



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101768217 A

(43) 申请公布日 2010.07.07

(21) 申请号 201010034438.3

(22) 申请日 2010.01.20

(71) 申请人 中国农业大学

地址 100094 北京市海淀区圆明园西路2号

(72) 发明人 王保民 赵洪伟 南铁贵 谭桂玉

刘威 高巍 谭伟明 李召虎

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

公司 11245

代理人 关畅

(51) Int. Cl.

*C07K 14/765* (2006.01)

*C07K 14/77* (2006.01)

*C07K 14/795* (2006.01)

*C07K 1/113* (2006.01)

*C07K 16/44* (2006.01)

*G01N 33/53* (2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 9 页 附图 1 页

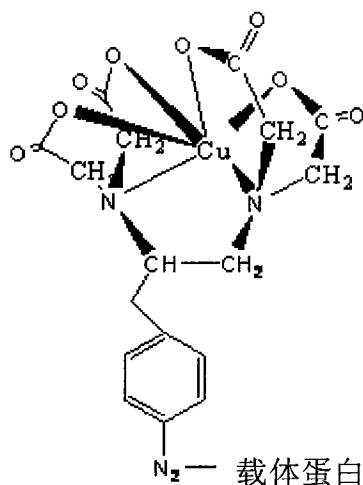
(54) 发明名称

铜离子抗原及其制备方法与应用

(57) 摘要

本发明公开了一种铜离子抗原及其制备方法与应用。该铜离子抗原，是螯合剂与载体蛋白的偶联物与铜离子形成的络合物。本发明的制备铜离子抗原的方法能够方便、快捷地获得铜离子抗原，且合成步骤简洁明了、合成成本低，效果好。用本发明方法制备的铜离子抗原进行免疫得到的抗体的特异性好、最低检测限值低。本发明的制备铜离子抗原的方法及由该方法获得的铜离子抗原在铜离子的快速免疫检测应用中将有广阔的前景。

1. 一种铜离子抗原,是螯合剂与载体蛋白的偶联物与铜离子形成的络合物。
2. 根据权利要求1所述的铜离子抗原,其特征在于:所述铜离子抗原的结构式如下:



3. 根据权利要求1或2所述的铜离子抗原,其特征在于:所述螯合剂与载体蛋白的偶联物是按照包括如下步骤的方法制备的:先将所述螯合剂重氮化,得到重氮化的螯合剂,再将所述重氮化的螯合剂与所述载体蛋白进行偶联,得到所述偶联物;

所述螯合剂与载体蛋白的偶联物与铜离子形成的络合物是按照包括如下步骤的方法制备的:将所述铜离子的溶液与所述螯合剂与载体蛋白的偶联物混合,进行络合反应,得到螯合剂与载体蛋白的偶联物与铜离子形成的络合物。

4. 根据权利要求3所述的铜离子抗原,其特征在于:

所述重氮化的方法包括如下步骤:将所述螯合剂溶于酸的水溶液中,再向其中加入亚硝酸盐,进行重氮化反应,得到所述重氮化的螯合剂;所述重氮化反应的条件包括:温度为0-5℃、避光;所述温度优选为0℃或4℃;

所述偶联的方法包括如下步骤:将所述重氮化的螯合剂与所述载体蛋白混合,进行偶联反应,得到所述偶联物;所述重氮化的螯合剂与所述载体蛋白的摩尔比为(5-15):1,优选为10:1。

5. 根据权利要求3或4所述的铜离子抗原,其特征在于:所述重氮化反应的时间为15min;所述螯合剂、酸和亚硝酸盐的配比为4mg :  $2 \times 10^{-3}$ mol :  $1.2 \times 10^{-4}$ mol;

所述偶联反应的条件包括:温度为4-10℃, pH值为8.5-9.0,反应时间为4-24h;所述螯合剂为对氨基苄基乙二胺四乙酸;所述载体蛋白为牛血清白蛋白、人血清白蛋白、血蓝蛋白或卵清白蛋白。

6. 一种制备铜离子抗原的方法,包括如下步骤:

- (1) 将螯合剂重氮化,得到重氮化的螯合剂;
- (2) 将载体蛋白与所述重氮化的螯合剂混合,进行偶联反应,得到载体蛋白与所述重氮化的螯合剂的偶联物;
- (3) 将铜离子的溶液与所述载体蛋白与重氮化的螯合剂的偶联物混合,进行络合反应,得到铜离子抗原。

7. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于:所述重氮化的方法包括如下步骤:将所述

螯合剂溶于酸的水溶液中,再向其中加入亚硝酸盐,进行重氮化反应,得到所述重氮化的螯合剂;所述重氮化反应的条件包括:温度为0-5℃、避光;所述温度优选为0℃或4℃。

8. 根据权利要求6或7所述的方法,其特征在于:

所述重氮化反应的时间为15min;所述螯合剂、酸和亚硝酸盐的配比为4mg :  $2 \times 10^{-3}$ mol :  $1.2 \times 10^{-4}$ mol ;

所述偶联反应的条件包括:温度为4-10℃,pH值为8.5-9.0,反应时间为4-24h ;

所述螯合剂为对氨基苄基乙二胺四乙酸;

