



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102190723 A

(43) 申请公布日 2011.09.21

(21) 申请号 201110090978.8

C07K 16/44 (2006.01)

(22) 申请日 2011.04.12

G01N 33/53 (2006.01)

(71) 申请人 中国农业大学

地址 100193 北京市海淀区圆明园西路2号

(72) 发明人 王保民 孙硕 赵洪伟 南铁贵

高巍 谭桂玉 王敏 曹振

何丽珊 张炜 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

(51) Int. Cl.

C07K 14/765 (2006.01)

C07K 14/77 (2006.01)

C07K 14/795 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图 1 页

(54) 发明名称

铬离子抗原及其制备方法与应用

(57) 摘要

本发明公开了铬离子抗原及其制备方法与应用。本发明所提供的制备铬离子抗原的方法,包括如下步骤:(1)将螯合剂进行重氮化反应,得到重氮化螯合剂;(2)将所述步骤(1)得到的重氮化的螯合剂与载体蛋白进行偶联反应,得到偶联产物;(3)将所述步骤(2)得到的偶联产物与铬离子进行络合反应,得到络合物,即得到铬离子抗原。本发明所提供的制备铬离子抗原的方法能够方便、快捷地获得铬离子抗原,且合成步骤简洁明了、合成成本低,效果好。用本发明方法制备的铬离子抗原进行免疫得到的抗体特异性好、最低检测限值低。因此,本发明所提供的制备铬离子抗原的方法以及由该方法获得的铬离子抗原,将在铬离子的酶联免疫检测中有广阔的应用前景。

1. 一种制备铬离子抗原的方法,包括如下步骤:

- (1) 将螯合剂进行重氮化反应,得到重氮化螯合剂;
- (2) 将所述步骤(1)得到的重氮化的螯合剂与载体蛋白进行偶联反应,得到偶联产物;
- (3) 将所述步骤(2)得到的偶联产物与铬离子进行络合反应,得到络合物,即得到铬离子抗原。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:所述步骤(1)中所述重氮化反应的方法包括以下步骤:

将所述螯合剂溶于酸的水溶液中,得到溶液I;再向所述溶液I中加入亚硝酸盐水溶液,得到溶液II;将所述溶液II在温度为 0°C - 5°C 或 0°C 或 4°C 或 5°C 、避光和反应时间为15min的条件下进行反应,即得到所述重氮化螯合剂。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其特征在于:

所述步骤(2)中所述载体蛋白与所述重氮化螯合剂的投料摩尔比为1:(5-25)或1:10或1:5或1:25;

所述偶联反应是在温度为 4°C - 10°C 或 4°C 或 7°C 或 10°C 和反应时间为4h-24h或12h或4h或24h的条件下进行;

所述载体蛋白为牛血清白蛋白或卵清白蛋白或人血清白蛋白或血蓝蛋白。

4. 根据权利要求1-3中任一所述的方法,其特征在于:

所述步骤(3)中所述偶联产物与所述铬离子的投料摩尔比为1:(1-10)或1:3或1:1或1:10;

所述络合反应是在温度为 4°C - 25°C 或 25°C 或 4°C 或 15°C 、pH值为7.0-8.0或7.0或7.5或8.0和反应时间为4h-24h或12h或4h或24h的条件下进行。

5. 根据权利要求1-4中任一所述的方法,其特征在于:

所述步骤(1)中所述的螯合剂与所述酸的投料摩尔比为1:(4-10)或1:10或1:7或1:4;

所述螯合剂与所述亚硝酸盐的投料摩尔比为1:(1-3)或1:2或1:1或1:3;

所述螯合剂为对氨基苯甲基乙二胺四乙酸;

所述的酸为盐酸或硫酸或硝酸或过氯酸或氟硼酸;

所述亚硝酸盐为亚硝酸钠。

6. 根据权利要求1-5中任一所述的方法,其特征在于:

所述步骤(2)中所述偶联反应还包括将所述偶联产物进行透析,得到纯化的偶联产物的步骤;

所述进行偶联反应前,还包括将所述载体蛋白溶解于碳酸盐缓冲液中的步骤。

7. 根据权利要求1-6中任一所述的方法,其特征在于:

所述步骤(3)中,还包括将所述络合物进行透析的步骤。

8. 根据权利要求1-7中任一所述的方法制备得到的铬离子抗原。

9. 由权利要求8所述的铬离子抗原制备得到的抗体。

10. 权利要求8所述的铬离子抗原和/或权利要求9所述的抗体在检测铬离子中的应用。

铬离子抗原及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及铬离子抗原及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 铬是国内外食品、药物、环境等样品中重要的污染物质之一。重金属铬在环境中主要以三价铬和六价铬的形式存在。其中，六价铬的毒性比三价铬高得多，对皮肤粘膜有刺激和腐蚀作用，并且更容易为人体吸收、蓄积，已被确认为致癌物，因此，重金属铬的摄入量及其价态对人体健康有很大影响。重金属铬的化合物广泛应用于制革、冶金、纺织品生产及镀铬等行业，环境中的铬含量在不断的增加，因此，重金属铬也成为各国环境监测中的必测元素，六价铬的测定方法也受到环境监测者的广泛关注。

