



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105021549 B

(45)授权公告日 2018.02.16

(21)申请号 201510411356.9

(22)申请日 2015.07.14

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105021549 A

(43)申请公布日 2015.11.04

(73)专利权人 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)

(56)对比文件

WO 9422490 A1,1994.10.13,

WO 9422490 A1,1994.10.13,

CN 102115497 A,2011.07.06,

CN 102399289 A,2012.04.04,

CN 101045748 A,2007.10.03,

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),

审查员 高本州

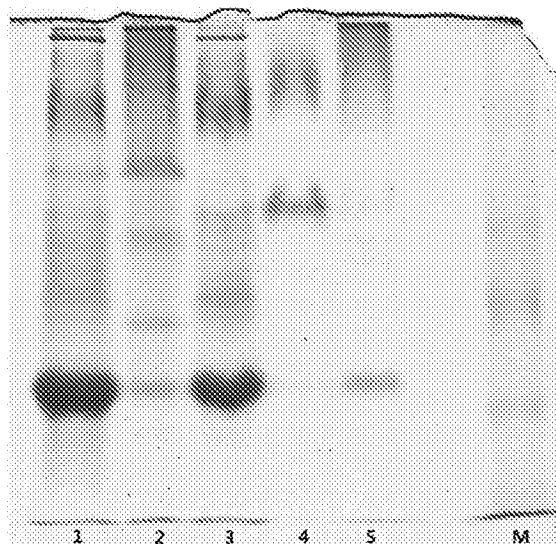
权利要求书2页 说明书18页 附图1页

(54)发明名称

一种镍-白蛋白螯合物及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明公开了一种镍-白蛋白螯合物及其制备方法和应用,该镍-白蛋白螯合物是镍离子与白蛋白通过巯基或/和半胱氨酸残基螯合而成。本发明建立了镍-白蛋白螯合物的定性定量检测方法,以便定量检测镍-白蛋白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-白蛋白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-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. 一种镍-白蛋白螯合物的制备方法,其特征在于,该镍-白蛋白螯合物由镍离子与白蛋白通过巯基或/和半胱氨酸残基螯合而成;具体包括以下步骤:

A) 镍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镍离子进行螯合反应,得到反应溶液;步骤A)具体包括如下:

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;

2) 取2.0mg 1TCBE溶于2ml DMSO中;

3) 取4.0mg 白蛋白溶于4.0ml 硼酸盐缓冲溶液中;

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1TCBE;

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80μl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;

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;

7) 将步骤6)透析后的液体于-20℃分装保存,得到反应溶液;

B) 纯化镍-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镍离子,即得镍-白蛋白螯合物;

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-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-白蛋白螯合物;

C)对镍-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)中提取纯化得到的镍-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。

2.一种如权利要求1所述镍-白蛋白螯合物在制备检测血样中镍-白蛋白螯合物的试剂或试剂盒中的应用。

3.一种至少包括如权利要求1所述的镍-白蛋白螯合物作为标准品的试剂盒。

4.根据权利要求3所述的试剂盒,其特征在于,还包括包被液,该包被液含有捕获白蛋白的物质或捕获镍的物质。

5.一种定量检测镍-白蛋白螯合物的方法,其特征在于,以已知含量的权利要求1所述的镍-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、提纯镍-白蛋白螯合物与酶联免疫结合法、提纯镍-白蛋白螯合物与原子吸收光谱结合法、提纯镍-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。

一种镍-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,涉及一种镍-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HN1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症反应的组分。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] 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。

[0007] 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。

[0008] 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

[0009] 针对镍污染严重的问题,本发明的目的在于提供一种镍-白蛋白螯合物及其制备方法,并建立镍-白蛋白螯合物的定性、定量检测方法,以便定量检测镍-白蛋白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-白蛋白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。

[0010] 本发明解决其技术问题所采用的技术方案是:提供一种镍-白蛋白螯合物,镍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镍-白蛋白螯合物的制备方法,包括以下步骤:

[0012] A) 镍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镍离子进行螯合反应,得到反应溶液;

[0013] B) 纯化镍-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镍离子,即得镍-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镍-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镍特异性结合的填料,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,即得镍-白蛋白螯合物。

[0026] 其中,上述镍-白蛋白螯合物的制备方法,还包括步骤C):对镍-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)中提取纯化得到的镍-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。

