

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/566 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910085054.1

[43] 公开日 2009年10月14日

[11] 公开号 CN 101556280A

[22] 申请日 2009.5.20

[21] 申请号 200910085054.1

[71] 申请人 江西中德生物工程有限公司

地址 330029 江西省南昌市高新区高新一路
建昌工业园海外大厦南 306

[72] 发明人 陈雪岚 赖卫华 熊勇华 魏 华
李 林

[74] 专利代理机构 北京三高永信知识产权代理有
限责任公司

代理人 江崇玉

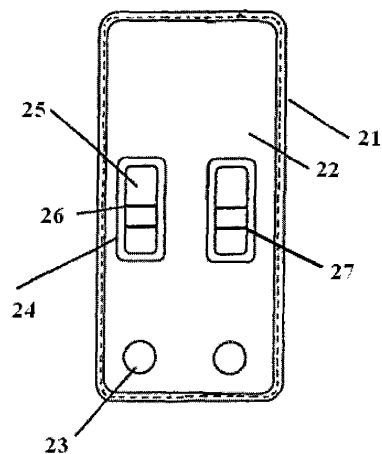
权利要求书 3 页 说明书 7 页 附图 2 页

[54] 发明名称

检测氯胺酮和甲基苯丙胺的荧光微球免疫层析检测卡及其制备方法

[57] 摘要

本发明公开了一种检测氯胺酮和甲基苯丙胺的荧光微球免疫层析检测卡及其制备方法。该检测卡为双卡型，一张检测氯胺酮，另一张检测甲基苯丙胺，从而实现对氯胺酮和甲基苯丙胺的同时检测。其构成依次包括滤纸、样本垫、玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜和吸水纸，所述的玻璃纤维膜上喷涂有荧光微球标记的抗体；所述的硝酸纤维素膜上固定有检测区和质控区；本发明以二氧化硅与荧光物质复合的核壳双结构发光纳米粒子为标记，采用免疫层析技术，实现氯胺酮和甲基苯丙胺快速免疫分析。在检测过程中，采用荧光微球最佳激发光源进行激发，发射出的荧光通过滤光片装置后用肉眼观察检测线是否有荧光物质，本发明的优点是灵敏度高、检测快速、操作方便、经济实用。



1. 一种检测氯胺酮和甲基苯丙胺的荧光微球免疫层析检测卡，其特征在于：包括用于检测氯胺酮的试纸条 A 和用于检测甲基苯丙胺的试纸条 B；所述试纸条 A 和试纸条 B 均包括在底板上依次搭接地粘贴的滤纸、样本垫、玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜和吸水纸，所述的玻璃纤维膜上喷涂有荧光微球垫；所述的硝酸纤维素膜上固定有检测区和质控区；所述试纸条 A 的玻璃纤维膜上喷涂的荧光微球垫为荧光微球标记的抗氯胺酮抗体，其硝酸纤维素膜上的检测区喷涂有载体蛋白质与氯胺酮的偶联抗原；所述试纸条 B 的玻璃纤维膜上喷涂的荧光微球垫为荧光微球标记的抗甲基苯丙胺抗体，其硝酸纤维素膜上的检测区喷涂有载体蛋白质与甲基苯丙胺的偶联抗原；所述试纸条 A 和试纸条 B 的质控区都固定有抗鼠抗体。

2. 根据权利要求 1 所述的检测氯胺酮和甲基苯丙胺的荧光微球免疫层析检测卡，其特征在于：所述荧光微球是直径为 $0.01\sim 1\mu\text{m}$ 的用二氧化硅包裹荧光物质的微球，其表面连接有活性基团，或与链霉亲和素偶联；所述荧光物质包括有机或无机的荧光物质或多种荧光物质的掺和物以及量子点。

3. 根据权利要求 2 所述的检测氯胺酮和甲基苯丙胺的荧光微球免疫层析检测卡，其特征在于：所述的活性基团为 $-\text{CHO}$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 或 $-\text{SH}$ ；所述的荧光物质为菲啉联钉有机染料、异硫氰根荧光素、异硫氰根罗丹明、6-羧基荧光素酰胺酯、3, 6-二乙氧基芘烷、3-二乙基氨基-7-(2'-氯苯胺基)芘烷、洛丹明 B、洛丹明 110、洛丹明 123 和洛丹明 10、1, 8-萘二酰亚胺 4-位被烷氧基或芳氧基取代的荧光物质、1, 8-萘二酰亚胺中引入磺酸基，羧基和季铵盐水溶性基团的荧光染料、1, 8-萘酸酐与邻苯二胺缩合所得到的匹苾酮类荧光材料、三氟甲醛香豆素、双荧光团香豆素、1, 2, 3, 3-四甲基吲哚基团香豆素有机荧光染料或其掺和物以及量子点。

