



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102680691 A

(43) 申请公布日 2012. 09. 19

(21) 申请号 201210011524. 1

(22) 申请日 2012. 01. 15

(71) 申请人 河南科技大学

地址 471003 河南省洛阳市涧西区西苑路
48 号

(72) 发明人 孔涛 杨自军 赵振升 张才
郝雪琴 周变华 常景周 李润乐
魏迎军 李嘉嘉 王振华

(74) 专利代理机构 郑州睿信知识产权代理有限
公司 41119

代理人 牛爱周

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

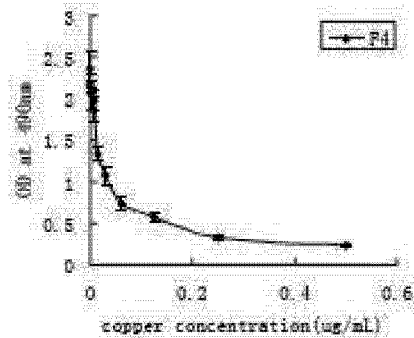
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种检测铜离子的酶联免疫试剂盒及其应用

(57) 摘要

本发明涉及了一种检测铜离子的酶联免疫试剂盒及其应用,其中试剂盒包括铜离子特异性抗体,铜离子-载体蛋白偶联物和酶标二抗,还设置有包被了铜离子抗原或抗铜离子特异性抗体的酶标板,铜离子标准溶液,底物显色剂,洗涤液,终止液和浓缩样品稀释液。本发明的检测铜离子的酶联免疫试剂盒灵敏、快速、准确,主要用于大批样品的筛查;试剂盒中的主要试剂均以工作液的形式提供,使用方便,具有高特异性、高灵敏性、高精度性、高准确性等特点,可快速检测水及畜产品中残留的铜离子。



1. 一种检测铜离子的酶联免疫试剂盒,其特征在于:包括铜离子特异性抗体,铜离子-载体蛋白偶联物和酶标二抗,还设置有包被了铜离子抗原或抗铜离子特异性抗体的酶标板,铜离子标准溶液,底物显色剂,洗涤液,终止液和浓缩样品稀释液。

2. 根据权利要求1所述的检测铜离子的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述的铜离子特异性抗体为单克隆抗体。

3. 根据权利要求1所述的检测铜离子的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述的载体蛋白为牛血清白蛋白,卵清蛋白或钥孔血兰蛋白(KLH),鼠血清蛋白,甲状腺蛋白,兔血清蛋白或人血清白蛋白。

4. 根据权利要求1所述的检测铜离子的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述的酶标二抗中的酶为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶。

5. 根据权利要求1或4所述的检测铜离子的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述的酶标二抗为羊抗鼠 IgG 抗体。

6. 根据权利要求1所述的检测铜离子的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述的洗涤液为含有 0.05% -0.5%吐温-20 的磷酸盐缓冲液。

7. 根据权利要求1所述的检测铜离子的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述的显色剂由显色剂 A 和显色剂 B 组成,显色剂 A 为过氧化氢或过氧化脲,显色剂 B 为邻苯二胺或四甲基联苯胺。

8. 根据权利要求1所述的检测铜离子的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述的终止液为氢氧化钠溶液或硫酸。

9. 根据权利要求1所述的检测铜离子的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述的浓缩样品稀释液为含 0.1%吐温-20 的磷酸盐缓冲液。

10. 一种采用权利要求1所述试剂盒在检测样品中铜离子含量方面的应用,其特征在于:具体包括以下步骤:

(1) 样品前处理;

(2) 用试剂盒进行检测,向包被有铜离子抗原的酶标板孔中加入标准品或样品溶液,再加入抗铜离子单克隆抗体,孵育后洗涤拍干,加入酶标记二抗,孵育后洗涤拍干,显色、终止,用酶标仪测定吸光度值;

(3) 分析检测结果。

一种检测铜离子的酶联免疫试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测铜离子的酶联免疫试剂盒,同时还涉及一种该试剂盒在检测样品中铜离子含量方面的应用,属于酶联免疫检测领域。

