抗人 β2-微球蛋白单克隆抗体的制备及免疫检测方法的建立

彭 倩[1,2], 仝 谣[3], 吴 意[2], 夏 川[4],
徐 叶[2], 周松辉[2], 李秋诺[1], 刘如石[1,2*], 郑 姣[1,2*]

(1. 湖南师范大学 医学院, 湖南 长沙 410013; 2. 湖南省"免疫诊断试剂"工程技术研究中心, 湖南 长沙 410013;
3. 湖南师范大学 生命科学学院, 湖南 长沙 410000; 4. 郴州市第一人民医院 检验医学中心, 湖南 郴州 423000)

摘 要 制备抗人 β2-微球蛋白(Beta-2-microglobulin, β2-MG)单克隆抗体, 建立快速、准确的 β2-MG 定性、定量检测方法。原核表达重组 β2-MG 并进行纯化后用于 BALB/c 小鼠免疫, 通过杂交瘤技术制备抗人 β2-MG 单克隆抗体, 通过双抗体夹心酶联免疫吸附测定法(double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay, DAS-ELISA)进行筛选, 建立基于化学发光酶免疫测定法(chemiluminescence enzyme immunoasssay, CLEIA)的检测平台, 将其应用于临床血清 β2-MG 的测定, 并初步建立可快速检测 β2-MG 的胶体金免疫层析法。结果表明, 基于 5H7/6H9-AP 抗体对构建的 CLEIA 检测体系线性范围为 0.14 ~ 120.00 μg/L(可扩展至 60.00 mg/L), 所开发的 CLEIA 与医院使用的胶乳增强免疫比浊法相比, 两种方法具有良好的一致性和较高的相关性, 相关系数 R^2 为 0.96 且 $P<0.0001$。本研究建立的胶体金免疫层析法检测重组 β2-MG 的最低限度可达到 0.20 mg/L, 表现出较好的敏感性, 表明筛选的抗人 β2-MG 单克隆抗体及建立的定量和定性免疫检测方法具有临床诊断应用的潜力。

关键词 β2-微球蛋白(β2-MG); 单克隆抗体; 临床诊断; 双抗体夹心酶联免疫吸附测定法; 化学发光酶免疫测定法; 胶体金免疫层析法

中图分类号 Q939.91 **文献标识码** A **文章编号** 1005 - 7021(2026)02 - 0083 - 09

doi:10.3969/j.issn.1005 - 7021.2026.02.008

Preparation of Monoclonal Antibodies and Development of Immunoassay for against Human β2-Microglobulin

PENG Qian[1,2], TONG Yao[3], WU Yi[2], XIA Chuan[4], XU Ye[2], ZHOU Song-hui[2],
LI Qiu-nuo[1], LIU Ru-shi[1,2*], ZHENG Jiao[1,2*]

(1. *School of Medicine, Hunan Normal University, Changsha* 410013;
2. *"Immunodiagnostic Reagents" Engineering Research Center of Hunan Province, Changsha* 410013;
3. *College of Life Science, Hunan Normal University, Changsha* 410000;
4. *Department of Laboratory Medical, The First People's Hospital of Chenzhou, Chenzhou* 423000)

Abstract This study aimed to prepare monoclonal antibodies against human β2-MG and to establish rapid and accurate quantitative and qualitative immunoassay methods for β2-MG detection. Recombinant β2-MG was produced through prokaryotic expression and purification, and subsequently used for immunizing BALB/c mice. Monoclonal an-

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(81702005);湖南省重点研发计划项目(2015SK20332);湖南省卫健委科研计划项目(B202311009257);湖南省自然科学基金项目(2019JJ50370)

作者简介:彭倩 女,硕士研究生。研究方向为免疫诊断试剂研究。E-mail:749950764@qq.com

* 通讯作者。刘如石,男,教授,博士,博士生导师。主要从事免疫诊断试剂研究工作。E-mail:liurushi@hunnu.edu.cn

郑姣,女,实验师,硕士。主要从事免疫诊断试剂研究工作。E-mail:16743@hunnu.edu.cn

收稿日期:2025-12-02

中国知网 https://www.cnki.net

tibodies against human β2-MG were generated using hybridoma technology and screened via double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA), which facilitated the development of a chemiluminescence enzyme immunoassay (CLEIA). Clinical serum β2-MG levels were measured to evaluate and analyze the detection performance of the proposed CLEIA. Additionally, a convenient and rapid colloidal gold immunochromatographic assay for β2-MG detection was preliminarily established. The monoclonal antibody pair 5H7/6H9-AP was developed into the CLEIA, demonstrating a linear range of 0.14-120.00 μg/L (extended to 60.00 mg/L). The serum β2-MG CLEIA results showed excellent correlation with the latex enhanced immunoturbidimetry assay conducted in hospitals (R^2: 0.96, P < 0.000 1). The established colloidal gold immunochromatographic assay exhibited good sensitivity for detecting recombinant β2-MG, with test strips capable of detecting a minimum concentration of 0.20 mg/L. The prepared monoclonal antibodies for β2-MG, along with the established quantitative and qualitative immunoassay methods, hold significant potential for clinical diagnostic applications.

