

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/68

G01N 33/535

G01N 33/493



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01142683.7

[45] 授权公告日 2005 年 7 月 27 日

[11] 授权公告号 CN 1212517C

[22] 申请日 2001.12.18 [21] 申请号 01142683.7

[71] 专利权人 杜凤鸣

地址 200433 上海市安波路 985 弄 4 号 402

[72] 发明人 杜凤鸣

审查员 倪晓红

[74] 专利代理机构 上海新天专利代理有限公司

代理人 衷诚宣

权利要求书 1 页 说明书 17 页 附图 6 页

[54] 发明名称 人尿中高密度脂蛋白含量酶联免疫
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高密度脂蛋白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。方法简便快速，特异性强，灵敏度高，有较好的临床应用前景。

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

1. 一种人尿中高密度脂蛋白的含量酶联免疫吸附试验试剂盒，其特征在于该试剂盒是由下列试剂组成的：

- ① 高密度脂蛋白抗体 IgG 预包被板 1 块
- ② 高密度脂蛋白抗体 IgG 酶标记液 1 瓶
- ③ 高密度脂蛋白抗体标准浓度为 2500ng/ml、1250ng/ml、625ng/ml、56ng/ml、10ng/ml、0ng/ml 各 1 瓶
- ④ 包被稀释液：Na₂CO₃ 0.16 克，NaHCO₃ 0.29 克，NaN₃ 0.02 克，加水至 100ml 成为 pH9.6 碳酸盐缓冲液
- ⑤ 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 的 PBS-Tween 20 样品稀释液
- ⑥ 洗涤液：Tris 2.42g，1N HCL 13ml，Tween-20 0.5ml 加水至 1000ml 成为 pH7.4 的 0.02M Tris-Tween 20 洗涤液
- ⑦ 基质液：0.1M Na₂HPO₄ 5.14ml，0.05M 柠檬酸 4.86ml，邻苯二胺 4mg，3% H₂O₂ 0.05ml 成为基质液
- ⑧ 终止液：3M H₂SO₄。

人尿中高密度脂蛋白含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高密度脂蛋白（High density lipoprotein HDL）含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尿中各种蛋白质的检测项目日益增多，但尿中 HDL 含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，研制一种高灵敏度和高特异性的诊断试剂盒。

本发明提供了一种 HDL 含量酶免试剂盒，该试剂盒是用抗体 HDL（IgG）包被，抗体 HDL（IgG）联接辣根过氧化物酶为检测抗体的夹心法，检测人尿中的 HDL 含量。并由下列试剂组成：

- ①高密度脂蛋白抗体 IgG 预包被板 1 块
- ②高密度脂蛋白抗体 IgG 酶标记液 1 瓶
- ③高密度脂蛋白抗体标准浓度为 2500ng/ml、1250ng/ml、625ng/ml、56ng/ml、10ng/ml、0ng/ml 各 1 瓶
- ④包被稀释液：Na₂CO₃ 0.16 克，NaHCO₃ 0.29 克，NaN₃ 0.02 克，加水至 100ml 成为 pH9.6 碳酸盐缓冲液
- ⑤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 的 PBS-Tween 20 样品稀释液
- ⑥洗涤液：Tris 2.42g，1N HCL 13ml，Tween-20 0.5ml 加水至 1000ml 成为 pH7.4 的 0.02M Tris-Tween 20 洗涤液
- ⑦基质液：0.1M Na₂HPO₄ 5.14ml，0.05M 柠檬酸 4.86ml，邻苯二胺 4mg，3% H₂O₂ 0.05ml 成为基质液
- ⑧终止液：3M H₂SO₄。

本发明的另一所要解决的技术问题是提供了上述尿中 HDL 含量的 ELISA 试剂盒的制备方法，该方法包括下列步骤：

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

超速离心机：日立牌 80-P-7 型，RPZ-48T 区带转子，RPS-50-2 水平转子

密度梯度形成仪，日立牌，DGP-2 型

Unic 紫外分光光度计：SP-800 型

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

蒸馏水必需符合《中国药典》(1990) 之规定

High Density lipoprotein, 高密度脂蛋白 标准品 (SigMA)

二、包被抗体高密度脂蛋白多克隆抗体的制备

(一) 区带密度梯度离心纯化高密度脂蛋白操作流程:

本文参考 Hinton (1976) 区带密度梯度离心法, 但做了较大改进。使用日立 30-P-7 离心机, RPZ-48T 转子做区带离心。先用阿贝折射仪, 将 NaBr 梯度液配制成密度为 1.4 的液体, 然后将密度为 1.4 的 NaBr 和密度为 1.0 的蒸馏水经密度梯度形成仪由边孔加区带转子内, 此时转速维持在 2800/rpm。加至中孔有梯度液流出时, 再经边孔用恒流泵注入密度为 1.4 的人血清 50ml。待血样全部加入后, 将转速上升至 42000/rpm 离心 18 小时后共得到四个峰, 由中孔收样, 样品流经 Unic 紫外分光光度计测得四个脂蛋白组分峰。其中第一个峰呈乳白色, 集中在第一管, 为极低密度脂蛋白 (vLDL)。其余几个峰均呈浅黄色, 分别为低密度脂蛋白 (LDL) 及高密度脂蛋白 (高密度脂蛋白)。其余系去脂血清, 含其他杂蛋白高峰。将收集到的峰, 选主峰顶部数管不可太宽, 以免混入中间密度脂蛋白 (IDL)。

