



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110426515 A

(43)申请公布日 2019.11.08

(21)申请号 201910486826.6

G01N 33/543(2006.01)

(22)申请日 2019.06.05

G01N 33/533(2006.01)

(71)申请人 江苏苏博生物医学科技南京有限公司

地址 210033 江苏省南京市江北新区新锦湖路3-1号中丹生态生命科学产业园A座5楼

申请人 江苏苏博生物医学股份有限公司

(72)发明人 王宇峰 徐声乐 郑超 张明航  
苏雪峰 赵晓芳 刘洋春 黄平

(74)专利代理机构 南京苏创专利代理事务所  
(普通合伙) 32273

代理人 杨勇

(51)Int.Cl.

G01N 33/559(2006.01)

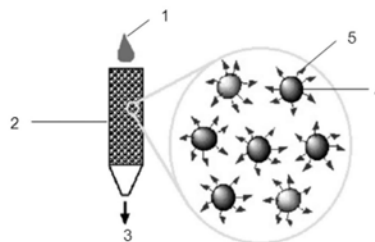
权利要求书2页 说明书14页  
序列表1页 附图2页

## (54)发明名称

一种时间分辨荧光免疫层析技术检测污水中痕量毒品的试剂盒及其应用

## (57)摘要

本发明公开了一种时间分辨荧光免疫层析技术检测污水中痕量毒品的试剂盒及其应用,一种时间分辨荧光免疫层析技术检测污水中痕量毒品的试剂盒,包括盒体,盒体内设有适配体亲和柱、时间分辨荧光微球冻干管和免疫层析试纸条。本发明采用时间分辨荧光微球进行抗体的标记,荧光半衰期长,产品稳定性较好,利于常温保存;检测限达到50ng/L,实现了毒品的精确检测;用适配体亲和柱将污水中待测药物甲基苯丙胺等小分子富集浓缩,提高了试纸条污水检测的灵敏度,按照浓缩10倍的效果,实际污水检测灵敏度可达到5ng/L;在批间差及试纸条的精密度方面有明显优势,而且反应充分,灵敏度更高;操作简便,本发明试纸条使用操作简便,不需要专业人员操作。



1. 一种时间分辨荧光免疫层析技术检测污水中痕量毒品的试剂盒,其特征在于:包括盒体,盒体内设有适配体亲和柱、时间分辨荧光微球冻干管和免疫层析试纸条。

2. 如权利要求1所述的时间分辨荧光免疫层析技术检测污水中痕量毒品的试剂盒,其特征在于:适配体亲和柱用于将污水中待测药物小分子富集浓缩:利用SELEX技术筛选靶分子特异核酸适配体,偶联到琼脂或磁珠上,形成靶分子捕捉琼脂或磁珠,利用核酸配基与配体的分子识别原理,捕捉靶分子,结合靶分子捕捉琼脂或磁珠,从混合物中分离出;再通过加热、酸、碱或溶剂处理,使靶分子与靶分子捕捉琼脂或磁珠有效分离,从而得到纯化靶分子,达到污水中毒品浓缩富集的目的。

3. 如权利要求2所述的时间分辨荧光免疫层析技术检测污水中痕量毒品的试剂盒,其特征在于:适配体亲和柱的制备方法包括如下步骤:

(1) 活化:将琼脂糖凝胶微球在去离子水中悬浮溶胀 $2 \pm 0.2$ 小时成凝胶,洗涤、静置,移除清洗液,得溶胀的凝胶,其中,去离子水用量为每80mg琼脂糖凝胶微球3~4mL;

(2) 偶联:将生物素修饰的毒品适配体溶于Tris缓冲液中,再与链霉亲和素标记的磁珠混入步骤(1)中溶胀的凝胶中混合均匀,得悬浮凝胶液;其中,Tris缓冲液浓度为50.0mmol/L, pH8.0;毒品适配体与链霉亲和素标记的磁珠的摩尔比为 $(3 \pm 0.2) : 1$ ;

(3) 装柱:将步骤(2)的悬浮凝胶液移入固相萃取小柱,避免产生气泡,用0.1mol/L pH7.4磷酸盐缓冲液平衡小柱,即得适配体亲和柱。

4. 如权利要求1-3任意一种所述的时间分辨荧光免疫层析技术检测污水中痕量毒品的试剂盒,其特征在于:时间分辨荧光微球冻干管中含有毒品单克隆抗体-时间分辨荧光微球复合物冻干粉。

5. 如权利要求4所述的时间分辨荧光免疫层析技术检测污水中痕量毒品的试剂盒,其特征在于:时间分辨荧光微球冻干管的制备方法包括如下步骤:

(1) 将时间分辨荧光微球用MES缓冲液配成 $0.1 \pm 0.02$ wt%浓度,然后与EDC和NHS在 $30 \pm 2^\circ\text{C}$ 下混合 $0.5 \pm 0.1$ h;其中,EDC的浓度为 $1.0 \times 10^{-4} \sim 2.4 \times 10^{-4}$ mol/L,NHS的浓度 $2.0 \times 10^{-4} \sim 4.8 \times 10^{-4}$ mol/L;

(2) 将步骤(1)所得物料中加入待标记抗体,搅拌 $2 \pm 0.1$ h,待标记抗体加入量为50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;

(3) 将步骤(2)所得物料用封闭液封闭,搅拌 $30 \pm 2$ min,封闭液为10wt%牛血清白蛋白溶液;

(4) 将步骤(3)所得物料用离心机在 $4 \pm 1^\circ\text{C}$ 下离心,离心速度为 $12000 \pm 500$ r/min,离心时间为 $20 \pm 2$ min,然后去上清液;

(5) 用微球存储液将骤(4)所得沉淀物复溶,微球存储液为含有 $0.2 \pm 0.01\%$ BSA、 $5 \pm 0.1\%$ 海藻糖及 $0.05 \pm 0.01\%$ 吐温20的Tris缓冲液;

(6) 在0.2M PBS缓冲液中依次加入海藻糖、BSA、Triton X-100和Proclin 300,得冻干液,其中,海藻糖浓度为 $5 \pm 0.01$ wt%,BSA浓度为 $0.5 \pm 0.01$ wt%,Triton X-100浓度为 $1 \pm 0.01$ wt%,Proclin 300浓度为 $0.1 \pm 0.01$ wt%;

(7) 将步骤(5)所得物料装入冻存管中,加入步骤(6)制备的冻干液;

