

大鼠白蛋白酶联免疫分析试剂盒的研制

袁志刚, 韩世泉, 刘一兵, 许文革, 贾娟娟

(中国原子能科学研究院 同位素研究所, 北京 102413)

摘要: 采用大鼠白蛋白免疫绵羊制得羊抗大鼠白蛋白抗血清, 建立了大鼠白蛋白酶联免疫分析方法。本方法的测量范围为 1~50 mg/L, 灵敏度为 0.42 mg/L, 回收率为 85.0%~106.0%, 批内、批间变异系数分别 < 8.9% 和 < 12.8%, 高浓度大鼠尿样系列倍比稀释后测定, 实测值和计算值呈线性相关, 相关系数 $r=0.999$ 。本方法与放射免疫分析 (RIA) 方法学的相关性方程为 $y=0.92x+0.08$, $r=0.976$, 两种方法的相关性良好。方法学鉴定结果符合免疫分析的基本要求, 大鼠白蛋白酶联免疫试剂盒的研制为肾病药物的开发及肾损伤的研究提供了方便。

关键词: 酶联免疫分析; 大鼠白蛋白; 放射免疫分析; 肾损伤

中图分类号: R 446.61 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-7512(2009)01-0023-05

Development of ELISA Kit for Rat Albumin

YUAN Zhi-gang, HAN Shi-quan, LIU Yi-bing, XU Wen-ge, JIA Juan-juan

(Isotope Department, China Institute of Atomic Energy, Beijing 102413, China)

Abstract: The Anti-rat albumin serum was prepared by immunized the sheep with rat albumin. A ELISA method was established for rat albumin. The measurement range of the assay was 1-50 mg/L, sensitivity of the assay was 0.42 mg/L, recovery rate was 85.0%-106.0%. Intra- and inter-assay variation coefficients were <8.9% and <12.8% respectively. The correlation coefficients between measured and expected values were 0.999 after serial dilution of the urine samples with high concentrations of rat albumin. A good correlation was observed between the ELISA and RIA methods, and the kit for rat albumin might provide a convenience in exploitation of renal drugs and experimental injury of the kidney.

Key words: ELISA; rat albumin; RIA; injury of the kidney

随着化学药品的应用日益广泛, 药源性肾损伤的发生率明显增加。尿中微量白蛋白的检测是诊断肾病的灵敏指标之一^[1]。测定大鼠尿白蛋白对糖尿病大鼠肾病的诊断具有重要价

值^[2-3]。目前, 国外已有用于大鼠药理学实验的检测试剂盒, 而国内所用的试剂盒基本为进口。本工作拟用羊抗大鼠白蛋白抗体开发出大鼠白蛋白检测试剂盒用于药物代谢的研究。

1 实验材料

1.1 试剂与仪器

大鼠白蛋白(rat-ALB)、辣根过氧化物酶(HRP)、四甲基联苯胺(TMB)、过氧化氢(H_2O_2): Sigma 公司产品;牛血清白蛋白(BSA):上海赛达生物有限公司产品;96孔酶标板:美国 Costar 公司;大鼠尿样:北京军事医学科学院新药研究中心提供;驴抗羊二抗抗体:原子高科股份有限公司生物组提供;放射免疫分析(RIA)试剂盒:本实验室研制;SPECTRA III 酶联免疫分析仪:奥地利 SLT 公司;电热培养箱:上海浦东跃欣科学仪器厂;紫外分光光度计:Varian 公司产品。

1.2 实验动物

健康雄性绵羊 2 只,4~6 月龄,普通级别,北坊村农场提供。

2 实验方法

2.1 大鼠白蛋白抗体的制备^[4]

采用背部小剂量多点皮下、皮内注射,基础免疫时每只绵羊注射 400 μg 大鼠白蛋白,2 周后第一次加强,以后每 4 周加强一次,加强免疫剂量减半,经 3 次加强免疫后采集颈静脉血测定抗血清的效价。

