

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/531 (2006.01)



[12] 实用新型专利说明书

专利号 ZL 200520041932.7

[45] 授权公告日 2007 年 3 月 21 日

[11] 授权公告号 CN 2881634Y

[22] 申请日 2005.5.27

[21] 申请号 200520041932.7

[73] 专利权人 杜凤鸣

地址 200433 上海市安波路 985 弄 4 号 402 室

[72] 设计人 杜凤鸣

[74] 专利代理机构 上海天翔知识产权代理有限公司
代理人 赵 青

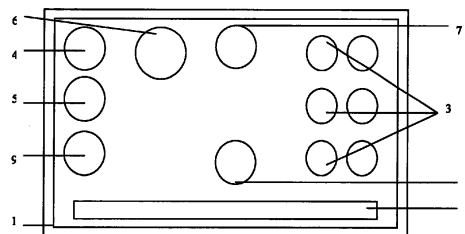
权利要求书 1 页 说明书 11 页 附图 1 页

[54] 实用新型名称

病人尿载脂蛋白 AI 超微量定量酶免试剂盒

[57] 摘要

本实用新型属于生物技术领域，具体涉及病人尿中载脂蛋白 AI(Apolipoprotein AI, 简称 Apo AI)超微量定量的酶免试剂盒。本实用新型提供一种病人尿中载脂蛋白 AI 超微量定量酶联免疫吸附试验试剂盒，包括一个箱体(1)，箱体(1)内有一块 48 孔或 96 孔的载脂蛋白 AI 抗体 IgG 预包被板(2)和 12 瓶试剂，12 瓶试剂分别为载脂蛋白 AI 标准品 6 瓶(3)、载脂蛋白 AI 抗体 IgG 酶标记液 1 瓶(4)、阴性对照 1 瓶(5)、10 倍浓洗涤液 1 瓶(6)、显色剂甲液 1 瓶(7)、显色剂乙液 1 瓶(8)和终止液 1 瓶(9)。



1、一种病人尿中载脂蛋白 AI 超微量定量酶联免疫吸附试验试剂盒，包括一个箱体（1），其特征在于：箱体（1）内有一块 48 孔或 96 孔的载脂蛋白 AI 抗体 IgG 预包被板（2）和 12 瓶试剂，12 瓶试剂分别为载脂蛋白 AI 标准品 6 瓶（3）、载脂蛋白 AI 抗体 IgG 酶标记液 1 瓶（4）、阴性对照 1 瓶（5）、10 倍浓洗涤液 1 瓶（6）、显色剂甲液 1 瓶（7）、显色剂乙液 1 瓶（8）和终止液 1 瓶（9）。

2、根据权利要求 1 所述的一种病人尿中载脂蛋白 AI 超微量定量酶联免疫吸附试验试剂盒，其特征在于其中的载脂蛋白 AI 抗体 IgG 酶标记液（4）、显色剂甲液（7）、显色剂乙液（8）和终止液（9）均为 3ml；阴性对照（5）为 500ul；10 倍浓洗涤液（6）为 13ml。

病人尿载脂蛋白 AI 超微量定量酶免试剂盒

技术领域

本实用新型属于生物技术领域，具体涉及病人尿中载脂蛋白 AI (Apolipoprotein AI，简称 Apo AI) 超微量定量的酶免试剂盒。

背景技术

当前临床对肾病综合症及糖尿病尿中 Apo AI (正常人及他种疾病尿中无 Apo AI) 的检测还停留在检测血清等体液的酶免技术，检测 Apo AI 量是 g/L 水平。用这种酶免技术检测一些疾病的 Apo AI 超微量 ($\mu\text{g/L}$) 变化是不可能的。

研制肾病综合症及糖尿病尿中 Apo AI 超微量定量的高灵敏度和高特异性的诊断试剂盒尚无报道。

发明内容

本实用新型的发明目的在于创建病人尿中载脂蛋白 AI 超微量定量酶免试剂盒，既超越当前的检测技术 g/L 水平，又超越了微量的 ng/L 水平 ($1\text{g}=1000\text{ng}$)，而是超微量的 $\mu\text{g/L}$ ($1\text{ng}=1000\mu\text{g}$) 技术。

