

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200610094687.5

[51] Int. Cl.

C07C 225/22 (2006.01)

C07K 14/765 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009年4月1日

[11] 授权公告号 CN 100473641C

[22] 申请日 2006.6.26

[21] 申请号 200610094687.5

[30] 优先权

[32] 2005.8.4 [33] CN [31] 200510028455.5

[73] 专利权人 曾立波

地址 200083 上海市中山北一路 803 号

共同专利权人 陈连康 胡小龙 张玉荣

[72] 发明人 曾立波

[56] 参考文献

CN1496974A 2004.5.19

US20040248964A1 2004.12.9

审查员 袁 营

[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 22 页 附图 5 页

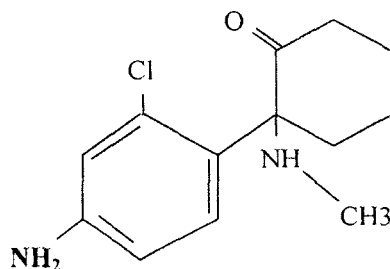
[54] 发明名称

一种用于氯胺酮检测的单克隆抗体及免疫检测板

[57] 摘要

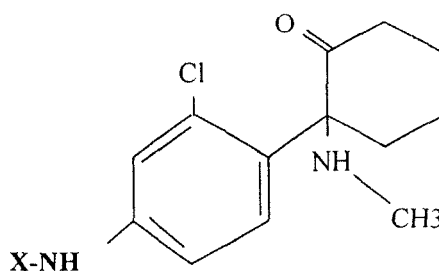
本发明公开了用于氯胺酮检测及抗体制备的半抗原、完全抗原。本发明还公开了用该完全抗原制备的抗氯胺酮单克隆抗体，以及胶体金标记氯胺酮单抗免疫检测板，以用于检测药品或尿样等人体标本中的氯胺酮。与 HPLC 等色谱方法相比，本发明的检测板简单、轻便，易于携带，可以现场检测，而且不需要昂贵的设备。使用本发明的检测板检测氯胺酮，整个测试可在 10min 内完成，检测的灵敏度可达 50ng，且与 39 种常见药物、毒品、氯胺酮体内代谢物没有交叉反应。

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)对氯胺酮进行硝化，在其对位接入硝基基团，以形成对硝基-氯胺酮；
  - (b)将对硝基-氯胺酮中的硝基还原为氨基，以制得对氨基-氯胺酮；
  - (c)将对氨基-氯胺酮与蛋白质载体连接，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，用于制备氯胺酮特异性单克隆抗体。
5. 一种单克隆抗体，其特征在于，它特异性结合于氯胺酮，且所述单克隆抗体由小鼠杂交瘤细胞系 CGMCC No.1404 所产生。
6. 一种产生特异性结合于氯胺酮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 CGMCC No.1404。
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

品中氯胺酮的试剂、检测板或试剂盒。

8.一种检测生物样品中是否存在氯胺酮的方法，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氯胺酮。

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

10.如权利要求9所述的检测板，其特征在于，所述基片为支撑板。

11.一种试剂盒，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或10所述的检测板和使用说明书。

## 一种用于氯胺酮检测的单克隆抗体及免疫检测板

### 技术领域

本发明涉及违禁药品的检测，尤其涉及氯胺酮的酶联免疫检测。

### 背景技术

氯胺酮(Ketamine)是一种通过静脉给药的短效麻醉剂，其进入血循环后大部分进入脑组织，然后再分布于全身组织中，肝、肺和脂肪内的药物浓度也较高。该药物主要在肝内进行生物转化成去甲氯胺酮，再逐步代谢成无活性的化合物经肾排出，仅有2.5%以原形随尿排出。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。

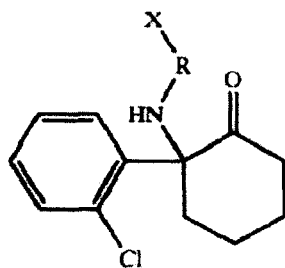
早在2001年6月，氯胺酮已被纳入国家第二类精神药品进行管理。由于氯胺酮是毒品“K粉”的主要成分，近年来，其非法滥用现象严重。滥用氯胺酮至70毫克就会导致中毒，200毫克会产生幻觉，过量则可致死。吸食和贩卖氯胺酮在部分省市呈发展蔓延态势，滥用氯胺酮引发的犯罪现象比较突出。因此，目前国家食品药品监督管理局已将氯胺酮及其盐和制剂列入第一类精神药品管理。

随着与氯胺酮相关的刑事案件逐年上升和国家对氯胺酮管理的日趋严格，本领域对氯胺酮和滥用毒品者生物标本中氯胺酮的检测提出了更高的要求。

目前，氯胺酮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。

美国专利US 2003/224447中揭示了一种式A所示的在去甲氯胺酮的N位置用交联剂制备的半抗原，以及用其制备的免疫原、抗原、抗体和偶联物：



式A

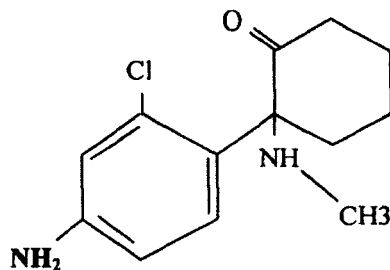
然而研究证明，该半抗原与载体蛋白的偶连效率较低，较难制备成完全抗原。此外，由其制得的完全抗原不能与氯胺酮标准品进行竞争反应，从而不能用于制备胶体金快速诊断试剂。

因此，本领域迫切需要一种能够更加快速、简易、灵敏地检测氯胺酮的检测方法和检测试剂。

### 发明内容

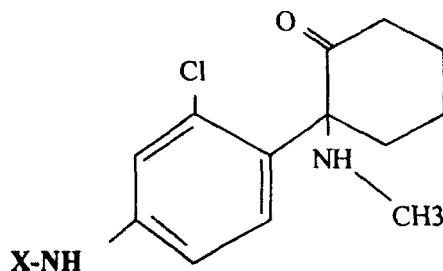
本发明的目的正是提供一种快速、简易、灵敏地检测氯胺酮的检测方法和检测试剂。

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、牛血清白蛋白、卵清蛋白或  $\gamma$  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)对氯胺酮进行硝化，在其对位接入硝基基团，以形成对硝基-氯胺酮；

