



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105037528 A

(43) 申请公布日 2015. 11. 11

(21) 申请号 201510412254. 9

(22) 申请日 2015. 07. 14

(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.

C07K 14/775(2006. 01)

C07K 1/22(2006. 01)

G01N 33/96(2006. 01)

G01N 33/92(2006. 01)

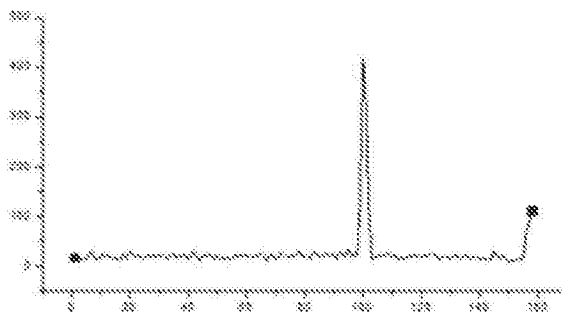
权利要求书2页 说明书17页 附图1页

(54) 发明名称

一种镍-低密度脂蛋白螯合物及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明提供一种镍-低密度脂蛋白螯合物及其制备方法和应用,该镍-低密度脂蛋白螯合物是镍离子与低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镍-低密度脂蛋白螯合物的试剂。本发明首次证实了镍离子可直接作用于低密度脂蛋白。本发明建立了镍-低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低密度脂蛋白的含量,从而间接反映一个地区镍污染程度以及对人群的健康影响。本发明建立的镍-低密度脂蛋白螯合物定量检测方法准确度高、复性好。



1. 一种镍-低密度脂蛋白螯合物,其特征在于,该镍-低密度脂蛋白螯合物是镍离子与低密度脂蛋白通过巯基或 / 和半胱氨酸残基螯合而成。

2. 制备如权利要求 1 所述的镍-低密度脂蛋白螯合物的方法,包括以下步骤:

A) 镍-低密度脂蛋白螯合物的合成:在提纯源于人体的低密度脂蛋白或按照生物学方法重组的低密度脂蛋白中加入镍离子进行螯合反应,得到反应溶液;

B) 镍-低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低密度脂蛋白、特异性抗体和镍离子,即得镍-低密度脂蛋白螯合物。

3. 如权利要求 2 所述的方法,其特征在于,

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) 的镍-低密度脂蛋白螯合物溶解于生理盐水中,得镍-低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低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) 的溶液,然后上柱,使低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 0.05-0.10mol/L 的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  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) 的洗脱液,装透析袋,用  $\text{ddH}_2\text{O}$  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镍特异性结合的填料,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 0.5-1.0mol/L 的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  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  $\text{ddH}_2\text{O}$  透析除盐,换水三次后,4℃ 透析过夜,收集样本,即得镍-低密度脂蛋白螯合物。

4. 根据权利要求 2 所述的镍-低密度脂蛋白螯合物的制备方法,其特征在于,步骤 B) 后还包括步骤 C):对镍-低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) 中提取纯化得到的镍-低密度脂蛋白螯合物,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:在胶床上找出含有镍的蛋白条带,将该蛋白条带取出,将蛋白条带溶解,然后再采用 ICP-MS 或 AAS 检测是否含有镍以及检测镍的含量。

5. 一种如权利要求 1 所述的镍-低密度脂蛋白螯合物在制备检测血样中镍-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 所述的镍 - 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 所述的试剂盒, 其特征在于, 还包括包被液, 该包被液含有捕获低密度脂蛋白的蛋白或捕获金属镍的物质。

8. 一种定量检测镍 - 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 所述的镍 - 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、提纯镍 - 低密度脂蛋白螯合物与酶联免疫结合法、提纯镍 - 低密度脂蛋白螯合物与原子吸收光谱结合法、提纯镍 - 低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。

## 一种镍 - 低密度脂蛋白螯合物及其制备方法和应用

### 技术领域

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

### 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, 简称 CM)。

[0003] 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。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 LDL 升高是动脉粥样硬化发生、发展的必备条件。2014 年,CELL REPORTS 报道,“坏胆固醇”还可促进癌症细胞的发展和转移。

[0004] 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有很强的影响动脉粥样硬化作用,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,其他一些疾病,诸如: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。

[0005] 镍 (Nickel, Ni) 与人的健康息息相关,首先其是人体维持健康所必需的微量元素,其存在于多种氢化酶中,催化氢的氧化还原反应,参与多种酶蛋白的合成和细胞激素及色素的代谢,具有促进铁的吸收和红细胞的增长、激活酶形成辅酶、增强胰岛素、降血糖、保护心血管等作用,因此如果人体缺乏镍,会导致疾病的发生。但是,事实在生活中,由于环境污染,人体内很少缺乏镍,相反镍的含量常常过量,常常导致疾病的发生,甚至危及生命。

[0006] 然镍螯合于低密度脂蛋白上的机制尚不清楚,两者之间的相互作用及对机体的影响也尚待研究。但是可以明确的,低密度脂蛋白和镍对于机体的作用都至关重要,而定量检测低密度脂蛋白上螯合镍是研究两者相互关系的第一步,其具有重要科研及临床价值。

### 发明内容

[0007] 针对镍污染严重的问题,本发明的目的在于提供一种镍 - 低密度脂蛋白螯合物及

其制备方法,并建立镍-低密度脂蛋白螯合物的定性、定量检测方法,以便定量检测镍-低密度脂蛋白螯合物在评价一个地区镍污染程度的应用。通过定量检测一个地区人群血清中镍-低密度脂蛋白螯合物,可以间接反映这个地区人群受镍污染的情况,从而间接反映这个地区镍污染程度。

