

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103472230 A

(43) 申请公布日 2013. 12. 25

(21) 申请号 201310449020. 2

(22) 申请日 2013. 09. 28

(71) 申请人 河南科技学院

地址 453003 河南省新乡市华兰大道东段

(72) 发明人 王自良 王爱萍 葛亚明 范国英

张海棠 张慧辉

(74) 专利代理机构 郑州市华翔专利代理事务所

(普通合伙) 41122

代理人 张爱军

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

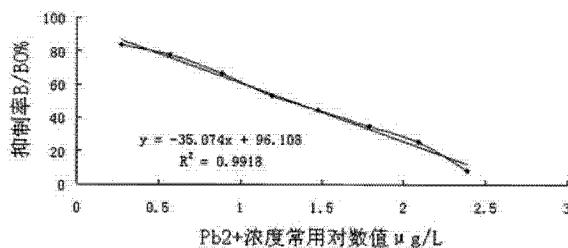
权利要求书3页 说明书8页 附图1页

(54) 发明名称

检测铅离子的间接竞争酶联免疫试剂盒及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种用于检测铅离子的间接竞争酶联免疫试剂盒及其制备方法, 盒体内设有用铅离子包被抗原包被的酶标板、铅离子单克隆抗体、酶标二抗、底物显色液、终止液、铅离子标准溶液、洗液浓缩液和样品处理液。本发明的铅离子间接竞争酶联免疫试剂盒, 能痕量检测铅离子, 可用于环境、土壤、水、食品和器物中的铅离子污染残留的检测, 具有快速、简便、敏感、特异、经济等特性, 检测步骤少, 节省检测时间, 降低操作误差; 时效性强, 可进行现场检测; 既可用于大批样品筛检, 又可用于小批样品的快速检测, 为食品进出口检验、食品检验、环境污染监测评价等提供有效手段。



1. 一种检测铅离子的间接竞争酶联免疫试剂盒,包括盒体,其特征在于:盒体内设有用铅离子包被抗原包被过的酶标板、铅离子的单克隆抗体、酶标二抗、底物显色液、终止液、铅离子标准溶液、洗液浓缩液和样品处理液。

2. 根据权利要求1所述的间接竞争酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述酶标二抗为羊抗鼠酶标二抗 GaMIgG-HRP 或兔抗鼠酶标二抗 RaMIgG-HRP,浓度均为 100 ng/mL;所述底物显色液由显色剂 A 和显色剂 B 组成,显色剂 A 为过氧化脲,显色剂 B 为四甲基联苯胺;所述终止液为 2 mol/L 的硫酸溶液;所述铅离子标准溶液为铅离子溶解于 0.01 mol/L、pH7.4 的磷酸盐缓冲液得到的系列浓度溶液;所述洗液浓缩液为 0.1 mol/L、pH7.4 的磷酸盐缓冲液,其中含 0.05% 的 Tween-20;所述样品处理液为 0.1 mol/L 的乙二胺四乙酸溶液;用于制备所述酶标板的固相材料为聚苯乙烯、聚乙烯或聚丙烯。

3. 根据权利要求1或2所述的间接竞争酶联免疫试剂盒,其特征是:所述的铅离子包被抗原是由以下方法制备的:

(1) 称取 20 mg 卵清蛋白 OVA 溶于 1 mL 浓度为 0.01 mol/L、pH 值为 9.0 的 HEPES 缓冲液中,形成载体蛋白溶液;

(2) 称取 10mg 异硫氰酸苄基乙二胺四乙酸螯合剂溶于 1mL 二甲基亚砷中形成金属螯合剂溶液;

(3) 将 0.5mL 金属螯合剂溶液逐滴加到载体蛋白溶液中,混匀后加入 100uL、1.5mol/L 的三正丁胺,摇床室温反应 24h,制成 OVA-ITCBE 溶液;

(4) 取 11.25mg 硝酸铅溶于 100uL 蒸馏水中,形成均匀的 Pb^{2+} 溶液;将 Pb^{2+} 溶液加入到 OVA-ITCBE 溶液中,调节 pH 值至 7.4,在室温下摇床孵育 4h,然后移入透析袋中用 PBS 透析 10d,即形成 Pb^{2+} -ITCBE-OVA 包被抗原,收集分装, - 20°C 冻存。

4. 根据权利要求3所述的间接竞争酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述酶标板按如下方法包被:包被抗原为 Pb^{2+} -ITCBE-OVA,包被浓度为 2 μ g/mL,包被溶液为 0.05 mol/L、pH 为 9.6 的碳酸盐缓冲液,包被剂量为 100 μ L/孔,37 °C 温育 2 h 或室温 8 h,用洗液浓缩液 PBST 洗涤 3 次,然后用 5% 的猪血清封闭,每孔 250 μ L,37 °C 温育 1 h,再用 PBST 洗涤 3 次。

5. 根据权利要求1-4 任一项所述的间接竞争酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述的铅离子单克隆抗体按以下方法制备:

(1) 人工免疫抗原合成:称取 20mg 牛血清白蛋白溶于 1mL、浓度为 10mmol/L、pH 为 9.0 的 HEPES 缓冲液中,形成 BSA 载体蛋白溶液;

称取 10mg ITCBE 溶于 1mL 二甲基亚砷中形成金属螯合剂溶液;将 0.5mL 金属螯合剂溶液逐滴加到 BSA 载体蛋白溶液中,混匀后,加入 100uL、1.5mol/L 的三正丁胺,摇床室温反应 24h,制成 BSA-ITCBE 溶液;取 11.25mg 硝酸铅溶于 100uL 蒸馏水中,形成均匀的 Pb^{2+} 溶液;将 Pb^{2+} 溶液加入到 BSA-ITCBE 溶液中,调节 pH 值至 7.4,在室温下摇床孵育 4h,然后移入透析袋中用 PBS 透析 10d,即形成免疫抗原 Pb^{2+} -ITCBE-BSA,收集分装, - 20°C 冻存;

(2) 免疫动物:以 Pb^{2+} -ITCBE-BSA 为免疫抗原,以 6 周龄雌性 Balb/c 小鼠作为免疫动物,背部皮下分点注射,免疫剂量为每只每次蛋白质含量 50 μ g、体积 0.2mL,首免用弗氏完全佐剂,加强免疫用弗氏不完全佐剂,首免后 3 周进行第二次免疫,以后间隔 2 周免疫一次,共免疫 5 次;

