



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105001310 B

(45)授权公告日 2017.12.15

(21)申请号 201510413049.4

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2015.07.14

C07K 14/00(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

C07K 16/00(2006.01)

申请公布号 CN 105001310 A

C07K 1/22(2006.01)

(43)申请公布日 2015.10.28

G01N 33/53(2006.01)

(73)专利权人 上海拜豪生物科技有限公司

审查员 许珊萍

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

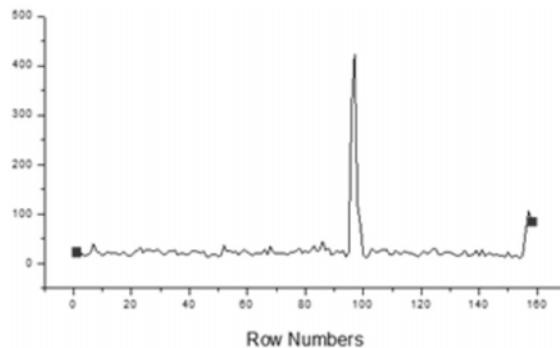
权利要求书2页 说明书18页 附图1页

(54)发明名称

一种铬螯合型免疫复合物及其制备方法和  
应用

(57)摘要

本发明公开了一种铬螯合型免疫复合物及其制备方法和应用,该铬螯合型免疫复合物为以下复合物中的一种:铬离子结合于免疫复合物形成的复合物,或铬离子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;或铬离子结合于免疫球蛋白后与载体蛋白结合形成的复合物。本发明所述铬螯合型免疫复合物可用于检测地区人群血清中是否铬螯合型免疫复合物及含量,间接反映这个地区铬污染程度。



1. 一种铬螯合型免疫复合物, 其特征在于, 该铬螯合型免疫复合物为以下复合物中的一种:

铬离子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;

所述铬螯合型免疫复合物由如下方法制备而成, 所述方法包括:

A) 合成铬螯合型免疫复合物的步骤;

B) 提纯铬螯合型免疫复合物的步骤: 采用免疫亲和层析法去除步骤A) 合成的铬螯合型免疫复合物中未参与反应的载体蛋白、和该载体蛋白特异性结合的抗体及铬离子;

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, 得到载体蛋白溶液;

(3) 搅拌过夜: 将步骤(1)的螯合剂溶液加入到步骤(2)的载体蛋白溶液中, 搅拌后于摇床中作用2-30h, 得到混合液;

(4) 透析袋预处理: 在透析袋中加入EDTA-NaHCO<sub>3</sub>溶液煮沸, 弃废液后用ddH<sub>2</sub>O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<sub>2</sub>O透析, 换水2-3次, 4℃透析过夜之后, 收集液体;

(6) 铬离子螯合: 在上述步骤(5)中的液体中加入HCl溶液调整pH至7.0, 缓慢加入铬盐溶液, 边滴加边振荡, 之后于摇床中作用2-30h, 然后将得到的液体装入经步骤(4)处理后的透析袋中, 用ddH<sub>2</sub>O透析, 换水2-3次, 4℃透析过夜之后, 收集液体, 得到铬螯合型抗原;

(7) 在上述铬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铬螯合型免疫复合物;

所述步骤B) 具体步骤如下:

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

(b) 层析柱预处理: 使用稀释缓冲液冲洗管路, 在层析柱中装入能与免疫复合物特异性结合的填料, 装柱后继续用稀释缓冲液平衡柱子;

(c) 上样: 待柱子平衡后, 用稀释缓冲液稀释上述(a) 步骤得到的铬螯合型免疫复合物溶液, 然后上柱, 铬螯合型免疫复合物吸附在填料上, 未反应的载体蛋白、抗体、铬离子随稀释缓冲液流出;

(d) 洗脱: 使用稀释缓冲液冲洗柱子, 至基线平衡, 然后使用0.05-0.10mol/L的Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub>溶液进行洗脱;

(e) 收集: 收集步骤(d) 中洗脱处理后的洗脱液, 收集完毕后立即使蛋白复性;

(f) 将经过步骤(e) 收集到的洗脱液装入透析袋用ddH<sub>2</sub>O透析除盐, 换水2-4次后, 4℃透析过夜, 收集样本;

(g) 层析柱预处理: 采用新的层析柱, 用稀释缓冲液冲洗管路, 在该层析柱中装入能与Cr特异性结合的填料, 装柱后再用稀释缓冲液平衡柱子;

(h) 上样: 待步骤(g) 的柱子平衡后, 用稀释缓冲液稀释上述步骤(f) 的样本, 然后将稀释后的样本上柱, 铬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稀释缓冲液流出;

(i) 洗脱:步骤(h)之后用稀释缓冲液冲洗柱子,至基线平衡,然后使用0.5-1.0mol/L的Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub>进行洗脱;

(j) 收集:收集步骤(i)洗脱后的洗脱液,收集完毕后立即使蛋白复性;

(k) 将步骤(j)收集到的洗脱液装入透析袋用ddH<sub>2</sub>O透析除盐,换水三次后,4℃透析过夜,收集样本,即得到纯化的铬螯合型免疫复合物。

2. 根据权利要求1所述的铬螯合型免疫复合物,其特征在于,所述载体蛋白至少含有锌指结构、巯基、半胱氨酸残基中一种结构,铬离子通过锌指结构、巯基、半胱氨酸残基中至少一种与载体蛋白结合。

3. 根据权利要求2所述的铬螯合型免疫复合物,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. 如权利要求1所述的铬螯合型免疫复合物在制备检测螯合铬免疫复合物的酶联免疫试剂盒中的应用。

5. 一种检测螯合铬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所述的铬螯合型免疫复合物的标准品。

6. 根据权利要求5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:含有可捕获抗原抗体复合物的蛋白的包被液、含有可捕获金属Cr的抗体包被液、酶标抗体。

7. 一种定量检测铬螯合型免疫复合物的方法,其特征在于,以已知含量的权利要求1所述的铬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。

## 一种铬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,具体涉及铬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] 铬(chromium,Cr)是元素周期表VI族中的一种过渡金属,铬广泛应用于电镀、鞣革、颜料、油漆、合金、印染等各个方面,与人们的生活息息相关,但是同样也对人类的身体健康产生巨大影响。在美国,Cr与Hg、Cd、Pb被称为四大环境污染物。自然界中铬主要以三价和六价的形式存在,而一般认为,三价铬是人类所需的微量元素,而六价铬才是明显的毒性物质。由于六价铬易通过细胞膜进入细胞,而且可以通过一系列反应,产生强烈的细胞毒性及基因毒性,因而普遍认为六价铬的毒性高于三价铬,达10—100倍。六价铬进入体内后,可以引发氧化应激、染色体畸变、细胞凋亡、多种DNA损伤(包括单链断裂、DNA-蛋白质交联、DNA-氨基酸交联、Cr-DNA配合物形成等),从而造成机体多处组织、器官、系统损伤。不仅如

此,六价铬还被认为是一种强有力的致癌物,早在1990年国际癌症研究组织(International Agency for Research on Cancer,IARC)就将六价铬作为一种人类致癌物。关于六价铬的细胞毒性、基因毒性、致癌性已成为当前广泛研究的课题。

