



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105115914 A

(43) 申请公布日 2015. 12. 02

(21) 申请号 201510412224. 8

G01N 1/28(2006. 01)

(22) 申请日 2015. 07. 14

G01N 1/34(2006. 01)

(71) 申请人 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 27/447(2006. 01)

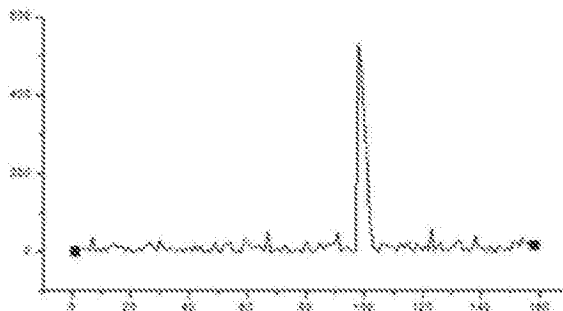
权利要求书2页 说明书16页 附图1页

(54) 发明名称

一种镉-低密度脂蛋白螯合物及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明公开了一种镉-低密度脂蛋白螯合物及其制备方法和应用,该镉-低密度脂蛋白螯合物是由镉离子通过锌指结构、巯基、半胱氨酸残基中的至少一种结构与低密度脂蛋白螯合形成。本发明建立了镉-低密度脂蛋白螯合物的定性定量检测方法,以便定量检测镉-低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-低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。本发明建立的镉-低密度脂蛋白螯合物定量检测方法其准确度大大提高,并且使检测的重复性得到大大提高。



1. 一种镉-低密度脂蛋白螯合物,其特征在于:其是由镉离子通过锌指结构、巯基、半胱氨酸残基中的至少一种结构与低密度脂蛋白螯合形成。

2. 一种如权利要求1所述的镉-低密度脂蛋白螯合物的制备方法,其特征在于:其包括以下步骤:

1) 低密度脂蛋白的合成步骤:

在人源低密度脂蛋白中加入镉离子进行螯合反应;

2) 低密度脂蛋白的纯化步骤:

采用免疫亲和层析去除步骤1)获得的镉-低密度脂蛋白螯合物中未参与反应的低密度脂蛋白及镉离子,即得镉-低密度脂蛋白螯合物。

3. 如权利要求2所述的镉-低密度脂蛋白螯合物的制备方法,其特征在于:所述步骤2)中包括以下步骤:

A. 将步骤1)制得的低密度脂蛋白复溶于生理盐水中,得到复溶液;

B. 平衡层析柱:使用稀释缓冲液冲洗层析柱,将能够与LDL特异性结合的填料装柱后,然后用缓冲液平衡层析柱;

C. 上样:上样前,用稀释缓冲液稀释复溶液,然后上样,LDL-Cd螯合物、未与Cd反应的LDL均吸附在填料上,未反应的镉离子随缓冲液流出;

D. 洗脱:使用稀释缓冲液冲洗层析柱至基线平衡,然后使用0.05-0.1M的 Na_2HPO_4 溶液进行洗脱稀释缓冲液;

E. 收集:收集洗脱液;集完后立即使蛋白复性;

F. 将收集到的洗脱液装入透析袋用 ddH_2O 透析除盐,换水2~4次后,4℃透析过夜,收集透析袋内的样本;

G. 平衡层析柱:使用稀释缓冲液冲洗新的层析柱,将能够与镉离子特异性结合的填料装柱后,用稀释缓冲液平衡层析柱;

H. 上样:上样前,稀释缓冲液稀释样本,然后上样;

I. 洗脱:使用稀释缓冲液冲洗层析柱至基线平衡,然后使用0.5-1.0M的 Na_2HPO_4 溶液进行洗脱稀释缓冲液;

J. 收集:收集洗脱液,集完后立即使蛋白复性;

K. 透析:将加入复原液后的洗脱液装入透析袋用 ddH_2O 透析除盐,换水三次后,4℃透析过夜,收集透析袋内的样本,得到纯化的镉-低密度脂蛋白螯合物。

4. 根据权利要求2或4所述的镉-低密度脂蛋白螯合物的制备方法,其特征在于:还包括后还包括步骤3):对LDL-Cd螯合物的鉴定步骤:

I. 制备胶床:选择琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶、SDS-聚丙烯酰胺凝胶中的一种作为介质,制备胶床;

II. 加样:取步骤2)制得的镉-低密度脂蛋白螯合物,加入上样缓冲液并混合均匀,然后加样于样品槽中;

III. 电泳:连接电泳板进行电泳;

IV. 复溶检测:在胶床上找出含镉的蛋白条带,将该条带取出并溶解,然后利用ICP-MS法或AAS法检测该液体中是否含有镉以及镉含量。

5. 一种如权利要求1所述的镉-低密度脂蛋白螯合物在检测人体内镉-低密度脂蛋白

螯合物的试剂或试剂盒中的应用。

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

7. 根据权利要求 6 所述的用于检测镉-低密度脂蛋白螯合物的试剂盒,其特征在于:该试剂盒还包括包被液,该包被液含有捕获 LDL 的物质。

8. 一种检测镉-低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-低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 LDL-Cd 螯合物与原子吸收光谱结合法、提纯 LDL-Cd 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 - 低密度脂蛋白螯合物及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及医学领域,具体涉及一种镉 - 低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, HDL)、中间密度脂蛋白 (intermediate density lipoprotein, IDL)、低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL)、极低密度脂蛋白 (very low density lipoprotein, VLDL)、乳糜颗粒 (chylomicron, CM)。在血液里约 70% 的胆固醇由 LDL 和 VLDL 所携带,而 LDL 所携带的胆固醇含量大于 VLDL,由于 LDL 富含胆固醇,因而被称为“坏胆固醇”,其与多种疾病的发生、发展密切相关,特别是冠心病,糖尿病等疾病,研究发现“坏胆固醇”还可促进癌症细胞的发展和转移。

[0003] LDL 是动脉粥样硬化发生和发展的主要危险因素,其改变在血清蛋白中对动脉粥样硬化有很强影响作用,是冠状动脉疾病的重要危险因子,与心血管疾病危险程度呈正相关。因而定量检测血清中 LDL 对于心血管疾病具有重要意义,不仅可以用于早期识别动脉粥样硬化的危险性,而且可以作为降脂药物治疗过程的检测以及预后评价的指标之一。此外,肾病综合征、慢性肾功能衰竭、肝病及糖尿病等,也可使血清中 LDL 含量上升,而定量检测 LDL 也可用于这些疾病的早期诊断以及治疗效果监测,甚至作为预后好坏的评价指标之一。而对于营养不良、慢性贫血、骨髓瘤、急性心肌梗死、创伤和严重肝病等患者,血清 LDL 的含量将会下降,定量检测 LDL 也可用于这些疾病的早期诊断、治疗效果监测以及作为预后评价的指标之一。

