



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105004686 A

(43) 申请公布日 2015. 10. 28

(21) 申请号 201510413563. 8

(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)

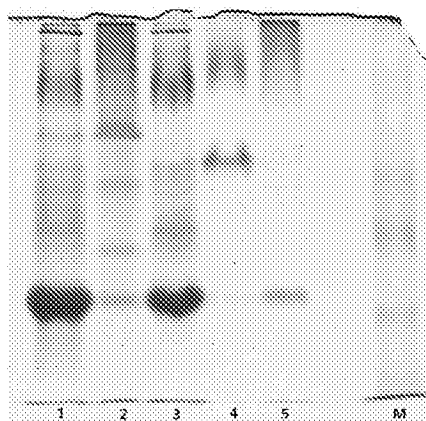
权利要求书2页 说明书19页 附图1页

(54) 发明名称

一种铬-白蛋白螯合物及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明公开了一种铬-白蛋白螯合物及其制备方法和应用,该铬-白蛋白螯合物是铬离子与白蛋白通过巯基或/和半胱氨酸残基螯合而成。本发明建立了铬-白蛋白螯合物的定性定量检测方法,以便定量检测铬-白蛋白螯合物在评价一个地区铬污染程度的应用。通过定量检测一个地区人群血清中铬-白蛋白螯合物可以间接反映这个地区人群受铬污染的情况,从而间接反映这个地区铬污染程度。本发明建立的铬-白蛋白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. 一种铬-白蛋白螯合物,其特征在于,铬离子与白蛋白通过巯基或/和半胱氨酸残基螯合而成。

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

A) 铬与白蛋白的螯合反应:在提纯源于人体的白蛋白或按照生物学方法重组的白蛋白中加入铬离子进行螯合反应,得到反应溶液;

B) 纯化铬-白蛋白螯合物的提取:采用免疫亲和层析法,去除反应溶液中未反应的白蛋白以及多余的铬离子,即得铬-白蛋白螯合物。

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铬-白蛋白螯合物复溶;

(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白蛋白特异性结合的填料,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,白蛋白与填料特异性结合;

(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铬特异性结合的填料,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,即得铬-白蛋白螯合物。

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

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) 中提取纯化得到的铬-白蛋白螯合物,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:在胶床上找出含铬的蛋白条带,将该蛋白条带取出并溶解,然后再采用 ELISA 法或 ICP-MS 法或 AAS 法检测是否含有铬以及检测铬的含量。

5. 一种如权利要求 1 所述的铬-白蛋白螯合物在制备检测血样中铬-白蛋白螯合物的

试剂或试剂盒中的应用。

6. 一种至少包括如权利要求 1 所述的铬 - 白蛋白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,该包被液含有捕获白蛋白的物质或捕获铬的物质。

8. 一种定量检测铬 - 白蛋白螯合物的方法,其特征在於,以已知含量的权利要求 1 所述的铬 - 白蛋白螯合物作为标准品,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、提纯铬 - 白蛋白螯合物与酶联免疫结合法、提纯铬 - 白蛋白螯合物与原子吸收光谱结合法、提纯铬 - 白蛋白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。

一种铬 - 白蛋白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,涉及一种铬 - 白蛋白螯合物及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 血清白蛋白 (HSA) 是哺乳动物血浆中含量最丰富的蛋白质,它能够储存和转运众多的内源性和外源性物质,这与它特异性结构密切相关。血清白蛋白是由肝脏合成的一种简单蛋白质,仅由氨基酸组成,没有修饰基团和其他附属物。根据数据资料显示,牛血清白蛋白 (BSA) 分子由 583 个氨基酸残基组成。而人血清白蛋白 (HSA) 比 BSA 多 2 个氨基酸,即 585 个氨基酸残基组成。两者的差异在于 BSA 缺失 HSA 氨基酸序列 116 位和 585 位的残基。白蛋白氨基酸成分最显著的特征是低含量的色氨酸, HSA 和 BSA 每分子中分别含有 1 或 2 个残基。苯丙氨酸和异亮氨酸含量也比较低。半胱氨酸、亮氨酸、谷氨酸和赖氨酸含量都非常高。大量的离子化残基提供了白蛋白非常高的电荷,在 PH7 的条件下,每分子白蛋白带有 185 个离子,这样就形成白蛋白易溶性。

[0003] 白蛋白最独特的结构特点是二硫键模式。BSA 序列包含 35 个半胱氨酸残基,形成 17 个二硫桥,相邻的半胱氨酸对与链上最近的残基连结,形成 10-47 个残基长度的一对环。S-S 键交迭增加了白蛋白结构的刚性和稳定性。

[0004] 白蛋白的三级结构被认为是一种高度螺旋的分子,通过 X 射线衍射得知 HCR 晶体中大约 67% 的残基参与形成了 28 个 α - 螺旋体, 10% 残基参与形成 β 转角, 23% 残基形成伸展链。

[0005] 生理机制上,白蛋白维持人体血浆胶体渗透压的 80%。另外,白蛋白也是血液中各种大分子物质的主要载体,在代谢物转运、生物转化中发挥着重要作用。它同时也是调节凝血功能和炎性反应的组分。人血清白蛋白主要应用于临床、新陈代谢和遗传方面的研究。

