



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108918896 A

(43)申请公布日 2018. 11. 30

(21)申请号 201810531071.2

G01N 33/558(2006.01)

(22)申请日 2018.05.29

G01N 33/533(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

(71)申请人 郑州左安检测科技有限公司

地址 450000 河南省郑州市高新技术产业
开发区金梭路41号1幢1单元14层108
号

(72)发明人 贾嘉 张振兴 吕小翠 赵琳

周亮 崔浩哲 张鹏 高翔

(74)专利代理机构 北京众合诚成知识产权代理

有限公司 11246

代理人 赵娟

(51) Int. Cl.

G01N 33/94(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

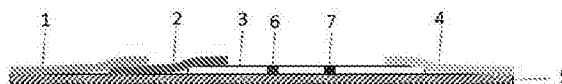
权利要求书1页 说明书6页 附图3页

(54)发明名称

一种检测苯二氮卓的FITC试纸条及其制备方法和应用方法

(57)摘要

本发明公开了一种检测苯二氮卓的FITC试纸条及其制备方法和应用方法。该试纸条构成依次包括样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫和底板；结合物释放垫上喷涂有FITC标记的抗体；所述的反应膜上包被有半抗原-载体蛋白偶联物的检测线和羊抗鼠二抗的质控线；本发明以FITC标记抗体，采用免疫层析技术，实现苯二氮卓的快速免疫分析。本发明还提供一种应用上述试纸条检测样品中苯二氮卓的方法。本发明的优点是灵敏度高，可准确定量，检测快速、操作方便，经济实用，能够实现对大批量的苯二氮卓样品进行快速检测和现场检测。



1. 一种检测苯二氮卓的FITC试纸条,包括样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫和底板;其特征在于:所述结合物释放垫上喷涂有FITC标记的抗体;所述反应膜上包被有半抗原-载体蛋白偶联物的检测线和羊抗鼠二抗的质控线。

2. 根据权利要求1所述的FITC试纸条,其特征在于:所述样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜和吸水垫均粘贴在底板上且中任意相邻两个沿上下方向部分叠加,结合物释放垫的1/3-1/2被覆盖于样品吸收垫下。

3. 根据权利要求1所述的FITC试纸条,其特征在于:所述结合物释放垫为玻璃纤维或聚酯材料。

4. 根据权利要求1所述的FITC试纸条,其特征在于:所述反应膜为硝酸纤维素膜或醋酸纤维素膜。

5. 一种制备权利要求1-4任一项所述FITC试纸条的方法,其特征在于,包括以下步骤:

1) 用FITC标记苯二氮卓抗体,并将其喷涂在结合物释放垫上,以制备喷涂有苯二氮卓单克隆抗体-FITC标记物的结合物释放垫;

2) 将半抗原-载体蛋白偶联物和羊抗鼠二抗分别喷涂于反应膜上作为检测线(T)和质控线(C);

3) 将1)和2)制备好的结合物释放垫、反应膜与样品吸收垫、吸水垫和底板组装成试纸条。

6. 根据权利要求5所述的制备FITC试纸条的方法,其特征在于:在步骤1)配置FITC溶液,然后加入苯二氮卓抗体进行共价偶联,结束后加入封闭缓冲液进行封闭,离心洗涤后4℃保存备用。

7. 根据权利要求5所述的制备FITC试纸条的方法,其特征在于:在步骤1)中用喷膜仪将FITC标记的苯二氮卓的抗体喷涂至结合物释放垫上,每1 cm结合物释放垫喷涂1-9 μL FITC标记的苯二氮卓抗体,37℃干燥1-2h,置于干燥环境中备用。

8. 一种应用权利要求1-4任一项所述检测苯二氮卓的FITC试纸条检测样品中苯二氮卓的方法,其特征在于,该方法包括以下步骤:

1) 将试纸条和待测样品恢复至室温;

2) 开启免疫荧光分析仪,插入对应ID卡,读取标准曲线;

3) 向试纸条的样品孔中加入待测样本60-120μL,反应5-10min后,将检测卡插入免疫荧光分析仪;

4) 截留在检测线和质控线的FITC在最佳激发光下,发出强烈的荧光条带;