[0004] 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、镍镉电池等,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。

[0005] 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,低密度脂蛋白是一种特殊意义的蛋白质,镉是否可以作用于低密度脂蛋白,而使低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

[0006] 针对镉污染严重的问题,本发明的目的在于提供一种镉 - 低密度脂蛋白螯合物及其制备方法,并建立镉 - 低密度脂蛋白螯合物的定性、定量检测方法,以便定量检测镉 - 低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-低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。

[0007] 为解决上述问题,本发明所采用的技术方案如下:

[0008] 镉-低密度脂蛋白螯合物,其是由镉离子通过锌指结构、巯基、半胱氨酸残基中的至少一种结构与低密度脂蛋白螯合形成。

[0009] 具体地,镉-低密度脂蛋白螯合物是由镉离子通过锌指结构、巯基、半胱氨酸残基中的至少一种结构与低密度脂蛋白上的载脂蛋白 B 或胆固醇、甘油三酯 等螯合形成。

[0010] 本发明还提供了如上所述的镉-低密度脂蛋白螯合物的一种制备方法,其包括以下步骤:

[0011] 1) 低密度脂蛋白的合成步骤:

[0012] 在人源低密度脂蛋白中加入镉离子进行螯合反应;

[0013] 2) 低密度脂蛋白的纯化步骤:

[0014] 采用免疫亲和层析去除步骤 1) 获得的镉-低密度脂蛋白螯合物中未参与反应的低密度脂蛋白及镉离子,即得镉-低密度脂蛋白螯合物。

[0015] 所述步骤 2) 中包括以下步骤:

[0016] A. 将步骤 1) 制得的 LDL-Cd 螯合物复溶于生理盐水中,得到复溶液;

[0017] B. 平衡层析柱:使用缓冲液冲洗层析柱,将能够与 LDL 特异性结合的填料装柱后,然后用缓冲液平衡层析柱;

[0018] C. 上样:上样前,用稀释缓冲液稀释复溶液,然后上样,LDL-Cd 螯合物、未与 Cd 反应的 LDL 均吸附在填料上,未反应的镉离子随缓冲液流出;

[0019] D. 洗脱:使用稀释缓冲液冲洗层析柱至基线平衡,然后使用 0.05-0.1M 的 Na_2HPO_4 溶液进行洗脱稀释缓冲液;

[0020] E. 收集:收集洗脱液;收集完毕后加入使蛋白复性;

[0021] F. 将收集到的洗脱液装入透析袋用 ddH_2O 透析除盐,换水 2 ~ 4 次后,4℃ 透析过夜,收集透析袋内的样本;

[0022] G. 平衡层析柱:使用缓冲液冲洗新的层析柱,将能够与镉离子特异性结合的填料装柱后,用稀释缓冲液平衡层析柱;

[0023] H. 上样:上样前,稀释缓冲液稀释样本,然后上样;

[0024] I. 洗脱:使用稀释缓冲液冲洗层析柱至基线平衡,然后使用 0.5-1.0M 的 Na_2HPO_4 溶液进行洗脱稀释缓冲液;

[0025] J. 收集:收集洗脱液,收集完毕后立即使蛋白复性;

[0026] K. 透析:将加入复原液后的洗脱液装入透析袋用 ddH_2O 透析除盐,换水三次后,4℃ 透析过夜,收集透析袋内的样本,得到纯化的镉-低密度脂蛋白螯合物。

[0027] 上述方法还包括步骤 3):对 LDL-Cd 螯合物的鉴定步骤:

[0028] I. 制备胶床:选择琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶、SDS-聚丙烯酰胺凝胶中的一种作为介质,制备胶床;

[0029] II. 加样:取步骤 2) 制得的镉-低密度脂蛋白螯合物,加入上样缓冲液并混合均匀,然后加样于样品槽中;

[0030] III. 电泳:连接电泳板进行电泳;

[0031] IV. 复溶检测:在胶床上找出含镉的蛋白条带,将该条带取出并溶解,然后利用 ICP-MS 法或 AAS 法检测该液体中是否含有镉以及镉含量。

[0032] 本发明还提供了如上所述的镉-低密度脂蛋白螯合物在检测人体内镉-低密度脂蛋白螯合物的试剂或试剂盒中的应用。

[0033] 本发明还提供了一种至少包括如上所述的镉-低密度脂蛋白螯合物的标准品的试剂盒。

[0034] 优选地,该试剂盒还包括包被液,该包被液含有捕获 LDL 的物质。

[0035] 本发明还提供了一种定量检测镉-低密度脂蛋白螯合物的方法,以已知含量的上述的镉-低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 LDL-Cd 螯合物与原子吸收光谱结合法、提纯 LDL-Cd 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。

[0036] 实施本发明的镉-低密度脂蛋白螯合物及其制备方法和应用,本发明的有益效果在于:

[0037] 1. 本发明首次体外合成镉-低密度脂蛋白螯合物;

[0038] 2. 本发明首次提出镉-低密度脂蛋白螯合物在可用于制备检测人体血样中镉-低密度脂蛋白螯合物的试剂或试剂盒中的应用。

[0039] 3. 本发明建立了镉-低密度脂蛋白螯合物的定性定量检测方法,以便定量检测镉-低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-低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;本发明建立的镉-低密度脂蛋白螯合物定量检测方法其准确度大大提高,并且使检测的重复性得到大大提高。

附图说明

[0040] 图 1 为本发明所述的镉-低密度脂蛋白螯合物的电泳条带图;

[0041] 图 2 为本发明所述的镉-低密度脂蛋白螯合物的电泳条的荧光分析图;

具体实施方式

[0042] 下面,结合具体实施方式,对本发明做进一步描述:

[0043] 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:

[0044] 提取试剂为 PEG 溶液、硼酸盐缓冲液等(采用 PEG 法);

[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 、0.5mL Tween-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 ddH_2O , 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 ddH_2O 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 二硫苏糖醇 (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 : ddH_2O : 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 800mL ddH_2O 中, 调 pH 至 8.3 后, 定容至 1L ;

[0055] 与低密度脂蛋白特异结合的物质、抗捕获低密度脂蛋白的物质可以是同一种物质, 可通过购买得到, 在本发明中选用为英国 Abcam 公司生产的“型号为 Abcam ab157795 “的 Anti-LDL 抗体。

