



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108956972 A

(43)申请公布日 2018.12.07

(21)申请号 201810516469.9

(22)申请日 2018.05.25

(71)申请人 清华大学深圳研究生院

地址 518055 广东省深圳市南山区西丽大
学城清华园区

(72)发明人 马岚 吴峰 毛茅 岑瑜

(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 张立娜

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

权利要求书4页 说明书9页 附图1页

(54)发明名称

重金属汞离子的检测试剂盒及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种重金属汞离子的检测试剂盒及其应用。本发明所提供的试剂盒含有试纸条和经超顺磁性荧光复合粒子标记的第一抗体(能够特异结合重金属汞离子);所述试纸条由依次连接并固定于基底层上的样品垫、设有相互分离的检测线(靠近样品垫,包被有载体蛋白偶联重金属汞离子抗原)和质控线(靠近吸水垫,包被有二抗,抗所述第一抗体的抗体)的包被膜,以及吸水垫组成。利用该试剂盒检测重金属汞离子,灵敏度高、特异性强,检测时间短,检测成本低,易于操作和推广。

1. 一种重金属汞离子的检测试剂盒, 含有试纸条和经超顺磁性荧光复合粒子标记的第一抗体; 所述第一抗体能够特异结合重金属汞离子;

所述试纸条由依次连接并固定于基层层上的样品垫、设有检测线和质控线的包被膜, 以及吸水垫组成;

所述检测线和所述质控线相互分离;

所述检测线处包被有载体蛋白偶联重金属汞离子抗原;

所述质控线处包被有二抗, 所述二抗为抗所述第一抗体的抗体;

所述检测线位于所述包被膜靠近所述样品垫的一端;

所述质控线位于所述包被膜靠近所述吸水垫的一端。

2. 根据权利要求1所述的产品, 其特征在于: 所述经超顺磁性荧光复合粒子标记的第一抗体为将所述第一抗体与所述超顺磁性荧光复合粒子通过肽键共价结合形成的聚合物;

和/或

所述第一抗体为能够特异结合重金属汞离子的多克隆抗体或单克隆抗体;

和/或

所述载体蛋白偶联重金属汞离子抗原是通过将所述载体蛋白偶联氨基功能化EDTA并螯合重金属汞离子得到的;

和/或

所述样品垫为玻璃纤维素膜, 所述包被膜为硝酸纤维素膜。

3. 根据权利要求1或2所述的产品, 其特征在于: 所述超顺磁性荧光复合粒子为超顺磁性荧光复合微球;

进一步地, 所述超顺磁性荧光复合微球为 Fe_3O_4 磁性纳米粒子与CdSe/ZnS荧光材料经包覆 SiO_2 并表面修饰羧基功能化基团的复合微球; 和/或

所述超顺磁性荧光复合微球的直径为10-500nm, 优选地, 为50-400nm, 更优选地, 为100-300nm;

所述超顺磁性荧光复合微球的磁饱和强度为40~120emu/g, 对应的外磁场响应速度为30~120秒; 进一步地, 所述超顺磁性复合粒子的磁饱和强度为40~80emu/g, 对应的外磁场响应速度为30~60秒;

所述超顺磁性荧光复合微球功能化基团羧基的含量为40~400 $\mu\text{mol/g}$; 进一步地, 所述羧基的含量为60~100 $\mu\text{mol/g}$ 。

4. 根据权利要求1-3中任一所述的产品, 其特征在于:

所述载体蛋白偶联重金属汞离子抗原按照包括如下步骤的方法制备:

(a1) 将所述载体蛋白溶于浓度为0.05M、pH值为9.6的硼酸盐缓冲液中, 得到载体蛋白溶液;

所述载体蛋白和所述浓度为0.05M、pH值为9.6的硼酸盐缓冲液的配比为100mg:10mL;

(a2) 将Aminobenzyl-EDTA溶于1M盐酸中, 然后0℃搅拌下滴加浓度为0.2M的 NaNO_2 溶液, 反应, 得到Aminobenzyl-EDTA溶液;

所述Aminobenzyl-EDTA、所述1M盐酸和所述浓度为0.2M的 NaNO_2 溶液的配比为9mg:4mL:150 μL ;

(a3) 将步骤(a2)得到的所述Aminobenzyl-EDTA溶液滴加到步骤(a1)得到的所述载体

蛋白溶液中,并用调节pH至8.5,反应,然后调节pH至7.5,加入浓度为0.5M的重金属汞离子溶液,再反应,得到反应液;

所述Aminobenzyl-EDTA溶液、所述载体蛋白溶液、所述浓度为0.5M的重金属汞离子溶液的配比为4.15mL:10mL:90 μ L;

和/或

所述经超顺磁性荧光复合粒子标记的第一抗体按照包括如下步骤的方法制备:

(b1) 将每5mg超顺磁性荧光复合粒子、0.96mg1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺、1.15mg N-羟基丁二酰亚胺和1mL浓度为0.1M、pH值为4.7的2-(N-吗啡啉)乙磺酸缓冲液混匀,反应,得到活化后磁性粒子;

(b2) 将每5mg步骤(b1)得到活化后磁性粒子、0.1-0.2mg所述第一抗体和0.8mL浓度为50mM pH为8.5的硼砂缓冲液混匀、反应,得到含有偶联后磁性粒子的反应液;

(b3) 向步骤(b2)得到的反应液中加入BSA混匀得到混合液、反应,得到含有封闭后磁性粒子的反应液;所述BSA在所述混合液中的质量百分含量为1%。

5. 根据权利要求4所述的试剂盒,其特征在于:

在所述载体蛋白偶联重金属汞离子抗原的制备方法中:

步骤(a2)中,所述反应的温度为0 $^{\circ}$ C、时间为15min;

步骤(a3)中,所述反应的温度为4 $^{\circ}$ C、时间为4h;所述再反应的温度为4 $^{\circ}$ C、时间为12h;

在所述经超顺磁性荧光复合粒子标记的第一抗体的制备方法中:

步骤(b1)中,所述反应的温度为37 $^{\circ}$ C、时间为0.5h;

步骤(b2)中,所述反应的温度为37 $^{\circ}$ C、时间为2h;

步骤(b3)中,所述反应的温度为37 $^{\circ}$ C、时间为0.5h。

6. 根据权利要求4或5所述的试剂盒,其特征在于:

在所述载体蛋白偶联重金属汞离子抗原的制备方法中,在步骤(a3)之后还包括如下步骤(a4):

(a4) 将步骤(a3)所得反应液经透析得到所述载体蛋白偶联重金属汞离子抗原;

进一步地,所述透析是采用的透析液为0.02M PBS缓冲液,透析时间为48h;

在所述经超顺磁性荧光复合粒子标记的第一抗体的制备方法中,在步骤(b3)之后还包括如下步骤(b4):

(b4) 将所述含有封闭后磁性粒子的反应液中的封闭后磁性粒子进行洗涤、悬浮,得到所述经超顺磁性荧光复合粒子标记的第一抗体;

进一步地,进行所述洗涤时采用的洗涤液和进行所述悬浮时采用的悬浮液均为浓度为0.02M pH值为7.4的PBS缓冲液。

7. 根据权利要求1-6中任一所述的试剂盒,其特征在于:所述第一抗体为能够特异结合重金属汞离子的小鼠来源的多克隆抗体;

进一步地,所述能够特异结合重金属汞离子的小鼠来源的多克隆抗体按照包括如下步骤的方法制备得到:将免疫原溶液和佐剂等体积混合后免疫小鼠;所述免疫原为重金属汞离子半抗原与载体蛋白的偶联物;所述佐剂为Quick Antibody-Mouse 3W佐剂;

更进一步地,所述免疫为两次免疫,包括初免和2周后进行的加强免疫;每次的免疫剂量为250ng,以所述重金属汞离子半抗原与载体蛋白的偶联物的量计。

8. 根据权利要求7所述的试剂盒,其特征在于:所述能够特异结合重金属汞离子的小鼠来源的多克隆抗体的制备方法中,还包括如下步骤:在对小鼠进行加强免疫后的第10天制备腹水,收集腹水,获得所述能够特异结合重金属汞离子的小鼠来源的多克隆抗体。

9. 权利要求1-8中任一所述试剂盒的制备方法,包括如下步骤:分别制备权利要求1-8中任一所述试剂盒中的所述试纸条和所述经超顺磁性荧光复合粒子标记的第一抗体;

制备所述试纸条的方法包括:

I、分别制备所述样品垫和所述设有检测线和质控线的包被膜;

II、将步骤I得到的所述样品垫、步骤I得到的所述设有检测线和质控线的包被膜与所述吸水垫依次粘贴到所述基层上,得到所述试纸条;

所述设有检测线和质控线的包被膜按照如下方法制备:将权利要求1-8任一中所述的载体蛋白偶联重金属汞离子抗原和所述二抗分别喷在所述包被膜的两端不同区域,形成所述检测线和所述质控线,得到所述设有检测线和质控线的包被膜;

制备所述经超顺磁性荧光复合粒子标记的第一抗体的方法为权利要求4-8任一中所述经超顺磁性荧光复合粒子标记的第一抗体的制备方法。

10. 应用或方法:

所述应用为权利要求1-8中任一所述试剂盒在检测重金属汞离子中的应用;

所述方法为如下(A)或(B):

(A) 一种检测或辅助检测待测样品中是否含有金属汞离子的方法,包括:

a1) 将待测样品与权利要求1-8任一所述试剂盒中的所述经超顺磁性荧光复合粒子标记的第一抗体混合后,磁分离,然后用含体积分数为0.2%的Tween20的0.02M pH7.4PBS溶液重悬,然后加入到所述试纸条的所述样品垫,反应10min,然后进行荧光检测;

a2) 根据所述试纸条的反应结果,按照如下确定所述待测样品中是否含有金属汞离子:若所述检测线与所述质控线均显示荧光,且所述检测线的荧光强度不低于所述质控线的荧光强度,则所述待测样品中不含有金属汞离子或候选不含有金属汞离子;若所述检测线不显示荧光且所述质控线显示荧光,或所述检测线与所述质控线均显示荧光但所述检测线的荧光强度低于所述质控线的荧光强度,则所述待测样品中含有金属汞离子或候选含有金属汞离子;

(B) 一种检测待测样品中金属汞离子含量的方法,包括:

b1) 绘制标准曲线:配制系列浓度的金属汞离子的标准品溶液,将所得的若干份含有不同浓度的金属汞离子的标准品溶液分别与权利要求1-8任一所述试剂盒中的所述经超顺磁性荧光复合粒子标记的第一抗体混合,磁分离,然后用含体积分数为0.2%的Tween20的0.02M pH7.4PBS溶液重悬,得到若干份重悬液;取若干个所述试剂盒中的所述试纸条检测所述若干份重悬液,每一个所述试纸条检测一份所述重悬液,所述检测为:将所述重悬液加入到所述试纸条的所述样品垫,反应10min;用荧光读数仪读取所述试纸条的所述质控线和所述检测线的荧光强度;以所述金属汞离子的标准品的浓度或其对数为横坐标,以所述检测线和所述质控线的荧光强度的比值或其对数为纵坐标,绘制标准曲线图,得到标准曲线方程;

b2) 待测样品检测:将所述待测样品与所述经超顺磁性荧光复合粒子标记的第一抗体混合后,磁分离,然后用含体积分数为0.2%的Tween20的0.02M pH7.4PBS溶液重悬,然后加

入到未使用过的所述试纸条的所述样品垫,反应10min;用荧光读数仪读取所述试纸条的所述质控线和所述检测线的荧光强度,将所述检测线和所述质控线的荧光强度的比值或其对数代入步骤b1)所得标准曲线方程,计算得到所述待测样品中的金属汞离子的浓度值。

