



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 01141150.3

[45] 授权公告日 2004 年 4 月 14 日

[11] 授权公告号 CN 1145797C

[22] 申请日 2001.9.27 [21] 申请号 01141150.3
 [30] 优先权
 [32] 2001.3.31 [33] KR [31] 2001-0017100
 [71] 专利权人 智诺百股份有限公司
 地址 韩国京畿道
 [72] 发明人 韩始薰 章暎珠 李秀英 申夏澈
 朴善荣 柳恩善 韩熙成
 审查员 边 昕

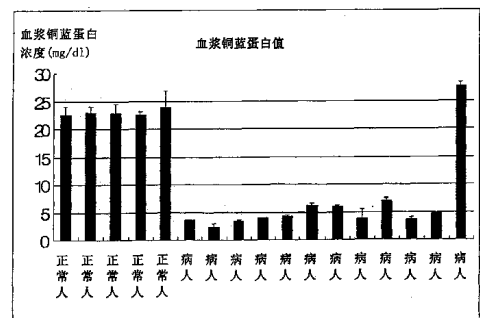
[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所
 代理人 徐 迅

权利要求书 3 页 说明书 13 页 附图 2 页

[54] 发明名称 测定血斑中血浆铜蓝蛋白浓度的方法及肝豆状核变性病筛选试剂盒和诊断试剂

[57] 摘要

本发明涉及测量全血浆铜蓝蛋白浓度的方法，特别涉及使用全血浆铜蓝蛋白特异性多克隆抗体和全血浆铜蓝蛋白特异性单克隆抗体，利用通过酶联免疫吸附测定法 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) 或解离强化的时间分辨荧光免疫测定法 (dissociation-enhanced time-resolved fluoroimmunoassay) 得到的标准浓度曲线，测定全血浆铜蓝蛋白浓度的方法。本发明还涉及肝豆状核变性病筛选的试剂盒和诊断试剂。



1. 一种血液斑点中测定全血浆铜蓝蛋白浓度的方法，其特征在于，使用全
5 血浆铜蓝蛋白特异性多克隆抗体和全血浆铜蓝蛋白特异性单克隆抗体，利用通过
酶联免疫吸附测定法得到的吸光度标准曲线测定。
2. 一种血液斑点中测定全血浆铜蓝蛋白浓度的方法，其特征在于，使用全
血浆铜蓝蛋白特异性多克隆抗体和全血浆铜蓝蛋白特异性单克隆抗体，利用通过
解离强化的时间分辨荧光免疫测定法得到的标准浓度曲线测定。
3. 如权利要求1或2 所述的方法，其中，上述血液斑点利用血液过滤纸收
10 集。
4. 如权利要求1或2 所述的方法，其中，上述血浆铜蓝蛋白特异性多克隆
抗体，是通过将用包含全血浆铜蓝蛋白的精制的血浆铜蓝蛋白免疫兔子，而得到
的血清制造的。
5. 如权利要求1或2 所述的方法，其中，上述血浆铜蓝蛋白特异性单克隆
15 抗体是如下获得的：用包含全血浆铜蓝蛋白的精制的血浆铜蓝蛋白免疫小鼠，得
到产生抗体的脾脏细胞，把上述脾脏细胞与骨髓瘤细胞融合及培育，得到单克隆
化的杂交瘤细胞而制造。
6. 如权利要求1或2 所述的方法，其中，上述通过酶联免疫吸附测定法得
到吸光度标准曲线的步骤包括：首先制造标准血液斑点和对照血液斑点后，将偶
20 联有辣根过氧化物酶的血浆铜蓝蛋白特异性多克隆抗体和血浆铜蓝蛋白特异性单
克隆抗体，分别施用于上述标准血液斑点和对照血液斑点。
7. 权利要求6 所述的方法，其中，上述吸光度标准曲线，以夹心法做成。
8. 权利要求2 所述的方法，其中，上述通过解离强化的时间分辨荧光免疫
测定法得到标准浓度曲线的步骤包括：首先制造标准血液斑点和对照血液斑点
25 后，以镧标记的血浆铜蓝蛋白特异性多克隆抗体和血浆铜蓝蛋白特异性单克隆抗
体，分别施用于上述标准血液斑点和对照血液斑点。
9. 权利要求8 所述的方法，其中，上述标准浓度曲线，以夹心法做成。
10. 一种利用酶联免疫吸附测定法测定血液斑点中全血浆铜蓝蛋白浓度的
方法，包括：

制造血浆铜蓝蛋白特异性多克隆抗体的步骤；

制造血浆铜蓝蛋白特异性单克隆抗体的步骤；

将上述血浆铜蓝蛋白特异性多克隆抗体和血浆铜蓝蛋白特异性单克隆抗体与辣根过氧化物酶偶联的步骤；

5 制造除去血浆铜蓝蛋白的血液，在此血液里添加一定浓度的包含精制血浆铜蓝蛋白的溶液，制造标准血液斑点和对照血液斑点的步骤；

利用上述血浆铜蓝蛋白特异性多克隆抗体和血浆铜蓝蛋白特异性单克隆抗体，根据标准血液斑点和对照血液斑点，通过酶联免疫吸附测定法制定吸光度标准曲线的步骤；和

10 利用上述标准曲线，从病人的血液斑点中，测定全血浆铜蓝蛋白浓度的步骤。

11. 一种利用解离强化的时间分辨荧光免疫测定法测定血液斑点中全血浆铜蓝蛋白浓度的方法，包括：

制造血浆铜蓝蛋白特异性多克隆抗体的步骤；

15 制造血浆铜蓝蛋白特异性单克隆抗体的步骤；

对上述血浆铜蓝蛋白特异性多克隆抗体和血浆铜蓝蛋白特异性单克隆抗体标记的步骤；

制造除去血浆铜蓝蛋白的血液，在此血液里添加一定浓度的包含精制血浆铜蓝蛋白溶液，制造标准血液斑点和对照血液斑点的步骤；

20 利用上述血浆铜蓝蛋白特异性多克隆抗体和血浆铜蓝蛋白特异性单克隆抗体，根据标准血液斑点和对照血液斑点，通过解离强化的时间分辨荧光免疫测定法制定标准浓度曲线的步骤；和

