



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105044324 A

(43) 申请公布日 2015. 11. 11

(21) 申请号 201510413025. 9

(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)

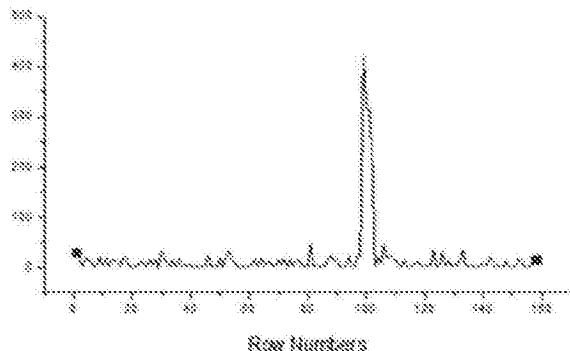
权利要求书2页 说明书18页 附图2页

(54) 发明名称

一种砷螯合型免疫复合物及其制备方法和应
用

(57) 摘要

本发明提供一种砷螯合型免疫复合物及其制备方法和应用；该砷螯合型免疫复合物为以下复合物中的一种：砷离子结合于免疫复合物形成的复合物，或砷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；或砷结合于免疫球蛋白后与载体蛋白结合形成的复合物。本发明所述砷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砷螯合型免疫复合物及含量，间接反映这个地区砷污染程度。



1. 一种砷螯合型免疫复合物，其特征在于，该砷螯合型免疫复合物为以下一种：
 砷离子结合于免疫复合物形成的复合物，或
 砷离子结合于载体蛋白后与和该载体蛋白特异性结合的抗体所形成的复合物；或
 砷结合于免疫球蛋白后与载体蛋白结合形成的复合物。
2. 如权利要求 1 所述的砷螯合型免疫复合物，其特征在于，所述免疫复合物或载体蛋白的结构中至少含有锌指结构、巯基、半胱氨酸残基中的一种，砷离子与免疫复合物或载体蛋白与锌指结构或巯基或半胱氨酸残基相结合。
3. 如权利要求 2 所述的砷螯合型免疫复合物，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、蠕虫或免疫球蛋白之中的一种。
4. 如权利要求 1 所述的砷螯合型免疫复合物，其特征在于，其中，砷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。
5. 制备如权利要求 1 所述的砷螯合型免疫复合物，其特征在于，包括以下步骤：
 - A) 合成砷螯合型免疫复合物的步骤；
 - B) 提纯砷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) 制得的砷螯合型免疫复合物中未参与反应的载体蛋白、特异性抗体及砷离子。
6. 如权利要求 5 所述的方法，其特征在于，
 所述步骤 A) 具体步骤为：
 - (I) 配制螯合剂溶液：将螯合剂溶于溶剂中，配制成螯合剂溶液；
 - (II) 配制载体蛋白溶液：将载体蛋白加入到硼酸盐缓冲溶液中，制得载体蛋白溶液；
 - (III) 搅拌过夜：将步骤 (I) 融合剂溶液加入到步骤 (II) 的载体蛋白溶液中，搅拌后于摇床作用 2-30h，得到混合液；
 - (IV) 透析袋预处理：在透析袋中加入 EDTA-NaHCO₃ 溶液煮沸，弃废液后用 ddH₂O 冲洗，重复该步骤 1-3 次；
 - (V) 透析：将步骤 (III) 的混合液装入经步骤 (IV) 处理后的透析袋中，用 ddH₂O 透析，换水 2-3 次，4℃ 透析过夜之后，收集液体；
 - (VI) 砷离子螯合：在上述步骤 (V) 中的液体中加入 HCl 溶液调整 pH 至 7.0，缓慢加入砷离子溶液，边滴加边震荡，之后于摇床作用 2-30h，然后重复步骤 (V) 一次，收集液体，得到砷螯合型抗原；
 - (VII) 结合：在上述砷螯合型抗原中加入能与载体蛋白特异性结合的抗体，反应后得到砷螯合型免疫复合物；
- 所述步骤 B) 具体步骤如下：
 - (i) 将上述 A) 步骤合成的砷螯合型免疫复合物复溶于生理盐水中，得到砷螯合型免疫复合物溶液；
 - (ii) 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；
 - (iii) 上样：待柱子平衡后，用稀释缓冲液稀释步骤 (i) 所得溶液，然后上柱，砷螯合型免疫复合物吸附在填料上，未反应的载体蛋白、抗体、砷离子随稀释缓冲液流出；
 - (iv) 洗脱：使用稀释缓冲液冲洗柱子，至基线平衡，然后使用 0.05-0.10 mol/L 的

Na₂HPO₄溶液进行洗脱；

(v) 收集：收集步骤(iv)的洗脱液，收集完毕后立即使蛋白复性；

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

(vii) 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砷特异性结合的填料，装柱后再用稀释缓冲液平衡柱子；

(viii) 上样：待步骤(vii)的柱子平衡后，用稀释缓冲液稀释上述步骤(vi)的样本，然后将稀释后的样本上柱，砷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；

(ix) 洗脱：步骤(viii)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Na₂HPO₄溶液进行洗脱；

(x) 收集：收集步骤(ix)的洗脱液，收集完毕后立即使蛋白复性；

(xi) 对步骤(x)的洗脱液装入透析袋用ddH₂O透析除盐，换水三次后，4℃透析过夜，收集样本，即得到纯化的砷螯合型免疫复合物。

7. 如权利要求1所述的砷螯合型免疫复合物在制备检测砷螯合循环免疫复合物的试剂或酶联免疫试剂盒中的应用。

8. 一种检测砷螯合循环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所述的砷螯合型免疫复合物的标准品。

9. 如权利要求8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：含有捕获抗原抗体复合物的蛋白的包被液、含有捕获砷的抗体的包被液、酶标抗体。

10. 一种定量检测砷螯合型循环免疫复合物的方法，其特征在于，以已知含量的权利要求1所述的砷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。

一种砷螯合型免疫复合物及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及循环免疫复合物的检测，具体涉及一种砷螯合型免疫复合物。

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)。免疫复合物的清除在很大程度上取决于 CIC 的大小、抗体类别、抗原抗体相对浓度等，只有在少数情况下免疫复合物沉淀下来引起组织损伤，造成疾病。多种疾病的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。

[0003] 关于循环免疫复合物的定量检测，目前国内外经常采用的方法主要包括聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 沉淀法、超速离心、分子超滤、凝胶过滤、双抗体夹心法 ELISA 定量检测、C1-q 补体 ELISA 定量检测，但这些方法只能检测出非特异性循环免疫复合物，多数只能作为病情活动性提示指标，而缺乏疾病特异性价值。虽然也有学者先采用 PEG 沉淀法提纯出非特异性 CIC，再利用已知抗原，联合酶联免疫吸附原理，进行特异性 CIC 定量检测，但也仅运用于肝炎、HIV 等几种已知抗原疾病。因而寻找一种特异性循环免疫复合物的定量检测方法至关重要。

[0004] 砷是一种常见的有毒非金属及环境污染物，普通人群接触或摄入砷的主要途径有：吸入砷污染的空气、摄入用砷容器或包装盛装的饮料或食物、摄入含砷药物等。尽管砷对机体的损害十分明显，但是其致机体损害的机制还尚待研究。砷存在正三价与正五价两种最常见的氧化态，无机砷在自然界及有机体的代谢过程中会发生氧化、还原、甲基化、糖基化等一系列变化，形成不同形态的砷。无机砷被认为是毒性很强的形态，被列为致癌物质，其中亚砷酸盐 ($i\text{As}^{\text{III}}$) 的毒性强于砷酸盐 ($i\text{As}^{\text{V}}$)；不同形态的砷毒性差异很大，单甲基亚砷酸 (monomethylarsonous acid, MMA^{III}) 及二甲基亚砷酸 (dimethylarsinous acid, DMA^{III}) 均有剧毒，而其五价形态 (MMA^V, DMA^V) 则毒性不强。研究认为，三价砷的毒性是通过与蛋白质巯基作用而产生的。砷与蛋白结合会影响蛋白质的组成、结构及功能，影响该蛋白质与其他功能蛋白质结合，因此研究砷与蛋白质结合对理解砷的毒性及其对机体的损伤机制具有重要意义。

