

• 临床检验研究论著 •

应用 FITC 系统建立非均衡竞争雌二醇(E2)化学发光法*

陈 茶¹, 孔海霞², 雷 鹏², 辛志勇³, 张 影³, 刘 萍^{2,3△}

(1. 广东省中医院检验科, 广东 510006; 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 建立能广泛应用于雌二醇(E2)检测的方法。方法 制备辣根过氧化物酶(HRP)标记兔抗人 E2 多克隆抗体及异硫氰酸荧光素(FITC)标记 E2 类似物。以抗 FITC 抗体包被发光板, FITC-E2 类似物与抗 FITC 抗体结合形成固相抗原, 固相抗原与血清中 E2 竞争结合抗 E2 抗体-HRP, 建立化学发光法(CLIA)血清 E2 检测系统(FITC 系统), 进行方法学评价, 并与 E2-牛血清清蛋白直接包被系统(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 10~3 000 pg/mL, 灵敏度为 10 pg/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 0.978 0, 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 E2 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; 雌二醇; 多克隆抗体; 化学发光免疫分析
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.06.016 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2012)06-0676-03

Construction of non-equilibrium competitive chemiluminescence immunoassay using FITC system for the detection of estradiol*
Chen Cha¹, Kong Haixia², Lei Peng², Xin Zhiyong³, Zhang Ying³, Liu Ping^{2,3△}
(1. Department of Clinical Laboratory, Traditional Chinese Medicine Hospital of Guang Dong, Guangzhou Guangdong 516000, China; 2. Department of Medical Laboratory, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 3. Petek Biotechnology Co., Ltd, Tianjin 300162, China)

Abstract:Objective To construct a method for the detection of estradiol(E2). **Methods** Anti-E2 polyclonal antibody was labeled with horse radish peroxidase(HRP), and fluorescein isothiocyanate(FITC) was conjugated to E2-analogue. Microwell was coated by anti-FITC antibody, FITC-E2-analogue was combined with anti-FITC to form solid phase antigen, and solid phase antigen and E2 in sample would combine to anti-E2-HRP competitively(FITC system). FITC system was evaluated and compared with non-FITC system, based on E2-bovine serum albumin, and Roche Elecsys2010 system. **Results** The constructed FITC system was with linear range of 10—3 000 pg/mL, sensitivity of 10 pg/mL, and coefficients of variability within and between-run under 5%, which was better than non-FITC system. Compared with Elecsys2010 system, the correlation coefficient was 0.979 0, and with no statistical difference of detection results($P>0.05$). **Conclusion** The non-equilibrium competitive CLIA 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; estradiol; polyclonal antibody; chemiluminescence immunoassay

雌二醇(E2)是雌激素中活性最强的激素, 主要由卵巢产生, 睾丸和肾上腺皮质也产生少量 E2, 妊娠期妇女主要由胎盘产生 E2^[1-6]。E2 检测可用于诊断下丘脑-脑垂体-性腺调节功能紊乱、男子女性型乳房、睾丸肿瘤和肾上腺皮质增生等, 还可用于评价女性卵巢功能及孕期监控^[7]。E2 检测方法包括放射免疫分析(RIA)、酶免疫分析(EIA)、化学发光免疫分析(CLIA)和电化学发光免疫分析(ECLIA)等^[8-9]。其中, CLIA 具有灵敏度高、特异性强、检测范围宽、无放射性危害等优势, 但目前 CLIA 检测仪和试剂 90% 以上依赖进口。异硫氰酸荧光素(FITC)抗原性强, 极易抗 FITC 抗体形成稳定的结合物^[10-11]。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 E2 类似物取代 E2 作为竞争抗原, 增加了 E2 校准品(或样品)与辣根过氧化物酶(HRP)标记抗 E2 抗体(抗-E2 抗体-HRP)的结合力, 提高检测灵敏度。本研究拟以 FITC 系统为平台建立可用于 E2 检测的非均衡竞争 CLIA 系统。

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、E2 类似物、E2 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-HRP(北京中杉公司)。Hi TrapTM 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 E2 和牛血清清蛋白(BSA)、钥孔戚血蓝素(KLH)耦联。

