



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102539773 B

(45) 授权公告日 2014. 07. 16

(21) 申请号 201110457819. 7

(22) 申请日 2011. 12. 31

(73) 专利权人 上海凯创生物技术有限公司

地址 201317 上海市浦东新区下沙镇工业园区鹤立路

(72) 发明人 张国华

(74) 专利代理机构 上海光华专利事务所 31219

代理人 许亦琳 余明伟

(51) Int. Cl.

G01N 33/64 (2006. 01)

G01N 33/558 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1907953 A, 2007. 02. 07, 说明书第 4 页第 3 行至第 5 页第 6 行, 第 10 页第 8 行至第 12 页第 6 行实施例 11、12、13、14.

CN 2914093 Y, 2007. 06. 20, 权利要求 1-4, 说明书第 1 页第 20 行至第 3 页第 17 行.

CN 1907953 A, 2007. 02. 07, 说明书第 4 页第 3 行至第 5 页第 6 行, 第 10 页第 8 行至第 12 页第 6 行实施例 11、12、13、14.

CN 2914093 Y, 2007. 06. 20, 权利要求 1-4,

说明书第 1 页第 20 行至第 3 页第 17 行.

US 2010/0159471 A1, 2010. 06. 24, 说明书第 [0002]-[0005] 段, 实施例 1、2, 表 2.

CN 102297966 A, 2011. 12. 28, 说明书实施例 1.

CN 101865913 A, 2010. 10. 20, 说明书第 [0066] 段.

EP 0426300 B1, 1998. 06. 03, 全文.

CN 101435823 A, 2009. 05. 20, 全文.

CN 102269763 A, 2011. 12. 07, 全文.

高燕红等. 晶种法制备单分散的金纳米粒子及光学性能研究. 《贵金属》. 2010, 第 31 卷 (第 04 期), 15-23.

杨新伟等. 单分散纳米金尺寸的分步晶种生长控制. 《物理化学学报》. 2009, 第 25 卷 (第 12 期), 2565-2569.

曹林有等. 晶种法合成金溶胶过程中非球形粒子的抑制. 《物理化学学报》. 2004, 第 20 卷 (第 02 期), 211-215.

审查员 许珊萍

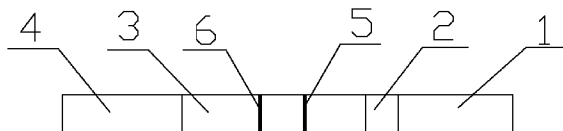
权利要求书2页 说明书10页 附图1页

(54) 发明名称

氯胺酮胶体金检测试剂盒及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及胶体金免疫层析领域, 具体公开了一种氯胺酮胶体金检测试剂盒, 包括试剂条, 所述试剂条包括衬底、滤样纸、免疫胶体金纸片、免疫硝酸纤维素膜和吸水纸, 滤样纸、免疫胶体金纸片、免疫硝酸纤维素膜和吸水纸依次首尾衔接并固定于衬底上; 所述免疫胶体金纸片上包被有胶体金标记的抗氯胺酮单克隆抗体, 所述免疫硝酸纤维素膜上设有包被有氯胺酮-牛血清白蛋白复合物的检测线和包被有羊抗鼠 IgG 的质控线。本发明的氯胺酮胶体金检测试剂盒, 具有抗原抗体结合反应充分, 灵敏度高, 成本低, 使用方便的优点。



1. 一种氯胺酮胶体金检测试剂盒的制备方法,所述氯胺酮胶体金检测试剂盒,包括试剂条,所述试剂条包括衬底、滤样纸、免疫胶体金纸片、免疫硝酸纤维素膜和吸水纸,滤样纸、免疫胶体金纸片、免疫硝酸纤维素膜和吸水纸依次首尾衔接并固定于衬底上;其特征在于,所述免疫胶体金纸片上包被有胶体金标记的抗氯胺酮单克隆抗体,所述免疫硝酸纤维素膜上设有包被有氯胺酮-牛血清白蛋白复合物的检测线和包被有羊抗鼠 IgG 的质控线,所述氯胺酮胶体金检测试剂盒的制备方法包括以下步骤:

1) 两步还原法制备胶体金,所述两步还原法为:

a. 第一次还原氯金酸溶液:制备浓度为 0.0004-0.0005mol/L 的  $\text{HAuCl}_4$  水溶液,加热煮沸 20-30 分钟,之后边搅拌边加入柠檬酸三钠水溶液, $\text{HAuCl}_4$  与柠檬酸三钠的摩尔比为 1:8 ~ 9,超声振荡 2-3 分钟后冷却至室温,即制得 14 ~ 16nm 粒径的胶体金原溶液;

b. 第二次还原氯金酸溶液:将第一步制得的胶体金原溶液放置于 4.0℃ 水浴中保持温度恒定,随后按胶体金原溶液与  $\text{HAuCl}_4$  水溶液体积比 1:1.9 ~ 2.0 加入 4.0℃ 的 0.003-0.004mol/L  $\text{HAuCl}_4$  水溶液,随后立即边搅拌边滴加 4.0℃ 的抗坏血酸与 PVP 的混合水溶液,加入的抗坏血酸与本步骤加入的  $\text{HAuCl}_4$  的摩尔比为 25 ~ 26:1,加入的 PVP 与本步骤加入的  $\text{HAuCl}_4$  的重量比为 1:2.0 ~ 2.1,反应中保持温度恒定,搅拌至反应完全,溶液呈透明的酒红色,制得 39-42nm 粒径的胶体金溶液;两步还原法中,配置各种水溶液均采用双蒸水;

2) 用步骤 1) 制备的胶体金标记抗氯胺酮单克隆抗体,获得胶体金标记的抗氯胺酮单克隆抗体;

