

TSH CLIA 方法的建立

尹东光等

促甲状腺激素 TSH 是一种由垂体前叶分泌的糖蛋白激素,由 α 和 β 二个亚基组成,分子量为 28000。TSH 本身受下丘脑分泌的促甲状腺激素释放激素 TRH 的调控, TSH 的主要生理作用是调节甲状腺激素的合成与分泌,血液中甲状腺激素水平与腺垂体分泌 TSH 的量之间有负反馈抑制关系。血清 TSH 水平是诊断原发性甲状腺机能低下的可靠、灵敏和特异的指标。可用作区别原发性甲减与二级和三级甲减,在原发性甲减中, TSH 水平显著上升,而在二级和三级甲减中,由于垂体或下丘脑受到损害,甲状腺水平低, TSH 水平也低。现在血清 TSH 水平在临床上已作为评估甲状腺功能的一线指标,甲亢患者的 TSH 水平很低,但某些甲状腺功能正常的非甲状腺病人的 TSH 水平有时也低,因而采用灵敏度高的 TSH 免疫分析法对区别甲亢、甲状腺癌与甲状腺功能正常具有重要意义,目前许多文献认为 TSH 化学发光免疫分析法是最灵敏的方法之一。本论文用合成的 DMAE-NHS 做为发光标记物,建立起了 TSH CLIA 方法,该方法的灵敏度达到 0.01mIU/L。

1. 实验部分

1.1 主要试剂和仪器

主要仪器: UV-Visible Spectrophotometer, 美国 Varian 公司; Shimadzu LC-6A High Pressure Liquid Chromatograph, 日本日立公司; 1290-003 Delfia PlateShaker, Wallac 公司。

主要试剂: 两株配对的抗 TSH McAb, 一株抗 TSH McAb(代号 04Ab), 芬兰 Medix 公司; 另一株抗 TSH McAb(代号 02Ab), 协和医科大学; TSH 抗原, 美国 Sigma 公司; TSH IRMA 试剂盒, 同位素所五十三室; Sephadex G-50, 瑞典 Pharmacia 公司; BSA, Tween-20, TritonX-100, 华美生物医学工程公司; NaN_3 , 德国 Merck 公司。 标记缓冲液: 0.1mol/L Na_2CO_3 - NaHCO_3 , pH 10.1; 纯化缓冲液: 0.1mol/L PB, pH6.3, 含 0.9%NaCl; 分析缓冲液: 0.05mol/L PB, pH7.0, 含 0.9%NaCl, 0.5%BSA, 0.05% NaN_3 , 0.1%Tween-20, 0.05%NMS(正常鼠血清); 洗涤缓冲液:

0.01mol/L PB, pH7.4, 含 0.9%NaCl 0.05%Tween-20;; 包被缓冲液: 0.05mol/L $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$, pH9.5; 封闭缓冲液: 0.05mol/L PB, pH7.4, 含 0.9%NaCl, 1%BSA, 0.04% NaN_3 。

其余仪器与试剂与第三章同。

1.2. 实验方法

1.2.1. DMAE-NHS 标记 04Ab

将 100 μl 1mg/ml 的 04Ab 预先在标记缓冲液中透析过夜。称取一定量的 DMAE-NHS, 溶于无水 DMF 中, 配成浓度为 6.5mmol/L 的 DMAE-NHS DMF 溶液。将经透析过后的 04Ab 置于一 2ml 棕色小玻璃瓶中, 加入 7.5 μl 6.5mmol/L DMAE-NHS DMF 溶液, 室温下搅拌反应 1h 后, 加入 100 μl 10g/l 赖氨酸反应 15min, 使标记反应终止。标记物 DMAE-NHS-04Ab 与游离 DMAE-NHS 通过 Sephadex G-50 柱(1 \times 25cm)分离, 用纯化缓冲液平衡并淋洗柱子, 分离过程中用色谱仪监测蛋白峰, 分别测量流出液的化学发光强度和 280nm 处吸光度值, 取发光强度高且吸光度大的部分, 加入 1%BSA 后分装冰冻保存。

