



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109298188 A

(43)申请公布日 2019.02.01

(21)申请号 201811348070.0

(22)申请日 2018.11.13

(71)申请人 广东众尔健生物科技有限公司
地址 510000 广东省广州市高新技术产业
开发区科学城揽月路3号广州国际企
业孵化器F区616号房间

(72)发明人 唐小江

(74)专利代理机构 广州市科丰知识产权代理事
务所(普通合伙) 44467
代理人 王海曼

(51)Int.Cl.
G01N 33/70(2006.01)
G01N 33/558(2006.01)
G01N 33/533(2006.01)

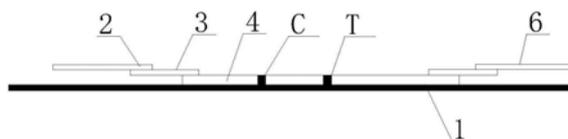
权利要求书2页 说明书7页 附图2页

(54)发明名称

一种重金属和肌酐联合检测试纸条及其制
备方法与应用

(57)摘要

本发明公开了一种重金属和肌酐联合检测
试纸条及其制备方法与应用;旨在提供一种可同
时检测重金属离子和肌酐的快速、准确、简便、廉
价的检测试纸条;其技术要点包括由底板依次衔
接有样品垫、结合垫、层析膜、肌酐试纸和吸水
垫,所述的层析膜上设有C线和T线,在结合垫上
喷有同一种胶体金颗粒标记的重金属离子抗体;
在层析膜上T位置包被荧光微球标记的重金属离
子抗原,C线位置包被的是荧光微球标记的BSA;
荧光免疫层析检测和干化学分析领域。



1. 一种重金属和肌酐联合检测试纸条,包括由底板(1),其特征在于,所述的底板(1)依次衔接有样品垫(2)、结合垫(3)、层析膜(4)、肌酐试纸(5)和吸水垫(6),所述的层析膜上设有C线和T线,在结合垫(3)上喷有同一种胶体金颗粒标记的重金属离子抗体;在层析膜(4)上T位置包被荧光微球标记的重金属离子抗原,C线位置包被的是荧光微球标记的BSA。

2. 根据权利要求1所述的一种重金属和肌酐联合检测试纸条,其特征在于,所述的重金属离子抗体为 Cd^{2+} 抗体或者 Cr^{3+} 抗体或者 Hg^{2+} 抗体或者 Pb^{2+} 抗体或者 As^{3+} 抗体或其它重金属离子抗体;所述的重金属离子抗原为 Cd^{2+} 抗原或者 Cr^{3+} 抗原或者 Hg^{2+} 抗原或者 Pb^{2+} 抗原或者 As^{3+} 抗原或其它重金属离子抗原。

3. 制备权利要求1所述的一种重金属和肌酐联合检测试纸条的方法,其特征在于,依次包括下述步骤:

将胶体金颗粒标记的金属粒子抗体用喷金划膜仪喷覆到结合垫上,烘干后按照从结合垫到吸水垫的方向,依次把按体积稀释100-140倍的荧光标记完全抗原和按体积稀释100-140倍的荧光标记BSA用喷金划膜仪包被到层析膜上,分别作为C线和T线,再次烘干,最后,在底板(1)依次衔接有样品垫(2)、结合垫(3)、层析膜(4)、肌酐试纸(5)和吸水垫(6),并且在结合垫(3)上喷有同一种胶体金颗粒标记的重金属离子抗体;在层析膜上T位置包被荧光微球标记的重金属离子抗原,C线位置包被的是荧光微球标记的BSA。

4. 根据权利要求3所述的一种重金属和肌酐联合检测试纸条的制备方法,其特征在于,所述的胶体金颗粒标记的金属粒子抗体的方法为:

A、胶体金的制备:

在100mL锥形瓶中装有50mL超纯水,将其放在磁力加热搅拌器上搅拌并加热至沸腾;准确加入1mL 1%的氯金酸后加入1.8mL 1%的柠檬酸三钠,加热搅拌10分钟后停止加热继续搅拌至所制备的胶体金溶液冷却,4℃保存备用;

B、胶体金标记抗体的制备:

取步骤A制备好的胶体金溶液5mL,用0.25M碳酸钾溶液将胶体金溶液的pH值调节为8.5,边加入50μL 0.85mg/mL的抗重金属-iEDTA抗体,搅拌30分钟;加入500μL 1%聚乙二醇20000,混匀反应30分钟后离心,弃上清液,将沉淀物用500mL复溶解液复溶,4℃保存备用。

5. 根据权利要求4所述的一种重金属和肌酐联合检测试纸条的制备方法,其特征在于,所述的复溶解液为0.02M PB溶液中含5%海藻糖、2%蔗糖、1%BSA、0.5%Tween-20 以及0.1%PEG4000。

6. 根据权利要求3所述的一种重金属和肌酐联合检测试纸条的制备方法,其特征在于,所述的荧光标记完全抗原的制备方法为:

将200μL 130nm荧光微球加入到离心管中,再加入800μL超纯水,避光混匀;接着加入20μL 1mg/mL的N-羟基琥珀酰亚胺和40μL 1mg/mL的碳二亚胺,混匀后室温活化反应30分钟;取活化后的荧光微球于另一离心管,再加入对应体积的2mg/mL的完全抗原重金属-iEDTA-BSA,混匀后室温避光反应2小时;加入10%牛血清白蛋白使BSA最终为1%,混匀后室温反应1小时离心分离,离心后收集沉淀物并且用复溶解液复溶至原体积的两倍,得到荧光标记完全抗原,4℃避光保存。

