



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107345909 A

(43)申请公布日 2017.11.14

(21)申请号 201710487523.7

(22)申请日 2017.06.23

(71)申请人 浙江诺迦生物科技有限公司

地址 310032 浙江省杭州市江干区九环路9号4号楼11楼1126室

(72)发明人 范春雷 程向荣 陈喆 田男

(74)专利代理机构 杭州五洲普华专利代理事务所(特殊普通合伙) 33260

代理人 张瑜

(51)Int.Cl.

G01N 21/552(2014.01)

G01N 33/53(2006.01)

C07K 16/44(2006.01)

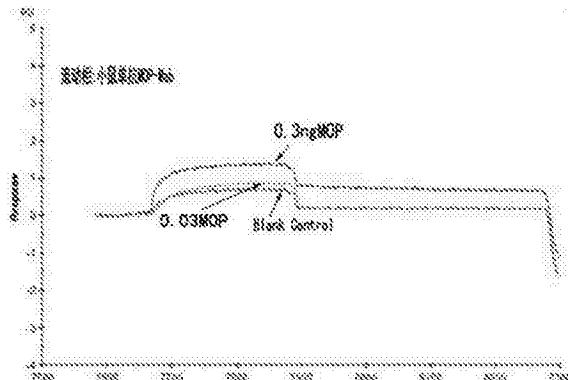
权利要求书2页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

一种唾液样本中痕量吗啡的检测方法及使用的SPR芯片

(57)摘要

本发明涉及一种唾液样本中痕量吗啡的检测方法及其使用的SPR芯片，该检测方法为利用SPR芯片在SPR仪上检测待测样本中的MOP含量，SPR芯片为抗MOP抗体SPR芯片，抗MOP抗体SPR芯片通过将抗MOP的Fab段包被于3D环氧SPR芯片后制得。本发明制备的SPR芯片是表面偶联了抗MOP的特异性抗体，可特异性结合复杂样本中的MOP分子，因而可应用于唾液样本中痕量吗啡的检测。同时，利用本发明制备的抗MOP抗体SPR芯片在SPR仪上检测吸食吗啡人员唾液样本中的MOP时，可达到快速、准确、灵敏的效果，其检测灵敏度至少可以达到0.3-3ng/mL，满足犯罪现场快速检测的需求。



1. 一种唾液样本中痕量吗啡的检测方法,所述检测方法为利用SPR芯片在SPR仪上检测待测样本中的MOP含量,其特征在于,所述SPR芯片为抗MOP抗体SPR芯片,所述抗MOP抗体SPR芯片通过以下方法制得:

S1、将MOP分别偶联于KLH和OVA,得到MOP-KLH和MOP-OVA;

S2、用上述MOP-KLH和快速免疫佐剂免疫BALB/C小鼠,用MOP-OVA检测免疫小鼠抗MOP的抗血清效价;

S3、取抗血清ELISA效价在6K以上的小鼠,取脾脏的B淋巴细胞与小鼠骨髓瘤细胞SP2/0融合,经单克隆筛选获得抗血清ELISA效价在10K以上的抗MOP抗体杂交瘤细胞株;

S4、将上述杂交瘤细胞株接种至BALB/C小鼠腹腔,从腹水中制备纯化抗体;

S5、用木瓜蛋白酶将上述纯化抗体水解成Fc段和Fab段,将Fab段包被于3D环氧SPR芯片,获得抗MOP抗体SPR芯片。

2. 根据权利要求1所述的一种唾液样本中痕量吗啡的检测方法,其特征在于,步骤S2中所述的快速免疫佐剂为QuickAntibody-Mouse5W。

3. 根据权利要求1所述的一种唾液样本中痕量吗啡的检测方法,其特征在于,步骤S2中所述的MOP-OVA检测在MOP-KLH和快速免疫佐剂免疫BALB/C小鼠5周后进行。

4. 根据权利要求1所述的一种唾液样本中痕量吗啡的检测方法,其特征在于,步骤S3中所述的抗MOP抗体杂交瘤细胞株的灵敏度为0.3-3ng。

5. 根据权利要求1所述的一种唾液样本中痕量吗啡的检测方法,其特征在于,步骤S4中所述的从腹水中制备纯化抗体的具体过程为:从腹水中获取抗体,然后用Protein G柱吸附纯化得到纯化抗体。

