

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410062222.2

[51] Int. Cl.

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 33/547 (2006.01)

G01N 1/38 (2006.01)

[43] 公开日 2006年1月4日

[11] 公开号 CN 1715920A

[22] 申请日 2004.6.30

[21] 申请号 200410062222.2

[71] 申请人 中国人民解放军军事医学科学院野战
输血研究所

地址 100850 北京市海淀区太平路27号

[72] 发明人 陈竞新 王全立 詹林盛 王会中
付秋霞

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 鲁兵

权利要求书2页 说明书7页 附图1页

[54] 发明名称

血清或血浆样品稀释液及其应用

[57] 摘要

本发明公开一种血清或血浆样品稀释液，用在夹心 ELISA 检测人脂肪细胞补体相关蛋白 (Acrp30) 中稀释血清(血浆)样品，它包括一种还原剂及缓冲组分，具体可以由 25mM DTT、100mM pH8.0 的 Tris 缓冲液、2mM pH8.0 的 EDTA、和 200mM NaCl 组成。使用本发明稀释液可以使样品处理、稀释、上样一次完成，并且使得待检样品稀释前后无须煮沸处理，操作简便，并通过改变反应条件，缩短了反应时间，实现了对人血清(血浆) Acrp30 蛋白快速定量检测。

1. 一种血清或血浆样品稀释液，用于酶联免疫吸附测定中，其特征在于，它包括一种还原剂及缓冲组分。
2. 根据权利要求1所述的血清或血浆样品稀释液，其特征在于，所述还原剂为二硫苏糖醇，代号DTT。
3. 根据权利要求2所述的血清或血浆样品稀释液，其特征在于，所述稀释液中DTT的浓度在5mM到500mM。
4. 根据权利要求3所述的血清或血浆样品稀释液，其特征在于，所述稀释液中DTT的浓度优选为20mM到100mM。
5. 根据权利要求3所述的血清或血浆样品稀释液，其特征在于，所述稀释液中DTT的浓度最好为25mM。
6. 根据权利要求1所述的血清或血浆样品稀释液，所述缓冲组分为三（羟甲基）氨基甲烷（Tris）缓冲液、乙二胺四乙酸（EDTA）、和NaCl的组合。
7. 根据权利要求6所述的血清或血浆样品稀释液，其特征在于，所述稀释液中pH8.0的Tris缓冲液浓度在50mM到200mM，pH8.0的EDTA浓度在1mM到5mM，NaCl的浓度在100mM到400mM。
8. 根据权利要求1所述的血清或血浆样品稀释液，其特征在于，包含25mM DTT、100mM pH8.0的Tris缓冲液、2mM pH8.0的EDTA、和200mM NaCl。
9. 一种夹心法ELISA检测人血清或血浆脂肪细胞补体相关蛋白30(Acrp30)含量的方法，其特征在于，使用权利要求1至8任一所述血清或血浆样品稀释液来稀释待测样品。
10. 根据权利要求9所述的夹心法ELISA检测人血清或血浆脂肪细胞补体相关蛋白30(Acrp30)含量的方法，其特征在于，具体步骤包括：
 - 步骤一. 包被酶联板：

每孔加100微升用0.05M pH9.6碳酸盐缓冲液1:2000稀释的鼠抗人Acrp30单克隆抗体，室温孵育过夜；然后弃去液体，用pH7.4的0.01M PBST洗板2次，拍干板子；每孔加150微升用1.5%牛血清白蛋白、4%饱和硫酸铵、5%蔗糖、5%EDTA、0.01M PBS和0.2%柳硫汞组成的封闭液，室温孵育1小时；然后弃去液体，拍干板子；
 - 步骤二. 检测步骤：

