



(12) 实用新型专利

(10) 授权公告号 CN 203414467 U

(45) 授权公告日 2014. 01. 29

(21) 申请号 201320550667. X

(22) 申请日 2013. 09. 05

(73) 专利权人 中国人民解放军军事医学科学院
微生物流行病学研究所

地址 100071 北京市丰台区东大街 20 号

专利权人 中海智(北京)科技有限公司
北京热景生物技术有限公司

(72) 发明人 周蕾 杨笑嫒 杨瑞馥 林承喜
李靖 林长青

(74) 专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限公司 11322

代理人 鲁兵

(51) Int. Cl.

G01N 33/532 (2006. 01)

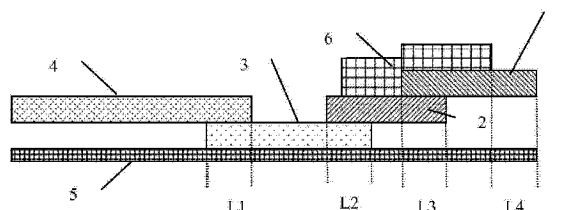
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54) 实用新型名称

一种对尿液中甲基苯丙胺浓度进行定量检测的上转发光免疫层析试纸

(57) 摘要

本实用新型对尿液中甲基苯丙胺浓度进行定量检测的上转发光免疫层析试纸,包括:等宽的条带状样品垫 [1]、结合垫 [2]、分析膜 [3]、吸水垫 [4]、粘性底衬 [5] 和 Max 线指示贴 [6],吸水垫与分析膜形成第一结合区,结合垫与分析膜形成第二结合区,样品垫与结合垫形成第三结合区,Max 线指示贴粘贴于结合垫与样品垫上,一侧与结合垫边缘平齐,另一侧比样片垫略短,各结合区长度以及略短长度为相应垫体长度的 $3/10-2/5$ 。本实用新型具有牢固稳定、尺寸精准、针对性强的特点,尤其适宜在现场对尿液中的甲基苯丙胺进行快速定量检测。



1. 一种对尿液中甲基苯丙胺浓度进行定量检测的上转发光免疫层析试纸,其特征在于,该试纸的组成结构包括:等宽的条带状样品垫 [1]、结合垫 [2]、分析膜 [3]、吸水垫 [4]、粘性底衬 [5]、Max 线指示贴 [6],其中,样品垫 [1]、结合垫 [2]、分析膜 [3] 和吸水垫 [4] 依次粘贴于粘性底衬 [5] 上,其中分析膜 [3] 贴于粘性底衬 [5] 的中间,吸水垫 [4] 贴于分析膜 [3] 的一侧且与分析膜 [3] 形成第一结合区,结合垫 [2] 贴于分析膜 [3] 的另一侧且与分析膜 [3] 形成第二结合区,样品垫 [1] 贴于结合垫 [2] 的另一侧之上且与结合垫 [2] 形成第三结合区,Max 线指示贴 [6] 粘贴于结合垫 [2] 与样品垫 [1] 上且覆盖结合垫 [2];所述第一结合区长度为吸水垫 [4] 长度的 $3/10-2/5$,所述第二结合区长度为结合垫 [2] 长度的 $3/10-2/5$;所述第三结合区长度为样品垫 [1] 长度的 $3/10-2/5$ 。

2. 如权利要求 1 所述的上转发光免疫层析试纸,其特征不在于,Max 线指示贴 [6] 与结合垫 [2] 重叠一侧的边缘与结合垫 [2] 平齐,与样品垫 [1] 重叠一侧的边缘比样品垫 [1] 略短,略短部分长度为样品垫 [1] 长度的 $3/10-2/5$ 。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的上转发光免疫层析试纸,其特征不在于,所述第一结合区长度为吸水垫 [4] 长度的 $7/20$;所述第二结合区长度为结合垫 [2] 长度的 $7/20$;所述第三结合区长度为样品垫 [1] 长度的 $7/20$ 。

