



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103487577 B

(45) 授权公告日 2015. 09. 16

(21) 申请号 201310445840. 4

郝亚明. 重金属铅、镉单克隆抗体的制备及 ELISA 检测方法的建立. 《中国优秀硕士学位论文全文数据库》. 2011,

(22) 申请日 2013. 09. 27

(73) 专利权人 河南科技学院

地址 453003 河南省新乡市红旗区五一路东段

审查员 舒霏霏

(72) 发明人 葛亚明 王自良 范国英 王爱萍 张海棠 张慧辉

(51) Int. Cl.

G01N 33/558(2006. 01)

G01N 33/544(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 102426239 A, 2012. 04. 25,

CN 101655494 A, 2010. 02. 24,

CN 101041696 A, 2007. 09. 26,

CN 102128920 A, 2011. 07. 20,

CN 102260347 A, 2011. 11. 30,

CN 201773105 U, 2011. 03. 23,

Hua Kuang et al. Rapid and Highly

Sensitive Detection of Lead Ions

in Drinking Water Based on a Strip

Immunosensor. 《SENSORS》. 2013, 第 13 卷

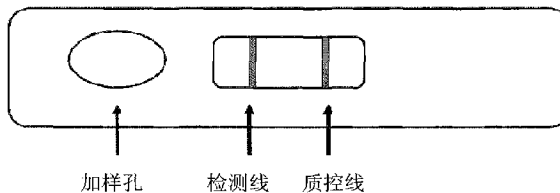
权利要求书2页 说明书8页 附图1页

(54) 发明名称

一种铅离子快速检测金标试纸条或卡

(57) 摘要

本发明公开了一种用于快速检测铅离子的金标试纸条 / 卡, 包括底层支撑板 (1)、样品垫 (2)、金标抗体结合垫 (3)、纤维素膜 (4)、吸水垫。本发明可以实现对环境、土壤、水、食品、药物、化妆品中铅离子污染残留的快速检测。



1. 一种用于快速检测铅离子的金标试纸条,包括底层支撑板(1)、样品垫(2)、金标抗体结合垫(3)、纤维素膜(4)、吸水垫(5),其特征在于:所述试纸条是以底层支撑板(1)为底部支撑,将样品垫(2)、金标抗体结合垫(3)、纤维素膜(4)、吸水垫(5)和包被膜依次粘贴于底层支撑板(1)上,所述底层支撑板(1)和外卡均由硬质塑料制成,所述样品垫(2)与金标抗体结合垫(3)以玻璃纤维棉为基质,所述金标抗体结合垫(3)包被有胶体金标记的能识别铅离子的单克隆抗体;所述纤维素膜(4)中部依次平行排列有隐形检测线(T线)和质控线(C线),检测线包被有铅离子与载体蛋白通过整合剂形成的偶联物,质控线包被有兔抗鼠 IgG(RaMIgG);

所述的整合剂选自异硫氰酸苄基乙二胺四乙酸(ITCBE)、乙二胺四乙酸(EDTA)、二乙烯三胺五乙酸(DTPA)、还原谷胱甘肽(GSH)中的一种;所述载体蛋白选自鸡卵清白蛋白(OVA)、牛血清白蛋白(BSA)、匙孔血蓝蛋白(KLH)中的一种;

所述的偶联物为 Pd^{2+} -ITCBE-OVA,

所述的金标试纸条通过包括如下步骤在内的方法制备得到:

(1) 称取 20mg OVA 溶于 1mL pH9.0 的 10mM/L 的 HEPES 缓冲液中形成 20mg/mL 的载体蛋白溶液;

(2) 称取 10mg ITCBE 溶于 1mL 二甲基亚砷(DMSO)中形成金属整合剂溶液;

(3) 将 0.5mL 金属整合剂溶液逐滴加入到 OVA 载体蛋白溶液中,混匀后,加入 100 μ L 1.5M 的三正丁胺,摇床室温反应 24h,制成 OVA-ITCBE 溶液;

(4) 取 11.25mg 硝酸铅($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$)溶于 100 μ L 蒸馏水中,形成均匀的 Pb^{2+} 溶液;

(5) 将 Pb^{2+} 溶液加入到 OVA-ITCBE 溶液中,调节 pH 值至 7.4,在室温下,摇床孵育 4h,然后移入透析袋中 PBS 透析 10d,即形成 Pb^{2+} -ITCBE-OVA,收集分装, -20°C 冻存;

(6) 胶体金溶液制备:采用柠檬酸盐还原法制备,取 1000mL 三角烧瓶,加入 975mL 双蒸水煮沸,加入 15mL 柠檬酸三钠继续加热 5min,加入 10mL 1% 氯金酸,继续加热至溶液呈现橘红色,冷却至室温后, 4°C 保存备用;

