



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101949921 B

(45) 授权公告日 2014.03.12

(21) 申请号 201010253930.X

(22) 申请日 2010.08.13

(83) 生物保藏信息

CGMCC No. 3987 2010.07.09

(73) 专利权人 中国农业大学

地址 100193 北京市海淀区圆明园西路2号

(72) 发明人 王保民 赵洪伟 南铁贵 谭桂玉

曹振 高巍 王敏 孙硕 李召虎

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

11245

代理人 关畅 任风华

(51) Int. Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

C07K 16/44(2006.01)

C12N 5/20(2006.01)

C12R 1/91(2006.01)

(56) 对比文件

CN 101768217 A, 2010.07.07, 权利要求书以及说明书第3-7页.

审查员 李保安

权利要求书2页 说明书9页 附图1页

(54) 发明名称

一种重金属酶标物及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种酶标物及其应用。该重金属酶标物,是络合物与酶形成的交联物;所述络合物为螯合剂与载体蛋白的偶联物与重金属形成的络合物。本发明所提供的制备铜离子酶标物的制备方法简单,合成成本低,HRP活性损失小。用本发明方法制备的酶标物所建立的ELISA检测方法具有很高的灵敏度。本发明的制备铜离子ELISA检测用酶标物的方法对其他重金属ELISA检测用酶标物的成功制备具有重要的参考价值,由该方法建立的铜离子快速免疫检测方法将有广阔的应用前景。

1. 一种用于检测样品中是否含有重金属的酶联免疫试剂盒,包括包被原和重金属酶标物;所述包被原为抗待检重金属的抗体;所述重金属酶标物中的重金属与所述待检重金属相同;

所述重金属酶标物是络合物与酶通过共价键形成的交联物;所述络合物为螯合剂与载体蛋白通过共价键连接形成的偶联物再与重金属通过配位键连接形成的络合物;

所述抗待检重金属的抗体是由保藏号为 CGMCC No. 3987 的杂交瘤细胞株 Cu-EDTA 6A9 产生。

2、根据权利要求 1 所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述重金属酶标物按照如下方法制备:

(1) 将酶活化,得到活化后的酶;

(2) 将所述活化后的酶与络合物进行交联反应,得到重金属酶标物;

所述络合物是按照包括如下步骤的方法制备的:

I、将螯合剂重氮化,得到重氮化的螯合剂;

II、将载体蛋白与所述重氮化的螯合剂混合,进行偶联反应,得到载体蛋白与所述重氮化的螯合剂的偶联物;

III、将金属离子的溶液与所述偶联物混合,进行络合反应,得到所述络合物。

3、根据权利要求 2 所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述步骤(1)中,所述活化的方法包括如下步骤:将酶的水溶液与  $\text{NaIO}_4$  水溶液混合,反应,得到活化的酶;

所述步骤(2)中,所述将活化后的酶与络合物进行交联反应的方法包括如下步骤:将所述络合物溶于碳酸盐缓冲液中,再加入所述活化后的酶,反应,得到所述重金属酶标物;

所述步骤 I 中,所述重氮化的方法包括如下步骤:将所述螯合剂溶于酸的水溶液中,再向其中加入亚硝酸盐,进行重氮化反应,得到所述重氮化的螯合剂;所述重氮化反应的条件包括:温度为  $0-5^\circ\text{C}$ 、避光和时间为 15min;所述螯合剂、酸和亚硝酸盐的投料配比为  $4\text{mg} : 2 \times 10^{-3}\text{mol} : 1.2 \times 10^{-4}\text{mol}$ ;

所述步骤 II 中,所述偶联反应的条件包括:温度为  $4^\circ\text{C} - 10^\circ\text{C}$  或  $4^\circ\text{C}$ , pH 值为 8.5-9.0 或 8.5,反应时间为 4h-24h 或 4h;所述重氮化的螯合剂与所述载体蛋白的投料摩尔比为 10:1;

所述步骤 III 中,所述络合反应的条件包括:温度为  $25^\circ\text{C}$ 、pH 值为 7.5 和时间为 12h;所述偶联物与所述金属离子的投料摩尔比为 1:20。

4、根据权利要求 3 所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述步骤(1)中,所述活化的方法中,所述反应的温度为  $25^\circ\text{C}$ ,反应的时间为 20min;

所述步骤(2)中,所述将活化后的酶与所述络合物进行交联反应的方法中,所述反应的温度为  $25^\circ\text{C}$ ,所述反应的时间为 2 小时,所述反应的 PH 值为 8.0;

所述步骤(1)中,所述活化的方法中,在所述反应后,包括如下用乙二醇终止反应的步骤:向所述反应的体系中加入乙二醇水溶液,  $25^\circ\text{C}$  搅拌反应 10min;其中乙二醇与  $\text{NaIO}_4$  的投料摩尔比为 1:1;

所述步骤(2)中,所述将活化后的酶与所述络合物进行交联反应的方法中,在所述反应后,包括如下步骤:向所述反应的体系中加入  $\text{NaBH}_4$ ,  $4^\circ\text{C}$  搅拌反应 2 小时。