[0006] 铬 (chromium, Cr) 是元素周期表 VI 族中的一种过渡金属,其质地坚硬,表面具有光泽,有较高的熔点,在工业生产中具有重大的经济价值,一个世纪以来被广泛应用,每年全球铬生产量高达 107 吨,因而铬是一种名副其实的重要金属污染物。目前,铬广泛应用于电镀、鞣革、颜料、油漆、合金、印染等各个方面,与人们的生活息息相关,但是同样也对人类的身体健康产生巨大影响。在美国, Cr 与 Cr、Cd、Pb 被称为四大环境污染物。据统计,每年有几十个亿的民众都在饮用铬污染的水源,而在加利福尼亚有高达 30% 的水资源都已经被铬污染,因而铬污染严重影响着人们的身体健康。

[0007] 自然界中铬主要以三价和六价的形式存在,而一般认为,三价铬 (Cr^{3+}) 是人类所需的微量元素,而六价铬 (Cr^{6+}) 才是明显的毒性物质。由于六价铬易通过细胞膜进入细胞,而且可以通过一系列反应,产生强烈的细胞毒性及基因毒性,因而普遍认为六价铬的毒性高于三价铬,达 10-100 倍。学者认为当水中的六价铬含量超过 0.05mg/L 即是有毒的。六价铬可以通过皮肤接触、食物摄入、饮用水饮入、呼吸道吸入等途径进入人体,对于职业性暴露人群主要是通过呼吸道吸入六价铬灰尘,而对于普通人群则是通过饮入污染源、食

入被污染的食物、吸入等方式摄入六价铬。六价铬进入体内后,可以引发氧化应激、染色体畸变、细胞凋亡、多种 DNA 损伤(包括单链断裂、DNA-蛋白质交联、DNA-氨基酸交联、Cr-DNA 配合物形成等),从而造成机体多处组织、器官、系统损伤。不仅如此,六价铬还被认为是一种强有力的致癌物,早在 1990 年国际癌症研究组织。

[0008] 铬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。随着对铬毒性研究的深入,人们逐渐认识到铬与蛋白的相互作用在其致毒过程中扮演着重要的角色,被认为是了解铬的毒性机理的关键所在,因此,对铬和蛋白质相互作用的研究就显得愈发重要。而现在关于铬与蛋白质作用的机理仅是冰山一角,还有很多蛋白质与铬之间的关系还不清楚,因而加强对于铬与蛋白质之间的关系至关重要。

发明内容

[0009] 针对铬污染严重的问题,本发明的目的在于提供一种铬-白蛋白螯合物及其制备方法,并建立铬-白蛋白螯合物的定性、定量检测方法,以便定量检测铬-白蛋白螯合物在评价一个地区铬污染程度的应用。通过定量检测一个地区人群血清中铬-白蛋白螯合物可以间接反映这个地区人群受铬污染的情况,从而间接反映这个地区铬污染程度。

[0010] 本发明解决其技术问题所采用的技术方案是:提供一种铬-白蛋白螯合物,铬离子与白蛋白通过巯基或 / 和半胱氨酸残基螯合而成。

[0011] 本发明还提供一种上述的铬-白蛋白螯合物的制备方法,包括以下步骤:

[0012] A) 铬与白蛋白的螯合反应:在提纯源于人体的白蛋白或按照生物学方法重组的白蛋白中加入铬离子进行螯合反应,得到反应溶液;

[0013] B) 纯化铬-白蛋白螯合物的提取:采用免疫亲和层析法,去除反应溶液中未反应的白蛋白以及多余的铬离子,即得铬-白蛋白螯合物。

[0014] 其中,体外合成法中所述步骤 B) 具体如下:

[0015] (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铬-白蛋白螯合物复溶;

[0016] (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白蛋白特异性结合的填料,装柱后,继续使用稀释缓冲液平衡层析柱;

[0017] (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,白蛋白与填料特异性结合;

[0018] (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;

[0019] (5) 收集:收集洗脱液 I;

[0020] (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;

[0021] (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铬特异性结合的填料,装柱后再用稀释缓冲液平衡层析柱;

[0022] (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;

[0023] (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;

[0024] (10) 收集 :收集洗脱液 II ;

[0025] (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,即得铬 - 白蛋白螯合物。

[0026] 其中,上述铬 - 白蛋白螯合物的制备方法,还包括步骤 C) :对铬 - 白蛋白螯合物的鉴定 ;

[0027] 其中,步骤 C) 中具体如下 :

[0028] (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 ;

[0029] (2) 加样 :取步骤 B) 中提取纯化得到的铬 - 白蛋白螯合物,加入稀释缓冲液,并混匀,然后加样于样品槽中 ;

[0030] (3) 电泳 :连接电泳板,进行电泳 ;

[0031] (4) 检测 :在胶床上找出含铬的蛋白条带,将该蛋白条带取出并溶解,然后再采用 ELISA 法或 ICP-MS 法或 AAS 法检测是否含有铬以及检测铬的含量。

[0032] 本发明还提供一种如上述的铬 - 白蛋白螯合物在制备检测人体内铬 - 白蛋白螯合物的试剂或试剂盒中的应用。

[0033] 本发明还提供一种至少包括如上述的铬 - 白蛋白螯合物作为标准品的试剂盒。

[0034] 优选地,该试剂盒中还包括包被液,该包被液含有捕获白蛋白的物质或捕获铬的物质。

[0035] 本发明还提供一种定量检测铬 - 白蛋白螯合物的方法,以已知含量的上述的铬 - 白蛋白螯合物作为标准品,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、提纯铬 - 白蛋白螯合物与酶联免疫结合法、提纯铬 - 白蛋白螯合物与原子吸收光谱结合法、提纯铬 - 白蛋白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。