1.2.2. TSH 标准的配制

正常小牛血清预先经过 57 $^{\circ}\text{C}$ 下灭活半小时, 经 IRMA 测量其 TSH 浓度与 IRMA 试剂盒的零血清相同, 以此作为“零”标准血清, 将不同量的 TSH 加入经灭活后的正常小牛血清中, 获得一系列 TSH 浓度的血清。以 TSH IRMA 试剂盒标定血清的 TSH 浓度。配制好的 TSH 标准分装冰冻保存。

1.2.3. 固相抗体的制备

将 02Ab 用包被缓冲液稀释成 6 $\mu\text{g/ml}$, 取 96 微孔板, 每孔加入 200 μl , 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置过夜, 甩弃溶液后, 用洗涤缓冲液洗板 2 次, 每孔加入封闭缓冲液 250 μl , 室温封闭 2 小时, 甩弃封闭液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 密封保存。

1.2.4. 血清 TSH CLIA

DMAE-NHS-04Ab 用分析缓冲液稀释成浓度为 88ng/ml, 向包被有 02Ab 的微孔板中, 每孔加入 100 μl 标准或样品, 100 μl DMAE-NHS-04Ab 稀释液, 室温下振荡 5h 后, 每次每孔加入 200 μl 洗涤缓冲液洗板 6 次, 在发光计上测量各孔

的 CPS, 在双对数坐标纸上以 CPS 对 TSH 浓度作图。

2. 结果及讨论

2.1 标记物的分离纯化

如图 4.1 所示, 用 Sephadex G-50 柱分离标记物 DMAE-NHS-04Ab 和游离 DMAE-NHS, 测量流出液的发光强度, 出现两上峰, 第一个峰与蛋白峰重叠, 此为标记物 DMAE-NHS-04Ab, 收集此峰对应的流出液; 第二个峰为游离 DMAE-NHS。

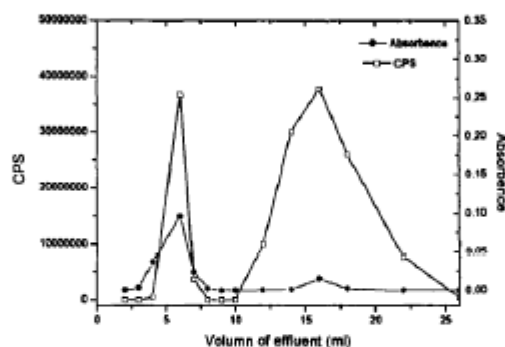


图 4.1. Sephadex G-50 柱分离标记物

DMAE-NHS-04Ab 和游离 DMAE-NHS 图谱

2.1. 标记缓冲液的 pH 值对 DMAE-NHS 标记 04Ab 的分子比的影响

用发光测定法测定标记物 DMAE-NHS-04Ab 中 DMAE-NHS 的量, 根据反应时 04Ab 的投入量和标记到 04Ab 上的 DMAE-NHS 的量, 求出 DMAE-NHS 标记 04Ab 的分子比, 即标记物 DMAE-NHS-04Ab 中一个 04Ab 分子结合 DMAE-NHS 的分子数。实验考查了三种不同 pH 值的标记缓冲液对 DMAE-NHS 标记 04Ab 的分子比的影响, 如表 4.1 所示, 在 pH 值为 8.0 的 PB 缓冲液中, DMAE-NHS 标记 Ab 的分子比非常低, 仅为 0.1, 将标记缓冲液改为 $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ (简称为 CB), 使溶液的 pH 值提高至 9.2 和 10.1, 分子比相应地分别提高至 0.78 和 2.4。

这种变化的原因，是因为 DMAE·NHS 标记 Ab 的反应为亲核取代反应，在碱性介质中有利于反应的进行。但由于在强的碱性介质中，DMAE·NHS 易水解，所标记不宜在更高 pH 值的缓冲液中进行。

