



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102250237 A

(43) 申请公布日 2011. 11. 23

(21) 申请号 201110099400. 9

(22) 申请日 2011. 04. 20

(71) 申请人 上海交通大学

地址 200240 上海市闵行区东川路 800 号

(72) 发明人 周培 奚涛 邢海波 时唯伟

曹成喜

(74) 专利代理机构 上海交达专利事务所 31201

代理人 王锡麟 王桂忠

(51) Int. Cl.

C07K 14/765(2006. 01)

C07K 14/77(2006. 01)

C07K 16/44(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

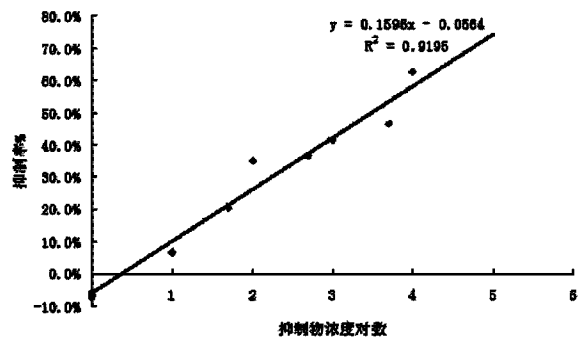
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 1 页

(54) 发明名称

重金属汞的酶联免疫吸附测定方法

(57) 摘要

一种水体中重金属检测技术领域的重金属汞的酶联免疫吸附测定方法, 通过将免疫原 Hg-GSH-BSA 通过多次反复免疫, 纯化后制备得到多克隆抗体并用于建立间接竞争酶联免疫吸附测定方法, 以检测水样中重金属汞。本发明针对水样中汞离子的检测限为 9. 54 μ g/L, 其他重金属对该检测方法的影响较小, 有一定的潜力可以应用于重金属汞离子的快速检测。



1. 一种重金属汞完全抗原的合成方法,其特征在于,通过将还原谷胱甘肽与载体蛋白分别溶于 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液后,谷胱甘肽的羧基端通过交联剂碳二亚胺盐酸盐溶液与大分子载体蛋白牛血清白蛋白或卵清白蛋白的氨基端偶联,用超滤离心管超滤离心去除未参与反应的小分子化合物,再添加汞离子溶液,汞离子与合成的 GSH-载体蛋白大分子中的谷胱甘肽的巯基结合,最终得到含有免疫原 Hg-GSH-BSA 或包被检测原 Hg-GSH-OVA 的重金属汞离子的完全抗原。

2. 根据权利要求 1 所述的重金属汞完全抗原的合成方法,其特征是,所述的碳二亚胺盐酸盐溶液的浓度为 2mg/mL。

3. 根据权利要求 1 所述的重金属汞完全抗原的合成方法,其特征是,所述的汞离子溶液中 Hg^{2+} 的浓度为 2mmol/L。

4. 一种重金属汞完全抗原的多克隆抗体的制备方法,其特征在于,通过将上述任一权利要求所述免疫原 Hg-GSH-BSA 通过多次反复免疫,纯化后制备得到多克隆抗体。

5. 根据权利要求 4 所述的重金属汞完全抗原的多克隆抗体的制备方法,其特征是,所述的多次反复免疫是指:运用常规多次免疫法免疫,其中第一次免疫使用弗氏完全佐剂与免疫原等体积乳化,从第二次免疫起用弗氏不完全佐剂乳化,最后一次免疫后十天即得多克隆抗体。

6. 一种重金属汞的酶联免疫吸附测定方法,其特征在于,利用上述任一权利要求所述的免疫原 Hg-GSH-BSA 制备的多克隆抗体建立间接竞争酶联免疫吸附测定方法,以检测水样中重金属汞。

7. 根据权利要求 6 所述的重金属汞的酶联免疫吸附测定方法,其特征是,所述的建立间接竞争酶联免疫吸附测定方法,包括以下步骤:

- 1) 前处理:0.5mM EDTA 与标准溶液,即待测样预混,37°C 温浴 1h;
- 2) 包被:包被原用 CB 缓冲液 100 μ L/孔包被 4°C 过夜,洗板 3 次;
- 3) 封闭:200 μ L/孔 5% 甘氨酸 37°C 封闭 1h,洗板 3 次;
- 4) 加样:将预混好的样品 50 μ L/孔加入,用 PBS 稀释抗体到两倍工作浓度,50 μ L/孔加入,振荡 10min,37°C 温浴 2h,洗板 3 次;
- 5) 加酶标二抗:1:6000 倍稀释的酶标二抗 100 μ L/孔,37°C 温浴 1h,洗板 3 次;
- 6) 显色:加 TMB 底物液显色 10min;
- 7) 终止反应:50 μ L/孔 2M 硫酸终止反应,450nm 下读取 OD 值。

重金属汞的酶联免疫吸附测定方法

技术领域

[0001] 本发明涉及的是一种重金属速测领域的方法,具体是一种重金属汞的酶联免疫吸附测定方法。

背景技术

[0002] 工农业及城市生活垃圾污染环境的现象日趋加剧,其中包括重要的污染物重金属污染,无疑对人类的健康安全产生了严重的威胁。污染环境的重金属种类很多,包括传统的五毒“汞、镉、铅、铬、砷”及其他的重金属铜、锌、钴、镍等,其中重金属汞污染造成的危害最大,臭名昭著的“水俣病”就是由于汞污染引起的。快速有效地监测和检测环境中的重金属含量,能从源头上监控重金属污染状况,防范重金属污染危害人类健康。

[0003] 目前主要应用的重金属检测方法包括原子吸收光谱分析(AAS)、电感耦合等离子发射光谱(ICP-AES)、电感耦合等离子质谱分析(ICP-MS)、原子荧光光谱分析(AFS)等,这些方法能定性定量检测样品中重金属的种类与含量,但普遍存在的不足是:需要配备昂贵的大型分析仪器及设备;需要专业的仪器操作人员;样品的前处理步骤复杂同时会产生二次污染等。而目前在国内外广泛开展研究的重金属免疫学检测方法,能很好地弥补上述不足,其原理是利用制备的重金属特异性抗体与重金属靶分子特异性结合,来精确定量检测目标重金属。重金属抗体的制备,确切地来说是,重金属与螯合剂复合物抗体的制备,因为重金属作为小分子物质不具有免疫原性,同时其本身还会对免疫动物产生毒害。目前重金属免疫学研究方面人们多热衷于重金属螯合剂复合物单克隆抗体的研究,虽然单抗在特异性等方面有多抗无可比拟的优势,但单抗的制备过程及条件要求高等问题,一定程度影响了重金属免疫检测技术的应用发展速度。

[0004] 重金属多克隆抗体制备方法相对单抗来说较单,如果根据其建立的检测方法能达到一定的检测要求,则也有一定的实际应用价值。Wylie等在“Monoclonal antibodies specific for mercuric ions(汞离子的特异性单抗)”(Proc. Natl. Acad. Sci., 89: 4104-4108, 1992)一文的报道中用谷胱甘肽作为双功能螯合剂,钥孔血蓝蛋白(KLH)作为载体蛋白,制备了重金属汞的单克隆抗体,但相关的针对检测重金属汞的应用研究并没有开展,也并没有检索发现利用类似抗原制备重金属汞的多抗应用于CI-ELISA的报道。

发明内容

[0005] 本发明针对现有技术存在的上述不足,提供一种重金属汞的酶联免疫吸附测定方法,针对水样中汞离子的检测限为 $9.54 \mu\text{g/L}$,其他重金属对该检测方法的影响较小,有一定的潜力可以应用于重金属汞离子的快速检测。

[0006] 本发明是通过以下技术方案实现的:

[0007] 本发明涉及一种重金属汞完全抗原的合成方法,通过将还原谷胱甘肽与载体蛋白分别溶于pH 7.4的磷酸盐缓冲液后,谷胱甘肽的羧基端通过交联剂碳二亚胺盐酸盐溶液(EDC.HCl)与大分子载体蛋白牛血清白蛋白(BSA)或卵清白蛋白(OVA)的氨基端偶联,用

