

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C07K 16/18 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810019780.9

[43] 公开日 2008年8月13日

[11] 公开号 CN 101240023A

[22] 申请日 2008.3.14

[21] 申请号 200810019780.9

[71] 申请人 南京大学

地址 210093 江苏省南京市汉口路22号

[72] 发明人 孙成 何欢 杨绍贵 刘贤进
刘振宇 张川 陈成

[74] 专利代理机构 南京知识律师事务所
代理人 汪旭东

权利要求书1页 说明书8页

[54] 发明名称

重金属镉多克隆抗体的制备及酶联免疫吸附测定方法

[57] 摘要

本发明公开了重金属镉多克隆抗体的制备及酶联免疫吸附测定方法。其中重金属镉多克隆抗体的制备方法，步骤包括(A)完全抗原的合成，完全抗原的合成是多克隆抗体制备的关键；(B)抗体的制备。酶联免疫吸附测定方法步骤包括：(1)采用方阵滴定法确定包被原 Cd - ITCBE - OVA 与抗体最佳反应浓度，以最佳浓度的包被原 Cd - ITCBE - OVA 包被 96 孔酶标板；(2)间接竞争酶联免疫吸附测定试验；(3)考察各种条件对 CI - ELISA 的影响，优化反应条件；(4)在已优化的反应条件下，建立 CI - ELISA，绘制标准抑制曲线。本发明的检测限为 $0.04 \mu\text{g/L}$ ，线性范围为 $10^{-1} \sim 10^3 \mu\text{g/L}$ ，对镉具有特异性，适合环境水样中痕量镉的测定。同时为重金属污染突发事件的现场快速检测提供技术支持，便于及时对污染事故进行补救和恢复工作。

1. 一种重金属镉多克隆抗体的制备方法，其包括以下步骤：
 - (A) 抗原的合成，以 1-(4-异硫氰基苯甲基)-乙二胺四乙酸作为双功能螯合剂，采用异硫氰酯法和重金属镉与载体蛋白偶联，获得完全抗原，包括免疫原 Cd-ITCBE-BSA 和包被原 Cd-ITCBE-OVA；
 - (B) 抗体的制备与鉴定，以免疫原 Cd-ITCBE-BSA，选取三只 1.5-2.0kg 的纯种雄性新西兰大白兔作为试验动物，试验前一周采集阴性血清，常规免疫方法对大白兔进行免疫，免疫 3 个月后心脏采血，制备血清，用间接非竞争 ELISA 法测定抗体效价，间接竞争 ELISA 法鉴定其对金属镉的特异性，血清添加浓度为 0.01% 的硫柳汞，分装后于 -20℃ 冻存，即得到重金属镉的多克隆抗体。
2. 根据权利要求 1 所述的重金属镉多克隆抗体的制备方法，其特征在于所述的步骤 (A) 抗原的合成中采用紫外吸收法对完全抗原进行全波扫描，以确定抗原是否合成功。
3. 根据权利要求 1 所述的重金属镉多克隆抗体的制备方法，其特征在于所述的步骤 (A) 抗原的合成中分别采用考马斯靛蓝法和火焰原子吸收分光光度法对完全抗原中蛋白含量与重金属镉的含量进行测定。
4. 一种酶联免疫吸附测定方法，其步骤包括：
 - (1) 采用方阵滴定法确定包被原 Cd-ITCBE-OVA 与抗体的最佳反应浓度，以最佳浓度的包被原 Cd-ITCBE-OVA 包被 96 孔酶标板；
 - (2) 用含 EDTA 的 PBS 溶液配制镉标准溶液，与等体积的 1/2 最佳工作浓度的抗体混合，作为反应液加入酶标板中进行间接竞争酶联免疫吸附测定试验；
 - (3) 考察螯合剂 EDTA 及其浓度、盐离子强度、pH 值、封闭液、预混时间对 CI-ELISA 的影响，优化反应条件；
 - (4) 在已优化的反应条件下，建立 CI-ELISA，绘制标准抑制曲线。
5. 根据权利要求 4 所述的酶联免疫吸附测定方法，其特征在于在抗原抗体反应体系中螯合剂 EDTA 浓度为 1.0mM，离子强度为 0.15M NaCl，基质及待测液 pH 值为 7.4，以 1% 明胶为封闭液、抗体与标液的预混时间为 1 小时的最佳反应条件下进行，获得竞争抑制标准曲线。

