

# 管式磁性微粒子化学发光免疫分析法测定人尿液中的雌三醇

郑国金<sup>1,4</sup> 方卢秋<sup>2,4</sup> 陈惠<sup>4</sup> 李振甲<sup>3</sup> 应希堂<sup>3</sup> 林金明<sup>\*4</sup>

<sup>1</sup>( 楚雄医药高等专科学校化学教研室, 楚雄 675000) <sup>2</sup>( 长江师范学院化学化工学院, 重庆 408100)

<sup>3</sup>( 北京科美东雅生物技术有限公司, 北京 100094) <sup>4</sup>( 清华大学化学系, 北京 100084)

**摘 要** 待测尿液中的雌三醇-辣根过氧化物酶标记的雌三醇与异硫氰酸荧光素( FITC ) 标记的兔抗雌三醇抗体在均相体系中发生竞争性免疫反应, 再加入用羊抗 FITC 抗体包被的磁微粒, 反应生成物结合在磁微粒上, 在磁场中经分离、洗涤后加发光底物, 检测发光强度( RLU ), 测定尿液中雌三醇的含量。通过对检测条件的优化, 建立了磁性微粒子化学发光免疫分析法测定人尿液中雌三醇的方法, 并对正常男性、女性和孕妇的尿液中雌三醇含量进行了测定。结果表明, 本方法的线性范围为 1 ~ 100  $\mu\text{g/L}$ , 检出限为 0.25  $\mu\text{g/L}$ , 具有很高的灵敏度; 批内相对标准偏差 < 14%; 批间相对标准偏差 < 7%, 具有良好的稳定性和重现性。

**关键词** 雌三醇; 化学发光免疫分析; 磁性微粒子; 尿液

## 1 引 言

雌三醇( Estriol, E3 ) 是重要的内源性雌性激素之一。人体内存在游离雌三醇和结合雌三醇, 男性及未孕女性体内的雌三醇含量很低。正常孕龄女性体内雌三醇的主要来源是雌二醇和雌酮的代谢产物; 孕妇体内雌三醇的主要来源是婴儿和胎盘, 且含量一般较高。通过检测孕妇血清或尿液中雌三醇的含量, 可以判断胎儿的发育状况。因此, 快速、准确地检测血清或尿液中雌三醇的含量对于科研和临床应用都具有重要意义。目前, 检测游离雌三醇或总雌三醇的常用方法有高效液相色谱法( HPLC )<sup>[1,2]</sup>、液相色谱-质谱( LC-MS ) 法<sup>[3]</sup>、酶联免疫分析法( ELISA )<sup>[4]</sup>、放射免疫法( RIA )<sup>[5~7]</sup>、时间分辨荧光免疫分析法( TRFIA )<sup>[8]</sup>和化学发光免疫分析法( CLIA )<sup>[9~11]</sup>等。本实验应用化学发光免疫分析法( CLIA ) 高灵敏度和高特异性的特点, 利用磁性微粒子的分离特性, 快速、准确地对人体尿液中的雌三醇含量进行了化学发光免疫检测。

雌三醇( E3 ) 是一种半抗原小分子, 有免疫反应性。实验中采用竞争法对尿液中的雌三醇进行分析, 使待测雌三醇-辣根过氧化物酶标记的雌三醇( E3-HRP ) 在均相体系中与异硫氰酸荧光素( FITC ) 标记的兔抗雌三醇抗体( FITC-E3 抗体) 发生竞争性免疫反应。再加入用羊抗 FITC 抗体包被的磁微粒, 反应生成物结合在磁微粒上, 在磁场中经分离、洗涤后加发光底物, 用冷光分析仪检测发光强度( RLU ), 测定尿液中雌三醇的含量。检测原理如图 1 所示。

## 2 实验部分

### 2.1 仪器与试剂

Flash'n glow LB955 30 管全自动进样冷光分析仪( Berthold 公司); 高速离心机( Beckman 公司), 实验中分离温度为 4 和 25  $^{\circ}\text{C}$ , 转速 13000 r/min; 磁性分离器( 北京科美东雅生物技术有限公司定制, 磁场强度 2800 Gs ); XW80 旋涡混合器( 上海精科实业有限公司); 试管 12  $\times$  60 mm( 浙江拱东医用塑料厂); 磁性微粒子( 磁性分离剂, Adaltis 公司)。

