

## TSH BAS—CLIA 方法的建立

尹东光等

在建立了 TSH CLIA 方法后, 为了获得更高的灵敏度, 在 TSH CLIA 方法学研究的基础上, 引进生物素—链亲和素放大系统(BAS), 进行了 TSH BAS—CLIA 方法的研究, 并取得期望的结果, 分析灵敏度提高至 0.007 mIU/L。

### 1. 实验部分

#### 1.1 主要试剂和仪器

链亲和素 (streptavidin, SA), 生物素 -N- 羟基琥珀酰亚胺酯 (Biotin-N-hydroxysuccinimide, B-NHS), 美国 Sigma 公司; 分析缓冲液: 0.05mol/LPB, pH7.0, 含 0.9%NaCl, 0.1%BSA, 0.05%NaN<sub>3</sub>, 0.1%Tween-20, 0.05%NMS, 0.1%TritonX-100; 洗涤缓冲: 0.01mol/LPB, pH8.0 含 0.9%NaCl,0.05%Tween-20; 其余同第四章。

#### 1.2 实验方法

##### 1.2.1 DMAE-NHS 标记 SA

称取一定量的 DMAE-NHS 溶于干燥的 DMF 中配成浓度为 6.5mmol/L 的 DMAE-NHS DMF 溶液。称取 90 $\mu$ gSA, 置于一 2ml 棕色小玻璃瓶中, 加入 200 $\mu$ l 标记缓冲液和 10.5  $\mu$ l 6.5mmol/L DMAE-NHS DMF 溶液, 室温反应 12h 后, 加入 100 $\mu$ l 10g/l 赖氨酸反应 15min, 使标记反应终止。标记物 DMAE-NHS-SA 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, 分部收集流出液, 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 B-NHS 标记 04Ab

将 200 $\mu$ l 1mg/ml 的 04Ab 预先在标记缓冲液中透析过夜, 除去其中的 NaN<sub>3</sub> 和可能含有的小分子化合物。称取 1.42mg B-NHS, 将其溶于无水 DMF 中配成浓度为 2.84mg/ml 的 B-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 14 $\mu$ l 2.84mg/ml 的 B-NHS DMF 溶液，室温下搅拌反应 2.5h。标记物 B-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，分部收集流出液，分别测量流出液的 280nm 处吸光度值，取吸光度大的部分，加入 1%BSA 后分装冰冻保存。

#### 1.2.2. TSH 标准的配制

与第四章同。

#### 1.2.3. 固相抗体的制备

与第四章同。

#### 1.2.4. 血清 TSH BAS-CLIA

以分析缓冲液将 B-NHS-04Ab 和 DMAE-NHS-SA 分别稀释成 1 $\mu$ g/ml 和 0.1125 $\mu$ g/ml,取包被 02Ab 的微孔板，每孔加入 100 $\mu$ l 标准或样品，100 $\mu$ l B-NHS-04Ab 稀释液，室温下振荡 4h, 洗板 4 次，每孔加入 200 $\mu$ l DMAE-NHS-SA 稀释液，室温下振荡 1h, 洗板 6 次，在发光计上测量 CPS,根据标准曲线求出样品的 TSH 浓度。

## 2. 结果及讨论

### 2.1. DMAE-NHS 标记 SA 的分子比

用发光测定法测定标记物 DMAE-NHS-SA 中 DMAE-NHS 的量，根据反应时 SA 的投入量和标记到 SA 上的 DMAE-NHS 的量，求出 DMAE-NHS 标记 SA 的分子比，实验测得 DMAE-NHS 标记 SA 的分子比为 4.2。

### 2.2 分析缓冲液对 TSH BAS-CLIA 的影响

分别用不同的分析缓冲液，进行 TSH BAS-CLIA，测定每种情况下的信噪比 [TSH 浓度为 0.25 mIU/L 的 CPS 与零标准的 CPS 的比值]，如表 5.1 所示，采用 PBS(含 0.9%NaCl 的 PB)做分析缓冲液，其信噪比较 Tris-HCl 分析缓冲液高，在 PBS 分析缓冲液中，加入 0.1% TritonX-100, 增大 BSA 的浓度，或提高溶液的 pH 值，能提高信噪比。由于 DMAE-NHS 在碱性介质中较易水解，因此不宜使用 pH 值过高的分析缓冲液。我们选择缓冲液 3 作为 TSH BAS-CLIA 的分析缓冲液。

