



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105388280 A

(43) 申请公布日 2016. 03. 09

(21) 申请号 201510772550. X

(22) 申请日 2015. 11. 12

(71) 申请人 江苏省检验检疫科学技术研究院

地址 210001 江苏省南京市中华路 99 号

申请人 南京大学

江苏出入境检验检疫局工业产品检测中心

(72) 发明人 丁友超 何欢 蔡建和 郑凯

孙成 何重辉

(74) 专利代理机构 南京知识律师事务所 32207

代理人 蒋海军

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

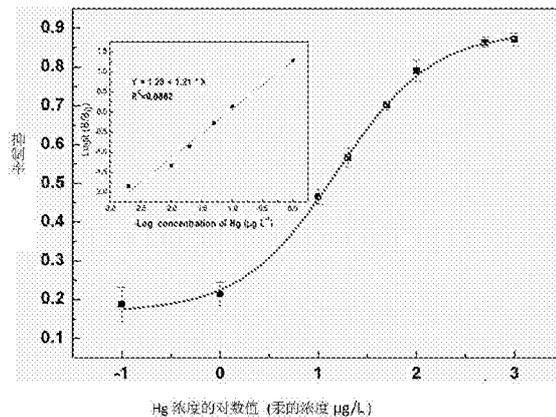
权利要求书1页 说明书9页 附图1页

(54) 发明名称

一种基于汞单克隆抗体检测纺织品中汞含量的间接竞争 ELISA 试剂盒及其检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种基于汞单克隆抗体检测纺织品中汞含量的间接竞争 ELISA 试剂盒及其检测方法,属于重金属检测技术领域。本发明以 Hg-ITCBE(异硫氰基-苯甲基-乙二胺四乙酸)-KLH(钥孔戚血蓝蛋白)为免疫抗原对小鼠进行免疫反应得到检测汞的单克隆抗体,基于汞单克隆抗体的间接竞争酶联免疫吸附测定方法适用于以模拟酸性汗液提取的纺织品中汞的快速、准确、高通量测定,实现了纺织品中汞的生物测定方法,并构建试剂盒,为儿童轻纺品的安全检测提供技术支持,具有效价高、亲和力强、检测灵敏度高、操作简便等优点。



1. 一种汞单克隆抗体的间接竞争 ELISA 试剂盒, 其特征在于: 包括包被了 Hg-ITCBE-BSA 且已封闭的 96 孔酶标板、汞标准储备液、稀释液、汞单克隆抗体、羊抗鼠 IgG-HRP 酶标二抗、抗体稀释液、底物缓冲液, 双氧水、TMB、终止液和洗涤液。

2. 根据权利要求 1 所述的一种汞单克隆抗体的间接竞争 ELISA 试剂盒, 其特征在于: 所述的汞标准储备液的浓度为 200mg/L, pH 值为 7.4; 所述的稀释液为含有 2.5mM EDTA 的 PBS 溶液; 所述的抗体稀释液为 PBS 溶液; 所述的底物缓冲液为 CPBS 溶液; 所述的双氧水的体积分数为 0.65%; 所述的终止液为 2M 浓度的 H_2SO_4 溶液; 所述的洗涤液为 PBST 溶液。

3. 根据权利要求 1 所述的一种汞单克隆抗体的间接竞争 ELISA 试剂盒, 其特征在于: 所述的汞单克隆抗体的制备方法为: 以异硫氰基-苯甲基-乙二胺四乙酸与钥孔戚血蓝蛋白和汞反应得到的 Hg-ITCBE-KLH 为免疫抗原, 对小鼠进行免疫反应得到。

4. 根据权利要求 1 所述的一种汞单克隆抗体的间接竞争 ELISA 试剂盒, 其特征在于: 能特异性测定汞, 与 Pb^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cd^{2+} 的交叉反应率低于 0.60%。

5. 权利要求 1-4 中任意一项所述的一种汞单克隆抗体的间接竞争 ELISA 试剂盒检测纺织品中汞的方法, 其步骤为:

(a) 采用权利要求 1-4 中任意一项所述的一种汞单克隆抗体的间接竞争 ELISA 试剂盒建立间接竞争酶联免疫吸附测定方法, 包括优化汞单克隆抗体和包被抗原的工作浓度及汞单克隆抗体和包被抗原的反应条件;

(b) 绘制标准竞争抑制曲线, 计算标准竞争抑制曲线的线性方程;

(c) 提取纺织品中的汞, 采用步骤 (a) 中建立的方法和步骤 (b) 中的线性方程测定纺织品提取液中的汞含量。

6. 根据权利要求 5 所述的一种汞单克隆抗体的间接竞争 ELISA 试剂盒检测纺织品中汞的方法, 其特征在于: 所述步骤 (b) 中的线性方程为 $Y = 0.86837 + 0.22795X$, $R^2 = 0.994$, 其中 Y 为 $\text{Logit}(B/B_0)$, B 为标准系列汞浓度下的 OD_{450} 值, B_0 为阳性对照的 OD_{450} 值, X 为 Hg^{2+} 浓度的负对数值, Hg^{2+} 浓度的单位为 $\mu g/L$ 。

7. 根据权利要求 5 所述的一种汞单克隆抗体的间接竞争 ELISA 试剂盒检测纺织品中汞的方法, 其特征在于: 所述步骤 (c) 中采用模拟酸性汗液提取纺织品中的汞, 模拟酸性汗液包括 0.5g/L 的 L-组氨酸盐酸盐-水合物, 5.0g/L 的氯化钠, 2.2g/L 的磷酸二氢钠二水合物, pH 值为 5.5。

