

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.  
G01N 33/53 (2006.01)



## [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200480043176.X

[43] 公开日 2007年5月2日

[11] 公开号 CN 1957255A

[22] 申请日 2004.3.29

[21] 申请号 200480043176.X

[86] 国际申请 PCT/JP2004/004434 2004.3.29

[87] 国际公布 WO2005/093415 日 2005.10.6

[85] 进入国家阶段日期 2006.11.28

[71] 申请人 株式会社芝山羊

地址 日本群馬县

[72] 发明人 小岛正章

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商  
标事务所  
代理人 李华英

权利要求书 2 页 说明书 12 页

### [54] 发明名称

用于测定载脂蛋白 B-48 的方法及其应用

### [57] 摘要

本发明意在提供检测 apo B-48 的方法，该方法包括用可选地含有表面活性剂的 tris 缓冲溶液稀释样本，然后使稀释的样本与抗-apo B-48 单克隆抗体反应而由此检测 apo B-48；本发明还提供了用于该方法中检测 apo B-48 的试剂盒。因此，特别可以精确、快速而便利地检测包含在血液中的 apo B-48。如上所述的 apo B-48 检测方法和/或用于其中的 apo B-48 检测试剂盒可应用于诊断 apo B-48-相关疾病并且评价在高脂血症疗法中的组分和能够升高或降低血 apo B-48 水平的功能食品中的成分的功效。

1. 用于测定 apo B-48 的方法，包括用 tris-缓冲液稀释样品，使稀释的样品与抗-apo B-48 单克隆抗体反应并且测定 apo B-48。

2. 如权利要求 1 中所述用于测定 apo B-48 的方法，包括使所述稀释的样品与所述抗-apo B-48 单克隆抗体反应以便使样品中的 apo B-48 与所述的抗-apo B-48 单克隆抗体缀合；加入抗-apo B-48/apo B-100-生物素-标记的抗体以便抗-apo B-48/apo B-100-生物素-标记的抗体与 apo B-48 缀合；使抗生物素蛋白-缀合的过氧化物酶反应以生成缀合产物，使所得缀合产物与显色底物反应；且然后测定 apo B-48。

3. 如权利要求 1 或 2 中所述用于测定 apo B-48 的方法，其中所述的 tris 缓冲液为 tris、tris-HCl 缓冲液、tris-马来酸盐缓冲液或 Good's 缓冲液。

4. 如权利要求 1-3 中任意一项所述用于测定 apo B-48 的方法，其中将所述稀释的样品进一步与表面活性剂混合。

5. 如权利要求 1-4 中任意一项所述用于测定 apo B-48 的方法，其中所述的表面活性剂为非离子型表面活性剂。

6. 用于测定 apo B-48 的试剂盒，包括 tris-缓冲液和抗-apo B-48 单克隆抗体。

7. 如权利要求 6 中所述的用于测定 apo B-48 的试剂盒，进一步包括抗-apo B-48/apo B-100-生物素-缀合的抗体、抗生物素蛋白-缀合的过氧化物酶和显色底物。

8. 如权利要求 6 或 7 中所述的用于测定 apo B-48 的试剂盒，其中所述的 tris-缓冲液包括 tris、tris-HCl 缓冲液、tris-马来酸盐缓冲液或 Good's 缓冲液。

9. 如权利要求 6-8 中任意一项所述用于测定 apo B-48 的试剂盒，进一步包括表面活性剂。

10. 如权利要求 6-9 中任意一项所述用于测定 apo B-48 的试剂盒，其中所述的表面活性剂为非离子型表面活性剂。

11. 用于测定 apo B-48 的方法，包括通过使用如权利要求 1-5 中任意一项所述用于测定 apo B-48 的方法和/或如权利要求 6-10 中任意一项所述的用于测定 apo B-48 的试剂盒测定样品中的 apo B-48。

12. 用于诊断与 apo B-48 相关疾病的方法，包括通过使用如权利要求 1-5 和 11 中任意一项所述用于测定 apo B-48 的方法和/或如权利要求 6-10 中任意一项所述的用于测定 apo B-48 的试剂盒测定样品中的 apo B-48。

