



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101445557 B

(45) 授权公告日 2012. 07. 25

(21) 申请号 200810239765. 5

1-4.

(22) 申请日 2008. 12. 16

(73) 专利权人 中国农业大学

地址 100094 北京市海淀区圆明园西路 2 号

(72) 发明人 王保民 高巍 南铁贵 何素平

赵洪伟 刘威 谭桂玉 谭伟明

李召虎

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

公司 11245

代理人 关畅 任风华

J. B. Delehanty 等. Identification of Important Residues in Metal-Chelate Recognition by Monoclonal Antibodies. 《Biochemistry》. 2003, 第 42 卷 (第 48 期), 摘要, 第 14177 页图 1.

J. B. Delehanty 等. Identification of Important Residues in Metal-Chelate Recognition by Monoclonal Antibodies. 《Biochemistry》. 2003, 第 42 卷 (第 48 期), 摘要, 第 14177 页图 1.

审查员 贾涛

(51) Int. Cl.

C07K 14/765(2006. 01)

C07K 14/795(2006. 01)

C07K 14/77(2006. 01)

C07K 16/44(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101016337 A, 2007. 08. 15, 全文.

CN 1763103 A, 2006. 04. 26, 摘要, 实施例

权利要求书 2 页 说明书 8 页 附图 1 页

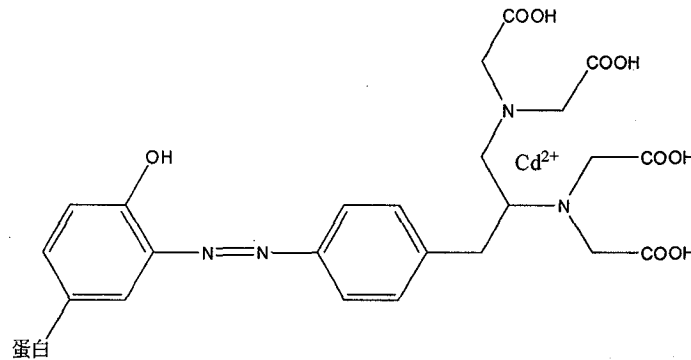
(54) 发明名称

镉离子抗原及其制备方法与应用

(57) 摘要

本发明公开了一种镉离子抗原及其制备方法与应用。该镉离子抗原,是螯合剂与载体蛋白的偶联物与镉离子形成的络合物。该制备镉离子抗原的方法,包括如下步骤:(1)将螯合剂重氮化,得到重氮化的螯合剂;(2)将载体蛋白与所述重氮化的螯合剂混合,进行偶联反应,得到载体蛋白与重氮化的螯合剂的偶联物;(3)将镉离子与所述偶联物混合,进行络合反应,得到镉离子抗原。利用本发明的方法能方便快捷地获得镉离子抗原,成本低,效果好。用本发明方法制得的完全抗原进行免疫得到的抗体的特异性好、最低检测限值低。因此,本发明方法及由该方法获得的抗原在镉离子的酶联免疫检测中会有广阔的应用前景。

1. 一种镉离子抗原,是整合剂与载体蛋白的偶联物与镉离子形成的络合物;所述镉离子抗原的结构式如下:



2. 根据权利要求1所述的镉离子抗原,其特征在于:所述整合剂与载体蛋白的偶联物是按照如下方法制备的:先将所述整合剂重氮化,得到重氮化的整合剂,再将所述重氮化的整合剂与所述载体蛋白进行偶联,得到所述偶联物;

所述偶联物与镉离子形成的络合物是按照如下方法制备的:将所述镉离子的溶液与所述偶联物混合,进行络合反应,得到所述络合物。

3. 根据权利要求2所述的镉离子抗原,其特征在于:所述重氮化的方法包括如下步骤:将所述整合剂溶于酸溶液中,再向其中加入亚硝酸盐,进行重氮化反应,得到所述重氮化的整合剂;所述重氮化反应的条件为:温度为0-5℃、避光;

所述偶联的方法包括如下步骤:将所述重氮化的整合剂与所述载体蛋白混合,进行偶联反应,得到所述偶联物;所述重氮化的整合剂与所述载体蛋白的摩尔比为15-30:1;所述偶联反应条件为:温度为22-25℃,pH值为9.0-10.0,反应时间为10-16小时;

所述偶联物与所述镉离子的摩尔比为1:1-5;所述络合反应的条件为:温度为22-25℃,pH值为9.0-10.0,反应时间为10-16小时。

4. 根据权利要求1-3中任一所述的镉离子抗原,其特征在于:所述整合剂为对氨基苯甲基乙二胺四乙酸。

5. 一种制备权利要求1所述镉离子抗原的方法,包括如下步骤:

(1) 将整合剂重氮化,得到重氮化的整合剂;

