

## 固相抗体放射免疫分析法测尿中微量白蛋白

陈泮藻 张敬礼 李振甲

(解放军总医院临床医学基础所,北京)

## 提 要

将抗人白蛋白抗体(或第二抗体)与纤维素偶联,建立了固相放免法。其剂量反应曲线在 20—540 ng/ml 范围内呈一直线,灵敏度为 20 ng/ml。20 例正常人尿中微量白蛋白测定值为  $5.71 \pm 1.39$  mg/24 h 尿,与液相放免法的  $7.17 \pm 3.70$  mg/24 h 尿的结果相接近。固相一抗放免法和液相或固相二抗放免法均有很好相关。

微量白蛋白测定对肾脏病、糖尿病等患者早期诊断和鉴别诊断提供了有用的指标。至今报道的微量白蛋白测定技术,包括免疫扩散、免疫电泳及 RIA 分析都较烦琐费时。为解决上述问题,我们建立了微晶纤维素固相一抗法和微晶纤维素固相二抗法,与液相 RIA 相比,更为简便,灵敏度较高,适于常规实验室应用。

## 材 料 和 方 法

## 一、试剂

1. 人血清白蛋白标准为美国的 Sigma 产品,以含 0.05% 明胶及 0.05% NaN<sub>3</sub> 磷酸缓冲液 (0.1 mol/L pH 7.4 PBS)。配成浓度为 20—1620 ng/ml 的标准溶液。

2. 人白蛋白抗体: 抗血清工作滴度为 1:10<sup>4</sup>, 与新鲜的 <sup>125</sup>I 标记白蛋白 (比度 370 kBq/ $\mu$ g) 的结合率为 48%。

3. 白蛋白-<sup>125</sup>I 标记品和液相放免试剂,均由北方免疫试剂所提供(加 12000 cpm/管)。

4. 固相载体: 采用 40 毫微米 (nm) 的细粒微晶纤维素(柱层析用, E Merk 产品)。

5. 白蛋白液相 RIA 操作程序按北方免疫试剂所生产的试剂盒说明书进行。

6. 其它试剂均为分析纯。

## 二、方法

1. 兔抗人白蛋白 IgG 制备, 按照硫酸铵沉

淀法进行提取。

2. 固相载体的活化: 取 100mg 微晶纤维素经溴化氰活化, 形成活化纤维素。

3. 人白蛋白抗体与纤维素的联接: 将活化的纤维素放于小瓶中, 在 0.1 mol/L NaHCO<sub>3</sub> 溶液中, 加入 3.6mg 提纯的白蛋白抗体。在转鼓上反应 24 h, 0.1 mol/L NaHCO<sub>3</sub> 洗一次。然后以 5% 甘氨酸封闭残基。随后用缓冲液洗涤数次, 并适当稀释后, 4℃ 保存备用 (用时每管加固相一抗 20  $\mu$ g)。

4. 羊抗兔二抗与纤维素联接: 将活化的纤维素于小瓶中, 加入 10ml (含 47 mg/ml) 提纯二抗反应 24h, 用 2% 的甘氨酸封闭残基, 用缓冲液做适当稀释于 4℃ 保存。

## 5. 测定程序:

(1) 白蛋白固相一抗 RIA 加样程序见表 1。

表 1 白蛋白固相一抗 RIA 加样程序 (单位  $\mu$ l)

|                      | 标准管 S <sub>1</sub> —S <sub>5</sub> | 样品管 u |
|----------------------|------------------------------------|-------|
| 白蛋白标准液               | 100                                | —     |
| 血清样品                 | —                                  | 100   |
| <sup>125</sup> I-白蛋白 | 100                                | 100   |
| 固相一抗                 | 100                                | 100   |

充分混匀后 37℃ 1 h, 4℃ 放置 16—18 h, 间隔摇动三次

|        |      |      |
|--------|------|------|
| PB 缓冲液 | 4000 | 4000 |
|--------|------|------|

振荡器上混匀 2 min, 于 3500 r/min 离心 2 min, 弃上清, 测沉淀物 cpm 数。

(2) 白蛋白固相二抗 RIA 加样程序,按液相 RIA 步骤进行,所不同之处是将固相一抗分离剂改用每管加入 100  $\mu$ l 固相二抗。

## 实验结果

1. 标准曲线 以  $B/B_0\%$  与白蛋白浓度对数作图,检测范围为 20—1620 ng/ml,在 20—540 ng/ml 浓度范围内呈直线,随着浓度增高,曲线上渐趋平缓(见表 2)。标记抗体 4℃ 保存,8 周内反复测定,最高结合率仍保持在  $44.2 \pm 8.5\%$ 。标准曲线稳定,重复性较好。