13. 如权利要求 12 中所述的诊断方法，其中所述与 apo B-48 相关的疾病为高脂血症、动脉硬化、心机能不全或猝死。

14. 用于评价治疗高脂血症的药物组分或功能食品中组分的功效的方法，包括使用如权利要求 1-5 和 11 中任意一项所述用于测定 apo B-48 的方法和/或如权利要求 6-10 中任意一项所述的用于测定 apo B-48 的试剂盒。

15. 用于分析疾病的方法，其特征在于使用相同的测定装置测定同样品中的多个项目，通过将如权利要求 1-5 中任意一项所述用于测定 apo B-48 的方法与测定非 apo B-48 的一个或多个项目组合进行。

## 用于测定载脂蛋白 B-48 的方法及其应用

### 技术领域

本发明涉及用于测定载脂蛋白 B-48 的方法及其应用。更具体的说，本发明涉及用于测定载脂蛋白 B-48 的方法和用于测定载脂蛋白 B-48 的试剂盒，以及通过使用它们诊断载脂蛋白 B-48-相关疾病的方法，和通过使用它们评价治疗高脂蛋白血症、增加或减少血液中的载脂蛋白 B-48 的药物组分和功能食品中的组分的功效的方法

### 背景技术

目前，日本人因心脏病和心血管疾病，特别是动脉硬化造成的死亡数量总计排在第二位，仅次于恶性肿瘤（癌症）。因此，从对正在发展中的老龄化社会中的人的健康保健的观点来看，迫切需要通过预防和治疗动脉硬化降低因动脉硬化导致的死亡率百分比。

然而，可以注意到，在目前的情况下，没有建立安全而有效地进行动脉硬化诊断和治疗的方法，使得研发用于诊断和治疗动脉硬化的安全而有效的方法的需求日益迫切。动脉硬化发生的原因尚不统一，并且已清楚的是不同因素和情况彼此相关，包括，但不限于高脂血症、高血压、糖尿病、肥胖、吸烟、遗传和老龄化。在这些因素中，认为高脂血症是最高的风险因素。

高脂血症可能在全身血管中导致动脉硬化发生并且随着动脉硬化的发展在不同器官中引起损伤发生且血流变得恶化。一方面，当动脉硬化在心脏血管（冠状动脉）中发生时，可能导致局部缺血性脑病（即心绞痛和心肌梗死）发生。另一方面，当动脉硬化在脑血管中发生时，可能导致脑血管疾病（例如心脏梗塞）。

高脂血症为血液中的脂质，包括，例如特别是胆固醇和中性脂肪（例如甘油三酯类）以过量存在的状态。胆固醇和甘油三酯类（中性

脂肪)在它们完整时不溶于血液,因为血液中的大部分被水占据。因此,胆固醇和甘油三酯类以由脂蛋白组成的球形颗粒形式溶于血液。脂蛋白由最外层的亲水性磷脂类、游离胆固醇和载脂蛋白以及在中间部分,即芯层中的疏水性胆固醇(大部分为酯类胆固醇)和甘油三酯类(中性脂肪)组成。这些脂质构成了体内的细胞膜并且最初作为类固醇激素等的物质起重要作用。然而,如果脂质,特别是胆固醇和甘油三酯类以过量存在于血液中,那么它们可以导致高脂血症。

如果因高脂血症或其它原因导致动脉硬化发生,那么在由存在于通过身体的血液循环中的胆固醇和甘油三酯类(中性脂肪)组成的脂蛋白中,涉及加速或抑制胆固醇沉积在血管内壁上的各种脂蛋白可能增加或减少。因此,血液中这些脂蛋白的量的精确测定可以有助于诊断和治疗高脂血症和动脉硬化。

然而,本文注意到血液中的脂蛋白为载脂蛋白与血清脂质结合并且它们作为血清脂质的载体起作用的形式。

脂蛋白根据其脂质组成具有不同的密度和粒径且一般根据不同的密度和粒径被分成5个类别,即乳糜微粒(CM)、极低密度脂蛋白(VLDL)、中间密度脂蛋白(IDL)、低密度脂蛋白(LDL)和高密度脂蛋白(HDL)。这些脂蛋白依次具有从较低密度水平到较高密度水平和从较大粒径到较小粒径。还注意到这些脂蛋白由胆固醇和中性脂肪(甘油三酯类: TG)以不同比例组成并且具有较大粒径的颗粒比较小粒径的颗粒含有较大比例的中性脂肪,而具有较小粒径的颗粒比较大颗粒含有较大比例的胆固醇。

