

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/531 (2006.01)



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510037436.9

[43] 公开日 2006年5月10日

[11] 公开号 CN 1769893A

[22] 申请日 2005.9.22

[21] 申请号 200510037436.9

[71] 申请人 暨南大学

地址 510632 广东省广州市黄埔大道西 601
号

[72] 发明人 江天久 牛 涛 向军俭

[74] 专利代理机构 广州市华学知识产权代理有限公司

代理人 陈燕娴

权利要求书 1 页 说明书 7 页

[54] 发明名称

重金属 Pb^{2+} 完全抗原的制备方法

[57] 摘要

本发明公开了一种重金属 Pb^{2+} 完全抗原的制备方法。该方法如下：取 3.0 ~ 10.0mg 重量份载体蛋白、0.4 ~ 1.8mg 重量份双功能螯合剂、0.3 ~ 0.8mg 重量份 $Pb(NO_3)_2$ 及 1.4 ~ 4.5mg 重量份三乙胺，于 1.0 ~ 3.0ml 体积份的 HEPES 缓冲溶液中溶解，15 ~ 30°C 温度下振荡 8 ~ 24 小时后，用超滤或透析的方法去除未反应的低分子物质，剩余物于 HEPES 缓冲溶液中保存，分装，得成品。本发明所得抗原具有较好的免疫原性，用此抗原免疫小鼠能制备 Pb 特异性抗体，可以进一步制备重金属 Pb 快速检测试剂盒。

1、一种重金属 Pb^{2+} 完全抗原的制备方法，其特征在于：取 3.0~10.0mg 重量份载体蛋白、0.4~1.8mg 重量份双功能螯合剂、0.3~0.8mg 重量份 $Pb(NO_3)_2$ 及 1.4~4.5mg 重量份三乙胺，于 1~3 ml 体积份的 HEPES 缓冲溶液中溶解，15~30℃ 温度下振荡 8~24 小时后，用超滤或透析的方法去除未反应的低分子物质，剩余物于 HEPES 缓冲溶液中保存，分装，得成品。

2、根据权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于：所述双功能螯合剂为二乙烯三胺五乙酸或者乙二胺四乙酸的硫氰基衍生物。

3、根据权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于：所述载体蛋白、双功能螯合剂、 $Pb(NO_3)_2$ 及三乙胺的重量比为 (4~8) : (0.7~1.2) : (0.4~0.7) : (2.5~4.0)。

4、根据权利要求 3 所述的制备方法，其特征在于：所述载体蛋白、双功能螯合剂、 $Pb(NO_3)_2$ 及三乙胺的重量比为 5:0.9:0.6 :3。

5、根据权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于：所述的 $Pb(NO_3)_2$ 的纯度级别为光谱纯度级别。

6、根据权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于：所述载体蛋白为钥孔血蓝蛋白、牛血清白蛋白或卵白蛋白。

7、根据权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于：所述用于溶解反应物的 HEPES 缓冲溶液的浓度为 30~100mM，PH 为 8.5~9.5。

8、根据权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于：所述用于保存生成物的 HEPES 缓冲溶液的浓度为 30~60mM，PH 为 7.0~7.4。

9、根据权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于：采用超滤方法去除未反应的低分子物质时，选用截留分子量为 10000~30000dal 的超滤离心管，3000rpm~6000rpm 超滤三次，每次 4~8 分钟。

10、根据权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于：采用透析方法去除未反应的低分子物质时，将待透析物置于截留分子量为 8000~14000dal 的透析袋中，透析 3 天。

重金属 Pb^{2+} 完全抗原的制备方法

技术领域

本发明涉及免疫学检测方法检测重金属 Pb^{2+} 残留的抗原的制备方法。

背景技术

现已知至少 20 种左右的重金属有很大的毒性，它们中又有一半以上被大量排放的周围环境中。重金属属于永久性污染物质，它们的半衰期一般都在几十年以上，并且不能通过化学或生物修复等方法进行有效去除。我国目前沿用的传统重金属检测方法需要大型、昂贵的检测仪器，虽然能精确检测样品中单种金属的总量，但存在着费力、费时、费用昂贵、需要进行大量的样品预处理，并且样品的检测需在设有大型分析设备的室内进行，不能用于现场检测等缺点。此外，这些检测方法不能提供重金属的氧化状态或者演变信息。

