



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108089002 A

(43)申请公布日 2018.05.29

(21)申请号 201711402931.4

(22)申请日 2017.12.22

(71)申请人 太原瑞盛生物科技有限公司

地址 030000 山西省太原市尖草坪区太原
不锈钢产业园区钢园北路10号

(72)发明人 于雪纯 康志禹 丁兰艳 赵慧敏
杜爱铭 徐兵

(51)Int.Cl.

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

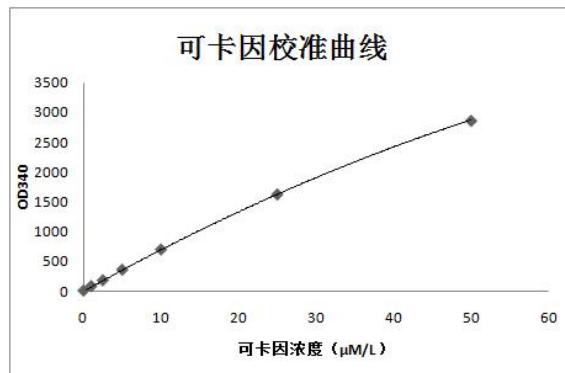
权利要求书2页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

一种可卡因免疫检测试剂及其制备和检测
方法

(57)摘要

本发明公开了一种可卡因免疫检测试剂及其制备和检测方法。包括：酶标可卡因、用于检测可卡因抗体-酶标可卡因复合物的指示试剂；上述酶标可卡因由可卡因和葡萄糖脱氢酶偶联而成。本发明的可卡因免疫检测试剂可以精确快速地确定人体血液等样品中可卡因含量。与市场上现有的检测试剂相比，本发明检测试剂具有方便快速、灵敏度高、特异性强、定量准确等优点，有利于临床的推广使用。



1. 一种可卡因免疫检测试剂及其制备和检测方法,其特征在于:酶标可卡因、用于检测可卡因抗体-酶标可卡因复合物的指示试剂。

2. 根据权利要求1所述的可卡因的免疫检测试剂,其特征在于:所述酶标可卡因由可卡因和葡萄糖脱氢酶偶联而成。

3. 根据权利要求1所述的可卡因免疫检测试剂,其特征在于:所述指示试剂选自酶试剂,包括:酶标偶联物和酶的底物;上述酶标偶联物包括葡萄糖脱氢酶-可卡因偶联物;上述酶的底物为葡萄糖。

4. 一种可卡因免疫检测试剂及其制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 葡萄糖脱氢酶-可卡因偶联物的制备:可卡因半抗原的制备,葡萄糖脱氢酶(GDH)与可卡因半抗原偶联,纯化偶联的酶标抗原;

(2) 可卡因均相酶免疫检测试剂的制备:

试剂1的制备:由可卡因抗体和均相酶底物混合而成;

试剂2的制备:由葡萄糖脱氢酶-可卡因偶联物与磷酸盐缓冲液混合而成。

5. 根据权利要求5所述的一种可卡因免疫检测试剂的制备方法,其特征在于,所述的步骤(1)具体过程为:

1) 可卡因半抗原的制备

a. 将10-50 mg可卡因溶于2-10 mL 稀HCl中搅拌溶解,室温反应2-5小时;

b. 用稀氢氧化钠溶液调pH至中性,然后用三氯甲烷萃取,收集有机相,无水硫酸镁干燥,回收溶剂得到带羧基的可卡因半抗原;

2) 葡萄糖脱氢酶(GDH)与可卡因的偶联

a. 将5-35 mg上述可卡因半抗原溶于500-2000 μL2-(N-吗啡啉)乙磺酸中,轻微振荡溶解;取10-45 mg 规格为100-300 KU的GDH溶解于PBS缓冲液中震荡均匀;

b. 将50-150 μL的碳二亚胺(EDC)溶液在搅拌下缓慢滴加到可卡因半抗原溶液中,旋转混合15-30分钟;

c. 将上述活化好的可卡因溶液在搅拌下缓慢加入到GDH溶液中,搅拌反应1-2小时;

