



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102890152 A

(43) 申请公布日 2013. 01. 23

(21) 申请号 201110203017. 3

(22) 申请日 2011. 07. 20

(71) 申请人 天津中新科炬生物制药有限公司  
地址 300457 天津市开发区第六大街 65 号

(72) 发明人 李洲 许俊艳

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

G01N 33/543(2006. 01)

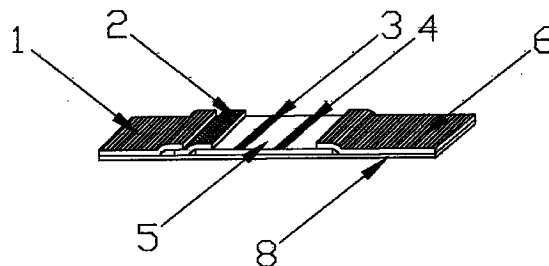
权利要求书 2 页 说明书 7 页 附图 1 页

### (54) 发明名称

一种快速定量检测血液中毒品的试纸条及检测方法

### (57) 摘要

一种快速定量检测血液中毒品的试纸条及检测方法,所述的试纸条包括上样垫、标记物垫、NC膜、吸样垫和支撑薄片,所述的上样垫、标记物垫、NC膜和吸样垫依次粘附于不吸水的支撑薄片,标记物垫上包被有标记的抗毒品单抗,NC膜上分别包被有毒品合成免疫抗原构成的检测线 T 线和羊抗鼠 IgG 抗体构成的质控线 C 线。该试纸条具有简便、准确、快速定量、灵敏度和特异性高、经济实用、适合于现场检测等优点。



1. 一种快速定量检测血液中毒品的试纸条,包括上样垫(1)、标记物垫(2)、NC膜(5)、吸样垫(6)和支撑薄片(8),其特征在于,所述的上样垫(1)、标记物垫(2)、NC膜(5)和吸样垫(6)依次粘附于不吸水的支撑薄片(8),标记物垫(2)上包被有标记的抗毒品单抗,NC膜(5)上分别包被有毒品合成免疫抗原构成的检测线T线(3)和羊抗鼠IgG抗体构成的质控线C线(4),所述试纸条与免疫层析判读仪配套使用进行毒品的定量检测,定量检测范围为0~2000ng/mL。

2. 根据权利要求1所述的试纸条,其特征在于,所述的抗毒品单抗通过胶体金标记法、乳胶微球标记法、纳米磁珠标记法或胶体硒标记法标记于标记物垫(2)上。

3. 根据权利要求2所述的试纸条,其特征在于,所述的胶体金标记法包括以下的步骤:用氯金酸-柠檬酸三钠还原法制备直径为40nm的胶体金溶液,用0.2M  $K_2CO_3$ 将溶液pH调到pH7~10,缓慢搅拌,加入抗毒品单抗使其终浓度为5~15 $\mu$ g/ml,继续搅拌,再加入终浓度为0.2%酪蛋白钠,0.1%聚乙二醇20000进行封闭20-40分钟,离心后弃上清,用胶体金工作液复溶至70-80ml,按1ml溶液铺14-18 $cm^2$ 的比例均匀地铺在无纺织布上,再置于温度20~25 $^{\circ}C$ 、湿度小于30%的干燥间干燥2~4小时。

4. 根据权利要求2所述的试纸条,其特征在于,所述的乳胶微球标记法包括以下的步骤:取红色乳胶微球,加入0.1M pH6.5MES混匀,加入10mg/mlNHS和10mg/ml EDC·HCl,离心,去上清,沉淀用硼砂缓冲液重悬,振荡、超声处理即成活化后的乳胶微球;用0.1MpH7~10的硼砂缓冲液将毒品单抗稀释,然后加入活化乳胶微球,振荡、离心、去上清,沉淀用酪蛋白溶液重悬,经超声粉碎、振荡后,重复离心,去上清,沉淀重悬,再次超声粉碎、离心,沉淀加保存液悬浮,即为乳胶微球标记吗啡单克隆抗体结合物,用工作液稀释乳胶抗体结合物溶液,按1ml溶液铺14-18 $cm^2$ 的比例均匀地铺在无纺织布上,再置于温度20~25 $^{\circ}C$ 、湿度小于30%的干燥间干燥2~4小时。

5. 根据权利要求2所述的试纸条,其特征在于,所述的纳米磁珠标记法包括以下的步骤:取磁珠,用50mM MES(pH5.7)配制成1%的纳米磁珠溶液,加入水溶性EDC,35-40 $^{\circ}C$  10min,再加入毒品单隆,35-40 $^{\circ}C$  孵育1.5~2.5小时,然后用磁力架吸附磁珠,将缓冲液更换至0.01M pH7.2的PBS,含0.5% BSA,0.5% Tween,完成标记;再用工作液制成0.3-0.7mg/ml的溶液,按1ml溶液铺20-24 $cm^2$ 的比例均匀地铺在玻璃纤维膜上,干燥2-4小时。

