



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105021554 A

(43) 申请公布日 2015. 11. 04

(21) 申请号 201510413047. 5

(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)

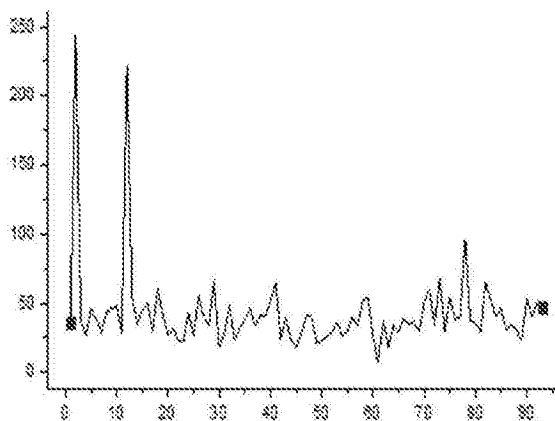
权利要求书2页 说明书18页 附图1页

(54) 发明名称

一种砷-IgM 螯合物及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明公开了一种砷-IgM 螯合物及其制备方法和应用,该砷-IgM 螯合物是砷离子与 IgM 通过巯基或 / 和半胱氨酸残基螯合而成。本发明建立了砷-IgM 螯合物的定性定量检测方法,以便定量检测砷-IgM 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血清中砷-IgM 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。本发明建立的砷-IgM 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. 一种砷-IgM 螯合物,其特征在于,砷离子与 IgM 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 所述的砷-IgM 螯合物的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

A) 砷与 IgM 的螯合反应:在人源的 IgM 或按照生物学方法重组的 IgM 中加入砷离子进行螯合反应,得到反应溶液;

B) 纯化砷-IgM 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 IgM 以及多余的砷离子,即得砷-IgM 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,使砷-IgM 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 IgM 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,IgM 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 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 ddH₂O 透析除盐,换水三次后,4℃透析过夜,收集样本,即得砷-IgM 螯合物。

4. 根据权利要求 2 所述的砷-IgM 螯合物的制备方法,其特征在于,还包括步骤 C):对砷-IgM 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) 中提取纯化得到的砷-IgM 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:在胶床上找出含砷的蛋白条带,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 法检测是否含有砷以及检测砷的含量。

5. 一种如权利要求 1 所述的砷-IgM 螯合物在制备检测血样中砷-IgM 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-IgM 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,该包被液含有可捕获 IgM 的蛋白或可捕获砷的物质。

8. 一种定量检测砷-IgM 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-IgM 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-IgM 螯合物与酶联免疫结合法、提纯砷-IgM 螯合物与原子吸收光谱结合法、提纯砷-IgM 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-IgM 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,涉及一种砷-IgM 螯合物及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 血清中 IgM 是由 5 个单体通过一个 J 链和二硫键连接成五聚体,分子量最大,为 970kD,沉降系数为 19S,称为巨球蛋白 (maAsoglobulin)。在分子结构上 IgM 无铰链区,C μ 2 可能替代了铰链区的功能。在生物进化过程中 IgM 是最早出现的免疫球蛋白。在个体发育过程中,无论是 B 细胞膜表面 Ig (SmIg),还是合成分泌到血清中的 Ig,IgM 都是最早出现的 Ig,在胚胎发育晚期的胎儿即有能力产生 IgM。在抗原刺激诱导体液免疫应答过程中,一般 IgM 也最先产生。IgM 占血清总 Ig 的 5%~10%。由于 IgM 在免疫应答早期产生,并在补体参与下的溶血作用比 IgG 强 500 倍以上,而且活化补体后通过 C3b、C4b 等片段发挥调理作用,因此 IgM 在机体的早期免疫防护中占有重要地位。天然的血型抗体 (凝集素) 为 IgM,血型不符的输血,易发生严重的溶血反应。IgM 不能过胎盘,脐血中如出现针对某种病原微生物的 IgM,表示胚胎期有相应病原微生物如梅毒螺旋体、风疹或巨细胞毒等感染,称为胚胎感染或垂直感染。正常人血清中也含有产量单体 IgM。

[0003] 砷是常见的环境毒物之一,广泛存在于水、土壤、空气以及食物之中。由于其毒性以及普遍存在性,美国毒物和疾病登记署 (Usted States Agency for Toxic Substances and Disease Registry,ATSDR) 一直将其列为头等有害物质 (<http://www.atsdr.cdc.gov/SPL/index.html>),同时砷也被许多国际组织 (包括国际癌症研究机构 (International Agency for Research on Cancer, IARC) 以及美国环境保护署 (U.S.Environmental Protection Agency,EPA)) 划定是人类致癌物质之一。砷能对人体产生急性或慢性毒性,急性砷中毒会导致呕吐、口干、肌肉痉挛、腹痛、手脚刺痛等剧烈症状,而慢性砷中毒对人类健康的影响也已成为人们关注的一个重大问题。通过饮用水和空气是两种与环境中砷接触最直接的方式,它会诱发心血管疾病、引起神经功能失调、并导致糖尿病以及肺癌、皮肺癌、膀胱癌等。而目前流行病学显示,在自然界存在的砷引起的地下饮用水污染,已在中国台湾、阿根廷、智利、孟加拉国、印度、中国等多个国家和地区造成高剂量的砷暴露,成为环境污染和危害健康的全球性问题。目前全球已有超过五千万人处于砷暴露和慢性砷中毒的威胁之中。