(b)将对硝基-氯胺酮中的硝基还原为氨基，以制得对氨基-氯胺酮；

(c)将对氨基-氯胺酮与蛋白质载体连接，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-10-10℃，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℃；反应 pH 为 3.0-6.0，优选 4.0；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，其用于制备氯胺酮特异性免疫球蛋白。

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氯胺酮。

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 CGMCC No.1404 所产生。

在另一优选例中，所述的免疫球蛋白与氯胺酮的结合效价大于 1:2000，更佳地大于 1:3000。

在另一优选例中，所述的免疫球蛋白还结合于去甲氯胺酮。

在另一优选例中，所述的免疫球蛋白不结合于氯胺酮的体内代谢物。

在另一优选例中，所述的免疫球蛋白为单克隆抗体。

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小鼠杂交瘤细胞系 CGMCC No.1404。

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氯胺酮的试剂、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氯胺酮的方法，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氯胺酮。

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，且包被量为 5-150  $\mu$ l/cm<sup>2</sup>，优选 10-100  $\mu$ l/cm<sup>2</sup>，更优选 20-70  $\mu$ l/cm<sup>2</sup> 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  $\mu$  l/cm<sup>2</sup>, 优选 0.5-50  $\mu$  l/cm<sup>2</sup>, 更优选 1-20  $\mu$  l/cm<sup>2</sup> 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。

## 附图说明

图1: 氯胺酮-KLH免疫小鼠抗血清效价(滴度)测定。

图2: 融合率测定示意图。

13: PE标记的抗小鼠B220单克隆抗体预标记SP2/0细胞

14: CFSE绿色荧光预标记淋巴细胞

15: 双荧光细胞

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: 氯胺酮单克隆抗体ket-5效价测定。

图5: 氯胺酮单克隆抗体Ket-5与BSA交叉反应的测定。

图6: 检测板中试条组成示意图。

1: 滤样纸      2: 层析材料      3: 硝酸纤维素膜      4: 吸水纸

11: 检测线      12: 质控线

其中2: 层析材料带有胶体金标记的ket-5单抗

图7: 检测板组装原理示意图。

1: 滤样纸      2: 层析材料      3: 硝酸纤维素膜      4: 吸水纸

5: 胶体金颗粒      6: ket-5单抗      7: 胶体金标记的ket-5单抗

8: 羊抗鼠羊抗鼠IgG多抗      9: BSA-氯胺酮      10: 支撑板

图8: 毒品单抗免疫快速检测板判定结果示意图。

11: 检测线      12: 质控线

16: 观察窗      17: 加样孔

图9A: 根据美国专利US 2003/224447制备的抗体的完全抗原与氯胺酮标准品的竞争反应试验结果。

图9B: 本发明的完全抗原与氯胺酮标准品的竞争反应试验结果。

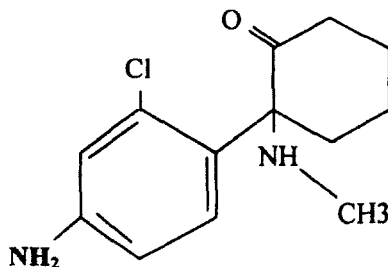
## 具体实施方式

本发明人经过长期而深入的研究合成了氯胺酮活化衍生物对氨基-氯胺酮，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，获得特异性分泌抗氯胺酮的单克隆细胞株 (CGMCC No. 1404)，并制备并纯化得到了氯胺酮单克隆抗体，其后进一步用所述完全抗原和氯胺酮抗体制备了具有高灵敏度和氯胺酮的免疫检测板，从而完成了本发明。

## 半抗原

氯胺酮(Ketamine)分子量很小(237.72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“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的对氨基-氯胺酮(p-NH<sub>2</sub>-Ketamine)，其结构如式1所示：



式 1

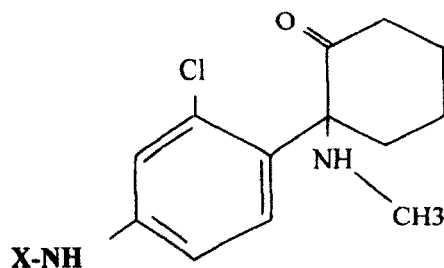
## 完全抗原

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。

本发明用于氯胺酮检测及抗体制备的完全抗原的结构如式2所示：



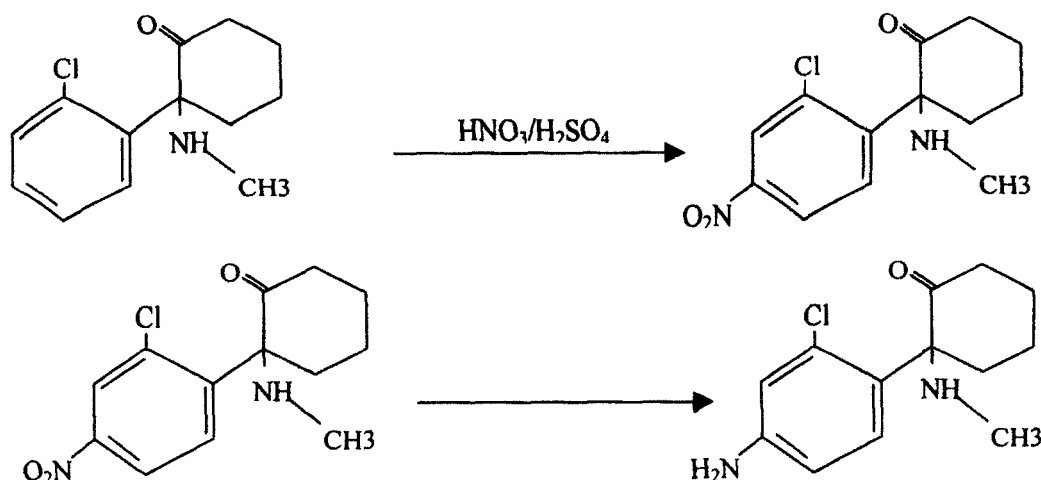
式 2

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氯胺酮的衍生物对氨基-氯胺酮(p-NH<sub>2</sub>-Ketamine)。