(7) 单克隆抗体制备:用铅离子-整合剂-载体蛋白免疫小鼠,以 Pb^{2+} -ITCBE-OVA 为例,说明如下:用 Pb^{2+} -ITCBE-OVA 免疫 6 周雌性 BALB/C 小鼠 5 只,剂量为 50 μ g/0.2mL/只,背部皮下分点注射;选择细胞融合备用小鼠,间接 ELISA 检测抗血清中 Pb^{2+} 螯合物 pAb 效价,阻断 ELISA 检测 Pb^{2+} -ITCBEpAb 对 Pb^{2+} -ITCBE 的 IC_{50} ,挑选效价最高、 IC_{50} 最低的小鼠,超免用于细胞融合,采用细胞融合技术无菌取脾脏制备脾细胞,在 pH8.0 的 50% PEG 作用下与 NS0 骨髓瘤细胞进行融合;用间接 ELISA 和阻断 ELISA 进行阳性杂交瘤细胞株的筛选,选择强阳性、抑制率高、细胞生长旺盛的孔进行 3 次有限稀释克隆化;分别于冻存 15d、30d 和 60d 后复苏杂交瘤细胞,培养后取上清液,间接 ELISA 测定抗体效价,考察杂交瘤细胞分泌单克隆抗体的稳定性,获得一株杂交瘤细胞株;之后采用体内诱生腹水法制备 Pb^{2+} -ITCBE-OVA mAb,取 8 周龄健康 Balb/c 雌性小鼠,腹腔注射 FIA0.5mL/只,10~15 天后使用;将培养的阳性杂交瘤细胞 1000rpm 离心 10min 弃上清,收集细胞沉淀;用灭菌的 PBS 将细胞沉淀悬浮、混匀,将细胞数调至 10^6 /mL,腹腔注射 Balb/C 小鼠 0.5mL/只;接种细胞 7-10 天后产生腹水,进行收集,于 37°C 水浴 30min, 4°C 放置过夜,12000rpm 离心 5min,弃去上层的脂肪、IFA 和下层的沉淀,饱和硫酸铵盐析法提纯后测定 IgG 含量和效价, -20°C 保存备用;

(8) 金标抗体制备:将待标单克隆抗体溶液 10000r/min 离心 30min,用 0.1mol/L K_2CO_3

溶液调节胶体金溶液的 pH 值至 8.2 ;根据聚沉现象,确定铅离子 - 螯合剂 - 载体蛋白 mAb 与胶体金溶液最适标记浓度, Pb^{2+} -ITCBE-OVAmAb 为 0.175mg/mL ;取胶体金溶液 10mL,用 0.1mol/L K_2CO_3 溶液调节胶体金溶液的 pH 值至 8.2 ;取等量的浓度为 0.175mg/mL 单克隆抗体溶液,磁力搅拌下混合,室温孵育 15min,10000r/min 离心 30min,弃上清,沉淀物用含 10g/L OVA、0.5g/L 叠氮钠的 0.02mol/L $Na_2B_4O_7$ 溶液稀释,4℃保存备用 ;

(9) 金标抗体结合垫制备 :裁取规格为 20×4 mm 的玻璃纤维棉,将金标抗体用 X-only 单向喷点仪均匀喷洒于玻璃纤维棉上,37℃干燥 1h,密封,4℃保存备用 ;

(10) 硝酸纤维素膜上检测线、质控线制备 :将浓度为 1mg/ml 的铅离子 - 螯合剂 - 载体蛋白放于 X-only 单向喷点仪贮存池 A,浓度为 1mg/ml 的 RaMIgG 放于贮存池 B,开机分别点射于膜中央,形成间距 0.5cm 的检测线和质控线,自然干燥,密封,4℃保存备用 ;

(11) 金标试纸条组装 :将样品垫、金标抗体结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫按顺序依次粘贴于支撑板上,并在样品垫与金标抗体结合垫表面粘贴 MAX 线,在切槽机上切割成宽度 4mm 的金标试纸。

2. 根据权利要求 1 所述的快速检测铅离子金标试纸条,检测线上铅离子 - 螯合剂 - 载体蛋白的包被量为 $1 \mu L/cm$,载体蛋白浓度为 1mg/mL。

3. 根据权利要求 1 所述的快速检测铅离子金标试纸条,其特征是 :所述质控线上 RaMIgG 的包被量为 $1 \mu L/cm$,RaMIgG 的浓度为 1mg/mL。

4. 根据权利要求 1 所述的快速检测铅离子金标试纸条,其特征是 ;所述的胶体金溶液中金颗粒的粒径为 30nm,标记量为 1mL 胶体金 :3ng 单克隆抗体。

5. 用于检测铅离子的金标试纸卡,其特征是 :所述试纸卡是以权利要求 1-4 任意一项所述的快速检测铅离子金标试纸条为基础,加上外卡制成。

6. 一种如权利要求 1 ~ 4 任意一项所述的快速检测铅离子金标试纸条或权利要求 5 所述的用于检测铅离子的金标试纸卡在环境、食品、化妆产品或药物中铅离子污染残留快速检测中的应用,所述的检测用于检测铅离子含量在 10ng/mL 的样品。

7. 根据权利要求 6 所述的应用,其特征是 :样品预处理方法是样品消解后,采用 10% EDTA 作为螯合剂处理溶液,离心取上清液用于检测。

一种铅离子快速检测金标试纸条或卡

技术领域：

[0001] 本发明涉及的是一种用于快速检测铅离子的金标试纸条 / 卡及其制备方法与应用,属于免疫学和卫生检验学技术领域。

背景技术：

[0002] 铅 (Pb) 是一种青灰色重金属,是我们所熟知的环境毒物之一,它在自然界中分布广泛,而且又是在现代社会中具有多种用途的有色金属之一。早在夏商时期,我们的祖先就利用铜与铅冶炼出具有硬度与韧性的青铜,广泛用于兵器、工具、礼器与食器制作,青铜器铅含量最高可达 40% 左右。随着工农业的发展,铅的用途也越来越广泛,以致在空气、土壤、食品、餐具、玩具中都能寻其身影,觅其踪迹。在我国,铅和精炼铅产量居世界第三位,主要用于蓄电池制造、颜料、合金等行业。1923 年开始在汽油中加入铅用作抗爆剂以后,更加速了全球性铅的污染。铅污染状况已不容忽视。铅是全身性毒物,具有高蓄积性与多亲和性,可通过消化、呼吸等途径被机体吸收,对人体无任何生理功能。急性铅中毒多表现为胃疼,头痛,颤抖,神经性烦躁,严重时,昏迷,直至死亡。慢性铅中毒大多表现为神经毒性,对血液系统、免疫系统、肾脏等造成一定损害。铅是对儿童威胁最大的环境污染物之一,儿童对铅元素较成人敏感。由于血脑屏障没有发育完整,婴幼儿的血铅水平在达到 $100 \mu\text{g/L}$ 时便可以引起认知功能障碍或发育延迟。

