



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101968481 A

(43) 申请公布日 2011.02.09

(21) 申请号 201010253926.3

C12N 5/20 (2006.01)

(22) 申请日 2010.08.13

C12R 1/91 (2006.01)

(83) 生物保藏信息

CGMCC No. 3987 2010.07.09

(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 赵洪伟 南铁贵 谭桂玉
曹振 高巍 王敏 孙硕 李召虎

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅 任风华

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/566 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 9 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种检测样品中是否含有重金属铜离子的方法及其专用试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种检测样品中是否含有重金属的方法及其专用试剂盒。该试剂盒,包括包被原、抗待检重金属的抗体;所述包被原与抗待检重金属的抗体相互作用,且所述包被原与所述抗待检重金属的抗体的亲和力小于所述待检重金属与所述抗待检重金属的抗体的亲和力。实验证明,本发明所提供的制备铜离子非均等竞争 ELISA 检测法中,包被抗原的制备方法简单,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包被抗原对 ELISA 检测灵敏度有明显提高。本发明的制备包被抗原的方法及由该方法建立的铜离子快速免疫检测方法将有广阔的应用前景。

1. 一种用于检测样品中是否含有重金属的试剂盒,包括包被原、抗待检重金属的抗体;所述包被原与抗待检重金属的抗体结合,且所述包被原与所述抗待检重金属的抗体的亲和力小于所述待检重金属与所述抗待检重金属的抗体的亲和力。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:所述包被原为如下络合物:螯合剂与载体蛋白通过共价键连接形成的偶联物再与金属离子 I 通过配位键连接形成的络合物;所述金属离子 I 为除了所述待检重金属外的其余金属中的任一种,且所述金属离子 I 与所述抗待检重金属的抗体的亲和力小于所述待检重金属与所述抗待检重金属的抗体的亲和力。

3. 根据权利要求1或2所述的试剂盒,其特征在于:所述包被原是按照包括如下步骤的方法制备得到的:

(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,得到载体蛋白与所述重氮化的螯合剂的偶联物;

(3) 将所述金属离子 I 的溶液与所述偶联物混合,进行络合反应,得到所述包被原;

所述重氮化的方法包括如下步骤:将所述螯合剂溶于酸的水溶液中,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;所述重氮化反应的条件包括:温度为 0-5℃、避光和时间为 15min;所述温度优选为 0℃或 4℃;所述螯合剂、酸和亚硝酸盐的配比为 4mg : 2×10^{-3} mol : 1.2×10^{-4} mol;

所述偶联反应的条件包括:温度为 4℃ -10℃或 4℃,pH 值为 8.5-9.0 或 8.5,反应时间为 4h-24h 或 4h;所述重氮化的螯合剂与所述载体蛋白的投料摩尔比为 10 : 1;

所述络合反应的条件包括:温度为 25℃、pH 值为 7.5 和时间为 12h;所述偶联物与所述金属离子 I 的投料摩尔比为 1 : 20。

4. 根据权利要求1-3 中任一所述的试剂盒,其特征在于:所述试剂盒中包括包被缓冲液、洗涤液、样品稀释液、标准品溶液和酶标抗体;

所述标准品为 EDTA 与所述待检重金属的螯合物。

5. 根据权利要求1-4 中任一所述的试剂盒,其特征在于:所述标准品是按照如下方法制备得到的:

(1) 将每 29.3mg EDTA 溶解于去离子水中,调节 pH 至 8.0,得到溶液 I ;

(2) 将 13.5mg 待检重金属可溶性盐溶解于去离子水中,并逐滴加入到所述溶液 I 中,磁力搅拌反应 12 小时,再将溶液定容至 6.4mL,得到 EDTA 与待检重金属的螯合物。

6. 根据权利要求1-5 中任一所述的试剂盒,其特征在于:所述标准品溶液中待检重金属离子浓度为 20ng/mL、10ng/mL、5ng/mL、2.5ng/mL、1.25ng/mL、0.625ng/mL、0.31ng/mL、0.156ng/mL 和 0.078ng/mL。