6. 根据权利要求2所述的试纸条,其特征在于,所述的胶体硒标记法包括以下的步骤:用抗坏血酸还原亚硒酸制备胶体硒溶液,以0.2M  $K_2CO_3$ 将溶液pH调到pH7~10,然后将溶液置于磁力搅拌器上缓慢搅拌,缓慢加入安非他命单克隆抗体使其终浓度为5~15 $\mu$ g/ml,继续搅拌,再加入10%的BSA至终浓度为1%进行封闭,12000转离心,弃上清,用工作液复溶至原体积的1/10,按1ml溶液铺14-18 $cm^2$ 的比例均匀地铺在无纺织布上,再置于温度20~25 $^{\circ}C$ 、湿度小于30%的干燥间干燥2~4小时。

7. 根据权利要求1所述的试纸条,其特征在于,所述的NC膜(5)按如下方法进行制备:用0.01M pH7.2PBS将毒品合成免疫抗原分别稀释成0.2~1.0mg/ml,然后用喷膜仪在NC膜上按1.0-1.5 $\mu$ l/cm划线包被,同时包被羊抗鼠IgG抗体作为C线,包被完成后将NC膜置于干燥间干燥8~10小时。

8. 一种快速定量检测血液中毒品的方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:

(1) 加样 :将被检血液样本平衡至室温,将制备好的试剂卡平放,向加样孔加入待检样本  $10 \sim 20 \mu\text{l}$ ,然后在上样垫上加稀释液  $60 \sim 100 \mu\text{l}$ ;

(2) 根据试剂条上线条的颜色强度以及免疫层析判读记录仪中内存的标准曲线,可定量检测出血液中毒品的浓度。

## 一种快速定量检测血液中毒品的试纸条及检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物应用技术领域,特别涉及一种快速定量检测血液中毒品的试剂条及检测方法。

### 背景技术

[0002] 吸毒和药物滥用是目前倍受全球关注的社会问题。据 WHO 估计,全球每年因毒品滥用和毒品犯罪致死的人数高达百万计,已成为许多国家仅次于心脑血管疾病和恶性肿瘤的第三大死因。近年来,受境外毒品活动的影响,吸毒和贩毒已再次殃及我国,而且各类毒品案件呈现快速上升趋势,过境贩毒和国内消费共存的现象已经形成。毒品的种类也越来越多,除了常见的海洛因、冰毒、摇头丸、氯胺酮外,还出现了三唑仑(海乐神)、氯氮卓(利眠宁)、艾司唑仑(舒乐安定)、地西洋(安定)、溴西洋、美沙酮、丁丙诺啡等毒品,毒品的种类呈现多元化的趋势。因此,为了高效打击吸毒和贩毒,开展体内毒品及其代谢物的系统分析研究、建立滥用药物种类的检测方法已成为当务之急。

[0003] 自 70 年代以来,国外陆续报道了毒品检测方法,其中以理化检测法居多,包括薄层法、气相色谱法、气-质联用法、红外分光光度法以及高效液相色谱法等,这些方法主要用于尿液样本中毒品及其代谢物的鉴定,但存在仪器昂贵、检测时间长,并且需要专业的技术人员进行操作,因此急需一种能快速、准确、简便的检测方法。

[0004] 免疫技术是一种新型的诊断技术,操作简便、快速及可以大批量检测等特点,已作为国际上通用的毒品筛选方法,目前检测最多的样品是尿液,主要是因为其采集方便,并可重复采集,能得到较大量的样品。但是,尿样却有其不足之处:①尿样的分析检测只能反映采样前 1~3 天的药物摄入情况;②尿样比较容易造假,比如将尿样进行稀释可引起假阴性的问题、可人为的加入一些成分等;③由于尿样检测的敏感度高,其带来的假阳性问题也是要考虑的,比如在一些咳嗽糖浆等临床用药物中常含有少量的鸦片类药物,这样就会出现用药者被动性尿样检测假阳性问题,一般只能用于定性检验。由于吸毒者血液中含有较高浓度的毒品及代谢物,利用血液的测定,可以提供反映被检测者身体受损害程度的依据。因此,开展血液中毒品的定量检测已成为毒品工作中的重中之重。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的在于通过对血液中毒品的检测技术研究,提供了一种快速定量检测血经济实用、适合于现场检测等特点,可以用于临床毒品成瘾者药物治疗浓度的监测,也给公、检、法等部门提供及时可靠的数据和证明。

[0006] 实现本发明的技术方案为:一种快速定量检测血液中毒品的试纸条,包括上样垫、标记物垫、NC 膜、吸样垫和支撑薄片,所述试纸条与免疫层析判读仪配套使用进行毒品的定量检测,定量检测范围为 0~2000ng/mL。

[0007] 所述的上样垫、标记物垫、NC 膜和吸样垫依次粘附于不吸水的支撑薄片,标记物垫上包被有标记的抗毒品单抗,NC 膜上分别包被有毒品合成免疫抗原构成的检测线 T 线和羊

