(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 101885775 A
(43)申请公布日 2010.11.17

(21)申请号 201010229009.1

(22)申请日 2010.07.16

(71)申请人 上海交通大学
地址 200240 上海市闵行区东川路800号

(72)发明人 周培　奚涛　邢海波　曹成喜

(74)专利代理机构 上海交达专利事务所 31201
代理人 王锡麟　王桂忠

(51)Int.Cl.
C07K 16/44(2006.01)
G01N 33/53(2006.01)
G01N 33/543(2006.01)

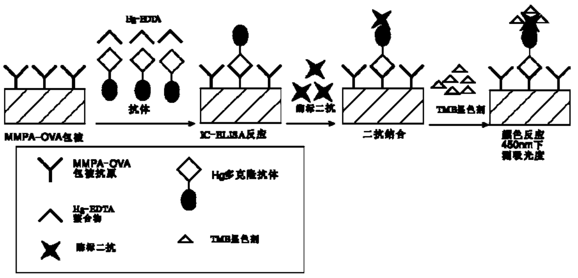
权利要求书 2 页　说明书 4 页　附图 1 页

(54)发明名称

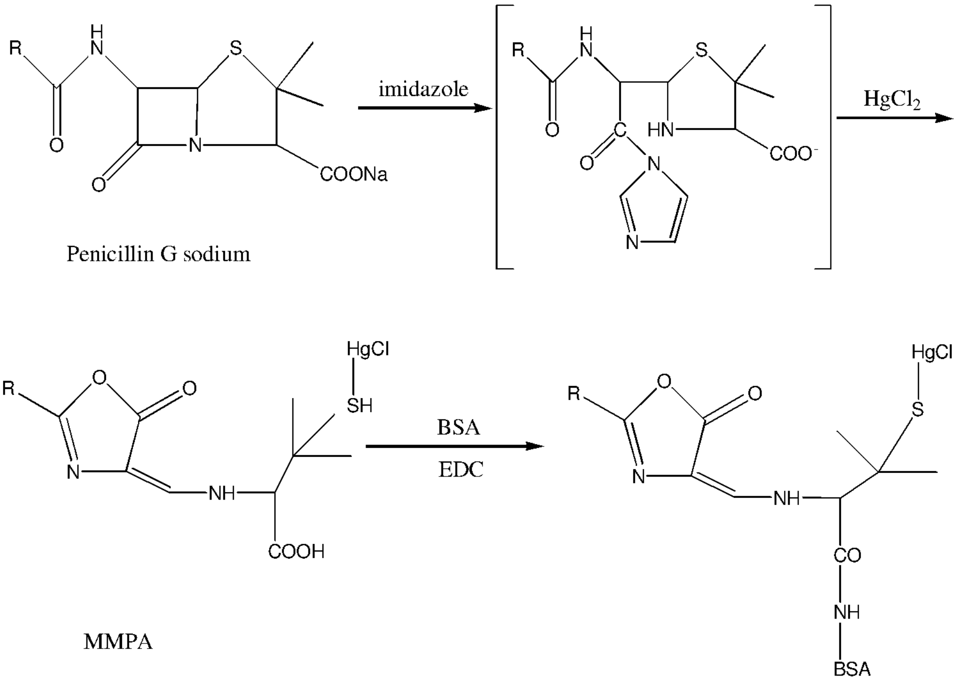
重金属汞多克隆抗体的制备及其酶联免疫吸附测定方法

(57)摘要

一种重金属检测技术领域的重金属汞多克隆抗体的制备及其酶联免疫吸附测定方法。通过将双工能螯合剂青霉素G钠盐的一端结合重金属汞，另一端与大分子载体蛋白牛血清白蛋白、卵清蛋白偶联形成汞-螯合剂-蛋白的免疫原MMPA-BSA和包被原MMPA-OVA，最后经对免疫原MMPA-BSA进行乳化、免疫后制备多克隆抗体用于酶联免疫吸附测定，本发明制备得到的抗体对汞离子具有很高的特异性，除了与镉的交叉反应率为7.9%之外，其他金属的均小于0.001%，添加回收率在91.4%-120%之间，可用于水样中的重金属汞的测定，也可以通过结合一定的前处理技术发展为快速检测农产品等其他样品中重金属汞的快速免疫检测技术。