7. 根据权利要求3所述的一种重金属和肌酐联合检测试纸条的制备方法,其特征在于,所述的荧光标记BSA的制备方法为:将200μL 130nm荧光微球加入到1.5mL离心管中,再加入

800 μ L超纯水,避光混匀;接着加入20 μ L 1mg/mL的N-羟基琥珀酰亚胺和40 μ L 1mg/mL的EDC(碳二亚胺),混匀后室温活化反应30分钟;加入10%BSA(牛血清白蛋白)使BSA最终质量体积比为1%,混匀后室温反应1小时;15000 \times g离心30分钟,离心后收集沉淀物,并且用复溶解液复溶至原体积的两倍,得到荧光标记完全抗原,4 $^{\circ}$ C避光保存。

8. 根据权利要求6或者7所述的一种重金属和肌酐联合检测试纸条的制备方法,其特征在于,所述的复溶解液是0.015M pH7.4的PBS:10%BSA:Tween-20按照体积比为90:10:1混合而成。

9. 根据权利要求4所述的一种重金属和肌酐联合检测试纸条的制备方法,其特征在于,所述的肌酐试纸的制备方法为:

将滤纸充分浸入A液后取出,于60 $^{\circ}$ C干燥1h;再将浸有A液并干燥后的滤纸再充分浸入B液后取出,于60 $^{\circ}$ C干燥20min;其中,所述A液包含0.4g硫酸铜、1g柠檬酸三钠、0.1g橙黄G以及1L 2mol/LpH6Tris缓冲液溶解;其中,所述B液包含10g表面活性剂、0.5g还原性色原、0.5g过氧化物以及1L氯仿溶液。

10. 权利要求1所述的重金属和肌酐联合检测试纸条在尿液中重金属和/或肌酐水平检测的应用。

一种重金属和肌酐联合检测试纸条及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及荧光免疫层析检测和干化学分析领域,具体是涉及一种重金属和肌酐联合检测试纸条。

背景技术

[0002] 重金属原义是指比重大于5的金属,如汞、金、银、铜、铁、锌、铅等。虽然有些重金属是个体需要的微量元素,但大部分重金属并非身体所需,而且所有重金属在体内累积达到一定程度,都会造成慢性中毒。有些重金属进入体内会破坏人体正常生理功能,被称为有毒重金属,如铬(Cr)、镉(Cd)、汞(Hg)、铅(Pb)、砷(As)等。

[0003] 重金属污染指由重金属及其化合物造成的环境污染。重金属污染包括:化工污染、汽车尾气排放、垃圾焚烧等。其中汞、铅和砷等影响中枢神经系统,铜、镉、铅和汞会影响肾脏和肝脏,镍、铜、镉和铬会影响皮肤、骨骼和牙齿。重金属中毒轻则发生怪病(水俣病、痛痛病等),重者就会死亡。我国重金属污染非常严重,按照环保部和国土资源部于2014年4月17日发布的《中国土壤污染状况调查报告》,全国土壤约13%重金属超标,重金属污染范围广,曝露人群多,严重危害人民健康,但现有临床检测重金属的方法需要大型仪器、操作复杂、费用高、时间长,亟需高通量的快速检测技术(POCT)。

[0004] 我国土壤重金属污染又以镉污染最为严重,镉超标达7%。镉能在体内长期蓄积,可造成急、慢性中毒,对人体的免疫系统、肝脏、肾脏等有很大的损伤,甚至会引起流产、畸形、癌症等。镉是确定致癌物及列为第六位危害人体健康的有毒物质,我国湖南、广西、广东等已发现大批镉污染中毒人群,但因为缺少快速简便廉价的检测技术等原因,至今未进行人群普查。

[0005] 尿镉是慢性镉中毒最重要的诊断指标之一。由于尿镉含量与排尿量有关,临床诊断采用尿肌酐作为校正参数。因为肌酐是人体肌肉中磷酸肌酸的代谢终产物,可随尿液排出。正常人尿中肌酐的日排出量相当稳定,正常范围为10mg/dL到300mg/dL,基本不受食物蛋白含量和尿量的影响,因此常被用作尿中其他排泄物浓度的校正参数。用尿肌酐做校正,可以消除取样方式和尿量对尿镉排泄量的影响,避免了单独观察尿镉水平产生的片面性。尿镉正常值大多数在1 μ g/g肌酐(或1 μ g/L)以下,上限为5 μ g/g肌酐(或5 μ g/L)。根据国家标准GBZ 17-2015《职业性镉中毒的诊断》,尿镉连续2次高于5 μ mol/mol肌酐(即5 μ g/g肌酐)是诊断慢性镉中毒必要指标。

[0006] 镉的检测方法很多,如:原子吸收法、分光光度法、原子荧光光谱法、电感耦合等离子体质谱法、高效液相色谱法等,它们大多需要昂贵的仪器、复杂的操作和较长的检测时间,并需要专门的技术人员来完成。

[0007] 肌酐的检测方法也较多,如:碱性苦味酸法、酶法、毛细管电泳法、液相层析法等,它们也大多需要相关仪器设备,操作复杂、检测速度慢、检测成本昂贵、临床使用不便,而且无法与镉同时检测进行校正。