抗鼠 IgG 抗体构成的质控线 C 线。

[0008] 同时,将贴好的试剂条按照一定的宽带进行切割,并将切割好的试剂条装入塑料卡内,塑料卡上设有上样孔,形成检测测试卡。

[0009] 所述的抗毒品单抗通过胶体金标记法、乳胶微球标记法、纳米磁珠标记法或胶体硒标记法标记于标记物垫上。

[0010] 其中,所述的胶体金标记法包括以下的步骤:用氯金酸-柠檬酸三钠还原法制备直径为 40nm 的胶体金溶液,用 0.2M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 将溶液 pH 调到 pH7 ~ 10,缓慢搅拌,加入抗毒品单抗使其终浓度为 5 ~ 15 μg/ml,继续搅拌,再加入终浓度为 0.2% 酪蛋白钠,0.1% 聚乙二醇 20000 进行封闭 20-40 分钟,离心后弃上清,用胶体金工作液复溶至 70-80ml,按 1ml 溶液铺 14-18cm<sup>2</sup> 的比例均匀地铺在无纺布上,再置于温度 20 ~ 25℃、湿度小于 30% 的干燥间干燥 2 ~ 4 小时。

[0011] 所述的乳胶微球标记法包括以下的步骤:取红色乳胶微球,加入 0.1M pH6.5MES 混匀,加入 10mg/ml NHS 和 10mg/ml EDC·HCl,离心,去上清,沉淀用硼砂缓冲液重悬,振荡、超声处理即成活化后的乳胶微球;用 0.1M pH7 ~ 10 的硼砂缓冲液将毒品单抗稀释,然后加入活化乳胶微球,振荡、离心、去上清,沉淀用酪蛋白溶液重悬,经超声粉碎、振荡后,重复离心,去上清,沉淀重悬,再次超声粉碎、离心,沉淀加保存液悬浮,即为乳胶微球标记吗啡单克隆抗体结合物,用工作液稀释乳胶抗体结合物溶液,按 1ml 溶液铺 14-18cm<sup>2</sup> 的比例均匀地铺在无纺布上,再置于温度 20 ~ 25℃、湿度小于 30% 的干燥间干燥 2 ~ 4 小时。

[0012] 所述的纳米磁珠标记法包括以下的步骤:取磁珠,用 50mM MES(pH5.7) 配制成 1% 的纳米磁珠溶液,加入水溶性 EDC,35-40℃ 10min,再加入毒品单隆,35-40℃ 孵育 1.5 ~ 2.5 小时,然后用磁力架吸附磁珠,将缓冲液更换至 0.01M pH7.2 的 PBS,含 0.5% BSA,0.5% Tween,完成标记;再用工作液制成 0.3-0.7mg/ml 的溶液,按 1ml 溶液铺 20-24cm<sup>2</sup> 的比例均匀地铺在玻璃纤维膜上,干燥 2-4 小时。

[0013] 所述的胶体硒标记法包括以下的步骤:用抗坏血酸还原亚硒酸制备胶体硒溶液,以 0.2M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 将溶液 pH 调到 pH7 ~ 10,然后将溶液置于磁力搅拌器上缓慢搅拌,缓慢加入安非他命单克隆抗体使其终浓度为 5 ~ 15 μg/ml,继续搅拌,再加入 10% 的 BSA 至终浓度为 1% 进行封闭,12000 转离心,弃上清,用工作液复溶至原体积的 1/10,按 1ml 溶液铺 14-18cm<sup>2</sup> 的比例均匀地铺在无纺布上,再置于温度 20 ~ 25℃、湿度小于 30% 的干燥间干燥 2 ~ 4 小时。

[0014] 所述的 NC 膜 (5) 按如下方法进行制备:用 0.01M pH7.2PBS 将毒品合成免疫抗原分别稀释成 0.2 ~ 1.0mg/ml,然后用喷膜仪在 NC 膜上按 1.0-1.5 μl/cm 划线包被,同时包被羊抗鼠 IgG 抗体作为 C 线,包被完成后将 NC 膜置于干燥间干燥 8 ~ 10 小时。

[0015] 一种快速定量检测血液中毒品的的方法,该方法包括以下步骤:

[0016] (1) 加样:将被检血液样本平衡至室温,将制备好的试剂卡平放,向加样孔加入待检样本 10 ~ 20 μl,然后在上样垫上加稀释液 60 ~ 100 μl;

[0017] (2) 根据试剂条上线条的颜色强度以及免疫层析判读记录仪中内存的标准曲线,可定量检测出血液中毒品的浓度。

[0018] 具体的检测方法为:检测时将试剂条平放,向加样孔加入待检样本 10 ~ 20 μl,然后在上样垫上加稀释液 60 ~ 100 μl 或者直接在上样垫上加入待检样本进行检测;10-15

分钟后将试纸条放入配套的免疫层析判读记录仪中判读；若样本中含有毒品，则与固定在硝酸纤维素薄膜上的毒品合成免疫抗原竞争有限的标记抗体结合位点，当样本中毒品浓度达到一定量时，它将占据所有的抗体结合位点，因而阻止了检测区毒品抗原与其抗体的结合，这样，检测区无线条出现；若样本中不含毒品，其标记的抗体结合物将随同样品溶液在 NC 膜上扩散，与毒品合成免疫抗原结合呈现出一肉眼可见的线条；线条颜色强度可用配套的免疫层析判读记录仪定量测试；根据仪器内存标准曲线，可快速定量血液中的毒品含量，定量范围为 0 ~ 2000ng/mL，超过 2000ng/mL，可对样本进行适量稀释，同样可得到定量结果。