1. 一种重金属汞多克隆抗体的制备方法，其特征在于，通过将双工能螯合剂青霉素G钠盐的一端结合重金属汞，另一端与大分子载体蛋白牛血清白蛋白、卵清蛋白偶联形成汞-螯合剂-蛋白的免疫原MMPA-BSA和包被原MMPA-OVA，最后经对免疫原MMPA-BSA进行乳化、免疫后制备多克隆抗体，其反应式如下：



。

2. 根据权利要求1所述的重金属汞多克隆抗体的制备方法，其特征是，所述的将双工能螯合剂青霉素G钠盐的一端结合重金属汞是指：取青霉素G钠盐或钾盐的水溶液中加入咪唑，搅拌溶解后逐滴加入HCl并调节pH到6.8，然后加入$HgCl_2$经水浴反应并冷却后产生黄色粉末状沉淀，最后再加入HCl并震荡离心处理后弃去上清，得到青霉烯酸硫醇汞盐。

3. 根据权利要求1所述的重金属汞多克隆抗体的制备方法，其特征是，所述的与大分子载体蛋白牛血清白蛋白、卵清蛋白偶联是指：采用碳二亚胺法和载体蛋白牛血清白蛋白加入青霉烯酸硫醇汞盐，经室温反应并透析后得到免疫原Hg-青霉素-BSA和包被原Hg-青霉素-OVA。

4. 根据权利要求1所述的重金属汞多克隆抗体的制备方法，其特征是，所述的偶联中采用紫外吸收法对完全抗原进行扫描，并且对完全抗原中的蛋白含量和重金属汞的含量进行测定，分别采用考马斯亮蓝法和电感耦合等离子发射光谱法，确定抗原是否合成成功。

5. 一种根据权利要求1所述方法制备得到的重金属汞多克隆抗体的酶联免疫吸附测定方法，其特征在于，包括以下步骤：

第一步、酶联免疫吸附测定方法，包括用棋盘法优化多克隆抗体及包被抗原工作浓度，建立IC-ELISA，绘制出标准曲线；

第二步、优化二抗、包被缓冲液、包被介质工作浓度；

第三步、检验该IC-ELISA方法中其他金属Cu^{2+}、Cd^{2+}、Pb^{2+}、Zn^{2+}、Mg^{2+}、Ca^{2+}、Fe^{2+}、Ni^{2+}的干扰，建立对水样的添加回收实验，实现对酶联免疫吸附的测定。

6. 根据权利要求5所述的重金属汞多克隆抗体的酶联免疫吸附测定方法，其特征是，所述的第一步具体为：将重金属汞多克隆抗体加入到孔底固定有表面半抗原的酶标板孔

中，使待测抗原与固相载体表面半抗原竞争抗体表面的结合位点。

7. 根据权利要求 5 所述的重金属汞多克隆抗体的酶联免疫吸附测定方法，其特征是，所述的第二步具体为：加入酶标记的二抗，二抗与结合在固相载体表面抗原上的抗体反应，也固定在固相载体上，使得底物被酶催化成为有色产物，而产物的量与待测重金属标准溶液的量相关，呈现的颜色通过紫外光一定波长下测定吸光度值，以进行定性或定量分析。

重金属汞多克隆抗体的制备及其酶联免疫吸附测定方法

技术领域

[0001] 本发明涉及的是一种重金属检测技术领域的方法，具体是一种重金属汞多克隆抗体的制备及其酶联免疫吸附测定方法。

背景技术

[0002] 近年来，随着工农业迅速发展，重金属污染日益加剧，造成的环境及食品安全问题也日益突出。重金属主要通过水循环，经由饮用水及农产品等途径，进入人体，威胁人们健康。污染水体的重金属主要包括 Hg、Cd、Cr、Cu、Co、Ni 等，其中 Hg 的毒性最大，因此快速检测重金属汞污染现状，显得尤为重要。目前，重金属的检测分析方法主要有：原子吸收光谱分析（AAS）、电感耦合等离子发射光谱（ICP-AES）、电感耦合等离子质谱分析（ICP-MS）、原子荧光光谱分析（AFS）等。这些检测方法虽然可以精确地测定重金属的含量，但需要对样品做繁琐的预处理步骤，检测过程需在配备大型分析仪器的室内进行，且需要专业的仪器操作员，检测费用也代价高昂，难以快速、简便、费用低廉地检测环境中的重金属汞。

