



(21)申请号 201810149539.1

(22)申请日 2018.02.13

(71)申请人 苏州仁端生物医药科技有限公司
地址 215200 江苏省苏州市吴江经济技术
开发区长安路650号

(72)发明人 周小进

(74)专利代理机构 北京品源专利代理有限公司
11332

代理人 巩克栋

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

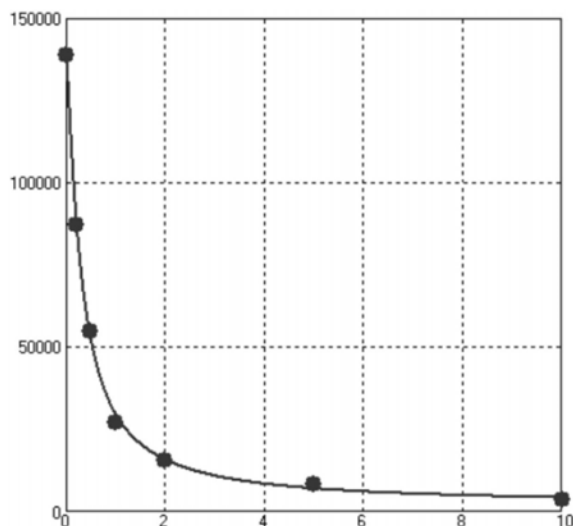
权利要求书2页 说明书8页 附图1页

(54)发明名称

一种镉离子检测试剂盒及其应用

(57)摘要

本发明提供了一种镉离子检测试剂盒及其制备方法和应用,所述镉离子完全抗原为镉离子、螯合剂与载体蛋白的复合物;其中,所述螯合剂包括乙二胺四乙酸、二乙三胺五乙酸、二乙三胺五乙酸衍生物、1,4,7,10-四氮杂环十二烷-N,N,N,N-四乙酸或1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯中的任意一种或至少两种的组合。本发明将重金属镉离子通过双功能螯合剂与载体蛋白偶联得到镉离子完全抗原,并制备得到免疫原性强、对镉离子有较高效价的镉离子单克隆抗体,组成的试剂盒特异性强、灵敏度高,可用于检测镉离子。



1. 一种镉离子完全抗原,其特征在於,所述镉离子完全抗原为镉离子、螯合剂与载体蛋白的复合物;

其中,所述螯合剂包括乙二胺四乙酸、二乙三胺五乙酸、二乙三胺五乙酸衍生物、1,4,7,10-四氮杂环十二烷-N,N,N,N-四乙酸或1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯中的任意一种或至少两种的组合。

2. 根据权利要求1所述的镉离子完全抗原,其特征在於,所述螯合剂为1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯。

3. 根据权利要求1或2所述的镉离子完全抗原,其特征在於,所述载体蛋白包括多聚赖氨酸、人血清白蛋白、匙孔血蓝蛋白或牛血清白蛋白中的任意一种或至少两种的组合,优选为多聚赖氨酸和/或人血清白蛋白。

4. 根据权利要求1-3任一项所述的镉离子完全抗原,其特征在於,所述镉离子完全抗原包括镉离子-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯-多聚赖氨酸复合物和/或镉离子-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯-人血清白蛋白复合物。

5. 一种镉离子单克隆抗体,其特征在於,所述镉离子单克隆抗体为如权利要求1-4任一项所述的镉离子完全抗原的特异性抗体;

优选地,所述镉离子单克隆抗体为镉离子-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯-多聚赖氨酸复合物的特异性抗体。

6. 一种试剂盒,其特征在於,所述试剂盒包括如权利要求1-4任一项所述的镉离子完全抗原和/或如权利要求5所述的镉离子单克隆抗体;

优选地,所述镉离子完全抗原偶联于固相载体表面,优选为偶联于磁微粒表面;

优选地,所述镉离子单克隆抗体修饰有化学发光标记物;

