

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103159669 A

(43) 申请公布日 2013.06.19

(21) 申请号 201110421698.0

C07K 14/795 (2006.01)

(22) 申请日 2011.12.15

C07K 14/435 (2006.01)

(83) 生物保藏信息

C07K 16/44 (2006.01)

CCTCC C20111118 2011.12.12

C12N 5/20 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

(71) 申请人 曾立波

G01N 33/564 (2006.01)

地址 200083 上海市虹口区中山北一路 803 号

C12R 1/91 (2006.01)

申请人 陈连康

胡小龙

张玉荣

(72) 发明人 曾立波 陈连康 胡小龙 张玉荣

(74) 专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司 31266

代理人 祝莲君 雷芳

(51) Int. Cl.

C07D 211/64 (2006.01)

C07K 14/765 (2006.01)

C07K 14/77 (2006.01)

权利要求书1页 说明书15页 附图2页

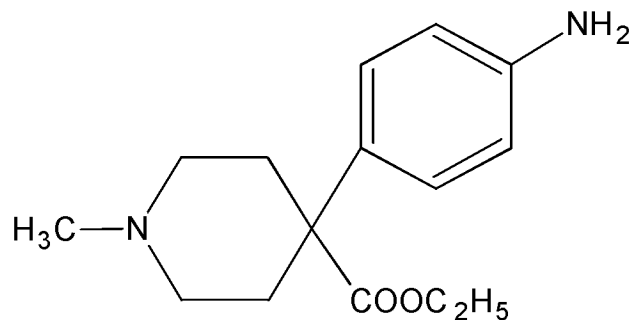
(54) 发明名称

度冷丁单克隆抗体及免疫检测板和试剂盒

(57) 摘要

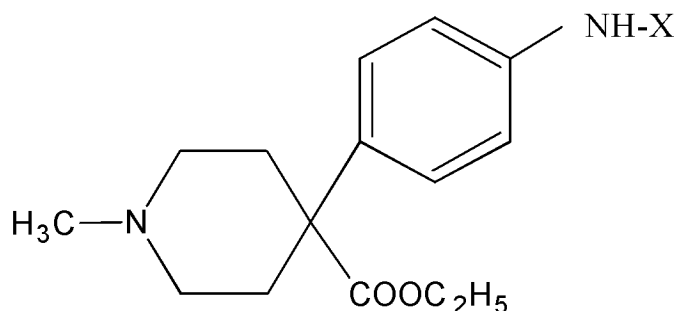
本发明涉及度冷丁单克隆抗体及免疫检测板和试剂盒。具体地,本发明公开了用一种度冷丁半抗原和度冷丁完全抗原的制备方法,本发明还公开了该完全抗原制备的抗度冷丁单克隆抗体,以及胶体金标记度冷丁单抗免疫检测板。与HPLC等色谱方法相比,本发明的检测板简单、轻便、易于携带,不需要昂贵的设备,可以现场检测。使用本发明的检测板检测度冷丁,整个测试可在3min内完成,灵敏度高,且与30种常见药物和毒品没有交叉反应。

1. 一种半抗原,其特征在于,所述半抗原具有式 I 所示的结构:



式 I

2. 一种完全抗原,其特征在于,所述完全抗原具有式 II 所示的结构:



式 II

其中, X 为蛋白质载体。

3. 一种制备权利要求 2 所述完全抗原的方法,其特征在于,所述方法包括步骤:
- 对度冷丁进行硝化,在其苯环的对位接入硝基基团,从而形成对硝基-度冷丁;
 - 将对硝基-度冷丁中的硝基还原为氨基,以制得权利要求 1 中式 I 所述的对氨基-度冷丁;
 - 将对氨基-度冷丁与蛋白质载体连接,以制得权利要求 2 中式 II 所示的完全抗原。
4. 一种权利要求 1 所述的半抗原或权利要求 2 所述完全抗原的用途,其特征在于,用于制备度冷丁特异性的免疫球蛋白。
5. 一种免疫球蛋白,其特征在于,它特异性地与度冷丁结合。
6. 一种产生权利要求 5 所述的免疫球蛋白的杂交瘤细胞系,其特征在于,它是度冷丁单克隆抗体杂交瘤细胞株 DLT-001CCTCC. C2011118。
7. 一种权利要求 5 所述的免疫球蛋白的用途,其特征在于,用于制备检测样品中度冷丁的试剂、检测板或试剂盒。
8. 一种检测生物样品中是否存在度冷丁的方法,其特征在于,包括步骤:
- 将样品与权利要求 5 所述的免疫球蛋白接触;
 - 检测是否形成抗原-抗体复合物,其中形成复合物就表示样品中存在度冷丁。
9. 一种检测板,其特征在于,所述的检测板包括基片(支撑板)和测试条,所述的测试条含有权利要求 5 所述的免疫球蛋白。
10. 一种试剂盒,其特征在于,所述的试剂盒含有一容器以及位于容器内的权利要求 5 所述的免疫球蛋白,或者所述的试剂盒含有权利要求 9 所述的检测板。

度冷丁单克隆抗体及免疫检测板和试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及违禁药品的检测领域,尤其涉及度冷丁单克隆抗体及免疫检测板和试剂盒。

背景技术

[0002] 毒品泛滥作为当今世界最严重的公害之一,越来越引起国际社会的关注。据联合国有关资料显示:毒品问题已对人类的生存和发展构成重大威胁,全世界至少有 5100 万人遭受毒品之害,全球每年毒品交易额已超过 5000 亿美元。近年来我国的毒品问题日趋严重,毒品滥用的趋势更为迅猛。上海地区的毒品犯罪形势也十分严峻。

[0003] 度冷丁是国际国内严格管制的滥用药物。度冷丁又名哌替啶,学名 N-甲基-4-苯基哌啶-4-甲酸乙酯(其结构见图 1)。度冷丁成瘾性很强,滥用度冷丁可造成严重的呼吸中枢障碍,其代谢产物去甲基度冷丁毒性更大,并可导致肌肉震颤和惊厥,严重损害人体健康,甚至导致死亡。由于度冷丁价格便宜,比海洛因容易买到,所以吸食、贩卖度冷丁的案件有严重上升趋势。

[0004] 在打击毒品犯罪案件中,毒品检验工作在其中发挥极其重要的作用,它不仅为侦破毒品犯罪提供了线索,也为法庭量刑、定刑提供了科学的依据。目前,气质联用(GC-MS)检测法是度冷丁检测的标准方法,但其存在以下缺点:1、仪器价格昂贵,一般单位无法购买,不易普及;2、检测仪器要在良好的实验室才能操作,对仪器操作都要求严格的培训;3、对检材都需要提取及衍生化,其操作繁琐时间长;4、上述仪器不能快速用于现场检测。

[0005] 特定的结合反应,例如抗原-抗体反应,已经广泛用于检测生物样品中存在的各种物质的免疫测试中。其中,胶体金免疫层析技术是近年来发展起来的一种独特的免疫诊断技术,具有免疫反应和色谱层析的特定,与 GC-MS 比较,胶体金层析技术具有特异性强、灵敏度高、简单快速、易于操作、结果容易判读、无需任何仪器设备等优点。