3) 免疫胶体金纸片的制备:预处理玻璃纤维纸;稀释步骤 2) 获得的胶体金标记的抗氯胺酮单克隆抗体,得到免疫胶体金溶液;用所述免疫胶体金溶液包被预处理过的玻璃纤维纸,获得免疫胶体金纸片;

4) 将氯胺酮-牛血清白蛋白复合物和羊抗鼠 IgG 分别喷在硝酸纤维素膜检测线和质控线的位置上,烘干备用,制得免疫硝酸纤维素膜;

5) 将滤样纸、免疫胶体金纸片、免疫硝酸纤维素膜、吸水纸依次粘贴在胶板上,切裁制得试剂条;

6) 将试剂条装入塑料盒,即获得氯胺酮胶体金检测试剂盒。

2. 如权利要求 1 所述的制备方法,其特征在于,步骤 a 中,加入的柠檬酸三钠水溶液的浓度为 0.01-0.02mol/L,超声震荡的频率为 20 - 30KHZ。

3. 如权利要求 1 所述的制备方法,其特征在于,步骤 b 中,所述抗坏血酸与 PVP 的混合水溶液中,抗坏血酸的浓度为 0.017-0.019mol/L, PVP 的浓度为 0.137-0.139g/L。

4. 如权利要求 1 所述的制备方法,其特征在于,所述步骤 3) 免疫胶体金纸片的制备为:

A. 用喷金缓冲液稀释胶体金标记的抗氯胺酮单克隆抗体,获得  $\text{OD}_{540}$  值为 2.0 的免疫胶体金溶液;

B. 用预处理液浸泡玻璃纤维纸,干燥后,再用免疫胶体金溶液喷涂预处理后的玻璃纤维纸,干燥,制得免疫胶体金纸片。

5. 如权利要求 4 所述的制备方法,其特征在于,所述步骤 A 中的喷金缓冲液配方如下: 8 ~ 12v% 1.0M Tris 液,0.2 ~ 0.4w/v% 聚乙二醇 20000,0.15 ~ 0.25w/v% 牛血清白蛋

白, 0.1 ~ 0.3w/v% 脱脂牛奶, 0.25 ~ 0.35w/v% 酪蛋白, 和 0.02 ~ 0.08w/v% 叠氮化钠, 用盐

酸调节 pH 至  $8.5 \pm 0.05$ , 余量为水。

6. 如权利要求 4 所述的制备方法, 其特征在于, 所述步骤 B 中的预处理液包括 0.5 ~ 0.8v% Tween-20, 12 ~ 18w/v% 蔗糖, 溶剂为水。

7. 一种氯胺酮胶体金检测试剂盒, 采用权利要求 1-3 任一权利要求所述方法制备获得; 所述试剂盒包括试剂条, 所述试剂条包括衬底、滤样纸、免疫胶体金纸片、免疫硝酸纤维素膜和吸水纸, 滤样纸、免疫胶体金纸片、免疫硝酸纤维素膜和吸水纸依次首尾衔接并固定于衬底上; 其特征在于, 所述免疫胶体金纸片上包被有胶体金标记的抗氯胺酮单克隆抗体, 所述免疫硝酸纤维素膜上设有包被有氯胺酮-牛血清白蛋白复合物的检测线和包被有羊抗鼠 IgG 的质控线。

## 氯胺酮胶体金检测试剂盒及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及胶体金免疫层析领域,具体涉及一种氯胺酮胶体金检测试剂盒及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 氯胺酮 (Ketamine, KET) 是苯环己哌啶 (N-1-phenylcyclohexyl-piperidine, PCP) 的衍生物,医学上作为外科手术麻醉剂,黑市上俗称“K 粉”、“K 仔”。近年来在娱乐场所滥用日趋严重,严重威胁健康。氯胺酮通常的使用方式以香烟吸服、鼻吸、静脉注射或将粉末溶入饮料中进行饮用。研究表明,在服用氯胺酮后都会出现“去人格化”、“去真实感”、人体形象改变、梦境、幻觉以及恶心呕吐,大剂量服用,会出现意识模糊、身体呈木僵状,呼吸抑制,甚至出现四肢抽搐以及呼吸停止等现象;长期使用氯胺酮可造成记忆缺失、认知功能损害和精神病。人体服用的氯胺酮有 70% -90% 在肝内代谢并经尿液排出,其在体内的代谢较快,清除半衰期约为 2.5 小时,一般在吸食后 2-4 小时内即可被检出。

[0003] 鉴于氯胺酮的严重危害性,国家对氯胺酮管理日趋严格,本领域对氯胺酮和滥用毒品者生物标本中的氯胺酮检测提出了更高的要求。

[0004] 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,由于其具有特异性强、灵敏度高、简单快速、易于操作、结果容易判读,无需附加仪器设备等优点而被广泛应用。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种氯胺酮胶体金检测试剂盒及其制备方法,从而有效提高试剂盒的检测灵敏度及质量。

[0006] 本发明一方面公开了一种氯胺酮胶体金检测试剂盒,包括试剂条,所述试剂条包括衬底、滤样纸、免疫胶体金纸片、免疫硝酸纤维素膜和吸水纸,滤样纸、免疫胶体金纸片、免疫硝酸纤维素膜和吸水纸依次首尾衔接并固定于衬底上;所述免疫胶体金纸片上包被有胶体金标记的抗氯胺酮单克隆抗体,所述免疫硝酸纤维素膜上设有包被有氯胺酮-牛血清白蛋白复合物的检测线和包被有羊抗鼠 IgG 的质控线。