所述载体蛋白为牛血清白蛋白、人血清白蛋白、血蓝蛋白或卵清白蛋白。

9. 由权利要求1-5中任一所述铜离子抗原得到的抗体。

10. 权利要求1-5中任一所述铜离子抗原和/或权利要求9中所述抗体在检测样品中铜离子中的应用。

## 铜离子抗原及其制备方法与应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及铜离子抗原及其制备方法与应用。

### 背景技术

[0002] 重金属是环境与农产品中的重要污染物质,可以通过食物链在动物及人的体内富集,对人类健康会带来严重的危害。铜是生命体生长所必须的微量元素之一,但是高浓度的铜会对生命体产生毒害作用。

[0003] 目前,重金属铜的分析方法主要有原子吸收光谱法、电感耦合等离子体发射光/质谱法、X-射线荧光光谱法、电位溶出分析法以及近几年发展的生物传感器检测法等。但是用这几种方法检测铜离子需要昂贵的仪器设备,检测费用高,耗时,不能用于现场快速检测。与仪器分析法相比,免疫分析法具有快速、简便、实时、易于进行现场检测、样品前处理简单、灵敏度高、选择性强、适合于高通量分析等优点,而且还能大幅度降低检测成本。

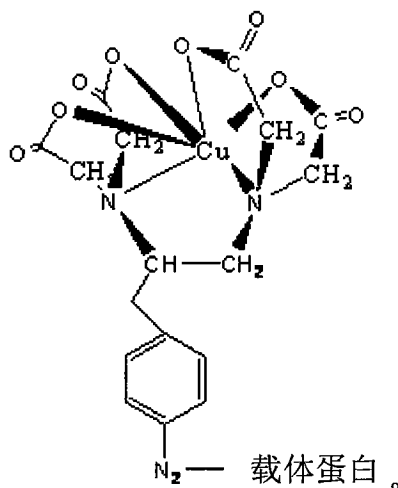
### 发明内容

[0004] 本发明的一个目的是提供一种铜离子抗原。

[0005] 本发明所提供的铜离子抗原,是螯合剂与载体蛋白的偶联物与铜离子形成的络合物。

[0006] 所述铜离子抗原的结构式如下:

[0007]



[0008] 所述螯合剂与载体蛋白的偶联物是按照包括如下步骤的方法制备的:先将所述螯合剂重氮化,得到重氮化的螯合剂,再将所述重氮化的螯合剂与所述载体蛋白进行偶联,得到所述偶联物;

[0009] 所述螯合剂与载体蛋白的偶联物与铜离子形成的络合物是按照包括如下步骤的方法制备的:将所述铜离子的溶液与所述螯合剂与载体蛋白的偶联物混合,进行络合反应,得到螯合剂与载体蛋白的偶联物与铜离子形成的络合物。

[0010] 所述重氮化的方法包括如下步骤:将所述螯合剂溶于酸的水溶液中,再向其中加

入亚硝酸盐,进行重氮化反应,得到所述重氮化的螯合剂;所述重氮化反应的条件包括:温度为0-5℃、避光;所述温度优选为0℃或4℃;

[0011] 所述偶联的方法包括如下步骤:将所述重氮化的螯合剂与所述载体蛋白混合,进行偶联反应,得到所述偶联物;所述重氮化的螯合剂与所述载体蛋白的摩尔比为(5-15):1,优选为10:1;

[0012] 所述将所述螯合剂溶于酸的水溶液中,所述酸可为盐酸、硫酸、硝酸或硼酸。

[0013] 所述重氮化反应的时间为15min;所述螯合剂、酸和亚硝酸盐的配比为4mg:  $2 \times 10^{-3}$ mol:  $1.2 \times 10^{-4}$ mol;

[0014] 所述偶联反应中,温度为4-10℃,pH值为8.5-9.0,反应时间为4-24h;具体可为:反应温度为4℃,pH值为8.5,反应时间为4h。

[0015] 所述络合反应中,所述螯合剂与载体蛋白的偶联物与所述铜离子的摩尔比为1:(10-50),优选为1:20;

[0016] 所述络合反应中,反应温度为4-25℃,pH值为7.0-8.0,反应时间为12-24h;具体可为:反应温度为25℃,pH值为7.5,反应时间为12h。

[0017] 所述螯合剂为对氨基苄基乙二胺四乙酸;

[0018] 所述载体蛋白为牛血清白蛋白、人血清白蛋白、血蓝蛋白或卵清白蛋白。

[0019] 所述载体蛋白与所述重氮化的对氨基苄基乙二胺四乙酸反应前,先将所述载体蛋白溶解于缓冲液中;所述缓冲液可为碳酸盐、磷酸盐、硼酸盐或HEPES缓冲液,pH为9.0-10.0,具体可为9.5。

[0020] 本发明的另一个目的是提供一种制备铜离子抗原的方法。

[0021] 本发明所提供的制备铜离子抗原的方法,包括如下步骤:

[0022] (1) 将螯合剂重氮化,得到重氮化的螯合剂;

[0023] (2) 将载体蛋白与所述重氮化的螯合剂混合,进行偶联反应,得到载体蛋白与重氮化的螯合剂的偶联物;