(3)选择细胞融合备用小鼠:间接 ELISA 检测抗血清中 Pb^{2+} -EDTA 螯合物的多克隆抗体效价,阻断 ELISA 法检测 Pb^{2+} -EDTA 对 Pb^{2+} -ITCBE-BSA 的半数抑制浓度 IC_{50} ,挑选效价最高、 IC_{50} 最低的小鼠,超免用于细胞融合;

(4)制备阳性杂交瘤细胞:取 NS0 骨髓瘤细胞与免疫小鼠脾细胞用 PEG 进行细胞融合,用间接 ELISA 法和阻断 ELISA 法进行阳性杂交瘤细胞株的筛选,对筛选的细胞进行 3 次有限稀释克隆化;分别于冻存 15d、30d 和 60d 后复苏杂交瘤细胞,培养后取上清液,间接 ELISA 测定抗体效价,考察杂交瘤细胞分泌单克隆抗体的稳定性,获得杂交瘤细胞株;

(5)制备单克隆抗体:采用体内诱生腹水法制备抗 Pb^{2+} -EDTA 单克隆抗体,取 8 周龄健康 Ba1b/c 雌性小鼠,腹腔注射弗氏不完全佐剂 0.5mL/只,10~15 天后使用;将培养的阳性杂交瘤细胞 1000r/min 离心 10min 弃上清,收集细胞沉淀;用灭菌的 PBS 将细胞沉淀悬浮、混匀,将细胞数调至 10^6 /mL,腹腔注射 0.5mL/只,接种细胞 7-10 天后产生腹水,进行收集腹水,于 37°C 水浴 30min,4°C 放置过夜,12000r/min 离心 5min,弃去上层脂肪、FIA 和下层沉淀物,用饱和硫酸铵盐析法进行纯化,测定 IgG 含量和效价,-20°C 保存备用。

6. 一种权利要求 1-3 任一项检测铅离子的间接竞争酶联免疫试剂盒的组建方法,其特征在于:所述试剂盒包括 Pb^{2+} -ITCBE-OVA 包被并用 5% 的猪血清封闭的酶标板;C1 号液:工作浓度为 1:10000 的铅离子单克隆抗体;C2 号液:工作浓度为 1:1000 的羊抗鼠酶标二抗 GaMIgG-HRP 或兔抗鼠酶标二抗 RaMIgG-HRP,其中酶为辣根过氧化物酶;C3 号液:显色剂 A,为过氧化脲;C4 号液:显色剂 B,为四甲基联苯胺;C5 号液:终止液,为 2mol/L 的硫酸溶液;铅离子标准溶液:用 2% 的硝酸稀释得到的硝酸铅系列浓度溶液;洗液浓缩液:PBST,为 0.1mol/L、pH7.4 的磷酸盐缓冲液,其中含 0.05% 的 Tween-20;样品处理液为 0.1 mol/L 的 EDTA 溶液。

7. 根据权利要求 6 所述的酶联免疫试剂盒的组建方法,其特征在于:所述酶标板按如下方法包被:包被抗原为 Pb^{2+} -ITCBE-OVA,包被浓度为 2 μ g/mL,包被溶液为 0.05 mol/L 的 pH 为 9.6 的碳酸盐缓冲液,包被剂量为 100 μ L/孔,37 °C 温育 2 h 或室温温育 8 h,用洗液浓缩液 PBST 洗涤 3 次,然后用 5% 的猪血清封闭,每孔 250 μ L,37 °C 温育 1 h,再用 PBST 洗涤 3 次。

8. 根据权利要求 7 所述的酶联免疫试剂盒的组建方法,其特征在于:所述的铅离子单克隆抗体是按以下方法制备的:

(1)人工免疫抗原合成:称取 20mg 牛血清白蛋白溶于 1mL、浓度为 10mmol/L、pH 为 9.0 的 HEPES 缓冲液中,形成 BSA 载体蛋白溶液;

称取 10mg ITCBE 溶于 1mL 二甲基亚砷中形成金属螯合剂溶液;将 0.5mL 金属螯合剂溶液逐滴加到 BSA 载体蛋白溶液中,混匀后,加入 100 μ L 浓度为 1.5mol/L 的三正丁胺,摇床室温反应 24h,制成 BSA-ITCBE 溶液;取 11.25mg 硝酸铅溶于 100 μ L 蒸馏水中,形成均匀的 Pb^{2+} 溶液;将 Pb^{2+} 溶液加入到 BSA-ITCBE 溶液中,调节 pH 值至 7.4,在室温下摇床孵育 4h,然后移入透析袋中用 PBS 透析 10d,即形成免疫抗原 Pb^{2+} -ITCBE-BSA,收集分装,-20°C 冻存;

(2)免疫动物:以 Pb^{2+} -ITCBE-BSA 为免疫抗原,以 6 周龄雌性 Ba1b/c 小鼠作为免疫动物,背部皮下分点注射,免疫剂量为每只每次蛋白质含量 50 μ g、体积 0.2mL,首免用弗氏完全佐剂,加强免疫用弗氏不完全佐剂,首免后 3 周进行第二次免疫,以后间隔 2 周免疫一次,共免疫 5 次;

(3)选择细胞融合备用小鼠:间接 ELISA 检测抗血清中 Pb^{2+} -EDTA 螯合物的多克隆抗体效价,阻断 ELISA 法检测 Pb^{2+} -EDTA 对 Pb^{2+} -ITCBE-BSA 的半数抑制浓度 IC_{50} ,挑选效价最高、 IC_{50} 最低的小鼠,超免用于细胞融合;

(4)制备阳性杂交瘤细胞:取 NS0 骨髓瘤细胞与免疫小鼠脾细胞用 PEG 进行细胞融合,用间接 ELISA 法和阻断 ELISA 法进行阳性杂交瘤细胞株的筛选,选择强阳性、抑制率较高、细胞生长旺盛的孔进行 3 次有限稀释克隆化;分别于冻存 15d、30d 和 60d 后复苏杂交瘤细胞,培养后取上清液,间接 ELISA 测定抗体效价,考察杂交瘤细胞分泌单克隆抗体的稳定性,获得杂交瘤细胞株;

(5)制备单克隆抗体:采用体内诱生腹水法制备抗 Pb^{2+} -EDTA 单克隆抗体,取 8 周龄健康 Balb/c 雌性小鼠,腹腔注射弗氏不完全佐剂 0.5mL/只,10~15 天后使用;将培养的阳性杂交瘤细胞 1000r/min 离心 10min 弃上清,收集细胞沉淀;用灭菌的 PBS 将细胞沉淀悬浮、混匀,将细胞数调至 10^6 /mL,腹腔注射 Balb/C 小鼠 0.5mL/只,接种细胞 7-10 天后产生腹水,收集腹水,于 37°C 水浴 30min,4°C 放置过夜,12000r/min 离心 5min,弃去上层脂肪、FIA 和下层沉淀物,用饱和硫酸铵盐析法进行纯化,测定 IgG 含量和效价,-20°C 保存备用。

