

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710031810.3

[51] Int. Cl.

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

[43] 公开日 2008年8月13日

[11] 公开号 CN 101241136A

[22] 申请日 2007.11.30

[21] 申请号 200710031810.3

[71] 申请人 广州万孚生物技术有限公司

地址 510641 广东省广州市天河五山华南理工大学万孚科技园

[72] 发明人 王继华

[74] 专利代理机构 广州华进联合专利商标代理有限公司

代理人 曾旻辉

权利要求书 3 页 说明书 15 页 附图 2 页

[54] 发明名称

检测唾液中滥用毒品的多联免疫层析试纸条、系统及其制备方法

[57] 摘要

本发明公开了一种检测唾液中滥用毒品的多联免疫层析试纸条及其制备方法，该试纸条是在底衬上顺次相互搭接地粘贴样品垫、涂覆有彩色胶乳、胶体金或胶体硒微粒标记蛋白的玻璃纤维膜、包被膜以及吸水纸而形成的反应膜条，所述包被膜上设有控制区，以及两个或两个以上的检测区，每个检测区包被有相应的毒品抗原，控制区包被抗鼠抗体。它具有操作安全、简便、适合单人/份检测和快速，可以同时检测唾液中的毒品抗原进行多种检测等优点。



1、一种检测唾液中滥用毒品的多联免疫层析试纸条，其特征是，该试纸条是在底衬上顺次相互搭接地粘贴样品垫、涂覆有彩色胶乳、胶体金或胶体硒微粒标记蛋白的玻璃纤维膜、包被膜以及吸水纸而形成的反应膜条，所述包被膜上设有控制区、以及两个或两个以上的检测区，每个检测区包被有相应的毒品抗原，控制区包被抗鼠抗体。

2、根据权利要求1所述的多联免疫层析试纸条，其特征是，玻璃纤维膜上涂覆的彩色胶乳、胶体金或胶体硒微粒的直径范围为  $0.01\ \mu\text{m}\sim 1\ \mu\text{m}$ 。

3、一种制备如权利要求1所述的检测唾液中滥用毒品的多联免疫层析试纸条的方法，其特征是，

(1) 当采用彩色胶乳微粒涂覆时，主要包括以下步骤：

A. 彩色胶乳的共价活化：超声波处理彩色胶乳微球体30秒后，调节浓度为2%~10%彩色胶乳微球活化浓度为1%， $8000\times g$  离心1~5分钟，离心后收集沉淀物用蒸馏水或者50mM ~200mM pH6.0~7.0磷酸钠溶液溶解至初始体积，并超声波处理30秒；加入一定量的20~100mg/mlEDC，混匀；室温孵育30分钟后 $8000\times g$ 离心1~5分钟，沉淀用20mM~100mM的pH5.0~6.0的柠檬酸缓冲液溶解至初始体积，放置于2~8℃环境中备用，以标记蛋白质；

B. 每种标记物的制备：将上述活化后的彩色胶乳超声波处理30秒后，按照50ug~500ug毒品-BSA单克隆抗体或毒品-OVA单克隆抗体/ml活化彩色胶乳的比例加入需标记的单克隆抗体，混匀后室温搅拌反应1.5-3小时，2-4次离心洗涤，每次 $8000\times g$ 、离心1~5分钟，沉淀用PBS-TBN溶解并超声波处理25-35秒，用PBS-TBN恢复至标记前的体积，放置室温备用；

C. 涂覆有标记物的玻璃纤维膜的制备：将标记的多个毒品抗原的单克隆抗体彩色微球标记物，按照效价试验匹配的结果，以1: 1: 1...~1: 5: 5...的比例混和均匀，按照每毫升溶

液铺20~60平方厘米涂覆玻璃纤维膜，25℃~40℃干燥16小时，封袋，板贴备用；

D. 包被膜的制备：两种或两种以上毒品抗原和抗鼠抗体包被到硝酸纤维素膜上并封闭：分别将对应的两种或两种以上毒品抗原和抗鼠IgG用包被缓冲液稀释，稀释毒品抗原为浓度为0.1~2.5mg/ml，稀释抗鼠抗体的浓度为1~3mg/ml，喷膜液量为20ul/35cm，并将两种或两种以上毒品抗原及抗鼠IgG分别喷到硝酸纤维素膜上对应的检测区和控制区，保持区域之间的间隔均大于或等于3mm，室温凉干20分钟；25℃~37℃在封闭液浸泡60分钟，取出后置25℃~37℃烘干处理2小时，封袋，得到包被膜，以备贴板用；

E. 在底衬上顺次相互搭接地粘贴样品垫、涂覆彩色胶乳微粒标记蛋白的玻璃纤维膜、包被膜以及吸水纸，得到试纸板，按照要求切割成不同宽度的反应膜条；

或（2）当采用胶体金或胶体硒微粒涂覆时，包括以下步骤：

A. 胶体金或胶体硒标记蛋白的制备：用0.1M碳酸钾调节胶体金或胶体硒pH值至7.0~8.0，按6~20ug毒品-BSA或毒品-OVA单克隆抗体/ml胶体金或胶体硒加入一种毒品单克隆抗体，混匀后静置，离心处理，弃去上清，将沉淀用标记洗涤液洗涤，将沉淀用十分之一初始胶体金或胶体硒标记蛋白保存液溶解，置2℃~8℃备涂覆玻璃纤维膜用；试纸条上有多个检测区，要标记对应的多个毒品抗原的单克隆抗体；

