



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106841626 B

(45)授权公告日 2019.06.07

(21)申请号 201710099368.1

(22)申请日 2017.02.23

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106841626 A

(43)申请公布日 2017.06.13

(73)专利权人 河南科技学院
地址 453000 河南省新乡市红旗区五一路
东段

专利权人 方城县机电信息中等职业学校

(72)发明人 王秋霞 欧长波 马景周 余燕
魏小兵 张艳红 刘兴友 姜金庆
孙勇

(74)专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569
代理人 代芳

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

(56)对比文件

CN 1707267 A,2005.12.14,说明书第2页最后1段-第3页第2段、第4-5页.

CN 103558387 A,2014.02.05,说明书第39-51段、权利要求1.

审查员 贾静

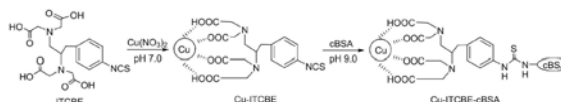
权利要求书2页 说明书10页 附图1页

(54)发明名称

一种环境污染中铜离子直接竞争酶联免疫检测试剂盒及其应用

(57)摘要

本发明提供了一种基于直接竞争酶联免疫法铜离子检测试剂盒,包括:包被有羊抗鼠IgG二抗的检测板,所述检测板真空密封包装;所述羊抗鼠IgG二抗的包被浓度为50~200 μg/mL;质量浓度为20~50 μg/mL的酶标Cu-ITCBE螯合物半抗原;质量浓度为10~20 μg/mL的抗铜离子单克隆抗体溶液;所述抗铜离子单克隆抗体溶液由Cu-ITCBE-cBSA免疫原免疫Ba1b/C小鼠制备而来;1.0~3.0mol/L的终止液;样品稀释液;底物显色液;洗涤液;铜离子标准品溶液;质量浓度为10~20mg/mL的EDTA处理液。本发明提供试剂盒具有灵敏度高、特异性强的特点,同时具有检测时间短的优点。



1. 一种基于直接竞争酶联免疫法铜离子检测试剂盒,包括:

(1) 包被有羊抗鼠IgG二抗的检测板,所述检测板真空密封包装;所述羊抗鼠IgG二抗的包被浓度为80~150 μ g/mL;

(2) 质量浓度为30~40 μ g/mL的酶标Cu-ITCBE螯合物半抗原溶液;

(3) 质量浓度为13~18 μ g/mL的抗铜离子单克隆抗体溶液;所述抗铜离子单克隆抗体溶液由Cu-ITCBE-BSA免疫原免疫Balb/C小鼠制备而来;

(4) 1.0~3.0mol/L的终止液;

(5) 样品稀释液;

(6) 底物显色液;

(7) 洗涤液;

(8) 铜离子标准品溶液;

(9) 质量浓度为10~20mg/mL的EDTA处理液;

所述洗涤液为包含质量浓度0.05~0.1%Tween20的PBS溶液;

所述洗涤液为包含质量浓度0.05~0.1%Tween20的PBS溶液;

所述Cu-ITCBE-cBSA免疫原的制备方法包括以下步骤:

(1) 将ITCBE和二甲基亚砷(DMSO)按照ITCBE的质量和二甲基亚砷的体积比为(8~12)mg:1mL混合,形成金属螯合剂溶液;

(2) 将硝酸铜Cu(NO₃)₂与HEPES缓冲液按照9mg:1mL的比例混合,形成Cu²⁺溶液;

(3) 将所述步骤(1)中得到的金属螯合剂溶液和所述步骤(2)中得到的Cu²⁺溶液按照体积比为1:1混合,调节混合液pH值至7.0,然后在23~27 $^{\circ}$ C条件下振荡反应10~14h,形成Cu-ITCBE螯合物半抗原;

(4) 将BSA、EDC与PBS缓冲液混合搅拌得到混合液,BSA质量、EDC质量与PBS缓冲液的体积比为66mg:11.6mg:5mL,将所述混合液与乙二胺按照混合液体积和乙二胺质量比为5mL:7mg的比例混合,37 $^{\circ}$ C振荡反应2h得反应液;反应液用PBS透析4d,得到活化的载体蛋白BSA;

(5) 将所述活化的载体蛋白BSA和pH值为8.0的HEPES缓冲液混合,形成浓度为30mg/mL的载体蛋白溶液;

(6) 将所述步骤(3)中得到的Cu-ITCBE螯合物半抗原溶液和所述步骤(5)得到的载体蛋白溶液按照体积比为1:1的比例混合,调节pH值至9.0,23~27 $^{\circ}$ C条件下振荡反应22~26h,将得到的反应液装入透析袋,先用蒸馏水透析2d,再用PBS透析3d,即形成Cu-ITCBE-cBSA免疫原;

所述酶标Cu-ITCBE螯合物半抗原的制备方法,包括以下步骤:

A. 将异硫氰酸苄基乙二胺四乙酸(ITCBE)与二甲基亚砷(DMSO)混合形成金属螯合剂溶液;

B. 将硝酸铜Cu(NO₃)₂与HEPES缓冲液混合,形成Cu²⁺溶液;

C. 将所述步骤A中得到的金属螯合剂溶液和所述步骤B中得到的Cu²⁺溶液混合,调节混合液的pH值至7.0~7.2,得到的混合液振荡反应10~14h,形成Cu-ITCBE螯合物半抗原;

D. 将标记用酶与HEPES缓冲液混合,得到酶溶液;

E. 将所述步骤C得到的Cu-ITCBE螯合物半抗原溶液与所述步骤D中得到的酶溶液混合,调节混合物的pH值至8.8~9.2,再将混合液振荡反应22~26h,得到酶标Cu-ITCBE螯合物半

抗原；

所述步骤A、B和D之间没有时间顺序的限制；

所述C和D之间没有时间顺序的限制。

2. 权利要求1所述铜离子检测试剂盒在检测环境中铜离子的应用，其特征在于，包括以下步骤：

a、将抗铜离子单克隆抗体溶液、稀释的待测样品溶液和酶标Cu-ITCBE螯合物半抗原溶液加入到包被有羊抗鼠IgG二抗的检测板孔内，混合，孵育后用洗涤液洗涤；

b、向检测板中加入底物显色液，孵育，加入终止液混合，测定OD值；

c、根据所述步骤b得到的OD值与预定的标准曲线，得到待测样品中铜离子的浓度，所述标准曲线是铜离子浓度与OD值之间的线性关系曲线。

3. 根据权利要求2所述的应用，其特征在于，所述检测板孔内抗铜离子单克隆抗体溶液、稀释的待测样品溶液和酶标Cu-ITCBE螯合物半抗原溶液的体积比为1~2:1~2:1~2。

