

尿液水通道蛋白-2双抗体夹心ELISA测定法的建立

卢武生袁顶立袁晓燕袁昊袁素荣渊第一军医大学南方医院心血管内科袁广东广州510515冤

摘要目的 建立较为稳定的定量检测尿液水通道蛋白-2(AQP2)的酶联免疫吸附测定法(LISA)方法。方法 人工合成 AQP2 蛋白 C-末端的 CELHSPQSLPRGSKA 多肽片段并与 KLH 联接制备兔抗 AQP2 多肽片段的单克隆抗体。用辣根过氧化物酶标记部分抗 AQP2 抗体 IgG 建立检测充血性心力衰竭模型大鼠尿液 AQP2 的双抗体夹心 ELISA 法。结果 双抗体夹心 ELISA 法成功建立。灵敏度为 15.625 pmol/ml。批内及批间变异系数分别为 4.65% 和 14.05%。用该法定量检测左冠状动脉结扎术后不同梗死面积充血性心力衰竭模型大鼠的尿 AQP2 浓度。其结果与 Western blotting 半定量检测结果一致。结论 双抗体夹心 ELISA 法可以较好地定量检测充血性心力衰竭模型大鼠的尿 AQP2 蛋白浓度。且较 Western blotting 更加简便易行。易于临床推广使用。

关键词心力衰竭;充血性;水孔蛋白类;酶联免疫吸附测定

中图分类号 R341;R541.61 文献标识码 文章编号 000-2588(2002)06-0486-04

Enzyme-linked immunosorbent assay for urinary aquaporin-2 water channel protein measurement

LU Wu-sheng, XU Ding-li, YIN Xiao-yan, REN Hao, MENG Su-rong

Department of Cardiovascular Diseases, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To develop an efficient and stable enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detecting urinary aquaporin-2 (AQP2) water channel protein. Methods Rat AQP2 C-terminal peptides (CELHSPQSLPRGSKA) were synthesized and linked to KLH to prepare rabbit anti-AQP2 polyclonal antibodies, and IgG of the antibodies were labeled with horseradish peroxidase (HRP). Rat models of congestive heart failure (CHF) was established by ligation of the left coronary artery, in which both direct and sandwich ELISA for urinary AQP2 detection were tested. Results Double antibody sandwich ELISA was able to detect urinary AQP2 as low as 15.625 pmol/ml with intra- and inter-assay coefficients of variance (CVs) of 4.65% and 14.05% respectively. Urinary AQP2 concentration determined by this assay showed significant positive relation to that by Western blot analysis in CHF rats. Conclusion Double antibody sandwich ELISA was successfully established to detect urine AQP2 in CHF rats, which is more efficient and simpler than Western blot analysis.

Key words: heart failure, congestive; aquaporins; enzyme-linked immunosorbent assay

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)的水潴留中起关键性作用。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。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。但同时也体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(LISA)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,易于基层推广等优点。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 00~250g,采用左冠状动脉结扎致慢性心力衰竭大鼠模型。术后第 4 周和第 6 周,将大鼠置于代谢笼,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,滴取肾脏,分离并保存肾内髓质。滴取心脏,按解剖学大体估算

收稿日期 001-10-25

基金项目 广东省自然科学基金 70355 冤

作者简介 卢武生,男,湖北宜昌人,001 年毕业于第一军医大学,主治医师,电话 20-85141501

法计算大鼠左心室梗死面积 VMI 20% 的大鼠选入 CHF 大鼠模型组 VMI < 20% 选入心肌梗死心功能代偿组 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 0mmol/L 甘油 glycerophosphate 0.00 mmol/L Na₃VO₄ 0.1 mmol/L MgCl₂ 0.1 mmol/L EGTA 0.5% Triton-X100 0.5 mmol/L DTT 方法 裂解液中含有蛋白酶抑制剂 0 mmol/L Pepstatin 0 mmol/L Leupepin 0.00 U/ml Aprotinin 0.1 mmol/L 苯甲基磺酰氟 MSF 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 3.8~15.0ml 收集的尿液以 2000r/min 低温离心 5~10min 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 以 2000r/min 低温离心 75min 使原尿浓缩至 1ml 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 益保存

