



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105021551 A

(43) 申请公布日 2015. 11. 04

(21) 申请号 201510411419. 0

G01N 27/447(2006. 01)

(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)

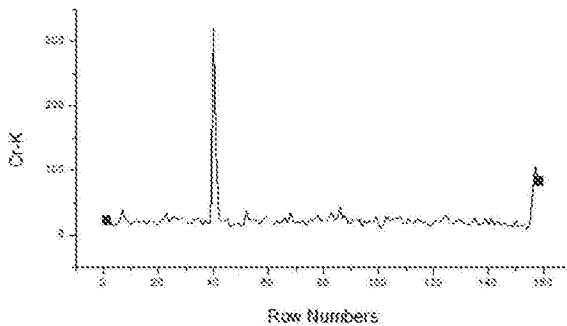
权利要求书2页 说明书19页 附图1页

(54) 发明名称

一种铬 - IgG 融合物及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明公开了一种铬 - IgG 融合物及其制备方法和应用, 该铬 - IgG 融合物是铬离子与 IgG 通过巯基或 / 和半胱氨酸残基结合而成。本发明建立了铬 - IgG 融合物的定性定量检测方法, 以便定量检测铬 - IgG 融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 - IgG 融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 - IgG 融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 -IgG 融合物，其特征在于，铬离子与 IgG 通过巯基或 / 和半胱氨酸残基融合而成。

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

A) 铬与 IgG 的融合反应：在人源的 IgG 或按照生物学方法重组的 IgG 中加入铬离子进行融合反应，得到反应溶液；

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

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 -IgG 融合物复溶；

(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 IgG 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，IgG 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；

(5) 收集：收集经过步骤 (4) 洗脱后的洗脱液，收集完毕后立即使蛋白复性；

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

(7) 平衡层析柱：采用新的层析柱，用稀释缓冲液冲洗管路，在该层析柱中装入能与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；

(10) 收集：收集经过步骤 (9) 洗脱后的洗脱液，收集完毕后立即使蛋白复性；

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

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

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 -IgG 融合物，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，将蛋白条带复溶，然后再采用 ICP-MS 法、AAS 法或 ELISA 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 -IgG 融合物在制备检测血样中铬 -IgG 融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 -IgG 融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, 其特征在于, 还包括包被液, 该包被液含有可捕获 IgG 的蛋白或可捕获金属铬的物质。
8. 一种定量检测铬 -IgG 融合物的方法, 其特征在于, 以已知含量的权利要求 1 所述的铬 -IgG 融合物作为标准品, 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 -IgG 融合物与酶联免疫结合法、提纯铬 -IgG 融合物与原子吸收光谱结合法、提纯铬 -IgG 融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 - IgG 融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 - IgG 融合物及其制备方法和应用。

### 背景技术

[0002] IgG 主要由脾、淋巴结中的浆细胞合成和分泌,以单体形式存在。在个体发育过程中机体合成 IgG 的年龄要晚于 IgM, 在出生后第 3 个月开始合成, 3~5 岁接近成年人水平。IgG 是血清中主要的抗体成分, 约占血清总 Ig 的 75%。IgG 是唯一能通过胎盘的 Ig, 在自然被动免疫中起重要作用。此外 IgG 还具有调理吞噬、ADCC 和结合 SPA 等作用。由于 IgG 上述特点, IgG 在机体免疫防护中起着主要的作用, 大多数抗菌、抗病毒、抗毒素抗体都属于 IgG 类抗体。应用对麻疹、甲型肝炎等有免疫力的产妇或正常人丙种或胎盘球蛋白可进行人工被动免疫, 能有效预防相应的传染性疾病。

[0003] 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 Hg、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。

[0004] 自然界中铬主要以三价和六价的形式存在, 而一般认为, 三价铬是人类所需的微量元素, 而六价铬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水源、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 (International Agency for Research on Cancer, IARC) 就将六价铬作为一种人类致癌物。关于六价铬的细胞毒性、基因毒性、致癌性已成为当前广泛研究的课题。

[0005] 关于铬中毒, 特别是慢性铬中毒的评价, 仅能通过检测血铬含量, 间接反映人体内的循环铬含量, 无法进一步评估铬对于机体功能的损伤程度, 而随着科学技术的飞速发展, 铬与人体的关系也日益紧密, 因而寻找一种可以从机体功能角度评价铬中毒, 特别是慢性铬中毒对于机体的损害程度的评价方式日益重要。

## 发明内容

[0006] 针对铬污染严重的问题,本发明的目的在于提供一种铬 -IgG 融合物及其制备方法,并建立铬 -IgG 融合物的定性、定量检测方法,以便定量检测铬 -IgG 融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 -IgG 融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。

[0007] 本发明解决其技术问题所采用的技术方案是:提供一种铬 -IgG 融合物,铬离子与 IgG 通过巯基或 / 和半胱氨酸残基融合而成。

[0008] 本发明还提供一种上述的铬 -IgG 融合物的制备方法,包括以下步骤:

[0009] A) 铬与 IgG 的融合反应:在人源的 IgG 中加入铬离子进行融合反应,得到反应溶液;

[0010] B) 纯化铬 -IgG 融合物的提取:采用免疫亲和层析法,去除反应溶液中未反应的 IgG 以及多余的铬离子,即得铬 -IgG 融合物。

[0011] 其中,体外合成法中所述步骤 B) 具体如下:

[0012] (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 -IgG 融合物复溶;

[0013] (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 IgG 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;

[0014] (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, IgG 与填料特异性结合;

[0015] (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;

[0016] (5) 收集:收集经过步骤 (4) 洗脱后的洗脱液,收集完毕后立即使蛋白复性;

