

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910135015.8

[51] Int. Cl.

C07C 211/49 (2006.01)

C07K 14/765 (2006.01)

C07K 14/77 (2006.01)

C07K 14/795 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

C12N 5/20 (2006.01)

[43] 公开日 2009年12月9日

[11] 公开号 CN 101597233A

[51] Int. Cl. (续)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/536 (2006.01)

[22] 申请日 2009.4.15

[21] 申请号 200910135015.8

[30] 优先权

[32] 2008.4.15 [33] CN [31] 200810036031.7

[71] 申请人 曾立波

地址 200083 上海市中山北一路 803 号

共同申请人 陈连康 胡小龙 张玉荣

[72] 发明人 曾立波

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 徐 迅

权利要求书 2 页 说明书 23 页 附图 4 页

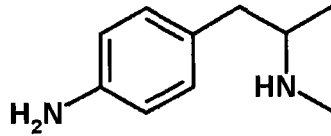
[54] 发明名称

不与麻黄碱和伪麻黄碱交叉反应的甲基苯丙胺单抗试剂盒

[57] 摘要

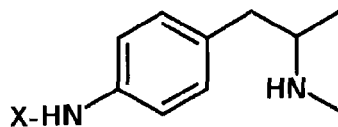
本发明公开了用于甲基苯丙胺检测及抗体制备的半抗原、完全抗原。本发明还公开了用该完全抗原制备的抗甲基苯丙胺单克隆抗体，以及胶体金标记甲基苯丙胺单抗免疫检测板，以用于检测药品或尿样等人体标本中的甲基苯丙胺。与 HPLC 等色谱方法相比，本发明的检测板简单、轻便，易于携带，可以现场检测，而且不需要昂贵的设备。使用本发明的检测板检测甲基苯丙胺，整个测试可在 3-5min 内完成，检测的灵敏度可达 300ng，且与 60 种常见药物、毒品，尤其是麻黄碱和伪麻黄碱，没有交叉反应。

1. 一种半抗原，其特征在于，所述半抗原具有式1所示的结构：



式1

2. 一种完全抗原，其特征在于，所述完全抗原具有式2所示的结构：



式2

其中，X 为蛋白质载体。

3. 一种制备式2所述的完全抗原的方法，其特征在于，所述方法包括步骤：
- (a)对甲基苯丙胺进行硝化，在其对位接入硝基基团，以形成对硝基-甲基苯丙胺；
- (b)将对硝基-甲基苯丙胺中的硝基还原为氨基，以制得对氨基-甲基苯丙胺；
- (c)将对氨基-甲基苯丙胺与蛋白质载体连接，以制得式2所示的完全抗原。
4. 一种权利要求1所述的半抗原或权利要求2所述的完全抗原的用途，其特征在于，用于制备甲基苯丙胺特异性单克隆抗体。
5. 一种单克隆抗体，其特征在于，它特异性结合于甲基苯丙胺。
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. C200914。
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甲基苯丙胺的试剂、检测板或试剂盒。
8. 一种检测生物样品中是否存在甲基苯丙胺的方法，其特征在于，包括步骤：
- (a)将样品与权利要求5所述的单克隆抗体接触；

(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甲基苯丙胺。

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

10. 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。

不与麻黄碱和伪麻黄碱交叉反应的甲基苯丙胺单抗试剂盒

技术领域

本发明涉及违禁药品的检测，尤其涉及甲基苯丙胺的酶联免疫检测。

背景技术

甲基苯丙胺，又称甲基安非他明 (Methamphetamine)、“冰毒”，是一种兴奋剂新型毒品，非法滥用严重。

随着与甲基苯丙胺相关的刑事案件逐年上升和国家对甲基苯丙胺管理的日趋严格，本领域对甲基苯丙胺和滥用毒品者生物标本中甲基苯丙胺的检测提出了更高的要求。

目前，甲基苯丙胺的检测主要是基于色谱分析方法，例如气质联用色谱分析 (GC-MS) 和高效液相色谱分析 (HPLC)。这些色谱方法具有很好的灵敏度和特异性，但操作繁琐，需要昂贵的仪器设备，且耗时长。

特定的结合反应，例如抗原-抗体反应，已经广泛用于检测生物样品中存在的各种物质的免疫测试中。其中，胶体金免疫层析技术是近年来发展起来的一种独特的免疫诊断技术，具有免疫反应和色谱层析的特定，与GC-MS比较，胶体金层析技术具有特异性强、灵敏度高、简单快速、易于操作、结果容易判读、无需任何仪器设备等优点。

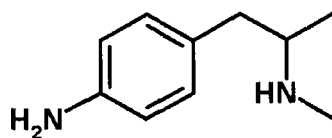
国内外现有的甲基苯丙胺单抗免疫试剂盒均与的麻黄碱和伪麻黄碱成分发生交叉反应，产生假阳性的结果。麻黄碱和伪麻黄碱是感冒药、止咳药水等正常治疗药物中含有的主要成分，在毒品尿检、征兵体检中经常发生当事人在正常服用上述含有麻黄碱和伪麻黄碱成分的药物时被检测出假阳性结果，严重影响了办案工作，产生了严重的负面影响。因此，甲基苯丙胺单抗免疫试剂盒与麻黄碱和伪麻黄碱发生交叉反应的问题，是国内外长期为之研究的难题。

因此，本领域迫切需要一种能够更加快速、简易、灵敏地检测甲基苯丙胺，且与麻黄碱和伪麻黄碱没有交叉反应的检测方法和检测试剂。

发明内容

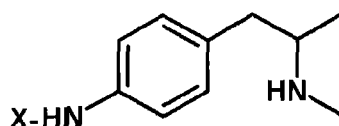
本发明的目的正是提供一种快速、简易、灵敏地检测甲基苯丙胺且与麻黄碱和伪麻黄碱没有交叉反应的检测方法和检测试剂。

在本发明的第一方面中，提供了一种半抗原，所述半抗原具有式1所示的结构：



式1

在本发明的第二方面中，提供了一种完全抗原，所述完全抗原具有式2所示的结构：



式2

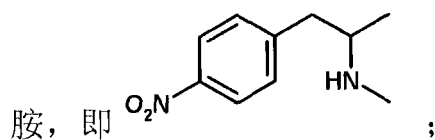
其中，X为蛋白质载体。

在本发明的一个优选例中，所述蛋白质载体为选自下组中的任何一种蛋白质：血蓝蛋白(KLH)、牛血清白蛋白(BSA)、卵清蛋白或 γ 球蛋白。

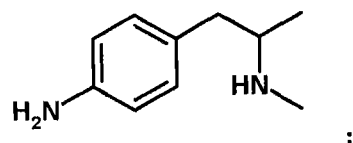
在本发明的另一个优选例中，所述蛋白质载体是血蓝蛋白或牛血清白蛋白。

在本发明的第三方面中，提供了一种制备式2所述的完全抗原的方法，所述方法包括步骤：

(a)对甲基苯丙胺进行硝化，在其对位接入硝基基团，以形成对硝基-甲基苯丙胺，即



(b)将对硝基-甲基苯丙胺中的硝基还原为氨基，以制得对氨基-甲基苯丙胺，即



(c)将对氨基-甲基苯丙胺与蛋白质载体连接，以制得式2所示的完全抗原。

在本发明的一个优选例中，步骤(a)的条件如下：反应温度为-20~20℃，优选

-10~10℃，更优选-5~0℃；反应时间为 1-24 小时，优选 2-12 小时，更优选 2-6 小时。

在另一优选例中，步骤(b)的条件如下：反应温度为室温~100℃，优选 50-70℃，更优选 60℃；反应时间为 5-24 小时，优选 8-12 小时，更优选 8 小时。

