

• 临床检验研究论著 •

应用 FITC 系统建立非均衡竞争游离雌三醇(E3)化学发光法*

曾建明¹, 雷 鹏², 孔海霞², 宋启超³, 刘 萍^{2,3,△}

(1. 广东省中医院大学城医院检验科, 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 300162)

摘要:目的 建立可以广泛应用于游离雌三醇(E3)检测的方法。方法 制备辣根过氧化物酶(HRP)标记兔抗人多克隆抗体及异硫氰酸荧光素(FITC)标记雌三醇类似物。以抗 FITC 抗体包被发光板, FITC-E3 类似物与抗 FITC 抗体结合形成固相抗原, 并与血清中的 free E3 竞争结合抗 E3 抗体-HRP, 建立化学发光血清 free E3 检测系统(FITC 系统), 进行方法学评价, 并与 E3-牛血清白蛋白直接包被系统(非 FITC 系统)和西门子 ADVIA Centaur® XP 系统进行比较。结果 FITC 系统检测线性范围为 0.1~40 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; 与西门子 ADVIA Centaur® XP 系统检测结果有良好的相关性($r=0.9657$)。结论 应用 FITC 系统建立的非均衡竞争 free E3 化学发光免疫分析系统灵敏度高、特异性强, 可用于临床标本的检测。

关键词:游离雌三醇; 异硫氰酸荧光素; 非均衡竞争; 化学发光免疫分析

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.15.006

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)15-1806-03

Construction of non-equilibrium competitive chemiluminescence immunoassay using FITC system for the detection of free estriol*

Zeng Jianming¹, Lei Peng², Kong Haixia², Song Qichao³, Liu Ping^{2,3,△}

(1. Department of Clinical Labrotaroy, University City Hospital of Traditional Chinese Medicine Hospital of Guangdong Province, 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 free estriol(E3). **Methods** Anti- estriol polyclonal antibody was labeled with horse radish peroxidase(HRP), and fluorescein isothiocyanate(FITC) was conjugated to estriol analogue. Microwell was coated by anti-FITC antibody, FITC-estriol analogue was combined with anti-FITC to form solid phase antigen, and solid phase antigen and estriol in serum samples would combine to anti- E3-HRP competitively(FITC system). FITC system was evaluated and compared with non-FITC system, based on E3-bovine serum albumin, and Siemens ADVIA Centaur® XP system. **Results** The constructed FITC system was with linear range of 0.1—40 ng/mL, sensitivity of 0.1 ng/mL and coefficients of variability among and between batch under 5%, which was better than non-FITC system. Compared with Siemens ADVIA Centaur® XP system, the correlation coefficient was 0.9657, and with no statistical difference of detection results($P>0.5$). **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: free estriol; fluorescein isothiocyanate; non-equilibrium competition; chemiluminescence immunoassay

雌三醇(E3)是由经胎儿肾上腺和肝脏最后由胎盘合成的一种甾体类激素。正常妊娠时,血循环中的 90% 的雌激素为雌三醇,检测血清游离雌三醇可以作为显示胎儿生长和胎盘功能的良好指标^[1]。唐氏综合征胎儿的母体血清游离雌三醇偏低,推测可能与胎儿生长迟缓有关。该指标可用于唐氏综合症的筛查^[2-3]。用于游离 E3 检测方法有放射性免疫分析(RIA)、酶免疫分析(EIA)、化学发光免疫分析(CLIA)^[4-7]。化学发光免疫分析具有灵敏度高、特异性强、检测范围宽,特别是无放射性危害等优势而得以广泛应用,但目前临床检测所用仪器和试剂 90% 以上依赖进口。抗异硫氰酸荧光素(FITC)抗体可特异性地结合 FITC,且亲和力高^[8-9],本研究拟以 FITC 系统为平台建立非均衡竞争 free E3 检测 CLIA 技术。

1 材料与方

1.1 仪器与试剂 2.3 kg 左右的雄性新西兰大白兔,购自军事医学科学院实验动物中心。弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂、E3 类似物、E3 纯品、FITC 均购自美国 Sigma 公司。抗

FITC 抗体购自美国 Fitzgerald 公司。羊抗兔 IgG-HRP 购自北京中杉公司。Bioscience PETECK96-1 型微孔板发光分析仪、BIOS-401 型微孔板脱水机由博奥赛斯(天津)生物科技有限公司提供。自动化酶免分析仪 SM-3 由美国 Thermo 公司提供。紫外分光光度计 7252PC 由上海光谱仪器有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 抗原的合成 使用碳化二亚胺试剂将 E3 和牛血清白蛋白、钥孔戚血蓝素偶联。

