



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104965076 A

(43) 申请公布日 2015. 10. 07

(21) 申请号 201510412898. 8

(22) 申请日 2015. 07. 14

(71) 申请人 上海拜豪生物科技有限公司

地址 200000 上海市浦东新区中国(上海)自
由贸易试验区新金桥路 27 号 13 号楼 2
层

(72) 发明人 张积仁 阳帆 董欣敏 吴婧
蔡睿 孙遥 赵乙木

(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 汤喜友

(51) Int. Cl.

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

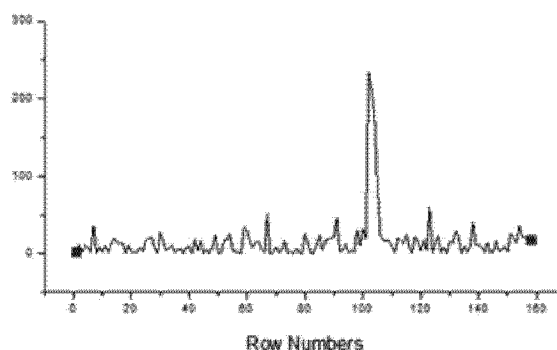
权利要求书2页 说明书18页 附图1页

(54) 发明名称

一种镉螯合型免疫复合物及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明公开了一种镉螯合型免疫复合物及其制备方法和应用,该镉螯合型免疫复合物为以下复合物中的一种:镉结合于免疫复合物形成的复合物,或镉结合于载体蛋白及能和该载体蛋白特异性结合的抗体所形成的复合物;或镉结合于免疫球蛋白后与载体蛋白结合形成的复合物。本发明所述镉螯合型免疫复合物的是一种相对特异性的免疫复合物,用于检测地区人群血清中是否镉螯合型免疫复合物及含量,间接反映这个地区镉污染程度。



1. 一种镉螯合型免疫复合物,其特征在于,该镉螯合型免疫复合物为以下复合物中的一种:

镉结合于免疫复合物形成的复合物,或

镉结合于载体蛋白及能和该载体蛋白特异性结合的抗体所形成的复合物;或

镉结合于免疫球蛋白后与载体蛋白结合形成的复合物。

2. 根据权利要求1所述的镉螯合型免疫复合物,其特征在于,所述载体蛋白或免疫复合物至少含有锌指结构、巯基、半胱氨酸残基中一种结构,镉通过锌指结构、巯基、半胱氨酸残基中至少一种与载体蛋白或免疫复合物结合。

3. 根据权利要求2所述的镉螯合型免疫复合物,其特征在于,所述载体蛋白为抗体蛋白、脂蛋白、血红蛋白、核抗原、异种血清抗原、病毒、细菌、原虫、蠕虫中的一种。

4. 根据权利要求1所述的镉螯合型免疫复合物,其特征在于,其中,镉通过螯合剂与载体蛋白结合后再与能和载体蛋白特异性结合的抗体结合。

5. 一种如权利要求1所述的镉螯合型免疫复合物的制备方法,其特征在于,该制备方法包括

A) 合成镉螯合型免疫复合物的步骤;

B) 提纯镉螯合型免疫复合物的步骤:采用免疫亲和层析去除步骤A)合成的镉螯合型免疫复合物中未参与反应的载体蛋白、特异性抗体及 Cd^{2+} 。

6. 根据权利要求5所述的制备方法,其特征在于,

所述步骤A)具体步骤如下:

(1) 配制螯合剂:将螯合剂溶于溶剂中,配制成螯合剂溶液;

(2) 配制载体蛋白溶液:将载体蛋白加入到硼酸盐溶液中;

(3) 搅拌过夜:将步骤(1)螯合剂溶液加入到步骤(2)的载体蛋白溶液中,搅拌后于摇床中过夜,得到混合液;

(4) 透析袋预处理:在透析袋中加入 EDTA-NaHCO_3 溶液煮沸,弃废液后用 ddH_2O 冲洗;重复该步骤1-3次;

(5) 透析:将步骤(3)的混合液装入经步骤(4)处理后的透析袋中,用 ddH_2O 透析,换水2-3次,透析过夜之后,收集液体;

(6) 镉离子螯合:在上述步骤(5)中的液体中加入 HCl 溶液调整pH至7.0,缓慢加入 CdCl_2 溶液,边滴加边震荡,之后于摇床中过夜,然后重复步骤(5)一次,收集液体,得到镉螯合型抗原;

(7) 在上述镉螯合型抗原中加入能与载体蛋白特异性结合的抗体反应后得到镉螯合型免疫复合物;

所述步骤B)具体步骤如下:

(a) 将上述A)步骤合成的镉螯合型免疫复合物复溶于生理盐水中,得到复溶液;

(b) 层析柱预处理:使用样品缓冲稀释液冲洗管路,在层析柱中装入含有能与免疫复合物特异性结合的物质填料,装柱后继续用样品缓冲稀释液平衡柱子;

(c) 上样:待柱子平衡后,用样品缓冲液稀释上述复溶液,然后上柱,镉螯合型免疫复合物吸附在填料上,未反应的载体蛋白、抗体、 Cd^{2+} 随缓冲液流出;

(d) 洗脱:使用样品缓冲稀释液冲洗柱子,至基线平衡,然后使用0.05-0.1mol/L的磷

酸盐溶液进行洗脱,镉螯合型免疫复合物随着洗脱液洗脱出来;

(e) 收集:收集洗脱液,收集完毕后立即使蛋白复性;

(f) 收集到的洗脱液装入透析袋用 ddH₂O 透析除盐,换水 2-4 次后,多次透析过夜,收集样本;

(g) 层析柱预处理:采用新的层析柱,用样品缓冲稀释液冲洗管路,在该层析柱中装入含有能与 Cd 特异性结合的物质填料,装柱后再用样品缓冲稀释液平衡柱子;

(h) 上样:待步骤 (g) 的柱子平衡后,用样品缓冲稀释液稀释上述步骤 (f) 的样本,然后将稀释后的样本上柱,镉螯合型免疫复合物吸附在填料上,未反应的抗原抗体复合物会随缓冲液流出;

(i) 洗脱:步骤 (h) 之后用样品缓冲稀释液冲洗柱子,至基线平衡,然后使用 0.5-1.0mol/L 的磷酸盐溶液进行洗脱,此时镉螯合型免疫复合物随着洗脱液洗脱出来;

(j) 收集:收集步骤 (i) 的洗脱液,收集完毕后立即使蛋白复性;

(k) 对步骤 (j) 收集到的洗脱液装入透析袋用 ddH₂O 透析除盐,换水三次后,多次透析过夜,收集样本,即得到纯化的镉螯合型免疫复合物。

7. 如权利要求 1 所述的镉螯合型免疫复合物在制备检测整合镉免疫复合物的酶联免疫试剂盒中的应用。

8. 一种检测整合镉免疫复合物的酶联免疫试剂盒,其特征在于,该试剂盒包括如权利要求 1 所述的镉螯合型免疫复合物的标准品。

9. 根据权利要求 1 所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于,该试剂盒还包括至少一种以下试剂:以捕获免疫复合物的蛋白作为包被液、以捕获金属 Cd 的抗体作为二抗以及酶标抗体。

10. 一种检测镉螯合型免疫复合物的方法,其特征在于,以权利要求 1 所述的镉螯合型免疫复合物作为标准品,采用以下方法之一对样品进行检测:酶联免疫法、酶联免疫与原子吸收光谱结合法、酶联免疫与电感耦合等离子体质谱结合法、提纯免疫复合物与原子吸收光谱结合法、提纯免疫复合物与电感耦合等离子体质谱结合法、电泳与酶联免疫或原子吸收光谱或电感耦合等离子体质谱结合法。

一种镉螯合型免疫复合物及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及属于医学领域,具体涉及镉螯合型免疫复合物及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 免疫复合物 (Immune complexes, IC) 是抗原抗体结合的产物,根据全国科学技术名词审定委员会的定义,是指抗体与可溶性抗原结合而形成的复合物。它分为两类,一种是组织中固定的免疫复合物,而另一种则是游离于血液中的免疫复合物,成为循环免疫复合物 (circulating immune complexes, CIC)。免疫复合物在清除和破坏各种抗原中起着不可缺少的作用,机体免疫反应的结果就是不断产生免疫复合物。当机体内抗原 (或抗体) 数量略多于抗体 (或抗原) 时,就会形成中等分子大小的免疫复合物,它既不易被吞噬细胞吞噬,又不能通过肾小球滤孔排出,可较长时间游离于血液和其他体液中。当血管壁通透性增加时,此类 IC 可随血液沉积在某些部位的毛细血管壁或嵌合在肾小球基底膜上,激活补体导致免疫复合物沉积。这些沉积或镶嵌于血管壁或组织的免疫复合物,乃造成血管基膜炎症和组织损伤的始动因素。免疫复合物可通过以下几方面造成组织损伤:1) 激活补体:沉积的 IC 通过激活补体,产生过敏毒素和具有趋化效应的活性片段,趋化至局部的肥大细胞、嗜碱性粒细胞释放活性介质致局部血管通透性增高,引起渗出和局部水肿;2) 吸引白细胞浸润和集聚:中性粒细胞在吞噬 IC 时释放毒性氧化物和溶酶体酶,损伤邻近组织;3) 活化血小板:IC 可通过活化血小板释放血管活性胺类物质,导致血管扩张、通透性增加,加剧局部渗出和水肿,并激活凝血机制,形成微血栓,引起局部缺血、出血和组织坏死。