[0006] 然而,度冷丁是一种小分子物质,只具备免疫反应性,而没有免疫原性,因此不能用来直接免疫动物产生抗体。因此目前本领域目前还没有一种成熟有效迅速的检测度冷丁的方法,因此本领域急需开发准确、特异性强、快速、灵敏、且能在现场检测度冷丁的新方法。

发明内容

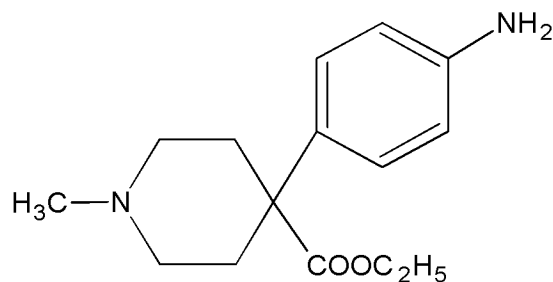
[0007] 本发明的目的是提供度冷丁的半抗原和完全抗原的合成方法。

[0008] 本发明的另一目的是提供一种制备度冷丁单克隆抗体方法和具有分泌抗度冷丁单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0009] 本发明的另一目的是提供检测度冷丁的免疫检测试剂、免疫检测板和试剂盒。

[0010] 在本发明的第一方面,提供了一种半抗原,所述半抗原具有式 I 所示的结构:

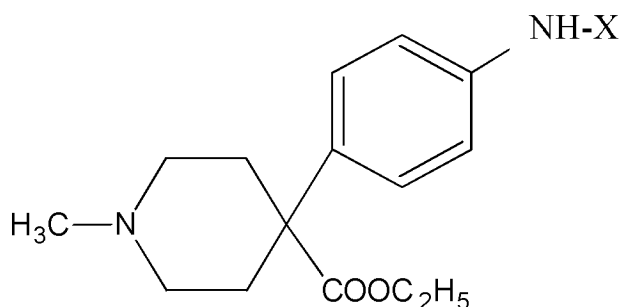
[0011]



式I

[0012] 在本发明的第二方面,提供了一种完全抗原,所述完全抗原具有式 II 所示的结构:

[0013]



式 II

[0014] 其中, X 为蛋白质载体。

[0015] 在另一优选例中,所述蛋白质载体 X 选自下组:血蓝蛋白、牛血清白蛋白、卵清蛋白或 γ 球蛋白,较佳地,所述的蛋白质载体 X 是血蓝蛋白或牛血清白蛋白。

[0016] 在本发明的第三方面,提供了一种制备本发明第二方面所述完全抗原的方法,所述方法包括步骤:

[0017] (a) 对度冷丁进行硝化,在其苯环的对位接入硝基基团,从而形成对硝基-度冷丁;

[0018] (b) 将对硝基-度冷丁中的硝基还原为氨基,以制得式 I 所示的对氨基-度冷丁;

[0019] (c) 将对氨基-度冷丁与蛋白质载体连接,以制得式 II 所示的完全抗原。

[0020] 在另一优选例中,步骤 (a) 的硝化反应条件如下:反应温度为 $-10-10^{\circ}\text{C}$,较佳地为 $-5-0^{\circ}\text{C}$;反应时间为 0.5-24 小时,较佳地为 1-12 小时,更佳地为 2-5 小时。

[0021] 在另一优选例中,步骤 (b) 的还原条件如下:反应温度为室温 -100°C ,较佳地为 $50-70^{\circ}\text{C}$,更佳地为 60°C ;反应时间为 1-24 小时,较佳地为 2-10 小时,更佳地为 2 小时。

[0022] 在另一优选例中,步骤 (c) 的连接反应条件如下:反应温度为 $0-40^{\circ}\text{C}$,较佳地为 $20-25^{\circ}\text{C}$;反应 pH 为 3.0-6.0,较佳地为 4.5;反应时间为 2-24 小时,较佳地为 3-12 小时,更佳地为 4 小时。

[0023] 在本发明的第四方面,提供了本发明第一方面所述的半抗原或本发明第二方面所述完全抗原的用途,所述的半抗原或完全抗原用于制备度冷丁特异性的免疫球蛋白。

[0024] 在本发明的第五方面,提供了一种免疫球蛋白(或抗体),它特异性地与度冷丁结合。

[0025] 在另一优选例中,所述免疫球蛋白由度冷丁单克隆抗体杂交瘤细胞株

DLT-001CCTCC. C2011118 所产生。

[0026] 在另一优选例中,所述的免疫球蛋白与度冷丁的结合效价为 0.1×10^{-7} – 5×10^{-7} ,更佳地,结合效价为 0.13×10^{-7} 。

[0027] 在另一优选例中,所述的免疫球蛋白还与度冷丁的体内代谢物去甲基度冷丁结合。

[0028] 在另一优选例中,所述的免疫球蛋白为单克隆抗体。

[0029] 在本发明的第六方面,提供了一种产生本发明的第五方面所述的免疫球蛋白的杂交瘤细胞系,较佳地,所述的杂交瘤细胞系是度冷丁单克隆抗体杂交瘤细胞株 DLT-001CCTCC. C2011118。

[0030] 在本发明的第七方面,提供了一种本发明的第五方面所述的免疫球蛋白的用途,所述的免疫球蛋白用于制备检测样品中度冷丁的试剂、检测板或试剂盒。

[0031] 在另一优选例中,所述的样品是生物样品,较佳地为体液样品,更佳地为血样、尿样或唾液。

[0032] 在本发明的第八方面,提供了一种检测生物样品中是否存在度冷丁的方法,包括步骤:

[0033] (1) 将样品与本发明第五方面所述的免疫球蛋白接触;

[0034] (2) 检测是否形成抗原-抗体复合物,其中形成复合物就表示样品中存在度冷丁。

[0035] 在另一优选例中,所述的免疫球蛋白带有可检测标记物,较佳地,所述可检测标记物选自下组:胶体金标记物、有色标记物或荧光标记物。

[0036] 在另一优选例中,所述检测方法为胶体金检测法、比色检测法、荧光检测法,或其组合。

[0037] 在本发明的第九方面,提供了一种检测板,所述的检测板包括基片(支撑板)和测试条,所述的测试条含有本发明的第五方面所述的免疫球蛋白。

[0038] 在另一优选例中,所述的测试条还含有完全抗原点样区,所述的完全抗原点样区含有固定化的式 II 所示的完全抗原。

[0039] 在另一优选例中,所述的测试条由滤样纸、层析材料、硝酸纤维素膜和吸水纸依次搭接组成。

[0040] 在另一优选例中,所述层析材料预包被有经胶体金标记或有色标记的本发明的第五方面所述的免疫球蛋白;

[0041] 所述硝酸纤维素膜上吸附有检测线和质控线,所述的检测线为式 II 所示的完全抗原;

[0042] 所述的质控线为固定的 SPA。

[0043] 在本发明的第十方面,提供了一种试剂盒,所述的试剂盒含有一容器以及位于容器内的本发明的第五方面所述的免疫球蛋白,或者所述的试剂盒含有本发明的第九方面所述的检测板。

[0044] 应理解,在本发明范围内中,本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合,从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅,在此不再一一累述。