[0008] 本发明解决其技术问题所采用的技术方案是:提供一种镍-低密度脂蛋白螯合物,该镍-低密度脂蛋白螯合物是镍离子与低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镍-低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) 镍-低密度脂蛋白螯合物的合成:在提纯源于人体的低密度脂蛋白或按照生物学方法重组的低密度脂蛋白中加入镍离子进行螯合反应,得到反应溶液;

[0011] B) 镍-低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低密度脂蛋白、特异性抗体和镍离子,即得镍-低密度脂蛋白螯合物。

[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)的镍-低密度脂蛋白螯合物溶解于生理盐水中,得镍-低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低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] (3) 上样:待层析柱平衡后,用稀释缓冲液稀释步骤(1)的溶液,然后上柱,使低密度脂蛋白与填料特异性结合;

[0016] (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 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 溶液进行洗脱;

[0017] (5) 收集:收集步骤(4)的洗脱液,收集完毕后立即使蛋白复原;

[0018] (6) 透析:将步骤(5)的洗脱液,装透析袋,用 $\text{ddH}_2\text{O}$ 透析除盐,换水三次后,4℃透析过夜,收集样本;

[0019] (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镍特异性结合的填料,装柱后再用稀释缓冲液平衡层析柱;

[0020] (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;

[0021] (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 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 溶液进行洗脱;

[0022] (10) 收集:收集步骤(9)的洗脱液,收集完毕后立即使蛋白复原;

[0023] (11) 透析:将步骤(10)的洗脱液,装透析袋,用 $\text{ddH}_2\text{O}$ 透析除盐,换水三次后,4℃透析过夜,收集样本,即得镍-低密度脂蛋白螯合物。

[0024] 作为优选,上述镍-低密度脂蛋白螯合物的制备方法,还包括以下对镍-低密度脂蛋白螯合物的鉴定步骤,具体包括以下步骤:

[0025] (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;

[0026] (2) 加样:取步骤B)中提取纯化得到的镍-低密度脂蛋白螯合物,加入上样缓冲液,并混匀,然后加样于样品槽中;

[0027] (3) 电泳:连接电泳板,进行电泳;

[0028] (4) 检测:在胶床上找出含有镍的蛋白条带,将该蛋白条带取出,将蛋白条带溶解,然后再采用 ICP-MS 或 AAS 检测是否含有镍以及检测镍的含量。

[0029] 本发明还提供一种如上述的镍-低密度脂蛋白螯合物在制备检测人体内镍-低密度脂蛋白螯合物的试剂或试剂盒中的应用。

[0030] 本发明还提供一种至少包括如上述的镍-低密度脂蛋白螯合物作为标准品的试剂盒。

[0031] 优选地,该试剂盒中还包括包被液,该包被液含有捕获低密度脂蛋白的蛋白或捕获金属镍的物质。

[0032] 本发明还提供一种定量检测镍-低密度脂蛋白螯合物的方法,以已知含量的上述的镍-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、提纯镍-低密度脂蛋白螯合物与酶联免疫结合法、提纯镍-低密度脂蛋白螯合物与原子吸收光谱结合法、提纯镍-低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。

[0033] 相比现有技术,本发明的有益效果在于:

[0034] 1. 本发明首次合成了镍-低密度脂蛋白螯合物;

[0035] 2. 本发明首次提出镍-低密度脂蛋白螯合物可用于制备检测血样中镍-低密度脂蛋白螯合物的试剂或试剂盒中的应用;

[0036] 3. 本发明实现了整合型低密度脂蛋白的特异性识别和定量检测,以便定量检测人群血清中镍-低密度脂蛋白螯合物的含量,以评价一个地区镍污染程度的应用,为工业地区的镍污染水平提供间接指标。本发明建立的镍-低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

[0037] 图 1 为本发明所述的镍-低密度脂蛋白螯合物的非变性电泳条带图;

[0038] 图 2 为本发明所述的镍-低密度脂蛋白螯合物的电泳条带的同步辐射 X 线荧光分析图。

## 具体实施方式

[0039] 下面结合具体实施方式,对本发明做进一步描述:

[0040] 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:

[0041] 提取试剂为 PEG 溶液、硼酸盐缓冲液等(采用 PEG 法);

[0042] 捕获低密度脂蛋白的蛋白为抗低密度脂蛋白抗体,可通过市售获得,如货号为“Abcam ab157795”的 anti-LDL 抗体,以下实施方式中,所述与低密度脂蛋白特异性结合的物质、抗低密度脂蛋白抗体、抗 LDL 抗体均为捕获低密度脂蛋白的蛋白;

[0043] 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;

[0044] 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  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  和 2.93g 的  $\text{NaHCO}_3$  溶解加 ddH<sub>2</sub>O 定容至 1000mL;

[0045] 洗涤缓冲液为 pH7.4 的 0.15M PBS 溶液, 配制方法示例: 取 0.2g 的  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、2.90g 的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、8.0g 的  $\text{NaCl}$ 、0.2g 的  $\text{KCl}$ 、0.5mL Tween-20, 溶解加  $\text{ddH}_2\text{O}$  定容至 1000mL;

[0046] 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;

[0047] 终止液为 2M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 配制方法示例: 取 178.3mL 的  $\text{ddH}_2\text{O}$ , 加浓  $\text{H}_2\text{SO}_4$  定容至 200mL;

[0048] 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;

[0049] 底物缓冲液 pH 为 5.0, 其中  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  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  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、0.96g 柠檬酸, 然后加入  $\text{ddH}_2\text{O}$  至 50mL, 即得;

[0050] 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°C 孵育 30min, 得洗脱液;

