



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105021548 A

(43) 申请公布日 2015. 11. 04

(21) 申请号 201510411289. 0

G01N 1/34(2006. 01)

(22) 申请日 2015. 07. 14

G01N 27/447(2006. 01)

(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)

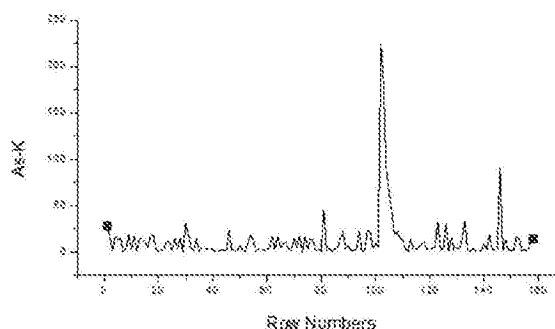
权利要求书2页 说明书17页 附图1页

(54) 发明名称

一种砷-纤维蛋白原螯合物及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明提供一种砷-纤维蛋白原螯合物及其制备方法和应用,该砷-纤维蛋白原螯合物是砷离子与纤维蛋白原通过巯基或/和半胱氨酸残基螯合而成,可用于制备检测人体砷-纤维蛋白原螯合物的试剂。本发明首次证实了砷离子可直接作用于纤维蛋白原。本发明建立了砷-纤维蛋白原螯合物的定性定量检测方法,以检测一个地区人群体内纤维蛋白原的含量,从而间接反映一个地区砷污染程度以及对人群的健康影响。本发明建立的砷-纤维蛋白原螯合物定量检测方法准确度高、复性好。



1. 一种砷-纤维蛋白原螯合物,其特征在于,该砷-纤维蛋白原螯合物是砷离子与纤维蛋白原通过巯基或 / 和半胱氨酸残基螯合而成。

2. 如权利要求 1 所述的砷-纤维蛋白原螯合物的制备方法,包括以下步骤:

A) 砷-纤维蛋白原螯合物的合成:在提纯源于人体的纤维蛋白原或按照生物学方法重组的纤维蛋白原中加入砷离子进行螯合反应,得到反应溶液;

B) 砷-纤维蛋白原螯合物纯化:采用免疫亲和层析法,去除步骤 A) 反应溶液中未反应的纤维蛋白原、特异性抗体和砷离子,即得砷-纤维蛋白原螯合物。

3. 如权利要求 2 所述的方法,其特征在于,

所述步骤 B) 中具体包括以下步骤:

(1) 溶解样品:将上述步骤 A) 的砷-纤维蛋白原螯合物溶解于生理盐水中,得砷-纤维蛋白原螯合物溶液;

(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纤维蛋白原特异性结合的填料,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)所述溶液,然后上柱,使纤维蛋白原与填料特异性结合;

(4) 洗脱:使用稀释缓冲液冲洗层析柱至基线平衡,然后使用 0.05-0.10mol/L 的 Na_2HPO_4 溶液进行洗脱;

(5) 收集:收集步骤(4)的洗脱液,收集完毕后立即使蛋白复原;

(6) 透析:将步骤(5)中的收集的洗脱液装透析袋,用 ddH_2O 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砷特异性结合的填料,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 Na_2HPO_4 溶液进行洗脱;

(10) 收集:收集步骤(9)的洗脱液,收集完毕后立即使蛋白复原;

(11) 透析:将步骤(10)的洗脱液装透析袋,用 ddH_2O 透析除盐,换水三次后,4℃透析过夜,收集样本,即得砷-纤维蛋白原螯合物。

4. 根据权利要求 2 所述的砷-纤维蛋白原螯合物的制备方法,其特征在于,步骤 B) 后还包括步骤 C):对砷-纤维蛋白原螯合物的鉴定;

其中,步骤 C) 中具体包括以下步骤:

(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) 中提取纯化得到的砷-纤维蛋白原螯合物,加入上样缓冲液,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:在胶床上找出金属的蛋白条带,将该蛋白条带取出,将蛋白条带溶解,然后再采用 ICP-MS 或 AAS 检测是否含有砷以及检测砷的含量。

5. 一种如权利要求 1 所述的砷-纤维蛋白原螯合物在制备检测血样中砷-纤维蛋白原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 所述的砷-纤维蛋白原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,该包被液含有捕获纤维蛋白原的物质或捕获砷的物质。

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

一种砷 - 纤维蛋白原螯合物及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及砷离子的免疫学检测,具体涉及一种砷 - 纤维蛋白原螯合物及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 纤维蛋白原 (fibrinogen, Fg) 其生理功能主要是作为凝血因子 I 而直接参与凝血过程。在凝血共同途径中,凝血酶先裂解纤维蛋白原两条 A α 链氨基端 Arg16-Gly17 释放出一对纤维蛋白原肽 A,形成纤维蛋白原单体 I ;在裂解纤维蛋白原两条 B β 链氨基端 Arg14-Gly15 释放出一对纤维蛋白原肽 B,形成纤维蛋白原单体 II,暴露纤维蛋白原单体的聚合部位,通过非共价结合,形成了不稳定的可溶性纤维蛋白原单体。在活化的凝血因子 XIII 及 Ca²⁺的作用下,纤维蛋白原单体互相交联,生成稳定的可溶性纤维蛋白原,并将血液的有形成分包绕其中,形成牢固的血栓。

[0003] 除参与凝血外,纤维蛋白原还具有其他多种功能,如与血小板膜糖蛋白 II b/ III a 结合而介导血小板聚集反应,参与动脉粥样硬化及肿瘤血行转移等 ;纤维蛋白原水平还影响血液粘度,尤其近年来人们发现血浆纤维蛋白原水平升高是心脑血管、血栓性疾病的重要危险因素。血浆纤维蛋白原也是急性时相蛋白,在很多应激状况下,如感染、严重外伤等也可短时间内升高。

[0004] 砷是一种常见的有毒金属及环境污染物,普通人群接触或摄入砷的主要途径有 :吸入砷污染的空气、摄入用砷容器或包装盛装的饮料或食物、摄入含砷药物等。尽管砷对机体的损害十分明显,但是其致机体损害的机制还尚待研究。砷存在正三价与正五价两种最常见的氧化态,无机砷在自然界及有机体的代谢过程中会发生氧化、还原、甲基化、糖基化等一系列变化,形成不同形态的砷。无机砷被认为是毒性很强的形态,被列为致癌物质,其中亚砷酸盐 (iAs^{III}) 的毒性强于砷酸盐 (iAs^V) ;不同形态的砷毒性差异很大,单甲基亚砷酸 (monomethylarsonous acid, MMA^{III}) 及二甲基亚砷酸 (dimethylarsinous acid, DMA^{III}) 均有剧毒,而其五价形态 (MMA^V, DMA^V) 则毒性不强。研究认为,三价砷的毒性是通过与蛋白质巯基作用而产生的。砷与蛋白结合会影响蛋白质的组成、结构及功能,影响该蛋白质与其他功能蛋白质结合,因此研究砷与蛋白质结合对理解砷的毒性及其对机体的损伤机制具有重要意义。

