



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110058012 A

(43)申请公布日 2019.07.26

(21)申请号 201910275940.4

(22)申请日 2019.04.08

(71)申请人 石家庄洄众生物科技有限公司  
地址 050000 河北省石家庄市高新区珠江大道313号方亿科技园A区3号楼四层

(72)发明人 李晓春 李森

(74)专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569  
代理人 赵晓琳

(51)Int.Cl.  
G01N 33/533(2006.01)  
G01N 33/543(2006.01)

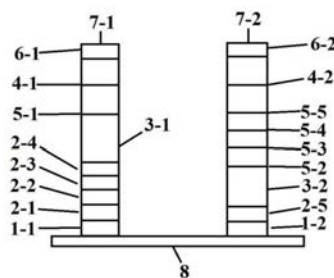
权利要求书2页 说明书10页 附图1页

(54)发明名称

同步检测二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮和可卡因的荧光免疫试纸组及其制备和使用方法

(57)摘要

本发明提供一种同步检测二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮和可卡因的荧光免疫试纸组及其制备和使用方法,涉及生物医药技术领域,本发明所述荧光免疫试纸组,包括定性试纸和定量试纸;定性试纸的样品垫分别设置有独立的四种毒品的荧光微球标记单克隆抗体区,检测线喷涂有四种毒品的混合物;定量试纸的样品垫设置有四种毒品混合免疫得到的多克隆抗体,NC膜上则分别喷涂四种毒品抗原作为四条定量检测线。本发明提供的荧光免疫试纸组可同时测定四种毒品,并且结合定性试纸和定量试纸后一次性实现定性和定量检测的需要,省时省力,对毒品执法的现场检测具有重大意义。



1. 一种同步检测二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮和可卡因的荧光免疫试纸组,其特征在于,包括定性试纸和定量试纸;

所述定性试纸和定量试纸由下至上依次包括样品垫、样品结合垫、NC膜和吸水纸;

所述定性试纸的样品结合垫包括独立的荧光微球标记的二乙酰吗啡单克隆抗体区、荧光微球标记的甲基苯丙胺单克隆抗体区、荧光微球标记的氯胺酮单克隆抗体区和荧光微球标记的可卡因单克隆抗体区;

所述定性试纸的NC膜上设置有一条定性检测线和一条质控线,所述定性检测线为二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮和可卡因的混合物;

所述定量试纸的样品结合垫包括二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮和可卡因的荧光微球标记多克隆抗体;

所述定量试纸的NC膜上设置有四条定量检测线和一条质控线,所述定量检测线包括二乙酰吗啡定量检测线、甲基苯丙胺定量检测线、氯胺酮定量检测线和可卡因定量检测线,各自喷涂有二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮或可卡因;

所述二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮和可卡因的荧光微球标记单克隆抗体中,标记的荧光微球各不相同。

2. 根据权利要求1所述的荧光免疫试纸组,其特征在於,所述荧光微球选自稀土荧光微球、时间分辨荧光微球、二氧化硅荧光微球与单分散荧光微球中的一种或多种。

3. 根据权利要求1所述的荧光免疫试纸组,其特征在於,所述定性试纸和定量试纸中,样品垫与样品结合垫有1/3长度的交叠,样品结合垫未与样品垫交叠的一端与NC膜有1/3长度的交叠,NC膜未与样品结合垫交叠的一端与吸水纸有1/3长度的交叠。

4. 根据权利要求1所述的荧光免疫试纸组,其特征在於,所述质控线为IgG多克隆抗体。

5. 根据权利要求1所述的荧光免疫试纸组,其特征在於,所述定性试纸中,样品结合垫上依次包括荧光微球标记的二乙酰吗啡单克隆抗体区、荧光微球标记的甲基苯丙胺单克隆抗体区、荧光微球标记的氯胺酮单克隆抗体区和荧光微球标记的可卡因单克隆抗体区。

6. 根据权利要求1或5所述的荧光免疫试纸组,其特征在於,所述定量试纸中,定量检测线依次为二乙酰吗啡定量检测线、甲基苯丙胺定量检测线、氯胺酮定量检测线和可卡因定量检测线。

7. 根据权利要求1所述的荧光免疫试纸组,其特征在於,所述二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮和可卡因的荧光微球标记多克隆抗体,是以二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮和可卡因作为抗原混合免疫得到的多克隆抗体经荧光微球标记得到的。

8. 权利要求1~7任意一项所述荧光免疫试纸组的制备方法,包括以下步骤:

S1、向结合垫喷涂独立的荧光微球标记的二乙酰吗啡单克隆抗体区、荧光微球标记的甲基苯丙胺单克隆抗体区、荧光微球标记的氯胺酮单克隆抗体区和荧光微球标记的可卡因单克隆抗体区,得到定性试纸的结合垫;向结合垫喷涂二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮和可卡因的荧光微球标记多克隆抗体,得到定量试纸的结合垫;

S2、向NC膜喷涂二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮和可卡因的混合物作为检测线、喷涂IgG多克隆抗体作为质控线,得到定性试纸的NC膜;向NC膜分别喷涂二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮和可卡因作为二乙酰吗啡定量检测线、甲基苯丙胺定量检测线、氯胺酮定量检测线和可卡因定量检测线,喷涂IgG多克隆抗体作为质控线,得到定量试纸的NC膜;

S3、由下到上依次将样品垫、定性试纸的结合垫、定性试纸的NC膜以及吸水纸组装,得到定性试纸;由下到上依次将样品垫、定量试纸的结合垫、定量试纸的NC膜以及吸水纸组装,得到定量试纸;

