

## 促黄体生成激素酶促化学发光免疫分析方法的建立

刘佳宁, 刘一兵, 贾娟娟, 许文革, 张雪峰, 韩世泉

(中国原子能科学研究院 同位素研究所, 北京 102413)

**摘要:** 采用双抗体夹心一步检测法和鲁米诺-过氧化氢发光体系建立了血清促黄体生成激素(LH)的酶促化学发光免疫分析方法。结果显示, 本方法测量范围为 1.5~200 IU/L, 灵敏度为 0.08 IU/L, 批内变异系数 < 9%, 批间变异系数 < 11%, 回收率为 96.3%~112.1%, 稀释实验测定值与稀释度呈线性相关, 相关系数  $r=0.995$ 。与进口酶促化学发光免疫分析试剂盒测定的临床值进行比较, 线性相关方程为  $y=0.967x+0.0689$ , 相关系数  $r=0.975$ , 相关性良好。方法学鉴定结果符合免疫分析的基本要求。

**关键词:** 促黄体生成激素; 酶促化学发光免疫分析; 分析方法

中图分类号: R446.61 文献标志码: A 文章编号: 1000-7512(2010)01-0028-06

## Chemiluminescence Immunoassay for Luteinizing Hormone

LIU Jia-ning, LIU Yi-bing, JIA Juan-juan,

XU Wen-ge, ZHANG Xue-feng, HAN Shi-quan

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

**Abstract:** The chemiluminescence immunoassay (CLIA) for serum luteinizing hormone was established by using the reaction of luminol with hydrogen peroxide. The measurement range of this method was 1.5 to 200 IU/L, the sensitivity was 0.08 IU/L, the recovery rate was 96.3% to 112.1%, the coefficient correlation of dilution was 0.995, and the intra- and inter-assay coefficient of variability were 4.09%-8.36% and 5.14%-10.23%, respectively. Compared with Beckman CLIA system, the coefficient correlation was 0.975.

**Key words:** luteinizing hormone; chemiluminescence immunoassay; analysis

促黄体生成激素 (Luteinizing Hormone, LH) 是由脑垂体前叶嗜碱性细胞分泌的一种糖蛋白类促性腺激素, 含 219 个氨基酸, 相对分子质量约 30 000, 由非特异的  $\alpha$  亚基和特异的  $\beta$  亚基组成, LH 与特异性受体的相互作用及信号转导由  $\beta$  亚基决定<sup>[1]</sup>。促黄体生成激素受体主要存在于卵泡颗粒细胞、黄体细胞和睾丸间质细胞膜上, LH 与细胞膜上相应受体结合后通过腺苷

酸环化酶系统刺激甾体激素生成, 在受精卵着床、性腺发育及功能调节中起重要作用<sup>[2]</sup>。垂体 LH 的分泌受下丘脑分泌的促性腺激素释放激素的严格控制, 随女性月经周期而呈周期性变化, 通过刺激卵巢合成类固醇而促进排卵和黄体生成, 并促进黄体分泌雌激素和孕激素; 对男性则促进睾丸间质细胞增生, 分泌雄激素<sup>[3]</sup>。检测 LH 含量对预测排卵期、更年期综合征、多囊卵

巢综合征、原发性不孕症、月经失调、子宫内膜异位症、性腺功能低下等生殖系统的生理研究、疾病诊疗、随访等具有重要意义<sup>[4]</sup>。目前 LH 的检测主要有放射免疫分析、免疫放射分析、酶联免疫分析、时间分辨荧光免疫分析、胶体金试纸条、化学发光免疫分析等多种标记免疫分析方法。其中,化学发光免疫分析具有无放射性污染、检测范围宽、灵敏度高、发光迅速、操作简便等优点,近年来发展迅猛,是目前推广应用最快的免疫分析方法之一。

本工作拟根据酶促化学发光免疫分析方法原理,建立血清 LH 的酶促化学发光免疫分析方法。

## 1 实验材料

### 1.1 主要仪器

化学发光检测仪及其软件:Wallac 公司产品;GAMMA-C12  $\gamma$  计数器;DPC 公司;1260 II 型  $\gamma$  计数器;LKB 公司产品。

