



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107247142 A

(43)申请公布日 2017. 10. 13

(21)申请号 201710542323.7

(22)申请日 2017.07.05

(71)申请人 河南科技大学

地址 471000 河南省洛阳市涧西区西苑路
48号

(72)发明人 孔涛 王国永 张淑慧 杨自军
杨帆 张才 张梦雨 李芳源
敬梦瑶 张柏豪 王杰 张倩文

(74)专利代理机构 洛阳公信知识产权事务所
(普通合伙) 41120

代理人 程茗

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

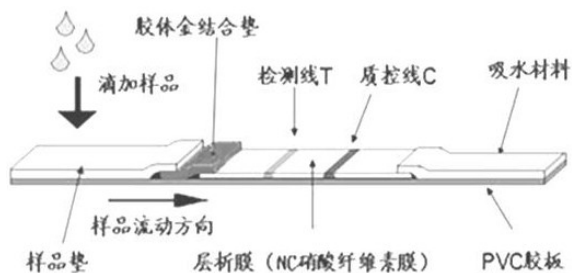
权利要求书2页 说明书8页 附图1页

(54)发明名称

一种检测乙二胺四乙酸及其螯合物的胶体金试纸及其制备和检测方法

(57)摘要

本发明涉及一种检测乙二胺四乙酸及其螯合物的胶体金试纸及其制备和检测方法,胶体金试纸,包括反应膜、样本垫、结合物释放垫、吸水垫和背衬,其特征在于,所述反应膜上具有包被乙二胺四乙酸-载体蛋白偶联物的测试区和包被羊抗鼠IgG的质控区,所述结合物释放垫包被乙二胺四乙酸单克隆抗体-胶体金标记物;将待测样品滴入试剂卡孔内,当乙二胺四乙酸及其螯合物在样品中浓度低时,胶体金抗体在层析过程中会被固定在反应膜上的乙二胺四乙酸偶联物结合,在测试区质控区内会出现各一条红色条带;浓度高时,则反之;本发明能准确且灵敏的检测乙二胺四乙酸及其螯合物。



1. 一种检测乙二胺四乙酸及其螯合物的胶体金试纸, 包括反应膜、样本垫、结合物释放垫、吸水垫和背衬, 其特征在于, 所述反应膜上具有包被乙二胺四乙酸-载体蛋白偶联物的测试区和包被羊抗鼠 IgG 的质控区, 所述结合物释放垫包被乙二胺四乙酸单克隆抗体-胶体金标记物;

所述乙二胺四乙酸-载体蛋白偶联物由乙二胺四乙酸经过 Aminobenzyl-EDTA 或 Isothiocyanobenzyl-EDTA 与载体蛋白偶联得到;

所述乙二胺四乙酸单克隆抗体-胶体金标记物中的乙二胺四乙酸单克隆抗体是以乙二胺四乙酸-载体蛋白偶联物作为免疫抗原免疫试验动物后制备获得。

2. 如权利要求1所述检测乙二胺四乙酸及其螯合物的胶体金试纸, 其特征在于: 所述乙二胺四乙酸-载体蛋白偶联物, 为二乙烯三胺五乙酸-牛血清白蛋白偶联物、二乙烯三胺五乙酸-人血清白蛋白偶联物、二乙烯三胺五乙酸-钥孔血蓝蛋白偶联物、二乙烯三胺五乙酸-卵清蛋白偶联物、二乙烯三胺五乙酸-铁蛋白偶联物或二乙烯三胺五乙酸-多聚赖氨酸偶联物。

3. 如权利要求2所述检测乙二胺四乙酸及其螯合物的胶体金试纸, 其特征在于: 所述二乙烯三胺五乙酸-钥孔血蓝蛋白偶联物的制备方法: 取 0.8-20mg Isothiocyanobenzyl-EDTA 溶于 50 μ L 二甲基亚砜, 配制 16-400mg/mL 的 Isothiocyanobenzyl-EDTA; 取 2.0-20.0 mg 钥孔血蓝蛋白溶于 1 mL HEPES 缓冲溶液或碳酸盐缓冲液, 配制 2-20 mg/mL 的钥孔血蓝蛋白溶液; 将此半抗原溶液逐滴加入到 1 mL 2-20 mg/mL 的钥孔血蓝蛋白溶液中, 于 4 $^{\circ}$ C 或室温、pH7.5-10.5 条件下振荡反应 24h; 用超滤或透析的方法去除未反应的低分子物质, 得到二乙烯三胺五乙酸-钥孔血蓝蛋白偶联物。

4. 如权利要求2所述检测乙二胺四乙酸及其螯合物的胶体金试纸, 其特征在于: 所述二乙烯三胺五乙酸-钥孔血蓝蛋白偶联物的制备方法: 取 0.8-20 mg Aminobenzyl-EDT 溶于 50 μ L 二甲基亚砜, 配制 16-400mg/mL 的 Aminobenzyl-EDTA; 取 2.0-20.0 mg 钥空血蓝蛋白溶于 1mL HEPES 缓冲溶液或碳酸盐缓冲液, 配制 2-20 mg/mL 的钥空血蓝蛋白溶液; 将 1mL 1% 戊二醛溶液逐滴加入 Aminobenzyl-EDTA 溶液中, 室温放置过夜以活化氨基; 将活化的半抗原溶液逐滴加入到 1mL 2-20mg/mL 的钥空血蓝蛋白溶液中, 于 4 $^{\circ}$ C 或室温、pH7.5-10.5 条件下振荡反应 24 h; 用超滤或透析的方法去除未反应的低分子物质, 得到二乙烯三胺五乙酸-钥孔血蓝蛋白偶联物。