超滤离心管超滤离心去除未参与反应的小分子化合物,再添加汞离子溶液,汞离子与合成的 GSH-载体蛋白大分子中的谷胱甘肽的巯基结合,最终得到含有免疫原 Hg-GSH-BSA 或包被检测原 Hg-GSH-OVA 的重金属汞离子的完全抗原。

[0008] 所述的碳二亚胺盐酸盐溶液的浓度为 2mg/mL;

[0009] 所述的汞离子溶液中 Hg^{2+} 的浓度为 2mmol/L。

[0010] 本发明涉及一种重金属汞完全抗原的多克隆抗体的制备方法,通过将免疫原 Hg-GSH-BSA 通过多次反复免疫,纯化后制备得到多克隆抗体。

[0011] 所述的多次反复免疫是指:运用常规多次免疫法免疫,其中第一次免疫使用弗氏完全佐剂与免疫原等体积乳化,从第二次免疫起用弗氏不完全佐剂乳化,最后一次免疫后十天即得多克隆抗体。

[0012] 本发明涉及一种重金属汞的酶联免疫吸附测定方法,利用以 Hg-GSH-BSA 为免疫原制备的多克隆抗体建立间接竞争酶联免疫吸附测定方法,以检测水样中重金属汞。

[0013] 所述的建立间接竞争酶联免疫吸附测定方法,包括以下步骤:

[0014] 1) 前处理:0.5mM EDTA 与标准溶液,即待测样预混,37°C 温浴 1h。

[0015] 2) 包被:包被原用 CB 缓冲液 100 μL /孔包被 4°C 过夜,洗板 3 次。

[0016] 3) 封闭:200 μL /孔 5%甘氨酸 37°C 封闭 1h,洗板 3 次。

[0017] 4) 加样:将预混好的样品 50 μL /孔加入,用 PBS 稀释抗体到两倍工作浓度,50 μL /孔加入,振荡 10min,37°C 温浴 2h,洗板 3 次。

[0018] 5) 加酶标二抗:1:6000 倍稀释的酶标二抗 100 μL /孔,37°C 温浴 1h,洗板 3 次。

[0019] 6) 显色:加 TMB 底物液显色 10min。

[0020] 7) 终止反应:50 μL /孔 2M 硫酸终止反应,450nm 下读取 OD 值。

[0021] 本发明在利用合成重金属汞抗原的基础上,制备了重金属汞完全抗原与多克隆抗体,并建立了测定水样中汞离子含量的间接竞争酶联免疫吸附测定方法。本发明的检测限为 9.54 $\mu\text{g/L}$,对汞离子具有很高的特异性,添加回收率在 90% -102% 之间。本方法具有一定的潜力可用于环境中重金属汞样品的快速检测。

附图说明

[0022] 图 1 为实施例重金属抑制率示意图。

具体实施方式

[0023] 下面对本发明的实施例作详细说明,本实施例在以本发明技术方案为前提下进行实施,给出了详细的实施方式和具体的操作过程,但本发明的保护范围不限于下述的实施例。

[0024] 实施例 1

[0025] 重金属汞完全抗原的合成及多克隆抗体的制备

[0026] 步骤 1:完全抗原的合成

[0027] 称取 GSH 和 BSA 各 10mg,分别溶于 5mL 的磷酸盐缓冲液 (PBS, pH7.4) 中,将 GSH 溶液逐滴滴加到 BSA 溶液中,然后加入 10mL 的 EDC·HCl (2mg/mL) 溶液,置于摇床上,室温反应 3h 后取出反应液,用超滤离心管 (截留分子量为 30000) 5000r/m 离心分离、洗涤纯化,

去除未反应的小分子物质（超滤离心管在使用前，用 100mmol/L EDTA 进行预处理）。将 10mL 2mmol/L 的 Hg^{2+} 溶液逐滴加入纯化产物中，摇床上室温反应过夜，次日取出反应物，同前法超滤，以达到分离纯化的目的，分装后 -20°C 保存备用。合成的抗原用作免疫原，记作 Hg-GSH-BSA。