[0017] (6) 透析:将步骤 (5) 中的收集的洗脱液,装透析袋,用 ddH<sub>2</sub>O 透析除盐,换水三次后,4℃透析过夜,收集样本;

[0018] (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;

[0019] (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;

[0020] (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;

[0021] (10) 收集:收集经过步骤 (9) 洗脱后的洗脱液,收集完毕后立即使蛋白复性;

[0022] (11) 透析:将步骤 (10) 中的收集的洗脱液,装透析袋,用 ddH<sub>2</sub>O 透析除盐,换水三次后,4℃透析过夜,收集样本,即得铬 -IgG 融合物。

[0023] 其中,上述铬 -IgG 融合物的制备方法,还包括步骤 C):对铬 -IgG 融合物的鉴定;

[0024] 其中,步骤 C) 中具体如下:

[0025] (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;

[0026] (2) 加样:取步骤 B) 中提取纯化得到的铬 -IgG 融合物,加入稀释缓冲液,并混匀,然后加样于样品槽中;

[0027] (3) 电泳:连接电泳板,进行电泳;

[0028] (4) 检测:在胶床上找出含铬的蛋白条带,将该蛋白条带取出,将蛋白条带复溶,

然后再采用 ICP-MS 法、AAS 法或 ELISA 法检测是否含有铬以及检测铬的含量。

[0029] 本发明还提供一种如上述的铬 -IgG 融合物在制备检测人体内铬 -IgG 融合物的试剂或试剂盒中的应用。

[0030] 本发明还提供一种至少包括如上述的铬 -IgG 融合物作为对照品的试剂盒。

[0031] 优选地，该试剂盒中还包括包被液，该包被液含有可捕获 IgG 的蛋白或捕获金属铬的物质。

[0032] 本发明还提供一种定量检测铬 -IgG 融合物的方法，以已知含量的上述的铬 -IgG 融合物作为对照品，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 -IgG 融合物与酶联免疫结合法、提纯铬 -IgG 融合物与原子吸收光谱结合法、提纯铬 -IgG 融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。

[0033] 实施本发明的铬 -IgG 融合物及其制备方法和应用，具有以下有益效果：

[0034] 1. 本发明首次体外合成铬 -IgG 融合物；

[0035] 2. 本发明首次提出铬 -IgG 融合物可用于制备检测血样中铬 -IgG 融合物的试剂或试剂盒中的应用。

[0036] 3. 本发明建立了铬 -IgG 融合物的定性定量检测方法，以便定量检测铬 -IgG 融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 -IgG 融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 -IgG 融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

[0037] 图 1 为本发明所述的铬 -IgG 融合物的非变性电泳条带图；

[0038] 图 2 为本发明所述的铬 -IgG 融合物的同步辐射 X 线电泳条带的荧光分析图；

[0039] 其中，图 1 中，M 为 Marker, 5 为铬 -IgG 融合物；图 2 中，横坐标为蛋白条带位置，纵坐标为该蛋白条带中铬金属能量。

## 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] 提取试剂为 PEG 溶液、硼酸盐缓冲液等（采用 PEG 法）；

[0043] 胶床介质为琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶中的一种；

[0044] 本发明中的所述能与 IgG 特异性结合的填料，为表面附有能捕获 IgG 的蛋白的硅胶或树脂；

[0045] 本发明中的能捕获 IgG 的蛋白（抗 IgG 抗体），包括但不限于兔 Anti- 人类 IgG H&L，其品牌为 Abcam、型号为 ab6715；

[0046] 本发明中的能与铬特异性结合的填料，为表面附有能捕获铬的物质的硅胶或树

脂；

[0047] 本发明中的能捕获铬的物质，包括但不限于鼠抗 Cr mAb，购买自广州然科公司、货号为 RK10641；

[0048] 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；

[0049] 底物为甲基联苯胺 (TMB) 溶液；

[0050] 洗涤液为含有  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2mg/ml、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2.90mg/ml、 $\text{NaCl}$  18.0mg/ml、 $\text{KCl}$  0.2mg/ml、0.5% Tween-20 的 pH 为 7.4 的 0.15M PBS 溶液；

[0051] 封闭液为 1% -5% 牛血清白蛋白或脱脂奶粉；

[0052] 稀释缓冲液为含 1.5mg/mL  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 、2.93mg/ml  $\text{NaHCO}_3$  的 pH 为 9.6 的 0.05M 磷酸盐缓冲液；

[0053] 酶标抗体为 HRP 酶标抗体；

[0054] 终止液为：将 21.7ml 的 2M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  定容至 200ml 的 ddH<sub>2</sub>O 中；

[0055] 洗脱液为含 1-2mg/ml 木瓜蛋白酶的 pH 为 8.0 的 0.1mol/L Tris-HCL 缓冲液；

[0056] 酸化剂为硝酸；

[0057] 上样缓冲液为含有 1M Tris-HCl (pH 6.8) 15.5mL、1% 溴酚蓝 2.5mL、ddH<sub>2</sub>O 7mL、甘氨酸 25mL 的 Sample buffer (5X)；

[0058] 电泳缓冲液为含 Tris 3mg/ml、甘氨酸 14.4mg/ml 的 pH 为 6.8 的 ddH<sub>2</sub>O 溶液。

[0059] 本发明还提供一种铬 -IgG 融合物的制备方法，包括以下步骤：

[0060] A) 铬与 IgG 的融合反应：在人源的 IgG 或按照生物学方法重组的 IgG 中加入铬离子进行融合反应，得到反应溶液；

[0061] B) 纯化铬 -IgG 融合物的提取：采用免疫亲和层析法，去除反应溶液中未反应的 IgG 以及多余的铬离子，即得铬 -IgG 融合物，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，使铬 -IgG 融合物复溶

