(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106565741 A
(43)申请公布日 2017.04.19

(21)申请号 201610944960.2

(22)申请日 2016.11.02

(71)申请人 黄燕
地址 331300 江西省吉安市新干县寺南路141号

(72)发明人 黄燕

(74)专利代理机构 广州科粤专利商标代理有限公司 44001
代理人 莫瑶江

(51)Int.Cl.
C07D 495/04(2006.01)
C07J 19/00(2006.01)
C07H 21/00(2006.01)
G01N 33/531(2006.01)

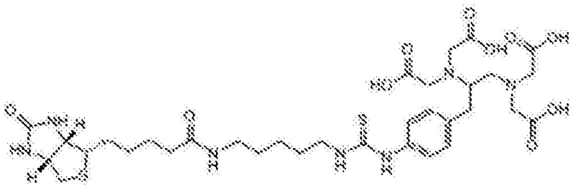
权利要求书2页 说明书8页 附图3页

(54)发明名称

一种特异性分子标记的重金属螯合剂、相应的快速层析检测卡及应用

(57)摘要

本发明涉及了一种特异性分子标记的重金属螯合剂、相应的检测技术及应用。本发明所述重金属螯合剂为特异性标记分子标记的金属螯合分子，该分子一端结合重金属后能被抗体识别并捕获，另一端的标记分子与其相应的配体或抗体结合，从实现夹心检测。所述检测技术包括酶联免疫技术和快速纸层析技术。本发明首次实现了对金属离子的快速夹心检测，避免了常规重金属检测对贵重仪器的需求，弥补了竞争法重金属检测卡的灵敏度和特异性的不足。



CN 106565741 A

1.一种特异性分子标记的重金属螯合剂,其特征在于所述的重金属螯合剂为能与重金属离子起螯合作用的有机化合物,包括羧酸型螯合剂、有机多元膦酸螯合剂、聚羧酸螯合剂。

2.根据权利要求1所述的特异性分子标记的重金属螯合剂,其特征在于所述羧酸型螯合剂包括乙二胺四乙酸,氨基三乙酸,二亚乙基三胺五乙酸及它们的盐类和/或改构分子;所述聚羧酸螯合剂包括聚丙烯酸、聚甲基丙烯酸、水解聚马来酸酐、反丁烯二酸—丙烯磺酸及其共聚体等。

3.根据权利要求1所述的特异性分子标记的重金属螯合剂,其特征在于所述特异性分子为能被抗体或受体特异性结合的小分子、大分子、纳米材料、微米材料及短序列核酸等。

4.根据权利要求3所述的特异性分子标记的重金属螯合剂,其特征在于所述小分子包括叶酸、地高辛、各种荧光分子、荧光时间分辨分子、荧光上转换分子、单糖、多糖、各种药用分子,该类分子能与受体或相应的抗体、配体特异性结合;所述纳米材料、微米材料包括胶体金、有机聚合物微球、磁珠、量子点、荧光上转换微球、荧光微球、荧光时间分辨微球;所述短序列核酸包括DNA、RNA、PNA及其组合,序列长度为5～2000个碱基。

5.根据权利要求1所述的特异性分子标记的重金属螯合剂,其特征在于所述特异性分子标记与重金属螯合剂通过共价键结合。

6.一种重金属检测ELISA试剂盒,其特征在于所述试剂盒应用权利要求1～5任一项所述的特异性分子标记的重金属螯合剂,所述试剂盒还包括酶标板、包被液、封闭液、洗脱液、酶标特异性小分子配体或酶标抗螯合剂-重金属离子复合物抗体、显色物质标记的特异性小分子配体或显色物质标记的抗螯合剂-重金属离子复合物抗体,所述酶标板包被抗螯合剂-重金属离子复合物的抗体或特异性小分子配体。

7.根据权利要求6所述的重金属检测ELISA试剂盒,其特征在于,所述显色物质为辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶催化酶类及由其组成的复合材料、荧光分子、荧光纳米材料。

8.一种特异性分子标记的重金属螯合剂快速层析检测卡,其特征在于所述快速层析检测卡为多孔膜材质,膜上固定有抗螯合剂-重金属离子复合物的抗体,用于层析显色的微球上固定能与特异性分子标记结合的特异性抗体或分子,权利要求1～5中任意一条权利要求所述特异性分子标记的重金属螯合剂一端与抗螯合剂-重金属离子复合物的抗体结合,一端通过特异性分子标记与显色材料结合,从而在T线上形成夹心结构。

9.根据权利要求8所述特异性分子标记的重金属螯合剂快速层析检测卡,由底板、样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜和吸水纸组装而成,其特征在于样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜和吸水纸依次贴在具有粘性的底板上,所述样品垫为空白玻璃纤维,或经离子缓冲液、蛋白、高聚物或它们的组合处理并干燥后的玻璃纤维;所述金标垫连接着样品垫和硝酸纤维素膜,金标垫一端粘贴在样品垫下方,另一端粘贴在在硝酸纤维素上方,且有2～3mm的重叠,金标垫上喷涂显色材料;所述硝酸纤维素膜上固定一条或多条识别抗螯合剂-重金属离子复合物作为检测线,固定能特异性结合显色材料或其上包被分子的抗体、受体或配体作为质控线;吸水纸粘贴在硝酸纤维素膜的另一端,所述吸水纸与硝酸纤维素膜之间有2-3mm的重叠。

