

# 间接 ELISA 法检测促卵泡素抗体方法的建立

李红飞, 崔贞亮, 靳亚平\* (西北农林科技大学动物科技学院农业部家畜生殖内分泌与胚胎工程重点开放实验室, 陕西杨凌 712100)

**摘要** 建立了检测促卵泡素(FSH)抗体的间接ELISA方法,用该法检测由FSH BSA免疫BaLb/c小鼠所分离的5份待检血清,结果均为阳性。通过反复试验,确立间接ELISA检测FSH抗体的最佳反应条件,即酶标二抗工作浓度为1:1200,抗原包被浓度10 μg/mL,待测血清最佳稀释度为1:500,封闭液为1.0%的脱脂奶粉,同时设置抗原阻断试验对结果进行验证。

**关键词** 促卵泡素;完全抗原;酶联免疫吸附试验

中图分类号 Q95-33 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2006)17-4223-02

## Establishment of the Detection of the Antibody against Follicular-stimulating Hormone with the Indirect ELISA

LI Hong-fei et al (Key Laboratory of Animal Reproductive Endocrinology and Embryo Biotechnology, Ministry of Agriculture, College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100)

**Abstract** An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was standardized to detect the antibody against follicular-stimulating hormone (FSH). Being tested with the indirect ELISA, 5 serum samples which were acquired by the FSH BSA immunized BaLb/c mice were all positive. The optimum working concentration of the indirect ELISA was established. Polystyrene micro-titer plates were coated by the purified FSH at the concentration of 10 μg/mL. The working concentration of serum samples was 1:500 and the sheep-against-mouse IgG labeled by HRP was 1:1200. The confining liquid was 1.0% defatted milk powder. Antigen-blockage test was designed to check the results.

**Key words** FSH; Holoantigen; ELISA

促卵泡素(FSH)是由垂体前叶促性腺激素细胞的内质网上生成的一种糖蛋白激素<sup>[1]</sup>,它与人类及其他哺乳动物的生殖生育功能密切相关<sup>[2]</sup>,哺乳动物体内FSH含量不足同样会引起生殖能力下降,严重者引起不孕不育。FSH在人类及哺乳动物体内如此重要的生理作用决定了体液FSH含量检测的重要意义。目前国内对FSH的定量检测多采用放射免疫法<sup>[3]</sup>,该法灵敏度高,但存在着放射性核素污染,对标准物、标记物、抗体的质量要求比较高,操作较复杂,试剂保存期短等不足,极大限制了放射免疫在临床及基层的大规模应用。酶联免疫吸附试验(ELISA)是继免疫荧光技术和放射免疫之后发展起来的一种免疫酶技术,具有操作相对简单、试剂来源广泛、无核素污染等特点,具有较好的应用前景<sup>[4]</sup>。该试验的目的就是利用ELISA的理论基础,建立一种间接ELISA法检测FSH抗体的方法,使其检测方法简便化、实用化,为基层医学研究工作提供了一定的理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

**1.1.1** 促卵泡素及阳性、阴性血清。促卵泡素购自中科院动物研究所;促卵泡素抗体阳性血清由本实验室保存;阴性血清分离自健康BaLb/c小鼠。

**1.1.2** 酶标羊抗小鼠IgG及小鼠IgG。购自北京鼎国生物技术公司,酶标二抗建议工作浓度为1:1000。

**1.1.3** 免疫抗原的制备<sup>[5]</sup>。称取FSH和牛血清白蛋白(BSA)各6.0 ng,分别溶解于1.5、0.6 mL的0.1 mol/L的MES液中,将两者混匀,加入10 ng/mL的EDC溶液0.6 mL,混匀,室温作用3 h,低温冻干,4℃保存。