[0005] 目前已知砷可以抑制 200 多种酶,不管是三价砷还是有机砷 (包括氧化苯砷, phenylarsine (PAO)) 都有抑制酶的作用,这些酶包括谷胱甘肽还原酶、谷胱甘肽转移酶、谷胱甘肽过氧化物酶、硫氧还原化物酶、DNA 连接酶、Arg-tRNA 蛋白质转移酶、氧化型二谷胱甘肽亚精胺还原酶、I κ B 激活 β 酶 (IKK β)、丙酮酸激活半乳凝素 1 酶、酪氨酸磷酸蛋白酶、JNK 磷酸酶、Wip1 磷酸酶、E3 连接 c-CBL 和 SIAH1。研究认为,砷主要是通过结合于巯基上或蛋白质或肽链里的半胱氨酸残基结合,而发挥作用的。

[0006] 目前国内外存在大量方法进行血砷检测,包括 ELISA、原子吸收光谱 (Atomic Absorption Spectroscopy, AAS) 定量检测法、电感耦合等离子体质谱仪 (inductively

coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS) 定量检测法等。但这些方法只能检测出非特异性血砷,多数只能作为病情活动性提示指标,而缺乏疾病特异性价值。

发明内容

[0007] 针对砷污染严重的问题,本发明的目的在于提供一种砷-纤维蛋白原螯合物及其制备方法,并建立砷-纤维蛋白原螯合物的定性、定量检测方法,以便定量检测砷-纤维蛋白原螯合物在评价一个地区砷污染程度的应用。通过定量检测一个地区人群中砷-纤维蛋白原螯合物,可以间接反映这个地区人群受砷污染的情况,从而间接反映这个地区砷污染程度。

[0008] 本发明解决其技术问题所采用的技术方案是:提供一种砷-纤维蛋白原螯合物,该砷-纤维蛋白原螯合物是砷离子与纤维蛋白原通过巯基或/和半胱氨酸残基螯合而成。

[0009] 本发明还提供一种上述的砷-纤维蛋白原螯合物的制备方法,即体外合成法,包括以下步骤:

[0010] A) 砷-纤维蛋白原螯合物的合成:在提纯源于人体的纤维蛋白原或按照生物学方法重组的纤维蛋白原中加入砷离子进行螯合反应,得到反应溶液;

[0011] B) 砷-纤维蛋白原螯合物纯化:采用免疫亲和层析法,去除步骤A) 反应溶液中未反应的纤维蛋白原、特异性抗体和砷离子,即得砷-纤维蛋白原螯合物。

[0012] 作为优选,所述步骤B) 中具体包括以下步骤:

[0013] (1) 溶解样品:将上述步骤A) 的砷-纤维蛋白原螯合物溶解于生理盐水中,得砷-纤维蛋白原螯合物溶液;

[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纤维蛋白原特异性结合的填料,装柱后,继续使用稀释缓冲液平衡层析柱;

[0015] 所述能与纤维蛋白原特异性结合的填料为吸附有可与纤维蛋白原特异性结合物质的硅胶或树脂;

[0016] (3) 上样:待层析柱平衡后,用稀释缓冲液稀释步骤(1) 所述溶液,然后上柱,使纤维蛋白原与填料特异性结合;

[0017] (4) 洗脱:使用稀释缓冲液冲洗层析柱至基线平衡,然后使用 0.05-0.10mol/L 的 Na_2HPO_4 溶液进行洗脱;

[0018] (5) 收集:收集步骤(4) 的洗脱液,收集完毕后立即使蛋白复原;

[0019] (6) 透析:将步骤(5) 中的收集的洗脱液装透析袋,用 ddH_2O 透析除盐,换水三次后,4℃透析过夜,收集样本;

[0020] (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砷特异性结合的填料,装柱后再用稀释缓冲液平衡层析柱;

[0021] 所述能与砷特异性结合的填料为吸附有可与砷特异性结合物质的硅胶或树脂;

[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 Na_2HPO_4 溶液进行洗脱;

[0024] (10) 收集:收集步骤(9) 的洗脱液,收集完毕后立即使蛋白复原;

[0025] (11) 透析:将步骤(10) 的洗脱液装透析袋,用 ddH_2O 透析除盐,换水三次后,4℃透

析过夜,收集样本,即得砷-纤维蛋白原螯合物。

[0026] 作为优选,上述砷-纤维蛋白原螯合物的制备方法,还包括以下对砷-纤维蛋白原螯合物的鉴定步骤,具体包括以下步骤:

[0027] (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;

[0028] (2) 加样:取步骤B)中提取纯化得到的砷-纤维蛋白原螯合物,加入上样缓冲液,并混匀,然后加样于样品槽中;

[0029] (3) 电泳:连接电泳板,进行电泳;

[0030] (4) 检测:在胶床上找出金属的蛋白条带,将该蛋白条带取出,将蛋白条带溶解,然后再采用 ICP-MS 或 AAS 检测是否含有砷以及检测砷的含量。

[0031] 本发明还提供一种如上述的砷-纤维蛋白原螯合物在制备检测人体内砷-纤维蛋白原螯合物的试剂或试剂盒中的应用。

[0032] 本发明还提供一种至少包括如上述的砷-纤维蛋白原螯合物作为标准品的试剂盒。

[0033] 优选地,该试剂盒中还包括包被液,该包被液含有捕获纤维蛋白原的物质或捕获砷的物质。

[0034] 本发明还提供一种定量检测砷-纤维蛋白原螯合物的方法,以已知含量的上述的砷-纤维蛋白原螯合物作为标准品,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、提纯砷-纤维蛋白原螯合物与酶联免疫结合法、提纯砷-纤维蛋白原螯合物与原子吸收光谱结合法、提纯砷-纤维蛋白原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。

[0035] 相比现有技术,本发明的有益效果在于:

[0036] 1. 本发明首次体外合成或从全血中提取砷-纤维蛋白原螯合物;

[0037] 2. 本发明首次提出砷-纤维蛋白原螯合物可用于制备检测血样中砷-纤维蛋白原螯合物的试剂或试剂盒中的应用;

[0038] 3. 本发明实现了砷-纤维蛋白原螯合物的特异性识别和定量检测,以便定量检测人群中砷-纤维蛋白原螯合物的含量,以评价一个地区砷污染程度的应用,为工业地区的砷污染水平提供间接指标。本发明建立的砷-纤维蛋白原螯合物定量检测方法的准确度高、重复性好。

附图说明

[0039] 图1为本发明所述的砷-纤维蛋白原螯合物的非变性电泳条带图;

[0040] 图2为本发明所述的砷-纤维蛋白原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

[0041] 下面结合具体实施方式,对本发明做进一步描述:

[0042] 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、材料如未特殊说明,均视为可从市购方式购得:

- [0043] 提取试剂为 PEG 溶液、硼酸盐缓冲液等（采用 PEG 法）；
- [0044] 捕获纤维蛋白原的物质为抗纤维蛋白原抗体，可通过市售获得，如货号为“NovusA-0577”的人纤维蛋白原抗体 anti-human Fibrinogen，以下实施方式中，所述与纤维蛋白原特异性结合的物质、抗纤维蛋白原抗体、抗 Fg 抗体均为捕获纤维蛋白原的物质；
- [0045] 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；
- [0046] 稀释缓冲液为 pH 9.6 的 0.05M 碳酸盐缓冲液，配制方法示例：取 1.5g 的 Na_2CO_3 和 2.93g 的 NaHCO_3 溶解加 ddH₂O 定容至 1000mL；
- [0047] 洗涤缓冲液为 pH7.4 的 0.15M PBS 溶液，配制方法示例：取 0.2g 的 KH_2PO_4 、2.90g 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、8.0g 的 NaCl、0.2g 的 KCl、0.5mLTween-20，溶解加 ddH₂O 定容至 1000mL；
- [0048] 封闭液为牛血清白蛋白溶液，配制方法示例：取 0.1g 牛血清白蛋白，加入洗涤缓冲液稀释定容至 100mL；
- [0049] 终止液为 2M H_2SO_4 ，配制方法示例：取 178.3mL 的 ddH₂O，加浓 H_2SO_4 定容至 200mL；
- [0050] 底物为甲基联苯胺 (TMB) 溶液，配制方法示例：取 0.5mL 浓度为 2g/L 的甲基联苯胺乙醇溶液，加底物稀释液稀释至 10mL；
- [0051] 底物缓冲液 pH 为 5.0，其中 Na_2HPO_4 的摩尔浓度为 0.2M、柠檬酸的摩尔浓度为 0.1M，配制方法示例：取 1.42g Na_2HPO_4 、0.96g 柠檬酸，然后加入 ddH₂O 至 50mL，即得；
- [0052] 洗脱液的配制方法示例：将木瓜蛋白酶用 pH 8.0, 0.1mol/L Tris-HCl 缓冲液配制成 1-2mg/mL，再加入 1mmol/L 二硫苏糖醇 (DTT) 37℃ 孵育 30min，得洗脱液；
- [0053] 上样缓冲液可由如下比例的组分配制而成：Tris-HCl : 1% 溴酚蓝 : ddH₂O : 甘氨酸 = 15.5 : 2.5 : 7 : 25，其中 Tris-HCl 的 pH 为 6.8、摩尔浓度为 1M；
- [0054] 电泳缓冲液的配制方法如下：取 3.0g Tris、14.4g 甘氨酸、溶于 800mL ddH₂O 中，调 pH 至 8.3 后，定容至 1L；
- [0055] 捕获砷的物质为货号为“广州然科公司 RK15728”的鼠抗 As mAb，以下实施方式中所述的与砷特异性结合的物质、抗 As 抗体、二抗、抗砷抗体均为捕获砷的物质；
- [0056] 本发明提供一种砷-纤维蛋白原螯合物，砷离子与纤维蛋白原通过巯基或 / 和半胱氨酸残基螯合而成。
- [0057] 本发明还提供砷-纤维蛋白原螯合物的制备方法，包括以下步骤：
- [0058] A) 砷-纤维蛋白原螯合物的合成：在提纯源于人体的纤维蛋白原或按照生物学方法重组的纤维蛋白原中加入砷离子进行螯合反应，得到反应溶液；
- [0059] B) 砷-纤维蛋白原螯合物纯化：采用免疫亲和层析法，去除步骤 A) 反应溶液中未反应的纤维蛋白原、特异性抗体和砷离子，即得砷-纤维蛋白原螯合物，具体包括以下步骤：
- [0060] (1) 溶解样品：将上述步骤 A) 的砷-纤维蛋白原螯合物溶解于生理盐水中，得砷-纤维蛋白原螯合物溶液；
- [0061] (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纤维蛋白原特异性结合的填料，装柱后，继续使用稀释缓冲液平衡层析柱；
- [0062] 所述能与纤维蛋白原特异性结合的填料为吸附有可与纤维蛋白原特异性结合物质的硅胶或树脂；
- [0063] (3) 上样：待层析柱平衡后，用稀释缓冲液稀释步骤 (1) 所述溶液，然后上柱，使纤

维蛋白原与填料特异性结合；

[0064] (4) 洗脱：使用稀释缓冲液冲洗层析柱至基线平衡，然后使用 0.05-0.10mol/L 的 Na_2HPO_4 溶液进行洗脱；

[0065] (5) 收集：收集步骤 (4) 的洗脱液，收集完毕后立即使蛋白复原；

[0066] (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；

[0067] (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砷特异性结合的填料，装柱后再用稀释缓冲液平衡层析柱；

[0068] 所述能与砷特异性结合的填料为吸附有可与砷特异性结合物质的硅胶或树脂；

[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 Na_2HPO_4 溶液进行洗脱；

[0071] (10) 收集：收集步骤 (9) 的洗脱液，收集完毕后立即使蛋白复原；

[0072] (11) 透析：将步骤 (10) 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，即得砷-纤维蛋白原螯合物。

[0073] C)：对砷-纤维蛋白原螯合物的鉴定，具体包括以下步骤：

[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) 中提取纯化得到的砷-纤维蛋白原螯合物，加入上样缓冲液，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：在胶床上找出金属的蛋白条带，将该蛋白条带取出，将蛋白条带溶解，然后再采用 ICP-MS 或 AAS 检测是否含有砷以及检测砷的含量。

[0078] 本发明还提供一种至少包括如上述的砷-纤维蛋白原螯合物作为标准品的试剂盒。

[0079] 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。

[0080] 一种检测血样中砷-纤维蛋白原螯合物的试剂盒，包括：含有可用于捕获纤维蛋白原的物质的包被液、封闭液、洗涤缓冲液、可捕获砷的物质作为二抗、酶标抗体、底物、终止液、稀释缓冲液、阳性对照、阴性对照等。

[0081] 一种检测血样中砷-纤维蛋白原螯合物的试剂盒，包括：含有可用于捕获纤维蛋白原的物质的包被液、封闭液、洗涤缓冲液、洗脱液、阳性对照、阴性对照等。

[0082] 一种检测血样中砷-纤维蛋白原螯合物的试剂盒，包括：含有可用于捕获纤维蛋白原的物质的包被液、封闭液、洗涤缓冲液、洗脱液、酸化剂、过氧化氢、标准品、阴性对照等。

[0083] 一种检测血样中砷-纤维蛋白原螯合物的试剂盒，包括用于提纯纤维蛋白原所需提取试剂、复溶液、含有可用于捕获砷的物质的包被液、封闭液、洗涤缓冲液、酶标抗体、底物、终止液、稀释缓冲液、标准品、阴性对照等。

[0084] 一种检测血样中砷-纤维蛋白原螯合物的试剂盒，包括用于提纯纤维蛋白原所需提取试剂、复溶液、阳性对照、阴性对照等。

[0085] 一种检测血样中砷-纤维蛋白原螯合物的试剂盒，包括用于提纯纤维蛋白原所需

提取试剂、复溶液、酸化剂、过氧化氢、阳性对照、阴性对照等。

[0086] 一种检测血样中砷-纤维蛋白原整合物的试剂盒,包括用于提纯纤维蛋白原所需提取试剂、胶床介质、复溶液、加样缓冲液、溶解胶床上金属的蛋白条带所需液体、含有可用于捕获砷的物质的包被液、封闭液、洗涤缓冲液、酶标抗体、底物、终止液、阳性对照、阴性对照等。

[0087] 一种检测血样中砷-纤维蛋白原整合物的试剂盒,包括用于提纯纤维蛋白原所需提取试剂、胶床介质、复溶液、加样缓冲液、溶解胶床上金属的蛋白条带所需液体、阳性对照、阴性对照等。

[0088] 一种检测血样中砷-纤维蛋白原整合物的试剂盒,包括用于提纯纤维蛋白原所需提取试剂、胶床介质、复溶液、加样缓冲液、溶解胶床上金属的蛋白条带所需液体、硝酸、过氧化氢、阳性对照、阴性对照等。