[0003] 由于铅的污染和危害性较大,我国制定了土壤、食品、水体、玩具、用具等涉铅领域中的国家限量标准,农产品安全质量无公害水产品安全要求 (GB18406.4-2001) 中对铅含量都有限定量 $\leq 0.5\text{mg/kg}$,地下水质量标准 (GB/T14848-93) 中规定,主要适用于集中式生活饮用水水源及工农业用水的铅离子限量 $\leq 0.05\text{mg/L}$,熟肉制品 (GB2726-2005) 要求铅含量 $\leq 0.5\text{mg/kg}$ 。欧盟、日本、韩国等对我国的出口物资的重金属含量标准也越来越严格。

[0004] 目前,检测环境铅离子的方法主要有：

[0005] (1) 物理和化学分析方法:包括紫外分光光度法 (UV)、电化学分析法 (EC)、原子吸收光谱法 (AAS)、电感耦合等离子体质谱法 (ICP-MS)、电感耦合等离子体原子发射光谱法 (ICP-AES)、氢化物发生-原子荧光光谱法 (HG-AFS)、中子活化分析法 (NAA) 等。这些方法各有自己优缺点,紫外分光光度法操作简单,快速,干扰小,但其灵敏度不高;电化学分析法具有灵敏、简便等特点,对操作人员的技术要求高;原子吸收光谱法、电感耦合等离子体质谱法、电感耦合等离子体原子发射光谱法、氢化物发生-原子荧光光谱法具有选择性好、测定精度高、简单、快速等优点,但所用仪器比较昂贵,只能在实验室进行检测,且对操作人员技术要求较为严格,限制了其广泛使用;中子活化分析法是一种以核反应为基础的分析方法,具有微量、快速、准确和非破坏性且同时可分析多元素的优点,但所需的设备不易为一般实验室所具备,很难得到广泛应用。

[0006] (2) 免疫学分析方法:包括酶联免疫吸附法 (ELISA),和胶体金免疫层析法。酶联免疫吸附法 (ELISA) 以竞争性酶联免疫反应为检测原理,反应显色后用酶标仪测定吸光值 (OD) 值进行结果判定。缩短了检测时间,可以对残留药物进行定性定量检测。但 ELISA 方

法需要配套的酶标仪和配套试剂,操作过程仍较复杂,而且国内现处在研发阶段,进口国外产品价格昂贵,因而ELISA方法的应用受到了较大限制。胶体金免疫层析法(GICA),其检测原理是当待检样本与吸附在膜上的胶体金标记物(抗体或单克隆抗体)结合后,通过层析,与固定在膜上的特异性的抗原或抗体发生特异性结合而被截留,聚集在检测带上,可通过肉眼观察到胶体金标记物的显色结果。胶体金免疫层析技术因具有携带方便、操作简便、快速、特异性强、敏感性高、影响因素少、无需特殊仪器和标本不易污染等优点,适合对大批量样品进行现场初筛,从而被广泛用于免疫学、组织学、病理学和细胞生物学等众多领域。但对于铅离子快速检测金标试纸条/卡研制的有关文献和专利目前尚未见报道。

[0007] 因此,铅离子污染已对人类健康构成了严重威胁,研制快速、简便、敏感、特异、经济、筛检量大的铅离子快速检测金标试纸产品,对于减少环境污染、提高食品质量、保障食品安全具有重要意义。

发明内容:

[0008] 本发明的目的:研制出一种能够快速、简便、敏感、特异的检测铅离子污染残留的快速检测铅离子金标试纸条和试纸卡。

[0009] 一种用于快速检测铅离子的金标试纸条/卡,包括底层支撑板(1)、样品垫(2)、金标抗体结合垫(3)、纤维素膜(4)、吸水垫(5)、包被膜(6)和外卡(7)等部分。其特征在于:所述试纸条是以底层支撑板为底部支撑,将样品垫、金标抗体结合垫、纤维素膜、吸水垫和包被膜依次粘贴于底层支撑板上。所述试纸卡是以试纸条为基础,加上外卡制成。所述底层支撑板和外卡均由硬质塑料制成,所述样品垫与金标抗体结合垫由玻璃纤维棉制成;所述金标抗体结合垫包被有胶体金标记的能识别铅离子的单克隆抗体;所述纤维素膜中部依次平行排列有隐形检测线(T线)和质控线(C线),检测线包被有铅离子与载体蛋白形成的偶联物,质控线包被有兔抗鼠IgG(RaMIgG)。所述的铅离子金标试纸条/卡,其特征是:所述的检测抗原铅-异硫氰酸苄基乙二胺四乙酸-鸡卵清白蛋白(Pb^{2+} -ITCBE-OVA),其制备步骤:

[0010] (1)称取20mg卵清蛋白(OVA)溶于1mL pH9.0的HEPES缓冲液(10mM/L)中形成20mg/mL的载体蛋白溶液。

[0011] (2)称取10mg1-(4-异硫氰根苯基)-乙二胺四乙酸(ITCBE)溶于1mL二甲基亚砷(DMSO)中形成金属螯合剂溶液;

[0012] (3)将0.5mL金属螯合剂溶液逐滴加到OVA载体蛋白溶液中,混匀后,加入100uL三正丁胺(1.5M),摇床室温反应24h,制成OVA-ITCBE溶液。

[0013] (4)取11.25mg硝酸铅($Pb(NO_3)_2$)溶于100uL蒸馏水中,形成均匀的 Pb^{2+} 溶液;

[0014] (5)将 Pb^{2+} 溶液加入到OVA-ITCBE溶液中,调节pH值至7.4,在室温下,摇床孵育4h,然后移入透析袋中PBS透析10d,即形成 Pb^{2+} -ITCBE-OVA,收集分装,-20℃冻存。

[0015] 所述的重金属铅离子金标试纸条/卡制备步骤:

[0016] (1)胶体金溶液制备:采用柠檬酸盐还原法制备,取1000mL三角烧瓶,加入975mL双蒸水煮沸,加入15mL柠檬酸三钠继续加热5min,加入10mL1%氯金酸,继续加热至溶液呈现橘红色,冷却至室温后,4℃保存备用。

[0017] (2)单克隆抗体制备:采用权利要求3所述的 Pb^{2+} -ITCBE-OVA免疫6周雌性BALB/

C 小鼠 5 只, 剂量为 $50 \mu\text{g}/0.2\text{mL}$ / 只, 背部皮下分点注射。采用细胞融合技术无菌取脾脏制备脾细胞, 在聚乙二醇 -1500 作用下与 NS0 骨髓瘤细胞进行融合; 用间接 ELISA 法和阻断 ELISA 法进行阳性孔筛选, 选择强阳性、抑制率高、细胞生长旺盛的孔进行有限稀释克隆化, 扩大培养、冻存并鉴定, 获得一株杂交瘤细胞株; 之后采用体内诱生腹水法制备 Pb^{2+} -ITCBE-OVA mAb;

[0018] (3) 金标抗体制备: 将待标单克隆抗体溶液 $10000\text{r}/\text{min}$ 离心 30min , 用 $0.1\text{mol}/\text{L}$ K_2CO_3 溶液调节胶体金溶液的 pH 值至 8.2; 根据聚沉现象, 确定 Pb^{2+} -ITCBE-OVA mAb 与胶体金溶液最适标记浓度, 为 $0.175\text{mg}/\text{mL}$ 。取胶体金溶液 10mL , 用 $0.1\text{mol}/\text{L}$ K_2CO_3 溶液调节胶体金溶液的 pH 值至 8.2。取等量的浓度为 $0.175\text{mg}/\text{mL}$ 单克隆抗体溶液, 磁力搅拌下混合, 室温孵育 15min , $10000\text{r}/\text{min}$ 离心 30min , 弃上清, 沉淀物用 $0.02\text{mol}/\text{L}$ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 溶液 (含 $10\text{g}/\text{LOVA}$ 、 $0.5\text{g}/\text{L}$ 叠氮钠) 稀释, 4°C 保存备用。

[0019] (4) 金标抗体结合垫制备: 裁取规格为 $20 \times 4\text{mm}$ 的玻璃纤维棉, 将金标抗体用 X-only 单向喷点仪均匀喷洒于玻璃纤维棉上, 37°C 干燥 1h , 密封, 4°C 保存备用。

[0020] (5) 硝酸纤维素膜上检测线、质控线制备: 将浓度为 $1\text{mg}/\text{mL}$ 的 Pb^{2+} -ITCBE-OVA 放于 X-only 单向喷点仪贮存池 A, 浓度为 $1\text{mg}/\text{mL}$ 的 RaMIgG 放于贮存池 B, 开机分别点射于膜中央, 形成间距 0.5cm 的检测线和质控线, 自然干燥, 密封, 4°C 保存备用。

[0021] (6) 金标试纸条组装: 将样品垫、金标抗体结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫按顺序依次粘贴于支撑板上, 并在样品垫与金标抗体结合垫表面粘贴 MAX 线, 在切槽机上切割成宽度 4mm 的金标试纸。

[0022] (7) 金标试纸卡组装: 将制备好的金标试纸条加上外卡制成。

[0023] 所述的铅离子金标试纸条 / 卡检测线上 Pb^{2+} -ITCBE-OVA 的包被量为 $1 \mu\text{L}/\text{cm}$, OVA 浓度为 $1\text{mg}/\text{mL}$; 所述质控线上 RaMIgG 的包被量为 $1 \mu\text{L}/\text{cm}$, RaMIgG 的浓度为 $1\text{mg}/\text{mL}$ 。

[0024] 一种快速检测铅离子的金标试纸条 / 卡, 其检测步骤:

[0025] (1) 样品预处理方法: 样品包括土壤、水、食品、饲料、动物组织、血液、尿液、器物 (如玩具、油漆等)。固体待检物研磨捣碎, 进行硝酸 - 高氯酸湿消化 (a) 或微波消解 (b)。液体待检物直接加入硝酸消化 (c)。

[0026] a 硝酸 - 高氯酸湿消化法: 分别取 0.5g 样品放入玻璃消化管中, 加 15mL 浓硝酸, 置于通风窗过夜; 然后加入 5mL 浓高氯酸, 恒温下缓缓加热至高氯酸白色烟雾逸尽, 同时溶液澄清透明为止, 冷却后转移到 25mL 容量瓶中待用。

