



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103412127 B

(45) 授权公告日 2015.09.23

(21) 申请号 201310373273.6

(22) 申请日 2013.08.25

(73) 专利权人 河南科技学院

地址 453003 河南省新乡市华兰大道东段

(72) 发明人 张海棠 王自良 姜金庆 范国英 黄华国

(74) 专利代理机构 郑州市华翔专利代理事务所 (普通合伙) 41122

代理人 张爱军

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

(56) 对比文件

JP 昭 56-120944 A, 1981.09.22, 全文.

张海棠等. Cd²⁺ 人工抗原的制备及其抗体特性. 《西北农业学报》. 2011, 第 20 卷 (第 6 期), 第 43 - 47 页.

Huaguo Huang 等. Development of a Polyclonal Antibody based Immunoassay for Detection of Molybdenum Levels in Environmental Water. 《2011 3rd international conference on awareness science and technology(iCAST)》. 第 103 - 106 页, 2011,

Huaguo Huang 等. Development of a Polyclonal Antibody based Immunoassay for Detection of Molybdenum Levels in Environmental Water. 《2011 3rd international conference on awareness science and technology(iCAST)》. 第 103 - 106 页, 2011,

审查员 陈伟潘

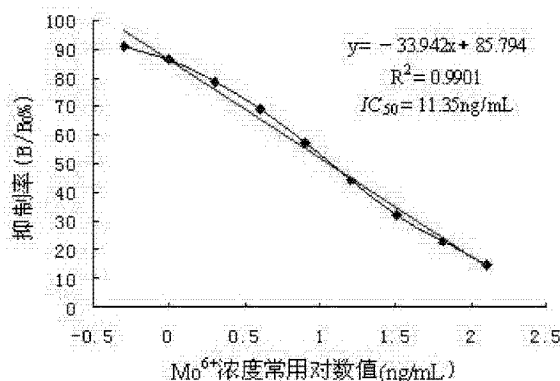
权利要求书2页 说明书9页 附图2页

(54) 发明名称

用于检测六价钼离子的酶联免疫试剂盒及其组建和检测方法

(57) 摘要

本发明涉及一种用于检测六价钼离子的酶联免疫试剂盒及组建和检测方法。试剂盒内设有用六价钼离子包被抗原包被过的酶标板、抗六价钼离子单克隆抗体抗、酶标二抗、底物显色液、终止液、六价钼离子标准溶液、洗液浓缩液、样品处理液。检测前用 0.1 mol/L 的 EDTA 螯合剂处理样品,使六价钼离子与 EDTA 充分螯合,得到待检测样品溶液,然后进行检测。本发明试剂盒能检测痕量的六价钼离子,检测灵敏度为 1 ng/mL;检测步骤少,节省时间,降低操作误差,检测成本不到理化分析方法的 1/20;时效性强,可进行现场检测,具有快速、简便、敏感、特异、经济等特性,主要用于环境、土壤、水、食品中钼离子污染残留的大批量样品筛检。



1. 一种用于检测六价钼离子的间接竞争酶联免疫试剂盒,包括盒体,其特征在于:盒体内设有用六价钼离子包被抗原包被过的酶标板、抗六价钼离子单克隆抗体、酶标二抗、底物显色液、终止液、六价钼离子标准溶液、洗液浓缩液、样品处理液;

所述六价钼离子包被抗原是由以下方法制备的:

取 20 mL 钼酸与 1mL 浓度为 10 mmol/L pH 值为 8.0 的 HEPES 缓冲液混合,得到 Mo^{6+} 溶液;称取 10 mg 异硫氰酸苄基乙二胺四乙酸 ITCBE 溶于 1mL 二甲基亚砷中,形成金属螯合剂溶液;将 Mo^{6+} 溶液和金属螯合剂溶液混合,调节溶液的 pH 值至 7.4, 25℃ 搅拌 24h, 转速为 1000 r/min, 形成 Mo^{6+} -ITCBE 螯合物的半抗原母液;称取 20 mg 载体蛋白 OVA 溶于 1mL 浓度为 10 mmol/L、pH 值为 8.0 的 HEPES 缓冲液中,形成载体蛋白溶液;取 1mL Mo^{6+} -ITCBE 螯合物半抗原母液,加入到 1mL 载体蛋白溶液中,调节 pH 值至 9.0, 室温下 1000 r/min 搅拌 24 h, 然后移入透析袋中透析 7 d 天, 收集透析液, 制备出包被抗原 Mo^{6+} -ITCBE-OVA, -20℃ 冻存储用;

所述酶标板按如下方法进行包被:包被抗原为 Mo^{6+} -ITCBE-OVA, 包被浓度为 2 $\mu\text{g/mL}$, 包被溶液为 0.05 mol/L pH 9.6 的碳酸盐缓冲液, 包被剂量为 100 $\mu\text{L/孔}$, 37℃ 温育 2 h 或室温 8 h, 用洗液 PBST 洗涤 3 次, 用 5% 的猪血清封闭, 每孔 250 μL , 37℃ 温育 1 h, 用洗液 PBST 洗涤 3 次;所述洗液 PBST 为 0.01 mol/L、pH7.4 的磷酸盐缓冲液, 其中含 0.05% 的 Tween-20。

2. 根据权利要求 1 所述的酶联免疫试剂盒, 其特征在于:所述的抗六价钼离子单克隆抗体是按以下方法制备的:

制备免疫抗原:取 20 mL 钼酸与 1mL 浓度为 10 mmol/L pH 值为 8.0 的 HEPES 缓冲液混合, 得到 Mo^{6+} 溶液;称取 10 mg 异硫氰酸苄基乙二胺四乙酸 ITCBE 溶于 1mL 二甲基亚砷中, 形成金属螯合剂溶液;将 Mo^{6+} 溶液和金属螯合剂溶液混合, 调节溶液的 pH 值至 7.4, 25℃ 搅拌 24 h, 转速为 1000 r/min, 形成 Mo^{6+} -ITCBE 螯合物的半抗原母液;称取 20 mg 载体蛋白 BSA 溶于 1mL 浓度为 10 mmol/L、pH 值为 8.0 的 HEPES 缓冲液中, 形成载体蛋白溶液;取 1mL Mo^{6+} -ITCBE 螯合物半抗原母液, 加入到 1mL 载体蛋白溶液中, 调节 pH 值至 9.0, 室温下 1000 r/min 搅拌 24 h, 然后移入透析袋中透析 7 d, 收集透析液, 制备出免疫抗原 Mo^{6+} -ITCBE-BSA, -20℃ 冻存储用;