3) 纯化偶联的酶标抗原

通过G-25凝胶层析柱纯化偶联的酶标抗原,得到葡萄糖脱氢酶-可卡因偶联物,于2-8°C下储存。

6. 根据权利要求5所述的一种可卡因免疫检测试剂的制备方法,其特征在于,步骤(2)的具体过程如下:

试剂1的制备:将2-5 g氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸NAD、0.5-3 g葡萄糖用0.5-2 L 磷酸盐缓冲液溶解制成均相酶底物;将可卡因抗体加到上述均相酶底物中,抗体与均相酶底物的体积比为1:100~1:10000;

试剂2的制备:将制备的葡萄糖脱氢酶-可卡因偶联物加到磷酸盐缓冲液中,上述偶联物与磷酸盐缓冲液的体积比为1:100~1:10000。

7. 利用权利要求1至4任意一项所述的可卡因免疫检测试剂的检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

1) 将待测样本与可卡因抗体接触;

2) 根据待测样本中可卡因与可卡因抗体的结合情况,利用指示试剂判断样本中可卡因

的含量；所述待测样本为血清、血浆、唾液或尿液。

一种可卡因免疫检测试剂及其制备和检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及医学检验领域,具体是一种可卡因免疫检测试剂及其制备和检测方法。

背景技术

[0002] 可卡因(cocaine,COC)是古柯叶中所含的主要生物碱,又名古柯碱。可卡因是人类发现的第一种具有局麻作用的天然生物碱,为长效酯类局麻药,脂溶性高,穿透力强,对神经组织亲和性好,能产生良好的表面麻醉作用。可卡因毒性较大,小剂量时能兴奋大脑皮层,产生欣快感,随着剂量增大,使呼吸、血管运动和呕吐中枢兴奋,严重者可发生惊厥;大剂量可引起大脑皮层下行异化作用的抑制,出现中枢性呼吸抑制,并抑制心肌而引起心力衰竭。

[0003] 可卡因滥用会对人体产生很大威胁,使得人类心率加快,呼吸急促,甚至出现震颤、痉挛、惊厥等现象,对人类安全、社会稳定和世界和平构成巨大威胁。因此,研究新型、灵敏、定量的可卡因检测方法对于禁毒、毒物检测、刑事鉴定等具有非常重要的实践意义和应用价值。

[0004] 目前检测可卡因的常用方法有:高效液相色谱分析(HPLC)、气相色谱-质谱联用(GC-MS)、胶体金法和核磁共振光谱法等。其中,HPLC法和GC-MS法费时且不易自动化;胶体金法检测结果的灵敏度和准确性都较差,核磁共振光谱法的灵敏度也相对较低,并且体内有金属异物不能做核磁共振。

[0005] 本发明采用的方法为均相酶免疫检测法,其优点为:操作简便、快速、灵敏度高、准确性好、适合于自动化,应用广泛,并且用全自动生化分析仪对小分子物质和大分子物质都能高通量快速测定。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于解决现有技术中可卡因检测过程操作复杂、以及测定准确度低的问题,本发明提供了一种快速、灵敏度高、准确检测出待测样本中可卡因含量的可卡因均相酶检测试剂及其制备方法。

[0007] 为实现上述目的,本发明提供如下技术方案:

一种可卡因免疫检测试剂及其制备和检测方法,其特征在于:酶标可卡因、用于检测可卡因抗体-酶标可卡因复合物的指示试剂;上述酶标可卡因由可卡因和葡萄糖脱氢酶偶联而成。

[0008] 作为本发明进一步的方案,所述指示试剂选自酶试剂,包括:酶标偶联物和酶的底物;上述酶标偶联物包括葡萄糖脱氢酶-可卡因偶联物;上述酶的底物为葡萄糖。

[0009] 作为本发明进一步的方案,所述的一种可卡因免疫检测试剂及其制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1)葡萄糖脱氢酶-可卡因偶联物的制备:可卡因半抗原的制备,葡萄糖脱氢酶(GDH)与