[0056] 可捕获金属镉离子的物质 (抗镉离子抗体) 为购买自巴傲德生物技术公司 (BioWorld Inc) 货号 BNA0008。

[0057] 本发明的目的之一在于提供一种镉-低密度脂蛋白螯合物, 其是由镉离子通过锌指结构、巯基、半胱氨酸残基中的至少一种结构与低密度脂蛋白螯合形成。

[0058] 具体地, 镉-低密度脂蛋白螯合物是由镉离子通过锌指结构、巯基、半胱氨酸残基中的至少一种结构与低密度脂蛋白上的载脂蛋白 B 或胆固醇、甘油三酯等螯合形成。

[0059] 本发明还提供如上所述的镉-低密度脂蛋白螯合物的制备方法, 其包括以下步骤 :

[0060] 1) 低密度脂蛋白的合成步骤 :

[0061] 在人源低密度脂蛋白中加入镉离子进行螯合反应 ;

[0062] 2) 低密度脂蛋白的纯化步骤 :

[0063] 采用免疫亲和层析去除步骤 1) 获得的镉-低密度脂蛋白螯合物中未参与反应的低密度脂蛋白及镉离子, 即得镉-低密度脂蛋白螯合物。

[0064] 所述步骤 2) 中包括以下步骤 :

[0065] A. 将步骤 1) 制得的 LDL-Cd 螯合物复溶于生理盐水中, 得到复溶液 ;

[0066] B. 平衡层析柱 : 使用缓冲液冲洗层析柱, 将能够与 LDL 特异性结合的填料装柱后, 然后用缓冲液平衡层析柱 ;

[0067] C. 上样 : 上样前, 用稀释缓冲液稀释复溶液, 然后上样, LDL-Cd 螯合物、未与 Cd 反应的 LDL 均吸附在填料上, 未反应的镉离子随缓冲液流出 ;

[0068] D. 洗脱 : 使用稀释缓冲液冲洗层析柱至基线平衡, 然后使用 0.05-0.1M 的 Na_2HPO_4 溶液进行洗脱稀释缓冲液 ;

[0069] E. 收集 : 收集洗脱液 ; 收集完毕后立即使蛋白复性 ;

[0070] F. 将收集到的洗脱液装入透析袋用 ddH_2O 透析除盐, 换水 2 ~ 4 次后, 4℃ 透析过夜, 收集透析袋内的样本 ;

[0071] G. 平衡层析柱 : 使用缓冲液冲洗新的层析柱, 将能够与镉离子特异性结合的填料

装柱后,用稀释缓冲液平衡层析柱;

[0072] H. 上样:上样前,稀释缓冲液稀释样本,然后上样;

[0073] I. 洗脱:使用稀释缓冲液冲洗层析柱至基线平衡,然后使用 0.5-1.0M 的 Na_2HPO_4 溶液进行洗脱稀释缓冲液;

[0074] J. 收集:收集洗脱液,收集完毕后立即使蛋白复性;

[0075] K. 透析:将加入复原液后的洗脱液装入透析袋用 ddH_2O 透析除盐,换水三次后,4℃透析过夜,收集透析袋内的样本,得到纯化的镉-低密度脂蛋白螯合物。

[0076] 上述方法还包括步骤 3):对 LDL-Cd 螯合物的鉴定步骤:

[0077] I. 制备胶床:选择琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶、SDS-聚丙烯酰胺凝胶中的一种作为介质,制备胶床;

[0078] II. 加样:取步骤 2) 制得的镉-低密度脂蛋白螯合物,加入上样缓冲液并混合均匀,然后加样于样品槽中;

[0079] III. 电泳:连接电泳板进行电泳;

[0080] IV. 复溶检测:在胶床上找出含镉的蛋白条带,将该条带取出并溶解,然后利用 ICP-MS 法或 AAS 法检测该液体中是否含有镉以及镉含量。

[0081] 本发明还提供一种至少包括如上所述的镉-低密度脂蛋白螯合物作为对照品的试剂盒。

[0082] 优选地,该试剂盒还包括包被液,该包被液含有捕获 LDL 的物质。

[0083] 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。

[0084] 一种用于检测镉-低密度脂蛋白螯合物的试剂盒,包括:含有可捕获低密度脂蛋白的物质的包被液、封闭液、洗涤液、作为二抗的可以捕获金属 Cd 的物质、酶标抗体、底物、终止液、样品缓冲液、阳性对照、阴性对照等。

[0085] 一种用于检测镉-低密度脂蛋白螯合物的试剂盒,包括:含有可捕获低密度脂蛋白的物质的包被液、封闭液、洗涤液、洗脱液等。

[0086] 一种用于检测镉-低密度脂蛋白螯合物的试剂盒,包括:含有可捕获低密度脂蛋白的物质的包被液、封闭液、洗涤液、洗脱液、硝酸、过氧化氢等。

[0087] 一种用于检测镉-低密度脂蛋白螯合物的试剂盒,包括:用于提纯血液低密度脂蛋白所需溶液、复溶液、含有可捕获金属 Cd 的物质的包被液、封闭液、洗涤液、酶标抗体、底物、终止液、样品缓冲液、标准品、阴性对照等。

[0088] 一种用于检测镉-低密度脂蛋白螯合物的试剂盒,包括:用于提纯血液低密度脂蛋白所需溶液、复溶液等。

[0089] 一种用于检测镉-低密度脂蛋白螯合物的试剂盒,包括用于提纯血液低密度脂蛋白所需溶液、复溶液、硝酸、过氧化氢等。

[0090] 一种用于检测镉-低密度脂蛋白螯合物的试剂盒,包括用于提纯血液低密度脂蛋白所需溶液、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、含有可捕获金属 Cd 的物质的包被液、封闭液、洗涤液、酶标抗体、底物、终止液、样品缓冲液、标准品、阴性对照等。

[0091] 一种用于检测镉-低密度脂蛋白螯合物的试剂盒,包括用于提纯血液低密度脂蛋白所需溶液、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。

[0092] 一种用于检测镉-低密度脂蛋白螯合物的试剂盒,包括用于提纯血液低密度脂蛋白所需溶液、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、酸化剂、过氧化氢、阳性对照、阴性对照等。

[0093] 上述试剂盒中,所述阳性对照为标准品,即螯合有重金属镉-低密度脂蛋白螯合物或镉-BSA螯合物;所述阴性对照为不含有标准品的稀释洗脱液。所述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,所述用于提纯血液低密度脂蛋白所需溶液为PEG溶液、硼酸盐缓冲液中的一种;所述胶床介质为琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶、SDS-聚丙烯酰胺凝胶中的一种,所述标准品或阳性对照为本发明所述的个镉-低密度脂蛋白螯合物。