[0003] 多种疾病的发生都与免疫复合物的沉积息息相关,如系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、肾病综合征、冷球蛋白血症、脉管炎、细菌、病毒和寄生虫感染、过敏反应、自身免疫疾病、皮肤病等。早在上世纪 90 年代,就有学者发现,在正常机体中,免疫复合物被不断降解,因而一般检测不到免疫复合物或只呈现低浓度,而在上述一系列疾病中,血清中的免疫复合物即 CIC 含量显著升高。虽然 CIC 检测不具有疾病特异性,但其检测能提供关于免疫病理、疾病的发展及预后方面的信息。在某些微生物感染、自身免疫中,检测循环免疫复合物可用作疾病活动性、评价机体的机能和检测疗效的指标。而近些年来,学者们致力于研究特异性的免疫复合物,研究各种特异性免疫复合物与疾病致病、疾病发展、疾病诊断等各方面的关系,而这些研究将促使我们对疾病有更深一步了解。

[0004] 镉是一种常见的有毒金属及环境污染物,广泛应用于工业生产环境中,包括电镀、制造工业颜料、塑料稳定剂、镍铬电池等,与人们生活息息相关。对于普通人群,主要是通过吸入镉污染的空气,及食用含镉污水灌溉农田生产的农作物 (如含镉大米) 等方式摄入镉。当然,吸烟也是慢性镉吸入的另一重要来源。随着经济的飞速发展,镉污染对于人类的影响越来越大。

[0005] 2004 年美国学者 A. Ramanaviciene 等发现血清中循环免疫复合物含量与地方环境污染有关,发现随着地区污染严重程度的增加,当地牛血清中的 CIC 含量显著增加,差异具有统计学意义,因而可以作为评价地区污染的指标。但环境污染究竟是如何刺激机体内

CIC 含量显著升高,是一种还是多种污染物共同作用导致其升高,CIC 的升高是否因此会导致机体损伤,增加机体对于疾病的易感性,这些都有待研究。众所周知,循环免疫复合物是一种特殊意义的蛋白质,而镉可作用于全身多个系统的蛋白质,镉是否可以作用于循环免疫复合物,而使循环免疫复合物含量改变、活性改变、功能改变,这些尚缺乏相关研究。

发明内容

[0006] 为了克服现有技术的不足,本发明的目的在于提供一种镉螯合型免疫复合物,该镉螯合型免疫复合物是一种相对特异性的免疫复合物,用于检测地区人群血清中是否镉螯合型免疫复合物及含量,间接反映这个地区镉污染程度。

[0007] 为解决上述问题,本发明所采用的技术方案如下:

[0008] 一种镉螯合型免疫复合物,该镉螯合型免疫复合物为以下复合物中的一种:

[0009] 镉结合于免疫复合物形成的复合物,或

[0010] 镉结合于载体蛋白及能和该载体蛋白特异性结合的抗体所形成的复合物;或

[0011] 镉结合于免疫球蛋白后与载体蛋白结合形成的复合物。

[0012] 具体的,所述载体蛋白或免疫复合物至少含有锌指结构、巯基、半胱氨酸残基中一种结构,镉通过锌指结构、巯基、半胱氨酸残基中至少一种与载体蛋白或免疫复合物结合。

[0013] 具体的,所述载体蛋白为抗体蛋白、脂蛋白、血红蛋白、核抗原、异种血清抗原、病毒、细菌、原虫、蠕虫中的一种。

[0014] 进一步的,镉通过螯合剂与载体蛋白结合后再与能和载体蛋白特异性结合的抗体结合。

[0015] 进一步的,所述螯合剂为 ITCBE、EDTA、多磷酸盐、氨基酸、1,3-二酮、羟基羧酸中的一种。

[0016] 本发明还提供了一种制备镉螯合型免疫复合物的方法,通过这以下方法获得镉螯合型免疫复合物:

[0017] A) 合成镉螯合型免疫复合物的步骤:先将螯合剂与载体蛋白结合,再与镉离子络合;

[0018] B) 提纯镉螯合型免疫复合物的步骤:采用免疫亲和层析去除步骤 A) 合成的镉螯合型免疫复合物中未参与反应的载体蛋白、特异性抗体及 Cd^{2+} 。

[0019] 具体地,所述镉螯合型免疫复合物的制备方法中,

[0020] 所述步骤 A) 具体步骤如下:

[0021] (1) 配制螯合剂:将螯合剂溶于溶剂中,配制成螯合剂溶液;

[0022] (2) 配制载体蛋白溶液:将载体蛋白加入到硼酸盐溶液中;

[0023] (3) 搅拌过夜:将步骤 (1) 螯合剂溶液加入到步骤 (2) 的载体蛋白溶液中,搅拌后于摇床中过夜,得到混合液;

[0024] (4) 透析袋预处理:在透析袋中加入 EDTA- NaHCO_3 溶液煮沸,弃废液后用 ddH_2O 冲洗;重复该步骤 1-3 次;

[0025] (5) 透析:将步骤 (3) 的混合液装入经步骤 (4) 处理后的透析袋中,用 ddH_2O 透析,换水 2-3 次,透析过夜之后,收集液体;

[0026] (6) 镉离子螯合:在上述步骤 (5) 中的液体中加入 HCl 溶液调整 pH 至 7.0,缓慢加

入 CdCl_2 溶液,边滴加边震荡,之后于摇床中过夜,然后重复步骤 (5) 一次,收集液体,得到镉整合型抗原;

[0027] (7) 在上述镉整合型抗原中加入能与载体蛋白特异性结合的抗体反应后得到镉整合型免疫复合物;

[0028] 所述步骤 B) 具体步骤如下:

[0029] (a) 将上述 A) 步骤合成的镉整合型免疫复合物复溶于生理盐水中,得到复溶液;

[0030] (b) 层析柱预处理:使用样品缓冲稀释液冲洗管路,在层析柱中装入含有能与免疫复合物特异性结合的物质填料的填料,装柱后继续用样品缓冲稀释液平衡柱子;

[0031] (c) 上样:待柱子平衡后,用样品缓冲液稀释上述复溶液,然后上柱,镉整合型免疫复合物吸附在填料上,未反应的载体蛋白、抗体、 Cd^{2+} 随缓冲液流出;

[0032] (d) 洗脱:使用样品缓冲稀释液冲洗柱子,至基线平衡,然后使用 $0.05\text{--}0.1\text{mol/L}$ 的磷酸盐溶液进行洗脱,镉整合型免疫复合物随着洗脱液洗脱出来;

[0033] (e) 收集:收集洗脱液,收集完毕后立即使蛋白复性;

[0034] (f) 收集到的洗脱液装入透析袋用 ddH_2O 透析除盐,换水 2-4 次后,多次透析过夜,收集样本;

[0035] (g) 层析柱预处理:采用新的层析柱,用样品缓冲稀释液冲洗管路,在该层析柱中装入含有能与 Cd 特异性结合的物质填料的填料,装柱后再用样品缓冲稀释液平衡柱子;

[0036] (h) 上样:待步骤 (g) 的柱子平衡后,用样品缓冲液稀释上述步骤 (f) 的样本,然后将稀释后的样本上柱,镉整合型免疫复合物吸附在填料上,未反应的抗原抗体复合物会随缓冲液流出;

[0037] (i) 洗脱:步骤 (h) 之后用样品缓冲稀释液冲洗柱子,至基线平衡,然后使用 $0.5\text{--}1.0\text{mol/L}$ 的磷酸盐溶液进行洗脱,此时镉整合型免疫复合物随着洗脱液洗脱出来;

[0038] (j) 收集:收集步骤 (i) 的洗脱液,收集完毕后立即使蛋白复性;

[0039] (k) 对步骤 (j) 收集到的洗脱液装入透析袋用 ddH_2O 透析除盐,换水三次后,多次透析过夜,收集样本,即得到纯化的镉整合型免疫复合物。

[0040] 本发明还提供了上述镉整合型免疫复合物在制备检测整合镉免疫复合物的酶联免疫试剂盒中的应用。

[0041] 本发明还提供了一种检测整合镉免疫复合物的酶联免疫试剂盒,该试剂盒包括如权利要求 1 所述的镉整合型免疫复合物的标准品。

[0042] 进一步的,上述试剂盒还包括至少一种以下试剂:以捕获免疫复合物的蛋白作为包被液、以捕获金属 Cd^{2+} 的抗体作为二抗、酶标抗体。

[0043] 一种检测镉整合型免疫复合物的方法,以已知含量的镉整合型免疫复合物作为标准品,采用以下方法之一对样品进行检测:酶联免疫法、酶联免疫与原子吸收光谱结合法、酶联免疫与电感耦合等离子体质谱结合法、提纯免疫复合物与原子吸收光谱结合法、提纯免疫复合物与电感耦合等离子体质谱结合法、电泳与酶联免疫或原子吸收光谱或电感耦合等离子体质谱结合法。

