通过分析图5发现，实施例1试剂对于检测新生儿样本结果比较差，甚至出现负值，而实施例2、3试剂检测结果较好，说明本法具有良好的抗干扰能力。

实施例 1 试剂检测方法

加入物	空白管	标准管	测定管
R1	240 μ L	240 μ L	240 μ L
蒸馏水	3 μ L		
标准液		3 μ L	
标本			3 μ L
混合，置 37℃ 预孵育 5 分钟，记录吸光度 A1			
R2	60 μ L	60 μ L	60 μ L
混匀，在主波长 546nm，反应 5 分钟后，记录 A2，计算 ΔA 。			

计算：尿酸含量 ($\mu\text{mol/L}$) = (ΔA 测定 $\div$ ΔA 标准) $\times$ C 标准。

图1

实施例 2 试剂检测方法

加入物	空白管	标准管	测定管
R1	240 μ L	240 μ L	240 μ L
蒸馏水	3 μ L		
标准液		3 μ L	
标本			3 μ L
混合，置 37℃ 预孵育 5 分钟，记录吸光度 A1			
R2	60 μ L	60 μ L	60 μ L
混匀，在主波长 546nm，反应 5 分钟后，记录 A2，计算 ΔA 。			

计算：尿酸含量 ($\mu\text{mol/L}$) = (ΔA 测定 $\div$ ΔA 标准) $\times$ C 标准。

图2

实施例 3 试剂检测方法

加入物	空白管	标准管	测定管
R1	240 μ L	240 μ L	240 μ L
蒸馏水	3 μ L		
标准液		3 μ L	
标本			3 μ L
混合, 置 37℃ 预孵育 5 分钟, 记录吸光度 A1			
R2	60 μ L	60 μ L	60 μ L
混匀, 在主波长 546nm, 反应 5 分钟后, 记录 A2, 计算 ΔA 。			

计算: 尿酸含量 ($\mu\text{mol/L}$) = (ΔA 测定 $\div$ ΔA 标准) $\times$ C 标准。

图3

实施例试剂抗干扰性能比较

干扰物质种类	干扰物质浓度	实施例 1		实施例 2		实施例 3	
		UA 均值 ($\mu\text{mol/L}$)	相对偏差 (%)	UA 均值 ($\mu\text{mol/L}$)	相对偏差 (%)	UA 均值 ($\mu\text{mol/L}$)	相对偏差 (%)
无干扰物 (对照组)	0	283	0	283	0	283	0
甘油三酯 (mmol/L)	22.6	143	-49.47%	275	-2.8%	280	-1.06%
胆红素 ($\mu\text{mol/L}$)	684	78	-72.44%	291	2.8	275	-2.8%
血红蛋白 (mg/dL)	2000	356	25.80%	280	-1.06%	295	4.24%
抗坏血酸 ($\mu\text{mol/L}$)	5000	18	-93.64%	289	2.5%	281	0.71%

图4

新生儿样本检测情况

单位: $\mu\text{mol/L}$

	实施例 1	实施例 2	实施例 3	液相色谱法
样本 1	110	152	148	153
样本 2	134	127	121	124
样本 3	296	369	371	365
样本 4	553	569	552	562
样本 5	0	48	41	43
样本 6	119	125	129	122
样本 7	-9	147	135	146
样本 8	21	74	69	75
样本 9	39	96	74	86
样本 10	-32	42	36	43
样本 11	185	153	158	159
样本 12	231	231	256	235
样本 13	162	354	339	356
样本 14	197	339	335	331
样本 15	21	178	179	175
样本 16	19	173	162	169
样本 17	-3	141	138	142
样本 18	0	194	205	196
样本 19	264	243	251	245

图5

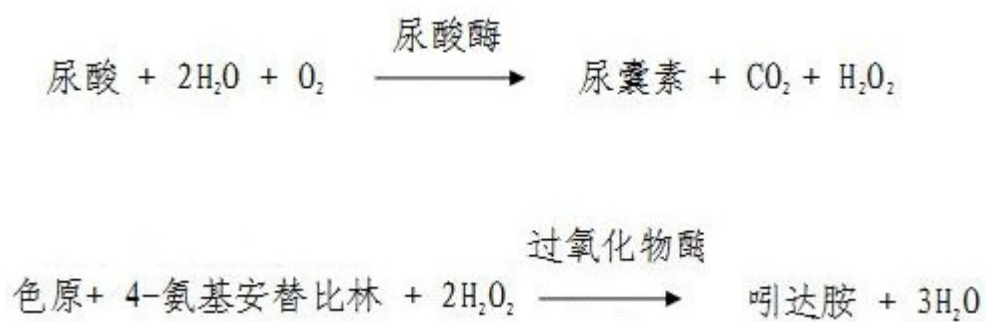


图6

专利名称(译)	一种抗干扰能力强的酶法尿酸检测试剂		
公开(公告)号	CN108287233A	公开(公告)日	2018-07-17
申请号	CN2017111389611.X	申请日	2017-12-21
[标]发明人	罗维晓 胡晓飞 王美丽		
发明人	罗维晓 胡晓飞 王美丽		
IPC分类号	G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种抗干扰能力强的酶法尿酸检测试剂，其特征在于，试剂R1中包括缓冲液、4-氨基安替比林、亚硝酸钠、离子平衡剂、抗坏血酸氧化酶、重金属离子螯合剂、牛血清白蛋白、十二烷基三甲基甜菜碱、曲拉通-305、防腐剂；试剂R2中包括缓冲液、F-DAOS (N-乙基-N-(2-羟-3-磺丙)-3,5-二甲氧-4-氟苯胺)、尿酸酶、牛血清白蛋白、过氧化物酶、防腐剂等组成成分，本发明具有非常好的抗干扰能力，特别是针对新生儿的样本，能够实现非常准确的检测。

实施例1 试剂检测方法

加入物	空白管	标准管	测定管
R1	240 μ L	240 μ L	240 μ L
蒸馏水	3 μ L		
标准液		3 μ L	
标本			3 μ L
混合，置 37℃ 预孵育 5 分钟，记录吸光度 A1			
R2	60 μ L	60 μ L	60 μ L
混匀，在主波长 546nm，反应 5 分钟后，记录 A2，计算 ΔA 。			

计算：尿酸含量 (μ mol/L) = (ΔA 测定 $\div$ ΔA 标准) $\times$ C 标准。