

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/53

G01N 33/535 G01N 33/573

G01N 33/577



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03142295.0

[43] 公开日 2005 年 2 月 16 日

[11] 公开号 CN 1580773A

[22] 申请日 2003.8.15 [21] 申请号 03142295.0

[71] 申请人 上海第二医科大学附属瑞金医院

地址 200025 上海市卢湾区瑞金二路 197 号

[72] 发明人 陈楠

[74] 专利代理机构 上海智信专利代理有限公司

代理人 薛琦

权利要求书 3 页 说明书 13 页 附图 1 页

[54] 发明名称 尿中性肽链内切酶的免疫检测方法

[57] 摘要

本发明公开了一种用于定量检测尿中性肽链内切酶的免疫检测方法，其特征在于该方法采用 ELISA 法。本方法有较好的灵敏度，准确度和重复性，检测的线性范围能够涵盖临床检测标本；且本法操作简便，方法无创，所需仪器价格低廉，一般医学实验室均可购置，成本较低，易于推广。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、一种尿中性肽链内切酶的免疫检测方法，其特征在于该方法采用酶联免疫吸附测定（ELISA）技术。

2、根据权利要求 1 所述的免疫检测方法，其特征在于该方法用于尿中性肽链内切酶的定量测定。

3、根据权利要求 2 所述的免疫检测方法，其特征在于该尿中性肽链内切酶的浓度测定范围为 20-200 $\mu\text{g/L}$ 。

4、根据权利要求 1 所述的免疫检测方法，其特征在于该方法包括下列步骤：

- 1) 用 5-15 $\mu\text{g/ml}$ 动物抗人尿中性肽链内切酶抗体包被酶标反应板，每孔 50-200 μl ，置 1-40 $^{\circ}\text{C}$ 12 小时；
- 2) 弃去孔中液体，洗涤甩干；
- 3) 1-40 $^{\circ}\text{C}$ 封闭酶标反应板 1-24 小时；
- 4) 弃去孔中液体，洗涤甩干；
- 5) 加入适当稀释的标准品、尿样、缓冲液，每份均加复孔，每孔 50-200 μl ，1-40 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 分钟-24 小时；
- 6) 弃去孔中液体，洗涤甩干；
- 7) 加入 2-10 $\mu\text{g/ml}$ 动物抗人尿中性肽链内切酶的单克隆抗体，每孔 50-200 μl ，1-40 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1-24 小时；
- 8) 弃去孔中液体，洗涤甩干；
- 9) 加入辣根过氧化物酶标记的抗步骤 7 中的动物免疫球蛋白的抗体，每孔 50-200 μl ，1-40 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1-24 小时；
- 10) 洗涤甩干；
- 11) 显色后，终止反应；
- 12) 酶标仪在 $\lambda=450\text{ nm}$ 处读取各孔吸光度 OD 值；
- 13) 根据标准系列浓度的吸光度值，在半对数坐标上得到标准曲线；

14) 根据标准曲线求得的回归方程, 将相应的吸光度值计算得到尿中性肽链内切酶的浓度。

5、根据权利要求 4 所述的免疫检测方法, 其特征在于该步骤 1 和 7 中所述的动物抗人尿中性肽链内切酶抗体为兔抗人或鼠抗人尿中性肽链内切酶抗体。

6、根据权利要求 4 所述的免疫检测方法, 其特征在于该步骤 9 中所述的辣根过氧化物酶标记的抗步骤 7 中的动物免疫球蛋白的抗体为 1: 1000 的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔或羊抗鼠免疫球蛋白的抗体。

7、根据权利要求 4 所述的免疫检测方法, 其特征在于该步骤 11 中的显色条件为加入现配的底物液, 每孔 50-200 μ l, 1-40 $^{\circ}$ C 避光环境下。

8、如权利要求 4-7 任一权利要求所述的免疫检测方法, 其特征在于该方法的具体步骤为:

1) 用 10 μ g/ml 兔抗人中性肽链内切酶的多克隆抗体包被酶标反应板, 每孔 100 μ l, 置 4 $^{\circ}$ C, 12 小时;

2) 弃去孔中液体, 洗涤液洗涤 3 次, 每次 3 分钟, 甩干;

3) 用封闭液封闭酶标反应板, 每孔 200 μ l, 置 4 $^{\circ}$ C, 18 小时;

4) 同步骤 2;

