



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105044006 B

(45)授权公告日 2018.04.03

(21)申请号 201510412924.7

(22)申请日 2015.07.14

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105044006 A

(43)申请公布日 2015.11.11

(73)专利权人 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 21/31(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 27/62(2006.01)

G01N 1/28(2006.01)

G01N 27/447(2006.01)

(56)对比文件

WO 94/22490 A1,1994.10.13,

CN 103472231 A,2013.12.25,

CN 101139396 A,2008.03.12,

JP 特开昭50-45687 A,1975.04.23,

审查员 郑义智

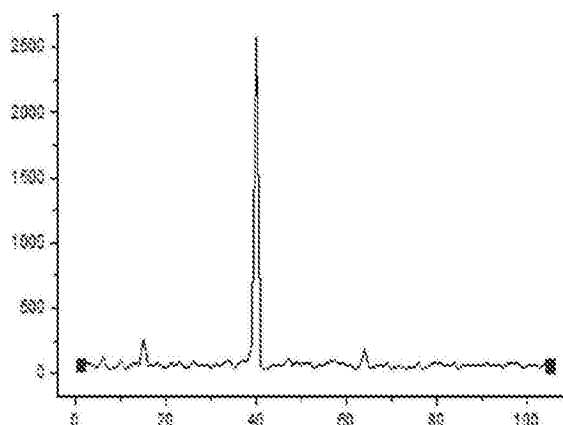
权利要求书2页 说明书18页 附图1页

(54)发明名称

一种汞-IgG螯合物及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明公开了一种汞-IgG螯合物及其制备方法和应用,该汞-IgG螯合物是汞离子与IgG通过巯基或/和半胱氨酸残基螯合而成。本发明建立了汞-IgG螯合物的定性定量检测方法,以便定量检测汞-IgG螯合物在评价一个地区汞污染程度的应用。通过定量检测一个地区人群血清中汞-IgG螯合物可以间接反映这个地区人群受汞污染的情况,从而间接反映这个地区汞污染程度。本发明建立的汞-IgG螯合物定量检测方法其准确度大大提高,并且使检测的重复性得到大大提高。



1. 一种汞-IgG螯合物,汞离子与IgG通过巯基或/和半胱氨酸残基螯合而成;

该汞-IgG螯合物的制备方法,包括以下步骤:

A) 汞与IgG的螯合反应:在人源的IgG或按照生物学方法重组的IgG中加入汞离子进行螯合反应,得到反应溶液;

B) 汞-IgG螯合物的提取:采用免疫亲和层析法,去除反应溶液中未反应的IgG以及多余的汞离子,即得汞-IgG螯合物;

所述步骤B)具体如下:

(1) 溶解样品:向经过步骤A)得到的反应溶液中加入生理盐水,使汞-IgG螯合物复溶;

(2) 平衡层析柱:使用稀释缓冲液冲洗层析柱的管路,在层析柱中装入能与IgG特异性结合的填料,装柱后,继续使用稀释缓冲液平衡层析柱;

(3) 上样:待层析柱平衡后,用稀释缓冲液稀释步骤(1)中样品,然后上柱,IgG与填料特异性结合;

(4) 洗脱:使用稀释缓冲液冲洗层析柱至基线平衡,然后使用0.05-0.1mol/L的磷酸盐溶液进行洗脱;

(5) 收集:收集经过步骤(4)洗脱后的洗脱液,收集完毕后立即使蛋白复性;

(6) 透析:将步骤(5)中的收集的洗脱液,装透析袋,用ddH₂O透析除盐,换水三次后,4℃透析过夜,收集样本;

(7) 平衡层析柱: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汞特异性结合的填料,装柱后再用稀释缓冲液平衡层析柱;

(8) 上样:待层析柱平衡后,用稀释缓冲液稀释步骤(6)中样本,然后上柱;

(9) 洗脱:使用稀释缓冲液冲洗层析柱至基线平衡,然后使用0.5-1.0mol/L的磷酸盐溶液进行洗脱;

(10) 收集:收集经过步骤(9)洗脱后的洗脱液,收集完毕后立即使蛋白复性;

(11) 透析:将步骤(10)中的收集的洗脱液,装透析袋,用ddH₂O透析除盐,换水三次后,4℃透析过夜,收集样本,即得汞-IgG螯合物。

2. 根据权利要求1所述的汞-IgG螯合物,其特征在于,其制备方法步骤B)之后还包括步骤C):对汞-IgG螯合物的鉴定;

其中,步骤C)中具体如下:

(1) 制备胶床:以琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶中的一种作为介质制备胶床;

(2) 加样:取步骤B)中纯化得到的汞-IgG螯合物,加入稀释缓冲液,并混匀,然后加样于样品槽中;

(3) 电泳:连接电泳板,进行电泳;

(4) 检测:在胶床上找出含汞的蛋白条带,将该蛋白条带取出,将蛋白条带复溶,然后再采用ICP-MS法、AAS法或ELISA法检测是否含有汞以及检测汞的含量。

3. 一种如权利要求1所述的汞-IgG螯合物在制备检测血样中汞-IgG螯合物的试剂或试剂盒中的应用。

4. 一种至少包括如权利要求1所述的汞-IgG螯合物作为标准品的试剂盒。

5. 根据权利要求4所述的试剂盒,其特征在于,还包括包被液,该包被液含有可捕获IgG的蛋白或可捕获金属汞的物质。

6. 一种定量检测汞-IgG螯合物的方法, 其特征在于, 以已知含量的权利要求1所述的汞-IgG螯合物作为标准品, 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、提纯汞-IgG螯合物与酶联免疫结合法、提纯汞-IgG螯合物与原子吸收光谱结合法、提纯汞-IgG螯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。

一种汞-IgG螯合物及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及检测领域,更具体地说,涉及一种汞-IgG螯合物及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] IgG主要由脾、淋巴结中的浆细胞合成和分泌,以单体形式存在。在个体发育过程中机体合成IgG的年龄要晚于IgM,在出生后第3个月开始合成,3~5岁接近成年人水平。IgG是血清中主要的抗体成分,约占血清总Ig的75%。IgG是唯一能通过胎盘的Ig,在自然被动免疫中起重要作用。此外IgG还具有调理吞噬、ADCC和结合SPA等作用。由于IgG上述特点,IgG在机体免疫防护中起着主要的作用,大多数抗菌、抗病毒、抗毒素抗体都属于IgG类抗体。应用对麻疹、甲型肝炎等有免疫力的产妇或正常人丙种或胎盘球蛋白可进行人工被动免疫,能有效地预防相应的传染性疾病。

[0003] 汞(Mercury,Hg)是一种无处不在的重金属,广泛应用于工业、农业、医药业,是一种非常重要的环境污染物。2011年,美国毒物和疾病登记署(United States Agency for Toxic Substances and Disease Registry,ATSDR)已将其列入物质优先列表内(Substance Priority List),而世界卫生组织(World Health Organization,WHO)也早已将其列为10大最易引起健康问题的化学品之一。在美国,Cr与Hg、Cd、Pb被认为是四大环境污染物,严重影响着人们的身体健康。常见的汞职业暴露人群包括从事金属冶炼、开采金矿、烧煤、电产业和木材生产的人群,而对于普通人群主要通过食入汞污染的海鲜、饮入汞污染水源、吸入燃料燃烧或蒸发的汞蒸气。此外,含汞化妆品的接触、填充汞合金牙科填充物、接触疫苗防腐剂中的乙基汞、含汞杀虫剂的接触都是常见的汞暴露方式,汞与人们的生活密切相关。2009年,国家健康与营养测试调查中发现(National Health and Nutrition Examination Study,NHANES),2%的美国育龄期妇女体内的汞都超标。汞被认为是对人体及其有害的,会影响人体的多个组织、器官及系统,包括心血管系统、呼吸系统、神经系统、内分泌系统、消化系统、泌尿系统、免疫系统等,对人体危害极大。