(8) 将冻存管置于冷冻干燥机中,冻存管中最终为淡黄色冻干粉,即得时间分辨荧光微球冻干管。

6. 如权利要求5所述的时间分辨荧光免疫层析技术检测污水中痕量毒品的试剂盒,其特征在于:步骤(1)中,时间分辨荧光微球的发射波长为600-620nm。

7. 如权利要求1-3任意一种所述的时间分辨荧光免疫层析技术检测污水中痕量毒品的试剂盒,其特征在于:免疫层析试纸条包含PVC衬板、硝酸纤维膜、样品垫和吸收垫,样品垫、硝酸纤维膜和吸收垫依次固定于PVC衬板之上,且硝酸纤维膜的两端分别与样品垫和吸收垫相交,硝酸纤维膜上设有检测线和质控线,检测线上包被有毒品-牛血清白蛋白偶联物,质控线上包被羊抗鼠IgG二抗。

8. 权利要求1-7任意一项所述的时间分辨荧光免疫层析技术检测污水中痕量毒品的试剂盒的应用,其特征在于:检测方法包括顺序相接的如下步骤:

(1) 将污水样品使用适配体亲和柱进行前处理得到待测样本液;

(2) 在时间分辨荧光微球冻干管中加入待测样本液充分混合均匀,反应2~5min,再取100ul反应液滴加到免疫层析试纸条中,反应5~8min,将免疫层析试纸条放入荧光层析检测仪检测窗口;

(3) 截留在检测线和质控线的荧光微球在激发光激发下,发出荧光,激发光的波长范围为300~400nm;

(4) 荧光层析检测仪检测检测线和质控线的荧光信号,并将荧光信号转化为电信号,然后通过标准曲线计算浓度,并呈现在荧光层析检测仪的显示屏上。

9. 如权利要求8所述的应用,其特征在于:步骤(4)中标准曲线的制备:配制一系列从0开始的不同浓度x的添加毒品标准品的样本,进行步骤(1)中前处理后得到加标样品液,用同一批次的试纸条检测加标样品液,得到检测线与质控线荧光强度比值y,绘制毒品浓度与荧光强度比值关系的标准曲线 $\log x = a(y/y_0) + b$ ,其中 $y_0$ 代表浓度为0时的检测线与质控线荧光强度比值,a和b为系数。

## 一种时间分辨荧光免疫层析技术检测污水中痕量毒品的试剂盒及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种时间分辨荧光免疫层析技术检测污水中痕量毒品的试剂盒及其应用,属于污水中痕量毒品的检测领域。

### 背景技术

[0002] 毒品严重危害人类健康,影响家庭和谐,威胁社会治安,破坏国家经济,已成为当今国际社会所需要面对的共同问题。为了与毒品作斗争,各国政府投入了大量的资金。我国在挽救、治疗吸毒者,开展禁毒教育和科研,加大缉毒力度等方面也投入了大量的人力、物力和财力。准确掌握毒品滥用信息对于打击毒品犯罪、指导开展毒品预防,全面开展各项禁毒工作,减少毒品的危害具有重要作用。违禁药物滥用量传统的估算方法主要通过社会流行病学调查进行,但该方法具有很大的局限性和不确定性,近年来环境科学界发展了污水流行病学方法,通过测定某个地区污水中违禁药物的残留浓度水平反算该地区违禁药物的用量,具有客观、实时和可对比等优点。然而如何针对污水毒品作出有效、快速、准确、稳定的检测成为了亟待解决的问题。

[0003] 污水中毒品残留物及其代谢产物的来源主要为吸毒人员的排泄物、突击缉查时吸毒人员为毁灭证据经下水道冲走丢弃、及制毒场所排放的废水等。2001年以来,在欧洲、拉丁美洲、亚洲等国家的城市污水收集系统、河流、湖泊中,甚至在日本的某些城市自来水中,均有该类化合物被检出的报道,其浓度为ng/L水平。通过测定未经处理生活污水中的毒品及其代谢产物的浓度,并应用相应数学模型计算,可将测得的毒品浓度 (ng/L) 推算为该区域内吸毒人员服用的某种类型的毒品数量(单位:药剂量/日/1000居民)。基于此项技术的毒品监控方法被命名为污水分析法。

[0004] 为了解环境中的滥用药物污染状况,需要准确、灵敏的分析检测方法。由于水环境中药物污染物含量极低,通常在ng/L水平,同时种类较多,常规的分析手段很难满足痕量或超痕量分析的实际需要,因此采用有效的前处理方法和高灵敏度的检测仪器是建立环境中滥用药物分析方法的关键。

[0005] 国内外有关污水毒品的检测方法有液相色谱法、气相色谱法和色谱联用法等仪器分析方法。这类仪器分析方法准确、稳定、灵敏,但耗时、设备昂贵,前处理方法繁琐,需要专业人员操作,不适用实际生产生活中。因此,快捷简便且灵敏的免疫检测技术是目前市场上应用最广泛的,主要有酶联免疫吸附法、免疫层析法等。相比较而言,免疫层析方法简单快速,结果直观,且不需要专业分析人员,特别适合现场监测。目前市场提供的免疫层析技术快速检测产品,存在灵敏度较低、批间差异较大、稳定性差、产品保质期短等现象。因此,改进技术方法,提高产品质量,研究一种稳定好,灵敏度高的免疫层析技术快速检测产品,对进一步推广应用免疫层析技术至关重要。

## 发明内容

[0006] 本发明提供一种检出限低、稳定性好、能够快速定量检测污水中毒品时间分辨荧光免疫层析试剂盒及其应用。

[0007] 为解决上述技术问题,本发明所采用的技术方案如下:

[0008] 一种时间分辨荧光免疫层析技术检测污水中痕量毒品的试剂盒,包括盒体,盒体内设有适配体亲和柱、时间分辨荧光微球冻干管和免疫层析试纸条。

[0009] 时间分辨荧光免疫法用镧系元素(三价稀土离子及其螯合物)作为示踪物,标记抗原或抗体,免疫反应发生时,用时间分辨荧光分析仪测定免疫反应最后产物的荧光强度,再根据荧光强度和相对荧光强度比值,判断反应体系中分析物的浓度,达到定量分析的目的。时间分辨荧光免疫分析法的灵敏度高达 $10^{-18}$ mol/L;特异性强,通过时间延迟,将特异性荧光与非特异性荧光分辨开来,使理论本底达到0;荧光寿命极长,极长的荧光衰退时间,发光效率高,非常稳定;发射光谱带较窄,激发光谱带较宽,Stokes位移大,因此干扰少,灵敏度高,结果准确度高。

[0010] 快速溶剂萃取、定量浓缩萃取、微波萃取、固相萃取和磁性萃取等前处理技术是目前仪器检测污水中毒品的主要前处理方法,这些方法较为繁琐,不适合现场检测。本申请采用免疫亲和层析柱,利用抗原抗体特异性可逆结合特性的SPE技术,根据抗原抗体的高选择性,从复杂的待测样品中提取目标化合物,具有简便高效的作用,