[0028] 采用相同方法合成得到包被检测抗原 Hg-GSH-OVA。

[0029] 合成的抗原用考马斯亮蓝染色法测定其中的蛋白含量，用电感耦合等离子发射光谱测定其中汞的含量，根据重金属汞与蛋白的摩尔比得出偶联比，Hg-GSH-BSA 与 Hg-GSH-OVA 的偶联比分别为 8/1 与 4/1。

[0030] 步骤 2：抗体的制备

[0031] 免疫原 Hg-GSH-BSA 乳化后，运用常规多次免疫法免疫，其中第一次使用弗氏完全佐剂与免疫原等体积乳化，其余的用弗氏不完全佐剂乳化，最后一次免疫后十天左右获得多克隆抗体，分装冻存。

[0032] 实施例 2

[0033] 酶联免疫吸附测定方法

[0034] 步骤一：效价测定

[0035] 用间接非竞争 ELISA 法测定重金属汞抗体效价，步骤如下：

[0036] (1) 包被：包被原用 CB 缓冲液 100 μL /孔包被 4°C 过夜，洗板 3 次。

[0037] (2) 封闭：200 μL /孔 5% 甘氨酸 37°C 封闭 1h，洗板 3 次。

[0038] (3) 加样：将抗体按一定的梯度稀释，100 μL /孔加入，振荡 10min， 37°C 温浴 1h，洗板 3 次。

[0039] (4) 加酶标二抗：1：6000 倍稀释的酶标二抗 100 μL /孔， 37°C 温浴 1h，洗板 3 次。

[0040] (5) 显色：加 TMB 底物液显色 10min。

[0041] (6) 终止反应：50 μL /孔 2M 硫酸终止反应，450nm 下读取 OD 值。

[0042] 当抗体的 OD_{450} 值大于阴性对照的 2.1 倍时，该稀释度判定为抗体的效价，选定效价最高的抗体用作 ELISA 检测方法的建立，抗体的效价为 1/50000。

[0043] 步骤二：ELISA 检测方法优化

[0044] 根据步骤一中所描述的间接非竞争 ELISA 法优化其中的各项反应条件，包括抗体、包被检测原和二抗的工作浓度，判定条件为 OD_{450} 值接近 1.0 的值可以被选为最佳反应条件，最终确定抗体的稀释度为 1/10000，检测原浓度为 0.0013mg/mL，二抗稀释度为 1/6000。

[0045] 步骤三：间接竞争法测定重金属汞方法建立

[0046] 汞标准溶液与 EDTA 预混后形成一定浓度梯度的 Hg-EDTA 反应液，在与抗体预混，作用是竞争抗原中汞的结合位点。

[0047] 间接竞争 ELISA 法的步骤如下：

[0048] (1) 前处理：0.5mM EDTA 与标准溶液（待测样）预混， 37°C 温浴 1h。

[0049] (2) 包被：包被原用 CB 缓冲液 100 μL /孔包被 4°C 过夜，洗板 3 次。

[0050] (3) 封闭：200 μL /孔 5% 甘氨酸 37°C 封闭 1h，洗板 3 次。

[0051] (4) 加样：将预混好的样品 50 μL /孔加入，用 PBS 稀释抗体到两倍工作浓度，50 μL /孔加入，振荡 10min， 37°C 温浴 2h，洗板 3 次。

[0052] (5) 加酶标二抗 ;1 : 6000 倍稀释的酶标二抗 100 μ L/ 孔, 37 $^{\circ}$ C 温浴 1h, 洗板 3 次。

[0053] (6) 显色 : 加 TMB 底物液显色 10min。

[0054] (7) 终止反应 : 50 μ L/ 孔 2M 硫酸终止反应, 450nm 下读取 OD 值。

[0055] 步骤四 : 方法评价与应用

[0056] 按公式 $(B_0 - B_1) / B_0 \times 100\%$ 计算抑制率, 以抑制物 (汞标准溶液) 对数值为横坐标, 抑制率为纵坐标绘制得标准曲线, 见图 1, 用直线拟合后得回归方程 $Y = 0.1596X - 0.0564$, 相关系数为 0.9195, 以抑制率为 10% 的待测样品汞含量 (IC_{10}) 作为检测限, 为 0.00954 μ g/mL。

