



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103472231 B

(45) 授权公告日 2015. 11. 18

(21) 申请号 201310449022. 1

(22) 申请日 2013. 09. 28

(73) 专利权人 郑州大学

地址 450001 河南省郑州市高新技术开发区
科学大道 100 号

(72) 发明人 王爱萍 周景明 张改平 祁元明
张守涛 祁艳华 李永欣 席宇
栗宁 段倩倩 郑伟 王新洲
何文博

(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)

(56) 对比文件

CN 101139398 A, 2008. 03. 12,

CN 101486767 A, 2009. 07. 22,

CN 101655499 A, 2010. 02. 24,

CN 103076446 A, 2013. 05. 01,

唐秋艳等. 酶联免疫诊断技术. 《免疫诊断
试剂实用技术》. 2009,

Diane A. Blake等. Antibody-based sensors
for heavy metal ions.. 《Biosensors &
Bioelectronics》. 2001, 第 16 卷

方淑兵等. 重金属汞酶联免疫检测方法的建
立. 《食品工业科技》. 2012, 第 33 卷 (第 16 期),

杨凤丽. 重金属汞单克隆抗体制备与免疫检
测方法建立. 《中国优秀硕士学位论文全文数据
库工程科技 I 辑》. 2008, (第 200805 期),

审查员 毕秀华

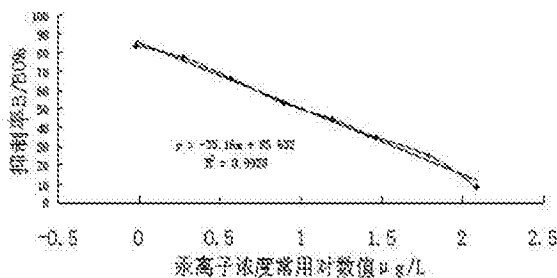
权利要求书2页 说明书9页 附图1页

(54) 发明名称

检测汞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汞离子的间接竞争
酶联免疫试剂盒及其制备方法。试剂盒内设有
汞离子包被抗原包被的酶标板、抗汞离子单
克隆抗体、酶标二抗、底物显色液、终止液、
汞离子标准溶液、洗液浓缩液和样品处理液。
本发明的试剂盒能痕量检测汞离子,用于检测
环境、土壤、水、食品、药物、化妆品等中的
汞离子,具有快速、简便、敏感、特异和经济
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。该试剂
盒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。



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

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 为过氧化氢或过氧化脲,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;所述汞离子标准溶液为汞离子溶解于 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;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;

所述的汞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 硝酸汞溶于 100uL 蒸馏水中,形成均匀的 Hg^{2+} 溶液;将 Hg^{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 Hg^{2+} -ITCBE-OVA 包被抗原,收集分装, -20℃ 冻存;

所述的抗汞离子单克隆抗体是按以下方法制备的:

(1) 人工抗原合成: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 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 硝酸汞溶于 100uL 蒸馏水中,形成均匀的 Hg^{2+} 溶液;将 Hg^{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 Hg^{2+} -ITCBE-BSA,收集分装, -20℃ 冻存;

(2) 免疫动物:以 Hg^{2+} -ITCBE-BSA 为免疫抗原,以 6 周龄雌性 Balb/c 小鼠 5 只作为免疫动物,背部皮下分点注射,免疫剂量为每只每次 50 μ g,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 Hg^{2+} -EDTA 螯合物的多克隆抗体(Hg^{2+} -EDTA pAb)效价,阻断 ELISA 法检测 Hg^{2+} -EDTA 对 Hg^{2+} -ITCBE-BSA 的半数抑制浓度 IC₅₀,挑选效价最高、IC₅₀ 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,获得一株杂交瘤细胞株;

(5) 制备单克隆抗体:采用体内诱生腹水法制备抗 Hg²⁺-EDTA 单克隆抗体(Hg²⁺-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 10⁶/mL,腹腔注射 Balb/C 小鼠 0.5mL/只,接种细胞 7-10 天后产生腹水,进行收集腹水,于 37℃ 水浴 30min,4℃ 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℃ 保存备用。

