



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107478829 A

(43)申请公布日 2017.12.15

(21)申请号 201710906487.3

(22)申请日 2017.09.29

(71)申请人 亳州市新健康科技有限公司

地址 236800 安徽省亳州市现代中药产业
创业基地B区10#B座

(72)发明人 熊良钟 王梓光 熊清爵 阮志燕
孙全峰 耿武松 蒋磊 李军
史学礼 王振 苏新国

(74)专利代理机构 北京律恒立业知识产权代理
事务所(特殊普通合伙)
11416

代理人 庞立岩 顾珊

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

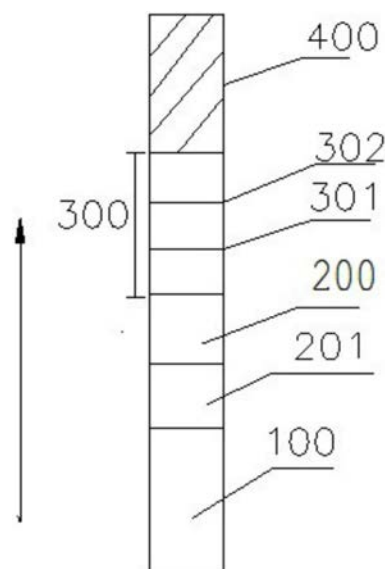
权利要求书2页 说明书8页 附图1页

(54)发明名称

一种基于双竞争免疫层析法的毒品检测试剂盒及其制备工艺

(57)摘要

本发明提供了一种应用于胶体金竞争法检测试剂盒及其制备工艺,将高度特异性的抗体抗原反应与免疫胶体金层析技术相结合,在此现有技术的基础上进行改进,引用荧光微球与胶体金标记抗体共同竞争样本中的待测物抗原,且荧光物质肉眼不可见的优点,从而提高竞争法胶体金检测试剂盒的灵敏度。



1. 一种基于双竞争免疫层析法的毒品检测试剂盒, 包括至少一种试纸和配套使用的塑料盒, 其特征在于, 所述试纸由样品垫、胶体金结合垫、荧光微球结合垫、硝酸纤维素膜、吸水纸顺次搭接粘贴在PVC塑料薄板上构成;

所述胶体金结合垫上涂覆有胶体金标记的待测物抗体, 所述荧光微球结合垫上涂覆有荧光微球标记的待测物抗体;

所述硝酸纤维素膜上包括包被有待测物抗原的检测区和包被有第二抗体的质控区。

2. 根据权利要求1所述的毒品检测试剂盒, 其特征在于, 所述胶体金结合垫的制备的具体步骤为:

S1: 胶体金颗粒的制备, 将氯金酸中的高价金还原成胶体金颗粒; 所述胶体金的制备按柠檬酸三钠还原法进行制备, 制备过程简单, 制备出的胶体金颗粒均匀一致;

S2: 抗体—胶体金标记物的制备, 选择40nm的胶体金颗粒与毒品抗体按最适当比例混匀, 使胶体金与抗体形成稳定的胶体颗粒, 通过纯化浓缩形成抗体—胶体金标记物, 所述毒品抗体为兔IgG, 浓度为0D30;

S3: 胶体金结合垫的制备, 将抗体—胶体金标记物用喷金机固定在结合垫上, 喷抗体—胶体金标记物的浓度为0D30-0D50, 干燥时间为4~24小时, 包被量为0.8~1.2 μ L/cm。

3. 根据权利要求1所述的毒品检测试剂盒, 其特征在于, 所述荧光微球结合垫的制备选择固含量1%的微球, 平均粒径为300nm, 均一性为CV<5%, 具体步骤如下:

R1: 微球悬浮液的制备, 将荧光微球用超声波清洗仪进行超声分散, 并结合手工摇匀, 超声时间为2min, 使微球分散均匀;

R2: 微球悬浮液的活化, 取1ml固含为1%的微球悬浮液, 加入到低吸附的离心管中, 离心条件13500r/min, 15min, 去掉上清液, 加入1mlMES缓冲液超声溶解; 分别加入5mg/ml的N-羟基琥珀酰亚胺与5mg/ml的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐加入到微球悬浮液中, 上下颠倒均匀反应30min; 离心条件13500r/min, 15min, 去掉上清液, 加入PB缓冲液, 然后用超声波超声分散均匀, 接着定容到1ml;

R3: 抗体—荧光微球标记物的制备, 取1ml活化后的微球悬浮液, 超声分散均匀, 边搅拌边滴加抗体, 抗体量为0.30mg, 搅拌过夜, 离心条件13500r/min, 15min; 加1%的BSA进行封闭1小时, 离心条件13500r/min, 15min, 用保存液定容到1ml, 得到抗体—荧光微球标记物;

R4: 荧光微球结合垫的制备, 将抗体—荧光微球标记物固定在结合垫上, 所述抗体—荧光微球标记物浓度为1%-20%, 干燥时间为4~24小时, 包被量为0.8~1.2 μ L/cm。

