

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

G01N 33/53

G01N 33/531 G01N 33/577

## [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00112681.4

[43] 公开日 2001 年 8 月 8 日

[11] 公开号 CN 1307236A

[22] 申请日 2000.2.2 [21] 申请号 00112681.4

[71] 申请人 昆明广博科技有限公司

地址 650118 云南省昆明市高新区光明电脑城 B  
栋 2 楼 10 号

[72] 发明人 谢伯林 徐 林 杨上川

郭 仁 彭小忠 张 翔

[74] 专利代理机构 云南省专利事务所

代理人 金耀生

权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图页数 0 页

[54] 发明名称 吗啡、海洛因及鸦片快速检测试纸条及其  
制备方法

[57] 摘要

本发明是一种吗啡、海洛因及鸦片快速检测试纸条及其制备方法。其特征在于用单克隆抗体技术及金标免疫分析法制备而成,能快速准确检测出吸毒者体内的微量吗啡,并有较高的特异性和灵敏度。本发明的快速检测试纸条具有高度的特异性和灵敏度,还具有稳定性好、重复性好,并且不用特殊仪器,费用较低廉,操作简便易学,短时同内就能判读结果,可满足现场筛检的要求等特点。

ISSN 1008-4274

# 权 利 要 求 书

1、一种吗啡、海洛因及鸦片快速检测试纸条,其特征在于用单克隆抗体技术及金标免疫分析法制备而成,能快速准确检测出吸毒者体内的微量吗啡,并有较高的特异性和灵敏度。

2、按权利要求 1 所述的快速检测试纸条的制备方法,其特征在于按以下步骤制得:

1) 制备检测用免疫原及抗原:采用混合酸酐法制取吗啡抗原;

2) 单克隆抗体的制备与筛选:用合成的吗啡抗原免疫小鼠,按常规方法进行细胞融合,融合后的细胞接种于甲基纤维素培养基上,经过转移克隆、筛选等步骤,最终获得抗吗啡单克隆抗体细胞株;

3) 制备免疫合成的吗啡抗原的免疫血清;

4) 制备胶体金标记抗体:采用枸橼酸三钠法制备胶体金颗粒,按比例与合成的吗啡抗原的单克隆抗体混合进行标记;

5) 检测试纸条的制备:选择适当的浓度将免疫血清抗体和金标记抗体分别固定于不同的载体上,经粘合、切割等步骤制备成检测试纸。

3、按权利要求 2 所述的制备方法,其特征在于采用混合酸酐将小分子量吗啡与大分子载体连接制备吗啡合成抗原。

4、按权利要求 1 所述的制备方法,其特征在于检测纸条的制备还可是将不同含量抗体以  $0.5 - 1.5 \mu\text{l}$ /点打在硝酸纤维素膜上,超净台内室温风干,将膜置于  $1 - 6\%$  牛血清白蛋白内  $37^\circ\text{C}$  封闭  $1 - 3$  小时,取出后用缓冲液冲洗数次,室温凉干,  $4^\circ\text{C}$  密封保存;在另一硝酸纤维素膜免疫条带上加入 T B S T  $20 - 50 \mu\text{l}$ ,加入抗吗啡的单克隆抗体标记的胶体金溶液  $20 - 60 \mu\text{l}$ ,室温凉干,  $4^\circ\text{C}$  密封保存,分别取大小适合的上述两种硝酸纤维素膜免疫条带和大小适合的空白硝酸纤维素膜条带,按空白、胶体金单抗和血清抗体的顺序粘接在大小适合的硬纸片上,其中空白端为样品加入端。