[0011] 本申请适配体亲和柱用于将污水中待测药物小分子富集浓缩:利用SELEX技术筛选靶分子特异核酸适配体,偶联到琼脂或磁珠上,形成靶分子捕捉琼脂或磁珠,利用核酸配基与配体的分子识别原理,捕捉靶分子,结合靶分子捕捉琼脂或磁珠,从混合物中分离出;再通过加热、酸、碱或溶剂处理,使靶分子与靶分子捕捉琼脂或磁珠有效分离,从而得到纯化靶分子,达到污水中毒品浓缩富集的目的。

[0012] 适配体经SELEX筛选富集后,可以拥有与抗原-抗体反应相匹敌的灵敏度,同时合成更容易,稳定性更好。基于适配体亲和层析是一种新型高效样品前处理技术,它的原理是利用适配体对靶分子选择性吸附来实现对复杂样品中靶分子的提取和净化处理,这种吸附是可逆的,利用适配体制备亲和层析柱成本低廉,具有广阔的开发潜力。

[0013] 为了提高检测的灵敏度,适配体亲和柱的制备方法包括如下步骤:

[0014] (1)活化:将琼脂糖凝胶微球在去离子水中悬浮溶胀 $2 \pm 0.2$ 小时成凝胶,洗涤、静置,移除清洗液,得溶胀的凝胶,其中,去离子水用量为每80mg琼脂糖凝胶微球3~4mL;

[0015] (2)偶联:将生物素修饰的毒品适配体溶于Tris缓冲液中,再与链霉亲和素标记的磁珠混入步骤(1)中溶胀的凝胶中混合均匀,得悬浮凝胶液;其中,Tris缓冲液浓度为50.0mmol/L,pH8.0;毒品适配体与链霉亲和素标记的磁珠的摩尔比为 $(3 \pm 0.2) : 1$ ;

[0016] (3)装柱:将步骤(2)的悬浮凝胶液移入固相萃取小柱,避免产生气泡,用0.1mol/LpH7.4磷酸盐缓冲液平衡小柱,即得适配体亲和柱。

[0017] 时间分辨荧光微球冻干管中含有毒品单克隆抗体-时间分辨荧光微球复合物。

[0018] 为了提高检测效率,时间分辨荧光微球冻干管的制备方法包括如下步骤:

[0019] (1)将时间分辨荧光微球用MES缓冲液配成 $0.1 \pm 0.02$ wt%,然后与EDC和NHS在 $30 \pm 2^\circ\text{C}$ 下混合 $0.5 \pm 0.1$ h;其中,EDC的浓度为 $1.0 \times 10^{-4} \sim 2.4 \times 10^{-4}$ mol/L,NHS的浓度 $2.0 \times 10^{-4} \sim 4.8 \times 10^{-4}$ mol/L;

[0020] (2) 将步骤(1)所得物料中加入待标记抗体,搅拌 $2 \pm 0.1$ h,待标记抗体加入量为 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ ;

[0021] (3) 将步骤(2)所得物料用封闭液封闭,搅拌 $30 \pm 2$ min,封闭液为 $10\text{wt}\%$ 牛血清白蛋白溶液;

[0022] (4) 将步骤(3)所得物料用离心机在 $4 \pm 1^\circ\text{C}$ 下离心,离心速度为 $12000 \pm 500$ r/min,离心时间为20min,然后去上清液;

[0023] (5) 用微球存储液将步骤(4)所得沉淀物复溶,微球存储液为含有 $0.2 \pm 0.01\%$ BSA、 $5 \pm 0.1\%$ 海藻糖及 $0.05 \pm 0.01\%$ 吐温20的Tris缓冲液;

[0024] (6) 在 $0.2\text{M}$  PBS缓冲液中依次加入海藻糖、BSA、Triton X-100和Proclin 300,得冻干液,其中,海藻糖浓度为 $5 \pm 0.01\text{wt}\%$ ,BSA浓度为 $0.5 \pm 0.01\text{wt}\%$ ,Triton X-100浓度为 $1 \pm 0.01\text{wt}\%$ ,Proclin 300浓度为 $0.1 \pm 0.01\text{wt}\%$ ;BSA主要起到封闭单抗剩余的反应位点的作用,提高时间分辨荧光微球-抗毒品单克隆抗体与样品中的毒品结合的特异性;海藻糖主要起到对单抗的保护作用,因为海藻糖在高温、高寒、高渗透压及干燥失水等恶劣环境下能在细胞表面形成独特的保护膜,有效地保护蛋白质分子不变性失活;

[0025] (7) 将步骤(5)所得物料装入冻存管中,加入步骤(6)制备的冻干液;

[0026] (8) 将冻存管置于冷冻干燥机中,冻存管中最终为淡黄色冻干粉,即得时间分辨荧光微球冻干管。

[0027] 上述时间分辨荧光免疫层析技术采用荧光纳米微球作为标记物,每个微球中可包裹成千上万个荧光分子,大大提高了标记效率,有效的提高了灵敏度;同时纳米荧光微球表面修饰有合适密度的羧基,用于与蛋白或抗体的共价偶联,提高标记物的稳定性。

[0028] 上述步骤(1)中,时间分辨荧光微球的发射波长为 $600-620\text{nm}$ 。更优选的,发射波长为 $610\text{nm}$ 。

[0029] 本申请免疫层析试纸条包含PVC衬板、硝酸纤维膜、样品垫和吸收垫,样品垫、硝酸纤维膜和吸收垫依次固定于PVC衬板之上,且样品垫和硝酸纤维膜的相邻端相交、硝酸纤维膜和吸收垫的相邻端相交,硝酸纤维膜上设有检测线和质控线,检测线上包被有毒品-牛血清白蛋白偶联物,质控线上包被羊抗鼠IgG二抗。

[0030] 本申请免疫层析试纸条的检测原理为竞争法,T线(检测线)包被的抗原和待检样品中的毒品抗原竞争结合毒品抗体-时间分辨荧光微球复合物,当待检样品中无毒品抗原存在,毒品抗体-时间分辨荧光微球复合物在层析过程中先和T线包被毒品抗原-牛血清白蛋白复合物结合,T线处形成荧光免疫分析仪可测的荧光信号;当待检样品中有毒品抗原存在,则样品中的毒品抗原、包被毒品抗原和毒品抗原-牛血清白蛋白复合物竞争结合,此时T线处信号强度会随着样品中毒品抗原的增加而逐渐减弱。

[0031] 利用本申请试剂盒的检测方法包括顺序相接的如下步骤:

[0032] (1) 将污水样品使用适配体亲和柱进行前处理得到待测样本液;

[0033] (2) 在时间分辨荧光微球冻干管中加入待测样本液充分混合均匀,反应 $2-5$ min,再取 $100\mu\text{l}$ 反应液滴加到免疫层析试纸条中,反应 $5-8$ min,将检测卡放入荧光层析检测仪检测窗口;

[0034] (3) 截留在检测线和质控线的荧光微球在激发光激发下,发出荧光;

[0035] (4) 荧光层析检测仪检测免疫层析试纸条检测线和质控线的荧光信号,并将荧光

信号转化为电信号,然后通过标准曲线自动计算浓度,并呈现在荧光层析检测仪的显示屏上。

[0036] 上述步骤(3)中,激发光的波长范围为300~400nm。更优选的,激发光的波长为365nm。

[0037] 上述步骤(4)中标准曲线的制备:配制一系列从0开始的不同浓度(x)的添加毒品标准品的样本(浓度设置5个以上),进行步骤(1)中前处理后得到加标样品液,用同一批次的试纸条检测加标样品液,得到检测线与质控线荧光强度比值(y),绘制毒品浓度与荧光强度比值关系的标准曲线 $\log x = a(y/y_0) + b$ ,其中 $y_0$ 代表浓度为0时的检测线与质控线荧光强度比值。

[0038] 通过标准曲线自动计算浓度的方法为:将检测样本的检测线与质控线荧光强度比值比标准曲线,得出检测样本中毒品的含量。

[0039] 本发明根据荧光强度可用于定量检测毒品含量,本发明可检测的毒品包括冰毒、吗啡、氯胺酮等。

[0040] 本发明未提及的技术均参照现有技术。

[0041] 与现有技术相比检测方法相比,本发明的有益效果是:

[0042] 1、稳定性好,本发明采用时间分辨荧光微球进行抗体的标记,荧光半衰期长,产品稳定性较好,将时间分辨荧光微球存放于冻干管中,更有利于微球常温保存。

[0043] 2、检出限低,荧光物质被特定波长激发后,发生斯托克斯位移效应,能在较大波长发射荧光,因此荧光不受外来激发光本底的干扰,本发明试纸条的检测限达到50ng/L,实现了毒品的精确检测。

[0044] 3、用适配体亲和柱将污水中待测药物甲基苯丙胺等小分子富集浓缩,提高了试纸条污水检测的灵敏度,按照浓缩10倍的效果,实际污水检测灵敏度可达到5ng/L。

[0045] 4、时间分辨荧光微球和样本反应是在微球冻干管中反应,这种反应方式较微球在结合垫上反应更均匀,在批间差及试纸条的精密度方面有明显优势,而且反应充分,灵敏度更高。

[0046] 5、操作简便,本发明试纸条使用操作简便,不需要专业人员操作。

## 附图说明

[0047] 图1为本发明适配体亲和柱结构示意图;

[0048] 图2为本发明时间分辨荧光微球冻存管结构示意图;

[0049] 图3为本发明层析试纸条结构示意图;

[0050] 图4为实施例中时间分辨荧光免疫层析试剂盒标准曲线图;

[0051] 图中,1为污水样本,2为适配体亲和柱,3为污水处理后洗脱的待测样品液,4为琼脂或磁珠,5为毒物核酸适配体,6为冻存管,7为时间分辨荧光微球,8为PVC衬板,9为样品垫,10为硝酸纤维膜,11为吸收垫,12为检测线,13为质控线。

## 具体实施方式

[0052] 为了更好地理解本发明,下面结合实施例进一步阐明本发明的内容,但本发明的内容不仅仅局限于下面的实施例。

[0053] 一、时间分辨荧光免疫层析检测污水毒品的试剂盒：

[0054] 试剂盒内设有适配体亲和柱(结构见图1)、时间分辨荧光微球冻干管(结构见图2)和免疫层析试纸条(结构见图3)；适配体亲和柱用于将污水中待测药物小分子富集浓缩；时间分辨荧光微球冻干管中含有毒品单克隆抗体-时间分辨荧光微球复合物；免疫层析试纸条包含PVC衬板、硝酸纤维膜、样品垫和吸收垫，样品垫、硝酸纤维膜和吸收垫依次固定于PVC衬板之上，样品垫和硝酸纤维膜的相邻端相交、硝酸纤维膜和吸收垫的相邻端相交，硝酸纤维膜上设有检测线和质控线；所述检测线上包被有毒品-牛血清白蛋白偶联物，所述质控线上包被羊抗鼠IgG二抗。

[0055] 二、适配体亲和柱的制备方法，包括顺序相接的如下步骤：

[0056] (1) 活化：取80mg的琼脂糖凝胶微球在3.0mL去离子水中悬浮溶胀2小时成凝胶，用100mL去离子水分三次洗涤凝胶，静置10min后，移除清洗液；

[0057] (2) 偶联：将生物素修饰的毒品适配体(江苏苏博生物医药股份有限公司，冰毒适配体序列为5'-GGA CGC GCA TAG ATC TCG GGG CTG TCC ACG GCT GC-Biotin-3')溶于1.5mL 50.0mmol/L pH8.0的Tris缓冲液中，再将其与链霉亲和素(Streptavidin)标记的磁珠(常在天地人和生物，SM00805)按照摩尔比3:1的比例混入步骤(1)中溶胀的凝胶中混合均匀；

[0058] (3) 装柱：将步骤(2)的悬浮凝胶液移入固相萃取小柱(内径10mm，容积2mL)，避免产生气泡，用10mL 0.1mol/L pH7.4磷酸盐缓冲液平衡小柱。

[0059] 三、毒品抗体-时间分辨荧光微球复合物冻干粉的制备：

[0060] 毒品单克隆抗体-时间分辨荧光微球复合物制备方法，包括顺序相接的如下步骤：

[0061] (1) 取200 $\mu$ L时间分辨荧光微球并将其用MES缓冲液配成0.1wt%，取EDC(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐)100 $\mu$ L，NHS(N-羟基琥珀酰亚胺)100 $\mu$ L，30 $^{\circ}$ C混合0.5h，EDC的浓度为 $2.0 \times 10^{-4}$ mol/L，NHS的浓度为 $4.0 \times 10^{-4}$ mol/L；

[0062] (2) 加入待标记的冰毒抗体，加入量为50 $\mu$ g/mL，搅拌2h；

[0063] (3) 用封闭液封闭，搅拌30min，封闭液为10wt%牛血清白蛋白溶液；

[0064] (4) 用离心机在4 $^{\circ}$ C下离心，离心速度为12000r/min，离心20min，然后去上清液；

[0065] (5) 微球存储液将沉淀物复溶，比例为0.1ml微球原液加入1ml微球储存液，微球存储液为含有0.2%BSA，5%海藻糖及0.05%吐温20的Tris缓冲液。

