



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109813921 A
(43)申请公布日 2019.05.28

(21)申请号 201910136064.7

(22)申请日 2019.02.25

(71)申请人 安徽大千生物工程有限公司
地址 231200 安徽省合肥市经开区桃花工业园繁华大道工投·立恒工业广场 B12C

(72)发明人 符修乐

(74)专利代理机构 合肥兴东知识产权代理有限公司 34148
代理人 王伟

(51)Int.Cl.
G01N 33/92(2006.01)
G01N 33/53(2006.01)

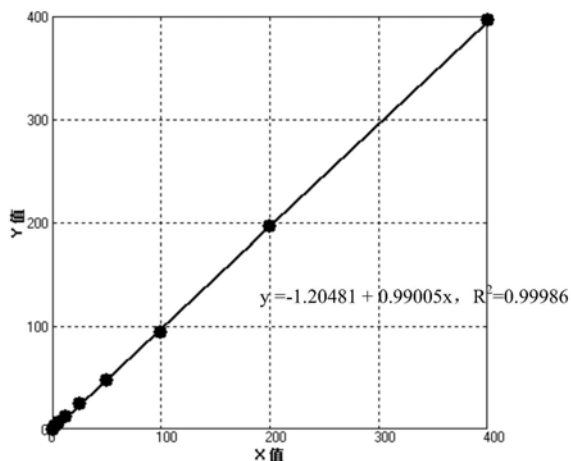
权利要求书4页 说明书15页 附图2页

(54)发明名称

基于多克隆抗体制备的HDL3免疫比浊法检测试剂盒及其制备使用方法

(57)摘要

本发明提供了一种基于多克隆抗体制备的HDL3免疫比浊法检测试剂盒,包括试剂R1和试剂R2,试剂R1:Tris-HCl、PEG 6000、BSA、NaCl、NaN₃、EDTA、Polyoxyethylene styrenated phenyl ether derivative、鸡抗人HDL3多克隆抗体;试剂R2:Tris-HCl、PEG 6000、BSA、NaCl、NaN₃、EDTA、Polyoxyethylene polycyclic phenyl ether。本发明还提供了一种上述试剂盒的制备与使用方法。本发明试剂盒利用免疫比浊法测定HDL3,能直接测定HDL3含量,测试结果更可靠。



1. 一种基于多克隆抗体制备的HDL3免疫比浊法检测试剂盒,其特征在于,包括彼此独立的试剂R1和试剂R2双液体组分,包括的成分及相应含量为:

试剂R1:

Tris-HCl	5-100 mM/L
PEG 6000	25-225 g/L
BSA	1-50 g/L
NaCl	0.9-18 g/L
NaN ₃	0.1-1.0 g/L
EDTA	0.1-1 g/L
Polyoxyethylene styrenated phenyl ether derivative	0.01-0.1%
鸡抗人 HDL3 多克隆抗体	0.1-20 g/L

其溶剂为纯化水;

试剂R2:

Tris-HCl	5-100 mM/L
PEG 6000	25-225 g/L
BSA	1-50 g/L
NaCl	0.9-18 g/L
NaN ₃	0.1-1.0 g/L
EDTA	0.1-1.0 g/L
Polyoxyethylene polycyclic phenyl ether	0.03-0.5 %

其溶剂为纯化水。

2. 根据权利要求1所述的基于多克隆抗体制备的HDL3免疫比浊法检测试剂盒,其特征在于,还包括HDL3校准品,包括的成分及相应含量为:

Tris-HCl	5-100 mM/L
BSA	1-50 g/L
HDL3	1-10 mg/L
NaN ₃	0.1-1.0 g/L

其溶剂为纯化水。

3. 根据权利要求1所述的基于多克隆抗体制备的HDL3免疫比浊法检测试剂盒,其特征在于,所述Polyoxyethylene styrenated phenyl ether derivative由一种或几种HBL值13.0-14.0的聚氧乙烯苯乙烯化苯基醚衍生物构成。

4. 根据权利要求3所述的基于多克隆抗体制备的HDL3免疫比浊法检测试剂盒,其特征在于,所述HBL值13.0-14.0的聚氧乙烯苯乙烯化苯基醚衍生物具体为花王公司产品EMULGEN B-66、EMULGEN A-90或日光化学公司产品NIKKOL BC-10。

5. 根据权利要求1所述的基于多克隆抗体制备的HDL3免疫比浊法检测试剂盒,其特征在于,所述Polyoxyethylene polycyclic phenyl ether由一种或几种HBL值15.0-15.6的聚氧乙烯多环苯基醚构成。

6. 根据权利要求5所述的基于多克隆抗体制备的HDL3免疫比浊法检测试剂盒,其特征在于,所述HBL值15.0-15.6的聚氧乙烯多环苯基醚具体为日光化学公司产品NIKKOL BC-15、NIKKOL BO-15V或NIKKOL BD-10。

7. 根据权利要求1所述的基于多克隆抗体制备的HDL3免疫比浊法检测试剂盒,其特征在于,所述鸡抗人HDL3多克隆抗体的获取方法如下:

①鸡的免疫:

选择30日龄、体重400g以上公鸡,取1mL 2.0mg/mL HDL3抗原与等量弗氏佐剂充分匀浆形成稳定乳液,记为乳化抗原;每只鸡于脖外侧注射共2mL乳化抗原;7日后进行第二次免疫,免疫方案如前;21日后进行第三次免疫,免疫方案如前;42日后进行第四次免疫,采用翅静脉注射2mL 1.0mg/mL HDL3抗原;49日取翅静脉血分离血清,并使用琼脂双扩散法测抗体效价,测得效价1:32及以上,终止免疫;采用心脏无菌采血法获得全血;

②多克隆抗体的纯化:

将上述步骤获得的全血于室温划十字口静置1h,再取上清获得粗制血清,粗制血清于4℃、1000r/min的条件下离心30min,得血清;加入等体积的PBS混匀得混合液,并向混合液中缓慢滴加同等体积的饱和硫酸铵,4℃静置5h;接着,于4℃、4500r/min条件下离心30min,弃去上清,沉淀用200mL的PBS溶解,加入总体积量33%的饱和硫酸铵,4℃下静置5h后,再于4℃、4500r/min条件下离心30min;此时,弃去上清,并将沉淀用200mL的PBS溶解,加入总体积量33%的饱和硫酸铵,4℃下静置5h后,4℃、4500r/min离心30min;离心后的沉淀再用200mL的PBS溶解,并进一步装入10kD透析袋中;最后,将其置于4℃环境下,采用20倍体积的PBS透析液透析6h除盐,即得鸡抗人HDL3多克隆抗体。

8. 根据权利要求1-7任一所述的基于多克隆抗体制备的HDL3免疫比浊法检测试剂盒,其特征在于,所述HDL3的获取方法如下:

①HDL分离液的配制:

称取分子量50000的硫酸葡聚糖9g、 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 105g、 NaN_3 250mg,并用900mL的蒸馏水溶解,然后用1mol/L的NaOH液调节pH至7.0,最后用蒸馏水加至1000mL,备用;

②HDL3分离液的配制:

称取分子量50000的硫酸葡聚糖9g、 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 315g、 NaN_3 250mg,并用900mL蒸馏水溶解,接着用1mol/L的NaOH调节pH至7.0,最后用蒸馏水加至1000mL,备用;

③分离:

吸取人血清50mL,加HDL分离液5mL,混匀;室温静置15min,然后于2000r/min条件下离心20min;取上清液20mL,并加入HDL3分离液2mL,混匀;接着,室温静置15min后,再于2000r/min条件下离心20min,此上清即为HDL3产物;

④浓度标定:

用Tris-HCl缓冲液稀释HDL3产物,使用微量定量仪标定到10mg/mL,备用。

9.一种如权利要求1-8任一所述的基于多克隆抗体制备的HDL3免疫比浊法检测试剂盒的制备方法,其特征在于,包括如下具体步骤:

(1) 制备人HDL3:

①HDL分离液的配制:称取分子量50000的硫酸葡聚糖9g、 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 105g、 NaN_3 250mg,并用900mL的蒸馏水溶解,然后用1mol/L的NaOH液调节pH至7.0,最后用蒸馏水加至1000mL,备用;

②HDL3分离液的配制:称取分子量50000的硫酸葡聚糖9g、 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 315g、 NaN_3 250mg,并用900mL蒸馏水溶解,接着用1mol/L的NaOH调节pH至7.0,最后用蒸馏水加至1000mL,备用;

③分离:吸取人血清50mL,加HDL分离液5mL,混匀;室温静置15min,然后于2000r/min条件下离心20min;取上清液20mL,并加入HDL3分离液2mL,混匀;接着,室温静置15min后,再于2000r/min条件下离心20min,此上清即为HDL3产物;

④浓度标定:用Tris-HCl缓冲液稀释HDL3产物,使用微量定量仪标定到10mg/mL,备用;

(2) 制备鸡抗人HDL3多克隆抗体:

①鸡的免疫:选择30日龄、体重400g以上公鸡,取1mL 2.0mg/mL HDL3抗原与等量弗氏佐剂充分匀浆形成稳定乳液,记为乳化抗原;每只鸡于脖外侧注射共2mL乳化抗原;7日后进行第二次免疫,免疫方案如前;21日后进行第三次免疫,免疫方案如前;42日后进行第四次免疫,采用翅静脉注射2mL 1.0mg/mL HDL3抗原;49日取翅静脉血分离血清,并使用琼脂双扩散法测抗体效价,测得效价1:32及以上,终止免疫;采用心脏无菌采血法获得全血;

②多克隆抗体的纯化:将上述步骤获得的全血于室温划十字口静置1h,再取上清获得粗制血清,粗制血清于4℃、1000r/min的条件下离心30min,得血清;接着,加入等体积的PBS混匀得混合液,并向混合液中缓慢滴加同体积的饱和硫酸铵,4℃静置5h;接着,于4℃、4500r/min条件下离心30min,弃去上清,沉淀用200mL的PBS溶解,加入总体积量33%的饱和硫酸铵,4℃下静置5h后,再于4℃、4500r/min条件离心30min;此时,弃去上清,并将沉淀用200mL的PBS溶解,加入总体积量33%的饱和硫酸铵,4℃下静置5h后,4℃、4500r/min离心30min;离心后的沉淀再用200mL的PBS溶解,并进一步装入10kD透析袋中;最后,将其置于4℃环境下,采用20倍体积的PBS透析液透析6h除盐,即得鸡抗人HDL3多克隆抗体;

(3) 配制试剂R1:

按照试剂R1的组分含量,将步骤(2)制得的鸡抗人HDL3多克隆抗体以及余下的其他组分物质于同一容器中混合,混合均匀后,制得试剂R1;

(4) 配制试剂R2:

按照试剂R2的组分含量,将各组分物质于同一容器中混合,混合均匀后,制得试剂R2。

10. 一种如权利要求1-8任一所述的基于多克隆抗体制备的HDL3免疫比浊法检测试剂盒的使用方法,其特征在于,包括如下具体步骤:

(1) 吸取2 μ L样本,加入150 μ L试剂R1,37 $^{\circ}$ C孵育5min;

(2) 再加入50 μ L试剂R2进行混合,并使其充分反应;

(3) 1min后读取吸光值A1,3min后读取吸光值A2,计算 ΔA ;

(4) 定标方法:6点定标;采用全自动生化分析仪进行检测,并设置校准品浓度分别为:0 μ g/mL、11.8 μ g/mL、46.9 μ g/mL、187.5 μ g/mL、375 μ g/mL、1500 μ g/mL;

(5) 依据定标值,根据 ΔA 测算样本中HDL3含量。

基于多克隆抗体制备的HDL3免疫比浊法检测试剂盒及其制备 使用方法

技术领域

[0001] 本发明属于免疫学测定分析领域,涉及蛋白质的测量测试,尤其涉及一种基于多克隆抗体制备的HDL3免疫比浊法检测试剂盒及其制备使用方法。

背景技术

[0002] 高密度脂蛋白3(High-density lipoprotein 3,HDL3)是高密度脂蛋白(High-density lipoprotein,HDL)的亚组分之一。HDL是血浆中主要脂蛋白之一,其密度最高,颗粒直径最小,蛋白组成以载脂蛋白为主,有HDL1、HDL2和HDL3 3种亚型。人类HDL颗粒大小为7.2-12.9nm,水合密度介于(1.063-1.210)g/mL之间,相对分子质量为200-400kD。HDL3的密度为1.125g/mL-1.210g/mL。

[0003] HDL主要由肝脏产生,而且主要又是由肝脏分解,小肠亦可合成。首先ApoA-I初步酯化,在LPL介导的脂解作用下,从CM、VLDL获得载脂蛋白,形成盘状新生HDL。新生HDL在LCAT的作用下先转变为HDL3,然后酯化胆固醇继续增加,逐步变为密度较小、颗粒较大的HDL2。HDL的重要生理功能是介导胆固醇逆转运,还为其他脂蛋白提供多种必需成分,具有抗动脉粥样硬化和血管保护作用,可减少心血管事件的发生。流行病学调查显示,血浆HDL-C水平与动脉粥样硬化等心血管疾病的危险性呈高度负相关。HDL-C可对抗由血脂代谢紊乱引起的心血管疾病,升高HDL-C有可能成为冠心病防治的有效措施。且有报道动物实验证明,HDL中起作用的亚组分为HDL3,而HDL2在调节血脂(及逆向胆固醇转运)方面并没有可观测到的作用。所以,HDL3可以用作心血管疾病的治疗剂,也可以用于心血管疾病、糖尿病、肾脏疾病的检测标志物。

