

硫酸脱氢表雄酮化学发光微粒子免疫法定量测定试剂的研制

黄明聪¹ 张晓琍² 林光华² 翁祖星¹ 孙旭东¹ 葛胜祥³ 张军^{3*}

[摘要] 目的 研制硫酸脱氢表雄酮化学发光免疫定量检测试剂。方法 利用硫酸脱氢表雄酮人工完全抗原免疫小鼠,通过杂交瘤技术制备特异性抗硫酸脱氢表雄酮单克隆抗体,采用竞争抑制法建立硫酸脱氢表雄酮化学发光免疫定量检测试剂。结果 筛选获得了27株稳定分泌抗硫酸脱氢表雄酮的单克隆抗体细胞株,建立了化学发光微粒子免疫法定量测定硫酸脱氢表雄酮的试剂盒雏形,与雅培公司的硫酸脱氢表雄酮定量检测试剂在检测临床标本上的相关系数 r 达0.99以上。结论 本研究为国产硫酸脱氢表雄酮化学发光微粒子免疫法定量测定试剂盒的研发奠定了基础。

[关键词] 硫酸脱氢表雄酮; 化学发光微粒子免疫法; 定量试剂盒

Development of chemiluminescent microparticle immunoassay for quantitative determination of dehydroepiandrosterone sulfate

HUANG Mingcong¹, ZHANG Xiaoli², LIN Guanghua², WENG Zuxing¹, SUN Xudong¹, GE Shengxiang³, ZHANG Jun^{3*}

(1. Xiamen Innodx Biotech Co., Ltd, Xiamen, Fujian, China, 361022; 2. Clinical Laboratory Department, Fujian Medical University Union Hospital, Fuzhou, Fujian, China, 350001; 3. National Institute of Diagnostics and Vaccine Development in Infectious Disease, Xiamen University, Xiamen, Fujian, China, 361102)

[ABSTRACT] Objective To develop chemiluminescent microparticle immunoassay for quantitative determination of dehydroepiandrosterone sulfate. Methods Mice were immunized by dehydroepiandrosterone sulfate artificial complete antigen. Monoclonal antibodies against dehydroepiandrosterone sulfate were prepared by hybridoma technique. Chemiluminescent microparticle immunoassay for quantitative determination of dehydroepiandrosterone sulfate was developed based on competitive binding method. Results 27 monoclonal antibodies were obtained. Chemiluminescent microparticle immunoassay for quantitative determination of dehydroepiandrosterone sulfate prototype kit was established. The coefficient r of testing specimens with reagent from Abbott company was over 0.99. Conclusion Development of domestic chemiluminescent microparticle immunoassay for quantitative determination of dehydroepiandrosterone sulfate reagent was laid foundation by this study.

[KEY WORDS] Dehydroepiandrosterone sulfate; Chemiluminescent microparticle immunoassay; Quantitative determination kit

基金项目:国家高技术研究发展计划(863计划)(2011AA02A101)

作者单位:1. 厦门万泰凯瑞生物技术有限公司,福建,厦门 361022

2. 福建医科大学附属协和医院检验科,福建,福州 350001

3. 厦门大学国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心,福建,厦门 361102

*通讯作者:张军, E-mail: zhangj@xmu.edu.cn

注:黄明聪和张晓琍为并列第一作者

硫酸脱氢表雄酮 (dehydroepiandrosterone sulfate, DHEAs) 是脱氢表雄酮 (dehydroepiandrosterone, DHEA) 的硫酸酯形式, 是一种主要由肾上腺皮质分泌的甾醇类激素^[1-2]。作为雄性激素和雌性激素的前体, DHEAs 是人体中含量最丰富的甾醇类物质, 在血清中的含量比 DHEA 高 250~500 倍, 比睾酮高 100~500 倍, 比雌二醇高 1 000~10 000 倍^[3-4]。循环血液中的 DHEAs 并不具备雄性和雌性激素的生物学活性, 运送到靶组织后经脱硫酸化生成 DHEA, 进而转变为不同的雄性和雌性激素化合物, 发挥生物学功能。在临床上, DHEAs 的定量检测常用于多毛症、女性男性化及多囊性卵巢综合症的辅助诊断, 当发生肾上腺肿瘤时 DHEAs 的水平也会异常升高^[5-6]。

