

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.  
G01N 33/53 (2006.01)  
C12Q 1/00 (2006.01)



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510046527.9

[43] 公开日 2006年11月29日

[11] 公开号 CN 1869696A

[22] 申请日 2005.5.24

[21] 申请号 200510046527.9

[71] 申请人 大连大学

地址 116622 辽宁省大连市大连经济技术开发区

[72] 发明人 刘庆平 刘 华

[74] 专利代理机构 大连智慧专利事务所  
代理人 周志舰 潘 迅

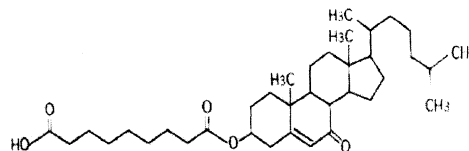
权利要求书1页 说明书9页 附图2页

## [54] 发明名称

检测血清  $\beta 2$ -糖蛋白 I 及其自身抗体的试剂

## [57] 摘要

本发明涉及与血清  $\beta 2$ -糖蛋白 I ( $\beta 2$ -GPI) 特异性结合的一种氧化低密度脂蛋白衍生化合物 7-ketocholesteryl-9-carboxynonanoate 的分离或化学合成; 以及以本衍生物为底物用于检测和分离纯化  $\beta 2$ -糖蛋白 I; 用以确定与  $\beta 2$ -糖蛋白 I 相关的动脉硬化和血栓形成发生危险性升高或降低有关的抗体检测试剂。



7-ketocholesteryl-9-carboxynonanoate [oxLig-1]

1、一种检测血清 $\beta$  2-糖蛋白 I 及其自身抗体的试剂，是能与血清 $\beta$  2-糖蛋白 I 特异性结合的氧化低密度脂蛋白衍生化合物，其特征在于：其中的氧化低密度脂蛋白衍生物是一种结构为 7-酮胆固醇酯衍生物，用于检测 $\beta$  2-糖蛋白 I 及其与之相关的疾病。

2、如权利要求 1 所述试剂，其特征在于：用于检测与血清 $\beta$  2-糖蛋白 I 相关的动脉硬化和血栓形成发生危险性升高或降低有关的抗体。

3、如权利要求 1 或 2 所述试剂，其特征在于：氧化低密度脂蛋白活性衍生化合物来源于  $\text{Cu}^{2+}$ 氧化的低密度脂蛋白的脂成分。

4、如权利要求 3 所述试剂，其特征在于：氧化低密度脂蛋白活性衍生化合物其主要活性成分来源于 oxLDL 脂中胆固醇亚油酸的氧化产物。

5、如权利要求 4 所述的试剂，其特征在于：7-酮胆固醇酯功能衍生物为氧化形式。

6、如权利要求 4 所述的试剂，其特征在于：7-酮胆固醇酯功能衍生物为化学合成形式。

7、如权利要求 1 或 2 或 4 或 5 或 6 所述的试剂，其特征在于： $\beta$  2-糖蛋白 I 及其抗体的测定方法为一种免疫检测方法。

8、如权利要求 7 所述的试剂，其特征在于：免疫检测方法为 ELISA 方法。

9、如权利要求 1 所述的试剂，其特征在于：抗体检测是一种特异性识别“ $\beta$  2-糖蛋白 I-衍生物复合物”的抗体。

10、如权利要求 1 所述的试剂，其特征在于：与抗体相关的疾病为抗磷脂综合征或血栓症。

## 检测血清 $\beta$ 2-糖蛋白 I 及其自身抗体的试剂

### 技术领域:

本发明涉及一种与血清  $\beta$  2-糖蛋白 I ( $\beta$  2-GPI) 特异性结合的氧化低密度脂蛋白衍生化合物 7-酮胆固醇酯 (7-ketocholesteryl-9-carboxynonanoate); 以本衍生物为底物用于检测和分离纯化  $\beta$  2-糖蛋白 I; 用以确定是否存在与  $\beta$  2-糖蛋白有关的疾病, 特别是用以确定是否存在动脉硬化和血栓形成发生危险性升高或降低有关的抗体, 从而来检测疾病。

### 技术背景:

隶属于系统性红斑狼疮症的抗磷脂综合症 (antiphospholipid syndrome; APS) 是一种临床上十分难治的一类自身免疫性疾病, 其临床的主要症状就是动脉硬化以及动静脉血栓的形成、习惯性流产和血小板减少等症状。血清学特征为大量自身抗体的存在。