10.根据权利要求8所述特异性分子标记的重金属螯合剂快速层析检测卡,其特征在于所述显色材料为具有特定光学特性的分子或者纳米材料,包括荧光分子、胶体金、有色乳胶

微球、荧光纳米颗粒及上述几种材料的复合物等。

一种特异性分子标记的重金属螯合剂、相应的快速层析检测卡及应用

技术领域

[0001]　本发明属于生物化学检测领域，涉及一种基于特异性分子标记修饰的重金属螯合剂、相应的快速层析检测卡及应用。

背景技术

[0002]　重金属一般以天然浓度广泛存在于自然界中，但随着经济的发展，国内对重金属的开采、冶炼、加工及商业制造活动日益增多，造成不少重金属如铅、汞、镉、钴等进入大气、水、土壤中，引起严重的环境污染。长期以来，重金属污染受到人们的广泛关注，工业活动导致的汞、镉、铅、铬、砷等重金属污染的生物毒性非常显著，给人类健康和环境造成极大危害。土壤或水体中含有重金属引起的污染通过食物链进入生态系统，造成危害的重金属有不易溶解、移动的特性，容易在生命体或生态系统中富集，对生物体产生毒害作用。

[0003]　2002年我国首次发布实施了《化妆品卫生规范》，从化妆品一般卫生要求、禁限用原料、检验评价方法等方面对化妆品做了详细规定。《化妆品卫生规范》列出了化妆品禁用物质清单，共421种，其中金属和非金属有16种，汞、铅、铬是必检物质，同时《化妆品卫生规范》中还规定了这些物质在化妆品中的限量，汞为1毫克/公斤，铅为40毫克/公斤。另外，我国职业病发病形势严峻。近十年职业病发病情况呈现明显的凹形反弹倾向。汞及其化合物中毒、铅及其化合物中毒都属于职业病中毒之列，并且危害巨大，比例较重。

[0004]　对重金属离子汞和铅的检测能加强重金属污染防治工作，及时排查重金属污染物及环境隐患，解决危害群众健康和生态环境的突出问题，不仅对环境和社会的可持续发展做出贡献，而且有利于督促企业做好职业健康监护工作、开展日常检测评价工作、规范职业病危害告知制度等方面开展职业病防治的监督管理工作，对劳动者接触危害因素造成的职业病损害做到早预防、早发现和早处理，切实防止群体性职业病危害事件的发生。此外也有利于国家对食品、化妆品及高危行业等企业实施更为科学和有效的监管，对提高产品质量和扩大产品出口范围、对企业和社会健康发展都具有重要的意义。

[0005]　目前重金属检测的主要方法是光谱法，包括原子(吸收、发射、荧光等)光谱方法以及分光光度法等。近年来，原子光谱与等离子发射光谱技术(ICP技术)的联用，提高了检测的灵敏度，拓宽了检测的线性范围，而与质谱联用(ICP-MS)使检测更加灵敏，数据分析更加方便。但是，此类仪器较为昂贵，在大多数实验室中的推广应用因此受到限制。

[0006]　除光谱法外，以金属显色剂为基础的分光光度法也是目前常用的一种检测方法。目前，食品添加剂中的重金属检查方法国家标准采用的是饱和硫化氢溶液作显色剂的分光光度法。但该法污染严重，制备繁琐且新鲜制备的饱和硫化氢溶液具有强烈的腐蛋臭味，毒性极大，会使人的中枢神经系统中毒，产生头昏、恶心、呕吐现象，重者丧失意识、昏迷、窒息甚至死亡。因此，近几年出现了一些利用重金属抗体的竞争法快速检测卡。该方法的优势的快捷和环保，但是由于采用竞争法，检测灵敏度和稳定性有很大的不足，不能达到国标需求。

发明内容

[0007]　本发明目的在于提供一种基于重金属螯合剂的快速层析检测卡，在国际上首次实现对重金属离子的快速夹心检测，不仅提高了灵敏度也增加了检测的稳定性，弥补现有检测方法的不足。

[0008]　本发明上述目的通过以下技术方案予以实现：

[0009]　一种特异性分子标记的重金属螯合剂，该重金属螯合剂为能与重金属离子起螯合作用的有机化合物，包括但不限于羧酸型螯合剂、有机多元膦酸螯合剂、聚羧酸螯合剂。

[0010]　作为本发明特异性分子标记的重金属螯合剂的一种改进，所述羧酸型螯合剂包括但不限于乙二胺四乙酸，氨基三乙酸，二亚乙基三胺五乙酸及它们的盐类和/或改构分子；所述聚羧酸螯合剂包括但不限于聚丙烯酸、聚甲基丙烯酸、水解聚马来酸酐、反丁烯二酸—丙烯磺酸及其共聚体。

[0011]　作为本发明特异性分子标记的重金属螯合剂的一种改进，所述特异性分子为能被抗体或受体特异性结合的小分子、大分子、纳米材料、微米材料。

[0012]　作为本发明特异性分子标记的重金属螯合剂的一种改进，所述小分子包括但不限于叶酸、地高辛、各种荧光分子、荧光时间分辨分子、荧光上转换分子、单糖、多糖、各种药用分子，该类分子能与受体或相应的抗体、配体特异性结合；所述纳米材料、微米材料包括但不限于胶体金、有机聚合物微球、磁珠、量子点、荧光上转换微球、荧光微球、荧光时间分辨微球。

[0013]　作为本发明特异性分子标记的重金属螯合剂的一种改进，所述特异性分子标记与重金属螯合剂通过共价键结合。

[0014]　为了实现本发明目的，本发明还提供了一种重金属检测ELISA检测试剂盒，包括特异性分子标记的重金属螯合剂，所述试剂盒还包括包被液、封闭液、洗脱液、酶标特异性小分子配体或酶标抗螯合剂-重金属离子复合物抗体、显色物质标记的特异性小分子配体或显色物质标记的抗螯合剂-重金属离子复合物抗体。

[0015]　作为本发明特异性分子标记的ELISA检测试剂盒的一种改进，所述显色物质为辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶催化酶类及由其组成的复合材料、荧光分子、荧光纳米材料。

[0016]　为了实现本发明目的，本发明还提供了一种特异性分子标记的重金属螯合剂快速层析检测卡，所述快速层析检测卡为多孔膜材质，膜上固定有抗螯合剂-重金属离子复合物的抗体，用于层析显色的微球上固定能与特异性分子标记结合的特异性抗体或分子，上述特异性分子标记的重金属螯合剂一端与抗螯合剂-重金属离子复合物的抗体结合，一端通过特异性分子标记与微球结合，从而在T线上形成夹心结构。

