

·技术研究·

# 人生长激素的时间分辨荧光免疫分析及其诊断试剂研制

杭建峰<sup>1</sup>, 吴英松<sup>1</sup>, 徐伟文<sup>1</sup>, 周志聪<sup>2</sup>, 黄颖<sup>3</sup>, 李明<sup>1</sup>( 1. 南方医科大学生物技术学院, 广东 广州 510515; 2. 广州市达瑞抗体工程技术有限公司, 广东 广州 510663;  
3. 中国药品生物制品检定所, 北京 100050 )

**摘要:**【目的】利用时间分辨荧光免疫分析(time-resolved fluorimmunoassay, TRFIA)技术, 建立人生长激素(human growth hormone, hGH)的快速检测方法并研制其诊断试剂。【方法】采用双抗体夹心法(一株抗 GH 的单抗用于包被微孔板, 另一株抗 GH 的单抗用于 Eu<sup>3+</sup>标记)建立 hGH-TRFIA。【结果】hGH-TRFIA 的线性测量范围为 0.1 ×10<sup>-3</sup>~100 ×10<sup>-3</sup> U/L, 灵敏度为 0.036 ×10<sup>-3</sup> U/L, 批内和批间的变异系数分别为 5.3%~8.6%和 7.6%~12.8%。与促甲状腺激素(TSH)、卵泡生成素(FSH)、人胎盘催乳素(LH)和黄体生成素(HPL)均无交叉反应。将 43 份血清标本用本法与 Wallac 试剂盒同时检测相关系数(r)为 0.957。【结论】hGH-TRFIA 可作为一种具有灵敏度高、特异性强和测量范围宽的新方法, 用于临床 GH 水平的测定。

**关键词:** 生长激素; 时间分辨荧光免疫分析; 试剂

中图分类号: R392.33; R446.61

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)04-0472-04

## Time-resolved Fluoroimmunoassay of Human Growth Hormone and Preparation of Its Diagnostic Reagent

HANG Jian-feng<sup>1</sup>, WU Ying-song<sup>1</sup>, XU Wei-wen<sup>1</sup>, ZHOU Zhi-cong<sup>2</sup>, HUANG Ying<sup>3</sup>, LI Ming<sup>1</sup>

( 1. School of Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou 510515; 2. Guangzhou Darui Antibody CO., LTD, Guangzhou 510663; 3. National Institute for The Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China )

**Abstract:**【Objective】To establish a fast time-resolved fluoroimmunoassay (TRFIA) for detection of human growth hormone (hGH) based on direct sandwich technique, and to prepare its diagnostic reagent.【Methods】The sandwich TRFIA for detection of serum GH level using two anti-GH mAbs (One monoclonal antibody was immobilized on the surface of microtiter plate strip wells, another was labelled with Eu<sup>3+</sup>).【Results】The measure range of GH-TRFIA was 0.1 ×10<sup>-3</sup> U/L~100 ×10<sup>-3</sup> U/L. The sensitivity was 0.036 ×10<sup>-3</sup> U/L. The intra- and inter-assay coefficients of variation(CV) were 5.3%~8.6% and 7.6%~12.8%, respectively. There was no cross-reaction to TSH, FSH, LH, and HPL. The correlation coefficient of 43 blood samples detected by self-made GH-TRFIA and commercially available Wallac kit was 0.957.【Conclusion】hGH-TRFIA is a new immunoassay which have several advantages including high sensitivity, specificity, and a wide working range. It is suitable for routine clinical use.

**Key words:** growth hormone; time-resolved fluoroimmunoassay (TRFIA); reagent

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(4):472-475]

人生长激素(human growth hormone, hGH)作为人体生长不可缺乏的成分, 是由脑垂体前叶嗜酸性细胞分泌的单一肽链的蛋白质激素, 具有广泛的生理功能。它通过刺激肝脏分泌类胰岛素刺激因子, 作用于骨和软骨引起身高增长, 同时能够促进人体蛋白质合成及脂肪分解, 调节体内水盐

