



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101451993 B

(45) 授权公告日 2013.07.17

(21) 申请号 200910000731.5

(22) 申请日 2009.01.09

(73) 专利权人 王贤俊

地址 325011 浙江省温州市经济技术开发区  
高新技术产业园区

(72) 发明人 王贤俊

(74) 专利代理机构 北京君智知识产权代理事务  
所 11305

代理人 郑明

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 35/00 (2006.01)

(56) 对比文件

EP 0506523 A2, 1992.09.30,

CN 101004421 A, 2007.07.25,

CN 101140286 A, 2008.03.12,

Jay M. Edelberg 等. Lipoprotein a

Inhibits Streptokinase-Mediated Activation  
of Human Plasminogen. 《Biochemistry》. 1989,  
第 28 卷 (第 6 期),

许平等. 脂蛋白 (a) 的分离纯化及其抗血清  
的制备. 《生物化学与生物物理学进展》. 1990, 第  
17 卷 (第 3 期),

审查员 许欣嘉

权利要求书1页 说明书10页

(54) 发明名称

抗 Lp(a) 抗体制备及检测 Lp(a) 的诊断试剂  
盒

(57) 摘要

本发明涉及一种抗 Lp(a) 抗体制备及检测  
Lp(a) 的诊断试剂盒。本发明所述的抗体制备是  
提取健康人群血清中的脂蛋白 (a) (Lp(a)) 制备  
成抗原后,用其多次免疫敏感动物,获得的高免血  
清中含有与人血清中 Lp(a) 抗原高度特异反应  
性的抗体,制备过程中应具有无须超速离心处理,  
制备时间短、抗体的效价高的特点;用该抗体所  
配制的检测试剂盒配合可见光/紫外半、全自动  
生化分析仪测定人血清中的脂蛋白 (a) 具有准确  
性高、重复性好、抗干扰能力强、基质稳定、线性范  
围宽等优点。

1. 一种抗 Lp(a) 抗体的制备方法,其特征在于:

(1) 抗原的制备

1) 将从健康人群不同个体获得的血清的混合物与脂肪族表面活性剂混匀,使其形成表面活性剂-血清复合物;将 38% 的磷钨酸-镁慢慢加入到以上表面活性剂-血清复合物中,脂蛋白沉淀后用生理盐水洗涤;

2) 将洗涤后的脂蛋白沉淀物加入到预冷的体积比为 3:2 的无水乙醇/无水乙醚混合液中,不断搅拌,12 小时过夜后,在 4℃ 离心,弃上清,收集沉淀物再加入到预冷的体积比为 3:2 的无水乙醇/无水乙醚混合液中,不断搅拌,12 小时过夜后,在 4℃ 离心,弃上清,收集沉淀物;

3) 将上述脱脂后的沉淀物用已知的 SDS-PAGE 凝胶电泳,将 Lp(a) 凝胶带收集,捣碎,析出 Lp(a),真空干燥后,于 -20℃ 保存;

4) 将提取的真空干燥的 Lp(a) 抗原用生理盐水稀释成浓度为 100mg/ml 的液体抗原,再分别经弗氏佐剂等比例混合、乳化,获得 FCA 免疫抗原和 FIA 免疫抗原;

(2) 用免疫抗原多次接种对 Lp(a) 抗原敏感但又不易产生免疫耐受的健康兔子,羊、牛中任一种,获得含抗 Lp(a) 抗体的高免血清。

2. 一种检测 Lp(a) 的诊断试剂盒,其特征在于该试剂盒含有由权利要求 1 制备的含抗 Lp(a) 抗体的高免血清配制而成的抗体试剂、由权利要求 1 的由多人份的混合血清中提取出的 Lp(a) 配制的标准液和反应剂,该反应剂是由以下成分所配制:pH=7.2 Tris 缓冲液 250~350ml,氯化钠 5~8g,聚乙烯二醇 8000 50~70g,对羟基苯甲酸酯 4~6g,链激酶-聚氧乙烯烷基芳醚溶液 80~120ml,小牛血清白蛋白 60~80g,纯化水补足到 1000ml,其中链激酶-聚氧乙烯烷基芳醚溶液是由以下成分所配制:1000U 链激酶溶解于 100ml 聚氧乙烯烷基芳醚,制成溶液。

3. 如权利要求 2 所述的一种检测 Lp(a) 的诊断试剂盒,其特征在于抗体试剂是由以下成分所配制:兔抗人 Lp(a) 抗体的血清稀释液 1000ml,效价为 1:32~1:64 的兔抗人 Lp(a) 抗体的血清 1000ml,柳氮磺胺吡啶-丙二醇溶液 150ml,其中柳氮磺胺吡啶-丙二醇溶液是由柳氮磺胺吡啶 80g 溶于 150ml 丙二醇中配成。

