

## 尿液水通道蛋白-2双抗体夹心ELISA测定法的建立

近年来的研究证实位于肾脏集合管主细胞的水通道蛋白-2 (AQP2)是机体内0调节水重吸收作用的最关键的靶蛋白,在充血性心力衰竭(CHF)的水滞留中起关键性作用[1][2][3]。由于肾脏AQP2的检测具有创伤性,不易在临床应用,因此探索尿液AQP2蛋白的检测方法及其意义也就成为当前的研究热点[4][5][6][7][8]。目前尿液AQP2蛋白的检测方法主要有两种:一是Western blotting半定量或定量检测法;二是放射免疫定量检测法。我们认为Western blotting半定量检测尿液AQP2浓度的敏感性和特异性较高,比较可靠,但同时也会到,该方法操作复杂且存在不能进行大规模定量对比检查的缺点,因此在临床普及开展尿液AQP2蛋白的检测之前,建立更简便准确的尿液AQP2定量检测方法成为当务之急。酶联免疫吸附测定(ELISA)法具有既无放射性污染又不需昂贵的测试仪器,且操作方便、便于基层推广等优点。为此,本实验尝试建立尿液AQP2的双抗体夹心ELISA测定法,并用双抗体夹心ELISA法定量测定了冠状动脉结扎大鼠模型不同时期及不同梗死面积时尿液AQP2的变化;观察了该法与Western blotting半定量测定心肌梗死致CHF大鼠模型尿液AQP2水平的关系。

### 1 材料和方法

#### 1.1 实验动物及分组

雄性SD大鼠,200~250 g,采用左冠状动脉结扎致慢性心力衰竭大鼠模型[1][2]。术后第4周和第6周,将大鼠置于代谢笼,待适应3 d后,收集大鼠24 h尿液并记录尿量。然后处死大鼠,收集血液,摘取肾脏,分离、保存肾内髓质。摘取心脏后,按解剖学大体估算法计算大鼠左心室梗死面积(LVMI), $LVMI \geq 20\%$ 的大鼠选入CHF大鼠模型组, $LVMI < 20\%$ 选入心肌梗死心功能代偿组[2]。假手术对照组仅打开心包腔而未行冠状动脉结扎。血清钠的测定采用美国Beckman仪器。尿渗量采用冰点抑制法(美国Advanced Instruments公司)。肾脏内髓质组织总蛋白的提取应用细胞裂解液(50 mmol/L  $\beta$ -glycerophosphate, 100 mmol/L  $Na_3VO_4$ , 2 mmol/L  $MgCl_2$ , 1 mmol/L EGTA, 0.5% Triton-X100, 1 mmol/L DTT)方法,裂解液中含有蛋白酶抑制剂(20 mmol/L Pepstatin, 20 mmol/L Leupepin, 100 U/ml Aprotinin, 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟(PMSF))。蛋白浓度的测定应用考马斯亮蓝法(Bio-rad公司)。主要试剂除标明者外,均购自Sigma公司。

#### 1.2 尿液样本的预处理

将SD大鼠放入大鼠代谢笼,收集24 h的尿液,每只动物约3.8~15.0 ml。收集的尿液以2 000 r/min低温离心5~10 min,取上清液作为原倍尿样分装成两份,其中一份转入Milliporecentriplus-10超滤管,再以2 000 r/min低温离心75 min,使原尿浓缩至1 ml以下,并记录尿液浓缩倍数,然后用细胞裂解液(同上)将尿液浓缩倍数调整至浓缩4倍的比例。原倍尿样、浓缩尿样均置-20 °C保存。