平衡, 以保证人体生长的需要。由于基础状态时血清 hGH 的浓度极低, 放免法可以测不出, 我们拟采用高灵敏的时间分辨荧光免疫分析(time-resolved fluoroimmunoassay, TRFIA)方法<sup>[1, 2]</sup>, 建立了快速检测 hGH 的方法并研制了诊断试剂, 报告如下。

收稿日期: 2005-12-29

基金项目: 广州市重大科技攻关基金资助项目(2003U130021)

作者简介: 杭建峰(1976-), 男, 内蒙古呼和浩特人, 医师, 硕士, 主要从事免疫学诊断研究; 李明, 教授, 通讯作者。E-mail: mingli@immu.com

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

分别用于包被和  $\text{Eu}^{3+}$  标记的两株抗 hGH 单克隆抗体及 hGH 抗原均购自美国 Biodesign 公司。96 孔微孔板为厦门新创公司产品。Sephadex G-50 系 Pharmacia 公司产品。 $\text{Eu}^{3+}$  标记试剂盒、专用  $\text{Eu}^{3+}$  荧光增强液、Wallac DELFIA™ GH-TRFIA 试剂盒及 Auto-Delfia 1235 全自动时间分辨免疫荧光检测仪均为美国 Perkin Elmer 公司产品。hGH 国家标准品购自中国药品生物制品检定所。hGH 血清标本 43 份及正常人标本 419 份,分别来自广州军区总医院和南方医院。带有滤膜的离心管为 Millipore 公司产品。其它试剂均为国产分析纯。

### 1.2 方法

**1.2.1 固相包被板的制备** 用 50 mmol/L、pH 9.6 的碳酸盐缓冲液将包被抗体稀释至 5 mg/L, 加入到 96 孔微孔板中, 每孔 200  $\mu\text{L}$ , 于 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜。弃掉包被液, 加入封闭液, 每孔 250  $\mu\text{L}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  2 h。弃去封闭液, 洗涤后真空抽干, 于 -20  $^{\circ}\text{C}$  冷冻保存。

**1.2.2  $\text{Eu}^{3+}$  标记物的制备** 将 0.5 mg 标记抗体加入到带有滤膜的离心管中, 以 7 000 r/min 离心 4 min ( $r=10$  cm)。用标记缓冲液重复洗涤 6 次后, 将 200  $\mu\text{L}$  标记抗体和 0.5 mg  $\text{Eu}^{3+}$  标记试剂充分混匀, 于 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜。

**1.2.3  $\text{Eu}^{3+}$  标记物的纯化** 将标记抗体加入到 Sephadex G-50 层析柱 (1 cm $\times$ 80 cm) 中, 用含 9 g/L NaCl 的 50 mmol/L Tris-HCl 的洗脱液洗脱。收集流出液 (1 mL/管), 逐管测定蛋白含量, 合并洗脱峰的各管, 同时以  $\text{Eu}^{3+}$  标记试剂盒中的  $\text{Eu}^{3+}$  标准测定洗脱峰各管中  $\text{Eu}^{3+}$  的浓度。合并后计算抗体标记率和蛋白回收率。

**1.2.4 参考标准品的制备** 用含 2 g/L BSA 及 1 g/L  $\text{NaN}_3$  的 50 mmol/L pH 7.4 Tris-HCl 缓冲液, 将 hGH 抗原配制成 0、0.1、1、10、50 及 100  $\times 10^{-3}$  U/L 系列浓度的标准溶液, 按每瓶 1 mL 分装冻干, 于 -20  $^{\circ}\text{C}$  干燥保存。

**1.2.5 分析操作程序** 向包被板中加入 25  $\mu\text{L}$  hGH 参考标准品或血清样本, 同时加入 1:50 稀释的  $\text{Eu}^{3+}$  标记抗体 200  $\mu\text{L}$ , 于室温孵育 1 h。用洗涤液洗板 6 次, 再加入 200  $\mu\text{L}$  增强液振荡 5 min 检测。全部过程均在 Auto-Delfia 1235 荧光检测仪