可卡因半抗原偶联，纯化偶联的酶标抗原。

[0010] (2) 可卡因均相酶免疫检测试剂的制备：

试剂1的制备：由可卡因抗体和均相酶底物混合而成；

试剂2的制备：由葡萄糖脱氢酶-抗原偶联物与磷酸盐缓冲液混合而成。

[0011] 作为本发明进一步的方案，所述的一种可卡因免疫检测试剂的制备方法，其特征在于，所述的步骤(1)具体过程为：

1) 可卡因半抗原的制备

- a. 将10-50 mg可卡因溶于2-10 mL 稀HCL中搅拌溶解，室温反应2-5小时；
- b. 用稀氢氧化钠溶液调pH至中性，然后用三氯甲烷萃取，收集有机相，无水硫酸镁干燥，回收溶剂得到带羧基的可卡因半抗原。

[0012] 2) 葡萄糖脱氢酶(GDH)与可卡因的偶联

- a. 将5-35 mg上述可卡因半抗原溶于500-2000 μL2-(N-吗啡啉)乙磺酸中，轻微振荡溶解；取10-45 mg 规格为100-300 KU的GDH溶解于PBS缓冲液中震荡均匀；
- b. 将50-150 μL的碳二亚胺(EDC)溶液在搅拌下缓慢滴加到可卡因半抗原溶液中，旋转混合15-30分钟；
- c. 将上述活化好的可卡因溶液在搅拌下缓慢加入到GDH溶液中，搅拌反应1-2小时。

[0013] 3) 纯化偶联的酶标抗原

通过G-25凝胶层析柱纯化偶联的酶标抗原，得到葡萄糖脱氢酶-可卡因偶联物，于2-8 °C下储存。

[0014] 作为本发明进一步的方案，所述的一种可卡因免疫检测试剂的制备方法，其特征在于，步骤(2)的具体过程如下：

试剂1 的制备：将2-5 g氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸NAD、0.5-3 g葡萄糖用0.5-2L 磷酸盐缓冲液溶解制成均相酶底物；将可卡因抗体加到上述均相酶底物中，抗体与均相酶底物的体积比为1:100~1:10000；

试剂2的制备：将制备的葡萄糖脱氢酶-可卡因偶联物加到磷酸盐缓冲液中，上述偶联物与磷酸盐缓冲液的体积比为1:100~1:10000。

[0015] 作为本发明进一步的方案，所述的可卡因免疫检测试剂的检测方法，其特征在于，包括以下步骤：

1) 将待测样本与可卡因抗体接触；

2) 根据待测样本中酶标可卡因与可卡因抗体的结合情况，利用指示试剂判断样本中可卡因的含量；所述待测样本为血清、血浆、唾液或尿液。

[0016] 本发明的原理是抗原与酶结合成酶标抗原，保留抗原和酶的生物活性，当酶标抗原与抗体结合后，抗原分子上的酶蛋白与抗体密切接触，使酶的活性中心受到影响，酶的活性受到抑制。测定时样本中的抗原、酶标抗原与抗体竞争性结合，样本中的抗原含量越高，加底物后其OD值越高。

[0017] 本发明的优点在于：本发明的可卡因免疫检测试剂可以精确快速地确定人体血液等样品中可卡因含量。与市场上现有的检测试剂相比，本发明检测试剂具有方便快速、灵敏度高、特异性强、定量准确等优点，有利于临床的推广使用。

附图说明

[0018] 图1 是可卡因均相酶免疫反应校准曲线图。

[0019] 图2 是可卡因均相酶免疫线性范围图。

具体实施方式

[0020] 本发明提供了一种可卡因免疫检测试剂及其制备和检测方法,为使本发明目的、技术方案及效果更加清楚、明确,以下对本发明进行详细说明。

[0021] 本发明提供了一种可卡因免疫检测试剂及其制备和检测方法。包括:酶标可卡因、用于检测可卡因抗体-酶标可卡因复合物的指示试剂;上述酶标可卡因由可卡因和葡萄糖脱氢酶偶联而成。

[0022] 本发明中所指的“可卡因”不仅仅指完整的可卡因分子,也包括保留完整抗原特异性结合能力的可卡因片断或者衍生物。

[0023] 一种可卡因均相酶免疫检测试剂,包括:酶标可卡因、用于检测可卡因抗体-酶标可卡因复合物的指示试剂。指示试剂选自酶试剂、放射性同位素试剂、荧光试剂和化学发光试剂。优选的,指示试剂为酶试剂,包括:酶标偶联物和酶的底物。其中,酶标偶联物包括葡萄糖脱氢酶-抗原偶联物,其可通过化学合成方法得到。

