

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/53

G01N 33/577 G01N 33/68

G01N 33/92 A61B 5/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03109935.1

[43] 公开日 2004 年 10 月 13 日

[11] 公开号 CN 1536365A

[22] 申请日 2003.4.8 [21] 申请号 03109935.1

[71] 申请人 萧 旭

地址 610075 四川省成都市十二桥路 37 号新
1 号华神科技大厦 A 座 5 楼

[72] 发明人 萧 旭

权利要求书 3 页 说明书 20 页 附图 6 页

[54] 发明名称 用抗磷酸胆碱抗体对氧化低密度脂蛋白的定量测定及其在诊断动脉粥样硬化中的应用

[57] 摘要

本发明涉及氧化低密度脂蛋白表面呈现的特异性抗原决定簇的定量检测方法及其试剂盒。本发明公开的定量检测方法包括下列步骤：(a) 将抗磷酸胆碱的抗体与含有 OxLDL 的样品接触；(b) 使所述抗体与 OxLDL 结合；(c) 测定所述抗体与 OxLDL 的结合量；(d) 依据以磷酸胆碱为标准品测得的标准曲线，定量 OxLDL 含量。本发明还公开了检测 OxLDL 的试剂盒，该试剂盒包含抗磷酸胆碱的抗体。本发明对动脉粥样硬化疾病发生、发展的诊断提供了可靠的参照指标。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种定量检测氧化低密度脂蛋白的方法，包含下列步骤：
(a) 将抗磷酸胆碱的抗体与含有氧化低密度脂蛋白的样品接触；
(b) 使所述抗体与氧化低密度脂蛋白结合；
5 (c) 测定所述抗体与氧化低密度脂蛋白的结合量。
2. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述抗体为单克隆抗体、多克隆抗体或单链抗体可变区片段。
- 10 3. 如权利要求2所述的方法，其中编码所述抗体的基因含有重链可变区S107 V_H和轻链可变区V-kappa 22 V_L。
4. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述样品为血清、血浆、组织匀浆液或组织提取液。
- 15 5. 如权利要求 1-4 任一项所述的方法，其中所述步骤 (c) 采用化学发光免疫分析法。
6. 如权利要求 1-4 任一项所述的方法，其中所述步骤 (c) 采用酶
20 联免疫吸附试验法。
7. 如权利要求 1 任一项所述的方法，其中所述步骤 (c) 采用生物素-亲和素系统测定法。
- 25 8. 如权利要求 1-4 任一项所述的方法，其中所述步骤 (c) 采用放射免疫测定法。
9. 如权利要求 1-4 所述的方法，其还包括步骤
(d) 根据以磷酸胆碱化合物为标准品测得的标准曲线，定量氧化低
30 密度脂蛋白表面的氧化特异抗原决定簇的量。

10. 一种检测氧化低密度脂蛋白的试剂盒，其包含抗磷酸胆碱的抗体。

5 11. 如权利要求 10 所述的试剂盒，其中所述抗体为单克隆抗体、多克隆抗体或单链抗体可变区片段。

 12. 如权利要求11所述的方法，其中所述抗体的基因组成含有重链可变区S107 V_H和轻链可变区V-kappa 22 V_L。

10

 13. 如权利要求 10—12 任一项所述的试剂盒，其中所述抗磷酸胆碱抗体是用酶标记的，该试剂盒还包括经与酶作用能发光或显色的化学物质。

15

 14. 如权利要求 10—12 任一项所述的试剂盒，其中进一步包括用酶标记的抗磷酸胆碱抗体的二级抗体以及经与酶作用能发光或显色的化学物质。

20

 15. 如权利要求 10—12 任一项所述的试剂盒，其中还包括用放射性同位素标记的磷酸胆碱、同位素标记的抗磷酸胆碱抗体或同位素标记的抗磷酸胆碱抗体的第二抗体。

25

 16. 如权利要求 10—12 任一项所述的试剂盒，其中所述抗体是用生物素标记的抗磷酸胆碱抗体，该试剂盒还包括用酶标记的亲合素及经与酶作用能发光或显色的化学物质。

30

 17. 如权利要求 10—12 任一项所述的试剂盒，其中所述抗体是用生物素标记的抗磷酸胆碱抗体的二级抗体，该试剂盒还包括用酶标记的亲合素及经与酶作用能发光或显色的化学物质。

18. 抗磷酸胆碱的抗体的应用，用于检测哺乳动物体内氧化低密度脂蛋白的氧化程度。

19. 一种保藏号为 C200304 的杂交瘤细胞系。

5

20. 一种由权利要求 19 所述杂交瘤细胞生产的单克隆抗体。

用抗磷酸胆碱抗体对氧化低密度脂蛋白的定量测定
及其在诊断动脉粥样硬化中的应用

5

技术领域

本发明涉及氧化低密度脂蛋白（OxLDL）的检测，具体涉及氧化低密度脂蛋白的定量检测方法及其试剂盒。

10

背景技术

脂蛋白是血浆胆固醇和甘油三酯的主要载体。低密度脂蛋白（LDL）是由磷脂、载脂蛋白（Apo）B多肽链、胆固醇、甘油三酯、碳水化合物等组成的（附图1）。近年来人们发现低密度脂蛋白的氧化态变化与许多疾病有关，如糖尿病、肾衰竭和惊厥前期。最近，人们还发现氧化低密度脂蛋白与心血管疾病有密切的关系。例如，在动脉壁中以及其他位点，LDL被氧化成氧化低密度脂蛋白（OxLDL）。OxLDL不再被正常细胞上的LDL受体识别，反而被巨噬细胞上的清道夫受体识别。使巨噬细胞摄取OxLDL不受调控，结果OxLDL中的脂类（包括被氧化的脂类）就在巨噬细胞中越积越多直到巨噬细胞变为泡沫细胞。据信这种泡沫细胞分泌各种导致血小板不稳和血液凝结的因子。另外，这些泡沫细胞的死亡导致脂类沉积在动脉壁中。脂肪在血管壁中的沉积是导致心血管疾病，特别是动脉粥样硬化的病因之一。

15

20

根据美国心脏协会2001年的最新统计，心血管疾病已成为人类头号死因，及时检测至关重要。但目前用于心血管疾病的检测方法主要有：

（1）常规预警检测，包括血脂、家族病史和生活方式等方面的检测。该法的缺陷包括仅能测出致病因素，与心血管疾病的发生、发展变化无直接关联；

25

（2）非入侵性功能检测，包括运动心电图、超声心动图和核磁共振等检测手段。该法缺陷包括对心血管疾病的发生、发展变化和严重性无法判断，而且仪器造价昂贵；

(3) 入侵性检测, 如冠状动脉血管造影和血管内超声。该法缺陷是入侵性的, 会给患者带来一定的痛苦, 有并发症危险, 需专业人员操作, 仅适用于严重晚期病人的检查, 检测费用也较高。

5 因此, 到目前为止尚没有任何特别有效地预警和/或辅助检测心血管疾病特别是动脉粥样硬化的发生、发展状况的方法。

10 尽管目前人们已经知道 OxLDL 与心血管疾病的发生、发展有一定的联系, 也针对 OxLDL 提出了一些检测方法, 但这些检测方法都不能做到将 OxLDL 含量与心血管疾病的程度直接联系起来, 因此其实用性不是很大。例如 Young 等(参见: 美国专利号 5,460,947) 公开了使用免疫分析方法检测血清中 ApoB 的含量。但这种方法测定的是氧化和非氧化 LDL 之和, 而不能将氧化的和非氧化的 LDL 区别开。此外, LDL 的氧化是一个复杂的过程, 其被氧化的程度目前尚没有定量的标准。因此, 用体外催化获得的 OxLDL 来作为标准物, 确定体内产生的 OxLDL, 既

15 由此可见, 现有技术检测心血管疾病方法操作不便, 检测指标与心血管疾病发生、发展变化无相关性, 尤其对心血管病变的早期诊断尚未发现行之有效的方法。冠状动脉狭窄(冠心病)是由动脉粥样硬化造成的, 这是一种高发生率和高死因的心血管疾病。如果能及早发现动脉粥样硬化的危险因素, 做到及早预防和治疗, 就能很好的避免这种疾病的

20 发作。因此, 目前急需找到一种氧化低密度脂蛋白的定量检测方法。

发明内容

25 研究发现低密度脂蛋白经氧化修饰后表面呈现与游离状磷酸胆碱(PC)的抗原决定簇一样的抗原决定簇, 或称表位结构。因此, 抗 PC 抗体只能与 OxLDL 结合, 而不与未经氧化的 LDL 结合, 并且结合的量与 OxLDL 的氧化程度成正比。本发明研究发现这种 PC 表位呈现的量与动脉粥样硬化症相关, 这种抗 PC 的抗体与 OxLDL 上 PC 表位结合的量与冠状动脉狭窄程度存在线性关系(参见附图 2)。因此, 本发明提供了

30 抗 PC 的抗体的应用, 用于检测哺乳动物体内 OxLDL 的氧化程度。通过抗原抗体的特异反应定量检测出样品中 OxLDL 上 PC 表位的含量, 并根

据该含量可判断出动脉粥样硬化的程度和冠心病发病的风险。

另一方面,本发明还提供了一种定量检测 OxLDL 中 PC 表位的方法,其包括下列步骤:

- (a) 将抗 PC 的抗体与含有 OxLDL 的样品接触;
- 5 (b) 使所述抗体与 OxLDL 结合;
- (c) 测定所述抗体与 OxLDL 上 PC 表位的结合量。

在本发明的方法中,所述抗 PC 的抗体可从市场上购买也可通过本领域熟知的生物工程方法制备。例如,购自 Sigma 化学公司的 TEPC15 (货物编号: M1421) 即可用做本发明方法中的抗 PC 的抗体。如果用
10 生物工程方法制备抗 PC 的抗体,优选编码所述抗 PC 抗体的基因含有重链可变区 S107 V_H 和轻链可变区 V-kappa 22 V_L。有关这方面的具体内容,可参见文献: Shaw, et al.: Natural antibodies with the T15 idiotype may act in atherosclerosis, apoptotic clearance, and protective immunity. J. Clin. Invest. 105:1731-1740 (2000)。这些抗体可以是选自抗 PC 单克隆抗体、
15 抗 PC 多克隆抗体或单链抗体可变区片段。本文所用的术语“磷酸胆碱”指的是磷脂酰胆碱的两条脂肪酸尾巴被去掉后所余下的结构部分。

本发明的方法可用于检测任何含有带 PC 表位的 OxLDL 的生物样品。所述样品优选为血清、血浆、组织匀浆液、组织提取液,最优选为血清。

20 本发明的方法基于抗原抗体间反应的特异性和标记物检测的灵敏性,是一种免疫标记测定方法。即采用酶、荧光剂、放射性同位素、发光剂或电子致密物质标记抗体或抗原,进行抗原抗体间的特异性反应,从而能定量检测抗体或抗原的量。其中将抗原特异性抗体标记后进行检测的方法是直接法,采用标记的第二抗体对检测结果进行放大的方法为
25 间接法。

因此,在本发明的方法中,步骤(c)可采用直接化学发光免疫分析法、间接化学发光免疫分析法、直接放射免疫测定法、间接放射免疫测定法、直接酶联免疫吸附试验法、间接酶联免疫吸附试验法、直接生物素-亲和素系统测定法、间接生物素-亲和素系统测定法中的任一种来完成。而上述这些直接法和间接法又分别可进一步地分为夹心法和非夹
30

心法。

双抗体夹心法可如下完成：先将抗 PC 抗体固定在固相载体上，加入含有 OxLDL 的样品，使二者接触，再加入抗 ApoB 抗体(或称抗 LDL 抗体,可购自 Sigma 化学公司, 货物编号: L8016), 使之与 OxLDL 接触, 测定抗 ApoB 抗体的量而定量 OxLDL 的含量。或者, 先将抗 ApoB 抗体固定在固相载体上, 加入含有 OxLDL 的样品, 使二者接触, 再加入抗 PC 抗体, 使之与 OxLDL 接触, 测定抗 PC 抗体的量而定量 OxLDL 的含量。

非夹心法可如下完成：先用含有 OxLDL 的样品包被固相载体, 再加入抗 PC 的第一抗体, 使之与 OxLDL 接触 (如有必要还可进一步加入抗 PC 抗体的第二抗体, 使之抗 PC 的第一抗体接触并结合), 然后测定抗 PC 抗体的量而定量 OxLDL 的含量。

为了避免人为操作、试剂盒不同批次和试验仪器不同而导致的误差, 在本发明的方法中, 优选还包括步骤 (d) 以 PC 化合物为标准品制得标准曲线, 并根据该标准曲线定量步骤(c)所测得的结合量所代表的 OxLDL 表面的氧化特异抗原决定簇的量。即, 依据标准曲线, 计算出单位数量的 OxLDL 中所呈现的 PC 表位的含量, 从而确定低密度脂蛋白在体内被氧化的程度。

各种 PC 化合物均可用做在步骤(d)中所用的 PC 化合物, 例如但不限于: PC、氯化 PC、乙酰化 PC、与血清白蛋白偶联的 PC 或与匙孔血蓝蛋白偶联的 PC (PC-KLH)。

另一方面, 本发明还提供了一种用于完成上述定量检测 OxLDL 的试剂盒。本发明的试剂盒包含抗 PC 的抗体。所述抗体可为单克隆抗体、多克隆抗体或单链抗体可变区片段。编码所述抗 PC 的抗体的基因优选含有重链可变区 S107 V_H 和轻链可变区 V-kappa 22 V_L。所述抗体进一步更优选为 TEPC15 (见文献: Moragan G, Berek C, Miller JF. An idiotypic determinant formed by both immunoglobulin constant and variable regions. Nature 1983; 301(5902): 720-2) 或自制抗体 MabHS1。

对于用于完成步骤 (c) 采用酶联免疫吸附试验法(ELISA)的本发明方法的试剂盒, 其中优选所述抗 PC 的抗体是酶标记的, 并且该试剂盒

还包括经与酶作用能显色的化学物质。或者，本发明的试剂盒中优选包括抗 PC 的抗体、用酶标记的抗 PC 抗体的二级抗体、以及经与酶作用能显色的化学物质。

5 对于用于完成步骤 (c) 采用放射免疫测定法(EIA)的本发明方法的试剂盒，其还优选包括用放射性同位素标记的 PC、同位素标记的抗 PC 抗体或同位素标记的抗 PC 抗体的第二抗体。

10 对于用于完成步骤 (c) 采用化学发光免疫分析法(Chemiluminescent Assay)的本发明方法的试剂盒，其中优选所述抗 PC 的抗体是酶标记的，并且该试剂盒还包括经与酶作用能发光的化学物质。或者，本发明的试剂盒中优选包括抗 PC 的抗体、用酶标记的抗 PC 抗体的二级抗体、以及经与酶作用能发光的化学物质。

15 对于用于完成步骤 (c) 采用生物素-亲和素系统测定法的本发明方法的试剂盒，其中优选所述抗 PC 的抗体是用生物素标记的，并且该试剂盒还包括用酶标记的亲和素及经与酶作用能发光或显色的化学物质。或者，本发明的试剂盒中优选包括抗 PC 的抗体、用生物素标记的抗 PC 抗体的二级抗体、用酶标记的亲和素及经与酶作用能发光或显色的化学物质。

20 本发明在 OxLDL 与冠状动脉狭窄具有相关性的基础上，寻找到了定量测定 OxLDL 的方法，并提供了完成本发明方法的定量检测 OxLDL 的试剂盒。这对于量化动脉粥样硬化性心血管疾病程度提供了可靠的测定方法和工具。

附图描述

附图 1 表示低密度脂蛋白的结构。

25 附图 2 表示氧化低密度脂蛋白滴度与冠状动脉狭窄的关系。

附图 3 表示氧化低密度脂蛋白测定方法的基本原理。

附图 4 表示自制抗体 MabHS1 与 OxLDL 结合的标准曲线。

附图 5 表示自制抗体 MabHS1 与 PC-KLH 结合的标准曲线。

30 附图 6 表示纯化自制抗体 MabHS1 的还原及非还原 SDS -PAGE 银染图谱。图中 1 表示分子量标准，2 表示细胞培养上清，3 表示自制抗体

MabHS1; A 表示非还原 SDS-PAGE 银染图谱, B 表示还原 SDS-PAGE 银染图谱。

具体实施方式

5 1. 步骤 (c) 采用酶联免疫吸附法(ELISA)的本发明方法

(1) 双抗夹心间接法

材料: 96 孔 ELISA 微滴板, 抗 ApoB 抗体, 磷酸盐缓冲液 (PBS), 检测样本, 牛血清白蛋白 (BSA), TEPC15 或自制抗体 MabHS1, 碱性磷酸酶 (AP) 或辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的抗 TEPC15 或自制抗体 MabHS1 第二抗体, ELISA 读数仪, PC 化合物。

10

方法: 用 PBS 将抗 ApoB 抗体稀释后, 加入到 ELISA 板中, 4℃ 放置 24-48 小时。用含有 0.1% 吐温-20 (tween-20) 的 PBS 洗涤 ELISA 板。向 ELISA 板的各孔中分别加入待测样品、阴性对照, 37℃ 放置 1 小时。洗涤板三次, 加入含 1% BSA 的 PBS (BSA-PBS) 稀释的第一抗体 TEPC 15 或者自制抗体 MabHS1, 37℃ 放置 1 小时。洗涤板 2-5 次, 优选 3 次, 加入稀释好的 HRP 标记的抗 TEPC15 或自制抗体 MabHS1 第二抗体, 37℃ 放置 45 分钟。洗涤板 2-5 次, 优选 3 次, 加入配好的显色液, 室温或 37℃ 显色 15-30 分钟, 硫酸终止反应。ELISA 读数仪测定光吸收值。以倍比稀释的已知浓度的 PC 化合物包被 ELISA 板, 加入 BSA-PBS 稀释的第一抗体 TEPC 15 或者自制抗体 MabHS1, 37℃ 放置 1 小时。洗涤板 2-5 次, 优选 3 次, 加入稀释好的 HRP 标记的抗 TEPC15 或自制抗体 MabHS1 第二抗体, 37℃ 放置 45 分钟。洗涤板 2-5 次, 优选 3 次, 加入配好的显色液, 室温或 37℃ 显色 15-30 分钟, 硫酸终止反应。ELISA 读数仪测定光吸收值, 绘制标准曲线。根据样品的测定值查找出 OxLDL 氧化表位的含量。