DHEAs 的定量检测方法主要有液相色谱-质谱联用法和免疫检测法^[7-8]。液相色谱-质谱法由于其样品前处理复杂, 仪器昂贵, 耗时长, 其应用受到限制。免疫学检测方法包括放射免疫法、酶联免疫法和化学发光微粒免疫法 (chemiluminescent microparticle immunoassay, CLIA)。其中 CLIA 灵敏度高、线性范围宽、再现性好、易于实现自动化和高通量检测, 已逐渐成为临床检测中的主流方法。目前, 国内只有罗氏、雅培、西门子和贝克曼等国外大公司的 DHEAs CLIA 定量检测试剂上市, 价格昂贵, 研制国产化的 DHEAs 化学发光免疫定量检测试剂十分必要。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 试剂

人工完全抗原 DHEAs-BSA、DHEAs-OVA 由本实验室自行合成, 弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂购自 Sigma 公司, 吡啶酯来自于厦门大学。

1.1.2 临床血清标本

临床血清标本来源于厦门大学。

1.1.3 仪器

Berthold Sirius 单管式化学发光检测仪为德国 Berthold Technologies 公司产品; PHOMO 全自动酶标仪为安图生物公司产品。

1.1.4 实验细胞、动物

骨髓瘤细胞 Sp2/0-Ag14 由本实验室保存; Balb/c 小鼠和 F1 小鼠均购自上海斯莱克实验动

物有限责任公司。

1.1.5 耗 材

细胞培养板购自美国 Thermo Nunc 公司; 96 孔酶标板购自厦门怡佳美实验器材有限公司; 细胞冻存管为德国 Greiner 公司产品; 磁微粒 Dynabeads M-270 购自美国 Lifetechnologies 公司。

1.2 方 法

1.2.1 小 鼠 免 疫

取 6~8 周龄的 Balb/c 小鼠, 人工完全抗原 DHEAs-BSA 和佐剂乳化后皮下注射小鼠, 初次免疫注射 100 μ g 抗原, 加强免疫注射 50 μ g 抗原, 免疫间隔周期为 3w, 加强免疫 3 针后, 眼眶后静脉丛采血 4~6 滴, 分离血清后检测血清效价, 取效价高的小鼠进行脾脏免疫。

1.2.2 单克隆抗体的筛选

小鼠脾脏免疫 72 h 后取脾脏细胞与骨髓瘤细胞融合, 融合 5 d~7 d 后换液, 间接酶联免疫吸附试验和间接竞争酶联免疫吸附试验筛选阳性克隆, 采用有限稀释法进行杂交瘤细胞的克隆化。

1.2.3 单克隆抗体的制备

取 F1 小鼠, 向腹腔中注射 0.5 mL 的液体石蜡油; 3 d 后, 向腹腔中注射对数生长期的杂交瘤细胞约 1×10^6 个; 7 d~14 d 后, 抽取腹水, 离心取上清。上清经饱和硫酸铵沉淀后用 Protein A 亲和层析柱纯化单克隆抗体。

1.2.4 磁珠包被

磁微粒用 MEST (10 mmol/L MES, pH 6.0, 0.05% Tween 20) 洗涤 2 次后加入新配制的 EDC 活化 30 min, 用 MEST 洗涤 2 次; 加入抗体或抗原, 37 $^{\circ}$ C 反应 3 h; 用 MEST 洗涤 5 次, 用含 2% 酪蛋白的磷酸盐缓冲液重悬后于 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.5 吡啶酯标记

取 50 μ g 抗原或抗体加入到 600 μ L 0.1 mol/L 的 PBS (pH 8.0) 中, 加入 5 μ L 1 mmol/L 吡啶酯, 混匀, 室温避光反应 1 h; 加赖氨酸溶液反应 15 min, 然后 4 $^{\circ}$ C 透析至 20 mmol/L pH 6.5 的 PBS 中 12 h。

