



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105137059 A

(43) 申请公布日 2015. 12. 09

(21) 申请号 201510411290. 3

(22) 申请日 2015. 07. 14

(71) 申请人 上海拜豪生物科技有限公司

地址 200000 上海市浦东新区中国(上海)自由贸易试验区新金桥路 27 号 13 号楼 2 层

(72) 发明人 张积仁 阳帆 董欣敏 吴婧
蔡睿 孙遥 赵乙木

(74) 专利代理机构 广州市越秀区哲力专利商标
事务所(普通合伙) 44288

代理人 汤喜友

(51) Int. Cl.

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

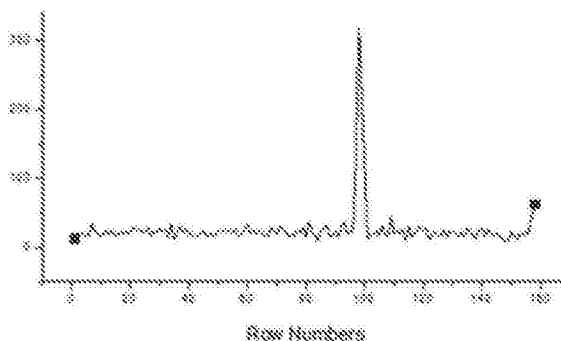
权利要求书2页 说明书19页 附图2页

(54) 发明名称

一种汞螯合型免疫复合物及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明公开了一种汞螯合型免疫复合物及其制备方法和应用,该汞螯合型免疫复合物为以下复合物中的一种:汞离子结合于免疫复合物形成的复合物,或汞离子结合于载体蛋白及能和该载体蛋白特异性结合的抗体所形成的复合物;或汞离子结合于免疫球蛋白后与载体蛋白结合形成的复合物。本发明所述汞螯合型免疫复合物的是一种相对特异性的免疫复合物,用于检测地区人群血清中是否汞螯合型免疫复合物及含量,间接反映这个地区汞污染程度。



1. 一种汞螯合型免疫复合物,其特征在于,该汞螯合型免疫复合物为以下复合物中的一种:

汞离子结合于免疫复合物形成的复合物,或

汞离子结合于载体蛋白及能和该载体蛋白特异性结合的抗体所形成的复合物;或

汞离子结合于免疫球蛋白后与载体蛋白结合形成的复合物。

2. 根据权利要求1所述的汞螯合型免疫复合物,其特征在于,所述载体蛋白或免疫复合物至少含有锌指结构、巯基、半胱氨酸残基中一种结构,汞离子通过锌指结构、巯基、半胱氨酸残基中至少一种与载体蛋白或免疫复合物结合。

3. 根据权利要求2所述的汞螯合型免疫复合物,其特征在于,所述载体蛋白为抗体蛋白、脂蛋白、血红蛋白、核抗原、异种血清抗原、病毒、细菌、原虫、蠕虫中的一种。

4. 根据权利要求1所述的汞螯合型免疫复合物,其特征在于,其中,汞离子通过螯合剂与载体蛋白结合后再与能和载体蛋白特异性结合的抗体结合。

5. 一种如权利要求1所述的汞螯合型复合肥物的制备方法,其特征在于,该制备方法包括:

A) 合成汞螯合型复合肥物的步骤;

B) 提纯汞螯合型复合肥物的步骤:采用免疫亲和层析法去除步骤A)合成的汞螯合型免疫复合物中未参与反应的载体蛋白、特异性抗体及汞离子。

6. 根据权利要求5所述的制备方法,其特征在于,

所述步骤A)具体步骤为:

(I) 配制螯合剂溶液:将螯合剂溶解,配制成螯合剂溶液;

(II) 配制载体蛋白溶液:将载体蛋白加入到硼酸盐缓冲溶液中,制得载体蛋白溶液;

(III) 搅拌过夜:将步骤(I)螯合剂溶液加入到步骤(II)的载体蛋白溶液中,搅拌后于摇床作用2-30h,得到混合液;

(IV) 透析袋预处理:在透析袋中加入EDTA-NaHCO₃溶液煮沸,弃废液后用ddH₂O冲洗,重复该步骤1-3次;

(V) 透析:将步骤(III)的混合液装入经步骤(IV)处理后的透析袋中,用ddH₂O透析,换水2-3次,4℃透析过夜之后,收集液体;

(VI) 汞离子螯合:在上述步骤(V)中的液体中加入HCl溶液调整pH至7.0,缓慢加入汞离子溶液,边滴加边震荡,之后于摇床作用2-30h,然后重复步骤(V)一次,收集液体,得到汞螯合型抗原;

(VII) 结合:在上述汞螯合型抗原中加入能与载体蛋白特异性结合的抗体,反应后得到汞螯合型免疫复合物;

所述步骤B)具体步骤如下:

(i) 将上述A)步骤合成的汞螯合型免疫复合物复溶于生理盐水中;

(ii) 层析柱预处理:使用稀释缓冲液冲洗管路,在层析柱中装入能与免疫复合物特异性结合的填料,装柱后继续用稀释缓冲液平衡柱子;

(iii) 上样:待柱子平衡后,用稀释缓冲液稀释步骤(i)所得溶液,然后上柱,汞螯合型免疫复合物吸附在填料上,未反应的载体蛋白、抗体、汞离子随稀释缓冲液流出;

(iv) 洗脱:使用稀释缓冲液冲洗柱子,至基线平衡,然后使用0.05-0.10mol/L的

Na₂HPO₄溶液进行洗脱；

(v) 收集:收集步骤(iv)的洗脱液,收集完毕后立即使蛋白复性；

(vi) 收集到的洗脱液装入透析袋用 ddH₂O 透析除盐,换水 2-4 次后,4℃透析过夜,收集样本；

(vii) 层析柱预处理:采用新的层析柱,用稀释缓冲液冲洗管路,在该层析柱中装入能与汞特异性结合的填料,装柱后再用稀释缓冲液平衡柱子；

(viii) 上样:待步骤(vii)的柱子平衡后,用稀释缓冲液稀释上述步骤(vi)的样本,然后将稀释后的样本上柱,汞螯合型免疫复合物吸附在填料上,未反应的抗原抗体复合物会随稀释缓冲液流出；

(ix) 洗脱:步骤(viii)之后用稀释缓冲液冲洗柱子,至基线平衡,然后使用 0.5-1.0Mol/L 的 Na₂HPO₄溶液进行洗脱；

(x) 收集:收集步骤(ix)的洗脱液,收集完毕后立即使蛋白复性；

(xi) 对步骤(x)的洗脱液装入透析袋用 ddH₂O 透析除盐,换水三次后,4℃透析过夜,收集样本,即得到纯化的汞螯合型免疫复合物。

7. 如权利要求 1 所述的汞螯合型免疫复合物在制备检测汞螯合型免疫复合物的酶联免疫试剂盒中的应用。

8. 一种检测汞螯合型免疫复合物的酶联免疫试剂盒,其特征在于,该试剂盒包括如权利要求 1 所述的汞螯合型免疫复合物的标准品。

9. 根据权利要求 8 所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于,该试剂盒还包括至少一种以下试剂:含有捕获抗原抗体复合物的蛋白的包被液、含有捕获金属 Hg 的抗体的包被液、酶标抗体。

10. 一种定量检测汞螯合型免疫复合物的方法,其特征在于,以已知含量的权利要求 1 所述的汞螯合型免疫复合物作为标准品,采用以下方法之一对样品进行检测:酶联免疫法、酶联免疫与原子吸收光谱结合法、酶联免疫与电感耦合等离子体质谱结合法、提纯免疫复合物与原子吸收光谱结合法、提纯免疫复合物与电感耦合等离子体质谱结合法、电泳与酶联免疫或原子吸收光谱或电感耦合等离子体质谱结合法。

一种汞螯合型免疫复合物及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及属于医学领域,具体涉及汞螯合型免疫复合物及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 免疫复合物 (Immune complexes, IC) 是抗原抗体结合的产物,根据全国科学技术名词审定委员会的定义,是指抗体与可溶性抗原结合而形成的复合物。它分为两类,一种是组织中固定的免疫复合物,而另一种则是游离于血液中的免疫复合物,成为循环免疫复合物 (circulating immune complexes, CIC)。免疫复合物在清除和破坏各种抗原中起着不可缺少的作用,机体免疫反应的结果就是不断产生免疫复合物。当机体内抗原 (或抗体) 数量略多于抗体 (或抗原) 时,就会形成中等分子大小的免疫复合物,它既不易被吞噬细胞吞噬,又不能通过肾小球滤孔排出,可较长时间游离于血液和其他体液中。当血管壁通透性增加时,此类 IC 可随血液沉积在某些部位的毛细血管壁或嵌合在肾小球基底膜上,激活补体导致免疫复合物沉积。这些沉积或镶嵌于血管壁或组织的免疫复合物,乃造成血管基膜炎症和组织损伤的始动因素。免疫复合物可通过以下几方面造成组织损伤:1) 激活补体:沉积的 IC 通过激活补体,产生过敏毒素和具有趋化效应的活性片段,趋化至局部的肥大细胞、嗜碱性粒细胞释放活性介质致局部血管通透性增高,引起渗出和局部水肿;2) 吸引白细胞浸润和集聚:中性粒细胞在吞噬 IC 时释放毒性氧化物和溶酶体酶,损伤邻近组织;3) 活化血小板:IC 可通过活化血小板释放血管活性胺类物质,导致血管扩张、通透性增加,加剧局部渗出和水肿,并激活凝血机制,形成微血栓,引起局部缺血、出血和组织坏死。