在本发明的一个优选的方案中，X为血蓝蛋白，完全抗原为氯胺酮-KLH，作为免疫用抗原，用于制备分泌抗氯胺酮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，完全抗原为氯胺酮-BSA，作为检测用抗原，用于制备检测氯胺酮的单克隆抗体免疫检测板。

本发明的完全抗原是的制备方法如下：



首先将氯胺酮活化，得到其衍生物：对氨基-氯胺酮，再将对氨基-氯胺酮与适合的蛋白质载体(例如，KLH、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氯胺酮的衍生物对氨基-氯胺酮(p-NH<sub>2</sub>-Ketamine)。

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-10-10℃，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；本发明的

还原反应条件可在如下条件下进行：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；本发明的载体连接反应可在如下条件下进行：反应温度为 0-40℃，优选 4-25℃；反应 pH 为 3.0-6.0，优选 4.0；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，氯胺酮-KLH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；完全抗原氯胺酮-BSA很好的保留了氯胺酮的免疫反应性。

### **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氯胺酮的单克隆抗体Ket-5,经鉴定为IgG1型, $\kappa$  (kappa)亚型。本发明的一个优选的方案中,单克隆抗体Ket-5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Ket-5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。

本发明在采用氯胺酮-KLH免疫的小鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤S/P20细胞按常规方法制备杂交瘤时,筛选到一株特异性分泌抗氯胺酮的单克隆细胞株(保藏单位:中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏号为CGMCC No. 1404,保藏日期为2005年6月30日)。

### **标记的本发明的免疫球蛋白**

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。

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，抗氯胺酮的单克隆抗体Ket-5用胶体金标记，得到胶体金标记的Ket-5单克隆抗体。

本发明的抗氯胺酮单克隆抗体ket-5有很好的特异性，与38种常见药物、毒品、没有交叉反应；ket-5与氯胺酮-BSA的载体BSA没有交叉反应。

本发明的单克隆抗体ket-5有很高的效价，在氯胺酮-BSA包被的酶标板检测中，效价达到1：3200。

## **氯胺酮检测用胶体金标记-免疫检测板**

### **检测原理**

氯胺酮的检测采用竞争抑制法。本发明将氯胺酮-BSA固定于硝酸纤维膜上的检测区(固相抗原)，待检样品溶液中的氯胺酮(游离抗原)与固相抗原竞争结合胶体金标记的抗氯胺酮单抗(标记抗体)。待检样品中含有的氯胺酮，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，待测样品不含氯胺酮；反之，不形成色带，则结果为阳性，检测样品含有氯胺酮。

通常，在检测中设置内质控。本发明在硝酸纤维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氯胺酮单克隆抗体。无论待检样品中是否含有氯胺酮，层析载体玻璃纤维上预包被的胶体金标记或有色标记的氯胺酮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。

### **检测板及其材料**

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。

本发明检测氯胺酮的免疫检测板，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氯胺酮单克隆抗体或多克隆抗体，优选被胶体金标记的氯胺酮单克隆抗体(ket-5)，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氯胺酮-BSA，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氯胺酮单克隆抗体(Ket-5)、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氯胺酮单克隆抗体(Ket-5)是采用浓度为0.5-1.5mg/ml胶体金标记的氯胺酮单克隆抗体(Ket-5)溶液进行预包被的，包被量为 $50 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ ；优选的浓度为0.5或1.5mg/ml， $50 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ ；

硝酸纤维膜上吸附的完全抗原氯胺酮-BSA是采用浓度为0.5~1mg/ml的完全抗原氯胺酮-BSA溶液进行吸附的，吸附量为 $10 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ ；优选的浓度为0.5或1mg/ml， $10 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ ；

硝酸纤维膜上吸附的羊抗鼠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 $10 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ ；优选的浓度为0.8或1.2mg/ml， $10 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ ；

检测板的灵敏度在50ng~1000ng之间。

### **免疫检测板的性能**

本发明的胶体金标记氯胺酮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ket-5单抗溶液、氯胺酮-BSA完全抗原的量，测试尿样中含有的氯胺酮，进行灵敏度测试。结果表明，本发明的胶体金标记的氯胺酮单克隆抗体和完全抗原制备的检测板，氯胺酮的最低检测量可达到50ng/ml。

**稳定性好：**将胶体金标记的氯胺酮单克隆抗体试剂条，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，胶体金标记的氯胺酮单抗在65℃下能够耐受5天，具有良好的稳定性。

**特异性佳：**用氯胺酮单克隆抗体免疫检测板检测共40种毒品，结果仅氯胺酮和去甲氯胺酮呈阳性，其他为阴性。用于检测的毒品和药品是：氯胺酮、去甲氯胺酮、吗啡、美沙酮、度冷丁、海洛因、麻黄素、左旋麻黄素、右旋麻黄素、MDMA、可待因、大麻、可卡因、咖啡因、氯丙嗪、布洛芬、蒂巴因、四氢大麻酚、利多卡因、那可丁、阿普唑仑、福尔可啉、喃氟啉、苯噻啉、安定、三唑仑、比沙可啉、苯乙哌啉、硝苯啉、卡马西平、硫唑嘌呤、阿托品、氨苯

蝶啶、氟哌啶醇、甲磺酸双麦角毒碱、去甲基度冷丁、丁丙诺非、苯丙醇胺和苯乙胺共40种。

综上所述，本发明的胶体金标记氯胺酮单抗免疫检测板与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氯胺酮，整个测试可在10min钟内完成，检测的灵敏度可达50ng，与38种常见药物、毒品、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，试样约120 $\mu$ 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8。

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氯胺酮单克隆抗体和完全抗原制备的检测板，氯胺酮的最低检测量可达到50ng/mL。考虑到某些正常使用的药物中也含有氯胺酮成分，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ket-5单抗溶液、氯胺酮-BSA完全抗原的量，使得检测板对氯胺酮的最低检测量为1000ng/ml。当尿液中的氯胺酮浓度<1000ng/ml，胶体金标记抗氯胺酮单抗通过层析作用，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；当尿液中的氯胺酮浓度>1000ng/ml，胶体金标记的抗氯胺酮单抗完全与尿液中的氯胺酮相结合，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。

