

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/53

G01N 33/535

G01N 33/573

G01N 33/558



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03151292.5

[43] 公开日 2005 年 4 月 6 日

[11] 公开号 CN 1603824A

[22] 申请日 2003.9.29 [21] 申请号 03151292.5

[71] 申请人 杜凤鸣

地址 200433 上海市安波路 985 弄 4 号 402

[72] 发明人 杜凤鸣

[74] 专利代理机构 上海新天专利代理有限公司

代理人 王 巍

权利要求书 6 页 说明书 18 页

[54] 发明名称 人尿中 Apo AI 蛋白定量酶联免疫吸附试验试剂盒及制备方法

[57] 摘要

本发明涉及生物技术产品技术领域。本发明公开了一种人尿中 Apo AI 含量酶联免疫吸附试验试剂盒及制备方法。本发明的试剂盒经临床试验结果表明能判断肾病患者的病情轻重以及预后和糖尿病的病情。方法简便快速，特异性强，灵敏度高，有较好的临床应用价值。

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

Tween-20 化学纯
邻苯二胺 化学纯
H₂SO₄ A. R

人 Apolipoprotein AI 标准品及免疫源(SigMA)

蒸馏水必需符合《中国药典》(1990)之规定

二、Apo AI 多克隆抗体 IgG 的制备和亲和层析纯化

首先用人 Apo AI(SigMA)溶于 0.01M PH7.4 磷酸缓冲液中,加等量的福氏完全佐剂乳化后,给新西兰大白兔,颈背部多点及脚垫内注射 2.0mg,为基础免疫,每两周加强一次,共免疫 6 次,最后一次免疫后 8-10 天抽血测试效价,效价满意者,由心脏抽血收集抗血清,抗血清再经硫酸铵两次盐析,50%及 33%饱和 (NH₄)₂SO₄分步沉淀纯化后,再用 Sepharose 4B 亲和层析纯化,用高压液相色谱(HPLC)测纯度为单一峰,纯度高达 96%以上的兔抗人 Apo AI 抗体 IgG,简称 Apo AI 抗体 IgG;

三、辣根过氧化物酶(HRP)与 Apo AI 抗体 IgG 偶联

经纯化所得的兔抗人 Apo AI 抗体 IgG 与辣根过氧化物酶用改良的过碘酸钠法交联获得“酶标抗体 IgG”,试剂配制和操作步骤如下:

1. 过碘酸钠标记法试剂

- (1) 0.06M NaIO₄, 0.13 克 NaIO₄, 加水至 10ml
- (2) 0.16M 乙二醇溶液 0.1ml 加水至 10ml
- (3) NaBH₄, 5mg/ml, NaBH₄ 5mg 加水至 1ml
- (4) 0.05M PH9.5 碳酸盐缓冲液

甲液: 无水碳酸钠 10.6 克加水至 500ml

乙液: 无水碳酸氢钠 16.8 克加水至 1000ml

取甲液 16ml+乙液 34ml, 加水至 200ml

- (5) 0.02M PH 7.4 PBS, 用 0.1M PH7.4 PBS 稀释

2. 过碘酸标记法的操作步骤

7.5mg HRP+0.5ml 蒸馏水溶解

↓

加 0.06M NaIO₄ 0.5ml, 混合后置 4℃, 30 分钟

↓

加 0.16M 乙二醇 0.5ml 室温 30 分钟

↓

加兔抗人载脂蛋白抗体 Apo AI IgG 0.5ml
(约含 Apo AI 抗体 IgG 7mg), 混合后装透析袋, 用 0.05M, PH9.6
碳酸缓冲液透析过液

↓

次日吸出透析物, 加 NaBH₄ 溶液 0.2ml (5mg/ml) 置冰箱 2 小时

↓

吸出上述结合物混合液, 加入等体积饱和硫酸铵, 冰箱 4℃ 30'
后, 离心 4000 转/分×15 分钟弃上清, 沉淀溶于 1ml PH7.4 0.02M PBS
中透析过液, 换液三次, 每次 1000ml

↓

次日, 再离心除去不溶物即得“酶标抗体 IgG”, 分装于安瓿中
密封后, 置-40℃保存

四、最佳酶标记 Apo AI 抗体 IgG 工作浓度的选择

用方阵滴定法, 选择最佳酶标记 Apo AI 抗体 IgG 工作浓度为 1:
2000 稀释 (其阳性 OD 值/阴性 OD 值的 P/N 值最大为 9.48);

五、最佳 Apo AI 抗体 IgG 包被量选择

用方阵滴定法, 选择最佳 Apo AI 抗体 IgG 包被浓度为 20 μg/ml
(其阳性 OD 值/阴性 OD 值的 P/N 值为最大为 9.17);

六、Apo AI 酶联免疫吸附试验 ELISA 双抗体夹心法的一步法和
二步法操作步骤如下:

(一)二步法:

尿样: 原液

包被稀释液: Na₂CO₃ 0.16 克, NaHCO₃ 2.9 克, NaN₃ 0.02 克, 加
水至 100ml 成为 PH9.6 碳酸盐缓冲液

样品稀释液: NaCl 8 克, KH₂PO₄ 0.2 克, Na₂HPO₄ 2.9 克, KCL 0.2
克, Tween-20 0.5ml, NaN₃ 0.2 克, 加水至 1000ml, 用前每 100ml
加 10ml 小牛血清成为 PH7.4 PBS-Tween 20 样品稀释液

洗涤液: Tris 2.42g, 1N HCL 13ml, Tween-20 0.5ml 加水至 1000ml
成为 PH7.4 0.02M Tris-Tween 20 洗涤液

基质液: 0.1M Na_2HPO_4 5.14ml, 3.6 克 Na_2HPO_4 加水 100ml, 0.05M
柠檬酸 4.86ml, 1 克柠檬酸加水 100ml 邻苯二胺 4mg, 3% H_2O_2 0.05ml
成为基质液