用未加 DTT 的样品稀释液作为标准品稀释液，对标准品作 1: 50 稀释后，再作倍比稀释至 1: 1600；在离心管里加 100 微升样品稀释液，再加 25 微升人血清或血浆浆标本，该标本为经 5000g 离心 1 分钟后取的上清液；每孔加 100 微升稀释好的标准品、人血标本，37℃ 震荡孵育 40 分钟；弃去液体，用 pH7.4 的 0.01M PBST 洗板 5 次，拍干板子；每孔加 100 微升用酶标稀释液 1: 300 稀释的酶标抗体，37℃ 震荡孵育 30 分钟，其中该酶标稀释液由 20%小牛血清、15%甘油、4%聚乙二醇 6000、0.75%饱和硫酸铵、0.01M PBS 和 0.1%吐温-20 组成，该酶标抗体为用过碘酸钠法标记上辣根过氧化物酶的兔抗人 Acrp30 多克隆抗体；弃去液体，用 0.01M PBST (pH7.4) 洗板 5 次，拍干板子；然后每孔加 A、B 显色液各一滴，37℃ 震荡孵育 15 分钟，其中 A 显色液为十二水磷酸氢二钠 18.41g/L、柠檬酸 7.65g/L 和 30%双氧水 0.24ml/L 组成，B 显色液为四甲基联苯胺 0.4g/L、二甲基甲酰胺 40ml/L、EDTA0.525g/L 和柠檬酸 4.2g/L 组成；然后每孔加 50 微升 1M 硫酸终止液，OD450nm 检测；

步骤三. 根据标准曲线，得到检测样品中人血 Acrp30 含量。

血清或血浆样品稀释液及其应用

技术领域：

本发明涉及酶联免疫吸附测定（ELISA）中，血清或血浆样品的处理、稀释、上样，特别应用于夹心 ELISA 检测人血清（血浆）中脂肪细胞补体相关蛋白 30（Acrp30）的含量。

背景技术：

目前，大部分 ELISA 系统中的包被、酶标抗体是用重组表达蛋白作为抗原，免疫动物产生的。若重组蛋白大量表达，形成包涵体沉淀，须使用变性剂将其完全变性溶解后再免疫动物。而变性蛋白与天然蛋白的构象有一定差别，其免疫动物产生的抗体可能很难与天然蛋白结合，从而影响 ELISA 建立。

Acrp30 是脂肪细胞特异性分泌的血浆蛋白，1995 年，Scherer 等首先报道了 Acrp30 的存在及其 cDNA 序列。人 Acrp30 基因位于 3q27，其编码蛋白含有 247 个氨基酸，单体分子由 4 个结构域组成，从 N 端到 C 端依次为信号肽序列、非同源序列、胶原样结构域、球状结构域，C 端球状区（110~247 氨基酸）占主要部分。Acrp30 翻译后可发生糖基化，是一种糖蛋白，其球状区三聚体结构与肿瘤坏死因子（TNF）家族具有极强的同源性。Acrp30 在血浆中有两种形态，即低分子量同源三聚体（LMW）和高分子量复合体（HMW）。Acrp30 寡聚体通过 39 位半胱氨酸（Cys-39）上的二硫键连接，Cys-39 突变造成胶原区蛋白剪切形成三聚体。最近 Tsao 等的研究表明循环血液中大部分 Acrp30（>80%）是以 HMW 形式存在，少部分为六聚体（<10%）和三聚体（<10%）。

Acrp30 的生理学功能包括调节糖、脂代谢，提高胰岛素敏感性，抗动脉粥样硬化等。新近的研究表明 Acrp30 有抗炎保肝的效果，有可能成为一种新的肝病治疗药物。目前，人血清（血浆）中脂肪细胞补体相关蛋白 30（Acrp30）的含量测定，使用的 ELISA 试剂（Linco Research, Inc.等）仅供实验室研究使用，且检测周期长，操作较复杂；国内尚无成套试剂。

在用鼠抗人 Acrp30 单抗作包被，兔抗人 Acrp30 多抗作酶标，用于免疫动物的重组蛋白 Acrp30 是以包涵体形式表达，在免疫前用 8M 尿素使其变性溶解的实验设计中，采用现有 ELISA 试剂中的样品稀释液配方，均不能检测到人血中的 Acrp30，因而有必要寻找一种适合的样品稀释液。

