

• 临床检验研究论著 •

应用 FITC 系统建立非均衡竞争睾酮(T)化学发光法^{*}陈 茶¹,孔海霞²,雷 鹏²,宋启超³,刘 萍^{2,3△}

(1. 广东省中医院检验科,广东广州 510006;2. 重庆医科大学检验医学院 400016;

3. 博奥赛斯(天津)生物科技有限公司,天津 300162)

摘要:目的 建立可广泛应用于睾酮(T)检测的方法。方法 制备辣根过氧化物酶(HRP)标记兔抗人 T 多克隆抗体及异硫氰酸荧光素(FITC)标记 T-类似物。以抗 FITC 抗体包被发光板, FITC-T 类似物与抗 FITC 抗体结合形成固相抗原, 固相抗原与血清中 T 竞争结合抗 T 抗体-HRP, 建立化学发光法(CLIA)血清 T 检测系统(FITC 系统), 进行方法学评价, 并与直接用 T-牛血清蛋白包被系统(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 0.05~20 ng/mL, 灵敏度为 0.05 ng/mL; 批内、批间变异系数均小于 5%, 优于非 FITC 系统; 与 Elecsys2010 系统检测结果的相关系数为 0.973 2, 测定结果差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 成功建立基于 FITC 系统的非均衡竞争 T 检测 CLIA 系统, 精密度、灵敏度等指标均符合临床要求, 可用于临床标本检测。

关键词:异硫氰酸荧光素; 非均衡竞争; 睾酮; 化学发光免疫分析

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.06.013

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)06-0668-03

Construction of non-equilibrium competitive chemiluminescence immunoassay using FITC system for the detection of testosterone^{*}Chen Cha¹, Kong Haixia², Lei Peng², Song Qichao³, Liu Ping^{2,3△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Traditional Chinese Medicine hospital of Guangdong, Guangzhou Guangdong 516000, China; 2. Department of Medical Laboratory, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 3. Peteck Biotechnology Co., Ltd, Tianjin 300162, China)

Abstract: Objective To construct a method for the detection of testosterone(T). **Methods** anti-T polyclonal antibody was labeled with horse radish peroxidase(HRP), and fluorescein isothiocyanate(FITC) was conjugated to T-analogue. Microwell was coated by anti-FITC antibody, FITC-T-analogue was combined with anti-FITC to form solid phase antigen, and solid phage antigen and T in sample would combine to anti-T-HRP competitively(FITC system). FITC system was evaluated and compared with non-FITC system, based on T-bovine serum albumin, and Roche Elecsys2010 system. **Results** The constructed FITC system was with linear range of 0.05~20 ng/mL, sensitivity of 0.05 ng/mL, and coefficients of variability among and between batch under 5%, which was better than non-FITC system. Compared with Elecsys2010 system, the correlation coefficient was 0.973 2, and with no statistical difference of detection results ($P>0.05$). **Conclusion** The non-equilibrium competitive chemiluminescence immunoassay based on FITC system was successfully constructed, with satisfying precision and sensitivity, and could be applied for the detection of clinical samples.

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

男性及女性均可分泌产生睾酮(T), 生理水平雄激素对妇女没有特殊作用^[1]。女性检测 T 有助于诊断雄激素综合征、肾上腺发育不良或卵巢功能不足等;女性检测 T 可用于诊断性腺发育不足、雌激素治疗、染色体异常和肝硬化等^[2-4]。用于 T 检测的方法有放射免疫分析(RIA)、酶免疫分析(EIA)、免疫荧光分析(IF)、化学发光免疫分析(CLIA)和电化学发光免疫分析(ECLIA)等^[5-8]。CIA 具有灵敏度高、特异性强、检测范围宽、无放射性危害等优势而得以广泛应用, 但目前临床检测仪器和试剂 90% 以上依赖进口。抗异硫氰酸荧光素(FITC)单克隆抗体可特异性结合 FITC, 且亲和力较高^[9-10]。本研究以 FITC 系统为平台建立了非均衡竞争法 T 检测 CLIA 技术。

1 材料与方法

1.1 材料 2.3 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、T 类似物、T 纯品、FITC(美国 Sigma 公司), 抗 FITC 抗体(美国 Fitzgerald 公司), Lowry 蛋白定量试剂盒(北京博陵科为生物有限公司),