[0057] 用其他金属 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Ni^{2+} 的标准溶液代替汞的标准溶液检验交叉反应率, 交叉反应率公式如下 $CR = IC_{50}(\text{汞}) / IC_{50}(\text{其他金属}) \times 100\%$ 。结果验证抗体对于汞具有很高的特异性, 供试金属交叉反应率都小于 0.001%。

[0058] 通过对纯水中按 5, 0.5, 0.05 μ g/mL 三种不同浓度添加汞离子, 按步骤二进行试验, 检验添加回收率, 得添加回收率在 90% ~ 102% 之间。

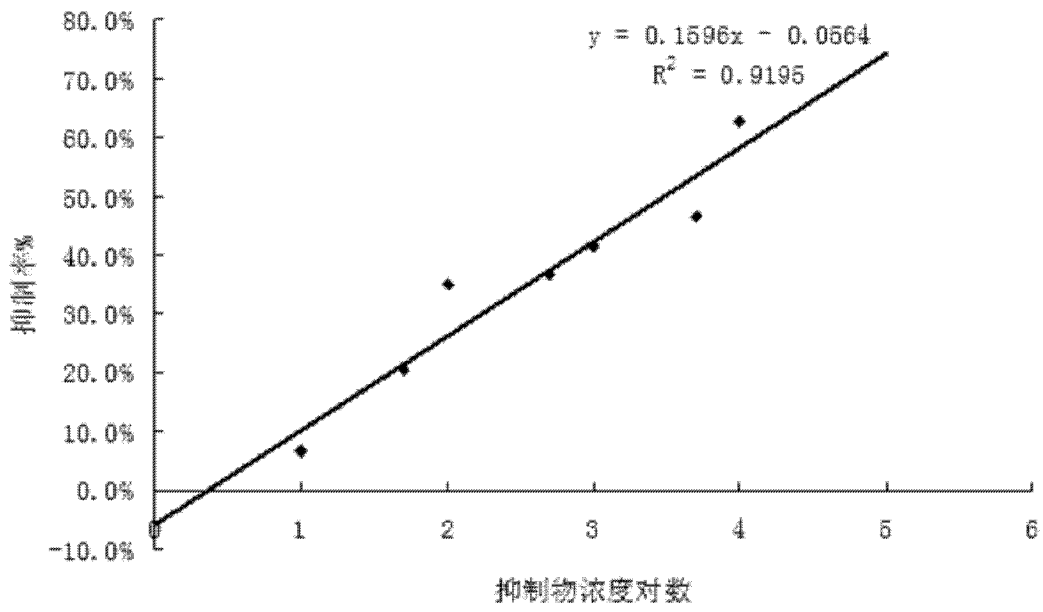


图 1

专利名称(译)	重金属汞的酶联免疫吸附测定方法		
公开(公告)号	CN102250237A	公开(公告)日	2011-11-23
申请号	CN201110099400.9	申请日	2011-04-20
[标]申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
当前申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
[标]发明人	周培 奚涛 邢海波 时唯伟 曹成喜		
发明人	周培 奚涛 邢海波 时唯伟 曹成喜		
IPC分类号	C07K14/765 C07K14/77 C07K16/44 G01N33/53		
代理人(译)	王锡麟 王桂忠		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种水体中重金属检测技术领域的重金属汞的酶联免疫吸附测定方法，通过将免疫原Hg-GSH-BSA通过多次反复免疫，纯化后制备得到多克隆抗体并用于建立间接竞争酶联免疫吸附测定方法，以检测水样中重金属汞。本发明针对水样中汞离子的检测限为9.54μg/L，其他重金属对该检测方法的影响较小，有一定的潜力可以应用于重金属汞离子的快速检测。

