

经验交流

一种简便的尿总蛋白定性方法

胡望平 朱忠勇 倪正菱

(解放军医学检验专科中心、南京军区福州总医院, 福州)

尿蛋白质定性分析是临床大量而重要的检验项目。目前应用的主要方法仍然是醋酸加热法、磺柳酸法和蛋白试纸法。醋酸加热法特异性较好, 但较繁琐费时; 磺柳酸法易出现假阳性; 蛋白试纸法虽较方便但仅对白蛋白起反应, 且受 pH 与盐类的影响, 价格昂贵而有效期有限。探索特异、经济及更方便的方法, 将有广泛的实用意义。本文报道我们设计及改良的一种尿总蛋白的定性方法。

材料与 方法

试剂 (1)CBB 蛋白试剂: 称取考马斯亮蓝 G-250(Coomassie Brilliant Blue G-250) 75 mg, 溶于甲醇 40ml 内, 加 85% 浓磷酸 100ml、浓盐酸 5ml、水 800 ml、十二烷基磺酸钠(SDS)30 mg, 加水至 1L。(2)蛋白标准液: 病理性尿蛋白主要是“漏入”尿中的血清蛋白, 因此采用人血清总蛋白作标准。初标准用南京总医院产的全军质控标准血清, 派生标准血清用双缩脲法定量, 然后用生理盐水或饱和苯甲酸液稀释成下列六种浓度: 30 mg/L (极微量); 80 mg/L (微量); 250mg/L(+); 750 mg/L (++) ; 2250 mg/L (+++) ; > 4500 mg/L(++++)。贮放冰箱备用。

方法 (1) 定性试验: 在多孔白瓷凹板上加一滴尿液于一孔(约 0.05 ml, 每份尿占一孔)用定量加液器冲加 CBB 试剂 0.5ml (尿量的 10 倍)。蓝色为阳性; 5 分钟后黄棕色不变化为阴性。(2)阳性分级(半定量): 与蛋白标准比较

颜色, 可根据蓝色深浅程度判断阳性等级, 从浅灰、绿、浅蓝、蓝到深蓝。(3)本研究用定量法: 取尿液 50 μ l, 加 CBB 试剂 5 ml (尿量的 100 倍), 5 分钟后在 595 nm 波长处(以空白管调零)读取吸光度。与标准管比较, 计算尿蛋白浓度。

结果与 讨论

(1) 本法的特异性 在酸性介质中, CBB 结合蛋白质的一 NH_3^+ 基团, 引起颜色的变化, 从棕色到蓝色, 光谱吸收峰从 465 nm 移至 595 nm, 见图 1。

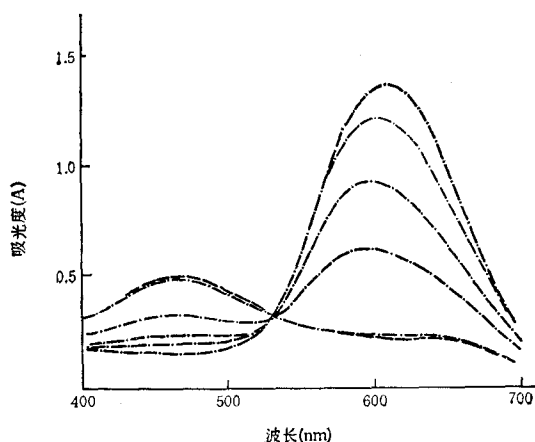


图 1 CBB-蛋白质复合物吸收光谱

注: ①粗花线(---)为试验管, 595 nm 处
从上至下分别为>+++、+++、++、+、0。

②细虚线(---)为试剂空白管。

它与试纸法的指示剂蛋白误差原理不同。染料 CBB 能特异地结合蛋白质, 几乎不结合小

分子物质,因此很少被干扰。Lott 氏试验了尿酸、葡萄糖、肌酐、脲、多巴胺、水杨酸类代谢产物、防腐剂、肾病与糖尿病诊治药物共 30 多种,多数无干扰,仅甲磺丁脲、极高浓度脲稍有干扰。血红蛋白的干扰与血清蛋白的反应相同^[1]。CBB 亦不结合 DNA、RNA、单核苷酸和植物色素^[2]。

(2) 结果判断 肉眼观察阴性与阳性区别明显,蓝色深浅清楚层次分明。传统的定性法多以白色浊度判定结果,而人眼视觉对颜色的敏感度比对浊度更强,尤其是对蓝绿色。本法反应后色彩鲜明,非白色浊度法可比。阴性反应及阳性分级的颜色深度以吸收光谱表示见图

1。

(3) 灵敏度 按定性试验法尿总蛋白浓度 10mg/L 约可产生 0.02 吸光度 (A_{595})。CBB 法对各种蛋白的灵敏度不一样,对白蛋白灵敏度比球蛋白高。Macart 氏等用十二烷基硫酸钠提高对球蛋白的灵敏度,应用于脑脊液^[3]和尿液^[4]蛋白定量。但十二烷基硫酸钠所配试剂颜色较蓝;而且它在酸性介质中易水解,不够稳定。我们根据定性试验的特点,改用十二烷基磺酸钠。提高了球蛋白的灵敏度 (27.9%),使总蛋白反应趋于合理 (见表 1),更有利于检测肾小管性蛋白尿和检出 B-J 蛋白。

