

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



# [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810131795.4

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

[43] 公开日 2008年11月19日

[11] 公开号 CN 101308139A

[22] 申请日 2008.6.30

[21] 申请号 200810131795.4

[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 沈笑平 魏万里  
何金海 蔡建荣 张凌裳 龚燕  
孙蔚榕 张东升 蔡正森 吴杰  
沈雯琰 王文静 叶进

[74] 专利代理机构 无锡盛阳专利事务所

代理人 刘瑞平

权利要求书3页 说明书9页 附图1页

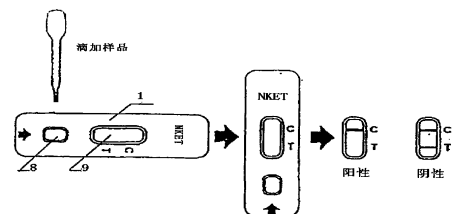
## [54] 发明名称

一种去甲氯胺酮金标检测试纸盒及其制备方法

## [57] 摘要

本发明为一种去甲氯胺酮金标检测试纸盒。其可以快速、简易、灵敏地检测去甲氯胺酮，为此，本发明还提供了试纸盒的制备方法。其包括试纸条，所述试纸条被封装于盒壳体，所述盒壳体上面开有注样孔，观测孔，其特征在于：试纸条用聚氯乙烯或聚乙烯作背衬，在试纸条一端的注样区粘贴吸附胶体金-抗去甲氯胺酮单克隆抗体结合物的玻璃纤维膜；在试纸条中间的测试区粘贴硝酸纤维素膜，硝酸纤维素膜和玻璃纤维膜连接处有一小段重叠区，玻璃纤维膜的一小段重叠在硝酸纤维素膜上，在试纸条另一端吸水区粘贴吸水纸；在硝酸纤维素膜上从注样区到吸水区的方向，依次设置材质为去甲氯胺酮卵清白蛋白作检测线，和材质为羊抗鼠质控线，所述硝酸纤维素膜上覆盖有浓度为1%

是牛血清白蛋白；所述注样孔位置对应于试纸条注样区的玻璃纤维膜，所述观测孔对应于试纸条的测试区。



1、去甲氯胺酮金标检测试纸盒，包括试纸条，所述试纸条被封装于盒壳体，所述盒壳体上面开有注样孔，观测孔，其特征在于：试纸条用聚氯乙烯或聚乙烯作背衬，在试纸条一端的注样区粘贴吸附胶体金-抗去甲氯胺酮单克隆抗体结合物的玻璃纤维膜；在试纸条中间的测试区粘贴硝酸纤维素膜，硝酸纤维素膜和玻璃纤维膜连接处有一小段重叠区，玻璃纤维膜的一小段重叠在硝酸纤维素膜上，在试纸条另一端吸水区粘贴吸水纸；在硝酸纤维素膜上从注样区到吸水区的方向，依次设置材质为去甲氯胺酮卵清白蛋白作检测线，和材质为羊抗鼠质控线，所述硝酸纤维素膜上覆盖有浓度为1%的牛血清白蛋白；所述注样孔位置对应于试纸条注样区的玻璃纤维膜，所述观测孔对应于试纸条的测试区。

2、根据权利要求1所述去甲氯胺酮金标检测试纸盒，其特征在于：所述硝酸纤维素膜厚度为 $120\mu\text{m}$ ；所述蛋白质负载量为 $5\mu\text{g}/\text{cm}^2\sim 20\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ；所述聚氯乙烯或聚乙烯背衬厚度为 $100\mu\text{m}$ ；所述试纸条的尺寸为 $(55\sim 65)\text{mm}\times(3\sim 5)\text{mm}$ ；检测线和质控线的宽度分别为 $0.5\sim 1\text{mm}$ 。