重金属镉多克隆抗体的制备及酶联免疫吸附测定方法

技术领域

本发明涉及重金属镉多克隆抗体的制备以及基于抗体的酶联免疫吸附测定方法（ELISA）。

背景技术

由重金属造成的污染称为重金属污染，目前对环境污染最严重的重金属为铅、镉、汞、铬和砷，简称为“五毒”。重金属进入人体后，不易排泄，逐渐蓄积，当超过人体的生理负荷时，就会引起生理功能改变，导致急、慢性疾病或产生远期危害。近年来随着我国经济的迅猛发展，越来越多的环境突发事件频繁发生，其中主要的一类污染物即为重金属污染物，尤其是食物中毒、饮水中毒、水体突发污染事故等。因此，建立快速便捷的重金属检测方法，对重金属污染进行长期监测，对控制污染，保护环境和人类生命安全与健康具有十分重要的意义。

当前，国际上对重金属检测的发展方向是灵敏、准确、实时、快速、选择性好和适用范围广等。而传统的重金属检测技术大多需要大型或专门仪器（原子吸收光谱法、原子发射光谱法等）才能完成，且前处理过程复杂，耗时较多，分析工作只能在室内进行，难以满足高通量快速和在线检测的需要。免疫学检测方法是利用抗原与抗体的特异性结合作用来选择性识别和测定可以作为抗体或抗原的待测物。它是免疫学长期发展的一个重要分支，具有检测速度快、费用低廉、仪器简单易携、灵敏度高和选择性强等优点。已广泛应用于临床医学、生命科学以及环境中有机有毒物质的检测。同时，也为重金属的检测提供了新的思路，对传统的重金属检测方法进行了有效的补充。

自从1985年Reardan等人在Nature上发表文章，首次通过金属-螯合剂制备单克隆抗体以来，国外对于重金属免疫学检测方法的研究越来越多，至目前为止， Cd^{2+} 、 Co^{2+} 、 U^{6+} 、 Pb^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Zn^{2+} 和 In^{3+} 金属-螯合剂复合物抗体被研制出来，并建立了相应的酶联免疫检测方法。专利CN1769893公开了一种重金属 Pb^{2+} 完全抗原的制备方法，朱晓霞等制备了镉，铅的单克隆抗体，并建立了相应的酶联免疫检测方法。上述方法均是基于重金属单克隆抗体进行的研究。目前，

对重金属免疫检测的研究大多集中在单克隆抗体及相应酶联免疫检测方法方面，对多克隆抗体研究相对较少。单克隆抗体的制备相对多克隆抗体而言制备成本高，周期更长，风险大。虽然在特异性方面较多克隆抗体稍高，但就建立的检测方法来说，多克隆抗体亦能达到检测的要求，且方法的检测限与灵敏度与基于单克隆抗体的检测方法接近。

文献检索表明，国外只有David K. Johnson在1999年以四乙二胺五乙酸酸酐为螯合剂制备了镉多克隆抗体，采用荧光偏振免疫法对镉进行检测（Johnson, D.K., A fluorescence polarization immunoassay for cadmium(II). *Analytica Chimica Acta*, 1999. 399: p. 161-172）。

