维普资讯 http://www.cqvip.com

136~138

Tamm-Horsfall糖蛋白ABC-ELISA测定法的建立

实验诊断教研室 朱光恒 陈宏础 康格非

R446.6

提 要 人尿Tamm-Horsfall糖蛋白(THP)经盐析、Sephadex G-100层析获得SDS-PAGE均一的蛋白质纯品。后者与福氏完全佐剂充分混合免疫家兔得到抗THP抗体。将纯化了的该抗体与生物素连结，建立了生物素-抗生素系统的ELISA(ABC-ELISA)测定法。该法最低检测限为2ng，回收率97%，变异系数4.7%。测定51名正常人血清中THP水平为226.94±145.90ng/ml。并测定了50名各类肾脏病人血中的THP值。

关键词 Tamm-Horsfall糖蛋白；粘蛋白；酶联免疫；免疫分析
中图分类号 R446·1

Tamm-Horsfall糖蛋白(THP)是由肾脏Henle's袢升支粗段及远曲小管上皮细胞合成并分泌，分子量约7×10^6Dalt，由一些约8×10^4的亚单位通过非共价健连接组成[1]。THP具有可逆性聚集作用，在电解质浓度增加，PH值下降以及本身浓度增加时，可使其分子发生聚集，粘性增加且易形成凝胶，它是透明管形的主要成份。THP分泌的改变，在肾结石病人，可能是产生结石的因素。

目前，国外已开展了很多THP理化性质及其含量测定工作，国内也开始有报道。本人试图从正常尿中提取THP，纯化后免疫家兔，得到的抗体与生物素结合，建立较为敏感能测定血清THP的ABC-ELISA法。

方法与结果

1. THP的提取、纯化及鉴定

取人体新鲜尿液4000ml，加入固体Nacl使其最终浓度达0.58mol/L，置冰箱4℃过夜，离心，5000r/-min，30分钟，用0.58mol/L NaCl溶液洗三次沉淀，加蒸馏水，重复盐析二次。用蒸馏水溶解后，置蒸馏水中充分透析，冻干得THP粗品。

将SephadexG-100用水预处理后装柱，用65mmol/L PBS(pH7.4，含1g/L SDS)平衡，称THP粗品10mg加入25μl100g/LSDS溶液及2mlPBS使其溶解，上柱，流速每10分钟2ml，收集第一峰，用蒸馏水充分透析，冻干得THP纯品。

将该纯品THP作SDS-PAGE，为单一区带，保证了其纯度的可靠性。该蛋白与标准抗THP抗体作琼脂双扩，得到单一清晰的沉淀线，证明该蛋白为THP。

2. 抗THP抗体的制备

将THP溶于生理盐水，再与等量福氏完全佐剂充分混合，免疫家兔，待效价1∶32时，取血，用硫酸铵沉淀法及DEAE-52柱层析，冻干得IgG纯品。该IgG作SDS-PAGE为单一区带。将该IgG分别与

维普资讯 http://www.cqvip.com

THP、人血清白蛋白及牛血清白蛋白作琼脂双扩，只与THP出现清晰、单一沉淀线，证明该抗THP抗体的特异性。

3. 生物素-抗THP抗体(B-IgG)制备

将1mgIgG(抗THP抗体) 溶于0.1mol/L $NaHCO_3$溶液1ml中，迅速与0.2ml含生物素的重蒸N.N-二甲基甲酰胺(1mg/ml)溶液混合，置室温4小时，于0.01mol/L PBS(pH7.2)中充分透析，加等量甘油，-20℃保存。

4. ABC-ELISA法

按常规ABC-ELISA法操作。

5. 测定结果

(1) THP标准曲线的线性范围为20～400ng/ml。回归方程$y=3.57\times10^{-3}+2.10\times10^{-3}\times x$ 相关系数r=0.9979.

(2) THP ABC-ELISA质量指标:

① 特异性:用抗THP抗体与THP、牛血清白蛋白、人血清白蛋白同时作琼脂双扩，只与THP出现沉淀线，而后两者均无。

② 重复性、精确度:CV为4.7%，最低检测限为2ng。

③ 准确度:于已知THP含量的血清中分别加入不同量的THP，其平均回收率为97%。

表1 各种肾脏疾病血THP与正常比较表

病 名	例数	x(ng/ml)±s
慢性肾衰	3	15.67±13.65
肾囊肿	10	83.3±47.97
慢性肾炎	10	92.6±46.22
肾盂肾炎	4	88.75±28.49
肾结石	19	129.32±94.91
肾病综合征	2	77.5±10.6
高血压肾病	2	51±15.56
正 常	51	226.94±74.44