[0024] (3) 将铜离子的溶液与所述载体蛋白与重氮化的螯合剂的偶联物混合,进行络合反应,得到铜离子抗原。

[0025] 所述重氮化的方法包括如下步骤:将所述螯合剂溶于酸的水溶液中,再向其中加入亚硝酸盐,进行重氮化反应,得到所述重氮化的螯合剂;所述重氮化反应的条件为:温度为0-5℃、避光;所述温度优选为0℃或4℃。

[0026] 所述将所述螯合剂溶于酸的水溶液中,所述酸可为盐酸、硫酸、硝酸或硼酸。

[0027] 所述重氮化反应的时间为15min;所述螯合剂、酸和亚硝酸盐的配比为4mg:  $2 \times 10^{-3}$ mol:  $1.2 \times 10^{-4}$ mol;

[0028] 所述偶联反应中,所述重氮化的螯合剂与所述载体蛋白的摩尔比为(5-15):1,优选为10:1。

[0029] 所述偶联反应中,温度为4-10℃,pH值为8.5-9.0,反应时间为4-24h;具体可为:反应温度为4℃,pH值为8.5,反应时间为4h。

[0030] 所述络合反应中,所述螯合剂与载体蛋白的偶联物与所述铜离子的摩尔比为1:(10-50),优选为1:20。

[0031] 所述络合反应中,反应温度为4-25℃,pH值为7.0-8.0,反应时间为12-24h;具体

可为：反应温度为 25℃，pH 值为 7.5，反应时间为 12h。

[0032] 所述螯合剂为对氨基苄基乙二胺四乙酸；

[0033] 所述载体蛋白为牛血清白蛋白、人血清白蛋白、血蓝蛋白或卵清白蛋白；

[0034] 所述载体蛋白与所述重氮化的对氨基苄基乙二胺四乙酸反应前，先将所述载体蛋白溶解于缓冲液中；所述缓冲液可为碳酸盐、磷酸盐、硼酸盐或 HEPES 缓冲液，pH 为 9.0-10.0，具体可为 9.5。

[0035] 由上述任一所述铜离子抗原制备得到的抗体也属于本发明的保护范围。

[0036] 上述任一所述铜离子抗原和 / 或所述抗体在检测样品中铜离子的应用也属于本发明的保护范围。

[0037] 所述样品为水体、食品或土壤。

[0038] 所述应用可为利用所述铜离子抗原和 / 或所述抗体制备成检测样品中铜离子的酶联免疫试剂盒、发光免疫试剂盒和免疫亲和色谱柱等。

[0039] 本发明的制备铜离子抗原的方法能够方便、快捷地获得铜离子抗原，且合成步骤简洁明了、合成成本低，效果好。用本发明方法制备的铜离子抗原进行免疫得到的抗体的特异性好、最低检测限值低。本发明的制备铜离子抗原的方法及由该方法获得的铜离子抗原在铜离子的快速免疫检测应用中将有广阔的前景。

#### 附图说明

[0040] 图 1 为铜离子抗原的合成路线图。

[0041] 图 2 为以 EDTA-Cu 为标准样品建立的铜离子间接 ELISA 法标准曲线。

#### 具体实施方式

[0042] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明，均为常规方法。

[0043] 下述实施例中所用的材料、试剂等，如无特殊说明，均可从商业途径得到。

[0044] 对氨基苄基乙二胺四乙酸 (Aminobenzyl-EDTA) 购于 Sigma 公司，产品号 A3473.，弗氏完全佐剂，弗氏不完全佐剂，EDTA，牛血清白蛋白，卵清白蛋白和 CuCl<sub>2</sub> (原子吸收级) 均购于 Sigma 公司，羊抗小鼠 IgG-HRP 购自 Jackson 公司，其余常规试剂均购自北京化学试剂公司。

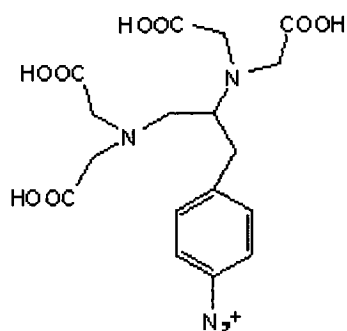
[0045] 实施例 1、铜离子抗原及其制备

[0046] 一、铜 - 对氨基苄基乙二胺四乙酸 - 卵清白蛋白 (Cu- 对氨基苄基 -EDTA-OVA) 抗原的制备

[0047] 1、重氮化：对氨基苄基乙二胺四乙酸 (Aminobenzyl-EDTA) 4mg，溶解于 2mL 1M 的 HCl 水溶液中，得到溶液 I；在 0℃ 避光条件下，向溶液 I 中滴加 60ul 2M 的 NaNO<sub>2</sub> 水溶液，搅拌反应 15 分钟，得到重氮化的对氨基苄基乙二胺四乙酸的酸性溶液。该反应体系中对氨基苄基乙二胺四乙酸、HCl 和 NaNO<sub>2</sub> 的配比为 4mg : 2×10<sup>-3</sup>mol : 1.2×10<sup>-4</sup>mol。

[0048] 重氮化的对氨基苄基乙二胺四乙酸的结构式如式 I 所示。

[0049]