优选地,所述化学发光标记物包括吖啶酯和/或吖啶磺酰胺,优选为吖啶酯。

7. 根据权利要求6所述的试剂盒,其特征在於,所述试剂盒还包括镉离子标准储备液、清洗液、化学发光激发液、乙二胺四乙酸溶液、NaOH溶液或说明书中的任意一种或至少两种的组合;

优选地,所述镉离子标准储备液中镉离子的浓度为1-2mg/mL,优选为1mg/mL;

优选地,所述乙二胺四乙酸溶液的浓度为0.1-0.3M,优选为0.1M。

8. 一种如权利要求6或7所述的试剂盒的标准曲线的制定方法,其特征在於,包括以下步骤:

(1) 将镉离子标准储备液进行梯度稀释,配置得到至少6份不同浓度的镉离子标准液;

(2) 将步骤(1)所述的镉离子标准液与偶联有镉离子完全抗原的磁微粒溶液、吖啶酯标记的镉离子单克隆抗体溶液混合孵育;

(3) 磁分离,弃上清液,加入化学发光激发液,测定化学发光强度;

(4) 以化学发光强度为纵坐标,镉离子标准液的浓度为横坐标,绘制化学发光强度与镉离子浓度的关系四参数曲线图,得到所述标准曲线;

优选地,步骤(2)所述孵育的温度为35-39℃;

优选地,步骤(2)所述孵育的时间为10-30min。

9. 一种检测镉离子的方法,其特征在於,所述方法采用如权利要求5所述的镉离子单克

隆抗体和/或如权利要求6或7所述的试剂盒；

优选地,所述方法包括以下步骤:

(1') 将待测样本与乙二胺四乙酸溶液共孵育,进行预处理;

(2') 将预处理的待测样本与偶联有镉离子完全抗原的磁微粒和吖啶酯标记的镉离子单克隆抗体混合孵育;

(3') 磁分离,弃上清液,加入化学发光激发液,测定化学发光强度;

(4') 根据标准曲线,计算得到所述待测样本中镉离子的浓度。

10. 一种如权利要求1-4任一项所述的镉离子完全抗原、如权利要求5所述的镉离子单克隆抗体或如权利要求6或7所述的试剂盒在检测镉离子中的应用。

一种镉离子检测试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于免疫分析领域,涉及一种镉离子检测试剂盒及其应用,尤其涉及一种基于磁微粒和化学发光技术的镉离子检测试剂盒及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 重金属镉(Cd)是一种常见的环境污染物,主要来源于采矿和冶炼等工业活动。释放到环境中的镉富集于土壤的镉经农作物和水中的水生动植物中,最终通过饮食进入人体。胃肠道对镉的吸收率约为5-10%,而肺对镉的吸收率则高达10-50%。镉在人体内的生物半衰期长达10-30年,对肝、肾、肺、骨骼、心血管系统、免疫系统和神经系统均具有损害作用。镉的主要危害包括肾毒性和骨毒性。其中,肾脏是镉暴露的主要靶器官,镉通过诱导氧化应激使肾小管细胞发生浊肿、凋亡、坏死、增生和管腔萎缩,造成肾小管重吸收功能紊乱;高剂量的镉通过与钙竞争直接抑制细胞对钙的转运,同时通过影响肾功能导致1,25-二羟基维生素D3合成下降而间接影响骨钙代谢,最终导致骨钙缺失,引起骨质疏松。近期研究结果证明,镉也是动脉粥样硬化、高血压等心血管疾病的危险因素之一。此外,长期暴露于高浓度的镉可能会诱发癌症,国际癌症研究机构(IARC)已将镉列入“人类致癌物质”。

[0003] 传统的重金属离子检测法包括原子吸收光谱法、电感耦合等离子体质谱法、伏安法、离子色谱法和电热原子化原子吸收光谱法等,然而这些检测方法必须采用大型分析仪器,无法用于现场检测,且受检费用高、处理量有限、检测时间长、准确度受仪器限制,不利于在日常生活中推广应用。