[0003] 多种疾病的发生都与免疫复合物的沉积息息相关,如系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、肾病综合征、冷球蛋白血症、脉管炎、细菌、病毒和寄生虫感染、过敏反应、自身免疫疾病、皮肤病等。早在上世纪 90 年代,就有学者发现,在正常机体中,免疫复合物被不断降解,因而一般检测不到免疫复合物或只呈现低浓度,而在上述一系列疾病中,血清中的免疫复合物即 CIC 含量显著升高。虽然 CIC 检测不具有疾病特异性,但其检测能提供关于免疫病理、疾病的发展及预后方面的信息。在某些微生物感染、自身免疫中,检测循环免疫复合物可用作疾病活动性、评价机体的机能和检测疗效的指标。而近些年来,学者们致力于研究特异性的免疫复合物,研究各种特异性免疫复合物与疾病致病、疾病发展、疾病诊断等各方面的关系,而这些研究将促使我们对疾病有更深一步了解。

[0004] 汞 (Mercury, Hg) 是一种无处不在的重金属,广泛应用于工业、农业、医药业,是一种非常重要的环境污染物。2011 年,美国毒物和疾病登记署 (United States Agency for Toxic Substances and Disease Registry, ATSDR) 已将其列入物质优先列表内 (Substance Priority List),而世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 也早已将其列为 10 大最易引起健康问题的化学品之一。在美国, Hg 被认为是四大环境污染物之一,严重影响着人们的身体健康。常见的汞职业暴露人群包括从事金属冶炼、开采金矿、烧煤、电产业和木材生产的人群,而对于普通人群主要通过食入汞污染的海鲜、饮入汞污染水源、吸入燃料燃烧或蒸发的汞蒸汽。此外,含汞化妆品的接触、填充汞合金牙科填充物、

接触疫苗防腐剂中的乙基汞、含汞杀虫剂的接触都是常见的汞暴露方式，汞与人们的生活密切相关。2009年，国家健康与营养测试调查中发现(National Health and Nutrition Examination Study, NHANES)，2%的美国育龄期妇女体内的汞都超标，可见汞污染是一个亟待解决的问题。

[0005] 2004年美国学者 A. Ramanaviciene 等发现血清中循环免疫复合物含量与地方环境污染有关，发现随着地区污染严重程度的增加，当地牛血清中的 CIC 含量显著增加，差异具有统计学意义，因而可以作为评价地区污染的指标。但环境污染究竟是如何刺激机体内 CIC 含量显著升高，是一种还是多种污染物共同作用导致其升高，CIC 的升高是否因此会导致机体损伤，增加机体对于疾病的易感性，这些都有待研究。众所周知，循环免疫复合物是一种特殊意义的蛋白质，而汞可作用于全身多个系统的蛋白质，汞是否可以作用于循环免疫复合物，而使循环免疫复合物含量改变、活性改变、功能改变，这些尚缺乏相关研究。

发明内容

[0006] 为了克服现有技术的不足，本发明的目的在于提供一种汞螯合型免疫复合物，该汞螯合型免疫复合物是一种相对特异性的免疫复合物，用于检测地区人群血清中是否存在汞螯合型免疫复合物及其含量，间接反映这个地区汞污染程度。

[0007] 为解决上述问题，本发明所采用的技术方案如下：

[0008] 一种汞螯合型免疫复合物，该汞螯合型免疫复合物为以下复合物中的一种：

[0009] 汞离子结合于免疫复合物形成的复合物，或

[0010] 汞离子结合于载体蛋白及能和该载体蛋白特异性结合的抗体所形成的复合物；或

[0011] 汞离子结合于免疫球蛋白后与载体蛋白结合形成的复合物。

[0012] 进一步地，所述载体蛋白或免疫复合物至少含有锌指结构、巯基、半胱氨酸残基中一种结构，汞离子通过锌指结构、巯基、半胱氨酸残基中至少一种与载体蛋白或免疫复合物结合。

[0013] 具体的，所述载体蛋白为抗体蛋白、脂蛋白、血红蛋白、核抗原、异种血清抗原、病毒、细菌、原虫、蠕虫中的一种。

[0014] 进一步的，汞离子通过螯合剂与载体蛋白结合后再与能和载体蛋白特异性结合的抗体结合。

[0015] 进一步的，所述螯合剂为 ITCBE、EDTA、多磷酸盐、氨基酸、1,3-二酮、羟基羧酸中的一种。

[0016] 本发明还提供了两种制备汞螯合型免疫复合物的方法，通过这两种方法获得汞螯合型免疫复合物。

[0017] 其中，第一种制备方法包括

[0018] A) 合成汞螯合型免疫复合物的步骤：先将螯合剂与载体蛋白结合，再与汞离子络合；

[0019] B) 提纯汞螯合型免疫复合物的步骤：采用免疫亲和层析法去除步骤 A) 合成的汞螯合型免疫复合物中未参与反应的载体蛋白、特异性抗体及汞离子。

[0020] 具体地，所述汞螯合型免疫复合物的制备方法中，

[0021] (I) 配制螯合剂溶液：将螯合剂溶解，配制成螯合剂溶液；

[0022] (II) 配制载体蛋白溶液:将载体蛋白加入到硼酸盐缓冲溶液中,制得载体蛋白溶液;

[0023] (III) 搅拌过夜:将步骤(I) 螯合剂溶液加入到步骤(II) 的载体蛋白溶液中,搅拌后于摇床作用 2-30h,得到混合液;

[0024] (IV) 透析袋预处理:在透析袋中加入 EDTA-NaHCO₃溶液煮沸,弃废液后用 ddH₂O 冲洗,重复该步骤 1-3 次;

[0025] (V) 透析:将步骤(III) 的混合液装入经步骤(IV) 处理后的透析袋中,用 ddH₂O 透析,换水 2-3 次,4℃透析过夜之后,收集液体;

[0026] (VI) 汞离子螯合:在上述步骤(V) 中的液体中加入 HCl 溶液调整 pH 至 7.0,缓慢加入汞离子溶液,边滴加边震荡,之后于摇床作用 2-30h,然后重复步骤(V) 一次,收集液体,得到汞螯合型抗原;

[0027] (VII) 结合:在上述汞螯合型抗原中加入能与载体蛋白特异性结合的抗体,反应后得到汞螯合型免疫复合物;

[0028] 所述步骤 B) 具体步骤如下:

[0029] (i) 将上述 A) 步骤合成的汞螯合型免疫复合物复溶于生理盐水中;

[0030] (ii) 层析柱预处理:使用稀释缓冲液冲洗管路,在层析柱中装入能与免疫复合物特异性结合的填料,装柱后继续用稀释缓冲液平衡柱子;

[0031] 所述能与免疫复合物特异性结合的填料为吸附有可与免疫复合物特异性结合物质的硅胶或树脂;

[0032] (ii) 上样:待柱子平衡后,用稀释缓冲液稀释步骤(i) 所得溶液,然后上柱,汞螯合型免疫复合物吸附在填料上,未反应的载体蛋白、抗体、汞离子随稀释缓冲液流出;

[0033] (iv) 洗脱:使用稀释缓冲液冲洗柱子,至基线平衡,然后使用 0.05-0.10mol/L 的 Na₂HPO₄ 溶液进行洗脱;

[0034] (v) 收集:收集步骤(iv) 的洗脱液,收集完毕后立即使蛋白复性;

[0035] (vi) 收集到的洗脱液装入透析袋用 ddH₂O 透析除盐,换水 2-4 次后,4℃透析过夜,收集样本;

[0036] (vii) 层析柱预处理:采用新的层析柱,用稀释缓冲液冲洗管路,在该层析柱中装入能与汞特异性结合的填料,装柱后再用稀释缓冲液平衡柱子;

[0037] 所述能与汞特异性结合的填料为吸附有可与汞特异性结合物质的硅胶或树脂;

[0038] (viii) 上样:待步骤(vii) 的柱子平衡后,用稀释缓冲液稀释上述步骤(vi) 的样本,然后将稀释后的样本上柱,汞螯合型免疫复合物吸附在填料上,未反应的抗原抗体复合物会随稀释缓冲液流出;

[0039] (ix) 洗脱:步骤(viii) 之后用稀释缓冲液冲洗柱子,至基线平衡,然后使用 0.5-1.0mol/L 的 Na₂HPO₄溶液进行洗脱;

[0040] (x) 收集:收集步骤(ix) 的洗脱液,收集完毕后立即使蛋白复性;

[0041] (xi) 对步骤(x) 的洗脱液装入透析袋用 ddH₂O 透析除盐,换水三次后,4℃透析过夜,收集样本,即得到纯化的汞螯合型免疫复合物。

[0042] 本发明还提供了上述汞螯合型免疫复合物在制备检测汞螯合型免疫复合物的酶联免疫试剂盒中的应用。

[0043] 本发明还提供了一种检测汞整合型免疫复合物的酶联免疫试剂盒,该试剂盒包括如权利要求 1 所述的汞整合型免疫复合物的标准品。

[0044] 进一步的,上述试剂盒还包括至少一种以下试剂:含有捕获抗原抗体复合物的蛋白的包被液、含有捕获金属 Hg 的抗体的包被液、酶标抗体。

[0045] 一种定量检测汞整合型免疫复合物的方法,其特征在于,以已知含量的汞整合型免疫复合物作为标准品,采用以下方法之一对样品进行检测:酶联免疫法、酶联免疫与原子吸收光谱结合法、酶联免疫与电感耦合等离子体质谱结合法、提纯免疫复合物与原子吸收光谱结合法、提纯免疫复合物与电感耦合等离子体质谱结合法、电泳与酶联免疫或原子吸收光谱或电感耦合等离子体质谱结合法。