[0036] 实施本发明的铬 - 白蛋白螯合物及其制备方法和应用,具有以下有益效果 :

[0037] 1. 本发明首次体外合成铬 - 白蛋白螯合物 ;

[0038] 2. 本发明首次提出铬 - 白蛋白螯合物可用于制备检测血样中铬 - 白蛋白螯合物的试剂或试剂盒中的应用。

[0039] 3. 本发明建立了铬 - 白蛋白螯合物的定性定量检测方法,以便定量检测铬 - 白蛋白螯合物在评价一个地区铬污染程度的应用。通过定量检测一个地区人群血清中铬 - 白蛋白螯合物可以间接反映这个地区人群受铬污染的情况,从而间接反映这个地区铬污染程度。本发明建立的铬 - 白蛋白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

[0040] 图 1 为本发明所述的铬 - 白蛋白螯合物的非变性电泳条带图 ;

[0041] 图 2 为本发明所述的铬 - 白蛋白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

[0042] 下面,结合具体实施方式,对本发明做进一步描述 :

[0043] 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:

[0044] 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;

[0045] 提取试剂为 PEG 溶液、硼酸盐缓冲液等(采用 PEG 法);

[0046] 胶床介质为琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶中的一种;

[0047] 捕获白蛋白的物质购买自 Novus 公司型号为 A-0577 的人白蛋白抗体;其中,本发明所述与白蛋白特异性结合的物质、抗 HSA 抗体、抗白蛋白抗体均为捕获白蛋白的物质;

[0048] 捕获铬的物质购买自广州然科生物科技有限公司的型号为 RK10641 的抗铬抗体;其中,本发明所述与铬特异性结合的物质、抗 Cr 抗体、抗铬抗体、铬抗均为捕获铬的物质;

[0049] 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;

[0050] 底物为甲基联苯胺(TMB)溶液;

[0051] 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 18.0mg/ml、KCl 0.2mg/ml、0.5% Tween-20 的 pH 为 7.4 的 0.15M PBS 溶液;

[0052] 封闭液为 1% -5% 牛血清白蛋白或脱脂奶粉;

[0053] 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;

[0054] 酶标抗体为 HRP 酶标抗体;

[0055] 终止液为:将 21.7ml 的 2M H_2SO_4 定容至 200ml 的 ddH₂O 中;

[0056] 洗脱液为含木瓜蛋白酶的 PH 为 8.0 的 0.1mol/L Tris-HCL 缓冲液;

[0057] 酸化剂为硝酸;

[0058] 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);

[0059] 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;

[0060] 本发明提供一种铬-白蛋白螯合物,铬离子与白蛋白通过巯基或 / 和半胱氨酸残基螯合而成。

[0061] 本发明还提供一种铬-白蛋白螯合物的制备方法,包括以下步骤:

[0062] A) 铬与白蛋白的螯合反应:在人源的白蛋白中加入铬离子进行螯合反应,得到反应溶液;

[0063] B) 纯化铬-白蛋白螯合物的提取:采用免疫亲和层析法,去除反应溶液中未反应的白蛋白以及多余的铬离子,即得铬-白蛋白螯合物,具体步骤如下:

[0064] (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铬-白蛋白螯合物复溶;

[0065] (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白蛋白特异性结合的填料,装柱后,继续使用稀释缓冲液平衡层析柱;所述能与白蛋白特异性结合的填料为含抗白蛋白抗体的硅胶或树脂;

[0066] (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,白蛋白与填料特异性结合;

[0067] (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 ;

[0068] (5) 收集 :收集洗脱液 I ;

[0069] (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 ;

[0070] (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铬特异性结合的填料,装柱后再用稀释缓冲液平衡层析柱 ;所述能与铬特异性结合的填料为含抗铬抗体的硅胶或树脂 ;

[0071] (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 ;

[0072] (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 ;

[0073] (10) 收集 :收集洗脱液 II ;

[0074] (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,即得铬 - 白蛋白螯合物 ;

[0075] C) 对铬 - 白蛋白螯合物的鉴定,具体步骤如下 :

[0076] (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 ;

[0077] (2) 加样 :取步骤 B) 中提取纯化得到的铬 - 白蛋白螯合物,加入稀释缓冲液,并混匀,然后加样于样品槽中 ;

[0078] (3) 电泳 :连接电泳板,进行电泳 ;

[0079] (4) 检测 :在胶床上找出含铬的蛋白条带,将该蛋白条带取出并溶解,然后再采用 ELISA 法或 ICP-MS 法或 AAS 法检测是否含有铬以及检测铬的含量。

[0080] 本发明还提供一种至少包括如上述的铬 - 白蛋白螯合物作为标准品的试剂盒。

[0081] 优选地,该试剂盒中还包括包被液,该包被液含有捕获白蛋白的物质或捕获铬的物质。

[0082] 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。

[0083] 一种检测血样中铬 - 白蛋白螯合物的试剂盒,包括含有捕获白蛋白的物质的包被液、封闭液、洗涤液、作为二抗的可捕获铬的物质、酶标抗体、底物、终止液、稀释缓冲液、阳性对照、阴性对照等。