[0007] 较优的,所述胶体金的颗粒大小为 39 ~ 42nm。

[0008] 较优的,所述胶体金是由两步还原法制备获得。

[0009] 更优的,所述两步还原法的步骤为:

[0010] a) 第一次还原氯金酸溶液:制备浓度为 0.0004-0.0005mol/L 的  $\text{HAuCl}_4$  水溶液,加热煮沸 20-30 分钟,之后边搅拌边加入柠檬酸三钠水溶液, $\text{HAuCl}_4$  与柠檬酸三钠的摩尔比为 1 : 8 ~ 9,超声振荡 2-3 分钟后冷却至室温,即制得 14 ~ 16nm 粒径的胶体金原溶液;

[0011] b) 第二次还原氯金酸溶液:将第一步制得的胶体金原溶液放置 4.0°C 水浴中保持温度恒定,随后按胶体金原溶液与  $\text{HAuCl}_4$  水溶液体积比 1 : 1.9 ~ 2.0 加入 4.0°C 的 0.003-0.004mol/L  $\text{LHAuCl}_4$  水溶液,随后立即边搅拌边滴加 4.0°C 的抗坏血酸与 PVP 的混合

水溶液,加入的抗坏血酸与本步骤加入的  $\text{HAuCl}_4$  的摩尔比为 25 ~ 26 : 1,加入的 PVP 与本步骤加入的  $\text{HAuCl}_4$  的重量比为 1 : 2.0 ~ 2.1,反应中保持温度恒定,搅拌至反应完全,溶液呈透明的酒红色,制得 39-42nm 粒径的胶体金溶液;

[0012] 两步还原法中,配置各种水溶液均采用双蒸水。

[0013] 最优的,步骤 a) 中,加入柠檬酸三钠水溶液的浓度为 0.01-0.02mol/L。

[0014] 最优的,步骤 a) 中,超声震荡的频率为 20-30KHZ。

[0015] 最优的,步骤 b) 中,抗坏血酸与 PVP 的混合水溶液的滴加速度为 1-2 滴 /s。

[0016] 最优的,步骤 b) 中,所述抗坏血酸与 PVP 的混合水溶液中,抗坏血酸的浓度为 0.017-0.019mol/L, PVP 的浓度为 0.137-0.139g/L。

[0017] 步骤 b) 中,搅拌反应约为 50-70 分钟。

[0018] 采用上述方法制得的胶体金清亮透明,粒径尺寸均一,无凝集颗粒,基本未发现非球形粒子。

[0019] 较优的,所述免疫胶体金纸片是经过预处理的玻璃纤维纸,所述预处理的预处理液包括 0.5 ~ 0.8v% Tween-20,12 ~ 18w/v% 蔗糖,溶剂为水。

[0020] 更优的,所述免疫胶体金纸片是经过预处理的玻璃纤维纸,所述预处理的预处理液配方为:0.7v% Tween-20,16w/v% 蔗糖。

[0021] 本发明的另一方面,提供了一种氯胺酮胶体金检测试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

[0022] 1) 两步还原法制备胶体金;

[0023] 2) 用步骤 1) 制备的胶体金标记抗氯胺酮单克隆抗体,获得胶体金标记的抗氯胺酮单克隆抗体(免疫胶体金);

[0024] 3) 免疫胶体金纸片的制备:预处理玻璃纤维纸;稀释步骤 2) 获得的胶体金标记的抗氯胺酮单克隆抗体,得到免疫胶体金溶液;用所述免疫胶体金溶液包被预处理过的玻璃纤维纸,获得免疫胶体金纸片;

[0025] 4) 将氯胺酮-牛血清白蛋白复合物和羊抗鼠 IgG 分别喷在硝酸纤维素膜检测线(T 线)和质控线(C 线)的位置上,烘干备用,制得免疫硝酸纤维素膜;

[0026] 5) 将滤样纸、免疫胶体金纸片、免疫硝酸纤维素膜、吸水纸依次粘贴在胶板上,切割制得试剂条;

[0027] 6) 最后将试剂条装入塑料盒,即获得氯胺酮胶体金检测试剂盒。

[0028] 较优的,所述胶体金的颗粒大小为 39 ~ 42nm,所述胶体金是由两步还原法制备获得。

[0029] 更优的,所述两步还原法的步骤为:

[0030] a) 第一次还原氯金酸溶液:制备浓度为 0.0004-0.0005mol/L 的  $\text{HAuCl}_4$  水溶液,加热煮沸 20-30 分钟,之后边搅拌边加入柠檬酸三钠水溶液, $\text{HAuCl}_4$  与柠檬酸三钠的摩尔比为 1 : 8 ~ 9,超声振荡 2-3 分钟后冷却至室温,即制得 14 ~ 16nm 粒径的胶体金原溶液;

[0031] b) 第二次还原氯金酸溶液:将第一步制得的胶体金原溶液放置 4.0℃ 水浴中保持温度恒定,随后按胶体金原溶液与  $\text{HAuCl}_4$  水溶液体积比 1 : 1.9 ~ 2.0 加入 4.0℃ 的 0.003-0.004mol/L  $\text{HAuCl}_4$  水溶液,随后立即边搅拌边滴加 4.0℃ 的抗坏血酸与 PVP 的混合水溶液,加入的抗坏血酸与本步骤加入的  $\text{HAuCl}_4$  的摩尔比为 25 ~ 26 : 1,加入的 PVP 与本

步骤加入的  $\text{HAuCl}_4$  的重量比为 1 : 2.0 ~ 2.1, 反应中保持温度恒定, 搅拌至反应完全, 溶液呈透明的酒红色, 制得 39-42nm 粒径的胶体金溶液;

