

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910101118.2

[51] Int. Cl.

C07D 241/42 (2006.01)

C07K 14/765 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

C12N 15/06 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

[43] 公开日 2009年12月9日

[11] 公开号 CN 101597266A

[51] Int. Cl. (续)

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 21/31 (2006.01)

[22] 申请日 2009.7.21

[21] 申请号 200910101118.2

[71] 申请人 浙江林学院

地址 311300 浙江省临安市锦城街道环城北路88号

[72] 发明人 郭明 车晓青 姚嘉赞 刘力

[74] 专利代理机构 杭州求是专利事务所有限公司

代理人 周烽

权利要求书7页 说明书18页

[54] 发明名称

镍离子人工抗原螯合剂的合成及镍单克隆抗体的制备

[57] 摘要

一种镍离子人工抗原螯合剂的合成及镍单克隆抗体的制备。以4-硝基邻苯二胺为原料经过一系列反应化学合成了6-溴乙酰氨基-2,3-(N,N,N',N'-四乙酸)二甲胺基喹啉,简称BATDQ,作为合成镍人工抗原的双功能螯合剂,利用BATDQ的四乙酸和溴乙酰氨基结构螯合镍离子及载体蛋白质,获得人工抗原。然后通过人工抗原免疫BALB/c小鼠,并运用细胞融合、细胞克隆等技术获得对应于镍的单克隆抗体,用于检测环境、食品中镍的残留。本发明具有快速、灵敏、成本低、特别适合大批量现场快速检测的特点,并且本发明中的镍人工抗原制备方法简单,成本低,而单克隆抗体的制备技术相对比较成熟,便于规模化生产,检测技术简单,易于推广。

1. 一种镍离子人工抗原螯合剂的合成方法，其特征包括下列步骤：

1) 6-硝基-2, 3-二甲基喹啉的合成：

将 2 g 4-硝基邻苯二胺和 1.13 g 丁二酮放入 250 mL 单口烧瓶中，以 50 mL 无水乙醇为溶剂，加热回流 2 h，冷却至室温后抽滤，加 30 mL 无水乙醇结晶提纯，所得产物即为 6-硝基-2, 3-二甲基喹啉；

2) 6-硝基-2, 3-二溴甲基喹啉的合成：

取 0.5 g 第一步产物 6-硝基-2, 3-二甲基喹啉、0.202 g 偶氮二异丁腈与 1.14 g N-溴代琥珀酰亚胺置于干燥的 250 mL 单口圆底烧瓶中，再取 40 mL 四氯化碳加入烧瓶中，装上回流冷凝管，抽真空并用氩气保护，将烧瓶置于事先加热到 80℃ 的油浴中，强力搅拌，并用火焰枪辅助加热使之快速回流，待反应完毕后，将混合物冷却至室温再过滤，取滤液放入水浴锅中蒸馏、冷却，得 6-硝基-2, 3-二溴甲基喹啉；

3) 6-硝基-2, 3-(N, N, N', N'-四乙酸)二甲胺基喹啉的合成：

在装有机械搅拌、回流冷凝管和恒压漏斗的三口烧瓶中，加入 1.99 mL 亚氨基二乙酸二乙酯、10 mL 干燥的乙腈和 2.63 g 无水碳酸钾粉末；搅拌下向反应混合液中滴加溶有 1.805 g 6-硝基-2, 3-二溴甲基喹啉的 10 mL 干燥乙腈，回流 8-10 h，冷却，滤去碳酸钾，滤液减压下旋转蒸发回收溶剂，得淡黄色油状液体；往上述油状液中加入含 3.48 g 结晶氢氧化钡的饱和溶液，室温下

充分搅拌至油状液体均转化为白色沉淀，抽滤钡盐并用蒸馏水充分浸泡、洗涤；

然后将此钡盐转移到 15 mL 蒸馏水中，将混合物加热煮沸，加入硫酸至清液中不再出现混浊，过滤除去硫酸钡，再用沸水煮洗硫酸钡残渣 3 次，将滤液和洗涤液合并，冰箱中冷却 8-10 h，得到 6-硝基-2, 3-(N, N, N', N'-四乙酸)二甲胺基喹喔啉；

4) 6-氨基-2, 3-(N, N, N', N'-四乙酸)二甲胺基喹喔啉的合成：

将 100 mL 乙醇和 2.025 g 6-硝基-2, 3-(N, N, N', N'-四乙酸)二甲胺基喹喔啉加入到 250 mL 装有温度计、机械搅拌器的三口瓶中，加入 1.2 g 钨碳催化剂和 5.29 g 水合肼，不断搅拌，在 80-85℃ 条件下反应 4 h 后，趁热过滤，滤液经减压蒸去乙醇，冷却后所得固体用 50 mL 苯重结晶，得到 6-氨基-2, 3-(N, N, N', N'-四乙酸)二甲胺基喹喔啉；

5) 6-溴乙酰氨基-2, 3-(N, N, N', N'-四乙酸)二甲胺基喹喔啉的合成：

取 5.05 g 溴乙酰溴溶于 30 mL 三氯化碳中，2.105 g 碳酸氢钠溶于 100 mL 水中，冰浴中将碳酸氢钠溶液缓慢滴加到溴乙酰溴溶液中，取 18.722 g 6-氨基-2, 3-(N, N, N', N'-四乙酸)二甲胺基喹喔啉装入三口烧瓶中，温度保持在 50-60℃，快速搅拌的同时把溴乙酰溴和碳酸氢钠混合液缓慢地滴入 6-氨基-2, 3-(N, N, N', N'-四乙酸)二甲胺基喹喔啉中，并用氢氧化钠溶液控制反应体系的 pH 为 12.0，滴加完毕，升温到 90℃，搅拌，将溶剂全部蒸出，加入 50 mL 浓盐酸，过滤分离出氯化钠，然后往盐酸提取液中加入

入 150 mL 无水乙醇，产生白色沉淀，4℃存放 8-10 h，用 50%的乙醇水溶液重结晶，得 6-溴乙酰氨基-2, 3-(N, N, N', N'-四乙酸)二甲胺基喹啉;

2. 用权利要求 1 所述的合成的螯合剂合成镍人工抗原的方法，其特征包括下列步骤:

1) 重金属镍半抗原的合成:

取 6-溴乙酰氨基-2, 3-(N, N, N', N'-四乙酸)二甲胺基喹啉 0.8 mg，用 pH=7.5，浓度为 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷酸盐缓冲液定容至 2 mL，加入 0.4 mg 的硝酸镍，搅拌使其混合均匀，反应 30 min;