发明内容

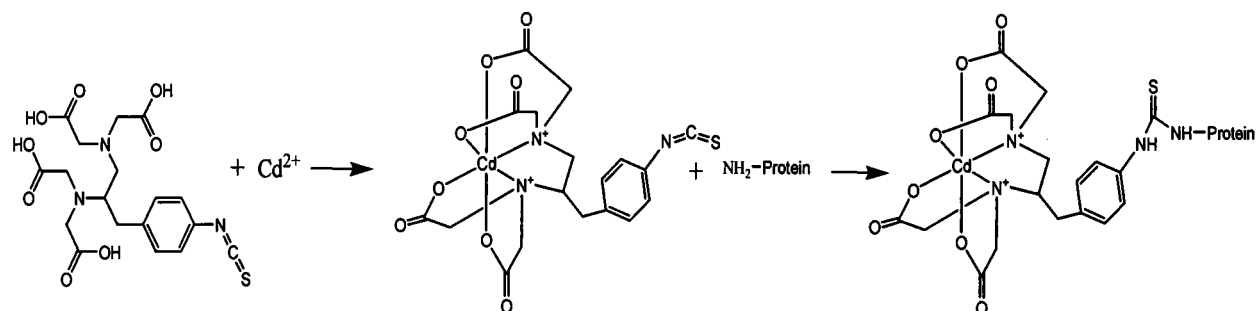
1. 发明要解决的技术问题：

针对现有的重金属镉免疫学检测方法存在的问题，本发明提供了重金属镉多克隆抗体的制备及酶联免疫吸附测定方法，制备一种重金属镉的多克隆抗体，并通过抗体抗原反应，建立一种用于重金属镉检测的酶联免疫吸附测定方法，用于环境水样的快速检测。

2. 技术方案：

本发明的原理：制备重金属镉的多克隆抗体，并建立了一种间接竞争酶联免疫吸附测定方法（CI-ELISA）。重金属的免疫学检测方法的关键在于抗重金属抗体的制备，包括多克隆抗体和单克隆抗体，而抗体制备的关键又在于重金属免疫原的制备。重金属镉多克隆抗体制备与间接竞争酶联免疫吸附测定方法的基本原理是：通过选择性双功能螯合剂的一端与重金属螯合生成重金属-螯合剂复合物，作为半抗原，半抗原再通过螯合剂的另一端与载体蛋白如牛血清白蛋白（BSA）、卵清白蛋白（OVA）等偶联后形成重金属-螯合剂-蛋白完全抗原（免疫原和包被原）。以免疫原免疫新西兰大白兔，获得多克隆抗体。CI-ELISA的基础是抗原的固相化及抗体的酶标记。结合在固相载体表面的抗原仍保持其免疫学活性，酶标记的抗体既保留其免疫学活性，又保留酶的活性。在测定时，可溶性抗原包被酶标板，加入系列浓度的待测物的标准溶液与抗体等体积混合孵育后的混合溶液，混合溶液中的待测抗原与固相载体表面的抗原竞争抗体表面的结合位点。再加入

酶标记的抗体，也通过反应而结合在固相载体上。此时固相上的酶量与混合溶液中待测物标准溶液的量呈一定的比例。加入酶反应的底物后，底物被酶催化成为有色产物，产物的量与混合溶液中待测物标准溶液的量直接相关，故可根据呈色的深浅进行定性或定量分析。抗原制备反应方程式为：



本发明的具体技术方案如下：

重金属镉多克隆抗体的制备方法，其步骤包括

(A) 完全抗原的合成，完全抗原的合成是多克隆抗体制备的关键，以 1-(4-异硫氰基苯甲基)-乙二胺四乙酸 (ITCBE) 作为双功能螯合剂，采用异硫氰酯法和重金属与载体蛋白偶联，获得完全抗原，包括免疫原 Cd-ITCBE-BSA 和包被原 Cd-ITCBE-OVA；

(B) 抗体的制备，以免疫原 Cd-ITCBE-BSA，选取三只 1.5-2.0kg 的纯种雄性新西兰大白兔作为试验动物，试验前一周采集阴性血清，常规免疫方法对大白兔进行免疫，免疫约 3 个月后心脏采血，制备血清，用间接非竞争 ELISA 法测定抗体效价，间接竞争 ELISA 法鉴定其对金属镉的特异性，血清添加终浓度为 0.01% 的硫柳汞，分装后于 -20℃ 冻存，即得到重金属镉的多克隆抗体。

步骤 (A) 中采用紫外吸收法对完全抗原进行全波扫描，以确定抗原是否合成功。对完全抗原中蛋白含量与重金属镉的含量进行测定，分别采用考马斯靛蓝法和火焰原子吸收分光光度法。

酶联免疫吸附测定方法，其步骤包括：

(1) 采用方阵滴定法确定包被原 Cd-ITCBE-OVA 与抗体最佳反应浓度，以最佳浓度的包被原 Cd-ITCBE-OVA 包被 96 孔酶标板；

(2) 用含 EDTA 的 PBS 溶液配制镉标准溶液，与等体积的 1/2 最佳工作浓度的抗体混合，作为反应液加入酶标板中进行间接竞争酶联免疫吸附测定试验；

(3) 考察螯合剂 EDTA 及其浓度、盐离子强度、pH 值、封闭液和预混时

间对 CI-ELISA 的影响, 优化反应条件;