5、根据权利要求 1 或 2 所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述重金属为铜;所述螯

合剂为对氨基苄基乙二胺四乙酸；所述载体蛋白为牛血清白蛋白、人血清白蛋白、血蓝蛋白或卵清白蛋白；所述酶为辣根过氧化物酶。

6、根据权利要求 1 或 2 所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述酶联免疫试剂盒中包括包被缓冲液、洗涤液、样品稀释液和标准品溶液；

所述标准品为 EDTA 与所述待检重金属的螯合物；

所述标准品是按照如下方法制备得到的：

(1) 将每 29.3mg EDTA 溶解于去离子水中，调节 pH 至 8.0，得到溶液 I；

(2) 将 13.5mg 待检重金属的可溶性盐溶解于去离子水中，并逐滴加入到所述溶液 I 中，磁力搅拌反应 12 小时，再将溶液定容至 6.4mL，得到 EDTA 与所述待检重金属的螯合物；

所述标准品溶液中所述待检重金属离子浓度为 10ng/mL、5ng/mL、2.5ng/mL、1.25ng/mL、0.625ng/mL、0.31ng/mL、0.156ng/mL、0.078ng/mL 和 0.039ng/mL；

所述包被缓冲液为 0.05M、pH9.6 的碳酸盐缓冲液；

每 1 升洗涤液按照如下方法配制：将 8.0g NaCl、0.2g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、2.96g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、1ml Tween-20 溶于水中，并用水补足至 1L；

样品稀释液按照如下方法配制：将 1mL 吐温 20 和 1g 明胶溶于 1L PBS 缓冲液中，得到样品稀释液；

所述抗待检重金属的抗体为抗待检重金属的单克隆抗体或多克隆抗体。

7、根据权利要求 1 或 2 所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述待检重金属为铜；

8、保藏号为 CGMCC No. 3987 的杂交瘤细胞株 Cu-EDTA 6A9 产生的抗金属铜的单克隆抗体。

9、保藏号为 CGMCC No. 3987 的杂交瘤细胞株 Cu-EDTA 6A9。

10、权利要求 1-7 任一所述酶联免疫试剂盒在检测样品中是否含有重金属中的应用。

## 一种重金属酶标物及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种重金属酶标物及其应用。

### 背景技术

[0002] 重金属是环境与农产品中的重要污染物质,可以通过食物链在动物及人的体内尤其是肝脏内富集,对人类健康会带来严重的危害。铜是生命体生长所必须的微量元素之一,但是高浓度的铜会对生命体产生毒害作用。水生生物对铜离子的毒害作用尤为敏感。

[0003] 目前,重金属铜的分析方法主要有原子吸收光谱法、电感耦合等离子体发射光/质谱法、X-射线荧光光谱法、电位溶出分析法以及近几年发展的生物传感器检测法等。但是用这几种方法检测铜离子需要昂贵的仪器设备,检测费用高,耗时,不能用于现场快速检测。与仪器分析法相比,直接酶联免疫吸附测定法(ELISA)具有快速、简便、实时、易于进行现场检测、样品前处理简单、灵敏度高、选择性强、适合于高通量分析等优点,而且还能大幅度降低检测成本。获得好的抗原酶标物是建立高灵敏度的直接 ELISA 检测方法的前提。

### 发明内容

[0004] 本发明的一个目的是提供一种制备重金属酶标物的方法。

[0005] 本发明所提供的制备重金属酶标物的方法,包括如下步骤:

[0006] (1) 将酶活化,得到活化后的酶;

[0007] (2) 将所述活化后的酶与络合物进行交联反应,得到重金属酶标物;

[0008] 所述络合物是按照包括如下步骤的方法制备的:

[0009] I、将螯合剂重氮化,得到重氮化的螯合剂;

[0010] II、将载体蛋白与所述重氮化的螯合剂混合,进行偶联反应,得到载体蛋白与所述重氮化的螯合剂的偶联物;

[0011] III、将金属离子的溶液与所述偶联物混合,进行络合反应,得到所述络合物。

[0012] 上述任一所述制备方法中,所述步骤(1)中,所述活化的方法包括如下步骤:将酶的水溶液与  $\text{NaIO}_4$  水溶液混合,反应,得到活化的酶;

[0013] 上述任一所述制备方法中,所述步骤(2)中,所述将活化后的酶与络合物进行交联反应的方法包括如下步骤:将所述络合物溶于碳酸盐缓冲液中,再加入所述活化后的酶,反应,得到所述重金属酶标物;

[0014] 上述任一所述制备方法中,所述步骤 I 中,所述重氮化的方法包括如下步骤:将所述螯合剂溶于酸的水溶液中,再向其中加入亚硝酸盐,进行重氮化反应,得到所述重氮化的螯合剂;所述重氮化反应的条件包括:温度为  $0-5^{\circ}\text{C}$ 、避光和时间为 15min;所述温度优选为  $0^{\circ}\text{C}$  或  $4^{\circ}\text{C}$ ;所述螯合剂、酸和亚硝酸盐的配比为  $4\text{mg} : 2 \times 10^{-3}\text{mol} : 1.2 \times 10^{-4}\text{mol}$ ;

[0015] 上述任一所述制备方法中,所述步骤 II 中,所述偶联反应的条件包括:温度为  $4^{\circ}\text{C} - 10^{\circ}\text{C}$  或  $4^{\circ}\text{C}$ , pH 值为 8.5-9.0 或 8.5,反应时间为 4h-24h 或 4h;所述重氮化的螯合剂与所述载体蛋白的投料摩尔比为 10 : 1;