上完成。

**1.2.6 hGH-TRFIA 法检测指标 准确度:** 对试剂参考标准品与相应浓度的国家标准品, 同时进行分析测定。用双对数数学模型拟合, 比较两条剂量-反应曲线的斜率并作 t 检验。同时以 hGH 的国家标准品为对照, 计算参考标准品的实测效价与标示效价的比值。线性范围: 将抗原参考标准品稀释成不同浓度进行测定。灵敏度: 以零参考标准品 (A1) 当作样品测量 20 次, 计算其均值及标准差。以 A1 测定值的均值加上 2 倍的标准差所得荧光值, 代入标准曲线方程求得。精密性: 对低中高 3 个质控品 (期望值分别为 18、34 和 62  $\times 10^{-3}$  U/L) 进行测定, 各设 8 个复孔, 计算各质控品检测值的均数、标准差及 CV 值。特异性: 将促甲状腺激素 (TSH)、卵泡生成素 (FSH)、黄体生成素 (LH) 及人胎盘催乳素 (HPL) 稀释至一定浓度后进行测定。正常参考值范围: 用自制 hGH-TRFIA 试剂盒检测 419 份正常人血清, 统计所得的 hGH 浓度的分布, 数据采用软件 SPSS 10.0 进行统计学处理。与国外同类产品的比较: 用自行制备的 hGH-TRFIA 诊断试剂和 Wallac GH-TRFIA 试剂盒同时检测血清样本 43 份进行检测性能及相关性比较。

## 2 结果

### 2.1 标记物的标记率和回收率

标记率和回收率分别为 7.5  $\text{Eu}^{3+}$ /抗体和 86%。

### 2.2 准确度

对参考标准品与相应浓度的国家标准品同时进行分析测定后, 用双对数数学模型拟合, 两条剂量-反应曲线基本平行, 两条曲线的斜率分别为 0.431 和 0.437 (t 检验  $P > 0.05$ )。以 hGH 国家标准品为对照品, 参考标准品的实测效价与标示效价的比值见表 1 (比值应在 0.9~1.1 之间)。剂量-反应曲线的线性相关系数为 0.998。

### 2.3 线性范围和灵敏度

标准曲线的线性范围 0.1  $\times 10^{-3}$  U/L ~100  $\times 10^{-3}$  U/L。以参考标准品 A1 测定值的均值加上 2 倍的标准差所得的荧光值扣除本底的荧光值, 代入标准曲线方程求得灵敏度为 0.036  $\times 10^{-3}$  U/L。

### 2.4 精密性

用自制 hGH- TRFIA 试剂分析, 批内的 CV< 10%, 批间的 CV<15%(表 2)。

表 1 hGH - TRFIA 试剂剂量- 反应曲线的准确度

Table 1 Accuracy of dose- response curve for hGH - TRFIA reagent (n=8)

	NS( $\times 10^{-3}$ U/L)					
	0(A)	0.1(B)	1(C)	10(D)	50(E)	100(F)
RS( $\times 10^{-3}$ U/L)	0.05(A1)	0.094(B1)	1.03(C1)	9.43(D1)	46.6(E1)	106(F1)
	0-0.1	0.091-1.12	0.92-1.07	9.2-10.6	45.5-54.3	92.4-107.6
Ratio(RS/NS)	-	0.94	1.03	0.94	0.93	1.06
	-	0.91-1.12	0.92-1.07	0.92-1.06	0.91-1.08	0.92-1.08

Note: NS=national standard; RS=reference standard; A- F: concentration of national standard; A1- F1: concentration of reference standard

表 2 自制 hGH 试剂检测的精密度

Table 2 Accuracy detected by self- made hGH reagent

(n=8,  $\bar{x} \pm s$ )

Group	Intra- assay						Inter- assay	
	Lot No. 041023	CV(%)	Lot No. 050116	CV(%)	Lot No. 050427	CV(%)	3 lots	CV(%)
QC L	16.1 $\pm$ 1.38	8.6	15.8 $\pm$ 1.17	7.4	17.3 $\pm$ 1.38	8.0	16.4 $\pm$ 2.10	12.8
QC M	36.5 $\pm$ 2.63	7.2	35.5 $\pm$ 1.88	5.3	36.1 $\pm$ 2.09	5.8	35.7 $\pm$ 3.14	8.8
QC H	65.2 $\pm$ 4.17	6.4	64.3 $\pm$ 3.60	5.6	65.7 $\pm$ 4.07	6.2	65.4 $\pm$ 4.97	7.6