利用上述标准浓度曲线，从病人的血液斑点中，测定全血浆铜蓝蛋白浓度的步骤。

25 12. 权利要求10或11所述的血液斑点中测定全血浆铜蓝蛋白浓度的方法，其中，上述病人为肝豆状核变性病患者。

13. 权利要求10或11所述的方法，其中，上述制造除去血浆铜蓝蛋白的血液的步骤，使用磷酸缓冲液。

14. 权利要求10或11所述的方法，其中，上述制造标准血液斑点和对照血

液斑点是通过在除去血浆铜蓝蛋白的血液里添加已知浓度的血浆铜蓝蛋白溶液而制造。

15. 权利要求10或11所述的方法，其中，上述血液里添加的已知浓度的血浆铜蓝蛋白溶液为3种以上。

5 16. 权利要求10或11所述的方法，其中，在上述制造血浆铜蓝蛋白特异性单克隆抗体的步骤中，还包括步骤：筛选可中和全血浆铜蓝蛋白的氧化酶活性的抗体。

17. 权利要求10或11所述的方法，其中，在上述制造血浆铜蓝蛋白特异性单克隆抗体的步骤后，还包括精制其抗体的步骤。

10 18. 一种诊断肝豆状核变性病的试剂，其特征在于，包含全血浆铜蓝蛋白特异性多克隆抗体和全血浆铜蓝蛋白特异性单克隆抗体、标准血液斑点及对照血液斑点。

15 19. 一种肝豆状核变性病筛选检查用试剂盒，其特征在于，使用全血浆铜蓝蛋白特异性多克隆抗体和全血浆铜蓝蛋白特异性单克隆抗体、标准血液斑点及对照血液斑点，通过利用酶联免疫吸附测定法制定的吸光度标准曲线，测定血液斑点中全血浆铜蓝蛋白的浓度。

20 20. 一种肝豆状核变性病筛选检查用试剂盒，其特征在于，使用全血浆铜蓝蛋白特异性多克隆抗体和全血浆铜蓝蛋白特异性单克隆抗体、标准血液斑点及对照血液斑点，通过利用解离强化的时间分辨荧光免疫测定法制定的标准浓度曲线，测定血液斑点中全血浆铜蓝蛋白的浓度。

测定血斑中血浆铜蓝蛋白浓度的方法
及肝豆状核变性病筛选试剂盒和诊断试剂

5

技术领域

本发明涉及测量全血浆铜蓝蛋白(holoceruloplasmin)浓度的方法，特别涉及使用全血浆铜蓝蛋白特异性多克隆抗体和全血浆铜蓝蛋白特异性单克隆抗体，利用通过酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)或解离强化的时间分辨荧光免疫测定法(dissociation-enhanced time-resolved fluoroimmunoassay)得到的标准浓度曲线，测定全血浆铜蓝蛋白浓度的方法。

背景技术

15 测定全血浆铜蓝蛋白浓度的方法，对 Wilson 病的诊断有非常重要的作用。

Wilson 病又称肝豆状核变性病(Wilson's disease)，1912 年第一次被报道，是现今全世界以 25,000 -30,000 名中 1 名的频率发生的一种常染色体隐性疾病，其遗传携带率为 90/1，是较为常见的遗传疾病之一。对铜代谢过程引起障碍的 Wilson 病伴有通过胆管的铜排泄减少、铜吸收于血浆铜蓝蛋白中有异常等特点。因铜胆管排泄的障碍，铜沉积于肝、脑、角膜、红血球、肾胀等器官，引起肝炎、肝硬变等肝功能障碍，说话障碍等神经障碍，溶血性贫血、肾小管功能异常等现象。

20 大部分 Wilson 病患者们都是以发生肝硬化、神经血损伤等疾病之后才发现，因此，需要肝移植或无法治疗，甚至引起死亡，是一种致命的疾病。但如能早期发现，利用 D-青霉胺(D-phenicillamine)，三亚乙基四胺等螯合剂等试剂，进行早期的适当治疗，就不能引起并发症，能谋求正常生活，因此，Wilson 病的早期诊断和治疗对患者的治疗有非常重要的意义。

血液内的血浆铜蓝蛋白浓度是 Wilson 病诊断中重要的指标之一。血浆铜蓝蛋白是一种分子量为 132,000 道尔顿，且具有每一个分子能与 6 个铜原子结

合的结构物质，是一种在正常情况下，含生物体内铜量的 95%左右的血浆蛋白质，起着把铜运输到组织内，提高芳香族胺氧化酶的活性，抗栓化作用，除去自由基及过氧化氢，调节炎症性反应等作用。血浆铜蓝蛋白在正常人血清内的含量为 20-50mg/dl(200-500 μ g/ml)左右。但在 Wilson 病患者的血清内的含量特别少。通常，血浆铜蓝蛋白大部分有氧化酶活性，以含铜的全血浆铜蓝蛋白形态存在；正常人可有效地排泄掉铜，并且在体内没有氧化酶活性的脱辅基血浆铜蓝蛋白(apoceruloplasmin)的数量很少(3.3 \pm 3.1 mg/dl :33 \pm 31 μ g/ml)。与之相反，尽管 Wilson 病患者的脱辅基血浆铜蓝蛋白的量与正常人基本相同，其全血浆铜蓝蛋白数量很少(2.7 \pm 2.0 mg/dl :27 \pm 20 μ g/ml)。

10 所以，测定血液内的血浆铜蓝蛋白，特别是全血浆铜蓝蛋白的方法对灵敏地诊断 Wilson 病有重要的意义。同时，在新生儿时期，血浆铜蓝蛋白浓度的测定量为很低，因此，筛选检查效率也比较低。所以，其浓度达到正常成人水平的 3-5 水左右为筛选检查的最佳时期。

15 从前的血浆铜蓝蛋白测定方法，是利用血清的通过血浆铜蓝蛋白氧化酶活性(oxydase activity)测定全血浆铜蓝蛋白的方法、利用多克隆抗体的放射性免疫扩散法(radial immunodiffusion assay)、免疫浊度测定法(immunoturbidimetric assay)等。

20 血浆铜蓝蛋白氧化酶活性的测定方法对血浆铜蓝蛋白没有特异的酶底物，所以，很难测定血浆铜蓝蛋白。利用多克隆抗体的测定方法中，多克隆抗体，跟全血浆铜蓝蛋白结合的同时，也跟脱辅基血浆铜蓝蛋白结合，所以有特异性低的特点。