表 4.1. 不同 pH 值的标记缓冲液对 DMAE·NHS 标记 O4Ab 的分子比的影响

标记缓冲液	0.1mol/L PB pH 8.0	0.1mol/L CB pH 9.2	0.1mol/L CB pH 10.1
分子比	0.1	0.78	2.4

标记反应时间 1h, 室温

2.2 O2Ab 包被浓度对 TSH CLIA 的影响

温育时间为 5h, DMAE·NHS-Ab 的量为 8.8ng/孔, 改变 O2Ab 的包被浓度, 做每种包被浓度下的 TSH CLIA, 观察测得的各标准点的 CPS, 以及 B 标准点(TSH 浓度为 0.25 mIU/L)的 CPS 与零标准 A 的 CPS 的比值(信噪比) 随 O2Ab 包被浓度的变化。下图 4.2 为测得的 G 标准点(TSH 浓度为 75mIU/L)的 CPS 及信噪比(B/A) 与 O2Ab 的包被浓度的关系, 由图 4.2 可知, G 标准点的 CPS 值随 O2Ab 的包被浓度的增加而增大, 但当 O2Ab 包被浓度达到 6 μ g/ml 后, CPS 出现平台, 其它标准点的情况与此相似, 且信噪比(B/A)在 O2Ab 的包被浓度为 3 μ g/ml 时已达到

4.0 以上, 因此, 选择 TSH CLIA 的 O2Ab 的包被浓度为 6 μ g/ml。式盐

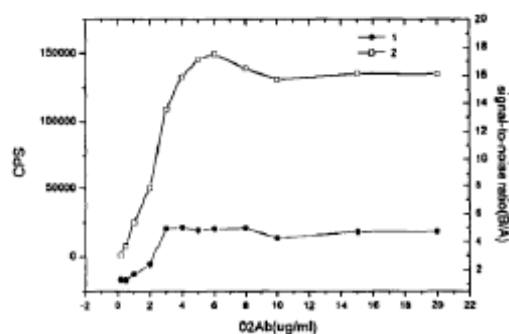


图 4.2. CPS 及信噪比随 O2Ab 包被浓度的变化关系曲线

1. 信噪比随 O2Ab 包被浓度的变化关系
2. CPS 随 O2Ab 包被浓度的变化关系

2.3 DMAE-NHS-04Ab 的量对 TSH CLIA 的影响

取包被有 02Ab 的微孔板, 温育时间为 5h, 改变加入反应体系中标记物 DMAE-NHS-Ab 的量, 分别做不同量 DMAE-NHS-Ab 的 TSH CLIA, 如图 4.3 所示, G 标准点的 CPS 随 DMAE-NHS-Ab 的量的增加而增大, 但当 DMAE-NHS-Ab 的量达到 8.8 ng(以 04Ab 的量为计算标准)后, CPS 出现平台。且信噪比(B/A)在 DMAE-NHS-Ab 的量大于 0.88 ng 小于 35.2 ng 时, 都能达到 4.0 以上。因此, 选择 TSH CLIA 每微孔加入 DMAE-NHS-Ab 的量为 8.8ng。

