



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410013867.7

[43] 公开日 2004 年 12 月 22 日

[11] 公开号 CN 1556408A

[22] 申请日 2004.1.8

[21] 申请号 200410013867.7

[71] 申请人 张晓膺

地址 213003 江苏省常州市局前街 185 号常州市第一人民医院胸外科

[72] 发明人 徐 宁

[74] 专利代理机构 常州市天龙专利事务所有限公司

代理人 王淑勤

权利要求书 1 页 说明书 5 页

[54] 发明名称 检测载脂蛋白 M 的免疫比浊法

[57] 摘要

本发明涉及一种检测载脂蛋白 M 的免疫比浊法，该检测方法用抗载脂蛋白 M 的多克隆抗体，与待检标本的载脂蛋白 M 反应，所形成的复合物引起浊度变化；用光透射强度或光散射强度表征这种变化；从载脂蛋白 M 标准品的浓度与相应光散射强度或光透射强度的标准曲线查出待检标本的载脂蛋白 M 的含量；其中所用抗载脂蛋白 M 的多克隆抗体效价至少为 1:128，不含杂抗体，具有识别载脂蛋白 M 多种抗原决定簇；待检标本是人空腹血浆或血清并用稀释剂作 1:200~300 稀释；抗载脂蛋白 M 的多克隆抗体与已稀释的待检标本的混合比为 1:4 体积比。为新发现的载脂蛋白 M 确定了一个简便、重现性好、适应性强的检测手段，并使载脂蛋白 M 对临床的指导作用及进一步研究其功能提供了可能。

ISSN 1008-4274

1、一种检测载脂蛋白 M 的免疫比浊法，其特征在于：用抗载脂蛋白 M 的多克隆抗体，与待检标本的载脂蛋白 M 反应，所形成的复合物引起浊度变化；用光透射强度或光散射强度表征这种变化；从载脂蛋白 M 标准品的浓度与相应光散射强度或光透射强度的标准曲线查出待检标本的载脂蛋白 M 的含量；其中所用抗载脂蛋白 M 的多克隆抗体效价至少为 1:128，不含杂抗体，具有识别载脂蛋白 M 多种抗原决定簇；待检标本是人空腹血浆或血清并用稀释剂作 1:200~300 稀释；抗载脂蛋白 M 的多克隆抗体与已稀释的待检标本的混合比为 1:4 体积比。

2、根据权利要求 1 所述的免疫比浊法，其特征在于：所述载脂蛋白 M 标准品是纯载脂蛋白 M，其浓度为 2.6g/l，先用稀释剂作 1:200 稀释，再作倍比稀释，作成系列标准品，供作标准曲线用；或者是定值健康人混合血浆或血清，用酶联免疫吸附法确定其载脂蛋白 M 浓度，根据所定浓度，再用稀释剂调整其载脂蛋白 M 浓度至 2.0g/l，1.5g/l 及 0.5g/l 各一份，供作标准曲线用。

3、根据权利要求 2 所述的免疫比浊法，其特征在于：用酶联免疫吸附法确定健康人混合血浆或血清的载脂蛋白 M 浓度的具体步骤是：包被只抗载脂蛋白 M 的单克隆抗体；配制系列载脂蛋白 M 标准品；准备待定值的健康人混合血浆或血清；使系列标准品和待定值的健康人混合血浆或血清，同时分别与已包被的抗体结合，再使已标记的、结合位点不同于包被在 96 孔微孔板上的单克隆抗体同时分别与之结合，用基质液显色 20~30 分钟后终止显色，10 分钟后测定上述系列标准品和待定值的健康人混合血浆或血清反应后的吸光度；建立系列标准品的浓度和吸光度的标准曲线并从该曲线查出待定值健康人混合血浆或血清的载脂蛋白 M 的浓度，得到定值的健康人混合血浆或血清。

4、根据权利要求 1 所述的免疫比浊法，其特征在于：所述稀释剂是由 0.2g KH_2PO_4 、2.9g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、8g NaCl、0.5ml Tween20、40g 聚乙二醇-6000，加去离子水至 1000ml 配制而成，用 5G 玻璃漏斗抽滤后备用。