[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 IgG 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；

[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，IgG 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；

[0066] (5) 收集：收集经过步骤 (4) 洗脱后的洗脱液，收集完毕后立即使蛋白复性；

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

[0068] (7) 平衡层析柱：采用新的层析柱，用稀释缓冲液冲洗管路，在该层析柱中装入能与铬特异性结合的填料，装柱后再用稀释缓冲液平衡层析柱；

[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；

[0071] (10) 收集：收集经过步骤 (9) 洗脱后的洗脱液，收集完毕后立即使蛋白复性；

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

[0073] C) 对铬 - IgG 融合物的鉴定, 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) 中提取纯化得到的铬 - IgG 融合物, 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 : 在胶床上找出含铬的蛋白条带, 将该蛋白条带取出, 将蛋白条带复溶, 然后再采用 ICP-MS 法、AAS 法或 ELISA 法检测是否含有铬以及检测铬的含量。

[0078] 本发明还提供一种至少包括如上述的铬 - IgG 融合物作为对照品的试剂盒。

[0079] 优选地, 该试剂盒中还包括包被液, 该包被液含有可捕获 IgG 的蛋白或可捕获金属铬的物质。

[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] 一种检测血样中铬 - IgG 融合物的试剂盒, 包括 : 含有可捕获 IgG 的蛋白的包被液、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、上样缓冲液、阳性对照、阴性对照等。

[0082] 一种检测血样中铬 - IgG 融合物的试剂盒, 包括 : 含有可捕获 IgG 的蛋白的包被液、封闭液、洗涤液、洗脱液、上样缓冲液、阳性对照、阴性对照等。

[0083] 一种检测血样中铬 - IgG 融合物的试剂盒, 包括 : 含有可捕获 IgG 的蛋白的包被液、封闭液、洗涤液、洗脱液、上样缓冲液、酸化剂、过氧化氢、标准品、阴性对照等。

[0084] 一种检测血样中铬 - IgG 融合物的试剂盒, 包括 : 作为提纯全血中 IgG 所需提取试剂、复溶液、含有可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、上样缓冲液、阳性对照、阴性对照等。

[0085] 一种检测血样中铬 - IgG 融合物的试剂盒, 包括 : 作为提纯全血中 IgG 所需提取试剂、复溶液、上样缓冲液、阳性对照、阴性对照等。

[0086] 一种检测血样中铬 - IgG 融合物的试剂盒, 包括 : 作为提纯全血中 IgG 所需提取试剂、上样缓冲液、复溶液、酸化剂、过氧化氢、阳性对照、阴性对照等。

[0087] 一种检测血样中铬 - IgG 融合物的试剂盒, 包括 : 含有可捕获 IgG 的蛋白的包被液、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、含有可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。

[0088] 一种检测血样中铬 - IgG 融合物的试剂盒, 包括 : 作为提纯全血中 IgG 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。

[0089] 一种检测血样中铬 - IgG 融合物的试剂盒, 包括 : 作为提纯全血中 IgG 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。

[0090] 上述几种试剂盒中, 所述阳性对照为标准品, 即融合有重金属铬的 IgG 融合物或融合有重金属铬的 BSA 融合物; 所述阴性对照为稀释缓冲液。

[0091] 上述试剂盒用于检测融合铬的 IgG, 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铬 -IgG 融合物的方法,以已知含量的上述的铬 -IgG 融合物作为对照品,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 -IgG 融合物与酶联免疫结合法、提纯铬 -IgG 融合物与原子吸收光谱结合法、提纯铬 -IgG 融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,用检测铬融合型免疫复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,上述定量检测铬 -IgG 融合物的方法中采用的试剂如下:

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

[0095] 1) 将能够捕获 IgG 的物质,如人 IgG 抗体包被于固相载体上:用稀释缓冲液稀释抗 IgG Ab 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;

[0096] 2) 从循环系统取全血,作待检样品,1000rmp 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、以已知含量的铬 -IgG 融合物作标准品;用稀释缓冲液稀释待检样品稀释至相应倍数,即稀释 10-40 倍,加入微孔中,37℃作用 1-2 小时;

[0099] 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与可以捕获铬的物质或能与铬反应形成抗原抗体复合物的抗 cr Ab,37℃作用 1-2 小时,使抗 cr Ab 与 IgG 上的金属铬反应;

[0100] 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 2 μg/ml,37℃作用 1-2 小时,使其与酶标抗体反应;

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

[0102] 8) 终止反应:滴加终止液至每一微孔;

[0103] 9) 取波长 405nm,加完终止液后,将 ELISA 板置于酶标仪上分别读取待检样品组和标准品的 OD 值,通过标准品,求得待检样品的含量(也可不使用酶标仪,直接通过染色情况进行定性检测)。

[0104] 该方法利用 ELISA 原理,可以将全血中的特异性 IgG 提取出来,提取出来的 IgG 上部分结合有重金属铬,而这部分 IgG 上的铬可以被抗铬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,而不含有结合金属铬的 IgG,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 IgG 上结合的金属铬。

[0105] 方法二:酶联免疫与原子吸收光谱结合法(ELISA 法+AAS 法)检测铬 -IgG 融合物

按照如下步骤检测：

[0106] 1) 将能够捕获 IgG 的物质,如人 IgG 抗体包被于固相载体上:用稀释缓冲液稀释抗 IgG Ab 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;

[0107] 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;

[0108] 3) 封闭:移去包被液,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、以已知含量的铬-IgG 融合物作标准品;用稀释缓冲液稀释待检样品稀释至相应倍数,即稀释 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,用洗脱液洗脱 1-3 小时。