(2) 将载体蛋白与所述重氮化的整合剂混合,进行偶联反应,得到载体蛋白与重氮化的整合剂的偶联物;

(3) 将镉离子与所述偶联物混合,进行络合反应,得到镉离子抗原。

6. 根据权利要求5所述的方法,其特征在于:所述重氮化的方法包括如下步骤:将所述整合剂溶于酸溶液中,再向其中加入亚硝酸盐,进行重氮化反应,得到所述重氮化的整合剂;所述重氮化反应的条件为:温度为0-5℃,避光;

所述偶联反应条件为:温度为22-25℃,pH值为9.0-10.0,反应时间为10-16小时;所述重氮化的整合剂与所述载体蛋白的摩尔比为15-30:1;

所述络合反应的条件为:温度为22-25℃,pH值为9.0-10.0,反应时间为10-16小时;所述偶联物与所述镉离子的摩尔比为1:1-5。

7. 根据权利要求5或6所述的方法,其特征在于:所述整合剂为对氨基苯甲基乙二胺四乙酸。

8. 由权利要求 1-4 中任一所述镉离子抗原制备得到的抗体。
9. 权利要求 1-4 中任一所述镉离子抗原和 / 或权利要求 8 中所述抗体在制备检测镉离子的酶联免疫试剂盒中的应用。

镉离子抗原及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种镉离子抗原及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 镉是一种能在人体和环境中长期蓄积的有害重金属物质,自从 20 世纪五六十年代在日本发现由慢性镉中毒导致的“痛痛病”以来,环境镉污染的健康危害问题受到了全世界的关注。

[0003] 目前,重金属镉的分析方法有原子吸收光谱法、电感耦合等离子体发射光 / 质谱法、X- 射线荧光光谱法及电位溶出分析法等。这些方法都需要昂贵的仪器设备,检测费用高,且不能用于现场检测;此外,重金属的毒性与它的物理状态和氧化状态有关,而上述仪器分析法大多无法得到重金属的氧化状态或者演变信息,只能得到某一重金属元素的总量,而这种总量分析有时与毒性并不成正比;因此,上述仪器检测法有很大的局限性。与仪器分析法相比,免疫分析法具有快速、简便、实时、易于进行现场检测、样品前处理简单、灵敏度高、选择性强、适合于高通量分析等优点,而且免疫分析法至少减少 50% 以上的成本;例如酶联免疫检测试剂盒可以快速检测某一特定物质的含量,但要把免疫分析方法应用到检测重金属镉离子,需要制备出高效的抗体,得到理想的抗体的一个必要条件是要有高效的抗原。

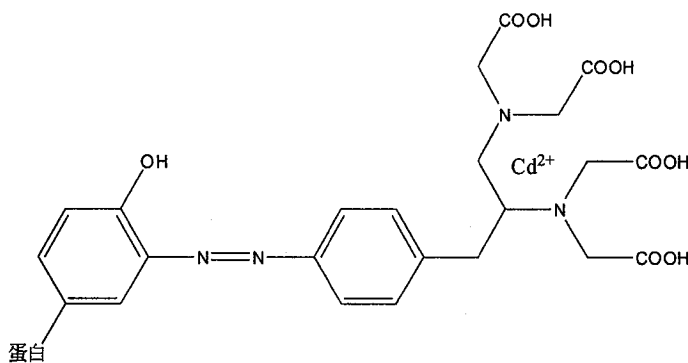
发明内容

[0004] 本发明的一个目的是提供一种镉离子抗原。

[0005] 本发明所提供的镉离子抗原,是螯合剂与载体蛋白的偶联物与镉离子形成的络合物。

[0006] 所述镉离子抗原的结构式具体如下:

[0007]



[0008] 其中,所述螯合剂与载体蛋白的偶联物可以按照如下方法制备的:先将所述螯合剂重氮化,得到重氮化的螯合剂,再将所述重氮化的螯合剂与所述载体蛋白进行偶联,得到所述偶联物;所述偶联物与镉离子形成的络合物可以按照如下方法制备的:将所述镉离子

的溶液与所述偶联物混合,进行络合反应,得到所述络合物。

[0009] 所述偶联的方法包括如下步骤:将所述重氮化的螯合剂与所述载体蛋白混合,进行偶联反应,得到所述偶联物;

[0010] 本发明的另一个目的是提供一种制备镉离子抗原的方法。

[0011] 本发明所提供的制备镉离子抗原的方法,包括如下步骤:

[0012] (1) 将螯合剂重氮化,得到重氮化的螯合剂;

[0013] (2) 将载体蛋白与所述重氮化的螯合剂混合,进行偶联反应,得到载体蛋白与重氮化的螯合剂的偶联物;