S4、将定性试纸和定量试纸组装在同一样品板上,得到荧光免疫试纸组。

9. 根据权利要求8所述的制备方法,其特征在于,所述定量试纸中,各定量检测线之间的间距为0.8~2mm;所述定量试纸的定量检测线和质控线的间距不低于8mm。

10. 一种同步检测二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮和可卡因四种毒品的荧光免疫方法,包括如下步骤:

(1) 将待测样品滴加到权利要求1~7任意一项所述技术方案所述的荧光免疫试纸组中的定性试纸的样品垫,孵育后检测质控线和检测线的荧光强度,同时设置空白对照组;

若定性试纸检测线的荧光信号低于空白对照且质控线有荧光信号,则判断待测样品中含有二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮和可卡因中的一种或多种;

若定性试纸检测线的荧光信号强度与空白对照相同且质控线有荧光信号,则判断待测样品无二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮和可卡因;

(2) 分别绘制二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮或可卡因的浓度与其相应定量检测线的荧光强度的标准曲线;

(3) 将步骤(1)中判断含有二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮和可卡因中一种或多种的待测样品滴加到所述定量试纸的样品垫,孵育后检测定量检测线和质控线的荧光强度,根据标准曲线计算样品中二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮和可卡因的一种或多种的浓度。

## 同步检测二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮和可卡因的荧光免疫试纸组及其制备和使用方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药技术领域,尤其涉及同步检测二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮和可卡因的荧光免疫试纸组及其制备和使用方法。

### 背景技术

[0002] 近年来,毒品的滥用已经成为全世界关注的一个问题。毒品不仅仅易上瘾,而且危害人们的身心健康,对社会的安宁造成了不可挽回的影响。所以,在这种违法的行为上,我们必须以最快的速度加以制止,及时将吸毒人员从吸毒的环境中解救出来,创造美好的社会。因此,执法人员如果能够在现场快速检测毒品,则能够更为有效的挽救吸毒者。

[0003] 海洛因是吗啡类毒品的一种,吗啡即我们平时所说的鸦片。其为半合成毒品,具有很强的药物依赖性。海洛因不仅能够对人体造成很大的危害,而且复吸率极高,一旦沾染,几乎没有可能戒除。其被联合国认定为一级管制毒品,也是中国监控、查禁的最主要毒品之一。

[0004] 冰毒是一种新型毒品,又名甲基安非他明,其主要成分为甲基苯丙胺,由于其形状与冰相似,故将其命名为冰毒。该药主要能够导致人体出现兴奋地症状,主要表现为精神兴奋、性欲亢进,并伴随着暴力倾向。冰毒可降低脑部血液的流动速度,导致脑细胞的死亡,使脑部受到严重的伤害。用药过多时会产生很强的依赖性。

[0005] 氯胺酮,又称K粉,是苯环己哌啶(PCP)的衍生物。服用后会导 致人体出现幻觉、运动功能障碍,容易产生精神分裂,是一种很强烈 的兴奋剂。吸食K粉后,吸毒者会不断的进行扭动,对心肺以及神经 系统造成很严重的损伤,吸食过量可致死,具有一定的精神依赖性。

[0006] 可卡因最早是从古柯叶中提取出来做为麻药使用,但是由于其毒性强,并且能够使人的中枢神经产生兴奋作用,世界各国已明文规定将其列为毒品 的行列。可卡因对人体的消化系统、免疫系统、心血管系统和泌尿生殖系统 都有损伤作用,还可导致肝细胞坏死。大量吸食后极易上瘾,并且复吸率超 过90%,很难戒除。

[0007] 目前对这四种毒品的检测主要采用红外光谱法(FTIR)、气相色谱法(GC)、液相色谱法(HPLC)、毛细管电泳法、气相色谱-质谱联用法(GC-MS)与液相色谱-质谱联用法(HPLC-MS)等,虽然这些方法检测的比较准确,但是检测所消耗的时间较长,并且对实验人员以及设备都有很高的要求,并 不能满足于在外的执法人员的现场检测。

### 发明内容

[0008] 本发明为了克服现有毒品检测方法时间长、需要进行实验室检测的缺 陷,提供了一种同步检测二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮和可卡因的荧光 免疫试纸组及其制备方法和使用方法,可快速对待测样品进行定性和定量检 测,满足执法人员现场检测的需求。

[0009] 为了实现上述发明目的,本发明提供以下技术方案:

[0010] 本发明提供了一种同步检测二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮和可卡因的荧光免疫试纸组,包括定性试纸和定量试纸;

[0011] 所述定性试纸和定量试纸由下至上依次包括样品垫、样品结合垫、NC膜和吸水纸;

[0012] 所述定性试纸的样品结合垫包括独立的荧光微球标记的二乙酰吗啡单克隆抗体区、荧光微球标记的甲基苯丙胺单克隆抗体区、荧光微球标记的氯胺酮单克隆抗体区和荧光微球标记的可卡因单克隆抗体区;

[0013] 所述定性试纸的NC膜上设置有一条定性检测线和一条质控线,所述定性检测线为二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮和可卡因的混合物;

[0014] 所述定量试纸的样品结合垫包括二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮和可卡因的荧光微球标记多克隆抗体;

[0015] 所述定量试纸的NC膜上设置有四条定量检测线和一条质控线,所述定量检测线包括二乙酰吗啡定量检测线、甲基苯丙胺定量检测线、氯胺酮定量检测线和可卡因定量检测线,各自喷涂有二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮或可卡因;

