

# 催乳素酶促化学发光免疫分析试剂盒的研制

贾娟娟, 刘一兵, 许文革, 张雪峰

(中国原子能科学研究院 同位素研究所, 北京 102413)

**摘要:** 采用两株催乳素(PRL)单克隆抗体, 一株包被化学发光板, 一株标记辣根过氧化物酶, 研制了测定人血清 PRL 浓度的酶促化学发光免疫分析试剂盒。本试剂盒测定范围 50~4 000 mIU/L, 灵敏度 4.26 mIU/L, 批内、批间变异系数分别小于 10%、15%, 回收率 90.3%~100.8%; 血清样品倍比稀释后的测定值和稀释度的相关系数为 1; 本试剂盒正常参考值范围: 女性 43.2~513.1 mIU/L ( $n=52$ ), 男性 54.8~334.3 mIU/L ( $n=68$ )。

**关键词:** 催乳素; 单克隆抗体; 化学发光免疫分析

**中图分类号:** R446.61   **文献标志码:** A   **文章编号:** 1000-7512(2010)02-0107-04

## Development of Chemiluminescence Immunoassay Kit for Prolactin

JIA Juan-juan, LIU Yi-bing, XU Wen-ge, ZHANG Xue-feng

(Department of Isotope, China Institute of Atomic Energy, Beijing 102413, China)

**Abstract:** The chemiluminescence immunoassay kit (CLIA) for Prolactin(PRL) in human serum was developed. Two monoclonal antibodies against PRL were applied. One of the antibodies was coated on the microtiter plate, the other was labeled with HRP. The sensitivity of the assay was 4.26 mIU/L and the recovery was 90.3%-100.8%. The intra- and inter-assay CV were less than 10% and 15% respectively. The results of dilution test demonstrated good correlation between dilution times and values ( $r=1$ ). The value for normal women samples ( $n=52$ ) was 43.2-513.1 mIU/L, normal men samples ( $n=68$ ) was 54.8-334.3 mIU/L.

**Key words:** prolactin(PRL); monoclonal antibody; chemiluminescence immunoassay

催乳素(Prolactin, PRL)是由脑垂体前叶合成和分泌的一种蛋白类激素, 由 198 个氨基酸组成, 相对分子质量约 22 000。其主要作用是刺激乳腺发育和促进泌乳, 对调节卵巢功能、维持妊娠等有重要作用。临床上测定 PRL 对研究生殖生理的调节及妊娠维持具有重要意义, 可为不孕患者的鉴别诊断、早孕先兆流产患者的保胎治疗和终止妊娠方面提供依据<sup>[1-7]</sup>。目前临床上测定 PRL 常用方法有放射免疫分析、免疫放射分

析、酶联免疫分析、化学发光免疫分析等。化学发光免疫分析方法是近十几年来发展起来的一种非放射性免疫分析技术, 具有仪器设备简单、操作方便、灵敏度高、线性范围宽、易于实现自动化等优点, 是理想的标记免疫分析测定方法。为顺应免疫分析发展趋势, 并实现 PRL 酶促化学发光免疫分析试剂盒的完全国产化, 本工作拟采用两株自制的抗 PRL 单克隆抗体, 研制 PRL 测定的双抗体夹心酶促化学发光免疫分析试剂盒。

## 1 实验材料

### 1.1 主要仪器

1420 型化学发光检测仪;芬兰 Wallac 公司产品;电热培养箱;上海浦东荣丰科学仪器有限公司产品;微孔可调加样器;瑞士 SCOREX 公司产品。

### 1.2 主要试剂

辣根过氧化物酶(HRP);Sigma 公司产品;PRL 抗原;CORTEX 公司产品;胎牛血清;北京元亨圣马生物制品公司产品;牛血清白蛋白;上海赛达生物有限公司产品;化学发光板;深圳市金灿华实业有限公司产品;PRL 抗体、发光底物、封闭液、PRL 免疫放射分析试剂盒;原子高科股份有限公司产品。实验所用化学试剂均为分析纯。

