

Tamm-Horsfall 糖蛋白 放免分析测定盒的研制*

韩世泉 周 棱 刘一兵

(中国原子能科学研究院, 北京 102413)

采用氯化钠沉淀及 SephadexG-100 层析方法, 从正常人尿中提纯了 Tamm-Horsfall 糖蛋白(THP)。用提纯的 THP 免疫家兔制备了 THP 抗血清, 抗体工作液滴度 1:20 000 至 1:40 000, 亲和常数 $0.99 \times 10^{11} \text{ mol}^{-1}$, 与人 IgG、白蛋白和 IgG 交叉反应分别小于 0.02%, 0.0001% 和 0.0004%。并采用双抗加 PEG 的方法制备了 THP 放免分析测定盒, 对人血清和尿中 THP 进行测定。测定范围 50—2000 ng/ml, 批内及批间变异系数分别为 (1.6—2.9)% ($n=6$) 和 (2.3—4.2)% ($n=6$), 回收率 (96.2—103.9)%, 正常人血清 THP 为 $(123.3 \pm 21.9) \text{ ng/ml}$ ($n=14$), 24 小时尿 THP 排泄量为 $(29.0 - 43.9) \text{ mg}$ ($n=3$)。

关键词 Tamm-Horsfall 糖蛋白, 放免测定盒, 肾功能。

一、前 言

Tamm-Horsfall 糖蛋白(THP)是肾脏髓袢开支厚壁段与远曲小管分泌的一种蛋白质, 1950 年由 Tamm 和 Horsfall 发现并从尿中提纯^[1,2], THP 是肾脏特异性蛋白, 体内的 THP 主要来源于肾脏。THP 对髓袢开支厚壁段和远曲小管的离子主动起转运功能, 维持肾髓质的渗透压梯度起重要作用^[3,4]。正常时尿中 THP 排出较为恒定, 但当肾脏受到各种原因损害时尿中 THP 的排出可发生显著变化, 如范可尼综合症和镉中毒人尿 THP 的排出量可增加^[3], 二铬酸钾中毒和肾移植排异反应引起的急性肾小管损伤, 尿中的 THP 排出可暂时性增高^[3]。慢性肾小球肾炎、肾病综合症、慢性肾盂肾炎、狼疮性肾炎和糖尿病肾病以及尿毒症病人尿中 THP 的排出量明显低于正常人^[5]。

我们采用自己提出的 THP 免疫家兔, 制备了 THP 抗体, 并以此制备了 THP 放免分析测定盒, 对人血清和尿中 THP 进行测定。

二、材料和制备方法

(1) **材料** SephadexG-100, 人血清白蛋白为 Pharmacia 产品; SDS, 浙江黄岩生化试剂厂

* 中国原子能科学研究院青年科学基金项目。

产品；人 IgG、 β_2 -mG 为本实验室提纯。人 IgG、白蛋白和 β_2 -mG 放免测定盒均为中国原子能科学研究院生产。

(2) **THP 的提纯** ①盐析^[6]：取正常人尿，加固体 NaCl 使之最终浓度达到 0.58 mol/l 进行第一次沉淀。然后将沉淀用蒸馏水溶解，加入 2.9 mol/l 的 NaCl 溶液，最终浓度为 0.58 mol/l，这样再重复沉淀二次，最后沉淀用水溶解，得到 THP 粗品。②柱层析：Sephadex G-100 处理后装柱(1.6 cm × 80 cm)，0.065 mol/l THP 磷酸缓冲液(含 0.002 5% SDS)平衡。20 mg/4 ml THP 粗品用 50 μ l 10% SDS 解聚后上柱，部分收集器收集，15 min 收集一管，每管 4 ml。