B. 涂覆有标记物的玻璃纤维膜的制备：将两种或两种以上的制备好的胶体金或胶体硒标记的毒品单克隆抗体根据它们效价试验匹配的结果，以1:1:1...~1:5:5...比例混和均匀，涂覆在玻璃纤维膜上，涂覆方法是将制备好的胶体金或胶体硒标记的毒品单克隆抗体均匀的铺在玻璃纤维膜上，每毫升溶液铺8~40平方厘米，25℃~40℃干燥16小时，封袋，以备板贴用；

C. 包被膜的制备:用包被膜缓冲液稀释各种毒品抗原和抗鼠IgG至浓度为0.1~2.5mg/ml,把两种或两种以上毒品抗原和抗鼠IgG喷印在硝酸纤维素膜对应的检测区和控制区上,每个区域之间的间隔为3-5mm,应细致均匀,凉干后在25℃~37℃封闭液中浸泡40-60分钟,取出后于25℃~37℃烘干2小时,封袋,得到包被膜,以备贴板用;

D. 在底衬上顺次相互搭接地粘贴样品垫、涂覆胶体金或胶体硒标记的毒品单克隆抗体的玻璃纤维膜、包被膜以及吸水纸,得到试纸板,按照要求切割成不同宽度的反应膜条。

4. 根据权利要求 3所述的检测唾液滥用毒品的多联免疫层析试纸条的制备方法,其特征是,所述样品垫的制备为:将玻璃纤维膜放入处理溶液中处理30~60min;处理液中含1%~5%BSA的0.01M PBS溶液,并含0.01%~0.5% PEG 0.01%~0.05% TWEEN-20表面活性剂。

5. 一种检测唾液中滥用毒品的多联免疫层析系统,其特征是包括塑料外壳,放置在塑料外壳中的权利要求 1 所述的多联免疫层析试纸条以及唾液预处理试剂。

6.根据权利要求 5 所述的检测唾液中滥用毒品的多联免疫层析系统,其特征是,唾液预处理试剂为含有(A)氢氧化钠水溶液,浓度为0.01-10mol/L;(B)酒石酸和/或柠檬酸的水溶液,浓度为0.01-3mol/L;(C)非离子表面活性剂和/或两性表面活性剂;

成分(C)与成分(A)和(B)的至少一个混合,或可以与成分(A)和(B)分别提供,以及在成分(A)、(B)和(C)的至少一个中含有选自氯化钠、氯化钾、氯化钙、氯化镁、硫酸镁和硫酸锰的至少一种物质,含量为5-25重量%。

## 检测唾液中滥用毒品的多联免疫层析试纸条、系统及其制备方法

### 技术领域

本发明属于医学检验领域，涉及一种基于免疫层析原理对唾液中毒品进行快速多联检测的免疫层析试纸条、系统及制备方法。

### 背景技术

毒品犯罪是当今国际社会的一大公害。毒品滥用已成全球性的问题，被认为是当今世界的瘟疫和社会的毒瘤。自改革开放以来，随着国门的打开，国际贩毒集团开始从我国边境进行毒品渗透活动，90年代呈迅速蔓延之势，成为一个严重的社会问题。且对每种毒品需要单项检测具有取材难，检测复杂，成本大等缺陷。

在毒品的检测中，国内外主要采用免疫层析法、酶联免疫吸附法（ELISA）、PCR、放射性免疫等方法对尿液、血液、组织以及毛发等样本进行检测。

相比于尿液、血液、组织以及毛发等来源的样本，唾液样本有其不可比拟的有点：

- （1）尿液样本涉及伦理与隐私，对于采样存在一定的困难和样本的保真性存在怀疑。
- （2）血液样本涉及伦理与创伤，对于供样人存在一定的感染风险。
- （3）组织和毛发样本前处理的程序负责，检测方法多为 ELISA，GC/MS 等大型仪器设备，技术要求更高，不适合现场快速检测。

### 发明内容

本发明的目的在于提供一种用于检测唾液中滥用毒品的多联免疫层析试纸条，能发挥彩色胶乳、胶体金或胶体硒标记层析检测技术快速、简便、操作方便的优点，避免现有尿液中毒品检测的缺点和不足，从而实现对唾液中毒品快速检测的目的。

本发明所述的检测唾液中滥用毒品的多联免疫层析试纸条，该试纸条是在底衬上顺次相互搭接地粘贴样品垫、涂覆彩色胶乳、胶体金或胶体硒微粒标记蛋白的玻璃纤维膜、包被膜以及吸水纸而形成的反应膜条，所述包被膜上设有控制区，以及两个或两个以上的检测区，每个检测区包被有相应的毒品抗原，控制区包被抗鼠抗体。

本发明的另一目的在于提供一种检测唾液滥用毒品的多联免疫层析试纸条的制备方法。

本发明所述的检测唾液滥用毒品的多联免疫层析试纸条的制备方法，按涂覆在玻璃纤维膜上的微粒的不同，可分为 **a** 涂覆彩色胶乳微粒和 **b** 涂覆胶体金或胶体硒微粒两种制备方法。

**a**、当采用彩色胶乳微粒涂覆时，反应膜条的制备包括以下步骤：

**A. 彩色胶乳的共价活化：**超声波处理彩色胶乳微球体30秒后，调节浓度为2%~10%彩色胶乳微球活化浓度为1%，8000×g 离心1~5分钟，离心后收集沉淀物用蒸馏水或者50mM ~200mM pH6.0~7.0磷酸钠溶液溶解至初始体积，并超声波处理30秒；加入一定量的20~100mg/mlEDC（碳二亚胺），混匀；室温孵育30分钟后8000×g、离心1~5分钟，沉淀用20mM~100mM 的pH5.0~6.0的柠檬酸缓冲液溶解至初始体积，放置于2~8℃环境中备用，以标记蛋白质；