1.2.6 间接竞争酶联免疫吸附试验

包被: 包被抗原用 20 mmol/L 的 CBS (pH 9.6) 稀释至 2 μ g/mL, 每孔加 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中放置 2 h。封闭: 取出酶标板, 用 PBST (20 mmol/L PBS, pH 6.0, 0.1% Triton-X100) 洗 1 遍。

每孔加入 180 μL 封闭液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中放置 2 h。弃去封闭液, 将板拍干。加样: 加入梯度稀释的血清或细胞上清和梯度稀释的 DHEAs 各 50 μL , 混匀后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中孵育 30 min, PBST 清洗 5 遍。加酶标二抗: 每孔加入酶标二抗 100 μL , 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中孵育 30 min, PBST 清洗 5 遍。显色: 将混合后加 100 μL 于孔中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中孵育 15 min。终止并读值: 2 mol/L 硫酸终止反应, 用酶标仪读值。

1.2.7 管式化学发光免疫分析实验

1.2.7.1 竞争模式一 向微孔板中依次加入包被 DHEAs-BSA 的磁微粒 50 μL 、梯度稀释的 DHEAs 20 μL 和按 1:500 稀释的吡啶酯标记 DHEAs 单克隆抗体 50 μL , 水浴 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 25 min; 用 PBST (20 mmol/L PBS, pH 6.0, 0.1% Triton-X100) 洗 4 遍; 将反应孔中的磁微粒转移至反应杯中, 用单管式化学发光检测仪检测发光值。

1.2.7.2 竞争模式二 向微孔板中依次加入 50 μL 包被 DHEAs 单克隆抗体的磁微粒, 20 μL 梯度稀释的 DHEAs, 50 μL 按 1:500 稀释的吡啶酯标记 DHEAs-BSA, 水浴 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 25 min; 用 PBST (20 mmol/L PBS, pH 6.0, 0.1% Triton-X100) 洗 4 遍; 将反应孔中的磁微粒转移至反应杯中, 用单管式化学发光检测仪检测发光值。

1.2.7.3 DHEA 对 DHEAs 定量检测的干扰 向微孔板中依次加入 50 μL 包被 DHEAs 单克隆抗体的磁微粒, 分别加入 20 μL 同等浓度的 DHEAs、DHEA 及 DHEAs 和 DEHA 的混合物, 50 μL 按 1:500 稀释的吡啶酯标记 DHEAs-BSA, 水浴 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 25 min; 用 PBST (20 mmol/L PBS, pH 6.0, 0.1% Triton-X100) 洗 4 遍; 将反应孔中的磁微粒转移至反应杯中, 用单管式化学发光检测仪检测发光值。

2 结果

2.1 DHEAs 单克隆抗体的制备

2.1.1 小鼠免疫和单克隆抗体筛选 小鼠加强免疫 3 针后, 血清效价达 $1:2 \times 10^5$ 以上, 间接竞争 ELISA 的结果显示免疫血清中存在 DHEAs 和 DHEA 特异性抗体 (图 1)。选择效价高的小鼠取脾脏与骨髓瘤细胞融合并进行单克隆抗体的筛选。

结合间接 ELISA 和间接竞争 ELISA 筛选 DHEAs 特异性抗体, 获得了 27 株稳定分泌抗 DHEAs 抗体的杂交瘤细胞。

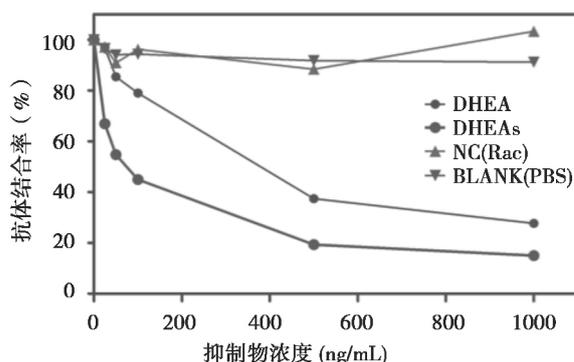


图 1 DHEAs-BSA 免疫小鼠血清的竞争抑制性
Figure 1 Competitive inhibition ability of DHEAs-BSA immune serum