检测铅离子的间接竞争酶联免疫试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及酶联免疫和离子检测,特别是涉及一种用于检测铅离子的间接竞争酶联免疫试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 铅(Pb)是一种青灰色重金属,是我们所熟知的环境毒物之一,在自然界中分布广泛。随着工农业的发展,铅的用途越来越广泛,在空气、土壤、食品、餐具、玩具中都能觅其踪迹,但是铅污染不容忽视。铅是全身性毒物,具有高蓄积性与多亲和性,可通过消化、呼吸等途径被机体吸收。急性铅中毒多表现为胃疼、头痛、颤抖、神经性烦躁,严重时昏迷,直至死亡。慢性铅中毒大多表现为神经毒性,对血液系统、免疫系统、肾脏等造成一定损害。铅是对儿童威胁最大的环境污染物之一,儿童对铅元素较成人敏感。由于血脑屏障没有发育完整,婴幼儿的血铅水平在达到 $100 \mu\text{g/L}$ 时便可以引起认知功能障碍或发育延迟。

[0003] 由于铅污染和危害性较大,我国制定了土壤、食品、水体、玩具、用具等涉铅领域中的国家限量标准,农产品安全质量无公害水产品安全要求(GB18406.4-2001)中对铅含量都有限定量 $\leq 0.5\text{mg/kg}$,地下水质量标准(GB/T14848-93)中规定,主要适用于集中式生活饮用水水源及工农业用水的铅离子限量 $\leq 0.05\text{mg/L}$,熟肉制品(GB2726-2005)要求铅含量 $\leq 0.5\text{mg/kg}$ 。

[0004] 目前,检测环境铅离子的方法主要有(1)物理和化学分析法:包括紫外分光光度法(UV)、电化学分析法(EC)、原子吸收光谱法(AAS)、电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS)、电感耦合等离子体原子发射光谱法(ICP-AES)、氢化物发生-原子荧光光谱法(HG-AFS)、中子活化分析法(NAA)等。这些方法各有优缺点,紫外分光光度法操作简单,快速,干扰小,但其灵敏度不高;电化学分析法具有灵敏、简便等特点,对操作人员的技术要求高;原子吸收光谱法、电感耦合等离子体质谱法、电感耦合等离子体原子发射光谱法、氢化物发生-原子荧光光谱法具有选择性好、测定精度高、简单、快速等优点,但所用仪器比较昂贵,只能在实验室进行检测,对操作人员技术要求较为严格;中子活化分析法是一种以核反应为基础的分析方法,具有微量、快速、准确和非破坏性且同时可分析多元素的优点,但所需设备不易为一般实验室所具备,很难得到广泛应用。(2)免疫学分析方法:包括酶联免疫吸附法(ELISA)。以竞争性酶联免疫反应为检测原理,反应显色后用酶标仪测定吸光值(OD)值进行结果判定,缩短了检测时间,可以对残留药物进行定性定量检测。但ELISA方法需要配套的酶标仪和配套试剂,操作过程较复杂。

[0005] 因此,研制快速、简便、敏感、特异、经济、筛检量大的铅离子快速检测产品,对于减少环境污染、提高食品质量、保障食品安全具有重要意义。

发明内容

[0006] 本发明要解决的技术问题:针对现有铅离子检测技术的不足,制备出铅离子的高敏感性、高亲和力、高特异性的单克隆抗体,以此为基础制备用于检测铅离子的间接竞争酶

联免疫试剂盒及其组建方法,该试剂盒能够快速、简便、敏感、特异的检测环境中的铅离子。

[0007] 本发明的技术方案:

一种检测铅离子的间接竞争酶联免疫试剂盒,包括盒体,盒体内设有用铅离子包被抗原包被过的酶标板、铅离子的单克隆抗体、酶标二抗、底物显色液、终止液、铅离子标准溶液、洗液浓缩液和样品处理液。

[0008] 所述酶标二抗为羊抗鼠酶标二抗 GaMIgG-HRP 或兔抗鼠酶标二抗 RaMIgG-HRP,浓度均为 100 ng/mL;所述底物显色液由显色剂 A 和显色剂 B 组成,显色剂 A 为过氧化脲,显色剂 B 为四甲基联苯胺(TMB);所述终止液为 2 mol/L 的硫酸溶液;所述铅离子标准溶液为铅离子溶解于 0.01 mol/L、pH7.4 的磷酸盐缓冲液(PBS)得到的系列浓度溶液;所述洗液浓缩液为 0.1 mol/L、pH7.4 的磷酸盐缓冲液,其中含 0.05% 的 Tween-20 (PBST);所述样品处理液为 0.1 mol/L 的乙二胺四乙酸(EDTA)溶液;用于制备所述酶标板的固相材料为聚苯乙烯、聚乙烯或聚丙烯。

[0009] 所述的铅离子包被抗原是由以下方法制备的:

(1) 称取 20 mg 卵清蛋白 OVA 溶于 1 mL 浓度为 0.01 mol/L、pH 值为 9.0 的 HEPES 缓冲液中,形成载体蛋白溶液;

(2) 称取 10mg 异硫氰酸苄基乙二胺四乙酸螯合剂(ITCBE)溶于 1mL 二甲基亚砷(DMSO)中形成金属螯合剂溶液;

(3) 将 0.5mL 金属螯合剂溶液逐滴加到载体蛋白溶液中,混匀后加入 100uL、1.5mol/L 的三正丁胺,摇床室温反应 24h,制成 OVA-ITCBE 溶液;

(4)取 11.25mg 硝酸铅溶于 100uL 蒸馏水中,形成均匀的 Pb^{2+} 溶液;将 Pb^{2+} 溶液加入到 OVA-ITCBE 溶液中,调节 pH 值至 7.4,在室温下摇床孵育 4h,然后移入透析袋中用 PBS 透析 10d,即形成 Pb^{2+} -ITCBE-OVA 包被抗原,收集分装, - 20℃ 冻存。

[0010] 所述酶标板按如下方法包被:包被抗原为 Pb^{2+} -ITCBE-OVA,包被浓度为 2 μ g/mL,包被溶液为 0.05 mol/L、pH 为 9.6 的碳酸盐缓冲液,包被剂量为 100 μ L/孔,37 °C 温育 2 h 或室温 8 h,用洗液浓缩液 PBST 洗涤 3 次,然后用 5% 的猪血清封闭,每孔 250 μ L,37 °C 温育 1 h,再用 PBST 洗涤 3 次。

