



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105445449 A

(43) 申请公布日 2016. 03. 30

(21) 申请号 201510938602. 6

(22) 申请日 2015. 12. 16

(66) 本国优先权数据

201510157438. 5 2015. 04. 04 CN

(71) 申请人 吉林双正医疗科技有限公司

地址 130000 吉林省长春市绿区汽贸小区以东景阳大路以南中海凯旋门 A5 幢

(72) 发明人 杨小军 李欣 赵旻

(74) 专利代理机构 吉林长春新纪元专利代理有限公司 22100

代理人 魏征骥

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

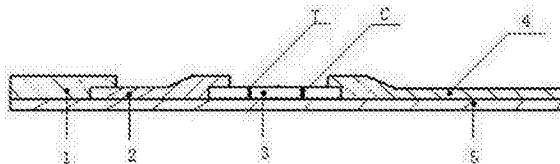
权利要求书2页 说明书20页 附图1页

(54) 发明名称

唾液尿酸快速半定量检测装置及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种唾液尿酸快速半定量检测装置及其制备方法,属于医疗检测设备领域。由固相尿酸-载体蛋白和羊抗兔 IgG 多克隆抗体的硝酸纤维素膜、吸附有胶体金标记抗尿酸抗体的玻璃纤维、样品垫、吸水纸等其它辅料粘贴制成。优点在于:结构新颖,特异性强,能快速半定量检测唾液尿酸含量,又没有增加生产操作的复杂度。采用多聚赖氨酸处理液对硝酸纤维素膜进行预处理,将尿酸-载体蛋白先与二氧化硅纳米颗粒结合再吸附到硝酸纤维素膜上,通过配合合适的喷金缓冲液和样品垫处理液,可保证免疫胶体金释放完全的基础上,有效的提高了反应的灵敏度,同样的阈值下,还可降低免疫胶体金的用量,节约成本。检测装置灵敏度高、特异性强、操作简便省时、实用性强。



1. 一种唾液尿酸快速半定量检测装置,其特征在于:样品垫(1)、免疫胶体金玻璃纤维膜(2)、硝酸纤维素膜(3)、吸收垫(4)分别粘贴在塑料板(5),所述硝酸纤维素膜(3)的两端分别与吸收垫(4)、免疫胶体金玻璃纤维膜(2)搭接,所述免疫胶体金玻璃纤维膜(2)的另一端与样品垫(1)搭接;所述硝酸纤维素膜(3)上设置检测线(T)和质控线(C),或设置第一检测线(T1)、第二检测线(T2)、第三检测线(T3)和质控线(C),所述的检测线(T)上固相有尿酸-载体蛋白;或所述的第一检测线T1、第二检测线T2、第三检测线T3上分别固相有浓度从小到大的尿酸-载体蛋白,所述的质控线(C)上喷点羊抗兔IgG多克隆抗体。

2. 根据权利要求1所述的唾液尿酸快速半定量检测装置,其特征在于:所述的检测线(T)上固相有尿酸-载体蛋白,该尿酸-载体蛋白包括:卵清蛋白(OVA)、牛血清白蛋白(BSA)、血蓝蛋白(KLH)。

3. 如权利要求1或2所述的唾液尿酸快速半定量检测装置的制备方法,其特征在于:包括下列步骤:

(a)采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金;

(b)采用步骤(a)中制得的胶体金标记兔抗尿酸抗体,获得免疫胶体金;

(c)采用喷金缓冲液稀释步骤(b)的免疫胶体金获得免疫胶体金溶液,用免疫胶体金溶液喷涂于玻璃纤维垫,制得免疫胶体金玻璃纤维膜;

(d)将硝酸纤维素膜用多聚赖氨酸处理液预处理后,喷点尿酸-载体蛋白为检测线T或不同浓度尿酸-载体蛋白为第一检测线(T1)、第二检测线(T2)、第三检测线(T3),喷点羊抗兔IgG抗体作为质控线,制得免疫硝酸纤维素膜;

(e)将预处理的样品垫、步骤(c)制备的免疫胶体金玻璃纤维膜、步骤(d)制备的免疫硝酸纤维素膜、吸水纸依次粘贴在胶板上,切裁制得检测试剂条,最后将检测试剂条装入塑料外壳。

4. 根据权利要求3所述的唾液尿酸快速半定量检测装置的制备方法,其特征在于:步骤(a)所述的采用柠檬酸三钠还原法制备的胶体金颗粒粒径为20~60nm。

5. 根据权利要求3所述的唾液尿酸快速半定量检测装置的制备方法,其特征在于:步骤(c)所述的喷金缓冲液由Tris-HCl液、蔗糖、海藻糖、牛血清白蛋白BSA组成,pH值8.5,其中Tris-Hcl浓度为0.02mol/L,蔗糖浓度为5~20%,海藻糖浓度为1~5%,牛血清白蛋白BSA浓度为0.5~1%。

6. 根据权利要求3所述的唾液尿酸快速半定量检测装置的制备方法,其特征在于:步骤(d)所述的多聚赖氨酸处理液由多聚赖氨酸稀释到浓度为0.5%组成,经0.22 μ m滤膜过滤,其中多聚赖氨酸,SIGMA,150KD~300KD,备用。

7. 根据权利要求3所述的唾液尿酸快速半定量检测装置的制备方法,其特征在于:步骤(d)所述的多聚赖氨酸处理液由多聚赖氨酸与甲醇混合组成,其中多聚赖氨酸浓度为0.5%组成,甲醇浓度为10%,经0.22 μ m滤膜过滤,其中多聚赖氨酸,SIGMA,150KD~300KD,备用。

8. 根据权利要求3所述的唾液尿酸快速半定量检测装置的制备方法,其特征在于:步骤(d)所述的多聚赖氨酸处理液由多聚赖氨酸、甲醇、PEG20000混合组成,其中多聚赖氨酸浓度为0.5%组成,甲醇浓度为10%,PEG20000浓度为0.2%,经0.22 μ m滤膜过滤,其中多聚赖氨酸,SIGMA,150KD~300KD,备用。

9. 根据权利要求3所述的唾液尿酸快速半定量检测装置的制备方法,其特征在于:步骤

(d)尿酸-载体蛋白与二氧化硅纳米颗粒结合,方法是:以二氧化硅作为载体,取1mL尿酸-载体蛋白溶液,与乙醇和去离子水搅拌混匀,再加入定量氨水和0.3mL正硅酸己酯,搅拌1小时后,补加剩余正硅酸己酯,持续搅拌,整个反应避光进行,分别以12000rpm,8500rpm和7000rpm离心10分钟收集,无水乙醇、去离子水各洗2遍。

10.根据权利要求9所述的唾液尿酸快速半定量检测装置的制备方法,其特征在于:步骤(d)所述二氧化硅纳米颗粒的制备是:将2.48mL体积分数25的氨水和43.2mL无水乙醇混合于锥形瓶中,在35℃左右和超声条件下,以0.4mL/min的速度滴入3.5mL正硅酸乙酯,滴完后再超声5分钟,即可制得粒径120nm均一的粒子,分别以12000rpm,8500rpm和7000rpm离心10分钟收集,倒掉上清液,再加水超声分散.反复多次洗涤至近中性,最后用水定容至体积与刚制备好时的体积相同,存放待用。

11.根据权利要求3所述的唾液尿酸快速半定量检测装置的制备方法,其特征在于:步骤(d)中尿酸-载体蛋白包括卵清蛋白(OVA)、牛血清白蛋白(BSA)、血蓝蛋白(KLH)。

12.根据权利要求3所述的唾液尿酸快速半定量检测装置的制备方法,其特征在于:步骤(e)所述的预处理的样品垫采用的样品垫处理液由Tris-HCL液、牛血清白蛋白BSA、酪蛋白、表面活性剂脂肪醇聚氧乙烯醚组成,其中Tris-HCL液的浓度为0.1mol/L,牛血清白蛋白BSA浓度为0.5~1%,酪蛋白浓度为0.1~0.2%、表面活性剂脂肪醇聚氧乙烯醚浓度为0.5~1%。

唾液尿酸快速半定量检测装置及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及医疗检测设备领域,特别涉及唾液尿酸快速半定量检测装置及其制备方法,利用胶体金免疫层析技术以及双抗体夹心法原理半定量检测唾液标本中尿酸含量的检测装置及其制备方法,可实现唾液尿酸的灵敏、特异、快速检测。

背景技术

[0002] 尿酸是人类嘌呤代谢的终末产物,通过黄嘌呤脱氢酶或黄嘌呤氧化酶降解嘌呤形成的。尿酸在细胞外液的浓度取决于尿酸生成速度和经肾排出之间的平衡关系,尿酸来源过多或经肾排泄不足导致血清尿酸水平升高,是高尿酸血症的主要病因,高浓度的尿酸盐可析出结晶沉积在关节软骨、肌腱、肾脏等部位,从而引起疾病。高尿酸血症与肥胖、血脂紊乱、高血压、糖代谢异常等并存,高尿酸血症是冠心病的独立危险因素。

[0003] 唾液是由腮腺、舌下腺、颌下腺分泌的混合液体,有帮助消化、保护黏膜等生理功能。唾液与其他体液如血液、尿液等样品一样,内含物极为丰富,与血液中的相应成分关系密切。自1901年Michaets和1903年Kirk率先将唾液分析作为诊断疾病方法以来,唾液分析的重要性已经得到越来越多的临床认可。与血液标本相比,唾液由于取材方便,对身体无创,患者更容易接受。唾液中尿酸浓度与血中尿酸浓度有很好的相关性,因此测定唾液中尿酸的浓度能够反映血中尿酸的浓度,唾液中尿酸是诊断高尿酸血症和痛风的潜在生物标志物。目前对于尿酸检测常用方法为全自动生化分析仪检测,该方法需要特殊仪器,只能在医院内检测,不适合高尿酸血症或痛风等患者日常尿酸监测,因此寻找灵敏、特异的可用于尿酸含量测定的快速简易装置研制也是近年研究热点。