4. 根据权利要求2或3所述的毒品检测试剂盒, 其特征在于, 所述抗体—荧光微球标记物的包被量为1.0 μ L/cm; 喷抗体—胶体金标记物的浓度为0D40, 包被量为1.0 μ L/cm。

5. 根据权利要求1所述的毒品检测试剂盒, 其特征在于, 所述检测区包被的毒品抗原的浓度为0.3~0.5mg/ml, 包被量为0.8~1.2 μ L/cm, 置于45℃条件下干燥24小时。

6. 根据权利要求1所述的毒品检测试剂盒, 其特征在于, 所述质控区包被的第二抗体为羊抗兔多克隆抗体, 其浓度为0.3~0.5mg/ml, 干燥时间为4~24小时, 包被量为0.8~1.2 μ L/cm。

7. 根据权利要求5或6所述的毒品检测试剂盒, 其特征在于, 所述检测区(T线)包被的毒品抗原的浓度为0.4mg/ml, 包被量1.0 μ L/cm; 所述第二抗体的浓度为0.4mg/ml, 包被量为1.0 μ L/cm。

8. 一种基于双竞争免疫层析法的毒品检测试剂盒的制备工艺,步骤如下:

步骤一:将抗体-胶体金标记物用喷金机固定于胶体金结合垫上;将抗体-荧光微球标记物固定于荧光微球结合垫上;

步骤二:将抗原、第二抗体用点膜机分别点于硝酸纤维素膜的检测区和控制区上,充分干燥,使硝酸纤维素膜牢固地吸附原料;

步骤三:按生产要求组装PVC塑料薄板,撕去PVC塑料薄板吸水纸粘贴处覆盖纸,将吸水纸沿上边缘对齐粘贴;撕去金标垫及样品垫粘贴处覆盖纸,将第一层荧光微球结合垫(4mm)压膜1-1.5mm,第二层胶体金结合垫(8mm)压第一层结合垫一半($2\text{mm} \pm 0.5\text{mm}$);样品垫沿下边缘对齐粘贴,再将覆盖纸覆在样品垫上,用手轻轻摁压一次;金垫与样品垫接触的位置用覆盖纸轻轻摁压一次,保证各组件连接紧密;

步骤四:将组装好的大板切成 $4\text{mm} \pm 0.05\text{mm}$ 的试纸条待测。

9. 根据权利要求8所述的毒品检测试剂盒的制备工艺,其特征在于,所述一个毒品检测试剂盒里有多种用于检测不同毒品的试纸。

10. 根据权利要求8所述的毒品检测试剂盒的制备工艺,其特征在于,所述检测抗体、抗原中的毒品包括但不限于以下毒品:吗啡、苯丙胺、甲基苯丙胺、大麻、氯胺酮、丁丙诺啡、美沙酮、可卡因、摇头丸、三唑仑、巴比妥、麦角二乙胺、芬太尼、三环类抗抑郁剂和杜冷丁。

一种基于双竞争免疫层析法的毒品检测试剂盒及其制备工艺

技术领域

[0001] 本发明涉及生物与新医药技术领域,特别涉及一种基于双竞争免疫层析法的毒品检测试剂盒及其制备工艺,用于戒毒所、医院、军队征兵、高危人群普查、特种行业和招工体检工作中筛检以及卫生防疫部门对食品检查等。

背景技术

[0002] 目前,毒品检测主要是以金标法进行尿液检测,主要特点是快速、方便、便于携带、准确率高等。尿液中单一毒品的测定较普遍采用的方法有:单克隆抗体单片定性法、薄层层析色谱法、气相色谱法、气-质联用检测法,但是这些方法均在不同程度上存在交叉反应、干扰因素多和前处理过程复杂等不足之处。气-质联用(GC-MS)检测法是毒品检测的标准方法,但其存在仪器价格昂贵、仪器的检测和操作有严格要求、不能快速用于现场检测等缺点。

[0003] 免疫胶体金标记技术是以胶体金作为示踪标志物或显色剂,应用于抗原抗体反应的一种新型免疫标记技术。由于它不存在内源酶干扰及放射性同位素污染等问题,且利用不同颗粒大小的胶体金还可以作多重标记,使定位更加精确。

[0004] 现有技术中,多种毒品复合检测方法是将高度特异性的抗体抗原反应与免疫胶体金层析技术相结合。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检测中。

[0005] 传统的竞争法原理为:NC反应膜上包被有待测物抗原,胶体金上标记上待测物抗体并固着于标记物垫上(如图1所示),当样本中无待测物时,胶体金上的抗体会与反应膜上的抗原反应结合,T线出线;当样本中含有待测物时,待测物会有胶体金上的抗体反应,当浓度足够大将胶体金上的抗体反应完,则胶体金上的抗体无法与反应膜上的抗原反应,则T线无线。但是,在实际生产中该检测试剂盒的灵敏度受到各种因素的影响:(1)反应灵敏度的高低取决于所采用抗原抗体的特异性反应以及对抗体的修饰;(2)有些产品由于特异性反应时间短造成结合不完全,从而影响检测试剂的灵敏度。

