

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710020472.3

[51] Int. Cl.
C07K 16/18 (2006.01)
G01N 33/531 (2006.01)

[43] 公开日 2007年8月15日

[11] 公开号 CN 101016337A

[22] 申请日 2007.3.2

[21] 申请号 200710020472.3

[71] 申请人 南京农业大学

地址 210095 江苏省南京市卫岗1号南京农业大学科技处钱宝英

[72] 发明人 刘凤权 朱晓霞

权利要求书2页 说明书6页

[54] 发明名称

重金属镉单克隆抗体的制备方法

[57] 摘要

本发明重金属镉单克隆抗体的制备方法，属于生物技术领域。专用于特异性识别重金属镉单克隆抗体的制备，及其在农产品和农业生产环境中镉残留的高灵敏快速检测。重金属镉离子与载体蛋白通过双功能金属螯合剂1-(4-异硫氰基苯基)-乙二胺四乙酸偶联形成完全抗原，用该完全抗原免疫Balb/C鼠，脾细胞和Sp2/0骨髓瘤细胞通过杂交瘤技术制备杂交瘤细胞，获得了稳定分泌抗Cd-EDTA的单克隆抗体。本发明抗体的制备技术简便可行：抗原的整个制备过程无需要特别的仪器设备，容易工厂化规模生产。

1、镉单克隆抗体的制备方法，包括：

1) 抗原制备：

分别称取血蓝蛋白和牛血清白蛋白 10mg 溶于 0.5ml 浓度为 10mM，pH 9.0 的 N-2-羟乙基哌嗪-N-2-乙磺酸缓冲液中形成血蓝蛋白和牛血清白蛋白溶液，

称取金属螯合剂 1-(4-异硫氰基苯基)-乙二胺四乙酸 10mg 溶于 1ml 二甲基亚砷中形成 23 nM 金属螯合剂溶液；

取 781 μ l 浓度为 23 nM 的金属螯合剂溶液分别逐滴滴加到 0.5ml 血蓝蛋白和牛血清白蛋白溶液中，用 10M KOH 调节 pH 至 9.0，室温下搅拌 24hr；

反应产物用 30Kd 的超滤管纯化，超滤管预先用 100 mM 乙二胺四乙酸浸泡后，用超纯水充分冲洗，然后在超滤管内加入反应产物超滤，超滤管内先用 10mM，pH 9.0 的 N-2-羟乙基哌嗪-N-2-乙磺酸缓冲液洗 3 次，然后再用 10mM，pH 7.4 的 N-2-羟乙基哌嗪-N-2-乙磺酸缓冲液 2 次除去其中未反应的小分子金属螯合剂，所得产物即分别为纯化的血蓝蛋白-1-(4-异硫氰基苯基)-乙二胺四乙酸和牛血清白蛋白-1-(4-异硫氰基苯基)-乙二胺四乙酸溶液，将牛血清白蛋白-1-(4-异硫氰基苯基)-乙二胺四乙酸溶液等分成两份，一份直接用作包被抗原，一份用于与金属镉连接；

称取 53.7mg 含量为 99.999% 的镉颗粒溶于 100 μ l 优级浓硝酸，待充分溶解加超纯水使终体积为 1ml，形成 477.8mM 镉溶液；

取 18.8 μ l 浓度为 477.8mM 的镉溶液搅拌下逐滴滴加到纯化过的血蓝蛋白-1-(4-异硫氰基苯基)-乙二胺四乙酸，取 9.4 μ l 浓度为 477.8mM 的镉溶液滴加到牛血清白蛋白-1-(4-异硫氰基苯基)-乙二胺四乙酸溶液中，用 0.5M 盐酸调节 pH 至 7.0，室温下反应 3 小时，用上述 30Kd 的超滤管方法进行纯化去除未反应的金属离子，纯化后的产物分别为血蓝蛋白-1-(4-异硫氰基苯基)-乙二胺四乙酸-Cd 和牛血清白蛋白-1-(4-异硫氰基苯基)-乙二胺四乙酸-Cd 以所含蛋白进行计量，以血蓝蛋白-1-(4-异硫氰基苯基)-乙二胺四乙酸-Cd 作免疫原以所含蛋白量为 10 mg，以牛血清白蛋白-1-(4-异硫氰基苯基)-乙二胺四乙酸-Cd 作为包被抗原以所含蛋白量为 5 mg；