[0004] 胶体金免疫层析技术(gold immunochromatography assay,GICA)是一种将胶体金标记技术和蛋白质层析技术结合的以微孔滤膜为载体的固相膜免疫分析技术。胶体金免疫层析技术是一种常用的免疫层析检测方法,由于其操作简单、省时、制造成本较低、结果易判读等特点,非常适合于现场检测,广泛用于生物、医药、食品等领域。由于胶体金免疫层析技术是一步完成检测,因此检测过程的干扰因素较多,其灵敏度低是限制胶体金免疫层析应用范围的主要因素,传统的胶体金免疫层析技术的检测限高于ELISA等方法。

[0005] 在胶体金免疫层析检测中,蛋白质固着于硝酸纤维素膜(NC膜)作为待测样本的捕获试剂。由于检测结果完全取决于捕获试剂在膜上达到良好的吸附效果,因此蛋白质在膜上均一、良好的吸附对胶体金检测结果非常重要。如果NC膜上结合的蛋白量不足或者蛋白结合力不够强,就会出现相当多的问题,在检测结果的检测线上非常明显。如果膜上结合的蛋白量太低,那么在结果中检测线显色较弱而且检测灵敏度降低。如果蛋白不能牢固的吸附于NC膜,那么在蛋白吸附于NC膜以前发生扩散,从而导致检测线较宽、显色较弱而不是鲜艳而清晰,使检测结果难以解释。在极端条件下,如果蛋白与NC膜的物理吸附作用太弱,流过的蛋白检测物和表面活性剂溶液可能将固着的蛋白从NC膜上洗掉,从而显示较宽或者根本不清晰的检测线,难以解释检测结果。

发明内容

[0006] 本发明提供一种唾液尿酸快速半定量检测装置及其制备方法,解决了不借用大型仪器的尿酸浓度检测,并解决了现有技术存在的NC膜吸附蛋白量不足、结合力不强的问题。本发明制备的唾液尿酸快速半定量检测装置,可实现唾液尿酸的灵敏、特异、快速检测,提高了对高尿酸血症患者进行尿酸代谢的合理综合判定,能够快速、准确进行高尿酸血症早期预警及病情风险判断。由固相有纯化尿酸-载体蛋白和羊抗兔IgG多克隆抗体的硝酸纤维素膜、吸附有胶体金标记兔抗尿酸抗体的玻璃纤维、样品垫、吸水纸等其它辅料粘贴制成。可实现唾液尿酸的灵敏、特异、快速检测。

[0007] 本发明采取的技术方案是:

[0008] 唾液尿酸快速半定量检测装置:样品垫(1)、免疫胶体金玻璃纤维膜(2)、硝酸纤维素膜(3)、吸收垫(4)分别粘贴在塑料板(5),所述硝酸纤维素膜(3)的两端分别与吸收垫(4)、免疫胶体金玻璃纤维膜(2)搭接,所述免疫胶体金玻璃纤维膜(2)的另一端与样品垫(1)搭接;所述硝酸纤维素膜(3)上设置检测线(T)和质控线(C),或设置第一检测线(T1)、第二检测线(T2)、第三检测线(T3)和质控线(C),所述的检测线(T)上固相有尿酸-载体蛋白;或所述的第一检测线T1、第二检测线T2、第三检测线T3上分别固相有浓度从小到大的尿酸-载体蛋白,所述的质控线(C)上喷点羊抗兔IgG多克隆抗体。

[0009] 所述的检测线(T)上固相有尿酸-载体蛋白,该尿酸-载体蛋白包括:卵清蛋白(OVA)、牛血清白蛋白(BSA)、血蓝蛋白(KLH)。

[0010] 本发明唾液尿酸快速半定量检测装置的制备方法,其特征在于:包括下列步骤:

[0011] (a)采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金;

[0012] (b)采用步骤(a)中制得的胶体金标记兔抗尿酸抗体,获得免疫胶体金;

[0013] (c)采用喷金缓冲液稀释步骤(b)的免疫胶体金获得免疫胶体金溶液,用免疫胶体金溶液喷涂于玻璃纤维垫,制得免疫胶体金玻璃纤维膜;

[0014] (d)将硝酸纤维素膜用多聚赖氨酸处理液预处理后,喷点尿酸-载体蛋白为检测线T或不同浓度尿酸-载体蛋白为第一检测线(T1)、第二检测线(T2)、第三检测线(T3),喷点羊抗兔IgG抗体作为质控线,制得免疫硝酸纤维素膜;

[0015] (e)将预处理的样品垫、步骤(c)制备的免疫胶体金玻璃纤维膜、步骤(d)制备的免疫硝酸纤维素膜、吸水纸依次粘贴在胶板上,切裁制得检测试剂条,最后将检测试剂条装入塑料外壳。

[0016] 本发明步骤(a)所述的采用柠檬酸三钠还原法制备的胶体金颗粒粒径为20~60nm。

[0017] 本发明步骤(c)所述的喷金缓冲液由Tris-HCL液、蔗糖、海藻糖、牛血清白蛋白BSA组成,pH值8.5,其中Tris-Hcl浓度为0.02mol/L,蔗糖浓度为5~20%,海藻糖浓度为1~5%,牛血清白蛋白BSA浓度为0.5~1%。

[0018] 本发明步骤(d)所述的多聚赖氨酸处理液由多聚赖氨酸稀释到浓度为0.5%组成,经0.22 μ m滤膜过滤,其中多聚赖氨酸,SIGMA,150KD~300KD,备用。

[0019] 本发明步骤(d)所述的多聚赖氨酸处理液由多聚赖氨酸与甲醇混合组成,其中多聚赖氨酸浓度为0.5%组成,甲醇浓度为10%,经0.22 μ m滤膜过滤,其中多聚赖氨酸,SIGMA,

150KD~300KD,备用。

[0020] 本发明步骤(d)所述的多聚赖氨酸处理液由多聚赖氨酸、甲醇、PEG20000混合组成,其中多聚赖氨酸浓度为0.5%组成,甲醇浓度为10%,PEG20000浓度为0.2%,经0.22 μ m滤膜过滤,其中多聚赖氨酸,SIGMA,150KD~300KD,备用。

[0021] 本发明步骤(d)尿酸-载体蛋白与二氧化硅纳米颗粒结合,方法是:以二氧化硅作为载体,取1mL尿酸-载体蛋白溶液,与乙醇和去离子水搅拌混匀,再加入定量氨水和0.3mL正硅酸己酯,搅拌1小时后,补加剩余正硅酸己酯,持续搅拌,整个反应避光进行,分别以12000rpm,8500rpm和7000rpm离心10分钟收集,无水乙醇、去离子水各洗2遍。

[0022] 本发明步骤(d)所述二氧化硅纳米颗粒的制备是:将2.48mL体积分数25的氨水和43.2mL无水乙醇混合于锥形瓶中,在35 $^{\circ}$ C左右和超声条件下,以0.4mL/min的速度滴入3.5mL正硅酸乙酯,滴完后再超声5分钟,即可制得粒径120nm均一的粒子,分别以12000rpm,8500rpm和7000rpm离心10分钟收集,倒掉上清液,再加水超声分散.反复多次洗涤至近中性,最后用水定容至体积与刚制备好时的体积相同,存放待用。

[0023] 本发明步骤(d)中尿酸-载体蛋白包括卵清蛋白(OVA)、牛血清白蛋白(BSA)、血蓝蛋白(KLH)。

[0024] 本发明步骤(e)所述的预处理的样品垫采用的样品垫处理液由Tris-HCL液、牛血清白蛋白BSA、酪蛋白、表面活性剂脂肪醇聚氧乙烯醚组成,其中Tris-HCL液的浓度为0.1mol/L,牛血清白蛋白BSA浓度为0.5~1%,酪蛋白浓度为0.1~0.2%、表面活性剂脂肪醇聚氧乙烯醚浓度为0.5~1%。

[0025] 本发明制备的唾液尿酸快速半定量检测装置可检测患者唾液尿酸含量,为临床高尿酸血症及痛风患者的体内尿酸水平监测具有重要意义。

[0026] 本发明由固相有纯化的尿酸-载体蛋白(检测线T)和羊抗兔IgG抗体(质控线)的硝酸纤维素膜、吸附有胶体金标记兔抗尿酸抗体的玻璃纤维、样品垫、吸水纸等其它辅料粘帖制成,具有特异、快速、灵敏的特点。采用多聚赖氨酸对硝酸纤维素膜进行预处理,并配制合适的喷金缓冲液和样品垫处理液,在保证免疫胶体金释放完全的基础上,有效的提高了反应的灵敏度,同样的阈值下,还可降低免疫胶体金的用量,节约成本。

[0027] 多聚赖氨酸(Poly-L-Lysine,PLL)的结构中含有多个氨基可供偶联,活化过程简单,方便NC膜表面固定蛋白。多聚赖氨酸带有大量的正电荷,可以显著增加NC膜上活性位点的正电荷数量,而抗体在常规包被条件下是带负电荷的,这样单位面积的NC膜上可以结合更多数量的抗体,这可以显著增加抗体的包被效率。常规条件下,单位面积的NC膜上结合抗体的数量是有限的,采用多聚赖氨酸处理之后,可以让单位面积的NC膜上结合抗体数量增加,进而可以实现更高的检测灵敏度。研究发现甲醇具有良好的重润湿性,可以保证在预处理NC膜的时候不产生气泡以免气泡的存在导致NC膜处理局部不充分,同时也能够活化NC膜,让NC膜带正电荷,这个与聚赖氨酸相似,两者协同作用,效果更好。PEG20000可与NC膜的位点发生吸附作用,在蛋白包被后,可以吸收蛋白的结合水,导致蛋白更加疏水,这样蛋白与NC膜的结合更加牢固,通过疏水作用明显提高蛋白的包被效率。综上,多聚赖氨酸、甲醇和PEG20000组合配方,可以从电荷作用和疏水作用两方面来提高NC膜蛋白的包被效率。

[0028] 为了提高胶体金免疫层析技术的灵敏度,我们通过对硝酸纤维素膜用多聚赖氨酸处理液进行了预处理,达到了提高试纸灵敏度的目的。

[0029] 本发明的有益效果在于：

[0030] 1、本发明的检测装置结构新颖，将尿酸抗体包被于硝酸纤维膜膜上，特异性强，既能快速半定量检测尿酸含量，即可通过比色卡或胶体金读值仪判定尿酸含量，也可通过三条检测线的显色情况判定机体尿酸含量，也没有增加生产操作的复杂度。