1.2.2 抗人 E3 多克隆抗体的制备 取两只雄性新西兰兔,将 150 微克 / 只 E3-KLH(溶于 0.9% 生理盐水中)与等体积的弗氏完全佐剂充分混合乳化后,于家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 ELISA 测定抗体效价,直至制备获得满意的抗体效价,制备相应的兔抗血清。

1.2.3 抗体的纯化和抗体浓度的测定 取含有抗 E3 多克隆

* 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。

的家兔血清,辛酸-硫酸铵法纯化。应用紫外光谱 280 nm 和 260 nm 吸收差法测定纯化后抗 E3 抗体浓度。

1.2.4 游离 E3 化学发光免疫检测方法^[10]。

1.2.4.1 包被板的制备 FITC 系统包被板的制备:将抗 FITC 抗体用包被缓冲液稀释成 4 μg/mL 的溶液,每孔 100 μL 加入微孔板中,37 ℃包被 2 h 后,去除孔内液体,洗板 3 次,拍干后,按照每孔 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。非 FITC 系统包被板的制备:将 E3-BSA 用包被缓冲溶液稀释至 2.0 μg/mL,其余步骤同 FITC 系统包被板的制备。

1.2.4.2 FITC-E3 类似物的制备 参考改良 Marsshall 法,用 FITC 标记 E3 类似物,游离的 FITC 经 PBS 充分透析除去,并用紫外分光光度计测定 A495 及 A280 值。

1.2.4.3 酶结合抗体的制备 采用常规高碘酸钠氧化法^[11]制备,制备后加入等体积甘油,混匀后-20 ℃存放保存。

1.2.4.4 游离 E3 化学发光检测方法 FITC 系统化学发光检测方法:取包被抗 FITC 抗体的发光板,每孔加入 50 μL FITC-E3 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,加入发光液后,避光 5 min 后在 Bioscience PETECK96-1 型微孔板发光分析仪上读数。非 FITC 系统化学发光检测方法:取包被有 E3-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,加入发光液后,避光 5 min 后在 Bioscience PETECK96-1 型微孔板发光分析仪上读数。

1.2.5 游离 E3 化学发光法方法学评价

1.2.5.1 线性范围 用 Log(X)-Logit(Y)数学模型进行线性回归处理数据,得到校准品剂量-反应曲线的回归直线,样品中 E3 和由光学系统检测的相对光单位(RLU)之间的关系成反比,校准品线性相关系数绝对值不小于0.990 0。

1.2.5.2 分析灵敏度 做标准曲线,测定 10 孔零值发光值,取 10 孔零值发光值的平均值($\bar{x}$),并求出 10 孔零值发光值的标准差(s),用平均值减去 2 个 s,将此值代回标准曲线,所测得的浓度即为分析灵敏度,分别测出 FITC 检测系统及非 FITC 检测系统的分析灵敏度。

1.2.5.3 精密性 每天测 10 孔高值质控品(QcH)和 10 孔低值质控品(QcL),分别计算出 QcH 和 QcL 的 10 孔的浓度 $\bar{x}$ 、s、变异系数(CV),算出的 CV 作为分析内精密性;每天不同操作者测 1 次,连续 3 d,3 d 所测 30 孔的值求出的 CV 作为分析间精密性,分别求出 FITC 检测系统及非 FITC 检测系统的批内、批间精密性。

1.2.5.4 特异性 临床上 E3 的主要交叉反应因子是孕酮(P)、睾酮(T)和雌二醇(E2),用不同的稀释液将其均稀释 200 ng/mL,用试剂盒检测分析交叉反应性。

1.2.5.5 临床参考区间的建立 有效标本 715 例,其中孕周 14 周 86 例,15 周 90 例,16 周 88 例,17 周 77 例,18 周 92 例,19 周 86 例,20 周 81 例,21 周 115 例。均为空腹静脉血自然凝固后,离心分离出血清,排除溶血、脂血或黄疸的血清标本,-20 ℃保存,分析前一次复融,充分摇匀使用。根据血样标本的检测结果确定本试剂盒的参考区间(95%的可信区间)。

1.2.5.6 与进口发光免疫分析系统比较 随机选取 110 份血清样本,采用本方法对血样标本进行检测,并使用进口试剂盒同日内对该批血样标本进行检测,将两种检测结果进行相关性分析及检测值不一致性分析。

