



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101914152 A

(43) 申请公布日 2010.12.15

(21) 申请号 201010259922.6

(22) 申请日 2010.08.20

(71) 申请人 中国农业大学

地址 100193 北京市海淀区圆明园西路2号

(72) 发明人 王保民 南铁贵 赵洪伟 谭桂玉

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 11245

代理人 关畅 任风华

(51) Int. Cl.

C07K 14/765 (2006.01)

C07K 14/77 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 8 页 附图 1 页

(54) 发明名称

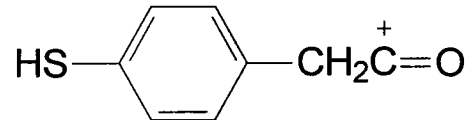
汞离子抗原及其制备方法与应用

(57) 摘要

本发明公开了一种汞离子抗原及其制备方法与应用。本发明提供的方法包括如下步骤:1) 活化 4-巯基苯基乙酸,得到活化的 4-巯基苯基乙酸;2) 将步骤 1) 得到的活化的 4-巯基苯基乙酸与载体蛋白偶联,得到活化的 4-巯基苯基乙酸与载体蛋白的偶联物;3) 将步骤 2) 得到的所述活化的 4-巯基苯基乙酸与载体蛋白的偶联物与汞离子螯合,得到所述偶联物和汞离子的螯合物,即得到汞离子抗原。本发明的制备汞离子抗原的方法能够方便、快捷地获得汞离子抗原,且合成步骤简洁明了、合成成本低,效果好。

1. 一种制备汞离子抗原的方法,包括如下步骤:
 - 1) 活化 4- 巯基苯基乙酸,得到活化的 4- 巯基苯基乙酸;
 - 2) 将步骤 1) 得到的活化的 4- 巯基苯基乙酸与载体蛋白偶联,得到活化的 4- 巯基苯基乙酸与载体蛋白的偶联物;
 - 3) 将步骤 2) 得到的所述活化的 4- 巯基苯基乙酸与载体蛋白的偶联物与汞离子螯合,得到所述偶联物和汞离子的螯合物,即得到汞离子抗原。
2. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于:
 - 步骤 1) 活化 4- 巯基苯基乙酸的方法包括如下步骤:
 - A、将 4- 巯基苯基乙酸溶解于 N, N' - 二甲基甲酰胺中,得到 I 液;
 - B、二环己基碳二亚胺和 N- 羟基琥珀酰亚胺溶于 N, N' - 二甲基甲酰胺中,得到 II 液;
 - C、将 I 液和 II 液混合,搅拌反应,离心,收集上清液,即得到活化的 4- 巯基苯基乙酸;
 - 步骤 2) 将步骤 1) 得到的活化的 4- 巯基苯基乙酸与载体蛋白偶联的方法包括如下步骤:
 - D、将步骤 C 得到的活化的 4- 巯基苯基乙酸与载体蛋白溶液混合,反应;
 - 步骤 3) 将步骤 2) 得到的所述活化的 4- 巯基苯基乙酸与载体蛋白的偶联物与汞离子螯合的方法包括如下步骤:
 - E、将所述活化的 4- 巯基苯基乙酸与载体蛋白的偶联物与汞离子溶液混合,反应。
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法,其特征在于:
 - 步骤 1) 中,所述二环己基碳二亚胺、N- 羟基琥珀酰亚胺与 4- 巯基苯基乙酸的投料摩尔比为不小于 1 : 1 : 1,具体为 2 : 2 : 1;
 - 步骤 2) 中,所述活化的 4- 巯基苯基乙酸与载体蛋白的投料摩尔比为 15 : 1;
 - 步骤 3) 中,所述偶联物与汞离子的投料摩尔比为 1 : 5。
4. 根据权利要求 1-3 中任一所述的方法,其特征在于:
 - 步骤 1) 中,所述步骤 C 中,搅拌反应的条件为:反应温度为 25℃、反应时间为 12 小时、避光;所述离心转速为 10000g,离心时间为 10min;
 - 步骤 2) 中,所述步骤 D 的反应条件为:反应温度为 25℃,反应时间为 12 小时,反应的 pH 为 9.5;
 - 步骤 3) 中,所述步骤 E 的反应条件为:反应温度 25℃,反应时间 24 小时。
5. 根据权利要求 1-4 中任一所述的方法,其特征在于:
 - 所述步骤 2) 中,所述载体蛋白溶液为按如下方法制备:将载体蛋白溶解到缓冲液中得到载体蛋白溶液;所述缓冲液为碳酸盐、磷酸盐、硼酸盐或 4- 羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲液, pH 为 9.6;所述载体蛋白为卵清白蛋白或牛血清白蛋白;
 - 所述步骤 3) 中,所述汞离子溶液为氯化汞水溶液。
6. 根据权利要求 1-5 中任一所述的方法,其特征在于:
 - 所述步骤 2) 的 D 中,在所述反应后,包括将反应产物进行透析的步骤;
 - 所述步骤 3) 的 E 中,在所述反应后,包括将反应产物进行透析得到汞离子抗原的步骤。
7. 由权利要求 1-6 中任一所述方法制备得到的汞离子抗原。
8. 一种汞离子抗原,是活化的 4- 巯基苯基乙酸与载体蛋白通过共价键连接形成的偶联物与汞离子通过配位键连接形成的络合物;所述共价键是活化的 4- 巯基苯基乙酸上的羧基与载体蛋白上的氨基形成的;所述配位键是偶联物中活化的 4- 巯基苯基乙酸上的硫