15

20

25

(2) 双抗夹心直接法

材料: 96 孔 ELISA 微滴板, 抗 ApoB 抗体, PBS, 检测样本, BSA, AP 或 HRP 标记的 TEPC15 或自制抗体 MabHS1, ELISA 读数仪, PC 化合物。

30

方法: 用 PBS 将抗 ApoB 抗体稀释后, 加入到 ELISA 板中, 4℃ 放

置 24-48 小时。用含有 0.1% tween-20 的 PBS 洗涤 ELISA 板。向 ELISA 板的各孔中分别加入待测样品、阴性对照，37℃放置 1 小时。洗涤板 2-5 次，优选 3 次，加入 BSA-PBS 稀释的 AP 或 HRP 标记的 TEPC15 或自制抗体 MabHS1，37℃放置 1 小时。洗涤板 2-5 次，优选 3 次，加入配好的显色液，室温或 37℃显色 15-30 分钟，硫酸终止反应。ELISA 读数仪测定光吸收值。以倍比稀释的已知浓度的 PC 化合物包被 ELISA 板，加入 BSA-PBS 稀释的 AP 或 HRP 标记的 TEPC15 或自制抗体 MabHS1，37℃放置 1 小时。洗涤板 2-5 次，优选 3 次，加入配好的显色液，室温或 37℃显色 15-30 分钟，硫酸终止反应。ELISA 读数仪测定光吸收值，绘制标准曲线。根据样品的测定值查找出 OxLDL 氧化表位的含量。

(3) 非夹心间接法

材料：96 孔 ELISA 微滴板，PBS，检测样本，BSA，TEPC15 或自制抗体 MabHS1，AP 或 HRP 标记的抗 TEPC15 或自制抗体 MabHS1 第二抗体，ELISA 读数仪，PC 化合物。

方法：将检测样本适当稀释后包被 96 孔 ELISA 微滴板，加入 BSA-PBS 稀释的第一抗体 TEPC 15 或者自制抗体 MabHS1，37℃放置 1 小时。洗涤板 2-5 次，优选 3 次，加入稀释好的 HRP 标记的抗 TEPC15 或自制抗体 MabHS1 第二抗体，37℃放置 45 分钟。洗涤板 2-5 次，优选 3 次，加入配好的显色液，室温或 37℃显色 15-30 分钟，硫酸终止反应。ELISA 读数仪测定光吸收值。以倍比稀释的已知浓度的 PC 化合物包被 ELISA 板，加入 BSA-PBS 稀释的第一抗体 TEPC 15 或者自制抗体 MabHS1，37℃放置 1 小时。洗涤板 2-5 次，优选 3 次，加入稀释好的 HRP 标记的抗 TEPC15 或自制抗体 MabHS1 第二抗体，37℃放置 45 分钟。洗涤板 2-5 次，优选 3 次，加入配好的显色液，室温或 37℃显色 15-30 分钟，硫酸终止反应。ELISA 读数仪测定光吸收值，绘制标准曲线。根据样品的测定值查找出 OxLDL 氧化表位的含量。

(3) 非夹心直接法

材料：96 孔 ELISA 微滴板，PBS，检测样本，BSA，AP 或 HRP 标记的 TEPC15 或自制抗体 MabHS1，ELISA 读数仪，PC 化合物。

方法：将检测样本适当稀释后包被 96 孔 ELISA 微滴板，加入

BSA-PBS 稀释的 AP 或 HRP 标记的 TEPC15 或自制抗体 MabHS1, 37 °C 放置 1 小时。洗涤板 2-5 次, 优选 3 次, 加入配好的显色液, 室温或 37 °C 显色 15-30 分钟, 硫酸终止反应。ELISA 读数仪测定光吸收值。以倍比稀释的已知浓度的 PC 化合物包被 ELISA 板, 加入 AP 或 HRP 标记的 TEPC15 或自制抗体 MabHS1, 37 °C 放置 45 分钟。洗涤板 2-5 次, 优选 3 次, 加入配好的显色液, 室温或 37 °C 显色 15-30 分钟, 硫酸终止反应。ELISA 读数仪测定光吸收值, 绘制标准曲线。根据样品的测定值查找出 OxLDL 氧化表位的含量。

2. 步骤 (c) 采用液相放射免疫测定法(EIA)的本发明方法

材料: 放射性同位素 ^3H 、 ^{14}C 或 ^{32}P 标记的 PC, 检测样本, TEPC15 抗体或自制抗体 MabHS1 抗体, 免疫分离剂。

方法: 将放射性同位素标记的 PC 和被测含 OxLDL 样本与限量的 TEPC15 抗体或自制抗体 MabHS1 抗体混合, 4 °C 温育 12-24 小时, 加入免疫分离剂, 抗原抗体复合物产生沉淀。离心分离, 分别测定标记抗原抗体复合物 (B) 和游离标记 PC (F) 的放射活性。计算标记抗原抗体复合物放射结合率 ($B/T(T=B+F)$)。同时以一系列已知浓度的未标记和一定量的放射标记的 PC 以及 TEPC15 或者自制抗体 MabHS1 相混合, 测出各标准浓度未标记 PC 参加下的标记抗原抗体复合物放射结合率 (B/T 或 B/T), 以放射结合率为纵座标和已知未标记 PC 为横座标绘制标准竞争抑制曲线。根据被测抗原的放射性结合率, 在标准曲线上即可查出相应的 OxLDL 含量。

3. 步骤 (c) 采用固相放射免疫测定法的本发明方法

(1) 双抗夹心间接法

材料: 96 孔 ELISA 微滴板, 抗 ApoB 抗体, PBS, 检测样本, BSA, TEPC15 或自制抗体 MabHS1, 同位素标记的抗 TEPC15 或自制抗体 MabHS1 第二抗体, 放射线测定仪, PC 化合物。

方法: 用俘获抗体, 即抗 ApoB 抗体包被 96 孔 ELISA 微滴板的孔。这些抗体可以是选自单克隆抗体、多克隆抗体或单链抗体。用 PBS 洗涤孔 2-5 次, 优选 3 次, 然后将检测样本 (优选为血清) 用 BSA-PBS 稀释 (1:10 至 1:100) 后, 加入微滴板的孔。室温孵育 20-60 分钟, 优选 30

分钟。用 PBS 洗涤孔 2-5 次，优选 3 次，将 BSA-PBS 稀释的第一抗体 TEPC15 或自制抗体 MabHS1 加入孔中，并于室温下温育。用 PBS 洗涤孔 2-5 次，优选 3 次。加入同位素标记的抗 TEPC15 或自制抗体 MabHS1 第二抗体，接着用水漂洗，使用放射线测定仪测定射线强度。同时以已知浓度的 PC 化合物连续 10 倍梯度稀释后包被 96 孔 ELISA 微滴板的孔，以 BSA-PBS 稀释的第一抗体 TEPC15 或自制抗体 MabHS1 加入孔中，并于室温下温育。用 PBS 洗涤孔 2-5 次，优选 3 次。加入同位素标记的抗 TEPC15 或自制抗体 MabHS1 第二抗体。接着用水漂洗，使用放射线测定仪测定射线强度，制作标准曲线。根据样品的测定值查找出 OxLDL 氧化表位的含量。

(2) 双抗夹心直接法

材料：96 孔 ELISA 微滴板，抗 ApoB 抗体，PBS，检测样本，BSA，同位素标记的 TEPC15 或自制抗体 MabHS1，放射线测定仪，PC 化合物。

方法：用俘获抗体，即抗 ApoB 抗体包被 ELISA 微滴板的孔。这些抗体可以是选自单克隆抗体、多克隆抗体或单链抗体。用 PBS 洗涤孔 2-5 次，优选 3 次，然后将检测样本（优选为血清）用 BSA-PBS 稀释（1:10 至 1:100）后，加入微滴板的孔。室温孵育 20-60 分钟，优选 30 分钟。用 PBS 洗涤孔 2-5 次，优选 3 次，将 BSA-PBS 稀释的同位素标记的 TEPC15 或自制抗体 MabHS1 加入孔中，并于室温下温育。接着用水漂洗，使用放射线测定仪测定射线强度。同时将已知浓度的 PC 化合物连续 10 倍梯度稀释后包被孔，将 BSA-PBS 稀释的同位素标记的 TEPC15 或自制抗体 MabHS1 加入孔中，并于室温下温育。接着用水漂洗，使用放射线测定仪测定射线强度。制作标准曲线。根据样品的测定值查找出 OxLDL 氧化表位的含量。

(3) 非夹心间接法

材料：96 孔 ELISA 微滴板，PBS，检测样本，BSA，TEPC15 或自制抗体 MabHS1，同位素标记的抗 TEPC15 或自制抗体 MabHS1 第二抗体，放射线测定仪，PC 化合物。

