



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105004684 A

(43) 申请公布日 2015. 10. 28

(21) 申请号 201510411520. 6

(22) 申请日 2015. 07. 14

(71) 申请人 上海拜豪生物科技有限公司

地址 200000 上海市浦东新区中国(上海)自由贸易试验区新金桥路 27 号 13 号楼 2 层

(72) 发明人 张积仁 阳帆 董欣敏 吴婧  
蔡睿 孙遥 赵乙木

(74) 专利代理机构 广州市越秀区哲力专利商标  
事务所(普通合伙) 44288

代理人 汤喜友

(51) Int. Cl.

G01N 21/31(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

G01N 27/62(2006. 01)

G01N 1/28(2006. 01)

G01N 27/447(2006. 01)

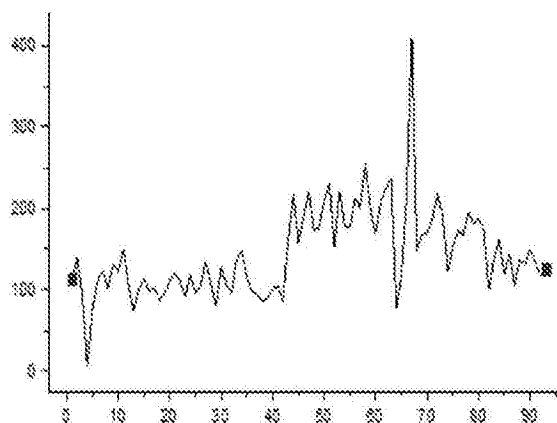
权利要求书2页 说明书18页 附图1页

(54) 发明名称

一种镍-IgE 螯合物及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明公开了一种镍-IgE 螯合物及其制备方法和应用,该镍-IgE 螯合物是镍离子与 IgE 通过巯基或 / 和半胱氨酸残基螯合而成。本发明建立了镍-IgE 螯合物的定性定量检测方法,以便定量检测镍-IgE 螯合物在评价一个地区镍污染程度的应用。通过定量检测一个地区人群血清中镍-IgE 螯合物可以间接反映这个地区人群受镍污染的情况,从而间接反映这个地区镍污染程度。本发明建立的镍-IgE 螯合物定量检测方法其准确度大大提高,并且使检测的重复性得到大大提高。



1. 一种镍-IgE 螯合物,其特征在于,镍离子与 IgE 通过巯基或 / 和半胱氨酸残基螯合而成。

2. 一种如权利要求 1 所述的镍-IgE 螯合物的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

A) 镍与 IgE 的螯合反应:在提纯源于人体的 IgE 或按照生物学方法重组的 IgE 中加入镍离子进行螯合反应,得到反应溶液;

B) 纯化镍-IgE 螯合物的提取:采用免疫亲和层析法,去除反应溶液中未反应的 IgE 以及多余的镍离子,即得镍-IgE 螯合物。

3. 根据权利要求 2 所述的制备方法,其特征在于,

所述步骤 B) 具体如下:

(1) 溶解样品:向经过步骤 A) 得到的反应溶液中加入生理盐水使镍-IgE 螯合物复溶;

(2) 平衡层析柱:使用稀释缓冲液冲洗层析柱的管路,在层析柱中装入能与 IgE 特异性结合的填料,装柱后,继续使用稀释缓冲液平衡层析柱;

(3) 上样:待层析柱平衡后,用稀释缓冲液稀释步骤(1)中样品,然后上柱,IgE 与填料特异性结合;

(4) 洗脱:使用稀释缓冲液冲洗层析柱至基线平衡,然后使用 0.05-0.1mol/L 的磷酸盐溶液进行洗脱,得到洗脱液 I;

(5) 收集:收集洗脱液 I;

(6) 透析:将步骤(5)中的收集的洗脱液,装透析袋,用 ddH<sub>2</sub>O 透析除盐,换水三次后,4℃透析过夜,收集样本;

(7) 平衡层析柱:采用新的层析柱,用稀释缓冲液冲洗管路,在该层析柱中装入能与镍特异性结合的填料,装柱后再用稀释缓冲液平衡层析柱;

(8) 上样:待层析柱平衡后,用稀释缓冲液稀释步骤(6)中样本,然后上柱;

(9) 洗脱:使用稀释缓冲液冲洗层析柱至基线平衡,然后使用 0.5-1.0mol/L 的磷酸盐溶液进行洗脱,得到洗脱液 II;

(10) 收集:收集洗脱液 II;

(11) 透析:将步骤(10)中的收集的洗脱液,装透析袋,用 ddH<sub>2</sub>O 透析除盐,换水三次后,4℃透析过夜,收集样本,即得镍-IgE 螯合物。

4. 根据权利要求 2 所述的镍-IgE 螯合物的制备方法,其特征在于,还包括步骤 C):对镍-IgE 螯合物的鉴定;

其中,步骤 C) 中具体如下:

(1) 制备胶床:以琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶中的一种作为介质制备胶床;

(2) 加样:取步骤 B) 中提取纯化得到的镍-IgE 螯合物,加入稀释缓冲液,并混匀,然后加样于样品槽中;

(3) 电泳:连接电泳板,进行电泳;

(4) 检测:在胶床上找出含镍的蛋白条带,将该蛋白条带取出并溶解,然后再采用 ELISA 法或 ICP-MS 法或 AAS 法检测是否含有镍以及检测镍的含量。

5. 一种如权利要求 1 所述的镍-IgE 螯合物在制备检测血样中镍-IgE 螯合物的试剂或试剂盒中的应用。

6. 一种至少包括如权利要求 1 所述的镍-IgE 螯合物作为标准品的试剂盒。

7. 根据权利要求 6 所述的试剂盒,其特征在於,还包括包被液,该包被液含有捕获 IgE 的物质或捕获镍的物质。

8. 一种定量检测镍-IgE 螯合物的方法,其特征在於,以已知含量的权利要求 1 所述的镍-IgE 螯合物作为标准品,采用以下方法之一对样品进行检测:酶联免疫法、酶联免疫与原子吸收光谱结合法、酶联免疫与电感耦合等离子体质谱结合法、提纯镍-IgE 螯合物与酶联免疫结合法、提纯镍-IgE 螯合物与原子吸收光谱结合法、提纯镍-IgE 螯合物与电感耦合等离子体质谱结合法、电泳与酶联免疫或原子吸收光谱或电感耦合等离子体质谱结合法。

## 一种镍-IgE 螯合物及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及检测领域,更具体地说,涉及一种镍-IgE 螯合物及其制备方法和应用。

### 背景技术

[0002] IgE 主要由粘膜相关淋巴样组织产生,其中大部分是由胃肠淋巴样组织所合成,少部分由呼吸道、唾液腺和生殖道粘膜组织合成。哺乳期产妇腺组织含有大量 IgE 产生细胞,这些细胞主要来自胃肠。在人类,还有少量的 IgE 来自骨髓。人出生后 4~6 月开始合成 IgE,4~12 岁血清中含量达成人水平,血清型 IgE 总 Ig 的 10%左右,半衰期约 5~6 天。IgE 有 IgE1 和 IgE2 两个亚类。IgE1 主要存在于血清中,约占血清中 IgE 的 85%, $\alpha 1$  链分子量为 56kD;IgE2 主要存在于外分泌液中,少部分以血清型 IgE 存在,约占血清中 IgE 的 15%, $\alpha 2$  链缺乏铰链区,分子量为 52kD。血清中的 IgE 除单体形式外还有由 J 链共价相连的二聚体或三聚体等形式。分泌型 IgE 是由 J 连接的双体和分泌成分所组成,主要存在于初乳、唾液、泪液、胃肠液、支气管分泌等外分泌液中,是粘膜局部免疫的最重要因素,分泌型 IgE 通过与相应的病原微生物(如脊髓灰质炎病毒)结合,阻抑其吸附到易感细胞上,分泌型 IgE 还可中和毒素如霍乱弧菌毒素和大肠杆菌毒素等。新生儿易患呼吸道、胃肠道感染可能与 IgE 合成不足有关。慢性支气管炎发作与分泌型 IgE 的减少也有一定关系。产妇可通过初乳将分泌型 IgE 传递给婴儿,这也是一种重要的自然被动免疫。嗜酸性粒细胞、中性粒细胞和巨噬细胞表达 Fc $\alpha$ R, 血清型单体 IgE 可介导调理吞噬和 ADCC 作用。此外,分泌型 IgE 具有免疫排除功能,即分泌型 IgE 结合饮食中大量的可溶性抗原以及肠道正常菌群或病原微生物所释放的热原物质,防止它们进入血液。