**B. 每种标记物的制备：**将上述活化后的彩色胶乳超声波处理30秒后，按照50ug~500ug 毒品-BSA（牛血清白蛋白， bovine serum albumin,）、单克隆抗体或毒品-OVA（卵白蛋白，Ovalbumin, OVA)单克隆抗体/ml活化彩色胶乳的比例加入需标记的单克隆抗体，混匀后室温

搅拌反应1.5-3小时，2-4次离心洗涤，每次8000×g、离心1~5分钟，沉淀用PBS-TBN（磷酸盐缓冲液PB，含氯化钠NaCl，吐温Tween-20，牛血清白蛋白BSA，叠氮钠NaN<sub>3</sub>）溶解并超声波处理25-35秒，用PBS-TBN恢复至标记前的体积，放置2~8℃备用；

C. 涂覆有标记物的玻璃纤维膜的制备：将标记的两个或两个以上的毒品抗原的单克隆抗体彩色微球标记物，按照效价试验匹配的结果，以1: 1: 1…~1: 5: 5…比例混和均匀，按照每毫升溶液铺20~60平方厘米涂覆玻璃纤维膜，25℃~40℃干燥16小时，封袋，板贴备用；

D. 包被膜的制备：两种或两种以上毒品抗原和抗鼠抗体包被到硝酸纤维素膜上并封闭：分别将对应的两种或两种以上毒品抗原和抗鼠IgG用包被缓冲液调节浓度，喷膜液量为20ul/35cm，用包被缓冲液稀释抗鼠IgG，调节浓度为1.0~3.0mg/ml，用包被缓冲液分别稀释毒品抗原，调节浓度为0.1~2.5mg/ml，并将两种或两种以上毒品抗原及抗鼠IgG分别喷到硝酸纤维素膜上对应的检测区和控制区，保持区域之间的间隔均大于或等于3mm，室温凉干20分钟；25℃~37℃在封闭液浸泡60分钟，取出后置25℃~37℃烘干处理2小时，封袋，得到包被膜，以备贴板用；

E. 在底衬上顺次相互搭接地粘贴样品垫、涂覆彩色胶乳微粒标记蛋白的玻璃纤维膜、包被膜以及吸水纸，得到试纸板，按照要求切割成不同宽度的反应膜条；

或（2）当采用胶体金或胶体硒微粒涂覆时，包括以下步骤：

A. 胶体金或胶体硒标记蛋白的制备：用0.1M碳酸钾调节胶体金或胶体硒pH值至7.0~8.0，按6~20ug毒品-BSA或毒品-OVA单克隆抗体/ml胶体金或胶体硒加入一种毒品单克隆抗体，混匀后静置，离心处理，弃去上清，将沉淀用标记洗涤液洗涤，将沉淀用十分之一初始胶体金或胶体硒标记蛋白保存液溶解，置2℃~8℃备涂覆玻璃纤维膜用；试纸条上有多个

检测区，要标记对应的多个毒品抗原的单克隆抗体；

B. 涂覆有标记物的玻璃纤维膜的制备：将制备好的两个或两个以上的胶体金或胶体硒标记的毒品单克隆抗体根据效价试验匹配的结果，以 1: 1: 1...~1: 5: 5...（省略的分别为多个的：1 以及：5）比例混和均匀，涂覆在玻璃纤维膜上，涂覆方法是将制备好的胶体金或胶体硒标记的毒品单克隆抗体均匀的铺在玻璃纤维膜上，每毫升溶液铺 8~40 平方厘米，25℃~40℃干燥 16 小时，封袋，以备板贴用；

C. 包被膜的制备：用包被膜缓冲液稀释各种毒品抗原和抗鼠IgG至浓度为0.1~2.5mg/ml，把两种或两种以上毒品抗原和抗鼠IgG喷印在硝酸纤维素膜对应的检测区和控制区上，每个区域之间的间隔为3-5mm，应细致均匀，凉干后在25℃~37℃封闭液中浸泡40-60分钟，取出后于25℃~37℃烘干2小时，封袋，得到包被膜，以备贴板用；

D. 在底衬上顺次相互搭接地粘贴样品垫、涂覆胶体金或胶体硒标记的毒品单克隆抗体的玻璃纤维膜、包被膜以及吸水纸，得到试纸板，按照要求切割成不同宽度的反应膜条。

本发明的另一目的是提供一种检测唾液中滥用毒品的多联免疫层析系统。检测唾液中滥用毒品的多联免疫层析系统包括塑料外壳，放置在塑料外壳中的上述多联免疫层析试纸条以及唾液预处理试剂。

所述唾液预处理试剂为含有（A）氢氧化钠水溶液，浓度为 0.01-10mol/L；（B）酒石酸和/或柠檬酸的水溶液，浓度为 0.01-3mol/L；（C）非离子表面活性剂和/或两性表面活性剂；

成分（C）与成分（A）和（B）的至少一个混合，或可以与成分（A）和（B）分别提供，以及在成分（A）、（B）和（C）的至少一个中含有选自氯化钠、氯化钾、氯化钙、氯化镁、硫酸镁和硫酸锰的至少一种物质，含量为 5-25 重量%。