[0011] 所述的铅离子单克隆抗体按以下方法制备:

(1) 人工免疫抗原合成:称取 20mg 牛血清白蛋白(BSA)溶于 1mL、浓度为 10mmol/L、pH 为 9.0 的 HEPES 缓冲液中,形成 BSA 载体蛋白溶液;

称取 10mg ITCBE 溶于 1mL 二甲基亚砷(DMSO)中形成金属螯合剂溶液;将 0.5mL 金属螯合剂溶液逐滴加到 BSA 载体蛋白溶液中,混匀后,加入 100uL、1.5mol/L 的三正丁胺,摇床室温反应 24h,制成 BSA-ITCBE 溶液;取 11.25mg 硝酸铅溶于 100uL 蒸馏水中,形成均匀的 Pb^{2+} 溶液;将 Pb^{2+} 溶液加入到 BSA-ITCBE 溶液中,调节 pH 值至 7.4,在室温下摇床孵育 4h,然后移入透析袋中用 PBS 透析 10d,即形成免疫抗原 Pb^{2+} -ITCBE-BSA,收集分装, - 20℃ 冻存;

(2) 免疫动物:以 Pb^{2+} -ITCBE-BSA 为免疫抗原,以 6 周龄雌性 Balb/c 小鼠作为免疫动物,背部皮下分点注射,免疫剂量为每只每次蛋白质含量 50 μ g、体积 0.2mL,首免用弗氏完全佐剂,加强免疫用弗氏不完全佐剂,首免后 3 周进行第二次免疫,以后间隔 2 周免疫一次,共免疫 5 次;

(3) 选择细胞融合备用小鼠 :间接 ELISA 检测抗血清中 Pb^{2+} -EDTA 螯合物的多克隆抗体 (Pb^{2+} -EDTA pAb) 效价, 阻断 ELISA 法检测 Pb^{2+} -EDTA 对 Pb^{2+} -ITCBE-BSA 的半数抑制浓度 IC_{50} , 挑选效价最高、 IC_{50} 最低的小鼠, 超免用于细胞融合 ;

(4) 制备阳性杂交瘤细胞 :取 NS0 骨髓瘤细胞与免疫小鼠脾细胞用 PEG 进行细胞融合, 用间接 ELISA 法和阻断 ELISA 法进行阳性杂交瘤细胞株的筛选, 对筛选的细胞进行 3 次有限稀释克隆化 ; 分别于冻存 15d、30d 和 60d 后复苏杂交瘤细胞, 培养后取上清液, 间接 ELISA 测定抗体效价, 考察杂交瘤细胞分泌单克隆抗体的稳定性, 获得杂交瘤细胞株 ;

(5) 制备单克隆抗体 :采用体内诱生腹水法制备抗 Pb^{2+} -EDTA 单克隆抗体 (Pb^{2+} -EDTA mAb), 取 8 周龄健康 Balb/c 雌性小鼠, 腹腔注射弗氏不完全佐剂 (FIA) 0.5mL/ 只, 10 ~ 15 天后使用 ; 将培养的阳性杂交瘤细胞 1000r/min 离心 10min 弃上清, 收集细胞沉淀 ; 用灭菌的 PBS 将细胞沉淀悬浮、混匀, 将细胞数调至 10^6 /mL, 腹腔注射 0.5mL/ 只, 接种细胞 7-10 天后产生腹水, 进行收集腹水, 于 37°C 水浴 30min, 4°C 放置过夜, 12000r/min 离心 5min, 弃去上层脂肪、FIA 和下层沉淀物, 用饱和硫酸铵盐析法进行纯化, 测定 IgG 含量和效价, -20°C 保存备用。

[0012] 一种检测铅离子的间接竞争酶联免疫试剂盒的组建方法, 试剂盒包括 Pb^{2+} -ITCBE-OVA 包被并用 5% 的猪血清封闭的酶标板 ; C1 号液 : 工作浓度为 1 : 10000 的铅离子单克隆抗体 ; C2 号液 : 工作浓度为 1 : 1000 的羊抗鼠酶标二抗 GaMIgG-HRP 或兔抗鼠酶标二抗 RaMIgG-HRP, 其中酶为辣根过氧化物酶 ; C3 号液 : 显色剂 A, 为过氧化脲 ; C4 号液 : 显色剂 B, 为四甲基联苯胺 (TMB) ; C5 号液 : 终止液, 为 2mol/L 的硫酸溶液 ; 铅离子标准溶液 : 用 2% 的硝酸稀释得到的硝酸铅系列浓度溶液 ; 洗液浓缩液 : PBST, 为 0.1mol/L、pH7.4 的磷酸盐缓冲液, 其中含 0.05% 的 Tween-20 ; 样品处理液为 0.1 mol/L 的 EDTA 溶液。

[0013] 所述酶标板按如下方法包被 : 包被抗原为 Pb^{2+} -ITCBE-OVA, 包被浓度为 2 μ g/mL, 包被溶液为 0.05 mol/L 的 pH 为 9.6 的碳酸盐缓冲液, 包被剂量为 100 μ L/ 孔, 37 °C 温育 2 h 或室温温育 8 h, 用洗液浓缩液 PBST 洗涤 3 次, 然后用 5% 的猪血清封闭, 每孔 250 μ L, 37 °C 温育 1 h, 再用 PBST 洗涤 3 次。

[0014] 所述的铅离子单克隆抗体是按以下方法制备的 :

(1) 人工免疫抗原合成 : 称取 20mg 牛血清白蛋白 (BSA) 溶于 1mL、浓度为 10mmol/L、pH 为 9.0 的 HEPES 缓冲液中, 形成 BSA 载体蛋白溶液 ;

称取 10mg ITCBE 溶于 1mL 二甲基亚砷 (DMSO) 中形成金属螯合剂溶液 ; 将 0.5mL 金属螯合剂溶液逐滴加入到 BSA 载体蛋白溶液中, 混匀后, 加入 100 μ L 浓度为 1.5mol/L 的三正丁胺, 摇床室温反应 24h, 制成 BSA-ITCBE 溶液 ; 取 11.25mg 硝酸铅溶于 100 μ L 蒸馏水中, 形成均匀的 Pb^{2+} 溶液 ; 将 Pb^{2+} 溶液加入到 BSA-ITCBE 溶液中, 调节 pH 值至 7.4, 在室温下摇床孵育 4h, 然后移入透析袋中用 PBS 透析 10d, 即形成免疫抗原 Pb^{2+} -ITCBE-BSA, 收集分装, -20°C 冻存 ;