其中抗心磷脂抗体由于与血栓形成、血小板减少、系统性红斑狼疮、习惯性流产、神经系统疾病、急慢性白血病、消化系统疾病、肾脏疾病等凝血系统改变等密切相关, 所以抗心磷脂抗体可作为系统性红斑狼疮等自身免疫性疾病的辅助诊断指标及抗磷脂综合症诊断依据之一, 也可作为临床上预测血栓形成趋势的标志。

长年以来, 抗心磷脂抗体的测定在梅毒检测法中呈现梅毒生物学试验假阳性, 其特异性和敏感性很差, 1983-1984 年间, 开发了固相化心磷脂 RIA 和 ELISA 测定方法, 而且近年来由于使用纯净的心磷脂作为抗原, 抗心磷脂抗体的实验室和临床研究发展很快。目前抗  $\beta$  2-GPI 抗体的检测方法是以纯净的心磷脂作为抗原检测抗  $\beta$  2-GPI 抗体的 IgG、IgM 和 IgA, 但在临床患者血清自身抗体检测中, 由于敏感性过高, 相对特异性较差, 更重要的是未能提供特异性的抗磷脂综合症发病机理相关的信息, 所以, 在目前的抗磷脂综合症实验室诊断检测中, 仍然存在着诊断困难, 缺乏有效药物, 患者的死亡率高达 75% 以上。所以寻找能够提供抗磷脂综合症特异性发病原因即动脉硬化和血栓形成发病原因的特异性抗  $\beta$  2-GPI 抗体的检测方法显得意义十分重大。

### 发明内容:

#### 1、氧化低密度脂蛋白衍生物 7-ketocholesteryl-9-carboxynonanoate

在动脉粥样硬化的发生发展中, 众多的理论研究和实验结果证实了 LDL 的氧化扮演了非常重要的角色, 为了探索动脉粥样硬化的发病机理, 在体外研究中, 几种主要的 LDL 的实验模型是 MDA-LDL、acetylated-LDL 和  $\text{Cu}^{2+}$ -LDL, 在这些实验模型中,  $\text{Cu}^{2+}$ -LDL 显示了作为体外实验模型的优势,  $\text{Cu}^{2+}$  能够诱导 LDL 氧化, 导致 LDL 结构的高度破坏, 产生了多种 oxLDL 的氧化产物。  $\text{Cu}^{2+}$  所导致的 LDL 的破坏和产生的氧化产物与几种细胞 (如血管内皮细胞、平滑肌细胞和巨噬细胞等) 诱导的 LDL 氧化以及从动脉硬化巢中所提取的 oxLDL 具有非常相似的性质和结果, 而且在动脉硬化巢中提取出来的 oxLDL 展示了与  $\text{Cu}^{2+}$ -oxLDL 相似的物理和免疫学性质。而 MDA 是一个亲水性的短链乙醛结构, 它很容易从 LDL 中分离和扩散, 在透析之后, oxLDL 的 TBARS 分离物减少到无法检测的低水平。所以, 这已经成为一种共识, 即将  $\text{Cu}^{2+}$ -oxLDL 作为一种体内外实验研究动脉硬化的自身抗原。

$\beta_2$ -GPI 是抗磷脂综合症抗心磷脂抗体的主要抗原, 具有结合如心磷脂 (cardiolipin) 等阴性磷脂、活化血小板及凋亡细胞膜表面暴露出来的磷脂酰丝氨酸的性质。近年来, 通过对  $\beta_2$ -GPI 的变异蛋白质及体外合成多肽的研究以及结晶构造体的解析, 发现  $\beta_2$ -GPI 的第五个 domain 上, 特别是  $\text{C}^{281}\text{KNKEKKC}^{288}$  领域存在着与脂质结合的部位, 更确切地说, 结晶构造体表明, 在第五个 domain 上  $\text{K}^{317}$  与  $\text{T}^{318}$  的位置如果发生断裂,  $\beta_2$ -GPI 与磷脂的结合活性消失。最近, George 等报告在对 LDL 受体缺乏小鼠进行  $\beta_2$ -GPI 免疫之后, 发现  $\beta_2$ -GPI 促进了小鼠动脉壁脂肪斑的形成。还报告在人动脉硬化巢中含有丰富的  $\beta_2$ -GPI, 并且是与 CD4-阳性淋巴细胞共存。Lin 等报告冠心病 (CAD) 患者血清 LDL 升高的同时, HDL、apoA-1 和  $\beta_2$ -GPI 显示了低于正常人的水平。越来越多的证据表明  $\beta_2$ -GPI 卷入了脂蛋白和脂质的代谢中。这些结果和现象与 Ross 等提倡的伤害反应学说相加在一起, 表明既不仅是各种细胞因子和免疫细胞, 而且  $\beta_2$ -GPI 也显示了对动脉硬化发生和发展过程中重要的调节作用。