近年来由于我国社会经济的高速发展，重金属等污染物质被大量排放到周围环境中，由于重金属属于永久性污染物，并能被初等植物富集，通过食物链传递而进行生物放大作用，对人类健康造成严重威胁，因而需要对环境中的重金属残留尤其是市售食品重金属残留进行长期监测。

免疫学检测方法是一种新型、高效快速的检测方法，该方法具有检测速度快、费用低廉、简单易携、具有高度的灵敏度和选择性的特点，理论上能应用于能产生合适抗体的任何污染物质，目前被广泛应用于临床医学、动物检疫、食品科学、植物病毒、药物残留、病虫害防治等分析领域。建立重金属免疫学检测方法的关键点在于重金属完全抗原的制备，重金属离子由于其分子量较小，并且具有毒性，不能直接作为免疫原免疫动物，因而需要运用特殊的方法制备重金属完全抗原。

国外自从 Reardan 等人首次通过金属-螯合剂抗原制备出单克隆抗体以来，越来越多的抗 Hg^{2+} 、 In^{3+} 、 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 、 U^{6+} 等金属-螯合剂复合物的单克隆抗体被制备出来，建立了 KinExA 法、间接竞争 ELISA 法、一步竞争性免疫检测法、荧光偏振免疫检测法等重金属免疫检测方法，检测限能达到 ppb 级别，并进行了抗原-抗体的结合属性的相关研究，这些研究基本上还处于实验室研究阶段。此外，国外水体受 Cd^{2+} 离子污染最为严重，因而针对对 Cd^{2+} 离子进行的相关研

究最多，并取得了一定的进展：Blake 等人正在研制 Cd^{2+} 离子免疫传感器模型，检测结果能达到与 ICP-AES 可比的检测水平，并且他们正在与公司合作开发重金属免疫传感器。而国内尚未见到相关报道。

重金属免疫学检测方法的建立为重金属污染物的检测提供了另一途径。重金属免疫学检测方法建立的关键在于金属完全抗原的制备。重金属离子自身不能作为有效的抗体识别目标，因为它们带有电荷，趋向于与生物分子发生强烈的不可逆的反应（这也是重金属的毒性所在），选用螯合剂与金属离子配位使之与生物分子的反应能力减弱，这种金属-螯合剂复合物应能够提供一个能被动物免疫系统识别的有机物外壳。但这种重金属-螯合剂复合物是低分子的半抗原，不足以引起小鼠的免疫反应的发生，因此选用结构较复杂的大分子双功能螯合剂，一方面螯合重金属，另一方面通过其上的硫氰基团将其偶联到载体蛋白（BSA 或 KLH）上，从而制备出完全抗原。国外运用此理论目前已经建立了 Hg^{2+} 、 In^{3+} 、 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 、 U^{6+} 等重金属酶联免疫快速高效检测方法，检测限能达到 ppb 级别，其检测结果甚至能达到与 ICP-AES 可比的程度，但这些研究成果目前还处于实验室研究阶段，离实际应用还有一段距离。

发明内容

本发明的目的在于提供一种重金属 Pb^{2+} 完全抗原的制备方法，为制备重金属 Pb^{2+} 残留快速检测试剂盒或者传感器提供物质基础。

为达上述目的，本发明的重金属 Pb^{2+} 完全抗原的制备方法如下：取 3.0~10.0mg 重量份载体蛋白、0.4~1.8mg 重量份双功能螯合剂、0.3~0.8mg 重量份 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 及 1.4~4.5mg 重量份三乙胺，于 1.0~3.0ml 体积份的 HEPES 缓冲溶液中溶解，15~30℃ 温度下振荡 8~24 小时后，用超滤或透析的方法去除未反应的低分子物质，剩余物于 HEPES 缓冲溶液中保存，分装，得成品。