表 5.1. 分析缓冲液对 TSH BAS-CLIA 的信噪比的影响

分析缓冲液	1	2	3	4
信噪比	2.91	5.64	6.26	2.97

注：分析缓冲液 1: 0.05mol/L PBS, pH7.0, 0.5%BSA, 0.05%NaN<sub>3</sub>, 0.1%Tween-20, 0.05%NMS;  
 分析缓冲液 2: pH8.0, 余同 1;                      分析缓冲液 3: 1%BSA, 0.1%TritonX-100,余同 1;  
 分析缓冲液 4: 0.05mol/LTris-HCl,pH8.0, 0.1%BSA, 0.05%NaN<sub>3</sub>, 0.1%Tween-20, 0.05%NMS.

### 2.3. TSH BAS-CLIA 方法学评价

**标准曲线和分析灵敏度：**如图 5.1 所示，在 TSH 浓度范围 0.25~150mIU/L 之间，TSH BAS-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 0.9996，信噪比为 5.72，与 150mIU/L TSH 标准相对应的 CPS 约为 1002860。测量 22 个零标准的 CPS，求出标准偏差和平均值，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 0.007mIU/L。生物素是一种小分子物质，经活化后可以高比度的偶联抗体，一个抗体分子上可以结合多个生物素，而链亲和素对生物素有极强的亲和力，这种亲和力远远大于抗原抗体的结合力，这样，即可通过链亲和素的双端效应，一端与生物素化抗体联结，一端与 DMAE·NHS 联结，构成抗体-生物素-链亲和素-DMAE·NHS 复合物介导的标记免疫分析体系，该体系中由于生物素-链亲和素的存在，具有多级放大信号的作用，从而使分析灵敏度得到提高。

**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=10)和批间(n=10)重复测量，求得批内变异系数分别为 1.35%、2.87%和 3.42%，批间变异系数分别为 4.35%、3.91%和 2.44%。

**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 94.49%、103.6%和 107.1%。

**健全性：**将 TSH 浓度为 4.478 和 116.7mIU/L 的两份血清，用正常小牛血清分别按 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 稀释，测量其 TSH 浓度，由表 5.2 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 0.9999 和 0.9996。

**与 TSH IRMA 的相关性:** 以建立的 TSH BAS-CLIA 和 TSH IRMA 试剂盒分别测量 62 例不同人群的临床血清(40 例正常人血清,10 例甲亢病人和 12 例甲减病人血清)的 TSH 浓度, 如图 5.2 所示, 两种方法的测量值呈良好相关性, 相关方程为  $Y=-0.015 + 1.02X$ , 相关系数为 0.989。

**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 例甲减病人血清, 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 5.3 所示, 测量结果与 Ciba Corning TSH CLIA 测量值相关良好, 相关方程为  $Y=-0.06 + 0.89X$ , 相关系数为  $R=0.988$ 。

**与 TSH CLIA 的相关性:** 将 TSH BAS-CLIA 与我们建立的 TSH CLIA 对照(40 例正常人血清,10 例甲亢病人和 12 例甲减病人血清), 如图 5.4 所示, 两种方法明显相关, 相关方程为  $Y=-0.24 + 1.01X$ , 相关系数为 0.992。

表 5.2. 样品稀释实验结果

血样 \ 稀释倍数	原血清	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
血样 1 <sup>a</sup> TSH 期望值(mIU/L)	4.48	2.24	1.12	0.56	0.28	0.14
血样 1 <sup>a</sup> TSH 测量值(mIU/L)	4.48	2.25	1.10	0.57	0.31	0.15
血样 2 <sup>b</sup> TSH 期望值(mIU/L)	116.70	58.35	29.18	14.59	7.30	3.65
血样 2 <sup>b</sup> TSH 测量值(mIU/L)	116.70	60.05	31.05	15.71	8.28	4.10

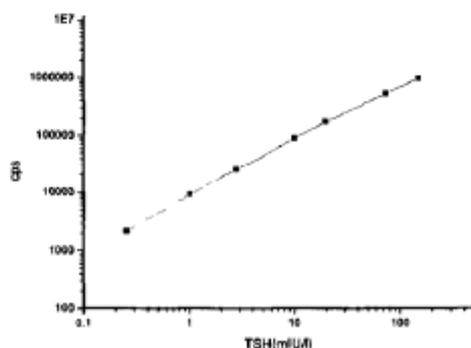


图 5.1. TSH BAS-CLIA 标准曲线