2.1.2 单抗性质鉴定

27 株 DHEAs 单克隆抗体的效价均在 $1:1 \times 10^5$ 以上, 均特异性识别 DHEAs, 不与氢化可的松、甲羟孕酮、 β -雌二醇发生交叉反应, 但能结合 DHEA (图 2)。其中 2D1、3C4 两株单抗对 DHEAs 的亲合力明显高于对 DHEA 的亲合力, 选择这 2 株单抗作为试剂建立的原料。

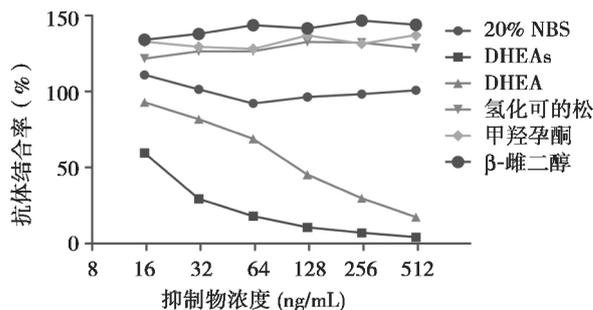


图 2 DHEAs 单克隆抗体的竞争抑制性
Figure 2 Competitive inhibition ability of DHEAs Mabs

2.2 DHEAs 化学发光免疫定量测定法的建立

2.2.1 竞争模式的选择

分别用 DHEAs-BSA 抗原和 DHEAs 单克隆抗体包被磁微粒, 并用吡啶酯标记 DHEAs-BSA 抗原和 DHEAs 单克隆抗体, 以竞争抑制法建立 DHEAs 的化学发光免疫测定方法, 检测系列稀释的 DHEAs。用双对数法拟合剂量反应曲线, 结果显示 2 种竞争模式的定量检测结果与样品稀释倍数均有较好的线性相关, 但标记抗体的斜率更优 (表 1)。

表1 标记抗体或抗原模式所建立的 CLIA 检测系列稀释样品的线性方程

Table 1 Linear equation of CLIA test series diluted sample based on antibody or antigen labeled pattern

吡啶酯标记物	磁珠包被物	双对数线性方程	R ²
DHEAs-BSA	DHEAs 2D1	$y = -0.4511x + 6.5609$	0.9619
DHEAs-BSA	DHEAs 3C4	$y = -0.5225x + 5.9748$	0.9903
DHEAs 2D1	DHEAs-BSA	$y = -1.0564x + 7.5028$	0.9772
DHEAs 3C4	DHEAs-BSA	$y = -1.0120x + 6.6467$	0.9935

2.2.2 DHEA 对 DHEAs 定量检测的干扰

在同等浓度下,抗体对 DHEAs 显示出更高的亲和力(图 3),当 DHEAs 和 DHEA 以同等浓度存在时,DHEA 并不影响抗体与 DHEAs 的结合,加上生理条件下 DHEAs 的浓度是 DHEA 的 250~500 倍^[3-4],因此检测临床标本时,DHEA 对 DHEAs 定量检测影响很小。