重金属汞离子的检测试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域中的重金属离子检测,具体涉及一种重金属汞离子的检测试剂盒及其应用,更具体地,涉及重金属汞离子的检测试剂盒和检测重金属汞离子的方法

背景技术

[0002] 随着经济发展以及工业化进程,重金属被广泛应用于现代工业产品中,工业废弃物的排放导致土壤和水资源中重金属的污染严重。全球每年向环境中排放的重金属达数万吨,其中大部分进入土壤和水源,从而污染农产品和饮用水。

[0003] 环境中的重金属汞离子无法降解,并且逐年蓄积,然后通过食物链进入人体,严重威胁人类健康,重金属汞是蓄积作用很强的金属元素,在水源、水生植物、水产品中极易蓄积。因此,快速灵敏的检测饮用水及食品中的重金属汞离子残留是食品安全及维护人类健康的保障。

[0004] 传统检测重金属离子残留的主要方法有原子吸收光谱法,气相色谱分析法、比色法、电感耦合等离子体光谱法及其联用法等。传统方法所需仪器昂贵,操作复杂,需专业人员。而随着免疫检测技术的发展,基于特异抗体识别重金属离子的免疫分析法如ELISA、电化学发光检测、免疫层析检测等都能用于重金属残留的检测。目前用于重金属离子残留现场筛查方法,因其灵敏度低不能很好满足要求,因此需要开发可在现场更为准确和快速的检测方法。

发明内容

[0005] 本发明旨在至少解决现有技术中存在的技术问题之一。为此,本发明的一个目的在于提出一种检测重金属汞离子的检测试剂盒,该试剂盒的检测灵敏度高、特异性强、能快速、简便地检测重金属汞离子。

[0006] 第一方面,本发明要求保护一种重金属汞离子的检测试剂盒。

[0007] 本发明所提供的重金属汞离子的检测试剂盒,含有试纸条和经超顺磁性荧光复合粒子标记的第一抗体;所述第一抗体能够特异结合重金属汞离子。

[0008] 其中,所述试纸条由依次连接并固定于基底层上的样品垫、设有检测线和质控线的包被膜,以及吸水垫组成。所述检测线和所述质控线相互分离。所述检测线处包被有载体蛋白偶联重金属汞离子抗原。所述质控线处包被有二抗,所述二抗为抗所述第一抗体的抗体。所述检测线位于所述包被膜靠近所述样品垫的一端。所述质控线位于所述包被膜靠近所述吸水垫的一端。

[0009] 进一步地,所述经超顺磁性荧光复合粒子标记的第一抗体为将所述第一抗体与所述超顺磁性荧光复合粒子通过肽键共价结合形成的聚合物。所述第一抗体可为能够特异结合重金属汞离子的多克隆抗体或单克隆抗体。所述载体蛋白偶联重金属汞离子抗原是通过将所述载体蛋白偶联氨基功能化EDTA并螯合重金属汞离子得到的。所述样品垫可为玻璃纤

纤维素膜,所述包被膜可为硝酸纤维素膜。

[0010] 其中,所述载体蛋白可为BSA、OVA、KLH等。在本发明的具体实施例方式中,所述载体蛋白具体为牛血清白蛋白(BSA)。

[0011] 更进一步地,所述超顺磁性荧光复合粒子为超顺磁性荧光复合微球。所述超顺磁性荧光复合微球为 Fe_3O_4 磁性纳米粒子与CdSe/ZnS荧光材料经包覆 SiO_2 并表面修饰羧基功能化基团的复合微球。所述超顺磁性荧光复合微球的直径可为10-500nm,优选地,为50-400nm,更优选地,为100-300nm。所述超顺磁性荧光复合微球的磁饱和强度为40~120emu/g,对应的外磁场响应速度为30~120秒,所述超顺磁性复合粒子的磁饱和强度具体为40~80emu/g,对应的外磁场响应速度为30~60秒,所述超顺磁性荧光复合微球功能化基团羧基的含量为40~400 $\mu\text{mol/g}$,所述羧基的含量具体为60~100 $\mu\text{mol/g}$ 。

[0012] 在所述方法中,所述载体蛋白偶联重金属汞离子抗原可按照包括如下步骤的方法制备:

[0013] (a1) 将所述载体蛋白溶于浓度为0.05M、pH值为9.6的硼酸盐缓冲液中,得到载体蛋白溶液;

[0014] 所述载体蛋白和所述浓度为0.05M、pH值为9.6的硼酸盐缓冲液的配比为100mg:10mL。

[0015] (a2) 将Aminobenzyl-EDTA溶于1M盐酸中,然后0℃(冰浴)搅拌下滴加浓度为0.2M的 NaNO_2 溶液,反应,得到Aminobenzyl-EDTA溶液;

[0016] 所述Aminobenzyl-EDTA、所述1M盐酸和所述浓度为0.2M的 NaNO_2 溶液的配比为9mg:4mL:150 μL ;

[0017] (a3) 将步骤(a2)得到的所述Aminobenzyl-EDTA溶液滴加到步骤(a1)得到的所述载体蛋白溶液中,并用1M NaOH调节pH至8.5,反应,然后用1M HCL调节pH至7.5,加入浓度为0.5M的重金属汞离子溶液,再反应,得到反应液;

[0018] 所述Aminobenzyl-EDTA溶液、所述载体蛋白溶液、所述浓度为0.5M的重金属汞离子溶液的配比为4.15mL:10mL:90 μL 。

[0019] 在所述方法中,所述经超顺磁性荧光复合粒子标记的第一抗体可按照包括如下步骤的方法制备:

[0020] (b1) 将每5mg超顺磁性荧光复合粒子、0.96mg 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC)、1.15mg N-羟基丁二酰亚胺(NHS)和1mL浓度为0.1M、pH值为4.7的2-(N-吗啡啉)乙磺酸(MES)缓冲液混匀,反应,得到活化后磁性粒子;

[0021] (b2) 将每5mg步骤(b1)得到活化后磁性粒子、0.1-0.2mg所述第一抗体和0.8mL浓度为50mM pH为8.5的硼砂缓冲液混匀、反应,得到含有偶联后磁性粒子的反应液;

