

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

G01N 33/53

G01N 33/558 G01N 33/92

G01N 33/577



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03104664.9

[43] 公开日 2004 年 8 月 25 日

[11] 公开号 CN 1523355A

[22] 申请日 2003.2.20 [21] 申请号 03104664.9

[71] 申请人 刘凤鸣

地址 100044 北京市海淀区车公庄西路 20 号  
北京亿利高科生物工程技术有限公司

[72] 发明人 刘凤鸣

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司  
代理人 关 畅

权利要求书 2 页 说明书 5 页 附图 1 页

[54] 发明名称 一种检测脂质过氧化物的方法

[57] 摘要

本发明公开了一种检测脂质过氧化物的方法，目的是提供一种具有较高稳定性、灵敏度及特异性的检测脂质过氧化物的方法。本发明检测脂质过氧化物的方法，是利用抗脂质过氧化物和抗非过氧化脂质的单克隆或多克隆抗体配对进行样品中脂质过氧化物 oxLDL 和 MDA - LDL 的测定。利用本发明的方法检测脂质过氧化物既可以基于酶联免疫法的原理，又可以基于免疫纸层析法的原理。本发明的方法提高了对血液和脂质样品中过氧化物检测的可行性，并大大降低了该检测中的配对抗体筛选的复杂性，具有重要的实际应用意义。

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

1、检测脂质过氧化物的方法，是利用抗脂质过氧化物和抗非过氧化脂质的单克隆或多克隆抗体配对进行样品中脂质过氧化物 oxLDL 和 MDA-LDL 的测定。

2、根据权利要求 1 所述的检测脂质过氧化物的方法，其特征在于：在酶联免疫法的测定中包括以下步骤：

1) 用抗人 oxLDL 或抗人 MDA-LDL 或抗人 LDL 的单克隆或多克隆抗体包板；

2) 加入待测样品；

3) 加入相应的第二抗体，当采用抗人 oxLDL 或抗人 MDA-LDL 单克隆或多克隆抗体包板时，加入的第二抗体为抗人 LDL 单克隆或多克隆抗体；当采用抗人 LDL 单克隆或多克隆抗体包板时，加入的第二抗体为抗人 oxLDL 或 MDA-LDL 单克隆或多克隆抗体；