[0019] 与现有技术相比，本发明涉及快速定量检测血液中毒品的试剂条及方法具有如下优点和显著的进步：

[0020] (1) 多功能性：10 分钟可出定性结果，20 分钟可定量检测出血液中毒品含量；

[0021] (2) 快速定量：配套的免疫层析判读记录仪将人肉眼观察到检测区反应显色的颜色深浅程度进行了量化，根据仪器内存标准曲线，在一定的范围内，反应线条颜色的深浅与被测物的浓度可以呈现出一定的关系，20 分钟内即可准确对样本中毒品浓度进行定量；

[0022] (3) 可保存和追溯数据和图片：目前市场用于检测毒品的快速试剂由于本身的特点即在一定时间内显示的颜色有效，所以大多数都是看完结果后就把试剂卡扔弃了，本试剂配套的判读记录仪不仅能保存产品有效测试时间内判定结果的图像资料，也能保存原始的整个图像信息。

#### 附图说明

[0023] 图 1 为快速定量检测血液中毒品的试纸条结构示意图；

[0024] 图 2 为快速定量检测血液中毒品的试剂卡平面图；

[0025] 1、上样垫；2、标记物垫；3、检测线 T 线；4、质控线 C 线；5、硝酸纤维素 (NC) 膜；6、吸样垫；7、加样孔；8、塑料板。

#### 具体实施方式

[0026] 以下是本发明涉及快速定量检测血液中毒品的方法的具体实施例，对本发明的技术方案做进一步作描述，但是本发明的保护范围并不限于这些实施例。凡是不背离本发明构思的改变或等同替代均包括在本发明的保护范围之内。

[0027] 实施例 1 美沙酮胶体金检测试纸条的制备及检测应用

[0028] 1.1 胶体金标记美沙酮单克隆抗体标记物的制备

[0029] 用氯金酸 - 柠檬酸三钠还原法制备直径为 40nm 的胶体金溶液，制备完成后用 0.2MK<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 可将溶液 pH 调到 pH7 ~ 10，然后将溶液置于磁力搅拌器上缓慢搅拌，缓慢加入美沙酮单克隆抗体使其终浓度为 5 ~ 15 μg/ml。继续搅拌 1 小时，再加入终浓度为 0.2% 酪蛋白钠，0.1% 聚乙二醇 20000 进行封闭 30 分钟，12000 转离心 30 分钟，弃上清，用胶体金工作液复溶至 76.5ml，按 1ml 溶液铺 16cm<sup>2</sup> 的比例均匀地铺在无纺织物上，再置干燥间温度 20 ~ 25℃，湿度小于 30% 干燥 2 ~ 4 小时，制成标记物垫，备用。

[0030] 1.2 美沙酮合成免疫抗原包被

[0031] 用 0.01M pH7.2PBS 将美沙酮合成免疫抗原分别稀释成 0.2 ~ 1.0mg/ml，然后用喷

膜仪在 NC 膜上按  $1.3 \mu\text{l}/\text{cm}$  划线包被,同时包被羊抗鼠 IgG 抗体作为 C 线,包被完成后将 NC 膜置于干燥间干燥 3 ~ 4 小时,备用。

#### [0032] 1.3 试纸条的装配

[0033] 在干燥室内温度  $20 \sim 25^\circ\text{C}$ ,湿度小于 30%,取塑料支撑板,将已包被的 NC 膜放置在塑料支撑板的中部粘贴,在 NC 膜 T 线一侧搭接标记物垫,在标记物垫另一侧搭接粘贴上样垫;在 NC 膜 C 线一侧搭接吸样垫。然后用裁剪机将贴好的塑料板切成合适宽度的试纸条。最终结构为上样垫 1、标记物垫 2、NC 膜 5 和吸样垫 6 依次粘附于不吸水的支撑薄片 8,标记物垫 2 上包被有胶体金标记的美沙酮单抗,NC 膜 5 上分别包被有美沙酮合成免疫抗原构成的检测线 T 线 3 和羊抗鼠 IgG 抗体构成的质控线 C 线 4。参见图 1。

[0034] 最后,切好的试纸条装入塑料卡内,且塑料卡上设有上样孔 7,由此制成美沙酮检测试剂卡,参见图 2。快速定量检测血液中美沙酮的试纸条可以与免疫层析判读记录仪配套使用。

[0035] 1.4 检测方法:将被检血液样本平衡至室温,将制备好的试剂卡平放,向加样孔加入待检样本  $10 \sim 20 \mu\text{l}$ ,然后在上样垫上加稀释液  $60 \sim 100 \mu\text{l}$ ,或者直接在上样垫上加入 3 滴待检样本进行检测。10 分钟内观察定性结果,同时线条颜色强度可用配套的免疫层析判读记录仪定量测试。根据仪器内存标准曲线,10-15 分钟可定量检测出血液中的毒品浓度。