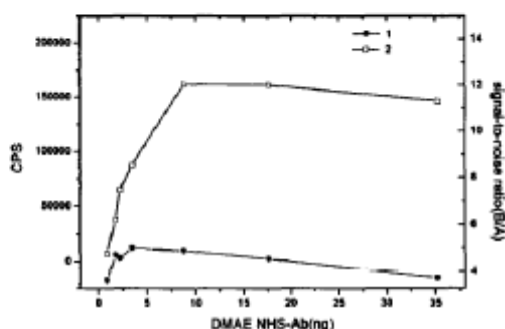


图 4.3. CPS 及信噪比与 DMAE-NHS-Ab 的量的关系曲线

1. 信噪比与 DMAE-NHS-Ab 的量的关系
2. CPS 与 DMAE-NHS-Ab 的量的关系

2.4 温育时间对 TSH CLIA 的影响

DMAE-NHS-Ab 的量为 8.8ng, 改变温育时间, 分别做不同温育时间的 TSH CLIA, 由图 4.4 可知, G 标准点的 CPS 值随温育时间的增加而增大, 但当温育时间达到 5h 后, CPS 出现平台, 则在所固定的反应条件下, 免疫反应达到平衡的时间为 5h, 温育时间 3h 以上能达到较高的信噪比。据此, 选择 TSH CLIA 的温育时间为 5h。免疫反应速度受参加免疫反应的抗原、抗体浓度的影响, 增大抗原、抗体浓度, 反应速度加快, 达到平衡的时间缩短, 图 4.5 为 DMAE-NHS-Ab 的量分别为 8.8ng, 35.2ng 和 176ng 的免疫分析曲线, 可以看出, 当增大 DMAE-NHS-Ab 的量, 使 DMAE-NHS-Ab 的量为 176ng 时, 免疫反应 15min, 就

能得到比较好的分析曲线, 信噪比达到 3.60。

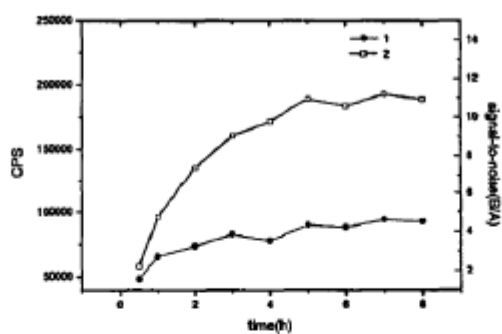


图 4.4. CPS 值及信噪比与温育时间的关系曲线

1.信噪比与温育时间的关系曲线

2.CPS 值与温育时间的关系曲线

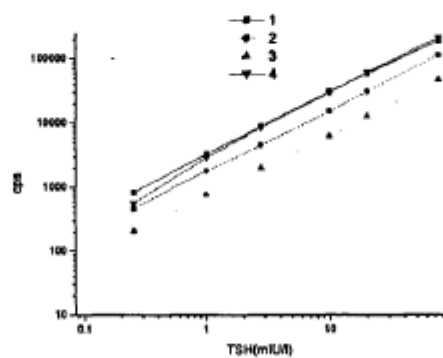


图 4.5 TSH CLIA 曲线

1: DMAE-NHS-Ab 的量为 8.8ng, t=5h

2: DMAE-NHS-Ab 的量为 176ng, t=15min

3: DMAE-NHS-Ab 的量为 35.2ng, t=15min

4: DMAE-NHS-Ab 的量为 35.2ng, t=2h

2.5 一步法与两步法 TSH CLIA 比较

一步法如 1.2.4 所述，二步法为：取包被 O2Ab 的微孔板，每孔加入 100 μ l 标准及样品，室温下振荡 3.5h，洗板 4 次，加入 100 μ l 浓度为 88ng/ml 的 DMAE-NHS-04Ab 稀释液，室温下振荡 1.5h，洗板 6 次，在发光计上测量各孔的 CPS。如图 4.6 所示，一步法 CPS 较两步法大，对应 TSH 浓度为 150mIU/L，一步法和两步法的 CPS 分别为 325810 和 220470。且一步法的信噪比也较两步法高，分别为 4.56 和 2.67，因此，选择 TSH CLIA 一步法。

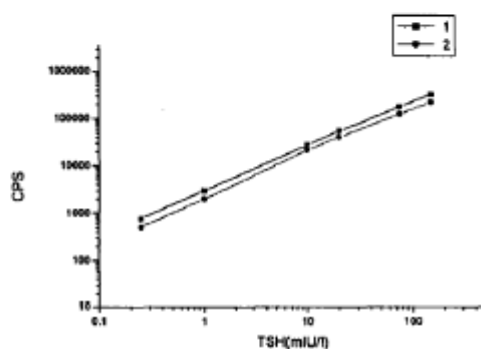


图 4.6. 一步法与两步法 TSH CLIA 比较

1: 一步法, 2: 两步法

2.6 两种温育方式的 TSH CLIA 比较

一种温育方式为室温振荡 5h，另一种方式为 37 $^{\circ}$ C 烘箱温育 5h，不振荡，这两种方式的 TSH CLIA 曲线如图 4.7 所示，由图 4.7 可知前者的 CPS 值较后者大，且前一种方式的信噪比也较后一种方式高，分别为 4.86 和 3.87。以微孔包被抗体的免疫反应，抗原抗体反应在微孔表面进行，抗原-抗体反应速度主要地决定于抗原、抗体扩散至微孔表面的速度，在静止状态下，这种扩散速度由抗原、抗体的浓度及其由微孔中央至微孔表面的浓度梯度决定。而振荡能加快溶液与固相表面的相对运动，加快试剂扩散至微孔表面的速度，因此在振荡情况下，能加快免疫反应速度。