[0094] 本发明还提供了一种定量检测镉-低密度脂蛋白螯合物的方法,以已知含量的上述的镉-低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LDL-Cd螯合物与酶联免疫法、提纯LDL-Cd螯合物与原子吸收光谱结合法、提纯LDL-Cd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,用检测镉螯合型免疫复合物的方法可以列出的有以下几种,但并不限于以下几种。

[0095] 方法一:酶联免疫(ELISA)法检测镉-低密度脂蛋白螯合物,按以下步骤进行检测:

[0096] 1) 将前面所述的可以捕获低密度脂蛋白的蛋白,如抗LDL抗体蛋白包被于固相载体上:用稀释缓冲液以1:250~2000的比例稀释包被蛋白,加入ELISA板微孔中,4℃下过夜16-18小时,或37℃水浴1-3小时,储存冰箱;

[0097] 2) 封闭:移去稀释缓冲液,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入封闭液,37℃放置1小时,移去封闭液,并用洗涤液进行洗涤;洗涤完成后,ELISA板于37℃放置1小时;

[0098] 3) 加待检样品,并且温育:从循环系统中取样,作待检样品;以已知含量的镉-低密度脂蛋白螯合物作标准样品;用稀释缓冲液稀释样品至10~40倍,加入微孔中,37℃作用1-2小时;

[0099] 4) 加入抗Cd抗体,并且温育:移去待检样品,并用相应洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入用稀释缓冲液以1:12500~100000的比例稀释的抗Cd抗体,37℃作用1-2小时,使其与低密度脂蛋白上的金属镉反应;

[0100] 5) 酶结合物温育:移去抗Cd抗体,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入用稀释缓冲液稀释的酶标抗体(如HRP酶标抗体),37℃作用1-2小时,使其与抗Cd抗体反应;

[0101] 6) 底物温育:移去酶标抗体,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入底物,37℃下避光作用30min;

[0102] 7) 终止反应:滴加终止液至每一微孔;

[0103] 8) 加完终止液后,取450nm波长,并从ELISA试剂板中洗脱的溶液中取0.5mL液体在酶标仪上分别读取待测样品组和标准样品的OD值,通过与标准样品组比较,求得待测样品中镉-低密度脂蛋白螯合物的含量。

[0104] 该方法利用酶联免疫吸附测定 (ELISA) 原理, 可以将血清中的低密度脂蛋白提取出来, 提取出来的低密度脂蛋白上部分螯合有重金属镉, 而这部分低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低密度脂蛋白, 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, 即可证明检测出循环低密度脂蛋白上螯合的金属镉。

[0105] 方法二: 酶联免疫 (ELISA) 与原子吸收光谱 (AAS) 结合法检测镉 - 低密度脂蛋白螯合物, 按以下步骤进行检测:

[0106] 1) 将前面所述的可以捕获低密度脂蛋白的蛋白, 如抗 LDL 抗体蛋白包被于固相载体上: 用稀释缓冲液以 1:250 ~ 2000 的比例稀释包被蛋白, 加入 ELISA 板的微孔中, 4℃ 下过夜 16-18 小时, 或 37℃ 水浴 1-3 小时, 储存冰箱;

[0107] 2) 封闭: 移去包被液, 并用洗涤液进行洗涤, 待洗涤完成后, 加入作为封闭液, 37℃ 放置 1 小时, 移去封闭液, 并用洗涤液进行洗涤, 洗涤完成后, ELISA 板于 37℃ 放置 1 小时;

[0108] 3) 加待检样品, 并且温育: 从循环系统中取样, 作待检样品; 以已知含量的镉 - 低密度脂蛋白螯合物作为标准样品; 用稀释缓冲液释样品至 10 ~ 40 倍, 加入微孔中, 37℃ 作用 1-2 小时;

[0109] 4) 洗脱: 移去待检样品, 并用洗涤液进行洗涤, 待洗涤完成后, 加入稀释倍数为 5-80 倍的洗脱液 37℃ 下洗脱 0-2 小时;

[0110] 5) 检测: 从 ELISA 试剂板中洗脱的溶液中取 0.5mL 液体, 在原子吸收光谱仪上检测已知含量的标准样品的吸光度, 并绘制标准曲线, 然后检测待测样品的吸光度, 在标准曲线上读出相应的含量数值。

[0111] 该方法在利用 ELISA 原理的基础上, 结合原子吸收光谱 (AAS) 原理, 利用原子吸收光谱仪检测螯合于低密度脂蛋白上的镉, 由于溶液中仅含有低密度脂蛋白, 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, 即可证明检测出低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 (ICP-MS) 结合法检测镉 - 低密度脂蛋白螯合物, 按以下步骤进行检测:

[0113] 1) 将前面所述的可以捕获低密度脂蛋白的蛋白, 如抗 LDL 抗体包被于固相载体上: 用稀释缓冲液以 1:250 ~ 1:2000 的比例稀释包被蛋白, 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, 并用洗涤液进行洗涤, 洗涤完成后, ELISA 板于 37℃ 放置 1 小时;

[0115] 3) 加待检样品, 并且温育: 从循环系统取样, 作待检样品; 以已知含量的镉 - 低密度脂蛋白螯合物作为标准样品; 用稀释缓冲液稀释待测样品至 10 ~ 40 倍, 加入微孔中, 37℃ 作用 1-2 小时;

[0116] 4) 洗脱 :移去待检样品,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入稀释倍数为 5 ~ 80 倍的洗脱液,37℃下作用 0-2 小时 ;

[0117] 5) 酸化 :在微孔中加入酸化剂 (如硝酸) 进行酸化,封口过夜,彻底酸化 ;

[0118] 6) 检测 :加入双氧水,并加热赶酸后,并从 ELISA 试剂板中洗脱的溶液中取 0.5mL 液体,在电感耦合等离子体质谱仪上检测标准样品上的镉,并绘制标准曲线,然后检测待测样品上的镉,读出相应数值。

[0119] 该方法在利用 ELISA 原理的基础上,结合电感耦合等离子体质谱法原理,用电感耦合等离子体质谱仪 ICP-MS 检测整合于低密度脂蛋白上的镉,由于溶液中仅含有低密度脂蛋白,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,即可证明检测出低密度脂蛋白上整合的金属镉。

[0120] 方法四:提纯 LDL-Cd 螯合物与酶联免疫法检测镉-低密度脂蛋白螯合物,按以下步骤进行检测 :

[0121] 1) 提取 LDL :采用化学沉淀法、超速离心法、高压液相层析法、凝胶过滤层析法、电泳法、ELISA 等方法将 LDL 提纯出来,然后对 LDL 进行复溶,得低密度脂蛋白的复溶液 ;

