



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105044008 B

(45)授权公告日 2018.01.05

(21)申请号 201510413246.6

(22)申请日 2015.07.14

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105044008 A

(43)申请公布日 2015.11.11

(73)专利权人 上海拜豪生物科技有限公司

地址 200000 上海市浦东新区中国(上海)

自由贸易试验区新金桥路27号13号楼
2层

(72)发明人 张积仁 阳帆 董欣敏 吴婧

蔡睿 孙遥 赵乙木

(74)专利代理机构 广州市越秀区哲力专利商标

事务所(普通合伙) 44288

代理人 汤喜友

(51)Int.Cl.

G01N 21/31(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 27/62(2006.01)

G01N 1/28(2006.01)

G01N 1/34(2006.01)

G01N 27/447(2006.01)

(56)对比文件

WO 2006/123343 A2,2006.11.23,

WO 2006/123343 A2,2006.11.23,

WO 94/22490 A1,1994.10.13,

CN 101082045 A,2007.12.05,

审查员 郑义智

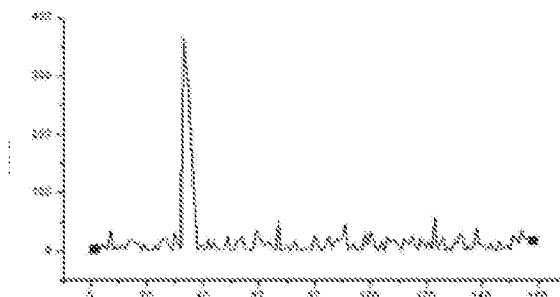
权利要求书2页 说明书17页 附图1页

(54)发明名称

一种镉-高密度脂蛋白螯合物及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明提供一种镉-高密度脂蛋白螯合物及其制备方法和应用,该镉-高密度脂蛋白螯合物是镉离子与高密度脂蛋白通过巯基或/和半胱氨酸残基螯合而成,可用于制备检测人体镉-高密度脂蛋白螯合物的试剂。本发明首次证实了镉离子可直接作用于高密度脂蛋白。本发明建立了镉-高密度脂蛋白螯合物的定性定量检测方法,以检测一个地区人群体内高密度脂蛋白的含量,从而间接反映一个地区镉污染程度以及对人群的健康影响。本发明建立的镉-高密度脂蛋白螯合物定量检测方法准确度高重、复性好。



1. 一种镉-高密度脂蛋白螯合物, 其特征在于, 该镉-高密度脂蛋白螯合物是镉离子与高密度脂蛋白通过巯基或/和半胱氨酸残基螯合而成;

所述的镉-高密度脂蛋白螯合物的制备方法, 包括以下步骤:

A) 镉-高密度脂蛋白的合成: 在提纯源于人体的高密度脂蛋白或按照生物学方法重组的高密度脂蛋白中加入镉离子进行螯合反应, 得到反应溶液;

具体操作步骤如下:

1) 取2.0mg ITCBE溶于2mLDMSO中;

2) 缓慢将步骤1) 制备的液体加入高密度脂蛋白溶液中, 边滴加边震荡, 于25℃, 100r/min的摇床中作用24h, 然后用透析袋透析24h, 除去未与高密度脂蛋白结合的ITCBE;

3) 将透析所得的液体用1moI/L HCl调节pH值至7.0, 然后缓慢逐渐滴加80μI 1mmoI/L镉离子溶液, 边滴加边振荡, 以免镉离子使蛋白变性沉淀;

4) 将加好的溶液在25℃, 100r/min的摇床中反应2h, 用处理好的透析袋进行透析24h;

5) 将透析好的液体于-20℃分装保存, 得到镉-高密度脂蛋白螯合物的反应溶液;

B) 镉-高密度脂蛋白螯合物纯化: 采用免疫亲和层析法, 去除步骤A) 反应溶液中未反应的高密度脂蛋白、特异性抗体和镉离子, 即得镉-高密度脂蛋白螯合物;

所述步骤B) 中具体包括以下步骤:

(1) 溶解样品: 将上述步骤A) 的提取的镉-高密度脂蛋白螯合物溶解于生理盐水中, 得镉-高密度脂蛋白螯合物溶液;

(2) 平衡层析柱: 使用稀释缓冲液冲洗层析柱的管路, 在层析柱中装入能与高密度脂蛋白特异性结合的填料, 装柱后, 继续使用稀释缓冲液平衡层析柱;

(3) 上样: 待层析柱平衡后, 用稀释缓冲液稀释步骤(1) 所述溶液, 然后上柱, 使高密度脂蛋白与填料特异性结合;

(4) 洗脱: 使用稀释缓冲液冲洗层析柱至基线平衡, 然后使用0.05-0.10moI/L的Na₂HP0₄溶液进行洗脱;

(5) 收集: 收集步骤(4) 的洗脱液, 收集完毕后立即使蛋白复原;

(6) 透析: 将步骤(5) 中的收集的洗脱液装透析袋, 用ddH₂O透析除盐, 换水三次后, 4℃透析过夜, 收集样本;

(7) 平衡层析柱: 采用新的层析柱, 用稀释缓冲液冲洗管路, 在该层析柱中装入能与镉特异性结合的填料, 装柱后再用稀释缓冲液平衡层析柱;

(8) 上样: 待层析柱平衡后, 用稀释缓冲液稀释步骤(6) 中样本, 然后上柱;

(9) 洗脱: 使用稀释缓冲液冲洗层析柱至基线平衡, 然后使用0.5-1.0moI/L的Na₂HP0₄溶液进行洗脱;

(10) 收集: 收集步骤(9) 的洗脱液, 收集完毕后立即使蛋白复原;

(11) 透析: 将步骤(10) 的洗脱液装透析袋, 用ddH₂O透析除盐, 换水三次后, 4℃透析过夜, 收集样本, 即得镉-高密度脂蛋白螯合物。

2. 根据权利要求1所述的镉-高密度脂蛋白螯合物, 其特征在于, 步骤B) 后还包括步骤C): 对镉-高密度脂蛋白螯合物的鉴定;

其中, 步骤C) 中具体包括以下步骤:

(1) 制备胶床: 以琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶中的一种作为介质制备胶床;

(2) 加样:取步骤B)中提取纯化得到的镉-高密度脂蛋白螯合物,加入上样缓冲液,并混匀,然后加样于样品槽中;

(3) 电泳:连接电泳板,进行电泳;

(4) 检测:在胶床上找出含镉的蛋白条带,将该蛋白条带取出,将蛋白条带溶解,然后再采用ICP-MS或AAS检测是否含有镉以及检测镉的含量。

3. 一种如权利要求1所述的镉-高密度脂蛋白螯合物在制备检测血样中镉-高密度脂蛋白螯合物的试剂或试剂盒中的应用。

4. 一种至少包括如权利要求1所述的镉-高密度脂蛋白螯合物作为标准品的试剂盒。

5. 根据权利要求4所述的试剂盒,其特征在于,还包括包被液,该包被液含有捕获高密度脂蛋白的物质或捕获金属镉的物质。

6. 一种定量检测镉-高密度脂蛋白螯合物的方法,其特征在于,以已知含量的权利要求1所述的镉-高密度脂蛋白螯合物作为标准品,采用以下方法之一对样品进行检测:酶联免疫法、酶联免疫与原子吸收光谱结合法、酶联免疫与电感耦合等离子体质谱结合法、提纯镉-高密度脂蛋白螯合物与酶联免疫结合法、提纯镉-高密度脂蛋白螯合物与原子吸收光谱结合法、提纯镉-高密度脂蛋白螯合物与电感耦合等离子体质谱结合法、电泳与酶联免疫或原子吸收光谱或电感耦合等离子体质谱结合法。

一种镉-高密度脂蛋白螯合物及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及重金属离子的免疫学检测,具体涉及一种镉-高密度脂蛋白螯合物及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 脂蛋白(Lipoproteins)是蛋白质与脂质结合所形成的一种脂质-蛋白质复合物,按密度分为高密度脂蛋白(high density lipoprotein,简称HDL)、中间密度脂蛋白(intermediate density lipoprotein,简称IDL)、低密度脂蛋白(low density lipoprotein,简称LDL)、极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein,简称VLDL)、乳糜颗粒(chylomicron,CM)。血液中大约百分之三十的胆固醇是通过高密度脂蛋白从组织细胞中运输到肝脏转化为胆汁酸或通过胆汁排出体外的。高密度脂蛋白由50%的蛋白、30%的磷脂、25%的胆固醇(其中70%为胆固醇酯)、5%的三酰甘油组成。

[0003] 高密度脂蛋白(简称HDL)是血浆中主要脂蛋白之一,其密度最高,颗粒直径最小,蛋白和脂质含量大致均等的异质性脂蛋白。由50%的蛋白、30%的磷脂、25%的胆固醇(其中70%为胆固醇酯)、5%的三酰甘油组成。