3、去甲氯胺酮金标检测试纸盒的制备方法，其特征在于：其包括以下步骤，

(1) 去甲氯胺酮金标检测试纸条的制备，将胶体金-抗去甲氯胺酮单克隆抗体结合物稀释至 $0.5\mu\text{g}/\text{mL}\sim 2\mu\text{g}/\text{mL}$ ，放入 $10\text{mm}\times 300\text{mm}$ 玻璃纤维膜，浸泡10-20分钟， $37^\circ\text{C}$ 烘干， $4^\circ\text{C}\sim 8^\circ\text{C}$ 保存，粘贴在背衬一端的注样区；背衬的材质为聚氯乙烯或聚乙烯，聚氯乙烯或聚乙烯背衬厚度为 $100\mu\text{m}$ ，在背衬中间检测区粘贴硝酸纤维素膜，硝酸纤维素膜厚度为 $120\mu\text{m}$ ，在硝酸纤维素膜上喷涂浓度为 $100\mu\text{g}/\text{mL}\sim 500\mu\text{g}/\text{mL}$  NKET-OA 结合物作检测线，喷涂浓度为 $50\mu\text{g}/\text{mL}\sim 200\mu\text{g}/\text{mL}$  羊抗鼠 IgG 作质控线，检测线和质控线的宽度为 $0.5\text{mm}\sim 1\text{mm}$ ，再用1%牛血清白蛋白封闭硝酸纤维素膜；蛋白质负载量为 $5\mu\text{g}/\text{cm}^2\sim 20\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ，在背衬另一端吸水区粘贴吸水纸；

(2) 所得去甲氯胺酮金标检测试纸条包封在上面开有注样孔和观测孔的盒壳体内。

4、根据权利要求3所述去甲氯胺酮金标检测试纸盒的制备方法，其特征在于：所述胶体金的制备：取50ml 0.01%的氯金酸溶液，1000r/min 磁力搅拌下，

加热至 110℃, 迅速加入 1%柠檬酸钠水溶液 2ml, 保持反应温度和搅拌转速不变, 沸腾反应 5min, 溶液颜色刚刚变为清亮橘红色后停止反应, 获得的胶体金平均粒径为 10.9nm。

5、根据权利要求 3 所述去甲氯胺酮金标检测试纸盒的制备方法, 其特征在于: 抗去甲氯胺酮单克隆抗体及其溶液的制备

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  $1 \times 10^4$  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<sub>2</sub>, 37℃条件下培养, 8 天后, 每培养孔更换 2/3 HT 培养液; 10 天~20 天后, 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 天~10 天后, 腹腔注射培养至对数期的杂交瘤细胞,  $5 \times 10^5$  细胞/只; 5 天后注意观察, 收集腹水, 离心去除沉淀, 加甘油于 -20℃ 保存。

6、根据权利要求 3 所述去甲氯胺酮金标检测试纸盒的制备方法, 其特征在于: 完全福氏佐剂是由下列材料配比而成, 液体石蜡:羊毛脂:卡介苗=12 g:20

ml:0.105g。

7、根据权利要求3所述去甲氯胺酮金标检测试纸盒的制备方法，其特征在于：不完全福氏佐剂是由下列材料配比而成，液体石蜡:羊毛脂=12 g:20 ml。

8、根据权利要求3所述去甲氯胺酮金标检测试纸盒的制备方法，其特征在于：胶体金-抗去甲氯胺酮单克隆抗体结合物的制备：在一定体积的胶体金溶液中，缓慢滴加0.1 mg/ml 去甲氯胺酮单克隆抗体溶液，溶于0.01M pH7.4 的PBS缓冲液中，超声波混匀2 min，静置0.5 h后通过4℃冷冻离心进行纯化，首次离心转速10000 r/min，时间45 min，弃上清，沉淀用10%BSA溶液溶解，进行下次离心；第二次用10%~30%甘油密度梯度离心，转速7000 r/min，时间45 min，用于除去未标记的蛋白和金颗粒聚集体，收集中间红褐色部分即可。

## 一种去甲氯胺酮金标检测试纸盒及其制备方法

### (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金标检测试纸盒及其制备方法。

### (二)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。该药物主要在肝内生物转化成去甲氯胺酮(Norketamine)，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去甲氯胺酮的检测提出了更高的要求。由于氯胺酮代谢的半衰期为3-4小时，摄入体内后，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基氯胺酮(norketamine)、去氢去甲基氯胺酮(Dehydronorketamine)，见图3。