附图说明

[0045] 下列附图用于说明本发明的具体实施方案,而不用限定由权利要求书所界定的本发明范围。

[0046] 图 1 显示了度冷丁的分子结构。

[0047] 图 2 显示了度冷丁半抗原的合成过程。

[0048] 图 3 显示了度冷丁半抗原转化为度冷丁完全抗原的合成过程。

[0049] 图 4 显示了检测板的结构和原理。

[0050] 图 5 显示了检测板在不同条件下的检测结果。

具体实施方式

[0051] 本发明人经过广泛而深入的研究,首次制备了度冷丁单克隆抗体及免疫检测板和试剂盒。具体地,本发明制备了一种度冷丁半抗原和度冷丁完全抗原,并使用该完全抗原制备了抗度冷丁单克隆抗体以及胶体金标记度冷丁单抗免疫检测板。与色谱法相比,本发明的检测方法简单、轻便、检测设备易于携带,并可以实现可以现场检测。整个测试可在 3min 内完成,灵敏度高,特异性好,与常见药物、毒品没有交叉反应。

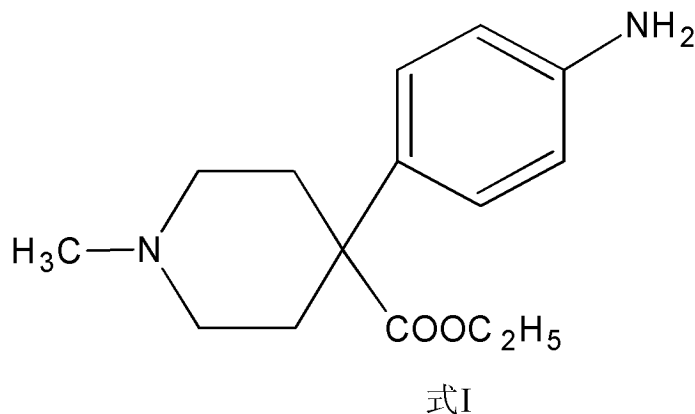
[0052] 术语

[0053] 半抗原

[0054] 度冷丁分子量很小(图 1),是半抗原物质,只具备免疫反应性,没有免疫原性,不能直接用于免疫动物而获得抗体。因此,为了制备本发明的完全抗原,对度冷丁进行了活化并制得了本发明的半抗原。

[0055] 如本文所用,本发明的“半抗原”或“度冷丁活化衍生物”是指经本发明的衍生反应得到的具有结构式 1 的氨基度冷丁,结构如式 I 所示。

[0056]



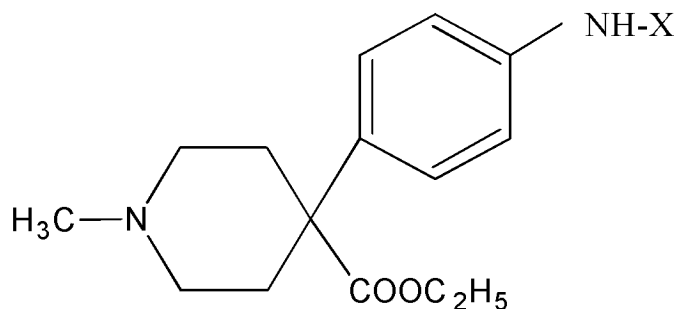
[0057] 完全抗原

[0058] 通常,半抗原需要和大分子蛋白(如 KLH 血蓝蛋白或 BSA 牛血清白蛋白)以共价键方式偶联,成为既具有免疫反应性,又具有免疫原性的完全抗原。

[0059] 如本文所用,本发明的“完全抗原”是指本发明的半抗原与适当的蛋白质载体结合后的产物。

[0060] 如本文所用,本发明中的“蛋白质载体”是指任何在免疫学上可接受的用于形成完全抗原的蛋白质,其可为例如,血蓝蛋白、牛血清白蛋白、卵清蛋白或 γ 球蛋白等。

[0061]



式II

[0062] 在本发明的一个优选例中,式 II 中的 X 为牛血清白蛋白或卵清蛋白。

[0063] 完全抗原的制备方法

[0064] 度冷丁完全抗原的制备方法如图 2 所示。

[0065] 在本发明的一个优选例中,首先将度冷丁进行硝化,在其苯环上引入一个硝基基团,然后将硝基还原为氨基,使其具有活泼的化学性质(度冷丁半抗原)。然后采用同源双功能氨基偶联剂作为偶联剂将活化的度冷丁与 BSA 偶联,这样度冷丁成为完全抗原,具有的免疫原性。

[0066] 其中所述的硝化和还原反应可以本领域技术人员已知的任何方法、任何适宜的条件进行。例如,本发明的硝化反应可在如下条件下进行:反应温度为 $-10-10^{\circ}\text{C}$,较佳地 $-5-0^{\circ}\text{C}$;反应时间为 0.5-24 小时,较佳地 1-12 小时,更佳地 2-5 小时。本发明的还原反应条件可在如下条件下进行:反应温度为室温 -100°C ,较佳地 $50-70^{\circ}\text{C}$,更佳地 60°C ;反应时间为 1-24 小时,较佳地 2-10 小时,更佳地 2 小时。本发明的载体连接反应可在如下条件下进行:反应温度为 $0-40^{\circ}\text{C}$,较佳地 $20-25^{\circ}\text{C}$;反应 pH 为 3.0-6.0,较佳地 4.5;反应时间为 2-24 小时,较佳地 3-12 小时,更佳地 4 小时。

[0067] 本领域普通技术人员可根据具体操作或对产物的要求对这些条件进行适当调整。

[0068] 本发明的半抗原和蛋白质载体的连接可使用本领域已知的任何连接方式。例如但不限于:碳二亚胺法(EDC)、戊二醛法等。

[0069] 用本发明方法制备的完全抗原具有极好的免疫原性,能刺激小鼠产生强烈的免疫反应,抗血清效价很高,且完全抗原完全保留了度冷丁的免疫反应性。

[0070] 单克隆抗体的制备

[0071] 本文所用的术语“单克隆抗体”是指获自基本上同源的抗体群的抗体,即,组成该群体的抗体个体都相同,除了可能存在少量可能的自发突变。因此,修饰语“单克隆的”是指该抗体的性质不是离散抗体的混合物。

[0072] 本发明的抗体可以通过本领域内技术人员已知的各种技术进行制备。例如,本发明完全抗原,可被施用于动物以诱导单克隆抗体的产生。对于单克隆抗体,可利用杂交瘤技术来制备(见 Kohler 等人, Nature 256:495, 1975; Kohler 等人, Eur. J. Immunol. 6:511, 1976; Kohler 等人, Eur. J. Immunol. 6:292, 1976; Hammerling 等人, In Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas, Elsevier, N. Y., 1981) 或可用重组 DNA 法(美国专利号 4,816,567) 制备。

[0073] 代表性的骨髓瘤细胞是有效融合、通过选择的抗体产生细胞支持抗体的稳定高水平产生、且对培养基（HAT 培养基基质）敏感的那些骨髓瘤细胞，包括骨髓瘤细胞系，例如鼠类的骨髓瘤细胞系，包括衍生自 MOPC-21 和 MPC-11 小鼠肿瘤的骨髓瘤细胞系（可购自 Salk Institute Cell Distribution Center, 圣地亚哥, 加利福尼亚, 美国）以及 SP-2、NZO 或 X63-Ag8-653 细胞（可购自 American Type Culture Collection, 洛克维尔, 马里兰, 美国）。人骨髓瘤和小鼠-人杂合骨髓瘤细胞系也已被描述用于产生人单克隆抗体 [Kozbor, J. Immunol., 133 :3001(1984) ;Brodeur 等, 单克隆抗体的生产技术和应用 (Monoclonal Antibodies Production Techniques and Applications), 51-63 页 (Marcel Dekker, Inc., 纽约, 1987)]。