[0004] 目前可以运用多种方法检测出血砷含量,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,但仍存在一定缺陷。

[0005] 关于砷中毒,特别是慢性砷中毒的评价,仅能通过检测血砷含量,间接反应人体内的循环砷含量,无法进一步评估砷对于机体功能的损伤程度,而随着科学技术的飞速发展,砷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砷中毒,特别是慢性砷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] 针对砷污染严重的问题,本发明的目的在于提供一种砷-IgM 螯合物及其制备方法,并建立砷-IgM 螯合物的定性、定量检测方法,以便定量检测砷-IgM 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血清中砷-IgM 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。

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

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

[0009] A) 砷与 IgM 的螯合反应:在人源的 IgM 中加入砷离子进行螯合反应,得到反应溶液;

[0010] B) 纯化砷-IgM 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 IgM 以及多余的砷离子,即得砷-IgM 螯合物。

[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,使砷-IgM 螯合物复溶;

[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 IgM 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, IgM 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 ddH₂O 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砷特异性结合的填料,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 ddH₂O 透析除盐,换水三次后,4℃透析过夜,收集样本,即得砷-IgM 螯合物。

[0023] 其中,上述砷-IgM 螯合物的制备方法,还包括步骤 C):对砷-IgM 螯合物的鉴定;

[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) 中提取纯化得到的砷-IgM 螯合物,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 :在胶床上找出含砷的蛋白条带,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 法检测是否含有砷以及检测砷的含量。

[0029] 本发明还提供一种如上述的砷-IgM 螯合物在制备检测人体内砷-IgM 螯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砷-IgM 螯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 IgM 的蛋白或捕获砷的物质。

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

[0033] 实施本发明的砷-IgM 螯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砷-IgM 螯合物;

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

[0036] 3. 本发明建立了砷-IgM 螯合物的定性定量检测方法,以便定量检测砷-IgM 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血清中砷-IgM 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。本发明建立的砷-IgM 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

[0037] 图 1 为本发明所述的砷-IgM 螯合物的非变性电泳条带图;

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

[0039] 其中,图 1 中, M 为 Marker, 2 为砷-IgM 螯合物;图 2 中,横坐标为蛋白条带位置,纵坐标为该蛋白条带中砷能量。

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 IgM 特异性结合的填料,为表面附有能捕获 IgM 的蛋白的硅胶或树脂;

[0045] 本发明中的能捕获 IgM 的蛋白(抗 IgM 抗体),包括但不限于兔 Anti-人类 IgM H&L,其品牌为 Abcam、型号为 ab8505;

- [0046] 本发明中的能与砷特异性结合的填料,为表面附有能捕获砷的物质的硅胶或树脂;
- [0047] 本发明中的能捕获砷的物质,包括但不限于鼠抗 As mAb,购买自广州然科公司、货号为 RK15728;
- [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 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;
- [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 Na_2CO_3 、2.93mg/ml 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 H_2SO_4 定容至 200ml 的 ddH₂O 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、ddH₂O 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 ddH₂O 溶液。
- [0059] 本发明提供一种砷-IgM 螯合物,砷离子与 IgM 通过巯基或 / 和半胱氨酸残基螯合而成。
- [0060] 本发明还提供一种砷-IgM 螯合物的制备方法,包括以下步骤:
- [0061] A) 砷与 IgM 的螯合反应:在人源的 IgM 或按照生物学方法重组的 IgM 中加入砷离子进行螯合反应,得到反应溶液;
- [0062] B) 纯化砷-IgM 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 IgM 以及多余的砷离子,即得砷-IgM 螯合物,具体步骤如下:
- [0063] (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,使砷-IgM 螯合物复溶
- [0064] (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 IgM 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;
- [0065] (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, IgM 与填料特异性结合;
- [0066] (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;
- [0067] (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;
- [0068] (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;
- [0069] (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;
- [0070] (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;

[0071] (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 ;

[0072] (10) 收集 :收集经过步骤 (9) 洗脱后的洗脱液,收集完毕后即使蛋白复性 ;

[0073] (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,即得砷 -IgM 螯合物 ;

[0074] C) 对砷 -IgM 螯合物的鉴定,具体步骤如下 :

[0075] (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 ;

[0076] (2) 加样 :取步骤 B) 中提取纯化得到的砷 -IgM 螯合物,加入稀释缓冲液,并混匀,然后加样于样品槽中 ;

[0077] (3) 电泳 :连接电泳板,进行电泳 ;

[0078] (4) 检测 :在胶床上找出含砷的蛋白条带,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 法检测是否含有砷以及检测砷的含量。

