

doi: 10.12452/j.fxcxb.25120204

# 重金属铬单克隆抗体制备及其免疫分析方法的建立

林 慈<sup>1</sup>, 束广萍<sup>1</sup>, 王 琪<sup>1</sup>, 岳绪辉<sup>1</sup>, 徐乃丰<sup>1</sup>, 令狐克勇<sup>2</sup>, 王元凤<sup>1\*</sup>

(1. 上海师范大学 生命科学学院, 上海 200234; 2. 贵州国芯生物科技有限公司, 贵州 贵阳 550027)

**摘要:** 该文制备了重金属铬的单克隆抗体, 并建立了彩色乳胶微球免疫层析快速检测方法。采用异硫氰酸酯法, 分别与载体蛋白进行偶联合成完全抗原(免疫原和包被原), 通过免疫小鼠制备特异性识别重金属铬的单克隆抗体(4G9)。结果表明, 单抗4G9的半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)为21.9 ng/mL, 与镉、铅、汞、砷、铜、铁、镍重金属交叉反应率均小于0.3%。基于此, 建立了重金属铬彩色乳胶微球免疫层析方法, 优化了抗体用量、试纸条T线浓度、探针用量以及试纸条检测体系pH值。在最佳工作条件下, 建立的彩色乳胶微球免疫层析试纸条对重金属铬的检出限(LOD)为0.95 ng/mL, 线性范围为0.78~25 ng/mL; 该试纸条在实际芦笋样本中的LOD为5.15 ng/mL, 加标回收率为75.3%~119%, 相对标准偏差均小于10%, 可用于实际样品中重金属铬残留的快速检测。

**关键词:** 重金属铬; 单克隆抗体; 免疫层析技术; 试纸条

**中图分类号:** O614.61; R392 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2026)05-1061-10

## Preparation of Monoclonal Antibody Against Heavy Metal Chromium and Development of Immunochromatographic Assay

LIN Ci<sup>1</sup>, SHU Guang-ping<sup>1</sup>, WANG Qi<sup>1</sup>, YUE Xu-hui<sup>1</sup>, XU Nai-feng<sup>1</sup>, LINGHU Ke-yong<sup>2</sup>,  
WANG Yuan-feng<sup>1\*</sup>

(1. College of Life Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China; 2. Guizhou Guoxin Biotechnology Co., Ltd., Guiyang 550027, China)

**Abstract:** A color latex microsphere-based immunochromatographic assay was developed for the rapid detection of chromium using a monoclonal antibody. Firstly, chromium haptens were synthesized by coupling them with carrier proteins via the isothiocyanate method to prepare complete antigens (immunogen and coating antigen). The complete antigens were used to immunize mice, and spleen cells were fused with myeloma cells to obtain a monoclonal antibody (4G9) specifically recognizing chromium. The results showed that the IC<sub>50</sub> value of monoclonal antibody 4G9 was 21.9 ng/mL, and its cross-reaction rates with other heavy metals, including Cd, Pb, Hg, As, Cu, Fe and Ni, were all below 0.3%. Based on this antibody, the conditions of the color latex microsphere immunochromatographic assay including antibody dosage, T-line coating concentration, probe loading, and pH of the detection system were optimized. Under the optimum conditions, the limit of detection (LOD) of the test strip for chromium was 0.95 ng/mL, and the linear detection range was 0.78–25 ng/mL. For real asparagus samples, the LOD was 5.15 ng/mL, with spiked recoveries ranging from 75.3% to 119% and relative standard deviations below 10%. These results indicate that the established immunochromatographic assay possesses high specificity and sensitivity and can be applied to the rapid detection of chromium residues in actual samples.

**Key words:** heavy metal chromium; monoclonal antibody; immunochromatography; test strip

重金属铬(Cr)是16种对人体健康最有害的污染物之一, 通常以六价(Cr<sup>6+</sup>)形式被广泛用于冶金、钢铁、纺织和染料制造等污染行业<sup>[1]</sup>, Cr<sup>6+</sup>毒性大, 可导致胃肠道的腐蚀性病变, 并可能由于胃和肠的大面积坏死和出血而导致死亡<sup>[2]</sup>; Cr<sup>3+</sup>作为生物体的微量矿物质, 在限量标准下, 可以改善胰岛素敏感性、血糖、胰岛素、血脂、血红蛋白、瘦体重和相关变量<sup>[3-4]</sup>。在正常生理条件下, 摄入的Cr<sup>6+</sup>进入细

收稿日期: 2025-12-02; 修回日期: 2026-03-06

基金项目: 上海市科技计划项目(20392002100); 2023年贵阳贵安科技人才培养项目(筑科合同[2024]2-6号)

\*通讯作者: 王元凤, 博士, 教授, 研究方向: 茶功能性食品研发及食品安全检测, E-mail: yfwang@shnu.edu.cn

网络首发日期: 2026-03-19

胞后可还原为  $\text{Cr}^{3+}$ , 这一过程将改变体内自由基如巯基和羟基的活性, 并通过攻击蛋白质、DNA 和膜脂质破坏细胞完整性<sup>[5]</sup>。芦笋作为一种高经济价值的食用蔬菜, 因富含氨基酸、维生素及多种矿物质而深受消费者喜爱。芦笋具有较强的重金属富集能力, 容易从污染土壤中吸收铬等重金属离子, 对人体健康构成潜在威胁<sup>[6]</sup>。Zhang 等<sup>[7]</sup>对芦笋中多种重金属离子进行了风险评估, 结果表明铬离子对人体健康具有不可忽视的影响。因此检测芦笋中的重金属铬离子具有重要意义。

为了严格控制铬对人类的影响, 中国国家标准 GB 2762-2017《食品安全国家标准—食品中污染物限量》规定, 水生动物及其制品, 谷物、豆类、肉类及其制品, 蔬菜及其制品的铬最高限量应分别小于 2.0 mg/kg、1.0 mg/kg 和 0.5 mg/kg<sup>[8-9]</sup>。金属离子的传统检测一般采用仪器分析法<sup>[10]</sup>, 包括原子吸收光谱法(AAS)<sup>[11]</sup>、原子发射光谱法(AES)<sup>[12]</sup>、原子荧光光谱法(AFS)<sup>[13]</sup>、电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS)<sup>[14]</sup>等。仪器分析法可实现定量检测、准确度高, 但费力、耗时、仪器昂贵且操作复杂。免疫学检测方法因具有灵敏度高、特异性好的优点, 能够满足现场大批量快速筛查需求, 从而受到越来越多研究学者的青睐。俞华齐等<sup>[15]</sup>通过制备重金属铬单克隆抗体, 建立了酶联免疫分析(ELISA)检测方法, 其方法灵敏度达 1  $\mu\text{g/L}$ ; 刘茜等<sup>[16]</sup>建立了水样中铬离子( $\text{Cr}^{3+}$ )的胶体金免疫层析试纸条检测方法, 其灵敏度为 50  $\mu\text{g/L}$ 。染料掺杂的乳胶微球具有各种鲜艳的颜色, 可为抗体的共价附着提供丰富的表面化学基团, 增强免疫探针的稳定性<sup>[17]</sup>, 结合侧流免疫层析技术建立乳胶微球免疫层析试纸条方法是近年来发展迅速的一项新技术。