本发明的检测原理是将不同直径范围  $0.01\ \mu\text{m}\sim 1\ \mu\text{m}$  的彩色胶乳、胶体金或胶体硒微粒与含有羧基、氨基、羟基等酯类或其他生物大分子物质的毒品单克隆抗体共价结合，当检测的唾液样本中含有的毒品浓度大于或等于 cutoff 值时，此彩色胶乳、胶体金或胶体硒标记的毒品单克隆抗体与唾液中足够的相应毒品抗原结合后形成复合物并聚积下来，包被膜检测区上包被的毒品抗原则无法与彩色胶乳、胶体金或胶体硒标记的毒品单克隆抗体再进行反应，从而在包被膜的检测区上没产生明显的条带变化，并由此判断唾液样本中含有毒品抗原；而当检测的唾液样本中没有毒品抗原时，此彩色胶乳、胶体金或胶体硒标记的毒品单克隆抗体则随着唾液样本的流动到达包被膜的检测区上，并与检测区上的毒品抗原结合后形成复合物并聚积下来，彩色胶乳标物在相应的配体处于大量聚积时，形成肉眼可见红色、紫红色、黑色、蓝色或者其他颜色的条带，胶体金或胶体硒标记物在相应的配体处于大量聚积时，形成肉眼可见的红色条带，并由此判断唾液样本中没含有毒品抗原。

本发明所述的免疫层析检测技术与放射性免疫、酶联免疫法以及 PCR 相比，具有操作安全（无放射物污染）、简便（简单操作一步完成）、适合单人/份检测（放免、酶免不适合单人/份或少量样品检测）和快速（10 分钟左右即可有结果），并且可以同时检测唾液中的毒品抗原进行多种检测，更加方便使用等优点。

#### 附图说明

图1是本发明的结构示意图；

图 2 是实施例一检测唾液滥用毒品的两联免疫层析试纸条检测结果的示意图，其中，图 2a，图 2b，图 2c 分别是不同的检测结果示意图；

图 3 是实施例二检测唾液滥用毒品的三联免疫层析试纸条检测结果的示意图，其中，图

3a, 图 3b, 图 3c 分别是不同的检测结果示意图。

### 具体实施方式

本发明所述的免疫反应试纸条主要是应用竞争抑制法的原理进行制备的。如图1所示, 1是塑料外壳, 2是多联免疫层析检测试纸条。具体可参见图2和图3。图2是本发明两项检测时检测结果的示意图, 两项检测既是对唾液样本中两种的毒品抗原进行检测。图2中唾液样本中的两种毒品抗原与包被在检测区T处的两种对应的毒品抗原竞争结合彩色胶乳、胶体金或胶体硒标记的相应毒品单克隆抗体。图2(a)阴性结果显示唾液样本中无毒品抗原或者所含毒品抗原的浓度低于被检测的最低限值, 而不足以完全结合彩色胶乳、胶体金或胶体硒标记的相应的毒品单克隆抗体, 剩余的彩色胶乳、胶体金或胶体硒标记的相应的毒品单克隆抗体与检测膜上的对应毒品抗原结合, 检测区有颜色条带出现。图2(b)和图2(c)当唾液样本中含有待检测毒品抗原, 并且毒品抗原的浓度足够结合彩色胶乳、胶体金或胶体硒标记的毒品单克隆抗体时, 在唾液样本经过包被线时, 没有多余的彩色胶乳、胶体金或胶体硒标记的毒品单克隆抗体蛋白与包被的毒品抗原结合, 不能在检测区积聚形成条带, 即检测区不出现条带, 显示阳性结果。

如图3所示, 本发明可用于一检三项检测项目, 当唾液样本中含有全部被检毒品抗原项目时, 检测区上多条检测带均没有出现(代表两项以上检测指标), 只在控制区出现一条质控带; 当唾液样本中没有相应毒品抗原或者浓度低于被检测目标物的限值时, 检测区出现多条对应的检测带, 同时控制区出现一条质控带; 不出现任何条带, 说明检测试剂盒失效。

免疫层析试纸条的制备中涉及到的各种溶液, 例如包被缓冲液、封闭液、标记洗涤液等溶液都为常用的试纸条制备中的试剂。

包被缓冲液的制备：0.05M pH9.6硫酸盐缓冲液为包被溶液，0.22 μ膜过滤后，置2℃~8℃备用，有效期一周。

封闭液的配制：

配制0.01M pH7.0磷酸盐缓冲液(PBS)，0.22 μ膜过滤后，置2℃~8℃备用，有效期一周。

配制封闭工作液：2%BSA, 2%脱脂奶, 0.01M pH7.0磷酸盐缓冲液(PBS)，0.22 μ膜过滤后，置2℃~8℃备封闭包被膜用，有效期一周。

标记洗涤液的配制：2%牛血清白蛋白BSA，0.01M pH7.0 PBS溶液，0.22 μ膜过滤，置2℃~8℃备用，有效期两周。1000ml 标记洗涤液配方：20gBSA溶解于1000ml 0.01M pH7.0 PBS溶液。

