



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102213719 A

(43) 申请公布日 2011. 10. 12

(21) 申请号 201010138484. 8

(22) 申请日 2010. 04. 02

(71) 申请人 北京库尔科技有限公司

地址 102206 北京市昌平区生命园路 29 号 C
座 100 号

(72) 发明人 李峰 陈立柱

(51) Int. Cl.

G01N 33/558(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

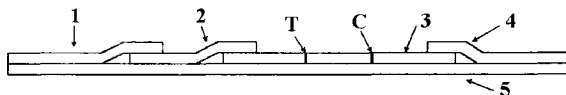
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

氟硝西洋检测试剂盒及其制备方法

(57) 摘要

本发明属于生物学免疫方法的测定技术领域,特别涉及一种氟硝西洋检测试剂盒及其制备方法。试剂盒包括样品垫(1)、胶体金垫(2)、硝酸纤维素膜(3)、吸样垫(4)和PVC支撑板(5)。胶体金垫为胶体金标记的抗氟硝西洋多抗玻璃纤维(或无纺布),硝酸纤维素膜上依次包被了氟硝西洋偶联抗原作为检测线(T线),羊抗兔IgG抗体作为质控线(C线)。本发明采用胶体金免疫层析技术制备氟硝西洋检测试剂盒,制备方法简单,可用于检测样本中可能存在的氟硝西洋,具有使用方便、操作简单、反应迅速、经济实用等特点。



1. 一种氟硝西洋检测试剂盒及其制备方法,其特征在于由样品垫、胶体金垫、硝酸纤维素膜、吸样垫和 PVC 支撑板组成,样品垫、胶体金垫、硝酸纤维素膜、吸样垫依次粘贴在 PVC 支撑板上,胶体金垫为胶体金标记的抗氟硝西洋多抗玻璃纤维或无纺布,硝酸纤维素膜上依次包被了氟硝西洋偶联抗原作为检测线(T线),羊抗兔 IgG 抗体作为质控线(C线)。

2. 一种权利要求 1 所述的氟硝西洋检测试剂盒及其制备方法,其特征在于所述的样品垫为玻璃纤维或无纺布,吸样垫为吸水滤纸。

3. 一种权利要求 1 所述的氟硝西洋检测试剂盒及其制备方法,其特征在于所述的氟硝西洋偶联抗原为氟硝西洋与牛血清蛋白的偶联物,抗氟硝西洋多抗由氟硝西洋偶联抗原免疫获得。

4. 一种权利要求 1 所述的氟硝西洋检测试剂盒及其制备方法,其特征在于所述的胶体金是由氯金酸(HAuCl_4)在还原剂枸橼酸三钠作用下制成大小为 20-40nm 的胶体金颗粒。

5. 一种权利要求 1 所述的氟硝西洋检测试剂盒及其制备方法,其特征在于所述的胶体金垫的制备方法为:取颗粒大小为 20-40nm 的胶体金溶液 5ml,用 0.1mol/L K_2CO_3 将胶体金溶液的 pH 值调至 9.0,室温放置 10 分钟;逐滴加入蛋白浓度为 0.2mg/ml 的抗氟硝西洋多抗 0.04ml,混合均匀,室温放置 30 分钟;加入 0.075ml 10%牛血清蛋白(BSA)溶液,混合均匀,室温放置 10 分钟;11000 转离心 30 分钟,仔细吸取上清液,弃去,用含 5%蔗糖的 0.002mol/L pH 9.0 的硼酸盐缓冲液 5mL 复溶,重复 2 次;最后用硼酸盐缓冲液溶解至 3mL,得到抗氟硝西洋多抗-胶体金标记物;将抗氟硝西洋多抗-胶体金标记物按 1mL 铺 56cm² 的比例均匀铺在无纺布上,再置干燥间,在温度 38℃,湿度小于 30%的条件下干燥 2-4 小时,制成胶体金垫。

6. 一种权利要求 1 所述的氟硝西洋检测试剂盒及其制备方法,其特征在于所述的硝酸纤维素膜上的两条线的包被方法为:设定划膜仪涂覆参数 1 $\mu\text{L}/\text{cm}$,分别用微量进样器取 0.2mL 氟硝西洋偶联抗原、羊抗兔 IgG,按顺序接到划膜仪的 A、B 管道接口。将贴有硝酸纤维素膜的 PVC 板置于划膜仪的往复运动平台上,开启划膜仪,在硝酸纤维素膜上涂覆氟硝西洋偶联抗原(T线)、羊抗兔 IgG(C线)。划线后将硝酸纤维素膜烘箱中,温度 38℃,干燥 24 小时,备用。