本研究使用双功能螯合剂(ITCBE)通过异硫氰酸酯法合成铬的完全抗原, 制备出特异性好的重金属铬单克隆抗体, 通过 1-乙基(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺(EDC)法将铬单抗与彩色乳胶微球偶联, 建立了彩色乳胶微球免疫层析试纸条快速检测方法, 并用于实际样品(芦笋)中重金属铬( $\text{Cr}^{3+}$ )的检测, 为食品中铬的检测提供了新方法。

## 1 实验部分

### 1.1 样品、试剂与仪器

芦笋样本产自崇明岛。

镉、汞、铅、砷、铜、铁、镍标准液(纯度 $\geq 95\%$ , 北京标准物质研究中心); 6~8 周龄 BALB/c 雌性小鼠(上海斯莱克实验动物有限公司); SP2/0 骨髓瘤细胞(中科院细胞库); 1-乙基(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺(EDC)、N-羟基丁二酰亚胺(NHS)、牛血清白蛋白(BSA)、卵清蛋白(OVA)、1-(4-异硫氰苄基)乙烯基二胺-N, N, N', N'-四乙酸(ITCBE)、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂(分析纯, 美国 Sigma 公司); 小鼠单抗 Ig 类/亚类/亚型鉴定用 ELISA 试剂盒(洛阳柏奥通实验材料中心); 彩色乳胶微球(苏州为度生物技术有限公司); 其余试剂均为分析级。

3423 型二氧化碳培养箱(赛默飞世尔科技公司); TS100 型倒置显微镜(尼康映像仪器销售(中国)有限公司); AMR-100 型全自动酶标分析仪(杭州奥盛仪器有限公司); ZQ2000 型微电脑自动斩切机、HM3035 型 XYZ 三维划膜喷金仪(上海金标科技有限公司)。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 重金属铬完全抗原的制备

重金属铬完全抗原的合成过程参考邹淑珍<sup>[18]</sup>所述的异硫氰酸酯法加以改进, 原理如图 1 所示。

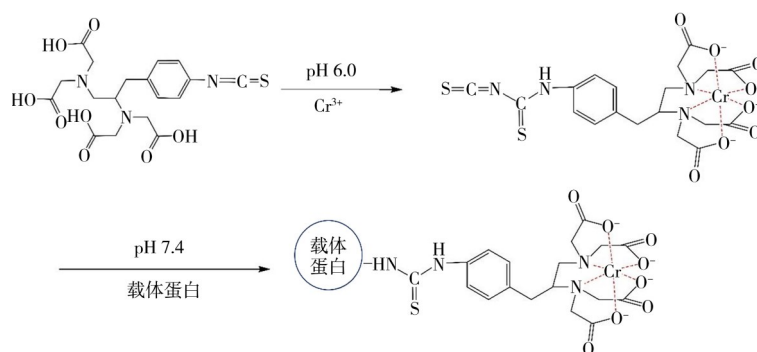


图 1 重金属铬完全抗原合成原理图

Fig. 1 Schematic diagram of  $\text{Cr}^{3+}$  complete antigen synthesis

免疫原合成步骤如下: 首先, 将ITCBE与Cr<sup>3+</sup>整合: 向玻璃瓶中加入600 μL铬标准液, 缓慢滴入200 μL 10 mg/mL ITCBE溶液, 调pH值至6.0, 室温搅拌反应6 h, 得到Cr-ITCBE溶液; 随后, 偶联载体蛋白BSA: 按照Cr-ITCBE: BSA的摩尔比为10:1和15:1, 称取相应质量的BSA分别溶解于3 mL 4-羟乙基哌嗪乙磺酸盐(HBS, 0.01 mol/L pH 7.4)缓冲液中, 将上述Cr-ITCBE溶液均分为两份, 缓慢滴入BSA溶液中, 调至pH 7.4, 室温下磁力搅拌反应24 h, 得到Cr-ITCBE-BSA溶液; 最后, 将反应后的溶液转移透析袋中, 室温条件下, 用0.01 mol/L HBS(pH 7.4)缓冲液透析72 h, 6~8 h换一次透析液。透析完成后将所得免疫原分装, 封口膜密封, 并记录其体积, 通过载体蛋白BSA的质量计算所得免疫原的浓度, 置于-20 °C保存。

包被原合成按照Cr-ITCBE: OVA的摩尔比为10:1和20:1分别称取相应质量的OVA溶于1.5 mL HBS(0.01 mol/L pH 7.4)缓冲液中, 其他步骤同免疫原合成。

### 1.2.2 完全抗原鉴定

紫外全波长扫描鉴定: 用0.01 mol/L PBS缓冲液配制1 mg/mL BSA、OVA溶液, 用超纯水将完全抗原稀释至0.5 mg/mL, 使用紫外分光光度计进行紫外扫描, 波长范围为200~400 nm。

SDS-PAGE凝胶电泳鉴定: 采用彩色凝胶快速试剂盒对完全抗原进行鉴定, 用0.01 mol/L PBS缓冲液配制0.8 mg/mL BSA、OVA溶液, 并将完全抗原稀释成0.8 mg/mL, 充分混匀后, 沸水浴5 min, 待样品恢复至室温后再使用。