4. 根据权利要求2所述的应用，其特征在于，所述步骤a和b中孵育的温度独立地为30~40℃。

5. 根据权利要求2或4所述的应用，其特征在于，所述步骤a和b中孵育的时间独立地为5~30min。

一种环境污染中铜离子直接竞争酶联免疫检测试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于环境检测技术领域,具体涉及一种环境污染中铜离子直接竞争酶联免疫检测试剂盒及其应用。

背景技术

[0002] 重金属铜是自然界存在的一种重要的金属元素,也是人体所必需的微量元素。常量铜对农作物或人均是营养物质,缺铜会发生贫血、腹泻等病症,但过量摄入铜也会产生危害。随着工农业的快速发展,铜的用途越来越广泛,用量不断增加,含铜污染物的排放也越来越多,对土壤等环境的污染逐渐显现出来。铜的主要污染源是电镀、冶炼、五金加工、矿山开采、石油化工和化学工业等部门的废水。含铜废水灌溉农田,铜在土壤中和农作物中累积,会造成农作物,特别是水稻和小麦生长不良,污染粮食籽粒,造成农产品中重金属污染超标,严重影响我国农产品质量和国际竞争力。因此,有关铜的排放、迁移、沉降以及控制研究已成为环境污染防治的新兴领域之一。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量为铜 $\leq 10\text{mg/kg}$ 。

[0003] 目前动物性食品及环境水样中 Cu^{2+} 污染的主要检测方法包括传统的理化检验和免疫学检验两种类型的方法。理化检验包括紫外分光光度法(UV)、电化学分析法、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)和中子活化分析法(NAA)等,它们是目前 Cu^{2+} 污染检测的主要方法,灵敏度高,结果准确,但由于需要昂贵的仪器设备、熟练的专业人员、烦琐费时、周期长、费用高、不能现场操作、样品筛检量小等缺陷,其应用受到了限制。免疫学检验方法是以抗原抗体分子的特异性、可逆性反应为基础的分析技术,包括荧光偏振免疫测定法(FPIA)、酶联免疫吸附测定法(ELISA)、KinExA免疫测定法(KIA)、胶体金免疫层析试验测定法(GICA)和微悬臂梁免疫传感器(MIS)等,由于抗原抗体的结合具有高度的选择性和敏感性,这一技术具有简便、快速、敏感、特异、经济、筛检量大等优势,代表着重金属离子检测的发展方向。目前,国内外重金属铜离子污染免疫检测技术研究非常活跃,其中公告号为CN103558387A的专利公开了一种用于检测样品中重金属铜离子含量的酶联免疫试剂盒,最低检测限为 $0.42\mu\text{g/L}$,并且检测时间较长。

发明内容

[0004] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种基于直接竞争酶联免疫法检测铜离子试剂盒及其应用,使所述试剂盒具有检测时间短的优点,同时具有灵敏度高、特异性强的特点。

[0005] 为了实现上述发明目的,本发明提供以下技术方案:

[0006] 本发明提供了一种基于直接竞争酶联免疫法铜离子检测试剂盒,包括:

[0007] (1) 包被有羊抗鼠IgG二抗的检测板,所述检测板真空密封包装;所述羊抗鼠IgG二

抗的包被浓度为50~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$;

[0008] (2) 质量浓度为20~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的酶标Cu-ITCBE螯合物半抗原溶液;

[0009] (3) 质量浓度为10~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的抗铜离子单克隆抗体溶液;所述抗铜离子单克隆抗体溶液由Cu-ITCBE-cBSA免疫原免疫Ba1b/C小鼠制备而来;

[0010] (4) 1.0~3.0 mol/L 的终止液;

[0011] (5) 样品稀释液;

[0012] (6) 底物显色液;

[0013] (7) 洗涤液;

[0014] (8) 铜离子标准品溶液;

[0015] (9) 质量浓度为10~20 mg/mL 的EDTA处理液。

[0016] 优选的,所述羊抗鼠IgG二抗的包被浓度为80~150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0017] 优选的,所述酶标Cu-ITCBE螯合物半抗原的质量浓度为30~40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0018] 优选的,所述抗铜离子单克隆抗体溶液的质量浓度为13~18 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0019] 优选的,所述样品稀释液为质量浓度为2~10 g/L 的HEPES缓冲液。

[0020] 优选的,所述洗涤液为包含质量浓度0.05~0.1% Tween 20的PBS溶液。

[0021] 本发明还提供了所述铜离子检测试剂盒在检测环境中铜离子的应用,包括以下步骤:

[0022] a、将抗铜离子单克隆抗体溶液、稀释的待测样品溶液和酶标Cu-ITCBE螯合物半抗原溶液,加入到包被有羊抗鼠IgG二抗的检测板孔内,混合,孵育后用洗涤液洗涤;

[0023] b、向检测板中加入底物显色液,孵育,加入终止液混合,测定OD值;