[0003] 众所周知,镍(Nickel, Ni)与人的健康息息相关,首先其是人体维持健康所必需的微量元素,其存在于多种氢化酶中,催化氢的氧化还原反应,参与多种酶蛋白的合成和细胞激素及色素的代谢,具有促进铁的吸收和红细胞的增长、激活酶形成辅酶、增强胰岛素、降血糖、保护心血管等作用,因此如果人体缺乏镍,会导致疾病的发生。但是,事实在生活中,由于环境污染,人体内很少缺乏镍,相反镍的含量常常过量,常常导致疾病的发生,甚至危及生命。

[0004] 镍作为一种常见的有毒金属,广泛应用于生活、生产之中,包括生产硬币、珠宝、镍合金不锈钢、制造 Ni-Cd 电池等,与人们的生活息息相关。随着科技的进步,人们将镍作为催化剂用于生产碳纳米颗粒的生产之中,又进一步加深了镍对于人类的影响。对于普通人群,镍主要是通过食入、吸入、接触等方式摄入镍,当然吸烟也是一重要途径。研究发现,过量的镍会导致机体多处组织及器官损伤,导致多种疾病的发生,包括呼吸系统疾病(肺炎、支气管炎、肺纤维化、哮喘、肺水肿等)、心血管疾病、肾脏疾病、皮肤疾病等,甚至还会导致肿瘤的发生。

[0005] 流行病学资料显示,长期接触镍的工人,其患呼吸系统肿瘤的几率大大增加,并且其因呼吸系统肿瘤致死的几率也大大增加。动物模型、体外模型试验也发现,镍可以诱导肿

瘤的发生。1990年,国际癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer, IARC)已将镍化合物作为第一类致癌物质(Group 1),将金属镍作为2B类致癌物质(Group 2B)。可见,镍严重威胁人体的健康。

[0006] 镍与多种蛋白质之间关系密切,可以与多种蛋白质结合,抑制多种蛋白酶的活性。随着对镍毒性研究的深入,人们逐渐认识到镍与蛋白的相互作用在其致毒过程中扮演着重要的角色,被认为是了解镍的毒性机理的关键所在,因此,对镍和蛋白质相互作用的研究就显得愈发重要。而现在关于镍与蛋白质作用的机理仅是冰山一角,还有很多蛋白质与镍之间的关系还不清楚,因而加强对于镍与蛋白质之间的关系至关重要。

## 发明内容

[0007] 针对镍污染严重的问题,本发明的目的在于提供一种镍-IgE螯合物及其制备方法,并建立镍-IgE螯合物的定性、定量检测方法,以便定量检测镍-IgE螯合物在评价一个地区镍污染程度的应用。通过定量检测一个地区人群血清中镍-IgE螯合物可以间接反映这个地区人群受镍污染的情况,从而间接反映这个地区镍污染程度。

[0008] 本发明解决其技术问题所采用的技术方案是:提供一种镍-IgE螯合物,镍离子与IgE通过巯基或/和半胱氨酸残基螯合而成。

[0009] 本发明还提供一种上述的镍-IgE螯合物的制备方法,包括以下步骤:

[0010] A) 镍与IgE的螯合反应:在提纯源于人体的IgE或按照生物学方法重组的IgE中加入镍离子进行螯合反应,得到反应溶液;

[0011] B) 纯化镍-IgE螯合物的提取:采用免疫亲和层析法,去除反应溶液中未反应的IgE以及多余的镍离子,即得镍-IgE螯合物。

[0012] 其中,体外合成法中所述步骤B)具体如下:

[0013] (1) 溶解样品:向经过步骤A)得到的反应溶液中加入生理盐水使镍-IgE螯合物复溶;

[0014] (2) 平衡层析柱:使用稀释缓冲液冲洗层析柱的管路,在层析柱中装入能与IgE特异性结合的填料,装柱后,继续使用稀释缓冲液平衡层析柱;

[0015] (3) 上样:待层析柱平衡后,用稀释缓冲液稀释步骤(1)中样品,然后上柱,IgE与填料特异性结合;

[0016] (4) 洗脱:使用稀释缓冲液冲洗层析柱至基线平衡,然后使用0.05-0.1mol/L的磷酸盐溶液进行洗脱,得到洗脱液I;

[0017] (5) 收集:收集洗脱液I;

[0018] (6) 透析:将步骤(5)中的收集的洗脱液,装透析袋,用ddH<sub>2</sub>O透析除盐,换水三次后,4℃透析过夜,收集样本;

[0019] (7) 平衡层析柱:采用新的层析柱,用稀释缓冲液冲洗管路,在该层析柱中装入能与镍特异性结合的填料,装柱后再用稀释缓冲液平衡层析柱;

[0020] (8) 上样:待层析柱平衡后,用稀释缓冲液稀释步骤(6)中样本,然后上柱;

[0021] (9) 洗脱:使用稀释缓冲液冲洗层析柱至基线平衡,然后使用0.5-1.0mol/L的磷酸盐溶液进行洗脱,得到洗脱液II;

[0022] (10) 收集:收集洗脱液II;

[0023] (11) 透析 :将步骤 (10) 中的收集的洗脱液,装透析袋,用 ddH<sub>2</sub>O 透析除盐,换水三次后,4℃透析过夜,收集样本,即得镍 -IgE 螯合物。

[0024] 其中,上述镍 -IgE 螯合物的制备方法,还包括步骤 C) :对镍 -IgE 螯合物的鉴定 ;

[0025] 其中,步骤 C) 中具体如下 :

[0026] (1) 制备胶床 :以琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶中的一种作为介质制备胶床 ;

[0027] (2) 加样 :取步骤 B) 中提取纯化得到的镍 -IgE 螯合物,加入稀释缓冲液,并混匀,然后加样于样品槽中 ;

[0028] (3) 电泳 :连接电泳板,进行电泳 ;

[0029] (4) 检测 :在胶床上找出含镍的蛋白条带,将该蛋白条带取出并溶解,然后再采用 ELISA 法或 ICP-MS 法或 AAS 法检测是否含有镍以及检测镍的含量。

[0030] 本发明还提供一种如上述的镍 -IgE 螯合物在制备检测人体内镍 -IgE 螯合物的试剂或试剂盒中的应用。

[0031] 本发明还提供一种至少包括如上述的镍 -IgE 螯合物作为标准品的试剂盒。

[0032] 优选地,该试剂盒中还包括包被液,该包被液含有捕获 IgE 的物质或捕获镍的物质。

[0033] 本发明还提供一种定量检测镍 -IgE 螯合物的方法,以已知含量的上述的镍 -IgE 螯合物作为标准品,采用以下方法之一对样品进行检测 :酶联免疫法、酶联免疫与原子吸收光谱结合法、酶联免疫与电感耦合等离子体质谱结合法、提纯镍 -IgE 螯合物与酶联免疫结合法、提纯镍 -IgE 螯合物与原子吸收光谱结合法、提纯镍 -IgE 螯合物与电感耦合等离子体质谱结合法、电泳与酶联免疫或原子吸收光谱或电感耦合等离子体质谱结合法。

[0034] 实施本发明的镍 -IgE 螯合物及其制备方法和应用,具有以下有益效果 :

[0035] 1. 本发明首次体外合成镍 -IgE 螯合物 ;

[0036] 2. 本发明首次提出镍 -IgE 螯合物可用于制备检测血样中镍 -IgE 螯合物的试剂或试剂盒中的应用。

[0037] 3. 本发明建立了镍 -IgE 螯合物的定性定量检测方法,以便定量检测镍 -IgE 螯合物在评价一个地区镍污染程度的应用。通过定量检测一个地区人群血清中镍 -IgE 螯合物可以间接反映这个地区人群受镍污染的情况,从而间接反映这个地区镍污染程度。本发明建立的镍 -IgE 螯合物定量检测方法其准确度大大提高,并且使检测的重复性得到大大提高。

## 附图说明

[0038] 图 1 为本发明所述的镍 -IgE 螯合物的非变性电泳条带图 ;

[0039] 图 2 为本发明所述的镍 -IgE 螯合物的电泳条带的同步辐射 X 线荧光分析图。

## 具体实施方式

[0040] 下面,结合具体实施方式,对本发明做进一步描述 :

[0041] 本发明除特别说明外,涉及的实验操作步骤均为本领域常规的步骤,所用试剂、材料如下述所列举,在本发明中没有列举出来的均为本领域常用的试剂或可以通过市购方式获得 :