[0017]　作为本发明特异性分子标记的重金属螯合剂快速层析检测卡的一种改进，所述快速层析检测卡由底板、样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜和吸水纸组装而成，样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜和吸水纸依次贴在具有粘性的底板上。

[0018]　作为本发明特异性分子标记的重金属螯合剂快速层析检测卡的一种改进，所述样品垫为空白玻璃纤维，或经离子缓冲液、蛋白、高聚物或它们的组合处理并干燥后的玻璃纤维；所述金标垫连接着样品垫和硝酸纤维素膜，金标垫一端粘贴在样品垫下方，另一端粘贴在在硝酸纤维素上方，且有2～3mm的重叠，金标垫上喷涂显色材料；所述硝酸纤维素膜上固

定一条或多条识别抗螯合剂-重金属离子复合物作为检测线，固定能特异性结合显色材料或其上包被分子的抗体、受体或配体作为质控线；吸水纸粘贴在硝酸纤维素膜的另一端，所述吸水纸与硝酸纤维素膜之间有2～3mm的重叠。

[0019] 作为本发明特异性分子标记的重金属螯合剂快速层析检测卡的一种改进，所述显色材料为能与特异性分子标记特异性结合的抗体或受体包被的具有特定光学特性的分子或者纳米材料。

[0020] 本发明所述特异性分子标记的重金属螯合剂快速层析检测卡可用于重金属离子检测中。

[0021] 与现有技术相比，本发明基于重金属螯合剂的快速层析检测卡，在国际上首次实现对重金属离子的快速夹心检测，不仅提高了灵敏度也增加了检测的稳定性，弥补现有检测方法的不足。这种检测方法操作简便，检测结果使用肉眼就能观察到，因此被可广泛地应用于基层和家用的快速重金属筛查、自检等。

附图说明

[0022] 图1为以生物素修饰的苯基-EDTA结构示意图。

[0023] 图2为本发明实施例5的检测结果图。

[0024] 图3为本发明实施例6的检测结果图。

[0025] 图4为本发明实施例7的检测结果图。

[0026] 图5为本发明实施例8的ELISA检测结果图。

[0027] 图6为本发明实施例9的ELISA检测结果图。

[0028] 图7为本发明实施例10ELISA检测标曲图。

[0029] 图8为本发明实施例11ELISA检测标曲图。

具体实施方式

[0030] 实施例1生物素修饰的苯基-EDTA的合成

[0031] (1)55mmol苯基丙氨酸(phenylalanine)用25.0mL85％的H_2SO_4溶解，逐滴滴加到12.5mL的HNO_3-H_2SO_4混合酸里(V/V＝1.4/1.1)，室温反应1h，其后用氨水调节PH到6，收集沉淀得到9g左右2-氨基-3-(4-硝基苯基)丙酸(2-amino-3-(4-nitrophenyl)propanoic acid)。

[0032] (2)上述产物溶解在20mL的盐酸饱和无水甲醇中，通氢气15min，室温回流4h，冷冻干燥收集固体，得到8.5g左右甲基-2-氨基-3(4硝基苯基)氯丙酸脂(methyl 2-amino-3-(4-nitrophenyl)propanoate hydrochloride)。

[0033] (3)上述中间产物用30mL甲醇溶解，其后加入5mL三乙胺，逐滴加入40mL饱和NH_4OH水溶液，室温反应15h，干燥后得到4g左右2-氨基-3-(4硝基苯基)丙酰胺(2-amino-3-(4-nitrophenyl)propanamide)。

[0034] (4)上述固体用200mL四氢呋喃溶解后在冰浴中逐滴加入30mL的1.0M硼烷四氢呋喃中，50度回流24h，其后冷却后在冰浴上逐滴加入20mL甲醇，自然恢复室温并在溶剂挥发后再加入20mL甲醇，抽干后得到3.1g左右3-(4硝基苯基)丙烷-1,2-二胺(3-(4-nitrophenyl)propane-1,2-diamine)。

[0035] (5)上述产物与3.5g NaI以及7.2g 1,8-双二甲氨基萘(Proton-Sponge)(溶解在25mL乙氰)共同加入到7.56g的溴醋酸叔丁酯中，避光回流12h。抽干乙氰后用50mL乙酸乙酯溶解，分别用水和卤水洗2次，冷冻干燥，得到2.4g左右四叔丁酯3-(4硝基苯基)丙烷化合物(tetra-tert-butyl 2,2',2",2"'-((3-(4-nitrophenyl)propane-1,2-diyl)bis(azanetriyl))tetraacetate)。

[0036] (6)上述产物在1atm氢气下在30mL乙醇中用0.15g Pd/C催化加氢，反应1h后Celite过滤得到2.3g左右四叔丁酯3-(4氨基苯基)丙烷化合物(tetra-tert-butyl 2,2',2",2"'-((3-(4-aminophenyl)propane-1,2-diyl)bis(azanetriyl))tetraacetate)。

[0037] (7)20mLDMF溶液(含有227mg HOBt,322mg EDCI,424mg TEA,500mg N-Biotinylcaproic Acid)室温搅拌半小时，将上述产物溶解在5mLDMF中，并加入上述溶液中，室温反应5h，用水-乙酸乙酯体系分离。有机相用卤水洗，Na_2SO_4干燥，抽干溶剂后得到1.4g左右的四叔丁酯3-(4生物素-苯基)丙烷化合物tetra-tert-butyl 2,2',2",2"'-((3-(4-(6-(5-((3aS,4S,6aR)-2-oxohexahydro-1H-thieno[3,4-d]imidazol-4-yl)pentanamido)hexanamido)phenyl)propane-1,2-diyl)bis(azanetriyl))tetraacetate。