[0016] 上述任一所述制备方法中,所述步骤III中,所述络合反应的条件包括:温度为25℃、pH值为7.5和时间为12h;所述偶联物与所述金属离子的投料摩尔比为1:20。

[0017] 上述任一所述制备方法中,所述步骤(1)中,所述活化的方法中,所述反应的温度为25℃,反应的时间为20min;(酶与NaIO<sub>4</sub>的投料配比为10mg酶:0.02mol NaIO<sub>4</sub>);

[0018] 上述任一所述制备方法中,所述步骤(2)中,所述将活化后的酶与所述络合物进行交联反应的方法中,所述反应的温度为25℃,所述反应的时间为2小时,所述反应的PH值为8.0;(所述活化后的酶与所述络合物的投料摩尔比为2:1);

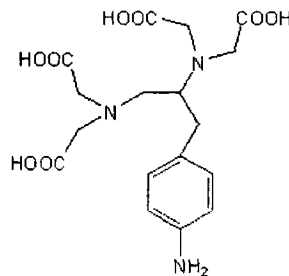
[0019] 上述任一所述制备方法中,所述步骤(1)中,所述活化的方法中,在所述反应后,包括如下用乙二醇终止反应的步骤:向所述反应的体系中加入乙二醇水溶液,25℃搅拌反应10min;其中乙二醇与NaIO<sub>4</sub>的投料摩尔比为1:1;

[0020] 上述任一所述制备方法中,所述步骤(2)中,所述将活化后的酶与所述络合物进行交联反应的方法中,在所述反应后,包括如下步骤:向所述反应的体系中加入NaBH<sub>4</sub>,4℃搅拌反应2小时。

[0021] 上述任一所述制备方法中,所述重金属为铜;所述螯合剂为对氨基苄基乙二胺四乙酸;所述载体蛋白为牛血清白蛋白、人血清白蛋白、血蓝蛋白或卵清白蛋白;所述酶为辣根过氧化物酶。

[0022] 所述对氨基苄基乙二胺四乙酸的结构式为:

[0023]



[0024] 由上述任一所述制备方法得到的重金属酶标物也属于本发明的保护范围。

[0025] 本发明的另一个目的是提供一种重金属酶标物。

[0026] 本发明所提供的重金属酶标物,是络合物与酶通过共价键形成的交联物;所述络合物为螯合剂与载体蛋白通过共价键连接形成的偶联物再与重金属通过配位键连接形成的络合物。

[0027] 所述络合物中,螯合剂与载体蛋白间的共价键是所述螯合剂上的氨基基团与所述载体蛋白中酪氨酸上的酚基基团形成的,所述配位键是所述重金属离子与所述偶联物中螯合剂上的EDTA形成的;所述络合物与酶间的共价键是所述络合物中载体蛋白上的氨基基团与所述酶上的糖基基团形成的。

[0028] 其中,所述重金属为铜;所述螯合剂为对氨基苄基乙二胺四乙酸;所述载体蛋白为牛血清白蛋白、人血清白蛋白、血蓝蛋白或卵清白蛋白;所述酶为辣根过氧化物酶。

[0029] 本发明的另一个目的是提供一种用于检测样品中是否含有重金属的酶联免疫试剂盒。

[0030] 本发明所提供的用于检测样品中是否含有重金属的酶联免疫试剂盒,包括包被原和上述任一所述重金属酶标物;所述包被原为抗待检重金属的抗体;所述重金属酶标物中

的重金属与所述待检重金属相同。

[0031] 上述任一所述酶联免疫试剂盒中,所述酶联免疫试剂盒中包括包被缓冲液、洗涤液、样品稀释液和标准品溶液;

[0032] 上述任一所述酶联免疫试剂盒中,所述标准品为 EDTA 与所述待检重金属的螯合物;

[0033] 上述任一所述酶联免疫试剂盒中,所述标准品是按照如下方法制备得到的:

[0034] (1) 将每 29.3mg EDTA 溶解于去离子水中,调节 pH 至 8.0,得到溶液 I;

[0035] (2) 将 13.5mg 待检重金属的可溶性盐溶解于去离子水中,并逐滴加入到所述溶液 I 中,磁力搅拌反应 12 小时,再将溶液定容至 6.4mL,得到 EDTA 与所述待检重金属的螯合物;

[0036] 上述任一所述酶联免疫试剂盒中,所述标准品溶液中所述待检重金属离子浓度为 10ng/mL、5ng/mL、2.5ng/mL、1.25ng/mL、0.625ng/mL、0.31ng/mL、0.156ng/mL、0.078ng/mL 和 0.039ng/mL;

[0037] 上述任一所述酶联免疫试剂盒中,所述包被缓冲液为 0.05M、pH9.6 的碳酸盐缓冲液;

[0038] 上述任一所述酶联免疫试剂盒中,每 1 升洗涤液按照如下方法配制:将 8.0g NaCl、0.2g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、2.96g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、1mL Tween-20 溶于水中,并用水补足至 1L;

[0039] 上述任一所述酶联免疫试剂盒中,样品稀释液按照如下方法配制:将 1mL 吐温 20 和 1g 明胶溶于 1L PBS 缓冲液中,得到样品稀释液;