### 1.2.3 单克隆抗体的制备

选取6~8周龄的BALB/c小鼠用免疫原进行免疫, 初次免疫3周后进行加强免疫, 之后每隔两周免疫1次, 从第3次加强免疫开始, 每一次加强免疫后的一周对小鼠进行尾静脉取血测定血清效价, 间接ELISA测定多抗血清效价, 以此判定免疫效果。挑选出效价高、抑制率强的小鼠用于细胞融合。融合前3天对融合小鼠进行冲刺免疫, 融合当天对小鼠摘眼球取血, 脱颈处死后浸泡在75%的酒精中, 5 min内取出脾脏制备脾细胞, 对两种细胞进行计数, 按照小鼠脾细胞: 骨髓瘤细胞=5:1~15:1的数量比例采用PEG1500介导的化学融合法促使细胞发生融合形成杂交瘤细胞。用间接竞争ELISA测定细胞上清液, 筛选阳性孔。挑选出强阳性、抑制率高、细胞状态好的孔, 利用有限稀释法对阳性孔进行克隆, 直至得到分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。向BALB/c小鼠腹腔注射杂交瘤细胞, 收集并用辛酸-饱和硫酸铵法纯化腹水<sup>[19-20]</sup>。

### 1.2.4 单克隆抗体性能鉴定

1.2.4.1 效价测定 采用间接竞争ELISA法对制备的单克隆抗体进行效价测定。将包被原用碳酸盐缓冲液稀释3k、9k、27k、81k后分别包板, 以未免疫的小鼠尾静脉血清稀释1k作为阴性样品, 将单抗4G9用抗体稀释液从1k开始进行3倍倍比稀释至2 187 k。在波长为450 nm处测定其吸光度值(OD<sub>450</sub>), 所得阳性OD值/阴性OD值≥2.1的抗体最大稀释倍数即为抗体效价<sup>[21]</sup>。

1.2.4.2 单抗亚型鉴定 采用洛阳柏奥通实验材料中心试剂盒进行单抗亚型鉴定, 首先将试剂盒恢复室温, 然后用纯水将清洗液配成工作浓度; 取出酶标板, 每个标本8孔, 阳性对照8孔, 阴性对照8孔; 将标本检测孔每孔先加入标本稀释液各50 μL, 然后加入50 μL稀释后的单抗, 贴上封板膜37 °C孵育30 min; 弃去板内液体, 洗板5次后拍干, 在每个标本以及阴阳性对照的8孔中分别加入8种酶标二抗(IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgM、IgA、Kappa、Lambda)各100 μL, 贴上封板膜37 °C孵育30 min; 弃去板内液体, 洗板5次后拍干, 每孔分别加入显色剂A和显色剂B各50 μL, 贴上封板膜避光37 °C显色20 min; 每孔加入50 μL反应终止液后用酶标仪测定450 nm处的吸光值。参考OD值最高孔所对应的酶标二抗, 判定单抗Ig类或亚类。

1.2.4.3 亲和力测定 用碳酸盐缓冲液将包被原浓度稀释为2、0.7、0.2、0.07 μg/mL, 用抗体稀释液将单抗从1k开始3倍倍比稀释至2 187 k, 采用间接竞争ELISA法对制备的单克隆抗体亲和力进行测定, 按照公式(1)计算亲和常数(K<sub>a</sub>)。

$$K_a = \frac{n-1}{2(n[Ab']_t - [Ab]_t)} \quad (1)$$

式中: K<sub>a</sub>为亲和常数; n为不同包被浓度下绘制的两条曲线中包被抗原浓度的倍数比值; [Ab']<sub>t</sub>为该曲

线中最大吸光值的50%对应的抗体浓度,  $[Ab]_t$ 为另一曲线中最大吸光值的50%对应的抗体浓度。

1.2.4.4 单抗纯度鉴定 采用SDS-PAGE电泳法对单抗4G9进行纯度测定, 使用0.01 mol/L PBS缓冲液将单抗4G9稀释至0.8 mg/mL, 其他步骤同“1.2.2”。

#### 1.2.5 灵敏度测定

采用间接竞争ELISA法在最佳工作浓度下加入不同浓度的EDTA-Cr<sup>3+</sup>溶液, 在波长450 nm处测定其吸光度值, 以EDTA-Cr<sup>3+</sup>的浓度为横坐标, OD值为纵坐标绘制标准曲线, 确定其对重金属铬的半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>), 以IC<sub>50</sub>值衡量该单克隆抗体的灵敏度。

#### 1.2.6 特异性测定

采用间接竞争ELISA法检测单抗与其他重金属(镉、汞、砷、铅、铜、铁、镍)EDTA螯合物(EDTA-metal ions)的IC<sub>50</sub>值, 以HBS-EDTA稀释液稀释1 mg/mL的重金属铬标准溶液至50 ng/mL, 其他7种重金属稀释至500 ng/mL, 按照公式(2)计算单抗的交叉反应率(CR), 判断单抗是否与其他重金属存在交叉反应。

$$CR(\%) = \frac{IC_{50} \text{ of EDTA - Metal ions}}{IC_{50} \text{ of EDTA - Cr}^{3+}} \quad (2)$$

#### 1.2.7 彩色乳胶微球免疫探针的制备与抗体标记量优化

取25 μL的彩色乳胶微球, 加入NHS和EDC溶液, 振荡混匀并离心用2-(N-吗啉基)乙磺酸(MES)溶液重悬, 重复离心, 超声混匀。加入适量的铬单抗, 振荡偶联2 h; 随后加入BSA溶液, 振荡0.5 h; 最后加入PEG-20000溶液, 振荡封闭0.5 h。离心弃上清, 复溶。

取100 μL已活化好的微球分别与3、4、5、6、7 μg铬单抗进行偶联, 取3 μL探针与90 μL HBS-EDTA缓冲溶液混合后加至酶标板中, 每组平行3次, 比较试纸条T线灰度值以及T/C的值, 获得抗体最佳标记量。

#### 1.2.8 彩色乳胶微球免疫层析试纸条检测体系pH值优化

采用10 mol/L NaOH溶液和1 mol/L HCl溶液将HBS-EDTA缓冲溶液pH值调至5.0、6.0、7.0、8.0、9.0, 加标浓度为50 ng/mL, 比较T线灰度值与竞争抑制率, 确定体系最佳检测pH值。

#### 1.2.9 彩色乳胶微球免疫层析试纸条参数优化

采用棋盘滴定实验对T线浓度、探针用量进行优化, 制备T线浓度为0.3、0.4、0.5 mg/mL的试纸条, 分别取3、3.5、4 μL探针与90 μL HBS-EDTA缓冲溶液和90 μL 50 ng/mL EDTA-Cr<sup>3+</sup>溶液混合后加至酶标板中, 每组平行3次, 比较T线灰度值、T/C值以及竞争抑制率, 获得试纸条最佳参数, 竞争抑制率=(1-B/B<sub>0</sub>)×100%(B为阳性加标条件下的T/C值, B<sub>0</sub>为阴性加标条件下的T/C值)。