[0032] 本发明还提供一种如上述的镍-白蛋白螯合物在制备检测人体内镍-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镍-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镍的物质。

[0035] 本发明还提供一种定量检测镍-白蛋白螯合物的方法,以已知含量的上述的镍-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、提纯镍-白蛋白螯合物与酶联免疫结合法、提纯镍-白蛋白螯合物与原子吸收光谱结合法、提纯镍-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] 实施本发明的镍-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镍-白蛋白螯合物;

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

[0039] 3. 本发明建立了镍-白蛋白螯合物的定性定量检测方法,以便定量检测镍-白蛋白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-白蛋白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-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为本发明所述的镍-白蛋白螯合物的非变性电泳条带图;

[0041] 图2为本发明所述的镍-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] 捕获白蛋白的物质为Abcam公司生产的型号为ab106349的Anti-人类Serum Albumin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] 捕获镍的物质购买自广州然科生物科技有限公司的型号为RK14419的鼠抗Ni mAb；其中，本发明所述与镍特异性结合的物质、抗Ni抗体、抗镍抗体、镍抗均为捕获镍的物质；
- [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 8.0mg/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] 本发明提供一种镍-白蛋白螯合物，镍离子与白蛋白通过巯基或/和半胱氨酸残基螯合而成。
- [0061] 本发明还提供一种镍-白蛋白螯合物的制备方法，包括以下步骤：
- [0062] A) 镍与白蛋白的螯合反应：在人源的白蛋白中加入镍离子进行螯合反应，得到反应溶液；
- [0063] B) 纯化镍-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镍离子，即得镍-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镍-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;

[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,即得镍-白蛋白螯合物;

[0075] C) 对镍-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)中提取纯化得到的镍-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。

[0080] 本发明还提供一种至少包括如上述的镍-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镍的物质。

[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] 一种检测血样中镍-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。

[0084] 一种检测血样中镍-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] 一种检测血样中镍-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] 一种检测血样中镍-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。

[0087] 一种检测血样中镍-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] 一种检测血样中镍-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] 一种检测血样中镍-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。

[0090] 一种检测血样中镍-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、溶解胶床上含镍的蛋白条带所需液体、阳性对照、阴性对照等。

[0091] 一种检测血样中镍-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。

[0092] 上述几种试剂盒中,所述阳性对照为标准品,即螯合有重金属镍的白蛋白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。

[0093] 上述试剂盒用于检测螯合镍的白蛋白,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镍-白蛋白螯合物的方法,以已知含量的上述的镍-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、提纯镍-白蛋白螯合物与酶联免疫结合法、提纯镍-白蛋白螯合物与原子吸收光谱结合法、提纯镍-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,用检测镍-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,上述定量检测镍-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)检测镍-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;

[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,1000rpm离心5-8分钟,离心弃去沉淀,1000rpm离心5-8分钟,离心弃去沉淀,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、以已知含量的镍-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与白蛋白上的金属镍反应形成抗原抗体复合物;

[0102] 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;

[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螯合有重金属镍,而这部分白蛋白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白蛋白,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,即可证明检测出白蛋白上螯合的金属镍。

[0107] 方法二:酶联免疫与原子吸收光谱结合法(ELISA法+AAS法)检测镍-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,1000rpm离心5-8分钟,离心弃去沉淀,1000rpm离心5-8分钟,离心弃去沉淀,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、以已知含量的镍-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螯合于白蛋白上的镍,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螯合于白蛋白上的镍,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镍。

[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)检测镍-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,1000rpm离心5-8分钟,离心弃去沉淀,1000rpm离心5-8分钟,离心弃去沉淀,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、以已知含量的镍-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镍,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镍,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镍。

[0124] 方法四:提纯镍-白蛋白螯合物与酶联免疫结合法(提纯法+ELISA法)检测镍-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;

[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)中的溶液中取样,作待检样品;以已知含量的镍-白蛋白螯合物作标准品;用稀释缓冲液稀释待检样品稀释至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2μg/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:提纯镍-白蛋白螯合物与原子吸收光谱结合法(提纯法+AAS法)检测血样中镍-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镍,并绘制标准曲线,读出数值。