2) 小鼠免疫：

将制备好的血蓝蛋白-1-(4-异硫氰基苯基)-乙二胺四乙酸-Cd 作为免疫原免疫 6-8 周龄雌性 Ba1B/c 鼠，每次每只小鼠的免疫原用量 200 μ g，共免疫五次，前两次免疫间隔 3 周采用由等体积的免疫原和佛氏完全佐剂乳化，腹腔注射，以后三次免疫间隔 2 周用等体积的佛氏不完全佐剂和免疫原乳化；

从第四次开始，每次免疫后一周，鼠尾静脉采血用间接非竞争 ELISA 法检测抗体的特异性，用相同浓度的牛血清白蛋白-1-(4-异硫氰基苯基)-乙二胺四乙酸和牛血清白蛋白-1-(4-异硫氰基苯基)-乙二胺四乙酸-Cd 50 μ l/孔包被 96 孔酶联微量分析板，4 $^{\circ}$ C 放置过夜或 37 $^{\circ}$ C 2 小时；

用含 0.5%土温 20 的磷酸盐缓冲液洗涤 5 次；

用含 0.5%土温 20 的磷酸盐缓冲液稀释明胶至 1%，100 μ l/孔，37 $^{\circ}$ C 放置 1.5 小时；

含 0.5%土温 20 的磷酸盐缓冲液洗涤 5 次；

加入相同数量的血清 50 μ l/孔，37 $^{\circ}$ C 1 小时；

用含 0.5%土温 20 的磷酸盐缓冲液洗涤 6 次；

磷酸盐缓冲液溶液 1000 倍稀释辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体，50 μ l/孔，37 $^{\circ}$ C 1 小时；

含 0.5%土温 20 的磷酸盐缓冲液洗涤 6 次；

四甲基联苯胺显色底物溶液 50 μ l/孔，37 $^{\circ}$ C 10 分钟；

加 25 μ l/孔的 2M 硫酸终止反应，酶联仪上 450nm 处读数，并计算差异，差异% = { Cd-1-4-异硫氰基苯基-乙二胺四乙酸-牛血清白蛋白的吸光值-1-4-异硫氰基苯基-乙二胺四乙酸-牛血清白蛋白的吸光值} / Cd-1-4-异硫氰基苯基-乙二胺四乙酸-牛血清白蛋白的吸光值 \times 100%；

3) 细胞融合

通过差异率筛选 BalB/ c 鼠，差异率超过 50%的 BalB/ c 鼠用 N-2-羟乙基哌嗪-N-2-乙磺酸缓冲液稀释血蓝蛋白-1-(4-异硫氰基苯基)-乙二胺四乙酸-Cd 直接免疫，三天后取脾脏，脾细胞和对数生长期的 Sp2/0 骨髓瘤细胞通过杂交瘤技术制备杂交瘤细胞，37 $^{\circ}$ C，5%二氧化碳培养箱培养 10-14 天后，通过检测融合孔上清筛选杂交瘤细胞；

