

医学生化

尿微量白蛋白 ELISA 测定法最适条件的探讨

任凤琴 宋耀虹 冯 涛

(中国医学科学院 北京协和医院, 北京 100730)
(中国协和医科大学)

摘要 用自制兔抗人白蛋白抗体; 酶标抗原和进口 NUNC 板, 进行了两种显色剂邻苯二胺 (OPD) 及四甲基联苯胺 (TMB) 测定尿微量白蛋白的比较, 底物 (H_2O_2) 浓度对测定的影响, 碳酸钠和戊二醛两种包被方法的比较, 以及抗体和抗原浓度的选择等影响因素进行了实验探讨, 并确定了本实验的最佳分析条件.

关键词 尿微量白蛋白, 竞争酶联免疫吸附法, 邻苯二胺

尿微量白蛋白 (mAlb) 测定, 主要用于肾脏病的早期诊断, 尿中白蛋白排出量的多少, 可反映肾小球损伤的程度, 是诊断肾小球肾病的灵敏指标之一, 并广泛用于高血压, 糖尿病, 自身免疫性疾病的检测^[1]. 近年来人们越来越认识到对糖尿病, 肾病等病人进行尿微量白蛋白的检查是非常重要的^[2,3]. 若对此类病人进行尿微量白蛋白的普查和监测, 对有可能避免明显的肾损害出现, 甚至可以恢复正常. 此外, 在肾移植的监护以及监测对肾小球有损伤的药物等方面都有一定的临床意义.

目前, 测定尿微量白蛋白的方法很多, 如: 放射免疫法^[4,5]、酶联免疫法^[6]、免疫比浊法 (中生临床生化技术通讯, 1994, 3 (1): 24) 和免疫电泳法等. 我们建立了尿微量白蛋白的竞争酶联免疫测定法, 将特异性抗 HSA 抗体包被在 NUNC 板上, 利用酶标抗原与标本中抗原竞争固相抗体的方法来测定抗原.

1 材料与方法

1.1 试剂

高纯度人血清白蛋白 HSA (sigma 公司); 兔抗人白蛋白血清 (效价为 1: 128) 和 HRP-HSA 均为自制; 邻苯二胺 (OPD, 北京化工

厂); 四甲基联苯胺 (TMB, Farcochemical Supplies 公司).

1.2 仪器

酶标仪 Clinbio 128 (奥地利). 微滴板为 NUNC 条板 (丹麦).

1.3 方法-竞争酶联免疫吸附法

1.3.1 抗体包被: 用 pH 9.5 碳盐缓冲液以 1: 5000 倍稀释抗 HSA 血清, 每孔加 100 μ l 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜, 或用 0.8% 戊二醛 pH 7.4 0.02 mol/L PBS 稀释抗血清包被板, 用 0.01 mol/L pH 7.4 PBS-Tween20 洗板 3 次去除未结合的抗体, 然后用 1% 小牛血清 PBS 每孔加 200 μ l, 37 $^{\circ}$ C 1 h 封闭板.

1.3.2 加入标本与酶标抗原: 加 50 μ l 标本或标准液, 50 μ l 1: 1000 倍的 HRP-HSA 37 $^{\circ}$ C 1 h.

1.3.3 底物显色: 加 0.0037 mmol/L OPD, 过氧化氢底物显色 10 min, 以 2 mol/L H_2SO_4 终止反应, 在 Clinbio 128 酶标仪 492 nm 上测定 mAlb 的含量.

2 结果与讨论

2.1 不同浓度牛血清白蛋白封闭液的影响

分别以 (0.2%、0.5%、1%、2%、4%

BSA-pH 7.4 0.01 mol/L PBS) 溶液封闭, 对“O”标准作重复性测定 20 次, 结果显示 0.2% 和 0.5% BSA 封闭板非特异性吸附较大, CV 也较大, 达 2.89%~3.12%, 而 1%~4% BSA 封闭板的非特异性吸附较小, A 值为 0.054~0.057, CV 为 2.82%~2.85% 结果基本一致, 为节省 BSA 用量, 本实验选用 1% pH 7.4 PBS-BSA 作封闭液.

2.2 两种显色剂的比较

我们分别用 OPD 和 TMB 为显色剂, 作了重复性, 最低检测限和显色后稳定性的观察 (表 1).

