



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108456253 B

(45) 授权公告日 2021.06.08

(21) 申请号 201810133989.1

CN 103472230 A, 2013.12.25

(22) 申请日 2018.02.09

CN 106565741 A, 2017.04.19

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 108456253 A

(43) 申请公布日 2018.08.28

(73) 专利权人 中国科学院广州生物医药与健康研究院

地址 510530 广东省广州市萝岗区开源大道190号

(72) 发明人 鲁学文 曾令文 梅婷 方志远

(74) 专利代理机构 广州科粤专利商标代理有限公司 44001

代理人 郝文婷

(51) Int. Cl.

C07K 16/42 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 103487577 A, 2014.01.01

CN 101655494 A, 2010.02.24

CN 102253213 A, 2011.11.23

CN 102507918 A, 2012.06.20

Ryo Tanaka等.A novel enhancement assay for immunochromatographic test strips using gold nanoparticles.《Anal Bioanal Chem》.2006,第385卷(第8期),第1414-1420页.

唐佳佳.重金属Cu²⁺免疫层析胶体金试纸条的研制.《中国优秀硕士学位论文全文数据库 医药卫生科技辑》.2012,(第10期),第E059-214页.

Tossapon WONGTANGPRASERT等.Production of a monoclonal antibody against oxytetracycline and its application for oxytetracycline residue detection in shrimp.《Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)》.2014,第15卷(第2期),第165-172页.

Bing Lv等.A Review of Heavy Metals Immunoassay Detection.《Advance Journal of Food Science and Technology》.2015,第8卷(第8期),第559-565页.

审查员 田晓蓉

权利要求书1页 说明书4页 附图3页

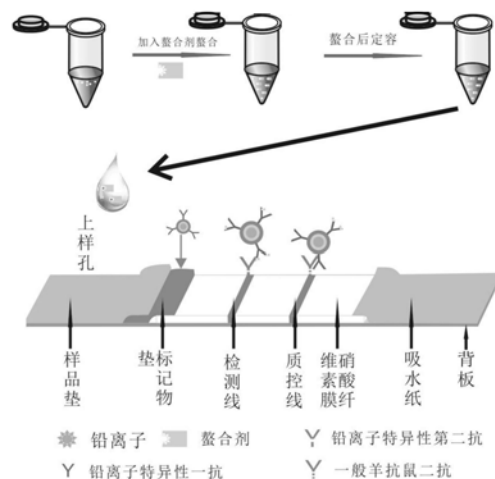
(54) 发明名称

一种重金属离子特异性二抗及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明公开了一种重金属离子特异性二抗及其制备方法和应用。本发明重金属离子特异性二抗仅特异性识别重金属离子第一抗体与螯合的重金属离子结合后构象改变的Fab片段,不识别没有与螯合的重金属离子结合的重金属离子第一抗体。本发明重金属离子特异性二抗可用于制备重金属离子快速定量检测卡,可以实现现场检测复杂体系中的重金属离子,具有快速、简便、灵敏度高、成本低的优点,检测过程无需大型设备,且检测结果可通过肉眼判读,适用于各种环境样品、化妆品、血清等体液和食品安全检测领

域,具有良好且广阔的应用前景和 market 价值。



1. 一种铅离子特异性二抗,其特征在于,其为仅特异性识别铅离子第一抗体与螯合的铅离子结合后构象改变的Fab片段,不识别没有与螯合的铅离子结合的铅第一抗体。

2. 权利要求1所述的铅离子特异性二抗的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

使用螯合剂螯合铅,与去除Fc片段的铅第一抗体孵育结合并去除多余的铅后,作为免疫抗原免疫实验动物,进一步取脾脏细胞与肿瘤细胞融合,获得融合细胞株;以所述免疫抗原为正向筛选抗原,获得阳性细胞克隆,进一步以没有结合铅的铅离子第一抗体为反向筛选抗原,筛选所述阳性细胞克隆,能识别反向筛选抗原的为非靶标细胞株,不识别反向筛选抗原的为靶标细胞株,进一步培养该靶标细胞株,得到铅离子特异性二抗。