[0038] (8)上述产物溶解在10mL三氟乙酸中，避光搅拌20h，抽干后得到0.8g左右终产物。

[0039] 实施例2地高辛修饰的苯基-EDTA的合成

[0040] (1)55mmol phenylalanine用25.0mL85％的H_2SO_4溶解，逐滴滴加到12.5mL的HNO_3-H_2SO_4混合酸里(V/V＝1.4/1.1)，室温反应1h，其后用氨水调节PH到6，收集沉淀得到9g左右2-氨基-3-(4-硝基苯基)丙酸(2-amino-3-(4-nitrophenyl)propanoic acid)。

[0041] (2)上述产物溶解在20mL的盐酸饱和无水甲醇中，通氢气15min，室温回流4h，冷冻干燥收集固体，得到8.5g左右甲基-2-氨基-3(4硝基苯基)氯丙酸脂(methyl 2-amino-3-(4-nitrophenyl)propanoate hydrochloride)。

[0042] (3)上述中间产物用30mL甲醇溶解，其后加入5mL三乙胺，逐滴加入40mL饱和NH_4OH水溶液，室温反应15h，干燥后得到4g左右2-氨基-3-(4硝基苯基)丙酰胺(2-amino-3-(4-nitrophenyl)propanamide)。

[0043] (4)上述固体用200mL四氢呋喃溶解后在冰浴中逐滴加入30mL的1.0M硼烷四氢呋喃中，50度回流24h，其后冷却后在冰浴上逐滴加入20mL甲醇，自然恢复室温并在溶剂挥发后再加入20mL甲醇，抽干后得到3.1g左右3-(4硝基苯基)丙烷-1,2-二胺(3-(4-nitrophenyl)propane-1,2-diamine)。

[0044] (5)上述产物与3.5g NaI以及7.2g Proton-Sponge(溶解在25mL CH_3CN)共同加入到7.56g的溴醋酸叔丁酯中，避光回流12h。抽干CH_3CN后用50mL乙酸乙酯溶解，分别用水和卤水洗2次，冷冻干燥，得到2.4g左右四叔丁酯3-(4硝基苯基)丙烷化合物(tetra-tert-butyl 2,2',2",2"'-((3-(4-nitrophenyl)propane-1,2-diyl)bis(azanetriyl))tetraacetate)。

[0045] (6)上述产物在1atm氢气下在30mL乙醇中用0.15g Pd/C催化加氢，反应1h后Celite过滤得到2.3g左右四叔丁酯3-(4氨基苯基)丙烷化合物(tetra-tert-butyl 2,2',2",2"'-((3-(4-aminophenyl)propane-1,2-diyl)bis(azanetriyl))tetraacetate)。

[0046] (7)48mM高碘酸用10mL水溶解，在冰浴上逐滴缓慢到加入20mL 50mM地高辛水溶液中，冰浴反应一小时，浓缩后过柱纯化得到18g羧基化地高辛。

[0047] (8)20mLDMF溶液(含有227mg HOBt,322mg EDCI,424mg TEA,300mgN-BiotinyIcaproic Acid)室温搅拌半小时,将上述产物溶解在5mLDMF中,并加入上述溶液中,室温反应5h,用水-乙酸乙酯体系分离。有机相用卤水洗,Na_2SO_4干燥,抽干溶剂后重新溶解在10mL三氟乙酸中,避光搅拌20h,抽干后得到0.8g左右终产物。

[0048] 实施例3核酸修饰的二亚乙基三胺五乙酸的合成

[0049] (1)35.7mg二亚乙基三胺五乙酸溶解在1mLDMF中,加入19mg1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐,室温反应30min后加入500mg氨基化DNA(NH_3-C_3-3’-TAGATCAGTCACGAT-5’),继续反应2h。

[0050] (2)反应结束后过柱纯化,得到500mg左右单链DNA修饰的二亚乙基三胺五乙酸。

[0051] 实施例4FITC修饰的二亚乙基三胺五乙酸的合成

[0052] (1)357mg二亚乙基三胺五乙酸溶解在5mL0.5moI/L(pH9.0)碳酸盐缓冲液中,将400mg异硫氰酸荧光素也溶解在5mL0.5moI/L(pH9.0)碳酸盐缓冲液中,室温快速搅拌下将异硫氰酸荧光素缓慢逐滴滴加到二亚乙基三胺五乙酸溶液中,4℃反应48h。

[0053] (2)反应结束后过柱纯化,得到721mg左右FITC修饰的二亚乙基三胺五乙酸。

[0054] 实施例5

[0055] 以生物素修饰的苯基-EDTA(图1)对铅检测为例进行说明:

[0056] (1)链霉亲和素(SA)包被的胶体金标记及金标垫制备

[0057] 取1mL待标胶体金溶液,加入以0.1M的K_2CO_3共7滴,其后加入将6μL浓度为1mg/mL的链霉亲和素进行标记,室温混匀静置1h后加入100μL 10%的牛血清白蛋白溶液,室温静置1h后14000g,4℃离心20min取沉淀,用含1%BSA、10%蔗糖的10mM PBS洗涤3次后喷涂在空白玻璃纤维上制成金标垫。

[0058] (2)检测线和质控线

[0059] 检测线(T线)用针对螯合剂-铅的单抗(1mg/mL)以1cm/s速度画线制备,质控线(C线)以抗链霉亲和素抗体(1mg/mL)以1cm/s速度画线制备。

[0060] (3)样品垫制备

[0061] 以PH为8.5的50mM的硼酸缓冲液溶解1%的PEG6000,0.05%的吐温80,用玻璃纤维浸泡烘干后备用。

[0062] (4)试纸条组装

[0063] 样品垫、金标垫、硝酸纤维膜、吸水纸按照2-3mm重叠依次黏贴在底衬上,并用切条机且为3mm条子,包装后干燥室温保存。

[0064] (5)样品检测

[0065] 将少量固体或1mL液体样本(50nM铅)加入到1mL PH为7.5的生物素修饰的苯基-EDTA溶液(100μM)中混匀,静置5-10min后取150μL左右加到检测卡的样品垫上进行检测,结果见图2。