④ 干扰试验:在已知THP含量的黄疸血清和溶血血清中分别加入不同量的THP，其平均回收率分别为95.5%和100.25%。

(3) 标本测定:测定51名正常人，其血清THP含量参考值范围为226.94±145.90ng/ml(x±1.96S)，测定60名肾病患者，结果见表1。

讨 论

用盐折及Sephadex G-100层析后所得THP经SDS-PAGE证实为单一区带，该蛋白与标准抗THP抗体作琼脂双扩，出现单一清晰沉淀线，说明该抗原为THP。自制抗THP抗体不与其它蛋白发生免疫沉淀反应，证明了该抗原抗体的特异性。

本法CV为4.7%，平均回收率为97%，最低检测限为2ng，足以检测血清中THP含量。黄疸及溶血对本试验无明显影响。

血尿THP含量测定方法的建立，国内有不少学者进行了探讨。上海第二医科大学朱菊红等[2]建立了血尿THP的放免测定法，南京军区总医院刘力勇等[3]建立了尿中THP的ELISA。但前者有放射性污染，操作较复杂，仪器昂贵，不利于临床THP测定的推广。后者灵敏度较低，尚不能检测出血中THP含量。本法具有无放射性污染，操作简便易行，不需昂贵仪器等优点，最低检测限已足以测定血清THP含量，对于THP的临床测定及其研究，提供了一个简单可行的方法。

本法所测51例正常人群，血清THP226.94±145.90ng/ml。与Peath[4]Hunt[5]等报告一致(见表2)。

表2 各种实验方法所测血清THP正常值

实验者姓名	例 数	方 法	正常参考范围
Hartmann, L[6]	34	放免	158±76ng/ml
Peath, RJ[4]	196	单抗ELISA	263±144ng/ml
Hunt, JS[5]	195	单抗ELISA	260±105ng/ml
Jeffrey, K[8]	92	免疫化学	190±111ng/ml
朱菊红[2]	51	放免	69.4～480.2ng/ml
本 文(x±1.96s)	51	ABC-ELISA	226.94±145.90ng/ml

维普资讯 http://www.cqvip.com

本文初步观察了50例肾脏病人，血清THP明显低于正常参考范围，以慢性肾衰、肾囊肿、肾盂肾炎为显著。肾结石患者血清THP亦有显著性下降。Alfaham[6]等人研究一组儿童肾脏病例，亦发现慢性肾衰、肾小球肾炎患者血中THP较正常明显降低。本文结果也与上海第二医科大学张德星等[7]研究相符。

至于血尿THP浓度变化对肾脏疾病的确切价值，应继续观察和总结。

（感谢上海第二医科大学朱菊红教师惠赠抗THP抗体参考品。）

参 考 文 献

1. Tamm, I. &Horsfall. FL. Pro. Soci. Exp. Bio. Med., 1950;74:108
2. 朱菊红，等．生物化学与生物物理学报 1988;20(2):105
3. 刘力勇，等．临床检验杂志1990;8(1):35
4. Peath, RJ. et al. Kidney Int., 1985;28:865
5. Hunt, J S. et al, J. Immunol. Meth, 1986;91:35
6. Alfaham, M. et al. Nephron, 1989;52:216
7. 张德星，等．中华肾脏病杂志1989;5(2):80
8. Hartmann, L. et al. Clinica. chim. acta, 1983;133:215
9. Jeffrey, K. et al. Clin. Chim. acta, 1988;174:225

（收稿日期 1994-01-20）

ESTABLISHMENT OF AN ABC—ELISA FOR THE DETERMINATION OF THP

Zhu Guangheng, et al
Dept. of Labratory Diagnosis

Tamm—Horsfall glycoprotein (THP) was purified from human urine by repeated salting out fractination and Sephadex G—100 Chromatography. Anti—THP antibodies were produced in rabbits by intramuscular injection of refined THP mixed with Freund's Complete adjuvant. The anti—THP antibodies were labelled with biotin to establish an ABC—ELISA (Avidin—Biotin—peroxidase complex ELISA.) The detection limit of this method. was 2ng. The average recovery was proved to be 97%. Coefficient of variation (CV) was 4.7%, Sera THP concentration of 51 normal blood donors tested with this method was 226.94±145.90ng/ml. 50patients with different renal diseases were investigated.

KEY WORDS Tamm—Horsfall glycoprotein; mucoprotein; ELISA. Immunoassy