



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109870442 A

(43)申请公布日 2019.06.11

(21)申请号 201910250542.7

(22)申请日 2019.03.29

(71)申请人 铁道警察学院

地址 450000 河南省郑州市金水区农业路
31号

(72)发明人 崔胜峰 万敬伟 马素娟 左健

(74)专利代理机构 郑州联科专利事务所(普通
合伙) 41104

代理人 时立新 张丽

(51)Int.Cl.

G01N 21/64(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/544(2006.01)

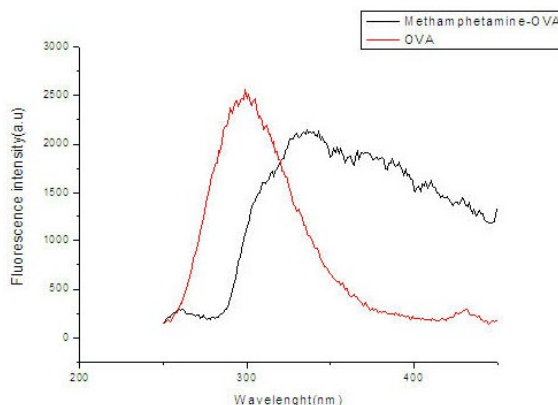
权利要求书2页 说明书8页 附图2页

(54)发明名称

一种甲基苯丙胺包被抗原、其制备方法及其
利用其检测甲基苯丙胺的方法

(57)摘要

一种甲基苯丙胺包被抗原、其制备方法及其
利用其检测甲基苯丙胺的方法,所述制备过程包括
如下步骤:(1)甲基苯丙胺半抗原的制备:称取琥
珀酸酐与甲基苯丙胺溶于有机溶剂中,在碳酸钾
的催化作用下,55~65℃加热搅拌至反应完全,薄
层色谱分离,所得琥珀酰甲基苯丙胺即为甲基苯
丙胺半抗原;(2)甲基苯丙胺包被抗原的制备:以
EDC、NHS为催化剂,将甲基苯丙胺半抗原和卵清
蛋白进行反应得到甲基苯丙胺包被抗原;(3)量
子点标记的甲基苯丙胺抗体的制备:将CdSe/ZnS
QDs溶解于硼酸缓冲液中,在EDC、NHS作用下,将
甲基苯丙胺抗体滴加至CdSe/ZnS QDs的硼酸缓
冲液中,搅拌反应,反应结束后,PBS缓冲液透析。



1. 一种甲基苯丙胺包被抗原的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 甲基苯丙胺半抗原的制备:以二氯甲烷或丙酮为溶剂,称取琥珀酸酐与甲基苯丙胺,在碳酸钾的催化作用下,55~65℃加热搅拌至反应完全,薄层色谱分离,所得琥珀酰甲基苯丙胺即为甲基苯丙胺半抗原;

(2) 甲基苯丙胺包被抗原的制备:以EDC和NHS为催化剂,将甲基苯丙胺半抗原和卵清蛋白进行反应得到甲基苯丙胺包被抗原。

2. 根据权利要求1所述甲基苯丙胺包被抗原的制备方法,其特征在于,所述步骤(1)的具体过程如下:取甲基苯丙胺溶于二氯甲烷或丙酮中,混合均匀后加入 K_2CO_3 ,加热至55~65℃搅拌10~30 min,再加入琥珀酸酐,55~65℃搅拌反应至完全,经琥珀酰甲基苯丙胺将反应体系全部转移至离心管内,向离心管内加入二氯甲烷并离心保留上层清液,重复此操作2~3次,再次利用薄层层析法将琥珀酰甲基苯丙胺与其他物质分离,琥珀酰甲基苯丙胺与其他反应物质分离时所使用的展开剂为二氯甲烷,制得琥珀酰甲基苯丙胺的二氯甲烷溶液,将琥珀酰甲基苯丙胺的二氯甲烷溶液加热结晶,制得琥珀酰甲基苯丙胺晶体,甲基苯丙胺、 K_2CO_3 和琥珀酸酐的摩尔比为1: (145~150) :50。

3. 根据权利要求1所述甲基苯丙胺包被抗原的制备方法,其特征在于,所述步骤(2)的具体过程如下:

将1.7 mg琥珀酰甲基苯丙胺晶体溶于0.5 mL的双蒸水中,完全溶解后,加入2.4 mg EDC·HCl标记为A溶液;

将1.3 mg卵清蛋白溶于0.5 mL的双蒸水,记为B溶液;

用0.1 mol/L HCl溶液将B溶液的pH调节至4.0,再将A、B溶液混合,加入1 mg NHS室温搅拌20~40 min后,4℃下搅拌过夜,用10 mM PBS缓冲液透析、离心、浓缩,即得。

4. 权利要求1至3任一所述的制备方法制得的量子点标记的甲基苯丙胺包被抗原。

5. 权利要求4所述量子点标记的甲基苯丙胺包被抗原的用途,其特征在于,用于检测甲基苯丙胺的含量。

6. 根据权利要求5所述的用途,其特征在于,所述检测为荧光免疫吸附分析方法,检测时,以所述CdSe/ZnS QDs标记的甲基苯丙胺包被抗原为荧光探针,CdSe/ZnS QDs标记的甲基苯丙胺包被抗原与被分析物甲基苯丙胺直接竞争具有特异性免疫反应的甲基苯丙胺抗体。

7. 一种检测甲基苯丙胺方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 先用10 mM PBS缓冲液清洗透明96孔酶标板每个孔,然后将比色孔和用于检测待测样品的检测孔中加入权利要求1制得的甲基苯丙胺包被抗原,然后将其在室温中孵化,将96孔板沥干后,使用PBST溶液清洗,干燥,再在每孔内加入1%BSA的PBS溶液封闭非特异性结合点位;

(2) 然后比色孔中加入荧光标记甲基苯丙胺抗体溶液,再加入系列梯度浓度的游离甲基苯丙胺溶液,将每个孔用10 mM PBS缓冲液定容至100 μ L,然后96孔板放入37℃的烘箱中孵化,作为比色法样品;