[0089] 上述几种试剂盒中,所述阳性对照为标准品,即整合有重砷的纤维蛋白原整合物或整合有重砷的 BSA 整合物;所述阴性对照为稀释缓冲液。

[0090] 上述试剂盒用于检测砷-纤维蛋白原整合物,以提高检测的准确性和重复性,并使之在临床中得到推广。

[0091] 本发明还提供一种定量检测砷-纤维蛋白原整合物的方法,以已知含量的上述的砷-纤维蛋白原整合物作为标准品,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、提纯砷-纤维蛋白原整合物与酶联免疫结合法、提纯砷-纤维蛋白原整合物与原子吸收光谱结合法、提纯砷-纤维蛋白原整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,用检测砷-纤维蛋白原整合物的方法可以列出的有以下几种,但并不限于以下几种。

[0092] 以下所述稀释倍比为重量体积比。

[0093] 方法一:酶联免疫法(ELISA法)检测砷-纤维蛋白原整合物,按照如下步骤检测:

[0094] 1) 包被:用稀释缓冲液稀释可以捕获纤维蛋白原的物质至 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;

[0095] 2) 封闭:移去稀释缓冲液,并用洗涤缓冲液进行洗涤,待洗涤完成后,加入封闭液,37℃放置 1 小时,移去封闭液,并用洗涤缓冲液进行洗涤,洗涤完成后,ELISA 板于 37℃放置 1 小时;

[0096] 3) 加待测样本,并且温育:从循环系统取样,作待测样本;以已知含量的砷-纤维蛋白原整合物作标准品;用稀释缓冲液将待测样本和标准品均稀释至 10-40 倍,加至微孔中,37℃作用 1-2 小时;

[0097] 4) 加入可以捕获砷的物质,并且温育:移去待测样本,并用洗涤缓冲液进行洗涤,待洗涤完成后,加入用稀释缓冲液稀释 25000-200000 倍的抗砷抗体,37℃作用 1-2 小时,使抗砷抗体与纤维蛋白原上的砷反应;

[0098] 5) 酶结合物温育:移去抗砷抗体,洗涤,加入用稀释缓冲液稀释的 HRP 酶标抗体,37℃作用 1-2 小时,使其与 HRP 酶标抗体反应;

[0099] 6) 底物温育:移去酶标抗体,并用洗涤缓冲液进行洗涤,待洗涤完成后,加入底物,37℃避光作用 30 分钟;

[0100] 7) 终止反应:加入终止液至每一微孔;

[0101] 8) 取波长 450nm,加完终止液后,将 ELISA 板置于酶标仪上分别读取待测样本组和标准品的 OD 值,绘制标准曲线,通过与标准品组比较,求得待测样本的含量。

[0102] 本方法中,步骤 8) 也可不使用酶标仪,直接通过染色情况进行定性检测。

[0103] 该方法利用 ELISA 原理,可以将全血中的特异性纤维蛋白原提取出来,提取出来的纤维蛋白原上部分螯合有重砷,而这部分纤维蛋白原上的砷可以被抗砷的特异性抗体所捕获,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,而不含有螯合砷的纤维蛋白原,则不会被抗砷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砷(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,即可证明检测出纤维蛋白原上螯合的砷。

[0104] 方法二:酶联免疫与原子吸收光谱结合法(ELISA 法+AAS 法)检测砷-纤维蛋白原螯合物按照如下步骤检测:

[0105] 1) 包被:将能够捕获纤维蛋白原的物质,如抗纤维蛋白原抗体包被于固相载体上:用稀释缓冲液稀释抗纤维蛋白原抗体至 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;

[0106] 2) 封闭:移去稀释缓冲液,并用洗涤缓冲液进行洗涤,待洗涤完成后,加入封闭液,37℃放置 1 小时,移去封闭液,并用相应洗涤缓冲液进行洗涤,洗涤完成后,ELISA 板于 37℃放置 1 小时;

[0107] 3) 加待测样本,并且温育:从循环系统中取样,作待测样本;以已知含量的砷-纤维蛋白原螯合物作标准品;用稀释缓冲液稀释至 10-40 倍,加至微孔中,37℃作用 1-2 小时;

[0108] 4) 洗脱:移去待测样本,洗涤,加入洗脱液,在 37℃下洗脱 1-3 小时;

[0109] 5) 检测:从 ELISA 微孔中取样,于原子吸收光谱仪检测螯合于纤维蛋白原上的砷,读出相应数值;

[0110] 该实施例利用 ELISA 原理对纤维蛋白原进行捕获,并结合原子吸收光谱(AAS)仪检测螯合于纤维蛋白原上的砷;由于溶液中仅含有纤维蛋白原,且所用试剂中不含砷(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,即可证明检测出纤维蛋白原上螯合的砷。

[0111] 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)检测砷-纤维蛋白原螯合物按照如下步骤检测:

[0112] 1) 包被:将能够捕获纤维蛋白原的物质,如抗纤维蛋白原抗体包被于固相载体上,用稀释缓冲液稀释抗纤维蛋白原抗体至 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;

[0113] 2) 封闭:移去稀释缓冲液,并用洗涤缓冲液进行洗涤,待洗涤完成后,加入封闭液,37℃放置 1 小时,移去封闭液,并用相应洗涤缓冲液进行洗涤,洗涤完成后,ELISA 板于 37℃放置 1 小时;

[0114] 3) 加待测样本,并且温育:从循环系统取样,作待测样本;以已知含量的砷-纤维蛋白原螯合物作标准品;用稀释缓冲液稀释至 10-40 倍,加至微孔中,37℃作用 1-2 小时;

[0115] 4) 洗脱:移去待测样本,并用相应洗涤缓冲液进行洗涤,待洗涤完成后,加入洗脱液,在 37℃ 下洗脱 1-3 小时;

[0116] 5) 酸化:在步骤 4) 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;

[0117] 6) 检测:加入过氧化氢,并且加热赶酸,并从 ELISA 试剂板中洗脱的溶液中取 0.5mL 液体,于电感耦合等离子体质谱仪下检测整合于纤维蛋白原的砷,读出相应数值。

[0118] 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纤维蛋白原上的砷;即先采用 ELISA 原理将全血中的砷-纤维蛋白原螯合物提取出来,再采用感耦合等离子体质谱仪对整合于纤维蛋白原上的砷进行定量检测;由于溶液中仅含有纤维蛋白原,且所用试剂中不含砷(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,即可证明检测出纤维蛋白原上螯合的砷。

[0119] 方法四:提纯砷-纤维蛋白原螯合物与酶联免疫结合法(提纯法+ELISA 法)检测砷-纤维蛋白原螯合物,按照如下步骤检测:

[0120] 1) 从全血中提取非特异性纤维蛋白原:采用超速离心法、高压液相层析法、凝胶过滤层析法、凝胶电泳法等方法,从全血中提取纤维蛋白原,并将提取出的纤维蛋白原复溶,得纤维蛋白原的溶液;

[0121] 2) 包被:将抗砷抗体包被于固相载体上,用稀释缓冲液稀释抗砷抗体至 25000-200000 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;

[0122] 3) 封闭:移去稀释缓冲液,并用洗涤缓冲液进行洗涤,待洗涤完成后,加入封闭液,37℃ 放置 1 小时,移去封闭液,并用相应洗涤缓冲液进行洗涤,洗涤完成后,ELISA 板于 37℃ 放置 1 小时;

[0123] 4) 加待测样本,并且温育:从步骤 1) 的溶液中取样,作待测样本;以已知含量的砷-纤维蛋白原螯合物作标准品;用稀释缓冲液稀释至 10-40 倍,加至微孔中,37℃ 作用 1-2 小时;

