

[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 200910184032.0

[51] Int. Cl.

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/64 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

C12N 15/06 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

[43] 公开日 2010 年 1 月 6 日

[11] 公开号 CN 101620231A

[22] 申请日 2009.8.11

[21] 申请号 200910184032.0

[71] 申请人 江苏省苏微微生物研究有限公司

地址 214063 江苏省无锡市钱荣路 7 号

[72] 发明人 赵晓联 赵春城 杨婷婷 沈笑平
魏万里 何金海 蔡建荣 龚 燕
蔡正森 吴 杰 沈雯琰 王文静
张海涛

权利要求书 3 页 说明书 9 页 附图 1 页

[54] 发明名称

一种检测去甲氯胺酮的 ELISA 测试盒及制备方法

[57] 摘要

本发明提供了一种检测去甲氯胺酮(NKET)的 ELISA 测试盒及制备方法。测试盒包括洗涤液、显色液 A、显色液 B 和终止液、包被板、去甲氯胺酮(NKET)标准品、抗 NKET 单克隆抗体和酶标记的羊抗鼠抗体冻干品。包被板包被固相抗原,去甲氯胺酮标准品从去甲氯胺酮纯品中稀释得到,抗 NKET 单克隆抗体通过先制备去甲氯胺酮的完全抗原,利用小鼠免疫制得。本发明提供的去甲氯胺酮(NKET)的 ELISA 测试盒采用酶联免疫吸附检测方法,通过测定去甲氯胺酮的吸光度值,从标准曲线计算样品中的 NKET 含量。操作简便,检测快速、灵敏、准确,专用测试盒使用方便、价格低,适用于大批量样品的检测。

1、一种检测去甲氯胺酮(NKET)的ELISA测试盒,其包括洗涤液、显色液A、显色液B和终止液,其特征在于:其还包括包被板、去甲氯胺酮(NKET)标准品、抗NKET单克隆抗体和酶标记的羊抗鼠抗体冻干品。

2、一种检测去甲氯胺酮(NKET)的ELISA测试盒的制备:其特征在于:其包括以下步骤,包被板的制备、去甲氯胺酮(NKET)标准品的制备、抗NKET单克隆抗体的制备和酶标记的羊抗鼠抗体冻干品的制备。

3、根据权利要求2所述一种检测去甲氯胺酮的ELISA测试盒的制备:其特征在于:所述包被板包被固相抗原,其可采用96或48或24孔微孔板,用10~100mmol/L pH9~10 $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ 的缓冲液作为包被液,去甲氯胺酮-卵清蛋白(NKET-OVA)稀释至0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$,96或48或24孔微孔板各孔加100 μl ,2~8 $^{\circ}\text{C}$ 放置过夜,弃去包被液,洗涤2~5次,按加入含1~5%牛血清白蛋白,pH7~8的磷酸盐缓冲液,2~8 $^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜,弃去封闭液,吹干,板条密封后置-20~-40 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存;

4、根据权利要求2所述一种检测去甲氯胺酮的ELISA测试盒的制备:其特征在于:所述去甲氯胺酮标准品从去甲氯胺酮纯品中稀释得到,稀释液为去离子水,NKET浓度为:0 ng/mL~100 ng/mL。

