

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

G01N 33/52

G01N 33/53

G01N 33/531

G01N 33/577



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 00109054.2

[45] 授权公告日 2005 年 11 月 23 日

[11] 授权公告号 CN 1228633C

[22] 申请日 2000.6.2 [21] 申请号 00109054.2

[71] 专利权人 北京大学

地址 100871 北京市海淀区北京大学

[72] 发明人 王能东 陈家华 张 秀 胡 玄  
金 声

审查员 石剑平

[74] 专利代理机构 北京双收知识产权代理有限公司

代理人 张华辉

权利要求书 4 页 说明书 11 页

[54] 发明名称 抗吗啡单抗细胞株的建立和吗啡双面检测试纸的制作方法

[57] 摘要

本发明的抗吗啡单抗细胞株的建立和吗啡双面检测试纸的制作方法是一种半定量同时检测尿样中游离吗啡和总吗啡的双面免疫层析试纸的制作方法，它包括的步骤是①N 位、3 位和 6 位吗啡-蛋白质复合物的制备；②抗吗啡单克隆抗体细胞株的建立及抗吗啡多克隆抗体和单克隆抗体的制备；③免疫亲和层析固定相的制备；④免疫亲和纯化多克隆抗体和单克隆抗体，及交叉纯化多克隆抗体；⑤胶体金标记抗 3 位吗啡和 6 位吗啡多克隆抗体和抗 N 位吗啡单克隆抗体复合物的制备；⑥用于免疫层析试纸的层析膜的制备；⑦组装双面免疫层析试纸，以便半定量同时检测尿样中游离吗啡和总吗啡。使用这种试纸可快速、简便地得出准确的检测结果，并能最大限度地避免假阴性。

1、一种半定量同时检测尿样中游离吗啡和总吗啡的双面免疫层析试纸的制作方法，包括如下步骤：

- ①N位、3位和6位吗啡-蛋白质复合物的制备；
- ②抗吗啡单克隆抗体细胞株的建立及抗吗啡多克隆抗体和单克隆抗体的制备；
- ③免疫亲和层析固定相的制备；
- ④免疫亲和纯化多克隆抗体和单克隆抗体，及交叉纯化多克隆抗体；
- ⑤胶体金标记抗3位吗啡和6位吗啡多克隆抗体和抗N位吗啡单克隆抗体复合物的制备；
- ⑥用于免疫层析试纸的层析膜的制备；
- ⑦组装双面免疫层析试纸，以便半定量同时检测尿样中游离吗啡和总吗啡。

2、根据权利要求1所述的制作方法，其中：

N位吗啡-蛋白质复合物是这样制备的：将1-10克吗啡，5-10克氯甲酸酯和1-10克碳酸盐溶于50-100 mL溶剂，回流，过滤，蒸馏产物，然后加入1-20 mL 64%-97%的水合肼，回流2-10小时，冷至室温，过滤得降吗啡，熔点为272℃-274℃；取0.1-10克降吗啡、0.2-20克溴代胺和0.1-15克碳酸盐，溶于10-50 mL二甲亚砜，加水合肼10 mL，回流，纯化收集产品；取该产品0.1-10克溶于10-50 mL水，加入牛血清白蛋白100-900 mg，将pH调到3-7，再加入5-25克碳二亚胺，反应4-24小时，得到N位吗啡-牛血清白蛋白复合物；

同上法，用鸡卵清白蛋白替代牛血清白蛋白得到N位吗啡-鸡卵清白蛋白复合物；

3位吗啡-蛋白质复合物是这样制备的：1-10克吗啡溶于10-100 mL二甲亚砜中，加入氢氧化钾5-50克，溴乙酸1-10克，搅拌2小时，倒入冰水，水溶液用盐酸酸化至pH 2-7，收集固体，得3位羧甲基吗啡，重结晶产物的熔点为292℃~293℃；

取0.5-10克羧甲基吗啡溶于10-100 mL二氧六环中，加入0.2-50 mL氯甲酸酯和0.4 mL三级胺，搅拌，得溶液A；0.5%牛血清白蛋白50-200 mL与二氧六环混合，调pH至碱性，得溶液B；将溶液A上清缓慢加入到溶液B中，搅拌2-4小时，浓缩至20~30 mL，对生理盐水透析，得到3位吗啡-牛血清白蛋白复合物；

同上，用鸡卵清白蛋白替代牛血清白蛋白，即可得到3位吗啡-鸡卵清白蛋白复合物；

6位吗啡-蛋白质复合物是这样制备的：1.0-10克吗啡溶于10-100 mL苯中，加入1.0-10克琥珀酸酐，回流1-10小时，冷却到室温，固体溶于10-200 mL水中，调pH 1-6，过滤，调pH至7-12，过滤，再调pH至酸性，得产品六位琥珀酰吗啡；取该产品0.1-5克溶于二氧六环，加入10-50  $\mu$ l 氯甲酸酯，10-100  $\mu$ l 三级胺，搅拌30分钟，得到A液；1%牛血清白蛋白与二氧六环混合，调pH为8-12，得到B液；然后将A的上清液缓慢加入B液，冷却；浓缩，透

析,得到6位吗啡-牛血清白蛋白复合物;

同上法,用鸡卵清白蛋白代替牛血清白蛋白,得到6位吗啡-鸡卵清白蛋白复合物。

3、根据权利要求2所述的制作方法,其中:抗吗啡单克隆抗体细胞株及抗吗啡单克隆抗体是这样建立和制备的:(1)分泌抗吗啡单克隆抗体的细胞株的建立,①动物免疫:取1~10mg N位吗啡-牛血清白蛋白复合抗原,用生理盐水稀释成0.5mL,再与等量的完全福氏佐剂混合,经腹腔免疫Balb/C小鼠,2周后再用同量N位吗啡-牛血清白蛋白复合抗原与等量不完全福氏佐剂混合,加强免疫,2周后再加强免疫一次,第二次加强免疫后2周即可考虑作细胞融合,融合前3天,直接用1~5mg N位吗啡-牛血清白蛋白复合抗原脾内追加免疫一次,②细胞融合:细胞融合前一周复苏SP2/0骨髓瘤细胞,培养至对数生长期,融合前一天取饲养细胞铺96孔细胞培养板,细胞融合当天,收集SP2/0细胞,取脾细胞,用50%聚乙二醇融合,置于铺有饲养细胞的培养板中培养,第15天取上清筛选杂交瘤,③阳性抗吗啡单克隆抗体的筛选:包被:用0.05M pH9.6的碳酸盐包被缓冲液将N位吗啡-鸡卵清白蛋白复合物稀释至1~10 $\mu$ g/mL,包被96孔酶标板,100 $\mu$ L/孔,4 $^{\circ}$ C过夜,然后弃去孔内的液体,用生理盐水-吐温洗涤缓冲液洗3次,拍干,加样:将有克隆生长的培养上清按顺序加入,100 $\mu$ L/孔,37 $^{\circ}$ C温育1小时,洗涤3次,甩干,加二抗:用吐温洗涤液稀释辣根酶标羊抗鼠,100 $\mu$ L/孔,置37 $^{\circ}$ C温育一小时;洗涤、拍干,显色:加新配制的底物工作液100 $\mu$ L/孔,37 $^{\circ}$ C温育10~30分钟,终止反应:每孔加2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止液50 $\mu$ L,结果判断:阴性对照孔无色,阳性对照孔明确显色,测定OD值,以空白对照孔调零,OD值大于或等于阴性对照2.1倍即为阳性,对其中阳性的上清再作游离吗啡的阻断实验,筛选出特异阳性细胞,及时扩大、冻存、转种并进行有限稀释法纯化,即可获得抗吗啡单克隆抗体的杂交瘤细胞株,(2)接种杂交瘤细胞:在接种杂交瘤细胞前1周,先给Balb/C小鼠腹腔注射0.5mL液体石蜡;将抗吗啡单克隆抗体杂交瘤细胞数调至1 $\times$ 10<sup>6</sup>~2 $\times$ 10<sup>6</sup>/mL,每只小鼠经腹腔注射0.5mL;(3)采集腹水:接种杂交瘤细胞后第10天,用注射器抽取腹水,300g离心15分钟,收集上清,即得抗吗啡单克隆抗体;