[0016] 所述二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮和可卡因的荧光微球标记单克隆抗体中,标记的荧光微球各不相同。

[0017] 优选的,所述荧光微球选自稀土荧光微球、时间分辨荧光微球、二氧化硅荧光微球与单分散荧光微球中的一种或多种。

[0018] 优选的,所述定性试纸和定量试纸中,样品垫与样品结合垫有1/3长度的交叠,样品结合垫未与样品垫交叠的一端与NC膜有1/3长度的交叠,NC膜未与样品结合垫交叠的一端与吸水纸有1/3长度的交叠。

[0019] 优选的,所述质控线为IgG多克隆抗体。

[0020] 优选的,所述定性试纸中,样品结合垫上依次包括荧光微球标记的二乙酰吗啡单克隆抗体区、荧光微球标记的甲基苯丙胺单克隆抗体区、荧光微球标记的氯胺酮单克隆抗体区和荧光微球标记的可卡因单克隆抗体区。

[0021] 优选的,所述定量试纸中,定量检测线依次为二乙酰吗啡定量检测线、甲基苯丙胺定量检测线、氯胺酮定量检测线和可卡因定量检测线。

[0022] 优选的,所述二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮和可卡因的荧光微球标记多克隆抗体,是以二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮和可卡因作为抗原混合免疫得到的多克隆抗体经荧光微球标记得到的。

[0023] 本发明还提供了上述技术方案所述荧光免疫试纸组的制备方法,包括以下步骤:

[0024] S1、向结合垫喷涂独立的荧光微球标记的二乙酰吗啡单克隆抗体区、荧光微球标记的甲基苯丙胺单克隆抗体区、荧光微球标记的氯胺酮单克隆抗体区和荧光微球标记的可卡因单克隆抗体区,得到定性试纸的结合垫;向结合垫喷涂二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮和可卡因的荧光微球标记多克隆抗体,得到定量试纸的结合垫;

[0025] S2、向NC膜喷涂二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮和可卡因的混合物作为检测线、喷涂IgG多克隆抗体作为质控线,得到定性试纸的NC膜;向NC膜分别喷涂二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮和可卡因作为二乙酰吗啡定量检测线、甲基苯丙胺定量检测线、氯胺酮定量检测线和可卡因定量检测线,喷涂IgG多克隆抗体作为质控线,得到定量试纸的NC膜;

[0026] S3、由下到上依次将样品垫、定性试纸的结合垫、定性试纸的NC膜以及吸水纸组装,得到定性试纸;由下到上依次将样品垫、定量试纸的结合垫、定量试纸的NC膜以及吸水纸组装,得到定量试纸;

[0027] S4、将定性试纸和定量试纸组装在同一样品板上,得到荧光免疫试纸组。

[0028] 优选的,所述定量试纸中,各定量检测线之间的间距为0.8~2mm;所述定量试纸的定量检测线和质控线的间距不低于8mm。

[0029] 本发明还提供了一种同步检测二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮和可卡因四种毒品的荧光免疫方法,包括如下步骤:

[0030] (1) 将待测样品滴加到权利要求1~7任意一项所述技术方案所述的荧光免疫试纸组中的定性试纸的样品垫,孵育后检测质控线和检测线的荧光强度,同时设置空白对照组;

[0031] 若定性试纸检测线的荧光信号低于空白对照且质控线有荧光信号,则判断待测样品中含有二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮和可卡因中的一种或多种;

[0032] 若定性试纸检测线的荧光信号强度与空白对照相同且质控线有荧光信号,则判断待测样品无二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮和可卡因;

[0033] (2) 分别绘制二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮或可卡因的浓度与其相应定量检测线的荧光强度的标准曲线;

[0034] (3) 将步骤(1)中判断含有二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮和可卡因中一种或多种的待测样品滴加到所述定量试纸的样品垫,孵育后检测定量检测线和质控线的荧光强度,根据标准曲线计算样品中二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮和可卡因的一种或多种的浓度。

[0035] 与现有技术相比,本发明的有益效果:

[0036] 本发明提供了一种同步检测二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮和可卡因的荧光免疫试纸组,包括定性试纸和定量试纸;定性试纸的样品垫分别设置有独立的四种毒品的荧光微球标记单克隆抗体区,检测线喷涂有四种毒品的混合物;定量试纸的样品垫设置有四种毒品混合免疫得到的多克隆抗体,NC膜上则分别喷涂四种毒品抗原作为四条定量检测线。本发明采用竞争法的原理:在定性试纸的检测中,样品中若存在待测的四种毒品就会分别与其相应结合垫上的荧光微球标记的单克隆抗体进行特异性反应,所产生的结合物经过定性试纸的检测线时不会与抗原结合,导致检测线的荧光强度降低或消失,从而确定待测样品中是否含有待测的四种毒品;在定量试纸的检测中,经过定性试纸检测为含有待测毒品的样品继续进行定量检测,待测样品中的毒品经过结合垫时与其中的荧光微球标记多克隆抗体发生特异性结合,结合物经过NC膜时依次经过四个定量检测线与其中的毒品结合,通过绘制各定量检测线的荧光强度与已知样品浓度的标准曲线后,即可计算待测样品中的四种待测毒品浓度。

[0037] 本发明提供的荧光免疫试纸组可同时测定四种毒品,并且结合定性试纸和定量试纸后一次性实现定性和定量检测的需要,省时省力,对毒品执法的现场检测具有重大意义。