4. 根据权利要求 1 所述的检测氯胺酮和甲基苯丙胺的荧光微球免疫层析检测卡的制备方法，其特征在于，免疫层析试纸条制备步骤包括：

(1) 荧光微球垫的制备：用市售的荧光微球来标记抗氯胺酮和抗甲基苯丙胺抗体，并将其喷涂在玻璃纤维膜上得到荧光微球垫；

(2) 检测区和质控区的制备：将载体蛋白质与氯胺酮的偶联抗原或载体蛋白质与甲基苯丙胺的偶联抗原喷涂到硝酸纤维素膜上的检测区范围，制成检测区，将抗鼠抗体喷涂到硝酸纤维素膜上的质控区范围，制成质控区；

(3) 组装和剪切：在粘性底板上依次搭接地粘贴滤纸、样本垫、喷涂有荧光微球

垫的玻璃纤维膜、固定有检测区和质控区的硝酸纤维素膜及吸水纸，并剪切成所需的宽度即成为免疫层析试纸条；

按照上述步骤分别制得试纸条 A 和试纸条 B。

5. 根据权利要求 4 所述的检测氯胺酮和甲基苯丙胺的荧光微球免疫层析检测卡的制备方法，其特征在于，所述荧光微球垫的制备方法如下：

取荧光微球在 $1000\times g$ 离心 $10\sim 15$ min，离心后收集沉淀，用 0.01 M pH 4.8 的硼酸盐缓冲液调节微球浓度为 $OD_{450}=0.2$ ，然后分别加入 $20\sim 100$ mg/ml 对乙基-N,N-二甲基丙基碳二亚胺 $100\mu\text{l}$ ， $2\sim 20$ mg/ml 氮羟基琥珀酰亚胺 $100\mu\text{l}$ ，再加入 0.01 M pH 4.8 的硼酸盐缓冲液，振荡混匀，室温孵育 $10\sim 30$ min 后， $1000\times g$ 离心 $5\sim 15$ min，沉淀用 0.01 M pH 7~8 的硼酸盐缓冲液重悬，并调节微球浓度为 OD_{450} 在 $0.2\sim 1.0$ ，在 0.1 ml 的该荧光微球中加入 $1\sim 10$ μg 抗氯胺酮抗体或抗甲基苯丙胺抗体，充分混匀后，室温搅拌反应 $1\sim 4$ h，超纯水离心洗涤 $2\sim 5$ 次，用 0.01 M pH 7.2 磷酸盐缓冲液复溶沉淀至起始体积后，用 BIODOT 操作平台喷涂至玻璃纤维膜上， 25°C 真空干燥 $1\sim 2$ h，置于干燥环境中备用。

6. 根据权利要求 4 所述的检测氯胺酮和甲基苯丙胺的荧光微球免疫层析检测卡的制备方法，其特征在于，所述硝酸纤维素膜上检测区和质控区的制备方法如下：

用 0.01 M pH 7.4 磷酸盐缓冲液分别调节载体蛋白质和氯胺酮的偶联抗原、载体蛋白质和甲基苯丙胺的偶联抗原和抗鼠抗体的浓度为 $0.5\sim 8.0$ mg/ml，喷膜量为 0.7 $\mu\text{l}/\text{cm}$ ，检测区喷涂载体蛋白质和氯胺酮的偶联抗原或载体蛋白质和甲基苯丙胺的偶联抗原，质控区喷涂抗鼠抗体，两区相隔 5 mm，质控区距离硝酸纤维素膜一端 2 mm， 37°C 烘干过夜后，在室温干燥环境下保存备用。

7. 根据权利要求 4 所述的检测氯胺酮和甲基苯丙胺的荧光微球免疫层析检测卡的制备方法，其特征在于，免疫层析检测卡的制备方法如下：

将试纸条 A 和试纸条 B 两张免疫层析试纸条并排固定在底卡上，试纸条表面用面卡压紧，所述面卡上预留加样孔和观察窗，加样孔的位置与试纸条的样本垫对应，观察窗的位置与试纸条的硝酸纤维素膜对应，所述底卡和面卡为塑料卡。