6. 一种如权利要求1-5任一所述的唾液样本中痕量吗啡的检测方法中使用的SPR芯片,其特征在于,所述的SPR芯片为抗MOP抗体SPR芯片,所述抗MOP抗体SPR芯片通过以下方法制得:

S1、将MOP分别偶联于KLH和OVA,得到MOP-KLH和MOP-OVA;

S2、用上述MOP-KLH和快速免疫佐剂免疫BALB/C小鼠,用MOP-OVA检测免疫小鼠抗MOP的抗血清效价;

S3、取抗血清ELISA效价在6K以上的小鼠,取脾脏的B淋巴细胞与小鼠骨髓瘤细胞SP2/0融合,经单克隆筛选获得抗血清ELISA效价在10K以上的抗MOP抗体杂交瘤细胞株;

S4、将上述杂交瘤细胞株接种至BALB/C小鼠腹腔,从腹水中制备纯化抗体;

S5、用木瓜蛋白酶将上述纯化抗体水解成Fc段和Fab段,将Fab段包被于3D环氧SPR芯片,获得抗MOP抗体SPR芯片。

7. 根据权利要求6所述的一种唾液样本中痕量吗啡的检测方法中使用的SPR芯片,其特征在于,步骤S2中所述的快速免疫佐剂为QuickAntibody-Mouse5W。

8. 根据权利要求6所述的一种唾液样本中痕量吗啡的检测方法中使用的SPR芯片,其特征在于,步骤S2中所述的MOP-OVA检测在MOP-KLH和快速免疫佐剂免疫BALB/C小鼠5周后进行。

9. 根据权利要求6所述的一种唾液样本中痕量吗啡的检测方法中使用的SPR芯片,其特征在于,步骤S3中所述的抗MOP抗体杂交瘤细胞株的灵敏度为0.3-3ng。

10. 根据权利要求6所述的一种唾液样本中痕量吗啡的检测方法中使用的SPR芯片,其

特征在于，步骤S4中所述的从腹水中制备纯化抗体的具体过程为：从腹水中获取抗体，然后用Protein G柱吸附纯化得到纯化抗体。

一种唾液样本中痕量吗啡的检测方法及使用的SPR芯片

技术领域

[0001] 本发明涉及一种毒品吗啡的检测方法,尤其涉及一种唾液样本中痕量吗啡的检测方法及其使用的SPR芯片,属于检测技术领域。

[0002] 本发明中下列表达式的意义为:

[0003] MOP:吗啡

[0004] KLH:血蓝蛋白

[0005] OVA:鸡卵白蛋白

背景技术

[0006] 吗啡(Morphine,MOP)是阿片类毒品一种,化学名称17-甲基-4,5 α -环氧-7,8-二脱氢吗啡喃-3,6 α -二醇,化学式为C₁₇H₁₉NO₃,分子量为285.34,以口服形式为主。

[0007] 目前,对吗啡的检测常用的方法有化学显色法、薄层层析检测法(TLC)、高效液相色谱检测法(HPLC)和气质联用色谱检测法(GC/MS)法等。前两者需要大量检测样品,灵敏度及精密度均不高;后两者虽有较高的灵敏度及精密度,但检测要求高,也难以推广,均不能满足犯罪现场快速检测的需求。在此背景下,寻求一种可达到快速、准确、灵敏、经济的犯罪现场检测方法成为了科学工作者研究重点。

[0008] 表面等离子共振技术(SPR)是从20世纪90年代发展起来的一种新技术,其应用SPR原理检测生物传感芯片上配位体与分析物之间的相互作用情况,广泛应用于各个领域,已经成为生命科学和制药领域的一种重要的研究工具。与传统检测方法相比,具有高灵敏度、响应快、体积小、机械强度大、检测过程快、实时检测、能动态地监测生物分子相互作用的全过程和实时数据、无需标记样品、保持分子活性、对复合物的定量测定不干扰反应的平衡等优点,成为了检测冰毒的较优选择。目前,关于使用表面等离子共振技术快速检测吗啡的方法已有报道,如中国发明专利(公开号:CN101571480A)公开了一种毒品吗啡的表面等离子体共振检测方法,该检测方法具有抗恶劣环境、选择性高、响应快速、操作简便的特点,不仅提高了方法的灵敏度,也相应降低了检测成本。但该专利制备的SPR传感芯片是通过吸附的方法来达到检测MOP分子的目的,难以达到对复杂样本,如唾液检测的要求。