## 2 实验方法

### 2.1 酶标抗体的制备

采用高碘酸钠法<sup>[5]</sup>制备配标抗体。将 1 mg HRP 溶于 100  $\mu\text{L}$  双蒸水中,再加入 100  $\mu\text{L}$  0.06 mol/L 高碘酸钠水溶液,混匀,4  $^{\circ}\text{C}$  静置 30 min;加入 100  $\mu\text{L}$  0.16 mol/L 乙二醇水溶液,混匀,室温静置 30 min;将 1 mg 抗 PRL 单抗溶液加入上述溶液中,混匀,于 4  $^{\circ}\text{C}$  下用 0.05 mol/L pH9.5 碳酸盐缓冲液(CB)透析 6 h;加入 40  $\mu\text{L}$  硼氢化钠溶液(5 g/L),混匀,4  $^{\circ}\text{C}$  静置 2 h 后装入透析袋内,对 0.02 mol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲液(PB)4  $^{\circ}\text{C}$  透析过夜后,取出酶标记物,加入等体积甘油,-20  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 2.2 固相抗体的制备

用 0.1 mol/L pH9.5 的碳酸缓冲液(CB)将包被用 PRL 单抗稀释至 10 mg/L,以每孔 200  $\mu\text{L}$  加入化学发光板中,4  $^{\circ}\text{C}$  过夜。次日倾去包被液,再按每孔 250  $\mu\text{L}$  加入封闭液,37  $^{\circ}\text{C}$  封闭 1 h,此后倾去封闭液,自然晾干。

### 2.3 PRL 标准品的配制

将胎牛血清在 56  $^{\circ}\text{C}$  下灭活 30 min,将不同量的人 PRL 加入到灭活后的胎牛血清中,配制 PRL 浓度分别为 50、125、300、800、2 000、4 000 mIU/L 的标准品,用 S50、S125、S300、S800、S2000 和 S4000 表示用 PRL 免疫放射分析试剂盒校正该标准品浓度。校正后的标准品以 0.5 mL 分装,冻干,于 2~8  $^{\circ}\text{C}$  下保存。

### 2.4 PRL 酶促化学发光免疫分析程序

在包被有抗体的化学发光板中,每孔中加 50  $\mu\text{L}$  标准品或样品、150  $\mu\text{L}$  酶标抗体,混匀,37  $^{\circ}\text{C}$  下反应 1 h,洗涤拍干。此后加入 200  $\mu\text{L}$  化学发光底物,静置 1 min,检测各孔发光计数。以 PRL 浓度(mIU/L)为横坐标,相应的发光计数为纵坐标,采用双对数作图法绘制标准曲线,并根据样品的发光计数计算待测样品的 PRL 浓度。

## 3 结果和分析

### 3.1 试剂盒工作条件的选择

**3.1.1 酶标抗体工作浓度的选择** PRL 单抗包被浓度为 10 mg/L 时,观察不同酶标抗体稀释对标准曲线的影响,结果列于表 1。由表 1 可知,随着酶标抗体稀释度的增大,非特异结合、信噪比及相关系数均在减小,考虑到分析灵敏度及酶标抗体的用量,选择酶标抗体的稀释度为 1:5 000。此稀释度下,非特异结合为 1 660,信噪比为 15.5,相关系数为 0.996。

表 1 酶标抗体稀释度的选择

酶标抗体稀释度	非特异结合	信噪比	相关系数
1:2 000	2 025	27.8	0.997
1:5 000	1 660	15.5	0.996
1:10 000	1 445	7.5	0.993
1:20 000	1 155	2.8	0.992

**3.1.2 包被浓度的选择** 用包被缓冲液将包被用抗体稀释至 1、2、5、10、15 mg/L,酶标抗体稀释度为 1:5 000,观察不同包被浓度对标准曲线的影响,结果示于图 1。由图 1 可知,各标准点发光计数随包被浓度升高而增大,达 10 mg/L 后,发光计数基本不再变化。说明抗体包被浓度 10 mg/L 基本已达饱和,故选择抗体包被浓度为 10 mg/L。

**3.1.3 反应时间选择** 在包被有固相抗体的发光板微孔中加入 PRL 标准品、酶标抗 PRL 抗体,混匀,分别在 37  $^{\circ}\text{C}$  反应 0.5、1、2、3 h,测定发光计数,计算信噪比及线性相关系数,结果列于表 2。由表 2 可知,随着反应时间的延长,信噪比在增加,37  $^{\circ}\text{C}$  反应 2 h 后基本达到平衡;但反应 1 h 信噪比已达 11.2,可满足临床 PRL 测定分析灵敏度的需求。为满足临床快速检测的需要,选择反应时间为 1 h。

