

β_2 微球蛋白的微量测定和应用

陈 洋 藻 李 振 甲 陆 菊 明 潘 长 玉

(解放军总医院中心实验室,北京) (解放军总医院内科内分泌组,北京)

韩 春 生

(中国科学院原子能研究所,北京)

β_2 微球蛋白(简称 β_2 mG) 分子量小,因电泳显于 β_2 区带而得名,广泛存在于人各种体液中,是免疫球蛋白和移植抗原的一个组成成分,在生物学、免疫学和医学中已日益受到重视。本室建立血清 β_2 mG 放射免疫分析法(RIA),方法简便、特异性、灵敏度和重复性符合要求,对研究 β_2 mG 的生理代谢及临床上诊断肾脏、肝脏及血液系统疾病是一种有用的辅助指标。

一、材料和方法

1. 人 β_2 mG 的提纯

肾移植急、慢性排异期患者尿液,经硫酸铵粗提和凝胶 G100 层析、DE52 离子交换层析,收集洗脱液,浓缩、冰冻干燥。

2. 兔抗人 β_2 mG 抗血清制备

取 0.6 mg/ml β_2 mG 溶液 1ml 和福氏完全佐剂乳化,于 6 只雄兔背部皮内多点注射,2—3 周加强一次,剂量减半,2.5 个月均获得抗血清。

3. 125 I- β_2 mG 制备

将 5 mCiNa 125 I 与 100 μ l β_2 mG 提取液用氯胺 T 法标记,比度约 20 μ Ci/ μ g。用 0.1 M pH 7.4 PBS 稀释至 20,000 cpm/管(或 0.8 ng/管)。4 $^{\circ}$ C 保存,二个月内可用。

4. 试剂

(1) 0.1 M pH 7.4 PBS (含 0.58% NaCl, 0.1% Na $_2$ S $_2$ O $_3$, 0.1% BSA)。

(2) 标准 β_2 mG 溶液: 由 260 μ g/ml 标准贮液,用

PBS 稀释成标准曲线应用液。

(3) 30% PEG (MW = 6,000) 溶液。

(4) 正常人混合血清(作载体蛋白)。

5. 测定

在塑料管中进行。操作程序见表 1。取 10 μ l 血清,用 PBS 稀释成 1:200。用 30%PEG 分离 B、F。以 B/B $_0$ 为纵坐标,标准管浓度为横坐标,在半对数坐标纸上绘制标准曲线。

二、实验结果

1. 人 β_2 mG 纯度鉴定

肾移植病人尿液经硫酸铵粗提, G 100 和 DE 52 层析,得 UD $_1$ 样品,其洗脱位置在梯度 0.08 M NaCl 处。经 SDS-PAGE、无 SDS-PAGE 平板电泳都呈现单一色带(图 1、图 2),醋酸纤维膜电泳于 β_2 区有一条色带。等电聚焦电泳 pI 值在 5.4 左右。用 SDS-PAGE 测得分子量为 12,000,紫外吸收最大值在 277 nm 处,最小值在 250 nm 处。上述结果与文献报道一致,提示 UD $_1$ 样品即是 β_2 mG。用克分子消光系数(19800)计算样品中 β_2 mG 含量与 Folis 酚测定结果相似。

2. 抗血清效价和特异性

免疫 50、57、74 天采血,用 125 I- β_2 mG 测得抗血清效价分别为 1:2700, 1:9600, 1:24000(最终稀释度)。亲和常数为 7.4×10^9 L/M。用不同浓度的人肌红蛋白(12.5—800 ng/ml), 人血红蛋白(0.06—1.0 mg/ml), 人白蛋白(2.5—50 mg/ml) 与抗血清作交叉试验均为

表 1 操作程序(单位 μ l)

代 号	缓冲液	标准液	样 品 (1:200)	125 I- β_2 mG	抗血清		PEG	混合血清	
NSE	400	—	—	200	—	摇匀 37 $^{\circ}$ C	600	50	摇匀 4 $^{\circ}$ C 10 分 钟 3500 rpm 离心 20 分钟 分离 B、F
S $_0$	200	—	—	200	200	放置 1 小	600	50	
S $_1$ —S $_7$	—	200	—	200	200	时 4 $^{\circ}$ C 过	600	50	
U $_0$	200	—	200*	200	—	夜	600	50	
U	—	—	200	200	200		600	50	

* 混合样品

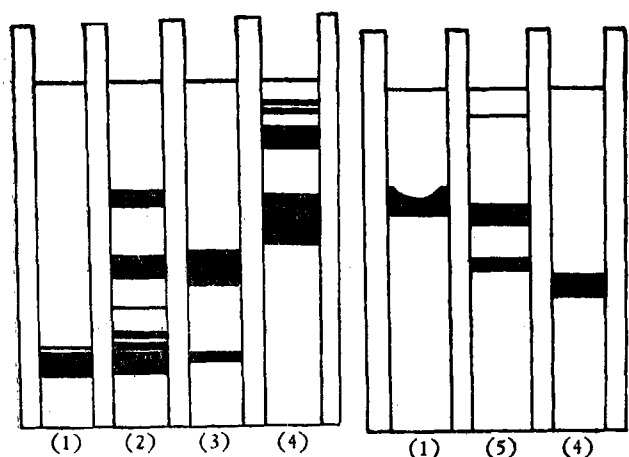


图1 SDS-PAGE 电泳图

图2 无 SDS-PAGE 电泳图

(1) 从尿液中提纯的 β_2 mG (2) 细胞色素 c*
(3) 卵白蛋白* (4) 血清白蛋白* (5) 5% 硫酸铵
粗提的尿蛋白 *为 Serva 标准蛋白