[0044] 相比现有技术,本发明的有益效果在于:

[0045] 1. 首次合成了镉整合型免疫复合物,并证实了在机体内镉可存在于免疫系统,并证明了镉整合型免疫复合物的存在;

[0046] 2. 本发明实现了免疫复合物的特异性识别,并实现了镉螯合型免疫复合物的定量检测,提供从免疫角度检测机体内的镉含量水平的方法,并为工业地区的镉污染水平提供间接指标。

[0047] 下面结合附图和具体实施方式对本发明作进一步详细说明。

附图说明

[0048] 图 1 为本发明实施例 1 所述镉螯合环免疫复合物电泳图;

[0049] 图 2 为本发明实施例所述的镉螯合环免疫复合物荧光分析图

具体实施方式

[0050] 一种镉螯合型免疫复合物,该镉螯合型免疫复合物为以下复合物中的一种:

[0051] 镉结合于免疫复合物形成的复合物,或

[0052] 镉结合于载体蛋白及能和该载体蛋白特异性结合的抗体所形成的复合物;或

[0053] 镉结合于免疫球蛋白后与载体蛋白结合形成的复合物。

[0054] 具体的,所述载体蛋白或免疫复合物至少含有锌指结构、巯基、半胱氨酸残基中一种结构,镉通过锌指结构、巯基、半胱氨酸残基中至少一种与载体蛋白或免疫复合物结合。

[0055] 具体的,所述载体蛋白为抗体蛋白、脂蛋白、血红蛋白、核抗原、异种血清抗原、病毒、细菌、原虫、蠕虫中的一种。

[0056] 进一步的,镉通过螯合剂与载体蛋白结合后再与能和载体蛋白特异性结合的抗体结合。

[0057] 进一步的,所述螯合剂为 ITCBE、EDTA、多磷酸盐、氨基酸、1,3-二酮、羟基羧酸中的一种。

[0058] 本发明还提供了一种制备镉螯合型免疫复合物的方法,通过这种方法获得镉螯合型免疫复合物。

[0059] 其中,该制备方法包括:

[0060] A) 合成镉螯合型免疫复合物的步骤;

[0061] B) 提纯镉螯合型免疫复合物的步骤:采用免疫亲和层析去除步骤 A) 合成的镉螯合型免疫复合物中未参与反应的载体蛋白、特异性抗体及 Cd^{2+} 。

[0062] 具体地,所述镉螯合型免疫复合物的制备方法中,

[0063] 所述步骤 A) 具体步骤如下:

[0064] (1) 配制螯合剂:将螯合剂溶于溶剂中,配制成螯合剂溶液;

[0065] (2) 配制载体蛋白溶液:将载体蛋白加入到硼酸盐溶液中;

[0066] (3) 搅拌过夜:将步骤 (1) 螯合剂溶液加入到步骤 (2) 的载体蛋白溶液中,搅拌后于摇床中过夜,得到混合液;

[0067] (4) 透析袋预处理:在透析袋中加入 EDTA-NaHCO_3 溶液煮沸,弃废液后用 ddH_2O 冲洗;重复该步骤 1-3 次;

[0068] (5) 透析:将步骤 (3) 的混合液装入经步骤 (4) 处理后的透析袋中,用 ddH_2O 透析,换水 2-3 次,透析过夜之后,收集液体;

[0069] (6) 镉离子螯合:在上述步骤 (5) 中的液体中加入 HCl 溶液调整 pH 至 7.0,缓慢加

入 CdCl_2 溶液,边滴加边震荡,之后于摇床中过夜,然后重复步骤 (5) 一次,收集液体,得到镉整合型抗原;

[0070] (7) 在上述镉整合型抗原中加入能与载体蛋白特异性结合的抗体反应后得到镉整合型免疫复合物;

[0071] 所述步骤 B) 具体步骤如下:

[0072] (a) 将上述 A) 步骤合成的镉整合型免疫复合物复溶于生理盐水中,得到复溶液;

[0073] (b) 层析柱预处理:使用样品缓冲稀释液冲洗管路,在层析柱中装入含有能与免疫复合物特异性结合的物质填料,装柱后继续用样品缓冲稀释液平衡柱子;

[0074] (c) 上样:待柱子平衡后,用样品缓冲液稀释上述复溶液,然后上柱,镉整合型免疫复合物吸附在填料上,未反应的载体蛋白、抗体、 Cd^{2+} 随缓冲液流出;

[0075] (d) 洗脱:使用样品缓冲稀释液冲洗柱子,至基线平衡,然后使用 $0.05\text{--}0.1\text{mol/L}$ 的磷酸盐溶液进行洗脱,镉整合型免疫复合物随着洗脱液洗脱出来;

[0076] (e) 收集:收集洗脱液,收集完毕后立即用使蛋白复性;

[0077] (f) 收集到的洗脱液装入透析袋用 ddH_2O 透析除盐,换水 2-4 次后,多次透析过夜,收集样本;

[0078] (g) 层析柱预处理:采用新的层析柱,用样品缓冲稀释液冲洗管路,在该层析柱中装入含有能与 Cd^{2+} 特异性结合的物质填料,装柱后再用样品缓冲稀释液平衡柱子;

[0079] (h) 上样:待步骤 (g) 的柱子平衡后,用样品缓冲液稀释上述步骤 (f) 的样本,然后将稀释后的样本上柱,镉整合型免疫复合物吸附在填料上,未反应的抗原抗体复合物会随缓冲液流出;

[0080] (i) 洗脱:步骤 (h) 之后用样品缓冲稀释液冲洗柱子,至基线平衡,然后使用 $0.5\text{--}1.0\text{mol/L}$ 的磷酸盐溶液进行洗脱,此时镉整合型免疫复合物随着洗脱液洗脱出来;

[0081] (j) 收集:收集步骤 (i) 的洗脱液,收集完毕后立即用使蛋白复性;

[0082] (k) 对步骤 (j) 收集到的洗脱液装入透析袋用 ddH_2O 透析除盐,换水三次后,多次透析过夜,收集样本,即得到纯化的镉整合型免疫复合物。

[0083] 本发明还提供了上述镉整合型免疫复合物在制备检测整合镉免疫复合物的酶联免疫试剂盒中的应用。

[0084] 本发明还提供了一种检测整合镉免疫复合物的酶联免疫试剂盒,该试剂盒包括本发明所述的镉整合型免疫复合物的标准品。

[0085] 进一步的,上述试剂盒还包括至少一种以下试剂:以捕获免疫复合物的蛋白作为包被液、以捕获金属 Cd^{2+} 的抗体作为二抗、酶标抗体。

[0086] 本发明除特别说明外,涉及的实验操作步骤均为本领域常规的步骤,所用试剂、材料如下所述列举,在本发明中没有列举出来的均为本领域常用的试剂或可以通过市购方式获得:

[0087] 样品缓冲稀释液,其为 $\text{pH}9.6$ 、摩尔质量为 0.05M 的碳酸盐缓冲液,每 1000mL 的样品缓冲液的制备方法如下:取 $1.5\text{gNa}_2\text{CO}_3$ 和 2.93gNaHCO_3 ,然后加入 ddH_2O 至 1000mL ,即得;

[0088] 洗涤液,该洗涤液为 $\text{pH}7.4$ 、摩尔质量为 0.15M 的 PBS,每 1000mL 的洗涤液的制备方法如下:取 $0.2\text{gKH}_2\text{PO}_4$ 、 $2.90\text{gNa}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、 8.0gNaCl 、 0.2gKCl 和 0.5mLTween-20 ,然后加入 ddH_2O 至 1000mL ,即得;

[0089] 酸化剂为硝酸；

[0090] 包被液，每 100ml 的包被液的制备方法如下：取 0.1g 牛血清白蛋白 (BSA)，然后加入洗涤液至 100ml，即得；

[0091] 封闭液，在本发明的具体实施方式中，ELISA 法所采用的封闭液与包被液相同；

[0092] 终止液，该终止液中 H_2SO_4 的摩尔质量为 2M，每 200ml 的终止液的制备方法如下：取 178.3ml ddH₂O，然后逐滴加入浓硫酸至 200ml，即得；

[0093] 底物缓冲液，该底物缓冲液的 pH 为 5.0，其中 Na_2HPO_4 的摩尔质量为 0.2M、柠檬酸的摩尔质量为 0.1M，每 50ml 的底物缓冲液的制备方法如下：取 1.42g Na_2HPO_4 、0.96g 柠檬酸，然后加入 ddH₂O 至 50ml，即得；

[0094] 甲基联苯胺 (TMB) 溶液，该甲基联苯胺 (TMB) 溶液由按照如下比例的组分配制而成：TMB：底物缓冲液：0.75% H_2O_2 = 0.5ml：10ml：32 μL ，其中 TMB 为 2g/L 的甲基联苯胺乙醇溶液；

