



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108535467 A

(43)申请公布日 2018.09.14

(21)申请号 201810252420.7

(22)申请日 2018.03.26

(83)生物保藏信息

CCTCC NO:C201670 2016.06.08

(71)申请人 暨南大学

地址 510000 广东省广州市黄埔大道西601号

(72)发明人 向军俭 黄建芳 杨浩 郝代玲

(74)专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569

代理人 刘奇

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

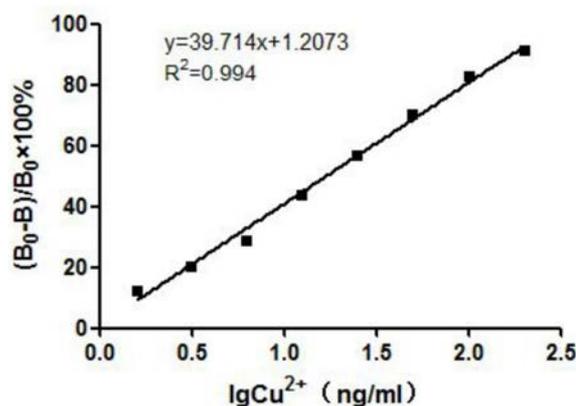
权利要求书1页 说明书14页 附图2页

(54)发明名称

一种化学发光间接竞争免疫检测铜离子的试剂盒及其应用

(57)摘要

本发明提供了一种化学发光间接竞争免疫检测铜离子的试剂盒及其应用,属于重金属免疫检测技术领域。所述试剂盒包括以下组分:酶标板、铜离子检测完全抗原、铜离子单克隆抗体、酶标二抗、发光底物、封闭液和洗涤液;所述试剂盒的使用方法:1)将铜离子检测完全抗原包被于酶标板上,封闭、洗涤;2)加入待检样品和铜离子单克隆抗体进行一抗孵育、第一洗涤后,加入酶标二抗,进行酶标二抗孵育、第二洗涤;3)加入发光底物反应、静置后,读取发光信号值B;4)将所述发光信号值B带入标准曲线线性回归方程计算获得待检样品中铜离子浓度。所述试剂盒能够用于不同样品中铜离子浓度的测定,准确度和精密度高、特异性好,测定结果稳定。



1. 一种化学发光间接竞争免疫检测铜离子的试剂盒,其特征在于,包括以下组分:酶标板、铜离子检测完全抗原、铜离子单克隆抗体、酶标二抗、发光底物、封闭液和洗涤液;所述铜离子检测完全抗原包括铜离子、载体蛋白以及将所述铜离子与载体蛋白偶联的螯合剂。

2. 根据权利要求1所述试剂盒,其特征在于,所述螯合剂为双功能螯合剂p-SCN-Bn-NOTA;所述载体蛋白为鸡卵白蛋白OVA。

3. 根据权利要求1所述试剂盒,其特征在于,步骤2)所述铜离子单克隆抗体由细胞株4F12分泌产生,所述细胞株4F12的保藏编号为CCTCC C201670。

4. 根据权利要求3所述试剂盒,其特征在于,所述铜离子单克隆抗体的浓度为20~30ng/ml。

5. 根据权利要求1所述试剂盒,其特征在于,所述铜离子检测完全抗原的浓度为100~200ng/ml。

6. 权利要求1~5任意一项所述试剂盒在检测样品铜离子浓度中的应用。

7. 权利要求6所述的应用,其特征在于,包括以下步骤:

1) 将铜离子检测完全抗原包被于酶标板上,封闭液封闭、洗涤液洗涤后获得包被有铜离子检测完全抗原的酶标板,所述铜离子检测完全抗原由螯合剂将铜离子与载体蛋白偶联获得;

2) 向所述包被铜离子检测完全抗原的酶标板中加入待检样品和铜离子单克隆抗体进行一抗孵育、第一洗涤后,加入酶标二抗,进行酶标二抗孵育、第二洗涤后获得待发光酶标板,所述待检样品是由样品与螯合剂偶联获得;

3) 向所述待发光酶标板中加入发光底物反应、静置后,读取发光信号值B;

4) 将所述发光信号值B带入预定的标准曲线线性回归方程计算获得待检样品中铜离子浓度;

所述预定的标准曲线线性回归方程的自变量为铜离子浓度的 \log_{10} 对数,因变量为发光抑制率,所述因变量由式I计算得到, $(B_0-B)/B_0 \times 100\%$ 式I, B_0 为未添加待检样品或未添加标准样品时的发光信号值,B为添加待检样品时的发光信号值。

8. 根据权利要求7所述的应用,其特征在于,所述标准曲线线性回归方程通过以下方法获得:

用不同梯度浓度的竞争物标准品Cu-NOTA替换步骤2)中的待检样品,按照步骤1)~3)的方法获得发光信号值B,以0ng/ml竞争物标准品的发光信号值为 B_0 ,计算不同梯度浓度竞争物标准品的发光抑制率,以发光抑制率为纵坐标,以 Cu^{2+} 浓度 \log_{10} 对数为横坐标,绘制标准曲线,获得标准曲线线性回归方程。

9. 根据权利要求7所述的应用,其特征在于,所述铜离子检测完全抗原制备过程中铜离子、螯合剂和载体蛋白摩尔比为(75~80):(68~72):1。

10. 根据权利要求7所述的应用,其特征在于,所述样品包括中草药样品、土壤样品和水样。

一种化学发光间接竞争免疫检测铜离子的试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于重金属免疫检测技术领域,尤其涉及一种化学发光间接竞争免疫检测铜离子的试剂盒及其应用。

背景技术

[0002] 重金属在地球上广泛分布,正常情况下不会对人类的生活环境造成危害。但随着城市的急速扩张和工业的快速发展,大量重金属因人为活动以非常态速度进入我们的生活环境,这些重金属及其化合物多有致畸、致癌作用,并且都是蓄积性毒物,通过饮用水或食物链富集等方式严重危害人类及动物的健康。