(3) 将液态待测样品与等体积的荧光标记甲基苯丙胺抗体溶液加入检测孔中,通过目测荧光强度并和比色孔中的荧光强度比较从而确定待测样品中甲基苯丙胺的浓度。

8. 根据权利要求7所述检测甲基苯丙胺方法,其特征在于,1号孔不加游离的甲基苯丙

胺最为对照组,2号孔中游离的甲基苯丙胺的浓度为1000 $\mu\text{g/mL}$,3号孔中游离的甲基苯丙胺的浓度为100 $\mu\text{g/mL}$,4号孔中游离的甲基苯丙胺的浓度为10 $\mu\text{g/mL}$,5号孔中游离的甲基苯丙胺的浓度为1 $\mu\text{g/mL}$,6号孔中游离的甲基苯丙胺的浓度为100 ng/mL ,7号孔中游离的甲基苯丙胺的浓度为10 ng/mL ,8号孔中游离的甲基苯丙胺的浓度为1 ng/mL ,9号孔中游离的甲基苯丙胺的浓度为0.1 ng/mL ,10号孔中游离的甲基苯丙胺的浓度为0.01 ng/mL 。

9.根据权利要求7所述检测甲基苯丙胺方法,其特征在于,所述荧光标记的甲基苯丙胺抗体溶液的制备过程如下:避光条件下,取20.5 μL 、浓度为8 μM 羧基化水溶性CdSe/ZnS QDs用10 mM, $\text{pH} = 7.4$ 的硼酸缓冲液稀释至1 μM ,室温搅拌下,将14 μL 甲基苯丙胺抗体滴加到CdSe/ZnS QDs的硼酸溶液中混合均匀,搅拌均匀后,将13 μL ,10 mg/mL 的EDC溶液滴加到溶液中反应20 min,搅拌下,滴加15 μL ,10 mg/mL NHS溶液,室温下搅拌2 h,反应结束,将制得的CdSe/ZnS QDs标记的甲基苯丙胺抗体用PBS缓冲液透析至少24 h,透析后浓缩、洗涤、离心,即得,其中,EDC溶液和NHS溶液的溶剂均为10 mM, $\text{PH} = 7.4$ 硼酸盐缓冲溶液。

一种甲基苯丙胺包被抗原、其制备方法及利用其检测甲基苯丙胺的方法

技术领域

[0001] 本发明属于毒品检测领域,涉及一种甲基苯丙胺包被抗原、其制备方法及利用其检测甲基苯丙胺的方法。

背景技术

[0002] 甲基苯丙胺即冰毒,纯白结晶体,晶莹剔透,故被吸毒、贩毒者称为“冰”。对人体中枢神经系统具有强烈的兴奋作用,且毒性强烈。冰毒的精神依赖性很强,吸食后会产生强烈的生理兴奋,可造成精神偏执,行为举止咄咄逼人,并引发反社会及性暴力倾向,同时严重损害内脏器官和脑组织,严重时导致肾机能衰竭及精神失常。其表现有被害妄想、幻觉,多为幻视,也可能出现听幻觉和触幻觉,严重时引起营养不良、体重减轻、人体免疫力降低、内脏器官得病率提高。用量稍大即会引起精神失常,使人因强烈的痉挛而死亡。

[0003] 尽管目前常用的用于检测甲基苯丙胺的方法主要有气相色谱-质谱连用技术,高效液相色谱法,拉曼光谱等方法应用到毒品检测中,但应用气相色谱-质谱技术,通常要对样品采取萃取富集后才能应用,其中用到的有机溶剂会对环境造成二次污染,不适合现场快速检测;高效液相色谱法设备复杂且繁琐,检测周期长;鉴于以上研究现状,开发新的快速高效的甲基苯丙胺类物质的检测方法十分必要。由于量子点标记免疫分析技术具有灵敏度高、特异性强、噪音误差小、速度快、安全无毒、操作简单、便于推广等优点,适合用于建立对甲基苯丙胺的快速检测方法。

[0004] 量子点标记免疫分析技术是基于新型荧光量子点标记生物抗体与免疫分析技术相结合,建立一种对甲基苯丙胺快速检测的方法。量子点标记抗体技术最主要的用途就是在荧光免疫分析技术中的应用,荧光标记抗体后既保持量子点的独特荧光稳定性又保持抗体对抗原结合的特异性,目前量子点与抗体的偶联方式主要采用EDC/NHS偶联法,将甲基苯丙胺抗体与羧基化水溶性CdSe/ZnS QDs偶联;荧光免疫分析技术,是将抗原抗体结合的特异性与荧光标记技术的灵敏性相结合,并对抗原或抗体进行定性定量分析的一项分析技术,即为将羧基化水溶性CdSe/ZnS QDs偶联的甲基苯丙胺抗体与吸附在96孔板上的甲基苯丙胺包被抗原和待测物共同竞争荧光抗体上的甲基苯丙胺特异性位点,待测物中甲基苯丙胺含量越高,与荧光标记抗体竞争结合越多,通过与包被抗原结合吸附在96孔板上荧光标记抗体越少,所测得荧光信号越弱,达到检测甲基苯丙胺的目的,利用量子点标记甲基苯丙胺抗体作为荧光探针结合免疫分析建立一种新型快速的荧光免疫分析方法。

[0005]

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种通过量子点标记的甲基苯丙胺抗体作为荧光探针结合免疫分析建立一种新型快速的荧光免疫分析方法。所述方法步骤简单、灵敏度高、特异性强、误差小、速度快、信号容易收集有助于提高检测限,可以快速准确地检测甲基苯丙胺。

[0007] 本发明基于量子点标记免疫分析的甲基苯丙胺检测的方法,是将人工合成甲基苯丙胺半抗原,与卵清蛋白(OVA)偶联形成包被抗原,利用羧基化水溶性CdSe/ZnS QDs通过EDC/NHS偶联法使其与甲基苯丙胺抗体偶联,并对偶联物进行表征,评价荧光标记抗体是否制备成功,以96孔酶标板为固相载体,利用制备荧光标记抗体免疫探针建立荧光免疫竞争吸附分析法(FLISA)快速检测甲基苯丙胺,并通过研究不同浓度甲基苯丙胺与荧光标记抗体竞争结合甲基苯丙胺包被抗原导致荧光强度的变化实现对甲基苯丙胺的定性、定量识别检测。