4) 杂交瘤筛选：

融合孔上清用上述筛选小鼠的间接非竞争 ELISA 法进行初步筛选，用相同浓度的牛血清白蛋白-1-(4-异硫氰基苯基)-乙二胺四乙酸和牛血清白蛋白-1-(4-异硫氰基苯基)-乙二胺四乙酸-Cd 50 μ l/孔包被 96 孔酶联微量分析板³上，4 $^{\circ}$ C 过夜或 37 $^{\circ}$ C 放置 2 小时；用含 0.5%土温 20 的磷酸盐缓冲液洗涤 5 次；含 0.5%土温 20 的磷酸盐缓冲液稀释明胶至 1%，100 μ l/孔，37 $^{\circ}$ C 放置 1.5 小时；含 0.5%土温 20 的磷酸盐缓冲液洗涤 5 次；加入相同数量的融合孔上清 50 μ l/孔，用 SP2/0 的上清作阴性对照，37 $^{\circ}$ C 1 小时，含 0.5%土温 20 的磷酸盐缓冲液洗涤 6 次；加入磷酸盐缓冲液溶液 1000 倍稀释辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体，50 μ l/孔，37 $^{\circ}$ C 1 小时；含 0.5%土温 20 的磷酸盐缓冲液洗涤 6 次；四甲基联苯胺 50 μ l/孔，37 $^{\circ}$ C 显色 10 分钟；加 25 μ l/孔的 2M 硫酸终止反应，酶联仪上 450nm 处读数，用牛血清白蛋白-1-(4-异硫氰基苯基)-乙二胺四乙酸-Cd 包被的成阳性而用牛血清白蛋白-1-(4-异硫氰基苯基)-乙二胺四乙酸包被的孔的读数接近 SP2/0 读数的融合孔即为阳性孔，阳性孔通过有限稀释法进行亚克隆，阳性孔分泌的上清即为所制备单克隆抗体。

重金属镉单克隆抗体的制备方法

(一) 技术领域

本发明是重金属镉单克隆抗体的制备,属于生物技术领域。专用于特异性识别重金属镉的单克隆抗体制备,以及农产品和农业生产环境中重金属残留的高灵敏快速检测,特别适用于大批量样品检测和现场监测。

(二) 背景技术

环境中镉的主要污染来源是:铅锌矿的开采、选矿和冶炼过程中产生的废水和废气;合金钢的生产和加工过程;电镀镉的生产废水,染料、农药、油漆、玻璃、陶瓷、照像材料等生产和加工过程。镉在环境中残留通过食物链逐渐富集,极微量的镉就可对人体造成伤害,1993年世界肿瘤研究机构(IARC)将镉定义为人类致癌物(group I),镉对环境的污染已引起普遍关注,世界卫生组织建议并建立相关标准。根据世界卫生组织的建议,日本规定大米含镉不超过1mg/kg,我国卫生标准规定大米含镉不超过2mg/kg,为了规范蔬菜的生产、加工和销售,控制重金属等有害物质在蔬菜中的残留量,中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局发布无公害蔬菜的重金属最大允许残留量镉 $\leq 0.5\text{mg/kg}$ 。

传统的重金属检测方法多采用化学仪器检测,如利用原子吸收光谱法、电感耦合等离子体原子发射光谱法、离子色谱仪、X射线荧光光谱法、气相色谱-质谱联用等,检测仪器昂贵,这些检测方法虽然能够精确测量样品中单种金属的总量,但检测相对费时、费力、费用昂贵,需要进行大量的样品预处理,且样品的检测需在大型分析设备的室内进行,不适应实践中快速简便灵敏的需要。

重金属的免疫检测方法具有快速、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。通过化学合成高选择性重金属离子捕获螯合剂,制备重金属离子螯合物,与载体蛋白偶联获得完全抗原,制备针对环境和农产品中重金属离子螯合物特异性的单克隆抗体。建立重金属离子螯合物免疫学检测方法,该方法的完成,将解决重金属螯合、偶联、单克隆抗体制备等关键技术,建立重金属离子螯合物的免疫学快速检测技术。该专利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。重金属残留的免疫学快速检测试剂盒的开发将会实现很好的经济效益。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。我国在这方面起步较晚,只是在近几年才有单位和研究人员重视并从事重金属免疫

速测技术研究, 目前国内尚未见该类方法的研究报道。

(三) 发明内容

技术问题 本发明的目的是提供镉单克隆抗体的制备方法, 通过合成镉抗原, 免疫 Ba1B/C 鼠, 通过杂交瘤技术制备特异性强的镉单克隆抗体, 并用于农产品和农业生产环境中重金属残留的高灵敏快速检测。

技术方案

1、镉单克隆抗体的制备方法, 包括:

1) 抗原制备:

分别称取血蓝蛋白和牛血清白蛋白 10mg 溶于 0.5ml 浓度为 10mM, pH 9.0 的 N-2-羟乙基哌嗪-N-2-乙磺酸缓冲液中形成血蓝蛋白和牛血清白蛋白溶液,