基与汞离子形成的 ;所述活化的 4- 巯基苯基乙酸的化学结构式如下所示 :



;所述载体蛋白为卵清白蛋白或牛血清白蛋白。

9. 由权利要求 7 或 8 所述汞离子抗原得到的抗体。

10. 权利要求 7 或 8 所述汞离子抗原和 / 或权利要求 9 中所述抗体在检测样品中汞离子中的应用 ;

权利要求 7 或 8 所述汞离子抗原和 / 或权利要求 9 中所述抗体在制备用于检测样品中汞离子的酶联免疫试剂盒中的应用 ;

权利要求 7 或 8 所述汞离子抗原和 / 或权利要求 9 中所述抗体在制备用于检测样品中汞离子的发光免疫试剂盒中的应用 ;

权利要求 7 或 8 所述汞离子抗原和 / 或权利要求 9 中所述抗体在制备用于检测样品中汞离子的免疫亲和色谱柱中的应用 ;

所述样品为水体、食品或土壤。

汞离子抗原及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种汞离子抗原及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 汞是环境与农产品的一个重要污染物质,由于其能在人体和环境中长期蓄积,且可以通过食物链的富集作用传递给人或动物,给人类健康带来了严重的危害。如 50 年代中期在日本曾经因食用重金属汞污染的鱼而出现了震惊世界的水俣病,从而使环境中汞污染的健康危害问题得到了全世界的关注。环境中的汞的大量蓄积主要是因为工业三废的无序、超限排放,从而造成大量的土壤和水体污染,造成环境恶化。

[0003] 重金属汞的分析方法有原子吸收光谱法、电感耦合等离子体发射光 / 质谱法、X- 射线荧光光谱法及电位溶出分析法等。这几种仪器检测方法检测重金属汞不仅需要昂贵的仪器设备,而且检测费用高、检测时间长和检测步骤繁杂,不能用于现场的快速检测。免疫分析法是利用抗原与抗体的特异性结合反应而建立的一种分析方法,与仪器分析法相比,免疫分析法具有快速、便宜、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。免疫检测试剂盒可以快速检测某一特定物质的含量,但要将免疫分析法应用到检测重金属离子汞,必须制备相应的抗原和抗体。目前,国内外文献报道的检测方法主要利用氨羧类螯合剂进行,螯合剂螯合重金属汞后制备重金属汞完全抗原,所制备的抗体只能识别重金属与螯合剂复合物,且需对样品进行复杂的前处理。

发明内容

[0004] 本发明的一个目的是提供制备汞离子抗原的方法。

[0005] 本发明所提供的方法,包括如下步骤:

[0006] 1) 活化 4- 巯基苯基乙酸,得到活化的 4- 巯基苯基乙酸;

[0007] 2) 将步骤 1) 得到的活化的 4- 巯基苯基乙酸与载体蛋白偶联,得到活化的 4- 巯基苯基乙酸与载体蛋白的偶联物;

[0008] 3) 将步骤 2) 得到的所述活化的 4- 巯基苯基乙酸与载体蛋白的偶联物与汞离子螯合,得到所述偶联物和汞离子的螯合物,即得到汞离子抗原。

[0009] 步骤 1) 活化 4- 巯基苯基乙酸的方法包括如下步骤:

[0010] A、将 4- 巯基苯基乙酸溶解于 N, N' - 二甲基甲酰胺中,得到 I 液;

[0011] B、将二环己基碳二亚胺和 N- 羟基琥珀酰亚胺溶于 N, N' - 二甲基甲酰胺中,得到 II 液,

[0012] C、将 I 液和 II 液混合,搅拌反应,离心,收集上清液,即得到活化的 4- 巯基苯基乙酸;

[0013] 步骤 2) 将步骤 1) 得到的活化的 4- 巯基苯基乙酸与载体蛋白偶联的方法包括如下步骤 :D、将步骤 C 得到的活化的 4- 巯基苯基乙酸与载体蛋白溶液混合,反应;

[0014] 步骤 3) 将步骤 2) 得到的所述活化的 4- 巯基苯基乙酸与载体蛋白的偶联物与汞

离子整合的方法包括如下步骤 :E、将所述活化的 4- 巯基苯基乙酸与载体蛋白的偶联物与汞离子溶液混合,反应。

[0015] 步骤 1) 中,所述二环己基碳二亚胺、N- 羟基琥珀酰亚胺与 4- 巯基苯基乙酸的投料摩尔比 (此处摩尔比至少为 1 : 1 : 1,要求 4- 巯基苯基乙酸彻底反应完毕,DCC 与 NHS 的摩尔量不应小于 4- 巯基苯基乙酸的摩尔量,但是二环己基碳二亚胺与 N- 羟基琥珀酰亚胺的摩尔量也不宜过多,过多易导致蛋白质自身偶联) 为不小于 1 : 1 : 1,具体为 2 : 2 : 1 ;