[0004] 目前可以运用多种方法检测出血汞含量,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,但仍存在一定缺陷。

[0005] 关于汞中毒,特别是慢性汞中毒的评价,仅能通过检测血汞含量,间接反应人体内的循环汞含量,无法进一步评估汞对于机体功能的损伤程度,而随着科学技术的飞速发展,汞与人体的关系也日益紧密,因而寻找一种可以从机体功能角度评价汞中毒,特别是慢性汞中毒对于机体的损害程度的评价方式日益重要。

发明内容

[0006] 针对汞污染严重的问题,本发明的目的在于提供一种汞-IgG螯合物及其制备方法,并建立汞-IgG螯合物的定性、定量检测方法,以便定量检测汞-IgG螯合物在评价一个地区汞污染程度的应用。通过定量检测一个地区人群血清中汞-IgG螯合物可以间接反映这个

地区人群受汞污染的情况,从而间接反映这个地区汞污染程度。

[0007] 本发明解决其技术问题所采用的技术方案是:提供一种汞-IgG螯合物,汞离子与IgG通过巯基或/和半胱氨酸残基螯合而成。

[0008] 本发明还提供一种上述的汞-IgG螯合物的制备方法,包括以下步骤:

[0009] A) 汞与IgG的螯合反应:在人源的IgG中加入汞离子进行螯合反应,得到反应溶液;

[0010] B) 纯化汞-IgG螯合物的提取:采用免疫亲和层析法,去除反应溶液中未反应的IgG以及多余的汞离子,即得汞-IgG螯合物。

[0011] 其中,体外合成法中所述步骤B) 具体如下:

[0012] (1) 溶解样品:向经过步骤A) 得到的反应溶液中加入生理盐水,使汞-IgG螯合物复溶;

[0013] (2) 平衡层析柱:使用稀释缓冲液冲洗层析柱的管路,在层析柱中装入能与IgG特异性结合的填料,装柱后,继续使用稀释缓冲液平衡层析柱;

[0014] (3) 上样:待层析柱平衡后,用稀释缓冲液稀释步骤(1) 中样品,然后上柱,IgG与填料特异性结合;

[0015] (4) 洗脱:使用稀释缓冲液冲洗层析柱至基线平衡,然后使用0.05-0.1mol/L的磷酸盐溶液进行洗脱;

[0016] (5) 收集:收集经过步骤(4) 洗脱后的洗脱液,收集完毕后立即使蛋白复性;

[0017] (6) 透析:将步骤(5) 中的收集的洗脱液,装透析袋,用ddH₂O透析除盐,换水三次后,4℃透析过夜,收集样本;

[0018] (7) 平衡层析柱: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汞特异性结合的填料,装柱后再用稀释缓冲液平衡层析柱;

[0019] (8) 上样:待层析柱平衡后,用稀释缓冲液稀释步骤(6) 中样本,然后上柱;

[0020] (9) 洗脱:使用稀释缓冲液冲洗层析柱至基线平衡,然后使用0.5-1.0mol/L的磷酸盐溶液进行洗脱;

[0021] (10) 收集:收集经过步骤(9) 洗脱后的洗脱液,收集完毕后立即使蛋白复性;

[0022] (11) 透析:将步骤(10) 中的收集的洗脱液,装透析袋,用ddH₂O透析除盐,换水三次后,4℃透析过夜,收集样本,即得汞-IgG螯合物。

[0023] 其中,上述汞-IgG螯合物的制备方法,还包括步骤C):对汞-IgG螯合物的鉴定;

[0024] 其中,步骤C) 中具体如下:

[0025] (1) 制备胶床:以琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶中的一种作为介质制备胶床;

[0026] (2) 加样:取步骤B) 中提取纯化得到的汞-IgG螯合物,加入稀释缓冲液,并混匀,然后加样于样品槽中;

[0027] (3) 电泳:连接电泳板,进行电泳;

[0028] (4) 检测:在胶床上找出含汞的蛋白条带,将该蛋白条带取出,将蛋白条带复溶,然后再采用ICP-MS法、AAS法或ELISA法检测是否含有汞以及检测汞的含量。

[0029] 本发明还提供一种如上述的汞-IgG螯合物在制备检测人体内汞-IgG螯合物的试剂或试剂盒中的应用。

[0030] 本发明还提供一种至少包括如上述的汞-IgG螯合物作为对照品的试剂盒。

[0031] 优选地,该试剂盒中还包括包被液,该包被液含有可捕获IgG的蛋白或捕获金属汞

的物质。

[0032] 本发明还提供一种定量检测汞-IgG螯合物的方法,以已知含量的上述的汞-IgG螯合物作为对照品,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、提纯汞-IgG螯合物与酶联免疫结合法、提纯汞-IgG螯合物与原子吸收光谱结合法、提纯汞-IgG螯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。

[0033] 实施本发明的汞-IgG螯合物及其制备方法和应用,具有以下有益效果:

[0034] 1. 本发明首次体外合成或从全血中提取汞-IgG螯合物;

[0035] 2. 本发明首次提出汞-IgG螯合物可用于制备检测血样中汞-IgG螯合物的试剂或试剂盒中的应用。

[0036] 3. 本发明建立了汞-IgG螯合物的定性定量检测方法,以便定量检测汞-IgG螯合物在评价一个地区汞污染程度的应用。通过定量检测一个地区人群血清中汞-IgG螯合物可以间接反映这个地区人群受汞污染的情况,从而间接反映这个地区汞污染程度。本发明建立的汞-IgG螯合物定量检测方法其准确度大大提高,并且使检测的重复性得到大大提高。

附图说明

[0037] 图1为本发明所述的汞-IgG螯合物的非变性电泳条带图;

[0038] 图2为本发明所述的汞-IgG螯合物的同步辐射X线电泳条带的荧光分析图;其中,图1中,M为Marker,5为汞-IgG螯合物;图2中,横坐标为蛋白条带位置,纵坐标为该蛋白条带中汞金属能量。

具体实施方式

[0039] 下面,结合具体实施方式,对本发明做进一步描述:

[0040] 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,所用试剂、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试剂或可以通过市购方式获得:

[0041] 提取试剂为PEG溶液、硼酸盐缓冲液等(采用PEG法);

[0042] 胶床介质为琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶中的一种;

[0043] 本发明中的所述能与IgG特异性结合的填料,为表面附有能捕获IgG的蛋白的硅胶或树脂;

[0044] 本发明中的能捕获IgG的蛋白(抗IgG抗体),包括但不限于兔Anti-人类IgG H&L,其品牌为Abcam、型号为ab6715;

[0045] 本发明中的能与汞特异性结合的填料,为表面附有能捕获汞的物质的硅胶或树脂;

[0046] 本发明中的能捕获汞的物质,包括但不限于鼠抗Hg mAb,购买自巴傲德生物技术公司(BioWorld Inc)、货号为AP7014;

[0047] 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中的一种;

[0048] 底物为甲基联苯胺(TMB)溶液;

[0049] 洗涤液为含有 KH_2PO_4 0.2mg/mL、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.90mg/mL、NaCl 8.0mg/mL、KCl