8. 用权利要求 1、2 或 3 所述的检测卡定性检测氯胺酮和甲基苯丙胺的方法，其特征在于，包括以下步骤：

(1) 在免疫层析检测卡的两个加样孔中分别加入待检样本，反应 $3\sim 20$ min 后，将检测卡放入简易荧光分析仪窗口检测；

(2) 荧光微球在激发光源下，发出强烈的荧光条带；

(3) 发射的荧光经滤除杂光后，用肉眼观察是否有荧光信号；当样本中不含有被检测物质时，检测区和质控区均出现一条荧光条带，即检测样本为阴性；当样本中含有过量被检测物质时，检测区无荧光条带，质控区有一条荧光条带，检测样本即为阳性。

检测氯胺酮和甲基苯丙胺的荧光微球免疫层析检测卡及其制备方法

技术领域

本发明属于缉毒检测领域，具体地说是涉及一种利用荧光微球免疫层析技术定性检测氯胺酮和甲基苯丙胺的检测卡及其制备方法。

背景技术

氯胺酮俗称“K粉”，是苯环己哌啶的衍生物，属N-甲基-D-天门冬氨酸受体拮抗物，是一种非巴比妥类麻醉剂。近年来，随着兴奋剂、 γ -羟基丁酸和大麻等与特殊的“社交”和“性环境”相关的“舞会药”在欧美国家的流行，K粉滥用的问题日益严重，本世纪初在我国开始出现K粉的滥用问题，且有越演越烈之势。有关资料显示，70mg K粉可引起中毒，大剂量200mg可产生幻觉，如进入温和而幻彩的世界，500mg可产生“濒死”状态，一种低氧、低血流量和短暂癫痫的状态。当K粉与其他软性毒品混合使用时，常以兴奋剂进入兴奋状态，再以K粉作为加强剂使用。目前，K粉多与摇头丸同案出现。

摇头丸的主要成分为甲基苯丙胺，俗称“冰毒”，属于兴奋剂类精神药品，具有强烈的中枢兴奋作用，应用于临床不久就开始泛滥，并被预言将逐步取代上世纪流行的鸦片、海洛因、大麻、可卡因等，成为21世纪滥用最为广泛的毒品。

当前，禁毒工作已成为我国政府的一项国策。在查禁毒品的工作中，不仅要从打击毒品的制造销售入手，而且还要加强对吸毒人员的检查。其中，对吸毒者的检查主要依赖于有效的检测方法。

目前，针对上述毒品的检测和监控方法包括确证法和筛查法两大类。确证法主要包括高效液相色谱、气相色谱、逆流色谱、离子色谱、离子阱质谱、等离子质谱、液质或气质联用等利用高端设备为辅助手段的方法。以上方法虽然敏感、特异、稳定，但是存在检测时间长，一般条件下检测通量不高，需要昂贵的设备支撑，因此确证法大多用于有疑问事件的仲裁；筛查方法一般是指快速检测方法。ELISA（酶联免疫吸附测定）以及胶体金免疫层析法是目前国际公认的主流技术，这两种方法具有检测速度快，价格便宜，操作简单等优点，是目前国内外检测毒品的主要监控方法。但ELISA检测仍需专业人员，且需要较长的时间显示结果；胶体金法一般情况下对氯胺酮和甲基苯丙胺能进行定性分析，检测时间比较短（10-15min）。目前国内使用的快速试剂，不管采用何种原理，由于其灵敏性限制，不能将样品进行多倍稀释，以至于样品中的干扰成分比较多，导致实际样品检测过程中会

产生假阴性或假阳性现象。

发明内容

本发明的一个目的是针对上述现有技术的不足之处，提供一种灵敏度高、操作简便、检测快速、价格低廉的能够同时检测氯胺酮和甲基苯丙胺的荧光微球免疫层析检测卡；本发明的另一个目的是提供上述检测卡的制备方法。