[0051] 上样缓冲液可由如下比例的组分配制而成: Tris-HCl : 1% 溴酚蓝 :  $\text{ddH}_2\text{O}$  : 甘氨酸 = 15.5 : 2.5 : 7 : 25, 其中 Tris-HCl 的 pH 为 6.8、摩尔浓度为 1M;

[0052] 电泳缓冲液的配制方法如下: 取 3.0g Tris、14.4g 甘氨酸、溶于 800mL  $\text{ddH}_2\text{O}$  中, 调 pH 至 8.3 后, 定容至 1L;

[0053] 捕获镍的物质为货号为“广州然科公司 RK14419”的鼠抗 Ni mAb, 以下实施方式中所述的与镍特异性结合的物质、抗 Ni 抗体、二抗、抗镍抗体均为捕获得镍的物质;

[0054] 本发明提供一种镍-低密度脂蛋白螯合物, 镍离子与低密度脂蛋白通过巯基或/和半胱氨酸残基螯合而成。

[0055] 具体地, 镍-低密度脂蛋白螯合物是由镍通过结合锌指结构、巯基、半胱氨酸残基中的至少一种结构与低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。

[0056] 本发明还提供镍-低密度脂蛋白螯合物的制备方法, 包括以下步骤:

[0057] A) 镍-低密度脂蛋白的合成: 在提纯源于人体的低密度脂蛋白或按照生物学方法重组的低密度脂蛋白中加入镍离子进行螯合反应, 得到反应溶液;

[0058] B) 镍-低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低密度脂蛋白、特异性抗体和镍离子, 即得镍-低密度脂蛋白螯合物, 具体包括以下步骤:

[0059] (1) 溶解样品: 将上述步骤 A) 的镍-低密度脂蛋白螯合物溶解于生理盐水中, 得镍-低密度脂蛋白螯合物溶液;

[0060] (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低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;

[0061] (3) 上样: 待层析柱平衡后, 用稀释缓冲液稀释步骤 (1) 的溶液, 然后上柱, 使低密度脂蛋白与填料特异性结合;

[0062] (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  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  溶液进行洗脱;

[0063] (5) 收集: 收集步骤 (4) 的洗脱液, 收集完立即使蛋白复原;

[0064] (6) 透析: 将步骤 (5) 的洗脱液, 装透析袋, 用  $\text{ddH}_2\text{O}$  透析除盐, 换水三次后, 4°C 透析过夜, 收集样本;

[0065] (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镍特异性结合的填料,装柱后再用稀释缓冲液平衡层析柱 ;

[0066] (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 ;

[0067] (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  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  溶液进行洗脱 ;

[0068] (10) 收集 :收集步骤 (9) 的洗脱液,收集完毕后立即使蛋白复原 ;

[0069] (11) 透析 :将步骤 (10) 的洗脱液,装透析袋,用  $\text{ddH}_2\text{O}$  透析除盐,换水三次后,4℃ 透析过夜,收集样本,即得镍 - 低密度脂蛋白螯合物。

[0070] C) :对镍 - 低密度脂蛋白螯合物的鉴定,具体包括以下步骤 :

[0071] (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 ;

[0072] (2) 加样 :取步骤 B) 中提取纯化得到的镍 - 低密度脂蛋白螯合物,加入上样缓冲液,并混匀,然后加样于样品槽中 ;

[0073] (3) 电泳 :连接电泳板,进行电泳 ;

[0074] (4) 检测 :在胶床上找出含有镍的蛋白条带,将该蛋白条带取出,将蛋白条带溶解,然后再采用 ICP-MS 或 AAS 检测是否含有镍以及检测镍的含量。

[0075] 本发明还提供一种至少包括如上述的镍 - 低密度脂蛋白螯合物作为标准品的试剂盒。

[0076] 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。

[0077] 一种检测血样中镍 - 低密度脂蛋白螯合物的试剂盒,包括 :含有可用于捕获低密度脂蛋白的蛋白的包被液、封闭液、洗涤缓冲液、可捕获镍的物质作为二抗、酶标抗体、底物、终止液、稀释缓冲液、阳性对照、阴性对照等。

[0078] 一种检测血样中镍 - 低密度脂蛋白螯合物的试剂盒,包括 :含有可用于捕获低密度脂蛋白的蛋白的包被液、封闭液、洗涤缓冲液、洗脱液、阳性对照、阴性对照等。

[0079] 一种检测血样中镍 - 低密度脂蛋白螯合物的试剂盒,包括 :含有可用于捕获低密度脂蛋白的蛋白的包被液、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。

[0080] 一种检测血样中镍 - 低密度脂蛋白螯合物的试剂盒,包括提取全血中低密度脂蛋白所需提取试剂、复溶液、含有可用于捕获镍的物质的包被液、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。

[0081] 一种检测血样中镍 - 低密度脂蛋白螯合物的试剂盒,包括提取全血中低密度脂蛋白所需提取试剂、复溶液、阳性对照、阴性对照等。

[0082] 一种检测血样中镍 - 低密度脂蛋白螯合物的试剂盒,包括提取全血中低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。

[0083] 一种检测血样中镍 - 低密度脂蛋白螯合物的试剂盒,包括提取全血中低密度脂蛋白所需提取试剂、胶床介质、复溶液、加样缓冲液、溶解胶床上含有镍的蛋白条带所需液体、含有可用于捕获镍的物质的包被液、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。

[0084] 一种检测血样中镍 - 低密度脂蛋白螯合物的试剂盒,包括提取全血中低密度脂蛋白所需提取试剂、胶床介质、复溶液、加样缓冲液、溶解胶床上含有镍的蛋白条带所需液体、