[0008] 因此,现有尿镉检测技术难以满足体外快速检测的需求,有必要发明一种可以同

时检测 Cd^{2+} 和肌酐的快速诊断试纸,提供快速、准确、简便、廉价的实用推广技术。

[0009] 现有满足以上要求的镉检测方法有侧向层析试纸条,肌酐检测方法有干化学试纸,前者为荧光免疫层析技术,后者为干化学分析技术,但是荧光免疫层析技术中的胶体金颜色可能会影响干化学试纸的结果观察,干化学试纸的有色物质可能会影响荧光免疫层析技术的反应,因此还需研究能同时检测尿镉和肌酐的方法。

发明内容

[0010] 本发明的第一个目的是提供一种高灵敏度、操作简单、快速、低成,并可同时检测重金属离子和肌酐,相互间无干扰的检测试纸条。

[0011] 一种重金属和肌酐联合检测试纸条,依次由底板、样品垫、结合垫、NC膜、吸水垫构成,所述的NC膜上设有C线和T线,在结合垫上喷有同一种胶体金颗粒标记的重金属离子抗体;在NC膜上T位置包被荧光微球标记的重金属离子抗原,C线位置包被的是荧光微球标记的BSA。

[0012] 优选的,上述的一种重金属和肌酐联合检测试纸条,所述的重金属离子抗体为 Cd^{2+} 抗体或者 Cr^{3+} 抗体或者 Hg^{2+} 抗体或者 Pb^{2+} 抗体或者 As^{3+} 抗体。

[0013] 优选的,上述的一种重金属和肌酐联合检测试纸条,所述的重金属离子抗原为 Cd^{2+} 抗原或者 Cr^{3+} 抗原或者 Hg^{2+} 抗原或者 Pb^{2+} 抗原或者 As^{3+} 抗原,或者其它重金属离子抗原。

[0014] 本发明提供的第二个技术方案是上述的一种重金属和肌酐联合检测试纸条的制备方法,依次包括下述步骤:

[0015] 将胶体金颗粒标记的金属粒子抗体用喷金划膜仪喷覆到结合垫上,烘干后按照从结合垫到吸水垫的方向,依次把按体积稀释100-140倍的荧光标记完全抗原和按体积稀释100-140倍的荧光标记BSA用喷金划膜仪包被到NC膜上,分别作为C线和T线,并且再次烘干;最后在底板上顺次搭接粘贴样品垫、结合垫、层析膜、肌酐试纸和吸水垫。

[0016] 进一步的,上述的一种重金属和肌酐联合检测试纸条的制备方法,所述的胶体金颗粒标记的金属粒子抗体的方法为:

[0017] A、胶体金的制备:

[0018] 在100mL锥形瓶中装有50mL超纯水,将其放在磁力加热搅拌器上搅拌并加热至沸腾;准确加入1mL 1%的氯金酸后加入1.8mL 1%的柠檬酸三钠,加热搅拌10分钟后停止加热继续搅拌至所制备的胶体金溶液冷却,4℃保存备用;

[0019] B、胶体金标记抗体的制备:

[0020] 取步骤A制备好的胶体金溶液5mL,用0.25M碳酸钾溶液将胶体金溶液的pH值调节为8.5,边加入50μL 0.85mg/mL的抗重金属-iEDTA抗体,搅拌30分钟;加入500μL 1%聚乙二醇20000,混匀反应30分钟后离心,弃上清液,将沉淀物用500mL复溶解液复溶,4℃保存备用。

[0021] 进一步的,上述的一种重金属和肌酐联合检测试纸条的制备方法,所述的复溶解液为0.02M PB溶液中含5%海藻糖、2%蔗糖、1%BSA、0.5%Tween-20以及0.1%PEG4000。

[0022] 进一步的,上述的一种重金属和肌酐联合检测试纸条的制备方法,所述的荧光标记完全抗原的制备方法为:

[0023] 将200μL 130nm荧光微球加入到离心管中,再加入800μL超纯水,避光混匀;接着加

入20 μ L 1mg/mL的N-羟基琥珀酰亚胺和40 μ L 1mg/mL的碳二亚胺,混匀后室温活化反应30分钟;取活化后的荧光微球于另一离心管,再加入对应体积的2mg/mL的完全抗原重金属-iEDTA-BSA,混匀后室温避光反应2小时;加入10%牛血清白蛋白使BSA最终为1%,混匀后室温反应1小时离心分离,离心后收集沉淀物并且用复溶解液复溶至原体积的两倍,得到荧光标记完全抗原,4 $^{\circ}$ C避光保存。

[0024] 进一步的,上述的一种尿中重金属和酞联合检测试纸条的制备方法,所述的荧光标记BSA的制备方法为:将200 μ L 130nm荧光微球加入到1.5mL离心管中,再加入800 μ L超纯水,避光混匀;接着加入20 μ L 1mg/mL的NHS(N-羟基琥珀酰亚胺)和40 μ L 1mg/mL的EDC(碳二亚胺),混匀后室温活化反应30分钟;加入10%BSA(牛血清白蛋白)使BSA最终质量体积比为1%,混匀后室温反应1小时;15000 \times g离心30分钟,离心后收集沉淀物,并且用复溶解液复溶至原体积的两倍,得到荧光标记完全抗原,4 $^{\circ}$ C避光保存

[0025] 进一步的,上述的一种重金属和肌酐联合检测试纸条的制备方法,所述的复溶解液是0.015M pH7.4的PBS:10%BSA:Tween-20按照体积比为90:10:1混合而成。