羊抗兔 IgG-辣根过氧化物酶(HRP)(北京中杉公司)。HiTrapTM 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 抗原合成 使用碳化二亚胺试剂将 T 和牛血清清蛋白(BSA)、钥孔戚血蓝素(KLH)耦联。

1.2.2 抗人 T 多克隆抗体制备 T-KLH(溶于 0.9% 生理盐水中)与等体积弗氏完全佐剂充分混合乳化后, 按 50 微克/只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完全弗氏佐剂, 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。

* 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: liup0708@163.com。

1.2.3 抗体纯化和浓度测定 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。十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 检测蛋白纯度; 以 Lowry 蛋白定量试剂盒检测抗体浓度。

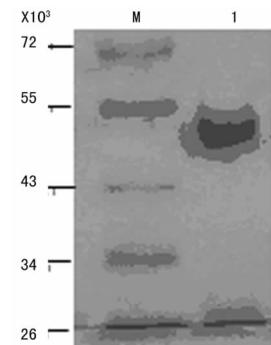
1.2.4 CLIA 检测系统的建立 (1)包被板的制备: 用包被缓冲液稀释抗 FITC 抗体至 5 μ g/mL, 按每孔 100 μ L 加入微孔板, 37 °C 包被 2 h 后去除孔内液体, 洗板 3 次, 拍干, 按每孔 200 μ L 加入封闭液, 37 °C 封闭 2 h, 去除孔内液体, 拍干后烘干, 加入适量干燥剂, 2~8 °C 密封保存, 作为 FITC 系统包被板。用包被缓冲液稀释 T-BSA 至 1.5 μ g/mL, 其余步骤同 FITC 系统包被板的制备, 作为非 FITC 系统包被板。(2) FITC-T 类似物的制备: 参考改良 Marsshall 法^[11], 用 FITC 标记 T 类似物, 游离 FITC 经磷酸盐缓冲液 (PBS) 透析除去, 并测定 A495 及 A280 值。(3)酶结合抗体的制备: 采用常规高碘酸钠氧化法制备^[12], 制备后加入等体积甘油, 混匀后 -20 °C 保存。(4)FITC 系统 CLIA 检测步骤: 取包被抗 FITC 抗体的发光板, 每孔加入 50 μ L FITC-T 类似物、50 μ L 校准品或样品, 50 μ L 酶结合抗体, 混匀, 37 °C 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。(5)非 FITC 系统 CLIA 检测步骤: 取包被 T-BSA 的发光板, 每孔加入 50 μ L 校准品或样品, 50 μ L 酶结合抗体, 混匀, 37 °C 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 $\text{Log}(X)$ - $\text{Logit}(Y)$ 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 T 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 个零值发光值, 计算 ($\bar{x} \pm 2s$), 将此值代回标准曲线, 所得浓度值即为灵敏度, 分别测定 FITC 检测系统及非 FITC 检测系统的灵敏度。(3)精密度: 每天测高值质控品 (QcH) 和低值质控品 (QcL) 各 10 孔, 计算 QcH 和 QcL 检测结果的变异系数 (CV%), 即为批内精密度 (CV_{批内}); 相同方法连续检测连续 3 d, QcH 和 QcL 各 30 孔, 计算各自的 CV%, 即批间精密度 (CV_{批间})。分别计算 FITC 检测系统及非 FITC 检测系统的 CV_{批内} 及 CV_{批间}。(4)特异度: 用不同稀释液配制浓度均为 1 000 ng/mL 的雌二醇 (E2)、雌三醇 (E3) 和孕酮 (P) 溶液, 用试剂盒检测交叉反应性。(5)临床参考区间的建立: 随机选择体检健康男性 126 例, 平均年龄 35.5 岁, 女性 274 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), 根据检测结果确定所建立检测方法的参考区间 [95% 置信区间 (95% CI)]。(6)与进口 CLIA 检测系统比较: 随机选取 118 份血清标本, 采用本方法及进口罗氏检测系统 (Elecsys2010 及配套试剂) 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 °C 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。