4. 如权利要求 3 所述的上转发光免疫层析试纸,其特征不在于,所述 Max 线指示贴 [6] 由隔水材料制成。

5. 如权利要求 4 所述的上转发光免疫层析试纸,其特征不在于,分析膜 [3] 上在长度方向间距设置有平行的检测带 T[10] 和质控带 C[11],检测带 T[10] 中包被有甲基苯丙胺-牛血清白蛋白交联抗原,质控带 C[11] 中包被有兔抗羊 IgG。

6. 如权利要求 5 所述的上转发光免疫层析试纸,其特征不在于,结合垫 [2] 中固定有 UCP 结合物混合物 [7],UCP 结合物混合物 [7] 中包括:检测结合物和质控结合物,检测结合物为 UCP-甲基苯丙胺单克隆抗体结合物 [8],质控结合物为 UCP-羊 IgG 结合物 [9];

7. 如权利要求 6 所述的上转发光免疫层析试纸,其特征不在于,样品垫 [1] 为经缓冲液、表面活性剂、封闭蛋白、无机盐处理的滤尿垫。

一种对尿液中甲基苯丙胺浓度进行定量检测的上转发光免疫层析试纸

发明领域

[0001] 本实用新型涉及一种基于上转发光免疫层析技术的试纸结构,特别涉及一种可对尿液中甲基苯丙胺浓度进行精确定量检测的基于上转发光免疫层析技术的试纸。

背景技术

[0002] 甲基苯丙胺(methamphetamine, MA)是一种具有兴奋中枢神经作用的苯丙胺类物质,因其外观纯白晶莹似冰,而俗称为“冰毒”。冰毒具有强烈的中枢神经兴奋作用,由于其刺激性强且持久,使用一次便会上瘾,毒性强于有毒品之王之称的海洛因,因此被预言将逐步取代上世纪流行的鸦片、海洛因、大麻、可卡因等,成为 21 世纪滥用最为广泛的毒品。甲基苯丙胺是我国目前监控、查禁的最重要毒品之一。

[0003] 甲基苯丙胺的检测方法几乎包含了现代分析化学的各个领域,有色谱法、光谱法、质谱法等,还涉及生物学检测的多种经典技术,如免疫层析法、酶联免疫吸附法等。由于技术水平的限制,目前国际上对甲基苯丙胺的检测主要采用先筛查后确证的方法,即先采用快速定性检测方法对吸毒群体进行筛查,然后再用精确定量方法对初筛阳性的样本进行确证。

[0004] 主流的初筛方法是胶体金免疫层析法,它是一种基于多种微孔材料侧向毛细虹吸以达到特定靶标捕获与示踪的固相标记免疫测定技术。该方法具有简便、快速和价格低廉等优势,但是存在敏感性差、肉眼主观判读结果、无法精确定量等无法克服的技术缺陷。另外一些在初筛中涉及的技术还包括放射免疫分析法和酶联免疫吸附法(ELISA)。放射免疫分析法的样品用量少且无需预处理,准确度较高,但是对操作人员和环境有较大危害;ELISA 成本较低,速度较快,灵敏度高,但是样品需要一定的预处理,检测时间长达 2-3 小时,需要酶标仪,且对操作人员的专业水平要求较高,难以实现真正意义的现场在线监控和检测。

[0005] 确证方法主要有、高效液相色谱法(HPLC)和气/质联用分析法(GC-MS)。HPLC 和 GC-MS 法具有准确、重复性好,适用于定量检测等优点,是目前应用最广泛、最权威的确证毒品的定量方法。但是这两种方法都需要对样品进行预处理,操作繁琐,对操作人员的专业素质和技术熟练水平有较高的要求;而且,这两种方法的仪器比较昂贵,成本较高,因此只能定位为“初筛完成后针对阳性样品,由专业技术人员在实验室中进行结果复核”,不适合现场快速初筛。