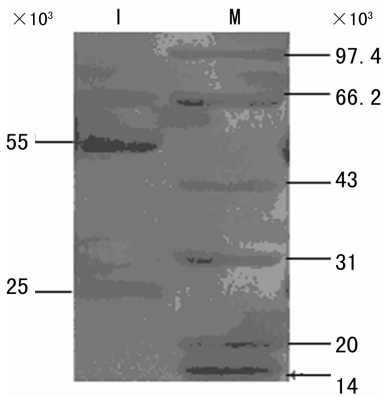
1.2.5.7 稳定性 取同一批两个试剂盒,一个放入 37 ℃烘

箱,一个放入 4 ℃冰箱,两个试剂盒各放置 7 d,然后拿出一起平衡至室温后做标准曲线,比较两个试剂盒的校准品或样品检测值的有统计学差异。

1.2.6 统计学处理 本检测系统与进口发光检测系统对比试验的结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计分析软件对两组数据进行配对 *t* 检验(检验水准 $\alpha=0.05$)、线性相关和回归分析评价;采用配对资料的 χ^2 检验分析临床检测结果不一致的原因。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 抗体的效价、纯度及浓度 间接 ELISA 法检测兔血清效价为 1:16 000。纯化后抗 E3 抗体 SDS-PAGE 检测在 55×10^3 及 25×10^3 处分别出现 1 条明显条带(见图 1),浓度为 2.5 mg/mL。



I:纯化后的抗人 E3 多克隆抗体;M:蛋白质标准

图 1 SDS-PAGE 检测纯化后的抗人 E3 多克隆抗体

2.2 线性范围和灵敏度 FITC 系统线性范围为 0.1~40 ng/mL,标准曲线回归方程为 $Y=-2.414\ 4X-0.902\ 8$,灵敏度为 0.1 ng/mL。非 FITC 系统标准曲线回归方程为 $Y=-2.384\ 2X-1.177\ 4$,灵敏度为 0.75 ng/mL。

2.3 精密性 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 4.10~4.52%,3.47~4.54%,非 FITC 系统在 10%左右。

表 1 FITC 与非 FITC 系统化学发光方法测定游离 E3 的 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	0.76±0.03(4.52)	0.75±0.08(11.01)*
	第 2 批	0.73±0.03(4.17)	0.74±0.07(9.71)*
	第 3 批	0.76±0.03(4.10)	0.77±0.08(10.70)*
QcH	第 1 批	19.98±0.69(3.47)	20.38±1.93(9.47)*
	第 2 批	19.47±0.88(4.54)	19.27±1.95(10.13)*
	第 3 批	19.75±0.71(3.61)	19.65±1.78(9.04)*

*: $P<0.05$,与同批次 FITC 系统检测 CV 批内比较。

2.4 特异性 E2、P、T 对 FITC 系统检测游离 E3 的交叉反应性均小于 0.01%。

2.5 临床参考区间 FITC 系统检测游离 E3 水平参考区间见表 2。

2.6 自建系统与进口系统测定结果分析 自建 FITC 系统、Siemens ADVIA Centaur® XP 系统测定结果分别为 (12.26 ± 8.13) ng/mL 和 (12.17 ± 8.05) 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,以西门子 AD-

VIA Centaur® XP 系统测定结果为横坐标,线性回归方程为 $Y=0.956\ 2X+0.448\ 3$ (回归系数为 0.956 2, $r=0.965\ 7$, $P<0.01$)。110 例血清标,有 3 例(占 3.33%)测定结果不一致,但该差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 2 游离 E3 化学发光法的参考范围

孕周(周)	参考范围(ng/mL)	孕周(周)	参考范围(ng/mL)
14	0.31~2.60	18	0.59~5.27
15	0.40~3.28	19	0.67~6.11
16	0.46~3.86	20	0.71~6.70
17	0.52~4.69	21	0.75~7.23

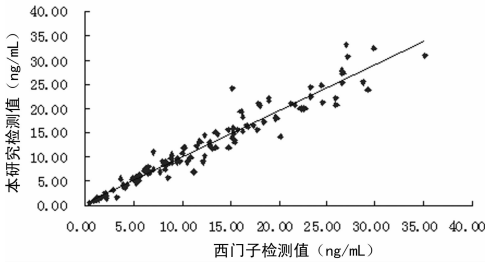


图 2 西门子与本研究测定值相关性分析($n=110$)

2.7 稳定性 稳定性试验结果见表 3。其中 4℃保存试剂检测各校准品结果相关系数、回归系数分别为,0.999 5、2.414 4; 37℃试剂检测各校准品结果相关系数、回归系数分别为,0.999 3、2.293 5。

表 3 稳定性试验结果(ng/mL)

校准品浓度(ng/mL)	4℃保存试剂	37℃保存试剂
0	0.00	0.00
0.2	0.20	0.26
0.8	0.86	1.07
3	2.72	3.24
12	12.45	14.60
40	40.09	39.58