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，检测氯胺酮及其代谢物的分析方法主要有：（一）气相色谱法(GC)；（二）气-质联用法(GC-MS)；（三）

高效液相色谱法 (HPLC); (四) 液-质联用法 (LC-MS); (五) 高效毛细管电泳法 (HPCE) 等。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。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, 本发明提供了一种去甲氯胺酮金标检测试纸盒, 其可以快速、简易、灵敏地检测去甲氯胺酮, 为此, 本发明还提供了去甲氯胺酮金标检测试纸盒的制备方法。

本发明的技术方案:

去甲氯胺酮金标检测试纸盒, 包括试纸条, 所述试纸条被封装于盒壳体, 所述盒壳体上面开有注样孔, 观测孔, 其特征在于: 试纸条用聚氯乙烯或聚乙烯作背衬, 在试纸条一端的注样区粘贴吸附胶体金-抗去甲氯胺酮单克隆抗体结合物的玻璃纤维膜; 在试纸条中间的测试区粘贴硝酸纤维素膜, 硝酸纤维素膜和玻璃纤维膜连接处有一小段重叠区, 玻璃纤维膜的一小段重叠在硝酸纤维素膜上, 在试纸条另一端吸水区粘贴吸水纸; 在硝酸纤维素膜上从注样区到吸水区的方向, 依次设置材质为去甲氯胺酮卵清白蛋白作检测线, 和材质为羊抗鼠质控线, 所述硝酸纤维素膜上覆盖有浓度为 1% 是牛血清白蛋白; 所述注样孔位置对应于试纸条注样区的玻璃纤维膜, 所述观测孔对应于试纸条的测试区;

其进一步特征在于: 所述硝酸纤维素膜厚度为  $120\mu\text{m}$ ; 蛋白质负载量为  $5\mu\text{g}/\text{cm}^2\sim 20\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ; 聚氯乙烯或聚乙烯背衬厚度为  $100\mu\text{m}$ ; 试纸条的尺寸为  $(55\sim 65)\text{mm}\times(3\sim 5)\text{mm}$ ; 检测线和质控线的宽度为  $0.5\text{mm}\sim 1\text{mm}$ ;

去甲氯胺酮金标检测试纸盒的制备方法, 其特征在于:

(1) 去甲氯胺酮金标检测试纸条的制备, 将胶体金-抗去甲氯胺酮单克隆抗体结合物稀释至  $0.5\mu\text{g}/\text{mL}\sim 2\mu\text{g}/\text{mL}$ , 放入  $10\text{mm}\times 300\text{mm}$  玻璃纤维膜, 浸泡 10 分钟 $\sim$ 20 分钟,  $37^\circ\text{C}$  烘干,  $4^\circ\text{C}\sim 8^\circ\text{C}$  保存, 粘贴在背衬一端的注样区; 背衬的材质为聚氯乙烯或聚乙烯, 聚氯乙烯或聚乙烯背衬厚度为  $100\mu\text{m}$ , 在背衬中间检测区粘贴硝酸纤维素膜, 硝酸纤维素膜厚度为  $120\mu\text{m}$ , 在硝酸纤维素膜上喷涂浓度为  $100\mu\text{g}/\text{mL}\sim 500\mu\text{g}/\text{mL}$  NKET-OA 结合物作检测线, 喷涂浓度为  $50\mu\text{g}/\text{mL}\sim 200\mu\text{g}/\text{mL}$  羊抗鼠 IgG 作质控线, 检测线和质控线的宽度为  $0.5\text{mm}\sim 1\text{mm}$ ,

再用 1%牛血清白蛋白封闭硝酸纤维素膜；蛋白质负载量为  $5\mu\text{g}/\text{cm}^2\sim 20\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ，在背衬另一端吸水区粘贴吸水纸；

(2) 所得去甲氯胺酮 (NKET) 金标检测试纸条包封在上面开有注样孔和观测孔的盒壳体内。

其进一步特征在于：

胶体金的制备：取 50ml 0.01%的氯金酸溶液，1000r/min 磁力搅拌下，加热至  $110^\circ\text{C}$ ，迅速加入 1%柠檬酸钠水溶液 2ml，保持反应温度和搅拌转速不变，沸腾反应 5min，溶液颜色刚刚变为清亮橘红色后停止反应，获得的胶体金平均粒径为 10.9nm；

