



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105974143 A

(43)申请公布日 2016.09.28

(21)申请号 201610219116.3

(22)申请日 2016.04.08

(71)申请人 刘庆平

地址 116622 辽宁省大连市经济技术开发区金石滩优山美地琴海园45号楼1-202号

(72)发明人 刘庆平 张鹤 李敬达 王仁军

(74)专利代理机构 大连八方知识产权代理有限公司 21226

代理人 朱秀芬

(51)Int.Cl.

G01N 33/92(2006.01)

G01N 33/545(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书2页 说明书7页 附图3页

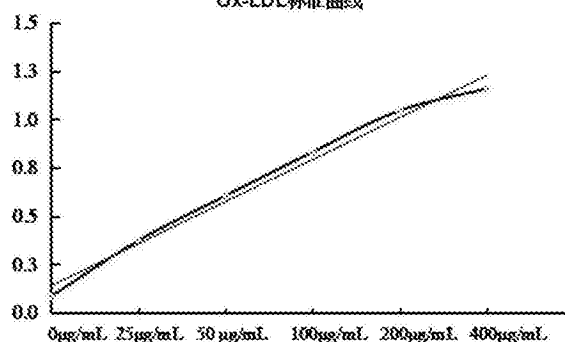
(54)发明名称

一种人体氧化低密度脂蛋白的酶联免疫检测试剂盒及其制备方法

(57)摘要

一种人体氧化低密度脂蛋白的酶联免疫检测试剂盒及其制备方法。本发明属于体外检测诊断试剂领域,具体涉及一种人体内的Ox-LDL含量测定的试剂盒及制备与应用。其包括固相化有特异性结合氧化低密度脂蛋白新型配体结构的重组蛋白P.rβ2-GPI-DV或E.coli重组蛋白rβ2-GPI-DV的酶标板、不同浓度的氧化低密度脂蛋白标准对照样品、质控品、酶标记的抗体、稀释液、清洗液、显色液A、显色液B和终止液。本发明所使用的酵母重组蛋白P.rβ2-GPI-DV或E.coli重组蛋白rβ2-GPI-DV通过结合oxLDL新型配体识别位点检测的Ox-LDL是具有致动脉粥样硬化、心血管疾病、非酒精性脂肪性肝病炎症反应的致病性Ox-LDL,对于伴有动脉粥样硬化、脂质代谢异常以及炎症反应特质的疾病的精准辅助诊断具有应用价值,本发明所用检测仪器简单,检测成本低,非专业人员即可实现检测操作。

Ox-LDL标准曲线



1. 一种人体氧化低密度脂蛋白的酶联免疫检测试剂盒, 其特征在于, 其包括固相化有特异性结合氧化低密度脂蛋白的重组蛋白的酶标板、不同浓度的氧化低密度脂蛋白标准对照样品、质控品、酶标记的抗体、稀释液、清洗液、显色液A、显色液B、终止液;

其中, 固相化有特异性结合氧化低密度脂蛋白的重组蛋白的酶标板中的酶标板为聚苯乙烯的96微孔板、固相化的特异性重组蛋白为酵母重组表达的重组蛋白P.r β 2-GPI-DV或E.coIi重组蛋白r β 2-GPI-DV, 试剂盒微孔板上固相化的重组蛋白的数量为50ug/孔;

质控品为含有5%蔗糖的0.5U和20U的氧化低密度脂蛋白纯品各2支, 每支5mI, 其中1U定义为2.5ug;

酶标记的抗体为辣根过氧化物酶标记的羊抗人抗apoB抗体, 辣根过氧化物酶标记的抗apoB抗体为1支、10uI;

不同浓度的氧化低密度脂蛋白标准对照样品为6支、各2mI, 氧化低密度脂蛋白标准对照品均为氧化低密度脂蛋白的纯品与氧化低密度脂蛋白标准品稀释液按照0U、1U、2U、4U、8U、16U稀释而成, 氧化低密度脂蛋白标准品稀释液是在PH 7.4的磷酸盐缓冲液中, 分别加入5%的蔗糖及1U、2U、4U、8U、16U的氧化低密度脂蛋白, 1U定义为25 μ g;

稀释液为是PH7.4的磷酸盐缓冲液, 10mI、1支;

清洗液为每升含5mI吐温20的磷酸盐缓冲液, 50mI, 1支;

显色液A是在1M的柠檬酸盐溶液中加入质量分数为1%的30%的过氧化氢, 5mI、1支;

显色液B是每升中含有10ug的OPD水溶液, 10mI、1支;

终止液是2N的浓硫酸溶液, 10mI、1支。

2. 根据权利要求1所述的一种人体氧化低密度脂蛋白的酶联免疫检测试剂盒, 其特征在于, 其制备方法为:

(1) 氧化低密度脂蛋白纯品的制备:

①. 取准确浓度的低密度脂蛋白一定体积数量, 加入到灭菌培养瓶中;

②. 加入500uMCuSO₄ • 5H₂O, 使其终浓度达到5uM;

③. 再加入1M的磷酸盐缓冲液(PBS), 加入的体积分数为89%; 培养瓶盖半松情况下, 37℃, 孵育8h, 在培养4h后拿出培养瓶摇晃一下;

④. 孵育8h后加入硫酸铜体积一半量的EDTA终止氧化;

⑤. 将终止氧化的氧化液装入准备好的透析袋中, 100℃沸水煮3次, 3min/次;