免疫动物:以 Mo^{6+} -ITCBE-BSA 为免疫抗原, 以 Balb/c 小鼠作为免疫动物, 背部皮下多点注射, 免疫剂量为每只每次 50 ~ 100 μg , 首免用弗氏完全佐剂, 加强免疫用弗氏不完全佐剂, 首免后 3 周进行第二次免疫, 以后间隔 2 周免疫, 共免疫 5 次;

选择细胞融合备用小鼠:间接 ELISA 法检测抗血清中 Mo^{6+} 螯合物多克隆抗体的效价, 阻断 ELISA 法检测 Mo^{6+} 螯合物多克隆抗体对 Mo^{6+} -EDTA 的半数抑制浓度 IC_{50} , 挑选效价最高、 IC_{50} 最低的小鼠, 超免用于细胞融合;

制备阳性杂交瘤细胞:取 NS0 骨髓瘤细胞与免疫小鼠脾细胞用 PEG 进行细胞融合, 经过四次有限稀释法亚克隆, 获得稳定分泌抗六价钼离子的单克隆抗体的细胞株;

制备单克隆抗体:对经产母鼠腹腔注射杂交瘤细胞株, 采集腹水纯化, 获得抗六价钼离子的单克隆抗体。

3. 根据权利要求 1 所述的酶联免疫试剂盒, 其特征在于:所述的酶标二抗为羊抗鼠酶标二抗 GaMIgG-HRP 或兔抗鼠酶标二抗 RaMIgG-HRP;所述的底物显色液由显色剂 A 和显色

剂 B 组成,显色剂 A 为过氧化氢或过氧化脲,显色剂 B 为邻苯二胺或四甲基联苯胺;所述的终止液为 2 mol/L 硫酸溶液;所述的六价钼离子标准溶液为六价钼离子溶解于 0.01 mol/L、pH7.4 的磷酸盐缓冲液得到的系列浓度的溶液;所述的洗液浓缩液为 0.1 mol/L、pH7.4 的磷酸盐缓冲液,其中含 0.05% 的 Tween-20;所述的样品处理液为 0.1 mol/L 的 EDTA 溶液;用于制备所述酶标板的固相材料为聚苯乙烯、聚乙烯或聚丙烯。

4. 一种权利要求 1-3 任一项所述的间接竞争酶联免疫试剂盒的组建方法,其特征在于:组建的试剂盒包括:Mo⁶⁺-ITCBE-OVA 包被并封闭的 8×12 孔酶标板;C1 号液:工作浓度为 1:10000 的抗六价钼离子的单克隆抗体;C2 号液:工作浓度为 1:1000 的羊抗鼠酶标二抗 GaMIgG-HRP 或兔抗鼠酶标二抗 RaMIgG-HRP,其中酶为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶;C3 号液:显色剂 A 过氧化氢或过氧化脲;C4 号液:显色剂 B 四甲基联苯胺或邻苯二胺;C5 号液:终止液,2 mol/L 硫酸溶液;钼离子标准溶液:为六价钼离子溶解于 0.01 mol/L、pH7.4 的磷酸盐缓冲液得到的系列浓度的溶液;洗液浓缩液:0.1 mol/L、pH7.4 的磷酸盐缓冲液,其中含 0.05% 的 Tween-20;样品处理液:0.1 mol/L 的 EDTA 溶液。

5. 根据权利要求 4 的间接竞争酶联免疫试剂盒的组建方法,其特征在于:所述试剂盒检测六价钼离子的灵敏度为 1 ng/mL, IC₅₀ 为 11.35 ng/mL,检测范围为 1.0 ~ 128.0 ng/mL。

6. 根据权利要求 1-3 任一项所述的酶联免疫试剂盒的检测方法,其特征在于:该检测操作包括以下步骤:

(1) 样品前处理方法:

用 0.1 mol/L 的 EDTA 螯合剂处理样品,使六价钼离子与 EDTA 充分螯合,得到待检测的样品溶液;

(2) 检测步骤:第一步,每孔加入 50 μL 工作浓度的抗六价钼离子单克隆抗体,同时等体积加入钼离子标准溶液或样品溶液,设阴性和空白对照,37 °C 温育 15 min,用 PBST 缓冲液洗板;第二步,每孔加入 50 μL 工作浓度的酶标二抗,37 °C 温育 25 min,用 PBST 缓冲液洗板;第三步,每孔加入 100 μL 的底物显色液 A、B 的混合液显色,室温反应 5 min,每孔加入 100 μL 终止液,用酶标仪读 A₄₅₀ 值,记录结果。

用于检测六价钼离子的酶联免疫试剂盒及其组建和检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及酶联免疫和六价钼离子检测领域,特别是涉及一种用于检测六价钼离子的酶联免疫试剂盒及组建和检测方法。

背景技术

[0002] 我国具有丰富的钼矿资源,总储量 840 万吨,钼作为一种过渡态金属元素,其化合物呈现五种价态,其中六价钼最为稳定,也与人类的生命活动关系最为密切,缺乏与过量均会影响生命的质量。钼是有机体必需的微量元素之一,人体各种组织都含钼,成人体内总量为 9 mg,肝脏、肾脏含量最高。钼元素本身没有生物活性,只有六价钼离子与嘌呤结合形成辅酶后才具有生物活性,其生理功能主要有维持正常的新陈代谢,提高动脉壁的弹性,减少心血管疾病,通过抗氧化作用提高机体免疫机能,并可抑制亚硝胺类致癌物质在体内的合成,具有抗癌作用;六价钼缺乏会导致龋齿、肾结石、克山病、大骨节病、食道癌等疾病。但同时六价钼过量能够引起机体中毒,人体摄入量超过 10 ~ 15 mg 时,会导致生长发育迟缓,体重下降,甚至发生痛风样综合症、关节疼痛及畸形、肺部变性等病症。动物钼中毒表现类似铜缺乏病,1938 年 Ferguson 首次报道了牧草中钼含量过高,可使放牧牛产生持续性腹泻、被毛脱色为特征的中毒性疾病。英国的“牛腹泻病”、新西兰的“牛泥炭泻”和澳大利亚“牛地方性血尿症”和我国 1981 年赣南地区发生的耕牛“红皮白毛症”等,都是六价钼中毒的典型事件。在自然状态下六价钼对生物体没有危害,但由于钼被广泛应用于特种钢、机械、石油、化工、国防、航空航天、电子、核工业等诸多领域,钼矿大量开采,六价钼离子以各种形式进入自然界,环境污染急剧加重,加之累积效应和生物富集作用,对环境污染和人类健康构成了严重威胁。因此,对环境土壤、水源、饲料、食品中六价钼含量的检测意义重大。