$\beta_2$ -GPI 是抗磷脂综合症抗心磷脂抗体的主要抗原, 大量的实验研究证实了  $\beta_2$ -GPI 与系统性红斑狼疮以及抗磷脂综合症动脉硬化发生血栓形成之间的重要相互关系, 其动脉硬化及血栓形成的发病机制是一种相关于  $\beta_2$ -GPI 的自身免疫性机制。基于  $\beta_2$ -GPI 与系统性红斑狼疮以及抗磷脂综合症动脉硬化发生和血栓形成之间的重要相互关系以及结合阴性物质的特点, 设想在系统性红斑狼疮以及抗磷脂综合症

患者动静脉硬化和血栓发病中  $\beta_2$ -GPI 与动脉硬化危险因子 oxLDL 之间是否存在某种相关性,这种相关性是否能够提供更为有价值的特异性的动脉硬化和血栓发生的信息?

我们在抗磷脂综合症的发病机制研究过程中,首次发现了  $\beta_2$ -GPI 和抗  $\beta_2$ -GPI 抗体与  $\text{Cu}^{2+}$ 氧化来源的氧化性低密度脂蛋白 (oxLDL) 之间的相互关系,我们的结果还显示:在抗磷脂综合症患者血清中存在的抗  $\beta_2$ -GPI · oxLDL 复合体抗体的出现与即往性动脉血栓症之间呈现正相关性。而且,这一抗体与抗磷脂综合症患者血清中  $\beta_2$ -GPI 依赖性的抗心磷脂抗体及抗  $\beta_2$ -GPI 抗体之间也呈现良好的相关性。我们的研究进一步显示,在血清中,确实存在着  $\beta_2$ -GPI 和 oxLDL 的复合体,而且这种复合体是稳定且不可分离的。体外实验还表明  $\beta_2$ -GPI 与 oxLDL 结合的复合物与致病性自身抗体尤其是 IgG 型血栓高危险性自身抗体特异性结合,经由巨噬细胞吞噬摄取,可能导致了抗磷脂综合症动脉硬化及血栓形成。

上述结果和实验数据均表明正常机体血浆中存在的一种糖蛋白  $\beta_2$ -糖蛋白 I ( $\beta_2$ -GPI) 和血中过多的低密度脂蛋白 (LDL) 在血管壁上的沉积以及由此而引起的 LDL 的氧化 (oxLDL) 卷入了抗磷脂综合症动脉硬化和血栓形成的自身免疫性发病机制中。既在抗磷脂综合症患者循环血流中,抗  $\beta_2$ -GPI 自身抗体识别 oxLDL ·  $\beta_2$ -GPI 复合体,三者形成了免疫复合物,这一三元免疫复合物可能是经由巨噬细胞的 Fc  $\gamma$  受体摄取 oxLDL 的胆固醇脂,形成泡沫细胞,这可能是抗磷脂综合症患者动脉硬化及血栓形成的原因。这一研究成果为抗磷脂综合症特异性的临床诊断和治疗提供了十分重要的理论依据。上述研究结果提供了一种与  $\beta_2$ -GPI 特异性结合的 oxLDL 及其 oxLDL 活性衍生化合物应用于与动脉硬化和动静脉血栓发生有关的自身抗体的 ELISA (酶联免疫吸附实验) 测定。

然而  $\beta_2$ -GPI 与 oxLDL 的结合是由什么结构位点来介导,仍然不清楚,所以鉴定和分离纯化  $\beta_2$ -GPI 与 oxLDL 的结合的结构位点,将能够了解和实行一种更加易行简便的测定体系,此外,试剂在操作和储存上更易于运输,可以提供价廉低成本的质量稳定的测定试剂和测定试剂盒。

本发明的检测血清  $\beta_2$ -糖蛋白 I 及其自身抗体的试剂,是能与血清  $\beta_2$ -糖蛋白 I ( $\beta_2$ -GPI) 特异性结合的氧化低密度脂蛋白衍生化合物,本发明特有的特征在于:其中的氧化低密度脂蛋白衍生物是一种结构为 7-酮胆固醇酯衍生物,化学结构即是