7. 一种权利要求 1 所述的氟硝西洋检测试剂盒及其制备方法,其特征在于所述的氟硝西洋检测试剂盒的组装方法为:将样品垫、胶体金垫、硝酸纤维素膜、吸样垫由一端依次黏附在 PVC 支撑板上,即可形成检测氟硝西洋的试剂条,试剂条也可以装入塑料卡中形成卡型包装。

氟硝西洋检测试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明是涉及生物学免疫方法的测定技术领域,特别是涉及一种以胶体金免疫层析法快速检测氟硝西洋检测试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 氟硝西洋 (Flunitrazepam) 属本二氮卓类镇静催眠药,俗称“十字架”,又名氟硝安定;氟甲硝基安定;氟硝基二氮卓。为较强的镇静催眠药,其作用与硝基安定相似,但比它强,亦有较强的肌肉松弛作用。用于术前镇静及各种失眠症。催眠作用开始快,可持续 5~7 小时;用作静脉麻醉药(单用或诱导麻醉),诱导时间较长,约 135 秒,但效果满意;与肌松药——箭毒合用,可稳定麻醉达 1~2 小时。吸食氟硝西洋,具有较强的镇静、催眠作用,诱导睡眠迅速,可持续睡眠 5-7 小时。氟硝安定通常与酒精合并滥用,滥用后可使受害者在药物作用下无能力反抗而被强奸和抢劫,并对所发生的事情失忆。因此近年来被受到特别关注,美国 1992 年已将氟硝西洋列为违禁药物。氟硝安定与酒精和其它镇静催眠药合用后可导致中毒死亡。据美国急诊室报告因滥用氟硝西洋死亡案例由 1994 年的 13 例上升至 1999 年的 540 例。

[0003] 氟硝西洋是麻醉后犯罪案件中常用的药物,为确定案件的性质,常需进行受害人血、尿等体液中药物或其代谢物的检测。目前,国内外有关氟硝西洋的检测主要有高效液相色谱法 (HPLC)、气相色谱法 (GC)、高效薄层色谱法 (HPTLC) 等方法,这些方法虽然检测的灵敏度较高,检测结果准确,但是需要昂贵的仪器设备,对检测材料的要求也高,需要提纯处理后才能进行,且需要培训专门的实验人员,另外这些方法均不适合高通量、现场的快速检测。因此研究具有快速、便携等优点的检测方法具有现实意义。

[0004] 本发明采用胶体金免疫层析技术,制备一种快速检测氟硝西洋的试剂盒。这种方法开始于上个世纪 90 年代中期,是在免疫渗滤法的基础上发展起来的,是免疫亲和技术、印刷技术、免疫标记技术和层析技术的结合。这种方法不仅具有敏感、特异、便捷、快速等特点,而且适合基层和现场使用。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种便携、快速、适合于现场检测氟硝西洋的试剂盒,用于检测血、尿等体液中氟硝西洋。

[0006] 本发明提供了一种氟硝西洋检测试剂盒。包括样品垫 (1)、紧密连接于样品垫一端的含有标记抗氟硝西洋多抗的胶体金垫 (2),与胶体金垫的另一端紧密相连的硝酸纤维素膜 (3) 和紧密连接于硝酸纤维素膜另一端的吸样垫 (4)。硝酸纤维素膜包被了两条线,其中一条包被了氟硝西洋偶联抗原的检测线 (T 线) (6),一条包被了羊抗兔 IgG 抗体的质控线 (C 线) (7)。样品垫、胶体金垫、硝酸纤维素膜和吸样垫粘贴在 PVC 支撑板 (5) 上形成试剂条,试剂条也可以装入塑料卡中形成卡型包装。

[0007] 本发明还提供了一种氟硝西洋检测试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

[0008] (1) 制备氟硝西洋偶联抗原

[0009] 将氟硝西洋与牛血清蛋白分子进行偶联,作为氟硝西洋偶联抗原。

[0010] (2) 制备抗氟硝西洋多抗

[0011] 用氟硝西洋偶联抗原采用常规方法免疫制得抗氟硝西洋多抗。

[0012] (3) 制备胶体金颗粒

[0013] 取 0.01% 的氯金酸水溶液 100mL,加热煮沸。根据需要迅速加入 1% 枸橼酸三钠水溶液 0.75mL,继续煮沸约 5min,出现橙红色。这样制成的胶体金颗粒的大小为 20-40nm。