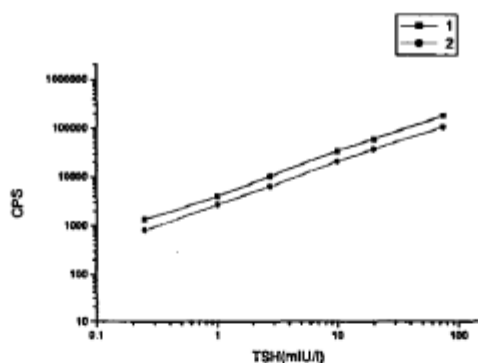


图 4.7. TSH CLIA 两种温育方式的比较

1: 室温振荡 5h, 2: 37℃烘箱温育 5h

2.7 TSH CLIA 方法学评价

标准曲线和分析灵敏度: 如图 4.8 所示, 在 0.25~150mIU/L 的 TSH 浓度范围之间, TSH CLIA 的 TSH 浓度与特异化学发光强度(CPS)呈现良好的线性关系, 线性相关系数为 0.9998, 信噪比(B/A)为 4.86, 与 150mIU/L TSH 标准相对应的 CPS 约为 320000。测量 20 个零标准的 CPS, 求出标准偏差, 以平均值加上 2 倍标准偏差, 在标准曲线上查得此值对应的 TSH 浓度规定为 TSH 的分析灵敏度, 实验测得该方法的 TSH 分析灵敏度为 0.01mIU/L, 该方法的灵敏度较 IRMA 法(分析灵敏度为 0.04mIU/L)高。

精密度: 以低(2.08mIU/L)、中(9.72 mIU/L)、高(19.35 mIU/L)三种不同 TSH 浓度的质控做批内(n=16)和批间(n=10)重复测量, 求得批内变异系数分别为 5.74%, 4.29%和 6.71%,批间变异系数分别为 5.24%, 4.36%, 6.14%。

准确性: 在已知 TSH 浓度的血清中,加入三种不同 TSH 标准浓度(0.6, 2.7, 75mIU/L)的血清, 测定回收率分别为 109.5%, 91.8%和 92.7%。

健全性: 将 TSH 浓度为 2.01 和 21.4mIU/L 的二份血清, 用标准零血清分别按 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 稀释, 测量各稀释点的 TSH 浓度, 由表 4.3 可知, TSH 的测量值与稀释倍数之间呈良好的线性关系, 线性相关系数分别为 0.992 和 0.999。

与 TSH IRMA 的相关性: 以我们建立的 TSH CLIA 和本室的 TSH IRMA 分别

测量不同人群的 65 例临床血清(35 例正常人血清, 20 例甲亢病人和 10 例甲减病人)的 TSH 浓度, 如图 4.9 所示, 两种方法的测量值相关性良好, 相关方程为 $Y=0.20 + 0.92X$, 相关系数为 0.993。

与 Ciba Corning TSH CLIA 测量值的相关性: 以本方法对 56 例临床血清(17 例正常人血清, 30 例甲减病人, 9 例甲亢病人血清, 301 医院提供, 附 Ciba Corning CLIA 测量值)进行测量, 如图 4.10 所示, 测量结果与 Ciba Corning TSH CLIA 测量值相关良好, 相关方程为 $Y=-0.16 + 0.92X$, 相关系数为 0.986。

Hook 效应: 实验测得在 0.25~500mIU/L 的 TSH 浓度范围之间, TSH CLIA 的 TSH 浓度与特异化学发光强度(CPS)呈现良好的线性关系, 但当 TSH 浓度大于 500mIU/L 时, 标准曲线出现“Hook 效应”, 即 CPS 值不再随 TSH 浓度增大而增大, 出现“弯钩”现象。