25 而且，要实现上述方法，得采集大量血液、经过另行的血液离心分离过程分离血清、采集后，因血清内蛋白质的稳定性问题，在保存和搬运的过程重要时刻保持冰冻状态，具有很大的不便性。如同上述，现有的方法，在采集、搬运、保存等方面都很不方便，且一次能测定的样品的数也受限制，因此，此方法在测定大量样品的全国性的筛选检查中不易使用。

发明内容

本发明的目的是提供使用全血浆铜蓝蛋白特异性多克隆抗体和全血浆铜蓝

蛋白特异性单克隆抗体，利用通过酶联免疫吸附测定法 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) 或解离强化的时间分辨荧光免疫测定法 (dissociation-enhanced time-resolved fluoroimmunoassay) 得到的标准浓度曲线，测定全血浆铜蓝蛋白浓度的方法。

- 5 本发明的再一个目的是提供利用对全血浆铜蓝蛋白分子的氧化酶活性重要的，能识别跟抗原决定簇 (epitope) 分子一样的别的抗原决定簇的两个单克隆抗体，或单克隆抗体和多克隆抗体，或两个多克隆抗体，以夹心法定量分析血液内的全血浆铜蓝蛋白，从而早期诊断Wilson病的方法。

本发明的再一个重要的目的是提供用包含全血浆铜蓝蛋白的精制的血浆铜蓝蛋白免疫兔子，得到血清并制造血浆铜蓝蛋白特异性多克隆抗体的方法。

本发明的再一个重要的目的是提供用包含全血浆铜蓝蛋白的精制的血浆铜蓝蛋白免疫小鼠，得产生抗体的脾脏细胞，把上述脾脏细胞与骨髓瘤细胞融合及培育，得单克隆化的杂交瘤细胞并制造血浆铜蓝蛋白特异性单克隆抗体的方法。

本发明的再一个重要的目的是提供以制造标准血液斑点和对照血液斑点的方法，及分别利用偶联有辣根过氧化物酶标记的血浆铜蓝蛋白特异性多克隆抗体及单克隆抗体，通过酶联免疫吸附测定法，以夹心法，制作吸光度标准曲线的方法。

本发明的再一个重要的目的是提供以制造标准血液斑点和对照血液斑点的方法，及利用以铕 (Europium; Eu^{3+}) 标记的血浆铜蓝蛋白特异性多克隆抗体及单克隆抗体，通过解离强化的时间分辨荧光免疫测定法，以夹心法，制做标准浓度曲线的方法。

本发明的再一个重要的目的是提供使用全血浆铜蓝蛋白特异性多克隆抗体和全血浆铜蓝蛋白特异性单克隆抗体，标准血液斑点及对照血液斑点，利用通过酶联免疫吸附测定法或解离强化的时间分辨荧光免疫测定法得到的标准浓度曲线，测定全血浆铜蓝蛋白浓度的方法。

本发明的再一个重要的目的是提供早期诊断Wilson病的筛选检查试剂盒，从而提供与现今使用的检测法有区别的，从血液过滤纸收集的1-7岁幼儿的血液斑点中，通过酶联免疫吸附测定法或解离强化的时间分辨荧光免疫测定法，定量分析把含铜的全血浆铜蓝蛋白的方法。从而，测定血浆铜蓝蛋白时，不必采集大

量血液，用1-2滴血液就可进行筛选检查。

本发明的最终目的是为了实现一次性地测定多数的样品，提供利用样品的采集、搬运、保存都非常方便的血液斑点，通过使用酶联免疫吸附测定法或解离强化的时间分辨荧光免疫测定法，定量分析把含铜的全血浆铜蓝蛋白的方法，便能早期诊断Wilson病。

在本研究里，开发两种方法的原因是现在全世界开发的其他疾病的筛选检查用试剂盒(kit)，都采用这两种方法之一。

附图说明

10 图 1 表示把包含全血浆铜蓝蛋白的精制的血浆铜蓝蛋白(11)和血浆铜蓝蛋白特异性抗体的混合液，在 37°C 反应，把得到的反应物(2)电泳得凝胶体，把这凝胶体用氧化酶活性染色法染色的结果。

图 2 表示利用包含几种浓度的血浆铜蓝蛋白的标准血液斑点，使用本发明开发的酶联免疫吸附测定法得到的标准浓度曲线。

15 图 3 表示利用包含几种浓度的血浆铜蓝蛋白的标准血液斑点，使用本发明开发的解离强化的时间分辨荧光免疫测定法得到的标准浓度曲线。

图 4 表示利用图 2、图 3 的标准浓度曲线，测定 5 名正常人和 12 名 Wilson 病人的全血浆铜蓝蛋白的结果。

20 具体实施方式

为了达到上述目的，本发明提供使用全血浆铜蓝蛋白特异性多克隆抗体和全血浆铜蓝蛋白特异性单克隆抗体，利用通过酶联免疫吸附测定法得到的吸光度标准曲线测定血液斑点中全血浆铜蓝蛋白浓度的方法。

更详细的说明，本发明的利用酶联免疫吸附测定法，测定血液斑点中全血浆铜蓝蛋白浓度的方法包括：

制造血浆铜蓝蛋白特异性多克隆抗体的步骤，

制造血浆铜蓝蛋白特异性单克隆抗体的步骤，

对上述血浆铜蓝蛋白特异性多克隆抗体和血浆铜蓝蛋白特异性单克隆抗体与辣根过氧化物酶偶联的步骤，

制造除去血浆铜蓝蛋白的血液，在此血液里添加一定浓度的包含精制血浆铜蓝蛋白溶液，制造标准血液斑点和对照血液斑点的步骤，

利用上述血浆铜蓝蛋白特异性多克隆抗体和血浆铜蓝蛋白特异性单克隆抗体，根据标准血液斑点和对照血液斑点，通过酶联免疫吸附测定法制作吸光度标准曲线的步骤，和

利用上述标准曲线，从病人的血液斑点中，测定全血浆铜蓝蛋白浓度的步骤。

同时，本发明提供使用全血浆铜蓝蛋白特异性多克隆抗体和全血浆铜蓝蛋白特异性单克隆抗体，利用通过解离强化的时间分辨荧光免疫测定法得到的标准浓度曲线测定血液斑点中全血浆铜蓝蛋白浓度的方法。