7. 根据权利要求1-6 中任一所述的试剂盒,其特征在于:所述包被缓冲液为 0.05M、pH9.6 的碳酸盐缓冲液;

每 1 升洗涤液按照如下方法配制:将 8.0g NaCl、0.2g KH_2PO_4 、2.96g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、1mLTween-20 溶于水中,并用水补足至 1L;

样品稀释液按照如下方法配制:将 1mL 吐温 20 和 1g 明胶溶于 1L PBS 缓冲液中,得到样品稀释液;

所述抗待检重金属的抗体为抗待检重金属的单克隆抗体或多克隆抗体;

所述载体蛋白为牛血清白蛋白、人血清白蛋白、血蓝蛋白或卵清白蛋白；

所述酶标抗体为辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠抗体。

8. 根据权利要求 1-7 中任一所述的试剂盒,其特征在于:所述待检重金属为铜,所述包被原中的金属为钴,所述标准品中的金属为铜,所述抗铜的单克隆抗体为由保藏编号为 CGMCC No. 3987 的杂交瘤细胞株 Cu-EDTA 6A9 分泌得到的,所述螯合剂为对氨基苄基乙二胺四乙酸。

9. 一种检测样品中是否含有重金属的方法,是用权利要求 1-8 中任一所述试剂盒对待测样品进行检测。

10. 保藏号为 CGMCC No. 3987 的杂交瘤细胞株 Cu-EDTA 6A9 产生的抗金属铜的单克隆抗体；

保藏号为 CGMCC No. 3987 的杂交瘤细胞株 Cu-EDTA 6A9。

一种检测样品中是否含有重金属铜离子的方法及其专用试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测样品中是否含有重金属铜离子的方法及其专用试剂盒。

背景技术

[0002] 重金属是环境与农产品中的重要污染物质,可以通过食物链在动物及人的体内富集,对人类健康会带来严重的危害。铜是生命体生长所必须的微量元素之一,但是高浓度的铜会对生命体产生毒害作用。

[0003] 目前,重金属铜的分析方法主要有原子吸收光谱法、电感耦合等离子体发射光谱法、X-射线荧光光谱法、电位溶出分析法以及近几年发展的生物传感器检测法等。但是用这几种方法检测铜离子需要昂贵的仪器设备,检测费用高,耗时,不能用于现场快速检测。与仪器分析法相比,酶联免疫吸附测定法(ELISA)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,而且还能大幅度降低检测成本。

发明内容

[0004] 本发明的一个目的是提供一种用于检测样品中是否含有重金属的试剂盒。

[0005] 本发明所提供的用于检测样品中是否含有重金属的试剂盒,包括包被原、抗待检重金属的抗体;所述包被原与抗待检重金属的抗体结合,且所述包被原与所述抗待检重金属的抗体的亲和力小于所述待检重金属与所述抗待检重金属的抗体的亲和力。

[0006] 上述任一所述试剂盒中,所述包被原为如下络合物:螯合剂与载体蛋白通过共价键连接形成的偶联物再与金属离子 I 通过配位键连接形成的络合物;所述金属离子 I 为除了所述待检重金属外的其余金属中的任一种,且所述金属离子 I 与所述抗待检重金属的抗体的亲和力小于所述待检重金属与所述抗待检重金属的抗体的亲和力;

[0007] 所述共价键是所述螯合剂上的氨基基团与所述载体蛋白上的酚基基团形成的;所述配位键是所述金属离子 I 与所述偶联物中的螯合剂上的乙二胺四乙酸形成的。

[0008] 上述任一所述试剂盒中,所述包被原是按照如下方法制备得到的:

[0009] (1) 将螯合剂重氮化,得到重氮化的螯合剂;

[0010] (2) 将载体蛋白与所述重氮化的螯合剂混合,进行偶联反应,得到载体蛋白与所述重氮化的螯合剂的偶联物;

[0011] (3) 将所述金属离子 I 的溶液与所述偶联物混合,进行络合反应,得到所述包被原;