5. 如权利要求2所述检测乙二胺四乙酸及其螯合物的胶体金试纸, 其特征在于: 所述二乙烯三胺五乙酸-牛血清白蛋白偶联物的制备方法: 取 0.8-20mg Isothiocyanobenzyl-EDTA 溶于 50 μ L 二甲基亚砜, 配制 16-400mg/mL 的 Isothiocyanobenzyl-EDTA; 取 2.0-20.0mg 牛血清白蛋白溶于 1 mL HEPES 缓冲溶液或碳酸盐缓冲液, 配制 2-20mg/mL 的牛血清白蛋白溶液; 将此半抗原溶液逐滴加入到 1mL 2-20mg/mL 的牛血清白蛋白溶液中, 于 4 $^{\circ}$ C 或室温、pH7.5-10.5 条件下振荡反应 24h; 用超滤或透析的方法去除未反应的低分子物质, 得到二乙烯三胺五乙酸-牛血清白蛋白偶联物。

6. 如权利要求2所述检测乙二胺四乙酸及其螯合物的胶体金试纸, 其特征在于: 所述二乙烯三胺五乙酸-牛血清白蛋白偶联物的制备方法: 取 0.8-20mg Aminobenzyl-EDTA 溶于 50 μ L 二甲基亚砜, 配制 16-400mg/mL 的 Aminobenzyl-EDTA; 取 2.0-20.0 mg 牛血清白蛋白溶于 1 mL HEPES 缓冲溶液或碳酸盐缓冲液, 配制 2-20 mg/mL 的牛血清白蛋白溶液; 将 1 mL 1% 戊二

醛溶液逐滴加入Aminobenzyl-EDTA溶液中,室温放置过夜以活化氨基;将活化的半抗原溶液逐滴加入到1 mL2-20 mg/mL的牛血清白蛋白溶液中,于4℃或室温、pH7.5-10.5条件下振荡反应24 h;用超滤或透析的方法去除未反应的低分子物质,得到二乙烯三胺五乙酸-牛血清白蛋白偶联物。

7.如权利要求1-6其中之一所述胶体金试纸的制备方法,其特征在于:包括以下步骤:

1) 制备包被乙二胺四乙酸单克隆抗体-胶体金标记物的结合物释放垫;

2) 制备具有包被乙二胺四乙酸-载体蛋白偶联物的测试区和包被羊抗鼠IgG的质控区的反应膜;

3) 将1)和2)制备好的结合物释放垫、反应膜与样本垫、吸水垫和背衬组装成试纸卡。

8.如权利要求7所述胶体金试纸的制备方法,其特征在于:包括以下步骤:

(1) 将双功能乙二胺四乙酸与载体蛋白偶联,形成乙二胺四乙酸-载体蛋白偶联物;

(2) 用乙二胺四乙酸-载体蛋白偶联物免疫小鼠,将小鼠脾细胞和小鼠骨髓瘤细胞通过融合、筛选,得到分泌乙二胺四乙酸的单克隆抗体杂交瘤细胞株;培养分泌乙二胺四乙酸的单克隆抗体杂交瘤细胞株,得到乙二胺四乙酸单克隆抗体;

(3) 用柠檬酸三钠与氯金酸反应制备胶体金;

(4) 将制备的乙二胺四乙酸单克隆抗体加入步骤(3)制备的胶体金中,得到乙二胺四乙酸单克隆抗体-胶体金标记物;

(5) 将乙二胺四乙酸单克隆抗体-胶体金标记物包被在结合物释放垫上,用含0.1-1.5%卵清蛋白的磷酸氢二钠和磷酸二氢钠配制的缓冲液浸湿30秒,37℃烘2h,备用;

(6) 将乙二胺四乙酸-载体蛋白偶联物包被在反应膜上构成测试区,并将羊抗鼠IgG包被在反应膜上构成质控区,用含0.1%牛血清的封闭液进行封闭;

(7) 将样本垫用0.1-1.5%的兔血清蛋白、1-1.5%吐温-20、磷酸氢二钠和磷酸二氢钠配制的缓冲液浸泡2h,37℃烘2h,备用;

(8) 乙二胺四乙酸及其螯合物检测用胶体金试纸卡的组装:在背衬上按顺序依次粘附反应膜、吸水垫、结合物释放垫和样本垫,然后切成3mm宽的小条,加塑料盒,真空包装。

9.采用如权利要求1所述胶体金试纸检测乙二胺四乙酸及其螯合物的方法,其特征在于:包括以下步骤:将待测样品滴入试剂卡孔内,当乙二胺四乙酸及其螯合物在样品中浓度低时,胶体金抗体在层析过程中会被固定在反应膜上的乙二胺四乙酸偶联物结合,在测试区和质控区内会出现各一条红色条带;如果乙二胺四乙酸及其螯合物在样品中浓度高时,胶体金抗体与乙二胺四乙酸及其螯合物全部结合,从而在测试区内因为竞争反应不会与乙二胺四乙酸偶联物结合而不出现红色条带;阴性样品在检测过程中由于缺少抗原抗体竞争反应,将会在测试区与质控区内出现红色条带;

阳性:当质控区显示出红色条带,而测试区不显色时,判为阳性;

阴性:当质控区显示出红色条带,测试区同时也显示出红色条带,且测试区颜色接近质控线或者浅于质控线时,判为阳性;