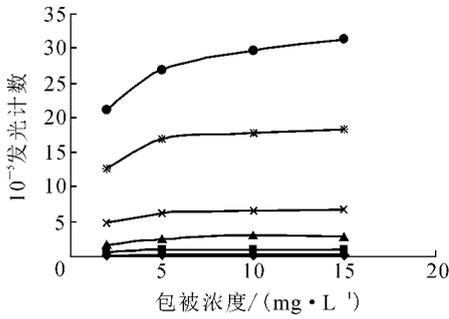


图 1 PRL 酶促化学发光包被浓度选择

◆—S50; ■—S125; ▲—S300;  
×—S800; ※—S2000; ●—S4000

表 2 PRL 酶促化学发光反应时间选择

反应时间/h	非特异	信噪比	相关系数
0.5	1490	2.4	0.992
1.0	1 440	11.2	0.993
2.0	1 400	20.9	0.994
3.0	1 390	21.8	0.995

### 3.2 方法学鉴定

**3.2.1 标准曲线及分析灵敏度** PRL 酶促化学发光标准曲线示于图 2。同时测定 20 个“零”标准的发光计数值,以其平均值加 2s 在标准曲线上对应的值为 4.26 mIU/L,即本方法的分析灵敏度。本试剂盒的测定范围为 50~4 000 mIU/L。

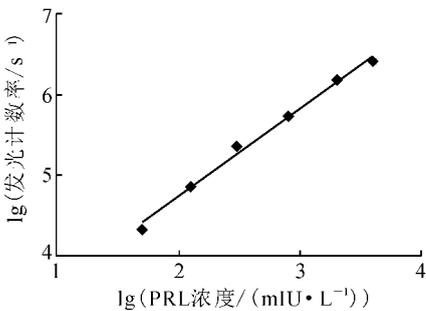


图 2 PRL 酶促化学发光免疫分析标准曲线

**3.2.2 精密度** 选择高、中、低 3 个浓度样品进行多次测定,其批内、批间变异系数列于表 3。由表 3 可知本方法的批内变异系数为 3.5%~5.3%,批间变异系数为 9.8%~11.2%,符合免疫分析的基本要求。

**3.2.3 健全性** 将 1 份高浓度人 PRL 血清样品进行系列倍比稀释,采用本试剂盒进行测定,结果示于图 3。对图 3 进行线性回归分析,相关

方程为  $y=2\ 071.7x-24.3, r=1$ 。说明本方法健全性良好。

**3.2.4 回收率** 向两份人血清样品中加入不同浓度已知量的人 PRL,测定其回收率,结果列于表 4。由表 4 可知,本方法回收率为 90.3%~100.8%。

表 3 批内、批间变异系数

样品浓度	批内(n=10)		批间(n=10)	
	$\bar{x}+s/(mIU \cdot L^{-1})$	CV/%	$\bar{x}+s/(mIU \cdot L^{-1})$	CV/%
低	93.6+5.0	5.3	98.8+11.1	11.2
中	319.6+12.2	3.8	322.0+27.7	8.6
高	1 080.9+37.5	3.5	1 027.0+100.9	9.8

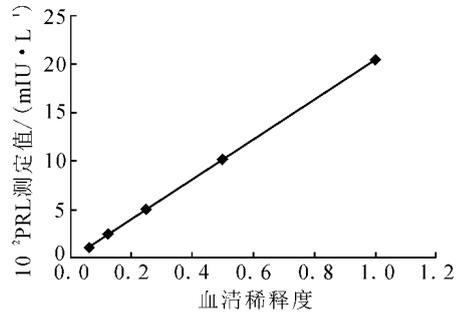


图 3 PRL 酶促化学发光健全性实验结果

表 4 PRL 酶促化学发光回收率实验结果

样品	PRL 浓度/(mIU · L⁻¹)			回收率/%
	加入量	测定值	计算值	
1 号	0	68.3		
	150	201.4	218.3	92.3
	400	430.6	468.3	91.9
2 号	1 000	1 067.3	1 068.3	99.9
	400	664.5	659.4	100.8
	1 000	1 229.0	1 259.4	97.6
	2 000	2 039.5	2 259.4	90.3

### 3.3 正常参考值

正常人血清 PRL 测定均值加减两个标准差( $\bar{x} \pm 2s$ )作为血清 PRL 正常值的上下限,本方法正常女性血清参考值范围为 43.2~513.1 mIU/L( $n=52$ ),正常男性血清参考值范围为 54.8~334.3 mIU/L( $n=68$ )。

### 3.4 方法学比较

用本方法与原子高科股份有限公司生产的 PRL 免疫放射分析试剂盒(IRMA)同时测定人血清样品 67 例,结果示于图 4。由图 4 可知,本方法

测定 PRL 浓度为 54.3~3 805.5 mIU/L, IRMA 测定 PRL 浓度为 53.9~3 666.1 mIU/L。相关方程为  $y=0.96x-40.9, r=0.989$ 。此结果说明, 本法与 IRMA 法具有较好的相关性, 可以用于人血 PRL 浓度的测定。