[0008] 基于上述目的,本发明采取的技术方案是:一种量子点标记的甲基苯丙胺包被抗原的制备方法,包括如下步骤:

(1) 甲基苯丙胺半抗原的制备:以二氯甲烷或丙酮为溶剂,称取琥珀酸酐与甲基苯丙胺,在碳酸钾的催化作用下,55~65℃加热搅拌至反应完全,薄层色谱分离,所得琥珀酰甲基苯丙胺即为甲基苯丙胺半抗原;

(2) 甲基苯丙胺包被抗原的制备:以EDC和NHS为催化剂,将甲基苯丙胺半抗原和卵清蛋白进行反应得到甲基苯丙胺包被抗原(又称为甲基苯丙胺-OVA)。

[0009] 进一步地,所述步骤(1)的具体过程如下:取甲基苯丙胺溶于二氯甲烷或丙酮中,混匀后加入K₂CO₃,加热至55~65℃搅拌10~30 min,再加入琥珀酸酐,55~65℃搅拌反应至完全,将琥珀酰甲基苯丙胺将反应体系全部转移至离心管内,向离心管内加入二氯甲烷离心取上层清液并重复此操作2~3次,再次利用薄层层析法将琥珀酰甲基苯丙胺与其他物质分离,琥珀酰甲基苯丙胺与其他反应物质分离时所使用的展开剂为二氯甲烷,制得琥珀酰甲基苯丙胺的二氯甲烷溶液,将琥珀酰甲基苯丙胺的二氯甲烷溶液加热结晶,制得琥珀酰甲基苯丙胺晶体,甲基苯丙胺、K₂CO₃和琥珀酸酐的摩尔比为1:(145~150):50。

[0010] 进一步地,所述步骤(2)的具体过程如下:

将1.7 mg琥珀酰甲基苯丙胺晶体溶于0.5 mL的双蒸水中,完全溶解后,加入2.4 mg EDC·HCl标记为A溶液;

将1.3 mg卵清蛋白溶于0.5 mL的双蒸水,记为B溶液;

用0.1 mol/L HCl溶液将B溶液的pH调节至4.0,再将A、B溶液混合,加入1 mg NHS室温搅拌20~40 min后,4℃下搅拌过夜,用10 mM PBS缓冲液透析、离心、浓缩,即得。

[0011] 进一步地,所述步骤(3)的具体过程如下:

避光条件下,取20.5 μL、8 μM羧基化水溶性CdSe/ZnS QDs用10 mM、pH = 7.4的硼酸缓冲液稀释至1 μM得到CdSe/ZnS QDs的硼酸溶液,室温搅拌下,将14 μL甲基苯丙胺包被抗原滴加到CdSe/ZnS QDs的硼酸溶液中混合均匀,搅拌5 min后,将13 μL、10 mg/mL的EDC溶液滴加到溶液中反应20 min,搅拌下,滴加15 μL、10 mg/mL NHS溶液,室温下搅拌2 h,反应结束,将制得的CdSe/ZnS QDs标记的甲基苯丙胺抗原用PBS缓冲液透析24 h,透析后浓缩、洗涤、离心,即得。

[0012] 进一步地,EDC溶液和NHS溶液的溶剂均为10 mM、pH = 7.4硼酸盐缓冲溶液。

[0013] 上述制备方法制得的甲基苯丙胺包被抗原。

[0014] 上述量子点标记的甲基苯丙胺包被抗原的用途,用于检测甲基苯丙胺的含量。

[0015] 所述检测为荧光免疫吸附分析方法,检测时,以所述CdSe/ZnS QDs标记的甲基苯丙胺抗体为荧光探针,甲基苯丙胺包被抗原与被分析物甲基苯丙胺直接竞争具有特异性免

疫反应的甲基苯丙胺抗体。

[0016] 一种检测甲基苯丙胺方法,包括如下步骤:

(1)先用10 mM PBS缓冲液清洗透明96孔酶标板每个孔,然后将比色孔和用于检测待测样品的检测孔中加入权利要求1制得的甲基苯丙胺包被抗原,然后将其在室温中孵化,将96孔板沥干后,使用PBST溶液清洗,干燥,再在每孔内加入1%BSA的PBS溶液封闭非特异性结合点位;

(2)然后比色孔中加入荧光标记甲基苯丙胺抗体溶液,再加入系列梯度浓度的游离甲基苯丙胺溶液,将每个孔用10 mM PBS缓冲液定容至100 μ L,然后96孔板放入37 $^{\circ}$ C的烘箱中孵化,作为比色法样品;

(3)将液态待测样品与等体积的荧光标记甲基苯丙胺抗体溶液加入检测孔中,通过目测荧光强度并和比色孔中的荧光强度比较从而确定待测样品中甲基苯丙胺的浓度。

[0017] 进一步地,1号孔不加游离的甲基苯丙胺最为对照组,2号孔中游离的甲基苯丙胺的浓度为1000 μ g/mL,3号孔中游离的甲基苯丙胺的浓度为100 μ g/mL,4号孔中游离的甲基苯丙胺的浓度为10 μ g/mL,5号孔中游离的甲基苯丙胺的浓度为1 μ g/mL,6号孔中游离的甲基苯丙胺的浓度为100 ng/mL,7号孔中游离的甲基苯丙胺的浓度为10 ng/mL,8号孔中游离的甲基苯丙胺的浓度为1 ng/mL,9号孔中游离的甲基苯丙胺的浓度为0.1 ng/mL,10号孔中游离的甲基苯丙胺的浓度为0.01 ng/mL。