**1.1.4** 工作液。包被液:pH值9.6的碳酸盐缓冲液,用于包被抗原的稀释;稀释液:含1.0% BSA的PBST液,用于血清及酶标二抗的稀释;封闭液:PBST;洗涤液:PBST。

### 1.2 试验方法

**1.2.1** 酶标二抗工作浓度的选择。用10 μg/mL的小鼠IgG进行包被,将酶标二抗用稀释液作1:400、1:600、1:800、1:1000、1:1200、1:1400、1:1600稀释后分别加入已包被的孔中,保温,洗涤。加底物显色,加酸终止反应后,450 nm波长处读取吸光度值(OD)。取OD值最接近1.0时的稀释度作为酶标二抗的工作浓度。

**1.2.2** 血清最适工作浓度的选择。在20 μg/mL包被抗原和酶标二抗工作浓度的条件下,将阴、阳性血清分别作1:50、1:100、1:250、1:500、1:1000、1:2000稀释,进行ELISA检测,记录结果,取阳性血清与阴性血清OD值之比>2的最高稀释度作为待检血清的最佳工作浓度。

**1.2.3** 最佳包被条件及封闭条件的选择。包被抗原稀释至20、10.5和1 μg/mL。封闭液分别用0.1%、0.5%、1.0%的脱脂奶粉,5.0%、10%的小牛血清,1.0%的明胶,同时设置不封闭条件作为对照。

**1.2.4** 间接ELISA操作程序<sup>[6]</sup>。

**1.2.4.1** 抗原包被。用包被液将抗原作适当稀释,加入酶标板中,100 μL/孔,37℃作用1 h,4℃过夜。

**1.2.4.2** 洗涤。倾去孔内反应液,在吸水纸上拍干。每孔加满洗涤液,轻轻摇动,3 min/次,共3次。每次都需要拍干。

**1.2.4.3** 封闭。将反应板的孔内加入封闭液,100 μL/孔,37℃作用1 h,重复洗涤过程。

**1.2.4.4** 加待检血清样品。用稀释液将待检血清做适当稀释,每孔加100 μL,每份样品加2孔,另设阴性血清及空白对照各2孔,加盖,置37℃湿盒反应0.5 h,重复洗涤程序。

**1.2.4.5** 加入HRP酶标记的羊抗小鼠IgG。用稀释液将酶标二抗做适当稀释,除空白对照外每孔加100 μL,置37℃湿盒内反应0.5 h,重复洗涤程序。

**1.2.4.6** 加入底物。每孔加入新配制的底物(OPD-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)溶液100 μL,37℃避光作用20 min。

**1.2.4.7** 终止反应。每孔加入2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>溶液50 μL,5 min内在450 nm处测定OD值。

基金项目 国家自然科学基金资助项目(39770545);西北农林科技大学青年骨干教师支持计划项目(01140305)。

作者简介 李红飞(1982-),男,河南汝州人,硕士研究生,研究方向:家畜生殖内分泌。\*通讯作者,教授,博士生导师。

收稿日期 2006-05-24

**1.2.4.8** 记录结果。取每个样品的2孔平均值,计算出被检血清(P)与阴性血清(N)的比值( $P/N$ )。 $P/N > 2$ ,且被检血清的A值 $> 0.2$ 者,判为阳性样品。

**1.2.5** 中和阻断试验。在待检血清中加入等体积的 $5 \mu\text{g/ml}$ 包被抗原,室温作用30 min。操作过程同于间接ELISA操作程序。记录结果,并与**1.2.4.8**的相应结果进行对比,若相应吸光度值降低证明待检血清中有抗体与FSH抗原作用,可以对结果进行验证。

**1.2.6** 被检血清的制备。取8~12周龄BaLb/c小鼠5只,用生理盐水将FSH BSA配成 $1 \text{ ng/ml}$ ,与等体积的福氏完全佐剂混匀后背部皮下多点注射作为初次免疫, $0.2 \text{ ml/只}$ 。间隔2周后,取等量抗原与等体积的福氏不完全佐剂混匀,同样途径作追加免疫。追加免疫后第7天,眼眶静脉丛采血,4分离血清,作为待检血清。