### **试剂盒**

本发明的试剂盒是指含有本发明的免疫球蛋白或本发明的检测板的试剂盒。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。

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，且保留了氯胺酮的免疫反应性；
- (2) 本发明的抗氯胺酮单克隆抗体ket-5的特异性优异且效价高；
- (3) 本发明的胶体金标记氯胺酮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适用于限制本发明的范围。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，或按照制造商所建议的条件。

#### 实施例1 氯胺酮的活化及半抗原的制备

在反应瓶中加入氯胺酮原料0.52g和10ml 98wt%的浓硫酸，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0.25ml 70wt%的硝酸和0.75ml 98wt%的硫酸组成的混合酸液。加完后，在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：对硝基-N-氯胺酮。

将反应产物(即对硝基氯胺酮)0.5g溶于1.4ml水中，搅拌下加入0.55ml 38wt%的浓盐酸，逐渐升温，40℃时开始加入锌粉(分4批)共0.62g，直至55℃。加完后，在此温度条件下反应2小时，过滤，滤液用20wt%的NaOH水溶液中和至弱碱性(pH=8)，并抽滤，将滤出的白色固体(为氢氧化锌)用温水洗涤，合并收集的滤液，用30ml二氯甲烷萃取3次，合并二氯甲烷溶剂，用饱和食盐水洗至中性，用无水硫酸钠干燥，挥干溶剂，得半固体状黄色物质，用硅胶柱层析(展开剂比例为乙酸乙酯：石油醚=1:2)，得到浅黄色固体252mg。反应得率：56%，反应产物经MNR分析为目标物，对氨基-氯胺酮(p-NH<sub>2</sub>-Ketamine)。

$^1\text{H NMR (DMSO)} \delta$  6.40~6.97 ( m, 4H, ArH ) 5.17 ( s, 2H,  $-\text{NH}_2$  ) 5.12 ( s, 1H,  $-\text{NH}$  ) 1.98 ( s, 3H,  $-\text{NCH}_3$  ) 1.60~2.51 ( m, 8H,  $\text{CH}_2$  )

### 实施例2 氯胺酮-KLH完全抗原的制备

称取100mg对氨基-氯胺酮，在搅拌下将其溶解于10ml水中，然后缓慢加入400mg的EDC(碳化二亚胺)，边加边摇，用0.1M盐酸将pH值调节至4.5，在25℃继续反应10min。取100mg血蓝蛋白(KLH)溶于5 ml双蒸水中，加入到对氨基-氯胺酮溶液中，25℃继续反应3小时。反应产物用0.01M磷酸盐缓冲液在4℃下进行透析，除去未反应的对氨基-氯胺酮和EDC，更换缓冲液3~4次。获得氯胺酮-KLH完全抗原120mg。

### 实施例3 氯胺酮-BSA完全抗原的制备

制备方法同实施例2，只是将KLH换成牛血清白蛋白(BSA)，制得氯胺酮-BSA完全抗原120mg。

### 实施例4 氯胺酮单克隆抗体的制备

#### Balb/C小鼠免疫操作

先将抗原与弗氏佐剂(Freund's adjuvant)乳化，用PBS将完全抗原氯胺酮-KLH配制成1mg/ml的溶液，然后将完全抗原溶液与弗氏佐剂等体积混合，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。

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，每只腹腔注射完全弗氏佐剂乳化抗原100  $\mu\text{L}$ 。第14天，再对每只小鼠腹腔注射不完全弗氏佐剂乳化抗原100  $\mu\text{L}$ 。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，再次腹腔注射不完全弗氏佐剂乳化抗原100  $\mu\text{l}$ 。在细胞融合反应前一周，用100  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 抗原生理盐水再次加强免疫。采血后经测定，所得抗血清效价为1: 6400，见实施例5。

#### 细胞融合及克隆化

按文献“Ed Harlow, David Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual. 1999”描述的方法进行细胞融合和克隆化操作。

细胞融合操作3天后检查细胞融合情况，8天后加HT<sup>+</sup>完全培养基，每孔加入1ml。

在12天内，就可以观察到杂交细胞的克隆。当克隆直径长到约1mm时，用氯胺酮-BSA包被的酶联板来筛选出抗氯胺酮的杂交瘤细胞。筛选到的阳性克隆用有限稀释法进行克隆化，以氯胺酮-BSA包被的ELISA法酶标板来筛选抗氯胺酮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氯胺酮单克隆细胞(保藏单位：中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，保藏号为CGMCC No. 1404)。

### 实施例5 氯胺酮-KLH免疫小鼠抗血清效价(滴度)测定

取实施例4中经过4次免疫的小鼠，用氯胺酮-BSA包被的酶联板测定抗血清的滴度。将包被抗原以 $10 \mu\text{g/ml}$ 稀释于pH 9.6的0.05M碳酸盐缓冲液中， $100 \mu\text{l}$ /孔加入到96孔酶标板于 $4^\circ\text{C}$ 过夜。弃去包被液后用1%明胶/PBS在 $37^\circ\text{C}$ 下封闭2小时，然后用PBS-Tween-20洗液洗板3遍，再加入稀释后的氯胺酮抗血清，置于 $37^\circ\text{C}$ 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， $37^\circ\text{C}$ 孵育1小时后用PBS-Tween-20洗液洗板3遍，加TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>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，所得氯胺酮抗血清的效价为1:6400，见图1。

### 实施例6 融合效率分析

按Hodgkin, P. D., J. H. Lee, and AB Lyons (1996) B cell differentiation and isotype switching is related to division cycle number. J. Exp. Med. 184, 277. 中描述的方法进行融合效率分析。

简单的说，用CFSE绿色荧光预标记的淋巴细胞显绿色，用PE标记的抗小鼠B220单克隆抗体预标记的SP2/0细胞显红色，两种细胞融合形成的杂交瘤细胞带有双色荧光。经流式细胞仪测定分析双荧光细胞比例，用于反映融合效率。如图2所示，13代表PE标记的抗小鼠B220单克隆抗体预标记的SP2/0(骨髓瘤)细胞，14代表CFSE绿色荧光预标记淋巴细胞，15代表带有双色荧光的杂交瘤细胞。