[0003] 目前,检测环境六价钼离子主要采用理化分析方法和免疫分析方法,理化分析方法包括紫外分光光度法(UV)、电化学分析法(EC)、原子吸收光谱法(AAS)、电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS)、电感耦合等离子体原子发射光谱法(ICP-AES)、氢化物发生-原子荧光光谱法(HG-AFS)、中子活化分析法(NAA)等。这些方法各有优缺点,紫外分光光度法操作简单,快速,干扰小,但其灵敏度不高;电化学分析法灵敏、简便,对操作人员技术要求高;原子吸收光谱法、电感耦合等离子体质谱法、电感耦合等离子体原子发射光谱法、氢化物发生-原子荧光光谱法具有选择性好、测定精度高、简单、快速等优点,但所用仪器比较昂贵,只能在实验室进行检测,且对操作人员技术要求较为严格,限制了其广泛使用;中子活化分析法是一种以核反应为基础的分析方法,具有微量、快速、准确和非破坏性且同时可分析多元素的优点,但所需设备一般实验室不具备,很难得到广泛应用。自 1985 年 Reardan 等首次通过金属-螯合剂人工抗原制备出重金属(In)单克隆抗体(mAb)并建立免疫分析方法以来,国内外重金属污染免疫检测技术的研究非常活跃,但对于六价钼离子的免疫检测技术目前还处于实验室阶段。

[0004] 因此,建立快速、简便、敏感、特异、经济、筛检量大的六价钼离子免疫检测技术,对

于减少环境污染、提高食品质量和保障食品安全具有重要意义。

发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题：提供一种能够快速、简便、敏感、特异的检测六价钼离子的酶联免疫试剂盒；

[0006] 还提供了该酶联免疫试剂盒的组建方法以及检测方法。

[0007] 本发明的技术方案：

[0008] 一种用于检测六价钼离子的间接竞争酶联免疫试剂盒，包括盒体，盒体内设有用六价钼离子包被抗原包被过的酶标板、抗六价钼离子单克隆抗体抗、酶标二抗、底物显色液、终止液、六价钼离子标准溶液、洗液浓缩液、样品处理液。

[0009] 所述六价钼离子包被抗原是由以下方法制备的：

[0010] 取 20 mL 钼酸与 1mL 浓度为 10 mmol/L pH 值为 8.0 的 HEPES 缓冲液混合，得到 Mo^{6+} 溶液；称取 10 mg 异硫氰酸苄基乙二胺四乙酸 ITCBE 溶于 1mL 二甲基亚砷中，形成金属螯合剂溶液；将 Mo^{6+} 溶液和金属螯合剂溶液混合，调节溶液的 pH 值至 7.4，25℃ 搅拌 24h，转速为 1000 r/min，形成 Mo^{6+} -ITCBE 螯合物的半抗原母液；称取 20 mg 载体蛋白 OVA 溶于 1mL 浓度为 10 mmol/L、pH 值为 8.0 的 HEPES 缓冲液中，形成载体蛋白溶液；取 1mL Mo^{6+} -ITCBE 螯合物半抗原母液，加入到 1mL 载体蛋白溶液中，调节 pH 值至 9.0，室温下 1000 r/min 搅拌 24 h，然后移入透析袋中透析 7 d 天，收集透析液，制备出包被抗原 Mo^{6+} -ITCBE-OVA，-20℃ 冻存备用。

[0011] 所述酶标板按如下方法进行包被：包被抗原为 Mo^{6+} -ITCBE-OVA，包被浓度为 2 $\mu\text{g/mL}$ ，包被溶液为 0.05 mol/L pH 9.6 的碳酸盐缓冲液，包被剂量为 100 $\mu\text{L/孔}$ ，37℃ 温育 2 h 或室温 8 h，用洗液 PBST 洗涤 3 次，用 5% 的猪血清封闭，每孔 250 μL ，37℃ 温育 1 h，用洗液 PBST 洗涤 3 次；所述洗液 PBST 为 0.01 mol/L、pH7.4 的磷酸盐缓冲液，其中含 0.05% 的 Tween-20。

[0012] 所述的抗六价钼离子单克隆抗体是按以下方法制备的：

[0013] 制备免疫抗原：取 20 mL 钼酸与 1mL 浓度为 10 mmol/L pH 值为 8.0 的 HEPES 缓冲液混合，得到 Mo^{6+} 溶液；称取 10 mg 异硫氰酸苄基乙二胺四乙酸 ITCBE 溶于 1mL 二甲基亚砷中，形成金属螯合剂溶液；将 Mo^{6+} 溶液和金属螯合剂溶液混合，调节溶液的 pH 值至 7.4，25℃ 搅拌 24 h，转速为 1000 r/min，形成 Mo^{6+} -ITCBE 螯合物的半抗原母液；称取 20 mg 载体蛋白 BSA 溶于 1mL 浓度为 10 mmol/L、pH 值为 8.0 的 HEPES 缓冲液中，形成载体蛋白溶液；取 1mL Mo^{6+} -ITCBE 螯合物半抗原母液，加入到 1mL 载体蛋白溶液中，调节 pH 值至 9.0，室温下 1000 r/min 搅拌 24 h，然后移入透析袋中透析 7 d，收集透析液，制备出免疫抗原 Mo^{6+} -ITCBE-BSA，-20℃ 冻存备用；

[0014] 免疫动物：以 Mo^{6+} -ITCBE-BSA 为免疫抗原，以 Balb/c 小鼠作为免疫动物，背部皮下多点注射，免疫剂量为每只每次 50 ~ 100 μg ，首免用弗氏完全佐剂，加强免疫用弗氏不完全佐剂，首免后 3 周进行第二次免疫，以后间隔 2 周免疫，共免疫 5 次；