[0004] CN 106872709 A公开了一种基于直接竞争酶联免疫法检测镉离子试剂盒及其应用,所述试剂盒包括包被有羊抗鼠IgG二抗的检测板,酶标Cd-ITCBE螯合物半抗原,抗镉离子单克隆抗体溶液,所述抗镉离子单克隆抗体溶液由Cd-ITCBE-cBSA免疫原免疫Balb/C小鼠制备而来,然而所述试剂盒的最低检测线为0.04μg/L,灵敏度较低,不能用于检测痕量镉离子的浓度。

[0005] 因此,提供一种灵敏度高、特异性强、成本低的镉离子检测试剂盒,在重金属分析领域具有重要意义。

发明内容

[0006] 针对现有技术的不足,本发明提供一种镉离子检测试剂盒及其制备方法和应用,所述试剂盒基于磁微粒和化学发光技术,具有灵敏度高、特异性强、操作方法简单、成本低的优点,可以用于测定食品、土壤、水源、动物及人体体液中重金属镉离子的含量。

[0007] 为达此目的,本发明采用以下技术方案:

[0008] 第一方面,本发明提供了一种镉离子完全抗原,所述镉离子完全抗原为镉离子、螯合剂与载体蛋白的复合物;

[0009] 其中,所述螯合剂包括乙二胺四乙酸、二乙三胺五乙酸、二乙三胺五乙酸衍生物、1,4,7,10-四氮杂环十二烷-N,N,N,N-四乙酸或1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙

酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯中的任意一种或至少两种的组合。

[0010] 螯合剂是一种与生物分子和金属离子均具有结合作用的物质,其分子结构包含一个结合蛋白的化学反应功能团和一个结合金属离子的金属螯合基团。本发明中,乙二胺四乙酸(EDTA)、二乙三胺五乙酸(DTPA)及其衍生物通过与金属离子和蛋白的酪氨酸、组氨酸和赖氨酸残基作用达到偶联,1,4,7,10-四氮杂环十二烷-N,N,N,N-四乙酸(DOTA)及其衍生物较EDTA和DTPA的偶联稳定性更优,镉离子半抗原通过螯合剂与载体蛋白形成具有免疫原性和免疫反应性的镉离子完全抗原。

[0011] 优选地,所述螯合剂为1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯。

[0012] 优选地,所述载体蛋白包括多聚赖氨酸、人血清白蛋白、血蓝蛋白或牛血清白蛋白中的任意一种或至少两种的组合,优选为多聚赖氨酸和/或人血清白蛋白。

[0013] 本发明中,多聚赖氨酸(PLL)、人血清白蛋白(HSA)、匙孔血蓝蛋白(KLH)和牛血清白蛋白(BSA)为具有高度免疫原性的蛋白大分子,通过与半抗原交联,增强半抗原的免疫原性。与PLL和HSA相比,KLH和BSA的免疫原性过强,作为重金属离子的载体会减弱抗重金属离子抗体的产生,使得抗重金属离子的抗体的效价降低。本发明中,采用PLL和HSA作为载体蛋白,不仅增强了镉离子的免疫原性,而且产生的抗体对镉离子具有较高的效价。

[0014] 优选地,所述镉离子完全抗原包括镉离子-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯-多聚赖氨酸复合物和/或镉离子-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯-人血清白蛋白复合物。

[0015] 本发明中,双功能螯合剂1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯(DOTA-NHS)的NHS反应基团与载体蛋白的氨基定位反应,杂环的氮原子与重金属镉离子配位生成稳定的配合物,得到的镉离子-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯-多聚赖氨酸复合物(Cd-DOTA-PLL)作为镉离子完全免疫原用于刺激机体产生镉离子单克隆抗体,镉离子-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯-人血清白蛋白复合物(Cd-DOTA-BSA)作为检测原偶联于固相载体表面,用于检测待测样本中的镉离子。

[0016] 第二方面,本发明提供了一种镉离子单克隆抗体,所述镉离子单克隆抗体为如第一方面所述的镉离子完全抗原的特异性抗体。

[0017] 本发明中,所述镉离子单克隆抗体为采用镉离子完全抗原作为免疫原,刺激机体免疫系统产生的针对镉离子的特异性抗体。

[0018] 优选地,所述镉离子单克隆抗体为镉离子-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯-多聚赖氨酸复合物的特异性抗体。

