



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102260347 A

(43) 申请公布日 2011. 11. 30

(21) 申请号 201110157141. 0

(22) 申请日 2011. 06. 13

(71) 申请人 上海交通大学

地址 201108 上海市闵行区东川路 800 号

(72) 发明人 周培 奚涛 邢海波 支月娥

詹学佳

(74) 专利代理机构 上海交达专利事务所 31201

代理人 王毓理

(51) Int. Cl.

C07K 14/765(2006. 01)

C07K 14/77(2006. 01)

C07K 14/795(2006. 01)

C07K 16/44(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

G01N 33/577(2006. 01)

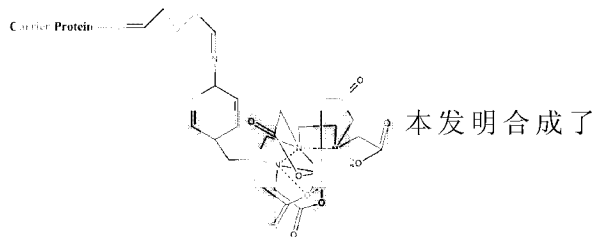
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 2 页

(54) 发明名称

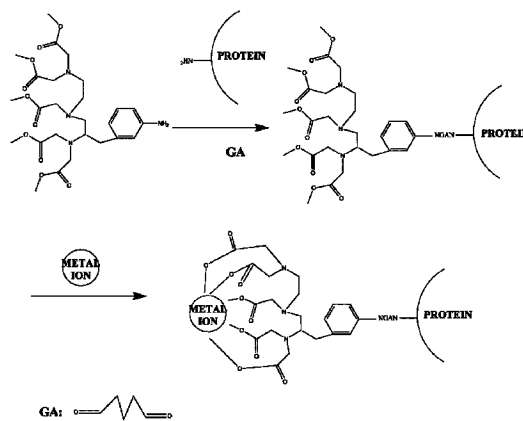
用于多种重金属的抗原的合成及其应用方法

(57) 摘要

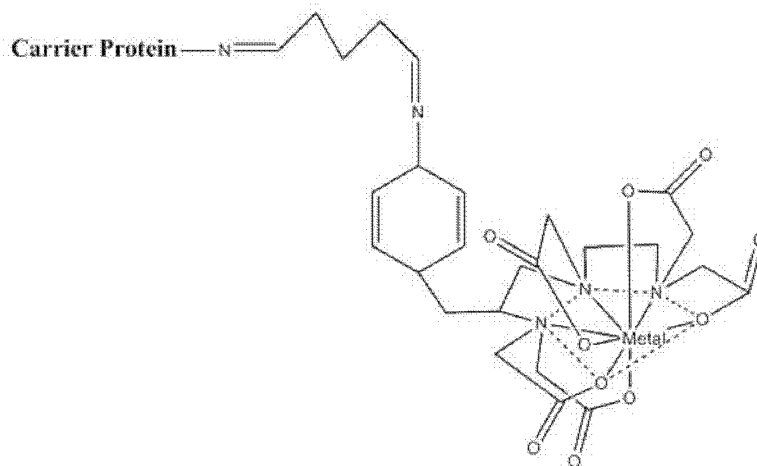
一种环境污染检测技术领域的用于多种重金属的抗原的合成及其应用方法,其分子结构为:



多种重金属包括镉、铅、汞、锌等的完全抗原,并经过纯化、表征鉴定其结构与偶联比等关键参数,确立了一种简单快速有效的重金属抗原合成方法。



1. 一种用于多种重金属的抗原,其特征在于,抗原分子结构如下所示:



2. 一种根据权利要求1所述的抗原的合成方法,其特征在于,通过将双功能螯合剂2-(4-氨基苯基)-二乙三胺五乙酸带有苯胺基的一端用戊二醛与载体蛋白偶联,将带有羧基的一端螯合重金属,形成用于多种重金属的抗原。
3. 根据权利要求2所述的合成方法,其特征是,所述的载体蛋白为大分子蛋白。
4. 根据权利要求2或3所述的合成方法,其特征是,所述的载体蛋白为钥孔血蓝蛋白、牛血清白蛋白或卵清蛋白。
5. 根据权利要求2所述的合成方法,其特征是,所述的偶联是指:将p-NH₂-Bn-DTPA溶于缓冲液中,利用戊二醛法将p-NH₂-Bn-DTPA上的氨基与载体蛋白的氨基偶联,再通过超滤离心法或透析去除未反应的小分子,制备得到双功能螯合剂与蛋白的偶联化合物溶液。
6. 根据权利要求2所述的合成方法,其特征是,所述的螯合是指:将偶联得到的化合物溶液中加入目标重金属,经过螯合反应后形成的重金属完全抗原。
7. 根据权利要求2或6所述的合成方法,其特征是,所述的重金属为镉、铅、汞或锌。
8. 一种根据上述任一权利要求所述抗原的应用,其特征在于,用于制备复合物相关多克隆抗体、单克隆抗体及重金属免疫检测试剂盒或用于检测重金属含量。

用于多种重金属的抗原的合成及其应用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种环境污染检测技术领域的方法,具体是一种用于多种重金属的抗原的合成及其应用方法。

背景技术

[0002] 环境中的重金属污染,是目前威胁人类健康的一个严峻问题。各种有毒有害重金属包括镉、铅、汞、锌、铜等,在污染了水体和农产品之后,通过生物富集作用,富集于食物链顶端的人体内,产生毒害作用,如重金属镉中毒会引起“痛痛病”,铅中毒损害神经和脏器。要从源头上控制重金属污染对人类可能产生的危害,首要的是对重金属污染的样品(包括土壤、水及农产品等)进行有效地监控与检测,传统的重金属检测方法如电感耦合等离子发射光谱等检测重金属的方法,虽然能精确定量地检测重金属的含量与种类,但需要的仪器代价高昂,对操作人员的要求也很高,同时前处理等工作非常复杂,检测的周期也很长,很难满足大批量快速检测重金属并控制其危害的要求。

[0003] 目前国内外广泛开展研究的免疫检测技术能较好地满足这样的要求,免疫技术是利用抗原抗体特异性结合反应,达到定量检测重金属含量的目的。该技术的关键在于合成重金属相关抗原和制备重金属相关抗体。重金属作为一种小分子物质不能直接用于免疫动物,也很难产生针对重金属离子的特异性抗体,所以通常需要一种双功能螯合剂螯合重金属与载体蛋白连接,制备可以用于免疫动物的重金属完全抗原。

[0004] 经过对现有技术的检索发现,近年有关重金属 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Pb^{2+} 、 U^{6+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 等的抗体都有一定的研究报道,他们合成抗原运用的双功能螯合剂包括 EDTA、DTPA 等的衍生物,但普遍的侧重点在于其抗体的制备,对抗原合成与鉴定研究的报道很少,所用的方法技术细节也各有不同,很难找到一种普遍的适用于多种重金属抗原的合成与鉴定方法。

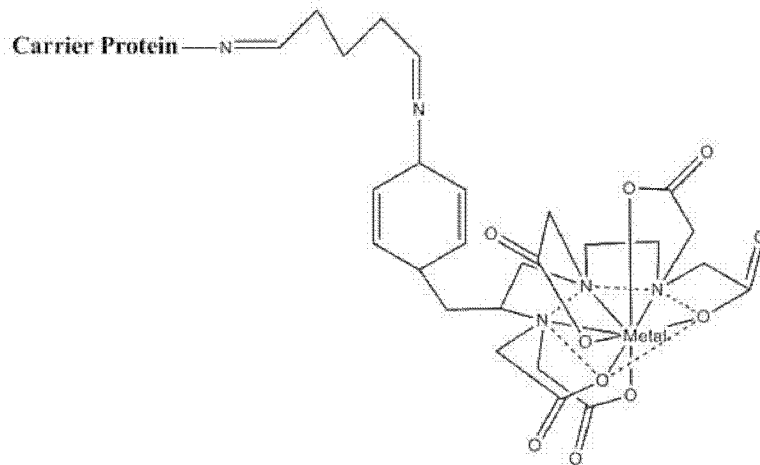
发明内容

[0005] 本发明针对现有技术存在的上述不足,提供一种用于多种重金属的抗原的合成及其应用方法,合成了多种重金属包括镉、铅、汞、锌等的完全抗原,并经过纯化、表征鉴定其结构与偶联比等关键参数,确立了一种简单快速有效的重金属抗原合成方法。