[0111] 6) 检测:从 ELISA 微孔中取样,于原子吸收光谱仪检测融合于 IgG 上的铬,并绘制标准曲线,读出相应数值;

[0112] 该实施例利用 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融合于 IgG 上的铬,由于溶液中仅含有 IgG,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 IgG 上融合的金属铬。

[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) 检测铬-IgG 融合物按照如下步骤检测:

[0114] 1) 将能够捕获 IgG 的物质,如人 IgG 抗体包被于固相载体上:用稀释缓冲液稀释抗 IgG Ab 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;

[0115] 2) 从循环系统取全血,作待检样品,1000rmp 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、以已知含量的铬-IgG 融合物作标准品;用稀释缓冲液稀释待检样品稀释至相应倍数,即稀释 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,用洗脱液洗脱 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;

[0120] 7) 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样,于电感耦合等离子体质谱仪下检测融合于 IgG 的铬,并绘制标准曲线,读出相应数值。

[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融合于 IgG 上的铬,由于溶液中仅含有 IgG,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 IgG 上螯合的金属铬。

[0122] 方法四：提纯铬 -IgG 融合物与酶联免疫结合法（提纯法 +ELISA 法）检测铬 -IgG 融合物，按照如下步骤检测：

[0123] 1) 从全血中提取 IgG :采用聚乙二醇 PEG 沉淀法、超速离心、分子超滤、凝胶过滤等方法采用全血提取法将血液的提纯出来的 IgG 复溶，得到 IgG 的复溶液；

[0124] 2) 将抗 cr Ab 包被于固相载体上：用稀释缓冲液稀释抗 cr Ab 至 50000-400000 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：从提取的 IgG 的复溶液中取样，作待检样品；以已知含量的铬 -IgG 融合物作标准品；用稀释缓冲液稀释相应倍数，即稀释 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 IgG 的复溶液，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，使稀释的酶标抗体的浓度为 2 μ g/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：滴加终止液至每一微孔；

[0130] 8) 取波长 405nm，加完终止液后，将 ELISA 板置于酶标仪上分别读取待检样品组和标准品的 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，直接通过染色情况进行定性检测）。

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

[0132] 1) 从全血中提取 IgG :采用聚乙二醇 PEG 沉淀法、超速离心、分子超滤、凝胶过滤等方法从全血提取法将血液的提纯出来的 IgG 复溶，得到 IgG 的复溶液；

[0133] 2) 检测：从步骤 1) 中的复溶液中取样，于原子吸收光谱仪检测螯合于 IgG 上的铬，并绘制标准曲线，读出相应数值。

[0134] 方法六：提纯铬 -IgG 融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 -IgG 融合物，按照如下步骤检测：

[0135] 1) 从全血中提取 IgG :采用聚乙二醇 PEG 沉淀法、超速离心、分子超滤、凝胶过滤等方法从全血提取法将血液的提纯出来的 IgG 复溶，得到 IgG 的复溶液；

[0136] 2) 酸化：从步骤 1) 中的复溶液中取样，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；

[0137] 3) 检测：加入过氧化氢，并且加热赶酸，并从溶液中取样，于电感耦合等离子体质谱仪下检测螯合于 IgG 上的铬，并绘制标准曲线，读出相应数值。

[0138] 方法七：电泳与酶联免疫法（电泳法 -ELISA 法）检测铬 -IgG 融合物，按照如下步骤检测：

[0139] 1) 从全血中提取 IgG :采用聚乙二醇 PEG 沉淀法、超速离心、分子超滤、凝胶过滤等方法从全血提取法将血液的提纯出来的 IgG 复溶,得到 IgG 的复溶液;

[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相应胶床;

[0141] 3) 加样 :取步骤 1) 中的复溶液 8 μL 加入 2 μL 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 :在胶床上找出含有铬的蛋白条带,将该条带取出,将该蛋白条带溶于液体之中,然后再利用 ELISA 原理检测溶于液体中的铬含量。此外,还可以利用此方法检测螯合铬的 IgG 的等电点、分子量及含量等。

[0144] 方法八:电泳与原子吸收光谱法(电泳法-AAS 法)检测铬 -IgG 融合物,按照如下步骤检测:

[0145] 1) 从全血中提取 IgG :采用聚乙二醇 PEG 沉淀法、超速离心、分子超滤、凝胶过滤等方法从全血提取法将血液的提纯出来的 IgG 复溶,得到 IgG 的复溶液;

[0146] 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,按照相应要求制备好相应胶床;

[0147] 3) 加样 :从步骤 1) 中的复溶液中取样,加入上样缓冲液,并混匀,然后加样于样品槽中;

[0148] 4) 电泳 :连接电泳板,进行电泳分离;

[0149] 5) 检测 :在胶床上找出含有铬的蛋白条带,将该条带取出,将该蛋白条带溶于液体之中,然后再利用 AAS 原理检测溶于液体中的铬含量。此外,还可以利用此方法检测螯合铬的 IgG 的等电点、分子量及含量等。

[0150] 方法九:电感耦合等离子体质谱结合法(电泳法-ICP-MS 法)检测铬 -IgG 融合物,按照如下步骤检测:

[0151] 1) 从全血中提取 IgG :采用聚乙二醇 PEG 沉淀法、超速离心、分子超滤、凝胶过滤等方法从全血提取法将血液的提纯出来的 IgG 复溶,得到 IgG 的复溶液;

[0152] 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,制备好胶床;

[0153] 3) 加样 :从步骤 1) 中的复溶液中取样,加入上样缓冲液,并混匀,然后加样于样品槽中;

