



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102937647 B

(45) 授权公告日 2015. 11. 25

(21) 申请号 201210034598. 7

22 卷 (第 2 期),

(22) 申请日 2012. 02. 16

审查员 李倩

(73) 专利权人 北京宝瑞源科技孵化有限公司

地址 102433 北京市房山区窦大路九区 30 号

(72) 发明人 陈立柱 杨利

(51) Int. Cl.

G01N 33/558(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101017169 A, 2007. 08. 15,

CN 101076731 A, 2007. 11. 21,

CN 101078724 A, 2007. 11. 28,

CN 1879019 A, 2006. 12. 13,

US 6248598 B1, 2001. 06. 19,

曾立波等. 检测丁丙诺啡的胶体金标记单克隆抗体免疫试剂盒研制. 《法医学杂志》. 2006, 第

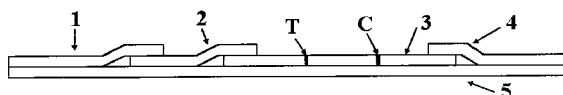
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

麦角乙二胺检测试剂盒及其制备方法

(57) 摘要

一种用于检测麦角乙二胺的检测试剂盒, 该试剂盒包括样品垫 (1)、胶体金垫 (2)、硝酸纤维素膜 (3)、吸样垫 (4) 和 PVC 支撑板 (5), 在 PVC 支撑板上依次连续粘附有样品垫、胶体金垫、硝酸纤维素膜和吸样垫, 所述胶体金垫为胶体金标记的麦角乙二胺单克隆抗体聚酯膜, 所述硝酸纤维素膜上依次包被了麦角乙二胺-BSA 偶联抗原作为检测线 (T 线), 羊抗鼠 IgG 多克隆抗体作为质控线 (C 线)。本发明采用胶体金免疫层析技术制备麦角乙二胺检测试剂盒, 用于检测样本中可能存在的麦角乙二胺, 本试剂盒制备方法简单, 具有使用方便、反应迅速、经济实用等特点。



1. 一种麦角乙二胺检测试剂盒,其特征在于由样品垫、胶体金垫、硝酸纤维素膜、吸样垫和 PVC 支撑板组成,样品垫、胶体金垫、硝酸纤维素膜和吸样垫紧密粘附在 PVC 支撑板上;所述样品垫为玻璃纤维;所述胶体金垫为胶体金标记的麦角乙二胺单克隆抗体聚酯膜;所述硝酸纤维素膜上依次包被了麦角乙二胺-BSA 偶联抗原作为检测线,羊抗鼠 IgG 多克隆抗体作为质控线;所述吸样垫为吸水纸;所述的胶体金垫的制备方法为:取颗粒大小为 20-40nm 的胶体金溶液,用 0.1mol/LK<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>将胶体金溶液的 pH 值调至 7.0-9.0,室温放置 10 分钟;在上述溶液中加入麦角乙二胺单克隆抗体,使麦角乙二胺单克隆抗体的浓度为 20-80 μg/ml 胶体金,混合均匀后,室温放置 30 分钟;加入 10% 的 BSA 溶液使其浓度为 10-60 μl/ml,混合均匀,室温放置 10 分钟;12000 转离心 30 分钟,仔细吸取上清液,弃去,剩余的沉淀用初始胶体金体积的胶体金复溶液溶解;12000 转离心 30 分钟,仔细吸取上清液,弃去,剩余的沉淀用 30%-100% 初始胶体金体积的胶体金复溶液溶解,得到麦角乙二胺单克隆抗体-胶体金标记物;将麦角乙二胺单克隆抗体-胶体金标记物按 1mL 铺 40-70cm<sup>2</sup>聚酯膜的比例均匀铺在聚酯膜上,再置干燥间,在温度 38℃,湿度小于 30% 的条件下干燥 24±2 小时,制成胶体金垫。

2. 一种权利要求 1 所述的麦角乙二胺检测试剂盒,其特征在于所述的麦角乙二胺单克隆抗体由麦角乙二胺-BSA 偶联抗原作为免疫原免疫 BALB/C 小鼠获得。

3. 一种权利要求 1 所述的麦角乙二胺检测试剂盒,其特征在于所述的胶体金的制备方法为:取 90ml 纯化水于洁净的圆底烧瓶中,于电磁加热套中搅拌并加热,等待沸腾后,加入 4ml1% 的氯化金溶液,继续搅拌 1min,迅速加入 6ml 1% 的柠檬酸三钠,溶液颜色由浅黄变成黑色最后变成酒红色,继续加热 5min,取出冷却到室温,常温避光保存,这样制成的胶体金颗粒的大小为 20-40nm。