在这些脂蛋白中,乳糜微粒(CM)主要由甘油三酯类(中性脂肪)组成并且由来源于小肠中的膳食的甘油三酯类和胆固醇通过小肠合成且分泌入血液。乳糜微粒通过淋巴管分泌入血流,甘油三酯类被脂蛋白脂酶(LPL)分解成具有较小粒径并且富含胆固醇的乳糜微粒残留物(CM-R)。乳糜微粒残留物随后通过载脂蛋白E受体被肝脏吸收。如上所述,乳糜微粒(CM)在将外源性甘油三酯类(来源于膳食)转运入脂肪组织和肌肉并且在同时携带胆固醇达到肝脏的过程中起作用。

极低密度脂蛋白（VLDL）主要由甘油三酯类（中性脂肪）组成并且由肝脏和小肠产生且从其中分泌。然后，极低密度脂蛋白主要将内源性脂质，即由肝细胞合成的内源性甘油三酯类和内源性胆固醇从肝脏转运入血流。尽管部分 VLDL 被直接吸收入组织，但是其大部分使得甘油三酯类被脂蛋白脂酶（LPL）分解成中间密度脂蛋白（IDL = VLDL 残留物）。

中间密度脂蛋白（IDL）随后通过载脂蛋白 E 被吸收入肝脏并且被脂酶分解成低密度脂蛋白（LDL）。

如上所述，低密度脂蛋白（LDL）作为极低密度脂蛋白（VLDL）通过中间密度脂蛋白（IDL）代谢的结果产生。LDL 含有大于任意其它脂蛋白量的胆固醇并且由约 40%的胆固醇组成，该胆固醇主要被提供给肝脏和几乎所有的组织。由于 LDL 的粒径较小，因此它具有易于移动通过动脉壁的特性。不同于在血液中，通过动脉壁的 LDL 变得极可能被氧化成氧化的 LDL，它由此作为导致动脉硬化发生的引发剂起作用。因此，为了预防和治疗动脉硬化，认为减少胆固醇的量并且防止氧化具有显著的重要性。

另一方面，高密度脂蛋白（HDL）主要由小肠和肝脏产生，不过，甚至在乳糜微粒和极低密度脂蛋白（VLDL）通过脂蛋白脂酶的作用分解代谢步骤过程中形成。HDL 在通过采集周围组织细胞中过量的胆固醇和蓄积在动脉壁上的胆固醇并且将它们转运至肝脏而在进行分解代谢中起作用。因此，近来认为 HDL 的量增加可能导致高脂血症改善并且最终预防和治疗动脉硬化。

然而，最近以来，正在变成明显的是在饥饿时测定脂质水平不足以评价动脉硬化的风险度，并且认为需要根据膳食后的脂质水平评价动脉硬化风险度，即评价膳食后的高脂血症。

膳食后增加的脂质为甘油三酯类（TG）。富含 TG 的脂蛋白，即 TG-富含的脂蛋白，包括乳糜微粒（CM）、极低密度脂蛋白（VLDL）和作为来自其中的代谢产物的残留脂蛋白的增加导致高甘油三酯血症发生。在导致高甘油三酯血症的三种脂蛋白中，认为残留脂蛋白对评价

动脉硬化风险度而言是最重要的。

换句话说，含有来源于膳食并且在小肠中产生的富含量的外源性TG的乳糜微粒被脂蛋白脂酶（LPL）分解成CM残留物，此残留物被识别载脂蛋白E的残留物受体吸收并且被肝脏处理。

据报导目前尚无简单、可再现和快速区分在循环中来源于膳食的外源性脂质的缀合物，即乳糜微粒和乳糜微粒残留物，和分泌自肝脏的内源性缀合物，即极低密度脂蛋白（VLDL）和低密度脂蛋白（LDL）之间鉴别的检测方法（Lovegrove, J. A. 等: *Biochim, et Biophys. Acta*, 1301(1996) 221-229）。