[0006] 针对甲基苯丙胺初筛所依赖的免疫层析技术存在的技术缺陷,一种新型上转发光材料(Up-Converting Phosphor, UCP)的出现为其提供了解决的突破点。UCP 是新型的稀土金属晶体光学材料,其独特的物理结构以及化学组成使其具有自然界中不存在的上转发光现象,即 UCP 颗粒可由红外光激发、发射可见光,由此为所有以 UCP 颗粒作为生物示踪物的检测技术奠定了高信噪比、精确量化分析的坚实基础;依靠上转发光技术(Up-converting Phosphor Technology, UPT)促成了免疫层析技术与 UCP 结合成为上转发光免疫层析技术

(Up-converting Phosphor Technology based Lateral Flow assay, UPT-LF assay),即通过一系列表面修饰与活化后将 UCP 颗粒作为示踪物应用于免疫层析,在红外光照射下以独特的上转发光现象揭示生物活性分子之间高敏感特异的识别。使用上转发光免疫分析仪即可对 UPT 免疫层析试纸上由 UCP 产生的特异检测信号进行激发、接收、转换,从而实现目标被检物的准确定量。UPT-LF 试纸检测过程中样品无需预处理,加样后数分钟可完成检测,市售上转发光免疫分析仪价格低廉、操作简便、易于携带,可在数秒内扫描获取定量结果,因此无专业背景人员也可在现场快速实现特定靶标的精确定量检测。由此可见,通过 UCP 独特的光学特性针对性的解决了传统免疫层析技术敏感性差、不可精确定量的问题,同时保留了层析技术简便快捷的技术优势。

[0007] 综上所述,利用 UPT-LF 对尿液中甲基苯丙胺浓度进行精确定量检测,将会大幅提升甲基苯丙胺现场初筛的准确性、可靠性。

[0008] 然而,目前已有的免疫层析试纸各区域结构相对松散,存在试纸装载中易于散落的缺点,且试纸结构对甲基苯丙胺特性针对性较差,因此有必要设计针对甲基苯丙胺定量检测的上转发光免疫层析试纸。

[0009] 发明技术

[0010] 为了克服现有技术中存在的缺陷,本实用新型目的在于提供一种结构更牢固的对尿液中甲基苯丙胺浓度进行定量检测的上转发光免疫层析(UPT-LF)试纸。

[0011] 本实用新型提供的一种对尿液中甲基苯丙胺浓度进行定量检测的上转发光免疫层析(UPT-LF)试纸,包括:等宽的条带状样品垫、结合垫、分析膜、吸水垫、粘性底衬和 Max 线指示贴,其中,样品垫、结合垫、分析膜和吸水垫依次粘贴于粘性底衬上,其中分析膜贴于粘性底衬的中间,吸水垫贴于分析膜的一侧且与分析膜形成第一结合区,结合垫贴于分析膜的另一侧且与分析膜形成第二结合区,样品垫贴于结合垫的另一侧之上且与结合垫形成第三结合区,Max 线指示贴粘贴于结合垫与样品垫上且覆盖结合垫;所述第一结合区长度为吸水垫长度的 $\frac{3}{10}$ - $\frac{2}{5}$,所述第二结合区长度为结合垫长度的 $\frac{3}{10}$ - $\frac{2}{5}$;所述第三结合区长度为样品垫长度的 $\frac{3}{10}$ - $\frac{2}{5}$ 。

[0012] 其中,Max 线指示贴与结合垫重叠一侧的边缘与结合垫平齐,与样品垫重叠一侧的边缘比样品垫略短,略短部分长度为样品垫长度的 $\frac{3}{10}$ - $\frac{2}{5}$ 。

[0013] 具体的,所述第一结合区长度为吸水垫长度的 $\frac{7}{20}$;所述第二结合区长度为结合垫长度的 $\frac{7}{20}$;所述第三结合区长度为样品垫长度的 $\frac{7}{20}$;