[0066] 实施例6

[0067] 以地高辛修饰的苯基-EDTA对铅、镉、汞3重检测为例进行说明:

[0068] (1)地高辛包被的胶体金标记及金标垫制备

[0069] 取1mL待标胶体金溶液,加入以0.1M的K_2CO_3共7滴,其后加入将7μL浓度为1mg/mL的地高辛抗体进行标记,室温混匀静置1h后加入100μL 10%的牛血清白蛋白溶液,室温静置

1h后14000g，4℃离心20min取沉淀，用用含1％BSA、10％蔗糖的10mM PBS洗涤3次后喷涂在空白玻璃纤维上制成金标垫。

[0070] (2)检测线和质控线

[0071] 3条检测线(T线)分别用针对螯合剂-铅、螯合剂-镉、螯合剂-汞的单抗(1mg/mL)以1cm/s速度画线制备，质控线(C线)以抗鼠二抗(1mg/mL)以1cm/s速度画线制备。

[0072] (3)样品垫制备

[0073] 以PH为8.5的50mM的硼酸缓冲液溶解1％的PEG6000，0.05％的吐温80，用玻璃纤维浸泡烘干后备用。

[0074] (4)试纸条组装

[0075] 样品垫、金标垫、硝酸纤维膜、吸水纸按照2-3mm重叠依次黏贴在底衬上，并用切条机且为3mm条子，包装后干燥室温保存。

[0076] (5)样品检测

[0077] 将少量固体或1mL液体样本(各50nM重金属)加入到1mL PH为7.5的生物素修饰的苯基-EDTA溶液(100μM)中混匀，静置5-10min后取150μL左右加到检测卡的样品垫上进行检测，结果见图3。

[0078] 实施例7

[0079] 以DNA修饰的二亚乙基三胺五乙酸对汞检测为例进行说明：

[0080] (1)DNA的量子点标记及金标垫制备

[0081] 取0.1mL待1mg/mL的量子点溶液，用50μL0.3mg/mL的EDC的PBS溶液室温活化20min，14000g4℃离心20min后加入100OD的氨基化修饰单链DNA(序列NH3-C6-3’-ATCGTGACTGATCTA-5’)，室温反应30min后加入100μL10％的牛血清白蛋白溶液封闭，室温静置1h后14000g，4℃离心20min取沉淀，用用含1％BSA、10％蔗糖的10mM PBS洗涤3次后喷涂在空白玻璃纤维上制成金标垫。

[0082] (2)检测线和质控线

[0083] 3条检测线(T线)分别用针对螯合剂-汞单抗(1mg/mL)以1cm/s速度画线制备，质控线(C线)以与胶体金互补的单链DNA(500Nm，(序列3’-TAGATCAGTCACGAT-5’)以1cm/s速度画线制备。

[0084] (3)样品垫制备

[0085] 以PH为8.5的50mM的硼酸缓冲液溶解1％的PEG6000，0.05％的吐温80，用玻璃纤维浸泡烘干后备用。

[0086] (4)试纸条组装

[0087] 样品垫、金标垫、硝酸纤维膜、吸水纸按照2-3mm重叠依次黏贴在底衬上，并用切条机且为3mm条子，包装后干燥室温保存。

[0088] (5)样品检测

[0089] 将少量固体或1mL液体样本(各50nM重金属)加入到1mL PH为7.5的DNA修饰的二亚乙基三胺五乙酸溶液(100μM)中混匀，静置5-10min后取150μL左右加到检测卡的样品垫上进行检测，结果见图4。

[0090] 实施例8

[0091] 以生物素修饰的苯基-EDTA对铅检测为例进行说明：

[0092] 酶标板的制备：

[0093] (1)以0.1M碳酸缓冲液(PH9.6)稀释抗螯合剂-铅的抗体到5μg/mL，100μL/孔，37℃孵育2h，用0.1%PBST洗脱3次；

[0094] (2)0.1M碳酸缓冲液(PH9.6)配制的1%BSA以250μL/孔进行封闭，37℃孵育2h，用0.1%PBST洗脱3次并烘干4℃保存。

[0095] 重金属检测：

[0096] (1)重金属标准品、样本按照50μL/孔加入酶标板，其后加入50μL/孔的辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素，37℃孵育30min，用0.1%PBST洗脱3次；

[0097] (2)分别加入50μL/孔的显色液A和显色液B，37℃孵育15min后用终止液终止显色，并在酶标仪上读取450nm吸收光数据，结果见图5，检测灵敏度为0.08nM，线性范围为1-130nM。

[0098] 实施例9

[0099] 以地高辛修饰的苯基-EDTA对镉检测为例进行说明：

[0100] 酶标板的制备：

[0101] (1)以0.1M碳酸缓冲液(PH9.6)稀释抗地高辛抗体到10μg/mL，100μL/孔，37℃孵育2h，用0.1%PBST洗脱3次；

[0102] (2)0.1M碳酸缓冲液(PH9.6)配制的1%BSA以250μL/孔进行封闭，37℃孵育2h，用0.1%PBST洗脱3次并烘干4℃保存。

[0103] 重金属检测：

[0104] (1)重金属标准品、样本按照50μL/孔加入酶标板，其后加入50μL/孔的辣根过氧化物酶标记的抗螯合剂-镉抗体，37℃孵育30min，用0.1%PBST洗脱3次；

[0105] (2)分别加入50μL/孔的显色液A和显色液B，37℃孵育15min后用终止液终止显色，并在酶标仪上读取450nm吸收光数据，结果见图6，检测灵敏度为0.1nM，线性范围为1-115nM。