[0018] 所述荧光标记的甲基苯丙胺抗体溶液的制备过程如下:避光条件下,取20.5 μ L、浓度为8 μ M羧基化水溶性CdSe/ZnS QDs用10 mM,pH = 7.4的硼酸缓冲液稀释至1 μ M,室温搅拌下,将14 μ L甲基苯丙胺抗体滴加到CdSe/ZnS QDs的硼酸溶液中混合均匀,搅拌均匀后,将13 μ L,10 mg/mL的EDC溶液滴加到溶液中反应20 min,搅拌下,滴加15 μ L,10 mg/mL NHS溶液,室温下搅拌2 h,反应结束,将制得的CdSe/ZnS QDs标记的甲基苯丙胺抗体用PBS缓冲液透析至少24 h,透析后浓缩、洗涤、离心,即得,其中,EDC溶液和NHS溶液的溶剂均为10 mM,PH = 7.4硼酸盐缓冲溶液。

[0019] 上述检测方法中甲基苯丙胺的检出限为1 ng/mL。

[0020] 硼酸盐缓冲溶液(10 mM,pH = 7.4)的配制过程如下:取45 mL硼酸溶液(0.2 mol/L)与5 mL的硼酸盐溶液(0.05 mol/L)混合为0.2 M的硼酸盐缓冲液,将其稀释20倍即为10 mM的硼酸盐溶液,室温保存;5 $\times$ PBS溶液(0.05 mol/L,pH = 7.4) 4 $^{\circ}$ C保存,使用前稀释至1 $\times$ PBS (10 mM)。

[0021] 将荧光标记抗体放置30天后测定荧光强度。新鲜制备的荧光标记抗体与放置一个月后荧光标记抗体同时对甲基苯丙胺标准溶液检测,荧光信号强度几乎无明显差异,结果表明,放置一个月后溶液荧光强度及特异性几乎没有显著差异,对甲基苯丙胺的检测方法无影响,此方法制备的荧光标记抗体稳定性较好。

[0022] 本发明的有益效果:

(1) 本发明所述方法操作简便、操作步骤简单、节省时间、信号容易收集。

[0023] (2) 本发明所述的甲基苯丙胺抗体和羧基化水溶性CdSe/ZnS QDs制备方案成熟,已经商业化,购买方便,制备的甲基苯丙胺包被抗原和荧光标记抗体保存时间长,且每一次检测的用量少,是一种非常经济的检测方法。

[0024] (3) 本发明方法所得荧光标记抗体的灵敏度高,响应时间较短。

附图说明

[0025] 图1为甲基苯丙胺-OVA与OVA荧光发射光谱图

图2为量子点与量子点标记的甲基苯丙胺包被抗原的荧光发射光谱图;

图3为量子点标记抗体与不同浓度甲基苯丙胺溶液的荧光光谱。

[0026] 图4为量子点标记抗体与甲基苯丙胺中最大发射波长的荧光强度随甲基苯丙胺浓度的变化。

具体实施方式

[0027] 以下结合附图和实施例对本发明的技术方案做进一步详细说明,但不是对本发明保护范围的限制。

[0028] 实施例1

一种甲基苯丙胺包被抗原的制备方法,包括如下步骤:

步骤(1):甲基苯丙胺半抗原的制备及表征

所述的甲基苯丙胺与丁二酸酐的反应通过前期预实验,测定甲基苯丙胺与丁二酸酐的最佳摩尔比值为1:50,与催化剂 K_2CO_3 的最佳摩尔比值为1:149。

[0029] 取1 mg甲基苯丙胺溶于500 μ L的二氯甲烷,充分震荡使其混合均匀后加入138 mg K_2CO_3 ,加热至60 $^{\circ}C$ 搅拌二十分钟,再加入33.6 mg的丁二酸酐,保持60 $^{\circ}C$ 继续搅拌四小时,琥珀酰甲基苯丙胺将反应体系全部转移至离心管内,向离心管内加入二氯甲烷离心取上层清液并重复此操作2~3次,再次利用薄层色谱法将琥珀酰甲基苯丙胺与其他反应物质分离,琥珀酰甲基苯丙胺与其他反应物质分离时所使用的展开剂为二氯甲烷,制得琥珀酰甲基苯丙胺的二氯甲烷溶液。甲基苯丙胺半抗原薄层层析鉴定。配置一定浓度的甲基苯丙胺、琥珀酰甲基苯丙胺溶液(1 mg/mL),以二氯甲烷:甲醇(v/v 20/1)展开剂,用点样毛细管各取10 μ L同浓度的样品溶液分别点于同一硅胶薄层板上,置于展开剂的展缸内,展开,取出后自然晾干,放置紫外光365 nm波长下检视。

[0030] 步骤(2):甲基苯丙胺包被抗原的制备及表征

将步骤(1)中的琥珀酰甲基苯丙胺的二氯甲烷溶液加热结晶,制得1.7 mg琥珀酰甲基苯丙胺再通过卵清蛋白(OVA)为载体蛋白采用EDC/NHS偶联成包被抗原载体蛋白偶联物,制取甲基苯丙胺包被抗原,并对其进行表征。

[0031] 所述的1.7 mg琥珀酰甲基苯丙胺晶体溶于0.5 mL的双蒸水中,完全溶解后,加入2.4 mg EDC $\cdot$ HCl标记为A溶液,将1.3 mg卵清蛋白(OVA)溶于0.5 mL的双蒸水,记为B溶液,用0.1 mol/L HCl溶液将B溶液的pH调节至4.0,再将A、B溶液混合,加入1 mg NHS室温搅拌30 min后,4 $^{\circ}C$ 下磁力搅拌过夜,用1 $\times$ PBS (10 mM PBS缓冲液)透析三天除去未反应的小分子甲基苯丙胺半抗原,每隔24 h更换一次1 $\times$ PBS (10 mM PBS缓冲液),将反应体系放入超滤浓缩管中,在5000 r/min条件下离心10 min浓缩至100 μ L,获得浓度为2.6 mg/mL纯净甲基苯丙胺包被抗原,将步骤(2)中反应体系完全取出定容至500 μ L用荧光分光光度计在230 nm的激发波长、240 nm/min的扫描速度下测定荧光强度,相同测定条件下与等浓度等体积的OVA溶液荧光强度作对比,如图1所示:

图1中所用纯OVA溶液与琥珀酰甲基苯丙胺溶液浓度均为2.4 mg/mL,500 μ L。与纯OVA溶液最大发射波长328 nm相比制备的琥珀酰THC-OVA在最大发射峰处有明显蓝移,这种蓝