QC: quality control L: low concentration; M: medium concentration; H: high concentration

## 2.5 特异性

将 200  $\mu$ g/L TSH、40 U/L FSH、150 U/L LH 及 200 g/L HPL, 用自制的 hGH- TRFIA 试剂测定后, 所获 GH 的水平均为  $0 \times 10^{-3}$  U/L。

## 2.6 正常值范围

用 hGH- TRFIA 试剂对 419 例正常人(男 200 例, 年龄 19-78 岁; 女 219 例, 年龄 18-76 岁)血清 GH 的水平检测表明, 血清 hGH 水平的正常参考值范围是  $0 \sim 24.5 \times 10^{-3}$  U/L, 成年人男性 hGH 水平相对低于女性, 但无统计学差异。

## 2.7 自制 hGH 试剂与国外试剂盒的比较

对 43 份临床标本同时使用自制 GH- TRFIA 试剂和 Wallac GH- TRFIA 试剂盒检测结果(表 3、图 1)。

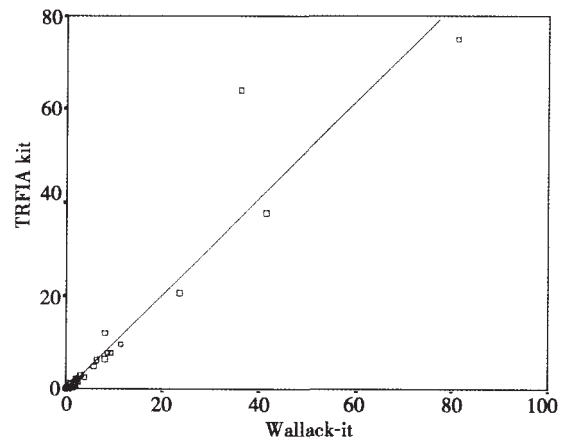


图 1 自制 hGH 试剂与 Wallac- GH 试剂盒检测血清 hGH 的相关性

Fig.1 Correlation of serum hGH detected by self- made hGH reagent and Wallac- GH kit( $r=0.957$ )

表 3 自制 hGH 试剂与国外 Wallac- GH 试剂盒检测性能的比较

Table 3 Comparison of detecting results of between self- made hGH reagent and Wallac- GH kit

Index	Self- made hGH reagent	Wallac- GH kit
Sensitivity( $\times 10^{-3}$ U/L)	0.036	0.03
Linear range( $\times 10^{-3}$ U/L)	0.1-100	0.1-100
Precision(%)	CV < 8.6	CV < 6.5
Stability	10 months at 4	1 year at 4

## 3 讨论

成熟的 hGH 是由 191 个氨基酸组成, 生物活性片段位于氨基端 134 个氨基酸。循环血中有多种类型的 hGH, 以相对分子质量  $M_r=22 \times 10^3$  为主, 另有 5%~10%是生物活性、免疫活性较低的 hGH, 及少量 hGH 二聚体<sup>[3]</sup>。hGH 对生长发育、生殖起决定性作用。实验表明随着年龄的增长, hGH 水平下

降,成为衰老及生殖功能下降的主要原因<sup>[4-6]</sup>。用哺乳类细胞合成的第四代人工合成 GH 的氨基酸序列与自然人 GH 完全一致,同时减少了抗原性,为临床应用的进一步扩展奠定了基础。目前生长激素已用于:治疗儿童青春前期生长迟缓,成人生长激素缺乏症,治疗心功能不全,治疗骨质疏松,抗衰老。