[0124] 5) 酶结合物温育:移去待测样本,并用洗涤缓冲液进行洗涤,待洗涤完成后,加入用稀释缓冲液稀释的酶标抗体,37℃ 作用 1-2 小时,使其与酶标抗体反应;

[0125] 6) 底物温育:移去酶标抗体,并用相应洗涤缓冲液进行洗涤,待洗涤完成后,加入底物,37℃ 避光作用 30 分钟;

[0126] 7) 终止反应:加入终止液至每一微孔;

[0127] 8) 取波长 450nm,加完终止液后,在酶标仪上分别读取待测样本组和标准品的 OD 值,绘制标曲线,通过与标准品组比较,求得待测样本的含量。

[0128] 本方法中,也可不使用酶标仪,直接通过染色情况进行定性检测。

[0129] 方法五:提纯砷-纤维蛋白原螯合物与原子吸收光谱结合法(提纯法+AAS 法)检测血样中砷-纤维蛋白原螯合物,按照如下步骤检测:

[0130] 1) 从全血中提取非特异性纤维蛋白原:采用超速离心法、高压液相层析法、凝胶过滤层析法、凝胶电泳法等方法,从全血中提取纤维蛋白原,并将提取出的纤维蛋白原复溶,得到纤维蛋白原溶液;

[0131] 2) 检测:从步骤1)的溶液中取样,于原子吸收光谱仪检测整合于纤维蛋白原上的砷,读出相应数值。

[0132] 方法六:提纯砷-纤维蛋白原螯合物与电感耦合等离子体质谱结合法(提纯法+ICP-MS法)检测砷-纤维蛋白原螯合物,按照如下步骤检测:

[0133] 1) 从全血中提取非特异性纤维蛋白原:采用超速离心法、高压液相层析法、凝胶过滤层析法、凝胶电泳法等方法,从全血中提取纤维蛋白原,并将提取出的纤维蛋白原复溶,得纤维蛋白原的溶液;

[0134] 2) 酸化:从步骤1)的溶液中取样,在溶液中加入硝酸对溶液进行酸化,封口过夜,彻底酸化;

[0135] 3) 检测:加入过氧化氢,并且加热赶酸后取0.5mL溶液,于电感耦合等离子体质谱仪下检测整合于纤维蛋白原上的砷,读出相应数值。

[0136] 方法四、方法五和方法六均是通过全血提取法分离出纤维蛋白原,再采用特异性检测方法,测定纤维蛋白原中砷-纤维蛋白原螯合物上砷的含量;即先采用物理分离手段,如超速离心法、高压液相层析法、凝胶过滤层析法等,将纤维蛋白原从待测血浆样本中分离出来并复溶于生理盐水中,再利用ELISA原理、原子吸收光谱检测或进行检测电感耦合等离子体质谱法检测砷-纤维蛋白原螯合物上的砷含量。

[0137] 方法七:电泳法+ELISA/AAS/ICP-MS法检测砷-纤维蛋白原螯合物,具体如下:

[0138] 1) 从全血中提取非特异性纤维蛋白原:采用超速离心法、高压液相层析法、凝胶过滤层析法、凝胶电泳法等方法,从全血中提取纤维蛋白原,将提取出来的纤维蛋白原复溶于生理盐水中,得纤维蛋白原的溶液;

[0139] 2) 制备胶床:根据需要选择合适的介质(如琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶等),按照相应要求制备好相应胶床;

[0140] 3) 加样:从步骤1)的溶液中取8 μ L溶液,以已知含量的砷-纤维蛋白原螯合物作标准品,加入2 μ L上样缓冲液,并混匀,然后加样于样品槽中;

[0141] 4) 电泳:连接电泳板,加电泳缓冲液,进行电泳,并根据需求将蛋白按照分子量、等电点等参数的不同进行分离;

[0142] 5) 检测:在胶床上找出含有纤维蛋白原螯合物的蛋白条带,将该条带取出,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等原理检测溶于液体中的砷含量。

[0143] 此外,还可以利用此方法检测砷-纤维蛋白原螯合物的等电点、分子量及含量等。

[0144] 在方法七中,将纤维蛋白原从全血中提取出来,再采用凝胶电泳法对所提取的纤维蛋白原进行分离,再找出富含砷的相应条带,再检测相关纤维蛋白原的含量;即纤维蛋白原可以用多种方法提纯出来(例如超速离心法、高压液相层析法、凝胶过滤层析法、凝胶电泳法,ELISA方法等),将提纯出来的纤维蛋白原复溶于溶液中,取一定量的纤维蛋白原,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,寻找出富含砷的相应条带,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纤维蛋白原的含量,也可以利用ELISA、AAS、ICP-MS等原理检测出整合于纤维蛋白原上的砷含量,由于溶液中仅含有纤维蛋白原,且所用试剂中不含砷(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,即可证明检测出纤维蛋白原上螯合的砷。

[0145] **实施例 1:**合成法合成砷-纤维蛋白原螯合物,包括以下步骤:

[0146] 本实施例所制备的砷-纤维蛋白原螯合物,通过凝胶电泳进一步分离,并通过电感耦合等离子体质谱或原子吸收光谱进行检测定性鉴定。

[0147] 本实施例所使用的试剂如下:

[0148] 1) 硼酸盐缓冲液,其摩尔浓度为 0.01M,其制备方法示例如下:称取 0.31g 硼酸溶于 400mL ddH₂O 中,用 0.1mol/L 的 NaOH 调节 pH 至 9.0,定容至 500mL。

[0149] 2) EDTA-NaHCO₃溶液,其制备方法如下:取 1.86g EDTA·2H₂O 和 16.8g NaHCO₃,溶于 900mL ddH₂O 中,用 1.0M NaOH 调整 pH 至 8.0 定容至 1000mL,高压灭菌,室温保存;

[0150] 3) ITCBE 购买自日本同仁化学研究所,货号 M030;

[0151] 4) 纤维蛋白原溶液:称取 4.0mg 纤维蛋白原溶于 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 的纤维蛋白原溶液;

[0152] 5) 透析袋的截留分子量 14000,购买自 Bioshop Inc;

[0153] 透析袋的预处理:将透析袋放入 500mL 的 EDTA-NaHCO₃溶液中,煮沸 10min;倾弃 EDTA-NaHCO₃溶液,用 ddH₂O 轻轻漂洗,再用 500mL 5mmol/L EDTA 煮沸 10min;弃掉煮沸液,彻底用 ddH₂O 清洗,加入大量的 ddH₂O 浸泡透析袋 4℃ 过夜。使用时,戴上手套,取出透析袋,用大量的 ddH₂O 彻底冲洗其内外表面;

[0154] 制备砷-纤维蛋白原螯合物的方法,包括以下步骤:

[0155] A) 砷-纤维蛋白原螯合物的合成:在人源的纤维蛋白原中加入砷离子进行螯合反应,得到反应溶液;

[0156] 1) 取 2.0mg ITCBE 溶于 2mL DMSO 中;

[0157] 2) 缓慢将步骤 1 制备的液体加入纤维蛋白原溶液中,边滴加边震荡,于 25℃, 100r/min 的摇床中作用 24h,然后用透析袋透析 24h,除去未与纤维蛋白原结合的 ITCBE;

[0158] 3) 将透析所得的液体用 1mol/L HCl 调节 pH 值至 7.0,然后缓慢逐渐滴加 80 μl 1mmol/L 砷离子溶液,边滴加边振荡,以免砷离子使蛋白变性沉淀;