无效:当质控区不显示出红色条带,则无论测试区显示出红色条带与否,该试纸卡判为无效。

一种检测乙二胺四乙酸及其螯合物的胶体金试纸及其制备和检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种胶体金试纸,具体的说是一种检测乙二胺四乙酸及其螯合物的胶体金试纸及其制备和检测方法。

背景技术

[0002] 乙二胺四乙酸(EDTA)是个含有羧基和氨基的螯合剂,它具有广泛的配位能力,几乎能与所有过渡重金属离子生成稳定的水溶性螯合物。由于EDTA的结构特点,现已广泛地应用在化学分析和工业生产中。由于EDTA的结构特点,它能与50多种金属离子形成可溶性的螯合物,是一种高效螯合剂,尤其与一些有害金属离子形成的螯合物的稳定性极好。

[0003] EDTA 的生物降解性能较差,另外,EDTA 会长时间吸附于土壤颗粒上,EDTA 在土壤中残留期可能较长。EDTA 使用可能带来的环境风险主要表在以下几个方面:第一,EDTA 可能导致土壤养分及矿质元素(K、Fe、Ca、Mn)的流失;第二,EDTA 的加入导致重金属活化,致使重金属更容易迁移,引起地表水、深层土壤、地下水等的二次污染;第三,EDTA 对土壤微生物、植物可能存在生物毒害;第四,EDTA 在土壤中的残留及其潜在风险。

[0004] 随着EDTA的广泛应用,含有微量EDTA的工业废水流入江河湖泊,在环境中主要以重金属螯合物形式存在,这些重金属螯合物为有害和难解离物质,造成重金属的扩散,严重地污染了环境。近年来被发现明显富集在瑞士、德国、美国的河流和湖泊中。这些自然水中的EDTA来源于一些工业洗涤制品、摄影业制品等工厂。由于在自然水中EDTA和金属离子是络合存在的,所以河水中EDTA与重金属的富集程度是相一致的。由于EDTA的性质,使它成为重金属的保护伞,使得在自然水中重金属的富集对环境造成污染,这些已引起国内外环保部门的重视。瑞士的洗涤品协会已通过一项决议,即洗涤品中将不允许含有EDTA。它对水环境造成的污染,越来越引起人们的重视,已成为一个世界性的问题。并且EDTA随工业废水的排放和许多有害重金属形成配合物,增大了重金属的可溶性,造成重金属的扩散,危害较大,已引起国内外环境监测人员的重视。

[0005] 另外,在人体内不能被分解而排出体外,可引起人体缺钙,也可引起暂时性血压下降,肾脏功能障碍,所以EDTA在人体内的蓄积会危害健康。我国规定罐头食品中EDTA二钠盐的最大使用量为0.25 g/kg。

[0006] 目前,乙二胺四乙酸及其螯合物的检测方法有滴定法、高效液相色谱法(HPLC)。但这些方法检测费时费力且成本高,与其它检测系统相比,一次检测样品量少,检测时间长,不适合现场快速检测,仅作为少数实验室的确证方法,满足不了环境和农产品检测快速简便的需要。

[0007] 而基于乙二胺四乙酸特异性抗体的免疫检测方法为其检测提供了一种新的策略。免疫法目前越来越受到重视,因其检测限低,单个样品检测成本低(如ELISA法),尤其适合应用于大批样品的检测,尤其是免疫层析法,检测速度快,灵敏度高,与HPLC、GC-MS检测有较高一致性,而且非常适合活体动物的检测。而且成本低,无需大型仪器,而且可以直接对

尿液、饲料、洗涤剂、水样等样品进行检测,适用于现场检测。但是,目前还没有检测乙二胺四乙酸及其螯合物的商品化的试剂盒和试纸条。因此,研究和建立具有我国自主知识产权的乙二胺四乙酸及其螯合物免疫学检测方法,对提高我国环境和农产品乙二胺四乙酸及其螯合物控制和监测水平,保障环境及农产品质量和消费者的健康具有重要意义。

发明内容

[0008] 本发明目的是为解决上述技术问题的不足,提供一种检测乙二胺四乙酸及其螯合物的胶体金试纸及其制备和检测方法,能准确且灵敏的检测乙二胺四乙酸及其螯合物。

[0009] 本发明为解决上述技术问题所采用的技术方案是:

一种检测乙二胺四乙酸及其螯合物的胶体金试纸,包括反应膜、样本垫、结合物释放垫、吸水垫和背衬;所述反应膜上具有包被乙二胺四乙酸-载体蛋白偶联物的测试区和包被羊抗鼠IgG的质控区,所述结合物释放垫包被乙二胺四乙酸单克隆抗体-胶体金标记物;

所述乙二胺四乙酸-载体蛋白偶联物由乙二胺四乙酸经过双功能螯合剂Aminobenzyl-EDTA或Isothiocyanobenzyl-EDTA[1-(4-异硫氰苄基)乙烯基二胺-N,N',N'-四乙酸]与载体蛋白偶联得到;

所述乙二胺四乙酸单克隆抗体-胶体金标记物中的乙二胺四乙酸单克隆抗体是以乙二胺四乙酸-载体蛋白偶联物作为免疫抗原免疫试验动物后制备获得。

[0010] 所述乙二胺四乙酸-载体蛋白偶联物,为乙二胺四乙酸-牛血清白蛋白偶联物、乙二胺四乙酸-人血清白蛋白偶联物、乙二胺四乙酸-钥孔血蓝蛋白偶联物、乙二胺四乙酸-卵清蛋白偶联物、乙二胺四乙酸-铁蛋白偶联物或乙二胺四乙酸-多聚赖氨酸偶联物。