4. 如权利要求 2 所述的一种检测 Lp(a) 的诊断试剂盒,其特征在于标准液是由以下成分所配制:pH6~8 的 Tris 缓冲液 200ml,效价为 1:16~1:32 的 Lp(a) 抗原 10g,柳氮磺胺吡啶-丙二醇溶液 90~150ml,叠氮钠 0.5g,小牛血清白蛋白 40~60g,过氧乙酸 4~7g,柠檬酸 4~7g,纯净水加至 1000ml。

## 抗 Lp(a) 抗体制备及检测 Lp(a) 的诊断试剂盒

### 【技术领域】

[0001] 本发明涉及抗血清 Lp(a) 抗体的制备方法,以及用该抗体制成的用于临床上血清 Lp(a) 检测的体外诊断试剂盒,本发明属于检验医学及生物技术领域。

### 【背景技术】

[0002] 脂蛋白(a)即 LP(a)是一种类似低密度脂蛋白(LDL)的脂质,一种特殊独立的血浆脂蛋白,主要在肝脏合成后分泌入血,其含量的变化在血栓性疾病,肾脏疾病,糖尿病等疾病中具有非常重要的临床意义。

[0003] Lp(a)是1963年挪威遗传学家 Berg 在研究低密度脂蛋白的遗传学变异时发现的。人群中 Lp(a)的浓度个体差异极大,浓度范围可在 0~1000mg/L,这种差异最主要由 apo(a)基因位点决定(《血清脂蛋白 a(Lp(a))的生物学特性及临床应用分析》,齐鲁医学检验,2004年第15卷第4期)。Lp(a)是一种富含胆固醇的脂蛋白,核心部分为中性脂质和 apoB-100分子,其外围包绕着亲水性的 apo(a),二者以二硫键共价连接;其中 apo(a)是 Lp(a)的特征性糖蛋白成分,主要由一种被称为 Kringle 的,形状类似丹麦蛋糕的结构组成。Kringle 有多种,分别命名为 K1、K2、K3、K4 和 K5。Lp(a)只含一个 K5, K5 的一端连接有 37 个 K4,第 36 个 K4 中含有一个额外未配对的半胱氨酸,推测此处可能是 apo(a)以二硫键与 apoB100 结合的部位。Lp(a)中的 K4 有 75%~85%的氨基酸与纤维蛋白溶酶原(PG) Kringle 4 的氨基酸残基相同,有共同的抗原簇,表现两者有交叉免疫反应(《脂蛋白(a)的研究近况—分子生物学与疾病的相关性》,国外医学遗传学分册 1999 年第 22 卷第 2 期)。

[0004] 对脂蛋白(a)含量的临床意义,早期检测 Lp(a)多用电泳法,但此法灵敏度低,多用于定性检测。随后相继研制开发出一些直接测定 Lp(a)的免疫化学检测法,如辐射状免疫扩散法(RID)、电免疫扩散法(EID)、放射免疫测定法(RIA)、酶联免疫吸附试验(ELISA)、免疫浊度法[包括免疫散射比浊法(INA)和免疫透射比浊法(ITA)]、解离增强配体荧光免疫测定法(DELFIA)等。RID法与EID法因操作简便,不需特殊设备,仍有一些基层单位实验室采用,但缺点是灵敏度低。RIA法的缺点是操作复杂,有放射性核素污染。DELFI A法因需特殊仪器,国内也较少应用。各种方法测定 Lp(a)所得参考值相近,目前国内外所采用的判断标准基本相同。一般认为 300mg/L 为临界水平,大于 300mg/L 以上为病理水平。目前主要采用的方法主要是:酶联免疫吸附测定法和免疫透射比浊法(《脂蛋白(a)的测定方法与临床意义》,检验医学信息网。)

[0005] 酶联免疫吸附测定法不受 P1g 干扰,该法是根据 Lp(a)含有 apo(a)、apoB 两种抗原位点而设计,其相关性好,但是操作繁琐,无法用于自动化分析仪器,易受外界污染等。