### 1.2 主要试剂

标记单克隆抗体(LH5301)和包被单克隆抗体(LH5304);Medix 公司产品;LH 标准品抗原;ICN Biomedical 公司产品;辣根过氧化物酶(HRP)、Tween-20;Sigma 公司产品;化学发光板;购自深圳金灿华实业有限公司;胎牛血清:北京元亨圣马生物技术研究所产品;发光底物:原子高科股份有限公司医学二部提供。

## 2 实验方法

### 2.1 标准品的配制

将 LH 标准品用中国药品生物制品检定所标准品标定后,用灭活胎牛血清稀释为 1.5、5、15、45、100、200 IU/L,每瓶 0.5 mL 分装冻干后-20 °C 保存备用,使用前每瓶加 0.5 mL 蒸馏水复溶。

### 2.2 固相抗体的制备

用 0.1 mol/L pH9.5 的碳酸缓冲液(CB)将抗 LH 单抗(LH5304)稀释为 5 mg/L,以每孔 200  $\mu$ L 加入化学发光板中,4 °C 过夜;弃去包被液,拍干,每孔加 250  $\mu$ L 封闭液(含 0.4%明胶,2%丙三醇,5%蔗糖,pH 7.4),37 °C 封闭 1 h;倒出封闭液,晾干备用。

### 2.3 酶标抗体的制备

采用改良高碘酸钠氧化法<sup>[5]</sup>制备 LH 的酶

标记物,辣根过氧化物酶与 LH5301 均为 1 mg。酶标记物于 0.02 mol/L pH 7.4 的磷酸缓冲液(PB)中透析过夜后加入等体积甘油,-20 °C 保存备用。

### 2.4 酶促化学发光免疫分析程序

向包被好的化学发光板中同时加入 50  $\mu$ L 标准品或待测样本和 150  $\mu$ L 酶标抗体,37 °C 温育 1 h,弃去反应液,用磷酸缓冲液(含 0.05% Tween-20 的 0.02 mol/L pH 7.4)清洗酶标板,每孔 300  $\mu$ L,清洗 4 次。然后加入新鲜配制的发光底物工作液,每孔 200  $\mu$ L,室温静置 1 min。在化学发光仪上检测发光计数率,以发光计数率为纵坐标,标准品浓度为横坐标,采用双对数作图法绘制标准曲线并拟合线性回归方程,根据样品的发光计数率,计算出血清样品中 LH 的浓度。

## 3 结果与讨论

### 3.1 方法学建立

**3.1.1 包被浓度选择** 以 0.1 mol/L pH 9.5 的 CB 将包被用的单克隆抗体 LH5304 分别稀释为 1、2、5 和 10 mg/L,酶标记抗体稀释为 1:15 000,标准品为 50  $\mu$ L,酶标抗体为 150  $\mu$ L,37 °C 反应 1 h,观察不同包被浓度对免疫分析结果的影响,结果示于图 1。由图 1 可见,不同包被浓度下各标准点发光计数率基本相同,考虑到包被板的稳定性,选择 5 mg/L 作为本分析方法的包被浓度。

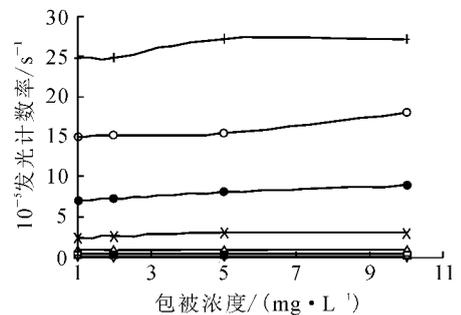


图 1 LH 包被浓度选择

◇—0; □—1.5 IU/L; △—5 IU/L; ×—15 IU/L;  
●—45 IU/L; ○—100 IU/L; +—200 IU/L

**3.1.2 酶标抗体稀释度选择** 确定包被浓度后,将辣根过氧化物酶标记的 LH5301 抗体分别稀释 5 000、10 000、15 000、20 000 倍,观察不同

酶标记抗体浓度对免疫分析结果的影响,以发光计数率和标准品浓度的双对数作标准曲线,计算线性拟合相关系数和信噪比,结果列于表 1。根据其曲线信噪比和线性相关系数选定酶标记抗体工作浓度为 1 : 10 000。