[0003] 铬的测定方法较多，主要有分光光度法、化学发光法、原子吸收光谱法、荧光分析法、电化学分析法和离子色谱法等。这几种仪器检测方法检测重金属铬的含量不仅需要昂贵的仪器设备，而且检测费用高、检测时间长和检测步骤繁杂，不能用于现场的快速检测。免疫检测技术已被广泛应用于毒素、杀虫剂、炸药等的环境污染和危险物的检测，与其他检测系统相比，免疫检测方法具有快速、廉价、简便、灵敏和特异的优点，可便携进行现场检测。免疫检测试剂盒可以快速检测某一特定物质的含量，但要使免疫分析法应用到检测重金属铬离子，必须制备相应的抗原和抗体。

发明内容

[0004] 本发明的一个目的是提供一种制备铬离子抗原的方法。

[0005] 本发明所提供的制备铬离子抗原的方法，包括如下步骤：

[0006] (1) 将螯合剂进行重氮化反应，得到重氮化螯合剂；

[0007] (2) 将所述步骤 (1) 得到的重氮化的螯合剂与载体蛋白进行偶联反应，得到偶联产物；

[0008] (3) 将所述步骤 (2) 得到的偶联产物与铬离子进行络合反应，得到络合物，即得到铬离子抗原。

[0009] 所述步骤 (1) 中所述重氮化反应的方法包括以下步骤：

[0010] 将所述螯合剂溶于酸的水溶液中，得到溶液 I；再向所述溶液 I 中加入亚硝酸盐水溶液，得到溶液 II；将所述溶液 II 在温度为 0℃ -5℃ 或 0℃ 或 4℃ 或 5℃、避光和反应时间为 15min 的条件下进行反应，即得到所述重氮化螯合剂。

[0011] 所述步骤 (2) 中所述载体蛋白与所述重氮化螯合剂的投料摩尔比为 1 : (5-25) 或 1 : 10 或 1 : 5 或 1 : 25；

[0012] 所述偶联反应是在温度为 4℃ -10℃ 或 4℃ 或 7℃ 或 10℃ 和反应时间为 4h-24h 或 12h 或 4h 或 24h 的条件下进行；

[0013] 所述载体蛋白为牛血清白蛋白或卵清白蛋白或人血清白蛋白或血蓝蛋白。

[0014] 所述步骤 (3) 中所述偶联产物与所述铬离子的投料摩尔比为 1 : (1-10) 或 1 : 3

或 1 : 1 或 1 : 10 ;

[0015] 所述络合反应是在温度为 4℃ -25℃ 或 25℃ 或 4℃ 或 15℃、pH 值为 7.0-8.0 或 7.0 或 7.5 或 8.0 和反应时间为 4h-24h 或 12h 或 4h 或 24h 的条件下进行。

[0016] 所述步骤 (1) 中所述的整合剂与所述酸的投料摩尔比为 1 : (4-10) 或 1 : 10 或 1 : 7 或 1 : 4 ;

[0017] 所述整合剂与所述亚硝酸盐的投料摩尔比为 1 : (1-3) 或 1 : 2 或 1 : 1 或 1 : 3 ;

[0018] 所述整合剂为对氨基苯甲基乙二胺四乙酸 ;

[0019] 所述的酸为盐酸或硫酸或硝酸或过氯酸或氟硼酸 ;

[0020] 所述亚硝酸盐为亚硝酸钠。

[0021] 所述步骤 (2) 中所述偶联反应还包括将所述偶联产物进行透析, 得到纯化的偶联产物的步骤 ;

[0022] 所述进行偶联反应前, 还包括将所述载体蛋白溶解于碳酸盐缓冲液中的步骤。

[0023] 所述步骤 (3) 中, 还包括将所述络合物进行透析的步骤。

[0024] 根据所述方法制备得到的铬离子抗原也属于本发明的保护范围。

[0025] 由所述铬离子抗原制备得到的抗体也属于本发明的保护范围。

[0026] 所述铬离子抗原和 / 或所述抗体在检测铬离子中的应用也属于本发明的保护范围。

[0027] 本发明所提供的制备铬离子抗原的方法能够方便、快捷地获得铬离子抗原, 且合成步骤简洁明了、合成成本低, 效果好。用本发明方法制备的铬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。因此, 本发明所提供的制备铬离子抗原的方法以及由该方法获得的铬离子抗原, 将在铬离子的酶联免疫检测中有广阔的应用前景。