#### 1.2.10 免疫层析试纸条的组装

将样品垫、NC膜和吸水纸按顺序固定在PVP背衬板上, 使用划膜稀释液将羊抗鼠二抗和铬包被原(Cr<sup>3+</sup>-ITCBE-OVA)稀释成一定浓度。用划膜仪喷涂C、T线, 干燥处理后切条。

#### 1.2.11 彩色乳胶微球免疫层析试纸条检测灵敏度测定

用HBS-EDTA缓冲溶液将铬标准液采用二倍倍比稀释的方式, 从200 ng/mL稀释至0.39 ng/mL, 向微孔中加入90 μL不同浓度的EDTA-Cr<sup>3+</sup>溶液, 每组平行3次。记录试纸条T、C线灰度值, 以EDTA-Cr<sup>3+</sup>溶液浓度为横坐标, T/C值为纵坐标绘制定量曲线, 取横坐标的对数值得到其标准曲线, 以IC<sub>10</sub>(10%抑制浓度)所对应的值为检出限(LOD)<sup>[22]</sup>。

#### 1.2.12 彩色乳胶微球免疫层析试纸条特异性测定

使用HBS-EDTA缓冲溶液将几种常见的重金属离子标准液(如镉、汞、砷、铅、铜、铁、镍)配制成终浓度为1 μg/mL的EDTA螯合物, 采用本研究所开发的试纸条对1 μg/mL的EDTA螯合物和50 ng/mL的EDTA-Cr<sup>3+</sup>溶液进行检测, 每组平行3次, 记录T/C值。

#### 1.2.13 实际样品检测与加标回收率测定

将芦笋干样0.25 g置于聚四氟乙烯内罐, 加硝酸浸泡过夜, 再加入30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液, 160 °C过夜处理, 加热赶酸至近干, 纯水复溶至100 mL, 4 °C保存<sup>[23-24]</sup>。选用的芦笋样本经ICP-MS测定, 鲜样的铬含量为0.070 4 mg/kg, 水分含量为90.2%。

将芦笋提取液用HBS-EDTA缓冲溶液稀释,配制成铬质量浓度为1~200 ng/mL的稀释溶液,取90  $\mu$ L溶液至加样孔中,加入探针充分混匀进行检测,每组平行3次,记录试纸条T、C线灰度值,建立芦笋样本的标准曲线。并向阴性样本中加入铬离子溶液使其质量浓度为5、10、50和100 ng/mL,计算加标回收率与相对标准偏差(RSD)以评价试纸条检测重金属铬的准确性及精密度。

## 2 结果与讨论

### 2.1 免疫原鉴定

#### 2.1.1 紫外扫描鉴定

重金属铬完全抗原的紫外扫描结果如图2A、B所示,载体蛋白BSA、OVA 和完全抗原的特征峰位于280 nm左右,所合成的完全抗原具有载体蛋白的特征峰,且相较于载体蛋白均发生蓝移,初步表明完全抗原合成成功。

#### 2.1.2 SDS-PAGE 凝胶电泳鉴定

载体蛋白BSA 和OVA 合成的完全抗原的SDS-PAGE 电泳图如图2C、D所示,图2C中BSA 的分子量在66~67 kD之间,其条带位于Marker所示的分子量72~55 kD之间,且靠近55 kD,即所合成的免疫原条带与BSA 条带相比有轻微上移,说明与BSA 偶联合成的免疫原合成成功。同理,图2D中偶联OVA 所合成的包被原的条带相较于OVA 的条带有轻微上移,且均只有一个条带,说明包被原合成成功。

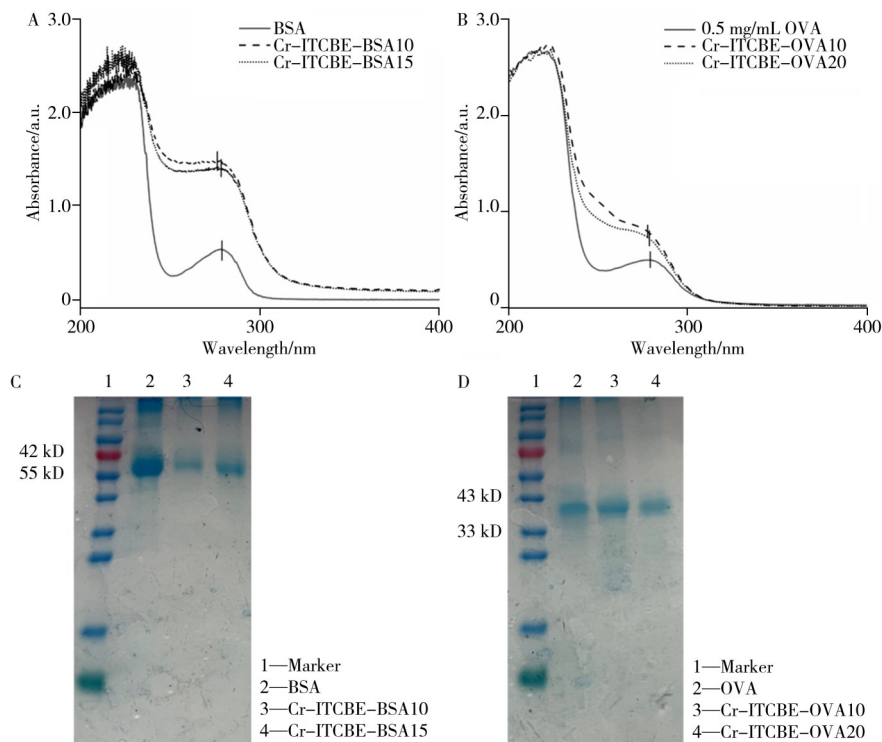


图2 铬完全抗原的紫外全波长扫描(A、B)与SDS-PAGE电泳(C、D)鉴定结果

Fig. 2 Identification of chromium complete antigen by UV spectra(A, B) and SDS-PAGE electrophoresis(C, D)