[0022] (b3) 向步骤(b2)得到的反应液中加入BSA混匀得到混合液、反应,得到含有封闭后磁性粒子的反应液;所述BSA在所述混合液中的质量百分含量为1%。

[0023] 进一步地,在所述载体蛋白偶联重金属汞离子抗原的制备方法中:

[0024] 步骤(a2)中,所述反应的温度可为0℃、时间可为15min;

[0025] 步骤(a3)中,所述反应的温度可为4℃、时间为4h;所述再反应的温度可为4℃、时间为12h;

[0026] 进一步地,在所述经超顺磁性荧光复合粒子标记的第一抗体的制备方法中:

[0027] 步骤(b1)中,所述反应的温度可为37℃、时间为0.5h;

[0028] 步骤(b2)中,所述反应(避光)的温度可为37℃,时间可为2h;

[0029] 步骤(b3)中,所述反应(避光)的温度可为37℃,时间可为0.5h。

[0030] 更进一步地,在所述载体蛋白偶联重金属汞离子抗原的制备方法中,在步骤(a3)之后还可包括如下步骤(a4):

[0031] (a4)将步骤(a3)所得反应液经透析得到所述载体蛋白偶联重金属汞离子抗原。

[0032] 其中,所述透析是采用的透析液可为0.02M PBS缓冲液,透析时间可为48h。

[0033] 更进一步地,在所述经超顺磁性荧光复合粒子标记的第一抗体的制备方法中,在步骤(b3)之后还可包括如下步骤(b4):

[0034] (b4)将所述含有封闭后磁性粒子的反应液中的封闭后磁性粒子进行洗涤、悬浮,得到所述经超顺磁性荧光复合粒子标记的第一抗体。

[0035] 其中,进行所述洗涤时采用的洗涤液和进行所述悬浮时采用的悬浮液均可浓度为0.02M pH值为7.4的PBS缓冲液。

[0036] 在本发明的具体实施方式中,所述第一抗体为能够特异结合重金属汞离子的小鼠来源的多克隆抗体;相应的,所述二抗可为抗小鼠IgG的抗体(如羊抗鼠IgG)。

[0037] 进一步地,所述能够特异结合重金属汞离子的小鼠来源的多克隆抗体可按照包括如下步骤的方法制备得到:将免疫原溶液(浓度为5μg/mL)和佐剂等体积混合后免疫小鼠;所述免疫原为重金属汞离子半抗原(一价汞离子)与载体蛋白的偶联物(按照上述“所述载体蛋白偶联重金属汞离子抗原的制备方法”制备得到);所述佐剂为Quick Antibody-Mouse 3W佐剂。其中,所述载体蛋白可为BSA、OVA、KLH等。在本发明的具体实施方式中,所述载体蛋白具体为卵清蛋白(ovalbumin,OVA)。

[0038] 更进一步地,所述免疫可为两次免疫,包括初免和2周后进行的加强免疫;每次的免疫剂量为250ng,以所述重金属汞离子半抗原与载体蛋白的偶联物的量计。

[0039] 更加具体的,在所述能够特异结合重金属汞离子的小鼠来源的多克隆抗体的制备方法中,还可包括如下步骤:在对小鼠进行加强免疫后的第10天制备腹水(加强免疫后1周采血,检测血清中抗体效价和对重金属汞离子的特异性),收集腹水,获得所述能够特异结合重金属汞离子的小鼠来源的多克隆抗体。

[0040] 第二方面,本发明要求保护前文所述试剂盒的制备方法。

[0041] 本发明所提供的试剂盒的制备方法可包括如下步骤:分别制备前文所述试剂盒中的所述试纸条和所述经超顺磁性荧光复合粒子标记的第一抗体。

[0042] 其中,制备所述试纸条的方法包括:

[0043] I、分别制备所述样品垫和所述设有检测线和质控线的包被膜;

[0044] II、将步骤I得到的所述样品垫、步骤I得到的所述设有检测线和质控线的包被膜与所述吸水垫依次粘贴到所述基底层上,得到所述试纸条;

[0045] 所述设有检测线和质控线的包被膜按照如下方法制备:将前文所述的载体蛋白偶联重金属汞离子抗原和所述二抗分别喷在所述包被膜的两端不同区域,形成所述检测线和所述质控线,得到所述设有检测线和质控线的包被膜;

[0046] 所述样品垫按照如下方法制备:将玻璃纤维膜浸泡在膜处理缓冲液中,0.5h后取出晾干,即得所述样品垫。所述膜处理缓冲液为含体积分数为0.2%的Tween20的0.02M PBS

溶液 (pH7.4)。

[0047] 制备所述经超顺磁性荧光复合粒子标记的第一抗体的方法见前文相关描述。

[0048] 第三方面,本发明要求保护前文所述试剂盒在检测重金属汞离子中的应用。其中,所述检测为定量检测或定性检测。

[0049] 第四方面,本发明要求保护检测重金属汞离子的方法,具体为如下(A)或(B):

[0050] (A)一种检测或辅助检测待测样品中是否含有金属汞离子的方法,包括:

[0051] a1) 将1mL待测样品与20 μ L含有前文所述试剂盒中的所述经超顺磁性荧光复合粒子标记的第一抗体的溶液混合2分钟,磁分离后用50 μ L含体积分数为0.2%的Tween20的0.02M PBS溶液 (pH7.4) 重悬,然后加入到所述试纸条的所述样品垫,反应10min,然后进行荧光检测;

[0052] a2) 根据所述试纸条的反应结果,按照如下确定所述待测样品中是否含有金属汞离子:若所述检测线与所述质控线均显示荧光,且所述检测线的荧光强度不低于所述质控线的荧光强度,则所述待测样品中不含有金属汞离子或候选不含有金属汞离子;若所述检测线不显示荧光且所述质控线显示荧光,或所述检测线与所述质控线均显示荧光但所述检测线的荧光强度低于所述质控线的荧光强度,则所述待测样品中含有金属汞离子或候选含有金属汞离子。

