



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102539765 A

(43) 申请公布日 2012. 07. 04

(21) 申请号 201010610904. 8

(22) 申请日 2010. 12. 29

(71) 申请人 北京宝瑞源科技孵化有限公司  
地址 102433 北京市房山区窦大路九区 30 号

(72) 发明人 陈立柱 李峰 杨利

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/558(2006. 01)

G01N 33/543(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

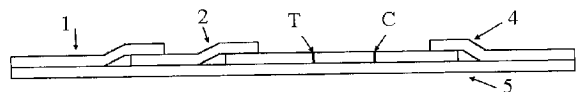
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

三唑仑检测试剂盒及其制备方法

(57) 摘要

一种用于检测三唑仑的检测试剂盒,该试剂盒包括样品垫(1)、胶体金垫(2)、硝酸纤维素膜(3)、吸样垫(4)和PVC支撑板(5),在PVC支撑板上依次连续粘附有样品垫、胶体金垫、硝酸纤维素膜和吸样垫,所述胶体金垫为胶体金标记的三唑仑单克隆抗体聚酯膜,所述硝酸纤维素膜上依次包被了三唑仑-牛血清蛋白偶联抗原作为检测线(T线),羊抗鼠IgG多克隆抗体作为质控线(C线)。本发明采用胶体金免疫层析技术制备三唑仑检测试剂盒,用于检测样本中可能存在的三唑仑,本试剂盒制备方法简单,具有使用方便、反应迅速、经济实用等特点。



1. 一种三唑仑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、硝酸纤维素膜和吸样垫紧密粘附在 PVC 支撑板上;所述样品垫为玻璃纤维;所述胶体金垫为胶体金标记的三唑仑单克隆抗体聚酯膜;所述硝酸纤维素膜上依次包被了三唑仑-牛血清白蛋白偶联抗原作为检测线(T线),羊抗鼠 IgG 多克隆抗体作为质控线(C线);所述吸样垫为吸水纸。

2. 一种权利要求 1 所述的三唑仑检测试剂盒及其制备方法,其特征在于所述的三唑仑单克隆抗体由三唑仑-牛血清蛋白偶联抗原作为免疫原免疫 BALB/C 小鼠获得。

3. 一种权利要求 1 所述的三唑仑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( $\text{HAuCl}_4$ )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。

4. 一种权利要求 1 所述的三唑仑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,用 0.1mol/L  $\text{K}_2\text{CO}_3$  将胶体金溶液的 pH 值调至 7.0-9.0,室温放置 30 分钟;在上述溶液中加入三唑仑单克隆抗体,使三唑仑单克隆抗体的浓度为 10-60  $\mu\text{g}/\text{ml}$  胶体金,混合均匀后,室温放置 30 分钟;加入 10% 的牛血清蛋白(BSA)溶液使其浓度为 10-60  $\mu\text{l}/\text{ml}$ ,混合均匀,室温放置 30 分钟;12000 转离心 30 分钟,仔细吸取上清液,弃去,剩余的沉淀用初始胶体金体积的胶体金复溶液溶解;12000 转离心 30 分钟,仔细吸取上清液,弃去,剩余的沉淀用 30%-100% 初始胶体金体积的胶体金复溶液溶解,得到三唑仑单克隆抗体-胶体金标记物;将三唑仑单克隆抗体-胶体金标记物按 1mL 铺 40-70 $\text{cm}^2$  聚酯膜的比例均匀铺在聚酯膜上,再置干燥间,在温度 38 $^{\circ}\text{C}$ ,湿度小于 30% 的条件下干燥 24 $\pm$ 2 小时,制成胶体金垫。

5. 一种权利要求 1 及权利要求 5 所述的三唑仑检测试剂盒及其制备方法,其特征在于所述的胶体金复溶液为含 0.01-0.1% 的 Tris, 1.0-3.0% 的蔗糖、0.1-1.0% 的 BSA 的 0.02M pH7.0-9.0 的磷酸盐缓冲溶液。