[0046] 相比现有技术,本发明的有益效果在于:

[0047] 1. 首次合成了汞整合型免疫复合物,并证实了在机体内汞可存在于免疫系统,并证明了汞整合型免疫复合物的存在;

[0048] 2. 本发明实现了免疫复合物的特异性识别,并实现了汞整合型免疫复合物的定量检测,提供从免疫角度检测机体内的汞含量水平的方法,并为工业地区的汞污染水平提供间接指标。

[0049] 下面结合附图和具体实施方式对本发明作进一步详细说明。

附图说明

[0050] 图 1 为免疫复合物非变性电泳条带图;

[0051] 图 2 为免疫复合物的电泳条带的同步辐射线 X 线荧光分析图;

[0052] 其中,图 1 中的 M 为 Marker, IC 为汞整合型免疫复合物;图 2 中的横坐标为蛋白条带位置,纵坐标为该蛋白条带中汞金属能量。

具体实施方式

[0053] 一种汞整合型免疫复合物,该汞整合型免疫复合物为以下复合物中的一种:

[0054] 汞离子结合于免疫复合物形成的复合物,或

[0055] 汞离子结合于载体蛋白及能和该载体蛋白特异性结合的抗体所形成的复合物;或

[0056] 汞离子结合于免疫球蛋白后与载体蛋白结合形成的复合物。

[0057] 具体的,所述载体蛋白或免疫复合物至少含有锌指结构、巯基、半胱氨酸残基中一种结构,汞离子通过锌指结构、巯基、半胱氨酸残基中至少一种与载体蛋白或免疫复合物结合。

[0058] 具体的,所述载体蛋白为抗体蛋白、脂蛋白、血红蛋白、核抗原、异种血清抗原、病毒、细菌、原虫、蠕虫中的一种。

[0059] 进一步的,汞离子通过螯合剂与载体蛋白结合后再与能和载体蛋白特异性结合的抗体结合。

[0060] 进一步的,所述螯合剂为 ITCBE、EDTA、谷胱甘肽 (GSH)、多磷酸盐、氨基酸、1,3-二酮、羟基羧酸中的一种。

[0061] 本发明还提供了两种制备汞整合型免疫复合物的方法,通过这两种方法获得汞整合型免疫复合物。

- [0062] 其中,第一种制备方法包括
- [0063] A) 合成汞螯合型免疫复合物的步骤;
- [0064] B) 提纯汞螯合型免疫复合物的步骤:采用免疫亲和层析法去除步骤 A) 合成的汞螯合型免疫复合物中未参与反应的载体蛋白、特异性抗体及汞离子。
- [0065] 具体地,所述汞螯合型免疫复合物的制备方法中,
- [0066] (I) 配制螯合剂溶液:将螯合剂溶解,配制成螯合剂溶液;
- [0067] (II) 配载体蛋白溶液:将载体蛋白加入到硼酸盐缓冲溶液中,制得载体蛋白溶液;
- [0068] (III) 搅拌过夜:将步骤(I) 螯合剂溶液加入到步骤(II) 的载体蛋白溶液中,搅拌后于摇床作用 2-30h,得到混合液;
- [0069] (IV) 透析袋预处理:在透析袋中加入 EDTA-NaHCO₃溶液煮沸,弃废液后用 ddH₂O 冲洗,重复该步骤 1-3 次;
- [0070] (V) 透析:将步骤(III) 的混合液装入经步骤(IV) 处理后的透析袋中,用 ddH₂O 透析,换水 2-3 次,4℃透析过夜之后,收集液体;
- [0071] (VI) 汞离子螯合:在上述步骤(V) 中的液体中加入 HCl 溶液调整 pH 至 7.0,缓慢加入汞离子溶液,边滴加边震荡,之后于摇床作用 2-30h,然后重复步骤(V) 一次,收集液体,得到汞螯合型抗原;
- [0072] (VII) 结合:在上述汞螯合型抗原中加入能与载体蛋白特异性结合的抗体,反应后得到汞螯合型免疫复合物;
- [0073] 所述步骤 B) 具体步骤如下:
- [0074] (i) 将上述 A) 步骤合成的汞螯合型免疫复合物复溶于生理盐水中;
- [0075] (ii) 层析柱预处理:使用稀释缓冲液冲洗管路,在层析柱中装入能与免疫复合物特异性结合的填料,装柱后继续用稀释缓冲液平衡柱子;
- [0076] (iii) 上样:待柱子平衡后,用稀释缓冲液稀释步骤(i) 所得溶液,然后上柱,汞螯合型免疫复合物吸附在填料上,未反应的载体蛋白、抗体、汞离子随稀释缓冲液流出;
- [0077] (iv) 洗脱:使用稀释缓冲液冲洗柱子,至基线平衡,然后使用 0.05-0.10mol/L 的 Na₂HPO₄ 溶液进行洗脱;
- [0078] (v) 收集:收集步骤(iv) 的洗脱液,收集完毕后立即使蛋白复性;
- [0079] (vi) 收集到的洗脱液装入透析袋用 ddH₂O 透析除盐,换水 2-4 次后,4℃透析过夜,收集样本;
- [0080] (vii) 层析柱预处理:采用新的层析柱,用稀释缓冲液冲洗管路,在该层析柱中装入能与汞特异性结合的填料,装柱后再用稀释缓冲液平衡柱子;
- [0081] (viii) 上样:待步骤(vii) 的柱子平衡后,用稀释缓冲液稀释上述步骤(vi) 的样本,然后将稀释后的样本上柱,汞螯合型免疫复合物吸附在填料上,未反应的抗原抗体复合物会随稀释缓冲液流出;
- [0082] (ix) 洗脱:步骤(viii) 之后用稀释缓冲液冲洗柱子,至基线平衡,然后使用 0.5-1.0mol/L 的 Na₂HPO₄溶液进行洗脱;
- [0083] (x) 收集:收集步骤(ix) 的洗脱液,收集完毕后立即使蛋白复性;
- [0084] (xi) 对步骤(x) 的洗脱液装入透析袋用 ddH₂O 透析除盐,换水三次后,4℃透析过

夜,收集样本,即得到纯化的汞螯合型免疫复合物。

[0085] 本发明还提供了上述汞螯合型免疫复合物在制备检测汞螯合型免疫复合物的酶联免疫试剂盒中的应用。

[0086] 本发明还提供了一种检测汞螯合型免疫复合物的酶联免疫试剂盒,该试剂盒包括如权利要求 1 所述的汞螯合型免疫复合物的标准品。

[0087] 进一步的,上述试剂盒还包括至少一种以下试剂:含有捕获抗原抗体复合物的蛋白的包被液、含有捕获金属 Hg 的抗体的包被液、酶标抗体。

[0088] 在本发明中,能实现本发明目的的试剂盒可以列出以下几种,但并不限于此。

[0089] 一种用于检测汞螯合循环免疫复合物的试剂盒,包括:含有可捕获抗原抗体复合物的蛋白的包被液、封闭液、洗涤缓冲液、抗汞抗体、酶标抗体、底物、终止液、稀释缓冲液、阳性对照、阴性对照。

[0090] 一种用于检测汞螯合循环免疫复合物的试剂盒,包括:含有可捕获抗原抗体复合物的蛋白的包被液、封闭液、洗涤缓冲液、洗脱液、阳性对照、阴性对照。

[0091] 一种用于检测汞螯合循环免疫复合物的试剂盒,包括:含有可捕获抗原抗体复合物的蛋白的包被液、封闭液、洗涤缓冲液、洗脱液、硝酸、过氧化氢、阳性对照、阴性对照。

[0092] 一种用于检测汞螯合循环免疫复合物的试剂盒,包括用于提纯血清免疫复合物所需溶液、复溶液、含有可捕获金属汞的抗体的包被液、封闭液、洗涤缓冲液、酶标抗体、底物、终止液、稀释缓冲液、标准品、阴性对照。

[0093] 一种用于检测汞螯合循环免疫复合物的试剂盒:包括用于提纯血清免疫复合物所需溶液、复溶液、阳性对照、阴性对照。

[0094] 一种用于检测汞螯合循环免疫复合物的试剂盒,包括用于提纯血清免疫复合物所需溶液、复溶液、硝酸、过氧化氢、阳性对照、阴性对照等。

[0095] 一种用于检测汞螯合循环免疫复合物的试剂盒,包括用于提纯血清免疫复合物所需溶液、胶床介质、复溶液、上样缓冲液、溶解胶床上含抗原抗体复合物的蛋白条带所需液体、含有可捕获金属汞的抗体的包被液、封闭液、洗涤缓冲液、酶标抗体、底物、终止液、稀释缓冲液、阳性对照、阴性对照等。

[0096] 一种用于检测汞螯合循环免疫复合物的试剂盒,包括用于提纯血清免疫复合物所需溶液、胶床介质、复溶液、上样缓冲液、溶解胶床上含抗原抗体复合物的蛋白条带所需液体、阳性对照、阴性对照等。

[0097] 一种用于检测汞螯合循环免疫复合物的试剂盒,包括用于提纯血清免疫复合物所需溶液、胶床介质、复溶液、上样缓冲液、溶解胶床上含抗原抗体复合物的蛋白条带所需液体、硝酸、过氧化氢、阳性对照、阴性对照等。

