上海仁机仪器仪表有限公司 --核检测仪器制造商--www.radtek.cn 021-61649690

前　　言

本标准以卫生部医政司编写的《全国临床检验操作规程第二版(1997)》中所列载脂蛋白 A_1 和载脂蛋白 B 测定方法为基础，并参考美国国家临床实验室标准委员会批准的“载脂蛋白免疫测定法”准则(NCCLS 文件 1/LA 15-A，1997)而制定。

本标准从 2000 年 5 月 1 日起实施。

本标准由卫生部医政司提出。

本标准由卫生部北京老年医学研究所负责起草。

本标准主要起草人：李健斋、王抒、国汉邦、唐蔚青。

本标准由卫生部委托卫生部临床检验中心负责解释。

上海仁机仪器仪表有限公司 --核检测仪器制造商--www.radtek.cn 021-61649690

中华人民共和国卫生行业标准

血清载脂蛋白 A_1 及载脂蛋白 B 免疫透射比浊测定法

WS/T 121—1999

Guidelines for the immuno-turbidimetric determination of serum apolipoprotein A_1 and apolipoprotein B

1 范围

本标准规定了测定血清载脂蛋白 A_1 和载脂蛋白 B 的免疫透射比浊测定法。

本标准适用于临床与基础医学实验室做载脂蛋白 A_1 和载脂蛋白 B 免疫透射比浊测定，亦可作为生产厂商生产载脂蛋白 A_1 和载脂蛋白 B 免疫透射比浊测定试剂盒的标准。

2 测定原理

本法血清中的载脂蛋白 A_1 或载脂蛋白 B 分别与试剂中的特异性羊(或兔)抗人载脂蛋白 A_1 或抗人载脂蛋白 B 抗体相结合，形成不溶性免疫复合物，使反应液产生混浊，浊度高低反映血清样品中载脂蛋白 A_1 或载脂蛋白 B 含量，后者可由校准血清所作剂量-响应曲线算出。

3 免疫原及抗血清的制备

3.1 免疫原(抗原)的制备

3.1.1 从混合新鲜人血清中提取免疫原。

3.1.2 提取抗原用的人血清必须包括人群样品中载脂蛋白 A_1、载脂蛋白 B 的各种抗原决定位点，包括各种表型的位点变化。

3.1.3 载脂蛋白 A_1 从超速离心制备的人血清高密度脂蛋白提取，用凝胶过滤、离子交换层析或高效液相色谱技术提纯，所得纯载脂蛋白 A_1 不得含有高密度脂蛋白中的其他载脂蛋白，特别是载脂蛋白 A_2，应达到免疫纯。

3.1.4 载脂蛋白 B 抗原用超速离心法制备密度在 1.030～1.050 g/mL 部分的低密度脂蛋白。

3.1.5 载脂蛋白 A_1 及载脂蛋白 B 抗原必须新鲜制备，在－20℃以下冰冻保存。在贮存中有潜在的丧失抗原位点的危险。避免反复冻融。

注：提纯的载脂蛋白 B 分子不可逆地聚合，丧失抗原决定位点，故只能用纯低密度脂蛋白作免疫原。

3.2 抗血清的制备

3.2.1 用于免疫比浊测定的载脂蛋白 A_1、载脂蛋白 B 抗体为兔抗人或羊抗人血清(多克隆抗体)。

3.2.2 抗血清特异性：应用双相免疫电泳和免疫印迹法鉴定抗血清，要与人血清主要蛋白质及其他载脂蛋白无交叉反应。

3.2.3 抗血清效价：用琼脂双向扩散法测定，中间孔加正常人血清(载脂蛋白 A_1 或载脂蛋白 B 浓度 1 g/L左右)0.01 mL，环绕四周的孔中分别加不同稀释度(如 1∶2，1∶4，1∶8，1∶16，1∶32，1∶64……)的抗血清 0.01 mL。载脂蛋白 A_1 抗血清效价应不低于 16，载脂蛋白 B 抗血清效价应不低于 128。

3.2.4 载脂蛋白 A_1 抗血清应对高密度脂蛋白各亚型、载脂蛋白 B 抗血清应对极低密度脂蛋白、中间

中华人民共和国卫生部 1999-12-09 批准　　2000-05-01 实施

上海仁机仪器仪表有限公司 --核检测仪器制造商--www.radtek.cn 021-61649690

密度脂蛋白、低密度脂蛋白及其各亚型都有反应。

3.2.5 抗血清外观应澄清。

3.2.6 抗血清的保存：加入适量防腐剂的抗血清在冰冻条件下(−70℃)保存三年。一般情况下经过纯化或处理的抗血清应用液保存时间不宜过长。

注

1 载脂蛋白 B 有 B-100 与 B-48 之分，因为 B-48 是 B-100 分子氨基末端的部分，所以用多克隆抗体只能测总载脂蛋白 B，除非已证明所用抗血清对载脂蛋白 B-48 无交叉反应。