Keywords beta-2-microglobulin; monoclonal antibody; clinical diagnosis; double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay; chemiluminescence enzyme immunoassay; colloidal gold immunochromatographic assay

尿毒症是一种与肾功能恶化相关的临床疾病,其表现特征为体液、电解质、激素失衡和代谢异常,常见于慢性和终末期肾病(end stage renal disease,ESRD)患者[1-3]。尿毒症发生的危险因素包括血液中尿毒相关毒素水平升高、原发性肾脏疾病以及各类可导致肾损伤的系统性疾病等。肾功能迅速丧失的情况下,如果尿素或肌酐突然升高,尿毒症也可能因急性肾损伤而发生,而且尿素本身对组织具有直接和间接毒性,比如常见的尿毒症引起的多发性神经病[4-7]。尿毒症常引发炎症导致免疫系统功能损害[8]。随着现代医学的发展,尿毒症可通过临床症状、实验室检测或影像分析进行诊断[9]。尽管目前尿毒症的治疗手段很少受到限制,但其诊断仍对临床医生构成挑战[10],因此,亟需探索新的诊断方式。β2-微球蛋白(Beta-2-microglobulin,β2-MG)是一种分子量为 11.73 kDa 的糖基化多肽,存在于所有有核细胞中[11-12]。健康个体的 β2-MG 合成速率为 2 ~ 4 mg/kg,半衰期为 2.5 h,广泛存在于血浆、尿液、脑脊液、唾液和初乳中[13]。正常情况下,几乎所有的 β2-MG 均经肾小球滤过,其中 99% 在肾小管中重吸收,仅少量随尿液排出。随着肾功能减退,β2-MG 通过肾小球滤过逐渐减少,导致血液中 β2-MG 浓度逐渐升高[14]。作为一种新的潜在炎症因子,近年来 β2-MG 在自身免疫性疾病、恶性肿瘤、肾脏疾病、外周动脉疾病中得到了广泛的研究[15-18],也是诊断早期高血压肾损伤的良好指标[19]。β2-MG 是引起透析淀粉样变性的物质,其预透析值有助于评价透析治疗本身的质量。此外,β2-MG 也是评价血液透析和血液透析滤过去除性能的重要生物标志物[20]。当尿 β2-MG 排泄水平高于 300 μg/g 肌酐时,提示肾小管重吸收功能缺陷,反映肾小球滤过率下降[21]。目前血清 β2-MG 的检测方法主要包括散射免疫法、酶联免疫吸附法和荧光免疫层析法等,但这些方法存在灵敏度不高、检测时间较长、检测过程复杂且检测设备价格昂贵等问题,制约了其进一步推广。近年开发的时间分辨荧光免疫测定法虽然将 β2-MG 浓度的检测灵敏度提升至 60 μg/L,但整个检测过程仍需耗时 2 h 以上[22-23]。因此,研发制备特异性单克隆抗体,建立快速灵敏的 β2-MG 检测方法具有重要的临床应用价值。本研究制备了 3 株高灵敏度的抗人 β2-MG 单克隆抗体,开发了用于临床诊断检测的高灵敏度化学发光酶免疫测定法(chemiluminescence enzyme immunoasssay,CLEIA),该方法与临床使用的胶乳增强免疫比浊法具有良好一致性,可为 β2-MG 的临床诊断提供更多工具。同时,本研究初步建立了方便快捷、特异敏感、稳定性强的胶体金免疫层析法,该方法不需要特殊设备和试剂,结果判断直观,便于检验人员基层和现场使用,整个检测过程可在 10 min 内完成,应用范围广,可适应多种检测条件,具有较好的临床诊断应用潜力。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株、质粒和动物 THP-1 细胞、*Escherichia coli* Top 10F′菌株、BL21(DE3)菌株、SP2/6 骨

中国知网 https://www.cnki.net

髓瘤细胞系及质粒 pTO-T7 保存于湖南省“免疫诊断试剂”工程技术研究中心(本实验室);BALB/c 小鼠购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司。

1.1.2 血清样本和伦理批准 临床血清样本收集自湖南省人民医院。本研究动物实验均获得湖南师范大学伦理委员会批准(审批号:360)。

1.1.3 主要试剂与仪器设备 辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase,HRP)-羊抗鼠由厦门大学夏宁邵教授惠赠;限制性内切酶 *Xho* I 和 *Bam*H I 购自日本 TAKARA 公司;化学发光反应试剂购自湖南远璟生物技术有限公司;PEG 1500、HAT 培养基、HT 培养基及弗氏佐剂购自美国 Sigma 公司;BCA 蛋白质检测试剂盒、Ni-TED 亲和层析柱、Protein A/G 亲和色谱柱及各类分析纯化学用品购自生工生物工程(上海)股份有限公司;样品垫、金标结合垫、NC 膜及吸水垫购自湖南旭翔生物科技有限公司。全自动酶标仪(Elx800,BioTek),化学发光免疫分析检测仪(Rangcel-1200i,湖南远璟生物技术有限公司),XYZ 三维划膜喷金仪(XYZ3060,BioDot)。

1.2 方法

1.2.1 β2-MG 的原核表达和蛋白质纯化 提取 THP-1 细胞 RNA,逆转录合成 cDNA,以其为 PCR 模板对 β2-MG 编码序列进行扩增,目的基因引物为 *Bam*HI-FP(5′-cgcGGATCCATGTCTCG-3′);*Xho*I-RP(5′-ccgCTCGAGCATGTCTCGATCC-3′)。在大肠埃希菌 BL21(DE3)中对构建的重组质粒 β2-MG-pTO-T7 经 0.5 mmol/L 的 IPTG 在 37 ℃诱导 4 h 表达重组 β2-MG,超声处理和离心后,进行包涵体纯化及 Ni-TED 亲和层析柱纯化,经 SDS-PAGE 鉴定分析。