然而，在本文中可以注意到，一方面，认为在膳食前后的乳糜微粒（CM）与极低密度脂蛋白（VLDL）之间没有显著性改变，而另一方面，通过脂蛋白脂酶（LPL）作用分解和代谢甘油三酯类形成的为乳糜微粒和极低密度脂蛋白代谢产物的残留脂蛋白，即CM残留物和VLDL残留物在膳食后增加，并且被肝细胞快速吸收和分解等，并且另一方面，对健康人而言它们在饥饿时不再存在于血液中。然而，这些残留脂蛋白的代谢可能因代谢异常、暴食、缺乏锻炼等而变得缓慢下来。目前认为，如果它们在膳食后停留在血液中，那么它们易于被动脉壁上的巨噬细胞吸收，这是导致动脉硬化初始损害的原因。残留的脂蛋白称作残留物样颗粒（RLP）并且还认为它们是与膳食后的高脂血症相关的重要因素。

另一方面，存在作为构成残留物样脂蛋白的蛋白质成分的载脂蛋白（apolipoproteins）（载脂蛋白（apoproteins））。载脂蛋白在通过缀合水不溶性脂质（酯类胆固醇、中性脂肪等）而将脂质以可溶于血液的形式转入血液中具有作用，并且它们还密切地涉及各种脂质的代谢。作为这类载脂蛋白，目前证实了有10种以上的载脂蛋白，包括，但不限于载脂蛋白A-I、载脂蛋白A-II、载脂蛋白B、载脂蛋白C-I、载脂蛋白C-II和载脂蛋白E。

在这些载脂蛋白中，载脂蛋白B进一步被分解成两种载脂蛋白，即载脂蛋白B-100（apoB-100）和载脂蛋白B-48（apoB-48）。一方面，

前者是由肝脏合成的人血浆 VLDL 的主要蛋白质成分并且在其合成和分泌中起重要作用，而另一方面，后者由小肠产生并且涉及乳糜微粒 (CM) 的合成。apoB-100 约占存在于极低密度脂蛋白中的蛋白质的 40% - 60%，并且约占低密度脂蛋白 (LDL) 的 98% (Mahley, R.W. 等: J. (1984) Lipid Res. 25, 1277-1294)。apoB-48 为构成与人血液中的高脂血症极为相关的脂蛋白的蛋白质。因此，apoB-48 的精确测定对诊断和治疗高脂血症和动脉硬化是有用的。

然而，精确区分 apoB-48 与 apoB-100 极为困难，因为 apoB-48 与 apoB-100 的 N-末端氨基酸序列的约 48% 的氨基酸序列相同并且与 apoB-100 具有极高的同源性 (Lovegrove, J.A. 等: 文献同上)。

如上所述，已知这种残留脂蛋白为动脉硬化的风险因素，然而，因为其测定不便利，所以长期以来尚没有实际用于临床检查。迄今为止通常使用的测定 apoB-48 的方法包括根据密度差别分离的超速离心法、根据电荷分离的琼脂糖电泳、根据尺寸差异分离的电泳和通过使用对载脂蛋白的抗体测定脂蛋白的方法等。然而，这些常规方法在实际应用的方面可行性较低，因为，例如它们各自难以测定，它们各自还缺少用于定量试验或它们各自的特异性较低。

因为还极难精确测定残留物类脂蛋白 (RLP)，所以研发了一种方法，它包括将血液中残留物类脂蛋白 (RLP) 的浓度测定为存在于残留物类脂蛋白中的胆固醇浓度，即残留物类颗粒-胆固醇 (RLP-C) 的浓度。

用于测定 RLP-C 的方法为使用对 apoA-I 的单克隆抗体和对 apoB-100 的单克隆抗体的测定方法，该方法包括通过与相应单克隆抗体缀合除去 apoA-I 和 apoB-100 并且测定保留在上清液中非缀合脂蛋白的量作为胆固醇的量。更具体的说，该方法因 CM 和 HDL 与 apoA-1 的单克隆抗体缀合而除去了 apoA-1，因为 apoA-1 作为 CM 和 HDL 的主要载脂蛋白存在，同时，该方法因新生 (野生型) VLDL (或 VLDL-2) 和 LDL 与 apoB-100 的单克隆抗体缀合而能够除去 apoB-100，因为 apoB-100 的单克隆抗体对 apoB-100 的特定氨基酸结构域具有特异性，但它无法