发明内容

本发明的目的在于提供一种用于酶联免疫吸附测定中的针对血清或血浆样品的稀释液。

本发明提供的样品稀释液，用于酶联免疫吸附测定中，它包括一种还原剂及缓冲组分。

其中，所述还原剂为二硫苏糖醇，代号 DTT，DTT 的浓度在 5mM 到 500mM，优选为 20mM 到 100mM，最好为 25mM。

其中，所述缓冲组分为三（羟甲基）氨基甲烷（Tris）缓冲液、乙二胺四乙酸（EDTA）、和 NaCl 的组合。其中 pH8.0 的 Tris 缓冲液浓度在 50mM 到 200mM，pH8.0 的 EDTA 浓度在 1mM 到 5mM，NaCl 的浓度在 100mM 到 400mM。

本发明样品稀释液配方最好为 25mM DTT、100mM pH8.0 的 Tris 缓冲液、2mM pH8.0 的 EDTA、和 200mM NaCl。

本发明的另一目的在于提供一种夹心法 ELISA 检测人血清或血浆脂肪细胞补体相关蛋白 30（Acrp30）含量的方法。

本发明提供的一种夹心法 ELISA 检测人血清或血浆脂肪细胞补体相关蛋白 30（Acrp30）含量的方法，是使用前面所述的任一种血清或血浆样品稀释液来稀释待测样品。

该方法具体步骤包括：

步骤一. 包被酶联板：

每孔加 100 微升用 0.05M pH9.6 碳酸盐缓冲液 1：2000 稀释的鼠抗人 Acrp30 单克隆抗体，室温孵育过夜；然后弃去液体，用 pH7.4 的 0.01M PBST 洗板 2 次，拍干板子；每孔加 150 微升用 1.5%牛血清白蛋白、4%饱和硫酸铵、5%蔗糖、5%EDTA、0.01M PBS 和 0.2%柳硫汞组成的封闭液，室温孵育 1 小时；然后弃去液体，拍干板子；

步骤二.检测步骤：

用未加 DTT 的样品稀释液作为标准品稀释液，对标准品作 1：50 稀释后，再作倍比稀释至 1：1600；在离心管里加 100 微升样品稀释液，再加 25 微升人血清或血浆浆标本，该标本为经 5000g 离心 1 分钟后取的上清液；每孔加 100 微升稀释好的标准品、人血标本，37℃ 震荡孵育 40 分钟；弃去液体，用 pH7.4 的 0.01M PBST 洗板 5 次，拍干板子；每孔加 100 微升用酶标稀释液 1：300 稀释的酶标抗体，37℃ 震荡孵育 30 分钟，其中该酶标稀释液由 20%小牛血清、15%甘油、4%聚乙二醇 6000、0.75%饱和硫酸铵、0.01M PBS 和 0.1%吐温-20 组成，该酶标抗体为用过碘酸钠法标记上辣根过氧化物酶的兔抗人 Acrp30 多克隆抗体；弃去液体，

用 0.01M PBST (pH7.4) 洗板 5 次, 拍干板子; 然后每孔加 A、B 显色液各一滴, 37°C 震荡孵育 15 分钟, 其中 A 显色液为十二水磷酸氢二钠 18.41g/L、柠檬酸 7.65g/L 和 30%双氧水 0.24ml/L 组成, B 显色液为四甲基联苯胺 0.4g/L、二甲基甲酰胺 40ml/L、EDTA0.525g/L 和柠檬酸 4.2g/L 组成; 然后每孔加 50 微升 1M 硫酸终止液, OD450nm 检测;

步骤三. 根据标准曲线, 得到检测样品中人血 Acrp30 含量。

依照上述技术方案, 本发明因提出含还原剂的样品稀释液, 使得待检样品稀释前后无须煮沸处理, 操作简便, 并通过改变反应条件, 缩短了反应时间, 实现了对人血清(血浆) Acrp30 蛋白快速定量检测。

附图说明

图 1 为本发明中菌产 Acrp30 标准品的稀释示意图;

图 2 为本发明中 ELISA 检测菌产 Acrp30 的标准曲线图。

具体实施方式

本发明涉及酶联免疫吸附测定 (ELISA) 中, 血清或血浆样品的处理、稀释、上样。

在本发明涉及的研究中, 用鼠抗人 Acrp30 单抗作包被, 兔抗人 Acrp30 多抗作酶标, 用于免疫动物的重组蛋白 Acrp30 是以包涵体形式表达, 在免疫前用 8M 尿素使其变性溶解。该实验设计中, 需要检测人血中的 Acrp30 含量, 发现其中样品稀释液会影响 Acrp30 的检测。