[0024] c、根据所述步骤b得到的OD值与预定的标准曲线,得到待测样品中铜离子的浓度,所述标准曲线是铜离子浓度与OD值之间的线性关系曲线。

[0025] 优选的,所述检测板孔内抗铜离子单克隆抗体溶液、稀释的待测样品溶液和酶标Cu-ITCBE螯合物半抗原溶液的体积比为1~2:1~2:1~2。

[0026] 优选的,所述步骤a和b中孵育的温度独立地为30~40 $^{\circ}\text{C}$ 。

[0027] 优选的,所述步骤a和b中孵育的时间独立地为5~30 min 。

[0028] 本发明提供了一种基于直接竞争酶联免疫法铜离子检测试剂盒,包括:(1)包被有羊抗鼠IgG二抗的检测板,所述检测板真空密封包装;所述羊抗鼠IgG二抗的包被浓度为50~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$;(2)质量浓度为20~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的酶标Cu-ITCBE螯合物半抗原;(3)质量浓度为10~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的抗铜离子单克隆抗体溶液;所述抗铜离子单克隆抗体溶液由Cu-ITCBE-cBSA免疫原免疫Ba1b/C小鼠制备而来;(4)1.0~3.0 mol/L 的终止液;(5)样品稀释液;(6)底物显色液;(7)洗涤液;(8)铜离子标准品溶液;(9)质量浓度为10~20 mg/mL 的EDTA处理液。本发明根据抗原抗体直接竞争性免疫层析原理设计,通过在检测板上预包被羊抗鼠IgG二抗,使抗铜离子单克隆抗体、待检样品或铜离子标准品溶液和酶标半抗原(Cu-ITCBE-HRP)三种物质能够同时加入,抗铜离子单克隆抗体与预包被羊抗鼠IgG二抗结合形成复合物,样品或标准品中的铜离子和酶标半抗原竞争性地与抗铜离子单克隆抗体结合,当加入底物显色液时,样品吸光度值与其残留的铜离子含量呈负相关,与标准曲线比较再乘以其对应的稀释倍数,即可得出样品中铜离子的含量。本发明提供的试剂盒,减少了传统竞争法中两次孵育和洗涤次数,缩短了孵育和洗涤的时间30 min ,使试剂盒快速简便地得到检测结果,大大缩短

了检测周期。本发明提供的铜离子检测试剂盒最低检测限 (LOD) 可达 $0.11\mu\text{g/L}$, 检测范围为 $0.18\sim 39\mu\text{g/L}$ 。

附图说明

[0029] 图1为实施例1中免疫原合成路线图;

[0030] 图2为实施例8中建立的dELISA和ciELISA标准曲线。

具体实施方式

[0031] 本发明提供了一种基于直接竞争酶联免疫法铜离子检测试剂盒, 包括:

[0032] (1) 包被有羊抗鼠IgG二抗的检测板, 所述检测板真空密封包装; 所述羊抗鼠IgG二抗的包被浓度为 $50\sim 200\mu\text{g/mL}$;

[0033] (2) 质量浓度为 $20\sim 50\mu\text{g/mL}$ 的酶标Cu-ITCBE螯合物半抗原溶液;

[0034] (3) 质量浓度为 $10\sim 20\mu\text{g/mL}$ 的抗铜离子单克隆抗体溶液; 所述抗铜离子单克隆抗体溶液由Cu-ITCBE-cBSA免疫原免疫Balb/C小鼠制备而来;

[0035] (4) $1.0\sim 3.0\text{mol/L}$ 的终止液;

[0036] (5) 样品稀释液;

[0037] (6) 底物显色液;

[0038] (7) 洗涤液;

[0039] (8) 铜离子标准品溶液;

[0040] (9) 质量浓度为 $10\sim 20\text{mg/mL}$ 的EDTA处理液。

[0041] 本发明提供的铜离子检测试剂盒包括包被有羊抗鼠IgG二抗的检测板, 所述检测板真空密封包装; 所述羊抗鼠IgG二抗的包被浓度为 $50\sim 200\mu\text{g/mL}$, 优选为 $80\sim 150\mu\text{g/mL}$, 更优选为 $100\sim 120\mu\text{g/mL}$ 。本发明中, 所述羊抗鼠IgG二抗的来源没有特殊限制, 采用本领域技术人员所熟知的羊抗鼠IgG二抗即可。

[0042] 本发明中, 所述包被有羊抗鼠IgG二抗的检测板的制备方法, 优选包括以下步骤:

[0043] I. 向检测板的检测孔中加入包被浓度为 $50\sim 200\mu\text{g/mL}$ 羊抗鼠IgG二抗包被液 $100\sim 150\mu\text{L}$ /孔, $35\sim 40^\circ\text{C}$ 条件下第一次孵育 $1.5\sim 3\text{h}$, 孵育后去除包被液, 用洗涤液第一次洗板 $2\sim 5$ 次;

[0044] II. 向所述步骤I中得到的检测板中加入质量浓度为 $3\sim 6\%$ 猪阴性血清 $200\sim 300\mu\text{L}$ /孔, $35\sim 40^\circ\text{C}$ 条件下第二次孵育 $1.5\sim 3\text{h}$, 孵育后去除包被液, 用洗涤液第二次洗板 $2\sim 5$ 次, 将检测板在 $23\sim 27^\circ\text{C}$ 条件下自然晾干, 得到包被有羊抗鼠IgG二抗的检测板。

[0045] 本发明中, 所述检测板的种类没有特殊限制, 采用本领域技术人员所熟知的ELISA检测板即可。所述检测板的孔数没有特殊限制, 采用本领域技术人员所熟知的检测板即可, 例如24孔、48孔或96孔。

[0046] 本发明中, 所述洗涤液为PBST溶液。PBS溶液的摩尔浓度优选为 $0.01\sim 0.02\text{mol/L}$, 更优选为 0.015mol/L 。所述PBS溶液的pH优选为7.4。所述Tween 20在PBS溶液中的质量浓度优选 $0.05\sim 0.1\%$, 更优选为 0.08% 。

[0047] 本发明中, 所述包被液的体积优选为 $120\mu\text{L}$ /孔。所述第一次孵育和第二次孵育的温度优选独立为 37°C 。所述第一次孵育和第二次孵育的时间优选独立为 2h 。