[0036] 1.5 结果判断:阴性,在检测线(T)和质控线(C)位置各出现一条色带。

[0037] 阳性,只在质控线(C)位置出现一条色带。

[0038] 无色带出现或仅在检测线位置出现一条色带,说明检测无效,应重新检测。定量范围为  $0 \sim 2000\text{ng}/\text{mL}$ ,超过  $2000\text{ng}/\text{mL}$ ,可对样本进行适量稀释,同样可得到定量结果。

#### [0039] 实施例 2 吗啡乳胶法检测试纸条的制备及检测应用

##### [0040] 2.1 乳胶微球标记吗啡单克隆抗体标记物的制备

[0041] 取红色乳胶微球 1ml,加入 9ml  $0.1\text{M}$  pH6.5MES 混匀,加入  $0.75\text{ml}$   $10\text{mg}/\text{ml}$ NHS 和  $1\text{ml}$   $10\text{mg}/\text{ml}$  EDC·HCl,离心 20min,去上清,沉淀用硼砂缓冲液重悬,振荡、超声处理即成活化后的乳胶微球。用  $0.1\text{M}$  硼砂缓冲液 (pH 8.5) 将吗啡单克隆抗体稀释成  $5\text{mg}/\text{ml}$ ,取适量吗啡单克隆抗体加入  $0.5\text{ml}$  活化乳胶微球,振荡、离心、去上清,沉淀用 1%酪蛋白溶液重悬,经超声粉碎、振荡后,重复离心 1 次,去上清,沉淀同上重悬,再次超声粉碎、离心,沉淀加保存液适量悬浮,即为乳胶微球标记吗啡单克隆抗体结合物,用工作液稀释乳胶抗体结合物溶液成合适浓度,按  $1\text{ml}$  溶液铺  $16\text{cm}^2$  的比例均匀地铺在无纺布上,再置干燥间温度  $20 \sim 25^\circ\text{C}$ ,湿度小于 30%干燥 2 ~ 4 小时,制成标记物垫,备用。

##### [0042] 2.2 吗啡合成免疫抗原包被

[0043] 用  $0.01\text{M}$  pH7.2PBS 将吗啡合成免疫抗原分别稀释成  $0.2 \sim 1.0\text{mg}/\text{ml}$ ,然后用喷膜仪在 NC 膜上按  $1.3 \mu\text{l}/\text{cm}$  划线包被,同时包被羊抗鼠 IgG 抗体作为 C 线,包被完成后将 NC 膜置于干燥间干燥 8 ~ 10 小时,备用。

##### [0044] 2.3 试纸条的装配

[0045] 在干燥室内温度  $20 \sim 25^\circ\text{C}$ ,湿度小于 30%,取塑料支撑板,将已包被的 NC 膜放置在塑料支撑板的中部粘贴,在 NC 膜 T 线一侧搭接标记物垫,在标记物垫另一侧搭接粘贴上样垫;在 NC 膜 C 线一侧搭接吸样垫。然后用裁剪机将贴好的塑料板切成合适宽度的试纸

条。最终结构为上样垫 1、标记物垫 2、NC 膜 5 和吸样垫 6 依次粘附于不吸水的支撑薄片 8，标记物垫 2 上包被有乳胶标记的吗啡单抗，NC 膜 5 上分别包被有吗啡合成免疫抗原构成的检测线 T 线 3 和羊抗鼠 IgG 抗体构成的质控线 C 线 4。参见图 1。

[0046] 最后，切好的试纸条装入塑料卡内，且塑料卡上设有上样孔 7，由此制成吗啡检测试剂卡，参见图 2。快速定量检测血液中吗啡的试纸条可以与免疫层析判读记录仪配套使用。

[0047] 2.4 检测方法：将被检血液样本平衡至室温，将制备好的试剂卡平放，向加样孔加入待检样本 10 ~ 20  $\mu$  l，然后在上样垫上加稀释液 60 ~ 100  $\mu$  l，或者直接在上样垫上加入 3 滴待检样本进行检测。10 分钟内观察定性结果，同时线条颜色强度可用配套的免疫层析判读记录仪定量测试。根据仪器内存标准曲线，10-15 分钟可定量检测出血液中的吗啡浓度。

[0048] 2.5 结果判断：阴性，在检测线 (T) 和质控线 (C) 位置各出现一条色带。

[0049] 阳性，只在质控线 (C) 位置出现一条色带。

[0050] 无色带出现或仅在检测线位置出现一条色带，说明检测无效，应重新检测。定量范围为 0 ~ 2000ng/mL，超过 2000ng/mL，可对样本进行适量稀释，同样可得到定量结果。