1.2.2 抗人 E2 多克隆抗体的制备 E2-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 100 微

* 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。

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。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 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 E2-BSA 至 1.5 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-E2 类似物的制备:参考改良 Marshall 法,用 FITC 标记 E2 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 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℃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 μL FITC-E2 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 E2-BSA 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。

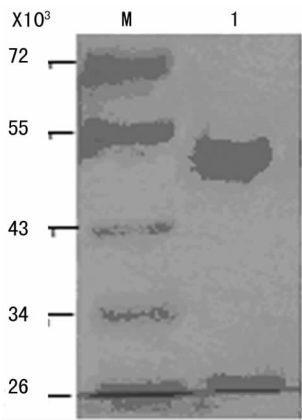
1.2.5 方法学评价 (1)线性范围:用 Log(X)-Logit(Y)数学模型进行线性回归处理,得到校准品剂量-反应曲线的回归直线,样品中 E2 和由光学系统检测的相对光单位(RLU)呈反比,校准品线性相关系数绝对值不小于 0.990 0。(2)灵敏度:制备标准曲线,测定 10 个零值孔的发光值,计算 $(\bar{x}-2s)$,将此值代回标准曲线,所得浓度值即为灵敏度,分别测定 FITC 检测系统及非 FITC 检测系统的灵敏度。(3)精密性:每天测高值质控品(QcH)和低值质控品(QcL)各 10 孔,计算 QcH 和 QcL 检测结果的变异系数(CV%),即为批内精密性(CV_{批内});相同方法连续检测连续 3 d,QcH 和 QcL 各 30 孔,计算各自的 CV%,即批间精密性(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)特异性:用不同稀释液配制雌三醇(E3)、睾酮(T)和孕酮(P)浓度分别为 1 000、100、1 000 ng/mL 的溶液,用试剂盒检测,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 93 例,平均年龄 35.5 岁,女性 385 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 116 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 χ^2 检验;显著性检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 抗体效价、浓度及纯度 间接 ELISA 检测兔血清效价为 1:100 000。纯化抗 E2 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 2.80 mg/mL。



M:蛋白分子标记物;1:纯化抗体

图 1 纯化抗 E2 抗体 SDS-PAGE 检测

2.2 线性范围和灵敏度 FITC 系统线性范围为 10~3 000 pg/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 $Y=-2.826\ 9X+4.038\ 6(r=0.999\ 6)$,灵敏度为 10 pg/mL。非 FITC 系统标准曲线回归方程为 $Y=-2.576\ 0X+3.765\ 2(r=0.998\ 3)$,灵敏度为 15 pg/mL。

2.3 精密性 FITC 与非 FITC 系统测定 E2 的 CV_{批内} 分析见表 1。FITC 系统测定 QcL、QcH 的 CV_{批间} 分别为 3.32%、3.47%,非 FITC 系统在 11.00% 左右。

表 1 FITC 与非 FITC 系统测定 E2 的 CV_{批内} 分析
[pg/mL(%) , $\bar{x}\pm s$ (CV%), $n=10$]

质控品	批次	FITC 系统	非 FITC 系统
QcL	第 1 批	91.28±2.90(3.18)	89.19±8.95(10.04)*
	第 2 批	91.96±2.20(2.40)	92.00±13.11(14.24)*
	第 3 批	89.61±3.57(3.99)	87.32±9.32(10.67)*
QcH	第 1 批	1 026.45±37.32(3.64)	1 027.43±104.03(10.04)*
	第 2 批	995.60±29.81(2.99)	968.60±109.75(9.38)*
	第 3 批	1 007.56±33.67(3.34)	1 012.60±122.37(9.36)*

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

2.4 特异性 E3、T、P 对 FITC 系统检测的交叉反应性均小于 0.01%。

2.5 临床参考区间 FITC 系统检测男性及处于不同生理周期女性血清 E2 水平的临床参考区间(95%CI),男性为 12~58 pg/mL,女性卵泡期、排卵期、黄体期、绝经期分别为 20~217、35~630、20~330、0~28 pg/mL。