#### 1.3 Western blotting

用合成的AQP2蛋白C-末端的CELHSPQ SLPRGSKA多肽片段(美国Genemed Biotechnologies公司)制备兔抗AQP2多克隆抗体,效价为1:100 000[1]。取浓缩尿液10  $\mu$ l进行变性SDS/12.5% polyacrylamide 胶电泳,然后电转移于PVDF膜(Millipore公司)上,应用TBS-T(pH 7.5)缓冲液(20 mmol/L Tris-base, 137 mmol/L NaCl, 0.1% Tween-20)配制5%无脂牛奶封闭PVDF膜,4 °C孵育过夜, TBS-T缓冲液漂洗。PVDF膜在室温下与AQP2多克隆抗体(1:500)温育90 min,再与驴抗兔IgG二抗(1:1 000, Amersham公司)温育1 h。每次温育之间均用TBS-T缓冲液漂洗3次,每次10 min,然后采用ECL (Amersham公司)方法显影。预先显色的蛋白质标记物(Gibco公司)用以显示蛋白质的相对分子质量。用5  $\mu$ g肾脏内髓质总蛋白电泳以确定AQP2蛋白的位置并作为阳性对照。用图像分析仪测定杂交信号的吸光度(杂交带面积乘以密度表示)。

#### 1.4 尿液AQP2双抗体夹心ELISA测定法

1.4.1 饱和硫酸铵分段盐析兔抗AQP2多克隆抗体 兔抗AQP2多克隆抗体血清2 ml,加生理盐水2 ml,搅匀,4 °C予冷。加入4 ml予冷的饱和硫酸铵(饱和度50%),于搅拌下逐滴加入,4 °C过夜,3 000 r/min离心30 min,弃上清。以0.01 mol/L PBS(pH 7.4)液溶解至2 ml,再逐滴加入饱和硫酸铵1 ml(此时饱和硫酸铵饱和度为33%),4 °C放置2 h以上,3 000 r/min离心30 min,弃上清。重复该步骤1~2遍。将沉淀物溶于0.01 mol/L PBS(pH7.4)2 ml中,装透析袋透析过夜,中间换透析液2~3次,直至奈氏试剂测定无 $NH_4^+$ 。4 °C保存。

#### 1.4.2 DEAE-纤维素吸附提取抗AQP2抗体IgG

1.4.2.1 预处理 10 g DE-52 以蒸馏水浸泡过夜,漂洗数次,在布氏滤斗中经2层滤纸抽滤沥干,用0.5 mol/L NaOH处理1次,最后用0.01 mol/L(pH7.4)PBS反复浸泡平衡。装柱:将玻璃管(直径2.5 cm,长20 cm)垂直固定于支架,下端细塑料管不夹死,将平衡好的DE-52慢慢倒入,液体从下端流出,纤维素逐渐沉积柱内。注意避免气泡、分层及干裂。PBS(pH 7.4)平衡过夜。

1.4.2.2 加样 在层析柱顶部尚存少量PBS时,将盐析法纯化后的兔抗AQP2多克隆抗体加入柱内,并从下口缓慢放液,待样品全部进入柱内,夹死出口,静置30 min。

