



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101580544 B

(45) 授权公告日 2012.10.10

(21) 申请号 200910004736.5

G01N 33/53(2006.01)

(22) 申请日 2009.02.23

G01N 33/543(2006.01)

(83) 生物保藏信息

CCTCC NO. C200915 2009.02.20

(56) 对比文件

陈连康等. 胶体金标记检测大麻单克隆抗体免疫试剂盒研制. 《中国法医学杂志》. 2002, 第17卷(第02期),

(73) 专利权人 曾立波

地址 200083 上海市中山北一路 803 号

专利权人 陈连康

胡小龙

张玉荣

审查员 陈莹

(72) 发明人 曾立波

(74) 专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司

公司 31266

代理人 祝莲君 雷芳

(51) Int. Cl.

C07K 14/435(2006.01)

C07K 16/44(2006.01)

C12N 5/18(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 18 页 附图 3 页

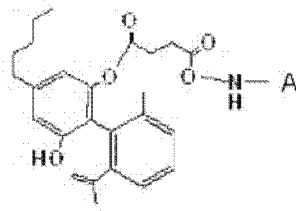
(54) 发明名称

胶体金标记大麻、四氢大麻酚单抗免疫检测板

(57) 摘要

本发明公开了用于四氢大麻酚检测及抗体制备的完全抗原。本发明还公开了用该完全抗原制备的抗四氢大麻酚单克隆抗体,以及胶体金标记四氢大麻酚单抗免疫检测板,以用于检测药品或尿样等人体标本中的四氢大麻酚。与 HPLC 等方法相比,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四氢大麻酚,整个测试可在 1.5min 内完成,检测的灵敏度可达 0.5ng,且与 60 多种常见药物、毒品、四氢大麻酚体内代谢物没有交叉反应。

1. 一种完全抗原,其特征在于,所述完全抗原具有式 1 所示的结构:



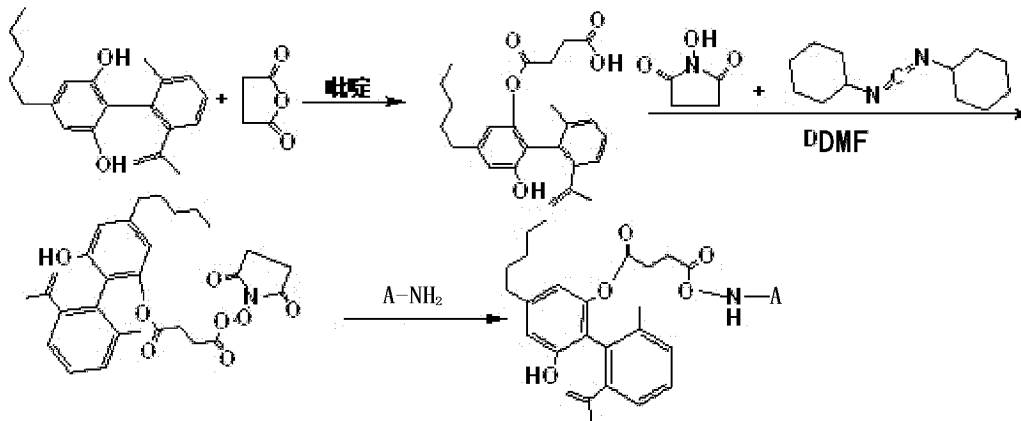
式 1

其中,A 为血蓝蛋白。

2. 一种制备式 1 所述的完全抗原的方法,其特征在于,所述方法包括步骤:

- 使含羟基的化合物首先与琥珀酸酐反应,生成带羧基的中间体;
- 使步骤 (a) 所得的中间体与 N-羟基琥珀酰亚胺反应,生成酯键;
- 使步骤 (b) 所得产物与血蓝蛋白连接,从而制得式 1 的完全抗原。

3. 如权利要求 2 所述的制备式 1 所述的完全抗原的方法,其特征在于,所述方法包括如下步骤:



4. 一种权利要求 1 所述的完全抗原的用途,其特征在于,用于制备四氢大麻酚特异性单克隆抗体。

5. 一种单克隆抗体,其特征在于,它特异性结合于四氢大麻酚,所述的单克隆抗体由小鼠杂交瘤细胞系 CCTCC NO. C200915 所产生。

6. 一种产生权利要求 5 所述的单克隆抗体的杂交瘤细胞系,其特征在于,它是小鼠杂交瘤细胞系 CCTCC NO. C200915。

7. 一种权利要求 5 所述的单克隆抗体的用途,其特征在于,用于制备检测样品中四氢大麻酚的试剂、检测板或试剂盒。

8. 一种检测生物样品中是否存在四氢大麻酚的方法,其特征在于,包括步骤:

- 将样品与权利要求 5 所述的单克隆抗体接触;
- 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四氢大麻酚。

9. 一种检测板,其特征在于,所述的检测板包括基片和测试条,所述的测试条含有权利要求 5 所述的单克隆抗体。

10. 如权利要求 9 所述的检测板,其特征在于,所述基片是支撑板。

11. 一种试剂盒,其特征在于,所述的试剂盒含有容器以及位于容器内的权利要求 5 所述的单克隆抗体,或者所述的试剂盒含有权利要求 9 所述的检测板和使用说明书。

## 胶体金标记大麻、四氢大麻酚单抗免疫检测板

### 技术领域

[0001] 本发明涉及分子免疫学和毒物学领域。具体而言,本发明涉及违禁药品的检测,尤其涉及四氢大麻酚的酶联免疫检测。

### 背景技术

[0002] 当前,毒品犯罪形势十分严峻。毒品种类多,仅据联合国 2004 年统计,全世界吸毒人员已超过 2 亿人,其中至少 1.4 亿人以上吸食大麻,900 万人以上吸食海洛因,1300 万人以上吸食可卡因,吸食苯丙胺等其他人工合成毒品更是难以计数。目前我国吸毒人数持续上升,我国登记在册的吸毒人员超过百万,青少年吸毒者急剧增加。受毒范围不断扩大,出现制毒、贩毒、吸毒现象的县市占全国县市总数的四分之三以上。

[0003] 大麻 (Cannabis 或 Marijuana) 是国际国内严格管制的麻醉药品,成瘾性强。大麻是从大麻植物中提取的一种酚类衍生物的总称,其主要含有四氢大麻酚、大麻酚、大麻二酚、四氢大麻酚酸等,其中以四氢大麻酚 (Tetrahydrocannabinol,  $\Delta^9$ THC 或 THC) 和 11-nor- $\Delta^8$ -四氢大麻酚-9-羧酸 (11-nor- $\Delta^8$ -Tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid) 为主。四氢大麻酚 (THC) 是一个分子量为 314Da 的小分子半抗原物质,本身没有免疫原性而只具备免疫反应性。

[0004] 长期以来,人们一直错误的认为吸食大麻是不会像海洛因等毒品容易产生成瘾依赖,这种错误的想法也是导致今天大麻滥用的主要原因之一。长期吸食大麻者,由于蓄积中毒造成行为毒性反应,呈醉酒状,情绪激动,自觉欣快,产生梦幻般的陶醉感,同时发生错觉、幻觉与思维障碍,对人产生敌对的意念,极易发生暴力和自杀倾向,具有极大的社会危害性。现在大麻毒品已引起我国政府的高度重视,必须给予严厉打击。

[0005] 实验室常规检验毒品的的方法是仪器分析,但是仪器检验速度慢,分析操作周期较长,购买仪器价格昂贵,需要专门培训,仪器检验成本高(一个样品需 400 元人民币以上)难以在广大基层单位推广。

[0006] 虽然国外(如美国等)已开发出了大麻单抗免疫检测板,但其中存在以下二个问题:(1) 国内外大麻鉴定主要是依据样品中是否含有四氢大麻酚 (THC),然而国外研发的大麻单克隆抗体只能识别尿样中含量最少的代谢物 11-nor- $\Delta^8$ -四氢大麻酚-9 羧酸,无法检测四氢大麻酚 (THC);(2) 目前大麻单抗免疫检测板灵敏度都在 100.0ng 以上,要准确的检测出 11-nor- $\Delta^8$ -四氢大麻酚-9 羧酸,大麻单抗免疫检测板的灵敏度必须在 10.0ng 以下。因此,使用国外进口的大麻单抗免疫检测板检测吸食大麻毒品人员的尿样一般都是假阴性,使得大量大麻吸毒案子无法侦破。

[0007] 造成这些问题的原因主要是国外使用 BSA(牛血清白蛋白)来制备完全抗原(大麻-BSA)并用其免疫小鼠制备单抗。由于 BSA 分子量只有 40-60 万 Da,来源与人种属较接近的动物,因此制备的单克隆抗体效价较低,特异性差。