为了实现上述目的本发明采取的一个技术方案是：

提供一种同时检测氯胺酮和甲基苯丙胺的荧光微球免疫层析检测卡，该检测卡为双卡型，由两张免疫层析试纸条、底卡及面卡构成。一张试纸条 A 用于检测氯胺酮，另一张试纸条 B 用于检测甲基苯丙胺。免疫层析试纸条是在底板上依次搭接地粘贴滤纸、样本垫、玻璃纤维膜、NC 膜（硝酸纤维素膜）和吸水纸而制成的，所述的玻璃纤维膜上喷涂有荧光微球垫，所述的 NC 膜上固定有检测区和质控区；所述试纸条 A 的玻璃纤维膜上喷涂的荧光微球垫为荧光微球标记的抗氯胺酮抗体，其硝酸纤维素膜上检测区喷涂有载体蛋白质与氯胺酮的偶联抗原；所述试纸条 B 的玻璃纤维膜上喷涂的荧光微球垫为荧光微球标记的抗甲基苯丙胺抗体，其硝酸纤维素膜上的检测区喷涂有载体蛋白质与甲基苯丙胺的偶联抗原；所述试纸条 A 和试纸条 B 的质控区都固定有抗鼠抗体。

所述荧光微球是直径为 $0.01\sim 1\mu\text{m}$ 的用二氧化硅包裹荧光物质的微球，其表面连接有活性基团，或与链霉亲和素偶联；所述荧光物质包括有机或无机的荧光物质或多种荧光物质的掺和物以及量子点。

所述的活性基团为 $-\text{CHO}$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 或 $-\text{SH}$ ；所述的荧光物质为菲咯啉联钌有机染料、异硫氰根荧光素、异硫氰根罗丹明、6-羧基荧光素酰胺酯、3, 6-二乙氧基芘、3-二乙基氨基-7-(2'-氯苯胺基)芘、洛丹明 B、洛丹明 110、洛丹明 123 和洛丹明 10、1, 8-萘二酰亚胺 4-位被烷氧基或芳氧基取代的荧光物质、1, 8-萘二酰亚胺中引入磺酸基，羧基和季铵盐水溶性基团的荧光染料、1, 8-萘酸酐与邻苯二胺缩合所得到的匹苡酮类荧光材料、三氟甲醛香豆素、双荧光团香豆素、1, 2, 3, 3-四甲基吲哚基团香豆素有机荧光染料或其掺和物以及量子点。

本发明采取的另一个技术方案是提供一种上述检测氯胺酮和甲基苯丙胺的荧光微球免疫层析检测卡的制备方法，具体包括以下步骤：

1. 免疫层析试纸条的制备

(1) 荧光微球垫的制备

用荧光微球标记抗体，并将其喷涂在玻璃纤维膜上。

取市售的荧光微球在 $1000\times g$ 离心 10~15 min, 收集沉淀, 用 0.01 M pH 4.8 的硼酸盐缓冲液调节微球浓度为 $OD_{450}=0.2$, 然后分别加入 20~100 mg/ml 对乙基-N,N-二甲基丙基碳二亚胺 (EDC) 100 μ l, 2~20 mg/ml 氮羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 100 μ l, 再加入 0.01 M pH 4.8 的硼酸盐缓冲液, 振荡混匀, 室温孵育 10~30 min 后, $1000\times g$ 离心 5~15 min, 沉淀用 0.01 M pH 7~8 的硼酸盐缓冲液重悬, 并调节微球浓度为 OD_{450} 为 0.2~1.0, 在 0.1 ml 的该荧光微球中加入 1~10 μ g 抗氯胺酮抗体或抗甲基苯丙胺抗体, 充分混匀后, 室温搅拌反应 1~4 h, 超纯水离心洗涤 2~5 次, 沉淀用 0.01 M pH 7.2 PBS (磷酸盐缓冲液, 其中包含 5%蔗糖和 0.05% Tween-20) 复溶沉淀至起始体积后, 用 BIODOT 操作平台喷涂至玻璃纤维膜上, 25 $^{\circ}$ C 真空干燥 1~2 h, 放于干燥环境备用。

(2) 检测区和质控区的制备

分别将载体蛋白质和氯胺酮的偶联抗原或载体蛋白质和甲基苯丙胺的偶联抗原, 抗鼠抗体 (二抗) 喷到硝酸纤维素膜上, 制成检测区和质控区; 所述载体蛋白是牛血清白蛋白或卵清白蛋白。