表 1 TMB, OPD 两种显色剂的比较			
显色剂	$CV/\%$	最低检测限 $/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	显色后稳定性 $/\text{h}$
TMB	0.23~3.05	1.11	1
OPD	0.22~2.14	0.14	1

2.3 两种包被方法的比较

用 pH 9.5 碳酸盐缓冲液和 0.8% 戊二醛 pH 7.4 0.02 mol/L PBS 液稀释抗体, 分别包被 NUNC 板条, 用 OPD 作显色剂, 作最低检测限和重复性比较 (表 2).

表 2 两种不同包被方法的比较		
包被方法	最低检测限/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$CV/\%$
碳酸盐	0.62	1.89~7.99
戊二醛	0.14	0.22~2.14

结果表明, 用戊二醛包被板重复性和最低检测限均比碳酸盐法好. 用戊二醛包被板, 使聚苯乙烯塑料板孔表面与抗体分子形成共价结合, 从而增加了单位面积抗体的结合率, 同时也降低了测定及洗涤过程中蛋白脱落程度. 因此, 在被测抗原分子浓度较低时也能达到较高的灵敏度. 而用碳酸盐缓冲液包被板, 聚苯乙烯塑料孔表面与抗体的结合方式, 是物理吸附. 因此吸附抗体的均一性没有戊二醛好, 易

脱落, 所以, 戊二醛包被板的重复性; 灵敏度等均比碳酸盐包被板好.

2.4 底物浓度对测定的影响

以过氧化氢为底物, 由酶联竞争反应曲线可见 (图 1), 随 H_2O_2 浓度增加, 反应速度加快, 吸光度值升高, 当底物浓度增至一定量时, 反应速度不再增加, 因此, H_2O_2 的浓度是影响反应的一个很重要因素. 另外, OPD 的浓度也是非常重要的, 它必须与 H_2O_2 浓度相适应才能找到最佳反应速度. 本实验选择 H_2O_2 为 3.52 mmol/L, OPD 为 0.0037 mmol/L.

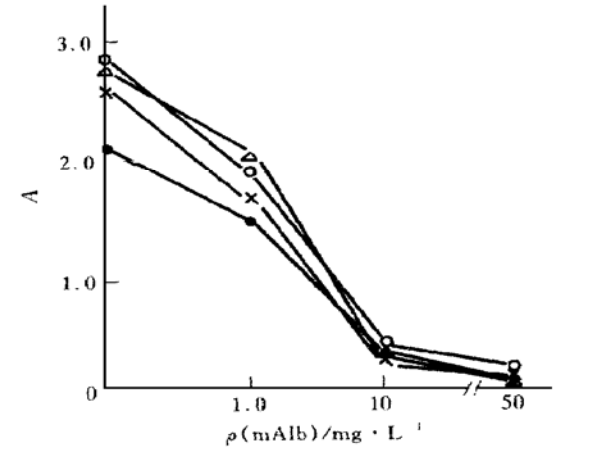


图 1 底物浓度对测定的影响
 H_2O_2 浓度: $\circ-\circ$: 4.40 mmol/L; $\triangle-\triangle$: 3.52 mmol/L; $\times-\times$: 2.64 mmol/L; $\bullet-\bullet$: 1.76 mmol/L.

2.5 抗体与抗原浓度的选择

应用棋盘实验的方式来寻找最佳抗体与酶标抗原的浓度. 同时又运用了四参数拟合的模式, 抗体与酶标抗原浓度匹配最好的情况下, 标准曲线拟合后白蛋白标准液浓度的计算值与实际标准液浓度值最吻合 (表 3), 竞争百分结合率最佳, 测定范围也大 (图 2). 从实验可知, 当酶标记抗原的浓度固定时, 竞争百分结合率和曲线测定范围随抗体稀释度的增加而减小, 同时曲线的线性部分斜率也随之变小. 反之当抗体稀释度固定时, 测定范围随酶标抗

原浓度的减少而缩小，竞争百分结合率也随之降低。

表 3 mAlb 标准曲线相对误差

测定浓度 /mg·L ⁻¹	标准浓度 /mg·L ⁻¹	绝对误差	相对误差 /%
0.7898	0.7812	0.0176	2.2500
1.5622	1.5625	0.0002	0.0128
3.0355	3.1250	- 0.0895	- 2.8640
5.9784	6.2500	- 0.2716	- 4.3456
12.978	12.500	0.4781	3.8248
24.928	25.000	- 0.0719	- 0.2876
49.594	50.000	- 0.4062	- 0.8124

截距(A) = - 0.1325; 斜率(B) = 1.0067; 相关系数(r) = 0.9997; y(标准浓度) = 1.0067x(测定浓度) - 0.1325.