称取 10mg 金属螯合剂 1-(4-异硫氰基苯基)-乙二胺四乙酸溶于 1ml 二甲基亚砜中形成 23 nM 金属螯合剂溶液;

分别取 78.1 μ l 浓度为 23 nM 的金属螯合剂溶液轻轻搅拌下逐滴滴加到 0.5ml 血蓝蛋白和牛血清白蛋白溶液中, 用 10M KOH 调节 pH 至 9.0, 室温下反应 24hr;

反应产物用 30Kd 的超滤管纯化, 超滤管预先用 100 mM 乙二胺四乙酸浸泡, 用超纯水充分冲洗后, 超滤管内加入反应产物超滤, 超滤管内先用 10mM, pH 9.0 的 N-2-羟乙基哌嗪-N-2-乙磺酸缓冲液洗 3 次, 再用 10mM, pH 7.4 的 N-2-羟乙基哌嗪-N-2-乙磺酸缓冲液洗 2 次除去其中未反应的小分子金属螯合剂, 所得产物即分别为纯化的血蓝蛋白-1-(4-异硫氰基苯基)-乙二胺四乙酸和牛血清白蛋白-1-(4-异硫氰基苯基)-乙二胺四乙酸溶液, 将牛血清白蛋白-1-(4-异硫氰基苯基)-乙二胺四乙酸溶液等分成两份, 一份直接用作包被抗原, 另一份与金属镉离子螯合;

53.7mg 纯度为 99.999%的镉粒溶于 100 μ l 优级浓硝酸, 待充分溶解加超纯水使终体积为 1ml, 形成 477.8 mM 镉溶液;

取 18.8 μ l 浓度为 477.8mM 的镉溶液搅拌下逐滴滴加到纯化过的血蓝蛋白-1-(4-异硫氰基苯基)-乙二胺四乙酸中, 取 8.9 μ l 浓度为 477.8mM 的镉溶液滴加到牛血清白蛋白-1-(4-异硫氰基苯基)-乙二胺四乙酸溶液中, 用 0.5M 盐酸调节 pH 至 7.0, 室温下反应 3 小时, 用上述 30Kd 的超滤管方法进行纯化去除未反应的金属离子, 纯化后的产物分别为血蓝蛋白-1-(4-异硫氰基苯基)-乙二胺四乙酸-Cd 和牛血清白蛋白-1-(4-异硫氰基苯基)-乙二胺四乙酸-Cd, 以所含蛋白进行计量, 以血蓝蛋白-1-(4-异硫氰基苯基)-乙二胺四乙酸-Cd 作免疫原共 10 mg, 以牛血清白蛋白-1-(4-异硫氰基苯基)-乙二胺四乙酸-Cd 作为包被抗原共 5 mg;

2) 小鼠免疫:

将制备好的血蓝蛋白-1-(4-异硫氰基苯基)-乙二胺四乙酸-Cd 作为免疫原

免疫 6-8 周龄雌性 Ba1B/ c 鼠，每次每只小鼠的免疫原用量 200 μ g，共免疫五次，前两次免疫间隔 3 周采用由等体积的免疫原和佛氏完全佐剂乳化，腹腔注射，以后三次免疫间隔 2 周用等体积的佛氏不完全佐剂和免疫原乳化；

从第四次开始，每次免疫后一周，鼠尾静脉采血用间接非竞争 ELISA 法检测抗体的特异性，用相同浓度的牛血清白蛋白-1-(4-异硫氰基苯基)-乙二胺四乙酸和牛血清白蛋白-1-(4-异硫氰基苯基)-乙二胺四乙酸-Cd 50 μ l/孔包被 96 孔酶联微量分析板，4 $^{\circ}$ C 放置过夜或 37 $^{\circ}$ C 2 小时；

用含 0.5% 吐温 20 的磷酸盐缓冲液洗涤 5 次；

用含 0.5% 吐温 20 的磷酸盐缓冲液稀释明胶至 1%，100 μ l/孔，37 $^{\circ}$ C 放置 1.5 小时；

含 0.5% 吐温 20 的磷酸盐缓冲液洗涤 5 次；

加入相同数量的血清 50 μ l/孔，37 $^{\circ}$ C 1 小时；

用含 0.5% 吐温 20 的磷酸盐缓冲液洗涤 6 次；

磷酸盐缓冲液溶液 1000 倍稀释辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体，50 μ l/孔，37 $^{\circ}$ C 1 小时；