[0014] (3) 将镉离子与所述偶联物混合,进行络合反应,得到镉离子抗原。

[0015] 其中,所述重氮化的方法包括如下步骤:将所述螯合剂溶于酸溶液中,再向其中加入亚硝酸盐,进行重氮化反应,得到所述重氮化的螯合剂;所述螯合剂与所述酸的摩尔比优选为 5.7 : 1000;所述重氮化反应的条件为:温度为 0-5℃、避光;所述温度优选为 4℃;所述酸可以为盐酸、硫酸、过氯酸或氟硼酸等无机酸。所述亚硝酸盐与所述螯合剂的摩尔比大于等于 1.2 : 1,小于等于 1.4 : 1。

[0016] 所述偶联中,所述重氮化的螯合剂与所述载体蛋白的摩尔比为 15-30 : 1,优选为 20 : 1;所述偶联反应条件为:温度为 22-25℃,pH 值为 9.0-10.0,反应时间为 10-16 小时;所述偶联反应条件优选为:温度为 25℃,pH 值为 9.5,反应时间为 12 小时;所述载体蛋白可为牛血清白蛋白、人血清白蛋白、兰素蛋白或卵清白蛋白。所述将载体蛋白与所述螯合剂混合前,先将所述蛋白溶解于 pH 为 9.0-9.6 的碳酸盐缓冲液中。

[0017] 所述偶联物与所述镉离子的摩尔比为 1 : 1-5,优选为 1 : 2;所述络合反应的条件为:温度为 22-25℃,pH 值为 9.0-10.0,反应时间为 10-16 小时;所述络合反应的条件优选为:温度为 25℃,pH 值为 9.5,反应时间为 12 小时。

[0018] 上述螯合剂具体可为对氨基苯甲基乙二胺四乙酸。

[0019] 上述任一所述镉离子抗原制备得到的抗体属于本发明的保护范围。

[0020] 上述任一所述镉离子抗原和 / 或由所述镉离子抗原制备得到的抗体在制备检测镉离子的酶联免疫试剂盒中的应用也属于本发明的保护范围。

[0021] 所述在重氮化螯合剂与载体蛋白偶联后,及所述偶联物与所述镉离子络合后,均还可包括透析的步骤,去除未被螯合的离子及其它小分子。

[0022] 利用本发明的方法能方便快捷地获得镉离子抗原,成本低,效果好。用本发明方法制得的镉离子抗原进行免疫得到的抗体的特异性好、最低检测限值低(即检测极限高)。因此,本发明方法及由该方法获得的抗原在镉离子的酶联免疫检测中会有广阔的应用前景。

附图说明

[0023] 图 1 为完全抗原合成反应图。

[0024] 图 2 为 Cd-EDTA 间接 ELISA 法标准曲线。

具体实施方式

[0025] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0026] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从生物公司购买。

[0027] 对氨基苯甲基乙二胺四乙酸（对氨基苯甲基 EDTA）购自美国 Sigma 公司 07097, 羊抗小鼠 IgG-HRP 购自北京中杉金桥生物技术有限公司 ZB-2305。

[0028] 实施例 1、镉 - 对氨基苯甲基乙二胺四乙酸 - 牛血清白蛋白（镉 - 对氨基苯甲基 EDTA-BSA）完全抗原的制备

[0029] 一、完全抗原的制备

[0030] 完全抗原的制备如图 1 所示。

[0031] 1、对氨基苯甲基 EDTA 半抗原的重氮化

[0032] (1) 称取 4.53mg 的固体对氨基苯甲基 EDTA, 充分溶解于 2.0mL 1.0M HCL 中; 对氨基苯甲基 EDTA 与 HCL 的摩尔比为 5.7 : 1000。

[0033] (2) 4℃避光条件下磁力搅拌, 并每间隔 30s 向溶液中滴加 15 μL 浓度为 1% (质量百分含量) 的 NaNO₂ 溶液; 所述 NaNO₂ 的加入量是过量的, 即所述 NaNO₂ 与对氨基苯甲基 EDTA 的摩尔比大于等于 1.27 : 1。

[0034] (3) 用淀粉 - 碘化钾试纸检验, 在试纸变蓝后, 继续反应 15 分钟, 得到重氮化半抗原溶液 (即重氮化对氨基苯甲基乙二胺四乙酸)。

[0035] 2、重氮化的对氨基苯甲基 EDTA 半抗原与蛋白质进行偶联

[0036] (1) 用 2.0 毫升 pH 9.6 的碳酸盐缓冲液溶解 BSA 19.68mg;

[0037] (2) 边搅拌, 边逐滴加入步骤 1 得到的重氮化半抗原, 直至将步骤 1 得到的所有重氮化半抗原溶液的一半加完为止; 所述重氮化半抗原 (即重氮化对氨基苯甲基乙二胺四乙酸) 与所述 BSA 的摩尔比为 20 : 1。

[0038] (3) 不断调节 pH 至 9.5, 25℃下搅拌反应 12 小时;