雌三醇标准品( Sigma 公司); 兔抗 E3 抗血清、羊抗 FITC 抗体包被的磁性微粒子( 5 g/L )、FITC 标记的兔抗雌三醇抗体、HRP 标记的 E3 抗原、发光底物及 PBST 洗涤液, 均由北京科美东雅生物技术有限公司提供; 其它试剂均为分析纯。标准品稀释液为 50 mmol/L PBS 缓冲溶液( pH = 7.4, 含 2.0% BSA

及 0.5% 水解明胶 (0.1% Proclin)。

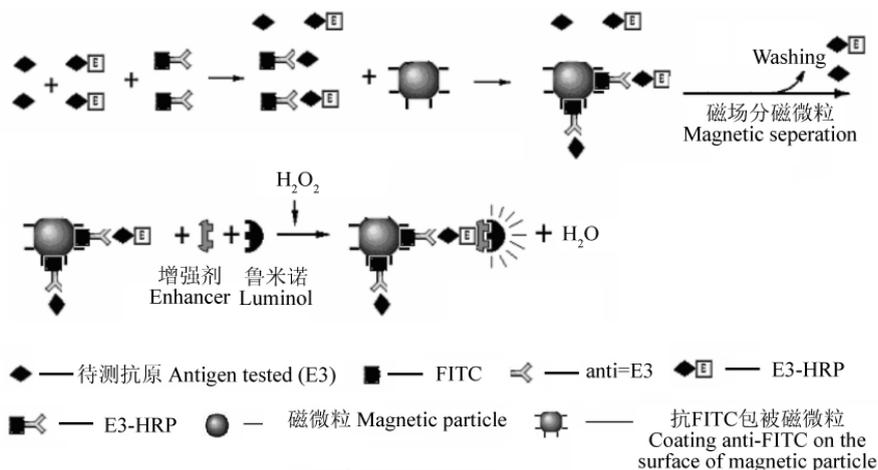


图 1 尿液中雌三醇的检测原理

Fig. 1 Principle of determination of estriol in human urine

## 2.2 实验步骤

**2.2.1 PBS-BSA 缓冲液、E3 标准溶液、E3-HRP 溶液、FITC-E3 抗体溶液的配制** PBS-BSA 缓冲液的配制: 用 50 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  配制 PBS-BSA 缓冲溶液 (pH = 7.4, 含 2.0% BSA 及 0.5% 水解明胶 0.1% 的 Proclin)。E3 标准溶液的配制: 称取 E3 标准品 0.0042 g, 加 420  $\mu\text{L}$  无水乙醇溶解得 10 g/L 的 E3 溶液, 取该 E3 溶液 100 mL, 加 4.9 mL 无水乙醇、5 mL 蒸馏水, 配成 0.1 g/L 的 E3 标准溶液。取此 E3 标准液, 用 PBS-BSA 缓冲液梯度稀释, 配制 100, 30, 10, 3 和 1  $\mu\text{g}/\text{L}$  的 E3 标准溶液, 4  $^\circ\text{C}$  保存。E3-HRP 溶液的配制: 取 E3-HRP 溶液, 以 PBS-BSA 缓冲液为梯度稀释, 配制 1: 100, 1: 200, 1: 500, 1: 800 和 1: 1000 (V/V) 的 E3-HRP 溶液, 4  $^\circ\text{C}$  保存。FITC-E3 抗体溶液的配制: 取 FITC-E3 抗体, 以 PBS-BSA 缓冲液梯度稀释, 配制 1: 100, 1: 200 和 1: 500 (V/V) 的 FITC-E3 抗体溶液, 4  $^\circ\text{C}$  保存。

**2.2.2 尿样的采集和处理** 采集 3 份男性尿样, 3 份女性尿样, 1 份 13 周孕妇尿样、1 份 17 周孕妇尿样。处理方法: 分别取原尿 0.5 mL 于 10 mL 具塞离心管中, 加 2.0 mL 蒸馏水, 2.5 mL 2.0 mol/L HCl, 置沸水浴中, 使结合态 E3 完全水解为游离 E3, 加热 30 min 后取出, 冷却至室温, 用 2 mol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液调至 pH  $\approx$  7.4。再用蒸馏水将溶液稀释到 7.5 mL。原尿液被稀释了 15 倍, 4  $^\circ\text{C}$  保存备用。使用时与 PBS-BSA 缓冲液等体积混和。