一种基于汞单克隆抗体检测纺织品中汞含量的间接竞争 ELISA 试剂盒及其检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于重金属检测技术领域,更具体地说,涉及一种基于单克隆抗体技术检测纺织品中汞含量的间接竞争 ELISA 试剂盒及其检测方法。

背景技术

[0002] 重金属一般以天然浓度广泛存在于自然界中,天然水体中含汞量极少,一般不超过 $0.1 \mu\text{g/L}$ 。但由于人类对重金属的开采、冶炼、加工及商业制造活动日益增多,造成不少重金属如镉、汞等进入大气、水、土壤环境,引起严重的环境污染。植物具有吸收、积累汞的能力,尤其是当土壤中含汞量增加时植物会吸收积累更多的汞。纺织品以植物作为原料,并且在生产工艺过程中,某些环节也会引入重金属汞,汞及汞化合物对人体的损害程度与进入体内的汞量有关。汞对人体的危害主要累及中枢神经系统、消化系统及肾脏,此外对呼吸系统、皮肤、血液及眼睛也有一定的影响。因此,建立纺织品中汞的准确、快速、便捷、高通量的检测方法,对纺织品品质控制、减少其质量问题对人们生命安全与健康具有十分重要的意义。

[0003] 纺织品中汞的含量低,一般需要通过酸性汗液或其他介质进行浸提或消解,由此带来的问题是纺织品本身存在的大量干扰物质如染料、增塑剂、增白剂以及其他金属离子将会随着汞一起被提取出来。另外,纺织品的汞筛查往往样品量大,对方法的分析速度和灵敏度有较高要求。当前,汞的传统检测方法主要为仪器检测,对样品要求高,抗干扰能力差,包括原子吸收光谱法、原子荧光光谱法和电感耦合等离子体-质谱法等,这些方法普遍需要依靠大型或专门仪器才能完成,且前处理过程复杂,耗时较多,难以满足高通量快速和在线检测的需要。基于抗原、抗体特异性结合作用的间接竞争酶联免疫吸附测定方法具有检测速度快、费用低廉、仪器简单易携、灵敏度高和选择性强等优点,且能同时分析大量的环境样本,已广泛应用于临床医学、生命科学以及环境中有机有毒物质的检测。目前,该方法用于纺织样品中重金属汞的检测报道则没有。

[0004] 文献检索结果表明,国外 Willy 等采用 GSH 为双功能螯合剂,首次制备了能特异性识别重金属汞的单克隆抗体 (Wylie, D. E., et al. Monoclonal-antibodies specific for mercuric ions[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1992, 89(9):4104-4108)。国内只有杨凤丽等在《高技术通讯》(2008.5)上发表了题为“重金属汞单克隆抗体的制备及鉴定”,该文介绍了制备汞单克隆抗体的方法及抗体鉴定。但制备的腹水效价偏低,不利于建立标准化的免疫检测方法。中国专利申请号为 200910037475.7,公开日为 2009 年 7 月 22 日的专利申请文件公开了一种抗汞螯合物单克隆抗体,所述单克隆抗体对汞螯合物具有特异性,所述的汞螯合物为汞-1-(4-异硫氨酸苄基)-乙二胺四乙酸-牛血清白蛋白偶联物和汞-乙二胺四乙酸,该发明公开了制备抗汞螯合物单克隆抗体的方法、制备免疫抗原汞-1-(4-异硫氨酸苄基)-乙二胺四乙酸-钥孔戚血蓝素和包被抗原汞-1-(4-异硫氨酸苄基)-乙二胺四乙酸-牛血清

白蛋白的方法及检测汞离子浓度的方法。申请号为 201010229009.1, 申请公布日为 2010 年 11 月 17 日的专利申请文件公开了一种重金属汞多克隆抗体的制备及其酶联免疫吸附测定方法。通过将双功能螯合剂青霉素 G 钠盐的一端结合重金属汞, 另一端与大分子载体蛋白牛血清白蛋白、卵清蛋白偶联形成汞-螯合剂-蛋白的免疫原 MMPA-BSA 和包被原 MMPA-OVA, 最后经对免疫原 MMPA-BSA 进行乳化、免疫后制备多克隆抗体用于酶联免疫吸附测定, 该发明制备得到的抗体对汞离子具有很高的特异性, 除了与镉的交叉反应率为 7.9% 之外, 其他金属的均小于 0.001%, 添加回收率在 91.4% -120% 之间, 可用于水样中的重金属汞的测定, 也可以通过结合一定的前处理技术发展为快速检测农产品等其他样品中重金属汞的快速免疫检测技术。

发明内容

[0005] 1. 要解决的问题

[0006] 针对纺织品中汞的生化分析方法的不足、检测灵敏度低、操作繁琐等问题, 本发明提供一种基于汞单克隆抗体检测纺织品中汞含量的间接竞争 ELISA 试剂盒及其检测方法, 该测定方法适用于以模拟酸性汗液提取的纺织品中汞的快速、准确、高通量测定, 实现了纺织品中汞的生物测定方法, 并构建试剂盒, 为儿童轻纺品的安全检测提供技术支持。

[0007] 2. 技术方案

[0008] 为了解决上述问题, 本发明所采用的技术方案如下:

[0009] 一种汞单克隆抗体的间接竞争 ELISA 试剂盒, 包括包被了 Hg-ITCBE-BSA 且已封闭的 96 孔酶标板、汞标准储备液、稀释液、汞单克隆抗体、羊抗鼠 IgG-HRP 酶标二抗、抗体稀释液、底物缓冲液, 双氧水、TMB、终止液和洗涤液。