识别具有 apoB-100 的部分氨基酸序列的 apoB-48。因此，该方法可以测定含有 apoB-48 的乳糜微粒和富含 apo-E 的 VLDL。

然而，用于测定 RLP-C 的方法要求通过吸附除去的步骤，使得其工作是繁琐而复杂的，并且需要富有经验的技术人员进行测定操作，因为需要彻底吸附。

如上文所述，apoB-48 作为载脂蛋白被包含在 CM 和 CM 残留物中。因为 CM 在膳食后通过脂蛋白脂酶的作用快速转化成 CM 残留物，所以在饥饿时它不再存在于血液中。如果有可能仅测定包含在 CM 残留物中的 apoB-48 的量，那么认为高脂血症的确切诊断可以变得切实可行并且这可以明显有助于诊断和治疗动脉硬化。

另外，如果能研发一种能特异性识别 apoB-48 自身的 apoB-48 的抗体，则可以认为可以直接仅测定存在于血液中的 CM 残留物的量。

作为这些测定方法之一，报导了使用抗 apoB-48-单克隆抗体的用于定量诊断膳食后的高脂血症的 ELISA 方法 (Kinoshita, M., 等“用于测定含 ApoB-48 的脂蛋白的方法的研发” - Abstracts of The 30th General Convention of the Japan Atherosclerosis Society, 133 页, 1999 年 6 月 11-12 日)。该方法包括制备能够特异性识别 apoB-48 的单克隆抗体 (4C8)，将该单克隆抗体固定在平板上，将用含有 2% SDS 的 PBS 稀释的血清加入到平板中，并且测定含 apoB-48 的脂蛋白。然而，其中披露在 2% SDS 中没有测定出血清中的 apoB-48，并且相反，SDS 抑制免疫反应，使得应用的 SDS 不适合用作使 apoB-48 表位暴露的表面活性剂 (日本专利号 JP3,440,852, col. 8, pp. 7-9)。

作为用于使用 apoB-48 的单克隆抗体测定 apoB-48 的另一种方法，披露了用于测定 apoB-48 和/或含 apoB-48 的脂蛋白的免疫测定方法，其特征在于用选自非离子型表面活性剂和阴离子型表面活性剂的表面活性剂，即脱氧胆酸钠处理样品，或冷冻和融化样品以使 apoB-48 的表位暴露且然后使样品与特异性识别 apoB-48 的单克隆抗体反应，但基本上不与 apoB-100 反应 (日本专利申请公开号 JP2003-270,427A)。

上述专利中披露的方法包括通过用含有不同表面活性剂的 PBS 稀

释血清并且将特异性识别 apoB-48 的单克隆抗体加入到稀释的血清中，来测定暴露的 apoB-48 的 C-末端表位（文献同上，col. 12, II. 30-38）。就使用诸如 Triton™X-100、Triton™X-114、Tween-20™、NP™-40 等这类非离子型表面活性剂的情况而言，可以识别强颜色显色并且测定暴露的 apoB-48 的 C-末端表位，而在不使用表面活性剂的情况下，未观察到颜色显色（文献同上，col. 14, II. 12-26）。

为了研发能够精确测定 apoB-48 的新方法，本发明者已经在测定 apoB-48 的方法的改进方面进行了广泛研究，结果，他们发现了一种测定 apoB-48 的方法，它可以精确测定 apoB-48。本发明正是基于这一发现。

#### 本发明的公开内容

因此，本发明的目的在于提供了用于测定载脂蛋白 B-48 的方法，它不需要使用任何表面活性剂并且包括通过将 apoB-48 的单克隆抗体施加在用 tris-缓冲溶液稀释的样品上来测定 apoB-48。

本发明的目的还在于提供用于测定 apoB-48 的试剂盒，可以将其应用于上述按照本发明测定 apoB-48 的方法中。

本发明在其优选的实施方案中的目的在于提供测定 apoB-48 的方法和测定 apoB-48 的试剂盒，其进一步包括各使用表面活性剂。

进一步地，本发明的目的在于提供用于诊断和治疗与 apoB-48 相关的各种疾病的方法，通过使用本发明用于测定 apoB-48 的方法和试剂盒并且精确、快速和便利地测定 apoB-48 来进行。

