

• 临床检验研究论著 •

应用 FITC 系统建立非均衡竞争孕酮(P)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 300162)

摘要:目的 建立可以广泛应用于孕酮(P)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)标记孕酮类似物。以抗 FITC 抗体包被发光板, FITC-P 类似物与抗 FITC 抗体结合形成固相抗原, 并与血清中的 P 竞争结合抗 P 抗体-HRP, 建立化学发光血清 P 检测系统(FITC 系统), 进行方法学评价, 并与 P-牛血清白蛋白直接包被系统(非 FITC 系统)和罗氏 Elecsys2010 系统进行比较。结果 FITC 系统检测线性范围为 0.1~60 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 系统检测结果有良好的相关性($r=0.9619$)。结论 应用 FITC 系统建立的非均衡竞争 P 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:孕酮; 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.1673-4130.2012.15.009

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)15-1813-02

Construction of non-equilibrium competitive chemiluminescence immunoassay using FITC system for the detection of progesterone^{*}

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

(1. Department of Clinical Laboratory, University City Hospital, Traditional Chinese Medicine Hospital of Guangdong, 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 progesterone(P). Methods Anti-progesterone polyclonal antibody was labeled with horse radish peroxidase(HRP), and fluorescein isothiocyanate(FITC) was conjugated to progesterone analogue. Microwell was coated by anti-FITC antibody, FITC-progesterone analogue was combined with anti-FITC to form solid phase antigen, and solid phase antigen and progesterone in serum samples would combine to anti-P-HRP competitively(FITC system). FITC system was evaluated and compared with non-FITC system, based on P-bovine serum albumin, and Roche Elecsys 2010 system. Results The constructed FITC system was with linear range of 0.1—60 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 Elecsys 2010 system, the correlation coefficient was 0.9619, 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: Progesterone; Fluorescein isothiocyanate; Non-equilibrium competition; Chemiluminescence immunoassay

在非妊娠妇女, 孕酮(P)由卵巢中的卵泡膜细胞产生, 妊娠期间, 则主要由胎盘合体滋养细胞分泌, 故血中 P 水平主要与胎盘重量及血液灌注量相关。P 对下丘脑-垂体系统具有正、负反馈作用, 可调控垂体促性腺激素的合成和分泌。排卵前小剂量孕酮协同 E3 诱发排卵前 LH 高峰出现, 排卵后大剂量 P 对下丘脑-垂体系统则呈现负反馈作用^[1-2]。目前用于 P 检测方法有很多^[3-6], 其中化学发光免疫分析具有特异性强、灵敏度高、检测范围比较宽, 特别是无放射性危害等优势而得以广泛应用。抗异硫氰酸荧光素(FITC)抗体可特异性地结合 FITC, 且亲和力高^[7-8], 本研究应用 FITC 系统包被孕酮类似物, 与血清中的孕酮非均衡竞争辣根过氧化物酶标记的抗体建立血清中孕酮检测的化学发光法。

1 材料与方

1.1 主要试剂和仪器 2.2 kg 左右的雄性大白兔, 购自北京实验动物中心。孕酮类似物、孕酮纯品、弗氏佐剂、异硫氰酸荧光素均购自美国 Sigma 公司。抗异硫氰酸荧光素抗体购自美国 Fitzgerald 公司。辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 购自北京博奥森生物技术有限公司。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。SM-3 型自动化酶免分析仪由美国 Thermo 公司提供。7252PC 型紫外分光光度计由上海光谱仪器有限公司提供。

1.2 实验方法

1.2.1 抗原的合成 使用混合酸酐法将 P 和牛血清清蛋白、钥孔戚血蓝素偶联。

1.2.2 兔抗人 P 多克隆抗体的制备 取 2 只雌性大白兔, 将 480 μ g 的 P-KLH 用 2 mL 的生理盐水溶解后, 与等体积的弗氏完全佐剂充分混合乳化后, 于大白兔皮下多点注射, 以后每 2 周免疫一次(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, 兔耳静脉采血, 间接 ELISA 法测定血清中抗体的效价, 直至制备满意的抗体效价, 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 P 多克隆的家兔血清, 硫酸铵分级沉淀法初步纯化抗血清, 亲和层析进一步纯化, 应用紫外光谱 280 nm 和 260 nm 吸收差法测定纯化后抗体的浓度, SDS-PAGE 电泳验证纯化后的效果。

1.2.4 P 化学发光免疫检测方法(参考文献[9-10])

1.2.4.1 包被板的制备 FITC 系统包被板的制备: 将抗

* 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。

FITC 抗体用包被缓冲液稀释成 4 μg/mL 的溶液包被化学发光微孔板,次日将 FITC-BGG-孕酮类似物用包被缓冲液稀释成 1 μg/mL 在抗 FITC 抗体包被板上二次包被,形成孕酮类似物化学发光包被板。非 FITC 系统包被板的制备:2.5 μg/mL 的 P-BSA 包被化学发光微孔板。