所述双功能螯合剂为常用重金属螯合剂二乙烯三胺五乙酸（以下称 DTPA）或者乙二胺四乙酸（以下称 EDTA）的硫氰基衍生物，例如 CHX-A'-DTPA (*N*-[2-amino-3-*p*-isothiocyanatophenyl-propyl]-trans-cyclohexane-1,2-diamine-*N,N'*,*N''*,*N'''*,*N''''*-diethylenetriamine pentaacetic acid)、1B4M-DTPA (*p*-SCN- C_6H_5 -DTPA)、1B4M-EDTA (*p*-SCN- C_6H_5 -EDTA) 等。

所述载体蛋白、双功能螯合剂、 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 及三乙胺的优选重量比为 (4~8) : (0.7~1.2) : (0.4~0.7) : (2.5~4.0)。

所述载体蛋白、双功能螯合剂、 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 及三乙胺的最佳重量比为 5:0.9:0.6 :3。

所述的 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 的纯度级别为光谱纯度级别。

所述载体蛋白可以为钥孔血蓝蛋白、牛血清白蛋白或卵白蛋白等。

所述用于溶解反应物的 HEPES 缓冲溶液的浓度为 30~100mM, PH 为 8.5~9.5。用于保存生成物的 HEPES 缓冲溶液的浓度为 30~60mM, PH 为 7.0~7.4。

当采用超滤方法去除未反应的低分子物质时, 选用截留分子量为 10000~30000dal 的超滤离心管, 3000~6000rpm 超滤三次, 每次 4~8 分钟。当采用透析方法去除未反应的低分子物质时, 将待透析物置于截留分子量为 8000~14000 的透析袋中, 透析 3 天。

对采用本发明的方法制得的完全抗原进行了以下几方面的检测:

1、完全抗原中载体蛋白质氨基酸替代度检测: 利用 A.F.S.A.HABEEB 于 1966 年提出的运用 TNBS (详见: Analytical Biochemistry, 1966, 14, 328~336) 来检测蛋白质中自由氨基酸基团数量法来检测蛋白质在偶联前后自由氨基酸基团数量的变化, 从而计算出其蛋白质氨基酸替代度。运用此法计算出上述制备的抗原中蛋白质氨基酸替代度为 23.8~53.6 %, 此结果表明双功能螯合剂与载体蛋白质偶联成功。

2、完全抗原中 Pb 离子含量测量: 为了进一步确定 Pb 离子是否与双功能螯合剂螯合, 接着用 ICP-AES 法对制备抗原中的 Pb 离子含量进行检测, 其结果为 36.48~54.02mg/L, 此结果表明抗原中 Pb 离子与双功能螯合剂螯合成功。

3、完全抗原免疫原性检测: 通过步骤 1 和 2 制备出的完全抗原, 需要检测其是否具有免疫原性。取此抗原与等量佐剂用注射器双推法混合均匀, 常规免疫小鼠, 免疫 4~5 次后测小鼠血清效价, 对血清效价较高的小鼠, 取其脾脏进行细胞融合, 经过后续一系列步骤制备出小鼠腹水性 Pb 特异性单抗, 对其也进行了效价检测。用含 Pb 完全抗原与无 Pb 完全抗原 (二者的载体蛋白与免疫小鼠所用抗原的载体蛋白不同) 包被酶标板, 用间接 ELISA 法检测血清、腹水的效价以及它们对 Pb 离子特异性, 结果显示: 二者效价分别为 $1/(4.1 \times 10^5 \sim 8.2 \times 10^5)$ 和 $1/(2.0 \times 10^5 \sim 4.1 \times 10^5)$, 并且在二者进行检测时, 用含 Pb 完全抗原作为间接 ELISA 检测抗原时的 OD 值远大于无 Pb 完全抗原, 说明原抗原具有较好的免疫原性, 用此抗原免疫小鼠能制备 Pb 特异性抗体, 可以进一步制备