[0074] 对杂交瘤细胞生长于其中的培养基进行分析以检测具有所需特异性的单克隆抗体的产生, 如, 通过体外结合分析例如, 酶联免疫吸附分析 (ELISA) 或放射免疫分析 (RIA)。表达抗体的细胞的位置可用 FACS 进行检测。然后, 可将杂交瘤克隆通过有限稀释步骤形成亚克隆 (subcloned), 并通过标准方法生长 (Goding, 单克隆抗体 (Monoclonal Antibodies): 原则和实践 (Principles and Practice), Academic Press (1986) 59-103 页)。为了达到这一目的而使用的适合的培养基包括, 例如, DMEM 或 RPMI-1640 培养基。此外, 杂交瘤细胞可在动物体内作为腹水瘤生长。

[0075] 由亚克隆分泌的单克隆抗体从培养基、腹水或血清中通过常规的免疫球蛋白纯化工艺适当地得到分离, 这些纯化工艺为例如, 蛋白 A- 琼脂糖法 (protein A-Sepharose)、羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析或亲和层析。

[0076] 本发明提供了一种度冷丁的单克隆抗体。在本发明的一个优选的方案中, 单克隆抗体采用培养杂交瘤细胞方法制备。取杂交瘤细胞培养的上清液, 经饱和硫酸铵沉淀法粗提出 IgG, 再将粗提的抗体经亲和层析柱 (Protein G-Sepharose) 纯化。

[0077] 本发明的一个优选的方案中, 单克隆抗体采用 Balb/C 小鼠腹水生产单克隆抗体的方法制备。将杂交瘤细胞接种到致敏的小鼠腹腔内, 2-4 周内可见腹部明显胀大。抽取腹水, 经饱和硫酸铵沉淀法粗提出 IgG, 再将粗提的抗体经亲和层析柱 (Protein G-Sepharose) 纯化。

[0078] 本发明在采用度冷丁完全抗原免疫的小鼠脾淋巴细胞与小鼠骨髓瘤 SP/20 细胞按常规方法制备杂交瘤时, 筛选到一株度冷丁单克隆抗体杂交瘤细胞株 DLT-001, 保藏单位为: 中国典型培养物保藏中心, 保藏号为 CCTCC. C2011118, 保藏日期为 2011 年 12 月 12 日。

[0079] 标记的免疫球蛋白

[0080] 在本发明的一个优选例中, 所述免疫球蛋白带有可检测标记物。更佳地, 所述的标记物选自下组: 胶体金标记物、有色标记物或荧光标记物。

[0081] 通过培养杂交瘤细胞或小鼠腹水方法生产单克隆抗体, 生产的抗体用胶体金标记。具体方法见: 曾立波、陈连康等《关于建立度冷丁单克隆抗体的研究》第三届全国毒物分析学术交流会论文选, 289-294, 中国人民公安大学出版社 2000 年 9 月; 朱立平、陈学清《免疫学常用实验方法》人民军医出版社 2000 年 3 月; Ed Harlow, David Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual. 1999。

[0082] 胶体金标记可采用本领域技术人员已知的方法进行。在本发明的一个优选的方案中, 抗度冷丁的单克隆抗体用胶体金标记, 得到胶体金标记的单克隆抗体。

[0083] 本发明的抗度冷丁单克隆抗体具有很好的特异性,很高的效价,与 30 种常见药物、毒品、没有交叉反应;与度冷丁-BSA 的载体 BSA 没有交叉反应。

[0084] 度冷丁检测用胶体金标记-免疫检测板

[0085] 检测原理

[0086] 度冷丁的检测采用竞争抑制法。将度冷丁-BSA 固定于硝酸纤维膜上的检测区(固相抗原),待检样品溶液中的度冷丁(游离抗原)与固相抗原竞争结合胶体金标记的抗度冷丁单抗(标记抗体)。待检样品中含有的度冷丁,将抑制标记抗体与固定抗原的结合,抑制在硝酸纤维素膜的检测区形成色带。测定后检测区如果形成色带,则结果为阴性,待测样品不含度冷丁;反之,不形成色带,则结果为阳性,检测样品含有度冷丁。

[0087] 通常,在检测中设置内质控。本发明在硝酸纤维膜的检测区临近设置的质控区,在层析载体玻璃纤维纸上预包有被胶体金标记或有色标记的度冷丁单克隆抗体。无论待检样品中是否含有度冷丁,层析载体玻璃纤维上预包被的胶体金标记或有色标记的度冷丁单克隆抗体总能与硝酸纤维素膜上的抗体结合形成一条有色质控带,该条色带是判定层析过程是否正常和检测板是否变质的标准。

[0088] 检测板及其材料

[0089] 本发明的检测板可采用本领域常用的检测板材料,采用常规的检测板制备方法制成。

[0090] 本发明检测度冷丁的免疫检测板,包括测试条和支撑测试条的支撑板,如可采用 PVC 聚脂胶板等;所述的测试条由滤样纸、层析材料、硝酸纤维素膜和吸水纸依次搭接组成,搭接部位可以采用常规的方法,如胶带等固定连接;其中:层析材料预包被胶体金标记或有色标记的度冷丁单克隆抗体或多克隆抗体,优选被胶体金标记的度冷丁单克隆抗体,硝酸纤维素膜上吸附检测线和质控线;

[0091] 所述的检测线为完全抗原度冷丁-BSA,检测线所在的区域为检测区;

[0092] 所述的质控线为固定化 SPA,质控线所在的区域为质控区。

[0093] 在一个优选的方案中:层析材料上预包被胶体金标记的度冷丁单克隆抗体是采用浓度为 0.5-1.5mg/ml 胶体金标记的度冷丁单克隆抗体溶液进行预包被的,包被量为 $50 \mu\text{l}/\text{cm}^2$;优选的浓度为 0.5 或 1.5mg/ml, $50 \mu\text{l}/\text{cm}^2$;

[0094] 硝酸纤维膜上吸附的完全抗原度冷丁-BSA 是采用浓度为 0.5 ~ 1mg/ml 的完全抗原度冷丁-BSA 溶液进行吸附的,吸附量为 $10 \mu\text{l}/\text{cm}^2$;优选的浓度为 0.5 或 1mg/ml, $10 \mu\text{l}/\text{cm}^2$;检测板的最低检测量在 5ng/ml 之间。

[0095] 免疫检测板的性能

[0096] 本发明的胶体金标记度冷丁单抗免疫检测板具有如下性能:

[0097] 灵敏度高:调节试剂条上预包被的胶体金标记的单抗溶液、度冷丁-BSA 完全抗原的量,测试样品中含有的度冷丁,进行灵敏度测试。结果表明,本发明的胶体金标记的度冷丁单克隆抗体和完全抗原制备的检测板,度冷丁的最低检测量可达到 50ng/ml。

[0098] 稳定性好:将胶体金标记的度冷丁单克隆抗体试剂条,灵敏度为 1000ng/ml 置于 4℃真空干燥 14 小时以上,结果表明,胶体金标记的度冷丁单抗能长期保存,室温下抗原保存 2 年左右。