3. 权利要求1所述的铅离子特异性二抗在检测相应的铅离子中的应用。

4. 一种铅离子快速检测卡,由背板、标记物垫、样品垫、硝酸纤维素膜和吸水纸组装而成,其特征在于,所述背板具有粘性,所述硝酸纤维素膜粘贴于背板的中部,其两端分别设置有吸水纸和标记物垫,且所述吸水纸和所述标记物垫均与所述硝酸纤维素膜有1~2mm的重叠;所述样品垫设置在所述标记物垫的远离所述硝酸纤维素膜的一侧,并与所述标记物垫有1~2mm的重叠;

所述标记物垫是涂有标记物产物的玻璃纤维膜,所述标记产物为通过静电或共价键结合有铅离子第一抗体的胶体金;

所述样品垫为经pH7~8的缓冲液处理并干燥后的玻璃纤维,其上设置有上样孔;

所述硝酸纤维素膜上固定有权利要求1所述的铅离子特异性二抗作为检测线,还固定有用于识别胶体金标记的抗体的一般二抗作为质控线;所述检测线设置在所述硝酸纤维素膜靠近所述标记物垫的一侧,所述质控线设置在所述硝酸纤维素膜远离所述标记物垫的一侧;所述铅离子特异性二抗的浓度为0.01-2mg/mL,在检测线上的使用量为0.5μL/cm;所述一般二抗的浓度为0.5-3mg/mL,在质控线上的使用量为0.5μL/cm。

5. 根据权利要求4所述的铅离子快速检测卡,其特征在于,所述胶体金用ps微球或磁性微球代替。

6. 根据权利要求4所述的铅离子快速检测卡,其特征在于,所述缓冲液为磷酸缓冲液、硼酸缓冲液、HEPES缓冲液或Tris缓冲液。

7. 根据权利要求4所述的铅离子快速检测卡,其特征在于,所述一般二抗为羊抗鼠抗体。

8. 权利要求4~7中任意一项权利要求所述的铅离子快速检测卡在铅离子和/或其浓度的快速检测中的应用。

9. 一种铅离子的检测方法,其特征在于,包括如下步骤:

S1、取待测样品400μL,调整其pH为6~9,加入0.5-50μL、10mM的螯合剂混匀并静置,然后定容至500μL,得到待测溶液;

S2、将权利要求4~7中任意一项权利要求所述的铅离子快速检测卡放在水平表面;

S3、取60~80μL步骤S1所得待测溶液,加入所述铅离子快速检测卡的加样孔中,室温反应3min以上,当检测线和质控线均呈红色时,则所述待测样品中含有铅离子且浓度大于等于3ng/mL;当检测线不显示红色,且质控线呈红色时,则所述待测样品中不含铅离子或铅离子浓度小于3ng/mL。

一种重金属离子特异性二抗及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属重金属离子快速检测技术领域,更具体地说,本发明涉及一种重金属离子特异性二抗及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 随着科技的发展,食品、水质等逐渐被工业废气、废水、废渣所污染,农田耕作层内的镉、砷、铅、汞等重金属大量富集,加上无机化学农药的使用,使蔬菜等农产品重金属含量严重超标,导致消费者重金属慢性中毒现象屡屡发生,现已引起社会各界的广泛关注,对重金属及其含量的快速测定的需求也越来越迫切。

[0003] 目前的重金属检测技术中,存在诸如仪器价格昂贵、检测费用高、需要专业技术人员操作等问题,不适合普通实验室开展检测,限制了技术的推广和普及。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于:提供一种重金属离子特异性二抗,该特异性二抗可用于制备重金属离子快速定量检测卡,具有高灵敏度、快速检测的优点,可用于多种环境和样品的快速重金属离子检测。

[0005] 本发明重金属离子特异性二抗,其为仅特异性识别重金属离子第一抗体与螯合的重金属离子结合后构象改变的Fab片段,不识别没有与螯合的重金属离子结合的重金属离子第一抗体(自由态)。

[0006] 需要说明的是,本发明所提到的重金属离子、重金属离子第一抗体和重金属离子二抗,所涉及到具体的重金属离子是统一的,如,当重金属离子为铅离子时,重金属离子第一抗体和重金属离子二抗则为铅离子第一抗体和铅离子二抗。

[0007] 本发明所述重金属离子特异性二抗的制备方法,其包括如下步骤:

[0008] 使用螯合剂螯合重金属离子,与去除Fc片段(可采用木瓜蛋白酶酶切的方式去除)的重金属离子第一抗体孵育结合并去除多余的重金属离子后,作为免疫抗原免疫动物,取脾脏细胞与肿瘤细胞融合,得到融合细胞株;以所述免疫抗原为正向筛选抗原从融合细胞株中获得阳性细胞克隆,再以没有结合重金属离子的重金属离子第一抗体为反向筛选抗原,筛选所述阳性细胞克隆,能识别反向筛选抗原的为非靶标细胞株,不能识别反向筛选抗原的为靶标细胞株,进一步培养所述靶标细胞株,其通过分泌得到重金属离子特异性二抗,或将所述靶标细胞株注射入动物获得腹水,再经纯化得到重金属离子特异性二抗。

[0009] 本发明重金属离子特异性二抗可用于检测相应的重金属离子,具体可以制备成重金属离子快速检测卡来实现。

[0010] 因此,本发明还公开了一种重金属离子快速检测卡,由背板、标记物垫、样品垫、硝酸纤维素膜和吸水纸组装而成,其中,所述背板具有粘性,所述硝酸纤维素膜粘贴于背板的中部,其两端分别设置有吸水纸和标记物垫,且所述吸水纸和所述标记物垫均与所述硝酸纤维素膜有1~2mm的重叠;所述样品垫设置在所述标记物垫的远离所述硝酸纤维素膜的一

侧,并与所述标记物垫有1~2mm的重叠;

[0011] 所述标记物垫是喷涂有标记物产物的玻璃纤维膜,所述标记产物为通过静电或共价键结合有重金属离子第一抗体的胶体金;

[0012] 所述样品垫为经pH7~8的缓冲液处理并干燥后的玻璃纤维,其上设置有上样孔;

[0013] 所述硝酸纤维素膜上固定有所说的重金属离子特异性二抗作为检测线,还固定有用于识别胶体金标记的抗体的一般二抗作为质控线;所述重金属离子特异性二抗的浓度为0.01-2mg/mL,在检测线上的使用量为0.5 μ L/cm;所述一般二抗的浓度为0.5-3mg/mL,在质控线上的使用量为0.5 μ L/cm。

[0014] 优选地,所述胶体金可以用ps微球或磁性微球代替。

[0015] 优选地,所述缓冲液为磷酸缓冲液、硼酸缓冲液、HEPES缓冲液或Tris缓冲液;所述螯合剂为EGTA、EDTA。

[0016] 优选地,所述一般二抗为羊抗鼠抗体。

[0017] 所述重金属离子特异性二抗的位置可与所述标记有重金属离子第一抗体的胶体金上的重金属离子第一抗体互换。

[0018] 本发明重金属离子快速检测卡可用于重金属离子和/或其浓度的快速检测。

[0019] 本发明还提供了一种重金属离子的检测方法,其包括如下步骤:

[0020] S1、取待测样品400 μ L,调整其pH为6~9,加入0.5-50 μ L、10mM的螯合剂混匀并静置,然后定容至500 μ L,得到待测溶液;

[0021] S2、将所述的重金属离子快速检测卡放在水平表面;

[0022] S3、取60~80 μ L步骤S1所得待测溶液,加入所述重金属离子快速检测卡的加样孔中,室温反应3min以上,当检测线和质控线均呈红色时,则所述待测样品中含有重金属离子且浓度大于等于3ng/mL;当检测线不显示红色,且质控线呈红色时,则所述待测样品中不含重金属离子或重金属离子浓度小于3ng/mL。

[0023] 本发明重金属离子快速检测卡的工作原理是:先采用螯合剂螯合重金属离子,然后利用标记于胶体金表面的重金属离子第一抗体识别并捕获重金属离子,胶体金和重金属离子第一抗体以及捕获的重金属离子被检测线上的重金属特异性二抗识别并捕获,从而使检测线显示红色(图1)。本发明方法经过两种抗体的特异性识别,灵敏度更好。若利用磁珠等替代胶体金时,一个抗体标记于磁珠表面,可利用磁性分选实现。

[0024] 需要说明的是,本发明上述方法是一种通用技术平台,适合各种重金属离子的单一检测,只要更换相应的抗体即可实现。本发明多以铅离子作为代表说明,但并不代表本发明实施方案仅适用于铅离子。

[0025] 同样,本发明重金属离子特异性二抗不仅能用于本发明提到的检测卡、试纸条等,还可以用于酶联免疫吸附试验、化学发光法等。

[0026] 相对于现有技术,本发明具有如下优点和有益效果:

[0027] 本发明重金属离子特异性二抗可用于制备重金属离子快速检测卡,可以实现夹心法现场检测复杂体系中的重金属离子,具有多通道、快速、简便、灵敏度高、成本低的优点,检测过程无需大型设备,且检测结果可通过裸眼判读,适用于各种环境样品、化妆品、血清等体液和食品安全检测领域,具有良好且广阔的应用前景和市场价值。

附图说明

[0028] 图1为本发明重金属离子检测方法的原理图。

[0029] 图2为本发明实施例2对工业排放废水中的铅离子检测结果。

[0030] 图3为本发明重金属离子检测方法的特异性实验结果图,自左至右依次为铅离子、汞离子、镉离子、铜离子的检测结果(检测化合物样品均为100ng/ml的浓度)。

[0031] 图4为本发明重金属离子快速定量检测卡的检测灵敏度结果,自左至右依次为铅离子浓度为0ng/ml,1ng/ml,2ng/ml,3ng/ml,4ng/ml,5ng/ml,10ng/ml。

具体实施方式

[0032] 为了使本发明的目的、技术方案和有益技术效果更加清晰,以下结合实施例,对本发明进行进一步详细说明。应当理解的是,本说明书中描述的实施例仅仅是为了解释本发明,并非为了限定本发明,实施例的参数、比例等可因地制宜做出选择而对结果并无实质性影响。实施例中除特殊说明外,均为本领域常规试剂和方法步骤。

[0033] 实施例1

[0034] 铅离子特异性二抗的制备方法如下:

[0035] (1) 先取10mM的氯化铅溶液50 μ L至1.5ml离心管中,加入100 μ L的EGTA混匀后,室温放置10分钟;

[0036] (2) 再往离心管中加入去除Fc片段的铅离子抗体,室温放置15分钟;

[0037] (3) 将以上产物置于10000KD的透析袋中用10mM的磷酸缓冲液,透析8次以上,每次透析4小时;

[0038] (4) 将透析后产物和完全佐剂乳化后免疫小鼠,该动物也可以是山羊、兔子等常见动物;

[0039] (5) 随后该产物用不完全佐剂乳化,加强免疫动物3次,每周免疫一次;

[0040] (6) 最后一次免疫一周后取脾脏,和SP/20肿瘤细胞融合后,做单克隆;

[0041] (7) ELISA方法检测:利用步骤(3)透析所得产物0.01-2 μ g/ml包板,为正向筛选酶标板,利用铅离子抗体0.01-2 μ g/ml包板为负筛选酶标板;

[0042] (8) 得到正向酶标板显色明显,负向筛选酶标板不显色的融合杂交瘤细胞株,并培养该细胞株,进一步获得该细胞株分泌的抗体,即为铅离子特异性二抗。

[0043] 实施例2

[0044] 以检测工业排放废水中的铅离子为例:

[0045] (1) 检测线和质控线:

[0046] 检测线溶液配制:以10mM PBS溶液溶解实施例1所得的铅离子特异性二抗,终浓度为0.8mg/mL;

[0047] 质控线溶液配制:以10mM PBS溶液溶解羊抗鼠二抗,终浓度1mg/mL;以0.8 μ L/cm将检测线和质控线溶液涂在硝酸纤维素检测膜的对应区域;

[0048] (2) 标记物垫:以5 μ g/mL铅离子第一抗体用量标记胶体金,12000rpm离心25分钟后,重悬于含有5%蔗糖和1%BSA溶液中;将所得溶液3 μ L/cm喷涂到玻璃纤维膜上,即得标记物垫;

[0049] (3) 样品垫制备:以pH为8.0、50mM的硼酸缓冲液加0.5%triton X-100混合液浸泡

玻璃纤维,烘干后备用。

[0050] (4) 试纸条装配:组装试纸条,切成3mm宽度的成品,装于塑料卡壳中得到检测卡;

[0051] (5) 样品制备:A:取400 μ L水样到EP管中,以酸或碱调节pH至6-9之间。B:加入50 μ L、10mM的EGTA,混匀后室温静置5分钟;C:以双蒸水定容样品至500 μ L;