0.2mg/mL、0.5% Tween-20的pH为7.4的0.15M PBS溶液；

[0050] 封闭液为1%-5%牛血清白蛋白或脱脂奶粉；

[0051] 稀释缓冲液为含1.5mg/mL Na_2CO_3 、2.93mg/mL NaHCO_3 的PH为9.6的0.05M磷酸盐缓冲液；

[0052] 酶标抗体为HRP酶标抗体；

[0053] 终止液为：将21.7mL的2M H_2SO_4 定容至200mL的ddH₂O中；

[0054] 洗脱液为含1-2mg/mL木瓜蛋白酶的PH为8.0的0.1mol/L Tris-HCl缓冲液；

[0055] 酸化剂为硝酸；

[0056] 上样缓冲液为含有1M Tris-HCl (pH 6.8) 15.5mL、1% 溴酚蓝2.5mL、ddH₂O 7mL、甘氨酸25mL的Sample buffer (5X)；

[0057] 电泳缓冲液为含Tris 3mg/mL、甘氨酸14.4mg/mL的PH为6.8的ddH₂O溶液。

[0058] 本发明还提供一种汞-IgG螯合物的制备方法，包括以下步骤：

[0059] A) 汞与IgG的螯合反应：在人源的IgG或按照生物学方法重组的IgG中加入汞离子进行螯合反应，得到反应溶液；

[0060] B) 纯化汞-IgG螯合物的提取：采用免疫亲和层析法，去除反应溶液中未反应的IgG以及多余的汞离子，即得汞-IgG螯合物，具体步骤如下：

[0061] (1) 溶解样品：向经过步骤A)得到的反应溶液中加入生理盐水，使汞-IgG螯合物复溶

[0062] (2) 平衡层析柱：使用稀释缓冲液冲洗层析柱的管路，在层析柱中装入能与IgG特异性结合的填料，装柱后，继续使用稀释缓冲液平衡层析柱；

[0063] (3) 上样：待层析柱平衡后，用稀释缓冲液稀释步骤(1)中样品，然后上柱，IgG与填料特异性结合；

[0064] (4) 洗脱：使用稀释缓冲液冲洗层析柱至基线平衡，然后使用0.05-0.1mol/L的磷酸盐溶液进行洗脱；

[0065] (5) 收集：收集经过步骤(4)洗脱后的洗脱液，收集完毕后立即使蛋白复性；

[0066] (6) 透析：将步骤(5)中的收集的洗脱液，装透析袋，用ddH₂O透析除盐，换水三次后，4℃透析过夜，收集样本；

[0067] (7) 平衡层析柱：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汞特异性结合的填料，装柱后再用稀释缓冲液平衡层析柱；

[0068] (8) 上样：待层析柱平衡后，用稀释缓冲液稀释步骤(6)中样本，然后上柱；

[0069] (9) 洗脱：使用稀释缓冲液冲洗层析柱至基线平衡，然后使用0.5-1.0mol/L的磷酸盐溶液进行洗脱；

[0070] (10) 收集：收集经过步骤(9)洗脱后的洗脱液，收集完毕后立即使蛋白复性；

[0071] (11) 透析：将步骤(10)中的收集的洗脱液，装透析袋，用ddH₂O透析除盐，换水三次后，4℃透析过夜，收集样本，即得汞-IgG螯合物；

[0072] C) 对汞-IgG螯合物的鉴定，具体步骤如下：

[0073] (1) 制备胶床：以琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶中的一种作为介质制备胶床；

[0074] (2) 加样：取步骤B)中提取纯化得到的汞-IgG螯合物，加入稀释缓冲液，并混匀，然后加样于样品槽中；

[0075] (3)电泳:连接电泳板,进行电泳;

[0076] (4)检测:在胶床上找出含汞的蛋白条带,将该蛋白条带取出,将蛋白条带复溶,然后再采用ICP-MS法、AAS法或ELISA法检测是否含有汞以及检测汞的含量。

[0077] 本发明还提供一种至少包括如上述的汞-IgG螯合物作为对照品的试剂盒。

[0078] 优选地,该试剂盒中还包括包被液,该包被液含有可捕获IgG的蛋白或可捕获金属汞的物质。

[0079] 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。

[0080] 一种检测血样中汞-IgG螯合物的试剂盒,包括:含有可捕获IgG的蛋白的包被液、封闭液、洗涤液、作为二抗的可捕获汞的物质、酶标抗体、底物、终止液、稀释缓冲液、上样缓冲液、阳性对照、阴性对照等。

[0081] 一种检测血样中汞-IgG螯合物的试剂盒,包括:含有可捕获IgG的蛋白的包被液、封闭液、洗涤液、洗脱液、上样缓冲液、阳性对照、阴性对照等。

[0082] 一种检测血样中汞-IgG螯合物的试剂盒,包括:含有可捕获IgG的蛋白的包被液、封闭液、洗涤液、洗脱液、上样缓冲液、酸化剂、过氧化氢、标准品、阴性对照等。

[0083] 一种检测血样中汞-IgG螯合物的试剂盒,包括:作为提纯全血中IgG所需提取试剂、复溶液、含有可捕获汞的物质的包被液、封闭液、洗涤液、酶标抗体、底物、终止液、稀释缓冲液、上样缓冲液、阳性对照、阴性对照等。

[0084] 一种检测血样中汞-IgG螯合物的试剂盒,包括:作为提纯全血中IgG所需提取试剂、复溶液、上样缓冲液、阳性对照、阴性对照等。

[0085] 一种检测血样中汞-IgG螯合物的试剂盒,包括:作为提纯全血中IgG所需提取试剂、上样缓冲液、复溶液、酸化剂、过氧化氢、阳性对照、阴性对照等。

[0086] 一种检测血样中汞-IgG螯合物的试剂盒,包括:含有可捕获IgG的蛋白的包被液、胶床介质、复溶液、上样缓冲液、溶解胶床上含汞的蛋白条带所需液体、含有可捕获汞的物质的包被液、封闭液、洗涤液、酶标抗体、底物、终止液、稀释缓冲液、阳性对照、阴性对照等。

[0087] 一种检测血样中汞-IgG螯合物的试剂盒,包括:作为提纯全血中IgG所需提取试剂、胶床介质、复溶液、上样缓冲液、溶解胶床上含汞的蛋白条带所需液体、阳性对照、阴性对照等。

[0088] 一种检测血样中汞-IgG螯合物的试剂盒,包括:作为提纯全血中IgG所需提取试剂、胶床介质、复溶液、上样缓冲液、溶解胶床上含汞的蛋白条带所需液体、酸化剂、过氧化氢、阳性对照、阴性对照等。

[0089] 上述几种试剂盒中,所述阳性对照为标准品,即螯合有重金属汞的IgG螯合物或螯合有重金属汞的BSA螯合物;所述阴性对照为稀释缓冲液。

[0090] 上述试剂盒用于检测螯合汞的IgG,以提高检测的准确性,重复性,并使之在临床中得到推广。

[0091] 本发明还提供一种定量检测汞-IgG螯合物的方法,以已知含量的上述的汞-IgG螯合物作为对照品,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、提纯汞-IgG螯合物与酶联免疫结合法、提纯汞-IgG螯合物与原子吸收光谱结合法、提纯汞-IgG螯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。在本发明中,

用检测汞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。

[0092] 其中,上述定量检测汞-IgG螯合物的方法中采用的试剂如下:

[0093] 方法一:酶联免疫法(ELISA法)检测汞-IgG螯合物,按照如下步骤检测:

[0094] 1) 将能够捕获IgG的物质,如人IgG抗体包被于固相载体上:用稀释缓冲液稀释抗IgG Ab至500000-4000000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;

[0095] 2) 从循环系统取全血,作待检样品,1000rpm离心5-8分钟,离心弃去沉淀;