2) 重金属镍人工抗原的合成:

将 5 mg 牛血清白蛋白用 pH=9.6 的磷酸盐缓冲液定容至 2 mL，室温下，将其缓慢加入半抗原溶液中，并用氢氧化钾调节 pH=9.5，室温下搅拌反应 20 h，即得重金属镍人工抗原;

3) 重金属镍包被抗原的合成:

将 5 mg 人血清白蛋白用 pH=9.6 的磷酸盐缓冲液定容至 2 mL，室温下，将其缓慢加入半抗原溶液中，并用氢氧化钾调节 pH=9.5，室温下搅拌反应 20 h，即得重金属镍包被抗原;

3. 用权利要求 2 所述的合成的镍人工抗原制备镍单克隆抗体的方法，其特征包括下列步骤:

1) 小鼠免疫及抗血清制备:

选用 6 周龄雌性 BALB/c 小鼠 8 只，将人工抗原与佐剂按 1:1 体积比混合，注射器双推法使其混合均匀，初次免疫将人工抗原与完全佐剂乳化，腹腔、皮下、颈部多点注射，每只小鼠注射 0.2 mL，第一次免疫 3 周后进行第二次免疫，剂量和途径同第一次，

但从第二次免疫开始佐剂换用不完全佐剂，每隔两周分别进行第三次、第四次免疫，第四次免疫后采血清，检测效价，取效价高的继续加强免疫，加强免疫时抗原不加任何佐剂；

加强免疫 3 天后，摘眼球取小鼠血液于灭菌的康氏管内，室温放置 1 h，在超净工作台用无菌管把血块和管壁剥离，37℃恒温 2 h 后，4℃冰箱中静置 8-10 h，使血清充分析出，收集血清，将血清 1000 rpm/min 离心 10 min，收集上清，将血清分装，-20℃保存；

2) 间接 ELISA 法检测抗血清效价：

包被：用 pH=9.6，浓度为 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的碳酸盐缓冲液将包被抗原稀释至 $2 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ， $100 \text{ } \mu\text{L}/\text{孔}$ ，包被到酶标板上，4℃反应 12 h 或 37℃水浴 3 h；

洗涤：倾去板孔液，用 pH=7.4，浓度为 $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，含 0.05%吐温 - 20 的磷酸盐缓冲液洗涤 3 次，5 min/次，拍干；

封闭：加入 10% 小牛血清作为封闭液， $200 \text{ } \mu\text{L}/\text{孔}$ ，37℃孵育 3 h，同前洗涤，拍干；

加抗血清：抗血清按 400、800、1600、3200、6400、12800、25600、51200 倍稀释， $100 \text{ } \mu\text{L}/\text{孔}$ ，设置空白对照，并用正常小鼠血清作为阴性对照，37℃孵育 1 h，同前洗涤，拍干；

加酶标记抗体：加入按 1:5000 稀释的用辣根过氧化物标记的羊抗小鼠， $100 \text{ } \mu\text{L}/\text{孔}$ ，37℃孵育 1 h，同前洗涤，拍干；

显色：加入使用前配制的邻苯二胺底物， $100 \text{ } \mu\text{L}/\text{孔}$ ，37℃显色 15 min；

终止：加 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硫酸， $50 \text{ } \mu\text{L} / \text{孔}$ ，终止反应 5 min；

读数：利用酶标仪测定 492 nm 波段处的吸光值；

3) 细胞融合：

在无菌条件下，制备饲养细胞，取效价高的 BALB/c 小鼠，最后加强免疫三天后，制备免疫脾细胞，并准备对数生长期的 Sp2/0 骨髓瘤细胞；

取 1.0×10^8 个脾细胞， $2.0-5.0 \times 10^7$ 个 Sp2/0 细胞，按 1-10:1 的比例加入到 50 mL 融合管中，轻轻摇匀，1000 r/min 离心 10 min，弃上清液；

将融合管置于掌心轻轻摩擦，以防止细胞沉淀，使细胞松散均匀成糊状；

将融合管置于 37°C 水浴中，吸取 1 mL 37°C 预热的聚乙二醇 4000，缓慢加入融合管中，边加边轻轻摇匀，60 s 内加完；

在 90 s 内缓慢滴加无血清的 DMEM 培养基 30-40 mL，终止融合，37°C 静止 10 min 后，1000 r/min，离心 10 min，弃上清液；

将融合管置于手掌，摩擦使之松散，加入 60-80 mL HAT 培养基使细胞悬浮、混匀，分装于带有饲养细胞的 96 孔细胞培养板，100 μ L/孔，于 37°C、5% CO₂ 培养箱中培养；

4) 采用有限稀释法筛选阳性孔及克隆：

制备待克隆的杂交瘤细胞悬液，细胞计数，用含 12% 血清的 HT 培养基稀释至每毫升含 10、15 和 20 个细胞 3 种不同的稀释度，分装于有饲养细胞的 96 孔细胞培养板中，每个稀释度分装 32 孔，100 μ L/孔；

于 37°C、5% CO₂ 培养箱中培养 7-10 天，出现肉眼可见的克隆即用间接 ELISA 法检测抗体效价，以样品孔的 OD 值大于阴性孔的

2 倍为阳性;

取抗体检测为阳性孔的细胞进行扩大培养并冻存;

5) 腹水型单克隆抗体的制备:

腹腔注射液体石蜡, 每只小鼠 0.5 mL;

7-10 天后用无血清培养基稀释的杂交瘤细胞腹腔接种, 每只小鼠注射 5×10^5 个细胞;

间隔 5 天后, 观察小鼠腹水产生情况, 如腹部明显膨大, 以手触摸时, 皮肤有紧张感, 即用 16 号针头采集腹水, 连续采 2-3 次, 每只小鼠采 5-10 mL 腹水;

将腹水在 2000 rpm/min 条件下离心 5 min, 除去细胞成分和其他沉淀物, 收集上清, 测定抗体效价, 分装, -80°C 冻存, 或冻干保存;

6) 腹水型单克隆抗体的纯化:

用微孔滤膜过滤腹水, 除去较大的凝块及脂肪滴, 在 4°C , 10000 rpm/min 的条件下离心 15 min, 除去细胞残渣及小颗粒物;

饱和硫酸铵法对腹水型单克隆抗体进行粗提取;

DEAE 离子交换层析法对腹水型单克隆抗体进一步纯化;