更详细的说明，本发明的利用解离强化的时间分辨荧光免疫测定法，测定血液斑点中全血浆铜蓝蛋白浓度的方法包括：

制造血浆铜蓝蛋白特异性多克隆抗体的步骤，

制造血浆铜蓝蛋白特异性单克隆抗体的步骤，

对上述血浆铜蓝蛋白特异性多克隆抗体和血浆铜蓝蛋白特异性单克隆抗体标记的步骤，

制造除去血浆铜蓝蛋白的血液，在此血液里添加一定浓度的包含精制血浆铜蓝蛋白溶液，制造标准血液斑点和对照血液斑点的步骤，

利用上述血浆铜蓝蛋白特异性多克隆抗体和血浆铜蓝蛋白特异性单克隆抗体，从标准血液斑点和对照血液斑点，通过解离强化的时间分辨荧光免疫测定法制定标准浓度曲线的步骤，和

利用上述标准浓度曲线，从病人的血液斑点中，测定全血浆铜蓝蛋白浓度的步骤。

上述血浆铜蓝蛋白特异性多克隆抗体是一种抗原，把包含全血浆铜蓝蛋白的精制的血浆铜蓝蛋白免疫兔子而制造；上述血浆铜蓝蛋白特异性单克隆抗体是一种抗原，把包含全血浆铜蓝蛋白的精制的血浆铜蓝蛋白免疫小鼠，得可以产生抗体的脾脏细胞，把这细胞与骨髓瘤细胞Sp2/0-Ag14以现为广泛认识的融合法融合，在HAT选择培养液中培养，用酶联免疫吸附测定法，选择可产生抗体的杂交瘤细胞的方法而制造。

把从上述杂交瘤分泌的包含单克隆抗体的培养上清液，跟血浆铜蓝蛋白反应，而确认全血浆铜蓝蛋白的中和氧化酶活性的能力，从而筛选产生全血浆铜蓝蛋白特异性抗体的杂交瘤细胞株。

同时，给上述单克隆抗体和多克隆抗体标记辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase)，从而制备酶联免疫吸附测定所需的抗体；给上述单克隆抗体和多克隆抗体标记铕(Europium; Eu^{3+})，从而制备解离强化的时间分辨荧光免疫测定所需的抗体。

利用酶联免疫吸附测定法或解离强化的时间分辨荧光免疫测定法，测定全血浆铜蓝蛋白，而确认Wilson病患者和正常人之间的差别方法包括：制造除去血浆铜蓝蛋白的血液，给上述血液里添加一定浓度的包含全血浆铜蓝蛋白的精制

10 的血浆铜蓝蛋白溶液制造标准血液斑点和对照血液斑点；利用上述标准血液斑点和抗体，以夹心法制备标准曲线；利用上述标准曲线以同样的方法从Wilson病患者和正常人的样品中测定全血浆铜蓝蛋白的浓度的步骤。

15 以下，通过实施例更详细的说明本发明。尽管下面叙述是通过本发明的优选实施例说明和解释的，但不只局限于下述实施例。

实施例 1：血浆铜蓝蛋白特异性多克隆抗体的制造

本实施例使用了包含从 Sigma 公司购买的全血浆铜蓝蛋白的精制的人体血浆铜蓝蛋白。为了生成特异地针对抗原的多克隆抗体，以 1mg/ml 的浓度，把溶解在磷酸缓冲液中的精制的血浆铜蓝蛋白溶液 400 μl ，用 Freund's 佐剂(BRL 公司上市)乳化后，给 10 周大的兔子以 14 天为间隔，进行了 3 次皮内注射。14 天后以 1mg/ml 的浓度，把溶解在磷酸缓冲液中的精制的血浆铜蓝蛋白溶液 400 μl ，注射在耳静脉内，7 天后以心胀穿孔法采血。把采集的血液在常温中放

25 30 分钟，4 $^{\circ}\text{C}$ 的温度下放置一个晚上。当完全凝固后，在 2, 500rpm 中离心分离 30 分钟，取上清液，的血清。采集到的血清里，为了使最终浓度成为 40%，添加硫酸铵，沉淀后，在 10mM 的磷酸缓冲液中透析一个晚上。之后，用 DEAE Affi-Gel Blue gel(Bio Rad 公司上市)精制抗体。

实施例 2：血浆铜蓝蛋白特异性单克隆抗体的制造

本发明使用的单克隆抗体是把 1mg/ml 的浓度的精制的血浆铜蓝蛋白 100 μ l，用同量的 Freund's 佐剂硫化后，以 2 周为间隔，3 次注射 6-8 周大的 BALB/c 小鼠腹腔内。最后注入后，确认抗血浆铜蓝蛋白抗体的生成，2 周之后，用 100 μ g 的血浆铜蓝蛋白进行最后的免疫。3 天之后，从小鼠抽出脾脏细胞，与 Sp2/0-Ag14 骨髓瘤细胞以 10 : 1 的比率混合，把这混合液放置在 50% 的聚乙二醇 1500 溶液中 3 分钟，进行细胞融合。之后把这个在 1,200rpm 中离心分离 8 分钟，得细胞沉淀物后，使其在包含 10%胎牛血清的 HAT RPMI-1640 培养液里悬浮，使每 ml 含 3.5×10^6 的细胞。之后，分注到 96-孔板里，每孔 0.1ml，在 37 $^{\circ}$ C，5%CO₂ 培养液里培养。3 天后，每孔里添加含 10%胎牛血清的 HAT RPMI-1640 培养液 0.1ml。用新的培养液，每 4 天换一半左右的培养液。

HAT 选择培养后，以酶联免疫吸附测定法确认杂交瘤细胞的抗体产生与否。即把上述用于免疫的血浆铜蓝蛋白，用 0.01M 碳酸盐/碳酸氢盐缓冲液 (pH 9.6) 稀释后，每孔里放进 50 μ l，在 4 $^{\circ}$ C 的温度中涂覆一个晚上。之后，用磷酸盐缓冲液 PBS (phosphate buffer saline, 0.15%Tween 20)，洗涤 3 次，用 1%白蛋白在室温中反应 2 个小时。把细胞的培养上清液，每孔里放进 50 μ l，在常温中反应 2 各小时后，用 PBST 洗涤 3 次。把偶联有生物素的二级抗体-抗小鼠免疫球蛋白抗体 (Biotin conjugated anti-mouse immunoglobulin antibody)，用 1%BSA-PBST 稀释到 1 μ g/ml。之后，每孔里放进 50 μ l，在 37 $^{\circ}$ C 的温度中反应 1 个小时。再用 PBST 洗涤 3 次后，把 Streptavidin-Horseradish Peroxidase，用 1%四甲基联苯胺 (Tetra-Methylbenzidine, TMB) 溶液稀释 1000 倍，每孔里放进 50 μ l，在 37 $^{\circ}$ C 的温度中反应 30 分钟，之后，再次用 PBST 洗涤 4 次。作为进行酶反应的酶底物，每孔里放进 50 μ l TMB 溶液，在室温下反应后，用 2N-硫酸停止反应，在 450nm 波长中，用 ELISA 读数仪测定吸光度。确认抗血浆铜蓝蛋白抗体的生成与否，在显示阳性的孔中得到的细胞，用限制稀释法 (limiting dilution) 亚克隆 3 次，培养为每孔 0.3 的细胞，进行单克隆化，得到了生成抗血浆铜蓝蛋白单克隆抗体的杂交瘤。