[0039] (4) 将产物置于透析袋中, 用 pH 为 9.5 的 PBS 透析 2 天, 每天换三次透析液, 得到透析产物, 透析产物中含有重氮化半抗原与 BSA 的偶联物。

[0040] 3、重金属离子镉的络合

[0041] (1) 称取 4.12mg CdCl₂, 用超纯水配制成 1.0M CdCl₂ 溶液;

[0042] (2) 边搅拌, 边将一半的 CdCl₂ 溶液逐滴加入步骤 2 中得到的透析产物中; 所述重氮化半抗原与 BSA 的偶联物与所述镉离子的摩尔比为 1 : 2;

[0043] (3) 在 pH 值为 9.5、温度为 25℃的条件下, 搅拌反应过夜 (即 12 小时);

[0044] (4) pH 为 9.5 的 PBS 透析 2 天, 每天换 3 次透析液, 以除去未联结的镉离子、有机溶剂及其它杂质; 透析产物即为镉离子抗原的溶液。

[0045] (5) 将透析产物分装, 经 -40℃冷冻后, 真空干燥, 放 -20℃冰箱中。

[0046] 二、完全抗原的制备

[0047] 1、对氨基苯甲基 EDTA 半抗原的重氮化

[0048] (1) 称取 4.53mg 的固体对氨基苯甲基 EDTA, 充分溶解于 2.0mL1M HCL 中; 对氨基苯甲基 EDTA 与 HCL 的摩尔比为 5.7 : 1000。

[0049] (2) 2℃避光条件下磁力搅拌, 并每间隔 30s 向溶液中滴加 15 μL 浓度为 1% (质量百分含量) 的 NaNO₂ 溶液; 所述 NaNO₂ 的加入量是过量的, 即所述 NaNO₂ 与对氨基苯甲基 EDTA 的摩尔比大于等于 1.2 : 1。

[0050] (3) 用淀粉 - 碘化钾试纸检验, 在试纸变蓝后, 继续反应 15 分钟, 得到重氮化对氨基苯甲基 EDTA 溶液。

[0051] 2、重氮化的对氨基苯甲基 EDTA 与蛋白质进行偶联

[0052] (1) 用 2.0 毫升 pH 值为 9.2 的碳酸盐缓冲液溶解 BSA 29.35mg ;

[0053] (2) 边搅拌,边逐滴加入步骤 1 得到的重氮化半抗原,直至将步骤 1 得到的所有重氮化半抗原溶液的一半加完为止 ;所述重氮化对氨基苯甲基 EDTA 与所述 BSA 的摩尔比为 15 : 1。

[0054] (3) 调节 pH 至 9.2,22℃ 搅拌反应 10 小时 ;

[0055] (4) 将产物置于透析袋中,用 pH 为 9.5 的 PBS 透析 2 天,每天换三次透析液,得到透析产物,透析产物中含有重氮化半抗原与 BSA 的偶联物。

[0056] 3、重金属离子镉的络合

[0057] (1) 称取 2.23mg CdCl_2 ,用超纯水配制成 1M CdCl_2 溶液 ;

[0058] (2) 边搅拌,边将一半的 CdCl_2 溶液逐滴加入步骤 2 中得到的透析产物中 ;所述重氮化半抗原与 BSA 的偶联物与所述镉离子的摩尔比为 1 : 1 ;

[0059] (3) 在 pH 值为 9.2、温度为 22℃ 的条件下,搅拌反应 10 小时 ;

[0060] (4) pH 值为 9.5 的 PBS 透析 2 天,每天换 3 次透析液,以除去未联结的镉离子、有机溶剂及其它杂质 ;透析产物即为镉离子抗原 (即镉 - 对氨基苯甲基 EDTA-BSA 完全抗原) 溶液。

[0061] (5) 将透析产物分装,经 -40℃ 冷冻后,真空干燥,放 -20℃ 冰箱中。

[0062] 三、完全抗原的制备

[0063] 1、对氨基苯甲基 EDTA 半抗原的重氮化

[0064] (1) 称取 4.53mg 的固体对氨基苯甲基 EDTA,充分溶解于 2.0mL 1M HCL 中 ;对氨基苯甲基 EDTA 与 HCL 的摩尔比为 5.7 : 1000。

[0065] (2) 5℃ 避光条件下磁力搅拌,并每间隔 30s 向溶液中滴加 15 μL 浓度为 1% (质量百分含量) 的 NaNO_2 溶液 ;所述 NaNO_2 的加入量是过量的,即所述 NaNO_2 与对氨基苯甲基 EDTA 的摩尔比 1.4 : 1。