4. 一种权利要求 1 所述的麦角乙二胺检测试剂盒,其特征在于所述的胶体金复溶液为含 0.01-0.1% 的 Tris,1.0-3.0% 的蔗糖、0.1-1.0% 的 BSA 的 0.02M pH 7.0-9.0 的磷酸盐缓冲溶液。

5. 一种权利要求 1 所述的麦角乙二胺检测试剂盒,其特征在于所述的硝酸纤维素膜上的两条线的包被方法为:设定划膜仪涂覆参数 1 μL/cm,分别用微量进样器取浓度为 1.0-5.0mg/ml 的麦角乙二胺-BSA 偶联抗原、取浓度为 0.5-3.0mg/ml 羊抗鼠 IgG 多克隆抗体,按顺序接到划膜仪的 A、B 管道接口,将贴有硝酸纤维素膜的 PVC 板置于划膜仪的往复运动平台上,开启划膜仪,在硝酸纤维素膜上涂覆麦角乙二胺-BSA 偶联抗原作为检测线、羊抗鼠 IgG 多克隆抗体作为质控线,划线后于温度 38℃ 的烘箱中干燥 24±2 小时,保存,备用。

## 麦角乙二胺检测试剂盒及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物学免疫方法的测定技术领域,特别是涉及一种利用胶体金免疫层析技术制作的一种麦角乙二胺检测试剂盒及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 麦角乙二胺(LSD)是已知药力最强的致幻剂,极易为人体吸收。服用后会产生幻视、幻听和幻觉,出现惊惶失措、思想迷乱、疑神疑鬼、焦虑不安、行为失控和完全无助的精神错乱的症状。同时会导致失去方向感、辨别距离和时间的能力,因而导致身体严惩受伤和死亡。

[0003] 目前有关麦角乙二胺的检测方法有很多,例如:高效液相色谱法(HPLC)、薄层色谱法(TLC)、气相色谱法(GC)、气相色谱-质谱联用法(GC-MS)等方法,但是存在需要昂贵的仪器设备,对检测材料的要求高,需要提纯处理等限制。因此研究具有快速、便携等优点的检测方法具有现实意义。本发明介绍了一种以胶体金免疫层析法快速检测麦角乙二胺的检测试剂盒及其制备方法,该方法具有简单、快速,无需任何仪器设备,经济实用等特点,适用于快速定性检测样本中是否含有麦角乙二胺。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种便携、快速,适合于现场检测麦角乙二胺的检测试剂盒及其制备方法。

[0005] 一种用于检测麦角乙二胺的检测试剂盒,包括样品垫(1)、胶体金垫(2)、硝酸纤维素膜(3)、吸样垫(4)和PVC支撑板(5),在PVC支撑板上依次紧密粘附有样品垫、胶体金垫、硝酸纤维素膜和吸样垫。所述样品垫为玻璃纤维;所述胶体金垫为胶体金标记的麦角乙二胺单克隆抗体聚酯膜;所述硝酸纤维素膜上依次包被有检测线(T线)和质控线(C线),其中检测线(T线)上包被了麦角乙二胺-BSA偶联抗原,质控线(C线)上包被了羊抗鼠IgG多克隆抗体;所述吸样垫为吸水纸。

[0006] 本发明采用纳米胶体金技术及抗原抗体特异性反应,应用免疫竞争抑制反应的原理制备而成,通过待检样本中含有的麦角乙二胺与硝酸纤维素膜上检测线(T线)包被的麦角乙二胺-BSA偶联抗原竞争结合胶体金标记的麦角乙二胺单克隆抗体,通过T线的显色来判定待检样本中是否含有麦角乙二胺。

[0007] 本发明提供了一种麦角乙二胺检测试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

[0008] (1) 制备麦角乙二胺偶联抗原

[0009] 将麦角乙二胺与BSA偶联,合成麦角乙二胺-BSA偶联抗原,作为麦角乙二胺偶联抗原。

[0010] (2) 制备麦角乙二胺单克隆抗体

[0011] 采用麦角乙二胺-BSA偶联抗原为免疫原免疫BALB/C小鼠,通过杂交瘤技术,得到分泌抗麦角乙二胺单克隆抗体的杂交瘤细胞株;以体内诱生腹水法大量制备抗体,使用