背景技术

[0002] 铜在土壤中和农作物中积累,会污染粮食籽粒,进而铜在农畜等产品中有不同程度的残留,造成农畜产品中铜污染超标,严重影响我国农畜产品质量和国际竞争力,而且还严重危害人类的身体健康。因此,世界各国都十分重视环境和农产品重金属污染的控制和监测。传统的重金属铜检测方法如:原子吸收光谱分析、电感耦合等离子发射光谱分析等需要大型的昂贵的分析仪器,无法用于现场检测,难以适应环境及农畜产品的现场抽查及产品进出口快速通关的要求。因此,需要发明一种新的重金属铜检测方法以解决上述问题。

发明内容

[0003] 本发明的目的在于提供一种快速检测铜离子的酶联免疫试剂盒。

[0004] 同时,本发明的目的还提供了一种试剂盒在检测样品中铜离子含量方面的应用。

[0005] 为了实现上述目的,本发明的技术方案采用了一种快速检测铜离子的酶联免疫试剂盒,该试剂盒包括:铜离子特异性抗体、铜离子-载体蛋白偶联物和酶标二抗,其中铜离子特异性抗体为鼠抗铜离子的单克隆抗体,可用铜离子与载体蛋白偶联物作为免疫原通过免疫动物(例如鼠)制得。

[0006] 所述的载体蛋白为牛血清白蛋白、人血清白蛋白、卵清蛋白或钥孔铜兰蛋白(KLH)、鼠血清蛋白、甲状腺蛋白、兔血清蛋白或人血清白蛋白等常用载体蛋白。

[0007] 所述铜离子与载体蛋白的偶联物可通过将铜离子与双功能螯合剂螯合后再与载体蛋白采用化学方法偶联得到。

[0008] 所述酶标二抗的标记酶为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶。

[0009] 所述酶标二抗可以用商品化的辣根过氧化物酶酶标二抗,也可以通过过碘酸钠法或戊二醛法将辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶与二抗偶联制得。

[0010] 在本发明的一个优选实施方案中,所述酶标二抗为羊抗鼠 IgG 抗体。

[0011] 用于制备所述酶标板的固相材料,包括聚苯乙烯、聚乙烯、聚丙烯;载体的形式是微量反应板凹孔。

[0012] 为了方便现场检测和大量样本筛查,所述试剂盒还可以进一步包括铜离子抗原或抗铜离子特异性抗体的酶标板、铜离子标准溶液、显色剂、洗涤液、终止液和浓缩样品稀释液。

[0013] 所述的洗涤液为 0.05% -0.5% 吐温 -20 磷酸盐缓冲液。

[0014] 所述的显色剂由显色剂 A 液和显色剂 B 液组成(例如,体积比为 1 : 1),显色剂 A 液为过氧化氢或过氧化脲,显色剂 B 液为邻苯二胺或四甲基联苯胺。

[0015] 所述的浓缩样品稀释液为含 0.1% 吐温 -20 的磷酸盐缓冲液。

[0016] 所述当标记酶为辣根过氧化物酶时,底物显色液由显色液 A 液和显色液 B 液组成,显色液 A 液为过氧化氢或过氧化脲,所述显色液 B 液为邻苯二胺或四甲基联苯胺,终止液为 1-2mol 硫酸;当标记酶为碱性磷酸酶时,显色液为对硝基苯磷酸缓冲液,终止液为 1-2mol/L 氢氧化钠溶液。

[0017] 所用的封闭液含有 10% 兔血清,0.1% 叠氮化钠的磷酸盐缓冲液。

[0018] 本发明中酶标板的制备过程为:用包被缓冲液将包被原稀释 0.05-0.1 $\mu\text{g/ml}$,每孔加入 100 μl ,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 2h,再 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,倾去包被液,用洗涤液洗涤 2 次,每次 30 秒,拍干,然后在每孔中加入 150-200 μl 封闭液,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1-2h,倾去孔内液体拍干,干燥后用铝膜真空密封保存。

[0019] 另一方面,本发明还提供了一种检测水、牛奶等样品中铜离子含量的方法,包括步骤:

[0020] (1) 样品前处理;

[0021] (2) 用、试剂盒进行检测,向包被有铜离子抗原的酶标板孔中加入标准品或样品溶液,再加入抗铜离子多克隆抗体,孵育后洗涤拍干,加入酶标记二抗,孵育后洗涤拍干,显色、终止,用酶标仪测定吸光度值;