本实验体系中脾细胞和SP2/0的最初融合效率约为34%，ELISA法测定阳性率为13.8%。

其中CFSE为绿色荧光染料羧乙基锆倍半氧化物，购于美国RENOVAR. INC公司；

PE为藻红蛋白(商品化荧光蛋白), B220为小鼠细胞表面抗原, PE标记的抗小鼠B220单克隆抗体购于RENOVAR. INC公司。

### **实施例7 Ket-5单抗的大规模制备 腹水制备**

培养实施例4制备的单克隆细胞株, 取 $10^6$ - $10^7$ 个杂交瘤细胞接种到致敏的小鼠腹腔内。3周内可见腹部明显胀大。抽取腹水离心, 加入0.02wt%的叠氮钠, 于4℃冰箱内保存。

#### **抗体的纯化(Sepharose-G蛋白亲和层析法)**

取10ml腹水, 先用饱和硫酸铵沉淀, 再对pH=8的磷酸缓冲液透析, 并用紫外吸收法测定280nm下的蛋白浓度。

取1g CL-4B Sepharose - Protein 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。

每1ml吸胀的CL-4B Sepharose - Protein G胶可与23mg的IgG结合, 控制过柱流速为8.5ml/min, 检测流出液的 $A_{280nm}$ 。用5ml的10mM磷酸缓冲液(pH=8)洗柱; 重复一次, 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5ml的0.1M柠檬酸钠缓冲液(pH=3.5)的洗脱IgG2b。

制得抗体20mg, 命名为Ket-5。

### **实施例8 Ket-5抗体的鉴定 分子量测定**

按《分子克隆》(科学出版社, 第二版, 2002年)方法对实施例7制备的抗体用2-ME( $\beta$ -巯基乙醇)还原, 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 测得Ket-5抗体分子量为55Kd, 见图3。

#### **型别测定**

Ket-5抗体经PIERCE公司生产的特异性抗体分型试剂盒(monoclonal antibody isotyping kit, PIERCE)鉴定, 操作方案试剂盒说明书进行。鉴定结果为Ket-5抗体为IgG1型, kappa亚型。

### **实施例9 Ket-5抗体的效价测定**

按照实施例5的方法测定抗体的滴度，Ket-5单抗的效价为1:3200，见图4。

### **实施例10 Ket-5抗体的与BSA的交叉反应性鉴定**

用完全抗原氯胺酮-BSA和BSA包被酶标板，以1:2000稀释的氯胺酮单克隆抗体Ket-5与之结合，进行酶联反应检测，结果显示氯胺酮单克隆抗体Ket-5可以检测到50ng的氯胺酮-BSA，而且与BSA没有任何交叉反应。（见图5）

### **实施例11 Ket-5抗体的胶体金标记**

#### **胶体金(Gold Colloidal)颗粒制备**

采用柠檬酸三钠还原法制备。取247.5ml水煮沸，溶解2.5ml的1wt%氯金酸溶液，于90℃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。

#### **胶体金-单抗结合物制备**

取上述胶体金100ml，缓慢滴加入10ml的pH为9.0的硼酸缓冲液，滴加完毕后在磁力快速搅拌下迅速加入1.5mg抗氯胺酮抗体，继续搅拌15 min。加入2ml的10wt%的牛血清蛋白，再搅拌15min后，以12000rpm/min，在4℃下离心30min，吸去上清液，用10ml含0.1%叠氮钠的硼酸缓冲液悬浮沉淀汲取保存。

### **实施例12 检测板的制备**

#### **(1)胶体金-单抗结合物玻璃纤维条的制备**

将实施例11制备的胶体金标记的Ket-5抗体与pH为7.4的10mM磷酸盐缓冲溶液混合，配制成0.5mg/ml浓度的溶液，均匀地涂布在玻璃纤维素纸上，涂布量为50  $\mu$  l/cm<sup>2</sup>，真空干燥。

#### **(2)检测线12和质控线11**

检测线12：将氯胺酮-BSA完全抗原与pH为7.4的10mM磷酸盐缓冲溶液混合配制成浓度为0.5mg/ml的混合溶液，喷在硝酸纤维膜上，涂布量为10  $\mu$  l/cm<sup>2</sup>；

质控线11：将羊抗兔IgG多抗与pH为7.4的10mM磷酸盐缓冲溶液混合配制成浓度为0.8mg/ml混合溶液，喷在硝酸纤维膜上，涂布量为10  $\mu$  l/cm<sup>2</sup>；

然后在15~35℃干燥。

### (3) 测试条组装

将滤样纸1、包被有胶体金标记的Ket-5抗体的玻璃纤维纸2、包被有氯胺酮-BSA(检测线)和羊抗兔IgG多抗(质控线)的硝酸纤维素膜3、吸水纸依次搭接组成测试条4,如图6所示;将测试条置于支撑板10,用胶带固定,如图7所示;用设有加样孔和观察窗的盖板覆盖测试条及支撑板,加样孔位于滤样纸1处,观察窗位于带有检测线和质控线的硝酸纤维素膜3处,如图8。

### 实施例13 检测板的制备

制备方法同实施例12,其中:

将实施例11制备的胶体金标记的Ket-5抗体与pH为7.4的10mM磷酸盐缓冲溶液混合,配制成1.5mg/ml浓度的溶液;

氯胺酮-BSA完全抗原溶液的浓度为1mg/ml;

羊抗兔IgG多抗溶液的浓度为1.2mg/ml。

### 实施例14 胶体金标记氯胺酮单抗免疫检测板的灵敏度测试

#### 试剂配制

根据测试要求,在空白尿样中添加氯胺酮,分别配制成含氯胺酮浓度为1ng/ml、2ng/ml、3ng/ml、4ng/ml、5ng/ml、10ng/ml、20ng/ml、50ng/ml、100ng/ml、150ng/ml、200ng/ml、300ng/ml、500ng/ml、1000ng/ml、1500ng/ml和2000ng/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,灵敏度试验结果见表1。

表1 免疫检测板的灵敏度试验结果

点样量(ng/ml)	1	2	3	4	5	10	20	50
实施例12检测板 试验结果	-	-	-	-	-	-	-	+
实施例13检测板 试验结果	-	-	-	-	-	-	-	-
点样量(ng/ml)	100	150	200	300	500	1000	1500	2000