[0154] 4) 电泳 :连接电泳板,进行电泳分离;

[0155] 5) 检测 :在胶床上找出含有铬的蛋白条带,将该条带取出,将该蛋白条带复溶,然后再利用 ICP-MS 原理检测溶于液体中的铬含量。此外,还可以利用此方法检测螯合铬的 IgG 的等电点、分子量及含量等。

[0156] 方法七至九中的 IgG 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 IgG 复溶,得到 IgG 的复溶液,取一定量的 IgG,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,寻找出富含铬的相应条带,将凝胶中的蛋白质复溶,即可以在特定波长下检测相关 IgG 的含量,也可以利用

ELISA、AAS、ICP-MS 等原理检测出螯合于 IgG 上的铬含量,由于溶液中仅含有 IgG,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 IgG 上螯合的金属铬。

[0157] 实施例 1: 铬 -IgG 融合物的制备方法,包括以下步骤:

[0158] A) 铬与 IgG 的融合反应:在人源的 IgG 中加入铬离子进行融合反应,得到反应溶液;

[0159] 试剂配制:

[0160] 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。

[0161] 2) IgG 溶液:称取 4.0mg IgG 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;

[0162] 3) 5mmol/L EDTA+200mmol/L NaHCO<sub>3</sub> 溶液:称取 EDTA · 2H<sub>2</sub>O 1.86g、NaHCO<sub>3</sub> 16.8g 溶于 900mL 超纯水中,用 1.0M NaOH 调整 pH 至 8.0 定容至 1000mL,高压灭菌,室温保存;

[0163] 4) ITCBE(购买自日本同仁化学研究所,货号 M030)

[0164] 5) 透析袋(截留分子量 14000)(Bioshop Inc)

[0165] 制备步骤具体为:

[0166] 1) 透析袋的处理:将透析袋放入 500mL(根据烧杯体积可变换用量)体积的 5mmol/L EDTA+200mmol/L NaHCO<sub>3</sub> 溶液中,煮沸 10min;倾弃 EDTA/NaHCO<sub>3</sub> 液,用超纯水轻轻漂洗,再用 500mL 5mmol/L EDTA 煮沸 10min;弃掉煮沸液,彻底用超纯水清洗,加入大量的超纯水浸泡透析袋 4℃过夜。使用时,戴上手套,取出透析袋,用大量的超纯水彻底冲洗其内外表面;

[0167] 2) 取 2.0mg ITCBE 溶于 2mL DMSO 中;

[0168] 3) 取 4.0mg IgG 溶于 4.0mL 硼酸盐缓冲溶液中 (0.01M pH9.0) 中;

[0169] 4) 缓慢将步骤 2 制备的液体加入 IgG 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 IgG 结合的 ITCBE;

[0170] 5) 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 铬离子溶液,边滴加边振荡,以免铬离子使蛋白变性沉淀;

[0171] 6) 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;

[0172] 7) 将透析后的液体于 -20℃ 分装保存。

[0173] B) 纯化铬 -IgG 融合物的提取:采用免疫亲和层析法,去除反应溶液中未反应的 IgG 以及多余的铬离子,即得铬 -IgG 融合物,具体步骤如下:

[0174] (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 -IgG 融合物复溶;

[0175] (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 IgG 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;

[0176] (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, IgG 与填料特异性结合;

[0177] (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；

[0178] (5) 收集：收集经过步骤(4)洗脱后的洗脱液，收集完毕后立即使蛋白复性；

[0179] (6) 透析：将步骤(5)中的收集的洗脱液，装透析袋，用 ddH<sub>2</sub>O 透析除盐，换水三次后，4℃透析过夜，收集样本；

[0180] (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；

[0181] (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；

[0182] (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；

[0183] (10) 收集：收集经过步骤(9)洗脱后的洗脱液，收集完毕后立即使蛋白复性；

[0184] (11) 透析：将步骤(10)中的收集的洗脱液，装透析袋，用 ddH<sub>2</sub>O 透析除盐，换水三次后，4℃透析过夜，收集样本，即得铬-IgG 融合物；

[0185] C) 对铬-IgG 融合物的鉴定，具体步骤如下：

[0186] (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；

[0187] (2) 加样：取步骤B)中提取 8 μL 纯化得到的铬-IgG 融合物，加入 2 μL 稀释缓冲液，并混匀，然后加样于样品槽中；

[0188] (3) 电泳：连接电泳板，进行电泳；电泳过程中，电流为 22mA 恒流，环境温度为 4 度；至溴酚蓝移至胶底部时停止电泳；

[0189] (4) 检测：在胶床上找出含铬的蛋白条带，将该蛋白条带取出，将蛋白条带复溶，然后再采用 AAS 法检测是否含有铬以及检测铬的含量。

[0190] D) 检测结果

[0191] (1) 电泳结果：

[0192] 其中，图 1 为本发明所述的铬-IgG 融合物的非变性电泳条带图。

[0193] (2) 同步辐射 X 荧光分析：

[0194] 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。

[0195] 图 2 为本发明所述的铬-IgG 融合物的同步辐射 X 线电泳条带的荧光分析图，图中横坐标为蛋白条带位置，纵坐标为该蛋白条带中铬金属能量(含量)值。

[0196] (3) 采用石墨炉原子吸收光谱法(AAS)初步测定本实施例得到的铬-IgG 融合物中的铬含量，其含量为 192.021 μg/L。

[0197] 本发明一种定量检测铬 -IgG 融合物的方法的检测条件的确定：

[0198] 1. 补体蛋白最佳工作浓度以及血浆的最佳稀释倍数的确定

[0199] 步骤如下：

[0200] (1) 将 IgG Ab 用稀释缓冲液按照以下质量体积比(稀释度)(1:500000、1:1000000、1:2000000、1:4000000)进行稀释,加入 ELISA 板微孔中,将抗 IgG Ab 包被于固相载体上,每个浓度包被三排,4℃过夜 18 小时;