[0098] 上述几种试剂盒中,所述捕获循环免疫复合物的蛋白,包括但不限于补体 C1q、C1F 蛋白、抗 C3 抗体,如货号为“NOVUS H00000712-p01”的 C1q Recombinant Protein;所述捕获金属汞的抗体包括但不限于购买自巴傲得生物科技有限公司货号为“巴傲得 AP7014”的鼠抗 Hg mAb;封闭液为质量浓度为 1% -5% 的牛血清蛋白或脱脂奶粉;洗脱液包括但不限于木瓜蛋白酶的 Tris-HCl 缓冲溶液;所述胶床介质包括但不限于琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶;用于提纯血清免疫复合物所需溶液包括但不限于 PEG 溶液、硼酸盐缓冲液;底物包括但不限于 TMB 溶液、ABTS 溶液;所述上样缓冲液包括但不限于含有溴酚蓝的 Tris-HCl 缓冲

溶液；酶标抗体为含有辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等酶标记的抗体，如 HRP 酶标抗体；标准品包括但不限于本发明的汞螯合型循环免疫复合物、其他螯合有汞金属的免疫复合物；阳性对照包括但不限于本发明汞螯合型循环免疫复合物、其他螯合有汞金属的免疫复合物，阴性对照为稀释缓冲液。

[0099] 本发明还提供了一种定量检测汞螯合型免疫复合物的方法，以已知含量的汞螯合型免疫复合物作为标准品，采用以下方法之一对样品进行检测：酶联免疫法、酶联免疫与原子吸收光谱结合法、酶联免疫与电感耦合等离子体质谱结合法、提纯免疫复合物与原子吸收光谱结合法、提纯免疫复合物与电感耦合等离子体质谱结合法、电泳与酶联免疫或原子吸收光谱或电感耦合等离子体质谱结合法。

[0100] 在本发明中，用检测汞螯合型免疫复合物的方法可以列出的有以下几种，但并不限于以下几种。

[0101] 本发明除特别说明外，涉及的实验操作步骤均为本领域常规的步骤，试剂、材料如下述所列举，在本发明中没有列举出来的均为本领域常用的或者可以通过市购方式获得，以下是本发明使用到的试验用试剂如下：

[0102] 稀释缓冲液为 pH 9.6 的 0.05M 碳酸盐缓冲液，配制方法示例：取 1.5g 的 Na_2CO_3 和 2.93g 的 NaHCO_3 溶解加 ddH₂O 定容至 1000mL；

[0103] 洗涤缓冲液为 pH7.4 的 0.15M PBS 缓冲液，配制方法示例：取 0.2g 的 KH_2PO_4 、2.90g 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、8.0g 的 NaCl 、0.2g 的 KCl 、0.5mL Tween-20，溶解加 ddH₂O 定容至 1000mL；

[0104] 封闭液为牛血清蛋白溶液，配制方法示例：取 0.1g 牛血清蛋白，加入洗涤缓冲液稀释定容至 100mL；

[0105] 终止液为 2M H_2SO_4 ，配制方法示例：取 178.3mL 的 ddH₂O，向 ddH₂O 中逐滴沿壁加入浓 H_2SO_4 ，边加边搅拌，定容至 200mL；

[0106] 底物缓冲液的 pH 为 5.0， Na_2HPO_4 的摩尔浓度为 0.2M、柠檬酸的摩尔浓度为 0.1M，每 50mL 的底物缓冲液的制备方法如下：取 1.42g Na_2HPO_4 、0.96g 柠檬酸，然后加入 ddH₂O 至 50mL，即得；

[0107] 底物为甲基联苯胺（简称 TMB）溶液，该甲基联苯胺（TMB）溶液由按照如下比例的组分配制而成：TMB：底物缓冲液：0.75% H_2O_2 = 0.5mL：10mL：32 μL ，其中 TMB 为 2g/L 的甲基联苯胺乙醇溶液；

[0108] 可以捕获免疫复合物的蛋白为可与免疫复合物特异性结合的蛋白，包括但不限于如补体 C1q、C1F 蛋白、抗 C3 抗体；以下实施例中，可以捕获免疫复合物的蛋白具体使用的是货号为“NOVUS H00000712-p01”的 C1q Recombinant Protein；

[0109] 捕获汞的物质为购买自巴傲得生物科技有限公司货号为“巴傲得 AP7014”的鼠抗 HgAb；其中，本发明所述与汞特异性结合的物质、抗 Hg 抗体、抗汞抗体均为捕获汞的物质；

[0110] 所述能与人血清白蛋白特异性结合的抗体为兔抗人血清白蛋白抗体，为市售；

[0111] 以下所述稀释倍比为重量体积比。

[0112] 方法一：ELISA 法检测汞螯合型免疫复合物，具体步骤如下：

[0113] 1) 包被：将可以捕获免疫复合物的蛋白包被于固相载体上：用稀释缓冲液稀释包被蛋白至 2500-20000 倍，加入 ELISA 板微孔中，4℃ 过夜 16-18 小时，或 37℃ 水浴 1-3 小时，储存冰箱；

[0114] 2) 封闭:移去稀释缓冲液,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入封闭液,37℃放置 1 小时,移去封闭液,并用洗涤液进行洗涤,洗涤完成后 ELISA 板于 37℃放置 1 小时;

[0115] 3) 加待检样品,并且温育:取血样,作待检样品;以已知含量的汞螯合型免疫复合物作标准品;用稀释缓冲液稀释 10-40 倍,加至微孔中,37℃作用 1-2 小时;

[0116] 4) 加入捕获汞的物质,并且温育:移去待检样品,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入用稀释缓冲液稀释 2500-20000 倍的抗汞抗体,37℃作用 1-2 小时,使其与免疫复合物上的金属汞反应;

[0117] 5) 酶结合物温育:移去抗 Hg 抗体,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入用稀释缓冲液稀释的 HRP 酶标抗体,37℃作用 1-2 小时,使其与抗 Hg 抗体反应;

[0118] 6) 底物温育:移去酶标抗体,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入底物,37℃避光作用 30 分钟;

[0119] 7) 终止反应:滴加终止液至每一微孔;

[0120] 8) 取波长为 405nm,加完终止液后,于规定时间内在酶标仪上分别读取待测样品组和标准品的 OD 值,通过与标准品组比较,求得待测样品的含量(也可不使用酶标仪,直接通过显色情况进行定性检测)。

[0121] 该方法利用酶联免疫吸附测定(ELISA)原理,可以将血清中的非特异性免疫复合物提取出来,提取出来的免疫复合物上部分螯合有重金属汞,而这部分免疫复合物上的汞可以被与汞特异性结合的物质或能与汞反应形成抗原抗体复合物的抗汞的特异性抗体所捕获,之后可以再被辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等酶标记的抗体所捕获(该抗体不识别包被蛋白),捕获上的抗体在显色剂及终止液的作用下,在仪器下读出 OD 值,而不含有螯合金属汞的免疫复合物,则不会被抗汞的特异性抗体所捕获,也不会与辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等酶标记的抗体所捕获,而所用试剂中也不含有金属汞(阴性对照组结果为阴性),因而当所读取的 OD 值结果显示为阳性时,即可证明检测出循环免疫复合物上螯合的金属汞。

[0122] 方法二:ELISA 法+AAS 法检测汞螯合型免疫复合物,具体步骤如下:

[0123] 1) 包被:将可以捕获免疫复合物的蛋白包被于固相载体上,用稀释缓冲液稀释至 2500-20000 倍,加入 ELISA 板微孔中,4℃过夜 16-18 小时,或 37℃水浴 1-3 小时,储存冰箱;

[0124] 2) 封闭:移去稀释缓冲液,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入封闭液,37℃放置 1 小时,移去封闭液,并用洗涤液进行洗涤。洗涤完成后,ELISA 板于 36.5-37.5℃放置 1 小时;

[0125] 3) 加待检样品,并且温育:从循环系统取样,作待检样品;以已知含量的汞螯合型免疫复合物作标准品;用稀释缓冲液稀释 10-40 倍,加至微孔中,37℃作用 1-2 小时;

[0126] 4) 洗脱:移去待检样品,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入稀释倍数为 5-80 倍的洗脱液,于 37-57℃下作用 0-2 小时;洗脱液;

[0127] 5) 检测:从 ELISA 微孔中取样,于原子吸收光谱仪检测螯合于免疫复合物上的汞,并绘制标准曲线,读出相应数值。

[0128] 该方法进一步的在酶联免疫原理的基础上结合原子吸收光谱(AAS)原理,利用原

子吸收光谱仪检测整合于循环免疫复合物上的汞,由于溶液中仅含有免疫复合物,且所用试剂中不含任何重金属(阴性对照组结果为阴性),不会对结果造成干扰,因而当所读取的结果显示为阳性时,即可证明检测出循环免疫复合物上整合的金属汞。

[0129] 方法三:ELISA法+ICP-MS法检测汞整合型免疫复合物,具体步骤如下:

[0130] 1) 包被:将可以捕获免疫复合物的蛋白包被于固相载体上:用稀释缓冲液稀释包被蛋白2500-20000倍,加入ELISA板微孔中,4℃过夜16-18小时,或37℃水浴1-3小时,储存冰箱;

[0131] 2) 封闭:移去稀释缓冲液,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入封闭液,37℃放置1小时,移去封闭液,并用洗涤液进行洗涤。洗涤完成后,ELISA板于36.5-37.5℃放置1小时;

[0132] 3) 加待检样品,并且温育:从循环系统取样,作待检样品;以已知含量的汞整合型免疫复合物作标准品;用稀释缓冲液稀释10-40倍,加至微孔中,37℃作用1-2小时;

[0133] 4) 洗脱:移去待检样品,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入洗脱液,于37℃下作用0-2小时;