5) 加入适当稀释的标准品、尿样、缓冲液, 每孔 100 μ l, 每份标准品、样品、缓冲液均加复孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时;

6) 同步骤 2;

7) 加入 6 μ g/ml 小鼠抗人中性肽链内切酶的单克隆抗体, 每孔 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时;

8) 同步骤 2;

9) 加入 1: 1000 辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠免疫球蛋白抗体, 每孔 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时;

10) 洗涤液洗板 4 次, 每次 3 分钟甩干;

11) 加入现配的底物液, 每孔 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 避光环境下显色, 15 分钟

后，每孔加终止液 50 μ l 终止反应；

12) 酶标仪在 $\lambda = 450\text{nm}$ 处读取各孔吸光度 OD 值；

13) 根据标准系列浓度的吸光度值，在半对数坐标上得到标准曲线；

14) 根据标准曲线求得的回归方程，将相应的吸光度值计算得到中性肽链内切酶的浓度。

尿中性肽链内切酶的免疫检测方法

技术领域

本发明涉及尿中性肽链内切酶（NEP）的一种检测方法，特别涉及一种 NEP 的定量检测免疫方法。

背景技术

中性肽链内切酶（neutral endopeptidase, NEP, 国际酶学编号为 EC 3.4.24.11）是哺乳动物细胞表面的一种含锌金属肽酶。它是 NEP 酶家族中的一员，属 II 型完整膜蛋白，在调节肽类代谢中起重要作用。此酶首先由 Kerr 和 Kenny 于 1974 年从兔肾小管的刷状缘发现并提纯出来。NEP 在肾脏和肺组织中含最丰富，所有的三型 NEP 的 mRNA（I 型，IIa 型，IIb 型）在近端肾小管均有表达，其中 IIb 型表达最高。这种肽链内切酶大量地位于近端小管上皮刷状缘膜上，在生理状态下只以顶膜片段形式少量地排入尿液，处理出现在小管液中的滤过出来的肽类。正如其他近端小管上皮细胞膜表面的蛋白质如丙氨酸氨基肽酶（AAP）、 γ -谷氨转肽酶（ γ -GT）一样，NEP 在肾小管细胞受损时才大量地释放入尿液。

学者分别从几组肾脏病患者尿中检测了 NEP 的活性，发现在急性肾小管中毒性肾病患者（肾毒性药物所致）中此酶活性最高（尿中 NEP 的活性达到正常上限的 6.5 倍），并且在服用肾毒性药物后第二天即开始升高。急性肾小管功能不全（非肾毒性药物引起）患者尿中 NEP 活性增加到正常上限的 2.5 倍，而肾小球疾病及糖尿病患者尿中 NEP 的活性在正常范围内。本发

明人同时研究了急性肾小管功能不全患者尿中的 α 1-MG 的活性,发现尿中 NEP 的活性已降至正常后, α 1-MG 的活性仍在增加。

Nortier J 等学者检测了接受肾移植患者尿中的 NEP 量,发现在移植后第 1、2 天,尿 NEP 显著增加,并在移植后 3~5 天内恢复正常。移植早期尿中 NEP 释放明显增加,可能与缺血及免疫抑制药对近端小管上皮的损伤有关。

J.F.Blaikley 分别于术前 1 天、术后 3 小时、术后第 1、4 天检测行心脏搭桥术的患者的尿 NEP,发现与对照相比,手术组术后尿 NEP 明显增高,且 NEP 增高最严重的病人多数术后进入急性肾功能衰竭并需要血透。因为在术后发生急性肾衰是患者死亡的主要原因,因此他们主张检测尿 NEP,以便早期发现有发展为急性肾衰危险的患者,并及时予以治疗。

近来对中草药引起的肾病研究颇多,因其中引起肾损害的成分主要为马兜铃酸,国内称为马兜铃酸肾病。马兜铃酸引起的肾损害以慢性肾小管间质性损害最多,也可表现为急性肾小管坏死。主要病理改变是肾小管严重受损,肾小管数减少,肾间质纤维化、萎缩,以外皮质层受累最重。JOELLE L. 等人分别测定中草药肾病(CHN)患者、使用中草药但尚未出现肾功能受累者、肾小球疾病患者及健康对照者尿微量蛋白(包括 CC16、 β 2-MG、 α 1-MG)及尿 β -D-N-乙酰葡萄糖胺酶(NAG)和尿 NEP 的量,同时进行肾脏病理活检,并对这些病人进行了 6 月~2 年的随访。结果发现在中草药肾病患者肾功能中、重度受累时,尿中 NEP 浓度明显下降,且其浓度水平与尿中微量蛋白呈负相关与内生肌酐清除率呈正相关,而在肾小球疾病患者中未发现尿 NEP 与内生肌酐清除率有相关性,且尿 NEP 下降的程度与肾活检中近端小管损伤的程度相一致。他们认为,尿 NEP 的量实际反映了在近端小管残留的未受损的刷状缘的比例。