在另一优选例中，步骤(c)的条件如下：反应温度为 0-40℃，优选 4-25℃，更优选 20~25℃；反应 pH 为 3.0-6.0，优选 4.0-5.0，更优选 4.5；反应时间为 3-24 小时，优选 6-12 小时，更优选 6 小时。

在本发明的第四方面中，提供了一种本发明前述的半抗原或完全抗原的用途，其用于制备甲基苯丙胺特异性免疫球蛋白。在本发明中，所述免疫球蛋白优选为甲基苯丙胺特异性的单克隆抗体。

在本发明的第五方面中，提供了一种免疫球蛋白，所述免疫球蛋白特异性结合于甲基苯丙胺。

在本发明的一个优选例中，所述免疫球蛋白由小鼠杂交瘤细胞系产生，优选所述杂交瘤细胞系为 CCTCC NO. C200914 (小鼠单抗杂交瘤细胞株，Met 1，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))。

在另一优选例中，所述的免疫球蛋白与甲基苯丙胺的结合效价大于 1: 4000，优选大于 1:8000，更优选大于 1: 16000。在另一优选例中，所述甲基苯丙胺的效价为 1: 4000~1: 16000，更优选 1: 8000~1: 16000。

在另一优选例中，所述的免疫球蛋白为单克隆抗体。

在另一优选例中，所述的免疫球蛋白还结合于 MDMA。

在另一优选例中，所述的免疫球蛋白不结合于麻黄碱或伪麻黄碱。

在本发明的第六方面中，提供了一种产生前述的免疫球蛋白的杂交瘤细胞系，所述杂交瘤细胞系是一种小鼠杂交瘤细胞系，优选所述细胞系为 CCTCC NO. C200914。

在本发明的第七方面中，提供了一种前述的免疫球蛋白的用途，其用于制备检测样品中甲基苯丙胺的试剂、检测板或试剂盒。

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。

在本发明的第八方面中，提供了一种检测生物样品中是否存在甲基苯丙胺的

方法，所述方法包括步骤：

(a)将样品与前述的免疫球蛋白接触；

(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甲基苯丙胺。

在本发明的一个优选例中，所述免疫球蛋白带有可检测标记物。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。

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。

在本发明的第九方面中，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免疫球蛋白。

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 2 所示的完全抗原。

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。

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免疫球蛋白；

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 2 所示的完全抗原；

所述的质控线为羊抗鼠 IgG 多抗。

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，最优选 0.5-1mg/ml，且包被量为 5-150 μ l/cm²，优选 10-100 μ l/cm²，更优选 20-70 μ l/cm² 的经胶体金标记或有色标记的本发明的免疫球蛋白。

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 μ l/cm²，优选 0.5-50 μ l/cm²，更优选 1-20 μ l/cm² 的式 2 所示的完全抗原。

在本发明的第十方面中，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免疫球蛋白，或者所述的试剂盒含有前述的检测板和使用说明书。

生物材料保藏说明

本发明的小鼠单抗杂交瘤细胞株Met 1, 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. C200914。

附图说明

- 图1: 甲基苯丙胺完全抗原制备示意图。
图2: 融合率测定示意图。
图3: 纯化抗体经2-ME还原后的聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱。
图4: 甲基苯丙胺抗血清的效价(滴度)测定。
图5: 甲基苯丙胺单克隆抗体MA-CH1的效价测定。
图6: 甲基苯丙胺单克隆抗体MA-CH1与BSA交叉反应的测定
图7: 检测板中试条组成示意图。
图8: 检测板组装原理示意图。
图9: 毒品单抗免疫快速检测板判定结果示意图。

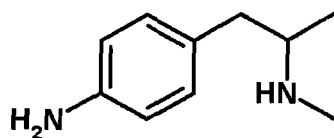
具体实施方式

本发明人经过长期而深入的研究合成了甲基苯丙胺活化衍生物对氨基-甲基苯丙胺, 并将其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Balb/C小鼠, 将其脾细胞与小鼠骨髓瘤SP20细胞融合, 获得特异性分泌抗甲基苯丙胺的单克隆细胞株, 并制备并纯化得到了甲基苯丙胺单克隆抗体, 其后进一步用所述完全抗原和甲基苯丙胺抗体制备了具有高灵敏度和甲基苯丙胺的免疫检测板, 从而完成了本发明。

半抗原

甲基苯丙胺(Methamphetamine)分子量很小(149.24道尔顿), 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。因此, 为了制备本发明的完全抗原, 对甲基苯丙胺进行了活化并制得了本发明的半抗原。

如本文所用, 本发明的“半抗原”、“甲基苯丙胺活化衍生物”或“活化的小分子”是指经本发明的衍生反应得到的具有结构式1的对氨基-N-甲基苯丙胺(p-NH₂-Methamphetamine):



式 1

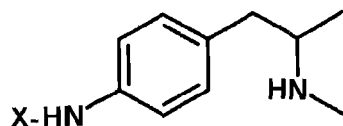
完全抗原

通常，半抗原需要和大分子如KLH(血蓝蛋白)或BSA(牛血清白蛋白)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。

如本文所用，本发明的“完全抗原”是指本发明的半抗原与适当的蛋白质载体结合后的产物。

如本文所用，本发明中的“蛋白质载体”是指任何在免疫学上可接受的用于形成完全抗原的蛋白质，其可为例如，血蓝蛋白、牛血清白蛋白、卵清蛋白或 γ 球蛋白等。

本发明用于甲基苯丙胺检测及抗体制备的完全抗原的结构如式2所示：



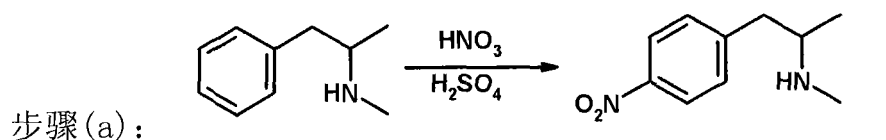
式 2

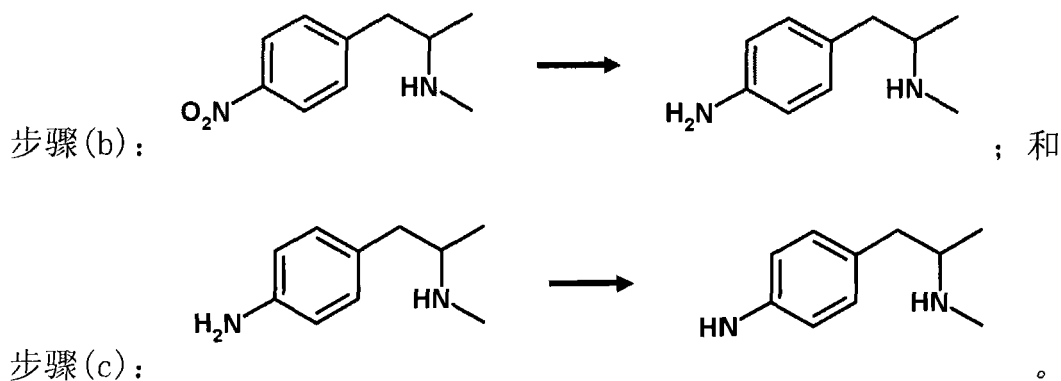
其中，X为蛋白质载体，本发明中优选血蓝蛋白(KLH)或牛血清白蛋白(BSA)；与X载体共价交联的部分为甲基苯丙胺的衍生物对氨基-甲基苯丙胺(p-NH₂-Methamphetamine)。