[0014] (4) 制备胶体金垫

[0015] 取颗粒大小为 20-40nm 的胶体金溶液 5ml,用 0.1mol/L K_2CO_3 将胶体金溶液的 pH 值调至 9.0,室温放置 10 分钟;逐滴加入蛋白浓度为 0.2mg/ml 的抗氟硝西洋多抗 0.04ml,混合均匀,室温放置 30 分钟;加入 0.075ml 10% 牛血清蛋白 (BSA) 溶液,混合均匀,室温放置 10 分钟;11000 转离心 30 分钟,仔细吸取上清液,弃去,用含 5% 蔗糖的 0.002mol/L pH 9.0 的硼酸盐缓冲液 5mL 复溶,重复 2 次;最后用硼酸盐缓冲液溶解至 3mL,得到抗氟硝西洋多抗-胶体金标记物;将抗氟硝西洋多抗-胶体金标记物按 1mL 铺 56cm² 的比例均匀铺在无纺布上,再置干燥间,在温度 38℃,湿度小于 30% 的条件下干燥 2-4 小时,制成胶体金垫。

[0016] (5) 包被氟硝西洋偶联抗原、羊抗兔 IgG

[0017] 设定划膜仪涂覆参数 1 μ L/cm,分别用微量进样器取 0.2mL 氟硝西洋偶联抗原、羊抗兔 IgG,按顺序接到划膜仪的 A、B 管道接口。将贴有硝酸纤维素膜的 PVC 板置于划膜仪的往复运动平台上,开启划膜仪,在硝酸纤维素膜上涂覆氟硝西洋偶联抗原 (T 线)、羊抗兔 IgG (C 线)。划线后将硝酸纤维素膜烘箱中,温度 38℃,干燥 24 小时,备用。

[0018] (6) 试剂盒的组装

[0019] 将样品垫、胶体金垫、硝酸纤维素膜、吸样垫由一端依次黏附在 PVC 支撑板上,即可形成检测氟硝西洋的试剂条,试剂条也可以装入塑料卡中形成卡型包装。

[0020] 本发明采用层析式一步竞争法,运用氟硝西洋偶联抗原与被测样品中可能含有的氟硝西洋竞争结合金标抗氟硝西洋多抗的原理检测氟硝西洋。检测样品时,样品因毛细管作用向吸样垫一端层析。若被测样品中含有氟硝西洋,它们将和检测线 (T 线) 上包被的氟硝西洋偶联抗原竞争有限的抗体结合位点,当样品中的氟硝西洋达到一定浓度时,与胶体金标记的抗氟硝西洋多抗发生免疫反应并完全饱和,此时胶体金复合物已无空余的位点和检测线上包被的氟硝西洋偶联抗原结合,此时 T 线不显色,此为阳性结果。若被测样品中不含氟硝西洋,标记了抗氟硝西洋多抗的胶体金颗粒将随同样品层析至 T 线位置后,与 T 线上包被的氟硝西洋偶联抗原发生免疫结合反应,胶体金颗粒在 T 线位置堆积使得 T 线呈现出肉眼可见的红色条带,此为阴性结果。无论被测样品中是否含有氟硝西洋,胶体金标记物均会与包被在质控线 (C 线) 上的羊抗兔 IgG 结合而显色,C 线显色是判定是否有足够样本,层析过程是否正常的标准,同时也作为试剂的内控标准。

[0021] 本发明所述试剂盒的检测方法为:将被检样品平衡至室温;取出氟硝西洋检测装置,水平放置;在样品垫中加入 2-3 滴样品,10 分钟时观察并记录 C、T 线的显色情况,判断检测结果。

[0022] 本发明所述的试剂盒采用胶体金免疫层析技术测定氟硝西洋,检测时,将被测样品加在试纸条 (卡) 上的样品垫上,可以直接观察到免疫反应的结果,完成样品检测。本发

明可用于检测样本中可能存在的氟硝西洋,具有使用方便、操作简单、反应迅速、经济实用等特点。

附图说明

[0023] 图 1 氟硝西洋检测试剂盒结构示意图;

[0024] 附图符号说明:

[0025] 1:样品垫;

[0026] 2:含有标记抗氟硝西洋多抗的胶体金垫;

[0027] 3:硝酸纤维素膜(T:包被了氟硝西洋偶联抗原的检测线;C:包被了羊抗兔 IgG 的质控线);

[0028] 4:吸样垫;

[0029] 5:PVC 支撑板;

[0030] 图 2 本发明试剂盒的检测结果示意图。

[0031] 自左至右依次为 C 一条线阳性检测结果,T、C 两条线阳性检测结果;T、C 两条线阴性检测结果;无效。

具体实施方式:

[0032] 实施例 1:氟硝西洋检测试剂盒的制备

[0033] (1) 制备氟硝西洋偶联抗原

[0034] 将氟硝西洋与牛血清蛋白分子进行偶联,作为氟硝西洋偶联抗原。

[0035] (2) 制备抗氟硝西洋多抗

[0036] 用氟硝西洋偶联抗原采用常规方法免疫制得抗氟硝西洋多抗。

[0037] (3) 制备胶体金颗粒

[0038] 取 0.01%的氯金酸水溶液 100mL,加热煮沸。根据需要迅速加入 1%枸橼酸三钠水溶液 1.0mL,继续煮沸约 5min,出现橙红色。这样制成的胶体金颗粒的大小为 20-40nm。

[0039] (4) 制备胶体金垫

[0040] 取颗粒大小为 20-40nm 的胶体金溶液 5ml,用 0.1mol/L K_2CO_3 将胶体金溶液的 pH 值调至 9.0,室温放置 10 分钟;逐滴加入蛋白浓度为 0.2mg/ml 的抗氟硝西洋多抗 0.04ml,混合均匀,室温放置 30 分钟;加入 0.075ml 10%牛血清蛋白(BSA)溶液,混合均匀,室温放置 10 分钟;11000 转离心 30 分钟,仔细吸取上清液,弃去,用含 5%蔗糖的 0.002mol/L pH 9.0 的硼酸盐缓冲液 5mL 复溶,重复 2 次;最后用硼酸盐缓冲液溶解至 3mL,得到抗氟硝西洋多抗-胶体金标记物;将抗氟硝西洋多抗-胶体金标记物按 1mL 铺 56cm² 的比例均匀铺在无纺布上,再置干燥间,在温度 38℃,湿度小于 30%的条件下干燥 2-4 小时,制成胶体金垫。

[0041] (5) 包被氟硝西洋偶联抗原、羊抗兔 IgG

[0042] 设定划膜仪涂覆参数 1 μ L/cm,分别用微量进样器取 0.2mL 氟硝西洋偶联抗原、羊抗兔 IgG,按顺序接到划膜仪的 A、B 管道接口。将贴有硝酸纤维素膜的 PVC 板置于划膜仪的往复运动平台上,开启划膜仪,在硝酸纤维素膜上涂覆氟硝西洋偶联抗原(T 线)、羊抗兔 IgG(C 线)。划线后将硝酸纤维素膜烘箱中,温度 38℃,干燥 24 小时,备用。

[0043] (6) 试剂盒的组装

[0044] 将样品垫、胶体金垫、硝酸纤维素膜、吸样垫由一端依次黏附在 PVC 支撑板上,即可形成检测氟硝西洋的试剂条,试剂条也可以装入塑料卡中形成卡型包装。

[0045] 实施例 2 :氟硝西洋检测试剂盒的要求

[0046] (1) 阴性参考品符合率

[0047] 用磷酸缓冲溶液 (PBS :0.01mol/L、pH 7.5) 配制浓度为 100ng/mL 的苯丙胺标准溶液进行 10 次平行检验,10 分钟时观察检测结果,T、C 线均呈现红色条带且显色度均一,结果为阴性。

[0048] 用磷酸缓冲溶液 (PBS :0.01mol/L、pH 7.5) 配制浓度为 100ng/mL 的巴比妥标准溶液进行 10 次平行检验,10 分钟时观察检测结果,T、C 线均呈现红色条带且显色度均一,结果为阴性。

[0049] (2) 阳性参考品符合率

[0050] 用磷酸缓冲溶液 (PBS :0.01mol/L、pH 7.5) 配制浓度为 20、50、100ng/mL 的氟硝西洋标准品,各浓度分别进行 10 次平行检验,10 分钟时观察检测结果,T 线不显色,C 线均呈现红色,结果为阳性。

[0051] (3) 最低检出量

[0052] 用磷酸缓冲溶液 (PBS :0.01mol/L、pH 7.5) 配制浓度为 0、5、10、15、20、25ng/mL 的氟硝西洋标准品,各浓度分别进行 10 次平行检验,10 分钟时观察检测结果,0、5ng/mL 的氟硝西洋标准品的检测结果为 T、C 线均显色且显色度均一,为阴性结果;10、15ng/mL 的氟硝西洋标准品的检测结果为 T、C 线均显色且 T 线颜色浅于 C 线颜色,判定为阳性检测结果;20、25ng/mL 的氟硝西洋标准品的检测结果为 T 线不显色,C 线显色,为阳性结果。最低检出量不高于 10ng/mL。