镉、铅等重金属可以引起的肾损害，早期主要累及近端小管。有学者检测了 52 名接触镉的工人及 54 名非职业性接触镉的工人尿液中的 NEP、NAG 及 NAG- β 的量和某些尿微量蛋白的含量[白蛋白、 β 2-MG、尿视黄醇结合蛋白(RBP)、CC16]。结果发现：对镉只有低剂量接触时，NEP 即开始升高（此时其它近端小管标志物尚未升高）。提示了 NEP 可以显示近端小管功能的早期损害。

Huang H.等学者分别检测了单侧肾结石不伴肾积水，输尿管结石伴同侧肾积水及对照组中尿 NEP、NAG、 β -GAL（ β -半乳糖酶）的值和血粘附分子值。结果发现，有输尿管结石伴肾积水患者组中尿 NEP 明显降低，而 NAG、 β -GAL 与对照组相比均增高。尿 NEP 的低水平提示了尿路梗阻、肾积水引起肾小管功能受损，近曲小管萎缩，残存的小管数减少。

在缺血、中毒等引起急性肾小管损伤时，近端小管刷状缘大量脱落，NEP 随脱落的刷状缘排入尿中，尿中 NEP 明显增加。此时部分肾小管重吸收功能下降，而部分肾小管重吸收功能却代偿性增加，因此，反映近端肾小管重吸收功能的尿微量蛋白尚无明显变化；进入慢性损害期的肾小管，已不能再提供 NEP 释放入尿液中，其尿中的 NEP 降低。同时其肾小管损伤的程度越重，肾小管的重吸收功能就越差，因而，尿内排出的微量蛋白就越多，尿 NEP 与尿微量蛋白之间出现程度不等的负相关。比较急性肾小管损伤组和慢性肾小管损伤组可以发现，在肾小管损伤的急性期，某些尿中微量蛋白尚无明显增高或仅有轻度增高，尿 NEP 已有明显增高，而随疾病进展，在肾小管损伤的慢性期，尿 NEP 已下降后，尿 α 1-MG 及 RBP 的量仍在增加。因此，若尿中 NEP 的量增加，而尿 α 1-MG 及 RBP 等尿微量蛋白的量并无明显增加，常提示肾小管早期急性损害并伴有肾小管重吸收功能代偿性增加。

而尿 NEP 降低，尿 α 1-MG 及 RBP 等微量蛋白增高，可提示肾小管的慢性病变，此时尿 NEP 因为肾小管上皮细胞的萎缩，肾小管数及表面刷状缘的减少而排出减少，并且由于肾小管重吸收功能逐渐降低，尿中的微量蛋白逐渐增高。

综上所述，在急性肾小管损伤中，尿 NEP 明显增高，此时尿微量蛋白尚未明显增加，因此检测尿 NEP 可以帮助我们更加早期地发现肾小管的急性损伤；在慢性肾小管损伤组中尿 NEP 降低，并与尿微量蛋白的增高呈负相关；而肾小球疾病尚未引起肾小管明显损害时，尿 NEP 与正常相比无变化。正是由于尿 NEP 在不同病程中出现双向的变化，当结合其他尿微量蛋白检测时，它可以帮助我们判断肾小管损伤处于急性期还是慢性期，从而有助于对治疗方案的选择和对预后进行估计。