[0066] 时间分辨荧光微球冻干粉的制备方法，包括顺序相接的如下步骤：

[0067] (1) 冻干液的制备：0.2M PBS缓冲液中加入海藻糖，至海藻糖终浓度5wt%，再向溶液中加入BSA，至BSA终浓度0.5wt%；再加入Triton X-100表面活性剂，至Triton X-100终浓度1wt%，最后加入Proclin 300，至Proclin 300终浓度0.1%wt%。BSA主要起到封闭单抗剩余的反应位点的作用，提高时间分辨荧光微球-抗毒品单克隆抗体与样品中的毒品结合的特异性；海藻糖主要起到对单抗的保护作用，因为海藻糖在高温、高寒、高渗透压及干燥失水等恶劣环境下能在细胞表面形成独特的保护膜，有效地保护蛋白质分子不变性失活。

[0068] (2) 将毒品抗体-时间分辨荧光微球复合物1 $\mu$ l装入冻存管中，加入步骤(1)制备的冻干液200 $\mu$ L。

[0069] (3) 将冻存管置于冷冻干燥机中，最终为淡黄色冻干粉。

[0070] 四、荧光免疫层析试纸条的生产步骤,包括顺序相接的如下步骤:

[0071] 1) 将毒品抗原-牛血清白蛋白复合物和羊抗兔抗体用点膜机分别点于硝酸纤维素膜的测试区(T)和质控区(C)上,充分干燥,使硝酸纤维素膜牢固地吸附原料。

[0072] 3) 将上述硝酸纤维素膜复合在PVC塑料薄板上,再贴上吸收垫和样品垫。

[0073] 4) 将复合好的塑料薄板置于切割机上,切割成单人份试纸。

[0074] 5) 将单人份试纸装入配套使用的塑料盒内。

[0075] 6) 将塑料盒、干燥剂、滴管放入包装袋内,封口、待检。

[0076] 五、时间分辨荧光免疫层析试剂盒标准曲线的绘制

[0077] 使用冰毒企业内部参考品0ng/mL、0.05ng/mL、0.5ng/mL、1ng/mL、2.5ng/mL、5ng/mL、10ng/mL,按照下述第六点中的步骤(1)-(3),取一个批号本发明的试剂盒,每个浓度检测6份取平均值,要求线性相关系数 $R \geq 0.99$ 。结果如表1,使用ELISA Calc制作图,见图4。

[0078] 表1测量结果

浓度 (ng/mL)	检测信号值 t/c	ave
0	19.443	19.418
	19.234	
	18.943	
	20.044	
	19.443	

[0080]		19.403	
	0.05	15.303	16.090
		17.387	
		16.097	
		15.073	
		15.657	
		17.023	
0.5	8.451		
	7.882		
	8.341		
	9.126		
	8.372		
		3.907	4.388
1	4.753		
	4.578		
	4.208		
	4.471		
	4.408		
2.5	1.509	1.566	
	1.476		
	1.535		
	1.491		
	1.694		
	1.693		
5	0.523	0.505	
	0.487		
	0.507		
	0.455		
	0.508		
	0.548		
10	0.219	0.207	
	0.208		
	0.194		
	0.221		
	0.199		
	0.202		

[0081] 表2四参数Logistic曲线拟合

$$\text{方程: } y = (A - D) / [1 + (x/C)^B] + D$$

[0082] A = 19.23586  
 B = 0.91313  
 C = 0.37499  
 D = -1.13778  
 [0083]  $r^2 = 0.99726$

[0084] 六、时间分辨荧光免疫层析试剂盒检测污水方法

[0085] (1) (a) 取收集的南京浦口区污水处理厂污水样本10mL,使用0.45um微孔滤膜过滤,滤液再加入到适配体亲和柱中富集;(b) 淋洗:待样品过柱后,用5mL去离子水淋洗柱床、弃去;(c) 洗脱:用3mL 10%甲醇洗脱,收集洗脱液1mL待用;(d) 再生:对于使用之后的凝胶,以3倍柱体积的含0.9mol/LNaCl的0.1mol/LpH 8.0Tris-HCl和含0.9mol/L NaCl的0.1mol/pH4.5乙酸缓冲液交替冲洗4次。

[0086] (2) 取200uL洗脱液加入至时间分辨荧光微球冻干管中与冻干粉充分混合均匀,反应2min。

[0087] (3) 取100uL (2) 反应液滴加到检测卡中,反应8min,将检测卡放入荧光层析检测仪检测窗口。

[0088] (4) 荧光检测分析仪检测试纸条荧光信号,并将荧光信号转化为电信号,然后通过每批次试纸条ID卡上的标准曲线信息自动计算浓度,并呈现在仪器的显示屏上,冰毒检测结果小于0.05ng/mL。

[0089] 七、本发明产品的性能研究

[0090] 1、线性范围

[0091] 将冰毒企业参考品各稀释成0ng/mL、0.025ng/mL、0.05ng/mL、0.1ng/mL、0.5ng/mL、1ng/mL、5ng/mg、10ng/mL、20ng/mL,然后按照第五点中的检测步骤,取3个批号本发明试剂盒(MET20180301、MET20180302和MET20180303,不同批号的试剂盒仅为制作时间不同,其余均参照前述一~四步骤制备),每个浓度检测3份取平均值。要求线性相关系数 $R \geq 0.99$ ,相对偏差在 $\pm 10\%$ 。结果如表3。

[0092] 表3冰毒线性范围检测结果

[0093]

参考品浓度 ng/mL	lot : MET20180301			lot : MET20180302			lot : MET20180303		
	检测结果	平均值	相对偏差%	检测结果	平均值	相对偏差%	检测结果	平均值	相对偏差%
0	0.001	0.001	/	0.002	0.002	/	0.001	0.001	/
	0.001			0.001			0.002		
	0.002			0.002			0.001		
0.025	0.012	0.016	-37.333	0.021	0.018	-26.667	0.011	0.016	-36.000
	0.014			0.013			0.013		
	0.021			0.021			0.024		
0.05	0.047	0.048	-3.333	0.049	0.048	-3.333	0.051	0.051	1.333

[0094]