[0006] 因此,需要一种能有效地提高抗原-抗体反应的灵敏度,进而提高检测试剂的灵敏度的基于双竞争免疫层析法的毒品检测试剂盒及其制备工艺。

发明内容

[0007] 为了克服现有技术中的缺陷,本发明提供一种基于双竞争免疫层析法的毒品检测试剂盒及其制备工艺。

[0008] 本发明的整体技术构思是:本发明提供了一种应用于胶体金竞争法检测试剂盒及其制备工艺,将高度特异性的抗体抗原反应与免疫胶体金层析技术相结合,在此现有技术的基础上进行改进,引用荧光微球与胶体金标记抗体共同竞争样本中的待测物抗原,将荧光微球结合垫作为第一层结合垫,胶体金结合垫作为第二层结合垫;其中,所述待测物可为毒品的主要有效化学成份或者毒品的代谢产物。

[0009] 当样本中无待测物时,胶体金标记的抗体与荧光微球标记的抗体一起随着液体向上层析,由于胶体金粒径比荧光微球粒径小,向上层析速度快,胶体金上标记的抗体会与反应膜上的抗原反应,T线上出现紫红色条带;到达质控区时,胶体金上的抗体与第二抗体反应,C线显色;

[0010] 当样本中含有待测物时,待测物抗原会先与胶体金结合垫上的抗体反应,再与荧光微球结合垫上的抗体反应,若待测物抗原与胶体金结合垫上的抗体因反应时间过短导致反应不完全,待测物抗原和胶体金标记的抗体以及荧光微球标记的抗体达到反应膜,T线也会出线,将导致检测不准确,而本发明增加的荧光微球结合垫一方面可以延长待测物抗原到达反应膜的时间,从而增加胶体金上的抗体与待测物抗原反应的时间(即此时未反应完全的待测物抗原与胶体金粒、比胶体金粒径更大的荧光微球粒一起向反应膜层析,层析速度也会变慢,从而延长了到达的反应膜的时间),另一方面经过胶体金结合垫的未反应完的待测物抗原还会再一次与荧光微球结合垫上的抗体反应,增加了待测物抗原与标记抗体的反应几率,使待测物抗原与标记抗体的反应完全;通过以上两个方面提高了待测物抗原与标记抗体的反应的灵敏度,进而提高了检测试剂盒的检测准确度。

[0011] 为达到上述目的,本发明提供一种毒品检测试剂盒,包括至少一种试纸和配套使用的塑料盒,所述试纸由样品垫、胶体金结合垫、荧光微球结合垫、硝酸纤维素膜、吸水纸顺次搭接粘贴在PVC塑料薄板上构成;所述胶体金结合垫上涂覆有胶体金标记的待测物抗体,所述荧光微球结合垫上涂覆有荧光微球标记的待测物抗体;所述硝酸纤维素膜上包括包被有待测物抗原的检测区(T线)和包被有第二抗体的质控区(C线)。

[0012] 其中,所述胶体金结合垫的制备应用还原技术,具体步骤为:

[0013] S1:胶体金颗粒的制备,将氯金酸中的高价金还原成胶体金颗粒;所述胶体金的制备按柠檬酸三钠还原法进行制备,制备过程简单,制备出的胶体金颗粒均匀一致。

[0014] S2:抗体—胶体金标记物的制备,选择40nm的胶体金颗粒与毒品抗体按最适当比例混匀,使胶体金与抗体形成稳定的胶体颗粒,通过纯化浓缩形成抗体—胶体金标记物;优选地,所述毒品抗体为兔IgG,浓度为0D30。

[0015] S3:胶体金结合垫的制备,将抗体—胶体金标记物用喷金机固定在结合垫上,喷抗体—胶体金标记物的浓度为0D30-0D50,干燥时间为4~24小时,包被量为0.8~1.2 μ L/cm。

[0016] 优选地,喷抗体—胶体金标记物的浓度为0D40,包被量为1.0 μ L/cm。

[0017] 其中,所述荧光微球结合垫的制备选择固含量1%的微球,平均粒径:280nm,均一性为CV<5%,具体步骤如下:

[0018] R1:荧光微球悬浮液的制备,将荧光微球用超声波清洗仪进行超声分散,并结合手工摇匀,超声时间大约为2min,使微球分散均匀。

[0019] R2:荧光微球悬浮液的活化,取1ml固含为1%的微球悬浮液,加入到低吸附的离心管中,离心条件13500r/min,15min,去掉上清液,加入1ml MES缓冲液超声溶解;分别加入5mg/ml的N-羧基琥珀酰亚胺与5mg/ml的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐加入到微球悬浮液中,上下颠倒均匀反应30min;离心条件13500r/min,15min,去掉上清液,加入PB缓冲液,然后用超声波超声分散均匀,接着定容到1ml;

