



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102520181 A

(43) 申请公布日 2012. 06. 27

(21) 申请号 201110458002. 1

(22) 申请日 2011. 12. 31

(71) 申请人 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 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

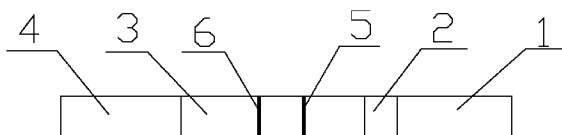
权利要求书 2 页 说明书 9 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种快速检测杜冷丁的胶体金检测试剂盒及其制备

(57) 摘要

本发明提供了一种快速检测杜冷丁的胶体金检测试剂盒及其制备。本发明的试剂盒包括试剂条,试剂条从加样端开始依次为滤样纸、免疫胶体金纸片、免疫硝酸纤维素膜和吸水纸,其中,所述免疫胶体金纸片为包被有胶体金标记的抗杜冷丁单克隆抗体的玻璃纤维垫片,免疫硝酸纤维素膜设有检测线和质控线,检测线上喷点有杜冷丁-载体复合物,质控线上喷点有羊抗鼠 IgG。本发明还进一步提供了上述杜冷丁的胶体金检测试剂盒的制备方法。采用本发明的试剂盒检测杜冷丁,灵敏度高、操作简单、快速,且检测结果费用低廉,储存和运输方便。



1. 一种杜冷丁胶体金检测试剂盒,包括试剂条,试剂条从加样端开始依次为滤样纸、免疫胶体金纸片、免疫硝酸纤维素膜和吸水纸,其中,所述免疫胶体金纸片为包被有胶体金标记的抗杜冷丁单克隆抗体的玻璃纤维垫片,免疫硝酸纤维素膜设有检测线和质控线,检测线上喷点有杜冷丁-载体复合物,质控线上喷点有羊抗鼠 IgG。

2. 如权利要求 1 所述杜冷丁胶体金检测试剂盒,其特征在于,所述胶体金标记的抗杜冷丁单克隆抗体中,胶体金为粒径 39-42nm 的球形颗粒。

3. 如权利要求 1 所述杜冷丁胶体金检测试剂盒本的制备方法,包括下列步骤:

1) 用两步还原法制备平均粒径为 39-42nm 的胶体金;

2) 采用步骤 1 制得的胶体金标记抗杜冷丁单克隆抗体获得免疫胶体金;

3) 采用喷金缓冲液稀释步骤 2) 的免疫胶体金获得免疫胶体金溶液,用免疫胶体金溶液喷涂经预处理的玻璃纤维垫片,制得免疫胶体金纸片;

4) 在硝酸纤维素膜的检测线和质控线上分别喷点杜冷丁-载体复合物及羊抗鼠 IgG,制得免疫硝酸纤维素膜;

5) 将滤样纸、步骤 3) 制备的免疫胶体金纸片、步骤 4) 制备的免疫硝酸纤维素膜、吸水纸依次粘贴在胶板上,剪裁制得检测试剂条;最后将检测试剂条装入塑料盒制得检测试剂盒。

4. 如权利要求 3 所述杜冷丁胶体金检测试剂盒本的制备方法,其特征在于,步骤 1) 所述两步还原法制备平均粒径为 39-42nm 的胶体金具体包括下列步骤:

a) 第一次还原氯金酸溶液:

制备浓度为 0.0004-0.0005mol/L 的 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, 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,既制得 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 4.0-4.5°C 恒温冰浴中稳定温度,随后按胶体金原溶液与 HAuCl_4 水溶液体积比 1 : (1.9-2.0) 加入 4.0-4.5°C 的 0.003-0.004mol/L HAuCl_4 水溶液,随后立即边搅拌边滴加 4.0-4.5°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 HAuCl_4 的摩尔比为 (25-26) : 1,加入的 PVP 与本步骤加入的 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,既制得 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。

5. 如权利要求 4 所述杜冷丁胶体金检测试剂盒本的制备方法,其特征在于,步骤 a) 中,加入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。