(3) **THP 纯度鉴定** 采用放免分析的方法测定提纯后 THP 中 β_2 -mG、白蛋白和 IgG 含量。

(4) **抗血清的制备** 采用背部皮内多点注射免疫方法，首次剂量为 400 μ g/只，使用完全佐剂，以后每月加强免疫一次，剂量减半，使用不完全佐剂。经过 4 次加强免疫注射，获得了较高滴度抗体。动物经颈动脉放血，分离血清，分装后 -50 $^{\circ}$ C 存放。

(5) **THP 的标记** 氯胺 T 方法标记，使用 Sephadex G-100 柱层析分离，所得标记物稀释分装，4 $^{\circ}$ C 存放，分析时直接使用。

(6) **标准品配制** 将 THP 用 SDS 解聚，用 0.2% 明胶，0.05 mol/l 磷酸缓冲液(pH7.4) 配制成 20、100、200、500、1 000、2 000 ng/ml 六个标准品，4 $^{\circ}$ C 存放备用。

(7) **非特异(NSB) 的配制** 0.05 mol/l 磷酸缓冲液，含 0.2% BSA，0.2% NaN_3 和 2% 的兔血清。

(8) **测定盒的组成** 由 6 个标准品、NSB、THP 抗体、 ^{125}I -THP、第二抗体、高浓度缓冲液和 PEG 组成。除 THP 抗体和第二抗体外，其它均为液体。

(9) **操作方法** 试剂配制及加样步骤按说明书^[7]操作。尿样用蒸馏水按 1:51 倍稀释，血清样品不需稀释。加标准品或样品 100 μ l，标记物 100 μ l，抗体 200 μ l。加样后摇匀置 37 $^{\circ}$ C 温育 3 h，取出后加二抗摇匀，室温放置 15 min，加 PEG 摇匀，3 500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min，弃上清，测沉淀放射性计数。

(10) **THP 标准品稳定性测定** 在紫外分光光度计上测定提纯的 THP 含量，用 0.065 mol/l 磷酸缓冲液(内含 0.2% BSA，0.1% NaN_3) 稀释成 50—2 000 ng/ml 的 6 个标准，然后分装冻干。以冻干品为标准，测定在 4 $^{\circ}$ C 和 37 $^{\circ}$ C 条件下用明胶等配制的液体样品的稳定性。每次测定前冻干标准品用水复原体积。

三、结 果

(1) **THP 纯度鉴定** 采用放免分析的方法测定提纯后 THP 中 β_2 -mG、白蛋白和 IgG，实验结果说明提纯后的 THP 几乎不含有这三种蛋白。

(2) **抗体的性能** 抗体工作液滴度 1:20 000 至 1:40 000，亲和常数为 $0.99 \times 10^{10} \cdot \text{mol}^{-1}$ ，与人 β_2 -mG，白蛋白和 IgG 的交叉反应分别小于 0.02%，0.000 1% 和 0.000 4%。

(3) **反应时间的选择** 分别选择 15 min，30 min，1 h，2 h，3 h，4 h 和 6 h 温育，观察 S_0 ， S_{50} 和 S_{2000} 的结合率变化(结果如图 1 所示)。反应到 3 h，各点的结合率基本上达到平衡。

(C)1994 China Academic Electronic Journal Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

坐标作图,即得 THP 标准抑制曲线(见图 2),根据样品的 $B/B_0\%$ logit 值,可以从曲线上查得样品的 THP 浓度,或通过曲线回归,计算出样品值。尿样应乘以稀释倍数。图 2 为 8 次标准曲线的平均值, $S_0 = (78.2 \pm 1.1)\%$, $r = -0.999\ 93$, $A = 5.497$, $B = -2.389$ 。