4. 如权利要求 3 所述的镍单克隆抗体的应用, 其特征是对含镍污水的检测按如下步骤进行:

1) 包被: 用 $\text{pH}=9.6$, 浓度为 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的碳酸盐缓冲液稀释抗原至 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$, $100 \mu\text{L}/\text{孔}$, 包被到酶标板上, 4°C 放置 12 h 或 37°C 水浴 3 h;

2) 洗涤: 倾去板孔液, 用 $\text{pH}=7.4$, 浓度为 $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,

含 0.05%吐温 - 20 的磷酸盐缓冲液洗涤 3 次, 5 min/次, 拍干;

3) 封闭: 加入 10% 小牛血清作为封闭液, 200 μL /孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 3 h, 同前洗涤, 拍干;

4) 加样: 将样品和最佳稀释浓度的抗血清按 1:1 的体积充分混合, 室温下反应 30 min, 100 μL /孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h, 洗涤 3 次, 5 min/次, 拍干;

5) 加酶标记抗体: 加入按 1:5000 稀释的辣根过氧化物标记的羊抗小鼠, 100 μL /孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 同前洗涤, 拍干;

6) 显色: 加入使用前配制的邻苯二胺底物, 100 μL /孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 显色 15 min;

7) 终止: 加 2 mol \cdot L⁻¹ 的硫酸, 50 μL /孔, 终止反应 5 min;

8) 读数: 利用酶标仪测定 492 nm 波段处的吸光值;

9) 数据处理: 根据抑制率计算公式和标准曲线求出相对应的样品浓度。

镍离子人工抗原螯合剂的合成及镍单克隆抗体的制备 技术领域

本发明涉及一种新的双功能螯合剂及该螯合剂在重金属镍离子人工抗原的合成及镍单克隆抗体制备中的应用。

背景技术

人工抗原的合成是重金属免疫分析技术中关键环节之一，它是利用双功能螯合剂先与重金属离子形成稳定的螯合物(半抗原分子)，再与载体蛋白质偶联形成重金属-螯合剂-载体蛋白质的螯合物(人工抗原)。目前双功能螯合剂的种类非常少，并且价格偏高，阻碍了重金属人工抗原合成的研究。本申请人曾在先申请了镉离子人工抗原螯合剂的合成方法，继而介绍了对应的镉离子人工抗原和单克隆抗体的合成，并将抗体应用于镉离子污染的检测，但对于重金属镍而言，目前国内并没有关于制备其人工抗原的相关报道，因此，寻找新型、价廉的双功能螯合剂，并进一步制备相应的人工抗原和单克隆抗体，对应用于重金属镍残留污染的快速检测具有十分重要的现实意义。

发明内容

针对现有技术的上述不足，本发明的目的是研制出一种双功能的镍离子人工抗原螯合剂 6-溴乙酰氨基-2, 3-(N, N, N', N'-四乙酸)二甲胺基喹喔啉(6-bromine acetamido-2, 3-(N, N, N', N'-tetraacetyl) dimethylamino-quinoxaline, BATDQ) 合成对应于重金属镍的人工抗原，并公开基于此人工抗原的重金属镍单克隆抗体的制备方法，以及运用酶联免疫吸附法(Enzyme

-linked immunosorbent assay, ELISA) 中的间接竞争法检测富含镍离子污染的样品。

本发明的目的通过如下措施实现:

1. 镍离子人工抗原螯合剂的合成方法如下:

1) 6-硝基-2, 3-二甲基喹啉的合成:

将 2 g 4-硝基邻苯二胺和 1.13 g 丁二酮放入 250 mL 单口烧瓶中, 以 50 mL 无水乙醇为溶剂, 加热回流 2 h, 冷却至室温后抽滤, 加 30 mL 无水乙醇结晶提纯, 所得产物即为 6-硝基-2, 3-二甲基喹啉;

2) 6-硝基-2, 3-二溴甲基喹啉的合成:

取 0.5 g 第一步产物 6-硝基-2, 3-二甲基喹啉、0.202 g 偶氮二异丁腈与 1.14 g N-溴代琥珀酰亚胺置于干燥的 250 mL 单口圆底烧瓶中, 再取 40 mL 四氯化碳加入烧瓶中, 装上回流冷凝管, 抽真空并用氩气保护, 将烧瓶置于事先加热到 80℃ 的油浴中, 强力搅拌, 并用火焰枪辅助加热使之快速回流, 待反应完毕后, 将混合物冷却至室温再过滤, 取滤液放入水浴锅中蒸馏、冷却, 得 6-硝基-2, 3-二溴甲基喹啉;

3) 6-硝基-2, 3-(N, N, N', N'-四乙酸)二甲胺基喹啉的合成:

在装有机械搅拌、回流冷凝管和恒压漏斗的三口烧瓶中, 加入 1.99 mL 亚氨基二乙酸二乙酯、10 mL 干燥的乙腈和 2.63 g 无水碳酸钾粉末; 搅拌下向反应混合物中滴加溶有 1.805 g 6-硝基-2, 3-二溴甲基喹啉的 10 mL 干燥乙腈, 回流 8-10 h, 冷却, 滤去碳酸钾, 滤液减压下旋转蒸发回收溶剂, 得淡黄色油状液体;

往上述油状液中加入含 3.48 g 结晶氢氧化钡 ($\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) 的饱和溶液, 室温下充分搅拌至油状液体均转化为白色沉淀, 抽滤钡盐并用蒸馏水充分浸泡、洗涤; 然后将此钡盐转移到 15 mL 蒸馏水中, 将混合物加热煮沸, 加入硫酸至清液中不再出现混浊, 过滤除去硫酸钡, 再用沸水煮洗硫酸钡残渣 3 次, 将滤液和洗涤液合并, 冰箱中冷却 8-10 h, 得到 6-硝基-2, 3-(N, N, N', N'-四乙酸)二甲胺基喹啉;

4) 6-氨基-2, 3-(N, N, N', N'-四乙酸)二甲胺基喹啉的合成:

将 100 mL 乙醇和 2.025 g 6-硝基-2, 3-(N, N, N', N'-四乙酸)二甲胺基喹啉加入到 250 mL 装有温度计、机械搅拌器的三口瓶中, 加入 1.2 g 钨碳催化剂和 5.29 g 水合肼, 不断搅拌, 在 80-85℃ 条件下反应 4 h 后, 趁热过滤, 滤液经减压蒸去乙醇, 冷却后所得固体用 50 mL 苯重结晶, 得到 6-氨基-2, 3-(N, N, N', N'-四乙酸)二甲胺基喹啉;