含 0.5% 吐温 20 的磷酸盐缓冲液洗涤 6 次；

四甲基联苯胺 50 μ l/孔，37 $^{\circ}$ C 显色 10 分钟；

加 25 μ l/孔的 2M 硫酸终止反应，酶联仪上 450nm 处读数，并计算差异，差异% = { Cd-1-4-异硫氰基苯基-乙二胺四乙酸-牛血清白蛋白的吸光值-1-4-异硫氰基苯基-乙二胺四乙酸-牛血清白蛋白的吸光值} / Cd-1-4-异硫氰基苯基-乙二胺四乙酸-牛血清白蛋白的吸光值 \times 100%；

3) 细胞融合

通过差异率筛选 Ba1B/ c 鼠，差异率超过 50% 的 Ba1B/ c 鼠用 N-2-羟乙基哌嗪-N-2-乙磺酸缓冲液稀释血蓝蛋白-1-(4-异硫氰基苯基)-乙二胺四乙酸-Cd 直接免疫，三天后取脾脏，脾细胞和对数生长期的 Sp2/0 骨髓瘤细胞通过杂交瘤技术制备杂交瘤细胞，37 $^{\circ}$ C，5% 二氧化碳培养箱培养 10-14 天后，通过检测融合孔上清筛选杂交瘤细胞；

4) 杂交瘤筛选：

融合孔上清用与筛选小鼠的方法相同多采用间接非竞争 ELISA 法进行初步筛选，用相同浓度的牛血清白蛋白-1-(4-异硫氰基苯基)-乙二胺四乙酸和牛血清白蛋白-1-(4-异硫氰基苯基)-乙二胺四乙酸-Cd 50 μ l/孔包被 96 孔酶联微量分析板上，4 $^{\circ}$ C 过夜或 37 $^{\circ}$ C 放置 2 小时；用含 0.5% 吐温 20 的磷酸盐缓冲液洗涤 5 次；含 0.5% 吐温 20 的磷酸盐缓冲液稀释明胶至 1%，100 μ l/孔，37 $^{\circ}$ C 放置 1.5 小时；含 0.5% 吐温 20 的磷酸盐缓冲液洗涤 5 次；加入相同数量的融合孔上清 50 μ l/孔，以空白孔调零，用 SP2/0 的上清作阴性对照，37 $^{\circ}$ C 1 小时，含 0.5% 吐温

20 的磷酸盐缓冲液洗涤 6 次；加入磷酸盐缓冲液溶液 1000 倍稀释辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠， $50\mu\text{l}/\text{孔}$ ， 37°C 1 小时；含 0.5% 土温 20 的磷酸盐缓冲液洗涤 6 次；四甲基联苯胺 $50\mu\text{l}/\text{孔}$ ， 37°C 显色 10 分钟；加 $25\mu\text{l}/\text{孔}$ 的 2M 硫酸终止反应，酶联仪上 450nm 处读数，用血清白蛋白-1-(4-异硫氰基苯基)-乙二胺四乙酸-Cd 包被的读数且大于 SP2/0 读数的 2.1 倍，而用牛血清白蛋白-1-(4-异硫氰基苯基)-乙二胺四乙酸包被的孔的读数接近 SP2/0 读数，这样的融合孔即为阳性孔，阳性孔通过有限稀释法进行亚克隆，阳性孔分泌的上清即为所制备镉单克隆抗体。