6. 一种权利要求 1 所述的三唑仑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浓度为 0.5-5.0mg/ml 的三唑仑-牛血清蛋白偶联抗原、取浓度为 0.5-5.0mg/ml 羊抗鼠 IgG 多克隆抗体,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三唑仑-牛血清蛋白偶联抗原(T线)、羊抗鼠 IgG 多克隆抗体(C线)。划线后于温度 38 $^{\circ}\text{C}$  的烘箱中干燥 24 $\pm$ 2 小时,保存,备用。

## 三唑仑检测试剂盒及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物学免疫方法的测定技术领域,特别是涉及一种利用胶体金免疫层析技术制作的一种三唑仑检测试剂盒及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 三唑仑又名海乐神、酣乐欣,淡蓝色片,是一种强烈的麻醉药品,口服后可以迅速使人昏迷晕倒,故俗称迷药、蒙汗药、迷魂药。可以伴随酒精类共同服用,也可溶于水及各种饮料中。见效迅速,药效比普通安定强 45-100 倍。三唑仑是当前国内最常用的苯二氮卓类药物之一,常被犯罪分子用于麻醉抢劫和麻醉凶杀。据报道,三唑仑在体内吸收代谢快,其主要代谢产物是  $\alpha$ -羟基三唑仑。由于三唑仑剂量少,在生物检材中的三唑仑及其代谢产物含量均很低,因此对其提取检验困难。

[0003] 有关三唑仑的检测方法有很多,例如:高效液相色谱法、气相色谱法、气相色谱-质谱联用法等方法,这些方法虽然检测的灵敏度较高,检测结果准确,但是存在需要昂贵的仪器设备,对检测材料的要求高,需要提纯处理等限制。因此研究具有快速、便携等优点的检测方法具有现实意义。本发明介绍了一种以胶体金免疫层析法快速检测三唑仑的检测试剂盒及其制备方法,该方法具有简单、快速,无需任何仪器设备,经济实用等特点,适用于快速定性检测样本中是否含有三唑仑。

[0004] 胶体金免疫层析技术是 20 世纪九十年代以来在单克隆抗体技术、免疫层析技术及胶体金显色技术基础上发展起来的一项新型体外诊断技术。基于胶体金免疫层析技术可以制备胶体金试纸,胶体金试纸的原理是应用胶体金标记技术,以胶体金为示踪物,利用抗原抗体特异性结合反应,利用特定的显色反应在试纸上的显色而判定检测的结果,具有操作简单、检测快速、灵敏度高、特异性强,无须复杂的仪器等特点。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种简单、快捷、灵敏度高、特异性强的三唑仑试剂盒及其制备方法,用于检测待检样本中是否含有三唑仑。

[0006] 一种用于检测三唑仑的检测试剂盒,包括样品垫、胶体金垫、硝酸纤维素膜、吸样垫和 PVC 支撑板,在 PVC 支撑板上依次紧密粘附有样品垫、胶体金垫、硝酸纤维素膜和吸样垫。所述样品垫为玻璃纤维;所述胶体金垫为胶体金标记的三唑仑单克隆抗体聚酯膜;所述硝酸纤维素膜上依次包被有检测线(T线)和质控线(C线),其中检测线(T线)上包被了三唑仑-牛血清蛋白偶联抗原,质控线(C线)上包被了羊抗鼠 IgG 多克隆抗体;所述吸样垫为吸水纸。

[0007] 本发明采用纳米胶体金技术及抗原抗体特异性反应,应用免疫竞争抑制反应的原理制备而成,通过待检样本中含有的三唑仑与硝酸纤维素膜上检测线(T线)包被的三唑仑-牛血清蛋白偶联抗原竞争结合胶体金标记的三唑仑单克隆抗体,通过 T 线的显色来判定待检样本中是否含有三唑仑。