[0005] 目前已知砷可以抑制 200 多种酶，不管是三价砷还是有机砷（包括氧化苯砷，phenylarsine (PAO)）都有抑制酶的作用，这些酶包括谷胱甘肽还原酶、谷胱甘肽转移酶、谷胱甘肽过氧化物酶、硫氧还原化物酶、DNA 连接酶、Arg-tRNA 蛋白质转移酶、氧化型二谷胱甘肽亚精胺还原酶、I κ B 激活 β 酶 (IKK β)、丙酮酸激活半乳凝素 1 酶、酪氨酸磷酸蛋白酶、JNK 磷酸酶、Wip1 磷酸酶、E3 连接 c-CBL 和 SIAH1。研究认为，砷主要是通过结合于巯基上或蛋白质或肽链里的半胱氨酸残基结合，而发挥作用的。

[0006] 目前国内外存在大量方法进行血砷检测,包括 ELISA、原子吸收光谱 (Atomic Absorption Spectroscopy, AAS) 定量检测法、电感耦合等离子体质谱仪 (inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS) 定量检测法等。但这些方法只能检测出非特异性循环免疫复合物,多数只能作为病情活动性提示指标,而缺乏疾病特异性价值。

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砷螯合型免疫复合物,该砷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存在砷螯合型免疫复合物及其含量,间接反映这个地区砷污染程度。

[0008] 为解决上述问题,本发明所采用的技术方案如下:

[0009] 一种砷螯合型免疫复合物,该砷螯合型免疫复合物为以下一种:

[0010] 砷离子结合于免疫复合物形成的复合物,或

[0011] 砷离子结合于载体蛋白后与和该载体蛋白特异性结合的抗体所形成的复合物;或

[0012] 砷结合于免疫球蛋白后与载体蛋白结合形成的复合物。

[0013] 具体地,所述免疫复合物或载体蛋白的结构中至少含有锌指结构、巯基、半胱氨酸残基中的一种,砷离子与免疫复合物或载体蛋白与锌指结构或巯基或半胱氨酸残基相结合。

[0014] 进一步地,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、蠕虫或免疫球蛋白之中的一种。

[0015] 进一步地,砷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] 进一步地,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] 本发明还提供了制备砷螯合型免疫复合物的方法,包括以下步骤:

[0018] A) 合成砷螯合型免疫复合物的步骤;

[0019] B) 提纯砷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) 制得的砷螯合型免疫复合物中未参与反应的载体蛋白、特异性抗体及砷离子。

[0020] 具体地,所述步骤 A) 具体步骤为:

[0021] (I) 配制螯合剂溶液:将螯合剂溶于溶剂中,配制成螯合剂溶液;

[0022] (II) 配制载体蛋白溶液:将载体蛋白加入到硼酸盐缓冲溶液中,制得载体蛋白溶液;

[0023] (III) 搅拌过夜:将步骤 (I) 融合剂溶液加入到步骤 (II) 的载体蛋白溶液中,搅拌后于摇床作用 2-30h,得到混合液;

[0024] (IV) 透析袋预处理:在透析袋中加入 EDTA-NaHCO₃ 溶液煮沸,弃废液后用 ddH₂O 冲洗,重复该步骤 1-3 次;

[0025] (V) 透析:将步骤 (III) 的混合液装入经步骤 (IV) 处理后的透析袋中,用 ddH₂O 透析,换水 2-3 次,4℃透析过夜之后,收集液体;

[0026] (VI) 砷离子螯合:在上述步骤 (V) 中的液体中加入 HCl 溶液调整 pH 至 7.0,缓慢加入砷离子溶液,边滴加边震荡,之后于摇床作用 2-30h,然后重复步骤 (V) 一次,收集液体,

得到砷螯合型抗原；

[0027] (VII) 结合：在上述砷螯合型抗原中加入能与载体蛋白特异性结合的抗体，反应后得到砷螯合型免疫复合物；

[0028] 所述步骤B) 具体步骤如下：

[0029] (i) 将上述A) 步骤合成的砷螯合型免疫复合物复溶于生理盐水中，得到砷螯合型免疫复合物溶液；

[0030] (ii) 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；

[0031] 所述能与免疫复合物特异性结合的填料为吸附有可与免疫复合物特异性结合物质的硅胶或树脂；

[0032] (iii) 上样：待柱子平衡后，用稀释缓冲液稀释步骤(i)所得溶液，然后上柱，砷螯合型免疫复合物吸附在填料上，未反应的载体蛋白、抗体、砷离子随稀释缓冲液流出；

[0033] (iv) 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Na₂HPO₄溶液进行洗脱；

[0034] (v) 收集：收集步骤(iv)的洗脱液，收集完毕后立即使蛋白复性；

[0035] (vi) 收集到的洗脱液装入透析袋用ddH₂O透析除盐，换水2-4次后，4℃透析过夜，收集样本；

[0036] (vii) 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砷特异性结合的填料，装柱后再用稀释缓冲液平衡柱子；

[0037] 所述能与砷特异性结合的填料为吸附有可与砷特异性结合物质的硅胶或树脂；

[0038] (viii) 上样：待步骤(vii)的柱子平衡后，用稀释缓冲液稀释上述步骤(vi)的样本，然后将稀释后的样本上柱，砷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] (ix) 洗脱：步骤(viii)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Na₂HPO₄溶液进行洗脱；

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

[0041] (xi) 对步骤(x)的洗脱液装入透析袋用ddH₂O透析除盐，换水三次后，4℃透析过夜，收集样本，即得到纯化的砷螯合型免疫复合物。

[0042] 本发明还提供了上述砷螯合型免疫复合物在制备检测砷螯合型循环免疫复合物的试剂或酶联免疫试剂盒中的应用。

[0043] 本发明还提供了上述一种检测砷螯合型循环免疫复合物的酶联免疫试剂盒，该试剂盒包括上述的砷螯合型免疫复合物的标准品。

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

[0045] 一种定量检测砷螯合型循环免疫复合物的方法，以已知含量上述的砷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. 首次合成了砷螯合型免疫复合物,并证实了在机体内砷可存在于免疫系统,并证明了砷螯合型循环免疫复合物的存在;

[0048] 2. 本发明实现了循环免疫复合物的特异性识别,并实现了砷螯合型循环免疫复合物的定量检测,提供从免疫角度检测机体内的砷含量水平的方法,并为工业地区的砷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 为免疫复合物非变性电泳条带图;

[0051] 图 2 为砷螯合型免疫复合物的电泳条带的同步辐射线 X 线荧光分析图;

[0052] 其中,图 2 中的横坐标为蛋白条带位置,纵坐标为该蛋白条带中砷能量。

具体实施方式

[0053] 本发明提供一种砷螯合型免疫复合物,该砷螯合型免疫复合物为以下一种:

[0054] 砷离子结合于免疫复合物形成的复合物,或

[0055] 砷离子结合于载体蛋白后与和该载体蛋白特异性结合的抗体所形成的复合物;或

[0056] 砷结合于免疫球蛋白后与载体蛋白结合形成的复合物。

[0057] 具体地,所述免疫复合物或载体蛋白的结构中至少含有锌指结构、巯基、半胱氨酸残基中的一种,砷离子与免疫复合物或载体蛋白与锌指结构或巯基或半胱氨酸残基相结合。