[0032] 两步还原法中, 配置各种水溶液均采用双蒸水。

[0033] 最优的, 步骤 a) 中, 加入柠檬酸三钠水溶液的浓度为 0.01-0.02mol/L。

[0034] 最优的, 步骤 a) 中, 超声震荡的频率为 20-30KHZ。

[0035] 最优的, 步骤 b) 中, 抗坏血酸与 PVP 的混合水溶液的滴加速度为 1-2 滴 /s。

[0036] 最优的, 步骤 b) 中, 所述抗坏血酸与 PVP 的混合水溶液中, 抗坏血酸的浓度为 0.017-0.019mol/L, PVP 的浓度为 0.137-0.139g/L。

[0037] 步骤 b) 中, 搅拌反应约为 50-70 分钟。

[0038] 较优的, 步骤 2) 中, 胶体金标记抗氯胺酮单克隆抗体的比例为: 向胶体金中按照  $8 \mu\text{g}$  抗体 / (ml 胶体金) 的比例加入抗氯胺酮单克隆抗体, 制备得到免疫胶体金。

[0039] 较优的, 所述步骤 3) 免疫胶体金纸片的制备为:

[0040] A. 用喷金缓冲液稀释胶体金标记的抗氯胺酮单克隆抗体, 获得  $\text{OD}_{540}$  值为 2.0 的免疫胶体金溶液;

[0041] B. 用预处理液浸泡玻璃纤维纸, 干燥后, 再用免疫胶体金溶液喷涂预处理后的玻璃纤维纸, 干燥, 制得免疫胶体金纸片。

[0042] 本发明中, v% 指体积百分比; w/v% 指重量体积百分比, 如 1w/v% 即为 100ml 溶液中含 1g。

[0043] 更优的, 所述步骤 A 中的喷金缓冲液配方如下: 8 ~ 12v% 1.0M Tris 液, 0.2 ~ 0.4w/v% 聚乙二醇 20000, 0.15 ~ 0.25w/v% 牛血清白蛋白, 0.1 ~ 0.3w/v% 脱脂牛奶, 0.25 ~ 0.35w/v% 酪蛋白, 和 0.02 ~ 0.08w/v% 叠氮化钠, 用盐酸调节 pH 至  $8.5 \pm 0.05$ , 余量为水。

[0044] 最优的, 所述步骤 A 中的喷金缓冲液配方如下: 10v% 1.0M Tris 液、0.3w/v% 聚乙二醇 20000、0.2w/v% 牛血清白蛋白, 0.2w/v% 脱脂牛奶、0.3w/v% 酪蛋白, 和 0.05w/v% 叠氮化钠, 用盐酸调节 pH 至  $8.5 \pm 0.05$ , 余量为水。

[0045] 更优的, 所述步骤 B 中的预处理液包括 0.5 ~ 0.8v% Tween-20, 12 ~ 18w/v% 蔗糖, 溶剂为水。

[0046] 最优的, 所述步骤 B 中的预处理液包括 0.7v% Tween-20, 16w/v% 蔗糖, 溶剂为水。

[0047] 更优的, 步骤 B 中, 每 30ml 预处理液浸泡玻璃纤维纸 261mm × 220mm, 干燥后, 再用免疫胶体金溶液喷涂玻璃纤维纸, 每 261mm × 220mm 玻璃纤维纸上喷涂 20ml 免疫胶体金溶液, 干燥, 制得免疫胶体金纸片。

[0048] 较优的, 步骤 4) 中, 喷在硝酸纤维素膜质控线 (C 线) 上的羊抗鼠 IgG 的浓度为 0.4 ~ 0.6mg/ml, 喷在硝酸纤维素膜检测线 (T 线) 上的氯胺酮 - 牛血清白蛋白复合物浓度为 0.3 ~ 0.5mg/ml。

[0049] 较优的, 每 1m 长硝酸纤维素膜分别包被有 1ml 的羊抗鼠 IgG 和氯胺酮 - 牛血清白蛋白复合物溶液, 检测线和质控线的间距为 4.0 ~ 6.0mm。

[0050] 本发明的创新在于免疫胶体金纸片制备步骤的工艺改进以及两步还原法制备分子大小均一的胶体金颗粒, 其余步骤均可采用常规制备胶体金检测试剂条的条件进行。免疫胶体金纸片制备步骤中, 通过采用合理配方对玻璃纤维膜进行预处理并采用较好的喷金

缓冲液,在保障胶体金释放完全的基础上可有效减慢检测时免疫胶体金的释放层析,有利于抗原抗体充分反应结合,有效的提高了反应的灵敏度,同样的阈值下,还可降低免疫胶体金的用量,节约成本;采用的两步还原法,使得到的胶体金分子呈大小均一的 40nm 球形颗粒,由于胶体金颗粒大小适中、整体均一,使其与单克隆抗体的结合效率更高、效果更稳定。

[0051] 本发明氯胺酮胶体金检测试剂盒的工作原理,即是利用高度特异的抗体-抗原特异结合反应及免疫膜层析技术,通过免疫竞争抑制法来定性检测人尿液中出现的氯胺酮。

[0052] 试剂盒内的检测试剂条是实现氯胺酮检测的关键,在试纸条检测线(T线)包被了氯胺酮-牛血清白蛋白复合物;在试纸条的另一端固定有抗氯胺酮单克隆抗体-胶体金。尿液从加样孔加入,如果尿液中含有氯胺酮,它们将与氯胺酮-牛血清白蛋白复合物竞争胶体金-抗氯胺酮单克隆抗体上有限的抗原结合位点,当氯胺酮浓度达到产品设计的阈值浓度以上时,它们将占据抗氯胺酮单克隆抗体上全部的抗原结合位点,这样就阻止了抗氯胺酮单克隆抗体-胶体金和检测线上的氯胺酮-牛血清白蛋白复合物结合,检测线不能捕获到胶体金颗粒而无红色色带出现,为阳性结果。如果尿液中没有氯胺酮或氯胺酮的浓度低于阈值浓度,则抗氯胺酮单克隆抗体-胶体金随同尿液运行至检测线,检测线捕获到胶体金颗粒而呈现红色色带,为阴性结果。