重金属 Pb 快速检测试剂盒。

本发明成功解决了重金属 Pb^{2+} 完全抗原制备难题，在我国实属首创。应用本项专利免疫动物制备金属特异性单抗，进而研制重金属快速高效检测试剂盒、试剂条或者传感器，其将成为进出口检验检疫部门、食品卫生部门、水产养殖和渔业检测部门、环保部门等部门的首选检测工具，这种检测仪器的普及将改变我国食品重金属残留检测滞后、被动的窘境，充分保障我国食品的食用安全，促进食品安全体系的建立，进而能提升我国食品安全的形象和质量信誉，增加食品出口创汇，从而促进相关食品产业可持续发展，具有良好的经济价值和社会效益，市场前景十分广阔。

具体实施方式

实施例一：

称取 3mg 钥孔血蓝蛋白、0.4mg 双功能螯合剂 CHX-A''-DTPA、0.3mg 光谱纯度级别的 $Pb(NO_3)_2$ 、1.4mg 三乙胺于 1.0ml 30mM HEPES 缓冲溶液(PH9.0)中溶解，15℃振荡 24 小时，取出抗原至 6ml 的截留分子量为 10000dal 超滤管中，用 PH7.4 的 50mM HEPES 缓冲液稀释至 5ml，3000rpm 离心 8 分钟，再重复两次，再将此 HEPES 缓冲液稀释到 3ml，然后进行分装，得 Pb^{2+} 完全抗原。

实施例二：

称取 4mg 钥孔血蓝蛋白、0.7mg 双功能螯合剂 CHX-A''-DTPA、0.4mg 光谱纯度级别的 $Pb(NO_3)_2$ 、2.5mg 三乙胺于 1.5ml 50mM HEPES 缓冲溶液(PH9.0)中溶解，25℃振荡 12 小时，取出抗原至 6ml 的截留分子量为 30000dal 超滤管中，用 PH7.4 的 50mM HEPES 缓冲液稀释至 5ml，4000rpm 离心 5 分钟，再重复两次，再将此 HEPES 缓冲液稀释到 3ml，然后进行分装，得 Pb^{2+} 完全抗原。

实施例三：

称取 5mg 钥孔血蓝蛋白、0.9mg 双功能螯合剂 CHX-A''-DTPA、0.6mg 光谱纯度级别的 $Pb(NO_3)_2$ 、3mg 三乙胺于 1.5ml 50mM HEPES 缓冲溶液(PH9.0)中溶解，25℃振荡 10 小时，取出抗原至 6ml 的截留分子量为 30000dal 超滤管中，用 PH7.4 的 50mM HEPES 缓冲液稀释至 5ml，4000rpm 离心 5 分钟，再重复两次，再将此 HEPES 缓冲液稀释到 3ml，然后进行分装，得 Pb^{2+} 完全抗原。

实施例四：

称取 8mg 钥孔血蓝蛋白、1.2mg 双功能螯合剂 CHX-A''-DTPA、0.7mg 光

谱纯度级别的 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 、4.0mg 三乙胺于 2.0ml 50mM HEPES 缓冲溶液(PH9.0) 中溶解, 25℃振荡 8 小时, 取出抗原至 6ml 的截留分子量为 30000dal 超滤管中, 用 PH7.4 的 50mM HEPES 缓冲液稀释至 5ml, 4000rpm 离心 5 分钟, 再重复两次, 再将此 HEPES 缓冲液稀释到 3ml, 然后进行分装, 得 Pb^{2+} 完全抗原。

实施例五:

称取 10mg 钥孔血蓝蛋白、1.8mg 双功能螯合剂 CHX-A''-DTPA、0.8mg 光谱纯度级别的 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 、4.5mg 三乙胺于 3ml 100mM HEPES 缓冲溶液(PH9.5) 中溶解, 15℃振荡 24 小时, 取出抗原至 6ml 的截留分子量为 10000dal 超滤管中, 用 PH7.0 的 30mM HEPES 缓冲液稀释至 5ml, 6000rpm 离心 4 分钟, 再重复两次, 再将此 HEPES 缓冲液稀释到 3ml, 然后进行分装, 得 Pb^{2+} 完全抗原。