7-ketocholesteryl-9-carboxynonanoate, 用于检测与 $\beta_2$ -糖蛋白 I 及相关的疾病。特别是用于检测与血清 $\beta_2$ -糖蛋白 I 相关的动脉硬化和血栓形成发生危险性升高或降低有关的抗体。为了提供一种可以与 $\beta_2$ -GPI 特异性结合的底物, 本发明人分离了与 $\beta_2$ -GPI 特异性结合的来源于 oxLDL 的一种配体, 通过 LC-MS 及 NMR 方法确定其化学结构为 7-ketocholesteryl-9-carboxynonanoate。研究表明, 这一配体介导了 oxLDL 与 $\beta_2$ -GPI 的特异性结合, 并且结合的活性中心就是配体结构中 7-酮胆固醇的第三位所连接的短链脂肪酸末端的羧基团。毫无疑问, oxLDL 的阴性基团即 7-酮胆固醇酯的 $\omega$ -COOH 直接卷入了 oxLDL 与 $\beta_2$ -GPI 的特异性结合以及巨噬细胞吞噬摄取 oxLDL 的过程。本发明人并且以这一 $\beta_2$ -GPI 特异性配体 7-酮胆固醇酯 7-ketocholesteryl-9-carboxynonanoate 为特异性抗原建立了 $\beta_2$ -GPI 和其抗体的特异性检测体系。

因此, 含有这些抗原决定基的衍生物意味着可以用于 ELISA 方法中, 这种方法比现有的将 oxLDL 颗粒作为抗原的 ELISA 方法更加准确和可靠, 建立的 ELISA 测定体系和方法将能够更加准确的测定致病抗体。以及针对致病源有效预防和治疗动脉硬化。

所以, 本发明公开和提供了:

- 1、一种氧化低密度脂蛋白活性衍生化合物的分离或化学合成的方法;
- 2、本活性衍生物在检测 $\beta_2$ -GPI 的应用方法;
- 3、本活性衍生物在检测抗 $\beta_2$ -GPI-衍生物复合物抗体的应用方法;

## 2、本发明衍生物在 ELISA 测定体系中的应用:

### 1)、固相化载体:

作为固相化试剂的载体, 典型的载体包括一种合成有机高分子化合物。例如: 载体可以做为各种形状, 主要根据所用方法来确定载体的形状。

固相化试剂在载体上可以通过传统的方法固定在载体上。例如物理吸附, 离子结合等方法, 由于物理吸附法的简单易行, 常常被用来进行固相化试剂的载体固定。

在本发明中, 固相化试剂也可以通过传统的封闭处理方法来获得, 例如 BSA 或 gelatin, 可以避免非特异性结合反应。

### 2)、本发明的固相化:

本发明是一种不溶于水的衍生物，可以固定于包括板状、管状、珠状、膜状和凝胶上。固定材料可以是聚苯乙烯、聚丙烯、尼龙或聚丙烯酰胺，在这些材料中聚苯乙烯为首选物质。固相化的方法通常采用脂类固定方法，如物理吸附法或共价键结合法，一般物理吸附法为首选，因为其方法简便，使用范围广泛。

本发明的固相化衍生物通常溶解于乙醇、甲醇、或者甲醇与三氯甲烷的混合物中。溶解物在固相材料上蒸发干燥，吸附于固相材料之上。当固相化表面的衍生物还没有被固定时，如果 $\beta_2$ -GPI或者样品中所含有的其他分子此时接触固相化表面，就不能够得到精确正确的测定结果，所以，为避免这样的现象出现，通常用封闭物添加于固相化的衍生物上，例如：封闭物主要包括血清白蛋白、干酪素（酪蛋白）、脱脂乳、白明胶或者商业用封闭物也可以用来进行封闭。封闭后的固相物储存在 $37^{\circ}\text{C}$ ，30min-2h，或者在 $15-25^{\circ}\text{C}$ 下2h。

### 3)、样品:

在本发明中，对于所测样品没有特殊的要求，所测样品可以是任何生物学的其中含有oxLDL的生物学样品。所测样品可以是全血、血清或血浆。所测样品需要一个前处理，既需要添加 $\beta_2$ -GPI已形成能够测定的 $\beta_2$ -GPI-oxLDL复合体，但是当所测样品为血清时，本身即含有 $\beta_2$ -GPI，能够形成 $\beta_2$ -GPI-oxLDL复合体，则前处理可以省略。当然，如果按照本发明的方法，前处理也可以省略。

### 4)、试剂盒体系:

本发明的试剂盒是一种 $\beta_2$ -GPI的测定试剂盒。

#### 试剂盒1: A和B

A: 固相系统

B: 一种与 $\beta_2$ -GPI结合的底物

#### 试剂盒2: A和B

A: 固相系统

B: 一种与抗体结合的底物，这一抗体能够辨认 $\beta_2$ -GPI-衍生物的复合体。

只要每一个试剂盒含有A和B即可。

#### 试剂盒还可以包括:

- (1) 对于测定 $\beta_2$ -GPI或抗体时制备标准曲线时所用的标准浓度曲线。
- (2) 一种测定标记底物的试剂，一种测定底物与 $\beta_2$ -GPI、或抗体与 $\beta_2$ -GPI-