⑥. 放入透析液中, 透析液为含有0.5% 200mMEDTA的1M磷酸盐缓冲液;

⑦. 将透析袋及透析液放入4℃环境下, 每4h更换一次透析液, 更换5次;

⑧. 完成透析后将透析袋中的液体经超滤管浓缩、TBARS、BCA测定后4℃保存;

(2) 氧化低密度脂蛋白标准品的制备:

标准品1: 含有5%的蔗糖;

标准品2: 含有5%的蔗糖, 1U/mI的氧化低密度脂蛋白纯品;

标准品3: 含有5%的蔗糖, 2U/mI的氧化低密度脂蛋白纯品;

标准品4: 含有5%的蔗糖, 4U/mI的氧化低密度脂蛋白纯品;

标准品5: 含有5%的蔗糖, 8U/mI的氧化低密度脂蛋白纯品;

标准品6: 含有5%的蔗糖, 16U/mI的氧化低密度脂蛋白纯品;

(3) 氧化低密度脂蛋白质控品的制备:

质控品1:含有5%的蔗糖,2.5U/mI的氧化低密度脂蛋白纯品;

质控品2:含有5%的蔗糖,10U/mI的氧化低密度脂蛋白纯品;

(4)固相化有特异性结合氧化低密度脂蛋白的重组蛋白P.r β 2-GPI-DV或E.coIi重组蛋白r β 2-GPI-DV微孔板的制备:将浓度为1mg/mI的特异性结合氧化低密度脂蛋白的重组蛋白用PH9.6浓度1M碳酸盐缓冲液稀释到浓度为50ug/mI,加入到微孔板中50uI/孔,4℃相化12h;然后使用清洗液清洗微孔板4次,每次振摇2min;倾去包被液,甩干板,再向微孔板中加入1%geIatin溶液,200uI/孔进行37℃,1h封闭;倾去封闭液,等待微孔板干燥后,加入干燥剂的真空袋封装,既得到固相化有特异性结合氧化低密度脂蛋白的重组蛋白P.r β 2-GPI-DV或E.coIi重组蛋白r β 2-GPI-DV的微孔板,置于4℃保存。

3.根据权利要求1或2所述的一种人体氧化低密度脂蛋白的酶联免疫检测试剂盒,其特征在于,试剂盒的使用方法包含以下步骤:

(1)样品稀释:使用稀释液按照要求将待测样品以1:10-1:100的比例稀释;

(2)溶液配制:

标准品和质控品,复溶;

酶标记的抗apoB抗体工作液:用稀释液将酶标的抗体稀释1000~5000倍;

清洗工作液:用超纯水将10X的清洗液稀释到1X的清洗工作液;

(3)取固相化有特异性结合氧化低密度脂蛋白的重组蛋白P.r β 2-GPI-DV或E.coIi重组蛋白r β 2-GPI-DV的微孔板,室温平衡30min后,用清洗工作液洗涤4次,备用;

(4)加样:取标准品、质控品、稀释好的样品分别加入微孔板,每孔100uI,37℃下孵育1h,用清洗液洗涤4次,每次振摇1min;

(5)加入酶标记的抗体:将酶标记的抗apoB抗体1:1000稀释后垂直加入微孔板底部,50uI/孔,37℃下孵育1h,用清洗液洗涤4次,每次振摇1min;

(6)加入显色剂:显色液A、显色液B以1:9的比例分别加入微孔板,共计100uI/孔,室温避光孵育15min;

(7)加入终止液:100uI/孔;

(8)测定吸光度:在酶标仪下测定492nm下的吸光度值,测定要求在终止反应后30min中内完成。

4.根据权利要求3所述的一种人体氧化低密度脂蛋白的酶联免疫检测试剂盒,其特征在于,试剂盒在制备抗磷脂综合征、系统性红斑狼疮、动脉粥样硬化、急性心肌梗塞、非酒精性脂肪性肝病、高脂血症、糖尿病和高血压等疾病诊断试剂的应用。

一种人体氧化低密度脂蛋白的酶联免疫检测试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于体外检测诊断试剂领域,具体涉及一种人体内的氧化低密度脂蛋白Ox-LDL含量检测的试剂盒及制备与应用。

背景技术

[0002] 低密度脂蛋白LDL是一种存在于血浆中的载脂蛋白,核心组分是甘油三酯和胆固醇脂,表面分布着载脂蛋白aPO-B、游离胆固醇和磷脂。在体内活性氧、细胞、过渡金属、铜蓝蛋白、过氧化物酶、血红素、叶绿素以及外界一些敏感因素如,吸烟、药物、糖尿病和高血压等的氧化修饰作用下形成Ox-LDL。在Ox-LDL氧化衍生物中氧化磷脂、氧化固醇及修饰改变的apoB抗体是其发挥致病性的关键因素。