但目前国内对尿 NEP 的研究尚属空白，而国外只有少数几个实验室在进行研究，他们采用荧光法检测 (Joelle L, Nortier, Monique M, et al. Proximal tubular injury in Chinese herbs nephropathy: Monitoring by neutral endopeptidase enzymuria. *Kidney International*, 1997, 51:288-293.), 用丁二酰-丙氨酸-丙氨酸-苯丙氨酸-氨甲基香豆素 (succinyl-alanyl-alanyl-phenylalanyl-AMC) 作底物，NEP 能够在 succinyl-alanyl-alanyl-和-phenylalanyl-AMC 之间将此底物水解，接着用氨基肽酶 M 进一步孵育，释出游离的氨甲基香豆素 (AMC)，这一物质含有荧光基团，在 $\lambda_{ex}=367\text{nm}$ ， $\lambda_{em}=440\text{nm}$ 时，可以选择性的测定游离的 AMC。并且同时做对照管，反应前加入 NEP 的特异性抑制剂抑制酶活性。得到的结果减去有抑制剂存在的相应对照组的数据，以避免非特异性底物水解造成的误差。用纯化的人肾 NEP 建立起来的标准曲线，可使游离的氨甲基香豆素的荧光度转化为酶的量。但因该法需特殊的

荧光发光检测仪，该仪器约 10 万美元，价格昂贵，反应步骤较为复杂，目前仅用于实验研究中，不能在临床应用中大范围推广。

发明内容

本发明的目的是解决上述问题，提供一种可在临床推广应用的尿中性肽链内切酶（NEP）的免疫检测方法。

本发明的目的通过下述技术方案来实现：一种尿中性肽链内切酶（NEP）的免疫检测方法，其特征在于该方法采用酶联免疫吸附测定（ELISA）技术。

该方法可用于尿 NEP 的定量测定。

上述尿 NEP 的浓度测定范围为 20-200 $\mu\text{g/L}$ 。

上述 ELISA 方法包括下列步骤：

- 1) 用 5-15 $\mu\text{g/ml}$ 动物抗人尿 NEP 抗体包被酶标反应板，每孔 50-200 μl ，置 1-40 $^{\circ}\text{C}$ 12 小时；
- 2) 弃去孔中液体，洗涤甩干；
- 3) 1-40 $^{\circ}\text{C}$ 封闭酶标反应板 1-24 小时；
- 4) 弃去孔中液体，洗涤甩干；
- 5) 加入适当稀释的标准品、尿样、缓冲液（阴性对照），每份均加复孔，每孔 50-200 μl ，1-40 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 分钟-24 小时；
- 6) 弃去孔中液体，洗涤甩干；
- 7) 加入 2-10 $\mu\text{g/ml}$ 动物抗人尿 NEP 的单克隆抗体，每孔 50-200 μl ，1-40 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1-24 小时；
- 8) 弃去孔中液体，洗涤甩干；
- 9) 加入辣根过氧化物酶（HRP）标记的抗步骤 7 中的动物免疫球蛋白的抗体，每孔 50-200 μl ，1-40 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1-24 小时；
- 10) 洗涤甩干；
- 11) 显色后，终止反应；
- 12) 酶标仪在 $\lambda=450\text{ nm}$ 处读取各孔吸光度 OD 值；

13) 根据标准系列浓度的吸光度值, 在半对数坐标上得到标准曲线;

14) 根据标准曲线求得的回归方程, 将相应的吸光度值计算得到尿 NEP 的浓度。

其中, 上述步骤 1 和 7 中所述的动物抗人尿 NEP 抗体为兔抗人或鼠抗人尿 NEP 抗体。

上述步骤 9 中所述的 HRP 标记的抗步骤 7 中的动物免疫球蛋白的抗体为 1: 1000 的 HRP 标记的羊抗兔或羊抗鼠免疫球蛋白的抗体。

上述步骤 11 中的显色条件为加入现配的底物液, 每孔 50-200 μ l, 1-40 $^{\circ}$ C 避光环境下。

本发明的积极进步效果为: ELISA 法为常用的免疫检测方法(沈霞主编. 人民军医出版社 2002 年北京. 临床免疫学与免疫学检验新技术. 沈霞: 第二章 酶免疫测定技术. P12-20.), 但本发明采用了三明治 ELISA 法来检测尿 NEP, 这在国内外文献中尚未见报道; 同时进行的方法学评价显示: 这种方法有较好的灵敏度, 准确度和重复性, 检测的线性范围能够涵盖临床检测标本; 且本法操作简便, 方法无创, 所需仪器价格低廉, 一般医学实验室均可购置。