[0066] (3) 用淀粉 - 碘化钾试纸检验,在试纸变蓝后,继续反应 15 分钟,得到重氮化半抗原溶液 (即重氮化对氨基苯甲基 EDTA)。

[0067] 2、重氮化的对氨基苯甲基 EDTA 半抗原与蛋白质进行偶联

[0068] (1) 用 2.0 毫升 pH 值为 9.8 的碳酸盐缓冲液溶解 BSA15.23mg ;

[0069] (2) 边搅拌,边逐滴加入步骤 1 得到的重氮化半抗原,直至将步骤 1 得到的所有重氮化半抗原溶液的一半加完为止 ;所述重氮化对氨基苯甲基 EDTA 与所述 BSA 的摩尔比为 30 : 1。

[0070] (3) 调节 pH 至 9.8,25℃ 搅拌反应 16 小时 ;

[0071] (4) 将产物置于透析袋中,用 pH 为 9.5 的 PBS 透析 2 天,每天换三次透析液,得到透析产物,透析产物中含有重氮化半抗原与 BSA 的偶联物。

[0072] 3、重金属离子镉的偶联

[0073] (1) 称取 7.44mg CdCl_2 ,用超纯水配制成 1M CdCl_2 溶液 ;

[0074] (2) 边搅拌,边将一半的 CdCl_2 溶液逐滴加入步骤 2 中得到的透析产物中 ;所述重氮化半抗原与 BSA 的偶联物与所述镉离子的摩尔比为 1 : 4 ;

[0075] (3) 在 pH 值为 9.8、温度为 25℃ 的条件下,搅拌反应 16 小时 ;

[0076] (4) pH 为 9.5 的 PBS 透析 2 天, 每天换 3 次透析液, 以除去未联结的镉离子、有机溶剂及其它杂质; 透析产物即为镉-对氨基苯甲基 EDTA-BSA 完全抗原溶液。

[0077] (5) 将透析产物分装, 经 -40°C 冷冻后, 真空干燥, 放 -20°C 冰箱中。

[0078] 实施例 2、完全抗原的应用

[0079] 一、用抗原制备抗体

[0080] 分别用实施例 1 中的抗原制备抗体。

[0081] (1) 取 8-10 周龄的 Ba1 b/C 小白鼠为实验动物。实验中基础免疫剂量为 0.25-2.0mg/kg, 加强免疫剂量为 0.5-2.0mg/kg。

[0082] (2) 基础免疫: 用体积比为 1 : 1 的 PBS 甘油稀释实施例 1 中得到的镉-对氨基苯甲基 EDTA-BSA 完全抗原, 无菌过滤器过滤后加入等体积弗氏完全佐剂, 充分乳化, 直到滴入水中不扩散。用乳化好的完全抗原采用腹腔及背部皮下多点注射动物, 注射剂量为 0.1mg 抗原 / 只。

[0083] (3) 基础免疫 3-4 周后, 进行加强免疫; 用体积比为 1 : 1 的 PBS 甘油稀释实施例 1 中得到的镉-对氨基苯甲基 EDTA-BSA 完全抗原, 无菌过滤器过滤, 加入等体积不完全弗氏佐剂, 充分乳化, 直到滴入水中不扩散; 腹腔与背部轮换注射, 注射剂量为 0.1mg 抗原 / 只。

[0084] (4) 每隔 3-4 周, 按照步骤 (3) 中所述方法进行加强免疫; 从第三次免疫开始, 每次免疫后第 8-10 天, 从小鼠眼眶采血, 测效价, 待效价大于 1 : 10000 后, 采血, 分离出抗血清, 即得抗体。

[0085] 二、抗体效果检测

[0086] 本实验中所用的各种缓冲液如下:

[0087] (1) 包被缓冲液: 0.05M、pH 9.6 的碳酸盐缓冲液;

[0088] (2) PBS: 含 0.9% (质量百分含量) NaCl 的 0.1M 磷酸盐缓冲液, pH 7.5;

[0089] (3) 样品稀释液 PBSTG: 含有 0.1% (体积百分含量) 吐温-20 和 1g/L 明胶的 PBS;

[0090] (4) 柠檬酸盐-磷酸盐缓冲液: 含 0.01M 的柠檬酸三钠和 0.03M 的 Na_2HPO_4 , pH 5.5;

[0091] (5) 底物缓冲液: 在 10.0mL 含有 2.0mg/mL OPD 的柠檬酸盐-磷酸盐缓冲液中加入 4 μL 的 30% (体积百分含量) H_2O_2 溶液;

[0092] (6) 终止缓冲液: 2.0M 的硫酸溶液;

[0093] (7) 洗涤液: 每 1L 溶液中含有 8.0g NaCl、0.2g KH_2PO_4 、2.96g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、1.0mL Tween-20, 溶剂为蒸馏水。

[0094] 将实验一中制备的抗体分别进行如下检测, 以实施例 1 中实验一制备的抗原及由其制备的抗体为例, 下面详细描述实验过程:

[0095] (一) 抗体抑制实验

[0096] 1、Cd-对氨基苯甲基 EDTA-BSA 包被抗原溶液的配制:

[0097] 取实施例 1 中实验一制得的 Cd-对氨基苯甲基 EDTA-BSA 包被抗原, 完全解冻后, 用包被缓冲液按 1 : 500、1 : 1000、1 : 2000、1 : 4000、1 : 8000、1 : 16000 进行梯度稀释。

[0098] 2、Cd-EDTA 螯合物标准品溶液的配制

[0099] (1) 称取 36.54mg EDTA, 充分溶解于蒸馏水中, 并使用 NaOH 调节 pH 至 10.0;

[0100] (2) 称取 19.1mg CdCl_2 , 溶解于蒸馏水中, 并逐滴加入到上述 (1) 得到的溶液中, 磁力搅拌, 充分整合;

[0101] (3) 将步骤 (2) 中的溶液定容至 19.1mL, 得到 2.78mg/ml 的 Cd^{2+} -EDTA 溶液;

[0102] (4) 用样品稀释液将步骤 (3) 中的 CdCl_2 -EDTA 溶液配成浓度为 5560ng/mL 的 Cd^{2+} -EDTA 供试标准品溶液。

[0103] 3、Cd-对氨基苯甲基 EDTA-BSA 抗血清稀释液的配制

[0104] 取用实施例 1 中实验一所得的抗原制备的抗血清, 用样品稀释液按 1 : 1000、1 : 2000、1 : 4000、1 : 8000、1 : 16000 进行稀释。

[0105] 4、IgG-HRP 购自北京中杉金桥生物技术有限公司, 用样品稀释液稀释按 1 : 1000 进行稀释。

[0106] 5、抗体的抑制检测实验

[0107] (1) 包被原的包被: 将步骤 1 中制得的不同浓度的包被抗原溶液加入到酶标板中, 每孔 100 μL , 37°C 温育 3h; 用洗涤液洗板 4 次, 甩干;

[0108] (2) 向实验孔中加入步骤 2 中制得的供试标准品溶液, 每孔 50 μL ; 向对照孔中加入 50 μL 样品稀释液;

[0109] (3) 分别向实验孔和对照孔中加入步骤 3 得到的不同浓度的抗血清稀释液, 每孔 50 μL ; 37°C 温育 30min; 用洗涤液洗板 4 次, 甩干;

[0110] (4) 向实验孔和对照孔中加入 100 μL 用样品稀释液稀释的 IgG-HRP, 37°C 温育 30min; 用洗涤液洗板 4 次, 甩干;

[0111] (5) 向实验孔和对照孔中加入 100 μL 底物缓冲液, 15 分钟后, 再向每孔加入 50 μL 2.0M 的硫酸溶液终止反应;

[0112] (6) 在 492nm 下测定吸光值;

[0113] 实验设 3 次重复, 结果取平均数, 结果如表 1 所示。

[0114] 表 1、抑制实验结果

[0115]

抗体	1:1000		1:2000		1:4000		1:8000		1:16000	
	A_{100}^a	A_0^b	A_{100}^a	A_0^b	A_{100}^a	A_0^b	A_{100}^a	A_0^b	A_{100}^a	A_0^b
1:1000	1.82	2.81	1.41	2.59	0.90	2.22	0.46	0.94	0.29	0.77
1:2000	1.09	2.29	0.68	2.02	0.42	1.41	0.25	0.82	0.15	0.50
1:4000	0.53	1.35	0.36	1.06	0.22	0.78	0.14	0.46	0.12	0.29
1:8000	0.29	0.65	0.21	0.39	0.15	0.27	0.11	0.23	0.09	0.17
1:16000	0.15	0.26	0.14	0.20	0.10	0.16	0.09	0.12	0.08	0.09

[0116] 注: ^a 添加 50 μL 100ng/mL Cd-EDTA 竞争显色值 A_{100}

[0117] ^b 不添加 Cd-EDTA 竞争显色值 A_0

[0118] 表 1 表明, 当包被抗原与抗血清浓度适宜时, 就有抑制现象, 即 100ng/mL 孔与 0ng/mL 孔的吸光度度值有差别, 100ng/mL 孔吸光度值小, 0ng/mL 孔吸光度值高; 当包被抗

原稀释度为 1 : 2000, 抗血清稀释度为 1 : 4000 时, A_{100} 与 A_0 的吸收值之差最大, 此时抑制为最好。说明, 本发明的抗原能制备出抑制较好、检测极限较高的抗体。

[0119] 实施例 1 中实验二和实验三得到的抗原制备得到的抗体的检测结果同上述效果相同。

[0120] (二) 建立 Cd-EDTA 标准曲线

[0121] 按照实验 (一) 步骤 2 中所述方法制备 Cd-EDTA 标准品, 用样品稀释液将 Cd-EDTA 标准品稀释成不同浓度 (ng/ml), 依次为 2000ng/ml、666ng/ml、222ng/ml、74.1ng/ml、24.7ng/ml、8.2ng/ml、2.7ng/ml。