双抗体夹心法操作程序:

0.1ml 抗体 Apo AI IgG 包被 (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ IgG 4 $^\circ\text{C}$ 过夜)

↓ 洗涤

0.1ml 样品 (0.1ml 尿原液) (37 $^\circ\text{C}$ 2 小时)

0.1ml 载脂蛋白标准液 Apo AI 标准品 (SigMA 进口) 0-2500ng/ml

↓ 洗涤

0.1ml 酶标抗体 IgG (1:2000) (37 $^\circ\text{C}$ 2 小时)

↓ 洗涤

0.1ml 基质液 (邻苯二胺 4mg 溶于 10ml)

柠檬酸磷酸氢 (37 $^\circ\text{C}$ 10 分钟)

二钠缓冲液加 3% H_2O_2 0.05ml

↓

0.05ml 3M H_2SO_4 终止反应

↓

450nm 测 OD Multiskan MK3 酶免测定仪

↓

计算含量;

(二) 一步法: 尿原液及标准品加完后, 立即加 Apo AI 抗体
IgG-HRP, 其余步骤完全同二步法, 二步法比一步法 OD 值稍有增加;

七、抗体 IgG 的鉴定

经两次盐析纯化的 Apo AI 抗体 IgG, 经长海医院实验诊断科血
清室用免疫电泳鉴定结果;

八、标准曲线的制备

倍比稀释的 Apo AI, SigMA 进口标准液, 作双抗体夹心法 ELISA
测定, 分别绘出标准曲线图, 曲线呈“S”型, 灵敏度良好, Apo AI

蛋白质(Apo AI-P) 最低检测量约为 80ng, 标准曲线测定 Apo AI-P 含量范围为 80-1000ng/ml;

九、精密度试验

为了明确和证明本研究的载脂蛋白 Apo AI ELISA 的精密度, 作了批内、批间和各医院实验室间重复性试验;

批内及批间实验, 用混合血清分别作 Apo AI 批内测定, 结果见表 12, 用混合血清作 Apo AI-蛋白质 (Apo AI-P) 批间含量测定, 结果见表 13, 所得变异系数 CV%;

表 12 ELISA 法测血中载脂蛋白之批内实验

类别	稀释倍数	n	X(g/L)	SD	CV%
Apo B ₁₀₀	1:2000	30	0.80	0.05	7.0
	1:4000	30	0.82	0.05	6.6
Apo AI	1:2000	30	0.29	0.03	5.0
	1:4000	30	0.25	0.02	10

表 13 ELISA 法测定血中载脂蛋白之批间实验

类别	稀释倍数	n	X(g/L)	SD	CV%
Apo B ₁₀₀	1:2000	45	0.70	0.04	8.6
Apo AI	1:2000	30	0.22	0.02	9.0

十、特异性检定

取正常人尿液 11 份, 分别加入 IgA、IgM、IgG、C3、 β 2m、 α 巨球蛋白、转铁蛋白、白蛋白、纤维蛋白降解产物 (FDP) Apo B₁₀₀ 及 Apo AI 各 1000ng/ml, 用本试剂盒检测, 只查出 Apo AI 960ng/ml, 回收高达 96%;

十一、灵敏度 (最低检出量) 试验

Apo AI 标准曲线直线范围在 80-1000ng/ml 尿之间, 本试剂盒灵敏度 (最低检出量) 为 80ng/ml 尿;

十二、稳定性试验将 Apo AI 试剂盒放置 37°C 0、1、2、3、4、5 天分别查同一尿样 (4°C 保存) 活性下降很少。

3. 一种如权利要求1所述的一种人尿中 Apo AI 定量酶联免疫吸附试剂盒的 Apo 定量实验方法及其主要试剂：(1)Apo AI 标准品 (0-2500ng/ml)；(2)Apo AI 抗体 IgG；(3)酶标记 Apo AI 抗体 IgG；在人尿中的使用。
4. 一种如权利要求1所述的一种人尿中 Apo AI 定量酶联免疫吸附试剂盒的 Apo AI 标准品，在人尿中 Apo AI 定量标准品使用。
5. 一种如权利要求1所述的一种人尿中 Apo AI 定量酶联免疫吸附试剂盒的 Apo AI 抗体 IgG 及酶标记 Apo AI 抗体 IgG,用于人尿中 Apo AI 定量的检测。
6. 一种如权利要求2所述的一种人尿中 Apo AI 定量酶联免疫试剂盒的制备方法的11种蛋白质 (IgA、IgM、IgG、C₃、B₂M、 α 巨球蛋白、转铁蛋白、白蛋白、FDP、Apo AI、Apo B₁₀₀) 用于人尿中特异性 Apo AI 的检定。

人尿中 Apo AI 蛋白定量酶联免疫吸附试验试剂盒及制备方法

技术领域

本发明涉及生物技术产品，具体涉及一种人尿中 Apo AI (Apo lipoprotein AI Apo AI) 定量的酶联免疫吸附试验试剂盒及制备方法。

背景技术

目前对肾脏病人及糖尿病患者各种蛋白质的检测项目日益增多，但尿中 Apo AI 定量的测定至今未见报道。

发明内容

本发明所要解决的技术问题在于克服以往检测方法的不足之处，研制一种尿中 Apo AI 定量的高灵敏度和高特异性的诊断试剂盒。

本发明提供了一种 Apo AI 含量酶免试剂盒，该试剂盒是 Apo AI 纯品为标准品，用 Apo AI 抗体 IgG 包被，Apo AI 抗体 IgG 联接辣根过氧化物酶为检测抗体的 Apo AI 定量的一步及二步夹心法，检测人尿中的 Apo AI 含量。并由下列试剂组成：