[0026] 进一步的,上述的一种重金属和肌酐联合检测试纸条的制备方法,所述的肌酐试纸的制备方法为:

[0027] 将滤纸充分浸入A液后取出,于60 $^{\circ}$ C干燥1h;再将浸有A液并干燥后的滤纸再充分浸入B液后取出,于60 $^{\circ}$ C干燥20min;其中,所述A液包含0.4g硫酸铜、1g柠檬酸三钠、0.1g橙黄G以及1L 2mol/LpH6 Tris缓冲液溶解;其中,所述B液包含10g表面活性剂、0.5g还原性色原、0.5g过氧化物以及1L氯仿溶液。

[0028] 本发明的最后一个目的是提供上述的重金属和肌酐联合检测试纸条作为尿液中重金属和/或肌酐水平定性检测卡的应用。

[0029] 本申请提供的技术方案具有如下技术优点:

[0030] 1、本申请提供的技术方案可以同时检测尿液样本中的重金属与肌酐,并且与传统方法具有良好的相关性,结果互不干扰,是对镉等重金属超标检测的便捷检测方法。

[0031] 2、本发明提供的技术方案灵敏度高、操作简单、快速、成本低,易于加工。

[0032] 3、本申请提供的技术方案应用范围广,可以检测人或动物中尿液中重金属和肌酐水平,及时发现重金属超标、中毒情况,便于临床诊断和预防。

[0033] 说明书附图

[0034] 图1是重金属和肌酐联合检测试纸条结构示意图;

[0035] 图2是带壳体的检测试剂卡结构示意图;

[0036] 图3是本发明提供的检测试纸与石墨炉原子吸收法检测结果对比试验检测结果;

[0037] 图4是本发明提供的检测试纸与常规试验方法检测结果对比试验检测结果;

[0038] 图5是本发明提供的检测试纸Cd与肌酐浓度比值对比试验检测结果。

[0039] 图中符号代表元件及其类似元件如下:

[0040] 底板1,样品垫2,结合垫3,层析膜4,肌酐试纸5,吸水垫6,C线,T线,卡壳7,加样孔71,观察区72

具体实施方式

[0041] 为了使本发明的目的、技术方案和有益技术效果更加清晰,以下结合实施例和说

说明书附图,对本发明进行进一步详细说明。需要说明的是,本发明所采用的原料,除特殊说明外,均通过常规手段制备或者通过商业渠道购买。

[0042] 实施例1

[0043] 本发明提供一种重金属和肌酐联合检测试纸条,参阅图1,包括由PVC底板1,所述的底板1依次衔接有样品垫2、结合垫3、层析膜4、肌酐试纸5和吸水垫6,所述的层析膜上设有C线和T线,在结合垫3上喷有同一种胶体金颗粒标记的 Cd^{2+} 抗体(AuNPs-mAb,以下简称金标抗体);在层析膜上T位置包被荧光微球标记的 Cd^{2+} 抗原(FNPs-Cd Ag,以下简称抗原),C线位置包被的是荧光微球标记的BSA。

[0044] 上述的种重金属和肌酐联合检测试纸条的制备方法具体如下:

[0045] 1、样品垫的制备方法

[0046] 将规格为 $20\text{cm} \times 30\text{cm}$ 的大小样品垫裁浸泡在样品垫缓冲液中,于室温干燥16-18h,再于 37°C 烘箱干燥1h,干燥后切割成 $2\text{cm} \times 30\text{cm}$ 规格的样品垫。

[0047] 所述的样品垫的缓冲液配方如下:0.5%BSA、2.5%蔗糖糖、1.5%Tween 20溶解于0.015M pH9 PB缓冲液中。

[0048] 2、偶联抗原、偶联抗体与结合垫的制备方法

[0049] 1) 荧光标记完全抗原的制备:将 $200\mu\text{L}$ 130nm荧光微球加入到1.5mL离心管中,再加入 $800\mu\text{L}$ 超纯水,避光混匀;接着加入 $20\mu\text{L}$ 1mg/mL的NHS(N-羟基琥珀酰亚胺)和 $40\mu\text{L}$ 1mg/mL的EDC(碳二亚胺),混匀后室温活化反应30分钟;取活化后的荧光微球于另一1.5mL离心管,再加入对应体积的2mg/mL的完全抗原Cd-iEDTA-BSA,混匀后室温避光反应2小时;加入10%BSA(牛血清白蛋白)使BSA最终为1%,混匀后室温反应1小时; $15000 \times g$ 离心30分钟,离心后收集沉淀物并且用复溶解液(0.015M pH7.4的PBS:10wt%BSA:Tween-20的体积比为90:10:1)复溶至原体积的两倍,得到荧光标记完全抗原, 4°C 避光保存。

[0050] 2) 荧光标记BSA的制备:将 $200\mu\text{L}$ 130nm荧光微球加入到1.5mL离心管中,再加入 $800\mu\text{L}$ 超纯水,避光混匀;接着加入 $20\mu\text{L}$ 1mg/mL的NHS(N-羟基琥珀酰亚胺)和 $40\mu\text{L}$ 1mg/mL的EDC(碳二亚胺),混匀后室温活化反应30分钟;加入10%BSA(牛血清白蛋白)使BSA最终质量体积比为1%,混匀后室温反应1小时; $15000 \times g$ 离心30分钟,离心后收集沉淀物,并且用复溶解液(0.015M pH7.4的PBS:10%BSA:Tween-20的体积比为90:10:1)复溶至原体积的两倍,得到荧光标记完全抗原, 4°C 避光保存。