[0051] 实施例 3 氯胺酮纳米免疫磁珠检测试纸条的制备及检测应用

[0052] 3.1 纳米磁珠标记氯胺酮单克隆抗体标记物的制备

[0053] 取 10mg 磁珠，用 50mM MES (pH5.7) 配制成 1% 的纳米磁珠溶液，加入 0.5mg 水溶性 EDC，37 $^{\circ}$ C 10min，再加入适量氯胺酮单克隆抗体，37 $^{\circ}$ C 孵育 2 小时，然后用磁力架吸附磁珠，将缓冲液更换至 0.01M PBS (pH7.2)，含 0.5% BSA，0.5% Tween，完成标记。再用工作液制成 0.5mg/ml 的溶液，按 1ml 溶液铺 22cm<sup>2</sup> 的比例均匀地铺在玻璃纤维膜上，干燥 2-4 小时，制成纳米免疫磁珠 - 抗体标记物垫，备用。

[0054] 3.2 氯胺酮合成免疫抗原包被

[0055] 用 0.01M pH7.2PBS 将吗啡合成免疫抗原分别稀释成 0.2 ~ 1.0mg/ml，然后用喷膜仪在 NC 膜上按 1.3  $\mu$  l/cm 划线包被，同时包被羊抗鼠 IgG 抗体作为 C 线，包被完成后将 NC 膜置于干燥间干燥 8 ~ 10 小时，备用。

[0056] 3.3 试纸条的装配

[0057] 在干燥室内温度 20 ~ 25 $^{\circ}$ C，湿度小于 30%，取塑料支撑板，将已包被的 NC 膜放置在塑料支撑板的中部粘贴，在 NC 膜 T 线一侧搭接标记物垫，在标记物垫另一侧搭接粘贴上样垫；在 NC 膜 C 线一侧搭接吸样垫。然后用裁剪机将贴好的塑料板切成合适宽度的试纸条。最终结构为上样垫 1、标记物垫 2、NC 膜 5 和吸样垫 6 依次粘附于不吸水的支撑薄片 8，标记物垫 2 上包被有纳米免疫磁珠标记的氯胺酮单抗，NC 膜 5 上分别包被有氯胺酮合成免疫抗原构成的检测线 T 线 3 和羊抗鼠 IgG 抗体构成的质控线 C 线 4。参见图 1。

[0058] 最后，切好的试纸条装入塑料卡内，且塑料卡上设有上样孔 7，由此制成氯胺酮检测试剂卡，参见图 2。快速定量检测血液中氯胺酮的试纸条可以与免疫层析判读记录仪配套使用。

[0059] 3.4 检测方法：将被检血液样本平衡至室温，将制备好的试剂卡平放，向加样孔加入待检样本 10 ~ 20  $\mu$  l，然后在上样垫上加稀释液 60 ~ 100  $\mu$  l，或者直接在上样垫上加入 3 滴待检样本进行检测。10 分钟内观察定性结果，同时线条颜色强度可用配套的免疫层析

判读记录仪定量测试。根据仪器内存标准曲线,10-15分钟可定量检测出血液中的氯胺酮浓度。

[0060] 3.5 结果判断:阴性,在检测线(T)和质控线(C)位置各出现一条色带。

[0061] 阳性,只在质控线(C)位置出现一条色带。

[0062] 无色带出现或仅在检测线位置出现一条色带,说明检测无效,应重新检测。定量范围为0~2000ng/mL,超过2000ng/mL,可对样本进行适量稀释,同样可得到定量结果。

[0063] 实施例4 安非他命(摇头丸)胶体硒检测试纸条的制备及检测应用

[0064] 4.1 胶体硒标记安非他命单克隆抗体标记物的制备

[0065] 用抗坏血酸还原亚硒酸制备胶体硒溶液,以0.2MK<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>将溶液pH调到pH7~10,然后将溶液置于磁力搅拌器上缓慢搅拌,缓慢加入安非他命单克隆抗体使其终浓度为5~15μg/ml。继续搅拌1小时,再加入10%的BSA至终浓度为1%进行封闭30分钟,12000转离心30分钟,弃上清,用工作液复溶至原体积的1/10,按1ml溶液铺16cm<sup>2</sup>的比例均匀地铺在无无纺布上,再置干燥间温度20~25℃,湿度小于30%干燥2~4小时,制成硒标记物垫,备用。

[0066] 4.2 安非他命合成免疫抗原包被

[0067] 用0.01M pH7.2PBS将安非他命合成免疫抗原分别稀释成0.2~1.0mg/ml,然后用喷膜仪在NC膜上按1.3μl/cm划线包被,同时包被羊抗鼠IgG抗体作为C线,包被完成后将NC膜置于干燥间干燥8~10小时,备用。

[0068] 4.3 试纸条的装配

[0069] 在干燥室内温度20~25℃,湿度小于30%,取塑料支撑板,将已包被的NC膜放置在塑料支撑板的中部粘贴,在NC膜T线一侧搭接标记物垫,在标记物垫另一侧搭接粘贴上样垫;在NC膜C线一侧搭接吸样垫。然后用裁剪机将贴好的塑料板切成合适宽度的试纸条。最终结构为上样垫1、标记物垫2、NC膜5和吸样垫6依次粘附于不吸水的支撑薄片8,标记物垫2上包被有胶体硒标记的安非他命单抗,NC膜5上分别包被有安非他命合成免疫抗原构成的检测线T线3和羊抗鼠IgG抗体构成的质控线C线4。参见图1。