表 1 LH 酶标抗体稀释度选择

稀释度	信噪比	相关系数
1 : 5 000	5.25	0.999
1 : 10 000	9.97	0.997
1 : 15 000	6.69	0.992
1 : 20 000	6.90	0.992

**3.1.3 反应体积选择** 确定了最佳包被浓度和酶标抗体稀释度后,设定不同的标准品和酶标抗体体积,37 ℃下反应 1 h,检测发光计数率,以发光计数率和标准品浓度的双对数作标准曲线,计算线性拟合相关系数和信噪比,结果列于表 2。根据其曲线信噪比和线性相关系数选择反应体积为标准品 50 μL,酶标抗体 150 μL。

表 2 LH 反应体积选择

标准品+酶标抗体/μL	信噪比	相关系数
25+175	2.51	0.998
50+150	6.04	0.995
100+100	17.36	0.993

**3.1.4 反应时间选择** 确定了包被浓度、酶标抗体稀释度和反应体积后,设定反应时间为 20 min,1、2、3、4、5 h,观察发光计数率,结果示于图 2。由图 2 可见,随反应时间延长,发光计数率逐渐增加,反应 2 h 时基本达到平衡,为实现临床快速检测,选择反应时间为 1 h。

## 3.2 方法学鉴定

**3.2.1 标准曲线及方法灵敏度** 根据上述实验确定的参数,建立 LH 酶促化学发光免疫分析标

准曲线,结果示于图 3。由图 3 可得曲线线性拟合方程: $y=1.059 5x+4.235 2$ ,相关系数  $r=0.999$ 。同时平行测量 10 个零标准品的发光计数率,计算  $\bar{x}+2s$ ,将此值带入曲线方程,求出对应的浓度为 0.08 IU/L,此为方法学的灵敏度。

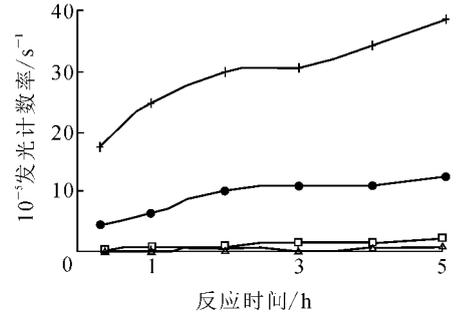


图 2 LH 反应时间选择

◇—0; □—1.5 IU/L; △—5 IU/L;  
●—45 IU/L; +—200 IU/L

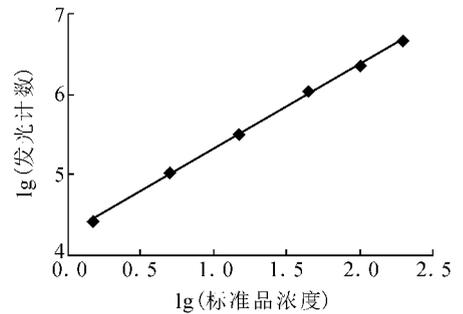


图 3 LH 酶促化学发光免疫分析方法标准曲线

**3.2.2 精密度** 对 LH 含量为高、中、低的质控血清分别在一次实验中平行多孔测定和在不同实验中重复测定,计算批内、批间变异系数,结果列于表 3。由表 3 可知,本方法的批内变异系数分别为 8.36%、3.56%和 4.09%,批间变异系数分别为 5.14%、9.57%和 10.23%。此结果符合方法学的要求。

表 3 批内、批间变异系数测定结果

样品	批内(n=10)			批间(n=10)		
	$\bar{x}/(\text{IU} \cdot \text{L}^{-1})$	$s/(\text{IU} \cdot \text{L}^{-1})$	CV/%	$\bar{x}/(\text{IU} \cdot \text{L}^{-1})$	$s/(\text{IU} \cdot \text{L}^{-1})$	CV/%
1	83.27	6.96	8.36	86.62	4.45	5.14
2	19.04	0.68	3.57	21.32	2.04	9.57
3	4.69	0.19	4.05	5.67	0.58	10.23

**3.2.3 健全性** 将 1 份高浓度 LH 血清样品进行倍比稀释后测定,相关曲线示于图 4。由图 4 可得相关方程为:  $y=43.18x-2.601$ , 相关系数  $r=0.995$ 。稀释度与检测值呈线性相关,该结果符合免疫分析的要求。

