



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108226488 A

(43)申请公布日 2018.06.29

(21)申请号 201711244732.5

(22)申请日 2017.11.30

(71)申请人 上海拜豪生物科技有限公司

地址 200120 上海市浦东新区周浦医谷蓝
靛路1199号1号楼303室

(72)发明人 刘丽玲 杨宇 蔺维超 陈丽
张媛媛

(74)专利代理机构 广州市越秀区哲力专利商标
事务所(普通合伙) 44288

代理人 莫之特 罗峰

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

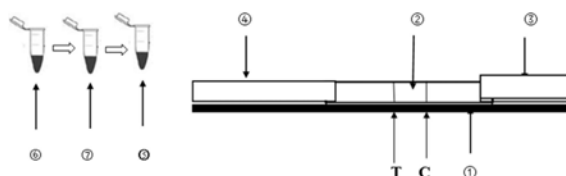
权利要求书2页 说明书14页 附图9页

(54)发明名称

一种重金属荧光免疫检测方法及其层析试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种重金属荧光免疫检测方法,包括以下步骤:1)样品前处理:将血液样本进行酸化处理,离心,取上清液,加入螯合剂进行螯合反应,然后加入碱性溶液中和;2)将含有修饰基团的荧光微球与重金属特异性抗体制成荧光微球溶液;3)抗原的包被:将重金属的完全抗原包被在检测线区(T);将羊抗鼠抗体包被在质控线区(C);4)检测,通过标准曲线计算浓度值。该方法能有效地使血液样本中的重金属离子释放出来,从而能有效地避免假阴性或检测含量偏低。该方法的特异性高、操作简单,所需成本低,适用于即时现场分析。本发明同时还提供一种重金属荧光免疫层析试剂盒,该试剂盒的特异性高、制作成本低。



1. 一种重金属荧光免疫检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

1) 样品前处理:将血液样本进行酸化、螯合,然后加入碱性溶液中中和;

2) 抗体荧光微球的制备:将含有修饰基团的荧光微球与重金属特异性抗体按10:(0.01-2)的重量比配成浓度为0.02-10 μ g/mL的荧光微球溶液;

3) 抗原的包被:将重金属的完全抗原包被在T线处,包被浓度为0.1-2.0mg/mL;以包被羊抗鼠抗体的C线作为质控,包被浓度为0.1-2.0mg/mL;

4) 检测:将步骤1)处理后的血液样本与步骤2)得到的荧光微球溶液反应,后加入步骤3)得到的包被有检测线T和质控线C的试剂条上,用荧光检测仪检测,通过标准曲线计算浓度值。

2. 如权利要求1所述的重金属荧光免疫检测方法,其特征在于,步骤1)的具体操作是:将血液样本利用无机酸溶液和EDTA或其衍生物的混合液进行酸化和螯合剂处理,再加入氢氧根离子浓度为0.1-1mol/L的无机碱溶液进行中和,离心,取上清;其中,无机酸溶液的浓度为0.1-1mol/L,EDTA或其衍生物的浓度为0.001-0.05mol/L,加入混合液的量为样本的1-50倍。

3. 如权利要求1所述的重金属荧光免疫检测方法,其特征在于,步骤2)中,所述荧光微球的大小为50-500nm;所述修饰基团为羧基、氨基、巯基、羟基、醛基或酰肼基,荧光微球与重金属抗体的结合方式为共价结合或吸附结合。

4. 如权利要求1所述的重金属荧光免疫检测方法,其特征在于,步骤3)中,所述重金属为铅、镉、铬、砷、汞、镍、钴或铝。

5. 如权利要求1所述的重金属荧光免疫检测方法,其特征在于,步骤3)缓冲液为PBS缓冲液或TRIS缓冲液。

6. 如权利要求1所述的重金属荧光免疫检测方法,其特征在于,步骤3)缓冲液中含有0.1-10%的蔗糖或海藻糖。

7. 如权利要求1所述的重金属荧光免疫检测方法,其特征在于,步骤4)中,标准曲线的绘制方法如下:

I) 标准溶液的配制:将重金属标准样品用小牛血清稀释成系列浓度;

II) 标准溶液的酸化:分别取系列浓度的标准溶液,用10-30倍体积的0.3-0.6mol/L的硝酸或盐酸和0.001-0.01mol/L的EDTA或其衍生物的混合溶液,酸化螯合5-20min,再滴加0.3-0.6mol/L的氢氧化钠或氢氧化钾溶液中和,离心,取上清;

III) 反应:取步骤II)处理后的标准溶液和荧光微球溶液反应2-6min后,加至包被有完全抗原T线和羊抗鼠抗体的C线的试剂条上;

IV) 制作标准曲线:检测T线和C线的荧光强度,以标准溶液的浓度对数为横坐标,以T/C荧光信号强度之比函数的对数为纵坐标,拟合制作双对数Logit-Log标准曲线。

8. 一种重金属荧光免疫层析试剂盒,其特征在于,包括试剂条、荧光微球溶液、样本前处理液I和样本前处理液II;所述试剂条包括底板和复合于底板上的样本垫、硝酸纤维素膜和吸水垫;所述硝酸纤维素膜上通过缓冲液包被有检测线T和质控线C,检测线T包被待检重金属的完全抗原,质控线C上包被有羊抗鼠抗体;所述缓冲液为含有蔗糖或海藻糖的PBS或TRIS缓冲液;

所述荧光微球溶液是由含有修饰基团的荧光微球与重金属特异性抗体按10:(0.01-2)

的重量比配成的浓度为0.02-10 μ g/mL的溶液；

所述样本前处理液I是包含有起酸化作用的硝酸或盐酸和起螯合作用的EDTA及其衍生物的混合溶液；

所述样本前处理溶液II是起中和作用的氢氧化钠或氢氧化钾无机碱溶液。

9.如权利要求8所述的重金属荧光免疫层析试剂盒,其特征在于,所述检测线T的包被浓度为0.1-2mg/mL;所述质控线C的包被浓度为0.1-2mg/mL。

10.如权利要求8所述的重金属荧光免疫层析试剂盒,其特征在于,所述样本垫和吸水垫分别搭接于所述硝酸纤维素膜的两端,且各有0.1-0.5cm的搭接长度。

一种重金属荧光免疫检测方法及其层析试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种体外免疫诊断技术领域,尤其涉及一种重金属荧光免疫检测方法及其层析试剂盒。

背景技术

[0002] 重金属指比重大于4或5的金属,约有45种,包括铜、铅、锌、铁、钴、镍、锰、镉、汞、钨、钼、金、银等。这些重金属中,有一部是生命活动所需要的微量元素,如锰、铜、锌;而有一些是并非生命活动所必须、且部分超过一定量后对人体具有较大毒性,如汞、铅、镉。

[0003] 大部分重金属不能被生物降解,相反却能在食物链的生物放大作用下,成千百倍地聚集,最后进入人体。重金属可能会在人体的某些器官中累积,造成慢性中毒。不同的重金属在进入人体后在不同的体内脏器中累积,进而引发不同的中毒反应。

[0004] 而对于怀孕的妈妈而言,如果体内重金属超标,可引起自发性流产,毒血症和贫血等症状;另外过多的重金属(例如铅),会通过胎盘进入胎儿的身体中,影响骨骼发育和大脑发育,胎儿日后会存在身体缺陷,甚至是大脑智障。这主要是由于铅导致了孩子的DNA发生异变,也就是甲基化模式发生改变,影响孩子的正常发育,而改变后的基因还会因为遗传而传递给后代,导致孩子身体出现伤害。

[0005] 通常认可的重金属分析方法有:紫外分光光度法(UV)、原子吸收法(AAS)、原子荧光法(AFS)、电感耦合等离子体法(ICP)、X荧光光谱(XRF)、电感耦合等离子质谱法(ICP-MS)。这些检测方法均需配套大型的检测仪器,这些仪器虽然能精确检测样本中的重金属含量,但也存在很大的缺点:一方面这些仪器均价格昂贵,仪器维护成本高,加上配套的耗材价格贵,这样重金属检测的综合成本较高,另外一方面检测过程中需要每次定标,操作步骤复杂,不能满足样本大批量检测及现场检测的需求,这些缺点均限制了重金属检测的大规模开展。

[0006] 免疫检测方法是基于抗原、抗体的特异性识别和结合反应的分析方法,通过对抗原或抗体进行标记(酶、荧光物质、放射性同位素标记等),利用标记物的信号放大作用,与现代测试技术相结合,对样品中特定的目标物进行一定的目标物进行定性定量测定。其具有以下几个优点:

[0007] 1) 特异性强、灵敏度高;

[0008] 2) 方法便捷、分析容量大、检测成本低;

[0009] 3) 可提供系列化的产品以及技术,产品可以商业化。

[0010] 免疫检测方法目前已得到了大规模应用,但是主要运用在蛋白类标记物的检测分析过程中,基于蛋白类物质分子量大,相应的抗体通过业已成熟的单克隆抗体或多克隆抗体制备技术容易制备获得;由于重金属物质分子量小,其本身并没有免疫原性,因此重金属的单抗或多抗十分难以获得。近年,研究人员通过把重金属螯合在乙二胺四乙酸二钠(EDTA)或其衍生物上,再将该螯合物和牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin,BSA)或钥孔血蓝蛋白(keyhole limpet hemocyanin,KLH)偶联后再免疫相应的宿主,进而制备出针对