1.3 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 χ^2 检验; 显著性检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 抗体效价、纯度及浓度 间接 ELISA 检测兔血清效价为 1:100 000。纯化抗 T 抗体 SDS-PAGE 检测仅在相对分子质量 55×10^3 及 25×10^3 处分别出现 1 条明显条带 (见图 1), 浓度为 2.50 mg/mL。



M: 蛋白分子标记物; 1: 纯化抗体。

图 1 纯化抗体 SDS-PAGE 检测

2.2 线性范围和灵敏度 FITC 系统线性范围为 0.05~20 ng/mL, 标准曲线回归方程为 $Y = -1.8597X - 0.8365$ ($r = 0.9993$), 灵敏度 0.05 ng/mL。非 FITC 系统标准曲线回归方程为 $Y = -1.6481X - 1.0383$ ($r = 0.9988$), 灵敏度 2 ng/mL。

2.3 精密度 FITC 与非 FITC 系统 CV_{批内} 分析见表 1。FITC 系统测定 QcL、QcH 的 CV_{批间} 分别为 4.03%、4.73%, 非 FITC 系统在 10.00% 左右。

表 1 FITC 与非 FITC 系统 CV_{批内} 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 | 1.52 \pm 0.06 (3.83) | 1.55 \pm 0.19 (12.47)* |
| | 第 2 批 | 1.52 \pm 0.06 (2.74) | 1.51 \pm 1.15 (10.02)* |
| | 第 3 批 | 1.56 \pm 4.29 (3.99) | 1.52 \pm 0.17 (11.00)* |
| QcH | 第 1 批 | 10.18 \pm 0.40 (3.95) | 9.97 \pm 0.99 (10.04)* |
| | 第 2 批 | 9.63 \pm 0.42 (4.39) | 9.81 \pm 0.91 (9.31)* |
| | 第 3 批 | 10.10 \pm 0.43 (4.22) | 10.30 \pm 1.08 (10.51)* |

*: $P < 0.05$, 与同批次 FITC 系统检测 CV_{批内} 比较。

2.5 特异度 E2、E3、P 对 FITC 系统检测 T 的交叉反应性均小于 0.01%。

2.6 临床参考区间 FITC 系统检测男性、女性血清 T 水平参考区间 (95% CI) 分别为 2.00~9.00 和 0.15~1.12 ng/mL。

2.7 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 (1.19 \pm 1.22) 和 (1.12 \pm 1.18) ng/mL, 比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 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 $Y = 1.0048X + 0.0704$ ($r = 0.9732$, $P < 0.05$)。118 例血清标本有 2 例 (占 1.69%) 测定结果不一致, 但该差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。2 例标本重复检测结果无明显改变。使用雅培系统进行检测, 测定结果与罗氏系统一致。

2.8 稳定性 稳定性试验结果见表 2。其中 4 °C 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 0.9993 和 1.86, 37 °C 保存试剂检测结果相关系数、回归系数分别为 0.9995 和 1.82。

表 2 稳定性试验结果(ng/mL)

| 校准品浓度(ng/mL) | 4 °C 保存试剂 | 37 °C 保存试剂 |
|--------------|-----------|------------|
| 0.0 | 0.00 | 0.00 |
| 0.2 | 0.19 | 0.21 |
| 1.0 | 1.12 | 1.16 |
| 2.5 | 2.51 | 2.72 |
| 10.0 | 9.84 | 10.13 |

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-T 类似物,校准品或样品,抗 T 抗体-HRP,与抗 FITC 抗体相比,校准品或样品中的 T 与抗 T 抗体-HRP 结合物的亲和力更高,形成 T-抗 T 抗体-HRP 复合物和较少的抗 FITC 抗体-FITC-T 类似物-抗 T 抗体-HRP 复合物,去除游离成分后加入 HRP 的作用底物,于第 5~15 分钟测定各加样孔在 425 nm 处的 RLU。RLU 与样品 T 浓度呈负相关,根据 RLU-浓度标准曲线即可获得样品中的 T 含量。

与传统的包被抗体标记抗原方法相比,本研究采用的抗 FITC-FITC 系统可有效避免加样延迟时间对反应的影响。本方法将抗原间接包被在微孔板上,样品或校准品中的抗原不与已包被抗原反应,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。此外,间接包被法可以增加包被浓度,使包被板的精密度优于直接包被法, $CV_{批内}$ 最小可达 3.57%, $CV_{批间}$ 小于 5%。应用 FITC-抗 FITC 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 FITC-抗 FITC 系统的稳定性。