用 0.01M pH 7.4 PBS (磷酸盐缓冲液, 其中包含 5%蔗糖和 0.05%吐温-20) 分别调节偶联抗原和二抗的浓度为 0.5~8.0 mg/ml, 喷膜量为 0.7 μ L/cm, 检测区喷涂偶联抗原, 质控区喷涂二抗, 两区相隔 5 mm, 质控区距离 NC 膜一端 2 mm, 37 $^{\circ}$ C 烘干过夜后, 在室温干燥环境下保存备用。

(3) 组装和剪切

在粘性底板上依次搭接地粘贴: 滤纸、样本垫、玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜以及吸水纸, 并剪切成适当宽度即成为免疫层析试纸条。

2. 免疫层析试纸条的组装

将根据上述方法制备的分别检测氯胺酮的试纸条 A 和检测甲基苯丙胺的试纸条 B 两张免疫层析试纸条并排固定在底卡上, 然后在试纸条表面用面卡压紧, 即成为免疫层析检测卡。底卡和面卡一般都为塑料卡, 底卡能使试纸条上的样本垫、玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜和吸水纸紧密结合, 面卡可保护试纸条, 使其不受损坏。面卡上预留加样孔和观察窗各两个, 加样孔的位置与每张试纸条的样本垫对应, 观察窗的位置与每张试纸条的 NC 膜对应。

用上述的荧光微球免疫层析检测卡定性检测氯胺酮和甲基苯丙胺, 包括以下步骤:

(1) 免疫层析检测卡的两个加样孔中分别加入待检样本, 反应 3~20min 后, 将检测卡放入检测窗口;

(2) 截留在检测区和质控区的荧光微球在最佳激发光源下，发出强烈的荧光条带；

(3) 发射的荧光经滤除杂光后，用肉眼观察是否有荧光信号；当样本中不含有被检测物质时，检测区和质控区均出现一条荧光条带，即检测样本为阴性；当样本中含有过量被检测物质时，检测区无荧光条带，质控区有一条荧光条带，检测样本即为阳性。当样本中含有不过量被检测物质时，检测区有一条弱荧光条带，质控区有一条荧光条带，检测样本即为弱阳性。

本发明的优点如下：

1. 荧光物质被入射光激发后，返回基态时发射出荧光，可以在与激发光源垂直的方向进行检测，因此荧光不受来自激发光本底的干扰，灵敏度大大提高，其灵敏度是用传统染料和有色标记物质检测方法的 10~1000 倍。另外，荧光标记检测方法还具有操作简便，检测快速，价格低廉等优点；

2. 荧光微球是核壳双结构，克服了常规荧光微球的染料泄露，抗溶液干扰能力差等缺点，增加了荧光微球的稳定性和荧光寿命；

3. 荧光微球表面修饰活性基团，采用化学偶联方法来标记抗体或抗原，形成抗体或抗原与微球的稳定结合；

4. 通过简易的滤光片装置能够实现定性检测；

5. 采用双卡型免疫层析检测卡，实现同时检测氯胺酮和甲基苯丙胺。

用本发明的方法制备的荧光微球免疫层析检测卡来测试 100 例已知吸食氯胺酮和甲基苯丙胺的尿样和 100 个无吸食氯胺酮和甲基苯丙胺的尿样，准确率均达到 100%，表明本发明提供的荧光微球免疫层析法结果准确，检测快速，操作简便，灵敏度高。本发明检测的样本包括尿液、全血等。

附图说明

图 1 是免疫层析试纸条的结构示意图；

图 2 是免疫层析检测卡的结构示意图；

图 3 是荧光微球免疫层析检测卡检测原理图。

如图 1 所示，该免疫层析试纸条的构成为：在粘性底板 18 上，依次搭接地粘贴滤纸 11、样本垫 12、喷涂有荧光微球标记的抗氯胺酮抗体或抗甲基苯丙胺抗体的玻璃纤维膜 13、喷涂有氯胺酮偶联抗原或甲基苯丙胺偶联抗原的检测区 15 和喷涂有二抗的质控区 16 的硝酸纤维素膜 14 和吸水纸 17，检测区 15 和质控区 16 相隔 5 mm，质控区距离 NC 膜一端 2 mm。

如图2所示,该免疫层析检测卡是双卡型的,由分别检测氯胺酮或甲基苯丙胺的两张免疫层析试纸条固定在底卡21上而形成,具体构造包括底卡21、面卡22、加样孔23、观察窗24、NC膜25、质控区26、检测区27。