重金属-EDTA或重金属-EDTA螯合物的抗体,为免疫方法检测重金属打下了基础。此法制备的抗体是针对螯合在EDTA或其衍生物的重金属,因此在检测过程中,需要将样本中的重金属先和EDTA或其衍生物螯合后,再在试剂条上进行检测。这种样本的前处理过程是重金属检测区别于常规的蛋白类物质检测的不同之处。

[0011] 中国专利申请CN201510220817.4公开了一种使用免疫方法检测重金属的试剂条制备方法,可以检测重金属,但是该方法是使用的胶体金标记,只能定性,无法定量分析,另外该方法仅能检测水中的重金属,无法检测人血液样本中的重金属含量。中国专利申请CN201510532267.X公开了一种重金属检测试剂条的制备方法,同样该方法也是使用的胶体金标记技术,虽然其使用了胶体金读数仪用于读取信号及输出检测浓度,但限于胶体金技术缺点,这种方法存在灵敏度不足的问题,从其公布的数据看,其检测的范围在ppm级别内;另外该方法针对的是粮食作物等固态物质,对人血液样本的检测同样没有涉及。

发明内容

[0012] 为了克服现有技术的不足,本发明的目的之一在于提供一种灵敏度高、抗干扰性强的重金属荧光免疫检测方法。

[0013] 本发明的目的之二在于提供上述荧光免疫检测层析试剂盒。

[0014] 本发明的目的采用如下技术方案实现:

[0015] 一种重金属荧光免疫检测方法,包括以下步骤:

[0016] 1) 样品前处理:将血液样本用样本前处理液I进行酸化和螯合反应,然后加入样本前处理液II中和,离心,取上清;

[0017] 2) 抗体荧光微球的制备:将含有修饰基团的荧光微球与重金属特异性抗体按10:(0.01-2)的重量比配成浓度为0.02-10 μ g/mL的荧光微球溶液;

[0018] 3) 抗原的包被:将重金属的完全抗原包被在T线处,包被浓度为0.1-2.0mg/mL;以包被羊抗鼠抗体的C线作为质控,包被浓度为0.1-2.0mg/mL;

[0019] 4) 检测:将步骤1)处理后的血液样本与步骤2)得到的荧光微球溶液反应,后加入步骤3)得到的包被有检测线T和质控线C的试剂条上。

[0020] 进一步地,步骤1)的具体操作是:将血液样本利用硝酸或盐酸和EDTA或其衍生物的混合溶液,酸化螯合5-20min,再滴加0.1-1mol/L的氢氧化钠或氢氧化钾溶液中和,离心,取上清。

[0021] 进一步地,步骤2)中,所述荧光微球的大小为50-500nm;所述修饰基团为羧基、氨基、巯基、羟基、醛基或酰肼基,荧光微球与重金属抗体的结合方式为共价结合或吸附结合。

[0022] 进一步地,步骤3)中,所述重金属为铅、镉、铬、砷、汞、镍、钴或铝。

[0023] 进一步地,步骤3)缓冲液为PBS缓冲液或TRIS缓冲液。

[0024] 进一步地,步骤3)缓冲液中含有0.1-10%的蔗糖或海藻糖。

[0025] 进一步地,步骤4)中,标准曲线的绘制方法如下:

[0026] I) 标准溶液的配制:将重金属标准样品用小牛血清稀释成系列浓度;

[0027] II) 标准溶液的酸化:分别取系列浓度的标准溶液,用10-30倍体积的0.3-0.6mol/L的硝酸或盐酸和0.001-0.01mol/L的EDTA或其衍生物的混合溶液,酸化螯合5-20min,再滴加0.3-0.6mol/L的氢氧化钠或氢氧化钾溶液中和,离心,取上清;

[0028] III) 反应:取步骤II)处理后的标准溶液和荧光微球溶液反应2-6min后,加至包被有完全抗原T线和羊抗鼠的C线的试剂条上;

[0029] IV) 检测T线和C线的荧光强度,以标准溶液的浓度对数为横坐标,以T/C荧光信号强度之比函数的对数为纵坐标,拟合制作双对数Logit-Log标准曲线。

[0030] 本发明的目的之二采用如下技术方案实现:

[0031] 一种重金属荧光免疫层析试剂盒,包括荧光微球溶液和试剂条,所述试剂条包括底板和复合于底板上的样本垫、硝酸纤维素膜和吸水垫;所述硝酸纤维素膜上通过缓冲液包被有检测线T和质控线C,检测线T包被待检重金属的完全抗原,质控线C上包被有羊抗鼠抗体;所述缓冲液为含有蔗糖或海藻糖的PBS或TRIS缓冲液;

[0032] 所述荧光微球溶液由含有修饰基团的荧光微球与重金属特异性抗体按10:(0.01-2)的重量比配成的浓度为0.02-10 μ g/mL的溶液。

[0033] 进一步地,所述检测线T的包被浓度为0.1-2mg/mL;所述质控线C的包被浓度为0.1-2mg/mL。

[0034] 进一步地,所述样本垫和吸水垫分别搭接于所述硝酸纤维素膜的两端,且各有0.1-0.5cm的搭接长度。

[0035] 相比现有技术,本发明的有益效果在于:

[0036] 1) 本发明提供的方法,通过有效地前处理过程,有效地解决了重金属离子被血液样本中的细胞和蛋白包埋的问题,从而有效地减少了重金属离子检测假阴性或含量偏低的问题;

[0037] 2) 本发明提供的方法,可利用抗原抗体特异结合的原理检测血液样本中的重金属的含量,具有操作简单,所需成本低,结果准确的优势,适用于采样现场即刻分析,省去标本在实验室检验时的复杂处理程序可快速得到检测结果

附图说明

[0038] 图1为铅离子检测的双对数Logit-Log标准曲线;

[0039] 图2为镉离子检测的双对数Logit-Log标准曲线;

[0040] 图3为铬离子检测的双对数Logit-Log标准曲线;

[0041] 图4为砷离子检测的双对数Logit-Log标准曲线;

[0042] 图5为汞离子检测的双对数Logit-Log标准曲线;

[0043] 图6为镍离子检测的双对数Logit-Log标准曲线;

[0044] 图7为钴离子检测的双对数Logit-Log标准曲线;

[0045] 图8为铝离子检测的双对数Logit-Log标准曲线;

[0046] 图9为血液样本中铅离子含量相关性回归图;

[0047] 图10为血液样本中镉离子含量相关性回归图;

[0048] 图11为血液样本中铬离子含量相关性回归图;

[0049] 图12为血液样本中砷离子含量相关性回归图;

[0050] 图13为血液样本中汞离子含量相关性回归图;

[0051] 图14为血液样本中镍离子含量相关性回归图;

[0052] 图15为血液样本中钴离子含量相关性回归图;

[0053] 图16为血液样本中铝离子含量相关性回归图；

[0054] 图17为本发明的试剂盒的结构示意图；

[0055] 图中,各附图标记:1、底板;2、硝酸纤维素膜;3、样本垫;4、吸水垫;5、荧光微球溶液;6、样本前处理液I;7、样本前处理液II。

具体实施方式

[0056] 下面,结合附图以及具体实施方式,对本发明做进一步描述,需要说明的是,在不相冲突的前提下,以下描述的各实施例之间或各技术特征之间可以任意组合形成新的实施例。

[0057] 本发明提供一种灵敏度高、抗干扰性强的重金属荧光免疫检测方法。可适用于包括铅、镉、铬、砷、汞、镍、钴和铝等金属在内的检测。

[0058] 本发明提供一种重金属荧光免疫检测方法,包括以下步骤:

[0059] 1) 样品前处理:将血液样本进行酸化、螯合中和后再离心,取上清;

[0060] 2) 抗体荧光微球的制备:将含有修饰基团的荧光微球与重金属特异性抗体按10:(0.01-2)的重量比配成浓度为0.02-10 μ g/mL的荧光微球溶液;

[0061] 3) 抗原的包被:将重金属的完全抗原包被,包被浓度为0.1-2.0mg/mL;以包被羊抗鼠抗体的孔板作为对照;

[0062] 4) 检测:将步骤1)处理后的血液样本与步骤2)得到的荧光微球溶液反应,后加入步骤3)得到的包被有检测线T和质控线C的试剂条上,用荧光检测仪检测,通过标准曲线计算浓度值。

[0063] 步骤4)中,血液样本中的重金属抗原和包被在检测线T的重金属完全抗原竞争结合荧光微球-重金属抗体复合物,多余的荧光微球与质控线C的羊抗鼠抗体结合,得到检测好的试剂条,用荧光检测仪检测,通过标准曲线计算浓度值。

[0064] 该方法能有效地使血液样本中的重金属离子释放出来,从而能有效地避免假阴性或检测含量偏低。该方法的特异性高、操作简单,所需成本低,适用于即时现场分析。

[0065] 本发明同时还提供一种重金属荧光免疫层析试剂盒,如图17所示,包括样本前处理液I、样本前处理液II、荧光微球溶液5和试剂条,所述试剂条包括底板1和复合于底板上的样本垫3、硝酸纤维素膜2和吸水垫4;所述硝酸纤维素膜上通过缓冲液包被有检测线T和质控线C,检测线T包被待检重金属的完全抗原,质控线C上包被有羊抗鼠抗体;所述缓冲液为含有蔗糖或海藻糖的PBS或TRIS缓冲液;