[0005] 铬与多种蛋白质之间关系密切,可以与多种蛋白质结合,抑制多种蛋白酶的活性。随着对铬毒性研究的深入,人们逐渐认识到铬与蛋白的相互作用在其致毒过程中扮演着重要的角色,被认为是了解铬的毒性机理的关键所在,因此,对铬和蛋白质相互作用的研究就显得愈发重要。而现在关于铬与蛋白质作用的机理仅是冰山一角,还有很多蛋白质与铬之间的关系还不清楚,因而加强对于铬与蛋白质之间的关系至关重要。

[0006] 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,而铬可作用于全身多个系统的蛋白质,铬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

[0007] 为了克服现有技术的不足,本发明的目的在于提供一种铬螯合型免疫复合物,该铬螯合型免疫复合物可用于检测地区人群血清中是否存在铬螯合型免疫复合物及其含量,间接反映这个地区铬污染程度。

[0008] 为解决上述问题,本发明所采用的技术方案如下:

[0009] 一种铬螯合型免疫复合物,该铬螯合型免疫复合物为以下复合物中的一种:

[0010] 铬离子结合于免疫复合物形成的复合物,或

[0011] 铬离子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

[0012] 铬离子结合于免疫球蛋白后与载体蛋白结合形成的复合物。

[0013] 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,铬离子通过锌指结构、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。

[0014] 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。

[0015] 进一步的,铬离子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。

[0016] 进一步的,所述螯合剂为ITCBE、EDTA、多磷酸盐、氨基羧酸、1,3-二酮、羟基羧酸中的一种。

[0017] 本发明还提供了两种制备铬螯合型免疫复合物的方法,通过这两种方法获得铬螯合型免疫复合物。

[0018] 其中,第一种制备方法包括:

[0019] A) 合成铬螯合型免疫复合物的步骤:先将螯合剂与载体蛋白结合,再与铬离子结合;

[0020] B) 提纯铬螯合型免疫复合物的步骤:采用免疫亲和层析法去除步骤A) 合成的铬螯合型免疫复合物中未参与反应的载体蛋白、特异性抗体及铬离子。

[0021] 具体地,所述铬螯合型免疫复合物的制备方法中,

[0022] 所述步骤A) 具体步骤如下:

[0023] (1) 配制螯合剂:将螯合剂溶于溶剂中,配制成螯合剂溶液;

[0024] (2) 配制载体蛋白溶液:将载体蛋白加入到硼酸盐溶液中;

[0025] (3) 搅拌过夜:将步骤(1) 融合剂溶液加入到步骤(2) 的载体蛋白溶液中,搅拌后于摇床中作用2-30h,得到混合液;

[0026] (4) 透析袋预处理:在透析袋中加入EDTA-NaHCO<sub>3</sub>溶液煮沸,弃废液后用ddH<sub>2</sub>O冲洗;重复该步骤1-3次;

[0027] (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<sub>2</sub>O透析,换水2-3次,4℃透析过夜之后,收集液体;

[0028] (6) 铬离子螯合:在上述步骤(5) 中的液体中加入HCl溶液调整pH至7.0,缓慢加入铬盐溶液,边滴加边振荡,之后于摇床中作用2-30h,然后重复步骤(5) 一次,收集液体,得到铬螯合型抗原;

[0029] (7) 在上述铬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铬螯合型免疫复合物;

[0030] 所述步骤B) 具体步骤如下:

[0031] (a) 将上述A) 步骤合成的铬螯合型免疫复合物复溶于生理盐水中,得到铬螯合型免疫复合物溶液;

[0032] (b) 层析柱预处理:使用稀释缓冲液冲洗管路,在层析柱中装入能与免疫复合物特异性结合的填料,装柱后继续用稀释缓冲液平衡柱子;

[0033] (c) 上样:待柱子平衡后,用稀释缓冲液稀释上述(a) 步骤得到的铬螯合型免疫复合物溶液,然后上柱,铬螯合型免疫复合物吸附在填料上,未反应的载体蛋白、抗体、铬离子随稀释缓冲液流出;

[0034] (d) 洗脱:使用稀释缓冲液冲洗柱子,至基线平衡,然后使用0.05-0.10mol/L的Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub>溶液进行洗脱;

[0035] (e) 收集:收集步骤(d) 中洗脱处理后的洗脱液,收集完毕后立即使蛋白复性;

[0036] (f) 将经过步骤(e) 收集到的洗脱液装入透析袋用ddH<sub>2</sub>O透析除盐,换水2-4次后,4℃透析过夜,收集样本;

[0037] (g) 层析柱预处理:采用新的层析柱,用稀释缓冲液冲洗管路,在该层析柱中装入能与Cr特异性结合的填料,装柱后再用稀释缓冲液平衡柱子;

[0038] (h) 上样:待步骤(g) 的柱子平衡后,用稀释缓冲液稀释上述步骤(f) 的样本,然后将稀释后的样本上柱,铬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稀释缓冲液流出;

[0039] (i) 洗脱:步骤(h) 之后用稀释缓冲液冲洗柱子,至基线平衡,然后使用0.5-1.0mol/L的Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub>进行洗脱;

[0040] (j) 收集:收集步骤(i) 洗脱后的洗脱液,收集完毕后立即使蛋白复性;

[0041] (k) 对步骤(j) 收集到的洗脱液装入透析袋用ddH<sub>2</sub>O透析除盐,换水三次后,4℃透

析过夜,收集样本,即得到纯化的铬螯合型免疫复合物。

[0042] 本发明还提供了上述铬螯合型免疫复合物在制备检测铬螯合型免疫复合物的酶联免疫试剂盒中的应用。

[0043] 本发明还提供了一种检测铬螯合型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所述的铬螯合型免疫复合物的标准品。

[0044] 进一步的,上述试剂盒还包括至少一种以下试剂:含有可捕获抗原抗体复合物的蛋白的包被液、含有可捕获金属Cr的抗体的包被液、酶标抗体。

[0045] 一种定量检测铬螯合型免疫复合物的方法,其以已知含量的铬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。

[0046] 相比现有技术,本发明的有益效果在于:

[0047] 1.首次合成了铬螯合型免疫复合物,并证实了在机体内铬可存在于免疫系统,并证明了铬螯合型免疫复合物的存在;

[0048] 2.本发明实现了免疫复合物的特异性识别,并实现了铬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铬含量水平的方法,并为工业地区的铬污染水平提供间接指标。

[0049] 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

[0050] 图1为实施例1的铬螯合型免疫复合物通过聚丙烯酰胺凝胶介质的胶床所形成的蛋白条带图;

[0051] 图2为实施例1的铬螯合型免疫复合物通过聚丙烯酰胺凝胶介质的胶床所形成的蛋白条带的X荧光分析图;

[0052] 其中,图1中的M为Marker,IC为铬螯合型免疫复合物;图2中的横坐标为蛋白条带位置,纵坐标为该蛋白条带中铬金属能量。

## 具体实施方式

[0053] 一种铬螯合型免疫复合物,该铬螯合型免疫复合物为以下复合物中的一种:

[0054] 铬离子结合于免疫复合物形成的复合物,或

[0055] 铬离子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

[0056] 铬离子结合于免疫球蛋白后与载体蛋白结合形成的复合物。

[0057] 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,铬离子通过锌指结构、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。

[0058] 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。

[0059] 进一步的,铬离子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。

[0060] 进一步的,所述螯合剂为ITCBE、EDTA、多磷酸盐、氨基羧酸、1,3-二酮、羟基羧酸中的一种。

[0061] 本发明还提供了该铬螯合型免疫复合物的制备方法,通过该方法获得铬螯合型免疫复合物。

[0062] 其中,该制备方法包括:

[0063] A) 合成铬螯合型免疫复合物的步骤;

[0064] B) 提纯铬螯合型免疫复合物的步骤:采用免疫亲和层析法去除步骤A)合成的铬螯合型免疫复合物中未参与反应的载体蛋白、特异性抗体及铬离子。

[0065] 具体地,所述铬螯合型免疫复合物的制备方法中,

[0066] 所述步骤A)具体步骤如下:

[0067] (1)配制螯合剂:将螯合剂溶于溶剂中,配制成螯合剂溶液;

[0068] (2)配制载体蛋白溶液:将载体蛋白加入到硼酸盐溶液中;

[0069] (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,搅拌后于摇床中作用2-30h,得到混合液;

[0070] (4)透析袋预处理:在透析袋中加入EDTA-NaHCO<sub>3</sub>溶液煮沸,弃废液后用ddH<sub>2</sub>O冲洗;重复该步骤1-3次;

[0071] (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<sub>2</sub>O透析,换水2-3次,4℃透析过夜之后,收集液体;

[0072] (6)铬离子螯合:在上述步骤(5)中的液体中加入HCl溶液调整pH至7.0,缓慢加入铬盐溶液,边滴加边振荡,之后于摇床中作用2-30h,然后重复步骤(5)一次,收集液体,得到铬螯合型抗原;

[0073] (7)在上述铬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铬螯合型免疫复合物;

[0074] 所述步骤B)具体步骤如下:

[0075] (a)将上述A)步骤合成的铬螯合型免疫复合物复溶于生理盐水中,得到铬螯合型免疫复合物溶液;

[0076] (b)层析柱预处理:使用稀释缓冲液冲洗管路,在层析柱中装入能与免疫复合物特异性结合的填料,装柱后继续用稀释缓冲液平衡柱子;

[0077] (c)上样:待柱子平衡后,用稀释缓冲液稀释上述(a)步骤得到的铬螯合型免疫复合物溶液,然后上柱,铬螯合型免疫复合物吸附在填料上,未反应的载体蛋白、抗体、铬离子随稀释缓冲液流出;

[0078] (d)洗脱:使用稀释缓冲液冲洗柱子,至基线平衡,然后使用0.05-0.10mol/L的Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub>溶液进行洗脱;

[0079] (e)收集:收集步骤(d)中洗脱处理后的洗脱液,收集完毕后立即使蛋白复性;

[0080] (f)将经过步骤(e)收集到的洗脱液装入透析袋用ddH<sub>2</sub>O透析除盐,换水2-4次后,4℃透析过夜,收集样本;

[0081] (g)层析柱预处理:采用新的层析柱,用稀释缓冲液冲洗管路,在该层析柱中装入能与Cr特异性结合的填料,装柱后再用稀释缓冲液平衡柱子;

[0082] (h) 上样:待步骤(g)的柱子平衡后,用稀释缓冲液稀释上述步骤(f)的样本,然后将稀释后的样本上柱,铬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稀释缓冲液流出;

[0083] (i) 洗脱:步骤(h)之后用稀释缓冲液冲洗柱子,至基线平衡,然后使用0.5-1.0mol/L的Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub>进行洗脱;

[0084] (j) 收集:收集步骤(i)洗脱后的洗脱液,收集完毕后立即使蛋白复性;

[0085] (k) 对步骤(j)收集到的洗脱液装入透析袋用ddH<sub>2</sub>O透析除盐,换水三次后,透析过夜,收集样本,即得到纯化的铬螯合型免疫复合物。

[0086] 本发明还提供了上述铬螯合型免疫复合物在制备检测铬螯合型免疫复合物的酶联免疫试剂盒中的应用。

[0087] 本发明还提供了一种检测铬螯合型免疫复合物的酶联免疫试剂盒,该试剂盒包括所述的铬螯合型免疫复合物的标准品。

[0088] 进一步的,上述试剂盒还包括至少一种以下试剂:含有可捕获抗原抗体复合物的蛋白的包被液、含有可捕获金属Cr的抗体的包被液、酶标抗体。

[0089] 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。

[0090] 一种用于检测铬螯合型免疫复合物的试剂盒,包括:含有可捕获免疫复合物的蛋白的包被液、封闭液、洗涤液、上样缓冲液、含有可捕获金属Cr的的抗体的包被液、酶标抗体、底物、终止液、稀释缓冲液、标准品、阴性对照。

[0091] 一种用于检测铬螯合型免疫复合物的试剂盒,包括:含有可捕获免疫复合物的蛋白的包被液、封闭液、洗涤液、洗脱液、上样缓冲液、阳性对照、阴性对照。

[0092] 一种用于检测铬螯合型免疫复合物的试剂盒,包括:含有可捕获免疫复合物的蛋白的包被液,还包括封闭液、洗涤液、洗脱液、上样缓冲液、硝酸、过氧化氢、阳性对照、阴性对照。

[0093] 一种用于检测铬螯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、含有可捕获金属Cr的抗体的包被液、封闭液、洗涤液、酶标抗体、底物、终止液、上样缓冲液、稀释缓冲液、标准品、阴性对照等。

[0094] 一种用于检测铬螯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、上样缓冲液、阳性对照、阴性对照等。

[0095] 一种用于检测铬螯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、上样缓冲液、过氧化氢、阳性对照、阴性对照等。

[0096] 一种用于检测铬螯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、上样缓冲液、溶解胶床上相应蛋白条带所需液体、含有可捕获金属Cr的抗体的包被液、封闭液、洗涤液、酶标抗体、底物、终止液、稀释缓冲液、阳性对照、阴性对照等。

[0097] 一种用于检测铬螯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、上样缓冲液、溶解胶床上相应蛋白条带所需液体、阳性对照、阴性对照等。

[0098] 一种用于检测铬螯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、上样缓冲液、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。

[0099] 上述所列举出的试剂盒中,可捕获免疫复合物的蛋白包括但不限于补体C1q、CIF蛋白和抗C3抗体,可捕获金属Cr的抗体包括但不限于抗Cr的特异性抗体,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;所述胶床介质包括但不限于琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶;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;底物包括但不限于TMB溶液、ABTS溶液;标准品包括但不限于本发明的铬螯合型循环免疫复合物、其他螯合有铬金属的免疫复合物;阳性对照包括但不限于本发明的铬螯合型循环免疫复合物、其他螯合有铬金属的免疫复合物;阴性对照包括但不限于稀释缓冲液。

