



ISSN 1674-6929

CN 44-1656/R

邮发代号: 46-283

分子诊断与治疗杂志

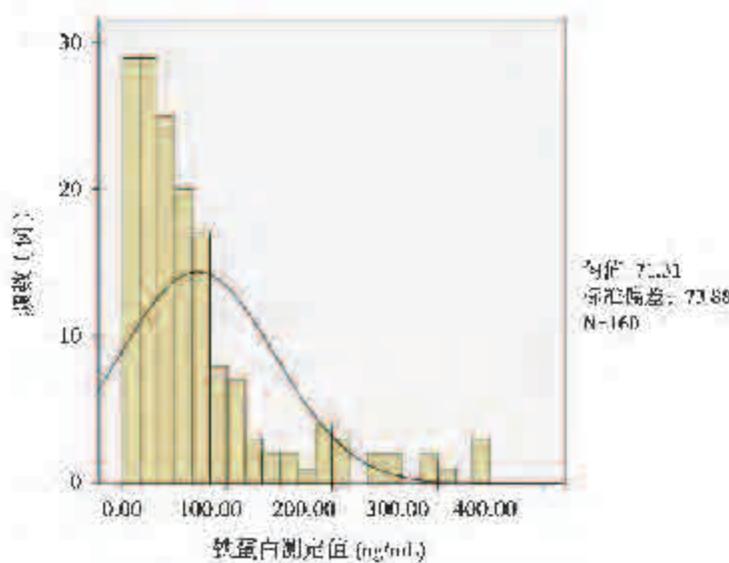
FENZI ZHENDUAN YU ZHILIAO ZAZHI

2015年9月 第7卷 第5期 总第39期

JOURNAL OF

MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Volume 7 Number 5 September 2015



图(P349) 160例健康女性人群铁蛋白测定结果直方图

Figure (P349) Histogram of ferritin in 160 health female

中山大学 主管

ISSN 1674-6929



9 771674 692099



中国核心期刊(遴选)数据库收录期刊
 中国期刊全文数据库全文必录期刊
 中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊
 中文生物医学期刊文献数据库收录期刊
 中国生物医学期刊引文数据库收录期刊



张 军

张军，1972年7月出生。1997年毕业于上海医科大学，获医学硕士学位。

教授，博士生导师。
现任厦门大学公共卫生学

院副院长、国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心副主任。为中华医学会微生物学与免疫学分会第八届委员会青年委员会副主任委员、全国临床医学计量技术委员会委员。入选中组部“万人计划”第一批科技创新领军人才、科技部创新人才推进计划中青年科技创新领军人才、教育部新世纪优秀人才、福建省第一批特支人才“双百计划”科技创新领军人才、厦门市第六批拔尖人才。获第19届中国十大杰出青年提名奖、第14届中国青年五四奖章。担任《国际病毒学杂志》编委、《中国人兽共患病学报》特邀审稿专家等学术职务。

张军教授长期从事分子病毒学和生物制品研究，在基因工程疫苗、诊断试剂方面取得了一系列研究成果，主持和参与了全球首个戊型肝炎疫苗以及艾滋病毒、人T淋巴细胞白血病病毒、戊肝病毒、乙肝病毒、丙肝病毒等40余项诊断试剂的研制。承担及完成国家、省部级研究课题10余项，其中国家863计划项目、国际科技合作项目、国家自然科学基金项目6项。获国家科技进步二等奖（2001年，排名第2）、国家技术发明二等奖（2010年，排名第4）、中国专利金奖（2012年，排名第2）、中国青年科技奖（2011年，排名第1）、教育部提名国家科技进步二等奖（2005年，排名第1），江苏省科学技术一等奖（2012年，排名第3）。获得授权专利20余项。发表相关论文100余篇，其中SCI收录90篇（“N Eng J Med” “Lancet” “Gut” “Hepatology” “J Hepatol” “Clin Microbiol Infect” “Vaccine”等）。培养出站博士后1名、博士研究生2名、硕士研究生33名。

分子诊断与治疗杂志

双月刊 2015年9月 第7卷 第5期

目次

述 评

化学发光免疫分析法的研究进展 陆龙飞 葛胜祥 张军 (289)

论 著

基于全自动管式化学发光免疫检测系统的人结核感染T细胞检测方法的建立
..... 陈鹭颖 林海军 翁祖星 等 (296)

硫酸脱氢表雄酮化学发光微粒子免疫法定量测定试剂的研制
..... 黄明聪 张晓琳 林光华 等 (302)

人肌红蛋白化学发光免疫分析定量检测方法的建立及性能评价
..... 王楠 彭波 李基 等 (306)

人胰岛素定量测定试剂盒化学发光免疫分析法的建立及方法学评价
..... 陈超 彭波 李基 (313)

癌胚抗原定量测定试剂盒(化学发光免疫分析法)的临床性能评价
..... 梁丽萍 李志雄 董志宁 等 (318)

总前列腺特异性抗原定量测定试剂盒(化学发光免疫分析法)的性能验证
..... 方婉仙 李志雄 董志宁 等 (323)

基于磁微粒化学发光法的肝纤四项检测限与功能灵敏度研究
..... 王新灵 李志信 关学 等 (328)

碱性磷酸酶标记抗人绒毛膜促性腺激素抗体的工艺比较 杜晔 李基 彭波 (333)

游离甲状腺素线性及回收实验的研究 孙臻懿 潘洁 彭波 (341)

上海市健康成人血清铁蛋白参考值调查 江生 彭波 李基 (347)

综 述

先天性肾上腺皮质增生症筛查的相关进展 吕萌萌 朱宇皇 张跃峰 等 (351)

叶酸及维生素B₁₂检测方法的发展及现状 陈伟方 李志信 渠海 等 (357)

专家风采

张军 (封二)

实验室巡礼

国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心 (封三)

动 态

2015 循环生物标志物检测与临床应用研讨会通知 (301)

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Bimonthly Volume 7 Number 5 September 2015

CONTENTS

COMMENTS

Review on the development of chemiluminescence immunoassay

..... *LU Longfei, GE Shengxiang, ZHANG Jun* (289)

ORIGINAL ARTICLES

Development of detection kit for T cell infected with *Mycobacterium tuberculosis* based on full-automatic chemiluminescence immune analyzer

CHEN Luying, LIN Haijun, WENG Zuxing, XU Feihai, GE Shengxiang, ZHANG Jun (296)

Development of chemiluminescent microparticle immunoassay for quantitative determination of dehydroepiandrosterone sulfate

HUANG Mingcong, ZHANG Xiaoli, LIN Guanghua, WENG Zuxing, SUN Xudong, GE Shengxiang, ZHANG Jun (302)

Establishment and performance evaluation of the quantitative detection for myoglobin based on chemiluminescent immunoassay

WANG Nan, PENG Bo, LI Ji, TANG Liangliang (306)

Establishment and performance evaluation of the quantitative detection for insulin based on chemiluminescent immunoassay

CHEN Chao, PENG Bo, LI Ji (313)

The clinic research of the carcinoembryonic antigen (CEA) quantitative diagnostic kit by chemiluminescent immunoassay (CLIA)

LIANG Liping, LI Zhixiong, DONG Zhining, LI Ming, WU Yingsong (318)

The verification of the performance of total prostate specific antigen (tPSA) quantitative diagnostic kit (chemiluminescent immunoassay)

FANG Wanxian, LI Zhixiong, DONG Zhining, LI Ming, WU Yingsong (323)

Research on magnetism particulate immuno chemistry luminescence method for limit of detection and functional sensitivity of four items of liver fibrosis

WANG Xinling, LI Zhongxin, GUAN Xue, QU Hai (328)

Process comparison of conjugating alkaline phosphatase with anti-human chorionic gonadotropin antibody

DU Ye, LI Ji, PENG Bo (333)

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Bimonthly Volume 7 Number 5 September 2015

CONTENTS

The research of free thyroxine linearity and recovery experiment
SUN Zhenyi, PAN Jie, PENG Bo (341)

Reference values survey for serum ferritin in shanghai health adults
JIANG Sheng, PENG Bo, LI Ji (347)

REVIEWS

The progress of screening for congenital adrenal hyperplasia
LV Mengmeng, ZHU Yuhuang, ZHANG Yuefeng, FU Guangyu (351)

The development of detection methods for folic acid and Vitamin B₁₂
CHEN Weicai, LI Zhongxin, QU Hai, FU Guangyu (357)

分子诊断与治疗杂志

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

双月刊 2015 年 9 月 第 7 卷 第 5 期 总第 39 期 Bimonthly Volume 7 Number 5 September 2015

主管 中山大学
主办 《中国家庭医生》杂志社有限公司

总编辑 黄筠生
执行主编 李明
编辑部主任 徐伟文
编辑部执行主任 邓子华
编辑 李晓兰 谭舜菁
排版 钟华安
编辑出版 《中国家庭医生》杂志社有限公司

地址 广州市天河区天河北路 179 号祥龙大厦 10~11 楼(510620)
电话 (020) 32290177 32290789-206
传真 (020) 32290177
电子邮箱 jmdt@vip.163.com
刊号 ISSN 1674-6929
CN 44-1656/R
邮发代号 46-283
发行单位 广东省报刊发行局
发行范围 国内外公开发行
广告经营许可证 粤工商广字第 01139 号
印刷 广州中大印刷有限公司
出版日期 2015 年 9 月 18 日
定价 RMB 15.00 元

Responsible Institution Sun Yat sen University
Sponsor China Family Doctors Magazine Publisher Co.Ltd.

Editor in Chief HUANG Qisheng
Execute Editor in Chief LI Ming
Managing Director XU Weiwen
Execute Managing Director DENG Zihua
Editors LI Xiaolan TAN Shunjing
Typesetting ZHONG Huaan
Editing China Family Doctors Magazine Publisher Co.Ltd.

Add 10~11 Fl., Xianglog Building, 179# Tian he bei Lu, Guangzhou, China 510620
Tel (020)32290177 32290789 206
Fax (020)32290177
E-mail jmdt@vip.163.com
CSSN ISSN 1674 6929
CN 44 1656/R
Printing Guangzhou Zhongda Printing Co., Ltd.
Publish Date 2015.9.18
Price RMB 15.00

·述 评·

[编者按] 自20世纪90年代,以雅培、罗氏为代表的国外主要体外诊断试剂厂家陆续推出全自动化学发光免疫分析系统,依靠其试剂品种齐全性、质量均衡性以及检测稳定性、准确性、方便性和及时性等方面的突出优势,大量取代了传统的酶联免疫诊断试剂,在发达国家的临床中心实验室中迅速普及并成为市场主导。进入21世纪以来,由于国内经济的快速增长,国内各类大型医院对价格的承受能力明显上升,纷纷引进了进口全自动化学发光免疫分析仪器,并促进了进口试剂的大量使用。国外厂商凭借其全自动仪器对其他厂家试剂不兼容的封闭策略,将国产试剂排挤出利润率最高的高端市场,导致国产诊断试剂的市场占有率迅速下滑。如不能迅速集中国内体外诊断试剂和仪器领域内优势单位的力量联合攻关,研制出有竞争力的国产全自动化学发光免疫分析系统及大量高质量配套试剂,我国体外诊断产业将直接面临巨大的生存危机,并进而使我国降低医疗费用和医疗负担的诸多努力难以取得预期成效。

全自动管式化学发光免疫检测系统的研制是一个综合了精密光学仪器研制、高品质辅助耗材研制、多品种试剂研制的大系统工程,需要生物医学、材料化学、精密制造、自动控制等诸多领域的交叉综合协作。我国在该领域的研究起步晚、起点低、高层次团队协作少。目前虽有个别厂家在近两年中研发出全自动管式化学发光检测仪器和少量配套试剂,但由于试剂品种有限、仪器性能与进口产品仍有差距,这些国产体系推广艰难,市场接受程度不够。

目前国内多数免疫诊断企业包括上海科华、北京万泰、郑州安图、广州达安和达瑞、深圳新产业等均陆续研发全自动化学发光免疫检测系统及其配套试剂,部分厂家仪器和试剂已上市销售。同时,国家也在该领域设立了相应的课题以支持国产全自动化学发光免疫检测技术的发展。然而,目前上市的国产全自动检测体系并不被市场所完全认可,并且性能上有待进一步的提高。为此,《分子诊断与治疗杂志》特地设置国内化学发光试剂研究专刊,报道国产全自动化学发光免疫检测系统的最新研究,以提高大家对于国产产品的认识和重视,推动国产化学发光免疫检测产业的发展和提升市场可接受程度。

化学发光免疫分析法研究进展

陆龙飞 葛胜祥 张军*

[摘要] 化学发光免疫分析法(chemiluminescence immunoassay, CLIA)是一种高灵敏度、高特异性的检测分析技术,具有广泛的应用领域。本文简要介绍了化学发光免疫分析法的分类、发展和应用,重点从实际应用的角度阐述了化学发光在解决低丰度低信噪比、多组分检测、高速自动化等方面的发展情况,以及简要介绍了新型材料、试剂和技术应用于化学发光体系的进展,并对化学发光免疫分析法的发展趋势进行了展望。

[关键词] 化学发光免疫分析;多组分检测;流动注射分析;量子点;微流控芯片

基金项目:国家高技术研究发展计划(863计划)(2011AA02A101)

作者单位:厦门大学国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心,福建,厦门361102

*通讯作者:张军, E-mail: zhangj@xmu.edu.cn

Review on the development of chemiluminescence immunoassay

LU Longfei, GE Shengxiang, ZHANG Jun*

(National Institute of Diagnostics and Vaccine Development in Infectious Diseases, Xiamen University, Xiamen, Fujian, China, 361102)

[ABSTRACT] Chemiluminescence immunoassay (CLIA) was a widely used technology attribute to its high sensitivity and specificity. The classification, recent advances and the application of chemiluminescence immunoassay were reviewed. This review was focused on the advances of chemiluminescence immunoassay in practical application, especially in improving the signal-to-noise ratio of low abundance samples, multi-analyte detection, rapid and automatic detection. In addition, the advances of new materials, reagents and technologies applied in chemiluminescence immunoassay were briefly reviewed. And the development trend of chemiluminescence immunoassay was prospected.

[KEY WORDS] Chemiluminescence immunoassay; Multi-analyte detection; Flow injection analysis; Quantum dot; Microfluidics

1978年 Halman 等成功建立化学发光免疫分析法 (chemiluminescence immunoassay, CLIA) 以来, 该方法大致经历了 4 个阶段的发展^[1], 相继应用了大量新的材料、技术、工艺和仪器而日趋完善和普及。化学发光免疫分析法是将具有高灵敏度的化学发光测定技术与高特异性的免疫反应相结合的检测分析技术, 通过激发化学发光剂进入激发态再回到稳定态并发射光子的过程, 将免疫反应信号转化为光信号, 进而利用光信号测量仪器测定发光强度, 发光强度因与待测物质浓度在一定条件下呈线性定量关系, 从而确定待测物质浓度。

1 化学发光免疫分析的分类

根据化学发光所用的标记物和发光原理的不

同, 一般可分为 3 类: 直接化学发光免疫分析、酶促化学发光免疫分析和电化学发光免疫分析。不同于前两者, 电化学发光由电启动电极表面的电化学发光剂发生电化学反应产生光信号, 常需要共反应剂提高发光效率, 如三丙胺 (tripropylamine, TPA) 作为三联吡啶钌 ($[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$) 的电子供体共反应剂。常用的发光体系有: 吖啶酯类、鲁米诺类 (luminol)、三联吡啶钌类、过氧化草酸酯类 (TCPO、DNPO) 和强氧化剂高锰酸钾、 $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ 等 (见表 1)。有些发光剂与氧化剂反应缓慢, 还需要催化剂和增强剂的作用, 提高发光强度和稳定性。

2 化学发光免疫分析的发展方向

近年来, 随着化学发光免疫分析在各个领域

表 1 化学发光免疫分析的分类和常用体系

Table 1 Classification of chemiluminescence immunoassay and systems in common use

	标记物	常用发光体系		最大波长 (nm)	信号 类型	常用增强剂
		底物	启动剂			
直接化学发光 免疫分析	吖啶酯	吖啶酯	$\text{NaOH}+\text{H}_2\text{O}_2$	430	闪光	金属离子、表面活性剂 ^[2]
	异鲁米诺	异鲁米诺	$\text{NaOH}+\text{H}_2\text{O}_2$	425	闪光	
酶促化学发光 免疫分析	辣根过氧化物酶	鲁米诺	$\text{NaOH}+\text{H}_2\text{O}_2$	425	辉光	苯酚衍生物、磁纳米颗粒、金属纳米颗粒 ^[3-5]
	碱性磷酸酶	AMPPD	$\text{NaOH}+\text{H}_2\text{O}_2$	470	辉光	
电化学发光免 疫分析	$[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$	$[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ -TPA	电启动	620	闪光	纳米颗粒、表面活性剂 (电极修饰) ^[6-8]

的应用,对其各方面要求和需求也发生了改变,在应用了大量新技术、新材料的基础上,化学发光免疫分析法呈现出高灵敏度、高通量和自动化的发展趋势。

2.1 高灵敏度检测

实际应用中常涉及到样品丰度低、信噪比低、稳定性差和信号干扰等问题。为解决化学发光免疫分析的实用性,需要提高其灵敏度和稳定性:一方面降低信号噪音,减少非特异性反应信号和信号干扰;另一方面增强光信号,提高信噪比和稳定性。

化学发光免疫分析系统的信号噪音和信号干扰的因素主要是发光体系缺陷和原料试剂特异性的影响。为改善发光体系缺陷,研发新的发光剂、增强剂、发光体系等^[5,6]以及对于反应时间、孵育时间、缓冲液的选择和标记抗体浓度等细节进行优化^[7,8],都是减少信号噪音干扰的影响因素,也是人们长期研究的目标。原料试剂中,基因工程抗原由于表达系统、标签融合蛋白的不同而导致修饰折叠的差异,往往对重组抗原的特异性和灵敏度带来很大影响。单克隆抗体(monoclonal antibody, Mab)具有很强的免疫反应特异性,围绕Mab的改造,减少无关结构,提高特异性和活性的研究日益增多,如嵌合抗体、小分子抗体、噬菌体抗体和胞内抗体等。因此,如何表达筛选获得高特异性和高灵敏度的抗原抗体^[2,3]成为人们研究的重点之一。此外采用多种重组抗原或抗体联检^[14,15]往往也能起到很好的效果。

除了减少信噪和干扰外,如何增强发光信号提高稳定性一直是化学发光研究的重点,新型纳米材料如纳米金、碳纳米管CNT、碳纳米球CNSs、碳纳米纤维以及量子点等联用到CLIA中,大大提高了CLIA的信号强度和稳定性。电化学发光免疫分析中电极表面是电化学反应的关键场所,电极表面的修饰对于电化学发光具有重要作用,对此人们开展了大量电极修饰的研究,特别是新型纳米材料、表面活性剂等^[6,9]对于电化学发光影响的研究。近些年,透明电极如氧化铟锡(indium tin oxide, ITO)电极与光导纤维技术的结合减少了干扰且更为简便,具有很好的应用前景。Chen^[6]用覆盖了一层含氟表面活性剂的4 nm的金纳米颗粒(GNPs)去修饰ITO电极,形成了FSO-GNP-ITO

修饰电极,大大改善了ITO电极用于ECLIA时TPA氧化率低和ITO表面不稳定的问题,提高了发光的稳定性和灵敏度。

量子点QDs具有尺寸可调的光学特性和高荧光量子产率,是生物荧光标记物的理想光学材料。但是量子点化学发光也存在着自身的缺点,比如QDs-ECL需要高发光电位,发光强度低等问题。通过改造量子点比如核壳结构量子点、掺杂型量子点和单量子点等^[16,17],修饰和改善QDs-ECL体系的发光信号强度和灵敏度,取得了很好的效果。Guo等^[18]建立了一个表面用石墨烯(G)-CdS QDs-琼脂糖复合材料修饰的玻璃碳电极(glass carbon electrode, GCE)的CdS QDs-ECL系统,以戊二醛(glutaric dialdehyde, GLD)为交联剂结合抗体,检测甲种胎儿球蛋白,石墨烯能大大提高CdS QDs-ECL的检测下限和灵敏度。

2.2 多项目联合检测

在临床应用中,常常需要对复杂体系的未知样本进行多组分的测定或者多种指标的检测,实现对于多组分的检测可以大大提高检测分析的准确性和可靠性,减少检测分析时间和繁琐的人工操作,是免疫分析研究的一个重要方向。一般静态多组分同时检测主要有2种模式:多标记物分辨技术和空间分辨技术。

多标记物分辨技术以不同的标记物标记不同的免疫活性物质,再通过识别不同的标记信号来检测不同的组分。Qian^[20]以兔免疫球蛋白抗原(IgG)和癌胚抗原(carcino-embryonic, CEA)为模型蛋白,将水溶性量子点材料CdS和PbS分别包裹到SiO₂纳米颗粒上作为探针标记到IgG和CEA抗体上,形成“三明治”探针Si/Cd/anti-IgG和Si/Pb/anti-CEA,经夹心法免疫反应后,再以方波伏安法(square wave voltammetry, SWV)在-0.57V和-0.81V电压下分别检测探针信号,实现了多标记物的同时检测。多色量子点用于CLIA的多组分检测是另外一种形式的“多标记物”分辨技术,多色荧光探针具有一元激发多元发射的优点,能同时标记和跟踪多个生物分子事件。Goldman等^[21]构建了ZnS-CdSe核壳结构的多色量子点标记抗体,用夹心免疫法在4种不同波长下检测4种毒素的混合物,显示多色量子点能够完成一般有机染料难以完成的的同时多组分检测。但是由于

多种信号的重叠交叉干扰,多标记物模式不可避免地涉及到最优分析的妥协。

空间分辨技术是通过在不同的区域空间发生免疫反应,再利用阵列检测器光电倍增管(photomultiplier tube, PMT)、电荷耦合元件(charge-coupled device, CCD)等同时测定大量样品。Fu^[22]设计的双通道流通池,通道 I 标记肿瘤标志物 CA153 和 CA125 抗体,通道 II 标记 CA199 和 CEA 抗体,

同时检测 4 种肿瘤标志物(图 1)。其将碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)和辣根过氧化物(horseradish peroxidase, HRP)标记到 2 个通道的抗体上,再向两个通道分别加入相应的底物发光剂(S1 和 S2)催化两个通道的化学发光(chemiluminescence, CL)反应。当用光电倍增管 PMT 收集其中一个信号时,采取移动光栅来遮蔽其他通道进行收集。

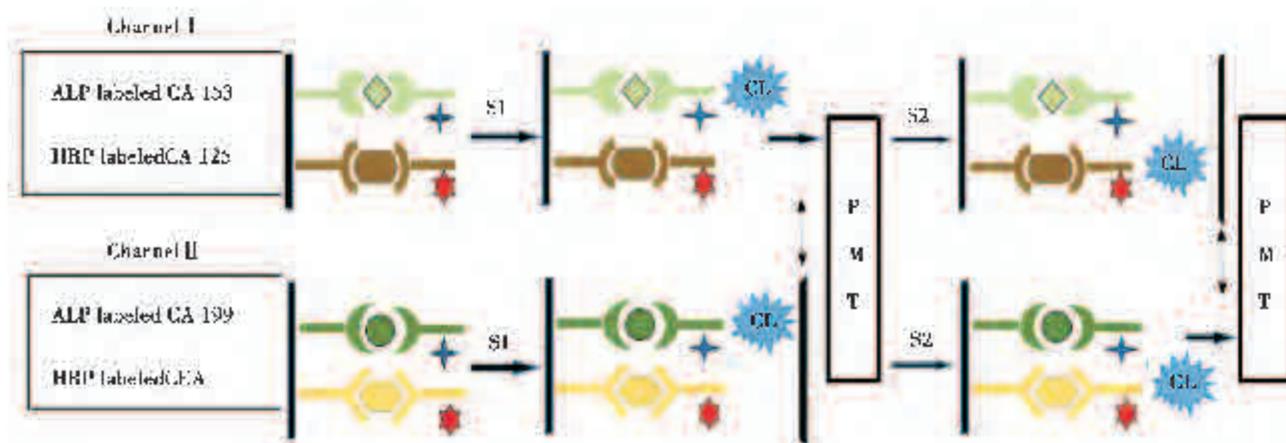


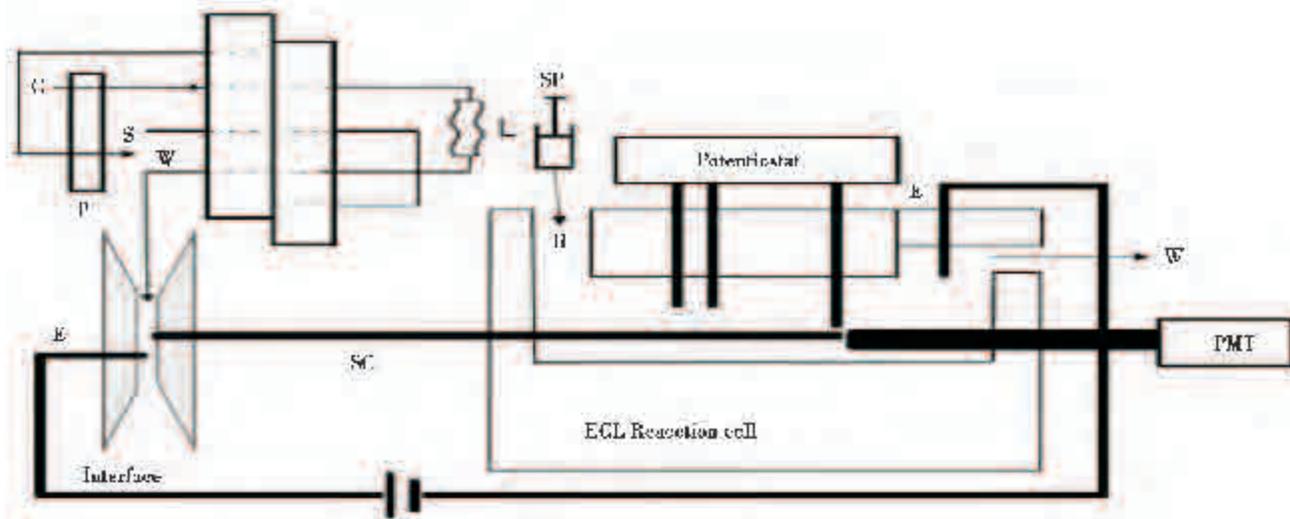
图 1 通道底物二维空间分辨化学发光免疫分析系统^[22]

Figure 1 Channel and substrate zone two-dimensional resolution system for CLIA^[22]

传统的静态检测方法耗时较多,流动注射分析(flow injection analysis, FIA)结合化学发光系统形成的动态检测方法具有灵敏度高、分析速度快、重复性好和在线自动分析的优点,顺序注射分析作为 FIA 分析的一个重要分支还可以实现多组分的在线过程分析和同时检测^[23-24]。一些具有高效分离检测能力的技术也可以与化学发光结合,如高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)、毛细管电泳法(capillary electrophoresis-chemiluminescence, CE)和微流控芯片(micro-fluidic chip, MFC)^[25-26],形成高自动化水平和高分离能力,快速、灵敏的在线多组分分离免疫分析检测法。当然联用体系也存在着自身的缺点,需要优化检测条件和接口类型等。Huang 等^[26]构建了微型化的 FIA-CE-ECL 装置中(图 2),采用落滴型分流接口来解决 FIA 分流进样与 CE 的隔离, [Rb(bpy)₃]²⁺以流动的方式不断加入柱端检测区域,将毛细管尾端插入到 [Rb(bpy)₃]²⁺流动池中实现 [Rb(bpy)₃]²⁺ 在毛细管出口端的电化

发光反应,再通过光纤经 PMT 检测。通过优化毛细管出口和工作电极、光纤的相对位置获得很高的灵敏度和分离效率。在 68 mm 长的分离毛细管中,脯氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸在 180 s 内得到分离检测。

微流控芯片分析技术结合了 CLIA、CE、FIA 和微流控的技术和优势,具有分析速度快、试剂消耗少和高度自动化等特点,包括非均相免疫反应和均相免疫反应 2 种反应方式。非均相免疫反应因具有富集效应而拥有更高的灵敏度^[26],而均相免疫反应具有更高的分离效率和更短的反应时间,但是由于在线引入发光剂对其他通道的干扰以及与发光剂混合效率较低等因素^[27],实际应用还存在许多问题。Zhao^[28]在微芯片电泳系统上完成细胞注入加载、溶解、电泳分离和发光检测,通过 luminol-Na₂S₂O₈ 体系选择性地检测细胞内的巯基化合物 Cys、GSH 和血红蛋白 Hb,在 120 s 内完成分离,检测下限分别达到 1 amol、32 amol、69 amol。虽然微流控芯片与传统 CE 相比灵敏度还不



C:载流; W:废液; S:样品; L:样品环; R:电化学发光试剂; SP:注射泵; E:铂电极; SC:分离毛细管

图2 微型流动注射毛细管电泳电化学发光检测系统^[26]

Figure 2 Miniaturized capillary electrophoresis system with flow injection sample introduction and electrogenerated chemiluminescence detection^[26]

够理想,但是未来微型化、自动化、集成化和便携化是分析仪器设备发展趋势,微流控分析芯片作为微全分析系统的重要组成部分之一,还是具有很大的改进空间和应用前景。

2.3 全自动化检测

传统的免疫分析由于免疫物质的混合反应效率低,检测分析的流程冗长操作繁琐,因而耗时较多。为实现快速检测,需加速热力和免疫动力学反应,提高自动化水平,联用其他技术减少操作节约时间。磁性纳米微粒作为载体平台,不但可以提高混合和反应效率以及灵敏度,利用外加磁场还可以方便快捷的分离结合相,减少繁琐的人工操作,为 CLIA 的全自动化发展奠定了坚实的基础。Zhang 等^[30]利用磁微粒 (magnetic particles, MP) 和包被管的化学发光酶免疫分析法 (chemiluminescent enzyme immunoassay, CLEIA) 对人血清甲种胎儿球蛋白的评估和分析进行了研究比较,MP-CLEIA 的线性范围更广泛、分析时间更短、钩状效应浓度更高,显示 MP-CLEIA 对于筛查检测的方便快捷优越的优点和全自动化操作系统的应用潜力。

随着人们对于检测水平和仪器要求的提高,化学发光免疫分析提高灵敏度、稳定性、检测项目以及分析速度等,集成磁微粒、流动注射分析、微

流控芯片以及机械电子等的新型自动化材料技术形成智能化、自动化、一体化系统是大势所趋。未来更高通量的全自动化学发光分析仪器、即时检测⁽³¹⁾仪器、远程在线检测仪器等将成为相关的研究热点之一。表 2 概述了目前市场上国内外代表性全自动化学发光免疫分析体系。

3 化学发光的应用与展望

鉴于化学发光免疫分析法高灵敏度、宽线性范围、分析速度快等优点,雅培、罗氏、贝克曼等相继推出了全自动检测仪器,极大地提高了工作效率和检测的准确度灵敏度,减少人为操作误差,推动了化学发光免疫分析法在临床、食品安全和环境分析等方面的应用。目前在临床上主要应用于激素、肿瘤标志物、心肌标志物、传染病等⁽³²⁻³³⁾的检测,为了提高诊断准确性,减少漏检等误差,结合多种抗原抗体联检取得了良好的效果。第四代雅培的艾滋病毒化学发光检测试剂盒,采用艾滋病毒的 P24 抗原和 HIV1/HIVII 型抗体联检,大大提高了检测的准确度和灵敏度,有效的减少了漏检的发生。

自从 20 世纪 60 年代开始,现代电子技术和高灵敏度的光电传感器的发展,提供了许多研究和测定化学发光的新手段,对该领域的发展起到了极大的推动作用而迅速发展。近年来,化学发光

表2 常见的化学发光免疫分析仪器技术参数

Table 2 Technical parameters of common chemiluminescence immunoassay instruments

仪器型号	Cobas e601	Architect i2000SR	Unicel DxI 800	Immulite 2000	LIAISON	Vitros 3600	AIA-2000	MAGLUMI 4000
生产厂家	罗氏	雅培	贝克曼	西门子	索灵	强生	东曹	新产业
反应原理	ECLIA	CLIA	CLEIA	CLEIA	CLIA	CLEIA	CLEIA	CLIA
标记底物	三联吡啶钨	吖啶酯	AMPPD	AMPPD	ABEI	鲁米诺	4-MUP	ABEI
固相载体	磁珠	磁珠	磁珠	塑料珠	磁珠	塑料管	磁珠	磁珠
样本位	150	150	120	90	120-144	90	200	144
试剂位	25	25	50	24	15	31	48	25
检测速度(测试)	170/h	200/h	400/h	200/h	180/h	189/h	200/h	280/h

的发展主要表现在:(1)化学发光使用的试剂以及原料的制备标记等研究和发展;(2)新化学发光体系和条件的不断建立和优化;(3)新型纳米材料与化学发光的结合应用;(4)化学发光与其他方法或技术联用,包括流动注射技术、新传感器技术、毛细管电泳分离技术和微流控技术等等,拓宽了化学发光体系的应用范围;(5)化学发光仪器的研究开发,为化学发光的进一步发展创造条件;(6)化学发光分析的应用范围扩大至各个领域。因此,可以预见,化学发光免疫分析法将更多的联用其他技术和材料,提高灵敏度和稳定性,逐步完善自动化、集成化、微型化、智能化和便携性水平,特别是发展多组分的全自动快速检测仪器和 POCT 仪器,应用到更广泛的领域范围。

参考文献

- [1] 李振甲,应希堂,马世俊. 化学发光免疫分析技术的研究现状与展望[J]. 国际检验医学杂志, 2006,27(1):95-97.
- [2] 尹东光,贺佑丰,刘一兵,等. 几种主要化学发光物质的发光性能及其化学发光免疫分析体系[J]. 标记免疫分析与临床, 2002,9(4):225-230.
- [3] Luo J, Cui X, Liu W, et al. Highly sensitive homogeneous chemiluminescence immunoassay using gold nanoparticles as label [J]. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2014,131:243-248.
- [4] He S, Shi W, Zhang X, et al. Beta-cyclodextrins-based inclusion complexes of CoFe₂O₄ magnetic nanoparticles as catalyst for the luminol chemiluminescence system and their applications in hydrogen peroxide detection[J]. Talanta, 2010, 82(1):377-383.
- [5] Nozaki O, Ji XY, Kricka LJ. New enhancers for the chemiluminescent peroxidase-catalyzed chemiluminescent oxidation of pyrogallol and purpurogallin[J]. Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence, 1995, 10(3):151-156.
- [6] Chen Z, Zu Y. Gold nanoparticle-modified ITO electrode for electrogenerated chemiluminescence: well-preserved transparency and highly enhanced activity [J]. Langmuir, 2007,23(23):11387-11390.
- [7] Liu ZM, Yang HF, Li YF, et al. Core-shell magnetic nanoparticles applied for immobilization of antibody on carbon paste electrode and amperometric immunosensing[J]. Sensors and Actuators B-Chemical, 2006,113(2):956-962.
- [8] Zu Y, Bard AJ. Electrogenerated chemiluminescence: 67.Dependence of light emission of the tris (2,2') bipyridylruthenium (II)/tripropylamine system on electrode surface hydrophobicity [J]. Anal Chem, 2001,73(16):3960-3964.
- [9] Martin C, Bresnick L, Juo RR, et al. Improved chemiluminescent DNA sequencing[J]. Biotechniques, 1991, 11(1):110-113.
- [10] Kaar JL. Lipase activation and stabilization in room-temperature ionic liquids[J]. Methods Mol Biol, 2011, 679:25-35.
- [11] Broeke LJP, van denBruijn VG, deHeijnen JHM, et al. Micellar catalysis for epoxidation reactions[J]. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2001,40(23):5240-5245.
- [12] Mousli M, Turki I, Kharnachi H, et al. Recombinant single-chain Fv antibody fragment-alkaline phosphatase conjugate: a novel in vitro tool to estimate rabies viral glycoprotein antigen in vaccine manufacture[J]. J Virol Methods, 2007,146(1-2): 246-256.