实施例 3：确认抗体的血浆铜蓝蛋白氧化酶活性的中和

把精制的血浆铜蓝蛋白 10 μ g 与在实施例 2 得到同样体积的杂交瘤的培养上清液混合后，在 37°C 的温度中反应 30 分钟，之后，在 4°C 的温度中用非参数 (nonparametric) 丙烯酰胺凝胶 (7.5%) 电泳。电泳后，为了确认血浆铜蓝蛋白氧化酶活性，作为染色溶液，使用了具有 1mg/ml 浓度的对苯二胺的醋酸纳 (0.1 M, pH 5.7) 缓冲液，在 37°C 的温度中染色凝胶体 (gel) 2 个小时，在 50% 乙醇溶液中脱色。(图 1)

从图 1 的结果中可知，精制的血浆铜蓝蛋白因自己的氧化酶活性，氧化无色的对苯二胺，形成紫色的带。相反，在血浆铜蓝蛋白和血浆铜蓝蛋白特异性抗体的混合液中，因抗体中和了血浆铜蓝蛋白的氧化酶活性，没有形成紫色的带。以此可知，在实施例 2 中制备的单克隆抗体，对具有氧化酶活性的全血浆铜蓝蛋白有特异性。

实施例 4：全血浆铜蓝蛋白特异性单克隆抗体的精制

把实施例 3 中筛选出的、产生全血浆铜蓝蛋白特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞，接种在有 RPMI 培养液的 T75 烧瓶中，在 37°C，5%CO₂ 培养基中培养 7 天后，进行离心分离，得到培养上清液，添加硫酸铵使最终浓度为 50%，进行沉淀后，在 10mM 的磷酸缓冲液 (pH7.0) 透析过夜。之后，用 DEAE Affi-Gel Blue 凝胶精制了抗体。

实施例 5：氧化酶结合抗血浆铜蓝蛋白抗体的制造

把在实施例 1 和实施例 4 中精制的抗体 5mg，与同量的辣根过氧化物酶，在 0.1M 的磷酸缓冲液 (pH6.8) 混合透析一个晚上。添加以 0.1M 的磷酸缓冲液稀释的最终浓度为 1% 的甲醛溶液，在常温中慢慢搅拌 3 个小时，同时，添加 2M 的甘氨酸，使最终浓度达到 0.1M 后，在常温中放置 2 个小时，再用磷酸缓冲液透析 1 个晚上。之后，在 10,000 中离心分离而得到的上清液中添加同样体积的甘油，在 -20°C 储存。

实施例 6：铕 (Europium) 结合抗血浆铜蓝蛋白抗体的制造

把在实施例 1 和实施例 4 中精制的抗体 1mg，放进 0.1M 的碳酸钠缓冲液

(Na_2CO_3 pH 9.3)里,透析一个晚上,浓缩到最终浓度为 4mg/ml。之后,把 250 μg 的抗体与 0.2 mg 的已螯合铜的 N^1 -(对-异氰酸酯苄基)-二亚乙基三胺- $\text{N}^1, \text{N}^2, \text{N}^3$ -四乙酸酯, [N^1 -(p-isothiocyanate benzyl)-diethylentriamine- $\text{N}^1, \text{N}^2, \text{N}^3$ -tetraacetate, 简称为 DTTA]慢慢搅拌后,在 4°C 的温度中反应一个晚上。之后,用 Superdex 200 柱(在 Amersham 公司上市)和 TSA 缓冲液 (50mmol/L, Tris-HCl (pH 7.8), 0.9%NaCl, 0.05%叠氮化钠)过滤凝胶体后,添加白蛋白,使最终浓度成为 0.1%,在-20°C 储存。

实施例 7 : 制造除去血浆铜蓝蛋白的血液的制造

10 把血液在 3,000rpm 中离心分离 10 分钟后,把上层的血浆部分扔掉。之后,添加磷酸缓冲液搅拌后,用同样的方法分离。反复洗涤 10 次后,离心分离,扔掉血浆部分,得除去血浆的红血球(RBC: Red Blood Cell)。

实施例 8 : 标准血液斑点的制造

15 在实施例 7 中制造的除去血浆铜蓝蛋白的血液里,添加已知浓度的血浆铜蓝蛋白,决定标准的范围。0mg/dl、1 mg/dl、5 mg/dl、20 mg/dl、50 mg/dl,这 5 个为利用在酶联免疫吸附测定法的标准血浆铜蓝蛋白的浓度的范围;0mg/dl、1 mg/dl、5 mg/dl、10 mg/dl、20 mg/dl、30 mg/dl,这 6 个为利用在解离强化的时间分辨荧光免疫测定法的标准血浆铜蓝蛋白的浓度的范围。制造标准血液斑点时,在实施例 6 中制造的血液里,以 1:1 的比例添加已知的血浆铜蓝蛋白溶液。最后调整到原来的血细胞比容。因此,各标准浓度曲线时,浓缩 2 倍,跟实施例 7 里制造的血液混合,滴到过滤纸上,在常温晾干一个晚上。

25 实施例 9 : 对照血液斑点的制造

对照血液斑点(control blood spot)的制造,与实施例 8 同样的方法进行。对照组的血浆铜蓝蛋白的范围为 3 mg/dl(1.40-4.80)、7 mg/dl(5.0-9.0)、15 mg/dl(10.5-19.5)三个范畴。跟标准血液斑点的制造方法一样,与血液以 1:1 的比例混合,滴到过滤纸上,在常温晾干一个晚上。