5) 采用免疫层析分析仪读取检测线和质控线的荧光强度,并给出T/C值,分析仪可通过内置的标准曲线计算出样品中苯二氮卓的浓度,并判断阴阳性。

一种检测苯二氮卓的FITC试纸条及其制备方法和应用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及苯二氮卓的检测,具体是一种利用FITC免疫层析技术定量检测苯二氮卓的FITC试纸条及其制备方法和应用方法。

背景技术

[0002] 苯二氮卓,即安非他命,是一系列对中枢神经系统具有显著兴奋作用的合成药物的原型。因静脉注射具有成瘾性,而被列为毒品。苯二氮卓引起的不良反应有过度兴奋、不安、失眠、震颤、紧张和烦躁等症状。对苯二氮卓的躯体耐受性出现的非常快,所以长期服用者必须越服用越多。服用大剂量苯二氮卓后最严重的后果就是一种毒性神经病,其症状类似类偏执型精神分裂症。苯二氮卓的滥用常和巴比妥药物及酒精的滥用一同发生。苯二氮卓超量或反复使用可产生病态嗜好,并引起兴奋与抑制过程的平衡失调而导致精神症状,故使用应严加控制。

[0003] 目前针对苯二氮卓的检测和监控方法主要包括高效液相色谱、气相色谱、液质或气质连用等。这些色谱方法具有很好的灵敏度和特异性,但操作复杂,通量不高,耗时较长,仪器设备昂贵。酶联免疫吸附测定(ELISA)以及胶体金免疫层析法是目前国际公认的主流技术,这两种方法具有检测速度快,价格便宜,操作简单等优点。但ELISA检测仍需专业人员,且需要较长时间显示结果;胶体金法能对苯二氮卓进行定性分析,操作简单,检测时间较短,但灵敏度低、人为因素干扰较大。

[0004] 综上所述,目前苯二氮卓的检测技术尚不成熟,开发一种灵敏度高、操作简便并且能够实现对大批量样品进行快速检测的产品和方法成为迫切需要解决的问题。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于克服现有的检测苯二氮卓的方法存在的操作复杂、耗时较长,并且不能够实现对大批量样品的快速检测的特点,提供一种操作简单、灵敏度高、检测速度快、成本低的检测苯二氮卓的FITC试纸条及其制备方法和应用方法,以实现大批量的苯二氮卓样品进行快速检测和现场监控。

[0006] 为了实现本发明的目的,本发明的一种检测苯二氮卓的FITC试纸条采用以下技术方案:一种检测苯二氮卓的FITC试纸条,包括样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫和底板;其特征在于:所述的结合物释放垫上喷涂有FITC标记的抗体;所述反应膜上包被有半抗原-载体蛋白偶联物的检测线和羊抗鼠二抗的质控线。

[0007] 所述样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜和吸水垫均粘贴在底板上且中任意相邻两个沿上下方向部分叠加,结合物释放垫的1/3-1/2被覆盖于样品吸收垫下。

[0008] 所述样品吸收垫为玻璃纤维素膜。

[0009] 所述结合物释放垫为玻璃纤维或聚酯材料。

[0010] 所述反应膜为硝酸纤维素膜或醋酸纤维素膜。

[0011] 所述底板为PVC底板或其他硬质不吸水的材料。

[0012] 所述吸水垫为吸水纸。

[0013] 本发明的一种制备上述检测苯二氮卓的FITC试纸条的方法,包括以下步骤:

1)用FITC标记苯二氮卓抗体,并将其喷涂在结合物释放垫上,以制备喷涂有苯二氮卓单克隆抗体-FITC标记物的结合物释放垫;

2)将半抗原-载体蛋白偶联物和羊抗鼠二抗分别喷涂于反应膜上作为检测线(T)和质控线(C);

3)将1)和2)制备好的结合物释放垫、反应膜与样品吸收垫、吸水垫和底板组装成试纸条。

[0014] 在步骤1)中配置FITC溶液,然后加入苯二氮卓抗体进行共价偶联,结束后加入封闭缓冲液进行封闭,离心洗涤后4℃保存备用。

[0015] 在步骤1)中用喷膜仪将FITC标记的苯二氮卓的抗体喷涂至结合物释放垫上,每1cm结合物释放垫喷涂1-9 μL FITC标记的苯二氮卓抗体,37℃干燥1-2h,置于干燥环境中备用。