[0012] 上述任一所述试剂盒中,所述重氮化的方法包括如下步骤:将所述螯合剂溶于酸的水溶液中,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;所述重氮化反应的条件包括:温度为 0-5℃、避光和时间为 15min;所述温度优选为 0℃或 4℃;所述螯合剂、酸和亚硝酸盐的配比为 4mg : 2×10^{-3} mol : 1.2×10^{-4} mol;

[0013] 上述任一所述试剂盒中,所述偶联反应的条件包括:温度为 4°C – 10°C 或 4°C ,pH值为8.5–9.0或8.5,反应时间为4h–24h或4h;所述重氮化的螯合剂与所述载体蛋白的投料摩尔比为10:1;

[0014] 上述任一所述试剂盒中,所述络合反应的条件包括:温度为 25°C 、pH值为7.5和时间为12h;所述偶联物与所述金属离子I的投料摩尔比为1:20。

[0015] 上述任一所述试剂盒中,所述试剂盒中包括包被缓冲液、洗涤液、样品稀释液、标准品溶液和酶标抗抗体;

[0016] 上述任一所述试剂盒中,所述标准品为EDTA与所述待检重金属的螯合物。

[0017] 上述任一所述试剂盒中,所述标准品是按照如下方法制备得到的:

[0018] (1) 将每29.3mg EDTA溶解于去离子水中,调节pH至8.0,得到溶液I;

[0019] (2) 将13.5mg待检重金属可溶性盐溶解于去离子水中,并逐滴加入到所述溶液I中,磁力搅拌反应12小时,再将溶液定容至6.4mL,得到EDTA与待检重金属的螯合物。

[0020] 上述任一所述试剂盒中,所述标准品溶液中待检重金属离子浓度为20ng/mL、10ng/mL、5ng/mL、2.5ng/mL、1.25ng/mL、0.625ng/mL、0.31ng/mL、0.156ng/mL和0.078ng/mL。

[0021] 上述任一所述试剂盒中,所述包被缓冲液为0.05M、pH9.6的碳酸盐缓冲液;

[0022] 上述任一所述试剂盒中,每1升洗涤液按照如下方法配制:将8.0g NaCl、0.2g KH_2PO_4 、2.96g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、1mLTween-20溶于水中,并用水补足至1L;

[0023] 上述任一所述试剂盒中,样品稀释液按照如下方法配制:将1mL吐温20和1g明胶溶于1L PBS缓冲液中,得到样品稀释液;

[0024] 每1升PBS缓冲液由NaCl、 KH_2PO_4 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 和水组成;NaCl在磷酸盐缓冲液中的浓度为8.0g/L, KH_2PO_4 在磷酸盐缓冲液中的浓度为0.2g/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 在磷酸盐缓冲液中的浓度为2.96g/L,pH值为7.5。

[0025] 上述任一所述试剂盒中,所述抗待检重金属的抗体为抗待检重金属的单克隆抗体或多克隆抗体;

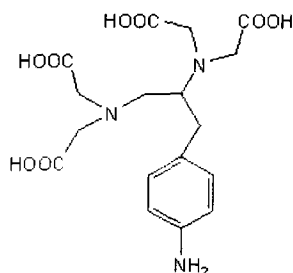
[0026] 上述任一所述试剂盒中,所述载体蛋白为牛血清白蛋白、人血清白蛋白、血蓝蛋白或卵清白蛋白;

[0027] 上述任一所述试剂盒中,所述酶标抗抗体为辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠抗体。

[0028] 上述任一所述试剂盒中,所述待检重金属为铜,所述包被原中的金属为钴,所述标准品中的金属为铜,所述抗铜的单克隆抗体为由保藏编号为CGMCC No. 3987的杂交瘤细胞株Cu-EDTA 6A9分泌得到的,所述螯合剂为对氨基苄基乙二胺四乙酸。

[0029] 所述对氨基苄基乙二胺四乙酸的结构式为:

[0030]