[0053] 试纸条的质控线(C线)上包被有羊抗鼠 IgG,以指示试剂盒反应系统工作是否正常。质控线的出现与氯胺酮或其代谢物的存在无关。质控线色带的出现表明:①样品加入量充足②样品在纸条上运行正常。

[0054] 从上述原理可以看到,在胶体金纸片上抗体-抗原特异结合反应是胶体金试剂盒正常工作的关键因素,直接关系到试剂盒的灵敏度及质量优劣,因此免疫胶体金的包被就显得尤其重要。

[0055] 本发明制得的氯胺酮胶体金检测试剂盒的使用方法如下:

[0056] 1. 将试剂盒放置在水平台面上。

[0057] 2. 用加样吸管吸取尿样,然后滴 3 滴(约 120u1)尿样到试剂盒的加样孔中。每检测一份不同的样品注意要使用不同的吸管。

[0058] 3. 观察结果:在滴加样品后 3-8 分钟判读结果。

[0059] 检测结果的判断方法:

[0060] 阴性:在结果观察窗口内出现两条色带。即检测线(T线)和质控线(C线)位置各出现一条红色线条。表示样品中无氯胺酮存在。

[0061] 阳性:只在结果观察窗口的质控线(C线)位置出现一条红色线条,检测线(T线)未出现任何线条,表示样品中有氯胺酮存在。

[0062] 无效:质控线(C线)不出现。任何情况下,C线均应形成,表示加样和操作正确。C线未出现表明测试结果是不确定的,应重做。

[0063] 采用本发明制备的氯胺酮胶体金检测试剂盒,抗原抗体结合反应充分,灵敏度高。

## 附图说明

[0064] 图 1:氯胺酮胶体金检测试剂盒试剂条示意图(1. 滤样纸 2. 免疫胶体金纸 3. 免疫硝酸纤维素膜 4. 吸水纸 5. 检测线 6. 质控线)

[0065] 图 2:胶体金透射电镜图

## 具体实施方式

[0066] 以下结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明,而非限制本发明的范围。

[0067] 实施例 1 氯胺酮胶体金检测试剂盒的制备

[0068] 一、试剂来源:

[0069] 抗氯胺酮单克隆抗体、羊抗鼠 IgG 多克隆抗体、氯胺酮-牛血清白蛋白复合物 (KET-BSA):购自美国美迪生物技术有限公司 (MAXMED LABORATORIES INC.)

[0070] 硝酸纤维素薄膜、玻璃纤维纸:购自德国赛多利斯公司 (SARTORIUS)

[0071] 二、制备步骤

[0072] 方法 1:

[0073] 1. 胶体金的制备:两步还原法制备胶体金

[0074] a) 第一次还原氯金酸溶液:将 6ml 0.0164mol/L 的  $\text{HAuCl}_4$  水溶液加入 200ml 双蒸水中,加热煮沸 30 分钟,之后缓慢搅动并准确加入 50ml 0.016mol/L 柠檬酸三钠水溶液。超声振荡 2 分钟后冷却至室温,超声震荡的频率为 25KHZ,即制得约 15nm 粒径的胶体金原溶液。

[0075] b) 第二次还原氯金酸溶液:取第一步制得的胶体金原核溶液 26ml,并放置于 4℃ 水浴锅中稳定温度,随后加入 50ml 预冷为 4.0℃ 的 0.0035mol/L  $\text{HAuCl}_4$  水溶液并立即缓慢滴加 250ml 预冷为 4.0℃ 的含 0.018mol/L 的抗坏血酸与 0.138g/L PVP 的混合水溶液,滴加速度为 1-2 滴/s,搅拌反应 1 小时,溶液呈透明的酒红色,既制得 40nm 粒径的胶体金溶液。

[0076] 制备好的胶体金颗粒通过透射电镜观察,结果显示,所制备的胶体金颗粒分散性好,粒径大小均一,为 40nm 左右(说明书附图图 2)。

[0077] 2. 免疫胶体金的制备

[0078] 2.1 将抗氯胺酮单克隆抗体用 0.1M pH 7.8 的磷酸盐缓冲液稀释至浓度为 1.0mg/ml 的抗体溶液。

[0079] 2.2 取 1000ml 的胶体金溶液,往里加入 1/10 倍胶体金体积的 0.1M pH 7.8 磷酸盐缓冲液混合 3 分钟。在快速搅拌下,再缓缓将稀释的抗氯胺酮单克隆抗体溶液 8ml 加入其中。室温反应 5 分钟并不时缓缓搅拌。

[0080] 2.3 反应结束后,在上述反应液中快速加入 20ml 的 10wt% 的牛血清白蛋白 (BSA) 溶液。室温反应 5 分钟并不时缓缓搅拌。

[0081] 2.4 将制备好的免疫胶体金 8000 转/min 离心 20 分钟,保留沉淀,并收集上清 12500 转/min 离心 30 分钟,弃上清。收集两次离心沉淀用含有 0.1wt% BSA 的硼酸缓冲液复溶到  $\text{OD}_{540}$  在 14。