(二) 脂蛋白抗血清高密度脂蛋白的制备

按常规制备蛋白质抗血清制备法。首先用纯化的高密度脂蛋白溶于 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 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ）分步沉淀纯化成兔抗人高密度脂蛋白抗体 IgG（简称高密度脂蛋白抗体 IgG）。

(三) 酶标兔抗人高密度脂蛋白抗体 IgG 交联物的制备。

经纯化所得的兔抗人高密度脂蛋白抗体 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 PH7.4 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 NaIO_4 0.5ml，混合后置 4℃，30 分钟

↓

加 0.16M 乙二醇 0.5ml 室温 30 分钟

↓

加 mg/ml 的兔抗脂蛋白抗体高密度脂蛋白 IgG 0.5ml

(约含高密度脂蛋白抗体 IgG 7mg)，混合后装透析袋，用 0.05M, pH9.5 碳酸缓冲液透析过液

↓

次日吸出透析物，加 NaBH_4 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) 高密度脂蛋白酶联免疫吸附试验 (ELISA) 双抗体夹心法的操作步骤

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 pH9.5 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 pH7.4PBS-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 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 抗体高密度脂蛋白 IgG 包被 (20μg/ml IgG 4℃过夜)

↓洗涤

0.1ml 样品 (0.1ml 尿原液) (37℃ 2 小时)

0.1ml 脂蛋白标准液 高密度脂蛋白标准品 (SigMA 进口)
0-2500ng/ml

↓洗涤

0.1ml 酶标抗体 IgG (1:2000) (37℃ 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℃ 10 分钟)

二钠缓冲液加 3%H₂O₂ 0.05ml

↓

0.05ml 3M H₂SO₄ 终止反应

↓

490nm 测 OD 值 (DG 3022 酶联免疫测定仪)

↓

计算含量

(五) 分离和纯化的脂蛋白高密度脂蛋白的鉴定

经区带离心和纯化的脂蛋白高密度脂蛋白应用琼脂糖免疫双扩散结果显示高密度脂蛋白为单一沉淀线，证明抗原已经纯化，再经 0.22μm 除菌滤膜过滤除菌。分别用 Lowry 氏法测定高密度脂蛋白蛋白质含量做抗原。做免疫原时需新鲜制备品。

(六) 抗体 IgG 的鉴定

经两次盐析纯化的高密度脂蛋白抗体 IgG, 经长海医院实验诊断科血清室用免疫电泳鉴定结果, 高密度脂蛋白为单一沉淀线。

(七) 标准曲线的制备

倍比稀释的高密度脂蛋白 (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, 高密度脂蛋白-蛋白质 (高密度脂蛋白-P) 最低检测量约为 100 μ g。标准曲线测定高密度脂蛋白-P 含量范围为 100-1000ng/ml。均在正常人含量波动范围之内。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。

(八) 精密度试验

为了明确和证明本研究的脂蛋白 (高密度脂蛋白) 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, 用混合血清分别作高密度脂蛋白批内测定, 结果见表 1。用混合血清作高密度脂蛋白-P 批间含量测定, 结果见表 2。所得变异系数 (CV%), 说明本法重复性良好。

表 2 ELISA 法测定各脂蛋白之批内实验

类别	稀释倍数	n	X (g/L)	SD	CV%	
LDL-P	1:2000	30	0.80	0.05	7.0	
	1:4000	30	0.82	0.05	6.6	
高密度脂蛋白-P	1:2000	30	0.27	0.03	5.0	
	1:4000	30	0.23	0.02	10	

表 2 ELISA 法测定各脂蛋白之批间实验

类别	稀释倍数	n	X (g/L)	SD	CV%	
LDL-P	1:2000	45	0.70	0.04	8.6	
高密度脂蛋白-P	1:2000	30	0.22	0.02	9.0	

(九) 准确性实验

ELISA 法与 UC 法测高密度脂蛋白-蛋白质 (HDL-P) 的比较。用 14 例血样, 每例血样分别用 UC 法和 ELISA 法分离测定高密度脂蛋白-P 含量。

UC 法, 用日立 80P-7 型离心机及 RPS50-2 转子。取血样 0.5ml, 以密度为 1.003-1.006 的 NaCl 轻梯度液及密度为 1.35 的 NaBr 重梯

度液配成线性梯度，49000rpm，10~15℃离心 4.5 小时。用恒流泵将四条 LP 带吸出（先用乙酰苏丹黑 B 予染呈兰色）。用 Lowry 法分别测定高密度脂蛋白-P 含量。

ELISA 法和 UC 法测定同一份血样高密度脂蛋白-P 含量的结果非常显著相关，其相关系数为 $r=0.96$ ($P<0.01$)。

上海长海医院肾内科用本发明试剂盒进行尿脂蛋白测定的试验：

目前对肾脏病人尿中各种蛋白质的检测项目日益增多，而尿脂蛋白测定至今未见报道。本文测定 55 例各种慢性肾脏病患者尿中高密度脂蛋白高密度脂蛋白和低密度脂蛋白 (LDL)。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）24 例（I 型 10 例，II 型 14 例）；慢性肾功能衰竭（慢性肾衰）19 例，慢性肾炎 6 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 1 例。所有检测对象均留 24 小时尿，以酶联免疫吸附试验（ELISA）法测定尿中高密度脂蛋白-蛋白质（高密度脂蛋白-P）和低密度脂蛋白-蛋白质（LDL-P），以 $\mu\text{g/L}$ 为单位。另设对照组 19 例，均为正常成人。