[0008] 本发明提供了一种三唑仑检测试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

[0009] (1) 制备三唑仑偶联抗原

[0010] 将三唑仑与牛血清蛋白偶联,合成三唑仑-牛血清蛋白偶联抗原,作为三唑仑偶联抗原。

[0011] (2) 制备三唑仑单克隆抗体

[0012] 采用三唑仑-牛血清蛋白偶联抗原为免疫原免疫 BALB/C 小鼠,通过杂交瘤技术,得到分泌抗三唑仑单克隆抗体的杂交瘤细胞株;以体内诱生腹水法大量制备抗体,使用 Protein G 柱进行纯化,获得三唑仑单克隆抗体。

[0013] (3) 制备胶体金

[0014] 取 0.01% 的氯金酸水溶液,加热煮沸。根据需要迅速加入 1% 枸橼酸三钠水溶液 1ml,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。

[0015] (4) 制备胶体金垫

[0016] 取颗粒大小为 20-40nm 的胶体金溶液,用 0.1mol/L  $K_2CO_3$  将胶体金溶液的 pH 值调至 7.0-9.0,室温放置 30 分钟;在上述溶液中加入三唑仑单克隆抗体,使三唑仑单克隆抗体的浓度为 10-60  $\mu$ g/ml 胶体金,混合均匀后,室温放置 30 分钟;加入 10% 的牛血清蛋白(BSA) 溶液使其浓度为 10-60  $\mu$ l/ml,混合均匀,室温放置 30 分钟;12000 转离心 30 分钟,仔细吸取上清液,弃去,剩余的沉淀用初始胶体金体积的胶体金复溶液溶解;12000 转离心 30 分钟,仔细吸取上清液,弃去,剩余的沉淀用 30% -100% 初始胶体金体积的胶体金复溶液溶解,得到三唑仑单克隆抗体-胶体金标记物;将三唑仑单克隆抗体-胶体金标记物按 1ml 铺 40-70cm<sup>2</sup> 聚酯膜的比例均匀铺在聚酯膜上,再置干燥间,在温度 38℃,湿度小于 30% 的条件下干燥 24 $\pm$ 2 小时,制成胶体金垫。

[0017] 上述胶体金复溶液为含 0.01-0.1% 的 Tris,1.0-3.0% 的蔗糖、0.1-1.0% 的 BSA 的 0.02M pH7.0-9.0 的磷酸盐缓冲溶液。

[0018] (4) 包被三唑仑-牛血清蛋白偶联抗原、羊抗鼠 IgG 多克隆抗体

[0019] 设定划膜仪涂覆参数 1  $\mu$  L/cm,分别用微量进样器取浓度为 0.5-5.0mg/ml 的三唑仑-牛血清蛋白偶联抗原、取浓度为 0.5-5.0mg/ml 羊抗鼠 IgG 多克隆抗体,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三唑仑-牛血清蛋白偶联抗原(T 线)、羊抗鼠 IgG 多克隆抗体(C 线)。划线后于温度 38℃ 的烘箱中干燥 24 $\pm$ 2 小时,保存,备用。

[0020] (5) 样品垫的处理

[0021] 将玻璃纤维浸泡于 0.01M pH 7.0-8.0 的磷酸盐缓冲溶液中 20-40min,其中磷酸盐缓冲溶液中含 0.5-1.5% BSA,0.5-1.0% Tween-20,于烘干箱中 38℃ 烘干,保存,备用

[0022] (6) 组装试剂盒

[0023] 在 PVC 支撑板上按顺序依次粘附样品垫、胶体金垫、硝酸纤维素膜和吸样垫,得到所述用于检测三唑仑的试纸条,试纸条可以装入塑料卡内,组装成检测卡。其中所述样品垫为玻璃纤维,吸样垫为吸水纸。

[0024] 本发明所述试剂盒的检测方法为:将被检样品平衡至室温;取出三唑仑检测装置,水平放置;在样品垫中加入 2-3 滴样品,10-15 分钟时观察并记录 C、T 线的显色情况,判断检测结果。