[0016] 步骤 2) 中,所述活化的 4- 巯基苯基乙酸与载体蛋白的投料摩尔比为 15 : 1 ;

[0017] 步骤 3) 中,所述偶联物与汞离子的投料摩尔比为 1 : 5。

[0018] 步骤 1) 中,所述步骤 C 中,搅拌反应的条件为 :反应温度为 25℃、反应时间为 12 小时、避光 ;所述离心转速为 10000g,离心时间为 10min ;

[0019] 步骤 2) 中,所述步骤 D 的反应条件为 :反应温度为 25℃,反应时间为 12 小时,反应的 pH 为 9.5 ;

[0020] 步骤 3) 中,所述步骤 E 的反应条件为 :反应温度 25℃,反应时间 24 小时。

[0021] 所述步骤 2) 中,所述载体蛋白溶液为按如下方法制备 :将载体蛋白溶解到缓冲液中得到载体蛋白溶液 ;所述缓冲液为碳酸盐、磷酸盐、硼酸盐或 4- 羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲液,pH 为 9.6 ;所述载体蛋白为卵清白蛋白或牛血清白蛋白 ;

[0022] 所述步骤 3) 中,所述汞离子溶液为氯化汞水溶液。

[0023] 所述步骤 2) 的 D 中,在所述反应后,包括将反应产物进行透析的步骤 ;所述透析液为浓度为 0.1M、PH 值为 9.5 的 PBS 缓冲液。

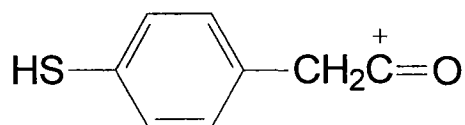
[0024] 所述步骤 3) 的 E 中,在所述反应后,包括将反应产物进行透析得到汞离子抗原的步骤,所述透析液为浓度为 0.1M、PH 值为 9.5 的 PBS 缓冲液。

[0025] 由上述任一所述方法制备得到的汞离子抗原也属于本发明的保护范围。

[0026] 本发明的另一个目的是提供一种汞离子抗原。

[0027] 本发明提供的汞离子抗原,是活化的 4- 巯基苯基乙酸与载体蛋白通过共价键连接形成的偶联物与汞离子通过配位键连接形成的络合物 ;所述共价键是活化的 4- 巯基苯基乙酸上的羧基与载体蛋白上的氨基形成的 ;所述配位键是偶联物中活化的 4- 巯基苯基乙酸上的巯基 (-SH) 与汞离子 (Hg^{2+}) 形成的 ;所述活化的 4- 巯基苯基乙酸的化学结构式如下所示 :

[0028]



[0029] ;所述载体蛋白为卵清白蛋白或牛血清白蛋白。

[0030] 由上述汞离子抗原得到的抗体也属于本发明的保护范围。

[0031] 所述汞离子抗原和 / 或所述抗体在检测样品中汞离子的应用也属于本发明的保护范围 ;

[0032] 所述汞离子抗原和 / 或所述抗体在制备用于检测样品中汞离子的酶联免疫试剂盒中的应用 ;

[0033] 所述汞离子抗原和 / 或所述抗体在制备用于检测样品中汞离子的发光免疫试剂

盒中的应用；

[0034] 所述汞离子抗原和 / 或所述抗体在制备用于检测样品中汞离子的免疫亲和色谱柱中的应用；

[0035] 所述样品为水体、食品或土壤。

[0036] 本发明的实验证明,本发明中的制备汞离子抗原的方法能够方便、快捷地获得汞离子抗原,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汞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,且样品无需螯合剂螯合即可直接检测样品中的游离汞离子,本发明的制备汞离子抗原的方法及由该方法获得的汞离子抗原在汞离子的酶联免疫检测中将有广阔的应用前景。

附图说明

[0037] 图 1 为 Hg-4-MPA- 蛋白人工抗原合成反应示意图

[0038] 图 2 为以 Hg 为标准样品建立的汞离子间接 ELISA 法标准曲线

具体实施方式

[0039] 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。

[0040] 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。

[0041] 4-MPA(4- 巯基苯基乙酸,购自 Sigma 公司,商品目录号为 653152),羊抗小鼠 IgG-HRP(购自 Jackson 公司,商品目录号为 79556),弗氏完全佐剂(购自 Sigma 公司,商品目录号为 F5881),弗氏不完全佐剂(购自 Sigma 公司,商品目录号为 F5506),DCC(二环己基碳二亚胺。购自 Sigma 公司,商品目录号为 D80002),NHS(N- 羟基琥珀酰亚胺,购自 Sigma 公司,商品目录号为 130672),牛血清白蛋白(购自 Sigma 公司,商品目录号为 A7906),卵清白蛋白(购自 Sigma 公司,商品目录号为 A5503),HgCl₂(氯化汞,购自 Sigma 公司,商品目录号为 449199),其余甘油、N, N' - 二甲基甲酰胺 (DMF) 和邻苯二胺 (OPD) 等常规试剂均购自北京化学试剂公司。