如图1、2和3所示,检测原理如下:在检测卡的两个加样孔23中加入待检样本,样本溶解玻璃纤维膜13上喷涂的荧光微球标记的抗氯胺酮抗体或荧光微球标记的抗甲基苯丙胺抗体,通过毛细作用在玻璃纤维膜13上向前泳动,同时样本中的氯胺酮或甲基苯丙胺与相应的荧光微球标记物反应;反应液经过检测区15时,与检测区15的喷涂物反应,并富积在检测区15;将检测卡放入检测窗口31,待检样本33在光源32激发下,发射的荧光34通过单色滤光片35过滤后,通过观察窗口36在检测区15观察是否有的荧光条带,质控区不管样本是阴性还是阳性都会出现荧光条带。检测区15无荧光条带,样本是阳性,检测区15有荧光条带,样本是阴性。

如图3所示,荧光微球免疫层析定性检测氯胺酮和甲基苯丙胺的检测步骤如下:

(1) 在检测卡的两个加样孔中滴加待检样本,反应3~20min后,将其放入检测窗口31;

(2) 检测区和质控区被截留的荧光微球33在最佳激发光源32激发下,发出荧光33通过单色滤光片34,在观察窗口35判断样本的阴阳性。所述的最佳激发光源指在450nm激发光源激发下,荧光微球能发出最强的荧光。

具体实施方式

下面结合具体实施例对本发明作进一步说明,但不作为对本发明的限定。

实施例1

1、荧光微球标记物的制备(EDC法):

荧光微球标记抗氯胺酮或抗甲基苯丙胺抗体的制备:取1mg包裹菲咯啉联钉有机染料的荧光微球在 $1000\times g$ 离心10min,收集沉淀,用0.01M pH4.8的硼酸盐缓冲液调节微球浓度为 $OD_{450}=0.2$,然后加入 $90\mu l$ 50 mg/ml EDC, $150\mu l$ 5 mg/ml NHS,振荡混匀,室温孵育20min后, $1000\times g$ 离心5min,沉淀用0.01M pH4.8的硼酸盐缓冲液溶解,并调节微球浓度为 OD_{450} 为0.5。在0.1ml OD_{450} 为0.5的该荧光微球中加入 $1\mu g$ 抗氯胺酮或抗甲基苯丙胺抗体,充分混匀后,室温搅拌反应3h,用超纯水洗涤离心3次后,用0.01M pH7.2的PBS(其中包含5%蔗糖和0.05% Tween-20)重悬沉淀至起始体积后,即为制备好的荧光微球标记的抗氯胺酮抗体或抗甲基苯丙胺抗体。

2、荧光微球垫的制备:

用 BIODOT 喷点仪，将荧光微球标记的抗氯胺酮抗体喷涂至玻璃纤维膜 A 上，荧光微球标记的抗甲基苯丙胺抗体喷涂至玻璃纤维膜 B 上，喷膜量均为 4 $\mu\text{l}/\text{cm}$ ，玻璃纤维膜大小为 30 \times 0.8 cm，25 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥 1~2h，置于干燥环境中备用。

3、NC 膜的制备：

将牛血清白蛋白与氯胺酮的偶联抗原和二抗抗鼠抗体、载体蛋白质与甲基苯丙胺的偶联抗原和二抗抗鼠抗体分别喷涂到 NC 膜 A、NC 膜 B 上：用 0.01M pH 7.4 PBS（磷酸盐缓冲液，其中包含 5%蔗糖和 0.05%吐温-20）分别将载体蛋白质与氯胺酮偶联抗原和载体蛋白质与甲基苯丙胺偶联抗原的浓度调节为 1mg/ml，将所得溶液分别喷涂在 NC 膜 A 和 NC 膜 B 上形成检测区；用 0.01M pH 7.2 PBS（磷酸盐缓冲液，其中包含 5%蔗糖和 0.05%吐温-20）调节二抗的浓度为 1mg/ml，将所得溶液分别喷涂在 NC 膜 A 和 NC 膜 B 上形成质控区。两区的喷膜量均为 0.7 $\mu\text{L}/\text{cm}$ ，两区相隔 5mm，质控区距离 NC 膜一端 2mm，37 $^{\circ}\text{C}$ 烘干过夜后，于室温干燥环境下保存备用；