方法：将检测样本适当稀释后包被 96 孔 ELISA 微滴板的孔。将 BSA-PBS 稀释的第一抗体 TEPC15 或自制抗体 MabHS1 加入孔中，并于

室温下温育。用 PBS 洗涤孔 2-5 次，优选 3 次。加入同位素标记的抗 TEPC15 或自制抗体 MabHS1 第二抗体，接着用水漂洗，使用放射线测定仪测定射线强度。同时以已知浓度的 PC 化合物连续 10 倍梯度稀释后包被孔，以 BSA-PBS 稀释的第一抗体 TEPC15 或自制抗体 MabHS1 加入孔中，并于室温下温育。用 PBS 洗涤孔 2-5 次，优选 3 次。加入同位素标记的抗 TEPC15 或自制抗体 MabHS1 第二抗体。接着用水漂洗，使用放射线测定仪测定射线强度，制作标准曲线。根据样品的测定值查找出 OxLDL 氧化表位的含量。

(4) 非夹心直接法

10 材料：96 孔 ELISA 微滴板，PBS，检测样本，BSA，同位素标记的 TEPC15 或自制抗体 MabHS1，放射线测定仪，PC 化合物。

方法：将检测样本适当稀释后包被 96 孔 ELISA 微滴板的孔。将 BSA-PBS 稀释的同位素标记的 TEPC15 或自制抗体 MabHS1 加入孔中，并于室温下温育。接着用水漂洗，使用放射线测定仪测定射线强度。同时以已知浓度的 PC 化合物连续 10 倍梯度稀释后包被孔，将 BSA-PBS 稀释的同位素标记的 TEPC15 或自制抗体 MabHS1 加入孔中，并于室温下温育。接着用水漂洗，使用放射线测定仪测定射线强度，制作标准曲线。根据样品的测定值查找出 OxLDL 氧化表位的含量。

4. 步骤 (c) 采用化学发光免疫分析法的本发明方法

20 本发明采用化学发光免疫分析法时，除材料与检测仪外，其原理，方法和步骤与具体实施方式 1 所述完全相同。

材料：包被板采用白色 U 形底聚苯乙烯(polystyrene) 高结合力微滴板，如 MicroFluor 微滴板(ThermoLabsystems, Franklin, MA, USA)，抗 ApoB 抗体，PBS，检测样本，BSA，TEPC15 或自制抗体 MabHS1，AP 标记的抗 TEPC15 或自制抗体 MabHS1 第二抗体，LumiPhos 530 (Lumigen Inc., Southfield, Michigan, USA)，DYNEX 亮度计(DYNEX Technologies)，PC 化合物

方法：实施方式 1 中所述的方法(1)-(4)中，以“MicroFluor 微滴板”取代“96 孔 ELISA 微滴板”；以 AP 标记的抗 TEPC15 或自制抗体 MabHS1 抗体为第二抗体；以 LumiPhos 530 为底物；用 DYNEX 亮度计测定相对发

光度 (Relative Light Unit, RLU), 即为本方法。(参见实施例 3)。

基于上述原理, 此法也可用于自动化检测。主要步骤包括: 用抗 ApoB 抗体包被微磁颗粒, 加入稀释血清, 加入抗 PC 抗体, 加入 AP 标记的第二抗体, 取得数据。

5 5. 步骤 (c) 采用生物素-亲和素系统测定法的本发明方法

(1) 双抗夹心间接法

材料: 96 孔 ELISA 微滴板, 抗 ApoB 抗体, PBS, 检测样本, BSA, TEPC 15 或者自制抗体 MabHS1, 生物素标记的抗 TEPC 15 或自制抗体 MabHS1 第二抗体, HRP 或 AP 标记亲和素, 显色液, PC 化合物。

10 方法: 用 PBS 将抗 ApoB 抗体稀释后, 加入到 ELISA 板中, 4°C 放置 24-48 小时。用含有 0.1% tween-20 的 PBS 洗涤 ELISA 板。向 ELISA 板的各孔中分别加入待测样品、阴性对照, 37°C 放置 1 小时。洗涤板 2-5 次, 优选 3 次, 加入 BSA-PBS 稀释的 TEPC 15 或者自制抗体 MabHS1, 37°C 放置 1 小时。洗涤板 2-5 次, 优选 3 次, 加入 BSA-PBS 稀释的生物素标记的抗 TEPC 15 或自制抗体 MabHS1 第二抗体, 37°C 放置 1 小时。洗涤板 2-5 次, 优选 3 次, 加入稀释好的 HRP 或 AP 标记亲和素, 37°C 放置 45 分钟。洗涤板 2-5 次, 优选 3 次, 加入配好的显色液, 室温或 37°C 显色 15-30 分钟, 终止反应。ELISA 读数仪测定光吸收值。以倍比稀释的已知浓度的 PC 化合物包被 ELISA 板, 加入 BSA-PBS 稀释的第一抗体 TEPC 15 或者自制抗体 MabHS1, 37°C 放置 1 小时。洗涤板 2-5 次, 优选 3 次, 加入 BSA-PBS 稀释的生物素标记的抗 TEPC 15 或自制抗体 MabHS1 第二抗体, 37°C 放置 1 小时。洗涤板 2-5 次, 优选 3 次, 加入稀释好的 HRP 或 AP 标记亲和素, 37°C 放置 45 分钟。洗涤板 2-5 次, 优选 3 次, 加入配好的显色液, 室温或 37°C 显色 15-30 分钟, 终止反应。ELISA 读数仪测定光吸收值。绘制标准曲线。根据样品的测定值查找出 OxLDL 氧化表位的含量。

(2) 双抗夹心直接法

30 材料: 96 孔 ELISA 微滴板, 抗 ApoB 抗体, PBS, 检测样本, BSA, 生物素标记的 TEPC 15 或者自制抗体 MabHS1, HRP 或 AP 标记亲和素, 显色液, PC 化合物。

方法：用 PBS 将抗 ApoB 抗体稀释后，加入到 ELISA 板中，4℃放置 24-48 小时。用含有 0.1% tween-20 的 PBS 洗涤 ELISA 板。向 ELISA 板的各孔中分别加入待测样品、阴性对照，37℃放置 1 小时。洗涤板 2-5 次，优选 3 次，加入 BSA-PBS 稀释的生物素标记的 TEPC 15 或者自制抗体 MabHS1，37℃放置 1 小时。洗涤板 2-5 次，优选 3 次，加入稀释好的 HRP 或 AP 标记亲和素，37℃放置 45 分钟。洗涤板 2-5 次，优选 3 次，加入配好的显色液，室温或 37℃显色 15-30 分钟，终止反应。ELISA 读数仪测定光吸收值。以倍比稀释的已知浓度的 PC 化合物包被 ELISA 板，加入 BSA-PBS 稀释的生物素标记的 TEPC 15 或者自制抗体 MabHS1，37℃放置 1 小时。洗涤板 2-5 次，优选 3 次，加入稀释好的 HRP 或 AP 标记亲和素，37℃放置 45 分钟。洗涤板 2-5 次，优选 3 次，加入配好的显色液，室温或 37℃显色 15-30 分钟，终止反应。ELISA 读数仪测定光吸收值。绘制标准曲线。根据样品的测定值查找出 OxLDL 氧化表位的含量。

(3) 非夹心间接法

材料：96 孔 ELISA 微滴板，PBS，检测样本，BSA，TEPC 15 或者自制抗体 MabHS1，生物素标记的抗 TEPC 15 或自制抗体 MabHS1 第二抗体，HRP 或 AP 标记亲和素，显色液，PC 化合物。

方法：将检测样本适当稀释后包被 96 孔 ELISA 微滴板，加入 BSA-PBS 稀释的 TEPC 15 或者自制抗体 MabHS1，37℃放置 1 小时。洗涤板 2-5 次，优选 3 次，加入 BSA-PBS 稀释的生物素标记的抗 TEPC 15 或自制抗体 MabHS1 第二抗体，37℃放置 1 小时。洗涤板 2-5 次，优选 3 次，加入稀释好的 HRP 或 AP 标记亲和素，37℃放置 45 分钟。洗涤板 2-5 次，优选 3 次，加入配好的显色液，室温或 37℃显色 15-30 分钟，终止反应。ELISA 读数仪测定光吸收值。以倍比稀释的已知浓度的 PC 化合物包被 ELISA 板，加入 BSA-PBS 稀释的第一抗体 TEPC 15 或者自制抗体 MabHS1，37℃放置 1 小时。洗涤板 2-5 次，优选 3 次，加入 BSA-PBS 稀释的生物素标记的抗 TEPC 15 或自制抗体 MabHS1 第二抗体，37℃放置 1 小时。洗涤板 2-5 次，优选 3 次，加入稀释好的 HRP 或 AP 标记亲和素，37℃放置 45 分钟。洗涤板 2-5 次，优选 3 次，加入配

好的显色液，室温或 37℃ 显色 15-30 分钟，终止反应。ELISA 读数仪测定光吸收值。绘制标准曲线。根据样品的测定值查找出 OxLDL 氧化表位的含量。

(4) 非夹心直接法

5 材料：96 孔 ELISA 微滴板，PBS，检测样本，BSA，生物素标记的 TEPC 15 或者自制抗体 MabHS1，HRP 或 AP 标记亲和素，显色液，PC 化合物。

