

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910043672. X

[51] Int. Cl.

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

[43] 公开日 2009年11月4日

[11] 公开号 CN 101571546A

[22] 申请日 2009.6.12

[21] 申请号 200910043672. X

[71] 申请人 袁 洪

地址 410013 湖南省长沙市桐梓坡路 138 号  
中南大学湘雅三医院

共同申请人 李登清 陈琳磊

[72] 发明人 袁 洪 李登清 陈琳磊 何笑恬  
曹 琳 金维荣

[74] 专利代理机构 长沙星耀专利事务所

代理人 宁星耀

权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 3 页

[54] 发明名称

人脂联素酶联免疫吸附检测试剂盒及其制备方法与应用

[57] 摘要

人脂联素酶联免疫吸附检测试剂盒及其制备方法与应用，所述试剂盒包括抗人 APN 单克隆抗体包被的酶标板，重组的 gAPN 蛋白标准品，抗人 APN 单克隆检测抗体，HRP - 链霉素，10mM pH7.4 的磷酸盐缓冲液，TMB 酶底物显色液，0.1M pH7.4 的磷酸盐缓冲液及 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>。本发明还包括所述试剂盒的制备方法与在人血 APN 含量检测中的应用。本发明使用操作方便、快捷，2h 内就能得到检测结果；特异性高，成本低，便于临床大量使用。

1、一种人脂联素酶联免疫吸附检测试剂盒，包括抗人 APN 单克隆抗体包被的酶标板，标准品冻干粉，检测抗体，酶标亲和素 HRP-链霉素，样本试剂稀释液，TMB 酶底物显色液，浓缩洗涤液 0.1M pH7.4 的磷酸盐缓冲液和终止反应液 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>，其特征在于：

标准品冻干粉为重组的 gAPN 蛋白标准品；

检测抗体为生物素标记的抗人 APN 单克隆检测抗体；

样本试剂稀释液为 10mM pH7.4 的磷酸盐缓冲液，其中含有 0.05%Tween-20；

所述百分比为体积百分比。

2、一种如权利要求 1 所述人脂联素酶联免疫吸附检测试剂盒的制备方法，包括抗人 APN 单克隆抗体包被的酶标板、重组的 gAPN 蛋白标准品、检测抗体为生物素标记的抗人 APN 单克隆检测抗体的制备及 10mM pH7.4 的磷酸盐缓冲液和 0.1M pH7.4 的磷酸盐缓冲液及 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 的配制，其特征在于，

重组的 gAPN 标准品的制备方法是：应用 PCR 方法获得脂联素球状结构域 gAPN 基因，构建 pET22b(+)/gAPN 重组表达质粒转化入大肠杆菌 BL21 菌株，IPTG 诱导表达 His-gAPN 融合蛋白，利用镍柱亲和层析法纯化目的蛋白，SDS-PAGE 及 Western blot 分析表达产物；