- [13] Brockmann EC, Vehniainen M, Pettersson K. Use of high-capacity surface with oriented recombinant antibody fragments in a 5-min immunoassay for thyroid-stimulating hormone[J]. *Analytical Biochemistry*, 2010, 396(2):242-249.
- [14] Holec-Gasier L, Kur J. *Toxoplasma gondii*: Recombinant GRA5 antigen for detection of immunoglobulin G antibodies using enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *Experimental Parasitology*, 2010,124(3):272-278.
- [15] Busse C, Strubel A, Schrittzler P. Combination of native and recombinant cytomegalovirus antigens in a new ELISA for detection of CMV-specific antibodies [J]. *J Clin Virol*, 2008,43(2):137-141.
- [16] Geng J, Jia XD, Zhu J.S onochemical selective synthesis of ZnO/CdS core/shell nanostructures and their optical properties[J]. *Crystengcomm*, 2011,13(1):193-198.
- [17] Deng L, Shan Y, Xu JJ, et al. Electrochemiluminescence behaviors of Eu(3+)-doped CdS nanocrystals film in aqueous solution[J]. *Nanoscale*, 2012,4(3):831-836.
- [18] Fan FR, Park S, Zhu Y, et al. Electrogenated chemiluminescence of partially oxidized highly oriented pyrolytic graphite surfaces and of graphene oxide nanoparticles[J]. *J Am Chem Soc*, 2009,131(3):937-939.
- [19] Guo Z, Hao T, Duan J, et al. Electrochemiluminescence immunosensor based on graphene-CdS quantum dots-agarose composite for the ultrasensitive detection of alpha fetoprotein[J]. *Talanta*, 2012,89:27-32.
- [20] Qian J, Dai HC, Pan XH, et al. Simultaneous detection of dual proteins using quantum dots coated silica nanoparticles as labels[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2011,28(1):314-319.
- [21] Goldman ER, Clapp AR, Anderson GP, et al. Multiplexed toxin analysis using four colors of quantum dot fluororeagents [J]. *Analytical Chemistry*, 2004,76(3):684-688.
- [22] Fu Z, Yang Z, Tang J, et al. Channel and substrate zone two-dimensional resolution for chemiluminescent multiplex immunoassay [J]. *Anal Chem*, 2007,79(19):7376-7382.
- [23] Gomez V, Callao MP. Multicomponent analysis using flow systems[J]. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 2007,26(8):767-774.
- [24] Liu H, Fu Z, Yang Z, et al. Sampling-resolution strategy for one-way multiplexed immunoassay with sequential chemiluminescent detection [J]. *Anal Chem*, 2008, 80(14):5654-5659.
- [25] Ikeda R, Ichiyama K, Tabuchi, N, et al. Determination of folates by HPLC-chemiluminescence using a ruthenium(II)-cerium(IV) system, and its application to pharmaceutical preparations and supplements [J]. *Luminescence*, 2014,29(7):824-830.
- [26] Huang XJ, Wang SL, Fang ZL. Combination of flow injection with capillary electrophoresis 8. Miniaturized capillary electrophoresis system with flow injection sample introduction and electrogenerated chemiluminescence detection [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2002,456(2):167-175.
- [27] Hashimoto M, Tsukagoshi K, Nakajima R, et al. Microchip capillary electrophoresis using on-line chemiluminescence detection [J]. *Journal of Chromatography A*, 2000,867(1-2):271-279.
- [28] Zhao S, Huang Y, Ye F, et al. Determination of intracellular sulphhydryl compounds by microchip electrophoresis with selective chemiluminescence detection [J]. *J Chromatogr A*, 2010,1217(36):5732-5726.
- [29] Wolter A, Niessner R, Seidel M. Detection of *Escherichia coli* O157: H7, salmonella typhimurium, and legionella pneumophila in water using a flow-through chemiluminescence microarray readout system [J]. *Analytical Chemistry*, 2008,80(15):5854-5863.
- [30] Zhang QY, Wang X, Li ZJ, et al. Evaluation of alpha-fetoprotein (AFP) in human serum by chemiluminescence enzyme immunoassay with magnetic particles and coated tubes as solid phases [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2009,631(2):212-217.
- [31] Yazawa Y, Dorishi T, Watanabe K, et al. System-on-fluidics immunoassay device integrating wireless radio-frequency-identification sensor chips [J]. *J Biosci Bioeng*, 2014,118(3):344-349.
- [32] Tong HL, Li J, Wen XY, et al. Clinical value of the combination detection serum tumor markers in cervical cancer [J]. *Labeled Immunoassays & Clin Med*, 2011, 18(3):160-162.
- [33] Ohta H, Takemura M, Furuta N, et al. Clinical significance and problems in HCV measurement—comparison of CLEIA method with PCR method [J]. *Rinsho Byon*, 2004,52(10):813-818.

基于全自动管式化学发光免疫检测系统的人结核感染 T 细胞检测方法的建立

陈鹭颖¹ 林海军² 翁祖星² 徐飞海² 葛胜祥² 张军^{2*}

[摘要] 目的 建立基于化学发光平台的人结核感染 T 细胞检测方法。方法 将一株 γ 干扰素单抗标记在磁微粒上,另一株 γ 干扰素单抗标记在吡啶酯上,然后将检测体系与已有的细胞刺激培养体系相结合。结果 本研究成功建立基于化学发光平台的人结核感染 T 细胞检测方法。以 ELISA 平台检测试剂的检测结果作为参考,该方法的灵敏度为 98.3%,特异性为 99.2%,总体符合率达到 98.8%。结论 该方法具有更高的分析灵敏度(可达 0.27 pg/mL)、更宽的线性范围(1 pg/mL~5 000 pg/mL)、更好的重复性(批内与批间变异系数均 <6.0%)及更易实现高通量检测,为临床诊断结核感染提供了有力的工具。

[关键词] 结核感染 T 细胞; γ -干扰素定量检测; 化学发光

Development of detection kit for T cell infected with *Mycobacterium tuberculosis* based on full-automatic chemiluminescence immune analyzer

CHEN Luying¹, LIN Haijun², WENG Zuxing², XU Feihai², GE Shengxiang², ZHANG Jun^{2*}

(1. Fujian Food and Drug Administration, Fuzhou, Fujian, China, 350003; 2. National Institute of Diagnostics and Vaccine Development in Infectious Diseases, Xiamen University, Xiamen, Fujian, China, 361012)

[ABSTRACT] Objective To develop the detection kit for T cell infected with *Mycobacterium tuberculosis* based on full-automatic chemiluminescence immune analyzer. Methods An antiIFN- γ Mab was coated on the surface of microparticle. Another anti IFN- γ Mab was labelled to acridinium ester. After that, the detection system was combined with the *in vitro* cell culture system. Results This research developed the detection kit for T cell infected with *Mycobacterium tuberculosis* based on full-automatic chemiluminescence immune analyzer. Compared with the testing results of the ELISA kit, the sensitivity, specificity and total matching ratio of the CLIA kit was 98.3%, 99.2% and 98.8%, respectively. Conclusion The CLIA kit has better sensitivity (0.27 pg/mL), wider linear range (1 pg/mL ~ 5 000 pg/mL), and better repeatability (intra and inter coefficient of variation < 6.0%). It makes a high throughput detection available. It will contribute to the clinical diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis*.

[KEY WORDS] T cell infected with *Mycobacterium tuberculosis*; IFN- γ quantitative detection; Chemiluminescent immunoassay

目前全球约有三分之一的人感染了结核分枝杆菌,其中约 10%会进一步发展成为活动性结核^[1]。临床上用于判断结核分枝杆菌感染的最常见

方法是结核菌素皮肤试验 (tuberculin skin test, TST)。但 TST 的特异性较差,阳性结果不能排除非结核分枝杆菌 (*Nontuberculous mycobacteria*,

基金项目:国家高技术研究发展计划(863 计划)(2011AA02A101)

作者单位:1. 福建省食品药品认证审评中心,福建,福州 350003

2. 厦门大学国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心,福建,厦门 361102

*通讯作者:张军, E-mail:zhangj@xmu.edu.cn

NTM)感染,也无法区分是否由接种卡介苗引起^[12]。因此,近年来在欧美发达国家,TST已逐渐被 γ -干扰素释放试验(interferon gamma release assay, IGRA)所取代。IGRA的方法是利用结核分枝杆菌特异性抗原与受试者的新鲜外周全血中的T细胞共同孵育刺激培养,如果受试者受到过结核分枝杆菌感染,那么激活的T细胞会分泌大量的 γ -干扰素,通过 γ -干扰素的定量检测可以判断受试者是否存在结核菌感染。由于IGRA采用结核分枝杆菌特异性抗原(CFP-10和ESAT-6)作为刺激原,不受卡介苗和一些非结核分枝杆菌的影响,其判断结核感染特异性明显高于TST试验^[3,4]。目前国内已上市的IGRA产品主要分为2类,一类为酶联免疫斑点法(enzyme-linked immunospot, ELISPOT),代表试剂为英国Oxford Immnotec的T-SPOT.TB试剂;另一类为体外释放酶联免疫法(tuberculosis interferon gamma release assay, TB-IGRA),代表试剂为澳大利亚Cellestis公司的QFT-GIT试剂和北京万泰的TB-IGRA试剂。ELISPOT方法直接测量外周血中MTB特异T细胞的含量,但需进行淋巴细胞分离培养和ELISPOT斑点计数,其技术水平和实验室条件要求较高,在我国仅能在部分科研单位及大的中心实验室使用。TB-IGRA方法通过检测T细胞在体外抗原刺激后的IFN- γ 释放来间接检测机体特异性T细胞应答。该技术采用全血培养,仅需普通37℃温箱和实验室常规的检测仪器,便于在有一定条件的医疗单位推广使用。目前采用TB-IGRA方法的试剂在 γ -干扰素检测部分均采用传统的酶联免疫分析,而化学发光免疫分析与传统的酶联免疫分析相比,它具有更高的灵敏度、更宽的线性范围、更好的重复性及更容易实现高通量的检测^[7]。本研究基于TB-IGRA原理,采用化学发光免疫分析法^[7,8](chemiluminescent immunoassay, CLIA)建立 γ -干扰素检测体系,并结合已有的细胞刺激培养体系建立了人结核感染T细胞检测方法,评价试剂各项性能指标,在临床检测中与国产主流试剂进行对比,其更宽检测范围等性能的实现,将为 γ -干扰素释放试验(interferon gamma release assay, IGRA)方法在结核病的辅助诊断以及用药后的疗效监测等方面的深入研究与应用提供有力的工具。

1 材料与方 法

1.1 材料和试剂

2株 γ -干扰素单克隆抗体C6H4和8A11、 γ -干扰素抗原、特异性刺激抗原E1C0和阳性刺激抗原PHA均来自厦门大学;磁珠购自Merck公司,吡啶酯原料来自厦门大学;检测仪器CARIS200分析仪及其配套耗材来自厦门优迈科医学仪器有限公司;对照试剂盒采用北京万泰生物药业股份有限公司的结核分枝杆菌相关 γ -干扰素检测试剂盒(体外释放酶联免疫法)。

用 γ -干扰素抗原配制的参考品:L系列参考品(L1-L8,浓度分别为1 pg/mL、5 pg/mL、15 pg/mL、50 pg/mL、150 pg/mL、500 pg/mL、1 500 pg/mL、5 000 pg/mL);精密度参考品CV-1(15 pg/mL)、CV-2(500 pg/mL)。临床样本来自厦门大学。

1.2 方法

1.2.1 磁珠包被单克隆抗体

取磁珠用EDC溶液(10 mg EDC溶于1 mL去离子水)活化,然后加入单克隆抗体C6H4并置于旋转混匀仪上孵育偶联,孵育后用甘氨酸溶液(pH 7.4)进行封闭,完成封闭后保存在含酪蛋白的磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)中。

1.2.2 吡啶酯标记单克隆抗体

取单克隆抗体8A11稀释到合适浓度后加入吡啶酯(溶于甲基甲酰胺中),混匀,室温避光反应;加入赖氨酸溶液(pH 8.0)封闭;最后透析到PBS中,用含酪蛋白的PBS稀释后使用。

1.2.3 刺激培养管的配制

直接在培养管中加入50 μ L 50 mmol/L的PBS,作为本底对照培养管N。用50 mmol/L的PBS将特异性结核杆菌抗原E1C0稀释至50 μ g/mL,每根培养管中加入50 μ L稀释后的E1C0,作为测试培养管T。用50 mmol/L的PBS将阳性抗原PHA稀释至1 mg/mL,每根培养管中加入50 μ L稀释后的PHA,作为阳性对照培养管P。

1.2.4 参考品的配制

用20%婴儿牛血清将 γ -干扰素抗原稀释成所需浓度,-20℃保存备用。

1.2.5 γ -干扰素的体外释放

采集:每个受试者采用静脉穿刺术采集标本,使用肝素抗凝的真空采血管采集。分装:在2 h之

内将采集的全血分装到“本底对照培养管 N”、“测试培养管 T”、“阳性对照培养管 P”3个培养管中。每种培养管加入全血 1.0 mL,分装前需要将采集的全血标本颠倒混匀 3 次以上。培养:将培养管轻柔颠倒 5 次后迅速放入 37℃温箱培养 (22 ± 2)h,培养过程中保持试验管直立。离心:将培养后的全血以 3 000 r/min-5 000 r/min 离心 10 min,取血浆进行检测,注意不可吸到细胞层。

1.2.6 γ-干扰素的测定

通过 CARIS 系统执行测定操作:CARIS 系统先吸取样本转移到反应杯中;向反应杯中加入包被后的磁珠,混匀、孵育并冲洗反应混合物;向反应杯中加入标记后的吡啶酯,混匀、孵育并冲洗反应混合物;添加预激发液和激发液后检测反应复合物的相对发光强度(relative light unit, RLU)。

1.2.7 四参数拟合剂量反应曲线

用 GraphPad Prism 5.01 进行四参数拟合,拟合公式为 $Y = \frac{a-d}{1+(\frac{X}{c})^b} + d$, Y 为测得的 RLU 均值, X 为样品浓度值。

值, X 为样品浓度值。

1.2.8 分析灵敏度的确定

用试剂检测 L 系列参考品,用 GraphPad Prism 5.01 进行四参数拟合试剂剂量反应曲线。然后重复测定基质血清 20 次,计算其平均发光值、标准差 (standard deviation, SD),得出 M+2SD,然后将 M+2SD 的 RLU 值代入试剂盒剂量反应曲线方程中,求出对应的浓度值,即为其分析灵敏度。

1.2.9 精密度的测量

用 3 批试剂分别检测精密度参考品 CV-1 (15 pg/mL)、CV-2 (500 pg/mL),每份标本平行检测 10 次,计算测定值的平均值和 SD,按照公式 $CV = SD / 平均值 \times 100\%$ 计算批内和批间 CV。

2 结果

2.1 分析灵敏度

以 L 系列参考品建立四参数拟合试剂剂量反应曲线,通过重复测定基质血清得出所建立化学发光试剂的检测下限 (分析灵敏度) 为 0.27 pg/mL,而 ELISA 试剂盒的分析灵敏度为 2 pg/mL。

2.2 剂量反应曲线

用试剂重复检测 4 次 L 系列参考品,建立四

参数拟合试剂剂量反应曲线,测量值与标定值的相关系数 (r) 为 0.99997,表明本试剂具有良好的剂量反应关系 (图 1)。

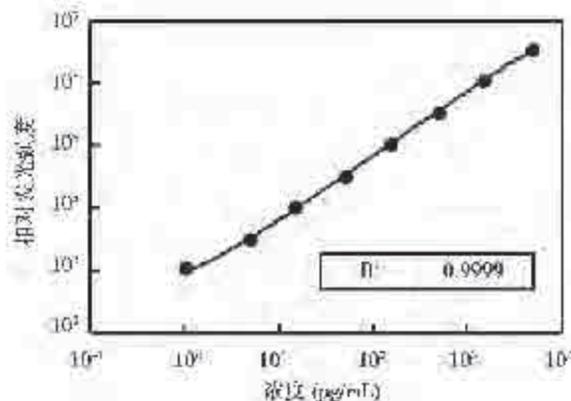


图 1 试剂剂量反应曲线

Figure 1 Dose-response curve of the reagent

2.3 精密度

用 3 批试剂分别检测精密度参考品 CV-1 (15 pg/mL)、CV-2 (500 pg/mL)。结果显示 3 批试剂的批内及批间精密度良好 (表 1)。

表 1 试剂的精密度评价

Table 1 The precision evaluation of reagents

	试剂批次 1	试剂批次 2	试剂批次 3	批间
CV-1	3.9%	5.2%	4.5%	4.8%
CV-2	3.6%	4.4%	3.1%	3.7%

2.4 抗干扰能力

分别考察溶血、黄疸、高脂、类风湿因子 (rheumatoid factor, RF) 等不同干扰因素对试剂检测结果的影响。

2.4.1 溶血

选取 3 份临床确诊为肺结核的标本 (编号分别为 1#-3#),在进行刺激培养前将采集的新鲜血分成 2 组,其中一组进行正常刺激培养,另外一组进行溶血处理后刺激培养,然后检测每份标本的 γ-干扰素含量,从而对检测结果进行判定,结果如表 2 所示。

由表 2 可知,正常培养的 3 份标本检测结果均为阳性,但溶血后对标本进行培养,阳性对照管没有反应,结果判定为不确定,这可能是由于溶血

表2 溶血对检测的影响
Table 2 The influence of hemolysis

标本类型	检测结果		
	1#	2#	3#
溶血前	阳性	阳性	阳性
溶血后	不确定	不确定	不确定

标本中T细胞破裂死亡导致。因此,溶血对本试剂检测结果有较大影响,在标本处理时应避免溶血现象的出现。

2.4.2 黄疸

选取3份临床确诊为肺结核和黄疸的标本(编号分别为4#-6#)、3份临床确诊为非结核但有黄疸的标本(编号分别为7#-9#)进行培养,然后检测每份标本的 γ -干扰素含量,从而对检测结果进行判定,结果如表3所示。

表3 黄疸对检测的影响
Table 3 The influence of jaundice

标本编号	4#	5#	6#	7#	8#	9#
结果判定	阳性	阳性	阳性	阴性	阴性	阴性

由表3可知,临床确诊为肺结核和黄疸的标本用本试剂检测均为阳性,非结核但患有黄疸的标本本试剂检测均为阴性,表明黄疸不会对本试剂检测结果造成影响。

2.4.3 高脂

选取3份临床确诊为肺结核的高脂标本(编号分别为10#-12#)、3份临床确诊为非结核的高脂标本(编号分别为13#-15#)进行培养,然后检测每份标本的 γ -干扰素含量,从而对检测结果进行判定,结果如表4所示。

表4 高脂对检测的影响
Table 4 The influence of hyperlipemia

标本编号	10#	11#	12#	13#	14#	15#
结果判定	阳性	阳性	阳性	阴性	阴性	阴性

由表4可知,3份肺结核标本检测结果为阳性,3份非结核标本检测为阴性,从而表明高脂不会对试剂结果造成影响。

2.4.4 类风湿因子

为考察标本中的RF是否会对本试剂的检测结果造成影响,收集3份IFN- γ 阳性RF阳性标本(编号为16#-18#),3份IFN- γ 阴性RF阳性标本(编号为19#-21#)用本试剂进行检测,结果如表5所示。

表5 类风湿因子对检测的影响
Table 5 The influence of RF

标本编号	16#	17#	18#	19#	20#	21#
结果判定	阳性	阳性	阳性	阴性	阴性	阴性

由表5可知,3份肺结核标本检测结果为阳性,3份非结核标本检测为阴性,从而表明类风湿因子不会对试剂结果造成影响。

2.5 与同类产品的比较

用本试剂与北京万泰生物药业股份有限公司的结核分枝杆菌相关 γ -干扰素检测试剂盒(体外释放ELISA)进行特异性、灵敏度的比较。

用本试剂和ELISA试剂分别检测241份临床标本。由表6结果可知,以北京万泰生物药业股份有限公司的结核分枝杆菌相关 γ -干扰素检测试剂盒(体外释放ELISA)的检测结果为对照,本试剂的特异性为98.3%、灵敏度为99.2%。总符合率达到98.8%。

表6 与ELISA试剂盒的符合率
Table 6 Coincidence rate with the ELISA kit

	ELISA 检测阳性	ELISA 检测阴性	合计	符合率
CLIA 检测阳性	117	1	118	98.8%
CLIA 检测阴性	2	121	123	
合计	119	122	241	

用本试剂与ELISA试剂分别检测82份临床血浆,由图2可知,两者的定量值经过直线回归后,得到的线性回归方程为 $y=0.9930x+0.01128$,相关系数 r 达到0.9833,表明两试剂有良好的相关性。

本试剂与ELISA试剂的主要性能指标对比如表7所示。

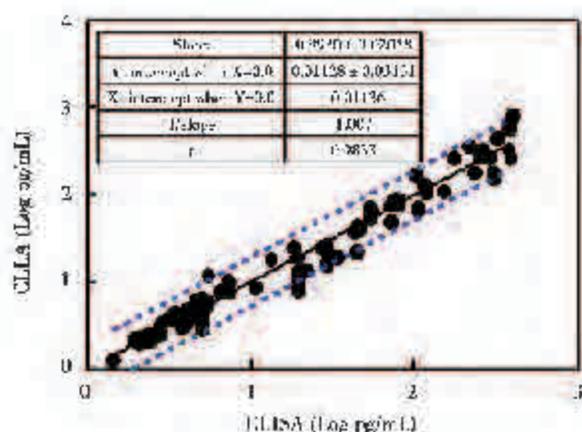


图2 CLIA试剂与ELISA试剂的定量相关性分析

Figure 2 The quantitative correlation analysis between CLIA kit and ELISA kit

表7 CLIA试剂与ELISA试剂的比较

Table 7 Comparison of the CLIA kit and the ELISA kit

灵敏度	剂量反应曲线范围	两者符合率
CLIA法 < 0.5 pg/mL	1 pg/mL~5 000 pg/mL	98.8%
ELISA法 2 pg/mL	12.5 pg/mL~400 pg/mL	

3 讨论

结核病作为可通过空气传播的疾病,其传播能力很强,不易控制。在临床上,TB-IGRA方法在结核诊断与防治上的应用已经越来越被认可并采用^[9,11]。

本研究所建立的人结核感染T细胞检测方法基于全自动管式化学发光免疫检测系统进行 γ -干扰素释放量的定量检测。全自动化学发光免疫检测系统是一个高度集成和自动化的免疫分析系统,包括了免疫反应及光检测系统,样本、试剂和耗材装载系统,液体管路和电器控制系统,用户操作界面等系统,能够实现检测多种项目的一体化操作,大大提高了临床检测的通量与效率。另外,由于其通过反应释放的光子数来只是分析物的浓度,与传统的ELISA相比,其具有更高的灵敏度,更宽的线性范围及更好的重复性。

在临床应用中,现有采用ELISA方法测定 γ -干扰素释放量的商品化试剂盒(北京万泰生物药业股份有限公司)对结果阴阳性的判定中最为重要的一个条件是测试培养管T的 γ -干扰素释放

量相对于本底对照培养管N的 γ -干扰素释放量升高14 pg/mL,而N管的检测值一般是趋近于检测下限的。该ELISA试剂的剂量反应曲线范围为12.5 pg/mL~400 pg/mL,浓度为14 pg/mL样本的检测已经接近其线性范围下限,所以在临床使用中对于操作人员就有较高的要求,对于T管实际 γ -干扰素含量在14 pg/mL附近的样本的检测需要足够的准确,轻微的误差就可能引起对样本阴阳性的判定的不同。而本研究所建立的基于全自动管式化学发光免疫检测系统的 γ -干扰素释放量的定量检测,其检测的线性范围为1 pg/mL~5 000 pg/mL,能够对绝大多数的临床样本的T管作出准确的定量检测。

本方法与现有采用ELISA方法测定 γ -干扰素释放量的商品化试剂盒(北京万泰生物药业股份有限公司)的主要性能对比如表7所示,其灵敏度、线性范围均有大幅提高,且具有良好的抗干扰能力。该方法的建立可为临床检测结核感染提供更加强有力的工具。

参考文献

- [1] World Health Organization. Tuberculosis [J]. Saudi Medical Journal, 2013,34(11):1205-1207.
- [2] Faris AB, Branda JA. QuantiFERON-TB gold assay for tuberculosis infection [J]. Clinical Microbiology Newsletter, 2007,29(17):129-136.
- [3] Winthrop KL. The risk and prevention of tuberculosis: screening strategies to detect latent tuberculosis among rheumatoid arthritis patients who use biologic therapy [J]. International Journal of Advances in Rheumatology, 2010,8(2):43-52.
- [4] Winthrop KL, Nyendak M, Calvet H, et al. Interferon- γ release assays for diagnosing Mycobacterium tuberculosis infection in renal dialysis patients [J]. Clinical Journal of the American Society of Nephrology, 2008, 3(5):1357-1363.
- [5] Richeldi L, Losi M, D'Amico R, et al. Performance of tests for latent tuberculosis in different groups of immunocompromised patients [J]. Chest Journal, 2009, 136(1):198-204.
- [6] Piana F, Codecasa LR, Cavallerio P, et al. Use of a T-cell-based test for detection of tuberculosis infection among immunocompromised patients [J]. European Respiratory Journal, 2006,28(1):31-34.

- [7] G3rniz-Gracia L, Garc3a-Campaf3a AM, Soto-Chinchilla JJ, et al. Analysis of pesticides by chemiluminescence detection in the liquid phase[J]. *Trends in Analytical Chemistry*, 2005,24(11):927-942.
- [8] Tao X, Wang W, Wang Z, et al. Development of a highly sensitive chemiluminescence enzyme immunoassay using enhanced luminol as substrate[J]. *Luminescence*, 2014,29(4):301-306.
- [9] 蒋英,赵蓉,张胜男,等. 干扰素释放酶联免疫法(TB-IGRA)用于检测结核分枝杆菌的优越性[J]. *实用预防医学*, 2012,19(1):24-26.
- [10] Kleinert S, Tony HP, Krueger K, et al. Screening for latent tuberculosis infection: performance of tuberculin skin test and interferon- γ release assays under real-life conditions[J]. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2012, 71(11):1791-1795.
- [11] Mariette X, Baron G, Tubach F, et al. Influence of replacing tuberculin skin test with ex vivo interferon γ release assays on decision to administer prophylactic antituberculosis antibiotics before anti-TNF therapy[J]. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2012,71(11):1783-1790.

2015 循环生物标志物检测与临床应用研讨会通知

各有关单位:

广东省医学会检验分会拟定于2015年11月在广州市广东大厦召开国家级继续教育项目“2015 循环生物标志物检测与临床应用研讨会”,项目编号:2015-11-00-180(国)。本次大会邀请了国内外知名专家教授就循环肿瘤细胞、细胞外囊泡、循环核酸等循环生物标志物的检测及其在人类重大疾病分子诊断、个体化用药等精准医疗领域的临床应用展开学术报告与交流,为我国从事循环生物标志物分子诊断与临床应用的学者搭建专业学术平台。

现将会议相关事项通知如下:

一、会议时间:2015年11月27日-29日。11月27日10:30开始报到,11月27日下午-28日会议。

二、会议地点:广州广东大厦(广州·东风中路309号,电话:020-62739888)

三、收费标准:会务费500元/人(含资料、授课费等),住宿200元/床/天。大会统一安排食宿。住宿及交通费自理,费用回原单位报销。

四、学分授予:会后授予国家级继续教育I类学分6分,项目编号:2015-11-00-180(国)。

五、报名方式:以下任一方式均可:1. 建议登录大会官方网站在线注册:南方检验医学网(www.nflab.net); 2. 手机微信公众账号(NFLAB-NET)易信公众账号(NFLABNET)注册参会; 3. 邮箱注册:将下面报名表格填写后发至邮箱 nflab@126.com。

六、学术咨询:蔡贞(13455046546),亓涛(13688867078,020-62787683)。

欢迎关注大会官方网站:www.nflab.net,或关注大会官方微信、易信了解大会动态。



手机扫描二维码或添加微信号
NFLAB-NET 即可关注最新资讯



我们特邀请您作为正式代表出席。欢迎登陆大会官方网站在线报名参会参加会议相关活动。

广东省医学会
2015年7月1日

硫酸脱氢表雄酮化学发光微粒子免疫法定量测定试剂的研制

黄明聪¹ 张晓璐² 林光华² 翁祖星¹ 孙旭东¹ 葛胜祥³ 张军^{3*}

[摘要] 目的 研制硫酸脱氢表雄酮化学发光免疫定量检测试剂。方法 利用硫酸脱氢表雄酮人工完全抗原免疫小鼠,通过杂交瘤技术制备特异性抗硫酸脱氢表雄酮单克隆抗体,采用竞争抑制法建立硫酸脱氢表雄酮化学发光免疫定量检测试剂。结果 筛选获得了27株稳定分泌抗硫酸脱氢表雄酮的单克隆抗体细胞株,建立了化学发光微粒子免疫法定量测定硫酸脱氢表雄酮的试剂盒雏形,与雅培公司的硫酸脱氢表雄酮定量检测试剂在检测临床标本上的相关系数 r 达0.99以上。结论 本研究为国产化硫酸脱氢表雄酮化学发光微粒子免疫法定量测定试剂盒的研发奠定了基础。

[关键词] 硫酸脱氢表雄酮;化学发光微粒子免疫法;定量试剂盒

Development of chemiluminescent microparticle immunoassay for quantitative determination of dehydroepiandrosterone sulfate

HUANG Mingcong¹, ZHANG Xiaolu², LIN Guanghua², WENG Zuxing¹, SUN Xudong¹, GE Shengxiang³, ZHANG Jun^{3*}

(1. Xiamen Innodx Biotech Co., Ltd, Xiamen, Fujian, China, 361022; 2. Clinical Laboratory Department, Fujian Medical University Union Hospital, Fuzhou, Fujian, China, 350001; 3. National Institute of Diagnostics and Vaccine Development in Infectious Disease, Xiamen University, Xiamen, Fujian, China, 361102)

[ABSTRACT] Objective To develop chemiluminescent microparticle immunoassay for quantitative determination of dehydroepiandrosterone sulfate. Methods Mice were immunized by dehydroepiandrosterone sulfate artificial complete antigen. Monoclonal antibodies against dehydroepiandrosterone sulfate were prepared by hybridoma technique. Chemiluminescent microparticle immunoassay for quantitative determination of dehydroepiandrosterone sulfate was developed based on competitive binding method. Results 27 monoclonal antibodies were obtained. Chemiluminescent microparticle immunoassay for quantitative determination of dehydroepiandrosterone sulfate prototype kit was established. The coefficient r of testing specimens with reagent from Abbott company was over 0.99. Conclusion Development of domestic chemiluminescent microparticle immunoassay for quantitative determination of dehydroepiandrosterone sulfate reagent was laid foundation by this study.

[KEY WORDS] Dehydroepiandrosterone sulfate; Chemiluminescent microparticle immunoassay; Quantitative determination kit

基金项目:国家高技术研究发展计划(863计划)(2011AA02A101)

作者单位:1. 厦门万泰凯瑞生物技术有限公司,福建,厦门361022

2. 福建医科大学附属协和医院检验科,福建,福州350001

3. 厦门大学国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心,福建,厦门361102

*通讯作者:张军, E-mail: zhangj@xmu.edu.cn

注:黄明聪和张晓璐为并列第一作者

硫酸脱氢表雄酮 (dehydroepiandrosterone sulfate, DHEAs) 是脱氢表雄酮 (dehydroepiandrosterone, DHEA) 的硫酸酯形式, 是一种主要由肾上腺皮质分泌的甾醇类激素^[1,2]。作为雄性激素和雌性激素的前体, DHEAs 是人体中含量最丰富的甾醇类物质, 在血清中的含量比 DHEA 高 250-500 倍, 比睾酮高 100-500 倍, 比雌二醇高 1 000-10 000 倍^[3,4]。循环血液中的 DHEAs 并不具备雄性和雌性激素的生物学活性, 运送到靶组织后经脱硫酸化生成 DHEA, 进而转变为不同的雄性和雌性激素化合物, 发挥生物学功能。在临床上, DHEAs 的定量检测常用于多毛症、女性男性化及多囊性卵巢综合症的辅助诊断, 当发生肾上腺肿瘤时 DHEAs 的水平也会异常升高^[5,6]。

DHEAs 的定量检测方法主要有液相色谱-质谱联用法和免疫检测法^[7,8]。液相色谱-质谱法由于其样品前处理复杂, 仪器昂贵, 耗时长, 其应用受到限制。免疫学检测方法包括放射免疫法、酶联免疫法和化学发光微粒子免疫法 (chemiluminescent microparticle immunoassay, CLIA)。其中 CLIA 灵敏度高、线性范围宽、再现性好、易于实现自动化和高通量检测, 已逐渐成为临床检测中的主流方法。目前, 国内只有罗氏、雅培、西门子和贝克曼等国外大公司的 DHEAs CLIA 定量检测试剂上市, 价格昂贵, 研制国产化的 DHEAs 化学发光免疫定量检测试剂十分必要。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 试剂

人工完全抗原 DHEAs-BSA、DHEAs-OVA 由本实验室自行合成, 弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂购自 Sigma 公司, 吡啶酯来自于厦门大学。

1.1.2 临床血清标本

临床血清标本来源于厦门大学。

1.1.3 仪器

Berthold Sirius 单管式化学发光检测仪为德国 Berthold Technologies 公司产品; PHOMO 全自动酶标仪为安图生物公司产品。

1.1.4 实验细胞、动物

骨髓瘤细胞 Sp2/0-Ag14 由本实验室保存; Balb/c 小鼠和 F1 小鼠均购自上海斯莱克实验动

物有限责任公司。

1.1.5 耗材

细胞培养板购自美国 Thermo Nunc 公司; 96 孔酶标板购自厦门怡佳美实验器材有限公司; 细胞冻存管为德国 Greiner 公司产品; 磁微粒 Dynabeads M-270 购自美国 Lifetechnologies 公司。

1.2 方法

1.2.1 小鼠免疫

取 6-8 周龄的 Balb/c 小鼠, 人工完全抗原 DHEAs-BSA 和佐剂乳化后皮下注射小鼠, 初次免疫注射 100 μ g 抗原, 加强免疫注射 50 μ g 抗原, 免疫间隔周期为 3w, 加强免疫 3 针后, 眼眶后静脉丛采血 4-6 滴, 分离血清后检测血清效价, 取效价高的小鼠进行脾脏免疫。

1.2.2 单克隆抗体的筛选

小鼠脾脏免疫 72 h 后取脾脏细胞与骨髓瘤细胞融合, 融合 5 d-7 d 后换液, 间接酶联免疫吸附试验和间接竞争酶联免疫吸附试验筛选阳性克隆, 采用有限稀释法进行杂交瘤细胞的克隆化。

1.2.3 单克隆抗体的制备

取 F1 小鼠, 向腹腔中注射 0.5 mL 的液体石蜡油; 3 d 后, 向腹腔中注射对数生长期的杂交瘤细胞约 1×10^6 个; 7 d-14 d 后, 抽取腹水, 离心取上清。上清经饱和硫酸铵沉淀后用 Protein A 亲和层析柱纯化单克隆抗体。

1.2.4 磁珠包被

磁微粒用 MEST (10 mmol/L MES, pH 6.0, 0.05% Tween 20) 洗涤 2 次后加入新配制的 EDC 活化 30 min, 用 MEST 洗涤 2 次; 加入抗体或抗原, 37 $^{\circ}$ C 反应 3 h; 用 MEST 洗涤 5 次, 用含 2% 酪蛋白的磷酸盐缓冲液重悬后于 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.5 吡啶酯标记

取 50 μ g 抗原或抗体加入到 600 μ L 0.1 mol/L 的 PBS (pH 8.0) 中, 加入 5 μ L 1 mmol/L 吡啶酯, 混匀, 室温避光反应 1 h; 加赖氨酸溶液反应 15 min, 然后 4 $^{\circ}$ C 透析至 20 mmol/L pH 6.5 的 PBS 中 12 h。

1.2.6 间接竞争酶联免疫吸附试验

包被: 包被抗原用 20 mmol/L 的 CBS (pH 9.6) 稀释至 2 μ g/mL, 每孔加 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中放置 2 h。封闭: 取出酶标板, 用 PBST (20 mmol/L PBS, pH 6.0, 0.1% Triton-X100) 洗 1 遍。

每孔加入 180 μL 封闭液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中放置 2 h。弃去封闭液, 将板拍干。加样: 加入梯度稀释的血清或细胞上清和梯度稀释的 DHEAs 各 50 μL , 混匀后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中孵育 30 min, PBST 清洗 5 遍。加酶标二抗: 每孔加入酶标二抗 100 μL , 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中孵育 30 min, PBST 清洗 5 遍。显色: 将混合后加 100 μL 于孔中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中孵育 15 min。终止并读值: 2 mol/L 硫酸终止反应, 用酶标仪读值。

1.2.7 管式化学发光免疫分析实验

1.2.7.1 竞争模式一 向微孔板中依次加入包被 DHEAs-BSA 的磁微粒 50 μL 、梯度稀释的 DHEAs 20 μL 和按 1:500 稀释的吡啶酯标记 DHEAs 单克隆抗体 50 μL , 水浴 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 25 min; 用 PBST (20 mmol/L PBS, pH 6.0, 0.1% Triton-X100) 洗 4 遍; 将反应孔中的磁微粒转移至反应杯中, 用单管式化学发光检测仪检测发光值。

1.2.7.2 竞争模式二 向微孔板中依次加入 50 μL 包被 DHEAs 单克隆抗体的磁微粒, 20 μL 梯度稀释的 DHEAs, 50 μL 按 1:500 稀释的吡啶酯标记 DHEAs-BSA, 水浴 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 25 min; 用 PBST (20 mmol/L PBS, pH 6.0, 0.1% Triton-X100) 洗 4 遍; 将反应孔中的磁微粒转移至反应杯中, 用单管式化学发光检测仪检测发光值。

1.2.7.3 DHEA 对 DHEAs 定量检测的干扰 向微孔板中依次加入 50 μL 包被 DHEAs 单克隆抗体的磁微粒, 分别加入 20 μL 同等浓度的 DHEAs、DHEA 及 DHEAs 和 DEHA 的混合物, 50 μL 按 1:500 稀释的吡啶酯标记 DHEAs-BSA, 水浴 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 25 min; 用 PBST (20 mmol/L PBS, pH 6.0, 0.1% Triton-X100) 洗 4 遍; 将反应孔中的磁微粒转移至反应杯中, 用单管式化学发光检测仪检测发光值。

2 结果

2.1 DHEAs 单克隆抗体的制备

2.1.1 小鼠免疫和单克隆抗体筛选 小鼠加强免疫 3 针后, 血清效价达 $1:2 \times 10^5$ 以上, 间接竞争 ELISA 的结果显示免疫血清中存在 DHEAs 和 DHEA 特异性抗体 (图 1)。选择效价高的小鼠取脾脏与骨髓瘤细胞融合并进行单克隆抗体的筛选。