[0031] 本发明的另一个目的是提供一种检测样品中是否含有重金属的方法。

[0032] 本发明所提供的检测样品中是否含有重金属的方法,是用上述任一所述试剂盒对待测样品进行检测。

[0033] 保藏号为 CGMCC No. 3987 的杂交瘤细胞株 Cu-EDTA 6A9 产生的抗金属铜的单克隆抗体也属于本发明的保护范围。

[0034] 保藏号为 CGMCC No. 3987 的杂交瘤细胞株 Cu-EDTA 6A9 也属于本发明的保护范围。

[0035] 所述应用可为利用所述包被抗原制备成检测样品中铜离子的酶联免疫试剂盒和发光免疫试剂盒。

[0036] 本发明发明人通过大量实验总结出,检测小分子物质时,如果包被抗原中使用的与载体蛋白连接的半抗原和待测物存在结构上的差异且包被抗原中的半抗原与抗体的亲和力低于待测物与抗体的亲和力,那么抗体在竞争反应中优先识别的是待测物,由于在竞争反应中存在这样的关系,因此选择好适当的包被抗原能够显著提高 ELISA 检测法的灵敏度。基于以上,本发明进一步建立了铜离子的非均等竞争间接酶联免疫检测方法及其专用试剂盒。

[0037] 实验证明,本发明所提供的制备铜离子非均等竞争 ELISA 检测法中,包被抗原的制备方法简单,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包被抗原对 ELISA 检测灵敏度有明显提高。本发明的制备包被抗原的方法及由该方法建立的铜离子快速免疫检测方法将有广阔的应用前景。

附图说明

[0038] 图 1 为以钴离子为例的包被抗原的合成路线图。

[0039] 图 2 为以 EDTA-Cu 为标准样品建立的铜离子非均等竞争间接 ELISA 法标准曲线。

具体实施方式

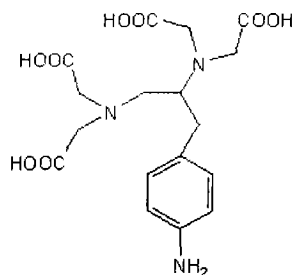
[0040] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0041] 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。

[0042] 对氨基苄基乙二胺四乙酸 {1-(4-Aminobenzyl)-EDTA} 购于日本同仁化学研究所 (Dojindo Laboratories), 产品号 :M029-10。乙二胺四乙酸 (EDTA), 牛血清白蛋白, 卵清白蛋白和原子吸收级金属铜离子均购于 Sigma-Aldrich 公司。辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠抗体 (IgG-HRP) 购自 Jackson 公司。其余常规试剂均购自北京化学试剂公司。辣根过氧化物酶 (HRP) 购自 Sigma-Aldrich 公司, 产品目录号为 P6782。

[0043] 对氨基苄基乙二胺四乙酸的结构式如下 :

[0044]



[0045] 实施例 1、试剂盒的组成及制备

[0046] 一、试剂盒的组成

[0047] 1、包被原：对氨基苄基乙二胺四乙酸与 BSA 的偶联物与钴离子形成的络合物（钴 - 对氨基苄基 -EDTA-BSA）。

[0048] 2、抗铜 -EDTA 螯合物的单克隆抗体：由保藏号 CGMCC No. 3987 的杂交瘤细胞株 Cu-EDTA 6A9 分泌得到的单抗；

[0049] 3、包被缓冲液：0.05M、pH9.6 的碳酸盐缓冲液；

[0050] 4、洗涤液：每 1 升洗涤液按照如下方法配制：将 8.0g NaCl、0.2g KH_2PO_4 、2.96g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、1mL Tween-20 溶于水中，并用水补足至 1L。

[0051] 5、样品稀释液：样品稀释液按照如下方法配制：将 1mL 吐温 20 和 1g 明胶溶于 1L PBS 缓冲液中，得到样品稀释液；

[0052] 每 1 升 PBS 缓冲液由 NaCl、 KH_2PO_4 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 和水组成；NaCl 在磷酸盐缓冲液中的浓度为 8.0g/L， KH_2PO_4 在磷酸盐缓冲液中的浓度为 0.2g/L， $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 在磷酸盐缓冲液中的浓度为 2.96g/L，pH 值为 7.5；

[0053] 6、标准品溶液：标准品为 EDTA-Cu 螯合物；

[0054] 标准品溶液中 Cu 离子浓度分别为 10g/mL、5ng/mL、2.5ng/mL、1.25ng/mL、0.625ng/mL、0.31ng/mL、0.156ng/mL。