[0008] 随着与四氢大麻酚相关的刑事案件逐年上升和国家对大麻管理的日趋严格,本领域对大麻,尤其是四氢大麻酚,和滥用毒品者生物标本中大麻和四氢大麻酚的检测提出了

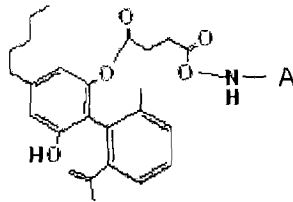
更高的要求。本领域迫切需要研发一种简便快速、准确可靠、灵敏、价格便宜适用于犯罪现场对大量检材即时定性筛选和实验室快速检验及基层单位易掌握的大麻毒品成分检验新方法。

### 发明内容

[0009] 本发明的目的正是提供一种快速、简易、灵敏地检测四氢大麻酚的检测方法和检测试剂。

[0010] 在本发明的第一方面中,提供了一种完全抗原,所述完全抗原具有式 1 所示的结构:

[0011]



[0012] 式 1

[0013] 其中, A 为血蓝蛋白。

[0014] 在本发明的第二方面中,提供了一种制备式 1 所述的完全抗原的方法,所述方法包括步骤:

[0015] (a) 使含羟基的化合物首先与琥珀酸酐反应,生成带羧基的中间体;

[0016] (b) 使步骤 (a) 所得的中间体与 N-羟基琥珀酰亚胺反应,生产的酯键;

[0017] (c) 使步骤 (b) 所得产物与血蓝蛋白连接,从而制得式 1 的完全抗原。

[0018] 在本发明的一个优选例中,步骤 (a) 的条件如下:反应温度为 0-100℃,优选室温 -80℃,更优选 30-60℃;反应时间为 1-24 小时,优选 2-12 小时,更优选 2-6 小时。

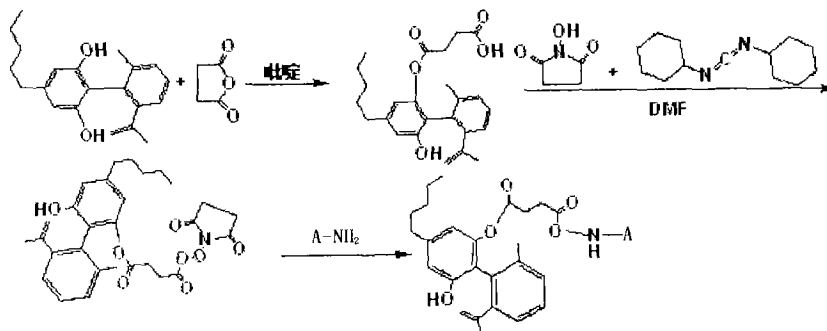
[0019] 在另一优选例中,步骤 (b) 的条件如下:反应温度为 0-60℃,优选室温 -60℃;反应时间为 1-24 小时,优选 2-12 小时,更优选 3 小时。

[0020] 在另一优选例中,步骤 (c) 的条件如下:反应温度为 0-40℃,优选 4-30℃;反应 pH 为 3.0-8.0;反应时间为 1-24 小时,优选 6-12 小时,更优选 6 小时。

[0021] 在本发明的第三方面中,提供了一种本发明前述的半抗原或完全抗原的用途,其用于制备四氢大麻酚特异性单克隆抗体。

[0022] 在一个优选例中,所述方法包括步骤:

[0023]



[0024] 在本发明的第三方面中,提供了本发明完全抗原的用途,其用于制备四氢大麻酚特异性单克隆抗体。

[0025] 在本发明的第四方面中,提供了一种单克隆抗体,所述单克隆抗体特异性结合于四氢大麻酚。在本发明的一个优选例中,所述单克隆抗体由小鼠杂交瘤细胞系 THC-KLH-CH1 所产生。

[0026] 在另一优选例中,所述的单克隆抗体与四氢大麻酚的结合效价大于 1 : 6000,更佳地大于 1 : 8000,最优选大于 1 : 10000。在另一优选例中,所述的单克隆抗体仅结合于与大麻的酚类衍生物 11-nor- $\Delta$ 8-四氢大麻酚-9 羧酸,11-羟- $\Delta$ 9-四氢大麻酚, $\Delta$ 8-四氢大麻酚, $\Delta$ 9-四氢大麻酚,大麻酚,大麻二酚,发生免疫结合反应。

[0027] 在本发明的第五方面中,提供了一种产生本发明单克隆抗体的杂交瘤细胞系,所述杂交瘤细胞系是小鼠杂交瘤细胞系 CCTCC NO. C200915(即大麻单抗细胞株 THC10A,于 2009 年 2 月 20 日保藏在中国典型培养物保藏中心(CCTCC,中国,武汉,武汉大学))。

[0028] 在本发明的第六方面中,提供了一种本发明单克隆抗体的用途,其用于制备检测样品中四氢大麻酚的试剂、检测板或试剂盒。

[0029] 在本发明的一个优选例中,所述样品是生物样品,且优选为血样或尿样。

[0030] 在本发明的第七方面中,提供了一种检测生物样品中是否存在四氢大麻酚的方法,所述方法包括步骤:

[0031] (a) 将样品与本发明的单克隆抗体接触;

[0032] (b) 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四氢大麻酚。

[0033] 在本发明的一个优选例中,所述单克隆抗体带有可检测标记物。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。

[0034] 在本发明的一个优选例中,所述检测方法为胶体金检测法、比色检测法、或荧光检测法。

[0035] 在本发明的第八方面中,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,所述的测试条含有前述的单克隆抗体。

[0036] 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 1 所示的完全抗原。

[0037] 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。

[0038] 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单克隆抗体;

[0039] 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 1 所示的完全抗原;

[0040] 所述的质控线为羊抗鼠 IgG 多抗。

[0041] 所述层析材料预包被有浓度范围为 0.01-20.0mg/ml,优选 0.1-10.0mg/ml,更优选为 0.2-2.0mg/ml,且包被量为 5-150  $\mu$ l/cm<sup>2</sup>,优选 10-100  $\mu$ l/cm<sup>2</sup>,更优选 20-70  $\mu$ l/cm<sup>2</sup>的经胶体金标记或有色标记的本发明的单克隆抗体。

[0042] 所述检测线采用了浓度范围为 0.01-20.0mg/ml,优选 0.1-10.0mg/ml,更优选为

0.2-2.0mg/ml,且吸附量为0.01-100 $\mu$ l/cm<sup>2</sup>,优选0.5-50 $\mu$ l/cm<sup>2</sup>,更优选1-20 $\mu$ l/cm<sup>2</sup>的式1所示的完全抗原。

[0043] 在本发明的第九方面中,提供了一种试剂盒,所述的试剂盒含有容器以及位于容器内的前述的单克隆抗体,或者所述的试剂盒含有前述的检测板和使用说明书。

[0044] 生物材料保藏说明

[0045] 本发明的小鼠单抗杂交瘤细胞株 THC-10A(又名 THC-KLH-CH1),已于2009年2月20日保藏在中国典型培养物保藏中心(CCTCC,中国武汉,武汉大学),保藏编号为 CCTCC NO. C200915。

## 附图说明

[0046] 图1:THC完全抗原制备示意图。其中步骤1为小分子活化;步骤2为活化的小分子与大分子KLH,以共价键方式偶联;步骤3为偶联后制得带有毒品小分子免疫原性的完全抗原。

[0047] 图2:融合率测定示意图。

[0048] 图3:纯化后抗体经2-ME还原后聚丙烯酰胺凝胶电泳考马斯亮蓝染色图谱。

[0049] 图4:THC抗血清效价(滴度)测定。

[0050] 图5:THC单克隆抗体效价(滴度)测定。

[0051] 图6:THC单克隆抗体与KLH交叉反应的测定。

[0052] 图7:本发明检测板中试条组成示意图。

[0053] 图8:检测板组装原理示意图。

[0054] 图9:大麻单抗免疫快速检测板判定结果示意图。

## 具体实施方式

[0055] 本发明人经过长期而深入的研究,将四氢大麻酚与适当的蛋白质载体连接产生了完全抗原,以此为免疫原免疫Ba1b/C小鼠,获得特异性分泌抗四氢大麻酚的单克隆细胞株,并由此制备纯化得到了四氢大麻酚单克隆抗体,其后进一步用所述完全抗原和四氢大麻酚抗体制备了具有高灵敏度的四氢大麻酚胶体金免疫检测板,从而完成了本发明。

[0056] 具体而言,本研究首先进行结构模拟计算,将THC进行活化,采用化学结构保护方法,在其苯环上引入一个活性基团-羧基(THC-羧基-KLH),使其具有活泼的化学性质。采用同源双功能氨基偶联剂将活化的THC与大分子KLH蛋白偶联,这样就使THC成为完全抗原所具有的免疫原性。