结合间接 ELISA 和间接竞争 ELISA 筛选 DHEAs 特异性抗体, 获得了 27 株稳定分泌抗 DHEAs 抗体的杂交瘤细胞。

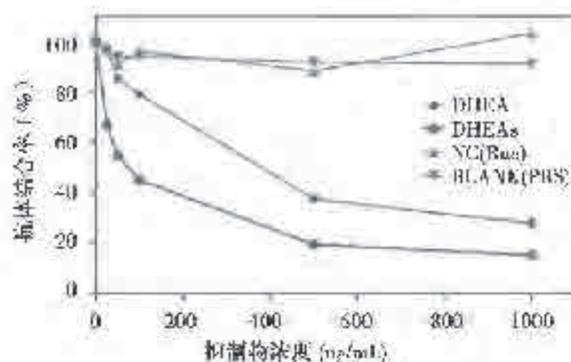


图 1 DHEAs-BSA 免疫小鼠血清的竞争抑制性
Figure 1 Competitive inhibition ability of DHEAs-BSA immune serum

2.1.2 单抗性质鉴定

27 株 DHEAs 单克隆抗体的效价均在 $1:1 \times 10^5$ 以上, 均特异性识别 DHEAs, 不与氢化可的松、甲羟孕酮、 β -雌二醇发生交叉反应, 但能结合 DHEA (图 2)。其中 2D1、3C4 两株单抗对 DHEAs 的亲合力明显高于对 DHEA 的亲合力, 选择这 2 株单抗作为试剂建立的原料。

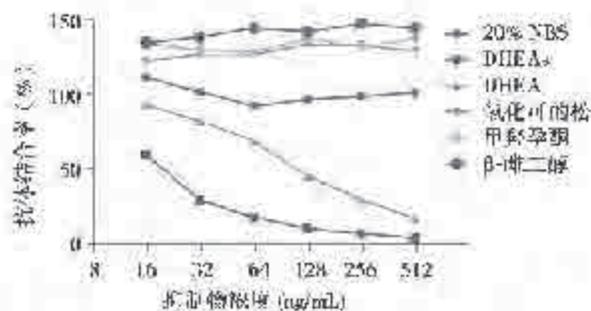


图 2 DHEAs 单克隆抗体的竞争抑制性
Figure 2 Competitive inhibition ability of DHEAs Mabs

2.2 DHEAs 化学发光免疫定量测定法的建立

2.2.1 竞争模式的选择

分别用 DHEAs-BSA 抗原和 DHEAs 单克隆抗体包被磁微粒, 并用吡啶酯标记 DHEAs-BSA 抗原和 DHEAs 单克隆抗体, 以竞争抑制法建立 DHEAs 的化学发光免疫测定方法, 检测系列稀释的 DHEAs。用双对数法拟合剂量反应曲线, 结果显示 2 种竞争模式的定量检测结果与样品稀释倍数均有较好的线性相关, 但标记抗体的斜率更优 (表 1)。

表1 标记抗体或抗原模式所建立的 CLIA 检测系列稀释样品的线性方程

Table 1 Linear equation of CLIA test series diluted sample based on antibody or antigen labeled pattern

吖啶酯标记物	磁珠包被物	双对数线性方程	R ²
DHEAs-BSA	DHEAs 2D1	y = 0.4511x + 6.5609	0.9619
DHEAs-BSA	DHEAs 3C4	y = 0.5225x + 5.9748	0.9903
DHEAs 2D1	DHEAs-BSA	y = 1.0564x + 7.5028	0.9772
DHEAs 3C4	DHEAs-BSA	y = 1.0120x + 6.6467	0.9935

2.2.2 DHEA 对 DHEAs 定量检测的干扰

在同等浓度下,抗体对 DHEAs 显示出更高的亲和力(图 3),当 DHEAs 和 DHEA 以同等浓度存在时,DHEA 并不影响抗体与 DHEAs 的结合,加上生理条件下 DHEAs 的浓度是 DHEA 的 250-500 倍^[3,4],因此检测临床标本时,DHEA 对 DHEAs 定量检测影响很小。

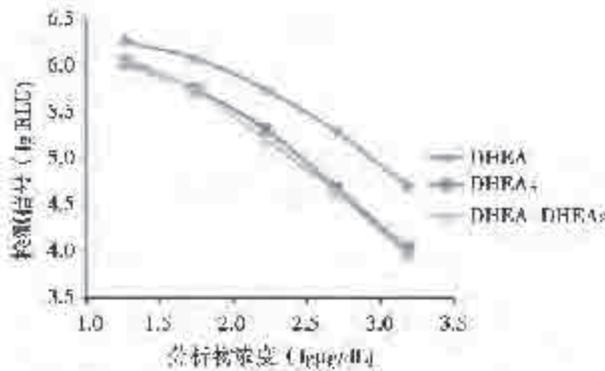


图3 DHEA 对检测的干扰

Figure 3 Interference of DHEA on detection

2.2.3 与国际主流同类产品的初步比较

选取 35 份不同背景值的临床血清标本,分别用 Abbott DHEAs 定量测定试剂盒和本研究建立的 DHEAs CLIA 法定量测定试剂检测 DHEAs 的含量,结果显示本研究建立的试剂盒与 Abbott 的试剂盒在检测临床血清标本上相关性良好,相关系数 r 在 0.99 以上(图 4)。

3 讨论

决定化学发光免疫定量测定试剂性能的参数主要有检测灵敏度、线性范围、特异性等。对于小分子半抗原的免疫定量检测试剂,特异性是影响其检测准确性的一个重要因素。DHEAs 是小分子半抗原物质,外周血中存在着许多结构类似的甾

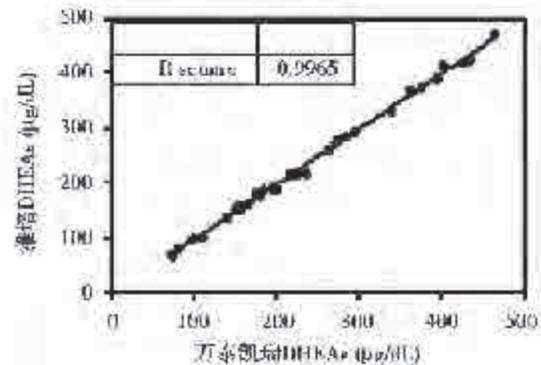


图4 临床血清标本检测相关性评价

Figure 4 Correlation of measuring specimens

醇类激素化合物,此外还有 DHEA 在化学结构上与其只相差一个磷酸基,因此,难以获得 DHEAs 高特异性抗体。本研究中筛选获得的单克隆抗体均能特异性地识别 DHEAs,与 β-雌二醇、甲羟孕酮、氢化可的松这三种甾醇类激素均无交叉反应,且部分抗体对 DHEAs 的亲和力明显高于 DHEA,选用此类抗体使得 DHEA 对 DHEAs 的定量检测影响很小。并且在人血清中 DHEAs 的含量比 DHEA 高 250-500 倍^[3,4]。因此本研究中建立的 DHEAs CLIA 定量检测试剂虽然对 DHEA 有一定的交叉反应,但其对临床标本的检测影响很小。

本研究筛选获得了 DHEAs 特异性的单克隆抗体,建立了 DHEAs 化学发光微粒子免疫检测法定量检测锥形试剂盒,初步评价特异性和定量准确性良好。

参考文献

- [1] Van Voorhees EE, Dennis MF, Calhoun PS, et al. Association of DHEA, DHEAS, and cortisol with childhood trauma exposure and posttraumatic stress disorder[J]. International Clinical Psychopharmacology, 2014, 29(1):56. (下转第 322 页)

人肌红蛋白化学发光免疫分析定量检测方法的建立及性能评价

王楠* 彭波 李基 廖亮亮

【摘要】 目的 利用化学发光免疫分析技术,建立一种人肌红蛋白(myoglobin,MYO)定量检测方法。方法 采用基于化学发光免疫分析的双抗体夹心法(以纳米磁微粒为固相载体包被抗人MYO抗体,以另一抗体交联碱性磷酸酶为标记物)研制MYO化学发光免疫定量检测试剂盒。并进行性能评估及临床试验。结果 该检测方法的线性范围为(1.0~2 500)ng/mL;灵敏度为1.0 ng/mL;批内精密度和批间精密度均小于5%;添加回收率在(100±5)%以内(平均回收率101.92%);当样本中的MYO浓度为40 000 ng/mL时,未发现钩状效应;试剂在37℃放置72h后,稳定性良好,各性能指标均达到要求;相关性试验结果 $r > 0.98$,相关性方程为 $y=0.9837x-8.9256$,与Beckman肌红蛋白测定试剂盒(化学发光法)的一致性结果良好。结论 本研究建立的MYO化学发光免疫分析定量检测方法的各项性能指标均达到了临床检测要求,可用于临床血清MYO检测。

【关键词】 肌红蛋白; 化学发光免疫分析(CLIA); 急性心肌梗死

Establishment and performance evaluation of the quantitative detection for myoglobin based on chemiluminescent immunoassay

WANG Nan*, PENG Bo, LI Ji, TANG Liangliang

(Shanghai Kehua Bioengineering Co., Ltd, Shanghai, China, 200235)

[ABSTRACT] Objective To establish a quantitative detection method for myoglobin (MYO) by chemiluminescent immunoassay. Method Applying double "sandwich" immunoassay method (one anti-human MYO antibody coated on the paramagnetic particle was used for capturing, and the other anti-human MYO antibody labeled with alkaline phosphatase was used for tracing) to develop a MYO chemiluminescent quantitative detection kit. The analytical performance of the established assay was further evaluated by a series of analysis. Results The linear range of the MYO quantitative detection kit was (1~2 500) ng/mL. The limit of blank was 1 ng/mL. The within-run %CV and between-run %CV were all < 5%. The spiking recovery for accuracy was < (100±5)%. There was no hook effect when the sample with 40 000 ng/mL MYO. The thermal stability result showed that the kit was stable at 37℃ for 72 hours. The correlation coefficient of clinical comparison test with Beckman ACCESS was $r > 0.98$ and the consistency analysis with the Bland-altman was > 95%. Conclusion The method of MYO by chemiluminescent immunoassay which established in this study has reached the satisfaction of a diagnostic kit and could be applied for the detection of human MYO in serum.

[KEY WORDS] Myoglobin (MYO); Chemiluminescent immunoassay (CLIA); Acute myocardial infarction (AMI)

基金项目:国家高技术研究发展计划(863计划)(2011AA02A101)

作者单位:上海科华生物工程股份有限公司,上海 200235

*通讯作者:王楠, E-mail:wangnan@skhb.com

肌红蛋白(myoglobin, MYO)是由一条肽链和一个血红素辅基组成的结合蛋白,大量存在于横纹肌(骨骼肌以及心肌)细胞中的血红素蛋白。心肌或者骨骼肌受损时,肌红蛋白会因为细胞膜的破裂而被释放到血管系统,可以在血液检测到^[1]。

在急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)患者发病后1 h - 3 h血内肌红蛋白浓度迅速升高,12 h时几乎所有AMI患者的肌红蛋白都升高^[2]。因此胸痛发作6 h - 12 h内肌红蛋白不升高是排除AMI良好的指标(即阴性指标),同时也是早期检测AMI最快的指标^[3]。由于在AMI后血中肌红蛋白很快从肾脏清除,发病18 h - 30 h内可完全恢复到正常水平,所以肌红蛋白的测定有助于在AMI病程中观察患者有无再梗死或梗死再扩展病症,同时也是溶栓治疗中判断有无再灌注的较敏感而准确的指标^[4-5]。

目前关于MYO的测定主要有免疫比浊法和化学发光法。免疫比浊法灵敏度低、且定量准确度差。化学发光是美国心脏协会推荐的MYO测定方法^[6]。化学发光免疫分析法(chemiluminescent immunoassay, CLIA)将免疫学反应与化学发光进行了偶联,与ELISA、RIA相比较,灵敏度、抗干扰能力及特异性要远远高于前两者,不会对环境和操作人员产生任何影响,而且操作简单反应速度更快^[7]。为促进我国急性心肌梗死的诊断水平,本研究建立一种基于纳米磁微粒作为固相载体的化学发光免疫分析法的MYO定量检测方法。

1 材料与方法

1.1 标本来源

本研究所使用的测试用血清标本均采集于上海同济医院疑似AMI患者的静脉血,采集后于-20℃以下保存。

1.2 试剂

基因工程重组MYO抗原由上海科华生物工程股份有限公司制备,抗MYO小鼠单克隆抗体对(MYO1、MYO2)由上海科华生物工程股份有限公司制备,碱性磷酸酶购自于罗氏诊断公司,纯化正常鼠IgG由上海科华生物工程股份有限公司制备,Tru block阻断剂购自美国Meridian公司,预活化纳米磁微粒由上海科华生物工程股份有限公司

制备。牛血清白蛋白(BSA, Protease Free)购自于美国MP BIO公司,酪蛋白(casein)购自美国Sigma公司,心肌标志物复合质控品(645)购自于美国Bio-Rad公司,化学发光底物(AMPPD)购自于美国Lumigen公司。

1.3 仪器

科华卓越C1800全自动化学发光免疫分析仪由上海科华实验系统有限公司研制。相关性测试的参比试剂选择美国Beckman Coulter Access2微粒子化学发光免疫分析仪及配套的MYO试剂盒,仪器及试剂均由上海同济医院提供。

1.4 双抗体夹心法CLIA方法的建立

1.4.1 捕获抗体工作液的制备

抗MYO小鼠单抗与经过预活化的磁微粒按6 μg抗体/1 mg磁珠的比例进行交联,交联了抗体的磁微粒后通过封闭、洗涤、热处理及超声后,以0.4 mg/mL的浓度悬浮于50 mmol/L TBS, pH = 8.0 (5 g/L BSA, 0.2 g/L TRU Block, 0.1 g/L 正常纯化鼠IgG, 1 g/L Procline300)溶液中,2℃ - 8℃保存备用。

1.4.2 标记抗体工作液的制备

采用过碘酸钠法^[8],将抗MYO小鼠单抗与碱性磷酸酶以1/1的质量比进行标记,标记完成的碱性磷酸酶结合物以4 μg/mL的浓度溶解于50 mmol/L TBS(含1 mmol/L MgCl₂, 5 g/L BSA, 0.2 g/L TRU Block, 0.1 g/L 正常纯化鼠IgG, 1 g/L Procline300) pH = 7.5的溶液中,制得标记抗体工作液,2℃ - 8℃保存备用。

1.4.3 校准品制备及定值

将基因工程重组MYO抗原溶解于含BSA的Tris-HCl缓冲液中,用缓冲液配制成浓度为100 000 ng/mL的抗原浓缩液,采用称重法配制成两组浓度为0 ng/mL, 50 ng/mL, 200 ng/mL, 800 ng/mL, 1 500 ng/mL及2 500 ng/mL的校准品。通过对10例浓度均匀分布在线性范围内的临床样本进行比对试验,计算与参考试剂结果之间的相关性和线性方程,最后用线性方程的斜率调整校准品定值。

1.4.4 试剂盒测定模式

本试剂盒采用一步法模式进行测定,在一次性反应杯中分别加入20 μL样本、100 μL捕获抗体和70 μL标记抗体37℃孵育15 min,洗涤,加入

化学发光底物:AMPPD[3-(2'-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3'-磷酸氧基)苯-1,2-二氧杂环丁烷],仪器自动对酶促反应产生的相对发光强度(relative luminescence intensity,RLU)进行测定,最后通过校准曲线读出待测抗原的浓度值。

1.4.5 试剂盒优化

通过使用不同封闭蛋白配制成封闭液对交联了抗体的磁微粒进行封闭,考察其封闭效果;通过分别改变捕获抗体及其包被浓度和标记抗体浓度,进行正交试验确定最佳的抗体工作浓度。

1.5 试剂盒性能评估

(1)灵敏度:参考EP17-A^[9],重复测定空白样本25次并计算测定结果RLU的平均值(mean,M)和标准差(standard deviation,SD),将零点校准品和第一点校准品的浓度相对RLU值进行两点线性回归拟合得出一次方程,然后将M+2SD的RLU值代入上述方程中,求出对应的浓度值,即为空白限。(2)线性:参考EP6-A^[10],分别选择MYO接近并高于线性范围上限的高浓度样本和接近并低于线性范围下端的低浓度样本进行不同比例的混合得出7个不同浓度的线性样本,最后计算测试结果与理论浓度之间的偏差。(3)精密度:用3批试剂对低、中、高三水平浓度的样本均重复测定20次,计算3批试剂的批内精密度和批间精密度。(4)添加回收率:将1份具有一定浓度的MYO样本以1:9的比例添加到正常人血清中,计算其添加回收率。(5)抗干扰性:在已知MYO浓度的血清中添加一定浓度的胆红素、血红蛋白、甘油三酯、RF,并测试HAMA阳性样本考察试剂盒的抗干扰能力。(6)37℃热稳定性:将试剂盒于37℃条件下放置3天后再次对其进行性能评估和样本测试,考察试剂盒的热稳定性。(7)钩状效应:配制MYO理论浓度为5000 ng/mL、10000 ng/mL、20000 ng/mL和40000 ng/mL的样本,用本研究建立的试剂盒进行测定,考察试剂盒的钩状效应。(8)方法学比对:以美国Beckman coulter ACCESS2 MYO 试剂盒作为参比试剂,测试126份临床样本,考察测定结果与参比试剂的相关性及一致性。

2 结果

2.1 校准品制备和定值

MYO至今尚没有国际标准品可供选用,参考

ISO17511^[11],如果要完成试剂盒的溯源以及校准品的定值,需要选择合适的参考测定程序,通过测定的临床样本为校准品进行定值。本实验所选定的参考测定程序为Beckman coulter ACCESS2 MYO 试剂盒。对10例临床样本的比对测定结果如表1所示,人源抗原配制的校准品对样本的测定结果与参比试剂结果的偏差在15%以内,相关系数 $r > 0.99$,相关性方程斜率为0.90,因此将校准品的理论浓度即0 ng/mL,50 ng/mL,200 ng/mL,800 ng/mL,1500 ng/mL及2500 ng/mL同时除以0.90即得到校准品的最终定值为:0 ng/mL,55.56 ng/mL,222.2 ng/mL,888.9 ng/mL,1666.7 ng/mL及2777.8 ng/mL。

表1 不同校准品的测试结果
Table 1 Measurement results of different calibrators

样本	参比试剂测定结果(ng/mL)	科华试剂测定结果(ng/mL)	偏差
样本1	2.9	2.54	12%
样本2	10.7	9.69	9%
样本3	25.6	22.37	13%
样本4	60.4	52.11	14%
样本5	79.5	71.92	10%
样本6	197.3	174.52	12%
样本7	691.1	635.21	8%
样本8	1514.5	1370.6	10%
样本9	1842.4	1709.2	7%
样本10	2238.5	1990.1	11%

$y = 0.9046x + 1.0938, r > 0.99$

2.1.1 磁珠封闭液中的封闭蛋白的摸索

磁珠交联过程中封闭环节对于测试至关重要。无论对于非特异反应的封闭作用还是对于灵敏度的提升都有着重要意义。本研究选择了2种主要的封闭蛋白进行比较,其中抗体交联比例为4 μg抗体/1 mg磁微粒,固定捕获抗体工作液浓度为0.4 mg/mL及标记抗体工作液浓度为4 μg/mL,结果如表2。从本底发光值、信噪比以及质控测试的准确度来看,BSA的封闭效果均优于酪蛋白的封闭效果。

2.1.2 试剂盒各试剂浓度优化

本实验采用了3种浓度的捕获抗体工作液,磁微粒浓度分别为0.2 mg/mL、0.4 mg/mL、0.6 mg/mL;3种标记抗体工作液,浓度分别为2 μg/

表2 封闭蛋白对于测试结果的影响

Table 2 Effect of the blocking proteins for assay

封闭蛋白	BSA(浓度 5 g/L)	酪蛋白(浓度 5 g/L)
C1 发光值(RLU)	823	1547
C2 发光值(RLU)	67812	42123
C2/C1 值(信噪比)	82.39	27.23
质控 L1(49.5 ng/mL)	57.62	81.24
质控 L2(98.7 ng/mL)	110.41	131.51
质控 L3(229.6 ng/mL)	247.93	298.17

C1 为校准品第一点, C2 为校准品第二点

mL、4 μg/mL、6 μg/mL 进行正交试验, 每组实验所使用的固相捕获抗体都采用 3 种抗体-磁珠交联比例, 交联比例为 3 μg 抗体/1 mg 磁珠、6 μg 抗体/1 mg 磁珠及 9 μg 抗体/1 mg 磁珠。通过汇总 27 组数据的校准曲线的线性、本底发光值、信噪比以及质控的测试结果确定捕获抗体工作液浓度为 0.4 mg/mL 以及标记抗体工作液浓度为 4 μg/mL 作为最佳的反应浓度, 该组实验的 3 种不同捕获抗体交联比例实验结果如表 3 和图 1 所示。当包被浓度较低时(3 μg 抗体/1 mg 磁微粒), 反应整体信号值偏低灵敏度较差, 并且整体线性较差, 推测可能是抗体浓度过低导致没有足够的抗体参与反应。随着包被浓度的升高, 测试的发光值上升灵敏度变好, 但是当包被浓度为 9 μg 抗体/1 mg 时在校准品高浓度区域的线性变差, 推测可能是抗体浓度过量导致了明显的线性偏差, 并且 9 μg 抗体/1 mg 磁微粒的交联比例相对于 6 μg 抗体/1 mg 磁微粒的交联比例灵敏度变化不显著。因此确定 MYO 抗体包被磁微粒浓度为 6 μg 抗体/1 mg 磁微粒。

表3 MYO 不同抗体包被浓度对于测试的影响

Table 3 Effects of different antibody coating concentrations for MYO assay

	3 μg 抗体/ 1 mg 磁微粒	6 μg 抗体/ 1 mg 磁微粒	9 μg 抗体/ 1 mg 磁微粒
校准品 1(RLU)	714	871	1942
校准品 2(RLU)	32721	65924	71825
校准品 3(RLU)	118249	344096	357127
校准品 4(RLU)	428342	1740156	2314201
校准品 5(RLU)	781825	3119045	3971234
校准品 6(RLU)	925546	4744636	4985231
S/N 值	45.83	75.69	36.973
相关系数 r	0.9977	0.9995	0.9961

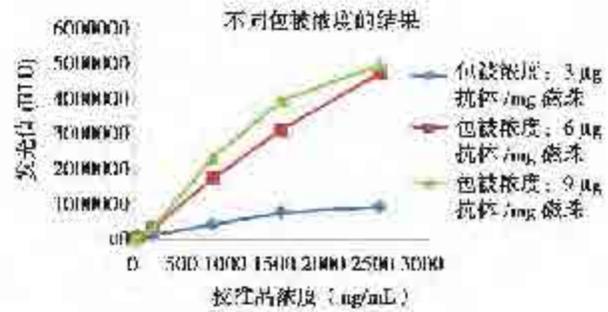


图1 MYO 不同抗体包被浓度对于测试的影响

Figure 1 Effects of different antibody coating concentrations for MYO assay

2.2 MYO 化学发光免疫分析法定量检测试剂盒的性能评估

2.2.1 空白限

将零浓度的校准品进行连续 25 次的重复测定后, 通过 M、SD 的计算得出 MYO 定量测定试剂盒的最低检出限为 0.10 ng/mL。

2.2.2 线性

本研究建立的线性范围拟设定为(1.0 - 2 500.0) ng/mL, 为了对该线性范围进行验证本实验所使用的线性高浓度样本浓度约为 2 600 ng/mL, 线性低浓度样本的浓度约为 0.8 ng/mL。两个样本的具体混合比例及测定结果如表 4 和图 2 所示。测定结果显示, 线性回归系数 $r > 0.999$, 线性样本 3 - 7 的相对偏差在 10% 以内, 当线性样本浓度低于 15 ng/mL 时, 实际测定浓度与理论浓度的绝对偏差在 ± 2 ng/mL 以内, 因为 MYO 的参考值为(17.4 - 105.0) ng/mL (Beckman), 因此当线性样本浓度低于 15 ng/mL 时带来的绝对偏差不会影响最终的临床判定结果, 故本研究建立的 MYO 分析方法的线性范围为(1.0 - 2 500.0) ng/mL。

2.2.3 精密度

本研究所进行的精密度评价为批内精密度。将高、中、低浓度的三水平样本用同一批试剂进行, 每批测试各样本均重复测定 20 次, 批内精密度结果见表 5。3 个水平的样本的批内变异系数 (coefficient of variation, CV) 均小于 5%, 说明研究建立的试剂盒重复性良好。

2.2.4 准确度

将经 1 份浓度约为 200 ng/mL 的 MYO 样本以 1:9 的比例与正常人血清进行混合测定后进行

表4 MYO线性分析结果
Table 4 Results of linearity analysis of MYO

q 样本	理论浓度 (ng/mL)	测定浓度 (ng/mL)	高值线性参考样本参与比例	偏差
线性样本 7	2641.96	2638.5	100%	0%
线性样本 6	1585.96	1590	60%	0%
线性样本 5	529.96	536.5	20%	1%
线性样本 4	133.96	130.25	5%	3%
线性样本 3	15.16	14.11	1%	7%
线性样本 2	2.224	1.13	0.010%	1.094(绝对偏差)
线性样本 1	1.96	0.805	0%	1.155(绝对偏差)

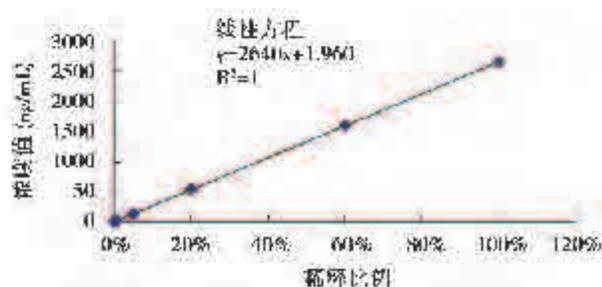


图2 MYO线性方程
Figure 2 Linear equation of MYO

回收试验,其添加回收率为101.92%,说明本研究建立的MYO检测方法的准确度良好,并且基本没有基质效应。

2.2.5 抗干扰性

甘油三酯、血红蛋白、胆红素、类风湿因子以及HAMA对于试剂盒的干扰情况如表6所示,稀释至一定浓度,计算测值偏差,同时测定MYO正常值HAMA样本,具体数据见表6。当样本中存在3 000 mg/dL甘油三酯、750 mg/dL血红蛋白、胆

表5 MYO精密密度结果
Table 5 Results of precision of MYO

样本	Lot 1 均值(n=20)	Lot 2 均值(n=20)	Lot 3 均值(n=20)	批内 CV(%)	批间 CV(%)
样本 1	44.23	45.68	46.89	3.47%	2.92%
样本 2	214.23	231.11	223.37	2.84%	3.79%
样本 3	1501.52	1552.21	1489.25	3.45%	2.20%

红素 30 mg/dL 时对于测试造成的偏差均在 10% 以内。类风湿因子为 1 000 IU/mL 测试的偏差在 15% 以内,对于测试基本没有影响。

2.2.6 热稳定性

将试剂置于 37℃ 条件下保存 3 d 后并进行相关性能评估试验具体结果如表 7 所示,经过热处理后的试剂的各项性能指标均能达到要求,并且测试结果未出现偏差。

2.2.7 钩状效应

用本试剂盒对含有 MYO 浓度分别为 5 000 ng/mL、10 000 ng/mL、20 000 ng/mL 和 40 000 ng/mL 钩状样本进行测定,结果显示浓度值均大于 2 500 ng/mL,说明本试剂盒在样本中 MYO 浓度高达 40 000 ng/mL 时,未出现钩状效应。

2.2.8 方法学比对

通过对上海同济医院收集的疑似急性心肌梗死患者的 126 份血清进行测试,样本分布区间为 (8.6 - 2 587) ng/mL,年龄 22 岁 - 101 岁;男 60 例,女 66 例,同时与 Beckman ACCESS 系统的测定结果进行相关性比对,相关性分析和 Bland-Altman 一致性分析结果见图 3 和图 4 所示。本研究建立的 MYO 试剂与参比试剂 Beckman ACCESS MYO 的相关性良好,相关性方程为 $y = 0.9837x - 8.9256$,相关系数 $r > 0.98$,在统计学意义上无显著差异;通过 Bland-Altman 一致性分析的结果显示,126 例样本中出现了 5 例离群点,得出本研究所建立的试剂(KHB)与参比试剂(Beckman)的一致性为 $(126-5)/126 \times 100\% = 96.03\%$,一致性

表6 MYO 干扰性结果

Table 6 Results of interference

低浓度样本试剂抗干扰实验结果				高浓度样本试剂抗干扰实验结果			
干扰物质	添加浓度	MYO测定浓度 (ng/mL)	测试偏差 (%)	干扰物质	添加浓度	MYO测定浓度 (ng/mL)	测试偏差 (%)
甘油三酯(mg/dL)	0	50.74	N/A	甘油三酯(mg/dL)	0	815.7	N/A
	500	48.25	4.9%		500	831.3	1.9%
	1000	53.49	5.4%		1000	792.5	2.8%
	3000	52.63	1.6%		3000	825.1	1.2%
血红蛋白(mg/dL)	0	51.82	N/A	血红蛋白(mg/dL)	0	801.6	N/A
	250	53.47	3.2%		250	824.3	2.8%
	750	55.21	6.5%		750	834.9	4.2%
	1000	60.83	17.4%		1000	894.3	11.6%
胆红素(mg/dL)	0	51.19	N/A	胆红素(mg/dL)	0	794.5	N/A
	15	48.13	6.0%		150	821.4	3.4%
	30	47.61	7.0%		300	768.6	3.3%
	45	53.82	5.1%		450	782.5	1.5%
RF(IU/mL)	0	52.88	N/A	RF(IU/mL)	0	813.9	N/A
	500	54.91	3.8%		500	854.8	5.0%
	1000	55.32	4.6%		1000	882.4	8.4%
	2000	78.92	49.2%		2000	982.5	20.7%
HAMA 样本 1	N/A	27.53		N/A			
HAMA 样本 2	N/A	34.17		N/A			

表7 MYO 试剂加速热稳定性结果

Table 7 Results of precision of MYO

性能指标	2℃~8℃ 保存 3 d	37℃ 保存 3 d
空白限	0.10 ng/mL	0.12 ng/mL
线性	线性范围(1~2 500)ng/mL	线性范围(1~2 500)ng/mL
添加回收率	101.4%	98.7%
批内精密度	CV<5%	CV<5%
样本 1(ng/mL)	14.82	15.13
样本 2(ng/mL)	88.56	87.97
样本 3(ng/mL)	268.6	255.4

大于 95%。因此通过相关性和一致性分析的结果显示,本研究建立的 MYO 试剂临床样本测试情况良好,准确度可以达到国际试剂盒水平,具有一定的可替代性。

3 讨论

AMI 是人类健康的一大杀手,一个快速准确且预估性强的诊断方法对于降低 AMI 患者的死亡

率具有深远意义。MYO 由于其大量存在于心肌细胞中并且出现时间早,对于早期心肌梗死的诊断具有重要意义,此外 MYO 也是 AMI 阴阳性判断的重要标准。

本研究所建立的化学发光免疫分析技术一方面以纳米磁微粒作为固相载体不仅增加反应的灵敏度还大大提高了试验的抗干扰能力,另一方面在标记系统中以碱性磷酸酶作为化学发光系统不

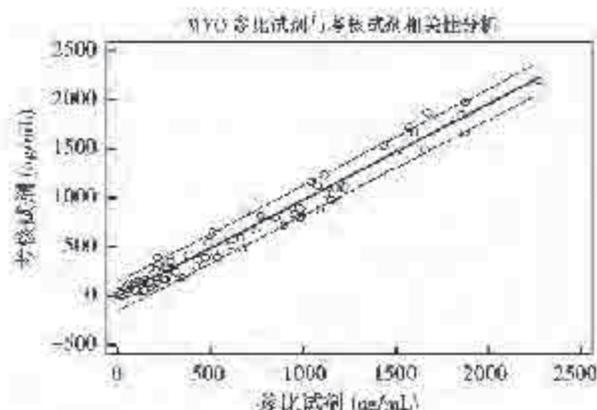


图3 MYO 相关性分析结果

Figure 3 Result of correlation analysis of MYO

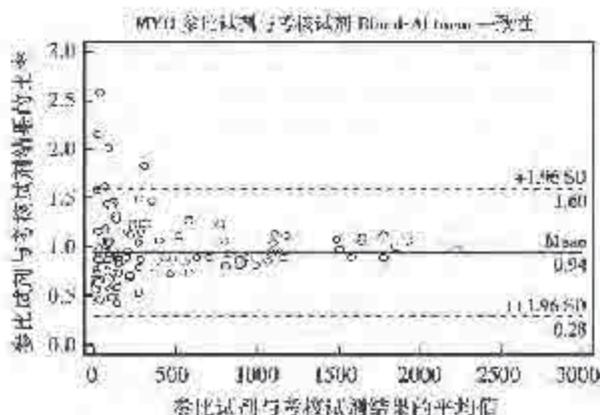


图4 MYO 一致性分析结果

Figure 4 Result of consistency analysis of MYO

仅反应速度快而且灵敏度更高,同时操作简单无毒无害,其代替 ELISA 和 RIA 成为最主流的免疫分析技术也已经是必然趋势。目前国内尚没有成熟的化学发光检测平台,本研究采用一对小鼠单克隆抗 MYO 抗体作为夹心抗体,结合国内首例自主研发的全自动化学发光免疫分析仪(上海科华实验系统有限公司研制),建立了一种定量测定人体血液中 MYO 的双抗体夹心化学发光免疫分析方法,通过一系列的体系优化以及性能评价,实验结果显示该方法已经达到了临床应用的要求,与进口试剂进行方法学比对的相关性 $r > 0.98$ 并且一致性 $> 95\%$,为我国心肌相关疾病的诊断做出了极大的推进。

参考文献

[1] Hendgen-Cotta UB, Kelm M, Rassaf T. Myoglobin functions in the heart [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2014,73:252-259.
 [2] Braunwald E, Antman EW, Beasley JW, et al. ACC/AHA guideline update for the management of patients with unstable angina and Non-ST-Segment elevation myocardial infarction-2002: summary article[J]. American Heart Association, 2002,106(14):1895-1900.
 [3] 姜晖勇. 不典型急性心肌梗死临床特点分析[J]. 临床

医学, 2011,6:2305-2306.
 [4] 杨振华,潘柏申,许俊堂. 中华医学会检验学会文件 心肌损伤标志物的应用准则[J]. 中华检验医学杂志, 2002,25(3):185-189.
 [5] Cannon CD, Brindis RG, Chaitman BR, et al. 2013 ACCF/AHA key data elements and definitions for measuring the clinical management and outcomes of patients with acute coronary syndromes and coronary artery disease [J]. J Am Cole Cardiol, 2013,61(9):992-1025.
 [6] Winter RJ, Koster RW, Vanstraelen JP, et al. Critical difference between serial measurements of MYO mass to detect myocardial damage [J]. Clin Chem, 1997,45:338-343.
 [7] 汪晨,吴洁,宗晨,等. 化学发光免疫分析方法与应用进展[J]. 分析化学, 2012,40(1):3-10.
 [8] Hermanson GT. Bioconjugate techniques [M]. Second edition. London: ELSEVIER, 2008, 802-804.
 [9] National committee for clinical laboratory standards. Protocols for determinations of limits of detection and limits of quantitation; Approved guideline. EP17-A[S], NCCLS document, USA, 2004.
 [10] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures. A statistical approach; Approved guideline. EP6-A[S], NCCLS document, USA, 2003.

人胰岛素定量测定试剂盒化学发光免疫分析法的建立及方法学评价

陈超* 彭波 李基

【摘要】 目的 建立了一种定量测定人血清中胰岛素的化学发光免疫方法,并对其试剂盒性能进行方法学评价。方法 试剂盒采用双抗体夹心法,以磁珠交联的单抗作为捕获抗体,碱性磷酸酶标记的单抗作为检测抗体,分别对本试剂盒的溯源性、参考范围、最低检测限、线性、准确度、精密性、分析特异性、抗干扰性、药物影响及样本比对方面进行评价。结果 用胰岛素 NIBSC 国际标准品(66/304)进行溯源,相关性方程为 $y=1.0335x+0.3349$, 相关系数 $r=0.999$;建立了健康人群空腹血清胰岛素参考范围,覆盖 2.5%~97.5%百分位数人群的参考值范围为 1.59 $\mu\text{IU}/\text{mL}$ ~14.64 $\mu\text{IU}/\text{mL}$; 对此方法建立的试剂进行了方法学评价,最低检测限可达 0.08 $\mu\text{IU}/\text{mL}$;线性在 0 $\mu\text{IU}/\text{mL}$ ~300 $\mu\text{IU}/\text{mL}$ 内,相关系数 $r=0.9999$;精密性 $\text{CV}<8\%$;准确度在 $\pm 10\%$ 之内;当样本中的胰岛素浓度为 200 000 $\mu\text{IU}/\text{mL}$ 时,未发现钩状效应;与 Roche 电化学发光系统测定结果显著相关,相关方程为 $y=0.9541x+0.177$, 相关系数 $r=0.9917$, 两种方法学的测定结果具有较高的一致性。结论 本研究建立的人胰岛素化学发光免疫分析定量检测试剂盒的各项性能指标均达到了临床检测要求,可用于临床血清胰岛素的检测。

【关键词】 胰岛素; 化学发光免疫分析法; 溯源性; 参考范围

Establishment and performance evaluation of the quantitative detection for insulin based on chemiluminescent immunoassay

CHEN Chao*, PENG Bo, LI Ji

(Shanghai Kehua Bioengineering Co., Ltd, Shanghai, China, 200233)

【ABSTRACT】 Objective To evaluate the performance of quantitative detection for insulin based on chemiluminescent immunoassay. Methods Double-antibody-sandwich immunoassay was employed. One monoclonal antibody (McAb) was bonded to the magnetic particles for coating, and another McAb was conjugated with alkaline phosphatase for detecting. Performance of the established assay was evaluated for traceability, reference interval, limit of detection (LOD), linearity, accuracy, precision, analytical specificity, interference, drug interference and samples comparison. Results After tracing to NIBSC international reference material (66/304), the correlation equation of insulin for traceability was $y=1.0335x+0.3349$ and the correlation coefficient (r) was 0.999. The fasting insulin reference interval was established for the healthy population with the value 1.59~14.64 $\mu\text{IU}/\text{mL}$ covering 2.5% to 97.5% population percentile. The limit of detection (LOD) was lower than 0.08 $\mu\text{IU}/\text{mL}$. This assay was designed to be linear across the measurement range of 0~300 $\mu\text{IU}/\text{mL}$ with the value $r=0.9999$. The imprecision (% CV) was less than 8% and the accuracy (% Recovery) was $100\pm 10\%$. The determination results of serum samples were significantly correlated with results tested by Roche Elecsys assay with the value $r=0.9917$. The results of the two assays showed high consistency. Conclusion All the performance characteristics of

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)(2011AA02A101)

作者单位: 上海科华生物工程股份有限公司, 上海 200233

*通讯作者: 陈超, E-mail: chencho@skhb.com

the CLIA kit established by this study met with the requirements for clinical detection. This kit can be applied to the clinical determination of serum insulin.