[0099] 特异性佳:用度冷丁单克隆抗体免疫检测板检测共 32 种毒品,结果仅度冷丁和去

甲度冷丁呈阳性,其他为阴性。用于检测的毒品和药品是:度冷丁、吗啡、海洛因、苯丙胺、麻黄素、甲基苯丙胺、可待因、大麻、可卡因、咖啡因、氯丙嗪、布洛芬、蒂巴因、四氢大麻酚、利多卡因、那可丁、阿普唑仑、福尔可啉、喃氟啉、苯噻啉、安定、三唑仑、比沙可啉、苯乙呱啉、硝苯啉、卡马西平、硫唑嘌呤、阿托品、氨苯蝶啉、氟哌啉醇、甲磺酸双氢麦角毒碱和去甲基度冷丁共 32 种。

[0100] 综上所述,本发明的胶体金标记度冷丁单抗免疫检测板与 HPLC 等色谱方法相比,本发明的检测板简单、轻便,易于携带,可以现场检测,而且不需要昂贵的设备。使用本发明的检测板检测度冷丁,整个测试可在 3min 钟内完成,最低检测剂量为 5ng/ml,且与种常见药物、毒品、没有交叉反应。

[0101] 检测方法与结果判定

[0102] 平放检测板,将试样滴在滤样纸上,试样约 120 μ l,3 ~ 5min 内观察层析结果。根据出现的条纹位置来判断结果,示意图见图 5。

[0103] 阴性:质控区、检测区均出现明显的色带,示为阴性;

[0104] 阳性:只在质控区出现明显色带,而在检测区无色带,示为阳性;

[0105] 无效:质控区、检测区无任何色带或在质控区未出现色带而在检测区出现色带,表明检测方法错误或检测板变质或失效,应重新换取检测板检测。

[0106] 如果检测线较浅于质控线说明被测者吸食过此毒品但已代谢到末尾或用量较小,所以质控线也是检测板判别吸毒状况的标准。

[0107] 吸毒阈值设定

[0108] 用本发明的胶体金标记后的度冷丁单克隆抗体和完全抗原制备的检测板,度冷丁的最低检测量可达到 50ng/mL。考虑到某些正常使用的药物中也含有度冷丁成分,实际工作中为避免假阳性的出现,参照国际通行的浓度值,设定检测板的阈值以 300ng/mL 为好。

[0109] 调节试剂条上预包被的胶体金标记的度冷丁单抗溶液、度冷丁-BSA 完全抗原的量,使得检测板对度冷丁的最低检测量为 300ng/ml。当尿液中的度冷丁浓度 < 300ng/ml,胶体金标记抗度冷丁单抗通过层析作用,向上移动,与固相于硝酸纤维素膜上的完全抗原相结合,形成色带,测试结果呈阴性;当尿液中的度冷丁浓度 > 300ng/ml,胶体金标记的抗度冷丁单抗完全与尿液中的度冷丁相结合,不能与固相于硝酸纤维素膜上检测区的完全抗原相结合,检测区不能形成色带,测试结果呈阳性。

[0110] 试剂盒

[0111] 本发明还提供了一种指含有本发明的全抗原免疫球蛋白或本发明的检测板的试剂盒,在本发明的一个优选例中,所述的试剂盒还包括容器、使用说明书、缓冲剂、免疫助剂等。

[0112] 本发明的优点:

[0113] (1) 本发明的完全抗原具有高免疫原性,且保留了度冷丁的免疫反应性;

[0114] (2) 本发明的抗度冷丁单克隆抗体的特异性很高,且效价高;

[0115] (3) 本发明的胶体金标记度冷丁单抗免疫检测板具有灵敏度高、特异性强、简便快捷,可进行现场检测等优点,为打击毒品犯罪提供了有力的武器。

[0116] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条

件如 Sambrook 等人, 分子克隆 : 实验室手册 (New York : ColdSpring Harbor Laboratory Press, 1989) 中所述的条件, 或按照制造厂商所建议的条件。

[0117] 实施例 1

[0118] 度冷丁半抗原的制备

[0119] 度冷丁是一个分子量很小的半抗原物质, 本身没有免疫原性只具备免疫反应性, 因此不能用来直接免疫动物而获得抗体。为了获得度冷丁的抗体, 发明人在本实施例中首先制备一种具有度冷丁性质的半抗原, 步骤如下 (图 2) :

[0120] 1. 硝化反应 : 在反应瓶中加入度冷丁原料 0.5g 和 10mL 浓硫酸, 搅拌使之溶解, 置于冰盐浴中冷却至 -5°C , 在 1 小时内分 4 次加入由浓硝酸 (0.25mL) 和浓硫酸 (0.75mL) 1 : 3 组成的混合酸液。加完后, 0°C 条件下反应 2 小时, 然后倒入 10g 碎冰中, 待碎冰融化后, 再在 0°C 条件下反应半小时, 当有白色固体析出时, 抽滤得白色固体物 0.60g (粗品, 不必纯化即可直接用于下一步反应), 反应得率 : 50%, 反应产物经 MNR 分析为目标物。

[0121] 2. 还原反应 : 将反应产物对硝基度冷丁 0.5g 溶于 1.4mL 水中, 搅拌下加入 0.55mL 浓盐酸, 逐渐升温, $30-40^{\circ}\text{C}$ 时开始加入锌粉 (分 4 批) 共 0.60g, 直至 $50-60^{\circ}\text{C}$, 加完后, 在此温度条件下反应 2 小时, 过滤, 滤液用 20% NaOH 溶液中和至弱碱性 ($\text{PH} = 8$), 抽滤, 滤出白色固体 (为氢氧化锌) 并用温水洗涤, 合并收集的滤液, 用 30mL 二氯甲烷萃取 3 次, 合并二氯甲烷溶剂, 用饱和食盐水洗至中性, 用无水硫酸钠干燥, 溶剂挥干, 得半固体状黄色物质, 用硅胶柱层析 (展开剂比例乙酸乙酯 : 石油醚 = 1 : 2), 得浅黄色固体 252mg, 反应得率 : 52%, 反应产物经 MNR 分析为目标物, 对氨基 -N- 度冷丁。

[0122] 实施例 2

[0123] 度冷丁完全抗原的制备

[0124] 将实施例 1 中获得的对氨基 - 度冷丁, 取 100mg, 在搅拌下溶解于 10ml 双蒸水中, 然后缓慢加入 400mg 的 EDC, 边加边摇, 用 0.1M 盐酸将 pH 值调节至 4.5, 在室温下 (25°C) 继续反应 10 分钟。取 100mg 或牛血清白蛋白 BSA 溶于 5ml 双蒸水中, 加入到对氨基 - 度冷丁溶液中, 室温下 (25°C) 继续反应 2-4 小时。反应产物对 0.01M 磷酸盐缓冲液 4°C 进行透析, 除去未反应的对氨基 - 度冷丁和 EDC, 更换缓冲液 4 次。获得的反应产物即为度冷丁 - BSA 完全抗原。

[0125] 这样就使度冷丁成为完全抗原所具有的免疫原性。制备过程如图 3 所示。

[0126] 实施例 3

[0127] 1. Balb/c 小鼠的免疫

[0128] 按常规方法分别用 BSA- 度冷丁和 OVA- 度冷丁免疫 Balb/c 小鼠 (来自于上海市肿瘤研究所)。配制抗原浓度为 0.15mg/100ml 的注射液。即用 0.15mg 完全抗原 / 每小鼠免疫 Balb/c 小鼠, 共免疫 4 只小鼠, 每 10 天一次, 两个月后应用眼球放血法采血, 离心收集抗血清。