[0040] 每 1 升 PBS 缓冲液由 NaCl、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  和水组成;NaCl 在磷酸盐缓冲液中的浓度为 8.0g/L, $\text{KH}_2\text{PO}_4$  在磷酸盐缓冲液中的浓度为 0.2g/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  在磷酸盐缓冲液中的浓度为 2.96g/L, pH 值为 7.5。

[0041] 上述任一所述酶联免疫试剂盒中,所述抗待检重金属的抗体为抗待检重金属的单克隆抗体或多克隆抗体。

[0042] 上述任一所述酶联免疫试剂盒中,所述待检重金属为铜;所述抗待检重金属的抗体是由保藏号为 CGMCC No. 3987 的杂交瘤细胞株 Cu-EDTA 6A9 产生。

[0043] 保藏号为 CGMCC No. 3987 的杂交瘤细胞株 Cu-EDTA 6A9 产生的抗金属铜的单克隆抗体也属于本发明的保护范围;

[0044] 保藏号为 CGMCC No. 3987 的杂交瘤细胞株 Cu-EDTA 6A9 也属于本发明的保护范围;

[0045] 上述任一所述重金属酶标物在检测样品中是否含有重金属中的应用也属于本发明的保护范围;

[0046] 上述任一所述酶联免疫试剂盒在检测样品中是否含有重金属中的应用也属于本发明的保护范围。

[0047] 在小分子物质的直接 ELISA 检测方法中,其酶标物的制备一般是通过活化小分子上的活性基团然后与 HRP 分子上的游离氨基、巯基或羧基连接,此方法经常容易导致所制备的酶标物酶活性的很大损失。本发明所提供的方法避开了小分子经活化后直接与 HRP 相连的常规方法,而是小分子先与载体蛋白连接后,再通过载体蛋白与 HRP 连接,这样可以极大地避免 HRP 在交联反应中的酶活性损失。

[0048] 本发明所提供的制备铜离子酶标物的制备方法简单,合成成本低,HRP 活性损失小。用本发明方法制备的酶标物所建立的 ELISA 检测方法具有很高的灵敏度。本发明的制备铜离子 ELISA 检测用酶标物的方法对其他重金属 ELISA 检测用酶标物的成功制备具有重要的参考价值,由该方法建立的铜离子快速免疫检测方法将有广阔的应用前景。

#### 附图说明

[0049] 图 1 为铜离子直接 ELISA 检测用酶标物的合成路线图。

[0050] 图 2 为以 EDTA-Cu 为标准样品建立的铜离子直接竞争 ELISA 法标准曲线。

#### 具体实施方式

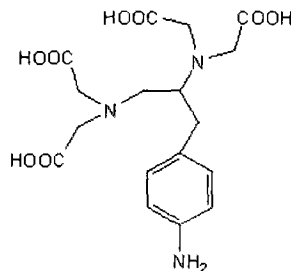
[0051] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0052] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0053] 对氨基苄基乙二胺四乙酸 {1-(4-Aminobenzyl)-EDTA} 购于日本同仁化学研究所 (Dojindo Laboratories),产品号 :M029-10。乙二胺四乙酸 (EDTA),牛血清白蛋白,卵清白蛋白和原子吸收级金属铜离子均购于 Sigma-Aldrich 公司。其余常规试剂均购自北京化学试剂公司。辣根过氧化物酶 (HRP) 购自 Sigma-Aldrich 公司,产品目录号为 P6782。

[0054] 所述对氨基苄基乙二胺四乙酸的结构式为 :

[0055]



[0056] 实施例 1、检测样品中是否含有重金属铜的试剂盒

[0057] 一、试剂盒的组成

[0058] (一) 本发明试剂盒的组成

[0059] 1、包被原 :抗铜的单克隆抗体,为由保藏号 CGMCC No. 3987 的杂交瘤细胞株 Cu-EDTA 6A9 分泌得到的单抗 ;

[0060] 2、酶标物 :酶标重金属铜,是络合物与辣根过氧化物酶通过共价键形成的交联物 ;所述络合物为对氨基苄基乙二胺四乙酸与 BSA 通过共价键连接形成的偶联物再与重金属铜通过配位键连接形成的络合物。

[0061] 3、包被缓冲液 :0.05M、pH9.6 的碳酸盐缓冲液 ;

[0062] 4、洗涤液 :每 1 升洗涤液按照如下方法配制 :将 8.0g NaCl、0.2g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、2.96g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、1mLTween-20 溶于水中,并用水补足至 1L。

[0063] 5、样品稀释液 :样品稀释液按照如下方法配制 :将 1mL 吐温 20 和 1g 明胶溶于 1L PBS 缓冲液中,得到样品稀释液 ;

[0064] 每 1 升 PBS 缓冲液由 NaCl、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  和水组成 ;NaCl 在磷酸盐缓冲液中的浓度为 8.0g/L, $\text{KH}_2\text{PO}_4$  在磷酸盐缓冲液中的浓度为 0.2g/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  在磷酸盐

缓冲液中的浓度为 2.96g/L, pH 值为 7.5;

[0065] 6、标准品溶液:标准品为 EDTA-Cu 螯合物;