[0122] 2) 用可以捕获镉的抗体包被于固相载体上 :用稀释缓冲液稀释包被抗体至 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 :移去包被液,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入封闭液,37℃放置 1 小时,移去封闭液,并用洗涤液进行洗涤,洗涤完成后,ELISA 板 37℃放置 1 小时 ;

[0124] 4) 加待检样品,并且温育 :从 LDL 复溶液中取样,作为待检样品 ;以已知含量的镉-低密度脂蛋白螯合物作为标准样品 ;用稀释缓冲液释样品至 10 ~ 40 倍,加入微孔中,37℃作用 1-2 小时 ;

[0125] 5) 酶结合物温育 :移去 LDL 复溶液,并用洗涤液进行洗涤,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,使其与抗 Cd 抗体反应 ;

[0126] 6) 底物温育 :移去酶标抗体,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入底物,37℃避光作用 30min ;

[0127] 7) 终止反应 :滴加终止液至每一微孔 ;

[0128] 8) 加完终止液后,在 450nm 波长下在酶标仪上分别读取待测样品组和标准样品的 OD 值,通过与标准样品组比较,求得待测样品的含量。

[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 LDL-Cd 螯合物与原子吸收光谱结合法检测镉-低密度脂蛋白螯合物,按以下步骤进行检测 :

[0131] 1) 提取低密度脂蛋白 :采用化学沉淀法、超速离心法、高压液相层析法、凝胶过滤层析法、电泳法、ELISA 等方法将 LDL 提纯出来,然后对 LDL 进行复溶 ;

[0132] 2) 检测 :从 LDL 复溶液中取 0.5mL 液体,在原子吸收光谱仪上检测已知含量的标准样品的吸光度,并绘制标准曲线,然后检测待测样品的吸光度,在标准曲线上读出相应的含量数值。

[0133] 方法六:提纯 LDL-Cd 螯合物与电感耦合等离子体质谱结合法检测镉-低密度脂蛋白螯合物,按以下步骤进行检测 :

[0134] 1) 提取 LDL :采用化学沉淀法、超速离心法、高压液相层析法、凝胶过滤层析法、电泳法、ELISA 等方法将 LDL 提纯出来,然后用复溶剂对 LDL 进行复溶 ;

[0135] 2) 酸化 :从 LDL 复溶液中取适量液体,然后加入酸化剂 (如硝酸) 对其进行酸化,封口过夜,彻底酸化 ;

[0136] 3) 检测 :加入双氧水,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低密度脂蛋白上的镉,读出相应数值。

[0137] 方法四、方法五和方法六中,所述超速离心法具体步骤如下 :

[0138] 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 ;

[0139] 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 ;

[0140] 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 ;

[0141] d) 向步骤 c) 4mL 混合血浆加入 2mL 1.006 盐溶液,18℃ 40000rap/min 离心 17h,取上层 1mL,即极低密度脂蛋白 ;

[0142] 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 ;

[0143] f) 弃去 1mL 上层的液体,转移剩余混合液,加入 2mL 1.478 盐溶液,18℃ 40kr/min 离心 41h,取上层溶液,即低密度脂蛋白 ;

[0144] 所述中性盐为 NaBr、KBr、NaCl 或 KCl 中的一种或两种以上。

[0145] 方法四、方法五和方法六均是通过全血提取法分离出低密度脂蛋白,再采用特异性检测方法,测定镉 - 低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,将低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 - 低密度脂蛋白螯合物上的镉含量。

[0146] 方法七 :电泳与酶联免疫法 (ELISA) 法检测镉 - 低密度脂蛋白螯合物,按照如下步骤检测 :

[0147] 1) 提取 LDL :采用化学沉淀法、超速离心法、高压液相层析法、凝胶过滤层析法、电泳法、ELISA 等方法将 LDL 提纯出来,然后对 LDL 进行复溶 ;

[0148] 2) 制备胶床 :根据需求选择琼脂糖凝胶或聚丙烯酰胺凝胶或 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶等作为介质,制备好相应胶床 ;

[0149] 3) 加样 :从步骤 1) 的复溶液中取 8 μ L 溶液,加入加样缓冲液,并混匀,然后加样于样品槽中 ;

[0150] 4) 电泳 :连接电泳板,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。

[0151] 5) 检测 :在胶床上找出含有镉的蛋白条带,将该条带取出并溶解,然后再利用 ELISA 原理检测溶于液体中的镉含量。此外,还可以利用此方法检测整合镉的低密度脂蛋白的等电点、分子量及含量等。

[0152] 此外,还可以利用此方法检测镉 - 低密度脂蛋白螯合物的免疫复合物的等电点、分子量及含量等。

[0153] 在方法七中,将低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低密度脂蛋白进行分离,再找出富含镉的相应条带,再检测相关低密度脂蛋白的含量;低密度脂蛋白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),将提纯出来的低密度脂蛋白用复溶剂复溶于溶液中,取一定量的低密度脂蛋白,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低密度脂蛋白的含量,也可以利用 ELISA、AAS、ICP-MS 等原理检测出螯合于低密度脂蛋白上的镉含量,由于溶液中仅含有低密度脂蛋白,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,即可证明检测出低密度脂蛋白上螯合的金属镉。

[0154] 实施例 1:镉-低密度脂蛋白螯合物的制备方法一,其包括以下步骤:

[0155] 1) LDL-Cd 螯合物的合成步骤:在提纯源于人体的低密度脂蛋白中加入镉离子进行螯合反应;

[0156] 2) LDL-Cd 螯合物的纯化步骤:采用免疫亲和层析去除步骤 1) 获得的 LDL-Cd 螯合物中未参与反应的 LDL 及镉离子,具体如下:

[0157] A. 将步骤 1) 制得的 LDL-Cd 螯合物复溶于生理盐水中,得到复溶液;

[0158] B. 平衡层析柱:使用稀释缓冲液冲洗层析柱,将能够与 LDL 特异性结合的填料装柱后,然后用稀释缓冲液平衡层析柱;

[0159] C. 上样:上样前,用稀释缓冲液稀释复溶液,然后上样,LDL-Cd 螯合物、未与 Cd 反应的 LDL 均吸附在填料上,未反应的镉离子随缓冲液流出;

[0160] D. 洗脱:使用稀释缓冲液冲洗层析柱,直至基线平衡,然后使用 0.05mol/L 的磷酸盐溶液进行洗脱,并收集洗脱液;收集完毕后立即使蛋白复性;

[0161] E. 将收集到的洗脱液装入透析袋用 ddH₂O 透析除盐,换水 2~4 次后,4℃透析过夜,收集透析袋内的样本;