[0006] 免疫透射比浊法测定 Lp(a)含量时,由于 P1g 与试剂中的抗体发生交叉免疫反应,从而对 Lp(a)含量测定产生干扰,这也是该方法测定 Lp(a)含量时的主要干扰因素。另外,由于 Lp(a)与 P1g 具有高度同源性,致使 Lp(a)抗体与 P1g 发生免疫交叉反应,进而干扰测定结果。这也是目前最主要的干扰因素,Lp(a)蛋白质分子颗粒大小的多态性和结构的复杂性,以致测定的结果受血清中 apo(a)分子大小及抗体特性的影响,致使室间差很大。

[0007] 同时,检测 Lp(a) 所需抗体的制备及抗原提取的方法直接关系到抗体质量的高低。已知的方法是采用倍比稀释的密度梯度超离心技术收集到电泳级别的抗原,再进行动物免疫实验。上述方法的缺点是超离心所用时间长,而且在提取过程中目标抗原蛋白容易变性而改变了目标抗原的免疫原性,得到的抗体血清自然效价很低。另外,采用该方法得到的抗体容易与纤维溶酶原蛋白发生交叉免疫反应。

## 【发明内容】

[0008] [要解决的技术问题]

[0009] 本发明的目的在于:为了克服上述背景技术中所提及目前检测 Lp(a) 方法的不足,提供一种具有准确性高、重复性好、抗干扰能力强、基质稳定、适用于可见光/紫外半、全自动生化分析仪等特点的用于检测 Lp(a) 的试剂盒。

[0010] [技术方案]

[0011] 由健康人群中的多人份的混合血清中提取出 Lp(a) 与佐剂混合后制备成免疫用的 Lp(a) 免疫抗原,多次接种对 Lp(a) 抗原敏感但又不产生免疫耐受的健康动物,获得的含抗 Lp(a) 抗体的高免血清;

[0012] 利用该高免血清配制成含抗 Lp(a) 抗体的检测试剂及 Lp(a) 标准液;

[0013] 本发明描述的 Lp(a) 检测双试剂盒,配合具有 340nm 波长、1cm 光径、37℃ 恒温装置的自动生化分析仪进行人血样品脂蛋白(a) 的检测。

[0014] 本发明的具体实施方式抗 Lp(a) 抗体制备的基本操作的如下:

[0015] 1. 抗原的制备

[0016] (1) 将 300ml 混合血清(从健康人群不同个体获得的血清的混合)与 400ml 的脂肪族表面活性剂(如:异丙基苯磺酸铵,羊毛脂等)在搅拌器中混匀,使其形成表面活性剂-血清复合物。

[0017] (2) 将 38% 的磷钨酸-镁 200ml 在搅拌器上慢慢加入到以上表面活性剂-血清复合物中,脂蛋白沉淀后用生理盐水洗涤。

[0018] (3) 将洗涤后的脂蛋白沉淀物加入到预冷的无水乙醇/无水乙醚(3:2)混合液中,不断搅拌,12 小时过夜后,在 4℃ 离心,弃上清,将收集的沉淀物后重复一次该操作。

[0019] (4) 将上述脱脂后的沉淀物用已知的 SDS-PAGE 凝胶电泳,将 Lp(a) 凝胶带收集,捣碎,析出 Lp(a),真空干燥后,于 -20℃ 保存。

[0020] (5) 免疫抗原的制备:将提取的真空干燥的 Lp(a) 抗原按(W/V)用生理盐水稀释成液体抗原(浓度为:100mg/ml),再分别经 FCA(弗氏完全佐剂)或 FIA(弗氏不完全佐剂)等比例混合,置于混合器上使之剧烈振荡 10min 使抗原充分乳化,获得 FCA 免疫抗原和 FIA 免疫抗原。

[0021] 2. 抗体的制备用免疫抗原接种

[0022] 本发明中抗体制备过程为:

[0023] (1) 动物:本发明中的实验免疫动物的选择可以是:只要对 Lp(a) 抗原敏感但又不产生免疫耐受的健康兔子,羊、牛中任一种动物制备含抗 Lp(a) 抗体的高免血清。本发明中优先选择的是同一直系兔做为免疫对象。

[0024] (2) 动物免疫:待免疫的用兔移入接种动物舍,大概需要四天适应期,在免疫接种

抗原前采取兔血,提取血清制备成用于抗体检测时作为阴性对照血清。

[0025] 免疫方法可采用背部多点皮下注射法,剂量 0.4 ~ 0.6ml/只,每点注 0.1ml,每间隔 2 周后再于上述部位选不同点注射(不要选择临近位点,否则溃疡愈合不好)。在免疫 3 ~ 4 次后可以获得较高效价的抗体,为此第 3 次免疫后一周进行检测抗体效价的试血,用单向免疫扩散法测定抗体效价(《实用临床免疫学检验》,江苏科技出版社。)如抗体效价符合要求(抗人脂蛋白(a)抗体效价在 1 : 32 ~ 1 : 64),可于最后一次注射后一周放血。