2.2 酶标大鼠白蛋白的制备

参照郭春祥^[5]等利用高碘酸钠改进的标记法进行标记。称取 2 mg HRP,溶于 1 mL 去离子水中,搅拌下加入 100 μL 0.1 mol/L 新鲜配制的 NaIO_4 水溶液,室温下避光搅拌 20 min,取出,装入透析袋,4 $^\circ\text{C}$ 下,于 1 mmol/L, pH 4.4 的醋酸盐缓冲液中透析过夜。次日,将溶液自透析袋取出,用 0.2 mol/L pH 9.5 的碳酸盐缓冲液调节 pH 至 9.5,将 2 mg(0.56 mL)大鼠白蛋白加入上述溶液中,室温避光搅拌 2 h,再加入新配制的 50 μL (4 g/L) NaBH_4 溶液,4 $^\circ\text{C}$ 下静置 2 h,装入透析袋,4 $^\circ\text{C}$ 下于 0.01 mol/L, pH 7.4 的 PB 中透析过夜,次日,将透析袋中溶液加等体积甘油,于 -20 $^\circ\text{C}$ 下保存备用。

2.3 大鼠白蛋白标准品的配制

将 1 g/L 大鼠白蛋白紫外定标后,用标准品稀释液配制成 0、1、2、5、10、20 和 50 mg/L 大鼠白蛋白标准品,编号分别为 S_0 、 S_1 、 S_2 、 S_5 、 S_{10} 、 S_{20} 、 S_{50} 。并以每瓶 1 mL 分装冻干,于 -20 $^\circ\text{C}$ 下保存备用。

2.4 驴抗羊二抗的提纯

驴抗羊二抗抗体采用蛋白 G 柱层析法提纯^[6],紫外分光光度仪测量其蛋白浓度。

2.5 固相抗体的制备

将驴抗羊二抗用包被缓冲液稀释至 8 mg/L,按每孔 150 μL 加入聚苯乙烯酶标板中,4 $^\circ\text{C}$ 静置过夜。次日,倾去包被液,再按 200 μL 每孔加入封闭液,37 $^\circ\text{C}$ 封闭 1 h。弃去封闭液,自然凉干。

2.6 大鼠白蛋白的酶联免疫分析(ELISA)程序

在包被有驴抗羊二抗的酶标板中,每孔分别加入 50 μL 大鼠白蛋白标准品或样品、50 μL 酶标大鼠白蛋白,混匀,加入 50 μL 大鼠白蛋白抗体混匀,37 $^\circ\text{C}$ 下反应 1 h,洗涤拍干,加入 100 μL 底物溶液,37 $^\circ\text{C}$ 显色 15 min,加入 50 μL 2 mol/L 的硫酸终止反应,测定 OD_{450} 。以 OD_{450} 为纵坐标,标准品浓度为横坐标,采用双对数作图法绘制标准曲线并拟合线性回归方程,根据样品的 OD_{450} ,计算出血清样品中大鼠白蛋白浓度。

3 结果与讨论

3.1 抗体工作浓度的选择

经 3 次加强免疫后采集颈静脉血测定血清的效价为 1:200 000。观察不同抗体浓度对标准曲线的影响,结果示于图 1。由图 1 可知,当抗体稀释倍数增加后,标准曲线的 OD_{450} 下降趋势明显。在抗体稀释度约为 1:10 000 时,标准曲线的 OD_{450} 更适合于免疫分析的要求。因此,本工作抗体稀释度选择在为 1:10 000。

3.2 酶标大鼠白蛋白偶联比对标准曲线的影响

通过改变酶标原料的投料比改变酶标大鼠白蛋白的偶联比,观察不同偶联比对标准曲线的影响,结果示于图 2。由图 2 可知,当酶标记物偶联比增加后,标准曲线的 OD_{450} 上升明显,在酶标记物偶联比大于 1.44 小于 2.53 时,标准曲线的 OD_{450} 更适合于免疫分析的要求。因此,本工作选择酶标大鼠白蛋白偶联比约为 2。

3.3 反应动力学实验

考察系列大鼠白蛋白标准品与大鼠白蛋白抗体反应时间对 ELISA 分析的影响,结果示于图 3。由图 3 可见,系列大鼠白蛋白标准品与大鼠白蛋白抗体反应在 1 h 时基本平衡。

3.4 方法学鉴定^[7]

3.4.1 标准曲线的建立 选择酶标大鼠白蛋白偶联比约为 2, 抗体稀释度选择为 1 : 10 000, 经一系列条件优化实验后, 所建立的标准曲线示于图 4。由图 4 所可知, 该测量方法的测量范围为 1~50 mg/L, 测量范围较宽, 符合 ELISA 的要求。

