

• 临床检验研究论著 •

## 应用 FITC 系统建立非均衡竞争总甲状腺素(TT4)化学发光法\*

陈 蕾<sup>1△</sup>, 孔海霞<sup>2</sup>, 刘 萍<sup>2,3</sup>, 宋启超<sup>3</sup>, 田云霞<sup>3</sup>

(1. 中国康复研究中心北京博爱医院, 北京 100068; 2. 重庆医科大学检验医学院, 重庆 400016;

3. 博奥赛斯(天津)生物科技有限公司, 天津 300162)

**摘要:**目的 建立可广泛应用于总甲状腺素(TT4)检测的方法。方法 制备辣根过氧化物酶(HRP)标记兔抗人甲状腺素(T4)多克隆抗体及异硫氰酸荧光素(FITC)标记 T4 类似物。以抗 FITC 抗体包被发光板, FITC-T4 类似物与抗 FITC 抗体结合形成固相抗原, 血清标本经处理后使 T4 均呈游离状态, 固相抗原与血清 T4 竞争结合抗 T4 抗体-HRP, 建立化学发光法(CLIA)血清 TT4 检测系统(FITC 系统), 进行方法学评价, 并与 T4-牛血清  $\gamma$  球蛋白直接包被系统(非 FITC 系统)和罗氏公司 Elecsys2010 系统进行比较。结果 FITC 系统检测线性范围为 0.1~320 ng/mL, 灵敏度为 0.1 ng/mL; 批内变异系数小于 5%, 优于非 FITC 系统; 与 Elecsys2010 系统检测结果具有良好的相关性( $r=0.9169$ )。结论 应用 FITC 系统建立的非均衡竞争 TT4 CLIA 分析系统灵敏度高、特异性, 可用于临床标本的检测。

**关键词:** 异硫氰酸荧光素; 非均衡竞争; 甲状腺素; 化学发光免疫分析

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.06.011

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)06-0663-03

## Construction of non-equilibrium competitive chemiluminescence immunoassay using FITC system for the detection of total tetraiodothyronine\*

Chen Lei<sup>1△</sup>, Kong Haixia<sup>2</sup>, Liu Ping<sup>2,3</sup>, Song Qichao<sup>3</sup>, Tian Yunxia<sup>3</sup>

(1. Beijing Boai Hospital, China Rehabilitation Research Center, Beijing 100068, China; 2. Department of Medical Laboratory, Chongqing University of Medical Science, Chongqing 400016, China; 3. Petek Biotechnology Co., Ltd, Tianjin 300162, China)

**Abstract:** Objective To construct a method for the detection of total tetraiodothyronine(TT4). **Methods** Anti-tetraiodothyronine(T4) polyclonal antibody was labeled with horse radish peroxidase(HRP), and fluorescein isothiocyanate(FITC) was conjugated to T4-analogue. Microwell was coated by anti-FITC antibody, FITC-T4-analogue was combined with anti-FITC to form solid phase antigen. T4 in serum samples, treated to release combined T4, and solid phase antigen would combine to anti-T4-HRP competitively(FITC system). FITC system was evaluated and compared with non-FITC system, based on T4-bovine serum gamma globulin, and Roche Elecsys2010 system. **Results** The constructed FITC system was with linear range of 0.1—320 ng/mL, sensitivity of 0.1 ng/mL, and coefficients of variability within-run under 5%, which was better than non-FITC system. There was fine correlation between FITC system and Elecsys2010 system( $r=0.9169$ ). **Conclusion** Non-equilibrium competitive CLIA system based on FITC system was successfully constructed, with satisfying specificity and sensitivity, and could be applied for the detection of clinical samples.