[0136] 方法六:提纯镍-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)检测镍-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镍,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)检测镍-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;

[0143] 3) 加样:取步骤1)得到的溶液8μL加入2μL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:在胶床上找出含有镍的蛋白条带,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白蛋白的含量,也可以利用ELISA或AAS或ICP-MS等原理检测出整合于白蛋白上的镍含量,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镍。

[0147] 实施例1:镍-白蛋白螯合物的制备方法,包括以下步骤:

[0148] A) 镍与白蛋白的螯合反应:在人源的白蛋白中加入镍离子进行螯合反应,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、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;

[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] 镍-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80μl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;

[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) 纯化镍-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镍离子,即得镍-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镍-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镍特异性结合的填料,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,即得镍-白蛋白螯合物;

[0175] C) 对镍-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8μL提取纯化得到的镍-白蛋白螯合物,加入2μL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。

[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	Ni (μg/L)
HSA	162.811
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.249
N.S	0.002
N.S	0

[0184] (2) 电泳结果:

[0185] 其中,图1为本发明所述的镍-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 1L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为本发明所述的镍-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镍-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、抗镍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1:10、1:20、1:40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HSA Ab、血清稀释浓度,不同浓度抗Ni Ab各加2孔,37℃作用1小时,使抗Ni Ab与HSA上的金属镍反应;

[0197] (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-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Ni 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Ni Ab+酶标+底物(即不添加待检样品)作为阴性对照1;抗HSA Ab+封闭+血浆+酶标+底物(即不加抗Ni Ab)作为阴性对照2;抗HSA Ab+封闭+酶标+底物(即不添加待检样品和抗Ni Ab)作为阴性对照3;抗HSA 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)

[0203]

		抗 HSA Ab (1:1000)	抗 HSA Ab (1:2000)	抗 HSA Ab (1:4000)	抗 HSA Ab (1:8000)
Ni 抗 1:5000	血浆 1:10	0.815	0.828	0.729	0.6
	血浆 1:20	0.836	0.853	0.763	0.628
	血浆 1:40	0.768	0.755	0.675	0.523
Ni 抗 1:10000	血浆 1:10	0.776	0.872	0.779	0.651
	血浆 1:20	0.844	0.875	0.859	0.712
	血浆 1:40	0.755	0.814	0.749	0.656
Ni 抗 1:20000	血浆 1:10	0.723	0.743	0.574	0.471
	血浆 1:20	0.725	0.776	0.61	0.533
	血浆 1:40	0.634	0.643	0.554	0.457
Ni 抗 1:40000	血浆 1:10	0.465	0.53	0.403	0.29
	血浆 1:20	0.587	0.604	0.521	0.426
	血浆 1:40	0.302	0.4	0.285	0.158

[0204] 表3:ELISA阳性对照及阴性对照ELISA检测结果

		阴性对照				空白对照			
[0205]	阳性对照	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	
[0206]	OD	0.866	0.078	0.048	0.066	0.095	0.074	0.036	0.017

[0207] 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、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。

[0208] 2. 定量检测镍-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

[0209] 步骤如下:(1) 包被:将抗NiAb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;

[0210] (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;

[0211] (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;

[0212] (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;

[0213] (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;

[0214] (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;

[0215] (7) 将终止液滴加至每一微孔;

[0216] (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。

[0217] 表4: ELISA洗脱液最佳工作浓度及洗脱时间确定

[0218]

	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80
[0219]					
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

[0220] 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。

[0221] 应用实施例1

[0222] 取采用ELISA法检测100份标本血浆中的镍-白蛋白螯合物, 按照以下步骤进行检测: 酶联免疫法 (ELISA法) 检测镍-白蛋白螯合物, 按照如下步骤检测:

[0223] 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℃水浴1小时, 储存冰箱;

[0224] 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, 1000rpm离心5-8分钟, 离心弃去沉淀, 1000rpm离心5-8分钟, 离心弃去沉淀, 1000rpm离心5-8分钟, 离心弃去沉淀;

[0225] 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;

[0226] 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-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;

[0227] 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10000倍,37℃作用1小时,使抗Ni Ab与白蛋白上的金属镍反应;

[0228] 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;

[0229] 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;

[0230] 8) 终止反应:将终止液滴加至每一微孔;