1.2.4.2 FITC-P 类似物的制备 参考文献改良 Marsshall 法^[11-12]。

1.2.4.3 P 化学发光检测方法 FITC 系统化学发光检测方法:取包被孕酮类似物的发光板,50 μL 校准品或样品,50 μL 抗 P 抗体-HRP,混匀,37℃水浴 1 h。洗板甩干后加入发光液,避光 10 min,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 P-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,反应过程同上。

1.2.5 P 化学发光法方法学评价

1.2.5.1 线性范围 将孕酮的浓储液稀释成系列浓度后检测,用双对数数学模型来拟合直线方程的相关系数,分析试剂的检测上限。

1.2.5.2 分析灵敏度 做标准曲线,测定 10 孔零值发光值,测定分析灵敏度,即最低检测限,分别测出两个检测系统的分析灵敏度。

1.2.5.3 重复性试验 收集高、低值浓度的患者混合血清分成两份,一份连续做 20 次重复性检测,计算其均值($\bar{x}$)、标准差(s)、变异系数(CV),分析其批内精密性;另一份再分成 20 份,冻存于-20℃,每日测定一份标本,连续检测 20 d,计算 $\bar{x}$ 、 s 和 CV,分析其批间精密性。

1.2.5.4 特异性试验 P 的主要交叉反应因子有雌三醇(E3)、睾酮(T)和雌二醇(E2),用不同的稀释液将其均稀释至 1 000 ng/mL,并用试剂盒检测分析其交叉反应率。

1.2.5.5 临床参考区间的建立 有效标本 420 例,其中男 131 例,平均年龄 39.2 岁,女 289 例,平均年龄 41~47 岁,均为排除溶血、脂血或黄疸的空腹静脉血清标本,-20℃保存,分析前一次复融,充分混匀后使用。根据检测结果确定本研究试剂盒的参考区间(95%的可信区间,95%CI)。

1.2.5.6 与进口发光免疫分析系统比较 用本研究方法和进口罗氏 Elecsys2010 检测系统同时测定 120 份血清标本,以罗氏检测值为 x 轴,以本研究方法的检测值为 y 轴,进行线性回归分析。

1.2.5.7 37℃加速稳定性试验 取同一批的试剂盒,37℃烘箱放置 7 天后,检测校准品或样本,建立标准曲线并分析其与未放置 37℃前的结果相比较有无显著性差异。

1.2.6 统计学处理 本研究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,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 检验分析标本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 兔抗人孕酮多克隆抗体的效价、浓度及纯度 间接 ELISA 法检测兔血清效价为 1:10 000。纯化后抗 P 抗体浓度为 4.5 mg/mL,SDS-PAGE 电泳检测在 55×10^3 及 25×10^3 处分别出现 1 条明显条带,说明纯化的效果较好。

2.2 线性范围和灵敏度 FITC 系统线性范围为 0.1~60 ng/mL,标准曲线回归方程为 $Y=-2.2854X-1.9968$,灵敏度为 0.1 ng/mL。非 FITC 系统标准曲线回归方程为 $Y=-2.4197X-2.2039$,灵敏度为 0.8 ng/mL。

2.3 重复性试验 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 3.12%~4.67%,3.25%~4.56%,非 FITC 系统的变异系数在 10%左右。

表 1 FITC 与非 FITC 系统化学发光方法测定 P 的 CV 批内分析[ng/mL(%) , $\bar{x}\pm s$ (CV), $n=10$]

指标	批次	FITC 系统	非 FITC 系统
QcL(CV) [ng/mL(%)]	第 1 批	1.44±0.04(3.12)	1.48±0.14(9.74)*
	第 2 批	1.54±0.07(4.67)	1.58±0.16(10.38)*
	第 3 批	1.41±0.07(4.71)	1.43±0.14(9.45)*
QcH(CV) [ng/mL(%)]	第 1 批	24.63±1.02(4.13)	24.43±2.46(10.07)*
	第 2 批	24.11±0.78(3.25)	24.31±2.33(9.59)*
	第 3 批	23.86±1.09(4.56)	24.66±2.48(10.05)*

* : $P<0.05$,与同批次 FITC 系统检测 CV 批内比较。

2.4 特异性 E2、E3、T 对 FITC 系统检测 P 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 P 水平参考区间(95%CI)为 0.1~2 ng/mL。女性血清 P 水平参考区间(95%CI)为:卵泡期 0.2~1.5 ng/mL;黄体期 1.7~33 ng/mL;绝经期 0.1~1 ng/mL。