## 实施例一

### (1) 多联免疫层析系统

可检测唾液中的毒品冰毒和吗啡的多联免疫层析系统，包括塑料外壳，放置在塑料外壳中的免疫层析唾液中毒品冰毒和吗啡两项检测试纸条以及唾液预处理试剂。

该免疫层析唾液中冰毒和吗啡两项检测试纸条为是底衬上顺次相互搭接地粘贴样品垫、涂覆有彩色胶乳微粒标记冰毒和吗啡单克隆抗体的玻璃纤维膜、包被膜以及吸水纸而形成的反应膜条，所述包被膜上设有包被抗鼠抗体的控制区（即控制条带），分别包被有冰毒和吗啡抗原的二个检测区（即检测条带）。

### (2) 制备方法

该免疫层析唾液中冰毒和吗啡两项检测试纸条的制备方法如下：

A. 彩色胶乳的共价活化：超声波处理0.1 μm彩色胶乳微球体30秒后，调节浓度为2%~10%彩色胶乳微球活化浓度为1%，8000×g 离心3分钟，离心后收集沉淀物用蒸馏水或者100mM pH6.5磷酸钠溶液溶解至初始体积，并超声波处理30秒；按照每ml活化胶乳加入50ul浓度为50mg/mlEDC的溶液，混匀；室温孵育30分钟后8000×g 、离心3分钟，沉淀用70mM的pH5.0的柠檬酸缓冲液溶解至初始体积，放置于4℃环境中备用，以标记蛋白质；

B. 标记物的制备（彩色胶乳微粒标记毒品-BSA或-OVA）单克隆抗体：将上述活化后的彩色胶乳超声波处理30秒后，按照200ug毒品-BSA/ml活化彩色胶乳的比例加入冰毒单克隆抗体，混匀后室温搅拌反应2小时，3次离心洗涤，每次8000×g 、离心3分钟，沉淀用PBS-TBN溶解并超声波处理30秒，用PBS-TBN恢复至标记前的体积，放置室温备用；用同样的方法将彩色胶乳微粒标记吗啡单克隆抗体。

C. 涂覆有标记物的玻璃纤维膜的制备：将标记的冰毒和吗啡的单克隆抗体彩色微球标记物，按照效价试验匹配的结果，以1：2的比例混和均匀，按照每毫升溶液铺50平方厘米涂覆玻璃纤维膜，37℃干燥16小时，封袋，板贴备用；

D. 包被膜的制备：两种或两种以上毒品抗原和抗鼠抗体包被到硝酸纤维素膜上并封闭：用包被缓冲液分别稀释冰毒和吗啡抗原，调节浓度分别为0.5mg/ml和1.0mg/ml，并将冰毒和吗啡抗原及抗鼠IgG（浓度是2.0mg/ml）分别喷到硝酸纤维素膜上对应的检测区和控制区，喷膜液量为20ul/35cm，保持区域之间的间隔均为3mm，室温凉干20分钟；37℃在封闭液浸泡60分钟，取出后置37℃烘干处理2小时，封袋，得到包被膜，以备贴板用；

所述样品垫的制备为：将玻璃纤维膜放入垫处理溶液中处理30min；处理液中含1%BSA的0.01M PBS溶液，并含0.01% PEG 0.01%~0.05% TWEEN-20表面活性剂。

E. 在底衬上顺次相互搭接地粘贴样品垫、涂覆彩色胶乳微粒标记蛋白的玻璃纤维膜、包被膜以及吸水纸，得到试纸条，按照要求切割成不同宽度的反应膜条。

在检测唾液中是否含有毒品抗原时，涉及到唾液的收集以及预处理的问题，唾液的收集主要通过唾液收集器，再利用唾液预处理试剂盒对收集到的唾液进行预处理。

所述的唾液预处理试剂含有 (A) 氢氧化钠水溶液，浓度为 0.01-10mol/L；(B) 酒石酸和/或柠檬酸的水溶液，浓度为 0.01-3mol/L；(C) 非离子表面活性剂和/或两性表面活性剂；

成分 (C) 与成分 (A) 和 (B) 的至少一个混合，或可以与成分 (A) 和 (B) 分别提供，以及在成分 (A)、(B) 和 (C) 的至少一个中含有选自氯化钠、氯化钾、氯化钙、氯化镁、硫酸镁和硫酸锰的至少一种物质，含量为 5-25 重量%。

唾液预处理试剂的唾液预处理方法，是按以下步骤完成：

A. 将选自氯化钠、氯化钾、氯化钙、氯化镁、硫酸镁和硫酸锰的至少一种物质以 5-25 重量%的量与选自下述 (A) 和 (B) 的至少一个混合：(A) 氢氧化钠水溶液，浓度为 0.01-10mol/L 和 (B) 酒石酸和/或柠檬酸的水溶液，浓度为 0.01-3mol/L；

B. 将 (C) 非离子表面活性剂和/或两性表面活性剂混入 (A) 和 (B) 的至少一个中，和通过以任意顺序滴下成分 (A) 和 (B) 将它们混合；

所述成分 (A) 用于本发明的唾液预处理法中，是浓度为 0.01-10mol/L 的氢氧化钠水溶液，具有对唾液中的粘蛋白和葡聚糖起作用，抑制特异性毒品抗原的聚集功能，从而使检测毒品抗原时，抗原在膜上的移动变得容易。

所述成分 (B) 用于本发明的唾液预处理方法中，是浓度为 0.01-3mol/L 的酒石酸和/或

柠檬酸的水溶液，具有抑制毒品抗原蛋白链形成的功能，从而使检测毒品抗原时，抗原在膜上的移动变得容易。

所述成分（C）用于本发明的唾液预处理方法中，非离子表面活性剂和/或两性表面活性剂具有将毒品抗原表面蛋白增溶的功能，从而使检测毒品抗原时，抗原在膜上的移动变得容易。