[0003] 经过对现有技术的检索发现，Reardan 等人于 1985 年首次利用螯合剂螯合金属制备单克隆抗体以来，重金属免疫学检测方法受到了国内外的广泛关注，尤其是近些年相关研究越来越多，多种重金属包括 Cd^{2+}、Hg^{2+}、Pb^{2+}、U^{6+}、Cu^{2+}、Zn^{2+} 等螯合剂复合物的抗体均有研究报道，其主要集中于单克隆抗体。

[0004] 进一步检索发现，Huan He 等在 Analytical Letters（42：409-424，2009）上公开了用 EDTA 衍生物螯合镉制备多克隆抗体进行间接酶联免疫吸附的研究。多克隆抗体就特异性而言不如单克隆抗体，但其检测方法也可以达到一定的检测要求。青霉素 G 盐作为双功能螯合剂连接重金属汞及大分子蛋白，藉此作为免疫原制备多克隆抗体，建立 IC-ELISA，未见报道先例。

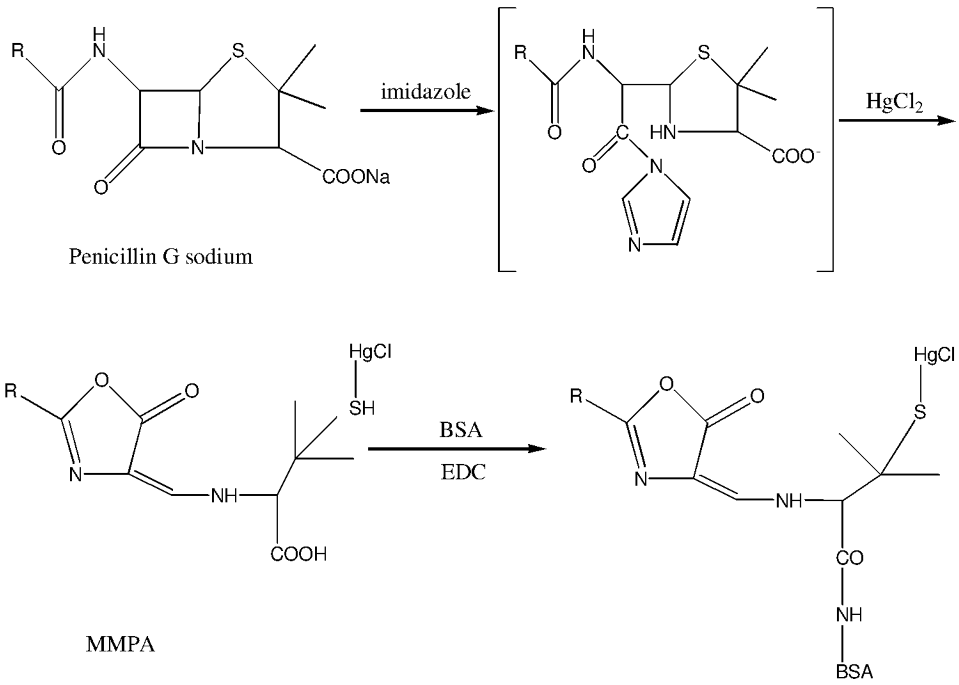
发明内容

[0005] 本发明针对现有技术存在的上述不足，提供一种重金属汞多克隆抗体的制备及其酶联免疫吸附测定方法，针对水样中汞离子的检测限为 14.5μg/L，对汞离子具有很高的特异性，可以运用于重金属污染地区及污染样本的快速检测。

[0006] 本发明是通过以下技术方案实现的：

[0007] 本发明涉及一种重金属汞多克隆抗体的制备方法，通过将双工能螯合剂青霉素 G 钠盐的一端结合重金属汞，另一端与大分子载体蛋白牛血清白蛋白（BSA）、卵清蛋白（OVA）偶联形成汞-螯合剂-蛋白的免疫原 MMPA-BSA 和包被原 MMPA-OVA，最后经对免疫原 MMPA-BSA 进行乳化、免疫后制备多克隆抗体，其反应式如下：

[0008]