[0004] 抗体是由抗原刺激机体,产生的免疫球蛋白。抗原通常是由多个抗原决定簇组成的,由一种抗原决定簇刺激机体,由一个B淋巴细胞接受该抗原刺激所产生的抗体称之为单克隆抗体(Monoclonal antibody)。由多种抗原决定簇刺激机体,相应地就产生各种各样的单克隆抗体,这些单克隆抗体混杂在一起就是多克隆抗体,机体内所产生的抗体就是多克隆抗体;除了抗原决定簇的多样性以外,同样一种抗原决定簇,也可刺激机体产生IgG、IgM、IgA、IgE和IgD等五类抗体。

[0005] 免疫比浊法(Turbidimetric inhibition immuno assay)是抗原抗体结合动态测定方法。其基本原理是:当抗原与抗体在特殊稀释系统中反应而且比例合适(一般规定抗体过量)时,形成的可溶性免疫复合物在稀释系统中的促聚剂的作用下,自液相析出,形成微粒,使反应液出现浊度;当抗体浓度固定时,形成的免疫复合物的量随着检样中抗原量的增加而增加,反应液的浊度也随之增加。通过测定反应液的浊度与一系列标准品对照,即可计算出检样中抗原的含量。

[0006] 目前,高密度脂蛋白亚组分测定的方法有:超速离心法、高效液相色谱(HPLC)法、沉淀法、核磁共振波谱(NMR)法等。其中,超速离心法通过离心,并利用脂蛋白的比重之差来进行分型;其缺点很明显:操作技术要求高、成本高、耗时长。冈崎等人提出的利用HPLC来区

分HDL2和HDL3的方法也存在上述问题。沉淀法为通过含有2价金属离子和硫酸葡聚糖的试剂将HDL3以外聚集,通过离心来回收上清液部分的HDL3并用自动分析装置进行测定的方法;其仍然存在下述缺点:作业需要熟练,另外需要手工操作,有时需要检样的前处理操作,耗时过长,且非通用。NMR法为通过磁共振来测定脂蛋白的颗粒数,非一般性的方法,需要有特定的设备和相应的技术人员。日本某公司专利(国内公开号为CN104169432A)公开了一种高密度脂蛋白3中的胆固醇的定量方法,用酶促反应法通过检测HDL3中胆固醇来间接检测HDL3的含量。该方法同市场上众多的高密度脂蛋白胆固醇检测方法一样,通过苯醌亚胺络合物显色。但此方法具有以下缺陷:①无法对高密度脂蛋白胆固醇亚型进行鉴别;②易受血清中血红蛋白、胆红素及甘油三酯的影响。其虽然通过采用特异性识别HDL3-C的表面活性剂来对其他脂蛋白组分进行遮蔽,提高了鉴别的特异性,但其无法避免血清中高血红蛋白、胆红素及甘油三酯的影响,且由于遮蔽HDL3-C,血清中游离胆固醇的影响就更加凸显,由此造成R1试剂的使用量加大,检测的重复性不高。

发明内容

[0007] 本发明所要解决的技术问题在于提供一种能直接测定HDL3含量的基于多克隆抗体制备的HDL3免疫比浊法检测试剂盒及其制备、使用方法,直接测定蛋白含量,不需要通过胆固醇的测定来间接反映HDL3的含量,测试结果可靠,重复性高。

[0008] 本发明采用以下技术方案解决上述技术问题:

[0009] 一种基于多克隆抗体制备的HDL3免疫比浊法检测试剂盒,包括彼此独立的试剂R1和试剂R2双液体组分,包括的成分及相应含量为:

[0010] 试剂R1:

Tris-HCl 5-100 mM/L

PEG 6000 25-225 g/L

[0011] BSA 1-50 g/L

NaCl 0.9-18 g/L

NaN₃ 0.1-1.0 g/L

EDTA 0.1-1 g/L

[0012] Polyoxyethylene styrenated phenyl ether derivative 0.01-0.1%

鸡抗人 HDL3 多克隆抗体 0.1-20 g/L

[0013] 其溶剂为纯化水;

试剂 R2:

Tris-HCl 5-100 mM/L

PEG 6000 25-225 g/L

BSA 1-50 g/L

[0014]

NaCl 0.9-18 g/L

NaN₃ 0.1-1.0 g/L

EDTA 0.1-1.0 g/L

Polyoxyethylene polycyclic phenyl ether 0.03-0.5 %

[0015]

其溶剂为纯化水。

[0016]

作为本发明的优选方式之一,还包括HDL3校准品,包括的成分及相应含量为:

Tris-HCl 5-100 mM/L

BSA 1-50 g/L

[0017]

HDL3 1-10 mg/L

NaN₃ 0.1-1.0 g/L

[0018]

其溶剂为纯化水。

[0019]

作为本发明的优选方式之一,所述Polyoxyethylene styrenated phenyl ether derivative由一种或几种HBL值13.0-14.0的聚氧乙烯苯乙烯化苯基醚衍生物构成。

[0020]

作为本发明的优选方式之一,所述HBL值13.0-14.0的聚氧乙烯苯乙烯化苯基醚衍生物具体为花王公司产品EMULGEN B-66、EMULGEN A-90或日光化学公司产品NIKKOL BC-10。

[0021]

作为本发明的优选方式之一,所述Polyoxyethylene polycyclic phenyl ether由一种或几种HBL值15.0-15.6的聚氧乙烯多环苯基醚构成。

[0022]

作为本发明的优选方式之一,所述HBL值15.0-15.6的聚氧乙烯多环苯基醚具体为日光化学公司产品NIKKOL BC-15、NIKKOL B0-15V或NIKKOL BD-10。

[0023]

作为本发明的优选方式之一,所述鸡抗人HDL3多克隆抗体的获取方法如下:

[0024]

①鸡的免疫:

[0025]

选择30日龄、体重400g以上公鸡,取1mL 2.0mg/mL HDL3抗原与等量弗氏佐剂充分匀浆形成稳定乳液,记为乳化抗原;每只鸡于脖外侧注射共2mL乳化抗原;7日后进行第二次免疫,免疫方案如前;21日后进行第三次免疫,免疫方案如前;42日后进行第四次免疫,采用翅静脉注射2mL 1.0mg/mL HDL3抗原;49日取翅静脉血分离血清,并使用琼脂双扩散法测抗体效价,测得效价1:32及以上,终止免疫;采用心脏无菌采血法获得全血;

[0026] ②多克隆抗体的纯化:

[0027] 将上述步骤获得的全血于室温划十字口静置1h,再取上清获得粗制血清,粗制血清于4℃、1000r/min的条件下离心30min,得血清;加入等体积的PBS混匀得混合液,并向混合液中缓慢滴加同等体积的饱和硫酸铵,4℃静置5h;接着,于4℃、4500r/min条件下离心30min,弃去上清,沉淀用200mL的PBS溶解,加入总体积量33%的饱和硫酸铵,4℃下静置5h后,再于4℃、4500r/min条件下离心30min;此时,弃去上清,并将沉淀用200mL的PBS溶解,加入总体积量33%的饱和硫酸铵,4℃下静置5h后,4℃、4500r/min离心30min;离心后的沉淀再用200mL的PBS溶解,并进一步装入10kD透析袋中;最后,将其置于4℃环境下,采用20倍体积的PBS透析液透析6h除盐,即得鸡抗人HDL3多克隆抗体。

[0028] 作为本发明的优选方式之一,所述HDL3的获取方法如下:

[0029] ①HDL分离液的配制:

[0030] 称取分子量50000的硫酸葡聚糖9g、 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 105g、 NaN_3 250mg,并用900mL的蒸馏水溶解,然后用1mol/L的NaOH液调节pH至7.0,最后用蒸馏水加至1000mL,备用;

[0031] ②HDL3分离液的配制:

[0032] 称取分子量50000的硫酸葡聚糖9g、 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 315g、 NaN_3 250mg,并用900mL蒸馏水溶解,接着用1mol/L的NaOH调节pH至7.0,最后用蒸馏水加至1000mL,备用;

[0033] ③分离:

[0034] 吸取人血清50mL,加HDL分离液5mL,混匀;室温静置15min,然后于2000r/min条件下离心20min;取上清液20mL,并加入HDL3分离液2mL,混匀;接着,室温静置15min后,再于2000r/min条件下离心20min,此上清即为HDL3产物;

[0035] ④浓度标定:

[0036] 用Tris-HCl缓冲液稀释HDL3产物,使用微量定量仪标定到10mg/mL,备用。

[0037] 一种基于多克隆抗体制备的HDL3免疫比浊法检测试剂盒的制备方法,包括如下具体步骤:

[0038] (1) 制备人HDL3:

[0039] ①HDL分离液的配制:称取分子量50000的硫酸葡聚糖9g、 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 105g、 NaN_3 250mg,并用900mL的蒸馏水溶解,然后用1mol/L的NaOH液调节pH至7.0,最后用蒸馏水加至1000mL,备用;

[0040] ②HDL3分离液的配制:称取分子量50000的硫酸葡聚糖9g、 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 315g、 NaN_3 250mg,并用900mL蒸馏水溶解,接着用1mol/L的NaOH调节pH至7.0,最后用蒸馏水加至1000mL,备用;

[0041] ③分离:吸取人血清50mL,加HDL分离液5mL,混匀;室温静置15min,然后于2000r/min条件下离心20min;取上清液20mL,并加入HDL3分离液2mL,混匀;接着,室温静置15min后,再于2000r/min条件下离心20min,此上清即为HDL3产物;

[0042] ④浓度标定:用Tris-HCl缓冲液稀释HDL3产物,使用微量定量仪标定到10mg/mL,备用;

[0043] (2) 制备鸡抗人HDL3多克隆抗体:

[0044] ①鸡的免疫:选择30日龄、体重400g以上公鸡,取1mL 2.0mg/mL HDL3抗原与等量弗氏佐剂充分匀浆形成稳定乳液,记为乳化抗原;每只鸡于脖外侧注射共2mL乳化抗原;7日

后进行第二次免疫,免疫方案如前;21日后进行第三次免疫,免疫方案如前;42日后进行第四次免疫,采用翅静脉注射2mL 1.0mg/mL HDL3抗原;49日取翅静脉血分离血清,并使用琼脂双扩散法测抗体效价,测得效价1:32及以上,终止免疫;采用心脏无菌采血法获得全血;

[0045] ②多克隆抗体的纯化:将上述步骤获得的全血于室温划十字口静置1h,再取上清获得粗制血清,粗制血清于4℃、1000r/min的条件下离心30min,得血清;接着,加入等体积的PBS混匀得混合液,并向混合液中缓慢滴加同等体积的饱和硫酸铵,4℃静置5h;接着,于4℃、4500r/min条件下离心30min,弃去上清,沉淀用200mL的PBS溶解,加入总体积量33%的饱和硫酸铵,4℃下静置5h后,再于4℃、4500r/min条件离心30min;此时,弃去上清,并将沉淀用200mL的PBS溶解,加入总体积量33%的饱和硫酸铵,4℃下静置5h后,4℃、4500r/min离心30min;离心后的沉淀再用200mL的PBS溶解,并进一步装入10kD透析袋中;最后,将其置于4℃环境下,采用20倍体积的PBS透析液透析6h除盐,即得鸡抗人HDL3多克隆抗体;

[0046] (3) 配制试剂R1:

[0047] 按照试剂R1的组分含量,将步骤(2)制得的鸡抗人HDL3多克隆抗体以及余下的其他组分物质于同一容器中混合,混合均匀后,制得试剂R1;

[0048] (4) 配制试剂R2:

[0049] 按照试剂R2的组分含量,将各组分物质于同一容器中混合,混合均匀后,制得试剂R2。

[0050] 作为本发明的优选方式之一,所述步骤(2)中还包括“多克隆抗体的验证”,具体验证方法为:使用步骤(1)中制备的HDL3为抗原,使用abcam公司山羊多克隆抗体to APOA1BP为阳性对照,以HDL3蛋白为检测抗原,使用琼脂双扩散法验证纯化后鸡抗人HDL3多克隆抗体的特异性及效价。

[0051] 一种基于多克隆抗体制备的HDL3免疫比浊法检测试剂盒的使用方法,包括如下具体步骤:

[0052] (1) 吸取2μL样本,加入150μL试剂R1,37℃孵育5min;

[0053] (2) 再加入50μL试剂R2进行混合,并使其充分反应;

[0054] (3) 1min后读取吸光值A1,3min后读取吸光值A2,计算 ΔA ;

[0055] (4) 定标方法:6点定标;采用全自动生化分析仪进行检测,并设置校准品浓度分别为:0μg/mL、11.8μg/mL、46.9μg/mL、187.5μg/mL、375μg/mL、1500μg/mL;

[0056] (5) 依据定标值,根据 ΔA 测算样本中HDL3含量。

[0057] 检测原理:

[0058] 目前,国内外没有直接检测HDL3的试剂盒,通常是通过检测HDL3胆固醇来间接反应蛋白的量;该方法存在诸多弊端,且血脂中胆固醇的量不能够代替脂蛋白的量,其在分子结构上非特定的比例是动态变化的。本发明提供的基于多克隆抗体直接检测HDL3的免疫比浊法试剂盒,其通过表面活性剂(Polyoxyethylene styrenated phenyl ether derivative)与HDL3特异性结合生成胶束结构从而达到屏蔽HDL3的目的,而试剂R1中的抗体(鸡抗人HDL3多克隆抗体)先与血清中的其他脂蛋白反应获得吸光度1;加入R2后,R2所含的增溶剂(Polyoxyethylene polycyclic phenyl ether)可以解除表面活性剂(Polyoxyethylene styrenated phenyl ether derivative)与HDL3所形成的胶束,释放HDL3,试剂中过量的抗体再与HDL3反应,获得吸光度2;接着,通过吸光度差与标准品比对,