[0055] 7、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 水溶液得到；[0056] 柠檬酸盐 - 磷酸盐缓冲液：由柠檬酸三钠、 Na_2HPO_4 和水组成；柠檬酸三钠在柠檬酸盐 - 磷酸盐缓冲液中的浓度为 0.01M， Na_2HPO_4 在柠檬酸盐 - 磷酸盐缓冲液中的浓度为 0.03M；柠檬酸盐 - 磷酸盐缓冲液的 pH 值为 5.5；

[0057] 8、终止缓冲液：2.0M 的硫酸水溶液。

[0058] 9、HRP 标记的羊抗小鼠抗体。

[0059] 10、封闭液：溶解于样品稀释液中的 3% 的脱脂牛奶。

[0060] 二、试剂盒的制备

[0061] （一）包被原的制备方法：钴 - 对氨基苄基乙二胺四乙酸 - 牛血清白蛋白（钴 - 对氨基苄基 -EDTA-BSA）

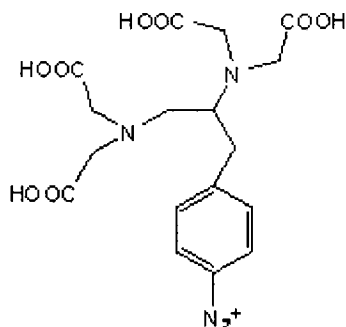
[0062] 包被原的合成路线如图 1 所示。

[0063] 1、重氮化：对氨基苄基乙二胺四乙酸 (Aminobenzyl-EDTA) 4mg，溶解于 2mL 1M 的 HCL 水溶液中，得到溶液 I；在 0℃ 避光条件下，向溶液 I 中滴加 60 μl 2M 的 NaNO_2 水溶液，搅拌反应 15 分钟，得到重氮化的对氨基苄基乙二胺四乙酸的酸性溶液。该反应体系中对氨

基苄基乙二胺四乙酸、HCL 和 NaNO_2 的投料配比为 $4\text{mg} : 2 \times 10^{-3}\text{mol} : 1.2 \times 10^{-4}\text{mol}$ 。

[0064] 重氮化的对氨基苄基乙二胺四乙酸的结构式如式 I 所示。

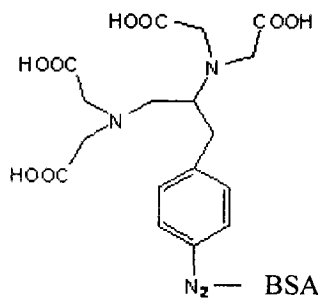
[0065]



[0066] 2、偶联：将步骤 1 得到的重氮化的对氨基苄基乙二胺四乙酸的酸性溶液在 10 分钟内加入到 4mL 含有 45mg BSA 的硼酸盐缓冲液 (0.05M, PH9.6) 中, 调节 pH 值到 8.5, 4°C 避光搅拌反应 4 小时, 得到反应产物溶液, 其中含有对氨基苄基乙二胺四乙酸与 BSA 的偶联物。该反应体系中所述重氮化的氨基苄基乙二胺四乙酸与所述载体蛋白 BSA 的投料摩尔比为 10 : 1。

[0067] 对氨基苄基乙二胺四乙酸与 BSA 的偶联物的结构式如式 II 所示。

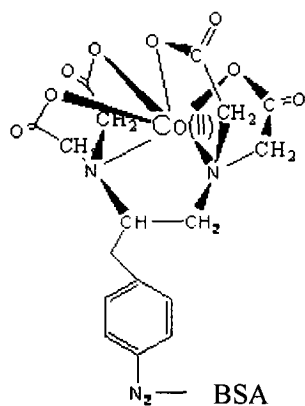
[0068]



[0069] 3、络合：将步骤 2 得到的反应产物溶液用 1M 的 HCL 将 pH 值调节到 7.5, 然后向其中滴加 40ul 0.5M 的钴离子水溶液, 室温 (25°C) 反应过夜 (12 小时), 得到反应产物溶液, 其中含有对氨基苄基乙二胺四乙酸与 BSA 的偶联物与钴离子形成的络合物。偶联物与所述钴离子的投料摩尔比为 1 : 20。