[0009]　所述的将双工能螯合剂青霉素 G 钠盐的一端结合重金属汞是指：取青霉素 G 钠盐或钾盐的水溶液中加入咪唑，搅拌溶解后逐滴加入 HCl 并调节 pH 到 6.8，然后加入 $HgCl_2$ 经水浴反应并冷却后产生黄色粉末状沉淀，最后再加入 HCl 并震荡离心处理后弃去上清，得到青霉烯酸硫醇汞盐。

[0010]　所述的与大分子载体蛋白牛血清白蛋白 (BSA)、卵清蛋白 (OVA) 偶联是指：采用碳二亚胺法和载体蛋白牛血清白蛋白 (BSA) 加入青霉烯酸硫醇汞盐，经室温反应并透析后得到免疫原 Hg- 青霉素 -BSA 和包被原 Hg- 青霉素 -OVA。

[0011]　所述的偶联中采用紫外吸收法对完全抗原进行扫描，并且对完全抗原中的蛋白含量和重金属汞的含量进行测定，分别采用考马斯亮蓝法和电感耦合等离子发射光谱法，确定抗原是否合成成功

[0012]　本发明涉及上述重金属汞多克隆抗体的酶联免疫吸附测定方法，包括以下步骤：

[0013]　第一步、酶联免疫吸附测定方法，包括用棋盘法优化多克隆抗体及包被抗原工作浓度，建立 IC-ELISA，绘制出标准曲线，具体为：将重金属汞多克隆抗体加入到孔底固定有表面半抗原的酶标板孔中，使待测抗原与固相载体表面半抗原竞争抗体表面的结合位点。

[0014]　第二步、优化二抗、包被缓冲液、包被介质工作浓度，具体为：加入酶标记的二抗，二抗与结合在固相载体表面抗原上的抗体反应，也固定在固相载体上，使得底物被酶催化成为有色产物，而产物的量与待测重金属标准溶液的量相关，呈现的颜色通过紫外光一定波长下测定吸光度值，以进行定性或定量分析。

[0015]　第三步、检验该 IC-ELISA 方法中其他金属 Cu^{2+}、Cd^{2+}、Pb^{2+}、Zn^{2+}、Mg^{2+}、Ca^{2+}、Fe^{2+}、Ni^{2+} 的干扰，建立对水样的添加回收实验，实现对酶联免疫吸附的测定。

[0016]　本发明在制备重金属汞多克隆抗体的基础上，建立了测定水样中汞离子含量的间接竞争酶联免疫吸附测定方法。本发明的检测限为 14.5μg/L，对汞离子具有很高的特异性，除了与镉的交叉反应率为 7.9％之外，其他金属的均小于 0.001％，添加回收率在 91.4％ -120％之间。本方法可用于水样中的重金属汞的测定，也可以通过结合一定的前处理技术发展为快速检测农产品等其他样品中重金属汞的快速免疫检测技术。

附图说明

[0017] 图 1 为本发明测定方法示意图。

[0018] 图 2 为实施例重金属抑制率示意图。

具体实施方式

[0019] 下面对本发明的实施例作详细说明，本实施例在以本发明技术方案为前提下进行实施，给出了详细的实施方式和具体的操作过程，但本发明的保护范围不限于下述的实施例。

[0020] 实施例 1

[0021] 多克隆抗体的制备

[0022] 步骤 1 ：完全抗原的合成

[0023] 取青霉素 G 钠盐或钾盐 50mg 溶解在 10ml 超纯水中，加入 1g 咪唑，搅拌使其完全溶解，逐滴加入 1M HCl 调 pH 到 6.8 ；加入与青霉素 G 钠盐或钾盐等物质量的 $HgCl_2$，60℃水浴 2 小时，取出室温中冷却，反应产生黄色粉末状沉淀。

[0024] 在所得溶液中加入过量的 1M HCl，边滴边轻轻震荡，溶液中产生大量黄色絮状沉淀，将溶液分装在 4mlEP 管中，10000r/m 离心 5 分钟，弃去上清 ；在 EP 管中加入超纯水洗涤沉淀，振荡 2min，然后 10000r/m 离心 5 分钟，重复洗涤 2 次，得到青霉烯酸硫醇汞盐。

[0025] 采用碳二亚胺法 (Harlow and Lane，1988) 与载体蛋白牛血清白蛋白 (BSA)，反应液在缓慢搅拌下室温反应 24 小时后装入预处理过的透析袋中，PBS 缓冲液透析三次，纯水透析二次，4℃透析 3 天。然后取透析液，即为免疫原 Hg- 青霉素 -BSA，低温保存。相同方法制备包被原 Hg- 青霉素 -OVA。