### 2.2 单克隆抗体的筛选与制备

#### 2.2.1 细胞融合

分别以 $\text{Cr}^{3+}$ -ITCBE-OVA10和 $\text{Cr}^{3+}$ -ITCBE-OVA20作为包被原,采用间接ELISA法,对 $\text{Cr}^{3+}$ -ITCBE-BSA10与 $\text{Cr}^{3+}$ -ITCBE-BSA15免疫小鼠所得的多抗血清进行效价测定。结果表明,以 $\text{Cr}^{3+}$ -ITCBE-BSA10免疫小鼠、并以 $\text{Cr}^{3+}$ -ITCBE-OVA10为包被原的组合,可获得理想的免疫效果,故确定该组合为最优体系。在该条件下,2号鼠血清效价高,抑制效果好(表1),将其加强免疫后用于细胞融合。融合细胞经3次亚克隆,得到1株分泌针对EDTA- $\text{Cr}^{3+}$ 单抗的细胞株(4G9)。

表 1 小鼠抗血清效价的测定结果

Table 1 Determination results of antiserum titer in mice

Mouse	Negative OD <sub>450</sub>	Positive OD <sub>450</sub>	Titer	Inhibition rate/%
1	1.151	0.854	27 000	26
2	1.817	1.012	27 000	44
3	1.217	0.819	27 000	33
4	1.95	1.09	9 000	44

2.2.2 单克隆抗体性能鉴定

2.2.2.1 效价测定结果 采用间接竞争 ELISA 法对制备的单克隆抗体效价进行测定, 结果如表 2 所示, 按照阳性 OD 值/阴性 OD 值 ≥ 2.1 做为判断标准, 单抗 4G9 的效价为 27 k。

表 2 单抗效价测定结果

Table 2 Results of monoclonal antibody titer determination

Dilution factor	1k	3k	9k	27k	81k	243k	729k	2 187k	Negative	
4G9	OD <sub>450</sub>	2.384	1.778	1.205	0.720	0.324	0.179	0.117	0.140	0.180
	P/N	13.2	9.9	6.7	4.0	1.8	1.0	0.7	0.8	-

2.2.2.2 亚型鉴定结果 经测定, 单克隆抗体 4G9 与 IgG2a、Kappa 二抗的 OD<sub>450</sub> 值最高, 与 IgG1、IgG2b 的二抗显色微弱, 而与 IgM、IgG3 和 IgGA 二抗几乎不显色, 说明单抗 4G9 的重链与轻链分别为 IgG2a 和 Kappa。

2.2.2.3 单抗纯度测定结果 如图 3 所示, 第 1 泳道为 Marker, 第 2 泳道为单抗 4G9, 该单抗条带清晰, 重链分子量在 50 kD 左右, 轻链分子量在 20 kD 左右, 说明抗体纯度高。

2.2.2.4 亲和力测定结果 采用间接竞争 ELISA 法测定亲和力, 结果如图 4A 所示, 结合公式 (1) 计算得到单抗 4G9 亲和常数 (K<sub>a</sub>) 为 4.13 × 10<sup>10</sup> L/mol。通常 K<sub>a</sub> 在 10<sup>7</sup>~10<sup>12</sup> L/mol 范围为高亲和力抗体<sup>[25]</sup>, 故本实验制备出的单克隆抗体为高亲和力抗体。

2.2.3 灵敏度测定结果

采用间接竞争 ELISA 法对灵敏度进行测定, 以 EDTA-Cr<sup>3+</sup> 的浓度为横坐标, OD 值为纵坐标绘制标准曲线, 结果如图 4B 所示, 标准曲线的方程为  $y=0.04633+1.52395/[1+(x/21.87453)^{0.81816}]$ , r<sup>2</sup> 为 0.9940, 单抗 4G9 的 IC<sub>50</sub> 为 21.9 ng/mL。说明基于该抗体建立的间接竞争 ELISA 方法的灵敏度较高, 可以用于后续试纸条的开发。

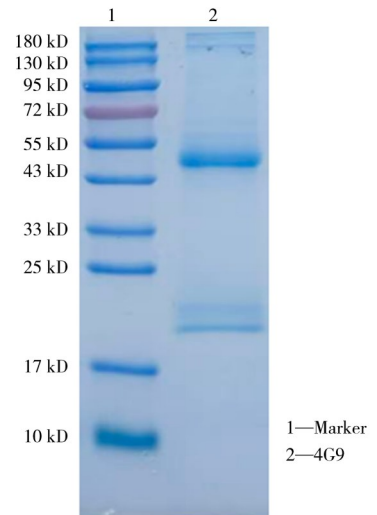


图 3 抗体纯度测定结果

Fig. 3 Antibody purity determination

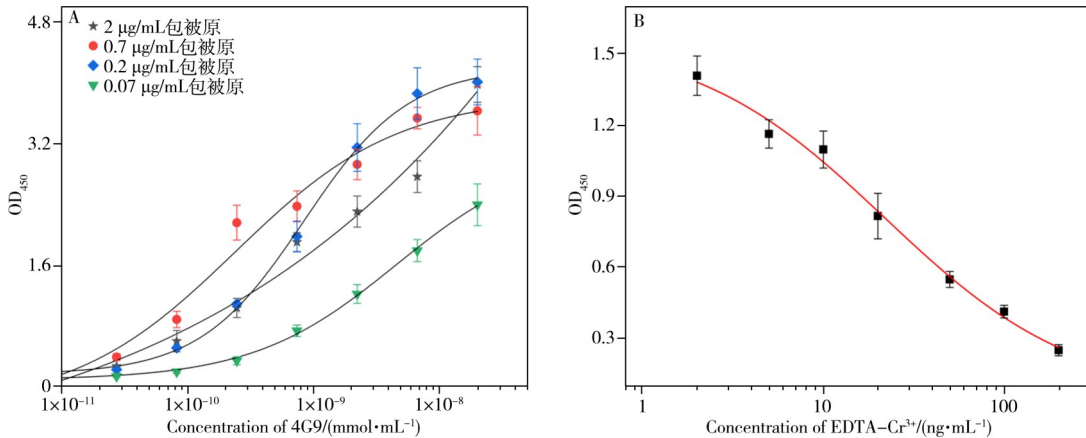


图 4 单克隆抗体 4G9 亲和力(A)与标准曲线(B)测定结果

Fig. 4 Determination of affinity(A) and standard curve(B) of monoclonal antibody 4G9

2.2.4 单抗特异性测定

采用间接竞争 ELISA 法测定单抗 4G9 与其他重金属(镉、汞、砷、铅、铜、铁、镍)的交叉反应率,

结果如表3所示。单抗4G9对EDTA-Cr<sup>3+</sup>的IC<sub>50</sub>为21.9 ng/mL, 与其他重金属的交叉反应率均小于0.3%, 说明其具有较强的特异性。