[0031] 2、免疫胶体金制备步骤中，通过配合合适的喷金缓冲液和样品垫处理液，可保证免疫胶体金释放完全的基础上，有效的提高了反应的灵敏度，同样的阈值下，还可降低免疫胶体金的用量，节约成本。

[0032] 3、本发明对硝酸纤维素膜进行预处理，提高了检测试纸灵敏度、特异性。

[0033] 4、本发明的检测装置不需要任何特殊仪器设备，检测成本低。

[0034] 5、本发明的检测装置操作简便，不需要专业人员操作。实用性强。

附图说明

[0035] 图1是本发明的结构示意图，图中为一条检测线；

[0036] 图2是本发明的结构示意图，图中为三条检测线。

具体实施方式

[0037] 参见图1所示，本发明的唾液尿酸快速半定量检测装置，样品垫(1)、免疫胶体金玻璃纤维膜(2)、硝酸纤维素膜(3)、吸收垫(4)分别粘贴在塑料板(5)，所述硝酸纤维素膜(3)的两端分别与吸收垫(4)、免疫胶体金玻璃纤维膜(2)搭接，所述免疫胶体金玻璃纤维膜(2)的另一端与样品垫(1)搭接；所述硝酸纤维素膜(3)上设置检测线(T)和质控线(C)，所述的检测线(T)上固相有尿酸-载体蛋白，所述的质控线(C)上喷点羊抗兔IgG多克隆抗体。

[0038] 参见图2所示，本发明的唾液尿酸快速半定量检测装置，样品垫(1)、免疫胶体金玻璃纤维膜(2)、硝酸纤维素膜(3)、吸收垫(4)分别粘贴在塑料板(5)，所述硝酸纤维素膜(3)的两端分别与吸收垫(4)、免疫胶体金玻璃纤维膜(2)搭接，所述免疫胶体金玻璃纤维膜(2)的另一端与样品垫(1)搭接；所述硝酸纤维素膜(3)上设置第一检测线(T1)、第二检测线(T2)、第三检测线(T3)和质控线(C)，所述的第一检测线T1、第二检测线T2、第三检测线T3上分别固相有浓度从小到大的尿酸-载体蛋白，所述的质控线(C)上喷点羊抗兔IgG多克隆抗体；其中第一检测线T1、第二检测线T2、第三检测线T3上分别固相有1mg/ml、1.5mg/ml、2mg/ml浓度的尿酸-载体蛋白；

[0039] 本发明的唾液尿酸快速半定量检测装置的制备方法，包括下列步骤：

[0040] (a)采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金；

[0041] (b)采用步骤(a)中制得的胶体金标记兔抗尿酸抗体，获得免疫胶体金；

[0042] (c)采用喷金缓冲液稀释步骤(b)的免疫胶体金获得免疫胶体金溶液，用免疫胶体金溶液喷涂于玻璃纤维垫，制得免疫胶体金玻璃纤维膜；

[0043] (d)将硝酸纤维素膜用多聚赖氨酸处理液预处理后，喷点尿酸-载体蛋白为检测线T或不同浓度尿酸-载体蛋白为第一检测线(T1)、第二检测线(T2)、第三检测线(T3)，喷点羊抗兔IgG抗体作为质控线，制得免疫硝酸纤维素膜；其中T1检测线可检测250 μ mol/L尿酸，T2检测线可检测250-350 μ mol/L尿酸，T3检测线可检测350-500 μ mol/L尿酸；

[0044] (e)将预处理的样品垫、步骤(c)制备的免疫胶体金玻璃纤维膜、步骤(d)制备的免

疫硝酸纤维素膜、吸水纸依次粘贴在胶板上, 剪裁制得检测试剂条, 最后将检测试剂条装入塑料外壳;

[0045] 步骤(a)所述的采用柠檬酸三钠还原法制备的胶体金颗粒粒径为20~60nm。

[0046] 步骤(c)所述的喷金缓冲液由Tris-HCL液、蔗糖、海藻糖、牛血清白蛋白BSA组成, pH值8.5, 其中Tris-Hcl浓度为0.02mol/L, 蔗糖浓度为5~20%, 海藻糖浓度为1~5%, 牛血清白蛋白BSA浓度为0.5~1%。

[0047] 步骤(d)所述的多聚赖氨酸处理液由多聚赖氨酸稀释到浓度为0.5%组成, 经0.22 μ m滤膜过滤, 其中多聚赖氨酸, SIGMA, 150KD~300KD, 备用。

[0048] 步骤(d)所述的多聚赖氨酸处理液由多聚赖氨酸与甲醇混合组成, 其中多聚赖氨酸浓度为0.5%组成, 甲醇浓度为10%, 经0.22 μ m滤膜过滤, 其中多聚赖氨酸, SIGMA, 150KD~300KD, 备用。

[0049] 步骤(d)所述的多聚赖氨酸处理液由多聚赖氨酸、甲醇、PEG20000混合组成, 其中多聚赖氨酸浓度为0.5%组成, 甲醇浓度为10%, PEG20000浓度为0.2%, 经0.22 μ m滤膜过滤, 其中多聚赖氨酸, SIGMA, 150KD~300KD, 备用。

[0050] 步骤(d)尿酸-载体蛋白与二氧化硅纳米颗粒结合, 方法是: 以二氧化硅作为载体, 取1mL尿酸-载体蛋白溶液, 与乙醇和去离子水搅拌混匀, 再加入定量氨水和0.3mL正硅酸己酯, 搅拌1小时后, 补加剩余正硅酸己酯, 持续搅拌, 整个反应避光进行, 分别以12000rpm, 8500rpm和7000rpm离心10分钟收集, 无水乙醇、去离子水各洗2遍。(这段重点看看)

[0051] 步骤(d)所述二氧化硅纳米颗粒的制备是: 将2.48mL体积分数25的氨水和43.2mL无水乙醇混合于锥形瓶中, 在35 $^{\circ}$ C左右和超声条件下, 以0.4mL/min的速度滴入3.5mL正硅酸乙酯, 滴完后再超声5分钟, 即可制得粒径120nm均一的粒子, 分别以12000rpm, 8500rpm和7000rpm离心10分钟收集, 倒掉上清液, 再加水超声分散. 反复多次洗涤至近中性, 最后用水定容至体积与刚制备好时的体积相同, 存放待用。

[0052] 步骤(d)中尿酸-载体蛋白包括卵清蛋白(OVA)、牛血清白蛋白(BSA)、血蓝蛋白(KLH)。

[0053] 步骤(e)所述的预处理的样品垫采用的样品垫处理液由Tris-HCL液、牛血清白蛋白BSA、酪蛋白、表面活性剂脂肪醇聚氧乙烯醚组成, 其中Tris-HCL液的浓度为0.1mol/L, 牛血清白蛋白BSA浓度为0.5~1%, 酪蛋白浓度为0.1~0.2%、表面活性剂脂肪醇聚氧乙烯醚浓度为0.5~1%。

[0054] 实施例1

[0055] (1)采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金

[0056] 在加热的100ml纯化水中快速加入氯化金, 待溶液再次沸腾后, 迅速加入柠檬酸三钠, 氯化金: 柠檬酸三钠=1:2, 继续煮沸, 观察溶液颜色由黄色变黑再变紫, 最后变成稳定的酒红色后, 计时继续加热10分钟即可, 胶体金颗粒为20nm;

[0057] (2)免疫胶体金制备

[0058] 1)分别取100毫升20nm胶体金溶液, 加入pH调节剂140 μ l, 混匀; 静置5min;

[0059] 2)在20nm胶体金溶液中, 按照每毫升胶体金溶液10 μ g的比例加入兔抗尿酸抗体, 共1mg, 混匀; 静置5min;

[0060] 3)分别按照0.4%的比例加入胶体金稳定剂0.4毫升, 混匀, 静置5分钟;

[0061] 4)10000、12000、14000rpm离心10min,分别收集沉淀,合并三次收集的沉淀;

[0062] (3)采用优化的喷金缓冲液稀释免疫胶体金获得免疫胶体金溶液,用免疫胶体金溶液喷涂于玻璃纤维垫,制得免疫胶体玻璃纤维膜;所述的喷金缓冲液包括:浓度为20mM Tris-HCL液、蔗糖浓度为5%、海藻糖浓度为1%、BSA浓度为1%,pH为8.5;

[0063] (4)固相硝酸纤维素膜

[0064] 1)多聚赖氨酸处理液预处理硝酸纤维素膜

[0065] 配制多聚赖氨酸处理液:多聚赖氨酸(SIGMA,150KD)、浓度为0.5%,经0.22 μ m滤膜过滤,备用;

[0066] 多聚赖氨酸处理液预处理硝酸纤维素膜:将硝酸纤维素膜放入多聚赖氨酸处理液中浸泡1h,并慢速振荡摇晃,取出后用蒸馏水清洗3遍,最后在真空干燥箱中干燥;

[0067] 2)二氧化硅纳米颗粒修饰尿酸-OVA抗原

[0068] 氧化硅纳米颗粒的制备是:将2.48mL体积分数25的氨水和43.2mL无水乙醇混合于锥形瓶中,在35 $^{\circ}$ C和超声条件下,以0.4mL/min的速度滴入3.5mL正硅酸乙酯,滴完后再超声5分钟,即可制得粒径120nm均一的粒子,分别以12000rpm,8500rpm和7000rpm离心10分钟收集,倒掉上清液,再加水超声分散.反复多次洗涤至近中性,最后用水定容至体积与刚制备好时的体积相同,存放待用。

[0069] 尿酸-OVA与二氧化硅纳米颗粒结合,方法是:以二氧化硅作为载体,取1mL尿酸-OVA抗原溶液,与乙醇和去离子水搅拌混匀,再加入定量氨水和0.3mL正硅酸乙酯,搅拌1小时后,补加剩余正硅酸乙酯,持续搅拌,整个反应避光进行,分别以12000rpm,8500rpm和7000rpm离心10分钟收集,无水乙醇、去离子水各洗2遍。