# 说明书

## 吗啡、海洛因及鸦片快速检测试纸条及其制备方法

本发明涉及医学技术领域，具体地说是吗啡、海洛因及鸦片快速检测试纸条及其制备方法。

吸毒成瘾是全球性的社会公害，不仅危害社会的安定，而且危害人类的健康。吗啡、海洛因及鸦片等是主要毒品种类，其在体内代谢的终产物是小分子量的吗啡，检测尿液中的吗啡含量可反映出体内这些毒品的水平。通常是对尿液样品进行薄层色谱法和高压液相色谱法分析检测，这些检测方法需要昂贵的检测设备和较高的技术要求，并且需要一天以后出结果，花费也较高，在实际应用中存在许多困难，尤其是不能满足现场筛检的要求，且价格昂贵。然而在现实的反毒禁毒斗争中，迫切需要一种特异、快速、简便、经济的检测试剂，以便于查禁人员现场使用的快速准确检测出吸毒者体内微量吗啡，满足现场筛检的要求。

本发明的目的是提供一种能快速准确检测出吸毒者体内微量吗啡的检测试纸条及其制备方法。这种试纸条具有高度的特异性和灵敏，操作简便易学，短时间内就能判读结果。

本发明的目的是这样实现的：利用单克隆抗体技术及金标免疫分析法研制出吗啡、海洛因及鸦片快速检测试纸条，它能快速准确检测出吸毒者体内的微量吗啡，并有较高的特异性和灵敏度。

上述快速检测试纸条的制备方法按以下步骤制得：

- 1) 制备检测用免疫原及抗原：采用混合酸酐法制取吗啡抗原；
- 2) 单克隆抗体的制备与筛选：用合成的吗啡抗原免疫小鼠，按常规方法进行细胞融合，融合后的细胞接种于甲基纤维素培养基上，经过转移克隆、筛选等步骤，最终获得抗吗啡单克隆抗体细胞株；
- 3) 制备免抗合成吗啡抗原的免疫血清；
- 4) 制备胶体金标记抗体：采用枸橼酸三钠法制备胶体金颗粒，按比例与合成的吗啡抗原的单克隆抗体混合进行标记；
- 5) 检测试纸条的制备：选择适当的浓度将免疫血清抗体和金标记抗体分别固定于不同的载体上，经粘合、切割等步骤制备成检测试纸。

上述方法中采用混合酸酐将小分子量吗啡与大分子载体连接制备吗啡合成抗

原。

上述方法中的检测纸条的制备是：将不同含量抗体以  $0.5 - 1.5 \mu\text{l}/\text{点}$  打在硝酸纤维素膜上，超净台内室温风干，将膜置于  $1 - 6\%$  牛血清白蛋白内  $37^\circ\text{C}$  封闭  $1 - 3$  小时，取出后用缓冲液冲洗数次，室温凉干， $4^\circ\text{C}$  密封保存；在另一硝酸纤维素膜免疫条带上加入  $\text{TBST } 20 - 50 \mu\text{l}$ ，加入抗吗啡的单克隆抗体标记的胶体金溶液  $20 - 60 \mu\text{l}$ ，室温凉干， $4^\circ\text{C}$  密封保存，分别取大小适合的上述两种硝酸纤维素膜免疫条带和大小适合的空白硝酸纤维素膜条带，按空白、胶体金单抗和血清抗体的顺序粘接在大小适合的硬纸片上，其中空白端为样品加入端。

本发明的快速检测试纸条具有高度的特异性和灵敏度，还具有稳定性好、重复性好，并且不用特殊仪器，费用较低廉，操作简便易学，短时间内就能判读结果，可满足现场筛检的要求等特点。克服了现有技术中存在的不足，达到及时准确发现和监控瘾君子的吸毒行为，有效地打击毒品的犯罪活动，这对人民的身体健康和社会的安定团结都有重要意义，对社会的精神文明和物质文明都是十分有益的。