结果：

一、正常人尿中高密度脂蛋白-P 和 LDL-P 的含量：

对照组正常人 19 例尿中高密度脂蛋白-P 和 LDL-P 均为“0”。

二、肾病病人尿中高密度脂蛋白-P 和 LDL-P 的含量：

肾病病人 24 例，尿中高密度脂蛋白-P 全部阳性，其中 I 型平均为 $226\pm 178.09\mu\text{g/L}$ ；

* 上海医学测试中心

II 型为 $357.86\pm 172.14\mu\text{g/L}$ 。I 型尿 LDL-P 全部阴性（均为 0）；II 型则全部为阳性。平均 $105.63\pm 112.96\mu\text{g/L}$ ，且全部病例尿中高密度脂蛋白-P 均 $>$ LDL-P，无 1 例 LDL-P $>$ 高密度脂蛋白-P。

三、慢性肾衰病人尿中高密度脂蛋白-P 和 LDL-P 的含量：

慢性肾衰病人 19 例，尿中高密度脂蛋白-P 阳性者 16 例（84%），平均为 $411.63\pm 392.24\mu\text{g/L}$ ；尿中 LDL-P 阳性者 12 例（63%），平均为 $353.33\pm 295.91\mu\text{g/L}$ 。尿中高密度脂蛋白-P $>$ LDL-P 者 5 例（26%）。

四、慢性肾炎病人高密度脂蛋白-P 和 LDL-P 的含量：

慢性肾炎病人 6 例，尿中高密度脂蛋白-P 与 LDL-P 均阳性，高密度脂蛋白 -P 平均为 $3.01\pm 162.50\mu\text{g/L}$ ，LDL-P 平均为 $164.50\pm 127.90\mu\text{g/L}$ 。全部病例尿中高密度脂蛋白-P 均 $>$ LDL-P。

五、其他肾脏病人尿中高密度脂蛋白-P 和 LDL-P 的含量:

其他肾脏病人共6例,尿中高密度脂蛋白-P除1例狼疮性肾炎外,其余5例均阳性;但尿中LDL-P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,高密度脂蛋白-P>LDL-P。

讨论:

检验中查见正常人对照组尿中高密度脂蛋白-P 和 LDL-P 均为阴性,而慢性肾脏病人皆为阳性(两者均阳性或二者之一为阳性)者52例(95%),可见尿脂蛋白测定可作为慢性肾脏损害的指标之一。

在无明显肾功能不全的肾病组,慢性肾炎和其他肾脏病人尿中高密度脂蛋白-P 检出的阳性率分别为100%、100%和83%,而LDL-P则为58%、100%和50%,前者平均为94%,后者平均为69%。就例数而言,上述3组病人尿中高密度脂蛋白-P 阳性者共35例(仅1例阴性),而尿中LDL-P 阳性者23例(13例阴性)。也就是在尿中高密度脂蛋白-P 阳性者中有12例尿中LDL-P 阴性。就数值而言,肾病组和慢性肾炎组病人尿中高密度脂蛋白-P 平均值明显>LDL-P 平均值(肾病组尿高密度脂蛋白-P 平均值与尿LDL-P 平均值相差非常显著, $P<0.001$);其它肾病组各例尿中高密度脂蛋白-P 均>LDL-P。故认为对于无明显肾功能不全的肾脏病人检测其尿中高密度脂蛋白-P 较LDL-P 敏感。

慢性肾衰组尿中高密度脂蛋白-P 虽检出阳性率及平均值均>LDL-P (两者平均值相差不显著, $P>0.05$),但其中5例尿中LDL-P 明显>高密度脂蛋白-P (包括尿高密度脂蛋白-P 阴性者而尿LDL-P $460\mu\text{g/L}$ 1例),1例中尿中高密度脂蛋白-P 与LDL-P 相等(均为 $500\mu\text{g/L}$)。经统计学处理证明与尿高密度脂蛋白-P 或血LDL-P 均无相关性。另2例两者均阴性,但与血中尿素氮,血清肌酐或肌酐清除率均无相关性。

24例肾病病人中I型者尿中高密度脂蛋白-P 均阳性,而LDL-P 均阴性;II型者两者均阳性,故可作为肾病I型与II型鉴别的指标之一。I型尿脂蛋白检查与尿中 C_3 测定或园盘电泳检测白蛋白相吻合;II型尿脂蛋白检查与激素反应相吻合。这种差异的机理似与两种脂蛋白的园形颗粒直径大小不同有关,高密度脂蛋白-P 为 $6.5\sim 9.5\mu\text{m}$,LDL 为 $20\sim 25\mu\text{m}$,高密度脂蛋白明显<LDL,一般认为I型肾小球滤过膜损害较轻,推测其仅允许颗粒直径小的高密度脂蛋白通过,而不允许颗粒直径大的LDL 通过;而II型肾小球滤过膜损害严重,则颗粒直径大的LDL 也可通过。故初步认为对尿脂蛋白测定可作为选择性蛋白尿与非选择性蛋白尿鉴别指标之一。

采用上海新新医学生物工程有限公司提供 ELISA 法及其试剂盒

测定尿中高密度脂蛋白-P 和 LDL-P 是一种简单快速、不需特殊仪器、易掌握的优于肾脏病尿中其检验方法，并具有高度的敏感性和特异性。故从方法学来讲，对肾脏病的诊断和分型有重要的临床应用价值，应大力推广。