[0015] 选择细胞融合备用小鼠：间接 ELISA 法检测抗血清中 Mo^{6+} 螯合物多克隆抗体的效价，阻断 ELISA 法检测 Mo^{6+} 螯合物多克隆抗体对 Mo^{6+} -EDTA 的半数抑制浓度 IC_{50} ，挑选效价最高、 IC_{50} 最低的小鼠，超免用于细胞融合；

[0016] 制备阳性杂交瘤细胞：取 NS0 骨髓瘤细胞与免疫小鼠脾细胞用 PEG 进行细胞融合，经过四次有限稀释法亚克隆，获得稳定分泌抗六价钼离子的单克隆抗体的细胞株；

[0017] 制备单克隆抗体：对经产母鼠腹腔注射杂交瘤细胞株，采集腹水纯化，获得抗六价钼离子的单克隆抗体。

[0018] 所述酶标二抗为羊抗鼠酶标二抗 GaMIgG-HRP 或兔抗鼠酶标二抗 RaMIgG-HRP；所述的底物显色液由显色剂 A 和显色剂 B 组成，显色剂 A 为过氧化氢或过氧化脲，显色剂 B 为邻苯二胺或四甲基联苯胺；所述的终止液为 2 mol/L 硫酸溶液；所述的六价钼离子标准溶液为六价钼离子溶解于 0.01 mol/L、pH7.4 的磷酸盐缓冲液得到的系列浓度的溶液；所述的洗液浓缩液为 0.1 mol/L、pH7.4 的磷酸盐缓冲液，其中含 0.05% 的 Tween-20；所述的样品处理液为 0.1 mol/L 的 EDTA 溶液；用于制备所述酶标板的固相材料为聚苯乙烯、聚乙烯或聚丙烯。

[0019] 所述的间接竞争酶联免疫试剂盒的组建方法，组建的试剂盒包括： Mo^{6+} -ITCBE-OVA 包被并封闭的 8×12 孔酶标板；C1 号液：工作浓度为 1 : 10000 的抗六价钼离子的单克隆抗体；C2 号液：工作浓度为 1 : 1000 的羊抗鼠酶标二抗 GaMIgG-HRP 或兔抗鼠酶标二抗 RaMIgG-HRP，其中酶为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶；C3 号液：显色剂 A 过氧化氢或过氧化脲；C4 号液：显色剂 B 四甲基联苯胺或邻苯二胺；C5 号液：终止液，2 mol/L 硫酸溶液；钼离子标准溶液：为六价钼离子溶解于 0.01 mol/L、pH7.4 的磷酸盐缓冲液得到的系列浓度的溶液；洗液浓缩液：0.1 mol/L、pH7.4 的磷酸盐缓冲液，其中含 0.05% 的 Tween-20；样品处理液：0.1 mol/L 的 EDTA 溶液。

[0020] 所述试剂盒检测六价钼离子的灵敏度为 1 ng/mL， IC_{50} 为 11.35 ng/mL，检测范围为 1.0 ~ 128.0 ng/mL。

[0021] 所述的酶联免疫试剂盒的检测方法，包括以下步骤：

[0022] (1) 样品前处理方法：

[0023] 用 0.1 mol/L 的 EDTA 螯合剂处理样品，使六价钼离子与 EDTA 充分螯合，得到待检测的样品溶液。

[0024] (2) 检测步骤：第一步，每孔加入 50 μL 工作浓度的抗六价钼离子单克隆抗体，同时等体积加入钼离子标准溶液或样品溶液，设阴性和空白对照，37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 15 min，用 PBST 缓冲液洗板；第二步，每孔加入 50 μL 工作浓度的酶标二抗，37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 25 min，用 PBST 缓冲液洗板；第三步，每孔加入 100 μL 的底物显色液 A、B 的混合液显色，室温反应 5 min，每孔加入 100 μL 终止液，用酶标仪读 A_{450} 值，记录结果。

[0025] 本发明的积极有益效果：

[0026] 1. 本发明试剂盒的组建方法，制备了重金属六价钼离子的人工抗原，得到了适宜分子结合比的人工免疫抗原、包被抗原，并获得了高效价、敏感和特异性的抗血清，为试剂盒的组建提供了必要条件。

[0027] 2. 本发明试剂盒的组建方法，制备了抗六价钼离子的单克隆抗体，抗体的腹水效价为 1 : 6.4×10^5 ，亲和常数 Ka 为 1.65×10^{10} L/mol，与其它重金属离子的交叉反应率小于 0.05%，该抗体具有高效价、高亲和力和特异性强等特性，为六价钼离子的痕量快速检测提供了保障。

[0028] 3. 本发明的六价钼离子酶联免疫试剂盒，能检测痕量的六价钼离子，具有快速、

简便、敏感、特异、经济等特性,检测步骤少,节省检测时间,降低操作误差。快速,45 ~ 50 min 出结果,比理化检测方法(3 d)大大节省时间;简便,不需要任何附加仪器和试剂,人人均可操作;敏感,检测灵敏度为 1ng/mL,符合国家限量标准要求,与理化检测方法灵敏度相当;特异,与其它重金属离子无交叉反应;经济,与理化检测方法相比,检测成本不到理化分析方法的 1/20;时效性强,可进行现场检测。

[0029] 4. 本发明的六价钼离子酶联免疫试剂盒,主要用于环境、土壤、水、食品中钼离子污染残留的大批量样品筛检,对样品的前处理要求低且处理过程简单,既可用于大批样品的筛检,又可进行小批样品的快速检测,不仅为环境、食品安全提供技术支撑,也为食品进出口检验、食品检验执法、环境污染监测评价等提供有效的技术手段和检测方法,对于提高食品安全、保障人民身心健康、保持环境友好与可持续发展具有重要现实意义,该技术的推广将具有显著的经济效益和社会效益。

附图说明

[0030] 图 1 为人工免疫抗原 Mo^{6+} -ITCBE-BSA 合成的技术路线图;

[0031] 图 2 为钼离子单克隆抗体的亲和常数测定图;