由于其实验操作步骤简单, 易于推广, 成本较低; 且实验结果准确可靠, 对临床诊治有较大帮助, 因此有广阔的临床应用前景。

附图说明

图 1 为本发明方法所测的 NEP 标准曲线。

具体实施方式

本研究通过对抗体体系的选择、抗体工作浓度的选择、最佳标准品/抗体作用时间的选择等大量实验, 总结出尿 NEP 定量检测的 ELISA 方法。下举的几个较佳实施例, 仅为更好的说明本发明方法, 而并不受其限制。

材料:

1. Elx800 型酶标仪 (购自美国 Bio-Tec 公司);

2. 96 孔酶标板（购自美国 Labsystem 公司）；
3. 人 NEP 标准品（比利时 laboratoire Pluridisciplinaire de Recherche Experimentale Biomedicale 实验室获得）；
4. 兔抗人 NEP 多克隆抗体（购自上海基因公司）；
5. 小鼠抗人 NEP 单克隆抗体（购自上海基因公司）；
6. 辣根过氧化物酶（HRP）标记的羊抗小鼠、羊抗兔免疫球蛋白抗体（上海第二医科大学医学检验重点实验室获得）；
7. 包被稀释液：pH 9.6，0.05mol/L 碳酸钠—碳酸氢钠缓冲液；
8. 封闭液：含 0.5%BSA 的 PB 缓冲液；
9. 洗涤液：0.1%Tween-20；
10. NEP 和抗体稀释液：pH 7.4 的 PBS；
11. 底物液：TMB（购自 Sigma 公司）；
12. 终止液：2mol/L 的 H_2SO_4 。

实施例 1

步骤 1. 用 $10\mu g/ml$ 兔抗人 NEP 的多克隆抗体包被酶标反应板，每孔 $100\mu l$ ，置 $4^\circ C$ ，12 小时；

步骤 2. 弃去孔中液体，洗涤液洗涤 3 次，每次 3 分钟，甩干；

步骤 3. 用封闭液封闭酶标反应板，每孔 $200\mu l$ ，置 $4^\circ C$ ，18 小时；

步骤 4. 同步骤 2；

步骤 5. 加入适当稀释的标准品、尿样、缓冲液（阴性对照），每孔 $100\mu l$ ，每份标准品、样品、对照均加复孔， $37^\circ C$ 孵育 1 小时；

步骤 6. 同步骤 2；

步骤 7. 加入 $6\mu g/ml$ 小鼠抗人 NEP 的单克隆抗体，每孔 $100\mu l$ ， $37^\circ C$ 孵育 1 小时；

步骤 8. 同步骤 2；

步骤 9. 加入 1: 1000 HRP 标记的羊抗小鼠免疫球蛋白抗体, 每孔 100 μ l, 37℃ 孵育 1 小时;

步骤 10. 洗涤液洗板 4 次, 每次 3 分钟甩干;

步骤 11. 加入现配的底物液, 每孔 100 μ l, 37℃ 避光环境下显色, 15 分钟后, 每孔加终止液 50 μ l 终止反应;

步骤 12. 酶标仪在 $\lambda = 450\text{nm}$ 处读取各孔吸光度 (OD) 值;

步骤 13. 根据标准系列浓度的吸光度值, 在半对数坐标上得到标准曲线;

步骤 14. 根据标准曲线求得的回归方程, 将相应的吸光度值计算得到 NEP 的浓度。

实施例 2

步骤 1. 用 15 μ g/ml 鼠抗人 NEP 的多克隆抗体包被酶标反应板, 每孔 50 μ l, 置 40℃, 1 小时;

步骤 2. 弃去孔中液体, 洗涤液洗涤 3 次, 每次 3 分钟, 甩干;

步骤 3. 用封闭液封闭酶标反应板, 每孔 100 μ l, 置 1℃, 24 小时;

步骤 4. 同步骤 2;

步骤 5. 加入适当稀释的标准品、尿样、缓冲液 (阴性对照), 每孔 50 μ l, 每份标准品、样品、对照均加复孔, 40℃ 孵育 10 分钟;

步骤 6. 同步骤 2;

步骤 7. 加入 2 μ g/ml 兔抗人 NEP 的单克隆抗体, 每孔 50 μ l, 1℃ 孵育 24 小时;

步骤 8. 同步骤 2;

步骤 9. 加入 1: 1000 HRP 标记的羊抗兔免疫球蛋白抗体, 每孔 50 μ l, 40℃ 孵育 4 小时;

步骤 10. 洗涤液洗板 4 次, 每次 3 分钟甩干;