附图说明

[0028] 图 1 为铬离子抗原的合成路线图。

[0029] 图 2 为以 EDTA-Cr 为标准样品建立的铬离子间接 ELISA 法标准曲线。

具体实施方式

[0030] 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。

[0031] 下述实施例中所用的材料、试剂等, 如无特殊说明, 均可从商业途径得到。

[0032] 对氨基苯甲基乙二胺四乙酸 (购自 Sigma 公司, 商品目录号为 A3473) ; 羊抗鼠 IgG-HRP (购自 Jackson 公司, 商品目录号为 79556) ; 弗氏完全佐剂 (购自 Sigma 公司, 商品目录号为 F5881) ; 弗氏不完全佐剂 (购自 Sigma 公司, 商品目录号为 F5506) ; EDTA (购自 Sigma 公司, 商品目录号为 E6758) ; 牛血清白蛋白 (购自 Sigma 公司, 商品目录号为 A7906) ; 卵清白蛋白 (购自 Sigma 公司, 商品目录号为 A5503), $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (购自 Sigma 公司, 商品目录号为 27096) ; 其余 HCl、 K_2CO_3 、 NaNO_2 和甘油等常规试剂均购自北京化学试剂公司。

[0033] 实施例 1、铬离子抗原及其制备

[0034] 一、铬 - 对氨基苯甲基乙二胺四乙酸 - 牛血清白蛋白 (Cr- 对氨基苯甲基 EDTA-BSA) 抗原的制备

[0035] 方法 I

[0036] 铬离子抗原的合成路线图如图 1 所示。

[0037] 1、对氨基苯甲基乙二胺四乙酸的重氮化

[0038] (1) 称取固体对氨基苯甲基乙二胺四乙酸 1.985mg, 充分溶解于 0.5mL 0.1M 的 HCl 水溶液中, 得到溶液 I。溶液 I 中, 对氨基苯甲基乙二胺四乙酸与 HCl 的投料摩尔比为 1 : 10。

[0039] (2) 将上述步骤 (1) 得到的溶液 I 在 4℃ 避光条件下进行搅拌, 每间隔 30s 向溶液 I 中滴加 30 μ L 质量百分含量为 1% 的 NaNO_2 水溶液, 得到溶液 II。 NaNO_2 的加入量是过量的, 即对氨基苯甲基乙二胺四乙酸与 NaNO_2 的投料摩尔比为 1 : 2。用淀粉-碘化钾试纸对上述步骤 (2) 得到的溶液 II 进行检验, 在试纸变蓝后, 反应 15 分钟, 得到重氮化对氨基苯甲基乙二胺四乙酸溶液。

[0040] 2、重氮化对氨基苯甲基乙二胺四乙酸与载体蛋白进行偶联

[0041] (1) 称取牛血清白蛋白 (BSA) 33.0mg, 充分溶解于 2.0mL 0.05M 的碳酸盐缓冲液中, 得到溶液 III。

[0042] 0.05M 的碳酸盐缓冲液配制方法如下:

[0043] 将 1.5g Na_2CO_3 和 2.93g NaHCO_3 溶解于蒸馏水中, 用蒸馏水定容至 1000mL, pH 值为 9.6。

[0044] (2) 将上述步骤 1 获得的重氮化对氨基苯甲基乙二胺四乙酸溶液逐滴加入上述步骤 (1) 的溶液 III 中, 使 BSA 与重氮化对氨基苯甲基乙二胺四乙酸的投料摩尔比为 1 : 10, 得到溶液 IV。

[0045] (3) 偶联反应: 在 4℃ 下, 将上述步骤 (2) 的溶液 IV 搅拌过夜 (12 小时), 得到偶联产物溶液。

[0046] (4) 偶联反应 12 小时后, 将上述步骤 (3) 得到的偶联产物溶液置于透析袋中, 用 pH 为 7.5 的磷酸盐缓冲液透析 2 天, 每天换 3 次透析液, 得到纯化的重氮化对氨基苯甲基乙二胺四乙酸与载体蛋白的偶联物。

[0047] 上述 pH 为 7.5 磷酸盐缓冲液的配制方法如下:

[0048] 将 8.0g NaCl 、0.2g KH_2PO_4 和 2.96g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 溶解于蒸馏水中, 再用蒸馏水定容至 1000mL。

[0049] 3、铬离子的络合

[0050] (1) 称取 4.00mg $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 用超纯水配制成 0.1M CrCl_3 水溶液。将步骤 2 得到的纯化的重氮化对氨基苯甲基乙二胺四乙酸与载体蛋白的偶联物溶液用 1M 的 HCl 将其 pH 值调节到 7.5, 得到调整 pH 值后的偶联物溶液。