- (1) Apo AI 标准品 (2500、1250、625、56、10、0ng/ml) 各 1 瓶
- (2) Apo AI 抗体 IgG 预包被板 1 块，(48T/96T)
- (3) Apo AI 抗体 IgG 酶标记液 1 瓶
- (4) 浓缩洗涤液 1 瓶
- (5) 底物液冲液甲、乙各 1 瓶
- (6) 终止液 1 瓶

本发明的另一所要解决的技术问题是提供了上述尿中 Apo AI 定

量的 ELISA 试剂盒的制备方法，该方法包括下列步骤：

一、原料料及其规格

正常人血清

动物：新西兰大白兔，健康雄性，体重 2~3kg

酶联免疫测定仪：Labosystems Dragon Multiskan MK3

UV754 分光光度计

旋涡混合器，XW-80 型

PHS-20 型精密酸度计

电泳仪(上海)

酶标板，华东理工大学 ELISA 测定 CV%(<10%

辣根过氧化物酶(RZ3.0, SigMA)

NaIO₄ A. R(进口分装)

NaBH₄ A. R(进口分装)

其他试剂

Na₂HPO₄·12H₂O A. R

柠檬酸 A. R

NaCl A. R

甘油 化学纯

H₂O₂ A. R

Tween-20 化学纯

邻苯二胺 化学纯

H₂SO₄ A. R

人 Apolipoprotein AI 标准品及免疫源(SigMA)

蒸馏水必需符合《中国药典》(1990)之规定

二、Apo AI 多克隆抗体 IgG 的制备和亲和层析纯化

首先用人 Apo AI(SigMA)溶于 0.01M PH7.4 磷酸缓冲液中，加等量的福氏完全佐剂乳化后，给新西兰大白兔，颈背部多点及脚垫内注射 2.0mg，为基础免疫。每两周加强一次，共免疫 6 次。最后一次免疫后 8-10 天抽血测试效价，效价满意者由心脏抽血收集抗血清，抗血清再经硫酸铵两次盐析，50%及 33%饱和(NH₄)₂SO₄ 分步沉淀纯化后，

再用 Sepharose 4B 亲和层析纯化，用高压液相色谱 (HPLC) 测纯度为单一峰，纯度高达 96% 以上的兔抗人 Apo AI 抗体 IgG (简称 Apo AI 抗体 IgG)。

三、辣根过氧化物酶 (HRP) 与 Apo AI 抗体 IgG 偶联

经纯化所得的兔抗人 Apo AI 抗体 IgG 与辣根过氧化物酶用改良的过碘酸钠法交联获得“酶标抗体 IgG”。试剂配制和操作步骤如下：

1. 过碘酸钠标记法试剂

(1) 0.06M NaIO₄ (0.13 克 NaIO₄, 加水至 10ml)

(2) 0.16M 乙二醇溶液 0.1ml 加水至 10ml

(3) NaBH₄ (5mg/ml, NaBH₄ 5mg 加水至 1ml)

(4) 0.05M PH9.5 碳酸盐缓冲液

甲液：无水碳酸钠 10.6 克加水至 500ml

乙液：无水碳酸氢钠 16.8 克加水至 1000ml

取甲液 16ml + 乙液 34ml, 加水至 200ml

(5) 0.02M PH7.4 PBS (用 0.1M PH7.4 PBS 稀释)

2. 过碘酸标记法的操作步骤

7.5mg HRP + 0.5ml 蒸馏水溶解

↓

加 0.06M NaIO₄ 0.5ml, 混合后置 4°C, 30 分钟

↓

加 0.16M 乙二醇 0.5ml 室温 30 分钟

↓

加兔抗人载脂蛋白抗体 Apo AI IgG 0.5ml

(约含 Apo AI 抗体 IgG 7mg), 混合后装透析袋, 用 0.05M, PH9.6 碳酸缓冲液透析过夜

↓

次日吸出透析物, 加 NaBH₄ 溶液 0.2ml (5mg/ml) 置冰箱 2 小时

↓

吸出上述结合物混合液, 加入等体积饱和硫酸铵, 冰箱 4°C 30' 后, 离心 4000 转/分 × 15 分钟弃上清, 沉淀溶于 1ml PH7.4 0.02M PBS

中透析过液，换液三次，每次 1000ml

↓

次日，再离心除去不溶物即得“酶标抗体 IgG”，分装于安瓿中密封后，置-40℃保存

四、最佳酶标记 Apo AI 抗体 IgG 工作浓度的选择

用方阵滴定法，选择最佳酶标记 Apo AI 抗体 IgG 工作浓度如下表 1。

表 1 酶标记 Apo AI 抗体 IgG 最佳工作浓度

A ₄₅₀	Apo AI 抗体 IgG—HRP 浓度				
	1:500	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000
样本					
阳性尿 1	1.215	1.184	1.021	0.844	0.620
阳性尿 2	1.043	0.976	0.893	0.713	0.478
正常人尿 3	0.135	0.127	0.106	0.097	0.085
正常人尿 4	0.128	0.114	0.096	0.090	0.072
P/N 值	8.55	8.92	9.48	8.59	7.42

测定结果为以 1:2000 稀释的 Apo AI 抗体 IgG—HRP 作为工作浓度实验结果最好。

五、最佳 Apo AI 抗体 IgG 包被量的选择

用方阵滴定法选择最佳 Apo AI 抗体 IgG 包被量结果如下表 2。

表 2 Apo AI 包被浓度

A ₄₅₀	Apo AI 抗体 IgG 包被浓度 (μg/ml)					
	80	40	20	15	10	5
样本						
阳性尿 1	1.346	1.274	1.126	0.820	0.710	0.524
阳性尿 2	0.963	0.761	0.671	0.499	0.367	0.300
正常人尿 3	0.137	0.128	0.105	0.086	0.082	0.071
正常人尿 4	0.120	0.103	0.090	0.077	0.068	0.059
P/N 值	8.95	8.77	9.17	8.04	7.18	6.34