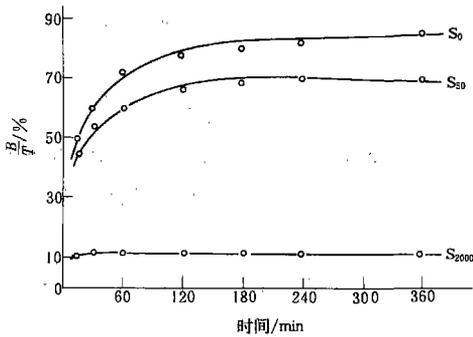


图 1 结合率随 THP 反应时间的变化

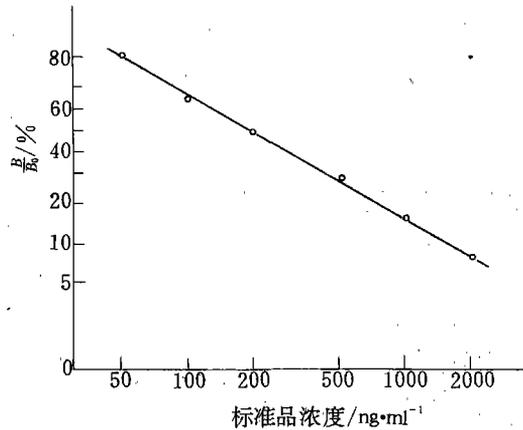


图 2 THP log-logit 标准曲线

(5) **方法学鉴定** 本测定盒的灵敏度小于 20 ng/ml,回收率(96.2~103.9)% 批内及批间变异系数分别为(1.6~2.9)% ($n=6$) 和(2.3~4.2)% ($n=6$),NSB=(4.6±2.9)%。

(6) **尿样稀释试验** 将高 THP 含量以及低 THP 含量的两个尿样分别以 1:5, 1:10, 1:20, 1:40 和 1:80 倍稀释(注意用蒸馏水稀释),分别测定稀释后样品中 THP 的含量,以观察稀释对测定值的影响。结果是高 THP 含量尿样稀释倍数少时,其测定结果偏低(见表 1)。

表 1 尿样不同稀释倍数的测定结果

尿样稀释倍数	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80
样 ₁ 测得量/ng·ml ⁻¹	1095	547	279	150	—
样 ₁ THP含量/μg·ml ⁻¹	5.5	5.4	5.6	6.0	—
样 ₂ 测得量/ng·ml ⁻¹	2761	1657	861	437	200
样 ₂ THP含量/μg·ml ⁻¹	13.8	16.7	17.2	17.5	16.0

(7) **标记物、一抗、二抗稳定性试验** 将液体状态标记物、一抗和二抗分别放入 4℃ 和 37℃。共放置 6 周,除标记物 37℃ 放置 6 周后略有下降外,其它均未见明显变化。

(8) **THP 标准稳定性试验** ①用牛血清白蛋白与用明胶配制的标准稳定性比较:表 2 比较两种不同保护蛋白配制的标准品在 4℃ 和 37℃ 液体状态下的稳定性,结果表明用明胶配制的标准较牛血清白蛋白(BSA)配制的标准稳定性好,尤其是高浓度点。②不同程度解聚 THP 配制的标准品稳定性:将 THP 加入不同量的 SDS,使其不同程度的解聚,然后用其配制标准(保护蛋白为明胶),以观察标准品的稳定性。实验中配制了四种不同程度解聚的标准品:A, B, C, D,其中 A 标准品的解聚程度大于 B>C>D。而每一种标准又配制成高、中、低三个浓度点

(一般浓度为 100.500 和 1 000 ng/ml(左右),分别放置 4 C 和 37 C 条件下,每周测定一次,第二天再重复测定一次。共进行了 6 周的实验。随着放置时间的延续,结果显示:A 标准品略有下降,B 标准品略有上升。而 C 和 D 标准品上升较多,37 C 下特别明显。最后我们取 A 和 B 解聚程度的中值,用来配制标准品。

(9)正常值 测定 14 例正常人血清 THP 值为(123.3±21.9) ng/ml($\bar{X}\pm SD$),测定 3 例正常人 24 小时尿排泄量为 29.0 至 43.9 mg。