[0066] 标准品溶液中 Cu 离子浓度分别为 10ng/mL、5ng/mL、2.5ng/mL、1.25ng/mL、0.625ng/mL、0.31ng/mL、0.156ng/mL、0.078ng/mL 和 0.039ng/mL。

[0067] 7、底物缓冲液:将 20.0mg 邻苯二胺 (OPD) 溶解于 10.0mL 柠檬酸盐-磷酸盐缓冲液中,然后加入 4 $\mu$ L 体积百分含量为 30%的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 水溶液得到;

[0068] 柠檬酸盐-磷酸盐缓冲液:由柠檬酸三钠、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 和水组成;柠檬酸三钠在柠檬酸盐-磷酸盐缓冲液中的浓度为 0.01M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 在柠檬酸盐-磷酸盐缓冲液中的浓度为 0.03M;柠檬酸盐-磷酸盐缓冲液的 pH 值为 5.5;

[0069] 8、终止缓冲液:2.0M 的硫酸水溶液。

[0070] 9、封闭液:溶解于样品稀释液中的 3%的脱脂牛奶。

[0071] 二、试剂盒的制备

[0072] (一) 酶标重金属铜的制备 (铜离子-对氨基苄基乙二胺四乙酸-牛血清白蛋白-HRP)

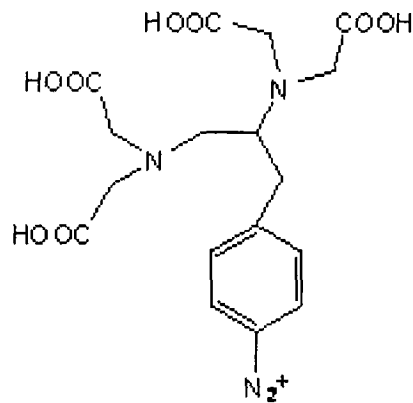
[0073] 制备的流程图如图 1 所示。

[0074] 1、铜-对氨基苄基乙二胺四乙酸-牛血清白蛋白 (Cu-对氨基苄基 EDTA-BSA) 的制备

[0075] (1) 重氮化:对氨基苄基乙二胺四乙酸 (Aminobenzyl-EDTA) 4mg, 溶解于 2mL 1M 的 HCL 水溶液中,得到溶液 1;在 0°C 避光条件下,向溶液 1 中滴加 60 $\mu$ L 2M 的 NaNO<sub>2</sub> 水溶液,搅拌反应 15min,得到重氮化的对氨基苄基乙二胺四乙酸的酸性溶液。该反应体系中对氨基苄基乙二胺四乙酸、HCL 和 NaNO<sub>2</sub> 的投料配比为 4mg : 2 $\times$ 10<sup>-3</sup>mol : 1.2 $\times$ 10<sup>-4</sup>mol;

[0076] 重氮化的对氨基苄基乙二胺四乙酸的结构式如式 I 所示。

[0077]

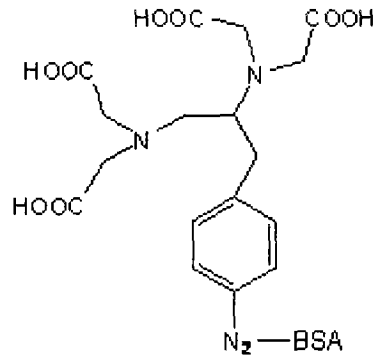


(式 I)

[0078] (2) 偶联:将步骤 1 得到的重氮化的对氨基苄基乙二胺四乙酸的酸性溶液在 10min 内加入到 4mL 含有 67.5mg BSA 的硼酸盐缓冲液 (0.05M, PH9.6) 中,调节 pH 值到 8.5,4°C 避光搅拌反应 4 小时,得到反应产物溶液,其中含有对氨基苄基乙二胺四乙酸与 BSA 通过共价键连接而成的偶联物。该反应体系中所重氮化的对氨基苄基乙二胺四乙酸与所述载体蛋白 BSA 的投料摩尔比为 10 : 1。

[0079] 对氨基苄基乙二胺四乙酸与 BSA 的偶联物的结构式如式 II 所示。

[0080]

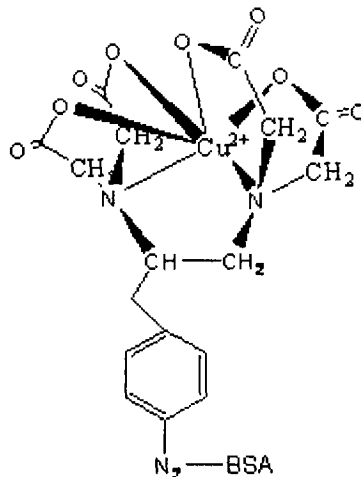


(式 II)

[0081] (3) 络合 : 将步骤 (2) 得到的反应产物溶液用 1M 的 HCL 将 pH 值调节到 7.5, 然后向其中滴加 40 $\mu$ l 0.5M 的氯化铜水溶液, 室温 (25 $^{\circ}$ C) 反应过夜 (12h), 得到反应产物溶液, 其中含有对氨基苄基乙二胺四乙酸与 BSA 的偶联物与铜离子通过配位键形成的络合物。偶联物与所述铜离子的摩尔比为 1 : 20 ; (螯合剂与 BSA 的摩尔比为 10 : 1, 而铜离子与螯合剂的投料摩尔比应该为 2 : 1, 所以偶联物与所述铜离子的摩尔比为 1 : 20)。