[0010] 优选地, 所述的汞标准储备液的浓度为 200mg/L, pH 值为 7.4; 所述的稀释液为含有 2.5mM EDTA 的 PBS 溶液; 所述的汞单克隆抗体为上述方法制备得到; 所述的抗体稀释液为 PBS 溶液; 所述的底物缓冲液为 CPBS 溶液; 所述的双氧水的体积分数为 0.65%; 所述的终止液为 2M 浓度的 H_2SO_4 溶液; 所述的洗涤液为 PBST 溶液。

[0011] 优选地, 所述的汞单克隆抗体的制备方法为: 以异硫氰基-苯甲基-乙二胺四乙酸与钥孔戚血蓝蛋白和汞反应得到的 Hg-ITCBE-KLH 为免疫抗原, 对小鼠进行免疫反应得到, 具体的制备步骤如下:

[0012] (1) 制备免疫抗原 Hg-ITCBE-KLH 和包被抗原 Hg-ITCBE-BSA (采用异硫氰酸酯法制备免疫抗原和包被抗原, 采用紫外可见分光光度仪和傅里叶红外分光光度仪鉴定免疫抗原和包被抗原是否偶联成功);

[0013] (2) 将步骤 (1) 中制备的免疫抗原免疫小鼠;

[0014] (3) 将免疫小鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞融合并培养;

[0015] (4) 采用有限稀释法, 以间接 ELISA、间接竞争 ELISA 和包被抗原筛选阳性克隆的杂交瘤细胞;

[0016] (5) 鉴定步骤 (4) 得到的杂交瘤细胞所分泌的单克隆抗体。

[0017] 优选地, 能特异性测定汞, 与 Pb^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cd^{2+} 的交叉反应率低于 0.60%。

[0018] 上述的一种汞单克隆抗体的间接竞争 ELISA 试剂盒检测纺织品中汞的方法, 其步

骤为：

[0019] (a) 采用上述的一种汞单克隆抗体的间接竞争 ELISA 试剂盒建立间接竞争酶联免疫吸附测定方法,包括优化汞单克隆抗体和包被抗原的工作浓度及汞单克隆抗体和包被抗原的反应条件；

[0020] (b) 绘制标准竞争抑制曲线,计算标准竞争抑制曲线的线性方程；

[0021] (c) 提取纺织品中的汞,采用步骤 (a) 中建立的方法和步骤 (b) 中的线性方程测定纺织品提取液中的汞含量。

[0022] 优选地,所述步骤 (b) 中的线性方程为 $Y = 0.86837 + 0.22795X$, $R^2 = 0.994$,其中 Y 为 $\text{Logit}(B/B_0)$, B 为标准系列汞浓度下的 OD_{450} 值, B_0 为阳性对照的 OD_{450} 值, X 为 Hg^{2+} 浓度的负对数值, Hg^{2+} 浓度的单位为 $\mu\text{g/L}$ 。

[0023] 优选地,所述步骤 (c) 中采用模拟酸性汗液提取纺织品中的汞,模拟酸性汗液包括 0.5g/L 的 L-组氨酸盐酸盐-水合物, 5.0g/L 的氯化钠, 2.2g/L 的磷酸二氢钠二水合物, pH 值为 5.5。提取后的溶液调节 pH 至 7.4。

[0024] 本发明采用以 ITCBE 作为双功能螯合剂,以钥孔戚血蓝蛋白 (KLH) 作为耦合蛋白制备的汞单克隆抗体,在此构建经酸性汗液提取的纺织品中汞的间接竞争 ELISA 试剂盒及其检测方法。

[0025] 3. 有益效果

[0026] 相比于现有技术,本发明的有益效果为：

[0027] (1) 本发明中的汞单克隆抗体具有效价高、亲和力强等优点,应用该单克隆抗体建立的间接竞争酶联免疫检测方法能特异性测定复杂环境条件下的汞含量；

[0028] (2) 本发明基于汞单克隆抗体的间接竞争酶联免疫吸附测定试剂盒 (间接竞争 ELISA 试剂盒) 适用于以模拟酸性汗液提取的纺织品中汞的快速、准确、高通量测定,实现了纺织品中汞的生物测定方法,并构建试剂盒,为儿童轻纺品的安全检测提供技术支持；

[0029] (3) 本发明以异硫氰基-苯甲基-乙二胺四乙酸与钥孔戚血蓝蛋白和汞反应得到的 Hg-ITCBE-KLH 为免疫抗原,对小鼠进行免疫反应得到汞单克隆抗体,以此构建的汞检测试剂盒具有灵敏度高、特异性好等优点,测定低限为 0.01mg/kg ,与 Pb^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cd^{2+} 等金属离子的交叉反应率低于 0.60% 。

附图说明

[0030] 图 1 为本发明中间接竞争酶联免疫吸附测定试剂盒的定量标准曲线图。

具体实施方式

[0031] 下面对本发明的实施例进行详细说明,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与操作过程,但本发明的保护范围不限于下述的实施例。

[0032] 本发明中涉及的英文简写所对应的中文如下所示：

[0033] ITCBE: 异硫氰基-苯甲基-乙二胺四乙酸,是一种双功能螯合剂;KLH: 钥孔戚血蓝蛋白,是一种偶联蛋白;BSA: 牛血清白蛋白;EDTA: 乙二胺四乙酸;PBS: 磷酸盐缓冲液 (pH 为 7.4);PBSE: 含 EDTA 的 PBS 稀释液;PBST: 含 5% (质量分数) 吐温 80 的磷酸盐缓冲液;CPBS: 柠檬酸盐缓冲溶液;CBS: 碳酸盐缓冲溶液。