抗3位吗啡多克隆抗体是这样制备的:将6个月左右,体重2.5kg的健康家兔,每足注射0.1~1mL 3位吗啡-牛血清白蛋白复合物与福氏完全佐剂乳化的抗原,两周后加强免疫,用同剂量3位吗啡-牛血清白蛋白复合物与福氏不完全佐剂乳化进行第二、三、四次加强免疫,每次加强免疫后的第5天耳静脉取血,用琼脂双扩散法检测免疫应答效果,当滴度达到1:64以上时,颈动脉放血,离心,收集血清;

抗6位吗啡多克隆抗体是这样制备的:将6个月左右,体重2.5kg的健康家兔,每足注射0.1~1mL 6位吗啡-牛血清白蛋白复合物与福氏完全佐剂乳化的抗原,两周后加强免疫,用同剂量6位吗啡-牛血清白蛋白复合物与福氏不完全佐剂乳化进行第二、三、四次加强免疫,每次加强免疫后的第5天耳静脉取血,用琼脂双扩散法检测免疫应答效果,当滴度达到1:64以上时,颈动脉放血,离心,收集血清。

4、根据权利要求3所述的制作方法,其中免疫亲和层析固定相是这样制备的:

N位吗啡-Sephadex 4 B的制备：取活化的Sephadex 4 B 20—50 mL，N位吗啡-蛋白质复合物50—100 mg，用碳酸盐调pH=8.0—12.0，搅拌3小时，然后取0.2—1.0克硼氢化钾溶于20—40 mL水，搅拌下加入反应体系中，反应5小时，即得N位吗啡-Sephadex 4 B免疫亲和层析固定相；

3位吗啡-Sephadex 4 B和6位吗啡-Sephadex 4 B的制备：取活化的Sephadex 4 B 40—80 mL，调pH 8.0—12.0，搅拌3小时，然后取0.5—2.0克硼氢化钾溶于40 mL水，搅拌下加入反应体系，pH维持在6.0~8.0，反应5小时，用蒸馏水洗涤后，平分为两份，一份加入3位羧甲基吗啡50—100 mg，另一份加入6位琥珀酰吗啡60—100 mg，调pH至3—7，再分别加入碳二亚胺50—200 mg，室温反应3小时，即分别得到3位吗啡-Sephadex 4 B免疫亲和层析固定相和6位吗啡-Sephadex 4 B免疫亲和层析固定相；

以上得到三种吗啡-Sephadex 4 B免疫亲和层析固定相，分别是N位吗啡-Sephadex 4 B、3位吗啡-Sephadex 4 B和6位吗啡-Sephadex 4 B。

5、根据权利要求4所述的制作方法，其中免疫亲和纯化多克隆抗体和单克隆抗体，及交叉纯化多克隆抗体是这样进行的：

①对抗N位吗啡单克隆抗体和抗3位吗啡和6位吗啡多克隆抗体进行预处理：将1—10 mL血清或腹水用磷酸缓冲液稀释一倍，经0.22 μm微孔膜过滤，4℃、10000 g离心；

②辛酸-硫酸铵法纯化：向1—10毫升预处理的抗血清或腹水中加入2—10毫升0.06 M pH 4.0的乙酸缓冲液，调pH至4.8，于搅拌下30分钟内缓慢加入辛酸33—300 μL，4℃静置2小时，15000 g、4℃离心30分钟，弃沉淀，上清加入1/10体积的0.1 M pH 7.4磷酸缓冲液，调pH至7.4，30分钟内加入饱和硫酸铵，使成45%饱和度，静置1小时，4℃下10000 g离心30分钟，沉淀溶于1/2量pH 7.4磷酸盐缓冲液中，对上述缓冲液透析，4℃下10000 g离心30分钟，-20℃保存；

③免疫亲和层析纯化单克隆抗体和多克隆抗体及交叉纯化多克隆抗体：将经辛酸-硫酸铵纯化的抗体用与之对应的N位、3位及6位吗啡-Sephadex 4 B免疫亲和层析固定相2.5 cm×2 cm作免疫亲和层析纯化，层析柱均先用0.5 M氯化钾-0.01 M pH 7.4的磷酸缓冲液平衡，上样后，用0.5 M氯化钾-0.01 M pH 7.4磷酸缓冲液洗脱杂蛋白，再用0.5 M氯化钾-0.1 M pH 0.5的甲酸洗脱液洗脱抗体峰，得纯化抗体，用于标记，其中抗N位吗啡单克隆抗体纯化用N位吗啡-Sephadex 4 B免疫亲和层析固定相纯化；抗3位吗啡多克隆抗体纯化先用3位吗啡-Sephadex 4 B免疫亲和层析固定相纯化，收集的抗体峰再用6位吗啡-Sephadex 4 B免疫亲和层析固定相进行交叉纯化，收集既能识别3位衍生吗啡又能识别6位衍生吗啡的抗体；而抗6位吗啡多克隆抗体则先用6位吗啡-Sephadex 4 B免疫亲和层析固定相纯化，收集的抗体峰再用3位吗啡-Sephadex 4 B免疫亲和层析固定相进行交叉纯化，收集既能识别6位衍生吗啡又能识别3位衍生吗啡的抗体。

6、根据权利要求5所述的制作方法，其中胶体金标记抗3位吗啡和6位吗啡多克隆抗体和抗N位吗啡单克隆抗体复合物是这样制备的：

取0.01%四氯金酸水溶液200 mL，加热至沸腾，加入8 mL 1%柠檬酸三钠水溶液，煮沸5分钟，出现橙红色，胶体金颗粒直径由电镜测定为20 nm；

各取50 mL胶体金三份，用0.1 mol/L碳酸钾调pH至8.0，搅拌下将三份金溶胶分别与免疫亲和纯化的抗3位吗啡多克隆抗体和抗6位吗啡多克隆抗体及抗N位吗啡单克隆抗体混合，再加入聚乙二醇20 M水溶液，使最终浓度为0.05%；

将粗制品6000 g离心45分钟，离心后，沉淀物用生理盐水混悬至1.5 mL，4℃保存；

将按上述方法制备的胶体金标记的以1:5混合的两类多克隆抗体及单克隆抗体分别分散在厚度1 mm的三张玻璃纤维纸上，冻干密封干燥保存。

7、根据权利要求6所述的制作方法，其中免疫层析试纸的层析膜是这样制备的：

将硝酸纤维素膜按 $25 \times 100$  mm的尺寸剪裁A、B两块，将经生理盐水缓冲液充分透析、浓度调整为0.02 mg/mL N位吗啡—鸡卵清白蛋白溶液在A膜上每隔2 mm等距离喷涂5条带；，再将按1:5混合的0.05 mg/mL的3位、6位吗啡—鸡卵清白蛋白经生理盐水缓冲液充分透析后在B膜上每2 mm等距离喷涂5条带，然后再在A、B膜的末端各喷涂一条羊抗鼠和羊抗兔的混合带，室温干燥30分钟，将膜置于含1%牛血清白蛋白的生理盐水中浸泡30分钟，取出吸干水分，于37℃孵育30分钟，置室温下干燥处密封贮藏。

8、根据权利要求7所述的制作方法，其中双面免疫层析试纸的组装是这样进行的：

取一块尺寸为 $80 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$ ，厚度约0.8 mm的硬质塑料底板，分别在其正反两面粘贴 $25 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$  A膜和B膜及在A膜所在面粘贴 $5 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$ 冻干金标单抗和在B膜所在面粘贴 $5 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$ 混合多抗，再在两面的两端顺次粘贴 $250 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$ 吸水纸，其中在A膜的下游紧邻贴上的是冻干的胶体金标记的单克隆抗体而在B膜的下游紧邻贴上的是冻干的胶体金标记的多克隆抗体，再按纵向切成宽度4 mm的条状，最后用铝泊袋干燥封装。