阳性对照、阴性对照等。

[0085] 一种检测血样中镍-低密度脂蛋白螯合物的试剂盒,包括提取全血中低密度脂蛋白所需提取试剂、胶床介质、复溶液、加样缓冲液、溶解胶床上含有镍的蛋白条带所需液体、硝酸、过氧化氢、阳性对照、阴性对照等。

[0086] 上述几种试剂盒中,所述阳性对照为标准品,即螯合有重金属镍的低密度脂蛋白螯合物或螯合有重金属镍的 BSA 螯合物;所述阴性对照为稀释缓冲液。

[0087] 上述试剂盒用于检测镍-低密度脂蛋白螯合物,以提高检测的准确性和重复性,并使之在临床中得到推广。

[0088] 本发明还提供一种定量检测镍-低密度脂蛋白螯合物的方法,以已知含量的上述的镍-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、提纯镍-低密度脂蛋白螯合物与酶联免疫结合法、提纯镍-低密度脂蛋白螯合物与原子吸收光谱结合法、提纯镍-低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,用检测镍-低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。

[0089] 方法一:酶联免疫法(ELISA法)检测镍-低密度脂蛋白螯合物,按照如下步骤检测:

[0090] 1) 包被:用稀释缓冲液稀释可以捕获低密度脂蛋白的蛋白至 250-2000 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;

[0091] 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;

[0092] 3) 加待测样本,并且温育:从循环系统取样,作待测样本;以已知含量的镍-低密度脂蛋白螯合物作标准品;用稀释缓冲液稀释待测样本和标准品均稀释至 10-40 倍,加入微孔中,37℃作用 1-2 小时;

[0093] 4) 加入可以捕获镍的物质,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 5000-40000 倍的抗镍抗体,37℃作用 1-2 小时,使抗镍抗体与低密度脂蛋白上的金属镍反应;

[0094] 5) 酶结合物温育:移去抗镍抗体,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;

[0095] 6) 底物温育:移去酶标抗体,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;

[0096] 7) 终止反应:滴加终止液至每一微孔;

[0097] 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。

[0098] 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。

[0099] 该方法利用 ELISA 原理,低密度脂蛋白上的镍可以被抗镍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

属镍的低密度脂蛋白,则不会被抗镍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镍(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,即可证明检测出低密度脂蛋白上整合的金属镍。

[0100] 方法二:酶联免疫与原子吸收光谱结合法(ELISA 法+AAS 法)检测镍-低密度脂蛋白螯合物按照如下步骤检测:

[0101] 1) 包被:将能够捕获低密度脂蛋白的蛋白,如抗低密度脂蛋白抗体(抗低密度脂蛋白抗体)包被于固相载体上,用稀释缓冲液稀释抗低密度脂蛋白抗体至 250-2000 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;

[0102] 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;

[0103] 3) 加待测样本,并且温育:从循环系统中取样,作待测样本;以已知含量的镍-低密度脂蛋白螯合物作标准品;用稀释缓冲液稀释至 10-40 倍,加入微孔中,37℃作用 1-2 小时;

[0104] 4) 洗脱:移去待测样本,洗涤,加入洗脱液,在 37℃下洗脱 1-3 小时;

[0105] 5) 检测:从 ELISA 微孔中取样,于原子吸收光谱仪检测整合于低密度脂蛋白上的镍,读出相应数值;

[0106] 该实施例利用 ELISA 原理对低密度脂蛋白进行捕获,并结合原子吸收光谱(AAS)仪检测整合于低密度脂蛋白上的镍;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镍。

[0107] 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)检测镍-低密度脂蛋白螯合物按照如下步骤检测:

[0108] 1) 包被:将能够捕获低密度脂蛋白的蛋白,如抗低密度脂蛋白抗体包被于固相载体上,用稀释缓冲液稀释抗低密度脂蛋白抗体至 250-2000 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;

[0109] 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;

[0110] 3) 加待测样本,并且温育:从循环系统取全血,作待测样本;以已知含量的镍-低密度脂蛋白螯合物作标准品;用稀释缓冲液稀释至 10-40 倍,加入微孔中,37℃作用 1-2 小时;

[0111] 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,加入洗脱液,在 37℃下洗脱 1-3 小时;

[0112] 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;

[0113] 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整合于低密度脂蛋白的镍,读出相应数值。

[0114] 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螯合于低密度脂蛋白上的镍；即先采用 ELISA 原理将血清中的镍-低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螯合于低密度脂蛋白上的镍进行定量检测；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镍。

[0115] 方法四：提纯镍-低密度脂蛋白螯合物与酶联免疫结合法（提纯法+ELISA法）检测镍-低密度脂蛋白螯合物，按照如下步骤检测：

[0116] 1) 从全血中提取非特异性低密度脂蛋白：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，从全血中提取低密度脂蛋白，并将提取出的低密度脂蛋白复溶，得低密度脂蛋白的溶液；

[0117] 2) 包被：将抗镍抗体包被于固相载体上，用稀释缓冲液稀释抗镍抗体至 2500-20000 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；

[0118] 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；

[0119] 4) 加待测样本，并且温育：从步骤 2) 的溶液中取样，作待测样本；以已知含量的镍-低密度脂蛋白螯合物作标准品；用稀释缓冲液稀释至 10-40 倍，加入微孔中，37℃作用 1-2 小时；

[0120] 5) 酶结合物温育：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；

[0121] 6) 底物温育：移去酶标抗体，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；

[0122] 7) 终止反应：滴加终止液至每一微孔；

[0123] 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。

[0124] 本方法中，步骤 8) 中，也可不使用酶标仪，直接通过染色情况进行定性检测。

[0125] 方法五：提纯镍-低密度脂蛋白螯合物与原子吸收光谱结合法（提纯法+AAS法）检测血样中镍-低密度脂蛋白螯合物，按照如下步骤检测：

[0126] 1) 从全血中提取非特异性低密度脂蛋白：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，从全血中提取低密度脂蛋白，并将提取出的低密度脂蛋白复溶，得低密度脂蛋白的溶液；