- [0042] 磷酸盐溶液为 0.05-0.1mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 溶液或 0.5-1mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 溶液；
- [0043] 提取试剂为 PEG 溶液、硼酸盐缓冲液等（采用 PEG 法）；
- [0044] 胶床介质为琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶中的一种；
- [0045] 捕获 IgE 的物质购买自艾美捷科技有限公司的型号为 Abcam ab171396 的兔 Anti-IgE 抗体；其中，本发明所述与 IgE 特异性结合的物质、抗 IgE 抗体、抗 IgE 抗体均为捕获 IgE 的物质；
- [0046] 捕获镍的物质为广州然科公司生产的型号为 RK14419 的抗镍抗体；其中，本发明所述与镍特异性结合的物质、Ni 抗、抗 Ni 抗体、抗镍抗体均为捕获镍的物质；
- [0047] 酶标抗体为含有辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等酶标记的抗体中的一种；
- [0048] 底物为甲基联苯胺 (TMB) 溶液；
- [0049] 洗涤液为含有  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0.2mg/ml、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2.90mg/ml、NaCl8.0mg/ml、KCl 0.2mg/ml、0.5% Tween-20 的 pH 为 7.4 的 0.15M PBS 溶液；
- [0050] 封闭液为 1% -5% 牛血清白蛋白或脱脂奶粉；
- [0051] 稀释缓冲液为含 1.5mg/mL  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 、2.93mg/ml  $\text{NaHCO}_3$  的 PH 为 9.6 的 0.05M 碳酸盐缓冲液；
- [0052] 酶标抗体为 HRP 酶标抗体；
- [0053] 终止液为：将 21.7ml 的 2M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 定容至 200ml 的 ddH<sub>2</sub>O 中；
- [0054] 洗脱液为含木瓜蛋白酶的 PH 为 8.0 的 0.1mol/L Tris-HCL 缓冲液；
- [0055] 酸化剂为硝酸；
- [0056] 上样缓冲液为含有 1M Tris-HCl (pH 6.8)15.5mL、1% 溴酚蓝 2.5mL、ddH<sub>2</sub>O7mL、甘氨酸 25mL 的 Sample buffer (5X)；
- [0057] 电泳缓冲液为含 Tris 3mg/ml、甘氨酸 14.4mg/ml 的 PH 为 6.8 的 ddH<sub>2</sub>O 溶液；
- [0058] 本发明提供一种镍-IgE 螯合物，镍离子与 IgE 通过巯基或 / 和半胱氨酸残基螯合而成。
- [0059] 本发明还提供一种镍-IgE 螯合物的制备方法，包括以下步骤：
- [0060] A) 镍与 IgE 的螯合反应：在人源的 IgE 中加入镍离子进行螯合反应，得到反应溶液；
- [0061] B) 纯化镍-IgE 螯合物的提取：采用免疫亲和层析法，去除反应溶液中未反应的 IgE 以及多余的镍离子，即得镍-IgE 螯合物，具体步骤如下：
- [0062] (1) 溶解样品：向经过步骤 A) 得到的反应溶液中加入生理盐水使镍-IgE 螯合物复溶；
- [0063] (2) 平衡层析柱：使用稀释缓冲液冲洗层析柱的管路，在层析柱中装入能与 IgE 特异性结合的填料，装柱后，继续使用稀释缓冲液平衡层析柱；所述能与 IgE 特异性结合的填料为含抗 IgE 抗体的硅胶或树脂；
- [0064] (3) 上样：待层析柱平衡后，用稀释缓冲液稀释步骤 (1) 中样品，然后上柱，IgE 与填料特异性结合；
- [0065] (4) 洗脱：使用稀释缓冲液冲洗层析柱至基线平衡，然后使用 0.05-0.1mol/L 的磷酸盐溶液进行洗脱，得到洗脱液 I；
- [0066] (5) 收集：收集洗脱液 I；

[0067] (6) 透析 :将步骤 (5) 中的收集的洗脱液,装透析袋,用 ddH<sub>2</sub>O 透析除盐,换水三次后,4℃透析过夜,收集样本 ;

[0068] (7) 平衡层析柱 :采用新的层析柱,用稀释缓冲液冲洗管路,在该层析柱中装入能与镍特异性结合的填料,装柱后再用稀释缓冲液平衡层析柱 ;所述能与镍特异性结合的填料为含抗镍抗体的硅胶或树脂 ;

[0069] (8) 上样 :待层析柱平衡后,用稀释缓冲液稀释步骤 (6) 中样本,然后上柱 ;

[0070] (9) 洗脱 :使用稀释缓冲液冲洗层析柱至基线平衡,然后使用 0.5-1.0mol/L 的磷酸盐溶液进行洗脱,得到洗脱液 II ;

[0071] (10) 收集 :收集洗脱液 II ;

[0072] (11) 透析 :将步骤 (10) 中的收集的洗脱液,装透析袋,用 2 升 ddH<sub>2</sub>O 透析除盐,换水三次后,4℃透析过夜,收集样本,即得镍 -IgE 螯合物 ;

[0073] C) 对镍 -IgE 螯合物的鉴定,具体步骤如下 :

[0074] (1) 制备胶床 :以琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶中的一种作为介质制备胶床 ;

[0075] (2) 加样 :取步骤 B) 中提取纯化得到的镍 -IgE 螯合物,加入稀释缓冲液,并混匀,然后加样于样品槽中 ;

[0076] (3) 电泳 :连接电泳板,进行电泳 ;

[0077] (4) 检测 :在胶床上找出含镍的蛋白条带,将该蛋白条带取出并溶解,然后再采用 ELISA 法或 ICP-MS 法或 AAS 法检测是否含有镍以及检测镍的含量。

[0078] 本发明还提供一种至少包括如上述的镍 -IgE 螯合物作为标准品的试剂盒。

[0079] 优选地,该试剂盒中还包括包被液,该包被液含有捕获 IgE 的物质或捕获镍的物质。

[0080] 在本发明中,能实现本发明目的的试剂盒可以列出以下几种,但并不限于此。

[0081] 一种检测血样中镍 -IgE 螯合物的试剂盒,包括含有捕获 IgE 的物质的包被液、封闭液、洗涤液、作为二抗的可捕获镍的物质、酶标抗体、底物、终止液、稀释缓冲液、阳性对照、阴性对照等。

[0082] 一种检测血样中镍 -IgE 螯合物的试剂盒,包括含有捕获 IgE 的物质的包被液、封闭液、洗涤液、洗脱液、阳性对照、阴性对照等。

[0083] 一种检测血样中镍 -IgE 螯合物的试剂盒,包括含有捕获 IgE 的物质的包被液、封闭液、洗涤液、洗脱液、酸化剂、过氧化氢、阳性对照、阴性对照等。

[0084] 一种检测血样中镍 -IgE 螯合物的试剂盒,包括作为提纯血浆中 IgE 所需提取试剂、复溶液、含有捕获镍的物质的包被液、封闭液、洗涤液、酶标抗体、底物、终止液、稀释缓冲液、阳性对照、阴性对照等。

[0085] 一种检测血样中镍 -IgE 螯合物的试剂盒,包括作为提纯血浆中 IgE 所需提取试剂、复溶液、阳性对照、阴性对照等。

[0086] 一种检测血样中镍 -IgE 螯合物的试剂盒,包括作为提纯血浆中 IgE 所需提取试剂、复溶液、酸化剂、过氧化氢、阳性对照、阴性对照等。

[0087] 一种检测血样中镍 -IgE 螯合物的试剂盒,包括作为提纯血浆中 IgE 的提取试剂、胶床介质、复溶液、上样缓冲液、溶解胶床上含镍的蛋白条带所需液体、含有捕获镍的物质的包被液、封闭液、洗涤液、酶标抗体、底物、终止液、稀释缓冲液、阳性对照、阴性对照等。

[0088] 一种检测血样中镍-IgE 螯合物的试剂盒,包括作为提纯血浆中 IgE 所需提取试剂、胶床介质、复溶液、上样缓冲液、溶解胶床上含镍的蛋白条带所需液体、阳性对照、阴性对照等。

[0089] 一种检测血样中镍-IgE 螯合物的试剂盒,包括作为提纯血浆中 IgE 所需提取试剂、胶床介质、复溶液、上样缓冲液、溶解胶床上含镍的蛋白条带所需液体、酸化剂、过氧化氢、阳性对照、阴性对照等。

[0090] 上述几种试剂盒中,所述阳性对照为标准品,即螯合有重金属镍的 IgE 螯合物或螯合有重金属镍的 BSA 螯合物;所述阴性对照为不含有标准品的稀释缓冲液。