在本发明的一个优选的方案中，X为血蓝蛋白，完全抗原为甲基苯丙胺-KLH，作为免疫用抗原，用于制备分泌抗甲基苯丙胺单克隆抗体的杂交瘤细胞。

在本发明的另一个优选的方案中，X为牛血清白蛋白，完全抗原为甲基苯丙胺-BSA，作为检测用抗原，用于制备检测甲基苯丙胺的单克隆抗体免疫检测板。

本发明的完全抗原的制备包括如下步骤：





具体而言，在步骤(a)硝化反应中，对甲基苯丙胺进行硝化，即在其苯环上接入一个硝基基团；步骤(b)还原反应中：将接上去的硝基还原为氨基，使其具有活泼的化学性质；步骤(c)偶联反应中：采用同源双功能氨基偶联剂将活化的甲基苯丙胺与大分子的 KLH、BSA 或 OVA 等蛋白偶联，这样就使甲基苯丙胺成为完全抗原所具有的免疫原性。

其中所述的硝化和还原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，本发明的硝化反应可在如下条件下进行：反应温度为 $-20\sim 20^{\circ}\text{C}$ ，优选 $-10\sim 10^{\circ}\text{C}$ ，更优选 $-5\sim 0^{\circ}\text{C}$ ；反应时间为 1-24 小时，优选 2-12 小时，更优选 2-6 小时；本发明的还原反应条件可在如下条件下进行：为 $-20\sim 20^{\circ}\text{C}$ ，优选 $-10\sim 10^{\circ}\text{C}$ ，更优选 $-5\sim 0^{\circ}\text{C}$ ；反应时间为 1-24 小时，优选 2-12 小时，更优选 2-6 小时；本发明的载体连接反应可在如下条件下进行：反应温度为 $0\sim 40^{\circ}\text{C}$ ，优选 $4\sim 25^{\circ}\text{C}$ ，更优选 $20\sim 25^{\circ}\text{C}$ ；反应 pH 为 3.0-6.0，优选 4.0-5.0，更优选 4.5；反应时间为 3-24 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。

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。

本发明制备的完全抗原，甲基苯丙胺-KLH以及甲基苯丙胺-KBSA等具有很好的免疫原性，能刺激小鼠产生强烈的免疫反应，经过1次基础免疫、3次加强免疫，抗血清效价可达1: 16000；完全抗原甲基苯丙胺-BSA很好的保留了甲基苯丙胺的免疫反应性。

单克隆抗体的制备

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。

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。

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、NZ0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)]。

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。

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免疫球蛋白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。

本发明提供了一种抗甲基苯丙胺的单克隆抗体MA-CH1，经鉴定为IgG1型， κ (kappa)亚型。在一个实施方式中，完全抗原上的蛋白质载体为KLH，所述MA-CH1称为MA-KLH-CH1(CCTCC NO. C200914)。在另一个实施方式中，完全抗原上的蛋白质载体为BSA，所述MA-CH1称为MA-BSA-CH1。在本发明的一个优选的方案中，单克隆抗体MA-CH1采用培养杂交瘤细胞方法制备。取杂交瘤细胞培养的上清液，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。

本发明的一个优选的方案中，单克隆抗体MA-CH1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。

标记的本发明的单克隆抗体

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。

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。

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，抗甲基苯丙胺的单克隆抗体MA-CH1用胶体金标记，得到胶体金标记的MA-CH1单克隆抗体。

本发明的抗甲基苯丙胺单克隆抗体MA-CH1有很好的特异性，与60种常见药物、毒品(尤其是麻黄碱或伪麻黄碱)没有交叉反应；MA-CH1与蛋白质载体没有交叉反应。在一个优选实施方式中，本发明的单克隆抗体与甲基苯丙胺-BSA的载体BSA没有交叉反应。在另一个优选实施方式中，本发明的单克隆抗体与甲基苯丙胺-KLH的载体KLH没有交叉反应。

本发明的单克隆抗体MA-CH1有很高的效价，在甲基苯丙胺-BSA包被的酶标板检测中，效价达到1：2000，优选1：4000，更优选1：8000。

检测试剂盒

本发明的检测试剂盒是指含有本发明的免疫球蛋白或单克隆抗体并可用于甲基苯丙胺检测的试剂盒。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。

本发明的检测试剂盒可采用多种形式，例如检测板、含有各种测试所需试剂的测试盒等。以下以检测板为例对本发明的试剂盒进行说明，但不应理解为本发明仅限于检测板，

甲基苯丙胺检测用胶体金标记-免疫检测板

检测原理

甲基苯丙胺的检测采用竞争抑制法。本发明将甲基苯丙胺-BSA固定于硝酸纤维素膜上的检测区(固相抗原)，待检样品溶液中的甲基苯丙胺(游离抗原)与固相抗原

竞争结合胶体金标记的抗甲基苯丙胺单抗(标记抗体)。待检样品中含有的甲基苯丙胺，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，待测样品不含甲基苯丙胺；反之，不形成色带，则结果为阳性，检测样品含有甲基苯丙胺。

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甲基苯丙胺单克隆抗体。无论待检样品中是否含有甲基苯丙胺，层析载体玻璃纤维上预包被的胶体金标记或有色标记的甲基苯丙胺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。

检测板

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。

本发明检测甲基苯丙胺的免疫检测板，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甲基苯丙胺单克隆抗体或多克隆抗体，优选被胶体金标记的甲基苯丙胺单克隆抗体(MA-CH1)，硝酸纤维素膜上吸附检测线和质控线；

所述的检测线为完全抗原甲基苯丙胺，检测线所在的区域为检测区；

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；

因此，测试条上的检测物依次为：预包被胶体金标记的甲基苯丙胺单克隆抗体(MA-CH1)、检测线和质控线；

在一个优选的方案中：层析材料上预包被胶体金标记的甲基苯丙胺单克隆抗体，其浓度为0.01-20.0mg/ml，优选0.1-10.0mg/ml，更优选为0.2-2.0mg/ml，最优选0.5-1.5mg/ml，且包被量为5-150 μ l/cm²，优选10-100 μ l/cm²，更优选20-70 μ l/cm²。在一个优选例中所述单克隆抗体为MA-CH1。

硝酸纤维素膜上吸附的本发明完全抗原是采用浓度为0.5~1mg/ml的完全抗原胺溶液进行吸附的，吸附量为10 μ l/cm²；优选的浓度为0.5或1mg/ml，10 μ l/cm²。在一个优选实施方式中，所述完全抗原中的蛋白质载体为BSA或KLH