此外，本发明的另一个目的在于提供评价用于治疗高脂血症的药物组分和功能食品组分的功效的方法，这通过使用本发明的试剂盒来进行。

#### 本发明的最佳实施方式

本发明用于测定 apo B-48 的方法包括通过使用 apoB-48 的单克隆抗体测定用 tris-缓冲溶液稀释的样品稀释液中的 apoB-48。

作为将用于本发明的 apoB-48 的单克隆抗体，可以使用任意可以特异性识别来自其 C-末端的 apoB-48 的部分氨基酸序列的抗-apoB-48 单克隆抗体，并且它们可以包括，但不限于如上所述的抗-apoB-48 单克隆抗体（4C8）。可以通过本领域中公知的常规方法制备这类单克隆抗体。

作为将用于本发明的 tris-缓冲溶液，可以使用任意一种，只要它可以实现本发明的目的，并且可以包括，但不限于 tris(2-氨基-2-羟甲基-1,3-丙二醇-tris)、tris-HCl 缓冲液 [tris(羟甲基)氨基甲烷盐酸盐 (pH 7.2-9.0)]，和 tris-马来酸盐缓冲液 [tris(羟甲基)氨基甲烷马来酸盐 (pH 5.2-8.6)]。可以将本文使用的 tris-缓冲液分类为 Good's 缓冲液，并且还可以包括，但不限于 MES、Bis-tris、ADA、Bis-tris 丙烷、PIPES、ACES、MOPSO、氯化胆胺、BES、MOPS、TES、HEPES、DIPSO、TAPSO、POPSO、HEPPSO、HEPPS (EPPS)、曲辛 (Tricin)、N,N-二(羟乙基)甘氨酸和甘氨酸酰胺。

用于本发明的 tris-缓冲溶液的浓度可以随种类等的不同适当改变，并且例如，就 tris-HCl 缓冲溶液而言，可以在在 10mM - 0.5M 的范围。

就本发明用于测定 apoB-48 的方法而言，并不需要使用表面活性剂，不过，如果需要，也可以添加表面活性剂。这类表面活性剂包括，但不限于 Triton<sup>TM</sup>X-100、Triton<sup>TM</sup>X-114、Tween-20<sup>TM</sup>和 NP-40<sup>TM</sup>。这些表面活性剂可以单独使用或彼此联用。

表面活性剂用于使能够暴露脂蛋白的表位，但它一般抑制免疫反应。然而，为了取得脂蛋白表位暴露与抑制免疫反应作用之间的平衡，可以适当选择表面活性剂的浓度。在进行样品与单克隆抗体的免疫反应时，可以使用浓度一般在 0.01% - 2%，优选 0.02% - 0.5% 的溶液形式的表面活性剂。尽管并没有对表面活性剂的处理温度和时间进行限定，但是温度一般可以在 4°C - 40°C 的范围并且时间范围一般可以在约 5 分钟 - 48 小时的范围。

就本发明而言，可以通过重复冷冻和融化样品的步骤，以便冷冻

和融化样品的步骤得以反复进行,优选一次以上来暴露脂蛋白的表位。

在下文中更详细地描述本发明用于测定 apoB-48 的方法。然而,应当理解下列描述并非在任何方面来限定本发明的范围,而其目的在于以更具体的方式解释本发明。因此,并不将本发明理解为以任何方式受到如下描述的限制。

例如,本发明用于测定 apo B-48 的方法包括用 tris-缓冲溶液稀释样品,将稀释的样品加入到平板上,其上固定有抗-apo B-48 单克隆抗体(4C8)的纯化 IgG 产物,以使包含在样品中的 apoB-48 与之缀合,使标记的抗-apo B-48/apo B-100-生物素-标记的抗体,且然后使抗生物素蛋白-缀合的辣根过氧化物酶(HRP)与 apoB-48 缀合,并且通过 ELISA 测定法测定 apo B-48。