[0004] HDL是动脉粥样硬化发生和发展的主要脂类保护因素,其在血清蛋白中有很强的抑制动脉粥样硬化作用,是冠状动脉疾病的重要保护因子,与冠心病危险程度呈负相关。

[0005] 镉是一种常见的有毒金属及环境污染物,广泛应用于工业生产环境中,包括电镀、制造工业颜料、塑料稳定剂、镍铬电池等,与人们生活息息相关。对于普通人群,主要是通过吸入镉污染的空气,及食用含镉污水灌溉农田生产的农作物(如含镉大米)等方式摄入镉。研究表明,镉是一种全身性毒物,可引起人和动物的肺、肝、肾等多种器官以及心血管、免疫、神经等多系统功能损伤,还具有较强的致癌作用。1993年国际肿瘤研究机构(IARC)已将镉及其化合物列为第1类人致癌物。可见镉对机体的影响及其重要,不可忽视。

[0006] 目前已有大量的文献证实镉可以作用于全身各个系统中的蛋白,从而影响机体各组织器官的机能。众所周知,高密度脂蛋白是一种特殊意义的蛋白质,镉是否可以作用于高密度脂蛋白,而使高密度脂蛋白结构改变、含量改变、活性改变、功能改变,这些尚缺乏相关研究。

发明内容

[0007] 针对镉污染严重的问题,本发明的目的在于提供一种镉-高密度脂蛋白螯合物及其制备方法,并建立镉-高密度脂蛋白螯合物的定性、定量检测方法,以便定量检测镉-高密度脂蛋白螯合物在评价一个地区镉污染程度的应用。通过定量检测一个地区人群血清中镉-高密度脂蛋白螯合物,可以间接反映这个地区人群受镉污染的情况,从而间接反映这个地区镉污染程度。

[0008] 本发明解决其技术问题所采用的技术方案是:提供一种镉-高密度脂蛋白螯合物,该镉-高密度脂蛋白螯合物是镉离子与高密度脂蛋白通过巯基或/和半胱氨酸残基螯合而

成。

[0009] 本发明还提供一种上述的镉-高密度脂蛋白螯合物的制备方法,即体外合成法,包括以下步骤:

[0010] A) 镉-高密度脂蛋白的合成:在提纯源于人体的高密度脂蛋白或按照生物学方法重组的高密度脂蛋白中加入镉离子进行螯合反应,得到反应溶液;

[0011] B) 镉-高密度脂蛋白螯合物纯化:采用免疫亲和层析法,去除步骤A) 反应溶液中未反应的高密度脂蛋白、特异性抗体和镉离子,即得镉-高密度脂蛋白螯合物。

[0012] 作为优选,所述步骤B) 中具体包括以下步骤:

[0013] (1) 溶解样品:将上述步骤A) 的提取的镉-高密度脂蛋白螯合物溶解于生理盐水中,得镉-高密度脂蛋白螯合物溶液;

[0014] (2) 平衡层析柱:使用稀释缓冲液冲洗层析柱的管路,在层析柱中装入能与高密度脂蛋白特异性结合的填料,装柱后,继续使用稀释缓冲液平衡层析柱;

[0015] 所述能与高密度脂蛋白特异性结合的填料为吸附有可与高密度脂蛋白特异性结合物质的硅胶或树脂;

[0016] (3) 上样:待层析柱平衡后,用稀释缓冲液稀释步骤(1) 所述溶液,然后上柱,使高密度脂蛋白与填料特异性结合;

[0017] (4) 洗脱:使用稀释缓冲液冲洗层析柱至基线平衡,然后使用0.05-0.10mol/L的 Na_2HPO_4 溶液进行洗脱;

[0018] (5) 收集:收集步骤(4) 的洗脱液,收集完毕后立即使蛋白复原;

[0019] (6) 透析:将步骤(5) 中的收集的洗脱液装透析袋,用 ddH_2O 透析除盐,换水三次后,4℃透析过夜,收集样本;

[0020] (7) 平衡层析柱:采用新的层析柱,用稀释缓冲液冲洗管路,在该层析柱中装入能与镉特异性结合的填料,装柱后再用稀释缓冲液平衡层析柱;

[0021] 所述能与镉特异性结合的填料为吸附有可与镉特异性结合物质的硅胶或树脂;

[0022] (8) 上样:待层析柱平衡后,用稀释缓冲液稀释步骤(6) 中样本,然后上柱;

[0023] (9) 洗脱:使用稀释缓冲液冲洗层析柱至基线平衡,然后使用0.5-1.0mol/L的 Na_2HPO_4 溶液进行洗脱;

[0024] (10) 收集:收集步骤(9) 的洗脱液,收集完毕后立即使蛋白复原;

[0025] (11) 透析:将步骤(10) 的洗脱液装透析袋,用 ddH_2O 透析除盐,换水三次后,4℃透析过夜,收集样本,即得镉-高密度脂蛋白螯合物。

[0026] 作为优选,上述镉-高密度脂蛋白螯合物的制备方法,还包括以下对镉-高密度脂蛋白螯合物的鉴定步骤,具体包括以下步骤:

[0027] (1) 制备胶床:以琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶中的一种作为介质制备胶床;

[0028] (2) 加样:取步骤B) 中提取纯化得到的镉-高密度脂蛋白螯合物,加入上样缓冲液,并混匀,然后加样于样品槽中;

[0029] (3) 电泳:连接电泳板,进行电泳;

[0030] (4) 检测:在胶床上找出含镉的蛋白条带,将该蛋白条带取出,将蛋白条带溶解,然后再采用ICP-MS或AAS检测是否含有镉以及检测镉的含量。

[0031] 本发明还提供一种如上述的镉-高密度脂蛋白螯合物在制备检测人体内镉-高密

度脂蛋白螯合物的试剂或试剂盒中的应用。

[0032] 本发明还提供一种至少包括如上述的镉-高密度脂蛋白螯合物作为标准品的试剂盒。

[0033] 优选地,该试剂盒中还包括包被液,该包被液含有捕获高密度脂蛋白的物质或捕获金属镉的物质。

[0034] 本发明还提供一种定量检测镉-高密度脂蛋白螯合物的方法,以已知含量的上述的镉-高密度脂蛋白螯合物作为标准品,采用以下方法之一对样品进行检测:酶联免疫法、酶联免疫与原子吸收光谱结合法、酶联免疫与电感耦合等离子体质谱结合法、提纯镉-高密度脂蛋白螯合物与酶联免疫结合法、提纯镉-高密度脂蛋白螯合物与原子吸收光谱结合法、提纯镉-高密度脂蛋白螯合物与电感耦合等离子体质谱结合法、电泳与酶联免疫或原子吸收光谱或电感耦合等离子体质谱结合法。

[0035] 相比现有技术,本发明的有益效果在于:

[0036] 1.本发明首次合成了镉-高密度脂蛋白螯合物;

[0037] 2.本发明首次提出镉-高密度脂蛋白螯合物可用于制备检测血样中镉-高密度脂蛋白螯合物的试剂或试剂盒中的应用;

[0038] 3.本发明实现了-高密度脂蛋白螯合物的特异性识别和定量检测,以便定量检测人群血清中镉-高密度脂蛋白螯合物的含量,以评价一个地区镉污染程度的应用,为工业地区的镉污染水平提供间接指标。本发明建立的镉-高密度脂蛋白螯合物定量检测方法的准确度高、重复性好。

附图说明

[0039] 图1为本发明所述的镉-高密度脂蛋白螯合物的非变性电泳条带图;

[0040] 图2为本发明所述的镉-高密度脂蛋白螯合物的同步辐射X线电泳条的荧光分析图。

具体实施方式

[0041] 下面结合具体实施方式,对本发明做进一步描述:

[0042] 本发明除特别说明外,涉及的实验操作步骤均为本领域常规的步骤;所用试剂、材料如未特殊说明,均视为可从市购方式购得:

[0043] 提取试剂为PEG溶液、硼酸盐缓冲液等(采用PEG法);

[0044] 捕获高密度脂蛋白的物质为抗高密度脂蛋白抗体,可通过市售获得,如艾博抗(上海)贸易有限公司出售的“Abcam ab157595”的anti-HDL抗体,以下实施方式中,所述与高密度脂蛋白特异性结合的物质、抗高密度脂蛋白抗体、抗HDL抗体均为捕获高密度脂蛋白的物质;

[0045] 酶标抗体为含有辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等酶标记的抗体中的一种;

[0046] 稀释缓冲液为pH 9.6的0.05M碳酸盐缓冲液,配制方法示例:取1.5g的 Na_2CO_3 和2.93g的 NaHCO_3 溶解加ddH₂O定容至1000mL;

