

氧化低密度脂蛋白定量检测试剂盒（酶联免疫法）

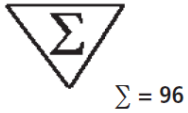




10-1143-01

96 人份试剂



由瑞典 Mercodia AB 制造

用于标签上的标识的说明

	96 测试试剂
	失效日期
	在 2-8℃ 下储存
	批号
	用于体外诊断

预期用途

氧化低密度脂蛋白定量检测试剂盒（酶联免疫法）预期用于人血清或血浆样本中氧化低密度脂蛋白的体外定量测定。脂蛋白的测定可用于脂质紊乱（如糖尿病）、动脉硬化症、以及多种肝脏和肾脏疾病的诊断和治疗。

本试验的综述和说明

从低密度脂蛋白（LDL）到氧化态低密度脂蛋白（oxidized LDL）的氧化转化，目前被认为是起始和加速早期动脉硬化病变和脂纹形成这一生物过程的一个关键事件 [1-5]。

实验研究表明，当天然 LDL 转化为氧化 LDL 时，可导致动脉粥样硬化，而且氧化 LDL 比天然 LDL 更易导致动脉粥样硬化 [1-5]。氧化 LDL 发现于动脉粥样硬化病变中的单核细胞源性巨噬细胞，而非正常动脉中 [6]。巨噬细胞对 LDL 的摄入不是通过经典的 Brown/Goldstein LDL 受体 [7]。大量研究 [1-5, 8] 确定了血液胆固醇的主要载体 LDL，首先转化为氧化 LDL，这样它就可以被“清道夫”或单核细胞源性巨噬细胞上的“氧化 LDL 受体”识别。氧化 LDL 和巨噬细胞的结合是一个必要的步骤，通过这样使氧化 LDL 诱导巨噬细胞中胆固醇富集，然后将巨噬细胞转变为充满脂质的泡沫细胞 [8]。

Holvoet 和他的同事 [9] 首次明确论证了冠状动脉硬化病人血浆中氧化 LDL 水平有显著升高，稳定性冠状动脉硬化患者和急性动脉综合症患者之间的血液循环中的氧化 LDL 水平是极其相似的。他们发现，稳定型心绞痛、不稳定型心绞痛和急性心肌梗塞患者血浆中氧化 LDL 水平明显高于年龄相当、据推测健康的控制样本。

据 Holvoet 发表的文章报道 [9-13]，血浆中氧化 LDL 水平由竞争 ELISA 法测量，应用了特异的鼠单克隆抗体 mAb-4E6。应该指出的是，Mercodia 公司的氧化低密度脂蛋白检测试剂盒（酶联免疫法）使用了与 Holvoet 试剂中同样的特异的鼠单克隆抗体 mAb-4E6。但是，Mercodia 公司的试剂盒是捕获 ELISA（也被称作“三明治”ELISA），微滴定盘的孔用捕获抗体 mAb-4E6 包被。

使用过 Mercodia 公司的氧化低密度脂蛋白检测试剂盒（酶联免疫法）的临床研究者的报道了很多值得关注的研究。Hulthe 和 Fagerberg 通过表明氧化 LDL 水平与颈动脉和股动脉内-中膜厚度和斑块的发生相关，论证了亚临床动脉粥样硬化和血液循环中氧化 LDL 的关系。Sigurdardottir、Fagerberg 和 Hulthe [15] 发现新陈代谢症候群患者中氧化 LDL 水平升高。另外，他们发现新陈代谢症候群患者中氧化 LDL 水平升高与微小 LDL 颗粒大小有关。Kopprasch 等 [16] 发现糖耐量减低（IGT）患者循环血液中氧化 LDL 水平升高。Duntas、

Mantzou 和 Koutras [17] 发现未经治疗的临床甲减患者血浆中氧化 LDL 水平显著升高。

在美国心脏协会 2002 科学年会中, Johnston 等 [18] 报道不稳定型冠状动脉疾病患者的血浆氧化 LDL 水平显著高于健康控制样本。最重要的是, 在不稳定型冠状动脉疾病患者和健康控制样本间的胆固醇水平并没有显著差异。