[0042] 实施例 1、汞 -N- 乙酰半胱氨酰苯丙氨酸 - 牛血清白蛋白抗原 (Hg-4-MPA-BSA) 的制备

[0043] 汞离子抗原的合成路线图如图 1 所示,具体步骤如下：

[0044] 1、4-MPA 的活化

[0045] (1) 称取 2.3mg 的粉状 4-MPA,充分溶解于 0.5mL 的无水 DMF 中,得到 I 液。

[0046] (2) 称取 2.8mg 固体 DCC 和 1.6mg 的固体 NHS,充分溶解于 1.0mL 无水 DMF 中,得到 II 液。

[0047] (3) 先将上述步骤 (1) 得到 I 液和步骤 (2) 得到 II 液在 25℃ 避光条件下进行磁力搅拌,再将 II 液和 I 液混合,混合的方法为每间隔 30s,将 50 μ L 上述步骤 (2) 得到 II 加入步骤 (1) 得到 I 液中,然后在 25℃ 避光条件下进行磁力搅拌反应 12 小时,得到混合液；DCC、NHS 的加入量是过量的,即 DCC、NHS 与 4-MPA 的投料摩尔比等于 2 : 2 : 1；

[0048] (4) 将上述步骤 (3) 混合液离心弃沉淀保留上清液,得到活化的 4-MPA 溶液。

[0049] 2、活化的 4-MPA 与载体蛋白进行偶联

[0050] (1) 称取 60.2mg 牛血清白蛋白 (BSA),充分溶解于 2.0mL 浓度为 50mM、pH 9.6 的

碳酸盐缓冲液中,得到溶液 III ;

[0051] (2) 将上述步骤 1 获得的活化的 4-MPA 溶液与上述步骤 (1) 溶液 III 混合,25℃条件下,搅拌过夜(12 小时),得到反应液;期间用质量百分含量为 5%的 K_2CO_3 将反应液的 pH 控制在 9.5 ;所述 4-MPA 与所述 BSA 的投料摩尔比为 15 : 1 ;

[0052] (3) 反应 12 小时后,将上述步骤 (2) 的反应液置于透析袋中,用浓度为 0.1M、pH 为 7.5 的 PBS 透析 2 天,每天换 3 次透析液,得到纯化的活化的 4-MPA 与载体蛋白的偶联物溶液。

[0053] 3、重金属离子汞的偶联

[0054] (1) 称取 15.4mg $HgCl_2$,用超纯水配制成 0.1M $HgCl_2$ 溶液,记作溶液 IV ;

[0055] (2) 将上述步骤 (1) 的溶液 IV 与上述步骤 2 获得的纯化的活化的 4-MPA 与载体蛋白的偶联物溶液混合,混合的方式为将溶液 IV 滴加到上述步骤 2 获得的纯化的活化的 4-MPA 与载体蛋白的偶联物溶液中,边滴加边搅拌,25℃条件下搅拌 24 小时,得到反应产物,所述活化的 4-MPA 与汞离子的投料摩尔比为 1 : 5 (即偶联物与汞离子的投料摩尔比为 1 : 5) ;

[0056] (3) 将上述步骤 (2) 的反应产物用浓度为 0.1M、pH 为 7.5 的 PBS 透析 2 天,每天换 3 次透析液,以除去未联结的汞离子及其它杂质,透析产物即为 Hg-4-MPA-BSA 抗原溶液 ;

[0057] (4) 将上述 Hg-4-MPA-BSA 抗原溶液分装,经 -40℃冷冻后,真空干燥,置于 -20℃冰箱中保存备用。

[0058] (5) 取 2mg 上述步骤 (4) 的冻干物,用由 0.1M、pH 为 7.5 的 PBS 和甘油 (PBS 和甘油的体积比为 1 : 1) 组成的混合液稀释成浓度 1mg/mL 的 Hg-4-MPA-BSA 抗原溶液,保存于 -20℃冰箱中。

[0059] Hg-4-MPA-BSA 抗原是活化的 4-MPA 与 BSA 通过共价键连接形成的偶联物与汞离子通过配位键连接形成的络合物 ;所述共价键是活化的 4-MPA 上的羧基与 BSA 上的氨基形成的 ;所述配位键是偶联物中活化的 4-MPA 上的巯基 (-SH) 与汞离子 (Hg^{2+}) 形成的。

[0060] 实施例 2、汞 -N- 乙酰半胱氨酸苯丙氨酸 - 卵清白蛋白抗原 (Hg-4-MPA-OVA) 的制备

[0061] 1、4-MPA 的活化

[0062] (1) 称取 2.3mg 的粉状 4-MPA,充分溶解于 0.5mL 的无水 DMF 中,得到 I 液。

[0063] (2) 称取 2.8mg 固体 DCC 和 1.6mg 的固体 NHS,充分溶解于 1.0mL 的无水 DMF 中,得到 II 液。

[0064] (3) 先将上述步骤 (1) 得到 I 液和步骤 (2) 得到 II 液在 25℃避光条件下进行磁力搅拌,再将 II 液和 I 液混合,混合的方法为每间隔 30s,将 50 μ L 上述步骤 (2) 得到 II 加入步骤 (1) 得到 I 液中,然后在 25℃避光条件下进行磁力搅拌反应 12 小时,得到混合液 ;DCC、NHS 的加入量是过量的,即 DCC、NHS 与 4-MPA 的投料摩尔比大于或等于 2 : 2 : 1 ;