[0070] 3)硝酸纤维素膜检测线与质控线抗体的包被

[0071] 当喷膜量为5 μ l/cm,将尿酸-卵清蛋白(OVA)抗原稀释至1、1.5、2mg/ml,对照线羊抗兔IgG抗体稀释至1mg/ml,分别包被硝酸纤维素膜的检测线与对照线,所述的第一检测线T1、第二检测线T2、第三检测线T3上固相有1、1.5、2mg/ml浓度的尿酸-OVA抗原;所述的质控线(C)上喷点羊抗兔IgG多克隆抗体.T1检测线可检测250 μ mol/L尿酸,T2检测线可检测250-350 μ mol/L尿酸,T3检测线可检测350-500 μ mol/L尿酸。室温干燥过夜,储存备用。

[0072] 4)样品垫预处理

[0073] 将玻璃纤维用样品垫处理液浸泡10min,其种样品垫处理液包括:Tris-HCL液浓度为0.1M、牛血清白蛋白BSA浓度为0.5%、酪蛋白浓度为0.1%、表面活性剂浓度为0.5%,37 $^{\circ}$ C烘干备用,经处理后样品垫可提高反应灵敏度;

[0074] (5)组装

[0075] 将预处理的样品垫、免疫胶体金玻璃纤维膜、免疫硝酸纤维素膜、吸水纸依次粘贴在胶板上,切裁制得检测试剂条,最后将检测试剂条装入塑料外壳。

[0076] (6)半定量检测:当T1、T2与T3检测线均显色提示尿酸含量小于250 μ mol/L,当T2、T3检测线显色,提示唾液尿酸含量250-350 μ mol/L,T3检测线显色,提示唾液尿酸含量2350-500 μ mol/L;当T1、T2与T3检测线均不显色提示尿酸含量大于500 μ mol/L。

[0077] 实施例2

[0078] (1)采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金

[0079] 在加热的100ml纯化水中快速加入氯化金,待溶液再次沸腾后,迅速加入柠檬酸三

钠,氯化金:柠檬酸三钠=1:1,继续煮沸,观察溶液颜色由黄色变黑再变紫,最后变成稳定的酒红色后,计时继续加热10分钟即可,胶体金颗粒为40nm;

[0080] (2)免疫胶体金制备

[0081] 1)分别取100毫升20nm胶体金溶液,加入pH调节剂140 μ l,混匀;静置5min;

[0082] 2)在20nm胶体金溶液中,按照每毫升胶体金溶液10 μ g的比例加入兔抗尿酸抗体,共1mg,混匀;静置5min;

[0083] 3)分别按照0.4%的比例加入胶体金稳定剂0.4毫升,混匀,静置5分钟;

[0084] 4)10000、12000、14000rpm离心10min,分别收集沉淀,合并三次收集的沉淀;

[0085] (3)采用优化的喷金缓冲液稀释免疫胶体金获得免疫胶体金溶液,用免疫胶体金溶液喷涂于玻璃纤维垫,制得免疫胶体玻璃纤维膜;所述的喷金缓冲液包括:浓度为20mM Tris-HCL液、蔗糖浓度为5%、海藻糖浓度为1%、BSA浓度为1%,pH为8.5;

[0086] (4)固相硝酸纤维素膜

[0087] 1)多聚赖氨酸处理液预处理硝酸纤维素膜

[0088] 配制多聚赖氨酸处理液:多聚赖氨酸(SIGMA,150KD)、浓度为0.5%,经0.22 μ m滤膜过滤,备用;

[0089] 多聚赖氨酸处理液预处理硝酸纤维素膜:将硝酸纤维素膜放入多聚赖氨酸处理液中浸泡1h,并慢速振荡摇晃,取出后用蒸馏水清洗3遍,最后在真空干燥箱中干燥;

[0090] 2)二氧化硅纳米颗粒修饰尿酸-OVA抗原

[0091] 氧化硅纳米颗粒的制备是:将2.48mL体积分数25的氨水和43.2mL无水乙醇混合于锥形瓶中,在35 $^{\circ}$ C和超声条件下,以0.4mL/min的速度滴入3.5mL正硅酸乙酯,滴完后再超声5分钟,即可制得粒径120nm均一的粒子,分别以12000rpm,8500rpm和7000rpm离心10分钟收集,倒掉上清液,再加水超声分散.反复多次洗涤至近中性,最后用水定容至体积与刚制备好时的体积相同,存放待用。

[0092] 尿酸-OVA与二氧化硅纳米颗粒结合,方法是:以二氧化硅作为载体,取1mL尿酸-OVA抗原溶液,与乙醇和去离子水搅拌混匀,再加入定量氨水和0.3mL正硅酸乙酯,搅拌1小时后,补加剩余正硅酸乙酯,持续搅拌,整个反应避光进行,分别以12000rpm,8500rpm和7000rpm离心10分钟收集,无水乙醇、去离子水各洗2遍。

[0093] 3)硝酸纤维素膜检测线与质控线抗体的包被

[0094] 当喷膜量为5 μ l/cm,将尿酸-OVA抗原稀释至1、1.5、2mg/ml,对照线羊抗兔IgG抗体稀释至1mg/ml,分别包被硝酸纤维素膜的检测线与对照线。所述的第一、二、三检测线(T1、T2、T3)上固相有1、1.5、2mg/ml浓度的尿酸-OVA抗原;所述的质控线(C)上喷点羊抗兔IgG多克隆抗体。T1检测线可检测250 μ mol/L尿酸,T2检测线可检测250-350 μ mol/L尿酸,T3检测线可检测350-500 μ mol/L尿酸。室温干燥过夜,储存备用。

[0095] 4)样品垫预处理

[0096] 将玻璃纤维用样品垫处理液浸泡10min,其种样品垫处理液包括:Tris-HCL液浓度为0.1M、牛血清白蛋白BSA浓度为0.5%、酪蛋白浓度为0.1%、表面活性剂浓度为0.5%,37 $^{\circ}$ C烘干备用,经处理后样品垫可提高反应灵敏度;

[0097] (5)组装

[0098] 将预处理的样品垫、免疫胶体金玻璃纤维膜、免疫硝酸纤维素膜、吸水纸依次粘贴

在胶板上,切裁制得检测试剂条,最后将检测试剂条装入塑料外壳。

[0099] (6)半定量检测:当T1、T2与T3检测线均显色提示尿酸含量小于250 $\mu\text{mol/L}$,当T2、T3检测线显色,提示唾液尿酸含量250–350 $\mu\text{mol/L}$,T3检测线显色,提示唾液尿酸含量2350–500 $\mu\text{mol/L}$;当T1、T2与T3检测线均不显色提示尿酸含量大于500 $\mu\text{mol/L}$ 。

[0100] 实施例3

[0101] (1)采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金

[0102] 在加热的100ml纯化水中快速加入氯化金,待溶液再次沸腾后,迅速加入柠檬酸三钠,氯化金:柠檬酸三钠=1:0.5,继续煮沸,观察溶液颜色由黄色变黑再变紫,最后变成稳定的酒红色后,计时继续加热10分钟即可,胶体金颗粒为60nm;

[0103] (2)免疫胶体金制备

[0104] 1)分别取100毫升20nm胶体金溶液,加入pH调节剂140 μl ,混匀;静置5min;

[0105] 2)在20nm胶体金溶液中,按照每毫升胶体金溶液10 μg 的比例加入兔抗尿酸抗体,共1mg,混匀;静置5min;

[0106] 3)分别按照0.4%的比例加入胶体金稳定剂0.4毫升,混匀,静置5分钟;

[0107] 4)10000、12000、14000rpm离心10min,分别收集沉淀,合并三次收集的沉淀;

[0108] (3)采用优化的喷金缓冲液稀释免疫胶体金获得免疫胶体金溶液,用免疫胶体金溶液喷涂于玻璃纤维垫,制得免疫胶体玻璃纤维膜;所述的喷金缓冲液包括:浓度为20mM Tris-HCL液、蔗糖浓度为5%、海藻糖浓度为1%、BSA浓度为1%,pH为8.5;

[0109] (4)固相硝酸纤维素膜

[0110] 1)多聚赖氨酸处理液预处理硝酸纤维素膜

[0111] 配制多聚赖氨酸处理液:多聚赖氨酸(SIGMA, 150KD)、浓度为0.5%,经0.22 μm 滤膜过滤,备用;

[0112] 多聚赖氨酸处理液预处理硝酸纤维素膜:将硝酸纤维素膜放入多聚赖氨酸处理液中浸泡1h,并慢速振荡摇晃,取出后用蒸馏水清洗3遍,最后在真空干燥箱中干燥;

[0113] 2)二氧化硅纳米颗粒修饰尿酸-OVA抗原

[0114] 氧化硅纳米颗粒的制备是:将2.48mL体积分数25的氨水和43.2mL无水乙醇混合于锥形瓶中,在35 $^{\circ}\text{C}$ 和超声条件下,以0.4mL/min的速度滴入3.5mL正硅酸乙酯,滴完后再超声5分钟,即可制得粒径120nm均一的粒子,分别以12000rpm,8500rpm和7000rpm离心10分钟收集,倒掉上清液,再加水超声分散.反复多次洗涤至近中性,最后用水定容至体积与刚制备好时的体积相同,存放待用。

[0115] 尿酸-OVA与二氧化硅纳米颗粒结合,方法是:以二氧化硅作为载体,取1mL尿酸-OVA抗原溶液,与乙醇和去离子水搅拌混匀,再加入定量氨水和0.3mL正硅酸己酯,搅拌1小时后,补加剩余正硅酸己酯,持续搅拌,整个反应避光进行,分别以12000rpm,8500rpm和7000rpm离心10分钟收集,无水乙醇、去离子水各洗2遍。

[0116] 3)硝酸纤维素膜检测线与质控线抗体的包被

[0117] 当喷膜量为5 $\mu\text{l/cm}$,将尿酸-OVA抗原稀释至1、1.5、2mg/ml,对照线羊抗兔IgG抗体稀释至1mg/ml,分别包被硝酸纤维素膜的检测线与对照线。所述的第一、二、三检测线(T1、T2、T3)上固相有1、1.5、2mg/ml浓度的尿酸-OVA抗原;所述的质控线(C)上喷点羊抗兔IgG多克隆抗体,T1检测线可检测250 $\mu\text{mol/L}$ 尿酸,T2检测线可检测250–350 $\mu\text{mol/L}$ 尿酸,T3检测线

可检测350-500 $\mu\text{mol/L}$ 尿酸,室温干燥过夜,储存备用;