[0024] 上述的可卡因免疫检测试剂的使用方法,包括以下步骤:

1) 将待测样本与可卡因抗体接触;

2) 根据待测样本中酶标可卡因与可卡因抗体的结合情况,利用指示试剂判断样本中可卡因的含量;所述待测样本为血清、血浆、唾液或尿液等。优选的,待测样本为血清或血浆。

[0025] 下面通过具体的实施例对本发明进行详细说明。

[0026] 实施例一:葡萄糖脱氢酶-抗原偶联物的制备

1) 可卡因半抗原的制备

a. 将40 mg可卡因溶于5 mL 1M的HCL中搅拌溶解,室温反应4小时;

b. 用稀氢氧化钠溶液调pH至中性,然后用50 mL的三氯甲烷萃取,收集有机相,无水硫酸镁干燥,回收溶剂得到带羧基的可卡因半抗原。

[0027] 2) 葡萄糖脱氢酶(GDH)与可卡因的偶联

a. 将25 mg上述可卡因半抗原溶于900 μ L 2-(N-吗啡啉)乙磺酸中,轻微振荡溶解;取35 mg 规格为150 KU的GDH溶解于1000 μ L PBS缓冲液中震荡均匀;

b. 将100 μ L的碳二亚胺(EDC)溶液在搅拌下缓慢滴加到可卡因半抗原溶液中,旋转混合30分钟;

c. 将上述活化好的可卡因溶液在搅拌下缓慢加入到GDH溶液中,搅拌反应2小时。

[0028] 3) 纯化偶联的酶标抗原

通过G-25凝胶层析柱纯化偶联的酶标抗原,得到葡萄糖脱氢酶-可卡因偶联物,于2-8°C下储存。

[0029] 实施例二:可卡因均相酶免疫检测试剂的制备

可卡因均相酶免疫检测试剂,包括:酶标可卡因、用于检测可卡因抗体-酶标可卡因复合物的指示试剂。指示试剂选自酶试剂、放射性同位素试剂、荧光试剂和化学发光试剂。优

选的，指示试剂为酶试剂，包括：酶标偶联物和酶的底物。其中，酶标偶联物包括葡萄糖脱氢酶-抗原偶联物，其可通过化学合成方法得到。

[0030] 可卡因均相酶免疫检测试剂在使用之前，为了避免指示试剂中的酶标偶联物和酶的底物发生反应，酶标偶联物和酶的底物是分开放置的，因此可卡因均相酶免疫检测试剂包括两种分开设置的试剂，具体如下：

1. 试剂1 的制备：将3.588g(10mM) 氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸NAD、1.802g(10mM) 葡萄糖用1L 50 mM、pH 8.0的磷酸盐缓冲液溶解制均相酶底物；将可卡因抗体加到上述均相酶底物中，抗体与均相酶底物的体积比为1:100 ~1:10000，在本实施例中具体的比例为1:550。

[0031] 2. 试剂2的制备：将制备的葡萄糖脱氢酶-可卡因偶联物加到50mM、pH8.0的磷酸盐缓冲液中，上述偶联物与磷酸盐缓冲液的体积比为1:100~1:10000，在本实施例中具体的比例为1:1600。

[0032] 上述可卡因均相酶免疫检测试剂的使用方法，包括以下步骤：

1) 将待测样本与可卡因抗体接触；

2) 根据待测样本中酶标可卡因与可卡因抗体的结合情况，利用指示试剂判断样本中可卡因的含量；

具体的，检测时将待测样本加到试剂1中，待测样本中的可卡因与试剂1中的可卡因抗体发生特异性结合，生成抗可卡因抗体-可卡因复合物；再加入试剂2，此时试剂2中的葡萄糖脱氢酶-可卡因偶联物与试剂1中的酶的底物混合、接触，发生酶促反应，构成检测可卡因抗体-酶标可卡因复合物的指示试剂，指示试剂根据待测样本中可卡因与上述可卡因抗体的结合情况判断待测样本中可卡因的含量。