[0025] 本发明所述的试剂盒采用胶体金免疫层析技术测定三唑仑,检测时,将被测样品加在试剂盒上的样品垫上,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三唑仑,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

[0026] 图 1 三唑仑检测试剂盒结构示意图;

[0027] 附图符号说明:

[0028] 1:样品垫;

[0029] 2:胶体金垫(胶体金标记三唑仑单克隆抗体的聚酯膜)

[0030] 3:硝酸纤维素膜(T:包被了三唑仑-牛血清蛋白偶联抗原的检测线;C:包被了羊抗鼠 IgG 多克隆抗体的质控线);

[0031] 4:吸样垫;

[0032] 5:PVC 支撑板;

[0033] 图 2 本发明试剂盒的检测结果示意图。

[0034] 自左至右依次为 C 线一条线阳性检测结果;T、C 两条线阴性检测结果;无效。

#### 具体实施方式:

[0035] 实施例 1:三唑仑检测试剂盒的制备

[0036] 1. 制备三唑仑偶联抗原

[0037] 将三唑仑与牛血清蛋白偶联,合成三唑仑-牛血清蛋白偶联抗原,作为三唑仑偶联抗原。

[0038] 2. 制备三唑仑单克隆抗体

[0039] 采用三唑仑-牛血清蛋白偶联抗原为免疫原免疫 BALB/C 小鼠,通过杂交瘤技术,得到分泌抗三唑仑单克隆抗体的杂交瘤细胞株;以体内诱生腹水法大量制备抗体,使用 Protein G 柱进行纯化,获得三唑仑单克隆抗体。

[0040] 3. 制备胶体金

[0041] 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 1ml,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。

[0042] 4. 制备胶体金垫

[0043] 取颗粒大小为 20-40nm 的胶体金溶液 5ml,加入 0.15ml 0.1mol/L  $K_2CO_3$  将胶体金溶液的 pH 值调至 8.0,室温放置 30 分钟;在上述溶液中加入 0.0375ml 浓度为 4.0mg/ml 的三唑仑单克隆抗体,混合均匀后,室温放置 30 分钟;加入 0.25ml 10% 的牛血清蛋白(BSA)溶液,混合均匀,室温放置 30 分钟;12000 转离心 30 分钟,仔细吸取上清液,弃去,剩余的沉淀用初始胶体金体积的胶体金复溶液溶解;12000 转离心 30 分钟,仔细吸取上清液,弃去,剩余的沉淀用 50% 初始胶体金体积的胶体金复溶液溶解,得到三唑仑单克隆抗体-胶体金标记物;将三唑仑单克隆抗体-胶体金标记物按 1mL 铺 56cm<sup>2</sup> 聚酯膜的比例均匀铺在聚酯膜上,再置干燥间,在温度 38℃,湿度小于 30% 的条件下干燥 24 小时,制成胶体金垫。

[0044] 上述胶体金复溶液为含 0.01% 的 Tris,2.0% 的蔗糖、0.5% 的 BSA 的 0.02M pH 8.0 的磷酸盐缓冲溶液。

[0045] 4. 包被三唑仑 - 牛血清蛋白偶联抗原、羊抗鼠 IgG 多克隆抗体

[0046] 设定划膜仪涂覆参数  $1\ \mu\text{L}/\text{cm}$ , 分别用微量进样器取浓度为  $2.0\text{mg}/\text{ml}$  的三唑仑 - 牛血清蛋白偶联抗原、取浓度为  $1.2\text{mg}/\text{ml}$  羊抗鼠 IgG 多克隆抗体, 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三唑仑 - 牛血清蛋白偶联抗原 (T 线)、羊抗鼠 IgG 多克隆抗体 (C 线)。划线后于温度  $38^\circ\text{C}$  的烘箱中干燥  $24\pm 2$  小时, 保存, 备用。