Protein G 柱进行纯化,获得麦角乙二胺单克隆抗体。

[0012] (3) 制备胶体金

[0013] 取 90ml 纯化水于洁净的圆底烧瓶中,于电磁加热套中搅拌并加热,等待沸腾后,加入 4ml 1% 的氯化金溶液,继续搅拌 1min,迅速加入 6ml 1% 的柠檬酸三钠,溶液颜色由浅黄变成黑色最后变成酒红色,继续加热 5min,取出冷却到室温,常温避光保存。这样制成的胶体金颗粒的大小为 20-40nm。

[0014] (4) 制备胶体金垫

[0015] 取颗粒大小为 20-40nm 的胶体金溶液,用 0.1mol/L  $K_2CO_3$  将胶体金溶液的 pH 值调至 7.0-9.0,室温放置 10 分钟;在上述溶液中加入麦角乙二胺单克隆抗体,使麦角乙二胺单克隆抗体的浓度为 20-80  $\mu g/ml$  胶体金,混合均匀后,室温放置 30 分钟;加入 10% 的 BSA 溶液使其浓度为 10-60  $\mu l/ml$ ,混合均匀,室温放置 10 分钟;12000 转离心 30 分钟,仔细吸取上清液,弃去,剩余的沉淀用初始胶体金体积的胶体金复溶液溶解;12000 转离心 30 分钟,仔细吸取上清液,弃去,剩余的沉淀用 30% -100% 初始胶体金体积的胶体金复溶液溶解,得到麦角乙二胺单克隆抗体-胶体金标记物;将麦角乙二胺单克隆抗体-胶体金标记物按 1mL 铺 40-70 $cm^2$  聚酯膜的比例均匀铺在聚酯膜上,再置干燥间,在温度 38 $^{\circ}C$ ,湿度小于 30% 的条件下干燥 24 $\pm$ 2 小时,制成胶体金垫。

[0016] 上述胶体金复溶液为含 0.01-0.1% 的 Tris,1.0-3.0% 的蔗糖、0.1-1.0% 的 BSA 的 0.02M pH 7.0-9.0 的磷酸盐缓冲溶液。

[0017] (4) 包被麦角乙二胺-BSA 偶联抗原、羊抗鼠 IgG 多克隆抗体

[0018] 设定划膜仪涂覆参数 1  $\mu L/cm$ ,分别用微量进样器取浓度为 1.0-5.0mg/ml 的麦角乙二胺-BSA 偶联抗原、取浓度为 0.5-3.0mg/ml 羊抗鼠 IgG 多克隆抗体,按顺序接到划膜仪的 A、B 管道接口。将贴有硝酸纤维素膜的 PVC 板置于划膜仪的往复运动平台上,开启划膜仪,在硝酸纤维素膜上涂覆麦角乙二胺-BSA 偶联抗原(T 线)、羊抗鼠 IgG 多克隆抗体(C 线)。划线后于温度 38 $^{\circ}C$  的烘箱中干燥 24 $\pm$ 2 小时,保存,备用。

[0019] (5) 样品垫的处理

[0020] 将玻璃纤维浸泡于 0.01M pH 7.0-8.0 的磷酸盐缓冲溶液中 20-40min,其中磷酸盐缓冲溶液中含 0.5-1.5% BSA,0.5-1.0% Tween-20,于烘干箱中 38 $^{\circ}C$  烘干,保存,备用

[0021] (6) 组装试剂盒

[0022] 在 PVC 支撑板上按顺序依次粘附样品垫、胶体金垫、硝酸纤维素膜和吸样垫,得到所述用于检测麦角乙二胺的试纸条,试纸条可以装入塑料卡内,组装成检测卡。其中所述样品垫为玻璃纤维,吸样垫为吸水纸。

[0023] 本发明所述试剂盒的检测方法为:将被检样品平衡至室温;取出麦角乙二胺检测装置,水平放置;在样品垫中加入 2-3 滴样品,10-15 分钟时观察并记录 C、T 线的显色情况,判断检测结果。

[0024] 本发明所述的试剂盒采用胶体金免疫层析技术测定麦角乙二胺,检测时,将被测样品加在试剂盒上的样品垫上,可以直接观察到免疫反应的结果,完成样品检测。本发明可用于检测样本中可能存在的麦角乙二胺,具有使用方便、操作简单、反应迅速、经济实用等特点。

