

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

G01N 33/543

G01N 33/535



## [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410061265.9

[43] 公开日 2005 年 5 月 25 日

[11] 公开号 CN 1619309A

[22] 申请日 2004. 12. 3

[21] 申请号 200410061265.9

[71] 申请人 湖南农业大学

地址 410128 湖南省长沙市芙蓉区

[72] 发明人 张彬 吴力专 李丽立

[74] 专利代理机构 武汉宇晨专利事务所

代理人 黄瑞棠

权利要求书 2 页 说明书 5 页

[54] 发明名称 一种猪金属硫蛋白的检测方法

[57] 摘要

本发明公开了一种猪金属硫蛋白的检测方法，涉及动物金属硫蛋白的检测方法，具体地说，涉及一种猪金属硫蛋白定性、定量检测的方法。本发明是用达到电泳纯的小鼠抗猪金属硫蛋白 IgG 作一抗，用山羊抗小鼠酶标抗体作二抗，采用固相抗原间接竞争型酶联免疫吸附法，测定猪金属硫蛋白的含量；其步骤有：①包被；②封闭；③加一抗与样品；④加酶标二抗；⑤加底物；⑥加终止液；⑦在酶标仪上 450nm 波长读数。本发明可以定性、定量检测在正常生理状态下猪体内各组织器官的金属硫蛋白；方便、快捷，灵敏度高，稳定性和重复性好；成本较低，取材容易，实用性强。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、一种猪金属硫蛋白的检测方法，包括固相抗原间接竞争型酶联免疫吸附法；其特征在于用达到电泳纯的小鼠抗猪金属硫蛋白 IgG 作一抗，用山羊抗小鼠酶标抗体作二抗，采用固相抗原间接竞争型酶联免疫吸附法，测定猪金属硫蛋白的含量；其步骤如下：

①包被——加含标准品金属硫蛋白 MT 的包被液即碳酸钠缓冲液 90-110 $\mu$ l/孔，3-5 $^{\circ}$ C包被过夜；取出，每孔加洗涤液即含 0.050% tween-20 的磷酸缓冲液 240-260 $\mu$ l，静置 2.5-3.5min，洗涤 3-5 次；

②封闭——每孔加封闭液即含 10.00% 新生牛血清的磷酸缓冲液 180-220 $\mu$ l，36.9-37.5 $^{\circ}$ C封闭 1.5-2.5hr，以转速 40-60 转/分振荡，并以不振荡出孔内溶液为限，取出，每孔加洗涤液 240-260 $\mu$ l，静置 2.5-3.5min，洗涤 3-5 次；

③加一抗即抗猪金属硫蛋白 IgG 与样品——将等量的含抗体和标准品或待测品的稀释液即含 0.050% tween-20 和 0.150% 牛血清白蛋白的磷酸缓冲液混合均匀后，加混合液 90-110 $\mu$ l/孔，同一样品重复 2-3 孔，36.9-37.5 $^{\circ}$ C反应 2.5-3.5hr，以转速 40-60 转/分振荡，并以不振荡出孔内溶液为限，取出，每孔加洗涤液 240-260 $\mu$ l，静置 2.5-3.5min，洗涤 3-5 次；

④加酶标二抗——加稀释好的辣根过氧化酶标记的山羊抗小鼠二抗 90-110 $\mu$ l/孔，35-39 $^{\circ}$ C反应 1.8-2.2hr，以转速 40-60 转/分振荡，并以不振荡出孔内溶液为限，取出，每孔加洗涤液 240-260 $\mu$ l，静置 2.5-3.5min，洗涤 3-5 次；

⑤加底物——加 TMB 底物 90-110 $\mu$ l/孔，36.9-37.5 $^{\circ}$ C反应 18-22min，以转速 40-60 转/分振荡，并以不振荡出孔内溶液为限；

⑥加反应终止液——加 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液 45-55 $\mu$ l/孔；

⑦在酶标仪上 450nm 波长读数。

2、按权利要求 1 所述的一种猪金属硫蛋白的检测方法，其特征在于包被缓冲液的配制为 NaHCO<sub>3</sub>: 2.300-2.304g; Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>: 1.590-1.594g; NaN<sub>3</sub>: 0.200-0.204g, 双蒸水溶解定容 1000ml, 调 pH 值为 9.60-9.62。