发明内容

[0009] 本发明的目的是针对现有技术中存在的上述问题,提出了一种利用唾液样本就可达到快速、准确的痕量吗啡的检测方法。

[0010] 本发明的目的可通过下列技术方案来实现:一种唾液样本中痕量吗啡的检测方法,所述检测方法为利用SPR芯片在SPR仪上检测待测样本中的MOP含量,所述SPR芯片为抗MOP抗体SPR芯片,所述抗MOP抗体SPR芯片通过以下方法制得:

[0011] S1、将MOP分别偶联于KLH和OVA,得到MOP-KLH和MOP-OVA;

[0012] S2、用上述MOP-KLH和快速免疫佐剂免疫BALB/C小鼠,用MOP-OVA检测免疫小鼠抗MOP的抗血清效价;

[0013] S3、取抗血清ELISA效价在6K以上的小鼠，取脾脏的B淋巴细胞与小鼠骨髓瘤细胞SP2/0融合，经单克隆筛选获得抗血清ELISA效价在10K以上的抗MOP抗体杂交瘤细胞株；

[0014] S4、将上述杂交瘤细胞株接种至BALB/C小鼠腹腔，从腹水中制备纯化抗体；

[0015] S5、用本瓜蛋白酶将上述纯化抗体水解成Fc段和Fab段，将Fab段包被于3D环氧SPR芯片，获得抗MOP抗体SPR芯片。

[0016] 在上述的一种唾液样本中痕量吗啡的检测方法中，步骤S2中所述的快速免疫佐剂为QuickAntibody-Mouse5W。

[0017] 在上述的一种唾液样本中痕量吗啡的检测方法中，步骤S2中所述的MOP-OVA检测在MOP-KLH和快速免疫佐剂免疫BALB/C小鼠5周后进行，进一步优选5-8周后进行，以便获得更高效的亚克隆细胞株。

[0018] 在上述的一种唾液样本中痕量吗啡的检测方法中，步骤S3中所述的抗MOP抗体杂交瘤细胞株的灵敏度为0.3-3ng。灵敏度为0.3-3ng的抗MOP抗体杂交瘤细胞株通过以下方法筛选得到：将MOP-OVA点样偶联于SPRi羧基芯片，MOP-OVA的量分别为30ng、3ng、0.3ng、0.03ng；另外，同样OVA点样，作为阴性对照。用表面等离子共振SPRi高通量生物分子间相互作用仪分析抗血清ELISA效价在10K以上的株杂交瘤细胞株的抗体与芯片上的样品结合反应情况，筛选出检测灵敏度能达到0.3ng-3ng的抗体杂交瘤细胞株。这个灵敏度使该抗体可应用于检测至少1周内吸食吗啡毒品人员的唾液样品。

[0019] 在上述的一种唾液样本中痕量吗啡的检测方法中，步骤S4中所述的从腹水中制备纯化抗体的具体过程为：从腹水中获取抗体，然后用Protein A柱吸附纯化得到纯化抗体。

[0020] 本发明步骤S5在步骤S4用Protein G柱吸附纯化洗脱前，直接用本瓜蛋白酶将Protein G-抗体柱上的抗体水解成Fc段和Fab段。由于Protein G是和抗体的Fc段特异性的，因而酶切后，Fab段即可游离纯化出来，收集、超滤脱盐浓缩此抗MOP的Fab，冻干保存。

[0021] 本发明将抗MOP的Fab段包被于3D环氧SPR芯片，同时以正常小鼠IgG的Fab片段为对照，获得抗MOP抗体SPR芯片，芯片上包括抗MOP的Fab段和正常小鼠IgG的Fab片段(阴性对照)。由于Fab段的分子是完整抗体分子大小的1/3，加上没有Y空间位阻，可以大大提高Fab段在芯片上包被的密度，至少比完整抗体提高3-5倍的有效密度，对于像毒品这类小分子可大大提高其检测灵敏度。