[0019] 第三方面,本发明提供了一种试剂盒,所述试剂盒包括如第一方面所述的镉离子完全抗原和/或如第二方面所述的镉离子单克隆抗体。

[0020] 优选地,所述镉离子完全抗原偶联于固相载体表面,优选为偶联于磁微粒表面。

[0021] 本发明中,固相载体表面修饰有羧基、氨基、对甲苯磺酰基、链霉亲和素或抗FITC抗体等功能团,可以直接与抗原偶联,也可以通过链霉亲和素或抗FITC抗体与生物素或FITC标记的抗原偶联。

[0022] 优选地,所述镉离子单克隆抗体修饰有化学发光标记物。

[0023] 优选地,所述化学发光标记物包括吖啶酯和/或吖啶磺酰胺,优选为吖啶酯。

[0024] 本发明中,采用化学发光标记物标记镉离子单克隆抗体,化学发光体系简单,反应在碱性环境中即可迅速进行,不需要催化剂,吖啶酯容易与蛋白质结合,光子产率不受构象影响,产生的光子能级高,信号强,信噪比高,稳定性好,激发液成本低。

[0025] 本发明中,所述试剂盒将抗体-抗原反应的高度特异性与化学发光体系的高度灵敏度相结合,采用间接竞争磁微粒化学发光技术,待测样本与偶联在磁微粒上的检测原竞争结合吖啶酯标记的镉离子单克隆抗体,磁分离后通过检测磁微粒上的化学发光强度,实现样本中镉离子含量的测定。

[0026] 优选地,所述试剂盒还包括镉离子标准储备液、清洗液、化学发光激发液、乙二醇四乙酸溶液、NaOH溶液或说明书中的任意一种或至少两种的组合。

[0027] 本发明中,清洗液为含有0.2mol/L NaCl和0.1% Tween-20的pH=7.2的25mmol/L Tris-HCL缓冲液。

[0028] 本发明中,化学发光激发液包括化学发光预激发液A和化学发光激发液B,其中,化学发光预激发液A为H₂O₂和HNO₃的混合液,H₂O₂的质量分数为0.1-5%,HNO₃的浓度为0.1-5mol/L,化学发光激发液B为Triton X-100和NaOH的混合液,其中Triton X-100的浓度为0.1-2.0mol/L,NaOH的浓度为0.1-1.0mol/L。

[0029] 优选地,所述镉离子标准储备液中镉离子的浓度为1-2mg/mL,例如可以是1mg/mL、1.1mg/mL、1.2mg/mL、1.3mg/mL、1.4mg/mL、1.5mg/mL、1.6mg/mL、1.7mg/mL、1.8mg/mL、1.9mg/mL或2mg/mL,优选为1mg/mL。

[0030] 本发明中,镉离子标准储备液为Cd-EDTA螯合物溶液,采用3%硝酸(v/v)将浓度为1mg/mL的镉离子储备液稀释为浓度分别为0.2ng/mL、0.5ng/mL、1ng/mL、2ng/mL、5ng/mL和10ng/mL的镉离子标准液。

[0031] 优选地,所述乙二醇四乙酸溶液的浓度为0.1-0.3M,例如可以是0.1M、0.2M或0.3M,优选为0.1M。

[0032] 第四方面,本发明提供了一种如第三方面所述的试剂盒的标准曲线的制定方法,包括以下步骤:

[0033] (1) 将镉离子标准储备液进行梯度稀释,配置得到至少6份不同浓度的镉离子标准液;

[0034] (2) 将步骤(1)所述的镉离子标准液与偶联有镉离子完全抗原的磁微粒溶液、吖啶酯标记的镉离子单克隆抗体溶液混合孵育;

[0035] (3) 磁分离,弃上清液,加入化学发光激发液,测定化学发光强度;