抗去甲氯胺酮单克隆抗体及其溶液的制备

50  $\mu\text{g}$  NKET-BSA 偶联抗原用 50  $\mu\text{l}$  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  $1\times 10^4$  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%  $\text{CO}_2$ ， $37^\circ\text{C}$  条件下培养，8 天后，每培养孔更换 2/3 HT 培养液；10 天~20 天后，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 天~10 天后, 腹腔注射培养至对数期的杂交瘤细胞,  $5 \times 10^5$  细胞/只; 5 天后注意观察, 收集腹水, 离心去除沉淀, 加甘油于  $-20^\circ\text{C}$  保存;

完全福氏佐剂是由下列材料配比而成, 液体石蜡:羊毛脂:卡介苗=12 g:20 ml:0.105g; 不完全福氏佐剂是由下列材料配比而成, 液体石蜡:羊毛脂=12 g:20 ml;

胶体金-抗去甲氯胺酮单克隆抗体结合物的制备: 在一定体积的胶体金溶液中, 缓慢滴加 0.1 mg/ml 去甲氯胺酮单克隆抗体溶液, 溶于 0.01M pH7.4 的 PBS 缓冲液中, 超声波混匀 2 min, 静置 0.5 h 后通过  $4^\circ\text{C}$  冷冻离心进行纯化, 首次离心转速 10000 r/min, 时间 45 min, 弃上清, 沉淀用 10%BSA 溶液溶解, 进行下次离心; 第二次用 10%~30%甘油密度梯度离心, 转速 7000 r/min, 时间 45 min, 用于除去未标记的蛋白和金颗粒聚集体, 收集中间红褐色部分即可。

本发明的有益效果: 本发明用于检测样本中去甲氯胺酮的含量, 检测时只需将检测样品滴入注样孔中, 稍许, 即可在观测区中观察检测线和质控线的变色情况, 确定样品中去甲氯胺酮含量是否超标, 与现有测试方法相比, 不需要大型检测仪器, 检测快速、准确、明显、灵敏度高。

#### (四)附图说明

图 1 为去甲氯胺酮 (NKET) 金标检测试纸盒检测示意图;

图 2 去甲氯胺酮 (NKET) 金标检测试纸条结构图;

图 3 为氯胺酮及其代谢产物图。

#### (五)具体实施方式

见图 1、图 2, 去甲氯胺酮 (NKET) 金标检测试纸盒, 其包括试纸条 2, 试纸条 2 被封装于盒壳体 1, 盒壳体 1 上面开有注样孔 8, 观测孔 9, 试纸条 2 用聚氯乙烯或聚乙烯作背衬, 在试纸条 2 一端的注样区粘贴吸附胶体金-抗去甲氯胺酮 (NKET) 单克隆抗体结合物的玻璃纤维膜 3; 在试纸条中间的测试区粘贴硝酸纤维素膜 4, 硝酸纤维素膜 4 和玻璃纤维膜 3 连接处有一小段重叠区, 玻璃纤维膜 3 的一小段重叠在硝酸纤维素膜 4 上, 在试纸条 2 另一端吸水区粘贴吸水纸 7; 在硝酸纤维素膜 4 上从注样区到吸水区的方向, 依次设置材质为去甲氯胺酮 (NKET) -卵清白蛋白作检测线 5, 和材质为羊抗鼠 IgG 质控线 6, 硝酸纤维

素膜 4 上覆盖有浓度为 1% 是牛血清白蛋白；注样孔 8 位置对应于试纸条 2 注样区的玻璃纤维膜 3，观测孔 9 对应于试纸条 2 的测试区。硝酸纤维素膜 4 厚度为 120 $\mu\text{m}$ ；蛋白质负载量为 5 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$ -20 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$ ；聚氯乙烯或聚乙烯背衬厚度为 100 $\mu\text{m}$ ；试纸条的尺寸为 (55~65) mm $\times$  (3~5) mm；检测线 5 和质控线 6 的宽度为 0.5 mm~1mm；