**2.2.3 尿液中 E3 含量的分析过程** (1) 取试管 28 支, 分成 14 组, 每组 2 支, 各加入 E3-HRP 50  $\mu\text{L}$ , 第一组加 PBS-BSA 缓冲液 50  $\mu\text{L}$ , 2~6 组加 1, 3, 10, 30 和 100  $\mu\text{g}/\text{L}$  的 E3 标准溶液 50  $\mu\text{L}$ , 7~14 组加 1~8 号尿样 50  $\mu\text{L}$ , 混匀后于每支试管中加入 FITC-E3 抗体溶液 50  $\mu\text{L}$ , 37  $^\circ\text{C}$  水浴中加热 15 min; (2) 在每支试管中加入羊抗 FITC 包被的磁微粒 (5 g/L) 50  $\mu\text{L}$ , 37  $^\circ\text{C}$  水浴加热 10 min; (3) 试管置于磁性分离器上, 磁微粒沉于试管底部, 倾去溶液, 试管脱离磁分离器, 振摇试管, 每管中加入 600  $\mu\text{L}$  PBST 洗涤液, 试管再次置于磁性分离器上, 磁微粒沉于试管底部, 倾去溶液, 如此洗涤 5 次, 每次需将试管静置在磁分离器上 3 min, 使磁微粒沉降完全; (4) 在每支试管中加入 300  $\mu\text{L}$  发光底物 (发光底物 A 和 B 需等体积混合), 37  $^\circ\text{C}$  水浴加热 20 min; (5) 擦干试管外壁的水, 置于冷光分析仪中, 测定 RLU, 经线性拟合, 进行定量分析 (包括灵敏度、线性范围和检出限等)。

## 3 结果与讨论

### 3.1 分析条件的优化

**3.1.1 E3-HRP 和 FITC-E3 抗体稀释浓度的优化** 通过棋盘实验对 E3-HRP 和 FITC-E3 抗体稀释浓度进行选择, 在其它条件不变的情况下,  $B_0$  为加入 PBS-BSA 缓冲液时的 RLU,  $B_1$  和  $B_5$  分别为加入 1 和 100  $\mu\text{g}/\text{L}$  E3 标准溶液时的 RLU, 实验结果见表 1。在标准品抗原存在下,  $B/B_0$  值可反映酶标抗原与抗体

的结合率。由于本实验采用了竞争法, 酶标抗原与标准品抗原竞争抗体, 标准品抗原浓度越大, 结合到抗体上的酶标抗原越少, RLU 越小,  $B/B_0$  值越小; 反之则越大。为确保标准曲线上每个浓度点的结合率之间有足够的落差, 保证检测的灵敏度和准确度, 曲线上最小剂量点的  $B_1/B_0 > 80\%$  和最大剂量点的  $B_5/B_0 < 20\%$  较为适宜。从结果分析, 选择 FITC-E3 抗体(1: 100) 和 E3-HRP(1: 500) 较为合适。

表 1 棋盘滴定实验

Table 1 Chessboard titration

FITC-E3 抗体稀释度 Dilution of FITC-anti-estriol antibody	E3-HRP 稀释度 Dilution of horseradish peroxidase (HRP) - estriol	发光强度 Luminescence intensity (RLU)				
		$B_0$	$B_1$	$B_5$	$B_1/B_0$ (%)	$B_5/B_0$ (%)
1: 100	1: 100	961864	899407	469723	94	49
	1: 200	797578	817439	235616	102	29
	1: 500	630539	535050	103891	85	16
1: 200	1: 100	297176	290196	157834	97	53
	1: 200	229916	194253	93931	85	40
	1: 500	134032	114406	45268	85	34
1: 500	1: 100	133132	110077	98056	83	74
	1: 200	81305	76874	49765	95	61
	1: 500	53352	45352	16007	85	30

$B_0$ : RLU of PBS-BSA;  $B_1$ : RLU of 1  $\mu\text{g/L}$  E<sub>3</sub>;  $B_5$ : RLU of 100  $\mu\text{g/L}$  E<sub>3</sub>.