[0020] R3:抗体—荧光微球标记物的制备,取1ml活化后的荧光微球悬浮液,超声分散均匀,边搅拌边滴加抗体;优选地,所述抗体为兔IgG,抗体量为0.30mg,搅拌过夜,离心条件

13500r/min,15min;加1%的BSA进行封闭1小时,离心条件13500r/min,15min,用保存液定容到1ml,得到抗体-荧光微球标记物。

[0021] R4:荧光微球结合垫的制备,将抗体-荧光微球标记物固定在结合垫上,所述抗体-荧光微球标记物浓度为1%-20%,干燥时间为4~24小时,包被量为0.8~1.2 μ L/cm;优选地,包被量为1.0 μ L/cm。

[0022] 其中,所述检测区(T线)包被的毒品抗原的浓度为0.3~0.5mg/ml,包被量为0.8~1.2 μ L/cm,置于45℃条件下干燥24小时,对50ng/ml毒品的检测灵敏度最好。

[0023] 优选地,所述检测区(T线)包被的毒品抗原的浓度为0.4mg/ml,包被量1.0 μ L/cm。

[0024] 其中,所述质控区(C线)包被的第二抗体为羊抗兔多克隆抗体,其浓度为0.3~0.5mg/ml,干燥时间为4~24小时,包被量为0.8~1.2 μ L/cm。

[0025] 优选地,所述第二抗体的浓度为0.4mg/ml,包被量为1.0 μ L/cm。

[0026] 根据本发明的另一个方面,还提供一种毒品检测试剂盒的制备工艺,步骤如下:

[0027] 步骤一:将抗体-胶体金标记物用喷金机固定于胶体金结合垫上;将抗体-荧光微球标记物固定于荧光微球结合垫上;

[0028] 步骤二:将抗原、第二抗体用点膜机分别点于硝酸纤维素膜的检测区和控制区上,充分干燥,使硝酸纤维素膜牢固地吸附原料;

[0029] 步骤三:按生产要求组装PVC塑料薄板,撕去PVC塑料薄板吸水纸粘贴处覆盖纸,将吸水纸沿上边缘对齐粘贴;撕去金标垫及样品垫粘贴处覆盖纸,将荧光微球结合垫(4mm)压膜1-1.5mm,第二层胶体金结合垫(8mm)压第一层结合垫一半(2mm $\pm$ 0.5mm);样品垫沿下边缘对齐粘贴,再将覆盖纸覆在样品垫上,用手轻轻摁压一次;金垫与样品垫接触的位置用覆盖纸轻轻摁压一次,保证各组件连接紧密;

[0030] 步骤四:将组装好的大板切成4mm $\pm$ 0.05mm的试纸条待测。

[0031] 本发明的基于双竞争免疫层析法的毒品检测试剂盒及其制备方法适用于所有竞争法产品,从而提高检抗原抗体反应的灵敏度,且成本极低。

[0032] 应当理解,前述大体的描述和后续详尽的描述均为示例性说明和解释,并不应当用作对本发明所要求保护内容的限制。

附图说明

[0033] 参考随附的附图,本发明更多的目的、功能和优点将通过本发明实施方式的如下描述得以阐明,其中:

[0034] 图1示出了传统的胶体金试纸条结构示意图。

[0035] 图2示出本发明的基于双竞争免疫层析法的试纸条结构示意图。

[0036] 附图标记:100、样品垫;200、胶体金结合垫;

[0037] 201、荧光微球结合垫;300、硝酸纤维素膜;301、检测区(T线);302、质控区(C线);400、吸水纸;

具体实施方式

[0038] 通过参考示范性实施例,本发明的目的和功能以及用于实现这些目的和功能的方法将得以阐明。然而,本发明并不受限于以下所公开的示范性实施例;可以通过不同形式来

对其加以实现。说明书的实质仅仅是帮助相关领域技术人员综合理解本发明的具体细节。

[0039] 在下文中,将参考附图描述本发明的实施例。在附图中,相同的附图标记代表相同或类似的部件,或者相同或类似的步骤。需要说明的是,本文所用的术语“单克隆抗体”是指获自基体上同源的抗体群的抗体,即除了可能存在少量可能的自发突变外,组成该群体的抗体个体都相同。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,可利用杂交瘤技术制备或可用重组DNA法(美国专利号4816567)进行制备。本文所述的各种毒品抗原和与之配对的毒品单克隆抗体也可向相关合格生产商购买。

[0040] 实施例1

[0041] 一种大麻(THC)检测试剂盒,包括用于检测大麻的试纸和配套使用的塑料盒,所述试纸由样品垫、胶体金结合垫、荧光微球结合垫、硝酸纤维素膜、吸水纸顺次搭接粘贴在PVC塑料薄板上构成;所述胶体金结合垫上涂覆有胶体金标记的THC兔IgG抗体,所述荧光微球结合垫上涂覆有荧光微球标记的THC兔IgG抗体;所述硝酸纤维素膜上包括包被有THC抗原的检测区(T线)和包被有第二抗体羊抗兔多克隆抗体的质控区(C线),如图2所示。