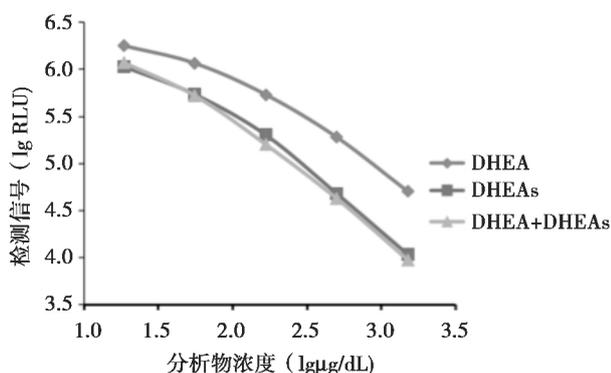


图 3 DHEA 对检测的干扰

Figure 3 Interference of DHEA on detection

2.2.3 与国际主流同类产品的初步比较

选取 35 份不同背景值的临床血清标本,分别用 Abbott DHEAs 定量测定试剂盒和本研究建立的 DHEAs CLIA 法定量测定试剂检测 DHEAs 的含量,结果显示本研究建立的试剂盒与 Abbott 的试剂盒在检测临床血清标本上相关性良好,相关系数 r 在 0.99 以上(图 4)。

3 讨论

决定化学发光免疫定量测定试剂性能的参数主要有检测灵敏度、线性范围、特异性等。对于小分子半抗原的免疫定量检测试剂,特异性是影响其检测准确性的一个重要因素。DHEAs 是小分子半抗原物质,外周血中存在着许多结构类似的甾

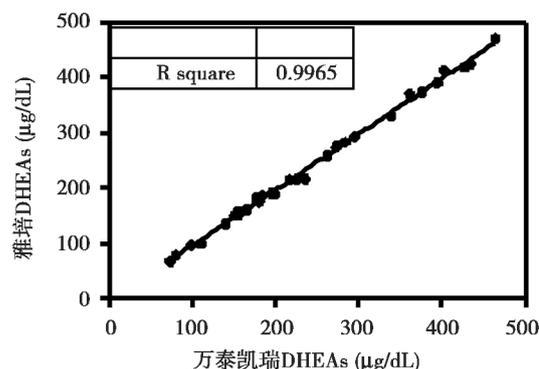


图 4 临床血清标本检测相关性评价

Figure 4 Correlation of measuring specimens

醇类激素化合物,此外还有 DHEA 在化学结构上与其只相差一个磷酸基,因此,难以获得 DHEAs 高特异性抗体。本研究中筛选获得的单克隆抗体均能特异性地识别 DHEAs,与 β -雌二醇、甲羟孕酮、氢化可的松这三种甾醇类激素均无交叉反应,且部分抗体对 DHEAs 的亲和力明显高于 DHEA,选用此类抗体使得 DHEA 对 DHEAs 的定量检测影响很小。并且在人血清中 DHEAs 的含量比 DHEA 高 250~500 倍^[3-4]。因此本研究中建立的 DHEAs CLIA 定量检测试剂虽然对 DHEA 有一定的交叉反应,但其对临床标本的检测影响很小。

本研究筛选获得了 DHEAs 特异性的单克隆抗体,建立了 DHEAs 化学发光微粒子免疫检测法定量检测锥形试剂盒,初步评价特异性和定量准确性良好。

参考文献

[1] Van Voorhees EE, Dennis MF, Calhoun PS, et al. Association of DHEA, DHEAS, and cortisol with childhood trauma exposure and posttraumatic stress disorder[J]. International Clinical Psychopharmacology, 2014, 29(1):56. (下转第 322 页)