[0011] 所述乙二胺四乙酸-钥孔血蓝蛋白偶联物的制备方法:取0.8-20 mg双功能螯合剂溶于50 μ L二甲基亚砜,配制16-400 mg/mL的Isothiocyanobenzyl-EDTA;取2.0-20.0 mg钥孔血蓝蛋白溶于1 mL HEPES缓冲溶液或碳酸盐缓冲液,配制2-20 mg/mL的钥孔血蓝蛋白溶液;将此半抗原溶液逐滴加入到1 mL 2-20 mg/mL的钥孔血蓝蛋白溶液中,于4℃或室温、pH7.5-10.5条件下振荡反应24 h;用超滤或透析的方法去除未反应的低分子物质,得到乙二胺四乙酸-钥孔血蓝蛋白偶联物。

[0012] 所述乙二胺四乙酸-钥孔血蓝蛋白偶联物的制备方法:取0.8-20 mg双功能螯合剂溶于50 μ L二甲基亚砜,配制16-400 mg/mL的Aminobenzyl-EDTA;取2.0-20.0 mg钥孔血蓝蛋白溶于1 mL HEPES缓冲溶液或碳酸盐缓冲液,配制2-20 mg/mL的钥孔血蓝蛋白溶液;将1 mL 1%戊二醛溶液逐滴加入Aminobenzyl-EDTA溶液中,室温放置过夜以活化氨基。将活化的半抗原溶液逐滴加入到1 mL 2-20 mg/mL的钥孔血蓝蛋白溶液中,于4℃或室温、pH7.5-10.5条件下振荡反应24 h;用超滤或透析的方法去除未反应的低分子物质,得到乙二胺四乙酸-钥孔血蓝蛋白偶联物。

[0013] 所述乙二胺四乙酸-牛血清白蛋白偶联物的制备方法:取0.8-20 mg双功能螯合剂溶于50 μ L二甲基亚砜,配制16-400 mg/mL的Isothiocyanobenzyl-EDTA;取2.0-20.0 mg牛血清白蛋白溶于1 mL HEPES缓冲溶液或碳酸盐缓冲液,配制2-20 mg/mL的牛血清白蛋白溶液;将此半抗原溶液逐滴加入到1 mL 2-20 mg/mL的牛血清白蛋白溶液中,于4℃或室温、pH7.5-10.5条件下振荡反应24 h;用超滤或透析的方法去除未反应的低分子物质,得到乙二胺四乙酸-牛血清白蛋白偶联物。

[0014] 所述乙二胺四乙酸-牛血清白蛋白偶联物的制备方法:取0.8-20 mg双功能螯合剂溶于50 μ L二甲基亚砜,配制16-400 mg/mL的Aminobenzyl-EDTA;取2.0-20.0 mg牛血清白蛋白溶于1 mL HEPES缓冲溶液或碳酸盐缓冲液,配制2-20 mg/mL的牛血清白蛋白溶液;将1 mL 1%戊二醛溶液逐滴加入Aminobenzyl-EDTA溶液中,室温放置过夜以活化氨基。将活化的半抗原溶液逐滴加入到1 mL 2-20 mg/mL的牛血清白蛋白溶液中,于4℃或室温、pH7.5-10.5条件下振荡反应24 h;用超滤或透析的方法去除未反应的低分子物质,得到乙二胺四乙酸-牛血清白蛋白偶联物。

[0015] 所述胶体金试纸的制备方法,包括以下步骤:

- 1) 制备包被乙二胺四乙酸单克隆抗体-胶体金标记物的结合物释放垫;
- 2) 制备具有包被乙二胺四乙酸-载体蛋白偶联物的测试区和包被羊抗鼠IgG的质控区的反应膜;
- 3) 将1)和2)制备好的结合物释放垫、反应膜与样本垫、吸水垫和背衬组装成试纸卡。

[0016] 所述胶体金试纸的制备方法,具体包括以下步骤:

(1) 将双功能螯合剂(Isothiocyanobenzyl-EDTA或Aminobenzyl-EDTA)与载体蛋白偶联,形成乙二胺四乙酸-载体蛋白偶联物;

(2) 用乙二胺四乙酸-载体蛋白偶联物免疫小鼠,将小鼠脾细胞和小鼠骨髓瘤细胞通过融合、筛选,得到分泌乙二胺四乙酸的单克隆抗体杂交瘤细胞株;培养分泌乙二胺四乙酸的单克隆抗体杂交瘤细胞株,得到乙二胺四乙酸单克隆抗体;

(3) 用柠檬酸三钠与氯金酸反应制备胶体金;

(4) 将制备的乙二胺四乙酸单克隆抗体加入步骤(3)制备的胶体金中,得到乙二胺四乙酸单克隆抗体-胶体金标记物;

(5) 将乙二胺四乙酸单克隆抗体-胶体金标记物包被在结合物释放垫上,用含0.1-1.5%卵清蛋白的磷酸氢二钠和磷酸二氢钠配制的缓冲液浸湿30秒,37℃烘2h备用;

(6) 将乙二胺四乙酸-载体蛋白偶联物包被在反应膜上构成测试区,并将羊抗鼠IgG包被在反应膜上构成质控区,用含0.1%牛血清的封闭液进行封闭;

(7) 将样本垫用0.1-1.5%的兔血清蛋白、1-1.5%吐温-20用磷酸氢二钠和磷酸二氢钠配制的缓冲液浸泡2h,37℃烘2h备用;