[0033] 由于葡萄糖脱氢酶-抗原偶联物与待测样本中的可卡因竞争性结合可卡因抗体，所以，待测样本中可卡因的量越多，均相酶溶液中游离的葡萄糖脱氢酶-抗原偶联物的量越多，酶促反应越快，导致OD₃₄₀ 上升。

[0034] 上述待测样本为生理样本，例如血清、血浆、尿液、唾液等，作为一种优选的方案，上述待测样本为血清或血浆。

[0035] 实施例三：可卡因均相酶免疫检测试剂反应校准曲线。

[0036] 1) 校准品配制：将市售人可卡因重组蛋白溶于类似人血清基质的溶液(NaCl 0.9%，BSA 0.2%，NaN₃ 0.1%，Tris-HCl pH 7.4)中，制成不同浓度的校准品。以北京库尔科技有限公司可卡因校准品为原始标准，采用其可卡因试剂盒对不同浓度的校准品分别检测10次，求出均值，得到可卡因校准品的浓度：1, 2.5, 5, 10, 25, 50 μM。

[0037] 2) 生化分析仪检测：以日立7170操作为例：测定波长为340nm，分别取不同浓度的校准品溶液(15μL)，加入可卡因R₁试剂(160μL)，混匀，再加入可卡因R₂试剂(40μL)，混匀后，测定不同时间点的OD₃₄₀ 吸光值，算出不同校准品浓度时的反应速率，实际操作过程中需不断调整试剂1 和试剂2的体积比例，同时调整测光点，最后得出较理想的反应标准曲线图，每管重复测定3次，以各校准管3次测得的吸光度差值Δ A的平均值为纵坐标，对应的校准品浓度为横坐标，绘制“浓度-吸光度差值”校准曲线(见图1)。

[0038] 取待测血清或血浆样本，同法测定样本的吸光度差值，代入校准曲线，即可计算出待测样本中可卡因的含量。如果血清或血浆中可卡因的浓度超出校准曲线范围，需对样本

进行稀释后再检测以保证检测结果的准确性。

[0039] 本检测试剂不仅适用于日立7170,还适用于其它品牌和型号的半自动、全自动生化分析仪,具体参数可根据仪器进行调整。

[0040] 实施例四:线性范围确定

用接近线性范围上限的可卡因高浓度样本(51.2 μ M),用上述类似人血清基质的溶液将其按1/2,1/4,1/8,1/16,1/32,1/64 稀释,共配制成6个稀释浓度(x_i)的溶液,用所述生化分析仪检测方法测定各稀释样本浓度。每个稀释浓度测试3次,分别求出每个稀释浓度检测结果的均值(y_i)。以稀释浓度(x_i)为自变量,以测定均值(y_i)为因变量求出线性回归方程,根据公式(1)计算线性回归的相关系数r,结果显示回归方程为 $y=1.0105x-0.2133$,相关系数r=0.9997,表明本发明试剂在0.8 μ M -51.2 μ M线性范围内相关性较好(见图2)。

[0041] 由于本发明的检测过程是由仪器全自动化完成,所以对检测人员的要求不高,易于实现和推广使用。

[0042] 需要说明的是,显然本发明不限于上述示范性实施例的细节,本发明的范围由所附权利要求而不是上述说明限定,因此旨在将落在权利要求的等同要件的含义和范围内的所有变化囊括在本发明的专利保护范围内。

[0043] 此外,以上所述的仅是本发明的优选实施方案,对于本技术领域的技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做若干的改进和调整,这些改进的调整也应视为本发明的保护范围。