为此, 经艰苦摸索与实验, 本发明提出了一种血清或血浆样品稀释液。

本发明提出的稀释液的主要特点是含有还原剂, 实验结果显示, 还原剂为二硫苏糖醇 (DTT) 为最好, 使用浓度在 20mM 到 100mM 时效果较好, 最佳浓度约为 25mM。

本发明样品稀释液中还包括缓冲液成分, 为三(羟甲基)氨基甲烷 (Tris) 缓冲液、乙二胺四乙酸 (EDTA)、和 NaCl 的组合。其中, Tris 缓冲液 (pH8.0) 的浓度大约在 50mM 到 200mM, 最佳浓度约为 100mM; EDTA (pH8.0) 的浓度大约在 1mM 到 5mM, 最佳浓度约为 2mM; NaCl 的浓度大约在 100mM 到 400mM, 最佳浓度约为 200mM。

实施例一: 本发明血清(血浆)样品稀释液的配制

本发明最优选的血清(血浆)样品稀释液, 为 25mM DTT、100mM Tris 缓冲

液 (pH8.0)、2mMEDTA (pH8.0)、200mM NaCl 组成, 参见表 1。

表 1: 样品稀释液成份

组份	浓度	来源
DTT	25mM	Sigma
Tris 缓冲液 (pH8.0)	100mM	Promega
EDTA (pH8.0)	2mM	北京化学试剂公司
NaCl	200mM.	北京益利精细化学品有限公司

表 1 中所列组分, 分别按下面方式配制待用:

Tris: 称 24.22g, 加蒸馏水至 100ml, 配制浓度为 2M;

HCl: 取 11.6N 的 HCl 172.4ml, 加蒸馏水至 1000ml, 配制浓度为 2M;

Tris 缓冲液 (pH8.0): 2M Tris 50ml 加 2M HCl 29.2ml, 加蒸馏水至 100ml; 配制浓度为 1M;

EDTA (pH8.0): 在 80ml 蒸馏水中加 186.1g 二水乙二胺四乙酸二钠 (EDTA-Na₂H₂O) 在磁力搅拌器上剧烈搅拌, 用 NaOH 调溶液 pH 至 8.0 (约需 20gNaOH 颗粒) 然后定容至 1L, 分装后高压灭菌备用, 配制浓度为 0.5M;

NaCl: 称 5.844g, 加蒸馏水至 100ml, 配制浓度为 1M;

DTT: 称 1.545g, 加蒸馏水至 10ml, 置-20℃存放, 配制浓度为 1M。

上述各组分, 用表 2 所列步骤进行配制, 形成 100ml 本发明样品稀释液:

表 2 样品稀释液的配制方法

操作步骤	体积
1.加 1M Tris 缓冲液 (pH8.0)	10ml
2.加 0.5M EDTA (pH8.0)	0.4ml
3.加 1M NaCl	20ml
4.加 1M DTT	2.5ml
5.加蒸馏水	67.1ml

实施例二至四: 用与实施例一相同的方法, 分别配制表 3 所列各组成及含量的样品稀释液。

表 3: 实施例二至四样品稀释液各成份浓度

组份	浓度	实施例二	实施例三	实施例四
	DTT	20mM	100mM	500mM
	Tris 缓冲液 (pH8.0)	200mM	50mM	120mM
	EDTA (pH8.0)	5mM	3mM	1mM
	NaCl	250mM	400mM	100mM

实施例五: ELISA 定量检测

一、标准品的稀释: 操作参见图 1, 具体步骤为:

1. 将配制好的标准品稀释液加到六个离心管中, 第一管加 500 μ l, 其它管加 250 μ l;

2. 向第一管内加入已知浓度 (1.4mg/ml) 的菌产 Acp30, 至终浓度为 28 μ g/ml。

3. 作倍比稀释, 使第二至六管中 Acp30 的浓度为 14 μ g/ml、7 μ g/ml、3.5 μ g/ml、1.75 μ g/ml、0.875 μ g/ml。

