



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104849447 A

(43) 申请公布日 2015. 08. 19

(21) 申请号 201510248885. 1

(22) 申请日 2015. 05. 15

(71) 申请人 深圳市三方圆生物科技有限公司  
地址 518102 广东省深圳市宝安区西乡街道桃花源科技创新园 B 栋 301-305、307-310

(72) 发明人 钟松清 江天久 谭攀 唐勇  
邹军辉 谢冬霞 刘家飞

(74) 专利代理机构 深圳市君胜知识产权代理事务所 44268  
代理人 王永文 刘文求

(51) Int. Cl.  
G01N 33/535(2006. 01)  
G01N 33/577(2006. 01)

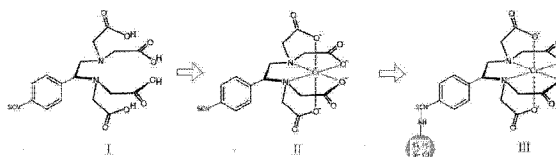
权利要求书2页 说明书7页 附图3页

(54) 发明名称

一种检测重金属铬的免疫分析方法及免疫分析检测试剂盒

(57) 摘要

本发明提供了一种检测重金属铬的免疫分析方法及免疫分析检测试剂盒, 本发明通过胶体金颗粒偶联辣根过氧化物酶和抗铬单克隆抗体, 形成酶标记复合物, 建立检测方法; 通过预处理样品中的铬与检测抗原竞争结合酶标记抗体复合物, 经显色反应放大信号实现对待测样品中铬含量的检测。本发明的检测铬的免疫分析方法为一步法竞争酶联免疫分析方法, 是一种简便、快速且能够高通量的检测方法。



1. 一种检测重金属铬的免疫分析方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 取铬检测用完全抗原,用碳酸盐缓冲液进行稀释,将稀释后的铬完全抗原包被至固相载体表面,4℃包被过夜,随后用洗涤缓冲液洗涤所述固相载体并甩干;

(2) 随后加入封闭缓冲液封闭所述固相载体表面的空余间隙,37℃封闭 0.5-3h,随后用洗涤缓冲液洗涤所述固相载体并甩干;

(3) 取已预处理的待测样品,加入至步骤(2)获得的固相载体表面,以及取浓度梯度的铬标准溶液按照所述待测样品的方法设置标准曲线;

(4) 取胶体金颗粒偶联辣根过氧化物酶和抗铬单克隆抗体的复合物,与步骤(3)中获得的固相载体上包被的所述铬完全抗原和所述铬标准溶液或所述待测样品反应连接,37℃反应 30min,随后用洗涤缓冲液洗涤所述固相载体并甩干;

(5) 通过加入辣根过氧化物酶显色剂进行显色反应并测定吸光度值或通过加入辣根过氧化物酶发光剂进行发光反应测定光信号,根据所述铬标准溶液所测得的吸光值绘制标准曲线,计算待测样品中铬的含量。

2. 如权利要求 1 所述的检测重金属铬的免疫分析方法,其特征在于,所述铬完全抗原的浓度为 250ng/mL;所述碳酸盐缓冲液的浓度为 0.05M 且 pH 值为 9.6,所述洗涤缓冲液含有浓度为 0.015M 且 pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液和质量浓度为 0.05% 的吐温 20;所述封闭缓冲液中含有质量浓度为 1% 的小牛血清白蛋白或质量浓度为 5% 的脱脂奶粉且所述封闭缓冲液的 pH 值为 7.4;所述铬标准溶液的浓度梯度均为 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200ng/mL。

3. 如权利要求 2 所述的检测重金属铬的免疫分析方法,其特征在于,所述铬完全抗原由具有硫氰基的双功能整合剂将铬离子与载体蛋白连接形成,所述双功能整合剂的一端与所述铬离子通过化学键连接,所述双功能整合剂的另一端的硫氰基与所述载体蛋白的氨基偶联。

4. 如权利要求 3 所述的检测重金属铬的免疫分析方法,其特征在于,所述具有硫氰基的双功能整合剂为 1-(4-异硫氰苄基)乙烯基二胺-N,N,N,N-四乙酸或 p-SCN-Bn-DTPA,所述载体蛋白为牛血清白蛋白或卵清蛋白。

5. 如权利要求 4 所述的检测重金属铬的免疫分析方法,其特征在于,所述铬完全抗原的制备方法包括以下步骤:

(1) 制备双功能整合剂 1-(4-异硫氰苄基)乙烯基二胺-N,N,N,N-四乙酸溶液;

(2) 将含有铬离子的溶液逐滴加入到所述 1-(4-异硫氰苄基)乙烯基二胺-N,N,N,N-四乙酸溶液中,室温下反应 3~24h,制得铬离子-双功能整合剂复合物,其中,所述铬离子与所述 1-(4-异硫氰苄基)乙烯基二胺-N,N,N,N-四乙酸的物质的量比例为 1:1;

(3) 将所述铬离子-双功能整合剂复合物逐滴加入到 pH 值为 7.4 的含有载体蛋白的缓冲体系中制得反应混合液,调节所述反应混合液的 pH 值为 9.0~9.5,室温下反应 12~24h,反应结束后离心超滤或透析除去未反应的铬离子和双功能整合剂,制得铬完全抗原;其中,当载体蛋白为牛血清蛋白时,所述载体蛋白与所述铬离子的物质的量比例为 1:20~1:50,当载体蛋白为卵清蛋白时,所述载体蛋白与所述铬离子的物质的量比例为 1:10~1:20。