[KEY WORDS] Insulin; Chemiluminescent immunoassay; Traceability; Reference interval

糖尿病(diabetes mellitus, DM)是一种因体内胰岛素相对不足或难以分泌胰岛素所导致的一系列临床综合征。胰岛素是一个含有51个氨基酸的蛋白激素,它由2条肽链即A链(含有21个氨基酸)和B链(含有30个氨基酸)通过二硫键连接组成,相对分子量为5808^[1,2]。胰岛素的检测在临床中主要应用于糖尿病诊断、低血糖综合征诊断及其他相关疾病的诊断。

进入21世纪后,中国糖尿病患者的总数日益增长,而检测血清胰岛素成为监控及诊断糖尿病中重要的一部分。由于胰岛素的定量检测需要检测速度快、灵敏度高、特异性好、精密性高等要求,且目前主流的胰岛素检测多为进口化学发光法试剂,研制国产的商品化胰岛素化学发光法定量测定试剂盒已成为趋势。这一方面有利于国产试剂的发展,增强国产胰岛素检测试剂的竞争力;另一方面有利于降低国民医疗检测费用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 标准品和质控品

人胰岛素国际标准品(66/304)、C肽国际标准品(84/510)、胰岛素原国际标准品(84/611)、胰岛素样生长因子-1国际标准品(02/254)、人生长激素(80/505)均购自于NISBC(National Institute for Biological Standards and Control,英国国家生物制品检定所);质控品购自于Bio-rad公司,货号为370。

1.1.2 样本

健康人群空腹血清样本来自上海科华生物工程股份有限公司体检血清;临床血清样本来自上海长征医院。

其中,健康人群空腹血清样本入选标准如下:体重质量指数 $<24\text{ kg/m}^2$,收缩压 $<140\text{ mmHg}$,舒张压 $<90\text{ mmHg}$,总胆固醇 $<5.0\text{ mmol/L}$,甘油三酯 $<3.5\text{ mmol/L}$,心电图检查正常,无糖尿病家族史,空腹血糖 $<5.6\text{ mmol/L}$,丙氨酸氨基转氨酶 $<40\text{ U/L}$,肌酐 $<103\text{ mol/L}$,尿酸 $<420\text{ mol/L}$,无现病史及近期手术史,排除孕妇和产妇。

1.2 方法

1.2.1 分析方法

以磁微粒交联的单抗作为捕获抗体,碱性磷酸酶(alkaline phosphates, ALP)标记的单抗作为检测抗体,依次在反应杯中加入待测样本、捕获抗体和检测抗体,于37℃条件下孵育30 min,形成磁微粒-抗体-抗原-酶标记抗体的复合物。洗涤复合物,加入化学发光底物:AMPPD [3-(2'-Spiroadamantane)-4-methoxy-4-(3''-phosphoryloxy) phenyl-1,2-dioxetane, 3-(2'-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3''-磷酸氧基)苯-1,2-二氧杂环丁烷]。AMPPD与ALP进行酶促化学发光反应10 min后,测得相对发光强度单位(relative light units, RLU),并通过标准曲线对待测样本中的抗原含量进行定量测定。

1.2.2 溯源性

1.2.2.1 国际标准品的配制 将胰岛素国际标准品(66/304)复溶于1 mL纯化水中。使用含2 g/L BSA的50 mmol/L Tris-HCl缓冲溶液将胰岛素国际标准品按称重法稀释至一定浓度的标准品溶液系列。

1.2.2.2 公司校准品的赋值 用胰岛素国际标准品(66/304)系列对公司级校准品进行赋值,并用赋值后的校准品和国际标准品同时定标,建立标准曲线,同步测定若干血清样本。由两组标准曲线得到两组不同的测定结果,以国际标准品得到的测定结果为x轴,校准品得到的测定结果为y轴,建立线性回归方程,确定两者测定结果的偏倚程度。

1.2.2.3 参考值范围建立 测定健康人群空腹血清,采用百分位数法建立本试剂盒健康人群空腹胰岛素参考值范围。

1.2.3 方法学评价

1.2.3.1 最低检测限 将零浓度校准品进行测定,重复测定20次,计算20次测定结果RLU的平均值(mean, M)和标准差(standard deviation, SD),得出M+2SD的RLU值,根据零浓度校准品和相邻校准品的浓度-RLU值的结果进行两点回归拟合得出一次方程,将M+2SD的RLU值代入上述方程中,求出对应的浓度值,即为最低检测限。

1.2.3.2 线性 参考 CLSI EP6-A2^[6]文件,将接近线性范围上限的高值样本以样本稀释液稀释 6-8 个浓度梯度。将测定结果和稀释比例用最小二乘法进行直线拟合,并计算线性相关系数 r 。

1.2.3.3 准确度 参考 CLSI EP9-A2^[6]文件,将胰岛素国际标准品稀释至 5 个不同浓度,计算检测值与稀释靶值的相对偏差,计算公式为相对偏差=(测定值-靶值)/靶值 \times 100%。将一定浓度的胰岛素样本加入到正常人血清中,计算添加回收率。

1.2.3.4 精密性 参考 CLSI EP5-A2^[6]文件,将低、中、高浓度样本按照检测程序,每天上下午各测定 1 次,共测定 20 天,计算测定结果的 M、SD 和变异系数(coefficient of variation, CV)。

1.2.3.5 分析特异性 测定一定浓度的 C 肽、胰岛素原、胰岛素样生长因子-1、人生长激素,计算其交叉反应率。

1.2.3.6 钩状效应 配制胰岛素理论浓度为 5 000 μ IU/mL、10 000 μ IU/mL、20 000 μ IU/mL 和 40 000 μ IU/mL 钩状样本,用本研究所建立的试剂盒进行测定,考察试剂盒的钩状效应。

1.2.3.7 干扰性 在已知胰岛素浓度的血清中添加一定浓度的胆红素、血红蛋白、甘油三酯、类风湿因子,考察对胰岛素测定结果的影响。

1.2.3.8 药物影响 考察一定浓度下常见类胰岛素药物(诺和锐、优泌乐、来得时、诺和平)对胰岛素测定结果的影响。

1.2.3.9 37 $^{\circ}$ C 热加速稳定性 将试剂盒置于 37 $^{\circ}$ C 加速破坏,考察试剂盒的热稳定性。

1.2.4 样本比对 以 Roche 胰岛素试剂盒作为参比试剂,考察样本测定结果与 Roche 参比体系的相关性及一致性。

2 结果

2.1 溯源性结果

公司校准品经胰岛素国际标准品赋值后,与国际标准品同时定标测定 15 例血清样本。结果表明,两者的测定相关性良好,相关性方程为 $y=1.0335x+0.3349$ (斜率 95%CI 为 1.0237-1.0432, $P<0.05$),相关系数 $r=0.999$,公司校准品可溯源至国际标准品(66/304)。

2.2 参考值范围建立

测定了 261 份空腹血清样本,并用 SPSS 19.0

软件进行分析。测定结果的均值为 8.69 μ IU/mL,其中测定结果最小值为 1.01 μ IU/mL,最大值为 15.90 μ IU/mL,中位数为 4.71 μ IU/mL。按照百分位数法^[6]对所有测定结果进行分布排序,选取覆盖 2.5% -97.5% 百分位数的参考值范围为 1.59 μ IU/mL -14.64 μ IU/mL,与相关文献报道的空腹血清胰岛素参考范围 1.4 μ IU/mL-14 μ IU/mL 基本吻合^[7]。

2.3 方法学评价

2.3.1 最低检测限

根据零浓度校准品和相邻校准品的浓度-RLU 值的结果进行两点回归拟合得出一次方程,将零浓度校准品的平均值 $M+2SD$ 的 RLU 值代入上述方程中,得到的最低检测限为 0.08 μ IU/mL。

2.3.2 线性

参考 CLSI EP6-A2 文件,将接近 300 μ IU/mL 的高值样本以样本稀释液稀释 6-8 个浓度梯度。将测定结果和稀释比例用最小二乘法进行直线拟合,线性相关系数 r 为 0.9999。结果表明,试剂在 0-300 μ IU/mL 的测定范围内线性相关性良好。

2.3.3 准确度

参考 CLSI EP9-A2 文件,与胰岛素国际标准品的靶值相比,相对偏差在 $\pm 5\%$ 之间,结果见表 1。

表 1 NIBSC 国际标准品测定
Table 1 Determination results of NIBSC international reference material

靶值(μ IU/mL)	测定值(μ IU/mL)	相对偏差
3.00	3.12	4.00%
10.00	9.87	1.30%
30.00	30.56	1.87%
100.0	102.7	2.70%
250.0	246.1	1.56%

将已知浓度的胰岛素样本加入到正常人血清中,测得的添加回收率为 97.6%-102.7%。

2.3.4 精密性

参考 CLSI EP5-A2 文件,分别用 3 批试剂测定胰岛素低、中、高样本测定 20 d 共 40 个测试,结果见表 2。

2.3.5 分析特异性

测定一定浓度的胰岛素原、C 肽、胰岛素样生长因子 1、人生长激素,对测定结果无交叉,具体的测定结果见表 3。

表2 精密性结果

Table 2 Results of precision

样本	测试数量	平均值	分析间精密性		日内精密性		日间精密性		总精密性	
			SD	CV	SD	CV	SD	CV	SD	CV
L1	80	4.96	0.119	2.4%	0.088	1.8%	0.012	0.2%	0.148	3.0%
L2	80	29.88	0.478	1.6%	0.215	0.7%	0.192	0.6%	0.559	1.8%
L3	80	148.6	2.824	1.9%	1.095	0.7%	0.276	0.2%	3.042	2.1%

表3 分析特异性

Table 3 Results of analytical specificity

干扰性物质	浓度	交叉反应率
胰岛素原	100 ng/mL	0.00%
C肽	1000 ng/mL	0.00%
胰岛素样生长因子 I(IGF-1)	1000 ng/mL	0.00%
人生长激素	1000 ng/mL	0.00%

2.3.6 抗干扰性

在已知胰岛素浓度的血清中添加一定浓度的胆红素、血红蛋白、甘油三酯、类风湿因子,对测定结果无明显影响,回收率为90%-110%。具体干扰物质测定结果见表4。

表4 抗干扰结果

Table 4 Results of interference

干扰性物质	浓度	回收率%
胆红素	60 mg/dL	108.3%
血红蛋白	1 000 mg/dL	107.6%
甘油三酯	2 000 mg/dL	105.3%
类风湿因子	2 000 IU/mL	102.1%

2.3.7 药物影响

诺和锐、优泌乐、来得时、诺和平是目前市面上最常见的且临床使用最普遍的4种类胰岛素药物。用含2 g/L BSA的溶液分别将100 IU/mL的诺和锐、优泌乐、来得时、诺和平稀释至1 000 mIU/L、300 mIU/L、100 mIU/L、30 mIU/L 4个浓度梯度,对这些药物的不同浓度梯度进行测定并计算交叉反应率。

从表5的结果可知,本试剂盒对300 mIU/L及以上浓度的诺和锐、诺和平对测定结果有一定的干扰,浓度为300 mIU/L时交叉反应分别达到了3.31%和8.96%,而300 mIU/L浓度以下的诺

和锐、诺和平几乎无明显干扰。而对于来得时、优泌乐来说,1 000 mIU/L的浓度下几乎无明显干扰。由于这4种药物与胰岛素结构近似,所以基本很难确保均无交叉反应。目前市场上的主流试剂对这4种药物均有着不同程度的干扰^[6]。

2.3.8 37℃热加速稳定性

试剂置于37℃ 6 d后,测定样本和质控品的结果无明显变化,相应的性能均能达到试剂盒要求。

2.4 样本比对

测定224例血清样本,与Roche电化学发光系统的测定结果线性相关方程 $y=0.9541x+0.177$ (斜率95%CI为0.9378-0.9705, $P<0.01$),相关系数 $r=0.9917$ 。结果显示,两者具有良好的相关性。

采用Bland-Altman统计学方法对两组测定结果进行分析,以两者的平均值为x轴,两者的比值为y轴作图,结果如图1。测定结果的95%一致性界限($X\pm 1.96SD$)为0.72-1.18,97.77%(219/224)的测定比值在一致性界限内,两者的测定结果具有较高的一致性。

3 讨论

本方法采用磁微粒作为反应的固相载体,利用共价交联的方式提高了单抗的包被效率及检测能力。同时,在相对均一的液相体系中反应,进一步提高了测定结果的敏感性和精密性。通过对本方法建立的试剂盒进行方法学评价,其试剂盒的最低检测限可达0.08 μ IU/mL;线性在0-300 μ IU/mL内,相关系数 $r=0.9999$;精密性 $CV<8\%$;准确度在 $\pm 10\%$ 之内;当样本中的胰岛素浓度为200 000 μ IU/mL时,未发现钩状效应。

血清胰岛素的检测易受外界因素影响,往往在检测过程中受到多种因素的共同影响。外源性

表5 药物干扰
Table 5 Results of drug interference

干扰物质	添加干扰物的浓度	测定结果 (μIU/mL)	交叉反应率%
诺和锐 (Aspart)	1 000 mIU/L	91.22	9.12%
	300 mIU/L	9.95	3.31%
	100 mIU/L	0.00	0.00%
	30 mIU/L	0.00	0.00%
诺和平 (Detemir)	1 000 mIU/L	124.2	12.42%
	300 mIU/L	26.87	8.96%
	100 mIU/L	1.34	1.34%
	30 mIU/L	0.00	0.00%
来得时 (Glargine)	1 000 mIU/L	0.00	0.00%
	300 mIU/L	0.00	0.00%
	100 mIU/L	0.00	0.00%
	30 mIU/L	0.00	0.00%
优泌乐 (Lispro)	1 000 mIU/L	9.92	0.99%
	300 mIU/L	0.00	0.00%
	100 mIU/L	0.00	0.00%
	30 mIU/L	0.00	0.00%

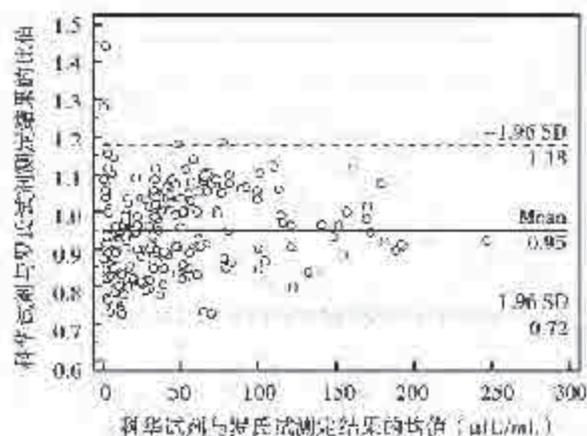


图1 两种试剂测定结果 Bland-Altman 一致性分析图
Figure 1 Bland-Altman plot with two assays

胰岛素(包括猪胰岛素、牛胰岛素等)、胰岛素原、C肽、胰高血糖素、胰岛素样生长因子-1等易产生交叉反应物质是影响血清胰岛素检测的重要因素之一^[1]。本方法使用高亲和力的抗胰岛素单克隆抗体,极大地提高了试剂盒的特异性,将大多数的干扰物质的交叉反应降到了最低。本方法学建立的

试剂盒,对于上述干扰物质无明显影响,其测定回收率均在 90%-110%之间。

目前市面上最常见的 4 种类胰岛素药物为诺和锐、优泌乐、来得时、诺和平。由于这 4 种药物与胰岛素结构近似,所以基本很难确保均无交叉反应。目前市场上的主流试剂对这 4 种药物均有着不同程度的干扰^[2]。本方法学建立的试剂盒对这 4 种药物进行的药物干扰实验,浓度为 300 mIU/L 时交叉反应分别达到了 3.31%和 8.96%,而 300 mIU/L 浓度以下的诺和锐、诺和平几乎无明显干扰,其性能达到国际先进水平。

本方法建立的胰岛素化学发光免疫分析法试剂盒,操作简便、反应时间短、成本较低。该试剂盒具有灵敏度高、特异性强等优点,达到或接近国际领先水平,并成功搭载全自动化学发光免疫分析仪,进一步提高化学发光法检测的高效性、便捷性。

参考文献

- [1] Spain R. Insulin assays: previously known and new analytical features[J]. Clin Lab, 2003,49:113-121.
- [2] Brange J, Langkjoer L. Insulin structure and stability [J]. Pharm Biotechnol, 1993,5:315-350.
- [3] Clinical and Laboratory Standards Institute. EP6-A2 Approved guideline-second edition: evaluation of the linearity of quantitative measurement methods [S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2005.
- [4] Clinical and Laboratory Standards Institute. EP9-A2 Approved guideline-second edition: method comparison and bias estimation using patient sample[S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2002.
- [5] Clinical and Laboratory Standards Institute. EP5-A2 Approved guideline-second edition: evaluation of precision performance of quantitative measurement methods [S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2004.
- [6] 金丕煊,陈峰. 医学统计方法(第三版)[M]. 上海:复旦大学出版社, 2009,11-25.
- [7] Alan HBW. Tietz Clinical Guide to Laboratory Tests [M]. 4th Ed. Philadelphia, Pa: WB Saunders Co, 2006: 622-623.
- [8] Owen WE, Roberts WL. Cross-Reactivity of three recombinant insulin analogs with five commercial insulin immunoassays[J]. Clin Chem, 2004,50(1):257-259.

癌胚抗原定量测定试剂盒(化学发光免疫分析法)的临床性能评价

梁丽萍¹ 李志雄¹ 董志宁¹ 李明² 吴英松^{2*}

【摘要】目的 对自制的癌胚抗原定量测定试剂盒(化学发光免疫分析法)进行临床应用研究及临床性能评价。方法 用自制试剂盒检测采集到的血清 1 156 例和 101 例血浆,以罗氏公司癌胚抗原定量测定试剂盒(电化学发光法)为对照试剂,雅培公司癌胚抗原测定试剂盒(化学发光微粒子免疫检测法)作为复核试剂,对自制试剂盒的一致性和相关性等指标进行计算分析。结果 同罗氏试剂盒相比,自制试剂盒异常符合率达 96.1%,正常符合率达 97.8%,总符合率达 97.3%,Kappa 值达 0.931($P<0.01$)。从定量测定值分析,与罗氏试剂盒测值相比,自制试剂盒测值的线性回归方程为 $Y=0.091+1.009X$,相关系数为 0.987($P<0.01$),相关性良好。结论 本试剂盒检测性能满足临床应用的需要。

【关键词】 癌胚抗原; 临床研究; 化学发光免疫分析法

The clinic research of the carcinoembryonic antigen (CEA) quantitative diagnostic kit by chemiluminescent immunoassay (CLIA)

LIANG Liping¹, LI Zhixiong¹, DONG Zhining¹, LI Ming², WU Yingsong^{2*}

(1. Dami Biotechnology Co., Ltd., Guangzhou, Guangdong, China, 510665; 2. School of Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515)

【ABSTRACT】Objective To investigate the clinic research of the carcinoembryonic antigen (CEA) quantitative diagnostic kit by chemiluminescent immunoassay (CLIA) (CEA-CLIA). Methods 1 156 cases of serum and 101 cases of plasma were detected with the self-made kit. Roche carcinoembryonic antigen quantitative determination kit (ECL) were used as control agents, and Abbott carcinoembryonic antigen determination kit (CMIA) were used as a reagent in review. Consistency and correlation were calculated. Results The positive accordant ratio, the negative accordant ratio, the Kappa value was 96.1%, 97.8%, 0.931 ($P<0.01$), respectively. Compared to Roche's kit in the quantitative analysis, the linear regression equation of the reagent was $Y=0.091+1.009X$. The correlation coefficient was 0.987 ($P<0.01$). And the correlation coefficient was satisfy. Conclusion CEA-CLIA was a valuable diagnostic kit for clinic application.

【KEY WORDS】 Carcinoembryonic antigen (CEA); Clinic research; Chemiluminescent Immunoassay (CLIA)

癌胚抗原 (carcinoembryonic antigen, CEA) 是一种分子量为 175 kDa-200 kDa 糖蛋白抗原, 1965 年首先由加拿大学者 Gold 和 Freedman 从胎儿及

结肠癌组织中发现^[1]。胚胎期主要存在于胃肠道、肝脏和胰腺等器官, 出生后含量很低。其浓度与多种肿瘤尤其是消化道肿瘤相关, 如结肠癌、直肠

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)(2011AA02A101)

作者单位: 1. 广州市达瑞生物技术股份有限公司, 广东, 广州 510665

2. 南方医科大学生物技术学院, 广东, 广州 510515

*通讯作者: 吴英松, E-mail: yingsongwu@hotmail.com

癌、胃癌、胰腺癌、胆管癌等,肺、乳腺及泌尿生殖系统的恶性肿瘤也升高^[2]。在临床中 CEA 常与多个肿瘤标志物联合检测,用于肺癌、胃癌、结直肠癌等多种肿瘤的早期诊断、疗效和预后评价^[3-5],在临床上已作为一项常规的检查项目。

本文对自行研制的癌胚抗原定量测定试剂盒(化学发光免疫分析法)进行了临床性能评价,分析比较了其与传统使用的进口试剂盒在样本检测中的符合率、相关性和一致性等指标,对其有效性及安全性提供了重要依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 自制癌胚抗原定量测定试剂盒(化学发光免疫分析法)

罗氏公司的癌胚抗原定量测定试剂盒(电化学发光法),对照用试剂;雅培公司的癌胚抗原测定试剂盒(化学发光微粒子免疫检测法),复核用试剂。

1.1.2 CEA 质控品

质控品 C1(7 ng/mL-13 ng/mL)、质控品 C2(21 ng/mL-39 ng/mL)、质控品 C3(70 ng/mL-130 ng/mL)为广州市达瑞生物技术股份有限公司自配。

1.1.3 样本

(1)血清样本:临床结肠癌患者或其他肿瘤(如肺癌、肝癌、乳腺癌等)患者和正常查体者血清,共有 1 156 例。(2)血浆样本:101 例,同一病例的血浆样本包含于上述血清样本中。(3)特异性样本:甲胎蛋白 11 例、类风湿因子 11 例、抗核抗体 12 例、溶血 13 例、脂血 11 例、黄疸 12 例。以上样本分别由中国人民解放军第 302 医院、南方医科大学南方医院、北京地坛医院和厦门大学附属第一医院提供,均用罗氏公司的癌胚抗原定量测定试剂盒(电化学发光法)测定血清 CEA 浓度。

1.1.4 实验仪器

应用厦门优迈科医学仪器有限公司的全自动化学发光免疫分析仪 Caris200。

1.2 方法

1.2.1 试验设计

(1)将采集的血清样本病例编码,采用对照方法和自制试剂盒同时进行盲法检测,试验结束后揭

盲,对不符样本采用复核方法进行复核。(2)用自制试剂盒对采集的同一病例的血清与血浆样本同时进行检测,结果进行统计。

1.2.2 样本正常参考值

罗氏试剂盒、雅培试剂盒及自制试剂盒的正常参考值均为 0 ng/mL-5 ng/mL。

1.2.3 统计处理

利用 SPSS 13.0 统计软件进行一致性及相关性分析;用 Medcalc 软件进行 Bland-Altman 定量分析。

2 结果

2.1 血清样本的检测结果分析

2.1.1 一致性分析

自制试剂盒和罗氏公司对照试剂盒相比较(见表 1),正常符合率为 97.8%,异常符合率为 96.1%,总符合率为 97.3%;Kappa 值为 0.931($P < 0.01$)(见表 2)。说明自制试剂盒的测定结果与罗氏公司试剂盒的测定结果符合率较高,有较好的一致性。

表 1 临床检测结果统计归纳表

Table 1 Statistical induction of clinical detection results

试验	对照试剂盒		合计
	异常	正常	
考核试剂盒			
异常	292	19	311
正常	12	833	845
合计	304	852	1 156

2.1.2 相关性分析

利用 SPSS13.0 统计软件对自制试剂盒和对照试剂盒的临床检测结果进行相关性分析。相关系数 r 值为 0.987($P < 0.01$)(见表 3),线性回归方程为 $Y=0.091+1.009X$ (见表 4),散点图见图 1。可见自制试剂盒与对照试剂测值相关性良好。

2.1.3 Bland-Altman 分析

以待考核试剂与对照试剂测值的均值为 X 轴,以两者的差异值为 Y 轴,绘制散点图(见图 2)。由图 2 可见,2.8%(32/1 156)的点在 95%一致性界限外;在一致性界限范围(9.8,-10.2)内,待考核试剂的测值与对照试剂的测值相比,差值的绝

表2 Kappa值的计算结果

Table 2 The calculated results of Kappa values

	Value	Asymp. Std. Error(a)	Approx. T(b)	Approx. Sig.
Measure of Agreement Kappa	.931	.012	51.669	.000
N of Valid Cases	1 156			

表3 相关性分析结果

Table 3 The results of correlation analysis

		考核试剂	对照试剂
考核试剂	Pearson Correlation	1	.987(**)
	Sig. (2-tailed)		.000
	N	1 145	1 145
对照试剂	Pearson Correlation	.987(**)	1
	Sig. (2-tailed)	.000	
	N	1 145	1 145

** 相关性在 $\alpha=0.01$ 水平上显著(双侧检测)

对值最大为 9.35 ng/mL, 而两者的测量结果平均为 100.725 ng/mL, 这种相差的幅度在临床上可以接受。因此认为待考核试剂与对照试剂的测试结果具有较好的一致性。

2.1.4 差异样本的分析

本次临床考核共进行了 1 156 例血清样本的测试考核, 其中有 31 例样本自制试剂盒和对照试剂盒的检测判断不一致。对这 31 例差异样本用复核试剂盒进行检测。复核试剂盒检测结果显

表4 线性回归分析表

Table 4 The analysis of linear regression

Model	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients		
	B	Std. Error	Beta	t	Sig.
1(Constant)	.091	.157	.987	.577	.564
考核试剂	1.009	.005		210.444	.000

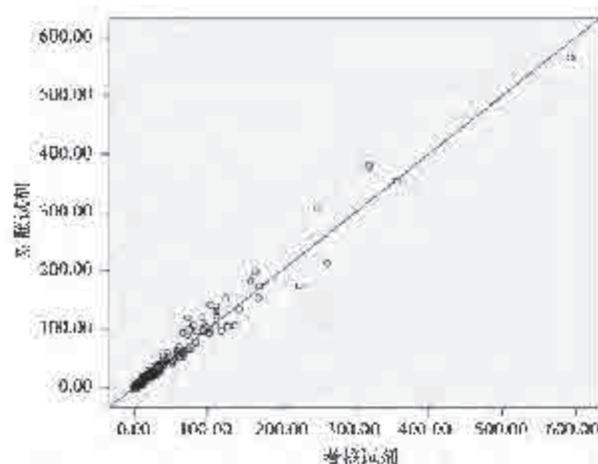


图1 血样测值相关性分析散点图

Figure 1 The scatter plot of correlation analysis

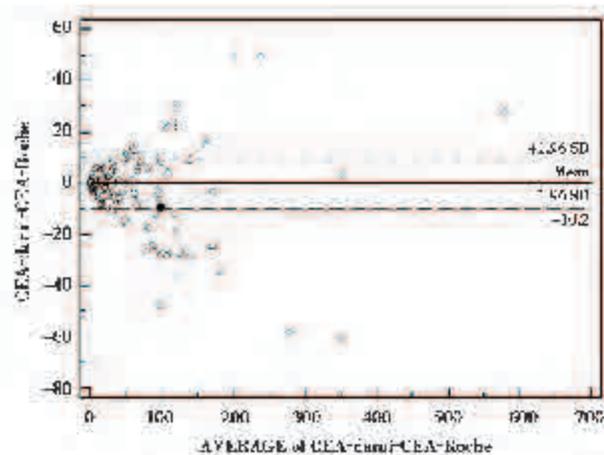


图2 Bland-Altman 分析图

Figure 2 The chart of Bland-Altman analysis

示有 21 例样本与考核试剂盒检测结果一致, 有 10 例与对照试剂盒检测结果一致。说明该待考核试剂盒测定结果较为准确、稳定和可靠。

可能的差异原因: 差异样本的 CEA 测值在正

常参考值的上限附近, 临界值导致了判断结果的不确定性。需要多次重复测定或进行第三方检测并作临床追踪检测, 才可明确实验结果和临床意义。

表5 同一病例血清血浆对比表

Table 5 The comparative table of the same patient serum and plasma

待考核试剂	血清		合计
	异常	正常	
血浆			
异常	56	0	56
正常	0	45	45
总数	56	45	101

2.2 血清与血浆样本的测值对比

本次临床试验对101例同一病例的血清和血浆样本用自制试剂盒进行检测,结果101例样本判定结果一致(见表5)。经统计分析,与血清检测结果相比,血浆的检测结果 Kappa 达 1.000 ($P < 0.01$) (见表6),两者测值相关系数 r 值达 0.991 ($P < 0.01$) (见表7),线性回归方程为 $Y = -1.292 + 1.097X$ (见表8),散点图见图3。结果表明待考核试剂盒对血清或血浆的检测结果一致性及相关性较好,待考核试剂

表6 同一病例血清和血浆 Kappa 值统计结果表

Table 6 The statistical results of the same patient serum and plasma

	Value	Asymp. Std. Error(a)	Approx. T(b)	Approx. Sig.
Measure of Agreement Kappa	1.000	.000	10.050	.000
N of Valid Cases	101			

表7 血浆与对应血清测值相关性

Table 7 The correlation analysis of the same patient serum and plasma

	Pearson Correlation	血清	血浆
血清	Sig. (2-tailed)	1	.991(**)
	N	101	.000
血浆	Pearson Correlation	.991(**)	101
	Sig. (2-tailed)	.000	1
	N	101	101

**相关性在 $\alpha = 0.01$ 水平上显著(双侧检测)

盒适用于血清及血浆样本的检测。

2.3 特异性样本试验分析

本次临床试验共纳入了70例特异性样本,分别为甲胎蛋白11例、类风湿因子11例、抗核抗体12例、溶血13例、脂血11例、黄疸12例,均使用自制试剂盒与对照试剂进行检测,两者检测结果均正常,表明待考核试剂盒检测血样时不受甲胎蛋白、类风湿因子、抗核抗体、溶血、脂血、黄疸的干扰。

表8 血浆与对应血清测值线性回归分析表

Table 8 The linear regression analysis of the serum and plasma

Model	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients Beta	r	Sig.
	B	Std. Error			
1(Constant)	1.292	1.180		1.095	.276
血浆	1.097	.015	.991	72.611	.000

2.4 可靠性分析

本实验在对质控验证后方进行测试,质控结果表明标准差及浓度测值均符合质控标准要求,实验准确可靠。

3 讨论

临床上检测 CEA 的方法有放射性免疫分析法、酶联免疫吸附测定等。近年来发展了荧光免疫

分析法、化学发光免疫分析法等,化学发光分析方法与免疫分析相结合已经成为近年来检测分析技术的研究热点。化学发光免疫分析技术是二十世纪八十年代继放射免疫分析、酶联免疫分析和荧光免疫分析后发展起来的一项新的免疫分析技术,具有灵敏度高、快速、准确、重复性好、效期长并安全无毒无污染等优点^[6]。

本研究以罗氏的癌胚抗原定量测定试剂盒

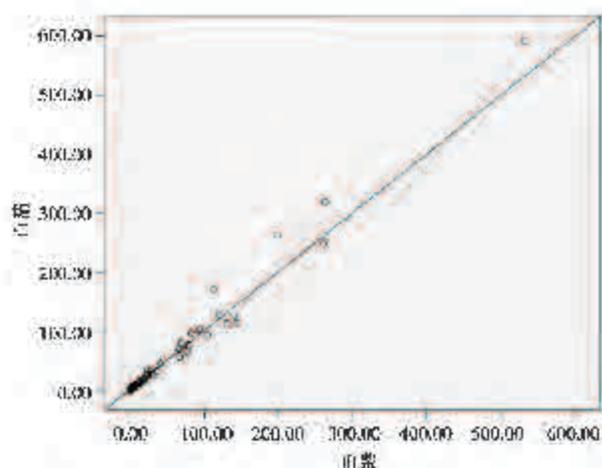


图3 血浆与对应血清测值相关性分析散点图

Figure 3 The scatter plot of correlation analysis of the serum and plasma

(电化学发光法)为对照试剂,对自制的癌胚抗原定量测定试剂盒(化学发光免疫分析法)进行临床检测性能评价。同对照试剂比较,自制试剂盒的正常符合率为97.8%,异常符合率为96.1%,总符合率为97.3%;Kappa值为0.931 ($P < 0.01$);两者测值相近,相关系数达0.987 ($P < 0.01$),线性回归方程为 $Y = 0.091 + 1.009X$,相关性良好。采用Bland-Altman统计学方法对两组测定结果进行分析,有97.2%的点在一致性界限内,两者的测定结果具有较高的一致性。且通过对同一病例的血清与血浆的测值比较,

两者测值一致,相关系数 r 值达0.991 ($P < 0.01$),说明本试剂盒适用于人血清或血浆中CEA含量的检测。同时,不受甲胎蛋白、类风湿因子、抗核抗体、溶血、脂血、黄疸的干扰。说明自制的试剂盒与目前临床广为应用的进口试剂在指标检测性能上具有良好的等效性,可替代国外昂贵试剂应用于临床检测和基础医学的研究。

参考文献

- [1] Gold P, Freedman SO. Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques[J]. J Exp Med, 1965,121:439-462.
- [2] 尚高峰,张翠秋. 癌胚抗原检测的临床意义[J]. 内蒙古中医药, 2014,33(33):57-58.
- [3] 潘丽兰. 血清CEA、CA199、CA125、CA153、AFP联合检测对胃癌的诊断价值[J]. 中国实验诊断学, 2013,17(12):2192-2195.
- [4] 张海英. 癌胚抗原和糖类抗原125联合检测在肺癌诊断中的应用[J]. 检验医学与临床, 2013,(24):3335-3336.
- [5] 卢灿荣,张士武,张勇,等. 联合检测癌胚抗原、糖类抗原19-9和C反应蛋白对结肠癌的的诊断价值[J]. 标记免疫分析与临床, 2012,19(1):3-6.
- [6] 农天雷. 常用化学发光免疫分析技术及其特点[J]. 现代医药卫生, 2011,27(14):2156-2158.
- [2] Van Voorhees EE, Dennis MF, McClemon FJ, et al. The association of dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate (DHEAS) with anxiety sensitivity and electronic diary negative affect among smokers with and without posttraumatic stress disorder[J]. Journal of Clinical Psychopharmacology, 2013,33(4):556.
- [3] Staeborg T, Fredenksen H, Fruerkilde P, et al. Serum concentrations of DHEA, DHEAS, 17 α -hydroxyprogesterone, Δ 4-androstenedione and testosterone in children determined by TurboFlow-LC-MS/MS[J]. Clinica Chimica Acta, 2013,419:95-101.
- [4] Urbanski HF, Mattison JA, Roth GS, et al. Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) as an endocrine marker of aging in calorie restriction studies[J]. Experimental Gerontology, 2013,48(10):1136-1139.
- [5] Goodarzi MO, Carrmina E, Azziz R. DHEA, DHEAS and PCOS[J]. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2015,145:213-225.
- [6] Jimenez MC, Sun Q, Schürks M, et al. Low dehydroepiandrosterone sulfate is associated with increased risk of ischemic stroke among women[J]. Stroke, 2013, 44(7):1784-1789.
- [7] Azziz R, Chang WY, Stanczyk FZ, et al. Effect of bilateral oophorectomy on adrenocortical function in women with polycystic ovary syndrome[J]. Fertility and Sterility, 2013,99(2):599-604.
- [8] Hildreth KL, Gozansky WS, Jankowski CM, et al. Association of serum dehydroepiandrosterone sulfate and cognition in older adults: Sex steroid, inflammatory, and metabolic mechanisms[J]. Neuropsychology, 2013, 27(3): 356.

