



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102128920 A

(43) 申请公布日 2011. 07. 20

(21) 申请号 201010539824. 8

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010. 11. 11

G01N 33/53(2006. 01)

(83) 生物保藏信息

G01N 33/543(2006. 01)

CCTCC C201084 2010. 08. 25

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 21/78(2006. 01)

(71) 申请人 暨南大学

地址 510760 广东省广州市黄埔大道西 601 号

申请人 百奥泰生物科技(广州) 有限公司

(72) 发明人 江天久 包财 秦超 王晔

(74) 专利代理机构 广州市华学知识产权代理有限公司 44245

代理人 裘晖 陈燕娴

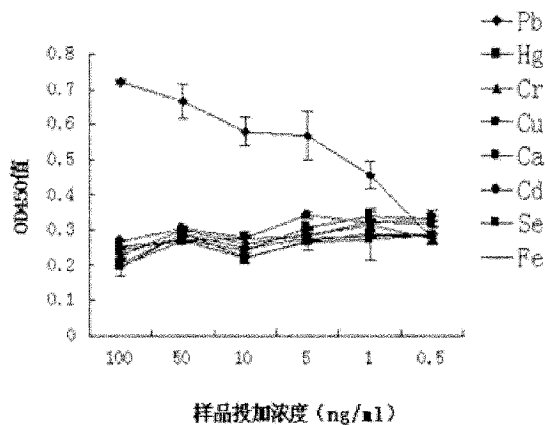
权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 2 页

(54) 发明名称

一种快速检测重金属铅离子的免疫学方法与试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种快速检测重金属铅离子的免疫学方法与试剂盒。该免疫学方法为间接酶联免疫技术,即通过人工合成抗原包被无铅抗原结合样品中的铅离子,形成含铅抗原;含铅抗原与抗铅单克隆抗体反应形成抗原-铅-抗体结构链;接着再与酶标记的二抗反应,形成抗原-铅-抗体-二抗的结构链;通过显色反应,由显色程度判断所检样品中的铅离子含量。实现该免疫学方法的试剂盒包含包被好人工抗原并封闭的 ELISA 酶标板和抗铅单克隆抗体,人工抗原指的是 CHX-A”-DTPA-OVA;抗铅单克隆抗体由保藏日期为 2010 年 8 月 25 日、保藏编号为 CCTCC C201084、名称 6H8/4F7 的单克隆细胞株产生。本发明首次将间接酶联免疫检测技术用于小分子检测中,检测效果好。



1. 一种快速检测重金属铅离子的免疫学方法,其特征在于包含以下步骤:采用间接酶联免疫技术,即通过人工合成抗原包被无铅抗原结合样品中的铅离子,形成含铅抗原;含铅抗原与抗铅单克隆抗体反应形成抗原-铅-抗体结构链;接着再与酶标记的二抗反应,形成抗原-铅-抗体-二抗的结构链;然后通过显色反应,由显色程度判断所检样品中的铅离子含量;

所述抗铅单克隆抗体由保藏日期为2010年8月25日、保藏编号为CCTCCC201084、名称为6H8/4F7的单克隆细胞株产生。

2. 根据权利要求1所述的免疫学方法,其特征在于:所述的人工合成抗原指的是CHX-A"-DTPA-OVA,该人工合成抗原是由OVA偶联重金属螯合剂CHX-A"-DTPA,经室温振荡反应24小时,采用超滤法纯化而得。

3. 根据权利要求2所述的免疫学方法,其特征在于:所述免疫学方法,更具体包含以下步骤:将人工合成抗原CHX-A"-DTPA-OVA包被于酶标板微孔内,加入量为100~400ng/well;接着封闭,再加入待检样品,于37°C反应至少5min, PBST溶液洗涤,再加入抗铅单克隆抗体,每孔加入100~500ng,于37°C孵育至少30min;再用PBST溶液洗涤,加入酶标记的羊抗鼠IgG,加入量为每孔10~12.5ng/well,于37°C孵育至少30min后用PBST溶液洗涤,再加入底物进行显色反应,根据显色的深浅对样品中铅离子含量进行定性和半定量分析。

4. 根据权利要求3所述的免疫学方法,其特征在于:所述的封闭是使用质量百分比3%的牛血清白蛋白溶液进行封闭,37°C孵育1h。

5. 根据权利要求3所述的免疫学方法,其特征在于:所述PBST溶液的组成为由0.01M、pH值为7.4的PBS缓冲液与Tween-20按体积比1000:0.5混合得到。