[0084] 一种检测血样中铬 - 白蛋白螯合物的试剂盒,包括含有捕获白蛋白的物质的包被液、封闭液、洗涤液、洗脱液、阳性对照、阴性对照等。

[0085] 一种检测血样中铬 - 白蛋白螯合物的试剂盒,包括含有捕获白蛋白的物质的包被液、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。

[0086] 一种检测血样中铬 - 白蛋白螯合物的试剂盒,包括作为提纯全血中白蛋白所需提取试剂、复溶液、含有捕获铬的物质的包被液、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。

[0087] 一种检测血样中铬 - 白蛋白螯合物的试剂盒,包括作为提纯全血中白蛋白所需提取试剂、复溶液、阳性对照、阴性对照等。

[0088] 一种检测血样中铬 - 白蛋白螯合物的试剂盒,包括作为提纯全血中白蛋白所需提取试剂、复溶液、酸化剂、过氧化氢、阳性对照、阴性对照等。

[0089] 一种检测血样中铬 - 白蛋白螯合物的试剂盒,包括作为提纯全血中白蛋白的提取

试剂、胶床介质、复溶液、上样缓冲液、溶解胶床上含铬的蛋白条带所需液体、含有捕获铬的物质的包被液、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。

[0090] 一种检测血样中铬-白蛋白螯合物的试剂盒,包括作为提纯全血中白蛋白所需提取试剂、胶床介质、复溶液、上样缓冲液、溶解胶床上含铬的蛋白条带所需液体、阳性对照、阴性对照等。

[0091] 一种检测血样中铬-白蛋白螯合物的试剂盒,包括作为提纯全血中白蛋白所需提取试剂、胶床介质、复溶液、上样缓冲液、溶解胶床上含铬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。

[0092] 上述几种试剂盒中,所述阳性对照为标准品,即螯合有重金属铬的白蛋白螯合物或螯合有重金属铬的 BSA 螯合物;所述阴性对照为不含有标准品的稀释缓冲液。

[0093] 上述试剂盒用于检测螯合铬的白蛋白,以提高检测的准确性,重复性,并使之在临床中得到推广。

[0094] 本发明还提供一种定量检测铬-白蛋白螯合物的方法,以已知含量的上述的铬-白蛋白螯合物作为标准品,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、提纯铬-白蛋白螯合物与酶联免疫结合法、提纯铬-白蛋白螯合物与原子吸收光谱结合法、提纯铬-白蛋白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,用检测铬-白蛋白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。

[0095] 其中,上述定量检测铬-白蛋白螯合物的方法中采用的试剂如下:

[0096] 方法一:酶联免疫法(ELISA法)检测铬-白蛋白螯合物,按照如下步骤检测:

[0097] 1) 将能够捕获白蛋白的物质,如抗白蛋白抗体(抗HSA Ab)包被于固相载体上:用稀释缓冲液将抗HSA 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;

[0098] 2) 从循环系统取全血,作待检样品,1000rpm离心5-8分钟,离心弃去沉淀;

[0099] 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;

[0100] 4) 加待检样品,并且温育:加入步骤2)中的待检样品、以已知含量的铬-白蛋白螯合物作标准品;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;

[0101] 5) 加入可以捕获铬的物质,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Cr Ab,37℃作用1-2小时,使抗Cr Ab与白蛋白上的金属铬反应形成抗原抗体复合物;

[0102] 6) 酶结合物温育:移去抗铬抗体,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;

[0103] 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；

[0104] 8) 终止反应 :将终止液滴加至每一微孔；

[0105] 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)。

[0106] 该方法利用 ELISA 原理,可以将全血中的特异性白蛋白提取出来,提取出来的白蛋白上部分整合有重金属铬,而这部分白蛋白上的铬被抗铬抗体所捕获,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,而不含有整合金属铬的白蛋白,则不会被抗铬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铬(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,即可证明检测出白蛋白上整合的金属铬。

[0107] 方法二:酶联免疫与原子吸收光谱结合法(ELISA 法+AAS 法)检测铬-白蛋白螯合物按照如下步骤检测:

[0108] 1) 将能够捕获白蛋白的物质,如抗白蛋白抗体(抗 HSA Ab)包被于固相载体上:用稀释缓冲液将抗 HSA 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;

[0109] 2) 从循环系统取全血,作待检样品,1000rpm 离心 5-8 分钟,离心弃去沉淀;

[0110] 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;

[0111] 4) 加待检样品,并且温育:加入步骤 2) 中的待检样品、以已知含量的铬-白蛋白螯合物作标准品;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;

[0112] 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。

[0113] 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白蛋白上的铬,并绘制标准曲线,读出数值;

[0114] 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整合于白蛋白上的铬,由于溶液中仅含有白蛋白,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,即可证明检测出白蛋白上整合的金属铬。

[0115] 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)检测铬-白蛋白螯合物按照如下步骤检测:

[0116] 1) 将能够捕获白蛋白的物质,如抗白蛋白抗体(抗 HSA Ab)包被于固相载体上:用稀释缓冲液将抗 HSA 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;

[0117] 2) 从循环系统取全血,作待检样品,1000rpm 离心 5-8 分钟,离心弃去沉淀;

[0118] 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;

[0119] 4) 加待检样品,并且温育:加入步骤 2) 中的待检样品、以已知含量的铬-白蛋白螯合物作标准品;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;

[0120] 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。

[0121] 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;