(2) 免疫动物 : 以 Pb^{2+} -ITCBE-BSA 为免疫抗原, 以 6 周龄雌性 Balb/c 小鼠作为免疫动物, 背部皮下分点注射, 免疫剂量为每只每次蛋白质含量 50 μ g、体积 0.2mL, 首免用弗氏完全佐剂, 加强免疫用弗氏不完全佐剂, 首免后 3 周进行第二次免疫, 以后间隔 2 周免疫一次, 共免疫 5 次 ;

(3) 选择细胞融合备用小鼠 : 间接 ELISA 检测抗血清中 Pb^{2+} -EDTA 螯合物的多克隆抗

体(Pb^{2+} -EDTA pAb) 效价, 阻断 ELISA 法检测 Pb^{2+} -EDTA 对 Pb^{2+} -ITCBE-BSA 的半数抑制浓度 IC_{50} , 挑选效价最高、 IC_{50} 最低的小鼠, 超免用于细胞融合;

(4) 制备阳性杂交瘤细胞: 取 NS0 骨髓瘤细胞与免疫小鼠脾细胞用 PEG 进行细胞融合, 用间接 ELISA 法和阻断 ELISA 法进行阳性杂交瘤细胞株的筛选, 选择强阳性、抑制率较高、细胞生长旺盛的孔进行 3 次有限稀释克隆化; 分别于冻存 15d、30d 和 60d 后复苏杂交瘤细胞, 培养后取上清液, 间接 ELISA 测定抗体效价, 考察杂交瘤细胞分泌单克隆抗体的稳定性, 获得杂交瘤细胞株;

(5) 制备单克隆抗体: 采用体内诱生腹水法制备抗 Pb^{2+} -EDTA 单克隆抗体(Pb^{2+} -EDTA mAb), 取 8 周龄健康 Balb/c 雌性小鼠, 腹腔注射弗氏不完全佐剂(FIA) 0.5mL/ 只, 10 ~ 15 天后使用; 将培养的阳性杂交瘤细胞 1000r/min 离心 10min 弃上清, 收集细胞沉淀; 用灭菌的 PBS 将细胞沉淀悬浮、混匀, 将细胞数调至 10^6 /mL, 腹腔注射 Balb/C 小鼠 0.5mL/ 只, 接种细胞 7-10 天后产生腹水, 收集腹水, 于 37°C 水浴 30min, 4°C 放置过夜, 12000r/min 离心 5min, 弃去上层脂肪、FIA 和下层沉淀物, 用饱和硫酸铵盐析法进行纯化, 测定 IgG 含量和效价, -20°C 保存备用。

[0015] 本发明的积极有益效果:

1. 本发明试剂盒的组建方法, 制备了铅离子的人工抗原, 得到了适宜分子结合比的人工免疫抗原和包被抗原, 解决了铅离子的免疫原性问题, 免疫动物后获得了高效价、敏感、特异的多抗血清, 为试剂盒的组建奠定了基础。

[0016] 2. 本发明试剂盒的组建方法, 制备了铅离子高效价、敏感、特异的单克隆抗体, 抗体腹水效价为 1 : 7.2×10^5 , 亲和常数 Ka 为 1.87×10^{10} L/mol, 与其它重金属离子的交叉反应率小于 1%, 为铅离子的痕量快速检测提供了保障。

[0017] 3. 本发明的铅离子间接竞争酶联免疫试剂盒, 能痕量检测铅离子, 具有快速、简便、敏感、特异、经济等特性, 检测步骤少, 节省检测时间, 降低操作误差。快速, 45 ~ 50 min 出结果, 比理化检测方法(3 d) 大大节省时间; 简便, 不需要任何附加仪器和试剂, 人人均可操作; 敏感, 检测灵敏度为 0.2 ng/mL, 符合国家限量标准要求, 与理化检测方法灵敏度相当; 特异, 与其它重金属离子无交叉反应; 经济, 与理化检测方法相比, 检测成本不到理化分析方法的 1/20; 检测的时效性强, 可进行现场检测。

[0018] 4. 本发明的铅离子间接竞争酶联免疫试剂盒, 主要用于检测环境、土壤、水、食品、器物中铅离子污染残留, 对样品的前处理要求低且处理过程简单, 既可用于大批样品的筛检, 又可进行小批样品的快速检测, 不仅为环境、食品安全提供技术支撑, 也为食品进出口检验、食品检验、环境污染监测评价等提供有效的技术手段和检测方法, 对于提高食品安全、保障人民身心健康、保持环境友好与可持续发展具有重要现实意义, 该技术的推广将具有显著的经济效益和社会效益。

[0019] 附图说明:

图 1 为人工免疫抗原 Pb^{2+} -ITCBE-Protein 合成的技术路线图;

图 2 为检测铅离子酶联免疫试剂盒的标准曲线图。

具体实施方式

[0020] 以下用实施例具体说明本发明, 但是并不表示对本发明的任何限制, 如没有特别

说明,其中的百分含量均为重量百分含量。

[0021] 实施例一、铅离子人工免疫抗原的制备

采用异硫氰酯法制备人工完全抗原,包括免疫抗原 Pb^{2+} -ITCBE-BSA 和包被抗原 Pb^{2+} -ITCBE-OVA。以包被抗原 Pb^{2+} -ITCBE-OVA 为例,其制备方法如下。

[0022] (1)称取 20 mg 卵清蛋白 OVA 溶于 1 mL 浓度为 0.01 mol/L、pH 值为 9.0 的 HEPES 缓冲液中,形成载体蛋白溶液;

(2)称取 10mg 异硫氰酸苄基乙二胺四乙酸螯合剂(ITCBE)溶于 1mL 二甲基亚砜(DMSO)中形成金属螯合剂溶液;

(3)将 0.5mL 金属螯合剂溶液逐滴加到载体蛋白溶液中,混匀后加入 100 μ L、1.5mol/L 的三正丁胺,摇床室温反应 24h,制成 OVA-ITCBE 溶液;

(4)取 11.25mg 硝酸铅溶于 100 μ L 蒸馏水中,形成均匀的 Pb^{2+} 溶液;将 Pb^{2+} 溶液加入到 OVA-ITCBE 溶液中,调节 pH 值至 7.4,在室温下摇床孵育 4h,然后移入透析袋中用 PBS 透析 10d,即形成 Pb^{2+} -ITCBE-OVA 包被抗原,收集分装, - 20 $^{\circ}$ C 冻存。