实施例六:

称取 3mg 牛血清白蛋白、0.4mg 双功能螯合剂 1B4M-DTPA (*p*-SCN-C₆H₅-DTPA)、0.3mg 光谱纯度级别的 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 、1.4mg 三乙胺于 1.0ml 30mM HEPES 缓冲溶液 (PH9.0) 中溶解, 15℃振荡 24 小时, 取出抗原至 6ml 的截留分子量为 10000dal 超滤管中, 用 PH7.4 的 50mM HEPES 缓冲液稀释至 5ml, 6000rpm 离心 4 分钟, 再重复两次, 再将此 HEPES 缓冲液稀释到 3ml, 然后进行分装, 得 Pb^{2+} 完全抗原。

实施例七:

称取 4mg 牛血清白蛋白、0.7mg 双功能螯合剂 1B4M-DTPA (*p*-SCN-C₆H₅-DTPA)、0.4mg 光谱纯度级别的 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 及 2.5mg 三乙胺于 1.5ml 50mM HEPES 缓冲溶液 (PH9.0) 中溶解, 25℃振荡 10 小时, 取出抗原至 6ml 截留分子量为 30000dal 超滤管中, 用 PH7.4 的 50mM HEPES 缓冲液稀释至 5ml, 4000rpm 离心 5 分钟, 再重复两次, 再将此 HEPES 缓冲液稀释到 3ml, 然后进行分装, 得 Pb^{2+} 完全抗原。

实施例八:

称取 5mg 牛血清白蛋白、0.9mg 双功能螯合剂 1B4M-DTPA (*p*-SCN-C₆H₅-DTPA)、0.6mg 光谱纯度级别的 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 及 3mg 三乙胺于 1.5ml 50mM HEPES 缓冲溶液 (PH9.0) 中溶解, 25℃振荡 10 小时, 取出抗原至 6ml 截留分子量为 30000dal 超滤管中, 用 PH7.4 的 50mM HEPES 缓冲液稀释至 5ml, 4000rpm 离心 5 分钟, 再重复两次, 再将此 HEPES 缓冲液稀释到 3ml, 然后进

行分装，得 Pb^{2+} 完全抗原。

实施例九：

称取 8mg 牛血清白蛋白、1.2mg 双功能螯合剂 1B4M-DTPA (*p*-SCN-C₆H₅-DTPA)、0.7mg 光谱纯度级别的 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 及 4.0mg 三乙胺于 1.5ml 50mM HEPES 缓冲溶液 (PH9.0) 中溶解，15℃ 振荡 12 小时，取出抗原至 6ml 截留分子量为 30000dal 超滤管中，用 PH7.4 的 50mM HEPES 缓冲液稀释至 5ml，4000rpm 离心 5 分钟，再重复两次，再将此 HEPES 缓冲液稀释到 3ml，然后进行分装，得 Pb^{2+} 完全抗原。

实施例十：

称取 10mg 牛血清白蛋白、1.8mg 双功能螯合剂 1B4M-DTPA (*p*-SCN-C₆H₅-DTPA)、0.8mg 光谱纯度级别的 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 、4.5mg 三乙胺于 3ml 100mM HEPES 缓冲溶液 (PH9.5) 中溶解，30℃ 振荡 8 小时，取出抗原至 6ml 的截留分子量为 10000dal 超滤管中，用 PH7.4 的 30mM HEPES 缓冲液稀释至 5ml，4000rpm 离心 5 分钟，再重复两次，再将此 HEPES 缓冲液稀释到 3ml，然后进行分装，得 Pb^{2+} 完全抗原。

实施例十一：

称取 3mg 卵白蛋白、0.4mg 双功能螯合剂 1B4M-EDTA (*p*-SCN-C₆H₅-EDTA)、0.3mg 光谱纯度级别的 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 、1.4mg 三乙胺于 1.0ml 30mM HEPES 缓冲溶液 (PH8.5) 中溶解，15℃ 振荡 24 小时，取出抗原至 6ml 的截留分子量为 10000dal 超滤管中，用 PH7.4 的 50mM HEPES 缓冲液稀释至 5ml，4000rpm 离心 5 分钟，再重复两次，再将此 HEPES 缓冲液稀释到 3ml，然后进行分装，得 Pb^{2+} 完全抗原。