6. 如权利要求 4 所述杜冷丁胶体金检测试剂盒本的制备方法,其特征在于,步骤 b) 中,所述抗坏血酸与 PVP 的混合双蒸水水溶液中,抗坏血酸的浓度为 0.017-0.019mol/L,PVP 的浓度为 0.137-0.139g/L。

7. 如权利要求 3 所述杜冷丁胶体金检测试剂盒本的制备方法,其特征在于,步骤 3) 免疫胶体金纸片的制备包括下列步骤:

1. 用喷金缓冲液稀释步骤 2) 的免疫胶体金,获得 OD540 值为 1.2 ~ 2.0 的免疫胶体金溶液;

II. 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玻璃纤维纸,干燥,制得免疫胶体金纸片。

8. 如权利要求 7 所述杜冷丁胶体金检测试剂盒本的制备方法,其特征在于,步骤 I 所述喷金缓冲液的组分为: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 ± 0.05 ,余量为水。

9. 如权利要求 7 所述杜冷丁胶体金检测试剂盒本的制备方法,其特征在于,步骤 II 所述预处理液的组分包括:0.5 ~ 0.8v% Tween-20,12 ~ 18w/v% 蔗糖,溶剂为水。

一种快速检测杜冷丁的胶体金检测试剂盒及其制备

技术领域

[0001] 本发明涉及一种胶体金检测试剂盒以及制备工艺,具体涉及杜冷丁胶体金检测试剂盒以及制备工艺。

背景技术

[0002] 杜冷丁的学名叫哌替啶,又叫作唛啶、地美露,是人工合成的吗啡代用品,其盐酸盐为白色结晶状粉末,能溶于水和乙醇,一般制成针剂,主要用于疼痛、心源性哮喘、内脏绞痛等适应症。杜冷丁对人体的作用机理与吗啡相似,欣快、镇痛作用较吗啡小,但连续使用1-2周便可产生依赖,一旦停止后则会产生类似于吗啡戒断后的戒断综合症,主要表现为精神萎靡不振、全身不适、流泪流涕、呕吐、腹泻、失眠,严重者也会产生虚脱。杜冷丁的滥用是我国当前所面临的毒品问题之一,已被列入国家麻醉药品予以严格管制。

[0003] 目前,杜冷丁的检测方法中运用最广泛的主要是气相色谱GC、高效液相色谱HPLC、气相质谱GC/MS或GC/FID分析的方法,这些检测方法需要专业人员操作,且复杂费时,成本高,仅适用于杜冷丁的确认检测,却不能达到国内缉毒、查毒、禁毒行动所需的方便、快速、灵敏的要求。至今,国内尚没有涉及杜冷丁快速检测试剂的相关专利。

发明内容

[0004] 本发明的目的是克服现有技术中的缺陷,从提高检测灵敏度出发,提供一种既方便又快速的杜冷丁胶体金快速检测试剂盒及其制备方法。

[0005] 本发明的一方面,提供一种杜冷丁胶体金检测试剂盒,包括试剂条,试剂条从加样端开始依次为滤样纸、免疫胶体金纸片、免疫硝酸纤维素膜和吸水纸,其中,所述免疫胶体金纸片为包被有胶体金标记的抗杜冷丁单克隆抗体的玻璃纤维垫片,免疫硝酸纤维素膜设有检测线(T线)和质控线(C线),检测线上喷点有杜冷丁-载体复合物,质控线上喷点有羊抗鼠IgG。

[0006] 较佳的,所述胶体金标记的抗杜冷丁单克隆抗体中,胶体金为粒径39-42nm的球形颗粒。

[0007] 本发明的第二方面还提供了上述杜冷丁胶体金检测试剂盒的制备方法,包括下列步骤:

[0008] 1) 用两步还原法制备平均粒径为39-42nm的胶体金;

[0009] 2) 采用步骤1制得的胶体金标记抗杜冷丁单克隆抗体获得免疫胶体金;

[0010] 3) 采用喷金缓冲液稀释步骤2)的免疫胶体金获得免疫胶体金溶液,用免疫胶体金溶液喷涂经预处理的玻璃纤维垫片,制得免疫胶体金纸片;

[0011] 4) 在硝酸纤维素膜的检测线和质控线上分别喷点杜冷丁-载体复合物及羊抗鼠IgG,制得免疫硝酸纤维素膜;