[0070] 对氨基苄基乙二胺四乙酸与 BSA 的偶联物与钴离子形成的络合物的结构式如式 III 所示。

[0071]



[0072] 4、透析：将步骤3得到的反应产物溶液在PBS溶液(pH7.5)中透析完全，用PBS缓冲液将透析完全的反应产物(Co-对氨基苄基-EDTA-BSA)溶液稀释为1mg/mL的溶液，置于-40℃冻存待用。透析的作用在于去除未螯合的钴离子或未反应的其他小分子。

[0073] 包被原中，对氨基苄基-EDTA与BSA通过共价键连接形成的偶联物再与金属离子Co通过配位键连接形成的络合物；所述Co离子与抗Cu的抗体的亲和力小于Cu与所述抗Cu的抗体的亲和力，单克隆抗体6A9与其他重金属的交叉反应率(表1)即可证明。

[0074] 对氨基苄基-EDTA与BSA间的共价键是对氨基苄基-EDTA上的氨基基团与所述BSA上的酚基基团形成的；偶联物与Co离子间的配位键是Co离子与所述偶联物中对氨基苄基-EDTA上的EDTA形成的。

[0075] (二) 标准品是按照如下方法制备得到的：

[0076] (1) 称取29.3mg EDTA，充分溶解于10mL去离子水中，用1M NaOH调节pH至8.0，得到溶液I；

[0077] (2) 称取13.5mg CuCl₂，溶解于去离子水中，并逐滴加入到上述步骤(1)配制的溶液I中，磁力搅拌反应12小时，再将溶液定容至6.4mL，得到螯合产物溶液，其中含有EDTA与Cu的螯合物(EDTA-Cu)，EDTA-Cu在溶液中的浓度为2.11mg/mL，螯合物中Cu离子在螯合产物溶液中的浓度为1mg/mL；

[0078] (3) 用样品稀释液将上述步骤(2)的螯合产物溶液配成螯合物中Cu离子浓度为2000ng/mL的EDTA-Cu螯合物标准品溶液。

[0079] (三) 单抗的制备方法

[0080] 铜离子单克隆抗体为以铜-对氨基苄基乙二胺四乙酸-卵清白蛋白为免疫原免疫小鼠经过细胞融合、筛选、亚克隆、腹水制备及抗体纯化步骤得到。

[0081] 铜-对氨基苄基乙二胺四乙酸-卵清白蛋白的制备方法：与实验(一)中包被原的制备方法相同，不同的是所用的蛋白为卵清白蛋白。

[0082] 免疫方法：

[0083] (1) 取8-10周龄的Ba1 b/C小白鼠作为实验动物。

[0084] (2) 基础免疫：铜-对氨基苄基EDTA-OVA完全抗原(1mg/mL)，经无菌过滤器过滤后加入等体积弗氏完全佐剂，用磁力搅拌器充分搅拌乳化，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Ba1 b/C小鼠，注射剂量为0.1mg抗原/只。

[0085] (3) 加强免疫：基础免疫2周后，取1mL上述稀释好的铜-对氨基苄基EDTA-OVA抗原溶液，然后加入1mL弗氏不完全佐剂，用磁力搅拌器充分搅拌乳化，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,每只小鼠的注射剂量为 0.1mg。

[0086] 加强免疫每隔 10 天免疫一次,从第三次加强免疫开始,每次免疫后第 6-7 天,从小鼠眼眶采血,测定抗体效价,待效价大于 1 : 8000 后,选择血清效价和抑制率俱佳的小鼠进行细胞融合筛选单克隆抗体。有限稀释法筛选分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株;采取间接竞争 ELISA 方法筛选分泌抗体效价高、特异性好的单克隆细胞株。