1.4.2.3 洗脱 以同法加PBS洗脱,保持下端出口流速30~40滴/min,边分管收集,边用层析仪测蛋白,记录峰值,第一峰为IgG。

1.4.2.4 浓缩 合并含IgG洗脱液,装入透析袋内,用高分子量聚乙二醇包埋浓缩。

1.4.2.5 测IgG浓度 收集1.6 ml浓缩IgG在280 nm处测 D(λ),依紫外线吸收公式计算IgG浓度。4 °C冰箱保存。

1.4.3 酶标记抗AQP2多克隆抗体 由北京成文免疫化学研究室采用过碘酸钠氧化法将辣根过氧化物酶标记在抗体IgG上,并计算酶标记抗体的酶浓度和IgG浓度。

1.4.4 双抗体夹心ELISA法的建立和工作浓度的确定 采用方阵滴定法确定包被抗体的工作浓度,样品抗原为AQP2蛋白C-末端的CELHSPQSLPRGSKA多肽片段-BSA。每孔加入用包被液等倍稀释成不同浓度(1~8 μg/ml)的纯化抗体100 μl,4 °C过夜,PBS-Tween洗涤3次,每次3~5 min;每孔加1% BSA-PBST 200 μl,37 °C下封闭1 h,洗涤;每孔加入用0.25% BSA-PBST稀释的样品抗原100 μl(8 μg/ml,即5 mmol/ml)。对照孔加0.25% BSA-PBST稀释液,37 °C下孵育1 h,洗涤;每孔加入用0.25% BSA-PBST作系列稀释的酶标抗体(稀释度为1:5 000至1:3 000)100 μl,37 °C下孵育1 h,洗涤,每孔加临时配制的四甲基联苯胺(TMB)底物缓冲液100 μl,37 °C下15 min;每孔加2 mol/L的H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50 μl终止反应。在酶标仪上测450 nm处D(λ)值,对照孔调零。根据方阵滴定结果,选定包被抗体及酶标抗体的最适工作浓度后,以同法检测不同状态的尿样(浓缩尿、原倍尿样、稀释成1/2、1/4、1/8倍的尿),并确定尿样的最适检测状态,正式检测CHF大鼠尿样。

### 1.5 统计分析

用SPSS 10.0软件进行统计学分析,采用方差分析及LSD检验。

## 2 结果

### 2.1 尿液AQP2蛋白双抗体夹心ELISA法的建立

2.1.1 最适工作浓度 取空白对照的D(λ)值<0.2,标准抗原的D(λ)值接近1.0的最大稀释度为最适工作浓度。方阵滴定结果显示,酶标抗体最适稀释度为1:500,包被抗体最适浓度为2 μg/ml(表1)。在此工作浓度下检测浓缩尿、原倍尿及稀释1/2、1/4、1/8的尿样,发现多数原倍尿样的D(λ)值都落在标准曲线之内,故选用原倍尿样检测尿液AQP2。仅当某些原倍尿样的D(λ)值落在标准曲线之外时,改用浓缩尿或 稀释尿样检测。

表1 尿液 AQP2 蛋白 ELISA 测定法的方阵滴定结果

Tab.1 ELISA for urinary aquaporin-2 water channel protein measurement

Antibody concentration (μg/ml)	Dilution of anti-AQP2 antibody labeled with horseradish peroxidase									
	1:500		1:1 000		1:1 500		1:2 000		1:3 000	
8	0.000	0.999	0.115	0.983	0.101	0.764	0.060	0.701	0.035	0.680
	0.124	0.991	0.077	0.898	0.011	0.766	0.070	0.710	0.033	0.651
4	0.060	0.987	0.066	0.793	0.034	0.753	0.033	0.704	0.005	0.671
	0.028	0.964	0.079	0.793	0.045	0.755	0.034	0.697	0.003	0.644
2	0.021	0.981	0.076	0.774	0.025	0.714	0.002	0.699	0.002	0.556
	0.041	0.972	0.045	0.790	0.031	0.710	0.003	0.689	0.001	0.541
1	0.031	0.764	0.051	0.711	0.030	0.696	0.000	0.696	0.004	0.455
	0.040	0.777	0.032	0.708	0.021	0.699	0.008	0.686	0.012	0.521

The first row was blank control and the second row was standard antigen of aquaporin-2 water channel protein of various dilution against anti-AQP2 antibody labeled with horseradish peroxidase

2.1.2 标准曲线 500 pmol/ml的标准抗原10 μl,加490 μl稀释成1 000 pmol/ml,然后等倍稀释成15.625~1 000 pmol/ml,用双抗体夹心ELISA检测5次,取其D(λ)值的均值绘制标准曲线。发现在15.625~1 000 pmol/ml区间抗原浓度的对数值与D(λ)值成线性相关:lnN=0.9923+5.9393 D(λ),r=0.964。1 000 pmol/ml以下的D(λ)值接近空白对照孔,检测灵敏度为15.625 pmol/ml。根据尿样的D(λ)值,查标准曲线得相应的AQP2浓度(表2)。