[0100] 本发明还提供了一种定量检测铬螯合型免疫复合物的方法,以已知含量的铬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。在本发明中,用检测铬螯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。

[0101] 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,试剂、材料如下述所列举,在本发明中没有列举出来的均为本领域常用的或者可以通过市购方式获得:

[0102] 稀释缓冲液,其为PH9.6、摩尔浓度为0.05M的碳酸盐缓冲液,每1000mL的稀释缓冲液的制备方法如下:取1.5gNa<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>和2.93gNaHCO<sub>3</sub>,然后加入ddH<sub>2</sub>O至1000ml,即得;

[0103] 洗涤液,该洗涤液为pH7.4、摩尔浓度为0.15M的PBS,每1000mL的洗涤液的制备方法如下:取0.2gKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、2.90gNa<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O、8.0gNaCl、0.2gKCl和0.5mlTween-20,然后加入ddH<sub>2</sub>O至1000ml,即得;

[0104] 封闭液,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;

[0105] 终止液,该终止液中H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>的摩尔浓度为2M,每200ml的终止液的制备方法如下:取178.3ml ddH<sub>2</sub>O,然后逐滴加入浓硫酸至200ml,即得;

[0106] 底物缓冲液,该底物缓冲液的pH为5.0,其中Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub>的摩尔浓度为0.2M、柠檬酸的摩尔浓度为0.1M,每50ml的底物缓冲液的制备方法如下:取1.42gNa<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub>、0.96g柠檬酸,然后加入ddH<sub>2</sub>O至50ml,即得;

[0107] 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub>=0.5ml:10ml:32μl,其中TMB为2g/L的甲基联苯胺乙醇溶液;

[0108] 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub>=0.5mg:1.0ml:2μl;

[0109] 本发明中的所述能与铬螯合型免疫复合物特异性结合的填料,为表面附有能捕获铬螯合型免疫复合物的物质的硅胶或树脂;

[0110] 本发明中的能捕获铬螯合型免疫复合物的物质,包括但不限于C1q Recombinant Protein(C1q重组蛋白,下文简称C1q),其型号为NOVUS H00000712-p01;

[0111] 本发明中的能与铬特异性结合的填料,为表面附有能捕获铬的物质的硅胶或树

脂；

[0112] 本发明中的能捕获铬的物质,包括但不限于鼠抗Cr mAb,购买自广州然科公司,型号为RK10641;

[0113] 以下所述稀释倍比为重量体积比。

[0114] 方法一:ELISA法检测铬螯合型免疫复合物,具体步骤如下:

[0115] 1) 将可以捕获免疫复合物的蛋白包被于固相载体上:用稀释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;

[0116] 2) 封闭:移去稀释缓冲液,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入封闭液,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;

[0117] 3) 加待检样品,并且温育:取血样,作待检样品;以已知含量的铬螯合型免疫复合物作标准品;用稀释缓冲液稀释至10-40倍,加入微孔中,37℃作用1-2小时;

[0118] 4) 加入捕获铬的物质,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铬特异性结合或能与铬反应形成抗原抗体复合物的抗铬抗体稀释至5000-40000倍,37℃作用1-2小时,使其与免疫复合物上的金属铬反应;

[0119] 5) 酶结合物温育:移去抗Cr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Cr抗体反应;

[0120] 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;

[0121] 7) 终止反应:加终止液至每一微孔;

[0122] 8) 取波长为405nm,加完终止液后,将ELISA板置于内在酶标仪上分别读取待检样品组和标准品的OD值,通过绘制标准曲线,求得待检样品的含量(也可不使用酶标仪,直接通过染色情况进行定性检测)。

[0123] 该方法利用酶联免疫吸附测定(ELISA)原理,可以将血清中的免疫复合物提取出来,提取出来的免疫复合物上部分螯合有重金属铬,而这部分免疫复合物上的铬可以被与铬特异性结合或能与铬反应形成抗原抗体复合物的抗铬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,而不含有螯合金属铬的免疫复合物,则不会被抗铬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铬(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螯合的金属铬。

[0124] 方法二:ELISA法+AAS法检测铬螯合型免疫复合物,具体步骤如下:

[0125] 1) 将可以捕获免疫复合物的蛋白包被于固相载体上:用稀释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;

[0126] 2) 封闭:移去稀释缓冲液,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入封闭液,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;

[0127] 3) 加待检样品,并且温育:从循环系统取样,作待检样品;以已知含量的铬螯合型免疫复合物作标准品;用稀释缓冲液稀释10-40倍,加入微孔中,37℃作用1-2小时;

[0128] 4) 洗脱: 移去待检样品, 并用洗涤液进行洗涤, 待洗涤完成后, 加入洗脱液, 于37-57℃下洗脱1-3小时;

[0129] 5) 检测: 从ELISA微孔中取样, 于原子吸收光谱仪检测螯合于免疫复合物上的铬, 读出相应数值。

[0130] 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螯合于循环免疫复合物上的铬, 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螯合的金属铬。

[0131] 方法三: ELISA法+ICP-MS法检测铬螯合型免疫复合物, 具体步骤如下:

[0132] 1) 将可以捕获免疫复合物的蛋白包被于固相载体上: 用稀释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。

[0133] 2) 封闭: 移去稀释缓冲液, 并用洗涤液进行洗涤, 待洗涤完成后, 加入封闭液, 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;

[0134] 3) 加待检样品, 并且温育: 从循环系统取样, 作待检样品; 以已知含量的铬螯合型免疫复合物作标准品; 用稀释缓冲液稀释10-40倍, 加入微孔中, 37℃作用1-2小时;

[0135] 4) 洗脱: 移去待检样品, 并用洗涤液进行洗涤, 待洗涤完成后, 加入洗脱液, 于37-57℃下洗脱1-3小时;

[0136] 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;

[0137] 6) 检测: 加入双氧水, 并且加热赶酸, 并从上述ELISA试剂板中洗脱的溶液中取样, 于电感耦合等离子体质谱仪下检测螯合于免疫复合物上的铬, 读出相应数值。

[0138] 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检测螯合于循环免疫复合物上的铬, 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螯合的金属铬。

[0139] 方法四: 提纯CIC法+ELISA法检测铬螯合型免疫复合物, 具体步骤如下:

[0140] 1) 提取免疫复合物: 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免疫复合物, 将提纯出来的免疫复合物复溶, 得到免疫复合物的复溶液;

[0141] 2) 用可以捕获铬的物质包被于固相载体上: 用稀释缓冲液稀释包被抗体至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;

[0142] 3) 封闭: 移去稀释缓冲液, 并用洗涤液进行洗涤, 待洗涤完成后, 加1%-5%牛血清白蛋白或脱脂奶粉作为封闭液, 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36.5-37.5℃放置1小时;

[0143] 4) 加待检样品, 并且温育: 从提取的免疫复合物的复溶液中取样, 作待检样品; 以已知含量的铬螯合型免疫复合物作标准品; 用稀释缓冲液稀释10-40倍, 加入微孔中, 37℃作用1-2小时;

[0144] 5) 酶结合物温育: 移去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Cr抗体反应;