上海第二医科大学附属新华医院用 ELISA 法测定尿中脂蛋白的试验：

在某些疾病中，尿中可出现脂蛋白。本文用酶联免疫吸附试验（简称 ELISA）法，在我院首次用于临床检测 38 例慢性肾脏疾患尿中高密度脂蛋白（高密度脂蛋白）和低密度脂蛋白（LDL），现将结果公布如下：

一、方法：

用上海新新医学生物工程有限公司提供的药盒，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）。测定其中高密度脂蛋白—蛋白质（高密度脂蛋白-P）及低密度脂蛋白—蛋白质（LDL-P）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。测定其尿中高密度脂蛋白-P 及 LDL-P 含量。

三、结果

1. ELISA 方法学鉴定

（1）高密度脂蛋白-P 及 LDL-P 的标准曲线（如图 1 ELISA 法测脂蛋白的标准曲线所示），曲线呈“S”状，可测范围在 80~1000ng/L 之间，与长海医院的标准曲线基本一致。

（2）我院与长海医院同做一组血样结果，发现高密度脂蛋白-P 含量呈显著相关（如图 2 所示） $n=10$ ， $r=0.642$ ， $P<0.05$ 。LDL-P 含量（如图 3 所示）呈非常显著相关。 $N=10$ ， $r=0.817$ ， $P<0.01$ 。

2. 正常人血中脂蛋白含量：血中高密度脂蛋白-P 含量，三个年龄组含量均值相差不大。LDL-P 含量均值随年龄而增加。高密度脂蛋白-P 及 LDL-P 含量，均女性高于男性。

3. 正常人尿中脂蛋白含量：检测正常人对照 15 例，尿中高密度脂蛋白-P 及 LDL-P 均为阴性。检测肾病综合症 18 例，结果见表 3。I 型（8 例）肾病综合症尿中高密度脂蛋白-P 为阳性，LDL-P 为阴性，II 型（10 例）肾病综合症尿中高密度脂蛋白-P 及 LDL-P 均为阳性。

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。

正常人血中高密度脂蛋白-P 及 LDL-P 含量与长海医院结果相一致。

15 例正常人尿中均未见高密度脂蛋白及 LDL，而肾病综合症组患者，I 型（轻型）尿中只出现高密度脂蛋白而 II 型（重型）尿中出现高密度脂蛋白及 LDL。由于呈球状的 LP 分子颗粒大小不一样，LDL 分子直径约为高密度脂蛋白的 2~3 倍，因此尿中 LP 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，而高密度脂蛋白比 LDL 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。

表 3 肾病综合症尿中高密度脂蛋白及 LDL 含量 ($\mu\text{g/L}$)

I 型		II 型	
高密度脂蛋白-P	LDL-P	高密度脂蛋白-P	LDL-P
0	0	450	100
300	0	440	100
400	0	300	200
300	0	500	400
450	0	620	300
0	0	400	300
500	0	820	800
0	0	500	300
		600	450
		400	260

上海第六人民医院用 ELISA 法测定血和尿中脂蛋白的试验：

上海新新医学生物工程有限公司创立了用 ELISA 法检测肾病病人尿中脂蛋白组分的新方法。我院用其提供的药盒用于临床，感到较原来的方法更为科学，合理。现将结果公布如下：

一、方法

用上海新新医学生物工程有限公司提供的药盒，以 ELISA 法进行检测。

二、对象

选正常健康人 10 人，急慢性肾脏疾患 28 例，其中急慢性肾炎 8 例，肾病综合症 10 例，蛋白尿 10 例，测定其尿中高密度脂蛋白-P 及 LDL-P 含量。

三、结果

(一) ELISA 方法学鉴定

1. 高密度脂蛋白-P 及 LDL-P 的标准曲线 (如图 4 所示)，曲线呈“S”状，可测范围在 80~1000ng/L 之间，与长海医院的标准曲线基本一致。

2. 我院与长海医院同做一组血样结果，发现高密度脂蛋白-P 含量呈显著相关 (如图 5 所示)，LDL-P 含量呈非常显著相关 (如图 6 所示)。

(二) 检测健康人尿液 10 例，高密度脂蛋白-P 和 LDL-P 均为阴性

检测各种肾病 28 例尿液中脂蛋白组分含量，其中急慢性肾炎 3 例，3 例高密度脂蛋白阳性 (阳性率 38%)，2 例 LDL 阳性 (阳性率 25%)，肾病综合症 10 例，8 例高密度脂蛋白阳性，(阳性率 80%)，5 例 LDL 阳性 (阳性率 50%)，蛋白尿 10 例，6 例高密度脂蛋白阳性 (阳性率 60%)，3 例 LDL 阳性 (阳性率 30%)，见附表 4。

表 4 各肾脏疾患尿中脂蛋白含量 ($\mu\text{g/L}$)

急慢性肾炎		肾病综合症		蛋白尿	
高密度脂蛋白-P	LDL-P	高密度脂蛋白-P	LDL-P	高密度脂蛋白-P	LDL-P
—	—	200	—	—	—
700	—	—	—	—	—
360	—	640	100 *	620	100
300	—	640	250 *	520	—
—	—	2000	320 *	450	200
—	—	—	—	300	—
400	320	450	80 *	460	—
400	260	300	—	540	150
—	—	400	—	—	—
—	—	440	70 *	—	—