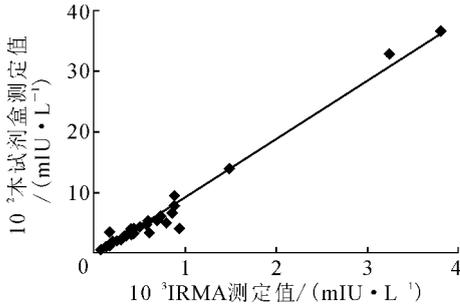


图 4 本方法与 IRMA 相关性实验结果

### 3.5 试剂盒的稳定性

将试制的 PRL 试剂盒在 2~8 °C 下放置一段时间后使用, 观察质控值和标准曲线, 结果列于表 5。从表 5 中数据可见, 试剂盒于 4 °C 存放 6 个月后, 相关系数大于 0.990, 质控值均在许可范围内(质控 1 范围 180.9~271.4 mIU/L, 质控 2 范围 389.0~583.6 mIU/L, 质控 3 范围 961.7~1 442.5 mIU/L)。表明 PRL 试剂盒在 2~8 °C 下至少可保存 6 个月。

将 PRL 试剂盒在 37 °C 下存放一周后使用, 以存放在 2~8 °C 的数据为对照, 观察试剂盒的标准曲线和质控值, 结果列于表 6。从表 6 中数据可见, 试剂盒于 37 °C 存放 1 周后使用, 相关系数大于 0.990, 质控值均在许可范围内。表明 PRL 试剂盒可采用快速专递常温运输。

表 5 试剂盒存放于 2~8 °C 6 个月后测定结果

药盒批号	实验日期	存放时间	非特异结合	信噪比	相关系数	PRL 浓度测定值/(mIU·L <sup>-1</sup> )		
						质控 1	质控 2	质控 3
200906	2009-06-03	0	2 225	36.6	0.999	221.0	467.8	1 176.7
200906	2009-09-02	3 个月	1 280	25.7	0.998	230.7	523.3	1 267.7
200906	2009-12-02	6 个月	1 430	14.6	0.995	237.4	499.0	1 184.9

表 6 37 °C 存放一周后 PRL 试剂盒标准曲线指标和质控值变化

组 别	非特异结合	信噪比	相关系数	PRL 浓度测定值/(mIU·L <sup>-1</sup> )		
				质控 1	质控 2	质控 3
对照组	3 055	37.9	0.999	189.9	410.6	1 030.9
实验组	2 405	34.3	0.998	241.5	512.2	1 216.8

## 4 小 结

本工作采用两株自制的抗 PRL 单克隆抗体研制了双位点夹心 PRL 酶促化学发光免疫分析试剂盒。本试剂盒方法学鉴定符合免疫分析试剂盒的质量控制要求, 与同类商品试剂盒样品测定值间有较好的相关性, 可用于人 PRL 的测定。

致谢: 本工作得到了中国原子能科学研究院同位素研究所王金兰、田君香、张莉玲、沈振芳等同志的帮助, 在此表示衷心感谢。

### 参考文献:

[1] 孙呈勇, 田进. 垂体催乳素的基础研究[J]. 中国性科学, 2006, 15(2): 33-36.  
[2] 张耀, 郭定宗. 催乳素结构与功能研究进展[J]. 动

物医学进展, 2007, 28(5): 49-52.

[3] 李昆明, 归绥琪. 催乳素对生殖生理的调控作用[J]. 生殖与避孕, 2001, 21(1): 9-14.  
[4] 周桂香, 刘雨生, 骆丽华, 等. 血清 PRL 及 CA125 测定对不孕症患者子宫内膜异位症的早期诊断价值[J]. 临床输血与检验, 2005, 7(1): 13-15.  
[5] 唐振华, 吴锦芝. 正常男性血清促性腺激素和性激素水平的观察[J]. 同位素, 1996, 9: 73-75.  
[6] 喻长法, 张仙森, 李香娟, 等. 高泌乳素血症与不孕的相关性研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 2009, 17(4): 120-121.  
[7] 卫薇. 原发性育龄不育不孕妇女实验室诊断及实验结果分析[J]. 吉林医学, 2009, 11: 67-68.  
[8] 郭春祥, 郭锡琼. 介绍一种简单、快速的辣根过氧化物酶标记抗体的过碘酸钠法[J]. 免疫学杂志, 1983, 33: 97-100.