硝酸纤维素膜上吸附的羊抗鼠IgG多抗是采用浓度为0.8~1.2mg/ml羊抗鼠IgG多抗溶液进行吸附的，吸附量为10 μ l/cm²；优选的浓度为0.8或1.2mg/ml，10 μ l/cm²；检测板的灵敏度在250ng~300ng之间。

免疫检测板的性能

本发明的胶体金标记甲基苯丙胺单抗免疫检测板具有如下性能：

灵敏度高：调节试剂条上预包被的胶体金标记的MA-CH1单抗溶液、本发明完全抗原的量，测试尿样中含有的甲基苯丙胺，进行灵敏度测试。结果表明，本发明的胶体金标记的甲基苯丙胺单克隆抗体和完全抗原制备的检测板，甲基苯丙胺的最低检测量可达到250ng/ml。

稳定性好：将胶体金标记的甲基苯丙胺单克隆抗体试剂条，灵敏度为1000ng/ml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1000ng/ml的灵敏度测试。结果表明，胶体金标记的甲基苯丙胺单抗在65℃下能够耐受5天，具有良好的稳定性。

特异性佳：用甲基苯丙胺单克隆抗体免疫检测板检测共60种毒品或药品，结果仅甲基苯丙胺和MDMA为阳性，其它均为阴性。

综上所述，本发明的胶体金标记甲基苯丙胺单抗免疫检测板与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。使用本发明的检测板检测甲基苯丙胺，整个测试可在3-5min钟内完成，检测的灵敏度可达250-300ng，与60种常见药物、毒品(尤其是麻黄碱或伪麻黄碱)没有交叉反应。

检测方法与结果判定：

平放检测板，将试样滴在滤样纸上，适量试样(通常约120 μ l)，3~5min内观察层析结果。根据出现的条纹位置来判断结果，示意图见图9。

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。

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。

吸毒阈值设定

用本发明的胶体金标记后的甲基苯丙胺单克隆抗体和完全抗原制备的检测板，甲基苯丙胺的最低检测量可达到250-300ng/mL。考虑到某些正常使用的药物中也含有甲基苯丙胺成分，实际工作中为避免假阳性的出现，参照国际通行的浓度值，设定检测板的阈值以1000ng/mL为好。

调节试剂条上预包被的胶体金标记的MA-CH1单抗溶液、完全抗原的量,使得检测板对甲基苯丙胺的最低检测量为1000ng/ml。当尿液中的甲基苯丙胺浓度<1000ng/ml,胶体金标记抗甲基苯丙胺单抗通过层析作用,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;当尿液中的甲基苯丙胺浓度>1000ng/ml,胶体金标记的抗甲基苯丙胺单抗完全与尿液中的甲基苯丙胺相结合,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。

与现有技术相比,本发明的优点在于:

- (1)本发明的完全抗原具有高免疫原性,且保留了甲基苯丙胺的免疫反应性;
- (2)本发明的抗甲基苯丙胺单克隆抗体MA-CH1的特异性优异且效价高;
- (3)本发明的胶体金标记甲基苯丙胺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。

实施例

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用来限制本发明的范围。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。

实施例1 甲基苯丙胺的活化及半抗原的制备

步骤(a)硝化反应

在反应瓶中加入甲基苯丙胺原料0.52g和10mL浓硫酸,搅拌使之溶解,置于冰盐浴中冷却至-5℃,在1小时内分4次加入由浓硝酸(0.25mL)和浓硫酸(0.75mL)1:3组成的混合酸液。加完后,0℃条件下反应2小时,然后倒入10g碎冰中,待碎冰融化后,再在0℃条件下反应半小时,当有白色固体析出时,抽滤得白色固体物0.62g(粗品,不必纯化即可直接用于下一步反应),反应得率:53%,反应产物经MNR分析为目标物。

步骤(b)还原反应

将甲基-[1-甲基-2-(4-硝基苯基)乙基]胺0.5g溶于1.4ml水中,搅拌下加入0.55ml浓盐酸,逐渐升温,30-40℃时开始加入锌粉(分4批)共0.62g,直至50-60℃,加完后,在此温度下反应2小时,过滤,滤液用20%NaOH溶液中和至偏碱性(pH=8),抽滤,滤出白色固体(为氢氧化锌)并用温水洗涤,滤液合并用二氯甲烷提取(30ml*3

次), 二氯甲烷层用饱和食盐水洗至中性, 无水硫酸钠干燥, 溶剂抽干, 得半固体状黄色物质, 用硅胶柱层析(展开剂比例 乙酸乙酯:石油醚=1:2), 得浅黄色固体 252mg, 收率:56%。

$^1\text{H NMR}$ (DMSO) δ 6.38~6.95 (m, 4H, ArH) 3.44 (m, 1H, -CH-) 2.44~2.63 (m, 2H, -CH₂) 2.41 (s, 2H, -NH₂) 2.31 (d, 3H, -NCH₃) 1.04 (d, 3H, CH₃)

反应产物经MNR分析为目标物, 对氨基-N-甲基苯丙胺(p-NH₂-Methamphetamine)。

实施例2 甲基苯丙胺-血蓝蛋白(KLH)以及甲基苯丙胺-牛血清白蛋白(BSA)完全抗原的制备

将对氨基-甲基苯丙胺(p-NH₂-Methamphetamine)与血蓝蛋白(KLH)或牛血清白蛋白(BSA)在EDC的作用下进行偶联。

称取100mg对氨基-N-甲基苯丙胺, 在搅拌下溶解于10ml双蒸水中, 然后缓慢加入400mg 的EDC, 边加边摇, 用0.1M盐酸将pH值调节至4.5, 在室温下(20~25℃)继续反应10分钟。

取100mg血蓝蛋白(KLH)或牛血清白蛋白(BSA)溶于5 ml双蒸水中, 加入到对氨基-N-甲基苯丙胺溶液中, 室温下(20~25℃)继续反应2-4小时。反应产物对0.01M磷酸盐缓冲液4℃进行透析。

除去未反应的对氨基-N-甲基苯丙胺和EDC, 更换缓冲液3~4次。获得的反应产物即为甲基苯丙胺-KLH或甲基苯丙胺-BSA完全抗原。

实施例3 甲基苯丙胺单克隆抗体MA-KLH-CH1的制备及性质测定

3.1 Balb/C小鼠免疫操作

3.1.1 试剂配制

先将抗原与CPG佐剂乳化, 把完全抗原甲基苯丙胺-KLH用PBS配制成1mg/mL的溶液, 然后将完全抗原溶液与CPG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。

3.1.2 小鼠免疫

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CPG佐剂乳化抗原100uL。第14天, 每只小鼠腹腔再注射CPG佐剂乳化抗原100uL。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CPG佐剂加甲基苯丙胺抗原100uL。在细胞融合反应前一周, 用100ug/100uL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。

3.2 细胞融合操作

3.2.1 HAT培养基贮存液的制备

3.2.1.1 10mM次黄嘌呤—16mM胸腺嘧啶核苷(100×HT)贮存液: 称取次黄嘌呤136.1mg和胸腺嘧啶核苷38.8mg, 溶于100mL50~60℃的双蒸水中; 微孔滤膜过滤后按需要量分装, -20℃保存。