6. 根据权利要求3所述的免疫学方法,其特征在于:所述酶标记的羊抗鼠IgG6为辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠IgG。

7. 实现权利要求1~6任一项所述免疫学方法的试剂盒,包含包被好人工抗原并封闭的ELISA酶标板、抗铅单克隆抗体、酶标记的羊抗鼠IgG和底物,其特征在于:所述人工抗原指的是CHX-A"-DTPA-OVA;所述抗铅单克隆抗体由保藏日期为2010年8月25日、保藏编号为CCTCC C201084、名称6H8/4F7的单克隆细胞株产生。

8. 根据权利要求7所述的试剂盒,其特征在于:所述包被好人工抗原并封闭的ELISA酶标板通过以下步骤制备得到:将人工合成抗原CHX-A"-DTPA-OVA包酶标板微孔内,加入量为100ng/well;接着用质量百分比为3%的BSA封闭,于37°C孵育1h,于吸水纸上拍干,用PBST溶液洗涤得到。

9. 根据权利要求7所述的试剂盒,其特征在于:所述酶标记的羊抗鼠IgG9为HR标记的羊抗鼠IgG,浓度为100ng/ml。

10. 根据权利要求7所述的试剂盒,其特征在于:所述的底物为3,3',5,5'-四甲基联苯胺,浓度为100~150μg/ml。

## 一种快速检测重金属铅离子的免疫学方法与试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明特别涉及一种快速检测重金属铅离子的免疫学方法与试剂盒,可用于环境农产品中重金属铅离子残留快速检测。

### 背景技术

[0002] 近年来,由于工业废水、矿厂开发废弃物等的大量释放,造成了我国土壤和水体中重金属污染物残留迅速增长,并直接影响到了农产品和水产品的质量安全。重金属元素可在动物植物体内富集并通过食物链最终转移至人体。因误食含有重金属污染物残留的农产品和水产品而造成人类中毒事件时有发生。这也表明,目前我们迫切需要对环境农产品和水产品的质量进行长期有效的监测,以保证其食用安全性。

[0003] 传统上,环境农产品中重金属残留的检测技术主要依靠大型仪器,如原子吸收分光光度法、电感耦合等离子体-原子发射光谱法、电感耦合等离子体质谱分析、原子荧光光谱分析等,这些重金属检测方法虽然能精确测量样品中重金属含量,但检测相对费时、费力、且费用昂贵,此外,这些方法需大量的样品预处理,并在大型分析设备上进行,需要专业人员操作,难以应用于现场检测。由于上述的不足之处,检测的样品数一般会少于最佳检测数量,导致在随后进行的重金属污染程度和风险的评估工作存在较大的不确定性,受污农产品的监管也难以及时有效开展。

[0004] 重金属免疫检测技术,是采用人工制备的抗重金属抗体与抗原之间的免疫反应为基础,通过酶联免疫系统信号放大作用,快速准确的表达所检样品中重金属含量。重金属免疫检测技术在国外研究较早。自 Reardan 首次通过重金属-螯合剂复合物制备出单克隆抗体以来,越来越多的抗重金属抗体被制备出来,并成功建立了相应的免疫监测系统。目前,这一技术多采用间接竞争酶联免疫方法(IC-ELISA)。IC-ELISA 用于检测重金属铅,虽然可达到较高的检测水平,但是其成本过高(需要过量昂贵的螯合剂),而很难真正应用于产品生产当中。

### 发明内容

[0005] 本发明的首要目的在于克服现有技术的缺点与不足,提供一种快速检测重金属铅离子的免疫学方法。

[0006] 本发明的另一目的在于提供实现所述免疫学方法的试剂盒。

[0007] 该发明的目的通过下述技术方案实现:一种快速检测重金属铅离子的免疫学方法,包含以下步骤:采用间接酶联免疫技术,即通过人工合成抗原包被无铅抗原结合样品中的铅离子,形成含铅抗原;含铅抗原与抗铅单克隆抗体反应形成抗原-铅-抗体结构链;接着再与酶标记的二抗反应,形成抗原-铅-抗体-二抗的结构链;然后通过显色反应,由显色程度判断所检样品中的铅离子含量;

[0008] 所述的人工合成抗原指的是 CHX-A"-DTPA-OVA,该人工合成抗原是由 OVA(卵白蛋白)偶联重金属螯合剂 CHX-A"-DTPA,经室温振荡反应 24 小时,采用超滤法纯化而得;