### 2.3 彩色乳胶微球层析试纸条的研制

#### 2.3.1 抗体标记量的优化

抗体标记量优化结果如图5A所示, 当抗体标记量从3 μg增加至7 μg时, 试纸条的T/C值逐步上升, 并在6 μg时达到最大; 从试纸条的T线灰度值来看, 抗体标记量为6 μg时T线灰度值较大。综合考虑, 选择6 μg为最佳抗体标记量。

#### 2.3.2 彩色乳胶微球免疫层析试纸条检测体系pH值优化

试纸条检测体系pH值优化结果如图5B所示, 随着pH值从5.0逐步上升至9.0, 抑制率呈现波动趋势并在pH 5.0和7.0时最高, 而T线灰度值在pH值为7.0时最大。综合比较, 确定pH 7.0为检测体系最佳pH值。

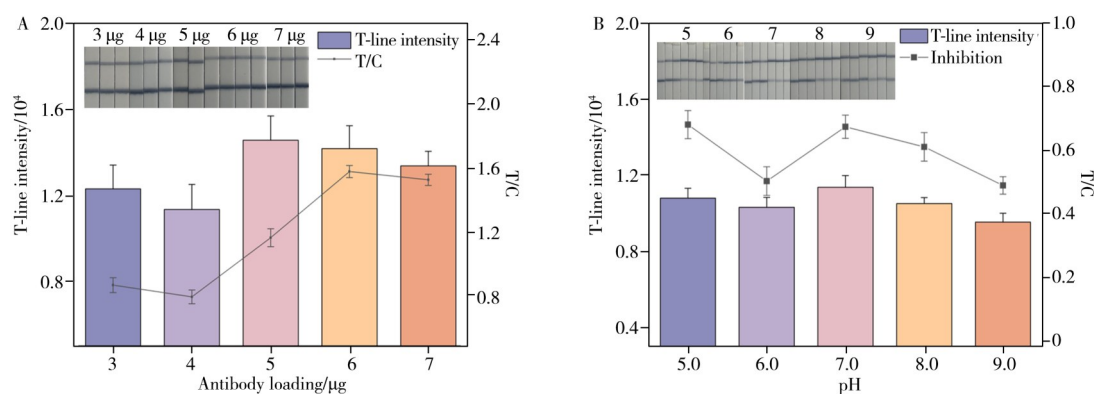


图5 抗体标记量(A)与检测体系pH值(B)优化结果

Fig. 5 Results of antibody added(A) and pH value(B) optimization for the detection system

#### 2.3.3 彩色乳胶微球免疫层析试纸条参数优化

试纸条参数优化结果如表4所示, 当固定T线浓度, 逐渐增大探针用量时, T线灰度值和T/C值均先增大后减小, 抑制率则先减小后增大。综合比较, 探针用量为3.0 μL时, 对照组与加标组的T线灰度值最小, C、T线变化最明显。固定探针用量为3.0 μL, 比较不同T线浓度下的抑制率, 结果显示T线浓度为0.3 mg/mL时抑制率最高。虽然T线浓度为0.5 mg/mL、探针用量为4.0 μL时, 也能得到较高的抑制率, 但考虑到工业放大时会浪费较多包被原, 因此根据经济节约的原则, 本研究选择T线浓度为0.3 mg/mL、探针用量为3.0 μL作为试纸条最佳参数。

表4 T线浓度与探针用量优化结果

Table 4 Optimization of T line concentration and probe dosage

Sample No.	T-line concentration/(mg·mL <sup>-1</sup> )	Probe volume/μL	T-line intensity	T/C	Inhibition rate/%
1	0.3	3.0	6 517±704	0.53±0.06	78.0
2		3.5	6 821±483	0.59±0.04	73.1
3		4.0	5 041±113	0.47±0.01	75.7
4	0.4	3.0	8 075±322	0.82±0.07	76.2
5		3.5	9 422±160	0.94±0.03	72.9
6	0.5	4.0	7 455±123	0.72±0.00	76.3
7		3.0	9 686±560	1.02±0.13	73.5
8		3.5	11 401±791	1.03±0.07	68.9
9		4.0	9 795±753	0.87±0.11	77.9

#### 2.3.4 彩色乳胶微球免疫层析试纸条标准曲线

在最佳条件下, 配制EDTA-Cr<sup>3+</sup>溶液浓度分别为0、0.39、0.78、1.56、3.12、6.25、12.5、25、50、100、200 ng/mL的溶液, 以EDTA-Cr<sup>3+</sup>浓度为横坐标(x)、T/C值为纵坐标(y)绘制标准曲线, 结果

表3 重金属铬单抗交叉反应检测结果

Table 3 The percent cross-reactivity of Cr<sup>3+</sup>-Ab with EDTA and other metal ions

Heavy metal ion	IC <sub>50</sub> /(ng·mL <sup>-1</sup> )	CR/%
EDTA-Cr <sup>3+</sup>	21.9	100
EDTA-Cd <sup>2+</sup>	>500	<0.3
EDTA-Hg <sup>2+</sup>	>500	<0.3
EDTA-Pb <sup>2+</sup>	>500	<0.3
EDTA-As <sup>3+</sup>	>500	<0.3
EDTA-Cu <sup>2+</sup>	>500	<0.3
EDTA-Fe <sup>3+</sup>	>500	<0.3
EDTA-Ni <sup>2+</sup>	>500	<0.3

如图 6A 所示, 在 0.78~25 ng/mL 范围内, T/C 值与 EDTA-Cr<sup>3+</sup> 浓度的对数 (lnx) 呈线性关系, 回归方程  $y = -0.31342 \ln x + 2.00609$ , 相关系数  $r^2$  为 0.9610。所建立的铬彩色乳胶微球免疫层析试纸条的 LOD 为 0.95 ng/mL, IC<sub>50</sub> 为 17.56 ng/mL。

2.3.5 彩色乳胶微球免疫层析试纸条特异性评价

将常见重金属(镉、汞、砷、铅、铜、铁、镍等)配制成 1 μg/mL 的标准品溶液, 采用重金属铬彩色乳胶微球免疫层析试纸条进行检测, 记录其 T/C 值, 并与阴性对照组的 T/C 值比较, 计算得到该试纸条检测其他重金属的 IC<sub>50</sub>, 从而得