3.2.1.2 4×10^{-5} M氨基喋呤(100×A)贮存液: 称取氨基喋呤1.76mg加入90mL双蒸水, 滴加1N NaOH至氨基喋呤溶解。然后用1N HCl调节pH=7.5; 用双蒸水定容至100mL; 过滤灭菌; 分装并避光于-20℃保存。

3.2.2 培养液的制备

3.2.2.1 完全培养基: DMEM(改良的Eagle's培养基)或RPMI-1640培养基450mL; 100mM丙酮酸钠 5mL; 青-链霉素溶液(青霉素500IU/ml, 链霉素5mg/mL)5mL; 200mM L-谷氨酰胺 5mL; 灭活的胎牛血清 50mL, 4℃保存。

3.2.2.2 HT培养基的制备: 每100mL完全培养基中, 加入1mL 100×HT贮存液即成。

3.2.2.3 HAT培养基的制备: 每100mL完全培养基中各加入1mL HT贮存液和1mL A贮存液(均为100×A)即成。

3.2.3 50%(w/v)PEG的配制

将固体PEG(MW1500或4000)高压灭菌, PEG即融化, 冷却至50℃(在此温度下仍为液体)。加入等体积无血清的DMEM或RPMI-1640培养基。-20℃贮存。

3.2.4 细胞悬液的制备

3.2.4.1 小鼠脾细胞: 将免疫好的小鼠引颈处死, 70%酒精消毒皮肤后, 无菌条件取出脾脏, 移到盛有5ml无血清RPMI-1640的培养皿中。将脾脏无菌研磨成单细胞悬液, 将细胞吸至一无菌管中, 静置使组织块沉降。将无团块的脾细胞悬液吸入另一试管, 800rpm/min离心5min。用无血清RPMI-1640培养基洗涤细胞2次。用Tris-NH₄Cl裂解红细胞。计算每mL悬液中的有核细胞数。每只小鼠的脾脏可得 10^8 淋巴细胞。

3.2.4.2 小鼠腹腔巨噬细胞: 处死小鼠, 消毒皮肤, 向腹腔内注入DMEM完全培养基2-3mL, 轻压腹部使细胞混悬。提起腹膜中心, 插入注射器针头, 吸出全部细胞悬液。3000rpm/min离心5min, 用DMEM洗涤2次, 再离心后计数。一只小鼠可获得 3×10^6 个细胞。用加有10%胎牛血清和抗生素的培养基制成 10^5 /mL的细胞悬液。

3.3 融合步骤

3.3.1 准备

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℃水浴中预热。

3.3.2 检查

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。

3.3.3 操作

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 2×10^7 骨髓瘤细胞。 $1000\text{rpm}/\text{min}$ 离心5min,吸尽上清液。轻弹离心管使细胞沉淀松散,1min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1min。然后,在2min内,边轻摇试管边缓慢滴加10mL无血清RPMI-1640培养基。静置放置约3min, $800\text{rpm}/\text{min}$ 离心10min,弃上清液。用含HAT和20%胎牛血清的 RPMI1640将细胞配成100mL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℃、5%CO₂的培养箱内培养。

3.4 融合细胞的选择性培养

3.4.1 检查

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。

3.4.2 操作

7~10天后加HT+完全培养基,每孔加入1mL。在8~14天间,就可以看到杂交细胞的克隆。当克隆约长到1mm直径时,即可检查孔中培养基的抗体含量。从培养孔取出1mL测定抗体,用甲基苯丙胺-BSA包被的酶联板(ELISA法)来筛选出抗甲基苯丙胺的杂交瘤细胞。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。

3.5 杂交瘤克隆化(有限稀释法)

3.5.1 操作

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℃CO₂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。

3.5.2 培养

将培养板置37℃CO₂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。

3.5.3 筛选

吸取孔中液体，再以甲基苯丙胺-BSA包被的ELISA法酶标板来筛选出抗甲基苯丙胺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甲基苯丙胺单克隆细胞，命名为MA-KLH-CH1(即CCTCC NO. C200914)，用于制备胶体金标记甲基苯丙胺单抗免疫试剂盒。

3.6 杂交瘤扩大培养

当需要大量抗体时，采用Balb/C小鼠腹水生产单克隆抗体蛋白。将约10⁶—10⁷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。

3.7 抗体的纯化(Sepharose-G蛋白亲和层析法)

3.7.1 准备

取 1g CL-4B Sepharose -蛋白G, 悬浮于200mL的磷酸缓冲溶液(pH=8.0)中，至少吸胀30min。取约4mL装柱，先后用pH=8.0的磷酸缓冲液100mL和pH=3的0.1M柠檬酸钠100mL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(先用饱和硫酸胺沉淀后，再透析效果更好)平衡。

3.7.2 上柱

每mL胶可与20—25mg的IgG结合，控制过柱流速为0.5—1ml/min。用5mL的10mM磷酸缓冲液(pH=8)洗柱，监测流出液的A_{280nm}，按0.5ml级分收集流出液。开始几管应该没有蛋白的，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5mL)洗柱，大多数IgA、IgM、IgG3将在这一级分内流出。用5mL的0.1M柠檬酸钠(pH=6)洗脱IgG1抗体。用5mL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。

3.8 抗体的测定

3.8.1 融合效率分析

通过CFSE绿色荧光预标记淋巴细胞和抗小鼠B220 PE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%。

3.9 抗甲基苯丙胺单克隆抗体MA-CH1的鉴定

3.9.1 抗体的纯化及型别测定

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-Sepharose)纯化, 经SDS-PAGE电泳后,考马斯亮蓝染色(见图3)。

3.9.2 抗体经特异性抗体分型试剂盒

以单克隆抗体分型试剂盒(Monoclonal antibody isotyping kit, PIERCE)鉴定后确定为IgG1型, κ 亚型。

实施例4 甲基苯丙胺单克隆抗体MA-BSA-CH1的制备

制备方法同实施例3, 所不同是采用了BSA作为载体蛋白。经检测所得MA-BSA-CH1能与甲基苯丙胺特异性结合。

实施例5 抗体的效价测定

抗血清的滴度测定

将甲基苯丙胺-BSA包被的酶联板用于测定此抗血清的滴度, 包被抗原10 μ g/ml稀释于pH9.6的0.05M碳酸盐缓冲液中, 100 μ l/孔加入到96-孔酶标板于4 $^{\circ}$ C过夜。弃去包被液后用1%明胶/PBS在37 $^{\circ}$ C封闭2小时, 然后用PBS-Tween-20洗液洗板3遍, 再加入稀释后的甲基苯丙胺抗血清或单抗(MA-CH1),置于37 $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ C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10min, 并用终止液(0.1N硫酸)终止显色。

在450nm光波长下测定吸收值(OD), 与空白对照孔的OD均值比较, 采用计量资料的t检验, 取P<0.05的最低稀释度作为此抗体的效价。经比色测定, 所得甲基苯丙胺抗血清的效价为1:16000(见图4)。