3.4.2 灵敏度 同时测定 20 个“零”标准的 OD₄₅₀, 以其 -2s 在标准曲线上对应的浓度即为分析灵敏度, 测得灵敏度为 0.42 mg/L。

3.4.3 精密度 采用本方法对 3 种不同浓度的

大鼠白蛋白溶液重复测定, 计算批内、批间变异系数, 结果列于表 1。由表 1 可知, 本方法批内变异系数 < 8.9%, 批间变异系数 < 12.8%, 符合 ELISA 的要求。

3.4.4 健全性 一份大鼠尿样经 1、2、4、8、16、32、64 系列倍比稀释后测定其白蛋白浓度, 对稀释度和测量值进行线性相关性分析, 得到其线性相关方程为 $y = 65.95x - 0.60$, 相关系数 $r = 0.999$ 。该结果表明, 尿样进行倍比稀释后, 不影响测量结果, 同时说明本试剂盒健全性良好。

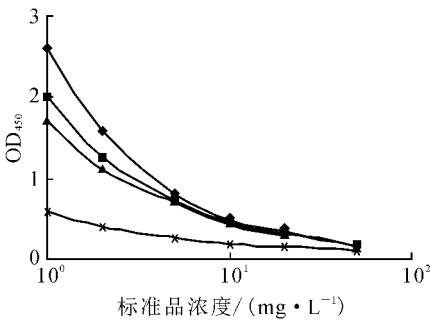


图 1 不同抗体稀释度对大鼠白蛋白 ELISA 标准曲线的影响

◆——5 000 倍; ■——10 000 倍;
▲——20 000 倍; ×——100 000 倍

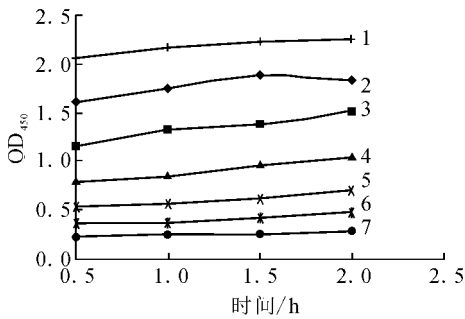


图 3 大鼠白蛋白 ELISA 反应动力学

1——S₀; 2——S₁; 3——S₂; 4——S₅;
5——S₁₀; 6——S₂₀; 7——S₅₀

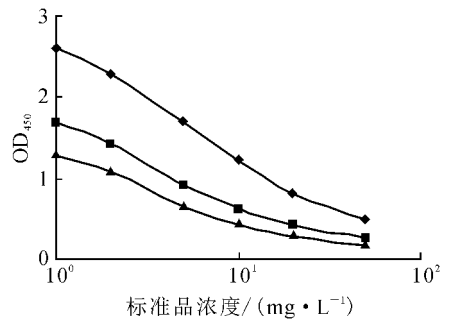


图 2 酶标记物不同偶联比对 ELISA 标准曲线的影响

◆——2.53; ■——1.44; ▲——1.09

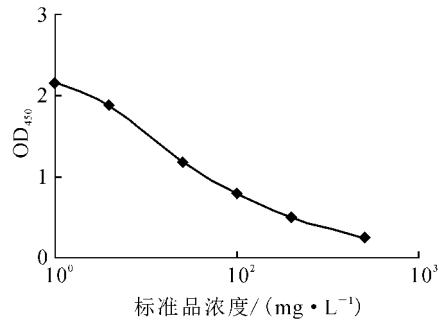


图 4 ELISA 分析曲线

表 1 批内、批间变异系数测定结果

样品浓度	批内 (n=10)			批间 (n=10)		
	$\bar{x}/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	$s/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	CV/%	$\bar{x}/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	$s/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	CV/%
低	3.46	0.18	5.3	2.88	0.37	12.8
中	11.45	0.98	8.6	11.26	0.72	6.4
高	18.57	1.66	8.9	20.79	1.55	7.5

3.4.5 回收率 向大鼠尿样中加入 3 种不同浓度的大鼠白蛋白,测定其回收率,结果列于表 3。由表 3 可知,本方法回收率为 85.0%~106.0%。

表 2 方法的回收率

加入量/ (mg · L ⁻¹)	测定值/ (mg · L ⁻¹)	计算值/ (mg · L ⁻¹)	回收率/%
0	5.71		
2.5	8.36	8.21	106.0
10	15.92	15.71	102.1
25	26.95	30.71	85.0