[0065] (4) 将上述步骤 (3) 的混合液离心弃沉淀保留上清液,得到活化的 4-MPA 溶液 ;离心转速为 10000g,时间为 10min。

[0066] 2、活化的 4-MPA 与载体蛋白进行偶联

[0067] (1) 称取 41.0mg 卵清白蛋白 (OVA),充分溶解于 2.0mL 浓度为 50mM、pH 9.6 的碳酸盐缓冲液中,得到溶液 III ;

[0068] (2) 将上述步骤 1 获得的活化的 4-MPA 溶液与上述步骤 (1) 溶液 III 混合, 25℃ 条件下, 搅拌过夜 (12 小时), 得到反应液; 期间用质量百分含量为 5% 的 K_2CO_3 将反应液的 pH 控制在 9.5; 所述 4-MPA 与 OVA 的投料摩尔比为 15 : 1;

[0069] (3) 反应 12 小时后, 将上述步骤 (2) 的反应液置于透析袋中, 用 0.1M、pH 为 7.5 的 PBS 透析 2 天, 每天换 3 次透析液, 得到纯化的活化的 4-MPA 与载体蛋白的偶联物溶液。

[0070] 3、重金属离子汞的偶联

[0071] (1) 称取 18.5mg $HgCl_2$, 用超纯水配制成 0.1M $HgCl_2$ 溶液, 记作溶液 IV;

[0072] (2) 将上述步骤 (1) 的溶液 IV 与上述步骤 2 获得的纯化的活化的 4-MPA 与载体蛋白的偶联物溶液混合, 混合的方式为将溶液 IV 滴加到上述步骤 2 获得的纯化的活化的 4-MPA 与载体蛋白的偶联物溶液中, 边滴加边搅拌, 25℃ 条件下搅拌 24 小时, 得到反应产物, 所述活化的 4-MPA 与汞离子的投料摩尔比为 1 : 5;

[0073] (3) 将上述步骤 (2) 的反应产物用 0.1M、pH 为 7.5 的 PBS 透析 2 天, 每天换 3 次透析液, 以除去未联结的汞离及其它杂质, 透析产物即为 Hg-4-MPA-OVA 抗原溶液;

[0074] (4) 将上述 Hg-4-MPA-OVA 抗原溶液分装, 经 -40℃ 冷冻后, 真空干燥, 置于 -20℃ 冰箱中保存。

[0075] (5) 取 2mg 上述步骤 (4) 的冻干物, 用由 0.1M、pH 为 7.5 的 PBS 和甘油 (PBS 和甘油的体积比为 1 : 1) 组成的混合液稀释成浓度 1mg/mL 的 Hg-4-MPA-OVA 抗原溶液, 保存于 -20℃ 冰箱中。

[0076] Hg-4-MPA-OVA 抗原是活化的 4-MPA 与 OVA 通过共价键连接形成的偶联物与汞离子通过配位键连接形成的络合物; 所述共价键是活化的 4-MPA 上的羧基与 OVA 上的氨基形成的; 所述配位键是偶联物中活化的 4-MPA 上的巯基 (-SH) 与汞离子 (Hg^{2+}) 形成的。

[0077] 实施例 3、汞离子抗原的应用

[0078] 一、利用 Hg-4-MPA-BSA 抗原制备抗体

[0079] (1) 取 8-10 周龄的 Ba1 b/C 小白鼠作为实验动物。实验中基础免疫剂量为 0.25-4.0mg/kg 体重, 加强免疫剂量为 0.5-4.0mg/kg 体重。

[0080] (2) 基础免疫: 取 1mL 由实施例 1 得到的浓度 1mg/mL 的 Hg-4-MPA-BSA 抗原溶液 (以 BSA 量计算) 用无菌过滤器过滤, 然后加入 1mL 的弗氏完全佐剂, 充分乳化, 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 乳化的抗原 (8 周龄的 Ba1 b/C 小鼠体重约 23-25g)。基础免疫只进行一次。

[0081] (3) 加强免疫: 基础免疫 3-4 周后, 取 1mL 由实施例 1 得到的浓度 1mg/mL 的 Hg-4-MPA-BSA 抗原溶液, 用无菌过滤器过滤, 然后加入 1mL 弗氏不完全佐剂, 充分乳化, 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 乳化的稀释抗原 (此时 Ba1 b/C 小鼠体重约 25-27g)。

[0082] 按照上述方法每隔 3-4 周加强免疫一次, 从第三次加强免疫开始, 每次免疫后第 7-10 天, 从小鼠眼眶采血, 测定抗体效价, 包被抗原浓度为 0.5 μ g/ml, 待效价大于 1 : 4000 后 (效价定义为零孔显色值为 1 时, 血清的稀释倍数), 处死小鼠, 采血, 分离出抗血清, 即得到 Hg-4-MPA-BSA 抗体。

[0083] 二、抗体效果检测

[0084] 下述实验中所用的各种缓冲液如下:

- [0085] (1) 包被缓冲液 :0.05M、pH9.6 的碳酸盐缓冲液 ;
- [0086] (2) PBS :称量 8.0g NaCl、0.2gKH₂PO₄、2.96g Na₂HPO₄·12H₂Oml,用蒸馏水定容到 1.0L(请提供),得到浓度为 0.1M、pH 为 7.5 磷酸盐缓冲液 ;
- [0087] (3) 样品稀释液 PBSTG :由 0.5ml 吐温 20、0.5g 明胶和 500ml 浓度为 0.1M、PH 为 7.5 的 PBS 缓冲液混合得到 ;
- [0088] (4) 柠檬酸盐 - 磷酸盐缓冲液 :由柠檬酸三钠、Na₂HPO₄ 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, Na₂HPO₄ 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 ;
- [0089] (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 μ L 体积百分含量为 30% 的 H₂O₂ 得到的溶液,柠檬酸盐 - 磷酸盐缓冲液为 (4) 中所述 ;
- [0090] (6) 终止缓冲液 :2.0M 的硫酸溶液 ;
- [0091] (7) 洗涤液 :由 NaCl、KH₂PO₄、Na₂HPO₄·12H₂O、Tween-20 和水组成 ;NaCl 在洗涤液中的浓度为 8.0g/L, KH₂PO₄ 在洗涤液中的浓度为 0.2g/L, Na₂HPO₄·12H₂O 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。
- [0092] 将上述步骤一制备的 Hg-4-MPA-BSA 抗体进行如下检测,下面详细描述具体的实验过程 :
- [0093] (一) 抗体抑制实验
- [0094] 1、Hg-4-MPA-OVA 包被抗原溶液的配制
- [0095] 将上述实施例 2 制备浓度 1mg/mL 的 Hg-4-MPA-OVA 抗原完全解冻后,用上述包被缓冲液按 1 : 500、1 : 1000、1 : 2000、1 : 4000、1 : 8000、1 : 16000 进行梯度稀释,得到不同浓度包被 Hg-4-MPA-OVA 抗原溶液。
- [0096] 2、Hg 标准品溶液的配制
- [0097] (1) 称取 13.5mg 固体 HgCl₂,充分溶解于 10.0mL 超纯水中,其中 Hg 离子的浓度为 1mg/mL ;
- [0098] (2) 用样品稀释液将上述步骤 (1) 的 Hg 溶液配成浓度为 4000ng/mL 的 Hg 标准品溶液。
- [0099] 3、Hg-4-MPA-BSA 抗血清稀释液的配制
- [0100] 将上述步骤一制备的 Hg-4-MPA-BSA 抗体用样品稀释液按 1 : 1000、1 : 2000、1 : 4000、1 : 8000、1 : 16000 进行梯度稀释,得到不同浓度的 Hg-4-MPA-BSA 抗血清稀释液。
- [0101] 4、将 IgG-HRP 用由 PBS(浓度为 0.1M, PH 为 7.5) 和甘油 (PBS 和甘油的体积比为 1 : 1) 组成的混合液稀释成 0.1mg/mL,保存于 -20℃ 冰箱中。使用时用样品稀释液按 1 : 1000 稀释。
- [0102] 5、抗原、抗体的棋盘格实验
- [0103] (1) 包被原的包被 :将上述步骤 1 制备的不同浓度的包被 Hg-4-MPA-OVA 抗原溶液加入到酶标板中,每孔 100 μ 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 ;
- [0104] (2) 在步骤 (1) 的酶标板中加入上述步骤 2 制备的 Hg 标准品溶液 (实验孔),每

孔 50 μ L, 对照孔中不添加 Hg 标准品溶液而加入 50 μ L 样品稀释液;

[0105] (3) 分别向上述实验孔和对照孔中加入上述步骤 3 制备的不同浓度的 Hg-4-MPA-BSA 抗血清稀释液, 每孔 50 μ L; 37 $^{\circ}$ C 温育 30 分钟; 倒掉酶标板中的溶液, 用洗涤液洗板 4 次, 甩干;

[0106] (4) 在实验孔和对照孔中分别加入 100 μ L 用样品稀释液稀释的 IgG-HRP, 37 $^{\circ}$ C 温育 30 分钟; 用洗涤液洗板 4 次, 倒掉酶标板中的溶液, 甩干;

[0107] (5) 向实验孔和对照孔中分别加入 100 μ L 底物缓冲液, 37 $^{\circ}$ C 温育 15 分钟后, 再向每孔中加入 50 μ L 2.0M 的硫酸溶液终止反应;

[0108] (6) 在 492nm 下测定吸光值。

[0109] 实验设 3 次重复, 取三次实验结果的平均值, 结果如表 1 所示。

[0110] 表 1、抗原、抗体棋盘格实验结果

抗体 \ 抗原	1:1000		1:2000		1:4000		1:8000	
	A ₀ ^a	A ₂₀₀₀ ^b	A ₀ ^a	A ₂₀₀₀ ^b	A ₀ ^a	A ₂₀₀₀ ^b	A ₀ ^a	A ₂₀₀₀ ^b
1:500	2.997	2.775	2.702	2.352	1.770	1.456	1.142	0.750
[0111] 1:1000	2.987	2.637	2.659	1.783	1.497	1.100	1.109	0.578
1:2000	2.941	2.262	2.557	0.865	1.213	0.579	0.949	0.430
1:4000	2.867	1.106	2.140	0.661	1.163	0.309	0.720	0.306
1:8000	2.316	0.789	1.620	0.477	0.716	0.241	0.470	0.203