步骤 11. 加入现配的底物液, 每孔 200 μ l, 1℃ 避光环境下显色, 30 分钟后, 每孔加终止液 200 μ l 终止反应;

步骤 12. 酶标仪在 $\lambda = 450\text{nm}$ 处读取各孔吸光度 (OD) 值;

步骤 13. 根据标准系列浓度的吸光度值, 在半对数坐标上得到标准曲线;

步骤 14. 根据标准曲线求得的回归方程, 将相应的吸光度值计算得到 NEP 的浓度。

实施例 3

步骤 1. 用 $5\ \mu\text{g/ml}$ 兔抗人 NEP 的多克隆抗体包被酶标反应板, 每孔 $200\ \mu\text{l}$, 置 1°C , 24 小时;

步骤 2. 弃去孔中液体, 洗涤液洗涤 3 次, 每次 3 分钟, 甩干;

步骤 3. 用封闭液封闭酶标反应板, 每孔 $50\ \mu\text{l}$, 置 40°C , 1 小时;

步骤 4. 同步骤 2;

步骤 5. 加入适当稀释的标准品、尿样、缓冲液 (阴性对照), 每孔 $200\ \mu\text{l}$, 每份标准品、样品、对照均加复孔, 1°C 孵育 24 小时;

步骤 6. 同步骤 2;

步骤 7. 加入 $10\ \mu\text{g/ml}$ 小鼠抗人 NEP 的单克隆抗体, 每孔 $200\ \mu\text{l}$, 40°C 孵育 3 小时;

步骤 8. 同步骤 2;

步骤 9. 加入 1: 1000 HRP 标记的羊抗小鼠免疫球蛋白抗体, 每孔 $200\ \mu\text{l}$, 1°C 孵育 24 小时;

步骤 10. 洗涤液洗板 4 次, 每次 3 分钟甩干;

步骤 11. 加入现配的底物液, 每孔 $50\ \mu\text{l}$, 40°C 避光环境下显色, 5 分钟后, 每孔加终止液 $10\ \mu\text{l}$ 终止反应;

步骤 12. 酶标仪在 $\lambda = 450\text{nm}$ 处读取各孔吸光度 (OD) 值;

步骤 13. 根据标准系列浓度的吸光度值, 在半对数坐标上得到标准曲线;

步骤 14. 根据标准曲线求得的回归方程, 将相应的吸光度值计算得到 NEP 的浓度。

统计学方法:

用 SAS6.12 及 EXCEL 软件进行相关回归分析和描述性统计。

结果:

(一) 线性范围

将人肾组织提取的 NEP 纯品用 PBS 缓冲液稀释成浓度为 400 μ g/L、200 μ g/L、100 μ g/L、50 μ g/L、20 μ g/L、10 μ g/L、5 μ g/L、2.5 μ g/L, 空白孔加 PBS 缓冲液, 以浓度的对数对相应的吸光度值作图, 当 NEP 浓度在 20~200 μ g/L 时, 对上述数据进行相关回归分析, 发现其浓度的对数与吸光度间有良好的线性关系 ($Y=A*\lg X+B$), 如图 1 示。

在不同时间, 取线性范围内, 对标准曲线的重复性进行检测。

取不同时间点线性范围内的标准曲线, 各标准浓度的 CV 为 2.063~4.170%, 平均 2.987%。

所有标准曲线 $r>0.99$ ($p<0.001$), 重复性良好。

(二) 准确度检测

回收实验用来检测实验的准确度, 即测定值与真值的接近程度, 常用回收率表示。向五份尿样中加入不同浓度的 NEP, 计算其各自回收率。回收率 93.6~107.3%, 平均 101.7%, 有良好准确度。

(三) 精确度检测

取两份浓度不同的尿标本于同一批内各测 10 次, 计算批内变异系数 (CV); 在 10 个不同检测日分别对两份尿标本测定 10 次, 计算批间 CV。

批内变异系数 (CV) 4.152~5.469%, 平均 4.811%, 批间变异系数 (CV) 6.241~6.395%, 平均 6.318%, 有良好精确度。

(四) 检测限值

检测限值即为某一实验的最低检测值，以空白吸光度的均值 $X+2S$ 所对应的浓度值作为检测限值，经计算得出检测限值为 $3.20 \mu\text{g/L}$ 。