[0122] (1) 包被原的包被: 将实验 (一) 中制得的稀释倍数为 1 : 2000 的包被抗原 (实施例 1 中实验一得到的抗原) 溶液加入到酶标板中, 每孔 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 温育 3h; 用洗涤液洗板 4 次, 甩干;

[0123] (2) 向实验孔中分别加入 7 个不同浓度的标准品溶液, 每孔 50 μ L; 向对照孔中加入 50 μ L 样品稀释液;

[0124] (3) 分别向实验孔和对照孔中加入实验 (一) 中制得的稀释倍数为 1 : 4000 的抗血清稀释液, 每孔 50 μ L; 37 $^{\circ}$ C 温育 30min; 用洗涤液洗板 4 次, 甩干;

[0125] (4) 向实验孔和对照孔中加入 100 μ L 稀释倍数为 1 : 1000 的 IgG-HRP, 37 $^{\circ}$ C 温育 30min; 用洗涤液洗板 4 次, 甩干;

[0126] (5) 向实验孔和对照孔中加入 100 μ L 底物缓冲液, 15 分钟后, 再向每孔加入 50 μ L 2.0M 的硫酸溶液终止反应;

[0127] (6) 在 492nm 下测定吸光值;

[0128] (7) 绘制标准曲线: 用不同浓度 (ng/ml) 的标准品溶液作为 X 轴, 百分吸光度值为 Y 轴, 绘制标准曲线图。

[0129] 用所获得的每个浓度的标准品溶液的吸光度平均值 (B) 除以对照孔的吸光度值 (B_0) 再乘以 100%, 得到百分吸光度值。

[0130]

$$\text{百分吸光度值 (\%)} = \frac{B}{B_0} \times 100\%$$

[0131] 公式中 B 为标准品溶液的平均吸光度值, B_0 为添加水的对照孔的平均吸光度值。

[0132] 实验设 3 次重复, 结果取平均数, 得到的标准曲线图如图 2 所示。表明, 其灵敏度 (IC_{50}) 为 52.464ng/mL, 检测范围是 1.7ng/mL-1225ng/mL 的 Cd^{2+} 。表明, 由本发明抗原制得的抗体的效果好。

[0133] 以实施例 1 中实验二和实验三得到的抗原为包被原建立的标准曲线的结果同上述效果相同。

[0134] (三) 抗体特异性检测

[0135] 1、与 $CdCl_2$ -EDTA 类似的螯合物的制备

[0136] 除所加入的金属及其加入量不同外, $MgSO_4$ -EDTA 螯合物、 $ZnSO_4$ -EDTA 螯合物、 $MnCl_2$ -EDTA 螯合物、 $Ca(NO_3)_2$ -EDTA 螯合物、 $FeSO_4$ -EDTA 螯合物的制备方法与实验 (一) 中 $CdCl_2$ -EDTA 螯合物的制备方法相同; 其中, $MgSO_4$ 的用量为 9.46mg、 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 的用量为 18.85mg、 $MnCl_2$ 的用量为 26mg、 $Ca(NO_3)_2$ 的用量为 108mg、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 的用量为 19.9mg。

[0137] 用样品稀释液将上述螯合物分别稀释成如下浓度:10000ng/ml、5000ng/ml、2500ng/ml、1250ng/ml、625ng/ml、312.5ng/ml、156.25ng/ml。

[0138] 2、各自建立标准曲线,测定抑制中浓度 IC_{50} 。

[0139] 标准曲线建立方法与实验(二)中所述一致。

[0140] 交叉反应率(%) = (引起50%抑制 Cd-EDTA 的浓度 / 引起50%抑制的 Cd-EDTA 类似物浓度) × 100%

[0141] 实验设3次重复,结果取平均数,结果如表2所示。表2表明本实施例步骤一中制得的 Cd-EDTA 抗体与其它金属离子 EDTA 螯合物的交叉反应率很小,说明由本发明抗原制备的抗体的特异性好。

[0142] 用实施例1中实验二和实验三得到的抗原制备得到的抗体的特异性检测结果同上述效果相同。

[0143] 表2 Cd-EDTA 抗体的特异性检测

[0144]	分析物	IC_{50} (ng/mL)	交叉反应率(%)
[0146]	Cd-EDTA	52.464	100
[0147]	Mg-EDTA	> 10000	< 1
[0148]	Zn-EDTA	> 10000	< 1
[0149]	Mn-EDTA	> 10000	< 1
[0150]	Ca-EDTA	> 10000	< 1
[0151]	Fe-EDTA	> 10000	< 1
[0152]	EDTA	72548	< 1