[0095] ABTS 溶液，该 ABTS 溶液由按照如下比例的组分配制而成：ABTS：底物缓冲液：3% H_2O_2 = 0.5mg：1.0ml：2 μL ；

[0096] 洗脱液为用木瓜蛋白酶与 pH 8.0、0.1mol/L Tris-HCl 缓冲液配制成 1-2mg/ml 的溶液。

[0097] 可捕获金属 Cd^{2+} 的物质或抗 Cd^{2+} 抗体为购买自巴傲德生物技术公司 (BioWorld Inc) 货号 BNA0008、或巴傲得生物科技有限公司生产的型号为 AP7015 的抗镉抗体；其中，本发明所述与镉特异性结合的物质、抗 Cd^{2+} 抗体、抗镉抗体均可以为同一种物质；

[0098] 可以捕获免疫复合物的蛋白为可与免疫复合物特异性结合的蛋白，包括但不限于如补体 C1q、C1F 蛋白、抗 C3 抗体；以下实施例中，可以捕获免疫复合物的蛋白具体使用的是 C1qRecombinant Protein，货号为“NOVUS H00000712-p01”；

[0099] 在本发明中，能实现本发明目的的试剂盒可以列出以下几种，但并不限于此。

[0100] 一种用于检测镉整合型免疫复合物的试剂盒，包括可用于捕获免疫复合物的蛋白作为包被液，还包括封闭液、洗涤液、可捕获金属 Cd^{2+} 的物质作为二抗、酶标抗体、底物、终止液、样品缓冲稀释液、阳性对照、阴性对照。

[0101] 一种用于检测镉整合型免疫复合物的试剂盒，包括作为包被液的可用于捕获免疫复合物的蛋白，还包括封闭液、洗涤液、洗脱液、阳性对照、阴性对照。

[0102] 一种用于检测镉整合型免疫复合物的试剂盒，包括作为包被液的可用于捕获免疫复合物的蛋白，还包括封闭液、洗涤液、洗脱液、硝酸、过氧化氢、阳性对照、阴性对照。

[0103] 一种用于检测镉整合型免疫复合物的试剂盒，包括作为包被液的可用于捕获金属 cd 的物质、封闭液、洗涤液、酶标抗体、底物、终止液、样品缓冲稀释液、阳性对照、阴性对照等。

[0104] 一种用于检测镉整合型免疫复合物的试剂盒，包括用于提纯血清免疫复合物所需溶液、复溶液、阳性对照、阴性对照等。

[0105] 一种用于检测镉整合型免疫复合物的试剂盒，包括用于提纯血清免疫复合物所需溶液、复溶液、硝酸、过氧化氢、阳性对照、阴性对照等。

[0106] 一种用于检测镉整合型免疫复合物的试剂盒，包括用于提纯血清免疫复合物所需溶液、胶床介质、复溶液、样品缓冲稀释液、溶解胶床上相应蛋白条带所需液体、作为包被液

可用于捕获金属 cd 的物质、封闭液、洗涤液、酶标抗体、底物、终止液、样品缓冲液、阳性对照、阴性对照等。

[0107] 一种用于检测镉整合型免疫复合物的试剂盒,包括用于提纯血清免疫复合物所需溶液、胶床介质、复溶液、样品缓冲稀释液、溶解胶床上相应蛋白条带所需液体、阳性对照、阴性对照等。

[0108] 一种用于检测镉整合型免疫复合物的试剂盒,包括用于提纯血清免疫复合物所需溶液、胶床介质、复溶液、样品缓冲稀释液、溶解胶床上相应蛋白条带所需液体、硝酸、过氧化氢、阳性对照、阴性对照等。

[0109] 上述所列举出的试剂盒中,所述酶标抗体包括但不限于含有辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶等酶标记的抗体;所述复溶液为生理盐水;所述胶床介质包括但不限于琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶等中的一种;用于提纯血清免疫复合物所需溶液包括但不限于 PEG 溶液、硼酸盐缓冲液等中的一种、所述酶标抗体包括但不限于有辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等酶标记的抗体中的一种,所述阳性对照或标准品为本发明所述的个镉整合型免疫复合物,所述底物为 TMB 溶液。

[0110] 本发明还提供了一种检测镉整合型免疫复合物的方法,以已知含量的镉整合型免疫复合物作为标准品,采用以下方法之一对样品进行检测:酶联免疫法、酶联免疫与原子吸收光谱结合法、酶联免疫与电感耦合等离子体质谱结合法、提纯免疫复合物与原子吸收光谱结合法、提纯免疫复合物与电感耦合等离子体质谱结合法、电泳与酶联免疫或原子吸收光谱或电感耦合等离子体质谱结合法。在本发明中,用检测镉整合型免疫复合物的方法可以列出的有以下几种,但并不限于以下几种。

[0111] 方法一:ELISA 法检测镉整合型免疫复合物,具体步骤如下:

[0112] 1) 将可以捕获免疫复合物的蛋白包被于固相载体上:用样品缓冲稀释液稀释包被蛋白至 2500-20000 倍,加入 ELISA 板微孔中,4℃过夜 16-18 小时,或 37℃水浴 1-3 小时,储存冰箱;

[0113] 2) 封闭:移去样品缓冲稀释液稀,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加封闭液,37℃放置 1 小时,移去封闭液,并用洗涤液进行洗涤,洗涤完成后,ELISA 板于 36.5-37.5℃放置 1 小时;

[0114] 3) 加待检样品,并且温育:取血样,待检样品;以已知含量的镉整合型免疫复合物作标准样品;用样品缓冲液稀释 10-40 倍,加入微孔中,37℃作用 1-2 小时;

[0115] 4) 加入捕获镉的物质,并且温育:移去待检样品,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入用稀释缓冲液稀释与镉有亲和力的物质或能与镉反应形成抗原抗体复合物的抗镉抗体稀释至 12500-100000 倍,37℃作用 1-2 小时,使其与免疫复合物上的金属镉反应;

[0116] 5) 酶结合物温育:移去抗 Cd^{2+} 抗体,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入用稀释缓冲液稀释的 HRP 酶标抗体,37℃作用 1-2 小时,使其与抗 Cd^{2+} 抗体反应;

[0117] 6) 底物温育:移去酶标抗体,并用相应洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入底物,37℃避光作用 30 分钟;

[0118] 7) 终止反应:以与加底物液相同的速度和顺序滴加终止液至每一微孔;

[0119] 8) 取波长为 405nm,加完终止液后,在上述 ELISA 试剂板中洗脱的溶液中取 0.5ml 液体,于酶标仪上分别读取待测样品组和标准样品的 OD 值,通过与标准样品组比较,求得

待测样品的含量（也可不使用酶标仪，直接通过染色情况进行定性检测）。

[0120] 该方法利用酶联免疫吸附测定（ELISA）原理，可以将血清中的非特异性免疫复合物提取出来，提取出来的免疫复合物上部分整合有重金属镉，而这部分免疫复合物上的镉可以被与镉有亲和力的物质或能与镉反应形成抗原抗体复合物的抗镉的特异性抗体所捕获，之后可以再被辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等酶标记的抗体所捕获（该抗体不识别包被蛋白），捕获上的抗体在显色剂及终止液的作用下，在仪器下读出 OD 值，而不含有螯合金属镉的免疫复合物，则不会被抗镉的特异性抗体所捕获，也不会与辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等酶标记的抗体所捕获，而所用试剂中也不含有金属镉（阴性对照组结果为阴性），因而当所读取的 OD 值结果显示为阳性时，即可证明检测出循环免疫复合物上整合的金属镉。

[0121] 方法二：ELISA 法+AAS 法检测镉整合型免疫复合物，具体步骤如下：

[0122] 1) 将可以捕获免疫复合物的蛋白包被于固相载体上：用样品缓冲液稀释包被蛋白至 2500-20000 倍，加入 ELISA 板微孔中，4℃过夜 16-18 小时，或 37℃水浴 1-3 小时，储存冰箱；

[0123] 2) 封闭：移去样品缓冲液稀释，并用洗涤液进行洗涤，待洗涤完成后，加封闭液，37℃放置 1 小时，移去封闭液，并用洗涤液进行洗涤，洗涤完成后，ELISA 板于 36.5-37.5℃放置 1 小时；

[0124] 3) 加待检样品，并且温育：取血样，作待检样品；以已知含量的镉整合型免疫复合物作标准样品；用样品缓冲液稀释 10-40 倍，加入微孔中，37℃作用 1-2 小时；

[0125] 4) 洗脱：移去待检样品，并用洗涤液进行洗涤，待洗涤完成后，加入稀释倍数为 5-80 倍的洗脱液，于 37-57℃下作用 0-2 小时；

[0126] 5) 检测：在上述 ELISA 试剂板中洗脱的溶液中取 0.5ml 液体，于原子吸收光谱仪检测整合于免疫复合物上的镉，读出相应数值。

[0127] 该方法进一步的在酶联免疫原理的基础上结合原子吸收光谱（AAS）原理，利用原子吸收光谱仪检测整合于循环免疫复合物上的镉，由于溶液中仅含有免疫复合物，且所用试剂中不含任何重金属（阴性对照组结果为阴性），不会对结果造成干扰，因而当所读取的结果显示为阳性时，即可证明检测出循环免疫复合物上整合的金属镉。