移是由于琥珀酰甲基苯丙胺与OVA成功偶联所引起的。

[0032] 确定其是否为甲基苯丙胺包被抗原,确定后放置于4℃下避光储存,分装待用。

[0033] 步骤(3):CdSe/ZnS QDs标记的甲基苯丙胺抗体的制备及表征

避光条件下,取20.5 μ L羧基化水溶性CdSe/ZnS QDs(由武汉伽源量子点技术开发公司购买,浓度为8 μ M)用硼酸缓冲液(10 mM,pH7.4)稀释至1 μ M,室温搅拌下,将14 μ L甲基苯丙胺抗体(Bispacific公司 CAT:A5719, CONC:11.16 mg/mL)滴加到CdSe/ZnS QDs溶液中混合均匀(搅拌速度不易过快,将搅拌速度设置为600~1000 r/min以不产生气泡为准)。搅拌5 min后,调低搅拌速度至300 r/min,将13 μ L的EDC溶液(浓度为10 mg/mL,溶剂为10 mM、pH7.4硼酸盐缓冲)滴加到溶液中反应20 min。在磁力搅拌下,滴加15 μ L NHS溶液浓度为(10 mg/mL,溶剂为10 mM、pH7.4硼酸盐缓冲),室温下搅拌2 h,反应结束,将CdSe/ZnS QDs标记的甲基苯丙胺抗体用1 $\times$ PBS缓冲液透析24 h除去过量的QDs。透析后,用超滤浓缩管以12000 rpm将溶液浓缩至原体积十分之一(浓缩比不小于10),浓缩后加入1 $\times$ PBS缓冲液离心洗涤3 min,洗涤后的产物复溶于PBS缓冲液中,12000 rpm离心3 min除团聚。将CdSe/ZnS QDs标记甲基苯丙胺抗体保存于4℃黑暗条件下备用(浓度为0.78 mg/mL)。

[0034] QDs标记甲基苯丙胺抗体的表征:将CdSe/ZnS QDs标记抗体的激发波长固定在365 nm,扫描其溶液以确定最大发射波长在523 nm。如图2所示:

与CdSe/ZnS QDs最大发射波长520 nm相比制备的荧光标记抗体在最大发射峰处有明显红移,这种红移可能是由量子尺寸效应引起的:量子点的表面与抗体偶联修饰,可降低非辐射跃迁的概率。偶联后,量子点偶极作用增强及斯托克位移到增大。与量子点的发射峰相比,所制备荧光标记抗体的最大半峰宽没有明显的变化。也可得出结论,制备过程没有引起量子点的聚集、分散和不规则分布,基于量子点和免疫分析技术建立甲基苯丙胺检测方法的研究荧光强度无明显变化,且量子点和量子点与甲基苯丙胺抗体物理混合溶液移动速度无明显差异,说明甲基苯丙胺抗体物理混合溶液不含偶联物,但荧光标记抗体的迁移率较小,移动速度较慢,可能由于量子点与抗体偶联引起尺寸的增加而造成,量子点与甲基苯丙胺抗体偶联效率增加,迁移速度会更慢。

[0035] 所述的甲基苯丙胺抗体和羧基化水溶性CdSe/ZnS QDs可购买获得,其中羧基化水溶性CdSe/ZnS QDs:EDC:NHS的最佳比值根据Sheng-Mei Wu等研究选取不同物质的量比例的羧基化水溶性CdSe/ZnS QDs:EDC:NHS (1:2000:8000,1:4000:8000,1:6000:8000,1:8000:8000,1:4000:4000,1:4000:6000和1:4000:10000),在其他相同偶联条件下,将CdSe/ZnS QDs与抗体偶联,用多功能酶标仪测定不同比例偶联物荧光强度,观察荧光稳定性,采用FLISA检测不同浓度的甲基苯丙胺,确定EDC/NHS最佳比例,当QDs:EDC:NHS的比例为1:2000:8000时,偶联物相对荧光强度最大,QDs:EDC:NHS的比例为1:4000:8000时比1:2000:8000时偶联物更稳定,采用FLISA检测甲基苯丙胺更稳定,灵敏度较高。因此,选取1:4000:8000的偶联物用于实验。将荧光标记抗体放置30天后测定荧光强度。新鲜制备的荧光标记抗体与放置一个月后荧光标记抗体同时对甲基苯丙胺标准溶液检测,荧光信号强度几乎无明显差异,结果表明,放置一个月后溶液荧光强度及特异性几乎没有显著差异,对甲基苯丙胺的检测方法无影响,此方法制备的荧光标记抗体稳定性较好。

[0036] 步骤(4):将操作(2)中浓缩后的甲基苯丙胺包被抗原(2.6 mg/mL)固相吸附在透明96孔酶标板上,1% BSA封闭非特异性位点,加入50 μ L浓度为0.78 mg/mL的CdSe/ZnS QDs

标记甲基苯丙胺抗体与等量待测物加入后,吸附在96孔板上的甲基苯丙胺包被抗原与待测物共同竞争荧光抗体上的甲基苯丙胺特异性位点,待测物中甲基苯丙胺含量越高,与荧光标记抗体竞争结合越多,通过与抗原结合吸附在96孔板上荧光标记抗体越少,所测得荧光信号越弱,达到检测甲基苯丙胺的目的。

[0037] 所述的透明96孔板在实验前用1×PBS溶液清洗每个孔,然后将A行1~10孔各个孔中加入50 μL操作(2)中甲基苯丙胺包被抗原,然后将其在室温中孵化2~4h,将96孔板沥干后,使用PBST溶液(0.01 mol/L PBST pH7.4 包含0.05% Tween 20)清洗三次,然后干燥。再在每孔内加入50 μL 1%BSA的1×PBS置于室温中1 h,封闭非特异性结合点位,然后在A行1~10号孔每孔加入10 μL的操作(3)中浓度为0.78 mg/mL的CdSe/ZnS QDs标记甲基苯丙胺抗体溶液,再加入不同浓度的游离甲基苯丙胺溶液,将每个孔用1×PBS溶液定容至100 μL,1号孔不加游离的甲基苯丙胺最为对照组,2号孔中游离的甲基苯丙胺的浓度为1000 μg/mL,3号孔中游离的甲基苯丙胺的浓度为100 μg/mL,4号孔中游离的甲基苯丙胺的浓度为10 μg/mL,5号孔中游离的甲基苯丙胺的浓度为1 μg/mL,6号孔中游离的甲基苯丙胺的浓度为100 ng/mL,7号孔中游离的甲基苯丙胺的浓度为10 ng/mL,8号孔中游离的甲基苯丙胺的浓度为1 ng/mL,9号孔中游离的甲基苯丙胺的浓度为0.1 ng/mL,10号孔中游离的甲基苯丙胺的浓度为0.01 ng/mL,然后96孔板放入37℃的烘箱中,孵化两小时,得到比色样品。