[0057] 发明人进一步制备了抗THC单克隆抗体:采用完全抗原免疫动物、细胞融合、筛选克隆、抗体纯化、杂交瘤扩大培养等操作步骤完成杂交瘤细胞株的制备,最后获得高效价、分泌专一性抗THC单克隆抗体的杂交瘤细胞株。THC单克隆抗体的杂交瘤细胞经纯化和鉴定后确定为IgG1型,kappa亚型,命名为THC-KLH-CH1(即保藏号为CCTCC NO. C200915的小鼠单抗杂交瘤细胞株THC-10A)。选择60余种毒品和药物进行交叉反应测试,结果为无交叉反应。

[0058] 胶体金制备和标记抗THC单克隆抗体的研究电镜方法选择胶体金颗粒大小为30nm,然后进行胶体金-THC单抗结合物标记包被制备。胶体金标记大麻单抗快速检测板制

备的研究胶体金标记大麻单抗快速检测板的制备系由完全抗原和 SPA 或羊抗鼠 IgG 分别固化在硝酸纤维素膜上,层析材料(载体)预包被胶体金标记抗 THC 单克隆抗体,分别与滤样纸、玻纤、吸水纸、胶带等材料贴在 PVC 聚脂胶板上,共同组装成胶体金标记大麻单克隆抗体免疫快速检测板。

[0059] 完全抗原及其制备

[0060] 四氢大麻酚(THC)分子量很小(314Da),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。通常,半抗原需要和大分子以共价键方式偶联,成为既具有免疫反应性,又具有免疫原性的完全抗原。

[0061] 国外虽已制备了 THC 完全抗原并用之获得了单抗,但由于使用了分子量只有 40-60 万 Da、来源与人种属较接近动物的 BSA(牛血清白蛋白)来制备完全抗原(大麻-BSA),所制得的单克隆抗体效价较低,特异性差,滴度仅为 1 : 5000 以下。

[0062] KLH 分子量为 500 万 Da,远大于 BSA,而且来源于与人种属差异很大的动物。这就使得按照本发明制备的抗大麻单克隆抗体的效价和特异性大幅度提高,解决了以往大麻单抗检测板只能检测 11-nor- $\Delta$ 8-四氢大麻酚-9 羧酸,不能检测 11-羟- $\Delta$ 9-四氢大麻酚、 $\Delta$ 8-四氢大麻酚、 $\Delta$ 9-四氢大麻酚、大麻酚、大麻二酚的难题。

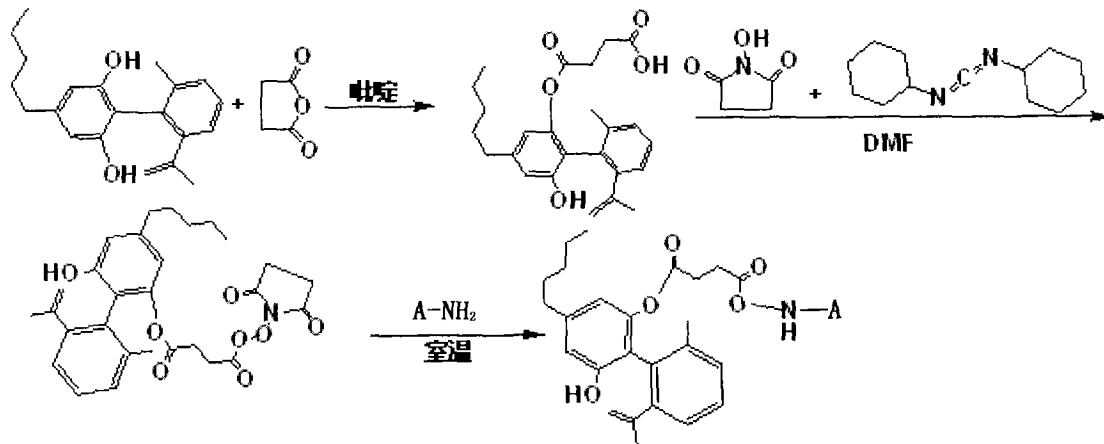
[0063] 为此,本发明人通过结构模拟计算和结构化学模拟实验,将 THC 进行活化,采用化学结构保护方法,在其苯环上引入一个活性基团-羧基(THC-羧基-KLH),使其具有活泼的化学性质,解决了在大麻小分子结构上定位接活性基团和保护 THC 原始结构的关键技术问题。在此基础上,进一步采用同源双功能氨基偶联剂将活化的 THC 与 KLH 蛋白偶联,这样就使 THC 成为完全抗原所具有的免疫原性。

[0064] 如本文所用,本发明的“完全抗原”是指本发明的大麻酚半抗原与血蓝蛋白载体结合后的产物。如本文所用,本发明中的“蛋白质载体”特指血蓝蛋白(KLH)。

[0065] 本研究采用琥珀酸酐法、NHS 法和 DCC 法进行大麻完全抗原的合成。通用步骤如下:第一步:用琥珀酸酐,先将 THC 进行半酯化,引入一个活性羧基;第二步:用 NHS 法,将活性羧基酯化;第三步:将活化的半抗原在 DCC 条件下与载体蛋白 KLH 上的氨基发生缩合反应,形成完全抗原。

[0066] 完全抗原的制备原理和步骤如以下流程所示:(1)使含羟基的化合物首先与琥珀酸酐反应,生成带羧基的中间体,(2)然后再与 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)反应,生产的酯键在脂溶性的二环己基碳二亚胺(DCC)的条件下,与蛋白质的氨基反应形成酰胺键。在小分子半抗原和蛋白质两个交联化合物之间插入一个琥珀二酰基。

[0067]



[0068] THC 完全抗原的制备反应式

[0069] 所述的酯化和缩合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，本发明的半酯化反应可在如下条件下进行：反应温度为 0-100℃，优选室温 -80℃，更优选 30-60℃；反应时间为 1-24 小时，优选 2-12 小时，更优选 2-6 小时；本发明的酯化反应条件可在如下条件下进行：反应温度为 0-60℃，优选室温 -60℃；反应时间为 1-24 小时，优选 2-12 小时，更优选 3 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℃，优选 4-30℃；反应 pH 为 3.0-8.0；反应时间为 1-24 小时，优选 6-12 小时，更优选 6 小时。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。

[0070] 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。

[0071] 本发明制备的完全抗原，四氢大麻酚-KLH 具有很好的免疫原性，能刺激小鼠产生强烈的免疫反应，抗血清滴度可达 1：8000 以上，完全抗原四氢大麻酚-KLH 很好的保留了四氢大麻酚的免疫反应性。

[0072] 单克隆抗体的制备

[0073] 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。

[0074] 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。

[0075] 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)]。

[0076] 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。

[0077] 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单克隆抗体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。

[0078] 在本发明中, 采用本发明的完全抗原免疫动物、细胞融合、筛选克隆、抗体纯化、杂交瘤扩大培养等操作步骤完成杂交瘤细胞株的制备, 最后获得高效价、分泌专一性抗 THC 单克隆抗体的杂交瘤细胞株。THC 单克隆抗体的杂交瘤细胞经纯化和鉴定后确定为 IgG1 型,  $\kappa$  (kappa) 亚型, 命名为 THC-KLH-CH1 (即保藏号为 CCTCC NO. C200915 的小鼠单抗杂交瘤细胞株 THC-10A)。

[0079] 本发明的一个优选的方案中, 单克隆抗体 THC-KLH-CH1 (CCTCC NO. C200915) 采用 Balb/C 小鼠腹水生产单克隆抗体的方法制备。将约  $10^6$ - $10^7$  个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。

[0080] 标记的本发明的单克隆抗体

[0081] 在本发明的一个优选例中, 所述单克隆抗体带有可检测标记物。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。

[0082] 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。

[0083] 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, 抗四氢大麻酚的单克隆抗体 THC-KLH-CH1 (CCTCC NO. C200915) 用胶体金标记, 得到胶体金标记的 THC-KLH-CH1 单克隆抗体。

[0084] 本发明的抗四氢大麻酚单克隆抗体 THC-KLH-CH1 有很好的特异性, 与 60 多种常见药物、毒品、没有交叉反应; THC-KLH-CH1 与四氢大麻酚-KLH 的载体没有交叉反应。本发明的单克隆抗体 THC-KLH-CH1 有很高的效价, 在四氢大麻酚-KLH 包被的酶标板检测中, 效价达到 1 : 16000。

[0085] 四氢大麻酚检测用胶体金标记-免疫检测板

[0086] 四氢大麻酚的检测采用竞争抑制法。本发明将四氢大麻酚-KLH 固定于硝酸纤维素膜上的检测区(固相抗原),待检样品溶液中的四氢大麻酚(游离抗原)与固相抗原竞争结合胶体金标记的抗四氢大麻酚单抗(标记抗体)。待检样品中含有的四氢大麻酚,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,待测样品不含四氢大麻酚;反之,不形成色带,则结果为阳性,检测样品含有四氢大麻酚。