[0051] (2) 将上述步骤 (1) 的 CrCl_3 水溶液逐滴加入到上述步骤 (1) 获得的调整 pH 值后的偶联物溶液中, 边滴加边搅拌, 使重氮化对氨基苯甲基乙二胺四乙酸与铬离子的投料摩尔比为 1 : 3, 得到溶液 V。

[0052] (3) 将上述步骤 (2) 的溶液 V 在 25℃、pH 值为 7.5 的条件下搅拌 12 小时, 用 pH 为 7.5 的磷酸盐缓冲液透析 2 天, 每天换 3 次透析液, 以除去未联结的铬离子及其它杂质, 透析产物即为铬-对氨基苯甲基乙二胺四乙酸-牛血清白蛋白 (Cr-对氨基苯甲基 EDTA-BSA) 抗原溶液。

[0053] (4) 将上述步骤 (3) 的透析产物分装, 经 -40℃ 冷冻后, 真空干燥, 置于 -20℃ 冰箱

中保存备用。

[0054] 方法 II

[0055] 1、对氨基苯甲基乙二胺四乙酸的重氮化

[0056] (1) 称取固体对氨基苯甲基乙二胺四乙酸 1.985mg, 充分溶解于 0.35mL 0.1M 的 HCl 水溶液中, 得到溶液 I。溶液 I 中, 对氨基苯甲基乙二胺四乙酸与 HCl 的投料摩尔比为 1 : 7。

[0057] (2) 除以下方法外, 其余方法均与方法 I 相同:

[0058] A、将上述步骤 (1) 得到的溶液 I 在 0℃ 避光条件下进行搅拌;

[0059] B、每间隔 30s 向溶液 I 中滴加 15 μ L 质量百分含量为 1% 的 NaNO₂ 水溶液, 得到溶液 II。NaNO₂ 的加入量是过量的, 即对氨基苯甲基乙二胺四乙酸与 NaNO₂ 的投料摩尔比为 1 : 1。

[0060] 2、重氮化对氨基苯甲基乙二胺四乙酸与载体蛋白进行偶联

[0061] (1) 与方法 I 相同。

[0062] (2) 除 BSA 与重氮化对氨基苯甲基乙二胺四乙酸的投料摩尔比为 1 : 5 外, 其余方法均与方法 I 相同。

[0063] (3) 偶联反应: 在 7℃ 下, 将上述步骤 (2) 的溶液 IV 搅拌 4h, 得到偶联产物溶液。

[0064] (4) 与方法 I 相同。

[0065] 3、铬离子的络合

[0066] (1) 将步骤 2 得到的纯化的重氮化对氨基苯甲基乙二胺四乙酸与载体蛋白的偶联物溶液用 1M 的 HCl 将其 pH 值调节到 7.0 外, 其余方法均与方法 I 相同。

[0067] (2) 除重氮化对氨基苯甲基乙二胺四乙酸与铬离子的投料摩尔比为 1 : 1 外, 其余方法均与方法 I 相同。

[0068] (3) 除将上述步骤 (2) 的溶液 V 在 4℃、pH 值为 7.0 的条件下搅拌 4h, 其余方法均与方法 I 相同。

[0069] (4) 与方法 I 相同。

[0070] 方法 III

[0071] 1、对氨基苯甲基乙二胺四乙酸的重氮化

[0072] (1) 称取固体对氨基苯甲基乙二胺四乙酸 1.985mg, 充分溶解于 0.2mL 0.1M 的 HCl 水溶液中, 得到溶液 I。溶液 I 中, 对氨基苯甲基乙二胺四乙酸与 HCl 的投料摩尔比为 1 : 4。

[0073] (2) 除以下方法外, 其余方法均与方法 I 相同:

[0074] A、将上述步骤 (1) 得到的溶液 I 在 5℃ 避光条件下进行搅拌;

[0075] B、每间隔 30s 向溶液 I 中滴加 45 μ L 质量百分含量为 1% 的 NaNO₂ 水溶液, 得到溶液 II。NaNO₂ 的加入量是过量的, 即对氨基苯甲基乙二胺四乙酸与 NaNO₂ 的投料摩尔比为 1 : 3。

[0076] 2、重氮化对氨基苯甲基乙二胺四乙酸与载体蛋白进行偶联

[0077] (1) 与方法 I 相同。

[0078] (2) 除 BSA 与重氮化对氨基苯甲基乙二胺四乙酸的投料摩尔比为 1 : 25 外, 其余方法均与方法 I 相同。

[0079] (3) 偶联反应: 在 10℃ 下, 将上述步骤 (2) 的溶液 IV 搅拌 24h, 得到偶联产物溶液。

[0080] (4) 与方法 I 相同。

[0081] 3、铬离子的络合

[0082] (1) 将步骤 2 得到的纯化的重氮化对氨基苯甲基乙二胺四乙酸与载体蛋白的偶联物溶液用 1M 的 HCl 将其 pH 值调节到 8.0 外,其余方法均与方法 I 相同。