[0096] 3) 封闭:移去稀释缓冲液,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入以1%-5%牛血清白蛋白或脱脂奶粉作为封闭液,37℃放置1小时,移去封闭液,并用洗涤液进行洗涤,洗涤完成后,ELISA板于36.5-37.5℃放置1-2小时;

[0097] 4) 加待检样品,并且温育:加入步骤2)中的待检样品、以已知含量的汞-IgG螯合物作标准品;用稀释缓冲液稀释待检样品稀释至相应倍数,即稀释10-40倍,加入微孔中,37℃作用1-2小时;

[0098] 5) 加入可以捕获汞的物质,并且温育:移去待检样品,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入用稀释缓冲液稀释与可以捕获汞的物质或能与汞反应形成抗原抗体复合物的抗Hg Ab,37℃作用1-2小时,使抗Hg Ab与IgG上的金属汞反应;

[0099] 6) 酶结合物温育:移去抗汞抗体,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入用稀释缓冲液稀释的酶标抗体,使稀释的酶标抗体的浓度为2μg/ml,37℃作用1-2小时,使其与酶标抗体反应;

[0100] 7) 底物温育:移去酶标抗体,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入底物,37℃避光作用30分钟;

[0101] 8) 终止反应:滴加终止液至每一微孔;

[0102] 9) 取波长405nm,加完终止液后,将ELISA板置于酶标仪上分别读取待检样品组和标准品的OD值,通过标准品绘制标准曲线,求得待检样品的含量(也可不使用酶标仪,直接通过染色情况进行定性检测)。

[0103] 该方法利用ELISA原理,可以将全血中的特异性IgG提取出来,提取出来的IgG上部分螯合有重金属汞,而这部分IgG上的汞可以被抗汞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,可以在仪器下读出OD值,而不含有螯合金属汞的IgG,则不会被抗汞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金属汞(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IgG上螯合的金属汞。

[0104] 方法二:酶联免疫与原子吸收光谱结合法(ELISA法+AAS法)检测汞-IgG螯合物按照如下步骤检测:

[0105] 1) 将能够捕获IgG的物质,如人IgG抗体包被于固相载体上:用稀释缓冲液稀释抗IgG Ab至500000-4000000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;

[0106] 2) 从循环系统取全血,作待检样品,1000rpm离心5-8分钟,离心弃去沉淀;

[0107] 3) 封闭:移去包被液,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入以1%-5%牛血清

白蛋白或脱脂奶粉作为封闭液,37℃放置1小时,移去封闭液,并用洗涤液进行洗涤,洗涤完成后,ELISA板于36.5-37.5℃放置1-2小时;

[0108] 4) 加待检样品,并且温育:加入步骤2)中的待检样品、以已知含量的汞-IgG螯合物作标准品;用稀释缓冲液稀释待检样品稀释至相应倍数,即稀释10-40倍,加入微孔中,37℃作用1-2小时;

[0109] 5) 洗脱:移去待检样品,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,用洗脱液洗脱1-3小时。

[0110] 6) 检测:从ELISA微孔中取样,于原子吸收光谱仪检测螯合于IgG上的汞,并绘制标准曲线,读出相应数值;

[0111] 该实施例利用ELISA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螯合于IgG上的汞,由于溶液中仅含有IgG,且所用试剂中不含任何重金属(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IgG上螯合的金属汞。

[0112] 方法三:酶联免疫与电感耦合等离子体质谱结合法(ELISA法+ICP-MS法)检测汞-IgG螯合物按照如下步骤检测:

[0113] 1) 将能够捕获IgG的物质,如人IgG抗体包被于固相载体上:用稀释缓冲液稀释抗IgG Ab至500000-4000000倍,加入ELISA板微孔中,4℃过夜10-40小时,或37℃水浴1-3小时,储存冰箱;

[0114] 2) 从循环系统取全血,作待检样品,1000rpm离心5-8分钟,离心弃去沉淀;

[0115] 3) 封闭:移去稀释缓冲液,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入以1%-5%牛血清白蛋白或脱脂奶粉作为封闭液,37℃放置1小时,移去封闭液,并用洗涤液进行洗涤,洗涤完成后,ELISA板于36.5-37.5℃放置1-2小时;

[0116] 4) 加待检样品,并且温育:加入步骤2)中的待检样品、以已知含量的汞-IgG螯合物作标准品;用稀释缓冲液稀释待检样品稀释至相应倍数,即稀释20-80倍,加入微孔中,37℃作用1-2小时;

[0117] 5) 洗脱:移去待检样品,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,用洗脱液洗脱1-3小时。

[0118] 6) 酸化:在步骤5)中的溶液中加入酸化剂对溶液进行酸化,封口过夜,彻底酸化;

[0119] 7) 检测:加入过氧化氢,并且加热赶酸,并从ELISA试剂板中洗脱的溶液中取样,于电感耦合等离子体质谱仪下检测螯合于IgG的汞,并绘制标准曲线,读出相应数值。

[0120] 该方法在利用ELISA原理的基础上,结合电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)原理,用电感耦合等离子体质谱仪检测螯合于IgG上的汞,由于溶液中仅含有IgG,且所用试剂中不含任何重金属(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IgG上螯合的金属汞。

[0121] 方法四:提纯汞-IgG螯合物与酶联免疫结合法(提纯法+ELISA法)检测汞-IgG螯合物,按照如下步骤检测:

[0122] 1) 从全血中提取IgG:采用聚乙二醇PEG沉淀法、超速离心、分子超滤、凝胶过滤等方法采用全血提取法将血液的提纯出来的IgG复溶,得到IgG的复溶液;

[0123] 2) 将抗Hg Ab包被于固相载体上:用稀释缓冲液稀释抗Hg Ab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;

[0124] 3) 封闭:移去稀释缓冲液,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入以1%-5%牛血清白蛋白或脱脂奶粉作为封闭液,37℃放置1小时,移去封闭液,并用洗涤液进行洗涤,洗涤完成后,ELISA板于36.5-37.5℃放置1-2小时;

[0125] 4) 加待检样品,并且温育:从提取的IgG的复溶液中取样,作待检样品;以已知含量的汞-IgG螯合物作标准品;用稀释缓冲液稀释相应倍数,即稀释10-40倍,加入微孔中,37℃作用1-2小时;

[0126] 5) 酶结合物温育:移去IgG的复溶液,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入用稀释缓冲液稀释的酶标抗体,使稀释的酶标抗体的浓度为2μg/mL,37℃作用1-2小时,使其与酶标抗体反应;

[0127] 6) 底物温育:移去酶标抗体,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入底物,37℃避光作用30分钟;

[0128] 7) 终止反应:滴加终止液至每一微孔;

[0129] 8) 取波长405nm,加完终止液后,将ELISA板置于酶标仪上分别读取待检样品组和标准品的OD值,通过与标准品组比较,求得待检样品的含量(也可不使用酶标仪,直接通过染色情况进行定性检测)。

[0130] 方法五:提纯汞-IgG螯合物与原子吸收光谱结合法(提纯法+AAS法)检测血样中汞-IgG螯合物,按照如下步骤检测:

[0131] 1) 从全血中提取IgG:采用聚乙二醇PEG沉淀法、超速离心、分子超滤、凝胶过滤等方法从全血提取法将血液的提纯出来的IgG复溶,得到IgG的复溶液;

[0132] 2) 检测:从步骤1)中的复溶液中取样,于原子吸收光谱仪检测整合于IgG上的汞,并绘制标准曲线,读出相应数值。

[0133] 方法六:提纯汞-IgG螯合物与电感耦合等离子体质谱结合法(提纯法+ICP-MS法)检测汞-IgG螯合物,按照如下步骤检测:

[0134] 1) 从全血中提取IgG:采用聚乙二醇PEG沉淀法、超速离心、分子超滤、凝胶过滤等方法从全血提取法将血液的提纯出来的IgG复溶,得到IgG的复溶液;

[0135] 2) 酸化:从步骤1)中的复溶液中取样,在溶液中加入酸化剂(如硝酸)对溶液进行酸化,封口过夜,彻底酸化;

[0136] 3) 检测:加入过氧化氢,并且加热赶酸,并从溶液中取样,于电感耦合等离子体质谱仪下检测整合于IgG上的汞,并绘制标准曲线,读出相应数值。

[0137] 方法七:电泳与酶联免疫法(电泳法-ELISA法)检测汞-IgG螯合物,按照如下步骤检测:

[0138] 1) 从全血中提取IgG:采用聚乙二醇PEG沉淀法、超速离心、分子超滤、凝胶过滤等方法从全血提取法将血液的提纯出来的IgG复溶,得到IgG的复溶液;

[0139] 2) 制备胶床:根据需要选择琼脂糖凝胶或聚丙烯酰胺凝胶或SDS-聚丙烯酰胺凝胶等作为介质,制备好胶床;

[0140] 3) 加样:取步骤1)中的复溶液8μL加入2μL上样缓冲液,混匀,短暂离心;(注意此处步骤不能煮)

[0141] 4) 电泳:连接电泳板,进行电泳分离;

[0142] 5) 检测:在胶床上找出含有汞的蛋白条带,将该条带取出,经过处理后将该蛋白条带溶于液体之中,然后再利用ELISA原理检测溶于液体中的汞含量。此外,还可以利用此方法检测整合汞的IgG的等电点、分子量及含量等。

[0143] 方法八:电泳与原子吸收光谱法(电泳法-AAS法)检测汞-IgG螯合物,按照如下步骤检测:

[0144] 1) 从全血中提取IgG:采用聚乙二醇PEG沉淀法、超速离心、分子超滤、凝胶过滤等方法从全血提取法将血液的提纯出来的IgG复溶,得到IgG的复溶液;

[0145] 2) 制备胶床:根据需要选择琼脂糖凝胶或聚丙烯酰胺凝胶或SDS-聚丙烯酰胺凝胶等作为介质,制备好胶床;

[0146] 3) 加样:从步骤1)中的复溶液中取样,加入上样缓冲液,并混匀,然后加样于样品槽中;

[0147] 4) 电泳:连接电泳板,进行电泳分离;

[0148] 5) 检测:在胶床上找出含有汞的蛋白条带,将该条带取出,经过处理后将该蛋白条带溶于液体之中,然后再利用AAS原理检测溶于液体中的汞含量。此外,还可以利用此方法检测整合汞的IgG的等电点、分子量及含量等。

[0149] 方法九:电感耦合等离子体质谱结合法(电泳法-ICP-MS法)检测汞-IgG螯合物,按照如下步骤检测:

[0150] 1) 从全血中提取IgG:采用聚乙二醇PEG沉淀法、超速离心、分子超滤、凝胶过滤等方法从全血提取法将血液的提纯出来的IgG复溶,得到IgG的复溶液;

[0151] 2) 制备胶床:根据需要选择琼脂糖凝胶或聚丙烯酰胺凝胶或SDS-聚丙烯酰胺凝胶等作为介质,制备好胶床;

[0152] 3) 加样:从步骤1)中的复溶液中取样,加入上样缓冲液,并混匀,然后加样于样品槽中;

[0153] 4) 电泳:连接电泳板,进行电泳分离;

[0154] 5) 检测:在胶床上找出含有汞的蛋白条带,将该条带取出,经过处理后将该蛋白条带溶于液体之中,然后再利用ICP-MS原理检测溶于液体中的汞含量。此外,还可以利用此方法检测整合汞的IgG的等电点、分子量及含量等。

[0155] 方法七至九中的IgG可以用多种方法提纯出来(例如超速离心法,高压液相层析法,凝胶过滤层析法,凝胶电泳法,ELISA方法等),将提纯出来的IgG复溶,取一定量的IgG,利用电荷移动原理,进行电泳(electrophoresis,EP),在凝胶板(可根据需要采用不同介质)上可根据分子量、等电点等不同跑出不同的条带,寻找出富含汞的相应条带,将凝胶中的蛋白质用相应复溶剂复溶于溶液中,即可以在特定波长下检测相关IgG的含量,也可以利用ELISA、AAS、ICP-MS等原理检测出螯合于IgG上的汞含量,由于溶液中仅含有IgG,且所用试剂中不含任何重金属(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IgG上螯合的金属汞。

[0156] 实施例1:汞-IgG螯合物的制备方法,包括以下步骤:

[0157] A) 汞与IgG的螯合反应:在人源的IgG中加入汞离子进行螯合反应,得到反应溶液;

[0158] 试剂配制:

[0159] 1) 硼酸盐缓冲液(0.01M):称取0.31g硼酸溶于400mL超纯水中,用0.1M的NaOH调节

pH至9.0,定容至500mL。

[0160] 2) IgG溶液:称取4.0mg IgG溶于4.0mL 0.01M pH9.0硼酸盐缓冲液中,充分振荡溶解,配制成1.0mg/mL的蛋白溶液;

[0161] 3) 5mmol/L EDTA+200mmol/L NaHCO₃溶液:称取EDTA • 2H₂O 1.86g、NaHCO₃16.8g溶于900mL超纯水中,用1.0M NaOH调整pH至8.0定容至1000mL,高压灭菌,室温保存;

[0162] 4) ITCBE (购买自日本同仁化学研究所,货号M030)

[0163] 5) 透析袋(截留分子量14000) (Bioshop Inc)

[0164] 标准品的制备步骤:

[0165] A.标准品的配制

[0166] 1) 透析袋的处理:将透析袋放入500mL (根据烧杯体积可变换用量) 体积的5mmol/L EDTA+200mmol/L NaHCO₃溶液中,煮沸10min;倾弃EDTA/NaHCO₃液,用超纯水轻轻漂洗,再用500mL 5mmol/L EDTA煮沸10min;弃掉煮沸液,彻底用超纯水清洗,加入大量的超纯水浸泡透析袋4℃过夜。使用时,戴上手套,取出透析袋,用大量的超纯水彻底冲洗其内外表面;

[0167] 2) 取2.0mg ITCBE溶于2mL DMSO中;

[0168] 3) 称取4.0mg IgG溶于4.0mL 0.01M pH9.0硼酸盐缓冲液中,充分振荡溶解,配制成1.0mg/mL的蛋白溶液;

[0169] 4) 缓慢将步骤2制备的液体加入IgG溶液中,边滴加边震荡,于25℃,100r/min的摇床中作用24h,然后用透析袋透析24h,除去未与IgG结合的ITCBE;

[0170] 5) 将透析所得的液体用1mol/L HCl调节pH值至7.0,然后缓慢逐渐滴加80μL 1mmol/L汞离子溶液,边滴加边振荡,以免汞离子使蛋白变性沉淀;

[0171] 6) 将加好的溶液在25℃,100r/min的摇床中反应2h,用处理好的透析袋进行透析24h;

[0172] 7) 将透析好的液体于-20℃分装保存。

[0173] B) 纯化汞-IgG螯合物的提取:采用免疫亲和层析法,去除反应溶液中未反应的IgG以及多余的汞离子,即得汞-IgG螯合物,具体步骤如下:

[0174] (1) 溶解样品:向经过步骤A)得到的反应溶液中加入生理盐水,使汞-IgG螯合物复溶;