衍生物结合的试剂。

除了这些，试剂盒还同时可以包括封闭底物、洗脂物、样品稀释剂和酶反应终止剂。

这些试剂盒成分，可以单独储存，使用时按照测定方法操作使用即可。

**本发明试剂盒的组成和装配：**

**试剂盒 1：**

- 1、 一个 96 孔的免疫板 (Immuno-plate), oxLig-1 固定于其上。(1 sheet)
- 2、  $\beta_2$ -GPI 标准溶液 (1 set)
- 3、 抗  $\beta_2$ -GPI 抗体 (WB-CAL-I) (1 Vial)
- 4、 HRP-labeled anti-mouse IgG antibody (1 Vial)
- 5、 O-phenyenediamine solution (1 Vial)
- 6、 Aqueous hydrogen peroxide (1 Vial)
- 7、 Reaction-terminating liquid(1N HCl) (1Vial)

**试剂盒 2：**

- 1、 一个 96 孔的免疫板 (Immuno-plate), oxLig-1 固定于其上。(1 sheet)
- 2、  $\beta_2$ -GPI (1 Vial)
- 3、 HRP-labeled anti-mouse IgG antibody (1 Vial)
- 4、 四甲基苯丁 (Tetramethylbenzidine) 溶液 (1 Vial)
- 5、 Aqueous hydrogen peroxide (1 Vial)
- 6、 Reaction-terminating liquid(1N HCl) (1Vial)

**附图说明：**

图 1 为 7-ketocholesteryl-9- carboxynonanoate 的结构模式图；图 2 为 7-ketocholesteryl-9- carboxynonanoate 作为底物进行  $\beta_2$ -GPI 的测定；图 3 为 7-ketocholesteryl-9- carboxynonanoate 作为底物进行系统性红斑狼疮 (SLE 和抗磷脂综合症 (APS) 患者抗  $\beta_2$ -GPI-配体复合物抗体和抗心磷脂抗体的测定比较血清样品。

**实施方案的描述：**

**材料和方法：**

**1、 试剂**

L- $\alpha$ -Dipalmitoylphosphatidylserine (DPPS), 7-ketocholesterol (5-cholesten-3  $\beta$ -ol-7-one, 7KC) 以及 cholesteryl linoleate (5-cholesten-3  $\beta$ -3-linoleate) 从 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) 购入。Dioleoylphosphatidyl-choline (DOPC) 从 Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, AL) 购入。其它试剂均为特级分析试剂。

### 2、oxLDL 衍生物 7-ketocholesteryl-9- carboxynonanoate 的分离提纯:

采用密度梯度超速离心法 (35000rpm/min, 4°C, 24h) 分离低密度脂蛋白 LDL ( $d=1.019-1.063\text{g/ml}$ )。Cu<sup>2+</sup>氧化法进行 LDL 体外氧化, LDL 蛋白浓度为 100 $\mu\text{g/ml}$ , CuSO<sub>4</sub> 浓度为 5 $\mu\text{M}$ , 37°C 8 小时孵育后 EDTA 1mM 中止反应。PBS 透析 24 小时。氧化后的 oxLDL 采用 thiobarbituric acid substance (TBARS) 反应及琼脂糖电泳测定 oxLDL 的氧化程度。oxLDL 来源的脂 (lipid) 点样于硅胶-薄层层析板 (Polygram, Machery-Nagel, Duren, Germany 分离配体用) 和 PLC 硅胶-60 层析板 (PLC silica gel-60 Merck, Darmstadt, Germany 分离脂), 层析板分别在三氯甲烷/甲醇/30% 氨水/水 (120/80/10/5 溶液 A) 以及三氯甲烷/甲醇 (8/1 溶液 B) 溶媒中展开, 展开后, 分离脂的层析板分别进行碘和钼兰试剂染色。TLC 薄层层析得到的来源于 oxLDL 粗制  $\beta_2$ -GPI 配体进一步通过逆相 HPLC 分析和精制。

$\beta_2$ -GPI 配体粗制样品在 C18 柱 (250 x 4.6mm Sephasyl peptide, Pharmacia) 上经过溶媒 C (氟化甲烷/异丙醇 30/70, v/v) 和溶媒 D (0.2% 醋酸水溶液) 的浓度流动相 { (50% 溶媒 C-50% 溶媒 D 混合液 (0 分钟) -100% 溶媒 C (15-40 分钟) } 溶出, 流速在 0.5ml/min, 234nm 的吸光度检测测定。HPLC 精制分离后的  $\beta_2$ -GPI 配体样品在 LC/MS-QP8000 $\alpha$  (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) HPLC 系统, APCI 法经 Shim-pack VP-ODS 柱 (150 X 4.6mm) 分析。