(上接第305页)

总前列腺特异性抗原定量测定试剂盒(化学发光免疫分析法)的性能验证

方婉仙¹ 李志雄¹ 董志宁¹ 李明² 吴英松^{2*}

[摘要] 目的 对自制的总前列腺特异性抗原(total prostate specific antigen, tPSA)定量测定试剂盒(化学发光免疫分析法)进行性能验证,判断自制试剂盒是否满足产品行业标准要求。方法 参照产品行业标准要求,对自制试剂盒的准确度、最低检测限、线性、重复性、批间差、稳定性、配对抗体等克分子反应性进行考察。结果 自制试剂盒的最低检测限为 0.0022 ng/mL,线性相关系数 $r=0.9998$,重复性为 2.82%和 1.96%,批间差为 5.55%,配对抗体等克分子反应小于 15%,均符合产品标准的要求。对刚过 12 个月有效期的产品进行以上项目检测,也符合产品标准要求,说明效期内试剂质量稳定。结论 自制试剂盒的各项性能指标符合行业标准要求,在线性、最低检测限和检测范围方面比临床常用的罗氏 tPSA 电化学发光试剂盒更优,可替代国外昂贵试剂应用于临床检测。

[关键词] 总前列腺特异性抗原(tPSA); 化学发光免疫分析法(CLIA); 性能验证

The verification of the performance of total prostate specific antigen (tPSA) quantitative diagnostic kit (chemiluminescent immunoassay)

FANG Wanxian¹, LI Zhuxiong¹, DONG Zhuning¹, LI Ming², WU Yingsong^{2*}

(1. Darni Biotechnology Co., Ltd., Guangzhou, Guangdong, China, 510665; 2. School of Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515)

[ABSTRACT] Objective To verify the performance of total prostate specific antigen (tPSA) quantitative diagnostic kit (CLIA) in order to know whether the kit is fit for industrial standard. Methods Referring to tPSA quantitative diagnostic kit (CLIA) industrial standard, the kit accuracy, sensitivity, linearity, repeatability, precision between different assays, stability and equal gram molecular reaction of matching antibodies were studied. Results The sensitivity of the kit was 0.0022 ng/mL. The linear coefficient (r) was 0.9998. Repeatability were 2.82% and 1.96%. And the precision between different assays was 5.55%. Equal gram molecular reaction of matching antibodies was less than 15%. All results were in line with the requirements of industrial standard. The same analysis was performed with the kits which were one month over the expiration date and all the analysis results were in line with industrial standard. Conclusion All analytic performance results of the kit meet industrial standard. The detection index of linearity, detection limit, detection range are better than that of the tPSA kit from Roche, which can replace foreign expensive reagent for clinical testing and basic medical research.

[KEY WORDS] Total prostate specific antigen (tPSA); Chemiluminescent immunoassay (CLIA); Performance verification

基金项目:国家高技术研究发展计划(863 计划)2011AA02A101

作者单位:1. 广州市达瑞生物技术股份有限公司,广东,广州 510665

2. 南方医科大学生物技术学院,广东,广州 510515

*通讯作者:吴英松, E-mail: yingsongwu@hotmail.com

当前,人口老龄化日益加剧,前列腺疾病患者数量不断增长,其中前列腺癌已成为严重危害人类健康的主要疾病之一^[1],如何及时正确诊断该类疾病是目前临床与医药科学研究的热点。前列腺特异性抗原(prostate specific antigen, PSA)是一种含有 237 个氨基酸、侧链含有 7%-8% 碳水化合物且具有糜蛋白酶样活性的丝氨酸蛋白酶,其分子量约为 30 000 道尔顿。在正常、存在良性增生和恶性前列腺组织的男性血清中均可以检测出 PSA,但在没有前列腺组织(如:由于根治性前列腺切除术或膀胱前列腺切除术)的男性血清或大多数女性血清中不能检测出 PSA。故 PSA 成为监视前列腺癌男性病人的合适标志。研究表明^[2-3]总前列腺特异性抗原(total prostate specific antigen, tPSA)是诊断前列腺疾病特异性最强的血清学指标。而 PSA 在监测患者术后或药物治疗后前列腺癌转移或病情迁延也有重要价值。目前,我国大部分大医院用进口化学发光法试剂盒进行测定,如罗氏、雅培、西门子等外国公司^[4-5]的试剂,但价格昂贵,患者负担沉重。本研究应用磁珠为载体,采用双抗体夹心免疫分析法将高灵敏度的化学发光体系和高特异性的免疫反应结合,配合国产全自动化学发光仪,定量测定人血清或血浆中的 tPSA 含量^[6]。该分析体系稳定可靠,成功实现化学发光 tPSA 体外诊断试剂的国产化,在临床上辅助诊断及监测前列腺癌等方面具有很高的应用价值。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

检测试剂:总前列腺特异性抗原定量测定试剂盒(化学发光免疫分析法),广州市达瑞生物技术股份有限公司制备。校准品:总前列腺特异性抗原校准品,广州市达瑞生物技术股份有限公司制备。质控品:Lyphochek Tumor Marker Plus Control,来源于 Bio-Rad 公司。溯源性参考物质:世界卫生组织 tPSA 国际标准品,来源于英国国家生物标准与检定所。游离 PSA:世界卫生组织游离前列腺特异性抗原(free prostate specific antigen, fPSA)国际标准品,来源于英国国家生物标准与检定所。

1.2 仪器

全自动化学发光免疫分析仪,型号:Caris200,来源于厦门优迈科医学仪器有限公司。

1.3 参考法规及标准

行业标准:《总前列腺特异性抗原(tPSA)定量测定试剂(盒)(化学发光免疫分析法)YY/T 1163-2009》。

1.4 实验方法

1.4.1 试剂盒定标与质量控制

试剂盒在使用前均需要用校准品进行标准曲线定标,同时测定第三方 Bio-Rad 质控品进行质量控制。

1.4.2 准确度

以浓度为 40 ng/mL 国际标准品 tPSA(NIBSC code:96/670)作为样本检测 5 次,测得的平均浓度记为 M,根据公式测量偏差=(M-理论值)/理论值×100%,行业标准要求其测量结果相对偏差应在±10%范围内。

1.4.3 最低检测限

用零浓度校准品作为样本进行检测,重复测定 20 次,得出 20 次测量结果的 RLU(relative light unit)值,计算其平均值(mean, M)和标准差(standard deviation, SD),得出 M+2SD,根据零浓度校准品和相邻校准品之间的浓度-相对发光值(relative light unit, RLU)值结果进行两点回归拟合得出一次方程,将 M+2SD 的 RLU 值带入上述方程中,得到的最低检测限,行业标准要求结果应不高于 0.1 ng/mL。

1.4.4 线性

将浓度为 100ng/mL 的高值样本按一定比例稀释为 5 个浓度,其中低值浓度样本须接近线性范围下限。每一浓度样本重复测试 2 次,计算其平均值,通过四参数拟合线性,行业标准要求试剂盒的相关系数(correlation coefficient, r)应不低于 0.9900。

1.4.5 重复性

用浓度分别为 4 ng/mL±0.8 ng/mL 和 30 ng/mL±6 ng/mL 的样本各重复检测 10 次,计算 10 次测量结果的平均值 M 和标准差 SD,根据公式 $CV=SD/M$ 均值有限公得出其变异系数(variable coefficient, CV),行业标准要求应不大于 10.0%。

1.4.6 批间差

用 3 个不同批号试剂盒检测同一样本 30 ng/mL±6 ng/mL 范围内的样本,重复检测 10 次,计算 30 次测量结果的 M 和 SD,根据公式 $CV=SD/M \times$

100%得出 CV, 3 个批号试剂盒之间的批间 CV 应符合行业标准要求, 不大于 15.0%。

1.4.7 稳定性

在 2℃-8℃条件下, 保存至有效期后 1 个月, 按照 1.4.2-1.4.6 的方法进行检测, 结果需符合相应要求。

1.4.8 配对抗体的等克分子反应性

配制 tPSA 浓度为 10.0 ng/mL 而 iPSA 比例不同的系列样本(见表 1), 分别平行测定各样本的浓度, 取测定结果平均值记为 M, 根据公式: 测量偏差=(M-理论值)/理论值×100%, 其测量结果的相对偏差应符合行业标准要求, 在±15%范围内。

表 1 等克分子反应性样本配制表

Table 1 Sample preparation of equal gram molecular reaction

序号	游离 PSA 浓度 (ng/mL)	PSA-ACT 复合物浓度 (ng/mL)	总 PSA 理论浓度 (ng/mL)	游离 PSA 比例 (FPSA)	总 PSA 测量浓度 (ng/mL)
T1	10.0	0	10.0	100%	C1
T2	3.0	7.0	10.0	30%	C2
T3	2.0	8.0	10.0	20%	C3
T4	1.5	8.5	10.0	15%	C4
T5	1.0	9.0	10.0	10%	C5

2 结果

第三方质控测量结果均在质控所标示的范围内(见表 2), 实验准确可靠。

2.1 试剂盒定标与质量控制

表 2 Lyphocheck Tumor Marker Plus Control 测量结果

Table 2 Measurement results of Lyphocheck Tumor Marker Plus Control

质控	测量次数	测量值(ng/mL)	质控范围(ng/mL)	是否符合质控标准
Level 1	3	0.092±0.008	0.061-0.113	符合
Level 2	3	3.57±0.32	2.34-4.34	符合
Level 3	3	14.84±1.12	10.6-19.8	符合

2.2 准确度

试剂盒对稀释成 40.0ng/mL 的 tPSA 国际标准品进行检测, 其相对标准偏差为 3.85%, 试剂盒准确度良好(见表 3)。

表 3 准确度测量结果($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Measurement results of accuracy($\bar{x} \pm s$)

标准品浓度 (ng/mL)	测量次数	测量值 (ng/mL)	RSD (%)
40	5	38.46±1.48	3.85

2.3 最低检测限

试剂盒对 tPSA 零浓度标准品检测, 其最低检出量为 0.0022 ng/mL, 远远低于标准规定的 0.1

ng/mL(见表 4)。

表 4 最低检测限检测结果($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Measurement results of sensitivity($\bar{x} \pm s$)

标准品浓度 (ng/mL)	检测 数量	RLU 值 (ng/mL)	检测限 (ng/mL)
0	20	360±18.07	0.0022

2.4 线性

将稀释好的 5 个浓度样本进行检测, 将测量结果通过四参数拟合线性, 线性方程为 $Y=(63.75-732489053.74)/(1+(X/28037.19)^{0.08})+732489053.74$, 其相关系数 r 为 0.9998, 线性良好(见表 5 和图 1)。

表 5 tPSA 线性检测结果

Table 5 Measurement results of linearity of tPSA

样本	稀释比	理论浓度 (ng/mL)	测定浓度 (ng/mL)	偏差 (%)
样本 1	1	100	96.21	3.79
样本 2	0.5	50	49.94	0.12
样本 3	0.1	10	9.96	0.40
样本 4	0.01	1	1.03	3.00
样本 5	0.001	0.1	0.10	0.00

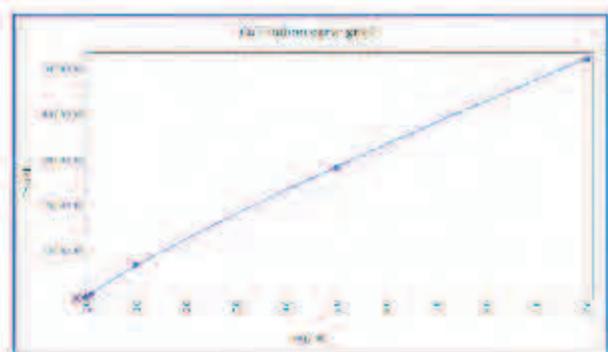


图 1 tPSA 线性拟合

Figure 1 linear fitting of tPSA

2.5 重复性

浓度分别为 4 ng/mL±0.8 ng/mL 和 30 ng/mL±6ng/mL 的样本,其变异系数 CV%分别为 2.82%和 1.96%,均不大于 10.0%(见表 6)。

表 6 重复性检测结果($\bar{x} \pm s$)

Table 6 Measurement results of repeatability ($\bar{x} \pm s$)

样品浓度 (ng/mL)	检测次数	测量值 (ng/mL)	变异系数 (%)
4.0	10	4.02±0.11	2.82
30.0	10	30.12±0.59	1.96

2.6 批间差

用 3 个批次试剂盒测定 30 ng/mL±6 ng/mL 范围内的样本,其变异系数 CV%为 5.55%,符合标准要求(见表 7)。

2.7 稳定性

结果显示,所有项目均符合标准要求,说明在 1 个月有效期内,检测性能未发生变化,线性关系良好,且标准品 A 点发光值未见明显升高(见表 8)。

表 7 批间差检测结果($\bar{x} \pm s$)

Table 7 Measurement results of precision between different assays ($\bar{x} \pm s$)

批号	样品浓度 (ng/mL)	测量次数	测量值 (ng/mL)	变异系数 (%)
1	30	10		5.55
2	30	10	29.36±1.63	
3	30	10		

2.8 配对抗体的等克分子反应性

试剂盒检测根据表 1 配制 tPSA 浓度为 10.0 ng/mL 而 tPSA 比例不同的系列样本,其测量结果均在±15%范围内(见表 9)。

3 讨论

试剂盒性能的好坏直接关系到试剂盒的临床使用性能。本研究着重验证自制的总前列腺特异性抗原定量测定试剂盒(化学发光免疫分析法)的分析性能。自制试剂盒用吖啶酯作为标记物,其化学反应简单、快速、无须催化剂;非特异性结合少,本底低;与大分子的结合不会减小所产生的光量,从而增加灵敏度。实验结果中充分体现这一特点,试剂盒其最低检测限为 0.0022 ng/mL,结果非常突出,灵敏度和精确度比酶免法、荧光法高几个数量级,可替代放射免疫分析。与国内外市场占有率较高的罗氏 tPSA 试剂盒进行比对,罗氏 tPSA 试剂盒最低检测限为 0.003 ng/mL,自制试剂盒灵敏度更高。自制试剂盒准确度良好,检测结果相对标准偏差为 3.85%,在线性范围为 0.1 ng/mL-100 ng/mL 内相关系数 r 为 0.9998,而罗氏 tPSA 试剂盒在 0.1 ng/mL-50 ng/mL 内相关系数 r 为 0.898,自制试剂盒线性更优。自制试剂盒检测范围为 0.0022 ng/mL-100 ng/mL,比罗氏 tPSA 试剂盒

表8 有效期后一个月的试剂盒分析性能评估的结果总结
Table 8 Summarizes the results of performance of the kits which were one month over the expiration date

检验项目	检验结果	标准要求	结果判定
准确度(相对偏差%)	5.45	≤10	符合规定
最低检测限(ng/mL)	0.0013	≤0.1	符合规定
线性	r=0.9999	≥0.9900	符合规定
重复性(%)			
C2	2.81	≤10.0	符合规定
C3	2.87		符合规定

表9 对抗体的等克分子反应性($\bar{x} \pm s$)
Table 9 Measurement results of equal gram molecular reaction of matching antibodies ($\bar{x} \pm s$)

样品	测量值(ng/mL)	RSD(%)
T1	9.98±0.02	0.2
T2	9.85±0.15	1.5
T3	9.76±0.23	2.4
T4	9.82±0.18	1.8
T5	9.71±0.28	2.9

检测范围 0.003 ng/mL-100 ng/mL 略广。对抗体的等克分子反应性检测表明试剂盒对 PSA 和 PSA-ACT 的识别是等量的。对过期 1 个月的试剂盒进行检测,试剂盒的性能仍然符合标准要求,试剂盒的稳定性较好。相对于罗氏 tPSA 试剂昂贵的价格,自制试剂盒价格便宜,能更好地在临床应用中降低医疗成本,减轻患者负担,提高医疗服务质量。

目前,全国批准上市的国产 tPSA 检测试剂盒种有 16 种,进口同类型 tPSA 检测试剂盒有 7 种,tPSA 试剂盒检测方法也不尽相同,其中有放射免疫分析法、酶联免疫吸附法、时间分辨荧光免疫分析法、胶乳增强免疫比浊法、流式荧光免疫法、胶体金法、微磁粒分离酶联免疫法等,其中接近 30% 的试剂盒应用酶联免疫吸附法,但都存在某些缺点,如荧光背景突光、荧光淬灭、放射性废物、灵敏度不佳、测定范围有限、标记物稳定性差等^[7-9]。而化学发光免疫分析技术将具有高灵敏度的化学发光测定技术与高特异性的免疫反应相结合,已经成为一种成熟的、先进的超微量活性物质检测技术,应用范围广泛,近 10 年发展迅猛,是目前发展

和推广应用最快的免疫分析方法,也是目前最先进的标记免疫测定技术,主要具有灵敏度高、特异性强、试剂价格低廉、试剂稳定且有效期(6 个月-18 个月)、方法稳定快速、检测范围宽、操作简单自动化程度高等优点^[10],受到广大科研工作者和临床分析工作者的青睐,显示了该技术将在现在及未来的免疫分析检测领域极其重要的作用。

综上所述,自制的总前列腺特异性抗原定量测定试剂盒(化学发光免疫分析法)各项性能均远远超出《总前列腺特异性抗原(tPSA)定量测定试剂(盒)(化学发光免疫分析法)YY/T 1163-2009》规定的要求,具有非常好的分析性能,与目前临床广为应用的进口试剂盒罗氏 tPSA 试剂盒在线性、检测限和检测范围更优,自制试剂盒所需样本量少、操作流程简单、无放射性危害、成本较进口试剂盒经济,因此能更好地满足临床检测的需要,并对 tPSA 检测的应用推广、国产化,并打破国外试剂的垄断具有重要意义。

参考文献

- [1] 韩苏军,张思维,陈万青,等.中国前列腺癌发病现状和流行趋势分析[J].临床肿瘤学杂志,2013,18(4):330-334.
- [2] 张汉东,富晓敏.前列腺特异性抗原的临床应用价值[J].医学理论与实践,2014,27(12):1648-1649.
- [3] Yeniyol CO, Bozkaya G, Cavusoglu A, et al. The relation of prostate biopsy and ration of free to total PSA in patients with a total PSA between 4-20 ng/ml [J]. Int Urol Nephrol, 2001,33:503-506.
- [4] 徐元基,凌世途,刘荷中,等.前列腺特异性抗原 EIA 试剂盒的研制及应用 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2000,16(4):360-362.
- [5] 唐望请.国内体外诊断行业分析及 DS 公司营销策略研究[D].上海:上海交通大学,2008.
- [6] 金茂俊,邵华,全芬,等.化学发光免疫分析方法和应用[J].农产品质量与安全,2012,(2):42-46.
- [7] 杨晓达,常文保,慈云祥.免疫分析法进展[J].化学进展,1995,7(2):83-97.
- [8] 赵启仁,王世真.时间分辨荧光免疫分析及其应用前景[J].国际放射医学核医学分册,1992,16(4):182-188.
- [9] 陈海斌.化学发光免疫分析技术及其进展[J].中国医学装备,2011,8(5):56-59.
- [10] 金茂俊,邵华,全芬,等.化学发光免疫分析方法和应用[J].农产品质量与安全,2012,(2):42-46.

基于磁微粒化学发光法的肝纤四项检测限与功能灵敏度研究

王新灵¹ 李志信^{2*} 关学² 渠海²

【摘要】 目的 评价磁微粒化学发光法检测肝纤维化血清学标志物(透明质酸、层粘连蛋白、Ⅲ型前胶原N端肽、Ⅳ型胶原)的空白限、检出限和功能灵敏度。方法 参照美国临床和实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)文件,利用空白样品及系列梯度稀释样品在AutoLumo A2000全自动化学发光测定系统上进行检测,确定该方法配套试剂的空白限、检出限及功能灵敏度。结果 透明质酸的空白限为7.59 ng/mL,检出限为16.17 ng/mL,20%变异系数(coefficient of variation, CV)功能灵敏度为18.72 ng/mL;层粘连蛋白的空白限为1.38 ng/mL,检出限为3.53 ng/mL,20%CV功能灵敏度为4.16 ng/mL;Ⅲ型前胶原N端肽的空白限为0.89 ng/mL,检出限为2.40 ng/mL,20%CV功能灵敏度为2.48 ng/mL;Ⅳ型胶原的空白限为2.42 ng/mL,检出限为6.49 ng/mL,20%CV功能灵敏度为9.21 ng/mL。结论 AutoLumo A2000全自动化学发光测定仪肝纤四项的空白限、检出限和功能灵敏度的建立为临床诊断和治疗提供了更有价值的信息。

【关键词】 血清学;肝纤维化;磁微粒化学发光法;空白限;检出限;功能灵敏度

Research on magnetism particulate immuno chemistry luminescence method for limit of detection and functional sensitivity of four items of liver fibrosis

WANG Xinling¹, LI Zhongxin^{2*}, GUAN Xue², QU Hai²

(1. School of Pharmacy, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou, Henan, China, 450046;
2. Zhengzhou Autobio Biological Engineering Co.Ltd, Zhengzhou, Henan, China, 450016)

【ABSTRACT】 Objective To evaluate the limit of blank (LoB), limit of detection (LoD) and functional sensitivity (F.S) of serum items for liver fibrosis [hyaluronic acid (HA), laminin (LN), procollagen type III N-terminal Propeptide (PIIINP), collagen type IV (CIV)] by magnetism particulate immuno chemistry luminescence method. Methods The LoB, LoD and F.S were confirmed by using the blank samples and series gradient dilution samples on AutoLumo A2000 in accordance with the files of clinical and laboratory standards institute (CLSI). Results The LoB of HA, LN, PIIINP, and CIV were 7.59 ng/mL, 1.38 ng/mL, 0.89 ng/mL and 2.42 ng/mL, respectively. The LoD of HA, LN, PIIINP, and CIV were 16.17 ng/mL, 3.53 ng/mL, 2.40 ng/mL and 6.49 ng/mL, respectively. The 20% CV F.S of HA, LN, PIIINP, and CIV were 18.72 ng/mL, 4.16 ng/mL, 2.48 ng/mL and 9.21 ng/mL, respectively. Conclusion More valuable informations for clinical diagnosis and treatment were provided by cofirming the LoB, LoD and F.S of the four liver fibrosis serum items on AutoLumo A2000.

【KEY WORDS】 Serology; Liver fibrosis; Magnetism particulate immuno chemistry luminescence method; Limit of blank (LoB); Limit of detection (LoD); Functional sensitivity (F.S)

基金项目:国家高技术研究发展计划(863计划)(2011AA02A101)

作者单位:1. 河南中医学院药学院,河南,郑州 450046

2. 郑州安图生物工程股份有限公司,河南,郑州 450016

*通讯作者:李志信, E-mail: lizhongxin@autobio.com.cn

肝纤维化是紧随肝细胞破坏之后的自身修复过程,是慢性肝病发展为肝硬化的必经之路,其实质是细胞外基质合成与降解失衡,导致细胞外基质尤其是胶原在肝内的过度增加和沉积^[1,2]。肝纤维化血清学四项指标是目前最为常用的检测肝纤维化的血清学指标,包括透明质酸(hyaluronic acid, HA)、层粘连蛋白(laminin, LN)、Ⅲ型前胶原N端肽(procollagen type Ⅲ N-terminal propeptide, PIIINP)和Ⅳ型胶原(collagen type Ⅳ, CIV)。随着免疫学检测的发展,化学发光法特别是全自动化学发光法已经广泛应用于血清学标志物的检测。本实验室利用国产全自动化学发光免疫分析仪,根据《医学实验室质量和能力认可准则 CNAS-CL 02:2012/ISO 15189:2012》、《医学实验室质量和能力认可准则在临床免疫学检验领域的应用说明 CNAS-CL39》,采用美国临床和实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)的相关文件介绍的方法,对肝纤四项磁微粒化学发光法检测试剂的空白限(limit of blank, LoB)、检出限(limit of detection, LoD)、功能灵敏度(functional sensitivity, F.S)等性能指标进行研究,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 仪器与试剂

郑州安图生物工程股份有限公司生产的全自动化学发光测定仪 AutoLumo A2000 及其配套肝纤维化检测试剂(试剂批号:HA:20140124;LN:20140108;PIIINP:20140321;CIV:20140312);安图公司通用稀释液(批号:2014040101)及2水平质控品(批号:HA:20131201;LN:20140114;PIIINP:20131119;CIV:20130910)。按说明书要求保存。

1.1.2 临床样本收集

收集郑州市第六人民医院健康男性体检低值新鲜血清20例(要求无任何可见疾病症状的健康人,酒精肝、脂肪肝、药物肝、各种肝损害应当排除),年龄18岁-22岁,平均19.7岁,于37℃下温育30 min后,置于离心机以4 000 rpm离心10 min,分离血清,混合备用。

1.2 方法

1.2.1 检测仪器的维护与质量控制

每天实验前后均对仪器进行维护保养,严格

按照说明书要求进行操作,并执行定期校准。利用各物质质控品进行实验前的室内质控,失控发生时测定的样本数据不采用。

1.2.2 确定LoB的程序

按照CLSI EP17-A文件进行^[3]。利用通用稀释液做空白样品,每个项目每天检测2批,间隔不小于2 h,每批6个重复,共进行5 d,记录检测浓度值,每个项目分别获得60个结果。按ISO推荐在规定的I类错误下,设定 $\alpha=5\%$,即LoB有5%的可能性含有待测物。采用非参数检验,将空白样品的结果由小到大排序,第95百分位数值即为LoB。

1.2.3 梯度样品制备

混合均匀后的健康人体血清分别进行4个指标的测定,每个指标3个重复,记录检测结果,并计算各指标平均浓度值;根据LoB结果,利用通用稀释液对混合血清按照测定的平均值进行系列稀释,样品的浓度范围在LoB的1倍-4倍之间,每个指标各稀释5个梯度,用来确定LoD、F.S。

1.2.4 确定LoD的程序

按照CLSI EP17-A文件进行^[3]。对每个项目的系列稀释样本进行相应指标检测,每天各检测2批,间隔不小于2 h,每个指标2个重复,共进行5 d,记录检测浓度值,每个项目分别获得100个结果,将结果从小到大排列。为了强调II类错误,设定 $\beta=5\%$,即LoD有5%的可能性不含有待测物。采用非参数估计LoD, $LoD = LoB + D_{s, \beta}$ 。 $D_{s, \beta}$ 是低浓度样品测定值中位数的值和低浓度样品的第5个百分位数值间的距离。

1.2.5 确定F.S的程序

功能灵敏度用于确定检测系统可报告的最低限值,以日间重复检测的变异系数(coefficient of variation, CV)为20%时对应LoD样品具有的平均浓度为该试剂的F.S。

2 结果

2.1 LoB结果

采用非参数检验,将空白样品的结果由小到大排序,第95百分位数值即为LoB。

公式: $P_{(1-\alpha)} = (1-\alpha)\% \times N_b + 0.5$

其中: α 为I型错误,设定5%; $P_{(1-\alpha)}$ 为在 $(1-\alpha)$ 百分位数值位置的值; N_b 为空白样本的重复检测次数。

根据以上公式,得出第95百分位数值为所有空白样本检测结果按从低到高顺序排列的第57.5位数值。表1为各项目空白样品检测结果排序后第51位-第60位的数值。计算各项目第57.5位的结果即为此项目的LoB,见表2。

表1 肝纤四项第51~60位空白值检测结果(ng/mL)
Table 1 The baseline value of 51~60 of four items of liver fibrosis(ng/mL)

序号	HA空白值	LN空白值	PIIINP空白值	CIV空白值
51	5.59	0.93	0.71	1.96
52	5.82	0.94	0.72	2.00
53	6.12	0.95	0.75	2.16
54	6.53	1.05	0.78	2.25
55	6.67	1.15	0.83	2.37
56	7.02	1.20	0.85	2.38
57	7.33	1.29	0.88	2.40
58	7.85	1.46	0.91	2.43
59	8.36	1.58	0.92	2.45
60	8.58	1.65	1.05	2.59

表2 肝纤四项LoB结果(ng/mL)
Table 2 The results of LoB of four items of liver fibrosis (ng/mL)

项目	HA	LN	PIIINP	CIV
LoB	7.59	1.38	0.89	2.42

2.2 混合血清原始结果

混合均匀后健康人体血清肝纤四项检测结果见表3。

表3 混合血清肝纤四项原始结果(ng/mL)
Table 3 The results of four items of liver fibrosis in pooled serum(ng/mL)

项目	重复1	重复2	重复3	平均值	CV%
HA	48.01	43.95	39.22	43.73	10.1%
LN	16.42	14.35	14.47	15.08	7.7%
PIIINP	4.38	4.63	4.55	4.52	2.8%
CIV	22.87	24.46	25.09	24.14	4.7%

2.3 系列稀释样品梯度选择

利用混合血清制备4个项目系列稀释样品的制备浓度见表4。

2.4 LoD结果

4个项目5个梯度样品测定的结果按由小到大排序,将第1位-第10位和第46位-第55

表4 肝纤四项系列稀释样品制备浓度(ng/mL)

Table 4 The results of four items of liver fibrosis in series gradient dilution samples(ng/mL)

项目	梯度1	梯度2	梯度3	梯度4	梯度5
HA	7.5	10	14	18	22
LN	1.5	2.0	3.0	4.0	6.0
PIIINP	0.9	1.5	2.0	2.5	3.0
CIV	2.5	4.0	5.5	7.0	9.0

位结果记录于表5中。根据公式 $LoD=LoB+D_{s, \rho}$ 。其中 $D_{s, \rho}$ 是中位数值和第5个百分位数值间的距离。中位数值为第50.5位置结果,第5百分位数值为第5位置结果。 $D_{s, \rho}$ =第50.5位置结果-第5位置结果。故可计算出各项目LoD,见表6。

2.5 F.S结果

分别计算4个项目5个梯度样品测定结果的平均值、标准差和CV,结果如表7所示。按照日间重复检测的CV \leq 20%的要求,各项目日间CV最接近20%所对应的浓度值即为此项目的FS。由表7可看出,HA浓度为18.72 ng/mL、LN浓度为4.16 ng/mL、PIIINP浓度为2.48 ng/mL、CIV浓度为9.21 ng/mL时,日间CV最接近20%,故此浓度即为各项目的FS。

3 讨论

肝纤维化不是一个独立的疾病,而是许多慢性肝病发展为肝硬化的共同病理过程,对肝纤维化的早发现、早治疗有着重要意义^[4]。血清学检测由于其无创伤性,同时具有简单、方便、利于动态检测的优点,从而成为肝纤维化诊断的重要辅助手段^[5]。近年来人们对肝纤维化研究的兴趣与日俱增,在诊断和治疗方面也取得一定的进展。姚真荣等利用化学发光法检测132例乙型病毒性肝炎患者血清中肝纤维化四项指标的水平,发现单个指标检测中,HA是四项指标中鉴别诊断肝炎与肝硬化最有价值的一项;通过HA联合其他指标进行分析,发现其中HA和PIIINP组合特异性、准确性最高^[6]。目前国外学者对肝纤维化的检测与治疗方面研究较少,并且利用肝纤四项作为肝纤维化检测血清学标志物的研究更加稀少,仅是将其中的某一项或某几项作为检测标志物。Catanzaro等利用透明质酸、III型前胶原肽、基质金属蛋白酶抑制剂I型作为标志物与肝活检进行比对研究,建立

表5 各项目梯度样品第1-10位和第46-55位结果(ng/mL)
Table 5 The results of 1-10 and 46-55 in series gradient dilution samples(ng/mL)

序号	HA	LN	PIIINP	CIV	序号	HA	LN	PIIINP	CIV
1	3.71	0.71	0.00	0.97	46	13.46	2.84	1.98	4.94
2	4.07	0.78	0.00	1.02	47	13.56	2.89	1.99	4.99
3	4.23	0.79	0.29	1.26	48	13.63	2.94	2.01	5.04
4	5.11	0.82	0.33	1.33	49	14.01	2.96	2.04	5.47
5	5.90	0.95	0.57	1.41	50	14.43	3.08	2.04	5.48
6	5.90	0.96	0.62	1.42	51	14.54	3.12	2.11	5.49
7	6.23	1.07	0.73	1.44	52	14.58	3.17	2.12	5.51
8	6.23	1.09	0.77	1.56	53	14.70	3.24	2.14	5.52
9	6.56	1.14	0.84	1.91	54	14.75	3.28	2.19	5.59
10	6.62	1.15	0.86	2.10	55	14.94	3.28	2.20	5.63

表6 肝纤四项 LoD 结果 (ng/mL)
Table 6 The results of LoD of four items of liver fibrosis (ng/mL)

项目	HA	LN	PIIINP	CIV
LoD	16.17	3.53	2.40	6.49

起一种用于肝纤维化进程检测的非侵入性方法^[7]; Zeuzem 等研究了 faldaprevir、deleobuvir、和 ribavirin 等药物在治疗慢性丙肝引起的晚期肝纤维化或肝硬化方面的疗效和安全性^[8]。分析国外研究较少的原因,笔者认为可能与肝脏疾病在流行病学上主

表7 肝纤四项梯度稀释样品检测 CV 统计结果
Table 7 The results of CV of four items of liver fibrosis in series gradient dilution samples

条目		梯度 1	梯度 2	梯度 3	梯度 4	梯度 5
HA	平均值	7.67	10.22	13.40	18.72	21.31
	SD	2.49	2.89	3.11	2.91	2.05
	CV	32.42%	28.28%	23.19%	15.57%	9.64%
LN	平均值	1.39	1.98	3.11	4.16	5.89
	SD	0.55	0.57	0.72	0.76	0.63
	CV	39.82%	29.01%	23.08%	18.36%	10.72%
PIIINP	平均值	1.01	1.40	2.21	2.48	2.94
	SD	0.59	0.51	0.56	0.44	0.39
	CV	58.50%	36.40%	25.28%	17.87%	13.32%
CIV	平均值	2.34	4.15	5.38	6.88	9.21
	SD	1.00	1.37	1.37	1.64	1.40
	CV	42.66%	32.94%	25.49%	23.83%	15.18%

要集中在国内、肝纤四项在检测肝纤维化上缺乏组织特异性及医学伦理等方面相关。

医学实验室在使用某种检测系统或检验方法前均应对该系统或方法的分析性能进行评价,选择性能优良的检测系统或检验方法是保证病人检验结果真实、可靠的前提。随着全自动检测仪器的广泛使用,检验工作者更加重视完成一个检验项目所涉及的仪器、试剂等组成的检测系统的可靠

性。戴悦等按美国病理家协会和 ISO15189 实验室认可的要求,对罗氏电化学发光系统促甲状腺激素受体抗体检测方法进行评价和性能验证,虽然各项指标均能满足临床要求,但提示评价结果与厂商提供的并不完全相同,建议各实验室应自主设立相应的分析性能指标^[9]。在实际检验工作中,参考 CLSI 发布的方法学评价系列文件(EP05-A2、EP06-A、EP09-A2、EP15-A2、EP17-A 等)对检测方

法和检测系统进行性能评价已经成为趋势。目前检验工作者需要首先摆脱对相关性能指标定义不明确的现象。结合本文,LoB、LoD与F.S均是评价检测系统或方法的灵敏度性能,但与分析灵敏度容易混淆。张秀明等针对临床实验室、仪器和试剂生产厂商及检验医学期刊中不能正确理解和区别灵敏度和检出限的现象,对它们进行详细的分析比较,并给出正确使用的方法^[10]。

国内外鲜有利用EP文件研究肝纤维化血清标志物检测试剂分析性能的相关报道,特别是对空白限、检出限和功能灵敏度的研究更加匮乏。目前国内研究较多的集中在肝纤维化血清学检测的方法建立上。张运洪等对肝纤四项化学发光试剂的精密度、加样针携带污染率、准确度、线性范围和参考区间进行验证,显示四项的批内变异均在5%以内,批间变异均在6%以内,准确性的偏差均不超过2%,携带污染、线性范围和参考区间均符合预期要求^[11]。此研究虽利用EP文件进行性能指标评价,但并不涉及灵敏度各指标,同时其使用的是评价方法,而非建立方法。在实际应用中,建立方法虽然复杂,可客观性和有效性要优于评价方法。

随着EP文件的普及,利用此文件进行检测系统及方法的性能建立及评价已经成为生产商和检测实验室的首选,也必将成为性能评价方法的“金标准”。本文参考CLSI发布的EP文件,利用国产全自动化学发光检测系统,采用性能确认方法,对肝纤四项血清学标志物检测试剂的空白限、检出限和功能灵敏度进行了研究,结果显示各检测限值均低于厂家声明值,可在低值区样本的准确定量和稳定检测方面发挥更加重要的作用。

参考文献

- [1] Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis: an integrated cellular response to tissue injury[J]. *J Biol Chem*, 2000,275(4):2247.
- [2] 赵洪昌. 慢乙肝患者血清学标志物与肝纤维化的关系[J]. *中国实验诊断学*, 2010,14(12):2021-2022.
- [3] NCCLS. EP17-A protocols for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline[S]. NCCLS, 2004,24(34):1-39.
- [4] 张梦然, 成军. 肝纤维化研究进展[J]. *国际消化病杂志*, 2014,34(6):374-379.
- [5] 王颖, 陈立宇, 冯萍. 肝纤维化的无创诊断技术研究进展[J]. *华西医学*, 2014,29(9):1783-1786.
- [6] 姚真荣, 高玲, 颜绵, 等. 化学发光法检测肝纤维化血清学指标的临床应用[J]. *热带医学杂志*, 2011,11(11):1264-1266.
- [7] Catanzaro R, Milazzo M, Arona S, et al. Diagnostic accuracy of enhanced liver fibrosis test to assess liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C[J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2013,12(5):500-507.
- [8] Zeuzem S, Soriano V, Asselah T, et al. Efficacy and safety of faldaprevir, telaprevir, and nifavir in treatment-naïve patients with chronic hepatitis C virus infection and advanced liver fibrosis or cirrhosis [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015,59(2):1282-1291.
- [9] 戴悦, 吴文清. 罗氏电化学发光检测系统促甲状腺激素受体抗体检测方法学评价及性能验证[J]. *标记免疫分析与临床*, 2015,22(1):52-55.
- [10] 张秀明, 冯仁丰. 正确理解和使用分析灵敏度及检出限[J]. *中华检验医学杂志*, 2014,37(9):669-672.
- [11] 张运洪, 何玲, 黄建军. 化学发光免疫分析法检测肝纤维化血清标志物的性能评价[J]. *检验医学与临床*, 2014,11(3):304-309.