[0006] 本发明是通过以下技术方案实现的:

[0007] 本发明涉及一种用于多种重金属的抗原,人工合成的抗原分子结构如下所示:

[0008]



[0009] 本发明涉及上述抗原的合成方法,通过将双功能整合剂 2-(4-氨基苯基)-二乙三胺五乙酸带有苯胺基的一端用戊二醛与载体蛋白偶联,将带有羧基的一端整合重金属,形成用于多种重金属的抗原。

[0010] 所述的载体蛋白为大分子蛋白,如钥孔血蓝蛋白 (KLH)、牛血清白蛋白 (BSA) 或卵清蛋白 (OVA)。

[0011] 所述的偶联是指:将 p-NH₂-Bn-DTPA 溶于缓冲液中,利用戊二醛法将 p-NH₂-Bn-DTPA 上的氨基与载体蛋白的氨基偶联,再通过超滤离心法或透析去除未反应的小分子,制备得到双功能整合剂与蛋白的偶联化合物 (DTPA-PROTEIN) 溶液。

[0012] 所述的整合是指:将偶联得到的化合物溶液中加入目标重金属,经过整合反应后形成的重金属完全抗原 (METAL-DTPA-PROTEIN)。

[0013] 所述的重金属为镉、铅、汞或锌。

[0014] 本发明涉及的上述抗原,可用于制备复合物相关多克隆抗体、单克隆抗体及重金属免疫检测试剂盒或用于检测重金属含量。

[0015] 本发明针对重金属免疫分析中的完全抗原制备这一关键性问题,用一种双功能整合剂解决了多种有毒有害重金属抗原合成的问题,并建立了一套有效合成抗原的表征鉴定分析方法,进而为研制重金属整合剂复合物相关多克隆抗体、单克隆抗体及重金属免疫检测试剂盒,提供了基础。重金属免疫检测技术拥有的快速、高效等优点,将应用于我国环境和农产品中重金属污染的监测,起到保障食品安全和人民身体健康的作用,具有良好的应用前景和重要意义。

附图说明

[0016] 图 1 为本发明合成方法反应示意图。

[0017] 图 2 为抗原 Cd-DTPA-BSA 的 SDS-PAGE 电泳图。

[0018] 图 3 为 Cd-DTPA-KLH, Cd-DTPA-BSA 的紫外扫描图谱。

具体实施方式

[0019] 下面对本发明的实施例作详细说明,本实施例在以本发明技术方案为前提下进行实施,给出了详细的实施方式和具体的操作过程,但本发明的保护范围不限于下述的实施例。

[0020] 实施例 1

[0021] 重金属镉完全抗原的制备

[0022] 如图 1 所示,为本实施例步骤,其中:双功能螯合剂 p-NH₂-Bn-DTPA 苯环上的氨基与载体蛋白上的氨基通过戊二醛连接后螯合重金属,合成人工抗原。详细如下:

[0023] 准备 p-NH₂-Bn-DTPA 10mg 溶于 3mL HEPES 缓冲液 (10mM, pH 7.4), 载体蛋白 BSA15mg 或 KLH 30mg 溶于 6mL HEPES 缓冲液, 戊二醛 (GA) 50% 水溶液用 HEPES 缓冲液 100 倍稀释, 室温下将 p-NH₂-Bn-DTPA 溶液缓慢滴加至载体蛋白溶液中, 边滴边搅拌, 再将稀释后的 GA 1mL, 缓慢滴加进入反应溶液, 边滴边搅拌, 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 (截留分子量为 10kD 或 30kD) 超滤 HEPES 缓冲液洗涤 3 次, 浓缩至 2mL 左右, 即为双功能螯合剂与蛋白的偶联化合物 (简称为 DTPA-PROTEIN)。超滤的过程也可以用透析袋透析代替, 即使用截留分子量为 3kD 的透析袋 HEPES 缓冲液多次换液透析, 该方法的耗时相对较长。