[0048] 本发明中,所述去除包被液的方法没有特殊限制,采用本领域技术人员所熟知的方法即可。本发明实施例中,所述去除包被液的方法是用甩检测板。

[0049] 本发明中,所述第一次洗板和第二次洗板的次数优选为3~4次。第一次洗涤和第二次洗板期间每次洗板的间隔时间优选为1.5~3min,更优选为2min。

[0050] 本发明中,所述猪阴性血清的来源没有特殊限制,采用本领域技术人员所熟知的猪阴性血清即可。猪阴性血清的质量浓度优选为5%。猪阴性血清的加入体积优选为220~280 μ L/孔,更优选260 μ L/孔。

[0051] 本发明中,将所述包被有羊抗鼠IgG二抗的检测板进行真空包装,得到真空包装的包被有羊抗鼠IgG二抗的检测板。所述真空包装的压力为600~1000Pa。

[0052] 本发明提供的铜离子检测试剂盒包括酶标Cu-ITCBE螯合物半抗原溶液。所述酶标Cu-ITCBE螯合物半抗原溶液的质量浓度为20~50 μ g/mL,优选为30~40 μ g/mL,最优选为35 μ g/mL。

[0053] 本发明中,所述酶的种类没有特殊限制采用本领域技术人员所熟知的酶种类即可。本发明实施例中,所述酶的种类为辣根过氧化物酶。

[0054] 本发明中,所述酶标Cu-ITCBE螯合物半抗原的制备方法,优选包括以下步骤:

[0055] A. 将异硫氰酸苄基乙二胺四乙酸(ITCBE)与二甲基亚砜(DMSO)混合形成金属螯合剂溶液;

[0056] B. 将硝酸铜Cu(NO₃)₂与HEPES缓冲液混合,形成Cu²⁺溶液;

[0057] C. 将所述步骤A中得到的金属螯合剂溶液和所述步骤B中得到的Cu²⁺溶液混合,调节混合液的pH值至7.0~7.2,得到的混合液振荡反应10~14h,形成Cu-ITCBE螯合物半抗原;

[0058] D. 将标记用酶与HEPES缓冲液混合,得到酶溶液;

[0059] E. 将所述步骤C得到的Cu-ITCBE螯合物半抗原溶液与所述步骤D中得到的酶溶液混合,调节混合物的pH值至8.8~9.2,再将混合液振荡反应22~26h,得到酶标Cu-ITCBE螯合物半抗原;

[0060] 所述步骤A与B之间没有时间顺序的限制;C和D之间,D与A和B之间同样没有时间顺序的限制。

[0061] 本发明中,所述ITCBE的质量与二甲基亚砜体积比优选为(5~15)mg:1mL,更优选为10mg:1mL。

[0062] 本发明中,制备酶标Cu-ITCBE螯合物半抗原用HEPES缓冲液的摩尔浓度优选为8~12mmol/L,更优选为10mmol/L。所述HEPES缓冲液的pH值优选为7.8~8.5,更优选为8.0。

[0063] 本发明中,所述硝酸铜Cu(NO₃)₂的质量和HEPES缓冲液的体积比优选为8.5~12.5mg:1mL,更优选为9mg:1mL。

[0064] 本发明中,所述金属螯合剂溶液和所述Cu²⁺溶液的体积比优选为0.8~1.2:0.8~1.2,更优选为1:1。

[0065] 本发明中,对含有金属螯合剂和Cu²⁺混合液的pH值调整方法没有特殊限制,采用本领域技术人员所熟知的含有金属螯合剂和Cu²⁺混合液的pH值调整方案即可。本发明实施例中,混合液的pH值调整方法用质量浓度为1%的氢氧化钠溶液进行。

[0066] 本发明中,所述步骤C中混合液振荡反应的时间优选为12h。所述混合液振荡反应

的温度优选为23~27℃,更优选为25℃。

[0067] 本发明中,所述标记用酶的质量与HEPES缓冲液的体积比为(80~120)mg:1mL,更优选为100mg:1mL。

[0068] 本发明中,所述Cu-ITCBE螯合物半抗原溶液体积与所述酶溶液体积比优选为0.8~1.2:0.8~1.2,更优选为1:1。

[0069] 本发明中,所述步骤D中含有酶的混合物的pH值优选为9.0。所述含有酶的混合液的pH值调整方法用质量浓度为1%的氢氧化钠溶液进行。所述步骤D中振荡反应的时间优选为24h。所述振荡反应的温度优选为23~27℃,更优选为25℃。

[0070] 本发明中,所述步骤E中混合液振荡反应后优选将Cu-ITCBE-酶半抗原溶液置于透析袋依次在蒸馏水中透析和在PBS溶液中透析,得到纯化的酶标Cu-ITCBE螯合物半抗原。在本发明中,所述蒸馏水中透析的时间优选为2d;所述PBS溶液中透析的时间优选为3d。

[0071] 本发明提供的铜离子检测试剂盒包括抗铜离子单克隆抗体溶液。所述抗铜离子单克隆抗体溶液的质量浓度为10~20μg/mL,优选为13~18μg/mL,更优选为15μg/mL。

[0072] 本发明中,所述抗铜离子单克隆抗体溶液由Cu-ITCBE-cBSA免疫原免疫Balb/C小鼠制备而来,本发明对抗铜离子单克隆抗体的制备方法没有特殊限制,采用本领域技术人员所熟知的抗铜离子单克隆抗体的制备方案即可。

[0073] 本发明中,所述Cu-ITCBE-cBSA免疫原的制备方法包括以下步骤:

[0074] 将ITCBE和二甲基亚砜(DMSO)按照ITCBE的质量和二甲基亚砜的体积比为(8~12)mg:1mL混合,形成金属螯合剂溶液;

[0075] 将硝酸铜Cu(NO₃)₂与HEPES缓冲液按照9mg:1mL的比例混合,形成Cu²⁺溶液;

[0076] 将所述步骤(1)中得到的金属螯合剂溶液和所述步骤(2)中得到的Cu²⁺溶液按照体积比为1:1混合,调节混合液pH值至7.0,然后在23~27℃条件下振荡反应10~14h,形成Cu-ITCBE螯合物半抗原;