[0087] 细胞融合和克隆化:取免疫 Ba1b/c 小鼠脾细胞,按 9 : 1(数量配比)比例与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合,筛选得到稳定分泌抗铜的单克隆抗体的杂交瘤细胞株。将此细胞株命名为 Cu-EDTA 6A9,该细胞株已于 2010 年 7 月 9 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简称 CGMCC,地址:北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号,中国科学院微生物研究所,邮编 100101),保藏号为 CGMCC No. 3987。

[0088] 间接竞争 ELISA 方法步骤如下:

[0089] 包被:在 96 孔酶标板中每孔加入 100μL 步骤 1 制备得到的 Cu-对氨基苄基 EDTA-BSA 的溶液,37℃包被 3 小时,用洗涤液洗涤 4 次。

[0090] 封闭:封闭液 150 μ L/孔,在 37℃湿盒中封闭 1h,弃封闭液,洗涤 3 次。

[0091] 竞争:零孔每孔加 50 μ L 样品稀释液,抑制孔每孔加入 50 μ L EDTA-Cu 螯合物标准品溶液。分别从 96 孔细胞培养板中取出 100 μ L 培养液分别于酶标板零孔和抑制孔中加入 50 μ L,置湿盒中 37℃条件下 30min,洗板 4 次。

[0092] 加酶标二抗:将羊抗鼠酶标二抗(0.1mg/mL)稀释 1000 倍,每孔加 100 μ L,置湿盒中 37℃条件下 30min,洗板 4 次。

[0093] 显色:取 20mg OPD 溶于 10mL 底物稀释液中,加 4 μ L 30% H₂O₂,将底物溶液加入酶标板中,每孔 100 μ L。避光显色 15min。

[0094] 终止:每孔加入 50 μ L 终止液,用酶标仪 490nm 处测定各孔的 OD 值。

[0095] 效价的定义为零孔 OD 值为 1 时的血清稀释倍数。

[0096] 单克隆抗体的制备与纯化:

[0097] 增量培养法:将杂交瘤细胞 CGMCC No. 3987 置于细胞培养基中,在 37℃条件下于二氧化碳培养箱中进行培养,用辛酸-饱和硫酸铵法将得到的培养液进行纯化,得到单克隆抗体,-20℃保存。

[0098] 所述细胞培养基为向 DMEM 培养基中添加小牛血清和碳酸氢钠,使小牛血清在细胞培养基中的终浓度为 20% (质量百分含量),使碳酸氢钠在细胞培养基中的终浓度为 0.2% (质量百分含量);所述细胞培养基的 pH 为 7.4。

[0099] (四) 单抗的特异性检测

[0100] 1、重金属标准样品的制备

[0101] 参照步骤(二)中标准品的制备方法,制备其它金属标准品溶液,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。

[0102] 2、各自建立标准曲线,测定抑制中浓度 IC₅₀(抑制率达到 50%的标样浓度值)。

[0103] 标准曲线的建立方法与实施例 2 中 Cu 标准曲线的建立方法相同。

[0104] 交叉反应率(%) = (Cu IC₅₀) / (金属标准样品 IC₅₀) × 100%。

[0105] 实验设 3 次重复,取三次实验结果的平均值 ± 标准差,结果如表 1 所示。

金属离子	IC ₅₀ (ng/mL)	交叉反应率 (%)
Cu(II)	1.8 ± 0.2	100 ± 6.7
Co(II)	9.6 ± 0.9	18.8 ± 1.8
Hg(II)	168.8 ± 15.9	1.1 ± 0.1
Ag(I)	195.8 ± 16.3	0.9 ± 0.1
Cd(II)	227.5 ± 19.5	0.8 ± 0.1
Pb(II)	640.3 ± 61.2	0.3 ± 0.03
Al(III)	1195.2 ± 153.4	0.2 ± 0.02
Fe(III)	1523.4 ± 127.4	0.1 ± 0.01
Mn(II)	> 2000	< 0.1
In(III)	> 2000	< 0.1
Ca(II)	> 2000	< 0.1
Mg(II)	> 2000	< 0.1
Zn(II)	> 2000	< 0.1

[0106]

[0107] 实施例 2、试剂盒的灵敏度测试

[0108] 将上述制备的 EDTA-Cu 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: 20ng/mL、10ng/mL、5ng/mL、2.5ng/mL、1.25ng/mL、0.625ng/mL、0.31ng/mL、0.156ng/mL 和 0.078ng/mL。