[0047] 5. 样品垫的处理

[0048] 将玻璃纤维浸泡于  $50\text{ml}$   $0.01\text{M}$   $\text{pH}$   $8.0$  的磷酸盐缓冲溶液处理液中  $30\text{min}$ , 其中磷酸盐缓冲溶液中含  $1.0\%$  BSA,  $0.5\%$  Tween-2, 于烘干箱中  $38^\circ\text{C}$  烘干, 保存, 备用

[0049] 6. 组装试剂盒

[0050] 在 PVC 支撑板上按顺序依次粘附样品垫、胶体金垫、硝酸纤维素膜和吸样垫, 得到所述用于检测三唑仑的试纸条, 试纸条可以装入塑料卡内, 组装成检测卡。其中所述样品垫为玻璃纤维, 吸样垫为吸水纸。

[0051] 实施例 2 : 三唑仑检测试剂盒的检测

[0052] 1. 检测方法 :

[0053] 取出三唑仑检测试剂盒, 水平放置 ; 在样品垫上滴入 3 滴样品, 10 分钟后观察并记录 C、T 线的显色情况, 判断检测结果。

[0054] 2. 结果判定

[0055] 阳性 : T 线不显色, 仅 C 线显色, 判定为阳性结果 ;

[0056] 阴性 : T 线、C 线均显色, 判定为阴性结果 ;

[0057] 无效 : C 线不显色, 说明不正确操作或试剂盒已经变质损坏。

[0058] 检测样品时, 样品因毛细管作用向吸样垫一端层析。若被测样品中含有三唑仑, 它们将和检测线 (T 线) 上包被的三唑仑 - 牛血清蛋白偶联抗原竞争结合胶体金标记的三唑仑单克隆抗体上有限的抗体结合位点, 当样品中的三唑仑达到一定浓度时, 与胶体金标记的三唑仑单克隆抗体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三唑仑 - 牛血清蛋白偶联抗原结合, 此时 T 线不显色, 此为阳性结果。若被测样品中不含三唑仑, 标记了三唑仑单克隆抗体的胶体金颗粒将随同样品层析至 T 线位置后, 与 T 线上包被的三唑仑 - 牛血清蛋白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 线呈现出一条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三唑仑, 胶体金标记物均会与包被在质控线 (C 线) 上的羊抗鼠 IgG 多克隆抗体结合而显色, 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。

[0059] 实施例 3 : 三唑仑检测试剂盒的应用评价

[0060] 1. 最低检出量

[0061] 用磷酸缓冲溶液 (PBS :  $0.01\text{mol}/\text{L}$ 、 $\text{pH}$   $7.5$ ) 配制浓度为  $0$ 、 $400$ 、 $500$ 、 $600\text{ng}/\text{mL}$  的三唑仑标准品, 各浓度分别进行 10 次平行检验, 10 分钟时观察检测结果,  $0\text{ng}/\text{mL}$ 、 $400\text{ng}/\text{mL}$  的三唑仑标准品的检测结果为 T 线、C 线均显色, 为阴性结果 ;  $500\text{ng}/\text{mL}$ 、 $600\text{ng}/\text{mL}$  的三唑仑标准品的检测结果为 T 线不显色、C 线显色, 判定为阳性检测结果 ; 最终确定三唑仑检测试剂盒的最低检出量为  $500\text{ng}/\text{ml}$ 。

[0062] 2. 阴性参考品符合率

[0063] 用磷酸缓冲溶液 (PBS :0.01mol/L、pH 7.5) 配制浓度为 100ug/mL 的冰毒标准溶液进行 10 次平行检验,10 分钟时观察检测结果, T 线、C 线均呈现红色条带, 结果为阴性。

[0064] 用磷酸缓冲溶液 (PBS :0.01mol/L、pH 7.5) 配制浓度为 100ug/mL 的美沙酮标准溶液进行 10 次平行检验,10 分钟时观察检测结果, T 线、C 线均呈现红色条带, 结果为阴性。