[0024] 用 HEPES 缓冲液稀释 5 倍, 约 10mL, 缓慢滴入重金属镉溶液 1mL, 重金属镉离子来源可以为 1mg/mL 的标准溶液或硝酸镉溶于浓硝酸溶液配制成 1mg/mL 的溶液, 边滴边搅拌。室温搅拌反应 5 小时。反应后的溶液用 15mL 离心超滤管 (截留分子量为 10kD 或 30kD) 超滤 HEPES 缓冲液洗涤 3 次, 得到重金属镉完全免疫原 Cd-DTPA-KLH 和包被检测原 Cd-DTPA-BSA。

[0025] 实施例 2

[0026] 重金属铅完全抗原的制备

[0027] 取 10mg p-NH₂-Bn-DTPA 溶解后分别滴加于载体蛋白 BSA 15mg 或 KLH 30mg, 再滴加 100 倍稀释的 50% 戊二醛水溶液 1mL, 室温搅拌反应过夜。用 15mL 离心超滤管超滤洗涤 3 次, 稀释后滴加 1mg/mL 的重金属铅溶液 2mL, 室温搅拌 5 小时。反应后的溶液用 15mL 离心超滤管超滤洗涤 3 次, 得到重金属铅完全免疫原 Pb-DTPA-KLH 和包被检测原 Pb-DTPA-BSA。

[0028] 实施例 3

[0029] 重金属汞完全抗原的制备

[0030] 取 10mg p-NH₂-Bn-DTPA 溶解后分别滴加于载体蛋白 BSA 15mg 或 OVA 10mg, 再滴加 100 倍稀释的 50% 戊二醛水溶液 1mL, 室温搅拌反应过夜。用 15mL 离心超滤管超滤洗涤 3 次, 稀释后滴加 1mg/mL 的重金属汞溶液 2mL, 室温搅拌 5 小时。反应后的溶液用 15mL 离心超滤管超滤洗涤 3 次, 得到重金属汞完全免疫原 Hg-DTPA-BSA 和包被检测原 Hg-DTPA-OVA。

[0031] 实施例 4

[0032] 重金属铜完全抗原的制备

[0033] 取 10mg p-NH₂-Bn-DTPA 溶解后分别滴加于载体蛋白 BSA 15mg 或 OVA 10mg, 再滴加 100 倍稀释的 50% 戊二醛水溶液 1mL, 室温搅拌反应过夜。用 15mL 离心超滤管超滤洗涤 3 次, 稀释后滴加 1mg/mL 的重金属铜溶液 1mL, 室温搅拌 5 小时。反应后的溶液用 15mL 离心超滤管超滤洗涤 3 次, 得到重金属铜完全免疫原 Cu-DTPA-BSA 和包被检测原 Cu-DTPA-OVA。

[0034] 实施例 5

[0035] 重金属锌完全抗原的制备

[0036] 取 10mg p-NH₂-Bn-DTPA 溶解后分别滴加于载体蛋白 BSA 15mg 或 OVA 10mg, 再滴加 100 倍稀释的 50% 戊二醛水溶液 1mL, 室温搅拌反应过夜。用 15mL 离心超滤管超滤洗涤

3 次, 稀释后滴加 1mg/mL 的重金属镉溶液 1mL, 室温搅拌 5 小时。反应后的溶液用 15mL 离心超滤管超滤洗涤 3 次, 得到重金属镉完全免疫原 Zn-DTPA-BSA 和包被检测原 Zn-DTPA-OVA。