即可从血清或血浆中直接检测HDL3的量,且不受高血红蛋白、胆红素及甘油三酯的干扰。

[0059] 本发明相比现有技术的优点在于:

[0060] (1) 本发明试剂盒由多克隆抗体(鸡抗人HDL3多克隆抗体)、表面活性剂(Polyoxyethylene styrenated phenyl ether derivative)、促聚剂(PEG 6000)、缓冲液(Tris-HCl)、防腐剂(NaN_3)、增溶剂(Polyoxyethylene polycyclic phenyl ether)、蛋白保护剂(BSA)等构成,可直接测得血清或血浆中HDL3的含量,且不受高血红蛋白、胆红素及甘油三酯的干扰;相对于间接测定的试剂盒而言,本发明试剂盒中加入了抗干扰蛋白和表面活性剂,具有更高的抗干扰能力,以保证试剂盒的稳定性和精密度;

[0061] (2) 本发明试剂盒基于免疫透射比浊法,适用于各类全自动生化分析仪分析;其使用方便、成本低廉,且自动化程度高,可大大节省检测时间;同时,相比于同类产品,本发明试剂盒具有更好地稳定性。

附图说明

[0062] 图1是实施例4中从abcam公司购入羊抗人APOA1BP作为阳性对照琼脂双扩散试验12h结果图(图中,孔1:HDL3抗原,10mg/mL,加入10 μ L;孔2:APOA1BP 1:4稀释后加入10 μ L;孔3:APOA1BP 1:8稀释后加入10 μ L;孔4:APOA1BP 1:16稀释后加入10 μ L;孔5:APOA1BP 1:32稀释后加入10 μ L;孔6:APOA1BP 1:64稀释后加入10 μ L;孔7:缓冲液对照);

[0063] 图2是实施例4中纯化后的鸡抗人HDL3多克隆抗体琼脂双扩散试验12h结果图(图中,孔1:HDL3抗原,10mg/mL,加入10 μ L;孔2:纯化后的鸡抗人HDL3血清1:4稀释后加入10 μ L;孔3:纯化后的鸡抗人HDL3血清1:8稀释后加入10 μ L;孔4:纯化后的鸡抗人HDL3血清1:16稀释后加入10 μ L;孔5:纯化后的鸡抗人HDL3血清1:32稀释后加入10 μ L;孔6:纯化后的鸡抗人HDL3血清1:64稀释后加入10 μ L;孔7:缓冲液对照);

[0064] 图3是实施例6中本发明试剂盒与离心法线性关系曲线图;

[0065] 图4是实施例6中本发明试剂盒线性范围线性回归图。

具体实施方式

[0066] 下面对本发明的实施例作详细说明,本实施例在以本发明技术方案为前提下进行实施,给出了详细的实施方式和具体的操作过程,但本发明的保护范围不限于下述的实施例。

[0067] 实施例1

[0068] 本实施例的一种基于多克隆抗体制备的HDL3免疫比浊法检测试剂盒,包括彼此独立的试剂R1和试剂R2双液体组分,包括的成分及相应含量为:

[0069] 试剂R1:

	Tris-HCl	5 mM/L
	PEG 6000	25 g/L
	BSA	1 g/L
	NaCl	0.9 g/L
[0070]	NaN ₃	0.1 g/L
	EDTA	0.1 g/L
	Polyoxyethylene styrenated phenyl ether derivative	0.01% (W/V)
	鸡抗人 HDL3 多克隆抗体	0.1 g/L
[0071]	其溶剂为纯化水；	
[0072]	试剂R2:	
	Tris-HCl	5 mM/L
	PEG 6000	25 g/L
	BSA	1 g/L
[0073]	NaCl	0.9 g/L
	NaN ₃	0.1 g/L
	EDTA	0.1 g/L
	Polyoxyethylene polycyclic phenyl ether	0.03 % (W/V)
[0074]	其溶剂为纯化水。	
[0075]	此外,所述试剂盒中还附带有HDL3校准品,该校准品包括的成分及相应含量如下:	
	Tris-HCl	5 mM/L
	BSA	1 g/L
[0076]	HDL3	1 mg/L
	NaN ₃	0.1 g/L
[0077]	其溶剂为纯化水。	
[0078]	进一步地,所述Polyoxyethylene styrenated phenyl ether derivative具体为花王公司产品EMULGEN B-66。	

[0079] 进一步地,所述Polyoxyethylene polycyclic phenyl ether具体为日光化学公司产品NIKKOL BC-15。

[0080] 实施例2

[0081] 本实施例的一种基于多克隆抗体制备的HDL3免疫比浊法检测试剂盒,包括彼此独立的试剂R1和试剂R2双液体组分,包括的成分及相应含量为:

[0082] 试剂R1:

Tris-HCl 100 mM/L

PEG 6000 225 g/L

BSA 50 g/L

NaCl 18 g/L

[0083]

NaN₃ 1.0 g/L

EDTA 1 g/L

Polyoxyethylene styrenated phenyl ether derivative 0.1% (W/V)

鸡抗人 HDL3 多克隆抗体 20 g/L

[0084] 其溶剂为纯化水;

[0085] 试剂R2:

Tris-HCl 100 mM/L

PEG 6000 225 g/L

BSA 50 g/L

[0086]

NaCl 18 g/L

NaN₃ 1.0 g/L

EDTA 1.0 g/L

Polyoxyethylene polycyclic phenyl ether 0.5 % (W/V)

[0087] 其溶剂为纯化水。

[0088] 此外,所述试剂盒中还附带有HDL3校准品,该校准品包括的成分及相应含量如下:

	Tris-HCl	100 mM/L
	BSA	50 g/L
[0089]	HDL3	10 mg/L
	NaN ₃	1.0 g/L

[0090] 其溶剂为纯化水。

[0091] 进一步地,所述Polyoxyethylene styrenated phenyl ether derivative具体为日光化学公司产品NIKKOL BC-10。

[0092] 进一步地,所述Polyoxyethylene polycyclic phenyl ether具体为日光化学公司产品NIKKOL BD-10。

[0093] 实施例3

[0094] 本实施例的一种基于多克隆抗体制备的HDL3免疫比浊法检测试剂盒,包括彼此独立的试剂R1和试剂R2双液体组分,包括的成分及相应含量为:

[0095] 试剂R1:

	Tris-HCl	50 mM/L
	PEG 6000	125 g/L
	BSA	25 g/L
	NaCl	10 g/L
[0096]	NaN ₃	0.5 g/L
	EDTA	0.5 g/L
	Polyoxyethylene styrenated phenyl ether derivative	0.05% (W/V)
	鸡抗人 HDL3 多克隆抗体	10 g/L