方法：将检测样本适当稀释后包被 96 孔 ELISA 微滴板，加入 BSA-PBS 稀释的生物素标记的 TEPC 15 或者自制抗体 MabHS1，37℃ 放置 1 小时。洗涤板 2-5 次，优选 3 次，加入稀释好的 HRP 或 AP 标记亲和素，37℃ 放置 45 分钟。洗涤板 2-5 次，优选 3 次，加入配好的显色液，室温或 37℃ 显色 15-30 分钟，终止反应。ELISA 读数仪测定光吸收值。以倍比稀释的已知浓度的 PC 化合物包被 ELISA 板，加入 BSA-PBS 稀释的生物素标记的 TEPC 15 或者自制抗体 MabHS1，37℃ 放置 1 小时。洗涤板 2-5 次，优选 3 次，加入稀释好的 HRP 或 AP 标记亲和素，37℃ 放置 45 分钟。洗涤板 2-5 次，优选 3 次，加入配好的显色液，室温或 37℃ 显色 15-30 分钟，终止反应。ELISA 读数仪测定光吸收值。绘制标准曲线。根据样品的测定值查找出 OxLDL 氧化表位的含量。

为完成本发明的上述方法，本发明人还开发出了一系列的检测氧化低密度脂蛋白的试剂盒。本发明的试剂盒包含抗 PC 的抗体。其中所述抗 PC 的抗体的基因组成含有重链可变区 S107 V_H 和轻链可变区 V-kappa 22 V_L，如 TEPC15，自制抗体 MabHS1，或其他相同基因结构的抗体（见文献：Shaw, et al. : Natural antibodies with the T15 idiotype may act in atherosclerosis, apoptotic clearance, and protective immunity. J. Clin. Invest. 105:1731-1740 (2000)）。也可选自单克隆抗体、多克隆抗体或单链抗体可变区片段的任一种，还分别包括以化学发光物质、放射性同位素或酶标记所述抗体或者用生物素标记所述抗体并用酶标记所述亲和素。

本发明在 OxLDL 与冠状动脉狭窄具有相关性的基础上，寻找到了定量测定 OxLDL 的方法，并依据该法公开了 OxLDL 的定量检测试剂盒，

这对于量化动脉粥样硬化性心血管疾病的程度提供了可靠的参照指标。

下文将以实施例更详细描述本发明，本领域技术人员可以理解实施例不是限制本发明的保护范围。

5 以下实施例中所用的试剂和设备除自制抗体 MabHS1 抗体和待测血清外，均从市场上购得。所用自制抗体 MabHS1 是按照实施例 1 的步骤制备的。

实施例 1

自制抗体 MabHS1 的制备。

10 1. MabHS1 单克隆抗体株的建立：

背景：

TEPC15 (即 T15) 细胞系最早分离自经异十八烷预处理的小鼠腹膜细胞，它可以特异性地结合作为肺炎球菌和某些其它微生物病原体的磷壁酸细胞壁多糖 (C-PS) 免疫功能区的磷酸胆碱部分。在同系 (BALB/c 和 C57BL/6) 或远系繁殖的小鼠家系，在没有预免疫的情况下，可以高频率出现含有 T15 抗体基因的 B 细胞克隆，并且大部分的抗 PC 自身抗体 (autoantibody) 表现出 T15 独特型。此外，已有研究显示，表现这种独特型的单克隆抗体可以对特定的肺炎球菌菌株引起的感染提供最佳的保护。进一步地研究证实，apo-E 缺陷小鼠来源的 OxLDL 特异性 B 细胞系确实表达 T15 抗体基因产物，也证实了这些 B 细胞分泌的抗体的重链可变区 (V_H) 与轻链可变区 (V_L) 在蛋白水平上是一致的，因为它们可被 3 种不同的 T15 特异性抗血清识别。在 MabHS1 单克隆抗体株的建立中我们采用 T15 V_H 基因序列和 T15 V_L 基因序列，V_H 家族来源于 S107；V_L 家族来源于 kappa-22。T15 特异性抗独特型抗体对这些 V_H、V_L 或 V_H-V_L 配对的免疫球蛋白产物是特异性的。

25 大量研究表明发育早期 T15 抗 PC B 细胞在免疫系统中具有优势地位。它们在出生后 6 天达到高峰，并且已作为单一 B 细胞对细菌有关抗原的初次免疫反应的典型例子被单独讨论过。

30 已了解到 OxLDL 抗原决定簇的自体抗体滴度在高胆固醇膳食喂养的 LDL 受体缺 (LDLR^{-/-}) 的小鼠中是逐渐增高的，且自体抗体的滴度与动

脉粥样硬化的程度相关。同样，在胆固醇膳食喂养的 apoE 缺陷(apoE^{-/-})的小鼠血浆中，自体抗体的滴度会极度升高。将从未经外源性免疫的胆固醇膳食喂养的小鼠脾脏克隆的自体抗体与 OxLDL 结合，可得到几个分泌 IgM 的阳性克隆。表明在有广泛性动脉粥样硬化和脂质过氧化增加的 apoE 缺陷的小鼠中可以产生对各种氧化特异性抗原决定簇非常强的免疫反应。这些资料证实在有明显动脉粥样硬化时，体内可产生大量针对 OxLDL 不同氧化特异性抗原决定簇的免疫学反应。

因此，我们能够以现有的技术与材料筛选出一种表达 T15 独特型抗体的鼠单克隆抗体杂交瘤细胞系，并用这种抗 PC 抗体作为检测 OxLDL 上抗原决定簇的试剂。

方法：

我们采用上述的方法，得到结合 OxLDL PC 抗原决定簇的杂交瘤细胞系（CCTCC，保藏号：C200304）。由于 B-1 细胞在胸腔和腹膜腔内膜中占优势，在未经免疫的小鼠大部分 IgM 主要由在脾脏和腹膜中自发性 IgM 分泌细胞产生。我们给新生 C57BL/6 小鼠高胆固醇膳食饲养 4 周，然后腹腔注射 0.5ml 异十八烷。继续喂养两周后，处死小鼠，取脾分离脾脏细胞，与从胸腔和腹膜腔内膜中得到的细胞混合。这些细胞与骨髓瘤细胞系 P3X63Ag8.653.1（购自 ATCC, 序列号：CRL-1580）融合，从而形成杂交瘤细胞。OxLDL 和磷酸胆碱-钥孔血蓝蛋白（PC-KLH，购自 Biosearch Technologies 公司，货物编号：PC-1013）作为筛选用的抗原。从单个起始克隆，得到大约 2,000 个可分泌免疫球蛋白的杂交瘤细胞系。从这些细胞系中首先筛选能分泌 IgM 抗体的细胞系。10 天后混合从每 2 个有 IgM 分泌细胞的孔中得到的上清，并检测与 OxLDL 和 PC-KLH 的结合。在 200 个混合样品中，大约 10% 分泌 IgM 的杂交瘤细胞可分泌既结合 OxLDL 又结合 PC-KLH 的抗体。通过有限稀释法，从这些杂交瘤细胞中，我们最终克隆了 1 株既结合 OxLDL 又结合 PC-KLH 的单克隆。该单克隆抗体具有 T15 独特型，与 AB1-2 细胞（购自 ATCC，序列号：HB33）有阳性反应，被命名为 MabHS1。

上述方法中所用 OxLDL 采用常规方法制备：按一次性密度梯度超速离心法分离人血浆脂蛋白，在血浆中加入 NaBr 使其密度为 1.400g/ml，上层

依次铺 $d=1.100$ 及 $d=1.006$ g/ml NaBr/血浆密度缓冲液(PDB, pH7.4, 含 0.9% NaCl 及 1mmol/L EDTA 的 10mmol/L Tris-HCl), 50000rpm 离心 5 小时, 收集 $d=1.030-1.050$ g/ml 的 LDL 组分。将 LDL 对 PBS 透析除去 EDTA, 取 LDL(1mg/ml) 与终浓度为 10mmol/L 的 Cu^{2+} 在 37°C 下共同温育 8 小时, 用 EDTA 中终止反应, 即得 OxLDL。

2.MabHS1 单克隆抗体的制备与纯化:

构建 MabHS1 单克隆抗体株小鼠的同系小鼠, 腹腔注射 0.5ml 的异十八烷一周后, 腹腔注射 3×10^6 个 1 所得 MabHS1 单克隆抗体杂交瘤细胞 (CCTCC, 保藏号: C200304), 7~10 天后, 收集小鼠腹水, $0.45\mu\text{m}$ 微孔膜过滤及 12000r/min 离心 15 分钟后, 用亲和层析法从腹水中纯化抗体。自制抗体 MabHS1 与 Cu-OxLDL 和 PC-KLH 结合, 但不与天然 LDL 和丙二醛修饰的 LDL (MDA-LDL) 结合 (附图 4, 5, 6)。

实施例 2

酶联免疫法定量测定 OxLDL。

采用双抗体法测定血清样品中的 OxLDL。

材料: 96 孔 ELISA 微滴板, 抗 ApoB 抗体, PBS, 检测样本, BSA, TEPC15 或自制抗体 MabHS1, AP 或 HRP 标记的抗 TEPC15 或自制抗体 MabHS1 第二抗体, ELISA 读数仪, PC 化合物。