实施例 10：利用酶联免疫吸附测定法测定血液斑点中血浆铜蓝蛋白浓度
(单克隆抗体-单克隆抗体夹心法)

为了测定血液斑点中的血浆铜蓝蛋白的量，首先把在实施例 2 和实施例 4
5 制备的抗全血浆铜蓝蛋白特异性单克隆抗体用 0.05M 碳酸盐/碳酸氢盐缓冲液稀
释到 2 μ g/ml, 放进每孔里 100 μ g, 在 4 $^{\circ}$ C 的温度中涂覆一个晚上。之后, 用添加
0.05%Tween 20 的磷酸缓冲液洗涤 4 次, 用具有 3%白蛋白的磷酸缓冲液, 在室
温反应 5-8 个小时。用同样的方法洗涤以后, 使用冲头(punch)把血液斑点打孔
1.5mm 直径, 放进各孔里。在这各孔里, 放入 100 μ l 洗脱液(含 1%白蛋白的磷
10 酸盐缓冲液), 使血液斑点浸泡在溶液里, 在 4 $^{\circ}$ C 反应一个晚上。其后, 除掉血
液斑点, 用具有 0.05%Tween 20 的磷酸缓冲液洗涤 4 次以后, 把在实施例 5 制
备的与辣根过氧化物酶偶联的二级单克隆抗体用添加 0.05%Tween 20 的磷酸缓
冲液(含 1%白蛋白)稀释到 500: 1 后, 每孔里放入 100 μ l, 在室温中反应 90 分
钟。之后, 再次用添加 0.05% Tween 20 的磷酸缓冲液洗涤 6 次, 作为酶反应的
15 酶底物, 每孔里放入 100 μ l TMB 溶液, 在室温反应后, 用 1N-盐酸停止反应, 在
450nm 波长, 用 ELISA 读数仪测定吸光度。

**实施例 11：利用解离强化的时间分辨荧光免疫测定血液斑点中血浆铜蓝
蛋白浓度**

20 (单克隆抗体-单克隆抗体夹心法)

为了测定血液斑点中的血浆铜蓝蛋白的量, 首先把在实施例 2 和实施例 4
制备的抗全血浆铜蓝蛋白特异性单克隆抗体用 0.05M 碳酸盐/碳酸氢盐缓冲液稀
释到 2 μ g/ml, 放进每孔里 100 μ g, 在 4 $^{\circ}$ C 的温度中涂覆一个晚上。之后, 用添加
0.1%Tween 20 和 0.9%NaCl 的 Tris-HCl 缓冲液(50mmol/L Tris-HCl (pH
25 7.8)0.9%NaCl 0.1%Tween 20)洗涤 4 次, 用具有 3%白蛋白且添加 0.1%Tween 20
和 0.9%NaCl 的 Tris-HCl 缓冲液, 在室温反应 5-8 个小时。用同样的方法洗涤
以后, 使用冲头把血液斑点打孔 1.5mm 直径, 放进各孔里。在这各孔里, 放入
100 μ l 的为涌出的 DELFIA 分析缓冲液(Wallac 公司上市)溶液, 使血液斑点浸泡
在溶液里, 在 4 $^{\circ}$ C 反应一个晚上。其后, 除掉血液斑点, 用添加 0.1%Tween 20

和 0.9%NaCl 的 Tris-HCl 缓冲液洗涤 4 次以后，把在实施例 6 制备的结合铈的 2 次单克隆抗体用 DELFIA 分析缓冲液稀释到 250ng/ml 后，每孔里放入 100 μ l，在室温中反应 90 分钟。之后，再次用添加 0.1%Tween 20 和 0.9%NaCl 的 Tris-HCl 缓冲液洗涤 4 次，把 DELFIA 增强溶液(Wallac 公司上市)溶液，每孔里放入 5 200 μ l，过 2 分钟后，利用时间分辨荧光分析仪(time-resolved fluorometry)测定铈的拷贝数(copy of Europium)。

**实施例 12：利用酶联免疫吸附测定法测定血液斑点中血浆铜蓝蛋白浓度
(单克隆抗体-多克隆抗体夹心法)**

10 为了测定血液斑点中的血浆铜蓝蛋白的量，与实施例 10 同样的方法测定，只是，二级抗体使用在实施例 1 和实施例 5 制备的偶联有辣根过氧化物酶的多克隆抗体。

实施例 13：利用分离-强化时间分辨荧光免疫测定血液斑点中血浆铜蓝蛋白浓度

15 (单克隆抗体-多克隆抗体夹心法)

为了测定血液斑点中的血浆铜蓝蛋白的量，与实施例 11 同样的方法测定，只是，二级抗体使用在实施例 1 和实施例 6 制备的结合铈的多克隆抗体。

**实施例 14：利用酶联免疫吸附测定法测定血液斑点中血浆铜蓝蛋白浓度
(多克隆抗体-多克隆抗体夹心法)**

20 为了测定血液斑点中的血浆铜蓝蛋白的量，与实施例 10 同样的方法测定，只是，涂覆抗体使用在实施例 1 和实施例 5 制备的偶联有辣根过氧化物酶的多克隆抗体。

25

实施例 15：利用分离-强化时间分辨荧光免疫测定血液斑点中血浆铜蓝蛋白浓度

(多克隆抗体-多克隆抗体夹心法)

为了测定血液斑点中的血浆铜蓝蛋白的量，与实施例 11 同样的方法测定，

只是，涂覆抗体使用在实施例 1 制造的多克隆抗体，二级抗体使用在实施例 1 和实施例 6 制备的结合物的多克隆抗体。

5 实施例 16：利用酶联免疫吸附测定法的正常人与 Wilson 病患者的血浆铜蓝蛋白的定量分析

采集 5 名正常人和 12 名 Wilson 病患者的血液，制造血液斑点，晾干一天后，按实施例 10 的方法，利用图 2 的标准浓度曲线，测定血浆铜蓝蛋白的浓度。

10 实施例 17：利用解离强化的时间分辨荧光免疫测定法的正常人与 Wilson 病患者的血浆铜蓝蛋白的定量分析

采集 5 名正常人和 12 名 Wilson 病患者的血液，制造血液斑点，晾干一天后，按实施例 11 的方法，利用图 3 的标准浓度曲线，测定血浆铜蓝蛋白的浓度。