[0058] 进一步地,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、蠕虫或免疫球蛋白之中的一种。

[0059] 进一步地,砷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] 进一步地,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] 本发明还提供了制备砷螯合型免疫复合物的方法,包括以下步骤:

[0062] A) 合成砷螯合型免疫复合物的步骤;

[0063] B) 提纯砷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) 制得的砷螯合型免疫复合物中未参与反应的载体蛋白、特异性抗体及砷离子。

[0064] 具体地,所述步骤 A) 具体步骤为:

[0065] (I) 配制螯合剂溶液:将螯合剂溶于溶剂中,配制成螯合剂溶液;

[0066] (II) 配制载体蛋白溶液:将载体蛋白加入到硼酸盐缓冲溶液中,制得载体蛋白溶液;

[0067] (III) 搅拌过夜:将步骤 (I) 融合剂溶液加入到步骤 (II) 的载体蛋白溶液中,搅拌后于摇床作用 2-30h,得到混合液;

[0068] (IV) 透析袋预处理:在透析袋中加入 EDTA-NaHCO₃ 溶液煮沸,弃废液后用 ddH₂O 冲洗,重复该步骤 1-3 次;

[0069] (V) 透析 : 将步骤 (III) 的混合液装入经步骤 (IV) 处理后的透析袋中, 用 ddH₂O 透析, 换水 2-3 次, 4℃ 透析过夜之后, 收集液体;

[0070] (VI) 砷离子螯合 : 在上述步骤 (V) 中的液体中加入 HCl 溶液调整 pH 至 7.0, 缓慢加入砷离子溶液, 边滴加边震荡, 之后于摇床作用 2-30h, 然后重复步骤 (V) 一次, 收集液体, 得到砷螯合型抗原;

[0071] (VII) 结合 : 在上述砷螯合型抗原中加入能与载体蛋白特异性结合的抗体, 反应后得到砷螯合型免疫复合物;

[0072] 所述步骤 B) 具体步骤如下 :

[0073] (i) 将上述 A) 步骤合成的砷螯合型免疫复合物复溶于生理盐水中, 得到砷螯合型免疫复合物溶液;

[0074] (ii) 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;

[0075] 所述能与免疫复合物特异性结合的填料为吸附有可与免疫复合物特异性结合物质的硅胶或树脂;

[0076] (iii) 上样 : 待柱子平衡后, 用稀释缓冲液稀释步骤 (i) 所得溶液, 然后上柱, 砷螯合型免疫复合物吸附在填料上, 未反应的载体蛋白、抗体、砷离子随稀释缓冲液流出;

[0077] (iv) 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 Na₂HPO₄ 溶液进行洗脱;

[0078] (v) 收集 : 收集步骤 (iv) 的洗脱液, 收集完毕后立即使蛋白复性;

[0079] (vi) 收集到的洗脱液装入透析袋用 ddH₂O 透析除盐, 换水 2-4 次后, 4℃ 透析过夜, 收集样本;

[0080] (vii) 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砷特异性结合的填料, 装柱后再用稀释缓冲液平衡柱子;

[0081] 所述能与砷特异性结合的填料为吸附有可与砷特异性结合物质的硅胶或树脂;

[0082] (viii) 上样 : 待步骤 (vii) 的柱子平衡后, 用稀释缓冲液稀释上述步骤 (vi) 的样本, 然后将稀释后的样本上柱, 砷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] (ix) 洗脱 : 步骤 (viii) 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 Na₂HPO₄ 溶液进行洗脱;

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

[0085] (xi) 对步骤 (x) 的洗脱液装入透析袋用 ddH₂O 透析除盐, 换水三次后, 4℃ 透析过夜, 收集样本, 即得到纯化的砷螯合型免疫复合物。

[0086] 本发明还提供了上述砷螯合型免疫复合物在制备检测砷螯合型循环免疫复合物的试剂或酶联免疫试剂盒中的应用。

[0087] 本发明还提供了上述一种检测砷螯合型循环免疫复合物的酶联免疫试剂盒, 该试剂盒包括上述砷螯合型免疫复合物的标准品。

[0088] 进一步地, 上述试剂盒还包括至少一种以下试剂 : 含有捕获抗原抗体复合物的蛋白的包被液、含有捕获砷的抗体的包被液、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] 一种用于检测砷螯合型循环免疫复合物的试剂盒,包括:含有可捕获抗原抗体复合物的蛋白的包被液、封闭液、洗涤缓冲液、抗砷抗体、酶标抗体、底物、终止液、稀释缓冲液、阳性对照、阴性对照。

[0091] 一种用于检测砷螯合型循环免疫复合物的试剂盒,包括:含有可捕获抗原抗体复合物的蛋白的包被液、封闭液、洗涤缓冲液、洗脱液、阳性对照、阴性对照。

[0092] 一种用于检测砷螯合型循环免疫复合物的试剂盒,包括:含有可捕获抗原抗体复合物的蛋白的包被液、封闭液、洗涤缓冲液、洗脱液、硝酸、过氧化氢、阳性对照、阴性对照。

[0093] 一种用于检测砷螯合型循环免疫复合物的试剂盒,包括用于提取免疫复合物所需溶液、复溶液、含有可捕获砷的抗体的包被液、封闭液、洗涤缓冲液、酶标抗体、底物、终止液、稀释缓冲液、标准品、阴性对照。

[0094] 一种用于检测砷螯合型循环免疫复合物的试剂盒:包括用于提取免疫复合物所需溶液、复溶液、阳性对照、阴性对照。

[0095] 一种用于检测砷螯合型循环免疫复合物的试剂盒,包括用于提取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。

[0096] 一种用于检测砷螯合型循环免疫复合物的试剂盒,包括用于提取免疫复合物所需溶液、胶床介质、复溶液、上样缓冲液、溶解胶床上含砷的蛋白条带所需液体、含有可捕获砷的抗体的包被液、封闭液、洗涤缓冲液、酶标抗体、底物、终止液、稀释缓冲液、阳性对照、阴性对照等。

[0097] 一种用于检测砷螯合型循环免疫复合物的试剂盒,包括用于提取免疫复合物所需溶液、胶床介质、复溶液、上样缓冲液、溶解胶床上含砷的蛋白条带所需液体、阳性对照、阴性对照等。

[0098] 一种用于检测砷螯合型循环免疫复合物的试剂盒,包括用于提取免疫复合物所需溶液、胶床介质、复溶液、上样缓冲液、溶解胶床上含砷的蛋白条带所需液体、硝酸、过氧化氢、阳性对照、阴性对照等。

[0099] 上述几种试剂盒中,所述包被液为捕获循环免疫复合物的蛋白,如补体 C1q、C1F 蛋白、抗 C3 抗体;封闭液为质量浓度为 1% -5% 的牛血清白蛋白或脱脂奶粉;洗脱液包括但不限于木瓜蛋白酶的 Tris-HCl 缓冲溶液;所述复溶液为包括但不限于;所述胶床介质包括但不限于琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶;用于提取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;所述上样缓冲液包括但不限于含有溴酚蓝的 Tris-HCl 缓冲溶液;酶标抗体为含有辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等酶标记的抗体,如 HRP 酶标抗体;标准品包括但不限于本发明的砷螯合型循环免疫复合物、其他螯合有砷的免疫复合物;阳性对照包括但不限于本发明砷螯合型循环免疫复合物、其他螯合有砷的免疫复合物,阴性对照为稀释缓冲液。

[0100] 本发明的又一目的在于提供一种定量检测砷螯合型循环免疫复合物的方法,以已知含量的上述砷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。