3.4.6 方法学的比较 同时采用本方法和 RIA 方法对 44 例大鼠尿样进行测定,得到本方法学与 RIA 方法学相关性,结果示于图 5。相关性方程为 $y = 0.92x + 0.08$, $r = 0.976$, $n = 44$ 。此结果表明本方法学与 RIA 方法学的相关性良好。

3.5 稳定性

3.5.1 包被板的稳定性 将驴抗羊二抗包被到酶标板后,在 37 °C 下放置 5、12、15、18、21、24、27 和 30 d,考察包被板的稳定性,结果示于图 6。由图 6 可知,放置一个月内各标准点的 OD₄₅₀ 变化不大,包被板在 37 °C 下放置一个月,活性基本没有变化。以上结果表明包被板稳定性良好。

3.5.2 酶标大鼠白蛋白的稳定性 标记物在 37 °C 下放置 4、7、10、13、16、19、22 和 25 d 后进行 ELISA 分析,结果示于图 7。由图 7 可知,标记物在 37 °C 下存放 20 d 内,各标准点的 OD₄₅₀ 变化不大,即酶标大鼠白蛋白在 37 °C 下可以稳定存放 20 d。

3.5.3 抗体的稳定性 将大鼠白蛋白抗体用标

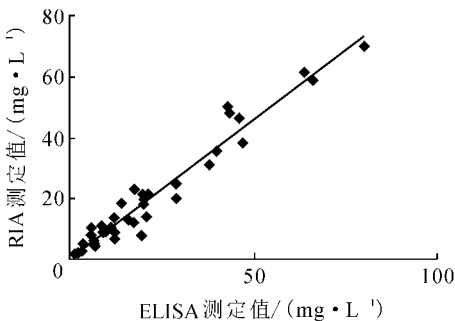


图 5 两种方法的线性相关曲线

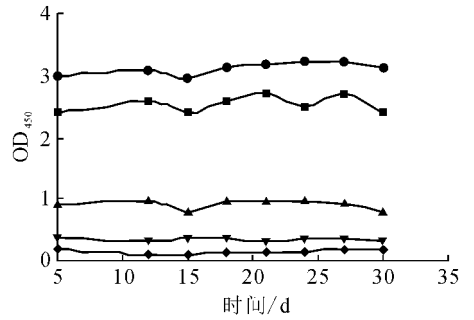


图 6 包被板在 37 °C 下的稳定性

◆—NSB; ●—S₀; ■—S₁;
▲—S₁₀; ▼—S₅₀

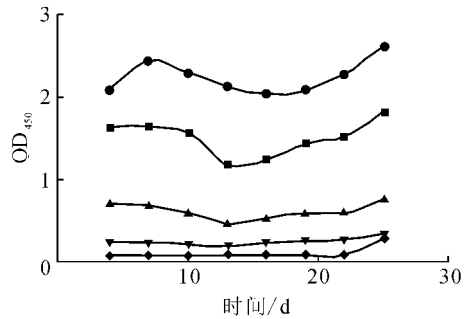


图 7 酶标大鼠白蛋白在 37 °C 下的稳定性

◆—NSB; ●—S₀; ■—S₁;
▲—S₁₀; ▼—S₅₀

准品稀释液以 10 000 倍稀释,37 °C 下保存 4、7、10、13、16、19、22、25 和 28 d 后进行 ELISA 分析,考察抗血清在 37 °C 下的稳定性,结果示于图 8。由图 8 可以看出,放置 28 d 内各标准点的 OD₄₅₀ 基本无变化,抗血清在 37 °C 下放置 28 d 活性基本没有变化,表明本工作制得的抗体稳定性良好。