以下结合实施例对本发明作进一步的详述，但不限于实施例。

实施例：

#### 1、制备检测用免疫原及抗原：

采用混合酸酐法将吗啡与载体蛋白连接制备吗啡合成抗原，使用苯邻二甲酰胺将去甲吗啡转化成  $\text{N} - (4 - \text{溴丁基})$  衍生物，并使用  $1 - \text{环己基} - 3 - (2 - \text{吗啡代己基}) - \text{碳二亚胺} - \text{N} - \text{甲} - \text{对位} - \text{甲苯磺酸盐}$ （简称  $\text{CMEC}$ ）， $1 - \text{己基} - 3 - (2 - \text{二甲基氨基丙基}) - \text{碳二亚胺}$  化合物，将其结合到分子量为  $10,000$  或  $10,000$  以上的大分子载体上，如  $\text{BSA}$ ， $\text{OVA}$ ， $\text{KLH}$ ，免疫球蛋白等生物大分子， $\text{PLL}$  等多聚氨基酸，制备出吗啡抗原。

#### 2、单克隆抗体的制备与筛选：

1) 免疫小鼠及制备脾淋巴细胞：用合成的吗啡抗原，加  $0.4\text{ml}$   $\text{PBS}(\text{PH}7.4)$  与  $0.4\text{ml}$  完全弗氏佐剂充分混合，并将  $0.2\text{ml}$  所得乳化液注射到 6 龄雌性  $\text{Bab/c}$  小鼠皮下，初次免疫两周后，再将  $0.2\text{ml}$  如上法制得的乳化液注入小鼠皮下，再过两周后，同法制得乳化液  $0.5\text{ml}$  注入小鼠腹腔，又两周后在小鼠尾静脉注入  $0.2\text{ml}$

含上述抗原的 P B S 溶液,三天后从已免疫小鼠的体内分离脾脏并挤压将细胞分散,将如此得到的淋巴细胞悬浮于淋巴细胞培养液 MEM 中,离心洗涤两次 (1 4 0 0 rpm, 6 分钟, 3 7 ℃),将淋巴细胞重新悬浮于培养液中,即可获得细胞融合的小鼠脾淋巴细胞;

2) 细胞融合:收获处于生长期小鼠骨髓瘤细胞 S P 2/0 悬浮于 MEM 中,并离心洗涤两次 (1 4 0 0 rpm, 6 分钟, 3 7 ℃),然后将细胞重新悬浮于培养液中,即获得细胞融合的小鼠骨髓瘤细胞;将  $3.56 \times 10^8$  个上述淋巴细胞和  $2.71 \times 10^8$  个上述骨髓瘤细胞置于 50ml 离心管内混合后离心 (1 4 0 0 rpm, 6 分钟, 3 7 ℃),去上清,缓慢加入 4 0 % P E G (M D 1 5 0 0) 溶液反应 1 分钟,在旋转离心管的同时缓慢加入 MEM 至 1 0 ml,离心 (8 0 0 rpm, 6 分钟, 3 7 ℃),去上清,将细胞重新悬浮于 1 4 0 ml HAT 培养基中,并在培养板上加样后,放入二氧化碳培养箱中培养 (5 % 二氧化碳, 9 5 % 空气, 湿度 1 0 0 %);

3) 杂交瘤细胞的筛选:按上述方法培养 2 至 4 周后,用 E L I S A 方法检测已证实有细胞生长的培养板中的培养物上清液中是否含有抗上述抗原的抗体,结果在 9 6 0 个培养板上的小井中有 1 1 个产生了抗体,在这些小井中加入上述抗原后,有 8 个能被抗原所抑制,进而证实这 8 个培养小井中有产生上述抗原的杂交瘤细胞;

4) 杂交瘤细胞的克隆:采用有限稀释至培养小井的最终细胞浓度为 10 个 / ml,从中筛选出 1 个细胞株。再接种于 9 6 孔培养板中,每孔 0. 1 ml 内含 1 个细胞,进行细胞株的再克隆,并对每个小井的培养物上清液进行抗体 E L I S A 检测;

5) 培养产生单克隆抗体:将在含有 1 5 % F C S 的 R P M I 培养基中培养所得的细胞株的培养细胞,移入不含 F C S 的 R P M I 培养基中培养至几乎所有细胞死亡,对其培养液进行离心得到含的单克隆抗体的上清液,并对抗体进行纯化鉴定;

