



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107782904 A

(43)申请公布日 2018.03.09

(21)申请号 201610735300.3

(22)申请日 2016.08.26

(71)申请人 武汉三鹰生物技术有限公司

地址 430070 湖北省武汉市东湖高新技术
开发区高新大道666号D3-3栋

(72)发明人 王慕元 赵以睿 张朋 连绘

(51)Int.Cl.

G01N 33/92(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页 附图2页

(54)发明名称

一种用于载脂蛋白L1的酶联免疫检测及制备方法

(57)摘要

本发明涉及一种酶联免疫及其检测方法,是一种新的抗人载脂蛋白L1的单抗包被酶标板及酶联免疫试剂盒的制备方法。其关键之处主要在于用基因工程方法制备特异性的鼠抗人载脂蛋白L1单抗,并将此抗体纯化后包被于酶标板上,做为试剂盒的一部分。试剂盒还包括载脂蛋白L1重组蛋白标准品、抗人载脂蛋白L1的多抗、辣根过氧化物酶标记的二抗、样本稀释液、抗体稀释液、显色液、终止液。试剂盒建立了快捷简便测定人血清和血浆中载脂蛋白L1浓度的测定方法。试剂盒主要用于供科学研究和动脉粥样硬化,肥胖,非洲锥虫病,慢性肾病等多种疾病的临床实验的研究使用。



1. 人APOL1的单抗包被酶标板的制法,通过下列步骤制备而成:

以BC017331 DNA为模板,PCR扩增APOL1 DNA片段(99nt-815nt)基因片段,与载体PET28a连接,转化BL21,表达大量32 KD APOL1蛋白片段;

将32 KD APOL1蛋白免疫小白鼠,取其脾细胞与鼠骨髓瘤细胞融合,选择阳性杂交瘤细胞于鼠腹水中培养,纯化蛋白得到抗APOL1的单抗;

将所得单抗用pH9.6的碳酸盐缓冲溶液稀释后包被96孔板,100 μ l/孔,4 $^{\circ}$ C 16-24小时,PBST洗涤3次,每次30秒,然后除尽孔内液体;

用含8% 小牛血清的pH7.4的PBS封闭,每孔200 μ l,37 $^{\circ}$ C,2小时,PBST洗涤3次,干燥后密封;该板即为抗APOL1的单抗包被的酶标板,可用于APOL1的特异性检测。

2. 应用权利要求1所述的人APOL1的单抗包被酶标板的ELISA检测试剂盒,其特征为:由权利要求1所述的抗APOL1的单抗包被的酶标板、APOL1标准品、APOL1的阳性对照样品、抗APOL1的多抗、样品稀释液、洗涤液、显色液、终止液构成,具体组分为:(1)酶标板:由APOL1的单抗包被;(2)样品稀释液:含8% 小牛血清的pH7.4的0.01mol/l PBS;(3)洗涤液:pH7.4 PBST;(4)酶标二抗:购自美国R&D systems的辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的羊抗兔IgG;(5)APOL1标准品:APOL1的PBS溶液,APOL1终浓度为1 mg/ml;(6)APOL1阳性对照样品:APOL1的PBS溶液,APOL1终浓度为1 mg/ml;(7)抗APOL1的多抗:多抗的PBS溶液,多抗的终浓度为1mg/ml;(8)显色液:TMB-H₂O₂系统;(9)终止液:2mol/L H₂SO₄溶液。

一种用于载脂蛋白L1的酶联免疫检测及制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药技术领域,具体地说涉及一种检测人载脂蛋白L1 (APOL1)的酶联免疫检测试剂盒。

[0002] 本发明还涉及上述试剂盒的制备方法。

[0003]

背景技术

[0004] 载脂蛋白L1 (apolipoprotein L1, APOL1) 是血浆高密度脂蛋白的组分之一,在脂质代谢,宿主免疫防疫等方面发挥重要作用。APOL1功能改变与动脉粥样硬化,肥胖,非洲锥虫病,慢性肾病等多种疾病的发生关系密切。