[0118] 4)样品垫预处理

[0119] 将玻璃纤维用样品垫处理液浸泡10min,其种样品垫处理液包括:Tris-HCL液浓度为0.1M、牛血清白蛋白BSA浓度为0.5%、酪蛋白浓度为0.1%、表面活性剂浓度为0.5%,37 $^{\circ}\text{C}$ 烘干备用,经处理后样品垫可提高反应灵敏度;

[0120] (5)组装

[0121] 将预处理的样品垫、免疫胶体金玻璃纤维膜、免疫硝酸纤维素膜、吸水纸依次粘贴在胶板上,切裁制得检测试剂条,最后将检测试剂条装入塑料外壳。

[0122] (6)半定量检测:当T1、T2与T3检测线均显色提示尿酸含量小于250 $\mu\text{mol/L}$,当T2、T3检测线显色,提示唾液尿酸含量250-350 $\mu\text{mol/L}$,T3检测线显色,提示唾液尿酸含量2350-500 $\mu\text{mol/L}$;当T1、T2与T3检测线均不显色提示尿酸含量大于500 $\mu\text{mol/L}$ 。

[0123] 实施例4

[0124] (1)采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金

[0125] 在加热的100ml纯化水中快速加入氯化金,待溶液再次沸腾后,迅速加入柠檬酸三钠,氯化金:柠檬酸三钠=1:2,继续煮沸,观察溶液颜色由黄色变黑再变紫,最后变成稳定的酒红色后,计时继续加热10分钟即可,胶体金颗粒为20nm;

[0126] (2)免疫胶体金制备

[0127] 1)分别取100毫升20nm胶体金溶液,加入pH调节剂140 μl ,混匀;静置5min;

[0128] 2)在20nm胶体金溶液中,按照每毫升胶体金溶液10 μg 的比例加入兔抗尿酸抗体,共1mg,混匀;静置5min;

[0129] 3)分别按照0.4%的比例加入胶体金稳定剂0.4毫升,混匀,静置5分钟;

[0130] 4)10000、12000、14000rpm离心10min,分别收集沉淀,合并三次收集的沉淀;

[0131] (3)采用优化的喷金缓冲液稀释免疫胶体金获得免疫胶体金溶液,用免疫胶体金溶液喷涂于玻璃纤维垫,制得免疫胶体玻璃纤维膜;所述的喷金缓冲液包括:浓度为20mM Tris-HCL液、蔗糖浓度为5%、海藻糖浓度为1%、BSA浓度为1%,pH为8.5;

[0132] (4)固相硝酸纤维素膜

[0133] 1)多聚赖氨酸处理液预处理硝酸纤维素膜

[0134] 配制多聚赖氨酸处理液:多聚赖氨酸(SIGMA, 150KD)、浓度为0.5%,经0.22 μm 滤膜过滤,备用;

[0135] 多聚赖氨酸处理液预处理硝酸纤维素膜:将硝酸纤维素膜放入多聚赖氨酸处理液中浸泡1h,并慢速振荡摇晃,取出后用蒸馏水清洗3遍,最后在真空干燥箱中干燥;

[0136] 2)二氧化硅纳米颗粒修饰尿酸-OVA抗原

[0137] 氧化硅纳米颗粒的制备是:将2.48mL体积分数25的氨水和43.2mL无水乙醇混合于锥形瓶中,在35 $^{\circ}\text{C}$ 和超声条件下,以0.4mL/min的速度滴入3.5mL正硅酸乙酯,滴完后再超声5分钟,即可制得粒径120nm均一的粒子,分别以12000rpm,8500rpm和7000rpm离心10分钟收集,倒掉上清液,再加水超声分散.反复多次洗涤至近中性,最后用水定容至体积与刚制备好时的体积相同,存放待用。

[0138] 尿酸-OVA与二氧化硅纳米颗粒结合,方法是:以二氧化硅作为载体,取1mL尿酸-OVA抗原溶液,与乙醇和去离子水搅拌混匀,再加入定量氨水和0.3mL正硅酸己酯,搅拌1小

时后,补加剩余正硅酸己酯,持续搅拌,整个反应避光进行,分别以12000rpm,8500rpm和7000rpm离心10分钟收集,无水乙醇、去离子水各洗2遍。

[0139] 3)硝酸纤维素膜检测线与质控线抗体的包被

[0140] 当喷膜量为 $5\mu\text{l}/\text{cm}$,将尿酸-OVA抗原稀释至 $3\text{mg}/\text{ml}$,对照线羊抗兔IgG抗体稀释至 $1\text{mg}/\text{ml}$,分别包被硝酸纤维素膜的检测线与对照线,所述的检测线(T)上固相有 $3\text{mg}/\text{ml}$ 浓度的尿酸-OVA抗原;所述的质控线(C)上喷点羊抗兔IgG多克隆抗体。

[0141] 4)样品垫预处理

[0142] 将玻璃纤维用样品垫处理液浸泡10min,其种样品垫处理液包括:Tris-HCL液浓度为 0.1M 、牛血清白蛋白BSA浓度为 0.5% 、酪蛋白浓度为 0.1% 、表面活性剂浓度为 0.5% , 37°C 烘干备用,经处理后样品垫可提高反应灵敏度;

[0143] (5)组装

[0144] 将预处理的样品垫、免疫胶体金玻璃纤维膜、免疫硝酸纤维素膜、吸水纸依次粘贴在胶板上,切裁制得检测试剂条,最后将检测试剂条装入塑料外壳。

[0145] (6)半定量检测:当T检测线显色,对比尿酸含量比色卡,显色浓度分别为 $200\mu\text{mol}/\text{L}$ 、 $250\mu\text{mol}/\text{L}$ 、 $300\mu\text{mol}/\text{L}$ 、 $400\mu\text{mol}/\text{L}$ 、 $500\mu\text{mol}/\text{L}$ 、 $600\mu\text{mol}/\text{L}$ 、 $700\mu\text{mol}/\text{L}$ 、 $800\mu\text{mol}/\text{L}$ 、 $900\mu\text{mol}/\text{L}$ 、 $1000\mu\text{mol}/\text{L}$,判断唾液样品尿酸含量。

[0146] 实施例5

[0147] (1)采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金

[0148] 在加热的100ml纯化水中快速加入氯化金,待溶液再次沸腾后,迅速加入柠檬酸三钠,氯化金:柠檬酸三钠=1:1,继续煮沸,观察溶液颜色由黄色变黑再变紫,最后变成稳定的酒红色后,计时继续加热10分钟即可,胶体金颗粒为40nm;

[0149] (2)免疫胶体金制备

[0150] 1)分别取100毫升20nm胶体金溶液,加入pH调节剂 $140\mu\text{l}$,混匀;静置5min;

[0151] 2)在20nm胶体金溶液中,按照每毫升胶体金溶液 $10\mu\text{g}$ 的比例加入兔抗尿酸抗体,共 1mg ,混匀;静置5min;

[0152] 3)分别按照 0.4% 的比例加入胶体金稳定剂 0.4 毫升,混匀,静置5分钟;

[0153] 4)10000、12000、14000rpm离心10min,分别收集沉淀,合并三次收集的沉淀;

[0154] (3)采用优化的喷金缓冲液稀释免疫胶体金获得免疫胶体金溶液,用免疫胶体金溶液喷涂于玻璃纤维垫,制得免疫胶体玻璃纤维膜;所述的喷金缓冲液包括:浓度为 20mM Tris-HCL液、蔗糖浓度为 5% 、海藻糖浓度为 1% 、BSA浓度为 1% ,pH为8.5;

[0155] (4)固相硝酸纤维素膜

[0156] 1)多聚赖氨酸处理液预处理硝酸纤维素膜

[0157] 配制多聚赖氨酸处理液:多聚赖氨酸(SIGMA,150KD)、浓度为 0.5% ,经 $0.22\mu\text{m}$ 滤膜过滤,备用;

[0158] 多聚赖氨酸处理液预处理硝酸纤维素膜:将硝酸纤维素膜放入多聚赖氨酸处理液中浸泡1h,并慢速振荡摇晃,取出后用蒸馏水清洗3遍,最后在真空干燥箱中干燥;

[0159] 2)二氧化硅纳米颗粒修饰尿酸-OVA抗原

[0160] 氧化硅纳米颗粒的制备是:将 2.48mL 体积分数25的氨水和 43.2mL 无水乙醇混合于锥形瓶中,在 35°C 和超声条件下,以 $0.4\text{mL}/\text{min}$ 的速度滴入 3.5mL 正硅酸乙酯,滴完后再超声

5分钟,即可制得粒径120nm均一的粒子,分别以12000rpm,8500rpm和7000rpm离心10分钟收集,倒掉上清液,再加水超声分散.反复多次洗涤至近中性,最后用水定容至体积与刚制备好时的体积相同,存放待用。

[0161] 尿酸-OVA与二氧化硅纳米颗粒结合,方法是:以二氧化硅作为载体,取1mL尿酸-OVA抗原溶液,与乙醇和去离子水搅拌混匀,再加入定量氨水和0.3mL正硅酸己酯,搅拌1小时后,补加剩余正硅酸己酯,持续搅拌,整个反应避光进行,分别以12000rpm,8500rpm和7000rpm离心10分钟收集,无水乙醇、去离子水各洗2遍。

[0162] 3)硝酸纤维素膜检测线与质控线抗体的包被

[0163] 当喷膜量为5 μ l/cm,将尿酸-OVA抗原稀释至3mg/ml,对照线羊抗兔IgG抗体稀释至1mg/ml,分别包被硝酸纤维素膜的检测线与对照线。所述的检测线(T)上固相有3mg/ml浓度的尿酸-OVA抗原;所述的质控线(C)上喷点羊抗兔IgG多克隆抗体。

[0164] 4)样品垫预处理

[0165] 将玻璃纤维用样品垫处理液浸泡10min,其种样品垫处理液包括:Tris-HCL液浓度为0.1M、牛血清白蛋白BSA浓度为0.5%、酪蛋白浓度为0.1%、表面活性剂浓度为0.5%,37 $^{\circ}$ C烘干备用,经处理后样品垫可提高反应灵敏度;