[0034] 实施例 1

[0035] 汞酶联免疫吸附测定试剂盒的构建

[0036] 步骤 1 :抗原抗体最佳工作浓度的确定

[0037] 采用方阵滴定法对包被抗原和抗体的最佳工作浓度进行优化 :用 CBS 将上述制备的包被抗原 Hg-ITCBE-BSA 系列稀释为 1000 倍、2000 倍、4000 倍、8000 倍分别包被酶标板的 1-3,4-5,6-9,10-12 列 ;用 1%明胶作为封闭液 ;抗体分别倍比稀释为 5000 倍、10000 倍、20000 倍、40000 倍、80000 倍、160000 倍、320000 倍和 640000 倍,分别加于酶标板的 A-H 行 ;加羊抗鼠二抗 IgG-HRP(1:5000, PBS 稀释) ;TMB 显色,2M 硫酸终止,测 OD₄₅₀值。以 OD₄₅₀值为略大于而趋近于 1 且抗原和抗体浓度均为最低的组合时为最佳工作浓度。实验结果表明抗原稀释度为 4000-8000,抗体稀释度为 80000 时,OD₄₅₀值为 1.092-1.247。本实验以抗原稀释度 5000 作为最佳抗原稀释浓度。

[0038] 步骤 2 :抗原抗体反应条件优化

[0039] 在上述最佳 ELISA 分析方法工作浓度基础上,用不同 pH 值和离子强度的包被液包被,选择出空白 OD₄₅₀值相对较高的包被条件作为最佳。本发明采用 pH = 9.6 的 CBS 溶液作为包被缓冲液。

[0040] 考察不同的盐离子浓度对抗原抗体结合反应的影响,使反应体系中 NaCl 的浓度依次改变,选择出空白 OD₄₅₀值相对较高的盐离子浓度。本发明采用 0.15M 的溶液作为稀释缓冲液。

[0041] 封闭液的作用是消除非特异性吸附。竞争 ELISA 反应中,在抗原抗体最佳工作浓度及最适盐离子强度的条件下,本发明分别采用了 1%明胶、3% BSA、1% OVA、及 5%脱脂奶粉作为封闭液(200 μL/孔),比较其对检测曲线的影响。根据实验结果本发明采用 1%明胶作为封闭液。

[0042] 改变金属标液稀释缓冲液中 EDTA 浓度即前文所述 PBSE 溶液中 EDTA 的浓度,使反应体系中 EDTA 浓度分别为 2.5mM,5.0mM,10mM,20mM,比较不同 EDTA 浓度对抗体的抑制作用。根据结果,本发明采用 5.0mM EDTA 作为样品缓冲液中 EDTA 的浓度。

[0043] 反应体系中 pH 值分别取 3.4、7.4、7.8,比较不同 pH 值对 ELISA 检测曲线的影响。根据实验结果,反应环境 pH 在 3.4-7.8 之间没有明显的差异,本发明采用反应体系 pH 值为 7.4。

[0044] 步骤 3 :汞酶联免疫检测方法的建立

[0045] 在上述最佳反应条件下,建立间接竞争酶联免疫吸附测定方法。具体操作过程如下 :

[0046] 预先将 1000mg/L 金属汞标准液稀释成 200mg/L 储备液,调节 pH 至 7.4 以稀释缓冲液 PBS 配置一定浓度的 EDTA 溶液,即为 PBSE 溶液。用蒸馏水将金属汞储备液稀释成系列浓度的标准溶液,即 20,10,2,0.2,0.02,0.002mg/L。再和 EDTA 反应生成系列浓度的 Hg-EDTA 复合物溶液作为竞争化合物,加入酶标板。在此过程中,保证每一浓度的标液中含 EDTA 的量是一致的。具体的实验步骤如下 :

[0047] (1) 包被 :以包被缓冲溶液 CBS 稀释包被原至抗原工作浓度,100 μL/孔,4℃过夜。

[0048] (2) 洗板 :以 PBST 为洗液,在洗板机上进行洗涤,每板洗三次,每次每孔注液 300 μL,拍干。

[0049] (3) 封闭 :以 1%明胶为封闭液, 200 μ L/ 孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h。

[0050] (4) 洗板 ;同 (2), 拍干。

[0051] (5) 预混合 :取系列浓度的 Hg^{2+} 溶液各 100 μ L 与 900 μ L EDTA 混合后, 将混合液与 PBS 稀释后的抗体等体积混合至 1mL, 在室温下作用一段时间得到各浓度的标准样品。同时以 EDTA 与稀释抗体混合液做阳性对照。

[0052] (6) 竞争 :将预混好的各浓度的标准样品加入 96 孔酶标板中, 100 μ L/ 孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2h。

[0053] (7) 洗板 :同 (2), 拍干。

[0054] (8) 加羊抗鼠酶标二抗 :羊抗鼠 IgG-HRP 以封闭液稀释 (1:10000), 100 μ L/ 孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h。