方法: 用 PBS 将抗 ApoB 抗体, 加入到 ELISA 板中, 4°C 放置 24-48 小时。用含有 0.1% tween 20 的 PBS 洗涤 ELISA 板。向 ELISA 板的各孔中分别加入待测样品、阴性对照, 37°C 放置 1 小时。洗涤板三次, 加入 BSA-PBS 稀释的第一抗体 TEPC 15 或者自制抗体 MabHS1, 37°C 放置 1 小时。洗涤板三次, 加入稀释好的 HRP 标记羊抗小鼠 Ig 第二抗体, 37°C 放置 45 分钟。洗涤板三次, 加入配好的显色液, 室温或 37°C 显色 15-30 分钟, 硫酸终止反应。ELISA 读数仪测定光吸收值。以倍比稀释的已知浓度的 PC 化合物包被 ELISA 板, 加入 BSA-PBS 稀释的第一抗体 TEPC 15 或者自制抗体 MabHS1, 37°C 放置 1 小时。洗涤板三次, 加入稀释好的 HRP 标记抗 TEPC15 或自制抗体 MabHS1 第二抗体, 37°C 放置 45 分钟。洗涤板三次, 加入配好的显色液, 室温或 37°C 显色 15-30 分钟, 硫酸终止反应。ELISA 读数仪测定光吸收值, 绘制标准曲线 (附图 5)。根

据样品的测定值查找出 OxLDL 氧化表位的含量。

实施例 3

放射免疫测定法定量测定 OxLDL。

材料：放射性同位素 ^3H 、 ^{14}C 或 ^{32}P 标记的 PC，检测样本，TEPC15
5 抗体或自制抗体 MabHS1 抗体，免疫分离剂。

方法：将放射性同位素标记的 PC 和被测含 OxLDL 样本与限量的
TEPC15 抗体或自制抗体 MabHS1 抗体混合，4℃温育 24 小时，加入免
疫分离剂，抗原抗体复合物产生沉淀。离心分离，分别测定标记抗原抗
体复合物 (B) 和游离标记 PC (F) 的放射活性。计算标记抗原抗体复
合物放射结合率 ($B/T(T=B+F)$)。同时以一系列已知浓度的未标记 PC 和
10 一定量的放射标记的 PC 以及 TEPC15 或者自制抗体 MabHS1 相混合，
测出各标准浓度未标记 PC 参加下的标记抗原抗体复合物放射结合率
(B/T 或 B/T)，以放射结合率为纵座标和已知未标记 PC 为横座标绘制
标准竞争抑制曲线。根据被测抗原的放射性结合率，在标准曲线上即可
15 查出相应的 OxLDL 含量。

实施例 4

化学发光免疫分析法定量测定 OxLDL。

采用双抗体法测定血清样品中的 OxLDL。

材料：MicroFluor 微滴板，抗 ApoB 抗体，PBS，检测样本，BSA，
20 TEPC15 或自制抗体 MabHS1，碱性磷酸酶 (AP) 标记的抗 TEPC15 或
者抗自制抗体 MabHS1 第二抗体，LumiPhos 530 (Lumigen Inc.,
Southfield, Michigan, USA), DYNEX 亮度计 (DYNEX Technologies),
PC (PC) 化合物

方法：用俘获抗体，即抗 ApoB 抗体包被 MicroFluor 微滴板的孔。
25 这些抗体可以是选自单克隆抗体、多克隆抗体或单链抗体。用 PBS 洗涤
孔三次，然后将检测样本--血清用含 1% BSA 的 PBS (BSA-PBS) 稀释
(1:10 至 1:100) 后，加入微滴板的孔。室温孵育 20-60 分钟，优选 30
分钟。用 PBS 洗涤孔三次，将 BSA-PBS 稀释的第一抗体 TEPC15 或自
制抗体 MabHS1 加入孔中，并于室温下温育。用 PBS 洗涤孔三次。加入
30 碱性磷酸酶 (AP) 标记的抗 TEPC15 或者抗自制抗体 MabHS1 第二抗体。

接着用水漂洗，并加入 LumiPhos 530 溶液。使用 DYNEX 亮度计以相对光单位 (RLU) 测定光发射。同时以已知浓度的 PC (PC) 化合物连续 10 倍梯度稀释后包被孔，以 BSA-PBS 稀释的第一抗体 TEPC15 或自制抗体 MabHS1 加入孔中，并于室温下温育。用 PBS 洗涤孔三次。加入碱性磷酸酶 (AP) 标记的抗 TEPC15 或者抗自制抗体 MabHS1 第二抗体。接着用水漂洗，并加入 LumiPhos 530 溶液，测定 RLU，制作标准曲线。根据样品的测定值查找出 OxLDL 氧化表位的含量。

实施例 5

生物素-亲和素系统夹心法定量测定 OxLDL (附图 3)。

10 材料: MicroFluor 微滴板, 抗 ApoB 抗体, PBS, 检测样本, BSA, 生物素标记的 TEPC 15 或者自制抗体 MabHS1, HRP 或 AP 标记亲和素, 显色液, PC 化合物

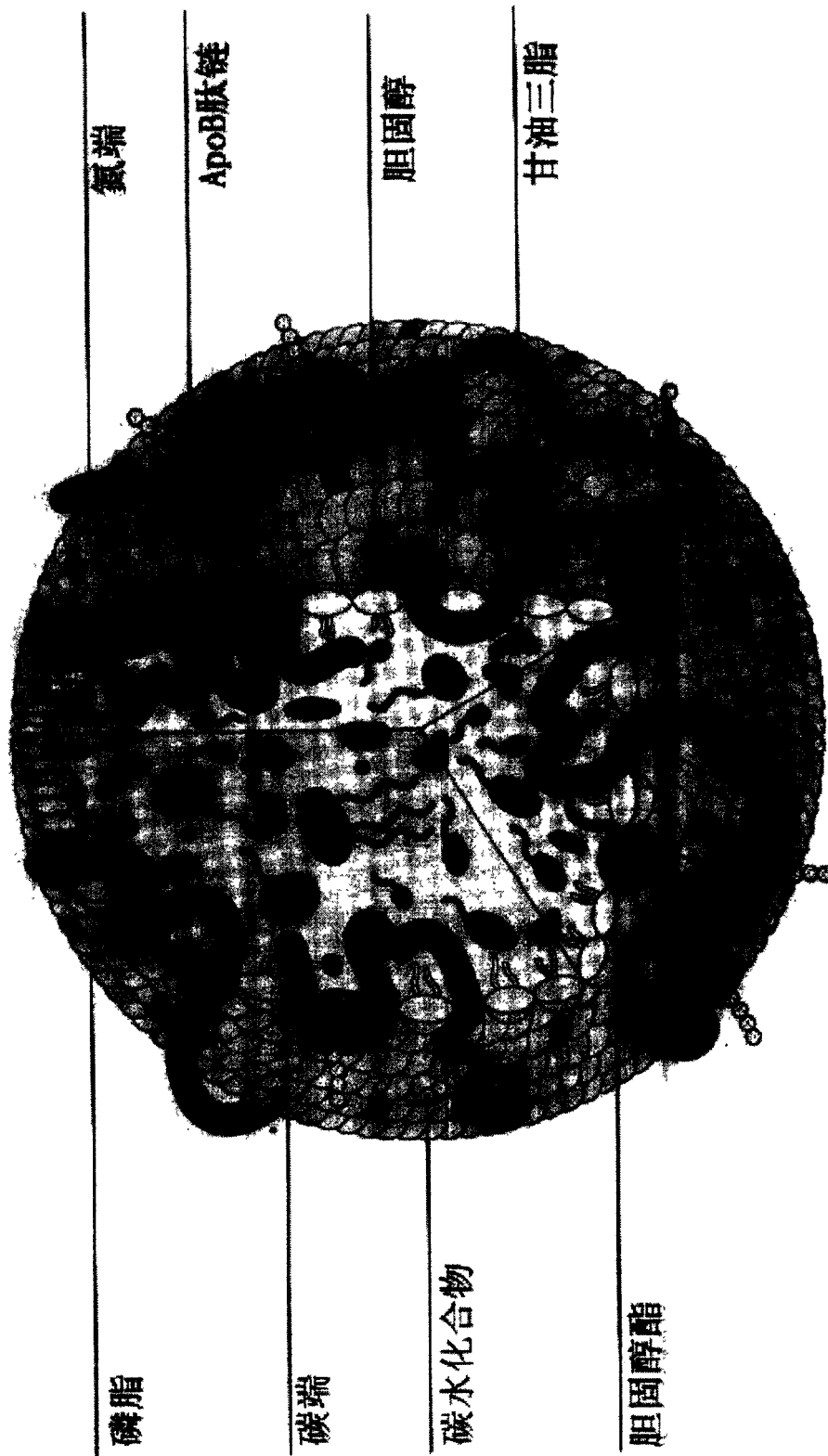
方法: 用磷酸盐缓冲液将抗 ApoB 抗体, 加入到 ELISA 板中, 4℃ 放置 24-48 小时。用含有 0.1% tween 20 的 PBS 洗涤 ELISA 板。向 ELISA 板的各孔中分别加入待测样品、阴性对照, 37℃ 放置 1 小时。洗涤板三次, 加入 BSA-PBS 稀释的生物素标记的 TEPC 15 或者自制抗体 MabHS1, 37℃ 放置 1 小时。洗涤板三次, 加入稀释好的 HRP 或 AP 标记亲和素, 37℃ 放置 45 分钟。洗涤板三次, 加入配好的显色液, 室温或 37℃ 显色 15-30 分钟, 终止反应。ELISA 读数仪测定光吸收值。以倍比稀释的已知浓度的 PC 化合物包被 ELISA 板, 加入 BSA-PBS 稀释的生物素标记的 TEPC 15 或者自制抗体 MabHS1, 37℃ 放置 1 小时。洗涤板三次, 加入稀释好的 HRP 或 AP 标记亲和素, 37℃ 放置 45 分钟。洗涤板三次, 加入配好的显色液, 室温或 37℃ 显色 15-30 分钟, 终止反应。ELISA 读数仪测定光吸收值。绘制标准曲线。根据样品的测定值查找出 OxLDL 氧化表位的含量。