[0134] 5) 酸化:在溶液中加入酸化剂对溶液进行酸化,封口过夜,彻底酸化;

[0135] 6) 检测:加入双氧水,并且加热赶酸,取样,于电感耦合等离子体质谱仪下检测整合于免疫复合物上的汞,读出相应数值。

[0136] 该方法进一步的在酶联免疫原理的基础上结合电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS)原理,用ICP-MS检测整合于循环免疫复合物上的汞,由于溶液中仅含有免疫复合物,且所用试剂中不含任何重金属(阴性对照组结果为阴性),不会对结果造成干扰,因而当所读取的结果显示为阳性时,即可证明检测出循环免疫复合物上整合的金属汞。

[0137] 方法四:提纯CIC法+ELISA法检测汞整合型免疫复合物,具体步骤如下:

[0138] 1) 提取非特异性免疫复合物:利用聚乙二醇PEG沉淀法、超速离心、分子超滤、凝胶过滤等方法提取非特异性免疫复合物将提纯出来的免疫复合物用复溶剂复溶于溶液中;

[0139] 2) 用可以捕获汞的物质包被于固相载体上:用稀释缓冲液稀释包被抗体至2500-20000倍,加入ELISA板微孔中,4℃过夜16-18小时,或37℃水浴1-3小时,储存冰箱;

[0140] 3) 封闭:移去稀释缓冲液,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加1%-5%牛血清白蛋白或脱脂奶粉作为封闭液,37℃放置1小时,移去封闭液,并用洗涤液进行洗涤,洗涤完成后,ELISA板于36.5-37.5℃放置1小时;

[0141] 4) 加待检样品,并且温育:从提取的非特异性免疫复合物的复溶液中取样,作待检样品;以已知含量的汞整合型免疫复合物作标准品;用稀释缓冲液稀释10-40倍,加至微孔中,37℃作用1-2小时;

[0142] 5) 酶结合物温育:移去非特异性免疫复合物的复溶液,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入用稀释缓冲液稀释的HRP酶标抗体,37℃作用1-2小时,使其与抗Hg抗体反应;

[0143] 6) 底物温育:移去HRP酶标抗体,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入底物,37℃避光作用30分钟;

[0144] 7) 终止反应 :滴加终止液至每一微孔。

[0145] 8) 取波长为 405nm,加完终止液后,于规定时间内在酶标仪上分别读取待测样品组和标准品的 OD 值,通过与标准品组比较,求得待测样品的含量(也可不使用酶标仪,直接通过显色情况进行定性检测)。

[0146] 方法五 :提纯 CIC 法 +AAS 法检测汞整合型免疫复合物,具体步骤如下 :

[0147] 1) 提取非特异性免疫复合物 :利用聚乙二醇 PEG 沉淀法、超速离心、分子超滤、凝胶过滤等方法提取非特异性免疫复合物将提纯出来的免疫复合物复溶 ;

[0148] 2) 检测 :从步骤 1) 溶液中取样,于原子吸收光谱仪检测整合于免疫复合物上的汞,读出相应数值。

[0149] 方法六 :提纯 CIC 法 +ICP-MS 法检测汞整合型免疫复合物,具体步骤如下 :

[0150] 1) 提取非特异性免疫复合物 :利用聚乙二醇 PEG 沉淀法、超速离心、分子超滤、凝胶过滤等方法提取非特异性免疫复合物将提纯出来的免疫复合物复溶 ;

[0151] 2) 酸化 :从步骤 1) 溶液中取样,在溶液中加入相应酸化剂对溶液进行酸化,封口过夜,彻底酸化 ;

[0152] 3) 检测 :加入双氧水,并且加热赶酸,然后再取加热赶酸后的溶液 0.5mL 于电感耦合等离子体质谱仪下检测整合于免疫复合物上的汞,读出相应数值。

[0153] 方法四、方法五和方法六均是先分离出免疫复合物,再采用特异性检测方法,测定免疫复合物中汞整合型免疫复合物上汞的含量 ;即先采用物理分离手段,如超速离心法、高压液相层析法、凝胶过滤层析法等,将免疫复合物从待测血浆样本中分离出来并复溶于生理盐水中,再利用 ELISA 原理、原子吸收光谱检测或进行检测电感耦合等离子体质谱法检测汞整合型免疫复合物上的汞含量。

[0154] 方法七 :电泳法 +ELISA/AAS/ICP-MS 法检测汞整合型免疫复合物,具体步骤如下 :

[0155] 1) 提取非特异性免疫复合物 :利用聚乙二醇 PEG 沉淀法、超速离心、分子超滤、凝胶过滤等方法提取非特异性免疫复合物将提纯出来的免疫复合物复溶,得到免疫复合物的溶液 ;

[0156] 2) 制备胶床 :根据需要选择合适的介质(如琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶等),按照要求制备好胶床 ;

[0157] 3) 加样 :从步骤 1) 的溶液中取样 8 μ L,加入 2 μ L 上样缓冲液,并混匀,然后加样于样品槽中 ;

[0158] 上样缓冲液(Sample buffer)可由如下比例的组分配制而成 :Tris-HCl :1%溴酚蓝 :ddH₂O :甘氨酸 = 15.5 :2.5 :7 :25,其中 Tris-HCl 的 pH 为 6.8、摩尔浓度为 1M。

[0159] 4) 电泳 :连接电泳板,进行电泳,并根据需求将蛋白按照分子量、等电点等参数的不同进行分离 ;

[0160] 所述电泳缓冲液可通过如下方法制得 :取 Tris3.0g、甘氨酸 14.4g,溶于 800mLddH₂O 中,调节 pH 至 8.3,然后加入 ddH₂O 至 1000mL,即得 ;

[0161] 5) 检测 :在胶床上找出含有免疫复合物的蛋白条带,将该条带取出,经过处理后将条带溶解,然后再分别利用 ELISA、ICP-MS、AAS 等原理检测汞含量 ;此外,还可以利用此方法检测整合汞的免疫复合物的等电点、分子量及含量等。

[0162] 方法七是在方法四、方法五、方法六的基础上,将汞整合型免疫复合物从全血中提

取出来,再采用凝胶电泳法对所提取的汞螯合型免疫复合物进行分离,进而从电泳条带中找出含有免疫复合物的蛋白条带,进行含量测定。

[0163] 实施例 1

[0164] 本实施例中,ITCBE 购买自日本同仁化学研究所,货号 M030;

[0165] 下述硼酸盐缓冲液,其配制方法示例:称取 0.31g 硼酸溶于 400mLddH₂O 中,用 0.1mol/L 的 NaOH 水溶液调节 pH 至 9.0,定容至 500mL,即得;

[0166] 下述 EDTA-NaHCO₃溶液的配制方法示例:取 1.86g EDTA·2H₂O 和 16.8g NaHCO₃,溶于 900mLddH₂O 中,用 1.0M NaOH 调整 pH 至 8.0 定容至 1000mL,高压灭菌,即得,25±2℃ 保存;

[0167] 下述透析袋的截留分子量为 14000,购买自 Bioshop Inc;透析袋经过以下处理:将透析袋放入 500mL 体积的 EDTA-NaHCO₃溶液中,煮沸 10min;倾弃 EDTA-NaHCO₃溶液,用 ddH₂O 漂洗,再用 500mL 5mmol/L EDTA 煮沸 10min;弃掉煮沸液,彻底用 ddH₂O 清洗,加入大量的 ddH₂O 浸泡透析袋 4℃ 过夜;使用时,戴上手套,取出透析袋,用大量的 ddH₂O 彻底冲洗其内外表面。

[0168] 本实施例提供一种汞螯合型免疫复合物,包括以下步骤:

[0169] A) 合成汞螯合型免疫复合物,具体操作步骤如下:

[0170] (I) 配制螯合剂溶液:将 2.0mg ITCBE 溶于 2mL DMSO 溶剂中,配制成螯合剂溶液;

[0171] (II) 配制人血清白蛋白溶液:将 4.0mg 的人血清白蛋白加入到 4mL 的 pH = 9.0 的 0.01M 硼酸盐缓冲溶液中,制得人血清白蛋白溶液;

[0172] (III) 搅拌过夜:将步骤 (I) 螯合剂溶液缓慢加入到步骤 (II) 的人血清白蛋白溶液中,边滴加边搅拌,于 25℃,100r/min 的摇床中作用 24h,然后用透析袋透析 24h,除去未与人血清白蛋白结合的 ITCBE,得到混合液;

[0173] (IV) 透析袋预处理:在透析袋中加入 EDTA-NaHCO₃溶液煮沸,弃废液后用 ddH₂O 冲洗;重复该步骤 2 次;

[0174] (V) 透析:将步骤 (III) 的混合液装入经步骤 (IV) 处理后的透析袋中,用 ddH₂O 透析,换 ddH₂O 3 次,4℃ 透析过夜之后,收集液体;

[0175] (VI) 汞离子螯合:在上述步骤 (V) 中的液体中加入 HCl 溶液调整 pH 至 7.0,缓慢加入 80 μL 的 1mmol/L 汞离子溶液,边滴加边震荡,之后于摇床作用 2-30h,然后重复步骤 (V) 1 次,收集液体,得到汞螯合型抗原;

[0176] (VII) 结合:将步骤 (VI) 制备的汞螯合型抗原中加入能与人血清白蛋白特异性结合的抗体反应后得到汞螯合型免疫复合物;

[0177] B) 提纯汞螯合型免疫复合物,具体操作步骤如下:

[0178] (i) 将上述 A) 步骤合成的汞螯合型免疫复合物复溶于生理盐水中;