[0032] 图 3 为检测六价钼离子酶联免疫试剂盒的标准曲线图。

具体实施方式

[0033] 以下用实施例具体说明本发明,但是并不表示对本发明的任何限制,如没有特别说明,其中的百分含量均为重量百分含量。

[0034] 由于六价钼离子不具有免疫原性而仅具有免疫反应性,要组装六价钼离子间接竞争酶联免疫测定试剂盒,必须要制备抗六价钼离子的特异性抗体,而其首要条件先制备人工免疫抗原与包被抗原;制备六价钼离子的人工免疫抗原后,免疫 Balb/c 小鼠,制备抗六价钼离子的高亲和力、高特异性的单克隆抗体,在此基础上组装制备六价钼离子酶联免疫试剂盒。

[0035] 实施例一、六价钼离子人工免疫抗原和包被抗原的制备

[0036] 采用异硫氰酯法制备人工免疫抗原 Mo^{6+} -ITCBE-BSA。取 20mL 钼酸与 1mL pH8.0 的 HEPES 缓冲液(10 mM/L),混合均匀形成 Mo^{6+} 溶液;称取 10 mg 异硫氰酸苄基乙二胺四乙酸(ITCBE)溶于 1mL 二甲基亚砷(DMSO),形成金属整合剂溶液;将 Mo^{6+} 溶液和金属整合剂溶液混合后,调节溶液的 pH 值至 7.4,25℃搅拌 24 h,转速为 1000 r/min,形成 Mo^{6+} -ITCBE 复合物的半抗原母液;

[0037] 称取 20 mg BSA 溶于 1 mL pH8.0 的 HEPES 缓冲液(10mM/L)中,形成浓度为 20 mg/mL 的载体蛋白溶液;取 1 mL Mo^{6+} -ITCBE 复合物半抗原溶液,加入到 1 mL 载体蛋白溶液中,调节 pH 值至 9.0,在室温下 1000 r/min 搅拌 24 h,然后移入透析袋中透析 7 d,收集透析液,-20℃冻存储备用,制备出人工免疫抗原 Mo^{6+} -ITCBE-BSA。同法制备包被抗原 Mo^{6+} -ITCBE-OVA。参见图 1。

[0038] 实施例二、六价钼离子人工免疫抗原的鉴定

[0039] 采用二喹啉甲酸法测定 Mo^{6+} -ITCBE-BSA 中载体蛋白 BSA 浓度。以 BSA 作为标准蛋白,用二喹啉甲酸法构建浓度检测标准曲线。BSA 浓度标准曲线的线性方程为:

$y=0.0004x + 0.0072$, $R^2 = 0.9987$, 其中 y 为样品在波长为 562 nm 处的吸光度, x 为样品的蛋白浓度。

[0040] 采用 ICP-AES 法测定 Mo^{6+} -ITCBE-BSA 中 Mo^{6+} 的浓度。将 100 $\mu\text{g/mL}$ 的 Mo^{6+} 标准储备液用 2% 的硝酸稀释成 0 $\mu\text{g/mL}$ 、0.25 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$ 、2 $\mu\text{g/mL}$ 、4 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度梯度, 仪器软件自动绘制标准曲线, 并得出线性回归方程; 将样品溶液 50 倍稀释, 在 226 nm 波长的最佳优化实验条件下进行测定, 仪器软件自动分析结果。

[0041] 实施例三、抗六价钼离子单克隆抗体的制备

[0042] 制备合格的抗体是组装免疫检测试剂盒的关键。由于单克隆抗体具有特异性强、亲和力高、均质、来源稳定、便于标准化生产等优点, 本发明采用抗六价钼离子的单克隆抗体。

[0043] 首先, 免疫 Balb/c 小鼠并选择细胞融合备用小鼠。用 Mo^{6+} -ITCBE-BSA 免疫 6 周龄雌性 Balb/C 小鼠 5 只, 50 $\mu\text{g} \cdot 0.2 \text{ mL/}$ 只, 背部皮下多点注射。首免, 用灭菌 PBS 稀释 Mo^{6+} -ITCBE-BSA, 与等量 CFA 混合乳化; 加强免疫, 用灭菌 PBS 稀释 Mo^{6+} -ITCBE-BSA, 与等量 IFA 混合乳化, 首免后 3 周进行第二次免疫, 以后间隔 2 周免疫一次, 共免 5 次, 第三次免疫后 10 d 断尾取血, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置过夜, 4000 r/min 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min, 取上清后 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。选择细胞融合备用小鼠, 间接 ELISA 法检测抗血清中 Mo^{6+} 螯合物 pAb 的效价, 阻断 ELISA 法检测 Mo^{6+} -EDTA pAb 对 Mo^{6+} -EDTA 的 IC_{50} , 挑选效价最高、 IC_{50} 最低的小鼠, 超免用于细胞融合。

[0044] 第二步, 细胞融合与阳性杂交瘤细胞株的筛选。细胞融合: 将 PEG 溶液、GNK 溶液预热至 40 $^{\circ}\text{C}$, 将制备好的脾细胞与 NS0 骨髓瘤细胞按 10 : 1 的比例混合于 50 mL 离心管中, 加 GNK 溶液至 40 mL, 1000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 打散细胞团, 将此融合管移入 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中。用 1 mL 吸管将预热的 50% PEG (pH 8.0) 滴加到融合管中, 边加边轻轻摇动融合管, 1min 内加完, 并继续在水浴中缓缓摇动融合管 1.5min; 然后慢慢补加 GNK 溶液至 40 mL, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴静置 5 min, 1000 r/min 离心 10 min, 弃上清; 打散细胞团, 加 40 mL HAT 吹打混匀, 加到 96 孔细胞培养板上, 每孔 100 μL , 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中培养。

[0045] 阳性杂交瘤细胞的筛选: 用间接 ELISA 和阻断 ELISA 进行阳性杂交瘤细胞株的筛选。选择强阳性、抑制效果好、细胞生长旺盛的孔进行 3 次有限稀释克隆化, 分别冻存 15 d、30 d 和 60 d 后复苏杂交瘤细胞, 培养后取上清液, 间接 ELISA 测定抗体效价, 考察杂交瘤细胞分泌的单克隆抗体的稳定性。