[0037] 实施例 6

[0038] 重金属镉完全抗原表征与鉴定

[0039] 步骤 1 : 抗原 Cd-DTPA-BSA 中重金属与蛋白偶联比测定

[0040] 考马斯亮蓝 G-250 100mg 溶于 50mL 95% 乙醇中, 加入 100mL 85% 磷酸, 用蒸馏水稀释至 1000mL, 滤纸过滤, 为考马斯亮蓝试剂。牛血清白蛋白 (BSA) 用 10mM HEPES 分别配置成 0mg/mL、0.01mg/mL、0.02mg/mL、0.03mg/mL、0.04mg/mL、0.05mg/mL、0.06mg/mL 的标准溶液, 取 0.1mL 蛋白标准溶液与 5mL 考马斯亮蓝试剂反应后, 在 5-20 分钟内测定 595nm 的吸光度值 (A_{595nm}), 以蛋白含量为横坐标, A_{595nm} 为纵坐标绘制标准曲线。将抗原 0.1mL 与 5mL 考马斯亮蓝试剂反应后测定 A_{595nm}, 根据标准曲线计算的抗原的蛋白浓度。抗原中重金属镉的含量用电感耦合等离子发射光谱测定。重金属与蛋白的偶联比值为重金属的分子质量比上蛋白的分子质量, 由于蛋白 KLH 的分子量较大且是一个约数, 所以实施例中不以 KLH 合成的蛋白为例, 最终本例中抗原 Cd-DTPA-BSA 重金属镉与蛋白的偶联比为 8.7 : 1。

[0041] 步骤 2 : 抗原 Cd-DTPA-BSA 的 SDS-PAGE 电泳图谱

[0042] 8% 的分离胶和 5% 的浓缩胶, 100V 电压进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 考马斯亮蓝 R 250 染色。

[0043] 电泳结果如图 2 所示, 其中 M 是 marker, A 是 BSA, B 是 Cd-DTPA-BSA, 相比较蛋白 BSA 而言, 合成的抗原 Cd-DTPA-BSA 的分子量明显大于 BSA 的分子量, 并有一定程度的拖带, 这种拖带是由于重金属离子在抗原中带电荷所致, 由此能间接反映抗原合成成功。

[0044] 骤 3 : 抗原 Cd-DTPA-KLH, Cd-DTPA-BSA 紫外扫描

[0045] 在 200nm-500nm 的范围内用紫外分光光度计对合成的抗原进行紫外扫描。

[0046] 紫外扫描结果如图 3 所示, 横坐标为紫外扫描波长, 纵坐标为样品吸光度值, 其中载体蛋白 BSA 和 KLH 在 287nm 附近有其特征吸收峰, 而合成的抗原相对于作为对照的载体蛋白其吸收峰向 255nm 处发生了不同程度的迁移, 其原因是由于 p-NH₂-Bn-DTPA 带有的一个苯环结构以及若干羧基与载体蛋白结合, 并且重金属被羧基螯合所导致的; 据此可以间接判定抗原合成的成功。