6. 如权利要求 5 所述的检测重金属铬的免疫分析方法,其特征在于,所述胶体金颗粒偶联辣根过氧化物酶和抗铬单克隆抗体复合物的制备方法包括以下步骤:

(1) 将超纯水加入到烧瓶中,随后加入氯金酸溶液,置于加热搅拌器上直至溶液沸腾后,迅速加入柠檬酸三钠溶液,待反应液颜色稳定后停止加热,室温静置冷却,制得胶体金颗粒;

(2) 调节所述胶体金颗粒溶液 pH 为 8.2 ~ 8.5,将按比例混合的抗铬单克隆抗体和辣根过氧化物酶逐滴加入到所述胶体金溶液中,室温反应 20min 后,静置 2h;

(3) 随后加入封闭缓冲液,室温静置反应 30min 封闭所述胶体金颗粒表面的空余间隙;

(4) 随后在 4℃ 条件下离心,并用洗涤缓冲液洗涤所述胶体金颗粒;最后用重悬缓冲液将所述胶体金颗粒充分重悬,制得抗铬单克隆抗体-胶体金颗粒-辣根过氧化物酶复合物。

7. 如权利要求 6 所述的检测重金属铬的免疫分析方法,其特征在于,所述胶体金颗粒偶联辣根过氧化物酶和抗铬单克隆抗体复合物的制备方法中,所述氯金酸溶液质量分数为 0.01% ~ 1%,所述柠檬酸三钠溶液质量分数为 1%,所述碳酸钾溶液物质的量浓度为 0.1 ~ 0.5mol/L,所述辣根过氧化物酶和抗铬单克隆抗体的物质的量比例为 1:1 ~ 1:24,所述封闭缓冲液为质量浓度 1% 的牛血清白蛋白溶液,所述洗涤缓冲液为 0.01M pH 7.4 的磷酸缓冲液,所述重悬缓冲液为含 5% m/v 海藻糖和质量浓度为 1% 的牛血清白蛋白的 0.015M pH7.4 的磷酸盐缓冲液。

8. 如权利要求 7 所述的检测重金属铬的免疫分析方法,其特征在于,所述胶体金颗粒偶联辣根过氧化物酶和抗铬单克隆抗体的浓度为 1:1000 稀释。

9. 如权利要求 8 所述的检测重金属铬的免疫分析方法,其特征在于,所述样品预处理过程包括以下步骤:

(1) 将采集的环境水样经滤纸过滤,做好标签于 4℃ 保存;

(2) 往样品中加入乙二胺四乙酸溶液,螯合水样中三价铬离子,用于三价铬浓度的测定;

或者往样品中加入氢氧化钠溶液,调节其 pH 至 9,沉淀除去样品中三价铬离子,转移上层清液,再加入等体积的亚硫酸氢钠或焦亚硫酸钠和 EDTA 的混合溶液,将六价铬还原成三价铬,并被 EDTA 螯合形成三价铬-EDTA 复合物,用于六价铬浓度的测定;

或者往样品中加入等体积的亚硫酸氢钠或焦亚硫酸钠和 EDTA 的混合溶液,将六价铬还原成三价铬,并被 EDTA 螯合形成三价铬-EDTA 复合物,用于检测总铬;

上述步骤中,所述滤纸为 0.22 ~ 0.45 μm,所述乙二胺四乙酸溶液的终浓度为 0.5mM ~ 10mM,所述亚硫酸氢钠溶液的终浓度为 60 ~ 180 μg/mL,所述焦亚硫酸钠溶液的终浓度为 54.8 ~ 164.4 μg/mL。

10. 一种检测重金属铬的免疫分析检测试剂盒,其特征在于,包括:包被有铬完全抗原的固相载体、铬标准溶液和胶体金颗粒偶联辣根过氧化物酶和抗铬单克隆抗体复合物溶液,以及包括辣根过氧化物酶显色剂和终止液。

## 一种检测重金属铬的免疫分析方法及免疫分析检测试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及免疫分析技术领域,尤其涉及一种检测铬(包括三价铬、六价铬和总铬)的免疫分析方法及检测铬的免疫分析检测试剂盒。

### 背景技术

[0002] 铬是一种银白色的金属,表面具光泽,质地坚硬而脆,具有良好的延展性。自然界没有游离状态的铬,主要的矿物是铬铁矿。常见的化合价有三价和六价,三价铬具有热力学稳定性,是人体必需的一个微量元素,具有生物学功能,例如,铬作为葡萄糖耐受因子的活性组分,给营养不良、糖尿病和健康人,补充适量的铬均能有效提高人体对葡萄糖的耐受性,能有效增强胰岛素的活性;铬缺乏能够增加患心血管疾病的风险。但过量的铬会对人体健康带来伤害,有体外实验证明,细胞中高浓度的三价铬能导致 DNA 损伤,对人体的皮肤也具有刺激性。

[0003] 而六价铬通常以铬酸盐( $\text{CrO}_4^{2-}$ )和重铬酸盐( $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ )形式存在,具有变应原性、遗传毒性和致癌性。由于六价铬分子量小,能很容易的经过硫酸盐通道进入细胞内部,从而在细胞内大量蓄积,能够造成 DNA 损伤,如链断裂和形成各种各样的 Cr-DNA 加合物。六价铬导致癌症发生的机制是:低浓度六价铬存在下,形成严重的 DNA 损伤,并经错配修复(mismatch repair, MMR)途径,导致染色体畸形;而高剂量六价铬条件下,微卫星不稳定性的产生导致功能性的错配修复(mismatch repair, MMR)完全丧失,使得基因突变频率增加,最终导致癌症发生。六价铬在生物系统内依赖抗坏血酸盐经过一系列的还原反应最终生成稳定的三价铬。因此,对重金属铬的检测已列为食品安全检测中的常规检测项目。