[0175] (2) 平衡层析柱:使用稀释缓冲液冲洗层析柱的管路,在层析柱中装入能与IgG特异性结合的填料,装柱后,继续使用稀释缓冲液平衡层析柱;

[0176] (3) 上样:待层析柱平衡后,用稀释缓冲液稀释步骤(1)中样品,然后上柱,IgG与填料特异性结合;

[0177] (4) 洗脱:使用稀释缓冲液冲洗层析柱至基线平衡,然后使用0.05-0.1mol/L的磷酸盐溶液进行洗脱;

[0178] (5) 收集:收集经过步骤(4)洗脱后的洗脱液,收集完毕后即使蛋白复性;

[0179] (6) 透析:将步骤(5)中的收集的洗脱液,装透析袋,用ddH₂O透析除盐,换水三次后,4℃透析过夜,收集样本;

[0180] (7) 平衡层析柱: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汞特异性结合的填料,装柱后再用稀释缓冲液平衡层析柱;

[0181] (8) 上样:待层析柱平衡后,用稀释缓冲液稀释步骤(6)中样本,然后上柱;

[0182] (9) 洗脱:使用稀释缓冲液冲洗层析柱至基线平衡,然后使用0.5-1.0mol/L的磷酸盐溶液进行洗脱;

[0183] (10) 收集:收集经过步骤(9)洗脱后的洗脱液,收集完毕后立即使蛋白复性;

[0184] (11) 透析:将步骤(10)中的收集的洗脱液,装透析袋,用ddH₂O透析除盐,换水三次后,4℃透析过夜,收集样本,即得汞-IgG螯合物

[0185] C) 对汞-IgG螯合物的鉴定,具体步骤如下:

[0186] (1) 制备胶床:以琼脂糖凝胶作为介质制备胶床;

[0187] (2) 加样:取步骤B)中8μL提取纯化得到的汞-IgG螯合物,加入2μL上样缓冲液,并混匀,然后加样于样品槽中;

[0188] (3) 电泳:连接电泳板,加入电泳缓冲液进行电泳;电泳过程中,电流为22mA恒流,环境温度为4度;至溴酚蓝移至胶底部时停止电泳;

[0189] (4) 检测:在胶床上找出含汞的蛋白条带,将该蛋白条带取出,将蛋白条带复溶,然后再采用AAS法检测是否含有汞以及检测汞的含量。

[0190] D) 检测结果

[0191] (1) 电泳结果:

[0192] 其中,图1为本发明所述的汞-IgG螯合物的非变性电泳条带图。

[0193] (2) 同步辐射X荧光分析:

[0194] 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(MCA4000)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(1mmx3mm)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。

[0195] 图2为本发明所述的汞-IgG螯合物的同步辐射X线电泳条带的荧光分析图,图中横坐标为蛋白条带位置,纵坐标为该蛋白条带中汞金属能量(含量)值。

[0196] (3) 采用石墨炉原子吸收光谱法(AAS)初步测定本实施例得到的汞-IgG螯合物中的汞含量,其含量为146.944μg/L。

[0197] 本发明一种定量检测汞-IgG螯合物的方法的检测条件的确定:

[0198] 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

[0199] 步骤如下:

[0200] (1) 将IgG Ab用稀释缓冲液按照以下配比稀释(1:500000、1:1000000、1:2000000、1:4000000),加入ELISA板微孔中,将抗IgG Ab包被于固相载体上,每个浓度包被三排,4℃过夜18小时;

[0201] (2) 移去稀释缓冲液,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,用2%牛血清白蛋白作为封闭液,37℃放置1小时,移去封闭液,并用洗涤液进行洗涤;

[0202] (3) 待检样品按以下浓度稀释 (1:10、1:20、1:40), 加入微孔中, 按照上述包被的抗 IgG Ab 浓度, 同一个浓度的抗 IgG Ab 的分别加入不同稀释度血浆, 37℃ 作用 1 小时;

[0203] (4) 移去待检样品, 并用洗涤液进行洗涤, 待洗涤完成后, 加入抗 Hg Ab, 抗 Hg Ab 按以下浓度稀释 (即 1:2500、1:5000、1:10000、1:20000), 按照每一个相同抗 IgG Ab、血清稀释浓度, 不同浓度抗 Hg Ab 各加 2 孔, 37℃ 作用 1 小时, 使抗 Hg Ab 与 IgG 上的金属汞反应;

[0204] (5) 酶标抗体选择最适工作浓度, 即 2ng/mL, 移去抗 Hg 抗体, 并用洗涤液进行洗涤, 待洗涤完成后, 加入用稀释缓冲液稀释 HRP 酶标抗体, 37℃ 作用 1 小时, 使 HRP 酶标抗体与汞-IgG 螯合物反应;

[0205] (6) 移去酶标抗体, 并用洗涤液进行洗涤, 待洗涤完成后, 加入底物, 37℃ 避光作用 30 分钟;

[0206] (7) 以与加底物液相同的速度和顺序滴加终止液至每一微孔;

[0207] (8) 取波长 405nm, 加完终止液后, 将 ELISA 板置于酶标仪上分别读取各孔 OD 值。根据各孔 OD 值数值, 选择抗 IgG Ab、抗 Hg-Ab 的最佳工作浓度以及血浆的最佳稀释倍数。

[0208] 试验中同时以所制对照品作为阳性对照, 选择 IgG 抗体+封闭+Hg 抗+酶标+底物 (即不加检测样本) 作为阴性对照 1、IgG 抗体+封闭+血浆+酶标+底物 (即不加 Hg 抗) 作为阴性对照 2、IgG 抗体+封闭+酶标+底物 (即不加检测样本和 Hg 抗) 作为阴性对照 3、IgG 抗体+封闭+血浆+Hg 抗+底物 (即不加酶标) 作为阴性对照 4, 封闭+血浆+Hg 抗+酶标+底物 (即不加 IgG 抗体) 作为空白对照 1, 只加底物及 PBS 作为空白对照 2; 检测结果见表 1-2。

[0209] 表 1: 抗 IgG Ab 和 Hg 抗体最佳工作浓度以及血浆稀释倍数的确定

[0210]

		抗 IgG Ab 浓度梯度 (1:500000)	抗 IgG Ab 浓度梯度 (1:1000000)	抗 IgG Ab 浓度梯度 (1:2000000)	抗 IgG Ab 浓度梯度 (1:4000000)
Hg 抗 1:2500	血浆 1:10	0.597	0.64	0.54	0.423
	血浆 1:20	0.633	0.685	0.559	0.463
	血浆 1:40	0.526	0.619	0.463	0.329
Hg 抗 1:5000	血浆 1:10	0.585	0.648	0.532	0.422
	血浆 1:20	0.657	0.7	0.551	0.477
	血浆 1:40	0.56	0.575	0.485	0.308
Hg 抗 1:10000	血浆 1:10	0.492	0.515	0.494	0.343
	血浆 1:20	0.532	0.607	0.5	0.417
	血浆 1:40	0.432	0.498	0.379	0.219
Hg 抗 1:20000	血浆 1:10	0.388	0.433	0.351	0.275
	血浆 1:20	0.51	0.529	0.437	0.313
	血浆 1:40	0.313	0.395	0.274	0.138

[0211] 表 2: ELISA 阳性对照及阴性对照 ELISA 检测结果

[0212]	阳性 对照	阴性对照				空白对照		
		阴 性 对照 1	阴 性 对照 2	阴性对 照 3	阴性对 照 4	空白对 照 1	空白对 照 2	空白对 照 3
OD 405	0.868	0.068	0.055	0.057	0.033	0.051	0.023	0.030