**Key words:** fluorescein isothiocyanate; non-equilibrium competition; thyroxine; chemiluminescence immunoassay

甲状腺素即 3,5,3',5'-四碘甲腺原氨酸(T4)由甲状腺滤泡上皮细胞合成和分泌。血清总 T4(TT4)包括游离 T4 和与蛋白质结合 T4, 后者经处理后可解离出 T4, 此时检测的 T4 即为 TT4。血清 TT4 检测可用于诊断甲状腺功能亢进、甲状腺功能减退、甲状腺炎<sup>[1]</sup>。TT4 检测方法包括放射免疫分析(RIA)、酶免疫分析(EIA)、免疫荧光分析(IFA)、化学发光免疫分析(CLIA)和电化学发光免疫分析(ECLIA)等<sup>[2-6]</sup>。其中, CLIA 因灵敏度高、特异性强、检测范围宽、无放射性危害, 得以广泛应用。抗异硫氰酸荧光素(FITC)单克隆抗体(抗 FITC 抗体)与 FITC 结合特异性高, 亲和力也高于抗体与多肽抗原的结合<sup>[7-11]</sup>。在化学发光板上包被高浓度抗 FITC 抗体, 可避免直接包被抗原引起的变异过大的问题, 有更好的均一性。用 FITC-T4 类似物取代 T4 作为竞争抗原, 可增加 T4 校准品或样品与辣根过氧化物酶(HRP)标记 T4 抗体结合, 提高检测灵敏度。本研究拟以 FITC 系统为平台建立可用于 TT4 检测的

非均衡竞争 CLIA 系统。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 2.5 kg 左右雄性新西兰大白兔(军事医学科学院实验动物中心)。弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、T4 类似物、T4 纯品、8-苯胺-1-萘磺酸(ANS)和 FITC(美国 Sigma 公司), 抗 FITC 抗体(美国 Fitzgerald 公司), 羊抗兔 IgG-HRP(北京中杉公司)。Hi Trap<sup>TM</sup> Protein A 亲和层析柱(美国 Pharmacia 公司), Bioscience PETECK96-1 型微孔板发光分析仪、BIOS-401 型微孔板脱水机[博奥赛斯(天津)生物科技有限公司], 自动化酶免分析仪 SM-3(美国 Thermo 公司), 紫外分光光度计 7252PC(上海光谱仪器有限公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 抗原的合成** 使用碳化二亚胺试剂将甲酯化-T4 和牛血清清蛋白(BSA)、牛  $\gamma$  球蛋白(BGG)耦联。

**1.2.2 抗人 T4 多克隆抗体的制备** 400  $\mu$ g T4-BSA(溶于

\* 基金项目: 天津市科技型中小企业技术创新专项资金项目(09ZXCXSH05300)。△ 通讯作者, E-mail: amooncl@yahoo.com。

0.9%生理盐水中)与等体积弗氏完全佐剂充分混合乳化后,于雄性新西兰兔后肢及皮下多点注射,以后每 2 周免疫 1 次(以弗氏不完全佐剂取代弗氏完全佐剂,其余同上)。免疫接种4~5 次,每次免疫后的第 10~14 天,从兔耳静脉采血,应用间接酶联免疫吸附法(ELISA)测定抗体效价,抗体效价满足试验要求后制备兔抗血清。

**1.2.3 抗体的纯化和抗体浓度的测定** 用 60%的硫酸铵对经免疫的家兔血清进行分级沉淀,溶解沉淀后用 Biogel P-10 柱除盐,冻干浓缩;用 pH7.4、0.1 mol/L Tris-HCl 溶解,在 Hi TrapTM Protein A 亲和层析柱上样后分别以 pH7.4、100 mmol/L Tris-HCl 和 pH7.4、10 mmol/L Tris-HCl 为流动相进行洗脱,分步收集;再用装有 3-碘-L-甲状腺原氨酸、3,5-二碘-L-甲状腺原氨酸、D-三碘甲状腺原氨酸(D-T3)、L-三碘甲状腺原氨酸(L-T3)、反三碘甲状腺原氨酸(rT3)的 Sepharose4B 洗脱纯化。ELISA 检测纯化液是否与上述成分存在交叉反应。十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测纯化液蛋白纯度;紫外光谱 280、260 nm 吸收差法测定纯化后抗人 T4 抗体浓度为 2.24 mg/mL。

