

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00850

# 人血清脂联素定量 ELISA 检测方法的建立及初步临床应用

## Development of quantitative ELISA for determination of serum adiponectin and its clinical application

李登清<sup>1</sup>, 陈琳磊<sup>1</sup>, 何笑恬<sup>2</sup>, 卫玲<sup>2</sup>, 曹琳<sup>2</sup>, 曹洁<sup>2</sup>, 徐晓晶<sup>2</sup>, 袁洪<sup>3</sup>, 金维荣<sup>2\*</sup>

1. 中南大学湘雅医学院医学检验系临床微生物免疫学教研室, 长沙 410013

2. 生物芯片上海国家工程研究中心, 上海 201203

3. 中南大学湘雅三医院, 长沙 410013

**[摘要]** **目的:** 建立一种检测人血清中脂联素(APN)的酶联免疫吸附方法(ELISA), 并初步探讨其在冠心病诊断中的应用。**方法:** 构建表达质粒 pET22b(+)/gAPN, 在原核表达系统大肠杆菌中表达并纯化重组脂联素球状区(gAPN)蛋白。用抗 APN 单克隆抗体 MAB10651 包被微孔板, 10% 小牛血清作为封闭液, 针对 APN 不同抗原表位的单克隆抗体 MAB1065 生物素化后作为标记抗体, 联合生物素-亲和素信号放大系统, 以 gAPN 重组蛋白为标准品绘制标准曲线, 以准确性、特异性、重复性、回收率试验和方法对比试验评价 ELISA 方法。检测 161 例冠心病患者血清 APN 水平并结合冠状动脉造影结果和 Gensini 积分系统, 探讨血清 APN 水平与冠心病的关系。**结果:** 利用基因克隆技术成功构建了 pET22b(+)/gAPN 质粒, 获得了相对分子质量约 15 000 的重组 gAPN 蛋白, 产量较高(1.57 mg), 纯度 > 90%, 并以此为标准品初步建立了检测人血清 APN 的定量 ELISA 方法。该法具有良好的准确性和重复性, 灵敏度达 150 pg/ml, 回收率为 91.0%~108.0%, 与深圳依诺金生物科技有限公司进口分装的 ELISA 试剂盒对照有良好的相关性( $r=0.935, P<0.001$ )。临床检测表明冠心病组血清 APN 水平明显低于非冠心病组( $P<0.01$ ), 且血清 APN 水平随冠状动脉狭窄程度的加重呈进行性下降趋势。**结论:** 本实验成功建立了一种简便快速检测人血清 APN 的 ELISA 方法, 对诊断冠心病有临床应用价值, 为国内 APN 诊断试剂盒的研制和开发提供了科学实验依据。**[关键词]** 脂联素; 酶联免疫吸附测定; 血清学诊断; 冠心病**[中图分类号]** R 446.112 **[文献标志码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2009)07-0850-04

脂联素(adiponectin, APN)是一种新近发现由脂肪细胞分泌的特异性蛋白。APN 在人血清中的浓度为 5~30 mg/L, 约占人血浆蛋白总量的 0.01%<sup>[1]</sup>。近年来越来越多的研究<sup>[2-5]</sup>表明, 血清 APN 水平与肥胖、糖尿病、高血压、高脂血症、冠心病、胰岛素抵抗等心血管疾病密切相关, APN 具有抗炎、抗动脉粥样硬化形成、抗血管损伤后内膜增生和增强胰岛素敏感性的作用, 患者血清 APN 水平较健康人明显降低。因此, 检测血清中 APN 的含量, 对于认识其与糖尿病、冠心病、高血压等疾病的发生发展有重要意义。目前, 检测人血清 APN 含量的方法主要有 ELISA 法和 RIA 法, 其中 ELISA 法操作简单安全, 灵敏度较高, 特异性较好。而国内检测 APN 含量的 ELISA 试剂盒大多为进口分装, 本研究建立了血清 APN ELISA 双抗体夹心检测方法, 并用于冠心病检测诊断取得了满意的效果。