[0079] 本发明还提供一种至少包括如上述的砷 -IgM 螯合物作为对照品的试剂盒。

[0080] 优选地,该试剂盒中还包括包被液,该包被液含有可捕获 IgM 的蛋白或可捕获砷的物质。

[0081] 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。

[0082] 一种检测血样中砷 -IgM 螯合物的试剂盒,包括 :含有可捕获 IgM 的蛋白的包被液、封闭液、洗涤液、作为二抗的可捕获砷的物质、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。

[0083] 一种检测血样中砷 -IgM 螯合物的试剂盒,包括 :含有可捕获 IgM 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。

[0084] 一种检测血样中砷 -IgM 螯合物的试剂盒,包括 :含有可捕获 IgM 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。

[0085] 一种检测血样中砷 -IgM 螯合物的试剂盒,包括 :作为提纯全血中 IgM 所需提取试剂、复溶液、含有可捕获砷的物质的包被液、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。

[0086] 一种检测血样中砷 -IgM 螯合物的试剂盒,包括 :作为提纯全血中 IgM 所需提取试剂、复溶液、上样缓冲液、阳性对照、阴性对照等。

[0087] 一种检测血样中砷 -IgM 螯合物的试剂盒,包括 :作为提纯全血中 IgM 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。

[0088] 一种检测血样中砷 -IgM 螯合物的试剂盒,包括 :含有可捕获 IgM 的蛋白的包被液、胶床介质、复溶液、上样缓冲液、溶解胶床上含砷的蛋白条带所需液体、含有可捕获砷的物质的包被液、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。

[0089] 一种检测血样中砷 -IgM 螯合物的试剂盒,包括 :作为提纯全血中 IgM 所需提取试剂、胶床介质、复溶液、上样缓冲液、溶解胶床上含砷的蛋白条带所需液体、阳性对照、阴性对照等。

[0090] 一种检测血样中砷 -IgM 螯合物的试剂盒,包括 :作为提纯全血中 IgM 所需提取试剂、胶床介质、复溶液、上样缓冲液、溶解胶床上含砷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。

[0091] 上述几种试剂盒中,所述阳性对照为标准品,即螯合有重砷的 IgM 螯合物或螯合有重砷的 BSA 螯合物;所述阴性对照为稀释缓冲液。

[0092] 上述试剂盒用于检测螯合砷的 IgM,以提高检测的准确性,重复性,并使之在临床中得到推广。

[0093] 本发明还提供一种定量检测砷 -IgM 螯合物的方法,以已知含量的上述的砷 -IgM 螯合物作为对照品,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、提纯砷 -IgM 螯合物与酶联免疫结合法、提纯砷 -IgM 螯合物与原子吸收光谱结合法、提纯砷 -IgM 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,用检测砷螯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。

[0094] 其中,上述定量检测砷 -IgM 螯合物的方法中采用的试剂如下:

[0095] 方法一:酶联免疫法(ELISA法)检测砷 -IgM 螯合物,按照如下步骤检测:

[0096] 1) 将能够捕获 IgM 的物质,如人 IgM 抗体包被于固相载体上:用稀释缓冲液稀释抗 IgM Ab 至 500-4000 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;

[0097] 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;

[0098] 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;

[0099] 4) 加待检样品,并且温育:加入步骤 2) 中的待检样品、以已知含量的砷 -IgM 螯合物作标准品;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;

[0100] 5) 加入可以捕获砷的物质,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砷的物质或能与砷反应形成抗原抗体复合物的抗 As Ab,37℃作用 1-2 小时,使抗 As Ab 与 IgM 上的砷反应;

[0101] 6) 酶结合物温育:移去抗砷抗体,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;

[0102] 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;

[0103] 8) 终止反应:滴加终止液至每一微孔;

[0104] 9) 取波长 405nm,加完终止液后,将 ELISA 板置于在酶标仪上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,直接通过染色情况进行定性检测)。

[0105] 该方法利用 ELISA 原理,可以将全血中的特异性 IgM 提取出来,提取出来的 IgM 上部分螯合有重砷,而这部分 IgM 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 IgM,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 IgM 上螯合的砷。

[0106] 方法二：酶联免疫与原子吸收光谱结合法（ELISA 法+AAS 法）检测砷-IgM 螯合物按照如下步骤检测：

[0107] 1) 将能够捕获 IgM 的物质，如人 IgM 抗体包被于固相载体上：用稀释缓冲液稀释抗 IgM Ab 至 500-4000 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；

[0108] 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；

[0109] 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；

[0110] 4) 加待检样品，并且温育：加入步骤 2) 中的待检样品、以已知含量的砷-IgM 螯合物作标准品；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；

[0111] 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。

[0112] 6) 检测：从 ELISA 微孔中取样，于原子吸收光谱仪检测螯合于 IgM 上的砷，并绘制标准曲线，读出相应数值；

[0113] 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螯合于 IgM 上的砷，由于溶液中仅含有 IgM，且所用试剂中不含任何砷（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 IgM 上螯合的砷。