[0003] 目前对于环境污染最严重的重金属包括:铅、镉、汞、铬、砷(号称“五毒”),除此之外,还包括毒性相对较弱的镍、锌、铜、钴、锡、钒等。虽然重金属铜的毒性相对较弱,但是因其在工业、农业及畜牧业的广泛应用,铜污染的危害也越来越多的引起人们的关注。人体摄入过量的铜会引发一系列病变,急性铜中毒可引起胃肠道黏膜刺激症状,如恶心、干呕、腹泻,甚至溶血性贫血,肾功能衰竭、休克、昏迷或死亡。慢性摄入铜过高,可引起呼吸系统疾病,铜粉尘可引起咽痛、咳嗽、咯痰和胸闷气憋,甚至出现尘肺等。另外,铜盐具有一定杀菌效果,所以在饲料中也被广泛使用,但高剂量的铜进入家畜的体内很难被代谢,随着生物累积效应造成家畜中毒死亡,还会通过食用家畜肉制品而直接威胁人类健康。因此,加强食品和环境卫生的重金属铜的监查检测迫在眉睫,意义重大。

[0004] 传统重金属检测方法多采用物理/化学方法,如原子吸收光谱法(AAS)、原子荧光光谱法(AFS)、电感耦合等离子体光谱分析法(ICP)等,虽然其检测结果准确,可信度高,但需要大型仪器设备和专业人员操作,分析时间长,成本昂贵,有一定时间地点局限性,难以适应突发性的环境污染事件或大规模环境质量筛查检测。现有的重金属铜的检测方法成本高、效率低、准确性欠佳。

发明内容

[0005] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种成本低、效率高、准确率高的化学发光间接竞争免疫检测铜离子试剂盒及其应用。

[0006] 为了实现上述发明目的,本发明提供以下技术方案:一种化学发光间接竞争免疫检测铜离子的试剂盒,包括以下组分:酶标板、铜离子检测完全抗原、铜离子单克隆抗体、酶标二抗、发光底物、封闭液和洗涤液;所述铜离子检测完全抗原包括铜离子、载体蛋白以及将所述铜离子与载体蛋白偶联的螯合剂。

[0007] 优选的,所述螯合剂为双功能螯合剂p-SCN-Bn-NOTA;所述载体蛋白为鸡卵白蛋白OVA。

[0008] 优选的,所述铜离子单克隆抗体由细胞株4F12分泌产生,所述细胞株4F12的保藏编号为CCTCC C201670。

[0009] 优选的,所述铜离子单克隆抗体的浓度为20~30ng/ml。

[0010] 优选的,所述铜离子检测完全抗原的浓度为100~200ng/ml。

[0011] 本发明还提供了所述试剂盒在检测样品铜离子浓度中的应用。

[0012] 优选的所述应用方法,包括以下步骤:1)将铜离子检测完全抗原包被于酶标板上,封闭液封闭、洗涤液洗涤后获得包被有铜离子检测完全抗原的酶标板;2)向所述包被铜离子检测完全抗原的酶标板中加入待检样品和铜离子单克隆抗体进行一抗孵育、第一洗涤后,加入酶标二抗,进行酶标二抗孵育、第二洗涤后获得待发光酶标板;3)向所述待发光酶标板中加入发光底物反应、静置后,读取发光信号值B;4)将所述发光信号值B带入预定的标准曲线线性回归方程计算获得待检样品中铜离子浓度;所述预定的标准曲线线性回归方程为 $y=39.714x+1.2073$,其中x为发光抑制率,y为待检样品中的铜离子浓度, $x=(B_0-B)/B_0 \times 100\%$, B_0 为未添加待检样品是的发光信号值;所述铜离子检测完全抗原由螯合剂将铜离子与载体蛋白偶联获得;所述待检样品是由样品与螯合剂偶联获得。

[0013] 优选的,所述标准曲线线性回归方程通过以下方法获得:

[0014] 用不同梯度浓度的竞争物标准品Cu-NOTA替换步骤2)中的待检样品,按照步骤1)~3)的方法获得发光信号值B,以0ng/ml竞争物标准品的发光信号值为 B_0 ,计算不同梯度浓度竞争物标准品的发光抑制率x, $x=(B_0-B)/B_0 \times 100\%$,以发光抑制率为纵坐标,以 Cu^{2+} 浓度log10对数为横坐标,绘制标准曲线,获得标准曲线线性回归方程。

[0015] 优选的,所述铜离子检测完全抗原制备过程中铜离子、螯合剂和载体蛋白摩尔比为(75~80):(68~72):1。

[0016] 优选的,所述样品包括中草药样品、土壤样品和水样。

[0017] 本发明的有益效果:本发明提供的试剂盒可通过化学发光间接竞争免疫检测铜离子的浓度,该试剂盒包括铜离子检测完全抗原,所述铜离子检测完全抗原将小分子的铜离子与载体蛋白偶联,使铜离子能够通过免疫的方法检测,利用发光抑制率与铜离子浓度log10对数的线性关系定量测定铜离子浓度,所述试剂盒通过化学发光间接竞争免疫检测法检测铜离子的浓度,以发光抑制率为纵坐标,以 Cu^{2+} 浓度log10对数为横坐标,绘制标准曲线,检测待检样品中铜离子的浓度,能够实现铜离子浓度的快速高效检测;检测灵敏度(IC50)为16.9ng/ml,检测范围(IC20-IC80)为2.9-96.4ng/ml,检测限(IC10)为1.6ng/ml。

附图说明

[0018] 图1为铜离子检测完全抗原的SDS-PAGE鉴定图;

[0019] 图2为BCA法测定铜离子检测完全抗原蛋白浓度的标准曲线;

[0020] 图3为实施例2中化学发光间接竞争免疫法测定铜离子浓度标准曲线。

[0021] 生物保藏说明

[0022] 铜离子单克隆抗体的细胞株4F12,保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏地址为湖北省武汉市武昌区八一路299号武汉大学校内,武汉大学保藏中心;保藏时间:2016年6月8日,保藏编号为CCTCC C201670。

具体实施方式

[0023] 本发明提供了一种化学发光间接竞争免疫检测铜离子的试剂盒,包括以下组分:酶标板、铜离子检测完全抗原、铜离子单克隆抗体、酶标二抗、发光底物、封闭液和洗涤液;

所述铜离子检测完全抗原包括铜离子、载体蛋白以及将所述铜离子与载体蛋白偶联的螯合剂。

[0024] 本发明所述的试剂盒包括酶标板,本发明对所述酶标板没有特殊限定,采用本领域常规的酶标板即可,例如常规的96孔板。所述酶标板优选的为黑色酶标板,黑色有利用发光信号的检测。

[0025] 本发明所述的试剂盒包括铜离子检测完全抗原,所述铜离子检测完全抗原包括铜离子、载体蛋白以及将所述铜离子与载体蛋白偶联的螯合剂。在本发明中所述螯合剂优选的为双功能螯合剂p-SCN-Bn-NOTA(以下简称NOTA);所述载体蛋白优选的为鸡卵白蛋白OVA。在本发明中,所述铜离子、螯合剂和载体蛋白摩尔比优选为(75~80):(68~72):1,更优选的为77:70:1。