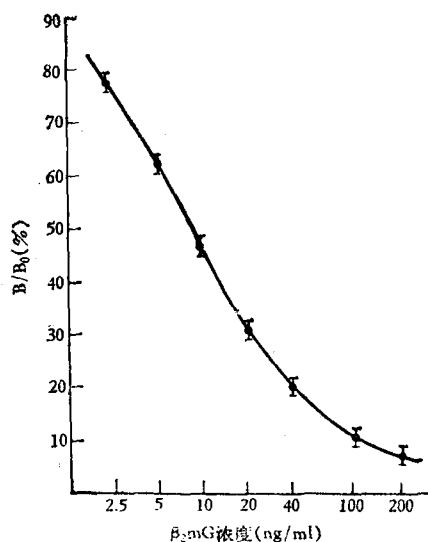


图3 β_2 mG 标准曲线

阴性。

3. 标准抑制曲线和方法学鉴定

β_2 mG 标准抑制曲线 ($n = 10$) (图3), 测定范围 2.5—200 ng/ml。灵敏度小于 2.5 ng/管, 回收率为 99% (96.7—100.2%)。批内、批间变异系数分别为 5.3—7.5% ($n = 10$), 9.4—11.3% ($n = 16$)。测定一份不同稀释度 (1:25—1:400) 混合血清, 结果表明不同稀释度血清中的 β_2 mG 浓度之间有着线性关系 ($r = 0.999$, $y = 2060x - 3.2$)。

4. 临床初步应用

125 名正常人 (5—50 岁), 血清 β_2 mG 浓度为 $2.16 \pm 0.43 \mu\text{g/ml}$ ($\bar{X} \pm \text{SD}$); 根据本文结果和参考有关资料, 以血清 β_2 mG 浓度超过 $3.1 \mu\text{g/ml}$ 为阳性结果。表 2 列举临床确诊的部分病人血清 β_2 mG 浓度。

表2 血清 β_2 mG 部分异常值

病 名	例数	$\bar{X} \pm \text{SD}$ ($\mu\text{g/ml}$)	阳性例数 ($>3.1 \mu\text{g/ml}$)
尿毒症	3	39.5 ± 9.1	3
轻度肾功能不全	3	10.3 ± 4.4	3
糖尿病肾病	5	4.5 ± 0.3	5
肝硬化	13	4.4 ± 1.7	10
淋巴瘤	16	3.0 ± 1.0	5
急淋	10	3.4 ± 1.0	6
慢淋	3	5.3 ± 2.4	3
慢粒	6	3.9 ± 0.7	5
合 计	59	...	40

三、讨 论

本文 β_2 mG 系由病人尿液中提取而得, 其 G100、

DE52 层析图谱与文献报道不尽相同。这与尿液来源, 处理方法和层析柱大小及病人本身状况有关。如本次采用 1000 ml 尿液加入 320 g 硫酸铵浓缩, 经醋酸纤维膜鉴定提示没有明显白蛋白区带。为此, 在凝胶层析中用细胞色素 C 跟踪 β_2 mG 外, 及时对各部分洗脱液用醋酸纤维膜和 SDS-PAEG 电泳进行鉴定很有必要。采用垂直板电泳, 有利于每种蛋白样品在电泳中所处的条件更接近一致。采用 0.01% 考马斯蓝 G 250 染色, 显色时间短 (40 分钟左右), 仅 0.25 μg 蛋白就可呈鲜艳天蓝色带, 而背景呈浅棕色, 具有快速灵敏等优点。层析后的样品, 经醋酸纤维膜和 PAGE 电泳, 提示样品中只含单一成份, 分子量为 12000。此外, 紫外吸收值、pI 值的结果都与文献报道一致。表明尿液经粗提和二步层析, 所得样品即是 β_2 mG。

本次采用小剂量 β_2 mG 免疫家兔, 产生高滴度的抗血清, 与 $^{125}\text{I}-\beta_2$ mG 的最高结合率可达 75—85%, 抗血清最适滴度为 1:20,000。为开展小剂量免疫提供一个依据。同时我们用尿 β_2 mG 粗提物免疫家兔也获得抗血清, 虽抗血清滴度较低, 但符合 RIA 测定的要求。这表明只要有纯度高的标准品和标记品, 同样可以用粗提物制备抗血清。据报道, 人和动物 β_2 mG 分子量及理化特性相近, 都由单一肽链组成, 但我们用兔抗人 β_2 mG 抗血清与狗、家兔、猫、豚鼠等动物血清中 β_2 mG 均无交叉反应, 表明该抗血清具有高度的种属特异性。