(8) 乙二胺四乙酸及其螯合物检测用胶体金试纸卡的组装:在背衬上按顺序依次粘附反应膜、吸水垫、结合物释放垫和样本垫,然后切成3mm宽的小条,加塑料盒,真空包装。本发明的试纸卡将样本垫盖住结合物释放垫可以延长检测结果的观察时间,样本垫也可以将检测液体充分吸收能与金标抗体完全接触充分反应、减少误差。

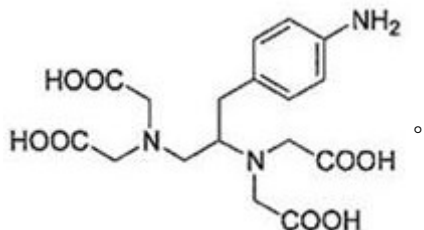
[0017] 采用所述胶体金试纸检测乙二胺四乙酸及其螯合物的方法,包括以下步骤:将待测样品滴入试剂卡孔内,当乙二胺四乙酸及其螯合物在样品中浓度低时,胶体金抗体在层析过程中会被固定在反应膜上的乙二胺四乙酸偶联物结合,在测试区(T)质控区(C)内会出现各一条红色条带。如果乙二胺四乙酸及其螯合物在样品中浓度高时,胶体金抗体与乙二胺四乙酸及其螯合物全部结合,从而在(T)区内因为竞争反应不会与乙二胺四乙酸偶联物结合而不出现红色条带。阴性样品在检测过程中由于缺少抗原抗体竞争反应,将会在(T)区与(C)区内出现红色条带。

[0018] 阳性:当(C)区显示出红色条带,而(T)区不显色时,判为阳性。

[0019] 阴性：当(C)区显示出红色条带，(T)区同时也显示出红色条带，且(T)区颜色接近(C)线或者浅于(C)线时，判为阳性。

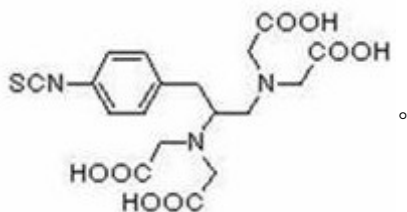
[0020] 无效：当(C)区不显示出红色条带，则无论(T)区显示出红色条带与否，该试纸卡判为无效。

[0021] 所述Aminobenzyl-EDTA，分子式： $C_{17}H_{23}N_3O_8$ ，分子量：397.38，结构式式为



[0022]

所述Isothiocyanobenzyl-EDTA，其全名为：1-(4-Isothiocyanobenzyl) ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid，即1-(4-异硫氰苄基) 乙烯基二胺-N,N,N',N'-四乙酸；分子式： $C_{18}H_{21}N_3O_8S$ ，分子量：439.44，结构式为：



[0023] 有益效果是：

1、本发明乙二胺四乙酸及其螯合物的快速检测试纸采用高度特异性的抗体-抗原反应及免疫层析分析技术，在反应膜测试区包被乙二胺四乙酸-载体蛋白偶联抗原、结合物释放垫包被胶体金标记的乙二胺四乙酸单克隆抗体，利用竞争法来检测待测样品中是否含有乙二胺四乙酸。通过待测样品中乙二胺四乙酸与包被在反应膜上的乙二胺四乙酸-载体蛋白偶联物共同竞争乙二胺四乙酸单克隆抗体-胶体金标记物，根据测试区红色条带有无或颜色深浅来判断待测样品液中是否含有乙二胺四乙酸及其螯合物或含量多少。

[0024] 2、采用不同的原料获得的完全抗原的结构必然不完全相同，由于获得的抗原结构不完全相同，并不能确定他人同样能够实现本申请中制备的全抗原，与抗体和羊抗鼠IgG共同使用准确且灵敏的检测乙二胺四乙酸的技术效果。本发明选择反应过程中的PH7.5-10.5，及双功能螯合剂、缓冲液、牛血清白蛋白、钥孔血蓝蛋白、戊二醛等原料的用量或浓度，确保全抗原制备过程中充分利用各个原料，并确保具有较高的产率。本发明的胶体金试纸卡具有敏感度高、价格低、操作简单、检测时间短、适合各种单位使用、储存简单、保质期长等优点。

附图说明

[0025] 图1为本发明检测试纸卡的组装示意图；

图2为本发明的检测结果分析示意图。

具体实施方式

[0026] 下面结合具体的实施例来进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明,而不是用来限制本发明的范围。

[0027] 实施例1

乙二胺四乙酸及其螯合物检测试纸卡的制备

1. 乙二胺四乙酸-载体蛋白偶联物的合成与鉴定

(1) 乙二胺四乙酸-钥孔血蓝蛋白偶联物的合成

可按以下步骤制备:取0.8-20 mg双功能螯合剂溶于50 μ L二甲基亚砜,配制16-400 mg/mL的Isothiocyanobenzyl-EDTA;取2.0-20.0 mg钥孔血蓝蛋白溶于1 mL HEPES缓冲溶液或碳酸盐缓冲液,配制2-20 mg/mL的钥孔血蓝蛋白溶液;将此半抗原溶液逐滴加入到1 mL 2-20 mg/mL的钥孔血蓝蛋白溶液中,于4℃或室温、pH7.5-10.5条件下振荡反应24 h;用超滤或透析的方法去除未反应的低分子物质,得EDTA的完全抗原。