[0003] 众多研究指向OxLDL是引发动脉粥样硬化、心血管疾病、自身免疫性心血管疾病及非酒精性脂肪肝病肝炎的生物标记物。Ox-LDL作为动脉粥样硬化剂心血管疾病的独立危险因子,广泛存在于疾病病灶及患者血液中,通过引起内皮损伤、血管壁增厚、脂质沉积、血酸形成等系列病例改变贯穿于整个疾病的病程;近年研究发现,自身免疫性疾病中的抗磷脂综合症(APS)及系统性红斑狼疮(SLE)患者血液中含有大量的Ox-LDL,可与血液中的糖蛋白 β 2-GPI、抗 β 2-GPI抗体形成免疫三元复合物,发挥促泡沫细胞形成的病理机制,参与动脉粥样硬化灶的形成[1,2],近年研究更加显示OxLDL可能是脂肪肝尤其是非酒精性脂肪肝肝病中引发氧化应激、炎症后导致肝炎的脂质代谢危险因子因此,人血液、血清以及体液等Ox-LDL含量的准确检测对心血管疾病及脂代谢障碍性疾病的预防、监测及早期诊断意义重大。

[0004] 目前,现有技术中,已经公开了一些相关的检测方法,通过半定量或定量的方式实现Ox-LDL检测,如:专利申请号为:200710202084.7,201210160797.2,201510263037.8,

[0005] 以上公开的发明技术中,检测所使用的关键包被固相主体是抗氧化低密度脂蛋白的单克隆抗体。然而氧化低密度脂蛋白OxLDL在血液和病灶间的流动性及氧化修饰程度、氧化修饰衍生物成份复杂的特点,OxLDL在体内以成份不均一的复合物形式存在,其氧化修饰衍生物是其发挥致病新的关键因素,如何准确达到识别致病OxLDL的氧化衍生物配体,达到精准检测OxLDL及对动脉粥样硬化、心血管疾病、自身免疫性APS和SLE以及非酒精性脂肪肝等疾病发展进程中的辅助应用是本发明的目的。

发明内容

[0006] 本发明的技术方案提供了一种可以特异性结合致巨噬细胞泡沫化以及产生炎症因子的致病性Ox-LDL检测的新技术,这项技术的核心是一种酵母表达P.r β 2-GPI-DV重组蛋白特异识别致病性OxLDL表面配体,该表面配体具有介导致病性OxLDL激发巨噬细胞和肝细胞等表面受体和胞内受体,引发细胞脂质代谢的异常变化导致动脉粥样硬化、心血管和脂质代谢等疾病发生。该发明技术检测原理清晰,操作简单、涉及的实验仪器单一、价格低廉以及具有精准检测OxLDL识别位点的特质,是临床心血管疾病、伴发动脉粥样硬化自身免疫

性疾病及脂代谢障碍性疾病诊断有价值的辅助诊断检测试剂盒。

[0007] 一种人体氧化低密度脂蛋白oxLDL的酶联免疫检测试剂盒,包括固相化有特异性结合oxLDL的重组蛋白的酶标板、不同浓度的oxLDL标准对照样品、质控品、酶标记的抗体、稀释液、清洗液、显色液A、显色液B和终止液。

[0008] 进一步的,所述的酶标板为聚苯乙烯的96微孔板;所述的固相化的特异性重组蛋白为酵母重组表达的P.rβ2-GPI-DV蛋白;所述的酶标记的抗体为辣根过氧化物酶标记的羊抗人的抗apoB抗体;所述的稀释液为磷酸盐缓冲液;所述的清洗液为含有吐温20的磷酸盐缓冲液;所述的显色液A为过氧化氢的柠檬酸盐缓冲液;所述的显色液B为邻苯二胺(OPD)溶液;所述的终止液为硫酸溶液。

[0009] 进一步的,所述试剂盒微孔板上固相化的重组蛋白的样品量为50ug/孔;所述的氧化低密度脂蛋白oxLDL标准对照品为6支、各2mI;所述的质控品5mI、2支;所述的辣根过氧化物酶标记的羊抗人抗apoB抗体1支、10uI;所述稀释液10mI、1支;所述清洗液50mI、1支;所述的显色液A5mI、1支,显色液B 10mI、1支;所述的终止液10mI、1支。

[0010] 进一步的,所述的氧化低密度脂蛋白oxLDL标准对照品均为氧化低密度脂蛋白的纯品与氧化低密度脂蛋白标准品稀释液按照比例稀释而成。所述质控品和标准对照品的区别只是浓度不同,所述质控品的设立目的是通过质控品检测值是否在质控范围内来对标准品拟合曲线进行核准校对,若质控品合格,则可用标准曲线对检测样品进行拟合计算样品中氧化低密度脂蛋白的浓度,若质控品不合格,则试剂盒无法准确进行检测拟合。

[0011] 进一步的,所述的氧化低密度脂蛋白标准品稀释液是在PH 7.4的磷酸盐缓冲液中,分别加入5%的蔗糖及1U、2U、4U、8U、16U的氧化低密度脂蛋白;所述的氧化低密度脂蛋白质控品是0.5U和20U的氧化低密度脂蛋白纯品;所述的1U定义为25μg。

[0012] 进一步的,所述的稀释液是PH7.4的磷酸盐缓冲液;所述的清洗液是每升含5mI的吐温20;所述的显色液A是在1M的柠檬酸盐溶液中加入质量分数为1%的30%的过氧化氢;显色液B是每升中含有10ug的OPD水溶液;所述的终止液是2N的浓硫酸溶液。

[0013] 制备如上任意所述的试剂盒方法,包括以下制备方法,不分前后顺序:

[0014] 特异性结合氧化低密度脂蛋白oxLDL的P.rβ2-GPI-DV重组蛋白的制备:将目的基因重组到X-33的酵母重组表达菌株中,在甲醇诱导下产生重组表达蛋白rβ2-GPI-DV,镍柱亲和层析获得纯化蛋白冻干成粉后于-80℃保存;