检测程序的原理

氧化低密度脂蛋白检测试剂盒(酶联免疫法)是一种固相双表位酶联免疫试剂。它基于双夹心技术, 两单克隆抗体分别结合在氧化态载脂蛋白 B 的抗原决定簇上。在孵育过程中, 样本中的氧化 LDL 与结合在微孔(板)中的抗氧化 LDL 抗体反应。经洗涤后, 洗去未反应的血浆成分, 一个过氧化物酶偶联的人载脂蛋白 B 抗体识别固定于固相上的氧化 LDL。经过第二次孵育和一个简单的洗涤步骤, 移去了未结合的酶标抗体, 结合的偶联物(标记物)通过与 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)反应而被检测到。加入酸后反应终止, 然后通过分光光度计(酶标仪)读取反应的终点。

警告和注意事项

- 用于体外诊断。不能用于人类或动物的内服或外用。
- 不能让反刍动物或猪接触到本试剂盒的内容物及其残余物。
- 本试剂盒的终止溶液含有 0.5M 的硫酸。按常规预防措施处理危险化学品。
- 所有的患者样本都应按潜在传染物处理。

警告! 本试剂盒所含试剂可能会有传染性!

本试剂盒含有以人血液成分为原料生产的试剂。材料的来源已对乙肝病毒表面抗原、丙肝病毒抗体、HIV 病毒抗体进行过酶免检测, 且结果为阴性。但是, 与血液衍生产品的处理相关的所有已建议的注意事项都应遵守。请参考 HHS 出版号(CDC) 88-8395 或相关的地区/国家实验室安全程序指导方针。

要求但未提供的材料

- 25 μ L、50 μ L、100 μ L、200 μ L、1000 μ L 移液管(重复移取加入酶结合物溶液、TMB 底物和终止溶液)
- 用于试剂制备的烧杯和量筒
- 重蒸水

- 带盖试管，3.5mL
- 酶标仪（含 450nm 滤光片）
- 平板振荡器（建议速率 700-900 循环/分钟，轨道运动）
- 微孔板（酶标板）洗涤设备
- 适当的混合设备

试剂

每个 Mercodia 的氧化低密度脂蛋白检测试剂盒（酶联免疫法）都包含 96 孔的试剂，足够用于双份测试的 40 个样本、2 个质控和 1 个校准曲线。对于更大量的试验，用标有相同批号的包装中试剂。完整的试剂盒的失效日期在外包装上。建议储存温度为 2-8°C。

包被微孔板	1 个平板	96 孔	准备好使用
鼠氧化 LDL 单克隆抗体		8 孔的条	

对于未使用过的微板条，用胶带重新密封在袋子里，储存在 2-8°C，在 8 周内使用。

校准品 1、2、3、4、5	5 瓶	1000µL	冻干
人氧化 LDL 黄色			每瓶加入 1000µL 重蒸水
浓度标示在瓶标签上			
重冻干后储存：2-8°C 一周			
对于储存超过 1 周的重悬校准品，储存在 -20°C			

校准品 0	1 瓶	1000µL	准备好使用
黄色			

质控品 (H) (L)	2 瓶	1000µL	冻干
抗原浓度标示在瓶标签上			每瓶加入 1000µL 重蒸水
重悬后储存：2-8°C 一周			
对于储存超过 1 周的重悬校准品，储存在 -20°C			

酶结合物 11X	1 瓶	1.2mL	制备，见下文
过氧化物酶结合的鼠抗 apoB 单克隆抗体			

酶结合物缓冲液 蓝色	1 瓶	1.2mL	准备好使用
试验缓冲液 红色	1 瓶	1.2mL	准备好使用
样本缓冲液 4× 黄色	1 瓶	50mL	用 150mL 重蒸水稀释，制作样本缓冲液 1×溶液
<p>注意！当储存在 2-8℃时，可能会产生沉淀。</p> <p>将样本缓冲液 4×放置于室温下混匀直到沉淀溶解</p> <p>稀释后储存：2-8℃四周</p>			
洗涤缓冲液 4×	1 瓶	50mL	用 1000mL 重蒸水稀释，制作洗涤缓冲液 1×溶液
<p>稀释后储存：2-8℃八周</p>			
底物 TMB 无色溶液	1 瓶	22mL	准备好使用
<p>注意！光敏！</p>			
终止溶液 0.5M 硫酸	1 瓶	7mL	准备好使用