[0231] 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。

[0232] 表5:100份血样标本中镍-白蛋白螯合物的ELISA检测结果

[0233]

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
OD ₄₀₅	0.847	0.393	0.546	0.503	0.776	0.551	0.41	0.367	0.572	0.493
编号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
OD ₄₀₅	0.835	0.557	0.45	0.872	0.389	0.852	0.51	0.386	0.731	0.461
编号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
OD ₄₀₅	0.477	0.697	0.512	0.674	0.301	0.573	0.318	0.309	0.444	0.389
编号	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
OD ₄₀₅	0.522	0.688	0.532	0.309	0.337	0.632	0.871	0.506	0.649	0.447
编号	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
OD ₄₀₅	0.715	0.604	0.705	0.695	0.445	0.461	0.535	0.344	0.602	0.7
编号	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
OD ₄₀₅	0.719	0.303	0.658	0.462	0.534	0.472	0.637	0.579	0.587	0.367
编号	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
OD ₄₀₅	0.578	0.595	0.728	0.666	0.322	0.344	0.688	0.409	0.302	0.322
编号	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
OD ₄₀₅	0.745	0.836	0.692	0.721	0.867	0.869	0.463	0.332	0.303	0.868
编号	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
OD ₄₀₅	0.368	0.494	0.528	0.734	0.354	0.824	0.311	0.343	0.797	0.541
编号	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
OD ₄₀₅	0.709	0.419	0.307	0.733	0.54	0.573	0.567	0.797	0.387	0.624

[0234]

[0235] 应用实施例2

[0236] 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-白蛋白螯合物,按照如下步骤检测:

[0237] 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;

[0238] 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,1000rpm离心5-8分钟,离心弃去沉淀,1000rpm离心5-8分钟,离心弃去沉淀,1000rpm离心5-8分钟,离心弃去沉淀;

[0239] 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;

[0240] 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-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;

[0241] 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;

[0242] 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镍,检测值如表6所示。

[0243] 表6:100份血样标本中镍-白蛋白螯合物的AAS检测结果

[0244]

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
μg/L	15.908	14.624	10.959	9.825	16.839	10.365	12.124	10.253	13.278	16.776
编号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
μg/L	15.896	13.792	15.988	16.137	12.038	11.203	15.156	12.103	10.416	8.902
编号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30

[0245]

μg/L	11.14	11.315	16.216	12.765	8.118	9.543	11.065	14.912	8.3	16.341
编号	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
μg/L	16.602	8.928	12.023	15.832	16.116	14.406	9.539	7.706	16.94	14.811
编号	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
μg/L	11.908	7.077	16.703	15.842	14.465	7.027	8.01	7.376	14.366	8.098
编号	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
μg/L	12.324	15.055	16.811	13.174	15.737	7.47	7.864	7.594	15.806	16.654
编号	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
μg/L	13.122	12.152	14.928	9.894	7.024	16.235	16.949	14.827	8.459	16.16
编号	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
μg/L	8.051	13.576	13.061	12.883	13.443	15.692	15.085	13.539	11.97	8.432
编号	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
μg/L	8.992	8.677	11.189	10.101	11.218	9.957	8.62	14.524	12.542	13.384
编号	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
μg/L	8.315	7.27	15.977	8.257	7.849	7.605	15.431	11.753	16.576	7.919

[0246] 应用实施例3

[0247] 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-白蛋白螯合物含量,按照如下步骤检测:

[0248] 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;

[0249] 2) 取100份标准血样作为待检样品;

[0250] 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;

[0251] 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-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;

[0252] 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;

[0253] 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;

[0254] 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螯合于白蛋白的镍,检测值如表7所示。

[0255] 表7:100份血样标本中镍-白蛋白螯合物的ICP-MS检测结果

[0256]