[0201] (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;

[0202] (3) 待检样品与稀释缓冲液按照以下质量体积比(稀释度)(1:10、1:20、1:40)进行稀释,加入微孔中,按照上述包被的抗 IgG Ab 浓度,同一个浓度的抗 IgG Ab 的分别加入不同稀释度血浆,37℃作用 1 小时;

[0203] (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 与稀释缓冲液按照以下质量体积比(稀释度)(即 1:5000、1:10000、1:20000、1:40000)进行稀释,按照每一个相同抗 IgG Ab、血清稀释浓度,不同浓度抗 cr Ab 各加 2 孔,37℃作用 1 小时,使抗 cr Ab 与 IgG 上的金属铬反应;

[0204] (5) 酶标抗体选择最适工作浓度,即 2ng/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 -IgG 融合物反应;

[0205] (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;

[0206] (7) 以与加底物液相同的速度和顺序滴加终止液至每一微孔;

[0207] (8) 取波长 405nm,加完终止液后,将 ELISA 板置于酶标仪上分别读取各孔 OD 值。根据各孔 OD 值数值,选择抗 IgG Ab、抗 cr-Ab 的最佳工作浓度以及血浆的最佳稀释倍数。

[0208] 试验中同时以所制对照品作为阳性对照,选择 IgG 抗体 + 封闭 +cr 抗 + 酶标 + 底物(即不加检测样本)作为阴性对照 1、IgG 抗体 + 封闭 + 血浆 + 酶标 + 底物(即不加 cr 抗)作为阴性对照 2、IgG 抗体 + 封闭 + 酶标 + 底物(即不加检测样本和 cr 抗)作为阴性对照 3、IgG 抗体 + 封闭 + 血浆 +cr 抗 + 底物(即不加酶标)作为阴性对照 4,封闭 + 血浆 +cr 抗 + 酶标 + 底物(即不加 IgG 抗体)作为空白对照 1,只加底物及 PBS 作为空白对照 2;检测结果见表 1-2。

[0209] 表 1 :抗 IgG Ab 和 cr 抗体最佳工作浓度以及血浆稀释倍数的确定

[0210]

		抗 IgG Ab 浓 度 梯 度 (1:500000)	抗 IgG Ab 浓 度 梯 度 (1:1000000)	抗 IgG Ab 浓 度 梯 度 (1:2000000)	抗 IgG Ab 浓 度 梯 度 (1:4000000)
Cr 抗 1:5000	血浆 1:10	0.667	0.644	0.562	0.375
	血浆 1:20	0.69	0.702	0.563	0.447
	血浆 1:40	0.571	0.597	0.487	0.354
Cr 抗 1:10000	血浆 1:10	0.558	0.673	0.483	0.34
	血浆 1:20	0.576	0.661	0.489	0.371
	血浆 1:40	0.54	0.637	0.371	0.23
Cr 抗 1:20000	血浆 1:10	0.48	0.509	0.467	0.278
	血浆 1:20	0.55	0.557	0.489	0.321
	血浆 1:40	0.355	0.407	0.321	0.251
Cr 抗 1:40000	血浆 1:10	0.336	0.402	0.347	0.215
	血浆 1:20	0.426	0.474	0.361	0.235
	血浆 1:40	0.292	0.397	0.256	0.135

[0211] 表 2 :ELISA 阳性对照及阴性对照 ELISA 检测结果

[0212]

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 405	0.875	0.100	0.094	0.055	0.045	0.014	0.020

[0213] 由表 1-2 数据显示,我们可以看出当人 IgG 抗体的稀释度为 1:1000000、全血稀释度为 1:20、cr 抗稀释度为 1:5000 时,OD 值最大,虽然 OD 值小于 0.8,但是其所对应的阴性对照组 OD 值全部小于 0.1,并且其所对应的阳性对照组,OD 值大于 0.8,所以选此值所对应的浓度作为最佳工作浓度(即人 IgG 抗体浓度为 1:1000000,全血稀释度为 1:20, cr 抗稀释浓度为 1:5000)。

[0214] 2. ELISA 洗脱液最佳工作浓度及时间确定

[0215] 步骤如下:(1) 将人 IgG 抗体用稀释缓冲液稀释至 1000000 倍(质量体积比),加入 ELISA 板微孔中,37°C 水浴 3 小时,储存冰箱;

[0216] (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;

[0217] (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HRP酶标抗体,37℃作用2小时,使其与人IgG抗体反应;

[0218] (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1~2mg/ml,再加入1mmol/L二硫苏糖醇(DTT)37℃孵育30min;

[0219] (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浓度:酶标抗体浓度比=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,分别放置于37℃温度下洗脱1h、2h、3h;

[0220] (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;

[0221] (7) 以与加底物液相同的速度和顺序滴加终止液至每一微孔;

[0222] (8) 取405nm波长,加完终止液后,将ELISA板置于酶标仪上分别读取每组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3。

[0223] 表3:ELISA洗脱液最佳工作浓度及洗脱时间确定

[0224]

	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

[0225] 从表4中我们可以发现,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,,即木瓜蛋白酶的浓度100ng/ml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孔壁上结合的人IgG抗体-酶标复合物洗脱程度达到最大,因而OD值最低);而作用时间不管是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,所以本实验中洗脱液的作用时间为1~3h皆可。