	0.049			0.047			0.052		
	0.049			0.049			0.049		
0.1	0.098	0.099	-0.667	0.102	0.104	4.000	0.097	0.099	-0.667
	0.101			0.098			0.099		
	0.099			0.112			0.102		
0.5	0.512	0.506	1.267	0.522	0.508	1.533	0.499	0.507	1.333
	0.509			0.499			0.512		
	0.498			0.502			0.509		
1	0.985	0.991	-0.933	1.023	1.002	0.167	1.054	1.045	4.467
	0.998			0.988			1.091		
	0.989			0.994			0.989		
5	5.023	5.007	0.133	5.102	5.011	0.213	4.995	5.042	0.847
	4.985			4.908			5.034		
	5.012			5.022			5.098		
10	9.894	9.974	-0.263	11.095	10.560	5.603	9.991	10.345	3.450
	9.985			10.043			10.042		
	10.042			10.543			11.002		
20	16.232	15.207	-23.967	15.043	15.025	-24.878	16.034	15.703	-21.483
	14.609			15.064			15.032		
	14.779			14.966			16.044		

[0095] 根据检测结果可知,浓度<0.05ng/mL时相对偏差>10%,浓度>10ng/mL时相对偏差>10%,不符合要求;在0.05-10ng/ml的范围内,产品线性的相关系数R≥0.99,相对偏差在±10%因此线性范围可设为0.05-10ng/mL。

[0096] 2、准确度

[0097] 取3个批号本发明试剂盒 (MET20180301、MET20180302和MET20180303),然后按照第五点中的检测步骤,分别检测0.5ng/mL、5ng/mL的标准品,每个浓度检测6份取平均值并计算相对偏差。结果如表4。

[0098] 表4冰毒准确度检测结果

[0099]

参考品浓度 ng/mL	lot : MET20180301			lot : MET20180302			lot : MET20180303		
	检测结果	平均值	相对偏差%	检测结果	平均值	相对偏差%	检测结果	平均值	相对偏差%
0.5	0.523	0.509	1.867	0.487	0.498	-0.433	0.507	0.508	1.667
	0.512			0.498			0.503		
	0.509			0.499			0.498		
	0.497			0.512			0.489		
	0.502			0.502			0.521		
	0.513			0.489			0.532		
5	5.098	5.179	3.577	4.998	4.999	-0.030	5.387	5.125	2.493
	5.223			5.008			5.021		

[0100]

4.989		4.997		4.897	
5.099		5.003		5.132	
5.321		4.892		5.213	
5.343		5.093		5.098	

[0101] 根据检测结果可知,冰毒污水快速检测试剂的准确度所有浓度相对偏差都在±10%以内。

[0102] 3、精密度

[0103] 取3个批号本发明试剂盒(MET20180301、MET20180302和MET20180303),然后按照第五点中的检测步骤,对浓度为0.5ng/mgL、5ng/mL的标准品进行检测并计算变异系数CV。结果如表5。

[0104] 表5冰毒精密度检测结果

[0105]

参考品浓度 ng/mL	lot : MET20180301		lot : MET20180302		lot : MET20180303	
	检测结果	变异 CV%	检测结果	变异 CV%	检测结果	变异 CV%
0.5	0.495	2.703	0.501	3.234	0.489	2.806
	0.504		0.534		0.502	
	0.497		0.522		0.533	
	0.521		0.508		0.521	
	0.502		0.499		0.509	
	0.483		0.502		0.499	
	0.503		0.532		0.503	
	0.488		0.524		0.485	
	0.519		0.482		0.508	
	0.522		0.518		0.499	
5	5.031	2.390	4.998	2.177	5.231	2.585
	5.044		5.221		5.213	
	4.989		5.098		5.094	
	4.979		4.906		4.987	
	5.039		5.093		4.976	
	4.885		4.885		4.769	
	4.907		5.086		5.032	
	5.045		4.964		5.023	
	5.088		5.086		5.033	
	4.684		4.908		4.989	

[0106] 根据检测结果可知,冰毒污水快速检测试剂批内精密度 $CV \leq 10\%$ 。

[0107] 4、最低检出度

[0108] 取3个批号本发明试剂盒(MET20180301、MET20180302和MET20180303),然后按照第五点中的检测步骤,对标准品基质进行检测,计算测定结果平均值 $\bar{X}$ 和标准偏差SD。结果如表6。

[0109] 表6冰毒最低检出限检测结果

[0110]

参考品 浓度 ng/mL	lot : MET20180301				lot : MET20180302				lot : MET20180303			
	检测 结果	平均 值	标准 偏差	最低检 出限	检测 结果	平均 值	标准 偏差	最低检 出限	检测 结果	平均值	标准 偏差	最低检 出限
标准品 基质	0.011	0.018	0.005	0.033	0.021	0.019	0.005	0.035	0.014	0.020	0.006	0.037
	0.012				0.013				0.023			
	0.021				0.013				0.022			
	0.016				0.023				0.013			
	0.022				0.014				0.023			
	0.012				0.012				0.022			
	0.013				0.013				0.011			
	0.013				0.024				0.012			
	0.022				0.016				0.013			
	0.021				0.015				0.031			
	0.024				0.021				0.023			
	0.019				0.011				0.021			
	0.015				0.023				0.019			
	0.012				0.015				0.024			
	0.025				0.025				0.018			
	0.021				0.029				0.026			
	0.019				0.019				0.021			
	0.023				0.021				0.028			
0.026	0.025	0.023										

[0111] 根据检测结果可知,冰毒污水快速检测试剂的最低检出限 (X+3SD) ≤0.05ng/mL。

[0112] 5、稳定性

[0113] 每个产品每批次各抽取400人份的成品放入常温的环境下,检测时间按0、3、6、9、12、18、24、30、31个月进行。检测线性:选择浓度为0.05ng/mL、0.5ng/mL、1ng/mL、5ng/mL、10ng/mL的企业内部参考品进行测量。

[0114] 表7冰毒成品的线性的检测结果(测试时间:0个月)

[0115]

参考品浓 度 ng/mL	lot : MET20180301			lot : MET20180302			lot : MET20180303		
	检测结果	平均值	相对偏差%	检测结果	平均值	相对偏 差%	检测结果	平均值	相对偏差%
0.05	0.052	0.049	-1.333	0.047	0.048	-4.667	0.051	0.051	2.000
	0.051			0.046			0.054		
	0.045			0.050			0.048		
0.5	0.481	0.497	-0.667	0.476	0.478	-4.333	0.550	0.531	6.267
	0.506			0.485			0.522		
	0.503			0.474			0.522		

[0116]

1	1.105	1.014	1.433	1.005	0.977	-2.267	1.070	0.995	-0.500
	0.935			0.982			0.992		
	1.003			0.945			0.923		
5	5.341	5.116	2.320	5.136	5.096	1.927	4.994	5.136	2.713
	5.358			4.712			5.103		
	4.649			5.441			5.310		
10	9.890	9.817	-1.830	9.720	9.843	-1.567	9.776	9.818	-1.817
	10.000			9.963			10.017		
	9.561			9.847			9.662		