**1.2.4 CLIA 检测系统的建立** (1)包被板制备:用包被缓冲液稀释抗 FITC 抗体至 100 μg/mL,按每孔 100 μL 加入微孔板,37℃包被 2 h 后去除孔内液体,洗板 3 次,拍干,按每孔 200 μL 加入封闭液,37℃封闭 2 h,去除孔内液体,拍干后烘干,加入适量干燥剂,2~8℃密封保存,作为 FITC 系统包被板。用包被缓冲液稀释 T4-BGG 至 2.5 μg/mL,其余步骤同 FITC 系统包被板制备,作为非 FITC 系统包被板。(2)FITC-T4 类似物制备:参考改良 Marshall 法<sup>[12]</sup>,用 FITC 标记纯化 T4 类似物,游离 FITC 经磷酸盐缓冲液(PBS)透析除去,并用紫外分光光度计测定 A<sub>495</sub> 及 A<sub>280</sub> 值。(3)酶结合抗体制备:采用常规高碘酸钠氧化法制备<sup>[12]</sup>,以酶稀释液稀释,采用方阵滴定法确定酶结合物工作浓度。(4)质控品配制:将适量 T4 加入阴性人血清中,配制高、中、低值质控品(QcH、QcM、QcL)。(5)FITC 系统 CLIA 检测步骤:取包被抗 FITC 抗体的发光板,每孔加入 50 μL FITC-T4 类似物,50 μL 校准品或样品,50 μL 酶结合抗体,混匀,37℃反应 1 h;洗板,加入发光底物液,避光 5 min 后在 Bioscience PETECK96-1 型微孔板发光分析仪上读数。(6)非 FITC 系统 CLIA 检测步骤:取包被 T4-BGG 的发光板,每孔加入 50 μL 校准品或样品,50 μL 酶结合抗体,混匀,37℃反应 1 h;洗板,加入发光液,避光 5 min 后在 Bioscience PETECK96-1 型微孔板发光分析仪上读数。

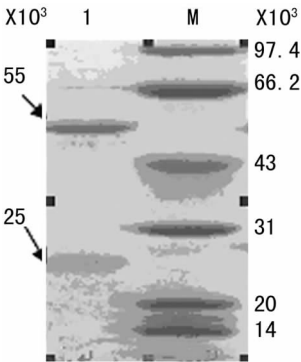
**1.2.5 方法学评价** (1)线性范围:用 Log(X)-Logit(Y)数学模型进行线性回归处理,得到校准品剂量-反应曲线的回归直线,样品中 T4 和由光学系统检测的相对光单位(RLU)呈反比,校准品线性相关系数绝对值不小于 0.990 0。(2)灵敏度:制备标准曲线,测定 10 个零值孔的发光值,计算( $\bar{x}-2s$ ),将此值代回标准曲线,所得浓度值即为灵敏度。(3)精密性:每天测 QcH、QcL 各 10 孔,计算 QcH 和 QcL 检测结果的变异系数(CV%),即为批内精密性(CV<sub>批内</sub>);相同方法连续检测连续 3 d,QcH 和 QcL 各 30 孔,计算各自的 CV%,即批间精密性(CV<sub>批间</sub>)。(4)特异度:用不同稀释液配制不同浓度 3-碘-L-甲状腺原氨酸、3,5-二碘-L-甲状腺原氨酸、D-T3、L-T3、rT3 溶液,用本系统检测,分析交叉反应性。(5)临床参考区间的建立:随机选择体检健康男性 240 例,平均年龄 35.5 岁,女性

264 例,平均 35.5 岁,采集空腹静脉血,常规分离血清(排除溶血、脂血或黄疸血清标本),根据检测结果确定自建检测系统的参考区间[95%置信区间(95%CI)]。(6)与进口 CLIA 检测系统比较:随机选取 120 份血清标本,采用本方法及进口罗氏公司 Elecsys2010 检测系统于同日内进行检测,对两种检测方法的结果进行相关性及不一致性分析。(7)稳定性:取同一批 2 个试剂盒,分别于 37、4℃保存 7 d 后同时平衡至室温,制备标准曲线,比较 2 个试剂盒检测相同校准品或样品的结果。

**1.2.6 统计学处理** 采用 SPSS13.0 软件进行数据分析,不同检测系统检测结果比较采用配对 *t* 检验,相关性分析采用线性相关和回归分析;检测结果不一致原因分析采用配对资料的  $\chi^2$  检验;显著性检验水准为  $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

**2.1 抗体效价及纯度** 间接 ELISA 检测兔血清效价为 1:18 000。纯化抗体 SDS-PAGE 检测仅在相对分子质量  $55\times10^3$  及  $25\times10^3$  处分别出现 1 条明显条带(见图 1)。



