



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105044009 A

(43) 申请公布日 2015. 11. 11

(21) 申请号 201510413275. 2

G01N 1/28(2006. 01)

(22) 申请日 2015. 07. 14

G01N 1/34(2006. 01)

G01N 27/447(2006. 01)

(71) 申请人 上海拜豪生物科技有限公司

地址 200000 上海市浦东新区中国(上海)自由贸易试验区新金桥路27号13号楼2层

(72) 发明人 张积仁 阳帆 董欣敏 吴婧 蔡睿 孙遥 赵乙木

(74) 专利代理机构 广州市越秀区哲力专利商标事务所(普通合伙) 44288

代理人 汤喜友

(51) Int. Cl.

G01N 21/31(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

G01N 27/62(2006. 01)

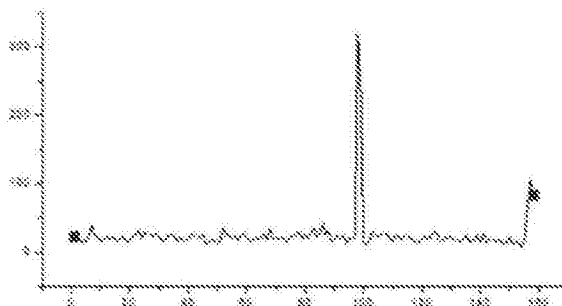
权利要求书2页 说明书18页 附图1页

(54) 发明名称

一种铬-极低密度脂蛋白螯合物及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明提供一种铬-极低密度脂蛋白螯合物及其制备方法和应用,该铬-极低密度脂蛋白螯合物是铬离子与极低密度脂蛋白通过巯基或/和半胱氨酸残基螯合而成,可用于制备检测人体铬-极低密度脂蛋白螯合物的试剂。本发明首次证实了铬离子可直接作用于极低密度脂蛋白。本发明建立了铬-极低密度脂蛋白螯合物的定性定量检测方法,以检测一个地区人群体内极低密度脂蛋白的含量,从而间接反映一个地区铬污染程度以及对人群的健康影响。本发明建立的铬-极低密度脂蛋白螯合物定量检测方法准确度高重、复性好。



1. 一种铬-极低密度脂蛋白螯合物,其特征在于,该铬-极低密度脂蛋白螯合物是铬离子与极低密度脂蛋白通过巯基或 / 和半胱氨酸残基螯合而成。

2. 如权利要求 1 所述的铬-极低密度脂蛋白螯合物的制备方法,包括以下步骤:

A) 铬-极低密度脂蛋白的合成:在提纯源于人体的极低密度脂蛋白或按照生物学方法重组的极低密度脂蛋白中加入铬离子进行螯合反应;

B) 铬-极低密度脂蛋白螯合物纯化:采用免疫亲和层析法,去除步骤 A) 反应溶液中未反应的极低密度脂蛋白、特异性抗体和铬离子,即得铬-极低密度脂蛋白螯合物。

3. 如权利要求 2 所述的方法,其特征在于,

所述步骤 B) 中具体包括以下步骤:

(1) 溶解样品:将上述步骤 A) 的铬-极低密度脂蛋白螯合物溶解于生理盐水中,得铬-极低密度脂蛋白螯合物的溶液;

(2) 平衡层析柱:使用稀释缓冲液冲洗层析柱的管路,在层析柱中装入能与极低密度脂蛋白特异性结合的填料,装柱后,继续使用稀释缓冲液平衡层析柱;

(3) 上样:待层析柱平衡后,用稀释缓冲液稀释步骤(1)的溶液,然后上柱,使极低密度脂蛋白与填料特异性结合;

(4) 洗脱:使用稀释缓冲液冲洗层析柱至基线平衡,然后使用 0.05-0.10mol/L 的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  溶液进行洗脱;

(5) 收集:收集步骤(4)的洗脱液,收集完毕后立即使蛋白复原;

(6) 透析:将步骤(5)的洗脱液,装透析袋,用  $\text{ddH}_2\text{O}$  透析除盐,换水三次后,4℃透析过夜,收集样本;

(7) 平衡层析柱:采用新的层析柱,用稀释缓冲液冲洗管路,在该层析柱中装入能与铬特异性结合的填料,装柱后再用稀释缓冲液平衡层析柱;

(8) 上样:待层析柱平衡后,用稀释缓冲液稀释步骤(6)中样本,然后上柱;

(9) 洗脱:使用稀释缓冲液冲洗层析柱至基线平衡,然后使用 0.5-1.0mol/L 的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  溶液进行洗脱;

(10) 收集:收集步骤(9)的洗脱液,收集完毕后立即使蛋白复原;

(11) 透析:将步骤(10)的洗脱液,装透析袋,用  $\text{ddH}_2\text{O}$  透析除盐,换水三次后,4℃透析过夜,收集样本,即得铬-极低密度脂蛋白螯合物。

4. 根据权利要求 2 所述的铬-极低密度脂蛋白螯合物的制备方法,其特征在于,步骤 B) 后还包括步骤 C):对铬-极低密度脂蛋白螯合物的鉴定;

其中,步骤 C) 中具体包括以下步骤:

(1) 制备胶床:以琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶中的一种作为介质制备胶床;

(2) 加样:取步骤 B) 中提取纯化得到的铬-极低密度脂蛋白螯合物,加入上样缓冲液,并混匀,然后加样于样品槽中;

(3) 电泳:连接电泳板,进行电泳;

(4) 检测:在胶床上找出含铬的蛋白条带,将该蛋白条带取出,将蛋白条带溶解,然后再采用 ICP-MS 或 AAS 检测是否含有铬以及检测铬的含量。

5. 一种如权利要求 1 所述的铬-极低密度脂蛋白螯合物在制备检测血样中铬-极低密度脂蛋白螯合物的试剂或试剂盒中的应用。

6. 一种至少包括如权利要求 1 所述的铬 - 极低密度脂蛋白螯合物作为标准品的试剂盒。

7. 根据权利要求 6 所述的试剂盒, 其特征在于, 还包括包被液, 该包被液包括捕获极低密度脂蛋白的物质或捕获金属铬的物质。

8. 一种定量检测铬 - 极低密度脂蛋白螯合物的方法, 其特征在于, 以已知含量的权利要求 1 所述的铬 - 极低密度脂蛋白螯合物作为标准品, 采用以下方法之一对样品进行检测: 酶联免疫法、酶联免疫与原子吸收光谱结合法、酶联免疫与电感耦合等离子体质谱结合法、提纯铬 - 极低密度脂蛋白螯合物与酶联免疫结合法、提纯铬 - 极低密度脂蛋白螯合物与原子吸收光谱结合法、提纯铬 - 极低密度脂蛋白螯合物与电感耦合等离子体质谱结合法、电泳与酶联免疫或原子吸收光谱或电感耦合等离子体质谱结合法。

## 一种铬 - 极低密度脂蛋白螯合物及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及重金属离子的免疫学检测,具体涉及一种铬 - 极低密度脂蛋白螯合物及其制备方法和应用。

### 背景技术

[0002] 脂蛋白 (lipoproteins) 是蛋白质与脂质结合所形成的一种脂质 - 蛋白质复合物,按密度分为高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, 简称 HDL)、中间密度脂蛋白 (intermediate density lipoprotein, 简称 IDL)、低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, 简称 LDL)、极低密度脂蛋白 (very low density lipoprotein, 简称 VLDL)、乳糜颗粒 (chylomicron, CM)。血液中大约百分之三十的胆固醇是通过 HDL 从组织细胞中运输到肝脏转化为胆汁酸或通过胆汁排出体外的。血液里约 70% 的胆固醇由 LDL 和 VLDL 所携带,肝脏中产生的内源性甘油三酯 (triglyceride, TG) 也主要依靠 VLDL 运输至肝外。VLDL 的增多与高脂血症、脂代谢紊乱息息相关,而血脂异常又是多种疾病发生的重要危险因素,因而 VLDL 含量水平的稳定对于人体各方面机能功能的稳定起着重要作用。

[0003] VLDL 含量水平及结构功能的稳定对机体意义重大。其含量过高与脂肪肝、脂代谢紊乱、心血管疾病、肾脏功能损伤等息息相关。定量检测 VLDL 可以用于这些疾病的早期诊断以及治疗效果监测,甚至作为预后好坏的评价指标之一。而对于营养不良、慢性贫血、肝功能受损者等患者,血清 VLDL 含量也会下降,定量检测 VLDL 也可用于这些疾病的早期诊断、治疗效果监测以及作为预后评价的指标之一。

[0004] 铬 (chromium, Cr) 是元素周期表 VI 族中的一种过渡金属,其质地坚硬,表面具有光泽,有较高的熔点,在工业生产中具有重大的经济价值,一个世纪以来被广泛应用,每年全球铬生产量高达 107 吨,因而铬是一种名副其实的重要金属污染物。目前,铬广泛应用于电镀、鞣革、颜料、油漆、合金、印染等各个方面,与人们的生活息息相关,但是同样也对人类的身体健康产生巨大影响。