注：*者为肾病综合症 II 型

四、讨论

根据我院试用 ELISA 方法，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复性均较好。10例健康人尿中均未见高密度脂蛋白及 LDL，而各种肾脏疾患则程度不同地出现高密度脂蛋白或 (LDL)。有意义的是，在 10 例肾病综合症患者中，仅含有高密度脂蛋白均为阴性的是临床诊断为 I 型（轻型）的病人，而 II 型（重型）尿中出现高密度脂蛋白和 LDL 这是由于肾小球滤过膜受损的严重程度不一，以及小分子量的高密度脂蛋白比 LDL 更容易滤出的原因故用 ELISA 法对肾病综合症进行分型比其他方法更为敏感。在蛋白尿和急慢性肾炎时，我们也可根据其尿中 LP 的种类及多少，来诊断其病情的严重程度以及预后等等。

同济大学上海放射免疫研究所用 ELISA 法测定人尿中脂蛋白的试验：

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。我所首先运用上海新新医学生物工程有限公司创立的用酶联免疫吸附试验（简称 ELISA）法检测人尿中高密度脂蛋白（高密度脂蛋白）和低密度脂蛋白（LDL）。

现将结果公布如下：

一、方法

用上海新新医学生物工程有限公司提供的药盒，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）和 45~60 岁组（男 35 人，女 30 人），测定其中高密度脂蛋白 2—蛋白质（高密度脂蛋白-P）及低密度脂蛋白—蛋白质（LDL-P）含量。

(2) 选正常健康人 10 人，慢性肾脏疾患 27 例，其中肾病综合症 16 例，慢性肾炎 11 例，测定其尿中高密度脂蛋白-P 及 LDL-P 含量。

三、结果

1. ELISA 方法学鉴定

(1) 高密度脂蛋白-P 及 LDL-P 的标准曲线（如图 7 ELISA 法测脂蛋白的标准曲线所示），曲线呈“S”状。可测范围在 80~1000ng/L 之间，与长海医院的标准曲线基本一致。

(2) 我所与长海医院同做一组样品，结果发现高密度脂蛋白-P 含量呈显著相关。 $n=10$, $r=0.726$, $P<0.05$ （如图 8 所示），LDL-P 含量呈非常显著相关。 $n=10$, $r=0.866$, $p<0.01$ （如图 9 所示）。

(3) 检测正常健康人尿中脂蛋白组分含量尿中高密度脂蛋白-P 及 LDL-P 均为“0”。检测肾病综合症 16 例，其中 I 型 7 例，II 型 9 例，尿中脂蛋白含量见表 5。检测慢性肾炎 11 例，尿中脂蛋白含量见表 6。

表1 肾病综合症病人尿中脂蛋白含量 ($\mu\text{g/L}$)

I 型		II 型	
高密度脂蛋白-P LDL-P	LDL-P	高密度脂蛋白-P	LDL-P
450	0	300	200
300	0	500	400
400	0	100	400
440	0	100	240
300	0	220	210
450	0	300	160
0	0	530	110
		700	230
		800	250

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。说明该法准确性及重演性均好。10 例健康人尿中均未见高密度脂蛋白和 LDL, 而肾病综合症 16 例。

表6 慢性肾炎病人尿中脂蛋白的含量 ($\mu\text{g/L}$)

高密度脂蛋白-P	LDL-P
400	320
0	0
400	260
500	250
0	0
0	0
100	0
0	0
250	100
0	0
600	320

尿中高密度脂蛋白阳性有 15 例,阳性率为 93.7%, LDL 阳性有 9 例,阳性率为 60%, 有意义的是, I 型(轻型)尿中只出现高密度脂蛋白, 而 II 型(重型)尿中出现高密度脂蛋白和 LDL。由于呈球状的 LP 分子颗粒大小不一样, LDL 分子直径约为高密度脂蛋白的 2~3

倍，因此尿中 LP 出现的种类不同有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。慢性肾炎病人 11 例，其中 6 例高密度脂蛋白阳性，阳性率为 54%，5 例 LDL 阳性，阳性率为 45%，可根据该病人尿中是否出现 LP，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。

附图说明

- 图 1 上海第二医科大学附属新华医院 ELISA 法测脂蛋白的标准曲线
- 图 2 上海第二医科大学附属新华医院 LPL-P 相关图
- 图 3 上海第二医科大学附属新华医院高密度脂蛋白-P 相关图
- 图 4 上海第六人民医院 ELISA 法测脂蛋白的标准曲线
- 图 5 上海第六人民医院高密度脂蛋白-P 相关图
- 图 6 上海第六人民医院 LPL-P 相关图
- 图 7 同济大学上海放射免疫研究所 ELISA 法测脂蛋白的标准曲线
- 图 8 同济大学上海放射免疫研究所高密度脂蛋白-P 相关图
- 图 9 同济大学上海放射免疫研究所 LPL-P 相关图

具体实施方式

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

超速离心机：日立牌 80-P-7 型，RPZ-48T 区带转子，RPS-50-2 水平转子

密度梯度形成仪，日立牌，DGP-2 型

Unic 紫外分光光度计：SP-800 型

DG3022 酶联免疫测定仪：南京华东电子管厂
721 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

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	A.R
柠檬酸	A.R
NaCl	A.R
甘油	化学纯
H ₂ O ₂	A.R
Tween-20	化学纯
邻苯二胺	化学纯
H ₂ SO ₄	A.R