包被浓度越高，阳性孔显色越深，但随之阴性显色也越深，P/N 值反而会越低，但包被浓度过低时，阳性孔显色明显减弱，而阴性孔

显色下降不明显，此时 P/N 值也低，通过实验滴定，Apo AI 抗体 IgG 最佳包被浓度是 $20 \mu\text{g/ml}$ 。

六、载脂蛋白 Apo AI 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 双抗体夹心法的一步法及二步法操作步骤如下：

(一) 二步法：

尿样：原液

包被稀释液： Na_2CO_3 0.16 克， NaHCO_3 2.9 克， NaN_3 0.02 克，加水至 100ml 成为 PH9.6 碳酸盐缓冲液。

样品稀释液： NaCl 8 克， KH_2PO_4 0.2 克， Na_2HPO_4 2.9 克， KCl 0.2 克，Tween-20 0.5ml， NaN_3 0.2 克，加水至 1000ml，用前每 100ml 加 10ml 小牛血清成为 PH7.4 PBS-Tween20 样品稀释液。

洗涤液： Tris 2.42g，1N HCL 13ml，Tween-20 0.5ml 加水至 1000ml 成为 PH7.4 0.02M Tween 20 洗涤液。

基质液：0.1M Na_2HPO_4 5.14ml (3.6 克 Na_2HPO_4 加水 100ml)，0.05M 柠檬酸 4.86ml (1 克柠檬酸加水 100ml) 邻苯二胺 4mg，3% H_2O_2 0.05ml 成为基质液。

双抗体夹心法操作程序：

0.1ml 抗体 Apo AI IgG 包被 ($20 \mu\text{g/ml}$ IgG 4°C 过夜)

↓ 洗涤

0.1ml 样品 (0.1ml 尿原液) (37°C 2 小时)

0.1ml 载脂蛋白标准液 Apo AI 标准品 (SigMA 进口) 0-2500ng/ml

↓ 洗涤

0.1ml 酶标抗体 IgG (1:2000) (37°C 2 小时)

↓ 洗涤

0.1ml 基质液 (邻苯二胺 4mg 溶于 10ml)

柠檬酸磷酸氢 (37°C 10 分钟)

二钠缓冲液加 3% H_2O_2 0.05ml

↓

0.05ml 3M H_2SO_4 终止反应

↓

450nm 测 OD Multiskan MK3 酶免测定仪



计算含量

(二)一步法:尿原液及标准品加完后,立即加Apo AI抗体 IgG-HRP,其余步骤完全同二步法。二步法比一步法 OD 值稍有增加。

七、抗体 IgG 的鉴定

经两次盐析纯化的 Apo AI 抗体 IgG,经长海医院实验诊断科血清室用免疫电泳鉴定结果, Apo AI 为单一沉淀线。

八、标准曲线的制备

倍比稀释的 Apo AI (Sigma 进口)标准液,作双抗体夹心法 ELISA 测定,分别绘出标准曲线图。曲线呈“S”型,灵敏度良好, Apo AI-蛋白质(Apo AI-P)最低检测量约为 80ng。标准曲线测定 Apo AI 含量范围为 80-1000ng/ml。在 ELISA 双抗夹心法的酶标板上的标准曲线的梯度浓度良好。

九、精密度试验

为了明确和证明本研究的载脂蛋白(Apo AI)ELISA 的精密度,作了批内、批间和各医院实验室间重复性试验。

批内及批间实验,用混合血清分别作 Apo AI 批内测定,结果见表 3。用混合血清作 Apo AI 批间含量测定,结果见表 4。所得变异系数(CV%),说明本法重复性良好。

表 3 ELISA 法测血中载脂蛋白之批内实验

类别	稀释倍数	n	X(g/L)	SD	CV%
Apo B ₁₀₀	1:2000	30	0.80	0.05	7.0
	1:4000	30	0.82	0.05	6.6
Apo AI	1:2000	30	0.29	0.03	5.0
	1:4000	30	0.25	0.02	10

表4 ELISA法测定血中载脂蛋白之批间实验

类别	稀释倍数	n	X(g/L)	SD	CV%
Apo B ₁₀₀	1:2000	45	0.70	0.04	8.6
Apo AI	1:2000	30	0.22	0.02	9.0

十、特异性检定

正常人尿液 11 份，分别加入 IgA、IgM、IgG、C3、 β 2M、 α 巨球蛋白、转铁蛋白、白蛋白、纤维蛋白降解产物 (FDP)、Apo B₁₀₀ 及 Apo AI 各 1000ng/ml 尿，用 Apo AI 试剂盒检测只测出 Apo AI 的结果见表 5:

表5 正常人尿中加不同蛋白的检出量

蛋白种类	正常人尿中各蛋白的加入量	检测结果	回收率
IgA	1000ng/ml 尿	阴性	0
IgM	1000ng/ml 尿	阴性	0
IgG	1000ng/ml 尿	阴性	0
C3	1000ng/ml 尿	阴性	0
β 2M	1000ng/ml 尿	阴性	0
α 巨球蛋白	1000ng/ml 尿	阴性	0
转铁蛋白	1000ng/ml 尿	阴性	0
白蛋白	1000ng/ml 尿	阴性	0
FDP	1000ng/ml 尿	阴性	0
Apo B ₁₀₀	1000ng/ml 尿	阴性	0
Apo AI	1000ng/ml 尿	960ng/ml 尿	96%

以上试验说明本 ELISA 试剂盒具有 Apo AI 的特异性。

十一、灵敏度(最低检出量)试验:

根据本 ELISA 法 Apo AI 标准曲线的制定，其检测范围的直线范围在 80-1000ng/ml 尿之间，因此，本法的灵敏度(最低检出量)为 80ng/ml 尿。

十二、稳定性试验

将 Apo AI ELISA 试剂盒放置 37℃ 0、1、2、3、4、5 天，每天分别测定同一阳性尿样，活性下降很少，说明本试剂盒稳定性好，结果见表。

表 6 Apo AI 试剂盒稳定性试验

年月日 A_{450nm}	2001.5.10	2001.5.11	2001.5.12	2001.5.13	2001.5.14
阳性尿	0.912	0.908	0.901	0.890	0.880

注：阳性尿液在 4℃ 冰箱放置 5 天。

上海长海医院肾内科用本发明试剂盒进行尿载脂蛋白 Apo AI 测定的试验：

目前对肾脏病人尿中各种蛋白质的检测项目日益增多，而尿载脂蛋白测定至今未见报道。本文测定 65 例各种慢性肾脏病患者尿中载脂蛋白 Apo AI 和载脂蛋白 Apo B₁₀₀。并对其临床意义进行初步探讨。

检测对象均为各种慢性肾脏病患者，其中原发性肾病综合症(肾病)25 例(I 型 12 例, II 型 13 例);慢性肾功能衰竭(慢性肾衰)20 例,慢性肾炎 8 例;其它肾病包括隐匿性肾炎、肝硬化性肾炎、狼疮性肾炎、痛风性肾病和双肾钙化,糖尿病肾病各 2 例。所有检测对象均留 24 小时尿,以酶联免疫吸附试验(ELISA)法测定尿中(Apo AI)和(Apo B₁₀₀),以 $\mu\text{g/L}$ 为单位。另设对照组 21 例,均为正常成人。

方法：用 Apo AI 及 Apo B₁₀₀ 试剂盒，以 ELISA 法进行检测。

结果：

一、正常人尿中 Apo AI 和 Apo B₁₀₀ 的含量：

对照组正常人 21 例尿中 Apo AI 和 Apo B₁₀₀ 均为“0”。

二、肾病病人尿中 Apo AI 和 Apo B₁₀₀ 的含量：

肾病病人 25 例，尿中 Apo AI 全部阳性，其中 I 型平均为 $226 \pm 178.09 \mu\text{g/L}$ ；II 型为 $357.86 \pm 172.14 \mu\text{g/L}$ 。I 型尿 Apo B₁₀₀ 全部阴性(均为 0)；II 型则全部为阳性。平均 $105.63 \pm 112.96 \mu\text{g/L}$ ，且全部病

例尿中 Apo AI 均 $>$ Apo B₁₀₀, 无 1 例 Apo B₁₀₀ $>$ Apo AI。

三、慢性肾衰病人尿中 Apo AI 和 Apo B₁₀₀ 的含量:

慢性肾炎病人 19 例, 尿中 Apo AI 阳性者 16 例 (84%), 平均为 $411.63 \pm 392.24 \mu\text{g/L}$; 尿中 Apo B₁₀₀ 阳性者 12 例 (63%), 平均为 $353.33 \pm 295.91 \mu\text{g/L}$ 。尿中 Apo AI $>$ Apo B₁₀₀ 者 5 例 (26%)。

四、慢性肾炎病人 Apo AI 和 Apo B₁₀₀ 的含量:

慢性肾炎病人 6 例, 尿中 Apo AI 阳性者与 Apo B₁₀₀ 均阳性, Apo AI 平均为 $3.01 \pm 162.50 \mu\text{g/L}$, Apo B₁₀₀ 平均为 $164.50 \pm 127.90 \mu\text{g/L}$ 。全部病例尿中 Apo AI 均 $>$ Apo B₁₀₀。

五、其他肾脏病人尿中 Apo AI 和 Apo B₁₀₀ 的含量

其他肾脏病人共 6 例, 尿中 Apo AI 除 1 例狼疮性肾炎外, 其余 5 例均阳性; 但尿中 Apo B₁₀₀ 有 3 例阴性 (狼疮性肾炎、肝硬化肾炎和痛风性肾病各 1 例), 两者均阳性者, Apo AI 和 Apo B₁₀₀。

结果:

1. 正常人 21 例对照尿中 Apo AI 和 Apo B₁₀₀ 均为 “0”。

2. 肾病综合症病人尿中 Apo AI 和 Apo B₁₀₀ 的含量见下表 7。

表 7 12 例肾病综合症病人尿中 Apo AI 和 Apo B₁₀₀ 的含量 ($\mu\text{g/L}$)

I 型		II 型	
Apo AI	Apo B ₁₀₀	Apo AI	Apo B ₁₀₀
250	0	450	100
300	0	350	200
400	0	300	100
450	0	400	300
500	0	800	600
350	0	600	400
300	0	500	300
250	0	400	200
300	0	600	300
350	0	400	200

400	0	650	350
450	0	600	400

3. 慢性肾衰病人尿中 Apo AI 和 Apo B₁₀₀ 含量:

慢性肾衰病人 20 例尿中 Apo AI 阳性比例数比 Apo B₁₀₀ 多, Apo AI 含量 > Apo B₁₀₀ 含量。

4. 慢性肾炎病人 9 例尿中 Apo AI 和 Apo B₁₀₀ 均呈阳性, 尿中 Apo AI 含量 > Apo B₁₀₀ 含量。

讨论:

正常人尿中未检测到 Apo AI 和 Apo B₁₀₀。

肾病综合症病人中 I 型者尿中 Apo AI 均阳性, 而 Apo B₁₀₀ 均阴性。II 型者尿中 Apo AI 及 Apo B₁₀₀ 均呈阳性, 而且 Apo AI 含量 > Apo B₁₀₀ 含量。因此作为肾病综合症 I 型与 II 型鉴别的指标。一般认为 I 型肾小球滤过膜损伤比 II 型较轻。