[0027] b 微波消解法: 分别称取 0.5g 样品, 放入体积为 20mL 密闭的聚四氟乙烯微波消化管中, 加入 12mL 硝酸, 浸泡过夜; 然后, 将装有样品的微波消化管放入微波炉中, 按程序消解。消解完成后, 冷却, 倒入烧杯, 置于 198°C 恒温电热板中, 体积浓缩至 $2\text{--}3\text{mL}$ 时, 冷却后用 2.5% 硝酸, 定容到 25mL 容量瓶中待用。

[0028] c 硝酸消化法: 液体待检物直接加入 15mL 硝酸, 室温静置 2h , 恒温电热板中, 体积浓缩至 $2\text{--}3\text{mL}$ 时, 冷却后用 2.5% 硝酸, 定容到 25mL 容量瓶中待用。

[0029] 按照 $1:1$ 体积将样品消化液与 10% ITCBE 螯合剂混匀, 使铅离子与 ITCBE 充分螯合, 形成样品待测液。

[0030] (2) 检测步骤: 取 $100 \mu\text{L}$ 待测样品, 将所述的铅离子金标试纸条插入待测样品中, 室温反应 5min , 水平放置, 观察结果, 10min 以后结果无效。或用滴管吸取待测样品 $100 \mu\text{L}$,

滴加于试纸卡的样品孔上,反应 5min,观察结果,10min 以后结果无效。

[0031] (3) 分析检测结果:T 线、C 线均显色,判为阴性,表示样品中铅离子浓度小于 2ng/mL 或样品中不含铅离子;仅 C 线显色,而 T 线不显色,判为阳性,表示样品中铅离子浓度大于 2ng/mL;若 C 线不显色,无论 T 线是否显色,均判为金标试纸失效。

[0032] 所述的铅离子金标试纸的检测灵敏度为 2ng/mL;所述的铅离子金标试纸可应用于环境、土壤、水、食品、器物中铅离子污染残留快速检测中。

附图说明:

[0033] 图 1,3 为铅离子快速检测金标试纸条 / 卡的结构示意图。

[0034] 图 2 为铅离子快速检测金标试纸的显色结果示意图。

具体实施方式:

[0035] 实施例一、铅离子人工免疫抗原制备

[0036] 采用采用异硫氰酯法制备人工免疫抗原 Pb^{2+} -ITCBE-OVA。称取 20mg 卵清蛋白 OVA 溶于 1mL pH9.0 的 HEPES 缓冲液 (10mM/L) 中形成 20mg/mL 的载体蛋白溶液。称取 10mg ITCBE 溶于 1mL 二甲基亚砷 (DMSO) 中形成金属螯合剂溶液;将 0.5mL 金属螯合剂溶液逐滴加到 OVA 载体蛋白溶液中,混匀后,加入 100 μ l 三正丁胺 (1.5M),摇床室温反应 24h,制成 OVA-ITCBE 溶液。取 11.25mg 硝酸铅 ($Pb(NO_3)_2$) 溶于 100 μ l 蒸馏水中,形成均匀的 Pb^{2+} 溶液;将 Pb^{2+} 溶液加入到 OVA-ITCBE 溶液中,调节 pH 值至 7.4,在室温下,摇床孵育 4h,然后移入透析袋中 PBS 透析 10d,即形成 Pb^{2+} -ITCBE-OVA,收集分装,-20 $^{\circ}$ C 冻存。制备出人工免疫抗原 Pb^{2+} -ITCBE-OVA。

[0037] 紫外分光光度法扫描可见 OVA 的最大吸收峰在 280nm 处,偶联物在浓度与 OVA 浓度相同的情况下的紫外扫描光谱中表现出了各自光谱图的迭加性质;SDS-PAGE 电泳法结果可见 OVA 的泳动速度大于偶联物,说明偶联物 Pb^{2+} -ITCBE-OVA 的分子量大于 OVA,证明偶联成功。

[0038] 实施例二、铅离子人工免疫抗原鉴定

[0039] 采用二喹啉甲酸法测定 Pb^{2+} -ITCBE-OVA 中载体蛋白 OVA 浓度。以 OVA 作为标准蛋白,配成 0 μ g/mL、10 μ g/mL、20 μ g/mL、40 μ g/mL、60 μ g/mL、80 μ g/mL 的浓度梯度,用二喹啉甲酸法构建浓度检测标准曲线。OVA 浓度标准曲线的线性方程为: $y=0.0022x+0.008$, $R^2=0.9987$,其中 y 为样品在波长为 562nm 处吸光度, x 为样品蛋白浓度。

[0040] 采用 ICP-AES 法测定 Pb^{2+} -ITCBE-OVA 中 Pb^{2+} 的浓度。将 100 μ g/mL 的 Pb^{2+} -ITCBE-OVA 中 Pb^{2+} 标准储备液用 2% 的硝酸稀释成 0 μ g/mL、0.1 μ g/mL、0.2 μ g/mL、0.3 μ g/mL、0.4 μ g/mL、0.5 μ g/mL 的浓度梯度,仪器软件自动绘制标准曲线,并得出线性回归方程 $Y=0.27X+0.0045$,相关系数 0.9998;在 283nm 波长的最佳优化实验条件下进行测定,仪器软件自动分析结果。