[0127] 2) 检测：从步骤 1) 的溶液中取样，于原子吸收光谱仪检测螯合于低密度脂蛋白上的镍，读出相应数值。

[0128] 方法六：提纯镍-低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）检测镍-低密度脂蛋白螯合物，按照如下步骤检测：

[0129] 1) 从全血中提取非特异性低密度脂蛋白：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，从全血中提取低密度脂蛋白，并将提取出的低密度脂蛋白复溶，得低密度脂蛋白的溶液；

[0130] 2) 酸化:从步骤1)的溶液中取样,在溶液中加入硝酸对溶液进行酸化,封口过夜,彻底酸化;

[0131] 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低密度脂蛋白上的镍,读出相应数值。

[0132] 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,测定低密度脂蛋白中镍-低密度脂蛋白螯合物上镍的含量;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镍-低密度脂蛋白螯合物上的镍含量。

[0133] 方法七:电泳法+ELISA/AAS/ICP-MS法检测镍-低密度脂蛋白螯合物,具体如下:

[0134] 1) 从全血中提取非特异性低密度脂蛋白: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,从全血中提取低密度脂蛋白,将提取出来的低密度脂蛋白复溶于生理盐水中,得低密度脂蛋白的溶液;

[0135] 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;

[0136] 3) 加样:从步骤1)的溶液中取8 $\mu$ L,以已知含量的镍-低密度脂蛋白螯合物作标准品,加入2 $\mu$ L上样缓冲液,并混匀,然后加样于样品槽中;

[0137] 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;

[0138] 5) 检测:在胶床上找出含有镍的蛋白条带,将该条带取出,将该蛋白条带溶解,然后再分别利用ELISA、ICP-MS或AAS等原理检测是否含有镍以及镍的含量。

[0139] 此外,还可以利用此方法检测镍-低密度脂蛋白螯合物的等电点、分子量及含量等。

[0140] 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,再找出富含镍的相应条带,再检测相关低密度脂蛋白的含量;即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复溶,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,寻找出富含镍的相应条带,将凝胶中的蛋白质复溶,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等原理检测出整合于低密度脂蛋白上的镍含量,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整合的金属镍。

[0141] **实施例1:**合成法合成镍-低密度脂蛋白螯合物,即包括以下步骤:

[0142] 本实施例所制备的镍-低密度脂蛋白螯合物,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。

[0143] 本实施例使用的试剂的配制方法如下:

[0144] 1) 硼酸盐缓冲液,其摩尔浓度为0.01M,其制备方法如下:称取0.31g硼酸溶于400mLddH<sub>2</sub>O中,用0.1mol/L的NaOH调节pH至9.0,定容至500mL。

[0145] 2) EDTA-NaHCO<sub>3</sub>溶液,其制备方法如下:取 1.86g EDTA·2H<sub>2</sub>O 和 16.8g NaHCO<sub>3</sub>,溶于 900mL ddH<sub>2</sub>O 中,用 1.0M NaOH 调整 pH 至 8.0 定容至 1000mL,高压灭菌,室温保存;

[0146] 3) ITCBE 购买自日本同仁化学研究所,货号 M030;

[0147] 4) 低密度脂蛋白溶液:称取 4.0mg 低密度脂蛋白溶于 4.0mL 0.01M pH9.0 硼酸盐缓冲液中,充分振荡溶解,配制成 1.0mg/mL 的低密度脂蛋白溶液;

[0148] 5) 透析袋的截留分子量 14000,购买自 Bioshop Inc;

[0149] 透析袋的预处理:将透析袋放入 500mL 的 EDTA-NaHCO<sub>3</sub>溶液中,煮沸 10min;倾弃 EDTA-NaHCO<sub>3</sub>溶液,用 ddH<sub>2</sub>O 轻轻漂洗,再用 500mL 5mmol/L EDTA 煮沸 10min;弃掉煮沸液,彻底用 ddH<sub>2</sub>O 清洗,加入大量的 ddH<sub>2</sub>O 浸泡透析袋 4℃ 过夜。使用时,戴上手套,取出透析袋,用大量的 ddH<sub>2</sub>O 彻底冲洗其内外表面;

[0150] 制备镍-低密度脂蛋白螯合物的方法,包括以下步骤:

[0151] A) 镍-低密度脂蛋白螯合物的合成:在提纯源于人体的低密度脂蛋白或按照生物学方法重组的低密度脂蛋白中加入镍离子进行螯合反应,得到反应溶液,具体包括以下步骤:

[0152] 1) 取 2.0mg ITCBE 溶于 2mL DMSO 中;

[0153] 2) 缓慢将步骤 1 制备的液体加入低密度脂蛋白溶液中,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,除去未与低密度脂蛋白结合的 ITCBE;

[0154] 3) 将透析所得的液体用 1mol/L HCl 调节 pH 值至 7.0,然后缓慢逐渐滴加 80 μl 1mmol/L 镍离子溶液,边滴加边振荡,以免镍离子使蛋白变性沉淀;

[0155] 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;

[0156] 5) 将透析好的液体于 -20℃ 分装保存,得到镍-低密度脂蛋白螯合物。

[0157] B) 镍-低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低密度脂蛋白、特异性抗体和镍离子,即得镍-低密度脂蛋白螯合物,具体包括以下步骤:

[0158] (1) 溶解样品:将上述步骤 A) 的镍-低密度脂蛋白螯合物溶解于生理盐水中,得镍-低密度脂蛋白螯合物溶液;

[0159] (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低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;