[0042] 其中,所述胶体金结合垫的制备应用还原技术,具体步骤为:

[0043] S1:胶体金颗粒的制备,将氯金酸中的高价金还原成胶体金颗粒;所述胶体金的制备按柠檬酸三钠还原法进行制备,制备过程简单,制备出的金颗粒均匀一致。

[0044] S2:THC兔IgG抗体—胶体金标记物的制备,选择40nm的胶体金颗粒与毒品抗体按最适当比例混匀,使胶体金与抗体形成稳定的胶体颗粒,通过纯化浓缩形成THC兔IgG抗体—胶体金标记物。

[0045] S3:胶体金结合垫的制备,将抗体—胶体金标记物用喷金机固定在结合垫上,喷THC兔IgG抗体—胶体金标记物的浓度为0D40,干燥时间为4~24小时,包被量1.0 μ L/cm,其中所述THC兔IgG抗体的浓度为0D30。

[0046] 其中,所述荧光微球结合垫的制备选择固含量1%的微球,平均粒径为300nm,均一性:CV<5%,具体步骤如下:

[0047] R1:微球悬浮液的制备,将荧光微球用超声波清洗仪进行超声分散,并结合手工摇匀,超声时间大约为2min,使微球分散均匀。

[0048] R2:微球悬浮液的活化,取1ml固含为1%的微球悬浮液,加入到低吸附的离心管中,离心条件13500r/min,15min,去掉上清液,加入1ml MES缓冲液超声溶解;分别加入5mg/ml的N-羟基琥珀酰亚胺与5mg/ml的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐加入到微球悬浮液中,上下颠倒均匀反应30min;离心条件13500r/min,15min,去掉上清液,加入PB缓冲液,然后用超声波超声分散均匀,接着定容到1ml。

[0049] R3:THC兔IgG抗体—荧光微球标记物的制备,取1ml活化后的微球悬浮液,超声分散均匀,边搅拌边滴加抗体;所述兔IgG抗体量为0.30mg,搅拌过夜,离心条件13500r/min,15min;加1%的BSA进行封闭1小时,离心条件13500r/min,15min,用保存液定容到1ml,得到THC兔IgG抗体—荧光微球标记物。

[0050] R4:荧光微球结合垫的制备,将THC兔IgG抗体—荧光微球标记物固定在结合垫上,所述THC兔IgG抗体—荧光微球标记物浓度为1%-20%,干燥时间为4~24小时,包被量为1.0 μ L/cm。

[0051] 其中,所述检测区(T线)包被的THC抗原的浓度为0.4mg/ml,包被量1.0μL/cm,置于45℃条件下干燥24小时,对50ng/ml THC的检测灵敏度最好。

[0052] 其中,所述质控区(C线)包被的第二抗体为羊抗兔多克隆抗体,其浓度为0.4mg/ml,干燥时间为4~24小时,包被量1.0μL/cm。

[0053] 实施例2

[0054] 一种大麻(THC)检测试剂盒的制备工艺,步骤如下:

[0055] 步骤一:将THC兔IgG抗体-胶体金标记物用喷金机固定于胶体金结合垫上;将THC兔IgG抗体-荧光微球标记物固定于荧光微球结合垫上;

[0056] 步骤二:将THC抗原、羊抗兔IgG多克隆抗体用点膜机点于硝酸纤维素膜的检测区和控制区上,充分干燥,使硝酸纤维素膜牢固地吸附原料;

[0057] 步骤四:按生产要求组装PVC塑料薄板,撕去PVC塑料薄板吸水纸粘贴处覆盖纸,将吸水纸沿上边缘对齐粘贴;撕去金标垫及样品垫粘贴处覆盖纸,将荧光微球结合垫(4mm)压膜1-1.5mm,第二层胶体金结合垫(8mm)压第一层结合垫一半(2mm±0.5mm);样品垫沿下边缘对齐粘贴,再将覆盖纸覆在样品垫上,用手轻轻摁压一次;金垫与样品垫接触的位置用覆盖纸轻轻摁压一次,保证各组件连接紧密;将组装好的大板切成4mm±0.05mm的试纸条待测。

[0058] 实施例3

[0059] 一种摇头丸(二亚甲基双氧安非它明)检测试剂盒,包括用于检测大麻的试纸和配套使用的塑料盒,其特征在于,所述试纸由样品垫、胶体金结合垫、荧光微球结合垫、硝酸纤维素膜、吸水纸顺次搭接粘贴在PVC塑料薄板上构成;所述胶体金结合垫上涂覆有胶体金标记的二亚甲基双氧安非它明兔IgG抗体,所述荧光微球结合垫上涂覆有荧光微球标记的二亚甲基双氧安非它明兔IgG抗体;所述硝酸纤维素膜上包括包被有二亚甲基双氧安非它明抗原的检测区(T线)和包被有第二抗体羊抗兔多克隆抗体的质控区(C线),如图2所示。