[0014] 分析膜上在长度方向间距设置有平行的检测带 T 和质控带 C,检测带 T 中包被有甲基苯丙胺-牛血清白蛋白交联抗原,质控带 C 中包被有兔抗羊 IgG。

[0015] 结合垫中固定有 UCP 结合物混合物,UCP 结合物混合物中包括:检测结合物和质控结合物,检测结合物为 UCP-甲基苯丙胺单克隆抗体结合物,质控结合物为 UCP-羊 IgG 结合物;

[0016] 样品垫为经缓冲液、表面活性剂、封闭蛋白、无机盐处理的滤尿垫。

[0017] 采用以上方案,本实用新型对尿液中甲基苯丙胺浓度进行定量检测的上转发光免疫层析(UPT-LF)试纸,整个试纸涉及的重叠区域包括“吸水垫与分析膜重叠的第一结合区”、“结合垫与分析膜重叠的第二结合区”、“样品垫与结合垫重叠的第三结合区”,均采用中度偏轻度重叠方式,根据所确定的检测目标物甲基苯丙胺与试剂的结合及其在试纸上的

移动特点,设计重叠幅度为各自的 $3/10-2/5$ (即 $6/20-8/20$),从而同时兼顾液体样本在试纸各部分内部侧向流动的充分性以及液体样本在样品垫与结合垫中的充分浸润混匀,一方面保证较为适宜的流动时间,另一方面使得样本中的检测靶标与检测结合物通过样品垫与结合垫的较大重叠得以充分反应;“Max 线指示贴粘贴结合垫、样品垫且覆盖结合垫”重叠方式,一方面,Max 线指示贴全覆盖且粘贴,相当于一个上盖,可以使夹在其与粘性底衬之间的结合垫与样品垫结合更牢固,保证重叠区域的稳定性,避免试纸装载中出现散落,另一方面,Max 线指示贴用隔水材料制成,Max 线指示贴、结合垫、样品垫、粘性底衬的依次叠置与固定,形成了在隔水的 Max 线指示贴和粘性底衬之间的液体流道,避免液体样本直接跨区域流动。

[0018] 本实用新型通过将 UCP 颗粒作为示踪物与免疫层析技术相结合,利用 UCP 示踪物无背景干扰的高信噪比光学信号,大幅提升了传统层析技术的检测敏感性,并赋予其精确定量的能力,同时完整保留了免疫层析技术操作简便、快捷的优势。因而,最终所建立的对尿液中甲基苯丙胺浓度进行定量检测的上转发光免疫层析(UPT-LF)试纸,集成了操作简便、快速、敏感性高、特异性好、可精确定量等诸多特性,尤其适宜在现场对尿液中的甲基苯丙胺进行快速定量检测。将会大幅提升甲基苯丙胺现场初筛的准确性、可靠性。

附图说明:

[0019] 图 1:本实用新型甲基苯丙胺定量检测试纸立体结构图;

[0020] 图 2:本实用新型甲基苯丙胺定量检测试纸剖面结构示意图;

[0021] 图 3:本实用新型甲基苯丙胺定量检测试纸粘贴示意图;

[0022] 图 4:对尿液中甲基苯丙胺标准品浓度检测的标准曲线。

[0023] 1、样品垫、2、结合垫、3、分析膜、4、吸水垫、5、粘性底衬、6、Max 线指示贴、7、UCP 结合物混合物、8、UCP-甲基苯丙胺单克隆抗体结合物、9、UCP-羊 IgG 结合物、10、检测带 T、11、质控带 C。

[0024] 下面结合附图进一步说明本实用新型。

具体实施方式:

[0025] 参见图 1 和图 2 所示,本实用新型提供对尿液中甲基苯丙胺浓度进行定量检测的上转发光免疫层析(UPT-LF)试纸,由等宽的条带状样品垫 [1]、结合垫 [2]、分析膜 [3]、吸水垫 [4]、粘性底衬 [5]、Max 线指示贴 [6] 几部分组成。其中:

[0026] 样品垫 [1] 为经缓冲液、表面活性剂、封闭蛋白、无机盐处理的滤尿垫;

[0027] 结合垫 [2] 中固定有 UCP 结合物混合物 [7],UCP 结合物混合物 [7] 中包括:检测结合物和质控结合物,检测结合物为 UCP-甲基苯丙胺单克隆抗体结合物 [8],质控结合物为 UCP-羊 IgG 结合物 [9];

[0028] 分析膜 [3] 上设置有检测带 T[10]、质控带 C[11],两条带在长度方向上相互平行且有一定间隔;检测带 T[10] 包被有甲基苯丙胺-牛血清白蛋白交联抗原,质控带 C[11] 包被有兔抗羊 IgG;

[0029] 样品垫 [1]、结合垫 [2]、分析膜 [3] 和吸水垫 [4] 依次粘贴于粘性底衬 [5] 上,其中分析膜 [3] 贴于粘性底衬 [5] 的中间,吸水垫 [4] 贴于分析膜 [3] 的一侧之上,两者重合

部分形成第一结合区,第一结合区长度 L1 为吸水垫 [4] 长度的 3/10-2/5,较好为 7/20;结合垫 [2] 贴于分析膜 [3] 的另一侧之上,两者重合部分形成第二结合区,第二结合区长度 L2 为结合垫 [2] 长度的 3/10-2/5,较好为 7/20;样品垫 [1] 贴于结合垫 [2] 的另一侧之上,两者重合部分形成第三结合区,第三结合区长度 L3 为样品垫 [1] 长度的 3/10-2/5,较好为 7/20;Max 线指示贴 [6] 粘贴于结合垫 [2] 与样品垫 [1] 之上且覆盖结合垫 [2],其中与结合垫 [2] 重叠一侧,边缘与结合垫 [2] 平齐;与样品垫 [1] 重叠一侧,边缘比样品垫 [1] 略短,略短部分长度 L4 为样品垫 [1] 长度的 3/10-2/5,较好为 7/20。

[0030] 该上转发光免疫层析(UPT-LF)试纸的制备方法为:

[0031] A. 样品垫 [1] 的制备:将 4ml 样品垫处理液(pH7.2 磷酸盐缓冲液,含 0.01%SDS、0.5%脱脂奶粉、2%NaCl)滴加到 20cm×1.5cm 的滤尿垫上,于 37℃下烘干 2h,得样品垫 [1],备用;

[0032] B. 结合垫 [2] 的制备:将检测结合物(UCP-甲基苯丙胺单克隆抗体结合物 [8])和质控结合物(UCP-羊 IgG 结合物 [9])混合,得 UCP 结合物混合物 [7],用结合物稀释液(pH7.2 磷酸盐缓冲液,含 1%脱脂奶粉)将 UCP 结合物混合物 [7] 稀释至终浓度为 2mg/ml,将 UCP 结合物混合物 [7] 加于玻璃纤维、聚酯膜或无纺布上,于 45℃下烘干 1.5h,得结合垫 [2],备用;

[0033] C. 分析膜 [3] 的制备:将 2mg/ml 甲基苯丙胺-牛血清白蛋白交联抗原和 2mg/ml 兔抗羊 IgG 喷点于硝酸纤维素膜或尼龙膜上分别作为检测带 T[10] 和质控带 C[11],于 37℃下烘干 1h,得分析膜 [3],备用;

[0034] D. 将样品垫 [1]、结合垫 [2]、分析膜 [3] 和吸水垫 [4] 依次粘贴于粘性底衬 [5] (可选择 PVC 板等隔水材料)上,将 Max 线指示贴 [6] (可选择 PVC 膜等隔水材料)粘贴于样品垫 [1]、结合垫 [2] 上,确保相互之间的重叠关系(如图 3 所示);将试纸剪切为 4mm 宽单独可用的成品,得本实用新型尿液中甲基苯丙胺浓度定量检测试纸;成型的试纸可直接使用或置入塑料外壳中使用。