[0226] 应用实施例1

[0227] 取采用ELISA法检测100份标本血浆中的铬-IgG复合物,按照以下步骤进行检测:酶联免疫法(ELISA法)检测铬-IgG复合物,按照如下步骤检测:

[0228] 1) 将抗IgG Ab包被于固相载体上:用稀释缓冲液稀释抗IgG Ab至1000000倍,加入ELISA板微孔中,37℃水浴1小时,储存冰箱;

[0229] 2) 从循环系统取全血,作待检样品,再加入甲苯,溶解细胞膜;

[0230] 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;

[0231] 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-IgG复合物作标准品;用稀释缓冲液稀释待检样品稀释至相应倍数,即稀释20倍,加入微孔中,37℃作用1小时;

[0232] 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 5000 倍, 37℃作用 1 小时, 使抗 cr Ab 与 IgG 上的金属铬反应;

[0233] 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;

[0234] 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;

[0235] 8) 终止反应: 滴加终止液至每一微孔;

[0236] 9) 取波长 405nm, 加完终止液后, 将 ELISA 板置于酶标仪上分别读取待检样品和标准品的 OD 值(也可不使用酶标仪, 直接通过染色情况进行定性检测), 检测结果如表 4 所示。

[0237] 表 4 :100 份血样标本中铬 -IgG 融合物的 ELISA 检测结果

[0238]

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
OD <sub>405</sub>	0.546	0.577	0.321	0.475	0.61	0.301	0.363	0.354	0.544	0.358
编号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
OD <sub>405</sub>	0.513	0.593	0.593	0.38	0.698	0.682	0.458	0.363	0.68	0.561
编号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
OD <sub>405</sub>	0.33	0.651	0.452	0.368	0.501	0.576	0.694	0.664	0.654	0.369
编号	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
OD <sub>405</sub>	0.347	0.31	0.579	0.453	0.308	0.665	0.663	0.422	0.615	0.528
编号	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
OD <sub>405</sub>	0.53	0.699	0.534	0.352	0.569	0.421	0.424	0.502	0.421	0.457
编号	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
OD <sub>405</sub>	0.436	0.506	0.572	0.407	0.555	0.66	0.352	0.474	0.633	0.354
编号	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70

[0239]

OD <sub>405</sub>	0.697	0.691	0.67	0.56	0.545	0.557	0.407	0.424	0.376	0.516
编号	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80

OD <sub>405</sub>	0.342	0.35	0.589	0.608	0.441	0.36	0.407	0.337	0.526	0.351
编号	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
OD <sub>405</sub>	0.562	0.524	0.505	0.534	0.551	0.362	0.621	0.569	0.595	0.582
编号	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
OD <sub>405</sub>	0.304	0.632	0.419	0.684	0.518	0.665	0.536	0.632	0.585	0.595

[0240] 应用实施例 2

[0241] 采用酶联免疫与原子吸收光谱结合法 (ELISA 法 +AAS 法 ) 检测 100 分标本血样中的铬 -IgG 融合物, 按照如下步骤检测 :

[0242] 1) 将能够捕获 IgG 的物质, 如抗 IgG 抗体 ( 抗 IgG Ab) 包被于固相载体上 : 用稀释缓冲液稀释抗 IgG Ab 至 1000000 倍, 加入 ELISA 板微孔中, 4℃过夜 18 小时 ;

[0243] 2) 从循环系统取全血, 作待检样品, 再加入甲苯, 溶解细胞膜 ;

[0244] 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 ;

[0245] 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 -IgG 融合物作标准品 ; 用稀释缓冲液稀释待检样品稀释至 20 倍, 加入微孔中, 37℃作用 1 小时 ;

[0246] 5) 洗脱 : 移去待检样品, 并用洗涤液进行洗涤, 待洗涤完成后, 加入以木瓜蛋白酶的浓度为 100ng/ml 的洗脱液, 洗脱 1-3 小时 ;

[0247] 6) 检测 : 从 ELISA 微孔中取样, 于原子吸收光谱仪检测融合于 IgG 上的铬, 检测值如表 5 所示。

[0248] 表 5 :100 份血样标本中铬 -IgG 融合物的 AAS 检测结果

[0249]

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
μg/L	3.201	4.725	4.15	3.251	3.378	5.236	4.786	15.61 5	4.316	4.51
编号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
μg/L	3.176	5.762	4.653	5.785	5.952	5.216	4.029	15.88 5	3.178	3.728
编号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
μg/L	4.572	5.805	4.503	5.331	5.12	3.971	4.665	14.00 5	3.657	5.164
编号	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
μg/L	3.964	5.203	3.241	5.077	4.698	3.256	13.75 1	4.103	3.341	5.873
编号	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
μg/L	5.187	4.465	3.494	3.905	15.76 9	5.856	4.17	4.04	3.617	3.456
编号	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
μg/L	4.034	3.813	5.3	5.205	14.94 7	3.437	4.549	3.755	4.195	3.711
编号	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
μg/L	4.852	4.679	3.805	14.77 8	5.849	4.197	5.958	3.609	3.182	5.477
编号	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
μg/L	3.244	5.354	14.39 6	3.742	5.979	5.794	3.765	5.85	5.628	3.993
编号	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
μg/L	4.707	14.68 8	4.667	4.527	5.805	4.11	5.855	5.307	5.797	3.094
编号	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
μg/L	13.73	4.62	4.761	5.285	5.421	4.058	4.878	5.126	14.04	3.947

[0250]

	7										
--	---	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

[0251] 应用实施例 3

[0252] 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 分标本血样中的铬 -IgG 融合物含量,按照如下步骤检测 :

[0253] 1) 将能够捕获 IgG 的物质,如抗 IgG 抗体 (抗 IgG Ab) 包被于固相载体上 :用稀释缓冲液稀释抗 IgG Ab 至 1000000 倍,加入 ELISA 板微孔中,4℃过夜 18 小时 ;