实施例12检测板 试验结果	+	+	+	+	+	+	+	+
实施例13检测板 试验结果	-	-	-	-	-	+	+	+

注：“+”表示阳性；“-”表示阴性。

试验结果表明，实施例12制备的免疫检测板最低检测量为50ng/ml，实施例13制备的免疫检测板最低检测量为1000ng/ml。

### 实施例15 胶体金标记氯胺酮单抗免疫检测板的稳定性试验

将实施例13制备的灵敏度为1000ng/ml的检测板的测试条置于65℃下分别保温0.5、1、1.5、2、2.5、3、4、5天，然后按上述灵敏度试验方法进行1000ng/ml的灵敏度测试。

上述条件下的测试结果见表2

**表2 稳定性试验结果**

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

注：“+”表示阳性

结果表明，胶体金标记的氯胺酮单抗在65℃下能够耐受5天，具有良好的稳定性。

### 实施例16 胶体金标记氯胺酮单抗免疫检测板的特异性反应试验

#### 选用的待检测物质

氯胺酮、去甲基氯胺酮、吗啡、苯丙胺、美沙酮、度冷丁、海洛因、麻黄素、左旋麻黄素、右旋麻黄素、MDMA、可待因、大麻、可卡因、咖啡因、氯丙嗪、布洛芬、蒂巴因、四氢大麻酚、利多卡因、那可丁、阿普唑仑、福尔可啶、喃氟啶、苯噻啶、安定、三唑仑、比沙可啶、苯乙哌啶、硝苯啶、卡马西平、硫唑嘌呤、阿托品、氨苯蝶啶、氟哌啶醇、甲磺酸双麦角毒碱、去甲基度冷丁、丁丙诺非、苯丙醇胺和苯乙胺共40种毒品和药品。

### 检测与结果

将上述检测物质配制成系列浓度的溶液，用实施例12制备的氯胺酮单抗胶体金标记检测板进行检测，结果表明用此抗体生产的氯胺酮单抗胶体金标记检测板仅与氯胺酮及去甲基氯胺酮发生免疫结合反应，而与上述其他抗原物质没有交叉反应。结果表明制备的胶体金标记氯胺酮单抗免疫检测板性能良好，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)	50	100	150	200	300	400	500	1000	1500	2000
氯胺酮	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
去甲基氯胺酮	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
苯丙胺	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
吗啡	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
美沙酮	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
度冷丁	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
海洛因	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
麻黄素	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
左旋麻黄素	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
右旋麻黄素	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MDMA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
可待因	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
大麻	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
可卡因	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
咖啡因	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
氯丙嗪	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
布洛芬	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
蒂巴因	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
四氢大麻酚	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
利多卡因	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
那可丁	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

阿普唑仑	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
福尔可啶	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
喃氟啶	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
苯噻啶	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
安定	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
三唑仑	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
比沙可啶	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
苯乙哌啶	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
硝苯啶	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
卡马西平	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
硫唑嘌呤	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
阿托品	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
氨苯蝶啶	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
氟哌啶醇	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
甲磺酸双麦角毒碱	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
去甲基度冷丁	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
丁丙诺非	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
苯丙醇胺	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
苯乙胺	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

### 实施例17 本发明的半抗原与式A半抗原的比较试验

在本实施例中，采用美国专利US 2003/224447中的制备方法制取了式A的半抗原(以下称对比物A)，并对该半抗原和本发明半抗原各自与载体蛋白的偶连效率、以及相应的完全抗原与氯胺酮标准品的竞争反应进行了比较。

#### 与载体蛋白的偶连效率

分别称取100mg对氨基-氯胺酮和对比物A，在搅拌下溶解于10ml双蒸水中，然后缓慢加入400mgEDC，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牛血清白蛋白（BSA）溶于5ml双蒸水中，加入到对氨基-氯胺酮溶液或对比物A溶液中，室温下（4~25℃）继续反应2-12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-氯胺酮或对比物A和EDC，更换缓冲液3~4次。获得的反应产物即

为氯胺酮-BSA完全抗原或对比物A-BSA完全抗原。

试验结果表明，对比物A的溶解性不佳，对载体蛋白的偶连效率较低，仅为约12%。而本专利方法所制备的半抗原很容易进行偶连，偶连效率为54%。

#### **与氯胺酮标准品的竞争反应**

分别在不同稀释倍数的本发明的氯胺酮-BSA完全抗原和对比物A-BSA完全抗原中加入1mg/ml的氯胺酮标准品，在450nm下测定OD值以此评估各稀释倍数的各种完全抗原与氯胺酮标准品间的竞争反应程度。

试验结果如图9A和9B所示。对比物A的完全抗原在加入1mg/ml的氯胺酮标准品时，结合反应基本不受影响。而本发明的完全抗原在加入1mg/ml的氯胺酮标准品时，结合反应被100%抑制。

结果表明对比物A的完全抗原不能和氯胺酮标准品进行竞争反应，因此不能用来制备胶体金快速诊断试剂。

#### **菌种保藏**

本发明的杂交瘤细胞系已于2005年6月30日保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCC, 中国, 北京), 保藏号为CGMCC No. 1404。