[0004] 在食品安全检测和环境监测中,重金属铬的检测大部分采用仪器法(如原子吸收光谱法、电感耦合等离子体质谱分析法等)和化学显色法(二苯碳酰二肼法)。但仪器法检测结果精确,但是普遍存在仪器昂贵、对检测样品要求高、需专业技术人员操作和在大量样品检测时耗时间长等问题,难以实现现场快速检测的需要。而化学显色法灵敏度又不够高、较易受样品中其他物质的干扰、在大量样品检测时,所需的耗材较多且耗时较长等。因此,寻找一种简便、快速和高通量的检测方法就显得十分重要。

### 发明内容

[0005] 为解决上述问题,本发明实施例提供了一种检测铬(包括三价铬、六价铬和总铬)的免疫分析方法,通过待测样品与铬完全抗原竞争结合胶体金偶联辣根过氧化物酶和抗铬单克隆抗体复合物并通过显色反应放大信号实现对待测样品中铬含量的检测。本发明实施例提供的一种检测铬的免疫分析方法为一步法竞争酶联免疫分析方法,简便、快速且能够高通量检测。本发明实施例还提供了一种检测铬(包括三价铬、六价铬和总铬)的免疫分析检测试剂盒。

[0006] 本发明实施例第一方面提供了一种检测铬(包括三价铬、六价铬和总铬)的免疫分析方法,包括以下步骤:

[0007] (1) 取铬检测用完全抗原,用碳酸盐缓冲液进行稀释,将稀释后的铬完全抗原包被至固相载体表面,4℃包被过夜,随后用洗涤缓冲液洗涤所述固相载体并甩干;

[0008] (2) 随后加入封闭缓冲液封闭所述固相载体表面的空余间隙,37℃封闭0.5-3h(优选1h),随后用洗涤缓冲液洗涤所述固相载体并甩干;

[0009] (3) 取已预处理的待测样品,加入至步骤(2)获得的固相载体表面,以及取浓度梯度的铬标准溶液按照所述待测样品的方法设置标准曲线;

[0010] (4) 取胶体金颗粒偶联辣根过氧化物酶和抗铬单克隆抗体的复合物,与步骤(3)中获得的固相载体上包被的所述铬完全抗原和所述铬标准溶液或所述待测样品反应连接,37℃反应30min,随后用洗涤缓冲液洗涤所述固相载体并甩干;

[0011] (5) 通过加入辣根过氧化物酶显色剂进行显色反应并测定光密度值或通过加入辣根过氧化物酶发光剂进行发光反应测定光信号,根据所述铬标准溶液所测得的吸光值绘制标准曲线,计算待测样品中铬的含量;

[0012] 上述步骤中,所述碳酸盐缓冲液的浓度为0.05M且pH值为9.6,所述洗涤缓冲液含有浓度为0.015M且pH值为7.4的磷酸盐缓冲液和质量浓度为0.05%的吐温20,所述封闭缓冲液中含有质量浓度为1%的小牛血清白蛋白或质量浓度为5%的脱脂奶粉且所述封闭缓冲液的pH值为7.4,所述稀释缓冲液为pH值为7.4的磷酸盐缓冲液。

[0013] 步骤(1)中,优选地,所述固相载体为聚苯乙烯酶标板、聚苯乙烯珠、尼龙膜、聚偏氟乙烯膜、硝酸纤维素膜或磁性微珠。

[0014] 优选地,所述铬完全抗原的浓度为250ng/mL。

[0015] 优选地,所述铬完全抗原由具有硫氰基的双功能螯合剂将铬离子与载体蛋白连接形成,所述双功能螯合剂的一端与所述铬离子通过化学键连接,所述双功能螯合剂的另一端的硫氰基与所述载体蛋白的氨基偶联。

[0016] 优选地,所述具有硫氰基的双功能螯合剂为1-(4-异硫氰苄基)乙烯基二胺-N,N,N,N-四乙酸(Isothiocyanobenzyl-EDTA简称iEDTA)或p-SCN-Bn-DTPA,

[0017] 优选地,所述载体蛋白为牛血清白蛋白(BSA)或卵清蛋白(OVA)。

[0018] 优选地,所述铬完全抗原的制备方法包括以下步骤:

[0019] 1) 制备双功能螯合剂1-(4-异硫氰苄基)乙烯基二胺-N,N,N,N-四乙酸(iEDTA)溶液;

[0020] 2) 将含有铬离子的溶液逐滴加入到所述1-(4-异硫氰苄基)乙烯基二胺-N,N,N,N-四乙酸(iEDTA)溶液中,室温下反应3~24h,制得铬离子-双功能螯合剂复合物,所述铬离子与所述1-(4-异硫氰苄基)乙烯基二胺-N,N,N,N-四乙酸(iEDTA)的物质的量比例为1:1;

[0021] 3) 将所述铬离子-双功能螯合剂复合物逐滴加入到pH值为7.4的含有载体蛋白的缓冲体系中制得反应混合液,调节所述反应混合液的pH值为9.0~9.5,室温下反应12~24h,反应结束后离心超滤或透析除去未反应的铬离子和双功能螯合剂,制得铬完全抗原;所述载体蛋白为牛血清白蛋白(BSA)或卵清蛋白(OVA),加入的所述载体蛋白(BSA)与所述铬离子的物质的量比例为1:20~1:50,加入的所述载体蛋白(OVA)与所述铬离子的物质的量比例为1:10~1:20;所述铬完全抗原由具有硫氰基的双功能螯合剂将铬离子与载体蛋白连接形成,所述双功能螯合剂的一端与所述铬离子通过络合作用连接,所述双功