[0101] 在本发明中,用检测砷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。

[0102] 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:

[0103] 稀释缓冲液为 pH 9.6 的 0.05M 碳酸盐缓冲液,配制方法示例:取 1.5g 的 Na₂CO₃ 和 2.93g 的 NaHCO₃ 溶解加 ddH₂O 定容至 1000mL;

[0104] 洗涤缓冲液为 pH7.4 的 0.15M PBS 缓冲液,配制方法示例:取 0.2g 的 KH₂PO₄、2.90g 的 Na₂HPO₄·12H₂O、8.0g 的 NaCl、0.2g 的 KCl、0.5mL Tween-20,溶解加 ddH₂O 定容至 1000mL;

[0105] 封闭液为牛血清白蛋白溶液,配制方法示例:取 0.1g 牛血清白蛋白,加入洗涤缓冲液稀释定容至 100mL;

[0106] 终止液为 2M H₂SO₄,配制方法示例:取 178.3mL 的 ddH₂O,向 ddH₂O 中逐滴沿壁加入浓 H₂SO₄,边加边搅拌,定容至 200mL;

[0107] 底物缓冲液的 pH 为 5.0、Na₂HPO₄ 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 1.42g Na₂HPO₄、0.96g 柠檬酸,然后加入 ddH₂O 至 50mL,即得;

[0108] 底物为甲基联苯胺 (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% H₂O₂ = 0.5mL : 10mL : 32 μL,其中 TMB 为 2g/L 的甲基联苯胺乙醇溶液;

[0109] 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、CIF 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 C1q Recombinant Protein,货号为“NOVUS H00000712-p01”;

[0110] 捕获砷的物质为货号为“广州然科公司 RK15728”的鼠抗 As mAb,以下实施方式中所述的与砷特异性结合的物质、与砷有亲和力的物质、抗 As 抗体、二抗、抗砷抗体均为捕获得砷的物质;

[0111] 能与人血清白蛋白特异性结合的抗体为兔抗人血清白蛋白抗体,为市售。

[0112] 以下所述稀释倍比为重量体积比。

[0113] 方法一:ELISA 法检测砷螯合型免疫复合物,具体步骤如下:

[0114] 1) 将可以捕获免疫复合物的蛋白包被于固相载体上:用稀释缓冲液稀释补体 C1q 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;

[0115] 2) 封闭:移去稀释缓冲液,并用洗涤缓冲液进行洗涤,待洗涤完成后,加封闭液,37℃放置 1 小时,移去封闭液,并用洗涤缓冲液进行洗涤,洗涤完成后,ELISA 板于 37℃放置 1 小时;

[0116] 3) 加待测样品,并且温育:从循环系统取样,作待测样品;以已知含量的砷螯合型免疫复合物作标准品;用稀释缓冲液稀释 10-40 倍,加至微孔中,37℃作用 1-2 小时;

[0117] 4) 加入捕获砷的物质,并且温育:移去待测样品,并用洗涤缓冲液进行洗涤,待洗涤完成后,加入用稀释缓冲液稀释与砷有亲和力的物质或能与砷反应形成抗原抗体复合物的抗砷抗体稀释至 25000-200000 倍,37℃作用 1-2 小时,使其与免疫复合物上的砷反应;

[0118] 5) 酶结合物温育:移去抗砷抗体,并用洗涤缓冲液进行洗涤,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,使其与抗砷抗体反应;

[0119] 6) 底物温育 : 移去酶标抗体, 并用洗涤缓冲液进行洗涤, 待洗涤完成后, 加入底物, 37℃避光作用 30 分钟;

[0120] 7) 终止反应 : 滴加终止液至每一微孔;

[0121] 8) 取波长为 405nm, 将 ELISA 板置于酶标仪上分别读取待测样品组和标准品的 OD 值, 绘制标准曲线, 求得待测样品的含量。

[0122] 本方法中, 步骤 8) 检测时, 也可不使用酶标仪, 直接通过显色情况进行定性检。

[0123] 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鳌合有砷, 而这部分免疫复合物上的砷可以被与砷有亲和力的物质或能与砷反应形成抗原抗体复合物的抗砷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, 而不含有鳌合砷的免疫复合物, 则不会被抗砷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砷 (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鳌合的砷。

[0124] 方法二 : ELISA 法 +AAS 法检测砷鳌合型免疫复合物, 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, 并用洗涤缓冲液进行洗涤, 待洗涤完成后, 加封闭液, 37℃放置 1 小时, 移去封闭液, 并用洗涤缓冲液进行洗涤, 洗涤完成后, ELISA 板于 37℃放置 1 小时;

[0127] 3) 加待测样品, 并且温育 : 从循环系统取样, 作待测样品; 以已知含量的砷鳌合型免疫复合物作标准品; 用稀释缓冲液稀释 10~40 倍, 加至微孔中, 37℃作用 1~2 小时;

[0128] 4) 洗脱 : 移去待测样品, 并用洗涤缓冲液进行洗涤, 待洗涤完成后, 加入洗脱液, 于 37℃下作用 1~2 小时;

[0129] 5) 检测 : 从 ELISA 微孔中取样, 于原子吸收光谱仪检测鳌合于免疫复合物上的砷, 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鳌合于循环免疫复合物上的砷, 由于溶液中仅含有免疫复合物, 且所用试剂中不含砷 (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鳌合的砷。

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

[0132] 1) 包被 : 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, 并用洗涤缓冲液进行洗涤, 待洗涤完成后, 加封闭液, 37℃放置 1 小时, 移去封闭液, 并用洗涤缓冲液进行洗涤, 洗涤完成后, ELISA 板于 37℃放置 1 小时;

[0134] 3) 加待测样品, 并且温育 : 从循环系统取样, 作待测样品; 以已知含量的砷鳌合型

免疫复合物作标准品；用稀释缓冲液稀释 10-40 倍，加至微孔中，37℃作用 1-2 小时；

[0135] 4) 洗脱：移去待测样品，并用洗涤缓冲液进行洗涤，待洗涤完成后，加入洗脱液，于 37℃下作用 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，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砷，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砷，由于溶液中仅含有免疫复合物，且所用试剂中不含砷（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砷。

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

[0140] 1) 提取非特异性免疫复合物：利用 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于溶液中；

[0141] 2) 包被：用可以捕获砷的物质包被于固相载体上，用稀释缓冲液稀释包被蛋白至 25000-200000 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，并用洗涤缓冲液进行洗涤，待洗涤完成后，加封闭液，37℃放置 1 小时，移去封闭液，并用洗涤缓冲液进行洗涤，洗涤完成后，ELISA 板于 37℃放置 1 小时；

[0143] 4) 加待测样品，并且温育：从步骤 1) 所得溶液中取样，作待测样品；以已知含量的砷螯合型免疫复合物作标准品；用稀释缓冲液稀释 10-40，加至微孔中，37℃作用 1-2 小时；

[0144] 5) 酶结合物温育：移去待测样品，并用洗涤缓冲液进行洗涤，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，使其与抗砷抗体反应；

[0145] 6) 底物温育：移去酶标抗体，并用洗涤缓冲液进行洗涤，待洗涤完成后，加入底物，37℃避光作用 30 分钟；

[0146] 7) 终止反应：滴加终止液至每一微孔。

[0147] 8) 取波长为 405nm，加完终止液后，将 ELISA 板置于酶标仪上分别读取待测样品和标准品的 OD 值，绘制标准曲线，求得待测样品的含量；

[0148] 本方法中，步骤 8) 中，也可不使用酶标仪，直接通过显色情况进行定性检测。

[0149] 方法五：提纯 CIC 法 +AAS 法检测砷螯合型免疫复合物，具体步骤如下：

[0150] 1) 提取非特异性免疫复合物：利用 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于溶液中；