检测载脂蛋白 M 的免疫比浊法

技术领域

本发明涉及检测载脂蛋白 M (Apolipoprotein M, 简称 ApoM) 的免疫比浊法, 更具体讲, 涉及人血浆或血清中 ApoM 含量的测定方法。

背景技术

脂蛋白是在血液和其它体液中转运各种脂质的大分子复合体, 参与体内多种生理、病理过程, 尤其与机体脂质代谢紊乱以及心血管疾病的发生、发展有着极其密切的联系。脂蛋白有不同类型, 目前主要根据物理化学性质来分类的, 其中最主要的是根据超速离心时的密度分类。据此可分为乳糜微粒 (CM, 密度 < 1.006)、极低密度脂蛋白 (VLDL, 密度 < 1.006)、中间密度脂蛋白 (IDL, 1.006 < 密度 < 1.019)、低密度脂蛋白 (LDL, 1.019 < 密度 < 1.063) 和高密度脂蛋白 (HDL, 1.063 < 密度 < 1.210)。因 CM、VLDL、IDL 富含甘油三酯, 故统称为富甘油三酯脂蛋白 (TGRLP)。血浆脂蛋白由脂类与蛋白质组分结合而成, 其中的蛋白质组分被称为载脂蛋白 (Apos), 有一些载脂蛋白的性质已经清楚, 如 ApoA-I、ApoA-II、ApoA-VI, ApoB, ApoCs 和 ApoE。载脂蛋白的功能有: 作为结合配基的受体、脂蛋白分解代谢的调节因子和/或调节脂类代谢酶的活性。某些载脂蛋白还与老年性痴呆以及调节机体免疫反应密切相关。

本项发明的发明人徐宁于 1999 年发现了一种新型人类载脂蛋白 M (ApoM), 并先后克隆了小鼠、大鼠及人的 ApoM cDNA, 实验发现 ApoM 基因存在于所有哺乳动物中, 并且有着极高的同源性。初步的研究资料已经揭示: ApoM 可能与体内脂肪和脂蛋白代谢有关, 也可能与机体脂质代谢紊乱以及机体防御反应有一定联系。最新的研究资料进一步揭示冠心病患者血浆中 ApoM 的水平明显高于健康志愿者。

有人研究表明: 青年人中成年发病型糖尿病 (Maturity-onset diabetes of the young, MODY3) 病人血清中 ApoM 含量明显降低。

综上所述, 测定血浆或血清中 ApoM 的含量, 在临床上有着广泛的应用前途; 同时由于 ApoM 是一种新近发现的蛋白, 它的功能还有待进一步深入研究, 在研究中, 特异性强、灵敏度高、稳定性好、简便易行的测定人血浆或血清中 ApoM 的方法是必不可少的工具, 但迄今仍未有一种适用的测定方法。

发明内容

本发明的目的在于, 提供一种检测载脂蛋白 M 的免疫比浊法, 该方法操

作简单、重现性好、适应性强。

实现本发明目的的技术方案：一种检测载脂蛋白 M 的免疫比浊法，用抗载脂蛋白 M 的多克隆抗体，与待检标本的载脂蛋白 M 反应，所形成的复合物引起浊度变化；用光透射强度或光散射强度表征这种变化；从载脂蛋白 M 标准品的浓度与相应光散射强度或光透射强度的标准曲线查出待检标本的载脂蛋白 M 的含量；其中所用抗载脂蛋白 M 的多克隆抗体效价至少为 1:128，不含杂抗体，具有识别载脂蛋白 M 多种抗原决定簇；待检标本是人空腹血浆或血清并用稀释剂作 1:200~300 稀释；抗载脂蛋白 M 的多克隆抗体与已稀释的待检标本的混合比为 1:4 体积比。

上述方法中，所述载脂蛋白 M 标准品是纯载脂蛋白 M，其浓度为 2.6g/l，先用稀释剂作 1:200 稀释，再作倍比稀释，作成系列标准品，供作标准曲线用；或者是定值健康人混合血浆或血清，用酶联免疫吸附法确定其载脂蛋白 M 浓度，根据所定浓度，再用稀释剂调整其载脂蛋白 M 浓度至 2.0g/l，1.5g/l 及 0.5g/l 各一份，供作标准曲线用。