1.2.2 抗人 β2-MG 单克隆抗体的制备及性能检测 以纯化的重组 β2-MG 为抗原对小鼠进行皮下多点注射(120 μg/只)免疫,每 2 周重新免疫 1 次,共进行 4 次免疫。从免疫小鼠中分离脾细胞并与 SP2/6 骨髓瘤细胞按 5∶1 比例混合,加入 PEG 1500 促进融合。采用有限稀释法进行杂交瘤细胞亚克隆获得阳性细胞株。使用饱和硫酸铵和 Protein A/G 亲和层析技术利用小鼠腹水制备纯化单克隆抗体。采用蛋白质印迹分析单克隆抗体的特异性。将 1 mg/L 重组 β2-MG 进行 SDS-PAGE 后,电转到 PVDF 膜,用 5% 脱脂奶 37 ℃封闭 2 h,PBST 洗膜后与一抗(1∶2 000)在室温下孵育 1 h。清洗后,将膜与 HRP-羊抗鼠(1∶5 000)一起孵育,利用 DAB 底物显色液鉴定。ELISA 检测单克隆抗体的性能。将 1 mg/L 重组 β2-MG 在 4 ℃下包被过夜。洗板后用 0.25% casein 的 ED 液 37 ℃封闭 2 h。洗板后分别将 1 μg/L 的 3 株抗体加入孔中孵育 30 min。洗板并将 HRP-羊抗鼠(1∶5 000)加入孵育 30 min。用 TMB 显色液室温下避光孵育 10 min 后,用 2 mol/L 硫酸终止反应,450 nm/630 nm 双波长处检测 *OD* 值。

1.2.3 双抗体夹心酶联免疫吸附测定法(DAS-ELISA)的建立 将筛选获得的 3 株单克隆抗体进行辣根过氧化物酶标记后[24],以 10 mg/L 的 3 株单克隆抗体包被,37 ℃孵育 2 h。洗板后加入 ED 液,37 ℃封闭 2 h。洗板后加入纯化的重组 β2-MG 孵育 2 h。洗板并加入 HRP 标记抗人 β2-MG 单克隆抗体(1∶2 000)反应 30 min。TMB 显色液避光孵育 10 min 后加入硫酸终止反应,于 450 nm/630 nm 双波长处读取 *OD* 值。

1.2.4 配对抗体对 5H7/6H9-AP 的化学发光酶免疫测定法的建立 基于 HRP 标记建立的 DAS-ELISA,对单克隆抗体 5H7 进行磁珠标记,单克隆抗体 6H9 进行碱性磷酸酶(alkaline phosphatase,AP)标记[25],建立人 β2-MG 化学发光酶免疫测定法。将纯化的重组 β2-MG 作为校准品,并稀释至 3.75、7.50、15.00、30.00 和 120.00 μg/L(质量浓度)5 个梯度,然后用化学发光免疫分析检测仪进行测定校准。使用分析仪上单个吸头连续吸取 50 μL 样品添加到 50 μL 磁珠标记的单克隆抗体 5H7 的颗粒溶液中,形成 Ag-Ab 免疫复合物共孵育 30 min。经清洗后,加入 150 μL AP 标记的单克隆抗体 6H9 的溶液共孵育 15 min,经清洗后,加入化学发光底物溶液并于 10 s 内对相对光单位(relative light unit, RLU)进行读取,由分析仪的 Zecen 软件进行 Logistic 四参数拟合计算。收集 2023 年 1 月至 10 月的 51 例门诊和住院患者临床血清 β2-MG 样本(β2-MG 阳性样本(n = 41),健康样本(n = 10)),年龄 18 ~ 60 岁,均由湖南省人民医院使用的胶乳增强免疫比浊法检测临床值。样本使用基于配对抗体对 5H7/6H9-AP 的 CLEIA 进行检测,根据标准曲线计算检测值,通过比较临床值与检测值相关性分析评价 5H7/6H9-AP 的临

中国知网 https://www.cnki.net

床应用价值。

1.2.5 配对抗体对 5H7/6H9 的胶体金免疫层析法的建立 ①胶体金及金标抗体的制备：配制 0.01% 的氯金酸溶液加热煮沸，加入 1% 柠檬酸三钠溶液，煮沸 15 min，待颜色稳定为酒红色后冷却至室温，加蒸馏水定容，用分光光度计扫描吸收峰进行胶体金质量鉴定，4 ℃保存。取调节至最适 pH 的胶体金溶液于冰上涡旋后静置；加入最适标记量 120% 的单克隆抗体 5H7 混匀后静置；用 5% BSA 调至溶液终浓度为 1% 混匀后静置；离心后沉淀用含 5% BSA 的 PBS 缓冲液加至总溶液的 1/10 进行重悬，4 ℃保存 。②试纸条的组装：试纸条由四部分组成，金标结合垫、样品垫及吸水垫进行预处理后干燥备用[26]，NC 膜上将单克隆抗体 6H9 和羊抗鼠多抗分别划检测线和质控线，将胶体金标记的单克隆抗体 5H7 固定在结合垫上并干燥。在 PVC 胶板上将样品垫、金标结合垫、NC 膜及吸水垫进行固定，分切成宽度 5 mm 的试纸条干燥密封保存备用。③试纸条测试方法与结果判定：室温下将 100 μL 重组 β2-MG 滴于免疫层析试纸条的样品孔中 10 min 观察结果。阳性结果显示质控线和检测线条带区域上有 2 条红线；阴性结果显示仅质控线上出现 1 条红线。无显色条带为无效结果。

1.2.6 统计学分析 采用 GraphPad PRISM 8 进行平均值($\bar{x}$)和标准差(SD)计算、线性回归和相关性分析。使用 Zecen (1.0.0.1) 软件在 RangeCL 免疫分析仪上绘制 CLEIA 标准曲线。$P<0.05$ 有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 重组 β2-MG 的表达纯化及鉴定

从 THP-1 细胞提取 RNA 并进行 PCR 扩增，经电泳分析目的产物(β2-MG 序列)的片段大小为 360 bp，与理论结果一致(图 1A)。将重组表达质粒 β2-MG-pTO-T7 转化至大肠埃希菌，制备重组 β2-MG 蛋白，该蛋白主要以不溶性包涵体的形式表达。包涵体裂解后，通过 Ni-TED 亲和层析纯化重组蛋白，经 SDS-PAGE 分析，目的蛋白条带大小约为 15 kDa，与预期相符(图 1B)。