[0012] 5) 将滤样纸、步骤3制备的免疫胶体金纸片、步骤4制备的免疫硝酸纤维素膜、吸水纸依次粘贴在胶板上,切裁制得检测试剂条;最后将检测试剂条装入塑料盒制得检测试

剂盒。

[0013] 步骤 1) 所述两步还原法制备平均粒径为 39-42nm 的胶体金具体包括下列步骤：

[0014] a) 第一次还原氯金酸溶液：

[0015] 制备浓度为 0.0004-0.0005mol/L 的 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, 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,既制得 14 ~ 16nm 粒径的胶体金原溶液。

[0016] b) 第二次还原氯金酸溶液：

[0017] 将第一步制得的胶体金原溶液放置于 4.0-4.5℃ 恒温冰浴中稳定温度,随后按胶体金原溶液与 HAuCl_4 水溶液体积比 1 : (1.9-2.0) 加入 4.0-4.5℃ 的 0.003-0.004mol/L HAuCl_4 水溶液,随后立即边搅拌边滴加 4.0-4.5℃ 的抗坏血酸与 PVP (聚乙烯醇吡咯烷酮) 的混合水溶液,加入的抗坏血酸与本步骤加入的 HAuCl_4 的摩尔比为 (25-26) : 1,加入的 PVP 与本步骤加入的 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,既制得 39-42nm 粒径的胶体金溶液。

[0018] 两步还原法中,配置各种水溶液均采用双蒸水。

[0019] 步骤 a) 中,加入柠檬酸三钠水溶液的浓度为 0.01-0.02mol/L。

[0020] 步骤 a) 中,超声震荡的频率为 20-30KHZ。

[0021] 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。

[0022] 步骤 b) 中,所述抗坏血酸与 PVP 的混合双蒸水水溶液中,抗坏血酸的浓度为 0.017-0.019mol/L, PVP 的浓度为 0.137-0.139g/L。

[0023] 步骤 b) 中,搅拌反应约为 50-70 分钟。

[0024] 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。

[0025] 步骤 2) 所述胶体金标记抗杜冷丁单克隆抗体可采用常规方法标记。

[0026] 具体的,步骤 3) 免疫胶体金纸片的制备包括下列步骤：

[0027] I. 用喷金缓冲液稀释步骤 2) 的免疫胶体金,获得 OD_{540} 值为 1.2 ~ 2.0 的免疫胶体金溶液；

[0028] II. 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玻璃纤维纸,干燥,制得免疫胶体金纸片。

[0029] 较佳的,步骤 I 所述喷金缓冲液的组分为 :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 ± 0.05 ,余量为水。

[0030] 最优的,步骤 I 中喷金缓冲液配方为 :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 ± 0.05 ,余量为水。

[0031] 较佳的,步骤 II 所述预处理液的组分包括 :0.5 ~ 0.8v% Tween-20,12 ~ 18w/v% 蔗糖,溶剂为水。最优的,步骤 II 中预处理液配方为 :0.7% Tween-20,16w/v% 蔗糖,余量为水。

[0032] 较佳的,步骤 II 中,用预处理液浸泡玻璃纤维纸时,每 30ml 预处理液浸泡玻璃纤维纸 261mm×220mm ;用免疫胶体金溶液喷涂玻璃纤维纸时,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。