[0026] 用羊、牛制备高免血清免疫方法和程序相同,但免疫剂量应按体重增加,即按每千克体重 0.2 ~ 0.3ml 计,每点注射 0.5 ~ 1.0ml。

[0027] (3) 抗体的提取:

[0028] 将上述颈动脉血置于 25 ~ 30℃ 条件下 24 小时,3000r/min 离心 30min,弃沉淀,获得含 Lp(a) 抗体的血清。

[0029] 可对 Lp(a) 抗体的血清中加入非还原型糖,丙三醇,乙二胺四乙酸二钠盐中的一种来保持抗体的效价稳定,同时可以用叠氮钠,乙基汞硫代硫酸钠等中的一种作为防腐。

[0030] 3. 检测人血清中 Lp(a) 含量试剂盒的制备:

[0031] 测定人血清中 Lp(a) 含量的试剂盒的原理是:在缓冲体系中,样品血清中的 Lp(a) 与抗 Lp(a) 抗体发生免疫反应,生成的免疫复合物使光透射强度或散射强度发生变化;用 Lp(a) 校准品的浓度和与之相应的光透射强度或散射强度的标准曲线查出待检测样品中 Lp(a) 的含量。

[0032] 由于本发明涉及的试剂盒用的是免疫透射比浊的检测方法,其显著的特色就是选择脂蛋白(a)与纤维蛋白溶酶原无同源的抗体结合位点,通过抗原决定簇掩蔽的方法消除了内源性同源蛋白(P1g)的干扰,同时利用链激酶-聚氧乙烯烷基芳醚溶液消除屏蔽,进一步减少 P1g 和其他杂蛋白的干扰。

[0033] 用于血清中 Lp(a) 含量的检测试剂盒,它由:反应剂(试剂 1),抗体试剂(试剂 2)和标准液组成。本试剂盒应用时必需配合具有 340nm 波长、1cm 光径、37℃ 恒温装置的自动生化分析仪进行人血清样品脂蛋白(a)的检测。

[0034] (1) 反应剂(试剂 1),其组成为:

[0035] Tris 缓冲液(pH = 7.2) 250 ~ 350ml

[0036] 氯化钠 5 ~ 8g

[0037] 聚乙烯二醇 8000 50 ~ 70g

[0038] 对羟基苯甲酸酯 4 ~ 6g

[0039] 链激酶-聚氧乙烯烷基芳醚溶液\* 80 ~ 120ml

[0040] 小牛血清白蛋白 60 ~ 80g

[0041] 其余为纯化水补足到 1000ml

[0042] \*:链激酶-聚氧乙烯烷基芳醚溶液是将 1000U 链激酶溶解于 100ml 聚氧乙烯烷基芳醚,制成溶液,其中链激酶可以用尿激酶替代,聚氧乙烯烷基芳醚可以用聚苯乙烯苯醚或聚氧乙烯烷基醚替代。

[0043] 本发明选取 Tris 缓冲液,缓冲液还可选择磷酸缓冲液、Tris 缓冲液、PIPES 缓冲液、HEPES 缓冲液、TAPS 缓冲液、甘氨酸缓冲液、硼酸缓冲液等替代,pH 值为 7.0 ~ 10.0。