能螯合剂的另一端的硫氰基与所述载体蛋白的氨基偶联。

[0022] 步骤 (3) 中, 优选地, 所述样品前处理过程包括以下步骤:

[0023] (1) 将采集的环境水样经滤纸过滤, 做好标签, 于 4℃ 保存;

[0024] (2) ①检测三价铬: 往样品中加入乙二胺四乙酸 (EDTA) 溶液, 螯合水样中三价铬离子, 用于三价铬浓度的测定; ②检测六价铬: 往样品中加入氢氧化钠 (NaOH) 溶液, 调节其 pH 至 9 左右, 沉淀除去样品中三价铬离子; 转移上层清液, 再加入等体积的亚硫酸氢钠 (NaHSO<sub>3</sub>) 或焦亚硫酸钠 (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) 和 EDTA 的混合溶液, 将六价铬还原成三价铬, 并被 EDTA 螯合形成三价铬-EDTA 复合物; ③检测总铬: 往样品中加入等体积的亚硫酸氢钠 (NaHSO<sub>3</sub>) 或焦亚硫酸钠 (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) 和 EDTA 的混合溶液, 将六价铬还原成三价铬, 并被 EDTA 螯合形成三价铬-EDTA 复合物。

[0025] 上述步骤中, 所述滤纸为 0.22 ~ 0.45 μm, 所述乙二胺四乙酸溶液的终浓度为 0.5mM ~ 10mM, 所述亚硫酸氢钠溶液的终浓度为 60 ~ 180 μg/mL, 所述焦亚硫酸钠溶液的终浓度为 54.8 ~ 164.4 μg/mL。

[0026] 优选地, 所述铬标准溶液的浓度梯度均为 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200ng/mL。

[0027] 步骤 (4) 中, 优选地, 所述胶体金颗粒偶联辣根过氧化物酶和抗铬单克隆抗体复合物的制备方法包括以下步骤:

[0028] 1) 将超纯水加入到洁净干燥的烧瓶中, 随后加入氯金酸溶液, 置于加热搅拌器上直至溶液沸腾后, 迅速加入柠檬酸三钠溶液, 待反应液颜色稳定后停止加热, 室温静置冷却, 制得胶体金颗粒, 所述胶体金颗粒溶液为红色, 颗粒直径为 20 ~ 40nm;

[0029] 2) 将所述胶体金颗粒溶液, 用碳酸钾溶液调节其 pH 为 8.2 ~ 8.5, 将按比例混合的抗铬单克隆抗体和辣根过氧化物酶逐滴加入到所述胶体金溶液中, 室温反应 20min 后, 静置 2h;

[0030] 3) 随后加入封闭缓冲液, 室温静置反应 30min 封闭所述胶体金颗粒表面的空余间隙;

[0031] 4) 随后在 4℃ 条件下离心, 并用洗涤缓冲液洗涤所述胶体金颗粒; 最后用重悬缓冲液将所述胶体金颗粒充分重悬, 制得抗铬单克隆抗体-胶体金颗粒-辣根过氧化物酶复合物;

[0032] 上述步骤中, 所述氯金酸溶液质量分数为 0.01% ~ 1%, 所述柠檬酸三钠溶液质量分数为 1%, 所述碳酸钾溶液物质的量浓度为 0.1 ~ 0.5mol/L, 所述辣根过氧化物酶和抗铬单克隆抗体的物质的量比例为 1:1 ~ 1:24, 所述封闭缓冲液为 1% 牛血清白蛋白溶液, 所述洗涤缓冲液为 0.01M pH7.4 的磷酸缓冲液, 所述重悬缓冲液为含 5% (m/v) 海藻糖和 1% 牛血清白蛋白的 0.015M pH7.4 的磷酸盐缓冲液。

[0033] 优选地, 所述胶体金颗粒偶联辣根过氧化物酶和抗铬单克隆抗体的浓度为 1:1000 稀释。

[0034] 步骤 (5) 中, 优选地, 所述辣根过氧化物酶显色剂为 3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺 (TMB)。优选地, 所述辣根过氧化物酶发光剂为 3-氨基邻苯二甲酰肼或 4-氨基邻苯二甲酰肼。显色反应为先加入辣根过氧化物酶显色剂再加入终止液终止显色, 随后用酶标仪测定光密度。发光反应为先加入辣根过氧化物酶发光剂再加入终止液终止发光, 随后用荧光检测仪测定发光强度。

[0035] 本发明实施例第二方面提供了一种检测铬（包括三价铬、六价铬和总铬）的免疫分析检测试剂盒，包括：包被有铬完全抗原的固相载体、铬标准溶液和胶体金颗粒偶联辣根过氧化物酶和抗铬单克隆抗体复合物，以及包括辣根过氧化物酶显色剂或辣根过氧化物酶发光剂。其中，所述铬完全抗原、所述固相载体、所述胶体金颗粒偶联辣根过氧化物酶和抗铬单克隆抗体复合物、所述辣根过氧化物酶显色剂和所述辣根过氧化物酶发光剂均如第一方面所述。