[0038] 待测物中甲基苯丙胺含量越高,与荧光标记抗原竞争结合越多,通过与抗体结合吸附在96孔板上荧光标记抗原越少,所测得荧光信号越弱,达到检测甲基苯丙胺的目的,本实验中,在最佳条件下,测得甲基苯丙胺浓度范围内荧光强度,在甲基苯丙胺浓度为呈现良好的线性关系,如图3所示:

红线代表1号孔不加游离的甲基苯丙胺测得的荧光强度,测得检出最低限度为1 ng/mL,在甲基苯丙胺0.1 ng/mL范围内程较好的线性关系($y = 421.255 - 15.7415x$),如图4所示:

以1 mg/L浓度的甲基苯丙胺在相同条件下重复五次检测,测得相对标准偏差为7.0%。

[0039] 实施例2:

检测液的制备:检测液的制备与实施例1步骤(3)中制备羧基化水溶性CdSe/ZnS QDs标记抗体溶液相同

比色法样品的制备:比色皿的制备即为步实施例1步骤(4)中所使用过的96孔板回收,并标记每个孔内的甲基苯丙胺浓度,分别将浓度为1000 μg/mL、100 μg/mL、10 μg/mL、1 μg/mL、100 ng/mL、10 ng/mL、1 ng/mL的孔依次记为1到7号,其中空白对照组记为0号

将实施例1操作(2)中甲基苯丙胺包被抗原(2.6 mg/mL)固相吸附在透明96孔板上,1%BSA封闭非特异性位点。

[0040] 用上述96孔板吸附免疫测定甲基苯丙胺的操作步骤如下

(1)待测物的基本情况:某娱乐会所酒水饮料中,经缉毒民警用其最常用的冰毒检测试纸检测结果为甲基苯丙胺阳性。

[0041] (2)将酒水饮料12000 pm离心10 min后,取100 μL的待测样品与100 μL检测液混合加入分析皿96孔板中,放置室温内,孵化2 h,目测该孔的荧光信号强度并于比色皿中的荧光强度比较,荧光强度在4号和5号之间,即甲基苯丙胺浓度大致在1 μg/mL到100 ng/mL之间,求得酒水饮料中甲基苯丙胺的含量。

[0042] (3) 验证本实施例检测的真实性:以气相色谱-质谱联用技术 (GC/MS) 和固相萃取技术 (SPE) 相结合测得酒水饮料中甲基苯丙胺含量为137.52 ng/mL,与本发明测得的结果一致。

[0043] 实施例3:

按照实施例2的方法制备比色皿和分析皿。

[0044] (1) 用上述96孔板吸附免疫测定甲基苯丙胺的操作步骤如下

(2) 待测人(甲)的基本情况:性别男,年龄28岁,饮用过实施例1中某娱乐会所的酒水饮料,其尿液经冰毒验尿板检测结果为甲基苯丙胺阳性。

[0045] 将甲的尿液12000 pm离心10 min后,取100 μ L的待测样品与100 μ L检测液混合加入分析皿中96孔板中,放置室温内,孵化2 h,目测该孔的荧光信号强度并于比色皿中的荧光强度比较,荧光强度在4号和5号之间,即甲基苯丙胺浓度大致在1 μ g/mL到100 ng/mL之间,求得酒水饮料中甲基苯丙胺的含量。

[0046] (3) 验证本实施例检测的真实性:以气相色谱-质谱联用技术 (GC/MS) 和固相萃取技术 (SPE) 相结合测得酒水饮料中甲基苯丙胺含量为293.4 ng/mL,与本发明测得的结果一致。

[0047] 实施例4:

按照实施例2的方法制备比色皿和分析皿。

[0048] 用上述96孔板吸附免疫测定甲基苯丙胺的操作步骤如下

(1) 待测人(乙)的基本情况:性别女,年龄31岁,饮用过实施例1中某娱乐会所的酒水饮料,其尿液经冰毒验尿板检测检测结果为甲基苯丙胺阳性。

[0049] (2) 将乙的尿液12000 pm离心10 min后,取100 μ L的待测样品与100 μ L分析液混合加入分析皿中96孔板中,放置室温内,孵化2 h,目测该孔的荧光信号强度并于比色皿中的荧光强度比较,荧光强度在5号和6号之间,即甲基苯丙胺浓度大致在100 ng/mL到10 ng/mL之间,求得酒水饮料中甲基苯丙胺的含量。

[0050] (3) 验证本实施例检测的真实性:以气相色谱-质谱联用技术 (GC/MS) 和固相萃取技术 (SPE) 相结合测得乙的尿液中乙基苯丙胺含量为56.71 ng/mL,与本发明测得的结果一致。

[0051] 实施例5:

按照实施例2的方法制备比色皿和分析皿。

[0052] 用上述96孔板吸附免疫测定甲基苯丙胺的操作步骤如下

(1) 待测人(丙)的基本情况:性别女,年龄35岁,饮用过实施例1中某娱乐会所的酒水饮料,其尿液经冰毒验尿板检测结果为甲基苯丙胺阴性。

[0053] (2) 将丙的尿液12000 pm离心10 min后,取100 μ L的待测样品与100 μ L检测液混合加入分析皿中96孔板中,放置室温内,孵化2 h,目测该孔的荧光信号强度并于比色皿中的荧光强度比较,荧光强度在5号和6号之间,即甲基苯丙胺浓度大致在100 ng/mL到10 ng/mL之间,求得酒水饮料中甲基苯丙胺的含量。