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:所述酶标板按如下方法包被:包被抗原为 Hg²⁺-ITCBE-OVA,包被浓度为 2 μg/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 μL/孔,37℃ 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 μL,37℃ 温育 1 h,再用 PBST 洗涤 3 次。

3. 一种如权利要求 1 所述的检测汞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 Hg²⁺-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 的抗汞离子的单克隆抗体;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;汞离子标准溶液为硝酸汞用 2% 的硝酸稀释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。

4. 根据权利要求 3 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 Hg²⁺-ITCBE-OVA,包被浓度为 2 μg/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 μL/孔,37℃ 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 μL,37℃ 温育 1 h,再用 PBST 洗涤 3 次。

检测汞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汞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] 汞,俗称水银,是在常温、常压下唯一以液态存在的金属,化学性质稳定,汞常温下即可蒸发,汞蒸汽和汞的化合物多有剧毒。汞在自然界中普遍存在,我国是汞的生产、使用和排放大国,汞污染防治形势十分严峻。重金属汞是环境污染持久的剧毒物质,毒性高,损害人类健康,汞污染已成为全球性的重大环境问题,亦引起我国政府的高度重视,汞污染防治已被列为“十二五”规划重大专项。汞中毒以慢性为多见,主要是在生产或使用过程中长期吸入汞蒸汽和汞化合物粉尘所致。汞蒸汽较易透过肺泡壁细胞膜,与血液中的脂质结合,很快分布到全身组织。汞在红细胞和其它组织中被氧化成 Hg^{2+} ,并与蛋白质结合而蓄积。金属汞在胃肠道几乎不吸收。慢性汞中毒主要症状表现为精神异常、齿龈炎、震颤和肾炎等;急性汞中毒主要表现为急性腐蚀性口腔炎和胃肠炎,严重时可发生急性肾功能衰竭、肝脏损害。皮肤接触汞及其化合物可引起接触性皮炎,具有变态反应性质。

[0003] 由于汞的污染和危害性较大,我国制定了土壤、食品、水体、化妆品等涉汞领域中的国家限量标准,食品中牛乳汞允许量标准(GB2762-94)为 $\leq 0.01mg/kg$,地下水质量标准(GB7468-2012)中规定,主要适用于集中式生活饮用水水源及农田灌溉水的汞离子限量 $\leq 0.001mg/L$ 。

[0004] 目前,检测环境汞离子的方法主要有(1)物理和化学分析方法,包括分光光度法、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)、原子荧光光谱法(AFS)等。这些方法各有优缺点,分光光度法操作简单,快速,干扰小,但其灵敏度不高;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、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,且对操作人员技术要求较为严格,限制了其广泛使用。(2)免疫学分析法:包括酶联免疫吸附法(ELISA)和胶体金免疫层析法。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,该方法缩短了检测时间,可以对重金属进行定性定量检测。但ELISA方法需要配套的酶标仪和配套试剂,操作过程较复杂,而且国内现处在研发阶段,进口国外产品价格昂贵,因而ELISA方法的应用受到了较大限制。而商品化的快速检测仪器,其灵敏度低(检测下限为 $0.1mg/L$),达不到国标规定的限值(污水 $0.05mg/L$,饮用水 $0.001mg/L$),且选择性差,无法满足灵敏、准确的检测要求。

[0005] 因此,研究一种可以简便、敏感、特异、经济、筛检量大的汞离子快速检测产品,是当前迫切需要解决的技术问题,对于减少环境污染、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：针对现有检测汞离子技术的不足，制备出抗汞离子的高敏感性、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汞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、特异的检测样品中的汞离子。

[0007] 本发明的技术方案：

[0008] 一种检测汞离子的间接竞争酶联免疫试剂盒，包括箱体，箱体内设有用汞离子包被抗原包被过的酶标板、抗汞离子的单克隆抗体、酶标二抗、底物显色液、终止液、汞离子标准溶液、洗液浓缩液和样品处理液。