[0033] 本发明中,wt%为重量百分比,v%指体积百分比;w/v%指重量体积百分比,1w/v%即为 100ml 溶液中含 1g。

[0034] 杜冷丁-载体复合物(如杜冷丁-牛血清白蛋白复合物)可市购或采用常规方法将杜冷丁与载体复合制得。

[0035] 本发明杜冷丁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杜冷丁。

[0036] 试剂盒内的检测试剂条是实现杜冷丁检测的关键,在试纸条检测区(T线)包被了杜冷丁-载体复合物。在试纸条的另一端固定有抗杜冷丁单克隆抗体-胶体金纸片。当尿液从加样孔加入,渗透到试剂条的加样垫上,被检样本首先与玻璃纤维膜上的胶体金标记的杜冷丁单克隆抗体结合,并通过毛细作用继续层析至试剂条硝酸纤维素膜,顺序通过硝酸纤维素膜上喷点了杜冷丁-载体复合物的检测区和喷点了 IgG 的质控区。如果尿液中含有杜冷丁,它们将与杜冷丁-载体复合物竞争胶体金-抗杜冷丁抗体上有限的抗原结合位点,当杜冷丁浓度达到产品设计的阈值浓度以上时,它们将占据抗杜冷丁单克隆抗体上全部的抗原结合位点,这样就阻止了抗杜冷丁单克隆抗体-胶体金和检测区的杜冷丁-复合物结合,检测区不能捕获到胶体金颗粒而无红色色带出现,检测结果呈阳性。如果尿液中没有杜冷丁或杜冷丁的浓度低于阈值浓度,则抗杜冷丁单克隆抗体-胶体金随同尿液运行至检测区,检测区捕获到胶体金颗粒而呈现红色色带,检测结果呈阴性。

[0037] 在试纸条上的质控区(C线)包被有羊抗鼠 IgG,以指示试剂盒反应系统工作是否正常。质控线的出现与杜冷丁或其代谢物的存在无关。质控区色带的出现表明:①样品加入量充足②样品在纸条上运行正常。

[0038] 本发明试剂盒的使用方法为:

[0039] 1. 将试剂盒放置在水平台面上。

[0040] 2. 用加样吸管吸取尿样,然后滴 3 滴(约 120ul)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。

[0041] 3. 观察结果:在滴加样品后 3-8 分钟判读结果。

[0042] 检测结果的判断方法:

[0043] 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,表示样品中无杜冷丁存在。

[0044] 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,表示样品中有杜冷丁存在。

[0045] 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。

[0046] 本发明的有益效果:

[0047] (1) 本发明在制备杜冷丁胶体金检测试剂盒时,采用了两步还原法制备胶体金分子,使得到的胶体金分子呈大小均一的约 40nm 球形颗粒,比之已公开的技术,虽然增加了一个操作步骤,但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,这保证了标记步骤的可控性、降低了试剂盒的批间差异。

[0048] (2) 免疫胶体金纸片制备步骤中,通过采用合理配方的预处理液对玻璃纤维膜进

行预处理并选配合适的喷金缓冲液,可保证免疫胶体金释放完全的基础上,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。

[0049] (3) 本发明制备的杜冷丁检测试剂盒,具有灵敏度高,可检出尿液中 900ng/ml 的杜冷丁;操作简单,检测结果肉眼可见,无需特殊实验仪器和专业技术人员;检测快速,5-8 分钟内可显示检测结果;而且检测结果费用低廉,储存和运输方便等优点。

附图说明

[0050] 图 1:胶体金透射电镜图

[0051] 图 2:杜冷丁胶体金检测试剂盒试剂条示意图

[0052] 1:滤样纸 2:免疫胶体金纸 3:免疫硝酸纤维素膜 4:吸水纸

[0053] 5:检测线(T线) 6:质控线(C线)

具体实施方式

[0054] 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。

[0055] 实施例 1 杜冷丁胶体金检测试剂盒的制备

[0056] 试剂来源:

[0057] 抗杜冷丁单克隆抗体、羊抗鼠 IgG 多克隆抗体、杜冷丁-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.)

[0058] 硝酸纤维素薄膜、玻璃纤维纸:购自德国赛多利斯公司(SARTORIUS)

[0059] 试剂配制:

[0060] 0.1M pH7.6 的磷酸盐缓冲液:分别称取 10.2gNa₂HPO₄,3.4gNaH₂PO₄,加 900ml 纯化水溶解,用盐酸调节溶液 pH 值为 7.6,用纯化水定容至 1000ml。

[0061] 10%的牛血清白蛋白(BSA)溶液:称取 100gBSA 用纯化水溶解并定容至 1000ml。

[0062] 0.1% BSA 的硼酸缓冲液:称取硼砂 9.535g 溶解于 900ml 纯化水中,用盐酸调 pH 值至 8.6±0.05,定容至 1000ml,即得 0.1M 硼酸盐缓冲液。称取 1gBSA 用 0.1M 硼酸盐缓冲液溶解并定容至 1000ml,即为 0.1% BSA 的硼酸缓冲液。