[0160] 所述能与低密度脂蛋白特异性结合的填料为吸附有可与低密度脂蛋白特异性结合物质的硅胶或树脂;

[0161] (3) 上样:待层析柱平衡后,用稀释缓冲液稀释步骤 (1) 的溶液,然后上柱,使低密度脂蛋白与填料特异性结合;

[0162] (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<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>溶液进行洗脱;

[0163] (5) 收集:收集步骤 (4) 的洗脱液,收集完毕后立即使蛋白复原;

[0164] (6) 透析:将步骤 (5) 的洗脱液,装透析袋,用 ddH<sub>2</sub>O 透析除盐,换水三次后,4℃ 透析过夜,收集样本;

[0165] (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镍特异性结合的填料，装柱后再用稀释缓冲液平衡层析柱；

[0166] 所述能与镍特异性结合的填料为吸附有可与镍特异性结合物质的硅胶或树脂；

[0167] (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；

[0168] (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  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  溶液进行洗脱；

[0169] (10) 收集：收集步骤 (9) 的洗脱液，收集完毕后立即使蛋白复原；

[0170] (11) 透析：将步骤 (10) 的洗脱液，装透析袋，用  $\text{ddH}_2\text{O}$  透析除盐，换水三次后，4℃ 透析过夜，收集样本，即得镍-低密度脂蛋白螯合物。

[0171] C) 对镍-低密度脂蛋白螯合物的鉴定，具体步骤如下：

[0172] (1) 制备胶床：以琼脂糖凝胶作为介质制备胶床；

[0173] (2) 加样：取步骤 B) 中提取纯化得到的镍-低密度脂蛋白螯合物，复溶于生理盐水中，得镍-低密度脂蛋白螯合物的溶液，取 8  $\mu\text{L}$  上述溶液，加入 2  $\mu\text{L}$  上样缓冲液，并混匀，然后加样于样品槽中；

[0174] (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 为本发明所述镍-低密度脂蛋白螯合物的非变性电泳条带图，M 泳道为非变性 Marker，LDL 泳道为低密度脂蛋白；

[0175] (4) 检测：在胶床上找出含有镍的蛋白条带，将该蛋白条带取出，将蛋白条带溶解，然后再采用 ICP-MS 或 AAS 检测是否含有镍以及检测镍的含量。

[0176] D) 鉴定结果

[0177] 1) AAS 检测结果

[0178] 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) 初步测定低密度脂蛋白中重金属镍的含量，如下表所示，以 NaCl 溶液、KBr 溶液、KCl 溶液为空白对照。

[0179] 表 1 低密度脂蛋白中镍的含量

[0180]

样本名	Ni ( $\mu\text{g/L}$ )
待测样本	13.812
NaCl	0.000
KBr	0.037
KCl	0.092

[0181] 2) 同步辐射 X 荧光分析

[0182] 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。

[0183] 图 2 为本发明所述的镍-低密度脂蛋白螯合物的电泳条带的同步辐射 X 线荧光分析图,图中横坐标为蛋白条带位置,纵坐标为该条带镍金属能量(含量)值。

#### [0184] 检测条件的确定

[0185] 1. 抗低密度脂蛋白抗体、抗 Ni 抗体最佳工作浓度以及血浆的最佳稀释倍数的确定。酶联免疫法检测镍-低密度脂蛋白螯合物的方法,具体包括以下步骤:

[0186] 1) 包被:将抗低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 1:250、1:500、1:10000、和 1:2000 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;

[0187] 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;

[0188] 3) 加待测样本:用稀释缓冲液将待测血浆样本按 1:10、1:20、1:40 的倍比稀释,加入微孔中,以已知含量的镍-低密度脂蛋白螯合物作标准品,设置阴性对照和空白对照,加入微孔中,37℃作用 1 小时;

[0189] 4) 加二抗:移去待测血浆样本,洗涤,加入用稀释缓冲液按 1:5000、1:10000、1:200000、1:40000 的倍比稀释的抗 Ni 抗体,37℃作用 1 小时,使其与低密度脂蛋白上的金属镍反应;

[0190] 5) 加酶标:移去抗 Ni 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 Ni 抗体反应;

[0191] 6) 底物温育:移去酶标抗体,洗涤,加入底物,37℃避光作用 30min,加入终止液;

[0192] 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。

[0193] 本实施例中,采用本发明提供的镍-低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,即依次加入了抗低密度脂蛋白抗体、封闭液、抗 Ni 抗体、酶标和底物;

[0194] 以不加抗 Ni 抗体的对照试验组作为阴性对照 2,即依次加入了抗低密度脂蛋白抗体、封闭液、待测血浆、酶标和底物;

[0195] 以不加酶标的对照试验组作为阴性对照 3、即依次加入了抗低密度脂蛋白抗体、封闭液、待测血浆、抗 Ni 抗体和底物;

[0196] 以同时不加待测样本和抗 Ni 抗体的对照试验组作为阴性对照 4,即依次加入了抗低密度脂蛋白抗体、封闭液、酶标和底物;

[0197] 以不加抗低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 Ni 抗体、酶标和底物;

[0198] 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。

[0199] 表 2 为不同抗低密度脂蛋白抗体稀释倍比、血浆稀释倍比、抗 Ni 抗体稀释倍比的样本 OD 值数据,

[0200] 表 2 不同抗低密度脂蛋白抗体、Ni 抗体以及血浆稀释倍比下的检测结果

[0201]