[0016] 本发明的一种应用方法上述检测苯二氮卓的FITC试纸条检测样品中苯二氮卓的方法,包括如下步骤:

(1)将试纸条和待测样品恢复至室温。

[0017] (2)开启免疫荧光分析仪,插入对应ID卡,读取标准曲线。

[0018] (3)向试纸条的样品孔中加入待测样本60-120μL,反应5-10min后,将检测卡插入免疫荧光分析仪。

[0019] (4)截留在检测线和质控线的FITC在最佳激发光下,发出强烈的荧光条带;

(5)采用免疫层析分析仪读取检测线和质控线的荧光强度,并给出T/C值,分析仪可通过内置的标准曲线计算出样品中苯二氮卓的浓度,并判断阴阳性。

[0020] 本发明与现有技术相比,有如下优点:

(1)本发明能够准确定量待测样本中的苯二氮卓的含量。

[0021] (2)本发明采用独立的质控线和检测线的反应系统,互不干扰和影响,并采用T/C值的方式进行标定,保证了测试结果的准确性。

[0022] 本发明的试纸条具有灵敏度高、特异性强、成本低、操作简单、检测时间短、不受检测设备限制、储存简单、保质期长的优点。用本发明试纸条检测苯二氮卓的方法,简便、快速、准确、适用范围广、成本低、易推广使用。

[0023] 进一步地,结合物释放垫的1/3-1/2被样品吸收垫覆盖可以延长检测结果观察时间,可使样品吸收垫将检测液体充分吸收并与抗体充分反应,从而减少误差。

附图说明

[0024] 图1是本发明的一种检测苯二氮卓的FITC试纸条的结构示意图;

图2是检测卡的结构示意图;

图3是试纸条样品检测结果示意图;

图4是本发明试纸条的标准曲线;

图5是唾液采集装置结构示意图;

1、样品吸收垫;2、结合物释放垫;3、反应膜;4、吸水垫;5、底板;6、检测线;7、质控线;8、

检测窗;9、样品孔;10、采集槽盖;11、采集槽;12、采集管;13、采集管盖;14、最低收集线。

具体实施方式

[0025] 下面结合具体的实施例来进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明,而不用来限制本发明的范围。另外,本领域的技术人员在所附权利要求书限定的范围内可能会对本发明进行各种改动或修饰,这些改动或修饰同样应落入发明的保护范围。

[0026] 本发明的一种检测苯二氮卓的FITC试纸条,如图1所示,包括样品吸收垫1、结合物释放垫2、反应膜3、吸水垫4和底板5;结合物释放垫上喷涂有FITC标记的抗体;反应膜上包被有半抗原-载体蛋白偶联物的检测线6和羊抗鼠二抗的质控线7。样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜和吸水垫均粘贴在底板上且中任意相邻两个沿上下方向部分叠加,结合物释放垫的1/3被覆盖于样品吸收垫下,结合物释放垫的1/3被样品吸收垫覆盖可以延长检测结果观察时间,可使样品吸收垫将检测液体充分吸收并与抗体充分反应,从而减少误差,在其他实施例中,也可以结合物释放垫的1/2被覆盖于样品吸收垫下。FITC是一种常用于标记各种蛋白的荧光染料,主要应用于免疫荧光检测。FITC能与各种抗体蛋白结合,结合后的抗体不丧失与抗原结合的特异性,而它在紫外波长下所发出的黄绿色荧光可以经由光学仪器检测,实现定量检测。样品吸收垫为玻璃纤维素膜。结合物释放垫为玻璃纤维或聚酯材料。反应膜为硝酸纤维素膜或醋酸纤维素膜。底板为PVC底板或其他硬质不吸水的材料。吸水垫为吸水纸。

[0027] 该检测苯二氮卓的FITC试纸条的制备方法主要包括以下步骤:

1)用FITC标记苯二氮卓抗体,并将其喷涂在结合物释放垫上,以制备喷涂有FITC标记的苯二氮卓抗体的结合物释放垫;

2)将半抗原-载体蛋白偶联物和羊抗鼠二抗分别喷涂于反应膜上作为检测线(T)和质控线(C),以制备包被有苯二氮卓半抗原-载体蛋白偶联物的检测线和包被有羊抗鼠二抗的质控线的反应膜;