[0026] 用电感耦合等离子发射光谱测定汞的含量，考马斯亮蓝染色法测定蛋白含量。根据重金属汞与蛋白的摩尔比得出偶联比，MMPA-BSA 与 MMPA-OVA 偶联比分别为 25/1 与 9/1。

[0027] 步骤 2 ：抗体的制备与鉴定

[0028] MMPA-BSA 作为免疫原，共分 5 次免疫，初免采用弗氏完全佐剂与免疫原等体积乳化，28 天后的二免及以后的免疫均用弗氏不完全佐剂作为乳化剂且间隔为 2 周，最后一次免疫之后 8 ～ 10 天，获得多克隆抗体，分装后于 -20℃冻存。

[0029] 通过间接非竞争ELISA法测定抗体效价，以效价高用作后续间接竞争ELISA的建立。

[0030] 效价检测步骤包括 ：

[0031] (1) 以 MMPA-OVA 及青霉素 -OVA 作为包被原包被，100μL/ 孔，4℃过夜，洗涤 3 次，拍干 ；(2) 封闭，200μL/ 孔，37℃ 2h，洗涤 3 次，拍干 ；(3) 加抗体 (稀释成 2000、4000、8000、16000、32000、64000、128000 倍) 100μL/ 孔，37℃ 1h，洗涤 3 次，拍干 ；(4) 加酶标二抗 (2000 倍稀释)，37℃ 1h，洗涤 3 次，拍干 ；(5) 加 TMB 反应液显色，100μL/ 孔，37℃ 10min ；(6) 加 50μL/ 孔 2M 硫酸终止反应 ；(7) 酶标仪测 OD450 值，值若等于或大于阴性的 2.1 倍即为阳性。

[0032] 测试结果显示以青霉素 -OVA 作为包被原的没有阳性反应，可见抗体并非是针对青霉素的 ；经测定效价超过 1 ∶ 128000，可以进行酶联免疫吸附试验。

[0033] 实施例 2

[0034] 酶联免疫吸附测定方法

[0035] 步骤一:效价测定

[0036] 采用棋盘法优化抗原抗体最佳工作浓度:把包被抗原 MMPA-OVA 用碳酸盐缓冲液(pH9.6)稀释到一定浓度(1,1.3,2,2.5,3,4,5,10μg/mL),分别包被在 96 孔酶标板 A ～ H 排,抗体也稀释一定倍数(4000,8000,10000,12000,16000,32000)加入 1 ～ 6 列,其余列作为对照;用间接非竞争 ELISA 的方法测定出 OD_{450} 值,以 0.8 ～ 1.2 的值为最优值,即该值对应的为最佳工作浓度。确定最佳包被原浓度为 MMPA-OVA 2.5μg/mL,最佳抗体稀释度为 1 ∶ 8000。

[0037] 步骤二:IC-ELISA 法测定重金属汞方法建立

[0038] 用间接竞争 ELISA 法建立抗体对重金属汞的检测方法。

[0039] 0.5mM EDTA 与汞标准溶液混合,形成浓度为 0.01,0.05,0.1,0.5,1,5,10mg/mL 的反应液,与等体积抗体溶液先混合过夜为样品进行前抑制。

[0040] 间接竞争 ELISA 法的步骤如下:

[0041] (1)前处理:0.5mM EDTA 与标准溶液(待测样)预混,37℃温浴 1h。

[0042] (2)包被:包被原用 CB 缓冲液 100μL/孔包被 4℃过夜,洗板 3 次。

[0043] (3)封闭:200μL/孔 5%甘氨酸 37℃封闭 1h,洗板 3 次。

[0044] (4)加样:将预混好的样品 50μL/孔加入,用 PBS 稀释抗体到两倍工作浓度,50μL/孔加入,振荡 10min,37℃温浴 2h,洗板 3 次。