[0087] 通常,在检测中设置内质控。本发明在硝酸纤维素膜的检测区临近的质控区设置羊抗鼠 IgG 多抗,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四氢大麻酚单克隆抗体。无论待检样品中是否含有四氢大麻酚,层析载体玻璃纤维上预包被的胶体金标记或有色标记的四氢大麻酚单克隆抗体总能与硝酸纤维素膜上的羊抗鼠 IgG 多抗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] 本发明检测四氢大麻酚的免疫检测板,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四氢大麻酚单克隆抗体或多克隆抗体,优选被胶体金标记的四氢大麻酚单克隆抗体(THC-KLH-CH1),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 THC-KLH,检测线所在的区域为检测区;

[0092] 所述的质控线为羊抗鼠多克隆抗体,质控线所在的区域为质控区;

[0093] 因此,测试条上的检测物依次为:预包被胶体金标记的四氢大麻酚单克隆抗体(THC-KLH-CH1)、检测线和质控线;

[0094] 在一个优选的方案中:层析材料上预包被胶体金标记的四氢大麻酚单克隆抗体(THC-KLH-CH1)是采用浓度为 0.1-5mg/ml,优选 0.5-1.5mg/ml 胶体金标记的四氢大麻酚单克隆抗体(THC-KLH-CH1)溶液进行预包被的,包被量为 20-100  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ,优选 30-80  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ,更优选 50  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ;优选的浓度为 0.5 或 1.5mg/ml,50  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ;

[0095] 硝酸纤维素膜上吸附的完全抗原 THC-KLH 是采用浓度为 0.1-5mg/ml,优选 0.5 ~ 1mg/ml 的完全抗原 THC-KLH 溶液进行吸附的,吸附量为 5-50  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ,优选 8-20  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ,更优选 10  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ;优选的浓度为 0.5 或 1mg/ml,10  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ;

[0096] 硝酸纤维素膜上吸附的羊抗鼠 IgG 多抗是采用浓度为 0.5 ~ 5mg/ml,优选 0.8 ~ 1.2mg/ml 羊抗鼠 IgG 多抗溶液进行吸附的,吸附量为 5-50  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ,10  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ;优选的浓度为 0.8 或 1.2mg/ml,10  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ 。

[0097] 本领域技术人员也可按照具体应用对上述包被量和吸附量进行适当调整。

[0098] 国外检测板无法检测 THC,且检测最低检测限仅为 100.0-300.0ng/ml。相比而言,本发明的检测板可检测 THC,且灵敏度高,最低检测限在 5.0ng ~ 10.0ng/ml 之间。

[0099] 免疫检测板的性能

[0100] 本发明的胶体金标记四氢大麻酚单抗免疫检测板具有如下性能:

[0101] 灵敏度高:调节试剂条上预包被的胶体金标记的 THC-KLH-CH1 单抗溶液、THC-KLH

完全抗原的量,测试尿样中含有的四氢大麻酚,进行灵敏度测试。结果表明,本发明的胶体金标记的四氢大麻酚单克隆抗体和完全抗原制备的检测板,四氢大麻酚的最低检测量可达到 5.0ng ~ 10.0ng/ml。

[0102] 稳定性好:将胶体金标记的四氢大麻酚单克隆抗体试剂条置于 65℃ 下分别保温 0.5d、1d、1.5d、2d、2.5d、3d、4d、5d,然后按上述灵敏度试验方法进行灵敏度测试。结果表明,胶体金标记的四氢大麻酚单抗在 65℃ 下能够耐受 5 天以上,具有良好的稳定性。

[0103] 特异性佳:用四氢大麻酚单克隆抗体免疫检测板检测 60 多种毒品,结果显示其仅与 THC 及其衍生物发生免疫结合反应,而与上述其他抗原物质没有交叉反应。用于检测的毒品和药品是:11-nor- $\Delta$ 8-四氢大麻酚-9 羧酸,11-羟- $\Delta$ 9-四氢大麻酚, $\Delta$ 8-四氢大麻酚, $\Delta$ 9-四氢大麻酚,大麻酚,大麻二酚,甲基苯丙胺,苯丙胺,MDMA,MDA,吗啡,可待因,海洛因,福尔可定,二氢埃托菲,雷米替丁、哌替啶,芬太尼,曲马多,右丙氧芬,纳洛酮,纳曲酮,烯丙吗啡,可乐宁,洛非西丁,东莨菪碱,益安口服液,正通宁片,扑热息痛,阿斯匹林,布洛芬,阿米替林,丙米嗪,氯丙嗪,异丙嗪,水合氯醛,安定,三唑仑,阿普唑仑,巴比妥,速可眠,异戊巴比妥,咖啡因,氟哌酸,先锋 IV, 黄连素,乳糖,普鲁卡因,康复新胶囊,水合氯醛,奥复沙星,非那西丁,去痛片,氯胺酮,美沙酮,度冷丁,麻黄素,可卡因,蒂巴因,利多卡因,那可丁,丁丙诺啡,苯丙醇胺和苯乙胺。

[0104] 综上所述,本发明的胶体金标记四氢大麻酚单抗免疫检测板与 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。与国外检测板相比,使用本发明的检测板检测四氢大麻酚,整个测试可在 1.5 分钟内完成,检测的灵敏度可达 5.0ng,与 60 多种常见药物、毒品、没有交叉反应。

[0105] 检测方法与结果判定:

[0106] 平放检测板,将试样滴在滤样纸上,1.5 ~ 5min 内观察层析结果。根据出现的条纹位置来判断结果。

[0107] 阴性:质控区、检测区均出现明显的色带,示为阴性;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;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。

[0108] 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。

[0109] 吸毒阈值设定

[0110] 用本发明的胶体金标记后的四氢大麻酚单克隆抗体和完全抗原制备的检测板,四氢大麻酚的最低检测量可达到 5.0ng/mL。考虑到某些正常使用的药物中也含有四氢大麻酚成分,实际工作中为避免假阳性的出现,可参照国际通行的浓度值,设定所需的检测板阈值。

[0111] 调节试剂条上预包被的胶体金标记的 THC-KLH-CH1 单抗溶液、THC-KLH 完全抗原的量,使得检测板对四氢大麻酚的最低检测量为 5.0-50.0ng/ml,优选 5.0-20.0ng/ml,更优选 5.0-10.0ng/ml。当尿液中的四氢大麻酚浓度小于最低检测量时,胶体金标记抗四氢大麻酚单抗通过层析作用,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;当尿液中的四氢大麻酚浓度大于最低检测量,胶体金标记的抗四氢大

麻酚单抗完全与尿液中的四氢大麻酚相结合,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。

#### [0112] 试剂盒

[0113] 本发明的试剂盒是指含有本发明的单克隆抗体或本发明的检测板的试剂盒。所述的试剂盒可根据需要包括容器、使用说明书、缓冲剂、免疫助剂等。

[0114] 与现有技术相比,本发明的优点在于:

[0115] (1) 本发明的完全抗原具有高免疫原性,且保留了四氢大麻酚的免疫反应性;

[0116] (2) 本发明的抗四氢大麻酚单克隆抗体 THC-KLH-CH1 的特异性优异且效价高;

[0117] (3) 本发明的胶体金标记四氢大麻酚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。

[0118] 与国外同类检测板相比,本发明大麻单抗检测板最低检测限为 5.0-10.0ng/mL,而国外检测板最低检测限为 100.0-300.0ng/mL。本发明检测板具有快速、特异、灵敏和可靠稳定的优点,检测速度在 1 分 30 秒内完成,保质期为二年以上,而国外检测板,检测速度在 3 分 40 秒左右,保质期短。

[0119] 此外,本发明中还采用动物脾脏直接免疫法。放弃了国内外所使用的弗氏佐剂,而采用了一种新型的含有特定的核酸序列的 CPG 免疫佐剂,实践证明,使用含有 CPG 序列的佐剂免疫动物,抗体的滴度要比常规的弗氏佐剂要高出 12 倍。建立了国际上第一株具有分泌高效价抗 THC 单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

#### [0120] 实施例

[0121] 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不适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,例如 Sambrook 等人,分子克隆:实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。

#### [0122] 实施例 1 四氢大麻酚-KLH 完全抗原的制备

[0123] 称取 THC 100.0mg,溶于 10.0mL 吡啶溶液中,并在该溶液中加入 300.0mg 的琥珀酸酐,60°C 下反应 4h,蒸除吡啶。乙醇洗涤,得到固体粉末。称取 20.0mg 上述固体粉末溶于 1.0mL DMF(N,N-二甲基甲酰胺)中,在其中加入 10.0mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和 65.0mg DCC,室温下反应 3h,10000.0rpm 离心除去不溶物,将上清液逐滴滴入 10.0mL、10.0mg/mL 的 KLH 蛋白溶液中,室温反应 2h,反应产物在 4°C,用 0.01M, pH 7.4 磷酸盐缓冲液透析,期间更换缓冲液 3~4 次,以除去未反应的小分子物质,最后用紫外光谱法鉴定,即得完全抗原 THC-KLH。