[0036] (4) 以化学发光强度为纵坐标,镉离子标准液的浓度为横坐标,绘制化学发光强度与镉离子浓度的关系四参数曲线图,得到所述标准曲线。

[0037] 优选地,步骤(2)所述孵育的温度为35-39℃,例如可以是35℃、36℃、37℃、38℃或39℃。

[0038] 优选地,步骤(2)所述孵育的时间为10-30min,例如可以是10min、11min、12min、13min、14min、15min、16min、17min、18min、19min、20min、21min、22min、23min、24min、25min、26min、27min、28min、29min或30min。

[0039] 第五方面,本发明提供了一种检测镉离子的方法,所述方法采用如第二方面所述

的镉离子单克隆抗体和/或如第三方面所述的试剂盒。

[0040] 优选地,所述方法包括以下步骤:

[0041] (1') 将待测样本与乙二胺四乙酸溶液共孵育,进行预处理;

[0042] (2') 将预处理的待测样本与偶联有镉离子完全抗原的磁微粒和吖啶酯标记的镉离子单克隆抗体混合孵育;

[0043] (3') 磁分离,弃上清液,加入化学发光激发液,测定化学发光强度;

[0044] (4') 根据标准曲线,计算得到所述待测样本中镉离子的浓度。

[0045] 第六方面,本发明提供了一种如第一方面所述的镉离子完全抗原、如第二方面所述的镉离子单克隆抗体或如第三方面所述的试剂盒在检测镉离子中的应用。

[0046] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:

[0047] (1) 本发明以重金属镉离子作为半抗原,通过双功能螯合剂与载体蛋白偶联得到镉离子完全抗原,并制备得到免疫原性强、对镉离子有高效价的镉离子单克隆抗体;

[0048] (2) 本发明采用偶联于磁微粒表面的镉离子完全免疫原作为靶向探针,标记有吖啶酯的镉离子单克隆抗体作为信号探针,将抗体-抗原反应的高度特异性与化学发光体系的高度灵敏度相结合,制备的镉离子检测试剂盒特异性强,对与镉离子相似的重金属离子不产生交叉反应,灵敏度高,最低检测0.03ng/mL;

[0049] (3) 本发明的试剂盒样品预处理方法简单,检测时间短,能够同时检测大量样品,检测成本低,试剂保存时间长,无放射性污染。

附图说明

[0050] 图1为镉离子检测试剂盒的标准曲线。

具体实施方式

[0051] 为进一步阐述本发明所采取的技术手段及其效果,以下结合实施例和附图对本发明作进一步地说明。可以理解的是,此处所描述的具体实施方式仅仅用于解释本发明,而非对本发明的限定。

[0052] 实施例中未注明具体技术或条件者,按照本领域内的文献所描述的技术或条件,或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可通过正规渠道商购获得的常规产品。

[0053] 实施例1镉离子完全抗原的制备

[0054] (1) 将10mg双功能螯合剂1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸-N-羧基琥珀酰亚胺酯(DOTA-NHS)溶于1mL二甲亚砜(DMSO)中形成金属螯合剂溶液,30mg多聚赖氨酸(PLL)或15mg人血清白蛋白(HSA)溶于1mL4-羧基哌嗪乙磺酸(HEPES)缓冲液中;

[0055] (2) 室温下将DOTA-NHS溶液缓慢滴入载体蛋白溶液中,边滴边搅拌,调节pH至9.0,室温搅拌过夜,隔天反应液呈无色或微黄透明状,使用15mL离心超滤管超滤,HEPES缓冲液洗涤3次,浓缩至2mL,即为双功能螯合剂与蛋白的偶联化合物;

[0056] (3) 将双功能螯合剂与蛋白的偶联化合物用HEPES缓冲液稀释5倍后,缓慢滴入1mL浓度为1mg/mL的重金属镉离子溶液中,室温搅拌反应5小时,用15mL离心超滤管超滤,HEPES缓冲液洗涤3次,得到镉离子完全免疫原Cd-DOTA-PLL和镉离子包被检测原Cd-DOTA-HSA。