#### 去甲氯胺酮 (NKET) 金标检测试纸盒的制备方法

胶体金的制备：取 50ml 0.01% 的氯金酸溶液，1000r/min 磁力搅拌下，加热至 110 $^{\circ}\text{C}$ ，迅速加入 1% 柠檬酸钠水溶液 2ml，保持反应温度和搅拌转速不变，沸腾反应 5min，溶液颜色刚刚变为清亮橘红色后停止反应，获得的胶体金平均粒径为 10.7nm；

#### 抗去甲氯胺酮 (NKET) 单克隆抗体及其溶液的制备

50  $\mu\text{g}$  NKET-BSA 偶联抗原用 50  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{g}/$ 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  $\mu\text{g}/$ 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 50S~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  $1 \times 10^4$  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<sub>2</sub>，37 $^{\circ}\text{C}$  条件下培养，8 天后，每培养孔更换 2/3 HT 培养液；10 天~20 天后，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 ml/只~0.5 ml/只，8天~10天后，腹腔注射培养至对数期的杂交瘤细胞， $5 \times 10^5$  细胞/只，5天后注意观察，收集腹水，离心去除沉淀，加甘油于 $-20^{\circ}\text{C}$ 保存；

完全福氏佐剂是由下列材料配比而成，液体石蜡:羊毛脂:卡介苗=12 g:20 ml:0.105g；不完全福氏佐剂是由下列材料配比而成，液体石蜡:羊毛脂=12 g:20 ml；

胶体金-抗去甲氯胺酮 (NKET) 单克隆抗体结合物的制备：在一定体积的胶体金溶液中，缓慢滴加 0.1 mg/ml 去甲氯胺酮 (NKET) 单克隆抗体溶液（溶于 0.01M pH7.4 的 PBS 缓冲液中），超声波混匀 2 min，静置 0.5 h 后通过  $4^{\circ}\text{C}$  冷冻离心进行纯化，首次离心转速 10000 r/min，时间 45 min，弃上清，沉淀用 10%BSA 溶液溶解，进行下次离心；第二次用 10%~30%甘油密度梯度离心，转速 7000 r/min，时间 45 min，用于除去未标记的蛋白和金颗粒聚集体，收集中间红褐色部分即可；

去甲氯胺酮(NKET)金标检测试纸条的制备，将胶体金-抗去甲氯胺酮(NKET)单克隆抗体结合物稀释至  $0.5\mu\text{g} / \text{mL} \sim 2\mu\text{g} / \text{mL}$ ，最佳为  $1.25\mu\text{g} / \text{mL}$ ，放入  $10\text{mm} \times 300\text{mm}$  玻璃纤维膜，浸泡 10 分钟~20 分钟，最佳时间为 15 分钟， $37^{\circ}\text{C}$  烘干， $4^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$  保存，最佳温度为  $6^{\circ}\text{C}$ ，粘贴在背衬一端的注样区；背衬的材质为聚氯乙烯或聚乙烯，聚氯乙烯或聚乙烯背衬厚度为  $100\mu\text{m}$ ，在背衬中间检测区粘贴硝酸纤维素膜，硝酸纤维素膜厚度为  $120\mu\text{m}$ ，在硝酸纤维素膜上喷涂浓度为  $100\mu\text{g} / \text{mL} \sim 500\mu\text{g} / \text{mL}$  NKET-OVA 结合物作检测线（最佳喷涂浓度为  $300\mu\text{g} / \text{mL}$ ），喷涂浓度为  $50\mu\text{g} / \text{mL} \sim 200\mu\text{g} / \text{mL}$  羊抗鼠 IgG 作质控线（最佳喷涂浓度为  $125\mu\text{g} / \text{mL}$ ），检测线和质控线的宽度为 0.5 mm~1mm（最佳宽度 0.75 mm），再用 1% 牛血清白蛋白封闭硝酸纤维素膜；蛋白质负载量为  $5\mu\text{g} / \text{cm}^2 \sim 20\mu\text{g} / \text{cm}^2$ ，（最佳负载量为  $12.5\mu\text{g} / \text{cm}^2$ ）在背衬另一端吸水区粘贴吸水纸；