3)将1)和2)制备好的结合物释放垫、反应膜与样品吸收垫、吸水垫和底板组装成试纸条。

[0028] 下面分步详细叙述:

1、FITC标记物的制备:

FITC标记苯二氮卓抗体的制备:将待标记的苯二氮卓单克隆抗体溶解于1M的碳酸盐缓冲液(pH9.0)中,抗体终浓度不小于2mg/mL。用DMSO避光配制1mg/mL的FITC溶液(DMSO溶液需现配现用)。避光,将50-100 μ L的FITC溶液缓慢地加入1mL抗体溶液中,在加入FITC的过程中轻轻混匀抗体溶液。将混合后的溶液避光、4 $^{\circ}$ C搅拌反应8h。然后加入5M的NH₄Cl,4 $^{\circ}$ C搅拌2h。然后将反应液置于PBS(pH7.4)中透析,直至透析液清凉。即为制备好的FITC标记的苯二氮卓的抗体,放置于4 $^{\circ}$ C备用。

[0029] 2、FITC垫的制备:

用喷膜仪将FITC标记的苯二氮卓的抗体喷涂至结合物释放垫上,每1 cm结合物释放垫喷涂1-9 μ L FITC标记的苯二氮卓抗体,37 $^{\circ}$ C干燥1-2h,置于干燥环境中备用。

[0030] 3、NC膜的制备:

将苯二氮卓半抗原-载体蛋白偶联物和羊抗鼠抗体分别包被于NC膜上:用0.02M pH7.4

的PBS将苯二氮卓半抗原-载体蛋白偶联物调节至0.5-2mg/mL,包被在NC膜上形成检测线,包被量为5-10 $\mu\text{L}/\text{cm}$;用0.01M pH7.4的PBS将羊抗鼠二抗调节至0.1-0.5mg/mL,包被在NC膜上形成质控线,包被量为5-10 $\mu\text{L}/\text{cm}$ 。将包被好的反应膜置于37 $^{\circ}\text{C}$ 干燥1-2 h,置于干燥环境中备用。

[0031] 4、FITC免疫检测卡的制备

在PVC底板上依次粘贴样品吸收垫,喷涂有FITC标记的苯二氮卓抗体的结合物释放垫,喷涂有苯二氮卓半抗原-载体蛋白偶联物作为检测线和羊抗鼠二抗作为质控线的反应膜,吸水垫;其中,结合物释放垫从起始端有1/3区域被样品吸收垫覆盖,结合物释放垫的末端与反应膜的始端连接,反应膜的末端与吸水垫的始端相连,样品吸收垫的始端与PVC底板的始端对齐,吸水垫的末端与PVC底板的末端对齐;所述反应膜上的检测线和质控线与所述试纸条的长相呈垂直的条状带;检测线位于靠近结合物释放垫的末端的一侧;质控线位于远离结合物释放垫的末端的一侧;组装完成后剪切成4mm的宽度,即成为免疫层析试纸条。

[0032] 把免疫层析试纸条固定在塑料底卡上,试纸条表面用面卡压紧,面卡在对应试纸条样品吸收垫和NC膜的部分分别预留加样孔和检测窗。该检测卡组装好后装入铝箔袋,加入干燥剂封口,放置于室温干燥环境下可保存12个月。

[0033] 一种应用方法上述试纸条检测样品中苯二氮卓的方法,该方法包括以下步骤:

- 1) 将试纸条和待测样品恢复至室温;
- 2) 开启免疫荧光分析仪,插入对应ID卡,读取标准曲线;
- 3) 向试纸条的样品孔9中加入待测样本60-120 μL ,反应5-10min后,将检测卡插入免疫荧光分析仪;
- 4) 截留在检测线和质控线的FITC在最佳激发光下,发出强烈的荧光条带;
- 5) 采用免疫层析分析仪读取检测线和质控线的荧光强度,并给出T/C值,分析仪可通过内置的标准曲线计算出样品中苯二氮卓的浓度,并判断阴阳性,如图3所示。