出本试纸条与其他重金属的交叉反应率。结果如表 5 所示, 所建立的免疫层析试纸条与其他重金属标准品的交叉反应率小于 0.1%, 表明本试纸条的特异性较好。

表 5 特异性评价结果

Table 5 Specific evaluation results

Heavy metal ion	IC <sub>50</sub> /(ng·mL <sup>-1</sup> )	CR/%
Cr <sup>3+</sup>	17.56	100
Cd <sup>2+</sup>	>1 000	<0.1
Hg <sup>2+</sup>	>1 000	<0.1
As <sup>3+</sup>	>1 000	<0.1
Pb <sup>2+</sup>	>1 000	<0.1
Cu <sup>2+</sup>	>1 000	<0.1
Fe <sup>3+</sup>	>1 000	<0.1
Ni <sup>+</sup>	>1 000	<0.1

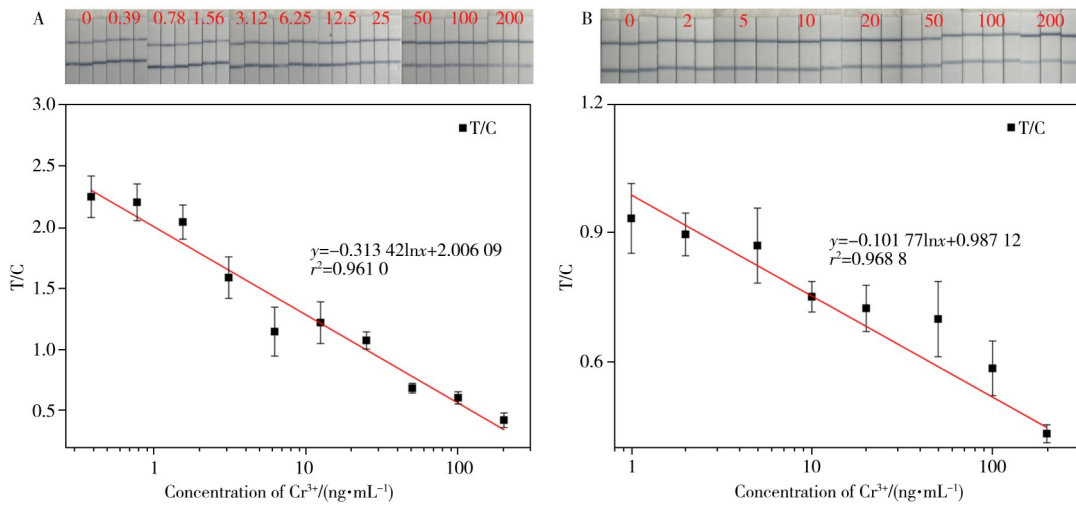


图 6 重金属铬免疫层析试纸条(A)与实际样本芦笋(B)的标准曲线

Fig. 6 Standard curves of heavy metal chromium immunoassay strip(A) and actual asparagus sample(B)

2.3.6 实际样品检测与回收率测定

取经 ICP-MS 检测, 重金属铬结果为阴性的芦笋样本进行前处理, 向处理好的芦笋样本溶液中添加铬标准品至质量浓度为 0、2、5、10、20、50、100、200 ng/mL, 以铬离子质量浓度为横坐标(x), T/C 值为纵坐标(y)绘制标准曲线。结果如图 6B 所示, 在铬离子质量浓度 0~200 ng/mL 范围内, 其对数 (lnx) 与 T/C 值呈良好的线性关系, 回归方程为  $y = -0.10177 \ln x + 0.98712$ , 相关系数  $r^2$  为 0.9688。所建立的铬彩色乳胶微球免疫层析试纸条在实际检测芦笋样本时的 LOD 为 5.15 ng/mL, 肉眼检测限 (vLOD) 为 10 ng/mL。

取经 ICP-MS 检测重金属铬结果为阴性的芦笋样本进行前处理, 向样本溶液中添加铬标准品至质量浓度为 5、10、50 和 100 ng/mL, 采用重金属铬彩色乳胶微球免疫层析试纸条进行检测, 结果如表 6 所示。在 4 种加标浓度下, 样本中铬的回收率为 75.3%~119%, RSD 均小于 10%。本研究所建立的彩色乳胶微球免疫层析试纸条在检测实际样本(芦笋)时具有较好的添加回收率, 表明该试纸条检测性能良好, 在高通量实际样本检测中拥有较好的前景。

表 6 芦笋样本加标回收率结果及相对标准偏差

Table 6 Results of the spiked recoveries and RSDs for asparagus samples

Spiked concentration/(ng·mL <sup>-1</sup> )	Detected concentration/(ng·mL <sup>-1</sup> )	Recovery/%	RSD/%
5	5.14	103	6.3
10	7.53	75.3	9.7
50	52.7	105	7.3
100	119.2	119	9.2

## 2.4 与其他方法的比较

与表7所列举的文献相比,本研究基于单克隆抗体建立的检测重金属铬的彩色乳胶微球免疫层析方法,其 $IC_{50}$ 虽不如ic-ELISA方法,但LOD与检测范围下限均有所提高,具有良好的应用前景,为开发相应试纸条产品奠定了基础。

表7 与其他重金属铬免疫分析方法的对比

Table 7 Comparison with some recent literatures on heavy metal chromium immunoassay

Immunoassay method	LOD/(ng·mL <sup>-1</sup> )	IC <sub>50</sub> /(ng·mL <sup>-1</sup> )	Detection range/(ng·mL <sup>-1</sup> )	Reference
ELISA	1	75 000	—	[15]
CG-LFA	50	—	—	[16]
ic-ELISA	1	8.64	1.13~66.3	[26]
CG-LFA	50	—	5~80	[27]
LM-LFA	0.95	17.56	0.78~25	This work

## 3 结 论

为解决重金属铬残留危害问题,本研究设计合成了重金属铬完全抗原,制备出亲和力高的重金属铬单克隆抗体4G9,其 $IC_{50}$ 为21.9 ng/mL,与其他重金属无交叉反应,特异性强。基于此建立了重金属铬彩色乳胶微球免疫层析检测方法,确定了最佳免疫检测条件:抗体投放量为6 μg;探针使用量为3 μL;T线质量浓度为0.3 mg/mL;检测pH值为7.0。所建方法对重金属铬的LOD为0.95 ng/mL,  $IC_{50}$ 为17.56 ng/mL,线性范围为0.78~25 ng/mL,与其他重金属不存在交叉反应。该方法对芦笋中重金属铬的LOD为5.15 ng/mL、vLOD为10 ng/mL,加标回收率为75.3%~119%,相对标准偏差均小于10%。本研究建立的彩色乳胶微球免疫层析方法检测性能良好、特异性较强、结果准确可靠,适用于芦笋中重金属铬残留的快速检测。