[0023] 同法制备免疫抗原 Pb^{2+} -ITCBE-BSA。

[0024] 实施例二、铅离子人工免疫抗原鉴定

采用二喹啉甲酸法测定 Pb^{2+} -ITCBE-BSA 中载体蛋白 BSA 浓度,以 BSA 作为标准蛋白,配成 0 μ g/mL、10 μ g/mL、20 μ g/mL、40 μ g/mL、60 μ g/mL、80 μ g/mL 的浓度梯度,用二喹啉甲酸法构建浓度检测标准曲线,BSA 浓度标准曲线的线性方程为: $y=0.0022x + 0.008$, $R^2 = 0.9987$,其中 y 为样品在波长为 562nm 处吸光度, x 为样品蛋白浓度。

[0025] 采用 ICP-AES 法测定 Pb^{2+} -ITCBE-BSA 中 Pb^{2+} 的浓度。将 100 μ g/mL 的 Pb^{2+} -ITCBE-BSA 中 Pb^{2+} 标准储备液用 2% 的硝酸稀释成 0 μ g/mL、0.1 μ g/mL、0.2 μ g/mL、0.3 μ g/mL、0.4 μ g/mL、0.5 μ g/mL 的浓度梯度,仪器软件自动绘制标准曲线,并得出线性回归方程 $Y=0.27X+0.0045$,相关系数 0.9998,在 283nm 波长的最佳优化实验条件下进行测定,仪器软件自动分析结果。

[0026] 实施例三、铅离子单克隆抗体的制备

(1)免疫动物。用 Pb^{2+} -ITCBE-BSA 免疫 Balb/c 小鼠 5 只,免疫剂量为 50 μ g \cdot 0.2 mL/只,背部皮下多点注射。首免,用灭菌磷酸盐缓冲液(PBS)稀释 Pb^{2+} -ITCBE-BSA,与等量弗氏完全佐剂(CFA)混合乳化;加强免疫,用灭菌 PBS 稀释 Pb^{2+} -ITCBE-BSA,与等量弗氏不完全佐剂(IFA)混合乳化,首免后 3 周进行第二次免疫,以后间隔 3 周免疫一次,共免 5 次,第三次免疫后 10 天断尾取血,37 $^{\circ}$ C 水浴 30 min,4 $^{\circ}$ C 放置过夜,800 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 5 min,取上清后 - 20 $^{\circ}$ C 保存备用。

[0027] (2)细胞融合备用小鼠选择。间接 ELISA 检测抗血清中 Pb^{2+} 与乙二胺四乙酸(EDTA)螯合物 Pb^{2+} -EDTA 的多克隆抗体(pAb)效价,阻断 ELISA 检测 Pb^{2+} -EDTA pAb 对 Pb^{2+} -EDTA 的半数抑制浓度(IC_{50}),挑选效价最高、 IC_{50} 最低的小鼠,超免用于细胞融合。

[0028] (3)细胞融合和阳性杂交瘤细胞株的筛选。细胞融合,将 PEG 溶液、GNK 溶液预热至 40 $^{\circ}$ C,将制备好的脾细胞与 NS0 骨髓瘤细胞按 10 : 1 的比例混合于 50 mL 离心管中,加 GNK 溶液至 40 mL,1000 r/min 离心 10 min,弃上清,打散细胞团,将此融合管移入 40 $^{\circ}$ C 水浴中。用 1 mL 吸管将预热的 50% PEG (pH 8.0)滴加到融合管中,边加边轻轻摇动融合管,1 min 内加完,并继续在水浴中缓缓摇动融合管 1.5 min;然后慢慢补加 GNK 溶液至 40 mL,

37℃水浴静置 5 min, 1000 r/min 离心 10 min, 弃上清; 打散细胞团, 加 40 mL HAT 吹打混匀, 加到含饲养细胞的 96 孔细胞培养板上, 每孔 100 μ L, 置 37℃、5% 的 CO₂ 培养箱中培养。

[0029] 阳性杂交瘤细胞的筛选, 用间接 ELISA 法和阻断 ELISA 法进行阳性杂交瘤细胞株的筛选。选择强阳性、抑制效果好、细胞生长旺盛的孔进行 3 次有限稀释克隆化, 分别于冻存 15 d、30 d 和 60 d 后复苏杂交瘤细胞, 培养后取上清液, 间接 ELISA 法测定抗体效价, 考察杂交瘤细胞分泌的抗 Pb²⁺ 离子单克隆抗体 (Pb²⁺-EDTA mAb) 的稳定性。

[0030] (4) 单克隆抗体的制备。采用体内诱生腹水法制备单克隆抗体, 取 8 周龄健康 Balb/c 雌性小鼠, 腹腔注射 FIA 0.5 mL/只, 10~15 天后使用。将培养的阳性杂交瘤细胞 1000 r/min 离心 10min, 弃上清, 收集细胞沉淀。用灭菌的 PBS 将细胞沉淀悬浮、混匀, 将细胞数调至 10⁶ 个/mL, 腹腔注射 Balb/C 小鼠 0.5 mL/只。接种细胞 7~10 天后产生腹水, 进行收集, 于 37℃水浴 30 min, 4℃放置过夜, 12000 r/min 离心 5 min, 弃去上层的脂肪、IFA 和下层的沉淀, 饱和硫酸铵盐析法提纯后测定 IgG 含量和效价, -20℃保存备用。

[0031] 实施例四、铅离子单克隆抗体的鉴定

(1) 腹水效价测定。给腹腔注射液体石蜡 10 d 后的小鼠腹腔注射克隆化细胞株 10⁷ 个细胞, 7 d 后抽取腹水, 饱和硫酸铵盐析法提纯, 间接 ELISA 测定效价。测定结果, 单克隆抗体的腹水效价为 1 : 7.2 × 10⁵。

[0032] (2) 亲和力鉴定。饱和 ELISA 测定亲和常数 (K_a), 用浓度分别为 3.4 μ g/mL 和 1.7 μ g/mL 的 Pb²⁺-ITCBE-OVA 包被, 加入倍比稀释的 Pb²⁺-ITCBE mAb, 再加入 GaMIgG-HRP, TMB 显色测 A_{450nm} 值, 以 Pb²⁺-ITCBE mAb 浓度为横坐标, 以 A_{450nm} 值为纵坐标, 绘出相应的 2 条反应曲线, 以每条曲线上部平坦段的 A_{450nm} 值作为 100%, 在曲线上算出 50% A_{450nm} 值时对应的 Pb²⁺-ITCBE mAb 浓度, 按照公式 $Kaff = (n - 1) / 2 (n[Ab']_t - [Ab]_t)$ 计算 K_a , 单克隆抗体的 K_a 为 1.52 × 10¹⁰ L/mol。