2.2 抗人 β2-MG 单克隆抗体的制备及鉴定

通过对小鼠皮下注射接种纯化的重组 β2-MG 作为免疫原诱导产生抗体。取免疫小鼠的脾细胞和 SP2/6 细胞进行融合，筛选制备了 3 株可稳定分泌抗人 β2-MG 单克隆抗体的杂交瘤细胞株(3B9、5H7 和 6H9)，用小鼠腹水制备单克隆抗体并进行纯化。通过蛋白质印迹法分析单克隆抗体 3B9、5H7 和 6H9 对重组 β2-MG 的反应性，结果如图 2 所示，3 株抗人 β2-MG 单克隆抗体均在约 15 kDa 的位置与重组 β2-MG 有较好的特异性反应。

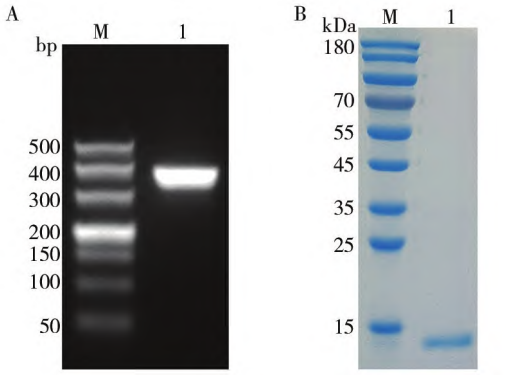


图 1 重组 β2-MG 的原核表达及纯化

Fig. 1 Prokaryotic expression and purification of recombinant β2-MG

A：β2-MG 的基因扩增；M：DNA 分子量标准；1：β2-MG 基因序列片段。B：纯化的重组 β2-MG；M：蛋白分子量标准；1：Ni-TED亲和层析纯化后的重组 β2-MG

A：Gene amplification of β2-MG；M：DNA Marker；1：The gene sequence segments of β2-MG. B：Purified recombinant β2-MG；M：Protein molecular weight marker；1：The recombinant β2-MG after purification with Ni-TED resin

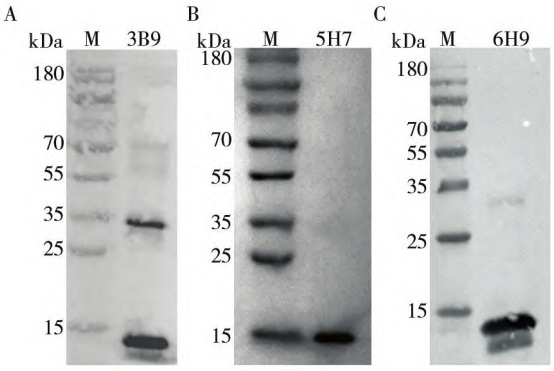


图 2 蛋白质印迹法分析重组 β2-MG 与单克隆抗体的免疫反应性

Fig. 2 Immunological reaction of monoclonal antibodies and recombinant β2-MG analyzed by Western blot

A～C：分别为单克隆抗体 3B9、5H7 和 6H9 的免疫反应性鉴定；M：蛋白质分子量标准

A-C：The identification of immunological reaction for mAb 3B9, 5H7 and 6H9；M：Protein molecular weight marker

中国知网 https://www.cnki.net

2.3 单克隆抗体的性能及配对检测

采用间接 ELISA 对单克隆抗体的性能进行检测。①对单克隆抗体的亚型进行鉴定：筛选的 3 株抗人 β2-MG 单克隆抗体为一抗，二抗为抗 IgM、抗 IgG1、抗 IgG2a、抗 IgG2b、抗 IgG3 的抗体。结果显示，3B9 和 6H9 为 IgG1 亚型，5H7 为 IgG2a 亚型（图 3A）。②对单克隆抗体结合抗原的滴度进行测定：一抗为筛选的 3 株抗人 β2-MG 单克隆抗体，重组 β2-MG 以 1∶1 000 为初始浓度进行 12 个梯度的倍比稀释，PBS 缓冲液（pH 7.4）为空白对照。结果显示，3 株抗人 β2-MG 单克隆抗体的滴度达到近 1∶512 000，均可以特异性的结合重组 β2-MG（图 3B）。使用 DAS-ELISA 对单克隆抗体进行配对。3 株单克隆抗体均分别作为捕获抗体和检测抗体（HRP 标记抗体），结果显示，单克隆抗体 5H7 和 6H9-HRP 配对分别作为捕获抗体和检测抗体时，具有较好的灵敏度（图 3C）。

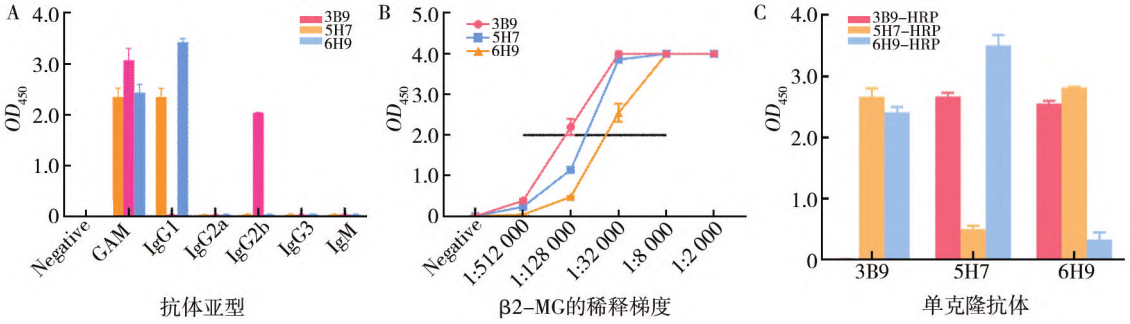


图 3 抗人 β2-MG 单克隆抗体的评价与双抗体夹心酶联免疫吸附测定法筛选单克隆抗体配对

Fig. 3 The evaluation of developed anti-β2-MG monoclonal antibodies and screening of mAb pairs in DAS-ELISA