[0065] 3. 阳性参考品符合率

[0066] 用磷酸缓冲溶液 (PBS :0.01mol/L、pH 7.5) 配制浓度为 500ng/mL、600ng/mL、700ng/mL 的三唑仑标准品, 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 线显色, 结果为阳性。

[0067] 4. 重复性

[0068] 用磷酸缓冲溶液 (PBS :0.01mol/L、pH 7.5) 配制浓度为 500ng/mL 的三唑仑标准品, 进行 10 次平行检验,10 分钟时观察检测结果, 结果均为 T 线不显色, C 线显色, 且显色度均一, 为阳性结果。

[0069] 5. 稳定性

[0070] 37℃放置 20 天后, 最低检出量、阴性参考品符合率、阳性参考品符合率、重复性各项指标均符合以上要求, 本试剂盒具有良好的稳定性。

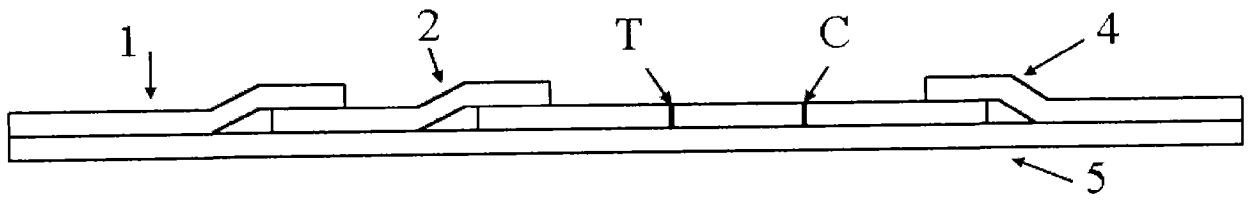


图 1

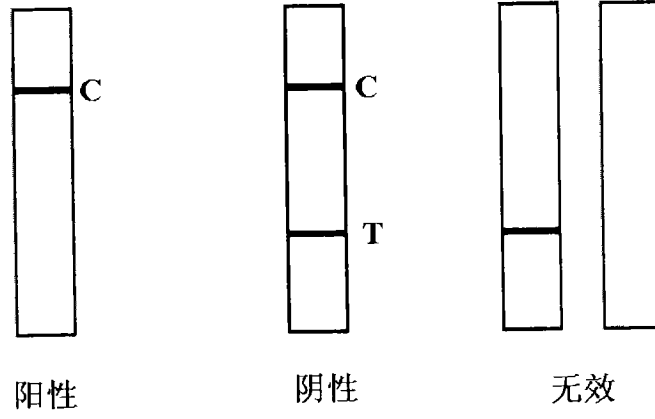


图 2

专利名称(译)	三唑仑检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN102539765A</a>	公开(公告)日	2012-07-04
申请号	CN201010610904.8	申请日	2010-12-29
[标]申请(专利权)人(译)	北京宝瑞源科技孵化有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京宝瑞源科技孵化有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京宝瑞源科技孵化有限公司		
[标]发明人	陈立柱 李峰 杨利		
发明人	陈立柱 李峰 杨利		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/558 G01N33/543 G01N33/532		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

一种用于检测三唑仑的检测试剂盒，该试剂盒包括样品垫(1)、胶体金垫(2)、硝酸纤维素膜(3)、吸样垫(4)和PVC支撑板(5)，在PVC支撑板上依次连续粘附有样品垫、胶体金垫、硝酸纤维素膜和吸样垫，所述胶体金垫为胶体金标记的三唑仑单克隆抗体聚酯膜，所述硝酸纤维素膜上依次包被了三唑仑-牛血清蛋白偶联抗原作为检测线(T线)，羊抗鼠IgG多克隆抗体作为质控线(C线)。本发明采用胶体金免疫层析技术制备三唑仑检测试剂盒，用于检测样本中可能存在的三唑仑，本试剂盒制备方法简单，具有使用方便、反应迅速、经济实用等特点。