6) 在小鼠腹腔内大量产生单克隆抗体:分别将悬浮有  $2 \times 10^6$  细胞株的 P B S 溶液 0. 5 ml 注入 6 周龄雌性 Bab/c 小鼠的腹腔内,约一周后小鼠体重显著增加,于注射细胞后的第 7、9、1 1 天用注射器收集腹水,离心得到腹水的上清液,并对腹水上清液进行抗体含量检测。

### 3、制备兔抗合成的吗啡抗原的免疫血清：

将含吗啡合成抗原用生理盐水混合稀释至总量 2ml, 注射进体重 2kg 左右的雄性大耳白兔腹腔, 两周后再次免疫一次, 检测兔血清针对此抗原的抗滴度后, 采用颈动脉放血收集血液, 4℃ 存放过夜后分离血清冻存, 对抗体进行纯化。

### 4、胶体金抗体的制备：

采用枸橼酸三钠法制备胶体金颗粒, 取 1% $\text{HauCl}_4$  (名称) 水溶液 1ml, 加重蒸馏水至 100ml, 迅速加入枸橼酸三钠水溶液 2ml, 5 分钟后出现橙红色, 制得的胶体金 16nm, 按 1:1 比例与单克隆抗体溶液在磁性搅拌下混合, 10 分钟后再加入 50g/l 牛血清白蛋白水溶液至终浓度为 10g/l, 用终浓度为 0.05% PEG 稳定标记后的胶体金颗粒, 于 4℃ 下 1500r/min 1 小时, 浓缩纯化离心两次, 沉淀物保存于原体积 5% 的保存液 (0.01mol/l, PH7.2 PBS 溶液, 含 0.5 mg/ml PEG 溶液, 含 0.5mg/ml PEG 和 1/10000  $\text{NaN}_3$ ) 中于 4℃ 保存。

### 5、检测试纸条的制备与使用：

将兔抗血清 IgG 等量混合后, 用不同含量抗体以 0.5  $\mu\text{l}$ /点打在硝酸纤维素膜上, 超净台内室温风干, 将膜置于 3% 牛血清白蛋白内 37℃ 封闭 2 小时, 取出后用缓冲液冲洗 3 次, 室温凉干, 4℃ 密封保存; 在另一硝酸纤维素膜免疫条带上加入 T B S T (150mmol/l NaCl, 25mmol/l Tris, PH7.5, 含 1% BSA, 0.02% Tween-20) 20  $\mu\text{l}$ , 加入抗吗啡的单克隆抗体标记的胶体金溶液共 50  $\mu\text{l}$ , 室温凉干, 4℃ 密封保存; 分别取 0.5 × 2.5 厘米大小的上述两种硝酸纤维素膜免疫条带和 0.5 × 3 厘米大小的空白硝酸纤维素膜条带, 按空白、胶体金单抗和血清抗体的顺序粘接在 0.5 × 8 厘米的硬纸片上, 共中空白端为样品加入端。

取可疑尿液作为样品, 浸湿试纸条的样品端, 阳性者试纸条内胶体金单抗区域呈红色圆点, 阴性者试纸条内胶体金单抗区域则不出红色圆点。

专利名称(译)	吗啡、海洛因及鸦片快速检测试纸条及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN1307236A</a>	公开(公告)日	2001-08-08
申请号	CN00112681.4	申请日	2000-02-02
[标]发明人	谢伯林 徐林 杨上川 郭仁 彭小忠 张翔		
发明人	谢伯林 徐林 杨上川 郭仁 彭小忠 张翔		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531 G01N33/577		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明是一种吗啡、海洛因及鸦片快速检测试纸条及其制备方法。其特征在于用单克隆抗体技术及金标免疫分析法制备而成,能快速准确检测出吸毒者体内的微量吗啡,并有较高的特异性和灵敏度。本发明的快速检测试纸条具有高度的特异性和灵敏度,还具有稳定性好、重复性好,并且不用特殊仪器,费用较低廉,操作简便易学,短时同内就能判读结果,可满足现场筛检的要求等特点。