[0005] APOL1基因只在人和其他几种灵长类动物中存在。基因编码一段信号肽,使剪接体进入血液。APOL1以高密度脂蛋白组分的形式存在于血液中,含量丰富,浓度约为5 μ M。血液中的APOL1蛋白主要在肝脏中生成。不过,APOL1也在肺,胎盘,胰腺,肾脏等多种组织广泛表达。

[0006] 血清中APOL1能够裂解非洲锥虫,保护人体不被寄生虫感染。APOL1在N端含有类似于细菌在胞膜打孔的通道,中间区段有助于APOL1定位于锥虫溶酶体。APOL1结合锥虫表面受体,进入锥虫溶酶体,并通过N端离子通道活化改变锥虫溶酶体渗透压,引起溶酶体肿胀,最终导致锥虫死亡。此外,APOL1也被发现参与抗病毒机制。

[0007] APOL1基因突变与非洲裔人群非糖尿病性肾病,晚期肾病高发有密切联系。两个氨基酸取代导致的突变(S342G和I384M)被称命名为G1,两个氨基酸(N388和Y389)被删除造成的突变命名为G2。约50%非洲裔美国人携带G1或者G2,10-15%同时携带G1和G2。APOL1在正常肾脏中主要表达于足细胞和血管内皮细胞,而肾病患者足细胞表达下降血管内皮细胞表达增加。外周血APOL1水平与肾病的致病风险是否存在联系尚不清楚。最新实验数据表明,APOL1突变蛋白具有细胞毒性,可通过活化MAPK通路,改变钠钾离子流引起细胞死亡。(Friedman DJ, Pollak MR. Apolipoprotein L1 and Kidney Disease in African Americans. Trends Endocrinol Metab. 2016 Apr;27(4):204-15.)

文献广泛报道了APOL1作为一种生物标志物在疾病的诊断和治疗中的作用,而目前国际上几大ELISA试剂盒生产商只是单一地生产APOL1蛋白或抗体,而尚未有生产整套APOL1 ELISA试剂盒的报道,缺乏APOL1在人的血液、组织或细胞中定量的研究。本发明构建了一套用酶联免疫方法定量测定人样本中内源性APOL1的浓度。

发明内容

[0008] 本发明的目的:提供一种新的用于人血清、或细胞培养上清中人源APOL1定量检测的ELISA试剂盒。

[0009] 本发明技术方案如下:

1、抗人APOL1的特异性单抗包被反应板的制备,通过以下步骤:

(1) 32 KD APOL1蛋白片段的获得:

32 KD APOL1蛋白片段的原核表达:以BC017331 DNA (购自美国典型培养物保藏中心, ATCC) 为模板,用一对特异性的正反引物,PCR扩增APOL1 DNA片段(99nt-815nt),将所得片段克隆于载体pET28a(购自德国Merck公司),转化BL21 (DE3) (购自Merck)感受态大肠杆菌,根据卡那霉素抗性筛选阳性克隆。提取阳性克隆的质粒DNA进行鉴定,得到与目的片段分子量相一致的片段,初步判定为阳性。以PCR阳性克隆提取质粒DNA,进行测序,结果表明APOL1 cDNA片段正确克隆至pET28a,为一个具有714 bp的完整开放式阅读框,与GenBank中人源APOL1基因100%同源,推算其表达的蛋白质分子量为32 KD,PI为5.3。

[0010] ①32 KD APOL1蛋白片段的鉴定:转化了重组质粒的大肠杆菌BL21经诱导后将菌体收集,超声波裂解,菌体蛋白经SDS-PAGE蛋白电泳及考马斯染色显示,在32 KD附近新增一条带,经Western blotting鉴定,能与APOL1的抗体发生强阳性反应,说明该32 KD的APOL1蛋白具有较强的免疫原性。

[0011] ②32 KD的APOL1蛋白片段的制备与纯化:经大量培养、诱导、表达,使用 Ni^{2+} 亲和层析柱(购自Pharmacia)纯化带有6×His标记的APOL1蛋白,得到大量32 KD APOL1蛋白片段。

[0012] (2) 制备抗APOL1的单抗:

①APOL1蛋白的动物免疫:将32KD的APOL1蛋白片段与福氏佐剂混合并经充分乳化后,皮下注射,免疫鼠龄在8~12周的BALB/c健康小鼠(购自湖北省实验动物研究中心)3至4只,每次免疫间隔为2周,直至血清效价高于40000:1。

[0013] ②杂交瘤细胞的制备:在末次免疫后4天,分离鼠脾细胞,在PEG存在条件下选择与对数生长期的Sp2/0骨髓瘤细胞株(购自中国典型培养物保藏中心,CCTCC)以4:1的比例融合,饲养细胞来自小鼠腹腔细胞。融合后的细胞以含HAT的培养基筛选,经有限稀释后选出高抗体分泌孔,将孔内细胞克隆,进行抗原特异的ELISA测定,挑选高分泌性细胞株扩大培养或冻存。

[0014] ③单抗制备:将分泌特异性单抗的杂交瘤细胞株进行小鼠腹腔接种,待产生明显腹水后收集腹水,用葡萄球菌A蛋白交联的亲和层析柱(购自Pharmacia公司)纯化单抗。抗体存于含55%甘油、0.1%BHA和0.01%硫柳汞的0.01mol/L、pH7.4的PBS之中。

[0015] (3) 以所得单抗包被反应板:单抗用pH 9.6的碳酸盐缓冲溶液稀释成适当浓度,包被96孔板,每孔100 μ l,置于4℃湿盒 16-24小时,PBST洗涤3次,每次30秒,然后拍干,除尽孔内液体。

[0016] (4) 封闭:用含8%小牛血清的pH7.4的PBS封闭,每孔200 μ l,37℃,2小时孵育后,PBST洗涤3次,干燥后密封;该板即为抗APOL1的单抗包被的酶标反应板,可用于APOL1的定量检测。

[0017] 2、APOL1标准品 (APOL1蛋白溶液) 的制备:

(1) APOL1蛋白的原核表达:以DNA (购自ATCC) 为模板,用一对特异性的正反引物,PCR扩增APOL1 (99nt-815nt) 目的基因,将所得基因克隆于载体pET28a,转化BL21 (DE3) 感受态大肠杆菌,根据卡那霉素抗性筛选阳性克隆。提取阳性克隆的质粒DNA进行鉴定,得到与目的片段分子量相一致的片段,初步判定为阳性。以PCR阳性克隆提取质粒DNA,进行测序,结果表明APOL1蛋白质的cDNA正确克隆至pET28a,为一个具有714 bp的完整开放式阅读框,与GenBank中APOL1基因100%同源,推算其分子量为32 KD,PI为5.3。

[0018] (2) APOL1蛋白的鉴定:转化了重组质粒的大肠杆菌BL21经诱导后将菌体收集,超声波裂解,菌体蛋白经SDS-PAGE蛋白电泳及考马斯染色显示,在32 KD附近新增一条带,经Western blotting鉴定,能与APOL1的抗体发生强阳性反应,说明APOL1蛋白具有较强的免疫原性。

[0019] (3) APOL1蛋白的制备与纯化:经大量培养、诱导、表达,使用 Ni^{2+} 亲和层析柱纯化,得到大量APOL1蛋白。

[0020] (4) APOL1标准品制备:将APOL1蛋白保存于含55%甘油、0.1%BHA和0.01%硫柳汞的0.01mol/l、pH7.4的PBS之中,并使APOL1蛋白的终浓度为1mg/ml

3、APOL1阳性对照样品的制备:将APOL1蛋白溶于含50%甘油、0.5%BSA、0.1%BHA和0.01%硫柳汞的0.01mol/l、pH7.4的PBS之中,并使APOL1蛋白的终浓度为10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0021] 4、APOL1的多抗的制备:

(1) 动物免疫:取纯化好的APOL1蛋白与福氏佐剂混合并经充分乳化后,脊柱两侧、对称多点皮下注射,免疫3-4月龄、体重在1.7Kg以上的健康日本大耳白兔(购自湖北省实验动物研究中心)3至4只,每次免疫间隔为2周,免疫1月后再次免疫后第8天耳静脉取血测血清效价,直至血清效价高于40000:1。