[0151] 2) 检测：从步骤 1) 的溶液中取样，于原子吸收光谱仪检测螯合于免疫复合物上的砷，读出相应数值。

[0152] 方法六：提纯 CIC 法 +ICP-MS 法检测砷螯合型免疫复合物，具体步骤如下：

[0153] 1) 提取非特异性免疫复合物：利用 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于溶液中；

[0154] 2) 酸化：从步骤 1) 所得溶液中取样，在溶液中加入酸化剂对溶液进行酸化，封口

过夜,彻底酸化;

[0155] 3) 检测:加入双氧水,并且加热赶酸,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砷,读出相应数值。

[0156] 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,测定免疫复合物中砷螯合型免疫复合物上砷的含量;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品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砷螯合型免疫复合物上的砷含量。

[0157] 方法七:电泳法+ELISA/AAS/ICP-MS 法检测砷螯合型免疫复合物,具体步骤如下:

[0158] 1) 提取非特异性免疫复合物:利用 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于溶液中;

[0159] 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),按照相应要求制备好相应胶床;

[0160] 3) 加样:从步骤 1) 所得溶液中取样 8 μL,加入 2 μL 上样缓冲液,并混匀,然后加样于样品槽中;

[0161] 所述上样缓冲液(Sample buffer)可由如下比例的组分配制而成:Tris-HCl:1% 溴酚蓝:ddH₂O:甘氨酸=15.5:2.5:7:25,其中 Tris-HCl 的 pH 为 6.8、摩尔浓度为 1M;

[0162] 4) 电泳:连接电泳板,加电泳缓冲液进行电泳,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;

[0163] 所述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 ddH₂O 中,调节 pH 至 8.3,然后加入 ddH₂O 至 1000mL,即得;

[0164] 5) 检测:在胶床上找出含有免疫复合物的蛋白条带,将该条带取出,将条带溶解,然后再分别利用 ELISA、ICP-MS、AAS 等原理检测砷含量;此外,还可以利用此方法检测螯合砷的免疫复合物的等电点、分子量及含量等。

[0165] 方法七是在方法四、方法五、方法六的基础上,将砷螯合型免疫复合物从全血中提取出来,再采用凝胶电泳法对所提取的砷螯合型免疫复合物进行分离,进而从电泳条带中找出含砷的蛋白条带,进行砷含量测定。

[0166] 实施例 1:

[0167] 本实施例中,ITCBE 购买自日本同仁化学研究所,货号 M030;

[0168] 下述硼酸盐缓冲液,其摩尔浓度为 0.01M,配制方法示例:称取 0.31g 硼酸溶于 400mL ddH₂O 中,用 0.1mol/L 的 NaOH 水溶液调节 pH 至 9.0,定容至 500mL,即得;

[0169] 下述 EDTA-NaHCO₃ 溶液的配制方法示例:取 1.86g EDTA·2H₂O 和 16.8g NaHCO₃,溶于 900mL ddH₂O 中,用 1.0M NaOH 调整 pH 至 8.0 定容至 1000mL,高压灭菌,即得,25±2℃ 保存;

[0170] 下述透析袋的截留分子量为 14000,购买自 Bioshop Inc;透析袋经过以下处理:将透析袋放入 500mL 体积的 EDTA-NaHCO₃ 溶液中,煮沸 10min;倾弃 EDTA-NaHCO₃ 溶液,用 ddH₂O 漂洗,再用 500mL 5mmol/L EDTA 煮沸 10min;弃掉煮沸液,彻底用 ddH₂O 清洗,加入大量的 ddH₂O 浸泡透析袋 4℃ 过夜;使用时,戴上手套,取出透析袋,用大量的 ddH₂O 彻底冲洗其内外表面。

[0171] 本实施例提供一种砷螯合型免疫复合物，该砷螯合型免疫复合物是由载体蛋白与螯合剂相桥联，再与砷离子结合形成抗体，与相应的抗原特异性结合而形成的复合物；所述载体蛋白为载体蛋白为牛血清白蛋白、卵清蛋白或血蓝蛋白；该砷螯合型免疫复合物的合成包括步骤 A) 合成砷螯合型免疫复合物以及步骤 B) 提纯砷螯合型免疫复合物；其中

[0172] A) 合成砷螯合型免疫复合物，具体操作步骤如下：

[0173] (I) 配制螯合剂溶液：将 2.0mg ITCBE 溶于 2mL DMSO 溶剂中，配制成螯合剂溶液；

[0174] (II) 配制人血清白蛋白溶液：将 4.0mg 的人血清白蛋白加入到 4mL 的 pH = 9.0 的 0.01M 硼酸盐缓冲溶液中，制得人血清白蛋白溶液；

[0175] (III) 搅拌过夜：将步骤 (I) 融合剂溶液缓慢加入到步骤 (II) 的人血清白蛋白溶液中，边滴加边搅拌，于 25℃, 100r/min 的摇床中作用 24h，然后用透析袋透析 24h，除去未与人血清白蛋白结合的 ITCBE，得到混合液；

[0176] (IV) 透析袋预处理：在透析袋中加入 EDTA-NaHCO₃ 溶液煮沸，弃废液后用 ddH₂O 冲洗；重复该步骤 2 次；

[0177] (V) 透析：将步骤 (III) 的混合液装入经步骤 (IV) 处理后的透析袋中，用 ddH₂O 透析，换 ddH₂O 3 次，4℃透析过夜之后，收集液体；

[0178] (VI) 砷离子螯合：在上述步骤 (V) 中的液体中加入 HCl 溶液调整 pH 至 7.0，缓慢加入 80 μL 的 1mmol/L 砷离子溶液，边滴加边震荡，之后于摇床作用 2–30h，然后重复步骤 (V) 1 次，收集液体，得到砷螯合型抗原；

[0179] (VII) 结合：将步骤 (VI) 制备的砷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砷螯合型免疫复合物；

[0180] B) 提纯砷螯合型免疫复合物，具体操作步骤如下：

[0181] (i) 将上述 A) 步骤合成的砷螯合型免疫复合物复溶于生理盐水中，得到砷螯合型免疫复合物溶液；

[0182] (ii) 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；

[0183] (iii) 上样：待柱子平衡后，用稀释缓冲液稀释步骤 (i) 所得溶液，然后上柱，砷螯合型免疫复合物吸附在填料上，未反应的载体蛋白、抗体、砷离子随稀释缓冲液流出；

[0184] (iv) 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 Na₂HPO₄ 溶液进行洗脱；

[0185] (v) 收集：收集步骤 (iv) 的洗脱液，收集完毕后立即使蛋白复性；

[0186] (vi) 收集到的洗脱液装入透析袋用 ddH₂O 透析除盐，换水 2–4 次后，4℃透析过夜，收集样本；

[0187] (vii) 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砷特异性结合的填料，装柱后再用稀释缓冲液平衡柱子；

[0188] (viii) 上样：待步骤 (vii) 的柱子平衡后，用稀释缓冲液稀释上述步骤 (vi) 的样本，然后将稀释后的样本上柱，砷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；

[0189] (ix) 洗脱：步骤 (viii) 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 Na₂HPO₄ 溶液进行洗脱；

[0190] (x) 收集 : 收集步骤 (ix) 的洗脱液, 收集完毕后立即使蛋白复性 ;

[0191] (xi) 对步骤 (x) 的洗脱液装入透析袋用 ddH₂O 透析除盐, 换水三次后, 4℃透析过夜, 收集样本, 即得到纯化的砷螯合型免疫复合物。

[0192] 实施例 1 所制备的砷螯合型免疫复合物, 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。