[0122] 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白蛋白的铬,并绘制标准曲线,读出数值。

[0123] 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白蛋白上的铬,由于溶液中仅含有白蛋白,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,即可证明检测出白蛋白上螯合的金属铬。

[0124] 方法四:提纯铬-白蛋白螯合物与酶联免疫结合法(提纯法+ELISA 法)检测铬-白蛋白螯合物,按照如下步骤检测:

[0125] 1) 从全血中提取白蛋白: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全血提取纯化血液中的白蛋白,并将白蛋白复溶于溶液中,得到白蛋白溶液;

[0126] 2) 将抗 Cr Ab 包被于固相载体上:用稀释缓冲液将抗 Cr 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;

[0127] 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;

[0128] 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;以已知含量的铬-白蛋白螯合物作标准品;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;

[0129] 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 2 μg/mL,37℃作用 1-2 小时,使其与酶标抗体反应;

[0130] 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;

[0131] 7) 终止反应:将终止液滴加至每一微孔;

[0132] 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)。

[0133] 方法五:提纯铬-白蛋白螯合物与原子吸收光谱结合法(提纯法+AAS 法)检测血样中铬-白蛋白螯合物,按照如下步骤检测:

[0134] 1) 从全血中提取白蛋白: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全血提取纯化血液中的白蛋白,并将白蛋白复溶于溶液中,得到白蛋白溶液;

[0135] 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白蛋白上的铬,并绘制标准曲线,读出数值。

[0136] 方法六:提纯铬-白蛋白螯合物与电感耦合等离子体质谱结合法(提纯法+ICP-MS 法)检测铬-白蛋白螯合物,按照如下步骤检测:

[0137] 1) 从全血中提取白蛋白: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全血提取纯化血液中的白蛋白,并将白蛋白复溶于溶液中,得到白蛋白溶液;

[0138] 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;

[0139] 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白蛋白上的铬,并绘制标准曲线,读出数值。

[0140] 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)检测铬-白蛋白螯合物,按照如下步骤检测:

[0141] 1) 从全血中提取白蛋白: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全血提取纯化血液中的白蛋白,并将白蛋白复溶于溶液中,得到白蛋白溶液;

[0142] 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;

[0143] 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)

[0144] 4) 电泳:连接电泳板,进行电泳分离;

[0145] 5) 检测:在胶床上找出含有铬的蛋白条带,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 检测溶于液体中的铬含量。此外,还可以利用此方法检测整合铬的白蛋白的等电点、分子量及含量等。

[0146] 方法七中的白蛋白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),将提纯出来的白蛋白复溶于溶液中,取一定量的白蛋白,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,寻找出富含铬的相应条带,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白蛋白的含量,也可以利用 ELISA、AAS、ICP-MS 等原理检测出整合于白蛋白上的铬含量,由于溶液中仅含有白蛋白,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,即可证明检测出白蛋白上整合的金属铬。

[0147] 实施例 1:铬-白蛋白螯合物的制备方法,包括以下步骤:

[0148] A) 铬与白蛋白的螯合反应:在人源的白蛋白中加入铬离子进行螯合反应,得到反应溶液;

[0149] 试剂配制:

[0150] 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。

[0151] 2) 白蛋白溶液 :称取 4.0mg 白蛋白溶于 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 ;

[0152] 3)EDTA-NaHCO₃ 混合溶液 :称取 EDTA •2H₂O 1.86g、NaHCO₃ 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 ;

[0153] 4) ITCBE 购买自日本同仁化学研究所,货号为 M030 ;

[0154] 5) 透析袋购自 Bioshop Inc,截留分子量 14000。

[0155] 铬 - 白蛋白螯合物的螯合步骤 :

[0156] 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 ;

[0157] 2) 取 2.0mg ITCBE 溶于 2ml DMSO 中 ;

[0158] 3) 取 4.0mg 白蛋白溶于 4.0ml 硼酸盐缓冲溶液中 ;

[0159] 4) 缓慢将步骤 2) 配制的液体加入步骤 3) 配制的白蛋白溶液中,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,除去未与白蛋白结合的 ITCBE ;

[0160] 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 μ l 的 1mmol/L 铬离子溶液,边滴加边振荡,以免铬离子使蛋白变性沉淀 ;

[0161] 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 ;

[0162] 7) 将步骤 6) 透析后的液体于 -20℃ 分装保存,得到反应溶液。

[0163] B) 纯化铬 - 白蛋白螯合物的提取 :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) 中未反应的白蛋白以及多余的铬离子,即得铬 - 白蛋白螯合物,具体步骤如下 :

[0164] (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铬 - 白蛋白螯合物复溶 ;

[0165] (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白蛋白特异性结合的填料,装柱后,继续使用稀释缓冲液平衡层析柱 ;

[0166] (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,白蛋白与填料特异性结合 ;

[0167] (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 ;

[0168] (5) 收集 :收集洗脱液 I ;

[0169] (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 ;

[0170] (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铬特异性结合的填料,装柱后再用稀释缓冲液平衡层析柱 ;