A：单克隆抗体的亚型鉴定；B：单克隆抗体的滴度测定；C：单克隆抗体的配对

A：The identification of mAbs subtypes；B：The measurement of mAbs titer；C：The pairing of monoclonal antibodies

2.4 配对抗体对 5H7/6H9-AP 的化学发光酶免疫测定法（CLEIA）的建立

使用变异系数（coefficient of variation，CV）评估 CLEIA 的精密度。将重组 β2-MG 稀释至 1.88、15.00 和 30.00 μg/L 三个质量浓度，每个质量浓度检测 5 次，连续检测 10 d。结果显示，建立的 CLEIA 对重组 β2-MG 检测有较好的精密度（CV < 10%）（图 4）。

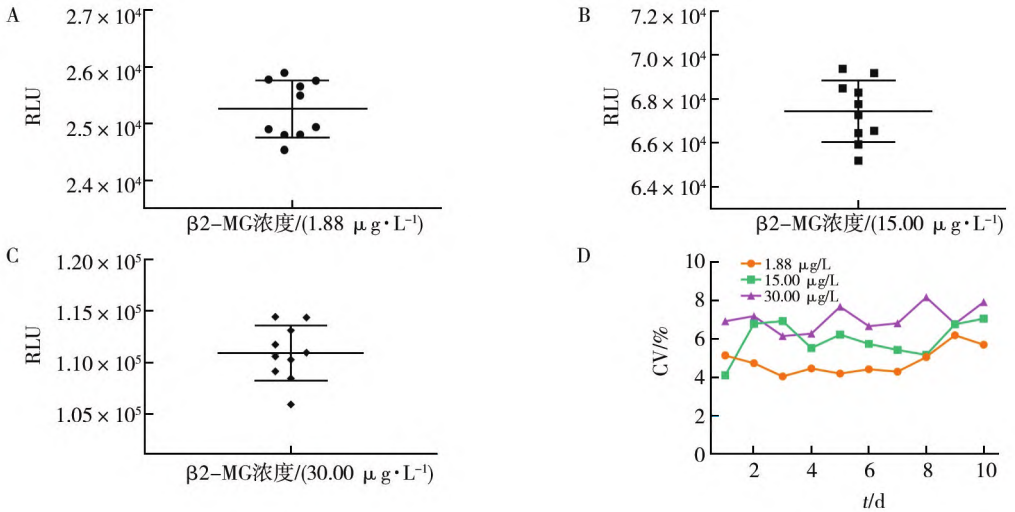


图 4 化学发光酶免疫测定法的精密度分析

Fig. 4 Precision analysis of CLEIA

A～C：用 CLEIA 检测重组 β2-MG 的 3 个质量浓度，分别为 1.88、15.00、30.00 μg/L；D：连续 10 d 的变异系数百分比

A-C：Three concentration of 1.88，15.00，30.00 μg/L with recombinant β2-MG were measured by CLEIA；D：Percent coefficient of variation for 10 consecutive days

中国知网 https://www.cnki.net

将重组 β2-MG(100 mg/L)稀释至 0 ~ 120 μg/L 八个质量梯度浓度,并进行 CLEIA 检测。如图 5A 所示,所建立的 CLEIA 用于重组 β2-MG 检测具有良好的检测线性(R^2 = 0.99)。使用检测限(Limit of detection,LoD)对建立的 CLEIA 灵敏度进行评价。如图 5B 所示,检测限为 0.14 μg/L,即比空白样品(n = 20)的平均 RLU 高出 3 个标准差(standard deviation,SD)所计算的浓度。将 CLEIA 测定的检测值与医院使用的胶乳增强免疫比浊法(β2-微球蛋白(科华生物)测定试剂盒)检测的临床值进行相关性分析,结果表明,两种方法检测临床血清 β2-MG 的相关性显著(R^2 = 0.96,P < 0.000 1)(图 5C),本研究建立的基于 5H7/6H9-AP 的 CLEIA 具有临床诊断的应用潜力。