[0166] (5)组装

[0167] 将预处理的样品垫、免疫胶体金玻璃纤维膜、免疫硝酸纤维素膜、吸水纸依次粘贴在胶板上,切裁制得检测试剂条,最后将检测试剂条装入塑料外壳。

[0168] (6)半定量检测:当T检测线显色,对比尿酸含量比色卡,显色浓度分别为200 μ mol/L、250 μ mol/L、300 μ mol/L、400 μ mol/L、500 μ mol/L、600 μ mol/L、700 μ mol/L、800 μ mol/L、900 μ mol/L、1000 μ mol/L,判断唾液样品尿酸含量。

[0169] 实施例6

[0170] (1)采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金

[0171] 在加热的100ml纯化水中快速加入氯化金,待溶液再次沸腾后,迅速加入柠檬酸三钠,氯化金:柠檬酸三钠=1:0.5,继续煮沸,观察溶液颜色由黄色变黑再变紫,最后变成稳定的酒红色后,计时继续加热10分钟即可,胶体金颗粒为60nm;

[0172] (2)免疫胶体金制备

[0173] 1)分别取100毫升20nm胶体金溶液,加入pH调节剂140 μ l,混匀;静置5min;

[0174] 2)在20nm胶体金溶液中,按照每毫升胶体金溶液10 μ g的比例加入兔抗尿酸抗体,共1mg,混匀;静置5min;

[0175] 3)分别按照0.4%的比例加入胶体金稳定剂0.4毫升,混匀,静置5分钟;

[0176] 4)10000、12000、14000rpm离心10min,分别收集沉淀,合并三次收集的沉淀;

[0177] (3)采用优化的喷金缓冲液稀释免疫胶体金获得免疫胶体金溶液,用免疫胶体金溶液喷涂于玻璃纤维垫,制得免疫胶体玻璃纤维膜;所述的喷金缓冲液包括:浓度为20mM Tris-HCL液、蔗糖浓度为5%、海藻糖浓度为1%、BSA浓度为1%,pH为8.5;

[0178] (4)固相硝酸纤维素膜

[0179] 1)多聚赖氨酸处理液预处理硝酸纤维素膜

[0180] 配制多聚赖氨酸处理液:多聚赖氨酸(SIGMA,150KD)、浓度为0.5%,经0.22 μ m滤膜过滤,备用;

[0181] 多聚赖氨酸处理液预处理硝酸纤维素膜:将硝酸纤维素膜放入多聚赖氨酸处理液中浸泡1h,并慢速振荡摇晃,取出后用蒸馏水清洗3遍,最后在真空干燥箱中干燥;

[0182] 2)二氧化硅纳米颗粒修饰尿酸-OVA抗原

[0183] 氧化硅纳米颗粒的制备是:将2.48mL体积分数25的氨水和43.2mL无水乙醇混合于锥形瓶中,在35°C和超声条件下,以0.4mL/min的速度滴入3.5mL正硅酸乙酯,滴完后再超声5分钟,即可制得粒径120nm均一的粒子,分别以12000rpm,8500rpm和7000rpm离心10分钟收集,倒掉上清液,再加水超声分散.反复多次洗涤至近中性,最后用水定容至体积与刚制备好时的体积相同,存放待用。

[0184] 尿酸-OVA与二氧化硅纳米颗粒结合,方法是:以二氧化硅作为载体,取1mL尿酸-OVA抗原溶液,与乙醇和去离子水搅拌混匀,再加入定量氨水和0.3mL正硅酸乙酯,搅拌1小时后,补加剩余正硅酸乙酯,持续搅拌,整个反应避光进行,分别以12000rpm,8500rpm和7000rpm离心10分钟收集,无水乙醇、去离子水各洗2遍。

[0185] 3)硝酸纤维素膜检测线与质控线抗体的包被

[0186] 当喷膜量为5 μ l/cm,将尿酸-OVA抗原稀释至3mg/ml,对照线羊抗兔IgG抗体稀释至1mg/ml,分别包被硝酸纤维素膜的检测线与对照线。所述的检测线(T)上固相有3mg/ml浓度的尿酸-OVA抗原;所述的质控线(C)上喷点羊抗兔IgG多克隆抗体。

[0187] 4)样品垫预处理

[0188] 将玻璃纤维用样品垫处理液浸泡10min,其种样品垫处理液包括:Tris-HCL液浓度为0.1M、牛血清白蛋白BSA浓度为0.5%、酪蛋白浓度为0.1%、表面活性剂浓度为0.5%,37°C烘干备用,经处理后样品垫可提高反应灵敏度;

[0189] (5)组装

[0190] 将预处理的样品垫、免疫胶体金玻璃纤维膜、免疫硝酸纤维素膜、吸水纸依次粘贴在胶板上,切裁制得检测试剂条,最后将检测试剂条装入塑料外壳。

[0191] (6)半定量检测:当T检测线显色,对比尿酸含量比色卡,显色浓度分别为200 μ mol/L、250 μ mol/L、300 μ mol/L、400 μ mol/L、500 μ mol/L、600 μ mol/L、700 μ mol/L、800 μ mol/L、900 μ mol/L、1000 μ mol/L,判断唾液样品尿酸含量。

[0192] 实施例7

[0193] 二氧化硅纳米颗粒修饰尿酸-BSA

[0194] 二氧化硅纳米颗粒的制备是:将2.48mL体积分数25的氨水和43.2mL无水乙醇混合于锥形瓶中,在35°C和超声条件下,以0.4mL/min的速度滴入3.5mL正硅酸乙酯,滴完后再超声5分钟,即可制得粒径120nm均一的粒子,分别以12000rpm,8500rpm和7000rpm离心10分钟收集,倒掉上清液,再加水超声分散.反复多次洗涤至近中性,最后用水定容至体积与刚制备好时的体积相同,存放待用;

[0195] 尿酸-BSA抗原与二氧化硅纳米颗粒结合,方法是:以二氧化硅作为载体,取1mL尿酸-BSA溶液,与乙醇和去离子水搅拌混匀,再加入定量氨水和0.3mL正硅酸乙酯,搅拌1小时后,补加剩余正硅酸乙酯,持续搅拌,整个反应避光进行,分别以12000rpm,8500rpm和7000rpm离心10分钟收集,无水乙醇、去离子水各洗2遍。

[0196] 其余同实施例2

[0197] 实施例8

[0198] 二氧化硅纳米颗粒修饰尿酸-KLH

[0199] 二氧化硅纳米颗粒的制备是：将2.48mL体积分数25的氨水和43.2mL无水乙醇混合于锥形瓶中，在35℃和超声条件下，以0.4mL/min的速度滴入3.5mL正硅酸乙酯，滴完后再超声5分钟，即可制得粒径120nm均一的粒子，分别以12000rpm,8500rpm和7000rpm离心10分钟收集，倒掉上清液，再加水超声分散。反复多次洗涤至近中性，最后用水定容至体积与刚制备好时的体积相同，存放待用；

[0200] 尿酸-KLH抗原与二氧化硅纳米颗粒结合，方法是：以二氧化硅作为载体，取1mL尿酸-KLH溶液，与乙醇和去离子水搅拌混匀，再加入定量氨水和0.3mL正硅酸乙酯，搅拌1小时后，补加剩余正硅酸乙酯，持续搅拌，整个反应避光进行，分别以12000rpm,8500rpm和7000rpm离心10分钟收集，无水乙醇、去离子水各洗2遍。

[0201] 其余同实施例2

[0202] 实施例9

[0203] 配制多聚赖氨酸处理液：由多聚赖氨酸(SIGMA,150KD)与甲醇混合组成，其中多聚赖氨酸浓度为0.5%组成，甲醇浓度为10%，经0.22μm滤膜过滤，备用。

[0204] 其余同实施例2。

[0205] 实施例10

[0206] 配制多聚赖氨酸处理液：由多聚赖氨酸(SIGMA,200KD)与甲醇混合组成，其中多聚赖氨酸浓度为0.5%组成，甲醇浓度为10%，经0.22μm滤膜过滤，备用。

[0207] 其余同实施例2。

[0208] 实施例11

[0209] 配制多聚赖氨酸处理液：由多聚赖氨酸(SIGMA,300KD)与甲醇混合组成，其中多聚赖氨酸浓度为0.5%组成，甲醇浓度为10%，经0.22μm滤膜过滤，备用。

[0210] 其余同实施例2。

[0211] 实施例12

[0212] 配制多聚赖氨酸处理液：由多聚赖氨酸(SIGMA,150KD)、甲醇、PEG20000混合组成，其中多聚赖氨酸浓度为0.5%组成，甲醇浓度为10%，PEG20000浓度为0.2%，经0.22μm滤膜过滤，备用；

[0213] 其余同实施例2。

[0214] 实施例13

[0215] 配制多聚赖氨酸处理液：由多聚赖氨酸(SIGMA,200KD)、甲醇、PEG20000混合组成，其中多聚赖氨酸浓度为0.5%组成，甲醇浓度为10%，PEG20000浓度为0.2%，经0.22μm滤膜过滤，备用；

[0216] 其余同实施例2。

[0217] 实施例14

[0218] 配制多聚赖氨酸处理液：由多聚赖氨酸(SIGMA,300KD)、甲醇、PEG20000混合组成，其中多聚赖氨酸浓度为0.5%组成，甲醇浓度为10%，PEG20000浓度为0.2%，经0.22μm滤膜过滤，备用；

[0219] 其余同实施例2。

[0220] 实施例15

[0221] 配制多聚赖氨酸处理液:由多聚赖氨酸(SIGMA,150KD)与甲醇混合组成,其中多聚赖氨酸浓度为0.5%组成,甲醇浓度为10%,经0.22 μ m滤膜过滤,备用。

[0222] 其余同实施例5。

[0223] 实施例16

[0224] 配制多聚赖氨酸处理液:由多聚赖氨酸(SIGMA,200KD)与甲醇混合组成,其中多聚赖氨酸浓度为0.5%组成,甲醇浓度为10%,经0.22 μ m滤膜过滤,备用。

[0225] 其余同实施例5。

[0226] 实施例17

[0227] 配制多聚赖氨酸处理液:由多聚赖氨酸(SIGMA,300KD)与甲醇混合组成,其中多聚赖氨酸浓度为0.5%组成,甲醇浓度为10%,经0.22 μ m滤膜过滤,备用。