[0097] 其溶剂为纯化水;

[0098] 试剂R2:

	Tris-HCl	50 mM/L
	PEG 6000	125 g/L
	BSA	25 g/L
[0099]	NaCl	10 g/L
	NaN ₃	0.5 g/L
	EDTA	0.5 g/L
	Polyoxyethylene polycyclic phenyl ether	0.25 % (W/V)

[0100] 其溶剂为纯化水。

[0101] 此外,所述试剂盒中还附带有HDL3校准品,该校准品包括的成分及相应含量如下:

[0102]	Tris-HCl	50 mM/L
	BSA	25 g/L

[0103]	HDL3	5 mg/L
--------	------	--------

	NaN ₃	0.5 g/L
--	------------------	---------

[0104] 其溶剂为纯化水。

[0105] 进一步地,所述Polyoxyethylene styrenated phenyl ether derivative具体为花王公司产品EMULGEN B-66、EMULGEN A-90和日光化学公司产品NIKKOL BC-10的混合物。

[0106] 进一步地,所述Polyoxyethylene polycyclic phenyl ether具体为日光化学公司产品NIKKOL BC-15、NIKKOL BO-15V和NIKKOL BD-10的混合物。

[0107] 实施例4

[0108] 本实施例的一种上述实施例中检测试剂盒的制备方法,包括如下具体步骤:

[0109] (1) 制备人HDL3:

[0110] ①HDL分离液的配制:称取分子量50000的硫酸葡聚糖9g、MgCl₂·6H₂O 105g、NaN₃ 250mg,并用900mL的蒸馏水溶解,然后用1mol/L的NaOH液调节pH至7.0,最后用蒸馏水加至1000mL,备用;

[0111] ②HDL3分离液的配制:称取分子量50000的硫酸葡聚糖9g、MgCl₂·6H₂O 315g、NaN₃ 250mg,并用900mL蒸馏水溶解,接着用1mol/L的NaOH调节pH至7.0,最后用蒸馏水加至1000mL,备用;

[0112] ③分离:吸取人血清50mL(来自于健康捐献者),加HDL分离液5mL,混匀;室温静置15min,然后于2000r/min离心条件下离心20min;取上清液20mL,并加入HDL3分离液2mL,混匀;接着,室温静置15min后,再于2000r/min离心条件下离心20min,此上清即为HDL3产物;

[0113] ④浓度标定:用Tris-HCl缓冲液稀释HDL3产物,使用微量定量仪标定到10mg/mL,备用。

[0114] (2) 制备鸡抗人HDL3多克隆抗体:

[0115] ①鸡的免疫:选择30日龄、体重400g以上公鸡,取1mL 2.0mg/mL HDL3抗原与等量弗氏佐剂充分匀浆形成稳定乳液,记为乳化抗原;每只鸡于脖外侧注射共2mL乳化抗原;7日后进行第二次免疫,免疫方案如前;21日后进行第三次免疫,免疫方案如前;42日后进行第四次免疫,采用翅静脉注射2mL 1.0mg/mL HDL3抗原;49日取翅静脉血分离血清,并使用琼脂双扩散法测抗体效价,测得效价1:32及以上,终止免疫;采用心脏无菌采血法获得全血;

[0116] ②多克隆抗体的纯化:将上述步骤获得的全血于室温划十字口静置1h,再取上清获得粗制血清,粗制血清于4℃、1000r/min的条件下离心30min,得血清;接着,加入等体积的PBS混匀得混合液,并向混合液中缓慢滴加同等体积的饱和硫酸铵,4℃静置5h;接着,于4℃、4500r/min条件下离心30min,弃去上清,沉淀用200mL的PBS溶解,加入总体积量33%的饱和硫酸铵,4℃下静置5h后,再于4℃、4500r/min条件离心30min;此时,弃去上清,并将沉淀用200mL的PBS溶解,加入总体积量33%的饱和硫酸铵,4℃下静置5h后,4℃、4500r/min离心30min;离心后的沉淀再用200mL的PBS溶解,并进一步装入10kD透析袋中;最后,将其置于4℃环境下,采用20倍体积的PBS透析液透析6h除盐,即得鸡抗人HDL3多克隆抗体;

[0117] ③多克隆抗体的验证:使用上述制备的HDL3为抗原,使用abcam公司山羊多克隆抗体to APOA1BP (ab81907) 为阳性对照,以上述HDL3蛋白为检测抗原,使用琼脂双扩散法验证多抗特异性及效价,验证结果见图1、图2;

[0118] 图1为从abcam公司购入羊抗人APOA1BP作为阳性对照琼脂双扩散试验12h结果图(图1中,孔1:HDL3抗原,10mg/mL,加入10μL;孔2:APOA1BP 1:4稀释后加入10μL;孔3:APOA1BP 1:8稀释后加入10μL;孔4:APOA1BP 1:16稀释后加入10μL;孔5:APOA1BP 1:32稀释后加入10μL;孔6:APOA1BP 1:64稀释后加入10μL;孔7:缓冲液对照);从图1中可以看出明显的免疫沉淀线,表明对照设置成立;

[0119] 图2为纯化后的鸡抗人HDL3多克隆抗体琼脂双扩散试验12h结果图(图2中,孔1:HDL3抗原,10mg/mL,加入10μL;孔2:纯化后的鸡抗人HDL3血清1:4稀释后加入10μL;孔3:纯化后的鸡抗人HDL3血清1:8稀释后加入10μL;孔4:纯化后的鸡抗人HDL3血清1:16稀释后加入10μL;孔5:纯化后的鸡抗人HDL3血清1:32稀释后加入10μL;孔6:纯化后的鸡抗人HDL3血清1:64稀释后加入10μL;孔7:缓冲液对照);从图2中可以看出明显的免疫融合型免疫沉淀线,效价达到1:32,效价较高。与图1综合比较可知,所得的鸡免疫血清含有同APOA1BP相似的抗体,由于APOA1BP为高密度脂蛋白的蛋白组成部分,判定所得抗血清为鸡抗HDL3阳性血清。

[0120] (3) 配制试剂R1:

[0121] 按照上述实施例中试剂R1的组分含量,将步骤(2)制得的鸡抗人HDL3多克隆抗体以及余下的其他组分物质于同一容器中混合,混合均匀后,制得试剂R1。

[0122] (4) 配制试剂R2:

[0123] 按照上述实施例中试剂R2的组分含量,将各组分物质于同一容器中混合,混合均匀后,制得试剂R2。

[0124] (5) 配制HDL3校准品:

[0125] 按照上述实施例中试剂HDL3校准品的组分含量,将各组分物质于同一容器中混合,混合均匀后,制得HDL3校准品。

[0126] 实施例5

[0127] 本实施例的一种上述实施例中检测试剂盒的使用方法：

[0128] 分析方法：两点终点法；

[0129] 反应方向：上升反应；

[0130] 校准方式：Logit-Log (4P)；

[0131] 测定波长：340nm/700nm；

[0132] 测定温度：37℃；

[0133] 样本：试剂R1：试剂R2=2:150:50 (μL)；

[0134] 使用步骤：吸取2μL样本，加入150μL试剂R1，37℃孵育5min；再加入50μL试剂R2进行混合，并使其充分反应；1min后读取吸光值A1，3min后读取吸光值A2，计算ΔA。

[0135] 定标方法：6点定标，采用贝克曼AU680全自动生化分析仪(或其他品牌型号)进行检测，并设置校准品浓度分别为：0μg/mL、11.8μg/mL、46.9μg/mL、187.5μg/mL、375μg/mL、1500μg/mL；

[0136] 依据定标值，根据ΔA测算样本中HDL3含量。

[0137] 检测原理：

[0138] 本发明试剂盒通过表面活性剂与HDL3特异性结合生成胶束结构从而达到屏蔽HDL3的目的，而试剂R1中的抗体先与血清中的其他脂蛋白反应获得吸光度1；加入R2后，R2所含的增溶剂可以解除表面活性剂与HDL3所形成的胶束，释放HDL3，试剂中过量的抗体再与HDL3反应，获得吸光度2；接着，通过吸光度差与标准品比对，即可从血清或血浆中直接检测HDL3的量。

[0139] 实施例6

[0140] 本实施例用以评价上述实施例中HDL3免疫比浊试剂盒：

[0141] (1) 线性相关性验证：

[0142] 利用实施例1-3配方配制试剂，并与超速离心方法进行对照检测，检测30份临床血清样本，检测结果如表1所示，获得了本发明试剂盒与超速离心方法的相关性曲线(见图3)。通过检测结果显示，两试剂盒的线性相关曲线为 $y = 2.2396 + 0.9549X$ ，相关系数 $R^2 = 0.97004$ ，说明两者具有较大的相关性。

[0143] 表1本发明试剂盒与离心法相关性比对值

[0144]

序号	测试值	对照值	序号	测试值	对照值	序号	测试值	对照值
1	25.4	26.6	11	26.5	27.5	21	27.5	29.1
2	28.5	29.3	12	34.2	35.6	22	28.8	29.5
3	33.6	34.1	13	28.5	27.9	23	31.2	31.5
4	24.3	25.6	14	31.6	32.3	24	33.6	34.4
5	26.9	27	15	29.9	31.5	25	29.3	30.6
6	27.8	29.2	16	29.8	30.9	26	33.3	34.2
7	30.2	31	17	38.5	38.7	27	33.5	34.3
8	33.6	33.9	18	33.9	34.2	28	27.4	28
9	30.1	31.4	19	32.7	33.5	29	28.8	31

10	28.7	28.7	20	25.3	26.9	30	35.5	36.7
----	------	------	----	------	------	----	------	------

[0145] (2) 线性范围验证:

[0146] 使用重组HDL3纯化品和生理盐水配制成浓度400mg/L、200mg/L、100mg/L、50mg/L、25mg/L、12.5mg/L、6.25mg/L、3.125mg/L和0mg/L(生理盐水对照)的测试品,并使用本发明试剂盒测定各测试品浓度;以稀释浓度为自变量,以测定结果为因变量求出线性回归方程,计算测定结果的相对偏差。检测与计算结果如表2所示,结果显示,测定结果与稀释浓度之间的线性回归方程为方程: $y=-1.20481+0.99005X$,相关系数 $R^2=0.99986$ (线性回归图见图4),说明线性关系良好,线性范围可达6.25-400mg/L。

[0147] 表2本发明试剂盒线性范围验证

[0148]

序号	稀释浓度	测试值1	测试值2	测试值3	平均数	绝对偏差	相对偏差
1	400	391.80	402.10	394.00	395.97	4.03	1.01%
2	200	194.30	198.50	196.60	196.47	3.53	1.77%
3	100	91.20	93.30	97.80	94.10	5.90	5.90%
4	50	47.00	45.90	49.20	47.37	2.63	5.27%
5	25	24.10	23.70	23.80	23.87	1.13	4.53%
6	12.5	12.00	11.30	11.50	11.60	0.90	7.20%
7	6.25	5.90	6.00	5.80	5.90	0.35	5.60%
8	3.13	2.80	2.80	2.70	2.77	0.36	11.61%
10	0	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	

[0149] (3) 重复性验证:

[0150] 由于该产品无质控血清,取具有溯源性的HDL-C高值血清质控和低值血清质控各一份,使用所述试剂盒对同一份血清样本连续检测10次,计算所述试剂盒的变异系数。检测数据如表3所示,检测结果表明,本发明试剂盒在检测高值和低值样本时的变异系数较小,分别为1.44%和4.69%,重复性较好。

[0151] 表3本发明试剂盒的精密度(重复性)验证结果

[0152]

检测值 1	检测值 2	检测值 3	检测值 4	检测值 5
127.20	129.60	126.80	124.90	125.50

	6.60	6.90	6.90	6.70	6.80
	检测值 6	检测值 7	检测值 8	检测值 9	检测值 10
	126.00	127.40	126.10	127.80	128.90
[0153]	6.60	6.90	6.80	6.70	6.60
	检测均值	标准差	变异系数		
	126.80	1.82	1.44%		
	6.78	6.13	4.69%		

[0154] (5) 干扰试验:

[0155] 使用上述质控血清样本,分别混入血红蛋白、胆红素和甘油三酯,使三者最终浓度达到:480g/L、60 μ mol/L和5.1mmol/L,均是正常人血清含量的三倍。使用本发明试剂进行检测,检测结果见表4。结果表明,所述试剂盒具有较强的抗干扰能力。本发明的突出优点是抗干扰性较强,直接测定HDL3的含量,从而大大地提高临床检测的准确性,以满足临床检测的需求。

[0156] 表4干扰试验检测结果

[0157]

项目	检测值 1	检测值 2	检测值 3	检测均值	较未添加干扰剂差异
未添加干扰剂	127.2	128	127.7	127.6333333	-
添加血红蛋白	126.1	127.3	125.9	126.4333333	-0.94%
添加胆红素	124.3	122.8	121.9	123	-3.63%
添加甘油三	125.5	126.3	125.4	125.7333333	-1.49%

[0158]