[0082] 3. 免疫胶体金纸制备

[0083] 3.1 预处理液的制备:准确称取 7ml Tween-20,160g 蔗糖,加纯化水定容至 1000ml。

[0084] 3.2 喷金缓冲液的制备:取 800ml 纯化水,往里加入 100ml 1.0M Tris 液,用盐酸调节 pH 至 8.5。准确称取 3.0g 聚乙二醇 20000、2.0g 牛血清白蛋白,2.0g 脱脂牛奶,3.0g 酪蛋白溶液和 0.5g 叠氮化钠加入溶液中,充分溶解,混合均匀,加纯化水至总体积 1000ml。

[0085] 3.3 用喷金缓冲液稀释胶体金标记的抗氯胺酮单克隆抗体,至溶液 OD<sub>540</sub> 值为 2.0, 获得免疫胶体金溶液。

[0086] 3.4 用预处理液浸泡玻璃纤维纸,每 30ml 预处理液浸泡玻璃纤维纸 261mm×220mm,浸泡 30min 后,37℃ 下干燥;再用免疫胶体金溶液喷涂玻璃纤维纸,每 261mm×220mm 玻璃纤维纸上喷涂 20ml 免疫胶体金溶液,干燥,制得免疫胶体金纸片。

[0087] 4. 免疫硝酸纤维素膜的制备

[0088] 4.1 将羊抗鼠 IgG 用磷酸盐缓冲液稀释成 0.5mg/ml,制得质控线(C线)溶液。

[0089] 4.2 将氯胺酮-牛血清白蛋白复合物用磷酸盐缓冲液稀释至蛋白浓度为 0.5mg/ml 制得检测线(T线)溶液。

[0090] 4.3 用点膜机喷点 C、T 线溶液,制得免疫硝酸纤维素膜。每 1m 长硝酸纤维素膜分别包被有 1ml 的 C 线和 T 线溶液,检测线和质控线的间距为 6.0mm。

[0091] 5. 将滤样纸、免疫胶体金纸片、免疫硝酸纤维素膜、吸水纸依次粘贴在胶板上,切割成宽度为 4mm 的试剂条(如图 1 所示)。

[0092] 6. 将检测试剂条装入塑料盒内即得检测试剂盒。

[0093] 考虑到某些正常使用的药物中也含有氯胺酮成分,实际工作中为避免假阳性的出现,参照国际通行的浓度值,本实施例设计的检测试剂盒的阈值为 1000ng/ml。

[0094] 方法 2:

[0095] 1. 胶体金的制备:参考实施例 1 方法 1 的步骤。

[0096] 2. 免疫胶体金的制备:参考实施例 1 方法 1 的步骤。

[0097] 3. 免疫胶体金纸制备

[0098] 3.1 预处理液的制备:准确称取 5ml Tween-20,120g 蔗糖,加纯化水定容至 1000ml。

[0099] 3.2 喷金缓冲液的制备:取 800ml 纯化水,往里加入 120ml 1.0M Tris 液,用盐酸调节 pH 至 8.5。准确称取 2.0g 聚乙二醇 20000、1.5g 牛血清白蛋白,3.0g 脱脂牛奶,2.5g 酪蛋白溶液和 0.8g 叠氮化钠加入溶液中,充分溶解,混合均匀,加纯化水至总体积 1000ml。

[0100] 3.3 用喷金缓冲液稀释胶体金标记的抗氯胺酮单克隆抗体,至溶液 OD<sub>540</sub> 值为 2.0, 获得免疫胶体金溶液。

[0101] 3.4 用预处理液浸泡玻璃纤维纸,每 30ml 预处理液浸泡玻璃纤维纸 261mm×220mm,浸泡 25min 后,37℃ 下干燥;再用免疫胶体金溶液喷涂玻璃纤维纸,每 261mm×220mm 玻璃纤维纸上喷涂 20ml 免疫胶体金溶液,干燥,制得免疫胶体金纸片。

[0102] 4. 免疫硝酸纤维素膜的制备:

[0103] 4.1 将羊抗鼠 IgG 用磷酸盐缓冲液稀释成 0.6mg/ml,制得质控线(C线)溶液。

[0104] 4.2 将氯胺酮-牛血清白蛋白复合物用磷酸盐缓冲液稀释至蛋白浓度为 0.3mg/ml 制得检测线(T线)溶液。

[0105] 4.3 用点膜机喷点 C、T 线溶液,制得免疫硝酸纤维素膜。每 1m 长硝酸纤维素膜分别包被有 1ml 的 C 线和 T 线溶液,检测线和质控线的间距为 4.0mm。

[0106] 5. 将滤样纸、免疫胶体金纸片、免疫硝酸纤维素膜、吸水纸依次粘贴在胶板上,切割成宽度为 5mm 的试剂条。

[0107] 6. 将检测试剂条装入塑料盒内即得检测试剂盒。

[0108] 方法 3：

[0109] 1. 胶体金的制备：参考实施例 1 方法 1 的步骤。

[0110] 2. 免疫胶体金的制备：参考实施例 1 方法 1 的步骤。

[0111] 3. 免疫胶体金纸制备

[0112] 3.1 预处理液的制备：准确称取 8ml Tween-20, 180g 蔗糖，加纯化水定容至 1000ml。

[0113] 3.2 喷金缓冲液的制备：取 800ml 纯化水，往里加入 80ml 1.0M Tris 液，用盐酸调节 pH 至 8.5。准确称取 4.0g 聚乙二醇 20000、2.5g 牛血清白蛋白，1.0g 脱脂牛奶，