[0193] 1) 制备胶床 : 根据需要选择非变性聚丙烯酰胺凝胶作为介质, 制备好胶床 ;

[0194] 2) 加样 : 取 8 μL 提纯出来的砷螯合型免疫复合物溶液, 加入 2 μL 上样缓冲液, 并混匀, 然后加样于样品槽中 ;

[0195] 所述上样缓冲液 (Sample buffer) 可由如下比例的组分配制而成 : Tris-HCl : 1% 溴酚蓝 : ddH₂O : 甘氨酸 = 15.5 : 2.5 : 7 : 25, 其中 Tris-HCl 的 pH 为 6.8、摩尔浓度为 1M ;

[0196] 3) 电泳 : 连接电泳板, 加电泳缓冲液, 在 22mA 恒流、4℃环境中进行电泳, 非变性电泳条带图见图 1, 其中左侧的 M 泳带为变性 Marker, IC 泳带为免疫复合物 ;

[0197] 所述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 ;

[0198] 4) 检测 : 在胶床上找出含砷的蛋白条带, 将该条带取出, 将条带溶解, 然后再利用电感耦合等离子体质谱或原子吸收光谱检测是否含有砷以及砷含量。

[0199] 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 (1mm×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 AXIL 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。

[0200] 本实施例的方法制备的砷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电泳条带的同步辐射 X 线荧光分析图详见图 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砷能量。

[0201] 采用石墨炉原子吸收光谱法 (AAS) 初步测定本实施例制备的砷螯合型免疫复合物中的砷含量, 其含量为 31.002 μg/L, 空白对照硼酸盐缓冲液检测值为 0.025 μg/L。

[0202] 本发明提供砷螯合型免疫复合物, 可用于制备检测砷螯合型循环免疫复合物的试剂, 或可用于制备酶联免疫试剂盒中。

[0203] 检测条件的确定

[0204] 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

[0205] 采用本发明提供的砷螯合型免疫复合物作为标准品, 采用棋盘滴定法确定补体 C1q、抗 As 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 :

[0206] 1) 固载 : 将补体 C1q 包被于固相载体上, 用稀释缓冲液按 1:2500、1:5000、1:

- 10000、1:20000 的倍比稀释,加至 ELISA 板微孔中,4℃下存放 16 小时;
- [0207] 2) 封闭:移去稀释缓冲液,洗涤,加封闭液,37℃放置 1 小时,移去封闭液,洗涤;
- [0208] 3) 温育:分别加待测血浆样品和砷螯合型免疫复合物标准品,用稀释缓冲液按 1:10、1:20、1:40 的倍比稀释,加至 ELISA 板微孔中,37℃温育 1-2 小时;
- [0209] 4) 捕获:移去待测血浆,洗涤,加入用稀释缓冲液按 1:25000、1:50000、1:100000、1:200000 的倍比稀释的抗 As 抗体,37℃作用 1-2 小时,使其与循环免疫复合物上的砷反应;
- [0210] 5) 酶结合物温育:移去抗砷抗体,用洗涤缓冲液洗涤,加入抗体浓度为 2 μg/mL 的酶标抗体,37℃温育 2 小时,使其与抗 As 抗体反应;
- [0211] 6) 底物温育:移去酶标抗体,洗涤后,加入底物,37℃避光作用 30 分钟,向 ELISA 板微孔加入终止液;
- [0212] 7) 检测:于 405nm 波长下在酶标仪上分别读取待测样品组和上述砷螯合型免疫复合物标准品的 OD 值。
- [0213] 本实施例中,采用本发明提供的砷螯合复合物标准品作为阳性对照,分别以不加检测样本的对照试验组作为阴性对照 1,即依次加入了 C1q 蛋白、封闭液、抗砷抗体、酶标和底物;
- [0214] 以不加抗砷抗体的对照试验组作为阴性对照 2,即依次加入了 C1q 蛋白、封闭液、待测血浆、酶标和底物;
- [0215] 以不加酶标的对照试验组作为阴性对照 3,即依次加入了 C1q 蛋白、封闭液、待测血浆、抗砷抗体和底物;
- [0216] 以同时不加检测样本和抗砷抗体的对照试验组作为阴性对照 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 蛋白的对照试验组作为空白对照 1,即加入了封闭液、待测血浆、抗砷抗体、酶标和底物;
- [0218] 以及以只加底物的对照试验组作为空白对照 2,以只加 PBS 缓冲液作为空白对照 3。
- [0219] 在酶联免疫法中,先以与免疫复合物具有亲和性的补体 C1q 蛋白或 CIF 蛋白或 anti-C3 蛋白作为捕获剂吸附免疫复合物,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螯合有重砷,而这部分免疫复合物上的砷可以被与砷有亲和力的物质或能与砷反应形成抗原抗体复合物的抗砷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酶标抗体所捕获,并在显色剂及终止液的作用下,可以在仪器下读出 OD 值,即可证明检测出循环免疫复合物上螯合的砷。
- [0220] 在酶联免疫法试验中,不同的补体 C1q 蛋白的稀释浓度、抗砷抗体的稀释浓度以及待测血浆的稀释浓度的参数优化如表 1 所示,
- [0221] 表 1 不同补体 C1q、抗砷抗体以及血浆稀释倍数下的检测结果
- [0222]

		C1q (1:2500)	C1q (1:5000)	C1q (1:10000)	C1q (1:20000)
抗砷抗体 1:25000	血浆 1:10	0.706	0.74	0.51	0.465
	血浆 1:20	0.766	0.779	0.52	0.424
	血浆 1:40	0.578	0.603	0.501	0.375
抗砷抗体 1:50000	血浆 1:10	0.589	0.642	0.394	0.314
	血浆 1:20	0.655	0.683	0.469	0.314
	血浆 1:40	0.484	0.518	0.329	0.251
抗砷抗体 1:100000	血浆 1:10	0.441	0.517	0.299	0.235
	血浆 1:20	0.483	0.523	0.332	0.256
	血浆 1:40	0.351	0.414	0.246	0.193
抗砷抗体 1:200000	血浆 1:10	0.348	0.42	0.212	0.182
	血浆 1:20	0.409	0.456	0.258	0.195
	血浆 1:40	0.276	0.369	0.198	0.162

[0223] 从表 1 可知,当补体蛋白 C1q 的稀释倍比为 1:5000、血浆稀释度的稀释倍比为 1:20、抗砷抗体的稀释倍比为 1:25000 时,OD 值最大,为 0.779,在该最佳工作浓度条件下,ELISA 阳性对照及阴性对照 ELISA 检测结果如表 2 所示,

[0224] 表 2 阳性对照、阴性对照及空白对照的检测结果

[0225]

阳性对照		阴性对照				空白对照		
阴性	阴性	阴性	阴性	空白	空白	空白	空白	空白
对照 1	对照 2	对照 3	对照 4	对照 1	对照 2	对照 3		
0.943	0.082	0.070	0.042	0.055	0.033	0.031	0.013	

[0227] 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。

[0228] 2. ELISA 洗脱液最佳工作浓度及洗脱时间确定

[0229] 为寻求最适宜的洗脱条件,通过酶联免疫法在抗砷抗体与酶标抗体温育后,以不同浓度的洗脱液进行洗脱,再通过酶标仪检测 OD 值,具体步骤如下:

[0230] (1) 包被:将抗砷抗体用稀释缓冲液按 1:25000 的倍比稀释,加入 ELISA 板微孔中,4℃过夜 18h;

[0231] (2) 封闭:移去稀释缓冲液,洗涤后,加封闭液,37℃放置 1 小时,移去封闭液,并洗涤;