蒸馏水必需符合《中国药典》(1990)之规定

High Density lipoprotein, 高密度脂蛋白 标准品 (SigMA)

二、包被抗体高密度脂蛋白多克隆抗体的制备

(一) 区带密度梯度离心纯化高密度脂蛋白操作流程:

本文参考 Hinton (1976) 区带密度梯度离心法, 但做了较大改进。使用日立 30-P-7 离心机, RPZ-48T 转子做区带离心。先用阿贝折射仪, 将 NaBr 梯度液配制成密度为 1.4mg/ml 的液体, 然后将密度为 1.4mg/ml 的 NaBr 和密度为 1.0mg/ml 的蒸馏水经密度梯度形成仪由边孔加区带转子内, 此时转速维持在 2800 rpm。加至中孔有梯度液流出时, 再经边孔用恒流泵注入密度为 1.4mg/ml 的人血清 50ml。待血样全部加入后, 将转速上升至 42000 rpm 离心 18 小时后共得到四个峰, 由中孔收样, 样品流经 Unic 紫外分光光度计测得四个脂蛋白组分峰。其中第一个峰呈乳白色, 集中在第一管, 为极低密度脂蛋白 (vLDL)。其余几个峰均呈浅黄色, 分别为低密度脂蛋白 (LDL) 及高密度脂蛋白 (高密度脂蛋白)。其余系去脂血清, 含其他杂蛋白高峰。将收集到的峰, 选主峰顶部数管不可太宽, 以免混入中间密度脂蛋白 (IDL)。

(二) 脂蛋白抗血清高密度脂蛋白的制备

按常规制备蛋白质抗血清制备法。首先用纯化的高密度脂蛋白溶于 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) SO₄) 分步沉淀纯化成兔抗人 (高密度脂蛋白) 抗体 IgG (简称高密度脂蛋白抗体 IgG)。

(三) 酶标兔抗人高密度脂蛋白抗体 IgG 交联物的制备。

经纯化所得的兔抗人高密度脂蛋白抗体 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℃, 30 分钟
- ↓
- 加 0.16M 乙二醇 0.5ml 室温 30 分钟
- ↓
- 加 mg/ml 的兔抗脂蛋白抗体高密度脂蛋白 IgG 0.5ml
(约含高密度脂蛋白抗体 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) 脂蛋白高密度脂蛋白酶联免疫吸附试验 (ELISA) 双抗体夹心法的操作

作步骤

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 pH7.4PBS-Tween 20 样品稀释液。

洗涤液: Tris 2.42g, 1M 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 抗体高密度脂蛋白 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 脂蛋白标准液 高密度脂蛋白标准品 (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

↓

490nm 测 OD 值 (DG 3022 酶联免疫测定仪)

↓

计算含量

(五) 分离和纯化的脂蛋白高密度脂蛋白的鉴定

经区带离心和纯化的脂蛋白高密度脂蛋白应用琼脂糖免疫双扩散结果显示高密度脂蛋白为单一沉淀线，证明抗原已经纯化，再经 0.22 μ 除菌滤膜过滤除菌。分别用 Lowry 氏法测定蛋白质含量做抗原。做免疫原时需新鲜制备品。

(六) 抗体 IgG 的鉴定

经两次盐析纯化的高密度脂蛋白抗体 IgG，经长海医院实验诊断科血清室用免疫电泳鉴定结果，高密度脂蛋白为单一沉淀线。

(七) 标准曲线的制备

倍比稀释的高密度脂蛋白 (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，高密度脂蛋白-蛋白质 (高密度脂蛋白-P) 最低检测量约为 100 μg 。标准曲线测定高密度脂蛋白-P 含量范围为 100-1000ng/ml。均在正常人含量波动范围之内。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。

(八) 精密度试验

为了明确和证明本研究的脂蛋白 (高密度脂蛋白) 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，用混合血清分别作高密度脂蛋白批内测定，结果见表 1。用混合血清作高密度脂蛋白-P 批间含量测定，结果见表 2。所得变异系数 (CV%)，说明本法重复性良好。

表 2 ELISA 法测定各脂蛋白之批内实验

类别	稀释倍数	n	X (g/L)	SD	CV%	
LDL-P	1:2000	30	0.80	0.05	7.0	
	1:4000	30	0.82	0.05	6.6	
高密度脂蛋白-P	1:2000	30	0.27	0.03	5.0	
	1:4000	30	0.23	0.02	10	

表 2 ELISA 法测定各脂蛋白之批间实验

类别	稀释倍数	n	X (g/L)	SD	CV%	
LDL-P	1:2000	45	0.70	0.04	8.6	
高密度脂蛋白-P	1:2000	30	0.22	0.02	9.0	

(九) 准确性实验

ELISA 法与 UC 法测高密度脂蛋白-P (高密度脂蛋白-蛋白质) 的比较。

用 14 例血样，每例血样分别用 UC 法和 ELISA 法分离测定高密度脂蛋白-P 含量。

UC 法，用日立 80P-7 型离心机及 RPS50-2 转子。取血样 0.5ml，以密度为 1.003-1.006 的 NaCl 轻梯度液及密度为 1.35 的 NaBr 重梯度液配成线性梯度，49000rpm，10~15℃离心 4.5 小时。用恒流泵将四条 LP 带吸出 (先用乙酰苏丹黑 B 予染呈兰色)。用 Lowry 法分别测定高密度脂蛋白-P 含量。