2.8 DMAE-NHS-Ab 的热稳定性

将 DMAE·NHS-Ab 用 PB 配成 pH 分别为 5.8, 7.0, 8.0 的三种不同酸度的水溶液, 分别间隔一定时间后取样置于室温(20℃)和 37℃保存, 至 16 天时分别测量其发光强度, 并进行 TSH CLIA, 与 4℃对比, 观察 TSH 浓度为 75mIU/L 对应的 CPS 值随时间的变化, 由此考查 DMAE·NHS-Ab 的发光活性与免疫活性在不同酸度和不同温度下随时间变化的情况。如图 4.11、4.13 所示, 室温下, DMAE·NHS-Ab 在 pH 分别为 5.8, 7.0, 8.0 的 0.1mol/LPB 缓冲液中, 16 天后发光活性分别降低 20%、10%和 26%; 16 天后 DMAE·NHS-Ab 在室温下进行免疫反应形成的复合物的发光活性相对 4℃分别降低 33%,11%和 28%。相对 4℃, DMAE·NHS-Ab 发生免疫反应形成的复合物的发光活性的降低是 DMAE·NHS-Ab 发光活性与免疫活性降低的综合效应的结果, DMAE·NHS-Ab 免疫活性的降低值由免疫反应复合物的发光活性的降低值减去 DMAE·NHS-Ab 发光活性的降低值, 结果分别为 13%,1%和 2%。如图 4.12、4.14 所示, 37℃下, 在 pH 为 5.8, 7.0, 8.0 的 0.1mol/L PB 缓冲液中, 16 天后, DMAE·NHS-Ab 的发光活性相对 4℃分别降低 40%, 25%和 37%,16 天后 DMAE·NHS-Ab 进行免疫反应形成的复合物的发光活性相对 4℃分别降低 46%, 31%和 51%, 免疫活性分别降

低 6%,6%和 14%。DMAE-NHS-Ab 的热稳定性随温度升高而降低, 随 pH 值的变化与 DMAE-NHS 的情况有所不同, 在所考查的三种 pH 中, DMAE-NHS-Ab 在 pH7.0 的缓冲液中最稳定。此结果比文献报导^[81]的没有甲基取代基的吡啶酯 AE-NHS 的热稳定性高很多, 与文献报导^[50]的 DMAE-NHS 的热稳定性基本相当。尽管 37℃下, 16 天后, 在 pH7.0 的缓冲液中, DMAE-NHS-Ab 的发光活性下降了 25%, 但仍能得到较好的分析曲线。室温和 37℃下, 实验测得的经过一定时间后 DMAE-NHS-Ab 进行免疫反应形成的复合物的发光活性相对 4℃下降的原因, 一方面是由于抗体的活性下降, 另一方面是由于标记物 DMAE-NHS-Ab 的部分水解所引起的发光活性下降, 其中, 后者为主要原因。在 4℃或冰冻条件下, DMAE-NHS-Ab 在 pH 为 7.0 的 PB 缓冲液中稳定, 半年后, 测得其发光活性和免疫活性没有下降。

表 4.3. 样品稀释实验结果

稀释倍数	原血清	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
血样 1 [#] TSH 期望值(mIU/L)	2.01	1.01	0.50	0.25	0.13	0.06
血样 1 [#] TSH 测量值(mIU/L)	2.01	1.19	0.61	0.32	0.13	0.08
血样 2 [#] TSH 期望值(mIU/L)	21.4	10.70	5.35	2.68	1.34	0.67
血样 2 [#] TSH 测量值(mIU/L)	21.4	11.95	6.09	3.23	1.74	0.82