5、根据权利要求2所述一种检测去甲氯胺酮的ELISA测试盒的制备:其特征在于,所述抗NKET单克隆抗体的制备:50 μg NKET-BSA 偶联抗原用50 μl 生理盐水配成1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 抗原溶液,与等体积完全福氏佐剂(液体石蜡:羊毛脂:卡介苗=12 g:20 ml:0.105g)混匀,充分乳化,供首次免疫用。加强免疫时用同量的不完全福氏佐剂(液体石蜡:羊毛脂=12 g:20 ml)代替完全福氏佐剂。首次免疫采用小鼠腹腔内直接注射,免疫剂量为50 $\mu\text{g}/\text{只}$ 小鼠。以后每隔2周加强免疫一次,加强免疫采用尾静脉注射,免疫剂量10 $\mu\text{g}/\text{只}$ 。最后一次免疫采用脾内注射,4天后取脾融合。将分离的免疫小鼠脾细胞与处于对数生长期的骨髓瘤细胞SP-2/o以10:1比例混合。离心,去除上清。在50~90 S内将1 ml 50%聚乙二醇(分子量为1500)加至细胞中,充分混匀,使其融合,1 min后加入20 ml DEM培养液,终止融合。水浴静置10 min后离心,去除上清。将融合细胞用含20%小牛血清的HAT选择性培养基悬浮后,以最后浓度为 1×10^4 饲养细胞/0.1 ml接种于以小鼠腹腔巨噬细胞作饲养层的96孔培养板中,于5% CO_2 ,37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养,8 d后,每培养孔更换2/3 HT培养液。10 d~20 d后,开始对镜检有杂交瘤克隆生长的培养孔,取上清液进行筛选,对检测结果呈阳性的细胞立即用有限稀释法进行克隆。杂交瘤筛选采用固相抗原间接非竞争ELISA法进行。以NKET-OVA为包被抗原,以免疫小鼠的血清为阳性对照,以SP-2/o骨髓瘤细胞培养的上清液为阴性对照。阳性细胞孔的判定标准为 $(A_{\text{试验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) > 2.1$ 。对分泌阳性抗体的细胞进行克隆。采用有限稀释法,将阳性克隆细胞吹匀,取一微滴至培养瓶内,倒置显微镜下准确计数细胞个数,稀释为70个/ml再取1 ml稀释20倍,接种入96孔培养板中进行亚克隆。直至所有细胞孔的培养上清均呈阳性为止。对10~13周龄Balb/c小鼠腹腔注射液体石蜡0.3~0.5 ml/只,8~10 d后,腹腔注射培养至对数期的杂交瘤细胞, 5×10^5 细胞/只。5 d后注意观察,收集腹水,离心去除沉淀,加甘油于-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

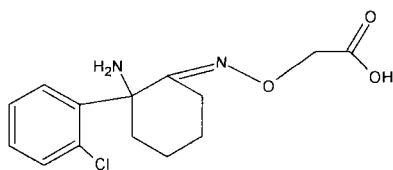
6、根据权利要求2所述一种检测去甲氯胺酮的ELISA测试盒的制备:其特征在于,去

甲氯胺酮-卵清蛋白(NKET-OVA)偶联物和去甲氯胺酮-BSA 完全抗原的制备：本发明实施中，有关抗体的产生采用如下方法：

半抗原

去甲氯胺酮（Norketamine）分子量很小（223.6 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，对去甲氯胺酮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”或“去甲氯胺酮活化衍生物”是指经本发明的衍生反应得到的具有结构式 1 的物质，其结构如式 1 所示：

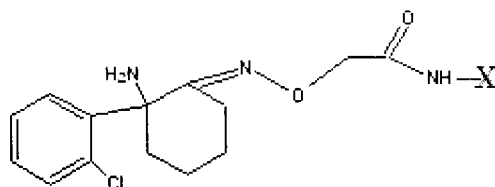


通常，半抗原需要和大分子如 KLH（血蓝蛋白）或 BSA（牛血清白蛋白）以共价键方式偶联，成为既具有免疫反应性，又具有免疫原性的完全抗原。

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。

本发明用于去甲氯胺酮检测及抗体制备的完全抗原的结构如式 2 所示：



其中，X 为蛋白质载体，本发明中优选卵清蛋白（OVA）或牛血清白蛋白（BSA）；与 X 载体共价交联的部分为去甲氯胺酮的衍生物 1-羧甲氧基氨-去甲氯胺酮

在本发明的一个优选的方案中，X 为卵清蛋白，完全抗原为去甲氯胺酮-OVA，作为免疫用抗原，用于制备去甲氯胺酮-OVA 偶联物。

在本发明的另一个优选的方案中，X 为牛血清白蛋白，完全抗原为去甲氯胺酮-BSA，作为检测用抗原，用于制备检测去甲氯胺酮的单克隆抗体。

本发明的完全抗原的制备方法如下：

首先将去甲氯胺酮活化，得到其衍生物：1-羧甲氧基氨-去甲氯胺酮，再将其与适合的蛋白质载体（例如，OVA、BSA）进行连接，得到完全抗原。其中 X 为蛋白质载体，本发明中优选卵清蛋白（OVA）或牛血清白蛋白（BSA）；与 X 载体共价交联的部分为去甲氯胺酮的衍生物 1-羧甲氧基氨-去甲氯胺酮。