甲基苯丙胺单克隆抗体滴度的测定

按照上述方法测定抗体的滴度, MA-CH1单抗的效价为1:8000(见图5)。

实施例6 单克隆抗体特异性的测定

甲基苯丙胺单克隆抗体MA-BSA-CH1与BSA交叉反应的测定

由于在制备胶体金快速试剂盒的过程中,所用的完全抗原是甲基苯丙胺-BSA, 因此, 如果单克隆抗体与BSA有交叉反应, 将会导致严重的假阴性结果。所以, 要确定甲基苯丙胺单克隆抗体MA-CH1与BSA没有任何的交叉反应。分别用完全抗原甲基苯丙胺-BSA和BSA包被酶标板, 以1:2000稀释的甲基苯丙胺单克隆抗体MA-CH1与之结合, 进行酶联反应检测, 结果显示甲基苯丙胺单克隆抗体MA-CH1可以检测到50ng的甲基苯丙胺-BSA, 而且与BSA没有任何交叉

反应。(见图6)

单克隆抗体与选用的60种毒品和药品的交叉反应

选用了如下60种毒品或药品与单克隆抗体MA-KLH-CH1进行反应：甲基苯丙胺，麻黄碱、伪麻黄碱、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，美沙酚，度冷丁，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。

用上述60种检测物质包被的酶标板与MA-KLH-CH1抗体反应进行ELISA测定，结果确定此抗体仅与甲基苯丙胺和MDMA发生免疫结合反应，而与上述其它毒品或药品没有交叉反应。

实施例7 胶体金标记甲基苯丙胺单克隆抗体免疫试剂盒的制备

7.1 胶体金(Gold Colloidal)标记抗甲基苯丙胺的单抗

7.1.1胶体金(Gold Colloidal)颗粒制备

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%氯金酸溶液，90°C保温2min，加入7.5mL的1%柠檬酸三钠水溶液，继续煮沸5min，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。

7.1.2 胶体金-单抗结合物制备

取上述胶体金100 mL，缓慢滴加10mL的BB(硼酸缓冲液)，滴加完毕后在磁力快速搅拌下分别迅速加入1-2mg抗甲基苯丙胺抗体，继续搅拌15 min。分别加入2mL的10%的牛血清蛋白，再搅拌15 min后，用高速离心机分别将其在12000rpm /min，4°C下离心30min，吸去上清液，用含少量稳定剂的BB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。

7.2 胶体金-单抗结合物玻璃纤维条制备

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，真空干燥。

7.3 检测线和质控线

配制0.5~1mg/mL浓度的甲基苯丙胺-BSA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，并至室

温干燥。

7.4 测试条组装

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。

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。

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。试剂盒中试条组成示意图(见图7)。

7.5 试剂盒的组成

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甲基苯丙胺单抗，分别与滤样纸、吸水纸、胶带等材料贴在PVC聚脂胶板上，共同组装成甲基苯丙胺免疫试剂盒，(见图8)。

7.6 检测原理与过程

7.6.1 检测原理

本试剂盒应用免疫竞争法原理，即尿液中的甲基苯丙胺与固相于硝酸纤维素膜上的甲基苯丙胺竞争结合胶体金标记的抗甲基苯丙胺单抗，通过观察窗检测区有无色带来判别测定结果。

7.6.2 检测过程

7.6.2.1 在硝酸纤维膜的检测区和质控区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甲基苯丙胺单抗。当尿液中的甲基苯丙胺浓度 $<1000\text{ng/mL}$ ，胶体金标记抗甲基苯丙胺单抗通过层析作用，向上移动，与固相于硝酸纤维素膜上的完全抗原相结合，形成两条色带，此时检测结果为阴性。当尿液中的甲基苯丙胺浓度 $>1000\text{ng/mL}$ ，胶体金标记的抗甲基苯丙胺单抗完全与尿液中的甲基苯丙胺相结合，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，此时检测结果为阳性。

7.6.2.2 无论尿液中是否含有甲基苯丙胺，胶体金标记的甲基苯丙胺单抗总能与固相于硝酸纤维素膜上的羊抗鼠IgG多抗结合形成一条有色质控带，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试剂盒是否变质的标准。

7.6.2.3 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，所以检测线也是试剂盒判别吸毒状况的标准。

实施例8 胶体金标记甲基苯丙胺单抗免疫试剂盒的灵敏度测试

试剂配制

根据测试要求，在空白尿样中添加甲基苯丙胺，分别配制成含甲基苯丙胺浓度为1.00ng/mL、2.00ng/mL、3.00ng/mL、4.00ng/mL、5.00ng/mL、10.00ng/mL、20.00ng/mL、50.00ng/mL、100.00ng/mL、150.00ng/mL、200.00ng/mL、300.00ng/mL、500.00ng/mL、1000.00ng/mL、1500.00ng/mL和2000.00ng/mL的系列试样。

检测与结果

将上述系列浓度作定量梯度点样，实施例7试剂盒的灵敏度试验结果(见表1)。

表1 灵敏度试验结果

点样量ng/mL	1	2	3	4	5	10	20	50
结果	-	-	-	-	-	-	-	-
点样量ng/mL	100	150	200	300	500	1000	1500	2000
结果	-	-	-	+	+	+	+	+

注：“+”表示阳性；“-”表示阴性。

试验结果表明，进行胶体金标记后的甲基苯丙胺单克隆抗体最低检测量为300.00ng/mL，考虑到某些正常使用的药物中也含有甲基苯丙胺成分，实际工作中为避免假阳性的出现，参照国际通行的浓度值将甲基苯丙胺的最低检测量确定为1000.00ng/mL。

实施例9 胶体金标记甲基苯丙胺单抗免疫试剂盒的稳定性实验

将实施例7的胶体金标记的甲基苯丙胺单克隆抗体试剂条置于65℃下分别保温0.5d(天)、1d、1.5d、2d、2.5d、3d、4d、5d，然后按上述灵敏度试验方法进行1000.00ng/mL的灵敏度测试。上述条件下的测试结果见表2。

表2 稳定性实验结果

保存时间(d)	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	5
结果	+	+	+	+	+	+	+	+	+

注：“+”表示阳性

实验结果表明，胶体金标记的甲基苯丙胺单抗在65℃下能够耐受5天，具有良好的稳定性。

实施例10 胶体金标记甲基苯丙胺单抗免疫试剂盒的特异性鉴定

选用以下60种毒品和药品与实施例7的试剂盒进行交叉反应测定：

甲基苯丙胺，麻黄碱、伪麻黄碱、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，美沙酚，度冷丁，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。

检测与结果

将上述检测物质配制成一定浓度的溶液进行检测，结果表明用单克隆抗体生产的单抗免疫板仅与甲基苯丙胺及其衍生物MDMA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。结果表明制备的胶体金标记甲基苯丙胺单抗免疫试剂盒性能良好，专一性强。测试结果(见表3)。