[0057] 实施例2镉离子单克隆抗体的制备

[0058] (1) 将60 μ g镉离子完全免疫原Cd-DOTA-PLL溶于200 μ L无菌生理盐水中,与200 μ L完全弗氏佐剂混合,充分乳化后向Balb/c雌性小鼠腹部皮下进行多点注射;两周后采用免疫原Cd-DOTA-PLL与不完全弗氏佐剂的混合液,进行加强免疫,免疫部位为颈背部皮下,从第三次免疫开始,免疫后一周从小鼠眼眶采血检测血清效价;第四次免疫不添加佐剂,直接采用免疫原Cd-DOTA-PLL进行腹腔免疫;

[0059] (2) 免疫结束3天后,将免疫小鼠的脾细胞与SP2/0骨髓瘤融合,经过3次以上亚克隆,筛选得到能够稳定分泌抗重金属镉离子单克隆抗体的杂交瘤细胞,收集杂交瘤细胞培养上清,离心去除细胞碎片,于-20 $^{\circ}$ C保存备用;

[0060] (3) 挑选经产Balb/c小鼠,腹腔注射0.5mL液体石蜡,将不完全培养液中的细胞浓度调至 10^6 /mL,每只预处理的小鼠七天后腹腔注射1mL阳性克隆杂交瘤细胞,待7-10天后,小鼠腹部明显增大,刺穿腹腔,采集腹水;

[0061] (4) 将腹水离心,弃脂肪层和细胞层,收集中间的澄清层,用辛酸-硫酸铵盐析法粗提腹水,用protein G柱子亲和层析法进一步纯化,获得纯化的镉离子单克隆抗体。

[0062] 实施例3偶联有镉离子包被检测原的磁微粒混悬液的制备

[0063] (1) 向1mg羧基化磁微粒中加入1mL浓度为0.05mol/L的2-(N-吗啡啉)乙磺酸(MES)缓冲液,漩涡混匀,置于磁力架上,静止5min,去上清,洗涤三次;

[0064] (2) 加入100 μ L 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)和100 μ L N-羧基琥珀酰亚胺(NHS),震荡反应30min后洗涤三次;

[0065] (3) 加入30 μ g镉离子包被检测原Cd-DOTA-HSA,涡旋,旋转反应管,室温孵育2h;

[0066] (4) 去上清,加入一定量的洗涤液(TBS+0.05%Tween-20),洗涤3次;

[0067] (5) 用含1%BSA的缓冲液封闭4次,每次10min,得到偶联有镉离子包被检测原的磁微粒混悬液,定容至1mL,2-8 $^{\circ}$ C保存。

[0068] 实施例4吖啶酯标记的镉离子单克隆抗体的制备

[0069] (1) 将镉离子单克隆抗体置于透析袋中,在不少于1L的标记缓冲液(0.1mol/L Na₂CO₃-NaHCO₃缓冲液,pH=10)中进行透析,期间缓冲液更换至少3次;

[0070] (2) 称取0.52mg吖啶酯(NSP-DMAE-NHS),溶于894 μ L二甲基甲酰胺(DMF)中,配成1mmol/L的NSP-DMAE-NHS DMF溶液;

[0071] (3) 将500 μ g经过透析的镉离子单克隆抗体置于离心管内,加入100 μ L浓度为1mmol/L的NSP-DMAE-NHS DMF溶液,加入标记缓冲液补齐体积至1000 μ L,避光室温下反应30min,加入100 μ L 10%赖氨酸,继续反应40min,终止反应,得到标记有吖啶酯的镉离子单克隆抗体(NSP-DMAE-NHS-Ab);

[0072] (4) 采用Sephadex G-50柱(1 $\times$ 25cm)分离NSP-DMAE-NHS-Ab和游离NSP-DMAE-NHS,用纯化缓冲液(0.1mol/L PBS,pH=6.3)平衡洗脱层析柱;

[0073] (5) 分离过程中用色谱仪检测蛋白峰,分别测量流出液的化学发光强度和280nm吸光度值;