[0091] 上述试剂盒用于检测螯合镍的 IgE,以提高检测的准确性,重复性,并使之在临床中得到推广。

[0092] 本发明还提供一种定量检测镍-IgE 螯合物的方法,以已知含量的上述的镍-IgE 螯合物作为标准品,采用以下方法之一对样品进行检测:酶联免疫法、酶联免疫与原子吸收光谱结合法、酶联免疫与电感耦合等离子体质谱结合法、提纯镍-IgE 螯合物与酶联免疫结合法、提纯镍-IgE 螯合物与原子吸收光谱结合法、提纯镍-IgE 螯合物与电感耦合等离子体质谱结合法、电泳与酶联免疫或原子吸收光谱或电感耦合等离子体质谱结合法。在本发明中,用检测镍-IgE 螯合物的方法可以列出的有以下几种,但并不限于以下几种。

[0093] 其中,上述定量检测镍-IgE 螯合物的方法中采用的试剂如下:

[0094] 方法一:酶联免疫法(ELISA法)检测镍-IgE 螯合物,按照如下步骤检测:

[0095] 1) 将能够捕获 IgE 的物质,如抗 IgE 抗体(抗 IgE Ab)包被于固相载体上:用稀释缓冲液将抗 IgE Ab 至稀释 1000-8000 倍,加入 ELISA 板微孔中,4℃过夜 16-18 小时,或 37℃水浴 1-3 小时,储存冰箱;

[0096] 2) 从循环系统取血浆,作待检样品,1000rpm 离心 5-8 分钟,离心弃去沉淀;

[0097] 3) 封闭:移去稀释缓冲液,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入以 1%-5% 牛血清白蛋白或脱脂奶粉作为封闭液,37℃放置 1 小时,移去封闭液,并用洗涤液进行洗涤,洗涤完成后,ELISA 板于 36.5-37.5℃放置 1-2 小时;

[0098] 4) 加待检样品,并且温育:加入步骤 2) 中的待检样品、以已知含量的镍-IgE 螯合物作标准品;用稀释缓冲液将待检样品稀释至 10-40 倍,加入微孔中,37℃作用 1-2 小时;

[0099] 5) 加入可以捕获镍的物质,并且温育:移去待检样品,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入用稀释缓冲液稀释至 5000-40000 倍的抗 Ni Ab,37℃作用 1-2 小时,使抗 Ni Ab 与 IgE 上的金属镍反应形成抗原抗体复合物;

[0100] 6) 酶结合物温育:移去抗镍抗体,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入用稀释缓冲液稀释的酶标抗体,使稀释的酶标抗体的浓度为 2 μg/mL,37℃作用 1-2 小时,使其与酶标抗体反应;

[0101] 7) 底物温育:移去酶标抗体,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入底物,37℃避光作用 30 分钟;

[0102] 8) 终止反应:将终止液滴加至每一微孔;

[0103] 9) 取波长 405nm,加完终止液后,将 ELISA 板置于酶标仪上检测,分别读取待检样品和标准品的 OD 值,通过绘制标准曲线,求得待检样品的含量(也可不使用酶标仪,直接通过显色情况进行定性检测)。

[0104] 该方法利用 ELISA 原理,可以将血浆中的特异性 IgE 提取出来,提取出来的 IgE 上部分螯合有重金属镍,而这部分 IgE 上的镍被抗镍抗体所捕获,之后可以再被辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等酶标记的抗体所捕获(该抗体不识别包被蛋白),捕获上的抗体在显色剂及终止液的作用下,可以在仪器下读出 OD 值,而不含有螯合金属镍的 IgE,则不会被抗镍的特异性抗体所捕获,也不会与辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等酶标记的抗体所捕获,而所用试剂中也不含有金属镍(阴性对照组结果为阴性),因而当所读取的 OD 值结果显示为阳性时,即可证明检测出 IgE 上螯合的金属镍。

[0105] 方法二:酶联免疫与原子吸收光谱结合法(ELISA 法+AAS 法)检测镍-IgE 螯合物按照如下步骤检测:

[0106] 1) 将能够捕获 IgE 的物质,如抗 IgE 抗体(抗 IgE Ab)包被于固相载体上:用稀释缓冲液将抗 IgE Ab 稀释至 1000-8000 倍,加入 ELISA 板微孔中,4℃过夜 16-18 小时,或 37℃水浴 1-3 小时,储存冰箱;

[0107] 2) 从循环系统取血浆,作待检样品,1000rpm 离心 5-8 分钟,离心弃去沉淀;

[0108] 3) 封闭:移去稀释缓冲液,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入以 1%-5% 牛血清白蛋白或脱脂奶粉作为封闭液,37℃放置 1 小时,移去封闭液,并用洗涤液进行洗涤,洗涤完成后,ELISA 板于 36.5-37.5℃放置 1-2 小时;

[0109] 4) 加待检样品,并且温育:加入步骤 2) 中的待检样品、以已知含量的镍-IgE 螯合物作标准品;用稀释缓冲液将待检样品稀释至 10-40 倍,加入微孔中,37℃作用 1-2 小时;

[0110] 5) 洗脱:移去待检样品,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入洗脱液,在 37℃下洗脱 1-3 小时。

[0111] 6) 检测:从 ELISA 板的微孔中取样,于原子吸收光谱仪检测螯合于 IgE 上的镍,并绘制标准曲线,读出数值;

[0112] 该方法利用 ELISA 原理的基础上结合原子吸收光谱(AAS)原理,利用原子吸收光谱仪检测螯合于 IgE 上的镍,由于溶液中仅含有 IgE,且所用试剂中不含任何重金属(阴性对照组结果为阴性),不会对结果造成干扰,因而当所读取的结果显示为阳性时,即可证明检测出 IgE 上螯合的金属镍。

[0113] 方法三:酶联免疫与电感耦合等离子体质谱结合法(ELISA 法+ICP-MS 法)检测镍-IgE 螯合物按照如下步骤检测:

[0114] 1) 将能够捕获 IgE 的物质,如抗 IgE 抗体(抗 IgE Ab)包被于固相载体上:用稀释缓冲液将抗 IgE Ab 稀释至 1000-8000 倍,加入 ELISA 板微孔中,4℃过夜 16-18 小时,或 37℃水浴 1-3 小时,储存冰箱;

[0115] 2) 从循环系统取血浆,作待检样品,1000rpm 离心 5-8 分钟,离心弃去沉淀;

[0116] 3) 封闭:移去稀释缓冲液,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入以 1%-5% 牛血清白蛋白或脱脂奶粉作为封闭液,37℃放置 1 小时,移去封闭液,并用洗涤液进行洗涤,洗涤完成后,ELISA 板于 36.5-37.5℃放置 1-2 小时;

[0117] 4) 加待检样品,并且温育:加入步骤 2) 中的待检样品、以已知含量的镍-IgE 螯合物作标准品;用稀释缓冲液将待检样品稀释至 10-40 倍,加入微孔中,37℃作用 1-2 小时;

[0118] 5) 洗脱:移去待检样品,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入洗脱液,在 37℃下洗脱 1-3 小时。

[0119] 6) 酸化:在步骤5)中的溶液中加入酸化剂对溶液进行酸化,封口过夜,彻底酸化,加入过氧化氢,并且加热赶酸;

[0120] 7) 检测:从步骤6)的ELISA板的溶液中取0.5ml液体,于电感耦合等离子体质谱仪下检测整合于IgE的镍,并绘制标准曲线,读出数值。

[0121] 该方法在利用ELISA原理的基础上,结合感耦合等离子体质谱(ICP-MS)原理,用电感耦合等离子体质谱仪检测整合于IgE上的镍,由于溶液中仅含有IgE,且所用试剂中不含任何重金属(阴性对照组结果为阴性),不会对结果造成干扰,因而当所读取的结果显示为阳性时,即可证明检测出IgE上整合的金属镍。

[0122] 方法四:提纯镍-IgE螯合物与酶联免疫结合法(提纯法+ELISA法)检测镍-IgE螯合物,按照如下步骤检测:

[0123] 1) 从血浆中提取IgE:采用聚乙二醇PEG沉淀法或超速离心或分子超滤或凝胶过滤等方法从血浆提取纯化血液中的IgE,并将IgE复溶于溶液中,得到IgE溶液;

[0124] 2) 将抗Ni Ab包被于固相载体上:用稀释缓冲液将抗Ni Ab稀释至5000-40000倍,加入ELISA板微孔中,4℃过夜16-18小时,或37℃水浴1-3小时,储存冰箱;

[0125] 3) 封闭:移去稀释缓冲液,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入以1%-5%牛血清白蛋白或脱脂奶粉作为封闭液,37℃放置1小时,移去封闭液,并用洗涤液进行洗涤,洗涤完成后,ELISA板于36.5-37.5℃放置1-2小时;

[0126] 4) 加待检样品,并且温育:从步骤1)的溶液中取样,作待检样品;以已知含量的镍-IgE螯合物作标准品;用稀释缓冲液将待检样品稀释至10-40倍,加入微孔中,37℃作用1-2小时;