[0066] 所述荧光微球溶液由含有修饰基团的荧光微球与重金属特异性抗体按10:(0.01-2)的重量比配成的浓度为0.02-10 μ g/mL的溶液。

[0067] 该试剂盒的特异性高、制作成本低,适用于即时现场分析。

[0068] 实施例1:抗体荧光微球的制备

[0069] 以铅为例,取1mL羧基修饰的荧光微球(固含量为1%,粒径为200nm左右)于9mL MES buffer (0.05M, pH6.0)中,分别加入10mg/mL的EDC溶液和10mg/mL的sulfo-NHS溶液各1mL,室温下搅拌反应15min,4 $^{\circ}$ C以14000rpm离心30分钟后去上清,将沉降在底部的荧光微球用10mL硼砂-硼酸缓冲溶液buffer (0.05M, pH8.0)悬浮,超声分散均匀。

[0070] 1mg抗铅-EDTA的抗体用1mL硼砂-硼酸缓冲溶液buffer (0.05M, pH8.0)稀释后加

入到分散均匀的荧光微球中(微球与抗体的质量比为:10mg:1mg),室温下搅拌反应3小时;然后加入(2ml) gly buffer (0.5M, pH8.0) 室温下搅拌反应30分钟,再加入封闭剂(BSA, 50mg/mL) 封闭30min,封闭过后, (4℃以) 14000rpm离心30分钟,去上清,沉淀用缓冲液(0.1M Gly buffer, pH7.2-7.4) 悬浮,超声分散均匀后,再加入缓冲液(0.1M Gly buffer, pH7.2-7.4),使荧光微球的终浓度为2 μ g/mL。制备好的荧光微球2-8℃保存。

[0071] 镉、铬、砷、汞、镍、钴和铝的抗重金属-EDTA的抗体与荧光微反应制备抗体荧光微球的方法同样。

[0072] 实施例2:抗原的包被

[0073] 用PBS buffer (10mM, 含3%蔗糖) 分别稀释铅的完全抗原和羊抗鼠抗体;其中铅的完全抗原的结构式为Pb-EDTA-BSA;其中PBS buffer (10mM, 含3%蔗糖) 含有0.1-5.0%的BSA。

[0074] 实施例3:荧光层析试剂条的制备

[0075] 使用Bio-Dot 3060划膜仪以1.0 μ L/cm的喷量,线宽1.0mm,分别将铅完全抗原和羊抗鼠抗体分别划于硝酸纤维素膜中间的检测区(T区,靠近样品垫处)和质控区(C区,靠近吸水纸处),检测线和质控线相距5mm。其中T区重金属铅完全抗原的包被浓度为0.5mg/mL, C区羊抗鼠抗体的包被浓度为1.0mg/mL。

[0076] 将硝酸纤维素膜粘贴于底板上,在硝酸纤维素膜的左右两端分别搭接0.3cm的样本垫和吸水垫,套上设有加样孔和检测口的卡壳,其中加样孔对应样本垫,检测口对应硝酸纤维素膜。

[0077] 镉、铬、砷、汞、镍、钴和铝的荧光层析试剂条的方法同实施例3相似。

[0078] 实施例4:标准曲线的制备

[0079] 用小牛血清稀释重金属铅的标准品,浓度分别为:10、20、50、100、500、1000、2000ng/mL,以小牛血清作为0ng/mL,分别取20 μ L标准品与1mL含有1%硝和0.01M/L的EDTA混合溶液酸化螯合反应5min后,再用5%的氢氧化钠溶液中和,离心;取50 μ L上清和50 μ L荧光微球反应5min后,再取80 μ L加入到上述实施例3制备的荧光层析试剂条上,反应15min,通过荧光读数仪,读取T/C信号值,每个标准品浓度检测三次,取信号均值。以浓度对数为横坐标,以均值的函数对数为纵坐标,拟合制作双对数Logit-Log标准曲线。铅离子的标准曲线如图1所示。

[0080] 实施例4的方法同样适用于镉、铬、砷、汞、镍、钴和铝的标准曲线的制作。具体操作如下所示:

[0081] 用小牛血清稀释重金属镉的标准品,浓度分别为:0.2、1、5、10、50、100、200ng/mL,以小牛血清作为0ng/mL,分别取20 μ L标准品与1mL含有0.5mol/L硝酸和0.01mol/L的EDTA混合溶液酸化螯合反应5min后,再用0.5mol/L的氢氧化钠溶液中和,离心;取50 μ L上清和50 μ L荧光微球反应5min后,再取80 μ L加入到上述实施例3制备的荧光层析试剂条上,反应15min,通过荧光读数仪,读取T/C信号值,每个标准品浓度检测三次,取信号均值。以浓度对数为横坐标,以均值的函数对数为纵坐标,拟合制作双对数Logit-Log标准曲线。标准曲线如图2所示;

[0082] 用小牛血清稀释重金属铬的标准品,浓度分别为:0.1、0.5、1、10、50、100、200ng/mL,以小牛血清作为0ng/mL,分别取20 μ L标准品与1mL含有0.5mol/L硝酸和0.01mol/L的

EDTA混合溶液酸化螯合反应5min后,再用0.5mol/L的氢氧化钠溶液中和,离心;取50 μ L上清和50 μ L荧光微球反应5min后,再取80 μ L加入到上述实施例3制备的荧光层析试剂条上,反应15min,通过荧光读数仪,读取T/C信号值,每个标准品浓度检测三次,取信号均值。以浓度对数为横坐标,以T/C函数的对数为纵坐标,拟合制作双对数Logit-Log标准曲线。标准曲线如图3所示。

[0083] 用小牛血清稀释重金属砷的标准品,浓度分别为:1、5、10、50、100、200、500ng/mL,以小牛血清作为0ng/mL,分别取20 μ L标准品与1mL含有0.5mol/L硝酸和0.01mol/L的EDTA混合溶液酸化螯合反应5min后,再用0.5mol/L的氢氧化钠溶液中和,离心;取50 μ L上清和50 μ L荧光微球反应5min后,再取80 μ L加入到上述实施例3制备的荧光层析试剂条上,反应15min,通过荧光读数仪,读取T/C信号值,每个标准品浓度检测三次,取信号均值。以浓度对数为横坐标,以T/C函数的对数为纵坐标,拟合制作双对数Logit-Log标准曲线。标准曲线如图4所示;

[0084] 用小牛血清稀释重金属汞的标准品,浓度分别为:5、10、50、100、200、500、1000ng/mL,以小牛血清作为0ng/mL,分别取20 μ L标准品与1mL含有0.5mol/L硝酸和0.01mol/L的EDTA混合溶液酸化螯合反应5min后,再用0.5mol/L的氢氧化钠溶液中和,离心;取50 μ L上清和50 μ L荧光微球反应5min后,再取80 μ L加入到上述实施例3制备的荧光层析试剂条上,反应15min,通过荧光读数仪,读取T/C信号值,每个标准品浓度检测三次,取信号均值。以浓度对数为横坐标,以T/C函数的对数为纵坐标,拟合制作双对数Logit-Log标准曲线。标准曲线如图5所示;

[0085] 用小牛血清稀释重金属镍的标准品,浓度分别为:0.1、0.4、0.8、1.6、3.2、6.4、12.8ng/mL,以小牛血清作为0ng/mL,分别取20 μ L标准品与1mL含有0.5mol/L硝酸和0.01mol/L的EDTA混合溶液酸化螯合反应5min后,再用0.5mol/L的氢氧化钠溶液中和,离心;取50 μ L上清和50 μ L荧光微球反应5min后,再取80 μ L加入到上述实施例3制备的荧光层析试剂条上,反应15min,通过荧光读数仪,读取T/C信号值,每个标准品浓度检测三次,取信号均值。以浓度对数为横坐标,以T/C函数的对数为纵坐标,拟合制作双对数Logit-Log标准曲线。标准曲线如图6所示;

[0086] 用小牛血清稀释重金属钴的标准品,浓度分别为:0.2、0.4、0.8、1.6、3.2、6.4、12.8ng/mL,以小牛血清作为0ng/mL,分别取20 μ L标准品与1mL含有0.5mol/L硝酸和0.01mol/L的EDTA混合溶液酸化螯合反应5min后,再用0.5mol/L的氢氧化钠溶液中和,离心;取50 μ L上清和50 μ L荧光微球反应5min后,再取80 μ L加入到上述实施例3制备的荧光层析试剂条上,反应15min,通过荧光读数仪,读取T/C信号值,每个标准品浓度检测三次,取信号均值。以浓度对数为横坐标,以T/C函数的对数为纵坐标,拟合制作双对数Logit-Log标准曲线。标准曲线如图7所示;

[0087] 用小牛血清稀释重金属铝的标准品,浓度分别为:2000、4000、8000、16000、32000、64000、128000ng/mL,以小牛血清作为0ng/mL,分别取20 μ L标准品与1mL含有0.5mol/L硝酸和0.01mol/L的EDTA混合溶液酸化螯合反应5min后,再用0.5mol/L的氢氧化钠溶液中和,离心;取50 μ L上清和50 μ L荧光微球反应5min后,再取80 μ L加入到上述实施例3制备的荧光层析试剂条上,反应15min,通过荧光读数仪,读取T/C信号值,每个标准品浓度检测三次,取信号均值。以浓度对数为横坐标,以T/C函数的对数为纵坐标,拟合制作双对数Logit-Log标准曲线。标准曲线如图8所示。

[0088] 实施例5:血液样本的检测

[0089] 1) 前处理:

[0090] 取确定体积的血液样本,使用10倍体积的含有0.5mol/L硝酸0.01mol/L的EDTA混合溶液酸化、螯合反应5min后,再用0.5mol/L的氢氧化钠溶液中和至pH为6.5-7.5。

[0091] 2) 与抗体荧光微球溶液反应

[0092] 取100μL步骤1)处理后的血液样本和分别与200μL实施例3得到的抗体荧光微球,反应5min,然后取80μL反应后的溶液加至试剂条的加样孔中,反应15min,通过荧光检测仪进行读数,T/C值代入标准曲线即可换算出样本的浓度值,作为试验组。

[0093] 3) 采用原子吸收法,分别对实施例5的血液样本进行检测,作为对照组,进行结果比对,结果如下表所示:

[0094] 表1血液样本的含铅量检测结果

序号	试验组	对照组	序号	试验组	对照组	序号	试验组	对照组	序号	试验组	对照组
1	67.2	52.2	9	89.2	93.4	17	89.3	93.2	25	69.2	70.4
2	167.9	170	10	287.3	268.1	18	63.2	68.3	26	367.2	332.9
3	28.3	29.4	11	60.1	61.5	19	28.9	35.5	27	62.1	65.7
4	66	69.2	12	58.3	61.2	20	25	29.2	28	72.3	79.6
5	52.2	42.7	13	119.4	126.2	21	68.1	69.2	29	38.4	41.6
6	99.1	109.1	14	93.2	97.4	22	178.9	161.8	30	55.5	58.9
7	73	79.1	15	65.9	72.1	23	67.2	73.8	31	29	29
8	25.3	30.2	16	18.2	21.9	24	28.3	20.3	32	73.4	78.1

[0096] 以原子吸收方法检测的含铅量结果为横坐标,以试剂条检测方法检测的含铅量结果为纵坐标,绘制样本回归曲线。如图9所示。由图示知相关系数 $R^2=0.9907$,满足临床检测的需要。

[0097] 表2血液样本的含镉量检测结果

序号	试验组	对照组	序号	试验组	对照组	序号	试验组	对照组	序号	试验组	对照组
1	0.25	0.71	9	0.71	0.73	17	0.88	0.93	25	0.55	0.91
2	0.27	0.33	10	0.66	0.69	18	0.32	0.33	26	0.69	1.31
3	0.30	0.77	11	0.64	1.01	19	0.72	0.99	27	0.54	0.99
4	2.53	3.01	12	0.85	1.06	20	0.72	1.20	28	2.77	2.57
5	0.42	0.50	13	0.72	1.06	21	1.31	1.47	29	0.29	0.54
6	0.26	0.51	14	3.99	4.32	22	0.55	0.83	30	0.70	0.74
7	2.18	2.61	15	0.77	0.79	23	0.57	0.44	31	0.58	0.94
8	1.00	1.09	16	0.40	0.69	24	0.43	0.81	32	0.89	1.17

[0100] 以原子吸收方法检测的含镉量结果为横坐标,以试剂条检测方法检测的含镉量结果为纵坐标,绘制样本回归曲线。如图10所示。由图示知相关系数 $R^2=0.9446$,满足临床检

测的需要。

[0101] 表3血液样本的含铬量检测结果

序号	试验组	对照组	序号	试验组	对照组	序号	试验组	对照组	序号	试验组	对照组
1	0.24	0.69	9	0.61	0.73	17	0.67	0.93	25	0.43	0.91
2	0.25	0.30	10	0.66	0.69	18	0.29	0.33	26	0.69	1.00
3	0.27	0.69	11	0.64	1.01	19	0.72	0.78	27	0.54	0.99
4	2.46	2.66	12	0.64	1.06	20	0.72	1.20	28	2.20	2.57
5	0.39	0.43	13	0.72	1.02	21	1.31	1.40	29	0.29	0.54
6	0.27	0.52	14	3.26	3.56	22	0.46	0.83	30	0.70	0.74
7	1.73	1.87	15	0.75	0.79	23	0.34	0.44	31	0.53	0.94
8	0.52	0.59	16	0.40	0.78	24	0.38	0.81	32	0.70	1.17

[0103] 以原子吸收方法检测的含铬量结果为横坐标,以试剂条检测方法检测的含铬量结果为纵坐标,绘制样本回归曲线。如图11所示。由图示知相关系数 $R^2=0.9467$,满足临床检测的需要。

[0104] 表4血液样本的含砷量检测结果

序号	试验组	对照组	序号	试验组	对照组	序号	试验组	对照组	序号	试验组	对照组
1	7.75	5.45	9	7.47	8.80	17	5.49	6.85	25	5.49	6.85
2	7.88	5.17	10	2.74	3.41	18	4.89	8.21	26	4.89	8.21
3	2.66	3.01	11	10.71	6.99	19	2.45	3.83	27	2.45	3.83
4	9.44	7.41	12	8.39	7.38	20	2.69	2.18	28	2.69	2.18
5	3.30	4.45	13	5.63	1.89	21	15.86	19.42	29	15.86	19.42
6	53.67	59.02	14	7.85	10.55	22	5.87	1.81	30	5.87	1.81
7	2.37	7.86	15	23.75	26.24	23	9.82	10.87	31	9.82	10.87
8	7.37	6.33	16	7.25	6.09	24	8.00	5.68	32	8.00	5.68

[0106] 以原子吸收方法检测的含砷量结果为横坐标,以试剂条检测方法检测的含砷量结果为纵坐标,绘制样本回归曲线。如图12所示。由图示知相关系数 $R^2=0.9446$,满足临床检测的需要。

[0107] 表5血液样本的含汞量检测结果

[0108]

序号	试验组	对照组	序号	试验组	对照组	序号	试验组	对照组	序号	试验组	对照组
1	8.66	9.48	9	6.57	8.28	17	2.62	1.57	25	10.17	9.74
2	8.55	4.88	10	5.78	6.33	18	2.88	1.12	26	4.30	4.93
3	2.51	3.62	11	7.90	5.90	19	8.00	5.47	27	4.54	5.87
4	8.64	5.88	12	7.37	6.40	20	2.74	2.61	28	6.00	3.46
5	4.92	3.99	13	6.64	7.50	21	34.96	30.26	29	6.06	8.37
6	9.69	6.04	14	6.34	3.72	22	6.55	5.41	30	30.72	33.60
7	20.56	17.61	15	7.40	8.20	23	2.21	1.38	31	2.97	2.87
8	1.42	1.83	16	8.40	6.31	24	1.64	6.63	32	6.52	4.59

[0109] 以原子吸收方法检测的含汞量结果为横坐标,以试剂条检测方法检测含汞量结果为纵坐标,绘制样本回归曲线。如图13所示。由图示知相关系数 $R^2=0.9191$,满足临床检测的需要。

[0110] 表6血液样本的含镍量检测结果

[0111]

序号	试验组	对照组	序号	试验组	对照组	序号	试验组	对照组	序号	试验组	对照组
1	0.31	0.23	9	0.50	0.86	17	0.27	0.48	25	0.24	0.24
2	0.50	0.69	10	0.22	0.37	18	0.39	0.54	26	0.50	0.54
3	1.27	1.54	11	0.33	0.43	19	5.45	5.00	27	3.48	3.06
4	0.39	0.42	12	0.20	0.40	20	0.38	0.54	28	0.22	0.26
5	0.48	0.29	13	1.25	1.37	21	0.46	0.52	29	0.24	0.37
6	3.48	3.71	14	0.31	0.37	22	0.39	0.40	30	0.31	0.45
7	0.44	0.46	15	0.26	0.45	23	0.34	0.36	31	0.43	0.59
8	0.42	0.51	16	0.32	0.39	24	0.44	0.27	32	0.32	0.43

[0112] 以原子吸收方法检测的含镍量结果为横坐标,以试剂条检测方法检测的含镍量结果为纵坐标,绘制样本回归曲线。如图14所示。由图示知相关系数 $R^2=0.9818$,满足临床检测的需要。

[0113] 表7血液样本的含钴量检测结果

[0114]

序号	试验组	对照组	序号	试验组	对照组	序号	试验组	对照组	序号	试验组	对照组

[0115]

1	0.22	0.23	9	0.27	0.29	17	0.45	0.56	25	0.37	0.46
2	0.34	0.46	10	0.34	0.45	18	0.33	0.49	26	2.36	2.53
3	0.25	0.43	11	3.43	3.62	19	0.36	0.46	27	0.24	0.32
4	1.47	1.63	12	0.47	0.49	20	0.47	0.50	28	0.49	0.52
5	0.29	0.31	13	0.26	0.35	21	0.30	0.44	29	0.50	0.62
6	0.25	0.44	14	0.20	0.22	22	0.25	0.34	30	1.23	1.42
7	0.36	0.48	15	0.47	0.54	23	0.49	0.63	31	0.37	0.54
8	0.21	0.30	16	0.27	0.38	24	0.45	0.58	32	0.23	0.40

[0116] 以原子吸收方法检测的含钴量结果为横坐标,以试剂条检测方法检测的含钴量结果为纵坐标,绘制样本回归曲线。如图15所示。由图示知相关系数 $R^2=0.9946$,满足临床检测的需要。

[0117] 表8血液样本的含铝量检测结果

[0118]