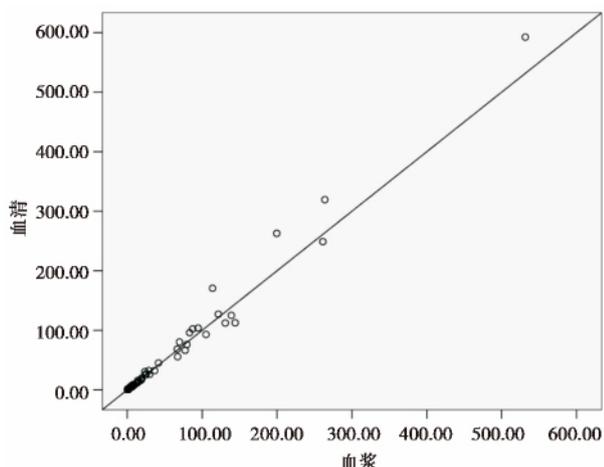


图3 血浆与对应血清测值相关性分析散点图

Figure 3 The scatter plot of correlation analysis of the serum and plasma

(电化学发光法)为对照试剂,对自制的癌胚抗原定量测定试剂盒(化学发光免疫分析法)进行临床检测性能评价。同对照试剂比较,自制试剂盒的正常符合率为97.8%,异常符合率为96.1%,总符合率为97.3%;Kappa值为0.931($P < 0.01$);两者测值相近,相关系数达0.987($P < 0.01$),线性回归方程为 $Y = 0.091 + 1.009X$,相关性良好。采用Bland-Altman统计学方法对两组测定结果进行分析,有97.2%的点在一致性界限内,两者的测定结果具有较高的一致性。且通过对同一病例的血清与血浆的测值比较,

两者测值一致,相关系数 r 值达0.991($P < 0.01$),说明本试剂盒适用于人血清或血浆中CEA含量的检测。同时,不受甲胎蛋白、类风湿因子、抗核抗体、溶血、脂血、黄疸的干扰。说明自制的试剂盒与目前临床广为应用的进口试剂在指标检测性能上具有良好的等效性,可替代国外昂贵试剂应用于临床检测和基础医学的研究。

参考文献

- [1] Gold P, Freedman SO. Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques[J]. J Exp Med, 1965,121:439-462.
- [2] 尚高峰,张翠歌. 癌胚抗原检测的临床意义[J]. 内蒙古中医药, 2014,33(33):57-58.
- [3] 潘丽兰. 血清CEA、CA199、CA125、CA153、AFP联合检测对胃癌的诊断价值[J]. 中国实验诊断学, 2013,17(12):2192-2195.
- [4] 张海英. 癌胚抗原和糖类抗原125联合检测在肺癌诊断中的应用[J]. 检验医学与临床, 2013,(24):3335-3336.
- [5] 卢灿荣,张士武,张勇,等. 联合检测癌胚抗原、糖链抗原19-9和C反应蛋白对结肠癌的诊断价值[J]. 标记免疫分析与临床, 2012,19(1):3-6.
- [6] 农天雷. 常用化学发光免疫分析技术及其特点[J]. 现代医药卫生, 2011,27(14):2156-2158.

(上接第305页)

- [2] Van Voorhees EE, Dennis MF, McClernon FJ, et al. The association of dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate (DHEAS) with anxiety sensitivity and electronic diary negative affect among smokers with and without posttraumatic stress disorder[J]. Journal of Clinical Psychopharmacology, 2013,33(4):556.
- [3] Sjøeborg T, Frederiksen H, Fruekilde P, et al. Serum concentrations of DHEA, DHEAS, 17α -hydroxyprogesterone, $\Delta 4$ -androstenedione and testosterone in children determined by TurboFlow-LC-MS/MS[J]. Clinica Chimica Acta, 2013,419:95-101.
- [4] Urbanski HF, Mattison JA, Roth GS, et al. Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) as an endocrine marker of aging in calorie restriction studies[J]. Experimental Gerontology, 2013,48(10):1136-1139.
- [5] Goodarzi MO, Carmina E, Azziz R. DHEA, DHEAS and PCOS[J]. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2015,145:213-225.
- [6] Jiménez MC, Sun Q, Schürks M, et al. Low dehydroepiandrosterone sulfate is associated with increased risk of ischemic stroke among women[J]. Stroke, 2013, 44(7):1784-1789.
- [7] Azziz R, Chang WY, Stanczyk FZ, et al. Effect of bilateral oophorectomy on adrenocortical function in women with polycystic ovary syndrome[J]. Fertility and Sterility, 2013,99(2):599-604.
- [8] Hildreth KL, Gozansky WS, Jankowski CM, et al. Association of serum dehydroepiandrosterone sulfate and cognition in older adults: Sex steroid, inflammatory, and metabolic mechanisms[J]. Neuropsychology, 2013, 27(3): 356.