2 单克隆抗体特异性高、易于纯化，但需作严格的鉴定与选择以了解其对存在于不同脂蛋白中的同种载脂蛋白的抗原位点是否都能起反应，对纯化的载脂蛋白 A_1 与低密度脂蛋白是否与自然状态存在的载脂蛋白 A_1 与载脂蛋白 B 同样起反应，对载脂蛋白的各种亚型是否一样起反应。

4 受检者的准备及样品的采取

4.1 受检者准备

应让受试者做如下准备：

a) 取血前两周保持平时饮食习惯；

b) 近期内无急性病、外伤、手术等异常情况；

c) 取血前数天至数周停用影响血脂的药物，否则记录用药情况；

d) 取血前 24 h 不饮酒、不做剧烈运动；

e) 取血前禁食 12 h；

f) 除卧床患者外，取血前至少静坐 5 min。

4.2 取血方法

取前臂静脉血，止血带的使用不超过 1 min，避免溶血。

4.3 取血次数

应以 1 周以上 2 月以内的时间间隔对同一受试者取血 2～3 次。

4.4 血清的处理和贮存

4.4.1 一律用血清测定

4.4.2 血液样品采取后在室温静置 30～40 min 令其自行凝固，3 h 内离心分离血清。样品如不能当日完成测定，在 4℃保存不超过 4 天，−20℃以下保存 6 个月，−70℃可存数年。冰冻与融化只能 1～2 次。冻存中应尽量避免融化。

5 仪器和设备

免疫透射比浊法须用配有波长 340 nm 滤光片的光度计或分光光度计。为检测大批样品，宜用全自动或半自动生化分析仪。使用手工操作的光度计及半自动分析仪者，还应配备高精密度的稀释器及加样器。光度计吸光度读数的精密度在 1.0 A 时应在±0.002 A 以内 。稀释器移液的精密度应在±0.3%以内，加样器应能准确加样小至 2 μL。

6 测定操作

6.1 安全措施

血清样品和来源于血液的参考物质、质控物质、校准物质有可能含致病微生物，须避免吞入或与皮肤接触。

6.2 试剂

6.2.1 样品稀释剂：宜用 pH7.0～7.4 的缓冲液，内含适量聚乙二醇 6 000 及表面活性剂，试剂本身的吸光度应小于 0.05(340 nm)，在 4℃冰箱中可存放 1 年。此液无色透明，如发现吸光度升高，应抽滤后

上海仁机仪器仪表有限公司 --核检测仪器制造商--www.radtek.cn 021-61649690

用。

6.2.2 抗血清应用液：将纯化的抗血清用不含表面活性剂的缓冲液稀释。抗血清的稀释度应由抗血清效价而定。稀释后的抗血清稳定性差，应加入稳定剂以延长保存期(因商品而异)。

6.2.3 校准血清见本标准第7章参考物质。

6.3 对测定方法的要求

6.3.1 应用免疫比浊法测定载脂蛋白 A_1、载脂蛋白B时必须去除血清加样品稀释剂的空白读数。故在手工或半自动操作中不能用单一试剂法，而以双试剂为宜。用自动分析仪时在加入抗血清后用两点法测定。

6.3.2 每批测定都必须做剂量-响应曲线(5～6点定标)。剂量-响应曲线的载脂蛋白 A_1、载脂蛋白B浓度范围应在0.4～2.5 g/L。校准血清载脂蛋白 A_1 浓度宜在1.4 g/L左右，载脂蛋白B浓度宜在1.0 g/L左右，可在作不同倍数稀释后用。如能配备3～5份校准血清则更好，其载脂蛋白 A_1 与载脂蛋白B浓度范围可在0.6 g/L至2.0 g/L。

6.3.3 血清样品用量：血清样品最好用稀释液在稀释(如1∶20或1∶100)后测定，反应总体积500 μL时，测载脂蛋白 A_1 的血清最适用量为0.5 μL～1 μL，测载脂蛋白B可用3 μL～5 μL。如血清不经稀释而直接测定，在反应总体积为500 μL时，测载脂蛋白 A_1 血清用量不得超过3 μL，测载脂蛋白B血清用量不得超过5 μL，还须具备准确加样(2 μL～5 μL)的设备。