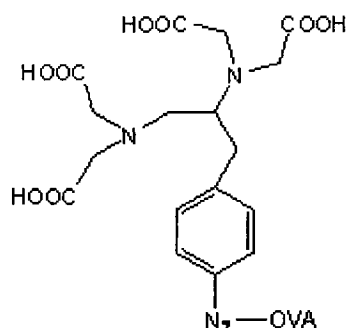


(式 I)。

[0050] 2、偶联：将步骤 1 得到的重氮化的对氨基苄基乙二胺四乙酸的酸性溶液在 10 分钟内加入到 4mL 含有 45mg OVA 的硼酸盐缓冲液 (0.05M, PH9.6) 中, 调节 pH 值到 8.5, 4°C 避光搅拌反应 4 小时, 得到反应产物溶液, 其中含有对氨基苄基乙二胺四乙酸与 OVA 的偶联物。该反应体系中所述重氮化的氨基苄基乙二胺四乙酸与所述载体蛋白 OVA 的摩尔比为 10 : 1。

[0051] 对氨基苄基乙二胺四乙酸与 OVA 的偶联物的结构式如式 II 所示。

[0052]

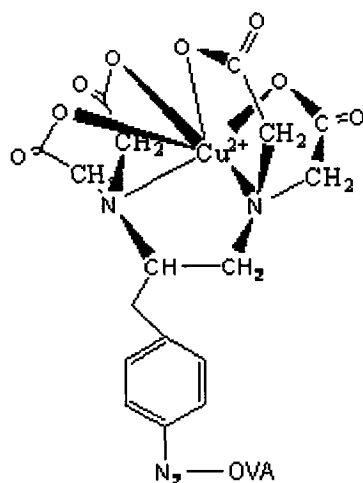


(式 II)。

[0053] 3、络合：将步骤 2 得到的反应产物溶液用 1M 的 HCl 将 pH 值调节到 7.5, 然后向其中滴加 40uL 0.5M 的氯化铜水溶液, 室温 (25°C) 反应过夜 (12 小时), 得到反应产物溶液, 其中含有对氨基苄基乙二胺四乙酸与 OVA 的偶联物与铜离子形成的络合物。偶联物与所述铜离子的摩尔比为 1 : 20。

[0054] 对氨基苄基乙二胺四乙酸与 OVA 的偶联物与铜离子形成的络合物的结构式如式 III 所示。

[0055]



(式 III)。

[0056] 4、透析：将步骤 3 得到的反应产物溶液在 PBS 溶液 (pH7.5) 中透析完全, 用 PBS 缓冲液将透析完全的反应产物 (Cu-对氨基苄基-EDTA-OVA) 溶液稀释为 1mg/mL 的溶液, 至

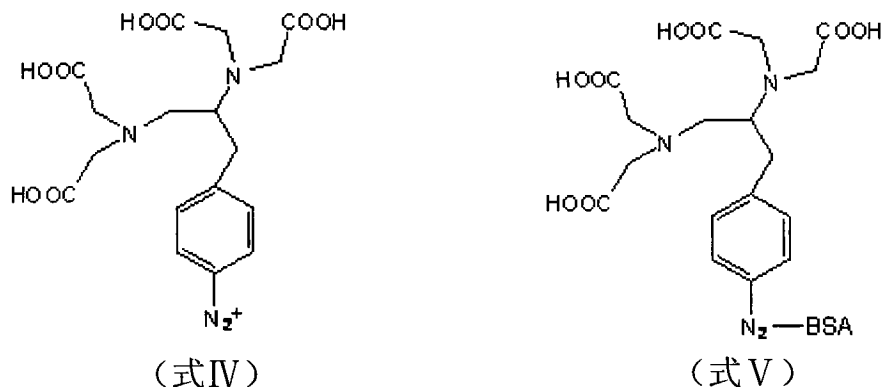
于  $-40^{\circ}\text{C}$  冻存待用。透析的作用在于去除未整合的铜离子或未反应的其他小分子。

[0057] 二、铜-对氨基苄基乙二胺四乙酸-牛血清白蛋白 (Cu-对氨基苄基 EDTA-BSA) 抗原的制备

[0058] 1、重氮化：对氨基苄基乙二胺四乙酸 (Aminobenzyl-EDTA) 4mg, 溶解于 2mL 1M 的 HCl 水溶液中, 得到溶液 I; 在  $0^{\circ}\text{C}$  避光条件下, 向溶液 I 中滴加 60 $\mu\text{l}$  2M 的  $\text{NaNO}_2$  水溶液, 搅拌反应 15 分钟, 得到重氮化的对氨基苄基乙二胺四乙酸的酸性溶液。该反应体系中对氨基苄基乙二胺四乙酸、HCl 和  $\text{NaNO}_2$  的配比为  $4\text{mg} : 2 \times 10^{-3}\text{mol} : 1.2 \times 10^{-4}\text{mol}$ ;

[0059] 重氮化的对氨基苄基乙二胺四乙酸的结构式如式 IV 所示。

[0060]