[0022] (3) 分析检测结果。

[0023] 本发明中抗原的合成过程为:

[0024] 1. 铜离子完全抗原的制备

[0025] 将铜离子先与双功能螯合剂通过羧基发生螯合,再与载体蛋白反应,通过硫脲基偶联得到完全抗原。

[0026] 铜离子是小分子物质,只有免疫反应性,没有免疫原性,不能诱发机体产生免疫应答,必须先与双功能螯合剂通过羧基发生螯合再与大分子载体蛋白偶联后才具有免疫原性。

[0027] 2. 铜离子鼠单克隆抗体的制备

[0028] 动物免疫程序:采用 Balb/c 小鼠作为免疫动物,以铜离子与载体蛋白偶联物为免疫原,得到较好的多克隆抗体,取出脾脏进行细胞融合。

[0029] 细胞融合与克隆化:取免疫 BALB/c 小鼠脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合,筛选细胞株,直到得到稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0030] 本发明抗体的制备过程:羊抗鼠抗抗体是以羊作为免疫动物,以鼠源抗体为免疫原对无病菌体羊进行免疫,得到羊抗鼠抗抗体。

[0031] 本发明试剂盒的检测原理为:

[0032] 将铜离子抗原吸附于固相载体上,加入样本或铜离子标准品溶液并加入铜离子抗体工作液,待测样品中铜离子和固相载体上包被的铜离子抗原竞争铜离子抗体,再加入酶标记抗抗体进行酶活性的放大作用,显色后终止,测定样品的吸光度值,该值与样品中铜离子的量呈负相关,与标准曲线比较即可得出铜离子浓度范围。

[0033] 本发明检测铜离子的试剂盒主要采用间接竞争酶联免疫测定法定性或定量样品中铜离子含量;该试剂盒采用高特异性的铜离子单克隆抗体,可以灵敏、快速、准确,主要用于大批样品的筛查;试剂盒中的主要试剂均以工作液的形式提供,使用方便,具有高特异性、高灵敏性、高精确性、高准确性等特点,可快速检测水及畜产品中残留的铜离子,为使用

者节省时间并降低因操作步骤冗繁造成的误差。本发明具有灵敏度高、特异性强、高精度、高准确度、对仪器要求低、试剂保存时间长、无放射性同位素污染,能同时快速检测大批样品等优点,可在水、饲料及动物源性产品检测中发挥重要作用。本发明的检测铜离子的酶联免疫试剂盒本发明的试剂盒在使用时具有快速、廉价、简便、灵敏、特异的优点,可便携而进行现场监测,克服了传统检测方法的缺点。通过制备针对 Cu^{2+} 特异性的单克隆抗体,建立重金属铜免疫学检测方法。该方法的完成将解决 Cu^{2+} 螯合、偶联、单克隆抗体的制备等关键技术,为建立 Cu^{2+} 免疫学检测技术奠定基础。本发明的试剂盒不仅为食品安全检测,而且为我国农产品等的出入境检测、环境监测部门的水域监测提供有效的技术手段和检测方法。对我国农产品的可持续健康发展、解决食品安全问题具有重要的现实意义和重要的社会、经济价值。

附图说明

[0034] 图 1 为铜离子抑制曲线。

具体实施方式

[0035] 实施例 1

[0036] 本实施例的检测铜离子的酶联免疫试剂盒包括铜离子特异性抗体,铜离子-载体蛋白偶联物和酶标二抗,还设置有包被了铜离子抗原或抗铜离子特异性抗体的酶标板,铜离子标准溶液,底物显色剂,洗涤液,终止液和浓缩样品稀释液。

[0037] 本实施例的试剂盒各原料的制备方法如下:

[0038] 1、完全抗原制备及鉴定:

[0039] 取 0.5 ~ 10mg 水溶性铜盐溶于 50 μL 超纯水,配制 2.0 ~ 80mg/mL 的 Cu^{2+} 溶液;取 0.8 ~ 20mg 双功能螯合剂 p-SCN-Bn-DOTA 溶于 50 μL 二甲基亚砜,配制 16 ~ 400mg/mL 的 p-SCN-Bn-DOTA 溶液;取 2.0 ~ 20.0mg 载体蛋白钥孔血蓝蛋白 (KLH) 及牛血清白蛋白 (BSA) 溶于 1mL HEPES 缓冲溶液或碳酸盐缓冲液,配制 2 ~ 20mg/mL 的载体蛋白溶液;将配制的 50 μL 2.0 ~ 80mg/mL 的 Cu^{2+} 溶液逐滴加入到 50 μL p-SCN-Bn-DOTA 溶液中,于 15 ~ 55 $^{\circ}\text{C}$ 、pH4.5 ~ 6.5、振荡条件下反应 15min ~ 3h 形成半抗原溶液;再将此半抗原溶液逐滴加入到 1mL 2 ~ 20mg/mL 的载体蛋白溶液中,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 或室温、pH7.5 ~ 10.5 条件下振荡反应 24h;用超滤或透析的方法去除未反应的低分子物质,得 Cu^{2+} 的完全抗原。以完全抗原 Cu^{2+} -p-SCN-Bn-DOTA-KLH 为免疫抗原;以完全抗原 Cu^{2+} -p-SCN-Bn-DOTA-BSA 为包被抗原。对制备的完全抗原进行 SDS-PAGE 电泳检测、紫外分光光度法检测及 Cu^{2+} 含量检测以鉴定抗原是否制备成功。

[0040] 2、小鼠免疫:

[0041] 将步骤 (1) 制备的免疫抗原 Cu^{2+} -p-SCN-Bn-DOTA-KLH 免疫 6 ~ 8 周龄 BALB/c 小鼠。在第 1、14、21、35d 给小鼠腹腔注射,每次免疫抗原用量为 50 μg /只。初次免疫用等量弗氏完全佐剂混合乳化,自第 2 次免疫起改用等量弗氏不完全佐剂混合乳化。自第 3 次免疫起,每次免疫后 10d 从小鼠尾静脉采血,以间接 ELISA 法测小鼠血清抗体效价。

[0042] 3、细胞融合

[0043] 选择血清效价高并且差异率高的小鼠,于细胞融合前 3d 进行冲击免疫,免疫抗原

用量为 100 μ g/只。将免疫小鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞以 3 ~ 10 : 1 混合, 1min 内加入 0.7 ~ 1.2mL 50% 聚乙二醇融合, 静置 90s, 然后在 5min 内加入 25mL 无血清 RPMI 1640 培养液, 终止融合反应, 800 ~ 1200rpm/min 离心 10min, 以含 2% HAT 的完全 RPMI 1640 培养液重悬, 将细胞悬液加入含有饲养细胞的 96 孔细胞培养板, 每孔 100 μ L, 将 96 孔细胞培养板置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养。在融合后 7d 内用 HAT 培养液, 第 7 ~ 14d 改用 HT 培养液, 第 14d 后用完全 RPMI 1640 培养液培养。

[0044] 4、杂交瘤细胞株的筛选及克隆

[0045] 间接 ELISA 法检测。以杂交瘤细胞上清 / 骨髓瘤细胞上清血清 > 2.1, 并且 OD 值 > 0.2 判断为阳性。选择阳性值高并且差异率高的细胞株, 以有限稀释法进行克隆。

[0046] 5、单克隆抗体的鉴定

[0047] 通过间接 ELISA 初筛的阳性克隆上清进一步用间接竞争 ELISA 法确定所分泌的抗体是否针对 Cu²⁺, 而不与螯合剂反应。具体步骤如下: 抗原 Cu²⁺-p-SCN-Bn-DOTA-BSA 包被 ELISA 板, 4 $^{\circ}$ C 放置过夜; 用含 0.5% 吐温 20 的磷酸盐缓冲液 (PBST) 洗涤, 3min \times 3 次; 用 20% 兔血清作为封闭液, 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 作用 1.5h; 用系列浓度的 p-SCN-Bn-DOTA 溶液 (1、2、5、10、20、50、100mM) 与初筛呈阳性的杂交瘤上清等体积混匀, 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 作用 1h; 用含 0.5% 吐温 20 的磷酸盐缓冲液 (PBST) 洗涤, 3min \times 3 次; 加入用含 0.5% 吐温 20 的磷酸盐缓冲液 (PBST) 5000 倍稀释的 HRP 酶标记的羊抗鼠二抗, 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 作用 1h; 用含 0.5% 吐温 20 的磷酸盐缓冲液 (PBST) 洗涤, 3min \times 3 次; 邻苯二胺 (OPD) 显色, 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 避光反应 10min; 加入 50 μ L/孔的 2M H₂SO₄ 终止反应。酶标仪上 490nm 读数。以杂交瘤细胞上清 / 骨髓瘤细胞上清血清 > 2.1, 并且 OD 值 > 0.2 判断为阳性。结果在螯合剂 p-SCN-Bn-DOTA 浓度最高达 5mM 时抗体与螯合剂不发生反应。