3、按权利要求1所述的一种猪金属硫蛋白的检测方法，其特征在于洗涤液的配制为  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ : 2.900—2.904g;  $\text{K H}_2\text{PO}_4$ : 0.200—0.204g;  $\text{KCl}$ : 0.200—0.204g;  $\text{NaN}_3$ : 0.200—0.204g ;  $\text{NaCl}$ : 8.000—8.004g, 高压灭菌后加双蒸水溶解，再加 Tween-20: 0.500—0.504ml, 定容至 1000ml 调 pH 为 7.40—7.42。

4、按权利要求1所述的一种猪金属硫蛋白的检测方法，其特征在于封闭液的配制为  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ : 0.2900—0.2904g;  $\text{K H}_2\text{PO}_4$ : 0.0200—0.0204g;  $\text{KCl}$ : 0.0200g;  $\text{NaN}_3$ : 0.0200—0.0204g ;  $\text{NaCl}$ : 0.8000—0.8004g, 高压灭菌后加双蒸水溶解，再加新生牛血清: 10.00—10.04ml, 定容至 100ml 调 pH 为 7.40—7.42, 放入 3—5°C 保存。

5、按权利要求1所述的一种猪金属硫蛋白的检测方法，其特征在于样品制备缓冲液的配制为 Tris: 1.2110—1.2114g; 12mol/L 的浓 HCl: 0.200—0.204ml, 加双蒸水溶解后，加蔗糖 8.5500—8.5504g, 溶解定容至 100ml, 调 pH 为 8.60—8.62。

6、按权利要求1所述的一种猪金属硫蛋白的检测方法，其特征在于稀释液的配制为  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ : 0.2900—0.2904g;  $\text{K H}_2\text{PO}_4$ : 0.0200—0.0204g;  $\text{KCl}$ : 0.0200—0.0204g;  $\text{NaCl}$ : 0.8000—0.8004g, 高压灭菌后加双蒸水溶解，再加 Tween-20: 0.050—0.054ml, 牛血清白蛋白: 1.5000—1.5004g, 定容至 100ml 调 pH 为 7.40—7.42, 放入 3—5°C 保存。

7、按权利要求1所述的一种猪金属硫蛋白的检测方法，其特征在于底物液的配制为取底物贮存液 200ul 和等量的 0.25%  $\text{H}_2\text{O}_2$  (新鲜配置), 混合均匀后, 再与 10.0ml 底物缓冲液混匀; 其中, 底物贮存液的配制方法为: 在 1.00ml 二甲亚砜中加入 10mg 3, 3', 5', 5'-四甲基联苯胺 (TMB) 溶解后放入 4—8°C 保存; 底物缓冲液的配制方法为:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ : 7.1640—7.1644g; 柠檬酸: 2.1000—2.1004g, 双蒸水溶解定容 100ml, 调 pH 值为 5.00—5.04。

8、按权利要求1所述的一种猪金属硫蛋白的检测方法，其特征在于反应终止液的配制为浓  $\text{H}_2\text{SO}_4$ : 11ml, 溶于双蒸水中, 定容至 100ml。

## 一种猪金属硫蛋白的检测方法

### 技术领域

本发明涉及动物金属硫蛋白的检测方法，具体的说，涉及一种猪金属硫蛋白定性、定量的检测方法。

### 背景技术

金属硫蛋白（MT）具有强烈的消除自由基的作用，可作为营养添加剂单独使用或与谷胱甘肽（GSH）、维生素 C（VC）、维生素 E（VE）等配合使用，能够有效地抑制脂质过氧化损伤、保护细胞、降低血液粘度、改善血液循环和提高机体免疫等多种生物学功能。金属硫蛋白还可以作为一种抗氧化剂使用，防止食品或饲料氧化变质。另外，金属硫蛋白能与许多金属离子结合，参与机体金属代谢调节，平衡机体金属离子稳态，参与金属离子运转与排泄，对矿物质营养起着重要作用，同时锌-金属硫蛋白可作为评价动物体内锌营养状态的指标。金属硫蛋白作为食品、饲料以及美容化妆品的添加剂和某些疾病的治疗药物在医学、食品加工、营养学等各个领域业已广泛应用。