表3 检测板的特异性反应测试结果

样品 \ 浓度 ng/mL	25	50	100	250	1000	5000	10000	100000
甲基苯丙胺	—	+	+	+	+	+	+	+
MDMA	—	+	+	+	+	+	+	+
麻黄碱	—	—	—	—	—	—	—	—
伪麻黄碱	—	—	—	—	—	—	—	—
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	—	—	—	—	—	—	—	—
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	—	—	—	—	—	—	—	—
去痛片	—	—	—	—	—	—	—	—
氯胺酮	—	—	—	—	—	—	—	—
美沙酮	—	—	—	—	—	—	—	—
美沙酚	—	—	—	—	—	—	—	—
度冷丁	—	—	—	—	—	—	—	—
四氢大麻酚	—	—	—	—	—	—	—	—
可卡因	—	—	—	—	—	—	—	—
蒂巴因	—	—	—	—	—	—	—	—

利多卡因	—	—	—	—	—	—	—	—
那可丁	—	—	—	—	—	—	—	—
丁丙诺啡	—	—	—	—	—	—	—	—
苯丙醇胺	—	—	—	—	—	—	—	—
苯乙胺	—	—	—	—	—	—	—	—

实施例11 试剂盒与GC/MS检测结果的比较

以本发明实施例7中制得的试剂盒与GC/MS对相同的样品进行测试，并比较两者结果(见表4)。

表4 实施例7试剂盒与GC/MS检测结果的比较

GC/MS (ng/ml)	样品例数	试剂盒	
		+	-
< 1000ng/ml	200	0	200
≥ 1000ng/ml	300	288	2

本实施例设定的阈值为1000.00ng/ml，试剂盒的敏感度为99.4%，准确度为99.8%，采用GC/MS检测复核，结果一致。

实施例12 试剂盒使用方法和结果判定

从密封袋中取出试剂盒，标明被检样品或对照样品。平放试剂盒，在点样孔内滴入三滴试样(约120uL)，3~5min内观察层析结果。

结果判定

(1)阴性：质控区(C)、检测区(T)均出现明显的色带，即在观察窗处出现两条线，为阴性。

(2)阳性：只在质控区(C)出现明显色带，而在检测区(T)无色带，示为阳性。

(3)无效：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)出现色带，表明检测方法错误或试剂盒变质或失效，应重新换取试剂盒检测。