4) 加入与第二抗体对应的酶标抗体进行反应；

5) 加入底物进行反应；

6) 确定样品中 oxLDL 或 MDA-LDL 的水平。

3、根据权利要求 2 所述的检测脂质过氧化物的方法，其特征在于：所述与第二抗体对应的酶标抗体是以制造第二抗体的动物的 IgG 为抗原得到的抗体。

4、根据权利要求 2 所述的检测脂质过氧化物的方法，其特征在于：所述酶标抗体的标记物为辣根过氧化物酶；所述底物为过氧化氢。

5、根据权利要求 2 或 3 或 4 所述的检测脂质过氧化物的方法，其特征在于：所述方法的步骤为：

1) 包被；

2) 洗板；

3) 封闭；

4) 洗板；

5) 加样；

6) 洗板；

7) 加入第二抗体；

8) 洗板；

9) 加入酶标抗体；

10) 洗板；

11) 加入底物；

12) 加入终止液；

13) 用酶免测定仪读取 450nm 波长处吸光率。

6、根据权利要求 1 所述的检测脂质过氧化物的方法，其特征在于：在免疫纸层析法的测定中包括以下步骤：

1) 标记抗人 oxLDL 和抗人 MDA-LDL 或标记抗人 LDL 的单克隆或多克隆抗体，作为显色抗体；

2) 用对应的非标记抗人 oxLDL 和抗人 MDA-LDL 或非标记抗人 LDL 的单克隆或多克隆抗体包被检测膜，作为捕获抗体；

3) 组装检测试纸条；

4) 向显色抗体中加入待测样品；

5) 确定样品中 oxLDL 或 MDA-LDL 的水平。

7、根据权利要求 6 所述的检测脂质过氧化物的方法，其特征在于：用胶体金属显色法进行所述显色抗体标记。

8、根据权利要求 7 所述的检测脂质过氧化物的方法，其特征在于：所述胶体金属显色法为胶体金法。

## 一种检测脂质过氧化物的方法

### 技术领域

本发明涉及一种检测脂质过氧化物的方法。

### 背景技术

氧自由基是人体白细胞用来抵御外来入侵的有力工具，但在某些状态下，它也可以导致人体的病理性改变，包括动脉粥样硬化、肺纤维化、肾小球硬化、肝硬化、衰老等。这些病理改变往往是由于体内过量的自由基导致脂质过氧化物在体内聚集所致。最常见的脂质过氧化物有氧化型低密度脂蛋白（oxLDL）和丙二醛氧化型低密度脂蛋白（MDA-LDL）。这些过氧化脂蛋白的形成可导致：1）低密度脂蛋白出现自体抗原性；2）对正常低密度脂蛋白（LDL）受体的亲和力降低或消失；3）过多的脂质过氧化物被细胞摄取，而形成泡沫样细胞；4）刺激细胞增值。这些改变的最终结果表现为动脉粥样硬化、肺纤维化、肝硬化等。目前，已有许多临床研究报道证实 oxLDL 和 MDA-LDL 在冠心病病人血液中的浓度明显高于正常人，同时在个别肾病病人、肝脏疾患、长期大量饮酒者血液中的浓度也高于正常人。部分结缔组织系统疾病患者，如系统性红斑狼疮患者血液中的浓度也有升高。血液脂质过氧化物的测定既有助于疾病的诊断，也是人群健康控制的一种良好检测手段。

酶联免疫法和免疫纸层析法是目前用于样品中 oxLDL 和 MDA-LDL 浓度的检测方法。一般采用双抗体夹心法，即选用不同的单克隆抗体，对样品抗原进行夹心测定，所用的抗体均为过氧化结构特异性的，即检测 oxLDL 水平，用抗 oxLDL 抗体，配对抗 oxLDL 抗体，检测 MDA-LDL 水平用抗 MDA-LDL 抗体配对抗 MDA-LDL 抗体。这些方法需要选配两个同时对抗脂质过氧化位点，但具有不同的抗原决定簇的抗体，工作量很大，比较复杂，并带有很大程度的偶然性，影响了血液脂质过氧化物水平检测的临床应用。

### 发明创造内容

本发明的目的是提供一种具有较高稳定性、灵敏度及特异性的检测脂质过氧化物的方法。

检测脂质过氧化物的方法，是利用抗脂质过氧化物和抗非过氧化脂质的单克隆或多克隆抗体配对进行样品中脂质过氧化物 oxLDL 和 MDA-LDL 的测定。

利用本发明的方法检测脂质过氧化物既可以基于酶联免疫法的原理，又可以基于免疫纸层析法的原理。

在酶联免疫法的测定中包括以下步骤：

- 1) 用抗人 oxLDL 或抗人 MDA-LDL 或抗人 LDL 的单克隆或多克隆抗体包板;
- 2) 加入待测样品;
- 3) 加入相应的第二抗体, 当采用抗人 oxLDL 或抗人 MDA-LDL 单克隆或多克隆抗体包板时, 加入的第二抗体为抗人 LDL 单克隆或多克隆抗体; 当采用抗人 LDL 单克隆或多克隆抗体包板时, 加入的第二抗体为抗人 oxLDL 或 MDA-LDL 单克隆或多克隆抗体;
- 4) 加入与第二抗体对应的酶标抗体进行反应;
- 5) 加入底物进行反应;
- 6) 确定样品中 oxLDL 或 MDA-LDL 的水平。

所述与第二抗体对应的酶标抗体是以制造第二抗体的动物的 IgG 为抗原得到的抗体。

所述酶标抗体的标记物优选为辣根过氧化物酶; 所述底物优选为过氧化氢。

优选用酶免测定仪读取 450nm 波长处吸光率来确定样品中 oxLDL 或 MDA-LDL 的水平。

以酶联免疫法为基础的测定样品中脂质过氧化物 oxLDL 和 MDA-LDL 含量的具体步骤为:

- 1) 包被;
- 2) 洗板;
- 3) 封闭;
- 4) 洗板;
- 5) 加样;
- 6) 洗板;
- 7) 加入第二抗体;
- 8) 洗板;
- 9) 加入酶标抗体;
- 10) 洗板;
- 11) 加入底物;
- 12) 加入终止液;
- 13) 用酶免测定仪读取 450nm 波长处吸光率。

在免疫纸层析法的测定中包括以下步骤:

- 1) 标记抗人 oxLDL 和抗人 MDA-LDL 或标记抗人 LDL 的单克隆或多克隆抗体, 作为显色抗体;
- 2) 用对应的非标记抗人 oxLDL 和抗人 MDA-LDL 或非标记抗人 LDL 的单克隆或多克隆抗体包被检测膜, 作为捕获抗体; 当采用标记抗人 oxLDL 和抗人 MDA-LDL 作为显色抗

体时，捕获抗体为非标记抗人 LDL 抗体，当采用非标记抗人 LDL 作为显色抗体时，捕获抗体为标记抗人 oxLDL 和抗人 MDA-LDL 抗体；

### 3) 组装检测试纸条

4) 向显色抗体中加入待测样品，使样品中的抗原 oxLDL 和抗人 MDA-LDL 分别与标记的抗人 oxLDL 和抗人 MDA-LDL 抗体结合或样品中的抗原 LDL 与标记的抗人 LDL 抗体结合并向捕获抗体泳动；

### 5) 确定样品中 oxLDL 或 MDA-LDL 的水平。

其中，结合有抗原的显色抗体与捕获抗体结合而显色，其显色强度与结合量相关。通过显色反应确定样品中 oxLDL 或 MDA-LDL 的水平。

一般采用胶体金属显色法进行所述显色抗体标记，其中优选的为胶体金法。

所述显色反应确定可采用目测法，即为定性法，或显色密度检测法来确定样品中 oxLDL 或 MDA-LDL 的水平，也可以用色卡等来确定样品中 oxLDL 或 MDA-LDL 的水平。

显色反应确定可采用目测法，即为定性法，或显色密度检测法来确定样品中 oxLDL 或 MDA-LDL 的水平，也可以用色卡等来确定样品中 oxLDL 或 MDA-LDL 的水平。

本发明中的抗人 oxLDL、抗人 MDA-LDL 及抗人 LDL 的单克隆或多克隆抗体均可以按照常规生物学及生物工程学方法制得。

本发明巧妙地利用抗脂质过氧化物和抗非过氧化脂质的单克隆或多克隆抗体配对进行样品中脂质过氧化物 oxLDL 和 MDA-LDL 的测定，实现了利用只有一个抗脂质过氧化物位点的单克隆或多克隆抗体配以一抗 LDL 的单克隆或多克隆抗体，就可夹心测定样品中脂质过氧化物 oxLDL 和 MDA-LDL 的水平，提高了对血液和脂质样品中过氧化物检测的可行性，并大大降低了该检测中的配对抗体筛选的复杂性，具有重要的实际应用意义。

## 附图说明

图 1 为酶联免疫检测法不同样品吸收光度的直方图。

## 具体实施方式

实施例 1、用脂质过氧化物包板的酶联免疫检测方法检测样品中的脂质过氧化物

### 一、实验材料：

#### 1、样品制备：

MDA-LDL 的制备：取 0.2ml 12M HCl，加入 0.165ml 四甲氧基丙烷，混合，室温静置 30 分钟，然后加入 4.8ml 0.1M 磷酸钠缓冲液 (pH6.4) (用 10M NaOH 调 pH)，再与等体积 2mg/ml LDL (SIGMA) 水溶液混合，37℃水浴 2 小时。

用 0.1M 磷酸钠缓冲液 (pH7.4) 透析过夜 (4℃)，终止反应，离心，-20℃保存。

oxLDL 的制备：分别配制 1mg/ml LDL (SIGMA) 和 10mg/ml 硫酸铜溶液，按 1:1 体积混合，37℃水浴通氧气反应 24 小时，用 0.1M 磷酸钠缓冲液 (pH7.4) 透析过夜 (4