[0046] 第三步, 单克隆抗体制备。采用体内诱生腹水法制备单克隆抗体, 取 8 周龄健康 Balb/c 雌性小鼠, 腹腔注射 FIA 0.5 mL/ 只, 10 ~ 15 d 后使用。将培养的阳性杂交瘤细胞 1000 r/min 离心 10min 弃上清, 收集细胞沉淀。用灭菌的 PBS 将细胞沉淀悬浮、混匀, 将细胞数调至 10^6 个/mL, 腹腔注射 Balb/C 小鼠 0.5 mL/ 只。接种细胞 7-10 d 后产生腹水, 进行收集, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置过夜, 12000 r/min 离心 5 min, 弃去上层的脂肪、IFA 和下层的沉淀, 饱和硫酸铵盐析法提纯后测定 IgG 含量和效价, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

[0047] 实施例四、抗六价钼离子单克隆抗体的鉴定

[0048] 亚型鉴定。取出正在培养的杂交瘤细胞上清, 按 1 : 50 稀释后, 参照小鼠单克隆抗体亚型鉴定试纸条说明书操作。取稀释液 0.15mL 加入试剂盒小管中, 室温放置 1 min。待其自然溶解后, 轻轻混匀; 然后将试纸条插到小管底部, 5 min 后当最前端条带在两对“+”

中间出现时,即可见与杂交瘤细胞株所分泌的抗体亚类和轻链类型对应所在的位置,从而确定抗体亚型。

[0049] 结合容量测定。间接 ELISA 测定其结合容量,测定的单克隆抗体腹水效价为 $1 : 6.4 \times 10^5$ 。

[0050] 亲和力鉴定。饱和 ELISA 测定亲和常数 (Ka),用浓度分别为 $3.4 \mu\text{g/mL}$ 和 $1.7 \mu\text{g/mL}$ 的 Mo^{6+} -ITCBE-BSA 包被,加入倍比稀释的 Mo^{6+} -EDTA mAb,再加入 GaMIgG-HRP, TMB 显色测 $A_{450\text{nm}}$ 值,以 Mo^{6+} -EDTA mAb 浓度为横坐标,以 $A_{450\text{nm}}$ 值为纵坐标,绘出相应的 2 条反应曲线,以每条曲线上部平坦段的 $A_{450\text{nm}}$ 值作为 100%,在曲线上算出 50% $A_{450\text{nm}}$ 值时对应的 Mo^{6+} -EDTA mAb 浓度,按照公式 $Kaff = (n - 1) / 2 (n[\text{Ab}']_t - [\text{Ab}]_t)$ 计算 Ka , Ka 为 $1.65 \times 10^{10} \text{ L/mol}$ 。

[0051] 敏感性鉴定。用阻断 ELISA 测定 Mo^{6+} -EDTA mAb 对不同浓度 Mo^{6+} -EDTA 的抑制率,以抑制率 B/B_0 为纵坐标,以不同浓度 Mo^{6+} -EDTA 的对数值为横坐标,绘制标准抑制曲线,进行相关回归分析,计算 Mo^{6+} -EDTA mAb 对 Mo^{6+} -EDTA 的 IC_{50} 。结果 IC_{50} 为 11.35 ng/mL 。

[0052] 特异性鉴定。采用交叉反应试验鉴定其特异性,结果表明:与其它重金属离子交叉反应小于 0.01%。

[0053] 实施例五、六价钼离子酶联免疫试剂盒的制备

[0054] 采用方阵法筛选确定酶标二抗 (GaMIgG-HRP 或 RaMIgG-HRP) 和单克隆抗体工作浓度,浓度分别为 $1 : 1000$ 和 $1 : 10000$ 。

[0055] 六价钼离子酶联免疫试剂盒的标准配置:包括 C1 号液(最佳工作浓度的 Mo^{6+} mAb), C2 号液(最佳工作浓度的 RaMIgG-HRP), C3 号液(底物显色剂 A), C4 号液(底物显色剂 B), Mo^{6+} -ITCBE-OVA 包被并封闭好的 8×12 (96 孔) 或酶 4×12 (48 孔) 酶标板, C5 号液(终止液), Mo^{6+} 标准品稀释液 1 ~ 7, 洗液浓缩液 (PBST)。

[0056] 六价钼离子酶联免疫试剂盒的标准曲线。阻断 ELISA 测定单克隆抗体对不同浓度 Mo^{6+} 标准品的抑制率,以抑制率 $B/B_0\%$ (B 是 Mo^{6+} 不同标准浓度的 A_{450} 值, B_0 是 Mo^{6+} 0 标准浓度的 A_{450} 值) 为纵坐标,以不同标准品浓度的对数值为横坐标,在半对数坐标纸上绘制标准曲线,推导回归方程,进行回归分析。标准曲线见附图 3。其线性回归方程为 $y = -33.942x + 85.794$, 检测灵敏度为 1 ng/mL , IC_{50} 为 11.35 ng/mL , 检测范围为 $1.0 \sim 128.0 \text{ ng/mL}$ 。

[0057] 实施例六、六价钼离子酶联免疫试剂盒的配置

[0058] 在制备免疫抗原、包被抗原、特异性单克隆抗体以及商品化酶标二抗基础上,组装用于检测六价钼离子的间接竞争酶联免疫试剂盒,其优化的标准配置包括:

[0059] (1) Mo^{6+} -ITCBE-OVA 包被并封闭的 8×12 孔酶标板;

[0060] (2) C1 号液:工作浓度为 $1 : 10000$ 的抗六价钼离子的单克隆抗体;

[0061] (3) C2 号液:工作浓度为 $1 : 1000$ 的羊抗鼠酶标二抗 GaMIgG-HRP 或兔抗鼠酶标二抗 RaMIgG-HRP, 其中酶为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶;

[0062] (4) C3 号液:显色剂 A, 为过氧化氢或过氧化脲, C4 号液:显色剂 B, 为四甲基联苯胺或邻苯二胺;显色剂 A 与显色剂 B 进行等比量混匀;

[0063] (5) C5 号液:终止液, 为 2 mol/L 硫酸溶液;

[0064] (6) 六价钼离子标准溶液:将六价钼离子溶解于 0.01 mol/L 、 $\text{pH}7.4$ 的磷酸盐缓冲

液中,得到浓度为 0.1 ng/mL、0.3 ng/mL、0.9 ng/mL、2.7 ng/mL、8.1 ng/mL、24.3 ng/mL、72.9 ng/mL 的系列标准溶液;