生物素标记的抗人 APN 单克隆检测抗体的制备方法是：按照 Sigma 公司生产的抗体生物素化试剂盒标记抗人 APN 单克隆抗体 MAB1065。

3、一种如权利要求 1 所述人脂联素酶联免疫吸附检测试剂盒在人血 APN 含量检测中的应用。

## 人脂联素酶联免疫吸附检测试剂盒及其制备方法与应用

### 技术领域

本发明涉及一种人脂联素酶联免疫吸附检测试剂盒及其制备方法与应用，尤其是涉及一种检测人血清或血浆中脂联素酶联免疫吸附分析（ELISA）试剂盒及其制备方法与应用。

### 背景技术

脂联素（adiponectin, APN）是上世纪90年代中期，最早由 Scherer 等发现的一种重要的血浆激素蛋白(Scherer PE, Williams S, Fogliano M, 1995, A novel serum protein similar to C1q produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem*, 270: 26746-26749)。APN 亦称 Acrp30, AdipoQ 或 GBP28, 是脂肪组织分泌的一种特异性血浆蛋白质，在循环中含量丰富，血清浓度为 5~30mg/L, 约占人血清蛋白总量 0.01%, 比瘦素、皮质醇、白细胞介素-6 等血清蛋白水平高出 103~106 倍(Shimada K, Miyazaki T, Daida H, 2004, Adiponectin and atherosclerotic disease. *Clin Chim Acta*, 344: 1-12)。APN 主要生物学作用是调节机体的能量代谢，能促进葡萄糖、脂肪的分解代谢，改善胰岛素的敏感性。近年来越来越多的研究表明，APN 水平与肥胖、糖尿病、高血压、高脂血症、动脉粥样硬化、胰岛素抵抗等心血管危险因素密切相关，患者血清 APN 水平较健康人明显降低。APN 具有增强胰岛素敏感性、抗动脉粥样硬化（AS）形成、抗炎症和血管损伤后抗内膜增生的作用(Zhu W, Cheng KK, Vanhoutte PM, 2008, Vascular effects of adiponectin: molecular mechanisms and potential therapeutic intervention. *Clin Sci(Lond)*, 114:361-74)。因此，检测血中 APN 的含量，对于认识其生理学功能、调控机制及与 II 型糖尿病、冠心病、高血压等疾病发生发展的关系有重要意义。

目前，检测人血 APN 含量的方法主要有放射性免疫分析方法(RIA)及酶联免疫吸附方法（ELISA）两种，其中 RIA 由于放射污染和危害，已较少使用。ELISA 方法灵敏度高，特异性强，酶标记试剂比较稳定，而且易与其他相关技术偶联，因此应用广泛。但现有 ELISA 试剂盒价格高昂，使用操作也还尚欠方便，检测花费时间较长。

### 发明内容

本发明的目的在于提供一种使用操作简便，灵敏度高，特异性强，成本低的定量检测人血清或血浆中的 APN 浓度的 ELISA 试剂盒及其制备方法与应用。

本发明之 APN 定量 ELISA 试剂盒，其组成包括抗人 APN 单克隆抗体包被的酶标板，标准品冻干粉，检测抗体，酶标亲和素 HRP-链霉素，样本试剂稀释液，TMB 酶底物显色液，浓缩洗涤液 0.1M pH7.4 的磷酸盐缓冲液和终止反应液 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>，其中：

标准品冻干粉为重组的 gAPN 蛋白标准品；

检测抗体为生物素标记的抗人 APN 单克隆检测抗体；  
样本试剂稀释液为 10mM pH7.4 的磷酸盐缓冲液，其中含有 0.05%Tween-20；  
所述百分比为体积百分比。

所述 APN 定量 ELISA 试剂盒的制备方法：包括抗人 APN 单克隆抗体包被的酶标板、重组的 gAPN 蛋白标准品、检测抗体为生物素标记的抗人 APN 单克隆检测抗体的制备及 10mM pH7.4 的磷酸盐缓冲液和 0.1M pH7.4 的磷酸盐缓冲液及 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 的配制，其中：

重组的 gAPN 标准品的制备方法是：应用 PCR 方法获得脂联素球状结构域 gAPN 基因，构建 pET22b(+)/gAPN 重组表达质粒转化入大肠杆菌 BL21 菌株，IPTG 诱导表达 His-gAPN 融合蛋白，利用镍柱亲和层析法纯化目的蛋白，SDS-PAGE 及 Western blot 分析表达产物；

生物素标记的抗人 APN 单克隆检测抗体的制备方法是：按照 Sigma 公司生产的抗体生物素化试剂盒标记抗人 APN 单克隆抗体 MAB1065。

将本发明试剂盒应用于人血中 APN 含量的检测，包括以下操作步骤：

(1) 将浓度为 0.9375ng/ml-15ng/ml 的重组 gAPN 蛋白标准品溶液和按 1:2000 稀释的样本加入到相应的包被抗体的酶标板孔中，空白孔中只加入 100 $\mu$ l 样本稀释液；在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 30min，使样品或标准品中的 APN 与固相载体上的抗体结合，用洗涤液（以浓缩稀释液稀释 10 倍后使用）洗去未结合的杂蛋白和其他物质；