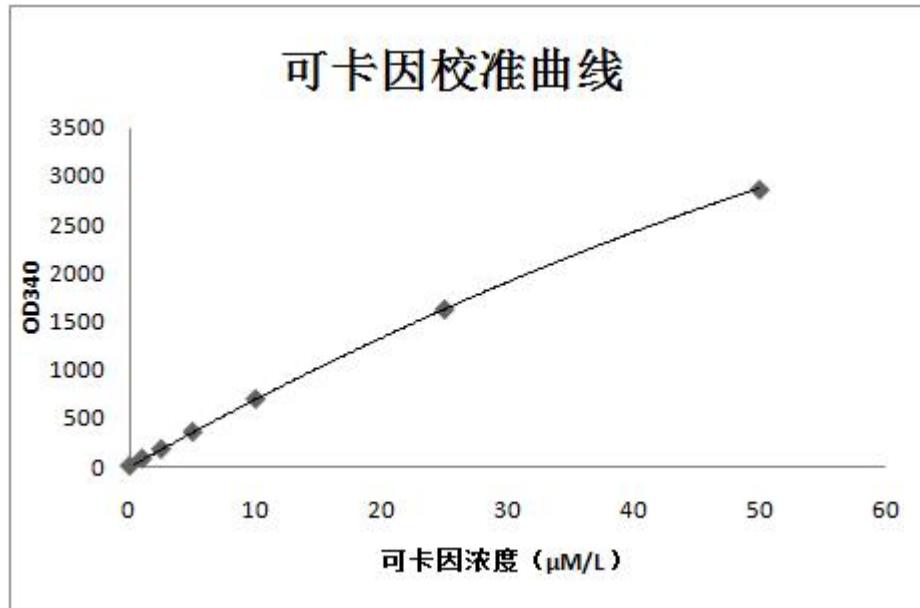


图1

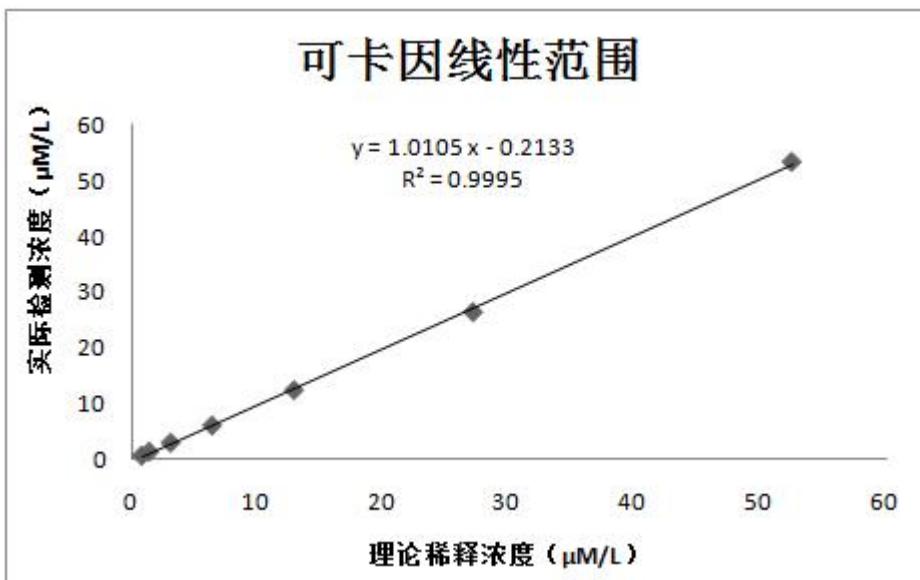


图2

专利名称(译)	一种可卡因免疫检测试剂及其制备和检测方法		
公开(公告)号	CN108089002A	公开(公告)日	2018-05-29
申请号	CN201711402931.4	申请日	2017-12-22
[标]发明人	于雪纯 康志禹 丁兰艳 赵慧敏 杜爱铭 徐兵		
发明人	于雪纯 康志禹 丁兰艳 赵慧敏 杜爱铭 徐兵		
IPC分类号	G01N33/58 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/946 G01N33/531 G01N33/581		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明公开了一种可卡因免疫检测试剂及其制备和检测方法。包括：酶标可卡因、用于检测可卡因抗体-酶标可卡因复合物的指示试剂；上述酶标可卡因由可卡因和葡萄糖脱氢酶偶联而成。本发明的可卡因免疫检测试剂可以精确快速地确定人体血液等样品中可卡因含量。与市场上现有的检测试剂相比，本发明检测试剂具有方便快速、灵敏度高、特异性强、定量准确等优点，有利于临床的推广使用。