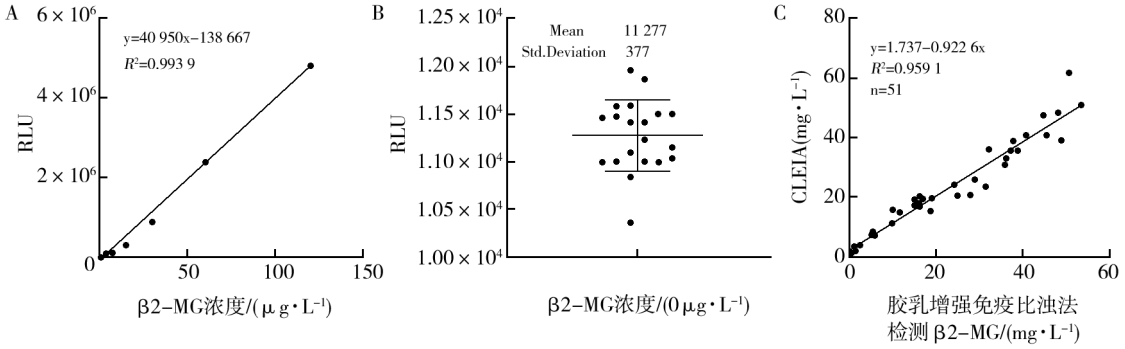


图 5 抗体对 5H7/6H9-AP 在 CLEIA 中的检测性能及 CLEIA 和胶乳增强免疫比浊法的相关性分析

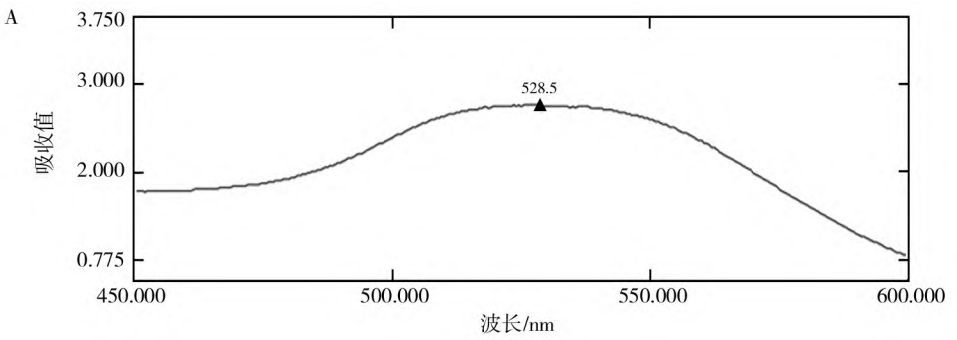
Fig. 5 Detection performances of mAb pairs 5H7/6H9-AP in CLEIA and correlation analysis of CLEIA and latex enhanced immunoturbidimetry assay

A: CLEIA 的线性分析,梯度稀释重组 β2-MG(质量浓度为 0、0.94、3.75、7.50、15.00、30.00、60.00 和 120.00 μg/L); B: 20 次空白试验检测的 RLU; C: 采用医院胶乳增强免疫比浊法和本研究建立的 CLEIA 检测 51 个临床血清 β2-MG

A: Linearity analysis of CLEIA, gradient diluting recombinant β2-MG at a concentration of 0, 0.94, 3.75, 7.50, 15.00, 30.00, 60.00 and 120.00 μg/L; B: Obtained RLUs in 20 tests of blank; C: The latex enhanced immunoturbidimetry assay and our developed CLEIA were used for measurement of 51 serum β2-MG

2.5 配对抗体对 5H7/6H9 的胶体金免疫层析法的建立

基于本研究建立的 CLEIA 与医院临床使用的胶乳增强免疫比浊法测定血清 β2-MG 的相关性显著(R^2 = 0.96,P < 0.000 1)(图 5C),建立抗体对 5H7/6H9 的胶体金免疫层析法。通过紫外分光光度计测定胶体金吸光度,最大吸收峰波长为 528.5 nm(图 6A),对应的吸光度约为 2.76,胶体金的平均粒径大小根据纳米金直径与最大吸收峰关系的回归方程(y = 0.786x + 505.530(x 为纳米金颗粒直径,y 为最大吸收峰波长))计算约为 29 nm[27],可用于试纸条的制作。将重组 β2-MG 从 51.20 mg/L 质量浓度开始进行 10 个梯度的倍比稀释,以 PBS 作为空白对照进行胶体金免疫层析测定。结果如图 6B 所示,随着抗原浓度降低,试纸条检测线颜色呈变浅趋势,重组 β2-MG 浓度为 0.20 mg/L 时仍呈阳性,浓度降至 0.10 mg/L 时检测线不显色,表明本研究制备的试纸条灵敏度良好。



中国知网 https://www.cnki.net

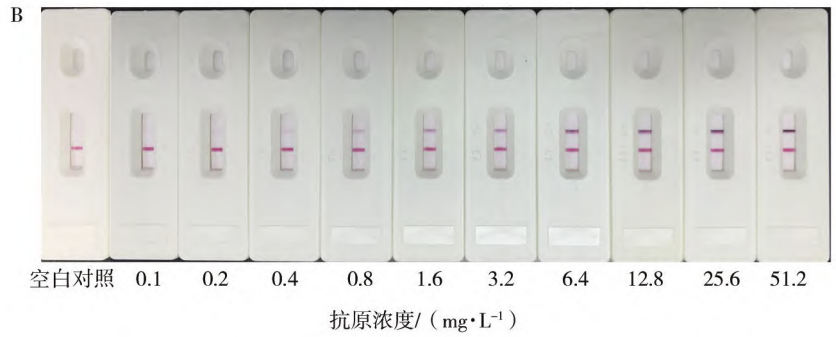


图 6 胶体金颗粒的质量鉴定(A)与胶体金试纸条灵敏性检验(B)

Fig. 6 Quality examination of colloidal gold particles (A) and sensitivity test of colloidal gold test strip(B)

3 讨 论

β2-MG 是一种小分子球蛋白,可经肾小球自由滤过,仅有少量随尿液排出,正常情况下,β2-MG 在血液和尿液中的含量相对稳定,是肾损伤早期诊断的敏感指标[28-31]。在多发性骨髓瘤、心血管疾病、炎症和淋巴增生性疾病等病理条件下,β2-MG 含量均会升高,是相关疾病诊断和预后的标志物。β2-MG 水平与肿瘤负荷相关,是血液系统恶性肿瘤和淋巴瘤预后的独立预测因子[32-35],在肿瘤发生和免疫调控中发挥重要的生物学功能,尤其在免疫监视过程中发挥着重要作用。β2-MG 是免疫检查点抑制剂治疗的潜在生物标志物,也可能是肿瘤研究中未来靶向治疗的主题[36]。制备具有自主知识产权的抗人 β2-MG 单克隆抗体,并建立快速准确的 β2-MG 检测技术,有助于降低国内 β2-MG 检测对关键原材料和主要技术的进口依赖,也是我国肾损伤及相关肿瘤诊断试剂的研究方向。