[0045] (5)加酶标二抗;1 ∶ 2000 倍稀释的酶标二抗 100μL/孔,37℃温浴 1h,洗板 3 次。

[0046] (6)显色:加 TMB 底物液显色 10min。

[0047] (7)终止反应:50μL/孔 2M 硫酸终止反应,450nm 下读取 OD 值。

[0048] 步骤三:优化条件

[0049] 在 ELISA 试验中,封闭介质的作用是消除非特异性吸附,本方法中比较了各种不同的封闭剂包括 1%明胶,8%脱脂奶粉,5%甘氨酸,2% BSA,2% OVA 对 ELISA 的影响,确定了 5%甘氨酸为封闭介质。

[0050] 本方法还比较了不同的二抗稀释度及不同的包被缓冲液对 ELISA 的影响,确定了最佳稀释比例为 1 ∶ 2000 ～ 8000,碳酸盐缓冲液(CB,pH9.6)为最佳包被缓冲液。

[0051] 步骤四:方法评价与应用

[0052] 根据 IC-ELISA 测定的 OD_{450} 值,以未添加汞标准溶液的 OD 值为 B_0,添加了标准溶液的 OD 值为 B_1,按公式 $(B_0-B_1)/B_0 \times 100\%$ 计算抑制率;以抑制物(汞标准溶液)对数值为横坐标,抑制率为纵坐标绘制得标准曲线,见图 1,用直线拟合后得回归方程 $Y = 0.17886X-0.10732$,相关系数为 0.988,以抑制率为 10%的待测样品汞含量(IC_{10})作为检测限,为 0.0145μg/mL。

[0053] 按本例步骤二,用其他金属 Cu^{2+}、Cd^{2+}、Pb^{2+}、Zn^{2+}、Mg^{2+}、Ca^{2+}、Fe^{2+}、Ni^{2+} 的标准溶液代替汞的标准溶液检验交叉反应率,交叉反应率公式如下 $CR = IC_{50}$(汞)/IC_{50}(其他金属)×100%。结果验证抗体对于汞具有很高的特异性,除了重金属镉有 7.9%的交叉反应率外,其他的供试金属交叉反应率都小于 0.001%。

[0054] 通过对纯水中按 5,0.5,0.05μg/mL 三种不同浓度添加汞离子,按步骤二进行试验,检验添加回收率,得添加回收率在 91.40%～ 120%之间。

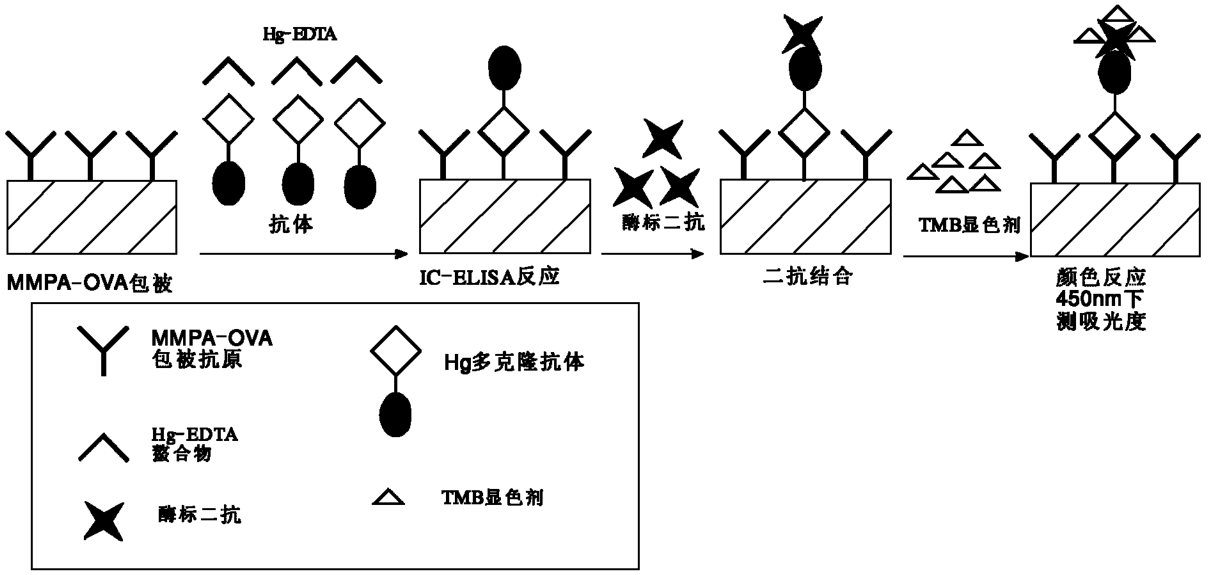

Hg-EDTA
抗体
MMPA-OVA包被
IC-ELISA反应
酶标二抗
二抗结合
TMB显色剂
颜色反应
450nm下
测吸光度
MMPA-OVA
包被抗原
Hg多克隆抗体
Hg-EDTA
螯合物
酶标二抗
TMB显色剂