### 2. 质控指标

(1) 重复性 批内变异  $CV$  分别为 8.81% ( $n = 10$ )。批间  $CV$  为 10.2% ( $n = 4$ )。

(2) 回收试验 取三份样品(即 200、500、1000 ng/ml)回收率分别为 88.6%、93.8% 和 95.1%。平均回收率为  $92.3 \pm 3.4\%$ 。

表 2 白蛋白固相一抗放免法标准曲线

| 白蛋白标准<br>浓度 (ng/ml) | n | 结合率 ( $B/B_0\%$ ) |     |
|---------------------|---|-------------------|-----|
|                     |   | $\bar{X}$         | SD  |
| 20                  | 6 | 90.4              | 3.8 |
| 60                  | 6 | 78.7              | 2.9 |
| 180                 | 6 | 58.1              | 4.3 |
| 540                 | 6 | 35.6              | 3.4 |
| 1620                | 6 | 19.4              | 1.1 |

(3) 健全性鉴定 取一份含白蛋白浓度高的尿样,用缓冲液稀释成不同浓度,测定其含量,绘制白蛋白浓度与尿量关系曲线,结果表明

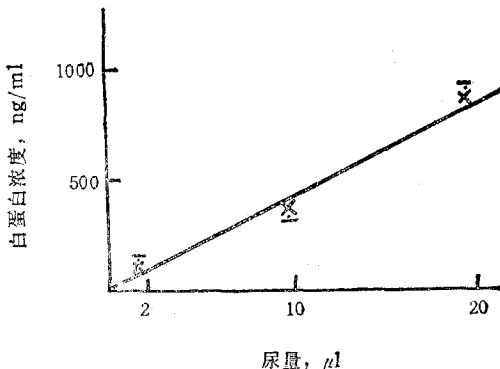


图 1 稀释尿样与白蛋白浓度的线性关系

线性关系良好( $r = 0.999$ )。方程  $y = 0.024x + 0.395$  (见图 1)。

(4) 抗体特异性 白蛋白抗血清与人 IgG (50—6400 ng/ml), 人肝铁蛋白 (50—5400 ng/ml) 和人的  $\beta_2$  mG (50—6400 ng/ml) 做交叉试验均阴性,表明白蛋白抗血清对白蛋白是特异的。

(5) 灵敏度:  $B/B_0 \times 100\%$  ( $\bar{x} \pm SD$ ) 标准曲线中,以  $\bar{X} - 2SD$  的值,从标准曲线上读出相应白蛋白浓度,即最小可测量的值为 20 ng/ml。

### 3. 正常人尿中白蛋白含量

测定 20 例无肝、肾病变,男女正常成年人尿中白蛋白值为  $5.71 \pm 1.39$  mg/24 h 尿。范围为: 2.92—8.50 mg/24 h 尿,实测范围: 3.80—8.74 mg/24 h 尿。与用液相 RIA 法所测得的 70 例正常成年人尿白蛋白值  $7.17 \pm 3.70$  mg/24 h 尿<sup>[2]</sup>相接近。

### 4. 二种白蛋白固相放免法与液相放免法比较

(1) 用纤维素固相一抗放免法和液相放免法同时测定 36 份尿样品白蛋白,将两者测定结果经相关处理,相关系数  $r = 0.889$ ,相关非常显著(见图 2)。提示这两种方法,均可用来测

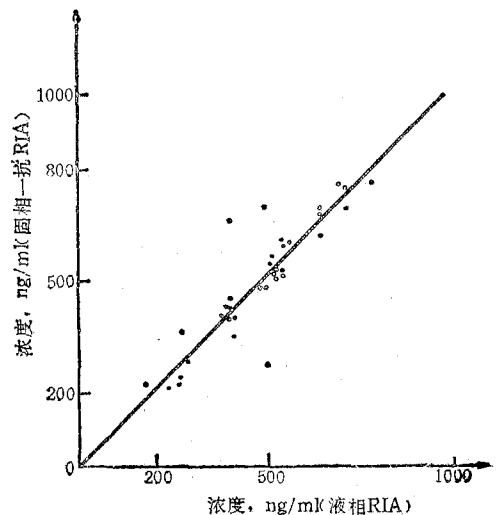


图 2 白蛋白固相一抗 RIA 法与液相 RIA 法的相关比较

定尿中微量白蛋白。

(2) 用纤维素固相二抗放免法和液相放免法同时测定 28 份尿样,将两种方法测定结果进行数据相关处理,相关系数  $r = 0.910$ , 回归方程为  $y = 0.947x - 52.93$  (见图 3)。结果提示两种方法具有同样使用价值。