[0052] (6) 将检测卡放平在桌面上,取60-80 μ L步骤(5)所得的溶液,加入上样孔,静置5分钟观察结果,超过15分钟判读无效。

[0053] (7) 结果判读:检测线和质控线同时显示红色,则指示被检样品中铅离子含量高于3ng/ml;检测线不显示红色,同时质控线显示红色,则指示被检样品中铅离子含量低于3ng/ml或不含有铅离子;若质控线不显色,无论检测线有无显示红色,则指示该检测卡失效(请参见图2,自左至右依次为阳性、阴性、无效、无效结果)。

[0054] 实施例3

[0055] 铅离子检测卡特异性验证:

[0056] (1) 按照实施例2中的步骤制作铅离子检测卡;

[0057] (2) 分别配制100ng/ml的氯化铅、氯化汞、氯化镉、氯化铜溶液作为检测样本;

[0058] (3) 按照实施例2中的步骤制备检测样本并检测;(4) 结果判读:检测线和质控线均出现,则为阳性样本,即对应样品中的铅离子超过检测限;若只出质控线,则为阴性样本,即样品中的铅离子浓度低于检测限;若质控线不出线,则无论检测限出现与否,结果无效。

[0059] 结果如图3所示,只有氯化铅样本检测为阳性,其余样本均为阴性检测结果。显示该检测卡具有较好的特异性。

[0060] 实施例4

[0061] 以检双蒸水稀释的氯化铅为标准品检测体系的灵敏度为例:

[0062] (1) 按照实施例2中的步骤制备检测卡;

[0063] (2) 稀释氯化铅溶液至浓度:0ng/ml,1.34ng/ml,2.690ng/ml,4.03ng/ml,5.38ng/ml,6.72ng/ml,13.44ng/ml该系列溶液中分别含有0ng/ml,1ng/ml,2ng/ml,3ng/ml,4ng/ml,5ng/ml,10ng/ml。此系列溶液作为样品测试体系的灵敏度;

[0064] (3) 按照实施例2中步骤制备样品和检测;

[0065] (4) 结果如图4所示。检测结果中0ng/ml样品,只有质控线出线,检测线不出现,结

[0066] 果为阴性,其余样品检测线和质控线均出现,自1ng/ml至10ng/ml铅离子浓度样品检测

[0067] 线依次加深,由此可见,该铅离子检测试纸条的灵敏度可达1ng/ml。

[0068] 根据上述说明书的揭示和指导,本发明所属领域的技术人员还可以对上述实施方式适当的变更和修改。因此,本发明并不局限于上面揭示和描述的具体实施方式,对本发明的一些修改和变更也应当落入本发明的权利要求的保护范围内。此外,尽管本说明书中使用了一些特定的术语,但这些术语只是为了方便说明,并不对本发明构成任何限制。