[0070] 最后,切好的试纸条装入塑料卡内,且塑料卡上设有上样孔7,由此制成安非他命检测试剂卡,参见图2。快速定量检测血液中安非他命的试纸条可以与免疫层析判读记录仪配套使用。

[0071] 4.4 检测方法:将被检血液样本平衡至室温,将制备好的试剂卡平放,向加样孔加入待检样本10~20μl,然后在上样垫上加稀释液60~100μl,或者直接在上样垫上加入3滴待检样本进行检测。10分钟内观察定性结果,同时线条颜色强度可用配套的免疫层析判读记录仪定量测试。根据仪器内存标准曲线,10-15分钟可定量检测出血液中的安非他命浓度。

[0072] 4.5 结果判断:阴性,在检测线(T)和质控线(C)位置各出现一条色带。

[0073] 阳性,只在质控线(C)位置出现一条色带。

[0074] 无色带出现或仅在检测线位置出现一条色带,说明检测无效,应重新检测。定量范围为0~2000ng/mL,超过2000ng/mL,可对样本进行适量稀释,同样可得到定量结果。

[0075] 实施例5 甲基安非他命(冰毒)金标免疫渗滤法试剂的制备

[0076] 5.1 胶体金标记抗原的制备

[0077] 取 10ml 胶体金溶液,加入 0.2MK<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 将溶液 pH 调到 pH7 ~ 10,然后加入适量的冰毒合成抗原溶液,室温摇动 15min,然后加入终浓度为 0.2%的聚乙二醇 20000 和终浓度为 1%的牛血清白蛋白,继续搅拌 15min,然后置 4℃冰箱 2h,于 4℃、10000r/min 离心 20min,弃上清,用稀释液恢复到原体积,于 4℃、10000r/min 离心 20min,弃部分上清液至金标抗原恢复到原体积的 1/10,放置在 4℃冰箱备用。

#### [0078] 5.2 硝酸纤维膜抗体包被

[0079] 将硝酸纤维素膜裁剪成 1×1cm,将冰毒合成免疫抗原产生的抗体用 0.01mol/LPBS(pH7.2) 稀释成 1 : 20,然后取 1μl 点在硝酸纤维膜检测点,同时将羊抗鼠 IgG 抗体稀释成合适比例,点在硝酸纤维膜指控点,室温包被 15min,然后浸在含 1% BSA 0.01mol/LPBS(pH7.2) 中室温封闭 10min,取出晾干,将其放入装有多层吸水纸的单项测试盒,4℃密封保存备用。

#### [0080] 5.3 试纸条的装配

[0081] 在干燥室内温度 20 ~ 25℃,湿度小于 30%,取塑料支撑板,将已包被的 NC 膜放置在塑料支撑板的中部粘贴,在 NC 膜 T 线一侧搭接标记物垫,在标记物垫另一侧搭接粘贴上样垫;在 NC 膜 C 线一侧搭接吸样垫。然后用裁剪机将贴好的塑料板切成合适宽度的试纸条。最终结构为上样垫 1、标记物垫 2、NC 膜 5 和吸样垫 6 依次粘附于不吸水的支撑薄片 8,标记物垫 2 上包被有胶体硒标记的甲基安非他命单抗,NC 膜 5 上分别包被有甲基安非他命合成免疫抗原构成的检测线 T 线 3 和羊抗鼠 IgG 抗体构成的质控线 C 线 4。参见图 1。

[0082] 最后,切好的试纸条装入塑料卡内,且塑料卡上设有上样孔 7,由此制成安非他命检测试剂卡,参见图 2。快速定量检测血液中安非他命的试纸条可以与免疫层析判读记录仪配套使用。