15 从图 4 可以看出，Wilson 病患者的血浆铜蓝蛋白的浓度，与正常人比较，测定为明显的低。这结果说明本发明的诊断试液在诊断 Wilson 病有很高的筛选力。同时，从图 4 的 Wilson 病患者 12(WD12)可以看出，在全体的 Wilson 病患者中，也有 5%以内的，显示正常血浆铜蓝蛋白数值得情况。这种情况，不仅在这次开发的试剂盒(kit)，而且在以前利用血清的检测法也显示同样的数值。

20

发明的效果

本发明提供了早期诊断 Wilson 病的筛选检查试剂盒；提供与现今在使用的检查方法有区别的，用酶联免疫吸附测定法或解离强化的时间分辨荧光免疫测定法，定量分析用血液过滤纸采集的 1-7 岁幼儿的血液斑点中含铜的全血浆铜蓝蛋白的方法，从而，测定血浆铜蓝蛋白时，不必采集大量血液，用 1-2 滴血液，就能早期诊断 Wilson 病。

本发明提供 Wilson 病诊断试剂及 Wilson 病诊断用试剂盒，实现了使用全血浆铜蓝蛋白特异性单克隆抗体和多克隆抗体，标准血液斑点及对照血液斑点，利用通过酶联免疫吸附测定法或解离强化的时间分辨荧光免疫测定法得到的标准

浓度曲线，测定血液斑点中全血浆铜蓝蛋白的浓度。从而，对样品的采集、搬运、保存提供了方便，而且能一次性的测定多量样品，对以多数认为对象的筛选检查更为有用。

- 5 尽管本发明是通过参考本发明的优选实施例说明和解释的,但不只局限于上述实施例，在不脱离本发明的精神和范围的情况下，通过熟悉本领域的技术人员，可以在形式和细节对其进行各种修改和改变。