[0038] 利用本发明提供的荧光免疫试纸组进行检测,灵敏度高(可达到100ng/mL),特异性强,准确度高(达到99%以上)。对专业知识以及操作水平要求低,更适宜毒品执法现场

检测的需求,对吸毒人群的快速初筛具有重要意义。

### 附图说明

[0039] 图1为同步定量检测二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮与可卡因四种毒品的荧光免疫试纸组的正面图;

[0040] 图2为荧光免疫试纸的定性试纸侧面图;

[0041] 图3为荧光免疫试纸的定量试纸侧面图;

[0042] 其中,左侧为定性试纸,右侧为定量试纸;1-1为定性试纸的样品垫,1-2为定量试纸的样品垫,2-1为荧光微球标记的海洛因单克隆抗体结合垫区,2-2为为荧光微球标记的冰毒单克隆样品结合垫区,2-3为为荧光微球标记的氯胺酮单克隆抗体结合垫区,2-4为为荧光微球标记的可卡因单克隆抗体结合垫区,2-5为定量试纸的结合垫;3-1为定性试纸NC膜,3-2为定量试纸NC膜,4-1为定性试纸质控线,4-2为定量试纸质控线;5-1为定性试纸检测线,5-2为定量试纸的海洛因定量检测线,5-3为冰毒定量检测线,5-4为氯胺酮定量检测线,5-5为可卡因定量检测线,6-1为定性试纸吸水纸,6-2为定量试纸吸水纸,7-1为定性试纸PVC底板,7-2为定量试纸PVC底板,8为样品板。

### 具体实施方式

[0043] 本发明提供了一种同步检测二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮和可卡因的荧光免疫试纸组,包括定性试纸和定量试纸;

[0044] 所述定性试纸和定量试纸由下至上依次包括样品垫、样品结合垫、NC膜和吸水纸;

[0045] 所述定性试纸的样品结合垫包括独立的荧光微球标记的二乙酰吗啡单克隆抗体区、荧光微球标记的甲基苯丙胺单克隆抗体区、荧光微球标记的氯胺酮单克隆抗体区和荧光微球标记的可卡因单克隆抗体区;

[0046] 所述定性试纸的NC膜上设置有一条定性检测线和一条质控线,所述定性检测线为二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮和可卡因的混合物;

[0047] 所述定量试纸的样品结合垫包括二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮和可卡因的荧光微球标记多克隆抗体;

[0048] 所述定量试纸的NC膜上设置有四条定量检测线和一条质控线,所述定量检测线包括二乙酰吗啡定量检测线、甲基苯丙胺定量检测线、氯胺酮定量检测线和可卡因定量检测线,各自喷涂有二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮或可卡因;

[0049] 所述二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮和可卡因的荧光微球标记单克隆抗体中,标记的荧光微球各不相同。

[0050] 在本发明所述定性试纸和定量试纸中,为了能够使样品进行充分的吸收与反应,所述样品垫与样品结合垫之间优选的有1/3长度的交叠,样品结合垫未与样品垫交叠的一端与NC膜优选的有1/3长度的交叠,NC膜未与样品结合垫交叠的一端与吸水纸优选的有1/3长度的交叠。

[0051] 在本发明中,所述样品垫的材质优选为玻璃纤维膜。样品垫用于滴加样品。为了提高检测的灵敏度、减少样本差异性,本发明优选的将样品垫浸泡于样品垫预处理溶液后

干燥;按质量百分比计,所述样品垫预处理溶液包括 1~5%BSA、1~4%蔗糖、0.5~2%吐温-20、0.01~0.05%叠氮钠、0.1~0.5% PVPK-30和余量的水;更优选的包括3%BSA、2.5%蔗糖、1%吐温-20、0.02% 叠氮钠、0.3%PVPK-30和余量的水。在本发明中,所述浸泡时间优选为 20~50min,更优选为30~40min。

[0052] 在本发明中,所述样品结合垫的材质优选为玻璃纤维。样品结合垫喷涂有待测四种毒品的单克隆抗体或多克隆抗体,以便待测样品与样品结合垫上的单克隆抗体或多克隆抗体结合。在本发明所述的定性试纸中,所述样品结合垫上优选的依次(从样品垫至NC膜方向)喷涂荧光微球标记的二乙酰吗啡单克隆抗体、荧光微球标记的甲基苯丙胺单克隆抗体、荧光微球标记的氯胺酮单克隆抗体和荧光微球标记的可卡因单克隆抗体。

[0053] 在本发明中,用于标记所述单克隆抗体的荧光微球包括但不限于稀土荧光微球、时间分辨荧光微球、二氧化硅荧光微球与单分散荧光微球中的四种。在本发明中,用于标记二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮和可卡因的多克隆抗体的荧光微球包括但不限于稀土荧光微球、时间分辨荧光微球、二氧化硅荧光微球与单分散荧光微球中的任意一种或多种。在本发明中,进行荧光微球标记时,优选的采用EDC和NHS溶液对荧光微球进行活化,所述EDC和NHS溶液优选的浓度均为5mg/mL。

[0054] 在本发明中,所述样品结合垫在喷涂单克隆抗体或多克隆抗体前,优选的以缓冲液进行预处理;所述缓冲液包括质量体积分数15~30%蔗糖、质量体积分数1~6%小牛血清白蛋白和0.02~0.1M的Tris-HCl缓冲液;更优选的包括质量体积分数20%蔗糖、质量体积分数2%小牛血清白蛋白和0.05M的 Tris-HCl缓冲液。在本发明中,所述缓冲液预处理的时间优选为1.5~4h,更优选为2h,以缓冲液预处理后干燥即可。