[0033] (3) 敏感性鉴定。用阻断 ELISA 测定 Pb²⁺-EDTA mAb 对不同浓度 Pb²⁺-EDTA 的抑制率, 以抑制率 B/B₀ 为纵坐标, 以不同浓度 Pb²⁺-EDTA 的对数值为横坐标, 绘制标准抑制曲线, 进行相关回归分析, 计算 Pb²⁺-EDTA mAb 对 Pb²⁺-EDTA 的 IC₅₀。鉴定结果, IC₅₀ 为 10.31ng/mL。

[0034] (4) 特异性鉴定。采用交叉反应试验鉴定其特异性。交叉反应试验选择铅、汞、铬、锌、铜、铍、钴、钼、铁与 ITCBE 的螯合物 (螯合方法同上) 和 ITCBE 溶液做为抑制剂, 用阻断 ELISA 测定各抑制物的 IC₅₀, 以 Pb²⁺-ITCBE mAb 对 Pb²⁺-ITCBE 的 IC₅₀ 和 Pb²⁺-ITCBE mAb 对各竞争物的 IC₅₀ 之比的百分数为其交叉反应率 (CR%)。鉴定结果, 与其它重金属离子交叉反应小于 0.01%。

[0035] 实施例五、铅离子酶联免疫试剂盒的制备

(1) 酶标二抗和单克隆抗体工作浓度的确定: 采用方阵法筛选确定酶标二抗 (RaMIgG-HRP) 和单克隆抗体的工作浓度, 分别为 1 : 1000 和 1 : 10000。

[0036] (2) 铅离子酶联免疫试剂盒的组装:

试剂盒包括 Pb²⁺-ITCBE-OVA 包被并用 5% 猪血清封闭的酶标板; C1 号液: 工作浓度为 1 : 10000 的铅离子的单克隆抗体; C2 号液: 工作浓度为 1 : 1000 的羊抗鼠酶标二抗 GaMIgG-HRP 或兔抗鼠酶标二抗 RaMIgG-HRP, 其中酶为辣根过氧化物酶; C3 号液: 显色剂 A,

为过氧化脲;C4 号液:显色剂 B,为四甲基联苯胺(TMB);C5 号液:终止液,为 2mol/L 的硫酸溶液;铅离子标准溶液为硝酸铅($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$)用 2% 的硝酸稀释成 0ng/mL、1ng/mL、2ng/mL、4ng/mL、8ng/mL、16ng/mL、32ng/mL、64ng/mL、128ng/mL、256ng/mL 得到的系列浓度的溶液;洗液浓缩液 PBST 为 0.1mol/L、pH7.4 的磷酸盐缓冲液,其中含 0.05% 的 Tween-20;样品处理液为 0.1 mol/L 的 EDTA 溶液。

[0037] (3) 铅离子酶联免疫试剂盒的标准曲线:阻断 ELISA 测定单克隆抗体对不同浓度 Pb^{2+} 标准品的抑制率,以抑制率 $B/B_0\%$ (B 是 Pb^{2+} 不同标准浓度的 A_{450} 值, B_0 是 Pb^{2+} 0 标准浓度的 A_{450} 值)为纵坐标,以不同标准品浓度的对数值为横坐标,在半对数坐标纸上绘制标准曲线,推导回归方程,进行回归分析。标准曲线见附图 2。线性回归方程为 $y = -35.074x + 96.108$, $R^2 = 0.9918$, IC_{50} 为 20.41 $\mu\text{g/L}$ 。

[0038] 实施例六、铅离子酶联免疫试剂盒的性能测定

灵敏性测定。按照阻断 ELISA 最低检测限为 $B/B_0 = 120\%$ 的方法,根据曲线回归方程计算出试剂盒的灵敏度,确定检测限。测定结果,检测限为 0.208 ng/mL。

[0039] 检测范围测定。按照阻断 ELISA 检测范围为 $B/B_0 = 20\% \sim 80\%$ 的方法,根据曲线回归方程计算出试剂盒的灵敏度,确定检测范围,检测范围 2.87 ~ 147.57 ng/mL。

[0040] 准确性测定。将 Pb^{2+} 标准品以终浓度分别为 2、4、8、16、32 ng/mL 添加到饲料、牛乳中,设 6 个重复,以回收率和变异系数(CV)确定其准确度。饲料样的回收率在 90.8% ~ 98.62%,平均 96.21%,变异系数(CV)在 10.6% ~ 13.7%,平均 12.16%;牛乳的回收率在 93.12% ~ 98.82%,平均 96.68%,CV 在 10.7% ~ 13.9%,平均 12.96%;平均 CV 小于 15%,表明试剂盒具有较高准确度。见表 2。

[0041] 表 2 铅离子酶联免疫试剂盒添加回收试验($n = 6$)

| 样品 | Pb^{2+} 添加量 ($\mu\text{g/L}$) | 测定值 ($\mu\text{g/L}$) | 回收率 (%) | 变异系数 (%) |
|----|--|-------------------------|-------------|----------|
| 饲料 | 2 | 1.80±0.22 | 90.8±12.47 | 13.7 |
| | 4 | 3.84±0.79 | 96.43±12.92 | 13.3 |
| | 8 | 7.89±1.05 | 98.62±10.74 | 10.8 |
| | 16 | 15.77±3.13 | 98.56±12.25 | 12.4 |
| | 32 | 30.94±3.84 | 96.68±10.32 | 10.6 |
| 牛乳 | 2 | 1.87±0.25 | 93.12±12.67 | 13.6 |
| | 4 | 3.88±0.94 | 96.9±13.08 | 13.4 |
| | 8 | 7.90±1.38 | 98.82±13.75 | 13.9 |
| | 16 | 15.54±3.17 | 97.08±10.41 | 10.7 |
| | 32 | 31.22±4.08 | 97.52±12.88 | 13.2 |

特异性测定。采用交叉反应试验,选择钼、铅、镉、铜、锌、铬、钴、铁等金属离子与 EDTA 的螯合物、EDTA 为抑制物,用阻断 ELISA 测定各抑制物的 IC_{50} ,以 Pb^{2+} mAb 对 Pb^{2+} 的 IC_{50} 和对其它各竞争物的 IC_{50} 的百分率为其交叉反应率(CR%)。见表 3。