[0009] 所述的抗铅单克隆抗体由保藏于中国典型培养物保藏中心（地址为中国湖北省武汉市武汉大学内）、保藏日期为 2010 年 8 月 25 日、保藏编号为 CCTCCC201084、名称为杂交瘤细胞株 6H8/4F7 的单克隆细胞株制备得到；

[0010] 所述快速检测重金属铅离子的免疫学方法，更具体包含以下步骤：

[0011] 将人工合成抗原 CHX-A”-DTPA-OVA 包被于酶标板微孔内，加入量为 100 ~ 400ng/well；接着封闭，再加入待检样品，于 37℃ 反应至少 5min，PBST 溶液洗涤，再加入抗铅单克隆抗体，每孔加入 100 ~ 500ng，于 37℃ 孵育至少 30min；再用 PBST 溶液洗涤，加入酶标记的羊抗鼠 IgG，加入量为每孔 10 ~ 12.5ng/well，于 37℃ 孵育至少 30min 后用 PBST 溶液洗涤，再加入底物进行显色反应，根据显色的深浅对样品中铅离子含量进行定性和半定量分析；

[0012] 所述的封闭优选为使用质量百分比 3% 牛血清白蛋白 (BSA) 溶液进行封闭，于 37℃ 孵育 1h；

[0013] 所述 PBST 溶液的组成优选为由 0.01M、pH 值为 7.4 的 PBS 缓冲液与 Tween-20 按体积比 1000 : 0.5 混合得到；

[0014] 所述抗铅单克隆抗体由保藏日期为 2010 年 8 月 25 日、保藏编号为 CCTCCC201084、名称 6H8/4F7 的单克隆细胞株制备得到；

[0015] 所述酶标记的羊抗鼠 IgG 优选为辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG；

[0016] 实现所述免疫学方法的试剂盒包含包被好人工抗原并封闭的 ELISA 酶标板、抗铅单克隆抗体、酶标记的羊抗鼠 IgG 和底物，其中，人工抗原指的是 CHX-A”-DTPA-OVA；抗铅单克隆抗体由保藏日期为 2010 年 8 月 25 日、保藏编号为 CCTCC C201084、名称 6H8/4F7 的单克隆细胞株制备得到；

[0017] 所述包被好人工抗原并封闭的 ELISA 酶标板优选通过以下步骤制备得到：将人工合成抗原 CHX-A”-DTPA-OVA 包被于酶标板微孔内，人工合成抗原 CHX-A”-DTPA-OVA 的加入量为 100ng/well；接着用质量百分比为 3% 的 BSA 封闭，于 37℃ 孵育 1h，于吸水纸上拍干，用 PBST 溶液洗涤 3 次得到；所述 PBST 溶液的组成优选为由 0.01M、pH 值为 7.4 的 PBS 缓冲液与 Tween-20 按体积比 1000 : 0.5 混合得到；

[0018] 所述酶标记的羊抗鼠 IgG 优选为 HRP 标记的羊抗鼠 IgG；使用浓度优选为 100ng/ml。

[0019] 所述的底物优选为 TMB (3,3',5,5' -四甲基联苯胺) 显色底物，使用浓度优选为 100 ~ 150 μg/ml。

[0020] 本发明相对于现有技术具有如下的优点及效果：

[0021] (1) 本发明首次将间接酶联免疫检测技术 (I-ELISA) 用于小分子检测中，不仅保留了免疫检测技术的灵敏度和准确性，而且也达到了降低制造成本的目的，真正完成了将 ELISA 技术应用于环境重金属铅残留的现场快速检测当中。

[0022] (2) 本发明首次成功制备出重金属铅酶联免疫检测试剂盒，并在实验水平下完成了水样品检测检验，达到了现有铅离子检测水平。

## 附图说明

[0023] 图 1 是本发明可行性的检测结果图。

[0024] 图 2 是杂交瘤细胞株培养上清特异性实验结果。

[0025] 图 3 是重金属铅离子免疫检测系统标准曲线。

[0026] 图 4 是重金属铅离子免疫检测试剂盒样品反应时间测定结果。

### 具体实施方式

[0027] 下面结合实施例及附图对本发明作进一步详细的描述,但本发明的实施方式不限于此。

[0028] 实施例 1

[0029] 用本发明所述的免疫学方法检测重金属铅离子:

[0030] (1) 单克隆抗体溶液的制备:

[0031] ①人工抗原的合成

[0032] 选择与小鼠亲缘关系较远的钥孔戚血蓝蛋白 (KLH) 作为免疫载体,选择卵白蛋白 (OVA) 作为检测载体。

[0033] 1) 母液配备:

[0034] A 液:称取 12mg CHX-A"-DTPA(二乙基三胺五乙酸)溶于 1ml 纯水中,加热至 60℃,溶解;

[0035] B 液:称取 17mg  $Pb(NO_3)_2$  溶于 200  $\mu$ l 体积百分比 2% 的稀硝酸中;

[0036] C 液:称取 10mg OVA 溶于 2ml HEPES(10mM, pH9.0) 中,置于 4℃;

[0037] D 液:量取 850  $\mu$ l KLH( $5.8\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ),置于 4℃保存备用。

[0038] 2) 免疫抗原制备:

[0039] 取 30  $\mu$ l 步骤 1)B 液逐滴加入 350  $\mu$ l 步骤 1)A 液中,室温振荡反应 4h,得到半抗原。将半抗原加入到 D 液中,并加入 5  $\mu$ l 三乙胺,室温振荡反应过夜,得到免疫抗原。

[0040] 3) 检测抗原的制备

[0041] 将步骤 1)C 液分装两支离心管,每支装 1ml,标记为 C1 和 C2;每支管中均加入 350  $\mu$ l 步骤 1)A 液。再取 30  $\mu$ l B 液加入到 C1 离心管中。

[0042] 将步骤 2) 和 3) 中获得的三组溶液均用 HEPES 缓冲液 (10mM, pH9.0) 稀释至 3ml,室温振荡反应过夜,得到检测抗原,其中离心管 C1 中得到的是含铅检测抗原 OVA-CHX-A"-DTPA-Pb,离心管 C2 中得到的是无铅检测抗原 CHX-A"-DTPA-OVA。

[0043] ②抗原纯化及鉴定

[0044] 步骤①中的免疫抗原和检测抗原的合成反应完成后需要进行小分子杂质及中间产物分离,才能达到抗原的纯化目的。纯化后通过蛋白浓度的测定以及铅离子浓度的检测,鉴定人工抗原是否合成成功。

[0045] 将获得的三组抗原分别装入超滤管 (10KD) 中,加 HEPES 缓冲液 (10mM, pH9.0) 至 14ml,进行超滤,3000rpm、20min、4℃,洗五次。每次超滤后浓缩液和穿透液各取样待测。浓缩液:稀释至 10ml 取 20  $\mu$ l,再用 HEPES 缓冲液 (10mM, pH9.0) 稀释至 1ml;穿透液:加 HEPES 缓冲液 (10mM, pH9.0) 至 10ml,取 1ml。

[0046] ③小鼠免疫

[0047] 采用常规免疫方法操作:将步骤②中纯化所得抗原用弗氏佐剂乳化,形成油包水状物之后,选择 5 只 5 周龄,雌性, Balb/C 小鼠进行腹腔免疫。所用的小鼠购自广东省实验动物中心。首次免疫采用弗氏完全佐剂,之后均使用弗氏不完全佐剂进行乳化。

**[0048] ④抗血清检测**

**[0049]** 收集步骤③进行免疫的小鼠血清后,采用间接 ELISA 检测小鼠抗血清,方法如下:

**[0050]** 包被人工检测抗原 OVA-CHX-A"-DTPA-Pb 和 CHX-A"-DTPA-OVA, 分别用  $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$  包被液 (1M, pH9.6) 稀释至  $400\text{ng} \cdot \text{well}^{-1}$ , 加样体积为  $100 \mu\text{l} \cdot \text{well}^{-1}$  加入包被板孔, 保鲜膜封闭好, 置于  $37^\circ\text{C}$  温育 1h; 用干净吸水纸拍干, 1M PBS 洗涤 3 次,  $200 \mu\text{l} \cdot \text{well}^{-1}$ , 50rpm, 振荡 3min (下同); 质量百分比 3% BSA,  $100 \mu\text{l} \cdot \text{well}^{-1}$ ,  $37^\circ\text{C}$  温育 1h; 干净吸水纸拍干封闭液, 不加洗涤直接加入血清样品,  $100 \mu\text{l} \cdot \text{well}^{-1}$ ,  $37^\circ\text{C}$  温育 1h; 0.05% 的 PBST (0.01M, pH 7.4 的 PBS 缓冲液 1000ml+ 的 tween-200.5ml) 洗涤三次; 加入 10ng/well 酶标二抗 (羊抗鼠 IgG-HRP) 后  $37^\circ\text{C}$  温育 1h; 0.05% 的 PBST 洗涤五次; 拍干孔内液体后, 每孔加入 100 微升 TMB 底物, 配方如下: 0.1M 的柠檬酸 8.85ml+0.2M 的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  11.15ml 混合后, 再加入  $250 \mu\text{l}$  TMB (6mg/ml) 和  $100 \mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (30%),  $37^\circ\text{C}$  温育 2min; 然后加入 1M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $50 \mu\text{l} \cdot \text{well}^{-1}$ , 终止显色反应; 酶标仪检测 OD450。