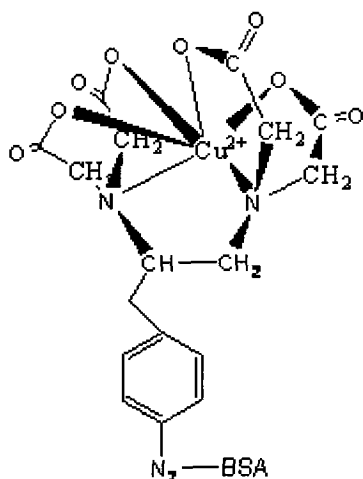
[0061] 2、偶联：将步骤 1 得到的重氮化的对氨基苄基乙二胺四乙酸的酸性溶液在 10 分钟内加入到 4mL 含有 67.5mg BSA 的硼酸盐缓冲液 (0.05M, PH9.6) 中, 调节 pH 值到 8.5,  $4^{\circ}\text{C}$  避光搅拌反应 4 小时, 得到反应产物溶液, 其中含有对氨基苄基乙二胺四乙酸与 BSA 的偶联物。该反应体系中所述重氮化的氨基苄基乙二胺四乙酸与所述载体蛋白 BSA 的摩尔比为 10 : 1。

[0062] 对氨基苄基乙二胺四乙酸与 BSA 的偶联物的结构式如式 V 所示。

[0063] 3、络合：将步骤 2 得到的反应产物溶液用 1M 的 HCl 将 pH 值调节到 7.5, 然后向其中滴加 40 $\mu\text{l}$  0.5M 的氯化铜水溶液, 室温反应过夜, 得到反应产物溶液, 其中含有对氨基苄基乙二胺四乙酸与 BSA 的偶联物与铜离子形成的络合物。偶联物与所述铜离子的摩尔比为 1 : 20; (螯合剂与载体蛋白的摩尔比为 10 : 1, 而铜离子与螯合剂的摩尔比应该为 2 : 1, 所以偶联物与所述铜离子的摩尔比为 1 : 20)。

[0064] 对氨基苄基乙二胺四乙酸与 BSA 的偶联物与铜离子形成的络合物的结构式如式 III 所示。

[0065]



(式VI)。

[0066] 4、透析：将步骤3得到的反应产物溶液在PBS溶液(pH7.5)中透析完全，用PBS缓冲液将透析完全的反应产物(Cu-对氨基苄基EDTA-BSA)溶液稀释为1mg/mL的溶液，至于-40℃冻存待用。透析的作用在于去除未螯合的铜离子或未反应的其他小分子。

[0067] 实施例2、铜离子抗原的应用

[0068] 一、利用铜-对氨基苄基乙二胺四乙酸-卵清白蛋白抗原制备抗体

[0069] (1) 取8-10周龄的Ba1 b/C小白鼠作为实验动物。

[0070] (2) 基础免疫：实施例1中得到的铜-对氨基苄基EDTA-OVA完全抗原(1mg/mL)，经无菌过滤器过滤后加入等体积弗氏完全佐剂，用磁力搅拌器充分搅拌乳化，直到滴入水中不扩散。用乳化好的完全抗原采用腹腔及背部皮下多点注射Ba1 b/C小鼠，注射剂量为0.1mg抗原/只。

[0071] (3) 加强免疫：基础免疫2周后，取1mL上述稀释好的铜-对氨基苄基EDTA-OVA抗原溶液，然后加入1mL弗氏不完全佐剂，用磁力搅拌器充分搅拌乳化，直到滴入水中不扩散。将乳化好的抗原采用腹腔及背部皮下多点注射Ba1 b/C小鼠，每只小鼠的注射剂量为0.1mg。

[0072] 加强免疫每隔10天免疫一次，从第三次加强免疫开始，每次免疫后第6-7天，从小鼠眼眶采血，测定抗体效价，待效价大于1：8000后(效价定义为零孔显色值为1时，血清的稀释倍数)，眼球摘除采血，血液室温静置2小时后，于离心机中5000r/min离心5分钟后，分离出抗血清，即得到抗体。用于下述各实验。

[0073] 二、抗体效果检测

[0074] 下述实验中所用的各种缓冲液如下：

[0075] (1) 包被缓冲液：0.05M、pH9.6的碳酸盐缓冲液；

[0076] (2) 磷酸盐缓冲液PBS(pH7.5)：由NaCl、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O和水组成；NaCl在磷酸盐缓冲液中的浓度为8.0g/L，KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>在磷酸盐缓冲液中的浓度为0.2g/L，Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O在磷酸盐缓冲液中的浓度为2.96g/L；

[0077] (3) 样品稀释液PBSTG：由吐温20、明胶和PBS缓冲液组成，吐温20在样品稀释液中的浓度为0.1% (体积百分含量)，明胶在样品稀释液中的浓度为1g/L；

[0078] (4) 柠檬酸盐-磷酸盐缓冲液：由柠檬酸三钠、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>和水组成；柠檬酸三钠在柠檬酸盐-磷酸盐缓冲液中的浓度为0.01M，Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>在柠檬酸盐-磷酸盐缓冲液中的浓度为0.03M；柠檬酸盐-磷酸盐缓冲液的pH值为5.5；