[0044] 本试剂盒的加速剂采用聚乙二醇 8000,但也可以选用分子量 1000 ~ 20000 中其他

的聚乙二醇。

[0045] 本试剂盒的防腐剂采用对羟基苯甲酸酯。但也可以采用叠氮钠、乙基汞硫代硫酸钠。

[0046] 以上处方中的小牛血清白蛋白也可以选用 EDTA-Na、氯化镁、牛血清白蛋白、乙二醇、甘露醇等替代。

[0047] 本试剂选用非离子表面活性剂：吐温系列、聚氧乙烯醚类。表面活性剂还可以选用阴离子表面活性剂、两性表面活性剂。

[0048] (2) 抗体试剂（试剂 2），其组成为：

[0049] 兔抗人 Lp(a) 抗体的血清稀释液 1000ml

[0050] 兔抗人 Lp(a) 抗体的血清（抗体效价 1 : 32 ~ 1 : 64） 1000ml

[0051] 柳氮磺胺吡啶 - 丙二醇溶液 \* 150ml

[0052] \* : 柳氮磺胺吡啶 - 丙二醇溶液 : 将柳氮磺胺吡啶 80g 溶于 50 ~ 150ml 丙二醇中配成。

[0053] 配方中的柳氮磺胺吡啶，可以采用丁基羟基茴香醚、硫代二丙酸二月桂酯、二丁基羟基甲苯、苯多酚、甘草抗氧化物、磷脂等。

[0054] 其中：

[0055] 兔抗人 Lp(a) 抗体的血清稀释液：

[0056] Tris 缓冲液 (pH = 7.2) 200 ~ 250ml

[0057] 聚乙烯二醇 8000 30 ~ 50g

[0058] 对羟基苯甲酸酯 2 ~ 6g

[0059] 小牛血清白蛋白 50 ~ 70g

[0060] 纯化水 加到 1000ml

[0061] (3) 标准液：

[0062] 校准液是决定试剂准确度的重要因素之一。Lp(a) 在液体状态下，在体外过度金属离子氧化、化学修饰、细胞氧化，均可引起 Lp(a) 发生氧化修饰，使标准液的值在短时间内发生很大的下降，所以用柳氮磺胺吡啶 - 丙二醇溶液来减缓其氧化速度。而目前大多数的氧化剂都根据其氧化剂自身的强还原性，从而阻止其标准液中的 Lp(a) 被氧化，因此抗氧化剂化效果随着时间的推移而下降。有研究发现，具有抗氧化作用物质在被还原的同时，会产生一定量的自由基。为了提高标准液在液态状态下的稳定性，我们在其中加入了适量的柠檬酸，增加柳氮磺胺吡啶 - 丙二醇溶液的稳定性，从而本发明制备的 Lp(a) 标准液，在 2 ~ 8℃ 一年内保持几乎不变。本发明的 Lp(a) 标准液的定值为 : 10.0g/L，因此标准液制备时，加入纯度为 90%（高压液相色谱法测定）、效价在 1 : 16 ~ 1 : 32（单向免疫扩散法测定）的纯化 Lp(a) 抗原 10.0g/L。

[0063] 其标准液的主要组成包括：

[0064] pH 6 ~ 8 Tris 缓冲液 200ml

[0065] Lp(a) 抗原（抗体效价 1 : 16 ~ 1 : 32） 10g

[0066] 柳氮磺胺吡啶 - 丙二醇溶液 \* 90 ~ 150ml

[0067] 山梨酸盐 0.1 ~ 0.5g

[0068] 小牛血清白蛋白 40 ~ 60g

- [0069] 过氧化酸钠 4 ~ 7g  
 [0070] 柠檬酸 4 ~ 7g  
 [0071] 纯化水 加到 1000ml

[0072] \*:柳氮磺胺吡啶-丙二醇溶液:将柳氮磺胺吡啶 60g 溶于 150ml 丙二醇中配成。

[0073] 本标准液选取 Tris 缓冲液。也可采用 PBS、TAPS、HEPPS、CHES、甘氨酸、双甘氨酸等替代。其中柳氮磺胺吡啶可以用丁基羟基茴香醚、硫代二丙酸二月桂酯、二丁基羟基甲苯、甘草抗氧化物等替代。

[0074] 小牛血清白蛋白可以稳定标准液中的抗原,防止抗原蛋白氧化,变性等引发的活性降低。

[0075] 4. 检测人血清中 Lp(a) 含量试剂盒的使用

[0076] (1) 检测仪器:本发明涉及的 Lp(a) 检测双试剂盒,必需配合具有 340nm 波长、1cm 光径、37℃恒温装置的自动生化分析仪进行检测。

[0077] (2) 检测样品的准备:样品为新鲜血清,血清中 LP(a) 室温保存可稳定 1 天,2 ~ 8℃可稳定 7 天,冰冻可稳定 3 个月。

[0078] (3) 操作步骤如下:

[0079] 1) 在全自动生化分析仪上设定:温度 37℃,反应时间 10min,主波长 340nm,副波长 800nm。测定试剂和样品的体积比为 20 : 1,将最终反应物置于生化分析仪下,检测在主波长 340nm 吸光度的变化。

[0080] 2) 加样及记录结果:

[0081] 表 1 样品检测操作术式

加入物 (ml)	空白管	标准管	样品管
R1	0.70	0.70	0.70
蒸馏水	0.04	---	---
标准液	---	0.04	---
样品	---	---	0.04
混匀, 37℃预温 5min, 在主波长 340nm/辅助波长 800nm 下读取各管吸光度值 A1。			
R2	0.10	0.10	0.10
混匀, 37℃预温 5min, 在主波长 340nm/辅助波长 800nm 下读取各管吸光度值 A2, $\Delta A=A2-A1$ 。			