2.6 本研究系统与进口检测系统方法比较试验 本研究的 FITC 系统、罗氏 Elecsys 2010 系统测定结果分别为(10.59±13.93)ng/mL 和(10.23±13.05)ng/mL,比较差异无统计学意义($P>0.05$)。以本研究检测方法的测定结果为 y 轴,以进口检测系统测定结果为 x 轴,线性回归方程为 $Y=1.0269X+0.0856$ (回归系数为 1.0269, $r=0.9619$, $P<0.01$)。118 例血清标本有 4 例(占 3.39%)测定结果不一致,但是差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.7 37℃加速稳定性试验 结果见表 2。其中 2~8℃保存试剂检测标准曲线的相关系数、回归系数分别为:0.99949、2.28544;37℃试剂检测标准曲线相关系数、回归系数分别为:0.99978、2.2865。

表 2 稳定性试验结果(ng/mL)		
校准品浓度(ng/mL)	2~8℃保存试剂	37℃保存试剂
0	0	0
0.2	0.21	0.23
1	0.96	1.09
5	4.50	5.32
20	20.27	23.90
60	63.66	67.04

3 讨 论

本研究主要采用非均衡竞争的原理,其最大的特点:(1)引入了抗 FITC 抗体-FITC 系统;(2)用孕酮类似物与孕酮竞争 HRP 标记的抗体。应用抗 FITC 抗体-FITC 系统主要是将孕酮类似物较为均一的包被在化学发光微孔板内,可以提高包被板的精密性,即重复性较好。批内 CV 最小可达到 3.12%,最大为 4.71%,批间 CV 小于 5%。应用孕酮类似物与孕酮非均衡竞争,加强了孕酮与其对应抗体结合的亲和性,使分析灵敏度大为提高,本研究孕酮检测的分析灵敏度为 0.1 ng/mL,达到临床质量评估的要求,且与进口的检测系统相当。在应用本研究检测体系与进口检测系统同时检测 118 例临床标本的结果可见,两检测体系的检测结果相关系数为 0.9619,具有较好的相关性,后续试验中将进一步扩大样本量更为精细的调试试剂盒。在稳定性试验中,试剂 37℃放置 7 d 后仍具有较良好的质量控制指标。本研究是用去激素血清稀释孕酮纯品配制不同浓度梯度,制备校准品,并以 Abbott AxSYM 全自动化学发光系统对其进行标定,而且抗孕酮抗体(下转第 1817 页)

表 3 阿奇霉素非敏感嗜血杆菌对抗菌药物耐药率

抗菌药物	流感嗜血杆菌		副流感嗜血杆菌		χ^2	P
	株数 (n)	耐药率 (%)	株数 (n)	耐药率 (%)		
氨苄西林	60	74.1	259	84.1	5.31	<0.05
阿莫西林/克拉维酸	13	26.0	38	14.0	4.53	<0.05
氨苄西林/舒巴坦	31	40.8	85	28.1	4.46	<0.05
头孢呋辛	20	25.9	47	15.5	3.95	<0.05
头孢曲松	13	16.2*	55	18.0*	0.13	>0.05
头孢泊肟	6	20.7*	6	13.0*	0.31	>0.05
氨曲南	20	26.7*	104	33.8*	1.39	>0.05
美罗培南	4	5.1*	6	2.0*	1.34	>0.05
左旋氧氟沙星	35	44.9*	148	47.9*	0.35	>0.05
复方新诺明	34	42.0	116	37.5	0.63	>0.05

* : 非敏感率。

3 讨 论

本研究显示 2008~2011 年随着本院呼吸道标本数量上升,嗜血杆菌的分离率也呈上升趋势。流感嗜血杆菌是嗜血杆菌中最常见的条件致病菌,是引起社区性获得性下呼吸道感染及化脓性脑膜炎的重要原因^[1]。以往认为副流感嗜血杆菌是一种上呼吸道正常菌群,但近年的多项研究证实,副流感嗜血杆菌是一种条件致病菌,并认为是下呼吸道感染和社区获得性肺炎的重要致病菌。本研究显示副流感嗜血杆菌构成比(68.42%)远高于流感嗜血杆菌(30.94%),2010、2011 两年副流感嗜血杆菌的的分离率明显高于流感嗜血杆菌,这一结果与朱泽航和蔡逸婷^[2]报道相似,但与 2010 年卫生部全国细菌耐药监测有关嗜血杆菌的报道^[3]数据不同,其原因可能与标本筛选、实验方法及临床用药等各个环节有关,有待探讨。

以往文献报道嗜血杆菌对阿奇霉素具有较高的敏感性^[4-8],近年来阿奇霉素已取代氨苄西林成为治疗嗜血杆菌感染的一线用药,阿奇霉素的大量使用,其耐药性问题也随之而来。2010 年全国监测流感嗜血杆菌对阿奇霉素耐药率为 11.3%,副流感嗜血杆菌对阿奇霉素的耐药率为 21.2%^[3]。