(上接第346页)

- [11] Elkins R. Measurement of free hormones in blood [J]. *Endocr Rev*, 1990,11(1):45-46.
- [12] van Deventer HE, Soldin SJ. The expanding role of tandem mass spectrometry in optimizing diagnosis and treatment of thyroid disease[J]. *Adv Clin Chem*, 2013, 61:127-152.
- [13] Soldin OP, Soldin SJ. Thyroid hormone testing by tandem mass spectrometry[J]. *Clin Biochem*, 2011, 44(1):89-94.
- [14] Holm SS, Hansen SH, Faber J, et al. Reference meth-

- ods for the measurement of free thyroid hormones in blood: evaluation of potential reference methods for free thyroxine[J]. *Clin Biochem*, 2004,37(2):85-95.
- [15] Thienpont LM, van Uyffanghe K, Poppe K, et al. Determination of free thyroid hormones[J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2013,27(5):689-700.
- [16] Faix JD. Principles and pitfalls of free hormone measurements[J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2013,27(5):631-645.

碱性磷酸酶标记抗人绒毛膜促性腺激素抗体的工艺比较

杜晔* 李基 彭波

[摘要] 目的 通过测定最低检测限、精密性、热稳定性和临床相关性来比较3种碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AP)标记抗人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, HCG)抗体工艺的优劣。方法 用3种常用的蛋白质标记方法,将碱性磷酸酶和抗HCG的单抗进行偶联,进一步制成HCG的化学发光法定量测定试剂盒。结果 对用3种标记工艺获得的试剂的各项性能指标进行考察,结果过碘酸钠法各指标表现均衡,测值准确;4-马来酰亚胺基丁酸-N-琥珀酰亚胺酯[N-(4-Maleimidobutyryloxy)succinimide, GMBS]法灵敏度高但热稳定性不佳;戊二醛法灵敏度过低且样本比对结果偏高。结论 用过碘酸钠法标记碱性磷酸酶与单抗获得的试剂在最低检测限、精密性、热稳定性及样本测定值比对各项指标中表现良好,是本研究推荐的一种标记工艺。

[关键词] 化学发光; 标记; 过碘酸钠; 碱性磷酸酶

Process comparison of conjugating alkaline phosphatase with anti-human chorionic gonadotropin antibody

DU Ye*, LI Ji, PENG Bo

(Shanghai Kehua Bioengineering Co., Ltd, Shanghai, China, 200233)

[ABSTRACT] Objective To compare 3 conjugating processes of alkaline phosphatase(AP) with anti-human chorionic gonadotropin(HCG) monoclonal antibody by determining the limit of detection, precision, thermal accelerated stability and clinical relevance. Methods AP and anti-HCG McAb were conjugated by employing 3 commonly used protein-coupled methods. Further the HCG quantitative detection kit was developed. Results All the performance characteristics of the 3 conjugating processes were compared. The sodium periodate method performed best with accurate measurement; the 4-maleimidobutyric acid N-hydroxy-succinimide (GMBS) method performed with high precision but bad thermal accelerated stability; and the glutaral performed with low precision and poor clinical relevance. Conclusion The sodium periodate conjugating method was recommended by this study for it's well performing in the the limit of detection, precision, thermal accelerated stability and clinical relevance.

[KEY WORDS] Chemiluminescence; Conjugation; Sodium periodate; Alkaline phosphatase

化学发光免疫分析法是继放射性免疫分析、酶联免疫分析、荧光免疫分析和时间分辨荧光后发展起来的一种新的标记免疫分析。在国内的临床免疫分析上,酶联免疫法一度是使用最广泛的手段。然而相比酶免法,化学发光法具有灵敏度高、线性范围宽等众多优势。因此,近年来,全自动的化学发光测定体系迅速兴起,正逐渐取代原来的酶免分析法。

在化学发光法中所使用的发光体系,主要包

括吖啶酯-H₂O₂^[1]、鲁米诺-辣根过氧化物酶(horse radish peroxidase, HRP)^[2]以及3-(2-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3-磷氧酰)-苯基-1,2-二氧环乙烷二钠盐[(3-[2-spiroadamantane]-4-methoxy-4-[3-phosphoryloxy]-phenyl-1,2-diox)Dioxetane, AMPPD]-碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AP)^[3]。其中鲁米诺-HRP体系因其价格低廉且HRP的标记方式简单,是国内体外诊断试剂厂家在研制化学发光试剂过程中采用较多的发光体

基金项目:国家高技术研究发展计划(863计划)(2011AA02A101)

作者单位:上海科华生物工程股份有限公司,上海 200233

*通讯作者:杜晔, E-mail: duyue702@163.com

系。但这一体系也存在发光平台期短、易受污染、重复性差等先天缺陷。相比之下,AMPPD-AP体系发光信号的平台期长、背景值低,底物长期稳定,在性能上更适合高精度的化学发光法进行搭配。然而在实际过程中AP标记抗原或抗体的工艺要较HRP更复杂,效率更低,在一定程度上也限制了AMPPD-AP这种高效的发光体系的应用。本研究分别使用了3种标记工艺,将AP与抗-人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, HCG)的单抗相偶联,并与包被了抗-HCG单抗的磁性微粒一起组成化学发光法HCG定量测定试剂盒,通过测定HCG的校准品、质控及临床样本来评价3种标记工艺之间的优劣。

1 材料与方法

1.1 主要原材料

主要原材料见表1。

1.2 主要仪器

主要仪器见表2。

1.3 方法

1.3.1 抗体-酶标记物的制备

1.3.1.1 戊二醛两步标记法(戊二醛法) 戊二醛的标记方法参考洪孝庄等人^[4]报道的方法进行。(1)将25%浓度的戊二醛母液以浓度10 mmol/L, pH 6.8的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline,

PBS)稀释至2.0%备用;(2)将AP溶于2.0%的戊二醛溶液,制备成20 mg/mL的AP戊二醛溶液,在生化培养箱中25℃静置过夜;(3)将AP戊二醛溶液转移至透析袋中,于2℃-8℃中的PBS(10 mmol/L, pH 7.0)透析过夜,期间更换一次透析液。取出后测量溶液体积,并计算醛化AP的浓度;(4)将醛化AP用PBS调整浓度至2 mg/mL;(5)取总量为1 mg的单抗McAb2(PBS缓冲体系,浓度4 mg/mL),与2.0 mL醛化AP相混合后转移至透析袋,在生化培养箱中25℃下以浓度50 mmol/L, pH 9.6的碳酸盐缓冲液(carbonate buffer, CB)透析过夜,期间更换2次透析液;(6)更换为PBS后继续在2℃-8℃透析6 h,期间更换2次透析液。(7)取出透析物,加等体积甘油后-20℃或以下保存。

1.3.1.2 改良过碘酸钠法 过碘酸钠标记法源于HRP与蛋白质的偶联工艺^[5-6],经过本实验室改良后,也成功用于了AP与抗体的偶联,具体流程如下:(1)取1 mg AP溶于200 μL 0.3 mol/L pH 8.0的NaHCO₃缓冲液中;(2)加1 mL 0.06 mol/L的过碘酸钠,室温下避光轻搅0.5 h;(3)加1 mL 0.16 mol/L的乙二醇,室温下轻搅1 h,终止氧化;(4)在0.01 mol/L pH 9.5的CB缓冲液中2℃-8℃透析过夜;(5)于1 mg醛化AP中加入0.5 mg抗体的CB缓冲液1 mL,室温避光轻搅3 h;(6)加入

表1 主要原料列表

Table 1 List of main raw materials

主要原料名称	生产厂商
4-马来酰亚胺基丁酸-N-琥珀酰亚胺酯 [N-(4-Maleimidobutyryloxy)succinimide, GMBS]	百灵威科技有限公司
AMPPD	西亚试剂
HCG 抗原	Fitzgerald
磁微粒	Merck
二甲基亚砜(Dimethyl Sulphoxide, DMSO)	上海慧颖生物科技有限公司
二巯苏糖醇(DL-Dithiothreitol, DTT)	百灵威科技有限公司
过碘酸钠	Alfa Aesar
碱性磷酸酶(AP)	美国 sigma
抗 HCG 标记单抗(McAb2)	上海科华生物工程股份有限公司
抗 HCG 捕获单抗(McAb1)	上海科华生物工程股份有限公司
硼氢化钠	国药集团化学试剂有限公司
戊二醛	国药集团化学试剂有限公司
其他化学试剂	国药集团化学试剂有限公司

表2 仪器和设备

Table 2 List of instruments and equipments

仪器设备名称	厂商
37℃恒温水箱	上海一恒科技仪器有限公司
pH计(Delta320)	梅特勒-托利多
电子天平(AL104)	梅特勒-托利多
电子天平(GB1302)	梅特勒-托利多
电子天平(EX10201)	奥豪斯仪器(上海)有限公司
生化培养箱 SPX-400	上海跃进医疗器械有限公司
冷冻离心机 5417R	EPPENDORF
旋涡混合器 XW-80A	江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司
紫外分光光度计 UV-2450	日本岛津公司
全自动化学发光测定仪卓越 C1800	上海科华实验系统有限公司

5 mg NaHB₄, 放 2℃-8℃过夜; (7) 在 0.01 mol/L, pH 7.2 PBS 中 2℃-8℃透析 24 h; (8) 4℃, 4 000 rpm/min 离心 30min, 除去沉淀; (9) 加等体积甘油, 低温保存。

1.3.1.3 双功能交联法 目前可用于蛋白质交联的交联剂种类繁多, 总共不下 100 种, 但被成熟应用的主要有 N-琥珀酰亚胺 3-(2 吡啶基二硫) 丙酸酯及以 GMBS^[7] 为代表的马来酰亚胺-琥珀酰亚胺系列交联剂。这两种交联剂都属于双功能交联剂, 在交联过程中可避免破坏蛋白质的自身结构, 不影响其生物活性。本实验室重点对 GMBS 的交联方法做了探索, 并优化出了一套较为成熟的 AP 标记工艺, 其过程如下 (以下称为 GMBS 法)。(1) AP 的马来酰亚胺化: 取 7.15 mg GMBS, 溶于 3.6 mL DMSO 中; 用 PBS 溶解 AP, 并调整浓度至 1 mg/mL; 将 GMBS 和抗体溶液相混合, 在 37℃下孵育 30 min; 再将溶液转移至透析袋, 在 pH 7.0 的 PBS 透析 4 h, 期间更换一次透析液; 取出透析物, 用超滤膜浓缩至 10 mg/mL, 备用。(2) McAb2 的巯基化: 将单抗 McAb2 用 pH 7.4 的 PBS 调整至 1 mg/mL; 将 215 μL 的 10 mmol/L 的 DTT 水溶液加入到 1 mL 的单抗 McAb2/PBS 溶液中, 混匀后在生化培养箱中 25℃下孵育 30 min; 在 HisTrap Desalting G25 上以 PBS 冲洗脱盐, 流速 5 mL/min。(3) 标记和纯化: 将马来酰亚胺化的 AP 和巯基化的单抗 McAb2 混合, 在生化培养箱中 37℃下孵育 2 h; 在 Sephadex G-25 上分离纯化, 洗脱液为 pH 7.4 的 PBS; 标记物以超滤膜浓

缩至约 1 mg/mL, 加等体积甘油后 -20℃或以下保存。

1.3.2 工作试剂的制备

1.3.2.1 磁珠试剂的制备 按照 Merck 公司提供的抗体包被工艺将单抗 McAb1 以 40 μg/mg 磁珠的比例包被在磁珠上。用 pH 7.5, 含 1% BSA 的 Tris-HCL 缓冲液将包被了单抗 McAb1 的磁珠稀释至 0.4 mg/mL 作为工作试剂备用。

1.3.2.2 酶试剂的制备 将标记过 AP 的 McAb2 用 pH 7.4, 含有 1% 酪蛋白和 0.5% 吐温-20 的 Tris-HCL 溶液稀释至 1 μg/mL 作为工作试剂备用。

1.3.3 酶标记物的评价 将 3 种工艺所标记的抗体搭配磁珠试剂制备成 3 套工作试剂, 分别在科华全自动化学发光测定仪 C1800 上按样本 10 μL、磁珠试剂 100 μL、酶试剂 100 μL 的加样量, 以一步法测试下列项目。

1.3.3.1 灵敏度 将 0 值校准品连续测定 20 次, 计算相对光单位 (relative light unit, RLU) 的平均值 (mean, M) 和标准差 (standard deviation, SD), 在校准曲线上计算 M+2SD 的浓度值, 即为最低检测限。最低检测限是体现试剂灵敏度最直接的指标。

1.3.3.2 精密性 制备高 (约 2 000 mIU/mL)、中 (约 200 mIU/mL)、低 (约 10 mIU/mL) 3 个混合血清样本, 分别用 3 套工作试剂在同一轮测试中分别测定 10 次, 计算各自的变异系数 (coefficient of variation, CV), 即为各自的轮内 (within-run) 精密性; 在连续 10 次测试中分别测定 3 个血清样本,

再计算各样本 10 次结果的变异系数,即为轮间(inter-run)精密性。

1.3.3.3 热稳定性 将酶试剂分装后分别置于 2℃-8℃和 37℃,3 天后取出在 C1800 上测定 HCG 校准品,比较反应信号的变化幅度。

1.3.3.4 临床比对

1.3.3.4.1 样本来源 样本来自上海龙华医院门诊或体检人员。

1.3.3.4.2 样本数量 不小于 100 例。

1.3.3.4.3 样本采集标准 (1)样本无溶血或脂血,在 2℃-8℃保存不超过一周,无冻融;(2)经 Roche 公司绒毛膜促性腺激素及 β 亚单位检测试剂盒(电化学发光法)测定;(3)在 0-10 000 mIU/mL 范围内均匀分布。

1.3.3.4.4 结果分析 (1)以考核试剂测定结果为横坐标,靶值为纵坐标作两组结果的相关性方程,并计算相关性系数 R²;(2)采用 Bland-Altman 统计学方法^[6],以考核试剂测定结果为横坐标,考

核试剂与靶值之间的差异为纵坐标作图,计算所有差值的 M 及 SD,并根据公式 A±1.96SD 得到覆盖 95%置信区间的一致性界限范围。

2 结果

2.1 最低检测限

由戊二醛法、过碘酸钠法和 GMBS 法标记的酶试剂测定所得的最低检测限分别为 3.12 mIU/mL、0.33 mIU/mL、0.15 mIU/mL。因此本指标中 GMBS 法最优,过碘酸钠法次之,戊二醛法不佳。

2.2 精密性

3 套试剂完成所有测试后计算各样本的轮内和轮间测定精密性,并取各组统计结果的平均值进行比较,如表 3。结果过碘酸钠法和 GMBS 法整体水平比较接近,而戊二醛法则受限于反映信号较低,特别是在中低浓度的样本测定 CV 上,要略高于过碘酸钠法和 GMBS 法。

表 3 3 套试剂的精密性
Table 3 Precision of the 3 kits

样本	戊二醛法		过碘酸钠法		GMBS法	
	轮内 CV	轮间 CV	轮内 CV	轮间 CV	轮内 CV	轮间 CV
低值	5.12%	5.56%	3.22%	4.31%	3.17%	4.18%
中值	6.11%	5.78%	3.12%	4.26%	4.15%	4.75%
高值	3.88%	4.13%	2.11%	4.11%	3.02%	3.35%
平均	5.10%		3.52%		3.77%	

2.3 热稳定性

3 套酶试剂,在 37℃热加速破坏 3 d 后,再测定校准品,将其各点反应信号与 2℃-8℃保存的酶试剂相比。并计算除 0 值校准品外其它各点的 RLU 变化比例及平均值,见表 4。结果戊二醛法和过碘酸钠法的试剂热稳定性较好,反应 RLU 降幅平均都小于 10%,而 GMBS 法的试剂反应 RLU 平均降幅达到了 24.2%,表明由 GMBS 法制得的抗体-碱性磷酸酶复合物其热稳定性不佳。

2.4 临床比对

共收集了 143 例符合要求的血清样本,分别用 3 套工作试剂测定,并计算结果与靶值的相关性和一致性,见图 1 至图 6。将 3 组结果的相关性

表 4 3 套试剂的热稳定性比较
Table 4 Thermal stability of the 3 kits

浓度 (mIU/mL)	偏差		
	戊二醛法	过碘酸钠法	GMBS 法
0	/	/	/
25	7.2%	7.2%	26.6%
200	6.4%	6.3%	24.8%
1000	9.2%	7.2%	20.1%
4000	10.0%	7.5%	25.3%
8000	7.9%	9.2%	24.7%
12000	7.9%	5.1%	23.8%
平均偏差	8.1%	7.1%	24.2%

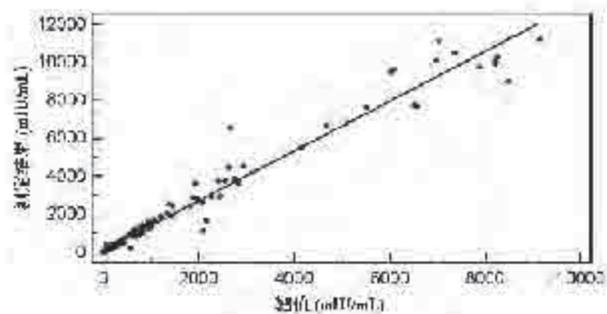


图1 戊二醛法测值相关性

Figure 1 The results of correlation by using glutaral method

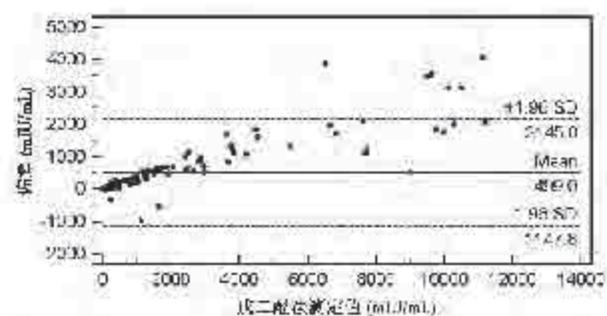


图2 戊二醛法测值一致性

Figure 2 The results of conformity by using glutaral method

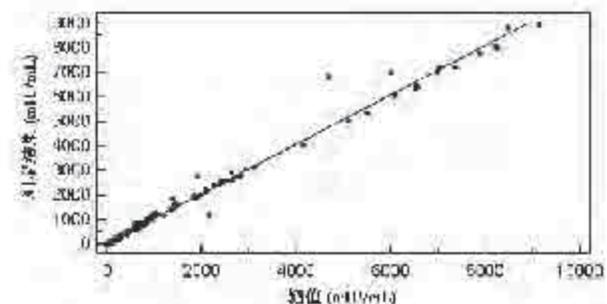


图3 过碘酸钠法测值相关性

Figure 3 The results of correlation by using sodium periodate method

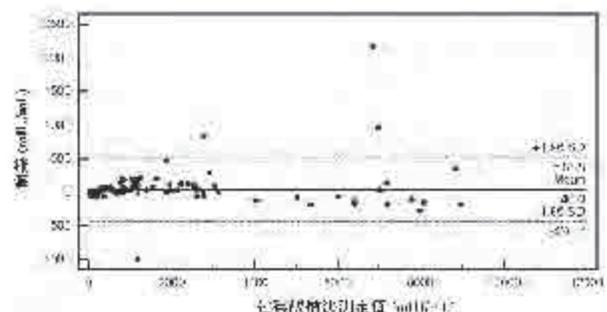


图4 过碘酸钠法测值一致性

Figure 4 The results of conformity by using sodium periodate method

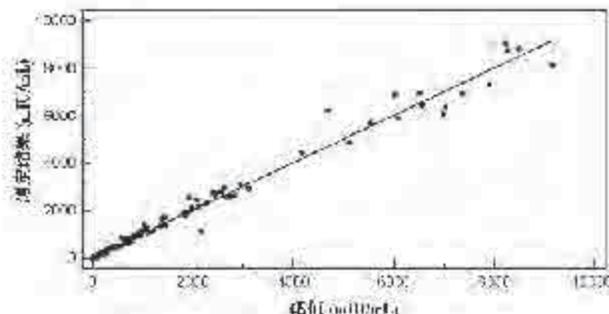


图5 GMBS法测值相关性

Figure 5 The results of correlation by using GMBS method

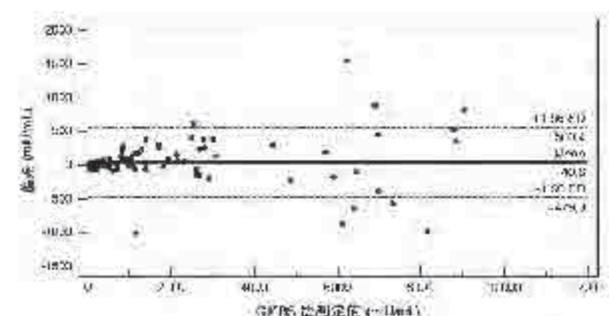


图6 GMBS法测值一致性

Figure 6 The results of conformity by using GMBS method

方程、相关性系数、与靶值的平均差异及一致性界限指标列表比较,见表5。

戊二醛组的相关方程斜率达到了1.31, 相关系数也较另外两组低, 说明由戊二醛法标记的抗体在测定样本时结果整体偏高, 平均差异达到了499.0 mIU/mL, 显著高于过碘酸钠组的46.0 mIU/mL和GMBS组的40.6 mIU/mL。过碘酸钠组与GMBS组的比对结果在斜率、相关性及与靶值的平均差异3个指标上都比较相近, 但前者的一致性界限要略小于GMBS法。比较图4和图6也可以发现, 过碘酸钠组中测定结果超过一致性界限的有4例, 样本集中在中部; 而GMBS组中结果超过一致性界限的有9例, 且样本整体离散度更高。因此本研究认为在临床样本的比对上过碘酸钠法优于GMBS法和戊二醛法。

2.5 小结

综合以上各指标的考察结果, 对3种标记工艺进行评价。戊二醛法由于其灵敏度较低(最低检测限较高)且在临床样本的比对中表现出与靶值偏差较大的缺点, 难以满足体外诊断试剂的性能

表 5 3套试剂临床测试对比
Table 5 Clinically test comparison of the 3 kits

项目	戊二醛法	过碘酸钠法	GMBS法
相关性方程	$y = 96.0268 + 1.3111x$	$y = 35.9409 + 1.0078x$	$y = 41.4308 + 0.9993x$
相关性系数 R^2	0.967	0.987	0.984
与靶值平均差异(A)	499.0 mIU/mL	46.0 mIU/mL	40.6 mIU/mL
一致性界限	1147.8~2145.8 mIU/mL	426.7~518.8 mIU/mL	479.3~560.4 mIU/mL

要求;GMBS法制备的试剂获得了3组中最高的灵敏度,但热稳定性不佳极大的限制了其在各研究中的应用;过碘酸钠法工艺成熟易控,性能均衡,是本研究推荐的一种抗体-碱性磷酸酶的偶联工艺。

3 讨论

戊二醛是一种常用的同型双功能交联剂,它的分子结构中具有两个醛基,可分别与蛋白质的氨基形成 Schiff 碱($-N=C-$),进而形成五碳桥结构。戊二醛的连接反应是较温和的交联反应,对蛋白质的三级结构影响较小。戊二醛法交联一般可分为一步法和两步法^[9,10]。一步法工艺简单、操作方便,但是交联过程中分子间的反应比例无法控制,会产生大量的自交联产物,因此其交联效率极低。本研究中使用两步法交联,先将戊二醛和 AP 作用,再透析除去多余戊二醛后,于 pH 9.6 的缓冲液中再与抗体作用而形成抗体-酶复合物。此法的效率可高于一步法 10 倍左右,但整体的交联效率仍属于较低水平。

过碘酸钠法是在戊二醛法之后发展起来的一种交联工艺,最早被 Nakne 等人发明。起初被广泛应用于 HRP 与抗体的交联,并因此推动了酶联免疫法的发展^[11,12]。过碘酸钠的氧化能力适中,且具有一定的选择性,可将邻位羟基氧化成醛基^[13],又不会将其进一步氧化成羧酸。因此,过碘酸钠可将 HRP 分子中糖链上的羟基转化成醛基进而和抗体上的氨基进行交联,其交联效果要显著好于戊二醛法。骆加理等^[5]在对 HRP 交联羊抗兔单抗的研究中,用戊二醛两步法获得的酶与抗体的结合效率约在 4%,而用简易的过碘酸钠法获得的结合效率则可达到 70%左右,是约前者的 17 倍。而 Tsang 等^[14]在用过碘酸钠法交联 HRP 和羊抗人抗体的过程中,将氧化的 pH 调整到 5.0,而氧化时间缩短

为 5 min,并将酶与抗体的分子比提升到 6:1,交联 pH 提升到 10.0,也获得了灵敏度为市售商品约 2 倍的抗体-酶复合物。

本研究将这种方法引用到 AP 与抗体的交联上。但是 HRP 分子表面的糖基含量约为 18%,而 AP 表面的糖基含量只有约 8%,无法提供足够的羟基作为反应基团,因此起初交联的效果不如 HRP。为了解决这一问题,我们对这一交联工艺进行了改良,将溶解酶用的缓冲液由酸性改成了弱碱性,并进一步升高碘酸钠的使用浓度,增加还原时间,提高了 AP 表面羟基转化为醛基的效率^[15,16],使得本研究中通过过碘酸钠法制得的标记物获得了相对于戊二醛两步法约 10 倍的反应灵敏度,提示前者酶与抗体的结合效率约为后者的 10 倍。考虑到 AP 的糖基含量不如 HRP 的一半,因此本研究中 AP 的醛化率实际上已高于骆加理等人研究中 HRP 的醛化率。今后,如果能通过基因工程的方式获得糖基含量的更高的 AP 分子,则通过这一方法获得的酶-抗体复合物也将会有更高的灵敏度。

此外,由于通过酶分子表面的醛基与抗体表面的氨基所形成的连接距离较短,可能在酶分子与抗体分子之间产生多个连接位点,从而也使得这种交联产物结构比较稳定,适合用来制备需要长效期的诊断试剂。

马来酰亚胺-琥珀酰亚胺系列的交联剂是在日本发展起来的新型双功能交联剂。通过人工合成将两个马来酰亚胺和琥珀酰亚胺之间以碳链相连接,制成包括 N-(11-马来酰亚胺十一酰基氧)琥珀酰亚胺、N-(6-马来酰亚胺己酰基氧)琥珀酰亚胺 [N-(6-maleimidocaproyloxy)succinimide, EMCS] 及本研究中所用的 GMBS 等一系列交联剂。这一系列的交联剂化学性质相近,但依靠连接两个亚胺的不同碳链的长度来获得各种不同臂长,可满足

足不同领域的分子交联,因此发展非常迅速^[17-20]。Hiroo等^[21]用GMBS活化卡那霉素,用2-亚氨基噻吩对卵清蛋白巯基化,成功将卡那霉素与卵清蛋白相偶联,并以此制备成卡那霉素免疫检测试剂的固相部分,配合HRP标记的抗卡那霉素抗体用以检测牛、猪、鸡的血浆和尿液中的卡那霉素,检测灵敏度可达4PPM。Biyani等^[20]通过EMCS和DTT搭配,将一段合成的寡聚核苷酸和生物素相连接,进而制备出一种新型高通量的基因芯片试剂盒。而Qian等^[22]在研究不同的化学连接剂偶联恶性疟原虫Pfs25抗原和绿脓杆菌重组去毒外毒素rEPA过程中,使用DL-N-乙酰高半胱氨酸硫内酯(DL-N-acetylhomocysteine thiolactone, NAHT)对重组蛋白Pfs25进行巯基化,成功的与用EMCS活化的rEPA进行了偶联,且偶联效率要高于其他方法。

这一系列的交联剂虽然使用范围较广,但也存在技术难点,即需要对目标分子进行巯基化。对抗体的巯基化一般可通过蛋白酶水解抗体的铰链区或使用DTT等化学还原剂作用抗体产生。前者破坏了抗体的分子结构使其分解为Fc段和Fab段,而要想得到有效的标记物,除保证有抗体特异性的Fab段生物活性不受损外,还需除去游离的Fc段,因此实际应用困难重重;而通过化学还原剂作用抗体产生巯基,则需要根据不同抗体的活性摸索精准的还原剂用量、反应温度及作用时间等条件。因此需要对不同的交联对象甚至不同的交联量制定不同的交联工艺,有碍于在生产中的大规模运用。

本研究中选取了GMBS作为交联剂,DTT作为巯基化试剂,将AP与抗-HCG单抗进行交联,通过优化酶分子的马来酰胺化条件与抗体分子的巯基化条件,获得了灵敏度比过碘酸钠法高一倍的标记物。但是其热稳定性不佳,推测原因在于巯基化条件未达到最优,没有形成足够多的巯基与马来酰胺化的酶分子相连接,或形成的巯基不够稳固。因此,用马来酰亚胺-琥珀酰亚胺系列交联剂交联的工艺下一步的改进应着眼于抗体巯基化条件的优化。

而巯基化条件的改善应从3个方面实现。第一,选择合适的巯基化试剂。可用于巯基化的化学试剂较多,除文中涉及的2-亚氨基噻吩、DTT和

NAHT外,N-琥珀酰亚胺S-乙酰硫代乙酸盐(N-succinimidyl-S-acetylthioacetate, STAT)及N-琥珀酰亚胺S-乙酰硫代丙酸盐(N-succinimidyl-S-propionylthioacetate, STAP)也是较常用的商品化巯基试剂。这些试剂氧化能力并不相同,其中STAT及STAP氧化能力最高,NAHT相对较弱。在巯基化时应选择氧化能力适中的试剂,避免产生过氧化效应而使得氧化对象发生聚合。第二,巯基化过程中的试剂浓度、反应温度、pH及反应时间等都会对最终的巯基化效果及稳定性产生影响,因此如何使巯基化条件达到最优需要大量的实验摸索。第三,巯基化抗体的纯化。巯基化反应结束后,得到的产物往往是巯基化试剂、巯基化抗体与尚未游离抗体的混合物。如何将所需的巯基化抗体纯化出来则直接影响后续与酶的交联效果。

在本研究中所比较的3种工艺中,除戊二醛法技术比较落后外,另外2种都是主流的蛋白质标记方法,并且还在各研究机构和企业的应用中获得了不断的改进和发展。相比较之下,过碘酸钠法工艺成熟,在实际应用中更容易放大规模,因此非常适合企业的生产应用。而由GMBS所代表的一大类双功能交联剂由于种类丰富,适用范围广,因而更适合在各科研领域中对研究对象进行“个性化定制”。

参考文献

- [1] 李振甲,应希堂,马世俊. 化学发光免疫分析技术的研究现状与展望[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(1): 95.
- [2] Nakamura H, Abe Y, Koizumi R, et al. A chemiluminescence biochemical oxygen demand measuring method [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2007, 602(1): 94-100.
- [3] Kim S, Kim JH, Yeon SY, et al. Clinical performance evaluation of four automated chemiluminescence immunoassays for hepatitis C virus antibody detection [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2008, 46 (12): 3919-3923.
- [4] 洪孝庄,孙曼雯. 蛋白质连接技术[M]. 中国医药科技出版社, 1993, 2-32.
- [5] 骆加理,沈炳贵,宋光承,等. 辣根过氧化物酶(HRP)标记抗体的简易方法[J]. 生物化学与生物物理学学报, 1981, 13(1): 1-8.
- [6] Wisdom GB. Conjugation of antibodies to horseradish peroxidase [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2005, 295: 127-130.

- [7] Yoo B, Ghosh SK, Kumar M, et al. Design of nanodrugs for miRNA targeting in tumor cells[J]. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 2014,10(6):1114-1122.
- [8] Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement[J]. *Lancet*, 1986,1(8476):307-310.
- [9] 李福枝, 陈承, 谭平. 戊二醛交联聚乙烯醇壳聚糖膜的制备与性能研究[J]. *化学工程与装备*, 2014,37(12):4-7.
- [10] 汪海波, 梁艳萍, 李云雁, 等. 交联方法对草鱼胶原蛋白白海绵性能的影响[J]. *水产学报*, 2013,37(1):132-139.
- [11] Godoy-Navajas J, Aquiar CMP, Gomez-Hens A. Heterogeneous immunoassay for soy protein determination using Nile blue-doped silica nanoparticles as labels and front-surface long-wavelength fluorimetry[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2011,701(2):194-199.
- [12] Charbgo F, Mirshahi M, Sarikhani S, et al. Synthesis of a unique high-performance poly-horseradish peroxidase complex to enhance sensitivity of immunodetection systems[J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2012,59(1):45-49.
- [13] 赵兵, 林红, 陈宇岳. 高碘酸钠选择性氧化纤维素研究进展[J]. *现代纺织技术*, 2013,22(5):58-61.
- [14] Tsang VC, Greene RM, Pilcher JB. Optimization of the covalent conjugating procedure (NaIO₄) of horseradish peroxidase to antibodies for use in enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *Journal of Immunoassay*, 1995, 16(4):395-418.
- [15] Shrestha D, Bagosi A, Szollosi J, et al. Comparative study of the three different fluorophore antibody conjugation strategies[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2012, 404(5):1449-1453.
- [16] Minamihata K, Goto M, Kamiya N, et al. Site-specific conjugation of an antibody-binding protein catalyzed by horseradish peroxidase creates a multivalent protein conjugate with high affinity to IgG[J]. *Biotechnology Journal*, 2015,10(1):222-226.
- [17] Shafiee H, Lidstone EA, Jahanqir M, et al. Nanostructured optical photonic crystal biosensor for HIV viral load measurement[J]. *Scientific Reports*, 2014,4:4116.
- [18] Kubinova S, Hrak D, Vanecek V, et al. The use of new surface-modified poly (2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels in tissue engineering: treatment of the surface with fibronectin subunits versus Ac-CGGASIKVAVS-OH, cysteine, and 2-mercaptoethanol modification [J]. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 2014, 102(7):2315-2322.
- [19] Hiroo W, Atsuko S, Yasumasa K, et al. Production of monoclonal antibody and development of enzyme-linked immunosorbent assay for kanamycin in biological matrices[J]. *Analyst*, 1999,124(11):1611-1615.
- [20] Biyani M, Husimi Y, Nemoto N. Solid-phase translation and RNA-protein fusion: a novel approach for folding quality control and direct immobilization of proteins using anchored mRNA [J]. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34(20):e140.
- [21] Qian F. Conjugation of plasmodium falciparum pfs25 to pseudomonas aeruginosa exoprotein a with different chemical linkers[J]. *Chin J Parasitol Parasit Dis*, 2011, 29(4):254-257.

游离甲状腺素线性及回收实验的研究

孙臻懿* 潘洁 彭波

[摘要] 目的 本文旨在验证游离甲状腺素可否进行线性范围稀释实验及回收实验,为游离甲状腺素试剂盒校准品参考物质的研发及临床实验室人员提供理论基础及实验数据。方法 本文采用酪蛋白、去甲状腺激素血清、临床血清样本及无蛋白缓冲液作为基质,对相同基质的高浓度游离甲状腺素样本进行稀释,回收实验采用临床样本比例混合的方式进行测试。结果 线性稀释试验中各基质稀释样本的线性相关系数均未到达0.99线性要求,而回收实验结果临床样本的回收率也并未达到85%~115%的回收率要求,仅为58.7%。结论 本文验证了游离甲状腺素无法进行线性范围稀释及回收实验,建议采用超滤法或者平衡透析法等精确方法对游离甲状腺素试剂盒校准品参考物质进行赋值,同时不建议混合游离甲状腺素样本。

[关键词] 游离甲状腺素;稀释;回收;全自动化学发光法

The research of free thyroxine linearity and recovery experiment

SUN Zhenyi*, PAN Jie, PENG Bo

(Shanghai Kehua Bioengineering Co., Ltd, Shanghai, China, 200233)

[ABSTRACT] Objective To confirm the experiment of the linearity dilution and recovery whether fit for free thyroxine, and to provide a theoretical basis and experimental data for the development of free thyroxine calibration and clinical laboratory. Methods In this paper, casein, stripped serum, clinical serum samples and protein free buffer were used as matrices to dilute. The clinical samples blended in proportion were tested in recovery experiment. Results Linear correlation coefficient of all the diluted matrix samples in the linearity experiment were less than 0.99, and the recovery rate of the recovery experiment was only 58.7%, which didn't reach the requirement of 85%~115%. Conclusion The concentration of free thyroxine could not be linearity diluted and the recovery of the free thyroxine samples performed not very well. It is suggested that ultrafiltration, equilibrium dialysis or other precise methods should be applied to calibrate the free thyroxine assay, and the free thyroxine samples should not be mixed.