### 1 材料和方法

1.1 主要试剂及仪器 质粒 pET22b(+), 大肠杆菌 TG1、

BL21(DE3)菌株, 人脂肪组织 cDNA 为上海华冠生物芯片有限公司保存, 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。Pyrobest DNA Polymerase 购自 TaKaRa(大连)公司, *Nde* I、*Xho* I 限制性核酶内切酶和  $T_4$  DNA 连接酶购自 Promega 公司, 凝胶回收试剂盒和质粒小量抽提试剂盒购自 iNtRON 公司, 蛋白相对分子质量标准购自 Fermentas 公司。抗 APN 的 MBA10651、MBA1065 单克隆抗体和商品化人脂联素重组蛋白 1065-AP 购自 R&D Systems 公司, 辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗鼠 IgG 抗体购自上海康成生物工程有限公司, 抗体的生物素化试剂盒购自 Sigma 公司, HRP 标记的亲合素购自 Invitrogen 公司, 脂联素 ELISA 检测试剂盒购自深圳依诺金生物科技有限公司, 酶标仪为 Tecan Sunrise<sup>TM</sup> Remote。

1.2 临床血清标本 临床收集疑诊断为冠心病并将行冠状动脉造影(CAG)检查的患者血清样本 198 例, 在排除肝肾功能不全、各种急慢性感染性疾病和各种肿瘤疾病后, 共有 161 例符合标准, 纳入本研究。其中男性 110 例, 女性 51 例, 年

**[收稿日期]** 2009-03-11 **[接受日期]** 2009-06-26**[基金项目]** 国家高技术研究发展计划("863 计划", 2007AA021702). National High-tech R&D Program ("863 Program", 2007AA021702).**[作者简介]** 李登清, 教授、主任医师, 博士生导师. E-mail: lidengqing@yahoo.com.cn

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-51320298, E-mail: weirong\_jin@shbiochip.com

龄 32~64 岁,平均(62±11)岁。根据 CAG 结果分为冠心病组和非冠心病组。冠心病组共有 103 例,CAG 显示左主干、左前降支、回旋支、右冠状动脉 4 支血管中至少 1 支血管目测直径狭窄程度 $\geq 50\%$ ;非冠心病组共有 58 例,CAG 显示所有血管目测直径狭窄程度 $< 50\%$ 。根据 1984 年美国心脏协会规定的冠状动脉血管图像分段评价标准和 Gensini 积分系统<sup>[6]</sup>对每支血管狭窄程度进行定量分析,每例患者冠状动脉造影病变最终积分为各节段积分之和。

### 1.3 脂联素球状结构区(gAPN)的重组表达

1.3.1 pET22b(+)/gAPN 原核表达载体的构建 根据 GenBank 数据,针对 gAPN 的基因编码区设计引物,引物 5'端分别携带 *Nde* I 和 *Xho* I 酶切位点。上游引物序列:5'-CCC ATA TGT ACC GCT CAG CAT TCA GTG TG-3';下游引物序列:5'-CGC TCG AGG TCA TGG TAG AGA AGA AAG CCT GT-3'。以人脂肪组织 cDNA 为模板,PCR 扩增出 gAPN 的基因片段。利用 *Nde* I 和 *Xho* I 分别酶切 gAPN 目的片段及 pET22b(+)表达载体,将二者纯化回收后的连接产物转染大肠杆菌 TG1,得到重组表达质粒 pET22b(+)/gAPN,重组质粒经限制性双酶切和 DNA 测序鉴定(上海华冠生物芯片有限公司),阳性质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3)菌株。

1.3.2 gAPN 重组蛋白的表达和纯化 挑取单个阳性菌落,接种于 50 ml 含氨苄青霉素(Amp<sup>+</sup>)的 LB 培养液中 37℃、250 r/min 振荡过夜。次日按 1:40 体积比,取 8 ml 接种到 500 ml Amp<sup>+</sup>的 SBM 培养基中,37℃、250 r/min 继续振荡培养 1~2 h,至  $D_{600}$  值约 0.5~1.0,加入异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG),IPTG 终浓度 0.6 mmol/L,于 30℃、200 r/min 诱导 2 h。常规方法收集菌体,用 10 ml 裂解缓冲液重悬沉淀,超声波裂解细胞,收集上清液,分别取诱导前菌液、诱导后菌液、培养液上清液、超声上清液及沉淀进行 SDS-PAGE 鉴定表达产物。用 His 镍亲和柱分离纯化超声上清液,纯化后的产物行 SDS-PAGE 分析和蛋白质印迹鉴定。