本实用新型提供一种病人尿载脂蛋白 AI 超微量定量酶免试剂盒，包括一个盒体，盒体内有一块 48 孔或 96 孔的载脂蛋白 AI 抗体 IgG 预包被板和 12 瓶试剂，12 瓶试剂分别为载脂蛋白 AI 标准品 6 瓶、载脂蛋白 AI 抗体 IgG 酶标记工作液 1 瓶、阴性对照 1 瓶、10 倍浓洗涤液 1 瓶、显色剂甲液 1 瓶、显色剂乙液 1 瓶和终止液 1 瓶。其配制如下：

- 一、载脂蛋白 AI 标准品 6 瓶分别为浓度为 $10000\mu\text{g/ml}$ 、 $8000\mu\text{g/ml}$ 、 $6000\mu\text{g/ml}$ 、 $4000\mu\text{g/ml}$ 、 $2000\mu\text{g/ml}$ 、 $0\mu\text{g/ml}$ 各 1 瓶。
- 二、预包被板的制备 48 孔或 96 孔

(1) 包被液:

Na₂CO₃ 0.6g
NaHCO₃ 1.58g
重蒸水 500ml

加入 Apo AI 抗体 IgG, 15 μg/ml, 调整 PH 至 9.5 加入板条各孔中, 置湿盒中加盖, 4℃过夜后甩干。

(2) 洗涤液

Tris 2.42g
重蒸水 1000ml

加入板条各孔中, 静置 5 秒后甩干, 上述操作重复 3 次, 以除去剩余抗体。

(3) 封闭液

蔗糖 100g
羊血清 25ml
0.1MPBS 1000ml

加入板条各孔中放入湿盒中(加盖) 37℃2h, 弃去液体, 吸水纸上拍干重复一次, 待干燥后, 放入有干燥剂的塑料袋封口, 保存于 4℃。

三、阴性对照的制备

正常人尿液用本实用新型试剂盒测定 OD 值 0—0.09 用万分之二硫柳汞防腐备用分装, 500u1 / 瓶。

四、酶标记抗体工作液

小牛血清 30ml
0.15MPBS 50ml
甘油 20ml
20%Tween-20 2.5ml

调 PH 至 7.2 加入酶标记 Apo AI 抗体 IgG 为 1: 2000 分装 3ml/瓶。

五、显色剂甲

Na₂HPO₄·12H₂O 1.7g
柠檬酸·H₂O 0.5g

3% H_2O_2 200 μl
重蒸水 100ml
调 PH 至 5.0 分装 3ml/瓶

六、显色剂乙

EDTA 17.5mg
柠檬酸· H_2O 0.5g
重蒸水 100ml

加入 10ml DMSO 含 60mg TMB 的溶液 25 μl 分装 3ml/瓶

七、10 倍浓洗涤液

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.6g
 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.4g
20% Tween-20 2.5ml
重蒸水 100ml
调整 PH 至 7.2 分装 13ml/瓶

八、终止液

3M H_2SO_4 3ml/瓶

本实用新型是用 Apo AI 纯品为标准品,用 Apo AI 抗体 IgG 包被,其最佳包被量为 15 $\mu\text{g/ml}$, Apo AI 抗体 IgG 联接辣根过氧化物酶为检测抗体,其最佳酶标记抗体工作浓度为 1:2000。Apo AI 超微量定量的夹心法,检测糖尿病及肾病综合症尿中的 Apo AI 含量。

载脂蛋白 Apo AI 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 双抗体夹心法的操作步骤如下:

取出已包被条孔,插入支架上,用胶布固定,以防脱落。

↓

反应孔中分别加各浓度 Apo AI 标准品每孔加 10000 $\mu\text{g/ml}$ 、8000 $\mu\text{g/ml}$ 、6000 $\mu\text{g/ml}$ 、4000 $\mu\text{g/ml}$ 、2000 $\mu\text{g/ml}$ 、0 $\mu\text{g/ml}$ 各 100 μl 待检尿液、阴性对照尿液各 100 μl 。

↓

甩去反应孔内液体在草纸上拍 2—3 下,然后用洗涤液洗 5 次,每次孔中加满洗涤液后停留 30 秒钟,甩去洗涤液后都要在草纸上拍干,以便洗涤彻底。(10

倍浓洗涤液 1ml+9ml 蒸馏水即为工作洗涤液)

↓

各孔滴加显色剂甲、乙各 1 滴, 37℃中反应 10 分钟后再各孔滴加终止液 1 滴, 置酶标仪 450nm 波长读取各孔光密度 (OD) 值。

↓

以标准品浓度为横座标, OD 值为纵座标绘出标准曲线, 以各待测尿液 OD 值在标准曲线上查出该尿液的 Apo AI 浓度。

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。

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。标准曲线测定 Apo AI 含量范围为 0-1000 μ g/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。

精密度试验: 为了明确和证明本实用新型超微量定量 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, 在正常尿液中加 Apo AI 标准品做批内测定, 结果见表 1。在正常尿液中加 Apo AI 标准品做批间含量测定, 结果见表 2。所得变异系数 (CV%), 说明本实用新型重复性良好。

表 1 正常尿加标准品 Apo AI 之批内实验

尿加 Apo AI (μ g/ml)	n	测得 Apo AI X (μ g/ml)	SD	CV%
200	10	190.6	9.5	5.0

表 2 正常尿加标准品 Apo AI 之批间实验

尿加 Apo AI (μ g/ml)	n	测得 Apo AI X (μ g/ml)	SD	CV%
200	10	186.0	10.6	6.0

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 AI 及 Apo B₁₀₀ 各 1000ng/ml 尿, 用 Apo AI 试剂盒检测只测出 Apo AI 的结果见表 3:

表 3 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	2.0g/ml 尿	阴性	0
IgM	2.0g/ml 尿	阴性	0
IgG	2.0g/ml 尿	阴性	0
C3	2.0g/ml 尿	阴性	0
β 2M	2.0g/ml 尿	阴性	0
α 巨球蛋白	2.0g/ml 尿	阴性	0
转铁蛋白	2.0g/ml 尿	阴性	0
白蛋白	2.0g/ml 尿	阴性	0
FDP	2.0g/ml 尿	阴性	0
Apo B ₁₀₀	1000 μ g/ml 尿	阴性	0
Apo AI	1000 μ g/ml 尿	960 μ g/ml 尿	96%

以上试验说明本 ELISA 试剂盒具有 Apo AI 的特异性。

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 4:

表 4 Apo AI 试剂盒稳定性试验

年月日	2003. 3. 8	2003. 3. 9	2003. 3. 10	2003. 3. 11	2003. 3. 12
A _{450nm}					
阳性尿	0.950	0.910	0.901	0.880	0.870

注: 阳性尿液在 4℃ 冰箱放置 5 天。

上海长海医院肾内科及内分泌科用本实用新型试剂盒进行尿载脂蛋白 Apo AI 测定的试验:

本文检测对象为 21 例正常人及原发性肾病综合症(肾病)24 例(I 型 12 例, II 型 12 例); 另有 8 例重症糖尿病人, 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。

方法：用 Apo AI 及 Apo B₁₀₀ 超微量定量试剂盒，以 ELISA 法进行检测。

结果：

1. 正常人 21 例对照尿中 Apo AI 和 Apo B₁₀₀ 均为 “0”。
2. 8 例重症糖尿病人尿有 Apo AI 及 Apo B₁₀₀ 为 6 例。单有 Apo AI 为 2 例。
3. 肾病综合症病人尿中 Apo AI 和 Apo B₁₀₀ 的含量见下表 5：