1-羧甲氧基氨-去甲氯胺酮的制备：取 260mg NKET+ 400 mg Omix，溶于 40ml 反应溶剂 [反应溶剂为：吡啶+甲醇+水=1:4:1] 中，磁力搅拌均匀，加热回流 3hr，室温过夜。40℃水浴，减压蒸干。用 30mL 水溶解固体，并用 1N NaHCO₃ 溶液调 pH 为 8.5，转移至分液漏斗中，用 80mL CHCl₃ 提取 3 次，弃去 CHCl₃ 层。再用 1.2N HCl 溶液调 pH 为 3，用 100mL CHCl₃ 提取 4 次，收集 CHCl₃ 层。加入 20mL 水洗涤 CHCl₃ 层，收集 CHCl₃ 层。加入无水 Na₂SO₄ 溶脱水 10min，过滤，CHCl₃ 液至蒸馏瓶中，减压浓缩至干。

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。

7、根据权利要求 2 所述一种检测去甲氯胺酮的 ELISA 测试盒的制备：其特征在于，所述酶标记的羊抗鼠抗体冻干品为辣根过氧化物酶-羊抗鼠抗体冻干品；所述洗涤液为含有吐温和 NaN₃ 的磷酸盐缓冲溶液；所述显色液 A 为含有过氧化氢的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液；所述显色液 B 为四甲基联苯二胺的乙醇溶液；所述终止液为硫酸溶液。

8、去甲氯胺酮的酶联免疫吸附检测方法，其特征在于：取包被有 NKET-OVA 的微孔包被板，加入 50~100 μL 的 NKET 标准品或处理好的样品到各自的微孔中，加 50~100μL 抗 NKET 抗体，35~45℃孵育 0.5~1 h，洗涤液洗 3~5 次，加 50~100μl 辣根过氧化物酶 (HRP) -羊抗鼠抗体，35~45℃孵育 0.5~1 h，用洗涤液洗 3~5 次，加 50~100 μL 显色液 A 和 50~100 μL 显色液 B，暗处静置 10~20 min 后加终止液，在 450 nm 处测其吸光度值，从标准曲线计算样品中的 NKET 含量。

一种检测去甲氯胺酮的 ELISA 测试盒及制备方法

(一) 技术领域

本发明涉及违禁药品的检测,属于生物技术领域,具体为一种去甲氯胺酮(NKET)的酶联免疫分析用测试盒及制备方法。

(二) 背景技术

氯胺酮(Ketamine),在我国俗称“K粉”,化学名为2-邻氯苯基-2-甲胺基-环己酮。试图以其替代苯环己哌啶(PCP),消除PCP作为麻醉剂所产生的精神性副作用,而成为一种新型麻醉剂。氯胺酮是PCP的衍生物,于1962年首次人工合成,属非麻醉性镇痛药类。该药物在亚麻醉剂量时就能深度镇痛,而且没有大多数其它常规麻醉剂相关的抑制心脏、呼吸功能的副作用,已经在临床试用多年。

自1971年美国旧金山和洛杉矶市首先报告的氯胺酮滥用病例以来,氯胺酮滥用迅速蔓延至周边国家。上个世纪90年代末,氯胺酮滥用流入日本,泰国等亚洲国家,并迅速蔓延到我国。近二十年来,我国滥用氯胺酮的比例连续攀升,香港特别行政区尤为严重。鉴于氯胺酮滥用全球化的严重性,建立准确、灵敏的检测方法十分必要。