[0232] (3) 加酶标抗体:移去封闭液,洗涤后,加入用稀释缓冲液稀释至抗体浓度为 2 μg/mL 的 HRP 酶标抗体,37℃作用 2 小时,使其与抗 As 抗体反应;

[0233] (4) 洗脱 : 移去酶标抗体, 用稀释缓冲液对洗脱液进行稀释, 使洗脱液中木瓜蛋白酶的浓度 : 酶标抗体中抗体的浓度 = 1:80、1:40、1:20、1:10、1:5, 分别放置于 37℃ 温度下作用 1h、2h、3h ; 移去洗脱液, 洗涤, 待洗涤完成后, 加入底物, 37℃ 避光作用 30 分钟 ;

[0234] 所述洗脱液的配制方法示例 : 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 1-2mg/mL, 再加入二硫苏糖醇 (简称 DTT), 配制成二硫苏糖醇的浓度为 1mmol/L, 37℃ 孵育 30min ;

[0235] (5) 滴加终止液至每一微孔 ;

[0236] (6) 于 405nm 的检测波长下在酶标仪上分别读取每组 OD 值, 具体结果参见表 3,

[0237] 表 3 不同洗脱液稀释倍数下的检测结果

[0238]

	洗脱液 1:5	洗脱液 1:10	洗脱液 1:20	洗脱液 1:40	洗脱液 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

[0239] 通过比较 OD 值, 以判断 ELISA 孔壁上结合的砷抗 - 酶标复合物洗脱程度, 当 OD 值最低时, 砷抗 - 酶标复合物洗脱程度达到最大。

[0240] 从表 3 可知, 当洗脱液中木瓜蛋白酶的浓度 : 酶标抗体中抗体的浓度 = 1:20 时, 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 ; 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。

[0241] 应用实施例

[0242] 1. ELISA 法检测血浆中砷整合型免疫复合物

[0243] 采用方法一提供的 ELISA 法, 对 100 个血浆样品进行检测, 具体操作条件如下 :

[0244] 1) 固载 : 将补体 C1q 包被于聚丙烯固相载体上, 用稀释缓冲液按 1:5000 的倍比稀释, 加至 ELISA 板微孔中, 4℃ 下存放 16 小时 ;

[0245] 2) 封闭 : 移去稀释缓冲液, 洗涤, 加封闭液, 37℃ 放置 1 小时, 移去封闭液, 洗涤 ;

[0246] 3) 加样 : 分别加待测血浆样品和标准品, 用稀释缓冲液按 1:20 的倍比稀释, 加至 ELISA 板微孔中, 37℃ 温育 1.5 小时 ;

[0247] 4) 捕获 : 移去待测血浆, 洗涤, 加入用稀释缓冲液按 1:25000 的倍比稀释的抗砷抗体, 37℃ 温育 1.5 小时 ;

[0248] 5) 酶结合物温育 : 移去抗砷抗体, 洗涤, 加入抗体浓度为 2 μg/mL 的酶标抗体, 37℃ 温育 1.5 小时 ;

[0249] 6) 底物温育 : 移去酶标抗体, 洗涤, 待洗涤完成后, 加入底物, 37℃ 避光作用 30 分钟, 向 ELISA 板微孔加入终止液 ;

[0250] 7) 检测 : 取样, 分别于 405nm 波长下在酶标仪上分别读取待测血浆样品和上述砷整合型免疫复合物标准品的 OD 值, 结果如表 4 所示。

[0251] 表 4 采用方法一对 100 份血浆样品的实测结果

[0252]

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
OD ₄₀₅	0.533	0.279	0.222	0.632	0.355	0.335	0.386	0.451	0.403	0.414
编号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
OD ₄₀₅	0.535	0.227	0.311	0.209	0.408	0.674	0.599	0.15	0.63	0.235
编号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
OD ₄₀₅	0.222	0.348	0.104	0.272	0.265	0.502	0.4	0.462	0.564	0.235
编号	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
OD ₄₀₅	0.2	0.285	0.623	0.736	0.376	0.19	0.483	0.197	0.207	0.385
编号	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
OD ₄₀₅	0.423	0.776	0.672	0.765	0.526	0.326	0.548	0.548	0.103	0.369
编号	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
OD ₄₀₅	0.304	0.619	0.161	0.581	0.726	0.616	0.553	0.764	0.376	0.455
编号	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
OD ₄₀₅	0.113	0.378	0.369	0.314	0.599	0.473	0.191	0.751	0.1	0.705
编号	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
OD ₄₀₅	0.241	0.31	0.76	0.172	0.438	0.384	0.672	0.599	0.342	0.124
编号	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
OD ₄₀₅	0.357	0.329	0.488	0.749	0.109	0.413	0.647	0.192	0.373	0.286

[0253]

编号	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
OD ₄₀₅	0.186	0.229	0.408	0.776	0.785	0.15	0.163	0.272	0.107	0.606

[0254] 2、ELISA+AAS 法检测血浆中砷螯合型免疫复合物

[0255] 采用本发明方法二提供的 Elisa 方法与 AAS 方法结合的方法, 对 100 个血浆样品进行检测, 具体操作条件如下:

[0256] 1) 固载: 将补体 CIF 蛋白包被于聚苯乙烯固相载体上, 用稀释缓冲液按 1:5000 的倍比稀释, 加至 ELISA 板微孔中, 4℃下存放 16 小时;

[0257] 2) 封闭: 移去稀释缓冲液, 洗涤, 加封闭液, 37℃放置 1 小时, 移去封闭液, 洗涤;

[0258] 3) 温育: 分别加标准品和待测血浆样品, 将样品用稀释缓冲液按 1:20 的倍比稀释, 加至 ELISA 板微孔中, 37℃温育 2 小时;

[0259] 4) 洗脱: 移去待测样品, 洗涤, 加入木瓜蛋白酶浓度为 100ng/mL 的洗脱液, 37℃下作用 1 小时;

[0260] 5) 检测: 取样, 采用原子吸收光谱仪检测待测血浆样品中整合于循环免疫复合物上的砷, 检测结果如表 5 所示。

[0261] 表 5 采用方法二对 100 份血浆样品的实测结果

[0262]

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
μg/L	2.351	1.284	1.666	0.042	0.632	0.975	1.299	2.155	0.712	3.151
编号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
μg/L	2.844	2.697	2.75	2.258	1.082	2.942	2.267	2.788	3.256	2.962
编号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
μg/L	1.308	3.269	2.661	1.279	1.311	1.858	3.145	0.881	2.755	2.385
编号	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
μg/L	0.3	1.3	3.24	2.929	2.735	0.914	0.486	1.109	1.645	0.808
编号	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
μg/L	2.343	1.286	0.866	1.28	0.505	1.621	3.347	2.467	2.867	0.519
编号	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
μg/L	3.016	1.219	3.047	1.857	0.09	3.424	0.345	2.203	0.356	2.414
编号	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
μg/L	0.603	1.199	2.152	1.748	0.888	0.641	2.882	0.201	0.272	0.042
编号	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
μg/L	1.308	2.436	2.007	1.505	0.033	0.575	1.428	3.278	1.291	0.825
编号	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
μg/L	0.784	2.583	0.114	1.009	3.424	1.262	1.716	0.312	0.448	0.169
编号	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100

[0263]

μg/L	2.414	1.147	2.984	0.265	1.947	0.122	2.304	0.195	1.251	1.149
------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

[0264] 应用实施例 3：

[0265] 采用本发明方法三供的 Elisa 与 ICP-MS 结合的方法,以实施例 1 提供的砷整合型免疫复合物标准品,对 100 个血浆样品进行检测,具体操作条件如下:

[0266] 1) 固载:将抗 C3 抗体包被于聚苯乙烯固相载体上,用稀释缓冲液按 1:5000 的倍比稀释,加至 ELISA 板微孔中,37℃水浴 1 小时后贮存于冰箱;

[0267] 2) 封闭:移去稀释缓冲液,洗涤,加 3% 的封闭液,37℃放置 1 小时,移去封闭液,洗涤;

[0268] 3) 温育:分别加标准品和待测血浆样品,将样品用稀释缓冲液按 1:20 的倍比稀释,加至 ELISA 板微孔中,37℃温育 2 小时;

[0269] 4) 洗脱:移去待测样品,洗涤,加入木瓜蛋白酶浓度为 100ng/mL 的洗脱液,37℃下作用 1 小时;

[0270] 5) 酸化:加入硝酸对溶液进行酸化,封口过夜,彻底酸化;

[0271] 6) 检测:加入双氧水,并且加热赶酸,取样,于电感耦合等离子体质谱仪下检测整合于循环免疫复合物上的砷,读出相应数值并计算含量,结果如表 6 所示。

[0272] 表 6 采用方法三对 100 份标本的实测结果

[0273]

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
μg/L	1.685	3.412	0.273	0.855	2.617	3.174	1.589	1.835	1.023	1.876
编号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
μg/L	0.941	2.216	0.299	3.063	2.11	3.088	3.377	3.392	2.016	0.853
编号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
μg/L	0.229	2.505	0.833	1.58	3.178	2.37	1.997	2.228	2.645	0.164
编号	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
μg/L	0.422	3.297	3.073	3.273	0.133	2.201	3.067	3.415	2.13	0.9
编号	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
μg/L	2.727	0.167	1.602	0.31	1.657	2.518	0.427	1.136	1.321	0.388
编号	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
μg/L	1.406	3.328	3.343	3.266	1.375	0.617	2.471	2.023	0.818	2.942
编号	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
μg/L	2.276	2.879	0.472	2.105	0.088	0.27	0.446	0.219	1.431	2.888
编号	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
μg/L	1.712	0.428	1.27	2.53	0.929	2.386	2.78	2.557	3.101	3.088
编号	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
μg/L	2.603	0.955	2.714	0.787	1.972	2.472	2.822	3.331	3.229	0.213

[0274]

编号	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
μg/L	0.695	2.586	1.361	1.181	0.862	1.841	3.371	0.214	1.128	1.913

[0275] 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。

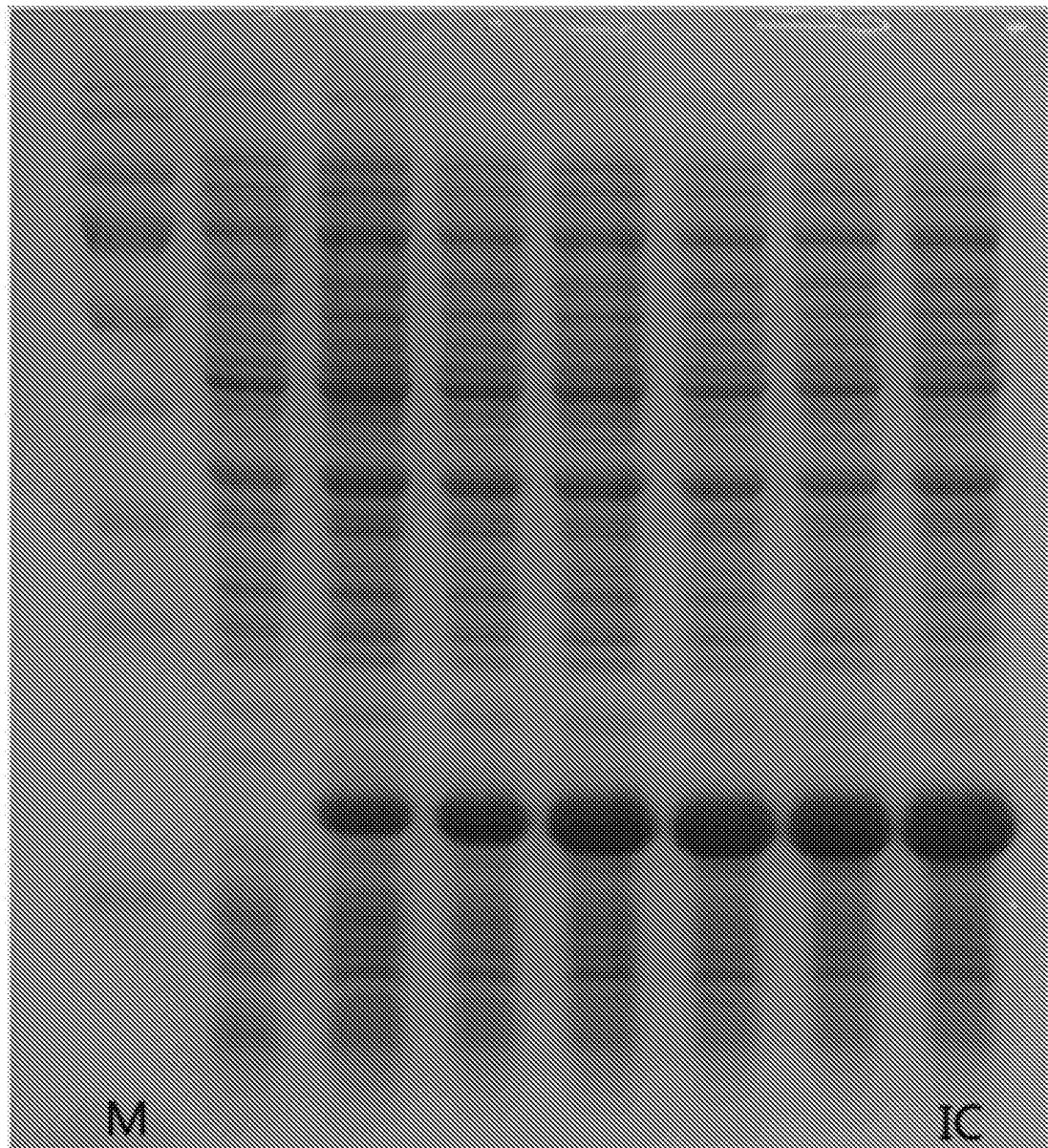


图 1

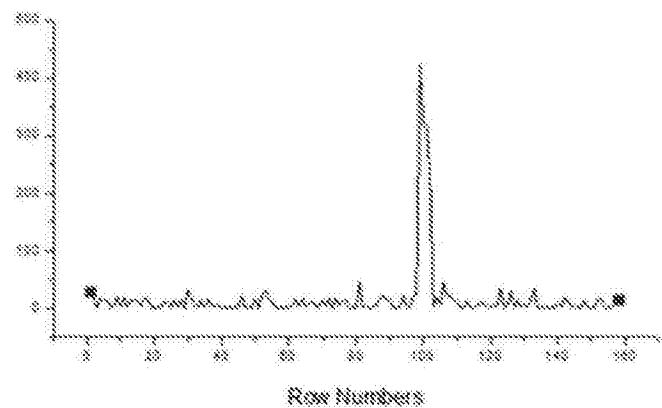


图 2

专利名称(译)	一种砷螯合型免疫复合物及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN105044324A	公开(公告)日	2015-11-11
申请号	CN201510413025.9	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	CN105044324B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种砷螯合型免疫复合物及其制备方法和应用；该砷螯合型免疫复合物为以下复合物中的一种：砷离子结合于免疫复合物形成的复合物，或砷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；或砷结合于免疫球蛋白后与载体蛋白结合形成的复合物。本发明所述砷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砷螯合型免疫复合物及含量，间接反映这个地区砷污染程度。