[KEY WORDS] Free thyroxine; Dilution; Recovery; Fully automatic chemiluminescence method

2010年中华医学会内分泌学分会开展的《十城市社区居民甲状腺调查》显示,在调查中的10个城市15 181名居民中,甲状腺结节的患病率则从2006年的10.2%提高到了18.6%,甲状腺机能减退患病率从3.8%提高到了6.5%,而其中能够接受正规有效治疗的患者则不到5%。由此可见,中

国居民人群由于碘盐摄入过多,精神压力过大等原因造成了中国人群甲状腺疾病的患病率呈逐年走高的趋势。

作为检测甲状腺状态的重要检测项目,游离甲状腺素的检测已被世界所认可。在人体内,99.95%以上的甲状腺素与甲状腺素结合蛋白结

项目基金:国家高技术研究发展计划(863计划)(2011AA02A101)

作者单位:上海科华生物工程股份有限公司,上海 200233

*通讯作者:孙臻懿, E-mail: sunzhenyi@skhb.com

合,处于结合状态,其中与甲状腺素结合球蛋白结合的约占75%,与白蛋白及甲状腺激素结合前白蛋白结合的则各占10%和15%^[1,2];游离的甲状腺素(free thyroxine, FT4)只占不到0.03%。FT4是甲状腺素(thyroxine, T4)的生理活性形式,反映了激素产生(甲状腺分泌、甲状腺外T4向三碘甲状腺原氨酸的转化)和激素清除(血管外转运、代谢)的真实状态。FT4比总甲状腺素更灵敏,是诊断原发性甲亢或甲减以及疗效评价的重要指标^[3]。特别是由于怀孕、使用类固醇类药物进行治疗、肾病综合症、口服雌激素避孕药等情况导致甲状腺素的蛋白结合浓度变化时,游离甲状腺素会更有利于对甲状腺功能的判断^[4,5]。

本文针对游离甲状腺素的特性,对其稀释及回收实验进行研究,从而为游离甲状腺素校准品参考物质的研发提供理论基础。

1 实验材料及方法

1.1 实验材料

全自动化学发光测定仪卓越C1800、卓越C1820(上海科华实验系统有限公司),移液器,漩涡振荡仪,上海科华生物工程股份有限公司生产的游离甲状腺素(FT4)定量测定试剂盒(化学发光法)(试剂批号:20131201501)。

1.2 样本线性实验

本实验选取4种基质的样本[酪蛋白(casein),去甲状腺激素血清(thyroxine hormone depleted serum, TDS),临床血清样本(clinical serum sample, CSS)及无蛋白缓冲液样本(磷酸缓冲液, phosphate buffered saline, PBS)],分别按表1进行稀释。

重复测定2次每个接近检测范围上限的高值

表1 不同基质样本线性实验
Table 1 Linearity experiment of different matrix samples

样本基质/稀释 基质(μL)	Casein/casein		TDS/TDS		CSS/TDS		CSS/casein		PBS/PBS	
	Sample 1	casein	Sample 2	TDS	Sample 3	TDS	Sample 3	casein	Sample 4	PBS
75%	375	125	375	125	187.5	62.5	187.5	62.5	375	125
50%	250	250	250	250	125	125	125	125	250	250
25%	125	375	125	375	62.5	187.5	62.5	187.5	125	375
10%	50	450	50	450	25	225	25	225	50	450
7.5%	37.5	462.5	37.5	462.5	18.5	231.5	18.5	231.5	37.5	462.5
5%	25	475	25	475	12.5	237.5	12.5	237.5	25	475

稀释度均由样本直接稀释得到,只进行一步稀释过程。casein:酪蛋白基质稀释液;TDS:去甲状腺激素血清;CSS:临床血清;PBS:磷酸盐缓冲液

样本(上海科华生物工程股份有限公司生产的FT4定量测定试剂盒(化学发光法)检测范围上限为8 ng/dL)及6个稀释样本,计算平均值。以稀释浓度(x_i)为自变量,检测结果均值(y_i)为因变量,用最小二乘法进行直线拟合求出线性回归方程,计算线性相关系数 r ;同时将稀释浓度(x_i)带入线性方程计算 y_i 的估计值,按公式 $B = \frac{M-T}{T} \times 100\%$ 计算 y_i 与估计值的相对偏差(B)或绝对偏差(M-T)(估计值的相对绝对偏差可以体现线性整体的偏差,克服线性相关系数的片面性)。式中:B-相对偏差;M- y_i 样本浓度;T- y_i 估计值浓度。按照GB/T

26124-2011《临床化学体外诊断试剂(盒)》中5.5线性范围的要求,当线性相关系数 $r \geq 0.99$ 时,认为样本符合线性稀释的要求。

1.3 回收实验

本实验采用2份临床血清样本A、B,将样本A(FT4浓度4 ng/dL以上)加入到样本B(FT4浓度0.8 ng/dL左右)中,所加入样本A与B之间的体积比例为1:9,得到样本C。样本各重复测定3次,计算各样本的测试平均值,根据公式(1)计算回收率R:

$$R = (C \times (V_0 + V) - C_0 \times V_0) / (V \times C_0) \times 100\% \quad (1)$$

其中:R-回收率;V-加入样本A体积; V_0 样本

B的体积;C-样本C的测定浓度;C₀样本B的测定浓度;C₁-样本A的浓度。

按照 GB/T 26124-2011《临床化学体外诊断试剂(盒)》的要求,当回收率R在85% - 115%的范围内时,认为样本回收实验符合要求。

2 结果

2.1 样本线性实验

本实验选取4种基质的样本(酪蛋白,去甲状腺激素血清,临床血清样本及无蛋白缓冲液样本),分别按表1进行稀释,其中酪蛋白样本采用

酪蛋白基质溶液线性稀释的结果见表2,可以看出采用酪蛋白基质进行线性稀释实验的线性相关系数为0.98812,未达到0.99的线性相关系数要求预期。酪蛋白基质样本采用酪蛋白溶液线性稀释结果图见图1。

去甲状腺激素血清基质样本采用去甲状腺激素血清进行线性稀释的结果见表3,可以看出采用去甲状腺激素血清进行线性稀释实验的线性相关系数为0.9878,未达到0.99的线性相关系数要求预期。去甲状腺激素样本采用去甲状腺激素血清线性稀释结果图见图2。

表2 酪蛋白基质样本采用酪蛋白溶液线性稀释结果

Table 2 Results of the linearity dilution of casein matrix samples by using casein diluent

	理论值(ng/dL)	测定值(ng/dL)	估计值(ng/dL)	绝对偏差	相对偏差%
100%	7.15	7.15	6.59	0.56	8.5%
75%	5.36	4.54	4.85	0.31	6.5%
50%	3.57	2.51	3.12	0.61	19.6%
25%	1.79	1.15	1.39	0.23	16.9%
10%	0.71	0.50	0.35	0.16	45.4%
7.5%	0.54	0.38	0.17	0.21	122.1%
5%	0.36	0.24	0.00	0.24	60011.3%
r	0.98812				

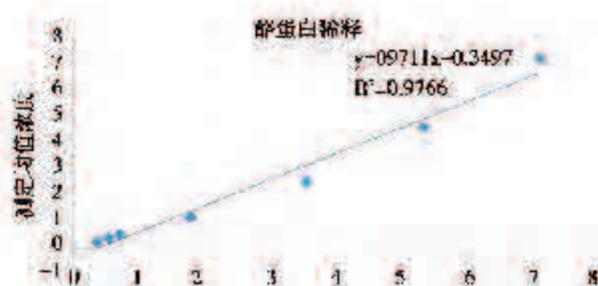


图1 酪蛋白基质样本采用酪蛋白溶液线性稀释结果图
Figure 1 The graph of linearity dilution of casein samples by using casein diluent

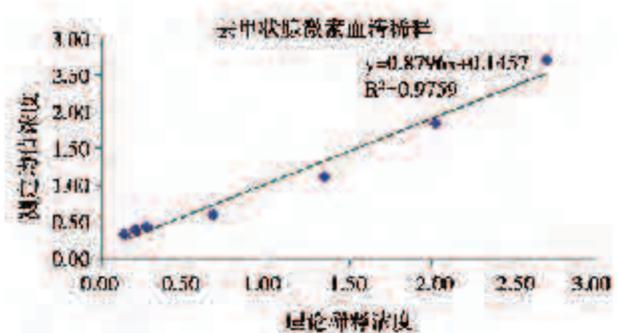


图2 去甲状腺激素血清基质样本采用去甲状腺激素血清线性稀释结果图
Figure 2 The graph of linearity dilution of TDS samples by using TDS

临床样本采用去甲状腺激素血清进行线性稀释的结果见表4,可以看出采用去甲状腺激素血清基质进行线性稀释实验的线性相关系数为0.9356,未达到0.99的线性相关系数要求预期。临床样本采用去甲状腺激素血清线性稀释结果图见图3。

临床样本采用酪蛋白基质溶液进行线性稀释的结果见表5,可以看出采用酪蛋白基质溶液进行

线性稀释实验的线性相关系数为0.9887,未达到0.99的线性相关系数要求预期。临床样本采用酪蛋白基质溶液线性稀释结果图见图4。

磷酸缓冲液基质样本采用磷酸缓冲液基质溶液进行线性稀释的结果见表6,可以看出采用磷酸

表3 去甲状腺激素血清基质样本采用去甲状腺激素血清线性稀释结果

Table 3 Results of the linearity dilution of TDS samples by using TDS

	理论值(ng/dL)	测定值(ng/dL)	估计值(ng/dL)	绝对偏差	相对偏差%
100%	5.34	5.34	4.57	0.77	16.74%
75%	4.00	2.83	3.41	0.59	17.21%
50%	2.67	1.63	2.26	0.63	27.89%
25%	1.33	0.89	1.10	0.21	19.14%
10%	0.53	0.55	0.40	0.15	36.67%
7.5%	0.40	0.51	0.29	0.22	77.62%
5%	0.27	0.47	0.17	0.30	173.56%
r	0.9878				

表4 临床样本采用去甲状腺激素血清线性稀释结果

Table 4 Results of the linearity dilution of clinical serum samples by using TDS

	理论值(ng/dL)	测定值(ng/dL)	估计值(ng/dL)	绝对偏差	相对偏差%
100%	10.63	10.63	8.64	1.99	23.0%
75%	7.97	4.81	6.31	1.50	23.8%
50%	5.32	2.28	3.97	1.69	42.7%
25%	2.66	1.13	1.63	0.51	30.9%
10%	1.06	0.67	0.23	0.43	186.3%
7.5%	0.80	0.58	0.00	0.58	50042.5%
5%	0.53	0.48	0.23	0.72	306.2%
r	0.9356				

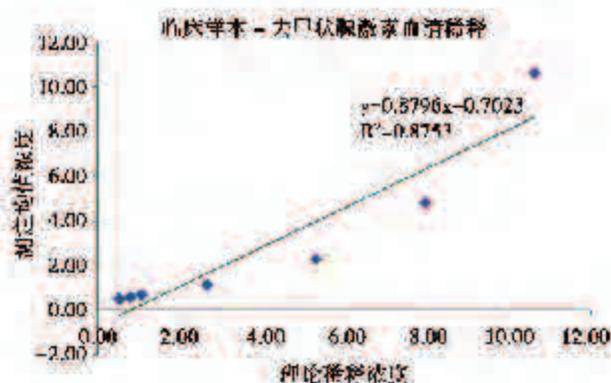


图3 临床样本采用去甲状腺激素血清线性稀释结果图
Figure 3 The graph of linearity dilution of clinical samples by using TDS

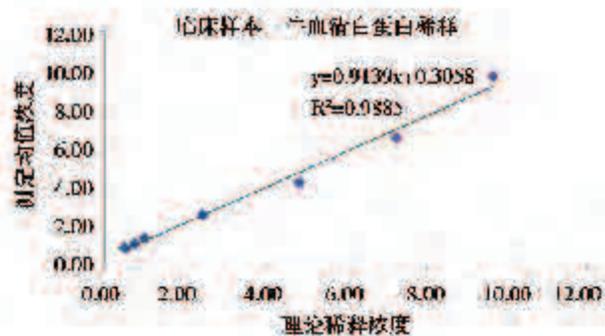


图4 临床样本采用酪蛋白溶液线性稀释结果图
Figure 4 The graph of linearity dilution of clinical samples by using casein diluent

缓冲液基质溶液进行线性稀释实验的线性相关系数为0.9728,未达到0.99的线性相关系数要求预期。临床样本采用磷酸缓冲液基质溶液线性稀释结果图见图5。

将线性稀释实验数据总结如下:采用酪蛋白基质进行线性稀释实验的线性相关系数为

0.98812;采用去甲状腺激素血清进行线性稀释实验的线性相关系数为0.9878;采用去甲状腺激素血清基质进行线性稀释实验的线性相关系数为0.9356;采用酪蛋白基质溶液进行线性稀释实验的线性相关系数为0.9887;采用磷酸缓冲液基质溶液进行线性稀释实验的线性相关系数为0.9728,

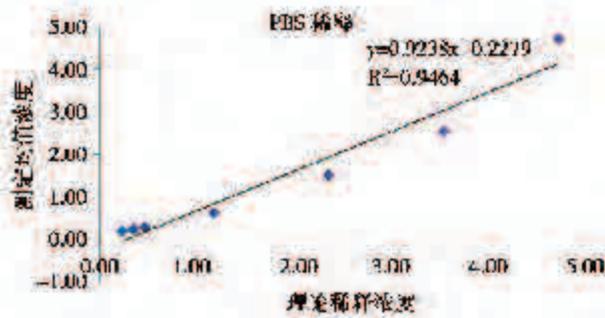


图5 磷酸盐缓冲液基质样本采用磷酸盐缓冲液线性稀释结果图

Figure 5 The graph of linearity dilution of PBS samples by using PBS diluent

均未达到0.99的线性相关系数要求预期。

2.2 回收实验

本实验采用2份临床血清样本A、B,按1.2操作进行回收实验,回收实验结果见表7。回收率结果仅为58.7%,未达到85%~115%的回收率要求预期。

3 讨论

从实验结果中可以看出,游离甲状腺素线性实验的线性相关系数 r 均小于0.99,实验稀释结果均不成线性,验证了以下公式: $[FT4] =$

表5 临床样本采用酪蛋白溶液线性稀释结果

Table 5 Results of the linearity dilution of clinical serum samples by using casein diluent

	理论值(ng/dL)	测定值(ng/dL)	估计值(ng/dL)	绝对偏差	相对偏差%
100%	9.69	9.69	8.94	0.75	7.75%
75%	7.26	6.13	6.75	0.51	7.00%
50%	4.84	4.02	4.57	0.27	5.53%
25%	2.42	2.16	2.39	0.08	1.14%
10%	0.97	1.35	1.09	0.12	12.01%
7.5%	0.73	1.07	0.87	0.14	19.22%
5%	0.48	0.84	0.65	0.17	34.40%
r	0.9887				

表6 磷酸盐缓冲液基质样本采用磷酸盐缓冲液线性稀释结果

Table 6 Results of the linearity dilution of PBS samples by using PBS diluent

	理论值(ng/dL)	测定值(ng/dL)	估计值(ng/dL)	绝对偏差	相对偏差%
100%	4.71	4.71	4.12	0.59	14.3%
75%	3.53	2.55	3.04	0.48	15.9%
50%	2.36	1.53	1.95	0.41	21.2%
25%	1.18	0.65	0.86	0.21	24.2%
10%	0.47	0.31	0.21	0.11	51.0%
7.5%	0.35	0.27	0.10	0.17	172.6%
5%	0.24	0.23	0.01	0.24	2532.2%
r	0.9728				

表7 回收实验

Table 7 The recovery experiment

样本A (ng/dL)	样本B (ng/dL)	样本C (ng/dL)	回收率%
4.47	0.86	1.04	58.7%

$\frac{C_{T4\text{结合}}}{C_{T4\text{未结合}} \times K_{eq}}$ 。式中: $C_{T4\text{结合}}$ -结合T4的表位浓度; $C_{T4\text{未结合}}$ -未结合T4的表位浓度; K_{eq} -反应常数。

由于每份样本的结合态甲状腺素与游离态甲状腺素存在一个动态平衡,且每份样本及稀释液

间存在蛋白种类及浓度的差异,造成了各样本间平衡结合常数 K 相同的可能性极小,故游离甲状腺素样本线性稀释的可能性很小,并不存在线性稀释游离甲状腺素样本的方法。同理,本次实验的回收实验也显示,由于临床样本间的平衡结合常数 K 明显不一致,混合后由于样本间蛋白种类及浓度的差异,平衡结合常数也发生改变,最终造成回收实验最终的回收率仅仅为58.7%,远低于85%~115%的范围。Wang等人分别对5种直接检测游离甲状腺素体系进行了临床样本回收试验,结果显示5个体系的不同蛋白浓度的样本回收率分别为2%~155%,25%~131%,53%~106%,37%~93%,和37%~73%^[9],其结果与本次样本回收实验所得到的结果一致;Nelson等人同样通过不同浓度的蛋白结合甲状腺素验证了不同游离甲状腺素试剂间检测此类样本存在着不准确性^[10]。结果均显示:回收实验中样本蛋白浓度以及平衡结合常数的变化不仅会影响样本的游离甲状腺素浓度,同时也会对直接检测游离甲状腺素体系产生干扰作用。

笔者按照上文阐述的实验方法对游离甲状腺素样本及回收进行了研究,线性稀释实验分别对酪蛋白基质、去甲状腺激素血清基质、临床血清样本及无蛋白缓冲液基质样本采用相同基质进行稀释,回收实验则采用临床样本比例混合进行测试,线性稀释试验线性相关系数小于0.99而回收实验结果回收率仅为58.7%,偏差不在85%~115%的范围内。论文验证了游离甲状腺素无法进行线性范围稀释实验及回收实验。故笔者建议临床实验室人员避免使用经稀释的游离甲状腺素样本及混合后的游离甲状腺素样本进行检测,样本的稀释及样本混合会造成样本游离甲状腺素结果的偏差。

而对于游离甲状腺素校准品及参考物质的研发,目前游离甲状腺素试剂的溯源方法主要分为2类:其中一种是将标准物质称重法溶解于溶液中,例如Elkins通过计算甲状腺素的结合能力^[11],来最终确定参考位置的浓度,亦或者是如Van Deventer和Soldin等人采用质谱的方法对其进行检测赋值^[2,14],但本文所验证的此类方法存在很大的局限性及试剂体系不兼容性;另一种则是采用超滤或者平衡透析的方法进行溯源,这也是目前被认为是目前检测游离激素“金标准”参考方法^[11,15,16]。

故笔者建议游离激素的赋值采用更为精确、不易受到干扰的超滤法及平衡透析法对检测方法进行溯源。若无法采用以上参考方法的,也应尽量采用称量法或者质谱法对公司参考品进行赋值,并将最终的检测方法与多家市场主流检测方法同时检测含有游离激素的临床样本,以减少可能存在的系统体系检测方法及其它干扰物质所引入的误差,从而提高检测方法的准确度。

参考文献

- [1] de Grande LA, van Uytvanghe K, Thienpont LM. A fresh look at the relationship between TSH and free thyroxine in cross-sectional data [J]. *Eur Thyroid*, 2015, 4(1):69-70.
- [2] Thienpont LM, van Uytvanghe K, Poppe K, et al. Determination of free thyroid hormones [J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2015, 27(5):689-700.
- [3] 中华医学会检验分会,卫生部临床检验中心,中华检验医学杂志编辑委员会. 甲状腺疾病诊断治疗中实验室检测项目的应用建议 [J]. *中华检验医学杂志*, 2012, 35(6):484-492.
- [4] Wenzel KW. Pharmacological interference with in vitro tests of thyroid function [J]. *Metabolism*, 1981, 30(7):717-732.
- [5] Moleti M, Trimarchi F, Vermiglio F. Thyroid physiology in pregnancy [J]. *Endocr Pract*, 2014, 20(6):589-596.
- [6] Midgley JE, Hoermann R. Measurement of total rather than free thyroxine in pregnancy: the diagnostic implications [J]. *Thyroid*, 2013, 23(3):259-261.
- [7] Medici M, Korevaar TI, Visser WE, et al. Thyroid Function in pregnancy: what is normal? [J]. *Clin Chem*, 2015, 61(5):704-713.
- [8] Negro R, Stagnaro-Green A. Diagnosis and management of subclinical hypothyroidism in pregnancy [J]. *BMI*, 2014, 349:g4929.
- [9] Wang R, Nelson JC, Weiss RM, et al. Accuracy of free thyroxine measurements across natural ranges of thyroxine binding to serum proteins [J]. *Thyroid*, 2009, 19(1):31-39.
- [10] Nelson JC, Weiss RM, Wilcox RB. Underestimates of serum free thyroxine concentrations by free T4 immunoassays [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1994, 79(1):76-79.

(下转第332页)

上海市健康成人血清铁蛋白参考值调查

江生* 彭波 李基

【摘要】目的 了解上海市健康成人血清铁蛋白参考值水平。方法 以上海科华生物工程股份有限公司生产的铁蛋白(Ferritin)定量测定试剂盒(化学发光法)对324例健康成人的铁蛋白水平进行测定。结果 健康成人血清铁蛋白浓度呈偏态分布,男性参考值水平为33.79 ng/mL~485.2 ng/mL,女性为6.37 ng/mL~251.0 ng/mL。结论 健康成人男、女两性的铁蛋白水平与文献报告有差异,由于地域及人群的差异,建议各地区、各实验室应建立自己的参考值范围,从而为临床提供有价值的依据。

【关键词】 铁蛋白;化学发光法;参考值

Reference values survey for serum ferritin in shanghai health adults

JIANG Sheng*, PENG Bo, LI Ji

(Shanghai Kehua Bioengineering Co., Ltd, Shanghai, China, 200233)

[ABSTRACT] Objective To study the reference value level for serum ferritin in Shanghai health adults. Methods Serum ferritin was detected by KHB Ferritin Quantitative Detection Kit (Chemiluminescent Immunoassay) in 324 health adults. Results The SF values were skewness distribution. Male reference values were 33.79 ng/mL~485.2 ng/mL. Female reference values were 6.37 ng/mL~251.0 ng/mL. Conclusion Ferritin levels in healthy adult male and female are different from the literature reports. Because of the difference of region and population, it is recommended that each laboratory establish its own reference values which provide valuable data for clinic.

[KEY WORDS] Ferritin; Chemiluminescent immunoassay (CLIA); Reference interval

血清铁蛋白的测定是监测铁代谢的有效指标。铁蛋白浓度下降并伴随着血红蛋白减少、小细胞性贫血,一般认为出现了铁缺乏^[1]。铁蛋白含量低于10 ng/mL~15 ng/mL通常被认为是缺铁性贫血^[1,2]。血清铁蛋白升高是肝铁过载的重要指标,肝铁过载可能导致肝硬化和肝纤维化^[3,4]。由感冒、肠炎、结核等各种感染性疾病引起的应激反应也会使血清铁蛋白升高,因此,血清铁蛋白高于15 ng/mL时,并不能完全排除缺铁性贫血^[5]。

溶血性贫血、巨幼红细胞性贫血、再生障碍性贫血及急性造血停滞等疾病会导致血清铁蛋白升高,病情好转时则恢复正常^[6]。糖尿病患者由于体

内胰岛素相对或绝对不足而引起糖、蛋白质、脂肪的代谢紊乱,蛋白质分解代谢增加及酶活力降低,引起肌红蛋白及酶中的铁蛋白释放入血,使血清铁蛋白水平增加^[7]。同时,有文献表明,血清铁蛋白对地中海贫血和缺铁性贫血有鉴别诊断意义,可用于地中海贫血基因携带者的筛查^[8]。

由于铁蛋白参考值在不同地区、群体以及方法学的不同其差异较大,男性高于女性,故建立一个地区和方法的参考值具有较大的临床意义,因此我对上海市的男女健康人群进行了血清铁蛋白的测定,以求建立一个合适本地区、本方法的参考值范围。

基金项目:国家高技术研究发展计划(863计划)(2011AA02A101)

作者单位:上海科华生物工程股份有限公司,上海 200233

*通讯作者:江生, E-mail:jiangsheng@skhb.com

1 材料与方法

1.1 调查对象

来自上海地区体检的健康成人, B超结果显示无脂肪肝、肝硬化及其它肝部疾病, 无炎症、感染及肾、肝和肺部慢性疾病。年龄为18岁-65岁, 平均年龄32岁, 共计324例样本, 其中男性样本164例, 女性样本160例。健康人群年龄分布见表1。

表1 324例健康人群年龄分布
Table 1 Age distribution of 324 health population sample

年龄分布	男性样本数	女性样本数
20岁以下	3	2
20岁~29岁	85	82
30岁~39岁	36	56
40岁~50岁	27	11
50岁以上	13	9
总计	164	160

1.2 样本收集

采集清晨空腹坐位的肘静脉血, 于3 500 r/min离心15 min-20 min, 排除可能干扰铁蛋白测定的溶血、脂血、黄疸样本, 分离出血清后一起上

机检测。

1.3 仪器及试剂

全自动化学发光测定仪卓越C1800(上海科华实验系统有限公司生产)及配套的铁蛋白(Ferritin)定量测定试剂盒(化学发光法)(上海科华生物工程股份有限公司生产)。

1.4 测定方法

测定方法为化学发光法。

1.5 质量控制

每次实验前按照仪器及项目的标准操作程序使用伯乐质控低、中、高值进行室内质量控制, 确认质控数据在控的前提下才进行实验。

1.6 统计方法

使用IBM SPSS Statistics 19软件进行分析统计, 并根据测定结果分别绘制浓度分布直方图。由于男、女血清铁蛋白数据呈偏态分布, 参考值范围采用百分位数法统计^[9]。

2 结果

2.1 不同公司同类试剂盒参考值范围确定情况

不同公司同类铁蛋白测定试剂盒参考值范围见表2。

表2 不同公司同类铁蛋白试剂盒参考值范围简介
Table 2 The reference rang of different ferritin kits

公司名称	试剂盒名称	健康人群(例)	参考值范围(ng/mL)
罗氏	铁蛋白(Ferritin)定量测定试剂盒(电化学发光法)	男性: 120	30~400
		女性: 104	13~150
雅培	铁蛋白测定试剂盒(化学发光微粒子免疫检测法)	男性: 32	21.81~274.66
		女性: 60	4.63~204.00
贝克曼	铁蛋白测定试剂盒(化学发光法)	男性: 49	23.9~336.2
		女性: 64	11.0~306.8

2.2 测定结果统计

164例男性血清样本和160例女性血清样本的测定结果均为偏态分布, 采用百分位数法做进一步的数据分析^[9](图1、图2)。164例男性血清样本的测定结果的均值为231.6 ng/mL, 其中测定结果最小值为14.82 ng/mL, 最大值为761.9 ng/mL, 中位数为213.9 ng/mL。按照百分位数法对所有测定结果进行分布排序, 选取覆盖5%-95%百分位数的测定范围作为铁蛋白血清参考值

范围, 本次测定确定的参考值范围为33.79 ng/mL-485.2 ng/mL。

160例女性血清样本的测定结果的均值为71.31 ng/mL, 其中测定结果最小值为2.44 ng/mL, 最大值为341.1 ng/mL, 中位数为46.31 ng/mL。按照百分位数法对所有测定结果进行分布排序, 选取覆盖5%-95%百分位数的测定范围作为铁蛋白血清参考值范围, 本次测定确定的参考值范围为6.37 ng/mL-251.0 ng/mL。

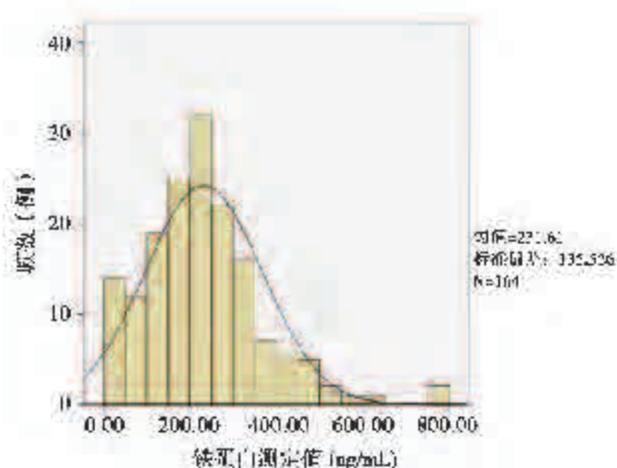


图1 164例健康男性人群铁蛋白测定结果直方图
Figure 1 Histogram of ferritin in 164 health male

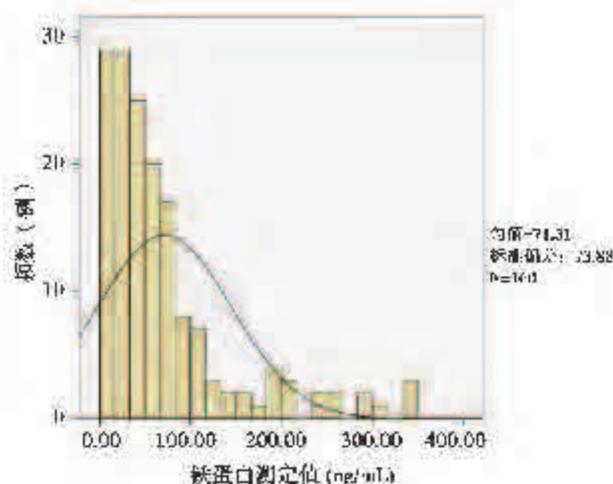


图2 160例健康女性人群铁蛋白测定结果直方图
Figure 2 Histogram of ferritin in 160 health female

表3 不同地域或其他人群的不同参考值范围

Table3 The different reference rang of different regions or the rest of the population

地区	年龄分布(岁)	参考值范围(ng/mL) (5%~95%百分位数浓度范围)		方法
		男性	女性	
上海市	18~65	33.79~485.2	6.37~251.0	化学发光法
德国 ^[10]	4~19	28.0~209.2	17.6~243.5	化学发光法
广西省 ^[11]	20~69	104.0~832.2	—	电化学发光法
四川省宜宾市 ^[12]	11~75	56.70~192.68	47.58~166.78	放射免疫法
浙江省杭州市 ^[13]	18~95	77.5~615.6	7.0~264.8	电化学发光法
广东省惠州市 ^[14]	25~82	46.7~623.9	17.2~201.5	电化学发光法
四川省攀枝花市 ^[15]	39~60	65.2~573.6	12.2~256.3	电化学发光法

2.3 调查结果与文献报告的血清铁蛋白结果比较

根据文献^[10-15]报道,不同国家或不同人种、同一国家不同地区、不同民族的铁蛋白在正常人群的参考范围都略有不同,因此参考值需要考虑地域或其他人群差异信息。参考美国临床实验室标准化协会 C28-A2^[20]要求,建议各地区、各实验室建立各自的参考范围。

3 讨论

铁蛋白是人体细胞内最重要的储铁蛋白,其主要功能是贮存并调节血清铁水平。同时,铁蛋白对造血及免疫系统具有重要的调控作用。随着经

济的发展,人们的生活水平不断提高,人们的生活方式和饮食结构发生了改变,体内的铁贮存量也有明显的变化。血清铁蛋白参考值范围的建立受很多变量的影响,包括研究人群和实验室使用方法。根据研究表明,年龄、体质量指数、运动、饮酒均会影响血清铁蛋白浓度。

医学参考值范围 (medical reference interval) 又称正常值。不同的条件(如地区、性别、年龄、生活水平、测定方法等)测出的范围也不同,所以不同的人群、不同的实验室应有自己的参考值范围。本次调查结果显示男性、女性血清铁蛋白的参考值与文献报道不一致,这可能与不同地区的人群条件、不同的检测标准化条件有关,这与国内外文献

报道的一致。根据表3显示,成人男性血清铁蛋白浓度明显高于女性,所以参考值范围有必要按照性别分组来设定。本次调查得出的参考值范围仅供上海地区使用上海科华生物工程股份有限公司生产的铁蛋白(Ferritin)定量测定试剂盒(化学发光法)的实验室作为参考。

临床检验项目的参考区间是临床医生判断患者健康与否的重要标准,实验室给临床提供的参考区间应正确适用,否则会导致误诊,甚至错误的医疗^[7]。根据临床应用目的不同,参考区间可以与健康相关联,以区分个体的健康状况。由于血清铁蛋白检测在临床贫血、肿瘤、肝肾疾病、流行性出血热、肺结核、甲状腺功能亢进、心脏病等领域中应用广泛^[8],因此,建议各地区、各实验室最好建立自己的血清铁蛋白参考范围,为临床提供可靠的检验报告。

参考文献

- [1] Wang W, Knowlton MA, Coffman LG, et al. Serum ferritin: Past, present and future [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010,1800(8):760-769.
- [2] Orino K, Watanabe K. Molecular physiological and clinical aspects of the iron storage protein ferritin [J]. *Veterinary Journal*, 2008,178(2):191-201.
- [3] Patel S, Monemian S, Khalid A, et al. Iron deficiency anemia in adult onset still's disease with a serum ferritin of 26,387 $\mu\text{g/L}$ [J]. *Anemia*, 2011,184748:1-4.
- [4] Zhu A, Kaneshiro M, Kaunitz JD. Evaluation and treatment of iron deficiency anemia: a gastroenterological perspective [J]. *Digestive Diseases and Sciences*, 2010, 55(3):548-559.
- [5] Chang JS, Lin SM, Huang TC, et al. Serum ferritin and risk of the metabolic syndrome: a population-based study [J]. *Asia Pac J Clin Nutr*, 2013,22(3):400-407.
- [6] Brugnara C, Adamson J, Auerbach M, et al. Iron deficiency: what are the future trends in diagnostics and therapeutics? [J]. *Clinical Chemistry*, 2013,59(5):740-745.
- [7] Joyce JC, Harold T, Robert EF. Hepcidin in human iron disorders: diagnostic implications [J]. *Clinical Chemistry*, 2011,57(12):1650-1669.
- [8] Takeshi N, Takahiro K, Masayoshi N. Importance of ferritin for optimizing anemia therapy in chronic kidney disease [J]. *Am J Nephrol*, 2010,32(5):439-446.
- [9] 金丕焕,陈峰. 医用统计学方法(第三版) [M]. 复旦大学出版社, 2009, 11:25.
- [10] Emlinger MW, Kühnel W, Ranke MB. Reference ranges for serum concentrations of luteinizing hormone (LH), follicle-stimulating hormone (FSH), estradiol (E2), prolactin, progesterone, sex hormone-binding globulin (SHBG), dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS), cortisol and ferritin in neonates, children and young adults [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2002,40(11):1151-1160.
- [11] Li S, Lin LW, Mo ZN, et al. Reference values for serum ferritin in Chinese Han ethnic males: results from a Chinese male population survey [J]. *Clinical Biochemistry*, 2011,44(16):1325-1328.
- [12] 刘韧,于梅花,代云才,等. 宜宾市健康人血清转铁蛋白受体和血清铁蛋白参考值调查 [J]. *四川省卫生管理干部学院学报*, 20(4):278-279.
- [13] 陈建祥,袁辉,梁平,等. 成人健康人群血清铁蛋白参考值范围的探讨 [C]. 2012年浙江省检验医学学术年会论文集. 嘉兴:浙江省医学会检验医学分会、浙江省医师协会检验医师分会, 2012:99-101.
- [14] 罗浩元. 惠州市健康成人血清铁蛋白参考值调查 [J]. *检验医学与临床*, 2013,10(9):1120-1121.
- [15] 谭春洋,李洪,湛永明. 攀枝花市健康成人血清铁蛋白参考值调查 [J]. *四川省卫生管理干部学院学报*, 2005, 24(3):226-228.
- [16] C28-A2 (ISBN 1-56238-406-6). How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory; approved guideline-second edition [S]. 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898: NCCLS, 2000.
- [17] 钟莹,王治国. 全国临床常规生化检验项目参考区间调查研究分析 [J]. *国际检验医学杂志*, 2011,32(2):273-274.
- [18] 马春红,张坤燕. 血清铁蛋白测定的临床意义 [J]. *中国煤炭工业医学杂志*, 2010,13(8):1258-1259.

先天性肾上腺皮质增生症筛查的相关进展

吕萌萌¹ 朱宇皇² 张跃峰² 付光宇^{2*}

【摘要】先天性肾上腺皮质增生症(congenital adrenal hyperplasia, CAH)是一种常染色体隐性遗传疾病,其发病原因是由于在肾上腺合成皮质醇途径中所需酶的缺失,其中90%以上属于21-羟化酶缺失。无论是什么性别,患者在酶缺失状态下如果没有及时诊断或治疗,在出生后都会经历快速生长,或者性别模糊的临床症状。如果出现几种酶同时缺失的情况,更会造成新生儿失盐,甚至死亡。本文将对CAH的新生儿筛查、产前诊断、非新生儿诊疗和分子诊断技术进行讨论,以便更加深入地了解CAH的特征,同时对其诊断方法有更全面的认识。

【关键词】先天性肾上腺皮质增生症;新生儿;筛查;分子诊断

The progress of screening for congenital adrenal hyperplasia

LV Mengmeng¹, ZHU Yuhuang², ZHANG Yuefeng², FU Guangyu^{2*}

(1. Department of Clinical Laboratory, the Sixth People's Hospital of Zhengzhou City, Zhengzhou, Henan, China, 450015; 2. Zhengzhou Autobio Biological Engineering Co.Ltd, Zhengzhou, Henan, China, 450016)

【ABSTRACT】 Congenital adrenal hyperplasia is a kind of autosomal recessive disorders which resulting from the deficiency of the enzymes required for cortisol synthesis. The most frequent is steroid 21-hydroxylase deficiency, which accounting for more than 90 percent of cases. Both males and females will undergo rapid growth or gender blur if they haven't been diagnosed or treated in time. And in the case of several enzymes deficiency at the same time, the newborns will have to suffer from salt-loss or even death. The neonatal screening, prenatal diagnosis, non-infant diagnosis and molecular diagnostic techniques of CAH will be discussed in this paper for in-depth understanding about the characteristics and the diagnostic methods of CAH.