**3.1.2 磁微粒加入量的优化** 50  $\mu\text{L}$  FITC-E3 抗体(1: 100) 和 50  $\mu\text{L}$  E3-HRP(1: 500) 发生免疫反应后, 加入不同量的磁微粒时,  $B_0$  值不同, 加入量与 RLU 的关系见图 2。E3 测定实验中加入量为 50  $\mu\text{L}$ 。

**3.1.3 温育时间的优化** 温育温度为 37  $^{\circ}\text{C}$  时, FITC-E3 抗体与 E3-HRP 在发生免疫反应时, 由于反应在均相体系中进行, 反应很快达到平衡。温育 15 min 后, RLU 接近最大值, 温育时间与 RLU 的关系见图 3a, E3 测定实验中温育时间选择为 15 min。羊抗 FITC 抗体包被的磁微粒与 FITC-E3 抗体抗原结合物发生免疫反应时, 由于反应在近于均相的体系中进行, 反应很快达平衡。温育时间与 RLU 的关系见图 3b。E3 测定实验中温育时间为 10 min 即可。加入发光底物后, 平台期维持时间很长, 温育时间与 RLU 的关系见图 3c, E3 测定实验中温育时间为 20 min。

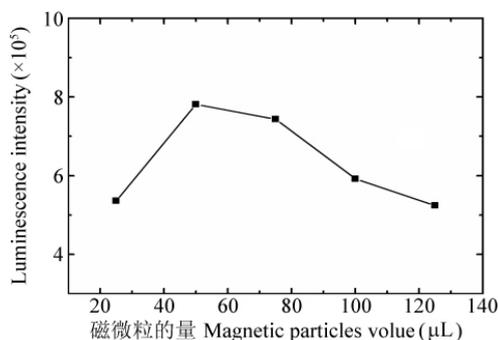


图 2 磁微粒的量对发光强度的影响

Fig. 2 Effect of amount of magnetic particles on luminescence intensity

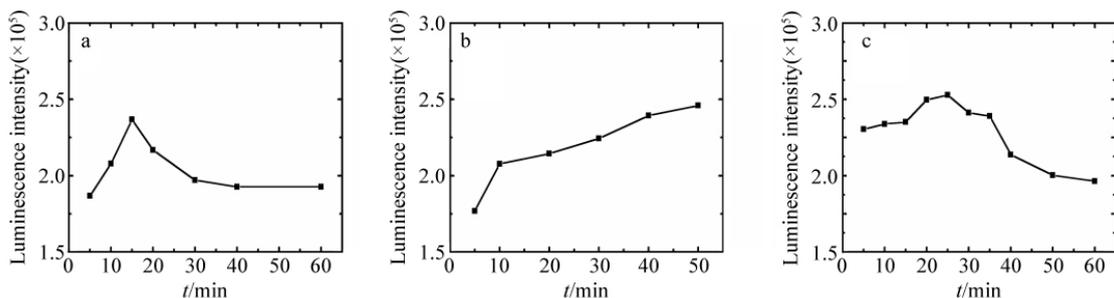


图 3 温育反应时间对发光强度的影响

Fig. 3 Effect of reaction time on luminescence intensity

Incubation on addition: (a) FITC-E<sub>3</sub> antibody; (b) goat anti-FITC antibody coated magnetic microparticle; (c) luminescence substrate.

**3.1.4 影响发光强度和测定结果的其它因素** 免疫反应、化学发光反应的温度对 RLU 有影响, 37  $^{\circ}\text{C}$  温浴能缩短反应达平衡的时间。洗涤磁微粒时, 洗涤次数、洗涤剂用量和磁微粒沉降时间对测定结果有