ELISA 法和 UC 法测定同一份血样高密度脂蛋白-P 含量的结果非常显著相关，其相关系数为 $r=0.96$ ($P<0.01$)。

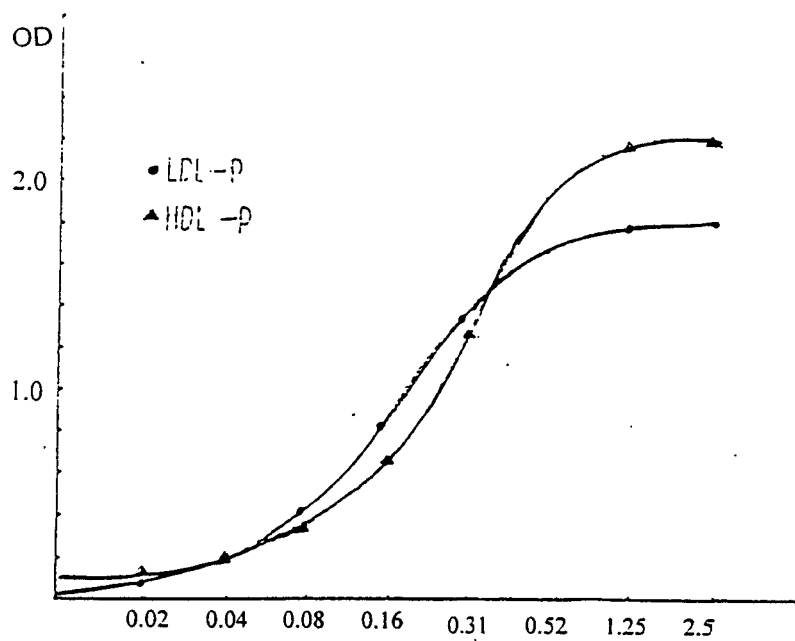


图 1

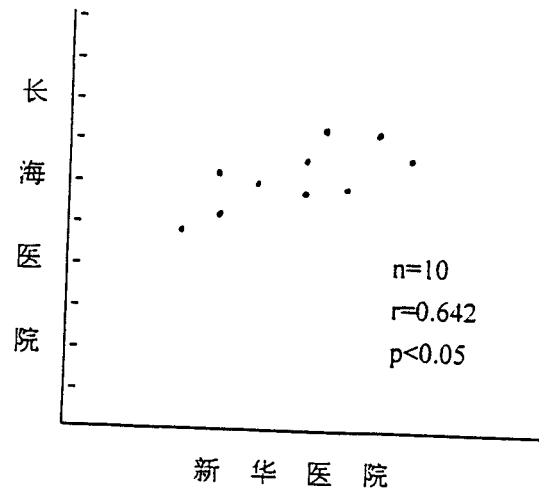


图 2

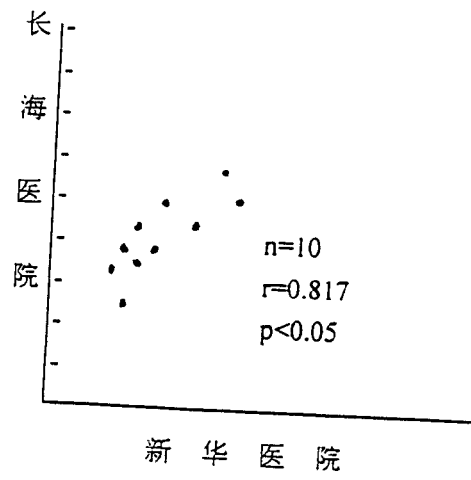


图 3

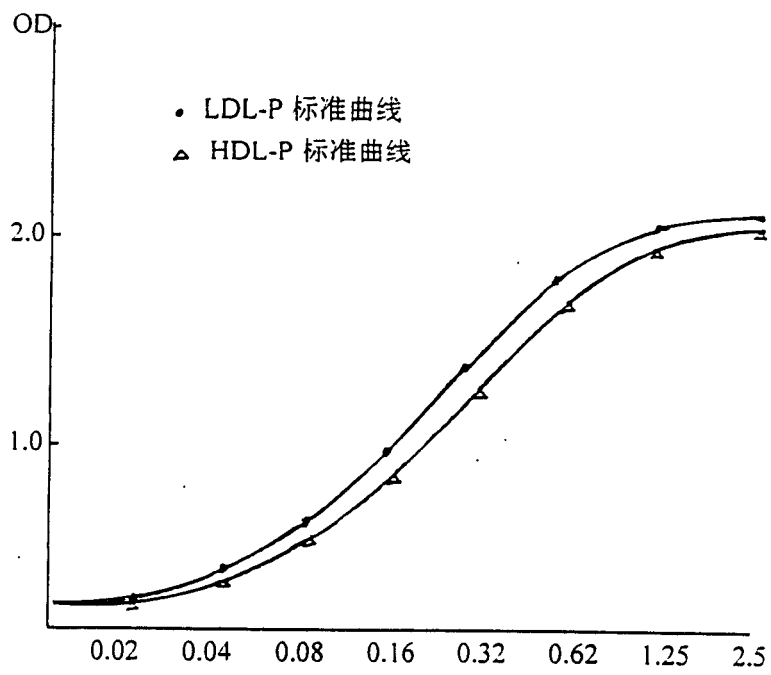


图 4

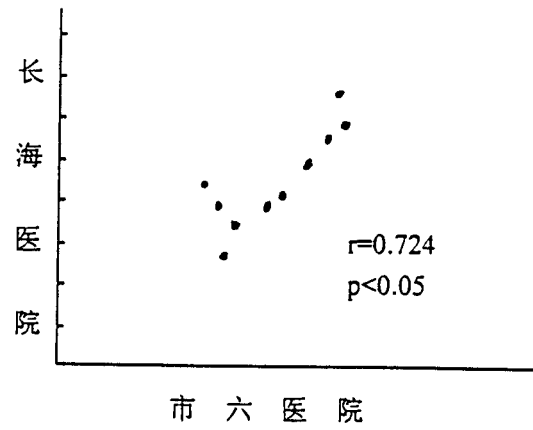


图 5

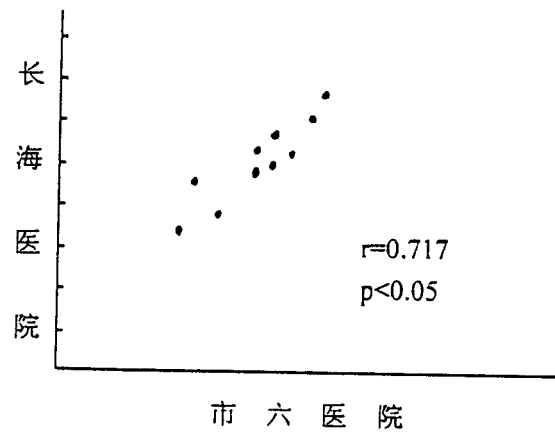


图 6

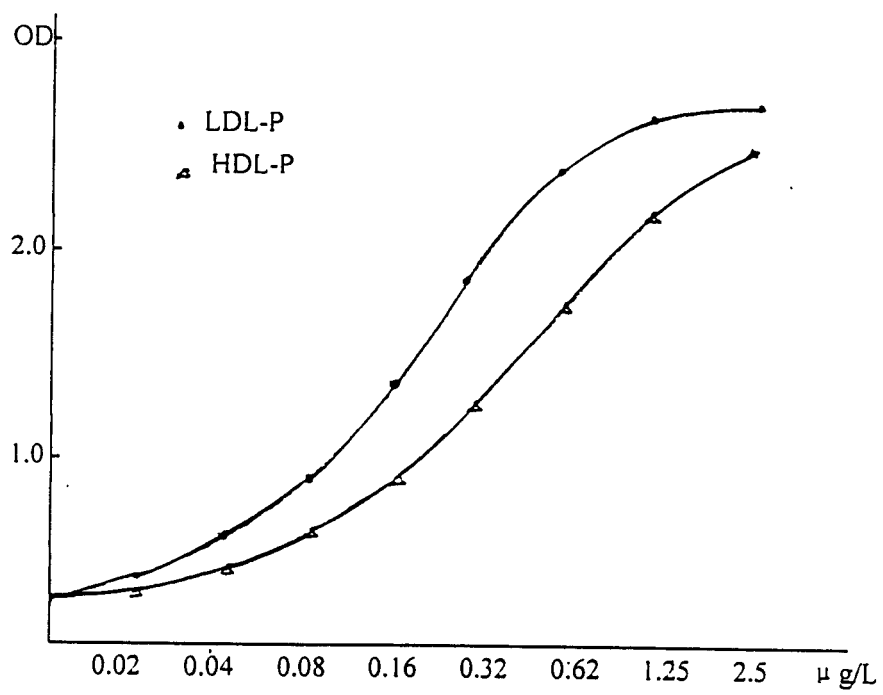


图 7

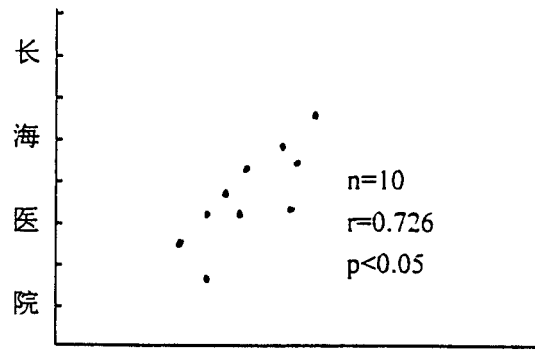


图 8

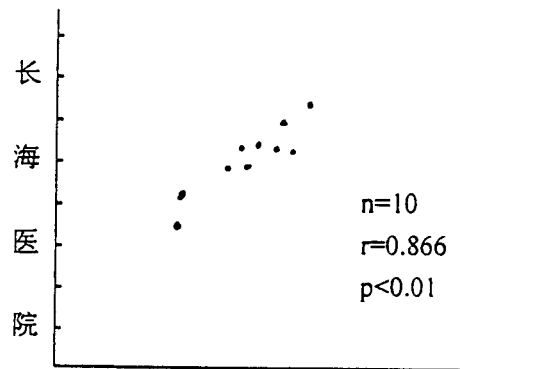


图 9

专利名称(译)	人尿中高密度脂蛋白含量酶联免疫吸附试验试剂盒及制备方法		
公开(公告)号	CN1212517C	公开(公告)日	2005-07-27
申请号	CN01142683.7	申请日	2001-12-18
[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	G01N33/493 G01N33/535 G01N33/68		
其他公开文献	CN1427257A		
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高密度脂蛋白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。方法简便快速，特异性强，灵敏度高，有较好的临床应用前景。