图 1

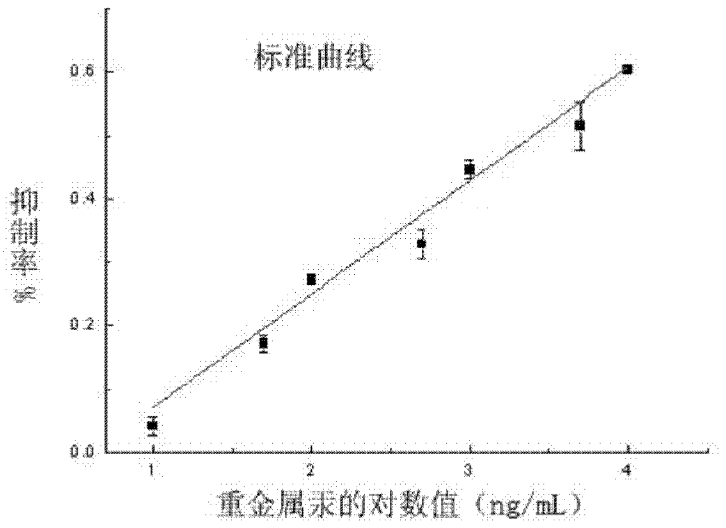
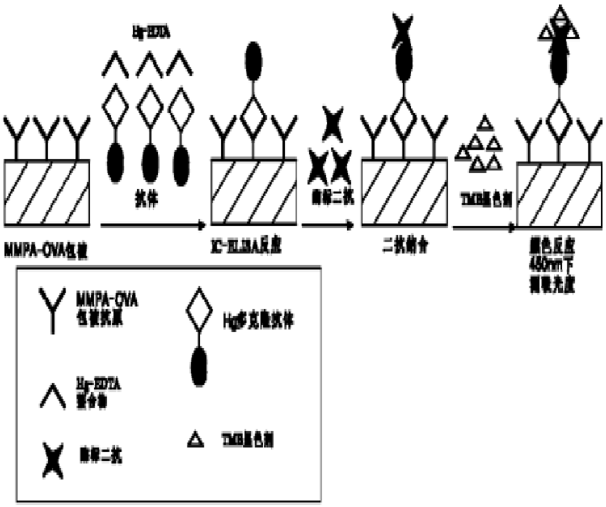

标准曲线
抑制率%
0.0
0.2
0.4
0.6
1
2
3
4
重金属汞的对数值（ng/mL）

图 2

专利名称(译)	重金属汞多克隆抗体的制备及其酶联免疫吸附测定方法		
公开(公告)号	CN101885775A	公开(公告)日	2010-11-17
申请号	CN201010229009.1	申请日	2010-07-16
[标]申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
当前申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
[标]发明人	周培 奚涛 邢海波 曹成喜		
发明人	周培 奚涛 邢海波 曹成喜		
IPC分类号	C07K16/44 G01N33/53 G01N33/543		
代理人(译)	王锡麟 王桂忠		
其他公开文献	CN101885775B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种重金属检测技术领域的重金属汞多克隆抗体的制备及其酶联免疫吸附测定方法。通过将双工能螯合剂青霉素G钠盐的一端结合重金属汞，另一端与大分子载体蛋白牛血清白蛋白、卵清蛋白偶联形成汞-螯合剂-蛋白的免疫原MMPA-BSA和包被原MMPA-OVA，最后经对免疫原MMPA-BSA进行乳化、免疫后制备多克隆抗体用于酶联免疫吸附测定，本发明制备得到的抗体对汞离子具有很高的特异性，除了与镉的交叉反应率为7.9%之外，其他金属的均小于0.001%，添加回收率在91.4%-120%之间，可用于水样中的重金属汞的测定，也可以通过结合一定的前处理技术发展为快速检测农产品等其他样品中重金属汞的快速免疫检测技术。