M:蛋白分子标记物;1:纯化抗体。

图 1 纯化抗人 T4 抗体 SDS-PAGE 检测

**2.2 线性范围和灵敏度** FITC 系统线性范围为 0.1~330 ng/mL,以 5 个系列浓度和 1 个零值校准品建立标准曲线,曲线回归方程为  $Y=-1.783\ 2X+1.290\ 5(r=0.998\ 6)$ ,灵敏度为 0.258 ng/mL。非 FITC 系统标准曲线回归方程为  $Y=-2.193\ 5X+2.559\ 4(r=0.997\ 4)$ ,灵敏度为 0.750 ng/mL。

**2.3 精密性** FITC 与非 FITC 系统测定 T4 的 CV<sub>批内</sub> 分析见表 1。FITC 系统测定 QcL、QcH 的 CV<sub>批间</sub> 分别为 4.47%、4.29%,非 FITC 系统在 11.00%左右。

表 1 FITC 与非 FITC 系统测定 T4 的 CV<sub>批内</sub> 分析 [ng/mL(%), $\bar{x}\pm s$ (CV%),*n*=10]

质控品	批次	FITC 系统	非 FITC 系统
QcL	第 1 批	27.18±0.96(3.53)	26.32±2.09(11.00)*
	第 2 批	27.29±1.38(4.05)	27.20±2.63(9.68)*
	第 3 批	27.20±1.46(4.35)	26.29±2.74(10.44)*
QcH	第 1 批	187.75±11.08(3.90)	182.56±16.04(8.99)*
	第 2 批	184.37±8.96(3.76)	174.97±17.95(10.26)*
	第 3 批	189.26±11.13(4.18)	179.23±19.02(10.15)*

\*:  $P<0.05$ ,与同批次 FITC 系统检测 CV<sub>批内</sub> 比较。

**2.4 特异度** 3-碘-L-甲状腺原氨酸、3,5-二碘-L-甲状腺原氨酸、L-T3、D-T3、rT3 对 FITC 系统检测的交叉反应性分别为:小于 0.01%、小于 0.01%、1.76%、1.57%、2.50%。

**2.5 临床参考区间** 应用 FITC 系统检测 504 例健康者标

本,建立本法临床参考区间(95%CI)为 35~103 ng/mL。

**2.6 自建系统与进口系统测定结果分析** 自建 FITC 系统、罗氏公司 Elecsys2010 系统测定结果分别为(78.02±52.75)和(80.40±42.75) ng/mL,比较差异无统计学意义( $t=1.561$ ,  $P>0.05$ );以自建系统测定结果为纵坐标,以罗氏公司 Elecsys2010 系统测定结果为横坐标,进行线性回归分析,回归方程为  $Y=1.181\ 6X-16.990\ 0$  (回归系数为 1.181 6,  $r=0.916\ 9$ ,  $P<0.001$ )。120 例血清标本有 6 例测定结果不一致,但该差异无统计学意义( $P>0.05$ )。6 例标本重复检测结果无明显改变。使用雅培系统进行检测,4 例标本检测结果与 Elecsys2010 系统检测结果一致,2 例与自建检测系统一致。以罗氏 MODULAR P800 检测系统为参考方法,经配对四格表分析(见表 2),自建及罗氏检测系统差异无统计学意义( $\chi^2=0.167$ ,  $P>0.05$ )。

自建系统	罗氏 MODULAR P800		合计
	阳性	阴性	
阳性	46	2	48
阴性	4	68	72
合计	50	70	120

**2.7 稳定性** 稳定性试验结果见表 3;其中 4℃ 保存试剂检测各浓度校准品结果相关系数、回归系数分别为 0.995 和 2.41,37℃ 保存试剂检测结果相关系数、回归系数分别为 0.994 和 2.43。

校准品 (ng/mL)	4℃ 保存试剂	37℃ 保存试剂
0	0.00	0.00
4	4.38	4.38
40	31.02	29.84
70	79.13	79.64
140	131.47	143.21
330	366.13	347.27