[0055] (9) 洗板 :同 (2), 拍干。

[0056] (10) 加显色液 :100 μ L/ 孔, 37 $^{\circ}$ C 作用 15min。

[0057] (11) 终止反应 :加浓度为 2M 的硫酸溶液终止显色反应, 50 μ L/ 孔。

[0058] (12) 测定 :酶标仪测定 OD_{450} 值, 以空白对照调零, 以 EDTA 与抗体混合液孔作为阳性对照。

[0059] 以抑制率 Inhibition rate 为纵坐标 (Y), Hg^{2+} 浓度 (μ g/L) 的负对数值为横坐标 (X) 绘制标准竞争抑制曲线, 如图 1 所示。从图中可以看出 Hg^{2+} 在 0.1 μ g/L ~ 1000 μ g/L 范围内, 抑制率与 Hg^{2+} 浓度 μ g/L 的负对数值相关系数达 0.999, 方法的检测范围较宽。从图中也可以得到 IC_{50} 为 13.27 μ g/L, IC_{20} 为 0.468 μ g/L, 以 IC_{20} 的浓度为最低检测限, 则该方法对 Hg^{2+} 浓度的检测限为 0.459 μ g/L。

[0060] 抑制率的计算公式如下 :
$$IR = \frac{\text{OD}_p - \text{OD}_c}{\text{OD}_p} \times 100\%$$

[0061] 其中 : OD_p 为阳性对照孔的 OD_{450} 值 ; OD_c 为已知浓度孔的 OD_{450} 值 ; IR 为每已知浓度孔的抑制率。

[0062] 步骤 4 :试剂盒的组装与测试方法

[0063] 使用前先用蒸馏水稀释 A 瓶中的汞标准储备液至 20 倍的工作浓度, 即 20, 10, 2, 0.2, 0.02, 0.002mg/L ;再用 PBSE 对上述溶液做 10 倍稀释, 即得到 2, 1, 0.2, 0.02, 0.002, 0.0002mg/L 的标准使用液, 备用。以抗体稀释液 PBS 对抗体进行稀释至 2 倍的工作浓度, 即 1:80000 ;将汞标准使用液与 2 倍工作浓度的抗体 (1:80000) 等体积混合, 此时汞的标准系列浓度为 1.0, 0.5, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001mg/L, 抗体也达到了工作浓度, 上述溶液置于室温下反应 1h。实际样品同样用 PBSE 做 10 倍稀释后与 2 倍工作浓度的抗体等体积混合, 室温下反应 1h。同时以 PBSE 直接与 2 倍工作浓度的抗体等体积混合, 作为阳性对照。随后作为样品加入到酶标板中, 100 μ L/ 孔。以 PBS 为空白对照。

[0064] 加样后酶标板于 37 $^{\circ}$ C 恒温水浴锅中孵育 2h, 取出, 以洗涤液 PBST 洗板三次, 拍干, 加入稀释好的酶标二抗, 100 μ L/ 孔, 37 $^{\circ}$ C 恒温水浴锅中孵育 1h。取出酶标板, 以洗涤液 PBST 洗板三次, 拍干, 加入显色剂, 100 μ L/ 孔, 37 $^{\circ}$ C 恒温水浴锅中显色 15min。加入 2M H_2SO_4 终止显色反应, 以空白对照调零, 用酶标仪测定标准系列样品和实际样品的 OD_{450} 值。

[0065] 步骤 5 :定量计算与分析

[0066] 以 $\text{Logit}(B/B_0)$ 为纵坐标 (Y), Hg^{2+} 浓度 ($\mu\text{g/L}$) 的负对数值为横坐标 (X), 做标准 Logit 曲线, 其中 B 为标准系列浓度下的 OD_{450} 值, B_0 为阳性对照的 OD_{450} 值。 $\text{Logit}(B/B_0)$ 与 Hg^{2+} 浓度 ($\mu\text{g/L}$) 的负对数值呈线性关系, 如图 1 的内插图所示。线性方程为 $Y = 0.86837 + 0.22795X$, $R^2 = 0.994$ 。

[0067] 根据待测样品的 OD_{450} 值, 计算出各待测样品的 Logit 值, 代入上述标准曲线的线性方程, 求出相应 Logit 值对应的样品中汞的浓度负对数, 即可方便的计算出待测样品中汞的含量。

[0068] 本实施例中采用的汞单克隆抗体的制备方法如下:

[0069] 步骤 1: 抗原的合成

[0070] 称取 20mg KLH 蛋白溶于 1mL pH9.5PBS 缓冲溶液中, 得到 20mg/mL KLH 蛋白溶液。称取 5mg ITCBE 溶于 1mL DMSO(二甲基亚砷)中, 得到 11.5mM ITCBE(异硫氰基-苯甲基-乙二胺四乙酸)螯合剂溶液。配制 11.5mM 汞使用液。取 11.5mM ITCBE 和 11.5mM 汞使用液各 0.25mL, 于室温下反应 2 小时得到 Hg-ITCBE 半抗原。将半抗原缓慢加入 20mg/mL KLH 蛋白溶液, 用 0.10M Na_3PO_4 或 KOH 迅速调节混合液的 pH 值至 9.2, 反应液在搅拌速度为 50/min 的转速下室温反应 24h。反应完成后将反应液装入 EDTA 预处理过的透析袋中, 4℃ 下透析三天。其中, 在 pH 为 7.4 的 PBS 缓冲液透析三次, 每次 16 小时, 纯水透析二次, 每次 12 小时, 以去除未反应的 Hg, ITCBE 以及 Hg-ITCBE 复合物。准确量取透析液, 分装, 于 -20℃ 下保存, 得到单克隆抗体免疫原 Hg-ITCBE-KLH。并采用紫外可见分光光度仪及傅里叶红外分光光度仪进行鉴定。紫外可见分光光度的鉴定表明, KLH 的紫外吸收明显增强, 并在 210nm 处有明显的红移现象。傅里叶红外分光光度表征也可以看出, 在 1011.9cm^{-1} 和 950.8cm^{-1} 两处的吸收强度明显增强, 1011.9cm^{-1} 和 950.8cm^{-1} 是 R-COOH 的特征吸收峰, 鉴定结果表明, 成功制备了免疫原。