### 1.4 血清 APN ELISA 检测方法的建立

1.4.1 APN 单抗 MAB1065 的生物素化 将 APN 单抗 MAB1065 稀释成 1 mg/ml,生物素标记按照 Sigma 公司的抗体生物素化试剂盒说明书操作。

1.4.2 检测血清 APN 的 ELISA 方法 采用双抗体夹心 ELISA 法。用 0.05 mol/L pH 9.6 的碳酸盐缓冲液将 APN 单抗 MBA1065 稀释至 2  $\mu$ g/ml,以 0.1 ml/孔加入酶标板 4℃过夜;次日用 10%小牛血清封闭,37℃作用 2 h;加入标准品(gAPN 重组蛋白)及待测样品,37℃作用 30 min,洗涤缓冲液洗涤 3 次,加入 2  $\mu$ g/ml 生物素化的 APN 单抗 MBA1065,37℃作用 30 min,洗涤缓冲液洗涤 3 次,加入 HRP 标记亲和素(1:10 000 稀释),37℃作用 20 min,洗涤 3 次后加 TMB 显色剂,室温避光显色 15 min,加入 1 mol/L  $H_2SO_4$  终止液,酶标仪 450 nm 处检测标准品和待测孔的光密度(D)值。

1.4.3 标准曲线的绘制 用 0.1% PBST 将重组的 gAPN 蛋白自 15 ng/ml 起,2 倍稀释至 0.937 5 ng/ml,每个浓度做复孔,测定  $D_{450}$  值。以  $D_{450}$  平均值为纵坐标,gAPN 蛋白浓度为横坐标绘制标准曲线。

1.4.4 准确性试验 将商品化人脂联素重组蛋白 1065-AP 稀释至 7.5 ng/ml,用本实验建立的 ELISA 方法检测,重复 3 次,计算其浓度。

1.4.5 特异性试验 用本实验建立的 ELISA 方法,分别检测 100 ng/ml 的 gAPN 重组蛋白、血红蛋白、三酰甘油、高密度脂蛋白和低密度脂蛋白,每种样品均设复孔测定  $D_{450}$  值,并与空白孔作对照,验证 ELISA 方法的特异性。

1.4.6 重复性试验 将 7.5 ng/ml gAPN 蛋白标准品在一块板上测定 10 孔,另将同一样品在不同包被板上检测,每板分别检测 5 孔,共检测 5 次,分别计算批内和批间变异系数(CV)。

1.4.7 回收率试验 在已知浓度的血清标本中分别加入 15.0、10.0、5.0、2.5、1.0 ng/ml 的 APN 标准品,每种样品均设复孔测定  $D_{450}$  值,根据标准曲线推算浓度,计算回收率。

1.4.8 方法对比试验 随机抽取 30 份临床标本,用本实验建立的 ELISA 方法与深圳依诺金生物科技有限公司的脂联素 ELISA 检测试剂盒同时进行检测,比较二者的相关性。

1.5 初步临床应用 161 例临床血清标本以 1:2 000 倍稀释,用本实验建立的 ELISA 方法检测血清 APN 浓度,根据 CAG 结果初步分析 APN 水平与冠心病发生发展的关系。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  或中位数(第 1 四分位数,第 3 四分位数)表示,非正态分布的计量资料进行对数转换后再行分析,采用成组 *t* 检验。 $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 脂联素球状结构区(gAPN)重组蛋白的表达及鉴定 以人脂肪组织的 cDNA 为模板,PCR 扩增可获得 400 bp 左右的 gAPN 目的基因,将该基因克隆到载体上,获得 pET22b(+)/gAPN 质粒,测序结果表明,插入载体中的 gAPN 基因片段序列与已知序列完全一致。在大肠杆菌中对该重组质粒进行诱导表达,分别取诱导前菌液、诱导后菌液、培养液上清液、超声上清液及沉淀进行 SDS-PAGE 分析(图 1A)。电泳结果表明,经 0.6 mmol/L IPTG 诱导表达后出现一明显的相对分子质量为 15 000 左右的新生蛋白带(与 gAPN 蛋白相符),且在超声上清液和菌体沉淀里含有大量目的重组蛋白,本实验纯化了超声上清液中的融合蛋白。