### 参考文献:

- [1] Eleni S, Cristina M V, Manolis K, Kyriakos M, Athanasia M, Michalis L. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **2014**, 11(10): 10125-10145.
- [2] Fernanda F P, Anderson H G, Manoela M P, Jean C O M, Claiton I S, Paola S, Tatiane T N W, Saulo P P, David D, Welden P. *Animals*, **2023**, 14(1): 63.
- [3] Vincent J B. *Polyhedron*, **2001**, 20(1): 1-26.
- [4] Anderson R A. *Nutr. Res. Rev.*, **2003**, 16(2): 267-275.
- [5] Sharma A, Kapoor D, Wang J F, Shahzad B, Kumar V, Bali A S, Jasrotia S, Zheng B S, Yuan H W, Yan D L. *Plants*, **2020**, 9(1): 100.
- [6] To Q T, Thu T N, Jwa Y C, Yun J P, Jae-Hyeong C, Song Y K, Ho-Youn K, Hee G B, Sang M K. *LWT-Food Sci. Technol.*, **2022**, 169: 113948.
- [7] Zhang Q H, Li M, Dou C H, Yan X L, Wang B, Zhang H M, Lin Y Q, Zhao D T. *Food Chem.*, **2025**, 495(1): 146395.
- [8] GB 2762-2017. National Food Safety Standard-Limits of Contaminants in Foods. National Standards of the People's Republic of China(食品安全国家标准-食品中污染物限量. 中华人民共和国国家标准).
- [9] Pei F, Wang Y Y, Fang Y, Li P, Yang W J, Ma N, Hu Q H. *J. Food Sci.*, **2020**, 85(2): 493-499.
- [10] Li H, Zhao J, Zhao S F, Cui G F. *Microchem. J.*, **2021**, 168: 106390.
- [11] Perelonia K B S, Beniyez K C D, Banicod R J S, Tadifa G C, Cambia F D, Montojo U M. *Food Contr.*, **2021**, 130: 108363.
- [12] Liu X, Yu K, Zhang H, Liu X Y, Yu K, Zhang H, Zhang X N, Zhang H N, Zhang J, Gao J, Li N, Jiang J. *Talanta*, **2020**, 219: 121348.
- [13] Xue J, Gong S F, Wang X M, Fan Y L, Li X. *Anal. Lett.*, **2012**, 45(15): 2257-2268.
- [14] Zahily H F, Juan R E A, Alfredo M A, Olegario M U, Ivan P G, Maydel R G, Jose A D S J, Mariana B C F B, Otavio P D S J. *Food Addit. Contam. B*, **2021**, 14(1): 59-65.
- [15] Yu H Q, Wang J, Jiang R R, Yao G, Liu S W. *Jiangsu J. Agric. Sci.*(俞华齐, 王娟, 姜忍忍, 姚刚, 刘少伟. 江苏农业学报), **2016**, 32(2): 460-466.
- [16] Liu Q, Tang Y, Xiang J J, Zou J H, Zhai Y F. *J. Instrum. Anal.*(刘茜, 唐勇, 向军俭, 邹军辉, 翟一凡. 分析测试学报), **2012**, 31(4): 397-402.

- [17] Li X M, Chen X M, Liu Z W, Wang J, Hua Q C, Liang J X, Shen X, Xu Z L, Lei H T, Sun Y M. *Food Chem.*, **2020**, 345: 128607.
- [18] Zou S Z. *Development of Rapid Immunoassay for Hg, Cr and Pb*. Wuxi: Jiannan University(邹淑珍.汞、铬、铅三种重金属免疫快速检测方法的研究.无锡:江南大学), **2018**.
- [19] Amritkar V, Adat S, Tejwani V, Rathore A, Bhambure R. *Biotechnol. Adv.*, **2020**, 44: 107632.
- [20] Wei K, Yang Q, Wei Y, Wang Y F, Xu N F, Wei X L. *Foods*, **2023**, 12: 1091.
- [21] Wang Y K. *Preparation of Monoclonal Antibody against Zearalenone and High-throughput Qualitative and Quantitative Detection Technology*. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University(王元凯.玉米赤霉烯酮单克隆抗体的制备及高通量定性、定量检测技术的研究.上海:上海交通大学), **2014**.
- [22] Yue X H, Zhang H X, Zhu J X, Zhang S K, Xu N F, Wang Y F. *J. Food Compos. Anal.*, **2025**, 146: 07888.
- [23] Zhu Z W, Jia J Z, Xu N F, Zhu J X, Wang J, Wang Y F. *Int. J. Food Sci. Technol.*, **2023**, 58(12): 6598–6608.
- [24] Guan Y J, Zhou L Y, Bi J F, Yi J Y, Li S R. *Sci. Technol. Food Ind.* (关云静, 周林燕, 毕金峰, 易建勇, 李淑荣.食品工业科技), **2015**, 36(5): 343–347.
- [25] Xu N F, Zhu Q J, Zhu J X, Jia J Z, Wei X L, Wang Y F. *Foods*, **2022**, 11: 78.
- [26] Wang X, Wang Y, Wang S, Hou J, Cai L, Fan G. *Molecules*, **2022**, 27: 1585.
- [27] Liu X, Xiang J J, Tang Y, Zhang X L, Fu Q Q, Zou J H, Lin Y. *Anal. Chim. Acta*, **2012**, 745: 99–105.

(责任编辑: 盛文彦)

(上接第 1060 页)

- [16] Yang J N, Zhao Z Y, Liu X, Yang H, Yang J, Zhou M, Li S, Liu X K, Xu X H, Cheng C. *Nat. Commun.*, **2025**, 16: 7654.
- [17] Dey N. *J. Mol. Liq.*, **2021**, 327: 114799.
- [18] Liu J Y. *Design of Supported Brønsted Acidic Ionic Liquids and Their Catalytic Performance Research*. Changchun: Northeast Normal University(刘敬好.负载型 Brønsted 酸性离子液体的设计及其催化性能研究.长春:东北师范大学), **2021**.
- [19] Liu Y J. *New Method for Enantioseparation of Chiral Drugs by Capillary Electrophoresis and Its Application Research*. Shenyang: Shenyang Pharmaceutical University(刘永静.手性药物的毛细管电泳分离新方法及其应用研究.沈阳:沈阳药科大学), **2016**.

(责任编辑: 丁 岩)