[0035] 使用本实用新型对尿液中甲基苯丙胺浓度进行定量检测的上转发光免疫层析(UPT-LF)试纸定量检测甲基苯丙胺的方法:

[0036] A. 添加样品:将待测样品(尿液)100 μl/条滴加至上述本实用新型甲基苯丙胺定量检测试纸的样品垫 [1] 上;

[0037] B. 层析反应:静置数分钟待层析反应完成;

[0038] C. 结果判读:用市售上转发光免疫分析仪对试纸进行扫描,将检测带 T[10] 和质控带 C[11] 的信号强度(即峰面积)依次赋值于 T 和 C, T/C 为甲基苯丙胺的检测值;

[0039] D. 结果定量:依次对甲基苯丙胺系列浓度标准品进行测定获得与每个浓度对应的 T/C 值,以 T/C 值作为 X、以标准品浓度作为 Y,绘制标准浓度工作曲线并拟合定量计算公式,将每个样品检测获得的 T/C 值代入定量计算公式即可获得其中所含甲基苯丙胺的精确浓度。

[0040] 对尿液中甲基苯丙胺浓度进行定量检测的上转发光免疫层析(UPT-LF)试纸检测甲基苯丙胺标准品敏感性与线性范围:

[0041] 将购自公安部物证鉴定中心的甲基苯丙胺标准品用标准尿稀释后,100 μl/条加到本实用新型甲基苯丙胺定量检测试纸上,层析数分钟后扫描,标准曲线见图 4,得出的实

验结果如表 1：

[0042] 表 1：本实用新型甲基苯丙胺定量检测试纸检测甲基苯丙胺标准品敏感性

[0043]

浓度 (ng/ml)	T/C 值			平均值	标准偏差	变异系数
	检测 1	检测 2	检测 3			
0	2.777	2.001	2.257	2.345	0.395	16.9%
100	2.188	1.739	1.954	1.960	0.225	11.5%
1000	1.226	1.003	1.068	1.099	0.115	10.4%
3000	0.663	0.618	0.625	0.635	0.024	3.8%
5000	0.537	0.43	0.443	0.470	0.058	12.4%