[0060] 其中,所述胶体金结合垫的制备应用还原技术,具体步骤为:

[0061] S1:胶体金颗粒的制备,将氯金酸中的高价金还原成胶体金颗粒;所述胶体金的制备按柠檬酸三钠还原法进行制备,制备过程简单,制备出的金颗粒均匀一致。

[0062] S2:二亚甲基双氧安非它明兔IgG抗体-胶体金标记物的制备,选择40nm的胶体金颗粒与毒品抗体按最适当比例混匀,使胶体金与抗体形成稳定的胶体颗粒,通过纯化浓缩形成二亚甲基双氧安非它明兔IgG抗体-胶体金标记物。

[0063] S3:胶体金结合垫的制备,将抗体-胶体金标记物用喷金机固定在结合垫上,喷二亚甲基双氧安非它明兔IgG抗体-胶体金标记物的浓度为0D40,干燥时间为4~24小时,包被量1.0μL/cm,其中所述二亚甲基双氧安非它明兔IgG抗体的浓度为0D30。

[0064] 其中,所述荧光微球结合垫的制备选择固含量1%的微球,平均粒径为300nm,均一性:CV<5%,具体步骤如下:

[0065] R1:微球悬浮液的制备,将荧光微球用超声波清洗仪进行超声分散,并结合手工摇匀,超声时间大约为2min,使微球分散均匀。

[0066] R2:微球悬浮液的活化,取1ml固含为1%的微球悬浮液,加入到低吸附的离心管中,离心条件13500r/min,15min,去掉上清液,加入1ml MES缓冲液超声溶解;分别加入5mg/ml的N-羟基琥珀酰亚胺与5mg/ml的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐加入到微

球悬浮液中,上下颠倒均匀反应30min;离心条件13500r/min,15min,去掉上清液,加入PB缓冲液,然后用超声波超声分散均匀,接着定容到1ml。

[0067] R3:二亚甲基双氧安非它明兔IgG抗体-荧光微球标记物的制备,取1ml活化后的微球悬浮液,超声分散均匀,边搅拌边滴加抗体;所述兔IgG抗体量为0.30mg,搅拌过夜,离心条件13500r/min,15min;加1%的BSA进行封闭1小时,离心条件13500r/min,15min,用保存液定容到1ml,得到二亚甲基双氧安非它明兔IgG抗体-荧光微球标记物。

[0068] R4:荧光微球结合垫的制备,将二亚甲基双氧安非它明兔IgG抗体-荧光微球标记物固定在结合垫上,所述二亚甲基双氧安非它明兔IgG抗体-荧光微球标记物浓度为1%-20%,干燥时间为4~24小时,包被量为1.0 μ L/cm。

[0069] 其中,所述检测区(T线)包被的THC抗原的浓度为0.4mg/ml,包被量1.0 μ L/cm,置于45℃条件下干燥24小时,对50ng/ml THC的检测灵敏度最好。

[0070] 其中,所述质控区(C线)包被的第二抗体为羊抗兔多克隆抗体,其浓度为0.4mg/ml,干燥时间为4~24小时,包被量1.0 μ L/cm。

[0071] 实施例4

[0072] 一种摇头丸(二亚甲基双氧安非它明)检测试剂盒的制备工艺,步骤如下:

[0073] 步骤一:将二亚甲基双氧安非它明兔IgG抗体-胶体金标记物用喷金机固定于胶体金结合垫上;将二亚甲基双氧安非它明兔IgG抗体-荧光微球标记物固定于荧光微球结合垫上;

[0074] 步骤二:将二亚甲基双氧安非它明抗原、羊抗兔IgG多克隆抗体用点膜机点于硝酸纤维素膜的检测区和控制区上,充分干燥,使硝酸纤维素膜牢固地吸附原料;

[0075] 步骤四:按生产要求组装PVC塑料薄板,撕去PVC塑料薄板吸水纸粘贴处覆盖纸,将吸水纸沿上边缘对齐粘贴;撕去金标垫及样品垫粘贴处覆盖纸,将荧光微球结合垫(4mm)压膜1-1.5mm,第二层胶体金结合垫(8mm)压第一层结合垫一半(2mm $\pm$ 0.5mm);样品垫沿下边缘对齐粘贴,再将覆盖纸覆在样品垫上,用手轻轻摁压一次;金垫与样品垫接触的位置用覆盖纸轻轻摁压一次,保证各组件连接紧密;将组装好的大板切成4mm $\pm$ 0.05mm的试纸条待测。