5) 6-溴乙酰氨基-2, 3-(N, N, N', N'-四乙酸)二甲胺基喹啉的合成:

取 5.05 g 溴乙酰溴溶于 30 mL 三氯化碳中, 2.105 g 碳酸氢钠溶于 100 mL 水中, 冰浴中将碳酸氢钠溶液缓慢滴加到溴乙酰溴溶液中, 取 18.722 g 6-氨基-2, 3-(N, N, N', N'-四乙酸)二甲胺基喹啉装入三口烧瓶中, 温度保持在 50-60℃, 快速搅拌的同时把溴乙酰溴和碳酸氢钠混合液缓慢地滴入 6-氨基-2, 3-(N, N, N', N'-四乙酸)二甲胺基喹啉中, 并用氢氧化钠溶液控制反应体系的 pH 为 12.0, 滴加完毕, 升温到 90℃, 搅拌, 将溶剂全部蒸出,

加入 50 mL 浓盐酸，过滤分离出氯化钠，然后往盐酸提取液中加入 150 mL 无水乙醇，产生白色沉淀，4℃存放 8-10 h，用 50%的乙醇水溶液重结晶，得 6-溴乙酰氨基-2, 3-(N, N, N', N'-四乙酸)二甲胺基喹啉；

2. 镍人工抗原的合成包括下列步骤：

1) 重金属镍半抗原的合成：

取 BATDQ 0.8 mg，用 pH=7.5，浓度为 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷酸盐缓冲液 (Phosphate buffered saline, PBS) 定容至 2 mL，加入 0.4 mg 的硝酸镍，搅拌使其混合均匀，反应 30 min；

2) 重金属镍人工抗原的合成：

将 5 mg 牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin, BSA) 用 pH=9.6 的 PBS 定容至 2 mL，室温下，将其缓慢加入半抗原溶液中，并用氢氧化钾调节 pH=9.5，室温下搅拌反应 20 h，即得重金属镍人工抗原；

3) 重金属镍包被抗原的合成：

将 5 mg 人血清白蛋白 (Human serum albumin, HSA) 用 pH=9.6 的 PBS 定容至 2 mL，室温下，将其缓慢加入半抗原溶液中，并用氢氧化钾调节 pH=9.5，室温下搅拌反应 20 h，即得重金属镍包被抗原；

3. 镍单克隆抗体制备包括下列步骤：

1) 小鼠免疫及抗血清制备：

选用 6 周龄雌性 BALB/c 小鼠 8 只，将人工抗原与佐剂按 1:1 体积比混合，注射器双推法使其混合均匀，初次免疫将人工抗原与完全佐剂乳化，腹腔、皮下、颈部多点注射，每只小鼠注射 0.2

mL, 第一次免疫 3 周后进行第二次免疫, 剂量和途径同第一次, 但从第二次免疫开始佐剂换用不完全佐剂, 每隔两周分别进行第三次、第四次免疫, 第四次免疫后采血清, 检测效价, 取效价高的继续加强免疫, 加强免疫时抗原不加任何佐剂;

加强免疫 3 天后, 摘眼球取小鼠血液于灭菌的康氏管内, 室温放置 1 h, 在超净工作台用无菌管把血块和管壁剥离, 37℃ 恒温 2 h 后, 4℃ 冰箱中静置 8-10 h, 使血清充分析出, 收集血清, 将血清 1000 rpm/min 离心 10 min, 收集上清, 将血清分装, -20℃ 保存;

2) 间接 ELISA 法检测抗血清效价:

包被: 用 pH=9.6, 浓度为 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的碳酸盐缓冲液将包被抗原稀释至 $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 100 μL /孔, 包被到酶标板上, 4℃ 反应 12 h 或 37℃ 水浴 3 h;

洗涤: 倾去板孔液, 用 pH=7.4, 浓度为 $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 含 0.05% 吐温 - 20 的磷酸盐缓冲液 (PBS-T) 洗涤 3 次, 5 min/次, 拍干;

封闭: 加入 10% 小牛血清作为封闭液, 200 μL /孔, 37℃ 孵育 3 h, 同前洗涤, 拍干;

加抗血清: 抗血清按 400、800、1600、3200、6400、12800、25600、51200 倍稀释, 100 μL /孔, 设置空白对照, 并用正常小鼠血清作为阴性对照, 37℃ 孵育 1 h, 同前洗涤, 拍干;

加酶标记抗体: 加入按 1:5000 稀释的用辣根过氧化物标记的羊抗小鼠 (IgG-HRP), 100 μL /孔, 37℃ 孵育 1 h, 同前洗涤, 拍干;

显色：加入使用前配制的邻苯二胺底物溶液 (0-phenylenediamine, OPD), 100 μL /孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 显色 15 min;

终止：加 2 mol \cdot L $^{-1}$ 的硫酸, 50 μL /孔, 终止反应 5 min;

读数：利用酶标仪测定 492 nm 波段处的吸光值, 经间接 ELISA 法检测抗血清的效价达到 1×10^5 ;

3) 细胞融合:

在无菌条件下, 制备饲养细胞, 取效价高的 BALB/c 小鼠, 最后加强免疫三天后, 制备免疫脾细胞, 并准备对数生长期的 Sp2/0 骨髓瘤细胞;

取 1.0×10^8 个脾细胞, $2.0-5.0 \times 10^7$ 个 Sp2/0 细胞, 按 1-10: 1 的比例加入到 50 mL 融合管中, 轻轻摇匀, 1000 r/min 离心 10 min, 弃上清液;

将融合管置于掌心轻轻摩擦, 以防止细胞沉淀, 使细胞松散均匀成糊状;

将融合管置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中, 吸取 1 mL 37 $^{\circ}\text{C}$ 预热的聚乙二醇 4000, 缓慢加入融合管中, 边加边轻轻摇匀, 60 s 内加完;

在 90 s 内缓慢滴加无血清的 DMEM 培养基 30-40 mL, 终止融合, 37 $^{\circ}\text{C}$ 静止 10 min 后, 1000 r/min, 离心 10 min, 弃上清液;

将融合管置于手掌, 摩擦使之松散, 加入 60-80 mL HAT 培养基使细胞悬浮, 混匀, 分装于带有饲养细胞的 96 孔细胞培养板, 100 μL /孔, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO $_2$ 培养箱中培养;

4) 采用有限稀释法筛选阳性孔及克隆:

制备待克隆的杂交瘤细胞悬液, 细胞计数, 用含 12% 血清的 HT 培养基稀释至每毫升含 10、15 和 20 个细胞 3 种不同的稀释度,

分装于有饲养细胞的 96 孔细胞培养板中，每个稀释度分装 32 孔，100 μL /孔；

于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 7-10 天，出现肉眼可见的克隆即用间接 ELISA 法检测抗体效价，以样品孔的 OD 值大于阴性孔的 2 倍为阳性；

取抗体检测为阳性孔的细胞进行扩大培养并冻存；

5) 腹水型单克隆抗体的制备：

腹腔注射液体石蜡，每只小鼠 0.5 mL；

7-10 天后用无血清培养基稀释的杂交瘤细胞腹腔接种，每只小鼠注射 5×10^5 个细胞；

间隔 5 天后，观察小鼠腹水产生情况，如腹部明显膨大，以手触摸时，皮肤有紧张感，即用 16 号针头采集腹水，连续采 2-3 次，每只小鼠采 5-10 mL 腹水；

将腹水在 2000 rpm/min 条件下离心 5 min，除去细胞成分和其他沉淀物，收集上清，测定抗体效价，分装，-80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存，或冻干保存；

6) 腹水型单克隆抗体的纯化：

用微孔滤膜过滤腹水，除去较大的凝块及脂肪滴，在 4 $^{\circ}\text{C}$ ，10000 rpm/min 的条件下离心 15 min，除去细胞残渣及小颗粒物；

饱和硫酸铵法对腹水型单克隆抗体进行粗提取；

DEAE 离子交换层析法对腹水型单克隆抗体进一步纯化；

4. 应用镍单克隆抗体检测含镍污水的方法按如下步骤进行：

1) 包被：用 pH=9.6，浓度为 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的碳酸盐缓冲液

稀释抗原至 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ， $100 \mu\text{L}/\text{孔}$ ，包被到酶标板上， 4°C 放置 12 h 或 37°C 水浴 3 h ；

2) 洗涤：倾去板孔液，用 $\text{pH}=7.4$ ，浓度为 $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，PBS-T 洗涤 3 次， $5 \text{ min}/\text{次}$ ，拍干；

3) 封闭：加入 10% 小牛血清作为封闭液， $200 \mu\text{L}/\text{孔}$ ， 37°C 孵育 3 h ，同前洗涤，拍干；

4) 加样：将样品和最佳稀释浓度的抗血清按 1:1 的体积充分混合，室温下反应 30 min ， $100 \mu\text{L}/\text{孔}$ ， 37°C 反应 1 h ，洗涤 3 次， $5 \text{ min}/\text{次}$ ，拍干；

5) 加酶标记抗体：加入按 1:5000 稀释的 IgG-HRP， $100 \mu\text{L}/\text{孔}$ ， 37°C 孵育 1 h ，同前洗涤，拍干；

6) 显色：加入使用前配制的 OPD 溶液， $100 \mu\text{L}/\text{孔}$ ， 37°C 显色 15 min ；

7) 终止：加 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硫酸， $50 \mu\text{L}/\text{孔}$ ，终止反应 5 min ；

8) 读数：利用酶标仪测定 492 nm 波段处的吸光值；

9) 数据处理：根据抑制率计算公式和标准曲线求出相对应的样品浓度。

本发明的有益效果是：

1) 本单克隆抗体对镍残留污染的检测专一性强，且与其他金属的交叉反应弱；

2) 原料便宜，总成本低，价格为 $30 \text{ 元}/\text{mg}$ ；

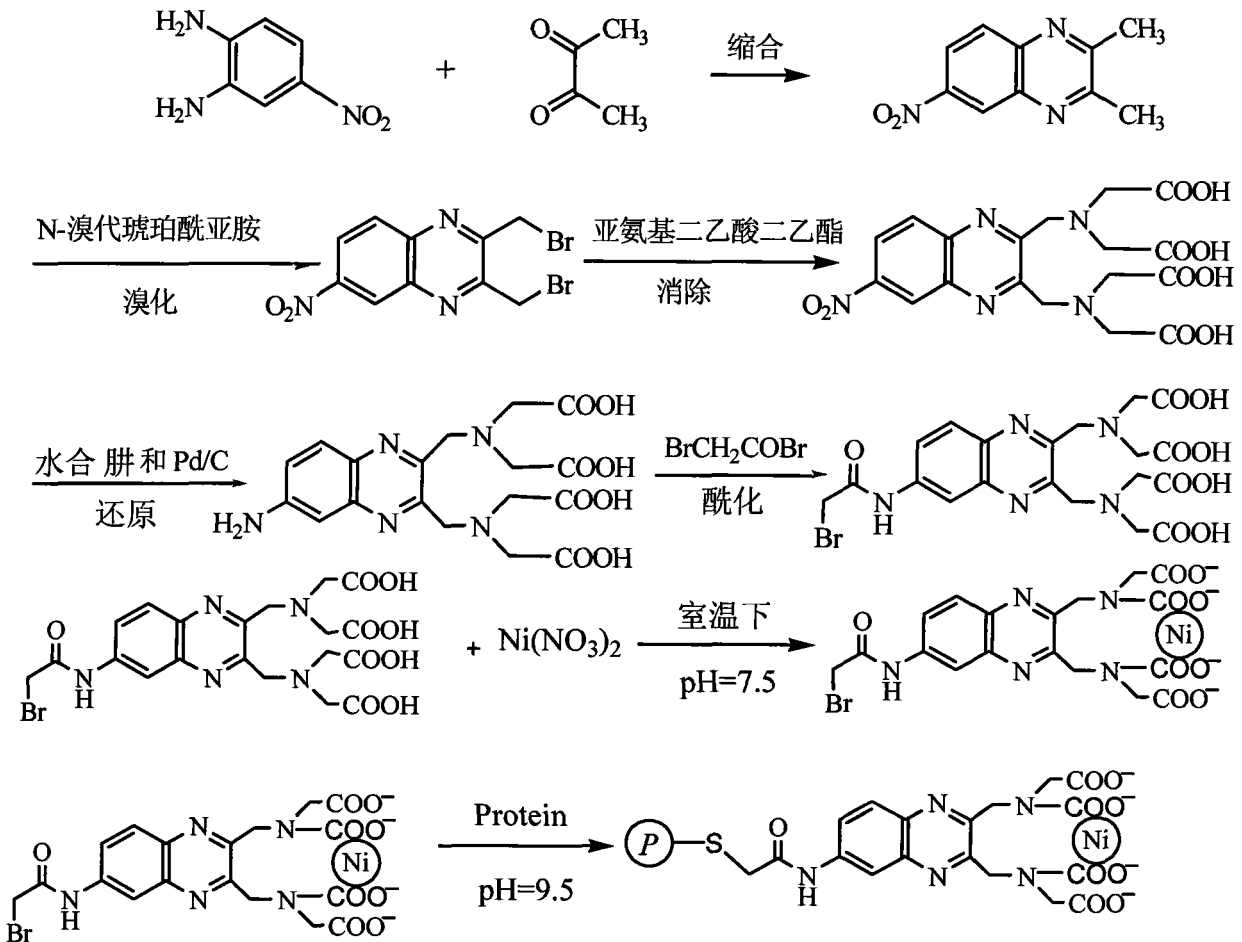
3) 通过原子吸收分光光度法测定的 Ni-BATDQ-BSA、Ni-BATDQ-HSA 的偶联比为 22:1、28:1，偶联比较高；