影响, 洗涤 5 次, 洗涤剂用量 600  $\mu\text{L}$ , 磁微粒沉降时间 3 min。空白实验表明, 空白值低, 测定值的精密度好。

### 3.2 方法的分析特性

**3.2.1 标准曲线** 在最佳反应条件下, E3 标准品浓度分别为 0, 1, 3, 10, 30 和 100  $\mu\text{g/L}$ , 以  $\log Y$  对  $\log X$  作图, 线性回归方程为  $\log Y = 1.5029 \log X - 1.6849$ , 线性相关系数  $r = 0.9975$ , 线性范围为 1 ~ 100  $\mu\text{g/L}$ , 可用于准确定量分析。实验中用了与仪器相配的软件计算。该线性方程采用的是  $\log Y - \log X$  的线性回归数学模型, 其线性方程表达式为:  $\log Y = a + b \log X$ 。其中,  $X$  为标准品(或待测样品)浓度,  $\text{logit}(Y) = \ln\left(\frac{Y'}{1 - Y'}\right)$ ,  $Y' = \frac{B - \text{NSB}}{B_0 - \text{NSB}}$ , 式中  $B$  为标准品(或待测样品)的 RLU,  $B_0$  为不加标准品(或待测样品)的 RLU, NSB 为不加抗体时的 RLU, 很低, 可忽略,  $Y' \approx B/B_0$ 。

**3.2.2 检出限** E3 标准品浓度为 0  $\mu\text{g/L}$  时, 平行测定 10 管的 RLU, 计算平均值及其标准偏差(SD), 发光平均值减去两倍标准偏差后的值代入线性方程, 所得浓度即为方法的检出限, 本方法的检出限为 0.25  $\mu\text{g/L}$ 。

**3.2.3 回收率** 在测定样品中加入已知量的被测物质, 测定其含量, 并与已知量相比较, 其结果用回收率表示。分别向稀释 60 倍的 13 周孕妇尿样中加入 E3, 使样品中增加的 E3 浓度为 5.0, 25.0 和 50  $\mu\text{g/L}$ , 然后用本方法对加标样品和稀释 60 倍的 13 周孕妇尿样中的 E3 含量进行测定。重复实验 3 次, 计算得到

平均回收率分别为 98%, 103% 和 105%。

**3.2.4 精密度** 对稀释 60 倍的 13 周孕妇尿样和稀释 240 倍的 18 周孕妇尿样进行分析, 每次每个样品做 10 管平行, 连续测定 3 次, 分别计算批内变异和批间变异。如表 2 所示, 批内相对标准偏差小于 14%, 批间相对标准偏差均 < 7%。

### 3.3 尿液中 E3 的测定

用 PBS-BSA 缓冲液倍比稀释经处理的 13 周孕妇尿样, 得到稀释度分别为 1/2,

1/4 和 1/8 的样品。用本方法测定 E3 含量, 稀释度作为  $X$  轴, 样品 E3 含量测值为  $Y$  轴, 作图。得到拟合直线方程:  $Y = 92.3428X + 0.3300$ ; 线性相关系数:  $r = 0.9993$ 。

对随机选取的 3 份男性尿样, 3 份女性尿样和 2 份孕期在 13 ~ 18 周的孕妇尿样进行了测定, 测定结果列于表 3。孕妇尿样的 E3 含量高于非孕女性和男性, 孕期 18 周的孕妇尿样的 E3 含量高于孕期 13 周, 说明本方法具有很好的临床应用前景。

表 3 尿液中 E3 测量结果

Table 3 Measured results of estriol in urine

来源 Urine sample	检测值 Found ( $\mu\text{g/L}$ )	稀释倍数(倍) Dilution time	浓度 Concentration ( $\mu\text{g/L}$ )	来源 Urine sample	检测值 Found ( $\mu\text{g/L}$ )	稀释倍数(倍) Dilution time	浓度 Concentration ( $\mu\text{g/L}$ )
女性 Women	3.93	30	117.9	男性 Men	3.66	30	110
女性 Women	4.48	30	134.4	男性 Men	3.71	30	111
女性 Women	4.08	30	122.4	孕尿 Pregnancy (13 weeks)	18.54	60	1112
男性 Men	3.58	30	107.4	孕尿 Pregnancy (18 weeks)	29.09	240	6982

表 2 化学发光检测 E3 的精密度

Table 2 Precision of estriol determination by chemiluminescence immunoassay

样品 Urine sample	批内 Inter-assay		批间 Intra-assay	
	1	2	1	2
平行管数 Times of replicate determination ( $n$ )	10	10	30	30
测得 E3 浓度 Found of estriol concentration ( $\mu\text{g/L}$ )	18.08	30.02	18.52	29.84
相对标准偏差 RSD (%)	14	12	5.9	6.7