[0053] (B)一种检测待测样品中金属汞离子含量的方法,包括:

[0054] b1) 绘制标准曲线:配制系列浓度的金属汞离子的标准品溶液,将所得的若干份含有不同浓度的金属汞离子的标准品溶液分别取1mL与20 μ L含有前文所述试剂盒中的所述经超顺磁性荧光复合粒子标记的第一抗体的溶液混合2分钟,磁分离后用50 μ L含体积分数为0.2%的Tween20的0.02M PBS溶液 (pH7.4) 重悬,得到若干份重悬液;取若干个所述试剂盒中的所述试纸条检测所述若干份重悬液,每一个所述试纸条检测一份所述重悬液,所述检测为:将所述重悬液加入到所述试纸条的所述样品垫,反应10min;用荧光读数仪读取所述试纸条的所述质控线和所述检测线的荧光强度;以所述金属汞离子的标准品的浓度或其对数为横坐标,以所述检测线和所述质控线的荧光强度的比值或其对数为纵坐标,绘制标准曲线图,得到标准曲线方程;

[0055] b2) 待测样品检测:将所述1mL待测样品与20 μ L含有所述经超顺磁性荧光复合粒子标记的第一抗体的溶液混合2分钟,磁分离后用50 μ L含体积分数为0.2%的Tween20的0.02M PBS溶液 (pH7.4) 重悬,然后加入到未使用过的所述试纸条的所述样品垫,反应10min;用荧光读数仪读取所述试纸条的所述质控线和所述检测线的荧光强度,将所述检测线和所述质控线的荧光强度的比值或其对数代入步骤b1) 所得标准曲线方程,计算得到所述待测样品中的金属汞离子的浓度值。

[0056] 本发明所提供的检测试剂盒及检测方法,检测重金属汞离子,检测的灵敏度高、特异性强,检测时间短,检测成本低,易于操作和推广。

附图说明

[0057] 图1为根据本发明一个实施例的重金属汞离子的检测试剂盒的侧视结构示意图。100表示基层;200表示样品垫;310表示检测线(T);320表示质控线(C)。

[0058] 图2为根据本发明一个实施例的重金属汞离子的检测试剂盒的主视结构示意图。

200表示样品垫;310表示检测线(T);320表示质控线(C);400表示吸水垫。

[0059] 图3为根据本发明一个实施例的重金属汞离子的检测试剂盒的检测值与浓度的曲线示意图。

具体实施方式

[0060] 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。

[0061] 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。

[0062] 实施例1、载体蛋白偶联重金属汞离子抗原的制备

[0063] 具体步骤为:

[0064] 1) 称取100mg蛋白(BSA、OVA或KLH)溶于10mL 0.05M的硼酸盐缓冲液中(pH9.6),得到蛋白溶液。

[0065] 2) 称取9mg Aminobenzyl-EDTA(东仁化学科技(上海)有限公司,M029)溶于4mL1M盐酸,0℃(冰浴)搅拌下滴加150μL浓度为0.2M的NaNO₂溶液,并于0℃反应15分钟。

[0066] 3) 将Aminobenzyl-EDTA溶液在10分钟内缓慢滴加入蛋白溶液,并用1M浓度NaOH调pH至8.5,4℃反应4小时,然后用1M HCL调pH至7.5。

[0067] 4) 加入90μL浓度为0.5M重金属离子溶液(汞离子),4℃反应12小时。

[0068] 5) 将步骤4)的反应溶液经0.02M PBS缓冲溶液透析48小时得到载体蛋白偶联的重金属汞离子抗原。所得样品用冻干机冻干,于-20℃保存。

[0069] 该实施例中所提供的“载体蛋白偶联重金属汞离子抗原”的制备方法是经过参数、条件、工艺优化后的结果。

[0070] 实施例2、抗重金属汞离子小鼠多抗的制备

[0071] 采用快速免疫法免疫Balb/c小鼠:将OVA-Hg抗原(利用实施例1的方法制备得到的重金属汞离子与载体蛋白OVA的偶联物)用生理盐水稀释配制成浓度5μg/mL后与Quick Antibody-Mouse 3W佐剂1:1(各50μL)混合,后小腿肌肉注射免疫Balb/c小鼠,第14天按同样方式加强免疫小鼠,每次的免疫剂量为250ng,以重金属汞离子与载体蛋白OVA的偶联物的量计。于第21天自小鼠尾部采血,分离血清后用间接ELISA法检测血清中抗体效价及对重金属汞离子的特异性。在小鼠血清效价达到1:10⁴后在末次免疫后的第10天,采用体内诱生法制备腹水,于免疫小鼠的腹腔注射0.5mL石蜡油,制备腹水抗体时,在免疫小鼠腹腔注射接种约10⁶个生长良好的NS1骨髓瘤细胞。7天后开始收集腹水直至小鼠死亡,腹水经蛋白A亲和层析纯化得到纯化的小鼠多克隆抗体。抗体分装后于-20℃冻存。

[0072] 实施例3、超顺磁性荧光复合微球的制备

[0073] 1) 取50mg粒径30纳米的超顺磁性Fe₃O₄纳米颗粒,以0.1M的HCl处理、洗涤。随后将其分散于55mL乙醇与水的混合液(体积比为10:1)中。超声条件下加入0.5mL浓氨水(浓度为28%)。后加入0.03mL硅酸四乙酯,25℃反应24小时。洗涤后分散于100mL乙醇中,加入0.5mL浓氨水(浓度为28%),随后加入0.3mL OTMS,25℃反应24小时,洗涤后分散于氯仿中,随后加入1g PMA-ODE(十八烯聚丙烯酸甲脂),干燥后加入氨水溶解,得到表面羧基功能化并包覆SiO₂的超顺磁性Fe₃O₄粒子。