上述用酶联免疫吸附法确定健康人混合血浆或血清的载脂蛋白 M 浓度的具体步骤是：包被只抗载脂蛋白 M 的单克隆抗体；配制系列载脂蛋白 M 标准品；准备待定值的健康人混合血浆或血清；使系列标准品和待定值的健康人混合血浆或血清，同时分别与已包被的抗体结合，再使已标记的、结合位点不同于包被在 96 孔微孔板上的单克隆抗体同时分别与之结合，用基质液显色 20~30 分钟后终止显色，10 分钟后测定上述系列标准品和待定值的健康人混合血浆或血清反应后的吸光度；建立系列标准品的浓度和吸光度的标准曲线并从该曲线查出待定值的健康人混合血浆或血清的载脂蛋白 M 的浓度，得到定值的健康人混合血浆或血清。

上述方法中，所述稀释剂是由 0.2g KH_2PO_4 、2.9g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、8g NaCl 、0.5ml Tween20、40g 聚乙二醇-6000，加去离子水至 1000ml 配制而成，用 5G 玻璃漏斗抽滤后备用。

本发明检测方法的测定范围是载脂蛋白 M 含量在 0.4g/L~2.5g/l。

本发明的技术效果：本发明技术方案所提供的检测方法，确定了抗载脂蛋白 M 的多克隆抗体必须具有的特性，还确定了它与待检标本的混合比例。由于这种抗载脂蛋白 M 的多克隆抗体所具有的多种抗原决定簇，为待检标本中所含载脂蛋白 M 提供了多个结合位点，确保二者的反应在多处发生，使反应所形成的复合物更适合用光散射强度或光透射强度的大小来表示，而且所确定的混合比例，可以确保待检标本的载脂蛋白 M 能完全与抗载脂蛋白 M 的多克隆抗体结合，因此，为新发现的载脂蛋白 M 建立了一种准确可行的检测方法，使载脂蛋白 M 对临床的指导作用及进一步研究载脂蛋白 M 的功能

成为可能。本发明检测方法，操作简单；测定光透射强度或光散射强度，可采用自动化仪器，也可用手工检测仪器；作为载脂蛋白 M 标准品，可用纯载脂蛋白 M，也可用定值健康人混合血浆或血清，因此，适用性强，特别是采用定值健康人混合血浆或血清作载脂蛋白 M 标准品，定值后，在-20℃以下至少可稳定半年，而且价格低于纯载脂蛋白 M，因此可以降低检测费用。

具体实施方式

以下结合实施例对本发明作进一步具体描述，但不局限于此。

以下载脂蛋白 M 均简称 ApoM，所用试剂均为市场采购的医用试剂，纯载脂蛋白 M、抗载脂蛋白 M 的单克隆抗体和多克隆抗体、与抗载脂蛋白 M 单克隆抗体结合位点不同的抗载脂蛋白 M 的单克隆抗体均为发明人自制并提供。

一、准备 ApoM 标准品

1、用纯 ApoM 作标准品

将纯 ApoM (2.6g/l)，先用稀释剂作 1:200 稀释，再用稀释剂进一步作 1:1、1:2、1:4、1:8 倍比稀释，获得 4 种不同浓度的标准 ApoM，供作标准曲线用；

2、用定值健康人混合血浆作标准品

采用酶联免疫吸附法确定健康人混合血浆的 ApoM 含量，具体步骤如下：

A、准备下述试剂和仪器

①、包被液：取 1.56gNa₂CO₃、2.93gNaHCO₃ 和 0.20gNaN₃ 用去离子水溶解并稀释至 1000ml，其 pH 为 9.6；

②、洗液：取 0.2g KH₂PO₄、2.9g Na₂HPO₄ · 12H₂O、8g NaCl、0.5ml Tween20，加去离子水至 1000ml，其 pH 为 7.4；