[0077] 将BSA、EDC与PBS缓冲液混合搅拌得到混合液,BSA质量、EDC质量与PBS缓冲液的体积比为66mg:11.6mg:5mL,将所述混合液与乙二胺按照混合液体积和乙二胺质量比为5mL:7mg的比例混合,37℃振荡反应2h得反应液;反应液用PBS透析4d,得到活化的载体蛋白BSA;

[0078] 将所述活化的载体蛋白BSA和pH值为8.0的HEPES缓冲液混合,形成浓度为30mg/mL的载体蛋白溶液;

[0079] 将所述步骤(3)中得到的Cu-ITCBE螯合物半抗原溶液和所述步骤(5)得到的载体蛋白溶液按照体积比为1:1的比例混合,调节pH值至9.0,23~27℃条件下振荡反应22~26h,将得到的反应液装入透析袋,先用蒸馏水透析2d,再用PBS透析3d,即形成Cu-ITCBE-cBSA免疫原。

[0080] 所述Cu-ITCBE-cBSA免疫原的合成路线见图1。

[0081] 本发明提供的铜离子检测试剂盒包括终止液。所述终止液的摩尔浓度为1.0~3.0mol/L,更优选为1.5~2.5mol/L,最优选为2.0mol/L。所述终止液优选为H₂SO₄溶液。

[0082] 本发明提供的铜离子检测试剂盒包括样品稀释液。所述样品稀释液为HEPES缓冲液。HEPES缓冲液的质量浓度优选为2~10g/L,更优选为4~8g/L,最优选为5g/L。所述HEPES缓冲液的pH值优选为7.8~8.5,更优选为8.0。

[0083] 本发明提供的铜离子检测试剂盒包括底物显色液。所述底物显色液的浓度为1~

2mg/mL,更优选为1.27mg/mL。所述底物显色液的种类根据标记用酶的种类确定。本发明实施例中,酶的种类为HRP时,所述底物显色液为四甲基联苯胺(TMB)。

[0084] 本发明提供的铜离子检测试剂盒包括洗涤液。所述洗涤液为包含Tween 20的摩尔浓度为0.01~0.02mol/L的PBS溶液。所述PBS溶液的pH值优选为7.0~8.0,更优选为7.4。Tween 20在PBS溶液中的质量浓度优选为0.05~0.1%,更优选为0.08%。

[0085] 本发明提供的铜离子检测试剂盒包括EDTA处理液。EDTA处理液的质量浓度为10~20mg/mL,更优选为15mg/mL。在EDTA处理液使用时优选将样品溶液、样品稀释液和EDTA处理液的体积比为5:5:1。EDTA处理液的作用是用于样品前处理,其目的是使EDTA和铜离子结合,形成铜离子-EDTA螯合物溶液,便于抗体对铜离子的识别。

[0086] 本发明提供的铜离子检测试剂盒包括铜离子标准品溶液。所述铜离子标准品溶液为 Cu^{2+} -EDTA溶液。所述 Cu^{2+} -EDTA溶液的来源没有特殊限制,采用本领域技术人员所熟知的 Cu^{2+} -EDTA溶液即可。本发明实施例中, Cu^{2+} -EDTA溶液为实验室自制。所述 Cu^{2+} -EDTA溶液制备方法没有特殊限制,采用本领域技术人员所熟知的 Cu^{2+} -EDTA溶液制备方法即可。

[0087] 本发明还提供了所述铜离子检测试剂盒在检测环境中铜离子的应用,包括以下步骤:

[0088] a、将抗铜离子单克隆抗体溶液、稀释的待测样品溶液和酶标Cu-ITCBE螯合物半抗原加入到包被有羊抗鼠IgG二抗的检测板孔内,混合,孵育后用洗涤液洗涤;

[0089] b、向检测板中加入底物显色液,孵育,加入终止液混合,测定OD值;

[0090] c、根据所述步骤b得到的OD值与预定的标准曲线,得到待测样品中铜离子的浓度,所述标准曲线是用铜离子标准品溶液进行检测,得到的OD值与铜离子标准品浓度构建具有线性关系的曲线。

[0091] 本发明将抗铜离子单克隆抗体溶液、稀释的待测样品溶液和酶标Cu-ITCBE螯合物半抗原加入到包被有羊抗鼠IgG二抗的检测板孔内,混合,孵育后用洗涤液洗涤。

[0092] 本发明中,所述样品溶液检查前优选进行稀释。所述稀释的倍数优选为100~1000倍,更优选为200~800倍,最优选为500倍。所述稀释采用样品稀释液进行处理。所述样品稀释液稀释样品后优选加入EDTA处理液。将样品溶液、样品稀释液和EDTA处理液的体积比为5:5:1。

[0093] 本发明中,所述检测板孔内抗铜离子单克隆抗体溶液、稀释的待测样品溶液和酶标半抗原溶液的体积比优选为1~2:1~2:1~2,更优选为1:1:1。

[0094] 本发明中,所述混合的方法优选采用移液器枪头吹吸的方法混合。

[0095] 本发明中,所述孵育的温度优选为30~40℃,更优选为35℃。孵育的时间优选为5~30min,更优选为20min。

[0096] 本发明中,所述洗涤的方法没有特殊限制,采用本领域技术人员所熟知的洗涤方法即可。

[0097] 所述步骤a中的洗涤后,本发明向得到的检测板中加入底物显色液,孵育,再加入终止液混合,测定OD值。

[0098] 本发明中,所述底物显色液的体积优选为60~120 μL /孔,更优选为80~100 μL 。在本发明中,加入显色液后孵育的时间优选为4~8min,更优选为5min。所述孵育的温度优选为23~28℃,更优选为25℃。