[0074] 2) 将包覆SiO₂的超顺磁性Fe₃O₄粒子溶于1%的PDDA溶液(Sigma-Aldrich,522376)中,超声10分钟,并用去离子水洗涤提纯。随后往该溶液中加入10μM水溶性CdSe/ZnS量子

点,超声10分钟,洗涤提纯后即可得到超顺磁性 Fe_3O_4 复合CdSe/ZnS荧光粒子。

[0075] 3) 将超顺磁性 Fe_3O_4 复合CdSe/ZnS荧光粒子分散于55ml乙醇与水的混合液(体积比10:1)中。超声条件下加入0.5mL浓氨水(浓度为28%)。后加入0.03mL硅酸四乙酯,25℃反应24小时。洗涤后分散于100ml乙醇中,加入0.5mL浓氨水(浓度为28%),随后加入0.3mL OTMS,25℃反应24小时,洗涤后分散于氯仿中,随后加入1g PMA-ODE,干燥后加入氨水溶解,得到表面羧基功能化并包覆 SiO_2 的超顺磁性 Fe_3O_4 复合CdSe/ZnS荧光微球,所制备超顺磁性荧光复合微球粒径为100~300nm,磁饱和强度为40~80emu/g,对应的外磁场响应速度为30~60秒,羧基的含量为60~100 $\mu\text{mol/g}$ 。

[0076] 实施例4、超顺磁性荧光复合微球标记重金属汞离子抗体的制备

[0077] 以平均直径为100~300nm、羧基修饰的超顺磁性荧光复合微球(实施例3制备),抗重金属汞离子小鼠多抗(实施例2制备),按照下述方法制备超顺磁性荧光复合微球标记重金属汞离子标记第一抗体:

[0078] (1) 取5mg的上述羧基修饰的超顺磁性荧光复合微球用MES缓冲液(0.1M、pH4.7)洗涤并磁分离后,用1ml MES缓冲液(0.1M、pH4.7)重悬,加入1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC)至终浓度为5mM(加入量0.96mg)、加入NHS(N-羟基丁二酰亚胺)至终浓度为10mM(加入量1.15mg),37℃避光,反应半小时得到活化后羧基修饰的超顺磁性荧光复合微球。

[0079] (2) 用50mM pH8.5的硼砂缓冲液洗涤该活化后羧基修饰的超顺磁性荧光复合微球,取0.1~0.2mg上述待标记抗重金属汞离子第一抗体和5mg上述活化后羧基修饰的超顺磁性荧光复合微球混合到50mM pH8.5的硼砂缓冲液中充分混匀。37℃避光下反应2小时,让该抗体和超顺磁性荧光复合微球形成稳定的肽键共价结合,得到超顺磁性荧光复合微球与重金属汞离子抗体的偶联物。反应结束后,加入终浓度为1%(质量百分含量)的BSA溶液对超顺磁性荧光复合微球与重金属汞离子抗体的偶联物上剩余活性羧基位点进行封闭,37℃避光反应0.5小时。完成后,用pH7.4的0.02M PBS缓冲液洗涤、重悬得到5mg/ml超顺磁性荧光复合微球标记重金属汞离子抗体液体,4℃保存待用。

[0080] 实施例5、检测重金属汞离子试剂盒的制备

[0081] 本发明所提供的重金属汞离子的检测试剂盒,含有试纸条和经超顺磁性荧光复合粒子标记的第一抗体(实施例4制备)。

[0082] 所述试纸条由依次连接并固定于基底层上的样品垫、设有检测线和质控线的包被膜,以及吸水垫组成。所述检测线和所述质控线相互分离;所述检测线处包被有载体蛋白偶联重金属汞离子抗原;所述质控线处包被有羊抗鼠IgG抗体。所述检测线位于所述包被膜靠近所述样品垫的一端;所述质控线位于所述包被膜靠近所述吸水垫的一端。

[0083] 其中,所述试纸条的制备方法具体如下:

[0084] 1、以BSA偶联重金属汞离子抗原(即利用实施例1的方法制备得到的重金属汞离子与载体蛋白BSA的偶联物)作为包被抗原,以羊抗鼠IgG抗体制备包被膜,具体方法如下:

[0085] (a) 采用pH7.4的0.02M PBS缓冲液,将羊抗鼠IgG抗体(长沙博优生物科技有限公司,ABGAM-0500)配制为浓度0.5mg/ml溶液,将BSA偶联重金属汞离子抗原配制浓度为0.5~1mg/ml的溶液。

[0086] (b) 选用BioDot的XYZ3050喷膜系统将步骤(a)得到羊抗鼠IgG抗体溶液喷至包被

膜(硝酸纤维素膜)的质控线(C线)位置,将BSA偶联重金属汞离子抗原包被缓冲液喷至检测线(T线)位置,于相对湿度为20%以下的干燥车间进行抽湿4小时后干燥待用,得到具有检测线和质控线的包被膜。

[0087] 2、用膜处理缓冲液(含体积分数为0.2%的Tween20的0.02M PBS溶液,pH7.4)浸泡样品垫玻璃纤维纸半小时,浸泡的温度为37℃,于同样的抽湿条件进行抽湿4小时后。在10万级洁净和干燥的车间中把上述干燥好的具有检测线和质控线的包被膜、样品垫、吸水垫和基底层按图1和图2所示进行搭配组装(即将样品垫、包被膜与吸水垫依次粘贴到基底层上)后,采用BioDot的CM4000裁切系统将贴好的纸板裁切为3.5mm/条的宽度,装入检测用夹片待用。

[0088] 实施例6、实施例5制备的试剂盒的使用方法

[0089] 一、定性检测

[0090] 向待测样品中加入5mL浓度1%(%表示质量分数)的硝酸溶液提取5-20分钟,过滤,滤液取1mL用10倍体积含络合剂(Aminobenzyl-EDTA,含量2μM)的pH为7.4的0.02M PBS缓冲液稀释,取1mL溶液与20μL所述重金属汞离子的检测试剂盒中的含有经超顺磁性荧光复合粒子标记的第一抗体的溶液混合2分钟,并经磁分离,用50μL含体积分数为0.2%的Tween20的0.02M PBS溶液(pH7.4)重悬,然后滴加到检测重金属汞离子试剂盒的加样端(即样品垫处)中,室温反应10分钟后,进行荧光检测。