[0065] (7) 洗液浓缩液:为 0.1mol/L、pH7.4 的磷酸盐缓冲液,其中含 0.05% 的 Tween-20 (PBST),使用时采用 10 倍的稀释液;

[0066] (8) 样品处理液:为 0.1mol/L 的 EDTA 溶液。

[0067] 实施例七、六价钼离子试剂盒的样品前处理方法与检测步骤

[0068] (1) 样品前处理方法:

[0069] 对于环境土壤样品,称取 1.0 g 土壤样品于 50 mL 微波管中,加入 1 mL 双蒸水浸润后加入混酸溶液(2 mL HNO₃和 6 mL HCl),室温反应 12 h,置于微波消解炉中,180℃保持 15min,冷却至室温,NaOH 溶液调节 pH 至 7.4,用 50mL 容量瓶定容,在定容后的水样消解液中按 9 : 1 的体积比加入摩尔浓度为 100 mmol/L 的 EDTA 螯合剂,混合均匀,使六价钼离与 EDTA 充分螯合,得到土壤样品检测溶液。

[0070] 对于一般食物样品,称取食物样品 1.0 g,在聚四氟乙烯坩埚中加入硝酸 2 mL,室温反应 4 h,然后用硝酸 4 mL 将样品全部转移到消化管内,加入 1.5 mL 30% 过氧化氢溶液反应 1 h,之后置于微波消解炉中,180℃保持 15min,冷却至室温,NaOH 溶液调节 pH 至 7.4,用 50 mL 容量瓶定容,在定容后的水样消解液中按 9 : 1 的体积比加入摩尔浓度为 100 mmol/L 的 EDTA 螯合剂,混合均匀,使六价钼离子与 EDTA 充分螯合,得到食物样品检测溶液。

[0071] 对于水样,直接向水样中按 9 : 1 的体积比加入摩尔浓度为 100 mmol/L 的 EDTA 螯合剂,混合均匀,使六价钼离与 EDTA 充分螯合,得到水样检测溶液。

[0072] (2) 检测步骤:第一步,每孔加入 50 μL 工作浓度的抗六价钼离子单克隆抗体,同时等体积加入钼离子标准溶液或样品溶液,设阴性和空白对照,37 °C 温育 15 min,用 PBST 缓冲液洗板;第二步,每孔加入 50 μL 工作浓度的酶标二抗 RaRIgG-HRP,37°C 温育 25 min,用 PBST 缓冲液洗板;第三步,每孔加入 100 μL 的底物显色液 A、B 的混合液显色,室温反应 5 min,每孔加入 100 μL 终止液,用酶标仪读 A₄₅₀值,记录结果。

[0073] 实施例八、六价钼离子酶联免疫试剂盒的性能测定

[0074] (1) 灵敏性。按照阻断 ELISA 最低检测限为 B₀/B = 1.2 的方法,根据曲线回归方程计算出试剂盒的灵敏度,确定检测限。测定的检测限为 1ng/mL。

[0075] (2) 准确性。将 Mo⁶⁺标准品添加到土壤样、水样中,使终浓度分别为 2 ng/mL、8 ng/mL、32 ng/mL、64 ng/mL,每个浓度设 6 个重复,以回收率和变异系数确定其准确度。结果见表 1,土壤样的回收率在 78.5%~84.7%,平均 81.5%,变异系数在 8.5%~12.3%,平均 10.7%;水样的回收率在 85.5%~91.3%,平均 89.5%,变异系数在 7.3%~10.4%,平均 9.1%;样品的平均变异系数均小于 15%,表明该检测方法具有较高的准确度。

[0076] 表 1 六价钼离子酶联免疫试剂盒添加回收试验(n=6)

[0077]

样品	Mo ⁶⁺ 添加量 (ng/mL)	测定值 (ng/mL)	回收率 (%)	变异系数 (%)
土壤	2	1.57±0.248	78.5±12.4	12.3
	8	6.61±0.71	82.6±8.9	10.7
	32	25.7±3.68	80.3±11.5	11.4
	64	54.2±5.38	84.7±8.4	8.5
水	2	1.71±0.176	85.5±8.8	9.8
	8	7.23±0.59	90.4±7.4	10.4
	32	29.22±2.27	91.3±7.1	7.3
	64	58.12±5.18	90.8±8.1	8.9

[0078] (3) 特异性。采用交叉反应试验,选择汞、铅、镉、铜、锌、铬、钴、铁等金属离子与 EDTA 的螯合物、EDTA 为抑制物,用阻断 ELISA 测定各抑制物的 IC_{50} ,以 Mo⁶⁺ mAb 对 Mo⁶⁺的 IC_{50} 和对其它各竞争物的 IC_{50} 的百分率为其交叉反应率(CR%)。结果见表 2,试剂盒对 Mo⁶⁺-EDTA 的 IC_{50} 为 11.35ng/mL,对与 EDTA 及其它金属离子的 IC_{50} 均大于 10^3 ,说明试剂盒具有较高的特异性。

[0079] 表 2 Mo⁶⁺-EDTA mAb 与其它金属螯合物的交叉反应

[0080]

化合物	IC_{50} (ng/mL)	交叉反应率 (%)
Mo ⁶⁺ -EDTA	11.35ng/mL	100
EDTA	$>6.4 \times 10^3$	<0.05
Hg ²⁺ -EDTA	$>3.2 \times 10^3$	<0.05
Pb ²⁺ -EDTA	$>6.4 \times 10^3$	<0.05
Cd ²⁺ -EDTA	$>6.4 \times 10^3$	<0.05
Cu ²⁺ -EDTA	$>3.2 \times 10^3$	<0.05
Zn ²⁺ -EDTA	$>3.2 \times 10^3$	<0.05
Cr ³⁺ -EDTA	$>3.2 \times 10^3$	<0.05
Co ²⁺ -EDTA	$>6.4 \times 10^3$	<0.05
Fe ²⁺ -EDTA	$>6.4 \times 10^3$	<0.05