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
μg/L	8.905	15.64	10.336	11.863	8.441	14.477	15.497	16.519	12.675	10.054
编号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
μg/L	8	7.858	8.524	12.183	11.551	16.907	15.719	16.843	14.828	13.496
编号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
μg/L	16.614	10.565	7.197	8.802	8.881	13.371	14.749	15.182	9.653	16.348
编号	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
μg/L	8.682	12.642	11.474	16.609	13.712	9.15	15.375	16.57	16.557	16.916
编号	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
μg/L	10.562	15.461	14.685	16.434	15.534	10.49	12.497	12.032	8.794	10.233
编号	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
μg/L	11.678	16.133	9.517	13.424	16.62	16.646	16.866	15.176	7.156	8.118
编号	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
μg/L	16.933	16.554	9.052	14.9	14.631	8.152	12.355	10.268	7.265	16.529
编号	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
μg/L	15.262	9.367	12.272	8.687	14.746	16.203	10.556	7.058	16.614	12.751
编号	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
μg/L	14.881	9.809	11.298	7.867	9.448	10.036	12.91	16.211	14.019	16.483

[0257]

编号	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
μg/L	14.534	14.512	10.997	11.911	16.054	15.318	8.757	7.522	13.667	16.393

[0258] 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。

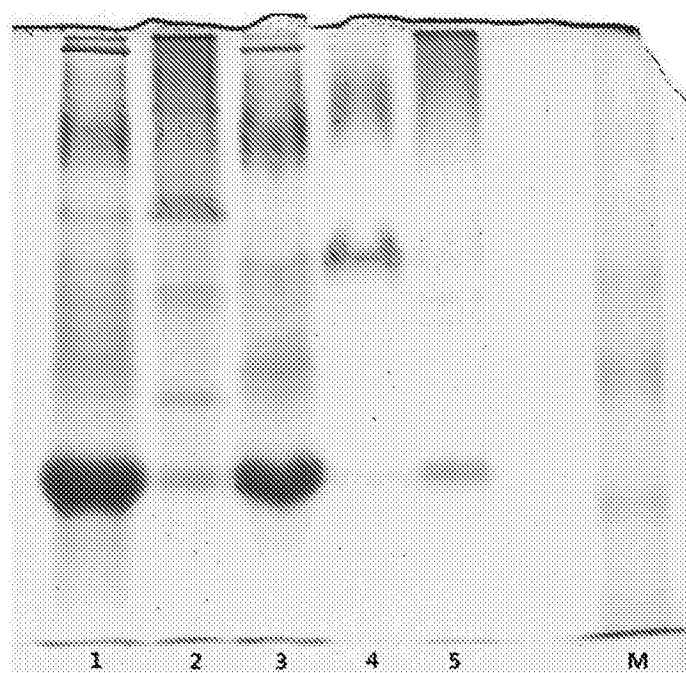


图1

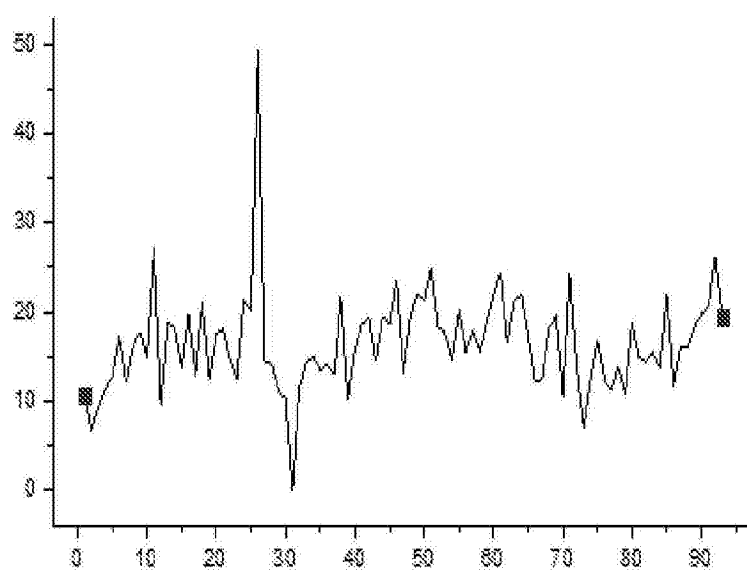


图2

专利名称(译)	一种镍-白蛋白螯合物及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN105021549B	公开(公告)日	2018-02-16
申请号	CN201510411356.9	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	CN105021549A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种镍-白蛋白螯合物及其制备方法和应用，该镍-白蛋白螯合物是镍离子与白蛋白通过巯基或/和半胱氨酸残基螯合而成。本发明建立了镍-白蛋白螯合物的定性定量检测方法，以便定量检测镍-白蛋白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-白蛋白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-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。