- [0171] (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 ;
- [0172] (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 ;
- [0173] (10) 收集 :收集洗脱液 II ;
- [0174] (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,即得铬 - 白蛋白螯合物 ;
- [0175] C) 对铬 - 白蛋白螯合物的鉴定,具体步骤如下 :
- [0176] (1) 制备胶床 :以琼脂糖凝胶作为介质制备胶床 ;
- [0177] (2) 加样 :取步骤 B) 中 8 μL 提取纯化得到的铬 - 白蛋白螯合物,加入 2 μL 上样缓冲液,并混匀,然后加样于样品槽中 ;
- [0178] (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 ;
- [0179] (4) 检测 :在胶床上找出含铬的蛋白条带,将该蛋白条带取出并溶解,然后再采用 ELISA 法或 ICP-MS 法或 AAS 法检测是否含有铬以及检测铬的含量。
- [0180] D) 检测结果
- [0181] (1) 石墨炉原子吸收光谱法 (AAS) 初步测定 HSA 中重金属含量 :结果见表 1
- [0182] 表 1 为白蛋白中重金属含量 (μg/L)
- [0183]

样本名	Cr (μg/L)
HSA	227.098
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.054
N. S	0.412
N. S	0

- [0184] (2) 电泳结果 :
- [0185] 其中,图 1 为本发明所述的铬 - 白蛋白螯合物的非变性电泳条带图。
- [0186] 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,因此右边泳道 M 为变性 Marker,只用于检测,没有标记作用,泳道 1 为白蛋白的条带。
- [0187] (3) 同步辐射 X 荧光分析 :
- [0188] 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。

[0189] 图 2 为本发明所述的铬-白蛋白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。

[0190] 本发明一种定量检测铬-白蛋白螯合物的方法的检测条件的确定:

[0191] 1. 抗白蛋白抗体、抗铬抗体最佳工作浓度以及血浆的最佳稀释倍数的确定

[0192] 步骤如下:

[0193] (1) 将抗 HSA Ab 用稀释缓冲液按照抗 HSA 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 HSA Ab 包被于固相载体上,每个浓度包被三排,4℃过夜 18 小时;

[0194] (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;

[0195] (3) 待检样品按待检样品与稀释缓冲液的质量体积比为 1:20、1:40、1:80 进行稀释,加入微孔中,按照上述包被的抗 HSA Ab 浓度,同一个浓度的抗 HSA Ab 的分别加入不同稀释度血浆,37℃作用 1 小时;

[0196] (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 Cr Ab,抗 Cr Ab 按抗 Cr 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 HSA Ab、全血稀释浓度,不同浓度抗 Cr Ab 各加 2 孔,37℃作用 1 小时,使抗 Cr Ab 与 HSA 上的金属铬反应;

[0197] (5) 酶标抗体选择最适工作浓度,即 2 μg/mL,移去抗 Cr 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 酶标抗体与铬-白蛋白螯合物反应;

[0198] (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;

[0199] (7) 将终止液滴加至每一微孔;

[0200] (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 HSA Ab、抗 Cr Ab 的最佳工作浓度以及血浆的最佳稀释倍数。

[0201] 试验中同时以所制标准品作为阳性对照,选择抗 HSA Ab+ 封闭+ 抗 Cr Ab+ 酶标+ 底物(即不加待检样品)作为阴性对照 1;抗 HSA Ab+ 封闭+ 血浆+ 酶标+ 底物(即不加抗 Cr Ab)作为阴性对照 2;抗 HSA Ab+ 封闭+ 酶标+ 底物(即不加待检样品和抗 Cr Ab)作为阴性对照 3;抗 HSA Ab+ 封闭+ 血浆+ 抗 Cr Ab+ 底物(即不加酶标)作为阴性对照 4;封闭+ 血浆+ 抗 Cr Ab+ 酶标+ 底物(即不加抗 HSA Ab 捕获 HSA)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。

[0202] 表 2:棋盘滴定法确定抗 HSA Ab、抗 Cr 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)

[0203]

		抗 HSA Ab (1:1000)	抗 HSA Ab (1:2000)	抗 HSA Ab (1:4000)	抗 HSA Ab (1:8000)
Cr 抗 1:5000	血浆 1:10	0.724	0.786	0.706	0.552
	血浆 1:20	0.756	0.821	0.722	0.632
	血浆 1:40	0.709	0.711	0.666	0.476
Cr 抗 1:10000	血浆 1:10	0.824	0.823	0.756	0.708
	血浆 1:20	0.812	0.856	0.766	0.709
	血浆 1:40	0.725	0.811	0.648	0.59
Cr 抗 1:20000	血浆 1:10	0.731	0.745	0.645	0.51
	血浆 1:20	0.788	0.77	0.708	0.59
	血浆 1:40	0.636	0.629	0.56	0.426
Cr 抗 1:40000	血浆 1:10	0.53	0.608	0.412	0.317
	血浆 1:20	0.642	0.664	0.527	0.406
	血浆 1:40	0.468	0.524	0.31	0.165

[0204] 表 3:ELISA 阳性对照及阴性对照 ELISA 检测结果

[0205]

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	0.834	0.062	0.058	0.049	0.077	0.086	0.032	0.012

[0206] 由表 2-3 数据显示,我们可以看出当抗 HSA Ab 的稀释度为 1:2000、全血稀释度为 1:20、Cr 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。

[0207] 2. 定量检测铬-白蛋白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

[0208] 步骤如下:(1)包被:将抗 Cr 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;

[0209] (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;

[0210] (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 $2 \mu\text{g/mL}$, 37°C 作用 2 小时,使其与抗 Cr Ab 反应;

[0211] (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 二巯苏糖醇 (DTT) 37°C 孵育 30min;

[0212] (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°C 温度下洗脱 1h、2h、3h;