[0036] 本发明实施例提供了一种检测铬（包括三价铬、六价铬和总铬）的免疫分析方法，通过待测样品与铬完全抗原竞争结合胶体金颗粒偶联辣根过氧化物酶和抗铬单克隆抗体复合物并通过显色反应放大信号实现对待测样品中铬含量的检测。本发明实施例提供了一种检测铬（包括三价铬、六价铬和总铬）的免疫分析方法为一步法竞争酶联免疫分析方法，简便、快速且能够高通量检测。本发明实施例还提供了一种检测铬（包括三价铬、六价铬和总铬）的免疫分析检测试剂盒。

### 附图说明

[0037] 图1为本发明实施例1制得的铬完全抗原的具体制备流程图。

[0038] 图2为本发明实施例2制得的胶体金颗粒偶联辣根过氧化物酶和抗铬单克隆抗体复合物的具体制备流程图。

[0039] 图3为本发明实施例4免疫分析方法的具体反应流程图。

[0040] 图4为本发明实施例4免疫分析方法的标准抑制曲线。

[0041] 图5为本发明实施例5样品用于检测总铬的前处理方法的具体流程图。

[0042] 图6为本发明实施例5样品用于检测三价铬的前处理方法的具体流程图。

[0043] 图7为本发明实施例5样品用于检测六价铬的前处理方法的具体流程图。

[0044] 图8为本发明效果实施例2提供的实际样品检测的结果对比表。

### 具体实施方式

[0045] 下面将结合本发明实施例中的附图，对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述，显然，所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例，而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例，本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例，都属于本发明保护的范围。

[0046] 实施例1

[0047] 一种铬完全抗原的制备方法，包括以下步骤：

[0048] 称取0.5mg iEDTA，用100  $\mu$ L DMSO溶解，制得 iEDTA 溶液，即如图1所示的成分 I；随后将100  $\mu$ L 含有1.0  $\mu$ M  $\text{Cr}^{3+}$ 的溶液逐滴加入到 iEDTA 溶液中，25 $^{\circ}$ C、125rpm 反应3h，制得  $\text{Cr}^{3+}$ -iEDTA 复合物，即如图1所示的复合物 II。将2.5mg 载体蛋白（BSA 或 OVA）溶解于800  $\mu$ L，0.1M，pH 值为7.4 Tris-HCl 缓冲液中制得含有载体蛋白的缓冲体系。然后将  $\text{Cr}^{3+}$ -iEDTA 复合物逐滴加入到含有载体蛋白的缓冲体系中制得反应混合液。加入三乙胺溶液调节反应混合液的 pH 值为9.0 ~ 9.5，25 $^{\circ}$ C、125rpm 反应24h。反应结束后，用反应液加入到已经用0.1M EDTA  $\cdot$  2Na 预处理的超滤管中，5000g 离心超滤5次，每次10min，除去未偶联的  $\text{Cr}^{3+}$ 和 iEDTA。收集离心超滤的截留物即为铬完全抗原。最后可用 PBS 缓冲液重悬

截留物,得到总体积为 1mL 的铬完全抗原溶液,即得到如图 1 所示的复合物 III。所述铬完全抗原溶液可经鉴定后分装,置于  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。

#### [0049] 实施例 2

[0050] 胶体金颗粒偶联辣根过氧化物酶和抗铬单克隆抗体复合物的制备方法,包括以下步骤:

[0051] (1) 量取 100mL 三蒸水,加入到洁净干燥地烧瓶中,随后加入 2mL,1% 氯金酸溶液;置于加热搅拌器上直至溶液沸腾后,迅速加入 4mL 1% 柠檬酸三钠溶液,待反应液颜色稳定后停止加热,室温静置冷却,制得如图 2 所示的胶体金颗粒 (AuNP);

[0052] (2) 吸取 5mL 直径 20nm 的胶体金颗粒 (AuNP) 溶液置于洁净干燥的低吸附玻璃瓶中,用 0.25M 碳酸钾溶液调节其 pH 为 8.2 ~ 8.5。接着,逐滴加入按物质的量比 [辣根过氧化物酶 (HRP) / 抗铬单克隆抗体 (Mab) 为 12 : 1] 的混合液,室温缓慢搅拌 20min 后,静置 2h,使如图 2 所示的抗铬单克隆抗体 Mab 和辣根过氧化物酶 HRP 充分偶联到金颗粒表面。随后加入 10% (m/V) BSA 溶液,使 BSA 的终浓度为 1%,充分混匀后静置 30min。在  $4^{\circ}\text{C}$  条件下,10000rpm 离心 40min 后,弃上层液体,再用 0.01M, pH 7.4 PB 缓冲液按上述操作洗涤沉淀三次,最终用 100  $\mu\text{L}$  含有 5% (m/V) 海藻糖和 1% BSA (m/V) 的 PBS 溶液重悬沉淀,制得抗铬单克隆抗体 - 胶体金颗粒 - 辣根过氧化物酶复合物 (Mab-AuNP-HRP),如图 2 所示。将其置于  $4^{\circ}\text{C}$  保存。

#### [0053] 实施例 3

[0054] 棋盘滴定法确定抗原抗体的最佳反应浓度,包括如下步骤:

[0055] (1) 用包被缓冲液 (0.05M, pH 9.6 碳酸盐缓冲液) 将检测抗原梯度稀释,每孔 100  $\mu\text{L}$  加入到 96- 微孔板中;

[0056] (2) 将板置于密封袋中,防止孔内液体挥发, $4^{\circ}\text{C}$  包被 16h;

[0057] (3) 倾去孔内液体,加入 PBS-T (0.015M, pH 7.4 磷酸盐缓冲液,含 0.05% Tween 20),放置 10s,然后弃板孔液并置于干净的吸水纸上使板孔内液体吸干,重复 3 次;