[0063] 制备步骤:

[0064] 1、胶体金的制备:用柠檬酸钠-抗坏血酸两步还原法制备粒径 40nm 的胶体金

[0065] a) 第一次还原氯金酸溶液:将 6ml 0.0164mol/L 的 HAuCl₄ 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。25KHZ 超声振荡 2 分钟后冷却至室温,既制得约 15nm 粒径的胶体金原溶液。

[0066] 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 HAuCl₄ 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。

[0067] 制得的胶体金采用紫外分光光度计扫描有单一吸收峰,峰形窄,λ_{max} 约为 525nm,采用透射电镜观察,如图 1 所示,粒径范围约为 40nm,粒径尺寸均一,无凝集颗粒,基

本未发现非球形粒子。

[0068] 2、免疫胶体金制备

[0069] 2.1 将抗杜冷丁单克隆抗体用 0.1M pH7.6 的磷酸盐缓冲液稀释至浓度为 1.0mg/ml 的抗体溶液。

[0070] 2.2 取 500ml 的胶体金溶液,往里加入 1/10 倍胶体金体积的 0.1MpH7.6 磷酸盐缓冲液混合 3 分钟。在快速搅拌下,再缓缓将稀释的抗杜冷丁单克隆抗体溶液 4ml 加入其中。室温反应 5 分钟并不时缓缓搅拌。

[0071] 2.3 反应结束后,在上述反应液中快速加入 10ml 的 10% 的牛血清白蛋白 (BSA) 溶液。室温反应 5 分钟并不时缓缓搅拌。

[0072] 2.4 将制备好的免疫胶体金 8000 转 / 分钟离心 20 分钟,保留沉淀,并收集上清 12500 转 / 分钟离心 30 分钟,弃上清。收集两次离心沉淀用含有 0.1% BSA 的硼酸缓冲液复溶到 OD₅₄₀ 在 13-15 之间。

[0073] 2.5 制得的纯化免疫胶体金为胶体金标记的抗杜冷丁单克隆抗体。

[0074] 3、免疫胶体金纸制备

[0075] 分别采用方法 1、2、3 制备。

[0076] 方法 1 :

[0077] 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。

[0078] 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。

[0079] 3.3 用喷金缓冲液稀释步骤 2 制备的免疫胶体金,至溶液 OD₅₄₀ 值为 1.5,获得免疫胶体金溶液。

[0080] 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。

[0081] 方法 2 :

[0082] 3.1 预处理液的制备 :准确称取 5ml Tween-20,180g 蔗糖,加纯化水定容至 1000ml。

[0083] 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。

[0084] 3.3 用喷金缓冲液稀释步骤 2) 的免疫胶体金,至溶液 OD₅₄₀ 值为 1.5,获得免疫胶体金溶液。

[0085] 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。

[0086] 方法 3 :

[0087] 3.1 预处理液的制备 :准确称取 8ml Tween-20,120g 蔗糖,加纯化水定容至

1000ml。

[0088] 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,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。

[0089] 3.3 用喷金缓冲液稀释步骤 2) 的免疫胶体金,至溶液 OD₅₄₀ 值为 1.5,获得免疫胶体金溶液。

[0090] 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。

[0091] 4、免疫硝酸纤维素膜的制备

[0092] 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。

[0093] 4.2 将杜冷丁-BSA 复合物用磷酸盐缓冲液稀释至蛋白浓度为 0.1mg/ml 制得检测线(T 线)溶液。

[0094] 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 长硝酸纤维素膜各包被有 1ml 的 C 线和 T 线溶液,检测线和质控线的间距为 5.0mm。

[0095] 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 2 所示)。

[0096] 6、将检测试剂条装入塑料盒内即得检测试剂盒。

[0097] 实施例 2 杜冷丁胶体金检测试剂盒的灵敏度实验

[0098] 检测方法:

[0099] 1、取实施例 1 制得的杜冷丁胶体金检测试剂盒,将试剂盒放置在水平台面上。

[0100] 2、用加样吸管吸取样品,然后滴 3 滴(约 120ul)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。