本研究构建的原核表达质粒 β2-MG-pTO-T7 在大肠埃希菌中能够高效表达,且重组β2-MG携带的组氨酸(His)标签有利于后续蛋白的纯化[37],对小鼠具有较好的免疫性。本研究筛选获得 3 株稳定的抗人 β2-MG 单克隆抗体具有高亲和力和特异性,为免疫诊断试剂盒的研制提供了关键且经济的原料。基于配对抗体对 5H7 与 6H9-HRP 在 DAS-ELISA 检测中的良好性能,本研究初步建立了 CLEIA,并对检测限和线性范围进行测定,结果表明该方法具有较低的检测限(0.14 μg/L)和较宽的动态检测范围(0.14 ~ 120.00 μg/L,可扩展至 60.00 mg/L),达到了临床检测诊断的要求,与近期开发的液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)方法(检测限为 0.06 mg/L,线性范围为 0.25 ~ 40.00 mg/L)相比,其灵敏度更高,测定范围更宽[38]。将本研究建立的 CLEIA 与医院使用的胶乳增强免疫比浊法同时用于临床血清样本中 β2-MG 的检测,结果显示两种检测方法表现出较好的一致性和相关性,具有良好的临床诊断检测潜力,可作为肾脏损伤、心血管疾病、炎症及相关恶性肿瘤早期诊断和预后监测的重要指标。后续将通过检测大量临床血清样本,进一步验证该方法的可靠性。基于 DAS-ELISA 和 CLEIA 的检测性能,本研究使用新开发的单克隆抗体对 5H7 与 6H9,初步建立了方便快捷的胶体金免疫层析法用于即时诊断。初步评估表明,该方法对重组 β2-MG 的检测表现出较好的敏感性,并具有简便、快速、经济等特点。由于成本低,不受仪器设备和实验场地限制,检测结果可在 10 min 内获得,适用于基层医务人员操作及患者家庭动态化监测。后续还将进一步优化胶体金免疫测定法的临床应用反应条件,并进行临床血清样本检测,以便更好地应用于临床诊断。

本研究利用制备的抗人 β2-MG 单克隆抗体开发的 CLEIA,可实现 β2-MG 的定量检测,该方法具有快速、易操作且成本低廉的优势,可用于肾损伤早期诊断及预后监测的准确筛查。同时,本研究初步建立的定性检测 β2-MG 的胶体金免疫层析法具有快速方便的特点且敏感性良好,为国内研发具有自主知识产权的抗人 β2-MG 单克隆抗体诊断试剂盒提供了诊断材料,具有较好的临床 β2-MG 检测诊断的应用潜力。

参考文献:

[1] Zhou J,Zeng Y,Zhou X,et al. Unexplained colonic necrosis in

中国知网 https://www.cnki.net

a patient with end-stage kidney disease on chronic hemodialysis: Case report and review of uremic colitis[J]. BMC Anesthesiology, 2024, 24(1): 249.

[2] Kung CW, Chou YH. Acute kidney disease: An overview of the epidemiology, pathophysiology, and management[J]. Kidney Research And Clinical Practice, 2023, 42(6): 686-699.

[3] Kashani K, Cozzolino MG, Massy ZA, et al. Proposal for a new classification of solutes of interest in uremia and hemodialysis[J]. Blood Purification, 2023, 52(3): 233-241.

[4] Ambrosio MB, Hennig MM, Nascimento HHL, et al. Non-renal lesions of uraemia in domestic cats[J]. Journal of Comparative Pathology, 2020, 180: 105-114.

[5] Martins JM, Magriço R. Uremic frost in end-stage renal disease[J]. New England Journal of Medicine, 2018, 379(7): 669.

[6] Hamed SA. Neurologic conditions and disorders of uremic syndrome of chronic kidney disease: Presentations causes, and treatment strategies[J]. Expert Review of Clinical Pharmacology, 2019, 12(1): 61-90.

[7] Zhu L, Tong G, Yang F, et al. The role of neuroimmune and inflammation in pediatric uremia-induced neuropathy[J]. Frontiers in Immunology, 2022, 13: 1013562.

[8] Wu W, Song A, Xie K, et al. Characteristics of T cell premature senescence in maintenance hemodialysis patients[J]. Inflammation Research, 2024, 73(8): 1299-1309.

[9] Frąk W, Dąbek B, Balcerczyk-Lis M, et al. Role of uremic toxins, oxidative stress, and renal fibrosis in chronic kidney disease[J]. Antioxidants (Basel), 2024, 13(6): 687.

[10] Ravid JD, Kamel MH, Chitalia VC. Uraemic solutes as therapeutic targets in CKD-associated cardiovascular disease[J]. Nature Reviews Nephrology, 2021, 17(6): 402-416.

[11] Vincent C, Revillard JP. Beta-2-microglobulin and HLA-related glycoproteins in human urine and serum[J]. Contributions to Nephrology, 1981, 26: 66-88.

[12] Kanat Sahin C, Mete B, Demirhindi H, et al. Low serum beta-2 microglobulin level: A possible biomarker for sarcopenia in the elderly population[J]. Medicina (Kaunas), 2024, 60(11): 1879.

[13] Cui N, Feng X, Zhang Y, et al. Serum β2-microglobulin as an independent risk factor for mortality in patients with acute respiratory distress syndrome caused by bacterial infection[J]. Scientific Reports, 2024, 14(1): 22999.

[14] Shen Y, Chen JJ, Yao WB, et al. Predictive value of serum β2-microglobulin in cardiac valve calcification in maintenance hemodialysis patients[J]. Journal of Thoracic Disease, 2023, 15(9): 4914-4924.