[0128] 方法三：ELISA 法+ICP-MS 法检测镉整合型免疫复合物，具体步骤如下：

[0129] 1) 将可以捕获免疫复合物的蛋白包被于固相载体上：用样品缓冲液稀释包被蛋白至 2500-20000 倍，加入 ELISA 板微孔中，4℃过夜 16-18 小时，或 37℃水浴 1-3 小时，储存冰箱。

[0130] 2) 封闭：移去样品缓冲液稀释，并用洗涤液进行洗涤，待洗涤完成后，加封闭液，37℃放置 1 小时，移去封闭液，并用洗涤液进行洗涤，洗涤完成后，ELISA 板于 36.5-37.5℃放置 1 小时；

[0131] 3) 加待检样品，并且温育：从循环系统取样，作待检样品；以已知含量的镉整合型免疫复合物作标准样品；用样品缓冲液稀释 10-40 倍，加入微孔中，37℃作用 1-2 小时；

[0132] 4) 洗脱：移去待检样品，并用洗涤液进行洗涤，待洗涤完成后，洗脱液加入稀释倍数为 5-80 倍的洗脱液，于 37-57℃下作用 0-2 小时；

[0133] 5) 酸化：在溶液中加入酸化剂对溶液进行酸化，封口过夜，彻底酸化；

[0134] 6) 检测：加入双氧水，并且加热赶酸，在上述 ELISA 试剂板中洗脱的溶液中取

0.5ml 液体,于电感耦合等离子体质谱仪下检测整合于免疫复合物上的镉,并绘制标准曲线,读出相应数值。

[0135] 该方法进一步的在酶联免疫原理的基础上结合电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS)原理,用 ICP-MS 检测整合于循环免疫复合物上的镉,由于溶液中仅含有免疫复合物,且所用试剂中不含任何重金属(阴性对照组结果为阴性),不会对结果造成干扰,因而当所读取的结果显示为阳性时,即可证明检测出循环免疫复合物上整合的金属镉。

[0136] 方法四:提纯 CIC 法 +ELISA 法检测镉整合型免疫复合物,具体步骤如下:

[0137] 1) 提取非特异性免疫复合物:利用聚乙二醇 PEG 沉淀法、超速离心、分子超滤、凝胶过滤等方法提取非特异性免疫复合物将提纯出来的免疫复合物复溶;

[0138] 2) 用可以捕获镉的物质包被于固相载体上:用样品缓冲液稀释包被抗体至 12500-100000 倍,加入 ELISA 板微孔中,4℃过夜 16-18 小时,或 37℃水浴 1-3 小时,储存冰箱;

[0139] 3) 封闭:移去样品缓冲液稀释,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加封闭液,37℃放置 1 小时,移去封闭液,并用洗涤液进行洗涤,洗涤完成后,ELISA 板于 36.5-37.5℃放置 1 小时;

[0140] 4) 加待检样品,并且温育:从提取的非特异性免疫复合物的复溶液中取样,作待检样品;以已知含量的镉整合型免疫复合物作标准样品;用样品缓冲液稀释 10-40,加入微孔中,37℃作用 1-2 小时;

[0141] 5) 酶结合物温育:移去非特异性免疫复合物的复溶液,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入用稀释缓冲液稀释的 HRP 酶标抗体,37℃作用 1-2 小时,使其与抗 Cd^{2+} 抗体反应;

[0142] 6) 底物温育:移去酶标抗体,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入底物,37℃避光作用 30 分钟;

[0143] 7) 终止反应:以与加底物液相同的速度和顺序滴加终止液至每一微孔。

[0144] 8) 取波长为 405nm,加完终止液后,在上述 ELISA 试剂板中洗脱的溶液中取 0.5ml 液体,于酶标仪上分别读取待测样品组和标准样品的 OD 值,通过与标准样品组比较,求得待测样品的含量(也可不使用酶标仪,直接通过染色情况进行定性检测)。

[0145] 方法五:提纯 CIC 法 +AAS 法检测镉整合型免疫复合物,具体步骤如下:

[0146] 1) 提取非特异性免疫复合物:利用聚乙二醇 PEG 沉淀法、超速离心、分子超滤、凝胶过滤等方法提取非特异性免疫复合物将提纯出来的免疫复合物复溶;

[0147] 2) 检测:从非特异性免疫复合物的复溶液中取 0.5ml 液体,于原子吸收光谱仪检测整合于免疫复合物上的镉,读出相应数值。

[0148] 方法六:提纯 CIC 法 +ICP-MS 法检测镉整合型免疫复合物,具体步骤如下:

[0149] 1) 提取非特异性免疫复合物:利用聚乙二醇 PEG 沉淀法、超速离心、分子超滤、凝胶过滤等方法提取非特异性免疫复合物将提纯出来的免疫复合物用复溶剂复溶于溶液中;

[0150] 2) 酸化:从非特异性免疫复合物的复溶液中取适量液体,在溶液中加入酸化剂对溶液进行酸化,封口过夜,彻底酸化。

[0151] 3) 检测:加入双氧水,并且加热赶酸,在赶酸后的溶液中取 0.5ml 液体,于电感耦

合等离子体质谱仪下检测整合于免疫复合物上的镉,并绘制标准曲线,读出相应数值。

[0152] 方法七:电泳法+ELISA/AAS/ICP-MS法检测镉整合型免疫复合物,具体步骤如下:

[0153] 1) 提取非特异性免疫复合物:利用聚乙二醇 PEG 沉淀法、超速离心、分子超滤、凝胶过滤等方法提取非特异性免疫复合物将提纯出来的免疫复合物复溶;

[0154] 2) 制备胶床:根据需求选择合适的介质(如琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶等),制备好相应胶床;

[0155] 3) 加样:从提纯出来的非特异性免疫复合物复溶剂中 8 μ L 溶液+2 μ L(5X) 上样缓冲液,混匀,短暂离心;其中样品缓冲液(Sample buffer)可由如下比例的组分配制而成:Tris-HCl:1%溴酚蓝:ddH₂O:甘氨酸=15.5:2.5:7:25,其中 Tris-HCl 的 pH 为 6.8、摩尔质量为 1M;

[0156] 4) 电泳:连接电泳板,进行电泳,并根据需求将蛋白按照分子量、等电点等参数的不同进行分离;电泳过程中,每 1000mL 所采用的电泳缓冲液可通过如下方法制得:取 Tris 3.0g、甘氨酸 14.4g,溶于 800mL ddH₂O 中,调节 pH 至 8.3,然后加入 ddH₂O 至 1000mL,即得;

[0157] 5) 检测:在胶床上找出含有镉的蛋白条带,将该条带取出溶解后,然后再分别利用 ELISA、ICP-MS、AAS 等原理检测溶于液体中的镉含量;此外,还可以利用此方法检测整合镉的免疫复合物的等电点、分子量及含量等。

[0158] 方法四、方法五、方法六和方法七中,血浆中免疫复合物的提取方法示例如下:

[0159] A. 取 2mL 血清,加入 0.1mol/L pH8.6 硼酸缓冲液稀释,稀释血清至 3 倍;

[0160] B. 取上述稀释后的血清加入 6mL 7.5% PEG,并置于 4℃ 2-4h,然后取出;

[0161] C. 在 4℃ 下,3000r/min 离心 20min,弃去上清液;

[0162] D. 加入 3.75% PEG1mL 将步骤 C) 的沉淀物复溶,并 3000r/min 离心 20min,弃去上清液;

[0163] E. 再次加入 3.75% PEG1mL 将步骤 D) 的沉淀物复溶,并 3000r/min 离心 20min,弃去上清液,即免疫复合物。

[0164] 实施例 1

[0165] 本实施例所用到的试剂如下:

[0166] 硼酸盐缓冲液,方法如下:称取 0.31g 硼酸溶于 400mL 超纯水中,用 0.1M 的 NaOH 水溶液调节 pH 至 9.0,定容至 500mL,即得;

[0167] 血红蛋白溶液,其制备方法如下:取血红蛋白溶于上述摩尔质量为 0.01M、pH 为 9.0 硼酸盐缓冲液中,充分振荡溶解,配制成 1.0mg/mL 的血红蛋白溶液;

[0168] 5mmol/L EDTA+200mmol/L NaHCO₃溶液,每 1000mL 5mmol/L EDTA+200mmol/L NaHCO₃溶液的由如下方法制得:取 1.86g EDTA 2H₂O、16.8g NaHCO₃,加入 900mL 超纯水中,然后用摩尔质量为 1.0M 的 NaOH 水溶液调整 pH 至 8.0,然后加入超纯水定容至 1000mL,高压灭菌,室温保存,即得;

[0169] ITCBE,购买自日本同仁化学研究所,货号为 M030;

[0170] 透析袋,截留分子量 14000,产自 Bioshop Inc 公司;