[0071] 步骤 2: 动物免疫与应答

[0072] 取 4 只 6 周龄的雌性 BALB/c 鼠, 分别编号 1, 2, 3 和 4, 于免疫前一周断尾采血, 作为阴性血清。一周后, 以 Hg-ITCBE-KLH 为免疫原进行免疫, 采取腹腔注射的方式共进行五次免疫。每次免疫抗原用量为 $200\mu\text{g}$ /只 (以蛋白浓度计), 初次免疫将免疫抗原用等量弗氏完全佐剂乳化, 第二、三、四、五次免疫与等量弗氏不完全佐剂乳化, 每次免疫间隔 2 周。进行细胞融合前的第 3 天, 用抗原直接加强免疫一次, 剂量同前。第三、四、五次免疫后第 10 天采用断尾方式采集血清, 通过间接非竞争 ELISA 法测抗体效价, 以 Hg-ITCBE-BSA 与 ITCBE-BSA 分别作为包被原包被酶标板, 比较小鼠抗血清对两种包被原的亲合性, 测定抗血清与它们的结合效价。最后选择抗体效价较高且二者 OD_{450} 差异较大的小鼠用于细胞融合, 实验结果表明, 四只小鼠中有两只具有较好的差异性。其中 1 号小鼠的差异值为 +42, 差异最大。因此, 选择 1 号小鼠进行后续实验。

[0073] 步骤 3: 效价测定及融合小鼠的筛选

[0074] 第三、四、五次免疫后第 10 天采用断尾方式采集血清, 通过间接非竞争 ELISA 法测抗体效价, 以此确定是否有针对汞离子的抗体生成。以 Hg-ITCBE-BSA 与 ITCBE-BSA 分别作为包被原包被酶标板, 比较小鼠抗血清对两种包被原的亲合性, 测定抗血清与它们的结合效价。最后选择抗体效价较高且二者 OD_{450} 差异较大的小鼠用于细胞融合。间接非竞争 ELISA 法操作步骤:

[0075] (1) 包被 :以包被缓冲溶液 CBS 稀释包被原 Hg-ITCBE-BSA 与 ITCBE-BSA,以相同的浓度包被酶标板,即稀释 5000 倍,100 μ L/孔,4 $^{\circ}$ C 过夜 ;

[0076] (2) 洗板 :以 PBST 为洗液,在洗板机上进行洗涤,每板洗三次,每次每孔注液 300 μ L,拍干 ;

[0077] (3) 封闭 :以质量分数为 1%的明胶为封闭液,200 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 孵育 1h ;

[0078] (4) 洗板 ;同 (2),拍干 ;

[0079] (5) 加抗血清 :将上述制备的抗血清以 PBS 进行倍比稀释,另设一个阴性对照 ;加入抗血清和阴性对照,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 孵育 2h。

[0080] (6) 洗板 :同 (2),拍干。

[0081] (7) 加羊抗鼠酶标二抗 :羊抗鼠 IgG-HRP 以封闭液稀释 (1:5000),100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 孵育 1h。

[0082] (8) 洗板 :同 (2),拍干。

[0083] (9) 加显色液 (100 μ L 10mg/mL 的四甲基联苯胺和 25 μ L 0.65% H_2O_2 溶于 9.875mL CPBS) :100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 作用 15min。

[0084] (10) 终止反应 :加浓度为 2M 的硫酸溶液终止显色反应,50 μ L/孔。

[0085] (11) 测定 :酶标仪测定 OD_{450} 值,以空白对照调零,以阴性血清作为对照,以待测孔 OD_{450} 值大于或等于阴性孔的 2.1 倍定为阳性。

[0086] 步骤 4 :汞单克隆抗体杂交瘤细胞株的建立

[0087] 将骨髓瘤细胞和小鼠脾细胞混合,1000rpm 离心 10 分钟,倾去上清液。细胞沉降在离心管底部,使底部细胞充分混合,混合均匀后,加 1mL 质量分数为 50 的 PEG,45s 加完。用 10mL 吸管在 90s 内加 20-30mL 预热至 37 $^{\circ}$ C 的不完全 DMEM 培养基,先慢后快。然后于 37 $^{\circ}$ C 水浴中反应 10 分钟,再在 1000rpm 离心 10 分钟。收取离心好的细胞,倾去上清液,用含有 ICR 小鼠细胞的 HAT 培养基将细胞悬浮,最后体积约 100mL,以 200 μ L/孔加入 96 孔细胞培养板中。随后将细胞培养板放入 37 $^{\circ}$ C,5% CO_2 培养箱中培养。五天后,用 HT 培养基置换出一半 HAT 培养基,继续于 37 $^{\circ}$ C,5% CO_2 培养箱中培养。定期观察细胞状态。细胞融合后,待细胞长出肉眼可见的群落时 (约占培养孔孔底的 1/4),采用间接非竞争 ELISA 对所有细胞孔进行初筛。