## 附图说明

- [0025] 图 1 麦角乙二胺检测试剂盒结构示意图；
- [0026] 附图符号说明：
- [0027] 1：样品垫；
- [0028] 2：胶体金垫（胶体金标记麦角乙二胺单克隆抗体的聚酯膜）
- [0029] 3：硝酸纤维素膜（T：包被了麦角乙二胺-BSA 偶联抗原的检测线；C：包被了羊抗鼠 IgG 多克隆抗体的质控线）；
- [0030] 4：吸样垫；
- [0031] 5：PVC 支撑板；
- [0032] 图 2 本发明试剂盒的检测结果示意图。
- [0033] 自左至右依次为 C 线一条线阳性检测结果；T、C 两条线阴性检测结果；无效。

## 具体实施方式：

- [0034] 实施例 1：麦角乙二胺检测试剂盒的制备
- [0035] 1. 制备麦角乙二胺偶联抗原
- [0036] 将麦角乙二胺与 BSA 偶联，合成麦角乙二胺-BSA 偶联抗原，作为麦角乙二胺偶联抗原。
- [0037] 2. 制备麦角乙二胺单克隆抗体
- [0038] 采用麦角乙二胺-BSA 偶联抗原为免疫原免疫 BALB/C 小鼠，通过杂交瘤技术，得到分泌抗麦角乙二胺单克隆抗体的杂交瘤细胞株；以体内诱生腹水法大量制备抗体，使用 Protein G 柱进行纯化，获得麦角乙二胺单克隆抗体。
- [0039] 3. 制备胶体金
- [0040] 取 90ml 纯化水于洁净的圆底烧瓶中，于电磁加热套中搅拌并加热，等待沸腾后，加入 4ml 1% 的氯化金溶液，继续搅拌 1min，迅速加入 6ml 1% 的柠檬酸三钠，溶液颜色由浅黄变成黑色最后变成酒红色，继续加热 5min，取出冷却到室温，常温避光保存。这样制成的胶体金颗粒的大小为 20-40nm。
- [0041] 4. 制备胶体金垫
- [0042] 取颗粒大小为 20-40nm 的胶体金溶液 5ml，加入 0.15ml 的 0.1mol/L  $K_2CO_3$  将胶体金溶液的 pH 值调至 8.0，室温放置 10 分钟；在上述溶液中加入 52.6  $\mu$ l 浓度为 3.8mg/ml 的麦角乙二胺单克隆抗体，混合均匀后，室温放置 30 分钟；加入 0.15ml 10% 的 BSA 溶液，混合均匀，室温放置 10 分钟；12000 转离心 30 分钟，仔细吸取上清液，弃去，剩余的沉淀用初始胶体金体积的胶体金复溶液溶解；12000 转离心 30 分钟，仔细吸取上清液，弃去，剩余的沉淀用 30% -100% 初始胶体金体积的胶体金复溶液溶解，得到麦角乙二胺单克隆抗体-胶体金标记物；将麦角乙二胺单克隆抗体-胶体金标记物按 1ml 铺 50cm<sup>2</sup> 聚酯膜的比例均匀铺在聚酯膜上，再置干燥间，在温度 38℃，湿度小于 30% 的条件下干燥 24 小时，制成胶体金垫。
- [0043] 上述胶体金复溶液为含 0.01% 的 Tris，2.0% 的蔗糖、0.5% 的 BSA 的 0.02M pH 8.0 的磷酸盐缓冲溶液。
- [0044] (4) 包被麦角乙二胺-BSA 偶联抗原、羊抗鼠 IgG 多克隆抗体

[0045] 设定划膜仪涂覆参数  $1 \mu\text{L}/\text{cm}$ ，分别用微量进样器取浓度为  $2.5\text{mg}/\text{ml}$  的麦角乙二胺-BSA 偶联抗原、取浓度为  $1.0\text{mg}/\text{ml}$  羊抗鼠 IgG 多克隆抗体，按顺序接到划膜仪的 A、B 管道接口。将贴有硝酸纤维素膜的 PVC 板置于划膜仪的往复运动平台上，开启划膜仪，在硝酸纤维素膜上涂覆麦角乙二胺-BSA 偶联抗原 (T 线)、羊抗鼠 IgG 多克隆抗体 (C 线)。划线后于温度  $38^\circ\text{C}$  的烘箱中干燥 24 小时，保存，备用。