[0114] 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-IgM 螯合物按照如下步骤检测：

[0115] 1) 将能够捕获 IgM 的物质，如人 IgM 抗体包被于固相载体上：用稀释缓冲液稀释抗 IgM Ab 至 500-4000 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；

[0116] 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；

[0117] 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；

[0118] 4) 加待检样品，并且温育：加入步骤 2) 中的待检样品、以已知含量的砷-IgM 螯合物作标准品；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；

[0119] 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。

[0120] 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；

[0121] 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整合于 IgM 的砷,并绘制标准曲线,读出相应数值。

[0122] 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 IgM 上的砷,由于溶液中仅含有 IgM,且所用试剂中不含任何砷(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 IgM 上整合的砷。

[0123] 方法四:提纯砷-IgM 螯合物与酶联免疫结合法(提纯法+ELISA 法)检测砷-IgM 螯合物,按照如下步骤检测:

[0124] 1) 从全血中提取 IgM: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 IgM 复溶,得到 IgM 的复溶液;

[0125] 2) 将抗 As Ab 包被于固相载体上:用稀释缓冲液稀释抗 As Ab 至 25000-400000 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;

[0126] 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;

[0127] 4) 加待检样品,并且温育:从提取的 IgM 的复溶液中取样,作待检样品;以已知含量的砷-IgM 螯合物作标准品;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;

[0128] 5) 酶结合物温育:移去 IgM 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 μg/ml,37℃作用 1-2 小时,使其与酶标抗体反应;

[0129] 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;

[0130] 7) 终止反应:滴加终止液至每一微孔;

[0131] 8) 取波长 405nm,加完终止液后,将 ELISA 板置于在酶标仪上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,直接通过染色情况进行定性检测)。

[0132] 方法五:提纯砷-IgM 螯合物与原子吸收光谱结合法(提纯法+AAS 法)检测血样中砷-IgM 螯合物,按照如下步骤检测:

[0133] 1) 从全血中提取 IgM: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 IgM 复溶,得到 IgM 的复溶液;

[0134] 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整合于 IgM 上的砷,并绘制标准曲线,读出相应数值。

[0135] 方法六:提纯砷-IgM 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-IgM 螯合物,按照如下步骤检测:

[0136] 1) 从全血中提取 IgM: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 IgM 复溶,得到 IgM 的复溶液;

[0137] 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;

[0138] 3) 检测:加入过氧化氢,并且加热赶酸,并从相应溶液中取样,于电感耦合等离子

体质谱仪下检测整合于 IgM 上的砷,并绘制标准曲线,读出相应数值。

[0139] 方法七:电泳与酶联免疫法(电泳法-ELISA法)检测砷-IgM 螯合物,按照如下步骤检测:

[0140] 1) 从全血中提取 IgM: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 IgM 复溶,得到 IgM 的复溶液;

[0141] 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;

[0142] 3) 加样:取步骤 1) 中的复溶液 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)

[0143] 4) 电泳:连接电泳板,进行电泳分离;

[0144] 5) 检测:在胶床上找出含有砷的蛋白条带,将该条带取出,将该蛋白条带复溶,然后再利用 ELISA 原理检测溶于液体中的砷含量。此外,还可以利用此方法检测整合砷的 IgM 的等电点、分子量及含量等。

[0145] 方法八:电泳与原子吸收光谱法(电泳法-AAS法)检测砷-IgM 螯合物,按照如下步骤检测:

[0146] 1) 从全血中提取 IgM: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 IgM 复溶,得到 IgM 的复溶液;

[0147] 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;

[0148] 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;

[0149] 4) 电泳:连接电泳板,进行电泳分离;

[0150] 5) 检测:在胶床上找出含有砷的蛋白条带,将该条带取出,将该蛋白条带复溶,然后再利用 AAS 原理检测溶于液体中的砷含量。此外,还可以利用此方法检测整合砷的 IgM 的等电点、分子量及含量等。

[0151] 方法九:电感耦合等离子体质谱结合法(电泳法-ICP-MS法)检测砷-IgM 螯合物,按照如下步骤检测:

[0152] 1) 从全血中提取 IgM: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 IgM 复溶,得到 IgM 的复溶液;

[0153] 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;

[0154] 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;

[0155] 4) 电泳:连接电泳板,进行电泳分离;

[0156] 5) 检测:在胶床上找出含有砷的蛋白条带,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砷含量。此外,还可以利用此方法检测整合砷的 IgM 的等电点、分子量及含量等。

[0157] 方法七至九中的 IgM 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 IgM 复溶,得到 IgM 的复溶

液,取一定量的 IgM,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,将凝胶中的蛋白质用相应复溶剂复溶于溶液中,即可以在特定波长下检测相关 IgM 的含量,也可以利用 ELISA、AAS、ICP-MS 等原理检测出螯合于 IgM 上的砷含量,由于溶液中仅含有 IgM,且所用试剂中不含任何砷(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 IgM 上螯合的砷。

[0158] **实施例 1:**砷-IgM 螯合物的制备方法,包括以下步骤:

[0159] A) 砷与 IgM 的螯合反应:在人源的 IgM 中加入砷离子进行螯合反应,得到反应溶液;

[0160] 试剂配制:

[0161] 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。

[0162] 2) IgM 溶液:称取 4.0mg IgM 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;

[0163] 3) 5mmol/L EDTA+200mmol/L NaHCO₃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;

[0164] 4) ITCBE(购买自日本同仁化学研究所,货号 M030)

[0165] 5) 透析袋(截留分子量 14000)(Bioshop Inc)

[0166] 制备步骤具体为:

[0167] 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 NaHCO₃溶液中,煮沸 10min;倾弃 EDTA/NaHCO₃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面;

[0168] 2) 取 2.0mg ITCBE 溶于 2ml DMSO 中;

[0169] 3) 取 4.0mg IgM 溶于 4.0ml 硼酸盐缓冲溶液中(0.01M pH9.0)中;

[0170] 4) 缓慢将步骤 2 制备的液体加入 IgM 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 IgM 结合的 ITCBE;

[0171] 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 砷离子溶液,边滴加边振荡,以免砷离子使蛋白变性沉淀;

[0172] 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;

[0173] 7) 将透析后的液体于 -20℃分装保存。

[0174] B) 纯化砷-IgM 螯合物的提取:采用免疫亲和层析法,去除反应溶液(即步骤 A 中 7)的透析后的液体)中未反应的 IgM 以及多余的砷离子,即得砷-IgM 螯合物,具体步骤如下:

[0175] (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,使砷-IgM 螯合物复溶;

[0176] (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 IgM 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;

[0177] (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,IgM与填料特异性结合;

[0178] (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;

[0179] (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;

[0180] (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;

[0181] (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;

[0182] (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;

[0183] (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;

[0184] (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;

[0185] (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,即得砷-IgM螯合物;

[0186] C) 对砷-IgM螯合物的鉴定,具体步骤如下:

[0187] (1) 制备胶床:以琼脂糖凝胶作为介质制备胶床;

[0188] (2) 加样:取步骤B)中8μL提取纯化得到的砷-IgM螯合物,加入2μL上样缓冲液,并混匀,然后加样于样品槽中;

[0189] (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度;至溴酚蓝移至胶底部时停止电泳;

[0190] (4) 检测:在胶床上找出含砷的蛋白条带,将该蛋白条带取出,将蛋白条带复溶,然后再采用AAS法检测是否含有砷以及检测砷的含量。

[0191] D) 检测结果

[0192] (1) 电泳结果:

[0193] 其中,图1为本发明所述的砷-IgG螯合物的非变性电泳条带图。

[0194] (2) 同步辐射X荧光分析:

[0195] 蛋白条带内微量元素含量的SRXRF分析在北京正负电子对撞机(BEPC)的4W1"同步辐射束线上完成。储存环中电子束流能量为2.2GeV,束流强度100mA。样品移动台(TSA200型,北京卓立汉光公司)可在计算机控制的步进马达驱动下沿X、Y二维方向上移动以改变入射光斑位置,移动步长为0.0025mm。从样品发射出的X射线由Si(Li)探测器(PGT Inc. LS 30143-DS)探测,探头与入射SR线共平面且相互垂直,距样品照射点20mm,信号用PGT多道分析仪(MCA4000)获取输出。用11.5keV的单色同步辐射光激发样品,调节入射光斑(1mmx3mm)位置使之处于条带一端,在300s的测定时间内,光斑一直沿条带均匀缓慢移动,计数结束时光斑移到该条带另一端。沿电泳方向每1mm取一个谱。采用AXIL软件处理数据,并用来源于空气且含量恒定的Ar信号峰对其它元素峰进行归一处理,以抵消束流强度变化对信号强弱产生的影响。在相同的条件下以同样的方式测量定量标准干胶膜的荧光谱。

[0196] 图 2 为本发明所述的砷-IgM 螯合物的同步辐射 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砷的能量(含量)值。

[0197] (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砷-IgG 螯合物中的砷含量,其含量为 92.401 $\mu\text{g/L}$ 。

[0198] 本发明一种定量检测砷-IgM 螯合物的方法的检测条件的确定:

[0199] 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

[0200] 步骤如下:

[0201] (1) 将抗 IgM Ab 用稀释缓冲液按照以下质量体积比(稀释度)1:500、1:1000、1:2000、1:4000 进行稀释,加入 ELISA 板微孔中,将抗 IgM Ab 包被于固相载体上,每个浓度包被三排,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜 18 小时;

[0202] (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 $^{\circ}\text{C}$ 放置 1 小时,移去封闭液,并用洗涤液进行洗涤;

[0203] (3) 待检样品用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 As Ab 浓度,同一个浓度的抗 As Ab 的分别加入不同稀释度血浆,37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 1 小时;