[0042] 表 3 Pb²⁺-EDTA mAb 与其它金属整合物的交叉反应

| 化合物 | IC ₅₀ (μg/L) | 交叉反应率(%) |
|------------------------|-------------------------|----------|
| Pb ²⁺ -EDTA | 20.41 | 100 |
| EDTA | >6.4×10 ³ | <0.05 |
| Mn ⁶⁺ -EDTA | >3.2×10 ³ | <0.05 |
| Hg ²⁺ -EDTA | >6.4×10 ³ | <0.05 |
| Cd ²⁺ -EDTA | >6.4×10 ³ | <0.05 |
| Cu ²⁺ -EDTA | >3.2×10 ³ | <0.05 |
| Zn ²⁺ -EDTA | >3.2×10 ³ | <0.05 |
| Cr ³⁺ -EDTA | >3.2×10 ³ | <0.05 |
| Co ²⁺ -EDTA | >6.4×10 ³ | <0.05 |
| Fe ²⁺ -EDTA | >6.4×10 ³ | <0.05 |

(4)稳定性:取同一批次的试剂盒保存于4℃,测定保存6个月中各月份的A₄₅₀值、IC₅₀、R²变化情况,确定其稳定性。结果显示,随着试剂盒保存期延长,各标准品的A_{450nm}值有所减小,但其IC₅₀、R²变化不大,曲线拟合良好,说明该试剂盒在4℃、6个月保存期内质量稳定。见表4。

[0043] 表 4 试剂盒的保存期

| 保存天数(d) | IC ₅₀ (μg/L) | R ² | 最大吸光值 |
|---------|-------------------------|----------------|-------|
| 1 | 20.41 | 0.9942 | 0.991 |
| 30 | 20.82 | 0.9902 | 0.985 |
| 60 | 20.93 | 0.9871 | 0.912 |
| 90 | 21.34 | 0.9814 | 0.889 |
| 120 | 21.85 | 0.9727 | 0.842 |
| 150 | 22.67 | 0.9704 | 0.785 |
| 180 | 23.08 | 0.9689 | 0.712 |

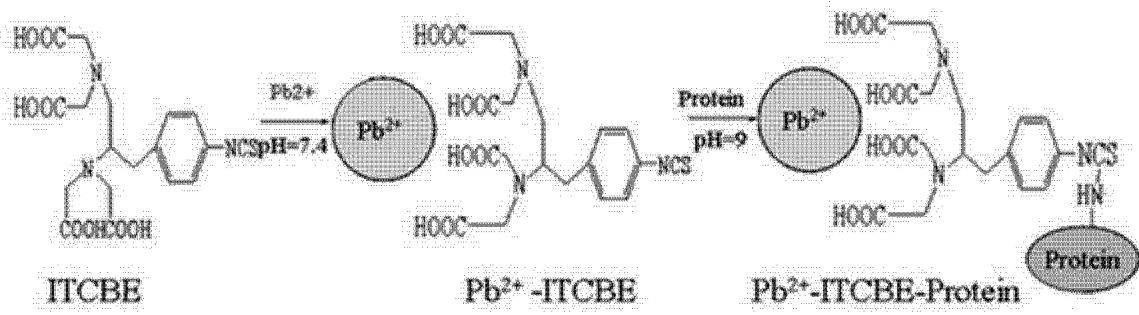


图 1

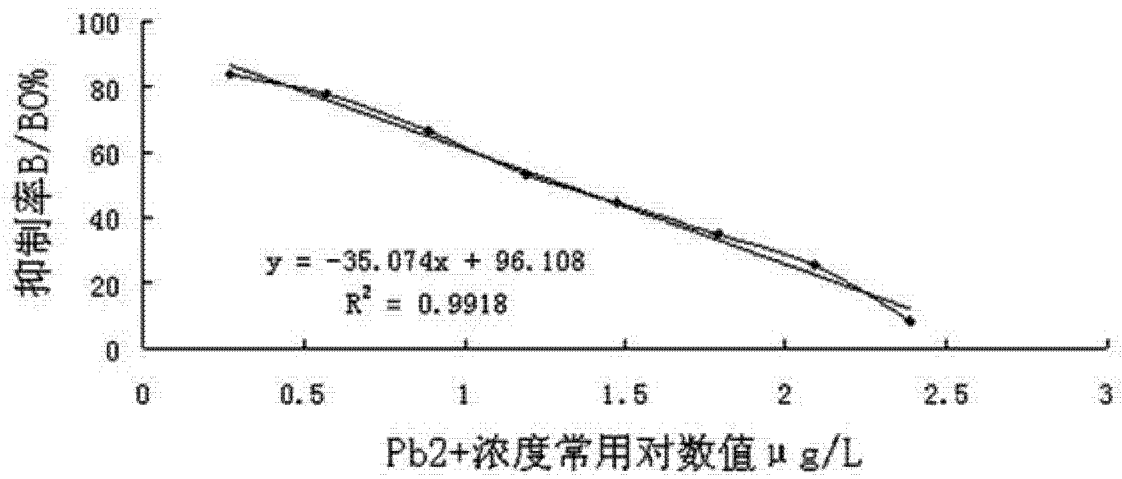


图 2

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 检测铅离子的间接竞争酶联免疫试剂盒及其制备方法 | | |
| 公开(公告)号 | CN103472230A | 公开(公告)日 | 2013-12-25 |
| 申请号 | CN201310449020.2 | 申请日 | 2013-09-28 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 河南科技学院 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 河南科技学院 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 河南科技学院 | | |
| [标]发明人 | 王自良 王爱萍 张慧辉 | | |
| 发明人 | 王自良 王爱萍 葛亚明 范国英 张海棠 张慧辉 | | |
| IPC分类号 | G01N33/577 G01N33/531 | | |
| 代理人(译) | 张爱军 | | |
| 其他公开文献 | CN103472230B | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明涉及一种用于检测铅离子的间接竞争酶联免疫试剂盒及其制备方法，盒体内设有用铅离子包被抗原包被的酶标板、铅离子单克隆抗体、酶标二抗、底物显色液、终止液、铅离子标准溶液、洗液浓缩液和样品处理液。本发明的铅离子间接竞争酶联免疫试剂盒，能痕量检测铅离子，可用于环境、土壤、水、食品和器物中的铅离子污染残留的检测，具有快速、简便、敏感、特异、经济等特性，检测步骤少，节省检测时间，降低操作误差；时效性强，可进行现场检测；既可用于大批样品筛检，又可用于小批样品的快速检测，为食品进出口检验、食品检验、环境污染监测评价等提供有效手段。