酶结合物 1×溶液的制备

按下表，用酶结合物缓冲液稀释酶结合物 11× (1+10)，来制备所需体积的酶结合物 1×溶液。当为整个平板制备酶结合物 1×溶液时，将所有酶结合物缓冲液倒入酶结合物 11×瓶中，轻柔混合。

条数量	酶结合物 11×	酶结合物缓冲液
12 条	1 瓶	1 瓶
8 条	700μL	7.0mL
6 条	500μL	5.0mL
4 条	350μL	3.5.mL

稀释后储存：2-8°C 一个月

样本的收集和处理

Mercodia 的氧化低密度脂蛋白定量检测试剂盒（酶联免疫法）建议使用的样本为新鲜的 EDTA-血浆。肝素-血浆和血清也可以使用。

血浆

通过静脉穿刺将血液收集在含 EDTA 或肝素抗凝血剂的试管里，分离血浆成分。样本可以在-80°C 储存至少 6 个月。避免反复冻融。

血清

通过静脉穿刺收集血液，允许结块，然后通过离心分离血清。样本可以在-80°C 储存至少 6 个月。避免反复冻融。

样本的稀释

为每个患者样本准备两个试管。每个样本都要经过以下两步稀释到 1/6561 倍：

1	患者样本	25 μ L	
	样本稀释液 1 \times 溶液	2000 μ L	
	带盖试管，倒置三次，vortex-mix*		稀释 1/81
2	1/81 稀释的样本	25 μ L	
	样本稀释液 1 \times 溶液	2000 μ L	
	带盖试管，倒置三次，vortex-mix*		稀释 1/6561

*确保在下一步开始前，每个稀释步骤都适当混合是很重要的。

本步骤的结果是将样本稀释 1/6561 倍。

检测步骤

在使用前，所有的试剂和样本都应放至室温。

每次试验都要做一个标准曲线。

1. 制备酶结合物 1 \times 溶液、样本缓冲液 1 \times 溶液、洗涤缓冲液 1 \times 溶液和样本。

2. 制备足够用于平行测试 2 次的校准品、质控品和样本的包被微孔(板)。
3. 各吸取 25 μ L 各水平校准品、质控品、已稀释的样本到适当的孔中。
4. 向各孔中加入 100 μ L 试验缓冲液。
5. 将上述微孔板放入平板振荡器 (700-900rpm) 在室温下 (18-25 $^{\circ}$ C) 培养 2 小时。
6. 用带有 overflow 洗涤功能的全自动洗板机, 每孔用 700 μ L 洗涤缓冲液 1 \times 溶液洗涤 6 次。
在洗涤程序中不包括浸泡步骤。
或手工洗涤:
将微板倒置在一个水槽上以弃去反应溶液。向每孔加入 350 μ L 洗涤缓冲液 1 \times 溶液。弃去洗涤溶液, 靠在吸水纸轻拍数次以除去多余的液体。重复 5 次。在洗涤过程中避免长时间浸泡。
7. 向每孔中加入 100 μ L 酶结合物 1 \times 溶液。
8. 放入平板振荡器在室温下 (18-25 $^{\circ}$ C) 培养 1 小时。
9. 按步骤 6 中所述洗涤。
10. 加入 200 μ L 底物 TMB。
11. 在室温下培养 15 分钟, 不需振荡,
12. 加入 50 μ L 终止溶液。将平板放入振荡器 5 秒以确保混匀。
13. 在 450nm 下读取光密度值并计算结果。
在 30 分钟内读数。

注意! 防止结合物和底物之间的污染, 建议单独使用移液器。

内部质量控制

对于商品质控品和/或含有低、中和高浓度氧化 LDL 的内部血浆/血清, 应该像检测样本一样进行日常检测, 并每天记录结果。对各试验的以下数据进行记录是良好的实验室规范: 试剂盒批号、试剂盒组分稀释液和/或重悬日期、空白、校准品和质控品的 OD 值。

结果的计算

计算机计算

由计算机数据获得除校准品 0 以外的校准品的氧化 LDL 浓度, 对三次样条回归而得的

浓度。将样本浓度乘以稀释因子（如×6561）。

人工计算

1. 对除校准品 0 以外的校准品的吸收值，相对于氧化 LDL 浓度，绘制 lin-log 图，并创建一个校准曲线。
2. 在校准曲线上读取质控品和未知样本的浓度。
3. 将质控品和样本的浓度值乘以稀释因子（如×6561）。