氯胺酮代谢较快,最初分布在脑和其他高灌流组织,然后分布到低灌流区。氯胺酮代谢的半衰期为3~4h,借助于细胞色素酶P450经N去甲基作用形成能产生与氯胺酮相同效果的去甲氯胺酮(norketamine),去甲氯胺酮再进一步脱氢产生可能同样有活性的脱氢去甲氯胺酮(Dehydronorketamine),见图1。氯胺酮和2种主要的代谢物又可进一步羟基化,形成葡萄糖酸结合物。氯胺酮及其代谢物90%经肾脏排泄,5%随粪便排除,4%以原形或去甲氯胺酮随尿排除。

图1 氯胺酮及其代谢产物

在生物检材（如血液、尿液、毛发等）中代谢物的含量比较高，因此作为检测指标，氯胺酮代谢物（主要是去甲基氯胺酮）的检测比氯胺酮的检测更加重要，对是否吸食氯胺酮的确认也更加有效。目前主流的检测方法有气相色谱法（GC）、液相色谱法（LC）、气相色谱-质谱联用法（GC-MS/GC-MS-MS）、液相色谱-质谱联用法（LC-MS/LC-MS-MS）、毛细管电泳（CE）和薄层层析（TLC）等理化分析方法，同时亦建立了胶体金免疫层析（GICA）等免疫学检测方法。理化分析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。而胶体金免疫层析法使用的试纸条虽然克服了传统的仪器检测方法检测速度慢和不能进行高通量检测的弱点，而且无须专业人员操作，但检测限偏高。因此，本领域迫切需要一种能够更加快速、简易、灵敏地检测去甲氯胺酮的检测方法和检测试剂。

（三）发明内容

针对上述问题，本发明提供了一种检测去甲氯胺酮（NKET）的 ELISA 测试盒，其检测快速、灵敏、准确、可定量、操作简便、无需贵重仪器设备，且对样品纯度要求不高，特异性强，简化了样品预处理和纯化过程，特别适用于大批量样品的检测，为此本发明还提供了测试盒的制备及检测方法。

一种检测去甲氯胺酮（NKET）的 ELISA 测试盒，其包括洗涤液、显色液 A、显色液 B 和终止液，其特征在于：其还包括包被板、去甲氯胺酮（NKET）标准品、抗 NKET 单克隆抗体和酶标记的羊抗鼠抗体冻干品。

一种检测去甲氯胺酮（NKET）的 ELISA 测试盒的制备：其特征在于：其包括以下步骤，包被板的制备、去甲氯胺酮（NKET）标准品的制备、抗 NKET 单克隆抗体的制备、酶标记的羊抗鼠抗体冻干品的制备。

其进一步特征在于：所述包被板包被固相抗原，其可采用 96 或 48 或 24 孔微孔板，用 10~100mmol / L pH9~10 Na_2CO_3 - NaHCO_3 的缓冲液作为包被液，去甲氯胺酮-卵清蛋白(NKET -OVA)稀释至 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，96 或 48 或 24 孔微孔板各孔加 100 μl ，2~8℃放置过夜，弃去包被液，洗涤 2~5 次，按加入含 1~5%牛血清白蛋白，pH 7~8 的磷酸盐缓冲液，2~8℃封闭过夜，弃去封闭液，吹干，板条密封后置-20~-40℃冷冻保存；