[0041] 实施例三、抗铅离子单克隆抗体制备

[0042] 用 Pb^{2+} -ITCBE-OVA 免疫 6 周雌性 BALB/C 小鼠 5 只,剂量为 50 μ g/0.2mL/只,背部皮下分点注射。选择细胞融合备用小鼠,间接 ELISA 检测抗血清中 Pb^{2+} 螯合物 pAb 效价,阻断 ELISA 检测 Pb^{2+} -ITCBE pAb 对 Pb^{2+} -ITCBE 的 IC_{50} ,挑选效价最高、 IC_{50} 最低的小鼠,超免用

于细胞融合。采用细胞融合技术无菌取脾脏制备脾细胞,在 50% PEG (pH8.0) 作用下与 NS0 骨髓瘤细胞进行融合;用间接 ELISA 和阻断 ELISA 进行阳性杂交瘤细胞株的筛选,选择强阳性、抑制率高、细胞生长旺盛的孔进行 3 次有限稀释克隆化。分别于冻存 15d、30d 和 60d 后复苏杂交瘤细胞,培养后取上清液,间接 ELISA 测定抗体效价,考察杂交瘤细胞分泌单克隆抗体的稳定性,获得一株杂交瘤细胞株;之后采用体内诱生腹水法制备 Pb^{2+} -ITCBE-OVA mAb,取 8 周龄健康 Balb/c 雌性小鼠,腹腔注射 FIA0.5mL/只,10~15 天后使用。将培养的阳性杂交瘤细胞 1000rpm 离心 10min 弃上清,收集细胞沉淀。用灭菌的 PBS 将细胞沉淀悬浮、混匀,将细胞数调至 10^6 /mL,腹腔注射 Balb/C 小鼠 0.5mL/只。接种细胞 7-10 天后产生腹水,进行收集,于 37℃ 水浴 30min,4℃ 放置过夜,12000rpm 离心 5min,弃去上层的脂肪、IFA 和下层的沉淀,饱和硫酸铵盐析法提纯后测定 IgG 含量和效价,-20℃ 保存备用。

[0043] 实施例四、抗铅离子单克隆抗体鉴定

[0044] 腹水效价测定。给腹腔注射液体石蜡 10d 后的小鼠腹腔注射克隆化细胞株 107 个细胞,7d 后抽取腹水,饱和硫酸铵盐析法提纯,间接 ELISA 测定效价。测定结果,单克隆抗体腹水效价为 1:7.2×10⁵。

[0045] 亲和力鉴定。饱和 ELISA 测定亲和常数 (K_a),用浓度分别为 3.4 μg/mL 和 1.7 μg/mL 的 Pb^{2+} -ITCBE-OVA 包被,加入倍比稀释的 Pb^{2+} -ITCBE mAb,再加入 GaMIgG-HRP, TMB 显色测 A_{450nm} 值,以 Pb^{2+} -ITCBE mAb 浓度为横坐标,以 A_{450nm} 值为纵坐标,绘出相应的 2 条反应曲线,以每条曲线上部平坦段的 A_{450nm} 值作为 100%,在曲线上算出 50% A_{450nm} 值时对应的 Pb^{2+} -ITCBE mAb 浓度,按照公式 $K_{aff}=(n-1)/2(n[Ab']_t-[Ab]_t)$ 计算 K_a 。单克隆抗体的 K_a 为 $1.87 \times 10^{10} L/mol$ 。

[0046] 敏感性鉴定。用阻断 ELISA 测定 Pb^{2+} -ITCBE mAb 对不同浓度 Pb^{2+} -ITCBE 的抑制率,以抑制率 B/B_0 为纵坐标,以不同浓度 Pb^{2+} -ITCBE 的对数值为横坐标,绘制标准抑制曲线,进行相关回归分析,计算 Pb^{2+} -ITCBE mAb 对 Pb^{2+} -ITCBE 的 IC_{50} 。鉴定结果, IC_{50} 为 25.25 μg/L。

[0047] 特异性鉴定。采用交叉反应试验鉴定其特异性。交叉反应试验选择汞、铬、铅、锌、铜、铍、钴、钼、铁与 ITCBE 的螯合物(螯合方法同上)和 ITCBE 溶液。做为抑制剂,用阻断 ELISA 测定各抑制物的 IC_{50} ,以 Pb^{2+} -ITCBE mAb 对 Pb^{2+} -ITCBE 的 IC_{50} 和 Pb^{2+} -ITCBE mAb 对各竞争物的 IC_{50} 之比的百分数为其交叉反应率 (cross-reactivity, CR%)。鉴定结果,与其它重金属离子交叉反应小于 0.01%。

[0048] 实施例五、铅离子金标试纸条 / 卡制备

[0049] (1) 胶体金溶液制备:采用柠檬酸盐还原法制备,取 1000mL 三角烧瓶,加入 975mL 双蒸水煮沸,加入 15mL 柠檬酸三钠继续加热 5min,加入 10mL 1% 氯金酸,继续加热至溶液呈现橘红色,冷却至室温后,4℃ 保存备用。

[0050] (2) 金标抗体制备:将待标单克隆抗体溶液 10000r/min 离心 30min,用 0.1mol/L K_2CO_3 溶液调节胶体金溶液的 pH 值至 8.2;根据聚沉现象,确定 Pb^{2+} -ITCBE-OVA mAb 与胶体金溶液最适标记浓度,为 0.175mg/mL。取胶体金溶液 10mL,用 0.1mol/L K_2CO_3 溶液调节胶体金溶液的 pH 值至 8.2。取等量的浓度为 0.175mg/mL 单克隆抗体溶液,磁力搅拌下混合,室温孵育 15min,10000r/min 离心 30min,弃上清,沉淀物用 0.02mol/L $Na_2B_4O_7$ 溶液(含 10g/LOVA、0.5g/L 叠氮钠)稀释,4℃ 保存备用。