[15] Carreras N, Arnaez J, Valls A, et al. CSF neopterin and beta-2-microglobulin as inflammation biomarkers in newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. Pediatric Research, 2023, 93: 1328-1335.

[16] Maaroufi A, Khadem-Ansari MH, Khalkhali HR, et al. Serum levels of bone sialoprotein, osteopontin, and β2-microglobulin in stage I of multiple myeloma[J]. Journal of Cancer Research and Therapeutics, 2020, 16(1): 98-101.

[17] Li J, Wu Y, Zhang X, et al. Causal relationship between beta-2 microglobulin and B-cell malignancies: Genome-wide meta-analysis and a bidirectional two-sample Mendelian randomization study[J]. Frontiers in Immunology, 2024, 5: 1448476.

[18] Zhang J, Lu X, Zu Y, et al. Prognostic value of beta-2 microglobulin on mortality in chronic kidney disease patients: A systematic review and meta-analysis[J]. Therapeutic Apheresis and Dialysis, 2022, 26: 267-274.

[19] Lin L, Wang C, Ren J, et al. A classifier based on 273 urinary peptides predicts early renal damage in primary hypertension[J]. Journal of Hypertension, 2023, 41(8): 1306-1312.

[20] Babovic B, Belada Babovic N, Tomovic F, et al. Association of uremic toxins and systemic inflammation with depression and anxiety among hemodialysis patients in Montenegro[J]. International Journal of Psychiatry in Medicine, 2025, 60(4): 443-455.

[21] Satarug S, Vesey DA, Nishijo M, et al. The inverse association of glomerular function and urinary β2-MG excretion and its implications for cadmium health risk assessment[J]. Environmental Research Letters, 2019, 173: 40-47.

[22] Seo S, Hong JY, Yoon S, et al. Prognostic significance of serum beta-2 microglobulin in patients with diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era[J]. Oncotarget, 2016, 7(47): 76934-76943.

[23] Liu Z, Huang J, Ou RM, et al. A dual-label time-resolved fluorescence immunoassay for the simultaneous determination of ferritin and β2-microglobulin[J]. Journal of Clinical Laboratory Analysis, 2017, 31(6): e22132.

[24] Liu Y, Liu YH, Bei WJ, et al. A dual-label time-resolved fluorescence immunoassay for the simultaneous determination of cystatin C and β2-microglobulin in urine[J]. British Journal of Biomedical Science, 2017, 74(4): 193-197.

[25] Liao M, Zheng J, Xu Y, et al. Development of magnetic particle-based chemiluminescence immunoassay for measurement of human procalcitonin in serum[J]. Journal of Immunological Methods, 2021, 488: 112913.

[26] 孙瑜翀,张小米,计晓花,等. 鲤疱疹病毒Ⅱ型抗体胶体金检测试纸条的制备和分析[J]. 微生物学通报, 2023, 50(12): 5449-5458.

[27] Yu G, Yu X, Yang G, et al. A novel diagnostic method to detect duck tembusu virus: A colloidal gold-based immunochromatographic assay[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1001.

[28] Zhang J, Lu X, Zu Y, et al. Prognostic value of beta-2 microglobulin on mortality in chronic kidney disease patients: A systematic review and meta-analysis[J]. Therapeutic Apheresis and Dialysis, 2022, 26(2): 267-274.

[29] Yu XL, Sun W, Liu L, et al. Urinary α 1-microglobulin and β2-

中国知网 https://www.cnki.net

microglobulin as markers of early kidney injury in HIV-positive male patients on tenofovir-based antiretroviral therapy [J]. PLoS One,2024,19(6):e0303442.

[30] Yuan L,Jin X. Predictive value of serum NGAL and β2 microglobulin in blood and urine amongst patients with acute pancreatitis and acute kidney injury [J]. Archivos Españoles de Urología,2023,76(5):335-340.

[31] Zhang L,Sun J,Zhang M,et al. The significance of combined detection of CysC,urinary mAlb and β2-MG in diagnosis of the early renal injury in pregnancy-induced hypertension syndrome [J]. Saudi Journal of Biological Sciences,2019,26(8):1982-1985.

[32] Pfahler V,D′anastasi M,Dürr HR,et al. Tumor load in patients with multiple myeloma:β2-microglobulin levels versus low-dose whole-body CT[J]. European Journal of Haematology,2020,104(5):383-389.

[33] Kim HD,Cho H,Kim S,et al. Prognostic stratification of patients with burkitt lymphoma using serum β2-microglobulin levels[J]. Cancer Research and Treatment,2021,53(3):847-856.

[34] Chen NC,Chang H,Kao HW,et al. Beta2-microglobulin is a valuable marker and identifies a poor-prognosis subgroup among intermediate-risk patients with diffuse large B cell lymphoma [J]. Clinical and Experimental Medicine,2023,23:3759-3766.

[35] Carreras N,Arnaez J,Valls A,et al. CSF neopterin and beta-2-microglobulin as inflammation biomarkers in newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. Pediatric Research,2023,93:1328-1335.

[36] Wang H,Liu B,Wei J. Beta2-microglobulin(B2M) in cancer immunotherapies:Biological function,resistance and remedy [J]. Cancer Letters,2021,517:96-104.

[37] Alizadeh AA,Rasouli S,Jamshidi Kandjani O,et al. Expression,purification and characterization of functional teduglutide using GST fusion system in prokaryotic cells[J]. Advanced Pharmaceutical Bulletin,2023,13(3):592-600.

[38] Yang S,Tian X,Chen Y,et al. Isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for serum beta-2-microglobulin quantification[J]. Journal of Chromatography. B,Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences,2022,1211:123487.

中国知网 https://www.cnki.net