4、荧光微球免疫层析检测卡的制备：

组装试纸条 A：在 PVC 底板上依次搭接地粘贴：（1）滤纸和样本垫，按照常规方法处理，样本垫为一种经过 1-5% Tween-20 浸泡处理的玻璃纤维膜；（2）喷涂有荧光微球标记抗氯胺酮抗体的玻璃纤维膜 A；（3）喷涂有载体蛋白质与氯胺酮偶联抗原作为检测区和抗鼠抗体作为质控区的硝酸纤维素膜 A；（4）吸水纸，组装完成后剪切成 4mm 的宽度，即成为免疫层析试纸条 A。

组装试纸条 B：在 PVC 底板上一次搭接地粘贴：（1）滤纸和样本垫，样本垫为一种经过 5% Tween-20 处理的玻璃纤维膜；（2）喷涂有荧光微球标记抗甲基苯丙胺抗体的玻璃纤维膜 B；（3）喷涂有载体蛋白质与甲基苯丙胺偶联抗原作为检测区和抗鼠抗体作为质控区的硝酸纤维素膜 B；（4）吸水纸，组装完成后剪切成 4mm 的宽度，即成为免疫层析试纸条 B。

把免疫层析试纸条 A 和免疫层析试纸条 B 并排固定在塑料底卡上，试纸条表面用面卡压紧，面卡在对应每张试纸条的样本垫和 NC 膜的部位分别预留加样孔和观察窗，制成的免疫层析检测卡可用来同时检测氯胺酮和甲基苯丙胺抗原。该检测卡组装好后装入铝箔袋中，加入干燥剂后封口保存，于室温干燥环境下至少可以保存一年。

5、荧光微球免疫层析定性检测氯胺酮和甲基苯丙胺的检测步骤如下：

（1）平放检测卡，待测样品尿样平衡至室温后，在检测卡的两个加样孔中滴加尿样 60 μl ，于室温下反应 10min 后，将检测卡放入检测窗口；

(2) 检测区和质控区被截留的荧光微球在最佳激发光源激发下，发出荧光通过单色滤光片，在观察窗口观察，试纸条 A 检测区无荧光条带，质控区有一条荧光条带，判断尿样为阳性。试纸条 B 检测区有荧光条带，质控区有一条荧光条带，判断尿样为阴性。

实施例 2

本实施例的制备方法与实施例 1 基本相同，不同点在于：

载体蛋白选用卵清白蛋白；标记载体荧光微球为量子点-二氧化硅壳核双结构微球。

用上述荧光微球免疫层析检测卡定性检测氯胺酮和甲基苯丙胺包括以下步骤：

(1) 平放检测卡，待测样品血样平衡至室温后，在检测卡的两个加样孔中各加入样品 90 μ l，于室温下反应 15min，将检测卡放入检测窗口；

(2) 截留在检测区和质控区的荧光微球在最佳激发光源的激发下，发出强烈的荧光；在观察窗口观察，试纸条 A 检测区有荧光条带，质控区有一条荧光条带，判断血样为阴性，试纸条 B 检测区无荧光条带，质控区有一条荧光条带，判断血样为阳性。

实施例 3

本实施例的制备方法与实施例 1 基本相同，不同点在于：标记载体荧光微球为异硫氰根荧光素-二氧化硅壳核双结构微球。

实施例 4

本实施例的制备方法与实施例 1 基本相同，不同点在于：1、标记载体荧光微球为异硫氰根罗丹明-二氧化硅核双结构微球，且其表面修饰的是链霉亲和素。2、抗氯胺酮或抗甲基苯丙胺抗体均可采用 EDC 方法与生物素偶联，EDC 方法与实施例 1 基本相同。