[0091] 根据所述试纸条的反应结果,按照如下确定所述待测样品中是否含有重金属汞离子:将反应后的试纸条置于紫外灯下照射,若所述检测线与所述质控线均显示红色荧光(所述检测线的荧光强度不显著低于所述质控线的荧光强度),则检测结果为阴性,即认为所述待测样品中不含有重金属汞离子;若所述检测线不显示红色荧光或显色微弱(所述检测线的荧光强度低于所述质控线的荧光强度),且所述质控线显示红色荧光,则检测结果为阳性,即认为所述待测样品中含有重金属汞离子。

[0092] 二、定量检测

[0093] 1、绘制标准曲线

[0094] 将重金属汞离子标准品(Sigma-Aldrich,28941)用含络合剂(Aminobenzyl-EDTA,含量2μM)的pH为7.4的0.02M PBS缓冲液配制成系列浓度(0、0.01、0.05、0.1、0.5、1、5、10μg/L),针对每个稀释度的重金属汞离子标准品溶液,均取1mL标准品溶液与20μL所述重金属汞离子的检测试剂盒中的含有经超顺磁性荧光复合粒子标记的第一抗体的溶液混合2分钟,并经磁分离,用50μL含体积分数为0.2%的Tween20的0.02M PBS溶液(pH7.4)重悬,然后滴加到检测重金属汞离子试剂盒的加样端(即样品垫处)中,室温反应10分钟后,采用荧光检测仪检测。检测时采用的激发和发射波长分别为365nm和615nm,读取所述试纸条的所述质控线和所述检测线的荧光强度;以所述重金属汞离子标准品浓度的对数为横坐标(X),以所述检测线和所述质控线的荧光强度比值对数为纵坐标(Y),绘制标准曲线图,得到标准曲线方程。质控线的荧光强度值用来判定试纸条是否有效。

[0095] 所得的标准曲线图如图3所示,标准曲线方程为:

[0096] $Y = -0.2226X^2 - 0.7414X - 0.6878, R^2 = 0.9966$ 。

[0097] 2、待测样品检测

[0098] 向待测样品中加入5mL浓度1%(%表示质量分数)的硝酸溶液提取5-20分钟,过

滤,滤液取1mL用10倍体积含络合剂(Aminobenzyl-EDTA,含量2 μ M)的pH为7.4的0.02M PBS缓冲液稀释,取1mL溶液与20 μ L所述重金属汞离子的检测试剂盒中的含有经超顺磁性荧光复合粒子标记的第一抗体的溶液混合2分钟,并经磁分离,用50 μ L含体积分数为0.2%的Tween20的0.02M PBS溶液(pH7.4)重悬,然后滴加到检测重金属汞离子试剂盒的加样端(即样品垫处)中,室温反应10分钟后,采用荧光检测仪检测。检测时采用的激发和发射波长分别为365nm和615nm,读取所述试纸条的所述质控线和所述检测线的荧光强度;将所述检测线和所述质控线的荧光强度比值的对数代入步骤1的标准曲线方程中,计算得到所述待测样品中的重金属汞离子的浓度值。

[0099] 实施例7、检测重金属汞离子试剂盒的性能评估

[0100] 对实施例5得到的检测重金属汞离子试剂盒进行评估,具体方法如下:

[0101] 1、检测灵敏度

[0102] 以重金属汞离子标准品(Sigma-Aldrich,28941)作为待测样品来测定实施例5的检测重金属汞离子试剂盒的灵敏度。

[0103] 按照实施例6步骤二中的方法绘制标准曲线,标准曲线图如图3所示。将检测灵敏度定为50%抑制率时的重金属汞离子浓度,将检测限定为90%抑制率时的重金属汞离子浓度,结果表明,重金属汞离子荧光检测试纸检测重金属汞离子的灵敏度为0.24 μ g/L,检测限为0.012 μ g/L。

[0104] 2、准确度和精密性检测

[0105] 检测大米样品和纯净水样品,分别添加不同浓度的重金属汞离子。称取待测样本1g,固体样品需研磨碎,液体样品可直接加入5mL浓度1%(%表示质量分数)的硝酸溶液提取5-20分钟,过滤,滤液取1mL用10倍体积含络合剂(同上)的pH为7.4的0.02M PBS缓冲液稀释,取1mL溶液与20 μ L所述重金属汞离子的检测试剂盒中的含有经超顺磁性荧光复合粒子标记的第一抗体的溶液混合2分钟,并经磁分离,用50 μ L含体积分数为0.2%的Tween20的0.02M PBS溶液(pH7.4)重悬,然后滴加到检测重金属汞离子试剂盒的加样端(即样品垫处)中,反应10分钟后,采用荧光检测仪检测。每个添加样品测试5次,并计算回收率。测定结果见表1,重金属汞离子添加回收率为86.5%~102.7%,准确度较好;变异系数6.6%~13.0%,平均变异系数小于15%。

[0106] 表1准确度和精密性检测

[0107]

样品	Hg 添加量 (μ g/L)	n	Hg 检测值($\bar{X} \pm SD$) μ g/L	回收率 (%)	CV (%)
大米	0.1	5	0.087 $\pm$ 0.009	86.5	10.3
	1	5	0.91 $\pm$ 0.12	90.5	13.0
	5	5	4.49 $\pm$ 0.3	89.9	6.6
纯净水	0.05	5	0.046 $\pm$ 0.004	92.9	8.0
	0.5	5	0.51 $\pm$ 0.05	102.7	10.4
	5	5	4.82 $\pm$ 0.42	96.4	8.7