(上接第 1814 页)

是自制的,因此本研究的检测成本较低。在板式化学发光免疫分析中,每批次检测均需要绘制标准曲线,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,本研究应用 FITC 系统建立的非均衡竞争 P 检测的化学方法已具备灵敏度高、检测范围宽、重复性好、稳定性高等优点,达到临床应用的要求。

参考文献

[1] Wu Y, Mitchell J, Cook C, et al. Evaluation of progesterone-ovalbumin conjugates with different length linkers in enzyme-linked immunosorbant assay and surface plasmon resonance-based immunoassay[J]. Steroids, 2002, 66(7): 565-572.

[2] Mitchell J, Wu Y, Cook C, et al. Technical note: protein conjugate-based immunoassay of whole milk progesterone[J]. J Dairy Sci, 2004, 87(9): 2864-2867.

[3] Wu Z, Xu L, Tu Y, et al. The relationship between the symptoms of female gonococcal infections and serum progesterone level and the genotypes of multi-antigen sequence type(NG-MAST) in Wuhan, China[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2011, 30: 113-116.

[4] Abdul-Hussein MM, Abdul-Rasheed OF, Al-Moayed HA. The values of CA-125, progesterone, β -HCG and estrADiol in the early predic-

而本次研究显示流感嗜血杆菌对阿奇霉素的非敏感率为 14.52%,而副流感嗜血杆菌对阿奇霉素的非敏感率为 24.58%。

药敏实验结果显示,阿奇霉素非敏感嗜血杆菌对常用抗菌药物的耐药率均高于阿奇霉素敏感菌株,而在副流感嗜血杆菌这一表现更为突出。两种阿奇霉素非敏感嗜血杆菌对头孢曲松、头孢泊肟、氨曲南、美罗培南和左氧氟沙星均出现敏感性减低现象,且流感嗜血杆菌与副流感嗜血杆菌无明显差异,提示阿奇霉素与此五种药物的敏感性机制可能存在某种关联,有待探索。此外,虽然试验菌株对氨苄西林的耐药率较高,但对氨苄西林/舒巴坦和阿莫西林/克拉维酸耐药率相对较低,是否间接说明嗜血杆菌对阿奇霉素非敏感性与 β 内酰胺酶存在某种联系,还有待更深入研究。

参考文献

[1] Jeana SS, Hsuehb PR. High burden of antimicrobial resistance in Asia[J]. Int Antimicrob Agents, 2011, 37(4): 291-295.

[2] 朱泽航, 蔡逸婷. 人群呼吸道中嗜血杆菌的分布及其非敏感性[J]. 解放军预防医学杂志, 2007, 25(1): 13-16.

[3] 吕媛, 马序竹, 崔兰卿. 2010 年度卫生部全国细菌耐药监测报告: 流感嗜血菌与副流感嗜血菌报告[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(24): 5144-5146.

[4] 张秀珍, 胡云建, 等. 2001~2003 年社区呼吸道感染病原菌耐药动态[J]. 中华医院感染学杂志, 2004, 14(7): 744-748.

[5] 张泓, 李万华, 王传清, 等. 2007 中国 CHINET 流感嗜血杆菌非敏感性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2009, 9(3): 207-209.

[6] 沙德高, 洪伍华, 李珍大, 等. 732 株嗜血杆菌对阿奇霉素敏感性分析[J]. 临床检验杂志, 2001, 19(6): 353-354.

[7] 张智州, 李丽, 张蓓, 等. 流感嗜血杆菌耐药分析[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(11): 1244-1245.

[8] 李云. 45 株副流感嗜血杆菌感染及耐药性调查[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(1): 29-31.

(收稿日期: 2012-01-09)

tion of ectopic pregnancy[P]. Oman Med J, 2012, 27(2): 124-128.

[5] Lv XH, Shi da Z. Variations of serum estrADiol and progesterone levels during consecutive reproductive states in Mongolian gerbils (Meriones unguiculatus)[J]. Exp Anim, 2010, 59(2): 231-237.

[6] 邱振华, 曾再祥, 舒云华, 等. 血清孕酮联合 β -人绒毛膜促性腺激素检测再异位妊娠早期诊断及保守治疗中的价值[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(7): 660-641.

[7] Ghosh S, Howlett M, Boag D, et al. Interference in free thyroxine immunoassay[J]. Eur J Intern Med, 2008, 19: 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(15): 2023-2032.

[9] 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(FT-3)化学发光法[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(3): 201-205.

[10] 陈茶, 孔海霞, 雷鹏, 等. 应用 FITC 系统建立非均衡竞争雌二醇(E2)化学发光法[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(6): 676-678.

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

[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: 2012-01-12)