[0058] (4) 每孔中加入 200  $\mu\text{L}$  封闭缓冲液 (5% 脱脂奶粉),将板密封后,置于  $37^{\circ}\text{C}$  封闭 1h;

[0059] (5) 重复洗板操作 (3);

[0060] (6) 取出需要数目的微孔,将梯度稀释的抗铬单克隆抗体 - 胶体金颗粒 - 辣根过氧化物酶复合物加入到相应地微孔板中,轻轻振荡混匀,密封后置于  $37^{\circ}\text{C}$  避光环境中反应 30min;

[0061] (7) 重复操作 (3);

[0062] (8) 依次加入 TMB 底物显色液 A 液与底物液 B 液各 50  $\mu\text{L}$  于微孔中,振荡混匀,置室温避光环境中反应 10min;

[0063] (9) 每孔中加入 50  $\mu\text{L}$  终止液 (2M 硫酸溶液轻轻振荡混匀,设定酶标仪于 450nm 处测定每孔 OD 值。

[0064] 实验结果显示:最适铬完全抗原浓度为 250ng/mL 和最适胶体金颗粒偶联辣根过氧化物酶和抗铬单克隆抗体复合物的浓度为 1 : 1000 稀释。

#### [0065] 实施例 4

[0066] 一步法竞争酶联免疫吸附试验 (ELISA),包括如下步骤:

[0067] (1) 如图 3 所示。用包被缓冲液 (0.05M, pH 9.6 碳酸盐缓冲液) 将最佳浓度的检测抗原稀释, 每孔 100  $\mu$ L 加入到 96- 微孔板中;

[0068] (2) 将板置于密封袋中, 防止孔内液体挥发, 4 $^{\circ}$ C 包被 16h;

[0069] (3) 倾去孔内液体, 加入 PBS-T (0.015M, pH 7.4 磷酸盐缓冲液, 含 0.05% Tween 20), 放置 10s, 然后弃板孔液并置于干净的吸水纸上使板孔内液体吸干, 重复 3 次;

[0070] (4) 每孔中加入 200  $\mu$ L 封闭缓冲液 (5% 脱脂奶粉), 将板密封后, 置于 37 $^{\circ}$ C 封闭 1h;

[0071] (5) 重复洗板操作 (3);

[0072] (6) 取出需要数目的微孔, 将梯度稀释的小分子抗原标准品和已预处理的样品分别加入到相应地微孔板中, 同时将样品轻轻振荡混匀; 再加入最佳浓度稀释的抗铬单克隆抗体-胶体金颗粒-辣根过氧化物酶复合物 (MAb-AuNP-HRP), 密封后置于 37 $^{\circ}$ C 避光环境中反应 30min, 抗铬单克隆抗体-胶体金颗粒-辣根过氧化物酶复合物 (MAb-AuNP-HRP) 中的抗铬单克隆抗体与检测抗原充分结合;

[0073] (7) 重复操作 (3);

[0074] (8) 依次加入 TMB 底物显色液 A 液与底物液 B 液各 50  $\mu$ L 于微孔中, 振荡混匀, 置室温避光环境中反应 10min;

[0075] (9) 每孔中加入 50  $\mu$ L 终止液 (2M 硫酸溶液), 轻轻振荡混匀, 设定酶标仪于 450nm 处测定每孔 OD 值。

[0076] (10) 通过测得的 OD 值, 绘制标准曲线, 如图 4 所示, 通过图 4 所示的标准曲线计算样品中重金属铬的浓度。

[0077] 实验结果显示: 本发明方法的半抑制浓度 (IC<sub>50</sub>) 为 3.86ng/ml, 标准抑制曲线的线性范围为 0.5-50ng/ml。

[0078] 实施例 5

[0079] 实际样品中重金属铬包括总铬、三价铬、六价铬的前处理方法分别如图 5、图 6 和图 7 所示, 包括以下步骤:

[0080] (1) 将采集的环境水样经 0.45  $\mu$ M 的滤纸过滤, 做好标签, 于 4 $^{\circ}$ C 保存;

[0081] (2) 如图 5 所示检测总铬: 往样品中加入等体积、终浓度为 60  $\mu$ g/mL 亚硫酸氢钠 (NaHSO<sub>3</sub>) 和终浓度为 0.5mM EDTA 的混合溶液, 将六价铬 [Cr(VI)] 还原成三价铬 [Cr(III)], 并被 EDTA 螯合形成三价铬-EDTA 复合物 [Cr(III)-EDTA]。

[0082] 如图 6 所示的检测三价铬: 往样品中加入终浓度为 0.5mM 的乙二胺四乙酸 (EDTA) 溶液, 螯合水样中三价铬离子 [Cr(III)] 形成三价铬-EDTA 复合物 [Cr(III)-EDTA], 六价铬离子 [Cr(VI)] 不会跟 EDTA 螯合, EDTA 也会螯合其他材料 (图中白色球代表其他物质), 但不影响三价铬的检测。

[0083] 如图 7 所示的检测六价铬: 往样品中加入氢氧化钠 (NaOH) 溶液, 调节其 pH 至 9 左右, 沉淀除去样品中三价铬离子 [Cr(III)]; 转移上层清液, 再加入等体积、终浓度为 60  $\mu$ g/mL 亚硫酸氢钠 (NaHSO<sub>3</sub>) 和终浓度为 0.5mM EDTA 的混合溶液, 将六价铬 [Cr(VI)] 还原成三价铬 [Cr(III)], 并被 EDTA 螯合形成三价铬-EDTA 复合物 [Cr(III)-EDTA], 当然与 EDTA 结合的还可能是其他物质 (图中白色球所表示), 但不影响铬元素的检测;