[0204] (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 As Ab,抗 As Ab 用稀释缓冲液按照以下质量体积比(稀释度)1:25000、1:50000、1:100000、1:200000 进行稀释,按照每一个相同抗 IgM Ab、血清稀释浓度,不同浓度抗 As Ab 各加 2 孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 1 小时,使抗 As Ab 与 IgM 上的砷反应;

[0205] (5) 酶标抗体选择最适工作浓度,即 2ng/ml,移去抗 As 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 $^{\circ}\text{C}$ 作用 1 小时,使 HRP 酶标抗体与砷-IgM 螯合物反应;

[0206] (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 $^{\circ}\text{C}$ 避光作用 30 分钟;

[0207] (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;

[0208] (8) 取波长 405nm,加完终止液后,将 ELISA 板置于在酶标仪上分别读取各孔 OD 值。根据各孔 OD 值数值,选择抗 IgM Ab、抗 As-Ab 的最佳工作浓度以及血浆的最佳稀释倍数。

[0209] 试验中同时以所制对照品作为阳性对照,选择 IgM 抗体+封闭+As 抗+酶标+底物(即不加检测样本)作为阴性对照 1、IgM 抗体+封闭+血浆+酶标+底物(即不加 As 抗)作为阴性对照 2、IgM 抗体+封闭+酶标+底物(即不加检测样本和 As 抗)作为阴性对照 3、IgM 抗体+封闭+血浆+As 抗+底物(即不加酶标)作为阴性对照 4,封闭+血浆+As 抗+酶标+底物(即不加 IgM 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。

[0210] 表 1 :抗 IgM Ab 和 As 抗体最佳工作浓度以及血浆稀释倍数的确定

[0211]

		抗 IgM	抗 IgM	抗 IgM Ab	抗 IgM
		Ab 浓度梯度 (1:500)	Ab 浓度梯度 (1:1000)	浓度梯度 (1:2000)	Ab 浓度梯度 (1:4000)
As 抗 1:25000	血浆 1:10	0.815	0.879	0.631	0.573
	血浆 1:20	0.749	0.841	0.58	0.532
	血浆 1:40	0.532	0.58	0.462	0.416
As 抗 1:50000	血浆 1:10	0.769	0.784	0.631	0.555
	血浆 1:20	0.71	0.736	0.549	0.474
	血浆 1:40	0.551	0.576	0.497	0.367
As 抗 1:100000	血浆 1:10	0.672	0.695	0.521	0.401
	血浆 1:20	0.626	0.635	0.459	0.333

[0212]

	血浆 1:40	0.398	0.433	0.229	0.199
As 抗 1:200000	血浆 1:10	0.45	0.431	0.274	0.197
	血浆 1:20	0.426	0.399	0.182	0.133
	血浆 1:40	0.293	0.304	0.122	0.107

[0213] 表 2 :ELISA 阳性对照及阴性对照 ELISA 检测结果

[0214]

	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	0.985	0.072	0.065	0.033	0.032	0.028	0.014	0.012

[0215] 由表 1-2 数据显示,我们可以看出当人 IgM 抗体的稀释度为 1:1000、全血稀释度为 1:10、As 抗稀释度为 1:25000 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 IgM 抗体浓度为 1:1000,全血稀释度为 1:10,As 浓度为 1:25000)。

[0216] 2. ELISA 洗脱液最佳工作浓度及时间确定

[0217] 步骤如下:(1) 将人 IgM 抗体用稀释缓冲液稀释至 1000 倍(质量体积比),加入

ELISA 板微孔中,37℃水浴 3 小时,储存冰箱;

[0218] (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;

[0219] (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 IgM 抗体反应;

[0220] (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;

[0221] (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;

[0222] (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;

[0223] (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;

[0224] (8) 取 405nm 波长,加完终止液后,将 ELISA 板置于在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。

[0225] 表 3:ELISA 洗脱液最佳工作浓度及洗脱时间确定

[0226]

	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

[0227] 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 IgM 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。

[0228] 应用实施例 1

[0229] 取采用 ELISA 法检测 100 份标本血浆中的砷-IgM 螯合物,按照以下步骤进行检测:酶联免疫法(ELISA 法)检测砷-IgM 螯合物,按照如下步骤检测:

[0230] 1) 将抗 IgM Ab 包被于固相载体上:用稀释缓冲液稀释抗 IgM Ab 至 1000 倍,加入 ELISA 板微孔中,37℃水浴 1 小时,储存冰箱;

[0231] 2) 从循环系统取全血,作待检样品,再加入甲苯,溶解细胞膜;

[0232] 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;

[0233] 4) 加待检样品,并且温育:加入步骤 2) 中的待检样品、以已知含量的砷-IgM 螯合物作标准品;用稀释缓冲液稀释待检样品稀释至相应倍数,即稀释 10 倍,加入微孔中,37℃作用 1 小时;

[0234] 5) 加入可以捕获砷的物质,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 25000 倍,37℃作用 1 小时,使抗 As Ab 与 IgM 上的砷反应;

[0235] 6) 酶结合物温育:移去抗砷抗体,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;

[0236] 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;

[0237] 8) 终止反应:滴加终止液至每一微孔;