His 镍亲和柱分离纯化后的产物行 SDS-PAGE 分析,经 Kodak 成像系统进行扫描,所得的 gAPN 蛋白纯度 $> 90\%$ (图 1B),通过 Bardford 法测定蛋白浓度,gAPN 重组蛋白浓度为 3 mg/ml,总产量为 1.57 mg。用抗 APN 单克隆抗体 MAB1065 进行蛋白印迹杂交,该单克隆抗体可特异识别 APN 球状结构区序列(aa104-244),证实了重组 gAPN 蛋白

的特异性(图1C)。

2.2 APN单抗MBA1065的生物素化效率 将生物素化的APN单抗MBA1065过Sephadex G-25柱纯化,依次收集10管洗脱液,每管1 ml,用BAC法检测10次收集组分的蛋白含量,发现纯化的抗APN抗体主要集中在第4,5管,合并含

有蛋白的分部收集组分, $D_{500}$ 检测生物素化效率,生物素标准曲线为 $Y = -388.86X + 347.24, R^2 = 0.9926$ ;计算得到生物素与抗体蛋白质的比例(摩尔分子比)为4,即每摩尔分子的抗体蛋白质与4摩尔分子的生物素结合。

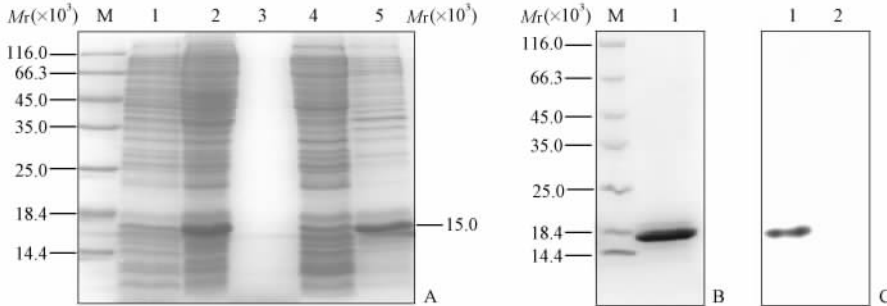


图1 pET22b(+)/gAPN重组质粒的诱导表达和鉴定

A: 诱导表达(M:低相对分子质量蛋白标记物;1:诱导前;2:0.6 mmol/L IPTG 诱导后;3:培养基上清液;4:超声上清液;5:超声沉淀);B:SDS-PAGE分析(M:低相对分子质量蛋白标记物;1:纯化的gAPN重组蛋白);C:蛋白质印迹分析(1:纯化的gAPN蛋白;2:阴性对照)

2.3 检测体系的评价指标

2.3.1 标准曲线 不同浓度的APN重组蛋白标准测出的 $D_{450}$ 值,呈良好线性关系,最佳范围为0.9375~15 ng/ml,直线回归方程: $Y = 0.1173X + 0.1153, R^2 = 0.9964$ 。

2.3.2 准确性 通过标准曲线,计算出商品化人脂联素重组蛋白1065-AP的浓度为(7.438±0.054) ng/ml,与实际浓度7.5 ng/ml比较无统计学差异( $P > 0.05$ ),证明以我们重组表达的gAPN为标准品建立的ELISA方法能准确检测APN浓度。

2.3.3 灵敏度和特异性 应用本实验建立的ELISA方法,可检出的最低APN蛋白含量为150 pg/ml。特异性试验结果显示,重组gAPN蛋白 $D_{450}$ 值大于2.0;而血红蛋白、三酰甘油、高密度脂蛋白、低密度脂蛋白样品的 $D_{450}$ 值均小于0.07,与空白对照孔比较无明显差异( $P > 0.05$ ),表明gAPN蛋白与这些物质均无交叉反应,具有较好的特异性。