### 3、oxLDL 衍生物 7-ketocholesteryl-9- carboxynonanoate 的化学合成:

7-ketocholesterol (5-cholesten-3  $\beta$ -ol-7-one, 50.1mg, 0.13mmol) 和 azelaic acid (70.6mg, 0.38mmol) 溶于 4ml 丙酮中, 随后加入 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (WSC; 95.8mg, 0.50mmol) 和 4-(dimethylamino) Pyridine (DMAP; 30.5mg, 0.25mmol)。混合物在室温下, 经过两天搅拌、离心, 用三氯甲烷抽提, 抽提物用 2M 的 hydrochloric acid、brine 连续洗涤, anhydrous magnesium sulfate (无水酒

石酸硫酸盐)干燥。干燥成分经过 silica 凝胶柱层析得到合成的  $\beta_2$ -GPI 配体 oxLig-1 (36.0% mg, 产量为 50.4%)。 $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): = 5.71 (s,  $^1\text{H}$ , H-6), 4.78-4.69 (m,  $^1\text{H}$ , H-3);  $^{13}\text{C-NMR}$  (75.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 202.5, 179.7, 173.4, 164.5, 127.1, 72.4, 55.2, 50.4, 50.2, 45.8, 43.5, 39.9, 38.7, 36.6, 36.1, 29.2, 28.9, 28.4, 25.3, 25.0, 24.2, 23.2, 23.0, 19.3, 17.7, 12.4.;  $m/z$  (FD-MS): 571 [(M+H)<sup>+</sup>,  $\text{C}_{36}\text{H}_{59}\text{O}_5$ ] (图 1)

#### 4、自身免疫性单克隆抗体:

WB-CAL-1 (IgG2a) 抗体来源于抗磷脂综合症模型 (NZW X BXSB) F1 小鼠, 它是能够特异性识别  $\beta_2$ -糖蛋白 I 隐藏的 (cryptic) 抗原决定基的单克隆抗  $\beta_2$ -糖蛋白 I 抗体<sup>10)</sup>。Cof-23 (IgG1) 以及 Cof-22 (IgG1) 来源于  $\beta_2$ -糖蛋白 I 免疫后的小鼠, 是具有识别  $\beta_2$ -糖蛋白 I native 构造结构的单克隆抗体<sup>11)</sup>。

#### 5、 $\beta_2$ -糖蛋白 I 的分离与纯化:

$\beta_2$ -糖蛋白 I 通过 Heparin-Sepharose、DEAE-cellulose 层析柱以及抗  $\beta_2$ -糖蛋白 I 亲和层析柱分离纯化<sup>12)</sup>, 最后用 protein A-Sepharose 层析柱除去 IgG, 并且通过 n-butanol 除去结合的脂质成分。

#### 6、 $\beta_2$ -GPI 的重组表达:

$\beta_2$ -糖蛋白 I 是一个已知的糖蛋白质, 它的氨基酸和核酸序列已被报告, 然而生物活性  $\beta_2$ -糖蛋白 I 在通常的 *E. coli* 和酵母表达体系中由于不能够形成功能二硫键, 所以不能够正确表达蛋白, 主要原因是天然  $\beta_2$ -糖蛋白 I 分子中有多达 11 个半胱氨酸 (S-S) 键, 并且还具有一个反复折叠所形成的五个结构域结构, 此外,  $\beta_2$ -糖蛋白 I 的编码核苷酸序列的先头蛋白有一个突变的蛋白附加物, 是由 19 个氨基酸组成的多肽, 位于在 N-末端, 在蛋白分泌时这个多肽应该被切割掉。1993 年 Igarash 利用 baculovirus 病毒表达体系解决了这一难题, 所重组的  $\beta_2$ -糖蛋白 I 与抗磷脂综合症患者的抗心磷脂抗体发生了特异性免疫反应, 表明利用这一方法获得的  $\beta_2$ -糖蛋白 I 具有生物学活性。(Clin, Exp. Immunol; 93, 19, 1993)

#### 具体实施例:

##### 实施例 1:

##### $\beta_2$ -GPI 依赖性的抗心磷脂抗体的 ELISA 测定:

心磷脂 (CL) 浓度为 50  $\mu\text{g/ml}$ , 以 50  $\mu\text{l/well}$  的量加入 96 孔 Immulon 1B (Dyner