**3.2.4 回收率** 向 3 份血清样品中加入已知浓度的 LH 标准品,测定其回收率,结果列于表 4。由表 4 可知,本方法的回收率为 96.3%~112.1%,平均 104.3%,符合免疫分析的要求。

**3.2.5 特异性** 分别用“零”标准品将高浓度 FSH、TSH、HCG 抗原稀释为正常值的 10 倍以上,按照分析程序进行测定,检测其中 LH 的含量,换算为质量单位,计算交叉反应率,结果列于表 5。由表 5 可知,本分析方法与 FSH、TSH 无明显交叉,与 HCG 存在交叉反应。

LH 与 HCG 属于同一个超家族,具有相似的立体结构,二者结合于一个共同受体 LH/HCG-R<sup>[7]</sup>。编码 LH $\beta$  亚基的基因定位于 19q13.3,与 hCG $\beta$  链基因相邻,hCG $\beta$  亚基有 85% 的序列与 LH $\beta$  亚基的前 114 个氨基酸同源<sup>[8]</sup>,因此 LH 与 HCG 更容易出现交叉反应。

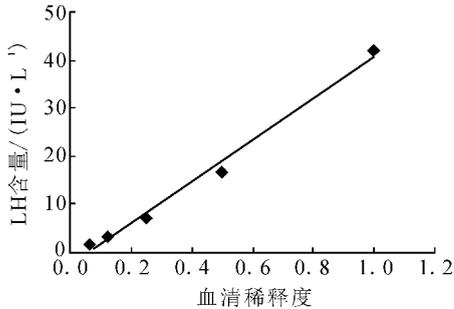


图 4 LH 酶促化学发光分析方法健全性实验

表 4 回收率实验测定结果

样品	LH 加入量/ (IU · L <sup>-1</sup> )	LH 检出量/ (IU · L <sup>-1</sup> )	回收率/%
1 号	4.07	3.92	96.3
	9.07	10.17	112.1
	24.07	25.72	106.9
2 号	16.39	17.73	108.2
	21.39	23.10	108.0
	36.39	36.03	99.0
3 号	27.51	29.52	107.3
	32.51	33.86	104.2
	47.51	46.07	97.0

表 5 交叉反应实验结果

试剂	加入量/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	测量 LH 的相当 含量/( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	交叉反应率/%
FSH	50	0.027	0.05
TSH	63	0.75	1.19
HCG	400	54.62	13.65

**3.2.6 弯钩效应** 配制一系列高浓度 LH 样品,按照分析程序进行测定,结果示于图 5。由图 5 可知,当血清样品 LH 浓度达 7 000 IU/L 时,仍未出现弯钩效应,但在 900 IU/L 处出现拐点。

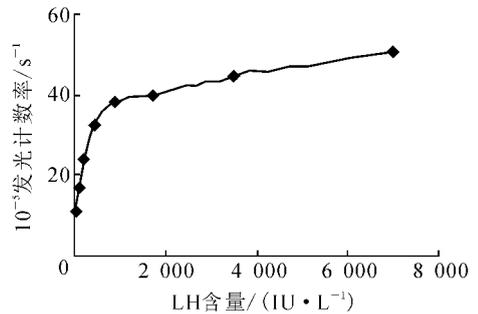


图 5 弯钩效应实验

**3.3 方法学比较**

用本方法与 Beckman 公司的全自动化学发光系统共同检测 56 份血清样本的 LH 含量,结果示于图 6。由图 6 可知,两种方法检测数据显著相关,相关方程为  $y=0.967x+0.0689$ , 相关系数  $r=0.975$ 。