所述去甲氯胺酮标准品从去甲氯胺酮纯品中稀释得到，稀释液为去离子水，NKET 浓度为：0 ng/mL~100 ng/mL；

所述抗 NKET 单克隆抗体的制备：50 μg NKET-BSA 偶联抗原用 50 μl 生理盐水配成 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 抗原溶液，与等体积完全福氏佐剂（液体石蜡:羊毛脂:卡介苗=12 g:20 ml:0.105g）混匀，充分乳化，供首次免疫用。加强免疫时用同量的不完全福氏佐剂（液体石蜡:羊毛脂=12 g:20 ml）代替完全福氏佐剂。首次免疫采用小鼠腹腔内直接注射，免疫剂量为 50 μg /只小鼠。以后每隔 2 周加强免疫一次，加强免疫采用尾静脉注射，免疫剂量 10 μg /只。最后一次免疫采用脾内注射，4 天后取脾融合。将分离的免疫小鼠脾细胞与处于对数生长期的骨髓瘤细胞 SP-2/o 以 10:1 比例混合。离心，去除上清。在 50~90 S 内将 1 ml 50%聚乙二醇(分子量为 1500)加至细胞中，充分混匀，使其融合，1 min 后加入 20 ml DEM 培养液，终止融合。水浴静止 10 min 后离心，去除上清。将融合细胞用含 20%小牛血清的 HAT 选择性培养基悬浮后，以最后浓度为 1×10^4 饲养细胞/0.1 ml 接种于以小鼠腹腔巨噬细胞作饲养层的 96 孔培养板中，于 5 % CO_2 ，37℃条件下培养，8 d 后，每培养孔更换 2/3 HT 培养液。10 d~20 d 后，开始对镜检有杂交瘤克隆生长的培养孔，取上清液进行筛选，对检测结果呈阳性的细胞立即用有限稀释法进行克隆。杂交瘤筛选采用固相抗原间接非竞

争 ELISA 法进行。以 NKET-OVA 为包被抗原，以免疫小鼠的血清为阳性对照，以 SP-2/o 骨髓瘤细胞培养的上清液为阴性对照。阳性细胞孔的判定标准为 $(A_{\text{试验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) > 2.1$ 。对分泌阳性抗体的细胞进行克隆。采用有限稀释法，将阳性克隆细胞吹匀，取一微滴至培养瓶内，倒置显微镜下准确计数细胞个数，稀释为 70 个 / ml 再取 1 ml 稀释 20 倍，接种入 96 孔培养板中进行亚克隆。直至所有细胞孔的培养上清均呈阳性为止。对 10~13 周龄 Balb/c 小鼠腹腔注射液体石蜡 0.3~0.5 ml/只，8~10 d 后，腹腔注射培养至对数期的杂交瘤细胞， 5×10^5 细胞/只。5 d 后注意观察，收集腹水，离心去除沉淀，加甘油于 -20℃ 保存。

所述酶标记的羊抗鼠抗体冻干品为辣根过氧化物酶-羊抗鼠抗体冻干品；所述洗涤液为含有吐温和 NaN_3 的磷酸盐缓冲溶液；所述显色液 A 为含有过氧化氢的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液；所述显色液 B 为四甲基联苯二胺的乙醇溶液；所述终止液为硫酸溶液。

去甲氯胺酮的酶联免疫吸附检测方法，其特征在于：取包被有 NKET-OVA 的微孔包被板，加入 50~100 μL 的 NKET 标准品或处理好的样品到各自的微孔中，加 50~100 μL 抗 NKET 抗体，35~45℃ 孵育 0.5~1 h，洗涤液洗 3~5 次，加 50~100 μL 辣根过氧化物酶（HRP）-羊抗鼠抗体，35~45℃ 孵育 0.5~1 h，用洗涤液洗 3~5 次，加 50~100 μL 显色液 A 和 50~100 μL 显色液 B，暗处静置 10~20 min 后加终止液，在 450 nm 处测其吸光度值，从标准曲线计算样品中的 NKET 含量。

本发明的去甲氯胺酮的酶联免疫吸附检测方法操作简便，检测快速、灵敏、准确，专用测试盒使用方便、价格低，适用于大批量样品的检测。

(四)附图说明

图2为去甲氯胺酮 NKET 标准曲线图。

(五) 具体实施方式

一种检测去甲氯胺酮的 ELISA 试剂盒，其包括洗涤液 1、显色液 A、显色液 B 和终止液 10，其还包括包被板 12、去甲氯胺酮标准品 11、去甲氯胺酮单抗 5 和酶标记的羊抗鼠抗体冻干品 6。