[0005] 自然界中铬主要以三价和六价的形式存在,而一般认为,三价铬 ( $\text{Cr}^{3+}$ ) 是人类所需的微量元素,而六价铬 ( $\text{Cr}^{6+}$ ) 才是明显的毒性物质。由于六价铬易通过细胞膜进入细胞,而且可以通过一系列反应,产生强烈的细胞毒性及基因毒性,因而普遍认为六价铬的毒性高于三价铬,达 10—100 倍。学者认为当水中的六价铬含量超过 0.05mg/L 即是有毒的。六价铬可以通过皮肤接触、食物摄入、饮用水饮入、呼吸道吸入等途径进入人体,对于职业性暴露人群主要是通过呼吸道吸入六价铬灰尘,而对于普通人群则是通过饮入污染水源、食入被污染的食物、吸入等方式摄入六价铬。六价铬进入体内后,可以引发氧化应激、显色体畸变、细胞凋亡、多种 DNA 损伤 (包括单链断裂、DNA-蛋白质交联、DNA-氨基酸交联、Cr-DNA 配合物形成等),从而造成机体多处组织、器官、系统损伤。

[0006] 如前所述,铬与多种蛋白质之间关系密切,可以与多种蛋白质结合,抑制多种蛋白酶的活性。随着对铬毒性研究的深入,人们逐渐认识到铬与蛋白的相互作用在其致毒过程中扮演着重要的角色,被认为是了解铬的毒性机理的关键所在,因此,对铬和蛋白质相互作

用的研究就显得愈发重要。而现在关于铬与蛋白质作用的机理仅是冰山一角,还有很多蛋白质与铬之间的关系还不清楚,因而加强对于铬与蛋白质之间的关系至关重要。

[0007] 关于铬中毒,特别是慢性铬中毒的评价,通过检测血铬含量也不能准确评价人体内的循环铬含量,无法进一步评估铬对于机体功能的损伤程度,而随着科学技术的飞速发展,铬与人体的关系也日益紧密,因而寻找一种可以从免疫功能角度评价铬中毒,特别是慢性铬中毒对于机体的损害程度的评价方式日益重要。

## 发明内容

[0008] 针对铬污染严重的问题,本发明的目的在于提供一种铬-极低密度脂蛋白螯合物及其制备方法,并建立铬-极低密度脂蛋白螯合物的定性、定量检测方法,以便定量检测铬-极低密度脂蛋白螯合物在评价一个地区铬污染程度的应用。通过定量检测一个地区人群血清中铬-极低密度脂蛋白螯合物,可以间接反映这个地区人群受铬污染的情况,从而间接反映这个地区铬污染程度。

[0009] 本发明解决其技术问题所采用的技术方案是:提供一种铬-极低密度脂蛋白螯合物,该铬-极低密度脂蛋白螯合物是铬离子与极低密度脂蛋白通过巯基或/和半胱氨酸残基螯合而成。

[0010] 本发明还提供一种上述的铬-极低密度脂蛋白螯合物的制备方法,即体外合成法,包括以下步骤:

[0011] A) 铬-极低密度脂蛋白螯合物的合成:在提纯源于人体的极低密度脂蛋白或按照生物学方法重组的极低密度脂蛋白中加入铬离子进行螯合反应,得到反应溶液;

[0012] B) 铬-极低密度脂蛋白螯合物纯化:采用免疫亲和层析法,去除步骤A)反应溶液中未反应的极低密度脂蛋白、特异性抗体和铬离子,即得铬-极低密度脂蛋白螯合物。

[0013] 作为优选,所述步骤B)中具体包括以下步骤:

[0014] (1) 溶解样品:将上述步骤A)的铬-极低密度脂蛋白螯合物溶解于生理盐水中,得铬-极低密度脂蛋白螯合物的溶液;

[0015] (2) 平衡层析柱:使用稀释缓冲液冲洗层析柱的管路,在层析柱中装入能与极低密度脂蛋白特异性结合的填料,装柱后,继续使用稀释缓冲液平衡层析柱;

[0016] (3) 上样:待层析柱平衡后,用稀释缓冲液稀释步骤(1)的溶液,然后上柱,使极低密度脂蛋白与填料特异性结合;

[0017] (4) 洗脱:使用稀释缓冲液冲洗层析柱至基线平衡,然后使用0.05-0.10mol/L的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 溶液进行洗脱;

[0018] (5) 收集:收集步骤(4)的洗脱液,收集完毕后立即使蛋白复原;

[0019] (6) 透析:将步骤(5)中的收集的洗脱液,装透析袋,用 $\text{ddH}_2\text{O}$ 透析除盐,换水三次后,4℃透析过夜,收集样本;

[0020] (7) 平衡层析柱:采用新的层析柱,用稀释缓冲液冲洗管路,在该层析柱中装入能与铬特异性结合的填料,装柱后再用稀释缓冲液平衡层析柱;

[0021] (8) 上样:待层析柱平衡后,用稀释缓冲液稀释步骤(6)中样本,然后上柱;

[0022] (9) 洗脱:使用稀释缓冲液冲洗层析柱至基线平衡,然后使用0.5-1.0mol/L的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 溶液进行洗脱;

[0023] (10) 收集 :收集步骤 (9) 的洗脱液,收集完毕后立即使蛋白复原 ;

[0024] (11) 透析 :将步骤 (10) 中的洗脱液,装透析袋,用 ddH<sub>2</sub>O 透析除盐,换水三次后,4℃透析过夜,收集样本,即得铬 - 极低密度脂蛋白螯合物。

[0025] 作为优选,上述铬 - 极低密度脂蛋白螯合物的制备方法,还包括以下对铬 - 极低密度脂蛋白螯合物的鉴定步骤,具体包括以下步骤 :

[0026] (1) 制备胶床 :以琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶中的一种作为介质制备胶床 ;

[0027] (2) 加样 :取步骤 B) 中提取纯化得到的铬 - 极低密度脂蛋白螯合物,加入上样缓冲液,并混匀,然后加样于样品槽中 ;

[0028] (3) 电泳 :连接电泳板,进行电泳 ;

[0029] (4) :在胶床上找出含铬的蛋白条带,将该蛋白条带取出,将蛋白条带溶解,然后再采用 ICP-MS 或 AAS 检测是否含有铬以及检测铬的含量。

[0030] 本发明还提供一种如上述的铬 - 极低密度脂蛋白螯合物在制备检测人体内铬 - 极低密度脂蛋白螯合物的试剂或试剂盒中的应用。

[0031] 本发明还提供一种至少包括如上述的铬 - 极低密度脂蛋白螯合物作为标准品的试剂盒。

[0032] 优选地,该试剂盒中还包括包被液,该包被液包括捕获极低密度脂蛋白的物质或捕获金属铬的物质。

[0033] 本发明还提供一种定量检测铬 - 极低密度脂蛋白螯合物的方法,以已知含量的上述的铬 - 极低密度脂蛋白螯合物作为标准品,采用以下方法之一对样品进行检测 :酶联免疫法、酶联免疫与原子吸收光谱结合法、酶联免疫与电感耦合等离子体质谱结合法、提纯铬 - 极低密度脂蛋白螯合物与酶联免疫结合法、提纯铬 - 极低密度脂蛋白螯合物与原子吸收光谱结合法、提纯铬 - 极低密度脂蛋白螯合物与电感耦合等离子体质谱结合法、电泳与酶联免疫或原子吸收光谱或电感耦合等离子体质谱结合法。

[0034] 相比现有技术,本发明的有益效果在于 :

[0035] 1. 本发明首次合成了铬 - 极低密度脂蛋白螯合物 ;

[0036] 2. 本发明首次提出铬 - 极低密度脂蛋白螯合物可用于制备检测血样中铬 - 极低密度脂蛋白螯合物的试剂或试剂盒中的应用 ;

[0037] 3. 本发明实现了铬 - 极低密度脂蛋白螯合物的特异性识别和定量检测,以便定量检测人群血清中铬 - 极低密度脂蛋白螯合物的含量,以评价一个地区铬污染程度的应用,为工业地区的铬污染水平提供间接指标。本发明建立的铬 - 极低密度脂蛋白螯合物定量检测方法的准确度高、重复性好。

#### 附图说明

[0038] 图 1 为本发明所述的铬 - 极低密度脂蛋白螯合物的非变性电泳条带图 ;

[0039] 图 2 为本发明所述的铬 - 极低密度脂蛋白螯合物的电泳条带的同步辐射 X 线荧光分析图。

#### 具体实施方式

[0040] 下面结合具体实施方式,对本发明做进一步描述 :

[0041] 本发明除特别说明外,涉及的实验操作步骤均为本领域常规的步骤;所用试剂、材料如未特殊说明,均视为可从市购方式购得;

[0042] 提取试剂为 PEG 溶液、硼酸盐缓冲液等(采用 PEG 法);

[0043] 捕获极低密度脂蛋白的物质为抗极低密度脂蛋白抗体,可通过市售获得,以下实施例方式,使用的抗极低密度脂蛋白抗体为货号为“Genetex gtx16419”的 VLDL antibody,所述与极低密度脂蛋白特异性结合的物质、抗极低密度脂蛋白抗体、抗 VLDL 抗体均为捕获极低密度脂蛋白的物质;