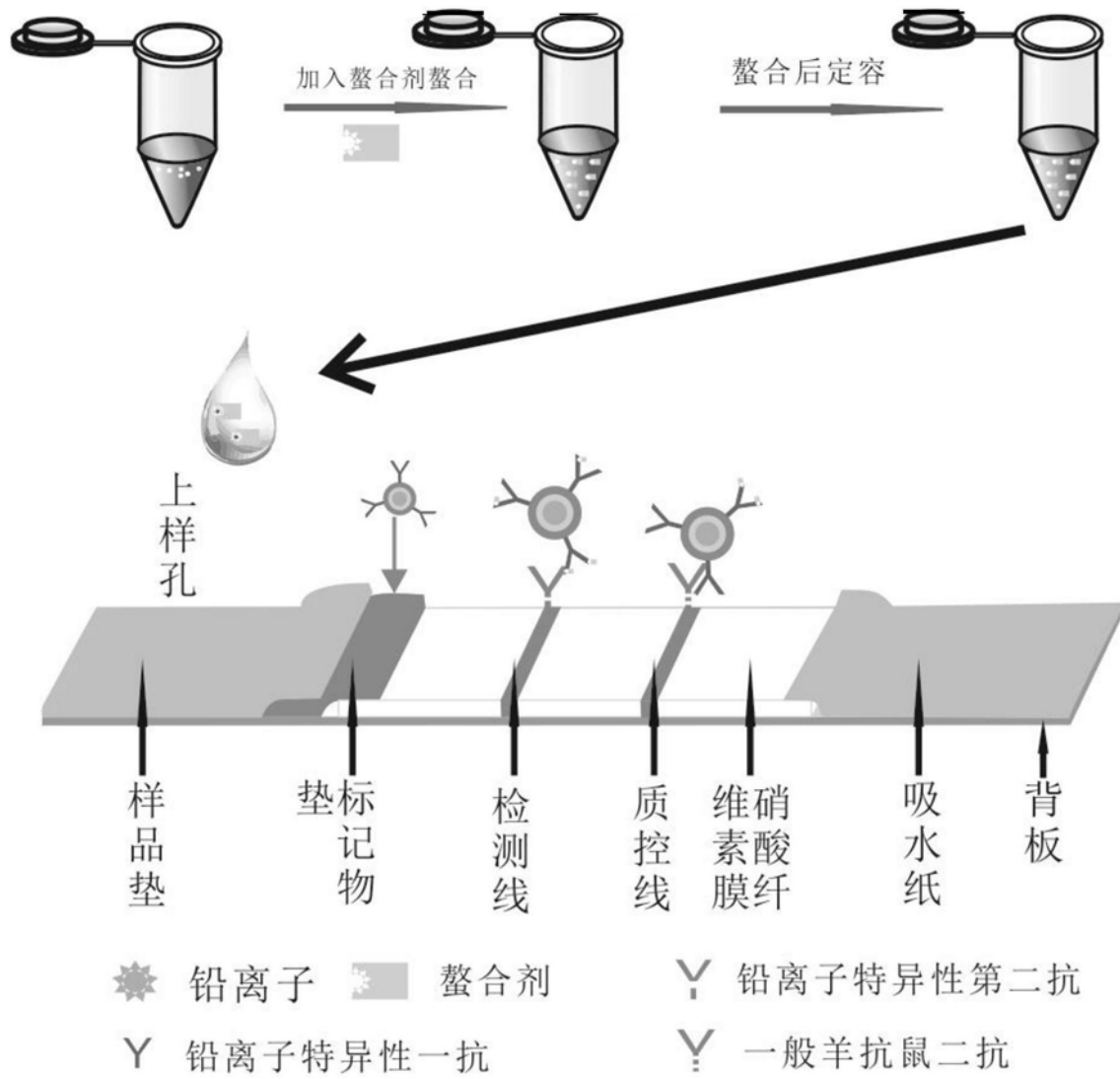


图1



图2



图3

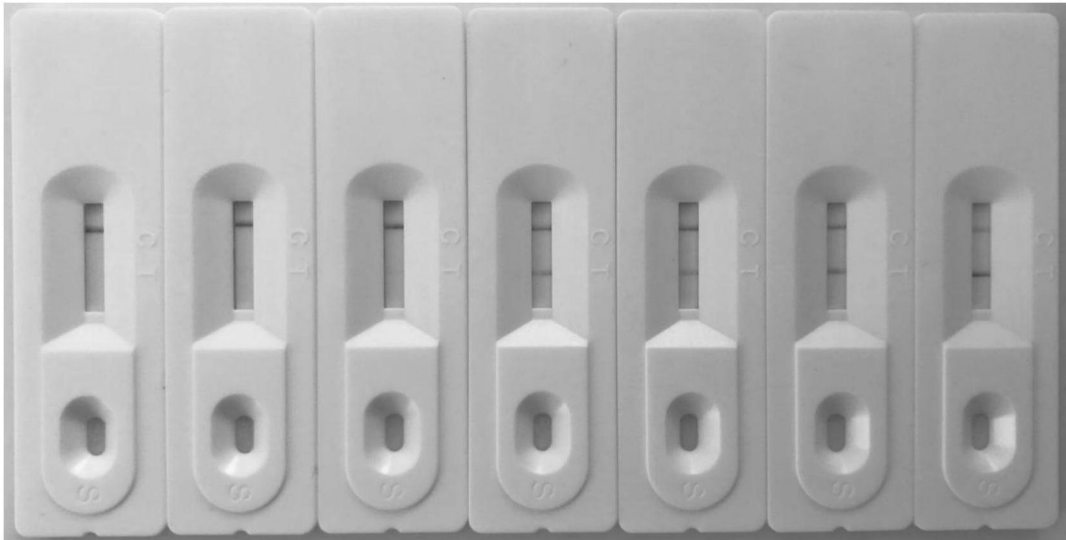


图4