[0099] 本发明中,加入终止液前优选弃去检测板中溶液。所述弃去检测板中溶液的方法优选甩干的方式进行。

[0100] 本发明中,所述终止液的加入体积优选为80~120 μ L/孔,更优选为100 μ L。混合的时间优选为2~4min,更优选为3min。

[0101] 本发明中,所述OD值测定的波长优选为450nm。

[0102] 得到OD值后,本发明根据预定的标准曲线和所述OD值,得到待测样品中铜离子的浓度。本发明中,所述标准液的检查方法与样品溶液检测方法相同。以抑制率 B/B_0 (%)为纵坐标(B_0 为 Cu^{2+} -EDTA为0浓度时的吸光度值, B 为 Cu^{2+} -EDTA不同浓度时的吸光度值),以 Cu^{2+} -EDTA标准品的浓度为横坐标,绘制标准曲线,根据曲线趋势推导回归方程。根据稀释后的待测样品溶液中OD值代入回归方程中,得到样品中铜离子的浓度。

[0103] 下面结合实施例对本发明提供的一种环境污染中铜离子直接竞争酶联免疫检测试剂盒及其应用进行详细的说明,但是不能把它们理解为对本发明保护范围的限定。

[0104] 实施例1

[0105] Cu-ITCBE-cBSA免疫原的合成(图1)

[0106] (1)称取10mg ITCBE溶于1mL二甲基亚砜(DMSO)中形成金属螯合剂溶液;称取9.0mg硝酸铜 $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 溶于1mL pH 8.0的HEPES缓冲液(对细胞无毒性作用。它是一种氢离子缓冲剂,能较长时间控制恒定的pH范围)(10mM/L)中形成 Cu^{2+} 溶液;将金属螯合剂溶液和 Cu^{2+} 溶液混合,并用NaOH调节pH值至7.0,然后在室温条件下放在摇床上反应12小时,即形成Cu-ITCBE螯合物半抗原。

[0107] (2)称取66mg BSA、11.6mg EDC溶于5mL PBS缓冲液中,搅拌条件下,缓慢加入7mg 乙二胺(提前溶于3mL PBS+DMF溶液中),37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡反应2h。反应液用PBS透析4d,活化的载体蛋白BSA冻干保存,即为cBSA。

[0108] (3)称取30mg cBSA溶于1mL pH 8.0的HEPES缓冲液(10mmol/L)中形成30mg/mL的载体蛋白溶液;取1mL Cu-ITCBE螯合物半抗原溶液加入到1mL载体蛋白溶液中并用NaOH调节pH值至9.0,室温摇床反应24小时,反应结束后将反应液装入透析袋,先用蒸馏水透析2d,再用PBS透析3d,即形成Cu-ITCBE-cBSA免疫原,其合成路线见图1。

[0109] 实施例2

[0110] 抗铜离子单克隆抗体的制备

[0111] 所述的抗铜离子特异性单克隆抗体由Cu-ITCBE-cBSA免疫原免疫Balb/C小鼠制备而来,由以下步骤实现:

[0112] (1)小鼠免疫:用Cu-ITCBE-cBSA免疫6-8周龄雌性Balb/C小鼠5只,剂量为60 μ g/只,体积为0.2mL。首免用PBS稀释的免疫原与等体积FCA完全乳化,以后每隔4w加强免疫一次,换用FIA乳化。免疫5次后7d断尾采血分离血清,用间接ELISA和间接竞争ELISA(ciELISA)筛选效价高,阻断效果好的小鼠作为融合备用鼠。融合前3d超免小鼠,尾静脉和腹腔各注射50 μ g免疫原,体积均为100 μ L。

[0113] (2)细胞融合:融合前4-5d用含有8-氮鸟嘌呤的完全培养基(含15%FBS的RPMI-1640)传代培养NS0细胞;前1d用HAT培养滋养细胞;融合时眶下窦采血,脱颈致死小鼠。无菌取脾脏制备脾细胞,在PEG-1500作用下与NS0细胞融合(细胞数量比约为10:1),将融合后的细胞悬液加入到已铺有滋养细胞的96孔细胞板中,HAT培养。

[0114] (3) 单克隆细胞株的筛选:融合后10~14d用间接ELISA和ciELISA筛选强阳性、抑制率高、生长状态好的杂交瘤细胞株,用有限稀释法进行3次亚克隆。然后用铜离子准品溶液筛选灵敏度高、特异性强的单克隆源细胞株,共取得6株。其中,C6H5细胞株灵敏度最高,特异性最强,

[0115] (4) 单克隆抗体的制备:将C6H5细胞株转移到24孔细胞板及50mL细胞瓶中扩大培养。筛选的杂交瘤细胞浓度达到约 10^7 /mL时,向10d前经液体石蜡处理过的经产母鼠腹腔内注射单克隆细胞 10^8 /只。10~12d后抽取腹水,饱和硫酸胺法纯化抗铜离子特异性单克隆抗体。

[0116] 实施例3

[0117] 间接ELISA测定铜离子抗体效价

[0118] 第一步,用pH 9.6的0.05mol/L碳酸盐缓冲液稀释的Cu-ITCBE-cOVA包被原包板,包被浓度 $2\mu\text{g}/\text{mL}$,包被量每孔 $100\mu\text{L}$, 37°C 温育2h,PBST洗板4次,每次间隔3min;第二步,用5%猪阴性血清封闭,每孔 $280\mu\text{L}$, 37°C 温育1h,PBST洗板4次,每次间隔3min;第三步,加铜离子多克隆或单克隆抗体,每孔 $50\mu\text{L}$,用封闭液倍比稀释,设阴性对照(negative control, NC)和空白对照(blank control, BC), 37°C 温育15min,PBST洗板4次,每次间隔3min;第四步,加GaMIgG-HRP,1:1000倍稀释,每孔 $50\mu\text{L}$, 37°C 温育25min,PBST洗板4次,每次间隔3min;第五步,加酶底物TMB显色液,每孔 $60\mu\text{L}$,室温反应5-10min;第六步,终止显色反应,每孔加入终止液 $2\text{mol}/\text{L}$ H_2SO_4 $100\mu\text{L}$,用酶标仪读 $A_{450\text{nm}}$ 值;第七步,结果判断,以待测孔 $A_{450\text{nm}} \geq \text{NCA}_{450\text{nm}}$ 的2.1倍($P/N \geq 2.1$)时,判为阳性,以最大稀释倍数计算抗体效价。