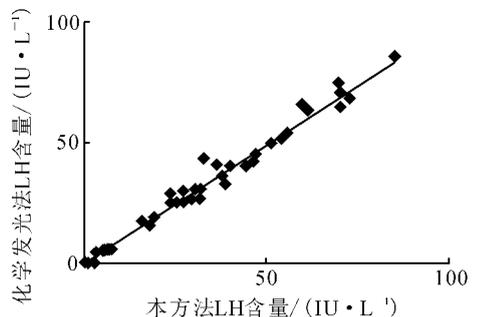


图 6 与 Beckman 公司方法测定结果的相关性

**3.4 主要组分的稳定性**

**3.4.1 包被板稳定性** 包被一批 5 mg/L 的 LH5304 化学发光板,封闭后分为 6 份,抽真空,分别于 37 °C 温箱放置 0~15 d,检测发光计数

率,考察其稳定性,结果示于图7。由图7可以看出,包被板在37℃下放置15d,基本稳定。

**3.4.2 酶标记抗体稳定性** 将酶标记的LH5301抗体稀释为1:10 000,分装为6份,置37℃温箱0~15d,考察其稳定性,结果示于图8。由图8可以看出,酶标记抗体37℃下放置10d基本稳定,10d后发光计数率有所下降,但不同时间标准曲线线性及信噪比均符合免疫分析基本要求,37℃下放置15d后,线性拟合相关系数为0.997,信噪比为8.78。

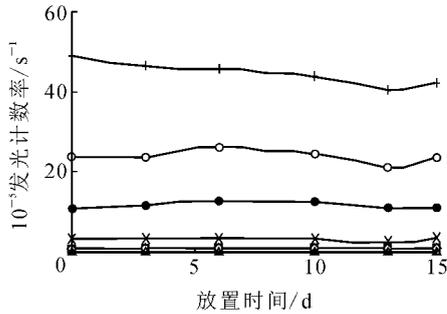


图7 LH包被板稳定性实验

◇—0; □—1.5 IU/L; △—5 IU/L; ×—15 IU/L;  
●—45 IU/L; ○—100 IU/L; +—200 IU/L

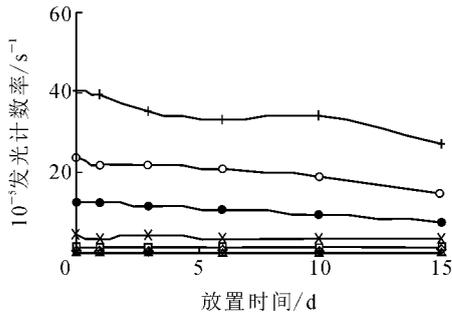


图8 LH酶标记抗体稳定性实验

◇—0; □—1.5 IU/L; △—5 IU/L; ×—15 IU/L;  
●—45 IU/L; ○—100 IU/L; +—200 IU/L

**3.4.3 标准品稳定性** 将标准品冻干粉在37℃下放置0~15d,分别加0.5mL蒸馏水溶解,做标准曲线,根据线性拟合方程计算各标准点值,结果示于图9。由图9可知,高浓度标准品3d后浓度有所下降,其余各标准品37℃下放置15d基本稳定。

**3.4.4 试剂盒整体稳定性** 将冻干标准品、1:10 000酶标记抗体、5mg/L包被板、发光液A、B分别于37℃下放置0~15d,观察试剂盒整体

稳定性,结果示于图10。由图10可知,37℃下放置15d时发光计数率有所下降,曲线线性拟合相关系数为0.993,信噪比为9.62。符合免疫分析方法的要求。

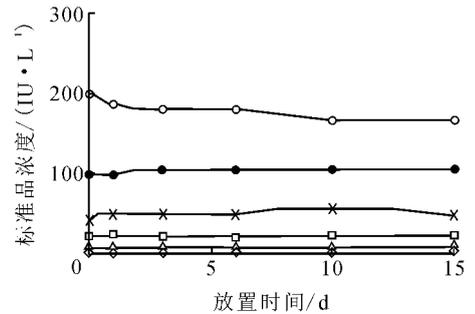


图9 LH标准品稳定性实验

◇—0; □—1.5 IU/L; △—5 IU/L; ×—15 IU/L;  
●—45 IU/L; ○—100 IU/L; +—200 IU/L

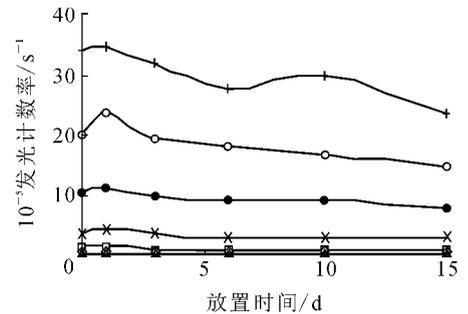


图10 LH酶促化学发光试剂盒整体稳定性实验

◇—0; □—1.5 IU/L; △—5 IU/L; ×—15 IU/L;  
●—45 IU/L; ○—100 IU/L; +—200 IU/L

## 4 小结

本实验建立的LH酶促化学发光免疫分析方法,灵敏度高、精密度好、检测范围宽,虽然与高浓度HCG存在一定交叉反应,但对检测结果无明显影响,检测值与国外同类试剂盒比较呈正相关,各组分比较稳定,符合免疫分析基本要求。在今后的研究中,可以通过多次细胞融合,制备出与HCG交叉反应率小的抗LH单克隆抗体,进一步完善本免疫分析方法。