应用实施例

一、材料和方法

一) 受试对象

1、分组情况

病人组共分为五组，包括急性肾小管损伤组、慢性肾小管损伤组、马兜铃酸肾病组、单纯肾小球疾病组、肾小球疾病所致的 CRF 组（具体分组情况见表 16）。所有病例均系 2002 年 1 月至 2002 年 10 月间在上海第二医科大学附属瑞金医院住院患者。均为病理诊断或临床诊断确诊者。临床诊断依据通过病史、体检、实验室检查（除其他常规化验外，同时检测患者的尿常规、尿 α_1 -微球蛋白(α_1 -MG)、尿转铁蛋白(TRU)、尿 RBP、尿 NAG、尿免疫球蛋白(IgG)、尿肌酐、血尿渗透压、血 Scr、24 小时尿电解质、尿可滴定酸和尿铵、血 β_2 -MG、血 α_1 -MG、尿 β_2 -MG、尿 α_1 -MG、尿氨基酸测定、尿糖测定、尿蛋白电泳、尿浓缩稀释实验等）。正常对照组均系本院健康医务人员和二医大健康在校生。

在病人组中 68 例行肾活检穿刺术并做病理切片。其中男性 36 例，女性 32 例。所有病理切片均行光镜（包括 HE、PAS、Masson 和 PASM 染色）、免疫荧光和电镜检查。其中病理诊断为各类肾小球疾病者为 38 例（包括肾小球疾病引起的慢性肾功能衰竭 7 例），急性肾小管损伤（包括急性肾小管坏死，肾曲管空泡变等）为 15 例，其他病因引起的慢性肾小管间质性病变 7 例。马兜铃酸肾病患者为 8 例，镜下均表现为慢性肾小管间质性病变。

二) 尿 NEP 定量检测

采用实施例 1 的方法步骤。

三) 统计学分析

用 SAS6.12 软件及 Excel 进行相关分析，Wilcoxin 秩和、符号秩检验和

描述性分析。

二、结果

(一) 正常对照组尿 NEP 的检测 (结果见下表 1):

表 1 正常对照组尿 NEP 的检测结果

分组	例数	NEP 中位数 ($\mu\text{g}/\text{mmol Cr}$)	四分位数间距 ($\mu\text{g}/\text{mmol Cr}$)
总正常组	100	68.41	68.15
男性组	54	71.84	69.28
女性组	46	63.76	61.44
<60 岁组	92	70.35	67.57
≥ 60 岁组	8	59.19	57.80

男女尿 NEP 检测差异无统计学意义 ($Z=0.9356$, $P>0.05$), <60 岁组和 ≥ 60 岁组检测差异无统计学意义 ($Z=1.5483$, $P>0.05$)。正常对照组尿 NEP 的 95%可信区间为 $46.29\sim 89.52 \mu\text{g}/\text{mmol Cr}$ 。

(二) 各组尿 NEP 及与正常组的比较 (结果见下表 2):

表 2 各组尿 NEP 及与正常组的比较结果

分组	各组样本的中位数 ($\mu\text{g}/\text{mmol Cr}$)	与正常对照组比较 P
急性肾小管损伤组	196.36	0.0001*
慢性肾小管损伤组	31.64	0.0017*
马兜铃酸肾病组	32.78	0.0076*
单纯肾小球疾病组	75.49	0.1425
肾小球疾病所致的 CRF 组	19.40	0.0042*

急性肾小管损伤组, 尿中 NEP 明显高于正常对照组 ($*P<0.01$); 慢性肾小管损伤组和马兜铃酸肾病组及 CRF 组, 尿中 NEP 明显低于正常对照组 ($*P<0.01$); 单纯肾小球疾病组, 尿 NEP 与正常对照差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

（三）两种检测方法的符合率比较

符合率是一项能同时反映敏感性和特异性的指标。为了比较本发明的 ELISA 法和荧光法检测尿 NEP 的效果，同时用荧光法检测尿 NEP，并以尿 NAG 活性、尿 α_1 -MG 作为肾小管损伤的参考指标，对两种测定方法进行符合率比较（结果详见下表 3、4）。

符合率=（真阳性例数+真阴性例数）/总病例数。

其中，所采用尿 NAG 活性的正常参考值：<18.50u/l；尿 α_1 -MG 正常参考值<1.28mg/ml。

表 3 以尿 NAG 活性为标准的两种方法的符合率比较结果

分组	ELISA 法符合率 (%)	荧光法符合率 (%)	两种方法符合率比较 X ² 值	P 值
急性肾小管损伤组	77.27	79.54	0.032	0.885
慢性肾小管损伤组	52.08	54.17	0.213	0.534
马兜铃酸肾病组	61.54	61.54	0.517	0.406
肾小球疾病组	38.71	35.48	0.069	0.698
CRF 组	38.46	32.77	0.018	0.973