[0009] 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；所述汞离子标准溶液为汞离子溶解于 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。

[0010] 所述的汞离子包被抗原是由以下方法制备的：

[0011] (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；

[0012] (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；

[0013] (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；

[0014] (4)取 11.25mg 硝酸汞溶于 100uL 蒸馏水中，形成均匀的 Hg^{2+} 溶液；将 Hg^{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 Hg^{2+} -ITCBE-OVA 包被抗原，收集分装，-20℃冻存。

[0015] 所述酶标板按如下方法包被：包被抗原为 Hg^{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℃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℃温育 1 h，再用 PBST 洗涤 3 次。

[0016] 所述的抗汞离子单克隆抗体是按以下方法制备的：

[0017] (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；

[0018] 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 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 硝酸汞溶于 100uL 蒸馏水中，形成均匀的 Hg^{2+} 溶液；将 Hg^{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 Hg^{2+} -ITCBE-BSA，收集分装，-20℃冻存；

[0019] (2) 免疫动物：以 Hg^{2+} -ITCBE-BSA 为免疫抗原，以 6 周龄雌性 Balb/c 小鼠 5 只作

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 $50\ \mu\text{g}$ 、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;

[0020] (3)选择细胞融合备用小鼠:间接ELISA检测抗血清中 Hg^{2+} -EDTA螯合物的多克隆抗体(Hg^{2+} -EDTA pAb)效价,阻断ELISA法检测 Hg^{2+} -EDTA对 Hg^{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;

[0021] (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,获得一株杂交瘤细胞株;

[0022] (5)制备单克隆抗体:采用体内诱生腹水法制备抗 Hg^{2+} -EDTA单克隆抗体(Hg^{2+} -EDTA mAb),取8周龄健康Ba1b/c雌性小鼠,腹腔注射弗氏不完全佐剂(FIA) $0.5\text{mL}/$ 只,10~15天后使用;将培养的阳性杂交瘤细胞 $1000\text{r}/\text{min}$ 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 $10^6/\text{mL}$,腹腔注射 $0.5\text{mL}/$ 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, $12000\text{r}/\text{min}$ 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。

[0023] 一种检测汞离子的间接竞争酶联免疫试剂盒的组建方法,试剂盒包括 Hg^{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的抗汞离子的单克隆抗体;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(HRP);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 $2\text{mol}/\text{L}$ 的硫酸溶液;汞离子标准溶液为硝酸汞用2%的硝酸稀释得到的系列浓度的溶液;洗液浓缩液PBST为 $0.1\text{mol}/\text{L}$ 、pH7.4的磷酸盐缓冲液,其中含0.05%的Tween-20;样品处理液为 $0.1\text{mol}/\text{L}$ 的EDTA溶液。

[0024] 所述酶标板按如下方法包被:包被抗原为 Hg^{2+} -ITCBE-OVA,包被浓度为 $2\ \mu\text{g}/\text{mL}$,包被溶液为 $0.05\text{mol}/\text{L}$ 的pH为9.6的碳酸盐缓冲液,包被剂量为 $100\ \mu\text{L}/$ 孔, 37°C 温育2h或室温8h,用洗液浓缩液PBST洗涤3次,然后用5%的猪血清封闭,每孔 $250\ \mu\text{L}$, 37°C 温育1h,再用PBST洗涤3次。

[0025] 所述的抗汞离子单克隆抗体是按以下方法制备的:

[0026] (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 $10\text{mmol}/\text{L}$ 、pH为9.0的HEPES缓冲液中,形成BSA载体蛋白溶液;

[0027] 称取10mg ITCBE溶于1mL二甲基亚砜(DMSO)中形成金属整合剂溶液;将 0.5mL 金属整合剂溶液逐滴加到BSA载体蛋白溶液中,混匀后,加入 $100\ \mu\text{L}$ 浓度为 $1.5\text{mol}/\text{L}$ 的三正丁胺,摇床室温反应24h,制成BSA-ITCBE溶液;取11.25mg硝酸汞溶于 $100\ \mu\text{L}$ 蒸馏水中,形成均匀的 Hg^{2+} 溶液;将 Hg^{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 Hg^{2+} -ITCBE-BSA,收集分装, -20°C 冻存;