结果示例

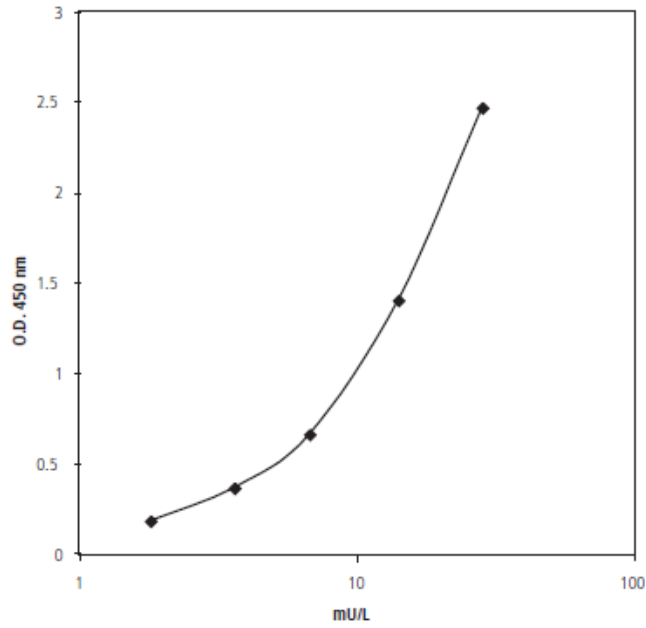
孔	样本	A _{450nm}	浓度 mU/L	U/L**
1A-B	校准品 0	0.072		
1C-D	校准品 1*	0.185		
1E-F	校准品 2*	0.369		
1G-H	校准品 3*	0.664		
2A-B	校准品 4*	1.405		
2C-D	校准品 5*	2.469		
2E-F	质控品 (H)	1.234	12.2	80.04
2G-H	质控品 (L)	0.513	5.2	34.12