[0051] 3) 胶体金标记抗Cd-iEDTA抗体的制备:

[0052] A、胶体金的制备:

[0053] 在100mL锥形瓶中装有50mL超纯水,将其放在磁力加热搅拌器上搅拌并加热至沸腾;准确加入1mL 1%的氯金酸后加入1.8mL 1%的柠檬酸三钠,加热搅拌10分钟后停止加热继续搅拌至所制备的胶体金溶液冷却, 4°C 保存备用。

[0054] B、胶体金标记抗体的制备:

[0055] 取步骤A制备好的胶体金溶液5mL,用0.25M碳酸钾溶液将胶体金溶液的pH值调节为8.5。边加入 $50\mu\text{L}$ 0.85mg/mL的抗Cd-iEDTA抗体,搅拌30分钟;加入 $500\mu\text{L}$ 1%PEG(聚乙二醇)20000,混匀反应30分钟; $4500 \times g$ 离心15分钟,弃上清液,将沉淀物用500mL复溶解液(5%海藻糖、2%蔗糖、1%BSA、0.5%Tween-20以及0.1%PEG4000)复溶, 4°C 保存备用。

[0056] 3、肌酐试纸的制备方法如下

[0057] 将滤纸充分浸入A液后取出,于60℃干燥1h;其中,所述A液包含0.4g硫酸铜、1g柠檬酸三钠、0.1g橙黄G以及1L 2mol/LpH6 Tris缓冲液溶解;再将浸有A液并干燥后的滤纸再充分浸入B液后取出,于60℃干燥20min;其中,所述B液包含10g表面活性剂、0.5g还原性色原、0.5g过氧化物以及1L氯仿溶液。

[0058] 4、Cd²⁺和肌酐联合检测试纸条的组装方法如下

[0059] 将胶体金标记的抗体用喷金划膜仪以3μL/cm的量喷覆到聚酯膜的结合垫3上,在37℃烘箱30分钟,后在27℃恒温箱放置2天;按照从结合垫2到吸水垫6的方向,依次把按体积稀释120倍的荧光标记完全抗原和按体积稀释120倍的荧光标记BSA用喷金划膜仪以0.8μL/cm的量包被到层析膜4(硝酸纤维素膜)上,分别作为检测线(T线)和校准线(C线),并且在37℃烘箱10小时,后在27℃恒温箱放置2天;最后在底板1上顺次搭接粘贴样品垫2、结合垫3、层析膜4、肌酐试纸5和吸水垫6,将制备的Cd²⁺检测区和肌酐检测区按要求切割成3.5mm的试纸条,组成的Cd²⁺和肌酐联合检测试纸条。

[0060] 实施例1制备的一种重金属和肌酐联合检测试纸条再装进塑料卡壳7;所述的塑料卡壳7开有加样孔71和观察区72,加样孔72的位置位于样品垫2位置;观察区位于检测线(T线)、校准线(C线)区域和肌酐试纸(5)块的位置,组成完整的Cd²⁺和肌酐联合检测试纸条,参阅图2。

[0061] 为了更好的使用本申请提供的重金属和肌酐联合检测试纸条,本申请提供的技术方案中还分别建立肌酐、Cd²⁺检测曲线:

[0062] 1.肌酐标准曲线的制备方法,按如下步骤进行

[0063] (1)配制0mg/dL、10mg/dL、50mg/dL、150mg/dL、300mg/dL的肌酐参考品;

[0064] (2)取100μL上述五种参考品分别加入实施例1制备好的试纸条的大加样孔中,1min后显色完全,用仪器检测;

[0065] (3)在0~300mg/L范围内,线性为 $y=1.047x+2.4204$, $R^2=0.9938$ 。Cd²⁺标准曲线的制备方法,按如下步骤进行。

[0066] 2.Cd²⁺标准曲线的制备方法,按如下步骤进行:

[0067] (1)取健康人尿加入到1mM整合剂EDTA-2Na,反应5min。

[0068] (2)在处理好的尿样中加入Cd²⁺标准溶液,分别配制如下浓度的Cd²⁺参考品:100ng/mL、50ng/mL、25ng/mL、12.5ng/mL、6.25ng/mL、3.13ng/mL、1.56ng/mL、0.73ng/mL。

[0069] (3)取100μL前述配制的8种浓度的标准溶液分别加入实施例1制备的试纸条的小加样孔中,15min后通过计算Cd²⁺检测区的检测线上荧光强度和校准线上荧光强度的比值,绘制标准曲线。在样品检测时把经过前处理的尿样加入到试纸卡的加样孔中,计算检测线和校准线上荧光强度的比值,再通过标准曲线就可以计算出尿样中Cd²⁺的浓度。本发明的灵敏度为0.21ng/mL,在0.73ng/mL到100ng/mL的检测范围内线性为 $y=0.817x+0.3094$, $R^2=0.9926$ 。

[0070] 为了更好的理解本发明提供的技术方案,下面给出本发明提供的Cd²⁺和肌酐检测卡的检测原理

[0071] Cd²⁺检测原理

[0072] 本发明提供的Cd²⁺和肌酐检测卡检测试剂未加样时,NC膜上的T、C线上包被的荧光微球偶联物,在激发光作用下, T、C线可显示出荧光。将加入检测样品时,样品在毛细管