[0055] 在本发明中,所述荧光微球标记的二乙酰吗啡单克隆抗体、荧光微球标记的甲基苯丙胺单克隆抗体、荧光微球标记的氯胺酮单克隆抗体或荧光微球标记的可卡因单克隆抗体来源于市售商品或自行制备均可。所述自行制备时,本发明优选的以二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮或可卡因为抗原对动物进行免疫,得到二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮或可卡因的单克隆抗体后再以荧光微球标记即可。

[0056] 在本发明中,所述二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮和可卡因的荧光标记多克隆抗体可与二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮和可卡因四种毒品进行特异性结合,可来源于市售商品或自行制备。在本发明中,所述二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮和可卡因的荧光微球标记多克隆抗体的制备优选的为:以二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮和可卡因作为抗原,混合后共同免疫同一动物而得到的多克隆抗体,再以荧光微球标记即可。

[0057] 在本发明中,所述定性试纸中,NC膜上包括一条检测线和一条质控线,所述的检测线为二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮和可卡因的混合物,用于与“样品-荧光微球单克隆抗体”的结合物进行竞争性结合,从而将该结合物固定在检测线位置,若样品中不含有待测的四种毒品,则检测线中的四种毒品能够与样品垫中的相应荧光微球标记单克隆抗体结合,使得检测线存在较高的荧光强度;反之,样品中含有待测的四种毒品的情况下检测线的荧光强度会相应的降低。因此,本发明通过检测线的荧光强度大小即可对样品中是否含有待测的四种毒品进行定性,简单方便,可快速确定和排除吸毒人员。在具体的检测环境下,可以通过空白样品作为对照,从而比较定性试纸中的检测线荧光强度变化。

[0058] 在本发明中,所述定量试纸中,NC膜上包括四条定量检测线和一条质控线,所述

的四条定量检测线分别为二乙酰吗啡定量检测线、甲基苯丙胺定量检测线、氯胺酮定量检测线和可卡因定量检测线,各自喷涂有二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮或可卡因。所述的四条定量检测线为四种毒品的抗原,各自独立设置,以便区分具体是哪种毒品以及毒品浓度。定量检测时,所述四条检测线分别的可以与“样品-荧光标记多克隆抗体”进行特异性结合,当“样品-荧光微球标记多克隆抗体”经过每一条定量检测线时,则该条定量检测线上的毒品抗原与其中的多克隆抗体发生特异性结合,若样品中不含该种毒品,则该条定量检测线上的抗原全部与荧光微球标记多克隆抗体结合,此时荧光强度最高;若样品中含有该种病毒,则该条定量检测线上的抗原能够结合的荧光微球标记多克隆抗体减少,从而荧光强度降低。因此,通过已知浓度的毒品与检测线上荧光强度大小的标准曲线,即可计算相应的样品中所含该种毒品的浓度,实现定量检测。

[0059] 在本发明中,所述四条定量检测的排列顺序优选的依次(从样品结合垫到NC膜方向)为二乙酰吗啡定量检测线、甲基苯丙胺定量检测线、氯胺酮定量检测线和可卡因定量检测线。

[0060] 在本发明中,所述质控线均为IgG多克隆抗体。在定性检测和定量检测中,未与检测线结合的部分单克隆抗体或多克隆抗体经过质控线时,能够与IgG多克隆抗体结合,从而产生荧光强度。本发明设置质控线的目的是为了 防止试纸条本身失效,当质控线无荧光强度时,则检测结果无效。

[0061] 在本发明中,从样品结合垫至NC膜方向,依次排列为检测线、质控线。

[0062] 在本发明中,所述试纸组还包括底板,用于将定性试纸和定量试纸一同固定。在本发明中,所述底板为不吸水材质,优选为PVC。

[0063] 本发明还提供了上述技术方案所述荧光免疫试纸组的制备方法,包括以下步骤:

[0064] S1、向结合垫喷涂独立的荧光微球标记的二乙酰吗啡单克隆抗体区、荧光微球标记的甲基苯丙胺单克隆抗体区、荧光微球标记的氯胺酮单克隆抗体区和荧光微球标记的可卡因单克隆抗体区,得到定性试纸的结合垫;向结合垫喷涂二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮和可卡因的荧光微球标记多克隆抗体,得到定量试纸的结合垫;

[0065] S2、向NC膜喷涂二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮和可卡因的混合物作为检测线、喷涂IgG多克隆抗体作为质控线,得到定性试纸的NC膜;向NC膜分别喷涂二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮和可卡因作为二乙酰吗啡定量检测线、甲基苯丙胺定量检测线、氯胺酮定量检测线和可卡因定量检测线,喷涂IgG多克隆抗体作为质控线,得到定量试纸的NC膜;

[0066] S3、由下到上依次将样品垫、定性试纸的结合垫、定性试纸的NC膜以及吸水纸组装,得到定性试纸;由下到上依次将样品垫、定量试纸的结合垫、定量试纸的NC膜以及吸水纸组装,得到定量试纸;

[0067] S4、将定性试纸和定量试纸组装在同一样品板上,得到荧光免疫试纸组。

[0068] 在本发明中,为了进一步提高定量检测的精确度、减少误差,所述定量试纸中,各定量检测线之间的间距优选为0.8~2mm,更优选为1mm;所述定量试纸的定量检测线和质控线的间距优选的不低于8mm。

[0069] 本发明还提供了一种同步检测二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮和可卡因四种毒品的荧光免疫方法,包括如下步骤:

[0070] (1) 将待测样品滴加到前述技术方案所述的荧光免疫试纸组中的定性试纸的样

品垫,孵育后检测质控线和检测线的荧光强度,同时设置空白对照组;

[0071] 若定性试纸检测线的荧光信号低于空白对照且质控线有荧光信号,则判断待测样品中含有二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮和可卡因中的一种或多种;

[0072] 若定性试纸检测线的荧光信号强度与空白对照相同且质控线有荧光信号,则判断待测样品无二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮和可卡因;

[0073] (2) 分别绘制二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮或可卡因的浓度与其相应定量检测线的荧光强度的标准曲线;

[0074] (3) 将步骤(1)中判断含有二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮和可卡因中一种或多种的待测样品滴加到所述定量试纸的样品垫,孵育后检测定量检测线和质控线的荧光强度,根据标准曲线计算样品中二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮和可卡因的一种或多种的浓度。

[0075] 在本发明中,用于检测的待测样品取用量优选的在80~200 $\mu$ L/次。在本发明中,待测样品可以是固体或液体,若待测样品为固体则以水或有机溶剂溶解后再进行检测,例如可能混有待测毒品的面粉等;待测样品可以是可能含有待测毒品的体液、饮料等。

[0076] 利用本发明所述的试纸组进行检测的灵敏度高、准确度高,操作简便,适宜现场检测。

[0077] 下面结合实施例对本发明提供的技术方案进行详细的说明,但是不能把它们理解为对本发明保护范围的限定。

[0078] 实施例1

[0079] 本发明所述用于同时检测二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮和可卡因四种毒品的试纸组包括定性试纸和定量试纸构成。定性试纸和定量试纸的结构由下到上依次为样品垫、结合垫、NC膜与吸水纸。样品垫、结合垫、NC膜和吸水纸均粘附在PVC底板上。样品垫与结合垫均由玻璃纤维膜构成,反应膜则为硝酸纤维素膜,吸水纸即为强力吸水纸。具体结构如图1所示。

[0080] 1、定性试纸的制备:

[0081] 定性试纸条的样品垫分为独立的四个区,依次为荧光微球标记的二乙酰吗啡单克隆抗体区、荧光微球标记的甲基苯丙胺单克隆抗体区、荧光微球标记的氯胺酮单克隆抗体区和荧光微球标记的可卡因单克隆抗体区;NC膜上依次喷涂有检测线和质控线,检测线为二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮和可卡因的混合物。

[0082] 1) 单克隆抗体的制备

[0083] 分别采用乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮或可卡因的合成抗原通过腹部注射的方式来免疫BALB/c小鼠,再通过制备杂交瘤细胞并利用杂交瘤细胞在小鼠体内进行单抗的大规模生产。生产出的单克隆抗体还得需要辛酸-硫酸铵沉淀法来进行纯化,最终得到二乙酰吗啡单克隆抗体、甲基苯丙胺单克隆抗体、氯胺酮单克隆抗体、可卡因单克隆抗体。

[0084] 2) 荧光微球-抗体结合物的制备

[0085] 用PBS溶液将荧光微球颗粒溶解,并加入EDC和NHS溶液进行活化,将其复合物放置于37 $^{\circ}$ C培养箱1h,离心收集沉淀备用。将步骤1)制备的各种单克隆抗体,分别与活化后的荧光微球进行结合,震荡摇匀后离心去上清,将沉淀用PBS洗涤至少2次,超声处理后加入PBS缓冲液放置4 $^{\circ}$ C冰箱即可。

[0086] 3) 样品垫的制备

[0087] 样品垫的材质为玻璃纤维膜,将其浸泡于化学物质(3%BSA、2.5%蔗糖、1%吐温-20、0.02%叠氮钠以及0.3%的PVVPK-30)中半小时,充分干燥备用。从而提高灵敏度,减少样本的差异性。

[0088] 4) 结合垫的制备

[0089] 结合垫为玻璃纤维膜,提前利用缓冲液(20%蔗糖、2%的小牛血清白蛋白、0.05%M的Tris-Hcl)进行2h的处理,处理完后37℃干燥备用。将步骤2)制备的四种毒品的荧光微球-单克隆抗体分别喷到样品结合垫的相应区域上,随后将其置于37℃下温育2h,取出后备用。

[0090] 5) NC膜的制备

[0091] 定性试纸条NC膜上含有一条检测线与一条质控线,检测线喷涂海洛因抗原、冰毒抗原、氯胺酮抗原与可卡因抗原混合物。质控线为羊抗鼠IgG多抗,利用滑膜仪分别将检测线与质控线滑到NC膜上,每条检测线的间距为1mm。检测线与质控线的距离为8mm。将制备好的NC膜放置37℃下干燥1h备用。

[0092] 2、定量试纸的制备:

[0093] 定量试纸条的样品垫为二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、荧光氯胺酮和可卡因的荧光微球标记多克隆抗体;NC膜上依次喷涂有四条检测线和一条质控线,检测线依次为二乙酰吗啡定量检测线、甲基苯丙胺定量检测线、氯胺酮定量检测线和可卡因定量检测线。

[0094] 1) 单克隆抗体的制备

[0095] 采用乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮或可卡因的合成抗原混合后腹部注射的方式来免疫BALB/c小鼠,再通过制备杂交瘤细胞并利用杂交瘤细胞在小鼠体内进行单抗的大规模生产。生产出的多克隆抗体还得需要辛酸-硫酸铵沉淀法来进行纯化,最终得到二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮和可卡因的多克隆抗体。