[0114] 3.5g 酪蛋白溶液和 0.2g 叠氮化钠加入溶液中，充分溶解，混合均匀，加纯化水至总体积 1000ml。

[0115] 3.3 用喷金缓冲液稀释胶体金标记的抗氯胺酮单克隆抗体，至溶液 OD<sub>540</sub> 值为 2.0，获得免疫胶体金溶液。

[0116] 3.4 用预处理液浸泡玻璃纤维纸，每 30ml 预处理液浸泡玻璃纤维纸 261mm×220mm，浸泡 30min 后，37℃ 下干燥；再用免疫胶体金溶液喷涂玻璃纤维纸，每 261mm×220mm 玻璃纤维纸上喷涂 20ml 免疫胶体金溶液，干燥，制得免疫胶体金纸片。

[0117] 4. 免疫硝酸纤维素膜的制备：

[0118] 4.1 将羊抗鼠 IgG 用磷酸盐缓冲液稀释成 0.4mg/ml，制得质控线（C 线）溶液。

[0119] 4.2 将氯胺酮-牛血清白蛋白复合物用磷酸盐缓冲液稀释至蛋白浓度为 0.4mg/ml 制得检测线（T 线）溶液。

[0120] 4.3 用点膜机喷点 C、T 线溶液，制得免疫硝酸纤维素膜。每 1m 长硝酸纤维素膜分别包被有 1ml 的 C 线和 T 线溶液，检测线和质控线的间距为 5.0mm。

[0121] 5. 将滤样纸、免疫胶体金纸片、免疫硝酸纤维素膜、吸水纸依次粘贴在胶板上，切割成宽度为 5mm 的试剂条。

[0122] 6. 将检测试剂条装入塑料盒内即得检测试剂盒。

[0123] 实施例 2 氯胺酮胶体金检测试剂盒的灵敏度实验

[0124] 1. 检测方法：

[0125] (1) 取实施例 1 制备的氯胺酮胶体金检测试剂盒，将试剂盒放置在水平台面上。

[0126] (2) 用加样吸管吸取样品，然后滴 3 滴（约 120 $\mu$ l）样品到试剂盒的加样孔中。每检测一份不同的样品使用不同的吸管。

[0127] (3) 观察结果：在滴加样品后 3-8 分钟判读结果。

[0128] 2. 检测样品：

[0129] 配置氯胺酮浓度为 500、600、700、800、900、1000、1200、1500、2000ng/ml 的质控参考品作为样品，每个浓度重复 3 次。

[0130] 3. 检测结果：

[0131] 表 1 氯胺酮胶体金检测试剂盒的灵敏度实验结果

	氯胺酮浓度 (ng/ml)	试剂盒检测结果
	1 500	阴性
	2 600	阴性
	3 700	阴性
[0132]	4 800	阴性
	5 900	阳性/阴性
	6 1000	阳性
	7 1200	阳性
	8 1500	阳性
	9 2000	阳性

[0133] 由表 1 可知,本发明试剂盒的检测灵敏度为 1000ng/ml,该氯胺酮胶体金检测试剂盒灵敏度符合检测要求。

[0134] 实施例 3 氯胺酮胶体金检测试剂盒的特异性实验

[0135] 1. 检测方法:

[0136] (1) 取实施例 1 制得的氯胺酮胶体金检测试剂盒,将试剂盒放置在水平台面上。

[0137] (2) 用加样吸管吸取用于检测交叉反应实验的样品,然后滴 3 滴(约 120 $\mu$ l)样品到试剂盒的加样孔中。每检测一份不同的样品使用不同的吸管。

[0138] (3) 观察结果:在滴加样品后 3-8 分钟判读结果。

[0139] 2. 检测样品:

[0140] 对以下 48 种麻醉药品、精神药品、常用消化系统药、解热镇痛药、抗生素、抗癌药进行检测,观察是否发生交叉反应。

[0141] 表 2 用于交叉反应实验的药品

[0142]	盐酸甲基麻黄碱	巴比妥	磷酸可待因	苯巴比妥
	酒石酸双氢可待因	盐酸麻黄碱	盐酸纳曲酮	盐酸曲马多
	艾司唑仑	盐酸纳洛酮	盐酸丁丙诺啡	那可丁
[0143]	乙酰可待因	盐酸伪麻黄碱	盐酸亚甲二氧基 甲基苯丙胺 (MDMA. HCl)	三唑仑
	硫酸苯丙胺	劳拉西洋	司可巴比妥钠	氯氮卓
	福尔可定	盐酸二氢埃托啡	马来酸咪达唑仑	氯硝西洋
	硫酸吗啡	硝西洋	苯甲酰爱康宁	异戊巴比妥
	地西洋	奥沙西洋	阿普唑仑	枸橼酸芬太尼
	蒂巴因	咖啡因	雷尼替丁	奥美拉唑
	多潘立酮	西沙必利	阿司匹林	对乙酰氨基酚
	阿莫西林	氧氟沙星	诺氟沙星	头孢氨苄
	卡铂	博来霉素	环磷酰胺	6-巯基嘌呤

[0144] 3. 检测结果:

[0145] 结果证实,当这些药物浓度等于或低于 100  $\mu$ g/ml 不会产生交叉反应。

[0146] 实施例 4 氯胺酮胶体金检测试剂盒的重复性和稳定性实验

[0147] 一、试剂盒的批内和批间重复性实验

[0148] 1. 实验方法:

[0149] 将同批和不同批次的氯胺酮胶体金检测试剂盒分别检测 800、900、1000、1100、1200ng/ml 标准品,每个浓度重复 3 次,观察试剂盒的重复性。

[0150] 2. 实验结果:经验证,氯胺酮胶体金检测试剂盒的批内和批间重复性为 100%,假阳性率和假阴性率均为 0。

[0151] 二、试剂盒的稳定性实验

[0152] 1. 实验目的:

[0153] 将氯胺酮胶体金检测试剂盒密封保存,并存放于 4℃ 及室温 (25℃ 左右) 下,观察不同存放温度对试剂盒稳定性的影响。

[0154] 2. 实验方法:

[0155] 保存于 4℃ 的试剂盒每周取出 5 盒,分别检测 800、900、1000、1100、1200ng/ml 标准品;保存于室温 (25℃) 的试剂盒每 4 天取出 5 盒,分别检测 800、900、1000、1100、1200ng/ml 标准品。

[0156] 3. 实验结果:

[0157] 经验证,试纸条在 4℃ 下可保存 24 个月,在室温下可保存 18 个月,在可保存的期限内,试剂盒均可达到 1000ng/ml 的检测灵敏度。

[0158] 对比实验

[0159] 一、试剂盒的制备:

[0160] 1. 免疫胶体金纸片的制备:取 pH 为 8.5 的 0.1M Tris 缓冲液稀释实施例 1 方法 1 制备的免疫胶体金至溶液 OD<sub>540</sub> 值为 2.0,获得免疫胶体金溶液,采用该免疫胶体金溶液直接喷涂未经预处理液浸泡的玻璃纤维纸,每 261mm×220mm 玻璃纤维纸上喷涂 20ml 免疫胶体金溶液,干燥,制得免疫胶体金纸片。

[0161] 2. 将滤样纸、本实验制备的未预处理的免疫胶体金纸片、实施例 1 方法 1 制备的免疫硝酸纤维素膜、吸水纸依次粘贴在胶板上,切裁成宽度为 4mm 的试剂条。

[0162] 3. 将检测试剂条装入塑料盒内获得检测试剂盒。

[0163] 二、试剂盒灵敏度检测:

[0164] (1) 分别取实施例 1 方法 1 和本实验制得的氯胺酮胶体金检测试剂盒,将试剂盒放置在水平台面上。

[0165] (2) 配置氯胺酮浓度为 900、1000、1100、1200、1300、1400、1500、2000ng/ml 的质控参考品作为样品。用加样吸管吸取样品,然后滴 3 滴 (约 120 $\mu$ l) 样品到试剂盒的加样孔中,每检测一份不同的样品使用不同的吸管。

[0166] (3) 观察结果:在滴加样品后 3-8 分钟判读结果。

[0167] 三. 检测结果:

[0168] 表 3 不同方法制备的氯胺酮胶体金检测试剂盒的灵敏度实验结果

项目	氯胺酮标准品浓度 (ng/ml)	实施例 1 方法 1 制备的 试剂盒	本实验试剂盒	
[0169]	1	900	阳性/阴性	阴性
	2	1000	阳性	阴性
	3	1100	阳性	阴性
	4	1200	阳性	阳性/阴性
	5	1300	阳性	阳性
	6	1400	阳性	阳性
	7	1500	阳性	阳性
	8	2000	阳性	阳性

[0170] 由表 3 可知,本发明实施例 1 方法 1 制备的氯胺酮胶体金试剂盒的检测灵敏度为 1000ng/ml,而本次对比试验制备的氯胺酮胶体金检测试剂盒灵敏度为 1200ng/ml 左右,低于含本发明方法制得的免疫胶体金纸片的试剂盒。

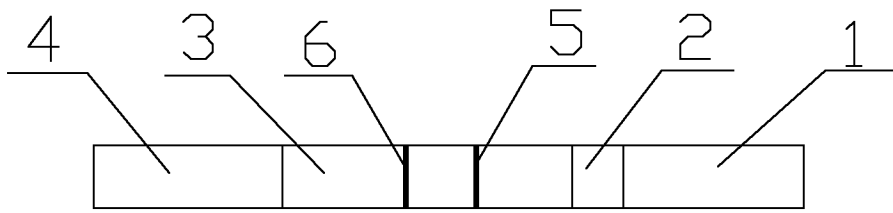


图 1

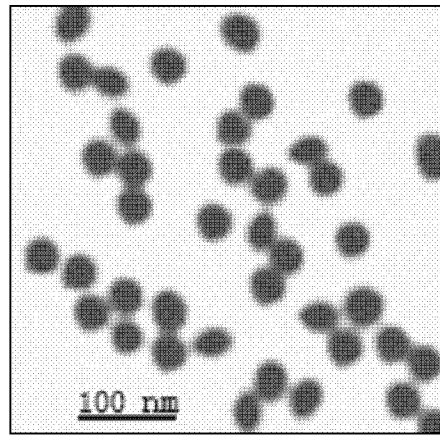


图 2

专利名称(译)	氯胺酮胶体金检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN102539773B</a>	公开(公告)日	2014-07-16
申请号	CN201110457819.7	申请日	2011-12-31
[标]申请(专利权)人(译)	上海凯创生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海凯创生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海凯创生物技术有限公司		
[标]发明人	张国华		
发明人	张国华		
IPC分类号	G01N33/64 G01N33/558 G01N33/531		
代理人(译)	余明伟		
其他公开文献	CN102539773A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及胶体金免疫层析领域，具体公开了一种氯胺酮胶体金检测试剂盒，包括试剂条，所述试剂条包括衬底、滤样纸、免疫胶体金纸片、免疫硝酸纤维素膜和吸水纸，滤样纸、免疫胶体金纸片、免疫硝酸纤维素膜和吸水纸依次首尾衔接并固定于衬底上；所述免疫胶体金纸片上包被有胶体金标记的抗氯胺酮单克隆抗体，所述免疫硝酸纤维素膜上设有包被有氯胺酮-牛血清白蛋白复合物的检测线和包被有羊抗鼠IgG的质控线。本发明的氯胺酮胶体金检测试剂盒，具有抗原抗体结合反应充分，灵敏度高，成本低，使用方便的优点。