[0015] 氧化低密度脂蛋白纯品的制备:取低密度脂蛋白,溶解于1M的磷酸盐缓冲液中,低密度脂蛋白的浓度为1mg/mI;在此溶液中加入硫酸铜,使其终含量为1%,37℃;8h。

[0016] 固相化有重组蛋白微孔板的制备:将浓度为1mg/mI的特异性结合氧化低密度脂蛋白的重组蛋白P.rβ2-GPI-DV用PH9.6浓度1M碳酸盐缓冲液稀释到浓度为50ug/mI,加入到微孔板中50uI/孔,4℃固相化12h;然后使用清洗液清洗微孔板4次,每次振摇2min;倾去包被液,甩干板,再向微孔板中加入1%geIatin溶液,200uI/孔进行37℃,1h封闭;倾去封闭液,等待微孔板干燥后,加入干燥剂的真空袋封装,既得到固相化有重组蛋白的酶标板,置于4℃保存。

[0017] 氧化低密度脂蛋白对照标准品和质控品的制备:

[0018] (1)氧化低密度脂蛋白纯品的制备:

[0019] ①.取准确浓度(100ug/mI)的低密度脂蛋白一定体积数量(过滤灭菌),加入到灭

菌培养瓶中；

[0020] ②.加入500uMCuSO₄ • 5H₂O,使其终浓度达到5uM(过滤灭菌)；

[0021] ③.再加入1M的磷酸盐缓冲液(PBS,过滤灭菌),加入的体积分数为89%；培养瓶盖半松情况下,37℃,孵育8h。在孵育4h后拿出培养瓶摇晃一下后继续孵育至8h；

[0022] ④.孵育8h后加入硫酸铜体积一半量的EDTA终止氧化；

[0023] ⑤.将终止氧化的氧化液装入准备好的透析袋中(100℃沸水煮3次,3min/次)；

[0024] ⑥.放入透析液中(含有0.5%200mM EDTA的1M磷酸盐缓冲液)；

[0025] ⑦.将透析袋及透析液放入4℃环境下,每4h更换一次透析液,更换5次；

[0026] ⑧.完成透析后将透析袋中的液体经超滤管浓缩、TBARS、BCA测定后过滤灭菌4℃保存；

[0027] (2)氧化低密度脂蛋白标准品的制备：

[0028] 标准品1:含有5%的蔗糖；

[0029] 标准品2:含有5%的蔗糖,1U/mI的氧化低密度脂蛋白纯品；

[0030] 标准品3:含有5%的蔗糖,2U/mI的氧化低密度脂蛋白纯品；

[0031] 标准品4:含有5%的蔗糖,4U/mI的氧化低密度脂蛋白纯品；

[0032] 标准品5:含有5%的蔗糖,8U/mI的氧化低密度脂蛋白纯品；

[0033] 标准品6:含有5%的蔗糖,16U/mI的氧化低密度脂蛋白纯品；

[0034] (3)氧化低密度脂蛋白质控品：

[0035] 质控品1:含有5%的蔗糖,2.5U/mI的氧化低密度脂蛋白纯品；

[0036] 质控品2:含有5%的蔗糖,10U/mI的氧化低密度脂蛋白纯品；

[0037] 样本稀释液的配制:1M的磷酸盐缓冲液；

[0038] 清洗液的配制:含有0.05%的1M的磷酸缓冲液；

[0039] 显色液A:含有1%的浓度为30%的过氧化氢的1M柠檬酸盐缓冲液；

[0040] 显色液B:每升中含有10ugOPD的水溶液；

[0041] 终止液:2N硫酸溶液。

[0042] 本发明提供了前期所述试剂盒的使用方法,它包含以下步骤：

[0043] (1)样品稀释:使用稀释液按照要求将待测样品以1:10-1:100的比例稀释；

[0044] (2)溶液配制：

[0045] 标准品和质控品,复溶；

[0046] 酶标记的抗apoB抗体工作液:用稀释液将酶标抗体稀释1000~5000倍；

[0047] 清洗工作液:用超纯水将10X的清洗液稀释到1X的清洗工作液；

[0048] (3)取固相化有特异性的重组蛋白的酶标板,室温平衡30min后,用清洗工作液洗涤4次,备用；

[0049] (4)加样:取标准品、质控品、稀释好的样品分别加入微孔板,每孔100uI,37℃下孵育1h,用清洗液洗涤4次；

[0050] (5)加入酶标记的抗体:将酶标记的抗apoB抗体1:1000稀释后垂直加入微孔板底部,50uI/孔,37℃下孵育1h,用清洗液洗涤4次；

[0051] (6)加入显色剂:显色液A、显色液B以1:9的比例分别加入微孔板,共计100uI/孔,室温避光孵育15min；

[0052] (7)加入终止液:100uI/孔;