[0162] F. 平衡层析柱:使用稀释缓冲液冲洗新的层析柱,将能够与 Cd 特异性结合的填料装柱后,然后用稀释缓冲液平衡层析柱;

[0163] G. 上样:上样前,用稀释缓冲液稀释样本,然后上样;LDL-Cd 螯合物吸附在填料上,未反应的 LDL 会随缓冲液流出;

[0164] H. 洗脱:使用稀释缓冲液冲洗层析柱,直至基线平衡,然后使用 0.5mol/L 的磷酸盐溶液进行洗脱,此时 LDL-Cd 螯合物随着洗脱液洗脱出来,收集洗脱液;收集完毕后立即使蛋白复性;

[0165] I. 将收集到的洗脱液装入透析袋用 ddH₂O 透析除盐,换水三次后,4℃透析过夜,收集透析袋内的样本,得到纯化的 LDL-Cd 螯合物。

[0166] 实施例 1 所述的制备方法均还包括以下对 LDL-Cd 螯合物的鉴定步骤:

[0167] I. 制备胶床:选择琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶、SDS-聚丙烯酰胺凝胶中的一种作为介质,制备胶床;

[0168] II. 加样:取 LDL-Cd 螯合物,加入样品缓冲液并混合均匀,然后加样于样品槽中;

[0169] III. 电泳:连接电泳板进行电泳;

[0170] IV. 复溶检测:在胶床上找出含镉的蛋白条带,将该条带取出并溶解,然后利用 ICP-MS 法或 AAS 法检测液体中是否含有镉以及镉含量。

[0171] 鉴定结果如下

[0172] 1) AAS 检测结果

[0173] 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) 初步测定镉-低密度脂蛋白螯合物中重金属镉的含量,如下表 1 所示,以 NaCl 溶液、KBr 溶液、KCl 溶液为空白对照;

[0174] 表 1 镉-低密度脂蛋白螯合物中重金属镉的含量

[0175]

样本名	Cd ($\mu\text{g/L}$)
待测样本	0.497
NaCl	0.023
KBr	0.000
KCl	0.110

[0176] 2) 同步辐射 X 荧光分析

[0177] 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. LS 30143-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。

[0178] 图 2 镉为本发明所述的镉-低密度脂蛋白螯合物的电泳条的荧光分析图,图中横坐标为蛋白条带位置,纵坐标为该条带镉金属能量 (含量) 值。

[0179] 检测条件的确定:

[0180] 1. 补体蛋白最佳工作浓度以及血浆的最佳稀释倍数的确定

[0181] 本发明采用棋盘滴定法确定抗 LDL 抗体蛋白、抗 Cd 抗体的最佳工作浓度以及待测血浆的最佳稀释倍数,棋盘滴定法具体步骤如下:

[0182] (1) 将抗 LDL 抗体蛋白用包被液分别按以下倍比 1:250、1:500、1:1000、1:2000 进行稀释,然后分别加入 ELISA 板微孔中,将抗 LDL 抗体包被于固相载体上,每个浓度包被三排,4℃过夜 18 小时;

[0183] (2) 移去包被液,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加封闭液,37℃放置 1 小时,移去封闭液,并用洗涤液进行洗涤;

[0184] (3) 加入待测血浆,并按以下浓度 1:10、1:20、1:40 进行稀释,加入微孔中,按照上述包被的 LDL 抗体浓度,同一个浓度的抗 LDL 抗体的微孔中分别加入不同稀释度血浆,37℃作用 1 小时;

[0185] (4) 移去待检样品,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入抗 Cd 抗体,抗 Cd 抗体稀释为四个不同浓度,即 1:12500、1:25000、1:50000、1:100000,按照每一个相同抗 LDL 抗体浓度、血清稀释浓度,不同浓度抗 Cd 抗体各加 2 孔,37℃作用 1 小时,使其与抗 LDL 抗体蛋白上的金属镉反应;

[0186] (5) 移去抗 Cd 抗体,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,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;

[0187] (6) 移去酶标抗体,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入底物,37℃避光作用 30min;

[0188] (7) 滴加终止液至每一微孔;

[0189] (8) 加完终止液后,在 450nm 波长下在酶标仪上分别读取各孔 OD 值。根据各孔 OD 值数值,选择 LDL 抗体、Cd 抗体的最佳工作浓度以及血浆的最佳稀释倍数。

[0190] 实验中同时以所制标准品作为阳性对照,选择 LDL-Ab+ 封闭 +Cd 抗 + 酶标 + 底物 (即不加检测样本) 作为阴性对照 1、LDL-Ab+ 封闭 + 血浆 + 酶标 + 底物 (即不加 Cd 抗) 作为阴性对照 2、LDL-Ab+ 封闭 + 酶标 + 底物 (即不加检测样本和 Cd 抗) 作为阴性对照 3、LDL-Ab+ 封闭 + 血浆 +Cd 抗 + 底物 (即不加酶标) 作为阴性对照 4,封闭 + 血浆 +Cd 抗 + 酶标 + 底物 (即不加 LDL-Ab 蛋白捕获 LDL) 作为空白对照 1,只加底物作为空白对照 2,只加 CDS 作为空白对照 3。结果见表 2 及表 3:

[0191] 表 2 抗 LDL 抗体和抗 Cd 抗体最佳工作浓度以及血浆最佳稀释倍数的确定

[0192]

项目		LDL 抗 1:250	LDL 抗 1:500	LDL 抗 1:1000	LDL 抗 1:2000
Cd 抗 1:12500	血浆 1:10	0.378	0.656	0.434	0.223
	血浆 1:20	0.423	0.678	0.338	0.211
	血浆 1:40	0.212	0.51	0.241	0.144
Cd 抗 1:25000	血浆 1:10	0.456	0.687	0.368	0.252
	血浆 1:20	0.487	0.637	0.467	0.265
	血浆 1:40	0.367	0.557	0.213	0.14
Cd 抗 1:50000	血浆 1:10	0.333	0.404	0.311	0.165
	血浆 1:20	0.351	0.432	0.294	0.173
	血浆 1:40	0.215	0.393	0.271	0.103

[0193]

Cd 抗 1:100000	血浆 1:10	0.139	0.352	0.132	0.081
	血浆 1:20	0.185	0.32	0.143	0.028
	血浆 1:40	0.106	0.237	0.121	0.067

[0194] 表 3 ELISA 阳性对照及阴性对照 ELISA 检测结果

[0195]

	阳 性 对 照	阴 性 对 照 1	阴 性 对 照 2	阴 性 对 照 3	阴 性 对 照 4	空 白 对 照 1	空 白 对 照 2	空 白 对 照 3
OD	0.868	0.039	0.023	0.051	0.012	0.031	0.003	0.011