## References

- Iwata T, Hirose T, Yamaguchi M. *J. Chromatogr. B*, 1997, 695(2): 201 ~ 207

- 2 Tagawa N , Tsuruta H , Fujinami A , Kobayashi Y. *J. Chromatogr. B* , **1999** , 723( 1-2) : 39 ~ 45
- 3 Kumar V , Nakada N , Yasojima M , Yamashita N , Johnson A C , Tanaka H. *Chemosphere* , **2009** , 77( 10) : 1440 ~ 1446
- 4 Cooke D G , Binnie J E , Blackwell L F. *Steroids* , **2007** , 72( 6-7) : 580 ~ 591
- 5 WU Dan-Ning , LIN Jin-Ming , LI Zhen-Jia , WANG Xu-Shu , YING Xi-Tang( 吴丹凝 林金明 李振甲 王翔淑 应希堂) . *Chinese J. Anal. Chem.* ( 分析化学) , **2007** , 35( 9) : 1241 ~ 1245
- 6 Tanaka T , Suguro N , Kubodera A. *Steroids* , **1985** , 46( 1) : 649 ~ 657
- 7 Soares J R , Zimmermann E , Gross S J. *FEBS Letters* , **1976** , 61( 2) : 263 ~ 266
- 8 Uehara M , Lapck O , Hampl R , Al-Maharik N , Makela T , Wahala K , Mikola H , Adlercreutz H. *J. Steroid Biochem. Molecular Biol.* , **2000** , 72( 5) : 273 ~ 282
- 9 WEI Hui-Bin , LIN Jin-Ming , WU Dan-Ning , ZHAO Li-Xia , LI Zhen-Jia , YING Xi-Tang( 魏慧斌 林金明 吴丹凝 赵利霞 李振甲 应希堂) . *Chinese J. Anal. Chem.* ( 分析化学) , **2007** , 35( 3) : 319 ~ 324
- 10 Tanaka T , Yanagi M , Kubodera A , Touichi T , Masayuki Y , Akiko K. *Steroids* , **1998** , 63( 20) : 516 ~ 522
- 11 WU Dan-Ning , WANG Xu , LIN Jin-Ming , LI Zhen-Jia , YING Xi-Tang( 吴丹凝 王翔 林金明 李振甲 应希堂) . *Acta Chimica Sinica*( 化学学报) , **2007** , 65( 23) : 2755 ~ 2760

## Magnetic Microparticle Chemiluminescence Immunoassay Method for Determination of Estriol in Human Urine

ZHENG Guo-Jin<sup>1,4</sup> , FANG Lu-Qiu<sup>2,4</sup> , CHEN Hui<sup>4</sup> , LI Zhen-Jia<sup>3</sup> , YING Xi-Tang<sup>3</sup> , LIN Jin-Ming<sup>\*4</sup>

<sup>1</sup>( Department of Chemistry , Chuxiong Medical College , Chuxiong 675000)

<sup>2</sup>( Department of Chemical Engineering and Yangtze Normal University , Chongqing 408100)

<sup>3</sup>( Beijing Chemclin Biotech Co. , Ltd , Beijing 100012)

<sup>4</sup>( Department of Chemistry , Tsinghua University , Beijing 100084)

**Abstract** A magnetic microparticle chemiluminescence immunoassay method was developed for the determination of estriol in human urine. The sample of estriol and horseradish peroxidase ( HRP) labeled estriol with fluorescein isothiocyanate ( FITC) labeled rabbit anti-estriol antibodies were mixed in homogeneous system. The reaction product in homogeneous system can be combined onto the goat anti-FITC antibody-coated magnetic particles. After the magnetic field separation of bound and free , the light-emitting substrate was added to magnetic particles. Under the optimization conditions , this method can be used to detect estriol in a linear range of 1 - 100  $\mu\text{g/L}$  , detection limit of 0.25  $\mu\text{g/L}$  , relative standard deviation less than 14% and between relative standard deviation less than 7% . The method has been applied for the determination of estriol in real samples , and the results are satisfactory.

**Keywords** Estriol; Chemiluminescence immunoassay; Magnetic particles; Urine

( Received 5 April 2010; accepted 8 July 2010)