## 抗吗啡单抗细胞株的建立和吗啡双面检测试纸的制作方法

### 技术领域

本发明涉及一种抗吗啡单抗细胞株的建立和吗啡双面检测试纸的制作方法，具体地说，涉及一种半定量同时检测尿样中游离吗啡和总吗啡的双面免疫层析试纸的制作方法。

### 背景技术

滥用药物已成为世界公害，是当今世界严重的社会问题之一，其中毒品特别是海洛因、吗啡等物质的危害很大，它严重威胁着人类的健康和安全。据统计，至1997年底，全世界有1000万人因卷入吸毒而丧失劳动能力。因而世界范围内的公安部门，正在把严厉打击贩毒作为一项重要工作来做。为配合这种工作，一种快速、简便、灵敏、准确，适于大规模普查和易于野外操作的检测方法的建立就显得尤其必要。

目前国内外对尿中海洛因排泄物吗啡的检测，一般采用薄层色谱、色质联用、高压液相色谱、酶联免疫吸附分析等方法。这些方法有的费时费力，有的依赖仪器，而在实际使用时，都存在明显的缺点。尽管新近有一种较方便的吗啡免疫层析试纸上市，但这种试纸一是只能定性检测，二是一条试纸不能同时检测游离吗啡和总吗啡，因而假阴性的存在是不可避免的，而且是难以克服的。

### 发明内容

本发明的目的在于克服现有吗啡检测方法的缺陷，而提供一种抗吗啡单抗细胞株的建立和吗啡双面检测试纸的制作方法，且用该方法制备的双面检测试纸是一种半定量同时检测尿样中游离吗啡和总吗啡的双面免疫层析试纸。

本发明的半定量同时检测尿样中游离吗啡和总吗啡的双面免疫层析试纸的制作方法包括如下步骤：

- ①N位、3位和6位吗啡-蛋白质复合物的制备；
- ②抗吗啡单克隆抗体细胞株的建立及抗吗啡多克隆抗体和单克隆抗体的制备；
- ③免疫亲和层析固定相的制备；
- ④免疫亲和纯化多克隆抗体和单克隆抗体，及交叉纯化多克隆抗体；
- ⑤胶体金标记抗3位吗啡和6位吗啡多克隆抗体和抗N位吗啡单克隆抗体复合物的制备；
- ⑥用于免疫层析试纸的层析膜的制备；
- ⑦组装双面免疫层析试纸，以便半定量同时检测尿样中游离吗啡和总吗啡。

本发明的半定量同时检测尿样中游离吗啡和总吗啡的双面免疫层析试纸的制作方法，其中：

N位吗啡-蛋白质复合物是这样制备的：将1—10克吗啡，5—10克氯甲酸酯和1—10克碳酸盐溶于50—100mL溶剂，回流，过滤，蒸馏产物，然后加入1—20mL64%—97%的水合肼，回流2—10小时，冷至室温，过滤得降吗啡，熔点为272℃—274℃；取0.1—1.0克降吗啡、0.2—2.0克溴代胺和0.1—1.5克

碳酸盐,溶于10—50 mL二甲亚砜,加水合肼10 mL,回流,纯化收集产品;取该产品0.1—1.0克溶于10—50 mL水,加入牛血清白蛋白100—900 mg,将pH调到3—7,再加入5—25克碳二亚胺,反应4—24小时,得到N位吗啡—牛血清白蛋白复合物;

同上法,用鸡卵清白蛋白替代牛血清白蛋白得到N位吗啡—鸡卵清白蛋白复合物;

3位吗啡—蛋白质复合物是这样制备的: 1—10克吗啡溶于10—100 mL二甲亚砜中,加入氢氧化钾5—50克,溴乙酸1—10克,搅拌2小时,倒入冰水,水溶液用盐酸酸化至pH2—7,收集固体,得3位羧甲基吗啡,重结晶产物的熔点为292℃~293℃;

取0.5—1.0克羧甲基吗啡溶于10—100 mL二氧六环中,加入0.2—50 mL氯甲酸酯和0.4 mL三级胺,搅拌,得溶液A; 0.5%牛血清白蛋白50—200 mL与二氧六环混合,调pH至碱性,得溶液B;将溶液A上清缓慢加入到溶液B中,搅拌2—4小时,浓缩至20~30 mL,对生理盐水透析,得到3位吗啡—牛血清白蛋白复合物;

同上,用鸡卵清白蛋白替代牛血清白蛋白,即可得到3位吗啡—鸡卵清白蛋白复合物;

6位吗啡—蛋白质复合物是这样制备的: 1.0—10克吗啡溶于10—100 mL苯中,加入1.0—10克琥珀酸酐,回流1—10小时,冷却到室温,固体溶于10—200 mL水中,调pH1—6,过滤,调pH至7—12,过滤,再调pH至酸性,得产品;取该产品0.1—5克溶于二氧六环,加入10—50  $\mu$ l 氯甲酸酯,10—100  $\mu$ l 三级胺,搅拌30分钟,得到A液;1%牛血清白蛋白与二氧六环混合,调pH为8—12,得到B液;然后将A的上清液缓慢加入B液,冷却;浓缩,透析,得到6位吗啡—牛血清白蛋白复合物;

同上法,用鸡卵清白蛋白代替牛血清白蛋白,得到6位吗啡—鸡卵清白蛋白复合物。

抗吗啡单克隆抗体细胞株及抗吗啡单克隆抗体是这样建立和制备的:(1)分泌抗吗啡单克隆抗体的细胞株的建立,①动物免疫:取1~10 mg N位吗啡—牛血清白蛋白复合抗原,用生理盐水稀释成0.5 mL,再与等量的完全福氏佐剂混合,经腹腔免疫Balb/C小鼠,2周后再用同量N位吗啡—牛血清白蛋白复合抗原与等量不完全福氏佐剂混合,加强免疫,2周后再加强免疫一次,第二次加强免疫后2周即可考虑作细胞融合,融合前3天,直接用1—5 mg N位吗啡—牛血清白蛋白复合抗原脾内追加免疫一次,②细胞融合:细胞融合前一周复苏SP2/0骨髓瘤细胞,培养至对数生长期,融合前一天取饲养细胞铺96孔细胞培养板,细胞融合当天,收集SP2/0细胞,取脾细胞,用50%聚乙二醇融合,置于铺有饲养细胞的培养板中培养,第15天取上清筛选杂交瘤,③阳性抗吗啡单克隆抗体的筛选: 包被:用0.05 M pH9.6的碳酸盐包被缓冲液将N位吗啡—鸡卵清白蛋白复合物稀释至1~10  $\mu$ g/mL,包被96孔酶标板,100  $\mu$ L/孔,4℃过夜,然后弃去孔内的液体,用生理盐水—吐温洗涤缓冲液洗3次,拍干,加样:将有克隆生长的培养上清按顺序加入,100  $\mu$ L/孔,37℃温育1小时,洗涤3次,甩干,加二抗:用吐温洗涤液稀释辣根酶标羊抗鼠,100  $\mu$ L/孔,置37℃温育一小时;洗涤、拍干,显色:加新配制的底物工作液100  $\mu$ L/孔,37℃温育10~30分钟,终止反应:每孔加2 M  $H_2SO_4$ 终止液50  $\mu$ L,结果判断:阴性对照孔无色,阳性对照孔明确显色,测定OD值,以空白对照孔调零,OD值大于或等于阴性对照2.1倍即