本发明的唾液预处理法中，选自氯化钠、氯化钾、氯化钙、氯化镁、硫酸镁和硫酸锰的至少一种物质具有通过盐析使唾液中存在的各种蛋白质聚集并抵消标记毒品单克隆抗体与保持该抗体的膜间的相互作用的功能，从而通过该功能提供促进标记毒品单克隆抗体或标记毒品单克隆抗体与毒品抗原复合物从保持标记抗体的膜中有效流出的效果。

选自氯化钠、氯化钾、氯化钙、氯化镁、硫酸镁和硫酸锰的至少一种物质以 5-25 重量% 的量包含在（A）、（B）和（C）的至少一个中是必要的，该量低于 5 重量% 时，不能得到充分的效果，并且标记毒品单克隆抗体或标记毒品单克隆抗体与毒品抗原复合物不能有效地从保持标记抗体的膜中流出；另一方面，超过 25 重量% 时，会使检测灵敏度降低。

上述（A）氢氧化钠水溶液，浓度为 0.01-10mol/L 和（B）酒石酸和/或柠檬酸的水溶液，浓度为 0.01-3mol/L 混合在一起后会发生中和反应，因此要选用缓冲剂，并且在中和反应中得到有效的缓冲作用。本发明主要选用三（羟甲基）氨基甲烷作为缓冲剂。因（A）氢氧化钠水溶液，浓度为 0.01-10mol/L 和（B）酒石酸和/或柠檬酸的水溶液引起中和反应，三（羟甲基）氨基甲烷必须单独提供，此时要选用水溶液的形式，并且必须在（A）和（B）混合前便已提供。

通过常用的唾液收集器收集唾液，由唾液预处理试剂和唾液预处理方法在对唾液进行预处

理后，可直接用于毒品的检测。

### (3) 检测结果

若样本中不含冰毒和吗啡毒品，或者所含两种毒品的浓度均低于最低限值时（吗啡限值 300ng/ml；冰毒限值是 1000ng/ml），对应的两个检测区出现条带，如图 2a 所示，同时质控区出现一条质控条带 C，其中，Ta 表示为吗啡检测条带，Tb 表示为冰毒检测条带，C 表示为质控条带。当唾液样本中存在冰毒和吗啡两种毒品时，且两种毒品的浓度均大于被检目标物的最低限值时，对应的检测区不出现两条检测条带，如图 2c 所示。同时控制区出现一条质控条带 C。若冰毒的含量大于最低限值，而吗啡的含量小于最低限值或者不含吗啡，对应的冰毒检测区不出现条带，吗啡检测区出现检测条带 Ta，如图 2b 所示。同时质控区出现一条质控条带 C。

本实施例毒品冰毒和吗啡两项检测反应膜条建立在竞争抑制性免疫层析的原理上，利用彩色胶乳标记原理检测唾液中是否含有冰毒和吗啡两种毒品抗原。在每个膜条的检测区包被冰毒-BSA 和吗啡-BSA (或者冰毒-OVA 和吗啡-OVA) 结合物，控制区 C 区包被羊抗鼠二抗。在膜条的下端粘涂覆彩色胶乳、冰毒和吗啡单克隆抗体的玻璃纤维膜。唾液中不含冰毒和吗啡时，彩色胶乳标记的冰毒和吗啡单克隆抗体结合物在毛细作用下，与唾液一起沿膜向前移动。到达固定有冰毒和吗啡抗原结合物的测试区时，彩色胶乳标记的冰毒和吗啡单克隆抗体与预包被的冰毒和吗啡抗原结合反应形成复合物显示两条红线，在检测区显示两条有颜色的条带说明唾液样本呈阴性，不含有冰毒和吗啡；在唾液中只含冰毒或吗啡其中一项时，则在检测区冰毒和吗啡相对应的抗原结合物处显示与其相对应的红线，通过与其相对应的红线来判断唾液中是否含有冰毒还是吗啡；当唾液中同时含有冰毒和吗啡时，其将和包被在检测区

的冰毒和吗啡抗原竞争性结合一定量的彩色胶乳标记的冰毒和吗啡单克隆抗体。当唾液中冰毒和吗啡抗原达到足够浓度时，它将与标记的定量冰毒和吗啡单克隆抗体完全结合，因而阻止了彩色胶乳标记的冰毒和吗啡的单克隆抗体与预包被在检测区上冰毒和吗啡抗原结合物的结合，因此，测试区不显色，为阳性结果。在控制区无论样品中有无冰毒和吗啡，均显色，说明检测板性能正常；若控制区不显色，则说明本测试版性能失效。

## 实施例二

### (1) 三联免疫层析系统：

可检测唾液中的可卡因、海洛因、摇头丸的多联免疫层析系统，包括塑料外壳，放置在塑料外壳中的可卡因、海洛因和摇头丸联合检测反应试纸条以及唾液预处理试剂。

可卡因、海洛因和摇头丸联合检测反应试纸条：它是底衬上顺次相互搭接地粘贴样品垫、涂覆有胶体硒微粒标记可卡因、海洛因和摇头丸单克隆抗体的玻璃纤维膜、包被膜以及吸水纸而形成的反应膜条，所述包被膜上设有包被抗鼠抗体的控制区（即质控条带），分别包被有可卡因、海洛因和摇头丸抗原的三个检测区（即检测条带）。