*瓶标签上显示的浓度

**乘以稀释因子（×6561）后的结果

校准曲线示例

典型的校准曲线如下所示。不要使用本曲线来确定实际试验结果。



程序的局限性

正如所有的诊断测试，一个确定的诊断不能仅基于单一的测试结果，而是由医生在所有临床发现评估后做出。

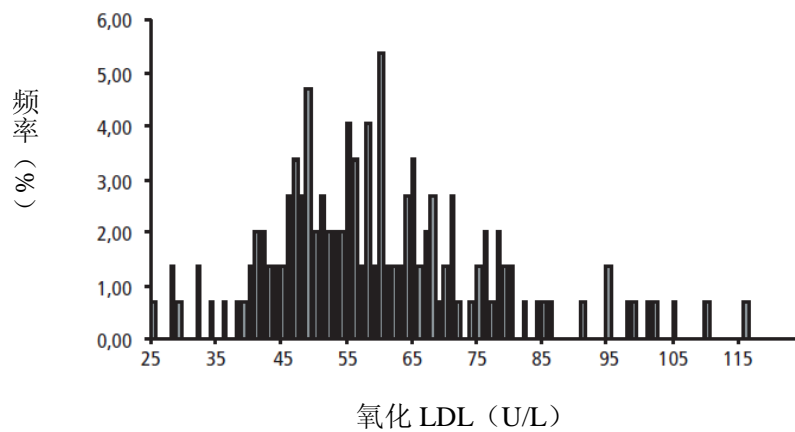
高血脂、黄疸或溶血样本不会对本试验造成影响。

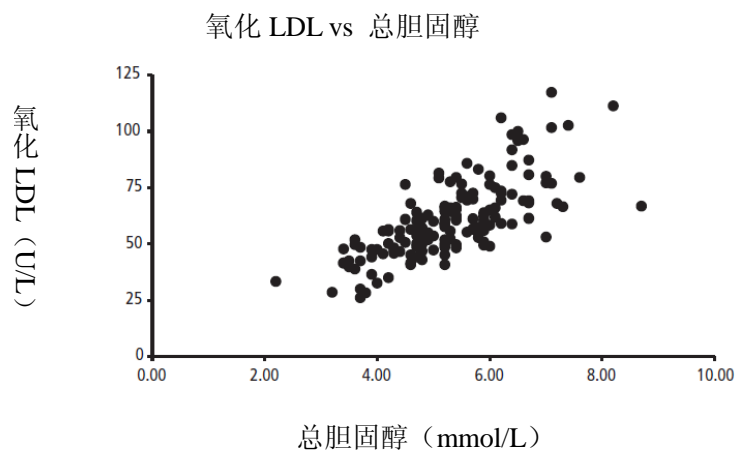
期望值

良好的规范决定了每个实验室要建立他们自己的期望值范围。在实验室收集到足够的数据库前，以下结果可以做为一个指南。

以下结果来自于瑞典斯德哥尔摩的 149 个门诊随机筛选的个体。

氧化 LDL 的分布





以下结果来自于瑞典斯德哥尔摩的 149 个门诊随机筛选的个体。

	平均值	中间值	范围
氧化 LDL 范围 (U/L) *	61	59	26-117
总胆固醇/HDL 比值**	4.10	3.90	1.68-7.89

*任意单位。见校准

**LDL (mmol/L) 和 HDL (mmol/L) 测量数据

氧化 LDL 和 HDL/HDL 比值

氧化 LDL U/L	LDL/HDL 比值	患者/总体 (%)	
第 1 个四分位数			
Q1 (26-49)	0.55-1.79	19/147	(13.0)
Q2 (50-59)	0.55-1.79	12/147	(8.2)
Q3 (60-69)	0.55-1.79	6/147	(4.1)
Q4 (70-117)	0.55-1.79	0/147	(0.0)
第 2 个四分位数			
Q1 (26-49)	1.79-2.33	10/147	(6.8)
Q2 (50-59)	1.79-2.33	13/147	(8.8)
Q3 (60-69)	1.79-2.33	10/147	(6.8)
Q4 (70-117)	1.79-2.33	3/147	(2.0)
第 3 个四分位数			

Q1 (26-49)	2.36-3.08	8/147	(5.4)
Q2 (50-59)	2.36-3.08	11/147	(7.5)
Q3 (60-69)	2.36-3.08	10/147	(6.8)
Q4 (70-117)	2.36-3.08	8/147	(5.4)
第 4 个四分位数			
Q1 (26-49)	3.09-5.56	0/147	(0.0)
Q2 (50-59)	3.09-5.56	5/147	(3.4)
Q3 (60-69)	3.09-5.56	8/147	(5.4)
Q4 (70-117)	3.09-5.56	24/147	(16.3)

性能指标

检测限

按照校准品 0 以上的三个标准偏差来计算，检测极限是<1mU/L。

回收率

回收率为 85-107%（平均值为 95%）。

精密度

精密度由对来自 20 个不同地点的三个样本进行 3-8 个重复试验所得。

样本	实测值		变异系数%	
	mU/L	批内	批间	总体
1	8.5	5.5	6.2	8.3
2	19	7.3	4.0	8.3
3	32	6.2	4.0	7.4

稀释

样本	稀释	获得值	实测值/
		mU/L	期望值
(试验 1/试验 2)			

样本 1	1: 3321		
	1: 6642	19.9/18.3	
	1: 13284	9.4/9.5	0.94/1.04
样本 2	1: 3321	-	
	1: 6642	20.6/20.4	
	1: 13284	10.6/9.8	1.02/0.97
样本 3	1: 3321	29.1/32.0	
	1: 6642	15.6/15.5	1.07/0.97
	1: 13284	7.7/8.0	1.05/1.00
样本 4	1: 3321	21.6/20.2	
	1: 6642	10.4/10.4	0.97/1.03
	1: 13284	5.9/5.7	1.08/1.12
样本 5	1: 3321	15.9/15.7	
	1: 6642	8.1/8.0	1.02/1.02
	1: 13284	4.0/4.4	1.02/1.13

平均实测值/期望值为 1.03，范围 0.94-1.13。

校准

目前尚没有国际参考品。Merco[®]dia 的氧化低密度脂蛋白检测试剂盒（酶联免疫法）用实验室内部参考控制程序来确定相对独立的单位来校准。

保证

在此发布的性能数据是按指定的程序操作获得的。任何非 Merco[®]dia AB 建议的对程序的变更或修改都可能会影响试验结果，在这种情况下，Merco[®]dia AB 会放弃所有明示的、隐含的或法定的保证，包括使用的适销性或适合性的隐含的保证。