2.3.4 重复性实验 将7.5 ng/ml gAPN蛋白标准品在同一板上测定10孔,批内CV<5%;将标准品在不同包被板上检测,每板检测5孔,共检测5次,批间CV<10%,说明本实验建立的ELISA检测方法具有良好的重复性。

2.3.5 回收率实验 回收率为91.0%~108.0%。

2.3.6 方法对比试验 本实验ELISA法检测30份临床人血清标本中APN浓度与深圳依诺金生物科技有限公司的APN ELISA检测结果相关性良好,相关系数为 $r = 0.935, P < 0.001$ ,直线回归方程为: $Y = 0.972X + 1.157, R^2 = 0.8737$ (图2)。

2.4 初步临床检测应用 本实验建立的ELISA法检测161例患者血清APN水平,分析结果,冠心病组血清APN水平显著低于非冠心病组[5.67(2.59~10.47) mg/L vs 7.14(4.37~11.40) mg/L,  $P < 0.01$ ];进一步根据冠状动脉造影

Gensini评分,将临床标本分为4组:Gensini积分<1分组、1~30分组(不包括30分)、30~90分组及>90分组,结果表明随着Gensini积分增高,冠状动脉狭窄程度加重,血清APN浓度分别为6.49(4.22~11.37) mg/L、6.02(3.42~9.96) mg/L、5.64(2.36~10.19) mg/L和5.05(2.10~12.72) mg/L,各组APN水平呈进行性下降趋势,且1~30分(不包括30分)、30~90分组血清APN水平与<1分组比较有统计学差异( $P < 0.05$ ),各组间APN水平差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

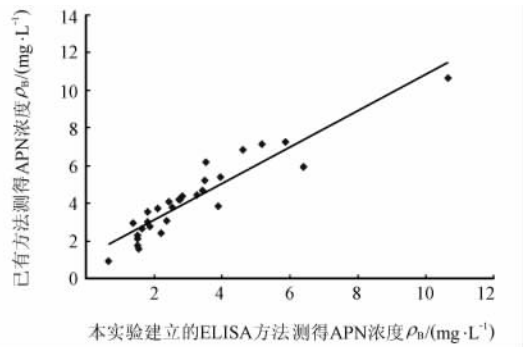


图2 本实验建立的ELISA方法与已有方法检测APN结果比较

3 讨论

冠心病是目前最常见、危害最大的心脏疾患之一,其主要的病理学基础是冠状动脉粥样硬化,学术界一直在寻找冠心病的病因及其危险因素,用于早期预防和诊治。自1995年Scherer等<sup>[7]</sup>首先发现APN以来,APN迅速成为研究者们关注的焦点。APN由脂肪组织特异性分泌后进入外周血

中,在人血浆中含量相对丰富,比瘦素、皮质醇、白细胞介素-6等血清蛋白水平高出 $10^3 \sim 10^6$ 倍<sup>[8]</sup>。近年来研究<sup>[5,9]</sup>发现,APN可通过调节血管内皮细胞炎症反应,抑制血管平滑肌细胞增殖,修复损伤的内皮等血管保护作用,起到抗炎、抗动脉粥样硬化的作用。大量的临床实验报道<sup>[3,10]</sup>表明,冠心病患者的血清APN水平下降,且血清APN浓度变化与冠状动脉狭窄程度、冠心病的进程有关,提出低脂联素血症是冠心病发病的一个独立的危险因素,且可以作为判断冠状动脉病变严重性的一个指标。