[0046] (5) 样品垫的处理

[0047] 将玻璃纤维浸泡于  $50\text{ml}$   $0.01\text{M}$   $\text{pH}$   $8.0$  的磷酸盐缓冲溶液处理液中  $30\text{min}$ ，其中磷酸盐缓冲溶液中含  $1.0\%$  BSA,  $0.5\%$  Tween-2, 于烘干箱中  $38^\circ\text{C}$  烘干，保存，备用

[0048] (6) 组装试剂盒

[0049] 在 PVC 支撑板上按顺序依次粘附样品垫、胶体金垫、硝酸纤维素膜和吸样垫，得到所述用于检测麦角乙二胺的试纸条，试纸条可以装入塑料卡内，组装成检测卡。其中所述样品垫为玻璃纤维，吸样垫为吸水纸。

[0050] 实施例 2 : 麦角乙二胺检测试剂盒的检测

[0051] 1. 检测方法：

[0052] 取出麦角乙二胺检测试剂盒，水平放置；在样品垫上滴入 3 滴样品，10 分钟后观察并记录 C、T 线的显色情况，判断检测结果。

[0053] 2. 结果判定

[0054] 阳性：T 线不显色，仅 C 线显色，判定为阳性结果；

[0055] 阴性：T 线、C 线均显色，判定为阴性结果；

[0056] 无效：C 线不显色，说明不正确操作或试剂盒已经变质损坏。

[0057] 检测样品时，样品因毛细管作用向吸样垫一端层析。若被测样品中含有麦角乙二胺，它们将和检测线 (T 线) 上包被的麦角乙二胺-BSA 偶联抗原竞争结合胶体金标记的麦角乙二胺单克隆抗体上有限的抗体结合位点，当样品中的麦角乙二胺达到一定浓度时，与胶体金标记的麦角乙二胺单克隆抗体发生免疫反应并完全饱和，此时胶体金复合物已无空余的位点和检测线上包被的麦角乙二胺-BSA 偶联抗原结合，此时 T 线不显色，此为阳性结果。若被测样品中不含麦角乙二胺，标记了麦角乙二胺单克隆抗体的胶体金颗粒将随同样品层析至 T 线位置后，与 T 线上包被的麦角乙二胺-BSA 偶联抗原发生免疫结合反应，胶体金颗粒在 T 线位置堆积使得 T 线呈现出一条肉眼可见的红色条带，此为阴性结果。无论被测样品中是否含有麦角乙二胺，胶体金标记物均会与包被在质控线 (C 线) 上的羊抗鼠 IgG 多克隆抗体结合而显色，C 线显色是判定是否有足够样本，层析过程是否正常的标准，同时也作为试剂的内控标准。

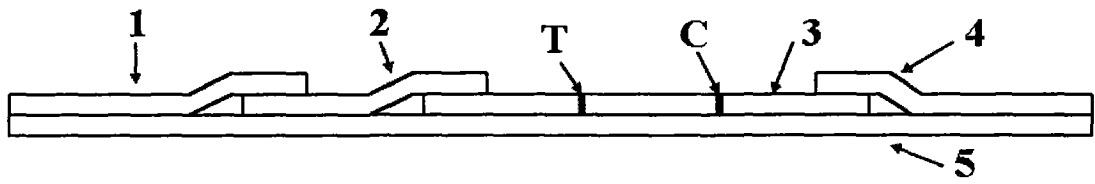


图 1

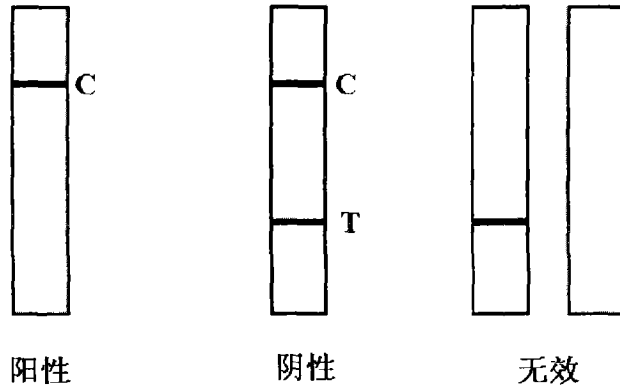


图 2