[0127] 5) 酶结合物温育:移去步骤4)中的待检样品,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入用稀释缓冲液稀释的酶标抗体,使稀释的酶标抗体的浓度为2μg/mL,37℃作用1-2小时,使其与酶标抗体反应;

[0128] 6) 底物温育:移去酶标抗体,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入底物,37℃避光作用30分钟;

[0129] 7) 终止反应:将终止液滴加至每一微孔;

[0130] 8) 取波长405nm,加完终止液后,将ELISA板置于酶标仪上检测,分别读取待检样品和标准品的OD值,通过绘制标准曲线,求得待检样品的含量(也可不使用酶标仪,直接通过显色情况进行定性检测)。

[0131] 方法五:提纯镍-IgE螯合物与原子吸收光谱结合法(提纯法+AAS法)检测血样中镍-IgE螯合物,按照如下步骤检测:

[0132] 1) 从血浆中提取IgE:采用聚乙二醇PEG沉淀法或超速离心或分子超滤或凝胶过滤等方法从血浆提取纯化血液中的IgE,并将IgE复溶于溶液中,得到IgE溶液;

[0133] 2) 检测:从步骤1)得到的溶液中取样,于原子吸收光谱仪检测整合于IgE上的镍,并绘制标准曲线,读出数值。

[0134] 方法六:提纯镍-IgE螯合物与电感耦合等离子体质谱结合法(提纯法+ICP-MS法)检测镍-IgE螯合物,按照如下步骤检测:

[0135] 1) 从血浆中提取IgE:采用聚乙二醇PEG沉淀法或超速离心或分子超滤或凝胶过滤等方法从血浆提取纯化血液中的IgE,并将IgE复溶于溶液中,得到IgE溶液;

[0136] 2) 酸化:从步骤 1) 得到的溶液中取样,在溶液中加入酸化剂(如硝酸)对溶液进行酸化,封口过夜,彻底酸化,加入过氧化氢,并且加热赶酸;

[0137] 3) 检测:从步骤 2) 得到的溶液中取 0.5ml 液体,于电感耦合等离子体质谱仪下检测整合于 IgE 上的镍,并绘制标准曲线,读出数值。

[0138] 方法七:电泳与酶联免疫法或原子吸收光谱法或电感耦合等离子体质谱结合法(电泳法-ELISA 法/AAS 法/ICP-MS 法)检测镍-IgE 螯合物,按照如下步骤检测:

[0139] 1) 从血浆中提取 IgE:采用聚乙二醇 PEG 沉淀法或超速离心或分子超滤或凝胶过滤等方法从血浆提取纯化血液中的 IgE,并将 IgE 复溶于溶液中,得到 IgE 溶液;

[0140] 2) 制备胶床:根据需求选择琼脂糖凝胶或聚丙烯酰胺凝胶或 SDS-聚丙烯酰胺凝胶等作为介质,按照常规方法制备好胶床;

[0141] 3) 加样:取步骤 1) 得到的溶液 8  $\mu$ L 加入 2  $\mu$ L 上样缓冲液,混匀,短暂离心;(注意此处步骤不能煮)

[0142] 4) 电泳:连接电泳板,进行电泳分离;

[0143] 5) 检测:在胶床上找出含有镍的蛋白条带,将该条带取出,经过处理后将该蛋白条带溶于液体之中,然后再分别利用 ELISA 或 ICP-MS 或 AAS 检测溶于液体中的镍含量。此外,还可以利用此方法检测整合镍的 IgE 的等电点、分子量及含量等。

[0144] 方法七中的 IgE 可以用多种方法提纯出来(例如超速离心法或高压液相层析法或凝胶过滤层析法或凝胶电泳法或 ELISA 方法等),将提纯出来的 IgE 复溶于溶液中,取一定量的 IgE,利用电荷移动原理,进行电泳(electrophoresis, EP),在凝胶板(可根据需求采用不同介质)上可根据分子量、等电点等不同跑出不同的条带,寻找出富含镍的相应条带,将凝胶中的蛋白质复溶于溶液中,即可以在特定波长下检测相关 IgE 的含量,也可以利用 ELISA、AAS、ICP-MS 等原理检测出整合于 IgE 上的镍含量,由于溶液中仅含有 IgE,且所用试剂中不含任何重金属(阴性对照组结果为阴性),不会对结果造成干扰,因而当所读取的结果显示为阳性时,即可证明检测出 IgE 上整合的金属镍。

[0145] 实施例 1:镍-IgE 螯合物的制备方法,包括以下步骤:

[0146] A) 镍与 IgE 的螯合反应:在人源的 IgE 中加入镍离子进行螯合反应,得到反应溶液;

[0147] 试剂配制:

[0148] 1) 硼酸盐缓冲液(0.01M):称取 0.31g 硼酸溶于 400ml 超纯水中,用 0.1M 的 NaOH 调节 pH 至 9.0,定容至 500mL。

[0149] 2) IgE 溶液:称取 4.0mg IgE 溶于 4.0mL 0.01M pH9.0 硼酸盐缓冲液中,充分振荡溶解,配制成 1.0mg/mL 的蛋白溶液;

[0150] 3) EDTA-NaHCO<sub>3</sub> 混合溶液:称取 EDTA·2H<sub>2</sub>O 1.86g、NaHCO<sub>3</sub> 16.8g 溶于 900mL 超纯水中,用 1.0M NaOH 调整 pH 至 8.0 定容至 1000ml,高压灭菌,室温保存;

[0151] 4) ITCBE 购买自日本同仁化学研究所,货号为 M030;

[0152] 5) 透析袋购自 Bioshop Inc,截留分子量 14000。

[0153] 镍-IgE 螯合物的螯合步骤:

[0154] 1) 透析袋的处理:将透析袋放入 500ml 的 EDTA-NaHCO<sub>3</sub> 混合溶液中,煮沸 10min;倾弃 EDTA/NaHCO<sub>3</sub> 液,用超纯水轻轻漂洗,再用 500ml 的 5mmol/L EDTA 溶液煮沸 10min;弃

掉煮沸液,用超纯水彻底清洗,加入超纯水浸泡透析袋 4℃过夜。使用时,戴上手套,取出透析袋,用超纯水彻底冲洗其内外表面;

[0155] 2) 取 2.0mg ITCBE 溶于 2ml DMSO 中;

[0156] 3) 取 4.0mg IgE 溶于 4.0ml 硼酸盐缓冲溶液中;

[0157] 4) 缓慢将步骤 2) 配制的液体加入步骤 3) 配制的 IgE 溶液中,边滴加边震荡,置于温度为 25℃,转速为 100r/min 的摇床中反应 24h,然后用透析袋透析 24h,除去未与 IgE 结合的 ITCBE;

[0158] 5) 将步骤 4) 所得的液体用 1mol/L HCl 调节 pH 值至 7.0,然后缓慢逐渐滴加 80 μl 的 1mmol/L 镍离子溶液,边滴加边振荡,以免镍离子使蛋白变性沉淀;

[0159] 6) 将步骤 5) 所得的溶液置于温度为 25℃,转速为 100r/min 的摇床中反应 2h,用透析袋进行透析 24h;

[0160] 7) 将步骤 6) 透析后的液体于 -20℃ 分装保存,得到反应溶液。

[0161] B) 纯化镍-IgE 螯合物的提取:采用免疫亲和层析法,去除反应溶液(即步骤 7)得到的反应溶液)中未反应的 IgE 以及多余的镍离子,即得镍-IgE 螯合物,具体步骤如下:

[0162] (1) 溶解样品:向经过步骤 7) 得到的反应溶液中加入生理盐水使镍-IgE 螯合物复溶;

[0163] (2) 平衡层析柱:使用稀释缓冲液冲洗层析柱的管路,在层析柱中装入能与 IgE 特异性结合的填料,装柱后,继续使用稀释缓冲液平衡层析柱;

[0164] (3) 上样:待层析柱平衡后,用稀释缓冲液稀释步骤 (1) 中样品,然后上柱,IgE 与填料特异性结合;

[0165] (4) 洗脱:使用稀释缓冲液冲洗层析柱至基线平衡,然后使用 0.05-0.1mol/L 的磷酸盐溶液进行洗脱,得到洗脱液 I;

[0166] (5) 收集:收集洗脱液 I;

[0167] (6) 透析:将步骤 (5) 中的收集的洗脱液,装透析袋,用 ddH<sub>2</sub>O 透析除盐,换水三次后,4℃透析过夜,收集样本;

[0168] (7) 平衡层析柱:采用新的层析柱,用稀释缓冲液冲洗管路,在该层析柱中装入能与镍特异性结合的填料,装柱后再用稀释缓冲液平衡层析柱;