**[0051]** 由以上抗血清检测结果中比较 5 只小鼠血清结合两组检测抗原的差异率, 从中选择差异最高的小鼠, 即抗体含量高的小鼠, 进行下一步实验。

**[0052] ⑤动物细胞实验**

**[0053]** 常规方法进行动物细胞采集: 选择一只 8 周龄未预处理的雌性 Balb/C 小鼠, 采集其腹腔巨噬细胞, 作为细胞融合时的饲养细胞, 提前 3 天采集并预种到 96 孔板内; 融合前将小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 离心, 用无血清培养基清洗 (800rpm, 5min 离心, 弃上清。) 后计数待用; 手术取下小鼠脾脏, 两支 1ml 注射器反复吹打脾脏分离细胞, 直至脾脏变白; 收集到的脾细胞用无血清培养基清洗 (800rpm, 5min 离心, 弃上清。) 后计数待用。细胞融合方法及单克隆杂交瘤细胞株筛选策略参考: 牛涛. 重金属  $\text{Pb}^{2+}$  单克隆抗体的制备及时 + 的 DTC 螯合 ELISA 检测方法研究. 暨南大学硕士学位论文. 2005.6。小鼠购自广东省实验动物中心; 小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 购自中国科学院上海细胞生物研究所。

**[0054]** 将分泌此抗体的单克隆杂交瘤细胞株保藏于中国生物保藏中心, 保藏日期为 2010 年 8 月 25 日、保藏编号为 CCTCC C201084、名称为 6H8/4F7。此细胞株是由小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞融合后, 筛选并克隆化获得的特异性分泌抗铅单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

**[0055] ⑥腹水型抗体的制备**

**[0056]** 挑选 5 只健康的 Balb/C 小鼠 (购自广东省实验动物中心), 腹腔注射不完全佐剂 0.5ml。注射佐剂后三天, 取对数生长期的杂交瘤细胞 (即名称为 6H8/4F7 的单克隆细胞株), 用无菌 PBS 洗 1 次, 腹腔注射, 每只小鼠每次注射约  $2 \times 10^6$  个细胞, 0.5ml PBS 缓冲液 (0.01M, pH 7.4)。7 天后腹水产生较充分 (提起小鼠尾巴, 可见小鼠腹部呈现方形), 收获腹水。腹水收获工作要在无菌工作台上进行无菌操作。首先拉颈处死小鼠, 浸泡在体积百分比 75% 酒精中 10min, 然后转入塑料槽。提起小鼠腹壁, 使与腹腔内腹水有一空间, 在腹壁剪开一小口, 使塑料转移滴管刚好插入, 腹水溢出。吸取腹水转入离心管。离心 1500rpm, 10min, 用吸管小心去掉最上层脂肪层, 收取中层腹水, 存于  $4^\circ\text{C}$  冰箱。留少量进行下一步实验, 其余分装冻存至  $-80^\circ\text{C}$ 。