[0022] 本发明利用该抗MOP的Fab抗体SPR芯片，在SPR仪上检测吸食吗啡人员唾液样本中的MOP，取样、检测等操作更快速、方便，可在1-2分钟左右得知检测结果，检测灵敏度至少可达到0.3-3ng/mL，具有快速、准确、灵敏的效果。与目前常规的尿检方法相比，本发明的优势在于：

[0023] (1) 取样方便，不受场地限制、降低被检人员的不配合度并避免其作弊的可能性，使毒驾临检成为可能。

[0024] (2) 可在1-2分钟内判读阴性和阳性结果(尿检至少3-8分钟)。

[0025] (3) 检测准确、灵敏度高，检测阈值至少可达0.3-3ng/mL，可应用于唾液快速实时检测。

[0026] 本发明另一个目的在于提供上述唾液样本中痕量吗啡的检测方法中使用的SPR芯片，所述的SPR芯片为抗MOP抗体SPR芯片，所述抗MOP抗体SPR芯片通过以下方法制得：

[0027] S1、将MOP分别偶联于KLH和OVA，得到MOP-KLH和MOP-OVA；

[0028] S2、用上述MOP-KLH和快速免疫佐剂免疫BALB/C小鼠，用MOP-OVA检测免疫小鼠抗MOP的抗血清效价；

[0029] S3、取抗血清ELISA效价在6K以上的小鼠，取脾脏的B淋巴细胞与小鼠骨髓瘤细胞SP2/0融合，经单克隆筛选获得抗血清ELISA效价在10K以上的抗MOP抗体杂交瘤细胞株；

[0030] S4、将上述杂交瘤细胞株接种至BALB/C小鼠腹腔，从腹水中制备纯化抗体；

[0031] S5、用本瓜蛋白酶将上述纯化抗体水解成Fc段和Fab段，将Fab段包被于3D环氧SPR芯片，获得抗MOP抗体SPR芯片。

[0032] 在上述的一种唾液样本中痕量吗啡的检测方法中使用的SPR芯片中，步骤S2中所述的快速免疫佐剂为QuickAntibody-Mouse5W。

[0033] 在上述的一种唾液样本中痕量吗啡的检测方法中使用的SPR芯片中，步骤S2中所述的MOP-OVA检测在MOP-KLH和快速免疫佐剂免疫BALB/C小鼠5周后进行，进一步优选5-8周后进行。

[0034] 在上述的一种唾液样本中痕量吗啡的检测方法中使用的SPR芯片中，步骤S3中所述的抗MOP抗体杂交瘤细胞株的灵敏度为0.3-3ng。

[0035] 在上述的一种唾液样本中痕量吗啡的检测方法中使用的SPR芯片中，步骤S4中所述的从腹水中制备纯化抗体的具体过程为：从腹水中获取抗体，然后用Protein G柱吸附纯化得到纯化抗体。

[0036] 与现有技术相比，本发明制备的SPR传感芯片是表面偶联了抗MOP的特异性抗体，可特异性结合复杂样本中的MOP分子，因而可应用于唾液样本中痕量吗啡的检测。同时，利用本发明制备的抗MOP抗体SPR芯片在SPR仪上检测吸食吗啡人员唾液样本中的甲基苯丙胺时，可达到快速、准确、灵敏的效果，其检测灵敏度至少可以达到0.3-3ng/mL，满足犯罪现场快速检测的需求。

附图说明

[0037] 图1为筛选出检测灵敏度能达到0.3ng的抗体杂交瘤细胞株的SPR结果图。

具体实施方式

[0038] 以下是本发明的具体实施例，并结合附图说明对本发明的技术方案作进一步的描述，但本发明并不限于这些实施例。

[0039] 实施例1：

[0040] 将MOP通过酯键[-C(=O)-O-]分别偶联于蛋白载体KLH和OVA，得到MOP-KLH和MOP-OVA。

[0041] 用MOP-KLH和快速免疫佐剂QuickAntibody-Mouse5W免疫BALB/C小鼠15只，5周后用MOP-OVA检测免疫小鼠抗甲基苯丙胺的抗血清效价；取能产生高特异性和高亲和力抗体（抗血清ELISA效价在6K以上）的小鼠5只。