[0047] 洗涤缓冲液为pH7.4的0.15M PBS溶液,配制方法示例:取0.2g的 KH_2PO_4 、2.90g的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、8.0g的 NaCl 、0.2g的 KCl 、0.5mLTween-20,溶解加ddH₂O定容至1000mL;

[0048] 封闭液为牛血清白蛋白溶液,配制方法示例:取0.1g牛血清白蛋白,加入洗涤缓冲液稀释定容至100mL;

[0049] 终止液为2M H_2SO_4 ,配制方法示例:取178.3mL的ddH₂O,加浓 H_2SO_4 定容至200mL;

[0050] 底物为甲基联苯胺(TMB)溶液,配制方法示例:取0.5mL浓度为2g/L的甲基联苯胺乙醇溶液,加底物稀释液稀释至10mL;

[0051] 底物缓冲液pH为5.0,其中 Na_2HPO_4 的摩尔浓度为0.2M、柠檬酸的摩尔浓度为0.1M,配制方法示例:取1.42g Na_2HPO_4 、0.96g柠檬酸,然后加入ddH₂O至50mL,即得;

[0052] 洗脱液的配制方法示例:将木瓜蛋白酶用pH 8.0,0.1mol/L Tris-HCl缓冲液配制成1-2mg/mL,再加入1mmol/L二巯苏糖醇(DTT) 37℃孵育30min,得洗脱液;

[0053] 上样缓冲液可由如下比例的组分配制而成:Tris-HCl:1%溴酚蓝:ddH₂O:甘氨酸=15.5:2.5:7:25,其中Tris-HCl的pH为6.8、摩尔浓度为1M;

[0054] 电泳缓冲液的配制方法如下:取3.0g Tris、14.4g甘氨酸、溶于800mLddH₂O中,调pH至8.3后,定容至1L;

[0055] 捕获镉的物质为货号为“巴傲得AP7015”的鼠抗Cd mAb;其中,本发明所述与镉特异性结合的物质、抗Cd抗体、二抗、抗镉抗体均为捕获镉的物质;

[0056] 本发明提供一种镉-高密度脂蛋白螯合物,镉离子与高密度脂蛋白通过巯基或/和半胱氨酸残基螯合而成。

[0057] 具体地,镉-高密度脂蛋白螯合物是由镉通过结合锌指结构、巯基、半胱氨酸残基中的至少一种结构与高密度脂蛋白上的载脂蛋白B或胆固醇、甘油三酯等结合而形成的螯合物。

[0058] 本发明还提供镉-高密度脂蛋白螯合物的制备方法,包括以下步骤:

[0059] A) 镉-高密度脂蛋白的合成:在提纯源于人体的高密度脂蛋白或按照生物学方法重组的高密度脂蛋白中加入镉离子进行螯合反应,得到反应溶液;

[0060] B) 镉-高密度脂蛋白螯合物纯化:采用免疫亲和层析法,去除步骤A)反应溶液中未反应的高密度脂蛋白、特异性抗体和镉离子,即得镉-高密度脂蛋白螯合物,具体包括以下步骤:

[0061] (1) 溶解样品:将上述步骤A)的提取的镉-高密度脂蛋白螯合物溶解于生理盐水中,得镉-高密度脂蛋白螯合物溶液;

[0062] (2) 平衡层析柱:使用稀释缓冲液冲洗层析柱的管路,在层析柱中装入能与高密度脂蛋白特异性结合的填料,装柱后,继续使用稀释缓冲液平衡层析柱;

[0063] 所述能与高密度脂蛋白特异性结合的填料为吸附有可与高密度脂蛋白特异性结合物质的硅胶或树脂;

[0064] (3) 上样:待层析柱平衡后,用稀释缓冲液稀释步骤(1)所述溶液,然后上柱,使高密度脂蛋白与填料特异性结合;

[0065] (4) 洗脱:使用稀释缓冲液冲洗层析柱至基线平衡,然后使用0.05-0.10mol/L的 Na_2HPO_4 溶液进行洗脱;

[0066] (5) 收集:收集步骤(4)的洗脱液,收集完毕后立即使蛋白复原;

[0067] (6) 透析:将步骤(5)中的收集的洗脱液装透析袋,用ddH₂O透析除盐,换水三次后,4℃透析过夜,收集样本;

[0068] (7) 平衡层析柱: 采用新的层析柱, 用稀释缓冲液冲洗管路, 在该层析柱中装入能与镉特异性结合的填料, 装柱后再用稀释缓冲液平衡层析柱;

[0069] 所述能与镉特异性结合的填料为吸附有可与镉特异性结合物质的硅胶或树脂;

[0070] (8) 上样: 待层析柱平衡后, 用稀释缓冲液稀释步骤(6)中样本, 然后上柱;

[0071] (9) 洗脱: 使用稀释缓冲液冲洗层析柱至基线平衡, 然后使用0.5-1.0mol/L的 Na_2HPO_4 溶液进行洗脱;

[0072] (10) 收集: 收集步骤(9)的洗脱液, 收集完毕后立即使蛋白复原;

[0073] (11) 透析: 将步骤(10)的洗脱液装透析袋, 用 ddH_2O 透析除盐, 换水三次后, 4℃透析过夜, 收集样本, 即得镉-高密度脂蛋白螯合物。

[0074] C): 对镉-高密度脂蛋白螯合物的鉴定, 具体包括以下步骤:

[0075] (1) 制备胶床: 以琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶中的一种作为介质制备胶床;

[0076] (2) 加样: 取步骤B)中提取纯化得到的镉-高密度脂蛋白螯合物, 加入上样缓冲液, 并混匀, 然后加样于样品槽中;

[0077] (3) 电泳: 连接电泳板, 进行电泳;

[0078] (4) 检测: 在胶床上找出含镉的蛋白条带, 将该蛋白条带取出, 将蛋白条带溶解, 然后再采用ICP-MS或AAS检测是否含有镉以及检测镉的含量。

[0079] 本发明还提供一种至少包括如上述的镉-高密度脂蛋白螯合物作为标准品的试剂盒。

[0080] 在本发明中, 能实现本发明目的的试剂盒可以列出以下几种, 但并不限于此。

[0081] 一种检测血样中镉-高密度脂蛋白螯合物的试剂盒, 包括: 含有可用于捕获高密度脂蛋白的包被液, 还包括封闭液、洗涤缓冲液、可捕获镉的物质作为二抗、酶标抗体、底物、终止液、稀释缓冲液、阳性对照、阴性对照等。

[0082] 一种检测血样中镉-高密度脂蛋白螯合物的试剂盒, 包括: 含有可用于捕获高密度脂蛋白的包被液, 还包括封闭液、洗涤缓冲液、洗脱液、阳性对照、阴性对照等。

[0083] 一种检测血样中镉-高密度脂蛋白螯合物的试剂盒, 包括: 含有可用于捕获高密度脂蛋白的包被液, 还包括封闭液、洗涤缓冲液、洗脱液、酸化剂、过氧化氢、标准品、阴性对照等。

[0084] 一种检测血样中镉-高密度脂蛋白螯合物的试剂盒, 包括提取高密度脂蛋白所需提取试剂、复溶液、含有可用于捕获镉的物质的包被液、封闭液、洗涤缓冲液、酶标抗体、底物、终止液、稀释缓冲液、标准品、阴性对照等。

[0085] 一种检测血样中镉-高密度脂蛋白螯合物的试剂盒, 包括提取高密度脂蛋白所需提取试剂、复溶液、阳性对照、阴性对照等。

[0086] 一种检测血样中镉-高密度脂蛋白螯合物的试剂盒, 包括提取高密度脂蛋白所需提取试剂、复溶液、酸化剂、过氧化氢、阳性对照、阴性对照等。

[0087] 一种检测血样中镉-高密度脂蛋白螯合物的试剂盒, 包括提取高密度脂蛋白所需提取试剂、胶床介质、复溶液、加样缓冲液、溶解胶床上含镉的蛋白条带所需液体、含有可用于捕获镉的物质的包被液、封闭液、洗涤缓冲液、酶标抗体、底物、终止液、阳性对照、阴性对照等。

[0088] 一种检测血样中镉-高密度脂蛋白螯合物的试剂盒, 包括提取高密度脂蛋白所需

提取试剂、胶床介质、复溶液、加样缓冲液、溶解胶床上含镉的蛋白条带所需液体、阳性对照、阴性对照等。

[0089] 一种检测血样中镉-高密度脂蛋白螯合物的试剂盒,包括提取高密度脂蛋白所需提取试剂、胶床介质、复溶液、加样缓冲液、溶解胶床上含镉的蛋白条带所需液体、硝酸、过氧化氢、阳性对照、阴性对照等。