[0108] 3、交叉反应检测

[0109] 将实施例5所得到的重金属汞离子试剂盒分别对不同金属离子进行交叉反应测定,并计算交叉反应率(交叉反应率($\%$) = $[\text{IC}_{50}(\text{Hg}) / \text{IC}_{50}(\text{待测离子})] \times 100$)。结果显示与其余金属离子的交叉反应率低(表2)。重金属汞离子试剂盒对重金属汞离子具有特异性。

[0110] 表2交叉反应检测

[0111]

金属离子名称	IC ₅₀ ($\mu\text{g/L}$)	交叉反应率 $\%$
--------	--------------------------------------	------------

[0112]

Hg ¹⁺	0.24	100
Cd ²⁺	>10000	<0.01
Cu ²⁺	>10000	<0.01
Cr ²⁺	>10000	<0.01
Pb ²⁺	>10000	<0.01
Zn ²⁺	>10000	<0.01
Mg ²⁺	>10000	<0.01
Ca ²⁺	>10000	<0.01
Fe ²⁺	>10000	<0.01
Fe ³⁺	>10000	<0.01

[0113] 尽管已经示出和描述了本发明的实施例,本领域的普通技术人员可以理解:在不脱离本发明的原理和宗旨的情况下可以对这些实施例进行多种变化、修改、替换和变型,本发明的范围由权利要求及其等同物限定。

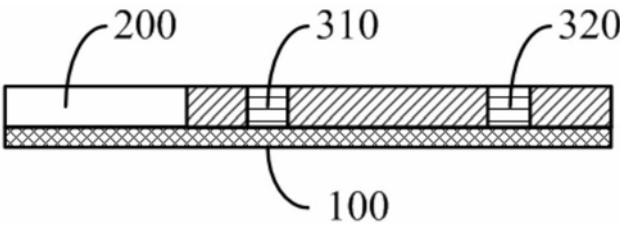


图1

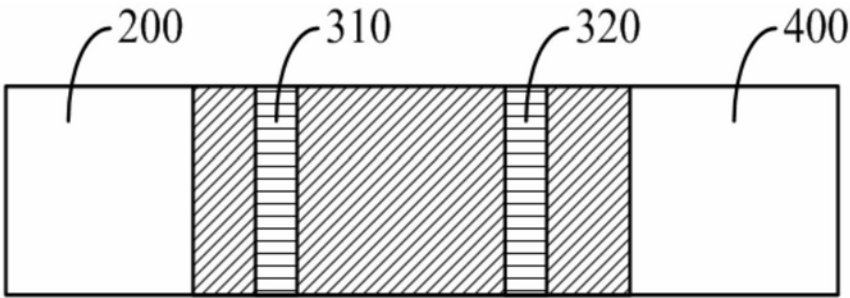


图2

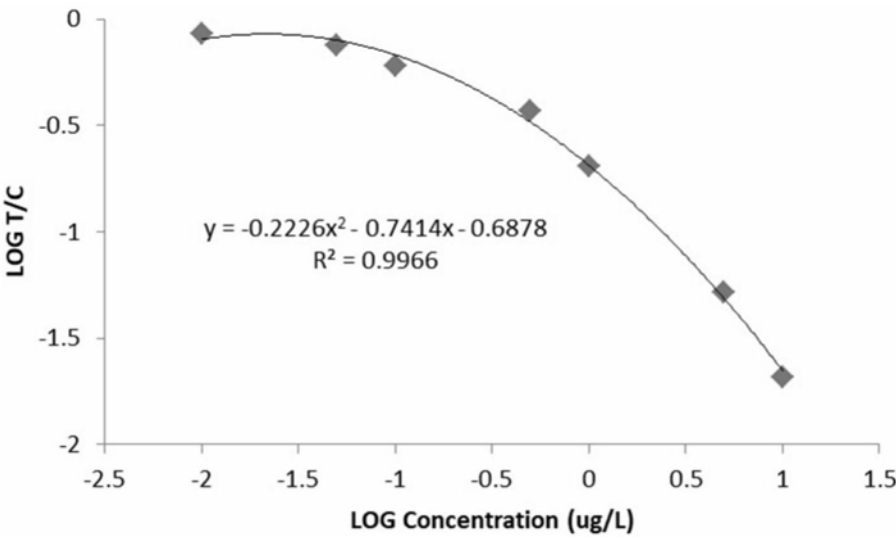


图3

专利名称(译)	重金属汞离子的检测试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN108956972A	公开(公告)日	2018-12-07
申请号	CN201810516469.9	申请日	2018-05-25
[标]申请(专利权)人(译)	清华大学深圳研究生院		
申请(专利权)人(译)	清华大学深圳研究生院		
当前申请(专利权)人(译)	清华大学深圳研究生院		
[标]发明人	马岚 吴峰 毛茅 岑瑜		
发明人	马岚 吴峰 毛茅 岑瑜		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/5304 G01N33/533		
代理人(译)	关畅 张立娜		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种重金属汞离子的检测试剂盒及其应用。本发明所提供的试剂盒含有试纸条和经超顺磁性荧光复合粒子标记的第一抗体(能够特异结合重金属汞离子);所述试纸条由依次连接并固定于基底层上的样品垫、设有相互分离的检测线(靠近样品垫, 包被有载体蛋白偶联重金属汞离子抗原)和质控线(靠近吸水垫, 包被有二抗, 抗所述第一抗体的抗体)的包被膜, 以及吸水垫组成。利用该试剂盒检测重金属汞离子, 灵敏度高、特异性强, 检测时间短, 检测成本低, 易于操作和推广。

样品	Hg 添加量 ($\mu\text{g/L}$)	n	Hg 检测值($\bar{X} \pm \text{SD}$) $\mu\text{g/L}$	回收率 (%)	CV (%)
大米	0.1	5	0.087 ± 0.009	86.5	10.3
	1	5	0.91 ± 0.12	90.5	13.0
	5	5	4.49 ± 0.3	89.9	6.6
纯净水	0.05	5	0.046 ± 0.004	92.9	8.0
	0.5	5	0.51 ± 0.05	102.7	10.4
	5	5	4.82 ± 0.42	96.4	8.7