检测结果示意图见图9。

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。

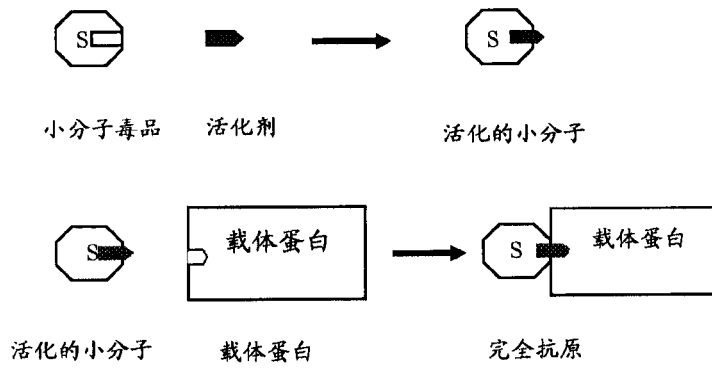


图 1

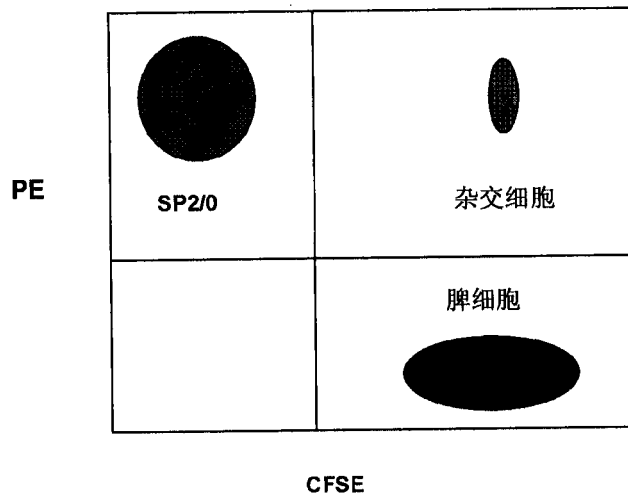


图 2

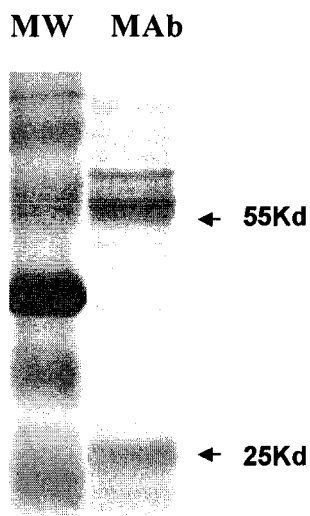


图 3

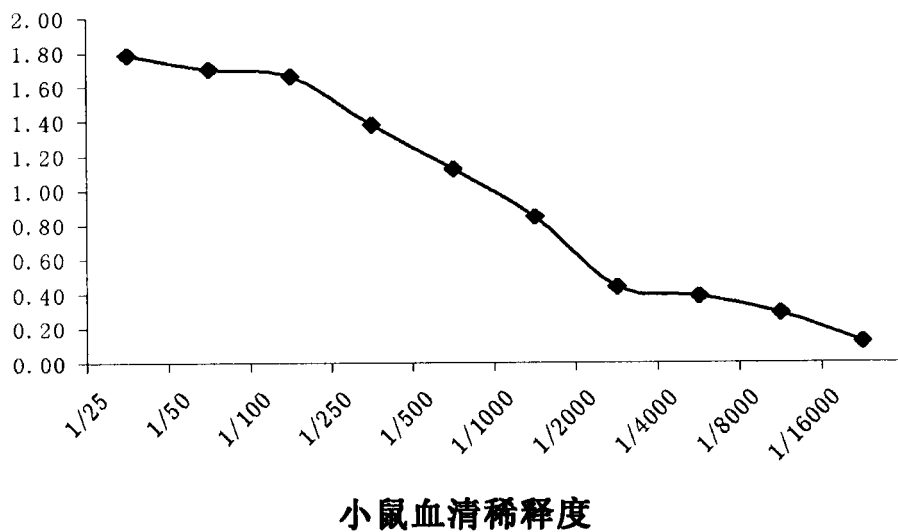


图 4

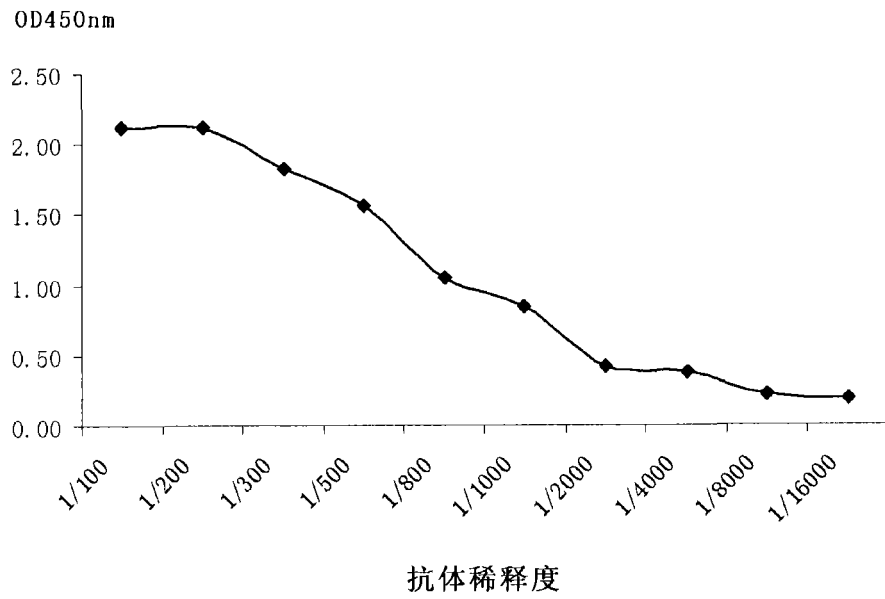


图 5

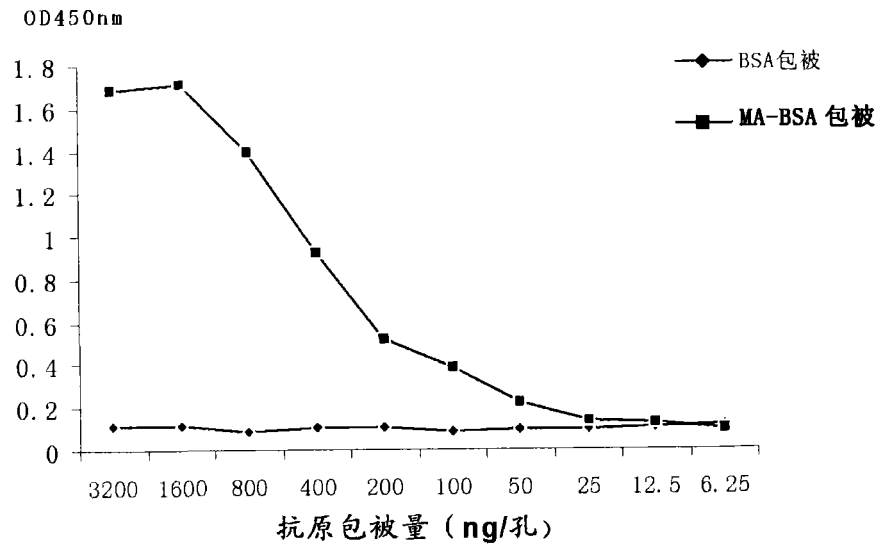


图 6

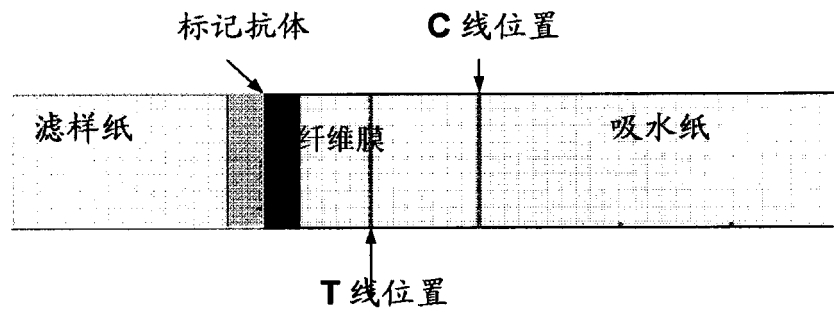


图 7

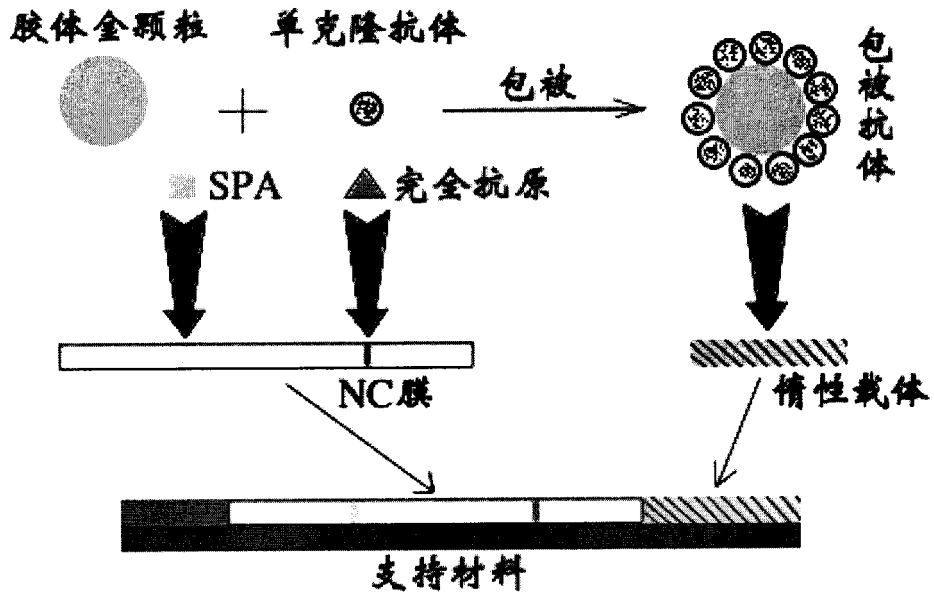


图 8

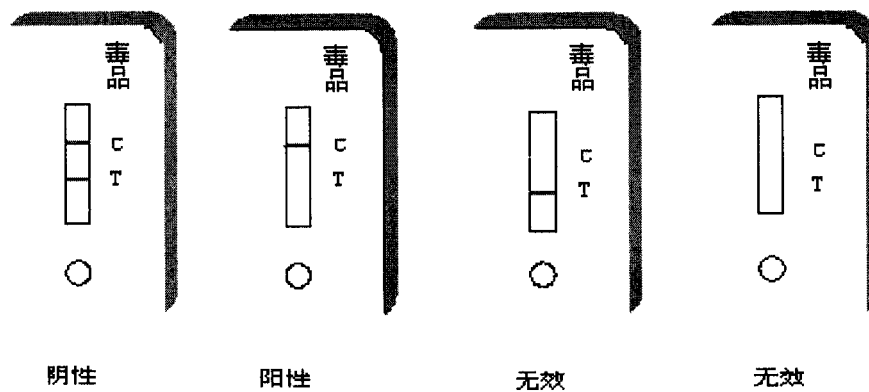


图 9

专利名称(译)	不与麻黄碱和伪麻黄碱交叉反应的甲基苯丙胺单抗试剂盒		
公开(公告)号	CN101597233A	公开(公告)日	2009-12-09
申请号	CN200910135015.8	申请日	2009-04-15
[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	C07C211/49 C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 C07K16/44 C12N5/20 G01N33/577 G01N33/536		
代理人(译)	徐迅		
优先权	200810036031.7 2008-04-15 CN		
其他公开文献	CN101597233B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了用于甲基苯丙胺检测及抗体制备的半抗原、完全抗原。本发明还公开了用该完全抗原制备的抗甲基苯丙胺单克隆抗体，以及胶体金标记甲基苯丙胺单抗免疫检测板，以用于检测药品或尿样等人体标本中的甲基苯丙胺。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。使用本发明的检测板检测甲基苯丙胺，整个测试可在3 - 5min内完成，检测的灵敏度可达300ng，且与60种常见药物、毒品，尤其是麻黄碱和伪麻黄碱，没有交叉反应。