[0106] 实施例10

[0107] 以DNA修饰的二亚乙基三胺五乙酸对铬检测为例进行说明：

[0108] 酶标板的制备：

[0109] (1)以0.1M碳酸缓冲液(PH9.6)稀释链霉亲和素到5μg/mL，100μL/孔，37℃孵育2h，用0.1%PBST洗脱3次；

[0110] (2)用PBS稀释biotin修饰的单链DNA(序列3’-TAGATCAGTCACGAT-5’)到500nM，然后100μL/孔加到酶标板中，37℃孵育2h，用0.1%PBST洗脱3次；

[0111] (3)0.1M碳酸缓冲液(PH9.6)配制的1%BSA以250μL/孔进行封闭，37℃孵育2h，用0.1%PBST洗脱3次并烘干4℃保存。

[0112] 重金属检测：

[0113] (1)重金属标准品、样本按照50μL/孔加入酶标板，其后加入50μL/孔的辣根过氧化物酶标记的抗螯合剂-铬抗体，37℃孵育30min，用0.1%PBST洗脱3次；

[0114] (2)分别加入50μL/孔的显色液A和显色液B，37℃孵育15min后用终止液终止显色，并在酶标仪上读取450nm吸收光数据，结果见图7，检测灵敏度为0.5nM，线性范围为1-210nM。

[0115] 实施例11

[0116] 以FITC修饰的二亚乙基三胺五乙酸对砷检测为例进行说明：

[0117] 酶标板的制备：

[0118] (1)以0.1M碳酸缓冲液(PH9.6)稀释抗二亚乙基三胺五乙酸-砷复合物的抗体到5μg/mL,100μL/孔,37℃孵育2h,用0.1％PBST洗脱3次；

[0119] (2)0.1M碳酸缓冲液(PH9.6)配制的1％BSA以250μL/孔进行封闭,37℃孵育2h,用0.1％PBST洗脱3次并烘干4℃保存。

[0120] 重金属检测：

[0121] (1)重金属标准品、样本按照50μL/孔加入酶标板,其后加入50μL/孔的辣根过氧化物酶标记的抗螯合剂-铬抗体,37℃孵育30min,用0.1％PBST洗脱3次;上荧光酶标仪检测,495nm激发,检测519nm发射波,检测灵敏度为0.06nM,线性范围为1-120nM,结果见图8。