[0044] 酶标抗体为含有辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等酶标记的抗体中的一种;

[0045] 稀释缓冲液为 pH 9.6 的 0.05M 碳酸盐缓冲液,配制方法示例:取 1.5g 的  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  和 2.93g 的  $\text{NaHCO}_3$  溶解加 ddH<sub>2</sub>O 定容至 1000mL;

[0046] 洗涤缓冲液为 pH7.4 的 0.15M PBS 溶液,配制方法示例:取 0.2g 的  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、2.90g 的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、8.0g 的 NaCl、0.2g 的 KCl、0.5mL Tween-20,溶解加 ddH<sub>2</sub>O 定容至 1000mL;

[0047] 封闭液为牛血清白蛋白溶液,配制方法示例:取 0.1g 牛血清白蛋白,加入洗涤缓冲液稀释定容至 100mL;

[0048] 终止液为 2M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,配制方法示例:取 178.3mL 的 ddH<sub>2</sub>O,加浓  $\text{H}_2\text{SO}_4$  定容至 200mL;

[0049] 底物为甲基联苯胺(TMB)溶液,配制方法示例:取 0.5mL 浓度为 2g/L 的甲基联苯胺乙醇溶液,加底物稀释液稀释至 10mL;

[0050] 底物缓冲液 pH 为 5.0,其中  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  的摩尔浓度为 0.2M、柠檬酸的摩尔浓度为 0.1M,配制方法示例:取 1.42g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、0.96g 柠檬酸,然后加入 ddH<sub>2</sub>O 至 50mL,即得;

[0051] 洗脱液的配制方法示例:将木瓜蛋白酶用 pH 8.0,0.1mol/L Tris-HCl 缓冲液配制成 1-2mg/mL,再加入 1mmol/L 二硫苏糖醇(DTT)37℃ 孵育 30min,得洗脱液;

[0052] 上样缓冲液可由如下比例的组分配制而成:Tris-HCl :1% 溴酚蓝 :ddH<sub>2</sub>O :甘氨酸 = 15.5 :2.5 :7 :25,其中 Tris-HCl 的 pH 为 6.8、摩尔浓度为 1M;

[0053] 电泳缓冲液的配制方法如下:取 3.0g Tris、14.4g 甘氨酸、溶于 800mL ddH<sub>2</sub>O 中,调 pH 至 8.3 后,定容至 1L;

[0054] 捕获铬的物质为货号为“广州然科公司 RK10641”的鼠抗 Cr mAb,以下实施方式中所述的与铬特异性结合的物质、抗 Cr 抗体、二抗、抗铬抗体均为捕获得铬的物质;

[0055] 本发明提供一种铬-极低密度脂蛋白螯合物,铬离子与极低密度脂蛋白通过巯基或 / 和半胱氨酸残基螯合而成。

[0056] 具体地,铬-极低密度脂蛋白螯合物是由铬通过结合锌指结构、巯基、半胱氨酸残基中的至少一种结构与极低密度脂蛋白上的载脂蛋白 C I、载脂蛋白 C II、载脂蛋白 C III、载脂蛋白 E 或胆固醇、甘油三酯等结合而形成的螯合物。

[0057] 本发明还提供铬-极低密度脂蛋白螯合物的制备方法,包括以下步骤:

[0058] A) 铬-极低密度脂蛋白的合成:在提纯源于人体的极低密度脂蛋白或按照生物学方法重组的极低密度脂蛋白中加入铬离子进行螯合反应,得到反应溶液;

[0059] B) 铬-极低密度脂蛋白螯合物纯化:采用免疫亲和层析法,去除步骤 A) 反应溶液中未反应的极低密度脂蛋白、特异性抗体和铬离子,即得铬-极低密度脂蛋白螯合物,具体包括以下步骤:

[0060] 所述步骤 B) 中具体包括以下步骤:

[0061] (1) 溶解样品 :将上述步骤 A) 的铬 - 极低密度脂蛋白螯合物溶解于生理盐水中, 得铬 - 极低密度脂蛋白螯合物的溶液 ;

[0062] (2) 平衡层析柱 :使用稀释缓冲液冲洗层析柱的管路, 在层析柱中装入能与极低密度脂蛋白特异性结合的填料, 装柱后, 继续使用稀释缓冲液平衡层析柱 ;

[0063] 所述能与极低密度脂蛋白特异性结合的填料为吸附有可与极低密度脂蛋白特异性结合物质的硅胶或树脂 ;

[0064] (3) 上样 :待层析柱平衡后, 用稀释缓冲液稀释步骤 (1) 的溶液, 然后上柱, 使极低密度脂蛋白与填料特异性结合 ;

[0065] (4) 洗脱 :使用稀释缓冲液冲洗层析柱至基线平衡, 然后使用 0.05-0.10mol/L 的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  溶液进行洗脱 ;

[0066] (5) 收集 :收集步骤 (4) 的洗脱液, 收集完毕后立即使蛋白复原 ;

[0067] (6) 透析 :将步骤 (5) 中的收集的洗脱液, 装透析袋, 用  $\text{ddH}_2\text{O}$  透析除盐, 换水三次后,  $4^\circ\text{C}$  透析过夜, 收集样本 ;

[0068] (7) 平衡层析柱 :采用新的层析柱, 用稀释缓冲液冲洗管路, 在该层析柱中装入能与铬特异性结合的填料, 装柱后再用稀释缓冲液平衡层析柱 ;

[0069] 所述能与铬特异性结合的填料为吸附有可与铬特异性结合物质的硅胶或树脂 ;

[0070] (8) 上样 :待层析柱平衡后, 用稀释缓冲液稀释步骤 (6) 中样本, 然后上柱 ;

[0071] (9) 洗脱 :使用稀释缓冲液冲洗层析柱至基线平衡, 然后使用 0.5-1.0mol/L 的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  溶液进行洗脱 ;

[0072] (10) 收集 :收集步骤 (9) 的洗脱液, 收集完毕后立即使蛋白复原 ;

[0073] (11) 透析 :将步骤 (10) 中的收集的洗脱液, 装透析袋, 用  $\text{ddH}_2\text{O}$  透析除盐, 换水三次后,  $4^\circ\text{C}$  透析过夜, 收集样本, 即得铬 - 极低密度脂蛋白螯合物。

[0074] C) :对铬 - 极低密度脂蛋白螯合物的鉴定, 具体包括以下步骤 :

[0075] (1) 制备胶床 :以琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶中的一种作为介质制备胶床 ;

[0076] (2) 加样 :取步骤 B) 中提取纯化得到的铬 - 极低密度脂蛋白螯合物, 加入上样缓冲液, 并混匀, 然后加样于样品槽中 ;

[0077] (3) 电泳 :连接电泳板, 进行电泳 ;

[0078] (4) 检测 :在胶床上找出含铬的蛋白条带, 将该蛋白条带取出, 将蛋白条带溶解, 然后再采用 ICP-MS 或 AAS 检测是否含有铬以及检测铬的含量。

[0079] 本发明还提供一种至少包括如上述的铬 - 极低密度脂蛋白螯合物作为标准品的试剂盒。

[0080] 在本发明中, 能实现本发明目的的试剂盒可以列出以下几种, 但并不限于此。

[0081] 一种检测血样中铬 - 极低密度脂蛋白螯合物的试剂盒, 包括 :含有可用于捕获极低密度脂蛋白的物质的包被液、封闭液、洗涤缓冲液、可捕获铬的物质作为二抗、酶标抗体、底物、终止液、稀释缓冲液、阳性对照、阴性对照等。

[0082] 一种检测血样中铬 - 极低密度脂蛋白螯合物的试剂盒, 包括 :含有可用于捕获极低密度脂蛋白的物质的包被液、封闭液、洗涤缓冲液、洗脱液、阳性对照、阴性对照等。

[0083] 一种检测血样中铬 - 极低密度脂蛋白螯合物的试剂盒, 包括 :含有可用于捕获极低密度脂蛋白的物质的包被液、封闭液、洗涤缓冲液、洗脱液、酸化剂、过氧化氢、标准品、阴

性对照等。

[0084] 一种检测血样中铬-极低密度脂蛋白螯合物的试剂盒,包括提取全血中极低密度脂蛋白所需提取试剂、复溶液、含有可用于捕获铬的物质的包被液、封闭液、洗涤缓冲液、酶标抗体、底物、终止液、稀释缓冲液、标准品、阴性对照等。

[0085] 一种检测血样中铬-极低密度脂蛋白螯合物的试剂盒,包括提取全血中极低密度脂蛋白所需提取试剂、复溶液、阳性对照、阴性对照等。

[0086] 一种检测血样中铬-极低密度脂蛋白螯合物的试剂盒,包括提取全血中极低密度脂蛋白所需提取试剂、复溶液、酸化剂、过氧化氢、阳性对照、阴性对照等。

[0087] 一种检测血样中铬-极低密度脂蛋白螯合物的试剂盒,包括提取全血中极低密度脂蛋白所需提取试剂、胶床介质、复溶液、加样缓冲液、溶解胶床上含铬的蛋白条带所需液体、含有可用于捕获铬的物质的包被液、封闭液、洗涤缓冲液、酶标抗体、底物、终止液、阳性对照、阴性对照等。