[0119] 实施例4

[0120] 抗体特异性结果鉴定

[0121] 用C6H5细胞株制备的抗铜离子单克隆抗体建立dELISA标准曲线,采用交叉反应试验鉴定其特异性。交叉反应试验选择镉、铅、汞、锌、钴、钼、铬与EDTA的螯合物溶液作为抑制剂,其标准螯合物溶液配制方法如下:用10mM HEPES缓冲液配制成EDTA溶液,将上述重金属离子标准储备液稀释成0、0.01、0.02、0.04、0.08、0.16、0.32、0.64、1.28、2.56、5.12、10.24、20.48、40.96、81.92、163.84 $\mu\text{g}/\text{L}$,两者混匀后用 NaHCO_3 调节pH值为6.0,室温摇床反应24小时,即形成重金属离子-EDTA螯合物溶液。抗体特异性以交叉反应率(CR)表示,计算公式是: $\text{CR}\% = \text{Cu}^{2+}\text{-EDTA的IC}_{50} / \text{其他竞争物IC}_{50} \times 100$,Cu离子浓度越低,抗体特异性越强,其实验结果见表一。表一可知,Cu²⁺-EDTA与其mAb的结合反应有很强的特异性,除与Zn²⁺-EDTA有9.4%的交叉反应外,与EDTA及其它重金属离子螯合物基本无交叉反应。

[0122] 表1 Cu²⁺-EDTA mAb与其它重金属离子螯合剂的交叉反应

	重金属离子螯合剂	IC ₅₀ (μg/L)	交叉反应率(%)
	Cu ²⁺ -EDTA	1.16	100
	Zn ²⁺ -EDTA	12.34	9.4
[0123]	Co ²⁺ -EDTA	> 58	< 2
	Hg ²⁺ -EDTA	> 116	< 1
	EDTA	> 232	< 0.5
	Cd ²⁺ -EDTA	> 232	< 0.5
	Pb ²⁺ -EDTA	> 232	< 0.5
[0124]	Mo ⁶⁺ -EDTA	> 232	< 0.5
	Cr ³⁺ -EDTA	> 232	< 0.5

[0125] 实施例5

[0126] Cu-ITCBE-HRP酶标半抗原的合成

[0127] (1) 称取10mg ITCBE溶于1mL二甲基亚砜(DMSO)中形成金属螯合剂溶液;称取9.0mg硝酸铜Cu(NO₃)₂溶于1mL pH 8.0的HEPES缓冲液(10mmol/L)中形成Cu²⁺溶液;将金属螯合剂溶液和Cu²⁺溶液混合,并用NaOH调节pH值至7.0,然后在室温条件下放在摇床上反应12小时,即形成Cu-ITCBE螯合物半抗原。

[0128] (2) 称取100mg HRP溶于1mL pH8.0的HEPES缓冲液(10mmol/L)中形成100mg/mL的HRP辣根过氧化物酶溶液;取1mL Cu-ITCBE螯合物半抗原溶液加入到1mL辣根过氧化物酶溶液中并用NaOH调节pH值至9.0,室温摇床反应24小时,反应结束后将反应液装入透析袋,先用蒸馏水透析2d,再用PBS透析3d,即形成Cu-ITCBE-HRP酶标半抗原。

[0129] 实施例6

[0130] 直接竞争ELISA(dELISA)检测步骤

[0131] 第一步,采用棋盘法优化羊抗鼠二抗(GaMIgG)包被浓度为10μg/孔,包被量每孔100μL,37℃温育2h,PBST洗板3次,每次间隔2min;第二步,用5%猪阴性血清封闭,每孔280μL,37℃温育1h,PBST洗板3次,每次间隔2min;第三步,依据效价添加稀释后的抗铜离子单克隆抗体、样品或倍比稀释的标准品、酶标半抗原,三者混匀后,37℃温育25min,PBST洗板3次,每次间隔2min,反应设NC和BC;第四步,加酶底物TMB显色液,每孔60μL,室温反应5min;第五步,终止显色反应,每孔加入终止液2mol/L H₂SO₄100μL,用酶标仪读A_{450nm}值。

[0132] 实施例7

[0133] 间接竞争ELISA(ciELISA)检测步骤

[0134] 第一步,用pH 9.6的0.05mol/L碳酸盐缓冲液稀释的Cu-ITCBE-cOVA包被原包板,包被浓度2μg/mL,包被量每孔100μL,37℃温育2h,PBST洗板4次,每次间隔3min;第二步,用5%猪阴性血清封闭,每孔280μL,37℃温育1h,PBST洗板4次,每次间隔3min;第三步,添加标准品:酶标板先以50uL封闭液铺底,然后第1孔加入500μg/L的Cu²⁺-EDTA螯合物标准品溶液,并向前进行倍比稀释,反应设NC和BC;第四步,依据间接ELISA抗体效价,添加封闭液稀释后的抗铜离子pAb,或mAb,每孔50μL,37℃温育15min,PBST洗板4次,每次间隔3min;第五步,加

GaMIgG-HRP,用封闭液1:1000倍稀释,每孔50 μ L,37 $^{\circ}$ C温育25min,PBST洗板4次,每次间隔3min;第六步,加酶底物TMB显色液,每孔60 μ L,室温反应5-10min;第七步,终止显色反应,每孔加入终止液2mol/LH₂SO₄100 μ L,用酶标仪读A_{450nm}值。

[0135] 实施例8

[0136] 实施例6中dELISA和实施例7中ciELISA检测性能的比较

[0137] 用C6H5细胞株制备的抗铜离子单克隆抗体建立ELISA检测方法,并进行dELISA和ciELISA检测性能的比较。以抑制率B/B₀(%)为纵坐标(B₀为Cu²⁺-EDTA为0浓度时的吸光度值,B为Cu²⁺-EDTA不同浓度时的吸光度值),以不同浓度的Cu²⁺-EDTA标准品为横坐标,绘制标准曲线,根据曲线趋势推导回归方程,进行相关分析。灵敏度以半数抑制浓度(IC₅₀值)表示;定量检测限(IC₂₀-IC₈₀)代表标准品对最大信号强度(B₀)的抑制范围;检测限以IC₁₅表示,其结果见图2。