[0074] (6) 收集光度值高且吸光度大的洗脱液,加入1%BSA后分装,得到纯化的标记有吖啶酯的镉离子单克隆抗体。

[0075] 实施例5标准曲线的制定

[0076] (1) 将浓度为1mg/mL的镉离子标准储备液采用3%硝酸(v/v)进行梯度稀释,得到浓度分别为0.2ng/mL、0.5ng/mL、1ng/mL、2ng/mL、5ng/mL、10ng/mL的镉离子标准液;

[0077] (2) 将100μL不同浓度的镉离子标准液与150μL偶联有Cd-DOTA-BSA的磁微粒溶液、150μL吡啶酯标记的镉离子单克隆抗体溶液混合,37℃下孵育15min,采用清洗液(25mmol/L Tris-HCL缓冲液+0.2mol/L NaCl+0.1%Tween-20,pH=7.2)清洗5次;

[0078] (3) 磁分离,弃上清液,加入100μL化学发光预激发液A和100μL化学发光激发液B,测定化学发光强度;

[0079] (4) 以化学发光强度为纵坐标,镉离子标准液的浓度为横坐标,绘制化学发光强度与镉离子浓度的关系曲线图,得到如图1所示的标准曲线。标准曲线的方程为:

$$[0080] \quad y = (A-D) / [1 + (x/C)^B] + D \quad (R^2 = 0.99878)$$

[0081] 其中,A=138597.77544,B=1.18948,C=0.31550,D=2057.29740。

[0082] 实施例6待测样本中镉离子浓度的测定

[0083] (1) 采用0.1M EDTA溶液预处理待测样本,离心取上清;

[0084] (2) 将100μL待测样本与150μL偶联有Cd-DOTA-BSA的磁微粒溶液、150μL吡啶酯标记的镉离子单克隆抗体溶液混合,37℃下孵育15min,采用清洗液(25mmol/L Tris-HCL缓冲液+0.2mol/L NaCl+0.1%Tween-20,pH=7.2)清洗5次;

[0085] (3) 磁分离,弃上清液,加入100μL化学发光预激发液A和100μL化学发光激发液B,测定化学发光强度;

[0086] (4) 根据标准曲线,计算得到所述待测样本中镉离子的浓度。

[0087] 结果如表1所示,10个样本中含有不同浓度的镉离子。

[0088] 表1

[0089]

样本编号	发光值	镉离子浓度 (ng/mL)
1	94446	0.17
2	25022	1.21
3	54522	0.47
4	93608	0.17
5	99979	0.14
6	30076	0.98

[0090]

7	103389	0.13
8	27777	1.08
9	68491	0.33
10	35008	0.83

[0091] 实施例7试剂盒的特异性评价

[0092] 采用试剂盒对与镉离子相似的重金属离子铁离子、锰离子、铜离子、锌离子、铬离子、汞离子、镍离子、铅离子和砷离子进行检测,制作交叉反应曲线,评价试剂盒的特异性。

[0093] 结果如表2所示,本试剂盒对镉离子具有较高的特异性,对其他重金属离子均无交叉反应。

[0094] 表2

[0095]

化合物	IC ₅₀ (ng/mL)	交叉反应率(%)
Cd ²⁺ -EDTA	2.8	100
Fe ²⁺ -EDTA	>1×10 ³	<0.1
Mn ²⁺ -EDTA	>1×10 ³	<0.1
Cu ²⁺ -EDTA	>1×10 ³	<0.1
Zn ²⁺ -EDTA	>1×10 ³	<0.1
Cr ³⁺ -EDTA	>1×10 ³	<0.1
Hg ²⁺ -EDTA	>1×10 ³	<0.1
Ni ²⁺ -EDTA	>1×10 ³	<0.1
Pb ²⁺ -EDTA	>1×10 ³	<0.1
As ³⁺ -EDTA	>1×10 ³	<0.1