[0084] 效果实施例 1

[0085] 本效果实施例 1 采用国家标准水质样品, 包括六价铬标准样品 (GSBZ50027-94,  $0.099 \pm 0.006$ mg/L) 和总铬标准样品 (GSB07-1187-2000,  $0.747 \pm 0.028$ mg/L) 检测本发明实施例 4 和实施例 5 的样品前处理效果和检测结果, 其检测结果如表 1 所示。

[0086] 表 1、本发明效果实施例 1 提供的标准样品检测结果对比表。

[0087]

样品	标准值 (mg/L)	检测值 (mg/L)
GSBZ50027-94 (六价铬)	$0.099 \pm 0.006$	$0.108 \pm 0.011$
GSB07-1187-2000 (总铬)	$0.747 \pm 0.028$	$0.782 \pm 0.064$

[0088] 从表 1 结果可以看出, 经本发明实施例 5 和实施例 4 处理和检测的样品中六价铬和总铬的回收率分别为 109.09% 和 104.69%, 说明本发明所提供的检测重金属铬的免疫分析方法具有较好的可靠性和精确度。

[0089] 效果实施例 2

[0090] 本效果实施例 2 提供了本发明方法检测低色度的地表水和生活应用中重金属六价铬浓度与仪器法 - 原子吸收光谱法 (AAS) 检测结果对比实验, 其结果如图 8 所示。

[0091] 如图 8 所示的结果显示, 经本发明实施例 5 和实施例 4 处理和检测的六价铬浓度与仪器法 - 原子吸收光谱法具有较高的相关系数, 线性相关系数为 0.9728, 也说明本发明方法具有较高的稳定性和实用性。

[0092] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已, 并不用以限制本发明, 凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等, 均应包含在本发明的保护范围之内。