[0054] (3) 验证本实施例检测的真实性:以气相色谱-质谱联用技术 (GC/MS) 和固相萃取技术 (SPE) 相结合测得乙的尿液中乙基苯丙胺含量为13.2 ng/mL,与本发明测得的结果一致。

[0055] 实施列6:

按照实施例2的方法制备比色皿和分析皿。

[0056] 用上述96孔板吸附免疫测定甲基苯丙胺的操作步骤如下

(1) 待测人(丁)的基本情况:性别男,年龄26岁,饮用过实施例1中某娱乐会所的酒水饮料,其尿液经冰毒验尿板检测结果为甲基苯丙胺阴性。

[0057] (2) 将丙的尿液12000 pm离心10 min后,取100 μ L的待测样品与100 μ L检测液混合加入分析皿中96孔板中,放置室温内,孵化2 h,目测该孔的荧光信号强度并于比色皿中的荧光强度比较,荧光强度在5号和6号之间,即甲基苯丙胺浓度大致在10 ng/mL到1 ng/mL之间,求得酒水饮料中甲基苯丙胺的含量。

[0058] (3) 验证本实施例检测的真实性:以气相色谱-质谱联用技术(GC/MS)和固相萃取技术(SPE)相结合测得乙的尿液中乙基苯丙胺含量为7.18 ng/mL,与本发明测得的结果一致。