[0101] 3、观察结果:在滴加样品后 3-8 分钟判读结果。

[0102] 检测样品:

[0103] 配置杜冷丁浓度为 450ng/ml、900ng/ml、1800ng/ml 的质控参考品作为样品。

[0104] 检测结果:

[0105]

杜冷丁浓度	试剂盒检测结果
450ng/ml	阴性
900ng/ml	阳性
1800ng/ml	阳性

[0106] 结果证实,制得的杜冷丁胶体金检测试剂盒灵敏度符合要求。

[0107] 实施例 3 杜冷丁胶体金检测试剂盒的临床试验

[0108] 采集 50 份人体尿液样本,其中 20 份为杜冷丁使用者的尿液样本,30 份为正常人的尿液样本,使用 50 份杜冷丁胶体金检测试剂盒分别对尿样进行检测。分别在试剂盒加样孔滴加 2-3 滴尿样,5 分钟后试剂盒全部开始显色,6 分钟后显色稳定,达到 8 分钟内显色的目

的。结果显示 20 份杜冷丁使用者的尿样全部呈阳性,30 份正常人的检测结果全部为阴性,无未显色的试剂盒。

[0109] 以气相质谱仪 GC/MS 的检测结果为参比试剂对临床试验结果进行统计,统计数据见下表:

[0110] 临床试验结果汇总表

[0111]

项 目	气相质谱 GC/MS 检测结果		合 计
	阳性结果 (+)	阴性结果 (-)	
杜冷丁 胶体金 检测试 剂盒	阳性结果 (+) 20	阴性结果 (-) 0	20
	阴性结果 (-) 0	30	30
合 计	20	30	50

[0112] 气相质谱 GC/MS 检测试剂为参照,本杜冷丁胶体金检测试剂盒:

[0113] 灵敏度 = $20/20 \times 100\% = 100\%$

[0114] 特异度 = $30/30 \times 100\% = 100\%$

[0115] 阳性试验的预示值 = $20/20 \times 100\% = 100\%$

[0116] 阴性试验的预示值 = $30/30 \times 100\% = 100\%$

[0117] 符合率(粗一致性) = $(20+30)/50 \times 100\% = 100\%$

[0118] 实施例 4 杜冷丁胶体金检测试剂盒的特异性实验

[0119] 取实例 1 制得的检测试剂盒,按下述表格分别加样检测,检测结果如下:

[0120] 单位:ng/ml

[0121]

样品	浓度 1	浓度 2	结果
吗啡	300	3000	阴性
摇头丸	500	50000	阴性
安非他明	1000	10000	阴性
甲基安非他明	1000	10000	阴性
可卡因	300	3000	阴性
巴比妥	300	3000	阴性
苯二氮卓	300	3000	阴性

三环抗抑郁药	1000	10000	阴性
氯胺酮	1000	10000	阴性

[0122] 由此可见,该试剂盒与其他常见毒品如吗啡、安非他明、甲基安非他明、冰毒等无交叉反应,特异性好。

[0123] 实施例 5 杜冷丁胶体金检测试剂盒的重复性和稳定性实验

[0124] 一、试剂盒的批内和批间重复性实验

[0125] 1. 实验方法:

[0126] 将采用实施例 1 的方法制备的同批和不同批次的杜冷丁胶体金检测试剂盒分别检测杜冷丁浓度为 450ng/ml、900ng/ml、1800ng/ml 的标准品,每个浓度重复 3 次,观察试剂盒的重复性。

[0127] 2. 实验结果:经验证,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。

[0128] 二、试剂盒的稳定性实验

[0129] 1. 实验目的:

[0130] 将杜冷丁胶体金检测试剂盒密封保存,并存放于室温(25℃左右)下,观察试剂盒的稳定性。

[0131] 1. 实验方法:

[0132] 保存于室温的试剂盒每周取出 4 盒,分别检测杜冷丁浓度为 450ng/ml、900ng/ml、1800ng/ml 的标准品;

[0133] 2. 实验结果:

[0134] 经验证,试纸盒在室温下可保存 18 个月,在可保存的期限内,试剂盒均可达到 900ng/ml 的检测灵敏度。

[0135] 对比实验 1

[0136] 一、试剂盒的制备:

[0137] 1. 免疫胶体金纸制备:取 pH 为 8.5 的 0.1M Tris 缓冲液稀释实施例 1 制备的免疫胶体金至溶液 OD₅₄₀ 值为 1.5,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。

[0138] 2. 将滤样纸、本实验制备的免疫胶体金纸片、实施例 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。

[0139] 3. 将检测试剂条装入塑料盒内获得检测试剂盒。

[0140] 二、试剂盒灵敏度检测:

[0141] (1) 分别取实施例 1 方法 1 和本实验制得的检测试剂盒,将试剂盒放置在水平台面上。

[0142] (2) 配置杜冷丁浓度为 800ng/ml、900ng/ml、1000ng/ml、1100ng/ml、1200ng/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 120u1)样品到试剂盒的加样孔中。每个浓度设 3 个重复,每检测一份不同的样品使用不同的吸管。

[0143] (3) 观察结果:在滴加样品后 3-8 分钟判读结果。

[0144] 三. 检测结果:

[0145] 表 3 不同方法制备的检测试剂盒的灵敏度实验结果

项目	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	
	1	800	阴性	阴性
[0146]	2	900	阳性	阴性
	3	1000	阳性	阳性
	4	1100	阳性	阳性
	5	1200	阳性	阳性

[0147] 由表 3 可知, 采用同样量的免疫胶体金溶液, 本发明实施例 1 制备的试剂盒的检测灵敏度为 900ng/ml, 而本次对比试验制备的试剂盒灵敏度为 1000ng/ml 左右, 低于实施例 1 制备的试剂盒。

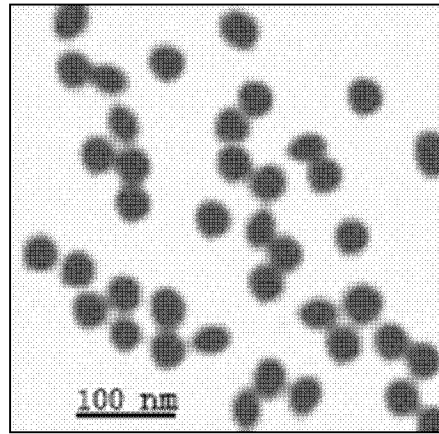


图 1

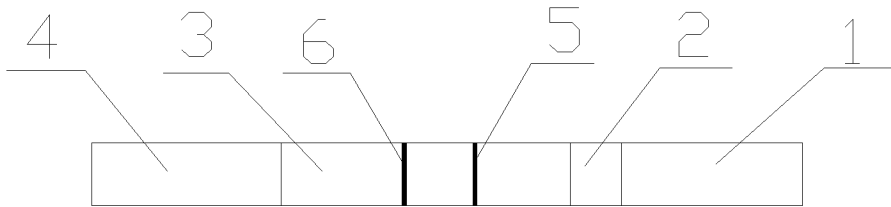


图 2

专利名称(译)	一种快速检测杜冷丁的胶体金检测试剂盒及其制备		
公开(公告)号	CN102520181A	公开(公告)日	2012-06-27
申请号	CN201110458002.1	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	G01N33/577 G01N33/531		
代理人(译)	余明伟		
其他公开文献	CN102520181B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种快速检测杜冷丁的胶体金检测试剂盒及其制备。本发明的试剂盒包括试剂条，试剂条从加样端开始依次为滤样纸、免疫胶体金纸片、免疫硝酸纤维素膜和吸水纸，其中，所述免疫胶体金纸片为包裹有胶体金标记的抗杜冷丁单克隆抗体的玻璃纤维垫片，免疫硝酸纤维素膜设有检测线和质控线，检测线上喷点有杜冷丁-载体复合物，质控线上喷点有羊抗鼠IgG。本发明还进一步提供了上述杜冷丁的胶体金检测试剂盒的制备方法。采用本发明的试剂盒检测杜冷丁，灵敏度高、操作简单、快速，且检测结果费用低廉，储存和运输方便。