#### [0124] 实施例 2 四氢大麻酚单克隆抗体(CCTCC NO. C200915)的制备

#### [0125] Balb/C 小鼠免疫操作

[0126] 先将抗原与弗氏佐剂(Freund's adjuvant)乳化,把完全抗原 THC-KLH 用 PBS 配制成 1.0mg/mL 的溶液,然后将完全抗原溶液与弗氏佐剂等体积混合,用高速震荡器震荡形成均匀乳浊液,将此乳浊液用于动物的免疫。

[0127] 选择 8 周龄的小鼠进行注射免疫。取 8 周龄的健康 Balb/C 小鼠 12 只,在第 0 天,每只腹腔注射完全弗氏佐剂乳化抗原 100.0uL。第 14 天,每只小鼠腹腔再注射不完全弗氏佐剂乳化抗原 100.0uL。第 21 天,以摘小鼠眼球法采血,用 ELISA 方法检测血清中抗体效

价（滴度）。第 28 天，再次腹腔注射不完全弗氏佐剂乳化抗原 100.0 $\mu$ L。在细胞融合反应前一周，用 100.0 $\mu$ g/100.0 $\mu$ L 抗原生理盐水再次加强免疫。采血后经测定，所得抗血清效价在 1 : 16000。

#### [0128] 融合程序步骤

[0129] 将融合用器材全部灭菌，将胎牛血清、HT 和 A 贮存液化冻，连同其它培养基成分和 PEG 溶液置于 37 $^{\circ}$ C 水浴中预热。

[0130] 选择处于对数生长期的 SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞进行融合。计数（密度范围应在 10 $^8$ /mL），通过台盼蓝染色计数，检查细胞活力（应高于 95%）后，悬浮于 RPMI 或 DMEM 培养基中。

[0131] 将用 RPMI-1640 洗涤过的小鼠脾细胞和骨髓瘤细胞按 5 : 1 的比例混合，用 10 $^8$  脾细胞和 2 $\times$ 10 $^7$  骨髓瘤细胞。1000.0rpm/min 离心 5.0min，吸尽上清液。轻弹离心管使细胞沉淀松散，1.0min 内边摇荡边逐滴加入 1.5mL 的 50% PEG4000 溶液。用吸管将细胞悬液小心地混匀，随后静置 1.0min。然后，在 2.0min 内，边轻摇试管边缓慢滴加 10.0mL 无血清 RPMI-1640 培养基。静置放置约 3.0min，800.0rpm/min 离心 10.0min，弃上清液。用含 HAT 和 20% 胎牛血清的 RPMI1640 将细胞配成 100.0mL 悬液，将细胞均匀铺 10 块 96 孔培养板（预先加入腹腔巨噬细胞作饲养层），将培养板置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$  的培养箱内培养。

#### [0132] 融合细胞的选择性培养

[0133] 细胞融合操作 2 ~ 3 天后检查细胞融合情况，此时未融合细胞大量死亡，唯有融合细胞才能成活。

[0134] 7 ~ 10 天后加 HT+ 完全培养基，每孔加入 1.0mL。在 8 ~ 14 日间，就可以看到杂交细胞的克隆。当克隆约长到 1.0mm 直径时，即可检查孔中培养基的抗体含量。从培养孔取出 1.0mL 测定抗体，用 THC-KLH 包被的酶联板（ELISA 法）来筛选出抗 THC 的杂交瘤细胞。将选出的阳性孔中的细胞移至 24 孔培养板中培养，并进行排除交叉免疫反应的检测工作，以进一步筛选阳性克隆。

#### [0135] 杂交瘤克隆化（有限稀释法）

[0136] 于克隆前 1 天向 96 孔培养板中加入巨噬细胞饲养层，每孔加入 0.1mL，在 37 $^{\circ}$ C CO $_2$  培养箱中温育。从阳性培养孔中吸取欲克隆的细胞，计数一次克隆化约需 1000 个细胞。多余的细胞放回 24 孔板中。用完全培养基稀释细胞成 30 个 /mL，加入两块 96 孔板中，每孔加 0.1mL（孔内已预加饲养层），将剩下的细胞再度稀释成 10 个 /mL，然后再取两块铺了饲养层的 96 孔板，每孔中加入 0.1mL。再制备 3 个 /mL 的细胞悬液，加到另外两块板上。

[0137] 将培养板置 37 $^{\circ}$ C CO $_2$  培养箱中培育，2-3 周可出现可见单细胞集落形成。继续培养，待培养板孔内液体颜色变为橙色。检测上清液的抗体活性，选出阳性孔，再进行扩大培养和再克隆。

[0138] 吸取孔中液体，再以 THC-KLH 包被的 ELISA 法酶标板来筛选出抗 THC 的特异性杂交瘤细胞。经五次克隆后，得到一株能分泌专一性抗体的抗 THC 的单克隆细胞，亚型为 IgG1，该细胞分泌的 THC 单抗，可用于制备胶体金标记 THC 单抗免疫检测板。

#### [0139] 杂交瘤扩大培养

[0140] 本项目因制备和生产单抗检测板需要大量抗体，采用 Balb/C 小鼠腹水生产单克隆抗体蛋白。将约 10 $^6$ -10 $^7$  个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。抽取腹水离心,加 0.02%的叠氮钠,4℃或 -20℃冰箱保存。

[0141] 抗体的纯化 (Sephrose-G 蛋白亲和层析法)

[0142] 取 1g CL-4B Sepharose-蛋白 G,悬浮于 200.0mL 的磷酸缓冲溶液 (pH = 8) 中,至少吸胀 30.0min。取约 4.0mL 装柱,先后用 pH = 8 的磷酸缓冲液 100.0mL 和 pH = 3 的 0.1M 柠檬酸钠 100.0mL 洗柱,然后用前一种缓冲液重新平衡。腹水或培养上清液对 pH = 8 的磷酸缓冲液透析 (先用饱和硫酸铵沉淀后,再透析效果更好) 平衡。

[0143] 每 mL 胶可与 20.0-25.0mg 的 IgG 结合,控制过柱流速为 0.5-1.0mL/min。用 5.0mL 的 10.0mM 磷酸缓冲液 (pH = 8) 洗柱,监测流出液的 A280.0nm,按 0.5mL 级分 收集流出液。开始几管是没有蛋白的,如果是强阳性,抗体就没有与蛋白 A 结合;如果是弱阳性,可能是上样过多了。再用上述缓冲液 (不少于 5.0mL) 洗柱,大多数 IgA、IgM、IgG3 将在这一级分内流出。用 5.0mL 的 0.1M 柠檬酸钠 (pH = 6) 洗脱 IgG1 抗体。用 5.0mL 的 0.1M 柠檬酸钠缓冲液 (pH = 4.5) 洗脱 IgG2a。用 pH = 3.5 的同类缓冲液洗脱 IgG2b。

[0144] 实施例 3. 实施例 2 所得单克隆抗体的测定

[0145] 融合效率分析

[0146] 通过 CFSE 绿色荧光预标记淋巴细胞和抗小鼠 B220PE 标记的单克隆抗体预标记 SP2/0 细胞后融合,并经流式细胞仪测定分析双荧光细胞比例测定,本实验体系中脾细胞和 SP2/0 的最初融合效率约为 35%。ELISA 法测定阳性率为 14.2%。融合率测定的示意图见图 2

[0147] 抗 THC 单克隆抗体的鉴定

[0148] 抗体的纯化及型别测定

[0149] 将腹水先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 (ProteinG-Sephrose) 纯化,经 SDS-PAGE 电泳后,考马斯亮蓝染色 (见图 3)。

[0150] 抗体经特异性抗体分型试剂盒鉴定

[0151] 采用单克隆抗体分型试剂盒 (Monoclonal antibody isotyping kit,PIERCE),鉴定后为 IgG1 型, kappa 亚型,命名为 THC-KLH-CH1 (即保藏号为 CCTCC NO. C200915 的小鼠单抗杂交瘤细胞株 THC-10A)。

[0152] 抗体的效价测定

[0153] 抗血清的滴度测定

[0154] 将 THC-KLH 包被的酶联板用于测定此抗血清的滴度,包被抗原 10.0ug/mL 稀释于 pH9.6 的 0.05M 碳酸盐缓冲液中,100.0uL/孔加入到 96 孔酶标板于 4℃ 过夜。弃去包被液后用 1% 明胶 /PBS 在 37℃ 封闭 2 小时,然后用 PBS-Tween-20 洗液洗板 3 遍,再加入稀释后的 THC 抗血清或单抗,置于 37℃ 孵育 1 小时。用 PBS-Tween-20 洗液洗板 3 遍,加入 1 : 2000 的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 多抗,37℃ 孵育 1 小时后用 PBS-Tween-20 洗液洗板 3 遍,加 TMB/H2O2 底物进行显色 10.0min,用终止液 (0.1N 硫酸) 终止显色