在本发明用于测定 apoB-48 的方法中,首先,通过将例如 0.1M tris-HCl 缓冲液(pH 7.8)加入到血清中作为样品制备血清样品且然后将该血清样品加入到 96-孔平板上,其上固定有抗-apo B-48 单克隆抗体(4C8) IgG,随后使血清样品与单克隆抗体反应预定时间期限,以便使血清样品中的 apoB-48 与抗-apo B-48 单克隆抗体(4C8)缀合。此后,加入抗-apo B-48/B-100-生物素-标记的抗体并且反应预定的时间期限以便缀合上述标记的抗体。然后使标记的抗体与抗生物素蛋白-缀合的过氧化物酶,诸如抗生物素蛋白-缀合的 HRP 等反应以便缀合标记的抗体,随后与显色底物,诸如四甲基联苯胺(TMB)等反应并且用反应终止剂,诸如硫酸等终止反应。然后在 450nm 处检测样品的吸收度。

优选通过免疫测定法(使用抗原-抗体反应原理的方法),诸如 ELISA 等进行本发明用于测定 apoB-48 的方法,不过,也可以使用其它免疫测定法。例如,可以将该方法应用于未标记的沉降法(浊度测定(turbimetric)分析、散射浊度分析等)、固定化法(胶乳法、表面细胞质基因组共振法、石英晶体振荡法等)、标记的测定法(放射性免疫测定法、酶联免疫测定法、发光免疫测定法、荧光免疫测定法、金属标记的免疫测定法等)。

本发明在另一个实施方案中为用于测定 apoB-48 的试剂盒,它包

括：抗-apo B-48 单克隆抗体，该抗体包括，但不限于 apo B-48 单克隆抗体 (4CB)；tris-缓冲溶液，包括，但不限于 tris-HCl 缓冲溶液；apo B-48/apo B-100-生物素-标记的抗体；抗生物素蛋白-缀合的过氧化物酶，包括但不限于抗生物素-缀合的辣根过氧化物酶 (HRP)；显色底物，包括，但不限于四甲基联苯胺 (TMB)；和反应终止剂，包括，但不限于硫酸。作为抗-apo B-48 单克隆抗体可以使用固定在 96-孔平板上的抗-apo B-48-单克隆抗体 (4C8) IgG。

通过实施例将更具体地描述本发明。一方面，应当理解本发明并不限于下列实施例，而另一方面，下列实施例作为描述不以任何方式来限定本发明并且描述它们的目的仅在于具体解释本发明。

### 具体实施方式

#### 实施例 1:

使用向其中加入了 0.1M tris-HCl (pH 7.8) 的血清作为待测定的样品。用洗涤缓冲溶液将其上固定有抗-apo B-48 单克隆抗体 (4C8) IgG 的 96-孔平板洗涤 3 次。向平板中加入 50 $\mu$ l/孔的 apo B-48 标准制品 (160ng/ml-2.5ng/ml) 并且测定 50 $\mu$ l/孔的测定样品。然后使所得平板在室温下反应 1 小时并且使样品中的 apo B-48 缀合 apo B-48 单克隆抗体 (4C8)，随后用洗涤缓冲溶液将平板洗涤 3 次。此后，将 50 $\mu$ l/孔的反应产物与一定比例的 50 $\mu$ l/孔的抗-apo B-48/apo B-100-生物素-标记的抗体混合并且在室温下反应 1 小时以缀合标记的抗体，随后用洗涤缓冲液将所得反应混合物洗涤 3 次。然后向 50 $\mu$ l/孔的反应产物中加入 50 $\mu$ l/孔的抗生物素蛋白-缀合的 HRP 以使抗生物素蛋白-缀合的 HRP 与标记的抗体缀合，并且加入 50 $\mu$ l/孔的四甲基联苯胺 (TMB) 且使所得混合物在室温下反应 30 分钟，随后添加 50 $\mu$ l/孔用量的 1M 硫酸以终止反应并且在 450nm 处测定吸收度。结果如表 1 中所示。