双抗体夹心ELISA检测方法的关键是标准品和一对配对合适的抗体。本实验所用的标准品为gAPN蛋白,采用基因工程技术将人脂联素球状区(gAPN)基因克隆到原核pET22b表达系统中,在高营养SBM培养基,低温、低转速、低IPTG浓度条件下诱导表达获得;重组的gAPN蛋白产量(1.57 mg)、纯度(>90%)高。gAPN是APN的羟基末端球形结构域,共137个氨基酸,是APN主要的活性结构域,具有APN广泛的生物学效应<sup>[11]</sup>。抗体则选用了R&D systems公司的一对抗APN抗体,与血红蛋白、三酰甘油、高密度脂蛋白、低密度脂蛋白无交叉反应,保证了体系的高度特异性。本实验建立的双抗体夹心ELISA方法,能准确检测商品化人脂联素重组蛋白1065-AP浓度,具有良好的准确性和重复性,灵敏度达150 pg/ml,回收率高(91.0%~108.0%),与深圳依诺金生物科技有限公司进口分装的ELISA试剂盒对照比较有良好的相关性( $r=0.935, P<0.001$ ),证明其检测的血清APN浓度结果可靠。此外,本检测方法样品稀释更简单,并可在2 h内得到结果,节省时间,更便于临床操作使用。

利用建立的ELISA方法检测血清APN,结果显示冠心病组血清APN水平显著低于非冠心病组( $P<0.01$ ),与文献<sup>[12]</sup>报道的结果相同,提示本实验建立的ELISA方法的可靠性。随着Gensini积分增高,冠状动脉狭窄程度加重,血清APN水平呈进行性下降趋势,仅Gensini积分1~30分(不包括30分)、30~90分组血清APN水平与<1分组比较有统计学差异( $P<0.05$ ),各组间APN水平差异无统计学意义( $P>0.05$ )。其原因可能为Gensini积分的增高仅反映了冠状动脉狭窄严重程度,并不反映斑块的活动状态,因此对APN水平的影响较少;再者,选用的临床血清标本没有排除糖尿病、高血压等心血管疾病,可能干扰了实验结果。

综上所述,本实验建立了简便快速检测人血清中APN的ELISA方法,对冠心病的诊断及人群筛查有积极提示作用和现实应用价值,为国内APN诊断试剂盒的研制和开发提供了科学实验依据。

## [参考文献]

- [1] Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, et al. Plasma concentrations of a novel adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, 20:1595-1599.
- [2] Salmenniemi U, Ruotsalainen E, Pihlajamäki J, Vauhkonen I, Kainulainen S, Punnonen K, et al. Multiple abnormalities in glucose and energy metabolism and coordinated changes in levels of adiponectin, cytokines, and adhesion molecules in subjects with metabolic syndrome[J]. *Circulation*, 2004, 110:3842-3848.
- [3] Nakamura Y, Shimada K, Fukuda D, Shimada Y, Ehara S, Hirose M, et al. Implications of plasma concentrations of adiponectin in patients with coronary artery disease[J]. *Heart*, 2004, 90:528-533.
- [4] Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity[J]. *Nat Med*, 2001, 7:941-946.
- [5] Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Okamoto Y, Maeda K, Kuriyama H, et al. Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF- $\kappa$ B signaling through a cAMP-dependent pathway[J]. *Circulation*, 2000, 102:1296-1301.
- [6] Gensini G G. A more meaningful scoring system for determining the severity of coronary heart disease[J]. *Am J Cardiol*, 1983, 51:606.
- [7] Scherer P E, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish H F. A novel serum protein similar to Clq, produced exclusively in adipocytes[J]. *J Biol Chem*, 1995, 270:26746-26749.
- [8] Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 257:79-83.
- [9] Matsuda M, Shimomura I, Sata M, Arita Y, Nishida M, Maeda N, et al. Role of adiponectin in preventing vascular stenosis. The missing link of adipo-vascular axis[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277:37487-37491.
- [10] 刘岩, 邹大进, 李慧, 陈月, 丁继军, 郑兴, 等. 低脂联素血症是冠状动脉粥样硬化严重程度的重要标志[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2005, 21:5-8.
- [11] Ding X, Saxena N K, Lin S, Xu A, Srinivasan S, Anania F A. The roles of leptin and adiponectin: a novel paradigm in adipocytokine regulation of liver fibrosis and stellate cell biology[J]. *Am J Pathol*, 2005, 166:1655-1669.
- [12] Rothenbacher D, Brenner H, März W, Koenig W. Adiponectin, risk of coronary heart disease and correlations with cardiovascular risk markers[J]. *Eur Heart J*, 2005, 26:1640-1646.

[本文编辑] 商素芳