含有锌的金属硫蛋白（Zn-MT）是一种正四面体金属巯基螯合族，结晶构相相当稳定，在正常的动物体内均含有金属硫蛋白。因此开展对金属硫蛋白的检测方法的研究有着重要的理论价值和广阔的应用前景。

目前，学术界公认的检测金属硫蛋白的经典方法镉-血红蛋白饱和法，但该方法不能用于 Bi、Hg、Ag、Cu 结合的金属硫蛋白的检测，且其灵敏度不高，不能用于检测正常生理状态下动物体内各组织器官中的金属硫蛋白的含量。用放射免疫分析法，实验条件要求较高，且有放射性污染，不能大幅度地推广。有些学者也开始试用其它种类的酶联免疫吸附法（ELISA），但其结果重复性、稳定性和灵敏度都不如意，因此至今仍缺乏一种简便、灵敏的检测

方法，不能满足对金属硫蛋白作进一步研究的需要。

由此可见，选择一种方便、快捷、灵敏度高的定量检测方法，就十分必要了。

另外，固相抗原间接竞争型酶联免疫吸附法（固相抗原间接竞争型 ELISA）是一种特异性强，灵敏度高，能定量检测生物机体的微量活性有机物的一种理想方法，其工作原理为：液相中的 MT 与孔壁上包被的固相 MT 相互竞争液相中的 MT 抗体，液相中的 MT 越多，则与固相 MT 结合的抗体越少，最终显色越浅，设液相中 MT 含量为 0 时的显色深度为 100%，计算液相中含不同浓度 MT 时的显色百分比作为横坐标，以液相中 MT 含量为纵坐标，则可制得间接竞争型 ELISA 标准曲线。

### 发明内容

本发明的目的就在于克服现有定量检测动物金属硫蛋白方法的不足，开辟一种新的检测方法，即提供一种猪金属硫蛋白的检测方法，该方法能定量检测处于正常生理状态下猪体内各组织器官金属硫蛋白的含量。

本发明的技术方案是：采用达到电泳纯的、从小鼠抗猪血清中分离纯化出抗金属硫蛋白的免疫球蛋白（IgG），通过固相抗原间接竞争型酶联免疫吸附法（固相抗原间接竞争型 ELISA）的步骤来完成对正常生理状态下猪各组织器官内的金属硫蛋白的定性、定量检测工作。

具体地说，本发明是用达到电泳纯的小鼠抗猪金属硫蛋白 IgG 作一抗，用山羊抗小鼠酶标抗体作二抗，采用固相抗原间接竞争型酶联免疫吸附法，测定猪金属硫蛋白的含量；其步骤如下：

①包被——加含标准品金属硫蛋白 MT 的包被液即碳酸钠缓冲液 90-110 $\mu$ l/孔，3-5 $^{\circ}$ C 包被过夜；取出，每孔加洗涤液即含 0.050% tween-20 的磷酸缓冲液 240-260 $\mu$ l，静置 2.5-3.5min，洗涤 3-5 次；

②封闭——每孔加封闭液即含 10.00% 新生牛血清的磷酸缓冲液 180-220 $\mu$ l，36.9-37.5 $^{\circ}$ C 封闭 1.5-2.5hr，以转速 40-60 转/分振荡，并以不振荡出孔内溶液为限，取出，每孔加洗涤液 240-260 $\mu$ l，静置 2.5-3.5min，洗涤 3-5 次；

③加一抗即抗猪金属硫蛋白 IgG 与样品——将等量的含抗体和标准品或待测品的稀释液即含 0.050% tween-20 和 0.150% 牛血清白蛋白的磷酸缓冲液混合均匀后，加混合液 90-110 $\mu$ l/孔，同一样品重复 2-3 孔，36.9-37.5 $^{\circ}$ C 反应 2.5-3.5hr，以转速 40-60 转/分振荡，并以不振荡出孔内溶液为限，取出，每孔加洗涤液 240-260 $\mu$ l，静置 2.5-3.5min，洗涤 3-5 次；

④加酶标二抗——加稀释好的辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠二抗 90-110 $\mu$ l/孔，35-39 $^{\circ}$ C 反应 1.8-2.2hr，以转速 40-60 转/分振荡，并以不振荡出孔内溶液为限，取出，每孔加洗涤液 240-260 $\mu$ l，静置 2.5-3.5min，洗涤 3-5 次；