℃)，终止反应，离心，-20℃保存。

2、酶联反应板：96孔板；

3、试剂配制：

试剂来源：兔抗人 oxLDL 多克隆抗体，羊抗人 MDA-LDL 多克隆抗体，购自美国 Biodesign 公司。辣根过氧化物酶（HRP）标记羊抗兔和兔抗羊 IgG 多克隆抗体购自北京中山生物技术公司，其它试剂均购自北京化学试剂总公司。

抗人非过氧化低密度脂蛋白单克隆抗体的制备过程是：采用非过氧化低密度脂蛋白免疫 Balb/c 小鼠，收集免疫 Balb/c 小鼠脾细胞，与瘤细胞融合，经筛选和 3-5 次亚克隆化而获得抗人非过氧化低密度脂蛋白单克隆抗体细胞株，在将该细胞株接种于小鼠腹腔内，使其产生腹水，收集腹水，经蛋白 A 法纯化而得。

包被缓冲液：50mM 碳酸盐缓冲液，pH9.6；

洗涤缓冲液：10mM PBS，0.05% Tween20，pH7.4；

底物缓冲液：24.3mM 柠檬酸，51.4mM 磷酸氢二钠，0.015% 双氧水邻苯二胺 1mg/ml；

封闭缓冲液：1 × 磷酸盐缓冲液，1% 牛血清白蛋白，pH7.4；

稀释缓冲液：1 × 磷酸盐缓冲液，0.25% 牛血清白蛋白，0.05% Tween，-20℃，pH7.4；

终止液：2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>；

二、操作方法：

1、包被：取兔抗人 oxLDL 或 MDA-LDL 多克隆抗体，用稀释缓冲液配制 4ug/ml 液体，按 100ul/孔加入反应板，37℃包被 2 小时。

2、洗板：用洗涤缓冲液按 100ul/孔洗涤三次；

3、封闭：用封闭缓冲液按 100ul/孔，室温封闭 2 小时；

4、洗板：用洗涤缓冲液按 100ul/孔洗涤三次；

5、加样：将 MDA-LDL、oxLDL 及 LDL 样品用稀释液稀释至 1ug/ml，然后每孔加入 100ul，37℃反应 2 小时；

6、洗板：用洗涤缓冲液按 100ul/孔洗涤三次；

7、加入第二抗体：用稀释缓冲液对鼠抗人非过氧化低密度脂蛋白单克隆抗体进行 1：1000 倍稀释，每孔加入 100ul，37℃反应 2 小时；

8、洗板：用洗涤缓冲液按 100ul/孔洗涤三次；

9、检测：用稀释缓冲液对 HRP 标记羊抗鼠 IgG 多克隆抗体进行 1：3000 稀释，每孔加入 100ul，37℃反应 1 小时；

10、洗板：用洗涤缓冲液按 100ul/孔洗涤三次；

11、底物：加入底物缓冲液 200ul/孔，室温放置 15-20 分钟；

12、加入终止液：50ul/孔；

13、用酶免测定仪读取 450nm 波长处吸光率。

### 三、结果：

如图 1 所示，MDA-LDL 与 oxLDL 的反应明显比 LDL 强，表明用本发明的方法检测脂质过氧化物具有较高的稳定性和灵敏度。

实施例 2、用标记非过氧化脂质的免疫纸层析法检测样品中的脂质过氧化物

1、样品制备：oxLDL 和 MDA-LDL 样品制备同实施例 1。

2、试剂配制：试剂来源同实施例 1，

胶体金溶液的制备采用如下方法，取 500ml 0.01% 氯金酸( $\text{HAuCl}_4$ )溶液，在 1000ml 烧杯中加热至沸腾，加入 3.5ml 1% 柠檬酸三钠溶液，继续沸腾 15 分钟，溶液的颜色由无色变为蓝色，再变为紫红色，待冷却至室温后，分光光度计比色为  $OD_{536}=1.15$