表 5 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
260	0	460	120
290	0	340	210
420	0	310	90
480	0	380	280
520	0	820	720
380	0	610	420
420	0	490	310
280	0	395	205
325	0	725	310
365	0	510	210
420	0	670	360
470	0	605	405

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。Apo AI 在尿中出现对肾病综合症患者的保肾或换肾症以及重症糖尿病的微细小血管已有损伤，出现的严重并发症有预警价值。

初步认为糖尿病人有严重并发症者微细小血管已有损害，尿中出现 Apo AI 和 Apo B₁₀₀，有较大预警价值。

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：

在我院首次用于临床超微量定量检测 20 例肾病综合症尿中载脂蛋白 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超微量定量试剂盒，以 ELISA 法进行检测。

二、结果

- 1. Apo AI 和 Apo AI 的标准曲线，可测范围在 0~1000 μ g/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 6。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 6 肾病综合症尿中 Apo AI 及 Apo B ₁₀₀ 含量 (μ g/L)			
I 型		II 型	
Apo AI	Apo B ₁₀₀	Apo AI	Apo B ₁₀₀

310	0	420	120
490	0	290	110
320	0	490	210
410	0	620	410
460	0	430	190
260	0	860	780
280	0	610	380
380	0	480	310
490	0	590	400
310	0	425	180

三、讨论

根据我院试用 ELISA 方法结果，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 B₁₀₀，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。同时，又发现糖尿病患者(重症)尿中也有 Apo AI 经 Apo B₁₀₀。ELISA 法简便、快速、特异性强、灵敏度高、超微量，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载脂蛋白，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超微量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超微量定量试剂盒，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)共 160 人。测定血中载脂蛋白 AI (Apo AI) 及载脂蛋白 B₁₀₀ (Apo B₁₀₀) 含量。

(2) 选肾病综合症 I 型及 II 型各 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，可测范围在 0~1000 μ g/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 26 例，其中 I 型 13 例，II 型 13 例，尿中载脂蛋白含量见表 7。

表 7 肾病综合症病人尿中载脂蛋白含量 (μ g/L)

I 型		II 型	
Apo AI	Apo B ₁₀₀	Apo AI	Apo B ₁₀₀
340	0	510	210
310	0	610	410

460	0	360	180
410	0	310	80
480	0	350	180
340	0	820	590
410	0	710	390
305	0	610	340
380	0	505	210
490	0	740	420
390	0	390	180
390	0	580	390
240	0	290	180

四、讨论

根据我所试用 ELISA 方法结果，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。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 AI 分子直径约比 Apo B₁₀₀ 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。来判断病人的病情轻重，以及预后。该 ELISA 法简便快速，超微量特异性强，灵敏度高，用于临床有较大的社会效益和经济效益。

用本实用新型检测血清及其他体液 Apo AI，需多倍稀释样品误差大，难以区别正常与异常含量差别。我们也曾用临床常用检测血清等体液酶免盒检测肾综合症及重症糖尿病尿中 Apo AI 含量，几乎全部是“0”。因此两者不能相互扩展使用。

综合以上多家医院的使用情况，用本实用新型检测肾病综合症及

重症糖尿病尿中发现 Apo AI 及 Apo B₁₀₀。用本实用新型的 Apo AI 及 Apo B₁₀₀ 试剂盒联合使用,可明确区分肾病综合症的 I 型或 II 型及重症糖尿病的微细小血管损伤的预警。可向临床提供上述两种疾病的预后。对肾疾综合症的保肾或换肾以及糖尿病的严重併发的下肢坏疽、视网膜病变,糖尿病的肾病及糖尿病的心脑血管病变有预警价值。