⑤加底物——加 TMB 底物 90-110 $\mu$ l/孔，36.9-37.5 $^{\circ}$ C 反应 18-22min，以转速 40-60 转/分振荡，并以不振荡出孔内溶液为限；

⑥加反应终止液——加 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液 45-55 $\mu$ l/孔；

⑦在酶标仪上 450nm 波长读数。

本发明具有以下优点和积极效果：

①可以定性、定量检测在正常生理状态下猪体内各组织器官的金属硫蛋白；

②能方便、快捷、有效地进行大量样品的测试，不需要特殊的仪器设备，又避免放射性污染，可以在一般的生理生化实验室中进行；

③测定结果灵敏度高，其灵敏度达 4.1ng/ml；而且稳定性和重复性好。

④由于小鼠是一种非常普遍的实验动物，成本较低，取材容易，可以进行大批量的金属硫蛋白抗体的制备，使得该方法具有实用性强的特点。

### 具体实施方式

下面结合具体实施例详细说明：

#### 1、检测

①猪血浆样品的制备：通过肝门静脉血管插管抽取肝门静脉血液 9-11ml，用 10%EDTA-Na 作为抗凝剂，离心 20min, 3000rpm, 4 $^{\circ}$ C，分装血浆放入 -70 $^{\circ}$ C 保存，待测；

猪组织器官样品的制备：猪肝脏、肾脏、肌肉称重后，按 1/4 的量加入含有 0.25mol/l 蔗糖的 Tris-HCl 缓冲液 (0.1mol/l, pH 8.6)，匀浆，离心 20min

(8000rpm, 4℃), 取上清液分装, 放入-70℃保存, 待测;

②包被: 标准品 MT 用包被缓冲液 (pH=9.6) 稀释成浓度为 6.25μg/ml, 于酶标板中加包被液 100μl/孔, 盖好后用封口膜密封, 放入 4℃条件下过夜 (16-24hr), 取出, 每孔加洗涤液 250μl, 静置 3min, 洗涤 4 次;

③封闭: 每孔加封闭液 (含 10%新生牛血清的 PBST pH 为 7.4) 200μl, 37℃封闭 2hr, 以转速 50 转/分振荡, 注意不振荡出孔内溶液为限, 取出, 每孔加洗涤液 250μl, 静置 3min, 洗涤 4 次;

④加一抗与待测样品: 用稀释液 (PBST pH 为 7.4) 将一抗配成浓度 50μg/ml, 分别与稀释 8 倍的猪肝、猪肾、肌肉及血浆样品, 等量混合均匀, 然后每孔加混合液 100.00μl, 同一样品重复 2-3 孔, 37℃反应 3hr, 以转速 40-60 转/分振荡, 注意不振荡出孔内溶液为限, 取出, 每孔加洗涤液 250μl, 静置 3min, 洗涤 4 次;

⑤加酶标二抗: 稀释液 (含 1.5%牛血清白蛋白的 PBST pH 为 7.4) 将辣根过氧化酶标记的山羊抗小鼠二抗稀释 8000 倍, 加 100μl/孔, 37℃反应 2hr, 以转速 40-60 转/分振荡, 注意不振荡出孔内溶液为限, 取出每孔加洗涤液 250μl, 静置 3min, 洗涤 4 次;

⑥加底物: 加 TMB 底物 (其浓度为含 TMB 为 0.2mg/ml) 100μl/孔, 37℃反应 20min (以转速 40-60 转/分振荡, 注意不振荡出孔内溶液为限);

⑦加终止液: 加浓度为 2mol/l H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 的 50μl/孔;

⑧在酶标仪上 450nm 波长读数;

根据标准曲线得出的回归方程  $y=10^5 \times 2^{(22.32880-0.39583x)}$ , 其中 x 代表  $(OD_{450nm}/0.982) \times 100$  (0.982 为 MT 的量为 0 时所对应的  $OD_{450nm}$ ), y 代表 MT 的量, 单位为 ng/ml; 计算出金属硫蛋白的含量;

最后测定金属硫蛋白的含量分别为:

猪肝  $0.13699 \pm 0.026686$ mg/g;