初步认为尿中载脂蛋白 Apo AI 和 Apo B₁₀₀ 测定可做为选择性载脂蛋白尿与非选择性载脂蛋白尿的鉴别指标之一。

采用尿中 Apo AI 及 Apo B₁₀₀ ELISA 法试剂盒是一种简单、快速、灵敏和特异, 而优于肾脏病尿中其他检测方法。对肾脏病的诊断和分型有重要的临床应用价值。

上海第二医科大学附属新华医院用 ELISA 法测定尿中载脂蛋白的试验:

在某些疾病中, 尿中可出现载脂蛋白。本文用酶联免疫吸附试验 (简称 ELISA 法), 在我院首次用于临床定量检测 38 例慢性肾脏疾患尿中载脂蛋白 AI (Apo AI) 和载脂蛋白 B₁₀₀ (Apo B₁₀₀), 现将结果公布如下:

一、方法:

用 Apo AI 及 Apo B₁₀₀ 试剂盒, 以 ELISA 法进行检测。

二、对象

(1) 选正常人 3 个年龄组, 4~16 岁组(男 25 人, 女 12 人), 17~23 岁组(男 28 人, 女 17 人), 45~60 岁组(男 40 人, 女 27 人)。测定血中 Apo AI 及 Apo B₁₀₀ 含量。

(2) 选正常人 15 人, 慢性肾脏疾患 38 例, 其中肾病综合症 18 例。测定其尿中 Apo AI 及 Apo B₁₀₀ 含量。

三、结果

1. Apo AI 和 Apo B₁₀₀ 的标准曲线, 曲线呈“S”状, 可测范围在 80~1000ng/ml 之间。

2. 正常人尿中脂蛋白含量: 检测正常人对照 15 例, 尿中 Apo AI 及 Apo B₁₀₀ 均为阴性。检测肾病综合症 20 例, 结果见表 8。I 型(10 例)肾病综合症尿中 Apo AI 为阳性, Apo B₁₀₀ 为阴性, II 型(10 例)肾病综合症尿中 Apo AI 和 Apo B₁₀₀ 均为阳性。

表 8 肾病尿中 Apo AI 及 Apo B₁₀₀ 含量(μ g/L)

I 型		II 型	
Apo AI	Apo B ₁₀₀	Apo AI	Apo B ₁₀₀
300	0	400	100
500	0	300	100
300	0	500	200
400	0	600	400
450	0	400	200
250	0	850	800
300	0	600	400
400	0	500	300
500	0	600	400
300	0	400	200

四、讨论

根据我院试用 ELISA 方法结果, 呈“S”型的标准曲线与长海医院基本一致。同做一组样品呈显著相关。说明该法准确性及重演性均较好。

15例正常人尿中均未见 Apo AI 及 Apo B₁₀₀，而肾病综合症组患者，I型(轻型)尿中只出现 Apo AI，而 II型(重型)尿中出现 Apo AI 及 Apo B₁₀₀。由于呈球状的 Apolipoprotein 分子颗粒大小不一样，Apo B₁₀₀ 分子直径约为 Apo AI 数倍，因此尿中 Apolipoprotein 出现的种类不同不仅说明肾小球滤过膜受到损害，而且还能说明其损害的程度，故用 ELISA 法对肾病综合症进行分型比其他方法更为敏感，而 Apo AI 经 Apo B₁₀₀ 又更敏感些。ELISA 法简便、快速、特异性强、灵敏度高，用于临床有较大的社会效益和经济效益。

同济大学上海放射免疫研究所用 ELISA 法测定人尿中载脂蛋白的试验：

在某些肾脏疾病中，尿中可出现不同类型的脂蛋白，但以往没有见过这方面的报导。我所首先运用杜凤鸣教授创立的定量酶联免疫吸附试验(简称 ELISA)法检测人尿中载脂蛋白 Apo AI 和载脂蛋白 Apo B₁₀₀。

现将结果公布如下：

一、方法

用 Apo AI 及 Apo B₁₀₀ 试剂盒，以 ELISA 法进行检测。

二、对象

(1) 选正常健康人 3 个年龄组，4~16 岁组(男 20 人，女 30 人)，17~23 岁组(男 25 人，女 20 人)，45~60 岁组(男 35 人，女 30 人)。测定血中载脂蛋白 AI(Apo AI)及载脂蛋白 B₁₀₀(Apo B₁₀₀)含量。

(2) 选正常人 12 人，慢性肾脏疾患 28 例，其中肾病综合症 15 例，慢性肾炎 13 例，测定其尿中 Apo AI 及 Apo B₁₀₀ 含量。

三、结果

(1) Apo AI 及 Apo B₁₀₀ 的标准曲线，曲线呈“S”状。可测范围在 80~1000ng/ml 之间。

(2) 检测正常健康人尿中脂蛋白组分含量尿中 Apo AI 及 Apo B₁₀₀ 均为“0”。检测肾病综合症 15 例，其中 I 型 13 例，II 型 13 例，尿

中载脂蛋白含量见表9。

表9 肾病综合症病人尿中载脂蛋白含量($\mu\text{g/L}$)

I 型		II 型	
Apo AI	Apo B100	Apo AI	Apo B100
300	0	500	200
300	0	600	400
450	0	350	200
400	0	300	100
500	0	400	200
350	0	800	600
400	0	700	400
300	0	600	350
400	0	500	200
500	0	750	400
400	0	400	200
400	0	600	400
250	0	300	200

四、讨论

根据我所试用 ELISA 方法结果, 呈“S”型的标准曲线与长海医院基本一致。同做一组样品呈显著相关。说明该法准确及重演性均好。10 例健康人尿中均未见 Apo AI 和 Apo B₁₀₀。