[0076] 上述实施例只是本发明构思下其中几种,其中优选实施例为:结合垫上标记的抗体选择兔IgG或鼠IgG,第二抗体选择羊抗兔IgG多克隆抗体或羊抗鼠IgG多克隆抗体;凡是属于使用竞争法原理的毒品检测试剂盒仍属于本发明构思下的产品,包括但不限于以下毒品的检测试剂盒:吗啡、苯丙胺、甲基苯丙胺(冰毒)、大麻、氯胺酮(K粉)、丁丙诺啡、美沙酮、可卡因、摇头丸、三唑仑、巴比妥、麦角二乙胺、芬太尼、三环类抗抑郁剂和杜冷丁;相应地,其中结合垫上标记用毒品抗体一般选择鼠或兔单克隆抗体,质控区(C线)的第二抗体为相应的毒品抗体的抗体即可。

[0077] 下面以大麻检测试剂盒为例说明本发明毒品试剂盒的使用方法及判读方法,具体如下:

[0078] 在使用大麻检测试剂盒检测尿液样本时,实际上检测的是尿液中是否含有四氢大麻酚(四氢大麻酚为大麻的主要有效化学成份或者为大麻的代谢产物,四氢大麻酚的简写为THC,以下可直接写THC),应该将样品垫浸入90 μ l~240 μ l尿液样本中;判读时间在2-10分钟之内,可判读出正确的结果,建议2-5分钟之内判读(最好3-5分钟之内判读,这样底板更

加清晰,判读更加容易),当小于2分钟判读时,由于背景较深而判读困难。另外,温度对检测试剂的信号有一定影响,检测试剂应在铝箔袋开封后1小时内使用;如在温度高于30℃和高湿的环境中,应尽可能做到即开即用。

[0079] 判读方法:质控区出现紫红色条带(C线)表示溶液充分层析,并有抗原抗体结合反应,作为内部质量控制;具体为,如果同时出现C线和T线,或只出现C线,则表示测试有效,如果不同时出现C线和T线或只出现T线,则表示测试无效。

[0080] 当本发明的样品垫浸入90 μ l~240 μ l尿液样本中,当尿液样本中不含有四氢大麻酚(THC)时,胶体金与荧光微球一起随着液体向上层析,由于胶体金粒径比荧光微球粒径小,向上层析速度快,会在反应膜上质控区(T线)上出现紫红色条带(实际生产中检测区抗原浓度要尽量高);当到达质控区时,胶体金标记的THC兔IgG抗体和荧光微球标记的THC兔IgG抗体就会和羊抗兔IgG多克隆抗体进行反应,C线显色;综上可知:当T线和C线同时出现,说明测试有效且尿液样本中不含有四氢大麻酚(THC),即检测结果为不含有毒品大麻。

[0081] 当样本中含有四氢大麻酚时,其会先与胶体金上的抗体反应再与荧光微球上的抗体反应,此时形成的结果有以下几种:

[0082] (1)样品中THC先与胶体金上的抗体反应,且反应完全,样本中THC被完全反应,荧光微球标记的抗体会依次与反应膜检测区上的THC抗原反应,质控区上的第二抗体反应,又由于荧光物质肉眼不可见,则不出现T线,只出现C线,测试有效,且尿液中含有四氢大麻酚(THC),即检测结果为含有毒品大麻。

[0083] (2)样品中THC先与胶体金上的抗体反应,若胶体金上的抗体与THC反应不完全,由于胶体金标记的抗体、荧光微球标记的抗体与未反应完的THC一起向上层析,胶体金向上层析的速度不会像原先快,增加了胶体金与THC反应的时间,使胶体金标记的抗体反应完全,此时,荧光微球标记的抗体会与反应膜检测区上的THC抗原反应,又由于荧光物质肉眼不可见,T线不会出现紫红色条带;当达到质控区时,荧光微球标记的THC兔IgG抗体还会与羊抗兔IgG多克隆抗体进行反应,出现C线,即只出现C线,说明测试有效,且尿液中含有四氢大麻酚(THC),即检测结果为含有毒品大麻。

[0084] 当样品含有的THC含量大于胶体金上标记的抗体含量时,胶体金上的抗体被反应完全,而样品中的THC未被反应完全,此时样品中未反应完全的THC还可与荧光微球结合垫上的抗体反应,增加了THC与抗体反应的几率,使得样品中的THC全部反应完;此时,荧光微球标记的抗体会与反应膜检测区上的THC抗原反应,又由于荧光物质肉眼不可见,T线不会出现紫红色条带;当达到质控区时,荧光微球标记的抗体还会与羊抗兔IgG多克隆抗体进行反应,出现C线,即只出现C线,说明测试有效,且尿液中含有含有四氢大麻酚(THC),即检测结果为含有毒品大麻。

[0085] 本发明提供了一种应用于胶体金竞争法检测试剂盒及其制备工艺,将高度特异性的抗体抗原反应与免疫胶体金层析技术相结合,在此现有技术的基础上进行改进,引用荧光微球与胶体金标记抗体共同竞争样本中的待测物抗原;当待测物抗原含量小于胶体金标记的抗体含量,且待测物抗原与胶体金结合垫上的抗体因反应时间过短导致反应不完全,本发明增加的荧光微球由于粒径较大,层析变慢,延长了待测物抗原到达反应膜的时间,从而增加胶体金上的抗体与待测物抗原反应的时间;当待测物抗原含量超过胶体金标记的抗体含量,胶体金标记的抗体被反应完全,待测物抗原可再次与本发明增加的荧光微球标记