[0026] 在本发明中,所述铜离子检测完全抗原的制备方法包括以下步骤:S1)将螯合剂溶液逐滴滴加至载体蛋白溶液中螯合获得螯合蛋白溶液;S2)将铜离子溶液逐滴滴加至所述螯合蛋白溶液中螯合至反应液呈淡蓝色,并伴有浑浊获得铜离子检测完全抗原。

[0027] 在本发明中,所述螯合剂溶液优选的为将所述NOTA粉末溶解于DMSO中获得,所述NOTA溶液的浓度优选的为25mg/ml;所述OVA蛋白溶液优选的为将OVA蛋白粉末溶解于HEPES缓冲液中获得,所述HEPES缓冲液的浓度优选的为0.1M,pH值优选的为8.9;所述OVA蛋白溶液的浓度优选的为10mg/ml;在本发明中,所述NOTA与OVA的摩尔比优选的为(68~72):1,更优选的为70:1;本发明将所述螯合剂溶液逐滴加入OVA液中,0~4℃搅拌螯合2~4h,4℃过夜获得螯合蛋白溶液。本发明所述的双功能螯合剂包含两个不同的结构单元,一是功能基团,可与生物大分子(如蛋白)以共价键形式连接;二是金属螯合基团,在三氮环配体空穴内使金属离子与其牢固结合,且引入的金属离子远离生物大分子,从而保证其生物活性不受影响。NOTA是多氨基多羧基类环形螯合剂中最小的一类,是在1,4,7-三氮杂环壬烷的基础上,在三个氮原子上连接三个羧基,此外NOTA杂环上还连接特征性功能基团——末端携带SCN(硫氰根)离子的苄基,通过共价键连接即可实现与OVA蛋白分子的偶联。

[0028] 在本发明中,所述铜离子溶液优选的为将CuSO₄·5H₂O粉末溶于超纯水制备获得,所述铜离子溶液的浓度优选的为0.8~1.2mg/ml,更优选的为1.0mg/ml。在本发明中,所述铜离子与NOTA摩尔比优选的为(75~80):(68~72),更优选的为1.1:1。在本发明中将所述铜离子溶液逐滴加入螯合蛋白溶液中,0~4℃搅拌螯合25~35min,反应液呈淡蓝色,并伴有浑浊,螯合结束。本发明在铜离子与螯合蛋白螯合反应后,优选将得到的螯合反应产物采用30kD超滤管超滤去除未偶联上的NOTA与铜离子,获得铜离子检测完全抗原。本发明中,所述超滤的转速优选的为4000~6000g,更优选的为5000g;所述超滤的时间优选的为8~12min,更优选的为10min;所述超滤的次数优选的为3~8次,更优选的为5次。

[0029] 本发明在获得铜离子检测完全抗原后,优选的通过SDS-PAGE、ICP-AES、BCA法联合鉴定所述铜离子检测完全抗原是否偶联成功以及计算其偶联比率。在本发明中所述铜离子检测完全抗原与待检样品中的铜离子共同竞争铜离子单克隆抗体,抑制待检样品中的铜离子与铜离子单克隆抗体结合,根据发光信号值的大小计算抑制率。

[0030] 本发明所述的试剂盒包括铜离子单克隆抗体,在本发明中所述铜离子单克隆抗体由细胞株4F12分泌产生,所述细胞株4F12的保藏编号为CCTCC C201670。在本发明中所述细胞株4F12分泌生产铜离子单克隆抗体的方法采用本领域常规的杂交瘤细胞株分泌生产单

克隆抗体的方法即可,无其他特殊要求。在本发明具体实施过程中,将所述细胞株4F12腹腔注射小鼠,6~8天后抽取腹水,分离纯化腹水获得铜离子单克隆抗体。

[0031] 本发明所述的试剂盒还包括酶标二抗、发光底物、封闭液和洗涤液。在本发明中所述酶标二抗优选的为市售的HRP-GoatAnti-mouse IgG (H+L)。在本发明中所述发光底物优选的为[HRP]鲁米诺化学发光底物;所述[HRP]鲁米诺化学发光底物包括A液和B液,A液主要成分为鲁米诺(Luminol)及发光增强剂,B液主要成分为过氧化物及增强剂。本发明所述的[HRP]鲁米诺化学发光底物在使用时,可以将A液与B液混合后添加,也可以分别添加,所述A液与B液的体积比优选的为1:1。本发明中所述发光底物作用于携带HRP的抗原-单克隆抗体-酶标二抗复合物,并通过增强剂放大作用,从而产生发光信号,由酶标仪捕获并转换为数字信号。在本发明中,所述酶标二抗的作用为与铜离子单克隆抗体结合后,与发光底物反应,改变发光信号值。

[0032] 在本发明中,所述封闭液优选的为质量分数为5%脱脂奶粉;本发明中所述5%脱脂奶粉的溶剂优选的为PBST缓冲液;本发明中所述脱脂奶粉为市售脱脂奶粉,在本发明具体实施过程中,采用BD Difco™ Skim Milk,本发明中所述封闭液的作用为封闭酶标板上铜离子检测完全抗原未结合的部分。

[0033] 在本发明中所述洗涤液优选的为PBST缓冲液,本发明中,所述洗涤液的作用为洗涤去除未结合的物质,所述未结合的物质包括多余的铜离子检测完全抗原、封闭液、待检样品、铜离子单克隆抗体和酶标二抗。在本发明中所述洗涤液PBST缓冲液的pH为7.2~7.6。

[0034] 本发明还提供了所述试剂盒的使用方法,包括以下步骤:1)将铜离子检测完全抗原包被于酶标板上,封闭、洗涤后获得包被铜离子检测完全抗原的酶标板;2)向所述包被铜离子检测完全抗原的酶标板中加入待检样品和铜离子单克隆抗体进行一抗孵育、第一洗涤后,加入酶标二抗,进行酶标二抗孵育、第二洗涤后获得待发光酶标板;3)向所述待发光酶标板中加入发光底物反应、静置后,读取发光信号值B;4)将所述发光信号值B带入标准曲线线性回归方程计算获得待检样品中铜离子浓度;所述铜离子检测完全抗原由螯合剂将铜离子与载体蛋白偶联获得。