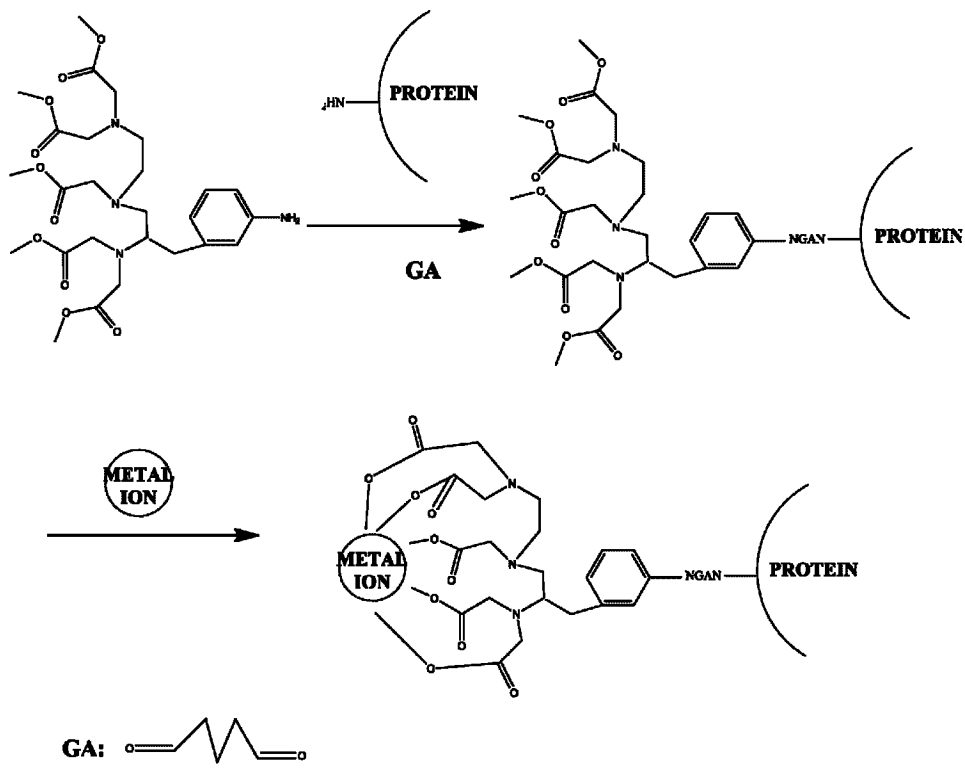


图 1

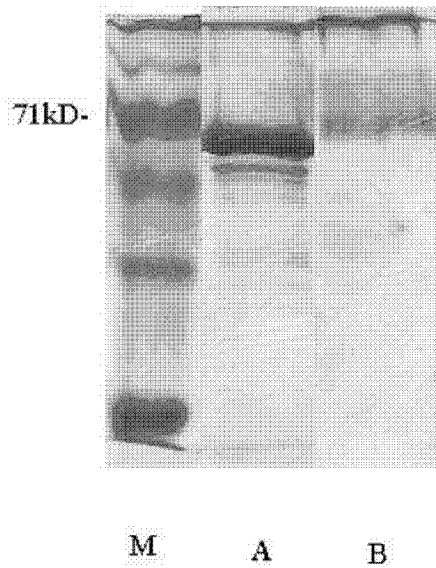


图 2

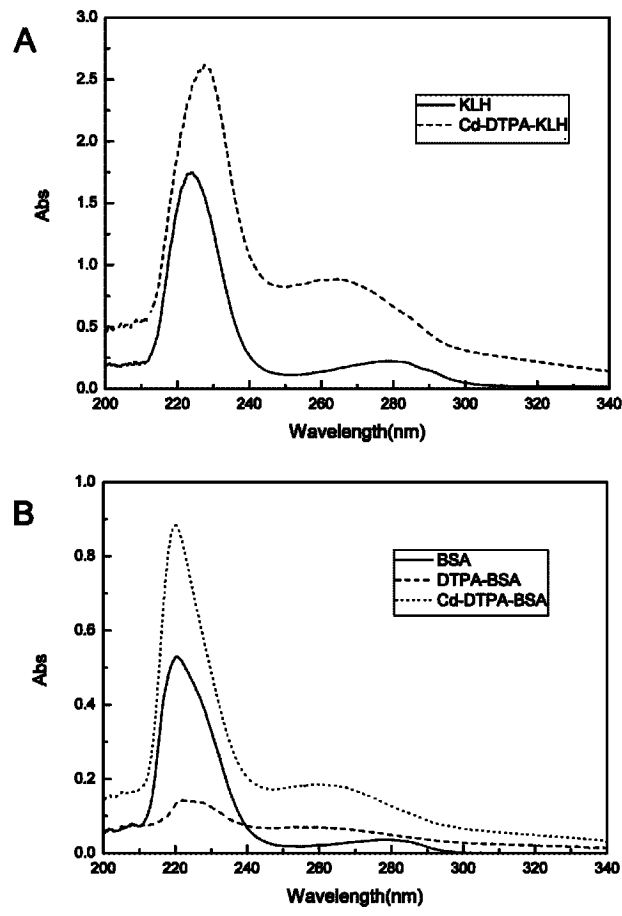


图 3

专利名称(译)	用于多种重金属的抗原的合成及其应用方法		
公开(公告)号	CN102260347A	公开(公告)日	2011-11-30
申请号	CN201110157141.0	申请日	2011-06-13
[标]申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
当前申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
[标]发明人	周培 奚涛 邢海波 支月娥 詹学佳		
发明人	周培 奚涛 邢海波 支月娥 詹学佳		
IPC分类号	C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 C07K16/44 G01N33/53 G01N33/577		
其他公开文献	CN102260347B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种环境污染检测技术领域的用于多种重金属的抗原的合成及其应用方法，其分子结构为：本发明合成了多种重金属包括镉、铅、汞、锌等的完全抗原，并经过纯化、表征鉴定其结构与偶联比等关键参数，确立了一种简单快速有效的重金属抗原合成方法。