4) 合成的人工抗原免疫原性强，稳定性好，以间接 ELISA 法

测定的抗血清效价达到 1×10^5 , 获得的单克隆抗体检出限为 1pbb。

具体实施方案

本发明的实验反应路线:



本发明是利用了 BATDQ 的四乙酸结构与重金属镍离子形成稳定的螯合物, 另一方面又利用它的溴乙酰氨基结构与蛋白质上的巯基在弱碱性条件下发生缩合反应, 从而实现了重金属镍人工抗原的合成, 这为重金属镍的酶免疫分析技术奠定了基础。同时, 本发明是对传统的重金属镍离子的检测技术进行的有益补充, 其快速、高灵敏度、在线操作等特点成为重金属检测的新发展方向。

最佳实施例:

镍离子人工抗原螯合剂的合成方法如下:

1) 6-硝基-2, 3-二甲基喹喔啉的合成:

将 2 g 4-硝基邻苯二胺和 1.13 g 丁二酮放入 250 mL 单口烧瓶中, 以 50 mL 无水乙醇为溶剂, 加热回流 2 h, 冷却至室温后抽滤, 加 30 mL 无水乙醇结晶提纯, 所得产物即为 6-硝基-2, 3-二甲基喹喔啉;

2) 6-硝基-2, 3-二溴甲基喹喔啉的合成:

取 0.5 g 第一步产物 6-硝基-2, 3-二甲基喹喔啉、0.202 g 偶氮二异丁腈与 1.14 g N-溴代琥珀酰亚胺置于干燥的 250 mL 单口圆底烧瓶中, 再取 40 mL 四氯化碳加入烧瓶中, 装上回流冷凝管, 抽真空并用氩气保护, 将烧瓶置于事先加热到 80℃ 的油浴中, 强力搅拌, 并用火焰枪辅助加热使之快速回流, 待反应完毕后, 将混合物冷却至室温再过滤, 取滤液放入水浴锅中蒸馏、冷却, 得 6-硝基-2, 3-二溴甲基喹喔啉;

3) 6-硝基-2, 3-(N, N, N', N'-四乙酸)二甲胺基喹喔啉的合成:

在装有机械搅拌、回流冷凝管和恒压漏斗的三口烧瓶中, 加入 1.99 mL 亚氨基二乙酸二乙酯、10 mL 干燥的乙腈和 2.63 g 无水碳酸钾粉末; 搅拌下向反应混合液中滴加溶有 1.805 g 6-硝基-2, 3-二溴甲基喹喔啉的 10 mL 干燥乙腈, 回流 8-10 h, 冷却, 滤去碳酸钾, 滤液减压下旋转蒸发回收溶剂, 得淡黄色油状液体; 往上述油状液中加入含 3.48 g $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ 的饱和溶液, 室温下充分搅拌至油状液体均转化为白色沉淀, 抽滤钡盐并用蒸馏水充分浸泡、洗涤; 然后将此钡盐转移到 15 mL 蒸馏水中, 将混合物加热煮沸, 加入硫酸至清液中不再出现混浊, 过滤除去硫酸钡,

再用沸水煮沸硫酸钡残渣 3 次，将滤液和洗涤液合并，冰箱中冷却 8-10 h 得到 6-硝基-2, 3-(N, N, N', N'-四乙酸)二甲胺基喹喔啉；

4) 6-氨基-2, 3-(N, N, N', N'-四乙酸)二甲胺基喹喔啉的合成：

将 100 mL 乙醇和 2.025 g 6-硝基-2, 3-(N, N, N', N'-四乙酸)二甲胺基喹喔啉加入到 250 mL 装有温度计、机械搅拌器的三口瓶中，加入 1.2 g 钨碳催化剂和 5.29 g 水合肼，不断搅拌，在 80-85℃ 条件下反应 4 h 后，趁热过滤，滤液经减压蒸去乙醇，冷却后所得固体用 50 mL 苯重结晶，得到 6-氨基-2, 3-(N, N, N', N'-四乙酸)二甲胺基喹喔啉；

5) 6-溴乙酰氨基-2, 3-(N, N, N', N'-四乙酸)二甲胺基喹喔啉的合成：

取 5.05 g 溴乙酰溴溶于 30 mL 三氯化碳中，2.105 g 碳酸氢钠溶于 100 mL 水中，冰浴中将碳酸氢钠溶液缓慢滴加到溴乙酰溴溶液中，取 18.722 g 6-氨基-2, 3-(N, N, N', N'-四乙酸)二甲胺基喹喔啉装入三口烧瓶中，温度保持在 50-60℃，快速搅拌的同时把溴乙酰溴和碳酸氢钠混合液缓慢地滴入 6-氨基-2, 3-(N, N, N', N'-四乙酸)二甲胺基喹喔啉中，并用氢氧化钠溶液控制反应体系的 pH 为 12.0，滴加完毕，升温到 90℃，搅拌，将溶剂全部蒸出，加入 50 mL 浓盐酸，过滤分离出氯化钠，然后往盐酸提取液中加入 150 mL 无水乙醇，产生白色沉淀，4℃ 存放 8-10 h，用 50% 的乙醇水溶液重结晶，得 6-溴乙酰氨基-2, 3-(N, N, N', N'-四乙酸)二甲胺基喹喔啉；

镍人工抗原的合成包括下列步骤:

1) 重金属镍半抗原的合成:

取 BATDQ 0.8 mg, 用 pH=7.5, $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PBS 定容至 2 mL, 加入 0.4 mg 的硝酸镍, 搅拌使其混合均匀, 反应 30 min;

2) 重金属镍人工抗原的合成:

将 5 mg BSA 用 pH=9.6 的 PBS 定容至 2 mL, 室温下, 将其缓慢加入半抗原溶液中, 并用氢氧化钾调节 pH=9.5, 室温下搅拌反应 20 h, 即得重金属镍人工抗原;

3) 重金属镍包被抗原的合成:

将 5 mg HSA 用 pH=9.6 的 PBS 定容至 2 mL, 室温下, 将其缓慢加入半抗原溶液中, 并用氢氧化钾调节 pH=9.5, 室温下搅拌反应 20 h, 即得重金属镍包被抗原;

4) 原子吸收分光光度法鉴定偶联比:

分别配制镍标准液 (0、0.1、0.5、1.0、1.5、2.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 制做标准曲线, 将偶联产物取 1 mL 稀释 20 倍, 用原子吸收法检测重金属镍的含量。利用原子吸收分光光度法检测人工抗原 Ni-BATDQ-BSA、包被抗原 Ni-BATDQ-HSA, 检测到重金属镍离子的含量分别为 $20.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $25.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 经计算两种人工抗原的偶联比分别为 22:1、28:1, 偶联比符合制备抗体要求。

5) SDS-PAGE 法对偶联结果的鉴定:

采用 SDS-PAGE 不连续电泳, 以 Tris-HCl 作为缓冲体系, 10% 分离胶, 5% 浓缩胶。样品在浓缩胶上电泳时以恒定电流 (20 mA) 电泳, 待其转入分离胶后恒定电流 (30 mA), 电泳至溴酚蓝距分离胶底边 1 cm 左右停止。卸开电泳槽, 取出胶板, 固定液固定

40 min, 敏化 30 min, 水洗 4 次, 银染, 最后显色呈像。电泳结果显示, 人工抗原 Ni-BATDQ-BSA、包被抗原 Ni-BATDQ-HSA 在电泳中的泳动速度明显落后于其相应的载体蛋白, 且偶联后的人工抗原与原载体蛋白相比增加的分子量在 6000 D 左右。

镍单克隆抗体制备包括下列步骤:

1) 小鼠免疫及抗血清制备:

选用 6 周龄雌性 BALB/c 小鼠 8 只, 将人工抗原与佐剂按 1:1 体积比混合, 注射器双推法使其混合均匀, 初次免疫将人工抗原与完全佐剂乳化, 腹腔、皮下、颈部多点注射, 每只小鼠注射 0.2 mL, 第一次免疫 3 周后进行第二次免疫, 剂量和途径同第一次, 但从第二次免疫开始佐剂换用不完全佐剂, 每隔两周分别进行第三次、第四次免疫, 第四次免疫后采血清, 检测效价, 取效价高的继续加强免疫, 加强免疫时抗原不加任何佐剂;

加强免疫 3 天后, 摘眼球取小鼠血液于灭菌的康氏管内, 室温放置 1 h, 在超净工作台用无菌管把血块和管壁剥离, 37℃ 恒温 2 h 后, 4℃ 冰箱中静置 8-10 h, 使血清充分析出, 收集血清, 将血清 1000 rpm/min 离心 10 min, 收集上清, 将血清分装, -20℃ 保存;

2) 间接 ELISA 法检测抗血清效价:

包被: 用 pH=9.6, 浓度为 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的碳酸盐缓冲液将包被抗原稀释至 $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $100 \mu\text{L}/\text{孔}$, 包被到酶标板上, 4℃ 反应 12 h 或 37℃ 水浴 3 h;

洗涤: 倾去板孔液, 用 pH=7.4, 浓度为 $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PBS-T 洗涤 3 次, 5 min/次, 拍干;

封闭：加入 10% 小牛血清作为封闭液，200 μL /孔，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 3 h，同前洗涤，拍干；

加抗血清：抗血清按 400、800、1600、3200、6400、12800、25600、51200 倍稀释，100 μL /孔，设置空白对照，并用正常小鼠血清作为阴性对照，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h，同前洗涤，拍干；

加酶标记抗体：加入按 1:5000 稀释的 IgG-HRP，100 μL /孔，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h，同前洗涤，拍干；

显色：加入使用前配制的 OPD 溶液，100 μL /孔，37 $^{\circ}\text{C}$ 显色 15 min；

终止：加 2 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ 的硫酸，50 μL /孔，终止反应 5 min；

读数：利用酶标仪测定 492 nm 波段处的吸光值，经间接 ELISA 法检测抗血清的效价达到 1×10^5 ；

3) 细胞融合：

在无菌条件下，制备饲养细胞，取效价高的 BALB/c 小鼠，最后加强免疫三天后，制备免疫脾细胞，并准备对数生长期的 Sp2/0 骨髓瘤细胞；

取 1.0×10^8 个脾细胞， $2.0-5.0 \times 10^7$ 个 Sp2/0 细胞，按 1-10:1 的比例加入到 50 mL 融合管中，轻轻摇匀，1000 r/min 离心 10 min，弃上清液；

将融合管置于掌心轻轻摩擦，以防止细胞沉淀，使细胞松散均匀成糊状；

将融合管置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中，吸取 1 mL 37 $^{\circ}\text{C}$ 预热的聚乙二醇 4000，缓慢加入融合管中，边加边轻轻摇匀，60 s 内加完；

在 90 s 内缓慢滴加无血清的 DMEM 培养基 30-40 mL，终止融

合，37℃静止 10 min 后，1000 r/min，离心 10 min，弃上清液；

将融合管置于手掌，摩擦使之松散，加入 60-80 mL HAT 培养基使细胞悬浮，混匀，分装于带有饲养细胞的 96 孔细胞培养板，100 μL/孔，于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养；

4) 采用有限稀释法筛选阳性孔及克隆：

制备待克隆的杂交瘤细胞悬液，细胞计数，用含 12% 血清的 HT 培养基稀释至每毫升含 10、15 和 20 个细胞 3 种不同的稀释度，分装于有饲养细胞的 96 孔细胞培养板中，每个稀释度分装 32 孔，100 μL/孔；

于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 7-10 天，出现肉眼可见的克隆即用间接 ELISA 法检测抗体效价，以样品孔的 OD 值大于阴性孔的 2 倍为阳性；