序号	试验组	对照组	序号	试验组	对照组
1	4368.5	4414.3	17	3782.1	3986.2
2	3531.5	3734.8	18	2990.6	3215.5
3	3336.1	3339.2	19	1756.2	1858.1
4	6130.5	6516.1	20	2145.1	2490.7
5	5117.2	5352.5	21	6056.9	6349.9
6	3488.3	3770.8	22	5353.6	5632.1
7	1111.3	1403.9	23	10893.1	13236.7
8	6754.3	7134.0	24	2248.3	2716.4
9	4859.7	4985.1	25	6532.2	6584.3
10	9620.5	10084.5	26	4495.2	4815.8
11	2999.7	3368.1	27	5197.3	5441.6
12	5266.1	5763.5	28	37070.8	40033.9
13	3159.2	3638.6	29	5829.9	6156.2
14	3306.7	3551.1	30	5655.4	5788.5
15	15375.2	15451.8	31	3634.3	3683.2
16	4842.2	5063.4	32	951.5	1028.8

[0119] 以原子吸收方法检测结果的含铝量为横坐标,以试剂条检测方法检测的含铝量结果为纵坐标,绘制样本回归曲线。如图16所示。由图示知相关系数 $R^2=0.9969$,满足临床检测的需要。

[0120] 性能检测与效果评价

[0121] 1、检测铅的试剂盒的精密性试验

[0122] 将实施例3制得的检测铅的试剂盒,分别测试浓度分别为50ng/mL和1000ng/mL的重金属铅的两个标准品,每个浓度分别检测10次,具体检测值如下表所示:

[0123] 表9检测铅的试剂盒的精密性试验

[0124]

序号	1	2	3	4	5	Mean	SD	CV
50ng/mL	61.1	52.4	47.2	48.2	49.4	53.52	5.612	10.49%
	6	7	8	9	10			
	53.3	57	52	49.3	65.3			
序号	1	2	3	4	5	Mean	SD	CV
1000ng/mL	1134.8	1082.9	1130.8	1115.6	1058.5	1060.6	67.72	6.39%
	6	7	8	9	10			
	1139.1	963.8	1017.2	1012.9	950.1			

[0125] 检测铅的试剂盒的精密密度为10.49%和6.39%，均在15%以下，满足POCT检测的需求。

[0126] 2. 检测镉的试剂盒的精密性试验

[0127] 将实施例3制得的检测镉的试剂盒，分别测试浓度分别为10ng/mL和100ng/mL的重金属镉的两个标准品，每个浓度分别检测10次，具体检测值如下表所示：

[0128] 表10检测镉的试剂盒的精密性试验

[0129]

序号	1	2	3	4	5	Mean	SD	CV
10ng/mL	10.2	9.5	9.0	11.9	12.9	10.71	1.1571	10.80%
	6	7	8	9	10			
	11.2	10.5	11.2	9.9	10.8			
序号	1	2	3	4	5	Mean	SD	CV
100ng/mL	105.2	93.9	95.9	93.2	99.1	97.46	4.8952	5.02%

[0130] 检测镉的试剂盒的精密密度为10.80%和5.02%，均在15%以下，满足POCT检测的需求。

[0131] 3. 检测铬的试剂盒的精密性试验

[0132] 将实施例3制得的检测铬的试剂盒，分别测试浓度分别为10ng/mL和100ng/mL的重金属铬的两个标准品，每个浓度分别检测10次，具体检测值如下表所示：

[0133] 表11检测铬的试剂盒的精密性试验

[0134]

序号	1	2	3	4	5	Mean	SD	CV
10ng/mL	10.3	9.6	8.8	12.5	11.7	10.66	1.0883	10.21%
	6	7	8	9	10			
	10.2	11.8	11	9.7	11			
序号	1	2	3	4	5	Mean	SD	CV
100ng/mL	104.1	92.1	96.4	92.8	98.2	97.91	5.37875	5.49%
	6	7	8	9	10			
	106.5	94.2	98.2	105.4	91.2			

[0135] 检测铬的试剂盒的精密密度为10.21%和5.49%，均在15%以下，满足POCT检测的需求。

[0136] 4. 检测砷的试剂盒的精密性试验

[0137] 将实施例3制得的检测砷的试剂盒,分别测试浓度分别为20ng/mL和500ng/mL的重金属砷的两个标准品,每个浓度分别检测10次,具体检测值如下表所示:

[0138] 表12检测砷的试剂盒的精密性试验

[0139]	序号	1	2	3	4	5	Mean	SD	CV
	20ng/mL	19.3	19.4	24.3	22.9	22.1	22.3	1.73032	7.76%
		6	7	8	9	10			
		22.2	24	21.4	23.2	24.2			
	序号	1	2	3	4	5	Mean	SD	CV
	500ng/mL	525.2	477.7	549.4	464.3	492.4	501.98	28.842	5.75%
		6	7	8	9	10			
		494.8	504.3	546	501.6	464.1			

[0140] 即检测砷的试剂盒的精密度为7.76%和5.75%,均在15%以下,满足POCT检测的需求。

[0141] 5.检测汞的试剂盒的精密性试验

[0142] 将实施例3制得的检测汞的试剂盒,分别测试浓度分别为20ng/mL和500ng/mL的重金属汞的两个标准品,每个浓度分别检测10次,具体检测值如下表所示:

[0143] 表13检测汞的试剂盒的精密性试验

[0144]	序号	1	2	3	4	5	Mean	SD	CV
	20ng/mL	22.9	21.5	19.2	18.7	24.4	20.72	1.82855	8.83%
		6	7	8	9	10			
		19.6	18.5	21.1	19.7	21.6			
	序号	1	2	3	4	5	Mean	SD	CV
	500ng/mL	450	452.2	456.9	488.9	504.2	484.71	26.8358	5.54%
		6	7	8	9	10			
		500.9	528.5	514.8	491.3	459.4			

[0145] 即检测汞的试剂盒的精密度为8.83%和5.54%,均在15%以下,满足POCT检测的需求。

[0146] 6.检测镍的试剂盒的精密性试验

[0147] 将实施例3制得的检测镍的试剂盒,分别测试浓度分别为1ng/mL和10ng/mL的重金属镍的两个标准品,每个浓度分别检测10次,具体检测值如下表所示:

[0148] 表14检测镍的试剂盒的精密性试验

[0149]

序号	1	2	3	4	5	Mean	SD	CV
1ng/mL	0.84	0.92	0.81	1.09	1.08	0.954	0.12126	12.71%
	6	7	8	9	10			
	1.07	0.81	1.02	0.81	1.09			
序号	1	2	3	4	5	Mean	SD	CV
10ng/mL	9.04	9.44	10.39	10.33	9.76	9.718	0.54396	5.60%
	6	7	8	9	10			
	10.19	9.61	9.01	9.05	10.36			

[0150] 即检测镍的试剂盒的精密密度为12.71%和5.60%，均在15%以下，满足POCT检测的需求。

[0151] 7. 检测钴的试剂盒的精密性试验

[0152] 将实施例3制得的检测钴的试剂盒，分别测试浓度分别为1ng/mL和10ng/mL的重金属钴的两个标准品，每个浓度分别检测10次，具体检测值如下表所示：

[0153] 表15检测钴的试剂盒的精密性试验

[0154]

序号	1	2	3	4	5	Mean	SD	CV
1ng/mL	0.96	1.13	0.89	1.01	1.17	1.055	0.09952	9.43%
	6	7	8	9	10			
	1.08	1.07	1.14	1.18	0.92			
序号	1	2	3	4	5	Mean	SD	CV
10ng/mL	9.21	10.64	10.94	8.54	11.15	9.652	1.11202	11.52%
	6	7	8	9	10			
	11.21	8.59	8.87	8.78	8.59			

[0156] 即检测钴的试剂盒的精密密度为9.43%和11.52%，均在15%以下，满足POCT检测的需求。

[0157] 8. 检测铝的试剂盒的精密性试验

[0158] 将实施例3制得的检测铝的试剂盒，分别测试浓度分别为8000ng/mL和32000ng/mL的铝的两个标准品，每个浓度分别检测10次，具体检测值如下表所示：

[0159] 表2检测铝的试剂盒的精密性试验

[0160]

序号	1	2	3	4	5	Mean	SD	CV
8000 ng/mL	9318.7	8841.9	7578.9	7532.9	7952.4	8459.75	579.389	6.85%
	6	7	8	9	10			
	8883.2	8988.5	8747.2	8489.8	8264			
序号	1	2	3	4	5	Mean	SD	CV
32000 ng/mL	33921.2	31518.2	36148.7	31753.4	33219.2	35393.4	2665.73	7.53%
	6	7	8	9	10			
	37156.1	39722.8	36672.9	38813	35008.8			

[0161] 即检测钴的试剂盒的精密度为6.85%和7.53%，均在15%以下，满足POCT检测的需求。

[0162] 上述实施方式仅为本发明的优选实施方式，不能以此来限定本发明保护的范围，本领域的技术人员在本发明的基础上所做的任何非实质性的变化及替换均属于本发明所要求保护的范围。