参考文献

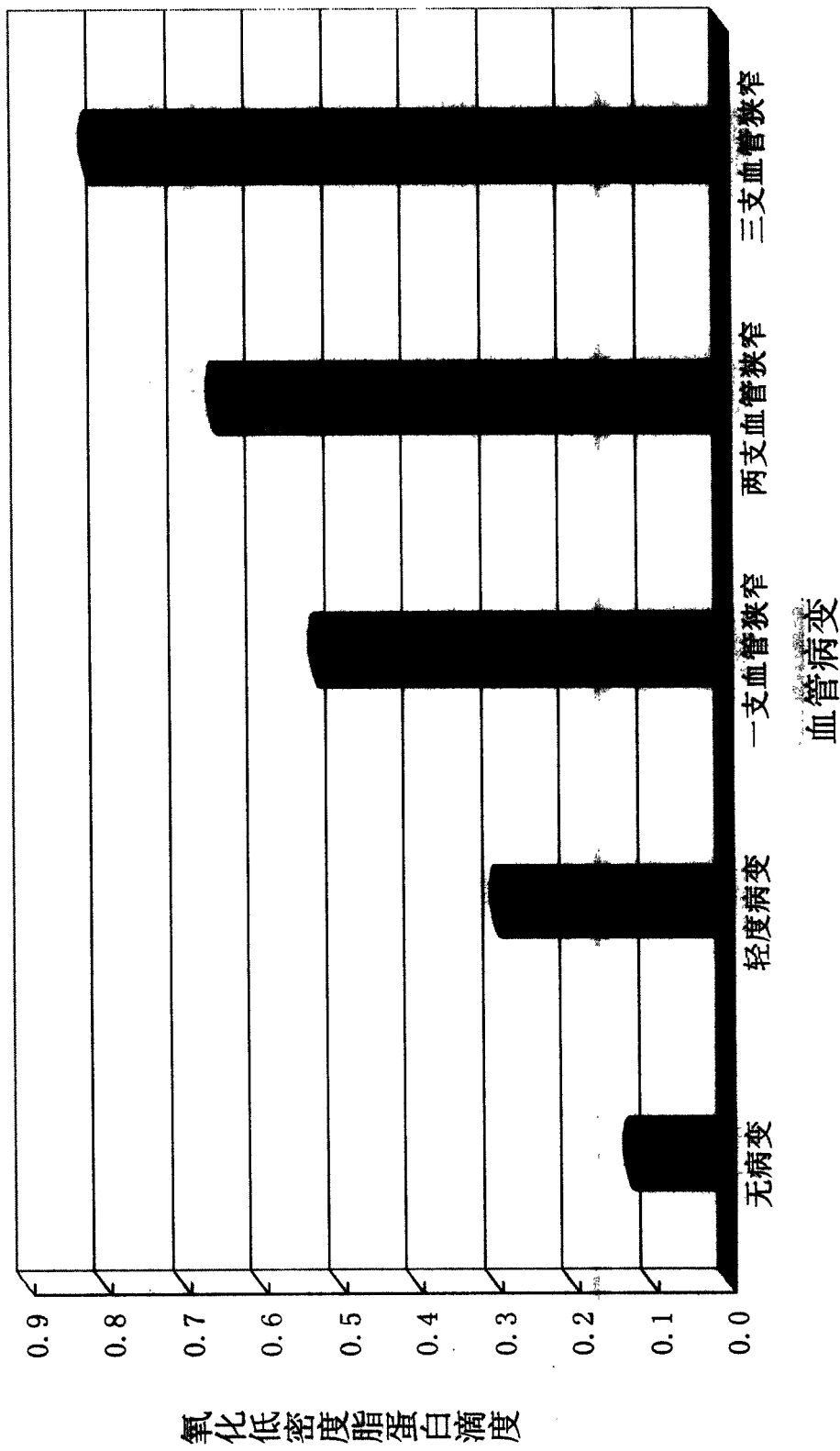
1. Gearhart, P. J., N. H. Sigal, and N. R. Kliaman. 1977. The monoclonal anti-phosphorylcholine antibody response in several murine strains: genetic implications of a diverse repertoire. *J Exp. Med* 145:876-891.

2. Claffin, J. L. and M. Cubberley. 1980. Clonal nature of the immune response to phosphocholine. VII. Evidence throughout inbred mice for molecular similarities among antibodies bearing the T15 idiotype. *J Immunol* 125:551-558.
3. Briles, D. E., C. Forman, S. Hudak, and J. L. Claffin. 1982. Anti-phosphorylcholine antibodies of the T15 idiotype are optimally protective against *Streptococcus pneumoniae*. *J Exp. Med* 156:1177-1185.
4. Desaynard, C., A. M. Giusti, and M. D. Scharff. 1984. Rat anti-T15 monoclonal antibodies with specificity for VH- and VH-VL epitopes. *Mol. Immunol* 21:961-967.
5. Palinski, W., R. K. Tangirala, E. Miller, S. G. Young, and J. L. Witztum. 1995. Increased autoantibody titers against epitopes of oxidized low density lipoprotein in LDL receptor-deficient mice with increased atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15:1569-1576.
6. Palinski, W., V. A. Ord, A. S. Plump, J. L. Breslow, D. Steinberg, and J. L. Witztum. 1994. Apoprotein E-deficient mice are a model of lipoprotein oxidation in atherogenesis: Demonstration of oxidation-specific epitopes in lesions and high titers of autoantibodies to malondialdehyde-lysine in serum. *Arterioscler. Thromb.* 14:605-615.
7. Palinski, W., S. Hörkkö, E. Miller, U. P. Steinbrecher, H. C. Powell, L. K. Curtiss, and J. L. Witztum. 1996. Cloning of monoclonal autoantibodies to epitopes of oxidized lipoproteins from apo E-deficient mice. Demonstration of epitopes of oxidized LDL in human plasma. *J. Clin. Invest.* 98:800-814.
8. Shaw, P. X., S. Horkko, M. K. Chang, L. K. Curtiss, W. Palinski, G. J. Silverman, and J. L. Witztum. 2000. Natural antibodies with the T15 idiotype may act in atherosclerosis, apoptotic clearance, and protective immunity [see comments]. *J Clin Invest* 2000. Jun.; 105. (12.): 1731.-40. 105:1731-1740.
9. Hoogenraad, N. J. and C. J. Wraight. 1986. The effect of pristane on ascites

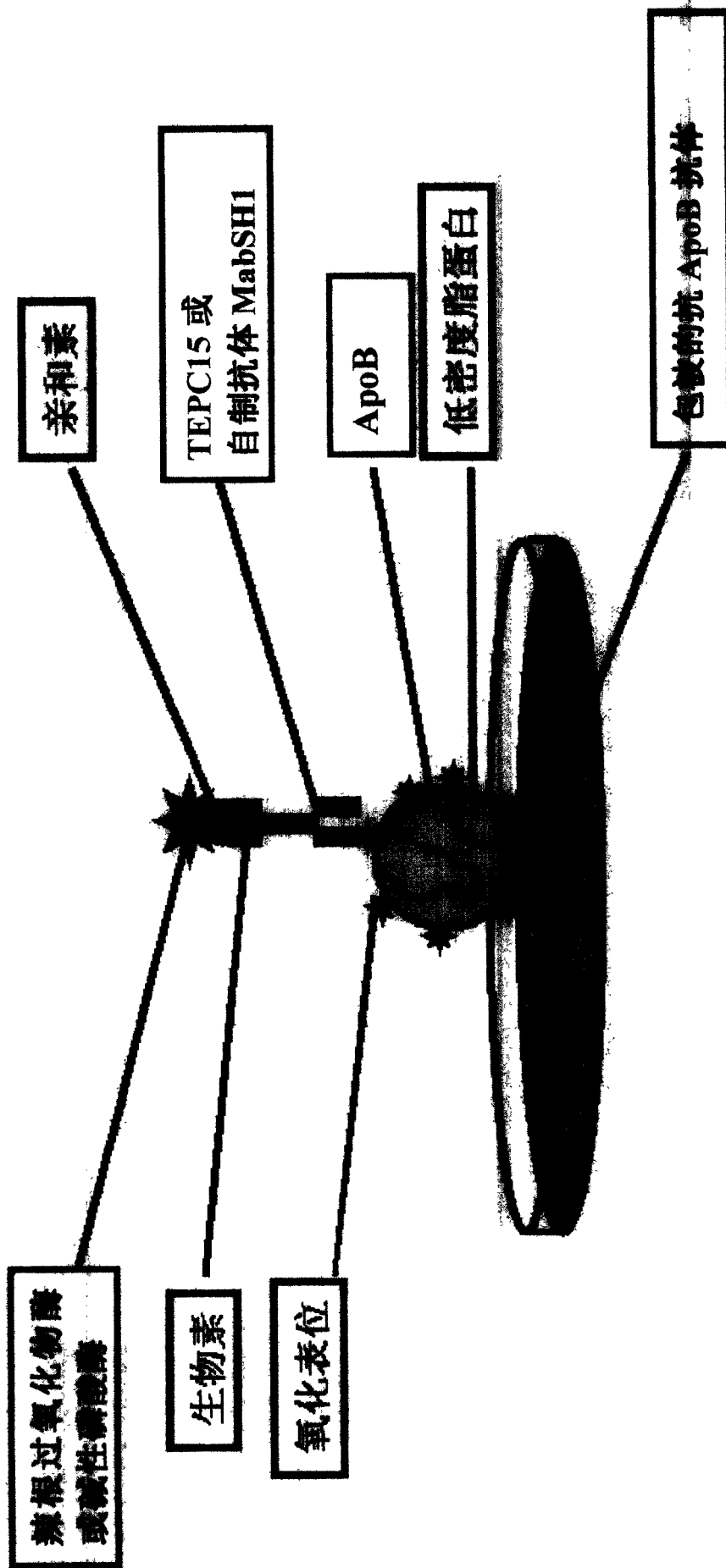
tumor formation and monoclonal antibody production. *Methods Enzymol.*
121:375-381.