为阳性,对其中阳性的上清再作游离吗啡的阻断实验,筛选出特异阳性细胞,及时扩大、冻存、转种并进行有限稀释法纯化,即可获得抗吗啡单克隆抗体的杂交瘤细胞株,(2)接种杂交瘤细胞:在接种杂交瘤细胞前1周,先给Balb/C小鼠腹腔注射0.5 mL液体石蜡;将抗吗啡单克隆抗体杂交瘤细胞数调至 $1 \times 10^6 - 2 \times 10^6 / \text{mL}$ ,每只小鼠经腹腔注射0.5 mL;(3)采集腹水:接种杂交瘤细胞后第10天,用注射器抽取腹水,300 g离心15分钟,收集上清,即得抗吗啡单克隆抗体;

抗3位吗啡多克隆抗体是这样制备的:将6个月左右,体重2.5 kg的健康家兔,每足注射0.1—1 mL 3位吗啡—牛血清白蛋白复合物与福氏完全佐剂乳化的抗原,两周后加强免疫,用同剂量3位吗啡—牛血清白蛋白复合物与福氏不完全佐剂乳化进行第二、三、四次加强免疫,每次加强免疫后的第5天耳静脉取血,用琼脂双扩散法检测免疫应答效果,当滴度达到1:64以上时,颈动脉放血,离心,收集血清;

抗6位吗啡多克隆抗体是这样制备的:将6个月左右,体重2.5 kg的健康家兔,每足注射0.1—1 mL 6位吗啡—牛血清白蛋白复合物与福氏完全佐剂乳化的抗原,两周后加强免疫,用同剂量6位吗啡—牛血清白蛋白复合物与福氏不完全佐剂乳化进行第二、三、四次加强免疫,每次加强免疫后的第5天耳静脉取血,用琼脂双扩散法检测免疫应答效果,当滴度达到1:64以上时,颈动脉放血,离心,收集血清。

免疫亲和层析固定相是这样制备的:

N位吗啡—Sephacrose 4 B的制备:取活化的Sephacrose 4 B 20—50 mL,加入由权利要求2中制备的 吗啡蛋白质复合物50—100 mg,用碳酸盐调 $\text{pH} = 8.0 - 12.0$ ,搅拌3小时,然后取0.2—1.0克硼氢化钾溶于20—40 mL水,搅拌下加入反应体系中,反应5小时,即得N位吗啡—Sephacrose 4 B免疫亲和层析固定相;

3位吗啡—Sephacrose 4 B和6位吗啡—Sephacrose 4 B的制备:取活化的Sephacrose 4 B 40—80 mL,调 $\text{pH} 8.0 - 12.0$ ,搅拌3小时,然后取0.5—2.0克硼氢化钾溶于40 mL水,搅拌下加入反应体系, $\text{pH}$ 维持在 $6.0 \sim 8.0$ ,反应5小时,用蒸馏水洗涤后,平分为两份,一份加入权利要求2中制备的3—羧甲基吗啡50—100 mg,另一份加入权利要求2中制备的6—琥珀酰吗啡60—100 mg,调 $\text{pH}$ 至3—7,再分别加入碳二亚胺50—200 mg,室温反应3小时,即分别得到3位吗啡—Sephacrose 4 B免疫亲和层析固定相和6位吗啡—Sephacrose 4 B免疫亲和层析固定相;

以上得到三种吗啡—Sephacrose 4 B免疫亲和层析固定相,分别是N位吗啡—Sephacrose 4 B、3位吗啡—Sephacrose 4 B和6位吗啡—Sephacrose 4 B。

免疫亲和纯化多克隆抗体和单克隆抗体,及交叉纯化多克隆抗体是这样进行的:

①抗N位吗啡单克隆抗体和抗3位吗啡和6位吗啡多克隆抗体的预处理:将1—10 mL血清或腹水用磷酸缓冲液稀释一倍,经 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔膜过滤,4℃、1000 g离心;

②辛酸—硫酸铵法纯化:向1—10毫升预处理的抗血清或腹水中加入2—10毫升 $0.06 \text{ M}$   $\text{pH} 4.0$ 的乙酸缓冲液,调 $\text{pH}$ 至4.8,于搅拌下30分钟内缓慢加入辛酸33—300  $\mu\text{L}$ ,4℃静置2小时,15000 g、4℃离心30分钟,弃沉淀,上清加入1/10体积的 $0.1 \text{ M}$   $\text{pH} 7.4$ 磷酸缓冲液,调 $\text{pH}$ 至7.4,30分钟内加入饱和硫酸铵,使成45%饱和度,静置1小时,4℃下10000 g离心30分钟,沉淀溶

于1/2量pH7.4磷酸盐缓冲液中,对上述缓冲液透析,4℃下10000g离心30分钟,-20℃保存;

③免疫亲和层析纯化单克隆抗体和多克隆抗体及交叉纯化多克隆抗体:将经辛酸-硫酸铵纯化的抗体用上述制备的与之对应的N位、3位及6位吗啡-Sepharose 4 B免疫亲和色谱固定相25cm\*2cm作免疫亲和层析纯化,色谱柱均先用0.5M氯化钾-0.01M pH7.4的磷酸缓冲液平衡,上样后,用0.5M氯化钾-0.01M pH7.4磷酸缓冲液洗脱杂蛋白,再用0.5M氯化钾-0.1M pH0.5的甲酸洗脱液洗脱抗体峰,得纯化抗体,用于标记,其中抗N位吗啡单克隆抗体纯化用N位吗啡-Sepharose 4 B免疫亲和色谱固定相纯化;抗3位吗啡多克隆抗体纯化先用3位吗啡-Sepharose 4 B免疫亲和色谱固定相纯化,收集的抗体峰再用6位吗啡-Sepharose 4 B免疫亲和色谱固定相进行交叉纯化,收集既能识别3位衍生吗啡又能识别6位衍生吗啡的抗体;而抗6位吗啡多克隆抗体则先用6位吗啡-Sepharose 4 B免疫亲和色谱固定相纯化,收集的抗体峰再用3位吗啡-Sepharose 4 B免疫亲和色谱固定相进行交叉纯化,收集既能识别6位衍生吗啡又能识别3位衍生吗啡的抗体。

胶体金标记抗3位吗啡和6位吗啡多克隆抗体和抗N位吗啡单克隆抗体复合物是这样制备的:

取0.01%四氯金酸水溶液200mL,加热至沸腾,加入8mL1%柠檬酸三钠水溶液,煮沸5分钟,出现橙红色,胶体金颗粒直径由电镜测定为20nm;

各取50mL胶体金三份,用0.1mol/L碳酸钾调pH至8.0,搅拌下将三份金溶胶分别与免疫亲和纯化的抗3位吗啡多克隆抗体和抗6位吗啡多克隆抗体及抗N位吗啡单克隆抗体混合,再加入聚乙二醇20M水溶液,使最终浓度为0.05%;

将粗制品6000g离心45分钟,离心后,沉淀物用生理盐水混悬至1.5mL,4℃保存;

将按上述方法制备的胶体金标记的以1:5混合的两类多克隆抗体及单克隆抗体分别分散在厚度1mm的三张玻璃纤维纸上,冻干密封干燥保存。

免疫层析试纸的层析膜是这样制备的:

将硝酸纤维素膜按25×100mm的尺寸剪裁A、B两块。将经生理盐水缓冲液充分透析、浓度调整为0.02mg/mL N位吗啡-鸡卵清白蛋白溶液在A膜上每隔2mm等距离喷涂5条带;再将按1:5混合的0.05mg/mL的3位、6位吗啡-鸡卵清白蛋白经生理盐水缓冲液充分透析后在B膜上每2mm等距离喷涂5条带,然后再在A、B膜的末端各喷涂一条羊抗鼠和羊抗兔的混合带,室温干燥30分钟,将膜置于含1%牛血清白蛋白的生理盐水中浸泡30分钟,取出吸干水分,于37℃孵育30分钟,置室温下干燥处密封贮藏。

双面免疫层析试纸的组装是这样进行的:

取一块尺寸为80mm×100mm,厚度约0.8mm的硬质塑料底板,分别在其正反两面粘贴25mm×100mmA膜和B膜及5mm×100mm冻干金标单抗和混合多抗,再在两面的两端顺次粘贴250mm×100mm吸水纸,其中在A膜的下游紧邻贴上的是冻干的胶体金标记的单克隆抗体而在B膜的下游紧邻贴上的是冻干的胶体金标记的多克隆抗体,再按纵向切成宽度4mm的条状,最后用铝泊袋干燥封装。

本发明所述的制作方法的优点在于:用其制作的免疫层析试纸是一种半定量同时检测

尿样中游离吗啡和总吗啡的免疫层析试纸。使用这种试纸可快速、简便地得出准确的检测结果，并能最大限度地避免假阴性。

本发明使用的生物材料“已于2000年4月26日交中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心（CGMCC）保藏；其地址为北京中关村，保藏编号为CGMCCN0.0448，分类命名为IC4单克隆抗体杂交瘤。

### 具体实施方式

下面对本发明所述制作方法的每一步骤作详细说明

本发明所述制作方法的第1步，其中：

N位吗啡-蛋白质复合物是这样制备的：将1克吗啡，5.5克氯甲酸甲酯和4.2克碳酸氢钠溶于50 mL氯仿中，回流20小时，过滤，氯仿洗净，合并滤液，用无水硫酸钠干燥，减压蒸馏得1.47克中间产物，然后加入1 mL 97%的胍，再加入2 mL 97%的胍，再加入4 mL 64%的胍，回流63小时，冷至室温，过滤，依次用水、丙酮和氯仿洗涤，得到0.5克降吗啡，其熔点为272℃—274℃。取0.5克降吗啡、0.8克4-溴丁基邻苯二甲酰亚胺和0.3克无水碳酸钠，溶于12 mL二甲基甲酰胺中，回流2小时，然后减压、滤除固体碳酸钠，蒸除溶剂后，加入90%水合胍10 mL，1 mL烯丙醇，回流1小时，然后过硅胶柱纯化收集4-氨基丁基吗啡0.4克；取4-氨基丁基吗啡100 mg溶于10 mL水，加入牛血清白蛋白100 mg，将pH调到5.5，再加入100—500 mg碳二亚胺，反应4小时，然后透析，冷冻干燥，得到N位吗啡-牛血清白蛋白复合物。

同上法，用鸡卵清白蛋白替代牛血清白蛋白得到N位吗啡-鸡卵清白蛋白复合物。

3位吗啡-蛋白质复合物是这样制备的：将1克吗啡溶于10 mL二甲基亚砜中，加入氢氧化钾5克，搅拌5分钟，再加入溴乙酸1克，继续搅拌2小时，然后倒入100 mL的冰水中，过滤除去不溶物，其水溶液用2 M盐酸酸化至pH≈5左右，收集固体，洗涤，干燥得到3位羧甲基吗啡0.8克，经无水乙醇重结晶，得到0.5克产物，其熔点为292℃~293℃。

取0.5克羧甲基吗啡溶于50 mL二氧六环中，加入0.2 mL氯甲酸异丁酯和0.4 mL三丁胺，混合搅拌30分钟，得溶液A；称取牛血清白蛋白0.5克，溶于100 mL水中，加100 mL二氧六环，用氢氧化钠调节pH至8.5，冰水浴至5℃左右，得溶液B。将溶液A上清缓慢加入到溶液B中，然后补加二氧六环50 mL，在5℃下搅拌4小时，减压浓缩至20~30 mL，装入透析袋对生理盐水透析48小时，其间换水3~5次。然后冰冻干燥，得到3位吗啡-牛血清白蛋白复合物。

同上，用鸡卵清白蛋白替代牛血清白蛋白，即可得到3位吗啡-鸡卵清白蛋白复合物。

6位吗啡-蛋白质复合物是这样制备的：将1.3克吗啡溶于20 mL苯中，加入1.3克琥珀酸酐，加热回流2小时，再补加1.3克琥珀酸酐，继续回流1小时，反应结束后冷却到室温，弃上清，固体剩余物溶于10 mL水中，用2 M盐酸调pH等于2，过滤，滤液用2.5 M氢氧化钠调pH等于9，过滤，滤液再调pH等于5，过滤，收集固体，干燥，得到琥珀酰吗啡1.0克；取0.129克琥珀酰吗啡溶于8.5 mL二氧六环中，加入33 μl 氯甲酸异丁酯，66 μl 三丁胺，在室温下搅拌30分钟，得到A液，同时称取0.17克牛血清白蛋白液溶于35 mL水中，缓慢加入35 mL二氧六环，加完后调pH为8.5，冷却至4℃，得到B液。然后将A液，缓慢加到B液中，再加入8.5

mL水,放入冰箱过夜;减压40℃蒸馏浓缩上述溶液至17mL,透析,换液3次,冷冻,干燥得到6位吗啡-牛血清白蛋白复合物。

同上法,用鸡卵清白蛋白代替牛血清白蛋白,得到6位吗啡-鸡卵清白蛋白复合物。

本发明所述制作方法的第2步,其中:

抗吗啡单克隆抗体细胞株和抗吗啡单克隆抗体是这样建立和制备的: (1) 分泌抗吗啡单克隆抗体的细胞株的建立, ① 动物免疫: 取10mgN位吗啡-牛血清白蛋白复合抗原, 用生理盐水稀释成0.5mL, 再与等量的完全福氏佐剂混合, 充分乳化, 经腹腔初次免疫8周龄雌性Balb/C小鼠, 2周后再用10mgN位吗啡-牛血清白蛋白复合抗原以生理盐水稀释成0.5mL, 与等量的不完全福氏佐剂混合, 充分乳化, 加强免疫, 2周后再加强一次。第二次加强免疫后2周即可考虑作细胞融合, 融合前3天, 直接用5mgN位吗啡-牛血清白蛋白复合抗原脾内追加免疫一次。② 细胞融合: 细胞融合前一周复苏SP2/0骨髓瘤细胞, 培养至对数生长期, 供融合用。融合前一天取饲养细胞铺96孔细胞培养板。细胞融合当天, 收集SP2/0细胞, 取脾细胞, 用50%聚乙二醇融合, 置于铺有饲养细胞的培养板中培养, 第15天取上清筛选杂交瘤。③ 阳性抗吗啡单克隆抗体的筛选: 包被: 用0.05M pH 9.6的碳酸盐包被缓冲液将纯化的用于筛选的N位吗啡-鸡卵清白蛋白复合物稀释至10μg/mL包被96孔酶标板, 100μL/孔, 4℃过夜, 然后弃去孔内的液体, 同时用的生理盐水-吐温洗涤缓冲液洗3次, 拍干。加样: 将有克隆生长的培养上清按顺序加入, 100μL/孔, 每块板应同时设空白对照、阴性对照和阳性对照各二孔。37℃温浴1小时, 洗涤3次, 每次5分钟, 甩干。加二抗: 先用生理盐水洗涤缓冲液稀释辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠酶标二抗, 再100μL/孔, 置37℃温浴一小时; 然后洗涤、拍干。显色: 加新配制的底物工作液100μL/孔, 37℃温浴10~30分钟。终止反应: 每孔加2MH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止液50μL。结果判断: 阴性对照孔无色, 阳性对照孔明确显色, 于白色背景直接用肉眼观察结果, 根据颜色深浅, 以“+”、“-”标明结果。测定OD值, 以空白对照孔调零, OD值大于或等于阴性对照2.1倍即为阳性。对其中阳性的上清再作游离吗啡的阻断实验, 挑出特异阳性细胞, 及时扩大、冻存、转种并进行有限稀释法纯化, 即可获得抗吗啡单克隆抗体的杂交瘤细胞株。(2) 接种杂交瘤细胞: 在接种杂交瘤细胞前1周, 先给Balb/C小鼠腹腔注射0.5mL液体石蜡; 将抗吗啡单克隆抗体杂交瘤细胞数调至1~2×10<sup>6</sup>/mL, 每只小鼠经腹腔注射0.5mL; (3) 采集腹水: 接种杂交瘤细胞后第10天, 用注射器抽取腹水, 300g离心15分钟, 收集上清, 即得抗吗啡单克隆抗体。