[0082] 对氨基苄基乙二胺四乙酸与 BSA 的偶联物与铜离子形成的络合物的结构式如式 III 所示。

[0083]



(式 III)。

[0084] (4) 透析 : 将步骤 (3) 得到的反应产物溶液在 PBS 溶液 (pH7.5) 中透析完全, 冷冻干燥后置于 -40 $^{\circ}$ C 冻存待用。透析的作用在于去除未螯合的铜离子或未反应的其他小分子。

[0085] 2、对氨基苄基乙二胺四乙酸与 BSA 的偶联物与铜离子形成的络合物与 HRP 的交联

[0086] (1) HRP 的活化 : 将 10mg HRP 溶于 1mL 水中, 加入 0.2mL 100mM NaIO<sub>4</sub> 水溶液, 25 $^{\circ}$ C 搅拌反应 20min, 将得到的溶液记作溶液 I ; HRP 与 NaIO<sub>4</sub> 的投料配比为 10mgHRP : 0.02mol NaIO<sub>4</sub> ; 此步骤的目的是使 HRP 糖基上的邻二羟基被氧化成活性醛基, 生成的醛基与络合物上 BSA 的氨基共价键结合, 避免了因酶分子上的氨基或羧基参与偶联反应而使酶的活性产生较大损失。

[0087] (2) 向所述溶液 I 中加入 20 $\mu$ L 的 1M 的乙二醇水溶液, 25 $^{\circ}$ C 搅拌反应 10min, 将反应溶液置于透析袋中与 pH7.5 的 PBS 溶液中 4 $^{\circ}$ C 透析 4 小时。将得到的溶液记作溶液 II ; 乙二醇与 NaIO<sub>4</sub> 的投料摩尔比为 1 : 1。加入乙二醇的目的是使其与过量的 NaIO<sub>4</sub> 反应, 终

止  $\text{NaIO}_4$  氧化反应并去除其对后续实验的干扰。

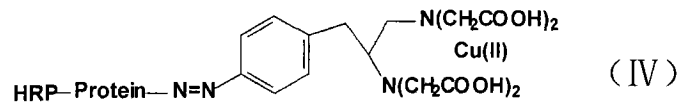
[0088] (3) 将 7mg 式 III 所示络合物 (以 BSA 计) 溶于 1mL PH 值为 9.5 的碳酸盐缓冲液中, 再加入所述溶液 II, 调节 PH 值至 8.0, 25°C 反应 2 小时, 将得到的溶液记作溶液 III; HRP 与络合物的投料摩尔比为 2 : 1。

[0089] (4) 向所述溶液 III 中加入 0.1mL 浓度为 0.1M 的  $\text{NaBH}_4$  水溶液, 4°C 搅拌反应 2 小时; 目的是还原过碘酸钠氧化法产生的不稳定的醛基与氨基形成的  $\text{C}=\text{N}$  双键。(C = N 双键指酶与络合物中的 BSA 之间的连接键)

[0090] (5) 将步骤 (4) 的反应液置于 PBS 中透析完全, 得到络合物与 HRP 的偶联物, 偶联物结构见式 IV。

[0091] 所述络合物与 HRP 形成的交联物其结构简式如式 IV 所示:

[0092]



[0093] 其中, 对氨基苄基乙二胺四乙酸与 BSA 间的共价键是对氨基苄基乙二胺四乙酸上的氨基基团与 BSA 上的酚基基团形成的, 所述配位键是铜离子与对氨基苄基乙二胺四乙酸上的乙二胺四乙酸形成的; 所述络合物与酶间的共价键是所述络合物中 BSA 上的氨基基团与 HRP 上的糖基基团形成的。

[0094] (二) 包被原: 抗铜的单克隆抗体的制备

[0095] 铜离子单克隆抗体为以铜-对氨基苄基乙二胺四乙酸-卵清白蛋白为免疫原免疫小鼠经过细胞融合、筛选、亚克隆、腹水制备及抗体纯化步骤得到。

[0096] 铜-对氨基苄基乙二胺四乙酸-卵清白蛋白的制备方法: 与实验(一)中 Cu-对氨基苄基 EDTA-BSA 的制备方法相同, 不同的是所用的蛋白为卵清白蛋白。

[0097] 免疫方法:

[0098] (1) 取 8-10 周龄的 Balb/c 小白鼠作为实验动物。

[0099] (2) 基础免疫: 铜-对氨基苄基 EDTA-OVA 完全抗原 (1mg/mL), 经无菌过滤器过滤后加入等体积弗氏完全佐剂, 用磁力搅拌器充分搅拌乳化, 直到滴入水中不扩散。用乳化好的完全抗原采用腹腔及背部皮下多点注射 Balb/c 小鼠, 注射剂量为 0.1mg 抗原 / 只。

[0100] (3) 加强免疫: 基础免疫 2 周后, 取 1mL 上述稀释好的铜-对氨基苄基 EDTA-OVA 抗原溶液, 然后加入 1mL 弗氏不完全佐剂, 用磁力搅拌器充分搅拌乳化, 直到滴入水中不扩散。将乳化好的抗原采用腹腔及背部皮下多点注射 Balb/c 小鼠, 每只小鼠的注射剂量为 0.1mg。