[0196] 由表 1 及表 2 可知,当抗 LDL 抗体的稀释度为 1:500、血浆稀释度为 1:10、Cd 抗稀

释度为 1:25000 时, OD 值最大, 虽然其 OD 值小于 0.8, 但是其所对应的阴性对照组 OD 值全部小于 0.1, 并且其对应的阳性对照的 OD 值大于 0.8, 所以选此值所对应的浓度作为最佳工作浓度, 即 LDL-Ab 蛋白浓度为 1:500, 血浆稀释度为 1:10, Cd 浓度为 1:25000。

[0197] 2. ELISA 洗脱液最佳工作浓度的确定

[0198] 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:

[0199] (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;

[0200] (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;

[0201] (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 2 μg/mL 的 HRP 酶标抗体, 37℃ 作用 2 小时, 使其与抗 Cd 抗体反应;

[0202] (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;

[0203] (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,

[0204] 表 4 不同洗脱液稀释倍数下的检测结果

[0205]

	洗脱液 1:5	洗脱液 1:10	洗脱液 1:20	洗脱液 1:40	洗脱液 1:80
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

[0206] 通过比较 OD 值, 以判断 ELISA 孔壁上结合的抗 Pb 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。

[0207] 应用实施例 1:

[0208] 采用酶联免疫法检测 100 份标本血浆中的镉 - 低密度脂蛋白螯合物, 按照以下步骤进行检测:

[0209] 1) 将抗 LDL 抗体蛋白包被于固相载体上: 用稀释缓冲液稀释包被蛋白至 500 倍, 加入 ELISA 板微孔中, 37℃ 水浴 1 小时, 储存冰箱;

[0210] 2) 封闭: 移去包被液, 并用洗涤液进行洗涤, 待洗涤完成后, 加封闭液, 37℃ 放置 1

小时,移去封闭液,并用洗涤液进行洗涤;洗涤完成后,ELISA 板于 37℃放置 1 小时;

[0211] 3) 加待检样品,并且温育:从循环系统中取样,作待检样品;以已知含量的镉-低密度脂蛋白螯合物作标准样品;用稀释缓冲液稀释样品至 10 倍,加入微孔中,37℃作用 1 小时;

[0212] 4) 加入抗 Cd 抗体,并且温育:移去待检样品,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入用稀释缓冲液稀释至 25000 倍的抗 Cd 抗体,37℃作用 1 小时,使其与低密度脂蛋白上的金属镉反应;

[0213] 5) 酶结合物温育:移去抗 Cd 抗体,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,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;

[0214] 6) 底物温育:移去酶标抗体,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加入底物,37℃下避光作用 30min;

[0215] 7) 终止反应:滴加终止液至每一微孔;

[0216] 8) 加完终止液后,取 450nm 波长,在酶标仪上分别读取待测样品组和标准样品的 OD 值,通过与标准样品组比较,求得待测样品中镉-低密度脂蛋白螯合物的含量(也可不使用酶标仪,直接通过染色情况进行定性检测),检测结果如表 5 所示。

[0217] 表 5 100 份标本血清镉-低密度脂蛋白螯合物 ELISA 检测结果

[0218]

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
OD	0.586	0.534	0.646	0.716	0.686	0.504	0.63	0.627	0.604	0.56
编号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
OD	0.695	0.597	0.63	0.699	0.578	0.604	0.531	0.585	0.626	0.521
编号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
OD	0.685	0.566	0.682	0.508	0.569	0.604	0.591	0.545	0.508	0.685
编号	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
OD	0.598	0.598	0.717	0.698	0.639	0.513	0.591	0.676	0.618	0.683
编号	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
OD	0.635	0.677	0.631	0.665	0.471	0.587	0.502	0.579	0.552	0.623
编号	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
OD	0.594	0.497	0.513	0.638	0.667	0.76	0.621	0.569	0.69	0.534
编号	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
OD	0.502	0.561	0.69	0.679	0.642	0.53	0.692	0.597	0.506	0.583
编号	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80

[0219]

OD	0.589	0.678	0.572	0.67	0.693	0.512	0.602	0.662	0.662	0.303
编号	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
OD	0.568	0.51	0.529	0.519	0.54	0.474	0.582	0.55	0.569	0.642
编号	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
OD	0.721	0.586	0.584	0.524	0.627	0.538	0.574	0.671	0.599	0.538

[0220] 应用实施例 2

[0221] 采用酶联免疫与原子吸收光谱结合法(ELISA 法+AAS 法)检测 100 份标本血样中的镉-低密度脂蛋白螯合物,按照如下步骤检测:

[0222] 1) 将抗 LDL 抗体蛋白包被于固相载体上:用稀释缓冲液以 1:500 的比例稀释包被蛋白,加入 ELISA 板的微孔中,4℃下过夜 18 小时;

[0223] 2) 封闭:移去包被液,并用洗涤液进行洗涤,待洗涤完成后,加作为封闭液的

1% -5% 牛血清白蛋白或脱脂奶粉, 37℃ 放置 1 小时, 移去封闭液, 并用洗涤液进行洗涤, 洗涤完成后, ELISA 板于 37℃ 放置 1 小时;

[0224] 3) 加待检样品, 并且温育: 从循环系统中取样, 作待检样品; 以已知含量的镉-低密度脂蛋白螯合物作为标准样品; 用稀释缓冲液以 1:10 的比例稀释样品, 加入微孔中, 37℃ 作用 1 小时;

[0225] 4) 洗脱: 移去待检样品, 并用洗涤液进行洗涤, 待洗涤完成后, 加入 0.5-1.0M 的 Na_2HPO_4 溶液, 在 37℃ 下洗脱 1 小时;

[0226] 5) 检测: 从 ELISA 微孔中取 0.5mL 液体, 在原子吸收光谱仪检测待测样品的吸光度, 检测值如表 6 所示。

[0227] 表 6: 100 份标本血浆镉-低密度脂蛋白螯合物 AAS 检测结果

[0228]

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$\mu\text{g/L}$	0.361	0.41	0.343	0.438	0.397	0.379	0.309	0.341	0.462	0.444
编号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
$\mu\text{g/L}$	0.388	0.34	0.407	0.354	0.495	0.315	0.544	0.308	0.365	0.441
编号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
$\mu\text{g/L}$	0.351	0.461	0.493	0.44	0.393	0.346	0.36	0.402	0.413	0.31
编号	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40

[0229]