本实用新型具有较好的社会效益和经济效益。

附图说明

图 1 本实用新型的结构示意图

具体实施方式

实施例 1

如图 1 所示,一种病人尿中载脂蛋白 AI 超微量定量酶联免疫吸附试验试剂盒,包括一个箱体 1,箱体 1 内有一块 96 孔的载脂蛋白 AI 抗体 IgG 预包被板 2 和 12 瓶试剂。12 瓶试剂分别为载脂蛋白 AI 标准品 6 瓶 3、载脂蛋白 AI 抗体 IgG 酶标记液 1 瓶 4、阴性对照 1 瓶 5、10 倍浓洗涤液 1 瓶 6、显色剂甲液 1 瓶 7、显色剂乙液 1 瓶 8、终止液 1 瓶 9。其中的载脂蛋白 AI 标准品 3 分别为浓度为 10000 $\mu\text{g/ml}$ 、8000 $\mu\text{g/ml}$ 、6000 $\mu\text{g/ml}$ 、4000 $\mu\text{g/ml}$ 、2000 $\mu\text{g/ml}$ 、0 $\mu\text{g/ml}$ 各 1 瓶;其中的载脂蛋白 AI 抗体 IgG 酶标记液 4、显色剂甲液 7、显色剂乙液 8 和终止液 9 均为 3ml;阴性对照 5 为 500ul; 10 倍浓洗涤液 6 为 13ml。

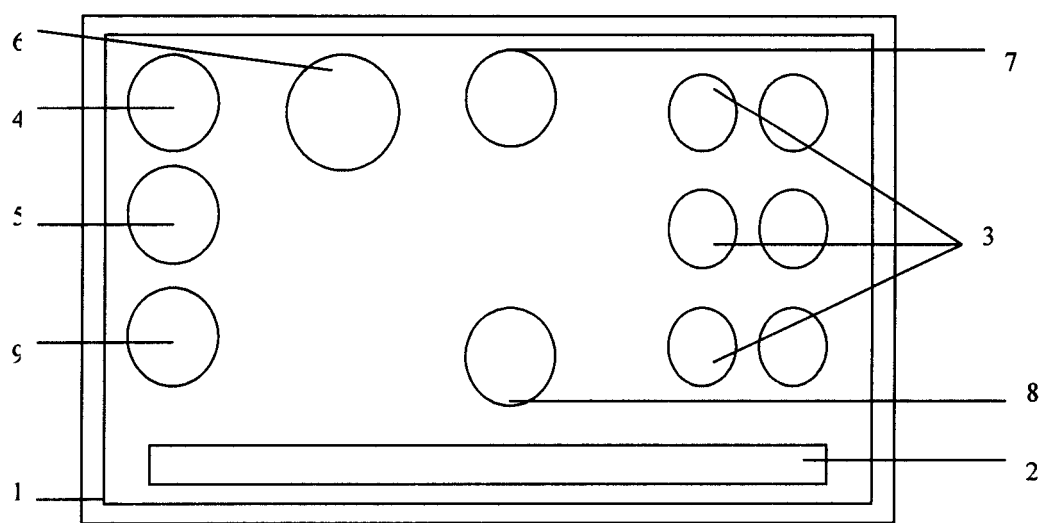


图 1

专利名称(译)	病人尿载脂蛋白AI超微量定量酶免试剂盒		
公开(公告)号	CN2881634Y	公开(公告)日	2007-03-21
申请号	CN200520041932.7	申请日	2005-05-27
[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	G01N33/543 G01N33/531		
代理人(译)	赵青		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本实用新型属于生物技术领域，具体涉及病人尿中载脂蛋白AI (Apolipoprotein AI，简称Apo AI)超微量定量的酶免试剂盒。本实用新型提供一种病人尿中载脂蛋白AI超微量定量酶联免疫吸附试验试剂盒，包括一个盒体(1)，盒体(1)内有一块48孔或96孔的载脂蛋白AI抗体IgG预包被板(2)和12瓶试剂，12瓶试剂分别为载脂蛋白AI标准品6瓶(3)、载脂蛋白AI抗体IgG酶标记液1瓶(4)、阴性对照1瓶(5)、10倍浓洗涤液1瓶(6)、显色剂甲液1瓶(7)、显色剂乙液1瓶(8)和终止液1瓶(9)。