[0053] (4) 重复性

[0054] 用磷酸缓冲溶液 (PBS :0.01mol/L、pH 7.5) 配制浓度为 20ng/mL 的氟硝西洋标准品,进行 10 次平行检验,10 分钟时观察检测结果,结果均为阳性,显色度均一。

[0055] (5) 稳定性

[0056] 37℃放置 10 天后,各项指标均符合以上要求。

[0057] 实施例 3 :氟硝西洋检测试剂盒的检测方法

[0058] (1) 样品制备

[0059] 血清 :抽取血清,离心或静置后取透明上清液使用;若血清过度溶血现象,将血清用蒸馏水稀释一倍后再进行实验,否则试剂片红色太深,影响测试结果。

[0060] 尿液 :用尿液直接进行测试,若尿液呈可见的混浊状,需先离心、过滤或待其沉淀后取上清液检测。

[0061] (2) 操作

[0062] 取出氟硝西洋检测装置,水平放置;在样品垫上滴入 2-3 滴样品,10 分钟时观察并记录 C、T 线的显色情况,判断检测结果。

[0063] (3) 结果判定

[0064] 阳性 :

[0065] T 线不显色,C 线呈现红色条带,判定为阳性结果,说明被测样品中氟硝西洋的含量高于 20ng/mL ;

[0066] T 线、C 线都显色,且 T 线颜色浅于 C 线颜色,说明被测样品中氟硝西洋的含量在 10-20ng/mL 之间。

[0067] 阴性:

[0068] T 线、C 线都呈现红色条带,且 T 线颜色等于或深于 C 线颜色,说明样品中氟硝西洋的含量低于 10ng/mL。

[0069] 无效:

[0070] C 线不显色,说明不正确操作或试剂盒已经变质损坏。

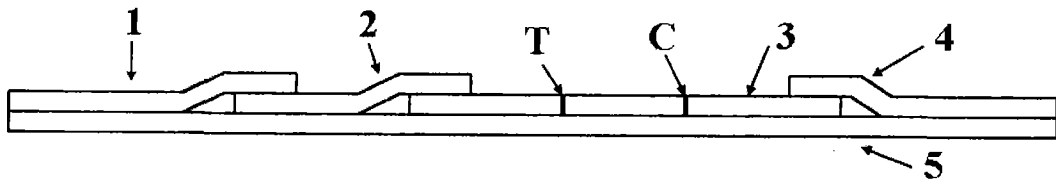


图 1

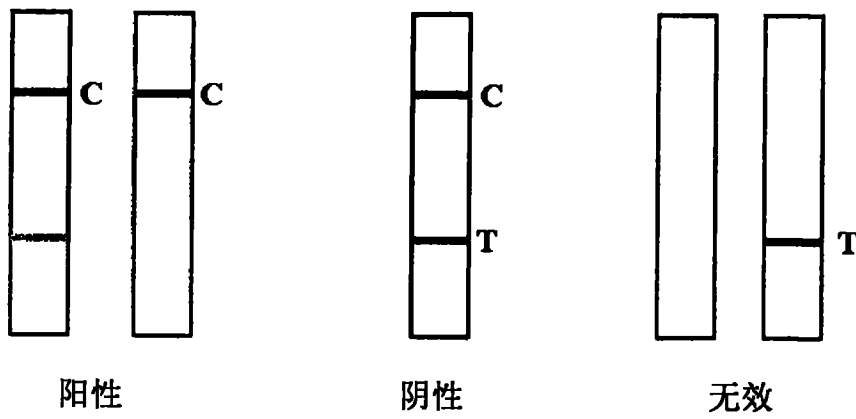


图 2

专利名称(译)	氟硝西泮检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN102213719A	公开(公告)日	2011-10-12
申请号	CN201010138484.8	申请日	2010-04-02
[标]发明人	李峰 陈立柱		
发明人	李峰 陈立柱		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/532		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于生物学免疫方法的测定技术领域，特别涉及一种氟硝西泮检测试剂盒及其制备方法。试剂盒包括样品垫(1)、胶体金垫(2)、硝酸纤维素膜(3)、吸样垫(4)和PVC支撑板(5)。胶体金垫为胶体金标记的抗氟硝西泮多抗玻璃纤维(或无纺布)，硝酸纤维素膜上依次包被了氟硝西泮偶联抗原作为检测线(T线)，羊抗兔IgG抗体作为质控线(C线)。本发明采用胶体金免疫层析技术制备氟硝西泮检测试剂盒，制备方法简单，可用于检测样本中可能存在的氟硝西泮，具有使用方便、操作简单、反应迅速、经济实用等特点。