[0090] 上述几种试剂盒中,所述阳性对照为标准品,即螯合有重金属镉的高密度脂蛋白螯合物或螯合有重金属镉的BSA螯合物;所述阴性对照为不含有标准品的稀释洗脱液。

[0091] 上述试剂盒用于检测镉-高密度脂蛋白螯合物,以提高检测的准确性和重复性,并使之在临床中得到推广。

[0092] 本发明还提供一种定量检测镉-高密度脂蛋白螯合物的方法,以已知含量的上述的镉-高密度脂蛋白螯合物作为标准品,采用以下方法之一对样品进行检测:酶联免疫法、酶联免疫与原子吸收光谱结合法、酶联免疫与电感耦合等离子体质谱结合法、提纯镉-高密度脂蛋白螯合物与酶联免疫结合法、提纯镉-高密度脂蛋白螯合物与原子吸收光谱结合法、提纯镉-高密度脂蛋白螯合物与电感耦合等离子体质谱结合法、电泳与酶联免疫或原子吸收光谱或电感耦合等离子体质谱结合法。在本发明中,用检测镉-高密度脂蛋白螯合物的方法可以列出的有以下几种,但并不限于以下几种。

[0093] 以下所述稀释倍比为重量体积比。

[0094] 方法一:酶联免疫法(ELISA法)检测镉-高密度脂蛋白螯合物,按照如下步骤检测:

[0095] 1) 包被:用稀释缓冲液稀释可以捕获高密度脂蛋白的物质至2000-16000倍,加入ELISA板微孔中,4℃过夜16-18小时,或37℃水浴1-3小时,储存冰箱;

[0096] 2) 封闭:移去稀释缓冲液,并用洗涤缓冲液进行洗涤,待洗涤完成后,加入封闭液,37℃放置1小时,移去封闭液,并用洗涤缓冲液进行洗涤,洗涤完成后,ELISA板于37℃放置1小时;

[0097] 3) 加待测样本,并且温育:从循环系统取样,作待测样本;以已知含量的镉-高密度脂蛋白螯合物作标准品;用稀释缓冲液将待测样本和标准品均稀释至10-40倍,加至微孔中,37℃作用1-2小时;

[0098] 4) 加入可以捕获镉的物质,并且温育:移去待测样本,并用洗涤缓冲液进行洗涤,待洗涤完成后,加入用稀释缓冲液稀释12500-100000倍的抗镉抗体,37℃作用1-2小时,使抗镉抗体与高密度脂蛋白上的金属镉反应;

[0099] 5) 酶结合物温育:移去抗镉抗体,洗涤,加入用稀释缓冲液稀释的HRP酶标抗体,37℃作用1-2小时,使其与HRP酶标抗体反应;

[0100] 6) 底物温育:移去待测样本,并用洗涤缓冲液进行洗涤,待洗涤完成后,加入底物,37℃避光作用30分钟;

[0101] 7) 终止反应:滴加终止液至每一微孔;

[0102] 8) 取波长450nm,加完终止液后,将ELISA板置于酶标仪上分别读取待测样本组和标准品的OD值,绘制标准曲线,通过与标准品组比较,求得待测样本的含量。

[0103] 本方法中,步骤8)也可不使用酶标仪,直接通过染色情况进行定性检测。

[0104] 该方法利用ELISA原理,可以将全血中的特异性高密度脂蛋白提取出来,提取出来的高密度脂蛋白上部分螯合有重金属镉,而这部分高密度脂蛋白上的镉可以被抗镉的特异

性抗体所捕获,之后可以再被辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等酶标记的抗体所捕获(该抗体不识别包被蛋白),捕获上的抗体在显色剂及终止液的作用下,可以在仪器下读出OD值,而不含有螯合金属镉的高密度脂蛋白,则不会被抗镉的特异性抗体所捕获,也不会与辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等酶标记的抗体所捕获,而所用试剂中也不含有金属镉(阴性对照组结果为阴性),因而当所读取的OD值结果显示为阳性时,即可证明检测出高密度脂蛋白上螯合的金属镉。

[0105] 方法二:酶联免疫与原子吸收光谱结合法(ELISA法+AAS法)检测镉-高密度脂蛋白螯合物按照如下步骤检测:

[0106] 1) 包被:将能够捕获高密度脂蛋白的物质,如抗高密度脂蛋白抗体(抗高密度脂蛋白抗体)包被于固相载体上,用稀释缓冲液稀释抗高密度脂蛋白抗体至2000-16000倍,加入ELISA板微孔中,4℃过夜16-18小时,或37℃水浴1-3小时,储存冰箱;

[0107] 2) 封闭:移去稀释缓冲液,并用洗涤缓冲液进行洗涤,待洗涤完成后,加入封闭液,37℃放置1小时,移去封闭液,并用相应洗涤缓冲液进行洗涤,洗涤完成后,ELISA板于37℃放置1小时;

[0108] 3) 加待测样本,并且温育:从循环系统中取样,作待测样本;以已知含量的镉-高密度脂蛋白螯合物作标准品;用稀释缓冲液稀释至10-40倍,加至微孔中,37℃作用1-2小时;

[0109] 4) 洗脱:移去待测样本,洗涤,加入稀释倍数为5-80的洗脱液,在37℃下洗脱1-3小时;

[0110] 5) 检测:从ELISA微孔中取样,于原子吸收光谱仪检测螯合于高密度脂蛋白上的镉,读出相应数值;

[0111] 该实施例利用ELISA原理对血清中的高密度脂蛋白进行捕获,并结合原子吸收光谱(AAS)仪检测螯合于高密度脂蛋白上的镉;由于溶液中仅含有高密度脂蛋白,且所用试剂中不含任何重金属(阴性对照组结果为阴性),不会对结果造成干扰,因而当所读取的结果显示为阳性时,即可证明检测出高密度脂蛋白上螯合的金属镉。

[0112] 方法三:酶联免疫与电感耦合等离子体质谱结合法(ELISA法+ICP-MS法)检测镉-高密度脂蛋白螯合物按照如下步骤检测:

[0113] 1) 包被:将能够捕获高密度脂蛋白的物质,如抗高密度脂蛋白抗体包被于固相载体上,用稀释缓冲液稀释抗高密度脂蛋白抗体至2000-16000倍,加入ELISA板微孔中,4℃过夜16-18小时,或37℃水浴1-3小时,储存冰箱;

[0114] 2) 封闭:移去稀释缓冲液,并用洗涤缓冲液进行洗涤,待洗涤完成后,加入封闭液,37℃放置1小时,移去封闭液,并用相应洗涤缓冲液进行洗涤,洗涤完成后,ELISA板于37℃放置1小时;

[0115] 3) 加待测样本,并且温育:从循环系统取全血,作待测样本;以已知含量的镉-高密度脂蛋白螯合物作标准品;用稀释缓冲液稀释至10-40倍,加至微孔中,37℃作用1-2小时;

[0116] 4) 洗脱:移去待测样本,并用相应洗涤缓冲液进行洗涤,待洗涤完成后,加入稀释5-80倍的洗脱液,在37-57℃下洗脱1-3小时;

[0117] 5) 酸化:在步骤4)中的溶液中加入酸化剂对溶液进行酸化,封口过夜,彻底酸化;

[0118] 6) 检测:加入过氧化氢,并且加热赶酸,并从ELISA试剂板中洗脱的溶液中取0.5mL液体,于电感耦合等离子体质谱仪下检测螯合于高密度脂蛋白的镉,读出相应数值。

[0119] 该方法在利用ELISA原理的基础上,结合感耦合等离子体质谱(ICP-MS)原理,用电感耦合等离子体质谱仪检测整合于高密度脂蛋白上的镉;即先采用ELISA原理将血清中的镉-高密度脂蛋白螯合物提取出来,再采用感耦合等离子体质谱仪对整合于高密度脂蛋白上的镉进行定量检测;由于溶液中仅含有高密度脂蛋白,且所用试剂中不含任何重金属(阴性对照组结果为阴性),不会对结果造成干扰,因而当所读取的结果显示为阳性时,即可证明检测出高密度脂蛋白上螯合的金属镉。

[0120] 方法四:提纯镉-高密度脂蛋白螯合物与酶联免疫结合法(提纯法+ELISA法)检测镉-高密度脂蛋白螯合物,按照如下步骤检测:

[0121] 1) 从全血中提取非特异性高密度脂蛋白:采用超速离心法、高压液相层析法、凝胶过滤层析法、凝胶电泳法等方法,从全血中提取高密度脂蛋白,并将提取出的高密度脂蛋白复溶,得高密度脂蛋白的溶液;

[0122] 2) 包被:将抗镉抗体包被于固相载体上,用稀释缓冲液稀释抗镉抗体至12500-100000倍,加入ELISA板微孔中,4℃过夜16-18小时,或37℃水浴1-3小时,储存冰箱;