③、稀释液：含 3%牛血清白蛋白的洗液；

④、基质液：H₂O₂ 和四甲基联苯胺的 1:1 混合物，购自 R & D Systems，目录号：DY999；

⑤、终止液：1M H₂SO₄；

⑥、封闭液：由 1%牛血清白蛋白、5%蔗糖和 0.05%的磷酸盐缓冲液混合而成；

⑦、链霉亲和素-辣根过氧化物酶，购自 R & D Systems，目录号：DY998；

⑧、酶标仪型号为 Benchmark，BIO-RAD 公司；

⑨、96 孔微孔板：与蛋白质有结合能力。

B、定值健康人混合血浆载脂蛋白 M

①、包被抗 ApoM 的单克隆抗体

用包被液 1:1 稀释抗 ApoM 的单克隆抗体（浓度为 6.6mg/ml），在 96 孔

微孔板的每个孔内加 100 μ l, 每个孔内约 6.6 μ g, 室温孵育过夜, 确保抗体与微孔板相互作用充分结合, 随后用洗液吸洗微孔板 3 次;

在每孔再加 300 μ l 封闭液, 封闭每孔内剩余位点, 室温孵育 1 小时, 确保完全封闭, 再用洗液吸洗微孔板 2 次;

将微孔板存放于 4 $^{\circ}$ C, 备用, 使用期 6 个月。

②、准备系列 ApoM 标准品

将起始浓度为 2.60g/l 标准品 ApoM, 用稀释液作 1:1000 稀释, 再进一步作 1:1、1:2、1:4、1:8 倍比稀释, 获得由 4 种不同浓度的 ApoM 标准品组成的系列 ApoM 标准品, 备用;

③、准备待定值健康人混合血浆

将待定值健康人混合血浆用 50mM NaH₂PO₄ 缓冲液作 1:100 稀释, 再用稀释液作 1:10 稀释, 备用;

④、将上述系列 ApoM 标准品和待定值健康人混合血浆, 分别在已包被的微孔板的每个孔内, 各加 100 μ l, 空白孔加稀释液, 室温孵育 2 小时, 使之与被包被的抗体充分结合, 用洗液吸洗微孔板 3 次;

⑤、先用 EZ-Link NHS-PEO 固相生物素标记试剂盒作成生物素标记的 ApoM 单克隆抗体 (该试剂盒的目录号 21450), 从中取 100 μ l 分别加到微孔板各孔内, 室温孵育 1 小时, 再用洗液吸洗微孔板 5 次; 每孔内加 100 μ l 链霉亲和素-辣根过氧化物酶, 与生物素结合, 使酶分别与待定值健康人混合血浆和 ApoM 标准品结合, 用洗液吸洗微孔板 5 次;

⑥、每孔内加入 100 μ l 基质液, 在酶的催化下基质液显色, 室温孵育 30 分钟, 然后加 50 μ l 终止液, 10 分钟后用光度计分别测定待定值健康人混合血浆和系列标准品在 450nm 处的吸光度;

⑦、建立标准品的浓度和吸光度的标准曲线并从该曲线查出待定值健康人混合血浆的 ApoM 含量。

测定范围在 0.25g/l~2.60g/l ApoM。

二、检测人血浆中载脂蛋白 M

实施例 1 (以纯 ApoM 作标准品)

1、准备下述试剂和仪器

①、稀释剂: 取 0.2g KH₂PO₄、2.9g Na₂HPO₄ · 12H₂O、8g NaCl、0.5ml Tween20、40g 聚乙二醇-6000, 加去离子水至 1000ml, 混合均匀用 5G 玻璃芯漏斗抽滤后备用, 在 2~6 $^{\circ}$ C 冰箱中可存放半年。本稀释剂的吸光度 A₃₄₀ < 0.05, 半年后仍保持此值, 可继续使用, 如 > 0.05 可再用 5G 玻璃芯漏斗抽滤后使用;

②、精密光度计为紫外可见光分光光度计 751 型或全自动分析仪为

OLYMPUS 大型全自动生化分析仪 AU2700; 比浊仪用 Beckman 比浊仪。

2、准备抗 ApoM 多克隆抗体

将抗 ApoM 多克隆抗体用稀释剂作 1:200 稀释供检测使用;