[0117] 表8冰毒成品的线性的检测结果(测试时间:3个月)

[0118]

参考品浓度 ng/mL	lot : MET20180301			lot : MET20180302			lot : MET20180303		
	检测结果	平均值	相对偏差%	检测结果	平均值	相对偏差%	检测结果	平均值	相对偏差%
0.05	0.053	0.049	-1.333	0.045	0.048	-4.667	0.051	0.049	-2.000
	0.048			0.045			0.046		
	0.047			0.053			0.050		
0.5	0.544	0.517	3.400	0.559	0.527	5.400	0.514	0.532	6.333
	0.467			0.548			0.525		
	0.540			0.474			0.556		
1	1.029	1.016	1.600	0.947	0.995	-0.500	0.983	1.094	9.433
	0.941			1.048			1.156		
	1.078			0.990			1.144		
5	5.280	4.949	-1.013	4.916	5.161	3.227	4.904	5.086	1.713
	4.668			5.342			5.255		
	4.900			5.226			5.098		
10	9.753	9.782	-2.183	9.760	9.935	-0.647	9.933	9.944	-0.557
	9.609			10.019			10.009		
	9.983			10.027			9.891		

[0119] 表9冰毒成品的线性的检测结果(测试时间:6个月)

[0120]

参考品浓度 ng/mL	lot : MET20180301			lot : MET20180302			lot : MET20180303		
	检测结果	平均值	相对偏差%	检测结果	平均值	相对偏差%	检测结果	平均值	相对偏差%
0.05	0.053	0.051	1.333	0.049	0.050	-0.667	0.054	0.049	-2.667
	0.048			0.054			0.046		
	0.051			0.046			0.046		
0.5	0.482	0.508	1.533	0.564	0.545	9.067	0.533	0.517	3.467
	0.523			0.550			0.480		
	0.518			0.522			0.539		
1	1.133	1.127	12.667	1.031	1.084	8.433	0.927	1.005	0.500
	1.103			1.155			1.154		
	1.144			1.067			0.934		
5	4.797	5.014	0.287	4.954	5.044	0.887	4.845	4.887	-2.253
	4.935			4.744			4.867		
	5.311			5.435			4.950		

[0121]

10	9.705	9.668	-3.317	9.868	9.847	-1.530	9.818	9.657	-3.427
	9.537			9.743			9.597		
	9.763			9.930			9.557		

[0122] 表10冰毒成品的线性的检测结果(测试时间:9个月)

[0123]

参考品浓度 ng/mL	lot : MET20180301			lot : MET20180302			lot : MET20180303		
	检测结果	平均值	相对偏差%	检测结果	平均值	相对偏差%	检测结果	平均值	相对偏差%
0.05	0.046	0.048	-3.333	0.048	0.049	-2.000	0.054	0.052	3.333
	0.047			0.051			0.050		
	0.052			0.048			0.051		
0.5	0.521	0.497	-0.600	0.489	0.501	0.267	0.513	0.514	2.867
	0.516			0.460			0.470		
	0.454			0.555			0.560		
1	1.060	1.077	7.733	1.127	1.042	4.200	1.044	1.097	9.667
	1.142			0.945			1.137		
	1.030			1.054			1.109		
5	5.030	4.909	-1.827	5.389	4.955	-0.907	4.654	4.720	-5.593
	5.056			4.693			4.729		
	4.640			4.782			4.778		
10	9.714	9.836	-1.640	9.885	9.791	-2.087	9.712	9.858	-1.420
	9.955			9.916			9.874		
	9.839			9.573			9.988		

[0124] 表11冰毒成品的线性的检测结果(测试时间:12个月)

[0125]

参考品浓度 ng/mL	lot : MET20180301			lot : MET20180302			lot : MET20180303		
	检测结果	平均值	相对偏差%	检测结果	平均值	相对偏差%	检测结果	平均值	相对偏差%
0.05	0.045	0.049	-2.667	0.052	0.049	-1.333	0.045	0.047	-5.333
	0.053			0.049			0.045		
	0.048			0.047			0.052		
0.5	0.510	0.528	5.533	0.454	0.491	-1.733	0.542	0.514	2.733
	0.526			0.537			0.470		
	0.547			0.483			0.529		
1	1.146	1.050	5.000	1.120	1.109	10.900	0.967	1.002	0.200
	0.960			1.152			1.023		
	1.044			1.055			1.016		
5	4.941	4.960	-0.807	4.980	5.127	2.540	4.925	4.973	-0.547
	5.311			4.965			5.363		
	4.627			5.436			4.630		
10	10.007	9.786	-2.137	9.629	9.598	-4.017	9.663	9.865	-1.347
	9.777			9.631			9.998		

[0126]

	9.575			9.535			9.935		
--	-------	--	--	-------	--	--	-------	--	--

[0127] 表12冰毒成品的线性的检测结果(测试时间:15个月)

[0128]

参考品浓度 ng/mL	lot : MET20180301			lot : MET20180302			lot : MET20180303		
	检测结果	平均值	相对偏差%	检测结果	平均值	相对偏差%	检测结果	平均值	相对偏差%
0.05	0.053	0.051	1.333	0.052	0.051	1.333	0.054	0.049	-2.667
	0.053			0.052			0.047		
	0.046			0.048			0.045		
0.5	0.562	0.548	9.533	0.513	0.517	3.400	0.484	0.521	4.133
	0.527			0.475			0.520		
	0.554			0.563			0.558		
1	1.101	1.076	7.633	1.026	1.060	6.000	1.093	1.091	9.133
	1.114			1.074			1.152		
	1.014			1.080			1.029		
5	4.681	4.949	-1.027	5.118	5.294	5.887	5.282	5.028	0.560
	5.060			5.426			4.815		
	5.105			5.339			4.987		
10	9.824	9.742	-2.583	9.533	9.844	-1.560	9.755	9.789	-2.113
	9.785			10.000			9.632		
	9.616			9.999			9.979		