[0088] 一种检测血样中铬-极低密度脂蛋白螯合物的试剂盒,包括提取全血中极低密度脂蛋白所需提取试剂、胶床介质、复溶液、加样缓冲液、溶解胶床上含铬的蛋白条带所需液体、阳性对照、阴性对照等。

[0089] 一种检测血样中铬-极低密度脂蛋白螯合物的试剂盒,包括提取全血中极低密度脂蛋白所需提取试剂、胶床介质、复溶液、加样缓冲液、溶解胶床上含铬的蛋白条带所需液体、硝酸、过氧化氢、阳性对照、阴性对照等。

[0090] 上述几种试剂盒中,所述阳性对照为标准品,即螯合有重金属铬的极低密度脂蛋白螯合物或螯合有重金属铬的 BSA 螯合物;所述阴性对照为稀释缓冲液。

[0091] 上述试剂盒用于检测铬-极低密度脂蛋白螯合物,以提极低检测的准确性和重复性,并使之在临床中得到推广。

[0092] 本发明还提供一种定量检测铬-极低密度脂蛋白螯合物的方法,以已知含量的上述的铬-极低密度脂蛋白螯合物作为标准品,采用以下方法之一对样品进行检测:酶联免疫法、酶联免疫与原子吸收光谱结合法、酶联免疫与电感耦合等离子体质谱结合法、提纯铬-极低密度脂蛋白螯合物与酶联免疫结合法、提纯铬-极低密度脂蛋白螯合物与原子吸收光谱结合法、提纯铬-极低密度脂蛋白螯合物与电感耦合等离子体质谱结合法、电泳与酶联免疫或原子吸收光谱或电感耦合等离子体质谱结合法。在本发明中,用检测铬-极低密度脂蛋白螯合物的方法可以列出的有以下几种,但并不限于以下几种。

[0093] 方法一:酶联免疫法(ELISA法)检测铬-极低密度脂蛋白螯合物,按照如下步骤检测:

[0094] 1) 包被:用稀释缓冲液稀释可以捕获极低密度脂蛋白的物质至 500-4000 倍,加入 ELISA 板微孔中,4℃过夜 16-18 小时,或 37℃水浴 1-3 小时,储存冰箱;

[0095] 2) 封闭:移去稀释缓冲液,并用洗涤缓冲液进行洗涤,待洗涤完成后,加入封闭液,37℃放置 1 小时,移去封闭液,并用洗涤缓冲液进行洗涤,洗涤完成后,ELISA 板于 37℃放置 1 小时;

[0096] 3) 加待测样本,并且温育:从循环系统取样,作待测样本;以已知含量的铬-极低密度脂蛋白螯合物作标准品;用稀释缓冲液稀释待测样本和标准品均稀释至 10-40 倍,加入微孔中,37℃作用 1-2 小时;

[0097] 4) 加入可以捕获铬的物质,并且温育:移去待测样本,并用洗涤缓冲液进行洗涤,待洗涤完成后,加入用稀释缓冲液稀释 5000-40000 倍的抗铬抗体,37℃作用 1-2 小时,使抗铬抗体与极低密度脂蛋白上的金属铬反应;

[0098] 5) 酶结合物温育:移去抗铬抗体,洗涤,加入用稀释缓冲液稀释的 HRP 酶标抗体,37℃作用 1-2 小时,使其与 HRP 酶标抗体反应;

[0099] 6) 底物温育:移去酶标抗体,并用洗涤缓冲液进行洗涤,待洗涤完成后,加入底物,37℃避光作用 30 分钟;

[0100] 7) 终止反应:终止液至每一微孔;

[0101] 8) 取波长 450nm,加完终止液后,将 ELISA 板置于酶标仪上分别读取待测样本组和标准品的 OD 值,绘制标准曲线,通过与标准品组比较,求得待测样本的含量。

[0102] 本方法中,步骤 8) 也可不使用酶标仪,直接通过显色情况进行定性检测。

[0103] 该方法利用 ELISA 原理,极低密度脂蛋白上的铬可以被铬的特异性抗体所捕获,之后可以再被辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等酶标记的抗体所捕获(该抗体不识别包被蛋白),捕获上的抗体在显色剂及终止液的作用下,可以在仪器下读出 OD 值,而不含有螯合金属铬的极低密度脂蛋白,则不会被抗铬的特异性抗体所捕获,也不会与辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等酶标记的抗体所捕获,而所用试剂中也不含有金属铬(阴性对照组结果为阴性),因而当所读取的 OD 值结果显示为阳性时,即可证明检测出极低密度脂蛋白上螯合的金属铬。

[0104] 方法二:酶联免疫与原子吸收光谱结合法(ELISA 法+AAS 法)检测铬-极低密度脂蛋白螯合物按照如下步骤检测:

[0105] 1) 包被:将能够捕获极低密度脂蛋白的物质,如抗极低密度脂蛋白抗体(抗极低密度脂蛋白抗体)包被于固相载体上,用稀释缓冲液稀释抗极低密度脂蛋白抗体至 500-4000 倍,加入 ELISA 板微孔中,4℃过夜 16-18 小时,或 37℃水浴 1-3 小时,储存冰箱;

[0106] 2) 封闭:移去稀释缓冲液,并用洗涤缓冲液进行洗涤,待洗涤完成后,加入封闭液,37℃放置 1 小时,移去封闭液,并用相应洗涤缓冲液进行洗涤,洗涤完成后,ELISA 板于 37℃放置 1 小时;

[0107] 3) 加待测样本,并且温育:从循环系统中取样,作待测样本;以已知含量的铬-极低密度脂蛋白螯合物作标准品;用稀释缓冲液稀释至 10-40 倍,加入微孔中,37℃作用 1-2 小时;

[0108] 4) 洗脱:移去待测样本,洗涤,加入洗脱液,在 37℃下洗脱 1-3 小时;

[0109] 5) 检测:从 ELISA 微孔中取样,于原子吸收光谱仪检测螯合于极低密度脂蛋白上的铬,读出相应数值;

[0110] 该实施例利用 ELISA 原理对血清中的极低密度脂蛋白进行捕获,并结合原子吸收光谱(AAS)仪检测螯合于极低密度脂蛋白上的铬;由于溶液中仅含有极低密度脂蛋白,且所用试剂中不含任何重金属(阴性对照组结果为阴性),不会对结果造成干扰,因而当所读取的结果显示为阳性时,即可证明检测出极低密度脂蛋白上螯合的金属铬。

[0111] 方法三:酶联免疫与电感耦合等离子体质谱结合法(ELISA 法+ICP-MS 法)检测铬-极低密度脂蛋白螯合物按照如下步骤检测:

[0112] 1) 包被:将能够捕获极低密度脂蛋白的物质,如抗极低密度脂蛋白抗体包被于固

相载体上,用稀释缓冲液稀释抗极低密度脂蛋白抗体至 500-4000 倍,加入 ELISA 板微孔中,4℃过夜 16-18 小时,或 37℃水浴 1-3 小时,储存冰箱;

[0113] 2) 封闭:移去稀释缓冲液,并用洗涤缓冲液进行洗涤,待洗涤完成后,加入封闭液,37℃放置 1 小时,移去封闭液,并用相应洗涤缓冲液进行洗涤,洗涤完成后,ELISA 板于 37℃放置 1 小时;

[0114] 3) 加待测样本,并且温育:从循环系统取全血,作待测样本;以已知含量的铬-极低密度脂蛋白螯合物作标准品;用稀释缓冲液稀释至 10-40 倍,加入微孔中,37℃作用 1-2 小时;

[0115] 4) 洗脱:移去待测样本,并用相应洗涤缓冲液进行洗涤,待洗涤完成后,加入洗脱液,在 37℃下洗脱 1-3 小时;

[0116] 5) 酸化:在步骤 4) 中的溶液中加入酸化剂对溶液进行酸化,封口过夜,彻底酸化;

[0117] 6) 检测:加入过氧化氢,并且加热赶酸,并从 ELISA 试剂板中洗脱的溶液中取 0.5mL 液体,于电感耦合等离子体质谱仪下检测螯合于极低密度脂蛋白的铬,读出相应数值。

[0118] 该方法在利用 ELISA 原理的基础上,结合感耦合等离子体质谱 (ICP-MS) 原理,用电感耦合等离子体质谱仪检测螯合于极低密度脂蛋白上的铬;即先采用 ELISA 原理将铬-极低密度脂蛋白螯合物提取出来,再采用感耦合等离子体质谱仪对螯合于极低密度脂蛋白上的铬进行定量检测;由于溶液中仅含有极低密度脂蛋白,且所用试剂中不含任何重金属(阴性对照组结果为阴性),不会对结果造成干扰,因而当所读取的结果显示为阳性时,即可证明检测出极低密度脂蛋白上螯合的金属铬。

[0119] 方法四:提纯铬-极低密度脂蛋白螯合物与酶联免疫结合法(提纯法+ELISA 法)检测铬-极低密度脂蛋白螯合物,按照如下步骤检测:

[0120] 1) 从全血中提取非特异性极低密度脂蛋白:采用超速离心法、高压液相层析法、凝胶过滤层析法、凝胶电泳法等方法,从全血中提取极低密度脂蛋白,并将提取出的极低密度脂蛋白复溶,得极低密度脂蛋白的溶液;

[0121] 2) 包被:将抗铬抗体包被于固相载体上,用稀释缓冲液稀释抗铬抗体至 5000-40000 倍,加入 ELISA 板微孔中,4℃过夜 16-18 小时,或 37℃水浴 1-3 小时,储存冰箱;

[0122] 3) 封闭:移去稀释缓冲液,并用洗涤缓冲液进行洗涤,待洗涤完成后,加入封闭液,37℃放置 1 小时,移去封闭液,并用相应洗涤缓冲液进行洗涤,洗涤完成后,ELISA 板于 37℃放置 1 小时;

[0123] 4) 加待测样本,并且温育:从步骤 1) 的溶液中取样,作待测样本;以已知含量的铬-极低密度脂蛋白螯合物作标准品;用稀释缓冲液稀释至 10-40 倍,加入微孔中,37℃作用 1-2 小时;

[0124] 5) 酶结合物温育:移去待测样本,并用洗涤缓冲液进行洗涤,待洗涤完成后,加入用稀释缓冲液稀释的酶标抗体,37℃作用 1-2 小时,使其与酶标抗体反应;

[0125] 6) 底物温育:移去酶标抗体,并用相应洗涤缓冲液进行洗涤,待洗涤完成后,加入底物,37℃避光作用 30 分钟;

[0126] 7) 终止反应:终止液至每一微孔;

[0127] 8) 取波长 450nm,加完终止液后,在酶标仪上分别读取待测样本组和标准品的 OD 值,绘制标准曲线,通过与标准品组比较,求得待测样本的含量。

[0128] 本方法中,也可不使用酶标仪,直接通过显色情况进行定性检测。

[0129] 方法五:提纯铬-极低密度脂蛋白螯合物与原子吸收光谱结合法(提纯法+AAS 法)检测血样中铬-极低密度脂蛋白螯合物,按照如下步骤检测:

[0130] 1) 从全血中提取非特异性极低密度脂蛋白:采用超速离心法、高压液相层析法、凝胶过滤层析法、凝胶电泳法等方法,从全血中提取极低密度脂蛋白,并将提取出的极低密度脂蛋白复溶,得极低密度脂蛋白的溶液;

[0131] 2) 检测:从步骤 1) 的溶液中取样,于原子吸收光谱仪检测整合于极低密度脂蛋白上的铬,读出相应数值。

[0132] 方法六:提纯铬-极低密度脂蛋白螯合物与电感耦合等离子体质谱结合法(提纯法+ICP-MS 法)检测铬-极低密度脂蛋白螯合物,按照如下步骤检测:

[0133] 1) 从全血中提取非特异性极低密度脂蛋白:采用超速离心法、高压液相层析法、凝胶过滤层析法、凝胶电泳法等方法,从全血中提取极低密度脂蛋白,并将提取出的极低密度脂蛋白复溶,得极低密度脂蛋白的溶液;

[0134] 2) 酸化:从步骤 1) 的溶液中取样,在溶液中加入硝酸对溶液进行酸化,封口过夜,彻底酸化;

[0135] 3) 检测:加入过氧化氢,并且加热赶酸后取 0.5mL 溶液,于电感耦合等离子体质谱仪下检测整合于极低密度脂蛋白上的铬,读出相应数值。

[0136] 方法四、方法五和方法六均是通过全血提取法分离出极低密度脂蛋白,再采用特异性检测方法,测定极低密度脂蛋白中铬-极低密度脂蛋白螯合物上铬的含量;即先采用物理分离手段,如超速离心法、高压液相层析法、凝胶过滤层析法等,将极低密度脂蛋白从待测血浆样本中分离出来并复溶于生理盐水中,再利用 ELISA 原理、原子吸收光谱检测或进行电感耦合等离子体质谱法检测铬-极低密度脂蛋白螯合物上的铬含量。

[0137] 方法七:电泳法+ELISA/AAS/ICP-MS 法检测铬-极低密度脂蛋白螯合物,具体如下:

[0138] 1) 从全血中提取非特异性极低密度脂蛋白:采用超速离心法、高压液相层析法、凝胶过滤层析法、凝胶电泳法等方法,从全血中提取极低密度脂蛋白,将提取出来的极低密度脂蛋白复溶于生理盐水中,得极低密度脂蛋白的溶液;

[0139] 2) 制备胶床:根据需求选择合适的介质(如琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶等),按照相应要求制备好相应胶床;

[0140] 3) 加样:从步骤 1) 的溶液中取 8 $\mu$ L 溶液,以已知含量的铬-极低密度脂蛋白螯合物作标准品,加入 2 $\mu$ L 上样缓冲液,并混匀,然后加样于样品槽中;

[0141] 4) 电泳:连接电泳板,加电泳缓冲液,进行电泳,并根据需求将蛋白按照分子量、等电点等参数的不同进行分离;

[0142] 5) 检测:在胶床上找出含有铬的蛋白条带,将该条带取出,将该蛋白条带溶解,然后再分别利用 ELISA 或 ICP-MS 或 AAS 等原理检测铬含量。

[0143] 此外,还可以利用此方法检测铬-极低密度脂蛋白螯合物的等电点、分子量及含

量等。

[0144] 在方法七中,将极低密度脂蛋白提取出来,再采用凝胶电泳法对所提取的极低密度脂蛋白进行分离,再找出富含铬的相应条带,再检测相关极低密度脂蛋白的含量;即极低密度脂蛋白从红细胞中释放后,可以用多种方法提纯出来(例如超速离心法、高压液相层析法、凝胶过滤层析法、凝胶电泳法,ELISA方法等),将提纯出来的极低密度脂蛋白复溶于溶液中,取一定量的极低密度脂蛋白,利用电荷移动原理,进行电泳(electrophoresis,EP),在凝胶板(可根据需要采用不同介质)上可根据分子量、等电点等不同跑出不同的条带,寻找出富含铬的相应条带,将凝胶中的蛋白质复溶于溶液中,即可以在特定波长下检测相关极低密度脂蛋白的含量,也可以利用ELISA、AAS、ICP-MS等原理检测出整合于极低密度脂蛋白上的铬含量,由于溶液中仅含有极低密度脂蛋白,且所用试剂中不含任何重金属(阴性对照组结果为阴性),不会对结果造成干扰,因而当所读取的结果显示为阳性时,即可证明检测出极低密度脂蛋白上整合的金属铬。

[0145] 实施例1:合成法合成铬-极低密度脂蛋白螯合物,即包括以下步骤:

[0146] 本实施例所制备的铬-极低密度脂蛋白螯合物,通过凝胶电泳进一步分离,并通过电感耦合等离子体质谱或原子吸收光谱进行检测定性鉴定。

[0147] 本实施例所使用的试剂如下:

[0148] 1) 硼酸盐缓冲液,其摩尔浓度为0.01M,其制备方法示例如下:称取0.31g硼酸溶于400mLddH<sub>2</sub>O中,用0.1mol/L的NaOH调节pH至9.0,定容至500mL。

[0149] 2) EDTA-NaHCO<sub>3</sub>溶液,其制备方法如下:取1.86g EDTA·2H<sub>2</sub>O和16.8g NaHCO<sub>3</sub>,溶于900mLddH<sub>2</sub>O中,用1.0M NaOH调整pH至8.0定容至1000mL,高压灭菌,室温保存;

[0150] 3) ITCBE 购买自日本同仁化学研究所,货号M030;

[0151] 4) 极低密度脂蛋白溶液:称取4.0mg极低密度脂蛋白溶于4.0mL0.01M pH9.0硼酸盐缓冲液中,充分振荡溶解,配制成1.0mg/mL的极低密度脂蛋白溶液;

[0152] 5) 透析袋的截留分子量14000,购买自Bioshop Inc;

[0153] 透析袋的预处理:将透析袋放入500mL的EDTA-NaHCO<sub>3</sub>溶液中,煮沸10min;倾弃EDTA-NaHCO<sub>3</sub>溶液,用ddH<sub>2</sub>O轻轻漂洗,再用500mL5mmol/L EDTA煮沸10min;弃掉煮沸液,彻底用ddH<sub>2</sub>O清洗,加入大量的ddH<sub>2</sub>O浸泡透析袋4℃过夜。使用时,戴上手套,取出透析袋,用大量的ddH<sub>2</sub>O彻底冲洗其内外表面;

[0154] A) 铬-极低密度脂蛋白螯合物的合成:在提纯源于人体的极低密度脂蛋白或按照生物学方法重组的极低密度脂蛋白中加入铬离子进行螯合反应,得到反应溶液,具体操作步骤如下;

[0155] 1) 取2.0mg ITCBE溶于2mLDMSO中;

[0156] 2) 缓慢将步骤1制备的液体加入极低密度脂蛋白溶液中,边滴加边震荡,于25℃,100r/min的摇床中作用24h,然后用透析袋透析24h,除去未与极低密度脂蛋白结合的ITCBE;