所得去甲氯胺酮 (NKET) 金标检测试纸条包封在上面开有注样孔和观测孔的盒壳体内。

本发明的检测原理是：样品中的去甲氯胺酮首先与胶体金颗粒表面的抗去甲氯胺酮单克隆抗体反应，如果样品中去甲氯胺酮的含量超过限值，胶体金的

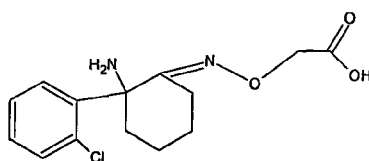
抗体位点将不再有剩余，当胶体金颗粒层析经过检测线时，胶体金颗粒将不会停留在该线的所在位置，继续上行时与控制线上喷涂的羊抗鼠的反应，呈现出胶体金的红色。如果样品中不含去甲氯胺酮或去甲氯胺酮含量低于限值，胶体金表面的抗体将与检测线上的化合物反应呈现出红色，质控线也呈现红色；

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：



式 1

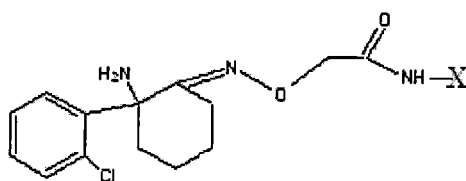
#### 完全抗原

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  $\gamma$  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：



## 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 为血蓝蛋白，完全抗原为去甲氯胺酮-KLH，作为免疫用抗原，用于制备分泌抗去甲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免疫检测板。

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，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 Omixe，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 NaHCO<sub>3</sub> 溶液调 pH 为 8.5，转移至分液漏斗中，用 80mL CHCl<sub>3</sub> 提取 3 次，弃去 CHCl<sub>3</sub> 层。再用 1.2N HCl 溶液调 pH 为 3，用 100mL CHCl<sub>3</sub> 提取 4 次，收集 CHCl<sub>3</sub> 层；加入 20mL 水洗涤 CHCl<sub>3</sub> 层，收集 CHCl<sub>3</sub> 层；加入无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶脱水 10min，过滤，CHCl<sub>3</sub> 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-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白发突变，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。

本发明的检测原理是：样品中的去甲氯胺酮（NKET）首先与胶体金颗粒表面的抗去甲氯胺酮（NKET）单克隆抗体反应，如果样品中去甲氯胺酮（NKET）的含量超过限值，胶体金的抗体位点将不再有剩余，当胶体金颗粒层析经过检测线时，胶体金颗粒将不会停留在该线的所在位置，继续上行时与控制线上喷涂的羊抗鼠 IgG 的反应，呈现出胶体金的红色。如果样品中不含去甲氯胺酮（NKET）或去甲氯胺酮（NKET）含量低于限值，胶体金表面的抗体将与检测线上的化合物反应呈现出红色，质控线也呈现红色。