[0096] 2) 荧光微球-抗体结合物的制备

[0097] 用PBS溶液将荧光微球颗粒溶解,并加入EDC和NHS溶液进行活化,将其复合物放置于37℃培养箱1h,离心收集沉淀备用。将步骤1)制备的多克隆抗体,分别与活化后的荧光微球进行结合,震荡摇匀后离心去上清,将沉淀用PBS洗涤至少2次,超声处理后加入PBS缓冲液放置4℃冰箱即可。

[0098] 3) 样品垫的制备

[0099] 样品垫的材质为玻璃纤维膜,将其浸泡于化学物质(3%BSA、2.5%蔗糖、1%吐温-20、0.02%叠氮钠以及0.3%的PVVPK-30)中半小时,充分干燥备用。从而提高灵敏度,减少样本的差异性。

[0100] 4) 结合垫的制备

[0101] 结合垫为玻璃纤维膜,提前利用缓冲液(20%蔗糖、2%的小牛血清白蛋白、0.05%M的Tris-Hcl)进行2h的处理,处理完后37℃干燥备用。将步骤2)制备的荧光微球-多克隆抗体喷到样品结合垫上,随后将其置于37℃下温育2h,取出后备用。

[0102] 5) NC膜的制备

[0103] 定性试纸条NC膜上含有四条检测线与一条质控线,分别喷涂海洛因抗原、冰毒抗原、氯胺酮抗原与可卡因抗原作为四条检测。质控线为羊抗鼠IgG多抗,利用滑膜仪分别将

检测线与质控线滑到NC膜上,四条检测线从下到上依次含有海洛因抗原、冰毒抗原、氯胺酮抗原与可卡因抗原。每条检测线的间距为1mm。海洛因检测线与质控线的距离为8mm。将制备好的NC膜放置37℃下干燥1h备用。

[0104] 按照由下到上依次为样品垫、样品结合垫、NC膜和吸水纸的顺序进行组装,得到定量试纸和定性试纸。其中,结合垫下侧的1/3位于样品垫的下方,上侧的1/3位于NC膜的上方,这样有利于样品更好地吸收与结合。样品垫、结合垫、NC膜和吸水纸均在PVC底板上。

[0105] 试纸条组装完成后将其切割为6mm宽度大小,随后安装到检测用卡壳中,再将卡壳插入荧光检测仪中进行定量分析。

[0106] 实施例2标准曲线的制定

[0107] 将标准品的浓度与最终的检测荧光强度做标准曲线,这样就可以通过样品的荧光强度来进行定量分析。

[0108] 将已知浓度的二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮和可卡因分别稀释到如下浓度系列:1000ng/mL、500ng/mL、250ng/mL、100ng/mL、50ng/mL、25ng/mL、10ng/mL、0ng/mL。

[0109] 取100μL各浓度的样品滴加到实施例1构建的定量试纸的样品垫上,25℃下静置5min;用免疫荧光分析仪对反应完成的试纸中的检测线和质控线进行荧光强度大小的检测。重复测定3次,分别将所得到的荧光强度信号T/C值作为纵坐标。将浓度作为横坐标做标准曲线。将其写入仪器的系统中以便以后进行定量分析。

[0110] 二乙酰吗啡的标准曲线为 $y=6E-06x^2-0.0089x+5.4502$ , $R^2$ 为0.9786。

[0111] 甲基苯丙胺的标准曲线为 $y=3E-06x^2-0.0044x+4.7449$ , $R^2$ 为0.9811。

[0112] 氯胺酮的标准曲线为 $y=2E-06x^2-0.0033x+3.7098$ , $R^2$ 为0.9732。

[0113] 可卡因的标准曲线为 $y=5E-06x^2-0.0077x+4.1097$ , $R^2$ 为0.9908。

[0114] 1、灵敏度测定

[0115] 利用试纸组的定量试纸进行灵敏度的测定,从高浓度到低浓度进行荧光强度的观察,当呈现阴性时即为检测线。阴性时T线的荧光强度强于C线,所以,将定量试纸的检测线与C线进行比较,来确定4种毒品分别的检测线。最终得出二乙酰吗啡的灵敏度为100ng/mL,甲基苯丙胺的灵敏度为500ng/mL,氯胺酮的灵敏度为500ng/mL,可卡因的灵敏度为100ng/mL。

[0116] 2、特异性测定

[0117] 通过试纸组的定性试纸即可测定试纸的特异性。分别取芬太尼、曲马多、阿司匹林、氟哌酸、黄连素、二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮、可卡因、苯巴比妥、奥复沙星、扑热息痛、正通宁片、洛非西丁、纳洛酮、可乐宁与阿普唑仑等17种药物与毒品进行特异性测定。结果显示,只有二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮和可卡因呈现阳性结果,其余的均为阴性,未发生交叉反应。结果表明,本试纸组对二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮和可卡因的检测具有较强的特异性。

[0118] 实施例3

[0119] 在某娱乐场所随机抽取50个人进行其尿液的测定,取100μL尿液样品加到实施例1构建的试纸组的定性试纸样品垫上,25℃下静置5min,采用免疫荧光分析仪检测定性试纸的检测线和质控线,并以清水作为对照组。若样品的检测线荧光强度低于对照组、并且质控线有荧光强度,则判断该样品中含有二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮和可卡因中的

一种或多种,记为阳性;反之,若样品的检测线荧光强度与对照组相同、且质控线有荧光强度,则判断该样品不含有二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮和可卡因,记为阴性。