表 4 以尿 α_1 -MG 活性为标准的两种方法的符合率比较结果

分组	ELISA 法符合率 (%)	荧光法符合率 (%)	两种方法符合率比较 X ² 值	P 值
急性肾小管损伤组	43.45	46.45	0.530	0.467
慢性肾小管损伤组	72.92	70.83	0.043	0.835
马兜铃酸肾病组	69.23	76.92	0.000	1.000
肾小球疾病组	41.94	38.71	0.065	0.799
CRF 组	69.23	69.23	0.170	0.680

表 3、4 的 X² 检验均显示：各病人组两种方法检验的符合率无显著差异（P 值均>0.05）。

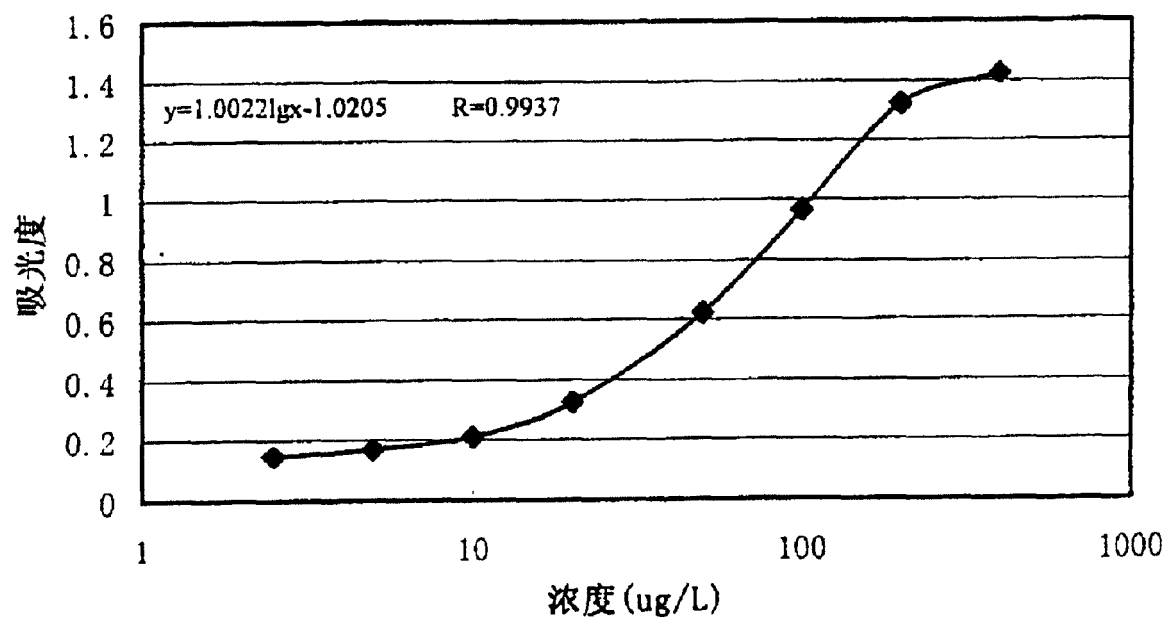


图1

专利名称(译)	尿中性肽链内切酶的免疫检测方法		
公开(公告)号	CN1580773A	公开(公告)日	2005-02-16
申请号	CN03142295.0	申请日	2003-08-15
[标]申请(专利权)人(译)	上海第二医科大学附属瑞金医院		
申请(专利权)人(译)	上海第二医科大学附属瑞金医院		
当前申请(专利权)人(译)	上海第二医科大学附属瑞金医院		
[标]发明人	陈楠		
发明人	陈楠		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/535 G01N33/573 G01N33/577		
代理人(译)	薛琦		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种用于定量检测尿中性肽链内切酶的免疫检测方法，其特征在于该方法采用ELISA法。本方法有较好的灵敏度，准确度和重复性，检测的线性范围能够涵盖临床检测标本；且本法操作简便，方法无创，所需仪器价格低廉，一般医学实验室均可购置，成本较低，易于推广。