[0022] (2) 血清获取:兔中耳动脉取血,每次40ml,静置30分钟后离心,3000rpm、5分钟,上清即为血清。

[0023] (3) 多抗的纯化:用APOL1蛋白交联的亲和层析柱(购自Pharmacia)纯化,得到APOL1的多抗,保存于含55%甘油、0.1%BHA和0.01%硫柳汞的0.01mol/l、pH7.4的PBS之中,多抗的终浓度为1mg/ml。

[0024] (4) 将得到多抗进行人血浆的蛋白印迹和肾和胰腺组织样本免疫组化,图2、图3,结果说明我们制得多抗能与人天然的APOL1蛋白反应,且具有特异性。

[0025] 5、酶标二抗:购自美国R & D systems,为辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase,HRP)标记的羊抗兔IgG。

[0026] 6、本试剂盒对APOL1的ELISA检测步骤包括:

(1) 待测样品、标准样、阳性对照依次加入微孔中,进行孵育,APOL1将与固相载体表面的捕获抗体——预先包被在孔内的抗体相结合。

[0027] (2) 经过洗涤,将特异性的抗APOL1的多抗加入孔内,在第二次孵育中,多抗扮演检测抗体,并与第一次孵育中被捕获的APOL1结合。

[0028] (3) 洗去多余的多抗,加入酶标二抗,在第三次孵育中,酶标二抗与上一步中的多抗——检测抗体相结合,形成一个4组分的夹心形状的结合物。

[0029] (4) 洗去未结合的酶标二抗,加入酶的底物3,3',5,5'-四甲基联苯胺(tetramethyl benzidine,TMB),孔内液体在过氧化物酶的催化下转化成蓝色,加入终止液,转化成黄色。颜色的深浅和样品中APOL1的含量呈正相关。

[0030] (5) 用酶标仪在450nm波长下测定吸光度(O.D.值),计算样品中APOL1浓度。

[0031] 这种新的APOL1 ELISA检测试剂盒,其特征在于:所述试剂盒由上述特异性的APOL1的单抗包被的酶标板、APOL1蛋白标准品、APOL1的阳性对照样品、APOL1的多抗、辣根过氧化物酶标记的二抗构成,具体组分为:(1)酶标板:由APOL1的单抗包被;(2)样品稀释液:含8%小牛血清pH7.4的0.01mol/l PBS;(3)洗涤液;(4)APOL1蛋白标准品;(5)APOL1的阳

性对照样品；(6) APOL1的多抗；(7) 辣根过氧化物酶标记的二抗；(8) 显色液：TMB-H₂O₂系统；(9) 终止液：2mol/l H₂SO₄溶液。

[0032] 本试剂盒所有指标符合美国R&D systems ELISA试剂盒各项指标的严格要求。目前，国外几大ELISA试剂盒生产商尚未有APOL1的ELISA试剂盒的报道，而国内厂家的产品处于初创阶段，基本没有APOL1的阳性内参，所得到的测量结论值得商榷。本试剂盒采用20个阴性样品的平均值加上2倍标准方差作为最低检出线，为0.07 ng/ml，本发明提高了检出精度。

[0033] 本发明选取包含了识别功能区的APOL1片段，并将其作为抗原免疫小鼠得到特异性的高纯度单抗。对单抗进行特异性检测，用人血浆进行蛋白印迹检测(图5)，验证单抗能特异性识别人天然的APOL1蛋白，以此单抗作为捕获APOL1的抗体，保证了检测结果的特异性，最大程度避免了假阳性。验证多抗的特异性(图2，图3和图4)，随后以特异性多抗作为检测抗体，进一步排除了假阳性；加入酶标二抗，形成一个4组分的夹心形状的结合物，最后加入底物显色液，将以上得到的正确信号有效放大，对比同步平行进行的标准品和内参实验，进一步排除实验中的试剂或操作误差，最终得到可信赖的结论。

[0034] 本发明与现有技术相比具有以下优点和效果：

- 1、应用范围广泛：适用于人血清、组织和细胞培养物；
- 2、检测速度快：仅约3小时；
- 3、使用便捷：不需要复杂仪器；
- 4、步骤简单；

5、所得结果准确可靠：通过多步特异性的抗原、抗体的亲和反应，层层有效地降低了非特异性反应；而且除提供标准品外，还提供阳性对照，确保所得数据排除了众多试剂、温度等因子的干扰。