[0044] 结论：本甲基苯丙胺定量检测试纸的敏感性为 100ng/ml，在 100-5000ng/ml 的范围内可以精确定量。其定量计算公式如图 4 所列。

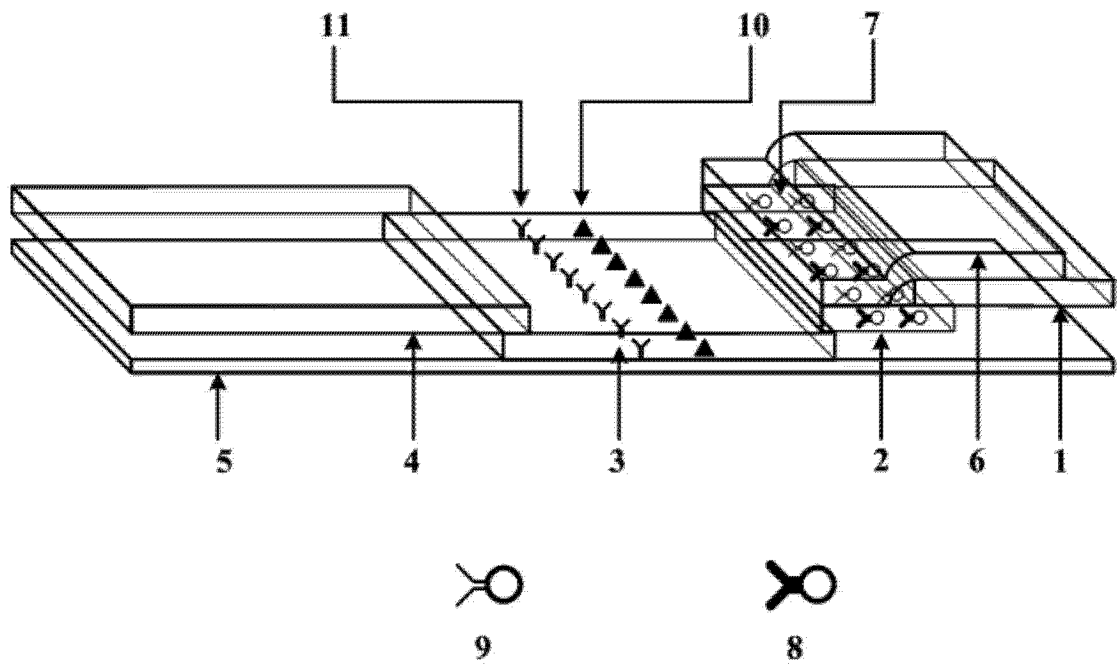


图 1

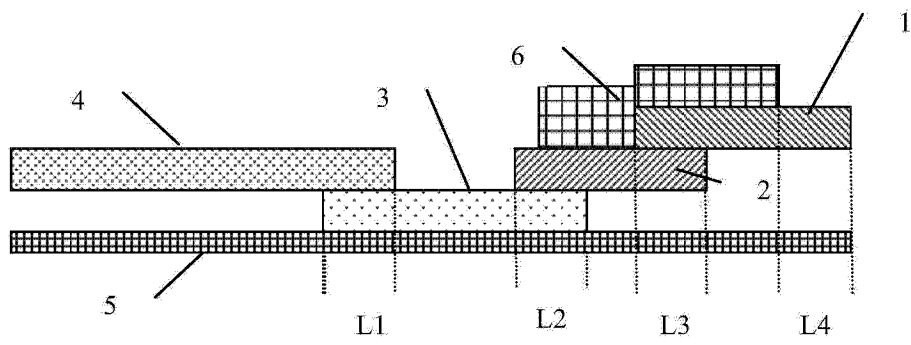


图 2

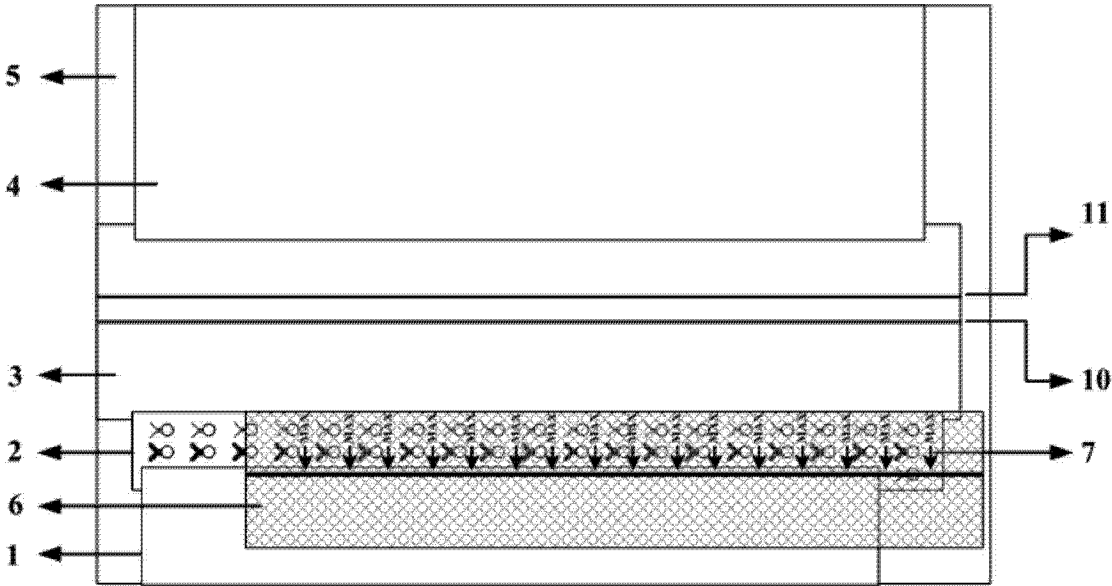


图 3

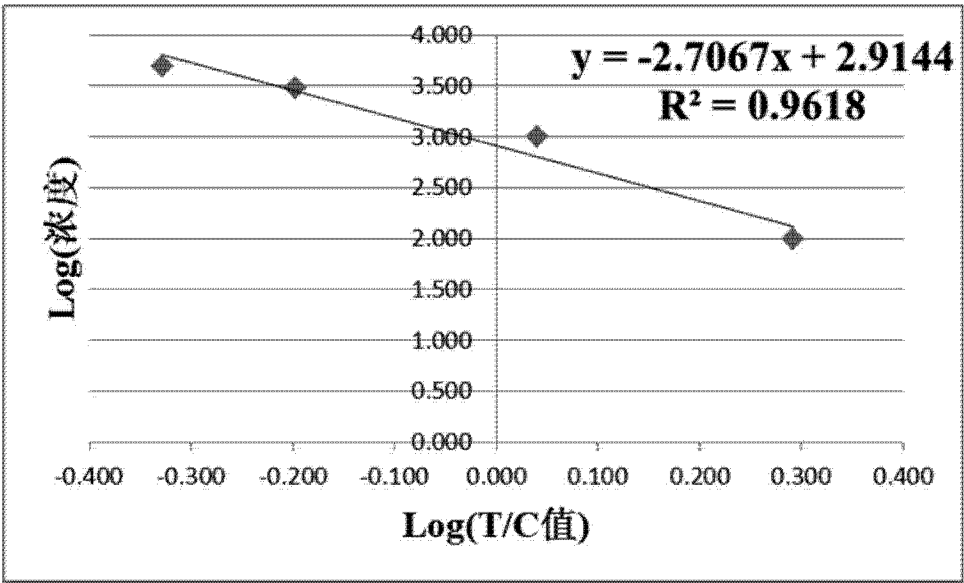


图 4

专利名称(译)	一种对尿液中甲基苯丙胺浓度进行定量检测的上转发光免疫层析试纸		
公开(公告)号	CN203414467U	公开(公告)日	2014-01-29
申请号	CN201320550667.X	申请日	2013-09-05
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病研究所 中海智(北京)科技有限公司 北京热景生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病研究所 中海智(北京)科技有限公司 北京热景生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病研究所 中海智(北京)科技有限公司 北京热景生物技术有限公司		
[标]发明人	周蕾 杨笑嫒 杨瑞馥 林承喜 李靖 林长青		
发明人	周蕾 杨笑嫒 杨瑞馥 林承喜 李靖 林长青		
IPC分类号	G01N33/532		
代理人(译)	鲁兵		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本实用新型对尿液中甲基苯丙胺浓度进行定量检测的上转发光免疫层析试纸，包括：等宽的条带状样品垫[1]、结合垫[2]、分析膜[3]、吸水垫[4]、粘性底衬[5]和Max线指示贴[6]，吸水垫与分析膜形成第一结合区，结合垫与分析膜形成第二结合区，样品垫与结合垫形成第三结合区，Max线指示贴粘贴于结合垫与样品垫上，一侧与结合垫边缘平齐，另一侧比样品垫略短，各结合区长度以及略短长度为相应垫体长度的3/10-2/5。本实用新型具有牢固稳定、尺寸精准、针对性强的特点，尤其适宜在现场对尿液中的甲基苯丙胺进行快速定量检测。