[0035] 在本发明中,将铜离子检测完全抗原包被于酶标板上,封闭、洗涤后获得包被铜离子检测完全抗原的酶标板。本发明中所述铜离子检测完全抗原包被的温度优选为4℃;所述包被的时间优选为10~14h;所述铜离子检测完全抗原的包被体积优选的为80~120μl/孔,更优选的为100μl/孔。

[0036] 本发明优选的在所述包被后,用洗涤液进行清洗,所述清洗的时间优选的为2~5min/次;所述清洗的次数优选的为2~4次。本发明在所述清洗结束后,向酶标板中加入封闭液进行封闭;所述封闭液的体积优选的为180~220μl/孔,更优选的为200μl/孔;所述封闭的温度优选的为35~40℃,更优选的为37℃;所述封闭的时间优选的为30~50min,更优选的为40min。

[0037] 本发明在所述封闭结束后,用洗涤液进行洗涤;所述清洗的时间优选的为2~5min/次;所述清洗的次数优选的为2~4次。

[0038] 本发明在得到包被铜离子检测完全抗原的酶标板后,向所述包被铜离子检测完全抗原的酶标板中加入待检样品和铜离子单克隆抗体进行一抗孵育、第一洗涤后,加入酶标二抗,进行酶标二抗孵育、第二洗涤后获得待发光酶标板。在本发明中,所述所述待检样品

是由样品与螯合剂偶联获得,所述样品优选的包括中草药样品、预混料样品、土壤样品和水样。在本发明中,所述待检样品的加入量优选的为50 μ l。

[0039] 在本发明中所述铜离子单克隆抗体的浓度优选的为20~30ng/ml,更优选的为22~26ng/ml最优选的为24ng/ml。所述铜离子单克隆抗体的用量优选为40~60 μ l/孔,更优选的为50 μ l/孔。本发明中所述一抗孵育的温度优选为35~40 $^{\circ}$ C,更优选的为37 $^{\circ}$ C;所述一抗孵育时间优选的为40~80min,更优选的为60min。本发明在所述一抗孵育后,进行第一洗涤;本发明中所述第一洗涤的时间优选的为2~5min/次;所述第一洗涤的次数优选的为2~4次。

[0040] 本发明在第一洗涤后,加入酶标二抗,进行酶标二抗孵育;在本发明中所述酶标二抗的浓度优选的为0.1 μ g/ml;添加量优选的为100 μ l。所述酶标二抗孵育温度优选的为35~40 $^{\circ}$ C,更优选的为37 $^{\circ}$ C;所述酶标二抗孵育的时间优选的为30~50min,更优选的为40min;本发明在所述酶标二抗孵育后,进行第二洗涤,本发明中,所述第二洗涤的时间优选的为2~5min/次;所述第二洗涤的次数优选的为2~4次。

[0041] 本发明在获得待发光酶标板后,向所述待发光酶标板中加入发光底物反应、静置后读取发光信号值B。

[0042] 在本发明中,所述静置的温度优选的为室温,具体为20~30 $^{\circ}$ C;所述静置的时间优选为8~12min,更优选为10min;本发明所述静置过程中需要避光。

[0043] 本发明在所述静置后,读取发光信号值B。在本发明中所述读取发光信号值B优选的采用多功能微孔板检测酶标仪进行,具体过程包括:连接电脑与多功能微孔板检测酶标仪,打开读取Gen5软件,选择发光-发光光纤检测程序,其余参数默认。

[0044] 本发明在获得发光信号值B后,将所述发光信号值B带入预定的标准曲线线性回归方程计算,获得待检样品中铜离子浓度。本发明中所述预定的标准曲线线性回归方程为 $y = 39.714x + 1.2073$,其中x为发光抑制率,y为待检样品中的铜离子浓度, $x = (B_0 - B) / B_0 \times 100\%$, B_0 为未添加待检样品是的发光信号值。

[0045] 在本发明中,所述标准曲线线性回归方程优选通过以下方法获得:用不同梯度浓度的竞争物标准品Cu-NOTA替换上述技术方案所述步骤2)中的待检样品,按照上述技术方案所述试剂盒的使用方法检测获得发光信号值B,以0ng/ml竞争物标准品的发光信号值为 B_0 ,计算不同梯度浓度竞争物标准品的发光抑制率x, $x = (B_0 - B) / B_0 \times 100\%$,以发光抑制率为纵坐标,以Cu²⁺浓度log10对数为横坐标,绘制标准曲线,获得标准曲线线性回归方程。

[0046] 在本发明中,所述不同梯度浓度的竞争物标准品Cu-NOTA的浓度优选的包括0ng/ml、1.6ng/ml、3.12ng/ml、6.25ng/ml、12.5ng/ml、25ng/ml、50ng/ml、100ng/ml和200ng/ml。

[0047] 本发明提供的方法,检测灵敏度(IC₅₀)为16.9ng/ml,检测范围(IC₂₀-IC₈₀)为2.9-96.4ng/ml,检测限(IC₁₀)为1.6ng/ml。所述标准曲线线性回归方程的检测精确度可满足GB5749《生活饮用水卫生标准》生活饮用水、GB3838《地表水环境质量标准》I类~V类水中铜最低限量值0.01mg/L的检测要求。

[0048] 本发明还提供了所述试剂盒在检测样品铜离子浓度中的应用。在本发明中,所述样品优选的包括中草药样品、预混料样品、土壤样品和水样。本发明中,所述样品在检测前优选的与螯合剂偶联获得待检样品。在本发明具体实施过程中,当所述样品为中草药样品,预混料样品或土壤样品时,优选的将中草药样品,预混料样品或土壤样品微波消解,再与螯

合剂NOTA偶联以制备待测样品。在本发明中,所述微波消解优选的采用微波消解仪进行;所述微波消解的目的是将固定样品消化为液态。在本发明中,所述微波消解的条件的消解程序优选的为:130℃爬升10min,130℃保持3min;160℃爬升3min,160℃保持5min;180℃爬升3min,180℃保持40min;冷却;本发明中所述固体样品在消解前优选的进行预消解;所述预消解优选的为通风橱过夜或赶酸仪130℃预热30min。在本发明中所述样品微波消解后与螯合剂偶联的具体操作:将消解后的中草药样品加入5 μ g/ μ l单NOTA液1~2 μ l混匀反应15min;或将消解后预混料样品或土壤样品加入5 μ g/ μ l单NOTA液2~4 μ l混匀反应15min。