[0035] 附图说明：

图1：本发明试剂盒盒体及组成成分。

[0036] 图2：从大肠杆菌中表达纯化的APOL1蛋白聚丙烯酰胺凝胶电泳图。

[0037] 图3：APOL1多克隆抗体的蛋白印记图，检测样本是人血浆，抗体稀释比1:1000。

[0038] 图4：APOL1多克隆抗体的免疫组化图，检测组织是石蜡包埋的人肾，抗体稀释比例1:50。

[0039] 图5：APOL1单克隆抗体蛋白印迹图，检测样本是人血浆，抗体稀释比1:40,000。

[0040] 图6：APOL1单克隆抗体的免疫组化图，检测组织是石蜡包埋的人肝脏，抗体稀释比例1:500。

[0041]

具体实施方式

[0042] 1、试剂：

(1) 包被液(0.02mol/l, pH9.6的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液)：Na₂CO₃ 0.6g, NaHCO₃ 1.16g, Na₂N₃ 0.2g, 加双蒸水至1000ml, 调pH至9.6。

[0043] (2) 标本稀释液(含8%小牛血清pH7.4的0.01mol/l PBS)：NaCl 8.0g, NaH₂PO₄ • 2H₂O 0.3g, Na₂HPO₄ • 12H₂O 2.9g, KCl 0.2g, 硫柳汞0.1g, 加双蒸水至1000ml, 调pH至7.4。

[0044] (3) 封闭液 (8%小牛血清/PBS溶液): 小牛血清80ml, 0.01mol/l pH7.4 PBS 920ml。

[0045] (4) 洗涤液 (pH7.4 PBST): NaCl 8.0g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.3g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g, Tween 20 0.5g, 硫柳汞0.1g, 加双蒸水至1000ml, 调pH至7.4。

[0046] (5) 酶标二抗 (HRP标记的羊抗兔多抗): 购自美国R&D systems, 使用时用PBS稀释至1:10000稀释。

[0047] (6) APOL1蛋白标准品: 全长238个氨基酸的APOL1蛋白的0.01mol/l PBS溶液, pH7.4, 含55%甘油、0.1%BHA和0.01%硫柳汞, APOL1终浓度为1mg/ml, 使用时用标本稀释液稀释至10、5、2.5、1.25、0.625、0.313、0.156、0 ng/ml八个梯度。

[0048] (7) APOL1的阳性对照样品: APOL1蛋白的0.01mol/l、pH7.4的PBS溶液, 含50%甘油、10%牛血清、0.5%BSA、0.1%BHA和0.01%硫柳汞, APOL1的终浓度为10 μg /ml, 使用时用标本稀释液作1:1000稀释。

[0049] (8) 抗APOL1的多抗: 多抗的PBS溶液, 含55%甘油、0.1%BHA和0.01%硫柳汞的0.01mol/l、pH7.4, 多抗的终浓度为1mg/ml, 使用时用标本稀释液作1:10000稀释。

[0050] (9) 底物显色液 (TMB- H_2O_2 系统):

①底物液A (3', 3', 5, 5'-四甲基联苯胺tetramethyl benzidine, TMB): TMB 200毫克, 无水乙醇100ml, 加双蒸水至990ml;

②底物液B (H_2O_2 尿素): $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 36.8g, 柠檬酸9.3g, 1%过氧化氢尿素4.8ml, 加双蒸水至1000ml, 调pH至5.2。

[0051] ③加入酶标孔前10分钟将底物液A和底物液B两者1:1混合, 作为底物显色液。

[0052] (10) 终止液 (2mol/l H_2SO_4 溶液): 烧杯内预先加入600ml双蒸水, 将浓硫酸100ml缓慢滴加, 不断搅拌, 冷却至室温后定容至900ml。

[0053] 2、主要仪器:

(1) 酶标仪: B10-RAD Model 680。

[0054] (2) ELISA反应板: 美国Corning Incorporated costar R 96 Well E1A/R1A plate。

[0055] (3) 水浴锅: 购自美国Napco公司, Model 203。

[0056] 3、方法:

(1) 酶标二抗最适滴度的选择

①将100ng/ml兔IgG包被反应板, 洗涤;

②将酶标二抗用标本稀释液作一系列稀释, 加入孔内, 37 $^{\circ}\text{C}$, 孵育40分钟后, PBST洗涤3次;

③加入底物显色, 20分钟后加入终止液;

④读取吸光值, 取吸光值为1.0时的酶标二抗稀释度——1:10000作为酶标二抗的最佳稀释度。

[0057] (2) 棋盘法选择单抗的最佳包被滴度

①用包被液将单抗作一系列稀释后, 4 $^{\circ}\text{C}$ 包被反应板16-24小时, PBST洗涤3次, 除尽孔内液体;

②加入标准样和APOL1阳性对照、阴性参考溶液, 孵育, 洗涤;

③加入多抗溶液, 孵育, 洗涤;

④加入酶标二抗,孵育,洗涤;

⑤加入底物显色,20分钟后加入终止液;

⑥读取吸光值,选取APOL1阳性对照样吸光值为0.8至1.0,阴性对照的吸光值小于0.1的单抗包被稀释度——1:10000作为最佳稀释度。

(3) 单抗包被反应板的制备方法:

①以碳酸盐缓冲液稀释单抗,包被96孔板,每孔100 μ l,置于4℃湿盒16-24小时,PBST洗涤3次,每次30秒,然后拍干,除尽孔内液体;

②用含8%小牛血清的pH7.4的PBS封闭,每孔200 μ l,37℃,2小时,PBST洗涤3次,干燥后密封;该板即为抗APOL1的单抗包被的酶标板,可用于APOL1的特异性检测。

[0058] (4) 试剂盒的构成:

所述试剂盒由特异性单抗包被反应板制得的酶标板、标本稀释液、洗涤液、酶标二抗、APOL1标准品、APOL1阳性对照样品、多抗、底物、终止液组成,具体组分为:

①酶标板:APOL1的单抗包被的酶标板;

②标本稀释液:含8%小牛血清和pH7.4的0.01mol/l PBS;

③洗涤液:pH7.4 PBST;

④酶标二抗:HRP标记的羊抗兔IgG;

⑤APOL1标准品: APOL1蛋白的PBS溶液,APOL1终浓度为10 ng/ml;

⑥APOL1阳性对照样品: APOL1蛋白的PBS溶液,APOL1终浓度为1mg/ml;

⑦

⑧多抗:多抗的PBS溶液,抗体终浓度为1mg/ml;

⑨底物显色液:TMB-H₂O₂系统;

⑩终止液:2mol/l H₂SO₄溶液。

[0059] (5) 利用上述试剂盒检测组织或细胞培养物、血清中APOL1浓度的方法:

①将待测样品、标准品、阳性对照样品进行处理:用标本稀释液将血清样品进行1:10000、阳性对照1:10000稀释;标准品用标本稀释液稀释成10、5、2.5、1.25、0.625、0.313、0.156、0 ng/ml 八个梯度;

②将待测样品、标准样、阳性对照依次加入酶标孔中,每孔100 μ l,37℃孵育1小时,PBST洗涤3次,每次洗涤均拍干孔内液体;

③将抗APOL1的多抗加入酶标孔内,每孔100 μ l,37℃孵育1小时,PBST洗涤3次;

④加入酶标二抗,每孔100 μ l,37℃孵育40分钟,PBST洗涤3次,每次洗涤均拍干孔内液体;

⑤加入酶的底物,每孔100 μ l,室温孵育20分钟后加入终止液,每孔50 μ l;

⑥用酶标仪在450nm波长下测定吸光度,制作不同浓度标准品的吸光值为Y轴、以其浓度的对数为X轴制得标准曲线。

[0060] ⑦计算结果:如果阳性对照样品的测定值和标示值(10 μ g/ml)相比较,其变异系数小于10%,说明测定过程可靠,可依据标准曲线计算所测样品中APOL1浓度。