[0213] 由表1-2数据显示,我们可以看出当人IgG抗体的稀释度为1:1000000、全血稀释度为1:20、Hg抗稀释度为1:5000时,OD值最大,虽然OD值小于0.8,但是其所对应的阴性对照组OD值全部小于0.1,并且其所对应的阳性对照组,OD值大于0.8,所以选此值所对应的浓度作为最佳工作浓度(即人IgG抗体浓度为1:1000000,全血稀释度为1:20,Hg抗稀释浓度为1:5000)。

[0214] 2.ELISA洗脱液最佳工作浓度及时间确定

[0215] 步骤如下:(1)将人IgG抗体用稀释缓冲液稀释至1000000倍(质量体积比),加入ELISA板微孔中,37℃水浴3小时,储存冰箱;

[0216] (2)移去稀释缓冲液,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,用2%牛血清白蛋白作为封闭液,37℃放置1小时,移去封闭液,并用洗涤液进行洗涤;

[0217] (3)移去封闭液,并用洗涤液进行洗涤,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2小时,使其与人IgG抗体反应;

[0218] (4)准备洗脱液:将木瓜蛋白酶用pH 8.0,0.1mol/L Tris-HCl缓冲液配制成1-2mg/mL,再加入1mmol/L二硫苏糖醇(DTT)37℃孵育30min;

[0219] (5)移去酶标抗体,用稀释缓冲液对洗脱液进行稀释,使洗脱液中的木瓜蛋白酶浓度:酶标抗体浓度比=1:80、1:40、1:20、1:10、1:5,其中,每个浓度作3个复孔,分别放置于37℃温度下洗脱1h、2h、3h;

[0220] (6)移去洗脱液,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入底物,37℃避光作用30分钟;

[0221] (7)以与加底物液相同的速度和顺序滴加终止液至每一微孔;

[0222] (8)取405nm波长,加完终止液后,将ELISA板置于酶标仪上分别读取每组OD值,通过与PBS缓冲液组比较,比较出洗脱液的最适浓度及洗脱时间,具体结果参见表3。

[0223] 表3:ELISA洗脱液最佳工作浓度及洗脱时间确定

[0224]

	1:5	1:10	1:20	1:40	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

[0225] 从表4中我们可以发现,洗脱液中的木瓜蛋白酶的浓度与酶标抗体的浓度之比=1:20时,即木瓜蛋白酶的浓度100ng/mL时,各组OD值均低于其他几组,说明该浓度洗脱液洗脱效果最优(即将ELISA孔壁上结合的人IgG抗体-酶标复合物洗脱程度达到最大,因而OD值最低);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。

[0226] 应用实施例1

[0227] 取采用ELISA法检测100份标本血浆中的汞-IgG螯合物,按照以下步骤进行检测:酶联免疫法(ELISA法)检测汞-IgG螯合物,按照如下步骤检测:

[0228] 1) 将抗IgG Ab包被于固相载体上:用稀释缓冲液稀释抗IgG Ab至1000000倍,加入ELISA板微孔中,37℃水浴1小时,储存冰箱;

[0229] 2) 从循环系统取全血,作待检样品,再加入甲苯,溶解细胞膜;

[0230] 3) 封闭:移去稀释缓冲液,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加2%牛血清白蛋白作为封闭液,37℃放置1小时,移去封闭液,并用洗涤液进行洗涤,洗涤完成后,ELISA板于37℃放置1小时;

[0231] 4) 加待检样品,并且温育:加入步骤2)中的待检样品、以已知含量的汞-IgG螯合物作标准品;用稀释缓冲液稀释待检样品稀释至相应倍数,即稀释20倍,加入微孔中,37℃作用1小时;

[0232] 5) 加入可以捕获汞的物质,并且温育:移去待检样品,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入用稀释缓冲液稀释5000倍,37℃作用1小时,使抗HgAb与IgG上的金属汞反应;

[0233] 6) 酶结合物温育:移去抗汞抗体,并用洗涤液进行洗涤,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小时,使其与酶标抗体反应;

[0234] 7) 底物温育:移去酶标抗体,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入底物,37℃避光作用30分钟;

[0235] 8) 终止反应:滴加终止液至每一微孔;

[0236] 9) 取波长405nm,加完终止液后,将ELISA板置于酶标仪上分别读取待检样品和标准品的OD值(也可不使用酶标仪,直接通过染色情况进行定性检测),检测结果如表4所示。

[0237] 表4:100份血样标本中汞-IgG螯合物的ELISA检测结果

[0238]

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
OD ₄₀₅	0.516	0.465	0.412	0.665	0.507	0.30 3	0.47 8	0.384	0.507	0.682
编号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
OD ₄₀₅	0.324	0.628	0.682	0.463	0.493	0.43 6	0.60 3	0.404	0.489	0.597
编号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
OD ₄₀₅	0.366	0.312	0.372	0.651	0.313	0.54	0.53 2	0.565	0.309	0.459
编号	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
OD ₄₀₅	0.568	0.627	0.651	0.304	0.43	0.32 2	0.44 5	0.486	0.405	0.369
编号	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
OD ₄₀₅	0.683	0.499	0.494	0.504	0.44	0.36 3	0.53 3	0.352	0.401	0.597
编号	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
OD ₄₀₅	0.516	0.554	0.597	0.381	0.349	0.43 6	0.36 3	0.643	0.631	0.631

[0239]

编号	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
OD ₄₀₅	0.392	0.645	0.438	0.56	0.576	0.39 4	0.45 6	0.329	0.48	0.564
编号	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
OD ₄₀₅	0.58	0.587	0.312	0.526	0.47	0.56 5	0.67	0.377	0.521	0.343
编号	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
OD ₄₀₅	0.337	0.491	0.312	0.645	0.467	0.50 7	0.45 7	0.347	0.522	0.603
编号	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
OD ₄₀₅	0.404	0.675	0.524	0.338	0.614	0.35 2	0.62 4	0.525	0.44	0.49

[0240] 应用实施例2

[0241] 采用酶联免疫与原子吸收光谱结合法 (ELISA法+AAS法) 检测100份标本血样中的汞-IgG螯合物,按照如下步骤检测:

[0242] 1) 将能够捕获IgG的物质,如抗IgG抗体(抗IgG Ab)包被于固相载体上:用稀释缓冲液稀释抗IgG Ab至1000000倍,加入ELISA板微孔中,4℃过夜18小时;

[0243] 2) 从循环系统取全血,作待检样品,再加入甲苯,溶解细胞膜;

[0244] 3) 封闭:移去稀释缓冲液,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入2%牛血清白蛋白或脱脂奶粉作为封闭液,37℃放置1小时,移去封闭液,并用洗涤液进行洗涤,洗涤完成后,ELISA板于37℃放置1小时;

[0245] 4) 加待检样品,并且温育:加入步骤2)中的待检样品、以已知含量的汞-IgG螯合物作标准品;用稀释缓冲液稀释待检样品稀释至20倍,加入微孔中,37℃作用1小时;

[0246] 5) 洗脱:移去待检样品,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入以木瓜蛋白酶的浓度为100ng/mL的洗脱液,洗脱1小时;

[0247] 6) 检测:从ELISA微孔中取样,于原子吸收光谱仪检测螯合于IgG上的汞,检测值如表5所示。

[0248] 表5:100份血样标本中汞-IgG螯合物的AAS检测结果

[0249]

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
μg/L	0.015	0.111	0.072	0.018	0.074	0.11	0.087	0.031	0.1	0.089
编号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
μg/L	0.019	0.07	0.107	0.117	0.037	0.045	0.014	0.079	0.114	0.11