抗3位吗啡多克隆抗体是这样制备的: 取6个月左右, 体重2.5kg的健康家兔。初次免疫时每足注射0.5mL 3位吗啡-牛血清白蛋白复合物与福氏完全佐剂乳化的抗原, 两周后进行第一次加强免疫, 用0.5mL 3位吗啡-牛血清白蛋白复合物与福氏不完全佐剂乳化的抗原注射于四肢肘窝处, 同剂量于背部、肩关节和髋关节等部位进行第二、三、四次加强免疫。每次加强免疫后的第5天耳静脉取血用琼脂双扩散法检测免疫应答效果决定放血的时间, 当滴度达到1:64以上时, 颈动脉放血, 离心, 收集血清。

抗6位吗啡多克隆抗体是这样制备的: 取6个月左右, 体重2.5kg的健康家兔。初次免疫时每足注射0.5mL 6位吗啡-牛血清白蛋白复合物与福氏完全佐剂乳化的抗原, 两周后进行第一次加强免疫, 用0.5mL 6位吗啡-牛血清白蛋白复合物与福氏不完全

佐剂乳化的抗原注射于四肢肘窝处,同剂量于背部、肩关节和髋关节等部位进行第二、三、四次加强免疫。每次加强免疫后的第5天耳静脉取血用琼脂双扩散法检测免疫应答效果决定放血的时间,当滴度达到1:64以上时,颈动脉放血,离心,收集血清。

本发明所述制作方法的第3步,其中所述免疫亲和层析固定相是这样制备的:

N位吗啡-Sephrose 4 B的制备:取活化的Sephrose 4 B 20 mL,加入由权利要求2中制备的4-氨基丁基吗啡50 mg,用5%碳酸钾调pH $\approx$ 8.0,缓慢搅拌3小时,然后取0.27克硼氢化钾溶于20 mL水,缓慢搅拌下加入到上述反应体系中,反应5小时,然后用蒸馏水反复洗涤5次,即为N位吗啡-Sephrose 4 B免疫亲和层析固定相。

3位吗啡-Sephrose 4 B和6位吗啡-Sephrose 4 B的制备:取活化的Sephrose 4 B 40 mL,加入3 mL乙二胺,调pH 8.0,搅拌3小时,然后取0.54克硼氢化钾溶于20 mL水,缓慢搅拌下加入到上述的反应体系中,反应5小时,pH维持在6.5~7.5之间,用蒸馏水反复洗涤5次,然后平分为两份,一份加入权利要求2中制备的3-羧甲基吗啡50 mg,另一份加入权利要求2中制备的6-琥珀酰吗啡60 mg,均轻搅混匀,调pH至5.5,再分别加入碳二亚胺100-500 mg,室温反应3小时,再用蒸馏水反复洗涤5次,即分别得到3位吗啡-Sephrose 4 B免疫亲和层析固定相和6位吗啡-Sephrose 4 B免疫亲和层析固定相。

以上得到三种吗啡-Sephrose 4 B免疫亲和层析固定相,分别是N位吗啡-Sephrose 4 B、3位吗啡-Sephrose 4 B和6位吗啡-Sephrose 4 B。

本发明所述制作方法的第4步,其中所述免疫亲和纯化单克隆抗体和多克隆抗体及多克隆抗体的交叉纯化是这样进行的:

①对上述抗N位吗啡单克隆抗体和抗3位吗啡和6位吗啡多克隆抗体进行预处理:将1.5 mL血清或1 mL腹水用生理盐水稀释一倍后,用0.22  $\mu$ m孔径的微孔膜过滤,再4 $^{\circ}$ C、10000g,15分钟除去细胞残渣以及小颗粒物质;

②辛酸-硫酸铵法纯化:向一份预处理的抗腹水或血清中加入2份0.06 M pH 4.0的乙酸缓冲液,用0.1 M的盐酸调pH至4.8,于室温搅拌下在30分钟内逐滴缓慢加入辛酸,每毫升抗血清或腹水加33  $\mu$ L,4 $^{\circ}$ C静置2小时,15000g、4 $^{\circ}$ C离心30分钟,弃沉淀。上清加入生理盐水,用1 M的氢氧化钠调pH至7.4,在4 $^{\circ}$ C下于30分钟内加入饱和的硫酸铵,使成45%饱和度,静置1小时,4 $^{\circ}$ C下10000g离心30分钟,弃上清,沉淀溶于1/2量pH 7.4含137 mM氯化钠、2.6 mM氯化钾的生理盐水中,对100倍的上述生理盐水于4 $^{\circ}$ C透析过夜。4 $^{\circ}$ C下10000g离心30分钟,除去不溶性沉渣,分装,-20 $^{\circ}$ C保存;

③免疫亲和纯化单克隆抗体和多克隆抗体及多克隆抗体的交叉纯化:将经辛酸-硫酸铵纯化的抗体采用上述制备的与之对应的N位、3位及6位吗啡-Sephrose 4 B免疫亲和层析固定相2.5 cm $\times$ 2 cm作免疫亲和层析纯化,层析柱均先用0.5 M氯化钾-0.01 M pH 7.0的生理盐水缓冲液平衡,基线平直后,上待纯化的抗体样品,然后0.5 M氯化钾-0.01 M pH 7.0的生理盐水缓冲液洗脱除去杂蛋白,再用0.5 M氯化钾-0.1 M pH 0.5的甲酸洗脱液洗脱,收集抗体峰,得纯化的抗体,用于标记。其中抗N位吗啡单克隆抗体纯化用N位吗啡-Sephrose 4 B免疫亲和层析固定相;抗3位吗啡多克隆抗体纯化先用3位吗啡-Sephrose 4 B免疫亲和层析固定相,收集的抗体峰再用6位吗啡-Sephrose 4 B免疫亲和层析固定相进行交叉纯化收集既能识别3位衍生吗啡又能识别6位

衍生吗啡的抗体;而抗6位吗啡多克隆抗体纯化则先用6位吗啡-Sephrose 4 B免疫亲和层析固定相,收集的抗体峰再用3位吗啡-Sephrose 4 B免疫亲和层析固定相进行交叉纯化收集既能识别6位衍生吗啡又能识别3位衍生吗啡的抗体。

本发明所述制作方法的第5步,其中所述胶体金标记吗啡多克隆抗体和单克隆抗体复合物是这样制备的:

取0.01%四氯金酸水溶液200 mL,加热至沸腾,加入8 mL 1%柠檬酸三钠水溶液,煮沸约5分钟后出现橙红色。胶体金颗粒直径由电镜测定,颗粒直径为20 nm;

各取50 mL胶体金三份,用0.1 mol/L碳酸钾调pH至8.0,搅拌下将三份金溶胶分别与免疫亲和纯化抗3位吗啡多克隆抗体和抗6位吗啡多克隆抗体及抗N位吗啡单克隆抗体混合,再加入聚乙二醇20,000水溶液,使最终浓度为0.05%;

将粗制品先4℃6000 g高速离心45分钟,除去游离的未结合的蛋白及未充分稳定的金颗粒和凝集物,离心后,小心吸出上清液,沉淀物用生理盐水混悬,反复离心2次,再用生理盐水混悬至1.5 mL,4℃保存;

将按上述方法制备的胶体金标记的以1:5混合的两类多克隆抗体及单克隆抗体分别分散在厚度1 mm的三张玻璃纤维纸上,冻干密封干燥保存。

本发明所述的制作方法第6步,其中所述用于免疫层析试纸的层析膜是这样制备的:

将硝酸纤维素膜按25 mm×100 mm的尺寸剪裁A、B两块。将经生理盐水缓冲液充分透析、浓度调整为0.02 mg/mL N位吗啡-鸡卵清白蛋白溶液在A膜上每隔2 mm等距离喷涂5条带;再将按1:5混合的0.05 mg/mL的3位、6位吗啡-鸡卵清白蛋白经生理盐水缓冲液充分透析后在B膜上每2 mm等距离喷涂5条带,然后再在A、B膜的末端各喷涂一条羊抗鼠和羊抗兔的混合带,室温干燥30分钟,再将膜置于含1%牛血清白蛋白的生理盐水中浸泡30分钟,取出吸干水分于37℃蒸发,置室温下密封干燥处贮藏。

本发明所述制作方法的第7步,其中所述双面免疫层析试纸的组装是这样进行的:

取一块尺寸为80 mm×100 mm厚度约0.8 mm的硬质塑料底板,分别在其正反两面粘贴25 mm×100 mm A膜和B膜及在A膜所在面粘贴5 mm×100 mm冻干金标单抗和在B膜所在面粘贴5 mm×100 mm混合多抗,再在两面的两端顺次粘贴250 mm×100 mm吸水纸,其中在A膜的下游紧邻贴上的是冻干的胶体金标记的单克隆抗体而在B膜的下游紧邻贴上的是冻干的胶体金标记的多克隆抗体,再按纵向切成宽度4 mm的条状,最后用铝泊袋干燥封装。

下面说明用本试纸条检测用健康人的尿稀释的标准吗啡的情形:

将用本发明所述的制作方法第7步组装的半定量同时检测尿样中游离吗啡和总吗啡的双面免疫层析试纸从铝泊袋中取出,垂直插入用健康人尿稀释的300 ng/mL,500 ng/mL,1 μg/mL,3 μg/mL,10 μg/mL标准吗啡溶液中,插入深度不得超过吸水纸上沿,10秒钟后从尿液中取出,垂直放置,5分钟后用检查试纸条的正反两面的条带数目。当尿液中游离吗啡浓度为0 ng/mL或小于300 ng/mL时,除A、B两面均出现质控线外,还各出5条红色的检测线。当尿液中游离吗啡浓度为大于300 ng/mL而小于500 ng/mL时,除出现质控线外,还均出现4条检测线;当尿液中游离吗啡浓度为大于500 ng/mL而小于1 μg/mL时,除出现质控线外,还出现3条检测线;当尿液中游离吗啡浓度为大于1 μg/mL而小于3 μg/mL时,除出现质控线外,还出现2条检测线;当尿液中游离吗啡浓度大于3 μg/mL而小于10 μg/mL时,除出现质控线外,还出

现1条检测线；当尿液中游离吗啡浓度大于 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 时，只出现质控线，而不出现检测线。

| 游离吗啡浓度 (M游离)                                                   | A、B两面检测线数目  | A、B两面质控线数目 |
|----------------------------------------------------------------|-------------|------------|
| M游离 $<300\text{ng}/\text{ml}$                                  | $5\times 2$ | 2 (均有)     |
| $300\text{ng}/\text{ml}\leq\text{M游离}<500\text{ng}/\text{ml}$  | $4\times 2$ | 2 (均有)     |
| $500\text{ng}/\text{ml}\leq\text{M游离}<1\mu\text{g}/\text{ml}$  | $3\times 2$ | 2 (均有)     |
| $1\mu\text{g}/\text{ml}\leq\text{M游离}<3\mu\text{g}/\text{ml}$  | $2\times 2$ | 2 (均有)     |
| $3\mu\text{g}/\text{ml}\leq\text{M游离}<10\mu\text{g}/\text{ml}$ | $1\times 2$ | 2 (均有)     |
| $10\mu\text{g}/\text{ml}\leq\text{M游离}$                        | 0           | 2 (均有)     |

下面说明如何使用GC—MS确定尿样中吗啡总浓度：

将检测尿样分成各 $10\text{mL}$ ，同时取正常尿 $80\text{mL}$ 分成八等份，一份作空白对照，其他的添加 $1\mu\text{l}$ 、 $2\mu\text{l}$ 、 $4\mu\text{l}$ 、 $8\mu\text{l}$ 、 $16\mu\text{l}$ 和 $32\mu\text{l}$ 、 $64\mu\text{l}$ 的 $1\text{mg}/\text{mL}$ 吗啡，降吗啡作内标，均加入浓盐酸 $1\text{mL}$ ，封口，用 $15$ 磅蒸气水解 $1$ 小时，冷却后，加入 $6\text{mL}$ 氯仿提取，弃去氯仿，水中加入 $12\text{M}$ 氢氧化钠溶液 $1\text{mL}$ ，用碳酸钠溶液调 $\text{pH}$ 至 $9.0$ ，加氯仿—异丙醇（ $9:1$ ） $10\text{mL}$ 提取，离心分离，有机物于 $55^\circ\text{C}$ 水浴中氮气流下吹干，残渣加入醋酐和吡啶各 $0.2\text{mL}$ ，加盖， $50^\circ\text{C}$ 水浴反应 $30$ 分钟，氮气流吹干，残渣加入 $30\mu\text{l}$ 氯仿溶解，取 $1\mu\text{l}$ 溶液进样，每个样重复三次。

GC—MS条件为：仪器为HP5890A气相色谱仪和HP质量选择检测器，HP—1毛细管柱（ $25\text{m}\times 0.2\text{mm}$ ），载气为氦气，柱头压为 $5\text{psi}$ ，柱温为 $270^\circ\text{C}$ ，进样温度为 $250^\circ\text{C}$ 。

同上重复3次实验，推算尿样中总吗啡浓度，取浓度最高尿样作为总吗啡标样，并经氮气浓缩再用正常人尿稀释成 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $3\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $0.5\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $0.3\mu\text{g}/\text{mL}$ 等5个梯度供调整和检测用。

下面说明用本试纸条检测用健康人的尿稀释的总吗啡的情形：

按如下方法检测阳性人尿配制的总吗啡：将组装的半定量同时检测尿样中游离吗啡和总吗啡的双面免疫层析试纸从铝泊袋中取出，垂直插入用已知浓度的阳性人尿配制的总吗啡溶液中，插入深度不超过吸水线上方的标线，5秒钟后从尿液中取出，垂直穿挂起来，5分钟后肉眼观察试条的正反两面的条带数目，质控线均出现。当尿液中总吗啡浓度小于 $300\text{ng}/\text{mL}$ 时，A、B两面均各出现5条带。当尿液中总吗啡浓度大于 $300\text{ng}/\text{mL}$ ，小于 $500\text{ng}/\text{mL}$ 时，A面仍出现5条带，B面出现4条带。当尿液中总吗啡浓度大于 $500\text{ng}/\text{mL}$ ，小于 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 时，A面仍出现5条带，B面出现3条带。当尿液中总吗啡浓度大于 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ ，小于 $3\mu\text{g}/\text{mL}$ 时，A面出现5条带，B面出现2条带。当尿液中总吗啡浓度大于 $3\mu\text{g}/\text{mL}$ 而小于 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 时，A面出现3条带，B面出现1带。当尿液中总吗啡浓度大于 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 时，A面出现2条带，B面只有质控线，不出现检测带。

| 总吗啡浓度 (M总)                                                   | A面检测线数 | B面检测线数 | 质控线    |
|--------------------------------------------------------------|--------|--------|--------|
| M总 $\leq 300\text{ng}/\text{ml}$                             | 5      | 5      | 2 (均有) |
| $300\text{ng}/\text{ml}\leq\text{M总}<1\mu\text{g}/\text{ml}$ | 4      | 3      | 2 (均有) |

|                                                        |   |   |        |
|--------------------------------------------------------|---|---|--------|
| $1\mu\text{g/ml} \leq M_{\text{总}} < 3\mu\text{g/ml}$  | 4 | 2 | 2 (均有) |
| $3\mu\text{g/ml} \leq M_{\text{总}} < 10\mu\text{g/ml}$ | 3 | 1 | 2 (均有) |
| $10\mu\text{g/ml} \leq M_{\text{总}}$                   | 2 | 0 | 2 (均有) |