[0059] 上述实施列并非是对本发明的限制,本发明并非仅限于上述实施列,只要符合本发明要求,均属于本发明的保护范围。

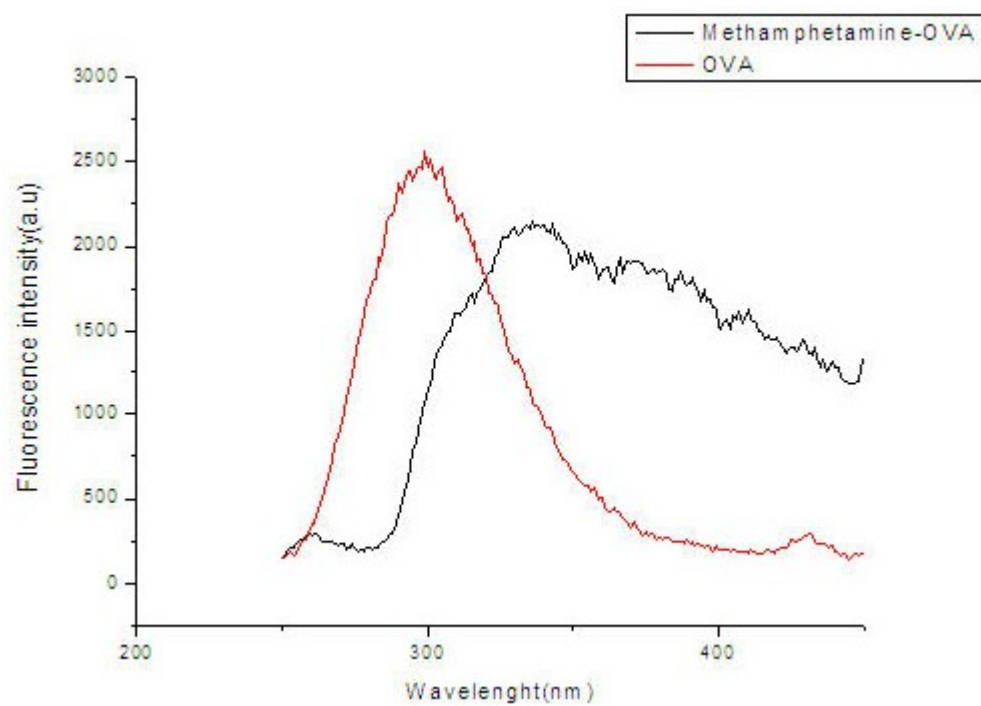


图1

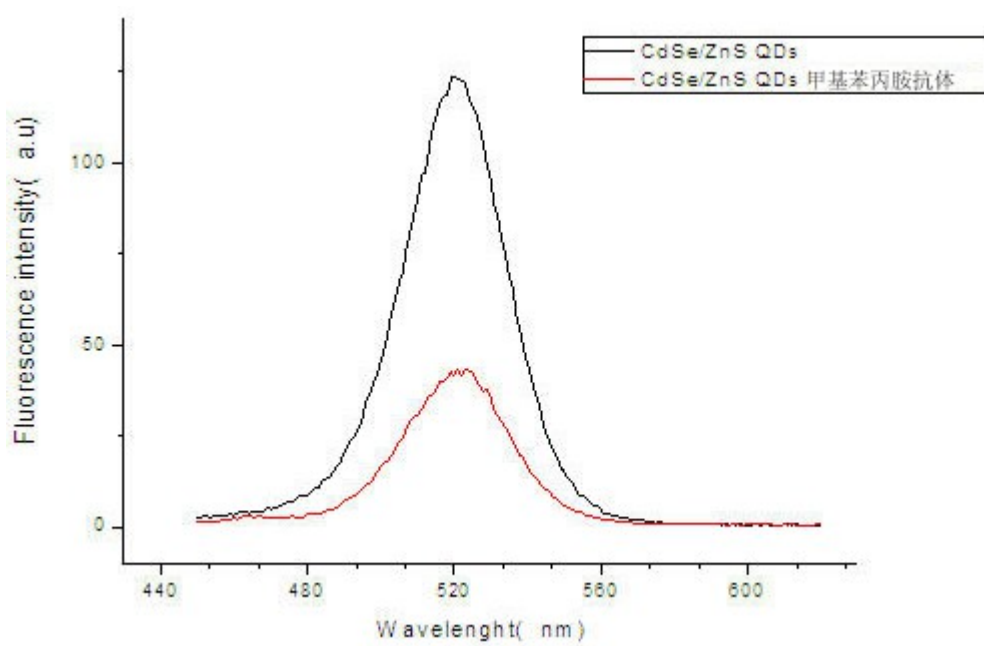


图2

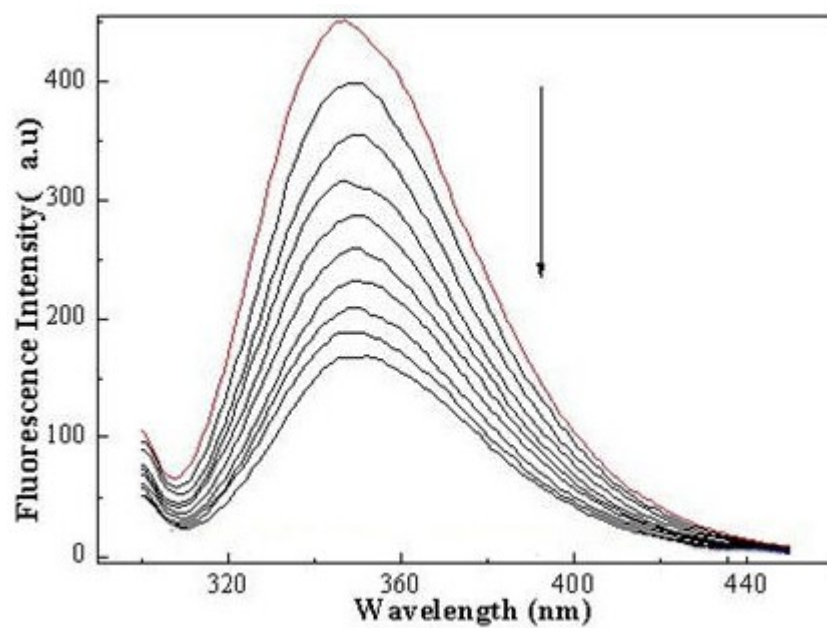


图3

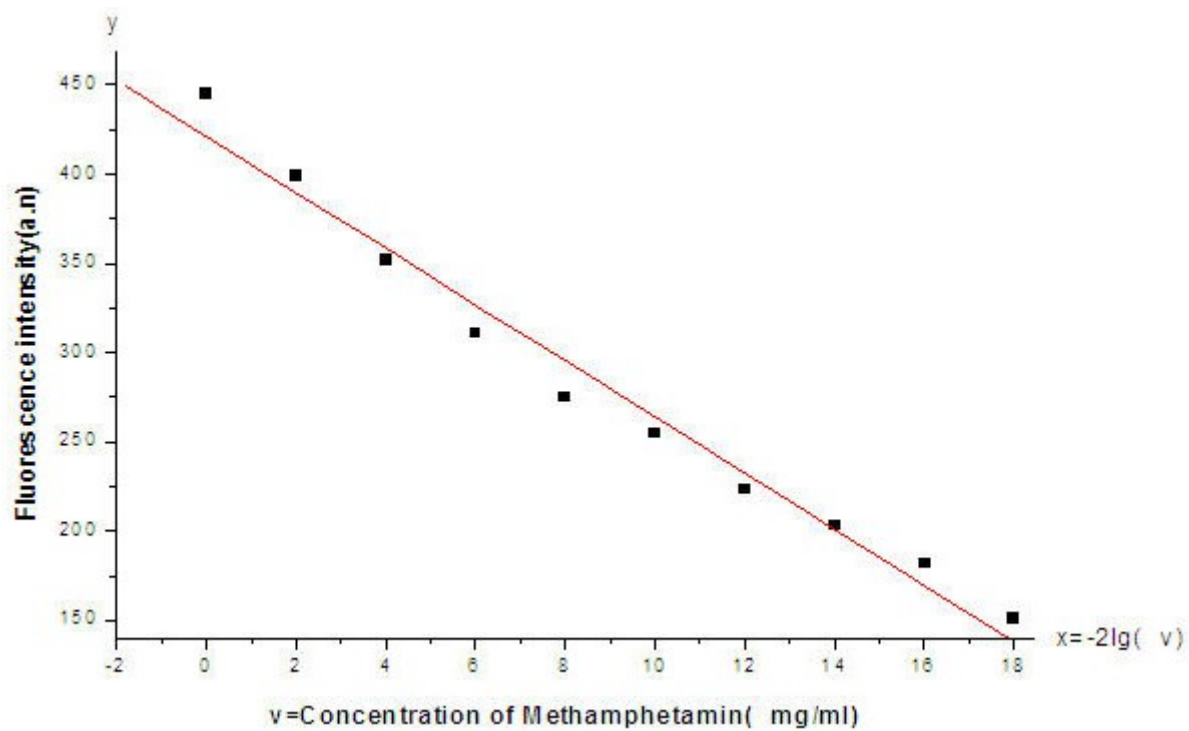


图4

专利名称(译)	一种甲基苯丙胺包被抗原、其制备方法及其检测甲基苯丙胺的方法		
公开(公告)号	CN109870442A	公开(公告)日	2019-06-11
申请号	CN201910250542.7	申请日	2019-03-29
[标]申请(专利权)人(译)	铁道警察学院		
申请(专利权)人(译)	铁道警察学院		
[标]发明人	崔胜峰 马素娟 左健		
发明人	崔胜峰 万敬伟 马素娟 左健		
IPC分类号	G01N21/64 G01N33/533 G01N33/535 G01N33/544		
代理人(译)	张丽		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种甲基苯丙胺包被抗原、其制备方法及其检测甲基苯丙胺的方法，所述制备过程包括如下步骤：(1)甲基苯丙胺半抗原的制备：称取琥珀酸酐与甲基苯丙胺溶于有机溶剂中，在碳酸钾的催化作用下，55~65°C加热搅拌至反应完全，薄层色谱分离，所得琥珀酰甲基苯丙胺即为甲基苯丙胺半抗原；(2)甲基苯丙胺包被抗原的制备：以EDC、NHS为催化剂，将甲基苯丙胺半抗原和卵清蛋白进行反应得到甲基苯丙胺包被抗原；(3)量子点标记的甲基苯丙胺抗体的制备：将CdSe/ZnS QDs溶解于硼酸缓冲液中，在EDC、NHS作用下，将甲基苯丙胺抗体滴加至CdSe/ZnS QDs的硼酸缓冲液中，搅拌反应，反应结束后，PBS缓冲液透析。