[0034] 试验例1 毛发样品中苯二氮卓含量的检测

1、苯二氮卓检测试纸条标准曲线的建立

取空白毛发样品,剪碎后超声,在超声后的溶液中分别添加苯二氮卓至终浓度为0ppb、0.4ppb、0.8ppb、1.6ppb、3.2ppb、6.4ppb、12.8ppb、25.6ppb、51.2ppb、102.4ppb,取试纸条进行检测,每个样品重复测定五次。将测定的五次重复结果取平均值后,在免疫荧光分析仪上进行标定。

[0035] 2、毛发样品中苯二氮卓的检测

(1) 样本的前处理

- ① 检测前将样本恢复至室温20-25 $^{\circ}\text{C}$;
- ② 称取20-50 mg毛发样本剪碎至聚苯乙烯离心管中;
- ③ 加入1 mL样品提取液,水浴超声3 min;

(2) 用试纸条进行检测

- ① 开启免疫荧光分析仪,插入对应ID卡,读取标准曲线。

[0036] ② 正面朝上平放检测卡,向试纸条的样品孔中加入待测样本60-120 μL ,室温反应5-10min后,将检测卡放入免疫荧光分析仪中进行检测

- ③ 截留在检测线和质控线的FITC在最佳激发光下,发出强烈的荧光条带;

④采用免疫层析分析仪读取检测线和质控线的荧光强度,并给出T/C值,分析仪可通过内置的标准曲线计算出样品中苯二氮卓的浓度,并判断阴阳性。

[0037] 试验例2 血液样品中苯二氮卓含量的检测

该实施例中,所有制备方法与实施例1相同,除样品吸收垫为滤血膜。

[0038] 1、溶血血液样品

(1) 苯二氮卓检测试纸条标准曲线的建立

取空白血液样品,用样品稀释液按1:5-1:20的比例进行稀释,向稀释后的溶血血液样品溶液中分别添加苯二氮卓至终浓度为0ppb、0.4ppb、0.8ppb、1.6ppb、3.2ppb、6.4ppb、12.8ppb、25.6ppb、51.2ppb、102.4ppb,取试纸条进行检测,每个样品重复测定五次。将测定的五次重复结果取平均值后,在免疫荧光分析仪上进行标定。

[0039] (2) 溶血血液样品中苯二氮卓的检测

① 样本的前处理

a检测前将样本恢复至室温20-25℃;

b用样品稀释液按1:5-1:20的比例对溶血血液样品进行稀释。

[0040] ② 用试纸条进行检测

a开启免疫荧光分析仪,插入对应ID卡,读取标准曲线。

[0041] b正面朝上平放检测卡,向试纸条的样品孔中加入待测样本60-120μL,室温反应5-10min后,将检测卡放入免疫荧光分析仪中进行检测

c截留在检测线和质控线的FITC在最佳激发光下,发出强烈的荧光条带;

d采用免疫层析分析仪读取检测线和质控线的荧光强度,并给出T/C值,分析仪可通过内置的标准曲线计算出样品中苯二氮卓的浓度,并判断阴阳性。

[0042] 2、新鲜血液样品

该实施例与上述溶血血液样品实施例相同,但是新鲜血液样品测试前无需稀释可直接加样进行检测。

[0043] 试验例3 尿液样品中苯二氮卓含量的检测

该实施例中,试纸条所有制备方法与样品检测方法与实施例1相同。

[0044] 试验例4 唾液样品中苯二氮卓含量的检测

该实施例中,试纸条所有制备方法与样品检测方法与实施例1相同,唾液的采集会用到唾液采集装置,如图5所示,包括采集槽盖10,采集槽11,采集管12,采集管盖13,采集管12上设置有最低收集线14。

[0045] 唾液样品的采集按照如下步骤进行:

1、将唾液吐进采集槽中直至唾液量达到最低采集线。

[0046] 2、将采集槽盖盖紧,直到听见咔嗒声,盖子中的样品稀释液流入采集管中,与唾液样品混和。

[0047] 3、将采集槽拧下,盖上采集管盖,上下颠倒混匀。

[0048] 4、吸取稀释后的唾液样品进行检测。

[0049] 基本参数的建立

检出限:用空白样品进行重复测定20次,计算20次结果的均值M与标准差SD,以空白均值加两倍标准差(M+2SD)报告方法的检测限,结果为0.2ppb。线性范围:取0ppb、0.4ppb、