[0083] (2) 除重氮化对氨基苯甲基乙二胺四乙酸与铬离子的投料摩尔比为 1 : 10 外,其余方法均与方法 I 相同。

[0084] (3) 除将上述步骤 (2) 的溶液 V 在 15°C、pH 值为 8.0 的条件下搅拌 24h 外,其余方法均与方法 I 相同。

[0085] (4) 与方法 I 相同。

[0086] 二、铬 - 对氨基苯甲基乙二胺四乙酸 - 卵清白蛋白 (Cr- 对氨基苯甲基 EDTA-OVA) 抗原的制备

[0087] 方法同实验一中所述免疫原的制备方法相同,不同的是所用的载体蛋白为卵清白蛋白 (OVA)。

[0088] 实施例 2、铬离子抗原的应用

[0089] 一、利用铬 - 对氨基苯甲基乙二胺四乙酸 - 牛血清白蛋白抗原制备抗体

[0090] (1) 取 6-8 周龄的 Ba1 b/C 小白鼠 (购自军事医学科学院实验动物中心) 作为实验动物。

[0091] (2) 基础免疫 :用 PBS 将上述实施例 1 制备的铬 - 对氨基苯甲基乙二胺四乙酸 - 牛血清白蛋白抗原稀释为 1mg/ml 的溶液,取 1ml 抗原溶液用无菌过滤器过滤,然后加入 1ml 的弗氏完全佐剂,充分乳化,直到滴入水中不扩散。将乳化好的抗原采用腹腔及背部皮下多点注射 Ba1 b/C 小鼠,注射剂量为 0.1mg 抗原 / 只。

[0092] (3) 加强免疫 :基础免疫 3 周后,取 1ml 上述稀释好的铬 - 对氨基苯甲基乙二胺四乙酸 - 牛血清白蛋白抗原溶液,用无菌过滤器过滤,然后加入 1ml 弗氏不完全佐剂,充分乳化,直到滴入水中不扩散。将乳化好的抗原采用腹腔及背部皮下多点注射 Ba1b/C 小鼠,注射剂量为 0.1mg 抗原 / 只。

[0093] 按照上述方法每隔 2 周加强免疫一次,共 4 次,并从第三次加强免疫开始,每次免疫后第 5 天,从小鼠眼眶采血,测定抗体效价,待效价大于 1 : 8000 后,采血,分离出铬 - 对氨基苯甲基乙二胺四乙酸 - 牛血清白蛋白抗血清,即得到抗体。

[0094] 二、抗体效果检测

[0095] 下述实验中所用的各种缓冲液如下 :

[0096] (1) 包被缓冲液 :0.05M、pH9.6 的碳酸盐缓冲液 ;

[0097] 0.05M、pH9.6 的碳酸盐缓冲液的配制方法如下 :

[0098] 分别称取 1.5g Na_2CO_3 和 2.93g NaHCO_3 ,用蒸馏水充分溶解后,用蒸馏水定容至 1000mL。

[0099] (2) 磷酸盐缓冲液 :含有质量百分含量为 0.9% 的 NaCl 的 0.1M、pH7.5 磷酸盐缓冲液。

[0100] 所述磷酸盐缓冲液的配制方法如下 :

[0101] 分别称取 8.0g NaCl、0.2g KH_2PO_4 和 2.96g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$,用蒸馏水充分溶解后,用蒸馏水定容至 1000mL。

[0102] (3) 样品稀释液 PBSTG :每 1L 样品稀释液中含有 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 和 1g 明胶,其余为水。

[0103] (4) 柠檬酸盐 - 磷酸盐缓冲液 :含有 0.01M 柠檬酸三钠和 0.03M Na_2HPO_4 的 pH5.5 的水溶液。

[0104] (5) 底物缓冲液 :将 20.0mg 邻苯二胺 (OPD) 溶解于 10.0mL 柠檬酸盐 - 磷酸盐缓冲液中,然后加入 4 μL 体积百分含量为 30% 的 H_2O_2 得到的溶液 ;

[0105] (6) 终止缓冲液 :2.0M 的硫酸水溶液 ;

[0106] (7) 洗涤液 :每 1L 洗涤液中含有 8.0g NaCl、0.2g KH_2PO_4 、2.96g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 和 1.0mL Tween-20,其余为水。

[0107] (一) 抗体抑制实验

[0108] 1、铬 - 对氨基苯甲基乙二胺四乙酸 - 卵清白蛋白包被抗原溶液的配制

[0109] 将上述实施例 1 制备的铬 - 对氨基苯甲基乙二胺四乙酸 - 卵清白蛋白抗原完全解冻后,用上述包被缓冲液按 1 : 1000、1 : 2000、1 : 4000、1 : 8000、1 : 16000 进行梯度稀释。