[0028] (2)免疫动物:以 Hg^{2+} -ITCBE-BSA为免疫抗原,以6周龄雌性Ba1b/c小鼠5只作

为免疫动物,背部皮下分点注射,免疫剂量为每只每次 50 μg ,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;

[0029] (3)选择细胞融合备用小鼠:间接 ELISA 检测抗血清中 Hg^{2+} -EDTA 螯合物的多克隆抗体(Hg^{2+} -EDTA pAb)效价,阻断 ELISA 法检测 Hg^{2+} -EDTA 对 Hg^{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;

[0030] (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,获得一株杂交瘤细胞株;

[0031] (5)制备单克隆抗体:采用体内诱生腹水法制备抗 Hg^{2+} -EDTA 单克隆抗体(Hg^{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 $10^6/\text{mL}$,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 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30min,4 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

[0032] 本发明的积极有益效果:

[0033] 1. 本发明试剂盒的组建方法,制备了汞离子的人工抗原,得到了适宜分子结合比的人工免疫抗原和包被抗原,并获得了高效价、敏感和特异的抗血清,为试剂盒的组建提供了必要条件。

[0034] 2. 本发明试剂盒的组建方法,制备了抗汞离子的单克隆抗体,抗体的腹水效价为 1 : 6.9×10^5 ,亲和常数 Ka 为 1.52×10^{10} L/mol,与其它重金属离子的交叉反应率小于 1%,该抗体具有高效价、高亲和力、特异性强等特性,为汞离子的痕量快速检测提供了保障。

[0035] 3. 本发明的汞离子间接竞争酶联免疫试剂盒,能痕量检测汞离子,具有快速、简便、敏感、特异和经济等特性,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 0.5 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。

[0036] 4. 本发明的汞离子间接竞争酶联免疫试剂盒,可用于检测环境、土壤、水、食品、药物、化妆品等中的汞离子,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。

附图说明

[0037] 图 1 为人工免疫抗原 Hg^{2+} -ITCBE-Protein 合成的技术路线图;

[0038] 图 2 为检测汞离子酶联免疫试剂盒的标准曲线图。

具体实施方式

[0039] 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。

[0040] 实施例一、汞离子人工免疫抗原的制备

[0041] 采用异硫氰酯法制备人工完全抗原,包括免疫抗原 Hg^{2+} -ITCBE-BSA 和包被抗原 Hg^{2+} -ITCBE-OVA。以包被抗原 Hg^{2+} -ITCBE-OVA 为例,其制备方法如下。

[0042] (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;

[0043] (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;

[0044] (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 μL 、1.5mol/L 的三正丁胺,摇床室温反应 24h,制成 OVA-ITCBE 溶液;

[0045] (4)取 11.25mg 硝酸汞溶于 100 μL 蒸馏水中,形成均匀的 Hg^{2+} 溶液;将 Hg^{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 Hg^{2+} -ITCBE-OVA 包被抗原,收集分装, - 20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存。

[0046] 同法制备免疫抗原 Hg^{2+} -ITCBE-BSA。

[0047] 实施例二、汞离子人工免疫抗原鉴定

[0048] 采用二喹啉甲酸法测定 Hg^{2+} -ITCBE-BSA 中载体蛋白 BSA 浓度。以 BSA 作为标准蛋白,配成 0 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 、20 $\mu\text{g/mL}$ 、40 $\mu\text{g/mL}$ 、60 $\mu\text{g/mL}$ 、80 $\mu\text{g/mL}$ 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: $y=0.0035x + 0.0065$, $R^2 = 0.9981$,其中 y 为样品在波长为 562nm 处的吸光度, x 为样品蛋白浓度。