[0053] (8)测定吸光度:在酶标仪下测定492nm下的吸光度值,测定要求在终止反应后30min中内完成。

[0054] 本发明的有益效果:本发明试剂盒提供了与Ox-LDL特异性结合的重组蛋白,该蛋白是一种重组人源P.r β 2-GPI-DV蛋白,此蛋白能与Ox-LDL新型识别位点oxLig-1特异性结合。Ox-LDL氧化新型识别位点oxLig-1作为巨噬细胞和肝细胞表面清道夫受体CD36的亲配体以及胞内核转录因子PPARs的配体,介导oxLDL激活下游炎症因子NF- κ B的活化、氧化应激及胆固醇的外流调节,进而促进疾病发生和炎症病灶的产生。因此,本发明所使用的重组蛋白P.r β 2-GPI-DV通过结合新型识别位点检测的Ox-LDL是具有致动脉硬化及炎症反应的致病性Ox-LDL;具有精准检测的特性,对于伴有动脉粥样硬化、脂质代谢异常及炎症反应特质的心血管疾病和非酒精性脂肪肝等疾病的诊断具有应用价值和良好的市场应用前景,同时,本发明由于所用的检测仪器较为简单,均为通常所用仪器,故检测成本较低,利于推广;并且该试剂盒容易操作,不需要专业的人员即可实现;同时试剂盒内配套标准品稀释液和样本缓冲液配方,有助于提高检测结果的标准可靠性和准确性。

附图说明

[0055] 图1是实施例1重组蛋白与oxLDL特异性配体识别位点oxLig-1的分子对接图

[0056] 图2实施例2、实施例4的冷风吹干固相化图

[0057] 图3是实施例3的微孔板固相化图

[0058] 图4是实施例6氧化低密度脂蛋白标准对照品标准曲线绘制图

[0059] 图5是实施例7的最优酶标抗体稀释度检测样本图

[0060] 图6是实施例8发明试剂盒的临床应用结果图。

具体实施方式

[0061] 实施例1:重组蛋白与特异性识别位点oxLig-1的分子对接:

[0062] (1)从蛋白质数据库(Protein Data Bank)中获得含配体的 β 2-GPI-DV复合物的晶体结构(PDB编号分别为3OP8)。将配体从复合物中剥离抽出,将受体导入到AUTODOCK 4.2.6软件包中进行必要的结构修改,包括去除水分子、加入氢原子以及加入Gasteiger-Marsili电荷等;

[0063] (2)利用AutoDock 4.2.6软件包对受体 β 2-GPI-DV和oxLig-1分子进行半柔性对接;分子对接中 β 2-GPI-DV与oxLig-1分子按1:1比例结合;在进行半柔性对接模拟前,使用AUTOGRIID计算网格,每一次对接所用的网格长、宽和高均为100个网格点,网格包含oxLig-1分子可能作用的所有活性氨基酸残基;

[0064] (3)模拟对接过程中 β 2-GPI-DV结构视为刚性,oxLig-1分子为柔性,oxLig-1分子内的旋转键由AUTODOCK程序识别并可以在搜索过程中任意旋转,分子对接在AutoDock软件包中进行,对接使用Lamarckian遗传算法与局部能量搜索相结合(GALS)对 β 2-GPI-DV-oxLig-1复合物构象进行搜索。

[0065] 实施例2:固相化有重组 β 2-GPI-DV蛋白的微孔板的制备

[0066] (1)P.r β 2-GPI-DV重组蛋白的制备

[0067] P.r β 2-GPI-DV重组蛋白是毕赤酵母体系表达的重组蛋白,重组表达过程如下:将保存于-80的x-33菌株取出,以1:10的比例接种于生长培养基(BMGY)中,经过29℃,240的摇菌生长;再以1:50的比例扩大培养,相同条件培养24h后;浓缩至诱导培养基中(BMMY)诱导表达,每天补加浓缩液的1%的甲醇,连续诱导72h后,收取菌液上清;经镍柱亲和层析获得高纯度的 β 2-GPI-DV蛋白,将P.r β 2-GPI-DV制备成冻干粉,-80℃保存。

[0068] (2)P.r β 2-GPI-DV微孔板的固相化

[0069] 将浓度为1mg/mL的特异性结合氧化低密度脂蛋白的P.r β 2-GPI-DV重组蛋白用PH9.6浓度1M碳酸盐缓冲液稀释到浓度为50ug/mL,加入到微孔板中50uL/孔,4℃固相化12h;然后使用清洗液清洗微孔板4次,每次振摇2min;倾去包被液,甩干板,再向微孔板中加入1%gelatin溶液,200uL/孔进行37℃,1h封闭;倾去封闭液,等待微孔板干燥后,加入干燥剂的真空袋封装,既得到固相化有重组蛋白的酶标板,置于4℃保存。

[0070] 实施例3:固相化有E.coli重组r β 2-GPI-DV蛋白的微孔板的制备

[0071] 该实施例里面的制备步骤与实施例2基本相同,不同的是:

[0072] 步骤(1) β 2-GPI-DV重组蛋白的制备, β 2-GPI-DV重组蛋白原核体系表达的重组蛋白,重组表达过程如下:将保存于-80的原核 β 2-GPI-DV蛋白表达菌株取出,以1:10的比例接种于生长培养基LB中,经过37℃,4h的摇菌生长;再加入终浓度5mg/mL的IPTG诱导,连续诱导5h后,弃上清收取菌体;超声破碎后,经镍柱亲和层析获得高纯度的r β 2-GPI-DV蛋白。

[0073] 实施例4:固相化有E.coli重组r β 2-GPI-DV蛋白的微孔板的制备

[0074] 该实施例与实施例2基本相同,不同的是:

[0075] 步骤(2)微孔板固相化中的,将r β 2-GPI-DV重组蛋白加入到微孔板后,以冷风吹干、冻干的方式进行蛋白的固相化。

[0076] 实施例5:通过以下方法制备该试剂盒

[0077] 固相化重组蛋白 β 2-GPI-DV的制备:与实施例2相同;

[0078] 重组 β 2-GPI-DV蛋白固相化的微孔板的制备:与实施例2相同;

[0079] 样本稀释液的制备:1M磷酸盐缓冲液,PH7.4;将氯化钠8g,氯化钾0.2g,硫酸氢二钠1.42g,磷酸二氢钾0.27g溶解于1L超纯水中,配制成浓度1M的磷酸盐缓冲液;

[0080] 清洗液的制备:含有0.05%吐温20,浓度为1M的磷酸盐缓冲液;

[0081] 显色液A:1M柠檬酸缓冲液;每升中含有86.1g的柠檬酸,173.46g的柠檬酸钠水溶液;在1M柠檬酸缓冲液中加入体积分数为1%的30%的过氧化氢;

[0082] 显色液B:将10ug的OPD溶解于1L的超纯水中;

[0083] 终止液:54mL的浓硫酸缓慢倒入946mL的超纯水中得到2N硫酸溶液;

[0084] 实施例6:不同浓度的氧化低密度脂蛋白标准对照样品标准曲线的绘制:

[0085] (1)按照氧化低密度脂蛋白标准对照样品0U、1U、2U、4U、8U、16U的浓度要求,使用1mL/L,PH7.4的磷酸盐缓冲液将氧化低密度脂蛋白纯品稀释待用;

[0086] (2)固相化有特异性结合氧化低密度脂蛋白重组蛋白的微孔板制备:浓度为1mg/mL的特异性结合氧化低密度脂蛋白的重组蛋白用PH9.6浓度1M碳酸盐缓冲液稀释到浓度为50ug/mL,加入到微孔板中50uL/孔,4℃固相化12h;然后使用清洗液清洗微孔板4次,每次振摇2min;倾去包被液,甩干板,再向微孔板中加入1%gelatin溶液,200uL/孔进行37℃,1h封闭;倾去封闭液;使用清洗液清洗微孔板4次,每次振摇2min,倾去清洗液,甩干板;

- [0087] (3)点加样品:将(1)中准备好的氧化低密度脂蛋白标准对照品分别加入到(2)中准备好的微孔板中,每个浓度三个孔,37℃孵育1h;
- [0088] (4)使用清洗液清洗微孔板4次,每次振摇2min;倾去清洗液,甩干板;
- [0089] (5)加入酶标记的抗apoB抗体,37℃孵育1h;
- [0090] (6)使用清洗液清洗微孔板4次,每次振摇2min;倾去清洗液,甩干板;
- [0091] (7)将显色液A、B以1:9的比例配制,充分混匀,加入到微孔板共100uI,室温显色15min;
- [0092] (8)加入100uI的2N硫酸终止液;
- [0093] (9)酶标仪492nm处测定吸光度值;
- [0094] (10)6个浓度的氧化低密度脂蛋白标准对照品的吸光度值绘制标准曲线,其中标准曲线的相关系数为0.987
- [0095] 实施例7:通过以下方法进行质控品和样本的检测:
- [0096] (一)检测前准备:
- [0097] (1)测定前提前30min从4℃取出试剂盒,室温下平衡后,用清洗工作液洗涤4次,备用;
- [0098] (2)将清洗工作液:用超纯水将10X的清洗液稀释到1X的清洗工作液;
- [0099] (3)标准品和质控品,复溶;
- [0100] (4)酶标记的抗apoB抗体工作液:用稀释液将酶标抗体稀释1000倍;
- [0101] (5)显色液配制:将显色液A、B以1:9的比例配制,充分混匀,如1mI显色液A加9mI显色液B,临用前配制。
- [0102] (二)测定
- [0103] (6)样品稀释:用稀释液将样品稀释10-100倍;
- [0104] (7)加样:取标准品、质控品、稀释好的样品分别加入微孔板,每孔100uI,37℃下孵育1h;
- [0105] 洗板方法:
- [0106] 自动洗板:要求每次每孔注入洗涤液300uI,注入与吸出时间间隔1min;
- [0107] 手动洗板:倾去孔内液体,每孔加入300uI洗涤液,振摇1min后,甩掉孔内液体,在吸水纸上拍干;
- [0108] (8)用稀释好的清洗液洗板4次;
- [0109] (9)加入酶标记的抗体:将酶标记的抗apoB抗体1:1000~1:5000的比例稀释后垂直加入微孔板底部,50uI/孔,37℃下孵育1h;
- [0110] (10)用清洗液洗涤板4次;
- [0111] (11)加入显色剂:将配置好的显色液混合物加入微孔板,共计100uI/孔,室温避光孵育15min;
- [0112] (12)加入终止液:100uI/孔;
- [0113] (13)测定吸光度:在酶标仪下测定492nm下的吸光度值,测定要求在终止反应后30min中内完成。
- [0114] (三)测定结果计算
- [0115] (14)计算标准品、质控品和检测样品的平均吸光度值;

[0116] (15)以0U/mI的标准品为空白对照,标准品、质控物和样品的光吸收值应减去空白对照的光吸收值;