[0088] 采用有限稀释法,将已检测为阳性的杂交瘤细胞计数,用无菌移液器轻轻吹打使细胞悬浮并分散均匀,依各孔细胞的不同个数分别系列稀释不同的倍数,在 8 个无菌青霉素小瓶中进行系列稀释,共 8 个稀释梯度,充分混合均匀,将稀释好的细胞悬液加入到 96 孔细胞培养板中培养,每个稀释梯度加 8 个细胞孔 (约 300 μ L 细胞悬液 / 孔)。在 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中培养 4 ~ 5 天后,于显微镜下观察细胞克隆情况,注意记录各孔细胞生长情况并标记单克隆细胞孔。7-10 天后,细胞上清液采用相同步骤的间接 ELISA 和间接竞争 ELISA 检测是否呈现阳性,对不完全呈现阳性的细胞孔应再次克隆化。经过 1 ~ 3 次克隆化操作,直至所有克隆化细胞孔检测阳性率为 100%时,即可确定已获得分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0089] 实施例 2

[0090] 汞酶联免疫检测试剂盒特异性评价

[0091] 本实施例选择了常见的一些重金属离子进行交叉反应率测定,考察汞酶联免疫检

测试剂盒特异性。选定常见的金属离子如 Pb^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cd^{2+} 的作为竞争物,进行交叉反应性研究。计算各反应的抑制中浓度 IC_{50} 值,以抗体对汞的 IC_{50} 与对竞争物的 IC_{50} 的比值作为其交叉反应率 (CR%), 如下列公式所示。

[0092]

$$\text{CR}\% = \frac{\text{汞的 } \text{IC}_{50}}{\text{竞争物的 } \text{IC}_{50}} \times 100\%$$

[0093] 按照发明内容中间接竞争酶联免疫吸附测定方法的具体实验步骤进行操作。以浓度为 0.1, 1, 10, 20, 50, 100, 500, 1000 $\mu\text{g/L}$ Hg^{2+} 标准溶液以及浓度为 0.01, 0.1, 1, 5, 10, 50mg/L 的 Pb^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cd^{2+} 系列标准溶液作为样品加入酶标板中,测定板中各孔的 OD_{450} 的值。根据抑制曲线产生 50% 抑制或结合的各竞争物浓度 IC_{50} (mg/L), 比较它们对抗体的亲和性。

[0094] 交叉反应率的高低决定了它们对 Hg^{2+} 检测干扰程度的大小,即方法对 Hg 的特异性。其他 10 种金属对抗体的最大抑制率均低于 50%, 交叉反应率均小于 0.52%。实验结果表明,本发明构建的试剂盒对汞具有良好的特异性, 对他金属离子的亲合力比较弱。

[0095] 实施例 3

[0096] 酸性汗液提取纺织品样品的汞

[0097] 步骤 1: 酸性汗液的配置

[0098] 按照国家标准 GB/T 17593.2-2007 《纺织品重金属的测定第 2 部分电感耦合等离子体原子发射光谱法》中 4.1 规定配置人工酸性汗液: 1000mL 水中加入 0.5g L- 组氨酸盐酸盐 - 水合物 ($\text{C}_6\text{H}_9\text{O}_2\text{N}_3 \cdot \text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$), 5.0g 氯化钠, 2.2g 磷酸二氢钠二水合物 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 配成酸性汗液, 用 4g/L 的氢氧化钠溶液调整试液 pH 值至 5.5。

[0099] 步骤 2: 酸性汗液提取纺织品

[0100] 按照国家标准 GB/T 17593.2-2007 《纺织品重金属的测定第 2 部分电感耦合等离子体原子发射光谱法》中 6.1 规定, 模拟人体穿着条件用人工酸性汗液提取纺织品中的重金属: 从样品上随机剪取试样, 剪碎至 $5\text{mm} \times 5\text{mm}$ 以下、混匀。称取 4g 试样置于具塞三角烧瓶中, 加入 80mL 酸性汗液, 摇振使得织物纤维充分浸湿, 放入恒温水浴振荡器中振荡 60min 后取出, 冷却至室温, 用玻璃砂芯漏斗过滤样品溶液后, 用于检测酸性汗液萃取的汞含量。

[0101] 步骤 3: 样品溶液 pH 值调节

[0102] 根据条件实验结果, 采用 1M 氢氧化钠溶液对提取后的含汞溶液进行 pH 调节, 至最佳 pH7.4, 不改变溶液的体积。

[0103] 实施例 4

[0104] 试剂盒检测方法应用于模拟酸性汗液提取纺织品中汞的测定

[0105] 步骤 1: 加标样品与实际样品

[0106] 取一定量的三种纺织品, 按照实施例 3 中的方法前处理提取后, 在与建立标准检测曲线时条件一致的情况下, 进行加标回收实验, 加标溶度分别为 0.02, 0.2, 1, 2mg/kg。

[0107] 取 20 种实际样品采用实施例 3 中的制备方法进行前处理, 待测。

[0108] 步骤 2: 方法测定

[0109] 采用实施例 1 中的方法对加标样品和实际样品进行测定。加标样品测试结果列于如表 1。

[0110] 表 1 汞测定试剂盒的准确度与精密度试验结果

[0111]

添加浓度 (mg/kg)	测量浓度 (mg/kg)	回收率 (%)	批内变异系数 (%)	批间变异系数 (%)
0.02	0.0224	111.8	7.20	8.70
0.2	0.22	108.9	5.60	6.40
1	1.12	111.6	0.84	2.30
2	2.06	102.8	1.40	3.40

[0112] 以添加回收率考察试剂盒测定方法的准确度,以批内批间变异系数考察试剂盒测定方法的精密度。从表可以看出,四种浓度的回收率在 102.8 ~ 111.8% 之间,平均回收率为 109.0%,这也表明酸性汗液对酶联免疫试剂盒的基质干扰可以忽略。批间变异系数比批内变异系数稍大,但均小于 10%,这可能是不同酶标板所带来的误差,不影响测定结果。试剂盒对汞的检测具有良好的准确度与精密度,满足检测要求。