[0155] 在 450.0nm 光波长下测定吸收值 (OD),与空白对照孔的 OD 均值比较,以免小鼠的血清为阳性对照,以 Sp2/0 细胞培养的上清液为阴性对照,阳性细胞孔的判定标准为: (OD450 试验 -OD450 空白) / (OD450 对照 -OD450 空白)  $\geq$  2.1,所得 THC 抗血清的效价为 1 : 16000 (见图 4)。

[0156] THC 单克隆抗体滴度的测定

[0157] 采用同上方法测定抗体的滴度,测得 THC 单抗的效价为 1 : 8000(见图 5)。

[0158] 特异性测定

[0159] 由于在制备胶体金快速检测板的过程中,所用的完全抗原是 THC-KLH,因此,如果单克隆抗体与 KLH 有交叉反应,将会导致严重的假阴性结果。所以,要确定 THC 单克隆抗体(THC-KLH-CH1(即保藏号为 CCTCC NO. C200915 的小鼠单抗杂交瘤细胞株 THC-10A))与 KLH 没有任何的交叉反应。我们分别用完全抗原 THC-KLH 和 KLH 包被酶标板,以 1 : 2000 稀释的 THC 单克隆抗体与之结合,进行酶联反应检测,结果显示 THC 单克隆抗体可以检测到 20.0ng 的 THC-KLH,而且与 KLH 没有任何交叉反应。(见图 6)

[0160] 交叉反应法测试 THC 单抗特异性

[0161] 本项目选用 60 余种毒品和药品进行特异性测试:11-nor- $\Delta$ 8-四氢大麻酚-9 羧酸,11-羟- $\Delta$ 9-四氢大麻酚, $\Delta$ 8-四氢大麻酚, $\Delta$ 9-四氢大麻酚,大麻酚,大麻二酚,甲基苯丙胺,苯丙胺,MDMA,MDA,吗啡,可待因,海洛因,福尔可定,二氢埃托菲,雷米替丁、哌替啶,芬太尼,曲马多,右丙氧芬,纳洛酮,纳曲酮,烯丙吗啡,可乐宁,洛非西丁,东莨菪碱,益安口服液,正通宁片,扑热息痛,阿斯匹林,布洛芬,阿米替林,丙米嗪,氯丙嗪,异丙嗪,水合氯醛,安定,三唑仑,阿普唑仑,巴比妥,速可眠,异戊巴比妥,咖啡因,氟哌酸,先锋 IV,黄连素,乳糖,普鲁卡因,康复新胶囊,水合氯醛,奥复沙星,非那西丁,去痛片,氯胺酮,美沙酮,度冷丁,麻黄素,可卡因,蒂巴因,利多卡因,那可丁,丁丙诺啡,苯丙醇胺和苯乙胺。

[0162] 用上述 60 余种被检测物质包被的酶标板与此抗体反应进行 ELISA 测定,结果确定此抗体仅与大麻的酚类衍生物 11-nor- $\Delta$ 8-四氢大麻酚-9 羧酸,11-羟- $\Delta$ 9-四氢大麻酚, $\Delta$ 8-四氢大麻酚, $\Delta$ 9-四氢大麻酚,大麻酚,大麻二酚,发生免疫结合反应,而与上述其他毒品和药品没有交叉反应。

[0163] 实施例 4. 胶体金标记 THC 单克隆抗体免疫检测板的制备

[0164] 胶体金标记 THC 单克隆抗体的制备

[0165] 采用柠檬酸三钠还原法制备。取 247.5mL 去离子水煮沸,溶解 2.5mL 的 1.0% 氯金酸溶液,90℃保温 2.0min,加入 7.5mL 的 1.0% 柠檬酸三钠水溶液,继续煮沸 5.0min,冷却至室温后,采用分光光度计检测颗粒均匀度及粒度大小,最大吸收峰在 521nm,胶体金大小为 30nm 左右。

[0166] 取上述胶体金 100.0mL,加入 1.0mL 的 0.1M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>,然后在磁力搅拌下搅拌,一次性快速加入 1.0 ~ 2.0mg 抗 THC 抗体,继续搅拌 5.0min 后,再加入 2.0mL 的 10.0% 的牛血清白蛋白溶液,继续搅拌 5.0min。用高速离心机分别将其在 12000rpm/min,4℃下离心 30.0min,吸去上清液,用含少量稳定剂的 BB 缓冲液(硼酸缓冲液)悬浮沉淀汲取保存。也可用蛋白浓缩仪洗去多余抗体并将其体积浓缩。

[0167] 用含有表面活性剂和稳定剂的缓冲液将胶体金-单抗结合物稀释至一定浓度后,均匀地涂在玻璃纤维素纸上,37℃干燥过夜。

[0168] 检测线和质控线的设计

[0169] 配制 0.5 ~ 1.0mg/mL 的 THC-KLH 完全抗原和 0.8 ~ 1.2mg/mL 浓度的羊抗鼠 IgG 多抗,同时喷上在硝酸纤维膜上分别为检测线和质控线,并放至 37℃干燥过夜。

[0170] 测试条组装

[0171] 将吸水纸放在贴板的下方凹槽中,然后将一段膜放在其上方。将胶板另一侧的纸

片撕开,依着贴板尺的边缘将胶体金纸条贴在膜的上面,再将滤样纸覆盖在胶体金纸条上。

[0172] 将“MAX”箭头胶带贴在胶体金纸条与膜的结合部位,将胶体金纸条完全盖住、压紧,再将覆盖胶带贴在吸水纸一侧,将吸水纸与膜的结合部完全盖住、压紧,将多余的覆盖胶带用刀划去。

[0173] 用切刀切裁相应规格的试纸条,将试纸条装入塑料卡中并用铝箔袋封装。检测板中试条组成示意图(见图7)。

[0174] 本品系由完全抗原和 SPA 或羊抗鼠 IgG 分别固化在硝酸纤维素膜上,层析材料(载体)预包被胶体金标记抗 THC 单抗,分别与滤样纸、吸水纸、胶带等材料贴在 PVC 聚脂胶板上,共同组装成 THC 单抗免疫检测板,(见图8)。

[0175] 检测原理与过程

[0176] 本检测板应用免疫竞争法原理,即尿液中的 THC 与固相于硝酸纤维素膜上的 THC-KLH 竞争结合胶体金标记的抗 THC 单抗,通过观察窗检测区有无色带来判别测定结果。

[0177] 在硝酸纤维素膜的检测区(T)和质控区(C)分别包被完全抗原和羊抗鼠 IgG 多抗,在层析载体玻璃纤维上包被胶体金标记的抗 THC 单抗。当尿液中的 THC 浓度  $< 50.0 \text{ ng/mL}$ ,胶体金标记抗 THC 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,此时检测区(T)和质控区(C)均出现一条紫红色带,说明检测结果为阴性。当尿液中的 THC 浓度  $> 50.0 \text{ ng/mL}$ ,胶体金标记的抗 THC 单抗完全与尿液中的 THC 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,检测区不能形成紫红色带,此时检测结果为阳性。

[0178] 无论尿液中是否含有 THC,胶体金标记的 THC 单抗总能与固相于硝酸纤维素膜上的羊抗鼠 IgG 多抗结合形成一条紫红色带,该条色带是判定尿样是否阳性和阴性、层析过程是否正常和检测板是否变质的标准,定为质控区(C)。

[0179] 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,所以检测线也是检测板判别吸毒状况的标准。

[0180] 检测板使用方法和结果判定

[0181] 从密封袋中取出检测板,标明被检样品或对照样品。平放检测板,在点样孔内滴入三滴试样(约  $120 \mu\text{L}$ ), $3 \sim 5 \text{ min}$  内观察层析结果。

[0182] 结果判定的示意图见图9。质控区(C)、检测区(T)均出现明显的紫红色带,即在观察窗处出现两条紫红色带,为阴性。只在质控区(C)出现紫红色带,而在检测区(T)无紫红色带,示为阳性。质控区(C)、检测区(T)无任何色带或在质控区(C)未出现色带而在检测区(T)出现紫红色带,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。