试剂盒的制备：其包括以下步骤，包被板的制备、去甲氯胺酮标准品的制备、抗去甲氯胺酮单克隆抗体的制备、酶标记的羊抗鼠抗体冻干品的制备。

包被板包被固相抗原，其可采用 96 或 48 或 24 孔微孔板，用 10mmol / L pH9.5 $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ 的缓冲液作为包被液，将去甲氯胺酮-卵清蛋白 (NKET-OVA) 稀释至 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，96 或 48 或 24 孔微孔板各孔加 100 μl ，5 $^{\circ}\text{C}$ 放置过夜，弃去包被液，洗涤 2 次，按加入含 5% 牛血清白蛋白，pH 7.5 的磷酸盐缓冲液，8 $^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜，弃去封闭液，吹干，板条密封后置 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存；

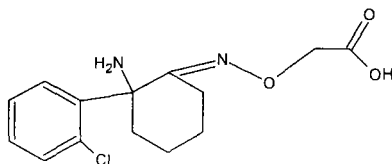
去甲氯胺酮从去甲氯胺酮纯品中稀释得到，稀释液为去离子水，NKET 浓度为：25 ng/mL；

本发明实施中，有关抗体的产生采用如下方法：

半抗原

去甲氯胺酮 (Norketamine) 分子量很小 (223.6 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，对去甲氯胺酮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”或“去甲氯胺酮活化衍生物”是指经本发明的衍生反应得到的具有结构式 1 的物质，其结构如式 1 所示：



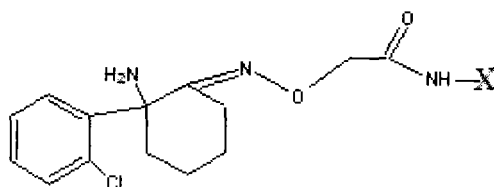
完全抗原

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。

本发明用于去甲氯胺酮检测及抗体制备的完全抗原的结构如式 2 所示：



其中，X 为蛋白质载体，本发明中优选卵清蛋白（OVA）或牛血清白蛋白（BSA）；与 X 载体共价交联的部分为去甲氯胺酮的衍生物 1-羧甲氧基氨-去甲氯胺酮

在本发明的一个优选的方案中，X 为卵清蛋白，完全抗原为去甲氯胺酮-OVA，作为免疫用抗原，用于制备去甲氯胺酮-OVA 偶联物。

在本发明的另一个优选的方案中，X 为牛血清白蛋白，完全抗原为去甲氯胺酮-BSA，作为检测用抗原，用于制备检测去甲氯胺酮的单克隆抗体。

本发明的完全抗原的制备方法如下：

首先将去甲氯胺酮活化，得到其衍生物：1-羧甲氧基氨-去甲氯胺酮，再将其与适合的蛋白质载体（例如，OVA、BSA）进行连接，得到完全抗原。其中 X 为蛋白质载体，本发明中优选卵清蛋白（OVA）或牛血清白蛋白（BSA）；与 X 载体共价交联的部分为去甲氯胺酮的衍生物 1-羧甲氧基氨-去甲氯胺酮。

1-羧甲氧基氨-去甲氯胺酮的制备：取 260mg NKET+ 400 mg Omix，溶于 40ml 反应溶剂 [反应溶剂为：吡啶+甲醇+水=1:4:1] 中，磁力搅拌浑匀，加热回流 3hr，室温过夜。40℃水浴，减压蒸干。用 30mL 水溶解固体，并用 1N NaHCO₃ 溶液调 pH 为 8.5，转移至分液漏斗中，用 80mL CHCl₃ 提取 3 次，弃去 CHCl₃ 层。再用 1.2N HCl 溶液调 pH 为 3，用 100mL CHCl₃ 提取 4 次，收集 CHCl₃ 层。加入 20mL 水洗涤 CHCl₃ 层，收集 CHCl₃ 层。加入无水 Na₂SO₄ 溶脱水 10min，过滤，CHCl₃ 液至蒸馏瓶中，减压浓缩至干。

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，去甲氯胺酮-OVA 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 1:6400；完全抗原去甲氯胺酮-BSA 很好的保留了去甲氯胺酮的免疫反应性。