表2 尿液 AQP2 蛋白 ELISA 测定法的标准曲线

Tab.2 Standard curve of measurement of urinary aquaporin-2 water channel protein by ELISA

Antibody(pmol/ml)	1 000	500	250	125	62.5	31.25	15.65
D(λ)value	0.900	0.824	0.681	0.573	0.490	0.408	0.270

2.1.3 变异系数 取尿样1份, 同批检测4孔, 其D( $\lambda$ )值分别为0.656、0.687、0.616、0.672,  $X=0.65775$ , 批内差异为4.65%; 同一标本连续检测5 d, 1次/d, 根据标准曲线计算尿样AQP2蛋白浓度分别为114.87、114.12、140.51、110.03、148.75 pmol/ml,  $X=125.656$ , 批间差异为14.05%, 与尿白蛋白等无交叉反应。

## 2.2 双抗体夹心ELISA法检测CHF模型大鼠尿液AQP2及其与Western blotting测定的相关性

2.2.1 Western blotting检测不同梗死面积CHF模型大鼠的尿AQP2水平 从图1可见在相对分子质量为 29 000、43 000、70 000处有蛋白杂交带。CHF大鼠模型组、心肌梗死心功能代偿组、对照组的D( $\lambda$ )值分别为 $3.656 \pm 1.029$ 、 $1.791 \pm 0.809$ 、 $0.985 \pm 0.476$ 。CHF大鼠模型组尿AQP2水平明显高于心肌梗死心功能代偿组和对照组( $P < 0.01$ ), 说明心力衰竭加重, 尿AQP2的表达增强。

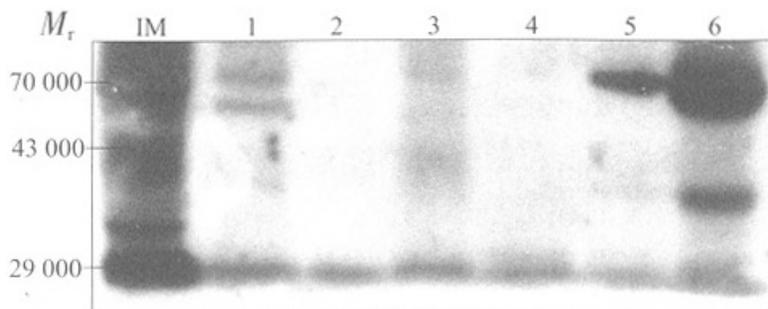


图1 Western blotting检测不同梗死面积充血性心力衰竭模型大鼠的尿AQP2水平

Fig.1 AQP2 concentration in the urine of rats with congestive heart failure determined by Western blotting  
Lane 1, 2: Control; Lane 3, 4: Compensative heart failure (LVMI<20%); Lane 5, 6: Congestive heart failure (LVMI $\geq$ 20%);

IM: Renal inner medulla; LVMI: Left ventricular myocardial infarction

2.2.2 双抗体夹心ELISA法定量检测CHF大鼠尿液AQP2的变化 梗死面积越大、梗死时间越长, 尿液AQP2水平越高。双抗体夹心ELISA法的定量检测结果与Western blotting半定量检测结果一致, 说明双抗体夹心ELISA法测尿液AQP2的结果是可靠的, 特异性高(表3)。

表3 双抗体夹心ELISA法检测心力衰竭大鼠尿液AQP2的变化 (pmol/ml,  $\bar{x} \pm s$ )  
Tab.3 ELISA for measurement of urinary AQP2 water channel protein in rat models of congestive heart failure (pmol/ml, Mean $\pm$ SD)

Group	Time after operation			
	<i>n</i>	The 4th week	<i>n</i>	The 6th week
Congestive heart failure (LVMI $\geq$ 20%)	8	15.80 $\pm$ 5.03**	5	61.70 $\pm$ 2.68*** $\Delta$
Compensative heart failure (LVMI<20%)	6	9.87 $\pm$ 0.61* $\Delta$	7	21.87 $\pm$ 10.15 $\Delta\Delta$
Control	6	7.11 $\pm$ 1.17	10	10.40 $\pm$ 6.02

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control group;  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs congestive heart failure group;  $\Delta^* P < 0.05$  vs the 4th week.