[0238] 9) 取波长 405nm,加完终止液后,将 ELISA 板置于在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。

[0239] 表 4:100 份血样标本中砷-IgM 整合物的 ELISA 检测结果

[0240]

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
OD ₄₀₅	0.605	0.22	0.635	0.723	0.529	0.31 8	0.50 7	0.488	0.602	0.124
编号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
OD ₄₀₅	0.711	0.319	0.493	0.745	0.447	0.14 8	0.60 7	0.664	0.233	0.443
编号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
OD ₄₀₅	0.14	0.473	0.636	0.14	0.127	0.28 4	0.58 6	0.79	0.581	0.179

[0241]

编号	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
OD ₄₀₅	0.151	0.755	0.445	0.502	0.219	0.11 9	0.70 9	0.114	0.126	0.681
编号	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
OD ₄₀₅	0.26	0.512	0.334	0.452	0.655	0.73 8	0.75 5	0.495	0.493	0.578
编号	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
OD ₄₀₅	0.511	0.292	0.556	0.157	0.705	0.80 1	0.79 4	0.235	0.568	0.399
编号	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
OD ₄₀₅	0.521	0.421	0.518	0.126	0.477	0.77 9	0.15	0.585	0.523	0.491
编号	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
OD ₄₀₅	0.583	0.38	0.2	0.384	0.619	0.52 9	0.75 5	0.341	0.299	0.222
编号	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
OD ₄₀₅	0.112	0.697	0.795	0.413	0.547	0.60 4	0.17 2	0.684	0.789	0.331
编号	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
OD ₄₀₅	0.403	0.691	0.644	0.732	0.213	0.32 8	0.54 7	0.418	0.627	0.544

[0242] 应用实施例 2

[0243] 采用酶联免疫与原子吸收光谱结合法 (ELISA 法 +AAS 法) 检测 100 分标本血样中的砷-IgM 螯合物, 按照如下步骤检测:

[0244] 1) 将能够捕获 IgM 的物质, 如抗 IgM 抗体 (抗 IgM Ab) 包被于固相载体上: 用稀释缓冲液稀释抗 IgM Ab 至 1000 倍, 加入 ELISA 板微孔中, 4℃ 过夜 18 小时;

[0245] 2) 从循环系统取全血, 作待检样品, 再加入甲苯, 溶解细胞膜;

[0246] 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;

[0247] 4) 加待检样品, 并且温育: 加入步骤 2) 中的待检样品、以已知含量的砷-IgM 螯合

物作标准品；用稀释缓冲液稀释待检样品稀释至 10 倍，加入微孔中，37℃作用 1 小时；

[0248] 5) 洗脱：移去待检样品，并用洗涤液进行洗涤，待洗涤完成后，加入以木瓜蛋白酶浓度为 100ng/ml 的洗脱液，洗脱 3 小时；

[0249] 6) 检测：从 ELISA 微孔中取样，于原子吸收光谱仪检测整合于 IgM 上的砷，检测值如表 5 所示。

[0250] 表 5：100 份血样标本中砷-IgM 整合物的 AAS 检测结果

[0251]

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
μg/L	2.963	3.28	2.38	0.841	0.13	3.85	3.144	0.516	3.543	1.58
编号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
μg/L	4.282	1.879	0.671	3.969	1.845	3.381	2.699	3.309	0.972	2.533
编号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
μg/L	2.198	0.371	1.281	3.73	1.452	3.261	4.157	0.4	1.798	2.3
编号	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
μg/L	2.325	1.504	3.829	0.281	1.787	2.73	0.249	1.861	0.58	0.289
编号	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
μg/L	0.167	4.209	1.412	1.663	0.738	0.147	3.521	3.07	2.305	3.814
编号	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
μg/L	4.146	4.029	0.224	2.23	2.132	2.669	4.089	4.283	3.603	2.853
编号	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
μg/L	0.773	1.267	0.078	1.988	3.749	0.685	0.994	2.07	1.106	0.365
编号	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80

[0252]

μg/L	3.023	2.235	2.149	1.927	3.638	3.763	0.944	2.83	2.838	2.326
编号	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
μg/L	2.855	3.312	3.334	0.74	4.297	3.73	3.88	1.223	4.106	3.52
编号	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
μg/L	4.136	1.718	4.227	0.723	2.917	1.288	2.172	3.08	0.963	3.959

[0253] 应用实施例 3

[0254] 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 份标本血样中的砷-IgM 整合物含量，按照如下步骤检测：

[0255] 1) 将能够捕获 IgM 的物质，如抗 IgM 抗体 (抗 IgM Ab) 包被于固相载体上：用稀释缓冲液稀释抗 IgM Ab 至 1000 倍，加入 ELISA 板微孔中，4℃过夜 18 小时；

[0256] 2) 取 100 份标准血样作为待检样品，再加入甲苯，溶解细胞膜；

[0257] 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；

[0258] 4) 加待检样品，并且温育：加入步骤 2) 中的待检样品、以已知含量的砷-IgM 整合物作标准品；用稀释缓冲液稀释待检样品稀释至 10 倍，加入微孔中，37℃作用 1 小时；