由于金属离子镉是小分子不具有免疫原性，单独的镉离子不具有抗原表位。必须借助螯合剂乙二胺四乙酸形成半抗原与抗体反应，为了进一步确定得到阳性孔所分泌抗体是针对金属镉，再通过竞争 ELISA 法筛选乙二胺四乙酸的浓度，用牛血清白蛋白-1-(4-异硫氰基苯基)-乙二胺四乙酸-Cd $50\mu\text{l}/\text{孔}$ 包被酶标板， 4°C 放置过夜，0.5% 土温 20 的磷酸盐缓冲液洗涤 5 次；0.5% 土温 20 的磷酸盐缓冲液稀释明胶至 1%， $100\mu\text{l}/\text{孔}$ ， 37°C 1.5 小时；0.5% 土温 20 的磷酸盐缓冲液洗涤 5 次；各种浓度 1, 2, 5, 10, 20, 50 mM 乙二胺四乙酸溶液与等体积的融合孔上清充分混匀室温反应 45 分钟， $50\mu\text{l}/\text{孔}$ 加入到酶联板上， 37°C 1 小时；0.5% 土温 20 的磷酸盐缓冲液洗涤 6 次；磷酸盐缓冲液溶液 1000 倍稀释辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体， $50\mu\text{l}/\text{孔}$ ， 37°C 1 小时；0.5% 土温 20 的磷酸盐缓冲液洗涤 6 次；四甲基联苯胺底物溶液 $50\mu\text{l}/\text{孔}$ ， 37°C 10 分钟，加入 $25\mu\text{l}/\text{孔}$ 2M 的硫酸终止反应，酶联仪上 450nm 处读数，用不加乙二胺四乙酸的孔作阳性对照吸光值 A_0 ，加乙二胺四乙酸孔的吸光值 A ，若 $A=A_0$ ，则 A 对应的加乙二胺四乙酸的浓度则为乙二胺四乙酸的最佳浓度，且所选乙二胺四乙酸浓度必须大于金属离子的最大浓度。

有益效果 本发明与现有方法相比，其优点和积极效果表现在：

(1) 抗原实用性强：镉抗原合成与抗体制备技术具有重要的使用价值和实际意义。上述方法利用金属螯合剂 1-(4-异硫氰基苯基)-乙二胺四乙酸，制备有效的镉抗原，免疫 Balb/C 鼠，通过杂交瘤技术获得特异性识别重金属镉的单克隆抗体，为重金属镉免疫速测试剂盒的研制解决了一个技术难点，为重金属镉高效快速简便的残留分析开山辟路，必将迅速推动我国镉免疫速测试剂盒的出现。

(2) 抗原和抗体稳定性好：此法合成的镉抗原具有较好的稳定性， -20°C 冰箱至少可以存放 5 年不影响其免疫原性。杂交瘤细胞冻存于液氮至少保持 3 年，抗体的稳定性也比较好，纯化的抗体 -20°C 冰箱至少可以存放 2 年。

(3) 抗原制备技术简便可行：抗原的整个制备过程无需要特别的仪器设备，容易工厂化规模生产。

具体实施方式

实施例1 镉标准溶液(Sigma Co.)的检测

采用间接竞争 ELISA 方法,对检测曲线进行初步探索。方法如下:

包被:用 10 Mm, pH7.4N-2-羟乙基哌嗪-N-2-乙磺酸缓冲液稀释包被抗原 Cd-1-(4-异硫氰基苯基)-乙二胺四乙酸-牛血清白蛋白, 50 μ l/孔加到 96 孔酶联微量分析板(Coring Co.)上, 4 $^{\circ}$ C放置过夜。

洗涤: PBST 洗涤 5 次

封闭: PBST 稀释明胶至 1%, 100 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 1.5 小时。

洗涤: PBST 洗涤 5 次

加样:用含 2mM 乙二胺四乙酸磷酸盐缓冲液 10 倍逐级稀释镉标准溶液, 稀释好的溶液室温放置 30min, 再与稀释到一定倍数的镉抗体等体积混匀室温反应 45 分钟, 加入到酶联板上 50 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 1 小时。

洗涤: PBST 洗涤 6 次

加酶标二抗: PBS 溶液 1000 倍稀释 HRP-羊抗鼠抗体(华美公司), 50 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 1 小时。

洗涤: PBST 洗涤 6 次

显色: TMB 50 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 显色 10 分钟

终止反应: 加 2M 的硫酸, 25 μ l/孔

酶联仪(Thermo Co.)上测 450nm 处吸光值, 并计算抑制率。抗体的 IC_{50} =4.19 μ g/ml。结果表明, 制备的抗体能很好的识别镉, 可用于研制镉免疫速测试剂盒。