LVMI: Left ventricular myocardial infarction; *n*: Number of rats in each group

## 3 讨论

本研究显示双抗体夹心ELISA法检测尿AQP2的优点是灵敏度高、阴性背景清晰、显色的深浅直接与待测物的含量呈正比、实验结果容易判定, 但用于夹心的抗原必须是二价或二价以上的较大分子蛋白质[9]。已有的研究发现, 由于糖基化等原因, 尿液中AQP2相对分子质量为29 000~190 000不等。在本实验中, 标准抗原为人工合成的AQP2蛋白C-末端的CELHSPQSLPRGSKA多肽片段, 仅15个氨基酸, 相对分子质量(1 610)也较小。我们采用与BSA联接的方法, 既增强了抗原的活性及夹心的可靠性, 又避免了多肽的载体与用多肽-KLH制备的抗AQP2多克隆抗体之间的交叉反应。由于标准抗原和尿液中AQP2相对分子质量不等, 所以我们采用摩尔质量为计算单位, 成功地建立了尿AQP2的双抗体夹心ELISA测定法。结果显示双抗体夹心ELISA法的检测结果与Western blotting检测结果一致, 说明双抗体夹心ELISA法检测尿液AQP2的结果是可靠的。

本法虽然批内差异(4.65%)较小, 但批间差异(14.05%)较大, 灵敏度也有待进一步提高。分析这可能与所用多克隆抗体有关, 虽然所用多克隆抗体效价较高, 且经过纯化, 但毕竟存在多个抗原决定簇。提示在以后的研究中, 在尿液的保存方法上需加以改进, 并尽可能采用两种不同种属动物的单克隆抗体, 以提高其灵敏度和特异性、稳定性。

致谢: 本实验得到第一军医大学免疫教研室陈政良教授、张丽云技师、卢晓技师的指导和帮助, 特此致谢!

参考文献:

- [1] Xu DL, Martin PY, Ohara M, et al. Upregulation of aquaporin-2 water channel expression in chronic heart failure[J]. J Clin Invest, 1997, 99(7): 1500-5.
- [2] 许顶立, 任 昊, Martin PY, 等. 充血性心力衰竭大鼠肾脏Aquaporin2水通道蛋白基因的表达[J]. 中华医学杂志, 1998, 78(2): 118-20.
- Xu DL, Ren H, Martin PY, et al. Renal aquaporin-2 water channel expression in congestive heart failure rat [J]. Natl Med J Chin, 1998, 78(2): 118-20.
- [3] 许顶立, 任 昊. 慢性心力衰竭水滞留机制的研究进展[J]. 第一军医大学学报, 2001, 21(1): 65-7.
- [4] Rai T, Sekine K, Kanno K, et al. Urinary excretion of aquaporin-2 water channel protein in human and rat [J]. J Am Soc Nephrol, 1997, 8(9): 1357-62.
- [5] 邓英姿, 张远慧, 许顶立. 禁水大鼠肾脏与尿液水通道蛋白2表达的改变及意义[J]. 第一军医大学学报, 1999, 19(6): 493-5.
- Deng YZ, Zhang YH, Xu DL. Changes of renal and urine water channel aquaporin 2 expression in dehydrated rats and its significance [J]. J First Mil Med Univ, 1999, 19(6): 493-5.
- [6] 许顶立, 殷晓燕, 邓英姿, 等. 尿液水通道蛋白2的临床检测[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2000, 9(4): 396-8.
- Xu DL, Yin XY, Deng YZ, et al. The measurement of urinary aquaporin-2 water channel protein concentration in patients[J]. Chin J Nephrol Dialy Transplant, 2000, 9(4): 396-8.
- [7] 许顶立, 殷晓燕, 邓英姿, 等. 充血性心力衰竭患者尿液水通道蛋白2的改变[J]. 中华内科杂志, 2000, 39(7): 471-2.
- Xu DL, Yin XY, Deng YZ, et al. Urinary concentration of aquaporin-2 water channel protein in patients with chronic heart failure[J]. Chin J Int Med, 2000, 39(7): 471-2.
- [8] 许顶立, 殷晓燕, 邓英姿, 等. 慢性心力衰竭大鼠模型尿液水通道蛋白2的检测[J]. 中华心血管病杂志, 2000, 28(3): 218-20.
- Xu DL, Yin XY, Deng YZ, et al. Urinary excretion of aquaporin-2 water channel protein in chronic heart failure rats[J]. Chin J Cardiol, 2000, 28(3): 218-20.
- [9] 沈关心, 周汝麟. 现代免疫学实验技术[M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1998. 38-76.