[0129] 2. ELISA 反应测定抗血清效价

[0130] 用 100.0uL 10.0ug/mL 的杜冷丁 - BSA 抗原包被 96 孔酶标板 4°C 过夜, 包被液采用 0.05M pH9.6 碳酸缓冲液, 再用 0.01M PBS 1% BSA 37°C 封闭 1 小时, 1 : 1000 倍稀释抗血清, 以 PBS 作为阴性对照, 37°C 孵育 1 小时。洗涤液洗板 3 次后, 加 1 : 4000 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠多抗, 37°C 孵育 1 小时, 洗板后加酶底物 TMB/ H_2O_2 显色 10 分钟, 用 0.2N 的

HCl 终止反应。读取 450nm 波长吸光值。

[0131] 按照以上方法测定抗体的滴度,4 只免疫小鼠的血清的效价为 1 : 12800, 1 : 6400, 1 : 3200 和 1 : 3200。

[0132] 实施例 4

[0133] 杂交瘤细胞的制备和克隆

[0134] 1. 饲养细胞的制备

[0135] 在细胞培养中,单个或少数分散的细胞一般不能培养成活,需要加入一些其他细胞方能使其繁殖,这种被加入的活细胞称之为饲养细胞。本实施例采用小鼠腹腔中的巨噬细胞作为饲养细胞。

[0136] 取 JCA 品系小鼠 (JCA 品系小鼠来源于上海市肿瘤研究所),断脊椎而致死,在小鼠腹腔内开一小口,注入约 5ml 的 DMEM 完全培养液,培养液在腹腔中充分混匀,吸出腹腔中含饲养细胞的培养液,3000rpm 离心 10 分钟,细胞沉淀 DMEM 洗涤一次,悬浮,滴加入 96 孔培养板中,每孔一滴,以备融合细胞培养用。

[0137] 2. 细胞的融合

[0138] 取经 8- 氮鸟嘌呤培养液处理一周的小鼠骨髓瘤 SP/20 细胞株 (来自上海市肿瘤研究所) 和经免疫后的小鼠脾淋巴细胞,以 1 : 10 的比例混合于 50ml 离心管内,在 1000rpm 离心 10 分钟,吸尽上清液,轻轻排击离心管,使管底的细胞沉淀混匀成糊状,1 分钟内加完 0.5ml 50% PEG 溶液,边加边摇晃,细胞悬液继续在 PEG 中作用 90 秒钟,在 5 分钟内滴加不含血清 DMEM 培养液 10ml,以终止 PEG 的作用,静置 10 分钟后,用滴管轻轻吹打细胞沉淀,使细胞分散均匀,加入含有 20% 小牛血清 DMEM 培养液约 10ml,将上述融合后的细胞悬液滴入一至两块含有饲养细胞的 96 孔培养板中,每孔约 100 μ l,培养板置于 37℃ 含 5% CO₂ 培养箱中培养。

[0139] 3. 融合细胞的选择性培养

[0140] 未融合的细胞和自身融合的细胞在 HAT 培养液中逐渐死亡,唯有融合的细胞才能存活下来。在细胞融合的 2-3 天后,在 96 孔培养板中换入 1/2 体积的新鲜完全培养液,在 5 天后改换 HAT 培养液融合细胞,持续 7 天,再改换 HT 培养液继续培养 6 天,以后恢复正常 DMEM 完全培养液培养杂交瘤细胞,细胞培养上清液用 ELISA 测定杂交瘤细胞抗体的分泌。

[0141] 4. 杂交瘤细胞的克隆

[0142] 取 ELISA 测定阳性的融合细胞,进行细胞计数,连续稀释细胞悬液,在 3-10 个细胞/ml 培养液,将上述细胞液分布于含饲养细胞当 96 孔培养板内,平均每孔约 0.1ml,第七天开始换培养液,观察细胞生长情况,以 1-3 天更换培养液一次,当细胞生长至 1/10 满度时,可进行 ELISA 测定,选择 ELISA 测定阳性孔的克隆细胞,共进行 5 次细胞克隆后得到 4 株杂交瘤细胞株:PH1、PH2、PH3 及 PH4。其分泌的抗体为单克隆抗体。

[0143] 实施例 5

[0144] 单克隆抗体的制备和鉴定分析

[0145] 1. 本实施例采用 Balb/C 小鼠腹水生产单克隆抗体蛋白,以 3×10^5 /0.5ml 生理盐水 / 每只小鼠,注入 Balb/C 小鼠腹腔,1-2 周后待腹水产生后,以 12 号注射针头抽取腹水,用硫酸铵沉淀法和 Sephadex 柱层析法纯化后获得单克隆抗体。

[0146] 2. 细胞融合及克隆化:融合效率为 35.9%,阳性率为 7.9%,经 5 次克隆化后得到

能分泌专一性抗体的 4 株杂交瘤细胞株 :DLT-001、DLT-002、DLT-003 及 DLT-004。

[0147] 3. 效价测定结果 :DLT-001、DLT-002、DLT-003、DLT-004 分别为 1.9×10^{-7} 、 3.1×10^{-7} 、 1.3×10^{-8} 、 42.9×10^{-8} 。

[0148] 4. 亚型分析 :DLT-001、DLT-002 为 IgG_{2b}, DLT-003 及 DLT-004 为 IgG_{2a}。

[0149] 将度冷丁单克隆抗体杂交瘤细胞株 DLT-001 于 2011 年 12 月 12 日保藏在中国典型培养物保藏中心 (CCTCC, 中国, 武汉), 保藏号为 CCTCC C2011118。

[0150] 实施例 6

[0151] 检测板的制备

[0152] 1. 度冷丁单克隆抗体的胶体金标记

[0153] 取已制备的胶体金 100.0mL, 用 0.1mol/L K₂CO₃ 将胶体金溶液调至 pH 9.0, 在磁力快速搅拌下迅速加入 1.0 ~ 2.0mg 杜冷丁单克隆抗体, 搅拌 10min 后加入 1.0mL 的 10% 的牛血清白蛋白, 再继续搅拌 10min。用高速冷冻离心机于 4℃、12000rpm/min 下离心 (离心半径 R = 9.8cm) 30min, 吸去上清液, 沉淀即为胶体金 - 杜冷丁单抗结合物。

[0154] 2. 胶体金标记度冷丁单克隆抗体的固相化

[0155] 用 0.01M pH 8.2Tris-HCl 缓冲液稀释将胶体金标记至一定浓度后, 均匀的浸在玻璃纤维膜上, 37℃干燥备用。

[0156] 3. SPA 与 BSA-度冷丁的固定化

[0157] 在硝酸纤维素膜上用点膜机分别划检测线和质控线, 检测线为杜冷丁-BSA (0.8mg/mL), 质控线 (C 线) 为 SPA (1.0mg/mL), 干燥后以封闭液 (1% BSA、0.01mol/L PBS) 封闭 2 小时; 用 0.01mol/L PBS 洗涤 3 次, 真空干燥后。