[0079] (5) 底物缓冲液 : 将 20.0mg 邻苯二胺 (OPD) 溶解于 10.0mL 柠檬酸盐 - 磷酸盐缓冲液中, 然后加入 4  $\mu$  L 体积百分含量为 30% 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 得到的溶液;

[0080] (6) 终止缓冲液 : 2.0M 的硫酸水溶液;

[0081] (7) 洗涤液 : 由 NaCl、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O、Tween-20 和水组成; NaCl 在洗涤液中的浓度为 8.0g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 在洗涤液中的浓度为 0.2g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 在洗涤液中的浓度为 2.96g/L, Tween-20 在洗涤液中体积百分含量为 1 : 1000。

[0082] (一) 抗体抑制实验

[0083] 1、Cu- 对氨基苄基 EDTA-BSA 包被抗原溶液的配制

[0084] 将上述实施例 1 制备的 Cu- 对氨基苄基 EDTA-BSA 抗原完全解冻后, 用包被缓冲液按 1 : 500、1 : 1000、1 : 2000、1 : 4000、1 : 8000 进行梯度稀释。

[0085] 2、EDTA-Cu 螯合物标准品溶液的配制

[0086] (1) 称取 29.3mg EDTA, 充分溶解于 10mL 去离子水中, 用 1M NaOH 调节 pH 至 8.0, 得到溶液 I;

[0087] (2) 称取 13.5mg CuCl<sub>2</sub>, 溶解于去离子水中, 并逐滴加入到上述步骤 (1) 配制的溶液 I 中, 磁力搅拌反应 12 小时, 再将溶液定容至 6.4mL, 得到螯合产物溶液, 其中含有 EDTA 与 Cu 的螯合物 (EDTA-Cu), EDTA-Cu 在溶液中的浓度为 2.11mg/mL, Cu 离子在螯合产物溶液中的浓度为 1mg/mL;

[0088] (3) 用样品稀释液将上述步骤 (2) 的螯合产物溶液配成浓度为 2000ngCu 离子/mL 的 EDTA-Cu 螯合物标准品溶液。

[0089] 3、Cu- 对氨基苄基 EDTA-OVA 抗血清稀释液的配制

[0090] 将上述步骤一制备的 Cu- 对氨基苄基 EDTA-OVA 抗血清用样品稀释液按 1 : 2500、1 : 5000、1 : 10000、1 : 20000、1 : 40000 进行梯度稀释。

[0091] 4、抗原、抗体的棋盘格实验

[0092] 包被 : 在 96 孔酶标板中每孔加入 100 $\mu$ L 步骤 1 制备得到的 Cu- 对氨基苄基 EDTA-BSA 的溶液, 37 $^{\circ}$ C 包被 3 小时, 用洗涤液洗涤 4 次。

[0093] 封闭 : 封闭液 150  $\mu$  L/ 孔, 在 37 $^{\circ}$ C 湿盒中封闭 1h, 弃封闭液, 洗涤 3 次。

[0094] 竞争 : 零孔每孔加 50 $\mu$ L 样品稀释液, 抑制孔每孔加入 50 $\mu$ L 步骤 2 制备得到的 EDTA-Cu 螯合物标准品溶液。将血清用样品稀释液倍比稀释成梯度浓度 (从 1/2500 到 1/40000), 然后加入酶标板中 (50 $\mu$ L/ 孔), 置湿盒中 37 $^{\circ}$ C 条件下 30min, 洗板 4 次。

[0095] 加酶标二抗 : 将羊抗鼠酶标二抗 (0.1mg/mL) 稀释 1000 倍, 每孔加 100  $\mu$  L, 置湿盒中 37 $^{\circ}$ C 条件下 30min, 洗板 4 次。

[0096] 显色 : 取 20mgOPD 溶于 10mL 底物稀释液中, 加 4  $\mu$  L 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 将底物溶液加入酶标板中, 每孔 100 $\mu$ L。避光显色 15min。

[0097] 终止 : 每孔加入 50  $\mu$  L 终止液, 用酶标仪 490nm 处测定各孔的 OD 值。

[0098] 效价的定义为零孔 OD 值为 1 时的血清稀释倍数。

[0099] 结果如表 1 所示。

[0100] 表 1 抗 Cu<sup>2+</sup>-EDTA 小鼠的血清效价检测 (OPD 37 $^{\circ}$ C 显色 15min, 2000ng 标样抑制)

血清	2.5×10 <sup>3</sup>		5×10 <sup>3</sup>		10×10 <sup>3</sup>		20×10 <sup>3</sup>		40×10 <sup>3</sup>	
抗原	I	C	I	C	I	C	I	C	I	C
0.5×10 <sup>3</sup>	2.068	2.824	1.569	2.242	0.798	1.846	0.310	1.311	0.132	0.967
[0101] 1×10 <sup>3</sup>	1.663	2.399	1.011	1.964	0.422	1.565	0.243	1.127	0.101	0.634
2×10 <sup>3</sup>	1.156	1.988	0.503	1.560	0.155	1.212	0.113	0.996	0.069	0.589
4×10 <sup>3</sup>	0.696	1.459	0.196	1.161	0.098	0.946	0.070	0.767	0.059	0.467
8×10 <sup>3</sup>	0.201	0.968	0.127	0.842	0.081	0.722	0.069	0.549	0.054	0.297