\* :相同浓度校准品不同温度保存试剂检测结果比较,  $P>0.05$ 。

3 讨 论

本研究采用非均衡竞争原理,将抗 FITC 抗体包被在微孔板中,加入 FITC-T4 类似物,T4 校准品或样品,抗 T4 抗体-HRP,FITC-T4 类似物与抗 FITC 抗体结合形成固相抗原。与固相抗原相比,校准品或样品中的 T4 与抗 T4 抗体-HRP 的亲合力更高,形成 T4-抗 T4 抗体-HRP 复合物和较少的抗 FITC 抗体-FITC-T4 类似物-抗 T4 抗体-HRP 复合物,去除游离成分后加入 HRP 的作用底物(鲁米诺),于第 5~15 分钟测定各加样孔在 425 nm 处的 RLU。RLU 与样品 T4 浓度呈负相关,根据 RLU-浓度标准曲线即可获得样品中的 E2 含量。在反应体系中加入解离剂 ANS 和巴比妥酸缓冲液,可使与甲状腺素结合球蛋白、前清蛋白结合的大量 T4 解离,从而更准确地检

测血清 TT4 含量。

与传统的包被抗体方法相比,本研究采用的抗 FITC 抗体-FITC 系统可有效避免加样延迟时间对反应的影响。本方法将抗原(T4 类似物)间接包被在微孔板上,样品或校准品中的 T4 不与已包被抗体反应,加入酶结合物后反应才开始,因此可避免加样延迟时间对反应的影响。间接包被法可以增加包被浓度,使包被板的精密度提高了 2.5 倍。本检测系统将 T4 类似物-FITC 间接包被在微孔板上作为固相抗原,传统方法则是直接以 T4 作为固相抗原,而 T4 类似物与抗 T4 抗体-HRP 的亲合力弱于 T4,因此,当采用竞争法检测标本 T4 含量时,本检测系统的灵敏度更高。此外,应用 FITC-抗 FITC 抗体放大系统具有诸多优点:FITC 易与抗原结合,标记率高,标记物易于分离;FITC 标记物十分稳定,保证了抗 FITC 抗体-FITC 系统的稳定性。

综上所述,本研究建立应用 FITC 系统建立的非均衡竞争 TT4 化学发光检测方法已具备灵敏度高、测定范围广、精密性好、稳定性高、临床符合性佳的优点,适合临床应用。

参考文献

[1] Karmisholt J, Andersen S, Laurberg P. Variation in thyroid function tests in patients with stable untreated subclinical hypothyroidism[J]. Thyroid,2008,18(3):303-308.

[2] 王贵生,张巧云. 甲状腺功能检测的分析前干扰因素[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(2):244-246.

[3] 张卫国,吴国球. 自动化学发光免疫分析法测定血清 T3、T4 和 TSH 的评价[J]. 现代医学,2005,33(2):111-113.

[4] 徐立根,孙有香,焦岩. 国产 T3、T4、FT3 和 FT4 RIA kit 对比测定研究[J]. 放射免疫学杂志,2005,18(1):1-4.

[5] Thienpont LM, Van Uytendaele K, Beaulieu G, et al. Report of the IFCC Working Group for Standardization of Thyroid Function Tests; part 2: free thyroxine and free triiodothyronine[J]. Clin Chem,2010,56(6):921-929.

[6] Huang Y, Zhao SL, Shi M, et al. Chemiluminescent immunoassay of thyroxine enhanced by microchip electrophoresis[J]. Anal Biochem,2010,399(1):72-77.

[7] Ghosh S, Howlett M, Boag D, et al. Interference in free thyroxine immunoassay[J]. Eur J Intern Med,2008,19(2):221-222.

[8] Yang H, Lou C, Xu M, et al. Investigation of folate-conjugated fluorescent silica nanoparticles for targeting delivery to folate receptor-positive tumors and their internalization mechanism [J]. Int J Nanomedicine,2011,6(16):2023-2032.

[9] 周新,涂植光. 临床生物化学和生物化学检测[M]. 北京:人民卫生出版社,2006:385-386.

[10] 林珍,王翔,任世奇,等. 化学发光酶免疫法测定游离三碘甲腺原氨酸[J]. 分析化学研究报告,2008,5(5):609-613.

[11] 董雪,钟青萍,黄安诚,等. 河豚毒素直接竞争 ELISA 检测方法的研究[J]. 现代食品科技,2009,25(8):977-981.

[12] 蔡文琴,王伯云. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术[M]. 成都:四川科技出版社,1994:45-60.

(收稿日期:2011-10-08)