[0259] 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 3 小时；

[0260] 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；

[0261] 7) 检测：加入过氧化氢，并且加热赶酸，并从相应溶液中取样，于电感耦合等离子体质谱仪下检测整合于 IgM 的砷，检测值如表 6 所示。

[0262] 表 6 100 份标本血样砷-IgM 螯合物的 ICP-MS 检测结果

[0263]

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
----	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

[0264]

$\mu\text{g/L}$	0.524	1.81	0.517	3.665	2.601	4.01	0.746	0.795	1.071	2.139
编号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
$\mu\text{g/L}$	2.056	4.052	2.831	2.599	1.707	3.431	1.921	2.507	3.661	1.623
编号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
$\mu\text{g/L}$	1.588	1.171	0.647	2.67	0.976	1.503	0.085	3.469	2.677	2.337
编号	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
$\mu\text{g/L}$	3.967	2.416	3.542	2.03	3.043	1.452	0.604	3.998	0.767	1.216
编号	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
$\mu\text{g/L}$	1.626	3.342	3.688	0.749	3.826	4.008	2.844	2.982	3.391	1.176
编号	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
$\mu\text{g/L}$	0.064	3.25	3.55	3.034	4.224	2.383	3.765	1.838	4.018	1.821
编号	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
$\mu\text{g/L}$	1.795	4.12	2.278	0.083	2.317	4.103	0.507	2.3	1.019	2.556
编号	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
$\mu\text{g/L}$	0.547	0.255	0.053	3.255	1.195	2.06	1.818	0.523	0.014	0.163
编号	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
$\mu\text{g/L}$	0.333	3.166	4.249	4.188	0.597	2.456	1.65	2.325	0.591	3.886
编号	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
$\mu\text{g/L}$	1.666	0.564	2.937	2.759	1.416	2.815	1.989	2.251	2.625	0.948

[0265] 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。

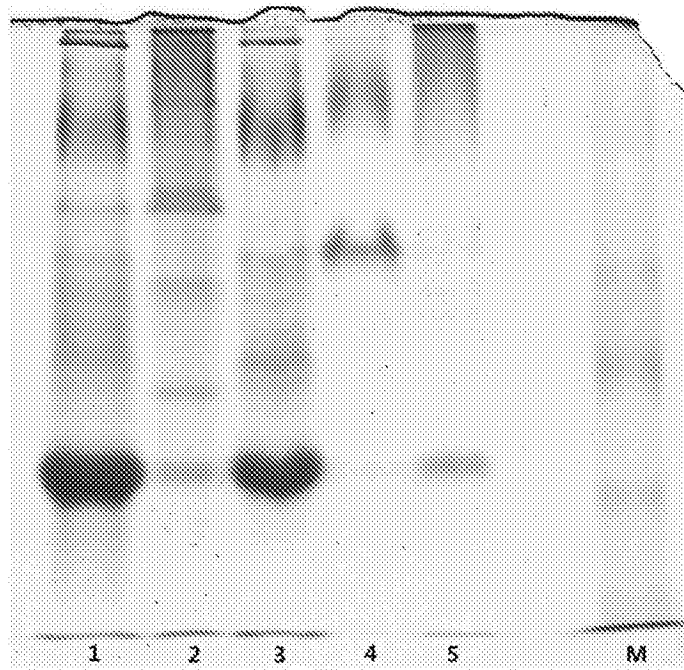


图 1

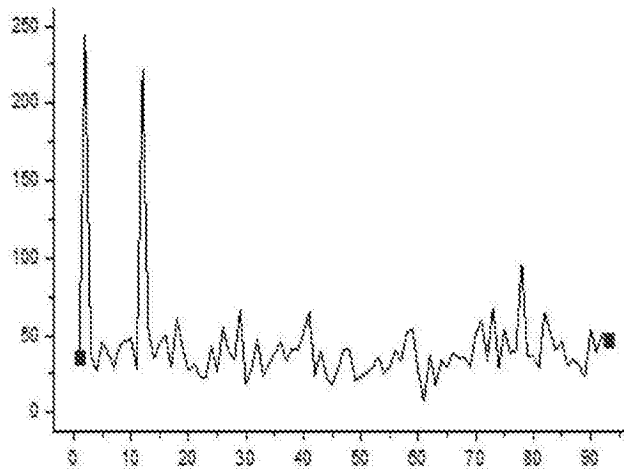


图 2

专利名称(译)	一种砷-IgM螯合物及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN105021554A	公开(公告)日	2015-11-04
申请号	CN201510413047.5	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	CN105021554B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种砷-IgM螯合物及其制备方法和应用，该砷-IgM螯合物是砷离子与IgM通过巯基或/和半胱氨酸残基螯合而成。本发明建立了砷-IgM螯合物的定性定量检测方法，以便定量检测砷-IgM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血清中砷-IgM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。本发明建立的砷-IgM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。