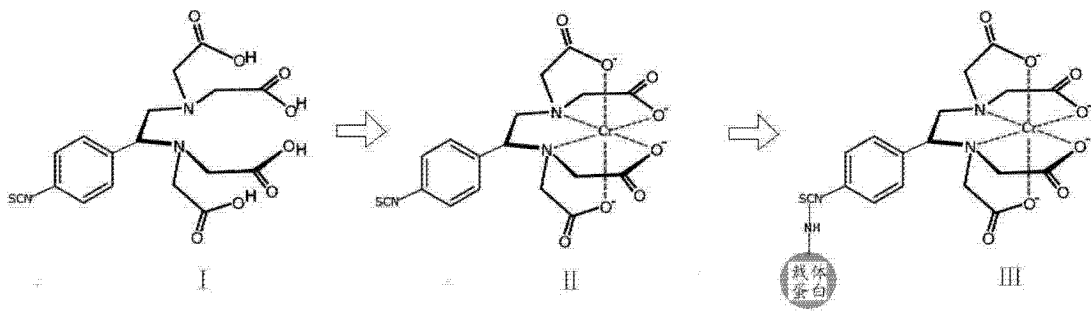


图 1

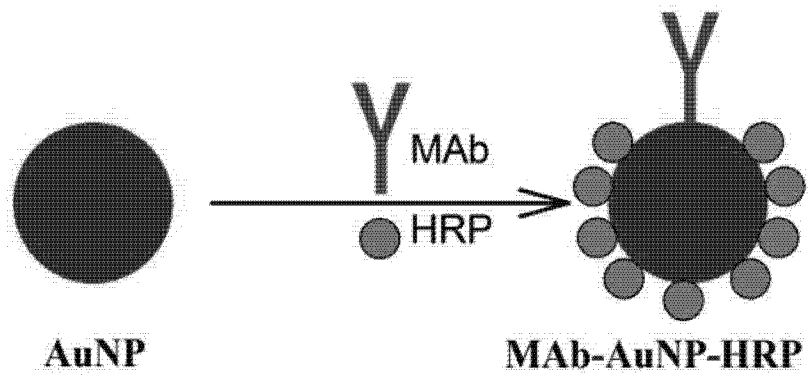


图 2

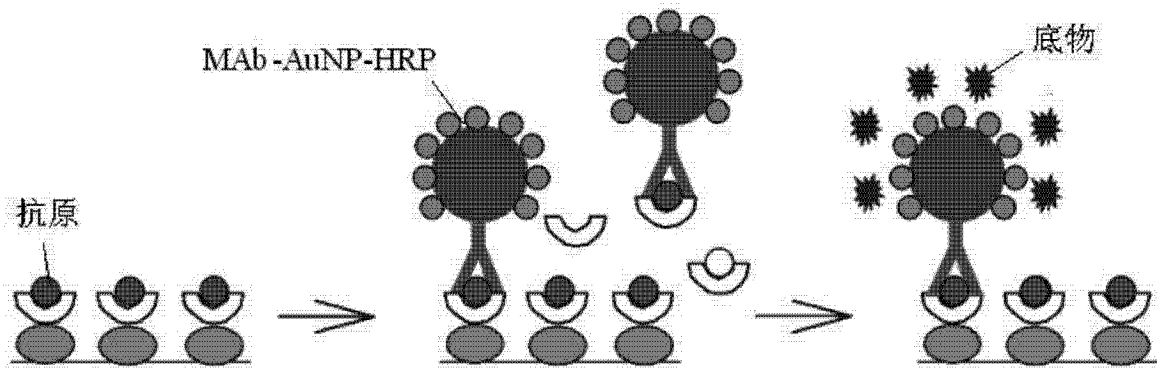


图 3



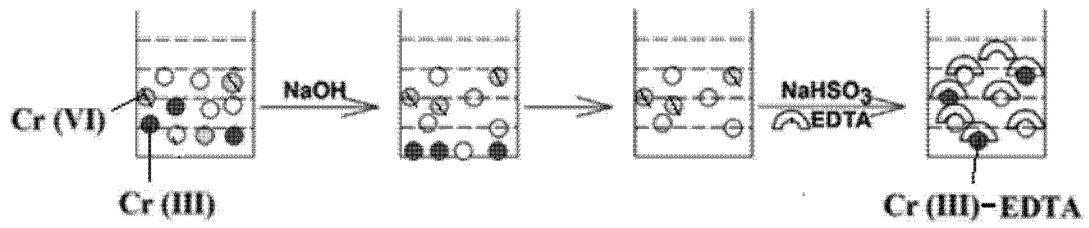


图 7

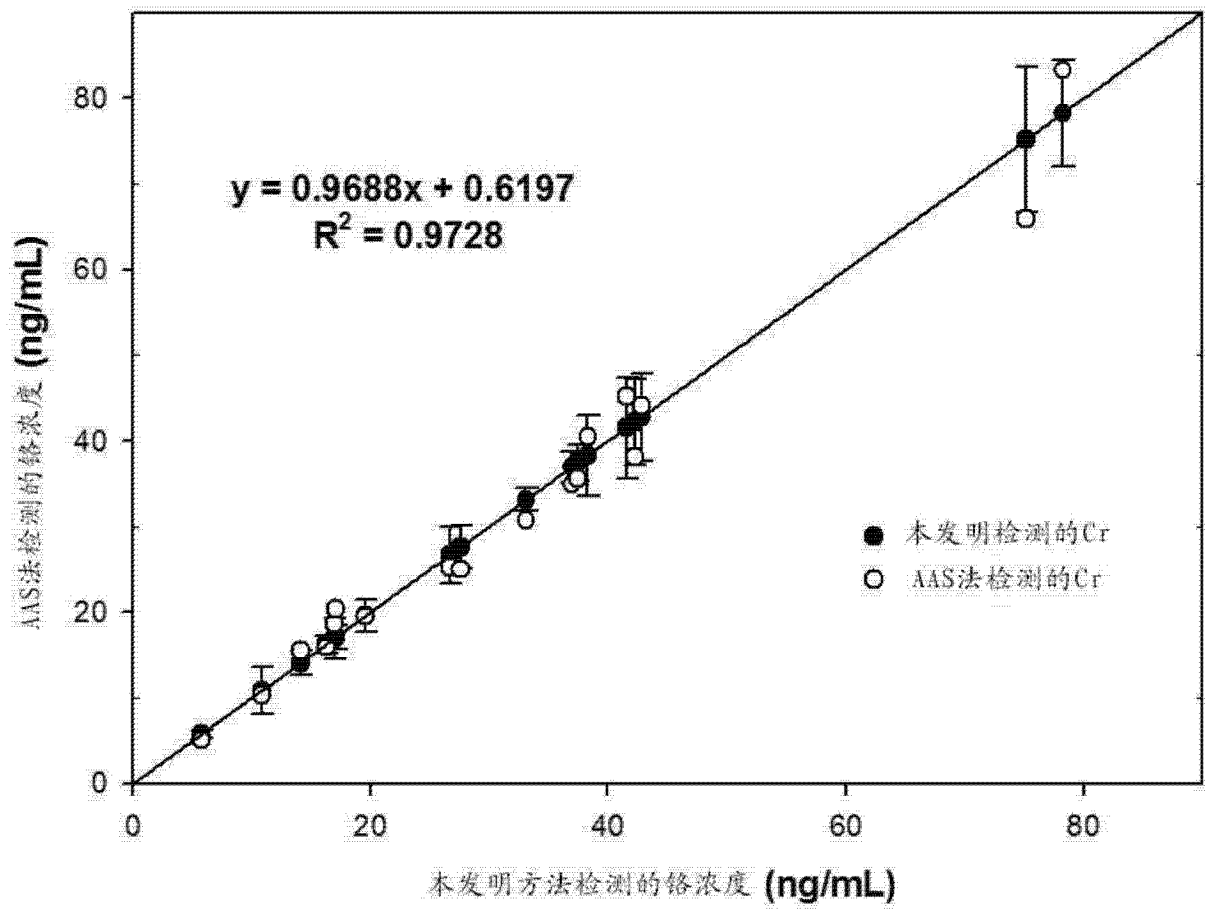


图 8

专利名称(译)	一种检测重金属铬的免疫分析方法及免疫分析检测试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN104849447A</a>	公开(公告)日	2015-08-19
申请号	CN201510248885.1	申请日	2015-05-15
[标]申请(专利权)人(译)	深圳市三方圆生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	深圳市三方圆生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	深圳市三方圆生物科技有限公司		
[标]发明人	钟松清 江天久 谭攀 唐勇 邹军辉 谢冬霞 刘家飞		
发明人	钟松清 江天久 谭攀 唐勇 邹军辉 谢冬霞 刘家飞		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/577		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/53		
代理人(译)	王永文		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供了一种检测重金属铬的免疫分析方法及免疫分析检测试剂盒，本发明通过胶体金颗粒偶联辣根过氧化物酶和抗铬单克隆抗体，形成酶标记复合物，建立检测方法；通过预处理样品中的铬与检测抗原竞争结合酶标记抗体复合物，经显色反应放大信号实现对待测样品中铬含量的检测。本发明的检测铬的免疫分析方法为一步法竞争酶联免疫分析方法，是一种简便、快速且能够高通量的检测方法。