试剂中加浓盐酸 5ml/L,使阴性与极微量

表 1 十二烷基磺酸钠对显色的作用

人血清蛋白组分及反应液内浓度	试剂内表面活性剂		
	未 用	加 SDS	吸光度变化
球蛋白(沪产) 495 mg/L	0.061 A	0.078 A	127.9%
血清总蛋白(宁产) 663 mg/L	0.148 A	0.164 A	110.8%
白蛋白(宁产) 495 mg/L	0.126 A	0.124 A	98.4%

表 2 1008 份尿二定性法结果对比

醋酸加热法	CBB 染料法					
	+++	++	+	微 量	极微量	—
+++	14(1.4%)	—	—	—	—	—
++	—	32(3.2%)	—	—	—	—
+	—	—	46(4.6%)	—	—	—
微量	—	—	—	85(8.4%)	—	—
极微量	—	—	—	4(0.4%)	212(21.0%)	25(2.5%)
—	—	—	—	—	23(2.3%)	567(56.2%)

的色差更加明显。

(4) 线性 定性试验 +++ 以下的色度与浓度成比例,+++ 以上色深难区别。定量试验蛋白浓度 2.25g/L 以内,与吸光度成直线关系。相关系数 $r = 0.9996$, $Y = 5.5 X - 0.033$ 。Y 为蛋白浓度 g/L, X 为吸光度 A。本试剂既可作定性,又可作定量。注意定量试验的试剂与样品比(100:1)不同于定性;要防止染料吸附在比色杯上影响下次比色。

(5) 与醋酸加热法比较 临床对比 1008 份常规化验尿,醋酸加热法与本法完全符合率

为 95.2%,其中包括极微量。有些书本的方法不计极微量(作阴性),符合率将更高。CBB 法极微量而醋酸加热法为阴性的占 2.3%,多数沉渣镜检轻度异常(有少量红细胞与白细胞)。二法对比结果详见表 2。

体检 80 名健康男女青年的晨尿(6:15—7:15)晨间活动后一小时整),CBB 法阴性为 75 名,极微量者 5 名,均被醋酸加热法证实。

(6) 尿蛋白成分 尿蛋白最主要的来源是血浆。不同疾病各种蛋白比例有差异。大多数肾脏病蛋白尿以白蛋白占优势;但有少数疾病

以球蛋白占优势,或白蛋白减少球蛋白增多,如:多发性骨髓瘤、巨球蛋白血症、肾盂肾炎、肾小管疾病等^[6]。本法添加表面活性剂十二烷基磺酸钠,提高了对球蛋白的灵敏度,缩小了各种蛋白与CBB试剂的反应差别。比昂贵的蛋白试纸法能检出更多种蛋白,能更全面、准确地反映疾病的状况。

CBB法多以Bradford的工作为基础。定量试验的特异性已有较多研究^[1,2]。在广泛的生物化学领域内,CBB定性法曾有人用于滤纸上的植物蛋白染色^[2],有人用于层析中的蛋白快速鉴定^[5]。本文率先用于临床尿总蛋白定性。比醋酸加热法简便,且特异、灵敏。它没有磺柳酸法的假阳性。能检出球蛋白,不受pH、盐类

影响,比试纸法更快、更准确、更经济。50份尿常规蛋白定性,10分钟内可完成,极大地提高了工作效率,尤其适用于大批样品化验。

参 考 文 献

- [1] Lott, J. A. et al.: *Clin. Chem.*, **26**, 1946, 1983.
- [2] Esen, A.: *Anal. Biochem.*, **89**, 264, 1978.
- [3] Macart, M. et al.: *Clin. Chim. Acta*, **122**, 93, 1982.
- [4] Perini, J. M. et al.: *Clin. Chim. Acta*, **143**, 321, 1984.
- [5] Bergmeyer, H. V. et al.: *Methods of enzymatic analysis*, Vol 2, 3ed, Verlag chemie, Weinheim, 92, 1983.
- [6] Davidsohn, L. et al.: *Clinical diagnosis by laboratory methods*, 15th ed. W. B. Saunders, Philadelphia, 72, 1974.

[本文于1986年9月8日收到]

简易微量蛋白液透析及浓缩法

张 向 明

(中国药品生物制品检定所,北京)

少量蛋白样品进行电泳常常需要透析或浓缩。用透析袋是难以处理微量样品的。我们用0.5ml或1.5ml去掉盖子的聚乙烯离心管,装入待处理的样品液,管口端用透析膜包上,再用橡皮筋扎紧,将管口朝下,并把样品液弹到透析膜端,检查无渗漏后,将离心管口朝下用橡皮筋固定在玻璃棒上,放入透析液中或直接放在

聚乙二醇上。透析或浓缩完的样品液离心管进行短暂离心,样品便尽收管底。也可把透析和浓缩在一个管子中连续进行。本法也适用于微量免疫抗原及其它用途的微量样品的处理。

[本文于1987年1月5日收到]