[0028] (2) 乙二胺四乙酸-牛血清白蛋白的合成

可按以下步骤制备:取0.8-20 mg双功能螯合剂溶于50 μ L二甲基亚砜,配制16-400 mg/mL的Isothiocyanobenzyl-EDTA;取2.0-20.0 mg牛血清白蛋白溶于1 mL HEPES缓冲溶液或碳酸盐缓冲液,配制2-20 mg/mL的牛血清白蛋白溶液;将此半抗原溶液逐滴加入到1 mL 2-20 mg/mL的牛血清白蛋白溶液中,于4℃或室温、pH7.5-10.5条件下振荡反应24 h;用超滤或透析的方法去除未反应的低分子物质,得EDTA的完全抗原。

[0029] 或按以下步骤制备:取0.8-20 mg双功能螯合剂溶于50 μ L二甲基亚砜,配制16-400 mg/mL的Aminobenzyl-EDTA;取2.0-20.0 mg牛血清白蛋白溶于1 mL HEPES缓冲溶液或碳酸盐缓冲液,配制2-20 mg/mL的牛血清白蛋白溶液;将1 mL 1%戊二醛溶液逐滴加入Aminobenzyl-EDTA溶液中,室温放置过夜以活化氨基。将活化的半抗原溶液逐滴加入到1 mL 2-20 mg/mL的牛血清白蛋白溶液中,于4℃或室温、pH7.5-10.5条件下振荡反应24 h;用超滤或透析的方法去除未反应的低分子物质,得EDTA的完全抗原。

[0030] 2. 乙二胺四乙酸单克隆抗体的制备

(1) 动物免疫

将免疫抗原注入到Balb/c小鼠体内,免疫剂量为50 μ g/只,使其产生多克隆抗体。

[0031] (2) 细胞融合和克隆

取免疫Balb/c小鼠脾细胞,按5:1比例与SP2/0骨髓瘤细胞融合,采用间接竞争ELISA法测定细胞上清液,筛选阳性孔。筛选乙二胺四乙酸溶液浓度低于4nm仍呈阳性反应的细胞株。利用有限稀释法对阳性孔进行克隆化,直到得到稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0032] (3) 杂交瘤细胞株的特异性检测

用间接竞争ELISA法测定细胞上清液与不同浓度的乙二胺四乙酸溶液及乙二胺四乙酸-金属离子(如 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Cr^{3+} 、 Mg^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 、 In^{3+} 、 K^{+} 、 Na^{+})螯合物溶液的反应性。选择交叉反应性均达到90%以上的细胞株。

[0033] (4) 细胞冻存和复苏

将抗乙二胺四乙酸的单克隆杂交瘤细胞株用冻存液制成 1×10^8 个/mL的细胞悬液,在液氮中长期保存。复苏时取出冻存管,立即放入 37℃水浴中速融,离心去除冻存液后,移入培养瓶内培养。

[0034] (5) 单克隆抗体的制备与纯化

将Balb/c小鼠腹腔注入灭菌石蜡油0.5ml/只,7天后腹腔注射抗乙二胺四乙酸的单克隆杂交瘤细胞 10^5 个/只,7天后采集腹水。用辛酸-饱和硫酸按法进行纯化,纯化后的腹水放入-20℃环境保存。

[0035] 3. 乙二胺四乙酸单克隆抗体-胶体金标记物的制备

(1) 胶体金的制备

用双蒸去离子水将1%氯金酸稀释成0.01%,置磁力加热棒搅拌器上搅拌煮沸,每100ml 0.01%氯金酸加入2ml 1%柠檬酸三钠,继续煮沸,至液体呈红色时停止加热,冷却至室温后补足失水。制备好的胶体金外观应纯净、透亮、无沉淀和漂浮物,有效期为一个月。

[0036] (2) 乙二胺四乙酸单克隆抗体-胶体金标记物的制备

在磁力搅拌下,用0.1M碳酸钾调胶体金的pH值至8.2,按1~2 μ g/ml抗体胶体金加入抗乙二胺四乙酸单克隆抗体,继续搅拌混匀30min,加入10% BSA至终浓度为1%,静置30min。12000rpm、4℃离心30min,弃上清液,沉淀用复溶缓冲液洗涤两次,用初始胶体金体积1/20的复溶缓冲液将沉淀重悬,置4℃备用,保存60天。

[0037] 5、结合物释放垫的包被

将结合物释放垫浸泡于含有0.1-1.5%的卵清蛋白的磷酸氢二钠和磷酸二氢钠配制的缓冲液中浸湿30秒,37℃烘2h;用点膜仪将制备好的乙二胺四乙酸单克隆抗体-胶体金标记物均匀包被在结合物释放垫上,真空干燥,真空封装,置4℃备用。

[0038] 6、硝酸纤维素膜的处理

处理:包被乙二胺四乙酸-载体蛋白偶联物构成测试区,包被羊抗鼠IgG构成质控区,再用含0.1%牛血清的封闭液进行封闭。

[0039] 包被过程:将硝酸纤维素膜用磷酸缓冲液(含3%的甲醇)将乙二胺四乙酸-血蓝蛋白(KLH)偶联物稀释到10mg/mL,用点膜仪将其包被于硝酸纤维素膜作为测试区,包被量为0.8 μ g/cm²,测试区靠近结合垫端,距结合垫端约8mm;用0.01M pH 7.4 PBS缓冲液(含3%的甲醇)将羊抗鼠IgG抗体稀释到150 μ g/ml,用点膜仪将其包被于纤维素膜作为质控区,包被量为0.8 μ g/cm²,质控区靠近吸水垫,距吸收垫约8mm,两线距离5-8mm。37℃烘干,封装。