3 讨 论

本研究采用非均衡竞争的原理,将抗 FITC 抗体包被微孔板中,加入 FITC-E3 类似物,校准品或样品,抗 E3 抗体-HRP, FITC-E3 类似物与抗 FITC 抗体结合形成固相抗原。与固相抗原相比较,校准品或样品中的 E3 与抗 E3 抗体-HRP 结合物的亲和力更高,形成 E3-抗 E3 抗体-HRP 复合物和较少的抗 FITC 抗体-FITC-E3 类似物-抗 E3 抗体-HRP 复合物,去除游离成分后,加入 HRP 的作用底物,于 5~15 min 测定各加样孔在 425 nm 处的 RLU。RLU 与样品 E3 浓度呈负相关,依据 RLU 与浓度标准曲线即可获得样品中的 E3 含量。

与传统方法包被抗体标记抗原方法比较,本研究采用的抗 FITC 抗体-FITC 系统可有效避免了加样延迟时间对反应的影响。本法将抗原(E3 类似物)间接包被在微孔板上,样品或校准品中的 E3 不与已包被抗体反应,只有加入酶标抗体后才开始反应,因此可以避免加样延迟时间对反应的影响。此外,用抗 FITC 抗体间接包被可以提高包被板的精密性,此法优于直接包被抗原,精密性大为提高,批内 CV%最小可达到 3.47%,最大为 4.54%,批间 CV%小于 5%。引用抗 FITC-FITC 放大系统在 CLIA 中应用具有诸多优点:(1)FITC 易与抗原结合,标记率高,标记物易于分离;(2)FITC 标记物十分稳定,保证了

FITC-抗 FITC 系统的稳定性。

由于 E3-类似物与抗 E3 抗体结合的亲和性小于 E3 抗原对抗 E3 抗体结合的亲和性,本研究采用 E3-类似物取代 E3 作为的竞争抗原增加了 E3 校准品(或样品)与抗 E3-HRP 抗体的结合力,使灵敏度大为提高,从实验结果可以看出使用 E3-类似物作为固相抗原,灵敏度达到 0.1 ng/mL,与进口检测系统相当。本研究建立 E3 化学发光检测方法和使用进口试剂盒测定结果具有良好的相关性($r=0.965\ 7$)。后续将进一步扩大样本量并与不同进口试剂盒进行检测值的比对,对检测条件进行优化。

本研究是以去激素血清将 E3 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,检测成本较低。由于每批次检测均需要制备标准曲线,当临床样本量较少时,有可能存在校准品用量较大的问题,后续将研究如何实现“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,本研究建立应用 FITC 系统建立的非均衡竞争 CLIA 检测方法已具备灵敏度高、测定范围广、精密性好、稳定性高等优点,能够满足临床应用的要求。

参考文献

[1] 伍绍文,王欣.唐氏综合征的产前筛查进展[J].医学综述,2011,17(5):757-760.

[2] 杜娟,张珍,杨晓文.妊娠中期孕妇唐氏综合征筛查结果分析[J].中国优生与遗传杂志,2011,19(3):45.

[3] 林敏,陈秀桔.游离雌三醇在孕中期胎儿唐氏综合征筛查中的应用[J].中国生育健康杂志,2010,21(1):34.

[4] Wu YY, Hsu TC, Chen TY, et al. Proteinase 3 and dihydroli-poamide dehydrogenase(E3) are major autoantigens in hepatitis C virus(HCV) infection[J]. Clin Exp Immunol, 2002, 128(3):347-352.

[5] Xin TB, Chen H, Lin Z, et al. A secondary antibody format chemi-luminescence immunoassay for the determination of estradiol in human serum[J]. Talanta, 2010, 15, 82(4):1472-1477.

[6] Deng X, Wang W, Wu X, et al. Correlation between bone mineral density and sexual hormones in healthy Chinese women[J]. J En-viron Pathol Toxicol Oncol, 2000, 19(1-2):167-169.

[7] 吴丹凝,王翔,林金明,等.磁性微粒子化学发光免疫分析法测定人血清中雌三醇[J].化学学报,2007,65(23):2755-2760.

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

[9] Hong Yang, Changchun Lou, Mingming Xu, et al. Investigation of folate-conjugated fluorescent silica nanoparticles for targeting de-livery to folate receptor-positive tumors and their internalization mechanism[J]. Int J Nanomedicine, 2011, 6:2023-2032.

[10] 孔海霞,刘萍,田云霞,等.应用 FITC 系统建立非均衡竞争游离三碘甲腺原氨酸(FT3)化学发光法[J].第三军医大学学报,2012,34(3):201-205.

[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.

(收稿日期:2012-01-09)