[0123] 3) 封闭:移去稀释缓冲液,并用洗涤缓冲液进行洗涤,待洗涤完成后,加入封闭液,37℃放置1小时,移去封闭液,并用相应洗涤缓冲液进行洗涤,洗涤完成后,ELISA板于37℃放置1小时;

[0124] 4) 加待测样本,并且温育:从步骤1)的溶液中取样,作待测样本;以已知含量的镉-高密度脂蛋白螯合物作标准品;用稀释缓冲液稀释至10-40倍,加至微孔中,37℃作用1-2小时;

[0125] 5) 酶结合物温育:移去高密度脂蛋白的复溶液,并用洗涤缓冲液进行洗涤,待洗涤完成后,加入用稀释缓冲液稀释的酶标抗体,37℃作用1-2小时,使其与酶标抗体反应;

[0126] 6) 底物温育:移去待测样本,并用相应洗涤缓冲液进行洗涤,待洗涤完成后,加入底物,37℃避光作用30分钟;

[0127] 7) 终止反应:滴加终止液至每一微孔;

[0128] 8) 取波长450nm,加完终止液后,在酶标仪上分别读取待测样本组和标准品的OD值,绘制标准曲线,通过与标准品组比较,求得待测样本的含量。

[0129] 本方法中,也可不使用酶标仪,直接通过染色情况进行定性检测。

[0130] 方法五:提纯镉-高密度脂蛋白螯合物与原子吸收光谱结合法(提纯法+AAS法)检测血样中镉-高密度脂蛋白螯合物,按照如下步骤检测:

[0131] 1) 从全血中提取非特异性高密度脂蛋白:采用超速离心法、高压液相层析法、凝胶过滤层析法、凝胶电泳法等方法,从全血中提取高密度脂蛋白,并将提取出的高密度脂蛋白复溶,得高密度脂蛋白的溶液;

[0132] 2) 检测:从步骤1)的复溶液中取样,于原子吸收光谱仪检测整合于高密度脂蛋白上的镉,读出相应数值。

[0133] 方法六:提纯镉-高密度脂蛋白螯合物与电感耦合等离子体质谱结合法(提纯法+ICP-MS法)检测镉-高密度脂蛋白螯合物,按照如下步骤检测:

[0134] 1) 从全血中提取非特异性高密度脂蛋白:采用超速离心法、高压液相层析法、凝胶过滤层析法、凝胶电泳法等方法,从全血中提取高密度脂蛋白,并将提取出的高密度脂蛋白复溶,得高密度脂蛋白的溶液;

[0135] 2) 酸化:从步骤1)的复溶液中取样,在溶液中加入硝酸对溶液进行酸化,封口过夜,彻底酸化;

[0136] 3) 检测:加入过氧化氢,并且加热赶酸后取0.5mL溶液,于电感耦合等离子体质谱仪下检测整合于高密度脂蛋白上的镉,读出相应数值。

[0137] 方法四、方法五和方法六均是通过全血提取法分离出高密度脂蛋白,再采用特异性检测方法,测定高密度脂蛋白中镉-高密度脂蛋白螯合物上镉的含量;即先采用物理分离手段,如超速离心法、高压液相层析法、凝胶过滤层析法等,将高密度脂蛋白从待测血浆样本中分离出来并复溶于生理盐水中,再利用ELISA原理、原子吸收光谱检测或进行检测电感耦合等离子体质谱法检测镉-高密度脂蛋白螯合物上的镉含量。

[0138] 方法七:电泳法+ELISA/AAS/ICP-MS法检测镉-高密度脂蛋白螯合物,具体如下:

[0139] 1) 从全血中提取非特异性高密度脂蛋白:采用超速离心法、高压液相层析法、凝胶过滤层析法、凝胶电泳法等方法,从全血中提取高密度脂蛋白,将提取出来的高密度脂蛋白复溶于生理盐水中,得高密度脂蛋白的复溶液;

[0140] 2) 制备胶床:根据需要选择合适的介质(如琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶等),按照相应要求制备好相应胶床;

[0141] 3) 加样:从步骤1)的复溶液中取8 μ L溶液,以已知含量的镉-高密度脂蛋白螯合物作标准品,加入2 μ L上样缓冲液,并混匀,然后加样于样品槽中;

[0142] 4) 电泳:连接电泳板,加电泳缓冲液,进行电泳,并根据需求将蛋白按照分子量、等电点等参数的不同进行分离;

[0143] 5) 检测:在胶床上找出含有镉的蛋白条带,将该条带取出,将该蛋白条带溶于液体之中,然后再分别利用ELISA、ICP-MS或AAS等原理检测溶于液体中的镉含量。

[0144] 此外,还可以利用此方法检测镉-高密度脂蛋白螯合物的等电点、分子量及含量等。

[0145] 在方法七中,将高密度脂蛋白从全血中提取出来,再采用凝胶电泳法对所提取的高密度脂蛋白进行分离,再找出富含镉的相应条带,再检测相关高密度脂蛋白的含量;即高密度脂蛋白从红细胞中释放后,可以用多种方法提纯出来(例如超速离心法、高压液相层析法、凝胶过滤层析法、凝胶电泳法,ELISA方法等),将提纯出来的高密度脂蛋白复溶于溶液中,取一定量的高密度脂蛋白,利用电荷移动原理,进行电泳(electrophoresis,EP),在凝胶板(可根据需要采用不同介质)上可根据分子量、等电点等不同跑出不同的条带,寻找出富含镉的相应条带,将凝胶中的蛋白质用相应复溶剂复溶于溶液中,即可以在特定波长下检测相关高密度脂蛋白的含量,也可以利用ELISA、AAS、ICP-MS等原理检测出整合于高密度脂蛋白上的镉含量,由于溶液中仅含有高密度脂蛋白,且所用试剂中不含任何重金属(阴性对照组结果为阴性),不会对结果造成干扰,因而当所读取的结果显示为阳性时,即可证明检测出高密度脂蛋白上整合的金属镉。

[0146] 方法四、方法五、方法六和方法七中,从全血中提取非特异性高密度脂蛋白的示例如下:

[0147] a) 取全血,用NaBr调节密度至1.21g/mL,50000rpm超速离心24h,收集下层浅黄色组分;

[0148] b) 用中性盐配置成密度分别为 $d=1.006$ 、 $d=1.182$ 、 $d=1.478$ 的三种溶液;

[0149] c) 取4mL步骤a) 血浆至容量为10mL的超离心管中的底层,上面铺盖2mL $d=1.006$ 盐溶液,4℃2000rap/min离心30min,收集下层4mL混合血浆待用;

[0150] d) 向步骤c) 4mL混合血浆加入2mL1.006盐溶液,18℃40000rap/min离心17h,取上层1mL,即极低密度脂蛋白;

[0151] e) 弃去1mL上层的液体,转移剩余混合液,加入2mL $d=1.182$ 盐溶液,混匀,18℃40000rpm/min离心21h,取出上层1mL混合液,此即低密度脂蛋白;

[0152] f) 弃去1mL上层的液体,转移剩余混合液,加入2mL1.478盐溶液,18℃40kr/min离心41h,取上层溶液,即高密度脂蛋白;

[0153] 所述中性盐为NaBr、KBr、NaCl或KCl中的一种或两种以上。

[0154] 实施例1:合成法合成镉-高密度脂蛋白螯合物,即包括以下步骤:

[0155] 本实施例所制备的镉-高密度脂蛋白螯合物,通过凝胶电泳进一步分离,并通过电感耦合等离子体质谱或原子吸收光谱进行检测定性鉴定。

[0156] 制备镉-高密度脂蛋白螯合物的方法,包括以下步骤:

[0157] 本实施例所使用的试剂如下:

[0158] 1) 硼酸盐缓冲液,其摩尔浓度为0.01M,其制备方法示例如下:称取0.31g硼酸盐溶于400mLddH₂O中,用0.1moI/L的NaOH调节pH至9.0,定容至500mL。

[0159] 2) EDTA-NaHCO₃混合液,其制备方法如下:取1.86g EDTA • 2H₂O和16.8g NaHCO₃,溶于900mLddH₂O中,用1.0M NaOH调整pH至8.0定容至1000mL,高压灭菌,室温保存;

[0160] 3) ITCBE购买自日本同仁化学研究所,货号M030;

[0161] 4) 高密度脂蛋白溶液:称取4.0mg高密度脂蛋白溶于4.0mL0.01M pH9.0硼酸盐缓冲液中,充分振荡溶解,配制成1.0mg/mL的高密度脂蛋白溶液;

[0162] 5) 透析袋的截留分子量14000,购买自Bioshop Inc;