[0159] 4) 将加好的溶液在 25℃, 100r/min 的摇床中反应 2h,用处理好的透析袋进行透析 24h;

[0160] 5) 将透析好的液体于 -20℃ 分装保存,得到砷-纤维蛋白原螯合物的反应溶液。

[0161] B) 砷-纤维蛋白原螯合物纯化:采用免疫亲和层析法,去除步骤 A) 反应溶液中未反应的纤维蛋白原、特异性抗体和砷离子,即得砷-纤维蛋白原螯合物,具体包括以下步骤:

[0162] (1) 溶解样品:将上述步骤 A) 的砷-纤维蛋白原螯合物溶解于生理盐水中,得砷-纤维蛋白原螯合物溶液;

[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纤维蛋白原特异性结合的填料,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) 所述溶液,然后上柱,使纤维蛋白原与填料特异性结合;

[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 0.05-0.10mol/L 的 Na₂HPO₄溶液进行洗脱;

- [0166] (5) 收集 :收集步骤 (4) 的洗脱液,收集完毕后立即使蛋白复原 ;
- [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砷特异性结合的填料,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 Na₂HPO₄溶液进行洗脱 ;
- [0171] (10) 收集 :收集步骤 (9) 的洗脱液,收集完毕后立即使蛋白复原 ;
- [0172] (11) 透析 :将步骤 (10) 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,即得砷 - 纤维蛋白原螯合物。
- [0173] C) 对砷 - 纤维蛋白原螯合物的鉴定,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) 中提取纯化得到的砷 - 纤维蛋白原螯合物,复溶于生理盐水中,取出 8 μL,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℃ ;至溴酚蓝移至胶底部时停止电泳,图 1 为本发明所述砷 - 纤维蛋白原螯合物的非变性电泳条带图 ;
- [0177] (4) 检测 :在胶床上找出金属的蛋白条带,将该蛋白条带取出,将蛋白条带溶解,然后再采用 ICP-MS 或 AAS 检测是否含有砷以及检测砷的含量。
- [0178] D) 鉴定结果
- [0179] 1) AAS 检测结果
- [0180] 取步骤 C) 分离出的蛋白条带溶液,以石墨炉原子吸收光谱法 (AAS) 初步测定纤维蛋白原中重砷的含量,如下表所示,以 (NH₄)₂SO₄溶液为空白对照 ;
- [0181] 表 1 纤维蛋白原中砷的含量
- [0182]

样本名	As(μg / L)
待测样本	110.498
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.077

- [0183] 2) 同步辐射 X 荧光分析
- [0184] 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. LS30143-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 (MCA 4000) 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 (1mmx 3mm) 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。

[0185] 图 2 为本发明所述的砷-纤维蛋白原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,纵坐标为该条带砷的能量(含量)值。

[0186] 检测条件的确定

[0187] 1. 抗纤维蛋白原抗体、抗 As 抗体最佳工作浓度以及血浆的最佳稀释倍数的确定。

[0188] 酶联免疫法检测砷-纤维蛋白原螯合物的方法,具体包括以下步骤:

[0189] 1) 包被:将抗纤维蛋白原抗体蛋白包被于固相载体上,分别用稀释缓冲液将包被蛋白以 1:1000、1:2000、1:4000 和 1:8000 的倍比稀释,加入 ELISA 板微孔中,每个浓度包被三排,4℃保存 18 小时;

[0190] 2) 封闭:移去稀释缓冲液,洗涤,加入封闭液,37℃放置 1 小时,移去封闭液,洗涤;

[0191] 3) 加待测样本:用稀释缓冲液将待测血浆样本按 1:10、1:20、1:40 的倍比稀释,加至微孔中,以已知含量的砷-纤维蛋白原螯合物作标准品,设置阴性对照和空白对照,加至微孔中,37℃作用 1 小时;

[0192] 4) 加抗 As 抗体:移去待测血浆样本,洗涤,加入用稀释缓冲液按 1:25000、1:50000、1:100000 和 1:200000 的倍比稀释的抗 As 抗体,37℃作用 1 小时,使其与纤维蛋白原上的砷反应;

[0193] 5) 加酶标:移去抗 As 抗体,洗涤,加入用稀释缓冲液稀释的 HRP 酶标抗体,37℃作用 1 小时,使其与抗 As 抗体反应;

[0194] 6) 底物温育:移去酶标抗体,洗涤,加入底物,37℃避光作用 30min,加入终止液;

[0195] 7) 检测:于 450nm 波长下在酶标仪上分别读取标准品、待测血浆、阳性对照、阴性对照和空白对照样本的 OD 值。

[0196] 本实施例中,采用本发明提供的砷-纤维蛋白原螯合物标准品作为阳性对照,分别以不加待测血浆作为阴性对照 1,即依次加入了抗纤维蛋白原抗体、封闭液、抗 As 抗体、酶标和底物;

[0197] 以不加抗 As 抗体的对照试验组作为阴性对照 2,即依次加入了抗纤维蛋白原抗体、封闭液、待测血浆、酶标和底物;

[0198] 以不加酶标的对照试验组作为阴性对照 3,即依次加入了抗纤维蛋白原抗体、封闭液、待测血浆、抗 As 抗体和底物;

[0199] 以同时不加待测样本和抗 As 抗体的对照试验组作为阴性对照 4,即依次加入了抗纤维蛋白原抗体、封闭液、酶标和底物;

[0200] 以不加抗纤维蛋白原抗体作的对照试验组为空白对照 1,即加入了封闭液、待测血浆、抗 As 抗体、酶标和底物;

[0201] 以及以只加底物的对照试验组为空白对照 2,以只加 PBS 的对照试验组为空白对照 3。

[0202] 表 2 为不同抗纤维蛋白原抗体稀释倍比、血浆稀释倍比、抗 As 抗体稀释倍比的样

本 OD 值数据,

[0203] 表 2 不同抗纤维蛋白原抗体、抗 As 抗体以及血浆稀释倍比下的检测结果
[0204]

		抗纤维蛋白原抗体			
		1:1000	1:2000	1:4000	1:8000
抗 As 抗体 1:25000	血浆 1:10	0.645	0.756	0.612	0.483
	血浆 1:20	0.667	0.641	0.572	0.464
	血浆 1:40	0.574	0.542	0.469	0.39
抗 As 抗体 1:50000	血浆 1:10	0.585	0.647	0.476	0.385
	血浆 1:20	0.564	0.547	0.441	0.358
	血浆 1:40	0.538	0.474	0.362	0.346
抗 As 抗体 1:100000	血浆 1:10	0.384	0.511	0.432	0.361
	血浆 1:20	0.345	0.418	0.372	0.327
	血浆 1:40	0.341	0.235	0.317	0.221
抗 As 抗体 1:200000	血浆 1:10	0.317	0.261	0.201	0.127
	血浆 1:20	0.372	0.278	0.24	0.167
	血浆 1:40	0.24	0.213	0.237	0.153

[0205] 从表 2 可知,抗纤维蛋白原抗体的稀释倍比为 1:2000 时,样本 OD 值大于平行条件下的其它抗纤维蛋白原抗体的稀释倍比;该组样本中,血浆稀释倍比为 1:10 时,抗 As 抗体稀释倍比为 1:25000 时,OD 值最大,为 0.756。