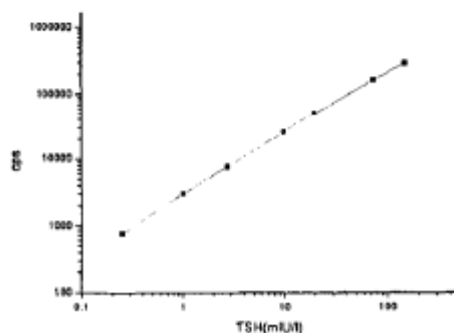


图 4.8. TSH CLIA 标准曲线

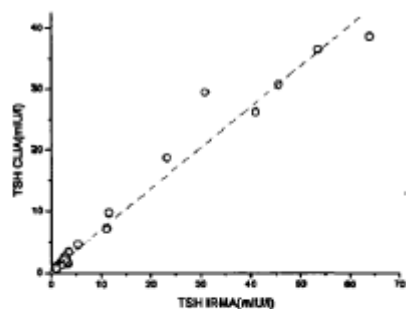


图 4.9. TSH CLIA 与 TSH IRMA 的相关性曲线
(正常 35 例, 甲亢 20 例, 甲减 10 例)

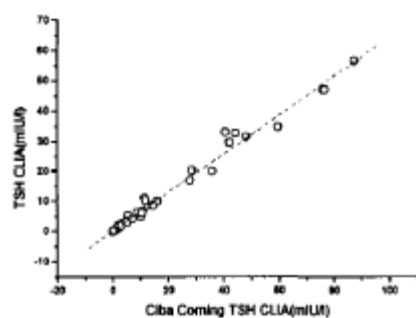


图 4.10. TSH CLIA 与 TSH Ciba Coming CLIA 测量值的相关性曲线
(17 例正常人血清, 30 例甲减病人, 9 例甲亢病人)

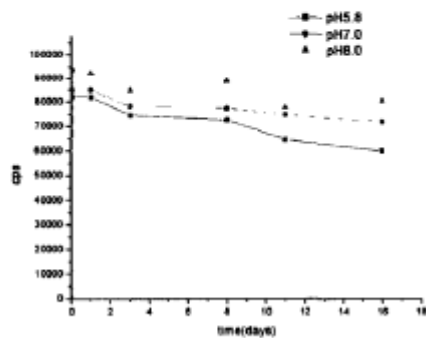


图 4.11. 室温下 DMAE-NHS-Ab 的发光活性随时间的变化

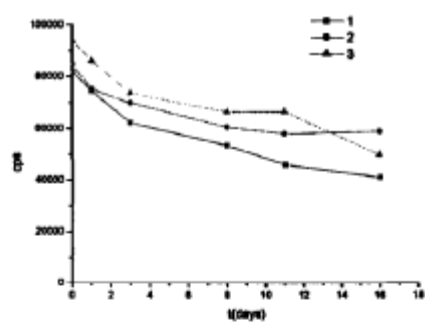


图 4.12. 37°C下 DMAE-NHS-Ab 的发光活性随时间的变化

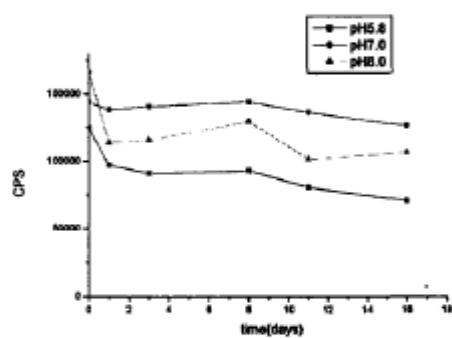


图 4.13. 室温下 DMAE-NHS-Ab 保存不同时间后进行免疫反应形成的复合物的发光活性与时间的关系

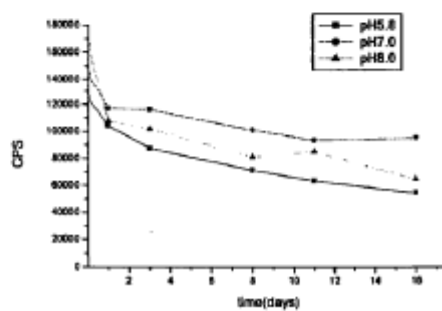


图 4.14. 37°C下 DMAE-NHS-Ab 保存不同时间后进行免疫反应形成的复合物的发光活性与时间的关系