3、鼠抗人 LDL 单克隆抗体胶体金标记：取胶体金溶液 100ml，调 pH 至 8.4，加入抗体 10mg/ml，室温搅拌 30 分钟，再缓慢加入至 10% 终浓度，室温搅拌 30 分钟。12000g 离心 10 分钟，弃去上清液，沉淀用含 10% BSA 的 50mM 磷酸缓冲液混悬，再离心一次，沉淀用同样液体混悬。

4、纸层析检测条制备：在涂有不干胶的 PVC 板上，顺序粘贴多聚酯纤维素膜，硝酸纤维素检测膜，吸水滤纸，然后向多聚酯纤维素膜印制含有 20% 蔗糖的胶体金标记抗体，向硝酸纤维素检测膜印制兔抗人 oxLDL 或 MDA-LDL 多克隆抗体，同时印制羊抗鼠 IgG 多克隆抗体作为质控线，37℃ 干燥 6 小时。然后在切条机上切成 3.5mg 宽的试纸检测条，干燥箱保存备用。

5、待测样品中 oxLDL 或 MDA-LDL 浓度测定：用正常血清配制的浓度为 1ug/ml oxLDL 或 MDA-LDL 溶液和正常血清，分别向不同的试纸条点样，15 分钟后观察并记录检测膜上检测线的显色反应。

6、检测结果：oxLDL 或 MDA-LDL 溶液呈明显的显色反应，正常血清则未见显色（见表 1）。

表 1、标记非过氧化脂质的免疫纸层析法检测结果

测试条	样品	浓度 (ug/ml)	检测片显色强度
oxLDL	oxLDL	0	—
	oxLDL	1.0	+++
	LDL	1.0	—
MDA-LDL	MDA-LDL	0	—
	MDA-LDL	1.0	+++
	LDL	1.0	—

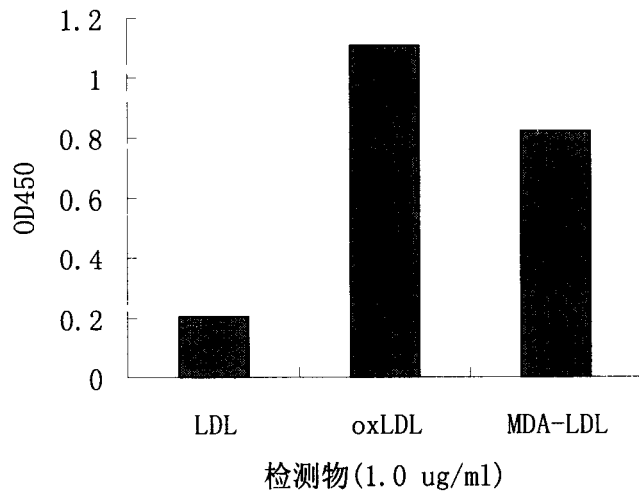


图 1

专利名称(译)	一种检测脂质过氧化物的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN1523355A</a>	公开(公告)日	2004-08-25
申请号	CN03104664.9	申请日	2003-02-20
[标]申请(专利权)人(译)	刘凤鸣		
申请(专利权)人(译)	刘凤鸣		
当前申请(专利权)人(译)	刘凤鸣		
[标]发明人	刘凤鸣		
发明人	刘凤鸣		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/558 G01N33/577 G01N33/92		
代理人(译)	关畅		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种检测脂质过氧化物的方法，目的是提供一种具有较高稳定性、灵敏度及特异性的检测脂质过氧化物的方法。本发明检测脂质过氧化物的方法，是利用抗脂质过氧化物和抗非过氧化脂质的单克隆或多克隆抗体配对进行样品中脂质过氧化物oxLDL和MDA - LDL的测定。利用本发明的方法检测脂质过氧化物既可以基于酶联免疫法的原理，又可以基于免疫纸层析法的原理。本发明的方法提高了对血液和脂质样品中过氧化物检测的可行性，并大大降低了该检测中的配对抗体筛选的复杂性，具有重要的实际应用意义。