[0169] (8) 上样:待层析柱平衡后,用稀释缓冲液稀释步骤 (6) 中样本,然后上柱;

[0170] (9) 洗脱:使用稀释缓冲液冲洗层析柱至基线平衡,然后使用 0.5-1.0mol/L 的磷酸盐溶液进行洗脱,得到洗脱液 II;

[0171] (10) 收集:收集洗脱液 II;

[0172] (11) 透析:将步骤 (10) 中的收集的洗脱液,装透析袋,用 2 升 ddH<sub>2</sub>O 透析除盐,换水三次后,4℃透析过夜,收集样本,即得镍-IgE 螯合物;

[0173] C) 对镍-IgE 螯合物的鉴定,具体步骤如下:

[0174] (1) 制备胶床:以琼脂糖凝胶作为介质制备胶床;

[0175] (2) 加样:取步骤 B) 中 8 μL 提取纯化得到的镍-IgE 螯合物,加入 2 μL 上样缓冲液,并混匀,然后加样于样品槽中;

[0176] (3) 电泳:连接电泳板,加入电泳缓冲液进行电泳;电泳过程中,电流为 22mA 恒流,环境温度为 4℃;电泳至溴酚蓝移至胶底部时停止电泳;

[0177] (4) 检测:在胶床上找出含镍的蛋白条带,将该蛋白条带取出并溶解,然后再采用 ELISA 法或 ICP-MS 法或 AAS 法检测是否含有镍以及检测镍的含量。

[0178] D) 检测结果

[0179] (1) 石墨炉原子吸收光谱法 (AAS) 初步测定 IgE 中重金属含量:结果见表 1

[0180] 表 1 为 IgE 中重金属含量 ( $\mu\text{g/L}$ )

[0181]

样本名	Ni ( $\mu\text{g/L}$ )
IgE	181.64

[0182]

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.249
N. S	0.002
N. S	0

[0183] (2) 电泳结果:

[0184] 其中,图 1 为本发明所述的镍-IgE 螯合物的非变性电泳条带图。

[0185] 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Native-PAGE) 或称为活性电泳是在不加入 SDS 和巯基乙醇等变性剂的条件下,对保持活性的蛋白质进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,常用于酶的鉴定、同工酶分析和提纯。未加 SDS 的天然聚丙烯酰胺凝胶电泳可以使生物大分子在电泳过程中保持其天然的形状和电荷,它们的分离是依据其电泳迁移率的不同和凝胶的分子筛作用,因而可以得到较高的分辨率,尤其是在电泳分离后仍能保持蛋白质和酶等生物大分子的生物活性,因此左边泳道 M 为变性 Marker,只用于检测,没有标记作用,泳道 4 为 IgE 的条带。

[0186] (3) 同步辐射 X 荧光分析:

[0187] 蛋白条带内微量元素含量的 SRXRF 分析在北京正负电子对撞机 (BEPC) 的 4W1" 同步辐射束线上完成。储存环中电子束流能量为 2.2GeV,束流强度 100mA。样品移动台 (TSA200 型,北京卓立汉光公司) 可在计算机控制的步进马达驱动下沿 X、Y 二维方向上移动以改变入射光斑位置,移动步长为 0.0025mm。从样品发射出的 X 射线由 Si (Li) 探测器 (PGT Inc. LS 30143-DS) 探测,探头与入射 SR 线共平面且相互垂直,距样品照射点 20mm,信号用 PGT 多道分析仪 (MCA4000) 获取输出。用 11.5keV 的单色同步辐射光激发样品,调节入射光斑 (1mmx3mm) 位置使之处于条带一端,在 300s 的测定时间内,光斑一直沿条带均匀缓慢移动,计数结束时光斑移到该条带另一端。沿电泳方向每 1mm 取一个谱。采用 AX IL 软件处理数据,并用来源于空气且含量恒定的 Ar 信号峰对其它元素峰进行归一处理,以抵消束流强度变化对信号强弱产生的影响。在相同的条件下以同样的方式测量定量标准干胶膜的荧光谱。

[0188] 图 2 为本发明所述的镍-IgE 螯合物的电泳条带的同步辐射 X 线荧光分析图,图中横坐标为蛋白条带位置,纵坐标为该条带各金属能量 (含量) 值。

[0189] 本发明一种定量检测镍-IgE 螯合物的方法的检测条件的确定:

[0190] 1. 抗 IgE 抗体、抗镍抗体最佳工作浓度以及血浆的最佳稀释倍数的确定

[0191] 步骤如下：

[0192] (1) 将抗 IgE Ab 用稀释缓冲液按照抗 IgE Ab 与稀释缓冲液的质量体积比为 1:1000、1:2000、1:4000、1:8000 进行稀释，加入 ELISA 板微孔中，将抗 IgE Ab 包被于固相载体上，每个浓度包被三排，4℃过夜 18 小时；

[0193] (2) 移去稀释缓冲液，并用洗涤液进行洗涤，待洗涤完成后，用 2% 牛血清白蛋白作为封闭液，37℃放置 1 小时，移去封闭液，并用洗涤液进行洗涤；

[0194] (3) 待检样品按待检样品与稀释缓冲液的质量体积比为 1:10、1:20、1:40 进行稀释，加入微孔中，按照上述包被的抗 IgE Ab 浓度，同一个浓度的抗 IgE Ab 的分别加入不同稀释度血浆，37℃作用 1 小时；

[0195] (4) 移去待检样品，并用洗涤液进行洗涤，待洗涤完成后，加入抗 Ni Ab，抗 Ni Ab 按抗 Ni Ab 与稀释缓冲液的质量体积比为 1:5000、1:10000、1:20000、1:40000 进行稀释，按照每一个相同抗 IgE Ab、血浆稀释浓度，不同浓度抗 Ni Ab 各加 2 孔，37℃作用 1 小时，使抗 Ni Ab 与 IgE 上的金属镍反应；

[0196] (5) 酶标抗体选择最适工作浓度，即 2 μg/mL，移去抗 Ni 抗体，并用洗涤液进行洗涤，待洗涤完成后，加入用稀释缓冲液稀释 HRP 酶标抗体，37℃作用 1 小时，使 HRP 酶标抗体与镍-IgE 螯合物反应；

[0197] (6) 移去酶标抗体，并用洗涤液进行洗涤，待洗涤完成后，加入底物，37℃避光作用 30 分钟；

[0198] (7) 将终止液滴加至每一微孔；

[0199] (8) 取波长 405nm，加完终止液后，将 ELISA 板置于酶标仪上检测，分别读取各孔 OD 值。根据各孔 OD 值数值，选择抗 IgE Ab、抗 Ni Ab 的最佳工作浓度以及血浆的最佳稀释倍数。

[0200] 试验中同时以所制标准品作为阳性对照，选择抗 IgE Ab+ 封闭+ 抗 Ni Ab+ 酶标+ 底物（即不加待检样品）作为阴性对照 1；抗 IgE Ab+ 封闭+ 血浆+ 酶标+ 底物（即不加抗 Ni Ab）作为阴性对照 2；抗 IgE Ab+ 封闭+ 酶标+ 底物（即不加待检样品和抗 Ni Ab）作为阴性对照 3；抗 IgE Ab+ 封闭+ 血浆+ 抗 Ni Ab+ 底物（即不加酶标）作为阴性对照 4；封闭+ 血浆+ 抗 Ni Ab+ 酶标+ 底物（即不加抗 IgE Ab 捕获 IgE）作为空白对照 1；只加底物作为空白对照 2 及 PBS 作为空白对照 3。检测结果见表 2-3。

[0201] 表 2：棋盘滴定法确定抗 IgE Ab、抗 Ni Ab 的最佳工作浓度以及血浆的最佳稀释倍数的数据（每个数据皆为平均值）

[0202]

		抗 IgE 抗体 (1:1000)	抗 IgE 抗体 (1:2000)	抗 IgE 抗体 (1:4000)	抗 IgE 抗体 (1:8000)
Ni 抗 1:5000	血浆 1:10	0.665	0.722	0.671	0.600
	血浆 1:20	0.735	0.800	0.757	0.674
	血浆 1:40	0.644	0.715	0.602	0.533
Ni 抗 1:10000	血浆 1:10	0.815	<b>0.840</b>	0.653	0.597
	血浆 1:20	0.816	0.827	0.740	0.669
	血浆 1:40	0.727	0.792	0.626	0.587
Ni 抗 1:20000	血浆 1:10	0.694	0.716	0.661	0.486
	血浆 1:20	0.740	0.793	0.682	0.533
	血浆 1:40	0.542	0.622	0.473	0.448
Ni 抗 1:40000	血浆 1:10	0.480	0.595	0.316	0.230
	血浆 1:20	0.503	0.616	0.442	0.387
	血浆 1:40	0.397	0.498	0.297	0.131