[0102] 注：I 表示酶标板中的抑制孔，C 表示酶标板中的对照孔。

[0103] 表 1 中结果表明，当包被抗原稀释度为 1：4000，抗血清稀释度为 1：10000 时，此时的抑制率最好，为 89.6%（抑制率 =  $(A_0 - A_{2000}) / A_0 \times 100\%$ ），也即此时的抑制效果最好。说明上述实施例 1 制备的 Cu-对氨基苄基 EDTA-OVA 可以作为免疫原制备出检测铜离子的抗体。

[0104]  $A_0$  为对照孔 OD 值； $A_{2000}$  为抑制孔 OD 值；

[0105] 抑制率的计算公式：抑制率 =  $(A_0 - A_{2000}) / A_0 \times 100\%$ 。

[0106] （二）EDTA-Cu 标准曲线的建立

[0107] 将上述制备的 EDTA-Cu 螯合物标准品溶液用样品稀释液分别稀释成如下不同的浓度：2000ng/mL、1000ng/mL、500ng/mL、250ng/mL、125ng/mL、62.5ng/mL、31.25ng/mL、15.6ng/mL。

[0108] （1）包被原的包被：将上述制备的 Cu-对氨基苄基 EDTA-BSA 抗原按照 1：4000 稀释后加入到酶标板中，每孔 100  $\mu$ L，37℃温育 3 小时；倒去酶标板中的溶液，用洗涤液洗板 4 次，甩干；

[0109] （2）在步骤（1）的酶标板中分别加入上述不同浓度的 EDTA-Cu 螯合物标准品溶液（实验孔），每孔 50  $\mu$ L，对照孔中不添加 EDTA-Cu 螯合物标准品溶液而加入 50  $\mu$ L 样品稀释液；

[0110] （3）分别向上述实验孔和对照孔中加入稀释倍数为 1：10000 的抗血清稀释液，每孔 50  $\mu$ L；37℃温育 30 分钟；倒掉酶标板中的溶液，用洗涤液洗板 4 次，甩干；

[0111] （4）在实验孔和对照孔中分别加入 100  $\mu$ L 稀释倍数为 1：1000 的 IgG-HRP (0.1mg/mL)，37℃温育 30 分钟；用洗涤液洗板 4 次，倒掉酶标板中的溶液，甩干；

[0112] （5）向实验孔和对照孔中分别加入 100  $\mu$ L 底物缓冲液，37℃温育 15 分钟后，再向每孔中加入 50  $\mu$ L 2.0M 的硫酸溶液终止反应；

[0113] （6）在 492nm 下测定吸光值；

[0114] （7）绘制标准曲线：以不同浓度 (ng/mL) 的 EDTA-Cu 螯合物标准品溶液作为 X 轴，以吸光度值的比值 ( $B/B_0 \times 100\%$ ，其中，B 为 EDTA-Cu 螯合物标准品溶液的平均吸光度值， $B_0$  为对照孔的平均吸光度值) 作为 Y 轴，绘制标准曲线图。

[0115] 实验设 3 次重复，取三次实验结果的平均值，得到的标准曲线图如图 2 所示。结果表明，其灵敏度 ( $IC_{50}$ ) 为 135ng/mL，检测范围是 22ng/mL-1080ng/mL。说明上述实施例 1 制备的 Cu-对氨基苄基 EDTA-OVA 作为抗原免疫小鼠得到的抗体具有很好的效果。

[0116] （三）抗体特异性检测

[0117] EDTA-Cu 螯合物标准品溶液的配制

[0118] 1、EDTA-Cu 类似螯合物的制备

[0119] 参照上述步骤（一）中 EDTA-Cu 螯合物的制备方法，制备 Cd、Pb、Hg、Zn、Al、Fe、Ag、Mg、Ca 金属的 EDTA 螯合物供试标准品溶液，以溶液中各金属离子实际含量计算各供试标准品溶液的浓度。

[0120] 用样品稀释液将上述类似螯合物分别稀释成如下浓度：20000ng 金属离子 /mL、10000ng 金属离子 /mL、5000ng 金属离子 /mL、2500ng 金属离子 /mL、1250ng 金属离子 /mL、625ng 金属离子 /mL、312.5ng 金属离子 /mL。

[0121] 2、各自建立标准曲线，测定抑制中浓度  $IC_{50}$ （抑制率达到 50% 的标样浓度值）。

[0122] 标准曲线的建立方法与上述 EDTA-Cu 标准曲线的建立方法相同。

[0123] 交叉反应率（%）=  $(EDTA-Cu IC_{50}) / (EDTA-Cu \text{ 类似螯合物 } IC_{50}) \times 100\%$ 。

[0124] 实验设 3 次重复，取三次实验结果的平均值，结果如表 2 所示。结果表明，上述由 Cu- 对氨基苄基 EDTA-OVA 制备得到的抗体与其它 EDTA-Cu 类似螯合物的交叉反应率很小，说明用 Cu- 对氨基苄基 EDTA-OVA 制备的抗体对铜离子具有很好的特异性。