标记免疫技术是利用免疫反应的高度特异性和标记示踪物的高度灵敏性相结合而建立的一大类微量物质检测技术的总称,TRFIA 作为新兴的超微量标记免疫检测技术之一,是采用镧系元素离子及其螯合物<sup>[7,8]</sup>标记抗原或抗体,在荧光检测时采用了特殊的时间延迟、波长分辨及解离增强技术,同时对蛋白质实现了原子标记,标记位点多,对标记物的影响小,克服了传统标记技术的缺陷,其反应模式也有夹心法和竞争抑制法等多种形式,与现有的检测方法(放免法和化学发光法)相比较,具有灵敏度高、操作简便、特异性强、标记物稳定、标准曲线范围宽、可重复测量、不受样品自然荧光干扰及无放射性污染等优点。以上优势是因为 TRFIA 具有独特的荧光特性(特异性荧光的衰变时间极长,为传统荧光的  $10^3 \sim 10^6$  倍。激发光与发射光之间的 Stokes 位移可达 290 nm,而普通荧光素的 Stokes 位移仅为 28 nm,提高了试剂的稳定性)。试剂盒标准曲线飘移小,对于同批次检测的试剂,可以设定参考曲线或使用两点定标进行测量,以减少医院检测的成本。目前生长激素临床主要使用放免法进行测定,但是该法具有同位素污染且灵敏度较低,危险性大,因此要求新的技术以适应检测的需要。采用 TRFIA 技术检测 hGH 灵敏度达到  $0.036 \times 10^{-3}$  U/L,与国外同类试剂(Wallac)的灵敏度( $0.03 \times 10^{-3}$  U/L)较为接近;标准曲线范围宽,可以达到  $0.1 \times 10^{-3}$  U/L  $\sim 100 \times 10^{-3}$  U/L,适应不同检测的需要;三批试剂的精密度评价表明,自制试剂无论是批内还是批间的 CV 全部达到临床测试要求(批内 CV $<10\%$ ,批间 CV $<15\%$ ),TRFIA 方法的重复性好。交叉反应结果表明,与 TSH、FSH、LH 及 HPL 均未见有交叉反应,自制试

剂检测的特异性较强。本法检测时间短,仅为 1 h,可实现快速检测。

#### 参考文献:

- [1] AMIYA N, AMANO M, TAKAHASHI A, et al. Effects of tank color on melanin-concentrating hormone levels in the brain, pituitary gland, and plasma of the barfin flounder as revealed by a newly developed time-resolved fluorimmunoassay[J]. Gen Comp Endocrinol, 2005, 143(3):251-256.
- [2] OKUMURA T, YOSHIDA K, NIKAIIDO H. Ovarian development and hemolymph vitellogenin levels in laboratory-maintained protandric shrimp, *Pandalus hypsinotus*: measurement by a newly developed time-resolved fluorimmunoassay (TR-FIA)[J]. Zoolog Sci, 2004, 21(10):1037-1047.
- [3] HIRT H, KIMELMAN J, BIRNBAUM, M J, et al. The human growth hormone gene locus: structure, evolution, and allelic variations[J]. DNA, 1987, 6(1): 59-70.
- [4] KUWAHARA S, KESUMA SARI D, TSUKAMOTO Y, et al. Age-related changes in growth hormone (GH)-releasing hormone and somatostatin neurons in the hypothalamus and in GH cells in the anterior pituitary of female mice[J]. Brain Res, 2004, 1025 (1-2): 113-122.
- [5] WOLLER M J, EVERSON-BINOTTO G, NICHOLS E, et al. Aging-related changes in release of growth hormone and luteinizing hormone in female rhesus monkeys[J]. Clin Endocrinol Metab, 2002, 87 (3):5160-5167.
- [6] CORPAS E, HARMAN S M, BLACKMAN M R. Human growth hormone and human aging[J]. Endocr Rev, 1993, 14(1): 20-39.
- [7] FIET J, GITON F, FIDAA I, VALLEIX A, et al. Development of a highly sensitive and specific new testosterone time-resolved fluorimmunoassay in human serum[J]. Steroids, 2004, 69(7):461-471.
- [8] TAKAHASHI T, HAMANAKA S, IMAI K, et al. A direct time-resolved fluorimmunoassay (TR-FIA) for measuring plasma estradiol-17 beta concentrations in cattle[J]. Vet Med Sci, 2004, 66(3):225-229.

(编辑 张敏瑞)