[0179] (ii) 层析柱预处理:使用稀释缓冲液冲洗管路,在层析柱中装入能与免疫复合物特异性结合的填料,装柱后继续用稀释缓冲液平衡柱子;

[0180] (iii) 上样:待柱子平衡后,用稀释缓冲液稀释步骤 (i) 所得溶液,然后上柱,汞螯合型免疫复合物吸附在填料上,未反应的载体蛋白、抗体、汞离子随稀释缓冲液流出;

[0181] (iv) 洗脱:使用稀释缓冲液冲洗柱子,至基线平衡,然后使用 0.05-0.10mol/L 的 Na₂HPO₄溶液进行洗脱;

[0182] (v) 收集 :收集步骤 (iv) 的洗脱液,收集完毕后立即使蛋白复性 ;

[0183] (vi) 收集到的洗脱液装入透析袋用 ddH₂O 透析除盐,换水 2-4 次后,4℃ 透析过夜,收集样本 ;

[0184] (vii) 层析柱预处理 :采用新的层析柱,用稀释缓冲液冲洗管路,在该层析柱中装入能与汞特异性结合的填料,装柱后再用稀释缓冲液平衡柱子 ;

[0185] (viii) 上样 :待步骤 (vii) 的柱子平衡后,用稀释缓冲液稀释上述步骤 (vi) 的样本,然后将稀释后的样本上柱,汞整合型免疫复合物吸附在填料上,未反应的抗原抗体复合物会随稀释缓冲液流出 ;

[0186] (ix) 洗脱 :步骤 (viii) 之后用稀释缓冲液冲洗柱子,至基线平衡,然后使用 0.5-1.0mol/L 的 Na₂HPO₄ 溶液进行洗脱 ;

[0187] (x) 收集 :收集步骤 (ix) 的洗脱液,收集完毕后立即使蛋白复性 ;

[0188] (xi) 对步骤 (x) 的洗脱液装入透析袋用 ddH₂O 透析除盐,换水三次后,4℃ 透析过夜,收集样本,即得到纯化的汞整合型免疫复合物。

[0189] 本实施例所制备的汞整合型免疫复合物,通过凝胶电泳进一步分离,并通过电感耦合等离子体质谱或原子吸收光谱进行检测定性鉴定,具体鉴定步骤如下 :

[0190] 1) 制备胶床 :根据需要进行选择非变性聚丙烯酰胺凝胶作为介质,制备好胶床 ;

[0191] 2) 加样 :取 8 μL 提纯出来的汞整合型免疫复合物溶液,加入 2 μL 上样缓冲液,并混匀,然后加样于样品槽中 ;

[0192] 所述上样缓冲液 (Sample buffer) 可由如下比例的组分配制而成 :Tris-HCl :1% 溴酚蓝 :ddH₂O :甘氨酸 = 15.5 :2.5 :7 :25,其中 Tris-HCl 的 pH 为 6.8、摩尔浓度为 1M ;

[0193] 3) 电泳 :连接电泳板,加电泳缓冲液进行电泳,电泳过程中,电流为 22mA 恒流,环境温度为 4 度 ;至溴酚蓝移至胶底部时停止电泳,非变性电泳条带图见图 1 ;

[0194] 所述电泳缓冲液可通过如下方法制得 :取 Tris3.0g、甘氨酸 14.4g,溶于 800mLddH₂O 中,调节 pH 至 8.3,然后加入 ddH₂O 至 1000mL,即得 ;

[0195] 4) 检测 :在胶床上找出含抗原抗体复合物的蛋白条带,将该条带取出,经过处理后将条带溶解,然后再利用电感耦合等离子体质谱或原子吸收光谱检测是否含有汞以及汞含量。

[0196] 将蛋白条带内微量元素含量的 SRXRF 分析在北京正负电子对撞机 (BEPC) 的 4W1" 同步辐射束线上完成,储存环中电子束流能量为 2.2GeV,束流强度 100mA。样品移动台 (TSA200 型,北京卓立汉光公司) 可在计算机控制的步进马达驱动下沿 X、Y 二维方向上移动以改变入射光斑位置,移动步长为 0.0025mm。从样品发射出的 X 射线由 Si (Li) 探测器 (PGT Inc. LS 30143-DS) 探测,探头与入射 SR 线共平面且相互垂直,距样品照射点 20mm,信号用 PGT 多道分析仪 (MCA 4000) 获取输出。用 11.5keV 的单色同步辐射光激发样品,调节入射光斑 (1mmx 3mm) 位置使之处于条带一端,在 300s 的测定时间内,光斑一直沿条带均匀缓慢移动,计数结束时光斑移到该条带另一端。沿电泳方向每 1mm 取一个谱。采用 AX IL 软件处理数据,并用来源于空气且含量恒定的 Ar 信号峰对其它元素峰进行归一处理,以抵消束流强度变化对信号强弱产生的影响。在相同的条件下以同样的方式测量定量标准干胶膜的荧光谱。

[0197] 本实施例的方法制备的铅整合型免疫复合物的电泳条带的同步辐射 X 线荧光

分析图详见图 2, 图 2 中的横坐标为蛋白条带位置, 纵坐标为该蛋白条带中汞金属能量。

[0198] 本实施例中的汞整合型免疫复合物, 可用于制备检测汞整合免疫复合物的试剂, 或可用于制备酶联免疫试剂盒中。

[0199] 检测条件的确定

[0200] 1. 补体蛋白最佳工作浓度以及血浆的最佳稀释倍数的确定

[0201] 采用本发明提供的汞整合型免疫复合物作为标准品, 采用棋盘滴定法确定补体 C1q、抗 Hg 抗体的最佳工作浓度以及血浆的最佳稀释倍数, 棋盘滴定法具体步骤如下:

[0202] 1) 固载: 将补体 C1q 包被于固相载体上, 用稀释缓冲液按 1:2500、1:5000、1:10000、1:20000 的倍比稀释, 加至 ELISA 板微孔中, 4℃ 下存放 18 小时;

[0203] 2) 封闭: 移去稀释缓冲液, 洗涤, 加封闭液, 37℃ 放置 1 小时, 移去封闭液, 洗涤;

[0204] 3) 温育: 分别加待测血浆样本和汞整合型免疫复合物标准品, 用稀释缓冲液按 1:10、1:20、1:40 的倍比稀释, 加至 ELISA 板微孔中, 37℃ 温育 2 小时;

[0205] 4) 捕获: 移去待测血浆, 洗涤, 加入用稀释缓冲液按 1:2500、1:5000、1:10000、1:20000 的倍比稀释的抗 Hg 抗体, 37℃ 作用 2 小时, 使其与循环免疫复合物上的金属汞反应;

[0206] 5) 酶结合物温育: 移去抗汞抗体, 用洗涤缓冲液洗涤, 加入抗体浓度为 2 μg/mL 的酶标抗体, 37℃ 温育 1-2 小时, 使其与抗 Hg 抗体反应;

[0207] 6) 底物温育: 移去酶标抗体, 洗涤后, 加入底物, 37℃ 避光作用 30 分钟, 向 ELISA 板微孔加入终止液;

[0208] 7) 检测: 于 405nm 波长下测试各孔样品的 OD 值。

[0209] 本实施例中, 采用本发明提供的汞整合复合物标准品作为阳性对照, 分别以不加检测样本的对照试验组作为阴性对照 1, 即依次加入了 C1q 蛋白、封闭液、抗汞抗体、酶标和底物;

[0210] 以不加抗汞抗体的对照试验组作为阴性对照 2, 即依次加入了 C1q 蛋白、封闭液、待测血浆、酶标和底物;

[0211] 以不加酶标的对照试验组作为阴性对照 3、即依次加入了 C1q 蛋白、封闭液、待测血浆、抗汞抗体和底物;

[0212] 以同时不加检测样本和抗汞抗体的对照试验组作为阴性对照 4, 即依次加入了 C1q 蛋白、封闭液、酶标和底物;

[0213] 以不加免疫复合物捕获剂 C1q 蛋白的对照试验组作为空白对照 1, 即加入了封闭液、待测血浆、抗汞抗体、酶标和底物;

[0214] 以及以只加底物的对照试验组为空白对照 2, 以只加 PBS 缓冲液为空白对照 3。

[0215] 在酶联免疫法中, 先以与免疫复合物具有亲和性的补体 C1q 蛋白或 C1F 蛋白或 anti-C3 蛋白作为捕获剂吸附免疫复合物, 将血清中的非特异性免疫复合物提取出来, 提取出来的免疫复合物上部分整合有重金属汞, 而这部分免疫复合物上的汞可以被与汞特异性结合的物质或能与汞反应形成抗原抗体复合物的抗汞的特异性抗体所捕获, 之后可以再被辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等酶标记的酶标抗体所捕获, 并在显色剂及终止液的作用下, 可以在仪器下读出 OD 值, 即可证明检测出循环免疫复合物上整合的金属汞。

[0216] 在酶联免疫法试验中, 不同的补体 C1q 蛋白的稀释浓度、抗汞抗体的稀释浓度以

及待测血浆的稀释浓度的参数优化如表 1 所示,表中每个数值为平均值;

[0217] 表 1 :Clq 和 Hg 抗体最佳工作浓度以及血浆稀释倍数的确定

[0218]