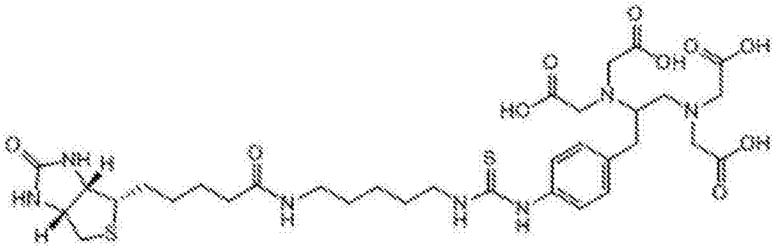


图1

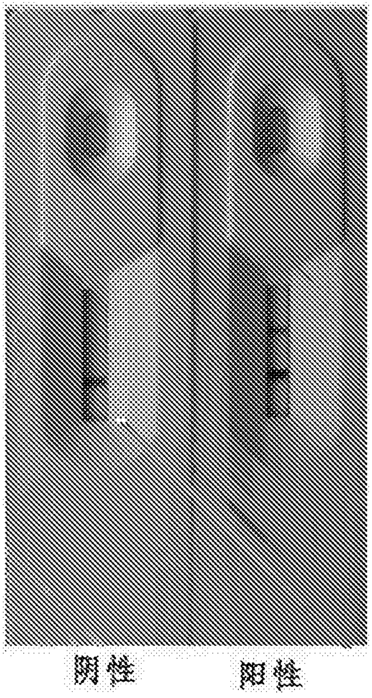


图2

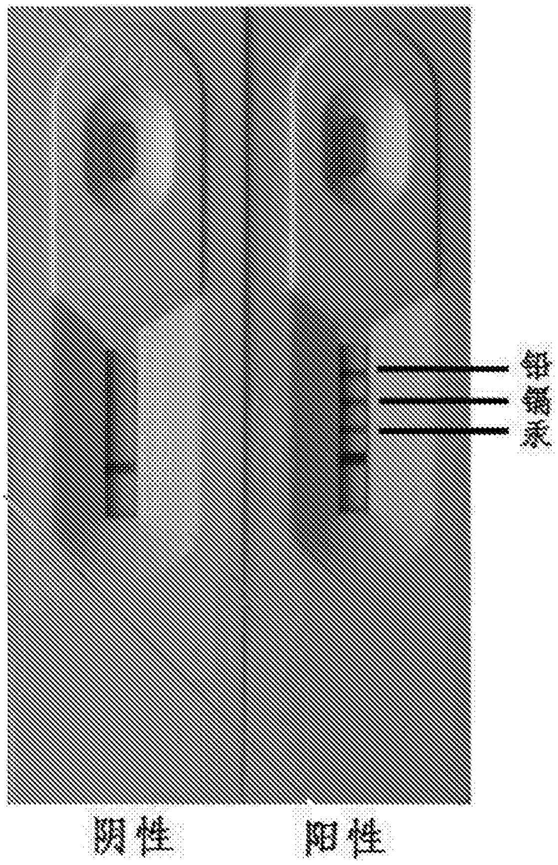


图3

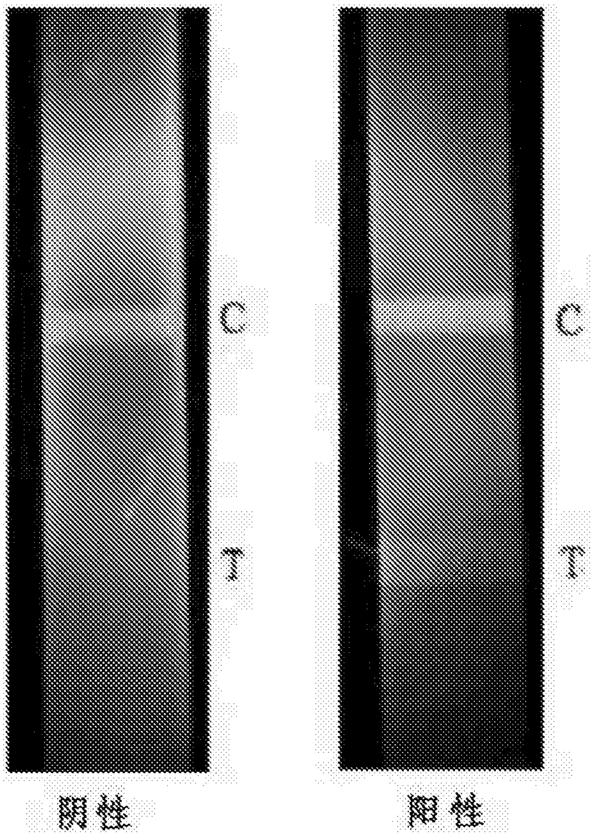


图4

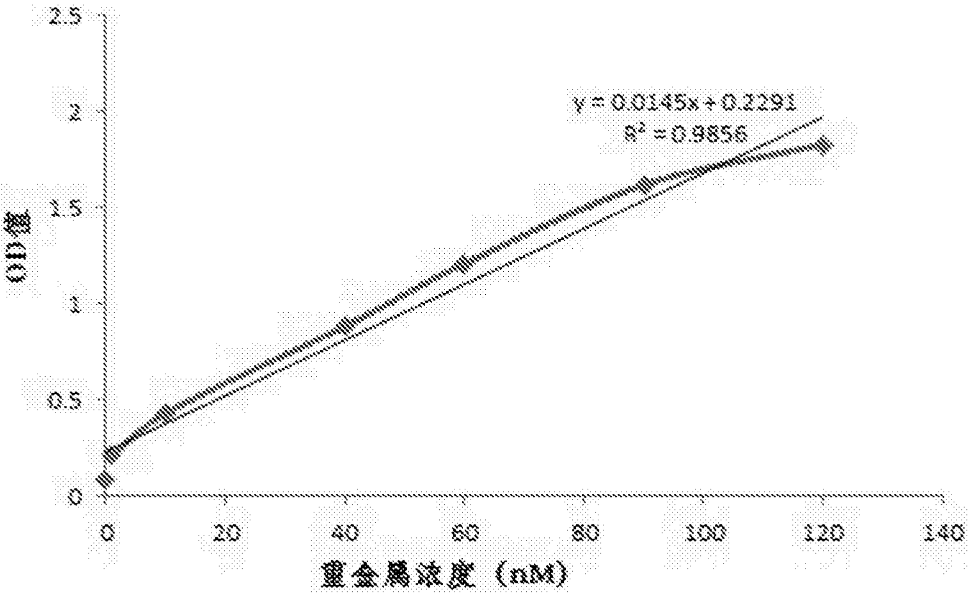

y = 0.0145x + 0.2291
R² = 0.9856
OD值
重金属浓度（nM）
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0
20
40
60
80
100
120
140

图5

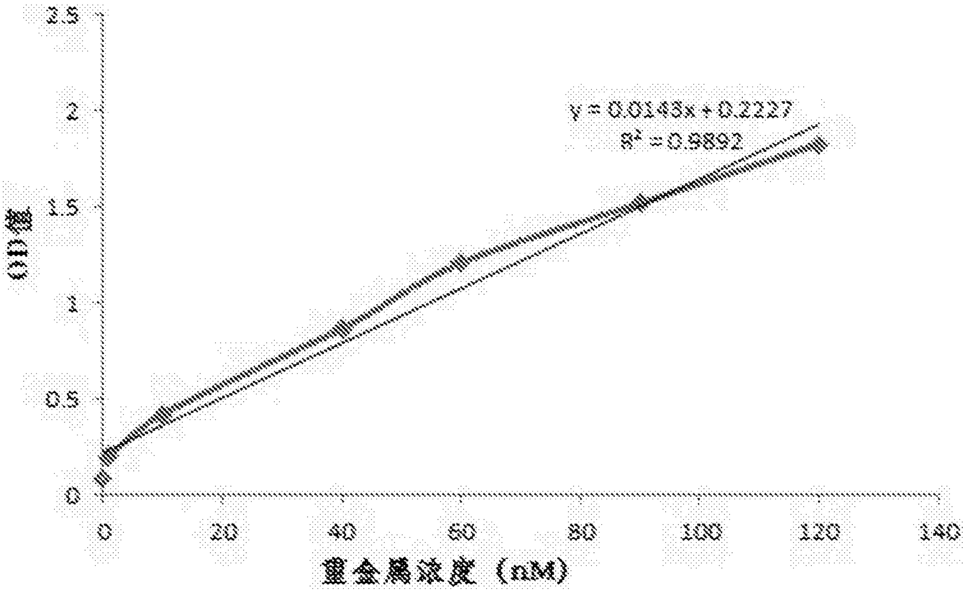

y = 0.0143x + 0.2227
R² = 0.9892
OD值
重金属浓度（nM）
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0
20
40
60
80
100
120
140