表 2 明胶与 BSA 配制标准稳定性比较

天数		0	3	7	14	21
0.1% 明胶	4 C	82.8	81.9	86.6	75.3	78.7
	含量/ng·ml ⁻¹	478.4	512.2	471.8	484.5	479.7
	37 C	82.8	73.0	79.4	78.8	71.7
	含量/ng·ml ⁻¹	478.4	462.0	441.7	495.8	497.3
1% BSA	4 C	67.0	74.9	70.5	66.0	63.4
	含量/ng·ml ⁻¹	462.9	411.9	379.1	375.1	389.0
	37 C	67.0	69.6	74.3	65.7	60.8
	含量/ng·ml ⁻¹	462.9	384.6	352.1	359.8	333.6

四、讨 论

THP 每个分子中含有 50 个半胱氨酸残基,在溶液中分子之间极容易聚集。 $[H^+]$, $CaCl_2$, $NaCl$ 及白蛋白等都会增加 THP 的粘度,从而引起凝聚形成聚合的 THP,尤其当 THP 含量高时更为明显,这样可造成放免分析中 NSB 升高,而标准品下降的情况。我们采用 SDS 解聚的方法,每瓶标记物中加入适量的 SDS,用来抑制标记物的聚合,从而降低了 NSB。但对于标准品而言,采用 SDS 抑制的方法不能大奏效,本文通过试验,选择明胶作为标准品的保护蛋白,并结合以一定程度解聚的 THP 配制 THP 标准品,使之配制的标准品液态下 37 C 放置 6 周,其测定仍无显著变化。

文献[8]介绍尿中大部分 THP 是聚合状态的,用水大于 20 倍稀释可使尿中 THP 基本解聚,这样测定的结果更接近真实值。在我们实验中证明,使用蒸馏水稀释尿样最好,其它如生理盐水,缓冲液,甚至有些去离子水的效果都不理想。特别对于 THP 含量较高的尿样,使用缓冲液稀释测定的结果比使用蒸馏水稀释测定的结果要低 6—7 倍以上。

参 考 文 献

- [1] Tamm, I. & Horsfall, F. L., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **74**, 108 (1950).
- [2] Tamm, I. & Horsfall, F. L., *J. Exp. Med.*, **95**, 71 (1952).
- [3] Hoyer, J. R. et al., *Kidney Int.*, **16**, 277 (1979).
- [4] Wirdnam, P. K. and Milner, RDG., *Neptron*, **40**, 362 (1985).

- [6] 朱菊红等,生物化学与生物物理学报,20(2),105(1988)。
[7] 中国原子能科学研究院,THP 放免测定盒说明书。
[8] Dawney, A. et al. *Biochem. J.*, 206, 461(1982).

[编辑部收到日期:1991年7月10日]

A RADIOIMMUNOASSAY KIT FOR TAMM-HORSFALL GLYCOPROTEIN

Han Shiquan Zhou Ling and Liu Yibing

(*Institute of Atomic Energy, P. O. Box 275, Beijing 102413*)

ABSTRACT

Tamm-Horsfall glycoprotein (THP) was prepared and purified from urine by salt precipitation and chromatography on Sephadex G-100. An antiserum was raised by immunizing rabbits. The antiserum had a working titer of 1 : 20 000 to 1 : 40 000 and the affinity constant was $0.99 \times 10^{10} \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1}$. The cross reaction with β_2 -MG, HSA and IgG was lower than 0.02%, 0.0001% and 0.0004% respectively. A RIA kit was developed for determination of THP in human serum and urine. The standard range was 50—200 ng/ml and recoveries varied from 96.2% to 103.9%. Intra- and Inter-assay coefficient of variation were (1.6—2.9)% and (2.3—4.2)% respectively. The normal range of THP was $123.3 \pm 21.9 \text{ ng/ml}$ ($\bar{X} \pm \text{SD}$, $n=14$) in serum, and (29.0—43.9) mg/24 h ($n=3$) in urine.

Key words Tamm-Horsfall glycoprotein, RIA kit, renal function.