[0112] 表 1 中, ^a 表示不添加 Hg 竞争显色值 A₀, ^b 表示添加 50 μ L 4000ng/mL 的 Hg 竞争显色值 A₂₀₀₀。

[0113] 结果表明, 当包被抗原与抗血清浓度适宜时, 就有抑制现象, 即 4000ng/mL 孔与 0ng/mL 孔的吸光度值有差别, 4000ng/mL 孔吸光度值小, 0ng/mL 孔吸光度值高; 用抑制率计算抗原、抗体的最佳组合, 从表 1 中可以看出, 当包被抗原稀释度为 1:4000, 抗血清稀释度为 1:4000 时, 此时的抑制率最好, 为 73.4% (抑制率 = (A₀ - A₄₀₀₀) / A₀), 也即此时的抑制效果最好。说明上述实施例 1 制备的 Hg-4-MPA-BSA 可以作为免疫原制备出检测汞离子的抗体。

[0114] (二) Hg 标准曲线的建立

[0115] 将上述步骤 (一) 制备的 Hg 标准品溶液用样品稀释液分别稀释成如下不同的浓度: 8000ng/mL、4000ng/mL、2000ng/mL、1000ng/mL、500ng/mL、250ng/mL 和 125ng/mL。

[0116] (1) 包被原的包被: 将上述实施例 2 制备的 1mg/ml Hg-4-MPA-BSA 抗原按照 1:4000 稀释后加入到酶标板中, 每孔 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 温育 3 小时; 倒去酶标板中的溶液, 用洗涤液洗板 4 次, 甩干;

[0117] (2) 在步骤 (1) 的酶标板中分别加入上述不同浓度的 Hg 标准品溶液 (实验孔), 每孔 50 μ L, 对照孔中不添加 Hg 标准品溶液而加入 50 μ L 样品稀释液;

[0118] (3) 分别向上述实验孔和对照孔中加入上述步骤(一)中3制备的稀释倍数为1:4000的抗血清稀释液,每孔50 μ L;37 $^{\circ}$ C温育30分钟;倒掉酶标板中的溶液,用洗涤液洗板4次,甩干;

[0119] (4) 在实验孔和对照孔中分别加入100 μ L稀释倍数为1:1000的IgG-HRP,37 $^{\circ}$ C温育30分钟;用洗涤液洗板4次,倒掉酶标板中的溶液,甩干;

[0120] (5) 向实验孔和对照孔中分别加入100 μ L底物缓冲液,37 $^{\circ}$ C温育15分钟后,再向每孔中加入50 μ L 2.0M的硫酸溶液终止反应;

[0121] (6) 在492nm下测定吸光值;

[0122] (7) 绘制标准曲线:以不同浓度(ng/mL)的Hg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Hg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。

[0123] 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1033ng/mL,检测范围是70ng/mL-16581ng/mL。说明上述实施例1制备的Hg-4-MPA-BSA作为抗原免疫小鼠得到的抗体具有良好的效果。

[0124] (三) 抗体特异性检测

[0125] Hg标准品溶液的配制

[0126] 1、重金属标准样品的制备

[0127] 参照步骤(一)中Hg的制备方法,制备Cd、Cu和Pb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。

[0128] 用样品稀释液将上述金属标准样品分别稀释成如下浓度:80000ng/mL、40000ng/mL、2000ng/mL、10000ng/mL、5000ng/mL、2500ng/mL、1250ng/mL、625ng/mL。

[0129] 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)。

[0130] 标准曲线的建立方法与上述Hg标准曲线的建立方法相同。

[0131] 交叉反应率(%) = $(Hg IC_{50}) / (\text{金属标准样品 } IC_{50}) \times 100\%$ 。

[0132] 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,上述步骤一制备的Hg-4-MPA-BSA抗体与其它重金属的交叉反应率很小,说明用上述实施例1制备的Hg-4-MPA-BSA免疫小鼠产生的抗体具有很好的特异性。

[0133] 表2 Hg-4-MPA-BSA抗体的特异性检测

[0134]

分析物	IC_{50} (ng/mL)	交叉反应率 (%)
Hg	1033	100
Cd	>80000	<0.5
Cu	>80000	<0.5
Pb	>80000	<0.5