作用下,依次经过样品垫,结合垫,NC膜,向吸水垫的方向移动。

[0073] 若样品中不含 Cd^{2+} ,结合垫上的金标抗体在样品的带动下流经NC膜,与NC膜T线上的抗原结合,其胶体金颗粒可以使荧光微球(与抗原偶联)的荧光发生能量转移,荧光激发光时,T线不发荧光,由此显示无线,该现象也称荧光淬灭。

[0074] 若样品中含有 Cd^{2+} ,样品中的 Cd^{2+} 可与结合垫上的金标抗体,使金标抗体无法与NC膜T线上的抗原结合,在荧光激发光下,T线显示出荧光。即待检测样本中的 Cd^{2+} 与NC膜T线上的抗原竞争结合垫上的金标抗体。若 Cd^{2+} 浓度越高,可与NC膜T线上的抗原结合的金标抗体越少,T线荧光淬灭的程度越低,荧光强度越强。此时样本中 Cd^{2+} 含量由T、C的荧光强度根据T/C进行计算。

[0075] 如果测试时C处不出现荧光,则表明此次测值无效,应进行重复实验。

[0076] 肌酐检测原理:

[0077] 酸性条件下,试纸中的 Cu^{2+} -柠檬酸盐与样本中肌酐反应,生成 Cu^{2+} -肌酐络合物,此络合物与TMB发生氧化还原反应,生成 Cu^{+} -肌酐络合物和TMB+,再利用过氧化物生成大量的羟基自由基,使 Cu^{+} 氧化成 Cu^{2+} , Cu^{2+} 再次与TMB重复上面的反应,整个反应过程得以循环,上述反应中TMB+呈蓝色,肌酐浓度越高,蓝色产物越多,蓝色越深。此时样本中肌酐含量由读卡仪读取吸收光强度进行计算。

[0078] $\text{H}^{+} + \text{Cu}^{2+} \cdot \text{柠檬酸盐} + \text{肌酐} \rightarrow \text{Cu}^{2+} \cdot \text{肌酐} + \text{柠檬酸}$

[0079] $\text{Cu}^{2+} \cdot \text{肌酐} + \text{TMB} \rightarrow \text{Cu}^{+} \cdot \text{肌酐} + \text{TMB}^{+}$

[0080] $\text{Cu}^{+} \cdot \text{肌酐} + \text{ROOH} \rightarrow \text{RO} \cdot + \text{OH}^{-} + \text{Cu}^{2+} \cdot \text{肌酐}$

[0081] 为了更好的说明本申请提供的技术方案,下面给出本申请提供的 Cd^{2+} 和肌酐联合检测试纸条的具体使用方法

[0082] 打开免疫分析仪,插入与试纸条批号相同的芯片;使用时除去试剂条外包装,取出试剂条,水平放置;精确吸取 $100\mu\text{l}$ 全尿样品,再加入百分之一体积 1mM 螯合剂EDTA-2Na,反应5min。将尿样加入到检测卡的加样孔中,然后开始计时;待室温反应15min后,将检测卡放入到仪器的卡槽中;点击仪器上的“测试”按键,仪器将开始测试,读取肌酐的OD值以及 Cd^{2+} 荧光信号的大小,并显示尿镉/肌酐比值结果。

[0083] 为了证明本发明提供的技术方案的优点,本发明与其它方法的对比实验例:

[0084] 收集疑似镉中毒患者尿液样本100例,分别用本发明与传统的石墨炉原子吸收光谱法测(ASS) Cd^{2+} 和生化反应仪测肌酐方法对比,结果如图1~图3所示。其中,本发明检测 Cd^{2+} 与石墨炉原子吸收法检测结果呈线性相关,线性方程为 $y = 1.018x + 0.9288$, $R^2 = 0.9495$;与传统的肌酐检测方法同样呈线性相关,线性方程为 $y = 0.9796x - 3.068$, $R^2 = 0.9519$; Cd^{2+} /肌酐 ($\mu\text{mol}/\text{mol}$) 线性方程为 $y = 1.1757x - 0.1542$, $R^2 = 0.9425$ 。

[0085] 以上结果表明,本发明可以同时检测尿液样本中的 Cd^{2+} 与肌酐,并且与传统方法具有良好的相关性,结果互不干扰,是对Cd中毒检测的便捷检测方法。

[0086] Cr^{3+} 抗体或者 Hg^{2+} 抗体或者 Pb^{2+} 抗体或者 As^{3+} 抗体

[0087] 需要特别说明的是,本申请提供的即使方案不仅仅可以检测的 Cd^{2+} 与肌酐,替换相对应的抗体,如 Hg^{2+} 抗体或者 Pb^{2+} 抗体或者 As^{3+} 抗体,并且对应替换相应的抗原如: Cr^{3+} 抗原或者 Hg^{2+} 抗原或者 Pb^{2+} 抗原或者 As^{3+} 抗原,同样可以检测对应的重金属。

[0088] 根据上述说明书的揭示和教导,本发明所属领域的技术人员还可以对上述实施方

式进行适当的变更和修改。因此,本发明并不局限于上面揭示和描述的具体实施方式,对本发明的一些修改和变更也应当落入本发明的权利要求的保护范围内。此外,尽管本说明书中使用了一些特定的术语,但这些术语只是为了方便说明,并不对本发明构成任何限制。