[0129] 根据检测结果可知,冰毒污水快速检测试剂的稳定性至少可放置常温保存15个月。

## SEQUENCE LISTING

<110> 江苏苏博生物医学科技南京有限公司

江苏苏博生物医学股份有限公司

<120> 一种时间分辨荧光免疫层析技术检测污水中痕量毒品的试剂盒及其应用

<130> 1

<160> 1

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

ggacgcgcac agatctcggg gctgtccacg gctgc 35

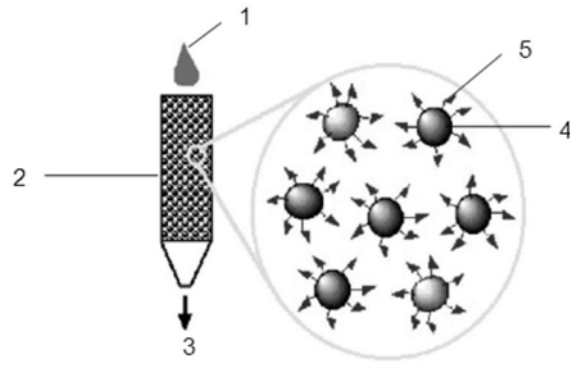


图1

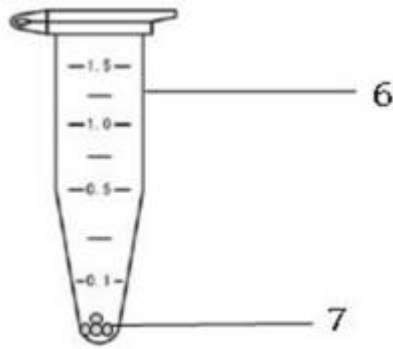


图2

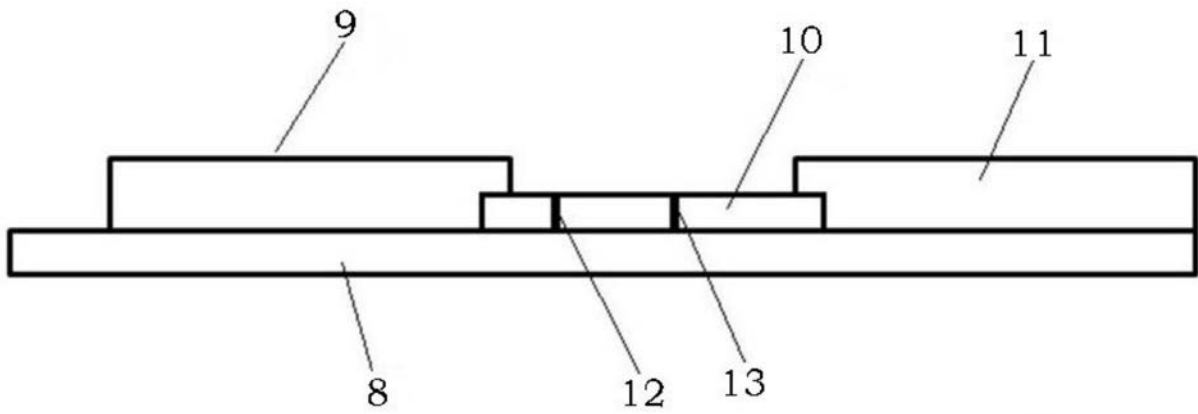


图3

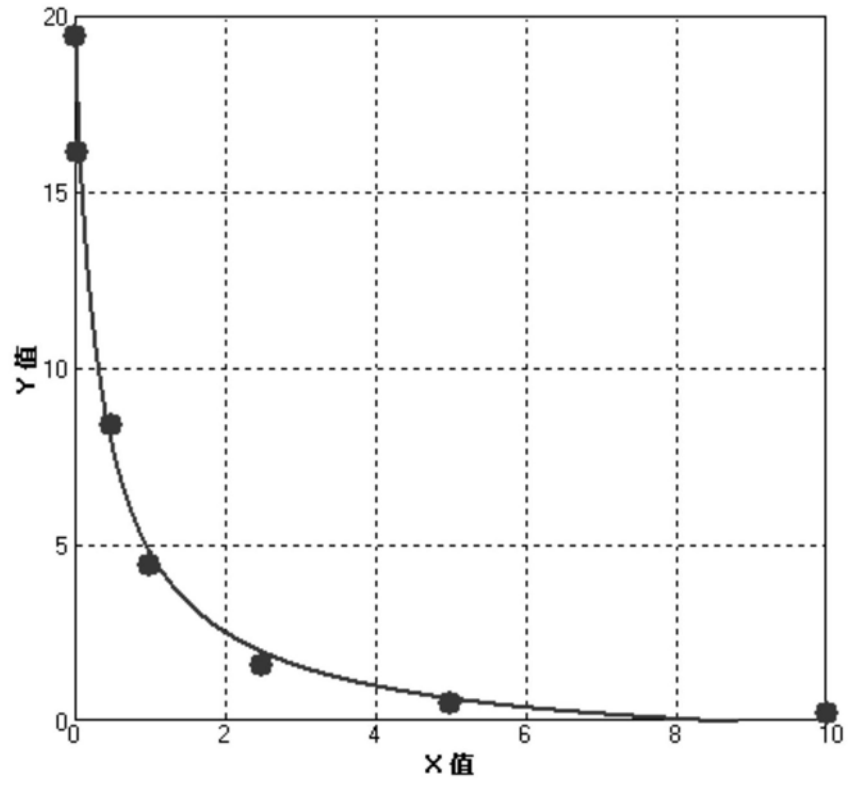


图4

专利名称(译)	一种时间分辨荧光免疫层析技术检测污水中痕量毒品的试剂盒及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN110426515A</a>	公开(公告)日	2019-11-08
申请号	CN201910486826.6	申请日	2019-06-05
[标]申请(专利权)人(译)	江苏苏博生物医学科技南京有限公司 江苏苏博生物医学股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	江苏苏博生物医学科技南京有限公司 江苏苏博生物医学股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	江苏苏博生物医学科技南京有限公司 江苏苏博生物医学股份有限公司		
[标]发明人	王宇峰 郑超 张明航 苏雪峰 赵晓芳 刘洋春 黄平		
发明人	王宇峰 徐声乐 郑超 张明航 苏雪峰 赵晓芳 刘洋春 黄平		
IPC分类号	G01N33/559 G01N33/543 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/54326 G01N33/559		
代理人(译)	杨勇		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种时间分辨荧光免疫层析技术检测污水中痕量毒品的试剂盒及其应用，一种时间分辨荧光免疫层析技术检测污水中痕量毒品的试剂盒，包括盒体，盒体内设有适配体亲和柱、时间分辨荧光微球冻干管和免疫层析试纸条。本发明采用时间分辨荧光微球进行抗体的标记，荧光半衰期长，产品稳定性较好，利于常温保存；检测限达到50ng/L，实现了毒品的精确检测；用适配体亲和柱将污水中待测药物甲基苯丙胺等小分子富集浓缩，提高了试纸条污水检测的灵敏度，按照浓缩10倍的效果，实际污水检测灵敏度可达到5ng/L；在批间差及试纸条的精密度方面有明显优势，而且反应充分，灵敏度更高；操作简便，本发明试纸条使用操作简便，不需要专业人员操作。