Technologies Inc., Chantilly) ELISA 培养板中, 物理干燥吸附后, 1% BSA 封闭, 随后依次加入  $\beta_2$ -GPI (15 $\mu$ g/ml, 50 $\mu$ l/well) 和抗  $\beta_2$ -GPI 抗体 (Cof-22 和 WB-CAL-1), 室温下共同孵育 1 小时, 最后与辣根过氧化物酶 HRP 标记的抗人 IgG 抗体孵育 1 小时, 显色后 490nm 的吸光度测定。在上述各步骤之间, 酶标板用 0.05% Tween 20 的 PBS 充分洗净。

**抗  $\beta_2$ -GPI-7-ketocholesteryl-9- carboxynonanoate 复合物抗体的 ELISA 测定:**

化学合成的 oxLDL 衍生物 (Syn-oxLig-1) 浓度为 50 $\mu$ g/ml, 以 50 $\mu$ l/well 的量加入 96 孔 Immulon 1B (Dynex Technologies Inc., Chantilly) ELISA 培养板中, 物理干燥吸附后, 随后的步骤等同于“ $\beta_2$ -GPI 依赖性的抗心磷脂抗体的 ELISA 测定”

上述实验结果表明, 以  $\beta_2$ -GPI-配体 7-ketocholesteryl-9- carboxynonanoate 为底物的抗  $\beta_2$ -GPI-7-ketocholesteryl-9- carboxynonanoate 复合物抗体与  $\beta_2$ -GPI 依赖性的抗心磷脂抗体具有几乎相同的抗体效价。

**实施例 2:**

**系统性红斑狼疮 (SLE 和抗磷脂综合症 (APS) 患者抗  $\beta_2$ -GPI-配体复合物抗体和抗心磷脂抗体的测定比较**

心磷脂 (CL) 或化学合成的 oxLDL 衍生物 (Syn-oxLig-1) 浓度为 50 $\mu$ g/ml, 以 50 $\mu$ l/well 的量加入 96 孔 Immulon 1B (Dynex Technologies Inc., Chantilly) ELISA 培养板中, 物理干燥吸附后, 1% BSA 封闭, 随后依次加入  $\beta_2$ -GPI (15 $\mu$ g/ml, 50 $\mu$ l/well) 和 SLE、APS 患者血清样品 (用 0.3% 的 PBS 以 1:100 稀释, 50 $\mu$ l/well), 室温下共同孵育 1 小时, 最后与辣根过氧化物酶 HRP 标记的抗人 IgG 抗体孵育 1 小时, 显色后 490nm 的吸光度测定。在上述各步骤之间, 酶标板用 0.05% Tween 20 的 PBS 充分洗净。

上述实验结果表明, 与系统性红斑狼疮阴性患者 (SLE-) 和抗磷脂综合症阴性患者 (APS-) 相比, 抗  $\beta_2$ -GPI-配体复合物抗体和抗心磷脂抗体在 SLE 阳性患者和 APS 患者血清中都显示了同样高水平的抗体效价。