[0040] 7、胶体金免疫试纸卡的组装

在PVC背衬上按顺序粘附硝酸纤维素膜、吸水垫、结合物释放垫和样本垫,结构如图1所示,图1中胶体金结合垫即为结合物释放垫;NC膜为反应膜;PVC胶板为背衬。将贴样本垫盖住结合物释放垫,然后切成2-3mm宽的小条,加塑料盒,真空包装。原包装应在18-25℃的环境中储存,有效期一年。本发明的试纸卡将样本垫盖住结合物释放垫可以延长检测结果观察时间,样本垫也可以将检测液体充分吸收能与金标抗体完全接触、充分反应,从而减少误差。

[0041] 本实施例中的Isothiocyanobenzyl-EDTA,购买于日本东仁化学科技有限公司,纯度:90%以上(HPLC),储存条件:-20℃。

[0042] 实施例2

本实施例中乙二胺四乙酸-钥空血蓝蛋白偶联物的制备方法如下,其余方法如实施例1:

取0.8-20 mg双功能螯合剂溶于50 μ L二甲基亚砜,配制16-400 mg/mL的Aminobenzyl-EDTA;取2.0-20.0 mg钥空血蓝蛋白溶于1 mL HEPES缓冲溶液或碳酸盐缓冲液,配制2-20

mg/mL的钥空血蓝蛋白溶液;将1 mL 1%戊二醛溶液逐滴加入Aminobenzyl-EDTA溶液中,室温放置过夜以活化氨基。将活化的半抗原溶液逐滴加入到1 mL 2-20 mg/mL的钥空血蓝蛋白溶液中,于4℃或室温、pH7.5-10.5条件下振荡反应24 h;用超滤或透析的方法去除未反应的低分子物质,得EDTA的完全抗原。

[0043] 本实施例中的Aminobenzyl-EDTA购买自美国SIGMA-ALDRICH公司,纯度:≥90% (CHN) (Sigma-Aldrich)。

[0044] 实施例3

本实施例中乙二胺四乙酸-牛血清白蛋白偶联物的制备方法如下,其余方法如实施例1:

取0.8-20 mg双功能螯合剂溶于50 μL二甲基亚砜,配制16-400 mg/mL的Isothiocyanobenzyl-EDTA;取2.0-20.0 mg牛血清白蛋白溶于1 mL HEPES缓冲溶液或碳酸盐缓冲液,配制2-20 mg/mL的牛血清白蛋白溶液;将此半抗原溶液逐滴加入到1 mL 2-20 mg/mL的牛血清白蛋白溶液中,于4℃或室温、pH7.5-10.5条件下振荡反应24 h;用超滤或透析的方法去除未反应的低分子物质,得EDTA的完全抗原。

[0045] 本实施例采用所述胶体金试纸检测乙二胺四乙酸及其螯合物的方法,包括以下步骤:将待测样品滴入试剂卡孔内,当乙二胺四乙酸及其螯合物在样品中浓度低时,胶体金抗体在层析过程中会被固定在反应膜上的乙二胺四乙酸偶联物结合,在测试区(T)质控区(C)内会出现各一条红色条带。如果乙二胺四乙酸及其螯合物在样品中浓度高时,胶体金抗体与乙二胺四乙酸及其螯合物全部结合,从而在(T)区内因为竞争反应不会与乙二胺四乙酸偶联物结合而不出现红色条带。阴性样品在检测过程中由于缺少抗原抗体竞争反应,将会在(T)区与(C)区内出现红色条带。

[0046] 阳性:当(C)区显示出红色条带,而(T)区不显色时,判为阳性。

[0047] 阴性:当(C)区显示出红色条带,(T)区同时也显示出红色条带,且(T)区颜色接近(C)线或者浅于(C)线时,判为阳性。

[0048] 无效:当(C)区不显示出红色条带,则无论(T)区显示出红色条带与否,该试纸卡判为无效。

[0049] 检测结果,如图2所示。

[0050] 本实施例中的Isothiocyanobenzyl-EDTA购买于美国SIGMA公司,纯度:~90% (HPLC)。

[0051] 实施例4

乙二胺四乙酸-牛血清白蛋白偶联物的制备方法如下,其余方法如实施例1:

取0.8-20 mg双功能螯合剂溶于50 μL二甲基亚砜,配制16-400 mg/mL的Aminobenzyl-EDTA;取2.0-20.0 mg牛血清白蛋白溶于1 mL HEPES缓冲溶液或碳酸盐缓冲液,配制2-20 mg/mL的牛血清白蛋白溶液;将1 mL 1%戊二醛溶液逐滴加入Aminobenzyl-EDTA溶液中,室温放置过夜以活化氨基。将活化的半抗原溶液逐滴加入到1 mL 2-20 mg/mL的牛血清白蛋白溶液中,于4℃或室温、pH7.5-10.5条件下振荡反应24 h;用超滤或透析的方法去除未反应的低分子物质,得EDTA的完全抗原。

[0052] 本实施例中的Aminobenzyl-EDTA,购买于日本东仁化学科技有限公司,外观:浅黄棕色粉末,外观:淡黄色-浅橙色粉末,纯度:≥95.0% (HPLC),储存条件:-20℃。

[0053] 相关试验：

试验一、样品中乙二胺四乙酸的检测

称取 1.0g (精确至 $\pm 0.01\text{g}$) 样品于50mL平底烧瓶中, 适量水溶解或匀浆后, 过滤或3000r/min离心5-10min, 取上清, 采用本发明检测乙二胺四乙酸及其螯合物的胶体金试纸, 点样检测, 30s内观察检测线的颜色。当乙二胺四乙酸及其螯合物的浓度达到900ng/ml时, 其检测线颜色仍肉眼可见。该方法耗时15min以内, 回收率达95%以上。