[0048] 6、细胞冻存和复苏

[0049] 将杂交瘤细胞用冻存液制成 1 \times 10⁶ 个 /ml 的细胞悬液, 在液氮中长期保存。

[0050] 复苏时取出冻存管, 立即放入 37 $^{\circ}$ C 水浴中速融, 离心去除冻存液后, 移入培养瓶内培养。

[0051] 7、单克隆抗体的制备与纯化

[0052] 将 Balb/c 小鼠腹腔注入灭菌石蜡油 0.4ml/只, 7 天后腹腔注射杂交瘤细胞 5 \times 10⁵ 个 / 只, 7 天后采集腹水。用辛酸 - 饱和硫酸按法进行纯化, 纯化后的腹水放入 -20 $^{\circ}$ C 环境保存。

[0053] 实施例 2

[0054] 检测铜离子的酶联免疫试剂盒的制备方法, 使其包含下述组分:

[0055] (1) 包被铜离子偶联抗原的酶标板;

[0056] (2) 用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体;

[0057] (3) 铜离子单抗体浓缩液;

[0058] (4) 铜离子标准品溶液 6 瓶, 浓度分别为 0.25mmol/L、0.125mmol/L、0.0625mmol/L、0.03125mmol/L、0.015625mmol/L、0.0078125mmol/L。

[0059] (5) 底物显色液由 A 液和 B 液组成, 底物显色液 A 液为过氧化脲, 底物显色液 B 液为四甲基联苯胺;

[0060] (6) 终止液为 2mol/L 盐酸或硫酸;

[0061] (7) 洗涤液为 0.01M, pH 为 7.4, 含有 0.05% -0.5% 吐温 -20 磷酸盐缓冲液;

[0062] (8) 浓缩样品液为 0.1% 吐温 -20 的磷酸盐缓冲液。

[0063] 实施例 3

[0064] 样品中铜离子残留的检测

[0065] 样品前处理

[0066] 准确量取 5ml 牛奶于 100ml 烧杯中。加入 20ml HCl, 静置 1h, 4000rpm 离心 15min, 取上清, 加入螯合剂, 静置 0.5h, 4000rpm 离心 15min, 取上清。

[0067] 用试剂盒进行检测

[0068] 向铜离子 - 螯合剂 - BSA 偶联物包被的酶标板微孔中加系列标准品或样品溶液 50 μ l, 再加入抗体工作液 50 μ l, 室温反应 1h。倒出孔中液体, 每孔加入 300 μ l 洗涤液, 30s 后倒出孔中液体, 如此重复操作共洗板 3 次, 用吸水纸拍干。每孔加入酶标记抗体 100 μ l, 暗室温孵育 30min。底物显色液 A 液 (过氧化脲) 50 μ l, 再加 B 液 (四甲基联苯胺) 50 μ l, 轻轻振荡混匀, 室温避光显色 10-15min, 每孔加入终止液 (2mol/L 盐酸) 50 μ l, 轻轻振荡混匀, 用酶标仪测定每孔吸光度值 (OD 值)。

[0069] 3.3 结果分析

[0070] 计算百分吸光度值并绘制标准曲线, 相对应每一个样品中铜离子的浓度可以从标准曲线上读出, 也可以用回归方程法计算出在样本中铜离子的含量。利用专业电脑软件更便于大量的样本的快速分析。根据酶标板上的样本颜色的深浅与系列浓度标准溶液颜色的比较, 可以判断出样本中铜离子的浓度范围。