[0110] 2、EDTA-Cr 螯合物标准品溶液的配制

[0111] (1) 称取 14.32mg EDTA- Na_2 ,充分溶解于 5mL 蒸馏水中,得到浓度为 2.864mg/mL 的 EDTA 水溶液。

[0112] (2) 称取 10.24mg $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$,溶解于蒸馏水中,并逐滴加入到上述步骤 (1) 配制的 EDTA 水溶液中,磁力搅拌,充分螯合,得到 EDTA 与 Cr 离子螯合产物的溶液。

[0113] (3) 将步骤 (2) 的 EDTA 与 Cr 离子螯合产物的溶液定容至 10.0mL,得到 Cr 离子浓度为 1mg/mL 的 EDTA-Cr 螯合产物的溶液。

[0114] (4) 用样品稀释液将上述步骤 (3) 的 EDTA-Cr 溶液配成浓度为 2000ng/mL (以溶液中 Cr 离子实际含量计算) 的 EDTA-Cr 螯合物标准品溶液。

[0115] 3、铬 - 对氨基苯甲基乙二胺四乙酸 - 牛血清白蛋白抗血清稀释液的配制

[0116] 将上述步骤一制备的铬 - 对氨基苯甲基乙二胺四乙酸 - 牛血清白蛋白抗血清用样品稀释液按 1 : 1000、1 : 2000、1 : 4000、1 : 8000、1 : 16000 进行梯度稀释。

[0117] 4、将羊抗鼠 IgG-HRP 用由 PBS 和甘油 (PBS 和甘油的体积比为 1 : 1) 组成的混合液稀释成 0.1mg/mL,保存于 -20°C 冰箱中。使用时用样品稀释液按 1 : 1000 稀释。

[0118] 5、抗原、抗体的棋盘格实验

[0119] (1) 包被原的包被 :将上述步骤 1 制备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 3 小时 ;倒去酶标板中的溶液,用洗涤液洗板 4 次,甩干 ;

[0120] (2) 在步骤 (1) 的酶标板中加入上述步骤 2 制备的 EDTA-Cr 螯合物标准品溶液 (实验孔),每孔 50 μL ,对照孔中不添加 EDTA-Cr 螯合物标准品溶液而加入 50 μL 样品稀释液 ;

[0121] (3) 分别向上述实验孔和对照孔中加入上述步骤 3 制备的不同浓度的抗血清稀释液,每孔 50 μL ; 37°C 温育 30 分钟 ;倒掉酶标板中的溶液,用洗涤液洗板 4 次,甩干 ;

[0122] (4) 在实验孔和对照孔中分别加入 100 μL 用样品稀释液稀释的 IgG-HRP, 37°C 温育 30 分钟 ;用洗涤液洗板 4 次,倒掉酶标板中的溶液,甩干 ;

[0123] (5) 向实验孔和对照孔中分别加入 100 μL 底物缓冲液, 37°C 温育 15 分钟后,再向每孔中加入 50 μL 终止缓冲液终止反应 ;

[0124] (6) 在 492nm 下测定吸光值。

[0125] 实验设 3 次重复,取三次实验结果的平均值,结果如表 1 所示。

[0126] 表 1 抗原和抗体棋盘格实验结果

[0127]

抗体 抗原	1:1000		1:2000		1:4000		1:8000		1:16000	
	A ₀ ^a	A ₂₀₀₀ ^b	A ₀ ^a	A ₂₀₀₀ ^b	A ₀ ^a	A ₂₀₀₀ ^b	A ₀ ^a	A ₂₀₀₀ ^b	A ₀ ^a	A ₂₀₀₀ ^b
1:1000	2.665	2.307	2.357	1.856	1.696	1.191	0.914	0.787	0.555	0.368
1:2000	2.625	1.461	2.347	1.272	1.431	0.829	0.715	0.673	0.312	0.241
1:4000	2.206	1.154	1.713	0.764	1.236	0.156	0.588	0.331	0.124	0.013
1:8000	1.299	0.614	0.927	0.4	0.902	0.139	0.28	0.074	0.093	0.057

[0128] 表 1 中, ^a 表示不添加 EDTA-Cr 竞争显色值 A₀, ^b 表示添加 50 μL 2000ng/mL 的 EDTA-Cr 竞争显色值 A₂₀₀₀。

[0129] 结果表明,当包被抗原与抗血清浓度适宜时,就有抑制现象,即 2000ng/mL 孔与 0ng/mL 孔的吸光度值有差别,2000ng/mL 孔吸光度值小,0ng/mL 孔吸光度值高;用抑制率计算抗原、抗体的最佳组合,从表 1 中可以看出,当包被抗原稀释度为 1:4000,抗血清稀释度为 1:4000 时,此时的抑制率最好,为 87.38% (抑制率 = (A₀ - A₂₀₀₀) / A₀ * 100%),也即此时的抑制效果最好。说明上述实施例 1 制备的 Cr-对氨基苯甲基 EDTA-BSA 可以作为免疫原制备出检测铬离子的抗体。