二、标准样品的 ELISA 检测:

1. 每孔加 100 μ l 步骤一配制的 Acp30 标准品, 加膜, 置 37 $^{\circ}$ C 震荡 40 分钟。
2. 弃去液体, 用 0.01M pH7.4 PBST 洗板五次, 拍干。
3. 每孔加 100 μ l 酶结合物, 加膜, 置 37 $^{\circ}$ C 震荡 30 分钟。
4. 弃去液体, 用 0.01M pH7.4 PBST 洗板五次, 拍干。
5. 每孔加显色液 A、B 各 50 μ l, 加膜, 置 37 $^{\circ}$ C 震荡 10 分钟。其中 A 显色液为十二水磷酸氢二钠 18.41g/L、柠檬酸 7.65g/L 和 30%双氧水 0.24ml/L 组成, B 显色液为四甲基联苯胺 0.4g/L、二甲基甲酰胺 40ml/L、EDTA0.525g/L 和柠檬酸 4.2g/L 组成;
6. 每孔加 50 μ l 1M H₂SO₄ 终止反应, OD450nm 检测。
7. 将检测结果绘制成标准曲线, 参见图 2。

三、ELISA 检测样品中 Acp30 的含量:

1. 将 1 体积血清加入到 4 体积样品稀释液中混合, 取 100 μ l 样品置于孔中, 加膜, 置 37 $^{\circ}$ C 震荡 40 分钟。
- 2.~6. 同步骤二中的步骤 1~6。

7. 对照标准曲线，得到测试样品的 Acp30 含量。

实验一：不同稀释液 ELISA 检测 Acp30 对照实验

对标准样品和待检样品，用不同的稀释液进行稀释，然后按照实施例五步骤二的方法 ELISA 检测 Acp30 的含量，结果如表 4 所示。其中，对照样为 Linco Research, Inc.的稀释液，本样为本发明实施例一配制的稀释液。

表 4：不同稀释液 ELISA 检测 Acp30 对照实验

样品处理	待检样品(人血标本)
用本样品稀释液处理	0.9-20 μ g/ml
用对照样品稀释液处理	— (没有检出)

从该实验可以看出，使用本发明稀释液，可以比较准确检出 Acp30 的含量，而用对照样稀释液，则无法检出 Acp30。

实验二：检测精确度实验

一) 标准品稀释及血清样品的处理：标准品稀释同实施例五；样品处理：将 1 体积血清加入到 3 体积样品稀释液中混合。

二) ELISA 检测：

1. 板内精确度：一份样品重复加十二个孔。
2. 板间精确度：一份样品分十二次检测。
3. 操作同实施例一

三) 结果：见表 5。从表 5 数据可以看出检测板内 CV 为 5%、板间 CV 为 8%，精确度良好。

表 5：ELISA 检测精确度

	Acp30 浓度 (X)	标准差 (S)	变异系数 (CV)
板内	3.2	0.16	5%
板间	6.8	0.544	8%

实验三：ELISA 检测准确性实验

一) 标准品稀释及血清样品的处理

1. 标准品稀释同实施例五。
2. 在一份血清中加入高、中、低三种已知浓度的标准品，样品稀释同实验二。

二) ELISA 检测：操作同实施例五。

三) 结果：见表 6。从表 6 数据可以看出检测的准确性在 88-108%，准确性良好。

表 6.ELISA 检测准确性

测定值 (O)	预期值 (E)	O/E (%)
1.48	-	
4.2	4.78	88
9.6	8.9	108
15.5	15.0	103

试验四：ELISA 检测的线性关系实验

一) 标准品稀释及血清样品的处理

1.标准品稀释同实施例五。

2. 样品稀释同实验二。将稀释好的血清用样液作 2 倍、4 倍、8 倍稀释。

二) ELISA 检测：操作同实施例五。

三) 结果：见表 7。从表 7 数据可以看出检测线性关系在 80-102%，线性关系良好。

表 7：ELISA 检测的线性关系

稀释倍数	测定值 (O)	预期值 (E)	O/E (%)
	13.54	-	
1: 2	6.83	6.77	101
1: 4	2.70	3.385	80
1: 8	1.73	1.6925	102