[0228] 其余同实施例5。

[0229] 实施例18

[0230] 配制多聚赖氨酸处理液:由多聚赖氨酸(SIGMA,150KD)、甲醇、PEG20000混合组成,其中多聚赖氨酸浓度为0.5%组成,甲醇浓度为10%,PEG20000浓度为0.2%,经0.22 μ m滤膜过滤,备用;

[0231] 其余同实施例5。

[0232] 实施例19

[0233] 配制多聚赖氨酸处理液:由多聚赖氨酸(SIGMA,200KD)、甲醇、PEG20000混合组成,其中多聚赖氨酸浓度为0.5%组成,甲醇浓度为10%,PEG20000浓度为0.2%,经0.22 μ m滤膜过滤,备用;

[0234] 其余同实施例5。

[0235] 实施例20

[0236] 配制多聚赖氨酸处理液:由多聚赖氨酸(SIGMA,300KD)、甲醇、PEG20000混合组成,其中多聚赖氨酸浓度为0.5%组成,甲醇浓度为10%,PEG20000浓度为0.2%,

[0237] 经0.22 μ m滤膜过滤,备用;

[0238] 其余同实施例5。

[0239] 下边通过实验来进一步说明本发明的效果。

[0240] 实验例1:

[0241] 1、多聚赖氨酸处理液对硝酸纤维素膜蛋白吸附能力的比较

[0242] 1.1材料与amp;方法

[0243] 1.1材料:硝酸纤维素膜,孔径4.5 μ m,购自美国通用电气公司,多聚赖氨酸(SIGMA,150KD)购自Sigma公司

[0244] 1.2硝酸纤维素膜处理方法

[0245] 1.2.1配制多聚赖氨酸处理液

[0246] 配制三种多聚赖氨酸处理液:多聚赖氨酸组,多聚赖氨酸浓度为0.5%组成;多聚赖氨酸处理液甲醇组,多聚赖氨酸浓度为0.5%组成,甲醇浓度为10%;多聚赖氨酸、甲醇和PEG20000组,,其中多聚赖氨酸浓度为0.5%组成,甲醇浓度为10%,PEG20000浓度为0.2%,三组处理液均经0.22 μ m滤膜过滤,备用。

[0247] 1.2.2硝酸纤维素膜处理方法

[0248] 将硝酸纤维素膜放入多聚赖氨酸处理液中浸泡1h,并慢速振荡摇晃,取出后用蒸馏水清洗3遍,最后在真空干燥箱中干燥。

[0249] 1.3实验方法

[0250] 分别将未处理和已处理过的硝酸纤维素膜按照上述实施例工艺流程制备唾液尿酸半定量快速检测检测试纸,测试流程参照试纸说明书,比较硝酸纤维素膜未处理和处理后吸附力和稳定性指标差异。

[0251] 1.4结果

[0252] 1.4.1蛋白吸附力比较

[0253] 取3组处理组和未处理组试纸,分别加入待检样品,通过观察显色情况判断处理后膜对蛋白吸附能力,结果见表1。结果显示,处理后的硝酸纤维素膜在溶液浸润性方面要明显优于未处理膜,处理后膜阳性条带颜色略深,尤其在浓度较低时,提高了反应的灵敏度,表明蛋白吸附能力明显增强,提高了反应灵敏度。多聚赖氨酸、甲醇和PEG20000处理组吸附效果明显优于多聚赖氨酸组和多聚赖氨酸甲醇组。

[0254] 表1硝酸纤维素膜吸附能力比较

[0255]

组别	尿酸阳性质控稀释倍数					
	1: 4	1: 16	1: 64	1:256	1:512	1:1024
多聚赖氨酸组	条带颜色 明显(+++)	条带颜色 较深(+++)	条带颜色 略深(++)	条带颜色 较淡(+)	无颜色	无颜色
多聚赖氨酸甲醇 组	条带颜色 明显(+++)	条带颜色 较深(+++)	条带颜色 略深(++)	条带颜色 较淡(+)	条带颜色 较淡 (+)	无颜色
多聚赖氨酸、甲醇 和 PEG2000 组	条带颜色 明显(+++)	条带颜色 较深(+++)	条带颜色 较深(+++)	条带颜色 略淡(+)	条带颜色 较淡 (+)	无颜色
未处理组	条带颜色 明显(+++)	条带颜色 略深(++)	条带颜色 较淡(+)	无颜色	无颜色	无颜色

[0256] 1.4.2硝酸纤维素膜稳定性比较

[0257] 取3组处理组和未处理组试纸,通过37℃加速实验观察显色情况来判断处理后硝酸纤维素膜上吸附蛋白的稳定性,结果见表2。表2结果与表1结果比较发现,处理后硝酸纤维素膜颜色变化与10天前基本一致,稳定性好。

[0258] 表2硝酸纤维素膜加速稳定性比较(37℃放置10天)

[0259]

组别	尿酸阳性质控稀释倍数					
	1: 4	1: 16	1: 64	1:256	1:512	1:1024
多聚赖氨酸组	条带颜色 明显(+++)	条带颜色 略深(++)	条带颜色 较淡(+)	条带颜色 隐约可见 (+/-)	无颜色	无颜色
多聚赖氨酸甲醇 组	条带颜色 明显(+++)	条带颜色 略深(++)	条带颜色 较淡(+)	条带颜色 隐约可见 (+/-)	无颜色	无颜色
多聚赖氨酸、甲醇 和 PEG2000 组	条带颜色 明显(+++)	条带颜色 较深(+++)	条带颜色 略深(++)	条带颜色 略淡(+)	条带颜 色较淡 (+)	无颜色

[0260] 实验例2:

[0261] 2、二氧化硅纳米颗粒修饰尿酸-OVA

[0262] 2.1材料与amp;方法

[0263] 1.1材料:硝酸纤维素膜,孔径4.5um,购自美国通用电气公司,正硅酸乙酯购自汕头陇西化工厂

[0264] 2.2.1二氧化硅纳米颗粒制备

[0265] 将2.48mL氨水(体积分数25)和43.2mL无水乙醇混合于锥形瓶中,在35℃左右和超声条件下,以0.4mL/min的速度滴入3.5mL正硅酸乙酯,滴完后再超声5分钟,即可制得粒径均一的粒子(120nm)。分别以12000rpm,8500rpm和7000rpm离心10分钟收集,倒掉上清液,再加水超声分散.反复多次洗涤至近中性。最后用水定容至体积与刚准备好时的体积相同,存放待用。

[0266] 2.2.2二氧化硅纳米颗粒修饰尿酸-OVA

[0267] 以二氧化硅作为载体,取1mL尿酸-OVA溶液,与乙醇和去离子水搅拌混匀,再加入定量氨水和0.3mL正硅酸已酯,搅拌1小时后,补加剩余正硅酸已酯,持续搅拌,整个反应避光进行,分别以12000rpm,8500rpm和7000rpm离心10分钟收集,无水乙醇、去离子水各洗2遍。

[0268] 2.3实验方法

[0269] 分别将二氧化硅纳米颗粒修饰的尿酸-OVA与未修饰的尿酸-OVA按照上述实施例工艺流程制备唾液尿酸半定量检测试纸,测试流程参照试纸说明书,比较二氧化硅纳米颗粒处理和未处理对蛋白吸附力和稳定性指标差异。

[0270] 2.4结果

[0271] 2.4.1蛋白吸附力比较

[0272] 取二氧化硅纳米颗粒处理组和未处理组试纸,分别加入待检样品,通过观察显色情况判断处理后膜对蛋白吸附能力,结果见表3。结果显示,二氧化硅纳米颗粒修饰组膜阳性条带颜色略深,尤其在浓度较低时,提高了反应的灵敏度,表明蛋白吸附能力明显增强,

提高了反应灵敏度。

[0273] 表3二氧化硅纳米颗粒修饰对蛋白吸附能力比较

[0274]

组别	尿酸阳性质控稀释倍数					
	1: 4	1: 16	1: 64	1:256	1:512	1:1024
二氧化硅纳米颗粒修饰组	条带颜色明显(+++)	条带颜色较深(+++)	条带颜色较深(+++)	条带颜色略淡(+)	条带颜色较淡(+)	无颜色
未修饰组	条带颜色明显(+++)	条带颜色略深(++)	条带颜色较淡(+)	无颜色	无颜色	无颜色

[0275] 2.4.2稳定性比较

[0276] 取二氧化硅纳米颗粒处理组和未处理组试纸,通过37℃加速实验观察显色情况来判断二氧化硅修饰后硝酸纤维素膜上吸附蛋白的稳定性,结果见表4。表4结果与表3结果比较发现,处理后硝酸纤维素膜颜色变化与10天前基本一致,稳定性好。

[0277] 表4加速稳定性比较(37℃放置10天)

[0278]

组别	尿酸阳性质控稀释倍数					
	1: 4	1: 16	1: 64	1:256	1:512	1:1024
二氧化硅纳米颗粒修饰组	条带颜色明显(+++)	条带颜色较深(+++)	条带颜色略深(++)	条带颜色略淡(+)	条带颜色较淡(+)	无颜色
未修饰组	条带颜色较深(++)	条带颜色较淡(+)	条带颜色隐约可见(+/-)	无颜色	无颜色	无颜色

[0279] 实验例3

[0280] 3、二氧化硅纳米颗粒修饰尿酸-BSA

[0281] 3.1材料与amp;方法

[0282] 1.1材料:硝酸纤维素膜,孔径4.5um,购自美国通用电气公司,正硅酸乙酯购自汕头陇西化工厂

[0283] 3.2.1二氧化硅纳米颗粒制备

[0284] 将2.48mL氨水(体积分数25)和43.2mL无水乙醇混合于锥形瓶中,在35℃左右和超声条件下,以0.4mL/min的速度滴入3.5mL正硅酸乙酯,滴完后再超声5分钟,即可制得粒径均一的粒子(120nm)。分别以12000rpm,8500rpm和7000rpm离心10分钟收集,倒掉上清液,再加水超声分散。反复多次洗涤至近中性。最后用水定容至体积与刚制备好时的体积相同,存