[0145] 6) 底物温育: 移去HRP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；

[0146] 7) 终止反应:加终止液至每一微孔。

[0147] 8) 取波长为405nm,加完终止液后,将ELISA板置于内在酶标仪上分别读取待检样品组和标准品的OD值,通过绘制标准曲线,求得待检样品的含量(也可不使用酶标仪,直接通过染色情况进行定性检测)。

[0148] 方法五:提纯CIC法+AAS法检测铬螯合型免疫复合物,具体步骤如下:

[0149] 1) 提取免疫复合物: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免疫复合物将提纯出来的免疫复合物复溶,得到免疫复合物的复溶液;

[0150] 2) 检测:从免疫复合物的复溶液中取样,于原子吸收光谱仪检测螯合于免疫复合物上的铬,并绘制标准曲线,读出相应数值。

[0151] 方法六:提纯CIC法+ICP-MS法检测铬螯合型免疫复合物,具体步骤如下:

[0152] 1) 提取免疫复合物: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免疫复合物将提纯出来的免疫复合物复溶,得到免疫复合物的复溶液;

[0153] 2) 酸化:从免疫复合物的复溶液中取样,在溶液中加入酸化剂对溶液进行酸化,封口过夜,彻底酸化。

[0154] 3) 检测:加入双氧水,并且加热赶酸,然后再取加热赶酸后的溶液0.5mL于电感耦合等离子体质谱仪下检测螯合于免疫复合物上的铬,并绘制标准曲线,读出相应数值。

[0155] 方法四、方法五和方法六均是通过全血提取法分离出免疫复合物,再采用特异性检测方法,测定免疫复合物中铬螯合型免疫复合物上铅的含量;即先采用物理分离手段,如超速离心法、高压液相层析法、凝胶过滤层析法等,将免疫复合物从待测血浆样本中分离出来并复溶于生理盐水中,再利用ELISA原理、原子吸收光谱检测或进行检测电感耦合等离子体质谱法检测铬螯合型免疫复合物上的铬含量。

[0156] 方法七:电泳法+ELISA/AAS/ICP-MS法检测铬螯合型免疫复合物,具体步骤如下:

[0157] 1) 提取免疫复合物: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免疫复合物将提纯出来的免疫复合物复溶,得到免疫复合物的复溶液;

[0158] 2) 制备胶床:根据需要选择合适的介质(如琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶等),制备好胶床;

[0159] 3) 加样:从提纯出来的免疫复合物复溶液中8uL溶液+2uL上样缓冲液,混匀,短暂离心;其中上样缓冲液(Sample buffer)可由如下比例的组分配制而成:Tris-HCl:1%溴酚蓝:ddH<sub>2</sub>O:甘氨酸=15.5:2.5:7:25,其中Tris-HCl的pH为6.8、摩尔浓度为1M。

[0160] 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Tris3.0g、甘氨酸14.4g,溶于800ml ddH<sub>2</sub>O中,调节pH至8.3,然后加入ddH<sub>2</sub>O至1000ml,即得;

[0161] 5) 复溶检测:在胶床上找出含有铬的蛋白条带,将该条带取出,经过处理后将含有铬的蛋白条带复溶,然后再分别利用ELISA、ICP-MS或AAS方法检测溶于液体中的铬含量;此外,还可以利用此方法检测螯合铬的免疫复合物的等电点、分子量及含量等。

[0162] 实施例1

[0163] 本实施例所用到的试剂如下:

[0164] 硼酸盐缓冲液,其摩尔浓度为0.01M,每500ml的该硼酸盐缓冲液又如下方法制得:

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;

[0165] 人血清白蛋白溶液,其制备方法如下:取人血清白蛋白溶于上述摩尔浓度为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的人血清白蛋白溶液;

[0166] 5mmol/L EDTA+200mmol/L NaHCO<sub>3</sub>溶液,每1000ml 5mmol/L EDTA+200mmol/L NaHCO<sub>3</sub>溶液的由如下方法制得:取1.86gEDTA 2H<sub>2</sub>O、16.8gNaHCO<sub>3</sub>,加入900mL超纯水中,然后用摩尔浓度为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;

[0167] ITCBE,购买自日本同仁化学研究所,货号为M030;

[0168] 透析袋,截留分子量14000,产自Bioshop Inc公司。

[0169] 一种铬螯合型免疫复合物,通过以下方法制备得到:

[0170] A) 合成铬螯合型免疫复合物的步骤:

[0171] (1) 配制螯合剂:取2.0mg ITCBE溶于2mLDMSO中,得到螯合剂溶液;

[0172] (2) 配制人血清白蛋白溶液:取4.0mg人血清白蛋白溶于4.0ml的硼酸盐缓冲溶液(0.01M、pH9.0)中,得到人血清白蛋白溶液;

[0173] (3) 搅拌过夜:将步骤(1)的螯合剂溶液加入到步骤(2)的人血清白蛋白溶液中,边滴加边振动,于25℃在100r/min的摇床中作用24小时,得到混合液;

[0174] (4) 透析袋预处理:在透析袋中加入5mmol/LEDATA+200mmol/L NaHCO<sub>3</sub>溶液中,煮沸10min,弃煮沸液,用ddH<sub>2</sub>O彻底冲洗,然后再次加入5mmol/LEDATA+200mmol/L NaHCO<sub>3</sub>溶液,煮沸10min;弃煮沸液,用ddH<sub>2</sub>O彻底冲洗;

[0175] (5) 透析:将步骤(3)得到的混合液装入经步骤(4)处理后的透析袋中透析24h,用2LddH<sub>2</sub>O透析,换水3次,4℃透析过夜之后,收集液体;该步骤可去除未与人血清白蛋白结合的ITCBE;

[0176] (6) 铬离子螯合: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80μL的1mmol/L Cr<sup>3+</sup>溶液,边滴加边振荡,避免铬离子使蛋白变性产生沉淀;之后于25℃、100r/min摇床中反应2h,然后重复步骤(5)一次,收集液体,得到铬螯合型抗原;

[0177] (6) 在上述铬螯合型抗原中加入能与人血清白蛋白特异性结合的抗体反应后得到铬螯合型免疫复合物;

[0178] B) 提纯铬螯合型免疫复合物的步骤:采用免疫亲和层析法去除步骤A)合成的铬螯合型免疫复合物中未参与反应的人血清白蛋白、特异性抗体及铬离子;所述步骤B)具体步骤如下:

[0179] (a) 将上述A)步骤合成的铬螯合型免疫复合物复溶于生理盐水中,得到铬螯合型免疫复合物溶液;

[0180] (b) 层析柱预处理:使用稀释缓冲液冲洗管路,在层析柱中装入能与免疫复合物特异性结合的填料,装柱后继续用稀释缓冲液平衡柱子;

[0181] (c) 上样:待柱子平衡后,用稀释缓冲液稀释上述(a)步骤得到的铬螯合型免疫复合物溶液,然后上柱,铬螯合型免疫复合物吸附在填料上,未反应的载体蛋白、抗体、铬离子随稀释缓冲液流出;