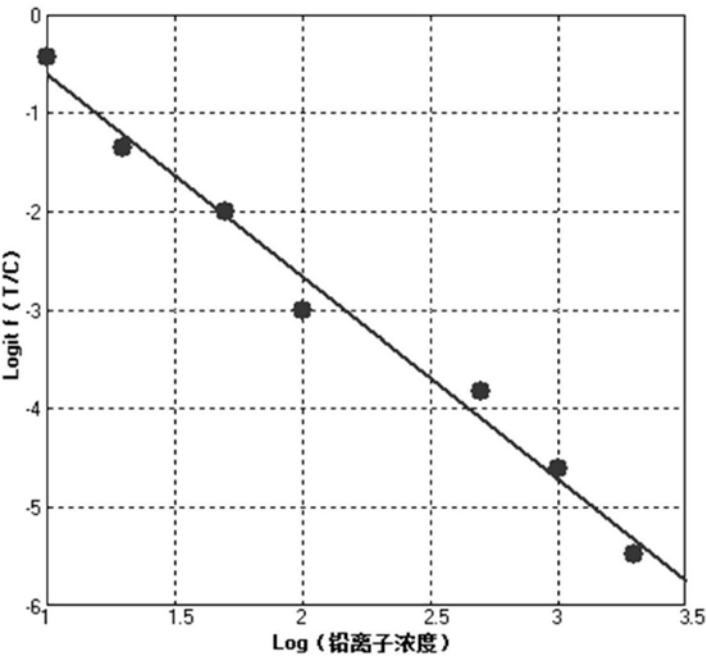


图1

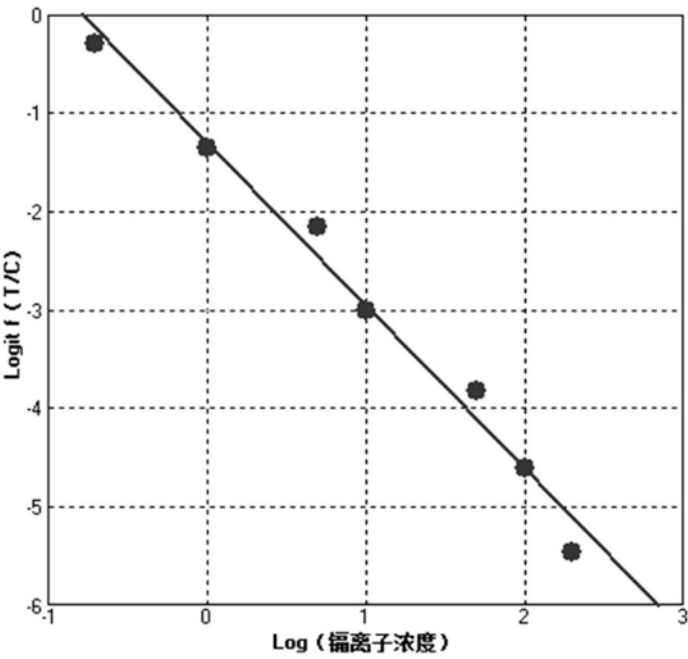


图2

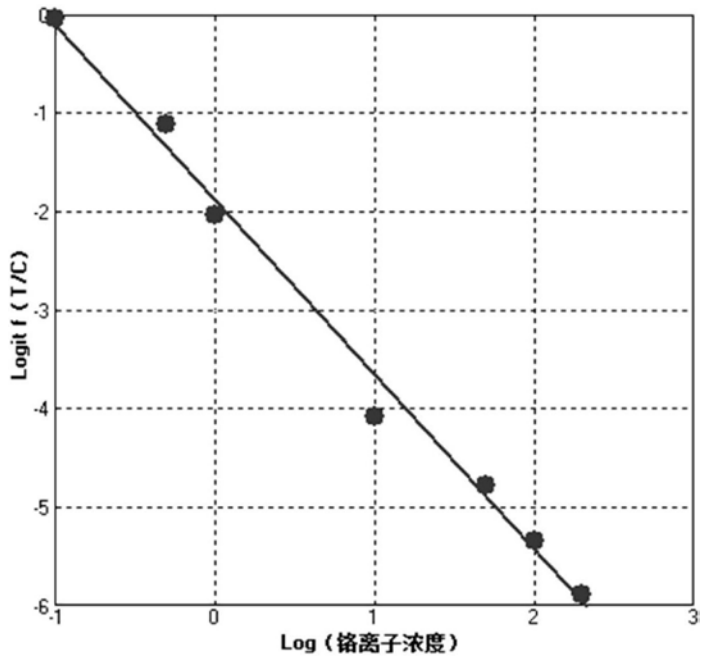


图3

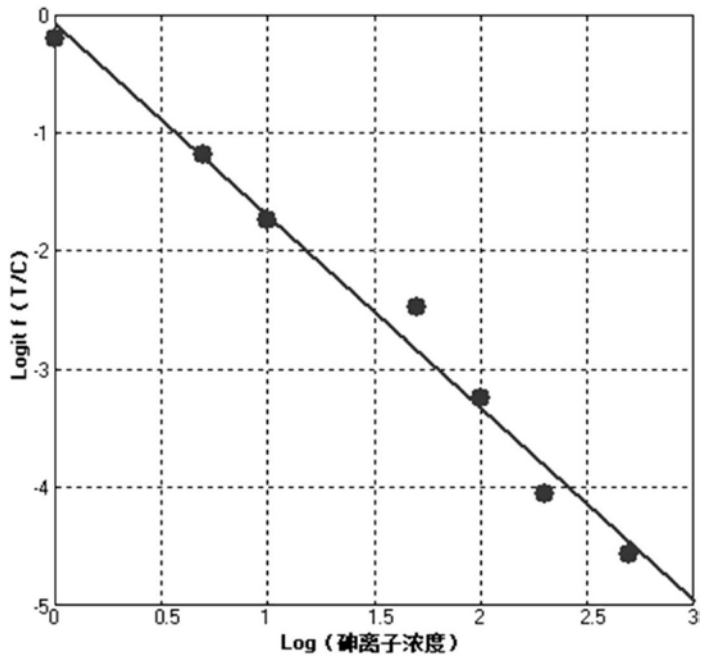


图4

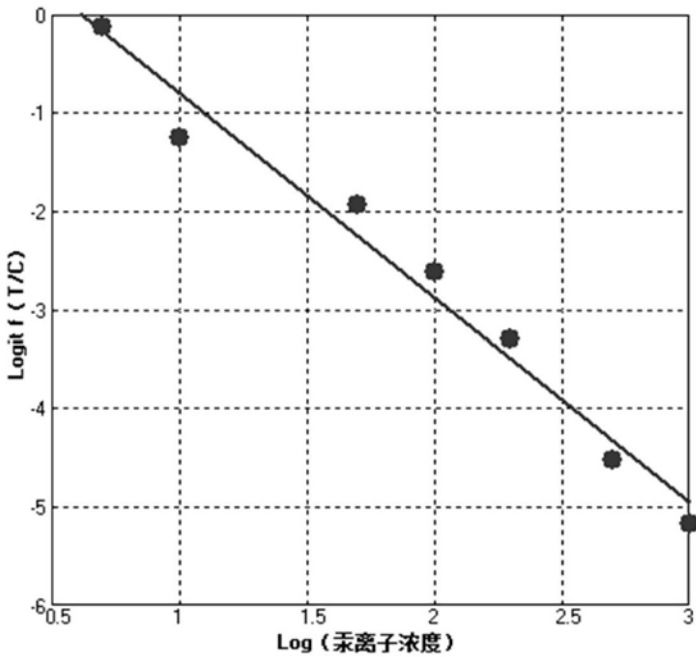