[0042] 分别取脾脏的B淋巴细胞与小鼠骨髓瘤细胞SP2/0融合，经单克隆筛选获得高特异性和高亲和力的抗甲基苯丙胺抗体杂交瘤细胞株，ELISA效价在10K以上100株。然后将MOP-OVA点样偶联于SPRi羧基芯片，MOP-OVA的量分别为30ng、3ng、0.3ng、0.03ng；另外，同样OVA点样，作为阴性对照。用表面等离子共振SPRi高通量生物分子间相互作用仪分析初筛所得

的100株杂交瘤细胞株的抗体与芯片上的样品结合反应情况,筛选出如图1所示的检测灵敏度能达到0.3ng的抗体杂交瘤细胞株。

[0043] 将上述灵敏度能达到0.3ng的抗体杂交瘤细胞株接种至BALB/C小鼠腹腔,从腹水中大量获取抗体,并用Protein G柱吸附纯化。在洗脱前,直接用本瓜蛋白酶将Protein G-抗体柱上的抗体水解成Fc段和Fab段。由于Protein G是和抗体的Fc段特异性的,因而酶切后,Fab段即可游离纯化出来,收集、超滤脱盐浓缩此抗MOP的Fab段,并包被于3D环氧SPR芯片,同明以正常小鼠IgG的Fab片段为对照,获得抗MOP抗体SPR芯片。

[0044] 应用实施例1-5:

[0045] 将实施例1制备得到的抗MOP抗体SPR芯片用于在SPR仪上检测4个分别吸食吗啡1天、3天、5天、和7天后的人员、1个正常人员唾液样本中的MOP。

[0046] 应用对比例1-5:

[0047] 将上述应用实施例1-5同时进行常规尿检。

[0048] 将应用实施例1-5和应用对比例1-5的检测结果进行对比,如表1所示。

[0049] 表1:本发明与常规尿检比较

[0050]

	被检人员情况	取样时间	检测时间	检测结果
应用实施例1	吸食吗啡1天后	半分钟内	2分钟	阳性+
应用实施例2	吸食吗啡3天后	半分钟内	2分钟	阳性+
应用实施例3	吸食吗啡5天后	半分钟内	2分钟	阳性+
应用实施例4	吸食吗啡7天后	半分钟内	2分钟	阳性+
应用实施例5	无吸毒史	半分钟内	2分钟	阴性-
应用对比例1	吸食吗啡1天后	2分钟以上	5分钟	阳性+
应用对比例2	吸食吗啡3天后	2分钟以上	5分钟	阳性+
应用对比例3	吸食吗啡5天后	2分钟以上	5分钟	阴性-
应用对比例4	吸食吗啡7天后	2分钟以上	5分钟	阴性-
应用对比例5	无吸毒史	2分钟以上	5分钟	阴性-

[0051] 从表1可知,与常规尿检比,本发明更快速、准确、灵敏。

[0052] 在实施例及其替换方案中,筛选出的抗MA抗体杂交瘤细胞株的灵敏度还可以为0.4ng、0.5ng、0.6ng、0.7ng、0.8ng、0.9ng、1ng、1.1ng、1.2ng、1.3ng、1.4ng、1.5ng、1.6ng、1.7ng、1.8ng、1.9ng、2ng、2.1ng、2.2ng、2.3ng、2.4ng、2.5ng、2.6ng、2.7ng、2.8ng、2.9ng、

3ng。

[0053] 鉴于本发明方案实施例众多,各实施例实验数据庞大众多,不适合于此处逐一列举说明,但是各实施例所需要验证的内容和得到的最终结论均接近。故而此处不对各个实施例的验证内容进行逐一说明,仅以实施例1和应用实施例1-5作为代表说明本发明申请优异之处。

[0054] 本文中所描述的具体实施例仅仅是对本发明精神作举例说明。本发明所属技术领域的技术人员可以对所描述的具体实施例做各种修改或补充或采用类似的方式替代,但并不会偏离本发明的精神或者超越所附权利要求书所定义的范围。