[0082] [0083] 结果计算:样品管 Lp(a) 的含重 (mg/L) = 标准液浓度  $\times \Delta A_{(样品管)} / \Delta A_{(标准管)}$ 。

[0084] 正常人群参考值为 0 ~ 300mg/L。

[0085] (4) 试剂盒检验结果验证:

[0086] 特异性:通过采用本发明的试剂盒分别检测含 Lp(a) 和已除去 Lp(a) 的人血清,根据检测结果显示,含 Lp(a) 的人血清的检出率为 99%,不含 Lp(a) 的人血清的检出率 2%,但检测出的含量却很低。

[0087] 准确性:取 710mg/L 的 Lp(a) 定值标准血清,采用同批次的本试剂盒在外部条件相同的条件下,用自动生化分析仪测定,测定结果如下表 2:

[0088] 表 2 准确性测定结果表

[0089]

测定次数	结果 (mg/L)
1	684
2	684.9
3	685.1
4	687.3
5	692.1
6	686.9
7	693.2
8	698.6
9	684.9
10	695.5

[0090] 准确度为 : -0.029%

[0091] 重复性测定数据如下表 3 :

[0092] 表 3 重复性测定数据结果表

[0093]

测定值				计算结果
173.2	174.2	173.8	174.7	N=20 X=174.45 CV=0.36% SD=0.6328
173.4	175.1	174.9	173.2	
174.7	174.6	175.2	174.4	
173.9	175.2	175.0	174.9	
173.6	174.7	174.8	175.1	

[0094] 本试剂盒的精密度的批内差为  $CV \leq 8\%$ 。[0095] 批间差为  $CV \leq 10\%$ 。[0096] 准确度的相对偏差控制在  $\pm 10\%$  的范围内。[0097] 线性范围控制在  $0 \sim 1000\text{mg/L}$ 。

[0098] 本发明的积极意义在于:本发明所述的抗体制备是提取健康人群血清中的脂蛋白(a) (Lp(a)) 制备成抗原后,用其多次免疫敏感动物,获得的高免血清中含有与人血清中 Lp(a) 抗原高度特异反应性的抗体,制备过程中应具有无须超速离心处理,制备时间短、抗体的效价高的特点;用该抗体所配制的检测试剂盒配合可见光/紫外半、全自动生化分析仪测定人血清中的脂蛋白(a) 具有准确性高、重复性好、抗干扰能力强、基质稳定、线性范围宽等优点。

[0099] 本发明中所使用的各种试剂和药品均购置于国内试剂公司和药品商店的分析纯或化学纯级。

[0100] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的保护范围。

[0101] 实施例 1 抗原的制备

[0102] 取 300ml 混合血清(从健康人群不同个体获得的血清的混合)与 400ml 的脂肪族表面活性剂(羊毛脂)在搅拌器中混匀,再慢慢加入 38%的磷钨酸-镁 200ml,待形成脂蛋白沉淀后用生理盐水对其进行洗涤;将洗涤后的脂蛋白沉淀物加入到预冷的无水乙醇/无水乙醚(3:2)混合液中,不断搅拌,12 小时过夜后,在 4℃离心,弃上清,将收集的沉淀物后重复一次该操作;将上述脱脂后的沉淀物用已知的 SDS-PAGE 凝胶电泳,将 Lp(a) 凝胶带收集,捣碎,析出 Lp(a),真空干燥成 Lp(a) 冻干制品,保存于 -20℃。

[0103] 将提取的真空干燥的 Lp(a) 冻干制品按(W/V)用生理盐水稀释成液体抗原(浓度为:100mg/ml),再分别经 FCA(弗氏完全佐剂)或 FIA(弗氏不完全佐剂)等比例混合,置于混合器上使之剧烈振荡 10min 使抗原充分乳化,获得 FCA 免疫抗原乳剂和 FIA 免疫抗原乳剂。

[0104] 实施例 2 抗体的制备

[0105] 选取 20 只健康家兔作为免疫动物移入兔房后,经过 4 天的适应期,在免疫接种抗原乳剂前采取兔血,提取血清制备成用于抗体检测时作为阴性对照。

[0106] 第一次免疫接种采用 FCA 免疫抗原乳剂,免疫方法可采用背部多点皮下注射法,剂量 0.4 ~ 0.6ml/只,每点注 0.1ml,从第二次免疫接种起改用 FIA 免疫抗原乳剂。每间隔 2 周后再于上述部位选不同点注射。第 3 次免疫后一周进行检测抗体效价的试血,用单向免疫扩散法测定抗体效价,如抗体效价达到 1:32 以上,可于第 4 次注射后一周颈动脉放血并提取血清,即为含 Lp(a) 抗体的血清。