取抗体检测为阳性孔的细胞进行扩大培养并冻存；

5) 腹水型单克隆抗体的制备：

腹腔注射液体石蜡，每只小鼠 0.5 mL；

7-10 天后用无血清培养基稀释的杂交瘤细胞腹腔接种，每只小鼠注射 5×10^5 个细胞；

间隔 5 天后，观察小鼠腹水产生情况，如腹部明显膨大，以手触摸时，皮肤有紧张感，即用 16 号针头采集腹水，连续采 2-3 次，每只小鼠采 5-10 mL 腹水；

将腹水在 2000 rpm/min 条件下离心 5 min，除去细胞成分和其他沉淀物，收集上清，测定抗体效价，分装，-80℃冻存，或冻干保存；

6) 腹水型单克隆抗体的纯化：

用微孔滤膜过滤腹水，除去较大的凝块及脂肪滴，在 4℃，10000 rpm/min 的条件下离心 15 min，除去细胞残渣及小颗粒物质；

饱和硫酸铵法对腹水型单克隆抗体进行粗提取；

DEAE 离子交换层析法对腹水型单克隆抗体进一步纯化。

至此，本发明对镍人工抗原螯合剂的合成方法及对应镍的人工抗原和镍单克隆抗体的制备，都作了完整而清楚的介绍，穿插介绍了人工抗原偶联结果的两种鉴定方法及抗血清效价的检测方法。

为更进一步说明本发明，下面再介绍重金属镍离子标准曲线的建立，并以水中重金属镍离子的含量为例介绍快速检测法，便于公众全面了解本发明。

为检测抗体的检测限，下面介绍重金属镍标准曲线的建立方法：

1) 包被：用 pH 为 9.6，浓度为 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的碳酸盐包被缓冲液稀释抗原至 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ， $100 \mu\text{L}/\text{孔}$ ，包被到酶标板上，4℃放置 12 h 或 37℃水浴 3 h；

2) 洗涤：倾去包被液，用 PBS-T 洗涤 3 次，5min/次，拍干；

3) 封闭：加入 10% 小牛血清作为封闭液， $200 \mu\text{L}/\text{孔}$ ，37℃孵育 3 h，同前洗涤，拍干；

4) 加样：取系列浓度（0、10、50、100、250、500、1000 和 $5000 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ）的镍标液加入适宜浓度的 EDTA 中，按 1:1 的体积比加入最佳稀释浓度的抗血清，室温下反应 30 min， $100 \mu\text{L}/\text{孔}$ ，37℃反应 1 h，同前洗涤，拍干；

5) 加酶标记抗体: 加入按 1:5000 稀释的 IgG-HRP, 100 μL /孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 同前洗涤, 拍干;

6) 显色: 加入使用前配制的 OPD 溶液, 100 μL /孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 显色 15 min;

7) 终止: 加 2 mol \cdot L $^{-1}$ 的硫酸, 50 μL /孔, 终止反应 5 min;

8) 读数: 利用酶标仪测定 492 nm 波段处的吸光值

9) 抑制率的计算

$$\text{抑制率 (I\%)} = \frac{\text{零标准吸光度值} - \text{样品或标准液吸光度值}}{\text{零标准吸光度值} - \text{空白对照吸光度值}} \times 100\%$$

然后以 I% 为纵坐标, 以标样的自然对数浓度值为横坐标, 做标准曲线。

下面以水体中重金属镍含量的快速检测为例加以说明:

水体样品的前处理: 取含镍水样 1000 μL , 用 0.45 μm 的微孔滤膜过滤出去杂质。

1) 包被: 用 pH=9.6, 浓度为 0.05 mol \cdot L $^{-1}$ 的碳酸盐缓冲液稀释抗原至 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 μL /孔, 包被到酶标板上, 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 12 h 或 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 3 h;

2) 洗涤: 倾去板孔液, 用 pH=7.4, 浓度为 0.15 mol \cdot L $^{-1}$, PBS-T 洗涤 3 次, 5 min/次, 拍干;

3) 封闭: 加入 10% 小牛血清作为封闭液, 200 μL /孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 3 h, 同前洗涤, 拍干;

4) 加样: 将样品和最佳稀释浓度的抗血清按 1:1 的体积充分混合, 室温下反应 30 min, 100 μL /孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h, 同前洗涤, 拍干;

5) 加酶标记抗体: 加入按 1:5000 稀释的 IgG-HRP, 100 μL /

孔, 37℃孵育 1 h, 同前洗涤, 拍干;

6) 显色: 加入使用前配制的 OPD 溶液, 100 μL /孔, 37℃显色 15 min;

7) 终止: 加 $2\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硫酸, 50 μL /孔, 终止反应 5 min;

8) 读数: 利用酶标仪测定 492 nm 波段处的吸光值;

9) 数据处理: 根据抑制率计算公式和标准曲线求出相对应样品的浓度。

| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 镍离子人工抗原整合剂的合成及镍单克隆抗体的制备 | | |
| 公开(公告)号 | CN101597266A | 公开(公告)日 | 2009-12-09 |
| 申请号 | CN200910101118.2 | 申请日 | 2009-07-21 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 浙江农林大学 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 浙江林学院 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 浙江林学院 | | |
| [标]发明人 | 郭明 车晓青 姚嘉赞 刘力 | | |
| 发明人 | 郭明 车晓青 姚嘉赞 刘力 | | |
| IPC分类号 | C07D241/42 C07K14/765 C07K16/44 C12N15/06 C12P21/08 G01N33/577 G01N33/531 G01N21/31 | | |
| 代理人(译) | 周烽 | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

一种镍离子人工抗原整合剂的合成及镍单克隆抗体的制备。以4 - 硝基邻苯二胺为原料经过一系列反应化学合成了6 - 溴乙酰氨基 - 2, 3 - (N, N, N', N' - 四乙酸)二甲胺基喹啉, 简称BATDQ, 作为合成镍人工抗原的双功能整合剂, 利用BATDQ的四乙酸和溴乙酰氨基结构整合镍离子及载体蛋白质, 获得人工抗原。然后通过人工抗原免疫BALB/c小鼠, 并运用细胞融合、细胞克隆等技术获得对应于镍的单克隆抗体, 用于检测环境、食品中镍的残留。本发明具有快速、灵敏、成本低、特别适合大批量现场快速检测的特点, 并且本发明中的镍人工抗原制备方法简单, 成本低, 而单克隆抗体的制备技术相对比较成熟, 便于规模化生产, 检测技术简单, 易于推广。