[0213] (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°C 避光作用 30 分钟;

[0214] (7) 将终止液滴加至每一微孔;

[0215] (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。

[0216] 表 4:ELISA 洗脱液最佳工作浓度及洗脱时间确定

[0217]

	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

[0218] 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 Cr 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。

[0219] 应用实施例 1

[0220] 取采用 ELISA 法检测 100 份标本血浆中的铬-白蛋白螯合物,按照以下步骤进行检测:酶联免疫法(ELISA 法)检测铬-白蛋白螯合物,按照如下步骤检测:

[0221] 1) 将抗 HSA Ab 包被于固相载体上:用稀释缓冲液将抗 HSA Ab 稀释至 2000 倍,加入 ELISA 板微孔中, 37°C 水浴 1 小时,储存冰箱;

[0222] 2) 从循环系统取全血,作待检样品, 1000rpm 离心 5-8 分钟,离心弃去沉淀;

[0223] 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°C 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°C 放置 1 小时;

[0224] 4) 加待检样品,并且温育:加入步骤 2) 中的待检样品、以已知含量的铬-白蛋白螯合物作标准品;用稀释缓冲液将待检样品稀释至 20 倍,加入微孔中, 37°C 作用 1 小时;

[0225] 5) 加入可以捕获铬的物质,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 10000 倍, 37°C 作用 1 小时,使抗 Cr Ab 与白蛋白上的金

属铬反应；

[0226] 6) 酶结合物温育：移去抗铬抗体，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；

[0227] 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；

[0228] 8) 终止反应：将终止液滴加至每一微孔；

[0229] 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。

[0230] 表 5：100 份血样标本中铬 - 白蛋白螯合物的 ELISA 检测结果

[0231]

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
OD ₄₀₅	0.37	0.803	0.474	0.782	0.791	0.506	0.723	0.343	0.503	0.349
编号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
OD ₄₀₅	0.828	0.442	0.339	0.778	0.373	0.543	0.724	0.403	0.366	0.681
编号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
OD ₄₀₅	0.813	0.571	0.417	0.624	0.616	0.305	0.314	0.621	0.729	0.721
编号	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
OD ₄₀₅	0.417	0.501	0.669	0.493	0.375	0.556	0.415	0.544	0.541	0.731
编号	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
OD ₄₀₅	0.402	0.576	0.357	0.539	0.379	0.426	0.709	0.514	0.653	0.626
编号	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
OD ₄₀₅	0.762	0.34	0.629	0.33	0.455	0.544	0.532	0.544	0.745	0.798
编号	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
OD ₄₀₅	0.734	0.85	0.707	0.377	0.656	0.625	0.446	0.726	0.649	0.32

[0232]

编号	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
OD ₄₀₅	0.689	0.694	0.327	0.569	0.614	0.84	0.694	0.331	0.521	0.417
编号	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
OD ₄₀₅	0.426	0.627	0.789	0.608	0.722	0.543	0.638	0.643	0.511	0.768
编号	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
OD ₄₀₅	0.856	0.538	0.564	0.325	0.472	0.623	0.551	0.771	0.609	0.574

[0233] 应用实施例 2

[0234] 采用酶联免疫与原子吸收光谱结合法 (ELISA 法 +AAS 法) 检测 100 份标本血样中的铬 - 白蛋白螯合物, 按照如下步骤检测:

[0235] 1) 将能够捕获白蛋白的物质, 如抗白蛋白抗体 (抗 HSA Ab) 包被于固相载体上: 用稀释缓冲液将抗 HSA Ab 稀释至 2000 倍, 加入 ELISA 板微孔中, 4℃ 过夜 18 小时;

[0236] 2) 从循环系统取全血, 作待检样品, 1000rpm 离心 5-8 分钟, 离心弃去沉淀;

[0237] 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;

[0238] 4) 加待检样品, 并且温育: 加入步骤 2) 中的待检样品、以已知含量的铬 - 白蛋白螯合物作标准品; 用稀释缓冲液稀释将待检样品稀释至 20 倍, 加入微孔中, 37℃ 作用 1 小时;

[0239] 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;

[0240] 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白蛋白上的铬, 检测值如表 6 所示。

[0241] 表 6: 100 份血样标本中铬 - 白蛋白螯合物的 AAS 检测结果

[0242]

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
μg/L	4.582	7.896	6.862	13.875	4.432	3.066	5.06	4.968	5.39	7.812
编号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
μg/L	6.425	16.563	4.957	7.891	16.08	5.911	4.503	4.015	3.57	3.031
编号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
μg/L	6.234	4.675	5.247	14.197	7.642	4.909	6.083	4.637	5.542	17.327
编号	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
μg/L	4.327	4.419	3.379	6.955	3.075	3.65	5.186	17.138	15.79	5.445
编号	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
μg/L	5.189	4.138	7.693	13.914	6.046	5.905	5.467	3.035	5.289	7.004
编号	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
μg/L	5.538	6.379	5.426	16.097	5.304	6.659	4.87	6.186	3.355	13.998
编号	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
μg/L	3.258	5.803	4.843	5.303	5.784	6.067	6.047	15.307	14.005	5.8
编号	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
μg/L	7.875	4.91	5.609	14.697	3.648	4.869	7.479	3.708	7.576	4.269
编号	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
μg/L	4.253	7.152	6.77	15.69	7.044	17.902	3.985	5.401	7.309	6.93
编号	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
μg/L	14.467	7.062	7.493	5.481	3.62	7.062	3.437	3.633	4.854	15.001