## 2 结果与分析

**2.1** 酶标二抗工作浓度的选择 结果表明(图1),其中1:200稀释酶标二抗的OD值最接近1.0,因此选择1:200作为酶标二抗的工作浓度。

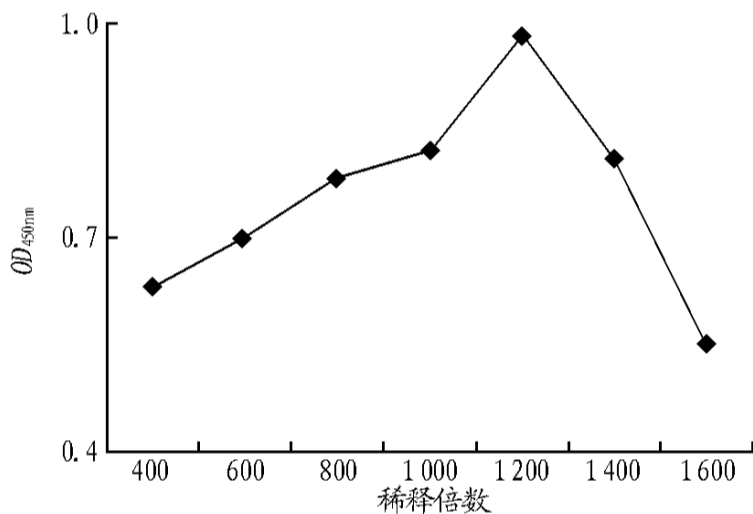


图1 不同稀释度酶标二抗吸光度值

**2.2** 待检血清工作浓度的选择 结果显示(图2):50、100、250、500倍稀释的血清 $P/N > 2$ ,因此选择1:500作为待检血清的工作浓度。

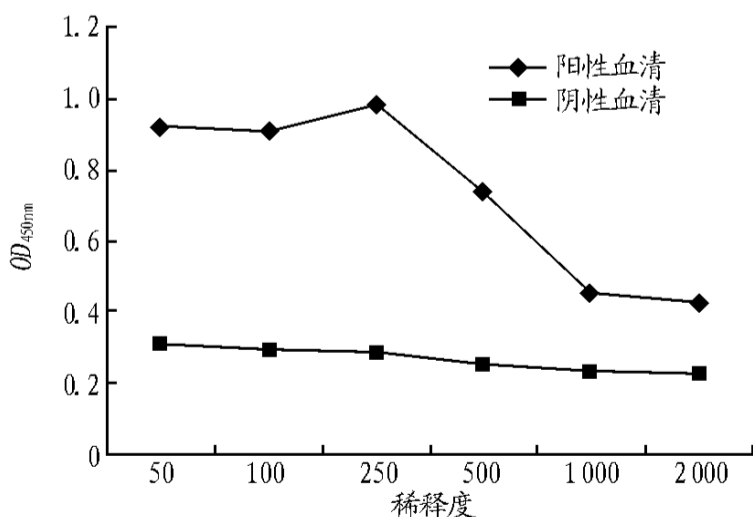


图2 不同稀释度阴性、阳性血清吸光度值

**2.3** 最佳包被条件及封闭条件的选择 选择不同物质的不同浓度作为包被液,以1:500稀释的阴性血清作为对照,通过比较阴性本底的高低确定最佳包被抗原浓度,应用封闭液及其最佳工作浓度。

试验结果显示(表1),明胶几乎没有封闭效果,小牛血清有一定的封闭效果。脱脂奶粉效果比较好,且1.0%脱脂奶粉阴性本底最低,因此选择1.0%脱脂奶粉作为封闭液。包被抗原在20、10.5  $\mu\text{g/ml}$  封闭效果相当,为了节约抗原,初步

选择10.5  $\mu\text{g/ml}$  作为包被抗原的工作浓度。

表1 不同物质不同浓度包被液的OD值

封闭	浓度	包被抗原 $\mu\text{g/ml}$			
		20	10	5	1
脱脂奶粉	0.1%	0.027	0.029	0.029	0.035
	0.5%	0.026	0.026	0.026	0.032
	1.0%	0.023	0.025	0.023	0.031
	未封闭	0.046	0.045	0.049	0.053
小牛血清	5%	0.037	0.038	0.040	0.041
	10%	0.035	0.035	0.034	0.035
	未封闭	0.045	0.043	0.048	0.046
明胶	1%	0.044	0.043	0.045	0.043
	未封闭	0.046	0.045	0.047	0.044