#### 实施例 2:

通过向血清中添加含有 0.1% Triton<sup>TM</sup>X-100 的 1M tris-HCl 溶液

(pH 7.8) 制备待测定的血清样品。用洗涤缓冲溶液单独将用于固定抗-apo B-48 单克隆抗体 (4CB) IgG 的 96-孔平板洗涤 3 次并且在平板的各孔上固定 50 $\mu$ l/孔的 apo B-48 标准产品(160ng/ml-2.5ng/ml)。向各孔中加入 50 $\mu$ l 待测定的血清样品。使平板在室温下反应 1 小时以使样品中的 apo B-48 缀合抗-apo B-48 单克隆抗体 (4C8)，随后用洗涤缓冲溶液将平板的各孔洗涤 3 次。向 50 $\mu$ l/孔的反应产物中加入 50 $\mu$ l/孔的抗-apo B-48/apo B-100-生物素-标记的抗体，且然后使反应产物在室温下反应 1 小时以使反应产物缀合标记的抗体，此后，用洗涤缓冲溶液将所得缀合物洗涤 3 次，随后向各孔中添加 50 $\mu$ l/孔的抗生物素蛋白-缀合的 HRP 并且使所得混合物在室温下反应 1 小时以便缀合标记的抗体。然后向各孔中添加 50 $\mu$ l/孔的四甲基联苯胺 (TMB) 且使所得混合物在室温下反应 1 小时。然后向各孔中添加 50 $\mu$ l 的 1M 硫酸以终止反应并且在 520nm 处测定吸收度。测定结果如表 1 中所示。

表 1:

缓冲液	0.1%1M Tris-HCl (pH 7.8)	含有 0.1%Triton <sup>TM</sup> X-100 的 0.1M tris-HCl (pH 7.8)
平均值	1.64 $\mu$ g/ml	1.70 $\mu$ g/ml

### 实施例 3: 试剂盒

本发明另一个实施方案的用于测定 apoB-48 的试剂盒包括下列成分:

其上固定有抗-apo B-48 单克隆抗体 (4C8) IgG 的 96-孔平板;  
apo B-48 标准产品 (用于制备校准线的抗原);  
tris-HCl 缓冲溶液;  
抗-apoB-48/apoB-100-生物素-标记的抗体;  
抗生物素蛋白-缀合辣根过氧化物酶 (HRP);  
四甲基联苯胺 (TMB);  
硫酸; 和  
浓缩和洗涤溶液。

#### 实施例 4:

基本上与实施例 1 中相同的方式测定饥饿时健康人的 apoB-48 的量。测定结果如表 2 中所示。

表 2:

	apoB-48 ( $\mu\text{g/ml}$ )
平均值	4.56

#### 实施例 5:

基本上与实施例 1 中相同的方式测定猝死人的 apoB-48 的量。测定结果如表 3 中所示。

表 3:

	apoB-48 ( $\mu\text{g/ml}$ )
平均值	17.60

#### 实施例 6:

基本上与实施例 1 中相同的方式测定患有急性心肌梗死的人的血样中 apoB-48 的量。测定结果如表 4 中所示。

表 4:

	apoB-48 ( $\mu\text{g/ml}$ )
平均值	30.97

#### 工业实用性

本发明用于测定 apoB-48 的方法可以如此精确、快速和便利地测定样品中的 apoB-48，它可用于诊断和治疗诸如高脂血症和动脉硬化这类疾病。本发明的方法可以精确和确定地测定血液中的 apoB-48，从而足以检查与冠状动脉相关的疾病并且进一步有助于预防猝死。

此外，本发明还可应用于通过测定血液中 apoB-48 的增加或减少而评价用于治疗高脂血症的药物组分和功能食品中的组分的功效。

专利名称(译)	用于测定载脂蛋白B - 48的方法及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN1957255A</a>	公开(公告)日	2007-05-02
申请号	CN200480043176.X	申请日	2004-03-29
[标]发明人	小岛正章		
发明人	小岛正章		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/92		
CPC分类号	G01N33/92		
代理人(译)	李华英		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明意在提供检测apo B - 48的方法，该方法包括用可选地含有表面活性剂的tris缓冲溶液稀释样本，然后使稀释的样本与抗 - apo B - 48单克隆抗体反应而由此检测apo B - 48；本发明还提供了用于该方法中检测apo B - 48的试剂盒。因此，特别可以精确、快速而便利地检测包含在血液中的apo B - 48。如上所述的apo B - 48检测方法和/或用于其中的apo B - 48检测试剂盒可应用于诊断apo B - 48 - 相关疾病并且评价在高脂血症疗法中的组分和能够升高或降低血apo B - 48水平的功能食品中的成分的功效。

	apoB-48 (µg/ml)
值	30.97