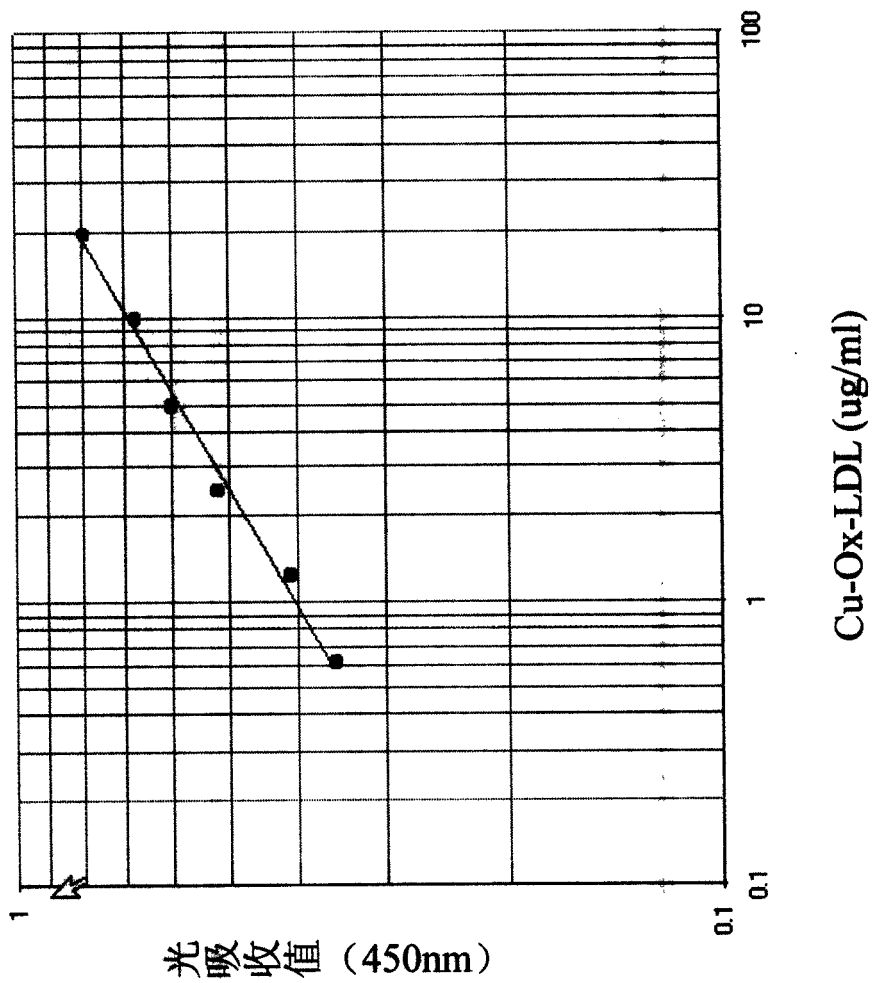
附图 1



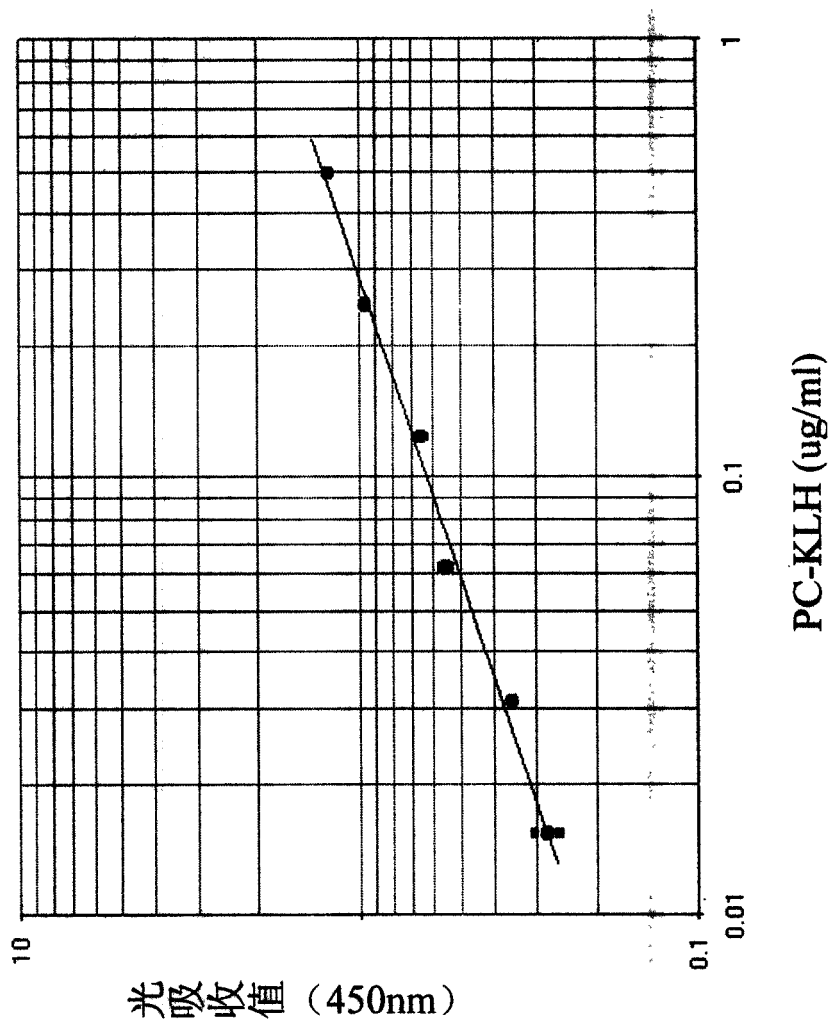
附图 2



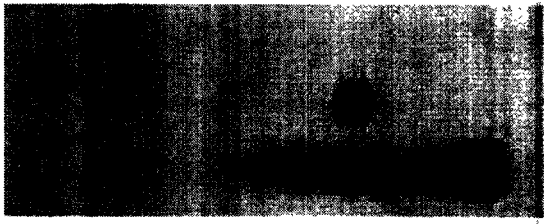
附图 3



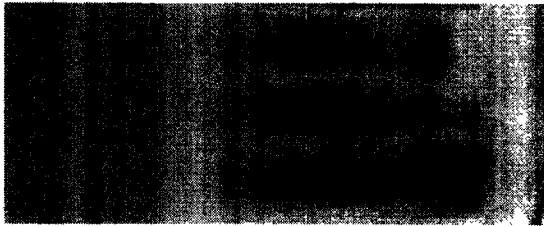
附图 4



附图 5



1 2 3
B



1 2 3
A

附图 6

专利名称(译)	用抗磷酸胆碱抗体对氧化低密度脂蛋白的定量测定及其在诊断动脉粥样硬化中的应用		
公开(公告)号	CN1536365A	公开(公告)日	2004-10-13
申请号	CN03109935.1	申请日	2003-04-08
[标]发明人	萧旭		
发明人	萧旭		
IPC分类号	A61B5/00 G01N33/53 G01N33/577 G01N33/68 G01N33/92		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及氧化低密度脂蛋白表面呈现的特异性抗原决定簇的定量检测方法及其试剂盒。本发明公开的定量检测方法包括下列步骤：(a)将抗磷酸胆碱的抗体与含有OxLDL的样品接触；(b)使所述抗体与OxLDL结合；(c)测定所述抗体与OxLDL的结合量；(d)依据以磷酸胆碱为标准品测得的标准曲线，定量OxLDL含量。本发明还公开了检测OxLDL的试剂盒，该试剂盒包含抗磷酸胆碱的抗体。本发明对动脉粥样硬化疾病发生、发展的诊断提供了可靠的参照指标。