(4) 在已优化的反应条件下, 建立 CI-ELISA, 绘制标准抑制曲线。

对方法的检测限, 检测范围, 精密度和准确度、与其他金属如 Pb^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Hg^{2+} 和 Fe^{3+} 的交叉反应率等进行分析; 以建立的方法对自来水、长江水进行加标回收实验。

3. 有益效果:

本发明提供了重金属镉多克隆抗体的制备及酶联免疫吸附测定方法, 在制备了重金属镉多克隆抗体的基础上, 建立了测定环境水样中镉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 $0.04\mu\text{g/L}$, 线性范围为 $10^{-1}\sim 10^3\mu\text{g/L}$, 对镉具有特异性, 与 Pb^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cr^{3+} 、和 Fe^{3+} 的交叉反应率低于 1%, 与 Hg^{2+} 交叉反应率为 7.4%; 加标回收率在 85.5%~116.3%之间。本方法适合环境水样中痕量镉的测定。同时为重金属污染突发事件的现场快速检测提供技术支持, 便于及时对污染事故进行补救和恢复工作, 且可以发展成为环境中其他样品和农产品食品安全检测的重要检测手段, 具有重大的现实意义。

具体实施方式

以下通过实例进一步说明本发明。

实施例 1

抗体的制备

步骤 1: 完全抗原的合成

称取 10mg ITCBE 溶于 10mL pH 9.5 的磷酸钠缓冲溶液中形成 2.275 mM 的金属螯合剂溶液。称取 40 mg BSA 蛋白溶于 pH 7.4 PBS (137mM NaCl, 3mM KCl, 8mM Na_2HPO_4 , 1mM KH_2PO_4) 缓冲溶液中形成 40 mg/mL 的蛋白溶液。镉 (99.999%) 溶于热的硝酸中, 稀释成 4.7 mM 的使用液。

取 2.5 mL ITCBE 与 1.5 mL 4.7mM 镉使用液反应, 得到 Cd-ITCBE 复合物。复合物逐滴滴加至 1 mL 40 mg/mL BSA 蛋白溶液中。反应液在缓慢搅拌下室温反应 24 小时后装入 EDTA 预处理过的透析袋中, PBS 缓冲液透析三次, 纯水透析二次, 4℃下透析三天, 以去除未反应的 Cd, ITCBE 以及 Cd-ITCBE 复合物。

准确量取透析液，透析液即为免疫原 Cd-ITCBE-BSA，低温下保存。相同方法制备包被原 Cd-ITCBE-OVA。

紫外分光光度计检测结合物中蛋白的含量。原子吸收法测定其中镉含量。紫外分光光度计扫描透析液，对偶联物进行分析鉴定。结果表明成功合成了完全抗原。

紫外分光光度计检测结合物中蛋白的含量。取 0.5 mL 抗原于比色管中，加入 3.5 mL 的蒸馏水。采用标准曲线法进行测定。样品的。原子吸收光度法测抗原中 Cd 离子含量。免疫原 Cd-ITCBE-BSA 中蛋白浓度为 7.024 mg/mL，镉浓度为 62.49 ppm；包被原 Cd-ITCBE-OVA 中蛋白浓度为 5.27 mg/mL，镉浓度为 8.866 ppm。

步骤 2：抗体的制备与鉴定

Cd-ITCBE-BSA 作为免疫原，选取三只 1.5-2.0 kg 的纯种雄性新西兰大白兔作为试验动物，试验前一周采集阴性血清。具体免疫程序如下：首免采用每只 1 mg 免疫原与等体积弗氏完全佐剂混和，乳化成油包水结构后进行背部皮下多点注射（20 点左右）。三周后用同样剂量的免疫原与等体积不完全弗氏佐剂进行加强。此后每隔两周加强一次，加强后一周耳缘静脉采血测效价。最后一次用等体积的生理盐水稀释免疫原，直接耳缘静脉注射。8 天后心脏采血，制备血清，添加重量百分比浓度为 0.01 % 的硫柳汞，分装后于 -20 °C 冻存。