[0117] (16)使用对数线性图纸,以标准品浓度的对数为横轴,光吸收值的对数为纵轴,绘制Ox-LDL浓度-光吸收值双对数剂量-反应曲线;

[0118] (17)根据稀释的待测样品光吸收值从剂量-反应曲线上查出稀释样品的OxLDL浓度;

[0119] (18)样品中Ox-LDL的最终浓度等于稀释样品的浓度乘以稀释倍数;

[0120] (19)如果样品的光吸收值高于16U/mI或低于1U/mI标准品的光吸收值,可适当延长曲线进行计算,外推因子(Extrapolation Factor)不超过2;

[0121] 表1实施例5样品检测结果

[0122]

0.842	0.641	0.846	0.655	0.759	0.793	0.989	0.841
0.722	0.732	0.755	0.812	0.858	0.88	0.876	0.893

[0123] 从表1可以看出,质控品1、2的检测值均在靶值范围内,所以可以确定结果可信;,样品的检测值标准偏差比较,CV%不高于15%,说明该技术发明有很好的重复性。

[0124] 实施例8:本发明试剂盒的临床应用

[0125] 采用该发明技术的试剂盒,检测了100例正常受试者及50例心梗患者血清Ox-LDL,结果显示,100例受试者血清Ox-LDL含量为 25.79 ± 3.89 U/mI,心梗患者血清Ox-LDL含量为 46.58 ± 6.03 U/mI,二者有显著性差异(0.003),可快速、精准的诊断冠心病、心梗患者血清OxLDL水平,同时实验显示与心梗患者的征象诊断成正比关系。