[0055] 尽管对本发明已作出了详细的说明并引证了一些具体实施例,但是对本领域熟练技术人员来说,只要不离开本发明的精神和范围可作各种变化或修正是显然的。

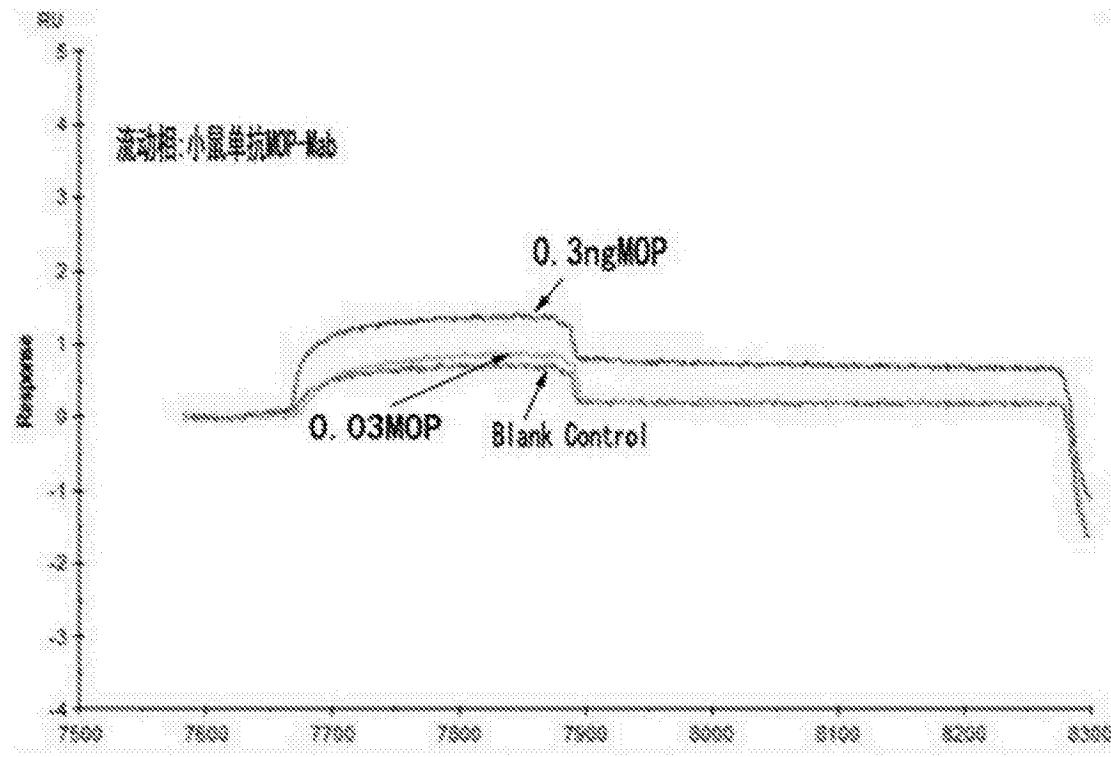


图1

专利名称(译)	一种唾液样本中痕量吗啡的检测方法及使用的SPR芯片		
公开(公告)号	CN107345909A	公开(公告)日	2017-11-14
申请号	CN201710487523.7	申请日	2017-06-23
[标]发明人	范春雷 程向荣 陈喆 田男		
发明人	范春雷 程向荣 陈喆 田男		
IPC分类号	G01N21/552 G01N33/53 C07K16/44		
CPC分类号	G01N21/553 C07K16/44 G01N33/53		
代理人(译)	张瑜		
外部链接	Espacenet	Sipo	

摘要(译)
本发明涉及一种唾液样本中痕量吗啡的检测方法及其使用的SPR芯片，该检测方法为利用SPR芯片在SPR仪上检测待测样本中的MOP含量，SPR芯片为抗MOP抗体SPR芯片，抗MOP抗体SPR芯片通过将抗MOP的Fab段包被于3D环氧SPR芯片后制得。本发明制备的SPR芯片是表面偶联了抗MOP的特异性抗体，可特异性结合复杂样本中的MOP分子，因而可应用于唾液样本中痕量吗啡的检测。同时，利用本发明制备的抗MOP抗体SPR芯片在SPR仪上检测吸食吗啡人员唾液样本中的MOP时，可达到快速、准确、灵敏的效果，其检测灵敏度至少可以达到0.3-3ng/mL，满足犯罪现场快速检测的需求。