		抗低密度脂蛋白抗体			
		1:250	1:500	1:1000	1:2000
抗 Ni 抗体 1:5000	血浆 1:10	0.729	0.818	0.756	0.674
	血浆 1:20	0.714	0.802	0.763	0.628
	血浆 1:40	0.595	0.765	0.613	0.574
抗 Ni 抗体 1:10000	血浆 1:10	0.572	0.791	0.662	0.567
	血浆 1:20	0.586	0.805	0.654	0.555
	血浆 1:40	0.472	0.767	0.554	0.466
抗 Ni 抗体 1:20000	血浆 1:10	0.451	0.724	0.585	0.433
	血浆 1:20	0.429	0.713	0.508	0.421
	血浆 1:40	0.369	0.646	0.424	0.329
抗 Ni 抗体 1:40000	血浆 1:10	0.344	0.638	0.479	0.384
	血浆 1:20	0.357	0.624	0.417	0.367
	血浆 1:40	0.317	0.486	0.384	0.301

[0202] 从表 2 可知,抗低密度脂蛋白抗体的稀释倍比为 1:500 时,样本 OD 值大于平行条件下的其它抗低密度脂蛋白抗体的稀释倍比;该组样本中,血浆稀释倍比为 1:10 时,抗 Ni 抗体稀释倍比为 1:5000 时,OD 值最大,为 0.818。

[0203] 表 3 为抗低密度脂蛋白抗体的稀释倍比为 1:500、血浆稀释倍比为 1:10、抗 Ni 抗体稀释倍比为 1:5000 时相对应的阳性对照、阴性对照和空白对照的 OD 检测值,

[0204] 表 3 阳性对照、阴性对照及空白对照的检测结果

[0205]

阳性对照	阴性对照				空白对照		
	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
0.981	0.055	0.035	0.068	0.078	0.075	0.023	0.035

[0206] 从表 3 可知,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。

[0207] 2. ELISA 洗脱液最佳工作浓度及洗脱时间确定

[0208] 为寻求最适宜的洗脱条件,通过酶联免疫法在抗 Ni 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:

[0209] (1) 包被:将抗 Ni 抗体包被于固相载体上,用稀释缓冲液按 1:500 的倍比稀释,加入 ELISA 板微孔中,4℃保存 16 小时;

[0210] (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;

[0211] (3) 加酶标抗体:移去封闭液,洗涤后,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 Ni 抗体反应;

[0212] (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；

[0213] (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，

[0214] 表 4 不同洗脱液稀释倍数下的检测结果

[0215]

	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

[0216] 通过比较 OD 值，以判断 ELISA 孔壁上结合的抗 Ni 抗体 - 酶标抗体复合物洗脱程度，当 OD 值最低时，抗 Ni 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，洗脱程度最高；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。

[0217] 应用实施例

[0218] 应用实施例 1

[0219] 采用全血提取法提取出镍 - 低密度脂蛋白螯合物，采用酶联免疫法 (ELISA 法) 检测 100 份标本血浆中的镍 - 低密度脂蛋白螯合物，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：

[0220] 1) 包被：将抗低密度脂蛋白抗体包被于固相载体上，用稀释缓冲液稀释至 500 倍，加入 ELISA 板微孔中，37℃保存 1 小时后于冰箱中 4℃储存；

[0221] 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；

[0222] 3) 加样：以标本血浆作为待测样本，以已知含量的镍 - 低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 倍，加入微孔中，37℃作用 1 小时；

[0223] 4) 加二抗：移去样品，洗涤，加入用稀释缓冲液稀释至 5000 倍的抗 Ni 抗体，37℃作用 1 小时，使其与低密度脂蛋白上的金属镍反应；

[0224] 5) 加酶标：移去抗 Ni 抗体，洗涤，加入用稀释缓冲液稀释至抗体浓度为 2 μg/mL 的酶标抗体，37℃作用 1 小时，使其与抗 Ni 抗体反应；

[0225] 6) 底物温育：移去酶标抗体，洗涤，加入底物，37℃避光作用 30min，滴加入终止液；

[0226] 7) 检测：于 450nm 波长下在酶标仪上分别读取待测样本和标准品的 OD 值，结果如表 5 所示。

[0227] 表 5 方法一对 100 份标本血浆的实测结果

[0228]

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
OD	0.519	0.436	0.421	0.343	0.687	0.546	0.337	0.342	0.508	0.692
编号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
OD	0.575	0.507	0.321	0.497	0.461	0.39	0.775	0.331	0.405	0.77
编号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
OD	0.803	0.677	0.564	0.526	0.654	0.635	0.313	0.787	0.412	0.481
编号	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
OD	0.708	0.616	0.606	0.556	0.477	0.497	0.792	0.622	0.539	0.6
编号	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
OD	0.355	0.376	0.777	0.35	0.367	0.798	0.348	0.498	0.464	0.774
编号	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
OD	0.689	0.352	0.628	0.363	0.687	0.794	0.322	0.818	0.674	0.357
编号	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
OD	0.771	0.34	0.82	0.443	0.66	0.654	0.52	0.548	0.591	0.514
编号	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
OD	0.815	0.531	0.428	0.56	0.575	0.432	0.76	0.593	0.641	0.646
编号	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
OD	0.691	0.548	0.585	0.678	0.692	0.413	0.803	0.792	0.652	0.31
编号	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
OD	0.645	0.483	0.462	0.435	0.529	0.454	0.596	0.577	0.61	0.77

[0229] 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。

#### [0230] 应用实施例 2

[0231] 采用酶联免疫与原子吸收光谱结合法 (ELISA 法 + AAS 法) 检测 100 份标本血浆中镍 - 低密度脂蛋白螯合物, 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:

[0232] 1) 包被: 将抗低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 500 倍, 加入 ELISA 板微孔中, 4℃ 过夜 18 小时;

[0233] 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;

[0234] 3) 加样: 以标本血浆作待测样本, 以已知含量的镍 - 低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稀释至 20 倍, 加入微孔中, 37℃ 作用 1 小时;