### (2) 制备方法：

免疫层析唾液毒品可卡因、海洛因和摇头丸联合检测反应试纸条（竞争抑制法）的制备方法如下：

A. 胶体硒标记蛋白的制备：用0.1M碳酸钾调节直径范围为0.1 μm胶体硒pH值至7.5，按12ug蛋白/ml胶体硒加入可卡因单克隆抗体，混匀后静置，离心处理，弃去上清，将沉淀用标

记洗涤液洗涤，将沉淀用十分之一初始胶体硒标记蛋白保存液溶解，置2~8℃备涂覆玻璃纤维膜用；胶体硒分别标记海洛因和摇头丸的单克隆抗体的方法如上；

**B. 涂覆有标记物的玻璃纤维膜的制备：**将制备好的胶体硒标记的可卡因、海洛因和摇头丸的单克隆抗体根据效价试验匹配的结果，以 1：2：3 的比例混和均匀，涂覆在玻璃纤维膜上，涂覆方法是将制备好的胶体硒标记的可卡因、海洛因和摇头丸单克隆抗体均匀的铺在玻璃纤维膜上，每毫升溶液铺 30 平方厘米，25℃干燥 16 小时，封袋，置 20~25℃备试纸板贴板用；

**C. 毒品抗原和抗鼠二抗包被到硝酸纤维素膜上及其封闭：**膜上包被的检测区和控制区是分别将对应的可卡因、海洛因和摇头丸抗原和抗鼠IgG，用包被缓冲液稀释抗鼠IgG浓度为 2.0mg/ml，用包被缓冲液分别稀释包被可卡因、海洛因和摇头丸抗原，浓度分别为1.0mg/ml，0.5mg/ml，0.75mg/ml，膜液量为20ul/35cm，将可卡因、海洛因和摇头丸抗原及抗鼠IgG喷到相对应的硝酸纤维素膜上，条带之间的间隔均为3mm，应细致均匀，室温凉干20分钟；37℃在封闭液浸泡50分钟，取出后置37℃烘干处理2小时，封袋，得到包被膜，以备贴板用；

**D. 样品垫的处理：**将样品垫的材料玻璃纤维膜放入样品垫处理溶液中处理；样品垫处理液中含3.5%BSA的0.01M PBS溶液50分钟，并含0.25% PEG和0.03% TWEEN-20 表面活性剂；

**E. 在底衬上顺次相互搭接地粘贴样品垫、涂覆胶体硒标记毒品单克隆抗体的玻璃纤维膜、包被膜以及吸水纸，得到试纸板，按照要求切割成不同宽度的反应膜条**

唾液的收集和预处理方法与实施例一相同。

### (3) 检测结果

若样本中不含可卡因、海洛因和摇头丸毒品，或者所含三种毒品的浓度均低于最低限值时（可卡因限值 500ng/ml；海洛因限值是 300ng/ml，摇头丸的限值是 1000ng/ml），对应的三个检测区出现条带，如图 3a 所示。同时质控区出现一条质控带。其中，T1 为可卡因检测条带，T2 为海洛因检测条带，T3 为摇头丸检测条带，C 为质控条带。当唾液样本中存在可卡因、海洛因和摇头丸三种毒品时，且三种毒品的浓度均大于被检目标物的最低限值时，对应的检测区不出现三条检测条带，如图 3c 所示，同时控制区出现一条质控带；若可卡因的含量小于最低限值或者不含时，而海洛因和摇头丸的含量大于最低限值，对应的可卡因检测区出现条带，海洛因和摇头丸检测区不出现条带，如图 3b 所示。若可卡因的含量大于最低限值，而海洛因和摇头丸的含量小于最低限值或者不含时，对应的可卡因检测区不出现条带，海洛因和摇头丸检测区出现条带，同时质控区出现一条质控条带。

本实施例中的胶体硒可换成胶体金，其与胶体硒标记的制备方法相同，且效果也一样。

本实施例毒品可卡因、海洛因和摇头丸三项检测反应膜条建立在竞争抑制性免疫层析的原理上，利用胶体金或胶体硒标记原理检测唾液中是否含有可卡因、海洛因和摇头丸三种毒品抗原。在每个膜条的检测区（T）分别包被可卡因—BSA、海洛因—BSA 和摇头丸—BSA（可卡因—OVA、海洛因—OVA 和摇头丸—OVA）结合物，控制区 C 区包被羊抗鼠二抗。在膜条的下端粘涂覆胶体金或胶体硒标记的可卡因、海洛因和摇头丸单克隆抗体的玻璃纤维膜。唾液中不含可卡因、海洛因和摇头丸时，彩色胶乳、胶体金或胶体硒标记的可卡因、海洛因和摇头丸单克隆抗体结合物在毛细作用下，与唾液一起沿膜向前移动。到达固定有可卡因、海洛因和摇头丸抗原结合物的检测区（T）时，胶体金或胶体硒标记的可卡因、海洛因和摇头丸单克隆抗体与预包被的可卡因、海洛因和摇头丸结合反应形成复合物显示三条红线，在测试