[0049] 采用 ICP-AES 法测定 Hg^{2+} -ITCBE-BSA 中 Hg^{2+} 的浓度。将 100 $\mu\text{g/mL}$ 的 Hg^{2+} -ITCBE-BSA 中 Hg^{2+} 标准储备液用 2% 的硝酸稀释成 0 $\mu\text{g/mL}$ 、0.1 $\mu\text{g/mL}$ 、0.2 $\mu\text{g/mL}$ 、0.4 $\mu\text{g/mL}$ 、0.6 $\mu\text{g/mL}$ 、0.8 $\mu\text{g/mL}$ 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 $Y=0.0174X+0.0019$,相关系数 0.9989;在 253.7nm 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。

[0050] 实施例三、抗汞离子单克隆抗体的制备

[0051] (1)免疫动物。用 Hg^{2+} -ITCBE-BSA 免疫 Balb/c 小鼠 5 只,免疫剂量为 50 $\mu\text{g} \cdot 0.2 \text{ mL/}$ 只,背部皮下多点注射。首免,用灭菌磷酸盐缓冲液(PBS)稀释 Hg^{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 Hg^{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 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 放置过夜,800 r/min 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min,取上清后 - 20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

[0052] (2)细胞融合备用小鼠选择。间接 ELISA 检测抗血清中 Hg^{2+} 与乙二胺四乙酸(EDTA)螯合物 Hg^{2+} -EDTA 的多克隆抗体(pAb)效价,阻断 ELISA 检测 Hg^{2+} -EDTA pAb 对 Hg^{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。

[0053] (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 ℃,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 ℃ 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 μL,置 37 ℃、5% 的 CO₂培养箱中培养。

[0054] 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 Hg²⁺离子单克隆抗体(Hg²⁺-EDTA mAb)的稳定性。

[0055] (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。

[0056] 实施例四、抗汞离子单克隆抗体的鉴定

[0057] (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 : 6.9 × 10⁵。

[0058] (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 μg/mL 和 1.7 μg/mL 的 Hg²⁺-ITCBE-OVA 包被,加入倍比稀释的 Hg²⁺-ITCBE mAb,再加入 GaMIgG-HRP, TMB 显色测 A_{450nm}值,以 Hg²⁺-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 Hg²⁺-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。

[0059] (3) 敏感性鉴定。用阻断 ELISA 测定 Hg²⁺-EDTA mAb 对不同浓度 Hg²⁺-EDTA 的抑制率,以抑制率 B/B₀为纵坐标,以不同浓度 Hg²⁺-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 Hg²⁺-EDTA mAb 对 Hg²⁺-EDTA 的 IC₅₀。鉴定结果,IC₅₀为 10.31ng/mL。

[0060] (4) 特异性鉴定。采用交叉反应试验鉴定其特异性。交叉反应试验选择汞、铬、铅、锌、铜、铯、钴、钼、铁与 EDTA 的螯合物(螯合方法同上)和 EDTA 溶液做为抑制剂,用阻断 ELISA 测定各抑制物的 IC₅₀,以 Hg²⁺-EDTA mAb 对 Hg²⁺-EDTA 的 IC₅₀和 Hg²⁺-EDTA 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 1%。

[0061] 实施例五、汞离子酶联免疫试剂盒的制备

[0062] (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(RaRIgG-HRP)和单克隆抗体的工作浓度,分别为 1 : 1000 和 1 : 10000。

[0063] (2) 汞离子酶联免疫试剂盒组装：

[0064] 试剂盒包括： Hg^{2+} -ITCBE-OVA 包被并用 5% 猪血清封闭的 8×12 (96 孔) 或 4×12 (48 孔) 酶标板；C1 号液：工作浓度为 1 : 10000 的抗汞离子的单克隆抗体；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；汞离子标准溶液为硝酸汞用 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。

[0065] (3) 汞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 Hg^{2+} 标准品的抑制率，以抑制率 $B/B_0\%$ (B 是 Hg^{2+} 不同标准浓度的 A_{450} 值， B_0 是 Hg^{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 $y = -35.16x + 85.632$ ， $R^2 = 0.9928$ ， IC_{50} 为 $10.31 \mu\text{g/L}$ 。