[0051] (3) 金标抗体结合垫制备:裁取规格为 20×4m 的玻璃纤维棉,将金标抗体用 X-only 单向喷点仪均匀喷洒于玻璃纤维棉上,37℃干燥 1h,密封,4℃保存备用。

[0052] (4) 硝酸纤维素膜上检测线、质控线制备:将浓度为 1mg/ml 的 Pb^{2+} -ITCBE-OVA 放于 X-only 单向喷点仪贮存池 A,浓度为 1mg/ml 的 RaMIgG 放于贮存池 B,开机分别点射于膜中央,形成间距 0.5cm 的检测线和质控线,自然干燥,密封,4℃保存备用。

[0053] (5) 金标试纸条组装:将样品垫、金标抗体结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫按顺序依次粘贴于支撑板上,并在样品垫与金标抗体结合垫表面粘贴 MAX 线,在切槽机上切割成宽度 4m 的金标试纸。

[0054] (6) 金标试纸条组装:将制备好的金标试纸条加上外卡制成。

[0055] 实施例六、铅离子金标试纸条 / 卡性能测定

[0056] (1) 本发明铅离子金标试纸条 / 卡的灵敏度试验

[0057] 用铅离子金标试纸测定浓度分别为 0、2、4、8、16、32、64、128、256、512ng/mL 的铅离子标准品,每个浓度设 6 个重复,根据试验结果判断其敏感性。结果见表 1,由表 1 可知,铅离子金标试纸的目测检测限为 2ng/mL。

[0058] 判定方法为:显色区出现两条线,且 T 线颜色明显浅于 C 线颜色;或者显色区只出现一条 C 线,而 T 线不显色,判为阳性。阳性结果表示含量汞离子 $\geq 1ng/mL$;显色区出现检测线(T 线)和对照线(C 线)两条线,且 T 线颜色不浅于 C 线颜色,判为阴性。无效:显色区两条线(T 线和 C 线)均不出现,表明操作有误或试纸失效,判为无效。

[0059] 表 1 测定金标试纸灵敏度试验 (n=6)

[0060]

铅离子浓度 (ng/mL)	0	2	4	8	16	32	64	128	256	512
结果	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

[0061] (2) 本发明铅离子金标试纸条 / 卡的特异性试验

[0062] 以交叉反应率为指标判定该试纸的特异性。采用交叉反应试验,选择汞、钼、镉、铜、锌、铬、钴、铁等金属离子与 ITCBE 的螯合物、ITCBE 为抑制物。用铅离子金标试纸测定终浓度分别为 0、2、4、8、16、32、64、128、256、512ng/mL 重金属离子标准品,每个浓度设 6 个重复,以此判断其特异性。结果见表 2,铅离子金标试纸与铅离子特异性结合,与其它重金属离子无交叉反应,交叉反应为 2ng/mL。

[0063] 表 2 测定金标试纸特异性试验 (n=6)

[0064]

重金属离子种类	重金属离子浓度 (ng/mL)									
	0	2	4	8	16	32	64	128	256	512
Pb ²⁺ -ITCBE	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
ITCBE	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Hg ²⁺ -ITCBE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mo ⁶⁺ -ITCBE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cd ²⁺ -ITCBE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cu ²⁺ -ITCBE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Zn ²⁺ -ITCBE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cr ³⁺ -ITCBE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Co ²⁺ -ITCBE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fe ²⁺ -ITCBE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[0065] (3) 本发明铅离子金标试纸条 / 卡的重复性试验

[0066] 取不同批次的 6 批铅离子金标试纸, 分别在 6d 对铅离子浓度为 0、2、4、8ng/mL 的油漆制备样、水样、鸡腿肌肉制备样进行检测, 每个浓度设 6 个重复, 检验其重复性。结果见表 3, 检测结果完全一致, 证明不同批次生产的金标试纸检测结果稳定可靠, 具有良好的重复性。

[0067] 表 3CAP-Strip 重复性试验 (n=6)

[0068]

批次	铅离子浓度 (ng/mL)											
	油漆				水				鸡腿肌肉			
	0	2	4	8	0	2	4	8	0	2	4	8
130711	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
130715	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
130718	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
130720	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
130723	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
130727	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+

[0069] (4) 本发明铅离子金标试纸条 / 卡的保存期试验

[0070] 保存期检验: 将不同批次的铅离子金标试纸分别保存于普通冰箱 (2 ~ 8°C) 12 个月和室温干燥保存 6 个月, 研究不同保存时间的检测结果, 确定其保存期。结果表明, 铅离子金标试纸在保存期内其外观、准确性、敏感性、特异性等均未发生变化, 与新制备试纸的测试结果完全相同, 其的有效期为 2 ~ 8°C 12 个月, 室温干燥条件下 6 个月。

[0071] 实施例七、动物实验

[0072] 健康昆明鼠 20 只, 雌雄各半, 5-6 周龄, 适应性饲养一周后, 雌雄各随机分为 2 组, 对照组和实验组。实验组饮用含 9.6mol/L 醋酸铅的蒸馏水, 对照组自由饮水, 10d 后, 采用

摘眼球法采血,收集血清。处死小鼠,采集肝脏组织,做石蜡切片,HE 染色。同一份样品分别采用 SOLAAR-M6 型原子吸收光谱仪和本发明的试纸条进行测定,测定结果见表 4。