下面说明通过检测健康人尿配制的各种药物，如何判定交叉反应性：

将各种药物用健康人尿配制成  $10\text{mg/mL}$  的标准液，然后用本发明制作方法第6步中所述的操作方法观察结果如下表：

| 标准品名称     | 浓 度              | A 面检测带数 | B 面检测带数 | 质控线 |
|-----------|------------------|---------|---------|-----|
| 海洛因       | $10\text{mg/mL}$ | 5       | 0       | 2   |
| 类似物 $M_1$ | $10\text{mg/mL}$ | 5       | 0       | 2   |
| 类似物 $M_2$ | $10\text{mg/mL}$ | 5       | 0       | 2   |
| 盐酸罂粟碱     | $10\text{mg/mL}$ | 5       | 5       | 2   |
| 那可丁       | $10\text{mg/mL}$ | 5       | 5       | 2   |
| 磷酸可待因     | $10\text{mg/mL}$ | 5       | 0       | 2   |
| 盐酸可卡因     | $10\text{mg/mL}$ | 5       | 5       | 2   |
| 硫酸安非他明    | $10\text{mg/mL}$ | 5       | 5       | 2   |
| 盐酸倍他司丁    | $10\text{mg/mL}$ | 5       | 5       | 2   |
| 盐酸麻黄碱     | $10\text{mg/mL}$ | 5       | 5       | 2   |

注：类似物  $M_1$  为  $O^3$ -单乙酰吗啡氨基磺酸盐；类似物  $M_2$  为  $O^6$ -单乙酰吗啡盐酸盐

对总吗啡测定有交叉反应性的4种类似物作展开试验，以观察这4种类似物的合适浓度，结果见下表：

| 类似物的浓度              | A 面检测带条数 | B 面检测带条数 |
|---------------------|----------|----------|
| $0.3\mu\text{g/mL}$ | 5        | 4        |
| $0.5\mu\text{g/mL}$ | 5        | 3        |
| $1.0\mu\text{g/mL}$ | 5        | 2        |
| $3.0\mu\text{g/mL}$ | 5        | 1        |
| $10\mu\text{g/mL}$  | 5        | 0        |
| $0.3\mu\text{g/mL}$ | 5        | 4        |
| $0.5\mu\text{g/mL}$ | 5        | 3        |
| $1.0\mu\text{g/mL}$ | 5        | 2        |
| $3.0\mu\text{g/mL}$ | 5        | 1        |
| $10\mu\text{g/mL}$  | 5        | 0        |
| $0.3\mu\text{g/mL}$ | 5        | 4        |
| $0.5\mu\text{g/mL}$ | 5        | 3        |
| $1.0\mu\text{g/mL}$ | 5        | 2        |
| $3.0\mu\text{g/mL}$ | 5        | 1        |
| $10\mu\text{g/mL}$  | 5        | 0        |

|           |   |   |
|-----------|---|---|
| 0.3 μg/ml | 5 | 4 |
| 0.5 μg/ml | 5 | 3 |
| 1.0 μg/ml | 5 | 2 |
| 3.0 μg/ml | 5 | 1 |
| 10 μg/ml  | 5 | 0 |

注：第一栏为 O<sup>3</sup>—单乙酰吗啡氨基磺酸盐；第二栏为 O<sup>6</sup>—单乙酰吗啡盐酸盐；  
第三栏为海洛因；第四栏为磷酸可待因

下面说明本试纸检测结果与 GC/MS 检测结果一致性：

检测实际尿样，并与 GC/MS 检测结果进行对照。其中阳性尿样来源于某戒毒所，  
阴性尿样来源于自愿正常人，结果如下表：

| 尿样<br>编号 | GC/MS<br>结果 | 试<br>A面带数 | 纸<br>吗啡浓度M <sub>游</sub> | 检<br>B面带数 | 测<br>总吗啡浓度M <sub>总</sub> | 结<br>果 |
|----------|-------------|-----------|-------------------------|-----------|--------------------------|--------|
| 1        | 10.30       | 1+2       | 1≤M游<3.0                | 1+0       | 10≤M总                    |        |
| 2        | 0.61        | 1+5       | M游<0.3                  | 1+3       | 0.5≤M总<1.0               |        |
| 3        | 0.25        | 1+5       | M游<0.3                  | 1+5       | M总<0.3                   |        |
| 4        | 5.12        | 1+2       | 1.0≤M游<3.0              | 1+1       | 3.0≤M总<10                |        |
| 5        | 3.70        | 1+3       | 0.5≤M游<1.0              | 1+1       | 3.0≤M总<10                |        |
| 6        | 0.80        | 1+5       | M游<0.3                  | 1+2       | 0.5≤M总<1.0               |        |
| 7        | 2.53        | 1+3       | 0.5≤M游<1.0              | 1+2       | 1.0≤M总<3.0               |        |
| 8        | 1.80        | 1+3       | 0.5≤M游<1.0              | 1+2       | 1.0≤M总<3.0               |        |
| 9        | 2.36        | 1+3       | 0.5≤M游<1.0              | 1+2       | 1.0≤M总<3.0               |        |
| 10       | 2.90        | 1+3       | 0.5≤M游<1.0              | 1+2       | 1.0≤M总<3.0               |        |
| 11       | 4.80        | 1+2       | 1.0≤M游<3.0              | 1+1       | 3.0≤M总<10                |        |
| 阴样5个     | 0           | 1+5       | M游<0.3                  | 1+5       | M总<0.3                   |        |

通过对照说明试纸检测结果与 GC/MS 检测结果基本一致。

下面说明本层析试纸试条的贮藏稳定性是如何确定的：

取某批生产的试条 300 条，置保干器中，室温放置。每隔一段时间取出若干条检查试纸条的稳定性。检测样品为：5 个正常人尿稀释的已知浓度的标准吗啡（0.05、0.2、0.8、2.4、7.0 μg/mL）和 5 个阳性尿液配制的已知浓度总吗啡（0.05、0.2、0.8、2.4、7.0 μg/mL）及 1 个阴性，每个样品重复三次，结果发现该试条在室温干燥保存一年内均稳定。

|                |                                                |         |            |
|----------------|------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 抗吗啡单抗细胞株的建立和吗啡双面检测试纸的制作方法                      |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN1228633C</a>                     | 公开(公告)日 | 2005-11-23 |
| 申请号            | CN00109054.2                                   | 申请日     | 2000-06-02 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 北京大学                                           |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 北京大学                                           |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 北京大学                                           |         |            |
| [标]发明人         | 王能东<br>陈家华<br>张秀<br>胡玄<br>金声                   |         |            |
| 发明人            | 王能东<br>陈家华<br>张秀<br>胡玄<br>金声                   |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/52 G01N33/53 G01N33/531 G01N33/577      |         |            |
| 代理人(译)         | 张华辉                                            |         |            |
| 其他公开文献         | CN1327158A                                     |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a> |         |            |

#### 摘要(译)

本发明的抗吗啡单抗细胞株的建立和吗啡双面检测试纸的制作方法是一种半定量同时检测尿样中游离吗啡和总吗啡的双面免疫层析试纸的制作方法，它包括的步骤是①N位、3位和6位吗啡-蛋白质复合物的制备；②抗吗啡单克隆抗体细胞株的建立及抗吗啡多克隆抗体和单克隆抗体的制备；③免疫亲和层析固定相的制备；④免疫亲和纯化多克隆抗体和单克隆抗体，及交叉纯化多克隆抗体；⑤胶体金标记抗3位吗啡和6位吗啡多克隆抗体和抗N位吗啡单克隆抗体复合物的制备；⑥用于免疫层析试纸的层析膜的制备；⑦组装双面免疫层析试纸，以便半定量同时检测尿样中游离吗啡和总吗啡。使用这种试纸可快速、简便地得出准确的检测结果，并能最大限度地避免假阴性。