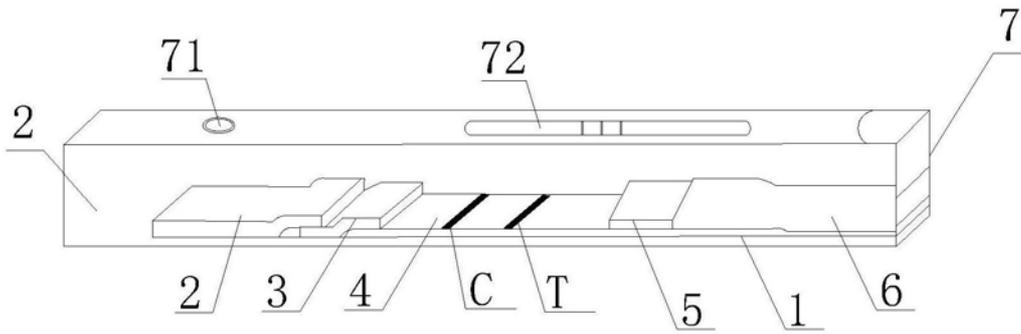


图1

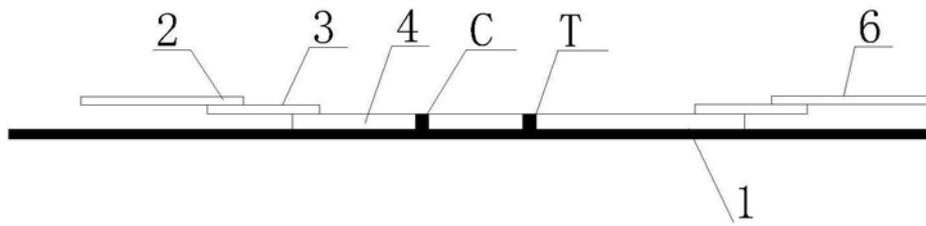


图2

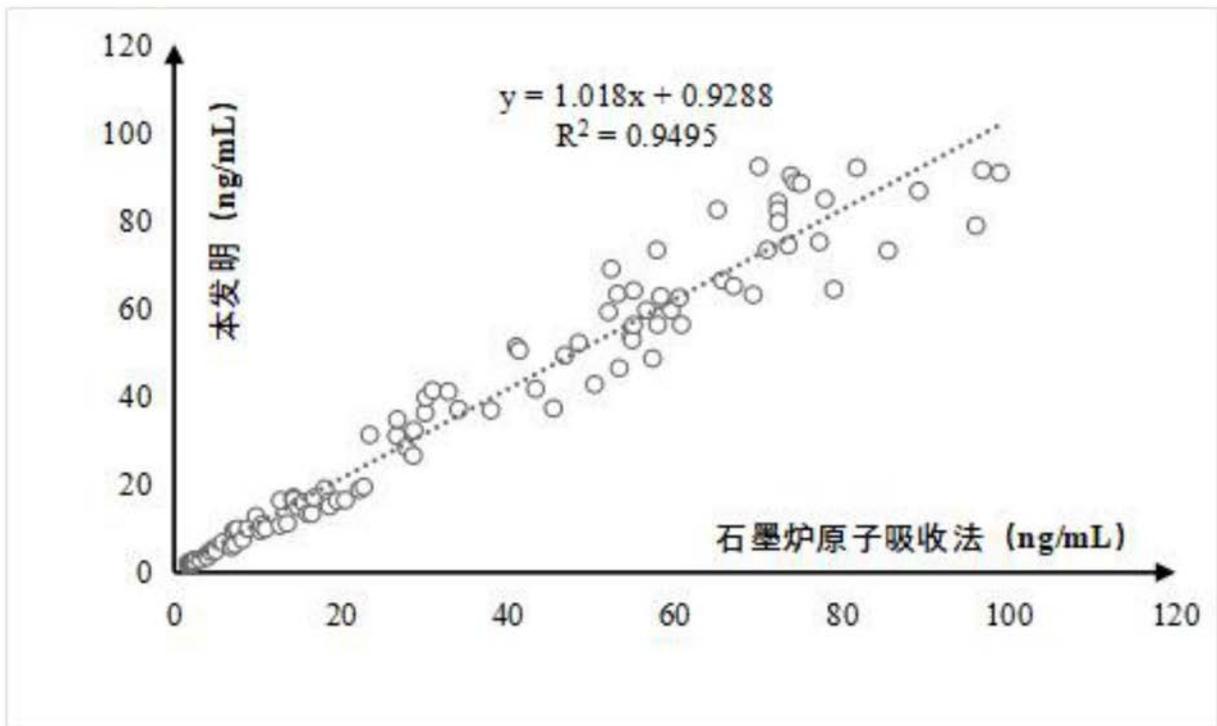


图3

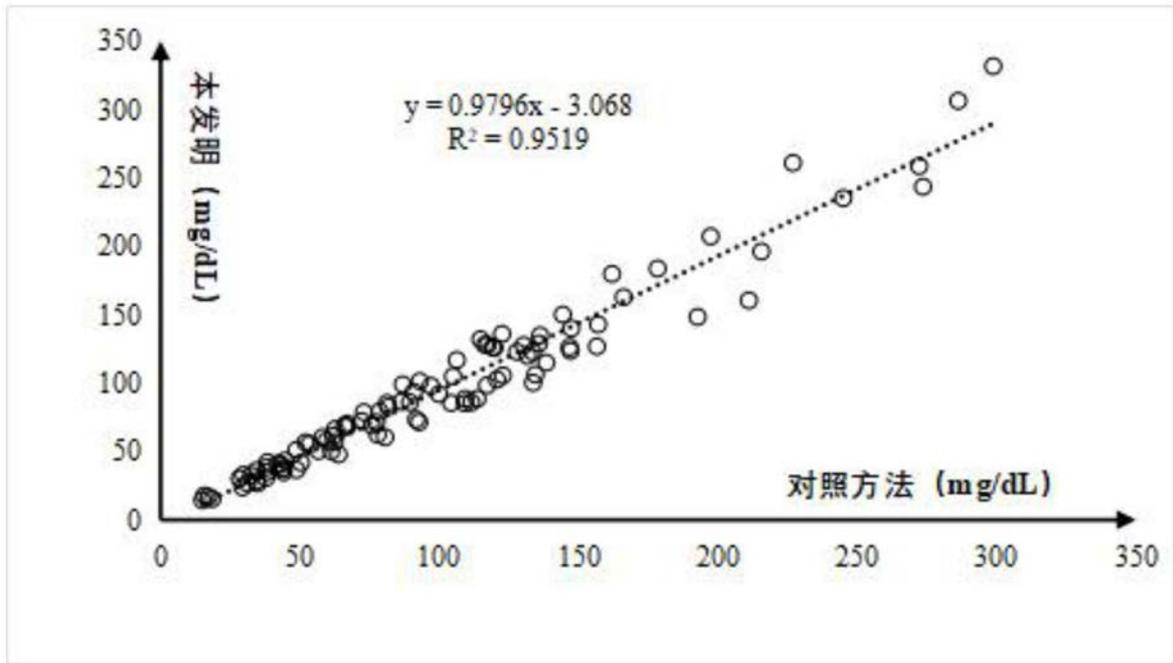


图4

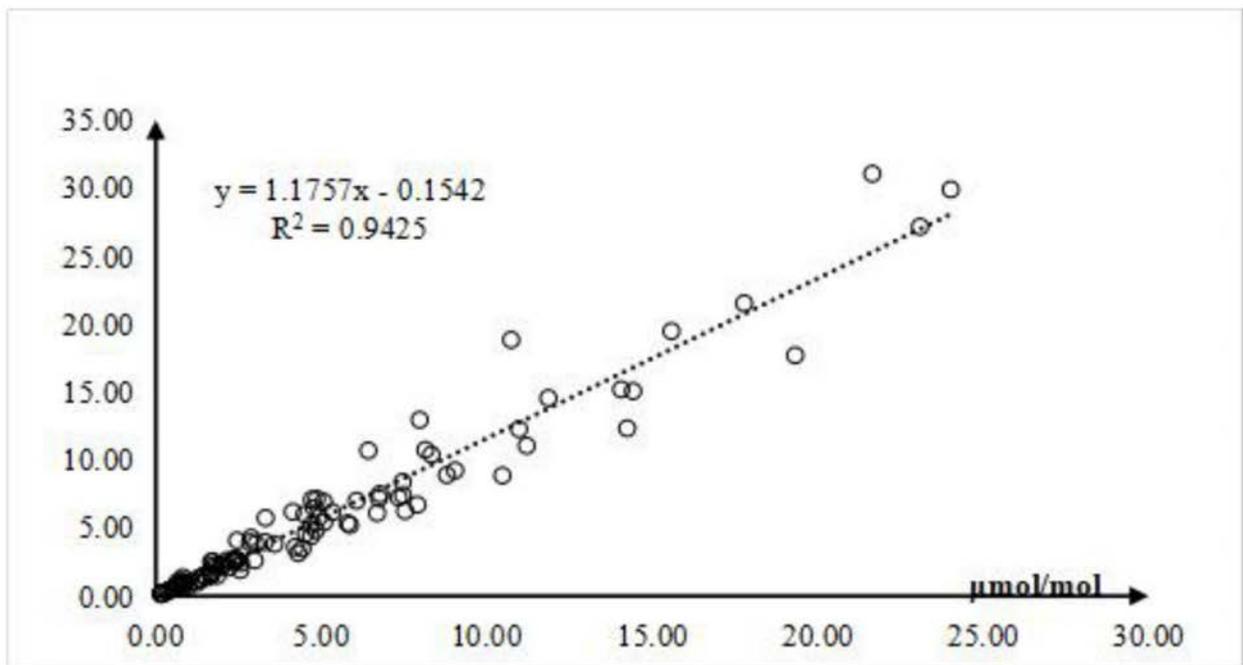


图5

专利名称(译)	一种重金属和肌酐联合检测试纸条及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN109298188A	公开(公告)日	2019-02-01
申请号	CN201811348070.0	申请日	2018-11-13
[标]发明人	唐小江		
发明人	唐小江		
IPC分类号	G01N33/70 G01N33/558 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/70 G01N33/533 G01N33/558		
代理人(译)	王海曼		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种重金属和肌酐联合检测试纸条及其制备方法与应用；旨在提供一种可同时检测重金属离子和肌酐的快速、准确、简便、廉价的检测试纸条；其技术要点包括由底板依次衔接有样品垫、结合垫、层析膜、肌酐试纸和吸水垫，所述的层析膜上设有C线和T线，在结合垫上喷有同一种胶体金颗粒标记的重金属离子抗体；在层析膜上T位置包被荧光微球标记的重金属离子抗原，C线位置包被的是荧光微球标记的BSA；荧光免疫层析检测和干化学分析领域。