3、准备待检标本

抽取人空腹血浆及时分离后, 用稀释剂作 1:200 稀释, 即可进行检测, 密封存放在 2~6℃ 冰箱内可在一周内进行检测; -20℃ 存放半年仍可检测;

4、取上述准备好的待检标本 100 μ l 和抗 ApoM 多克隆抗体 400 μ l, 在试管内混匀后, 在 25~37℃ 放置 30 分钟, 使二者反应, 751 型分光光度计在 340nm 处测定其光透射强度, 同时检测 ApoM 标准品的光透射强度; 检测时, 取 100 μ l 待检标本和 400 μ l 稀释剂在试管内混匀作为空白样;

5、用上述测定数据作出 ApoM 浓度和光透射强度的标准曲线并从中查出待检标本的 ApoM 含量。

实施例 2 (以纯 ApoM 作标准品)

1、2、3 项按实施例 1 操作, 然后在 AU2700 型全自动分析仪上, 设定标本量 (即待检标本) 为 40 μ l, 试剂量 (即抗 ApoM 多克隆抗体) 为 160 μ l, 反应温度为 37℃, 反应时间为 30 分钟, 检测波长为 340nm, 用已准备好的 ApoM 标准品定标, 用稀释剂作空白, 检测待检标本 ApoM 含量, 仪器自动给出检测结果。

实施例 3 (以纯 ApoM 作标准品)

除用比浊仪 (如 Beckman 比浊仪) 代替 AU2700 型全自动分析仪, 并设定待检标本和抗 ApoM 多克隆抗体反应后, 立即进行光散射强度速率法测定外, 其余操作均同实施例 2。

实施例 4 (以定值健康人混合血浆为 ApoM 标准品)

1、准备标准品

取已定值的健康人混合血浆, 用稀释剂调整其 ApoM 浓度为 2.0g/l、1.5g/l 及 0.5g/l 各一份, 获得 3 种不同浓度的标准 ApoM, 供作标准曲线用。

除用上述标准品作标准曲线并从该曲线查出待检标本的 ApoM 浓度外; 其余均按实施例 1 的操作步骤进行。

实施例 5 (以定值健康人混合血浆为 ApoM 标准品)

用实施例 4 的标准品, 采用实施例 3 的比浊仪并设定待检标本和抗 ApoM 多克隆抗体反应后立即进行光散射强度速率法测定, 其余操作均同实施例 2。

用实施例 1~5 检测的 ApoM 范围均在 0.4g/l~2.5g/l, 变异系数的范围为 6.3%~10.5%。

专利名称(译)	检测载脂蛋白M的免疫比浊法		
公开(公告)号	CN1556408A	公开(公告)日	2004-12-22
申请号	CN200410013867.7	申请日	2004-01-08
[标]申请(专利权)人(译)	张晓膺		
申请(专利权)人(译)	张晓膺		
当前申请(专利权)人(译)	张晓膺		
[标]发明人	徐宁		
发明人	徐宁		
IPC分类号	G01N33/536		
代理人(译)	王淑勤		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种检测载脂蛋白M的免疫比浊法，该检测方法用抗载脂蛋白M的多克隆抗体，与待检标本的载脂蛋白M反应，所形成的复合物引起浊度变化；用光透射强度或光散射强度表征这种变化；从载脂蛋白M标准品的浓度与相应光散射强度或光透射强度的标准曲线查出待检标本的载脂蛋白M的含量；其中所用抗载脂蛋白M的多克隆抗体效价至少为1:128，不含杂抗体，具有识别载脂蛋白M多种抗原决定簇；待检标本是人空腹血浆或血清并用稀释剂作1:200~300稀释；抗载脂蛋白M的多克隆抗体与已稀释的待检标本的混合比为1:4体积比。为新发现的载脂蛋白M确定了一个简便、重现性好、适应性强的检测手段，并使载脂蛋白M对临床的指导作用及进一步研究其功能提供了可能。