[0183] 实施例5.胶体金标记 THC 单克隆抗体免疫检测板的性能测试

[0184] 1. 胶体金标记 THC 单抗免疫检测板的灵敏度测试

[0185] 根据测试要求,在空白尿样中添加 THC,分别配制成含 THC 浓度为  $1.0 \text{ ng/mL}$ 、 $2.0 \text{ ng/mL}$ 、 $3.0 \text{ ng/mL}$ 、 $4.0 \text{ ng/mL}$ 、 $5.0 \text{ ng/mL}$ 、 $10.0 \text{ ng/mL}$ 、 $15.0 \text{ ng/mL}$ 、 $20.0 \text{ ng/mL}$ 、 $25.0 \text{ ng/mL}$ 、 $50.0 \text{ ng/mL}$ 、 $75.0 \text{ ng/mL}$ 、 $100.0 \text{ ng/mL}$ 、 $150.0 \text{ ng/mL}$  和  $200.0 \text{ ng/mL}$  的系列试样。

[0186] 将上述系列浓度作定量梯度点样,灵敏度试验结果(见表1)。

[0187] 表1 灵敏度试验结果

[0188]

点样量 ng/mL	1	2	3	4	5	10	15
结果	-	-	-	-	-	-	-
点样量 ng/mL	20	25	50	75	100	150	200
结果	+	+	+	+	+	+	+

[0189] 注：“+”表示阳性；“-”表示阴性。

[0190] 试验结果表明，进行胶体金标记后的 THC 单克隆抗体最低检测量为 20.0ng/mL。

[0191] 2. 胶体金标记 THC 单抗免疫检测板的稳定性实验

[0192] 将胶体金标记的 THC 单抗检测板中的试剂条置于 65℃ 下分别保温 0.5 天、1.0 天、1.5 天、2.0 天、2.5 天、3.0 天、4.0 天、5.0 天，然后按上述灵敏度试验方法进行 50.0ng/mL 的灵敏度测试。

[0193] 上述条件下的测试结果（见表 2）。

[0194] 表 2 稳定性实验结果

[0195]

保存时间（天）	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	5.0
结果	+	+	+	+	+	+	+	+	+

[0196] 注：“+”表示阳性

[0197] 实验结果表明，胶体金标记的 THC 单抗在 65℃ 下能够耐受 5 天以上，具有良好的稳定性。

[0198] 3. 胶体金标记 THC 单抗免疫检测板的特异性测试

[0199] 选用 60 余种毒品和药品进行特异性测试：11-nor- $\Delta$ 8-四氢大麻酚-9 羧酸，11-羟- $\Delta$ 9-四氢大麻酚， $\Delta$ 8-四氢大麻酚， $\Delta$ 9-四氢大麻酚，大麻酚，大麻二酚，甲基苯丙胺，苯丙胺，MDMA，MDA，吗啡，可待因，海洛因，福尔可定，二氢埃托菲，雷米替丁、哌替啶，芬太尼，曲马多，右丙氧芬，纳洛酮，纳曲酮，烯丙吗啡，可乐宁，洛非西丁，东莨菪碱，益安口服液，正通宁片，扑热息痛，阿斯匹林，布洛芬，阿米替林，丙米嗪，氯丙嗪，异丙嗪，水合氯醛，安定，三唑仑，阿普唑仑，巴比妥，速可眠，异戊巴比妥，咖啡因，氟哌酸，先锋 IV，黄连素，乳糖，普鲁卡因，康复新胶囊，水合氯醛，奥复沙星，非那西丁，去痛片，氯胺酮，美沙酮，度冷丁，麻黄素，可卡因，蒂巴因，利多卡因，那可丁，丁丙诺啡，苯丙醇胺和苯乙胺。

[0200] 将上述检测物质配制成一定浓度的溶液进行检测，结果表明用此抗体生产的单抗免疫检测板仅与 THC 及其衍生物发生免疫结合反应，而与上述其他抗原物质没有交叉反应。结果表明制备的胶体金标记 THC 单抗免疫检测板性能良好，专一性强。测试结果（见表 3）。

[0201] 表 3 检测板的特异性反应测试结果

[0202]

浓度ng/mL 样品	25	50	100	250	1000	5000	10000	100000
11-nor- $\Delta^8$ -四氢大麻酚-9羧酸	—	+	+	+	+	+	+	+
11-羟- $\Delta^9$ -四氢大麻酚	—	—	—	—	—	+	+	+
$\Delta^8$ -四氢大麻酚	—	—	—	—	—	+	+	+
$\Delta^9$ -四氢大麻酚	—	—	—	—	—	+	+	+
大麻酚	—	—	—	—	—	+	+	+
大麻二酚	—	—	—	—	—	—	+	+
甲基苯丙胺	—	—	—	—	—	—	—	—
MDMA	—	—	—	—	—	—	—	—
苯丙胺	—	—	—	—	—	—	—	—
MDA	—	—	—	—	—	—	—	—
吗啡	—	—	—	—	—	—	—	—
可待因	—	—	—	—	—	—	—	—
海洛因	—	—	—	—	—	—	—	—
福尔可定	—	—	—	—	—	—	—	—
二氢埃托菲	—	—	—	—	—	—	—	—
哌替啶	—	—	—	—	—	—	—	—
芬太尼	—	—	—	—	—	—	—	—
曲马多	—	—	—	—	—	—	—	—
右丙氧芬	—	—	—	—	—	—	—	—
纳洛酮	—	—	—	—	—	—	—	—
纳曲酮	—	—	—	—	—	—	—	—

[0203]

烯丙吗啡	—	—	—	—	—	—	—	—
可乐宁	—	—	—	—	—	—	—	—
洛非西丁	—	—	—	—	—	—	—	—
东莨菪碱	—	—	—	—	—	—	—	—
益安口服液	—	—	—	—	—	—	—	—
正通宁片	—	—	—	—	—	—	—	—
扑热息痛	—	—	—	—	—	—	—	—
阿斯匹林	—	—	—	—	—	—	—	—
布洛芬	—	—	—	—	—	—	—	—
阿米替林	—	—	—	—	—	—	—	—
丙米嗪	—	—	—	—	—	—	—	—
氯丙嗪	—	—	—	—	—	—	—	—
异丙嗪	—	—	—	—	—	—	—	—
水合氯醛	—	—	—	—	—	—	—	—
安定	—	—	—	—	—	—	—	—
三唑仑	—	—	—	—	—	—	—	—
阿普唑仑	—	—	—	—	—	—	—	—
苯巴比妥	—	—	—	—	—	—	—	—
速可眠	—	—	—	—	—	—	—	—
异戊巴比妥	—	—	—	—	—	—	—	—
咖啡因	—	—	—	—	—	—	—	—
氟哌酸	—	—	—	—	—	—	—	—
先锋 IV	—	—	—	—	—	—	—	—
黄连素	—	—	—	—	—	—	—	—
乳糖	—	—	—	—	—	—	—	—
普鲁卡因	—	—	—	—	—	—	—	—
康复新胶囊	—	—	—	—	—	—	—	—
水合氯醛	—	—	—	—	—	—	—	—
奥复沙星	—	—	—	—	—	—	—	—
非那西丁	—	—	—	—	—	—	—	—

[0204]

去痛片	—	—	—	—	—	—	—	—
氯胺酮	—	—	—	—	—	—	—	—
美沙酮	—	—	—	—	—	—	—	—
度冷丁	—	—	—	—	—	—	—	—
麻黄素	—	—	—	—	—	—	—	—
伪麻黄碱	—	—	—	—	—	—	—	—
可卡因	—	—	—	—	—	—	—	—
蒂巴因	—	—	—	—	—	—	—	—
利多卡因	—	—	—	—	—	—	—	—
那可丁	—	—	—	—	—	—	—	—
丁丙诺啡	—	—	—	—	—	—	—	—
苯丙醇胺	—	—	—	—	—	—	—	—
苯乙胺	—	—	—	—	—	—	—	—

[0205] 4. 检测板与 GC/MS 检测结果的比较

[0206] 采用本发明的检测板和 GC/MS 对相同的样品进行测试并对其检测结果进行比较 (见表 4)。

[0207] 表 4 检测板与 GC/MS 检测结果的比较

[0208]

GC-MS (ng/mL)	例数	检测板	
		+	—
<50 ng/mL	200	0	200
≥50 ng/mL	300	299	1

[0209] 我们设定的检测阈值为 50.0ng/mL, 敏感度为 99.8%, 准确度为 99.9%。

[0210] 此外, 2005 年-2007 年大麻单抗快速检测板已推广了 90000 余人份, 经统计检测吸食大麻毒品人员为 (阳性率) 52%, 没有吸食大麻毒品人员为 (阴性率) 48%, 此结果可以判断当前吸食大麻毒品人员上升是很快的。对于尿样阳性而吸毒者不承认吸毒的尿样, 采用 GC/MS 检测复核, 结果一致。