酯					
---	--	--	--	--	--

[0159] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

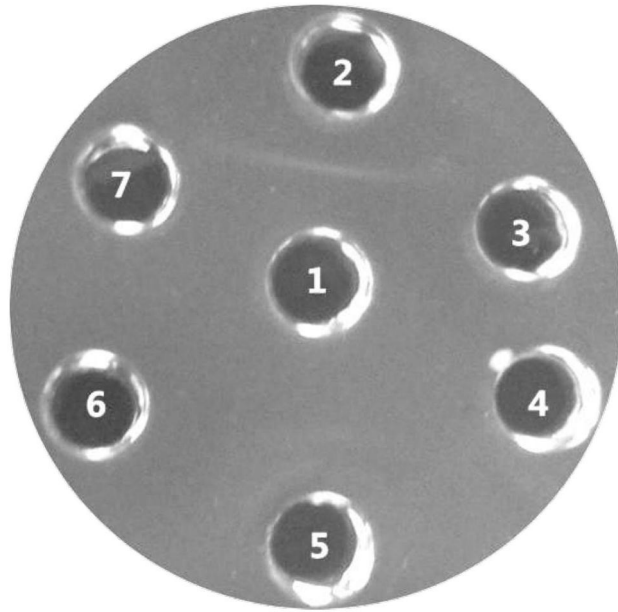


图1



图2

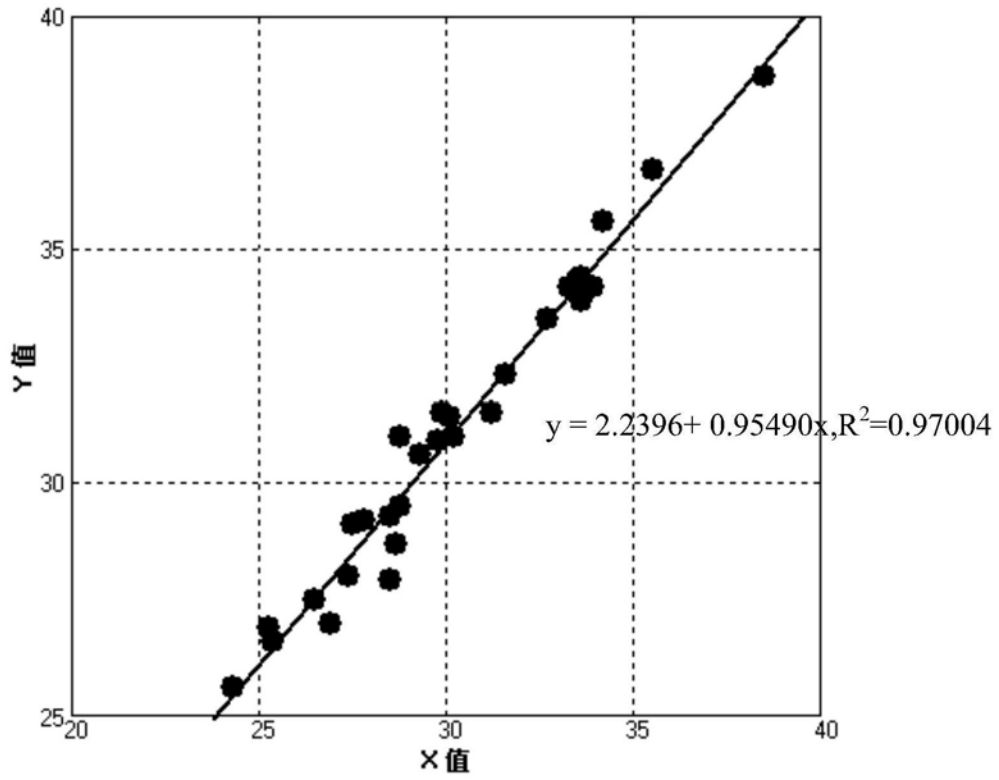


图3

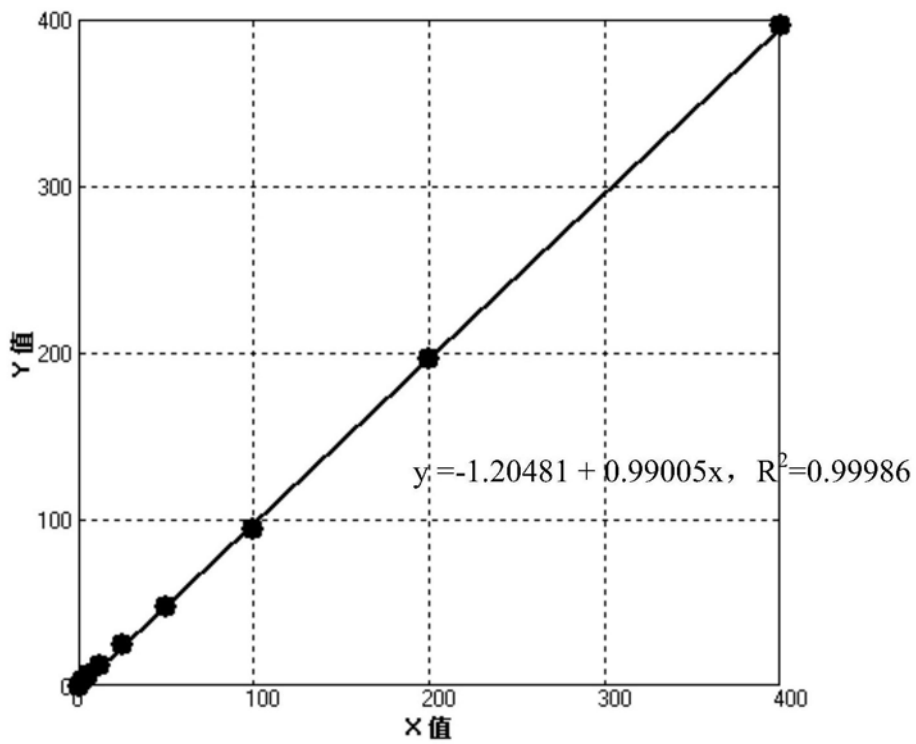


图4

专利名称(译)	基于多克隆抗体制备的HDL3免疫比浊法检测试剂盒及其制备使用方法		
公开(公告)号	CN109813921A	公开(公告)日	2019-05-28
申请号	CN201910136064.7	申请日	2019-02-25
[标]申请(专利权)人(译)	安徽大千生物工程有限公司		
申请(专利权)人(译)	安徽大千生物工程有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	安徽大千生物工程有限公司		
[标]发明人	符修乐		
发明人	符修乐		
IPC分类号	G01N33/92 G01N33/53		
代理人(译)	王伟		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种基于多克隆抗体制备的HDL3免疫比浊法检测试剂盒，包括试剂R1和试剂R2，试剂R1：Tris-HCl、PEG 6000、BSA、NaCl、NaN₃、EDTA、Polyoxyethylene styrenated phenyl ether derivative、鸡抗人HDL3多克隆抗体；试剂R2：Tris-HCl、PEG 6000、BSA、NaCl、NaN₃、EDTA、Polyoxyethylene polycyclic phenyl ether。本发明还提供了一种上述试剂盒的制备与使用方法。本发明试剂盒利用免疫比浊法测定HDL3，能直接测定HDL3含量，测试结果更可靠。