[0126] 以上的实施例为较佳实施例,并不用以限制本发明,应该理解为凡基于本发明上述内容所作的任何修改、等同替换、改进等均属于本发明的范围。

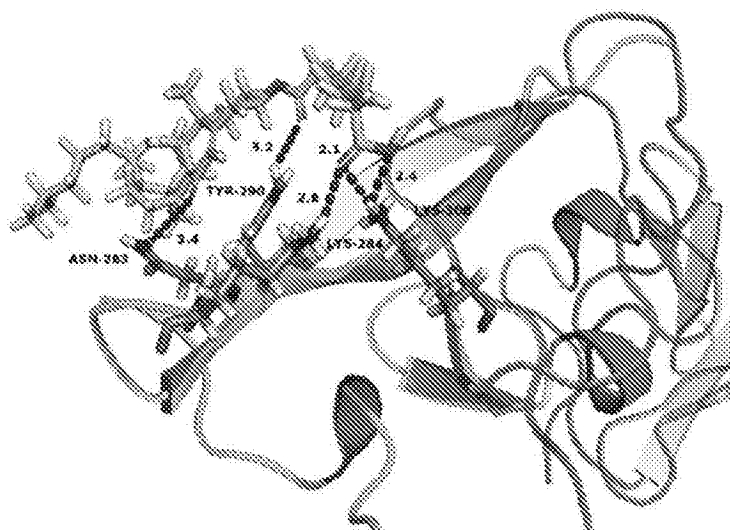


图1

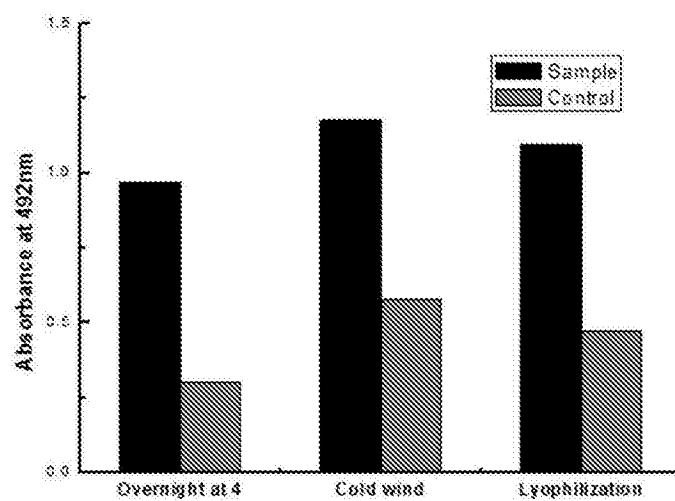


图2

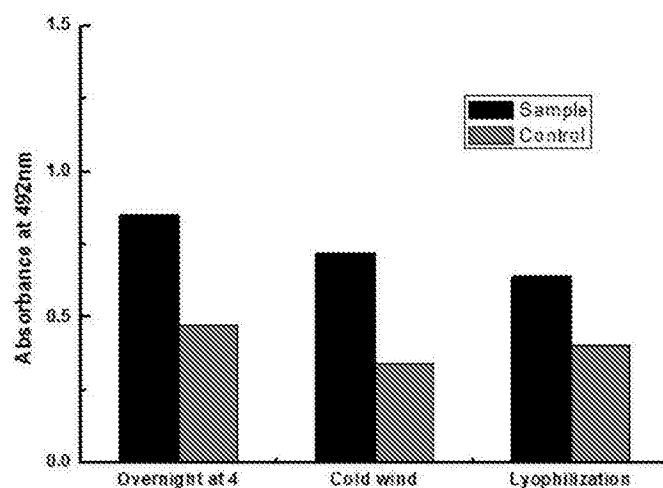


图3

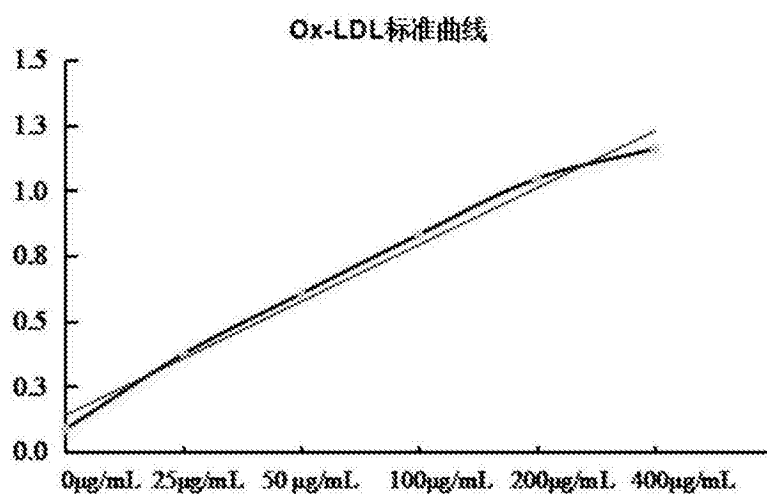


图4

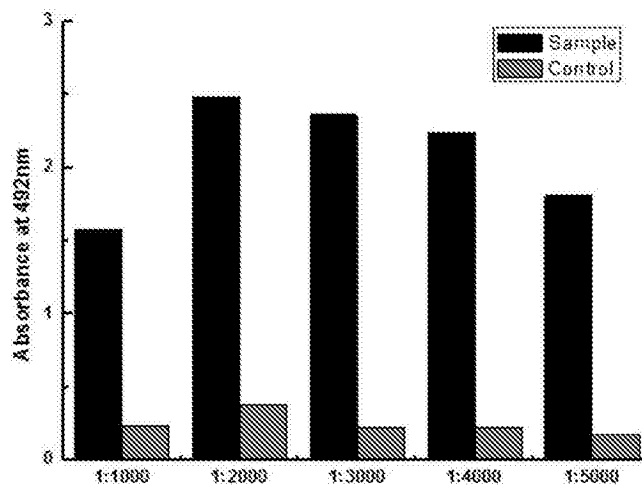


图5

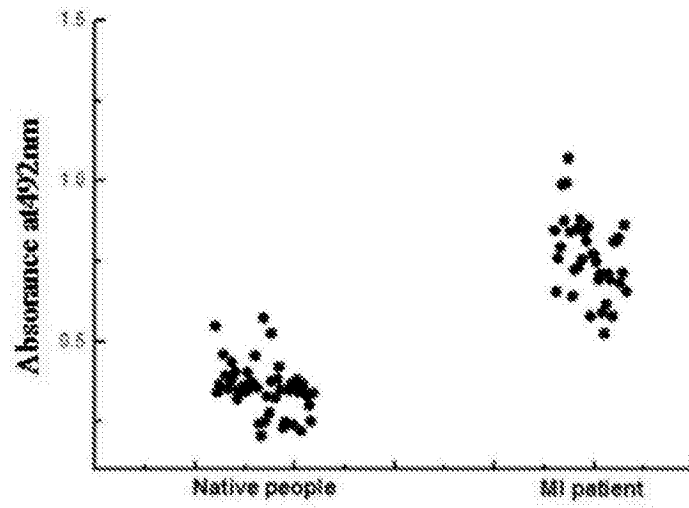


图6

专利名称(译)	一种人体氧化低密度脂蛋白的酶联免疫检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN105974143A	公开(公告)日	2016-09-28
申请号	CN201610219116.3	申请日	2016-04-08
[标]申请(专利权)人(译)	刘庆平		
申请(专利权)人(译)	刘庆平		
当前申请(专利权)人(译)	刘庆平		
[标]发明人	刘庆平 张鹤 李敬达 王仁军		
发明人	刘庆平 张鹤 李敬达 王仁军		
IPC分类号	G01N33/92 G01N33/545 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/92 G01N33/535 G01N33/545 G01N2333/775 G01N2800/04 G01N2800/042 G01N2800/044 G01N2800/085 G01N2800/104 G01N2800/321 G01N2800/323 G01N2800/324		
代理人(译)	朱秀芬		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种人体氧化低密度脂蛋白的酶联免疫检测试剂盒及其制备方法。本发明属于体外检测诊断试剂领域，具体涉及一种人体内的Ox-LDL含量测定的试剂盒及制备与应用。其包括固相化有特异性结合氧化低密度脂蛋白新型配体结构的重组蛋白P.rβ2-GPI-DV或E.coli重组蛋白rβ2-GPI-DV的酶标板、不同浓度的氧化低密度脂蛋白标准对照样品、质控品、酶标记的抗体、稀释液、清洗液、显色液A、显色液B和终止液。本发明所使用的酵母重组蛋白P.rβ2-GPI-DV或E.coli重组蛋白rβ2-GPI-DV通过结合oxLDL新型配体识别位点检测的Ox-LDL是具有致动脉粥样硬化、心血管疾病、非酒精性脂肪性肝病炎症反应的致病性Ox-LDL，对于伴有动脉粥样硬化、脂质代谢异常以及炎症反应特质的疾病的精准辅助诊断具有应用价值，本发明所用检测仪器简单，检测成本低，非专业人员即可实现检测操作。

Ox-LDL标准曲线