3.5.4 大鼠白蛋白标准品的稳定性 大鼠白蛋

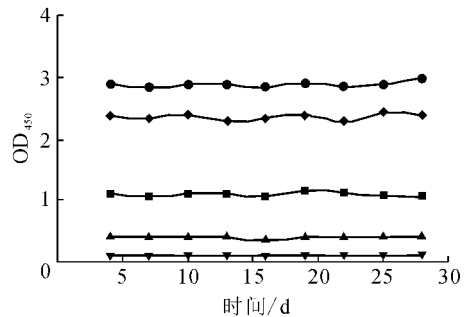


图 8 抗体在 37 °C 下的稳定性

▼—NSB; ●—S₀; ◆—S₁;
■—S₁₀; ▲—S₅₀

白标准品在 37 ℃下放置 0、7、14、21 d 后分别测量其蛋白含量,考察其稳定性,结果列于表 4。表 4 结果显示,标准品在 37 ℃放置 21 d 内都比较稳定。

表 3 标准品在 37 ℃下的稳定性

标准点	不同时间(d)白蛋白的含量/(mg · L ⁻¹)			
	0	7	14	21
1	1	0.87	0.93	0.83
2	2	2.06	2.21	2.28
3	5	5.29	5.14	5.36
4	10	10.65	9.77	9.34
5	20	21.26	22.02	23.81
6	50	42.82	68.38	53.10

4 小 结

本方法中采用的包被二抗对第一抗体 IgG 而言其结合位点是完全过量的,排除了包被二抗不均一对检测结果的影响,提高了方法的精密度。并且包被二抗法使得竞争抗原之间的竞争反应均在液相中进行,避免了由于固液反应和液液反应的反应速率不同所造成的反应曲线的改变。本方法测定范围为 1~50 mg/L,可以直接

检测大鼠尿液中白蛋白的含量,减少了测量中烦琐的稀释工作,从而降低系统误差。

参考文献:

[1] PRESSLER BM, VADEN SL, JENSEN WA, et al. Detection of canine microalbuminuria using semiquantitative test strips designed for use with human urine[J]. Vet Clin Pathol, 2002, 31(2): 56-60.

[2] 何诚. 实验动物学[M]. 北京:中国农业大学出版社,2006:76-77.

[3] 王力,潘长玉,兆坚,等. 大鼠尿白蛋白放免测定方法的建立及血管紧张素转换酶抑制剂对其排泄率的影响[J]. 中华内分泌代谢杂志, 1999, 15(3): 164-167.

[4] 王廷华,李官成, Xin-Fu Zhou. 抗体理论与技术[M]. 北京:科技出版社,2005: 80.

[5] 郭春祥,郭锡琼. 介绍一种简单、快速的辣根过氧化物酶标记抗体的过碘酸钠法[J]. 免疫学杂志, 2003,33:97-100.

[6] 马泓冰,孙中文,徐颖,等. 两步串联层析法纯化鼠抗人 CD28 单克隆抗体 2F5[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2007,23(2):152-154.

《同位素》第三届编委会成员

- | | | | | | | | |
|-------|-----|--------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| 顾 问 | 王方定 | 王世真 | 刘元方 | 刘伯里 | 陈子元 | 吴季兰 | 张青莲 |
| | 张家骅 | 傅依备 | 樊明武 | | | | |
| 主 编 | 贺佑丰 | | | | | | |
| 副 主 编 | 党淑琴 | 蔡善钰 | | | | | |
| 常务编委 | 王荣福 | 王翌善 | 田嘉禾 | 严叔衡 | 陈殿华 | 金小海 | 张锦荣 |
| | 杨树录 | 罗志福 | 罗顺忠 | | | | |
| 编 委 | 丁小平 | 于俊峰 | 马永健 | 王 刚 | 王旭辉 | 王国保 | 王学斌 |
| | 王祥云 | 方 平 | 匡安仁 | 吕建华 | 朱 霖 | 刘一兵 | 刘 宁 |
| | 刘雨人 | 刘国平 | 安继刚 | 孙树正 | 杜 进 | 李大康 | 李元敏 |
| | 李文新 | 李茂良 | 杨俊诚 | 杨维凡 | 吴文凯 | 陈 凌 | 陈绍亮 |
| | 何作祥 | 汪幼梅 | 汪勇先 | 张培信 | 张锦明 | 范 我 | 赵洪斌 |
| | 赵培华 | 林琼芳 | 林祥通 | 胡 骥 | 哈鸿飞 | 钟建国 | 侯朝勤 |
| | 姚历农 | 祝 勇 | 柴之芳 | 徐长林 | 唐志刚 | 韩世泉 | 程和森 |
| | 蔡明刚 | 廖建民 (以上各项均以姓氏笔画为序) | | | | | |