[0171] 可捕获金属 cd 的物质为购买自巴傲德生物技术公司(BioWorld Inc)货号 BNA0008;

[0172] 一种镉螯合型免疫复合物,通过以下方法制备得到:

[0173] A) 合成镉螯合型免疫复合物的步骤:

[0174] (1) 配制螯合剂:取 2.0mgITCBE 溶于 DMSO 中,,得到螯合剂溶液;

[0175] (2) 配制蛋白溶液:取已经配置好的 1.0mg/mL 的血红蛋白溶液;

[0176] (3) 搅拌过夜:将步骤(1)的螯合剂溶液加入到步骤(2)的血红蛋白溶液中,搅拌后于摇床中过夜,得到混合液;

[0177] (4) 透析袋预处理:在透析袋中加入 5mmol/L EDTA+200mmol/L NaHCO₃溶液中,煮沸 10min,弃煮沸液,用 ddH₂O 彻底冲洗,然后再次加入 5mmol/L EDTA+200mmol/L NaHCO₃溶液,煮沸 10min;弃煮沸液,用 ddH₂O 彻底冲洗;

[0178] (5) 透析:将步骤(3)的混合液装入经步骤(4)处理后的透析袋中,用 2L ddH₂O 透析 24h,换水 3 次,透析过夜之后,收集液体;

[0179] (6) 镉离子螯合:在上述步骤(5)中的液体中加入 HCl 溶液调整 pH 至 7.0,缓慢加入 CdCl₂溶液,边滴加边震荡,避免镉离子使蛋白变性产生沉淀;之后于摇床中过夜,然后重复步骤(5)一次,收集液体,得到镉螯合型抗原;

[0180] (7) 在上述镉螯合型抗原中加入能与血红蛋白溶特异性结合的抗体反应后得到镉螯合型免疫复合物;

[0181] B) 提纯镉螯合型免疫复合物的步骤:

[0182] (a) 将上述 A) 步骤合成的镉螯合型免疫复合物复溶于生理盐水中,得到复溶液;

[0183] (b) 层析柱预处理:使用样品缓冲稀释液冲洗管路,在层析柱中装入包含能与免疫复合物特异性结合的物质填料的填料,装柱后继续用样品缓冲稀释液平衡柱子;

[0184] (c) 上样:待柱子平衡后,用样品缓冲液稀释上述复溶液,然后上柱,镉螯合型免疫复合物吸附在填料上,未反应的血红蛋白溶、抗体、Cd²⁺随缓冲液流出;

[0185] (d) 洗脱:使用样品缓冲稀释液冲洗柱子,至基线平衡,然后使用 0.05mol/L 的磷酸盐溶液进行洗脱,镉螯合型免疫复合物随着洗脱液洗脱出来;

[0186] (e) 收集:收集洗脱液,收集完毕后立即使蛋白复性;

[0187] (f) 收集到的洗脱液装入透析袋用 ddH₂O 透析除盐,换水 2-4 次后,多次透析过夜,收集样本;

[0188] (g) 层析柱预处理:采用新的层析柱,用样品缓冲稀释液冲洗管路,在该层析柱中装入包含能可捕获金属 Cd²⁺的物质或抗 Cd²⁺抗体的填料,装柱后再用样品缓冲稀释液平衡柱子;

[0189] (h) 上样:待步骤(g)的柱子平衡后,用样品缓冲液稀释上述步骤(f)的样本,然后将稀释后的样本中上柱,镉螯合型免疫复合物吸附在填料上,未反应的抗原抗体复合物会随缓冲液流出;

[0190] (i) 洗脱:步骤(h)之后用样品缓冲稀释液冲洗柱子,至基线平衡,然后使用 1.0mol/L 的磷酸盐溶液进行洗脱,此时镉螯合型免疫复合物随着洗脱液洗脱出来;

[0191] (j) 收集:收集步骤(i)的洗脱液,收集完毕后立即使蛋白复性;

[0192] (k) 对步骤(j)收集到的洗脱液装入透析袋用 2L ddH₂O 透析除盐,换水三次后,4 次透析过夜,收集样本,即得到纯化的镉螯合型免疫复合物。

[0193] 实施例 1 所制备的镉螯合型免疫复合物,通过凝胶电泳进一步分离,并通过电感

耦合等离子体质谱或原子吸收光谱进行检测定性鉴定,步骤如下:

[0194] A) 制备胶床:根据需要选择作为非变性聚丙烯酰胺凝胶介质,制备好胶床;

[0195] B) 加样:取 8 μ L 提纯出来的镉整合型免疫复合物溶液液,加入 2 μ L 上样缓冲液,并混匀,然后加样于样品槽中;其中上样缓冲液 (Sample buffer) 由如下比例的组分配制而成:Tris-HCl:1%溴酚蓝:ddH₂O:甘氨酸=15.5:2.5:7:25(体积比),其中 Tris-HCl 的 pH 为 6.8、摩尔质量为 1M;

[0196] C) 电泳:连接电泳板,进行电泳,并根据需求将蛋白按照分子量、等电点等参数的不同进行分离;电泳过程中,电流为 22mA 恒流,环境温度为 4 度;至溴酚蓝移至胶底部时停止电泳;每 1000ml 所采用的电泳缓冲液通过如下方法制得:取 Tris 3.0g、甘氨酸 14.4g,溶于 800ml ddH₂O 中,调节 pH 至 8.3,然后加入 ddH₂O 至 1000ml,即得;

[0197] D) 检测:在胶床上找出相应蛋白条带,将该条带取出并溶解,然后再利用电感耦合等离子体质谱 (ICP-MS) 或原子吸收光谱 (AAS) 检测溶于液体中是否含有镉以及镉含量。

[0198] 实施例 1 的方法制备的镉整合型免疫复合物通过聚丙烯酰胺凝胶介质的胶床的电泳图如图 1 所示。

[0199] 本发明实施例 1 的镉整合型免疫复合物同步辐射 X 荧光分析,将蛋白条带内微量元素含量的 SRXRF 分析在北京正负电子对撞机 (BEPC) 的 4W1" 同步辐射束线上完成,储存环中电子束流能量为 2.2GeV,束流强度 100mA。样品移动台 (TSA200 型,北京卓立汉光公司) 可在计算机控制的步进马达驱动下沿 X、Y 二维方向上移动以改变入射光斑位置,移动步长为 0.0025mm。从样品发射出的 X 射线由 Si (Li) 探测器 (PGT Inc. LS 30143-DS) 探测,探头与入射 SR 线共平面且相互垂直,距样品照射点 20mm,信号用 PGT 多道分析仪 (MCA 4000) 获取输出。用 11.5keV 的单色同步辐射光激发样品,调节入射光斑 (1mmx 3mm) 位置使之处于条带一端,在 300s 的测定时间内,光斑一直沿条带均匀缓慢移动,计数结束时光斑移到该条带另一端。沿电泳方向每 1mm 取一个谱。采用 AX IL 软件处理数据,并用来源于空气且含量恒定的 Ar 信号峰对其它元素峰进行归一处理,以抵消束流强度变化对信号强弱产生的影响。在相同的条件下以同样的方式测量定量标准干胶膜的荧光谱,检测结果见图 2。

[0200] 本发明提供镉整合型免疫复合物,可用于制备检测镉整合免疫复合物的试剂,或可用于制备酶联免疫试剂盒中。

[0201] 检测条件的确定

[0202] 1. 补体蛋白最佳工作浓度以及血浆的最佳稀释倍数的确定

[0203] 采用本发明提供的镉整合型免疫复合物作为标准样品,包括以下步骤:

[0204] 1) 将可以捕获免疫复合物的蛋白包被于固相载体上:将补体 C1q 蛋白包被液分别以倍比为 1:2500、1:5000、1:10000、1:20000 的比例稀释,加入 ELISA 板微孔中,将 C1q 蛋白包被于固相载体上,每个浓度包被三排,4℃过夜 18 小时;

[0205] 2) 封闭:移去包被液,洗涤,加为封闭液,37℃放置 1 小时,移去封闭液,洗涤;

[0206] 3) 加待检样品,并且温育:加入待测血浆,并分别按照稀释倍比 1:10、1:20、1:40,加入微孔中,按照上述包被的 C1q 蛋白浓度,同一个浓度的 C1q 蛋白的分别加入不同稀释度血浆,37℃作用 1 小时;

[0207] 4) 加入捕获镉的物质,并且温育:移去待检样品,并用洗涤液进行洗涤,待洗

涤完成后,加入镉抗体,镉抗体也稀释为四个不同浓度,即 1:12500、1:25000、1:50000、1:100000,按照每一个相同 C1q 蛋白、血清稀释浓度,不同浓度 cd 抗各加 2 孔,37℃作用 1 小时,使其与免疫复合物上的金属镉反应;

[0208] 5) 酶结合物温育:酶标抗体按 1000 倍体积稀释至浓度为 2ng/ml,移去抗 Cd 抗体,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入用稀释缓冲液稀释的 HRP 酶标抗体,37℃作用 1 小时,使其与抗 cd 抗体反应;