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。

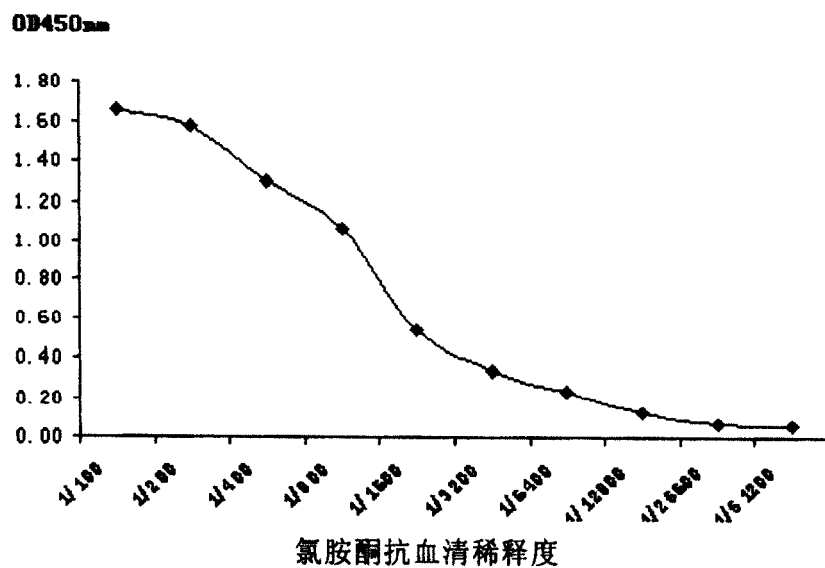


图 1

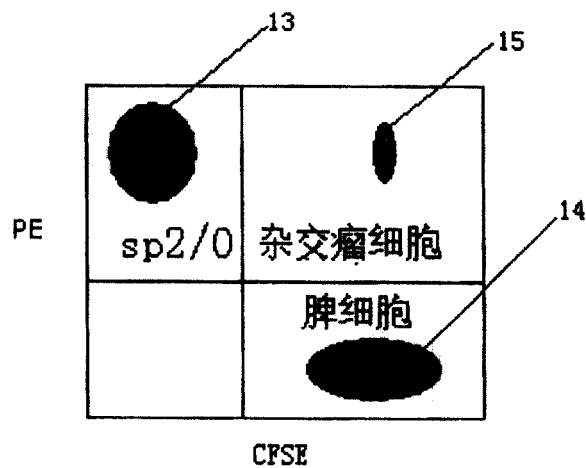


图 2

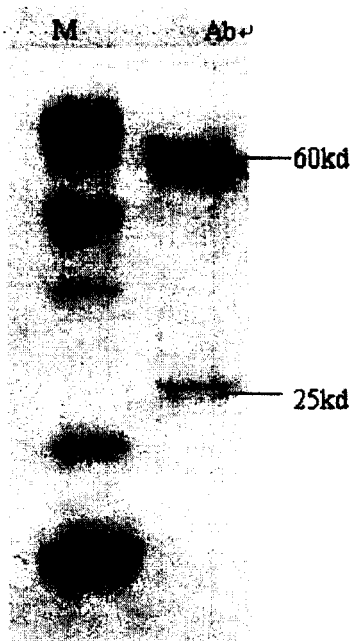


图 3

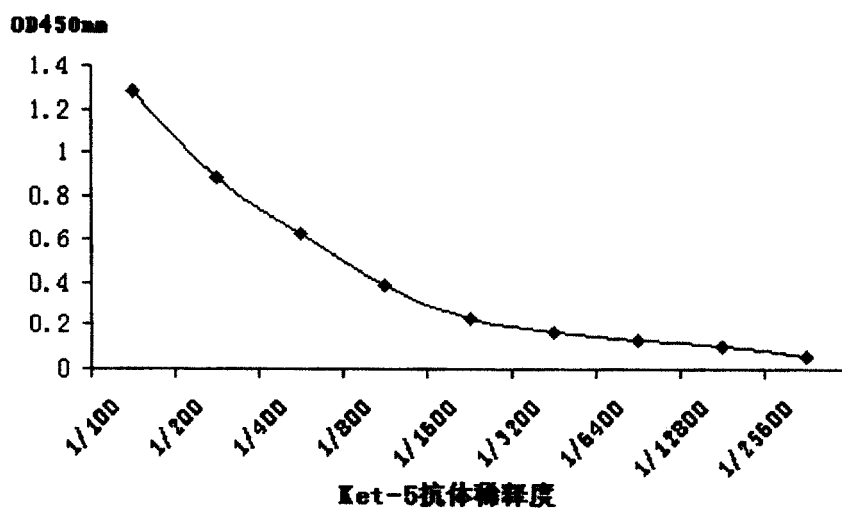


图 4

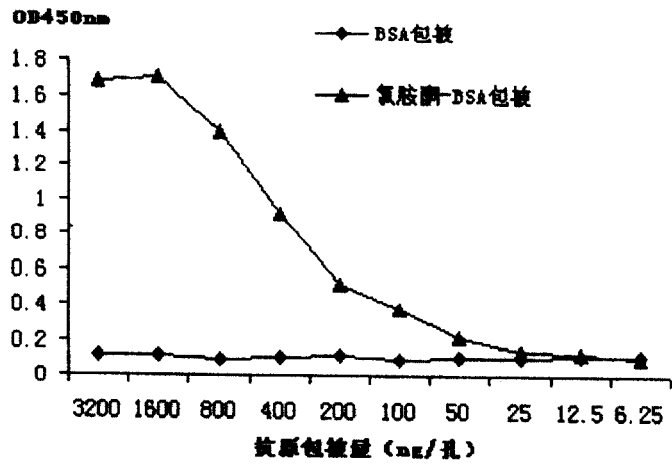


图 5

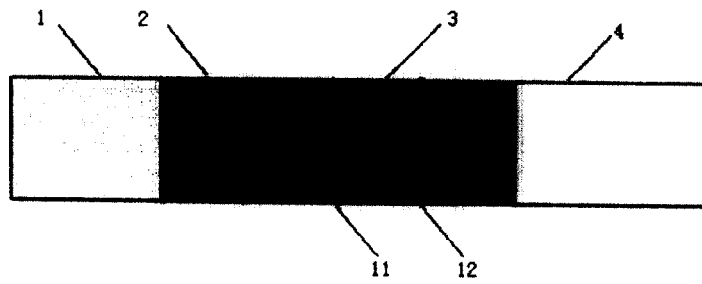


图 6

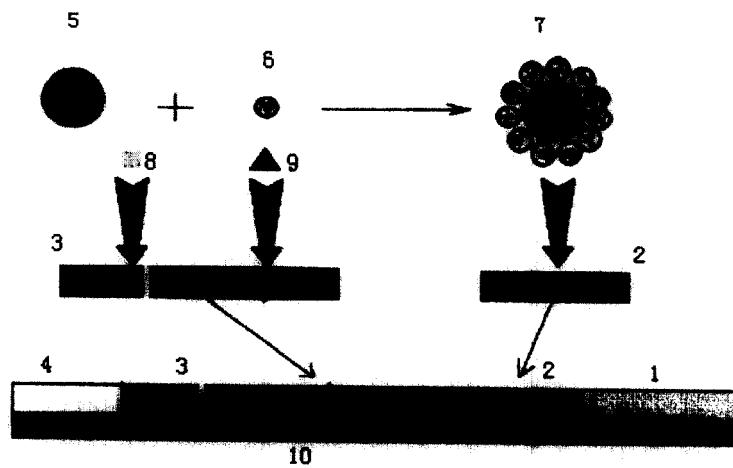


图 7

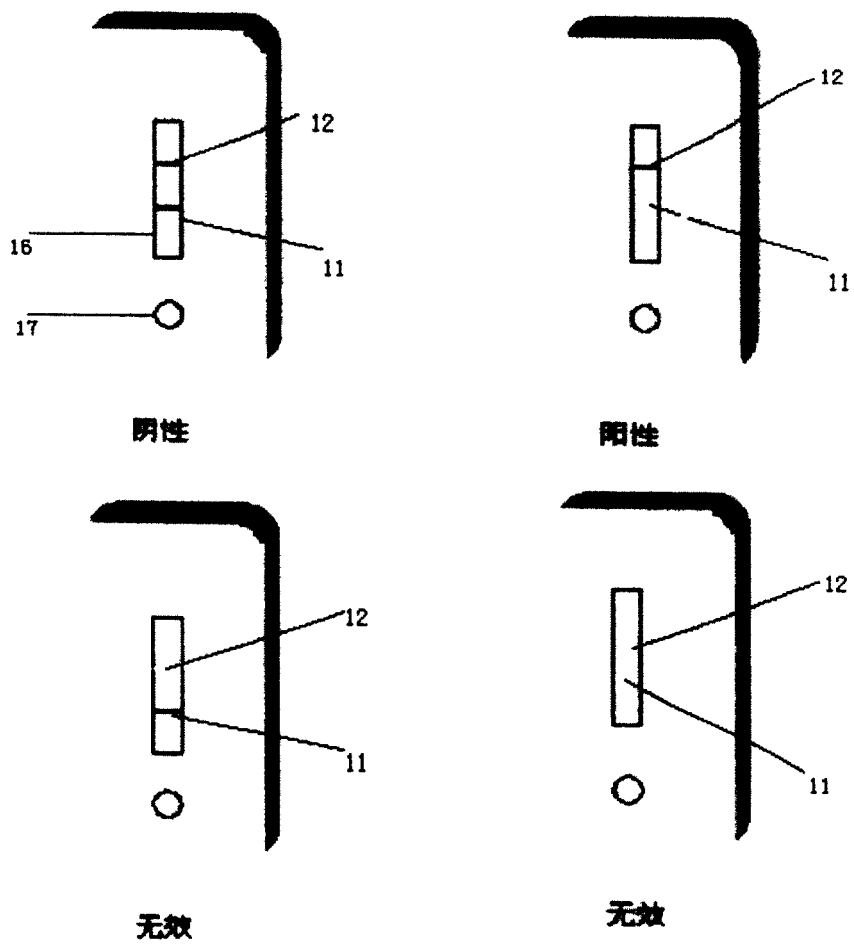


图 8

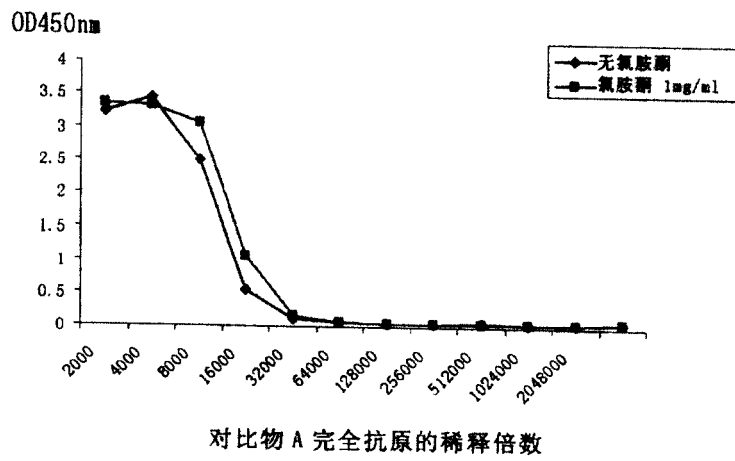


图 9A

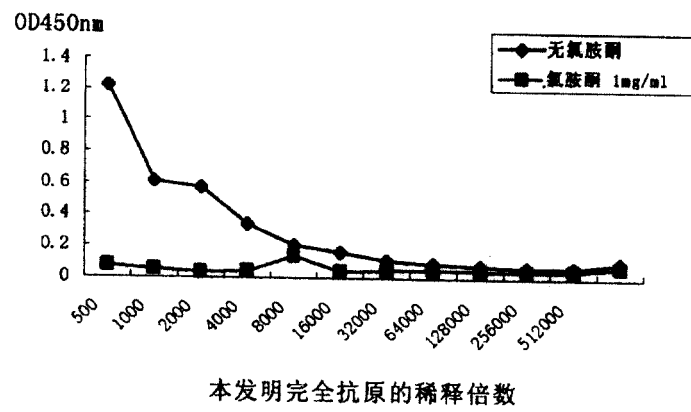


图 9B

专利名称(译)	一种用于氯胺酮检测的单克隆抗体及免疫检测板		
公开(公告)号	<a href="#">CN100473641C</a>	公开(公告)日	2009-04-01
申请号	CN200610094687.5	申请日	2006-06-26
[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	C07C225/22 C07K14/765 C07K14/435 G01N33/53 G01N33/577		
代理人(译)	徐迅		
审查员(译)	袁营		
优先权	200510028455.5 2005-08-04 CN		
其他公开文献	CN1907953A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了用于氯胺酮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氯胺酮单克隆抗体，以及胶体金标记氯胺酮单克隆抗体免疫检测板，以用于检测药品或尿样等人体标本中的氯胺酮。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氯胺酮，整个测试可在10min内完成，检测的灵敏度可达50ng，且与39种常见药物、毒品、氯胺酮体内代谢物没有交叉反应。