0.8ppb、1.6ppb、3.2ppb、6.4ppb、12.8ppb、25.6ppb、51.2ppb、102.4ppb等浓度值进行检测，每个浓度重复测量五次，将测定浓度平均值与理论值进行线性分析，得到线性方程 $y = -2.0321x + 1.6886$, $R^2 = 0.9912$ 。(实验结果及分析见表1、图4)。

[0050] 表1 苯二氮卓标准品检测结果

浓度 (ng/mL)		0.4	0.8	1.6	3.2	6.4	12.8	25.6	51.2	102.4
信号 (T/C)	1	2.799	2.501	2.254	2.051	1.751	1.053	0.641	0.383	0.257
	2	2.652	2.561	2.296	2.174	1.783	1.201	0.685	0.372	0.23
	3	2.701	2.49	2.126	1.986	1.68	1.105	0.595	0.401	0.268
平均值		2.717	2.517	2.225	2.070	1.738	1.120	0.640	0.385	0.252
标准差		0.061	0.031	0.072	0.078	0.043	0.061	0.037	0.012	0.016

准确度:用样品稀释液配制浓度为10ppb的苯二氮卓标准品,用所制备试纸条进行检测,重复检测三次,检测结果取平均值进行计算。回收率=检测浓度/实际加入浓度×100%,计算得样品回收率为107.1%。

[0051] 精密性:取三批实施例1中所制备的时间分辨荧光定量苯二氮卓检测试纸条,检测20ppb浓度标品,每批试纸条标品平行检测10次,结果显示,三批批次内CV值分别为10.630%,14.556%,12.511%,三批批次间CV值为12.738%。

[0052] 从上述数据可以看出,本发明所述试纸条,相比现有的检测苯二氮卓的方法,具有更灵敏、更快速、可准确定量的特点,不受操作地点的限制,且配套的检测仪器小巧轻便,人员要求更低,适合大范围的推广使用。