[0158] 4. 检测板的组成和原理

[0159] 一块完整的检测板由以下几个部分组成 (图 4): 固相化的胶体金标记的度冷丁单克隆抗体、支持介质 - 由疏水材料组成, 用于给其它部分提供一个良好的机械支持、固定化 SPA、度冷丁-BSA 的 NC 膜及吸水材料 - 由吸水性极强的材料组成, 可用滤纸、石棉和一些吸水性极强的高分子材料。其作用是加快渗透作用, 提高检测速度, 并吸掉反应废液。

[0160] 检测原理是: 当样品 (尿液或血清) 滴入到含有固相化的胶体金标记的度冷丁单克隆抗体的惰性材料后, 首先溶解固相化的胶体金标记的度冷丁单克隆抗体, 使之恢复为液相, 此时如样品中含有度冷丁及其代谢产物如去甲基度冷丁, 则这些抗原物质首先与胶体金表面的度冷丁单克隆抗体进行第一次免疫反应, 然后通过渗透作用与 NC 膜固定化上的 SPA 进行第二次免疫反应, 由于 SPA 在 NC 膜表面被固定化, 反应后金颗粒在 NC 膜表面沉淀析出, 仅形成一条红色区带, 为阳性反应; 如样品中不含有这类抗原物质, 则溶解后的胶体金标记的度冷丁单克隆抗体一部分与固定化于 NC 膜上的 BSA-度冷丁反应, 形成一条红色区带, 剩余部分则于 NC 膜上固定化的 SPA 反映, 同样也形成一条红色区带, 这样就会在 NC 膜上形成两条红色区带, 为阴性反应 (见图 5)。

[0161] 实施例 7

[0162] 胶体金标记度冷丁单克隆抗体的灵敏度测试

[0163] 本实施例采用滴金反应法进行灵敏测试, 在一 NC 膜上按 1ng/mL、2ng/mL、3ng/mL、4ng/mL、5ng/mL、10ng/mL、20ng/mL、50ng/mL、100ng/mL、150ng/mL、200ng/mL、300ng/mL、500ng/mL、1000ng/mL、1500ng/mL 和 2000ng/mL 作定量梯度点样, 于 50℃保温 2

小时。将膜浸泡于经上述稀释的胶体金标记的度冷丁单克隆抗体溶液中反应 5-10 分钟。出现红色斑点者为阳性反应,不出现斑点者为阴性反应,结果见表 1。

[0164] 表 1

[0165]

点样量 ng/ml	1	2	3	4	5	10	20	50
结果	-	-	-	-	+	+	+	+
点样量 ng/ml	100	150	200	300	500	1000	1500	2000
结果	+	+	+	+	+	+	+	+

[0166] 注:“+”表示阳性;“-”表示阴性。

[0167] 结果表明,胶体金标记后的度冷丁单克隆抗体的最低检测量为 5ng/ml,但由于度冷丁是国家控制的药物,在治疗中要用到,因此将检测的最低计量设计在 500ng/ml。

[0168] 实施例 8

[0169] 胶体金标记度冷丁单克隆抗体的稳定性实验

[0170] 将胶体金标记的度冷丁单克隆抗体溶液于 55℃ 分别保温 0.5 天、1.0 天、1.5 天、2.0 天、2.5 天、3.0 天、4.0 天、5.0 天,然后按上述灵敏度实验的方法做 100ng/ml 灵敏度测试,结果见表 2。

[0171] 表 2

[0172]

时间(天)	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	5
结果	+	+	+	+	+	+	+	+	+

[0173] 注:“+”表示阳性

[0174] 结果表明,胶体金标记的度冷丁单克隆抗体能够耐受 55℃ 达 5 天以上,具较高的稳定性。

[0175] 实施例 9

[0176] 胶体金标记度冷丁单克隆抗体的特异性反应实验

[0177] 1. 在 NC 膜上将度冷丁、吗啡、海洛因、苯丙胺、麻黄素、甲基苯丙胺、可待因、大麻、可卡因、咖啡因、氯丙嗪、布洛芬、蒂巴因、四氢大麻酚、利多卡因、那可丁、阿普唑仑、福尔可啉、喃氟啉、苯噻啉、安定、三唑仑、比沙可啉、苯乙呱啉、硝苯啉、卡马西平、硫唑嘌呤、阿托品、氨苯蝶啉、氟哌啉醇、甲磺酸双氢麦角毒碱和去甲基度冷丁按 50-1500ng/ml (见表 3) 作梯度点样,于 80℃ 烘烤 3 小时,然后将膜浸入 520nm 吸光度为 0.1 的胶体金标记度冷丁单克隆抗体的悬液中反应 10 分钟后,用 PBS 洗涤 3 次,蒸馏水洗涤 3 次,观测结果,出现红色斑点者为阳性,不出现者为阴性。

[0178] 表 3

[0179]

浓度ng/ml 样品	0	100	150	200	300	400	500	1000	1500	2000
度冷丁	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
吗 啡	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
海洛因	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
苯丙胺	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
麻黄素	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
甲基苯丙胺	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
可待因	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
大 麻	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[0180]

可卡因	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
咖啡因	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
氯丙嗪	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
布洛芬	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
蒂巴因	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
四氢大麻酚	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
利多卡因	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
那可丁	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
阿普唑仑	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
福尔可啶	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
喃氟啶	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
苯噻啶	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
安 定	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
三唑仑	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
比沙可啶	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
苯乙呱啶	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
硝苯啶	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
卡马西平	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
硫唑嘌呤	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
阿托品	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
氨苯蝶啶	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
氟哌啶醇	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
甲磺酸双氢 麦角毒碱	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
去甲基度冷丁	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

[0181] 注：“+”表示阳性；“-”表示阴性。

[0182] 结果表明，胶体金标记的度冷丁单克隆抗体除了与度冷丁及去甲基度冷丁有阳性反应外，于其它的常见物品与麻醉品均呈阴性反应，说明其具有很强的特异性。

[0183] 2. 检测板实际检测结果

[0184] 用胶体金标记的度冷丁单克隆抗体免疫检测板检测度冷丁吸食者尿样（800 例），

健康者尿样 (50 例), 并用 GC-MS 鉴定这些尿样中度冷丁实际含量, 试验结果表明, 检测板检测含度冷丁 140ng/ml 以上, 均呈阳性反应, 结果正确。

[0185] 实施例 10

[0186] 试剂盒

[0187] 本实施例提供了两种试剂盒。

[0188] 试剂盒 1 包括一容器及容器内的本发明式 II 所示的度冷丁全抗原。

[0189] 试剂盒 2 包括一容器及容器内的本发明的检测板, 所述的检测板包括基片 (支撑板) 和测试条, 所述的测试条含有度冷丁单克隆抗体杂交瘤细胞株 DLT-001CCTCC. C2011118 所产生单克隆抗体 (免疫球蛋白)。

[0190] 菌种保藏

[0191] 本发明的度冷丁单克隆抗体杂交瘤细胞株 DLT-001, 于 2011 年 12 月 12 日保藏于中国典型培养物保藏中心 (CCTCC, 中国, 武汉), 保藏号为 CCTCC. C2011118。

[0192] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考, 就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解, 在阅读了本发明的上述讲授内容之后, 本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改, 这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