[0049] 当所述样品为水样时,包括河水、池塘水、农田水、地表水;将所述水样过滤后再与螯合剂NOTA偶联以制备待测样品;所述过滤优选的先采用滤纸过滤,然后采用滤膜过滤;所述滤膜的孔径优选的为0.22 μ m。在本发明中,所述过滤后的水样与螯合剂偶联的具体操作方法:取5ml过膜液加入2 μ g/ μ l单NOTA液1~2 μ l混匀反应15min。

[0050] 下面结合实施例对本发明提供的一种化学发光间接竞争免疫检测铜离子的试剂盒及其应用进行详细的说明,但是不能把它们理解为对本发明保护范围的限定。

[0051] 首先对实施例中用到的试剂盒仪器进行如下说明:

[0052] 主要试剂与耗材

[0053] CuSO₄ · 5H₂O (天津大茂化学试剂厂)

[0054] HNO₃ [AR] (广州化学试剂厂)

[0055] P-SCN-Bn-NOTA (2-S-(4-Isothiocyanatobenzyl)-1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid) 双功能螯合剂 (Macrocyclics, Inc. 西安凯新生物科技有限公司代理)

[0056] 鸡卵清蛋白OVA (Sigma公司)

[0057] 羊抗鼠IgG-HRP (广州国奥生物技术有限公司)

[0058] HRP化学发光底物 (北京科跃中楷生物技术有限公司)

[0059] 96孔黑色酶标板 (GreinerBio-one, Inc. 广州艾斯金生物技术有限公司代理)

[0060] BCA蛋白浓度测定试剂盒 (碧云天生物技术研究)

[0061] 30kD超滤管 (Millipore公司)

[0062] 超纯水 (Millipore公司)

[0063] 主要仪器

[0064] SynergyH1多功能微孔板检测酶标仪 (BioTek公司)

[0065] 数字pH计 (Mettler-Toledo仪器公司)

[0066] 磁力搅拌器 (IKA公司)

[0067] 分析电子天平 (Sartorius公司)

[0068] MARS 6微波消解仪 (PyNN · CEM公司)

[0069] GS-1赶酸仪 (南京瑞尼克科技开发有限公司)

[0070] X-Series 2电感耦合等离子体发射光谱质谱仪 (Thermo Fisher Scientific公司) PinAAcleAA900T火焰石墨炉一体原子吸收光谱仪 (PerkinElmer公司)

[0071] 实施例1

[0072] 一种化学发光间接竞争免疫检测铜离子的试剂盒,包括以下组分:96孔黑色酶标板、铜离子检测完全抗原、铜离子单克隆抗体、羊抗鼠IgG-HRP (市售)、[HRP]鲁米诺化学发

光底物(市售)、5%脱脂奶粉(市售)和PBST缓冲液。

[0073] 铜离子检测完全抗原的制备与鉴定

[0074] 通过双功能螯合剂p-SCN-Bn-NOTA将Cu离子与载体蛋白OVA进行偶联

[0075] 配置pH8.9,0.1M HEPES缓冲液,将OVA蛋白粉末溶于HEPES缓冲液中,得到浓度为10mg/ml的OVA蛋白溶液;将NOTA粉末溶于DMSO溶液中,得到浓度为25mg/ml的NOTA溶液;将NOTA液逐滴加入OVA蛋白溶液中,冰盒中搅拌螯合3h,4℃过夜制得NOTA-OVA液(NOTA与OVA摩尔比约70:1);

[0076] 将CuSO₄·5H₂O粉末溶于超纯水,得到浓度为1.0mg/ml的铜离子溶液;将Cu²⁺溶液逐滴加入NOTA-OVA液中(Cu²⁺与NOTA摩尔比约1.1:1),冰盒中搅拌螯合30min,反应液呈淡蓝色,并伴有浑浊,即制得Cu-NOTA-OVA完全抗原,并4℃保存。然后用30kD超滤管超滤制得Cu-NOTA-OVA完全抗原,超滤条件:离心机转速5000g,离心10min,超滤5次,去除未偶联上的p-SCN-Bn-NOTA与Cu离子,获得铜离子检测完全抗原。

[0077] 通过SDS-PAGE、ICP-AES、BCA法联合鉴定完全抗原是否偶联成功以及计算其偶联比率。

[0078] SDS-PAGE结果如图1所示,重金属铜完全抗原Cu-NOTA-OVA条带与载体蛋白OVA条带相比有明显滞后现象,合成的完全抗原分子量比载体蛋白更大,表明Cu-NOTA成功偶联结合上OVA,检测抗原制备成功。

[0079] 火焰原子吸收仪器法测得完全抗原Cu-NOTA-OVA中Cu浓度为0.1107mg/ml,BCA法的标准曲线如图2所示,测得完全抗原Cu-NOTA-OVA中OVA蛋白浓度为3.962mg/ml,计算得完全抗原Cu离子与载体蛋白OVA偶联比约为20:1,满足要求。

[0080] 铜离子单克隆抗体的制备与鉴定

[0081] 复苏冻存的可稳定分泌抗重金属铜单克隆抗体的细胞株4F12,该细胞株于2016年6月8日保藏于武汉大学保藏中心(地址:湖北省武汉市武昌区珞珈山八一路299号),保藏编号为CCTCC C201670,并扩大培养,将生长状态良好的阳性细胞以 5×10^5 cells/只腹腔注射提前已打不完全佐剂的10周龄的Balb/c小鼠,接种7天后每日观察小鼠生存状态,当小鼠腹部明显肿胀时,及时用无菌针头取出腹水,3000rpm离心15min,取上清-20℃分装冻存。将收集的腹水型抗体4℃缓慢溶解,1200rpm离心30min去除杂质,在0℃条件下缓慢搅拌滴加与其等体积的4℃预冷的饱和硫酸铵溶液,30min后4℃沉淀过夜。转移混合液,4℃下10000rpm离心20min弃上清,取沉淀复溶制备重悬液,4℃透析3次,每次6h,完成后用结合缓冲液稀释并用0.45um滤膜抽滤,再通过ProteinG亲和层析柱纯化抗体。纯化收集的抗体用30kD超滤管4℃超滤,采用SDS-PAGE凝胶鉴定纯化后抗体纯度,BCA试剂盒测定纯化后抗体的蛋白浓度,并通过间接ELISA和棋盘法分别测定纯化抗体的效价与亲和力。B4效价 6×10^5 倍,抗体亲和力常数 $K = 1.51 \times 10^{10}$ L/mol。