(2) 使已结合的 APN 与生物素化的抗 APN 单克隆检测抗体相结合，37 $^{\circ}$ C 下孵育 30 分钟后用洗涤液洗去多余的检测抗体；

(3) 再加入 HRP-链霉素溶液，37 $^{\circ}$ C 下孵育 20min，形成包被抗体-APN-检测抗体-HRP 标记链霉素复合物，然后用洗涤液洗去多余的 HRP-链霉素；

(4) 加入酶底物显色液，室温孵育反应 15min，终止酶反应后检测显色反应的强度。

与现有 APN 定量 ELISA 试剂盒相比，本发明有以下优点：(1) 血清或血浆样品只需 1:2000 倍稀释，操作方便；(2) 对检测各步骤的反应时间进行了优化，2h 内就能得到检测结果；(3) 具有相似的灵敏度（150pg/ml），且特异性高；(4) 成本低，仅为 500 元/96 孔板，便于临床大量使用。

附图说明

图 1 为 PCR 方法克隆的 gAPN 基因电泳图。

图中：1 为 gAPN 基因，2 为 DL2000marker

图 2 为 pET22b(+)/gAPN 重组表达质粒酶切鉴定电泳图。

图中：1 为 DL2000 marker，2 为 NdeI 和 XhoI 双酶切重组质粒 pET22b(+)/gAPN (5.4kb+400bp)，3 为 NdeI 和 XhoI 双酶切质粒 pET22b(+)，4 为 DL15000 marker

图 3A 纯化后的 His-gAPN 蛋白电泳图。

图中：1 为低分子量蛋白 marker，2 为 gAPN 重组蛋白；

图 3B 为 Western blot 分析图。

图中：1 为 gAPN 重组蛋白，2 为阴性对照

图 4 为双抗体夹心 ELISA 的标准曲线。

图中：横坐标为不同稀释度的标准品，纵坐标为相应的  $OD_{450nm}$  值。

图 5 为本发明试剂盒与深圳依诺金公司人 APN 浓度 ELISA 试剂盒检测 APN 结果比较。

图中：横坐标为本发明试剂盒的 APN 浓度检测结果，纵坐标为深圳依诺金试剂盒的 APN 浓度检测结果。

#### 具体实施方式

以下结合实施例对本发明作进一步详细说明。

#### 实施例 1：

本实施例的 APN 定量 ELISA 试剂盒，其组成包括：抗人 APN 单克隆抗体（MAB10651）包被的酶标板，标准品干粉，检测抗体，酶标亲和素，样本试剂稀释液，TMB 酶底物显色液，浓缩洗涤液和终止反应液。其中：

标准品冻干粉为重组的 gAPN 蛋白标准品；

检测抗体为生物素标记的抗人 APN 单克隆抗体（MAB1065）；

酶标亲和素为 HRP-链霉素,为 Invitrogen 公司产品分装；

TMB 底物显色液为 KPL 公司产品分装；

样本稀释液为 10mM pH7.4 的磷酸盐缓冲液，其中含有 0.05%Tween-20；

浓缩洗涤液为 0.1M pH7.4 的磷酸盐缓冲液，其中含有 0.05%Tween-20；

终止反应液为 2 M  $H_2SO_4$ ；

所述百分比为体积百分比。

APN 定量 ELISA 试剂盒的制备方法：

1、重组的 gAPN 蛋白标准品的制备：

##### (1) gAPN 基因的克隆

根据 Genbank 中所提供的人 APN mRNA 序列(Genbank 登记号 NM004797)，找到羧基端，针对 gAPN 的基因编码区设计引物，上下游引物 5'端分别携带 NdeI 和 XhoI 酶切位点，由上海生工公司合成。