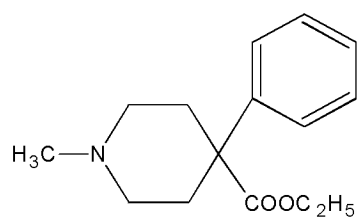


图 1

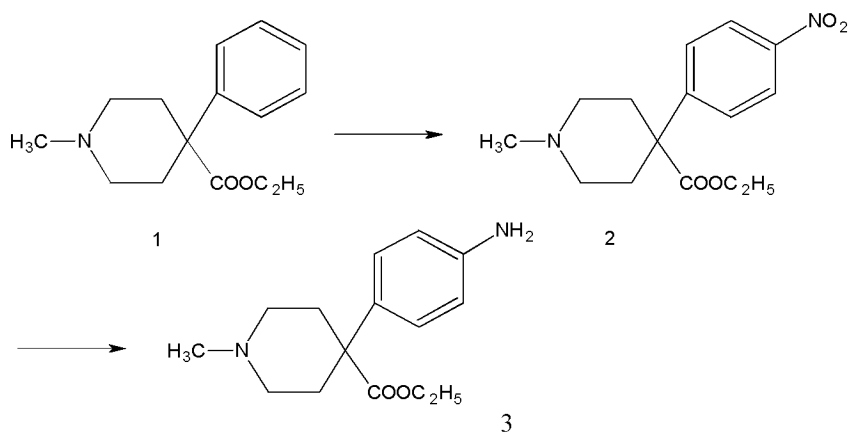


图 2

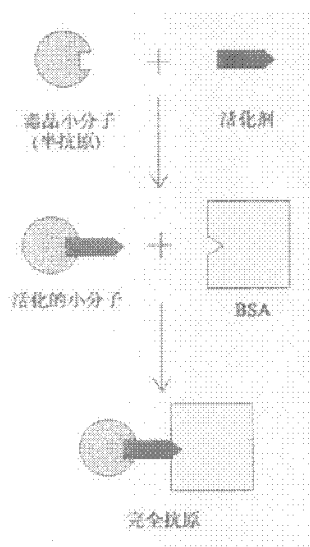


图 3

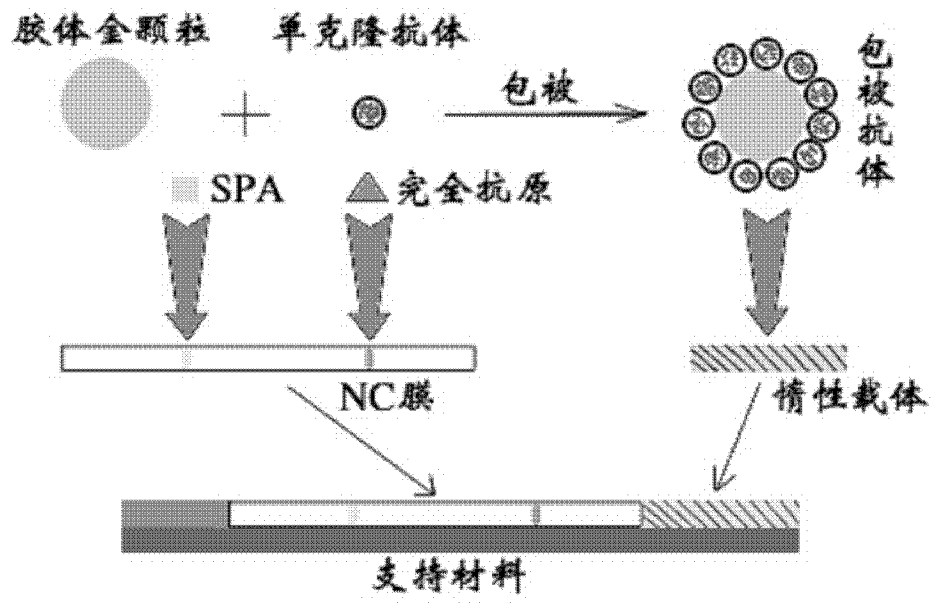


图 4

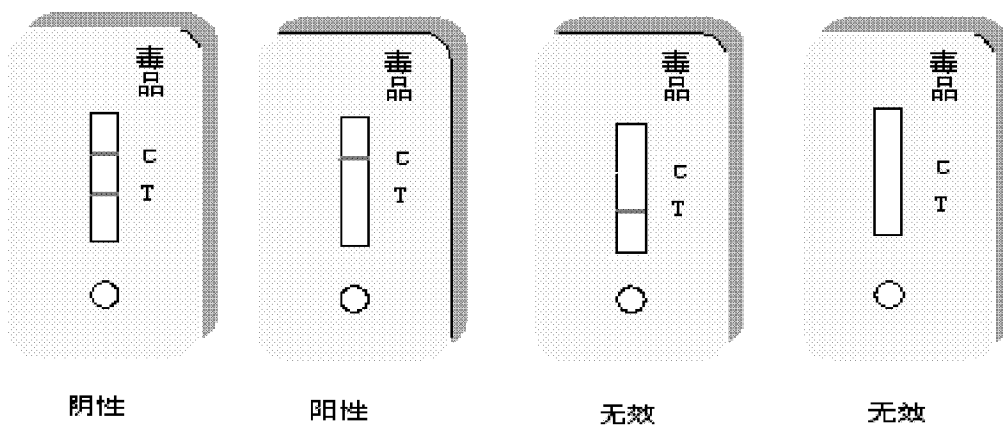
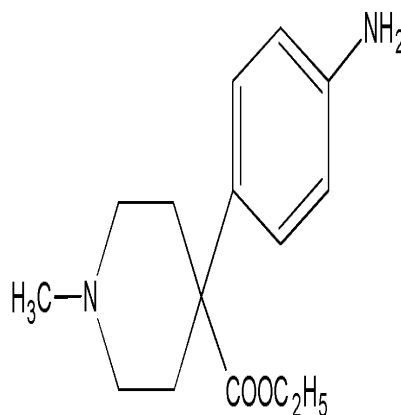


图 5

专利名称(译)	度冷丁单克隆抗体及免疫检测板和试剂盒		
公开(公告)号	CN103159669A	公开(公告)日	2013-06-19
申请号	CN201110421698.0	申请日	2011-12-15
[标]申请(专利权)人(译)	曾立波 陈连康 胡小龙 张玉荣		
申请(专利权)人(译)	曾立波 陈连康 胡小龙 张玉荣		
当前申请(专利权)人(译)	曾立波 陈连康 胡小龙 张玉荣		
[标]发明人	曾立波 陈连康 胡小龙 张玉荣		
发明人	曾立波 陈连康 胡小龙 张玉荣		
IPC分类号	C07D211/64 C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 C07K14/435 C07K16/44 C12N5/20 G01N33/531 G01N33/564 C12R1/91		
代理人(译)	雷芳		
其他公开文献	CN103159669B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及度冷丁单克隆抗体及免疫检测板和试剂盒。具体地，本发明公开了用一种度冷丁半抗原和度冷丁完全抗原的制备方法，本发明还公开了该完全抗原制备的抗度冷丁单克隆抗体，以及胶体金标记度冷丁单抗免疫检测板。与HPLC等色谱方法相比，本发明的检测板简单、轻便、易于携带，不需要昂贵的设备，可以现场检测。使用本发明的检测板检测度冷丁，整个测试可在3min内完成，灵敏度高，且与30种常见药物和毒品没有交叉反应。



式I