1.3 Western blotting

用合成的 AQP2 蛋白 C- 末端的 CELHSPQSLPRGSKA 多肽片段 美国 GenemedBiotechnologies 公司 制备兔抗 AQP2 多克隆抗体 效价为 1:100000 取浓缩尿液 10 滋 进行变性 SDS/12.5% polyacrylamide 胶电泳 然后电转移于 PVDF 膜 Millipore 公司 应用 TBS-T 缓冲液 0.1 mmol/L Tris-base 137mmol/L NaCl 0.1% Tween-20 配制 5% 无脂牛奶 封闭 PVDF 膜 益 孵育过夜 BS-T 缓冲液漂洗 PVDF 膜 在室温下与 AQP2 多克隆抗体 0.1 益 温育 90min 再与驴抗兔 IgG 二抗 0.1 益 温育 1 h 每次温育之间均用 TBS-T 缓冲液漂洗 3 次 每次 10min 然后采用 ECL 显影 预先显色的蛋白质标记物 ibco 公司 以显示蛋白质的相对分子质量 用 5 滋 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 饱和酸铵分段盐析兔抗 AQP2 多克隆抗体 兔抗 AQP2 多克隆抗体血清 2ml 加生理盐水 2ml 匀 益 予冷加入 4ml 予冷的饱和硫酸铵 饱和度 50% 于搅拌下逐滴加入 益过夜 000r/min 离心

30min 弃上清 以 0.01mol/L PBS 溶解至 2ml 再逐滴加入饱和硫酸铵 1ml 此时饱和硫酸铵终饱和度为 33% 益 放置 2 h 以上 000 r/min 离心 30min 弃上清 重复该步骤 1~2 遍 将沉淀物溶于 0.01mol/L PBS 7.4 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 NH₄⁺ 益 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 10g 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 0.5mol/L NaOH 处理 1 次 最后用 0.01mol/L PBS 反复浸泡平衡 装柱 将玻璃管 直径 2.5cm 长 20cm 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 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 关闭出口 静置 30min

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 高分子量聚乙二醇包埋浓缩

1.4.2.5 测 IgG 浓度 收集 1.6ml 浓缩 IgG 在 280nm 处测 D 按紫外吸收公式计算 IgG 浓度 益 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 滋/ml 的纯化抗体 100 益 过夜 PBS-Tween 洗涤 3 次 每次 3~5 min 每孔加 1% BSA-PBST 200 益 下封闭 1 h 洗涤 每孔加入用 0.25% BSA-PBST 稀释的样品抗原 100 滋 益 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 1:1000 至 1:10000 益 下 孵育 1 h 洗涤 每孔加入临时配制的四甲基联苯胺 MB 底物缓冲液 100 滋 益 下 15min 每孔加 2mol/L 的 H₂SO₄ 50 滋 终止反应 在酶标仪

上测 450nm 处 D 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 倍的尿样。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 值 < 0.2。标准抗原的 D 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 1 000。包被抗体最适浓度为 2 μg/ml。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 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 值落在标准曲线之外时，改用浓缩尿或稀释尿样检测。

2.1.2 标准曲线 500 pmol/ml 的标准抗原 10 倍稀释成 1 000 pmol/ml。然后等倍稀释成 15.625~1000pmol/ml。用双抗体夹心 ELISA 检测 5 次。取其 D 值的均值绘制标准曲线。发现在 15.625~1000pmol/ml 区间抗原浓度的对数值与 D 值成线性相关。r=0.9923+5.9393 D (r=0.964)。1000pmol/ml 以下的 D 值接近空白对照孔。检测灵敏度为 15.625pmol/ml。根据尿样的 D 值查标准曲线得相应的 AQP2 浓度。

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	1:1000	1:1500	1:2000	1:3000	1:4000	1:5000	1:6000	1:7000	1:8000
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.

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 (μmol/ml)	1000	500	250	125	62.5	31.25	15.65
D 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 值分别为 0.656、0.687、0.616、0.672。CV=0.65775。批内差异为 4.65%。同一标本连续检测 5 d。次/d。根据标准曲线计算尿样 AQP2 蛋白浓度分别为 114.87、114.12、40.51、10.03、48.75 pmol/ml。CV=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 29000、3 000、40000 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 值分别

为 3.656、0.029、0.791、0.809、0.985、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。

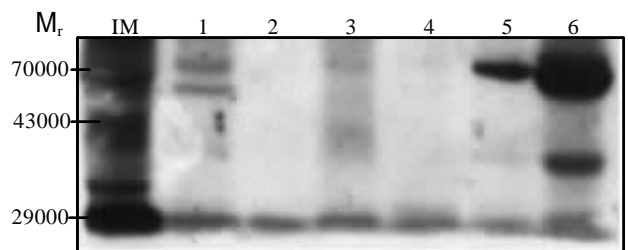


图 1 Western blotting 检测不同梗死面积充血性心力衰竭模型大鼠的尿 AQP2 水平

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 = 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 梗死面积越大尧梗死时间越长袁尿液 AQP2 水平越高遥双抗体夹心 ELISA 法的定量检测结

果与 Western blotting 半定量检测结果一致袁说明双抗体夹心 ELISA 法测尿液 AQP2 的结果是可靠的袁特异性高渊表 3 冤遥

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} 依D)
Tab.3 ELISA for measurement of urinary AQP2 water channel protein in rat models of congestive heart failure (pmol/ml, Mean依D)

Group	n	Timeafteroperation	
		The4thweek	The6thweek
Congestiveheartfailure(LVMI 20%)	8	15.80依.03**	61.70依.68** ^{##}
Compensativeheartfailure (LVMI<20%)	6	9.87依.61* ^{##}	21.87依.15 ^{##}
Control	6	7.11依.17	10.40依.02

*P<0.05,**P<0.01 vs controlgroup; P<0.05, P<0.01 vs congestiveheartfailuregroup; P<0.05vs the4thweek.