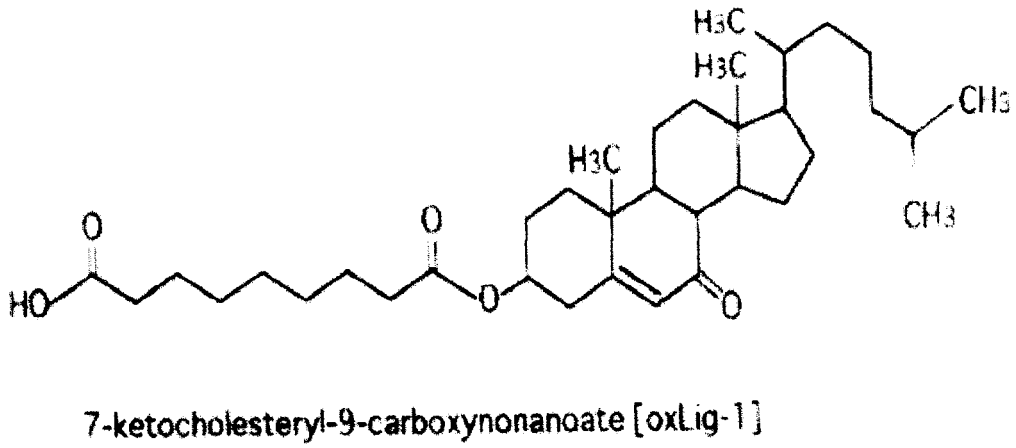


图 1

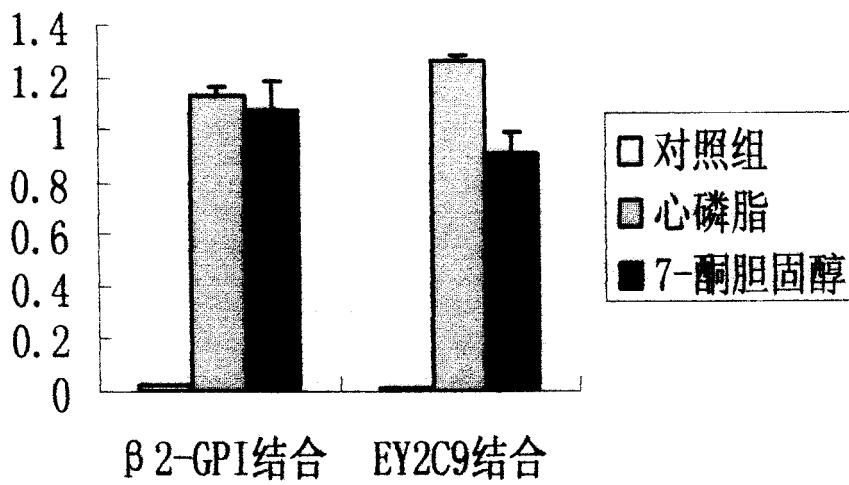


图 2

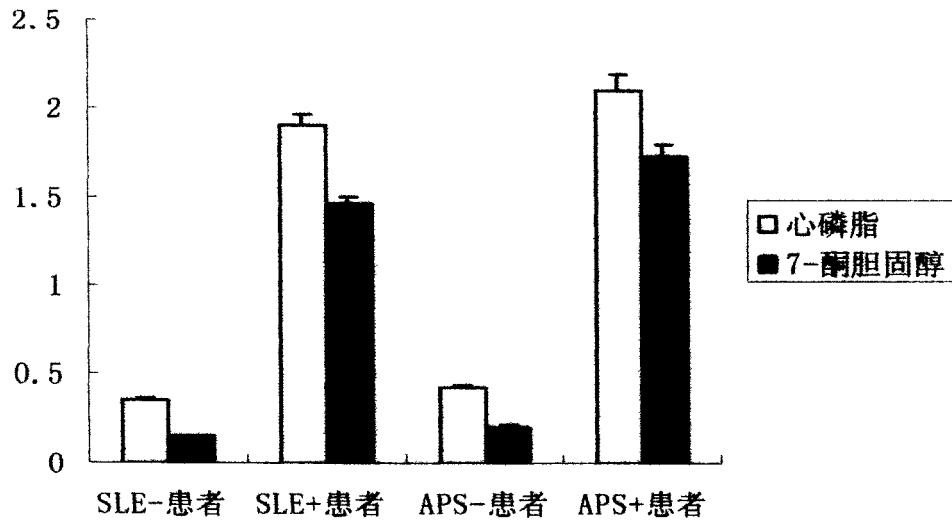
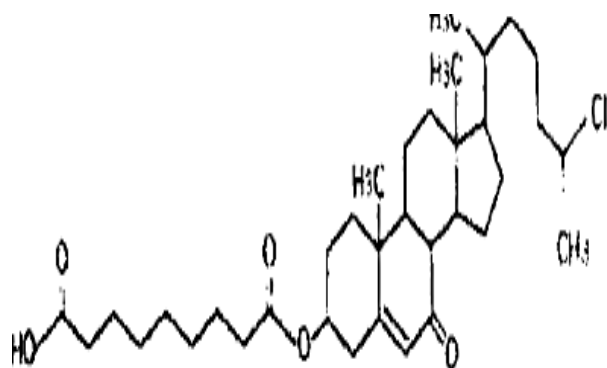


图 3

专利名称(译)	检测血清β2 - 糖蛋白I及其自身抗体的试剂		
公开(公告)号	<a href="#">CN1869696A</a>	公开(公告)日	2006-11-29
申请号	CN200510046527.9	申请日	2005-05-24
[标]申请(专利权)人(译)	大连大学		
申请(专利权)人(译)	大连大学		
当前申请(专利权)人(译)	大连大学		
[标]发明人	刘庆平 刘华		
发明人	刘庆平 刘华		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/00		
代理人(译)	潘迅		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及与血清β2 - 糖蛋白I(β2 - GPI)特异性结合的一种氧化低密度脂蛋白衍生化合物7 - ketocholesteryl - 9 - carboxynonanoate的分离或化学合成；以及以本衍生物为底物用于检测和分离纯化β2 - 糖蛋白I；用以确定与β2 - 糖蛋白I相关的动脉硬化和血栓形成发生危险性升高或降低有关的抗体检测试剂。



7-ketocholesteryl-9-carboxynonanoate (oxLig-1)