[0163] 透析袋的预处理:将透析袋放入500mL的EDTA-NaHCO₃混合液中,煮沸10min;倾弃EDTA-NaHCO₃液,用ddH₂O轻轻漂洗,再用500mL5mmoI/L EDTA煮沸10min;弃掉煮沸液,彻底用ddH₂O清洗,加入大量的ddH₂O浸泡透析袋4℃过夜。使用时,戴上手套,取出透析袋,用大量的ddH₂O彻底冲洗其内外表面;

[0164] A) 镉-高密度脂蛋白螯合物的合成:在提纯源于人体的高密度脂蛋白或按照生物学方法重组的高密度脂蛋白中加入镉离子进行螯合反应,得到反应溶液,具体操作步骤如下;

[0165] 1) 取2.0mg ITCBE溶于2mLDMSO中;

[0166] 2) 缓慢将步骤1制备的液体加入高密度脂蛋白溶液中,边滴加边震荡,于25℃,100r/min的摇床中作用24h,然后用透析袋透析24h,除去未与高密度脂蛋白结合的ITCBE;

[0167] 3) 将透析所得的液体用1moI/L HCl调节pH值至7.0,然后缓慢逐渐滴加80μI 1mmoI/L镉离子溶液,边滴加边振荡,以免镉离子使蛋白变性沉淀;

[0168] 4) 将加好的溶液在25℃,100r/min的摇床中反应2h,用处理好的透析袋进行透析24h;

[0169] 5) 将透析好的液体于-20℃分装保存,得到镉-高密度脂蛋白螯合物的反应溶液。

[0170] B) 镉-高密度脂蛋白螯合物纯化:采用免疫亲和层析法,去除步骤A) 反应溶液中未反应的高密度脂蛋白、特异性抗体和镉离子,即得镉-高密度脂蛋白螯合物,具体包括以下

步骤:

[0171] (1) 溶解样品:将上述步骤A)的提取的镉-高密度脂蛋白螯合物溶解于生理盐水中,得镉-高密度脂蛋白螯合物溶液;

[0172] (2) 平衡层析柱:使用稀释缓冲液冲洗层析柱的管路,在层析柱中装入能与高密度脂蛋白特异性结合的填料,装柱后,继续使用稀释缓冲液平衡层析柱;

[0173] (3) 上样:待层析柱平衡后,用稀释缓冲液稀释步骤(1)所述溶液,然后上柱,使高密度脂蛋白与填料特异性结合;

[0174] (4) 洗脱:使用稀释缓冲液冲洗层析柱至基线平衡,然后使用0.05-0.10mol/L的 Na_2HPO_4 溶液进行洗脱;

[0175] (5) 收集:收集步骤(4)的洗脱液,收集完毕后立即使蛋白复原;

[0176] (6) 透析:将步骤(5)中的收集的洗脱液装透析袋,用 ddH_2O 透析除盐,换水三次后,4℃透析过夜,收集样本;

[0177] (7) 平衡层析柱:采用新的层析柱,用稀释缓冲液冲洗管路,在该层析柱中装入能与镉特异性结合的填料,装柱后再用稀释缓冲液平衡层析柱;

[0178] (8) 上样:待层析柱平衡后,用稀释缓冲液稀释步骤(6)中样本,然后上柱;

[0179] (9) 洗脱:使用稀释缓冲液冲洗层析柱至基线平衡,然后使用0.5-1.0mol/L的 Na_2HPO_4 溶液进行洗脱;

[0180] (10) 收集:收集步骤(9)的洗脱液,收集完毕后立即使蛋白复原;

[0181] (11) 透析:将步骤(10)的洗脱液装透析袋,用 ddH_2O 透析除盐,换水三次后,4℃透析过夜,收集样本,即得镉-高密度脂蛋白螯合物。

[0182] C) 对镉-高密度脂蛋白螯合物的鉴定,具体步骤如下:

[0183] (1) 制备胶床:以琼脂糖凝胶作为介质制备胶床;

[0184] (2) 加样:取步骤B)中提取纯化得到的镉-高密度脂蛋白螯合物,复溶于生理盐水中,得镉-高密度脂蛋白螯合物的复溶液,取8 μL 上述复溶液,加入2 μL 上样缓冲液,并混匀,然后加样于样品槽中;

[0185] (3) 电泳:连接电泳板,加电泳缓冲液进行电泳;电泳过程中,电流为22mA恒流,环境温度为4度;至溴酚蓝移至胶底部时停止电泳,图1为本发明所述镉-高密度脂蛋白螯合物的非变性电泳条带图;

[0186] (4) 检测:在胶床上找出含镉的蛋白条带,将该蛋白条带取出,将蛋白条带溶解,然后再采用ICP-MS或AAS检测是否含有镉以及检测镉的含量。

[0187] D) 鉴定结果

[0188] 1) AAS检测结果

[0189] 取步骤C)分离出的蛋白条带溶液,以石墨炉原子吸收光谱法(AAS)初步测定高密度脂蛋白中重金属镉的含量,如下表所示,以NaCl溶液、KBr溶液、KCl溶液为空白对照;

[0190] 表1高密度脂蛋白中镉的含量

[0191]

样本名	Cd ($\mu\text{g/L}$)
待测样本	0.364
NaCl	0.023

KBr	0.000
KCl	0.000

[0192] 2) 同步辐射X荧光分析

[0193] 蛋白条带内微量元素含量的SRXRF分析在北京正负电子对撞机(BEPC)的4W1"同步辐射束线上完成。储存环中电子束流能量为2.2GeV,束流强度100mA。样品移动台(TSA200型,北京卓立汉光公司)可在计算机控制的步进马达驱动下沿X、Y二维方向上移动以改变入射光斑位置,移动步长为0.0025mm。从样品发射出的X射线由Si(Li)探测器(PGT Inc.LS30143-DS)探测,探头与入射SR线共平面且相互垂直,距样品照射点20mm,信号用PGT多道分析仪(MCA 4000)获取输出。用11.5keV的单色同步辐射光激发样品,调节入射光斑(1mmx 3mm)位置使之处于条带一端,在300s的测定时间内,光斑一直沿条带均匀缓慢移动,计数结束时光斑移到该条带另一端。沿电泳方向每1mm取一个谱。采用AX IL软件处理数据,并用来源于空气且含量恒定的Ar信号峰对其它元素峰进行归一处理,以抵消束流强度变化对信号强弱产生的影响。在相同的条件下以同样的方式测量定量标准干胶膜的荧光谱。

[0194] 图2为本发明所述的镉-高密度脂蛋白螯合物的同步辐射X线电泳条的荧光分析图,图中横坐标为蛋白条带位置,纵坐标为该条带各金属能量(含量)值。

[0195] 检测条件的确定

[0196] 1. 抗高密度脂蛋白抗体、抗Cd抗体最佳工作浓度以及血浆的最佳稀释倍数的确定。

[0197] 酶联免疫法检测镉-高密度脂蛋白螯合物的方法,具体包括以下步骤:

[0198] 1) 包被:将抗高密度脂蛋白抗体蛋白包被于固相载体上,分别用稀释缓冲液将包被蛋白以1:2000、1:4000、1:8000、1:16000的倍比稀释,加入ELISA板微孔中,每个浓度包被三排,4℃保存18小时;

[0199] 2) 封闭:移去稀释缓冲液,洗涤,加入封闭液,37℃放置1小时,移去封闭液,洗涤;

[0200] 3) 加待测样本:用缓冲液稀释将待测血浆样本按1:10、1:20、1:40的倍比稀释,加至微孔中,以已知含量的镉-高密度脂蛋白螯合物作标准品,设置阴性对照和空白对照,加至微孔中,37℃作用1小时;

[0201] 4) 加抗Cd抗体:移去待测血浆样本,洗涤,加入用稀释缓冲液按1:12500、1:25000、1:50000、1:100000的倍比稀释的抗Cd抗体,37℃作用1小时,使其与高密度脂蛋白上的金属镉反应;

[0202] 5) 加酶标:移去抗Cd抗体,洗涤,加入用稀释缓冲液稀释的HRP酶标抗体,37℃作用1小时,使其与抗Cd抗体反应;

[0203] 6) 底物温育:移去待测样本,洗涤,加入底物,37℃避光作用30min,加入终止液;

[0204] 7) 检测:于450nm波长下在酶标仪上分别读取标准品、待测血浆、阳性对照、阴性对照和空白对照样本的OD值,绘制标准曲线,求得待测样本的含量。

[0205] 本实施例中,采用本发明提供的镉-高密度脂蛋白螯合物标准品作为阳性对照,分别以不加待测血浆作为阴性对照1,即依次加入了抗高密度脂蛋白抗体、封闭液、抗Cd抗体、酶标和底物;

[0206] 以不加抗Cd抗体的对照试验组作为阴性对照2,即依次加入了抗高密度脂蛋白抗体、封闭液、待测血浆、酶标和底物;