上游引物：5'-CCCATATGTACCGCTCAGCATTCAGTGTG-3 ；

下游引物：5'-CGCTCGAGGTCATGGTAGAGAAGAAAGCCTGT-3。

以人脂肪组织 cDNA 为模板，PCR 扩增出大小为 412bp 的 gAPN 基因片段。PCR 反应条件为 95℃预变性 5min，95℃变性 30s，55℃退火 30s，72℃延伸 30s，共 30 个循环，72℃终止延伸 10min。

##### (2) pET22b(+)/gAPN 表达质粒的构建

利用 EcoR I 和 Xho I 分别酶切 gAPN 目的片段及 pET-22b(+)表达载体,将二者纯化回收后的连接产物转染 TG1,得到重组表达质粒 pET22b(+)/gAPN,重组质粒经限制性双酶切(参见图2)和 DNA 测序鉴定,阳性质粒转化 E.coli BL21 (DE3) 菌株。

### (3) gAPN重组蛋白的表达和纯化

挑取单个菌落,接种于50 ml含氨苄青霉素(Amp<sup>+</sup>)的LB培养液中37℃,250 rpm振荡过夜。次日按1:40体积比,取8ml接种到500ml Amp<sup>+</sup>的SBM培养基中,37℃,250rpm继续培养1h-2h,至OD<sub>600</sub>值约0.5-1.0,加入IPTG(终浓度0.6 mmol/L)于30℃,200rpm诱导2h,常规方法收集菌体,沉淀用10 ml裂解缓冲液重悬,经超声波裂解细胞,收集上清,分别取诱导前菌液,诱导后菌液,培养基上清,超声上清及沉淀进行SDS-PAGE电泳鉴定表达产物。用His镍亲和柱分离纯化收集的超声上清,纯化后的产物用考马斯亮蓝G-250测蛋白质浓度,行SDS-PAGE电泳和Western鉴定分析(见图3)。

### 2、生物素化抗体的制备:

将抗 APN 单抗 MAB1065 用 PBS 稀释成 1mg/ml,生物素标记按照 Sigma 公司的抗体生物素化试剂盒,操作方法参见其使用说明书。

(1) 用 30 $\mu$ l DMSO 溶解 BCA-SulfoNHS,加入 0.1mol/l 磷酸钠缓冲液至终体积为 0.5ml;涡旋均匀, BAC-SulfoNHS 终浓度为 10mg/ml;

(2) 按照每 1mg 样品加 38 $\mu$ l BAC-SulfoNHS 溶液,向 0.5mg MAB1065 中迅速加入 19 $\mu$ l BAC-SulfoNHS 溶液,边加边轻轻搅拌,使样品抗体溶液与 BAC-SulfoNHS 的摩尔比为 10:1;

(3) 将混合液在室温下避光 1,400rpm 轻轻振荡 30min;

(4) 用 PBS 溶液 30ml 分 6 次加入 Sephadex G25 凝胶过滤柱,以平衡凝胶过滤柱;

(5) 将反应混合液缓慢加入柱顶端,用离心管于柱底收集流穿组分;

(6) 以 9ml PBS 洗脱,以 1ml 为单位,分部收集留穿组分,重复 9 次;

(7) 用 BAC 法检测 10 次收集组分的蛋白含量;

(8) 合并含有蛋白的分部收集组分(理论上为第 4, 5 管),4℃保存;

(9) 用 15ml 的 0.01 mol/l PBS 分 3 次加入凝胶过滤柱来平衡与再生过滤柱,处理好的凝胶过滤柱保存在 4℃。

### 3、酶标板的包被

(1) 用包被液(0.05mol/L 碳酸缓冲液, pH9.6)将包被抗体(MAB10651)溶液稀释成 2 $\mu$ g/ml,混匀;待包被的酶标板微孔内每孔加入 100 $\mu$ l 2 $\mu$ g/ml 的抗体溶液;

(2) 酶标板封膜后 4℃下反应过夜;