		Clq (1:2500)	Clq (1:5000)	Clq (1:10000)	Clq(1:20000)
Hg 抗 1:2500	血浆 1:10	0.701	0.660	0.547	0.327
	血浆 1:20	0.703	0.669	0.570	0.420
	血浆 1:40	0.663	0.577	0.484	0.305
Hg 抗 1: 5000	血浆 1:10	0.697	0.695	0.505	0.402
	血浆 1:20	0.734	0.680	0.554	0.460
	血浆 1:40	0.616	0.625	0.471	0.352
Hg 抗 1: 10000	血浆 1:10	0.553	0.543	0.450	0.260
	血浆 1:20	0.621	0.580	0.485	0.357
	血浆 1:40	0.527	0.472	0.383	0.199
Hg 抗 1: 20000	血浆 1:10	0.451	0.411	0.281	0.184
	血浆 1:20	0.563	0.453	0.305	0.255
	血浆 1:40	0.360	0.301	0.177	0.158

[0219] 从表 1 中我们可以看出当补体蛋白 Clq 的的稀释倍比为 1:2500、血浆稀释度的稀释倍比为 1:20、抗 Hg 抗体的稀释倍比为 1:2500 时, OD 值最大,在该最佳工作浓度条件下, ELISA 阳性对照及阴性对照 ELISA 检测结果如表 2 所示,

[0220] 表 2 ELISA 阳性对照及阴性对照 ELISA 检测结果

[0221]

	阳性对照	阴性对照				空白对照		
		Clq+ 封闭 +Hg 抗+酶标+底物	Clq+封闭+血浆+酶标+底物	Clq+封闭+酶标+底物	Clq+封闭+血浆+Hg 抗+底物	封闭+血浆+Hg 抗+酶标+底物	底物	只含 PBS
OD ₄₀₅	0.922	0.099	0.099	0.070	0.050	0.033	0.026	0.015

[0222] 如表 2 所示,阴性对照组和空白对照组的 OD 值均小于 0.1,所以此工作浓度作为最佳工作浓度。

[0223] 2、ELISA 洗脱液最佳工作浓度及洗脱时间确定

[0224] 为寻求最适宜的洗脱条件,通过酶联免疫法在抗汞抗体与酶标抗体温育后,以不同浓度的洗脱液进行洗脱,再通过酶标仪检测 OD 值,以确定最佳的 ELISA 洗脱浓度和洗脱时间,具体步骤如下:

[0225] (1) 包被:将抗 Hg 抗体用稀释缓冲液按 1:2500 的倍比稀释,加入 ELISA 板微孔中,4℃过夜 18h;

[0226] (2) 封闭:移去稀释缓冲液,洗涤后,加封闭液,37℃放置 1 小时,移去封闭液,并洗涤;

[0227] (3) 加酶标抗体:移去封闭液,洗涤后,加入用稀释缓冲液稀释至抗体浓度为 2 μg/mL 的 HRP 酶标抗体,37℃作用 2 小时,使其与抗 Hg 抗体反应;

[0228] (4) 洗脱:移去酶标抗体,用稀释缓冲液对洗脱液进行稀释,使洗脱液中木瓜蛋白酶的浓度:酶标抗体中抗体的浓度 = 1:80、1:40、1:20、1:10、1:5,分别放置于 37℃温度下作用 1h、2h、3h;移去洗脱液,洗涤,待洗涤完成后,加入底物,37℃避光作用 30 分钟;

[0229] 所述洗脱液的配制方法示例:将木瓜蛋白酶用 pH 为 8.0、摩尔浓度 0.1mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液配制成 2mg/mL,再加入二硫苏糖醇 (DTT),配制成二硫苏糖醇的浓度为 1mmol/L,37℃孵育 30min;

[0230] (5) 滴加终止液至每一微孔;

[0231] (6) 于 405nm 的检测波长下在酶标仪上分别读取每组 OD 值,具体结果参见表 3,

[0232] 表 3:ELISA 洗脱液最佳工作浓度计洗脱时间

[0233]

浓度 时间 稀释度	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80
1h	0.281	0.168	0.081	0.114	0.469
2h	0.250	0.115	0.050	0.183	0.438
3h	0.225	0.106	0.100	0.196	0.441

[0234] 通过比较 OD 值,以判断 ELISA 孔壁上结合的汞抗-酶标复合物洗脱程度,当 OD 值最低时,抗汞抗体-酶标复合物洗脱程度达到最大。

[0235] 从表 3 可知,当洗脱液中木瓜蛋白酶的浓度:酶标抗体中抗体的浓度 = 1:20 时,各组 OD 值均低于其他组,说明在该浓度洗脱液洗脱效果达到最优;而作用时间不管是 1h、2h、3h,各组 OD 值变化均不大,可见随着时间的延长,酶活力逐渐减弱,在酶浓度不变的情况下,延长消化时间并不能提高消化率,所以本实验中洗脱液的作用时间为 1-3h 皆可。

[0236] 应用实施例

[0237] 1. ELISA 法检测血浆中汞螯合型免疫复合物

[0238] 采用方法一提供的 ELISA 法,对 100 个血浆样品进行检测,具体操作条件如下:

[0239] 1) 固载:将补体 C1q 包被于聚丙烯固相载体上,用稀释缓冲液按 1:2500 的倍比稀释,加至 ELISA 板微孔中,4℃下存放 16 小时;

[0240] 2) 封闭:移去稀释缓冲液,洗涤,加封闭液,37℃放置 1 小时,移去封闭液,洗涤;

[0241] 3) 加样:分别加待测血浆样品和标准品,将样品用稀释缓冲液按 1:20 的倍比稀释,加至 ELISA 板微孔中,37℃温育 1.5 小时;

[0242] 4) 捕获:移去待测血浆,洗涤,加入用稀释缓冲液按 1:2500 的倍比稀释的抗汞抗体,37℃温育 1.5 小时;

[0243] 5) 酶结合物温育:移去抗汞抗体,洗涤,加入抗体浓度为 2 μg/mL 的酶标抗体,37℃温育 1.5 小时;

[0244] 6) 底物温育:移去酶标抗体,洗涤,待洗涤完成后,加入底物,37℃避光作用 30 分钟,向 ELISA 板微孔加入终止液;

[0245] 7) 检测:于 405nm 波长下在酶标仪上分别读取待测血浆样品和上述汞螯合型免疫复合物标准品的 OD 值,结果如表 4 所示。

[0246] 表 4 采用方法一对 100 份标本血浆的实测结果

[0247]

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
OD ₄₀₅	0.619	0.53	0.646	0.46	0.559	0.396	0.395	0.597	0.485	0.606
编号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
OD ₄₀₅	0.662	0.649	0.409	0.303	0.668	0.306	0.502	0.525	0.668	0.342
编号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
OD ₄₀₅	0.617	0.475	0.309	0.413	0.396	0.351	0.664	0.449	0.406	0.628
编号	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
OD ₄₀₅	0.566	0.535	0.317	0.604	0.46	0.443	0.62	0.558	0.701	0.721
编号	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
OD ₄₀₅	0.57	0.524	0.383	0.313	0.677	0.553	0.684	0.624	0.656	0.504
编号	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60

[0248]

OD ₄₀₆	0.396	0.401	0.508	0.517	0.655	0.697	0.423	0.305	0.496	0.461
编号	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
OD ₄₀₅	0.628	0.618	0.507	0.498	0.521	0.392	0.563	0.308	0.303	0.348
编号	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
OD ₄₀₅	0.458	0.323	0.692	0.61	0.338	0.388	0.514	0.656	0.584	0.376
编号	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
OD ₄₀₅	0.532	0.454	0.592	0.607	0.427	0.338	0.448	0.473	0.446	0.513
编号	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
OD ₄₀₅	0.463	0.397	0.608	0.581	0.358	0.652	0.391	0.615	0.379	0.63

[0249] 2、ELISA+AAS 法检测血浆中铬螯合型免疫复合物

[0250] 采用本发明方法二提供的 Elisa 方法与 AAS 方法结合的方法,对 100 个血浆样品进行检测,具体操作条件如下:

[0251] 1) 固载:将补体 C1F 蛋白包被于聚苯乙烯固相载体上,用稀释缓冲液按 1:2500 的倍比稀释,加至 ELISA 板微孔中,4℃下存放 16 小时;

[0252] 2) 封闭:移去稀释缓冲液,洗涤,加封闭液,37℃放置 1 小时,移去封闭液,洗涤;

[0253] 3) 温育:分别加标准品和待测血浆样品,将样品用稀释缓冲液按 1:20 的倍比稀释,加至 ELISA 板微孔中,37℃温育 2 小时;

[0254] 4) 洗脱:移去待测样品,洗涤,加入木瓜蛋白酶浓度为 100 μg/mL 的洗脱液,37℃下作用 1 小时;

[0255] 5) 检测:采用原子吸收光谱仪检测标准品和待测血浆样品中螯合于循环免疫复合物上的铅,检测结果如表 5 所示。

[0256] 表 5 采用方法二对 100 份标本血浆的实测结果

[0257]

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
μg/L	0.011	0.064	0.109	0.146	0.147	0.008	0.06	0.022	0.049	0.052
编号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
μg/L	0.143	0.053	0.106	0.024	0.071	0.111	0.034	0.099	0.001	0.083
编号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
μg/L	0.055	0.1	0.077	0.089	0.131	0.064	0.042	0.04	0.023	0.125
编号	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40

[0258]

μg/L	0.007	0.022	0.006	0.073	0.116	0.134	0.056	0.022	0.021	0.069
编号	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
μg/L	0.021	0.051	0.143	0.103	0.066	0.145	0.023	0.152	0.008	0.127
编号	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
μg/L	0.138	0.109	0.119	0.062	0.132	0.107	0.022	0.037	0.036	0.074
编号	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
μg/L	0.067	0.04	0.144	0.071	0.006	0.097	0.095	0.001	0.083	0.038
编号	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
μg/L	0.004	0.022	0.038	0.116	0.08	0.022	0.005	0.02	0.134	0.112
编号	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
μg/L	0.14	0.093	0.056	0.031	0.023	0.064	0.006	0.123	0.064	0.079
编号	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
μg/L	0.096	0.133	0.014	0.099	0.117	0.109	0.14	0.112	0.048	0.081