2.6 自建系统与进口试剂系统测定结果分析 自建 FITC 系统、罗氏公司 Elecsys2010 系统测定结果分别为(120.15±

246.10)和(113.86±251.32)pg/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 Eelec-sys2010 系统测定结果为横坐标,线性回归方程为 $Y=0.957\ 6X+11.111\ 0$ (回归系数为 0.957 6, $r=0.978\ 0$, $P<0.001$)。116 例血清标本有 2 例(占 1.72%)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。

2.7 稳定性 稳定性试验结果见表 2。其中 4℃保存试剂检测各浓度校准品检测结果相关系数、回归系数分别为 0.999 3 和 2.56,37℃保存试剂检测结果相关系数、回归系数分别为 0.999 6 和 2.57。

表 2 稳定性实验结果 (pg/mL) *

校准品浓度 (pg/mL)	4℃保存试剂	37℃保存试剂
0	0.00	0.00
30	30.25	32.19
100	93.14	98.44
300	332.51	340.97
1 000	985.46	1 015.49
3 000	2 869.20	3 144.52

* :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-E2 类似物,校准品或样品,抗 E2 抗体-HRP, FITC-E2 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 E2 与抗 E2 抗体-HRP 结合物的亲和力更高,形成 E2-抗 E2 抗体-HRP 复合物和较少的抗 FITC 抗体-FITC-E2 类似物-抗 E2 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 E2 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。

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(E2 类似物)间接包被在微孔板上,样品或校准品中 E2 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。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%,最大为 4.92%, $CV_{批间}$ 小于 5%。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。

由于 E2 类似物与抗 E2 抗体结合亲和性小于 E2,本研究采用 E2 类似物取代 E2 作为竞争抗原,增加了 E2 校准品(或样品)与抗 E2 抗体-HRP 的结合力,检测灵敏度大为提高。试验结果显示,使用 E2-类似物作为固相抗原,检测灵敏度达 10 pg/mL,与进口检测系统相当。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相关性($r=0.978\ 0$)。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。

本研究以去激素血清将 E2 纯品配制成浓缩液,在稀释成不同浓度梯度,以其作为校准品,并以 Abbott Axsym 全自动化学发光系统对其进行标定,抗体则由本研究自制,检测成本相对较低。由于每批次检测均需制备标准曲线,当临床标本量较小时,有可能存在校准品用量较大的问题,后续将研究如何实现以“两点定标”或“一点定标”代替“六点定标”,以期降低检测成本。

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

[1] 沙桂华,林守清. 女性生殖内分泌功能检测方法学进展[J]. 中国实用妇科与产科杂志,2002,18(7):441.

[2] Wood CE. Fetal hypothalamus-pituitary-adrenal responses to estradiol sulfate[J]. Endocrinology,2011,152(12):4966-4973.

[3] Azcoitia I,Arevalo MA,De Nicola AF,et al. Neuroprotective actions of estradiol revisited[J]. Trends Endocrinol Metab,2011,22(12):467-473.

[4] Azcoitia I,Santos-Galindo M,Arevalo MA,et al. Role of astroglia in the neuroplastic and neuroprotective actions of estradiol[J]. Eur J Neurosci,2010,32(12):1995-2002.

[5] Wright CL,Schwarz JS,Dean SL,et al. Cellular mechanisms of estradiol-mediated sexual differentiation of the brain[J]. Trends Endocrinol Metab,2010,21(9):553-561.

[6] Brown LM,Clegg DJ. Central effects of estradiol in the regulation of food intake,body weight,and adiposity[J]. J Steroid Biochem Mol Biol,2010,122(1-3):65-73.

[7] Yonezawa S. Covalent coupling of steroid to microwell plates for use in competitive enzyme-linked immuosorbent assay[J]. J Immunol Methods,1993,166(1):55-61.

[8] Faupel-Badger JM,Fuhrman BJ,Xu X,et al. Comparison of liquid chromatography-tandem spectrometry,radioimmunoassay,and enzyme-linked immunosorbent assay methods for measurement of urinary estrogens[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers,2010,19(1):292-300.

[9] 王克珍. 雌二醇化学发光免疫测定法的建立[J]. 临床检验杂志,2004,22(4):252-253.

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

[11] 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/OL]. Int J Nanomedicine,2011-01-19 [2012-02-10], <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21976977>.

[12] 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.