## 参考文献:

- [1] Pierce JG, Faith MR, Giudice LC. Structure and structure-function relationships in glycoprotein hormones [J]. Ciba Found Symp, 1976, 41: 225-250.

[2] Puett D, Li Y, Angelova K, et al. Structure-function relationship of the luteinizing hormone receptor[J]. Ann N Y Acad Sci, 2005, 1 061: 41-54.

[3] Palermo R. Differential actions of FSH and LH during folliculogenesis[J]. Reprod Biomed Online, 2007, 15(3): 326-337.

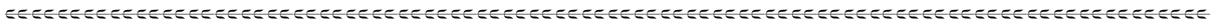
[4] 杨献福,和钰.促黄体生成素及其检测与免疫[J].中国畜牧兽医,2007,34(12):147-149.

[5] 郭春祥,郭锡琼.介绍一种简单、快速的辣根过氧化物酶标记物酶标记抗体的过碘酸钠法[J].免疫学杂志,1983,33:97-100.

[6] 尹东光,贺佑丰,刘一兵,等.标记免疫分析技术的发展点评[J].标记免疫分析与临床,2003,10(1):40-41.

[7] 梁淑芳,陈曼玲.LH/CG受体基因克隆与表达的研究进展[J].生物技术通讯,2002,13(1):92-97.

[8] Gadkari RA, Rov S, Rekha N, et al. Identification of a heterodimer-specific epitope present in human chorionic gonadotrophin (hCG) using a monoclonal antibody that can distinguish between hCG and human LH[J]. J Mol Endocrinol, 2005, 34(3): 879-887.



### 《同位素》来稿要求和注意事项

(1)登录本刊网站 <http://www.tws.org.cn> 在线投稿,并在网站首页下载《保密审查证明》和《版权转让协议》两个文件,签字盖章后通过邮局邮递给《同位素》编辑部(通信地址:北京 275 信箱 65 分箱《同位素》编辑部,邮编:102413)。按有关规定,编辑部没有收到这 2 份文件,所收稿件不能进入送外审程序。

(2)本刊收稿后系统会自动给作者发送《收稿回执》,因此作者在线投稿时要保证邮箱的准确。根据《著作权法》并结合本刊实际情况,作者在收到收稿回执后 4 个月内未接到稿件处理通知者(另有约定者除外),即可改投其他刊物。退修稿件一般超过 4 个月不修回者,本刊即作退稿处理。

(3)来稿要求论点明确,文字简练,数据可靠,研究报告不超过 6 000 字,综述约 8 000 字(包括图表)。

(4)来稿均须有中英文摘要及关键词,英文摘要前须有英文题目、作者姓名(中国作者用汉语拼音)、作者单位(正式对外名称)及邮编。获得基金资助产出的文章,须在第一页以页下注的形式注明基金项目的名称和编号。第一作者的作者简介也应注于第一页页下,格式:作者姓名(出生年—),性别(民族),籍贯,职称(或学位),从事专业。联系人非第一作者时,请注明联系人,并请写明联系方式。

(5)文后参考文献请选择主要的著录,文献序号以其在文中引用的先后排列。具体格式请从本刊网站下载。

(6)来稿须文责自负,但依照《著作权法》,本刊可以对来稿作文字修改或删节,凡有涉及原意的较大修改,则提请作者考虑。对不宜刊出的稿件,本刊会发退稿通知;恕不退还原稿,请自留底稿。来稿一经发表,将按有关规定向作者支付报酬,并赠送当期杂志 3 册。

(7)本刊刊用的所有稿件将由编辑部与有关网络出版商协商进行网络出版。本刊所付稿酬为一次性稿酬,包含网络出版服务报酬,不再另付。凡不同意纳入者,请在投稿时声明,本刊将另行处理。