[0138] dELISA标准曲线的回归方程式为 $y = -7.023 \ln(x) + 58.321$ ($R^2 = 0.9529$),IC₅₀值为1.16 μ g/L;ciELISA标准曲线的回归方程式为 $y = -5.908 \ln(x) + 55.349$ ($R^2 = 0.9569$),IC₅₀值为1.32 μ g/L。根据公式计算出dELISA标准曲线在PBS中对Cu²⁺-EDTA的线性检测范围为0.18~39 μ g/L,检测限(LOD)为0.11 μ g/L;ciELISA标准曲线在PBS中对Cu²⁺-EDTA的线性检测范围为0.21~46 μ g/L,LOD为0.13 μ g/L。

[0139] 实施例9

[0140] 环境水样中铜离子污染检测dELISA试剂盒的操作步骤

[0141] 第一步,将所需试剂从冷藏环境中取出,置于室温(20~25 $^{\circ}$ C)平衡30min,注意每种液体试剂使用前均须摇匀;第二步,用吸管采集水样0.5mL于离心管中,再加入0.4mL样品稀释液,混匀后加入EDTA处理液0.1mL;第三步,将样品处理液50 μ L加入酶标板微孔条中,同时加入稀释后的抗铜离子单克隆抗体50 μ L、稀释后的酶标半抗原50 μ L,混匀静置25min后洗板,注意检测设三个重复,并设置NC和BC对照;第四步,加底物显色液A液和B液各30 μ L,静置5min后洗板;第五步,加入H₂SO₄终止液100 μ L,静置5min后酶标仪读取吸光度值;第六步,将吸光度值代入dELISA标准曲线的回归方程式,计算得到水样中铜离子含量。

[0142] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

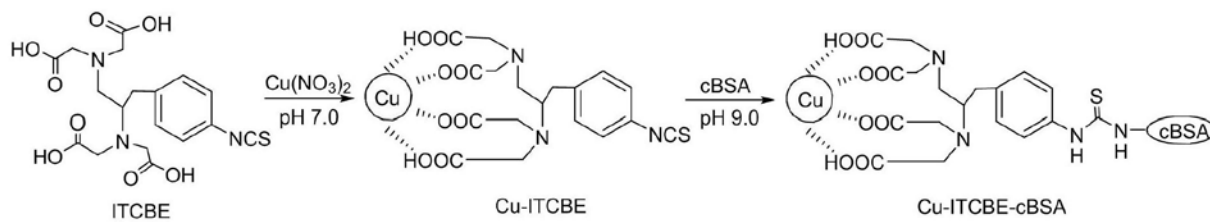


图1

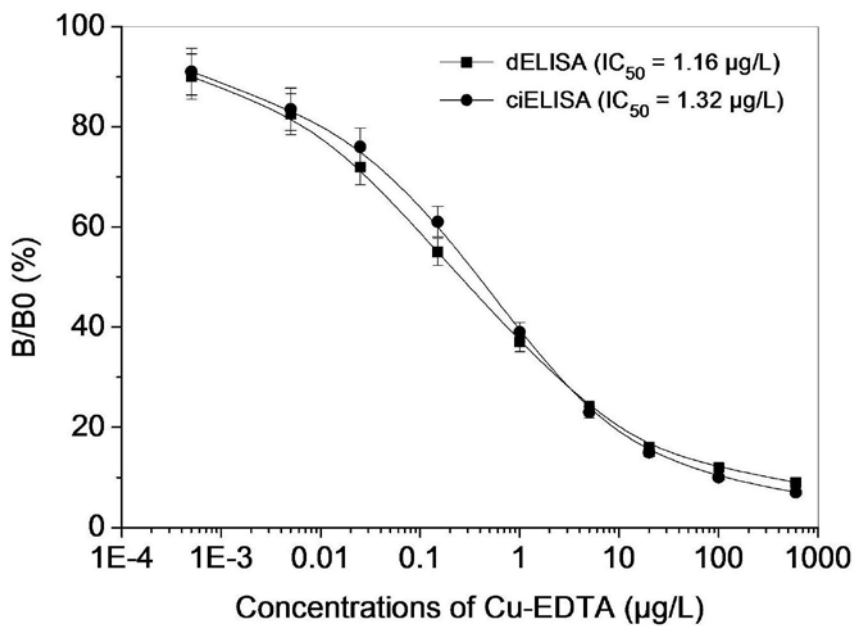


图2

专利名称(译)	一种环境污染中铜离子直接竞争酶联免疫检测试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN106841626B	公开(公告)日	2019-06-07
申请号	CN2017110099368.1	申请日	2017-02-23
[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	王秋霞 欧长波 马景周 余燕 魏小兵 张艳红 刘兴友 姜金庆 孙勇		
发明人	王秋霞 欧长波 马景周 余燕 魏小兵 张艳红 刘兴友 姜金庆 孙勇		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/577		
代理人(译)	代芳		
审查员(译)	贾静		
其他公开文献	CN106841626A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种基于直接竞争酶联免疫法铜离子检测试剂盒，包括：包被有羊抗鼠IgG二抗的检测板，所述检测板真空密封包装；所述羊抗鼠IgG二抗的包被浓度为50~200 μ g/mL；质量浓度为20~50 μ g/mL的酶标Cu-ITCBE螯合物半抗原；质量浓度为10~20 μ g/mL的抗铜离子单克隆抗体溶液；所述抗铜离子单克隆抗体溶液由Cu-ITCBE-cBSA免疫原免疫Balb/C小鼠制备而来；1.0~3.0mol/L的终止液；样品稀释液；底物显色液；洗涤液；铜离子标准品溶液；质量浓度为10~20mg/mL的EDTA处理液。本发明提供试剂盒具有灵敏度高、特异性强的特点，同时具有检测时间短的优点。