(3) 倒掉包被的抗体溶液,洗版,每孔加入 300 $\mu$ l 10%小牛血清封闭液,37℃下封闭 2 小时;

(4) 倒掉封闭液,将酶标板真空干燥后,密封入带干燥剂的金属箔袋内,在 4℃下贮存。

## APN 定量检测的 ELISA 系统建立及使用

### (1) 酶标板条安装

已包被的酶标条板平衡至室温后，开启包装袋，取出所需用数目的酶标板条，牢固地安装在酶标板框架上，不需要的酶标板置于包装袋中，驱气密封好，放在 2-8℃ 下贮存。

### (2) 样品孵育

移取 100μl 浓度为 0.9375ng/ml-15ng/ml 的重组 gAPN 蛋白标准品溶液和按 1:2000 稀释的样本加入到相应的包被抗体的酶标板孔中，空白孔中只加入 100μl 样本稀释液；在 37℃ 下孵育 30 分钟。

### (3) 洗版

吸走或倒空孔中的液体，用自动洗板仪洗版，洗版 4 次后拍干。

### (4) 检测抗体孵育

每孔加入 100μl 检测抗体溶液；在 37℃ 下孵育 30 分钟，如步骤(3)洗板 4 次。

### (5) 酶标记亲和素孵育

每孔加入 100μl HRP-链霉素溶液；37℃ 下孵育 20 分钟，如步骤(3)洗板 4 次。

### (6) 底物反应显色

每孔加入 100μl TMB 酶底物/显色液，轻轻晃摇 30 秒钟，室温静置反应 15 分钟。

### (7) 终止反应检测

每孔加入 100μl 终止反应液，20 分钟内在酶标仪的 450nm 波长下测出每孔的吸光度值。

### (8) 计算结果

计算重复孔的平均吸光度值；以标准溶液系列的平均吸光度值对相应浓度进行线性回归，绘制标准曲线；由样品重复孔的平均吸光度值从标准曲线计算出样本中的 APN 含量，附标准曲线，如图 4 所示。

### 实施例 2：本发明试剂盒的分析内精密度 (CV%)

随机抽取三份临床标本血清，用上述 APN ELISA 试剂盒的使用方法测定并计算出样本中的 APN 浓度和方法的分析内精密度，检测结果如表 1：

表1 本发明试剂盒精密度试验

血清标本	NO.1	NO.2	NO.3
重复测定次数	10	10	10
APN浓度(mg/L)	1.24±0.11	3.48±0.13	10.86±0.62
CV(%)	8.87	3.73	5.71

检测结果表明，应用本发明的试剂盒的检测精密度符合ELISA质量指标的标准要求，分析灵敏度为150ng/ml，适用于实际临床检测。

### 实施例3：本发明试剂盒的方法学比较

随机取30份临床血清标本，同时应用本发明试剂盒与深圳依诺金公司的人APN 浓度ELISA 定量检测试剂盒进行检测，比较两者的相关性；结果两者相关性良好，相关系数  $r = 0.935$ ，

$P < 0.001$ , 直线回归方程为:  $Y = 0.972X + 1.157$ ,  $R^2 = 0.8737$  (见图5)。

实施例 4: 应用本发明的试剂盒检测 103 例确诊为冠心病患者 (男 81 例, 女 22 例) 和 58 例正常人 (男 29 例, 女 29 例) 血清中 APN 水平, 结果见表 5:

表2 161例临床血清标本APN检测结果

指标	正常对照组	冠心病组
例数	58	103
APN 浓度 (mg/L)	7.14(4.37-11.40)	5.67(2.59-10.47)
log(APN) (mg/L)	0.85±0.33	0.67±0.39*

注: 血清APN浓度不符合正态分布, 对其进行对数转换后统计分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  或中位数 (第1四分位数, 第3四分位数) 表示。两组均数采用t检验, \*表示显著差异 ( $P < 0.01$ )  
结果提示: 血清中APN浓度降低可作为判断CHD发病的一个指标。