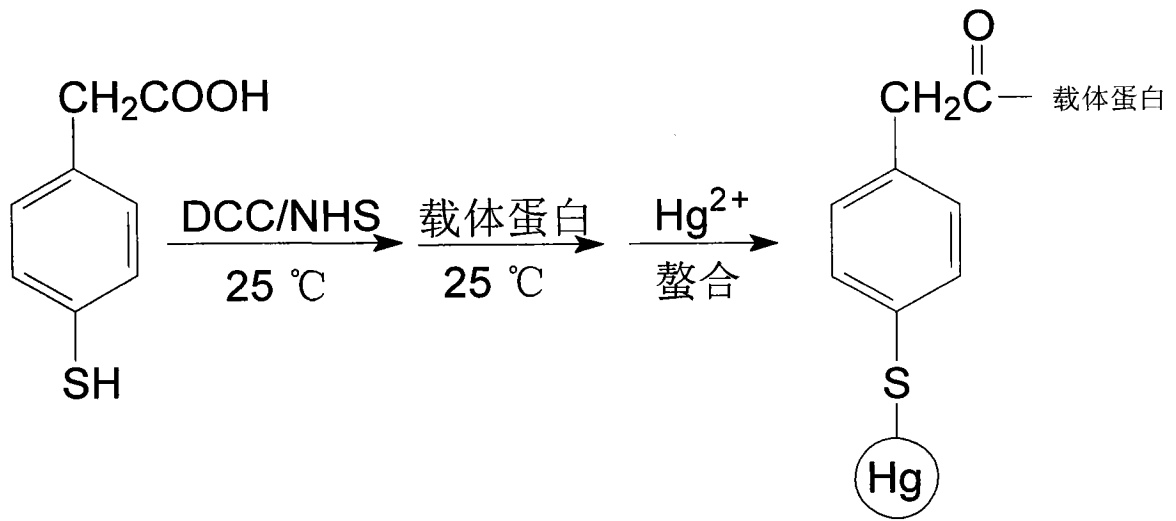


图 1

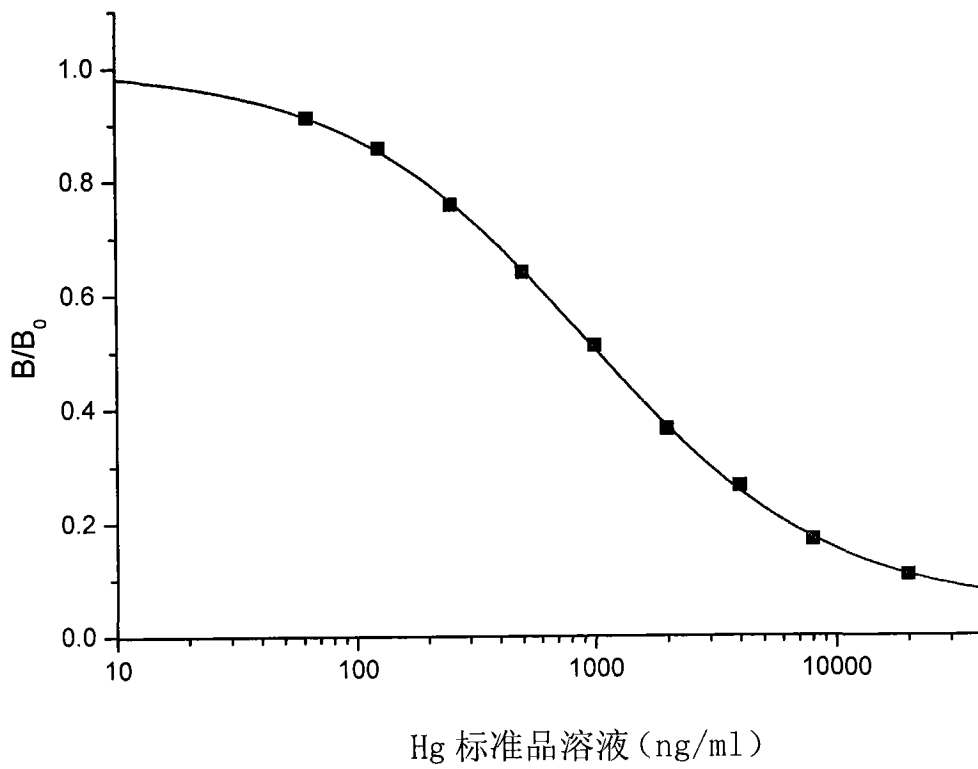


图 2

专利名称(译)	汞离子抗原及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN101914152A	公开(公告)日	2010-12-15
申请号	CN201010259922.6	申请日	2010-08-20
[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 南铁贵 赵洪伟 谭桂玉 高巍 谭伟明 李召虎		
发明人	王保民 南铁贵 赵洪伟 谭桂玉 高巍 谭伟明 李召虎		
IPC分类号	C07K14/765 C07K14/77 C07K16/44 G01N33/53		
代理人(译)	关畅		
其他公开文献	CN101914152B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种汞离子抗原及其制备方法与应用。本发明提供的方法包括如下步骤：1)活化4-巯基苯基乙酸，得到活化的4-巯基苯基乙酸；2)将步骤1)得到的活化的4-巯基苯基乙酸与载体蛋白偶联，得到活化的4-巯基苯基乙酸与载体蛋白的偶联物；3)将步骤2)得到的所述活化的4-巯基苯基乙酸与载体蛋白的偶联物与汞离子螯合，得到所述偶联物和汞离子的螯合物，即得到汞离子抗原。本发明的制备汞离子抗原的方法能够方便、快捷地获得汞离子抗原，且合成步骤简洁明了、合成成本低，效果好。