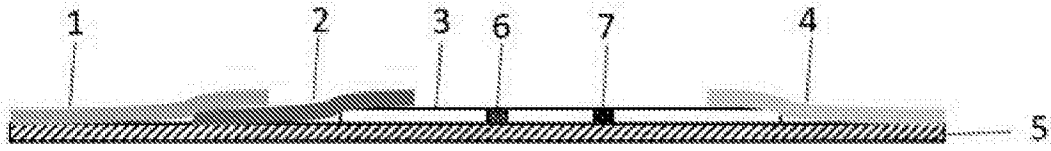


图1

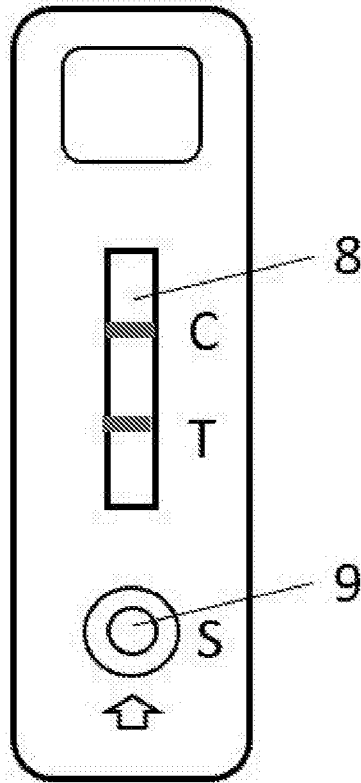


图2

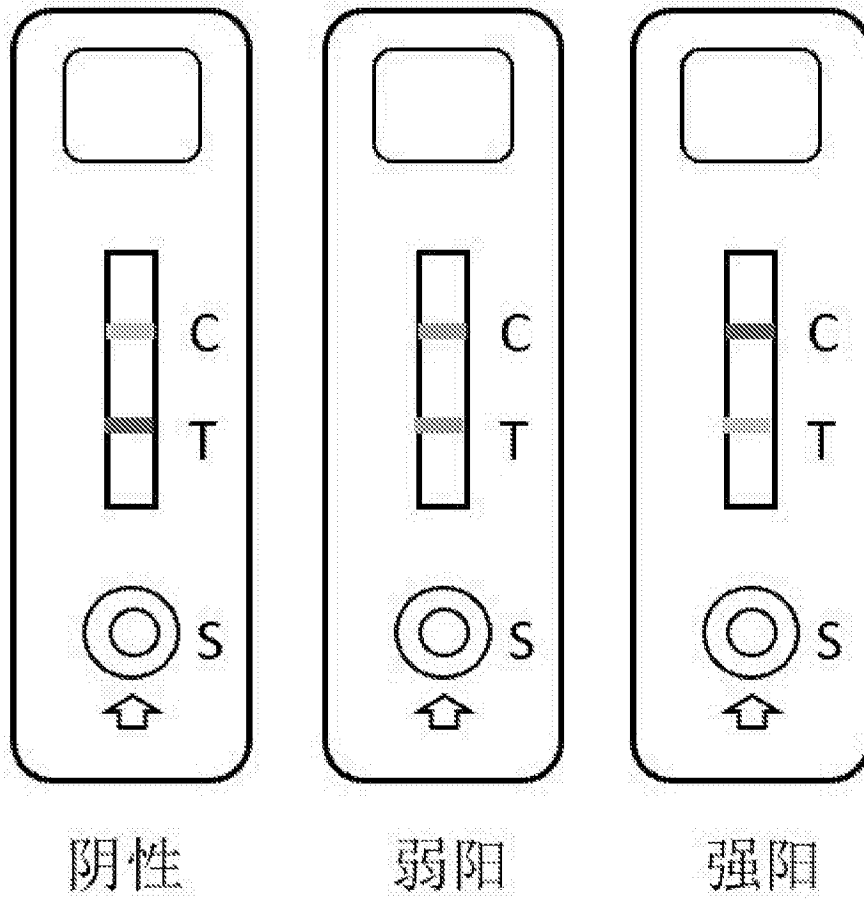


图3

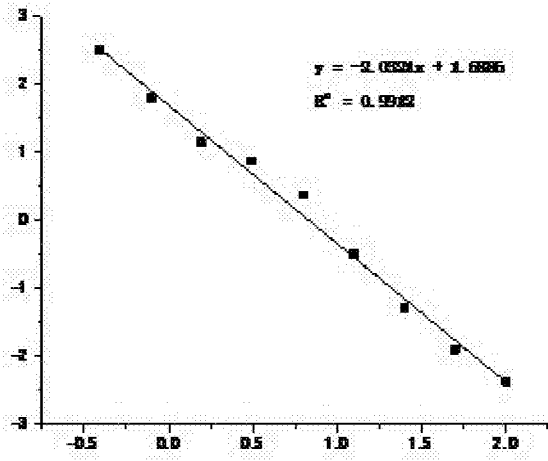


图4

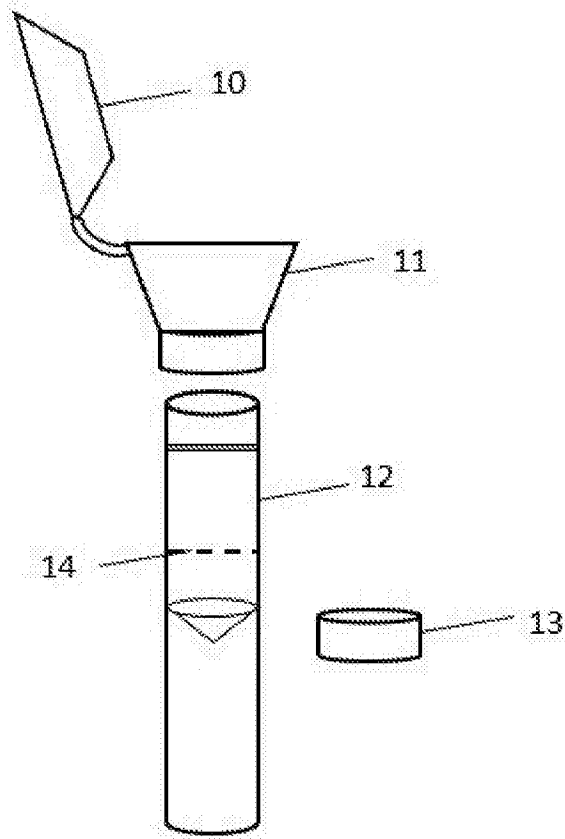


图5