[0082] 实施例2

[0083] 用实施例1中的试剂盒检测样品中的铜离子浓度的性能评价

[0084] 标准曲线的制备:将检测完全抗原Cu-NOTA-OVA稀释至最佳工作浓度(150ng/ml)后,100μl每孔包被于黑色酶标板板底,4℃过夜;PBST缓冲液洗涤3次(每次3min)后,用5%脱脂奶粉(BD Difco™ SkimMilk,5%为质量浓度,即5g脱脂奶粉溶于100ml PBST缓冲液中)封闭液,200μl每孔37℃孵育40min;PBST缓冲液洗涤3次(每次3min)后,各孔分别加入50μl

系列梯度浓度 (0、1.6、3.12、6.25、12.5、25、50、100、200ng/ml) 的竞争物标准品Cu-NOTA和50 μ l稀释至最佳工作浓度24ng/ml的单克隆抗体蛋白,以PBS缓冲液作空白对照,混匀后37 $^{\circ}$ C孵育1h;PBST缓冲液洗涤3次(每次3min)后,各孔分别加入100 μ l浓度为0.1 μ g/ml由KPL公司生产的HRP-GoatAnti-mouse IgG (H+L) (货号为074-1806)的酶标二抗),37 $^{\circ}$ C孵育40min;PBST缓冲液洗涤5次(每次3min)后,各孔分别加入平衡至室温的[HRP]鲁米诺化学发光底物A液、B液各50 μ l,室温避光静置10min,上机读取发光信号(连接电脑与Synergy H1多功能微孔板检测酶标仪,打开Gen5软件,选择发光-发光光纤检测程序,其余参数默认,放置好酶标板,点击开始检测即可)。每一检测采用3个平行组求得均值,计算标准曲线与抑制率。

[0085] 将0ng/ml标准品孔的发光信号值定为 B_0 ,其他孔为 B ,以检测抑制率 $(B_0-B)/B_0 \times 100\%$ 为纵坐标,以 Cu^{2+} 浓度 \log_{10} 对数为横坐标,绘制标准抑制曲线。

[0086] 结果如图3所示,标准曲线线性回归方程为 $y=39.714x+1.2073$, $R^2=0.994$,线性检测范围(IC_{20} - IC_{80})为2.9-96.4ng/ml,检测灵敏度(IC_{50})为16.9ng/ml,检测限(IC_{10})为1.6ng/ml。可满足GB5749《生活饮用水卫生标准》生活饮用水、GB3838《地表水环境质量标准》I类~V类水中铜最低限量值0.01mg/L的检测要求。

[0087] 准确度与精密度评价:

[0088] 在标准曲线线性范围内,配置低、中、高3种不同浓度的标准液,采用上述方法测定发光信号,通过标准曲线计算检测浓度,回收率在98.8%~103.0%之间,RSD在10%以下,符合一般重金属残留分析的检测要求。

[0089] 表1化学发光间接竞争法准确性与精密度试验 ($n=5$)

	标准液浓度 (ng/ml)	检测值 (ng/ml)	回收率 (%)	SD (ng/ml)	RSD (%)
[0090]	10	9.88	98.8	0.15	1.5
	40	41.21	103.0	0.48	1.2
	70	70.89	101.3	0.94	1.3

[0091] 样品液中添加回收试验:

[0092] 为考察复杂试样溶液基质对本分析方法可能存在的系统干扰,在自来水、湖水、菊花消解液中添加竞争物标准品,配置低、中、高3种不同浓度的待测液,采用上述方法测定发光信号,通过标准曲线计算检测浓度。结果如表2~4所示;通过对比各试样溶液体系检出值,回收率以及相对标准偏差可以发现,试样溶液基质成分越简单,检测值的准确性越高;且中、高浓度相对于低浓度检测值的稳定性更高。

[0093] 表2化学发光间接竞争法自来水添加回收试验 ($n=3$)

	标准液浓度 (ng/ml)	检测值 (ng/ml)	回收率 (%)	SD (ng/ml)	RSD (%)
[0094]	10	9.82	98.2	0.94	9.5
	40	37.25	93.1	1.12	3.0
	70	67.36	96.2	2.37	3.5

[0095] 表3化学发光间接竞争法湖水(暨南大学明湖)添加回收试验(n=3)

	标准液浓度 (ng/ml)	检测值 (ng/ml)	回收率 (%)	SD (ng/ml)	RSD (%)
[0096]	10	12.45	124.5	0.83	6.7
	40	48.51	121.3	1.83	3.8
	70	84.50	120.7	4.00	4.7

[0097] 表4化学发光间接竞争法菊花消解液添加回收试验(n=3)

	标准液浓度 (ng/ml)	检测值 (ng/ml)	回收率 (%)	SD (ng/ml)	RSD (%)
[0098]	10	9.33	93.3	0.85	9.1
	40	46.18	115.5	3.28	7.1
	70	83.37	119.1	3.35	4.0

[0099] 特异性评价

[0100] 制备各金属元素半抗原待测母液, ICP-AES测定其母液金属浓度, 配置系列梯度浓度竞争物工作液, 通过上述化学发光间接竞争法求出各金属元素标准抑制曲线灵敏度(IC₅₀值), 通过公式 $Cross\ Reactivity = [IC_{50}(Cu) / IC_{50}(\text{其他金属离子})] \times 100\%$ 求得各金属元素的交叉反应率。

[0101] 结果如表5所示, 本方法中除Mg元素、Zn元素分别对铜单克隆抗体有12.8%、3.2%的交叉反应率外, 其余常见金属元素的交叉反应率均小于或近似1%, 其特异性总体良好, 满足一般检测要求。

[0102] 表5化学发光间接竞争法特异性试验

[0103]	重金属离子/NOTA	IC ₅₀ (ng/ml)	Cross Reactivity (%)
--------	------------	--------------------------	----------------------

	Cu	16.9	100.0
	Pb	> 10000	< 1.0
	Mn	3029.6	< 1.0
[0104]	Cd	1452.6	1.2
	Zn	543.1	3.2
	Mg	131.7	12.8
	NOTA	> 10000	< 1.0

[0105] 稳定性评价:

[0106] 根据已建立的化学发光间接竞争法制备一批包被封闭好的酶标板,在-20℃避光保存数周,于2周、4周、6周、8周时分别拿出,采用上述方法测定发光信号,计算标准曲线与抑制率,观察其变化趋势,结果如表6所示。