[0113] 20 个实际样品同时采用仪器方法与本发明的试剂盒方法进行测定。其中仪器方法的阳性样品检出 3 个,检出溶度分别为 0.018、0.016 和 0.009mg/kg,试剂盒方法阳性样品检出 4 个,对应浓度分别为 0.013、0.020、0.013 和 0.037。试剂盒与仪器方法测试结果无显著性差异。

[0114] 根据实验,确定酶联免疫试剂盒对水溶液中 Hg 的测定低限为 0.1 μ g/L,对于纺织品中酸性汗液萃取汞检测,按照 4g 样品 :80mL 酸性汗液的比例,测定低限为 10 μ g/kg (0.01mg/kg),远低于 Oeko-tex standard 100 规定的 0.02mg/kg。满足纺织品中汞的测定要求。

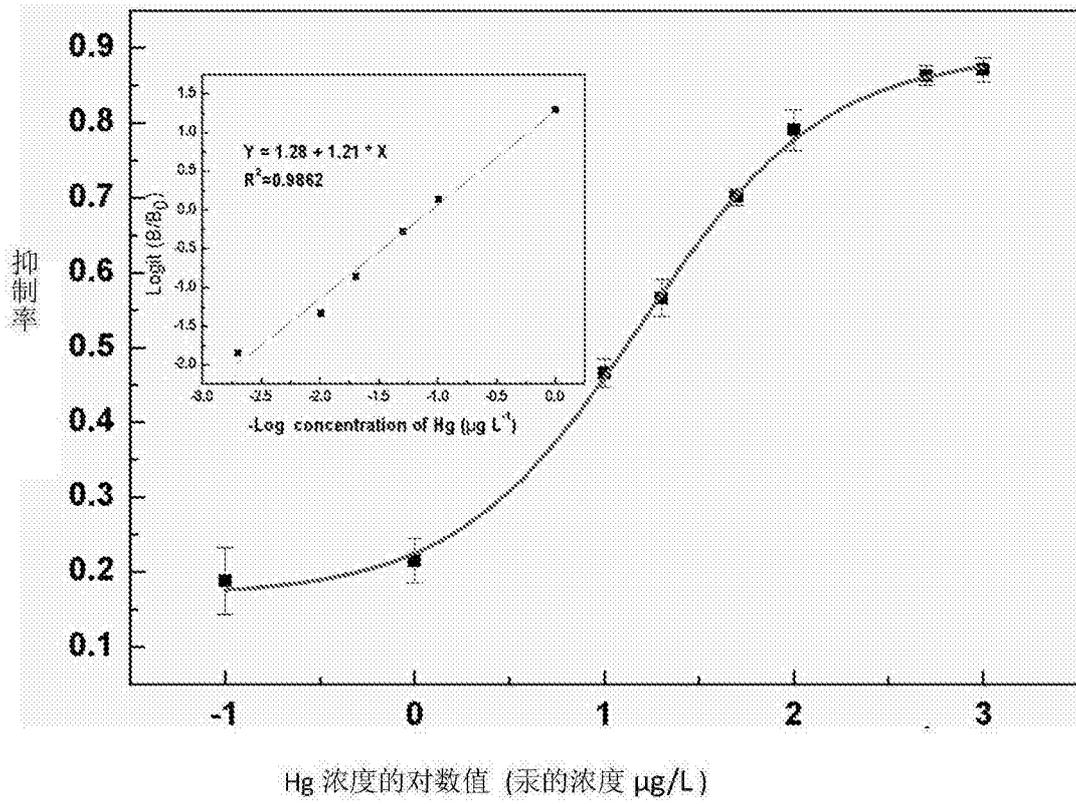


图 1

专利名称(译)	一种基于汞单克隆抗体检测纺织品中汞含量的间接竞争ELISA试剂盒及其检测方法		
公开(公告)号	CN105388280A	公开(公告)日	2016-03-09
申请号	CN201510772550.X	申请日	2015-11-12
[标]申请(专利权)人(译)	江苏省检验检疫科学技术研究院 南京大学 江苏出入境检验检疫局工业产品检测中心		
申请(专利权)人(译)	江苏省检验检疫科学技术研究院 南京大学 江苏出入境检验检疫局工业产品检测中心		
当前申请(专利权)人(译)	江苏省检验检疫科学技术研究院 南京大学 江苏出入境检验检疫局工业产品检测中心		
[标]发明人	丁友超 何欢 蔡建和 郑凯 孙成 何重辉		
发明人	丁友超 何欢 蔡建和 郑凯 孙成 何重辉		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/53		
代理人(译)	蒋海军		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种基于汞单克隆抗体检测纺织品中汞含量的间接竞争ELISA试剂盒及其检测方法，属于重金属检测技术领域。本发明以Hg-ITCBE(异硫氰基-苯甲基-乙二胺四乙酸)-KLH(钥孔戚血蓝蛋白)为免疫抗原对小鼠进行免疫反应得到检测汞的单克隆抗体，基于汞单克隆抗体的间接竞争酶联免疫吸附测定方法适用于以模拟酸性汗液提取的纺织品中汞的快速、准确、高通量测定，实现了纺织品中汞的生物测定方法，并构建试剂盒，为儿童轻纺品的安全检测提供技术支持，具有效价高、亲和力强、检测灵敏度高、操作简便等优点。