肾脏  $0.308929 \pm 0.154568$  mg/g;

肌肉  $69.6986 \pm 32.8346$ ng/g;

血浆  $10.81385 \pm 3.12627$ ng/ml。

## 2、配制

①包被缓冲液的配制： $\text{NaHCO}_3$ : 2.300—2.304g;  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ : 1.590—1.594g;  $\text{NaN}_3$ : 0.200—0.204g, 双蒸水溶解定容 1000ml, 调 pH 值为 9.60—9.62。

②洗涤液的配制为  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ : 2.900—2.904g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 0.200—0.204g;  $\text{KCl}$ : 0.200—0.204g;  $\text{NaN}_3$ : 0.200—0.204g;  $\text{NaCl}$ : 8.000—8.004g, 高压灭菌后加双蒸水溶解, 再加 Tween-20: 0.500—0.504ml, 定容至 1000ml 调 pH 为 7.40—7.42。

③封闭液的配制为  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ : 0.2900—0.2904g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 0.0200—0.0204g;  $\text{KCl}$ : 0.0200g;  $\text{NaN}_3$ : 0.0200—0.0204g;  $\text{NaCl}$ : 0.8000—0.8004g, 高压灭菌后加双蒸水溶解, 再加新生牛血清: 10.00—10.04ml, 定容至 100ml 调 pH 为 7.40—7.42, 放入 3—5℃保存。

④样品制备缓冲液的配制为 Tris: 1.2110—1.2114g; 浓  $\text{HCl}$  (12mol/L): 0.200—0.204ml, 加双蒸水溶解后, 加蔗糖 8.5500—8.5504g, 溶解定容至 100ml, 调 pH 为 8.60—8.62。

⑤稀释液的配制为 (PBST pH 为 7.4):  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ : 0.2900—0.2904g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 0.0200—0.0204g;  $\text{KCl}$ : 0.0200—0.0204g;  $\text{NaCl}$ : 0.8000—0.8004g, 高压灭菌后加双蒸水溶解, 再加 Tween-20: 0.050—0.054ml, 牛血清白蛋白: 1.5000—1.5004g, 定容至 100ml 调 pH 为 7.40—7.42, 放入 3—5℃保存。

⑥底物液的配制为取底物贮存液 200ul 和等量的 0.25%  $\text{H}_2\text{O}_2$  (新鲜配置), 混合均匀后, 再与 10.0ml 底物缓冲液混匀; 其中, 底物贮存液的配制方法为: 在 1.00ml 二甲亚砜中加入 10mg 3,3',5',5'-四甲基联苯胺 (TMB) 溶解后放入 4—8℃保存; 底物缓冲液的配制方法为:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ : 7.1640—7.1644g; 柠檬酸: 2.1000—2.1004g, 双蒸水溶解定容 100ml, 调 pH 值为 5.00—5.04。

⑦反应终止液的配制为浓  $\text{H}_2\text{SO}_4$ : 11ml, 溶于双蒸水中, 定容至 100ml。

专利名称(译)	一种猪金属硫蛋白的检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN1619309A</a>	公开(公告)日	2005-05-25
申请号	CN200410061265.9	申请日	2004-12-03
[标]申请(专利权)人(译)	湖南农业大学		
申请(专利权)人(译)	湖南农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	湖南农业大学		
[标]发明人	张彬 吴力专 李丽立		
发明人	张彬 吴力专 李丽立		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/543		
其他公开文献	CN1314966C		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了一种猪金属硫蛋白的检测方法，涉及动物金属硫蛋白的检测方法，具体地说，涉及一种猪金属硫蛋白定性、定量检测的方法。本发明是用达到电泳纯的小鼠抗猪金属硫蛋白IgG作一抗，用山羊抗小鼠酶标抗体作二抗，采用固相抗原间接竞争型酶联免疫吸附法，测定猪金属硫蛋白的含量；其步骤有：①包被；②封闭；③加一抗与样品；④加酶标二抗；⑤加底物；⑥加终止液；⑦在酶标仪上450nm波长读数。本发明可以定性、定量检测在正常生理状态下猪体内各组织器官的金属硫蛋白；方便、快捷，灵敏度高，稳定性和重复性好；成本较低，取材容易，实用性强。