[0203] 表 3 :ELISA 阳性对照及阴性对照 ELISA 检测结果

[0204]

	阳性 对照	阴性对照				空白对照		
		阴性对 照 1	阴性对 照 2	阴性对 照 3	阴性对 照 4	空白对 照 1	空白对 照 2	空白对 照 3
OD	0.977	0.082	0.080	0.070	0.063	0.028	0.012	0.014

[0205] 由表 2-3 数据显示,我们可以看出抗 IgE 抗体的稀释度为 1:2000、血浆稀释度为 1:10、Ni 抗稀释度为 1:10000 时,OD 值最大,所以选此值所对应的浓度作为最佳工作浓度。

[0206] 2. 定量检测镍-IgE 螯合物的方法中方法二、三中洗脱液最佳工作浓度及洗脱时间的确定

[0207] 步骤如下:(1)包被:将抗 Ni Ab 用稀释缓冲液稀释至 10000 倍(质量体积比),加入 ELISA 板微孔中,37℃水浴 3 小时,储存冰箱;

[0208] (2)封闭:移去稀释缓冲液,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,用 2%牛血清白蛋白作为封闭液,37℃放置 1 小时,移去封闭液,并用洗涤液进行洗涤;

[0209] (3)移去封闭液,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入用稀释缓冲液稀释的酶标抗体,酶标抗体稀释至浓度为 2 μg/mL,37℃作用 2 小时,使其与抗 Ni Ab 反应;

[0210] (4)准备洗脱液:将木瓜蛋白酶用 pH 8.0,0.1mol/L Tris-HCl 缓冲液配制成 100ng/ml,再加入 1mmol/L 二硫苏糖醇 (DTT) 37℃孵育 30min;

[0211] (5)移去酶标抗体,用稀释缓冲液对洗脱液进行稀释,使洗脱液中的木瓜蛋白酶的浓度与酶标抗体的浓度之比为 1:80、1:40、1:20、1:10、1:5(其中每个浓度作 3 个复孔),分别放置于 37℃温度下洗脱 1h、2h、3h;

[0212] (6)移去洗脱液,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入底物,37℃避光作用 30 分钟;

[0213] (7)将终止液滴加至每一微孔;

[0214] (8)取 405nm 波长,加完终止液后,将 ELISA 板置于酶标仪上检测,分别读取每组

OD 值,通过与 PBS 缓冲液组比较,比较出洗脱液的最适浓度及洗脱时间,具体结果参见表 4。

[0215] 表 4 :ELISA 洗脱液最佳工作浓度及洗脱时间确定

[0216]

	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80
1h	0.281	0.168	0.081	0.114	0.469
2h	0.250	0.115	0.050	0.183	0.438
3h	0.225	0.106	0.100	0.196	0.441

[0217] 从表 4 中我们可以发现,当洗脱液中的木瓜蛋白酶的浓度与酶标抗体的浓度之比 = 1:20 时,各组 OD 值均低于其他几组,说明该浓度洗脱液洗脱效果最优(即将 ELISA 孔壁上结合的抗 Ni Ab-酶标复合物洗脱程度达到最大,因而 OD 值最低);而洗脱时间不管是 1h、2h、3h,各组 OD 值变化均不大,可见随着时间的延长,酶活力逐渐减弱,在酶浓度不变的情况下,延长消化时间并不能提高消化率,所以本试验中洗脱液的洗脱时间为 1-3h 皆可。

[0218] 应用实施例 1

[0219] 取采用 ELISA 法检测 100 份标本血浆中的镍-IgE 螯合物,按照以下步骤进行检测:酶联免疫法(ELISA 法)检测镍-IgE 螯合物,按照如下步骤检测:

[0220] 1) 将抗 IgE Ab 包被于固相载体上:用稀释缓冲液将抗 IgE Ab 稀释至 2000 倍,加入 ELISA 板微孔中,37℃水浴 1 小时,储存冰箱;

[0221] 2) 从循环系统取血浆,作待检样品,1000rpm 离心 5-8 分钟,离心弃去沉淀;

[0222] 3) 封闭:移去稀释缓冲液,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加 2%牛血清白蛋白作为封闭液,37℃放置 1 小时,移去封闭液,并用洗涤液进行洗涤,洗涤完成后,ELISA 板于 37℃放置 1 小时;

[0223] 4) 加待检样品,并且温育:加入步骤 2) 中的待检样品、以已知含量的镍-IgE 螯合物作标准品;用稀释缓冲液将待检样品稀释至 10 倍,加入微孔中,37℃作用 1 小时;

[0224] 5) 加入可以捕获镍的物质,并且温育:移去待检样品,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入用稀释缓冲液稀释 5000 倍,37℃作用 1 小时,使抗 Ni Ab 与 IgE 上的金属镍反应;

[0225] 6) 酶结合物温育:移去抗镍抗体,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入用稀释缓冲液稀释的 HRP 酶标抗体,37℃作用 1 小时,使其与酶标抗体反应;

[0226] 7) 底物温育:移去酶标抗体,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入底物,37℃避光作用 30 分钟;

[0227] 8) 终止反应:将终止液滴加至每一微孔;

[0228] 9) 取波长为 405nm,加完终止液后,将 ELISA 板置于酶标仪上检测,分别读取待检样品 OD 值(也可不使用酶标仪,直接通过显色情况进行定性检测),具体检测值如表 5 所示。

[0229] 表 5 :100 份血样标本中镍-IgE 螯合物的 ELISA 检测结果

[0230]

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
OD <sub>405</sub>	0.36	0.623	0.398	0.495	0.501	0.669	0.437	0.323	0.393	0.342
编号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
OD <sub>405</sub>	0.572	0.48	0.614	0.772	0.689	0.706	0.678	0.309	0.363	0.512
编号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
OD <sub>405</sub>	0.347	0.396	0.441	0.411	0.536	0.556	0.378	0.603	0.316	0.372
编号	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
OD <sub>405</sub>	0.81	0.753	0.796	0.788	0.456	0.586	0.38	0.656	0.755	0.766
编号	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
OD <sub>405</sub>	0.587	0.64	0.742	0.466	0.344	0.627	0.635	0.642	0.466	0.613
编号	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
OD <sub>405</sub>	0.501	0.419	0.765	0.681	0.445	0.504	0.684	0.457	0.561	0.801
编号	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
OD <sub>405</sub>	0.799	0.397	0.562	0.755	0.383	0.701	0.78	0.739	0.688	0.723
编号	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
OD <sub>405</sub>	0.495	0.471	0.505	0.321	0.813	0.614	0.513	0.552	0.753	0.787
编号	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
OD <sub>405</sub>	0.403	0.323	0.596	0.633	0.826	0.689	0.304	0.355	0.532	0.543
编号	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
OD <sub>405</sub>	0.703	0.739	0.567	0.347	0.643	0.544	0.301	0.571	0.348	0.823

## [0231] 应用实施例 2

[0232] 采用酶联免疫与原子吸收光谱结合法 (ELISA 法 +AAS 法) 检测 100 分标本血样中的镍-IgE 螯合物,按照如下步骤检测:

[0233] 1) 将能够捕获 IgE 的物质,如抗 IgE 抗体 (抗 IgE Ab) 包被于固相载体上:用稀释缓冲液将抗 IgE Ab 稀释至 2000 倍,加入 ELISA 板微孔中,4℃过夜 18 小时;

[0234] 2) 从循环系统取血浆,作待检样品,1000rpm 离心 5-8 分钟,离心弃去沉淀;

[0235] 3) 封闭:移去稀释缓冲液,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入 2%牛血清

白蛋白或脱脂奶粉作为封闭液, 37℃放置 1 小时, 移去封闭液, 并用洗涤液进行洗涤, 洗涤完成后, ELISA 板于 37℃放置 1 小时;

[0236] 4) 加待检样品, 并且温育: 加入步骤 2) 中的待检样品、以已知含量的镍-IgE 螯合物作标准品; 用稀释缓冲液稀释将待检样品稀释至 10 倍, 加入微孔中, 37℃作用 1 小时;

[0237] 5) 洗脱: 移去待检样品, 并用洗涤液进行洗涤, 待洗涤完成后, 加入木瓜蛋白酶浓度为 100ng/ml 的洗脱液, 洗脱 1-3 小时;

[0238] 6) 检测: 从 ELISA 板的微孔中取样, 于原子吸收光谱仪检测整合于 IgE 上的镍, 检测值如表 6 所示。

[0239] 表 6: 100 份血样标本中镍-IgE 螯合物的 AAS 检测结果

[0240]