[0157] 3) 将透析所得的液体用1mol/L HCl调节pH值至7.0,然后缓慢逐渐滴加80μl 1mmol/L铬离子溶液,边滴加边振荡,以免铬离子使蛋白变性沉淀;

[0158] 4) 将加好的溶液在25℃,100r/min的摇床中反应2h,用处理好的透析袋进行透析24h;

[0159] 5) 将透析好的液体于  $-20^{\circ}\text{C}$  分装保存, 得到铬-极低密度脂蛋白螯合物的反应溶液。

[0160] B) 铬-极低密度脂蛋白螯合物纯化: 采用免疫亲和层析法, 去除步骤 A) 反应溶液中未反应的极低密度脂蛋白、特异性抗体和铬离子, 即得铬-极低密度脂蛋白螯合物, 具体包括以下步骤:

[0161] (1) 溶解样品: 将上述步骤 A) 的铬-极低密度脂蛋白螯合物溶解于生理盐水中, 得铬-极低密度脂蛋白螯合物的溶液;

[0162] (2) 平衡层析柱: 使用稀释缓冲液冲洗层析柱的管路, 在层析柱中装入能与极低密度脂蛋白特异性结合的填料, 装柱后, 继续使用稀释缓冲液平衡层析柱;

[0163] (3) 上样: 待层析柱平衡后, 用稀释缓冲液稀释步骤 (1) 的溶液, 然后上柱, 使极低密度脂蛋白与填料特异性结合;

[0164] (4) 洗脱: 使用稀释缓冲液冲洗层析柱至基线平衡, 然后使用  $0.05\text{--}0.10\text{mol/L}$  的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  溶液进行洗脱;

[0165] (5) 收集: 收集步骤 (4) 的洗脱液, 收集完毕后立即使蛋白复原;

[0166] (6) 透析: 将步骤 (5) 的洗脱液, 装透析袋, 用  $\text{ddH}_2\text{O}$  透析除盐, 换水三次后,  $4^{\circ}\text{C}$  透析过夜, 收集样本;

[0167] (7) 平衡层析柱: 采用新的层析柱, 用稀释缓冲液冲洗管路, 在该层析柱中装入能与铬特异性结合的填料, 装柱后再用稀释缓冲液平衡层析柱;

[0168] (8) 上样: 待层析柱平衡后, 用稀释缓冲液稀释步骤 (6) 中样本, 然后上柱;

[0169] (9) 洗脱: 使用稀释缓冲液冲洗层析柱至基线平衡, 然后使用  $0.5\text{--}1.0\text{mol/L}$  的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  溶液进行洗脱;

[0170] (10) 收集: 收集步骤 (9) 的洗脱液, 收集完毕后立即使蛋白复原;

[0171] (11) 透析: 将步骤 (10) 的洗脱液, 装透析袋, 用  $\text{ddH}_2\text{O}$  透析除盐, 换水三次后,  $4^{\circ}\text{C}$  透析过夜, 收集样本, 即得铬-极低密度脂蛋白螯合物。

[0172] C) 对铬-极低密度脂蛋白螯合物的鉴定, 具体步骤如下:

[0173] (1) 制备胶床: 以琼脂糖凝胶作为介质制备胶床;

[0174] (2) 加样: 取步骤 B) 中提取纯化得到的铬-极低密度脂蛋白螯合物, 复溶于生理盐水中, 得铬-极低密度脂蛋白螯合物的溶液, 取  $8\ \mu\text{L}$  前述溶液, 加入  $2\ \mu\text{L}$  上样缓冲液, 并混匀, 然后加样于样品槽中;

[0175] (3) 电泳: 连接电泳板, 加电泳缓冲液进行电泳; 电泳过程中, 电流为  $22\text{mA}$  恒流, 环境温度为  $4^{\circ}\text{C}$ ; 至溴酚蓝移至胶底部时停止电泳, 图 1 为本发明所述铬-极低密度脂蛋白螯合物的非变性电泳条带图, M 泳道为变性 Marker, VLDL 泳道为极低密度脂蛋白;

[0176] (4) 检测: 在胶床上找出含铬的蛋白条带, 将该蛋白条带取出, 将蛋白条带溶解, 然后再采用 ICP-MS 或 AAS 检测是否含有铬以及检测铬的含量。

[0177] D) 鉴定结果

[0178] 1) AAS 检测结果

[0179] 取步骤 C) 分离出的蛋白条带溶液, 以石墨炉原子吸收光谱法 (AAS) 初步测定极低密度脂蛋白中重金属铬的含量, 如下表所示, 以  $\text{NaCl}$  溶液、 $\text{KBr}$  溶液、 $\text{KCl}$  溶液为空白对照;

[0180] 表 1 极低密度脂蛋白中铬的含量

[0181]

样本名	Cr ( $\mu\text{g/L}$ )
-----	------------------------

[0182]

待测样本	7.489
NaCl	0.077
KBr	0.000
KCl	0.065

[0183] 2) 同步辐射 X 荧光分析

[0184] 蛋白条带内微量元素含量的 SRXRF 分析在北京正负电子对撞机 (BEPC) 的 4W1" 同步辐射束线上完成。储存环中电子束流能量为 2.2GeV, 束流强度 100mA。样品移动台 (TSA200 型, 北京卓立汉光公司) 可在计算机控制的步进马达驱动下沿 X、Y 二维方向上移动以改变入射光斑位置, 移动步长为 0.0025mm。从样品发射出的 X 射线由 Si (Li) 探测器 (PGT Inc. LS30143-DS) 探测, 探头与入射 SR 线共平面且相互垂直, 距样品照射点 20mm, 信号用 PGT 多道分析仪 (MCA 4000) 获取输出。用 11.5keV 的单色同步辐射光激发样品, 调节入射光斑 (1mmx 3mm) 位置使之处于条带一端, 在 300s 的测定时间内, 光斑一直沿条带均匀缓慢移动, 计数结束时光斑移到该条带另一端。沿电泳方向每 1mm 取一个谱。采用 AX IL 软件处理数据, 并用来源于空气且含量恒定的 Ar 信号峰对其它元素峰进行归一处理, 以抵消束流强度变化对信号强弱产生的影响。在相同的条件下以同样的方式测量定量标准干胶膜的荧光谱。

[0185] 图 2 为本发明所述的铬-极低密度脂蛋白螯合物的电泳条带的同步辐射 X 线荧光分析图, 图中横坐标为蛋白条带位置, 纵坐标为该条带铬金属能量 (含量) 值。

[0186] 检测条件的确定

[0187] 1. 抗极低密度脂蛋白抗体、抗 Cr 抗体最佳工作浓度以及血浆的最佳稀释倍数的确定。

[0188] 酶联免疫法检测铬-极低密度脂蛋白螯合物的方法, 具体包括以下步骤:

[0189] 1) 包被: 将抗极低密度脂蛋白抗体蛋白包被于固相载体上, 分别用稀释缓冲液将包被蛋白以 1:500、1:1000、1:2000、和 1:4000 的倍比稀释, 加入 ELISA 板微孔中, 每个浓度包被三排, 4℃ 保存 18 小时;

[0190] 2) 封闭: 移去稀释缓冲液, 洗涤, 加入封闭液, 37℃ 放置 1 小时, 移去封闭液, 洗涤;

[0191] 3) 加待测样本: 用稀释缓冲液将待测血浆样本按 1:10、1:20、1:40 的倍比稀释, 加入微孔中, 以已知含量的铬-极低密度脂蛋白螯合物作标准品, 设置阴性对照和空白对照, 加入微孔中, 37℃ 作用 1 小时;

[0192] 4) 加二抗: 移去待测血浆样本, 洗涤, 加入用稀释缓冲液按 1:5000、1:10000、1:20000、1:40000 的倍比稀释的抗 Cr 抗体, 37℃ 作用 1 小时, 使其与极低密度脂蛋白上的金属铬反应;

[0193] 5) 加酶标:移去抗 Cr 抗体,洗涤,加入用稀释缓冲液稀释至抗体含量为 2  $\mu$ g/mL 的 HRP 酶标抗体,37 $^{\circ}$ C 作用 1 小时,使其与抗 Cr 抗体反应;

[0194] 6) 底物温育:移去酶标抗体,洗涤,加入底物,37 $^{\circ}$ C 避光作用 30min,加入终止液;

[0195] 7) 检测:于 450nm 波长下在酶标仪上分别读取标准品、待测血浆、阳性对照、阴性对照和空白对照样本的 OD 值。

[0196] 本实施例中,采用本发明提供的铬-极低密度脂蛋白螯合物标准品作为阳性对照,分别以不加待测血浆作为阴性对照 1,即依次加入了抗极低密度脂蛋白抗体、封闭液、抗 Cr 抗体、酶标和底物;

[0197] 以不加抗 Cr 抗体的对照试验组作为阴性对照 2,即依次加入了抗极低密度脂蛋白抗体、封闭液、待测血浆、酶标和底物;

[0198] 以不加酶标的对照试验组作为阴性对照 3,即依次加入了抗极低密度脂蛋白抗体、封闭液、待测血浆、抗 Cr 抗体和底物;

[0199] 以同时不加待测样本和抗 Cr 抗体的对照试验组作为阴性对照 4,即依次加入了抗极低密度脂蛋白抗体、封闭液、酶标和底物;