放待用。

[0285] 3.2.2 二氧化硅纳米颗粒修饰尿酸-BSA

[0286] 以二氧化硅作为载体,取1mL尿酸-BSA溶液,与乙醇和去离子水搅拌混匀,再加入定量氨水和0.3mL正硅酸已酯,搅拌1小时后,补加剩余正硅酸已酯,持续搅拌,整个反应避光进行,分别以12000rpm,8500rpm和7000rpm离心10分钟收集,无水乙醇、去离子水各洗2遍。

[0287] 3.3 实验方法

[0288] 分别将二氧化硅纳米颗粒修饰的尿酸-BSA与未修饰的尿酸-BSA按照上述实施例工艺流程制备唾液尿酸半定量检测试纸,测试流程参照试纸说明书,比较二氧化硅纳米颗粒处理和未处理对蛋白吸附力和稳定性指标差异。

[0289] 3.4 结果

[0290] 3.4.1 蛋白吸附力比较

[0291] 取二氧化硅纳米颗粒处理组和未处理组试纸,分别加入待检样品,通过观察显色情况判断处理后膜对蛋白吸附能力,结果见表5。结果显示,二氧化硅纳米颗粒修饰组膜阳性条带颜色略深,尤其在浓度较低时,提高了反应的灵敏度,表明蛋白吸附能力明显增强,提高了反应灵敏度。

[0292] 表5 二氧化硅纳米颗粒修饰对蛋白吸附能力比较

[0293]

组别	尿酸阳性质控稀释倍数					
	1: 4	1: 16	1: 64	1:256	1:512	1:1024
二氧化硅纳米颗粒修饰组	条带颜色明显(+++)	条带颜色较深(+++)	条带颜色较深(+++)	条带颜色略淡(+)	条带颜色较淡(+)	无颜色
未修饰组	条带颜色明显(+++)	条带颜色略深(++)	条带颜色较淡(+)	无颜色	无颜色	无颜色

[0294] 2.4.2 稳定性比较

[0295] 取二氧化硅纳米颗粒处理组和未处理组试纸,通过37℃加速实验观察显色情况来判断二氧化硅修饰后硝酸纤维素膜上吸附蛋白的稳定性,结果见表6。表6结果与表5结果比较发现,处理后硝酸纤维素膜颜色变化与10天前基本一致,稳定性好。

[0296] 表6 加速稳定性比较(37℃放置10天)

[0297]

组别	尿酸阳性质控稀释倍数					
	1: 4	1: 16	1: 64	1:256	1:512	1:1024
二氧化硅纳米颗粒修饰组	条带颜色明显(+++)	条带颜色较深(+++)	条带颜色略深(++)	条带颜色略淡(+)	条带颜色较淡(+)	无颜色
未修饰组	条带颜色较深(++)	条带颜色较淡(+)	条带颜色隐约可见(+/-)	无颜色	无颜色	无颜色

[0298] 实验例4

[0299] 4、二氧化硅纳米颗粒修饰尿酸-KLH

[0300] 4.1材料与amp;方法

[0301] 1.1材料:硝酸纤维素膜,孔径4.5um,购自美国通用电气公司,正硅酸乙酯购自汕头陇西化工厂

[0302] 4.2.1二氧化硅纳米颗粒制备

[0303] 将2.48mL氨水(体积分数25)和43.2mL无水乙醇混合于锥形瓶中,在35℃左右和超声条件下,以0.4mL/min的速度滴入3.5mL正硅酸乙酯,滴完后再超声5分钟,即可制得粒径均一的粒子(120nm)。分别以12000rpm,8500rpm和7000rpm离心10分钟收集,倒掉上清液,再加水超声分散。反复多次洗涤至近中性。最后用水定容至体积与刚准备好时的体积相同,存放待用。

[0304] 4.2.2二氧化硅纳米颗粒修饰尿酸-BSA

[0305] 以二氧化硅作为载体,取1mL尿酸-BSA溶液,与乙醇和去离子水搅拌混匀,再加入定量氨水和0.3mL正硅酸乙酯,搅拌1小时后,补加剩余正硅酸乙酯,持续搅拌,整个反应避光进行,分别以12000rpm,8500rpm和7000rpm离心10分钟收集,无水乙醇、去离子水各洗2遍。

[0306] 4.3实验方法

[0307] 分别将二氧化硅纳米颗粒修饰的尿酸-BSA与未修饰的尿酸-BSA按照上述实施例工艺流程制备唾液尿酸半定量检测试纸,测试流程参照试纸说明书,比较二氧化硅纳米颗粒处理和未处理对蛋白吸附力和稳定性指标差异。

[0308] 4.4结果

[0309] 4.4.1蛋白吸附力比较

[0310] 取二氧化硅纳米颗粒处理组和未处理组试纸,分别加入待检样品,通过观察显色情况判断处理后膜对蛋白吸附能力,结果见表7。结果显示,二氧化硅纳米颗粒修饰组膜阳性条带颜色略深,尤其在浓度较低时,提高了反应的灵敏度,表明蛋白吸附能力明显增强,提高了反应灵敏度。

[0311] 表7二氧化硅纳米颗粒修饰对蛋白吸附能力比较

[0312]

组别	尿酸阳性质控稀释倍数					
	1: 4	1: 16	1: 64	1:256	1:512	1:1024
二氧化硅纳米颗粒修饰组	条带颜色明显(+++)	条带颜色较深(+++)	条带颜色较深(+++)	条带颜色略淡(+)	条带颜色较淡(+)	无颜色
未修饰组	条带颜色明显(+++)	条带颜色略深(++)	条带颜色较淡(+)	无颜色	无颜色	无颜色

[0313] 2.4.2稳定性比较

[0314] 取二氧化硅纳米颗粒处理组和未处理组试纸,通过37°C加速实验观察显色情况来判断二氧化硅修饰后硝酸纤维素膜上吸附蛋白的稳定性,结果见表8。表8结果与表7结果比较发现,处理后硝酸纤维素膜颜色变化与10天前基本一致,稳定性好。

[0315] 表8加速稳定性比较(37°C放置10天)

[0316]

组别	尿酸阳性质控稀释倍数					
	1: 4	1: 16	1: 64	1:256	1:512	1:1024
二氧化硅纳米颗粒修饰组	条带颜色明显(+++)	条带颜色较深(+++)	条带颜色略深(++)	条带颜色略淡(+)	条带颜色较淡(+)	无颜色
未修饰组	条带颜色较深(++)	条带颜色较淡(+)	条带颜色隐约可见(+/-)	无颜色	无颜色	无颜色

[0317] 以上所述仅为本发明的优选实例而已,并不用于限制本发明,对于本领域的技术人员来说,本发明可以有各种更改和变化。凡对本发明所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

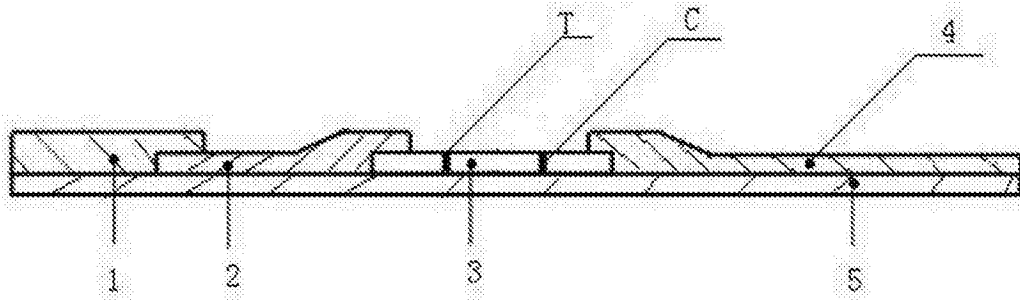


图1

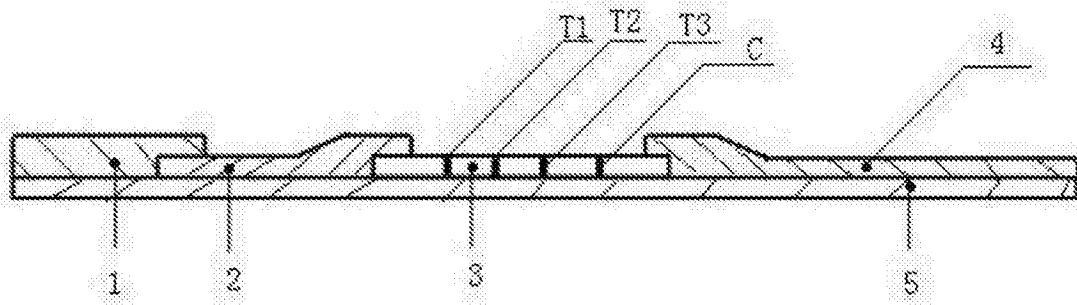


图2

专利名称(译)	唾液尿酸快速半定量检测装置及其制备方法		
公开(公告)号	CN105445449A	公开(公告)日	2016-03-30
申请号	CN201510938602.6	申请日	2015-12-16
[标]申请(专利权)人(译)	吉林双正医疗科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	吉林双正医疗科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	吉林双正医疗科技有限公司		
[标]发明人	杨小军 李欣 赵旻		
发明人	杨小军 李欣 赵旻		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N21/78 G01N33/5308 G01N33/531 G01N33/544 G01N33/558 G01N33/56911 G01N33/56983 G01N33/573 G01N33/6881 G01N33/6893 G01N2333/085 G01N2333/952 G01N2800/107 G01N2800/324		
优先权	201510157438.5 2015-04-04 CN		
其他公开文献	CN105445449B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种唾液尿酸快速半定量检测装置及其制备方法，属于医疗检测设备领域。由固相尿酸-载体蛋白和羊抗兔IgG多克隆抗体的硝酸纤维素膜、吸附有胶体金标记抗尿酸抗体的玻璃纤维、样品垫、吸水纸等其它辅料粘贴制成。优点在于：结构新颖，特异性强，能快速半定量检测唾液尿酸含量，又没有增加生产操作的复杂度。采用多聚赖氨酸处理液对硝酸纤维素膜进行预处理，将尿酸-载体蛋白先与二氧化硅纳米颗粒结合再吸附到硝酸纤维素膜上，通过配合合适的喷金缓冲液和样品垫处理液，可保证免疫胶体金释放完全的基础上，有效的提高了反应的灵敏度，同样的阈值下，还可降低免疫胶体金的用量，节约成本。检测装置灵敏度高、特异性强、操作简便省时、实用性强。