[0182] (d) 洗脱:使用稀释缓冲液冲洗柱子,至基线平衡,然后使用0.05-0.10mol/L的

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>溶液进行洗脱；

[0183] (e) 收集：收集步骤(d)中洗脱处理后的洗脱液，收集完毕后立即使蛋白复性；

[0184] (f) 将经过步骤(e)收集到的洗脱液装入透析袋用ddH<sub>2</sub>O透析除盐，换水2-4次后，4℃透析过夜，收集样本；

[0185] (g) 层析柱预处理：采用新的层析柱，用稀释缓冲液冲洗管路，在该层析柱中装入能与Cr特异性结合的填料，装柱后再用稀释缓冲液平衡柱子；

[0186] (h) 上样：待步骤(g)的柱子平衡后，用稀释缓冲液稀释上述步骤(f)的样本，然后将稀释后的样本上柱，铬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稀释缓冲液流出；

[0187] (i) 洗脱：步骤(h)之后用稀释缓冲液冲洗柱子，至基线平衡，然后使用0.5-1.0mol/L的Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>进行洗脱；

[0188] (j) 收集：收集步骤(i)洗脱后的洗脱液，收集完毕后立即使蛋白复性；

[0189] (k) 对步骤(j)收集到的洗脱液装入透析袋用ddH<sub>2</sub>O透析除盐，换水三次后，4℃透析过夜，收集样本，即得到纯化的铬螯合型免疫复合物。

[0190] 本实施例所制备的铬螯合型免疫复合物，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。

[0191] 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；

[0192] B) 加样：取8μL提纯出来的铬螯合型免疫复合物溶液，加入2μL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:ddH<sub>2</sub>O:甘氨酸=15.5:2.5:7:25，其中Tris-HCl的pH为6.8、摩尔浓度为1M；

[0193] C) 电泳：连接电泳板，进行电泳，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Tris3.0g、甘氨酸14.4g，溶于800mlddH<sub>2</sub>O中，调节pH至8.3，然后加入ddH<sub>2</sub>O至1000ml，即得(蛋白条带图参见图1)；

[0194] D) 检测：在胶床上找出含有铬的蛋白条带，将该条带取出，经过处理后将蛋白条带复溶，然后再利用原子吸收光谱(AAS)检测溶于液体中是否含有铬以及铬含量。

[0195] 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. LS30143-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(1mmx3mm)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。

[0196] 本实施例的方法制备的铬螯合型免疫复合物通过聚丙烯酰胺凝胶介质的胶床所形成的蛋白条带的X荧光分析图详见图2，图2中的横坐标为蛋白条带位置，纵坐标为该蛋白

条带中铬金属能量。

[0197] 采用石墨炉原子吸收光谱法(AAS)初步测定本实施例制备的铬螯合型免疫复合物中的铬含量,其含量为75.469 $\mu$ g/L。

[0198] 本实施例中的铬螯合型免疫复合物,可用于制备检测铬螯合免疫复合物的试剂,或可用于制备酶联免疫试剂盒中。

[0199] 应用例1

[0200] 检测条件的确定

[0201] 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

[0202] 采用棋盘滴定法确定补体C1q、Cr抗体的最佳工作浓度以及血浆的最佳稀释倍数,棋盘滴定法具体步骤如下:

[0203] (1) 将人补体C1q用稀释缓冲液倍比稀释(1:2500、1:5000、1:10000、1:20000),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,储存冰箱;

[0204] (2) 移去稀释缓冲液,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;

[0205] (3) 加入待测血浆,并按一定浓度稀释(稀释倍比分别为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2小时;

[0206] (4) 移去待检样品,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入铬抗体,铬抗体也稀释为四个不同浓度,即稀释倍比为1:5000、1:10000、1:20000、1:40000,按照每一个相同C1q蛋白、血清稀释浓度,不同浓度Cr抗各加2孔,37℃作用2小时,使其与循环免疫复合物上的金属铬反应;

[0207] (5) 酶标抗体选择最适工作浓度(稀释1000倍,浓度为2ng/ml),移去抗Cr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酶标抗体(如HRP酶标抗体),37℃作用1-2小时,使其与抗Cr抗体反应;

[0208] (6) 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;

[0209] (7) 加终止液至每一微孔;

[0210] (8) 取一定波长,加完终止液后,将ELISA板置于内在酶标仪上分别读取各孔OD值。根据各孔OD值数值,选择补体C1q、Cr抗体的最佳工作浓度以及血浆的最佳稀释倍数。实验中同时以所制标准品作为阳性对照,选择C1q+封闭+Cr抗+酶标+底物(即不加检测样本)、C1q+封闭+血浆+酶标+底物(即不加Cr抗)、C1q+封闭+酶标+底物(即不加检测样本和Cr抗)、C1q+封闭+血浆+Cr抗+底物(即不加酶标)作为阴性对照,封闭+血浆+Cr抗+酶标+底物(即不加C1q蛋白捕获CIC),只加底物及PBS作为空白对照。

[0211] 表1是棋盘滴定法确定补体C1q、Cr抗体的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);

[0212] 表1:C1q和Cr抗体最佳工作浓度以及血浆稀释倍数的确定

[0213]

		C1q (1:2500)	C1q (1:5000)	C1q (1:10000)	C1q (1:20000)
Cr 抗 1:5000	血浆 1:10	0.713	0.698	0.557	0.426
	血浆 1:20	0.717	0.699	0.593	0.473
	血浆 1:40	0.63	0.524	0.452	0.377
Cr 抗 1: 10000	血浆 1:10	0.687	0.671	0.53	0.4
	血浆 1:20	0.659	0.646	0.549	0.487
	血浆 1:40	0.593	0.516	0.486	0.371
Cr 抗 1: 20000	血浆 1:10	0.598	0.509	0.356	0.3
	血浆 1:20	0.577	0.482	0.332	0.226
	血浆 1:40	0.5	0.423	0.27	0.193
Cr 抗 1: 40000	血浆 1:10	0.35	0.244	0.168	0.148
	血浆 1:20	0.42	0.367	0.248	0.221
	血浆 1:40	0.25	0.184	0.152	0.102

[0214] 从表1中我们可以看出当补体蛋白C1q的稀释度为1:2500、血浆稀释度为1:20、Cr抗稀释度为1:5000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1:2500,血浆稀释度为1:20,Cr浓度为1:5000) (详见表1及表2)。

[0215] 表2 ELISA阳性对照及阴性对照ELISA检测结果

[0216]

阳性对照	C1q+封闭+Cr抗+酶标+底物	阴性对照				空白对照		
		C1q+封闭+血浆+酶标+底物	C1q+封闭+酶标+底物	C1q+封闭+血浆+Cr抗+底物	封闭+血浆+Cr抗+酶标+底物	底物	只含PBS	
OD <sub>405</sub>	0.917	0.0879	0.062	0.056	0.012	0.038	0.034	0.005

[0217] 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。

[0218] 2、ELISA洗脱液最佳工作浓度及洗脱时间确定

[0219] 为了寻找最佳的洗脱液工作浓度以及最适洗脱液工作浓度,我们采取了一下实验,步骤如下:

[0220] (1) 将C1q用稀释缓冲液稀释至的最佳工作浓度,加入ELISA板微孔中,4℃过夜18小时,储存冰箱;

[0221] (2) 封闭:移去稀释缓冲液,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;

[0222] (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2小时,使其与抗Cr抗体反应;

[0223] (4) 准备洗脱液:将木瓜蛋白酶用pH为8.0、摩尔浓度0.1mol/L的Tris-HCl缓冲液

配制成2mg/ml,再加入二硫苏糖醇 (DTT) ,配制成二硫苏糖醇的浓度为1mmol/L,37℃孵育30min;该实验中洗脱剂是木瓜蛋白酶,木瓜蛋白酶可以消化抗体,从而将结合于ELISA孔壁上的CIC复合物切掉,而木瓜蛋白酶的最适工作温度为57℃;但57℃使得实验步骤变得更为复杂,基于此发明人通过查阅文献并进行大量实验发现,可以通过加入激活剂的方式,使木瓜蛋白酶在37℃的作用条件下达到较高的活性,使得操作变得更为简单;其中激活剂包括但不限于二硫苏糖醇 (DTT) ;

[0224] (5) 移去酶标抗体,稀释缓冲液对洗脱液进行稀释,使洗脱液中以木瓜蛋白酶的浓度:酶标抗体的浓度=1:80、1:40、1:20、1:10、1:5,分别放置于37℃温度下作用1h、2h、3h;

[0225] (6) 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;

[0226] (7) 加终止液至每一微孔;

[0227] (8) 取405nm的波长,加完终止液后,将ELISA板置于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时间,具体结果参见表3。

[0228] 表3:ELISA洗脱液最佳工作浓度计洗脱时间

	洗脱液	洗脱液	洗脱液	洗脱液	洗脱液
	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80
[0229]	1h	0.281	0.168	0.081	0.114
	2h	0.250	0.115	0.050	0.183
	3h	0.225	0.106	0.100	0.196

[0230] 从表3中我们可以发现,当酶:抗体=1:20时,即洗脱液中木瓜蛋白酶的浓度为100 $\mu$ g/mL,各组OD值均低于其他组,说明在该浓度洗脱液洗脱效果达到最优(即将ELISA孔壁上结合的Cr抗-酶标复合物洗脱程度达到最大,因而OD值最低);而作用时间不管是1h、2h、3h,各组OD值变化均不大,可见随着时间的延长,酶活力逐渐减弱,在酶浓度不变的情况下,延长消化时间并不能提高消化率,所以本实验中洗脱液的作用时间为1-3h皆可。

[0231] 应用例2

[0232] 1、ELISA法检测血浆中铬螯合型免疫复合物

[0233] 以应用例1中确定的C1q蛋白、Cr抗体的最佳工作浓度,以及血浆最佳稀释度,取100份标本血浆,以方法一(即ELISA法)的方法进行检测,具体检测方法如下:

[0234] 1) 将可以捕获免疫复合物的蛋白包被于固相载体上:用稀释缓冲液稀释包被蛋白至2500倍,加入ELISA板微孔中,37℃水浴2小时,储存冰箱;

[0235] 2) 封闭:移去稀释缓冲液,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入封闭液,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;

[0236] 3) 加待检样品,并且温育:取血样,作待检样品;以已知含量的铬螯合型免疫复合物作标准品;用稀释缓冲液稀释20倍,加入微孔中,37℃作用1小时;

[0237] 4) 加入捕获铬的物质,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铬特异性结合或能与铬反应形成抗原抗体复合物的抗铬抗体稀释至5000倍,37℃作用1小时,使其与免疫复合物上的金属铬反应;

[0238] 5) 酶结合物温育:移去抗Cr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Cr抗体反应;

[0239] 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;

[0240] 7) 终止反应:加终止液至每一微孔;

[0241] 8) 取波长为405nm,加完终止液后,将ELISA板置于内在酶标仪上分别读取待检样品OD值,具体检测值如表4所示。

[0242] 表4:100份标本血浆铬螯合型免疫复合物ELISA检测结果

[0243]

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
OD <sub>405</sub>	0.603	0.702	0.306	0.415	0.534	0.546	0.35	0.506	0.388	0.335
编号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
OD <sub>405</sub>	0.405	0.545	0.517	0.668	0.562	0.484	0.419	0.59	0.519	0.449
编号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
OD <sub>405</sub>	0.682	0.683	0.65	0.305	0.336	0.45	0.698	0.449	0.302	0.56
编号	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
OD <sub>405</sub>	0.509	0.538	0.582	0.41	0.675	0.511	0.673	0.329	0.617	0.583
编号	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
OD <sub>405</sub>	0.397	0.425	0.685	0.634	0.625	0.659	0.529	0.642	0.476	0.336
编号	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
OD <sub>405</sub>	0.343	0.646	0.669	0.706	0.518	0.708	0.546	0.55	0.418	0.418
编号	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
OD <sub>405</sub>	0.597	0.486	0.489	0.666	0.323	0.519	0.652	0.381	0.361	0.687
编号	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
OD <sub>405</sub>	0.598	0.521	0.655	0.639	0.444	0.523	0.428	0.518	0.482	0.487
编号	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
OD <sub>405</sub>	0.333	0.665	0.629	0.626	0.47	0.575	0.614	0.658	0.669	0.713
编号	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
OD <sub>405</sub>	0.413	0.634	0.418	0.387	0.662	0.432	0.522	0.563	0.382	0.365

[0244] 2、ELISA+AAS法检测血浆中铬螯合型免疫复合物

[0245] 以应用例1中确定洗脱液最佳工作浓度以及最适洗脱时间,取100份标本血浆,利用方法二(ELISA+AAS检测方法)进行检测,具体检测方法如下:

[0246] 1) 将可以捕获免疫复合物的蛋白包被于固相载体上:用稀释缓冲液稀释C1q蛋白至2500倍,加入ELISA板微孔中,4℃过夜18小时,储存冰箱;

[0247] 2) 封闭:移去稀释缓冲液,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;

[0248] 3) 加待检样品,并且温育:取样,作待检样品;以已知含量的铬螯合型免疫复合物作标准品;用稀释缓冲液稀释20倍,加入微孔中,37℃作用2小时;

[0249] 4) 洗脱: 移去待检样品, 并用洗涤液进行洗涤, 待洗涤完成后, 加入木瓜蛋白酶浓度为100 $\mu$ g/mL的洗脱液, 37℃作用1小时;

[0250] 5) 检测: 从ELISA微孔中取样, 于原子吸收光谱仪检测螯合于免疫复合物上的铬, 检测值如表5所示:

[0251] 表5:100份标本血浆铬螯合型免疫复合物AAS检测结果

[0252]