[0200] 以不加抗极低密度脂蛋白抗体作的对照试验组为空白对照 1,即加入了封闭液、待测血浆、抗 Cr 抗体、酶标和底物;

[0201] 以及以只加底物的对照试验组为空白对照 2,以只加 PBS 的对照试验组为空白对照 3。

[0202] 表 2 为不同抗极低密度脂蛋白抗体稀释倍比、血浆稀释倍比、抗 Cr 抗体稀释倍比的样本 OD 值数据,

[0203] 表 2 不同抗极低密度脂蛋白抗体、抗 Cr 抗体以及血浆稀释倍比下的检测结果

[0204]

		抗极低密度脂蛋白抗体			
		1:500	1:1000	1:2000	1:4000
抗 Cr 抗体 1:5000	血浆 1:10	0.597	0.669	0.585	0.569
	血浆 1:20	0.611	0.707	0.616	0.557
	血浆 1:40	0.587	0.616	0.519	0.416
抗 Cr 抗体 1:10000	血浆 1:10	0.611	0.702	0.526	0.427
	血浆 1:20	0.625	0.682	0.596	0.451
	血浆 1:40	0.583	0.623	0.521	0.413
抗 Cr 抗体 1:20000	血浆 1:10	0.543	0.562	0.461	0.471
	血浆 1:20	0.558	0.547	0.432	0.422
	血浆 1:40	0.422	0.482	0.418	0.348

[0205]

抗 Cr 抗体 1:40000	血浆 1:10	0.474	0.505	0.441	0.401
	血浆 1:20	0.433	0.469	0.405	0.469
	血浆 1:40	0.411	0.387	0.316	0.327

[0206] 从表 2 可知,抗极低密度脂蛋白抗体的稀释倍比为 1:1000 时,样本 OD 值大于平行条件下的其它抗极低密度脂蛋白抗体的稀释倍比;该组样本中,血浆稀释倍比为 1:20 时,抗 Cr 抗体稀释倍比为 1:5000 时,OD 值最大,为 0.707。

[0207] 表 3 为抗极低密度脂蛋白抗体的稀释倍比为 1:1000、血浆稀释倍比为 1:20、抗 Cr 抗体稀释倍比为 1:5000 时相对应的阳性对照、阴性对照和空白对照的 OD 检测值,

[0208] 表 3 阳性对照、阴性对照及空白对照的检测结果

[0209]

阳性对照	阴性对照				空白对照		
	阴性 对照 1	阴性 对照 2	阴性 对照 3	阴性 对照 4	空白 对照 1	空白 对照 2	空白 对照 3
0.977	0.045	0.066	0.087	0.044	0.043	0.032	0.008

[0210] 从表 3 可知,阴性对照组 OD 检测值小于 0.1,说明该优化条件下,本方法的系统误差性小,满足分析方法要求,所以选此值所对应的浓度作为最佳工作浓度。

[0211] 2. ELISA 洗脱液最佳工作浓度及洗脱时间确定

[0212] 为寻求最适宜的洗脱条件,通过酶联免疫法在抗 Cr 抗体与酶标抗体温育后,以不同浓度的洗脱液进行洗脱,再通过酶标仪检测 OD 值,具体步骤如下:

[0213] (1) 包被:将抗 Cr 抗体蛋白包被于固相载体上,用稀释缓冲液按 1:5000 的倍比稀释,加至 ELISA 板微孔中,4℃ 保存 16 小时;

[0214] (2) 封闭:移去稀释缓冲液,洗涤后,加封闭液,37℃ 放置 1 小时,移去封闭液,并洗涤;

[0215] (3) 加酶标抗体:移去封闭液,洗涤后,加入用稀释缓冲液稀释至抗体浓度为 2 μg/mL 的 HRP 酶标抗体,37℃ 作用 2 小时,使其与抗 Cr 抗体反应;

[0216] (4) 洗脱:移去酶标抗体,用稀释缓冲液对洗脱液进行稀释,使洗脱液中木瓜蛋白酶酶的浓度:酶标抗体中抗体的浓度 = 1:5、1:10、1:20、1:40、1:80 的倍比将洗脱液加入微孔中,每个浓度作 3 个复孔,分别放置于 37℃ 下作用 1h、2h、3h;移去洗脱液,洗涤,待洗涤完成后,加入底物,37℃ 避光作用 30 分钟,加终止液终止反应;

[0217] (5) 于 450nm 的检测波长下在酶标仪上分别读取每个微孔的 OD 值,具体结果参见表 4,

[0218] 表 4 不同洗脱液稀释倍数下的检测结果

[0219]

	洗脱液	洗脱液	洗脱液	洗脱液	洗脱液
	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80
1h	0.281	0.168	0.081	0.114	0.469
2h	0.250	0.115	0.050	0.183	0.438
3h	0.225	0.106	0.100	0.196	0.441

[0220] 通过比较 OD 值,以判断 ELISA 孔壁上结合的抗 Cr 抗体 - 酶标抗体复合物洗脱程度,当 OD 值最低时,抗 Cr 抗体 - 酶标抗体复合物洗脱程度达到最大。如表 4 所示,当洗脱液中木瓜蛋白酶的浓度 :酶标抗体中抗体的浓度 = 1:20 时,洗脱程度最大 ;而作用时间为 1h、2h、3h 时,各组 OD 值变化不大,可见随着时间的延长,酶活力逐渐减弱,在酶浓度不变的情况下,延长消化时间并不能提高消化率,所以本实验中洗脱液的作用时间为 1-3h 皆可,综上所述,我们选择洗脱液 1:20 作为最适工作浓度,1-3h 作为最适洗脱时间。

[0221] 应用实施例

[0222] 应用实施例 1

[0223] 采用酶联免疫法 (ELISA 法) 检测 100 份标本血浆中的铬 - 极低密度脂蛋白螯合物,即采用具体实施例方法一记载的方法检测,具体操作步骤如下 :

[0224] 1) 包被 :将抗极低密度脂蛋白抗体包被于固相载体上,用稀释缓冲液稀释至 1000 倍,加入 ELISA 板微孔中,37℃ 保存 1 小时后于冰箱中 4℃ 储存 ;

[0225] 2) 封闭 :移去稀释缓冲液,洗涤,加封闭液,37℃ 放置 1 小时,移去封闭液,洗涤,ELISA 板 37℃ 放置 1 小时后于冰箱中 4℃ 储存 ;

[0226] 3) 加样 :以标本血浆作为待测样本,以已知含量的铬 - 极低密度脂蛋白螯合物作标准品,用稀释缓冲液将待测样本和标准品均稀释至 20 倍,加入微孔中,37℃ 作用 1 小时 ;

[0227] 4) 加抗 Cr 抗体 :移去样品,洗涤,加入用稀释缓冲液稀释至 5000 倍的抗 Cr 抗体,37℃ 作用 1 小时,使其与极低密度脂蛋白上的金属铬反应 ;

[0228] 5) 加酶标 :移去抗 Cr 抗体,洗涤,加入用稀释缓冲液稀释至抗体浓度为 2 μg/mL 的酶标抗体,37℃ 作用 1 小时,使其与抗 Cr 抗体反应 ;

[0229] 6) 底物温育 :移去酶标抗体,洗涤,加入底物,37℃ 避光作用 30min,以与加底物液相同的速度和顺序滴加入终止液 ;

[0230] 7) 检测 :于 450nm 波长下在酶标仪上分别读取待测样本和标准品的 OD 值,结果如表 5 所示。

[0231] 表 5 方法一对 100 份标本血浆的实测结果

[0232]

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
OD	0.532	0.427	0.312	0.35	0.664	0.682	0.499	0.522	0.585	0.631
编号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
OD	0.338	0.562	0.326	0.696	0.417	0.45	0.398	0.562	0.638	0.656
编号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
OD	0.497	0.461	0.587	0.411	0.585	0.483	0.643	0.358	0.5	0.374
编号	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
OD	0.369	0.387	0.416	0.62	0.382	0.63	0.562	0.547	0.612	0.605
编号	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
OD	0.585	0.316	0.319	0.426	0.696	0.321	0.401	0.422	0.338	0.541
编号	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
OD	0.488	0.431	0.3	0.503	0.5	0.371	0.642	0.489	0.302	0.518
编号	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
OD	0.666	0.636	0.411	0.454	0.317	0.691	0.398	0.415	0.553	0.417
编号	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
OD	0.572	0.582	0.402	0.373	0.468	0.349	0.55	0.562	0.54	0.319
编号	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
OD	0.692	0.51	0.409	0.619	0.65	0.673	0.376	0.64	0.66	0.643
编号	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
OD	0.642	0.303	0.479	0.572	0.655	0.655	0.454	0.485	0.393	0.536

[0233] 本应用实施例 1 中, 步骤 7) 中, 也可以不使用酶标仪检测, 而是直接通过显色进行定性检测。

#### [0234] 应用实施例 2

[0235] 采用酶联免疫与原子吸收光谱结合法 (ELISA 法 +AAS 法) 检测 100 份标本血浆中铬 - 极低密度脂蛋白螯合物, 即采用具体实施例方法二记载的方法检测, 具体操作步骤如下:

[0236] 1) 包被: 将抗极低密度脂蛋白抗体包被于固相载体上, 用稀释缓冲液稀释包被蛋白至 1000 倍, 加入 ELISA 板微孔中, 4℃ 过夜 18 小时;

[0237] 2) 封闭: 移去稀释缓冲液, 洗涤, 加封闭液, 37℃ 放置 1 小时, 移去封闭液, 洗涤, ELISA 板 4℃ 下保存;

[0238] 3) 加样: 以标本血浆作待测样本, 以已知含量的铬 - 极低密度脂蛋白螯合物作标准品, 用稀释缓冲液将待测样本和标准品稀释至 20 倍, 加入微孔中, 37℃ 作用 1 小时;

[0239] 4) 洗脱: 移去待测血浆样本, 洗涤, 加入 0.8mol/L 的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  溶液, 37℃ 作用 2 小

时；

[0240] 5) 检测：从 ELISA 微孔中取样，于原子吸收光谱仪检测待测样本和标准品中螯合于极低密度脂蛋白上的铬，结果如表 6 所示。

[0241] 表 6 方法二对 100 份标本血浆的实测结果

[0242]

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
μg/L	13.615	3.123	4.306	4.028	3.707	13.239	3.201	3.425	3.181	4.301
编号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
μg/L	3.906	4.514	13.459	4.779	3.952	3.042	13.514	3.473	3.284	3.85
编号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
μg/L	3.562	3.311	3.505	13.848	3.715	14.966	4.508	13.355	4.092	3.941
编号	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
μg/L	4.498	3.716	3.513	4.542	4.861	3.403	4.47	4.751	3.004	4.533
编号	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
μg/L	4.121	3.851	4.294	3.085	13.281	3.796	4.89	14.042	3.446	3.769
编号	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
μg/L	3.316	3.827	3.535	4.224	4.163	14.474	14.766	13.443	13.439	3.023
编号	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
μg/L	3.649	4.391	3.936	14.273	4.179	14.076	4.687	14.402	3.259	4.915
编号	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
μg/L	3.716	14.094	4.361	3.976	3.174	4.922	4.717	3.187	3.296	3.475
编号	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
μg/L	4.681	4.937	13.366	4.071	3.159	3.898	3.102	4.259	4.582	3.584
编号	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
μg/L	4.329	14.921	4.004	4.73	4.041	3.563	14.926	3.89	3.616	4.661

[0243] 应用实施例 3：

[0244] 采用酶联免疫与电感耦合等离子体质谱结合法（ELISA 法 + ICP-MS 法）检测 100 份标本血浆中铬 - 极低密度脂蛋白螯合物，即采用具体实施例方法三记载的方法检测，具体操作步骤如下：

[0245] 1) 包被：将抗极低密度脂蛋白抗体包被于固相载体上，用稀释缓冲液稀释包被蛋白至 1000 倍，加入 ELISA 板微孔中，4℃ 保存 18 小时；

[0246] 2) 封闭：移去稀释缓冲液，洗涤，加封闭液，37℃ 放置 1 小时，移去封闭液，洗涤，ELISA 板 4℃ 保存；

[0247] 3) 加样：以标本血浆作待测样本，以已知含量的铬 - 极低密度脂蛋白螯合物作标准品，用稀释缓冲液将待测样本和标准品稀释至 20 倍，加入微孔中，37℃ 作用 2 小时；

[0248] 4) 洗脱 :移去待测样本和标准品,洗涤,加入 0.8mol/L 的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  溶液,37℃洗脱 2 小时 ;

[0249] 5) 酸化 :在溶液中加入硝酸对溶液进行酸化,封口过夜,彻底酸化 ;

[0250] 6) 检测 :加入过氧化氢,并且加热赶酸,取样于电感耦合等离子体质谱仪下检测待测样本和标准品中整合于极低密度脂蛋白上的铬,结果如表 7 所示。

[0251] 表 7 方法三对 100 份标本血浆的实测结果

[0252]

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
μg/L	3.546	13.131	4.91	13.731	3.415	4.591	4.765	3.994	4.528	4.001
编号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
μg/L	4.785	4.945	3.286	3.969	13.11	3.62	4.327	4.789	13.802	4.823
编号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
μg/L	4.481	3.321	3.987	3.784	13.399	13.858	13.216	4.223	4.299	13.325
编号	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
μg/L	3.513	3.294	13.661	4.16	4.806	14.875	4.529	13.269	3.386	3.743
编号	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
μg/L	4.136	13.384	4.273	4.1	14.218	4.576	3.807	3.238	14.181	3.109
编号	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
μg/L	4.724	13.389	4.021	14.728	3.768	4.056	3.653	14.013	14.668	4.461
编号	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
μg/L	3.463	13.463	13.463	3.463	3.463	3.463	3.463	3.463	3.463	3.463
编号	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
μg/L	3.528	4.346	14.542	3.047	13.671	4.358	4.543	3.185	13.815	3.379
编号	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
μg/L	4.839	14.054	4.38	3.598	14.576	13.251	4.274	4.481	4.304	3.021
编号	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
μg/L	4.989	4.675	3.523	3.061	4.848	3.391	3.074	3.419	4.08	3.473

[0253] 上述实施方式仅为本发明的优选实施方式,不能以此来限定本发明保护的范围,本领域的技术人员在本发明的基础上所做的任何非实质性的变化及替换均属于本发明所要求保护的范围。

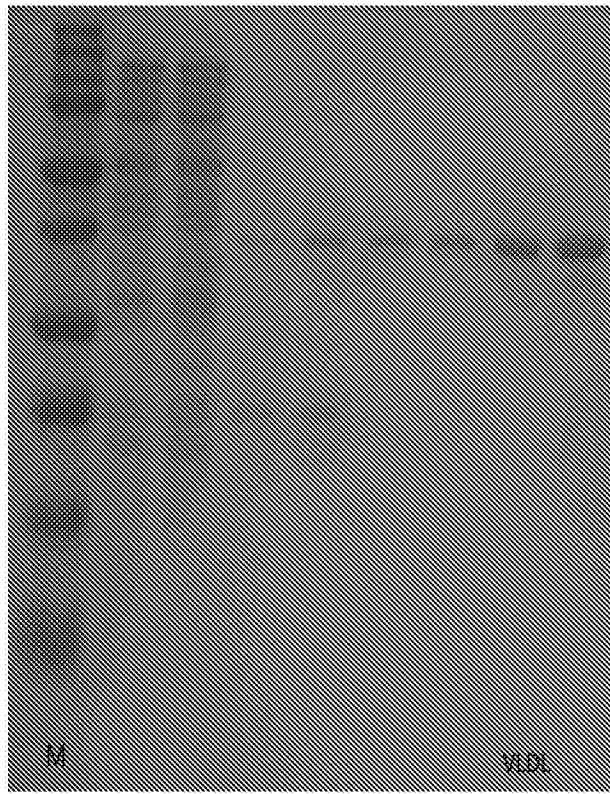


图 1

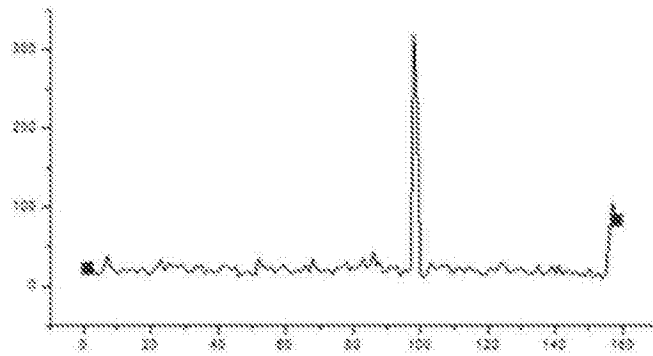


图 2

专利名称(译)	一种铬-极低密度脂蛋白螯合物及其制备方法和应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN105044009A</a>	公开(公告)日	2015-11-11
申请号	CN201510413275.2	申请日	2015-07-14
[标]申请(专利权)人(译)	上海拜豪生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海拜豪生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海拜豪生物科技有限公司		
[标]发明人	张积仁 阳帆 董欣敏 吴婧 蔡睿 孙遥 赵乙木		
发明人	张积仁 阳帆 董欣敏 吴婧 蔡睿 孙遥 赵乙木		
IPC分类号	G01N21/31 G01N33/53 G01N27/62 G01N1/28 G01N1/34 G01N27/447		
其他公开文献	CN105044009B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供一种铬-极低密度脂蛋白螯合物及其制备方法和应用，该铬-极低密度脂蛋白螯合物是铬离子与极低密度脂蛋白通过巯基或/和半胱氨酸残基螯合而成，可用于制备检测人体铬-极低密度脂蛋白螯合物的试剂。本发明首次证实了铬离子可直接作用于极低密度脂蛋白。本发明建立了铬-极低密度脂蛋白螯合物的定性定量检测方法，以检测一个地区人群体内极低密度脂蛋白的含量，从而间接反映一个地区铬污染程度以及对人群的健康影响。本发明建立的铬-极低密度脂蛋白螯合物定量检测方法准确度高重、复性好。