LVMI:Leftventricularmyocardialinfarction; n:Numberofratsineachgroup

3 讨论

本研究显示双抗体夹心 ELISA 法检测尿 AQP2 的优点是灵敏度高尧阴性背景清晰尧显色的深浅直接与待测物的含量呈正比尧实验结果容易判定袁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^遥已有的研究发现袁由于糖基化等原因袁尿液中 AQP2 相对分子质量为 29000~190000 不等遥在本实验中袁标准抗原为人工合成的 AQP2 蛋白 C- 末端的 CELHSPQSLPRGSKA 多肽片段袁仅 15 个氨基酸袁相对分子质量 610 冤尧较小遥我们采用与 BSA 链接的方法袁既增强了抗原的活性及夹心的可靠性袁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遥由于标准抗原和尿液中 AQP2 相对分子质量不等袁所以我们采用摩尔质量为计算单位袁成功地建立了尿 AQP2 的双抗体夹心 ELISA 测定法遥结果显示双抗体夹心 ELISA 法的检测结果与 Western blotting 检测结果一致袁说明双抗体夹心 ELISA 法检测尿液 AQP2 的结果是可靠的遥

本法虽然批内差异 渊.65%冤较小袁但批间差异 渊4.05%冤较大袁灵敏度也有待进一步提高遥分析这可能与所用多克隆抗体有关袁虽然所用多克隆抗体效价较高袁且经过纯化袁但毕竟存在多个抗原决定簇遥提示在以后的研究中袁在尿液的保存方法上需加以改进袁并尽可能采用两种不同种属动物的单克隆抗体袁以提高其灵敏度和特异性尧稳定性遥

致谢 本实验得到第一军医大学免疫教研室陈政良教授尧张丽云技师尧卢晓技师的指导和帮助袁特此致谢浴

参考文献院

咱暂 XuDL, MartinPY, Ohara M, et al. Upregulation of aquaporin-2 water channel expression in chronic heart failure [J]. J Clin Invest, 1997,99(7):1500-5.

咱暂 许顶立, 任 昊, MartinPY, 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.

咱暂 XuDL, RenH, MartinPY, et al. Renal aquaporin-2 water channel expression in congestive heart failure rat [J]. Natl Med J Chin, 1998, 78(2):118-20.

咱暂 许顶立, 任 昊. 慢性心力衰竭水潴留机制的研究进展咱暂 第一军医大学学报, 2001,21(1):65-7.

咱暂 RaiT, SekineK, KannoK, et al. Urinary excretion of aquaporin-2 water channel protein in human and rat 咱暂 J Am Soc Nephrol, 1997,8(9): 1357-62.

咱暂 邓英姿, 张远慧, 许顶立. 禁水大鼠肾脏与尿液水通道蛋白 2 表达的改变及意义咱暂 第一军医大学学报, 1999,19(6):493-5.

咱暂 DengYZ, ZhangYH, XuDL. Changes of renal and urine water channel aquaporin2 expression in dehydrated rats and its significance 咱暂 First Mil Med Univ, 1999,19(6):493-5.

咱暂 许顶立, 殷晓燕, 邓英姿, 等. 尿液水通道蛋白 2 的临床检测咱暂 肾脏病与透析肾移植杂志, 2000,9(4):396-8.

咱暂 XuDL, YinXY, DengYZ, et al. The measurement of urinary aquaporin-2 water channel protein concentration in patients 咱暂 Chin J Nephrol Dialy Transplant, 2000,9(4):396-8.

咱暂 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 的改变咱暂 中华内科杂志, 2000,39(7):471-2.

咱暂 XuDL, YinXY, DengYZ, et al. Urinary concentration of aquaporin-2 water channel protein in patients with chronic heart failure 咱暂 Chin J Int Med, 2000,39(7):471-2.

咱暂 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 的检测咱暂 中华心血管病杂志, 2000,28(3):218-20.

咱暂 XuDL, YinXY, DengYZ, et al. Urinary excretion of aquaporin-2 water channel protein in chronic heart failure rats 咱暂 Chin J Cardiol, 2000,28(3):218-20.

咱暂 沈关心, 周汝麟. 现代免疫学实验技术咱暂 武汉: 湖北科学技术出版社, 1998.38-76.