参考文献:

- [1] Xu DL, Martin PY, Ohara M, et al. Upregulation of aquaporin-2 water channel expression in chronic heart failure[J]. J Clin Invest, 1997, 99(7): 1500-5.
- [2] 许顶立, 任 昊, Martin PY, 等. 充血性心力衰竭大鼠肾脏Aquaporin2水通道蛋白基因的表达[J]. 中华医学杂志, 1998, 78(2): 118-20.
- Xu DL, Ren H, Martin PY, et al. Renal aquaporin-2 water channel expression in congestive heart failure rat [J]. Natl Med J Chin, 1998, 78(2): 118-20.
- [3] 许顶立, 任 昊. 慢性心力衰竭水滞留机制的研究进展[J]. 第一军医大学学报, 2001, 21(1): 65-7.
- [4] Rai T, Sekine K, Kanno K, et al. Urinary excretion of aquaporin-2 water channel protein in human and rat [J]. J Am Soc Nephrol, 1997, 8(9): 1357-62.
- [5] 邓英姿, 张远慧, 许顶立. 禁水大鼠肾脏与尿液水通道蛋白2表达的改变及意义[J]. 第一军医大学学报, 1999, 19(6): 493-5.
- Deng YZ, Zhang YH, Xu DL. Changes of renal and urine water channel aquaporin 2 expression in dehydrated rats and its significance [J]. J First Mil Med Univ, 1999, 19(6): 493-5.
- [6] 许顶立, 殷晓燕, 邓英姿, 等. 尿液水通道蛋白2的临床检测[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2000, 9(4): 396-8.
- Xu DL, Yin XY, Deng YZ, et al. The measurement of urinary aquaporin-2 water channel protein concentration in patients[J]. Chin J Nephrol Dialy Transplant, 2000, 9(4): 396-8.
- [7] 许顶立, 殷晓燕, 邓英姿, 等. 充血性心力衰竭患者尿液水通道蛋白2的改变[J]. 中华内科杂志, 2000, 39(7): 471-2.
- Xu DL, Yin XY, Deng YZ, et al. Urinary concentration of aquaporin-2 water channel protein in patients with chronic heart failure[J]. Chin J Int Med, 2000, 39(7): 471-2.
- [8] 许顶立, 殷晓燕, 邓英姿, 等. 慢性心力衰竭大鼠模型尿液水通道蛋白2的检测[J]. 中华心血管病杂志, 2000, 28(3): 218-20.
- Xu DL, Yin XY, Deng YZ, et al. Urinary excretion of aquaporin-2 water channel protein in chronic heart failure rats[J]. Chin J Cardiol, 2000, 28(3): 218-20.
- [9] 沈关心, 周汝麟. 现代免疫学实验技术[M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1998. 38-76.