[0211] 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。

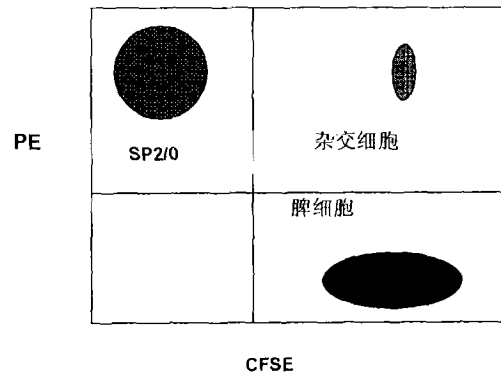
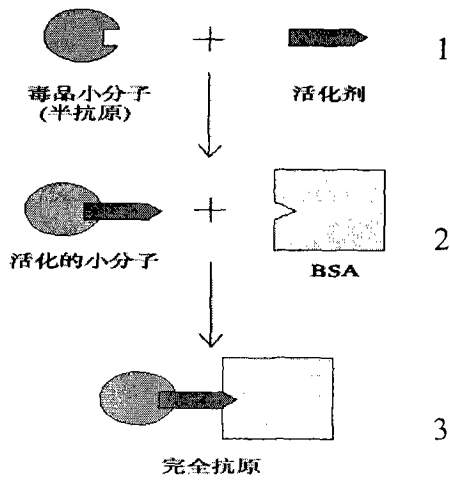


图 2

图 1

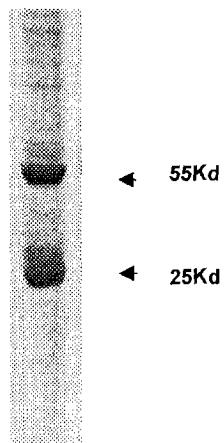


图 3

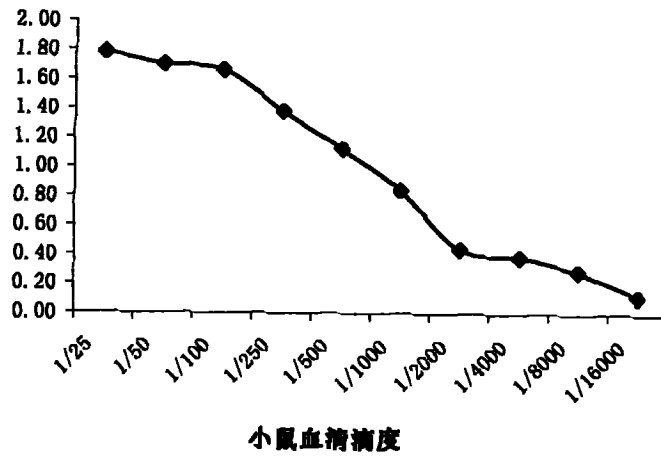


图 4

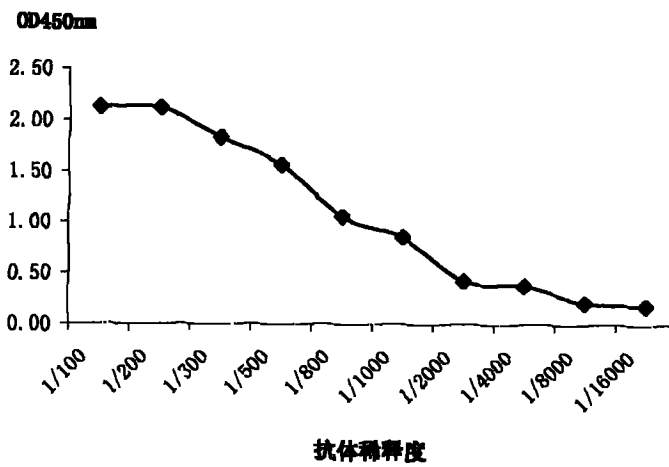


图 5

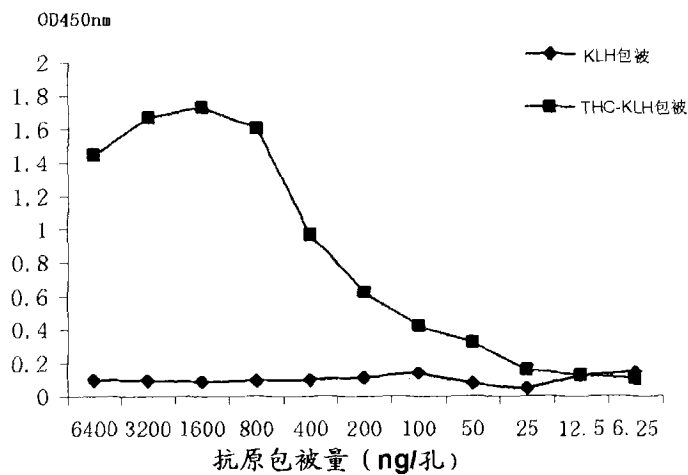


图 6

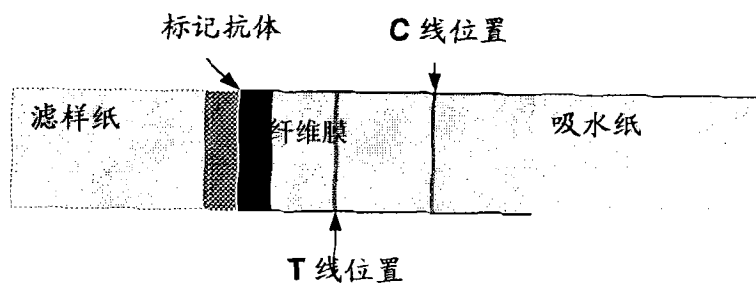


图 7

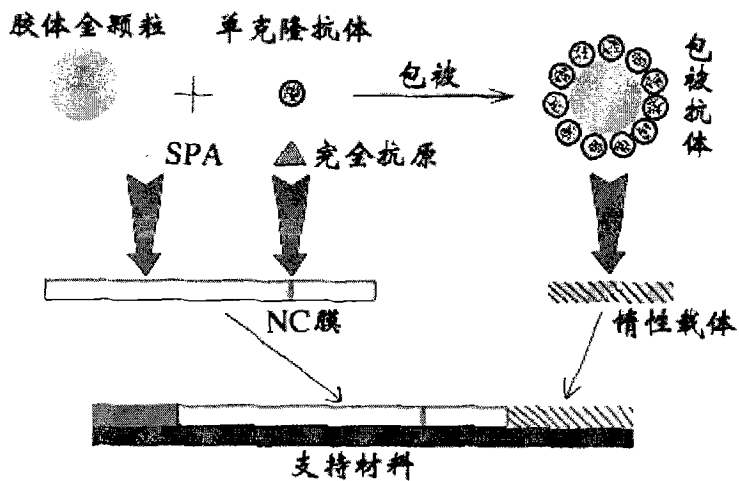


图 8

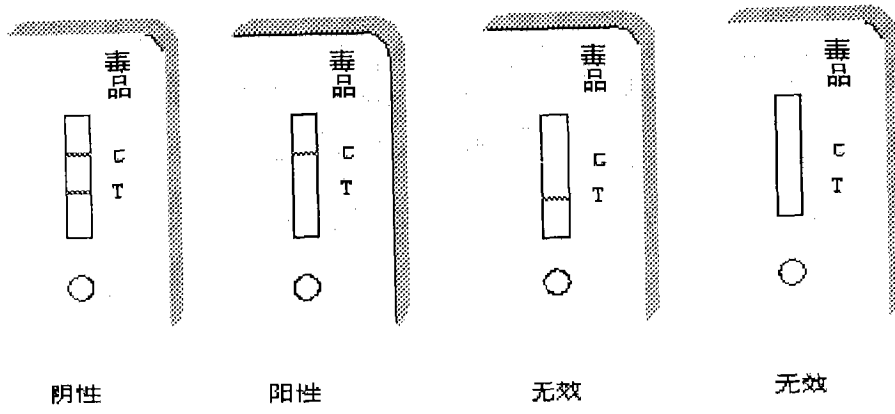


图 9

专利名称(译)	胶体金标记大麻、四氢大麻酚单抗免疫检测板		
公开(公告)号	<a href="#">CN101580544B</a>	公开(公告)日	2012-10-10
申请号	CN200910004736.5	申请日	2009-02-23
[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)	上海市刑事科学技术研究院		
[标]发明人	曾立波		
发明人	曾立波		
IPC分类号	C07K14/435 C07K16/44 C12N5/18 G01N33/53 G01N33/543		
代理人(译)	雷芳		
审查员(译)	陈莹		
优先权	200810033758.X 2008-02-21 CN		
其他公开文献	CN101580544A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了用于四氢大麻酚检测及抗体制备的完全抗原。本发明还公开了用该完全抗原制备的抗四氢大麻酚单克隆抗体，以及胶体金标记四氢大麻酚单抗免疫检测板，以用于检测药品或尿样等人体标本中的四氢大麻酚。与HPLC等方法相比，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四氢大麻酚，整个测试可在1.5min内完成，检测的灵敏度可达0.5ng，且与60多种常见药物、毒品、四氢大麻酚体内代谢物没有交叉反应。