图6

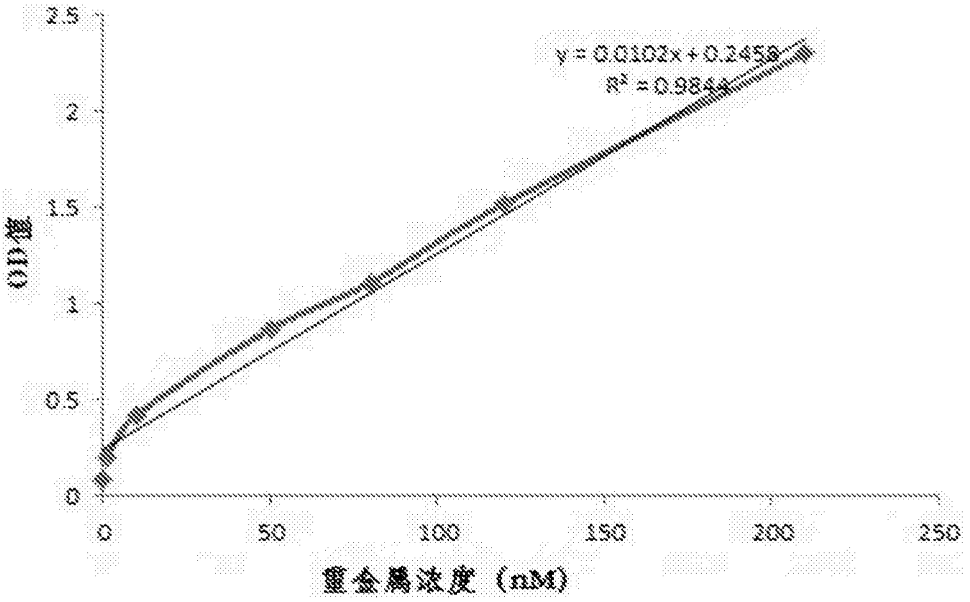

y = 0.0102x + 0.2458
R² = 0.9844
OD值
重金属浓度（nM）
0
0.5
1
1.5
2
2.5
0
50
100
150
200
250

图7

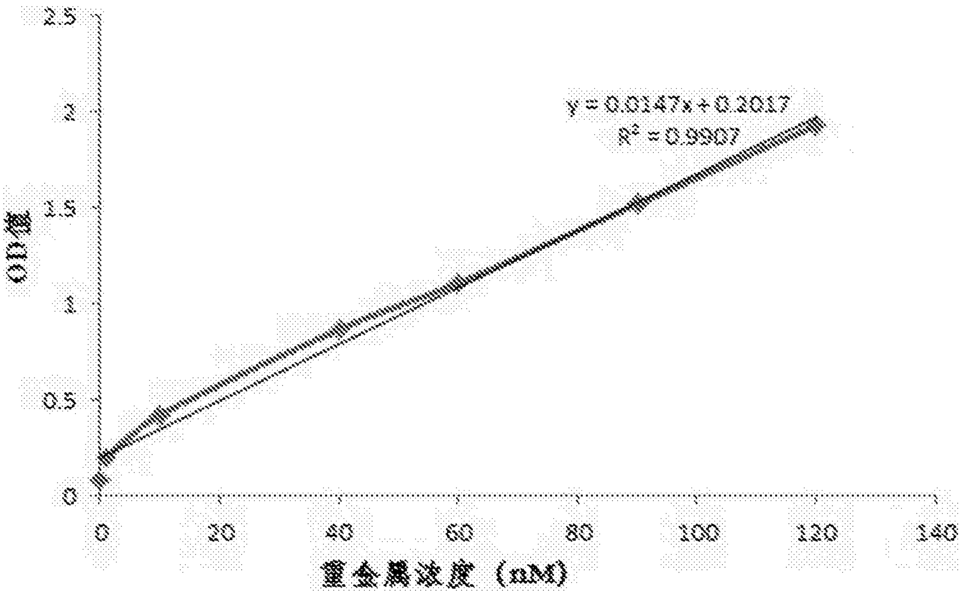
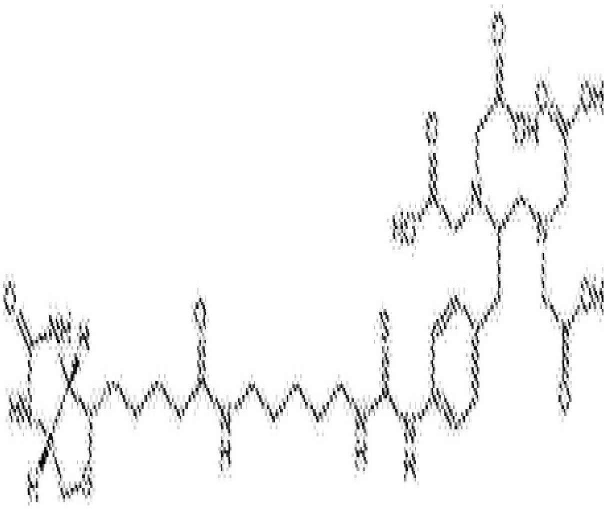

y = 0.0147x + 0.2017
R² = 0.9907
OD值
重金属浓度（nM）
0
0.5
1
1.5
2
2.5
0
20
40
60
80
100
120
140

图8

专利名称(译)	一种特异性分子标记的重金属螯合剂、相应的快速层析检测卡及应用		
公开(公告)号	CN106565741A	公开(公告)日	2017-04-19
申请号	CN201610944960.2	申请日	2016-11-02
[标]申请(专利权)人(译)	黄燕		
申请(专利权)人(译)	黄燕		
当前申请(专利权)人(译)	黄燕		
[标]发明人	黄燕		
发明人	黄燕		
IPC分类号	C07D495/04 C07J19/00 C07H21/00 G01N33/531		
CPC分类号	C07D495/04 C07H21/00 C07J19/005 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及了一种特异性分子标记的重金属螯合剂、相应的检测技术及应用。本发明所述重金属螯合剂为特异性标记分子标记的金属螯合分子，该分子一端结合重金属后能被抗体识别并捕获，另一端的标记分子与其相应的配体或抗体结合，从实现夹心检测。所述检测技术包括酶联免疫技术和快速纸层析技术。本发明首次实现了对金属离子的快速夹心检测，避免了常规重金属检测对贵重仪器的需求，弥补了竞争法重金属检测卡的灵敏度和特异性的不足。