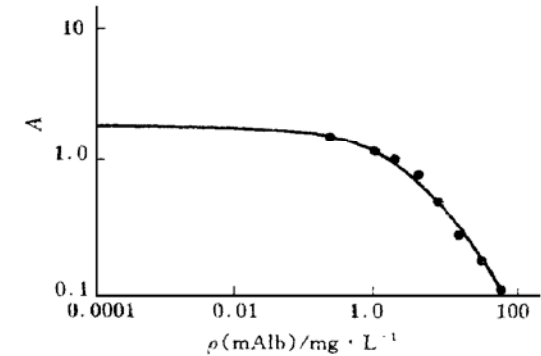


图 2 mAlb 竞争免疫标准曲线

根据以上实验确定了本法测定的最佳条件. 抗体稀释度为 1: 5000; 酶标抗原稀释度为 1: 1000; H₂O₂ 为 3.52 mmol/L; OPD 为 0.0037 mmol/L; 用 0.8% 戊二醛, pH 7.4 0.02 mol/L PBS 液稀释抗体; 1% BSA, pH 7.4 0.01 mol/L PBS 液封闭板条.

2.6 相关试验

用本法与 RIA 同时测定临床尿标本 25 例, 其中小于 20 mg/L 有 11 例, 大于 20 mg/L 有 14 例, 进行相关测定, 其相关系数 $r = 0.996 Y (ELISA) - 0.559 = 1.062 X (RIA) - 0.559$.

2.7 回收实验

在正常人尿 (微量白蛋白为 2.93 mg/L) 中分别加入 1.56, 12.5, 25 mg/L 微量白蛋白

作回收实验, 回收率为 94.9% ~ 104.8%.

2.8 95% 分布范围测定

我们共测定健康成人 90 例, 男 45 名, 女 55 名, 年龄从 22~ 72 岁, 以每克肌酐中所含尿 mAlb (mg/L) 方式表示, 约 95% 分布范围为 0.25~ 24.89 mg/L.

参 考 文 献

1 张秀明, 沈琪琳, 郭 杰等. 尿中微量白蛋白测定技术的研究进展. 实用医学检验杂志, 1995, 2 (4): 60~ 62
2 丁云红, 吕雁群. 离心分析仪透射比浊法检测尿微量白蛋白. 中华医学检验杂志, 1991, 14 (5): 163~ 265
3 魏有仁, 侯林浦, 王 玫等. 尿中微量白蛋白的测定及应用. 生物化学与生物物理学进展, 1995, 22: 169~ 173
4 许瑞吉, 杨晓晴, 常愈明. 放射免疫测定人尿白蛋白及其临床意义. 中华肾脏病杂志, 1987, 3 (4): 196~ 198
5 Osberg I, Chase H P, Garg S K *et al.* Effects of storage time and temperature on measurement of small concentrations of albumin in urine. Clin Chem. 1990. 36 (8): 1428~ 1430
6 Van Kamp G J, Van Bezu J S, Mulder C. A rapid and sensitive immunosorbent assay for urinary albumin. Ann Clin Biochem, 1989, 26 (5): 427~ 429

Studies on the Optimal Conditions for the Determination of Microalbumin in Urine by ELISA. REN Fengqin, SONG Yaohong, FENG Tao (Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Peking Union Medical College Hospital, Beijing 100730, China).

Abstract A solid phase and competitive enzyme immunoassay for the determination of microalbumin in urine using rabbit anti-human albumin antibody, HRP-HSA and Nunclon microtiter strips was developed. Two chromogens: σ -phenylenediamine (OPD) and 3, 3', 5, 5'-tetramethyl benzidine (TMB), sodium carbonate coated wells and glutaraldehyde coated wells was compared. The influences on the determination of the concentration of substrated, antigen and antibody was discussed. The optimal conditions for the assay was established.

Key words urine microalbumin, ELISA, OPD