[0120] 经过检测得出,有3个人的尿样呈阳性结果。将这50份尿液样本送往公安机关进行详细检测,检测结果与本发明的试纸条检测结果一致,证实本发明的定性检测的准确度很高,能够进行现场的初筛工作,并且对操作人员没有特别大难度的技术要求。

[0121] 实施例4

[0122] 从戒毒所中选取25个人的血液样本进行定性分析。分别取100 $\mu$ L上述25份血液样本,分别滴加到实施例1构建的定量试纸的样品垫上,25 $^{\circ}$ C下静置5min;以免疫荧光分析仪对反应完成的试纸中的检测线和质控线进行荧光强度大小的检测。

[0123] 进行分析,首先通过观察这四种检测线的变化情况来确定其吸食毒品种类,再与戒毒所所提供的数据进行对比,结果显示一致。

[0124] 随后进行定量分析,利用荧光分析仪将最开始测定的浓度进行记录,随后进行为期一个月的监测诊断,每天均抽取吸食者的血液进行毒品浓度的监测。通过一个月的监测,发现大部分吸食者体内的毒素浓度明显降低,并且这一个月检测结果与戒毒所提供的结果大致相同。本发明提供的试纸组与戒毒所采用的检测仪器相比,对操作人员技术要求低,并且方便快捷,能够实时检测吸食者体内的毒素水平,并根据实际情况采取相应的措施。

[0125] 由以上实施例可知,本发明提供的试纸组可快速、同时完成对二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮和可卡因四种毒品的现场检测,准确度高(与实验室仪器检测结果相符),定量检测结果准确,简单便携,易于操作。

[0126] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

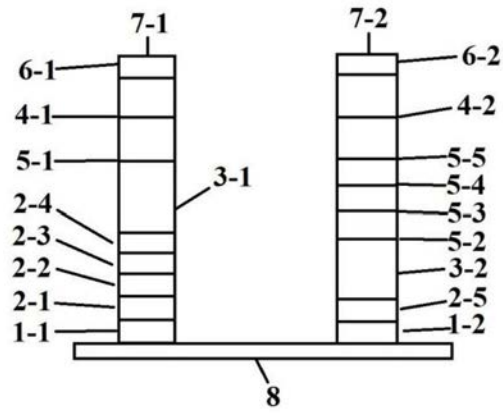


图1

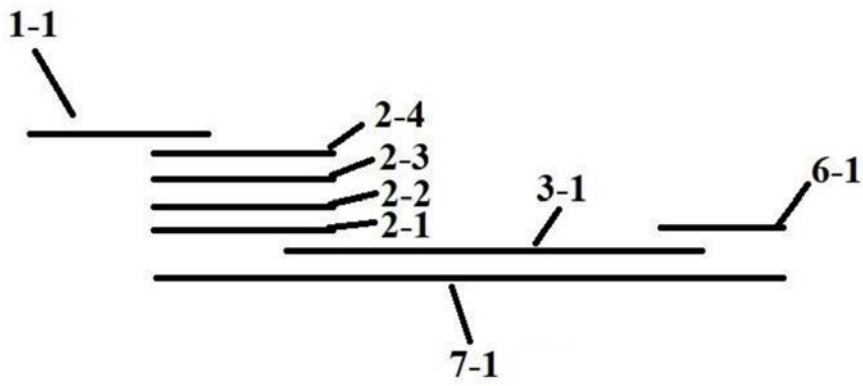


图2

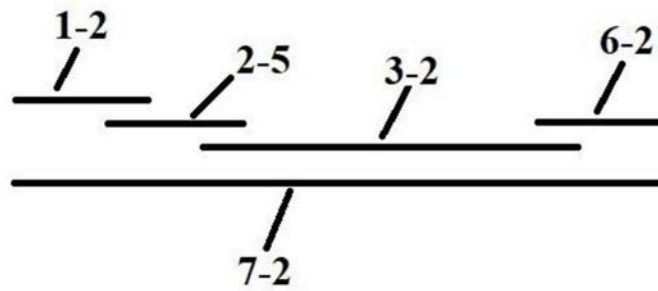


图3

|         |  |         |            |
|---------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 同步检测二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮和可卡因的荧光免疫试纸组及其制备和使用方法       |         |            |
| 公开(公告)号 | <a href="#">CN110058012A</a>                   | 公开(公告)日 | 2019-07-26 |
| 申请号     | CN201910275940.4                               | 申请日     | 2019-04-08 |
| [标]发明人  | 李晓春<br>李森                                      |         |            |
| 发明人     | 李晓春<br>李森                                      |         |            |
| IPC分类号  | G01N33/533 G01N33/543                          |         |            |
| CPC分类号  | G01N33/533 G01N33/54313                        |         |            |
| 代理人(译)  | 赵晓琳  |         |            |
| 外部链接    | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a> |         |            |

摘要(译)

本发明提供一种同步检测二乙酰吗啡、甲基苯丙胺、氯胺酮和可卡因的荧光免疫试纸组及其制备和使用方法，涉及生物医药技术领域，本发明所述荧光免疫试纸组，包括定性试纸和定量试纸；定性试纸的样品垫分别设置有独立的四种毒品的荧光微球标记单克隆抗体区，检测线喷涂有四种毒品的混合物；定量试纸的样品垫设置有四种毒品混合免疫得到的多克隆抗体，NC膜上则分别喷涂四种毒品抗原作为四条定量检测线。本发明提供的荧光免疫试纸组可同时测定四种毒品，并且结合定性试纸和定量试纸后一次性实现定性和定量检测的需要，省时省力，对毒品执法的现场检测具有重大意义。