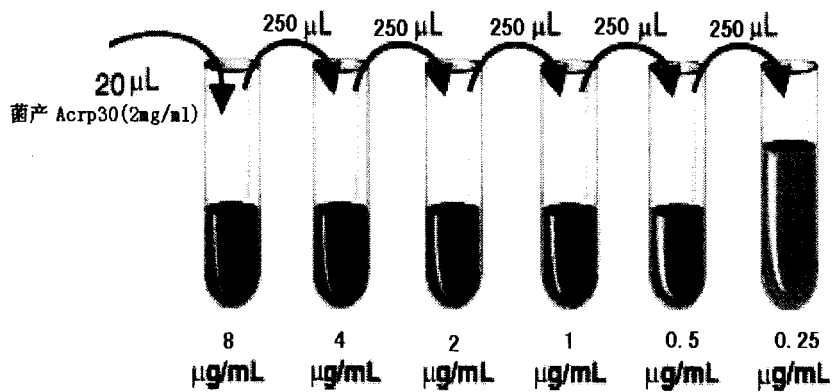


图 1

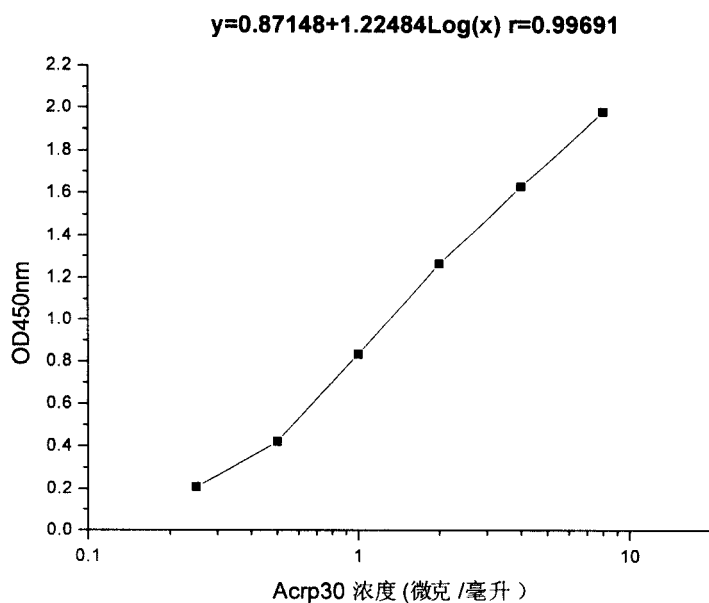


图 2

专利名称(译)	血清或血浆样品稀释液及其应用		
公开(公告)号	CN1715920A	公开(公告)日	2006-01-04
申请号	CN200410062222.2	申请日	2004-06-30
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院野战输血研究所		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院野战输血研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院野战输血研究所		
[标]发明人	陈竞新 王全立 詹林盛 王会中 付秋霞		
发明人	陈竞新 王全立 詹林盛 王会中 付秋霞		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/547 G01N1/38		
代理人(译)	鲁兵		
其他公开文献	CN1328583C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开一种血清或血浆样品稀释液，用在夹心ELISA检测人脂肪细胞补体相关蛋白(Acrp30)中稀释血清(血浆)样品，它包括一种还原剂及缓冲组分，具体可以由25mM DTT、100mM pH8.0的Tris缓冲液、2mM pH8.0的EDTA、和200mM NaCl组成。使用本发明稀释液可以使样品处理、稀释、上样一次完成，并且使得待检样品稀释前后无须煮沸处理，操作简便，并通过改变反应条件，缩短了反应时间，实现了对人血清(血浆)Acrp30蛋白快速定量检测。

组份 \ 浓度	实施例一	实施例二	实施例三	实施例四
DTT		20mM	100mM	500mM
Tris 缓冲液 (pH8.0)		200mM	50mM	120mM
EDTA (pH8.0)		5mM	3mM	1mM
NaCl		250mM	400mM	100mM