[0259] 应用实施例 3:

[0260] 采用本发明方法三提供的 Elisa 与 ICP-MS 结合的方法,以实施例 1 提供的汞螯合型免疫复合物标准品,对 100 个血浆样品进行检测,具体操作条件如下:

[0261] 1) 固载:将抗 C3 抗体包被于聚苯乙烯固相载体上,用稀释缓冲液按 1:2500 的倍比稀释,加至 ELISA 板微孔中,37°C 水浴 1 小时后贮存于冰箱;

[0262] 2) 封闭:移去稀释缓冲液,洗涤,加封闭液,37°C 放置 1 小时,移去封闭液,洗涤;

[0263] 3) 温育:分别加标准品和待测血浆样品,将样品用稀释缓冲液按 1:20 的倍比稀释,加至 ELISA 板微孔中,37°C 温育 2 小时;

[0264] 4) 洗脱:移去待测样品,洗涤,加入木瓜蛋白酶浓度为 100 μg/mL 的洗脱液,37°C 下作用 1 小时;

[0265] 5) 酸化:加入硝酸对溶液进行酸化,封口过夜,彻底酸化,加入双氧水,并且加热赶酸;

[0266] 6) 检测:取样于电感耦合等离子体质谱仪下检测螯合于循环免疫复合物上的汞,读出相应数值并计算含量,结果如表 6 所示。

[0267] 表 6 采用方法三对 100 份标本血浆的实测结果

[0268]

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
μ	0.118	0.104	0.069	0.001	0.085	0.031	0.004	0.096	0.077	0.122

[0269]

g/L										
-----	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

编号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
$\mu\text{g/L}$	0.017	0.06	0.078	0.01	0.006	0.097	0.126	0.07	0.048	0.082
编号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
$\mu\text{g/L}$	0.117	0.108	0.144	0.048	0.04	0.029	0.018	0.113	0.031	0.136
编号	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
$\mu\text{g/L}$	0.155	0.099	0.137	0.091	0.125	0.032	0.103	0.058	0.132	0.16
编号	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
$\mu\text{g/L}$	0.069	0.112	0.02	0.125	0.149	0.052	0.015	0.102	0.11	0.129
编号	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
$\mu\text{g/L}$	0.117	0.142	0.026	0.15	0.115	0.114	0.041	0.055	0.103	0.072
编号	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
$\mu\text{g/L}$	0.109	0.112	0.013	0.159	0.039	0.046	0.021	0.016	0.148	0.083
编号	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
$\mu\text{g/L}$	0.159	0.074	0.039	0.062	0.105	0.15	0.12	0.004	0.042	0.019
编号	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
$\mu\text{g/L}$	0.043	0.017	0.142	0.005	0.032	0.121	0.132	0.055	0.07	0.114
编号	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
$\mu\text{g/L}$	0.09	0.158	0.153	0.049	0.032	0.154	0.05	0.145	0.032	0.004

[0270] 上述实施方式仅为本发明的优选实施方式,不能以此来限定本发明保护的范围,本领域的技术人员在本发明的基础上所做的任何非实质性的变化及替换均属于本发明所要求保护的范围。

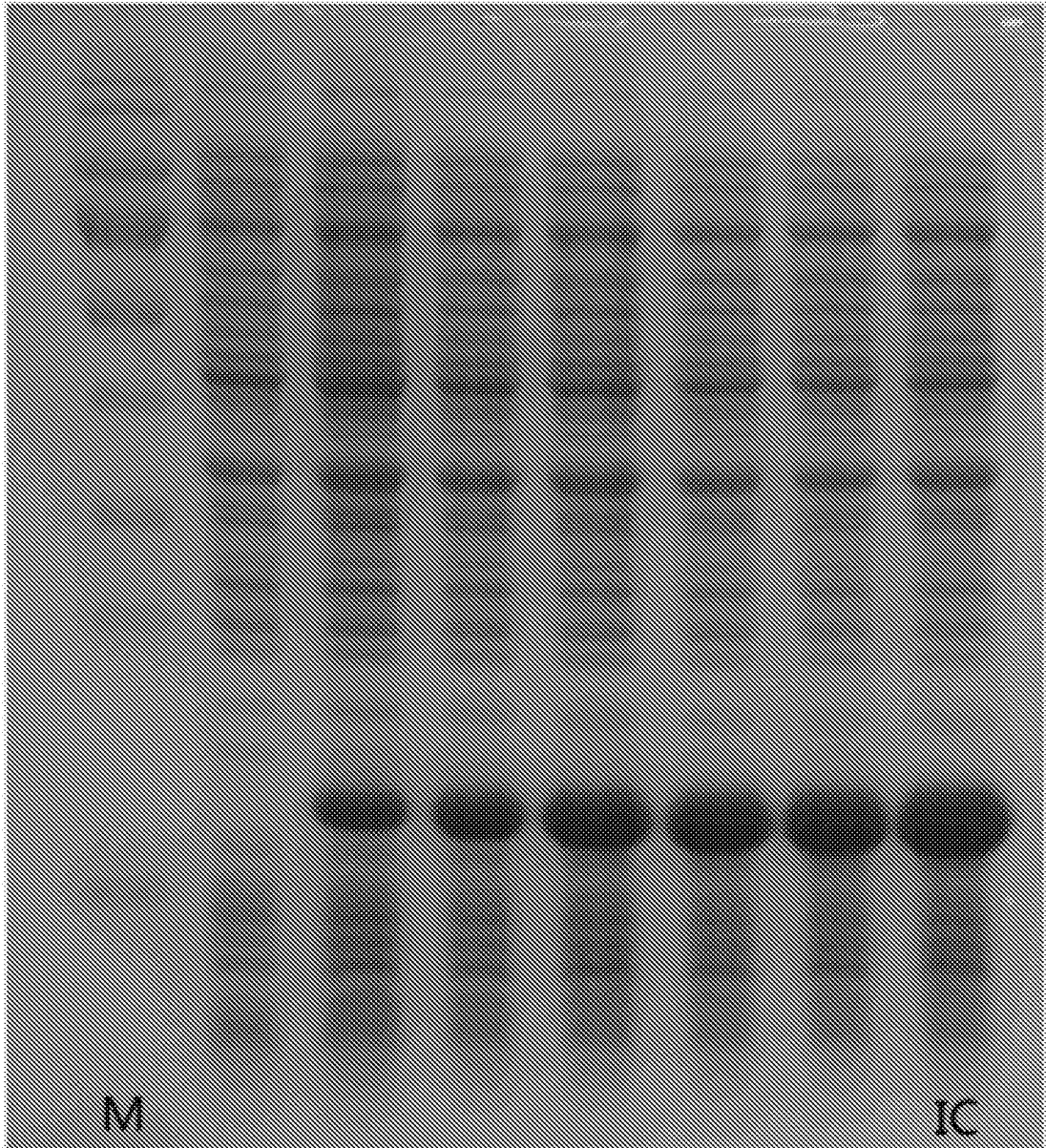


图 1

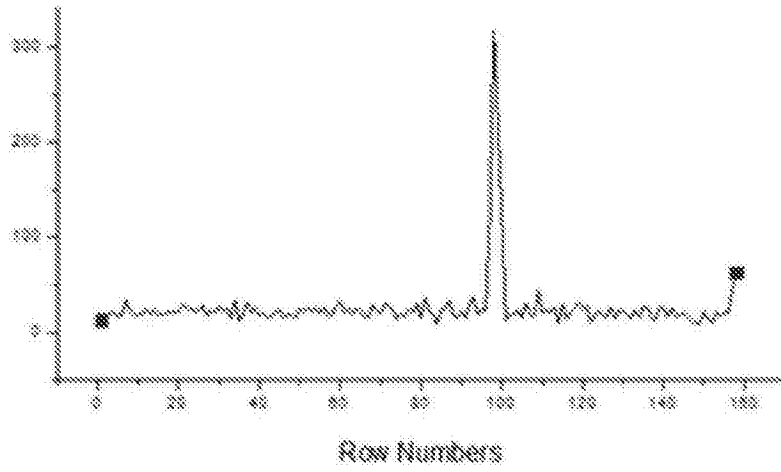


图 2

专利名称(译)	一种汞整合型免疫复合物及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN105137059A	公开(公告)日	2015-12-09
申请号	CN201510411290.3	申请日	2015-07-14
[标]申请(专利权)人(译)	上海拜豪生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海拜豪生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海拜豪生物科技有限公司		
[标]发明人	张积仁 阳帆 董欣敏 吴婧 蔡睿 孙遥 赵乙木		
发明人	张积仁 阳帆 董欣敏 吴婧 蔡睿 孙遥 赵乙木		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/53 G01N33/531		
其他公开文献	CN105137059B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种汞整合型免疫复合物及其制备方法和应用，该汞整合型免疫复合物为以下复合物中的一种：汞离子结合于免疫复合物形成的复合物，或汞离子结合于载体蛋白及能和该载体蛋白特异性结合的抗体所形成的复合物；或汞离子结合于免疫球蛋白后与载体蛋白结合形成的复合物。本发明所述汞整合型免疫复合物的是一种相对特异性的免疫复合物，用于检测地区人群血清中是否汞整合型免疫复合物及含量，间接反映这个地区汞污染程度。