以上所述的实施例，只是本发明较优选的具体实施方式的一种，本领域的技术人员在本发明技术方案范围内进行的通常变化和替换都应包含在本发明的保护范围内。

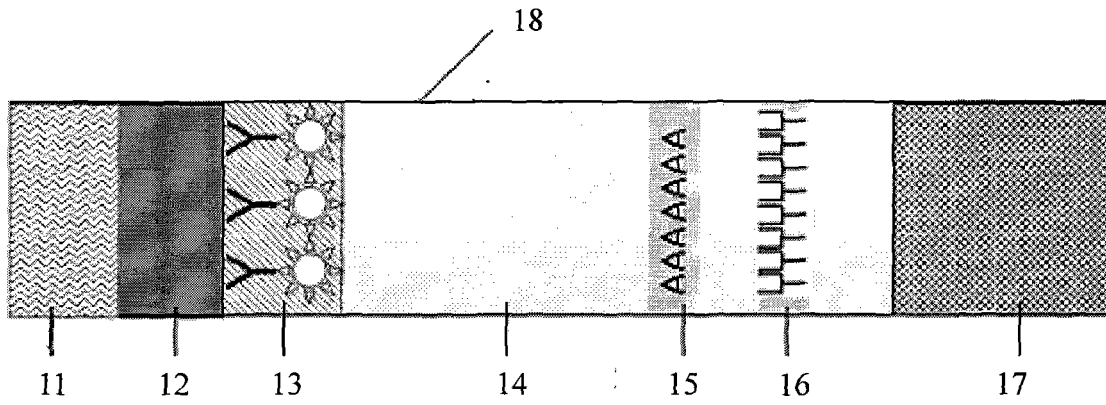


图 1

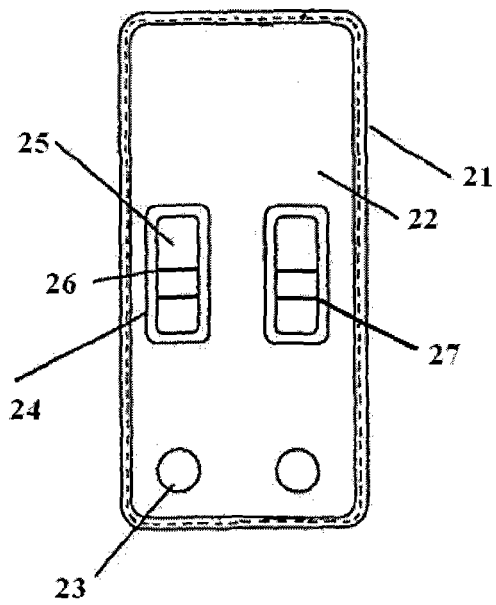


图 2

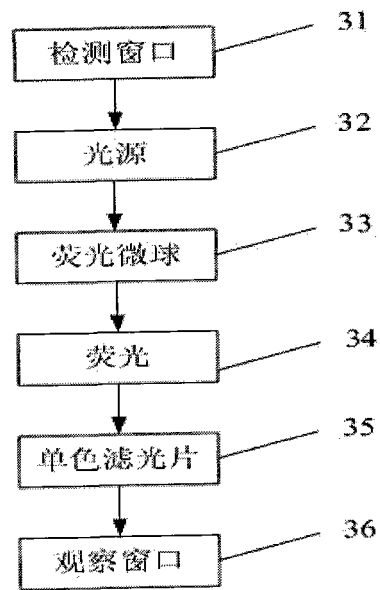


图3

专利名称(译)	检测氯胺酮和甲基苯丙胺的荧光微球免疫层析检测卡及其制备方法		
公开(公告)号	CN101556280A	公开(公告)日	2009-10-14
申请号	CN200910085054.1	申请日	2009-05-20
[标]申请(专利权)人(译)	江西中德生物工程有限公司		
申请(专利权)人(译)	江西中德生物工程有限公司		
[标]发明人	陈雪岚 赖卫华 熊勇华 魏华 李林		
发明人	陈雪岚 赖卫华 熊勇华 魏华 李林		
IPC分类号	G01N33/566 G01N33/558 G01N33/533		
其他公开文献	CN101556280B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测氯胺酮和甲基苯丙胺的荧光微球免疫层析检测卡及其制备方法。该检测卡为双卡型，一张检测氯胺酮，另一张检测甲基苯丙胺，从而实现同时对氯胺酮和甲基苯丙胺的同时检测。其构成依次包括滤纸、样本垫、玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜和吸水纸，所述的玻璃纤维膜上喷涂有荧光微球标记的抗体；所述的硝酸纤维素膜上固定有检测区和质控区；本发明以二氧化硅与荧光物质复合的核壳双结构发光纳米粒子为标记，采用免疫层析技术，实现氯胺酮和甲基苯丙胺快速免疫分析。在检测过程中，采用荧光微球最佳激发光源进行激发，发射出的荧光通过滤光片装置后用肉眼观察检测线是否有荧光物质，本发明的优点是灵敏度高、检测快速、操作方便、经济实用。