区(T)显示三条有颜色的条带说明唾液样本呈阴性,不含有可卡因、海洛因和摇头丸;在唾液中只含可卡因、海洛因和摇头丸其中一项或者只含它们中任意两项的组合时,则在测试区(T)可卡因、海洛因和摇头丸相对应的抗原结合物处显示与其相对应的一条或者两条红线,通过与其相对应的红线来判断唾液中含有可卡因、海洛因和摇头丸的种类及数量;当唾液中同时含有可卡因、海洛因和摇头丸时,其将和包被在各个检测区的可卡因、海洛因和摇头丸抗原竞争性结合一定量的胶体金或胶体硒标记的可卡因、海洛因和摇头丸单克隆抗体。当唾液中可卡因、海洛因和摇头丸抗原达到足够浓度时,它将与标记的定量可卡因、海洛因和摇头丸单克隆抗体完全结合,因而阻止胶体金或胶体硒标记的可卡因、海洛因和摇头丸的单克隆抗体与预包被在检测区上可卡因、海洛因和摇头丸抗原结合物的结合,因此,检测区(T)不显色,为阳性结果。在控制区(C)无论样品中有无可卡因、海洛因和摇头丸,均显色,说明检测板性能正常;若控制区(C)不显色,则说明本测试版性能失效。

该发明可以实现两项联检、三项联检;另外对应毒品系列的产品(安非他命、巴比妥、苯二氮卓、可卡因、冰毒、摇头丸、吗啡、美沙酮、鸦片、苯环己哌啶、三环抗抑郁药、大麻等)它们之间可以任意组合实现四项或五项联合检测。

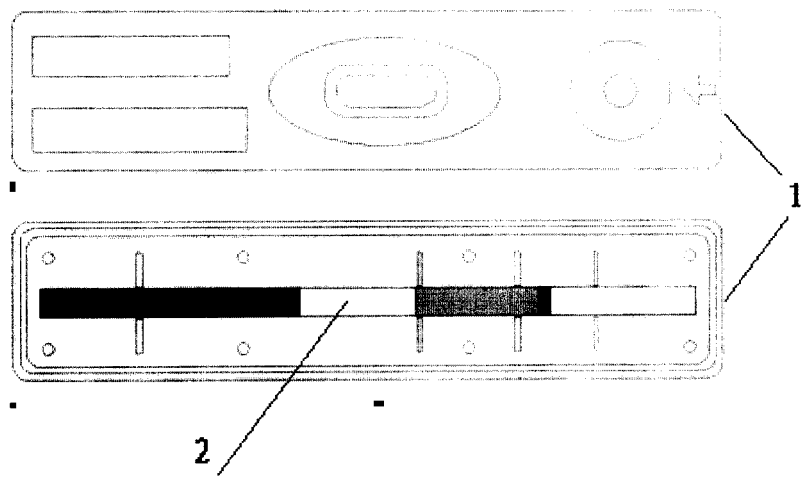


图 1



图 2a

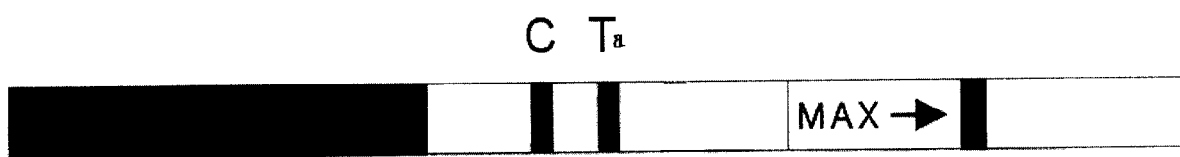


图 2b

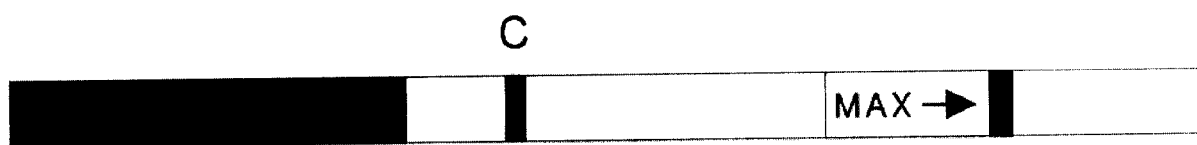


图 2c



图 3a

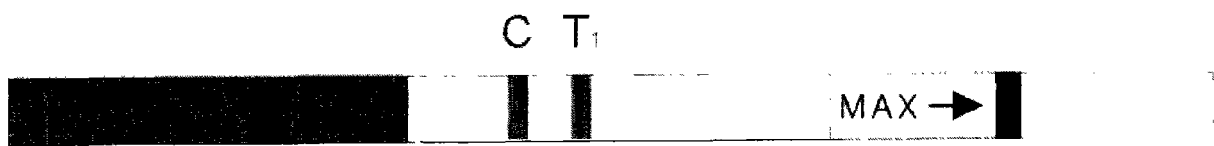


图 3b



图 3c

专利名称(译)	检测唾液中滥用毒品的多联免疫层析试纸条、系统及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101241136A</a>	公开(公告)日	2008-08-13
申请号	CN200710031810.3	申请日	2007-11-30
[标]申请(专利权)人(译)	广州万孚生物技术股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	广州万孚生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广州万孚生物技术有限公司		
[标]发明人	王继华		
发明人	王继华		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/543 G01N33/532		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种检测唾液中滥用毒品的多联免疫层析试纸条及其制备方法，该试纸条是在底衬上顺次相互搭接地粘贴样品垫、涂覆有彩色胶乳、胶体金或胶体硒微粒标记蛋白的玻璃纤维膜、包被膜以及吸水纸而形成的反应膜条，所述包被膜上设有控制区，以及两个或两个以上的检测区，每个检测区包被有相应的毒品抗原，控制区包被抗鼠抗体。它具有操作安全、简便、适合单人/份检测和快速，可以同时检测唾液中的毒品抗原进行多种检测等优点。

