

## • 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<sup>\*</sup>陈 茶<sup>1</sup>,孔海霞<sup>2</sup>,雷 鹏<sup>2</sup>,辛志勇<sup>3</sup>,张 影<sup>3</sup>,刘 萍<sup>2,3△</sup>

(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<sup>\*</sup>Chen Cha<sup>1</sup>, Kong Haixia<sup>2</sup>, Lei Peng<sup>2</sup>, Xin Zhiyong<sup>3</sup>, Zhang Ying<sup>3</sup>, Liu Ping<sup>2,3△</sup>

(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. Peteck 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<sup>[1-6]</sup>。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<sup>[7]</sup>。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<sup>[8-9]</sup>。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<sup>[10-11]</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-HPR)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 HiTrap™ 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 °C 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 °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。用包被缓冲溶液稀释 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 Marsshall 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<sup>[12]</sup>,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 μL FITC-E2 类似物,50 μL 校准品或样品,50 μL 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 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 °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。

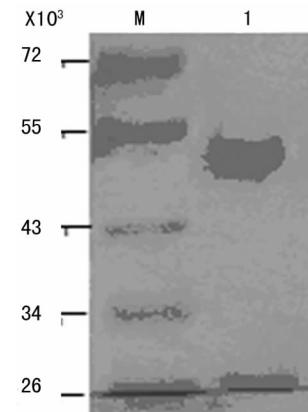
**1.2.5 方法学评价** (1)线性范围:用 Log(X)-Log(Y)数学模型进行线性回归处理,得到校准品剂量-反应曲线的回归直线,样品中 E2 和由光学系统检测的相对光单位(RLU)呈反比,校准品线性相关系数绝对值不小于 0.990 0。(2)灵敏度:制备标准曲线,测定 10 个零值孔的发光值,计算( $\bar{x}-2s$ ),将此值代回标准曲线,所得浓度值即为灵敏度,分别测定 FITC 检测系统及非 FITC 检测系统的灵敏度。(3)精密度:每天测高值质控品(QcH)和低值质控品(QcL)各 10 孔,计算 QcH 和 QcL 检测结果的变异系数(CV%),即为批内精密度(CV<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%,即批间精密度(CV<sub>批间</sub>)。分别计算 FITC 检测系统及非 FITC 检测系统的 CV<sub>批内</sub> 及 CV<sub>批间</sub>。(4)特异度: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 °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。

**1.2.6 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、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  $55 \times 10^3$  及  $25 \times 10^3$  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  $Y=-2.8269X+4.0386$  ( $r=0.9996$ ),灵敏度为 10 pg/mL。非 FITC 系统标准曲线回归方程为  $Y=-2.5760X+3.7652$  ( $r=0.9983$ ),灵敏度为 15 pg/mL。

**2.3 精密度** FITC 与非 FITC 系统测定 E2 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 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<sub>批内</sub> 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<sub>批内</sub> 比较。

**2.4 特异度** 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 Elecsys2010 系统测定结果为横坐标, 线性回归方程为  $Y = 0.9576 X + 11.1110$  (回归系数为 0.9576,  $r = 0.9780$ ,  $P < 0.001$ )。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 0.9993 和 2.56, 37 ℃ 保存试剂检测结果相关系数、回归系数分别为 0.9996 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,  $CV_{\text{批内}}$  最小可达 3.57%, 最大为 4.92%,  $CV_{\text{批间}}$  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 ( $r = 0.9780$ )。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 immunoassay[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.

(收稿日期: 2011-10-08)