[0109] (1) 包被原的包被: 将上述制备的钴-对氨基苄基 EDTA-BSA 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;

[0110] (2) 在步骤 (1) 的酶标板中分别加入上述不同浓度的 EDTA-Cu 螯合物标准品溶液 (实验孔), 每孔 50 μL, 对照孔中不添加 EDTA-Cu 螯合物标准品溶液而加入 50 μL 样品稀释液;

[0111] (3) 分别向上述实验孔和对照孔中加入 0.25 μg/mL 的单抗, 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;

[0112] (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 (0.1mg/mL), 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;

[0113] (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;

[0114] (6) 在 492nm 下测定吸光值;

[0115] (7) 绘制标准曲线: 以不同浓度 (ng/mL) 的 EDTA-Cu 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-Cu 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, 运用 Origin7.0 绘制标准曲线。

[0116] 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 1ng/mL , 检测范围是 $0.2\text{-}7\text{ng/mL}$ 。

[0117] 本实验同时设置对照实验, 对照实验 ELISA 的包被原采用 Cu-对氨基苄基-EDTA-BSA 为包被原, 其余条件与以上实验相同。对照实验的灵敏度为 1.8ng/mL 。

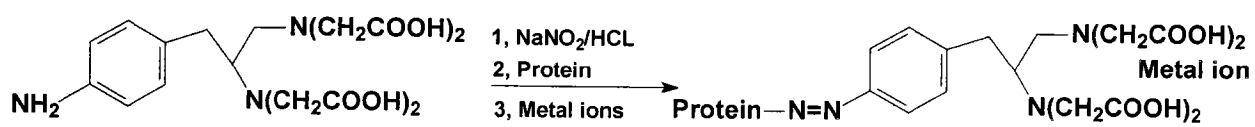


图 1

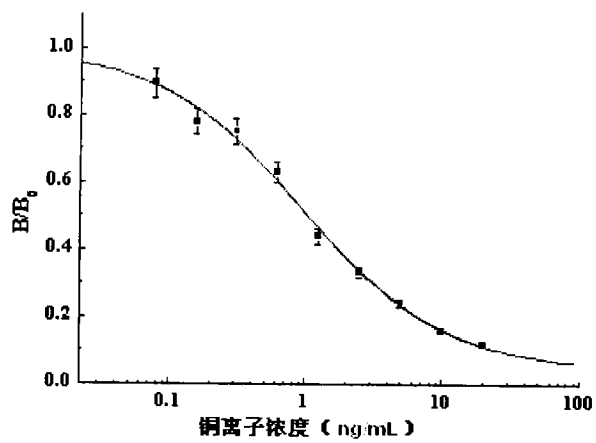


图 2

专利名称(译)	一种检测样品中是否含有重金属铜离子的方法及其专用试剂盒		
公开(公告)号	CN101968481A	公开(公告)日	2011-02-09
申请号	CN201010253926.3	申请日	2010-08-13
[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 赵洪伟 南铁贵 谭桂玉 曹振 高巍 王敏 孙硕 李召虎		
发明人	王保民 赵洪伟 南铁贵 谭桂玉 曹振 高巍 王敏 孙硕 李召虎		
IPC分类号	C12R1/91 G01N33/566 G01N33/53 C07K16/44 C12N5/20		
代理人(译)	关畅		
其他公开文献	CN101968481B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测样品中是否含有重金属的方法及其专用试剂盒。该试剂盒，包括包被原、抗待检重金属的抗体；所述包被原与抗待检重金属的抗体相互作用，且所述包被原与所述抗待检重金属的抗体的亲和力小于所述待检重金属与所述抗待检重金属的抗体的亲和力。实验证明，本发明所提供的制备铜离子非均等竞争ELISA检测法中，包被抗原的制备方法简单，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包被抗原对ELISA检测灵敏度有明显提高。本发明的制备包被抗原的方法及由该方法建立的铜离子快速免疫检测方法将有广阔的应用前景。