[0207] 以不加酶标的对照试验组作为阴性对照3、即依次加入了抗高密度脂蛋白抗体、封闭液、待测血浆、抗Cd抗体和底物；

[0208] 以同时不加待测样本和抗Cd抗体的对照试验组作为阴性对照4，即依次加入了抗高密度脂蛋白抗体、封闭液、酶标和底物；

[0209] 以不加抗高密度脂蛋白抗体作的对照试验组为空白对照1，即加入了封闭液、待测血浆、抗Cd抗体、酶标和底物；

[0210] 以及以只加底物的对照试验组为空白对照2，以只加PBS的对照试验组为空白对照3。

[0211] 表2为不同抗高密度脂蛋白抗体稀释倍比、血浆稀释倍比、抗Cd抗体稀释倍比的样本OD值数据，

[0212] 表2不同抗高密度脂蛋白抗体、抗Cd抗体以及血浆稀释倍比下的检测结果

		抗高密度脂蛋白抗体				
		1:2000	1:4000	1:8000	1:16000	
[0213]	Cd 抗 1:12500	血浆 1:10	0.325	0.582	0.573	0.512
		血浆 1:20	0.378	0.523	0.512	0.497
		血浆 1:40	0.213	0.301	0.278	0.322
	Cd 抗 1:25000	血浆 1:10	0.33	0.571	0.524	0.493
		血浆 1:20	0.413	0.591	0.567	0.411
		血浆 1:40	0.293	0.317	0.35	0.311
[0214]	Cd 抗 1:50000	血浆 1:10	0.288	0.367	0.337	0.309
		血浆 1:20	0.278	0.353	0.376	0.298
		血浆 1:40	0.212	0.314	0.327	0.256
	Cd 抗 1:100000	血浆 1:10	0.128	0.234	0.282	0.2
		血浆 1:20	0.165	0.221	0.238	0.198
		血浆 1:40	0.108	0.209	0.249	0.187

[0215] 从表2可知，抗高密度脂蛋白抗体的稀释倍比为1:4000时，样本OD值大于平行条件下的其它抗高密度脂蛋白抗体的稀释倍比；该组样本中，血浆稀释倍比为1:20时，抗Cd抗体稀释倍比为1:25000时，OD值最大，为0.591。

[0216] 表3为抗高密度脂蛋白抗体的稀释倍比为1:4000、血浆稀释倍比为1:20、抗Cd抗体稀释倍比为1:25000时的阳性对照、阴性对照和空白对照的OD检测值，

[0217] 表3阳性对照、阴性对照及空白对照的检测结果

[0218]	阴性对照				空白对照			
	阳性对照	阴性	阴性	阴性	阴性	空白	空白	空白
		对照 1	对照 2	对照 3	对照 4	对照 1	对照 2	对照 3
	0.872	0.054	0.038	0.043	0.037	0.029	0.007	0.020

[0219] 从表3可知,在表2所确定的条件下进行试验,阴性对照组OD检测值小于0.1,说明该优化条件下,本方法的系统误差性小,满足分析方法要求,所以选此值所对应的浓度作为最佳工作浓度。

[0220] 2.ELISA洗脱液最佳工作浓度及时间的确定

[0221] 为寻求最适宜的洗脱条件,通过酶联免疫法在抗Cd抗体与酶标抗体温育后,以不同浓度的洗脱液进行洗脱,再通过酶标仪检测OD值,具体步骤如下:

[0222] (1) 包被:将抗Cd抗体包被于固相载体上,用稀释缓冲液按1:25000的倍比稀释,加入ELISA板微孔中,4℃保存16小时;

[0223] (2) 封闭:移去稀释缓冲液,洗涤后,加封闭液,37℃放置1小时,移去封闭液,并洗涤;

[0224] (3) 加酶标抗体:移去封闭液,洗涤后,加入用稀释缓冲液稀释至抗体浓度为2μg/mL的HRP酶标抗体,37℃作用2小时,使其与抗Cd抗体反应;

[0225] (4) 洗脱:移去酶标抗体,用稀释缓冲液对洗脱液进行稀释,使洗脱液中木瓜蛋白酶的浓度:酶标抗体中抗体的浓度=1:80、1:40、1:20、1:10、1:5,分别放置于37℃温度下作用1h、2h、3h;移去洗脱液,洗涤,待洗涤完成后,加入底物,37℃避光作用30分钟,加终止液终止反应;

[0226] (5) 于450nm的检测波长下在酶标仪上分别读取每个微孔的OD值,具体结果参见表4,

[0227] 表4不同洗脱液稀释倍数下的检测结果

		洗脱液	洗脱液	洗脱液	洗脱液	洗脱液
		1:5	1:10	1:20	1:40	1:80
[0228]	1h	0.281	0.168	0.081	0.114	0.469
	2h	0.250	0.115	0.050	0.183	0.438
	3h	0.225	0.106	0.100	0.196	0.441

[0229] 通过比较OD值,以判断ELISA孔壁上结合的抗Cd抗体-酶标抗体复合物洗脱程度,当OD值最低时,抗Cd抗体-酶标抗体复合物洗脱程度达到最大。如表4所示,当洗脱液中木瓜蛋白酶的浓度:酶标抗体中抗体的浓度=1:20时,抗Cd抗体-酶标抗体复合物洗脱程度达到最大;而作用时间为1h、2h、3h时,各组OD值变化不大,可见随着时间的延长,酶活力逐渐减弱,在酶浓度不变的情况下,延长消化时间并不能提高消化率,所以本实验中洗脱液的作用时间为1-3h皆可,综上所述,我们选择洗脱液1:20作为最适工作浓度,1-3h作为最适洗脱时间。

[0230] 应用实施例

[0231] 应用实施例1

[0232] 采用全血提取法提取出镉-高密度脂蛋白螯合物,采用酶联免疫法(ELISA法)检测100份标本血浆中的镉-高密度脂蛋白螯合物,即采用具体实施例方法一记载的方法检测,具体操作步骤如下:

[0233] 1) 包被:将抗高密度脂蛋白抗体包被于固相载体上,用稀释缓冲液稀释至4000倍,加入ELISA板微孔中,37℃保存1小时后于冰箱中4℃储存;

[0234] 2) 封闭:移去稀释缓冲液,洗涤,加封闭液,37℃放置1小时,移去封闭液,洗涤,ELISA板37℃放置1小时后于冰箱中4℃储存;

[0235] 3) 加样:以标本血浆作为待测样本,以已知含量的镉-高密度脂蛋白螯合物作标准品,用稀释缓冲液稀释将待测样本和标准品均稀释至20倍,加至微孔中,37℃作用1小时;

[0236] 4) 加抗Cd抗体:移去样品,洗涤,加入用稀释缓冲液稀释至25000倍的抗Cd抗体,37℃作用1小时,使其与高密度脂蛋白上的金属镉反应;

[0237] 5) 加酶标:移去抗Cd抗体,洗涤,加入抗体浓度为2μg/mL的酶标抗体,37℃作用1小时,使其与抗Cd抗体反应;

[0238] 6) 底物温育:移去待测样本,洗涤,加入底物,37℃避光作用30min,入终止液;

[0239] 7) 检测:于450nm波长下在酶标仪上分别读取待测样本组和标准品的OD值,过与标准品组比较,根据标准方程求得待测样本的中镉的含量,结果如表5所示。

[0240] 表5方法一对100份血浆样品的实测结果

[0241]

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
OD	0.534	0.562	0.403	0.582	0.524	0.418	0.592	0.308	0.596	0.504
编号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
OD	0.326	0.589	0.454	0.462	0.529	0.627	0.426	0.319	0.517	0.511
编号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
OD	0.487	0.365	0.594	0.443	0.327	0.518	0.513	0.534	0.219	0.515
编号	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
OD	0.566	0.458	0.611	0.122	0.529	0.53	0.426	0.322	0.505	0.508
编号	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
OD	0.513	0.411	0.512	0.509	0.416	0.329	0.23	0.523	0.543	0.556
编号	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
OD	0.615	0.358	0.374	0.412	0.53	0.529	0.491	0.439	0.732	0.36
编号	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
OD	0.514	0.526	0.379	0.213	0.532	0.434	0.524	0.516	0.552	0.611
编号	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
OD	0.545	0.458	0.46	0.402	0.461	0.514	0.581	0.569	0.31	0.561
编号	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
OD	0.359	8	0.546	0.415	0.148	0.334	0.555	0.587	0.3569	0.61
编号	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
OD	0.597	0.576	0.4768	0.323	0.562	0.619	0.403	0.577	0.227	0.32

[0242] 本应用实施例1中,步骤7)中,也可以不使用酶标仪检测,而是直接通过染色进行

定性检测。

[0243] 应用实施例2

[0244] 采用酶联免疫与原子吸收光谱结合法 (ELISA法+AAS法) 检测100份标本血浆中镉-高密度脂蛋白螯合物,即采用具体实施例方法二记载的方法检测,具体操作步骤如下:

[0245] 1) 包被:将抗高密度脂蛋白抗体包被于固相载体上,用稀释缓冲液稀释包被蛋白至4000倍,加入ELISA板微孔中,4℃过夜18小时;

[0246] 2) 封闭:移去稀释缓冲液,洗涤,加封闭液,37℃放置1小时,移去封闭液,洗涤,ELISA板4℃下保存;

[0247] 3) 加样:以标本血浆作待测样本,以已知含量的镉-高密度脂蛋白螯合物作标准品,用稀释缓冲液稀释将待测样本和标准品稀释至20倍,加至微孔中,37℃作用1-2小时;

[0248] 4) 洗脱:移去待测血浆样本,洗涤,加入0.8mol/L的Na₂HPO₄溶液,37℃作用2小时;

[0249] 5) 检测:从ELISA微孔中取适量液体,于原子吸收光谱仪检测螯合于高密度脂蛋白上的镉,结果如表6所示。

[0250] 表6方法二对100份血浆样品的实测结果

[0251]

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
μg/L	0.244	0.206	0.177	0.129	0.1	0.29	0.259	0.293	0.184	0.215
编号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
μg/L	0.234	0.071	0.165	0.145	0.334	0.126	0.261	0.203	0.117	0.129
编号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
μg/L	0.109	0.205	0.268	0.236	0.265	0.254	0.275	0.104	0.183	0.085
编号	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
μg/L	0.232	0.131	0.247	0.372	0.276	0.237	0.169	0.26	0.274	0.319
编号	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
μg/L	0.153	0.224	0.171	0.146	0.141	0.195	0.288	0.241	0.212	0.295
编号	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
μg/L	0.333	0.231	0.205	0.213	0.239	0.236	0.167	0.137	0.177	0.258
编号	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
μg/L	0.242	0.273	0.175	0.188	0.319	0.228	0.257	0.296	0.214	0.237
编号	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
μg/L	0.201	0.108	0.122	0.121	0.314	0.203	0.178	0.126	0.232	0.244
编号	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
μg/L	0.343	0.398	0.183	0.235	0.323	0.285	0.227	0.146	0.157	0.127
编号	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
μg/L	0.266	0.297	0.264	0.112	0.144	0.137	0.396	0.324	0.266	0.185

[0252] 应用实施例3:

[0253] 采用酶联免疫与电感耦合等离子体质谱结合法 (ELISA法+ICP-MS法) 检测100份标本血浆中镉-高密度脂蛋白螯合物,即采用具体实施例方法三记载的方法检测,具体操作步骤如下:

[0254] 1) 包被:将抗高密度脂蛋白抗体包被于固相载体上,用稀释缓冲液稀释包被蛋白至4000倍,加入ELISA板微孔中,4℃保存18小时;

[0255] 2) 封闭:移去稀释缓冲液,洗涤,加封闭液,37℃放置1小时,移去封闭液,洗涤,ELISA板4℃保存;

[0256] 3) 加样:以标本血浆作待测样本,以已知含量的镉-高密度脂蛋白螯合物作标准品,用缓冲液稀释将待测样本和标准品稀释至20倍,加至微孔中,37℃作用2小时;

[0257] 4) 洗脱:移去待测样本和标准品,洗涤,0.8mol/L的Na₂HPO₄溶液,37℃洗脱2小时;

[0258] 5) 酸化:在溶液中加入硝酸对溶液进行酸化,封口过夜,彻底酸化,加入过氧化氢,并且加热赶酸;

[0259] 6) 检测:取样于电感耦合等离子体质谱仪下检测整合于高密度脂蛋白上的镉,结果如表7所示。

[0260] 表7方法三对100份标本的实测结果

[0261]

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
μg/L	0.273	0.222	0.265	0.143	0.158	0.176	0.236	0.375	0.207	0.263
编号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
μg/L	0.291	0.149	0.338	0.134	0.265	0.209	0.264	0.299	0.259	0.146
编号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
μg/L	0.103	0.147	0.154	0.244	0.256	0.223	0.225	0.182	0.187	0.159
编号	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
μg/L	0.189	0.108	0.124	0.163	0.224	0.296	0.255	0.324	0.217	0.299
编号	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
μg/L	0.216	0.247	0.219	0.161	0.194	0.221	0.171	0.233	0.245	0.276
编号	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
μg/L	0.123	0.137	0.152	0.157	0.291	0.285	0.231	0.269	0.213	0.111

[0262]

编号	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
μg/L	0.234	0.235	0.192	0.154	0.165	0.215	0.216	0.247	0.172	0.167
编号	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
μg/L	0.288	0.176	0.141	0.228	0.246	0.241	0.144	0.157	0.851	0.179
编号	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
μg/L	0.243	0.248	0.256	0.173	0.241	0.266	0.209	0.199	0.28	0.278
编号	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
μg/L	0.122	0.134	0.175	0.244	0.24	0.287	0.26	0.137	0.145	0.377

[0263] 上述实施方式仅为本发明的优选实施方式,不能以此来限定本发明保护的范围,本领域的技术人员在本发明的基础上所做的任何非实质性的变化及替换均属于本发明所要求保护的范围。

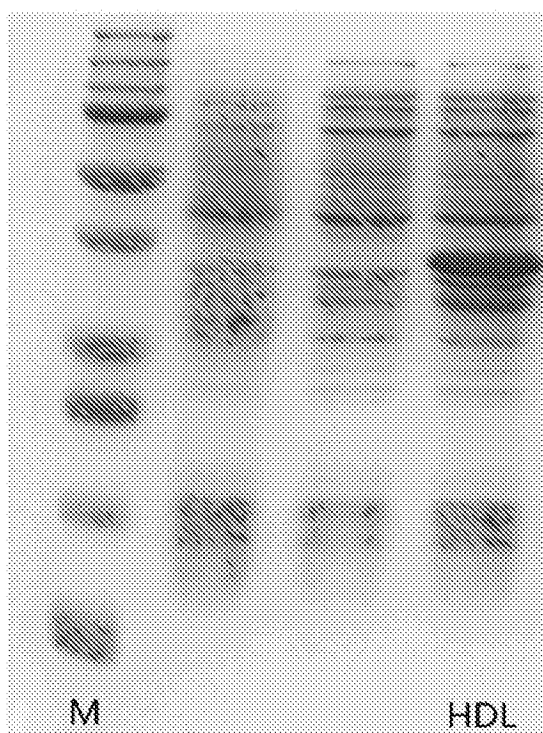


图1

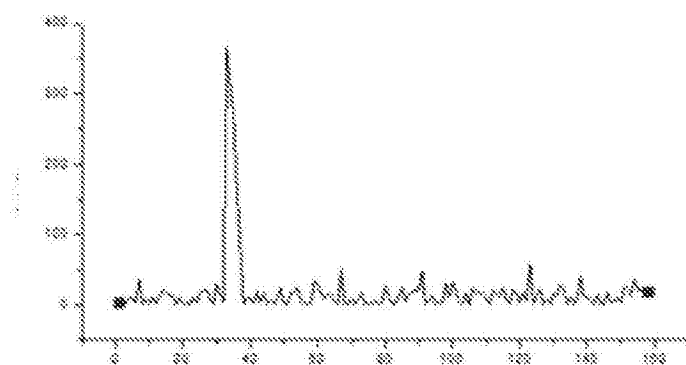


图2

专利名称(译)	一种镉-高密度脂蛋白螯合物及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN105044008B	公开(公告)日	2018-01-05
申请号	CN201510413246.6	申请日	2015-07-14
[标]申请(专利权)人(译)	上海拜豪生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海拜豪生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海拜豪生物科技有限公司		
[标]发明人	张积仁 阳帆 董欣敏 吴婧 蔡睿 孙遥 赵乙木		
发明人	张积仁 阳帆 董欣敏 吴婧 蔡睿 孙遥 赵乙木		
IPC分类号	G01N21/31 G01N33/53 G01N27/62 G01N1/28 G01N1/34 G01N27/447		
其他公开文献	CN105044008A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种镉-高密度脂蛋白螯合物及其制备方法和应用，该镉-高密度脂蛋白螯合物是镉离子与高密度脂蛋白通过巯基或/和半胱氨酸残基螯合而成，可用于制备检测人体镉-高密度脂蛋白螯合物的试剂。本发明首次证实了镉离子可直接作用于高密度脂蛋白。本发明建立了镉-高密度脂蛋白螯合物的定性定量检测方法，以检测一个地区人群体内高密度脂蛋白的含量，从而间接反映一个地区镉污染程度以及对人群的健康影响。本发明建立的镉-高密度脂蛋白螯合物定量检测方法准确度高重、复性好。