[0206] 表 3 为抗纤维蛋白原抗体的稀释倍比为 1:2000、血浆稀释倍比为 1:10、抗 As 抗体稀释倍比为 1:25000 时相对应的阳性对照、阴性对照和空白对照的 OD 检测值,

[0207] 表 3 阳性对照、阴性对照及空白对照的检测结果
[0208]

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
0.812	0.034	0.078	0.082	0.067	0.034	0.024	0.017

[0209] 从表 3 可知,阴性对照组 OD 检测值小于 0.1,说明该优化条件下,本方法的系统误差性小,满足分析方法要求,所以选此值所对应的浓度作为最佳工作浓度。

[0210] 2. ELISA 洗脱液最佳工作浓度及洗脱时间确定

[0211] 为寻求最适宜的洗脱条件,通过酶联免疫法在抗 As 抗体与酶标抗体温育后,以不同浓度的洗脱液进行洗脱,再通过酶标仪检测 OD 值,具体步骤如下:

[0212] (1) 包被:将抗 As 抗体包被于固相载体上,用稀释缓冲液按 1:25000 的倍比稀释,加入 ELISA 板微孔中,4℃ 保存 16 小时;

[0213] (2) 封闭:移去稀释缓冲液,洗涤后,加封闭液,37℃放置 1 小时,移去封闭液,并洗涤;

[0214] (3) 加酶标抗体:移去封闭液,洗涤后,加入用稀释缓冲液稀释至抗体浓度为 2ng/mL 的 HRP 酶标抗体,37℃作用 2 小时,使其与抗 As 抗体反应;

[0215] (4) 洗脱:移去酶标抗体,用稀释缓冲液对洗脱液进行稀释,使洗脱液中木瓜蛋白酶酶的浓度:酶标抗体中抗体的浓度 = 1:80、1:40、1:20、1:10、1:5,分别放置于 37℃温度下作用 1h、2h、3h;移去洗脱液,洗涤,待洗涤完成后,加入底物,37℃避光作用 30 分钟,加终止液终止反应;

[0216] (5) 于 450nm 的检测波长下在酶标仪上分别读取每个微孔的 OD 值,具体结果参见表 4,

[0217] 表 4 不同洗脱液稀释倍数下的检测结果

[0218]

	洗脱液 1:5	洗脱液 1:10	洗脱液 1:20	洗脱液 1:40	洗脱液 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

[0219] 通过比较 OD 值,以判断 ELISA 孔壁上结合的抗 As 抗体 - 酶标抗体复合物洗脱程度,当 OD 值最低时,抗 As 抗体 - 酶标抗体复合物洗脱程度达到最大。如表 4 所示,当洗脱液中木瓜蛋白酶的浓度:酶标抗体中抗体的浓度 = 1:20 时,洗脱程度最大;而作用时间为 1h、2h、3h 时,各组 OD 值变化不大,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,所以本实验中洗脱液的作用时间为 1-3h 皆可,综上所述,我们选择洗脱液 1:20 作为最适工作浓度,1-3h 作为最适洗脱时间。

[0220] 应用实施例

[0221] 应用实施例 1

[0222] 采用酶联免疫法 (ELISA 法) 检测 100 份标本血浆中的砷 - 纤维蛋白原螯合物,即采用具体实施例方法一记载的方法检测,具体操作步骤如下:

[0223] 1) 包被:将抗纤维蛋白原抗体包被于固相载体上,用稀释缓冲液稀释至 2000 倍,加入 ELISA 板微孔中,37℃保存 1 小时后于冰箱中 4℃储存;

[0224] 2) 封闭:移去稀释缓冲液,洗涤,加封闭液,37℃放置 1 小时,移去封闭液,洗涤,ELISA 板 37℃放置 1 小时后于冰箱中 4℃储存;

[0225] 3) 加样:以标本血浆作为待测样本,以已知含量的砷 - 纤维蛋白原螯合物作标准品,用稀释缓冲液将待测样本和标准品均稀释至 10 倍,加至微孔中,37℃作用 1 小时;

[0226] 4) 加抗 As 抗体:移去样品,洗涤,加入用稀释缓冲液稀释至 25000 倍的抗 As 抗体,37℃作用 1 小时,使其与纤维蛋白原上的砷反应;

[0227] 5) 加酶标:移去抗 As 抗体,洗涤,加入抗体浓度为 2ng/mL 的酶标抗体,37℃作用 1 小时,使其与抗 As 抗体反应;

[0228] 6) 底物温育:移去酶标抗体,洗涤,加入底物,37℃避光作用 30min,加入终止液至

每一微孔；

[0229] 7) 检测：于 450nm 波长下在酶标仪上分别读取待测样本组和标准品的 OD 值，结果如表 5 所示。

[0230] 表 5 方法一对 100 份标本血浆的实测结果

[0231]

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
OD	0.352	0.397	0.353	0.634	0.524	0.532	0.733	0.376	0.724	0.588
编号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
OD	0.326	0.497	0.420	0.312	0.676	0.344	0.552	0.610	0.495	0.645
编号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
OD	0.552	0.565	0.645	0.311	0.597	0.434	0.324	0.432	0.770	0.614
编号	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
OD	0.760	0.708	0.319	0.545	0.660	0.344	0.545	0.682	0.631	0.395
编号	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
OD	0.710	0.700	0.440	0.564	0.382	0.454	0.501	0.701	0.651	0.424
编号	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
OD	0.529	0.748	0.301	0.426	0.769	0.684	0.698	0.611	0.524	0.635
编号	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
OD	0.432	0.481	0.352	0.428	0.742	0.655	0.658	0.563	0.663	0.482
编号	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
OD	0.724	0.394	0.663	0.523	0.536	0.736	0.556	0.565	0.516	0.659
编号	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
OD	0.353	0.400	0.362	0.413	0.621	0.324	0.542	0.592	0.742	0.630
编号	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
OD	0.756	0.313	0.560	0.665	0.447	0.679	0.467	0.584	0.764	0.405

[0232] 本应用实施例 1 中，步骤 7) 中，也可以不使用酶标仪检测，而是直接通过染色进行定性检测。

[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 份标本血浆中砷 - 纤维蛋白原螯合物，即采用具体实施例方法二记载的方法检测，具体操作步骤如下：

[0235] 1) 包被：将抗纤维蛋白原抗体包被于固相载体上，用稀释缓冲液稀释包被蛋白至 2000 倍，加入 ELISA 板微孔中，4℃ 过夜 18 小时；

[0236] 2) 封闭：移去稀释缓冲液，洗涤，加封闭液，37℃ 放置 1 小时，移去封闭液，洗涤，ELISA 板 4℃ 下保存；

[0237] 3) 加样：以标本血浆作待测样本，以已知含量的砷 - 纤维蛋白原螯合物作标准品，用稀释缓冲液将待测样本和标准品稀释至 10 倍，加至微孔中，37℃ 作用 1-2 小时；

[0238] 4) 洗脱 : 移去待测血浆样本, 洗涤, 加入用稀释缓冲液稀释至木瓜蛋白酶浓度为 100ng/mL 的洗脱液, 37℃作用 2 小时 ;

[0239] 5) 检测 : 从 ELISA 微孔中取样, 于原子吸收光谱仪检测整合于纤维蛋白原上的砷, 结果如表 6 所示。

[0240] 表 6 方法二对 100 份标本血浆的实测结果

[0241]