[0130] (二) EDTA-Cr 标准曲线的建立

[0131] 将上述步骤 (一) 制备的 EDTA-Cr 螯合物标准品溶液用样品稀释液分别稀释成如下不同的浓度:2000ng/mL、1000ng/mL、500ng/mL、250ng/mL、125ng/mL、62.5ng/mL、31.25ng/mL、15.625ng/mL。

[0132] (1) 包被原的包被:将上述实施例 2 制备的铬-对氨基苯甲基乙二胺四乙酸-卵清白蛋白抗原按照 1:4000 稀释后加入到酶标板中,每孔 100 μL,37°C 温育 3 小时;倒去酶标板中的溶液,用洗涤液洗板 4 次,甩干;

[0133] (2) 在步骤 (1) 的酶标板中分别加入上述不同浓度的 EDTA-Cr 螯合物标准品溶液 (实验孔),每孔 50 μL,对照孔中不添加 EDTA-Cr 螯合物标准品溶液而加入 50 μL 样品稀释液;

[0134] (3) 分别向上述实验孔和对照孔中加入上述步骤 (一) 中制备的稀释倍数为 1:4000 的抗血清稀释液,每孔 50 μL;37°C 温育 30 分钟;倒掉酶标板中的溶液,用洗涤液洗板 4 次,甩干;

[0135] (4) 在实验孔和对照孔中分别加入 100 μL 稀释倍数为 1:1000 的 IgG-HRP,37°C 温育 30 分钟;用洗涤液洗板 4 次,倒掉酶标板中的溶液,甩干;

[0136] (5) 向实验孔和对照孔中分别加入 100 μL 底物缓冲液,37°C 温育 15 分钟后,再向每孔中加入 50 μL 2.0M 的硫酸溶液终止反应;

[0137] (6) 在 492nm 下测定吸光值；

[0138] (7) 绘制标准曲线：以不同浓度 (ng/mL) 的 EDTA-Cr 螯合物标准品溶液作为 X 轴，以吸光度值的比值 ($B/B_0 \times 100\%$ ，其中，B 为 EDTA-Cr 螯合物标准品溶液的平均吸光度值， B_0 为对照孔的平均吸光度值) 作为 Y 轴，绘制标准曲线图。

[0139] 实验设 3 次重复，取三次实验结果的平均值，得到的标准曲线图如图 2 所示。结果表明，其灵敏度 (IC_{50}) 为 93.88ng/mL，检测范围是 15.6ng/mL-2000ng/mL。表明，由本发明抗原制得的抗体的效果好。

[0140] (三) 抗体特异性检测

[0141] 1、EDTA-Cr 类似螯合物的制备

[0142] 参照上述步骤 (一) 中 EDTA-Cr 螯合物的制备方法，制备 Cd、Cu、Hg、Zn、Mn、Fe、Mg 金属的 EDTA 螯合物供试标准品溶液，以溶液中各金属离子实际含量计算各供试标准品溶液的浓度。

[0143] 用样品稀释液将上述类似螯合物分别稀释成如下浓度：20000ng/mL、10000ng/mL、5000ng/mL、2500ng/mL、1250ng/mL、625ng/mL、312.5ng/mL、156.25ng/mL。

[0144] 2、各自建立标准曲线，测定抑制中浓度 IC_{50} (抑制率达到 50% 的标样浓度值)。

[0145] 标准曲线的建立方法与上述 EDTA-Cr 标准曲线的建立方法相同。

[0146] 交叉反应率 (%) = $(EDTA-Cr IC_{50}) / (EDTA-Cr \text{ 类似螯合物 } IC_{50}) \times 100\%$ 。

[0147] 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 Cr-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。

[0148] 表 2 Cd-EDTA 抗体的特异性检测

[0149]

分析物	IC_{50} (ng/mL)	交叉反应率 (%)
Cr-EDTA	93.876	100
Cd-EDTA	> 10000	< 1
Zn-EDTA	> 10000	< 1
Hg-EDTA	> 10000	< 1
Mn-EDTA	> 10000	< 1
Cu-EDTA	> 10000	< 1
Fe-EDTA	> 10000	< 1
Mg-EDTA	> 10000	< 1
EDTA	72548	< 1

[0150]