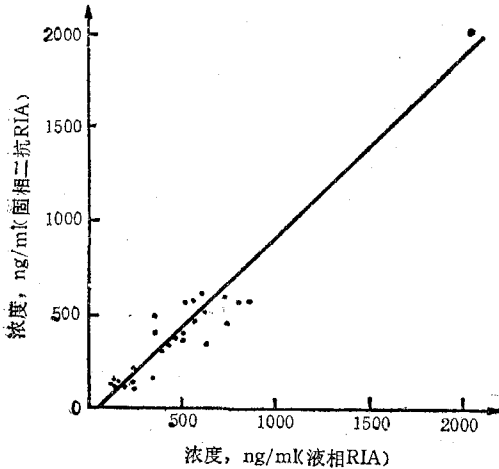


图 3 白蛋白固相二抗 RIA 法和液相 RIA 法的相关比较

## 讨 论

临床上多种疾病都会累及肾小球滤膜的正常功能,白蛋白从破坏的滤膜中漏过,肾小管又不能全吸收,而引起尿中白蛋白浓度增加。因此建立直接、快速测定尿中白蛋白浓度的方法,将为临床肾病诊断、分型、治疗等提供有价值的资料。本文在以往液相 RIA 法测定尿中微量白蛋白的基础上,建立了纤维素固相放免法。使测定方法更简便,并克服了分离剂对测定结

果的干扰,同时有利于系列化生产。

本文采用化学联接法,将抗体联接于微晶纤维素上,克服物理吸附法的缺点,抗体与固相材料结合牢固,提高了抗体的结合容量和稳定性。克服塑料珠反应面积有限和包被不均匀及抗体易脱落的缺点。固相 RIA 灵敏度为 20 ng/ml 比液相 RIA 50 ng/ml 有了进一步提高。本文为大量生产固相抗体,提供了有益的资料。

选择合适的固相第一抗体用量很重要,用量过大不但会降低测定灵敏度而且消耗大量的抗体,给推广应用带来困难。当每管加入 20、15、10、2.5  $\mu\text{g}$  的纤维素固相时,与  $^{125}\text{I}$ -白蛋白的 B/T 结合率分别为 74.7、70.9、71.6、63.8 和 59.3%。本文认为采用 2.5  $\mu\text{g}$ /管比较合适。

纤维素固相一抗及固相二抗放免法测定微量白蛋白,操作简便,影响因素少,优于液相白蛋白放免法。具有推广价值。

本工作得到军事医学科学院王仁芝教授大力支持,特此致谢。

## 参 考 文 献

- [1] Jury, D. R. et al.: *Clin. Chim. Acta*, 1985, 148, 63.
- [2] 陈泮藻等:《中国人民解放军军医进修学院学报》, 1988, 9(3), 239。
- [3] Woo, J. et al.: *Clin. Chem.*, 1978, 24(9), 1464.
- [4] 沈荣森等:《生物化学与生物物理进展》, 1988, 15(1), 57。
- [5] 陈泮藻等:《生物化学与生物物理进展》, 1986, (4), 69。

[本文于 1988 年 5 月 27 日收到]

(上接第 313 页)

- [9] Gray, B.H. et al.: *J. Anal. Toxic.*, 1985, 9, 36.
- [10] Yoshihiko, Oyanagui: *Anal. Biochem.*, 1984, 142, 290.
- [11] Huu, T.P. et al.: *Anal. Biochem.*, 1984, 142, 467.
- [12] Baret, A. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1979, 88, 337.

- [13] Kelly, K. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 1978, 190, 531.
- [14] Nobuhiko, Nishimura, et al.: *J. Pharm. Dyn.*, 1982, 5, 394.
- [15] Holt, M.E. et al.: *Br. J. Exp. Path.*, 1984, 65, 231.

[本文于 1988 年 6 月 29 日收到]