[0107] 表6化学发光间接竞争法稳定性试验

	Time	IC ₅₀ (ng/ml)	IC ₂₀ -IC ₈₀ (ng/ml)
	2weeks	21.6	4.3-107.4
[0108]	4weeks	23.1	4.1-131.1
	6weeks	23.8	4.4-129.4
	8weeks	27.2	5.8-126.9

[0109] 实施例3

[0110] 利用实施例1所述的试剂盒检测中草药样品、土壤样品、预混料样品,及水样中铜离子浓度

[0111] 1、中草药、预混料样品的微波消解回收率

[0112] 微波消解的条件准确称量样品0.2000g,加入硝酸8ml,通风橱过夜或赶酸仪130℃预热30min预消解;选择消解程序(130℃爬升10min,130℃保持3min;160℃爬升3min,160℃保持5min;180℃爬升3min,180℃保持40min;冷却);在本发明中所述样品微波消解后与螯合剂偶联的具体操作:中草药样品消解后用10ml容量瓶定容,取5ml消解液加入5μg/μl单NOTA液1~2μl混匀反应15min;预混料样品或土壤样品消解后用25ml容量瓶定容,取5ml消解液加入5μg/μl单NOTA液2~4μl混匀反应15min。在样品微波消解的同时,将标准物质与空白对照一同进行消解,采用石墨炉原子吸收法检测消解后标准物质与空白对照中的Cu含量,计算消解回收率,以评估消解效率是否达标。

[0113] 植物标准物质为国家一级标准物质GBW 07602 (GSV-1) 灌木枝叶,铜含量标准值为:5.2μg/g;土壤标准物质为国家一级标准物质GBW07404 (GSS-4) 土壤成分分析标准物质,铜含量标准值为:40.0μg/g;空白对照为硝酸AR,铜最高含量:≤0.00001%,标准物质及空白对照消解后Cu含量测定结果如表7所示:

[0114] 表7标准物质及空白对照微波消解后Cu含量测定结果

	样品名称	石墨炉原子吸收检测值 (ng/ml)	RSD (%)
[0115]	标准物质-灌木枝叶	39.705	0.8
	标准物质-土壤	346.5	1.4
	空白对照-硝酸 AR	2.757	2.9

[0116] 标准物质实际称量0.2000g, 赶酸后定容至25ml, 所以微波消解后标准物质Cu含量计算得:

[0117] (1) 植物: $(39.705 - 2.757) \times 0.025 \div 0.2 = 4.62 \mu\text{g/g}$;

[0118] (2) 土壤: $(346.5 - 2.757) \times 0.025 \div 0.2 = 42.97 \mu\text{g/g}$ 。

[0119] 消解回收率计算得:

[0120] (1) 植物: $(4.62 / 5.2) \times 100\% = 88.8\%$;

[0121] (2) 土壤: $(42.97 / 40.0) \times 100\% = 107.4\%$ 。

[0122] 消解合格。

[0123] 中草药、预混料及水样样品待测样的制备与检测

[0124] 中草药样品中铜含量的测定

[0125] 将中草药样品干燥研磨粉碎后微波消解, 再与螯合剂NOTA偶联以制备待测样品。通过上述化学发光间接竞争法、以及ICP-AES仪器法同时对样品中Cu含量进行测定, 结果如表8所示

[0126] 表8中草药样品重金属铜含量测定结果 (n=3)

[0127]	样品号	样品名	化学发光间接竞争法	ICP-AES 仪器法
--------	-----	-----	-----------	-------------

		检测值 ($\mu\text{g/g}$)	RSD(%)	检测值 ($\mu\text{g/g}$)	RSD(%)	
	7# 1693-3	决明子	3.43	1.3	3.62	2.4
	8# 1693-1	枸杞	8.66	5.7	8.68	0.9
	9# 1693-2	菊花	3.02	5.9	3.12	0.8
	10# 1640-3	金银花	3.80	4.7	4.12	1.5
	11# 1640-2	金银花	2.82	0.2	3.32	0.8
[0128]	12# 1640-1	金银花	3.39	6.0	3.62	0.1
	13# 1815-1	金银花	6.31	2.2	6.22	0.8
	14# 1733-1	金银花	8.58	4.0	9.42	1.4
	15# 1758-1	金银花	4.79	4.3	5.92	0.2
	16# 1816-1	金银花	6.76	8.3	7.02	0.6
	17# 1546-1	黄芪	5.51	11.8	5.03	0.5
	19# 1352-1	白芍	4.81	5.1	4.01	0.9
	20# 1693-4	覆盆子	10.32	1.0	9.82	0.4

[0129] 化学发光间接竞争法与ICP-AES仪器法检测结果采用GraphPadPrism及SPSS进行相关性统计分析,Pearson相关性分别为0.952,检测结果在0.05水平上显著相关,可应用于一般(中草药)植物中铜含量的检测。

[0130] 预混料样品中铜含量的测定

[0131] 将预混料粉末样品干燥后微波消解,再与螯合剂NOTA偶联以制备待测样品。通过上述化学发光间接竞争法、免疫荧光层析试纸条法以及ICP-AES仪器法同时对样品中Cu含量进行测定,结果如表9所示:

[0132] 表9预混料样品重金属铜含量测定结果 (n=3)

样品号	样品名	化学发光间接竞争法		ICP-AES 仪器法	
		检测值 (mg/g)	RSD(%)	检测值 (mg/g)	RSD(%)
21# F821-1	预混料	0.237	15.4	0.214	1.2
22# F829-1	预混料	0.442	15.3	0.403	5.5

[0134]	23# F829-4	预混料	0.137	8.7	0.136	2.1
	27# F988-3	预混料	0.224	11.0	0.252	1.8
	28# F987-1	预混料	1.901	2.8	1.961	2.3
	29# F987-2	预混料	1.875	0.7	1.766	7.0

[0135] 化学发光间接竞争法与ICP-AES仪器法检测结果采用GraphPad Prism及SPSS进行相关性统计分析,Pearson相关性分别为0.995,检测结果在0.01水平上显著相关,可应用于一般预混料中铜含量的检测。

[0136] 水样样品中铜含量的测定

[0137] 将河水、池塘水、农田水、(金属加工厂)地表水等水样样品滤纸过滤后0.22um滤器过膜,再与螯合剂NOTA偶联以制备待测样品。通过上述化学发光间接竞争法以及ICP-AES仪器法同时对样品中Cu含量进行测定,结果如表10所示。