[0096] 实施例8试剂盒的灵敏性评价

[0097] 采用试剂盒对镉离子零标准溶液进行20次重复测试,测定结果取平均值加2倍标准偏差,即为试剂盒的灵敏度。

[0098] 结果显示:本试剂盒对镉离子的灵敏度为0.03ng/mL。

[0099] 综上所述,本发明将重金属镉离子通过双功能螯合剂与载体蛋白偶联得到镉离子完全抗原,并制备得到免疫原性强、对镉离子有较高效价的镉离子单克隆抗体;利用偶联于磁微粒表面的镉离子完全免疫原作为靶向探针,标记有吡啶酯的镉离子单克隆抗体作为信号探针,将抗体-抗原反应的高度特异性与化学发光体系的高度灵敏度相结合,制备的镉离子检测试剂盒特异性强,灵敏度高,样本处理方法简单,检测时间短,成本低,在重金属离子检测领域具有重要意义。

[0100] 申请人声明,本发明通过上述实施例来说明本发明的详细方法,但本发明并不局限于上述详细方法,即不意味着本发明必须依赖上述详细方法才能实施。所属技术领域的技术人员应该明了,对本发明的任何改进,对本发明产品各原料的等效替换及辅助成分的

添加、具体方式的选择等,均落在本发明的保护范围和公开范围之内。

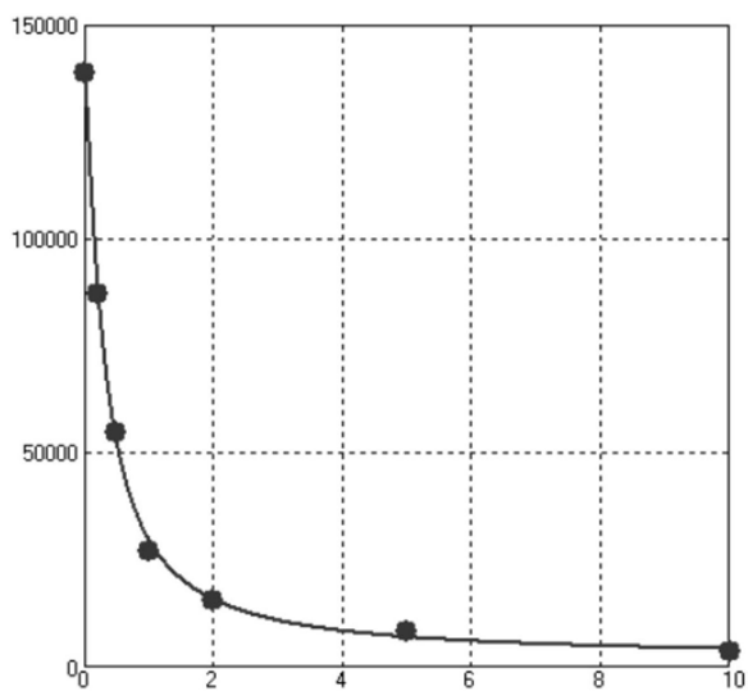


图1

专利名称(译)	一种镉离子检测试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN108362873A	公开(公告)日	2018-08-03
申请号	CN201810149539.1	申请日	2018-02-13
[标]发明人	周小进		
发明人	周小进		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/577 G01N33/532 G01N21/76		
CPC分类号	G01N21/763 G01N33/532 G01N33/54326 G01N33/577 G01N2446/90		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种镉离子检测试剂盒及其制备方法和应用，所述镉离子完全抗原为镉离子、螯合剂与载体蛋白的复合物；其中，所述螯合剂包括乙二胺四乙酸、二乙三胺五乙酸、二乙三胺五乙酸衍生物、1,4,7,10-四氮杂环十二烷-N,N,N,N-四乙酸或1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯中的任意一种或至少两种的组合。本发明将重金属镉离子通过双功能螯合剂与载体蛋白偶联得到镉离子完全抗原，并制备得到免疫原性强、对镉离子有较高效价的镉离子单克隆抗体，组成的试剂盒特异性强、灵敏度高，可用于检测镉离子。