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
μg/L	12.016	14.658	13.409	14.844	15.174	11.719	12.721	10.437	8.728	10.011
编号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
μg/L	13.171	9.55	14.11	9.387	9.607	14.03	12.46	13.446	7.984	15.782
编号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
μg/L	14.136	12.193	10.523	14.409	10.724	10.226	7.228	14.139	14.833	14.515
编号	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
μg/L	15.57	11.928	8.43	10.881	11.024	11.06	9.158	12.476	15.692	8.898
编号	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
μg/L	15.036	10.646	9.782	14.03	14.819	11.839	13.208	13.404	9.826	15.31
编号	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
μg/L	8.767	14.07	9.347	14.34	13.581	10.871	12.608	8.83	10.796	11.166
编号	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
μg/L	12.886	15.479	10.138	15.95	13.111	11.253	13.151	7.009	11.404	12.551
编号	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
μg/L	11.528	11.91	12.711	14.9	9.636	7.589	11.458	11.419	12.344	7.455
编号	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
μg/L	7.912	13.168	13.001	12.765	14.803	14.045	13.867	12.352	14.433	9.464
编号	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
μg/L	14.557	12.389	10.014	13.21	14.047	13.579	8.974	12.091	9.827	8.434

[0241] 应用实施例 3

[0242] 采用酶联免疫与电感耦合等离子体质谱结合法 (ELISA 法+ICP-MS 法) 检测 100

分标本血样中的镍-IgE 螯合物含量,按照如下步骤检测:

[0243] 1) 将能够捕获 IgE 的物质,如抗 IgE 抗体(抗 IgE Ab) 包被于固相载体上:用稀释缓冲液将抗 IgE Ab 稀释至 2000 倍,加入 ELISA 板微孔中,4℃过夜 18 小时;

[0244] 2) 取 100 份标准血样作为待检样品,1000rpm 离心 5-8 分钟,离心弃去沉淀;

[0245] 3) 封闭:移去稀释缓冲液,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入 2% 牛血清白蛋白作为封闭液,37℃放置 1 小时,移去封闭液,并用洗涤液进行洗涤,洗涤完成后,ELISA 板于 37℃放置 1 小时;

[0246] 4) 加待检样品,并且温育:加入步骤 2) 中的待检样品、以已知含量的镍-IgE 螯合物作标准品;用稀释缓冲液将待检样品稀释至 10 倍,加入微孔中,37℃作用 1 小时;

[0247] 5) 洗脱:移去待检样品,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入木瓜蛋白酶浓度为 100ng/ml 的洗脱液,洗脱 1-3 小时;

[0248] 6) 酸化:在步骤 5) 中的溶液中加入硝酸对溶液进行酸化,封口过夜,彻底酸化,加入过氧化氢,并且加热赶酸;

[0249] 7) 检测:从步骤 6) 得到的溶液中取样,于电感耦合等离子体质谱仪下检测整合于 IgE 的镍,检测值如表 7 所示。

[0250] 表 7:100 份血样标本中镍-IgE 螯合物的 ICP-MS 检测结果

[0251]

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
μg/L	11.247	11.508	11.034	9.997	8.141	9.316	7.805	12.838	14.361	13.434
编号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
μg/L	11.907	14.862	9.464	11.485	12.103	14.884	10.085	13.972	15.456	15.235
编号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30

[0252]

µg/L	8.255	12.914	8.553	15.392	10.421	13.025	11.148	9.324	14.708	9.089
编号	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
µg/L	10.609	9.082	14.463	15.062	13.291	8.451	9.679	12.251	14.118	12.377
编号	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
µg/L	9.954	15.44	7.986	7.77	12.563	15.755	9.786	12.952	8.671	15.876
编号	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
µg/L	14.222	8.776	12.646	11.196	13.596	9.284	9.315	7.581	7.263	12.288
编号	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
µg/L	10.609	12.706	14.213	7.746	7.437	7.142	14.697	9.565	15.04	8.988
编号	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
µg/L	9.684	15.497	7.739	15.412	9.448	14.452	12.075	13.594	15.504	8.733
编号	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
µg/L	14.098	14.561	11.225	15.235	14.554	9.929	12.843	8.84	11.164	9.455
编号	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
µg/L	9.491	13.728	12.022	13.994	10.99	15.141	15.453	13.969	10.576	13.637

[0253] 对本领域的技术人员来说,可根据以上描述的技术方案以及构思,做出其它各种相应的改变以及形变,而所有的这些改变以及形变都应该属于本发明权利要求的保护范围之内。

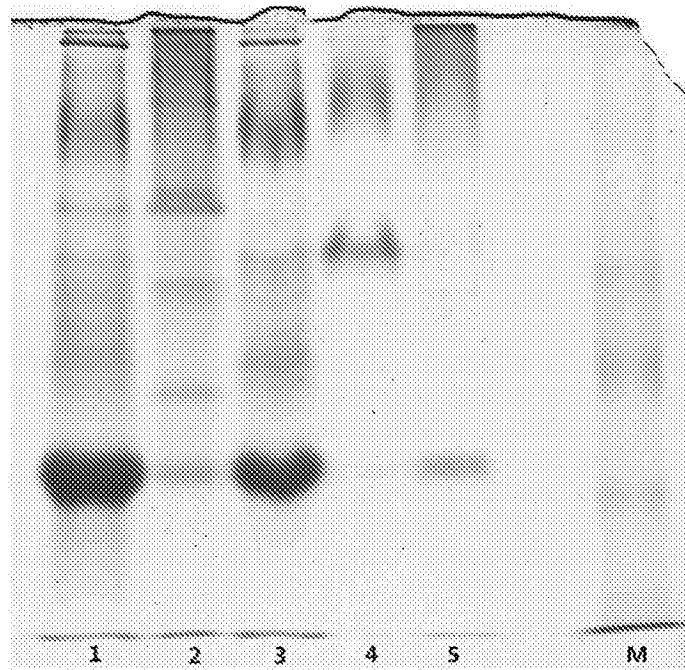


图 1

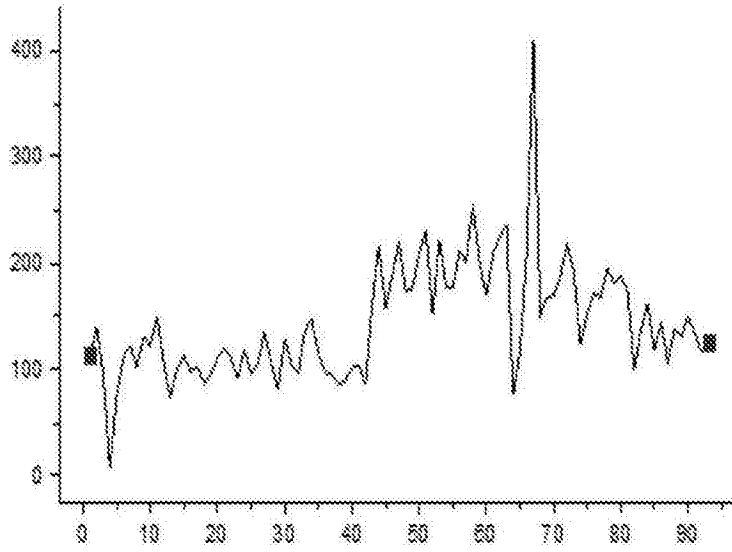


图 2

专利名称(译)	一种镍-IgE螯合物及其制备方法和应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN105004684A</a>	公开(公告)日	2015-10-28
申请号	CN201510411520.6	申请日	2015-07-14
[标]申请(专利权)人(译)	上海拜豪生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海拜豪生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海拜豪生物科技有限公司		
[标]发明人	张积仁 阳帆 董欣敏 吴婧 蔡睿 孙遥 赵乙木		
发明人	张积仁 阳帆 董欣敏 吴婧 蔡睿 孙遥 赵乙木		
IPC分类号	G01N21/31 G01N33/53 G01N27/62 G01N1/28 G01N27/447		
其他公开文献	CN105004684B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种镍-IgE螯合物及其制备方法和应用，该镍-IgE螯合物是镍离子与IgE通过巯基或/和半胱氨酸残基螯合而成。本发明建立了镍-IgE螯合物的定性定量检测方法，以便定量检测镍-IgE螯合物在评价一个地区镍污染程度的应用。通过定量检测一个地区人群血清中镍-IgE螯合物可以间接反映这个地区人群受镍污染的情况，从而间接反映这个地区镍污染程度。本发明建立的镍-IgE螯合物定量检测方法其准确度大大提高，并且使检测的重复性得到大大提高。