本研究将抗 FITC 抗体包被在微孔板上,再将 T 类似物标记在 FITC 上,从而可间接将 T 类似物包被在微孔板上,T 类似物与样品或校准品中 T 抗原竞争性结合抗 T 抗体。与传统的将 T 直接包被在微孔板上比较,用 T 类似物竞争结合抗 T 抗体-HRP 可显著提高检测灵敏度,因为 T 类似物、T 抗原与抗 T 抗体-HRP 具有不同的亲和力。

本研究建立的检测系统与罗氏检测系统的检测结果具有良好的相关性($r=0.973$)。后续将进一步扩大样本量并与不同进口检测系统进行比对分析,对检测条件进行优化。

综上所述,本研究应用 FITC 系统建立的非均衡竞争

CLIA 检测系统具备灵敏度高、测定范围广、精密度高、稳定性高等优点,能够满足临床应用要求。

参 考 文 献

- Rassue MJ, Kuman LG, Pandey PK, et al. A highly specific heterologous enzyme-linked immunosorbent assay for measuring testosterone in plasma using antibody-coated immunoassay plates or polypropylene tubes[J]. Steroids, 1992, 57(6): 288-294.
- Ostrowska Z, Kos-Kuda B, Marek B, et al. Circadian concentrations of free testosterone, selected markers of bone metabolism, osteoprotegerin and its ligand sRANKL in obese postmenopausal women[J]. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2011, 65(4): 658-667.
- Jin H, Qiu WB, Mei YF, et al. Testosterone alleviates tumor necrosis factor-alpha-mediated tissue factor pathway inhibitor down-regulation via suppression of nuclear factor-kappa B in endothelial cells[J]. Asian J Androl, 2009, 11(2): 266-271.
- 芦志华, 张宝刚, 朱刚, 等. 血清睾酮水平对提高前列腺癌检出水平临床意义的研究[J]. 中国实验诊断学, 2011, 15(7): 1102-1104.
- 张静兰, 陈磊, 易淳飞, 等. Centaur XP 化学发光免疫系统检测雌二醇的性能验证[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(14): 1615-1617.
- 王德芝, 张春明, 杨福军, 等. 血清睾酮酶联免疫吸附分析试剂盒的研制[J]. 中国预防医学杂志, 2006, 7(2): 102-104.
- 莫军, 杨丽珍, 李景, 等. 化学发光法检测妇女血清睾酮及其临床应用[J]. 现代检验医学杂志, 2007, 22(2): 105-106.
- 张东矗, 王薇薇. 化学发光酶免疫法与放射免疫法测定血清睾酮的方法学评价[J]. 检验医学, 2004, 19(1): 32, 35.
- Ghosh S, Howlett M, Boag D, et al. Interference in free thyroxine immunoassay[J]. Eur J Intern, 19(2): 221-222.
- 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(21): 2023-2032.
- 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.
- 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.

(收稿日期: 2011-10-09)

(上接第 667 页)

- of oxidative stress and vascular dysfunction[J]. Post grad Med J, 2003, 79(930): 195-200.
- Sakurai K, Sawamura T. Stress and vascular responses: endothelial dysfunction via Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1: close relationships with oxidative stress[J]. J Pharmacol Sci, 2003, 91(3): 182-186.
- Mehta JK, Chen J, Hermonat PL, et al. Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1(LOX-1): A critical player in the development of atherosclerosis and related disorders[J]. Cardiovasc Res, 2006, 69(1): 36-45.

- 欧阳春, 赵秋玲. 70 例急性脑梗死患者 ox-LDL 及 S-100B 蛋白监测分析[J]. 检验医学与临床, 2009, 6(20): 1703-1704.
- 王金松. 血浆氧化低密度脂蛋白、白细胞介素 6 水平与急性脑梗死的相关性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(7): 739-740.
- 方晓霞, 周珂. 血浆氧化低密度脂蛋白、高敏 C 反应蛋白与急性脑梗死的相关性研究[J]. 武汉大学学报: 医学版, 2009, 30(2): 238-241.

(收稿日期: 2011-10-08)