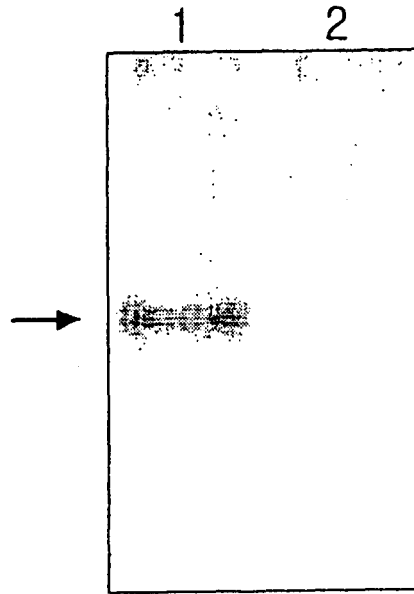


图 1

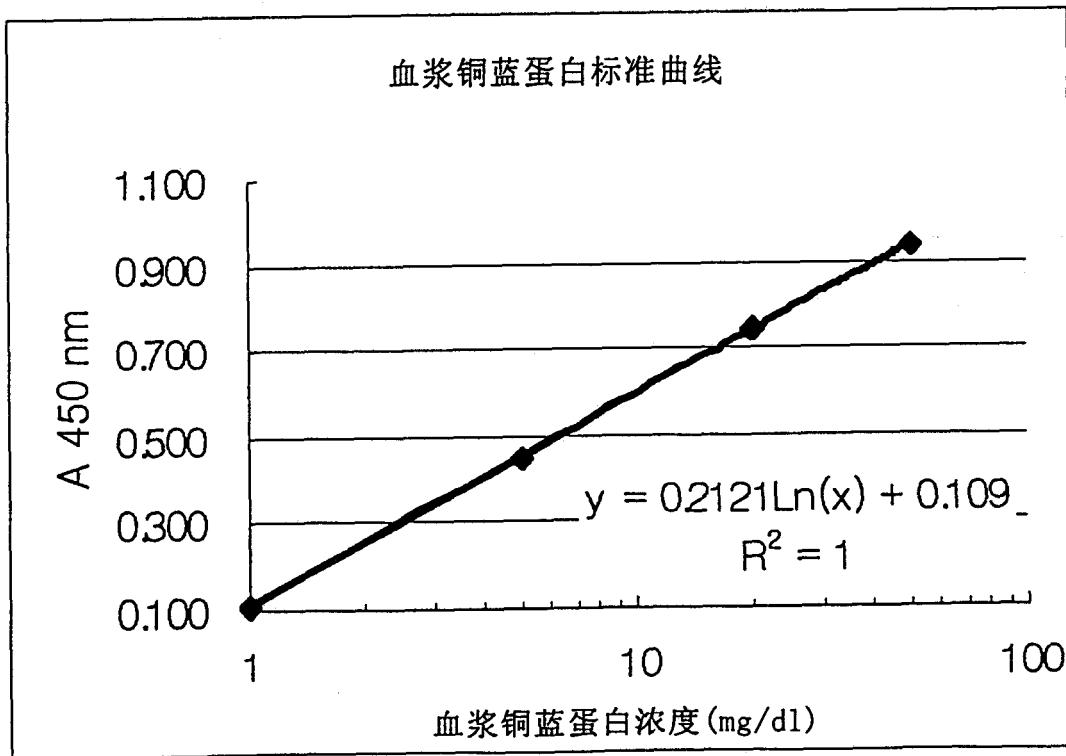


图 2

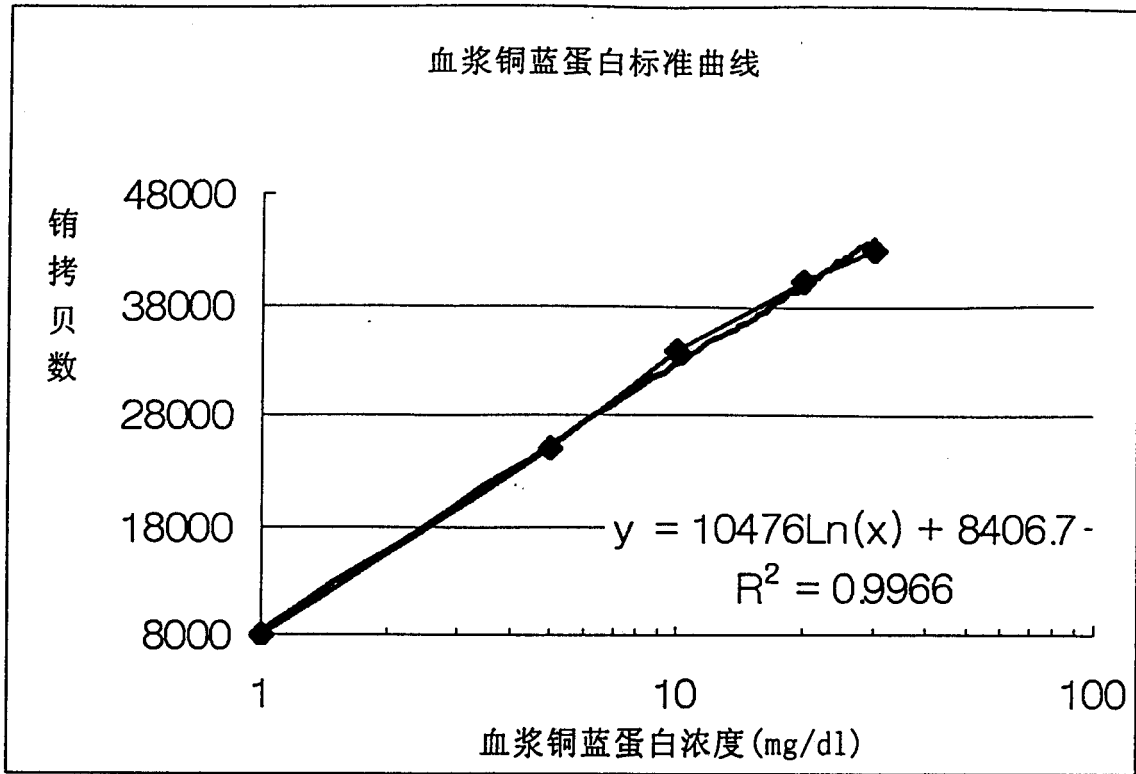


图 3

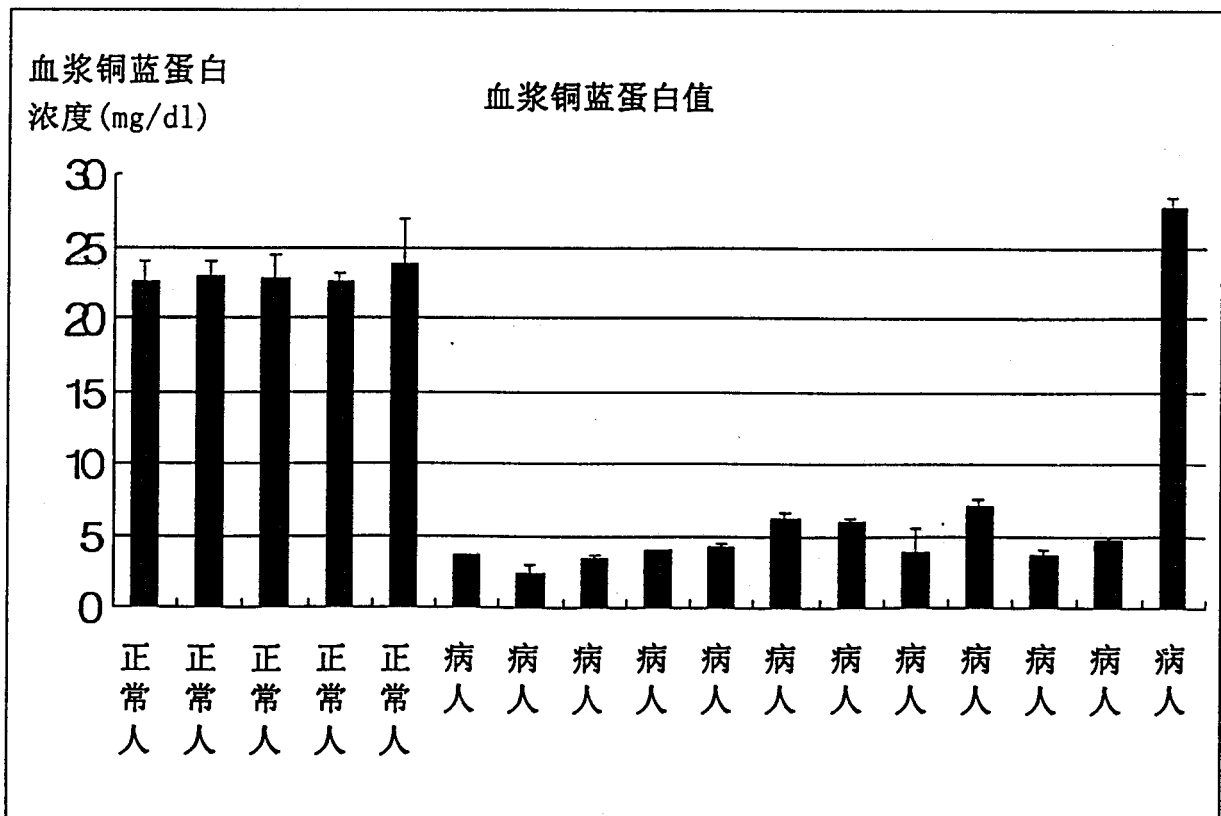


图 4

专利名称(译)	测定血斑中血浆铜蓝蛋白浓度的方法及肝豆状核变性病筛选试剂盒和诊断试剂		
公开(公告)号	CN1145797C	公开(公告)日	2004-04-14
申请号	CN01141150.3	申请日	2001-09-27
[标]发明人	韩始薰 章暎珠 李秀英 申夏澈 朴善荣 柳恩善 韩熙成		
发明人	韩始薰 章暎珠 李秀英 申夏澈 朴善荣 柳恩善 韩熙成		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/68 G01N33/53 C12P21/08		
CPC分类号	Y10S435/975 G01N33/6893 G01N2800/02		
代理人(译)	徐迅		
优先权	1020010017100 2001-03-31 KR		
其他公开文献	CN1379247A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及测量全血浆铜蓝蛋白浓度的方法，特别涉及使用全血浆铜蓝蛋白特异性多克隆抗体和全血浆铜蓝蛋白特异性单克隆抗体，利用通过酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)或解离强化的时间分辨荧光免疫测定法(dissociation-enhanced time-resolved fluoroimmunoassay)得到的标准浓度曲线，测定全血浆铜蓝蛋白浓度的方法。本发明还涉及肝豆状核变性病筛选的试剂盒和诊断试剂。