在这种事件中，Merco[®]dia AB 及其授权分销商，不对直接的或间接的损害负责。

参考文献

1. Steinberg D (1997) Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem* 272:20963–20966.
2. Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Watson AD and Lusis AJ (1995) Atherosclerosis: basic mechanisms: oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation* 91:2488–2496.
3. Steinberg D (1997) Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation* 95:1062–1071.
4. Heinecke JW (1998) Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: implications for the oxidized low density lipoprotein hypothesis. *Atherosclerosis* 141:1–15.
5. Witztum JL and Horkko S (1997) The role of oxidized LDL in atherogenesis: immunological re-sponse and anti-phospholipid antibodies. *Ann N Y Acad Sci* 811:88–99.
6. Yla-Herttuala S (1998) Is oxidized low-density lipoprotein present in vivo? *Curr Opin Lipidol* 9:337–344.
7. Brown, MS and Goldstein JL (1983) Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu Rev Biochem* 52:223–226.
8. Chisolm GM, Hazen SL, Fox PL and Cathcart MK (1999) The oxidation of lipoproteins by monocyte-macrophages. *J Biol Chem* 274:25959–25962.
9. Holvoet P, Vanhaecke J, Janssens S, Van de Werf F and Collen D (1998) Oxidized LDL and mal-on dialdehyde-modified LDL in patients with acute coronary syndromes and stable coronary artery disease. *Circulation* 98:1487–1494.
10. Holvoet P, Mertens A, Verhamme P, Bogaerts K, Beyens G, Verhaeghe R, D'ésir éCollen, Muls E and de Werf F (2001) Circulating Oxidized LDL Is a Useful Marker for Identifying Patients With Coronary Artery Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:844–848.
11. Holvoet P, Satszen J-M., Van Cleemput J, Collen D and Vanhaecke J (1998) Oxidized low density lipoproteins in patients with transplant-associated coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:100–107.
12. Holvoet P, Donck J, Landeloos M, Brouwers E, Luijtens K, Arnout J, Lesaffre E, Vanrenterghem Y and Collen D (1996) Correlation between oxidized low density lipoproteins and von Willebrand factor in chronic renal failure. *Thromb Haemost* 76:663–669.

13. Holvoet P, Van Cleemput J, Collen D and Vanhaecke J (2000) Oxidized low density lipoprotein is a prognostic marker of transplant-associated coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:698–702.
14. Hulthe J and Fagerberg B (2002) Circulating oxidized LDL is associated with subclinical atherosclerosis development and inflammatory cytokines (AIR Study). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 1162-1167.
15. Sigurdardottir V, Fagerberg B and Hulthe J (2002) Circulating oxidized low-density lipoprotein (LDL) is associated with risk factors of the metabolic syndrome and LDL size in clinically healthy 58-year old men (AIR study). *J internal Medicine* 252:440–447.
16. Kopprash S, Pietzsch J, Kuhlisch E, Fuecker K, Temelkova-Kurktschiev T, Hanefeld M, Kühne H, Julius U and Graessler J (2002) In vivo evidence for increased oxidation of circulating LDL in impaired glucose tolerance. *Diabetes* 51:3102–3106.
17. Duntas LH, Mantzou E and Koutras DA (2002) Circulating levels of oxidized low-density lipoprotein in overt mild hypothyroidism. *Thyroid* 12:1003–1007.
18. Johnston N, Lagerqvist B, Siegbahn A and Wallentin L (2002) Oxidized LDL and unstable coronary artery disease. Presented at the American Heart Association Scientific Sessions 2002 in Chicago.

方案概要表

氧化低密度脂蛋白 ELISA 试剂盒

加入校准品和样本	25 μ L
加入试验缓冲液	100 μ L
培养	在 18-25 $^{\circ}$ C 下用平板振荡器振荡 2 小时
用洗涤缓冲液洗涤平板	6 次
加入酶结合物溶液	100 μ L
培养	在 18-25 $^{\circ}$ C 下用平板振荡器振荡 1 小时
用洗涤缓冲液洗涤平板	6 次
加入底物 TMB	200 μ L
培养	在 18-25 $^{\circ}$ C 下 15 分钟
加入终止溶液	50 μ L 振荡 5 秒钟以确保混匀
在 A450 下测量	评估结果

31-3136

Version 12.0