[0107] 实施例 3

[0108] 可用健康的绵羊、牛和马等,只要对抗原敏感但又不易产生免疫耐受的动物取代实施例中的家兔制备含 Lp(a) 抗体的血清。

[0109] 实施例 4

[0110] 检测 Lp(a) 的诊断试剂盒各组分中相关溶液的配制:

[0111] 1. 链激酶-聚氧乙烯烷基芳醚溶液

[0112] 1000U 链激酶溶解于 100ml 聚氧乙烯烷基芳醚,制成溶液。

[0113] 2. 柳氮磺胺吡啶-丙二醇溶液

[0114] 柳氮磺胺吡啶 80g 溶于 150ml 丙二醇中配成。

[0115] 3. 兔抗人 Lp(a) 抗体的血清稀释液

[0116] pH 7.2 Tris 缓冲液 200ml

[0117] 聚乙烯二醇 8000 50g

[0118] 对羟基苯甲酸酯 4g

[0119] 小牛血清白蛋白 60g

[0120] 纯化水加至 1000ml

[0121] 实施例 5

[0122] 实施例 4 中链激酶-聚氧乙烯烷基芳醚溶液的配方中可以选聚苯乙烯苯醚,聚氧

乙烯烷基醚取代聚氧乙烯烷基芳醚;选用尿激酶替代链激酶。

[0123] 实施例 6

[0124] 实施例 4 柳氮磺胺吡啶 - 丙二醇溶液配方中的柳氮磺胺吡啶,可以采用丁基羟基茴香醚、硫代二丙酸二月桂酯、二丁基羟基甲苯、苯多酚、甘草抗氧化物、磷脂等替代。

[0125] 实施例 7

[0126] 检测 Lp(a) 的诊断试剂盒各组分的配制:

[0127] 1. 试剂 I:

[0128] pH = 7.2 Tris 缓冲液 250ml

[0129] 氯化钠 5g

[0130] 聚乙烯二醇 8000 50g

[0131] 对羟基苯甲酸酯 4g

[0132] 链激酶 - 聚氧乙烯烷基芳醚溶液 80ml

[0133] 小牛血清白蛋白 60g

[0134] 纯化水加至 1000ml

[0135] 2. 试剂 II:

[0136] 兔抗人 Lp(a) 抗体的血清稀释液 1000ml

[0137] 兔抗 Lp(a) 抗体的血清 (抗体效价 1 : 32 ~ 1 : 64) 1000ml

[0138] 柳氮磺胺吡啶 - 丙二醇溶液 150ml

[0139] 3. 标准液:

[0140] pH 7.2 Tris 缓冲液 200ml

[0141] Lp(a) 抗原 (抗体效价 1 : 16 ~ 1 : 32) 10g

[0142] 柳氮磺胺吡啶 - 丙二醇溶液 90ml

[0143] 山梨酸盐 0.3g

[0144] 小牛血清白蛋白 40g

[0145] 过氧乙酸纳 4g

[0146] 柠檬酸 4g

[0147] 纯化水加至 1000ml

[0148] 实施例 8:

[0149] 检测 Lp(a) 的诊断试剂盒各组分的配制:

[0150] 1. 试剂 I:

[0151] pH = 7.2 Tris 缓冲液 300ml

[0152] 氯化钠 7g

[0153] 聚乙烯二醇 8000 60g

[0154] 对羟基苯甲酸酯 6g

[0155] 尿激酶 - 聚氧乙烯烷基芳醚溶液 90ml

[0156] 小牛血清白蛋白 60g

[0157] 纯化水加至 1000ml

[0158] 2. 试剂 II:

[0159] 兔抗人 Lp(a) 抗体的血清稀释液 1000ml

[0160]	兔抗人 Lp(a) 抗体的血清 (抗体效价 1 : 32 ~ 1 : 64)	1000ml
[0161]	柳氮磺胺吡啶 - 丙二醇溶液	150ml
[0162]	3. 标准液 :	
[0163]	HEPPS 缓冲液	200ml
[0164]	Lp(a) 抗原 (抗体效价 1 : 16 ~ 1 : 32)	10g
[0165]	丁基羟基茴香醚 -- 丙二醇溶液	90ml
[0166]	叠氮钠	0.5g
[0167]	小牛血清白蛋白	45g
[0168]	过氧乙酸纳	7g
[0169]	柠檬酸	6g
[0170]	纯化水加至	1000ml
[0171]	实施例 9 :	
[0172]	检测 Lp(a) 的诊断试剂盒各组分的配制 :	
[0173]	1. 试剂 I :	
[0174]	磷酸缓冲液	250ml
[0175]	氯化钠	7g
[0176]	聚乙烯二醇 8000	70g
[0177]	叠氮钠	6g
[0178]	尿激酶 - 聚苯乙烯苯醚溶液	100ml
[0179]	小牛血清白蛋白	70g
[0180]	纯化水加至	1000ml
[0181]	2. 试剂 II :	
[0182]	兔抗 Lp(a) 抗体的血清稀释液	1000ml
[0183]	兔抗人 Lp(a) 抗体的血清 (抗体效价 1 : 32 ~ 1 : 64)	1000ml
[0184]	柳氮磺胺吡啶 - 丙二醇溶液	150ml
[0185]	3. 标准液 :	
[0186]	PBS 缓冲液	200ml
[0187]	Lp(a) 抗原 (抗体效价 1 : 16 ~ 1 : 32)	10g
[0188]	柳氮磺胺吡啶 - 丙二醇溶液	100ml
[0189]	叠氮钠	0.3g
[0190]	小牛血清白蛋白	50g
[0191]	过氧乙酸纳	5g
[0192]	柠檬酸	5g
[0193]	纯化水加到	1000ml
[0194]	实施例 10	
[0195]	1. 试剂 I	
[0196]	Tris 缓冲液 (pH = 7.2)	300ml
[0197]	氯化钠	8g
[0198]	聚乙烯二醇 8000	70g

---

[0199]	对羟基苯甲酸酯	6g
[0200]	链激酶 - 聚氧乙烯烷基芳醚溶液	120ml
[0201]	小牛血清白蛋白	80g
[0202]	纯化水补足到	1000ml
[0203]	2. 试剂 II :	
[0204]	兔抗人 Lp(a) 抗体的血清稀释液	1000ml
[0205]	兔抗人 Lp(a) 抗体的血清 (抗体效价 1 : 32 ~ 1 : 64)	1000ml
[0206]	柳氮磺胺吡啶 - 丙二醇溶液	150ml
[0207]	(3) 标准液 :	
[0208]	PBS 缓冲液	200ml
[0209]	Lp(a) 抗原 (抗体效价 1 : 16 ~ 1 : 32)	10g
[0210]	柳氮磺胺吡啶 - 丙二醇溶液	150ml
[0211]	山梨酸盐	0.5g
[0212]	小牛血清白蛋白	60g
[0213]	过氧乙酸纳	7g
[0214]	柠檬酸	7g
[0215]	纯化水加到	1000ml

专利名称(译)	抗Lp(a)抗体制备及检测Lp(a)的诊断试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN101451993B</a>	公开(公告)日	2013-07-17
申请号	CN200910000731.5	申请日	2009-01-09
[标]申请(专利权)人(译)	王贤俊		
申请(专利权)人(译)	王贤俊		
当前申请(专利权)人(译)	王贤俊		
[标]发明人	王贤俊		
发明人	王贤俊		
IPC分类号	G01N33/53 G01N35/00		
代理人(译)	郑明		
其他公开文献	CN101451993A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及一种抗Lp(a)抗体制备及检测Lp(a)的诊断试剂盒。本发明所述的抗体制备是提取健康人群血清中的脂蛋白(a)(Lp(a))制备成抗原后，用其多次免疫敏感动物，获得的高免血清中含有与人血清中Lp(a)抗原具有高度特异反应性的抗体，制备过程中应具有无须超速离心处理，制备时间短、抗体的效价高的特点；用该抗体所配制的检测试剂盒配合可见光/紫外半、全自动生化分析仪测定人血清中的脂蛋白(a)具有准确性高、重复性好、抗干扰能力强、基质稳定、线性范围宽等优点。

加入物 (ml)	空白管	标准管	样品管
R1	0.70	0.70	0.70
蒸馏水	0.04	---	---
标准液	---	0.04	---
样品	---	---	0.04
混匀，37℃预温 5min，在主波长 340nm/辅助波长 800nm 下读取各管吸光度值 A1。			
R2	0.10	0.10	0.10
混匀，37℃预温 5min，在主波长 340nm/辅助波长 800nm 下读取各管吸光度值 A2， $\Delta A=A2-A1$ 。			