[0071] 实验例 4

[0072] 试剂盒精密度试验:

[0073] 本实验例为标准可重复性试验。具体操作为:

[0074] 从每批实施例 2 或 3 中的方法制备的酶标板中, 各抽取 10 个孔, 测定 0.03125mmol/L 的标准溶液的吸光度值 (OD), 重复 3 次, 计算变异系数 CV%。结果表明变异系数范围在 8.8-15.6% 之间, 符合了变异系数小于 20/% 的规定, 说明本试剂盒标准品精密度达到了要求。

[0075] 实验例 5

[0076] 试剂盒的回收率试验

[0077] 取两个浓度的铜离子标样, 对样品进行添加回收试验, 每个浓度做 4 个平行, 分别计算回收率。结果表明牛奶中的添加回收率为 89.9-102.6%。

[0078] 实验例 6

[0079] 试剂盒稳定性试验

[0080] 试剂盒保存条件为 2-8 $^{\circ}$ C, 经过 6 个月的测定, 试剂盒的最大吸光度值 (零添加)、50% 抑制浓度、铜离子添加实际测定值均在正常范围之内。将试剂盒在 37 $^{\circ}$ C 保存条件下放置两周, 进行加速老化实验, 结果表明该试剂盒各项指标完全符合要求。将试剂盒放入 -20 $^{\circ}$ C 冰箱冷冻 5d, 测定结果也表明试剂盒各项指标完全正常。从以上结果可得出试剂盒可以在 2-8 $^{\circ}$ C 保存 12 个月以上。

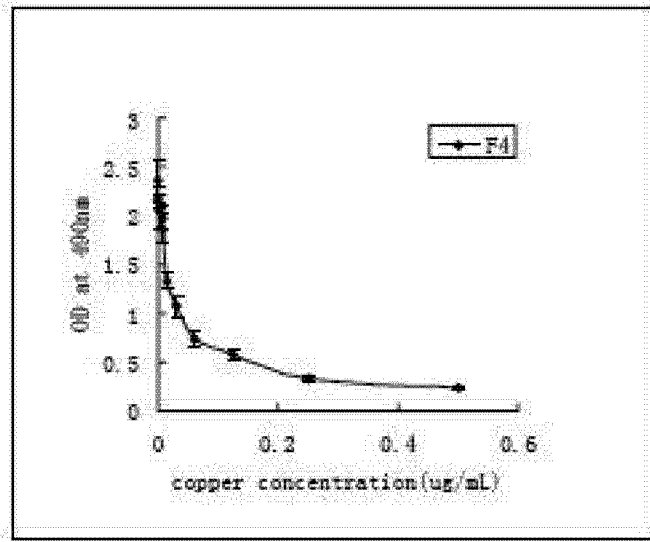


图 1

专利名称(译)	一种检测铜离子的酶联免疫试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN102680691A	公开(公告)日	2012-09-19
申请号	CN201210011524.1	申请日	2012-01-15
[标]申请(专利权)人(译)	河南科技大学		
申请(专利权)人(译)	河南科技大学		
当前申请(专利权)人(译)	河南科技大学		
[标]发明人	孔涛 杨自军 赵振升 张才 郝雪琴 周变华 常景周 李润乐 魏迎军 李嘉嘉 王振华		
发明人	孔涛 杨自军 赵振升 张才 郝雪琴 周变华 常景周 李润乐 魏迎军 李嘉嘉 王振华		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531 G01N33/535		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及了一种检测铜离子的酶联免疫试剂盒及其应用，其中试剂盒包括铜离子特异性抗体，铜离子-载体蛋白偶联物和酶标二抗，还设置有包被了铜离子抗原或抗铜离子特异性抗体的酶标板，铜离子标准溶液，底物显色剂，洗涤液，终止液和浓缩样品稀释液。本发明的检测铜离子的酶联免疫试剂盒灵敏、快速、准确，主要用于大批样品的筛查；试剂盒中的主要试剂均以工作液的形式提供，使用方便，具有高特异性、高灵敏性、高精确性、高准确性等特点，可快速检测水及畜产品中残留的铜离子。