**2.4** 待检血清的间接ELISA检测 结果表明(表2),与5  $\mu\text{g/ml}$ 的包被抗原相比,包被抗原浓度为10  $\mu\text{g/ml}$ 时,所测血样的吸光度值均较高,而且阴性本底也比较低。5个待检血样的 $P/N$ 均大于2,且被检血样的OD值均大于0.2,因此判断为阳性血清。阻断试验吸光度值明显降低进一步验证了待检血样为阳性血清,抗体含量与吸光度值成正相关。

表2 待检血清的间接ELISA检测结果

待检血样	包被抗原浓度 $\mu\text{g/ml}$	OD <sub>450nm</sub>	P/N	阻断值
1	10	0.536	4.68	0.261
	5	0.439	3.40	0.148
2	10	0.555	4.84	0.237
	5	0.439	3.57	0.156
3	10	0.562	4.91	0.275
	5	0.448	3.48	0.175
4	10	0.531	4.63	0.224
	5	0.421	3.26	0.154
5	10	0.518	4.51	0.240
	5	0.398	3.07	0.142

注:阴性对照OD值,当包被抗原浓度10  $\mu\text{g/ml}$ 时为0.128,5  $\mu\text{g/ml}$ 时为0.141;空白对照为0.017。

## 3 结论与讨论

(1) FSH是一种垂体促性腺激素,有极强的生物学活性,进入机体后发挥生理作用而使抗原性降低,该试验通过碳化二亚胺(EDC)偶联法将FSH与BSA结合,在保持其抗原性不变的同时极大降低生理学作用,使FSH的免疫原性增强,促进抗体的产生。

(2) 间接ELISA需要经过多步过程才能得到最终结果。虽然敏感性很高,但包被液的浓度、作用时间,洗涤液的选择及作用时间,酶标二抗的质量,血清的稀释倍数,酶标板的质量等都会对结果产生一定的影响,因此,在检测前一定要进行严格筛选,确保试验结果尽可能客观。

(3) 该试验通过筛选,确定最佳酶标二抗的工作浓度为1:200,待检血清的稀释倍数为1:500,封闭液为1.0%的脱脂奶粉,包被抗原的工作浓度为10  $\mu\text{g/ml}$ 。在此条件下检测被检血清的结果均为阳性。同时设置抗原阻断试验,对结果进行验证,进一步保证了检测结果的准确性。

(4) 不同浓度BSA封闭液的试验结果表明,封闭效果比较理想。由于该试验的完全抗原为FSH BSA,BSA的使用会

(下转第4226页)

(上接第4224页)

降低试验的特异性,但BSA本身为一种不错的封闭剂,希望能够为相关试验提供一定参考。

### 参考文献

- [1] SAIRAM MR, KRISHNAMURTYH. The role of follicle-stimulating hormone in spermatogenesis: lessons from knockout animal models[J]. *Res Med Res*, 2001, 32(6): 601-608.
- [2] 张家骅. 家畜生殖内分泌学[M]. 北京: 中国教育文化出版社, 2004: 101

- 103.

- [3] 王丽兰. 放射免疫测定FSH、PRL在女性不孕诊断中的意义[J]. *桂林医学院学报*, 1996(9): 1-3.
- [4] 焦奎, 张书圣. 酶联免疫分析技术及应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 84-90.
- [5] 王谦. 抗链霉素单克隆抗体制备与ELISA方法的建立[D]. 北京: 中国农业大学, 2003.
- [6] 王雪鹏, 李建亮. 用间接ELISA法检测鸡痘病毒抗体的研究[J]. *中国兽医科技*, 2003, 33(11): 8-11.