图5

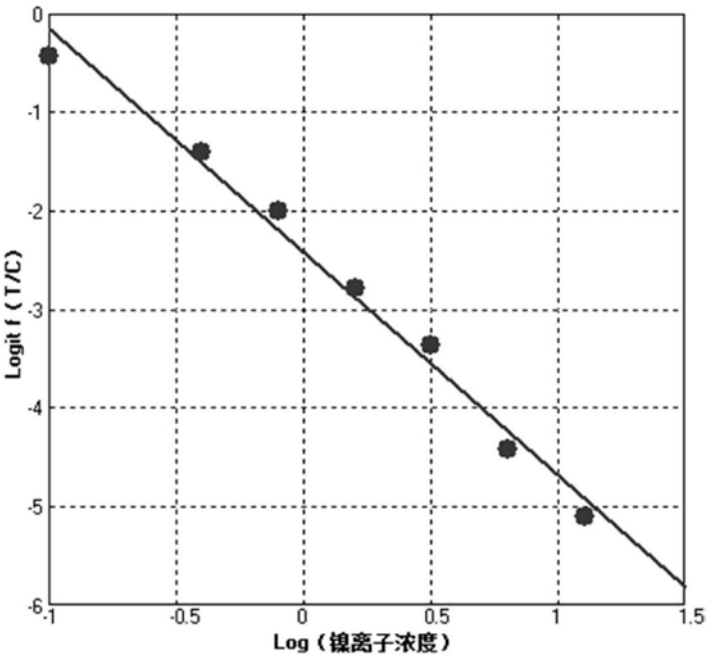


图6

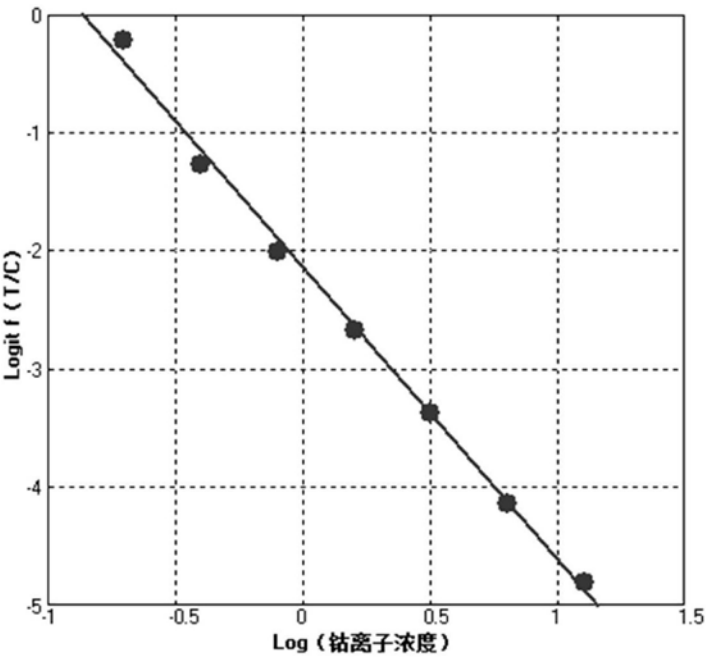


图7

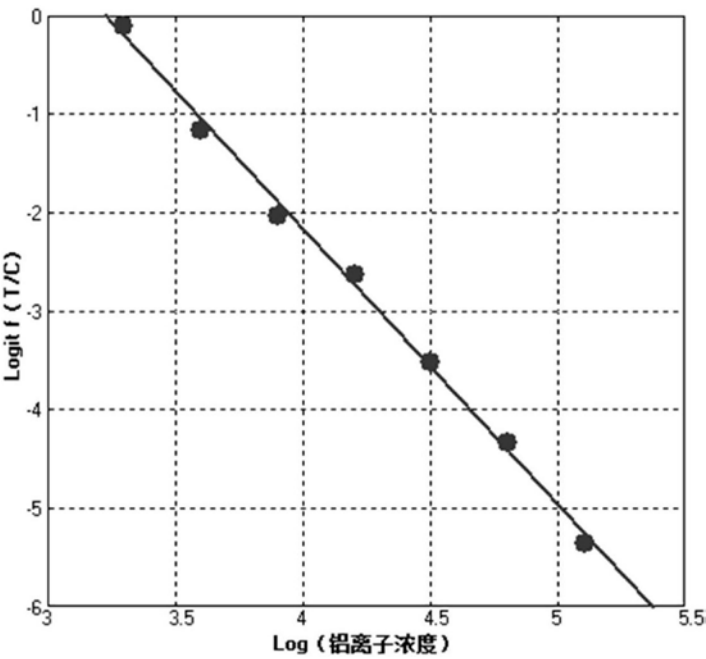


图8

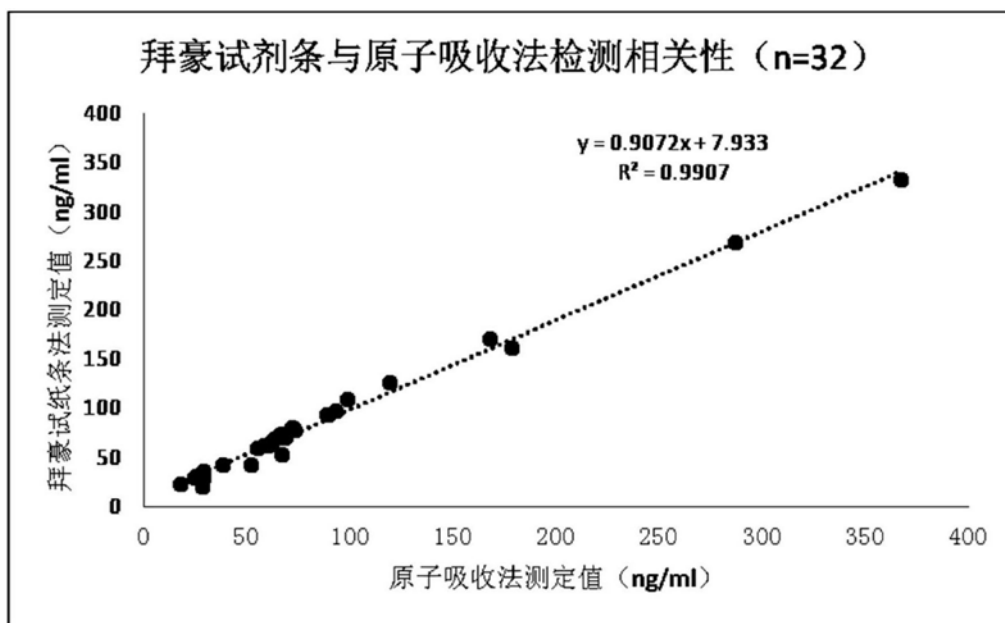


图9

拜豪试剂条与原子吸收法检测相关性 (n=32)