抗 NKET 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。

50 μg NKET-BSA 偶联抗原用 50 μl 生理盐水配成 1 μg/μl 抗原溶液，与等体积完全福氏佐剂（液体石蜡:羊毛脂:卡介苗=12 g:20 ml:0.105g）混匀，

充分乳化，供首次免疫用。加强免疫时用同量的不完全福氏佐剂（液体石蜡：羊毛脂=12 g:20 ml）代替完全福氏佐剂。首次免疫采用小鼠腹腔内直接注射，免疫剂量为 50 μg /只小鼠。以后每隔 2 周加强免疫一次，加强免疫采用尾静脉注射，免疫剂量 10 μg /只。最后一次免疫采用脾内注射，4 天后取脾融合。将分离的免疫小鼠脾细胞与处于对数生长期的骨髓瘤细胞 SP-2/o 以 10:1 比例混合。离心，去除上清。在 50~90 S 内将 1 ml 50% 聚乙二醇(分子量为 1500)加至细胞中，充分混匀，使其融合，1 min 后加入 20 ml DEM 培养液，终止融合。水浴静置 10 min 后离心，去除上清。将融合细胞用含 20% 小牛血清的 HAT 选择性培养基悬浮后，以最后浓度为 1×10^4 饲养细胞/0.1 ml 接种于以小鼠腹腔巨噬细胞作饲养层的 96 孔培养板中，于 5% CO_2 ，37 $^\circ\text{C}$ 条件下培养，8 d 后，每培养孔更换 2/3 HT 培养液。10 d~20 d 后，开始对镜检有杂交瘤克隆生长的培养孔，取上清液进行筛选，对检测结果呈阳性的细胞立即用有限稀释法进行克隆。杂交瘤筛选采用固相抗原间接非竞争 ELISA 法进行。以 NKET-OVA 为包被抗原，以免疫小鼠的血清为阳性对照，以 SP-2/o 骨髓瘤细胞培养的上清液为阴性对照。阳性细胞孔的判定标准为 $(A_{\text{试验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) > 2.1$ 。对分泌阳性抗体的细胞进行克隆。采用有限稀释法，将阳性克隆细胞吹匀，取一微滴至培养瓶内，倒置显微镜下准确计数细胞个数，稀释为 70 个 / ml 再取 1 ml 稀释 20 倍，接种入 96 孔培养板中进行亚克隆。直至所有细胞孔的培养上清均呈阳性为止。对 10~13 周龄 Balb/c 小鼠腹腔注射液体石蜡 0.3~0.5 ml/只，8~10 d 后，腹腔注射培养至对数期的杂交瘤细胞， 5×10^5 细胞/只。5 d 后注意观察，收集腹水，离心去除沉淀，加甘油于 -20 $^\circ\text{C}$ 保存。

酶标记的羊抗鼠抗体冻干品为辣根过氧化物酶-羊抗鼠抗体冻干品；所述洗涤液为含有吐温和 NaN_3 的磷酸盐缓冲溶液；所述显色液 A 为含有过氧化氢

的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液;所述显色液 B 为四甲基联苯二胺的乙醇溶液;所述终止液为硫酸溶液。

去甲氯胺酮的酶联免疫吸附检测方法:取包被有 NKET-OVA 的微孔包被板,加入 100 μL 的 NKET 标准品或处理好的样品到各自的微孔中,加 50 μL 抗 NKET 抗体,40 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 0.75 h,洗涤液洗 5 次,加 50~100 μl 辣根过氧化物酶 (HRP) -羊抗鼠抗体,35~45 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 0.5~1 h,用洗涤液洗 3~5 次,加 50 μL 显色液 A 和 75 μL 显色液 B,暗处静置 20 min 后加终止液,在 450 nm 处测其吸光度值,从标准曲线计算样品中的 NKET 含量。