[0081] (4) 稳定性:取同一批次的试剂盒保存于 4℃下,测定保存 6 个月中各月份的 A_{450} 值、 IC_{50} 和 R^2 变化情况,确定其稳定性。结果见表 3,随着试剂盒保存时间的延长,各标准品的 A_{450} 值有所减小,但其 IC_{50} 、 R^2 变化不大,曲线拟合良好,说明试剂盒在 4℃下 6 个月的保存期内质量稳定。

[0082] 表 3 试剂盒的保存期

[0083]

保存天数(d)	IC_{50} (ng/mL)	R^2	最大吸光值
1	11.35	0.9841	1.024
30	12.06	0.9746	0.958
60	11.87	0.9917	0.902
90	10.86	0.9783	0.854
120	9.91	0.9645	0.737
150	10.56	0.9587	0.683
180	11.38	0.9668	0.615

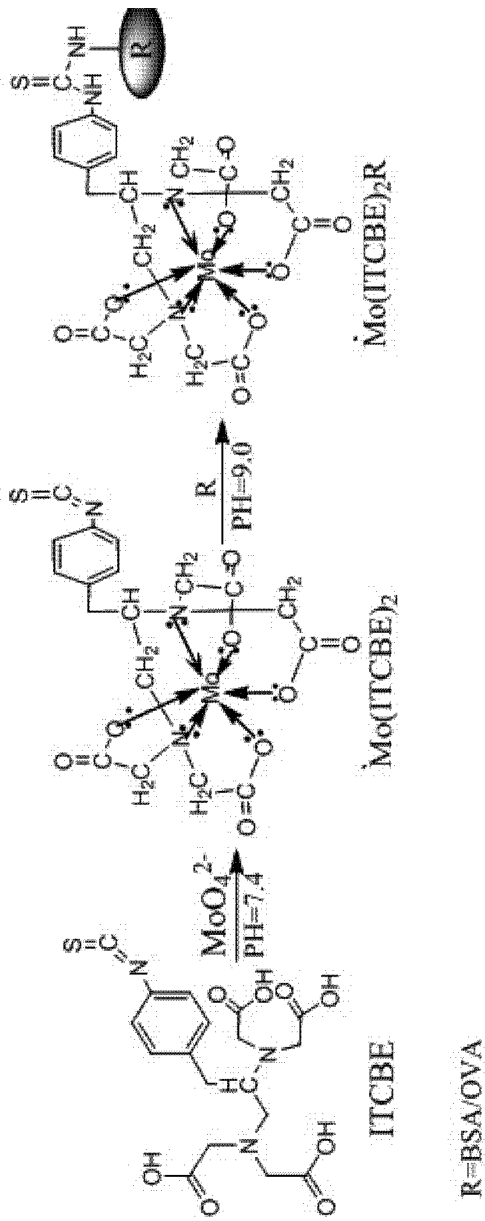


图 1

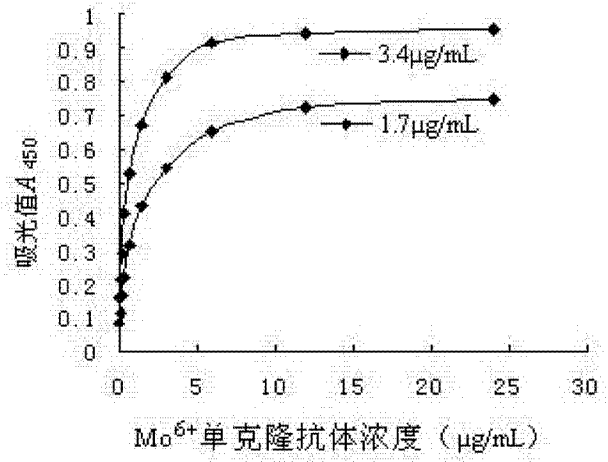


图 2

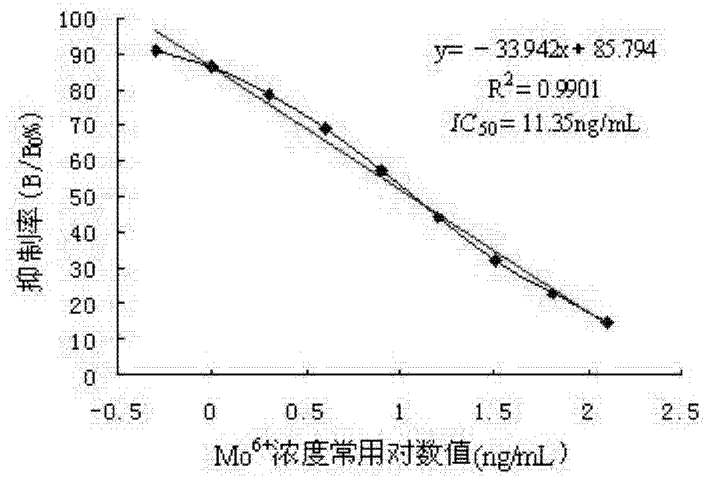


图 3

专利名称(译)	用于检测六价钼离子的酶联免疫试剂盒及其组建和检测方法		
公开(公告)号	CN103412127B	公开(公告)日	2015-09-23
申请号	CN201310373273.6	申请日	2013-08-25
[标]申请(专利权)人(译)	河南科技学院		
申请(专利权)人(译)	河南科技学院		
当前申请(专利权)人(译)	河南科技学院		
[标]发明人	张海棠 王自良 姜金庆 范国英 黄华国		
发明人	张海棠 王自良 姜金庆 范国英 黄华国		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531		
代理人(译)	张爱军		
其他公开文献	CN103412127A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种用于检测六价钼离子的酶联免疫试剂盒及组建和检测方法。试剂盒内设有用六价钼离子包被抗原包被过的酶标板、抗六价钼离子单克隆抗体抗、酶标二抗、底物显色液、终止液、六价钼离子标准溶液、洗液浓缩液、样品处理液。检测前用0.1 mol/L的EDTA螯合剂处理样品，使六价钼离子与EDTA充分螯合，得到待检测样品溶液，然后进行检测。本发明试剂盒能检测痕量的六价钼离子，检测灵敏度为1 ng/mL；检测步骤少，节省时间，降低操作误差，检测成本不到理化分析方法的1/20；时效性强，可进行现场检测，具有快速、简便、敏感、特异、经济等特性，主要用于环境、土壤、水、食品中钼离子污染残留的大批量样品筛检。