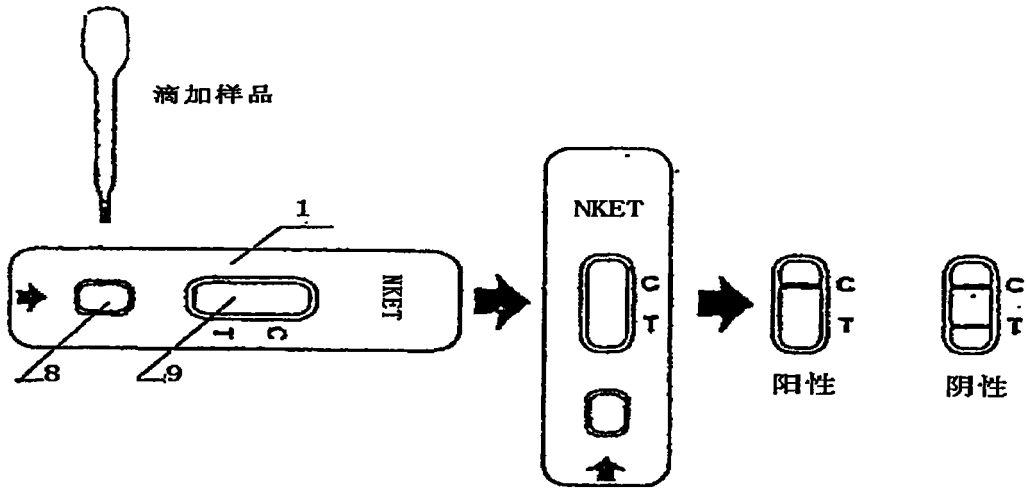


图 1

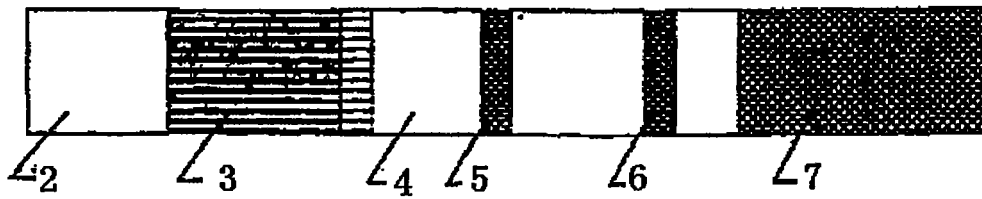


图 2

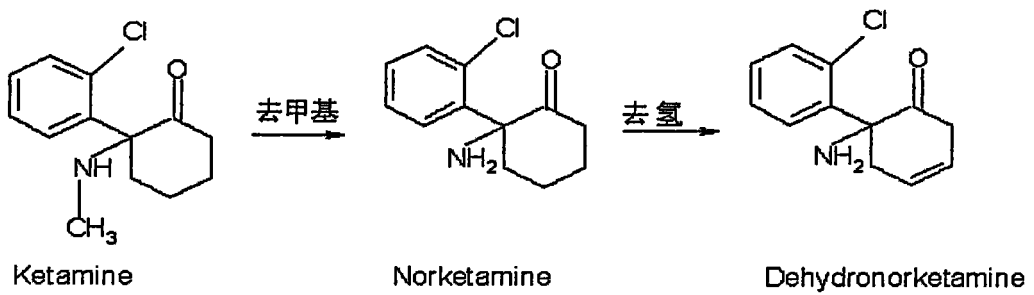


图 3

专利名称(译)	一种去甲氟胺酮金标检测试纸盒及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101308139A</a>	公开(公告)日	2008-11-19
申请号	CN200810131795.4	申请日	2008-06-30
[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 沈笑平 魏万里 何金海 蔡建荣 张凌裳 龚燕 孙蔚榕 张东升 蔡正森 吴杰 沈雯琰 王文静 叶进		
发明人	赵晓联 赵春城 沈笑平 魏万里 何金海 蔡建荣 张凌裳 龚燕 孙蔚榕 张东升 蔡正森 吴杰 沈雯琰 王文静 叶进		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/558 G01N33/543 G01N33/532		
代理人(译)	刘瑞平		
其他公开文献	CN101308139B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明为一种去甲氟胺酮金标检测试纸盒。其可以快速、简易、灵敏地检测去甲氟胺酮，为此，本发明还提供了试纸盒的制备方法。其包括试纸条，所述试纸条被封装于盒壳体，所述盒壳体上面开有注样孔，观测孔，其特征在于：试纸条用聚氯乙烯或聚乙烯

作背衬，在试纸条一端的注样区粘贴吸附胶体金 - 抗去甲氨胺酮单克隆抗体结合物的玻璃纤维膜；在试纸条中间的测试区粘贴硝酸纤维素膜，硝酸纤维素膜和玻璃纤维膜连接处有一小段重叠区，玻璃纤维膜的一小段重叠在硝酸纤维素膜上，在试纸条另一端吸水区粘贴吸水纸；在硝酸纤维素膜上从注样区到吸水区的方向，依次设置材质为去甲氨胺酮卵清蛋白作检测线，和材质为羊抗鼠质控线，所述硝酸纤维素膜上覆盖有浓度为1%的牛血清白蛋白；所述注样孔位置对应于试纸条注样区的玻璃纤维膜，所述观测孔对应于试纸条的测试区。