**[0057] ⑦单克隆抗体的纯化**

**[0058]** 采用亲和层析试剂 Protein-A 纯化腹水型单克隆抗体。

**[0059]** 将腹水 10000rpm 离心 20min 后, 去掉上层脂肪层, 留腹水层, 通过  $0.45 \mu\text{l}$  微孔滤

膜后备用。本实验采用的纯化试剂是以体积百分比为 20% 的乙醇溶液预胀的 Protein-A, 装柱前, 用 PBS 缓冲液 (0.01M, pH 7.0) 洗去乙醇, 并重悬 Protein-A。小心装柱, 吹去凝胶中的气泡。装柱完毕, 用 2 倍柱床体积的 PBS 平衡柱子。把处理好的腹水用 PBS 缓冲液稀释后小心加入柱内, 以每毫升 Protein-A 结合 5mg 蛋白计算。室温震荡反应 5h。保存流出液, 把流出液再上一次柱, 使未结合的目的蛋白充分结合。用 5 ~ 10 倍柱体积的 PBS 缓冲液洗柱子 (洗去残余在柱子里的杂蛋白), 取 2  $\mu$ l 洗出液用考马斯亮蓝液监控, 至到流出液不变蓝。用 5 倍柱床体积的甘氨酸 (1M, pH3.0) 洗脱柱子, 流出液用含 200  $\mu$ l 1M Tris-HCl pH 9.0 的 1.5ml 管接受, 每管总体积到 1ml 左右。测定洗脱液浓度, 在紫外 280nm 测定 OD 值, 乘系数 1.43 为蛋白 IgG 浓度, 并用 SDS-PAGE 胶检测洗脱液蛋白的纯度, 未降解 IgG, 分子量为 150KD 左右, 而降解的 IgG 的分子量为重链 50KD 和轻链 25KD。

[0060] 洗脱下来的蛋白, 进行脱盐后浓缩。本实验脱盐采用 G-25 脱盐柱分离盐离子。用 PBS 缓冲液平衡柱子后, 加入 2.5ml 抗体溶液。待溶液流出时, 除去前 2.5ml 后开始接收 3.5ml。反复使用 PBS 清洗和平衡柱子。脱盐后的抗体溶液体积较大, 需进一步浓缩。本实验采用 10KD 的超滤管浓缩抗体, 3000rpm, 10min。纯化后的抗体无杂蛋白干扰, 通过采用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度来确定纯化后抗体浓度, 并配合 SDS-PAGE 电泳图验证其纯度和浓度。

[0061] (2) 制备包被好人工抗原并封闭的 ELISA 酶标板: 将 1mg 双功能螯合剂 CHX-A"-DTPA (Macrocyclics) 与 5mg 载体蛋白 OVA 偶联, 加入 3.2  $\mu$ l 三乙胺, 室温振荡反应 24h 后超滤 5 次, 获得人工检测抗原 CHX-A"-DTPA-OVA 溶液 (参考文献: M. Khosraviani, R. C. Blake II, A. R. Pavlov, S. C. Lorbach, H. Yu, J. B. Delehanty, M. W. Brechbiel, and D. A. Blake. Binding properties of a monoclonal antibody directed toward lead-chelate complexes. *Bioconj. Chem.*, 2000, 11: 267-277)。用 BCA 试剂盒 (购自上海博彩生物有限公司) 检测蛋白浓度后, 用 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub> 包被液 (1M, pH9.6) 稀释至 1  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ l/well 加入酶标板微孔中, 37°C 孵育 1 小时后拍干水分, PBS 缓冲液洗三次。后加入质量百分比为 3% 的 BSA 进行封闭, 200  $\mu$ l/well, 37°C 孵育 1h。密封后转冻存于 -20°C 保存备用。

[0062] (3) 间接免疫学检测: 在步骤 (2) 得到的 ELISA 酶标板中加入不同浓度的铅标准溶液 (不同浓度的铅离子标准溶液的配制过程如下: 母液为 1mg/ml 的标准品 (购自国家钢铁材料测试中心钢铁研究总院), 分别稀释为以下不同浓度 (ng/ml): 0、1、2、5、10、20、50、100、500、1000), 于 37°C 孵育 30min, 用 0.05% 的 PBST (0.01M、pH 值为 7.4 的 PBS 缓冲液 1000ml + Tween-20.5ml 混合) 洗涤并在吸水纸上拍干, 再加入与抗原等质量体积浓度剂量的抗铅单克隆抗体溶液, 37°C 反应 1h 后洗涤并在吸水纸上拍干, 加入 100ng/ml 的 HR-羊抗鼠 IgG, 37°C 孵育 30 ~ 45min 后用 0.05% 的 PBST 洗 5 ~ 7 遍; 加入 TMB 显色底物 (10ml TMB 缓冲液加入 150  $\mu$ g TMB, 100  $\mu$ l 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)。待室温显色反应进行 2min 后加入 50  $\mu$ l 1M 的 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 进行终止。酶标仪读出 450nm 处的吸光度值, 检验该检测系统的可行性。检测结果如图 1 所示, 此结果说明曲线线性关系良好, 该系统可用于重金属铅离子检测。

[0063] 实施例 2

[0064] 检测本发明所述免疫学方法的特异性:

[0065] 将实施例 1 中的铅离子标准溶液换成不同浓度的 Pb, Cd, Hg, Cr, Ca, Cu, Fe, Mn 等

重金属标准溶液（购自国家钢铁材料测试中心钢铁研究总院），采用相同方法操作，并读出最终的  $OD_{450}$  值，检验系统检测铅的特异性。检测结果如图 2 所示，此结果表明，该抗体是特异性针对铅离子的，与其他重金属离子不存在交叉反应。

[0066] 实施例 3

[0067] 绘制铅离子 ELISA 检测系统标准曲线：

[0068] 在浓度为 100ng/well 的抗原 CHX-A”-DTPA-OVA 包被板上加入不同浓度的铅离子标准溶液 ( $\mu\text{g/L}$ )： $10^{-4}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-1}$ 、 $10^0$ 、 $10^1$ 、 $10^2$ 、 $10^3$ 。在铅离子溶液和抗原 37℃ 反应后，加入确定浓度的抗铅单克隆抗体 100ng/well；待反应完成后加入酶标二抗 IgG-HRP；最后加 TMB 底物显色（具体操作同实施例 1）。送至酶标仪读取 450nm 处的吸光度值 ( $OD_{450}$ )。以铅标准溶液浓度取对数作为横坐标， $OD_{450}$  值作为纵坐标，选择检测结果中线性段，绘制检测铅标准曲线（如图 3 所示）。由结果中可得出，该系统有效检测铅离子范围为 0.1 ~ 100ng/ml。

[0069] 实施例 4

[0070] 检验本发明所述检测方法精确度：

[0071] 向待测纯水水样品中添加  $10^2$ 、 $10^1$ 、 $10^0$ 、 $10^{-1}$   $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  四个水平的铅离子标准溶液，然后采用间接酶联免疫检测方法进行检测。各样品中铅离子含量由同一酶标板制得的标准曲线上求得，测得的数值与添加量的比值，获得样品添加回收率（表 1）。

[0072] 样品添加回收率计算公式：回收率 (%) =  $C_1/C_0 \times 100\%$

[0073] 公式中，

[0074]  $C_1$ ：ELISA 检测 OD 值照标准曲线得出的样品浓度对数值；

[0075]  $C_0$ ：纯水样品中铅离子理论浓度对数值。

[0076] 表 1

[0077]

实际标液浓度		标准曲线测浓度	
对数值	OD450	对数值	回收率 (%)
-1	0.278	-0.9890	98.90
0	0.405	-0.0714	93.86
1	0.519	1.0232	102.32
2	0.644	2.0669	106.69

[0078] 此结果说明了该方法检测重金属铅离子精确度较高。

[0079] 实施例 5

[0080] 分别加入  $10^{-2}$ 、 $10^{-1}$ 、 $10^0$ 、 $10^1$ 、 $10^2$ 、 $10^3$   $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  五个浓度的 Pb 离子标准溶液。将反应时间设定为 5min、15min、30min 和 45min，并在每个时间点设 2 个平行样，进行检测。待反应完成后，洗涤并添加抗铅单克隆抗体，后同实施例 1。最后记录  $OD_{450}$  值，并对各反应时间结果进行比较，确定最短反应时间（如图 4 所示）。此结果说明该产品可在 5min 内完