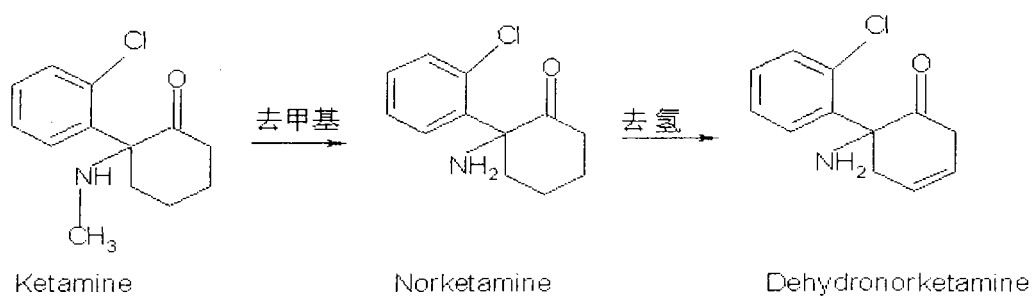


图 1

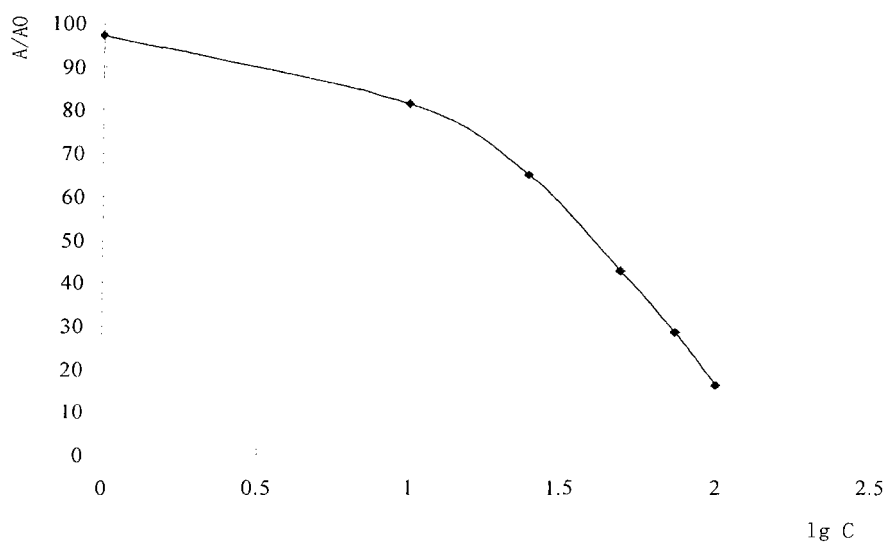


图 2

专利名称(译)	一种检测去甲氯胺酮的ELISA测试盒及制备方法		
公开(公告)号	CN101620231A	公开(公告)日	2010-01-06
申请号	CN200910184032.0	申请日	2009-08-11
[标]申请(专利权)人(译)	江苏省苏微微生物研究有限公司		
申请(专利权)人(译)	江苏省苏微微生物研究有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	江苏省苏微微生物研究有限公司		
[标]发明人	赵晓联 赵春城 杨婷婷 沈笑平 魏万里 何金海 蔡建荣 龚燕 蔡正森 吴杰 沈雯琰 王文静 张海涛		
发明人	赵晓联 赵春城 杨婷婷 沈笑平 魏万里 何金海 蔡建荣 龚燕 蔡正森 吴杰 沈雯琰 王文静 张海涛		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/64 G01N33/535 G01N33/543 C12N15/06 C12P21/08		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种检测去甲氯胺酮(NKET)的ELISA测试盒及制备方法。测试盒包括洗涤液、显色液A、显色液B和终止液、包被板、去甲氯胺酮(NKET)标准品、抗NKET单克隆抗体和酶标记的羊抗鼠抗体冻干品。包被板包被固相抗原，去甲氯胺酮标准品从去甲氯胺酮纯品中稀释得到，抗NKET单克隆抗体通过先制备去甲氯胺酮的完全抗原，利用小鼠免疫制得。本发明提供的去甲氯胺酮(NKET)的ELISA测试盒采用酶联免疫吸附检测方法，通过测定去甲氯胺酮的吸光度值，从标准曲线计算样品中的NKET含量。操作简便，检测快速、灵敏、准确，专用测试盒使用方便、价格低，适用于大批量样品的检测。