[0138] 表10水样样品重金属铜含量测定结果

样品号	样品名	化学发光间接竞争法		ICP-AES 仪器法	
		检测值 ($\mu\text{g/L}$)	RSD(%)	检测值 ($\mu\text{g/L}$)	RSD(%)
W-01#	池塘水	38.4**	9.2	8.8	1.2
W-02#	池塘水	13.2**	0.2	6.8	8.2
W-03#	农田水	10.0	8.8	8.9	2.0
W-04#	农田水	8.2	2.1	7.5	1.1
W-05#	农田水	18.3	0.6	20.0	2.2
W-06#	珠江水	6.2	3.7	6.2	3.1
W-07#	珠江水	7.1	0.5	6.3	1.2
W-08#	珠江水	6.3	4.8	5.9	3.5
W-09#	珠江水	8.1	7.7	6.4	0.8
W-10#	金属加工 厂地表水	31.0	2.8	26.6	0.5
W-11#	金属加工 厂地表水	31.5	4.3	25.8	0.8
W-12#	珠江水	7.3	13.3	8.2	2.9
W-13#	珠江水	5.6	1.9	6.2	1.4
W-14#	珠江水	12.0**	7.6	6.6	1.8
W-15#	珠江水	12.2**	4.5	7.6	0.6

[0141] **部分样品结果准确性偏离较大,计算相关性时舍弃

[0142] 化学发光间接竞争法与ICP-AES仪器法检测结果采用GraphPad Prism及SPSS进行相关性统计分析,Pearson相关性分别为0.97,检测结果在0.05水平上显著相关,可应用于一般水样中铜含量的检测。

[0143] 由上述实施例可知,本发明提供的化学发光间接竞争免疫检测铜离子的试剂盒能够用于不同样品中铜离子浓度的测定,准确度和精密度高、特异性好,测定结果稳定。

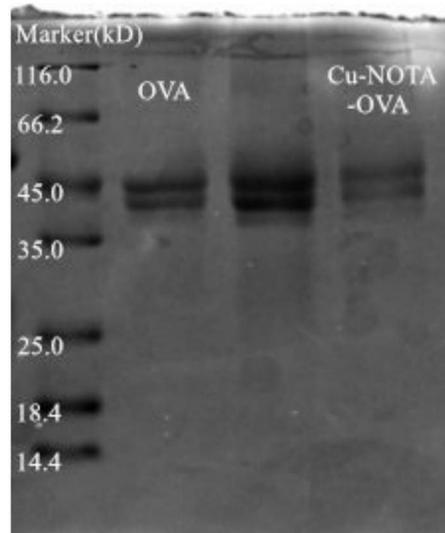


图1

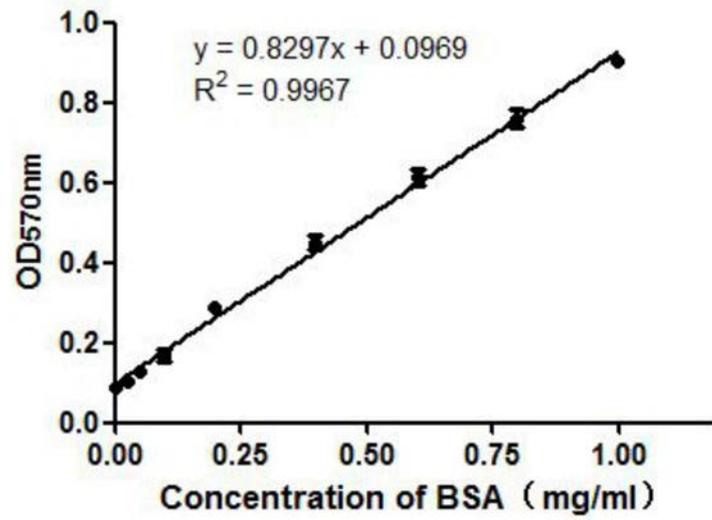


图2

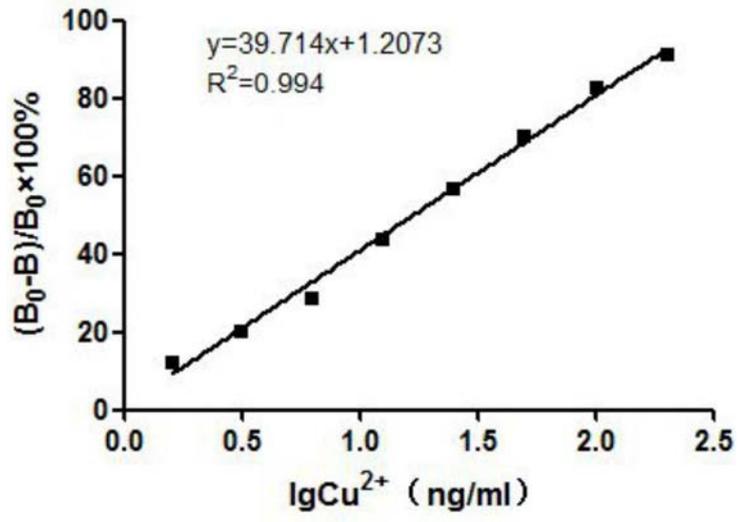


图3

专利名称(译)	一种化学发光间接竞争免疫检测铜离子的试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN108535467A	公开(公告)日	2018-09-14
申请号	CN201810252420.7	申请日	2018-03-26
[标]申请(专利权)人(译)	暨南大学		
申请(专利权)人(译)	暨南大学		
当前申请(专利权)人(译)	暨南大学		
[标]发明人	向军俭 黄建芳 杨浩 郝代玲		
发明人	向军俭 黄建芳 杨浩 郝代玲		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/5302 G01N33/531 G01N33/54306		
代理人(译)	刘奇		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种化学发光间接竞争免疫检测铜离子的试剂盒及其应用，属于重金属免疫检测技术领域。所述试剂盒包括以下组分：酶标板、铜离子检测完全抗原、铜离子单克隆抗体、酶标二抗、发光底物、封闭液和洗涤液；所述试剂盒的使用方法：1)将铜离子检测完全抗原包被于酶标板上，封闭、洗涤；2)加入待检样品和铜离子单克隆抗体进行一抗孵育、第一洗涤后，加入酶标二抗，进行酶标二抗孵育、第二洗涤；3)加入发光底物反应、静置后，读取发光信号值B；4)将所述发光信号值B带入标准曲线线性回归方程计算获得待检样品中铜离子浓度。所述试剂盒能够用于不同样品中铜离子浓度的测定，准确度和精密度高、特异性好，测定结果稳定。