[0254] 2) 取 100 份标准血样作为待检样品,再加入甲苯,溶解细胞膜 ;

[0255] 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 ;

[0256] 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 -IgG 融合物作标准品 ;用稀释缓冲液稀释待检样品稀释至 20 倍,加入微孔中,37℃作用 1 小时 ;

[0257] 5) 洗脱 :移去待检样品,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入以木瓜蛋白酶的浓度为 100ng/ml 洗脱液,洗脱 1-3 小时 ;

[0258] 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 ;

[0259] 7) 检测 :加入过氧化氢,并且加热赶酸,并从溶液中取样,于电感耦合等离子体质谱仪下检测融合于 IgG 的铬,检测值如表 6 所示。

[0260] 表 6 100 份标本血样铬 -IgG 融合物的 ICP-MS 检测结果

[0261]

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
μg/L	3.186	4.068	4.138	3.619	4.392	3.01	4.944	15.50 7	4.047	4.955
编号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
μg/L	5.245	4.838	5.182	5.967	4.804	4.605	3.889	13.48	4.835	5.873

[0262]

								4		
编号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
μg/L	5.951	5.117	3.874	4.312	3.845	15.3	5.436	3.947	4.053	4.868
编号	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
μg/L	5.066	5.61	3.599	3.989	3.467	13.08 8	3.665	5.043	4.511	3.41
编号	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
μg/L	3.172	5.696	3.423	4.863	3.468	5.897	3.554	13.62	4.841	4.924
编号	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
μg/L	5.207	3.46	5.029	5.579	5.429	15.42 6	5.584	5.589	3.355	5.77
编号	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
μg/L	3.759	4.43	5.367	4.012	5.548	13.56 9	4.041	3.13	5.583	4.306
编号	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
μg/L	4.336	5.404	5.544	14.90 5	3.344	5.933	4.802	5.979	5.914	3.471
编号	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
μg/L	4.194	3.693	13.94 9	4.095	4.7	4.065	4.983	3.186	3.354	3.486
编号	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
μg/L	13.97	5.188	4.611	3.152	5.083	3.328	3.106	5.062	14.84	3.868

[0263] 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。

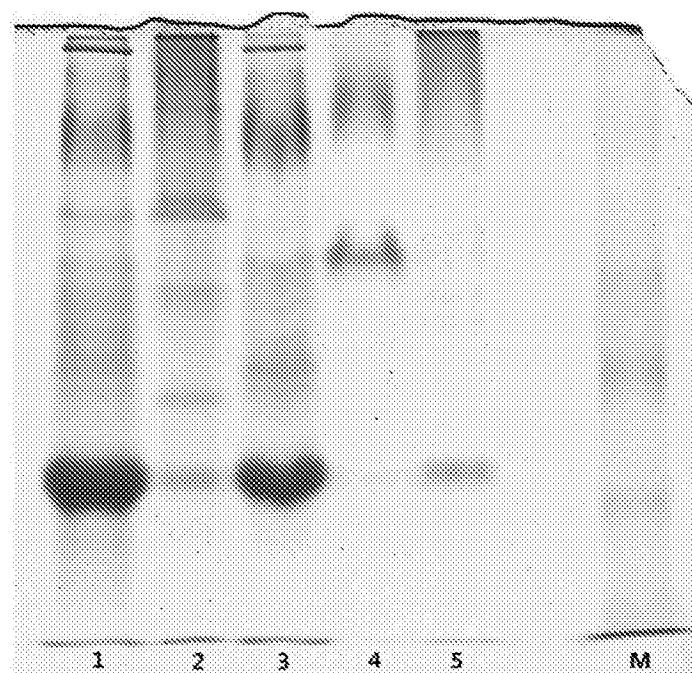


图 1

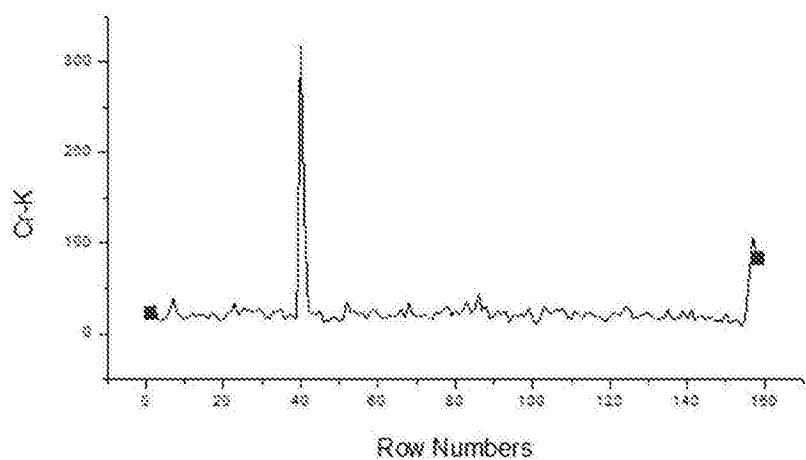


图 2

专利名称(译)	一种铬-IgG螯合物及其制备方法和应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN105021551A</a>	公开(公告)日	2015-11-04
申请号	CN201510411419.0	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 G01N27/447		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">Sipo</a>		

**摘要(译)**

本发明公开了一种铬-IgG螯合物及其制备方法和应用，该铬-IgG螯合物是铬离子与IgG通过巯基或/和半胱氨酸残基螯合而成。本发明建立了铬-IgG螯合物的定性定量检测方法，以便定量检测铬-IgG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-IgG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-IgG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。