通过间接 ELISA(I-ELISA)法测抗体效价,以此确定是否有针对金属离子的抗体生成。比较三只大白兔的效价，最后选择抗体效价较高的白兔血清用于建立 CI-ELISA 检测方法。

间接非竞争 ELISA(I-ELISA)法操作步骤：

(1) 包被，100 μ L /孔，4 °C 过夜，洗涤 3 次，拍干；(2) 封闭，200 μ L /孔，37 °C 孵育 1 h，洗涤 3 次，拍干；(3) 加入抗血清（分别稀释成 4000、8000、12000、20000、30000、40000 倍）100 μ L /孔，37 °C 孵育 2h，洗涤 3 次，拍干；(4) 加入羊抗兔酶标二抗(1: 10000 稀释)37 °C 孵育 1h，洗涤 3 次，拍干；(5) 加显色液 37 °C 作用 15 min。(6) 50 μ L /孔浓度为 2M 的硫酸溶液终止显色反应；(7) 酶标仪测 OD450 值，以空白对照调零，以阴性血清作为对照，以待测孔 OD450 值大于或等于阴性孔的 2.1 倍定为阳性。

经测定后，抗体效价达到了 $1:128 \times 10^4$ ，能进行酶联免疫吸附测定实验。

实施例 2:

酶联免疫吸附测定方法

步骤一：效价的测定

采用方阵滴定法来确定抗原抗体最佳工作浓度：包被抗原（Cd-ITCBE-OVA）系列稀释为 1500 倍、2500 倍、5000 倍、10000 倍包被酶标板的 AB, CD, EF, GH 行；用 1%OVA 作为封闭液；抗血清分别稀释为 20000 倍、40000 倍、80000 倍、160000、320000 倍和 640000 倍，加入酶标板的 1 2, 3 4, 5 6, 7 8, 9 10, 11 12 列；加羊抗兔-辣根过氧化物酶酶标二抗（1: 10000, 1%OVA 稀释）；TMB 显色，2M 硫酸终止，测 OD450 值。以 OD450 值为 0.8~1.2 的抗原抗体浓度作为最佳工作浓度。最后确定最佳包被原 Cd-ITCBE-OVA 与抗体浓度分别为 1.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $1:30 \times 10^4$ 。

步骤二：ELISA 方法的建立

在包被原与抗体的最佳工作浓度条件下，用间接竞争 ELISA 法（CI-ELISA）建立抗体对重金属镉的检测方法。用 1.0mMEDTA 的 PBS 溶液配制浓度为 0.00, 0.10, 1.00, 10.00, 100.00, 1000.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的镉标准溶液，与抗体混合过夜进行前抑制。绘制标准抑制曲线，并计算敏感度（IC50）及最低检测限（IC20）。

间接竞争 ELISA 法的步骤如下：

（1）抗体与标样（待测样）预混：用 PBS 稀释抗体到两倍工作浓度（如工作浓度 1:10000，应稀释为 1:5000）后与等体积标样（待测样品）室温预混。

（2）包被：CBS 包被缓冲液将包被原稀释到工作浓度，分别加入 96 孔酶标板的 AB、CD、EF、GH 八行，100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ ，4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。

（3）封闭：每孔加封闭液 200 μL ，37 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 1h。

（4）加样品：将预混液体加入酶标板，100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ ，于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 2h。

（5）加酶标二抗：用封闭液将酶标二抗稀释到工作浓度，100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入酶标板，37 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 1h。

（以上每一步结束都用洗涤液洗 3 次）

（6）显色：底物溶液 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加到酶标板，显色 15min。

(7) 终止反应：50 μ L/孔 2M H₂SO₄ 快速加到酶标板，450nm 下读取吸光值。

步骤三：条件优化

改变金属标液稀释缓冲液中 EDTA 浓度，使反应体系中 EDTA 浓度分别为 0.1mM, 0.5mM, 1.0mM, 5.0mM, 20mM, 20.0mM, 50.0mM, 比较不同 EDTA 浓度对阳性血清的抑制作用。

竞争 ELISA 反应中，在抗原抗体最佳工作浓度的条件下，改变基质中盐离子强度，使反应体系中 NaCl 的浓度依次为 0M、0.05M、0.15M、0.5M、1.0M 比较不同离子强度对 ELISA 检测曲线的影响。