[0066] 实施例六、汞离子酶联免疫试剂盒的性能测定

[0067] (1) 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 0.5 ng/mL。

[0068] (2) 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，检测范围为 0.5 ~ 73.62 ng/mL。

[0069] (3) 准确性测定。将 Hg^{2+} 标准品以终浓度分别为 1、2、4、8、10 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 91.2% ~ 98.41%，平均 96.1%，变异系数 (CV) 在 10.9% ~ 14.8%，平均 13.09%；牛乳的回收率在 89.7% ~ 98.1%，平均 95.43%，CV 在 11.2% ~ 13.9%，平均 13.46%；饲料和牛乳的平均 CV 小于 15%，表明试剂盒具有较高准确度。见表 2。

[0070] 表 2 汞离子酶联免疫试剂盒的添加回收试验 ($n = 6$)

[0071]

样品	Hg ²⁺ 添加量 (μg/L)	测定值 (μg/L)	回收率 (%)	变异系数 (%)
饲料	1	0.98±0.08	97.34±14.5	14.8
	2	1.82±0.25	91.2±12.5	13.7
	4	3.77±0.84	94.35±12.8	13.5
	8	7.92±1.02	98.41±10.8	10.9
	10	9.81±1.13	98.1±12.1	12.3
牛乳	1	0.96±0.06	96.2±13.4	13.9
	2	1.79±0.25	89.7±12.5	13.9
	4	3.84±0.94	96.2±13.8	14.3
	8	7.82±1.28	97.8±14.2	14.5
	10	9.79±1.15	98.1±10.4	10.6

[0072] (4) 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 Hg²⁺ mAb 对 Hg²⁺ 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。

[0073] 表 3 Hg²⁺-EDTA mAb 与其它金属螯合物的交叉反应

[0074]

化合物	$IC_{50}(\mu\text{g/L})$	交叉反应率(%)
Hg ²⁺ -EDTA	10.31	100
EDTA	$>6.4 \times 10^3$	<0.05
Mn ²⁺ -EDTA	$>3.2 \times 10^3$	<0.05
Pb ²⁺ -EDTA	$>6.4 \times 10^3$	<0.05
Cd ²⁺ -EDTA	$>6.4 \times 10^3$	<0.05
Cr ²⁺ -EDTA	$>3.2 \times 10^3$	<0.05
Zn ²⁺ -EDTA	$>3.2 \times 10^3$	<0.05
Co ²⁺ -EDTA	$>3.2 \times 10^3$	<0.05
Cu ²⁺ -EDTA	$>6.4 \times 10^3$	<0.05
Fe ²⁺ -EDTA	$>6.4 \times 10^3$	<0.05

[0075] (5) 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 A_{450} 值、 IC_{50} 、 R^2 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 $A_{450\text{nm}}$ 值有所减小,但其 IC_{50} 、 R^2 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。见下表 4。

[0076] 表 4 试剂盒的保存期

[0077]

保存天数 (d)	IC_{50} ($\mu\text{g/L}$)	R^2	最大吸光值
1	10.31	0.9905	1.075
30	10.38	0.9832	0.965
60	10.41	0.9817	0.934
90	11.25	0.9802	0.897
120	11.87	0.9739	0.836
150	12.26	0.9783	0.791
180	12.54	0.9749	0.708