有意义的是肾病综合症, I 型(轻型)尿中只出现 Apo AI, 而 II 型(重型)尿中出现 Apo AI 和 Apo B₁₀₀。由于呈球状的 Apo 分子颗粒大小不一样, Apo B₁₀₀ 分子直径约比 Apo AI 大, 因此尿中 Apo Lipoprotein 出现的种类不同不仅说明肾小球滤过膜受到损害, 而且还能说明其损害的程度, 故用 ELISA 法对肾病综合症进行分型比其他方法更为敏感。可根据该病人尿中是否出现 Apo Lipoprotein, 以及出现的种类, 含量的多少, 来判断肾炎病人的病情轻重, 以及预后。ELISA 法简便快速, 特异性强, 灵敏度高, 用于临床有较大的社会效

益和经济效益。

具体实施方式

实施例 1

一、原材料及其规格

正常人血清

动物：新西兰大白兔，健康雄性，体重 2-3kg

721 分光光度计

旋涡混合器，XW-80 型

PHS-20 型精密酸度计

酶标板，华东理工大学 ELISA 测定 CV% (%) <10%

辣根过氧化物酶 (RZ3.0, SigMA)

NaIO₄ A. R(进口分装)

NaBH₄ A. R(进口分装)

其他试剂

Na₂HPO₄·12H₂O A. R

柠檬酸 A. R

NaCl A. R

甘油 化学纯

H₂O₂ A. R

Tween-20 化学纯

邻苯二胺 化学纯

H₂SO₄ A. R

人 Apolipoprotein AI 标准品及免疫源(SigMA)

蒸馏水必需符合《中国药典》(1990)之规定

二、Apo AI 多克隆抗体 IgG 的制备和亲和层析纯化

首先用 Apo AI 制备抗血清 Apo AI (SigMA) 溶于 0.01MPH7.4 磷

酸缓冲液中，加等量的福氏完全佐剂乳化后，给新西兰大白兔，颈背部多点及脚垫内注射 2.0mg，为基础免疫。每两周加强一次，共免疫 6 次，最后一次免疫 8-10 天抽血测试效价，效价满意者，由心脏抽血收集血清，抗血清再经硫酸铵两次盐析（50%及 33%饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分步沉淀纯化后，再用 Sepharose 4B 亲和层析纯化，用高压液相色谱（HPLC）测纯度为单一峰，纯度高达 96%以上的兔抗人 Apo AI 抗体 IgG（简称 Apo AI 抗体 IgG）。

三、辣根过氧化物酶（HRP）与 Apo AI 抗体 IgG 偶联。

经纯化所得的兔抗人 Apo AI 抗体 IgG 与辣根过氧化物酶用改良的过碘酸钠法交联获得“酶标抗体 IgG”。试剂配制和操作步骤如下：

1. 过碘酸钠标记法试剂

(1) 0.06M NaIO_4 (0.13 克 NaIO_4 ，加水至 10ml)

(2) 0.16M 乙二醇溶液 0.1ml 加水至 10ml

(3) NaBH_4 (5mg/ml, NaBH_4 5mg 加水至 1ml)

(4) 0.05M PH9.5 碳酸盐缓冲液

甲液：无水碳酸钠 10.6 克加水至 500ml

乙液：无水碳酸氢钠 16.8 克加水至 1000ml

取甲液 16ml+乙液 34ml，加水至 200ml

(5) 0.02M PH7.4PBS (用 0.1M PH7.4 PBS 稀释)

2. 过碘酸标记法的操作步骤

7.5mg HRP+0.5ml 蒸馏水溶解

↓

加 0.06M NaIO_4 0.5ml，混合后置 4℃，30 分钟

↓

加 0.16 乙二醇 0.5ml 室温 30 分钟

↓

加兔抗人载脂蛋白抗体 Apo AI 抗体 IgG 0.5ml (约含 Apo AI 抗体 IgG 7mg)，混合后装透析袋，用 0.05M, PH9.6 碳酸缓冲液透析过夜

↓

次日吸出透析物，加 NaBH₄ 溶液 0.2ml (5mg/ml) 置冰箱 2 小时吸出上述结合物混合液，加入等体积饱和硫酸铵，4℃ 30 分钟后，离心 4000 转/分×15 分钟弃上清，沉淀溶于 1ml PH7.4 0.02M PBS 中透析过液，换液三次，每次 1000ml

↓

次日，在离心出去不溶物即得“酶标抗体 IgG”，分装于安中密封后，置-40℃保存

四、最佳酶标记 Apo AI 抗体 IgG 工作浓度的选择

用方阵滴定法，选择最佳酶标记 Apo AI 抗体 IgG 工作浓度为 1:2000 稀释（其阳性 OD/阴性 OD 的 P/N 值最大为 9.48）。

五、最佳 Apo AI 抗体 IgG 包被量选择

用方阵滴定法，选择最佳 Apo AI 抗体 IgG 包被浓度为 20 μg/ml（其阳性 OD 值/阴性 OD 值的 P/N 值为最大 9.17）。

六、载脂蛋白 Apo AI 酶联免疫吸附实验（ELISA）双抗体夹心法的一步法及二步法操作步骤如下：

（一）二步法：

尿样：原液

包被稀释液：Na₂CO₃0.16 克，NaHCO₃2.9 克，NaN₃0.02 克，加水至 100ml 成为 pH9.6 碳酸盐缓冲液。

样品稀释液：NaCl 8 克，KH₂PO₄ 0.2 克，Na₂HPO₄ 2.9 克，KCl 0.2 克，Tween-20 0.5ml NaN₃ 0.2 克，加水至 1000ml，用前每 100ml 加 10ml 小牛血清成为 pH 7.4PBS-Tween20 样品稀释液。