β_2 mG RIA 只需 5—10 μl 血清 (或血浆), 作 1:200 稀释, 可测范围为 2.5—200 ng/ml; 血清浓度过高, 需作进一步稀释。还可以用来测定尿液中的 β_2 mG (尿样作 1:20 稀释)。方法灵敏度小于 2.5 ng/ml, 采用来源方便的 PEG 作为分离剂, 若改用第二抗体和 50 μl 30% PEG, 分离效果与原法基本一致 ($P > 0.05$)。

此外,整个操作程序加液量相应减少一半,所得结果与原法基本一致。方法操作简单,便于组装药盒,宜于推广应用。

人体内多种体液(血液、脑脊液、唾液、羊水、精液等)均含有 β_2 mG。正常人 β_2 mG的合成量和从细胞膜上释放量是相当恒定的。 β_2 mG经肾小球滤出,99.9% β_2 mG由肾小管重吸收并分解。故正常人尿液和血液中 β_2 mG含量是一定的,而且尿液中 β_2 mG排出量极微。因此血清 β_2 mG升高反映肾小球滤过功能受损或 β_2 mG合成增多;而尿 β_2 mG排出增高,则提示肾小管受损或滤过负荷增加。所以 β_2 mG的测定在临床上应用日益广泛。本文测定肾脏病11例,血清 β_2 mG均增高,且肾功能受损越严重, β_2 mG上升越明显。有4例,血清肌酐正常,而 β_2 mG升高,这与文献报道血清 β_2 mG浓度在反映肾小球滤过率方面优于血清肌酐相一致。此外还有13例肝硬化患者有10例高于正常;16例淋巴瘤中5例增高;慢淋3例均增高;急性白血病10例中6例增高;慢粒白血病6例中5例增高。再障11例均正常。

总之, β_2 mG-RIA 建立为探讨 β_2 mG与HLA之间

密切关系和临床应用创造了条件。

本工作承马立人教授、汪月增、范尚廉医生支持,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Berggård I. et al.: *J. Biol. Chem.*, **243**, 4095, 1968.
- [2] 施秉钧等:《生物化学与生物物理学学报》**13**(1) 69, 1981
- [3] 陈泮藻等:《中国人民解放军军医进修学院学报》, **5**(2), 154, 1984.
- [4] Evrin P. E. et al.: *Lab. Invest.*, **29**, 69, 1972.
- [5] Viberti G. C. et al.: *Brit. Med. J.*, **282**: 95, 1981.
- [6] Latt et al.: *Annal of Rheum. Dis.* **40**: 157, 1981.
- [7] Teasdale C. et al.: *Clin. Chim. Acta*, **78**, 135, 1977.
- [8] Beorchias et al.: *Clin. Chim. Acta*, **109**, 245, 1981.
- [9] Woo J. et al.: *Clin. Chem*; **26**, 1193, 1980.

[本文于1984年2月21日收到]

经验交流

MPV₂ 显微分光光度计测量光阑的改进

郑木基 池旭生 庞大本

(北京光学仪器厂)

(中医研究院、北京)

MPV, 显微分光光度计是西德 Leitz 的产品,可对细胞内物质作定量测量。仪器原有的测量光阑是连续可变的虹彩式光阑,测量过程中用目镜测微尺读出光阑的直径,按内接多边形或圆的面积公式近似求出光阑的面积。用双区法、双波法测定细胞内物质相对质量时,由于被测物的相对质量与测量光阑面积成正比,因此如对光阑直径的读数稍有误差,就会直接影响测量结果的准确性。此外,每测量一个细胞,都要在目镜测微尺上读光阑直径,既费时又费力。为此,我们设计了一个转盘式光阑代替虹彩式光阑。

转盘式光阑的特点是在转动圆盘上分布着大小不一的系列圆孔,其孔径由被测样品的大小及物镜放大率决定(图1)。如测量人及动物的白细胞、肝细胞,各种癌细胞的细胞核,经常使用40倍物镜,为此我们设计了两个圆盘:第一个圆盘上有16个孔,直径分别为0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.7、2.0、2.6、2.8、3.8 mm,各孔中心对转动轴心跳动度不大于0.05 mm。

在物镜40倍,目镜10倍的情况下,转盘光阑上的0.1 mm即相当于样品的0.8 μ m,目镜测微尺的0.9 mm。

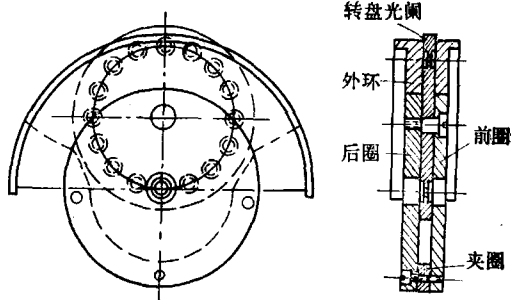


图1 转盘式光阑结构图

测量时,转盘光阑不需专门定位机构,可根据被测物大小选择适当圆孔,用手转动转盘将其转入视场中心作为测量光阑即可。精确测量各光阑圆孔面积,有