[0209] 6) 底物温育:移去酶标抗体,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入底物,37℃避光作用 30 分钟;

[0210] 7) 终止反应:以与加底物液相同的速度和顺序滴加终止液至每一微孔;

[0211] 8) 检测:于 405nm 波长下在酶标仪上分别读取待测样品组和上述镉整合型免疫复合物标准样品的 OD 值,通过待检样品的 OD 值计算待检样品中镉整合型免疫复合物的含量。

[0212] 采用本发明提供的镉整合复合物标准品作为阳性对照,分别

[0213] 以不加检测样本作为阴性对照 1,即依次加入了 C1q 蛋白、封闭液、Pb 抗体、酶标和底物;

[0214] 以不加 Pb 抗体作为阴性对照 2,即依次加入了 C1q 蛋白、封闭液、待测血浆、酶标和底物;

[0215] 以不加酶标作为阴性对照 3、即依次加入了 C1q 蛋白、封闭液、待测血浆、Pb 抗体和底物;

[0216] 以同时不加检测样本和 Pb 抗体作为阴性对照 4,即依次加入了 C1q 蛋白、封闭液、酶标和底物;

[0217] 以不加免疫复合物捕获剂 C1q 蛋白作为空白对照 1,即加入了封闭液、待测血浆、Pb 抗体、酶标和底物;

[0218] 以及以只加底物为空白对照 2,以只加 PBS 为空白对照 3;通过 6 组实验以确定补体蛋白最佳工作浓度以及血浆的最佳稀释倍数的数据显示(每个数据皆为平均值),结果见表 1 和表 2。

[0219] 从表一中我们可以看出当补体蛋白 C1q 的稀释度为 1:5000、血浆稀释度为 1:20、cd 抗稀释度为 1:12500 时,OD 值最大,虽然 OD 值小于 0.8,但是其所对应的阴性对照组 OD 值全部小于 0.1,并且其所对应的阳性对照组,OD 值大于 0.8,所以选此值所对应的浓度作为最佳工作浓度,即 C1q 蛋白浓度为 1:5000,血浆稀释度为 1:20,cd 浓度为 1:12500。

[0220] 表 1 :C1q 和 Cd 抗体最佳工作浓度以及血浆稀释倍数的确定

[0221]

		<i>C1q</i> (1:2500)	<i>C1q</i> (1:5000)	<i>C1q</i> (1:10000)	<i>C1q</i> (1:20000)
Cd 抗 1:12500	血浆 1:10	0.613	0.651	0.355	0.215
	血浆 1:20	0.66	0.686	0.368	0.206
	血浆 1:40	0.331	0.3	0.225	0.194
Cd 抗 1:25000	血浆 1:10	0.607	0.669	0.341	0.248
	血浆 1:20	0.654	0.638	0.391	0.239
	血浆 1:40	0.315	0.368	0.206	0.181
Cd 抗 1:50000	血浆 1:10	0.45	0.415	0.259	0.161
	血浆 1:20	0.468	0.402	0.214	0.136
	血浆 1:40	0.205	0.218	0.165	0.116
Cd 抗	血浆 1:10	0.381	0.363	0.102	0.104

[0222]

1:100000	血浆 1:20	0.35	0.31	0.159	0.11
	血浆 1:40	0.146	0.175	0.109	0.103

[0223] 表 2 :ELISA 阳性对照及阴性对照 ELISA 检测结果

[0224]

	阳 性 对照	阴性对照					空白对照	
		阴性对 照 1	阴性 对照 2	阴性 对照 3	阴性 对照 4	阴性 对照 5	底物	只含 PBS
OD ₄₀₅	0.884	0.060	0.051	0.068	0.039	0.028	0.014	0.019

[0225] 如表 2 所示,阴性对照组和空白对照组的 OD 值均小于 0.1,所以此工作浓度作为最佳工作浓度。

[0226] 2. ELISA 洗脱液最佳工作浓度及时间的确定

[0227] 采用本发明提供的镅整合型免疫复合物作为标准样品,包括以下步骤:

[0228] 1) 将可以捕获免疫复合物的蛋白包被于固相载体上:将 C1q 蛋白包以 1:5000 的比例稀释作为包被液,加入 ELISA 板微孔中,将 C1q 蛋白包被于固相载体上,每个浓度包被三排,4℃过夜 18 小时;

[0229] 2) 封闭:移去包被液,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加 25%牛血清白蛋白作为封闭液,37℃放置 1 小时,移去封闭液,并用洗涤液进行洗涤;

[0230] 3) 移去封闭液,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入用稀释缓冲液稀释的 HRP 酶标抗体,37℃作用 1-2 小时,使其与抗 cd 抗体反应;

[0231] 4) 移去酶标抗体,分别将稀释比为 1:5、1:10、1:20、1:40、1:80 的洗脱液以及 PBS 缓冲液加入微孔中(注意每个浓度作 3 个复孔),分别放置于 37℃温度下作用 1h;

[0232] 5) 移去洗脱液,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入底物,37℃避光作用 30 分钟;

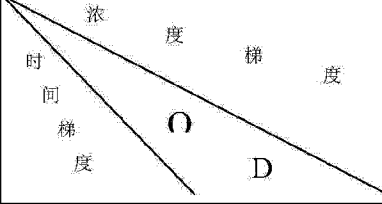
[0233] 6) 以与加底物液相同的速度和顺序滴加终止液至每一微孔;

[0234] 7) 取波长为 405nm,加完终止液后,于规定时间内在酶标仪上分别读取每组 OD 值,

通过与 PBS 组比较,比较出洗脱液作用最适浓度及温度具体结果参见表 3。

[0235] 表 3 ELISA 洗脱液最佳工作浓度及洗脱时间

[0236]

	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80
1h	0.281	0.168	0.081	0.114	0.469
2h	0.250	0.115	0.050	0.183	0.438
3h	0.225	0.106	0.100	0.196	0.441

[0237] 从表 3 中的结果可以发现,当洗脱液浓度为 1:5 时,各组 OD 值均低于其他几组,说明该浓度洗脱液洗脱效果最优(即将 ELISA 孔壁上结合的 Cd 抗-酶标复合物洗脱程度达到最大,因而 OD 值最低);而当洗脱液作用温度为 57℃ 时,在各浓度组 OD 值均达到最低,说明该作用温度为最佳作用温度,其洗脱效果最优。综上所述,我们选择洗脱液 1:5 作为最适工作浓度,57℃ 作为最适工作温度。

[0238] 应用实施例 1

[0239] 采用 ELISA 法检测 100 份标本血浆中镉螯合型免疫复合物,按照以下步骤进行检测:

[0240] 1) 将可以捕获免疫复合物的蛋白包被于固相载体上:将 C1q 蛋白包以 1:5000 的比例稀释作为包被液,加入 ELISA 板微孔中,37℃ 水浴 2 小时,储存冰箱;

[0241] 2) 封闭:移去包被液,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加 2% 牛血清白蛋白作为封闭液,37℃ 放置 1 小时,移去封闭液,并用洗涤液进行洗涤,洗涤完成后,ELISA 板于 37℃ 放置 1 小时;

[0242] 3) 加待检样品,并且温育:上述 100 份标本血浆作待检样品;以已知含量的镉螯合型免疫复合物作标准样品;用样品缓冲液稀释 20 倍,加入微孔中,37℃ 作用 1 小时;

[0243] 4) 加入捕获镉的物质,并且温育:移去待检样品,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入用稀释缓冲液稀释与镉有亲和力的物质或能与镉反应形成抗原抗体复合物的抗镉抗体稀释至 12500 倍,37℃ 作用 1 小时,使其与免疫复合物上的金属镉反应;

[0244] 5) 酶结合物温育:移去抗 Cd 抗体,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入用稀释缓冲液稀释的 HRP 酶标抗体,37℃ 作用 1 小时,使其与抗 cd 抗体反应;

[0245] 6) 底物温育:移去酶标抗体,并用相应洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入底物,37℃ 避光作用 30 分钟;

[0246] 7) 终止反应:以与加底物液相同的速度和顺序滴加终止液至每一微孔;

[0247] 8) 检测:于 405nm 波长下在酶标仪上分别读取待测样品组和上述镉螯合型免疫复合物标准样品的 OD 值,根据上述镉螯合型免疫复合物标准样品的 OD 值,检测结果见表 4。

[0248] 表 4:100 份标本血浆镉螯合型免疫复合物 ELISA 检测结果

[0249]

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
----	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

[0250]