[0054] 试验二、样品中乙二胺四乙酸的检测

称取 1.0g (精确至 $\pm 0.01\text{g}$) 样品于50mL平底烧瓶中, 适量水溶解或匀浆后, 过滤或3000r/min离心5-10min, 取上清, 用甲酸调pH至0.5-2.0, 过滤或3000r/min离心5-10min, 收集沉淀以HEPES缓冲液pH 4.5溶解, 采用本发明检测乙二胺四乙酸及其螯合物的胶体金试纸, 点样检测, 30s内观察检测线的颜色。当乙二胺四乙酸及其螯合物的浓度达到900ng/ml时, 其检测线颜色仍肉眼可见。该方法耗时15min以内, 回收率达85%-95%。

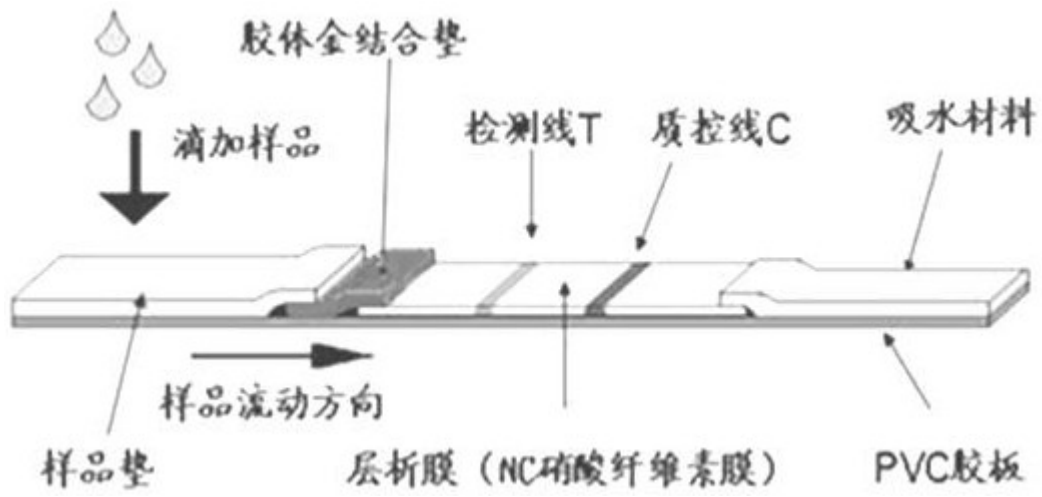


图1

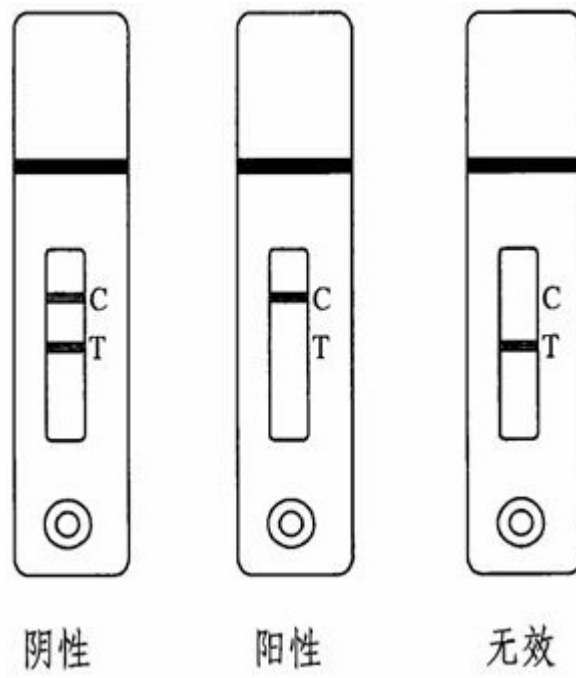


图2

专利名称(译)	一种检测乙二胺四乙酸及其螯合物的胶体金试纸及其制备和检测方法		
公开(公告)号	CN107247142A	公开(公告)日	2017-10-13
申请号	CN2017110542323.7	申请日	2017-07-05
[标]申请(专利权)人(译)	河南科技大学		
申请(专利权)人(译)	河南科技大学		
当前申请(专利权)人(译)	河南科技大学		
[标]发明人	孔涛 王国永 张淑慧 杨自军 杨帆 张才 张梦雨 李芳源 敬梦瑶 张柏豪 王杰 张倩文		
发明人	孔涛 王国永 张淑慧 杨自军 杨帆 张才 张梦雨 李芳源 敬梦瑶 张柏豪 王杰 张倩文		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/531 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/54306 G01N33/558		
代理人(译)	程茗		
其他公开文献	CN107247142B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种检测乙二胺四乙酸及其螯合物的胶体金试纸及其制备和检测方法，胶体金试纸，包括反应膜、样本垫、结合物释放垫、吸水垫和背衬，其特征在于，所述反应膜上具有包被乙二胺四乙酸-载体蛋白偶联物的测试区和包被羊抗鼠IgG的质控区，所述结合物释放垫包被乙二胺四乙酸单克隆抗体-胶体金标记物；将待测样品滴入试剂卡孔内，当乙二胺四乙酸及其螯合物在样品中浓度低时，胶体金抗体在层析过程中会被固定在反应膜上的乙二胺四乙酸偶联物结合，在测试区质控区内会出现各一条红色条带；浓度高时，则反之；本发明能准确且灵敏的检测乙二胺四乙酸及其螯合物。