实施例十二：

称取 4mg 卵白蛋白、0.7mg 双功能螯合剂 1B4M-EDTA (*p*-SCN-C₆H₅-EDTA)、0.4mg 光谱纯度级别的 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 及 2.5mg 三乙胺于 1.5ml 50mM HEPES 缓冲溶液 (PH9.0) 中溶解，25℃ 振荡 12 小时，取出抗原置于截留分子量为 14000dal 的透析袋中，于 50mM HEPES 缓冲液 (PH7.4) 中透析 3 天；再将此 HEPES 缓冲液稀释到 3ml，然后进行分装，得成品。

实施例十三：

称取 5mg 卵白蛋白、0.9mg 双功能螯合剂 1B4M-EDTA (*p*-SCN-

C₆H₅-EDTA)、0.6mg 光谱纯度级别的 Pb(NO₃)₂ 及 3mg 三乙胺于 1.5ml 50mM HEPES 缓冲溶液 (PH9.0) 中溶解, 15℃振荡 24 小时, 取出抗原置于截留分子量为 8000dal 的透析袋中, 于 50mM HEPES 缓冲液 (PH7.4) 中透析 3 天; 再将此 HEPES 缓冲液稀释到 3ml, 然后进行分装, 得成品。

实施例十四:

称取 8mg 卵白蛋白、1.2mg 双功能螯合剂 1B4M-EDTA (*p*-SCN-C₆H₅-EDTA)、0.7mg 光谱纯度级别的 Pb(NO₃)₂ 及 4.0mg 三乙胺于 2.0ml 50mM HEPES 缓冲溶液 (PH9.0) 中溶解, 25℃振荡 10 小时, 取出抗原置于截留分子量为 14000dal 的透析袋中, 于 60mM HEPES 缓冲液 (PH7.4) 中透析 3 天; 再将此 HEPES 缓冲液稀释到 3ml, 然后进行分装, 得成品。

实施例十五:

称取 10mg 卵白蛋白、1.8mg 双功能螯合剂 1B4M-EDTA (*p*-SCN-C₆H₅-EDTA)、0.8mg 光谱纯度级别的 Pb(NO₃)₂、4.5mg 三乙胺于 3ml 60mM HEPES 缓冲溶液 (PH8.5) 中溶解, 15℃振荡 24 小时, 取出抗原至 6ml 的截留分子量为 10000dal 超滤管中, 用 PH7.0 的 30mM HEPES 缓冲液稀释至 5ml, 6000rpm 离心 4 分钟, 再重复两次, 再将此 HEPES 缓冲液稀释到 3ml, 然后进行分装, 得 Pb²⁺完全抗原。

专利名称(译)	重金属Pb ²⁺ 完全抗原的制备方法		
公开(公告)号	CN1769893A	公开(公告)日	2006-05-10
申请号	CN200510037436.9	申请日	2005-09-22
[标]申请(专利权)人(译)	暨南大学		
申请(专利权)人(译)	暨南大学		
当前申请(专利权)人(译)	暨南学报		
[标]发明人	江天久 牛涛 向军俭		
发明人	江天久 牛涛 向军俭		
IPC分类号	G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种重金属Pb²⁺完全抗原的制备方法。该方法如下：取3.0~10.0mg重量份载体蛋白、0.4~1.8mg重量份双功能螯合剂、0.3~0.8mg重量份Pb(NO₃)₂及1.4~4.5mg重量份三乙胺，于1.0~3.0ml体积份的HEPES缓冲溶液中溶解，15~30℃温度下振荡8~24小时后，用超滤或透析的方法去除未反应的低分子物质，剩余物于HEPES缓冲溶液中保存，分装，得成品。本发明所得抗原具有较好的免疫原性，用此抗原免疫小鼠能制备Pb特异性抗体，可以进一步制备重金属Pb快速检测试剂盒。