[0235] 4) 洗脱: 移去待测血浆样本, 洗涤, 加入 0.8mol/L 的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  溶液, 37℃ 作用 2 小时;

[0236] 5) 检测: 从 ELISA 微孔中取样, 于原子吸收光谱仪检测螯合于低密度脂蛋白上的镍, 结果如表 6 所示。

[0237] 表 6 方法二对 100 份标本血浆的实测结果

[0238]

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
μg/L	8.636	13.353	8.066	11.2	9.25	8.488	12.355	8.518	11.711	13.648
编号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
μg/L	14.283	12.246	13.364	9.918	10.664	9.115	11.342	9.712	10.814	8.187
编号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
μg/L	13.472	12.53	8.242	14.818	11.05	13.166	10.424	10.871	7.493	8.036
编号	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
μg/L	13.8	11.376	14.173	11.178	10.91	9.182	11.64	12.706	14.512	12.196
编号	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
μg/L	11.266	13.751	8.635	8.58	9.058	12.19	14.633	8.499	9.918	12.67
编号	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
μg/L	13.693	7.388	12.236	13.419	10.76	7.557	7.681	11.935	8.067	7.751
编号	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
μg/L	11.361	12.004	10.87	11.164	9.238	14.402	13.782	12.184	8.67	14.962
编号	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
μg/L	14.173	8.008	10.714	8.908	9.046	11.095	9.229	9.329	8.142	12.023
编号	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
μg/L	14.995	7.408	9.448	11.813	14.107	7.457	10.723	8.854	12.663	11.351
编号	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
μg/L	7.745	9.157	14.196	13.742	8.732	10.719	9.965	11.047	8.74	13.918

[0239] 应用实施例 3:

[0240] 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 份标本血浆中镍 - 低密度脂蛋白螯合物, 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:

[0241] 1) 包被: 将抗低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 500 倍, 加入 ELISA 板微孔中, 4℃ 保存 18 小时;

[0242] 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;

[0243] 3) 加样: 以标本血浆作待测样本, 以已知含量的镍 - 低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稀释至 10 倍, 加入微孔中, 37℃ 作用 2 小时;

[0244] 4) 洗脱: 移去待测样本和标准品, 洗涤, 加入 0.8mol/L 的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  溶液, 37℃ 洗脱 2 小时;

[0245] 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;

[0246] 6) 检测: 取样, 于电感耦合等离子体质谱仪下检测螯合于低密度脂蛋白上的镍, 结果如表 7 所示。

[0247] 表 7 方法三对 100 份标本血的实测结果

[0248]

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
μg/L	11.509	8.412	13.233	13.811	12.144	8.177	14.746	11.972	12.155	13.121
编号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
μg/L	12.669	13.242	10.32	11.27	14.71	9.417	13.894	14.581	14.681	13.918
编号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
μg/L	13.371	8.574	14.906	11.459	14.237	14.428	11.045	9.995	10.057	12.5
编号	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
μg/L	13.724	13.578	7.1	10.653	8.345	13.5	14.954	11.52	14.793	7.759
编号	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
μg/L	13.69	12.484	13.137	8.5	7.385	10.689	12.097	12.338	10.497	14.344
编号	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
μg/L	9.227	12.714	7.041	12.478	13.673	7.443	12.627	12.885	10.88	7.572
编号	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
μg/L	11.801	13.545	12.207	14.756	8.039	7.908	14.803	13.257	14.699	11.607
编号	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
μg/L	14.913	11.303	8.049	12.537	13.98	13.674	14.328	13.601	11.128	12.953
编号	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
μg/L	14.731	11.06	11.478	11.332	9.096	12.384	8.998	13.028	12.509	13.383
编号	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
μg/L	14.425	9.741	7.263	10.251	12.004	10.958	12.478	12.045	10.092	12.622

[0249] 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畴。

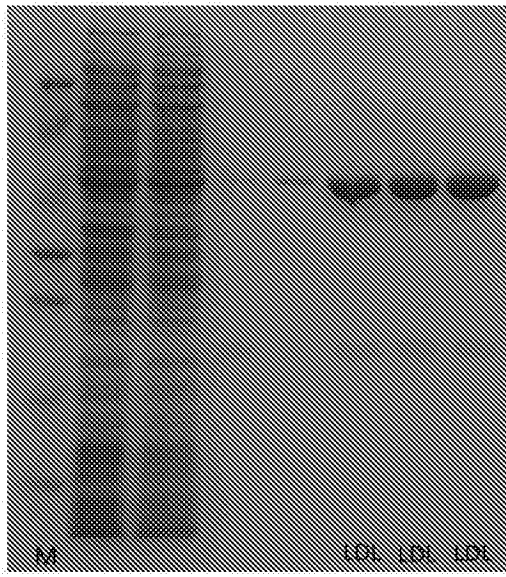


图 1

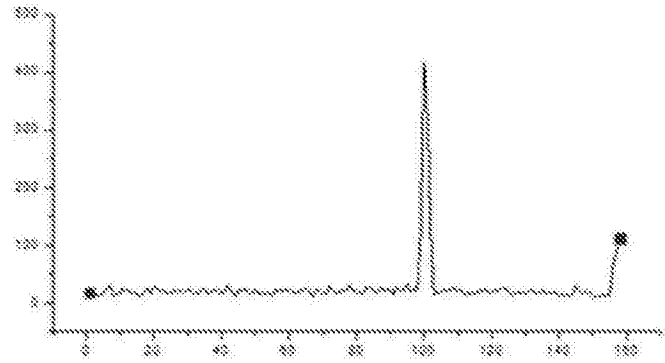


图 2