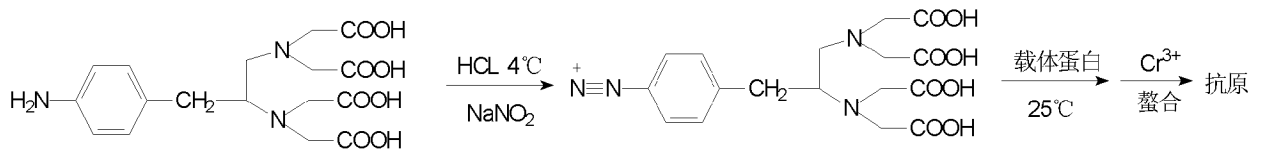


图 1

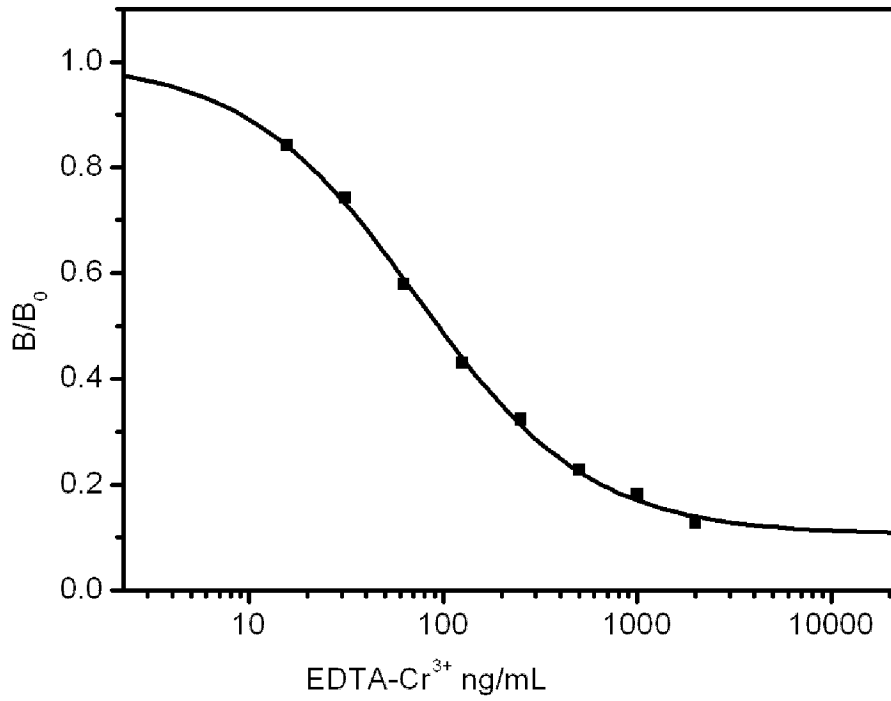


图 2

专利名称(译)	铬离子抗原及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN102190723A	公开(公告)日	2011-09-21
申请号	CN201110090978.8	申请日	2011-04-12
[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 孙硕 赵洪伟 南铁贵 高巍 谭桂玉 王敏 曹振 何丽珊 张炜 李召虎		
发明人	王保民 孙硕 赵洪伟 南铁贵 高巍 谭桂玉 王敏 曹振 何丽珊 张炜 李召虎		
IPC分类号	C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 C07K16/44 G01N33/53		
代理人(译)	关畅		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了铬离子抗原及其制备方法与应用。本发明所提供的制备铬离子抗原的方法，包括如下步骤：(1)将螯合剂进行重氮化反应，得到重氮化螯合剂；(2)将所述步骤(1)得到的重氮化的螯合剂与载体蛋白进行偶联反应，得到偶联产物；(3)将所述步骤(2)得到的偶联产物与铬离子进行络合反应，得到络合物，即得到铬离子抗原。本发明所提供的制备铬离子抗原的方法能够方便、快捷地获得铬离子抗原，且合成步骤简洁明了、合成成本低，效果好。用本发明方法制备的铬离子抗原进行免疫得到的抗体特异性好、最低检测限值低。因此，本发明所提供的制备铬离子抗原的方法以及由该方法获得的铬离子抗原，将在铬离子的酶联免疫检测中有广阔的应用前景。

抗体 \ 抗原	1:1000		1:2000		1:4000		1:8000		1:16000	
	A ₀ ^a	A ₂₀₀₀ ^b	A ₀ ^a	A ₂₀₀₀ ^b	A ₀ ^a	A ₂₀₀₀ ^b	A ₀ ^a	A ₂₀₀₀ ^b	A ₀ ^a	A ₂₀₀₀ ^b
1:1000	2.665	2.307	2.357	1.856	1.696	1.191	0.914	0.787	0.555	0.368
1:2000	2.625	1.461	2.347	1.272	1.431	0.829	0.715	0.673	0.312	0.241
1:4000	2.206	1.154	1.713	0.764	1.236	0.156	0.588	0.331	0.124	0.013
1:8000	1.299	0.614	0.927	0.4	0.902	0.139	0.28	0.074	0.093	0.057