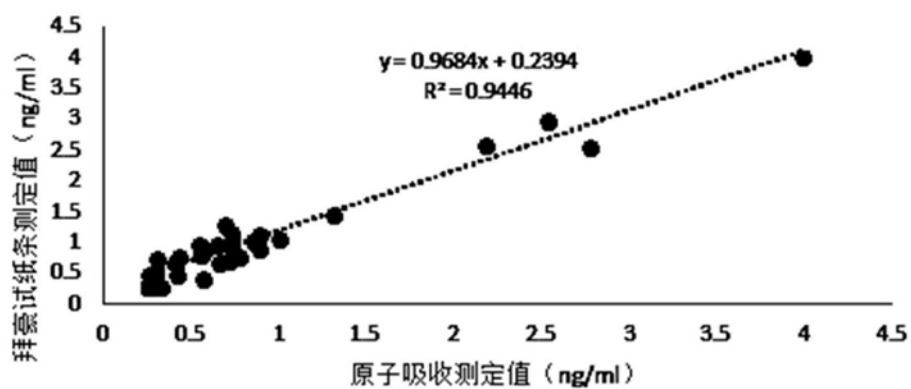


图10

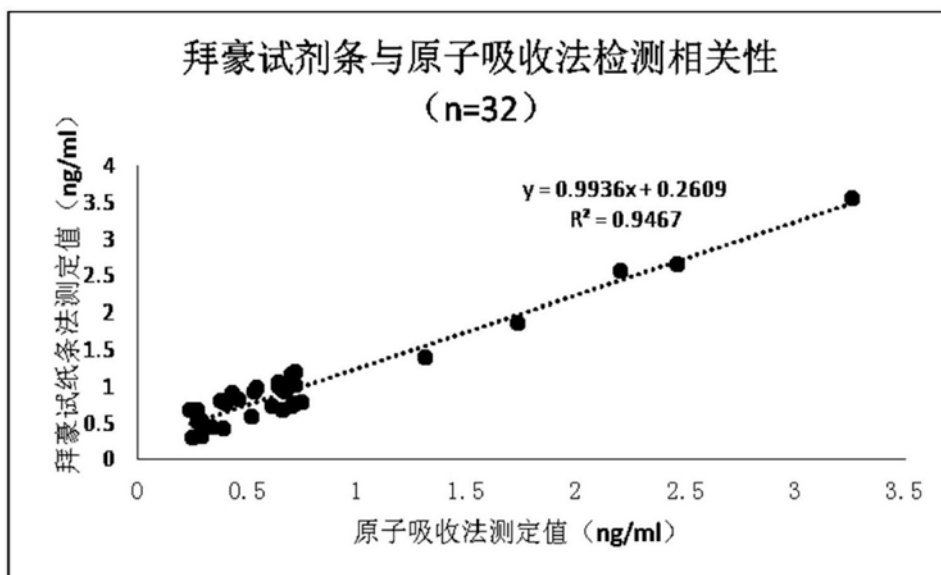


图11

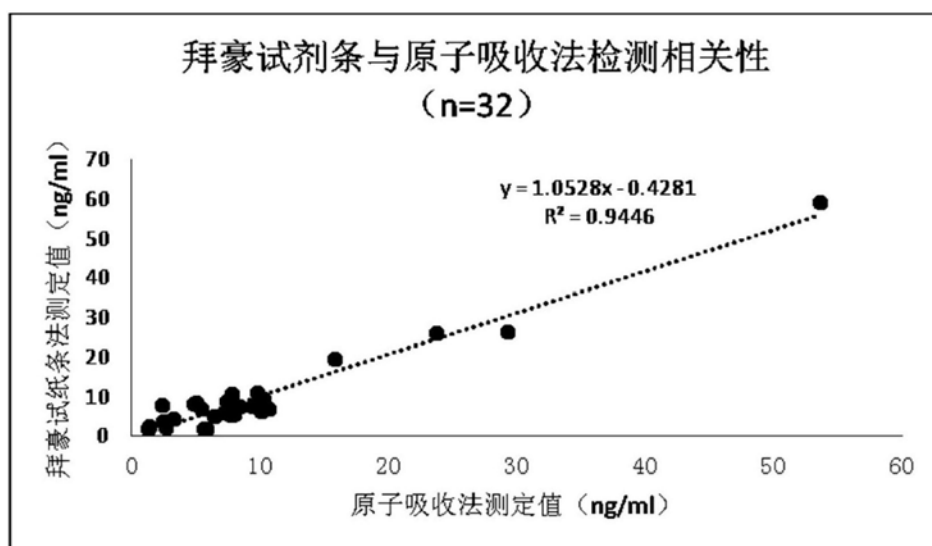


图12

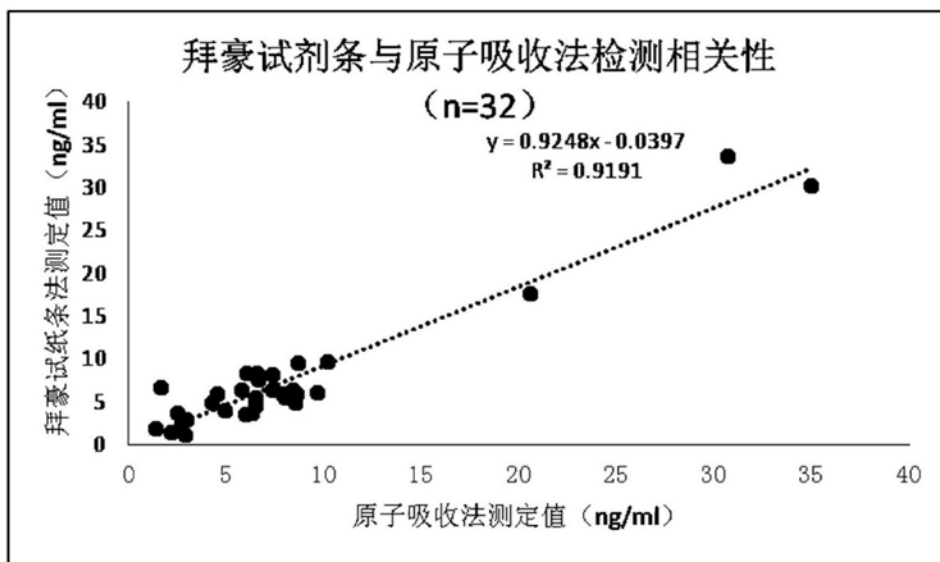


图13

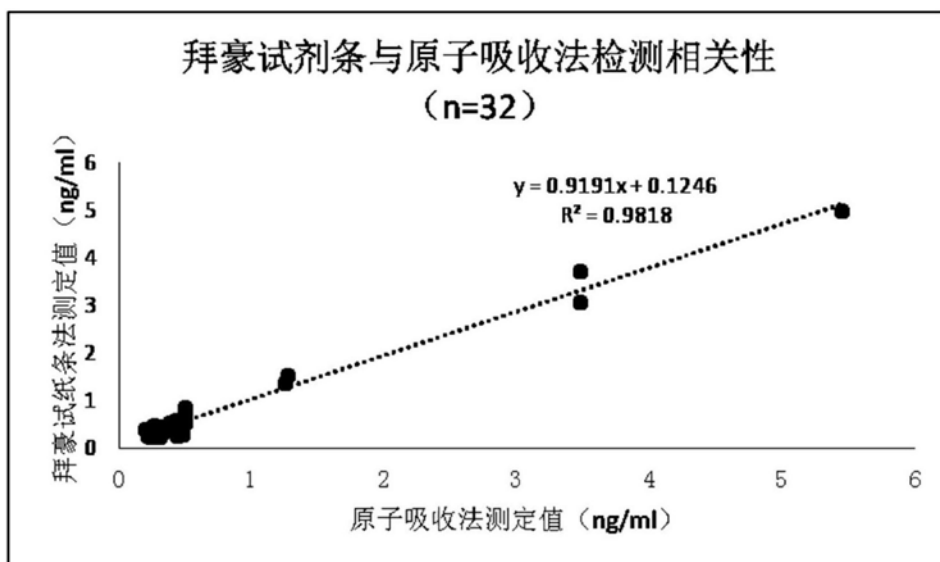


图14

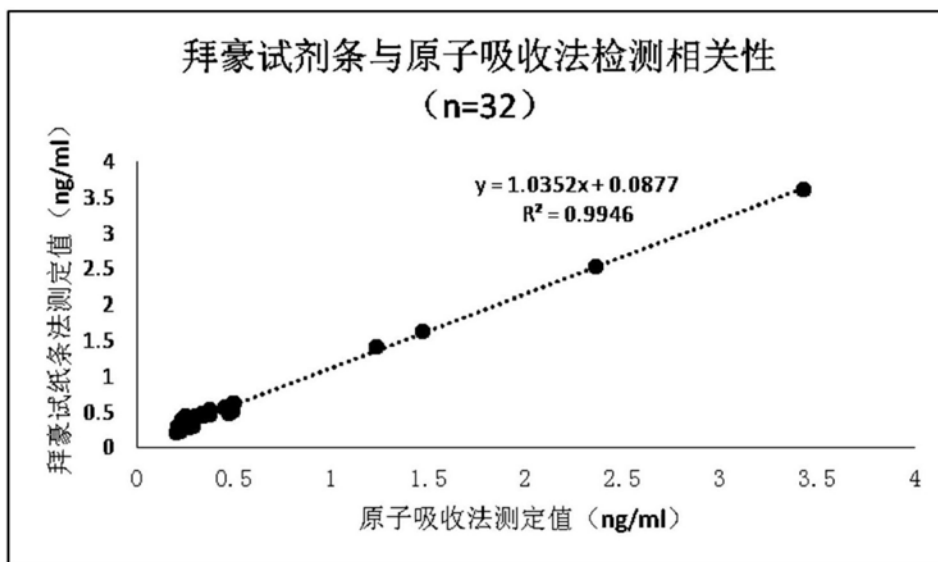


图15

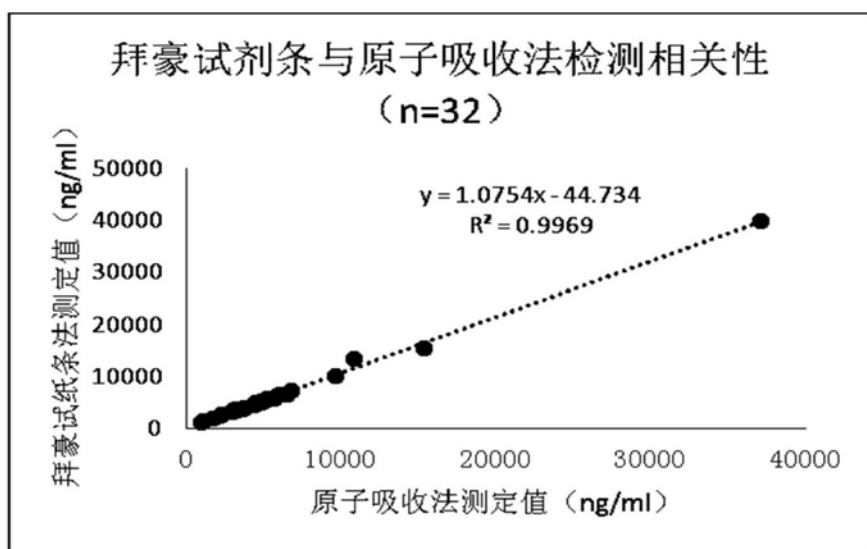


图16

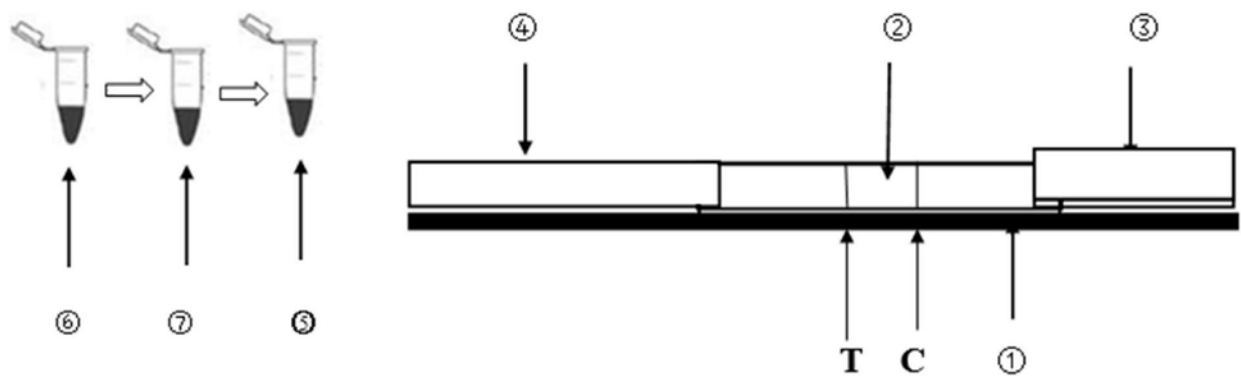


图17

专利名称(译)	一种重金属荧光免疫检测方法及其层析试剂盒		
公开(公告)号	CN108226488A	公开(公告)日	2018-06-29
申请号	CN201711244732.5	申请日	2017-11-30
[标]申请(专利权)人(译)	上海拜豪生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海拜豪生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海拜豪生物科技有限公司		
[标]发明人	刘丽玲 杨宇 蔺维超 陈丽 张媛媛		
发明人	刘丽玲 杨宇 蔺维超 陈丽 张媛媛		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/533		
代理人(译)	罗峰		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种重金属荧光免疫检测方法，包括以下步骤：1)样品前处理：将血液样本进行酸化处理，离心，取上清液，加入螯合剂进行螯合反应，然后加入碱性溶液中和；2)将含有修饰基团的荧光微球与重金属特异性抗体制成荧光微球溶液；3)抗原的包被：将重金属的完全抗原包被在检测线区(T)；将羊抗鼠抗体包被在质控线区(C)；4)检测，通过标准曲线计算浓度值。该方法能有效地使血液样本中的重金属离子释放出来，从而能有效地避免假阴性或检测含量偏低。该方法的特异性高、操作简单，所需成本低，适用于即时现场分析。本发明同时还提供一种重金属荧光免疫层析试剂盒，该试剂盒的特异性高、制作成本低。