图1

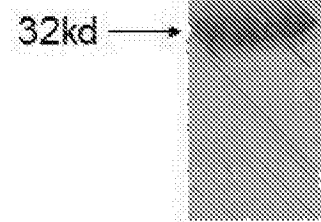


图2

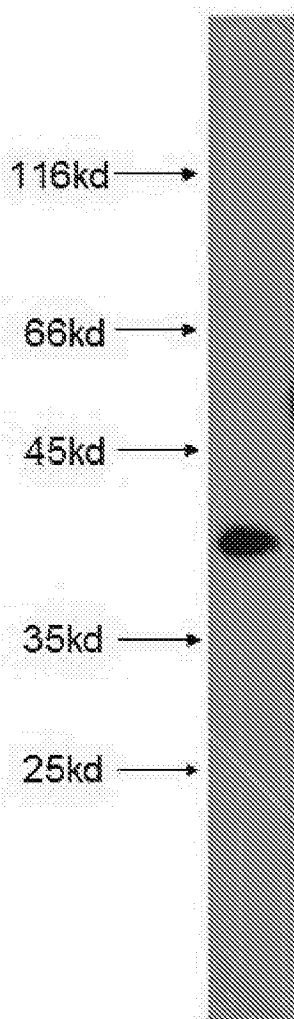


图3



图4

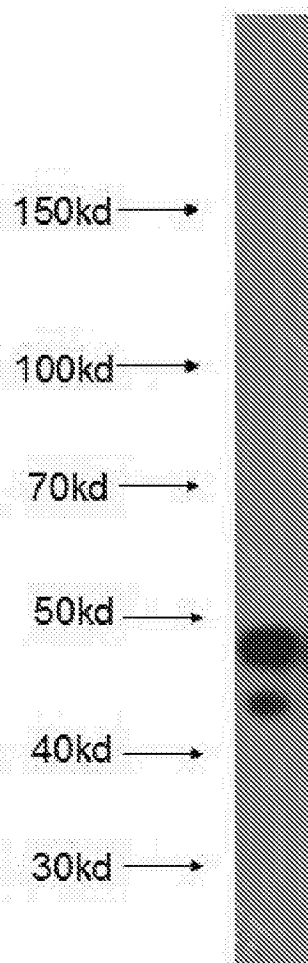


图5

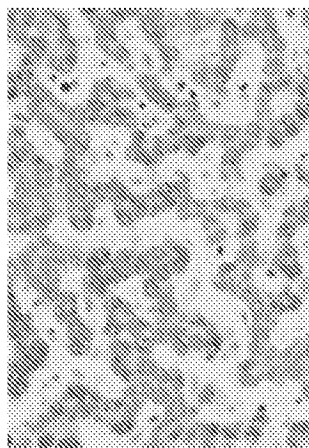


图6

专利名称(译)	一种用于载脂蛋白L1的酶联免疫检测及制备方法		
公开(公告)号	CN107782904A	公开(公告)日	2018-03-09
申请号	CN201610735300.3	申请日	2016-08-26
[标]申请(专利权)人(译)	武汉三鹰生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	武汉三鹰生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	武汉三鹰生物技术有限公司		
[标]发明人	王慕元 赵以睿 张朋 连绘		
发明人	王慕元 赵以睿 张朋 连绘		
IPC分类号	G01N33/92 G01N33/543 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/92 G01N33/531 G01N33/543		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种酶联免疫及其检测方法，是一种新的抗人载脂蛋白L1的单抗包被酶标板及酶联免疫试剂盒的制备方法。其关键之处主要在于用基因工程方法制备特异性的鼠抗人载脂蛋白L1单抗，并将此抗体纯化后包被于酶标板上，做为试剂盒的一部分。试剂盒还包括载脂蛋白L1重组蛋白标准品、抗人载脂蛋白L1的多抗、辣根过氧化物酶标记的二抗、样本稀释液、抗体稀释液、显色液、终止液。试剂盒建立了快捷简便测定人血清和血浆中载脂蛋白L1浓度的测定方法。试剂盒主要用于供科学研究和动脉粥样硬化，肥胖，非洲锥虫病，慢性肾病等多种疾病的临床实验的研究使用。