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
μg/L	0.201	0.111	0.380	0.233	0.112	0.383	0.369	0.275	0.291	0.273
编号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
μg/L	0.204	0.240	0.184	0.334	0.173	0.135	0.381	0.124	0.219	0.304
编号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
μg/L	0.226	0.308	0.288	0.389	0.125	0.285	0.137	0.359	0.243	0.229
编号	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
μg/L	0.323	0.340	0.300	0.121	0.344	0.253	0.252	0.395	0.396	0.330
编号	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
μg/L	0.367	0.125	0.139	0.112	0.246	0.352	0.235	0.116	0.302	0.265
编号	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
μg/L	0.312	0.394	0.207	0.391	0.200	0.306	0.161	0.217	0.315	0.227
编号	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
μg/L	0.145	0.385	0.388	0.195	0.365	0.324	0.127	0.168	0.207	0.295
编号	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
μg/L	0.187	0.123	0.134	0.278	0.293	0.235	0.364	0.370	0.313	0.315
编号	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
μg/L	0.159	0.399	0.177	0.105	0.271	0.299	0.299	0.155	0.329	0.241
编号	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
μg/L	0.334	0.171	0.381	0.274	0.394	0.251	0.148	0.101	0.279	0.137

[0242] 应用实施例 3 :

[0243] 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 份标本血浆中砷 - 纤维蛋白原螯合物, 即采用具体实施例方法三记载的方法检测, 具体操作步骤如下 :

[0244] 1) 包被 : 将抗纤维蛋白原抗体包被于固相载体上, 用稀释缓冲液稀释包被蛋白至 2000 倍, 加入 ELISA 板微孔中, 4℃保存 18 小时 ;

[0245] 2) 封闭 : 移去稀释缓冲液, 洗涤, 加封闭液, 37℃放置 1 小时, 移去封闭液, 洗涤, ELISA 板 4℃保存 ;

[0246] 3) 加样 : 以标本血浆作待测样本, 以已知含量的砷 - 纤维蛋白原螯合物作标准品, 用稀释缓冲液将待测样本和标准品稀释至 10 倍, 加至微孔中, 37℃作用 2 小时 ;

[0247] 4) 洗脱 : 移去待测样本和标准品, 洗涤, 加入用稀释缓冲液稀释至木瓜蛋白酶浓

度为 100ng/mL 的洗脱液,37℃洗脱 2 小时;

[0248] 5) 酸化:在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] 6) 检测:取样,于电感耦合等离子体质谱仪下检测整合于纤维蛋白原上的砷,结果如表 7 所示。

[0250] 表 7 方法三对 100 份标本血浆的实测结果

[0251]

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
μg/L	0.307	0.363	0.347	0.335	0.186	0.215	0.173	0.280	0.188	0.340
编号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
μg/L	0.337	0.367	0.288	0.382	0.253	0.333	0.328	0.196	0.361	0.316
编号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
μg/L	0.313	0.187	0.286	0.390	0.270	0.162	0.383	0.296	0.225	0.152
编号	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
μg/L	0.285	0.106	0.350	0.312	0.371	0.184	0.192	0.280	0.332	0.334
编号	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
μg/L	0.287	0.154	0.143	0.196	0.163	0.256	0.153	0.260	0.375	0.370
编号	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
μg/L	0.352	0.371	0.317	0.326	0.125	0.270	0.227	0.153	0.372	0.159
编号	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
μg/L	0.144	0.209	0.194	0.247	0.268	0.187	0.250	0.179	0.122	0.312
编号	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
μg/L	0.261	0.344	0.211	0.272	0.106	0.252	0.270	0.214	0.298	0.241
编号	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
μg/L	0.324	0.219	0.188	0.240	0.366	0.330	0.145	0.164	0.109	0.357
编号	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
μg/L	0.165	0.278	0.299	0.194	0.137	0.270	0.104	0.199	0.320	0.378

[0252] 上述实施方式仅为本发明的优选实施方式,不能以此来限定本发明保护的范围,本领域的技术人员在本发明的基础上所做的任何非实质性的变化及替换均属于本发明所要求保护的范畴。

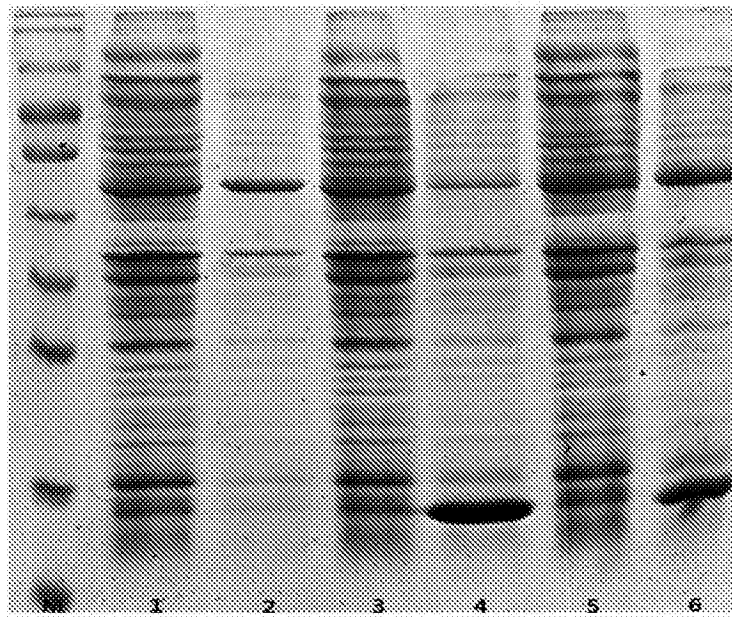


图 1

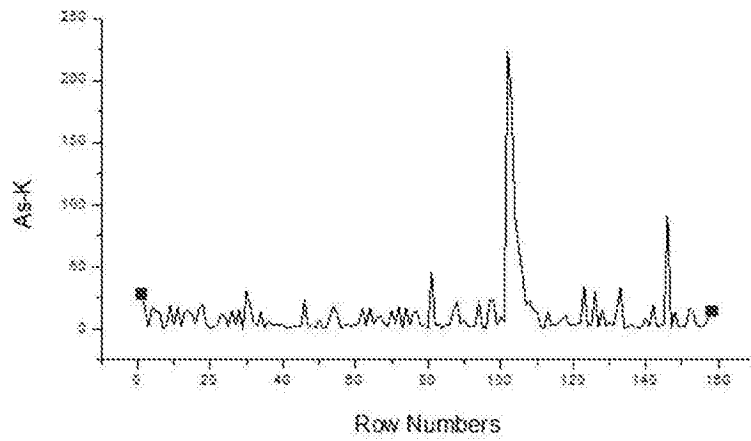


图 2

专利名称(译)	一种砷-纤维蛋白原螯合物及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN105021548A	公开(公告)日	2015-11-04
申请号	CN201510411289.0	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 G01N1/34 G01N27/447		
其他公开文献	CN105021548B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种砷-纤维蛋白原螯合物及其制备方法和应用，该砷-纤维蛋白原螯合物是砷离子与纤维蛋白原通过巯基或/和半胱氨酸残基螯合而成，可用于制备检测人体砷-纤维蛋白原螯合物的试剂。本发明首次证实了砷离子可直接作用于纤维蛋白原。本发明建立了砷-纤维蛋白原螯合物的定性定量检测方法，以检测一个地区人群体内纤维蛋白原的含量，从而间接反映一个地区砷污染程度以及对人群的健康影响。本发明建立的砷-纤维蛋白原螯合物定量检测方法准确度高重、复性好。