成样品溶液中铅离子的富集和反应过程,大大缩短了整个检测所需时间。

[0081] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

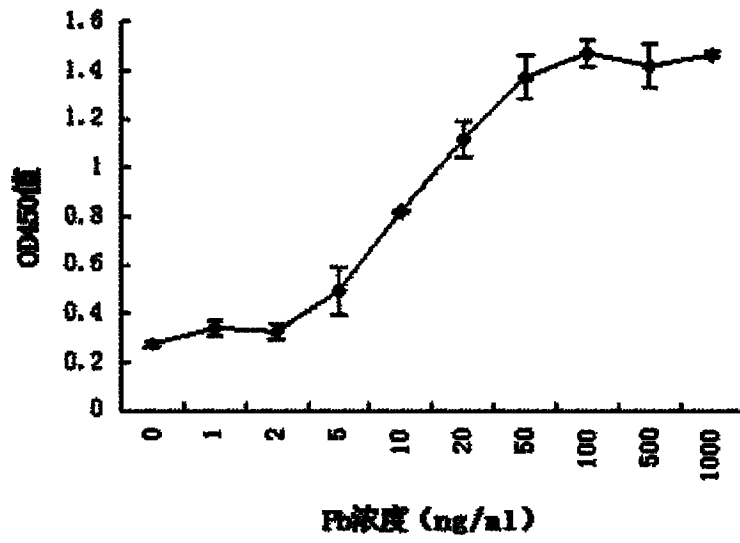


图 1

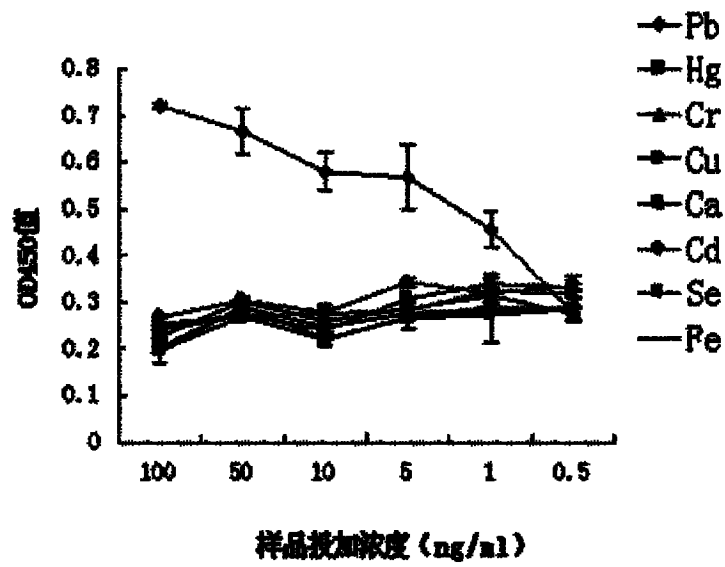


图 2

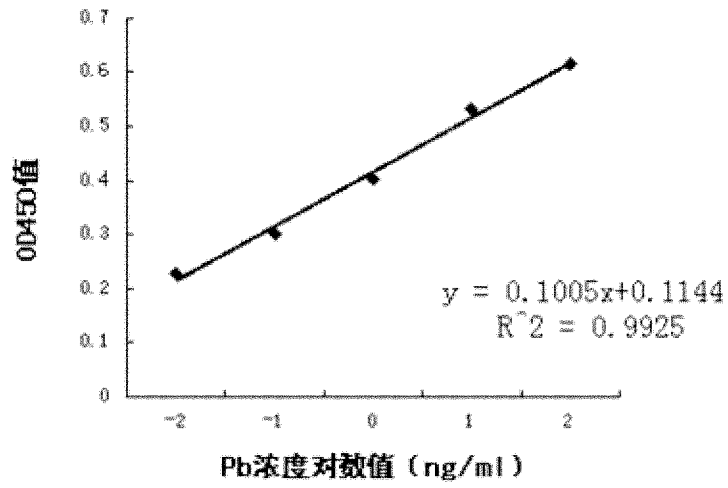


图 3

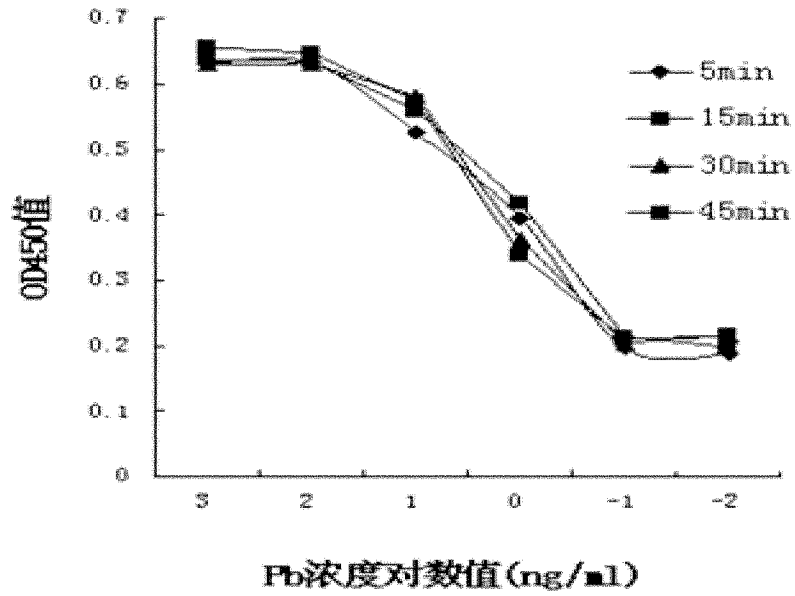


图 4