6.3.4 测浊度的波长选用340 nm，有的仪器用双波长者可按仪器说明书操作。

6.3.5 反应温度应在20℃以上。

6.3.6 加抗血清后的反应时间，手工操作中以30 min为终点，用自动分析仪时可根据反应进程确定读取终点时间，一般8～10 min为宜。

6.3.7 方法的不精密度与不准确度在使用自动分析仪时不得超过5%，手工操作时不得超过10%。

6.4 干扰因素

6.4.1 样品混浊：轻度混浊可以用表面活性剂及减去空白读数而得以校正。乳糜微粒血症可将血清放置冰箱中过夜，吸出液面的奶油样层，如血清仍显混浊，应作高速离心至清澈。必要时可改用放射免疫或酶联免疫法测定。

6.4.2 反向免疫反应：血清样品中可能含有对动物抗血清中某些蛋白的抗体，如遗传性免疫球蛋白A缺乏患者血清中常有动物免疫球蛋白M或乳蛋白抗体。人血清中的类风湿因子可以与动物免疫球蛋白起反应，操作者应注意到这些特殊情况的出现。

6.4.3 基质效应：基质效应是指样品基质的物理、化学变化对被分析物测定值的影响。在载脂蛋白测定中，分析新鲜样品用新鲜的参考血清时，不出现基质效应。但用多次冰冻融化的、冰冻干燥的或在制备中增添某种外加成分的参考血清，在某些分析系统中(不是所有的分析系统)其反应不同于新鲜血清，使样品测定结果引起偏差。所以载脂蛋白测定中要注意选用合适的分析系统及与样品基质十分相似的参考物质，以避免这种性质不明的干扰。

7 参考物质

7.1 一级参考物质

载脂蛋白 A_1 测定用提纯的载脂蛋白 A_1，载脂蛋白B测定用新鲜制备的低密度脂蛋白(d=1.030～1.050 g/mL)，其蛋白质含量用“十二烷基硫酸钠-酚试剂(Lowry氏)法或氨基酸组成分析法”测定，以美国国家标准与技术研究所的牛血清白蛋白(NIST No. 927)为参考标准。

此项工作由参考实验室负责。

7.2 国际参考物质

已由世界卫生组织与国际临床化学会(WHO-IFCC)合作制得第一份载脂蛋白 A_1 与载脂蛋白B国际参考物质。载脂蛋白 A_1 参考物质(SP1-01)是加有稳定剂冻干人血清，载脂蛋白B参考物质(SP3-07)

上海仁机仪器仪表有限公司 --核检测仪器制造商--www.radtek.cn 021-61649690

是加有稳定剂的液态人血清，证明这两份血清的基质效应不明显。参考物质的载脂蛋白定值依据一级参考物质，载脂蛋白 A_1 由双抗体放射免疫法测定，载脂蛋白 B 用免疫光散射法测定。

7.3 次级参考血清

次级参考血清的定值均应按 WHO-IFCC 的要求由国际参考物质准确转移，使其定值的准确性可溯源于国际参考物质。我国已有定值转移成功并获得证书的实验室可提供定值的参考血清，是同一份液态血清有载脂蛋白 A_1 与载脂蛋白 B 定值。

参考血清在 4℃只能保存 1～2 天，－20℃可保存 6 个月，－70℃充氮保存可稳定 3 年。

7.4 商品试剂盒用校准物

7.4.1 规定用混合人血清并力求新鲜。除适量抗菌物质与稳定剂外，不添加其他成分。

7.4.2 校准血清用安瓿分装(每支 1～2 mL)后封口，－20℃冰冻保存，临用前取 1 支或数支，融化并充分混匀后，当天使用，剩余弃去。同一份血清有载脂蛋白 A_1 与载脂蛋白 B 定值。如载脂蛋白 A_1 校准物用冻干血清，必须试验在复溶后与冻干前的血清比较有无基质效应。

7.4.3 校准血清必须准确定值。应对照次级参考血清，以试剂盒所配备的试剂及符合要求的抗血清作靶值转移，使采用该试剂盒及其校准物时，其准确性可溯源于国际参考物质及次级参考血清。

7.4.4 稳定性(见 7.3)

8 测定数据处理与报告

8.1 血清样品与参考物用量在最适范围(参见 6.3.3)且反应体系中有足够的特异性抗体时，载脂蛋白 A_1、载脂蛋白 B 在 0.4～2.5 g/L 时，剂量-响应曲线基本上成一直线，但会有一定截距，故应以回归方程计算结果。

8.2 血清不经稀释直接进行测定时，剂量-响应曲线往往呈 S 形，须用适当方法进行直线化转换。常用的计算方法是 logit-log 变换，即 Y 坐标为浊度读数的 logit，X 坐标为分析物(抗原)浓度的对数。$\text{logit}Y=\ln[Y/(100-Y)]$。也可用其他的曲线拟合方程计算。

8.3 载脂蛋白 A_1 及载脂蛋白 B 的测定值以 g/L 或 mg/L 报告。