的抗体反应,增加了待测物与标记抗体的反应几率,使待测物抗原与标记抗体的反应完全;通过以上两个方面提高了待测物抗原与标记抗体的反应的灵敏度,进而提高了检测试剂盒的灵敏度。

[0086] 需要说明的是,无论是使用多个本发明提供的用于检测某一种毒品检测试剂盒还是使用一个本发明提供的用于检测多种毒品的试剂盒,在检测有效的前提下,在现有检测试纸条采用胶体金结合垫的基础上增加了荧光微球结合垫,利用了荧光微球粒径较大层析较慢和荧光物质肉眼不可见的特点,不仅延长了待测物抗原和抗体反应的时间,还增加了待测物抗原与抗体反应的几率,从而提高反应的灵敏度,实现检测试剂盒的高灵敏度检测。

[0087] 结合这里披露的本发明的说明和实践,本发明的其他实施例对于本领域技术人员都是易于想到和理解的。说明和实施例仅被认为是示例性的,本发明的真正范围和主旨均由权利要求所限定。

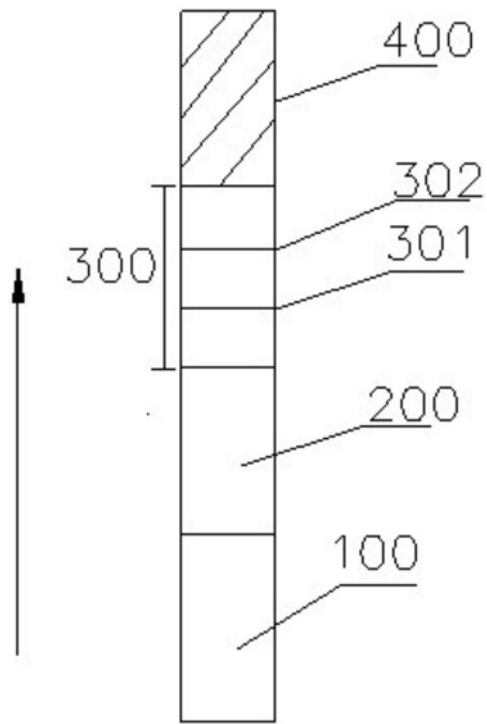


图1

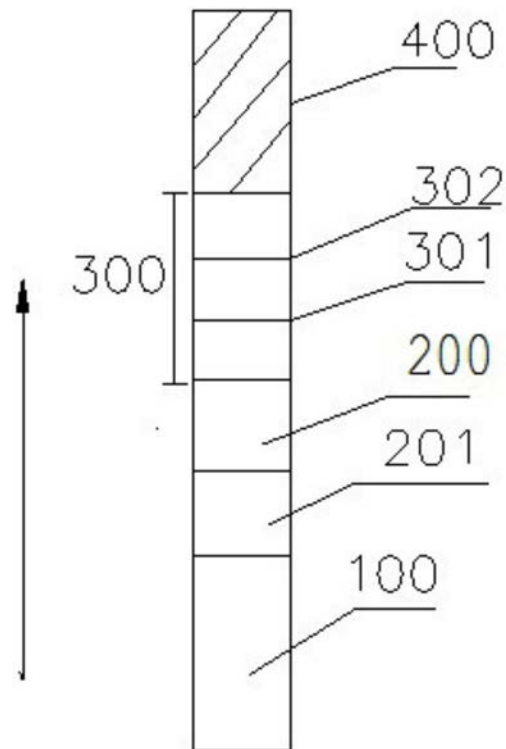


图2

专利名称(译)	一种基于双竞争免疫层析法的毒品检测试剂盒及其制备工艺		
公开(公告)号	CN107478829A	公开(公告)日	2017-12-15
申请号	CN2017110906487.3	申请日	2017-09-29
[标]申请(专利权)人(译)	亳州市新健康科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	亳州市新健康科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	亳州市新健康科技有限公司		
[标]发明人	熊良钟 王梓光 熊清爵 阮志燕 孙全峰 耿武松 蒋磊 李军 史学礼 王振 苏新国		
发明人	熊良钟 王梓光 熊清爵 阮志燕 孙全峰 耿武松 蒋磊 李军 史学礼 王振 苏新国		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/558 G01N33/533		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种应用于胶体金竞争法检测试剂盒及其制备工艺，将高度特异性的抗体抗原反应与免疫胶体金层析技术相结合，在此现有技术的基础上进行改进，引用荧光微球与胶体金标记抗体共同竞争样本中的待测物抗原，且荧光物质肉眼不可见的特点，从而提高竞争法胶体金检测试剂盒的灵敏度。