[0101] 加强免疫每隔 10 天免疫一次, 从第三次加强免疫开始, 每次免疫后第 6-7 天, 从小鼠眼眶采血, 测定抗体效价, 待效价大于 1 : 8000 后, 选择血清效价和抑制率俱佳的小鼠进行细胞融合筛选单克隆抗体。有限稀释法筛选分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株; 采取间接竞争 ELISA 方法筛选分泌抗体效价高的单克隆细胞株。

[0102] 细胞融合和克隆化: 取免疫 Balb/c 小鼠脾细胞, 按 9 : 1 (数量配比) 比例与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合, 筛选得到稳定分泌抗铜的单克隆抗体的单克隆杂交瘤细胞株。将此细胞株命名为 Cu-EDTA 6A9, 该细胞株已于 2010 年 7 月 9 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (简称 CGMCC, 地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号, 中国科

学院微生物研究所, 邮编 100101), 保藏号为 CGMCC No. 3987。

[0103] 间接竞争 ELISA 方法步骤如下:

[0104] 包被: 在 96 孔酶标板中每孔加入 100 $\mu$ L 步骤 1 制备得到的 Cu-对氨基苄基 EDTA-BSA 的溶液, 37 $^{\circ}$ C 包被 3 小时, 用洗涤液洗涤 4 次。

[0105] 封闭: 封闭液 150 $\mu$ L/孔, 在 37 $^{\circ}$ C 湿盒中封闭 1h, 弃封闭液, 洗涤 3 次。

[0106] 竞争: 零孔每孔加 50 $\mu$ L 样品稀释液, 抑制孔每孔加入 50 $\mu$ L EDTA-Cu 螯合物标准品溶液。分别从 96 孔细胞培养板中取出 100 $\mu$ L 培养液分别于酶标板零孔和抑制孔中加入 50 $\mu$ L, 置湿盒中 37 $^{\circ}$ C 条件下 30min, 洗板 4 次。

[0107] 加酶标二抗: 将羊抗鼠酶标二抗 (0.1mg/mL) 稀释 1000 倍, 每孔加 100 $\mu$ L, 置湿盒中 37 $^{\circ}$ C 条件下 30min, 洗板 4 次。

[0108] 显色: 取 20mg OPD 溶于 10mL 底物稀释液中, 加 4 $\mu$ L 30%  $H_2O_2$ , 将底物溶液加入酶标板中, 每孔 100 $\mu$ L。避光显色 15min。

[0109] 终止: 每孔加入 50 $\mu$ L 终止液, 用酶标仪 490nm 处测定各孔的 OD 值。

[0110] 效价的定义为零孔 OD 值为 1 时的血清稀释倍数。

[0111] 单克隆抗体的制备与纯化:

[0112] 增量培养法: 将杂交瘤细胞 CGMCC No. 3987 置于细胞培养基中, 在 37 $^{\circ}$ C 条件下于二氧化碳培养箱中进行培养, 用辛酸-饱和硫酸铵法将得到的培养液进行纯化, 得到单克隆抗体, -20 $^{\circ}$ C 保存。

[0113] 所述细胞培养基为向 DMEM 培养基中添加小牛血清和碳酸氢钠, 使小牛血清在细胞培养基中的终浓度为 20% (质量百分含量), 使碳酸氢钠在细胞培养基中的终浓度为 0.2% (质量百分含量); 所述细胞培养基的 pH 为 7.4。

[0114] (三) 标准品是按照如下方法制备得到的:

[0115] (1) 称取 29.3mg EDTA, 充分溶解于 10mL 去离子水中, 用 1M NaOH 调节 pH 至 8.0, 得到溶液 I;

[0116] (2) 称取 13.5mg  $CuCl_2$ , 溶解于去离子水中, 并逐滴加入到上述步骤 (1) 配制的溶液 I 中, 磁力搅拌反应 12 小时, 再将溶液定容至 6.4mL, 得到螯合产物溶液, 其中含有 EDTA 与 Cu 的螯合物 (EDTA-Cu), EDTA-Cu 在溶液中的浓度为 2.11mg/mL, 螯合物中 Cu 离子在螯合产物溶液中的浓度为 1mg/mL;

[0117] (3) 用样品稀释液将上述步骤 (2) 的螯合产物溶液配成螯合物中 Cu 离子浓度为 2000ngCu 离子/mL 的 EDTA-Cu 螯合物标准品溶液。

[0118] 实施例 2、试剂盒的应用

[0119] 将上述制备的 EDTA-Cu 螯合物标准品溶液用样品稀释液分别稀释成如下不同的 Cu 离子浓度: 10ng/mL、5ng/mL、2.5ng/mL、1.25ng/mL、0.625ng/mL、0.31ng/mL、0.156ng/mL、0.078ng/mL 和 0.039ng/mL。

[0120] (1) 抗体的包被: 将 1mg/mL 的单抗按照 1:2000 稀释后加入到酶标板中, 每孔 100 $\mu$ L, 37 $^{\circ}$ C 温育 3 小时; 倒去酶标板中的溶液, 用洗涤液洗板 4 次, 甩干;

[0121] (2) 在步骤 (1) 的酶标板中分别加入上述不同浓度的 EDTA-Cu 螯合物标准品溶液 (实验孔), 每孔 50 $\mu$ L, 对照孔中不添加 EDTA-Cu 螯合物标准品溶液而加入 50 $\mu$ L 样品稀释液;