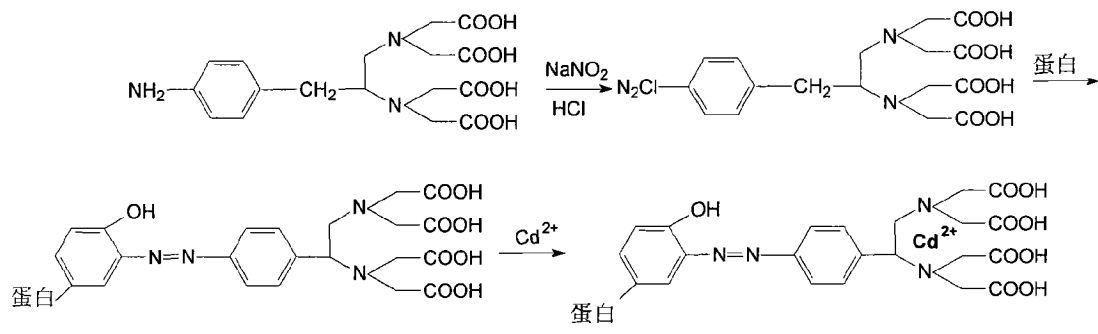


图 1

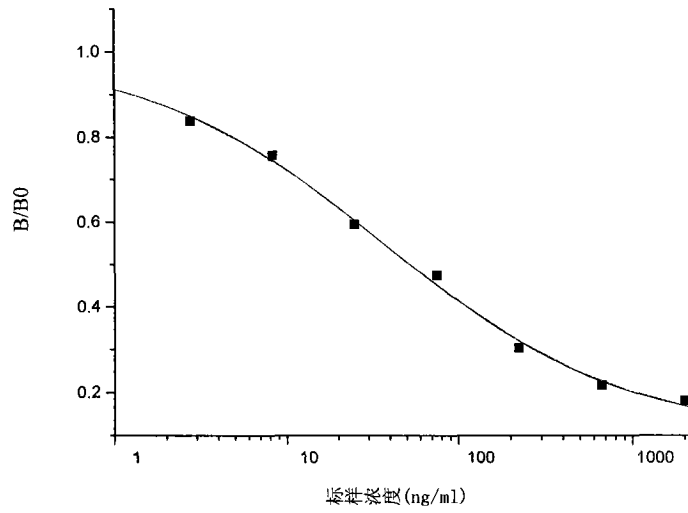


图 2

专利名称(译)	镉离子抗原及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN101445557B	公开(公告)日	2012-07-25
申请号	CN200810239765.5	申请日	2008-12-16
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
[标]发明人	王保民 高巍 南铁贵 何素平 赵洪伟 刘威 谭桂玉 谭伟明 李召虎		
发明人	王保民 高巍 南铁贵 何素平 赵洪伟 刘威 谭桂玉 谭伟明 李召虎		
IPC分类号	C07K14/765 C07K14/795 C07K14/77 C07K16/44 G01N33/53		
代理人(译)	关畅		
审查员(译)	贾涛		
其他公开文献	CN101445557A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种镉离子抗原及其制备方法与应用。该镉离子抗原，是螯合剂与载体蛋白的偶联物与镉离子形成的络合物。该制备镉离子抗原的方法，包括如下步骤：(1)将螯合剂重氮化，得到重氮化的螯合剂；(2)将载体蛋白与所述重氮化的螯合剂混合，进行偶联反应，得到载体蛋白与重氮化的螯合剂的偶联物；(3)将镉离子与所述偶联物混合，进行络合反应，得到镉离子抗原。利用本发明的方法能方便快捷地获得镉离子抗原，成本低，效果好。用本发明方法制得的完全抗原进行免疫得到的抗体的特异性好、最低检测限值低。因此，本发明方法及由该方法获得的抗原在镉离子的酶联免疫检测中会有广阔的应用前景。

抗体	1:1000		1:2000		1:4000		1:8000		1:16000	
抗原	A ₁₀₀ ^a	A ₀ ^b	A ₁₀₀ ^a	A ₀ ^b	A ₁₀₀ ^a	A ₀ ^b	A ₁₀₀ ^a	A ₀ ^b	A ₁₀₀ ^a	A ₀ ^b
1:1000	1.82	2.81	1.41	2.59	0.90	2.22	0.46	0.94	0.29	0.77
1:2000	1.09	2.29	0.68	2.02	0.42	1.41	0.25	0.82	0.15	0.50
1:4000	0.53	1.35	0.36	1.06	0.22	0.78	0.14	0.46	0.12	0.29
1:8000	0.29	0.65	0.21	0.39	0.15	0.27	0.11	0.23	0.09	0.17
1:16000	0.15	0.26	0.14	0.20	0.10	0.16	0.09	0.12	0.08	0.09