[0073] 肝脏 HE 染色结果:与对照组比较,铅中毒组小鼠肝脏组织病变为:肝小叶结构紊乱,肝索排列混乱且有断裂现象,窦状隙扩张,肝细胞大小不均匀,细胞有空泡化现象。

[0074] 表 4 本发明的试纸条和试制卡的适用性试验

[0075]

编号	对照组				编号	实验组				
	ICP-AES		试纸条			ICP-AES		试纸条		
	血清	肝脏	血清	肝脏		血清	肝脏	血清	肝脏	
1	5.78	1.117	+	—	11	890	2.528	+	+	
2	7.96	1.546	+	—	12	814	2.163	+	+	
雌性	3	5.66	1.759	+	—	13	814	2.51	+	+
4	7.87	1.779	+	—	14	788	4.301	+	+	
5	6.25	1.064	+	—	15	834	3.507	+	+	
6	7.25	0.533	+	—	16	846	9.586	+	+	
7	8.17	0.812	+	—	17	893	5.271	+	+	
雄性	8	7.17	1.111	+	—	18	777	3.238	+	+
9	5.26	1.048	+	—	19	652	2.226	+	+	
10	4.92	1.102	+	—	20	410	3.26	+	+	

[0076] 注:“上”表示可疑,肉眼可见颜色,但比对照显色弱;“+”表示阳性,完全不显色;“—”表示阴性,显色很强。

[0077] 应当理解的是,对本领域普通技术人员来说,可以根据上述说明加以改进或变换,而所有这些改进和变换都应属于本发明所附权利要求的保护范围。

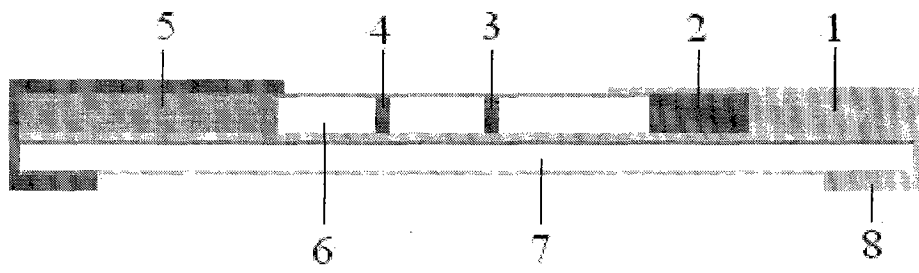


图 1

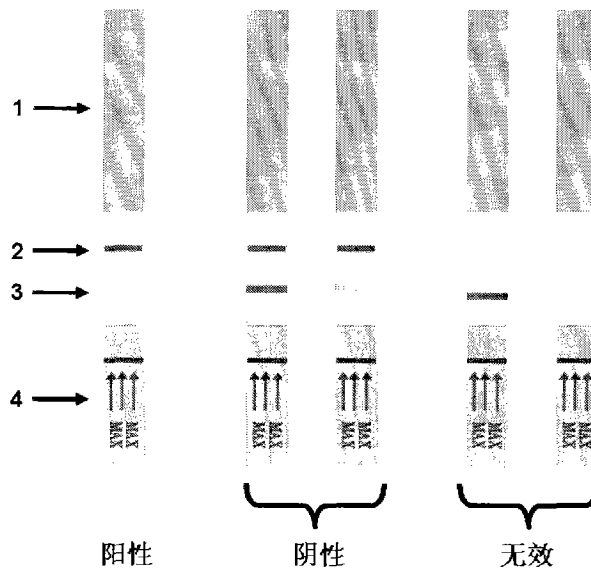


图 2

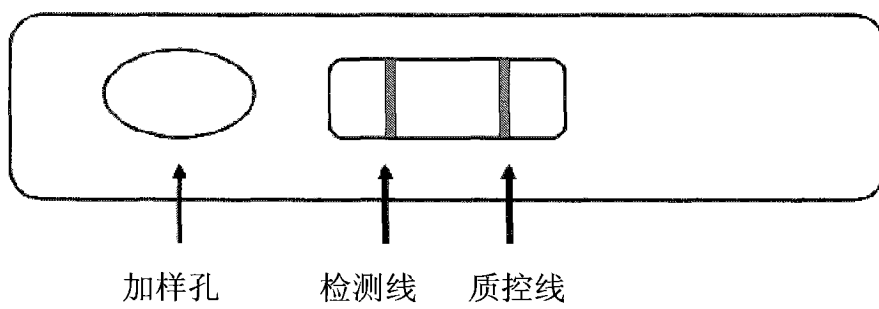


图 3

专利名称(译)	一种铅离子快速检测金标试纸条或卡		
公开(公告)号	CN103487577B	公开(公告)日	2015-09-16
申请号	CN201310445840.4	申请日	2013-09-27
[标]申请(专利权)人(译)	河南科技学院		
申请(专利权)人(译)	河南科技学院		
当前申请(专利权)人(译)	河南科技学院		
[标]发明人	葛亚明 王自良 范国英 王爱萍 张海棠 张慧辉		
发明人	葛亚明 王自良 范国英 王爱萍 张海棠 张慧辉		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/544 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/532 G01N33/544 G01N33/558 G01N33/577		
其他公开文献	CN103487577A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种用于快速检测铅离子的金标试纸条/卡，包括底层支撑板(1)、样品垫(2)、金标抗体结合垫(3)、纤维素膜(4)、吸水垫。本发明可以实现对环境、土壤、水、食品、药物、化妆品中铅离子污染残留的快速检测。