[0122] (3) 分别向上述实验孔和对照孔中加入  $0.5 \mu\text{g/mL}$  的酶标物, 每孔  $50 \mu\text{L}$ ;  $37^\circ\text{C}$  温育  $30\text{min}$ ; 倒掉酶标板中的溶液, 用洗涤液洗板 4 次, 甩干;

[0123] (4) 向实验孔和对照孔中分别加入  $100 \mu\text{L}$  底物缓冲液, 室温反应  $15\text{min}$  后, 再向每孔中加入  $50 \mu\text{L}$   $2.0\text{M}$  的硫酸溶液终止反应;

[0124] (5) 在  $492\text{nm}$  下测定吸光值;

[0125] (6) 绘制标准曲线: 以不同浓度 ( $\text{ng/mL}$ ) 的 EDTA-Cu 螯合物标准品溶液作为 X 轴, 以吸光度值的比值 ( $B/B_0 \times 100\%$ , 其中, B 为 EDTA-Cu 螯合物标准品溶液的平均吸光度值,  $B_0$  为对照孔的平均吸光度值) 作为 Y 轴, 运用 Origin7.0 绘制标准曲线。

[0126] 实验设 3 次重复, 取三次实验结果的平均值, 得到的标准曲线图如图 2 所示。结果表明, 其灵敏度 ( $\text{IC}_{50}$ ) 约为  $1.02\text{ng/mL}$ , 检测范围是  $0.1\text{--}7\text{ng/mL}$  (以  $10\%$  -  $90\%$  抑制率计算)。

[0127] 对照酶标物为对氨基苄基-EDTA 与 HRP 通过共价键形成的偶联物与铜离子螯合形成的络合物。按照上述同样的方法检测对照酶标物的效果。结果显示对照酶标物在 ELISA 反应中基本不显色或显色很弱, 以至于无法计算其 ELISA 检测灵敏度和检测范围, 说明 HRP 酶活性在偶联反应过程中损失很大。

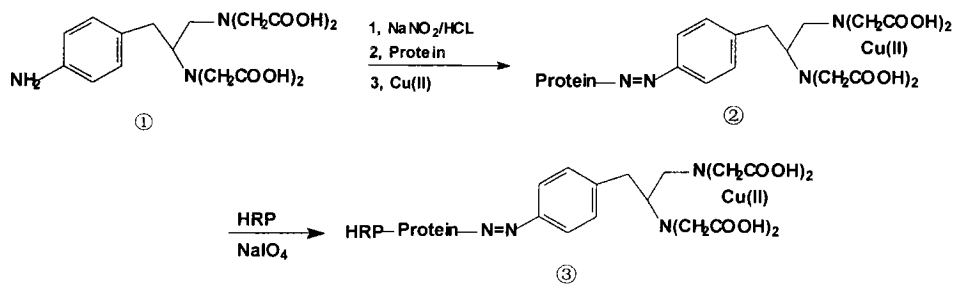


图 1

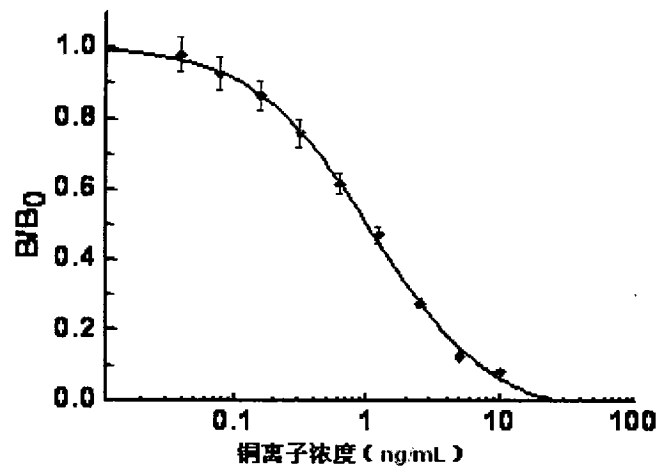


图 2

专利名称(译)	一种重金属酶标物及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN101949921B</a>	公开(公告)日	2014-03-12
申请号	CN201010253930.X	申请日	2010-08-13
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
[标]发明人	王保民 赵洪伟 南铁贵 谭桂玉 曹振 高巍 王敏 孙硕 李召虎		
发明人	王保民 赵洪伟 南铁贵 谭桂玉 曹振 高巍 王敏 孙硕 李召虎		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/577 C07K16/44 C12N5/20 C12R1/91		
代理人(译)	关畅		
审查员(译)	李保安		
其他公开文献	CN101949921A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了一种酶标物及其应用。该重金属酶标物，是络合物与酶形成的交联物；所述络合物为螯合剂与载体蛋白的偶联物与重金属形成的络合物。本发明所提供的制备铜离子酶标物的制备方法简单，合成成本低，HRP活性损失小。用本发明方法制备的酶标物所建立的ELISA检测方法具有很高的灵敏度。本发明的制备铜离子ELISA检测用酶标物的方法对其他重金属ELISA检测用酶标物的成功制备具有重要的参考价值，由该方法建立的铜离子快速免疫检测方法将有广阔的应用前景。

