



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105004684 B

(45)授权公告日 2018.04.03

(21)申请号 201510411520.6

G01N 33/53(2006.01)

(22)申请日 2015.07.14

G01N 27/62(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

G01N 1/28(2006.01)

申请公布号 CN 105004684 A

G01N 27/447(2006.01)

(43)申请公布日 2015.10.28

(56)对比文件

(73)专利权人 上海拜豪生物科技有限公司

WO 9422490 A1,1994.10.13,

地址 200000 上海市浦东新区中国(上海)

WO 9422490 A1,1994.10.13,

自由贸易试验区新金桥路27号13号楼
2层

CN 101045748 A,2007.10.03,

(72)发明人 张积仁 阳帆 董欣敏 吴婧

蔡睿 孙遥 赵乙木

CN 102115497 A,2011.07.06,

CN 102399289 A,2012.04.04,

(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

邹军辉.六价铬间接竞争ELISA检测试剂盒
的研制及新型一步法竞争ELISA的建立.《中国优
秀硕士学位论文全文数据库 医药卫生科技辑》
.2012,(第10期),第13-16页.

代理人 汤喜友

审查员 程莉莉

(51)Int.Cl.

G01N 21/31(2006.01)

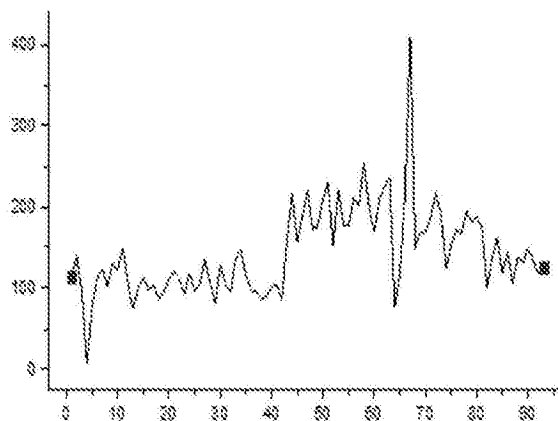
权利要求书2页 说明书18页 附图1页

(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,其特征就在于,镍离子与IgE通过巯基或/和半胱氨酸残基螯合而成;

该镍-IgE螯合物的制备方法,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) 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;

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ddH₂O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ddH₂O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。

2. 根据权利要求1所述的镍-IgE螯合物,其制备方法的步骤B) 之后还包括步骤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。

3. 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。

4. 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。

5. 根据权利要求4所述的试剂盒,其特征就在于,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。

6. 一种定量检测镍-IgE螯合物的方法,其特征在于,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%, α 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%, α 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 ϵ 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)与人体的健康息息相关,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、饮入、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ddH₂O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ddH₂O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 Na_2HPO_4 溶液或0.5-1mol/L Na_2HPO_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 KH_2PO_4 0.2mg/ml、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.90mg/ml、 NaCl 8.0mg/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 Na_2CO_3 、2.93mg/ml 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 H_2SO_4 定容至200ml的ddH₂O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、ddH₂O 7ml、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ddH₂O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ddH₂O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ddH₂O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2μg/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

下检测螯合于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。

[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螯合于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

螯合于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:根据需要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 μ L加入2 μ 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螯合镍的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(可根据需要采用不同介质)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等原理检测出螯合于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上螯合的金属镍。

[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-NaHCO₃混合溶液:称取EDTA·2H₂O 1.86g、NaHCO₃16.8g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-NaHCO₃混合溶液中,煮沸10min;倾弃EDTA/NaHCO₃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1moI/L HCl调节pH值至7.0, 然后缓慢逐渐滴加80μI的1mmoI/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0.05-0.1moI/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ddH₂O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0.5-1.0moI/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ddH₂O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8μL提取纯化得到的镍-IgE螯合物, 加入2μL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AXIL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2μg/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	0. 840	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复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2μg/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 ₄₀₅	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 ₄₀₅	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 ₄₀₅	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 ₄₀₅	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 ₄₀₅	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 ₄₀₅	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 ₄₀₅	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 ₄₀₅	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 ₄₀₅	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 ₄₀₅	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份标本血样中的镍-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螯合于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整合物的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。

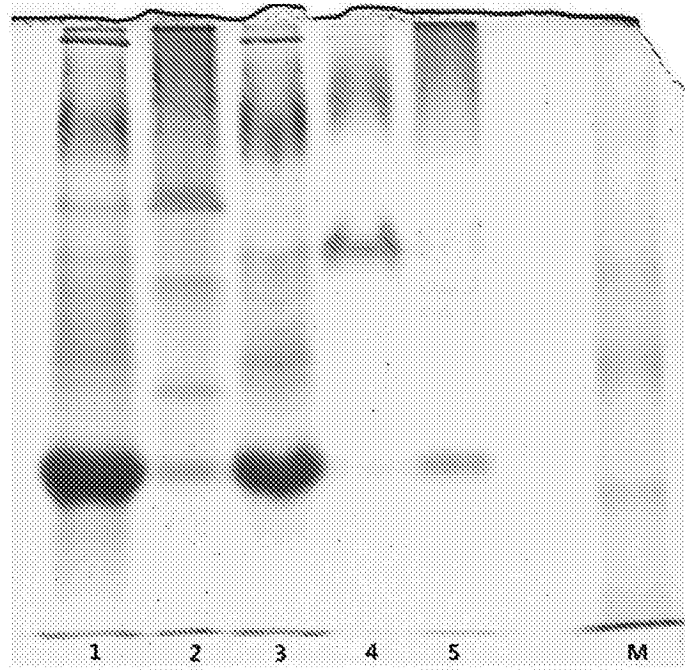


图1

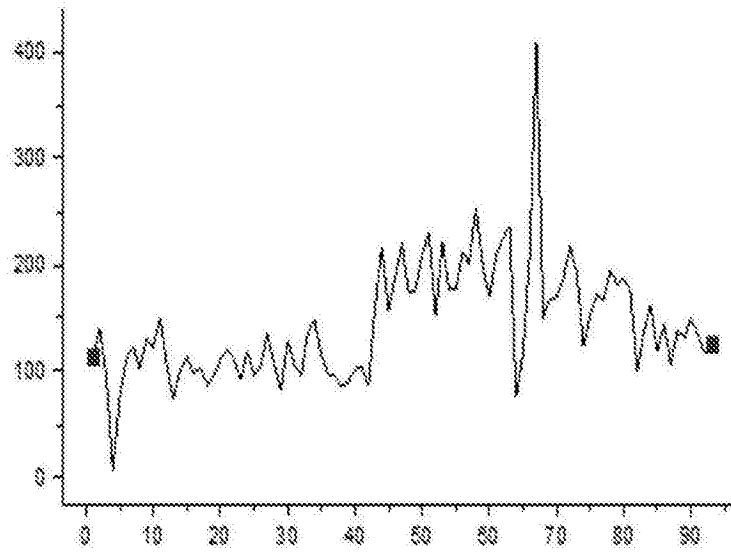


图2

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	CN105004684B	公开(公告)日	2018-04-03
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		
审查员(译)	程莉莉		
其他公开文献	CN105004684A		
外部链接	Espacenet SIPO		

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。