实施例2 自来水样品中检测镉残留量

Cd-1-(4-异硫氰基苯基)-乙二胺四乙酸-牛血清白蛋白 0.25 μ g/ml 包被微量分析板中 50 μ l/孔, 镉抗体上清稀释 50 倍作为工作浓度, 1%明胶作封闭物, 抗原抗体反应基质(HBS) pH 值为 7.0、离子强度为 0.15mol/L, 微量分析板中 50 μ l/孔。

待测样品准备:

自来水样品: 量取自来水 100 μ l, 加入 1000 μ g/ml 镉标准溶液 0.5 μ l, 配制成 5 μ g/ml 的液体样品。

采用镉 ELISA 检测方法对以上样品进行检测, 操作如下:

1) 包被:

Cd-1-(4-异硫氰基苯基)-乙二胺四乙酸-牛血清白蛋白 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 在微量分析板中每孔加 50 μl , 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜或 37 $^{\circ}\text{C}$ 放置 2 小时, PBST 洗涤 5 次并倒置、在吸水纸上拍干;

2) 封闭:

1%明胶作封闭物, 微量分析板每孔 100 μl , 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1.5 小时, 倒净, PBST 洗涤 5 次并倒置、在吸水纸上拍干;

3) 加抗体及抗体与待测样品的混合液:

取待测样品 3 μl 加到 500 μl 反应基质中配制成待测液, 稀释 50 倍的镉抗体上清与待测液等体积充分混合, 以每孔 50 μl 加到微量分析板中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 小时, 倒净, PBST 洗涤 6 次并倒置、在吸水纸上拍干;

4) 加酶标二抗:

用 pH7.4、0.15mol/L 的 PBST 缓冲液液将商品化的 HRP-羊抗鼠抗体稀释 1000 倍, 微量分析板每孔加 50 μl , 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 小时, 倒净, PBST 洗涤 8 次并倒置、在吸水纸上拍干。

5) 显色:

TMB 底物溶液 50 μl /孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 显色反应 10 分钟

6) 终止反应并读数

加 2mol/L 的硫酸, 25 μl /孔终止显色反应, 酶联仪上 450nm 处读出吸光值, 空白基质作阳性对照, $B_0=0.779$, 待测样品吸光值 $B=0.561$ 。

7) 数据处理

计算出结合率 $B/B_0=72.0\%$, 代入公式 1

$$\text{Logit}(B/B_0) = \text{Ln}[(B/B_0) / (1-B/B_0)] \quad \text{公式 1}$$

得到 $\text{Logit}(B/B_0) = 0.9445$

代入如下检测方程:

$$\text{Logit}(B/B_0) = 2.09\text{Log}C - 1.5146 \quad \text{公式 2}$$

其中 C 为微量分析板孔中测得的速灭威浓度, 求得 $C=14.95\text{ppb}$ 。待测样品中镉残留量为 4.995ppm。

专利名称(译)	重金属镉单克隆抗体的制备方法		
公开(公告)号	CN101016337A	公开(公告)日	2007-08-15
申请号	CN200710020472.3	申请日	2007-03-02
[标]申请(专利权)人(译)	南京农业大学		
申请(专利权)人(译)	南京农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	南京农业大学		
[标]发明人	刘凤权 朱晓霞		
发明人	刘凤权 朱晓霞		
IPC分类号	C07K16/18 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明重金属镉单克隆抗体的制备方法，属于生物技术领域。专用于特异性识别重金属镉单克隆抗体的制备，及其在农产品和农业生产环境中镉残留的高灵敏快速检测。重金属镉离子与载体蛋白通过双功能金属螯合剂1 - (4 - 异硫氰基苯基) - 乙二胺四乙酸偶联形成完全抗原，用该完全抗原免疫Balb/C鼠，脾细胞和Sp2/0骨髓瘤细胞通过杂交瘤技术制备杂交瘤细胞，获得了稳定分泌抗Cd - EDTA的单克隆抗体。本发明抗体的制备技术简便可行：抗原的整个制备过程无需要特别的仪器设备，容易工厂化规模生产。