$\mu\text{g/L}$	0.366	0.478	0.371	0.459	0.431	0.368	0.401	0.435	0.402	0.415
编号	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
$\mu\text{g/L}$	0.424	0.491	0.369	0.305	0.428	0.421	0.455	0.304	0.541	0.375
编号	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
$\mu\text{g/L}$	0.408	0.421	0.498	0.397	0.468	0.475	0.384	0.362	0.429	0.423
编号	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
$\mu\text{g/L}$	0.303	0.321	0.578	0.484	0.425	0.467	0.442	0.439	0.431	0.454
编号	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
$\mu\text{g/L}$	0.366	0.402	0.337	0.466	0.411	0.473	0.469	0.411	0.484	0.414
编号	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
$\mu\text{g/L}$	0.333	0.457	0.342	0.487	0.476	0.382	0.588	0.307	0.419	0.49
编号	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
$\mu\text{g/L}$	0.479	0.337	0.507	0.466	0.311	0.498	0.484	0.453	0.467	0.478

[0230] 应用实施例 3:

[0231] 采用酶联免疫与电感耦合等离子体质谱结合法检测 100 份标本血样中的镉-低密度脂蛋白螯合物, 按照如下步骤检测:

[0232] 1) 将抗 LDL 抗体包被于固相载体上: 用稀释缓冲液以 1:500 的比例稀释包被蛋白, 加入 ELISA 板微孔中, 4℃ 过夜 18 小时;

[0233] 2) 封闭: 移去包被液, 并用洗涤液进行洗涤, 待洗涤完成后, 加封闭液, 37℃ 放置 1 小时, 移去封闭液, 并用洗涤液进行洗涤, 洗涤完成后, ELISA 板于 37℃ 放置 1 小时;

[0234] 3) 加待检样品, 并且温育: 从循环系统取样, 作待检样品; 以已知含量的镉-低密度脂蛋白螯合物作为标准样品; 用样品缓冲液以 1:10 的比例稀释待测样品, 加入微孔中, 37℃ 作用 1 小时;

[0235] 4) 洗脱: 移去待检样品, 并用相应洗涤液进行洗涤, 待洗涤完成后, 加入稀释倍数为 20 倍的洗脱液, 在 37℃ 下洗脱 1 小时; 5) 酸化: 在微孔中加入硝酸进行酸化, 封口过夜,

彻底酸化；

[0236] 6) 检测：加入双氧水，并加热赶酸后，从微孔中取适量液体，在电感耦合 等离子体质谱仪上检测待测样品上的镉，读出相应数值，检测结果如表 7 所示。

[0237] 表 7:100 份标本血清镉 - 低密度脂蛋白螯合物 ICP-MS 检测结果

[0238]

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
μg/L	0.327	0.448	0.411	0.49	0.497	0.544	0.333	0.468	0.329	0.498
编号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
μg/L	0.399	0.336	0.517	0.376	0.403	0.322	0.462	0.321	0.403	0.431
编号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
μg/L	0.427	0.455	0.344	0.304	0.345	0.364	0.372	0.496	0.303	0.415
编号	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
μg/L	0.312	0.402	0.441	0.464	0.338	0.374	0.378	0.41	0.333	0.534
编号	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
μg/L	0.403	0.343	0.498	0.344	0.354	0.341	0.485	0.305	0.427	0.481
编号	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
μg/L	0.356	0.309	0.473	0.361	0.445	0.39	0.511	0.449	0.399	0.362
编号	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
μg/L	0.439	0.372	0.455	0.487	0.518	0.457	0.354	0.329	0.345	0.311
编号	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
μg/L	0.448	0.311	0.464	0.445	0.344	0.373	0.385	0.383	0.419	0.345
编号	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
μg/L	0.368	0.335	0.477	0.544	0.392	0.439	0.408	0.395	0.583	0.403
编号	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
μg/L	0.494	0.305	0.498	0.449	0.488	0.385	0.326	0.321	0.375	0.448

[0239] 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。

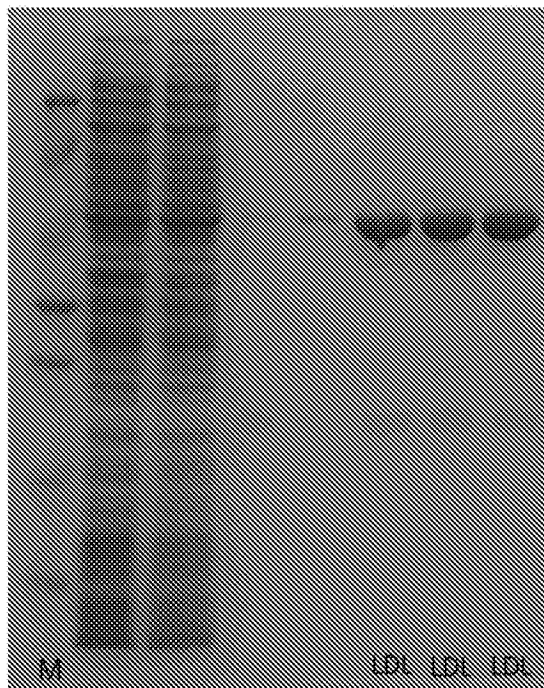


图 1

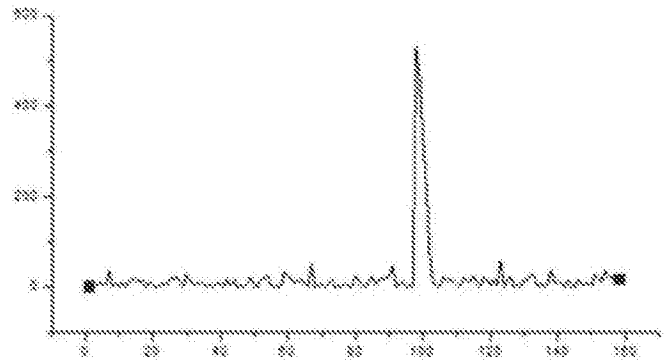


图 2

专利名称(译)	一种镉-低密度脂蛋白螯合物及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN105115914A	公开(公告)日	2015-12-02
申请号	CN201510412224.8	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 G01N27/447 G01N1/28 G01N1/34		
其他公开文献	CN105115914B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种镉-低密度脂蛋白螯合物及其制备方法和应用，该镉-低密度脂蛋白螯合物是由镉离子通过锌指结构、巯基、半胱氨酸残基中的至少一种结构与低密度脂蛋白螯合形成。本发明建立了镉-低密度脂蛋白螯合物的定性定量检测方法，以便定量检测镉-低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-低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。本发明建立的镉-低密度脂蛋白螯合物定量检测方法其准确度大大提高，并且使检测的重复性得到大大提高。