#### [0083] 5.4 检测方法

[0084] 取适量待测血液样本加入装置孔内,待渗入,然后取适量金标抗原加入孔内,待渗入。最后加入 200μl 洗涤液,待渗入,10 分钟后观察结果。

#### [0085] 5.5 结果判断

[0086] 阴性,在检测点和质控点位置各出现一个红色圆点。

[0087] 阳性,只在质控点位置出现一个红色圆点。

[0088] 无红色圆点出现或仅在检测点位置出现一个红色圆点,说明检测无效,应重新检测。

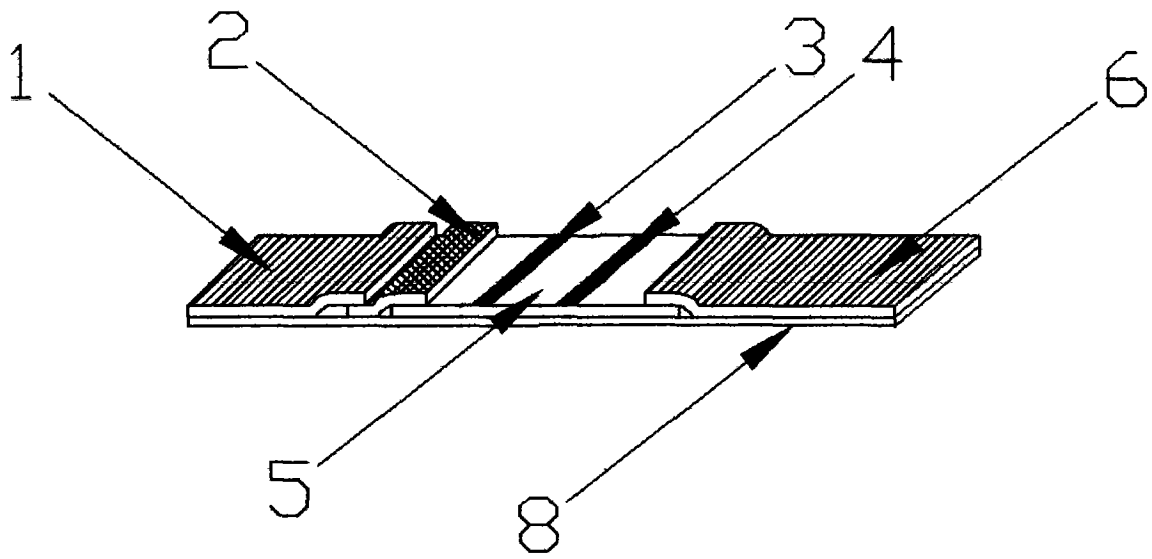


图 1

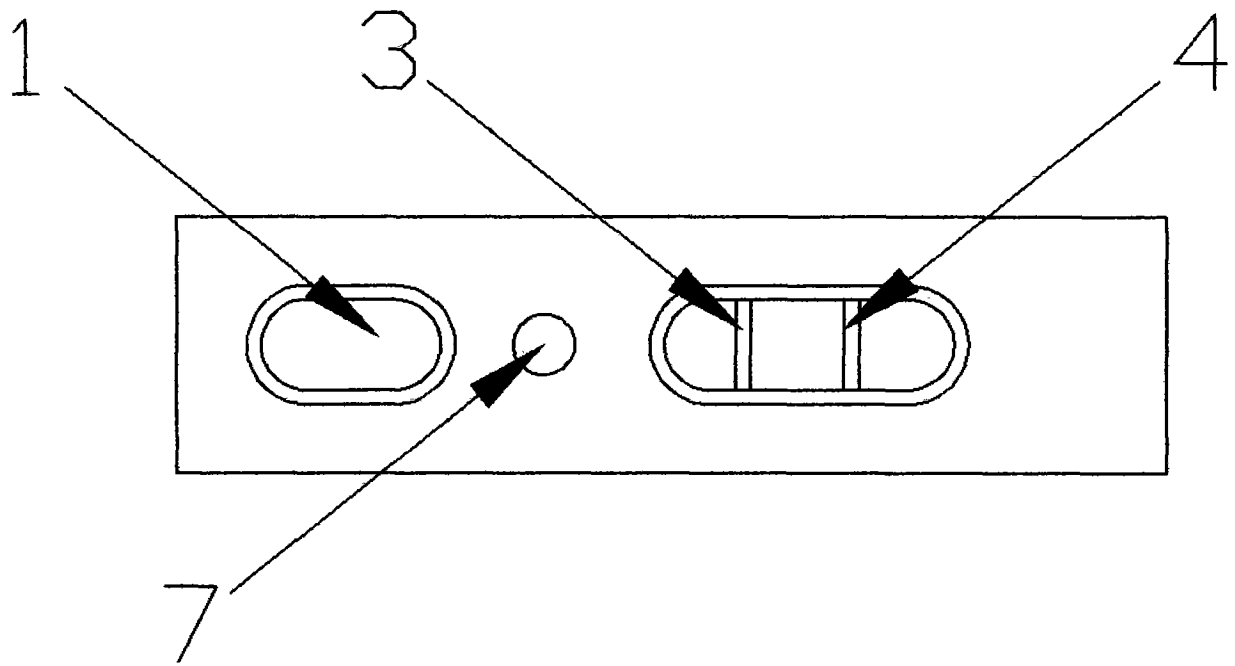


图 2

专利名称(译)	一种快速定量检测血液中毒品的试纸条及检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN102890152A</a>	公开(公告)日	2013-01-23
申请号	CN201110203017.3	申请日	2011-07-20
[标]申请(专利权)人(译)	天津中新科炬生物制药有限公司		
申请(专利权)人(译)	天津中新科炬生物制药有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	天津中新科炬生物制药有限公司		
[标]发明人	李洲 许俊艳		
发明人	李洲 许俊艳		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/532 G01N33/543		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

一种快速定量检测血液中毒品的试纸条及检测方法，所述的试纸条包括上样垫、标记物垫、NC膜、吸样垫和支撑薄片，所述的上样垫、标记物垫、NC膜和吸样垫依次粘附于不吸水的支撑薄片，标记物垫上包被有标记的抗毒品单抗，NC膜上分别包被有毒品合成免疫抗原构成的检测线T线和羊抗鼠IgG抗体构成的质控线C线。该试纸条具有简便、准确、快速定量、灵敏度和特异性高、经济实用、适合于现场检测等优点。