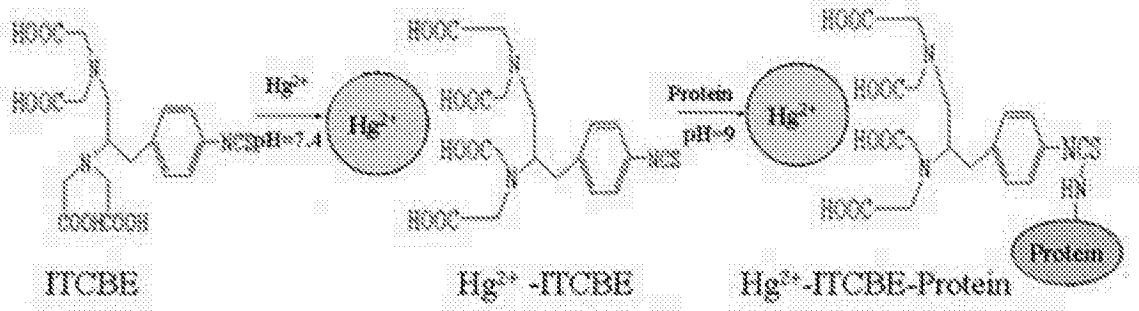


图 1

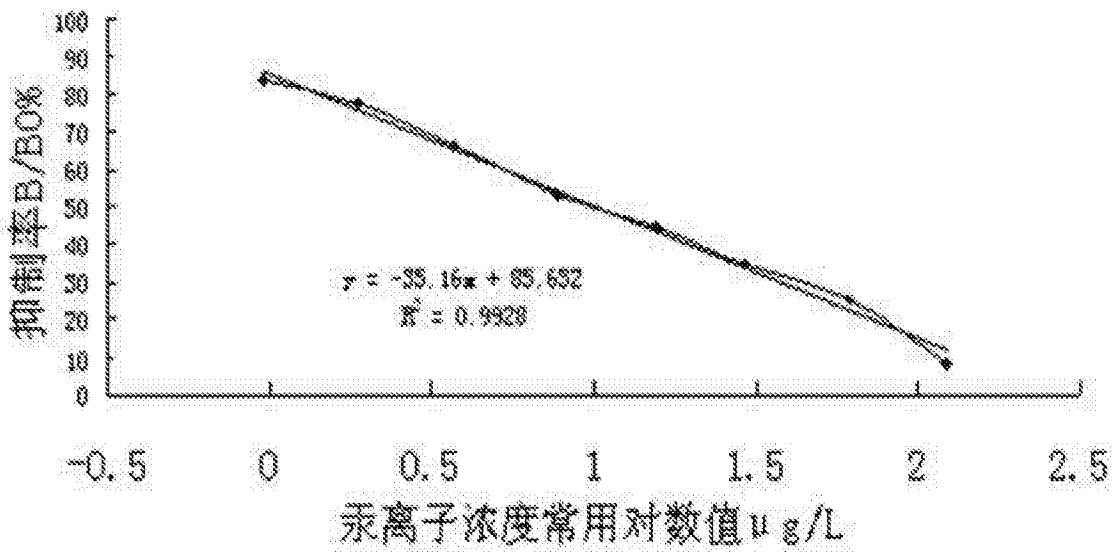


图 2

专利名称(译)	检测汞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	CN103472231B	公开(公告)日	2015-11-18
申请号	CN201310449022.1	申请日	2013-09-28
[标]申请(专利权)人(译)	郑州大学		
申请(专利权)人(译)	郑州大学		
当前申请(专利权)人(译)	郑州大学		
[标]发明人	王爱萍 周景明 张改平 祁元明 张守涛 祁艳华 李永欣 席宇 栗宁 段倩倩 郑伟 王新洲 何文博		
发明人	王爱萍 周景明 张改平 祁元明 张守涛 祁艳华 李永欣 席宇 栗宁 段倩倩 郑伟 王新洲 何文博		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531		
代理人(译)	张爱军		
其他公开文献	CN103472231A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种用于检测汞离子的间接竞争酶联免疫试剂盒及其制备方法。试剂盒内设有用汞离子包被抗原包被的酶标板、抗汞离子单克隆抗体、酶标二抗、底物显色液、终止液、汞离子标准溶液、洗液浓缩液和样品处理液。本发明的试剂盒能痕量检测汞离子，用于检测环境、土壤、水、食品、药物、化妆品等中的汞离子，具有快速、简便、敏感、特异和经济等特性，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。该试剂盒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。