封闭液的作用是消除非特异性吸附。竞争 ELISA 反应中，在抗原抗体最佳工作浓度及最适盐离子强度的条件下，本发明分别采用了 1%明胶、1%OVA、及 3%脱脂奶粉作为封闭液（200 μ L/孔），比较其对检测曲线的影响。

竞争 ELISA 反应中，在抗原抗体最佳工作浓度、最适盐离子强度及最佳封闭物封闭的条件下，通过改变反应基质中的 pH 值来反映对竞争 ELISA 结果的影响。反应体系中 pH 值分别取 5.7、6.5、7.4、8.5，比较不同 pH 值对 ELISA 检测曲线的影响。

在间接竞争 ELISA 反应中，设定金属标液与阳性血清的预混时间为室温过夜和室温 1 小时，比较其对抑制曲线的影响。

步骤四：方法评价

通过对间接竞争 ELISA 方法最佳条件的确定，本发明以 1: 5000（蛋白浓度为 1.05 μ g/mL）的包被原包被 96 孔酶标板，以 1%明胶作为封闭液。抗体浓度为 1: 300000。抗原抗体反应体系中螯合剂 EDTA 浓度选择为 1.0mM，pH 值为 7.4，离子强度为 0.15M NaCl。抗体与标液的预混时间为 1 小时。作为最佳反应条件。在最佳工作条件下，得到了抑制曲线，抑制中浓度 IC₅₀ 为 33.0ppb，IC₂₀ 为 2.7ppb，R² 为 0.9976。以 Logit (B/B₀) 为纵坐标 (Y)，以 Cd²⁺浓度 (ppb) 的负对数值为横坐标 (X)，做标准曲线。Cd²⁺在 0.1ppb-1000ppb 范围内，Logit (B/B₀) 与 Cd²⁺浓度 (ppb) 的对数值呈显著的线性关系，得到回归方程 $Y = 0.6834X + 0.4107$ ，相关系数达 0.998。

在以上最佳反应条件下，进行方法特异性实验。配制其他金属如 Pb²⁺、Ni²⁺、

Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Hg^{2+} 和 Fe^{3+} 的标准溶液，实验操作同步骤二。与 Pb^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Fe^{3+} 的交叉反应率低于 1%，与 Hg^{2+} 交叉反应率为 7.4%。抗体对金属镉具有很有特异性。

取自来水和长江水进行加标回收率实验，根据步骤三中确定的最佳条件下进行试验，操作过程同步骤二。自来水和长江水的加标回收率分别为 103.5%~116.3%和 85.5%~112.5%。

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 重金属镉多克隆抗体的制备及酶联免疫吸附测定方法 | | |
| 公开(公告)号 | CN101240023A | 公开(公告)日 | 2008-08-13 |
| 申请号 | CN200810019780.9 | 申请日 | 2008-03-14 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 南京大学 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 南京大学 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 南京大学 | | |
| [标]发明人 | 孙成 何欢 杨绍贵 刘贤进 刘振宇 张川 陈成 | | |
| 发明人 | 孙成 何欢 杨绍贵 刘贤进 刘振宇 张川 陈成 | | |
| IPC分类号 | C07K16/18 G01N33/53 | | |
| 代理人(译) | 汪旭东 | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明公开了重金属镉多克隆抗体的制备及酶联免疫吸附测定方法。其中重金属镉多克隆抗体的制备方法，步骤包括(A)完全抗原的合成，完全抗原的合成是多克隆抗体制备的关键；(B)抗体的制备。酶联免疫吸附测定方法步骤包括：(1)采用方阵滴定法确定包被原Cd - ITCBE - OVA与抗体最佳反应浓度，以最佳浓度的包被原Cd - ITCBE - OVA包被96孔酶标板；(2)间接竞争酶联免疫吸附测定试验；(3)考察各种条件对CI - ELISA的影响，优化反应条件；(4)在已优化的反应条件下，建立CI - ELISA，绘制标准抑制曲线。本发明的检测限为0.04μg/L，线性范围为10 - 1 ~ 103μg/L，对镉具有特异性，适合环境水样中痕量镉的测定。同时为重金属污染突发事件的现场快速检测提供技术支持，便于及时对污染事故进行补救和恢复工作。