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$\mu$ g/L	5.578	5.5	3.88	3.781	16.468	3.676	4.991	4.555	14.623	4.043
编号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
$\mu$ g/L	3.378	3.433	4.149	4.399	15.859	4.849	3.581	5.999	5.269	6.347
编号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
$\mu$ g/L	3.235	6.245	15.632	3.456	3.875	6.497	5.94	5.235	15.626	6.342
编号	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
$\mu$ g/L	4.418	4.059	3.514	5.016	13.76	4.945	4.874	5.708	4.446	6.102
编号	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
$\mu$ g/L	4.428	4.688	14.1	13.577	6.036	4.666	3.279	5.684	13.991	5.829
编号	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
$\mu$ g/L	3.624	3.46	3.923	5.483	3.3	3.938	5.437	13.423	6.2	3.385
编号	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
$\mu$ g/L	5.454	13.73 1	3.351	3.817	3.034	3.225	6.103	3.39	14.507	4.907
编号	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
$\mu$ g/L	6.311	4.006	4.549	16.466	3.119	6.32	3.093	13.668	6.032	4.493
编号	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
$\mu$ g/L	3.253	6.009	4.691	14.467	3.71	4.142	4.033	13.894	3.424	3.919
编号	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
$\mu$ g/L	6.188	5.514	4.9	4.716	5.165	16.472	5.395	4.043	3.484	15.55

[0253] 3、ELISA+ICP-MS法检测血浆中铬螯合型免疫复合物

[0254] 以上述洗脱液最佳工作浓度以及最适工作温度, 取100份标本血清, 利用方法三的检测方法进行检测, 具体检测方法如下:

[0255] 1) 将可以捕获免疫复合物的蛋白包被于固相载体上: 用稀释缓冲液稀释包被蛋白至2500倍, 加入ELISA板微孔中, 37℃水浴2小时, 储存冰箱。

[0256] 2) 封闭: 移去稀释缓冲液, 并用洗涤液进行洗涤, 待洗涤完成后, 加入封闭液, 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;

[0257] 3) 加待检样品, 并且温育: 从循环系统取样, 作待检样品; 以已知含量的铬螯合型免疫复合物作标准品; 用稀释缓冲液稀释20倍, 加入微孔中, 37℃作用1小时;

[0258] 4) 洗脱: 移去待检样品, 并用洗涤液进行洗涤, 待洗涤完成后, 加入木瓜蛋白酶浓度为100 $\mu$ g/mL的洗脱液, 于37℃下作用1小时;

[0259] 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;

[0260] 6) 检测: 加入双氧水, 并且加热赶酸, 并从上述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螯合于免疫复合物上的铬, 检测值如表6所示:

[0261] 表6:100份标本血浆铬螯合型免疫复合物ICP-MS检测结果

[0262]

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$\mu$ g/L	4.872	5.218	3.813	5.696	4.304	4.498	5.025	15.414	3.825	5.288
编号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
$\mu$ g/L	5.366	15.00 9	3.085	5.16	5.525	4.259	5.385	4.328	5.92	3.603
编号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
$\mu$ g/L	4.478	15.87 7	6.075	4.602	3.43	6.038	4.809	3.398	4.466	14.844
编号	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
$\mu$ g/L	3.858	5.582	5.755	6.422	5.468	3.309	6.168	14.858	3.401	5.344
编号	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
$\mu$ g/L	5.589	4.675	3.602	3.962	4.699	16.14 7	16.479	6.363	6.2	3.524
编号	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
$\mu$ g/L	13.27 1	3.413	14.695	3.903	6.181	4.057	4.141	4.93	16.409	5.304
编号	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
$\mu$ g/L	5.02	4.726	15.443	4.446	5.637	3.801	14.818	5.433	3.778	3.755
编号	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
$\mu$ g/L	3.623	3.817	4.395	5.248	14.757	6.494	3.673	6.179	6.412	3.666
编号	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
$\mu$ g/L	3.625	5.686	3.836	3.624	4.895	16.10 9	14.294	4.433	15.804	3.744
编号	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
$\mu$ g/L	4.239	4.012	4.537	6.094	4.514	3.735	14.122	14.78	5.934	4.652

[0263] 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。

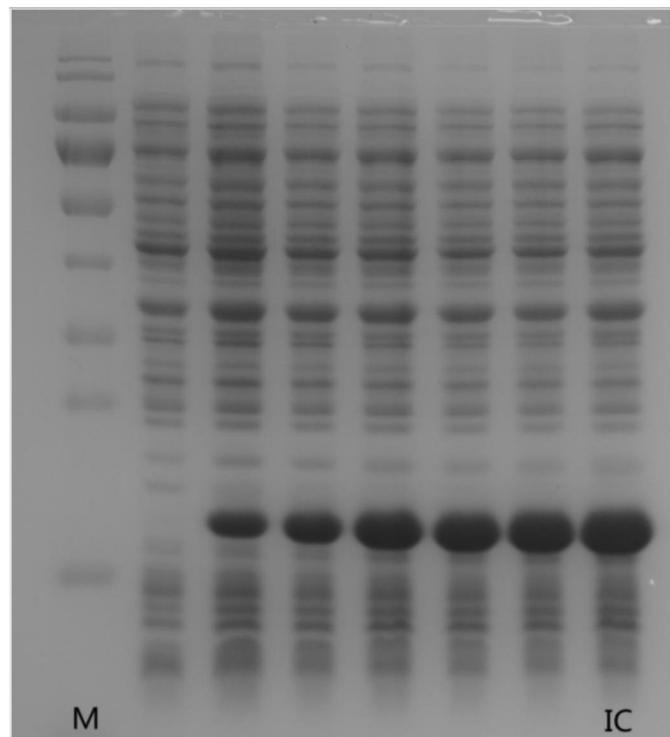


图1

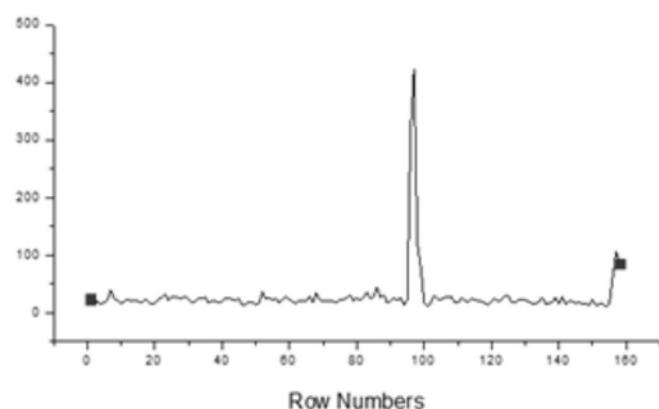


图2

专利名称(译)	一种铬螯合型免疫复合物及其制备方法和应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN105001310B</a>	公开(公告)日	2017-12-15
申请号	CN201510413049.4	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	C07K14/00 C07K16/00 C07K1/22 G01N33/53		
其他公开文献	<a href="#">CN105001310A</a>		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">Sipo</a>		

**摘要(译)**

本发明公开了一种铬螯合型免疫复合物及其制备方法和应用，该铬螯合型免疫复合物为以下复合物中的一种：铬离子结合于免疫复合物形成的复合物，或铬离子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；或铬离子结合于免疫球蛋白后与载体蛋白结合形成的复合物。本发明所述铬螯合型免疫复合物可用于检测地区人群血清中是否铬螯合型免疫复合物及含量，间接反映这个地区铬污染程度。