OD ₄₀₅	0.415	0.325	0.514	0.513	0.505	0.386	0.456	0.415	0.263	0.361
编号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
OD ₄₀₅	0.325	0.540	0.354	0.593	0.441	0.559	0.439	0.567	0.406	0.425
编号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
OD ₄₀₅	0.225	0.595	0.569	0.505	0.386	0.456	0.415	0.363	0.661	0.459
编号	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
OD ₄₀₅	0.375	0.638	0.584	0.597	0.383	0.568	0.640	0.581	0.402	0.491
编号	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
OD ₄₀₅	0.261	0.351	0.351	0.465	0.468	0.350	0.533	0.302	0.494	0.375
编号	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
OD ₄₀₅	0.369	0.533	0.291	0.248	0.596	0.512	0.368	0.220	0.459	0.336
编号	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
OD ₄₀₅	0.472	0.205	0.386	0.656	0.281	0.406	0.510	0.325	0.540	0.622
编号	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
OD ₄₀₅	0.693	0.684	0.219	0.323	0.577	0.581	0.406	0.444	0.325	0.514
编号	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
OD ₄₀₅	0.513	0.505	0.286	0.437	0.565	0.363	0.300	0.459	0.307	0.646
编号	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
OD ₄₀₅	0.596	0.459	0.348	0.525	0.415	0.368	0.350	0.459	0.346	0.236

[0251] 应用实施例 2

[0252] 采用 ELISA 法 +AAS 法检测 100 份标本血浆中镉螯合型免疫复合物,按照以下步骤进行检测:

[0253] 1) 将可以捕获免疫复合物的蛋白包被于固相载体上:用包被缓冲液稀释包被蛋白至 5000 倍,加入 ELISA 板微孔中,4℃过夜 18 小时;

[0254] 2) 封闭:移去包被液,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加 2%牛血清白蛋白作为封闭液,37℃放置 1 小时,移去封闭液,并用洗涤液进行洗涤;洗涤完成后,ELISA 板于 37℃放置 1 小时;

[0255] 3) 加待检样品,并且温育:从循环系统取样,作待检样品;以已知含量的镉螯合型免疫复合物作标准样品;用样品缓冲液稀释 20 倍,加入微孔中,37℃作用 2 小时;

[0256] 4) 洗脱:移去待检样品,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入稀释比为 1:5 的洗脱液,57℃作用 1 小时;

[0257] 5) 检测:从 ELISA 微孔中取 0.5mL 液体,于原子吸收光谱仪检测螯合于免疫复合物上的镉,测结果见表 5。

[0258] 表 5:100 份标本血浆镉螯合型免疫复合物 AAS 检测结果

[0259]

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
μg/L	0.202	0.125	0.267	0.224	0.332	0.190	0.152	0.439	0.418	0.391
编号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
μg/L	0.229	0.121	0.111	0.416	0.378	0.321	0.118	0.111	0.106	0.105
编号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
μg/L	0.185	0.348	0.390	0.410	0.103	0.356	0.281	0.208	0.282	0.465
编号	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
μg/L	0.176	0.291	0.426	0.499	0.246	0.391	0.104	0.174	0.264	0.238

[0260]

编号	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
μg/L	0.260	0.322	0.119	0.463	0.352	0.225	0.277	0.287	0.320	0.192
编号	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
μg/L	0.147	0.308	0.130	0.412	0.310	0.481	0.222	0.304	0.389	0.155
编号	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
μg/L	0.495	0.120	0.323	0.319	0.190	0.153	0.202	0.210	0.372	0.413
编号	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
μg/L	0.173	0.211	0.105	0.411	0.241	0.194	0.147	0.123	0.370	0.285
编号	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
μg/L	0.199	0.154	0.218	0.497	0.362	0.126	0.138	0.283	0.214	0.306
编号	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
μg/L	0.411	0.195	0.253	0.192	0.302	0.409	0.117	0.101	0.380	0.426

[0261] 应用实施例 3

[0262] 采用 ELISA 法 +ICP-MS 法对 100 份标本血浆检测镉整合型免疫复合物,具体步骤如下:

[0263] 1) 将可以捕获免疫复合物的蛋白包被于固相载体上:用包被缓冲液稀释包被蛋白至 5000 倍,加入 ELISA 板微孔中,4℃过夜 18 小时;

[0264] 2) 封闭:移去包被液,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加 2%牛血清白蛋白作为封闭液,37℃放置 1 小时,移去封闭液,并用洗涤液进行洗涤,洗涤完成后,ELISA 板于 37℃放置 1 小时;

[0265] 3) 加待检样品,并且温育:上述 100 份标本血浆作待检样品;以已知含量的镉整合型免疫复合物作标准样品;用样品缓冲液稀释 20 倍,加入微孔中,37℃作用 1 小时;

[0266] 4) 洗脱:移去待检样品,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入加入稀释比为 1:5 的洗脱液,57℃作用 1 小时;

[0267] 5) 酸化:在溶液中加入酸化剂对溶液进行酸化,封口过夜,彻底酸化;

[0268] 6) 检测:加入双氧水,并且加热赶酸,并从相应溶液中取 0.5mL 体,于电感耦合等离子体质谱仪下检测整合于免疫复合物上的镉,检测结果见表 6。

[0269] 表 6:100 份标本血清镉整合型免疫复合物 ICP-MS 检测结果

[0270]

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
μg/L	0.491	0.367	0.134	0.360	0.107	0.418	0.366	0.155	0.181	0.222
编号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
μg/L	0.203	0.365	0.170	0.122	0.279	0.434	0.119	0.159	0.388	0.210
编号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
μg/L	0.258	0.433	0.343	0.199	0.113	0.391	0.126	0.200	0.368	0.468
编号	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
μg/L	0.429	0.368	0.374	0.106	0.343	0.425	0.335	0.378	0.136	0.103
编号	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
μg/L	0.230	0.348	0.189	0.344	0.251	0.439	0.240	0.449	0.392	0.298
编号	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
μg/L	0.100	0.100	0.406	0.200	0.342	0.136	0.177	0.142	0.300	0.160
编号	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
μg/L	0.331	0.498	0.438	0.182	0.213	0.331	0.462	0.287	0.328	0.241
编号	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80

[0271]

$\mu\text{g/L}$	0.152	0.175	0.443	0.447	0.122	0.150	0.482	0.233	0.218	0.302
编号	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
$\mu\text{g/L}$	0.122	0.124	0.442	0.186	0.357	0.387	0.382	0.295	0.124	0.395
编号	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
$\mu\text{g/L}$	0.107	0.391	0.439	0.387	0.226	0.105	0.242	0.437	0.456	0.253

[0272] 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。

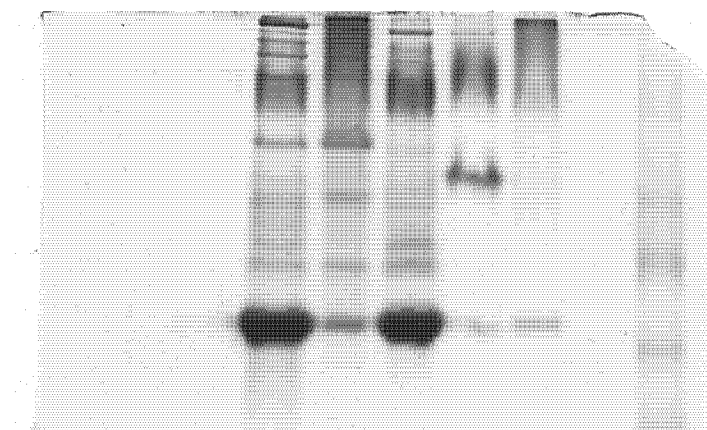


图 1

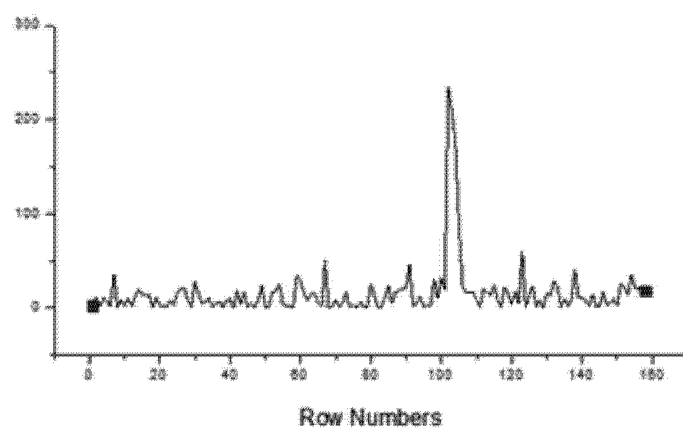


图 2

专利名称(译)	一种镉螯合型免疫复合物及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN104965076A	公开(公告)日	2015-10-07
申请号	CN201510412898.8	申请日	2015-07-14
[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	张积仁 阳帆 董欣敏 吴婧 蔡睿 孙遥 赵乙木		
发明人	张积仁 阳帆 董欣敏 吴婧 蔡睿 孙遥 赵乙木		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/53 G01N33/531		
其他公开文献	CN104965076B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种镉螯合型免疫复合物及其制备方法和应用，该镉螯合型免疫复合物为以下复合物中的一种：镉结合于免疫复合物形成的复合物，或镉结合于载体蛋白及能和该载体蛋白特异性结合的抗体所形成的复合物；或镉结合于免疫球蛋白后与载体蛋白结合形成的复合物。本发明所述镉螯合型免疫复合物的是一种相对特异性的免疫复合物，用于检测地区人群血清中是否镉螯合型免疫复合物及含量，间接反映这个地区镉污染程度。