[0243] 应用实施例 3

[0244] 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 份标本血样中的铬 - 白蛋白螯合物含量, 按照如下步骤检测:

[0245] 1) 将能够捕获白蛋白的物质, 如抗白蛋白抗体 (抗 HSA Ab) 包被于固相载体上; 用稀释缓冲液将抗 HSA Ab 稀释至 2000 倍, 加入 ELISA 板微孔中, 4℃ 过夜 18 小时;

[0246] 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;

[0247] 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;

[0248] 4) 加待检样品,并且温育:加入步骤2)中的待检样品、以已知含量的铬-白蛋白螯合物作标准品;用稀释缓冲液将待检样品稀释至20倍,加入微孔中,37℃作用1小时;

[0249] 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;

[0250] 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;

[0251] 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白蛋白的铬,检测值如表7所示。

[0252] 表7:100份血样标本中铬-白蛋白螯合物的ICP-MS检测结果

[0253]

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
μg/L	14.348	5.124	7.605	5.795	16.657	6.284	3.505	6.163	5.737	6.072
编号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
μg/L	17.736	15.227	3.444	6.183	13.669	4.702	4.691	4.327	7.193	5.761
编号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
μg/L	13.621	3.064	5.027	4.369	4.654	3.557	6.102	4.797	3.021	6.491
编号	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
μg/L	15.722	7.845	7.62	7.58	6.485	15.918	17.562	4.929	7.103	7.277

[0254]

编号	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
μg/L	5.473	7.169	7.069	6.264	13.152	6.593	6.451	4.75	3.107	6.247
编号	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
μg/L	15.437	4.247	5.886	7.617	3.405	15.331	6.41	6.753	4.162	5.893
编号	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
μg/L	17.022	3.548	5.523	5.867	5.509	7.824	15.214	6.846	4.456	6.464
编号	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
μg/L	3.475	4.38	7.692	6.43	16.321	15.644	5.663	5.97	6.395	5.455
编号	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
μg/L	13.547	4.388	3.242	4.065	4.132	3.897	6.246	6.8	4.55	3.194
编号	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
μg/L	17.949	4.4	7.954	6.128	3.552	3.112	15.579	4.651	4.301	15.132

[0255] 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。

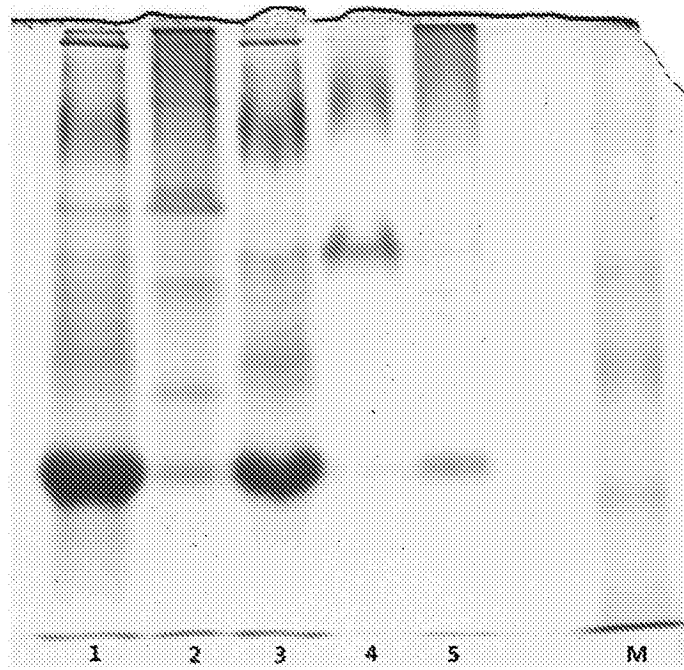


图 1

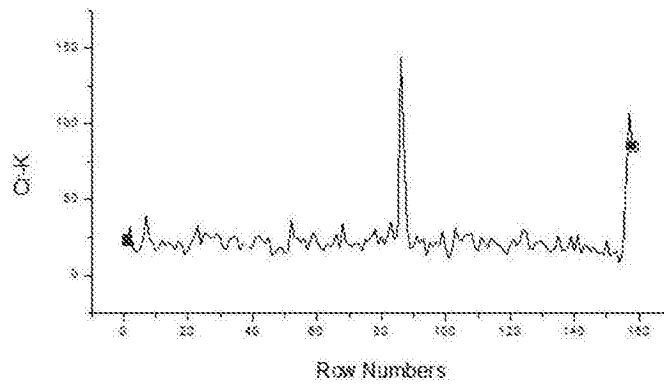


图 2

专利名称(译)	一种铬-白蛋白螯合物及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN105004686A	公开(公告)日	2015-10-28
申请号	CN201510413563.8	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	CN105004686B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种铬-白蛋白螯合物及其制备方法和应用，该铬-白蛋白螯合物是铬离子与白蛋白通过巯基或/和半胱氨酸残基螯合而成。本发明建立了铬-白蛋白螯合物的定性定量检测方法，以便定量检测铬-白蛋白螯合物在评价一个地区铬污染程度的应用。通过定量检测一个地区人群血清中铬-白蛋白螯合物可以间接反映这个地区人群受铬污染的情况，从而间接反映这个地区铬污染程度。本发明建立的铬-白蛋白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。