洗涤液：Tris2.42, 1NHCL13ml, Tween-20 0.5ml 加水至 1000ml 成为 pH 7.4 0.02M Tris-Tween 20 洗涤液。

基质液：0.1M Na₂HPO₄ 5.14ml (3.6 克 Na₂HPO₄加水 100ml)，0.05M 柠檬酸 4.86ml (1 克柠檬酸加水 100ml) 邻苯二胺 4mg, 3%H₂O₂ 0.05ml 成为基质液。

双抗体夹心法操作程序：

0.1ml 抗体 Apo AI IgG 包被 (20 μg/ml IgG4℃过夜)

↓ 洗涤

0.1ml 样品 (0.1ml 尿样液) (37°C 2 小时)

0.1ml 脂蛋白标准液 Apo AI 标准品 (SigMA 进口) 0-2500ng/ml

↓ 洗涤

0.1ml 酶标抗体 Apo AI IgG (1:2000) (37°C 2 小时)

↓ 洗涤

0.1ml 基质液 (邻苯二胺 4mg 溶于 10ml 柠檬酸磷酸氢 (37°C 10 分钟) 二钠缓冲液加 3% H_2O_2 0.05ml)

↓

0.05ml 3M H_2SO_4 终止反应

↓

450nm 测 OD Multiskam MK3 酶免测定仪

↓

计算含量

(二) 一步法: 尿原液及标准品加完后, 立即加 Apo AI 抗体 IgG-HRP, 其余步骤完全同二步法, 二步法比一步法 OD 值稍有增加。

七、Apo AI 抗体 IgG 的检定为单一沉淀线。

八、标准曲线的制备

倍比稀释的 Apo AI (SigMA 进口) 标准液, 做双抗体夹心法 ELISA 测定, 分别绘出标准曲线图。曲线呈“S”型, 灵敏度良好, Apo AI-蛋白质 (Apo B₁₀₀-P) 最低检测量约为 80ng。标准曲线测定 Apo B₁₀₀-P 含量范围为 80-1000ng/ml。在 ELISA 双抗体夹心法的酶标板上的标准曲线的梯度浓度良好。

九、精密度试验

为了明确和证明本研究的载脂蛋白 Apo AI ELISA 的精密度, 作了批内、批间和各医院实验室间重复试验。

批内及批间实验, 用混合血清分别作 Apo AI 批内测定, 结果见表 10。用混合血清作 Apo AI 批间含量测定, 结果见表 11。所得变异系数 (CV%), 说明本法重复性良好。

表 10 ELISA 法测定血中各载脂蛋白之批内实验

类别	稀释倍数	n	X (g/L)	SD	CV%
LDL-P	1:2000	30	0.80	0.05	7.0
Apo B ₁₀₀	1:4000	30	0.82	0.05	6.5
HDL-P	1:2000	30	0.29	0.03	5.0
Apo AI	1:4000	30	0.25	0.02	10

表 11 ELISA 法测定血中各载脂蛋白之批间实验

类别	稀释倍数	n	X (g/L)	SD	CV%
Apo B ₁₀₀	1:2000	45	0.70	0.04	8.6
Apo AI	1:2000	30	0.22	0.02	9.0

十、特异性检定

取正常人尿液 11 份，分别加入 IgA、IgM、IgG、C3、 β 2m、 α 巨球蛋白、转铁蛋白、白蛋白、纤维蛋白降解产物 (FDP) Apo B₁₀₀ 及 Apo AI 各 1000ng/ml，用本试剂盒检测，只查出 Apo AI 960ng/ml，回收高达 96%，说明特异性强。

十一、灵敏度 (最低检出量) 试验

Apo AI 标准曲线直线范围在 80-1000ng/ml 尿之间，本试剂盒灵敏度 (最低检出量) 为 80ng/ml 尿。

十二、稳定性试验将 Apo AI 试剂盒放置 37°C 0、1、2、3、4、5 天分别查同一尿样 (4°C 保存) 活性下降很少，说明试剂盒稳定性好。

专利名称(译)	人尿中Apo AI蛋白定量酶联免疫吸附试验试剂盒及制备方法		
公开(公告)号	CN1603824A	公开(公告)日	2005-04-06
申请号	CN03151292.5	申请日	2003-09-29
[标]申请(专利权)人(译)	杜凤鸣		
申请(专利权)人(译)	杜凤鸣		
当前申请(专利权)人(译)	杜凤鸣		
[标]发明人	杜凤鸣		
发明人	杜凤鸣		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/535 G01N33/558 G01N33/573		
代理人(译)	王巍		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及生物技术产品技术领域。本发明公开了一种人尿中Apo AI含量酶联免疫吸附试验试剂盒及制备方法。本发明的试剂盒经临床试验结果表明能判断肾病患者的病情轻重以及预后和糖尿病的病情。方法简便快速，特异性强，灵敏度高，有较好的临床应用价值。

果见表 5:

表 5 正常人尿中加不同蛋白的检出量

蛋白种类	正常人尿中各蛋白的加入量	检测结果	回收率
IgA	1000ng/ml 尿	阴性	0
IgM	1000ng/ml 尿	阴性	0
IgG	1000ng/ml 尿	阴性	0
C3	1000ng/ml 尿	阴性	0
β 2M	1000ng/ml 尿	阴性	0
α 巨球蛋白	1000ng/ml 尿	阴性	0
转铁蛋白	1000ng/ml 尿	阴性	0
白蛋白	1000ng/ml 尿	阴性	0
FDP	1000ng/ml 尿	阴性	0
Apo B ₁₀₀	1000ng/ml 尿	阴性	0
Apo AI	1000ng/ml 尿	960ng/ml 尿	96%

以上试验说明本 ELISA 试剂盒具有 Apo AI 的特异性。