编号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
μg/L	0.023	0.003	0.034	0.073	0.101	0.1	0.03	0.108	0.077	0.004
编号	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
μg/L	0.024	0.08	0.033	0.032	0.031	0.035	0.112	0.071	0.115	0.052
编号	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
μg/L	0.086	0.046	0.084	0.015	0.057	0.064	0.052	0.061	0.006	0.108
编号	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
μg/L	0.023	0.003	0.025	0.049	0.063	0.119	0.06	0.044	0.054	0.02
编号	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
μg/L	0.064	0.112	0.12	0.088	0.117	0.031	0.055	0.118	0.041	0.077
编号	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
μg/L	0.119	0.001	0.048	0.02	0.102	0.111	0.072	0.009	0.066	0.087
编号	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
μg/L	0.046	0.022	0.109	0.049	0.06	0.093	0.12	0.017	0.015	0.068
编号	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
μg/L	0.101	0.003	0.042	0.061	0.107	0.08	0.049	0.048	0.022	0.06

[0250] 应用实施例3

[0251] 采用酶联免疫与电感耦合等离子体质谱结合法 (ELISA法+ICP-MS法) 检测100分标本血样中的汞-IgG螯合物含量,按照如下步骤检测:

[0252] 1) 将能够捕获IgG的物质,如抗IgG抗体(抗IgG Ab)包被于固相载体上:用稀释缓冲液稀释抗IgG Ab至1000000倍,加入ELISA板微孔中,4℃过夜18小时;

[0253] 2) 取100份标准血样作为待检样品,再加入甲苯,溶解细胞膜;

[0254] 3) 封闭:移去稀释缓冲液,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入2%牛血清白蛋白作为封闭液,37℃放置1小时,移去封闭液,并用洗涤液进行洗涤,洗涤完成后,ELISA板于37℃放置1小时;

[0255] 4) 加待检样品,并且温育:加入步骤2)中的待检样品、以已知含量的汞-IgG螯合物作标准品;用稀释缓冲液稀释待检样品稀释至20倍,加入微孔中,37℃作用1小时;

[0256] 5) 洗脱:移去待检样品,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入以木瓜蛋白酶的浓度为100ng/ml的洗脱液,洗脱1小时;

[0257] 6) 酸化:在步骤5)中的溶液中加入硝酸对溶液进行酸化,封口过夜,彻底酸化;

[0258] 7) 检测:加入过氧化氢,并且加热赶酸,并从溶液中取样,于电感耦合等离子体质谱仪下检测螯合于IgG的汞,检测值如表6所示。

[0259] 表6 100份标本血样汞-IgG螯合物的ICP-MS检测结果

[0260]

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
μg/L	0.034	0.095	0.049	0	0.067	0.036	0.002	0.077	0.011	0.01
编号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
μg/L	0.015	0.12	0.034	0.009	0.049	0.067	0.066	0.067	0.064	0.035
编号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30

μg/L	0.095	0.05	0.105	0.082	0.114	0.093	0.059	0.116	0.035	0.037
编号	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
μg/L	0.088	0.024	0.037	0.091	0.019	0.04	0.087	0.08	0.083	0.051

[0261]

编号	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
μg/L	0.067	0.014	0.031	0.02	0.072	0.104	0.117	0.054	0.045	0.049
编号	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
μg/L	0.116	0.057	0.006	0.063	0.052	0.011	0.014	0.016	0.103	0.016
编号	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
μg/L	0.09	0.058	0.067	0.116	0.093	0.016	0.046	0.12	0.054	0.051
编号	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
μg/L	0.079	0.059	0.028	0.092	0.038	0.005	0.115	0.105	0.086	0.104
编号	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
μg/L	0.116	0.064	0.018	0.082	0.007	0.034	0.085	0.117	0.098	0.12
编号	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
μg/L	0.069	0.028	0.023	0.083	0.059	0.041	0.119	0.012	0.08	0.009

[0262] 对本领域的技术人员来说,可根据以上描述的技术方案以及构思,做出其它各种相应的改变以及形变,而所有的这些改变以及形变都应该属于本发明权利要求的保护范围之内。

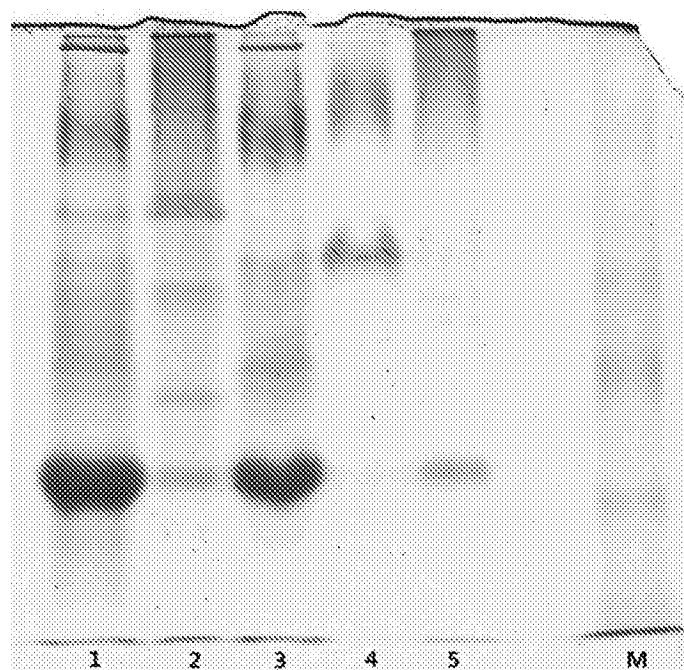


图1

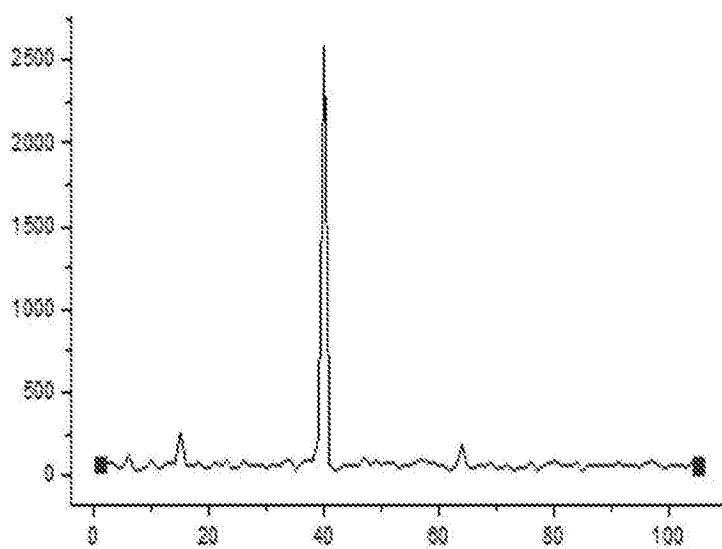


图2

专利名称(译)	一种汞-IgG螯合物及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN105044006B	公开(公告)日	2018-04-03
申请号	CN201510412924.7	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	G01N21/31 G01N33/53 G01N27/62 G01N1/28 G01N27/447		
其他公开文献	CN105044006A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种汞-IgG螯合物及其制备方法和应用，该汞-IgG螯合物是汞离子与IgG通过巯基或/和半胱氨酸残基螯合而成。本发明建立了汞-IgG螯合物的定性定量检测方法，以便定量检测汞-IgG螯合物在评价一个地区汞污染程度的应用。通过定量检测一个地区人群血清中汞-IgG螯合物可以间接反映这个地区人群受汞污染的情况，从而间接反映这个地区汞污染程度。本发明建立的汞-IgG螯合物定量检测方法其准确度大大提高，并且使检测的重复性得到大大提高。