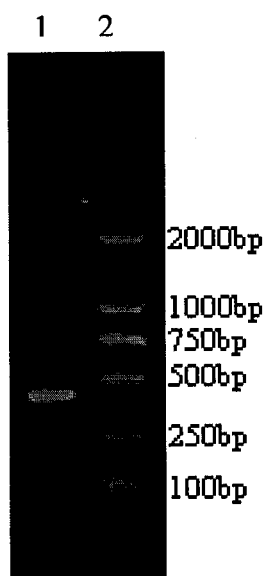


图 1

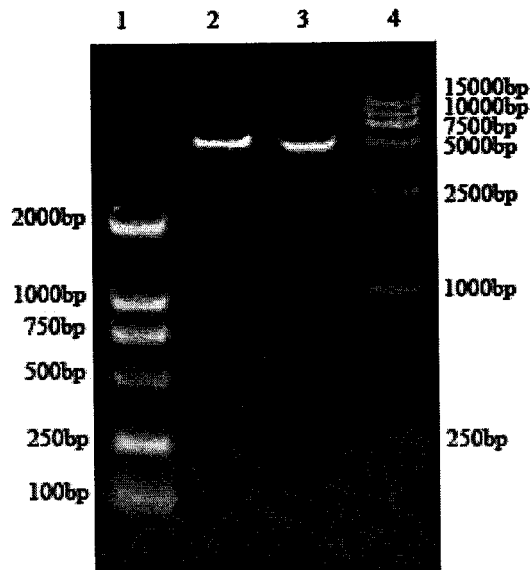


图 2

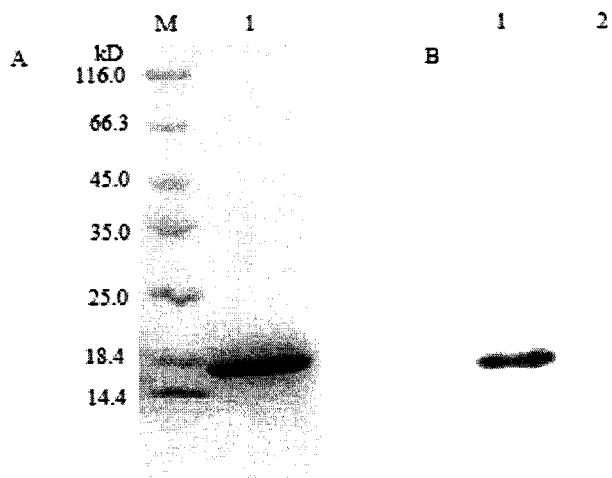


图 3A

图 3B

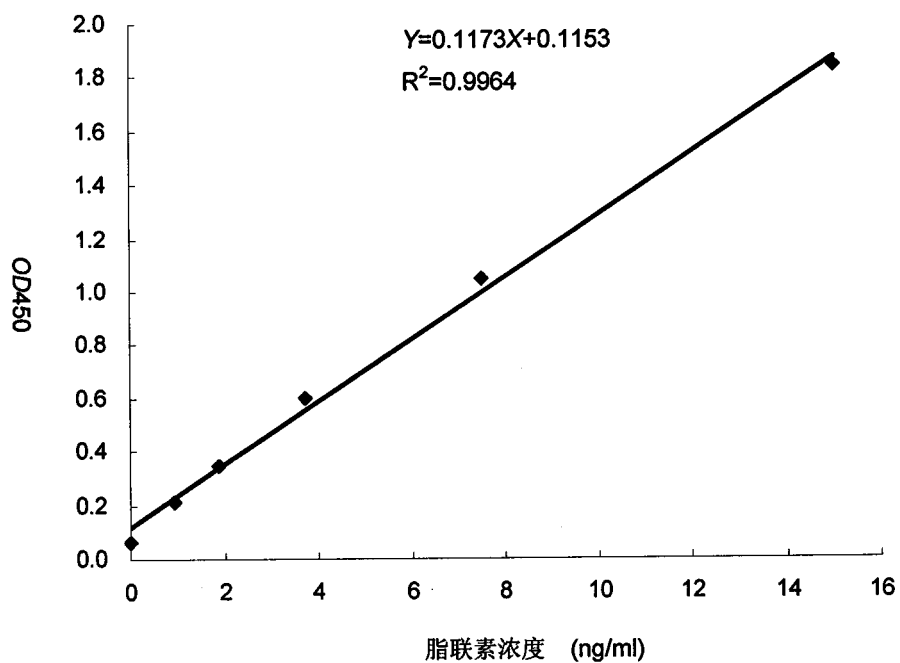


图 4

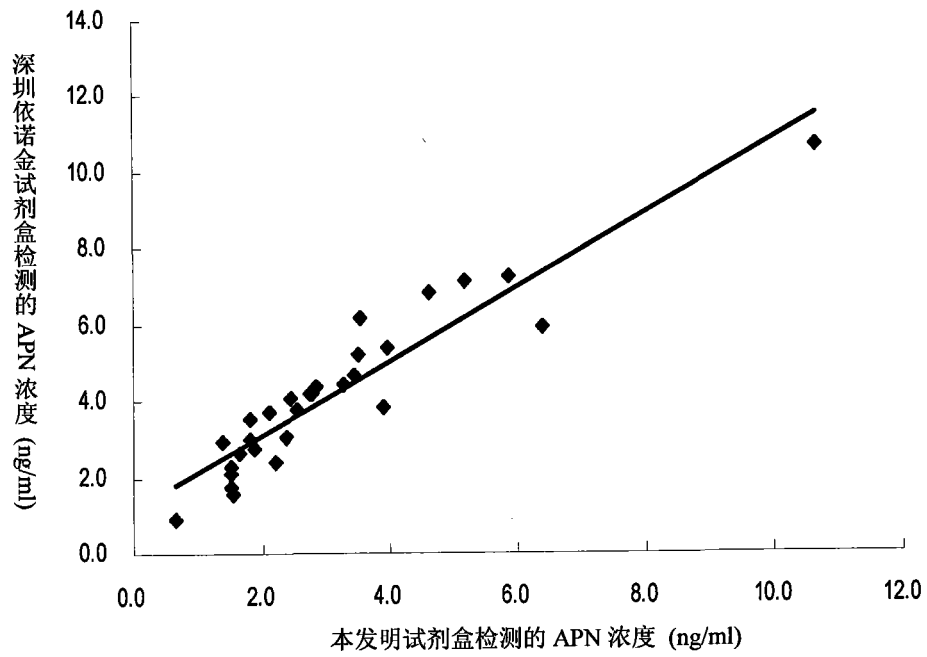


图 5

专利名称(译)	人脂联素酶联免疫吸附检测试剂盒及其制备方法与应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN101571546A</a>	公开(公告)日	2009-11-04
申请号	CN200910043672.X	申请日	2009-06-12
[标]申请(专利权)人(译)	袁洪		
申请(专利权)人(译)	袁洪		
当前申请(专利权)人(译)	袁洪		
[标]发明人	袁洪 李登清 陈琳磊 何笑恬 曹琳 金维荣		
发明人	袁洪 李登清 陈琳磊 何笑恬 曹琳 金维荣		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/543 G01N33/535		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

人脂联素酶联免疫吸附检测试剂盒及其制备方法与应用，所述试剂盒包括抗人APN单克隆抗体包被的酶标板，重组的gAPN蛋白标准品，抗人APN单克隆检测抗体，HRP - 链霉素，10mM pH7.4的磷酸盐缓冲液，TMB酶底物显色液，0.1M pH7.4的磷酸盐缓冲液及2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>。本发明还包括所述试剂盒的制备方法与在人血APN含量检测中的应用。本发明使用操作方便、快捷，2h内就能得到检测结果；特异性高，成本低，便于临床大量使用。