[0125] 表 2 由 Cu- 对氨基苄基 EDTA-OVA 制备的抗体的特异性检测

[0126]

分析物	$IC_{50}$ (ng/mL)	交叉反应率 (%)
EDTA-Cu	135	100
EDTA-Co	2480	5.4
EDTA-Hg	> 10000	< 1.5
EDTA-Pb	> 20000	< 1
EDTA-Cd	> 20000	< 1
EDTA-Fe	> 20000	< 1
EDTA-Al	> 20000	< 1
EDTA-Ca	> 20000	< 1
EDTA-Mg	> 20000	< 1
EDTA-Zn	> 20000	< 1
EDTA-Ag	> 20000	< 1
EDTA	> 20000	< 1

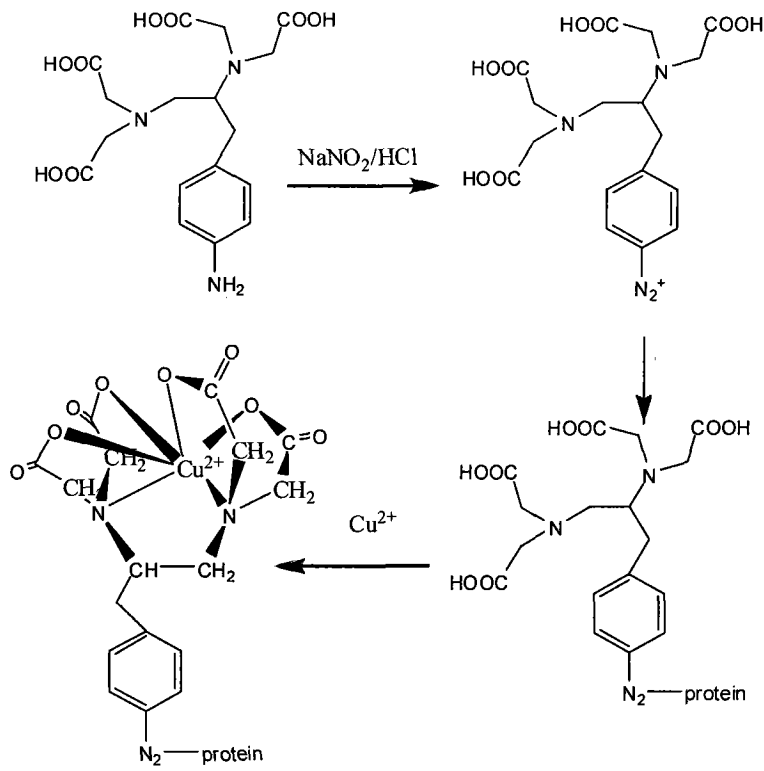


图 1

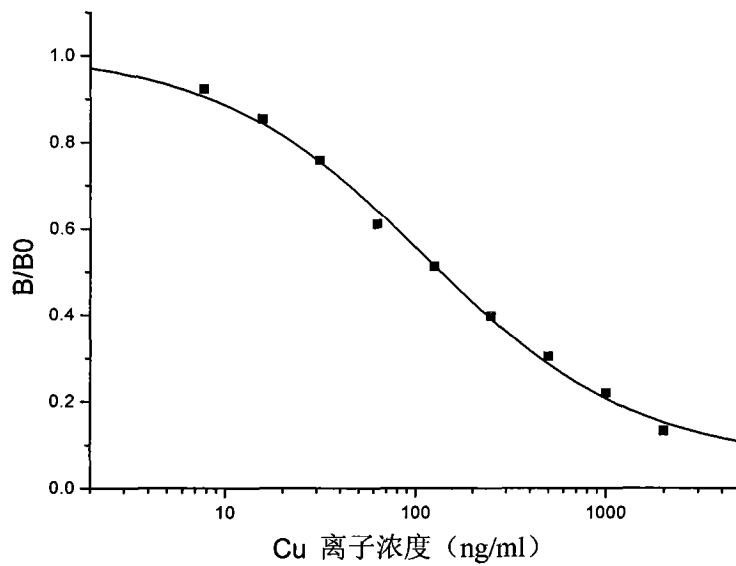


图 2

专利名称(译)	铜离子抗原及其制备方法与应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN101768217A</a>	公开(公告)日	2010-07-07
申请号	CN201010034438.3	申请日	2010-01-20
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
[标]发明人	王保民 赵洪伟 南铁贵 谭桂玉 刘威 高巍 谭伟明 李召虎		
发明人	王保民 赵洪伟 南铁贵 谭桂玉 刘威 高巍 谭伟明 李召虎		
IPC分类号	C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 C07K1/113 C07K16/44 G01N33/53		
代理人(译)	关畅		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种铜离子抗原及其制备方法与应用。该铜离子抗原，是螯合剂与载体蛋白的偶联物与铜离子形成的络合物。本发明的制备铜离子抗原的方法能够方便、快捷地获得铜离子抗原，且合成步骤简洁明了、合成成本低，效果好。用本发明方法制备的铜离子抗原进行免疫得到的抗体的特异性好、最低检测限值低。本发明的制备铜离子抗原的方法及由该方法获得的铜离子抗原在铜离子的快速免疫检测应用中将有广阔的前景。