【KEY WORDS】 Congenital adrenal hyperplasia(CAH); Newborns; Screening; Molecular diagnosis

先天性肾上腺皮质增生症(congenital adrenal hyperplasia, CAH)是因肾上腺皮质激素合成途径中酶的缺陷所引起的疾病,属常染色体隐性遗传病的一种,是最常见的隐性遗传性疾病之一。常见的缺陷酶包括21-羟化酶、3-羟脱氢酶、17-羟化酶、11-羟化酶和皮质酮甲基氧化酶等,其中21-羟化酶缺陷症(21-hydroxylase deficiency, 21-OHD)是CAH中最为多见的一种,约占90%-95%^[1]。临床

上根据疾病的严重程度,将CAH分为经典型和非经典型,其中经典型包括失盐型和单纯男性化型,非经典型又可称做迟发型(nonclassic 21-hydroxylase deficiency, NCCAH)。经典型新生儿病例出生后即可发现性别模糊、外生殖器畸形,并出现失盐和肾上腺皮质功能不全的症状,如呕吐、厌食、高血钾、低血钠、酸中毒及脱水等^[2],严重者甚至死亡。经典型新生儿病例只需作相关检查如染

基金项目:国家高技术研究发展计划(863计划)(2011AA02A101)

作者单位:1. 郑州市第六人民医院检验科,河南,郑州 450015

2. 郑州安图生物工程股份有限公司,河南,郑州 450016

*通讯作者:付光宇, E-mail: fuguangyu@autobio.com.cn

染色体核型分析、肾上腺的超声检查、血浆或血清17-羟孕酮(17-hydroxyprogesterone, 17-OHP)浓度的检测等即可判定。对于非经典型新生儿病例来讲,出生时并无明显的临床症状,至青春期时,女性才会由于雄性激素的增加而表现为女性第二性征无发育的临床症状,出现嗓音粗、闭经、体毛重、有喉结、肌肉相对发达、阴毛呈男性分布、皮肤和外生殖器色素沉着等^[3]。而以不孕及多囊卵巢综合征就诊的女性患者,进一步检查会发现患者的骨龄明显提前,血17-OHP明显升高。对于非经典型新生儿的男性患者则表现为外生殖器不同程度的发育不良。对于CAH患者来讲,即使是及时获得诊疗的病人也须终身服药。目前国际上对高危CAH家庭的孕妇作产前诊断以及进行新生儿CAH筛查的问题比较关注。

新生儿筛查CAH是提高人口素质和预防医学水平的重要措施。根据相关筛查统计结果显示得出,全世界21-OHD的发生率为1:13 000,日本为1:15 000,欧洲为1:14 000-1:10 000,北美为1:15 000,我国上海的发生率为1:20 000,其发病率介于日本人和白种人之间^[4,5]。目前新生儿筛查的相关统计结果的流行病学资料还不够完善,从以上统计数据可以发现CAH的发病率会由于地区以及人种的差异而有一定的不同。

本文将回顾及讨论关于CAH的诊断进展,包括新生儿的筛查、产前诊断、非新生儿的常用诊疗方案以及近些年发展起来的分子诊断技术等。

1 新生儿CAH的筛查

新生儿CAH筛查主要是指通过检测血17-OHP浓度而进行的21-OHD诊断^[6],目的是防止新生儿休克、肾上腺危象及相关后遗症的发生,从而降低新生儿的死亡率,防止女性男性化的发生,减轻产生过量雄激素作用的后果^[7]。典型21-OHD患者和正常新生儿的17-OHP含量有显著差异,17-OHP被认为是新生儿21-OHD筛查可靠的指标^[8]。

1977年,当研制出测定17-OHP的方法时,新生儿21-OHD的筛查成为可能。测定方法是指在新生儿出生后2 d-5 d的时间内,于清晨8点-9点采集新生儿的足跟血于滤纸上,从而测定17-OHP的浓度,此方法已被全世界普遍接受。在国外的筛查过程中,通常正常的新生儿出生后17-OHP

浓度会大于90 nmol/L,在12 h-24 h后恢复至正常。当17-OHP浓度大于500 nmol/L时,会鉴定为典型CAH。17-OHP浓度在150 nmol/L-200 nmol/L之间时,通常会出现在各种类型的CAH或假阳性患者当中。以上提到的参考性阳性切割点虽然已够详尽,但17-OHP筛查的阳性切割点仍应根据各实验室方法制定,并加以调整。同时确诊的阳性病例仍需密切随访,通过测定血清睾酮、皮质醇、双氢睾酮、脱氢表雄酮及17-OHP等指标进行监测。

目前我国仍未广泛开展新生儿CAH筛查,仅有少数医院掌握检测血17-OHP的方法用于检测和科研。其采血方法与国外一致,为滤纸片法,经酶联免疫法或时间分辨荧光免疫法等测定17-OHP的浓度,从而进行早期筛查。根据测定的不同方法,会有不同的正常值范围,有报道指出17-OHP的浓度与患者的采血时间、出生体重有一定的关系,故给筛查的特异性和敏感性都带来了影响^[9]。相关研究数据显示:当新生儿17-OHP浓度大于10 ng/mL时需复查,当其浓度值用作CAH筛查和诊断指标时,必须结合临床的实际状况,不能仅以激素水平进行诊断,以免误诊和误治^[10]。

新生儿筛查对测定失盐型CAH有明显的效果,对其他类型的筛查却不如人意。研究表明,对新生儿非经典型CAH筛查的假阴性率达到1/3^[11],即使是患有经典型CAH的新生儿也有约2%未通过检测17-OHP而确诊,诊断只是根据其临床表现进行重新的评估^[12]。患有多种其他疾病的早产儿或婴儿,如小于31周孕龄的早产儿,在出生后合并心肺疾病时,17-OHP浓度也会升高^[13],但无激素合成的先天性缺陷,从而导致了筛查的假阳性率上升。相关报道显示新生儿血17-OHP的浓度与出生时体重和孕龄相关,所以新生儿的CAH筛查应建立与体重和孕龄相关的阴阳性判定值(cut-off值),从而提高确诊率^[14]。有学者^[15]制定了孕龄相关17-OHP的cut-off值,出生时低体重的参考范围也被改进,从而相应地减少了早产儿和低体重儿筛查的假阳性率。早产儿进行连续的17-OHP检测,可以避免假阳性结果的出现。相关研究显示使用液相色谱-串联质谱法测定降低了筛查结果的假阳性率,但仍需通过大量样本进行验证^[16]。同时有研究团队认为应对21-OHD患儿的检测纳入新生儿筛查项目,首先进行免疫分析,然后再通过液相

色谱或串联质谱法测定^[17],但昂贵的成本将是普及的难点。

自1980年以来,已有13个国家开展了新生儿CAH的筛查项目。新生儿CAH筛查的实验室不同,其采用的17-OHP的cut-off值也不同。据2008年美国疾病控制与预防中心统计结果显示^[18],参加室间质评的131家实验室,其17-OHP的cut-off值分布范围较广,在4.7 nmol/L-212.3 nmol/L之间,美国44家实验室的平均cut-off值为93.8 nmol/L,其他国家的87家实验室采用的cut-off值平均为43.2 nmol/L。目前我国筛查实验室的cut-off值多采用30 nmol/L^[19]。新生儿筛查的实验结果是确诊疾病的重要指标,故筛查实验室的质量控制尤为重要,接受国际权威机构对相关实验室进行质量监控,可以对大批量样本检测的质量提供有效的保证^[20]。

国际上已有许多发达国家开展了CAH的新生儿筛查项目,我国的发达沿海地区也已经加入了此行列。目前筛查结果的准确度仍较差,cut-off值的确定还需更多实验室的共同配合。相信随着各国实验室对质量控制的进一步加强,检测方法的进一步优化,在未来会在降低假阳性的同时,得到更加可靠的cut-off值。

2 CAH的产前检查

CAH属于隐性遗传病的一种,据统计显示,母亲是非典型CAH患者,其生出非典型CAH患儿的比例为14.8%,生出典型患儿的比例在2.5%左右^[21]。因此,对患有该疾病家族的孕妇来讲,通过产前诊断会更有利于及时检出CAH患儿。检测内容通常包括:在孕9-11周时,取绒毛膜活检进行胎儿细胞DNA分析。由于胎儿的肾上腺皮质从孕第8周起已具有合成类固醇激素的迹象^[22],所以在孕16-20周时,可以取羊水进行孕三醇、17-OHP等生化项目的检测。

胎儿血液中的类固醇激素可以通过肾脏、羊膜、皮肤、肺、肠道等进入羊水,羊水中激素的水平与胎儿血液中的含量相关。17-OHP是类固醇激素合成途径中21羟化酶酶促反应的前质,其可以透过胎膜渗入羊膜腔,因此当21羟化酶缺陷时,胎儿血中的17-OHP浓度会显著升高,从而导致母亲羊水中的17-OHP浓度也相应地升高。1975年Frasier等人首次利用免疫学方法测定出羊水17-

OHP的浓度,成功地进行了CAH的产前诊断^[23]。此后也有许多学者发表了相关的报道^[24-25],均认为对孕中期羊水中17-OHP含量的分析是一种安全可靠CAH产前诊断方法。目前CAH的产前治疗尚处于试验阶段,故不推荐在产前进行手术治疗,首先应进行大样本相关研究,在获得足够数据后,再推广产前治疗。

CAH是比较典型的隐性遗传疾病,所以对于患病的家族来讲,产前检查可以对CAH新生儿患者的及时治疗提供较大的帮助。但是由于先证者的孕妇相关治疗流程还不够成熟,所以目前还无法避免CAH患儿的产生。

3 非新生儿CAH的诊疗

婴儿期后的相关诊断建议指出,对有症状的个体应监测其清晨基线血清17-OHP的水平,并在行替可克肽激发试验后,对肾上腺皮质激素谱进行检测,从而对其他酶缺陷或21-OHD进行区分^[26]。对肾上腺皮质激素谱的检测结果有争议或需要咨询遗传问题的患者,可通过基因分型进行诊断。当然同时还可以进行其他检查,如通过染色体检查可以对外生殖器严重畸形的患者进行鉴别性别,通过X线检查对骨龄进行判断,通过B超、CT和MRI检查双侧肾上腺增生,通过基因检查鉴定相关基因的突变或缺失。

CAH没有显著的临床特征,与其他疾病的鉴别诊断尤为重要。临床上需要区分鉴别诊断的疾病类型主要包括肾上腺皮质分泌雄酮的肿瘤、先天性肥厚性幽门狭窄、真性性早熟和其他原因引起的两性畸形。除以上几种疾病,在临床诊断过程中也应将CAH作为女性高雄激素血症患者的常规鉴别诊断疾病。由于CAH与其他疾病具有众多相似临床特征,所以提高临床医生对CAH相关特点的认识显得尤为重要。权威的研究机构对非新生儿CAH的诊疗已经达成了相关指南^[26],为以后CAH的诊疗工作带来了极大的帮助。对于典型CAH成年患者来说,采用氢化可的松或长效糖皮质激素治疗可以带来很好的效果,同时每年应进行一次身体检查和相关激素的测定,监测盐皮质激素和糖皮质激素的治疗效果。对于男性患者来说,典型CAH男性患者应自青春期开始定期筛查睾丸、肾上腺残存肿瘤,成年男性NCCAH患者不应该使用每日糖皮质激素替代治疗的方法。对于

女性 CAH 患者来说,应首先询问妇科病史,月经周期正常的患者不需要进行骨盆超声检查,如果出现不孕、不育问题应及时咨询相关专家。对于怀孕的 CAH 患者来说,应当接受内分泌科以及产科医师的联合治疗,继续接受和孕前相同剂量的氢化可的松或强的松及氟氢可的松的治疗,如出现糖皮质激素不足的症状或体征,应调整糖皮质激素剂量,不应使用能通过胎盘的糖皮质激素,应在临产和分娩时给予应激剂量的糖皮质激素。对于 CAH 家庭的患儿来说,在青少年以及即将步入成年期时,应进行遗传学检测。不同年龄的患者具有不同的诊疗策略,具体包含了生化、免疫、分子以及医学影像等检测方法,几乎涵盖了临床检验技术的各个方面。目前,免疫学检验方法正处于高速发展阶段,对于非新生儿 CAH 的显著指标 17-OHP 的检测方法已经经历了几个阶段,从早期的放射免疫分析法,中期的酶联免疫法和时间分辨荧光免疫法,到目前的化学发光分析法,随着检验技术平台的不断更新,极大地缩短了检测时间,同时也提高了检测的准确度。同时在质谱法和分子诊断法的不断完善下,相信未来检验的临床准确率会有更大的改观和提升。

随着临床专家对相关诊疗方法有了更深入的了解,相关研究数据收集的增多,诊断技术的不断提高,诊疗指南也将会越来越全面,从而可以更有效避免 CAH 病情的恶化。

4 CAH 的分子诊断

随着 CYP21 基因克隆测序的完成,通过该基因进行诊断的方法也日渐兴起。目前对 CAH 的诊断已在分子水平上进行了验证,所以对于有条件的患者可直接对基因缺陷进行鉴定。最早通过 CYP21 基因进行产前诊断的方法是通过 cDNA 探针对基因组进行斑点杂交,其缺点是只能检测出缺失和大的基因转换。

基因异常可分为 3 类:点突变、基因缺失和基因转换。CYP21 基因主要编码有生物活性的酶 p450c21,其能使 17-OHP 和孕酮分别转变成 11-脱氧皮质醇和 11-脱氧皮质甾酮。CYP21 基因的假基因是 CYP21P,其与 CYP21 有超过 93% 的同源性,二者容易发生基因转换,导致 CYP21 基因突变的发生率高。大多数患者的 CYP21A 和 CYP21B 相

互重叠导致基因突变,两个 CYP21 基因均位于 6 号染色体人类白细胞抗原 (human leukocyte antigen, HLA) 的中部,在 HLA-DR 和 HLA-B 之间。85% 的基因突变患者是由于发生基因转换障碍,从而引起 p450c21 酶转录功能消失,在临床上表现为失盐型。对于 CYP21B 其他的点突变,如 Ser268-Thr 等并不完全影响 p450c21 酶转录功能,在临床上则表现为单纯男性化型。Arg339-His、Pro30-leu、Pro453-Ser 和 Val281-leu 等点突变会导致 p450c21 的酶转录功能下降至正常活性的 20%~50%,在临床上多表现为非典型 NCCAH^[27]。

由于国家间医疗水平和经济实力的不同,在 CAH 分子诊断及研究结果上也存在明显的差异。如按疾病分类,失盐型患者中最常见的突变是 Del,占 44.4%;单纯男性化型患者中最常见的突变是 I172N,占 44.2%;NCCAH 患者中最常见的突变是 P30L,占 37.5%。以前国内的研究中未检测 Del^[28],失盐型患者中最常见的突变是 i2g,占 43%。中国 NCCAH 患者基因型也有鲜明的特征,如最常见的突变是 P30L,占 37.5%^[29]。白种人中最常见的是 V281L,一般在 45%~60%^[29];日本 NCCAH 患者最常见的突变与中国患者相同也是 P30L,占 50%^[29]。可见,东西方 NCCAH 患者的突变特点有所不同,而中国患者与日本患者又有所差异,在日本人患者未检测到 V281L 突变,中国患者 V281L 的突变频率则为 25.0%。

随着各国研究的不断加深,以聚合酶链反应为基础的基因突变检测方法不断成熟,未来实现迅速、准确地对 CYP21 基因的突变进行确定不再是梦想,同时也让学者们对 CYP21 基因的突变谱有了一个更为全面的认识,该方法将成为以后进行 21-OHD 产前分子诊断的有利方法。

5 小结与展望

CAH 作为常见的常染色体隐性遗传疾病,由于其不具备典型的临床特征,在临床上容易造成误诊或漏诊。目前有许多国家采用滤纸片法开展了新生儿 CAH 筛查的项目,但由于实验室检测方法的不同,17-OHP 检测的 cut-off 值又与多因素有关,临床检验的准确率远未达到理想的效果;还需更多数据的支持,同时加强各国实验室的室间质评合作才能更好地提高新生儿筛查的准确率。

产前诊断可以更好地防范新生儿 CAH 患者的出现,测定羊水 17-OHP 浓度作为产前诊断的方法已被普遍应用,但该方法涉及到半衰期短、需要专用设备 and 同位素污染等缺点,近年来逐渐被淘汰。针对非新生儿 CAH 患者的诊疗,随着相关类似疾病的鉴别方法越来越完善,同时伴随着诊疗指南的出现和相关诊断技术的不断更新,近年来已经相继开发出了新技术的试剂盒,其在检测精度和准确度方面都有了质的提升。国内在针对非新生儿 CAH 的检测方法已经处于了国际领先水平,已有公司通过全自动化学发光仪器进行 17-OHP 的检测,并成功应用于临床中。针对具有 CAH 家族史的青少年,分子诊断是高效的检验诊断方法,采用分子遗传方法作为 CAH 的二级检验已经确定,通过 DNA 水平进行诊断确认。但该方法的不足在于,未能在筛查过程中检测到所有的突变,因此该方法仅可以增加筛查的特异性,而非敏感性,且成本较高,可操作性欠佳。由上可知,对于不同阶段的患者或是正常人,临床应当结合不同的检验方法进行疾病的确诊,同时应采用不同的治疗策略进行恢复。相信在未来会有更多的免疫与分子相结合的诊断策略的出现,在提高准确率的同时也可以相应降低检测的成本。

由于 CAH 远期并发症的治疗成本更高,而治疗 CAH 本身的花费极少,使其诊断的准确性更具有临床和社会经济学意义。因此,应提高对 CAH 的认识,重视该病症的诊断。

参考文献

- [1] 胡亚美,江载芳.诸福棠实用儿科学第7版[M].北京:人民卫生出版社,2002.
- [2] White PC, Bacheega TA. Congenital adrenal hyperplasia due to 21 hydroxylase deficiency: from birth to adulthood[J]. Semin Reprod Med, 2012,30(5):400-409.
- [3] Gidlöf S, Falhammar H, Thulén A, et al. One hundred years of congenital adrenal hyperplasia in Sweden: a retrospective, population-based cohort study[J]. Lancet Diabetes Endocrinol, 2013,1(1):35-42.
- [4] Mak CM, Lee HC, Chan AY, et al. Inborn errors of metabolism and expanded newborn screening: review and update[J]. Crit Rev Clin Lab Sci, 2013, 50(6):142-162.
- [5] Hayashi G, Faure C, Brondi MF, et al. Weight-adjusted neonatal 17OH-progesterone cutoff levels improve the efficiency of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia[J]. Arq Bras Endocrinol Metab, 2011,55(8):632-637.
- [6] Falhammar H, Frisén L, Norby C, et al. Increased mortality in patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2014,99(12):E2715-2721.
- [7] Nascimento ML, Cristiano AN, Campos TD, et al. Ten-year evaluation of a neonatal screening program for congenital adrenal hyperplasia[J]. Arq Bras Endocrinol Metabol, 2014,58(7):765-771.
- [8] Tayel SM, Imael H, Kandil H, et al. Congenital adrenal hyperplasia in Alexandria, Egypt: a high prevalence justifying the need for a community-based newborn screening program[J]. J Trop Pediatr, 2011,57(3):232-234.
- [9] Finkelstein GP, Chen W, Mehta SP, et al. Comprehensive genetic analysis of 182 unrelated families with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2011,96(1):E161-172.
- [10] Sanches SA, Wiegers TA, Otten BJ, et al. Physical, social and societal functioning of children with congenital adrenal hyperplasia (CAH) and their parents, in a Dutch population[J]. Int J Pediatr Endocrinol, 2012, 2012(1):2.
- [11] Sarafoglou K, Lorentz CP, Otten N, et al. Molecular testing in congenital adrenal hyperplasia due to 21 α -hydroxylase deficiency in the era of newborn screening [J]. Clin Genet, 2012,82(1):64-70.
- [12] Heather NL, Seneviratne SN, Webster D, et al. Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in New Zealand, 1994-2013 [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2015, 100(3):1002-1008.
- [13] Witchel SF, Miller WL. Prenatal treatment of congenital adrenal hyperplasia-not standard of care[J]. J Genet Couns, 2012,21(5):615-624.
- [14] Reisch N, Willige M, Kohn D, et al. Frequency and causes of adrenal crises over lifetime in patients with 21-hydroxylase deficiency[J]. Eur J Endocrinol, 2012, 167(1):35-42.
- [15] 张芹,王本敬,陈亚平,等.新生儿胎龄、出生体重与 17 α 羟孕酮水平的多中心回顾性分析[J].中华儿科杂志, 2014,52(9):706-709.
- [16] Rossi C, Calton L, Hammond G, et al. Serum steroid profiling for congenital adrenal hyperplasia using liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Clin Chim Acta, 2010,411(3-4):222-228.
- [17] Flaminia F, Ilaria B, Valentina D, et al. Serum steroid

- pro ling by isotopic dilution-liquid chromatography-mass spectrometry: comparison with current immunoassays and reference intervals in healthy adults [J]. *Steroids*, 2011,76(3):244-253.
- [18] Centers for Disease Control and Prevention (CDC) and the Association of Public Health Laboratories. Newborn screening quality assurance program[R]. A Flanta: 2008 Annual Summary Report, 2009.
- [19] 毛维玉,郭焯,闵娟,等. 早产新生儿体重对 CAH 筛查中 17 羟孕酮结果的影响分析[J]. *国际医药卫生导报*, 2008,14(7):11-14.
- [20] 田国力,朱伟明,许洪平,等. 参加美国 CDC 新生儿疾病筛查室间质量评[J]. *检验医学*, 2005,20(1):63-65.
- [21] Costa-Barbosa FA, Telles-Silveira M, Kater CE. Congenital adrenal hyperplasia in the adult women: management of old and new challenges [J]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 2014,58(2):124-131.
- [22] Li XM, Ji H, Li CJ, et al. Chemerin expression in Chinese pregnant women with and without gestational diabetes mellitus[J]. *Ann Endocrinol (Paris)*, 2015,76(1):19-24.
- [23] Frasier SD, Thomeycroft IH, Weiss BA, et al. Elevated amniotic fluid concentration of 17 alpha-hydroxyprogesterone in congenital adrenal hyperplasia [J]. *J Pediatr*, 1975,8(2):310-312.
- [24] Luton D, Huel C, Vuillard E, et al. Assessment of thyroid hormones and androgens in amniotic fluid: clinical interest[J]. *Ann Biol Clin*, 2009,67(3):299-305.
- [25] Steut SA, Litvak M, Robbins NM, et al. Congenital adrenal hyperplasia: classification of studies employing psychological endpoints [J]. *Int J Pediatr Endocrinol*, 2010,2010:191520.
- [26] Speiser PW, Azziz R, Baskin LS, et al. Congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency: an endocrine society clinical practice guideline [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010,95(11):5137.
- [27] Baumgartner-Parzer SM, Fischer G, Vierhapper H. Predisposition for de novo gene aberrations in the offspring of mothers with a duplicated CY P21A2 gene [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007,92(3):1164-1167.
- [28] 廖相云,张雅芬,顾学范. 21 羟化酶缺乏症患者 CYP21 基因点突变研究[J]. *中华儿科杂志*, 2003,41(9):670-673.
- [29] Haider S, Islam B, D'Atri V, et al. Structure-phenotype correlations of human CYP21A2 mutations in congenital [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013,110(7):2605-2610.
- [30] Kashimada K, Ishii T, Nagasaki K, et al. Clinical, biochemical, and genetic features of non-classical 21-hydroxylase deficiency in Japanese children [J]. *Endocr J*, 2015,62(3):277-282.

(上接第 360 页)

- [13] Jansen EH, Beekhof PK, Cremers JW, et al. Long-term (in)stability of folate and vitamin B₁₂ in human serum[J]. *Clin Chem Lab Med*, 2012,50(10):1761-1763.
- [14] Mackey AD, Picciano MF. Maternal folate status during extended lactation and the effect of supplemental folic acid[J]. *Am J Clin Nutr*, 1999,69(2):285-292.
- [15] Jan H, Steen I. Ligand binding characteristics of two molecular forms, one equipped with a hydrophobic glycosyl phosphatidylinositol tail, of the folate binding protein purified from human milk [J]. *Bioscience Reports*, 2002,22(3-4):3-4.
- [16] 陈晓翔,杨培慧,蔡继业. 表面活性剂引起的血红蛋白构象变化[J]. *环境与健康杂志*, 2005,22(1):25-27.
- [17] Owen WE, Roberts WL. Comparison of five automated serum and whole blood folate assays [J]. *Am J Clin Pathol*, 2003,120(1):121-126.
- [18] Blackmore S, Pfeiffer CM, Lee A, et al. Isotope dilution-LC-MS/MS reference method assessment of serum folate assay accuracy and proficiency testing consensus mean[J]. *Clinical Chemistry*, 2011,57(7):986-994.
- [19] Hiroshi I, Naotaka H. Traditional reference values for serum vitamin B₁₂ and folate are not applicable to automated serum vitamin B₁₂ and folate assays: comparison of value from three automated serum vitamin B₁₂ and folate assays [J]. *Journal of Analytical Bio-Science*, 2008,31(4):291-298.
- [20] Yasir BN, Ashraf A, Brekhna A, et al. Perceptions of antenatal iron-folic acid supplements in urban and rural Pakistan: a qualitative study [J]. *BMC Pregnancy and Childbirth*, 2014,14:344.

叶酸及维生素 B₁₂ 检测方法的发展及现状

陈伟才¹ 李志信² 渠海² 付光宇^{2*}

【摘要】 本文简要概括了人体内叶酸及维生素 B₁₂ 检测方法的发展历史及现状,结合前人研究对现阶段应用最为广泛的化学发光检测方法着重分析,讨论了叶酸及 B₁₂ 检测试剂盒开发过程中常见的困难点,叶酸和 B₁₂ 检测标准的现状,为临床应用工作的展开提出建议。

【关键词】 叶酸; 维生素 B₁₂; 化学发光法; 检测分析; 临床

The development of detection methods for folic acid and vitamin B₁₂

CHEN Weicai¹, LI Zhongxin², QU Hai², FU Guangyu^{2*}

(1. Department of Clinical Laboratory, Chinese Medicine Hospital of Shunde District in Foshan City, Foshan, Guangdong, China, 528333; 2. Zhengzhou Autobio Biological Engineering Co., Ltd., Zhengzhou, Henan, China, 450016)

【ABSTRACT】 In the beginning we made a brief summary of the development history and present situation about the detection of human folic acid and vitamin B₁₂. A further discussion on the chemiluminescence method based on previous studies is conducted, which is most widely used at the present stage. And then we stated the key points during the R&D of Folate & B₁₂ detection agents, especially the difficulty in the establishment of standards. Finally we raised some advice to clinical workers.

【KEY WORDS】 Folic acid; Vitamin B₁₂; Chemiluminescence; Assay; Clinical

叶酸(folic acid)是与蝶酰谷氨酸(pteroylglutamic acid, PGA)功能和化学结构相似的一类化合物的统称,又称为维生素 B₉。叶酸是人体必不可少的营养物质,对人体具有重要的生理功能,是人体许多生化反应的辅酶。在人体内叶酸携带一碳单位形成 5-甲基四氢叶酸、亚甲基四氢叶酸等活性形式发挥作用,其中 5-甲基四氢叶酸是人体内活性叶酸的主要存在形式。研究证实,叶酸除了与巨幼红细胞性贫血有关外,还与新生儿神经管畸形、结肠癌、白血病等癌症,心脑血管疾病以及儿童智力低下有关,也可以导致出生缺陷发生率上升,例如先天性心脏病、唇腭裂以及唐氏综合症等^[1]。此

外,叶酸缺乏还可以引起早产、流产等不良妊娠的发生^[2]。

维生素 B₁₂ 又称氰钴胺素、钴胺素、外源因子、动物蛋白因子,是唯一含有矿物质的维生素。维生素 B₁₂ 贫乏也是巨幼红细胞性贫血的诱因,同时也与老年痴呆症、抑郁症以及冠心病等有关。

叶酸和 B₁₂ 都是人体内一碳单位转移的重要辅助因子,故在诸多生化反应中都起到协同作用,例如都是 DNA 合成过程中重要的辅酶,参与 DNA 合成,降低血浆中同型半胱氨酸水平^[3]等。无论是临床检测应用还是学术研究,通常都将二者放在一起,检测方法也极为类似。

基金项目:国家高技术研究发展计划(863 计划)(2011AA02A101)

作者单位:1. 广东省佛山市顺德区中医院检验科,广东,佛山 528333

2. 郑州安图生物工程股份有限公司,河南,郑州 450016

*通讯作者:付光宇, E-mail: fuguangyu@autobio.com.cn

叶酸和维生素 B₁₂ 重要临床意义的发现引发了学术界对其的广泛关注, 准确而高效的叶酸及 B₁₂ 检测手段也就显得极为重要。但由于叶酸和 B₁₂ 在人体内含量极低, 体外稳定性极差, 具有生物活性的相关化合物组成复杂等原因, 对其分析相当困难^[4], 直至今日, 对于叶酸和 B₁₂ 的检测标准依然未能够达成共识。

1 叶酸及维生素 B₁₂ 检测方法的发展及现状

经过半个多世纪的研究, 学者们根据检测对象的不同开发出了多种检测样品中叶酸或 B₁₂ 的方法, 如比色法、薄层层析法、气相色谱-质谱法、高效液相色谱法、微生物法和同位素放射免疫法等。一般测定原料叶酸或 B₁₂、纯叶酸或 B₁₂ 制品或药品制剂中的叶酸或 B₁₂ 质量分数常采用比色法; 而生物体、食品中叶酸的测定多采用微生物法、同位素放射免疫法或色谱法、色-质联用法以及最新的离子捕获法, 化学发光法和生物传感法。其中微生物分析法, 以其经典、准确可靠性为许多国际标准方法机构作为标准方法或第一法^[5], 而化学发光法为目前应用最广泛的检测方法。

1.1 叶酸及维生素 B₁₂ 检测方法的发展

微生物法和同位素放射免疫法是叶酸和 B₁₂ 检测的经典方法, 上世纪欧美针对人群体内叶酸及 B₁₂ 水平的普查以及大量临床研究, 均采用这两种方法。但两种方法在准确性上一直有争议。

微生物法的优点是成本低, 可操作性强, 能够检测到极低浓度的叶酸或 B₁₂ 水平, 缺点是由于微生物法不能够区分叶酸或 B₁₂ 的各种形式, 所测结果一般为总的叶酸或 B₁₂ 量, 准确度较低, 重复性较差, 无法形成统一标准^[6]; 同位素放射免疫法利用同位素标记的叶酸或 B₁₂ 受体进行检测, 相比微生物法较为便携与迅速, 但是放免法采用的叶酸受体对样本中不同形式的叶酸或 B₁₂ 亲和力大不相同, 灵敏度较差^[7], 并且放免法存在放射线辐射和污染等问题, 同时受样本基质、缓冲体系以及 pH 影响较大, 不同试剂盒检测结果偏差较大。

1995 年 Wilson 等^[8]提出离子捕获法检测叶酸, 样品加入变性剂后叶酸与内源性结合蛋白分离, 释放后的叶酸再与带有大量阴离子的亲合试剂结合, 合成产物经过离子捕获池而与阳离子纤维结

合, 最后通过碱性磷酸酶与蝶酸(叶酸的类似物) 结合物对叶酸结合蛋白上游离结合位点的探查, 定量分析样品中叶酸的质量分数。该研究证实, 当离子捕获法测定血清或红细胞中的叶酸时, 其结果与同位素放射免疫法的结果具有良好的相关性。

高效液相色谱-质谱联用技术(high performance liquid chromatography-mass spectrometry, HPLC-MS) 于 1999 年最早报道应用于叶酸分析^[9], 该技术不仅能够快速、高效地分离叶酸化合物, 而且质谱仪的高灵敏度满足了低检测限的要求, 具有样品用量少、自动化程度高等优点, 无论对定性及定量分析都显示了巨大的优势。目前, 利用 HPLC-MS 联用方法检测叶酸化合物主要集中于对食品和临床样品, 并且都已显示出较好的应用前景, 已逐步成为较为权威的叶酸检测手段。

90 年代, 有学者相继提出用非放射性标记蛋白结合技术检测血液叶酸, 其中包括克隆酶供体免疫测定法 (cloned enzyme-donor immunoassay, CEDIA)、ELISA、化学发光受体实验等。化学发光检测法易于实现自动化, 检测重现性好, 灵敏度较高, 对低浓度叶酸样品检测结果明显高于其他方法^[10], 是目前临床应用最为广泛的检测方法, 本文将对此方法着重介绍。

1.2 叶酸及维生素 B₁₂ 的化学发光检测法

1.2.1 叶酸

化学发光法检测叶酸目前均采用竞争法的原理, 一般使用从牛奶中提取的叶酸结合蛋白 (folate-binding proteins, FBP) 作为免疫反应的基础。研究证实, 此类 FBP 对血清中叶酸主要的活性结构均有很高亲和力^[11]; 样本中与内源性叶酸结合蛋白结合的叶酸以及蝶酰多聚谷氨酸则需要经过解离(酸解离, 碱解离或酶解离)。

1.2.2 维生素 B₁₂

化学发光法检测维生素 B₁₂ 也采用竞争法的原理, 一般都使用内因子 (IF, 人体吸收转运 B₁₂ 的重要载体蛋白) 作为免疫反应的基础。血清中的维生素 B₁₂ 也需要经解离转变成为游离形式后才能与 IF 进行结合。另外, 由于天然维生素 B₁₂ 在体外并不稳定, 通常还需要在预处理环节中添加氰化钾使之转变为稳定的形态^[12]。

一直以来, 叶酸及维生素 B₁₂ 用以临床推广使用的检测试剂盒的开发十分困难。首先, 叶酸和

B₁₂的理化性质十分不稳定,暴露在空气中很容易受到光、氧气和金属离子的影响而失去活性。例如 Jansen EH, Beekhof PK^[2]对叶酸和 B₁₂ 研究发现部分叶酸活性结构在-20℃储存 4 天含量降低了 60%,而 B₁₂ 则至少在-70℃条件才能长期储存。其次,叶酸和 B₁₂ 在人体内具有生物活性的相关化合物组成复杂,而且含量极低,对试剂盒灵敏度和精密度有很高要求;关于叶酸和 FBP 亲和力的研究也持续了很长一段时期。再有,叶酸和 B₁₂ 本身分子质量太小,用于包被用的叶酸或 B₁₂ 的衍生物和 IF 抗体制备工艺复杂。

经过各界学者不断的研究,对叶酸和 B₁₂ 检测试剂盒的开发逐渐达成了一些共识:鉴于叶酸和 B₁₂ 的不稳定性,样本在采集、转移和储存过程中需要特别注意环境温度以及光照环境,并依据样本保存条件在规定时间内检测样本以确保检测结果的准确性及临床意义的有效性;抗氧化剂也是一种必须的方法,在各组分的缓冲液中添加抗氧化剂,如柠檬酸、抗坏血酸、2-巯基乙醇等,用以保护不稳定的叶酸^[24],并使用不透光容器保存相关组分,最大程度上保护叶酸或 B₁₂ 及其衍生物的稳定性,提高检测结果的稳定性以及精密性;对待检样本进行解离处理,有研究发现,在酸性(pH=3.5)环境中,约 90%以上的叶酸谷氨酸多聚体能够转变为单体形式^[25],另外,碱解离和酶解离也用于许多叶酸、B₁₂ 分析研究中;由于免疫反应比较严苛,必须保证适宜的 pH、电解质环境和排除交叉反应,叶酸维持稳定最适宜的 pH 与和 FBP 结合的最适 pH 存在差异,抗氧化剂(如 2-巯基乙醇)、解离剂(酸碱或解离酶)都会干扰免疫反应和检测,检测试剂盒开发过程中都必须进行必要的处理和调整;另外,不同平台的化学发光检测系统有不同的发光检测体系,在辣根过氧化物酶(horse radish peroxidase, HRP)催化发光的体系中,还应特别注意排除全血叶酸检测中血红蛋白(HRP 结构类似物)的干扰,有学者进行专项研究,发现合适的阴离子型或非离子型表面活性剂对血红蛋白的有很好的清洁效果^[26]。

1.2.3 叶酸和维生素 B₁₂ 的化学发光检测法检测标准

虽然在检测原理上,各大厂商基本上达成共识,然而,许多学者或机构对不同厂商试剂盒的检测

结果进行比对,发现应用最广的几种检测试剂盒在检测结果上仍存在显著差异^[25]。在体外诊断行业飞速发展的今天,行业标准的建立意义重大,国际相关知名的标准实验室及组织机构也一直在致力于此方面的研究,如 ASCP 等。无论是以改良后的微生物测定法还是高效液相色谱-质谱联用法做参比,研究结果发现,各大厂商试剂盒的检测结果存在明显差异,这体现在检测结果与参比方法的比对以及回收实验的结果中^[17-20]。

上述学者或机构对这种检测结果的差异进行了调查和统计分析,发现造成这种差异的原因主要集中在以下几个方面:首先,溯源不同,各大厂家在试剂盒开发过程中均采用了不同的溯源途径,有的以 WHO 标准物质溯源,有的以改良后的微生物测定法作为溯源,有的以上世纪临床与研究应用最为广泛的 Bio-Rad 公司的同位素放射免疫试剂盒作为溯源,溯源本身就一直存在争议与差异;其次用于校正检验结果的标准物质不同,有的以单体叶酸为标准物质,有的以总叶酸为标准物质,校准曲线的拟合方式也存在差别^[27];校准品的缓冲基质不同,大量研究已经证实,在以 FBP 作为叶酸检测手段时,校准物质利用血清基质作为缓冲体系时比利用无机盐添加蛋白辅料的缓冲体系所得到的检测结果偏高^[7];另外,对 FBP 和叶酸以及 IF 和 B₁₂ 之间结合模型或方式的研究还不够透彻,样本预处理工艺^[27]也是各厂家的核心工艺及机密,无法得到有效交流,这都对叶酸和 B₁₂ 检测标准的统一造成了很大的困难;叶酸和 B₁₂ 的临床指标不明确,医学界并未为叶酸和 B₁₂ 规定确切的参照水平,单从目前临床应用讲,各厂家试剂盒均能基本满足临床要求。

高效液相色谱-质谱联用法为叶酸和 B₁₂ 检测标准的建立提供了可行方案,但笔者认为,对叶酸、B₁₂ 与相应结合蛋白的结合机制,各活性组分相互的转化的研究以及医学界对叶酸、B₁₂ 检测的引导才是最终统一叶酸、B₁₂ 检测标准的根本。

2 叶酸和维生素 B₁₂ 检测的临床应用

2007 年,国家启动了“出生缺陷干预工程”,全国各大医院也陆续开展了叶酸和 B₁₂ 检测项目。但调查发现,许多叶酸和 B₁₂ 的检测项目在开展过程中存在许多的不足与误区。

首先,需要明确全血叶酸和血清叶酸检测指标。众所周知,全血中的叶酸水平能够反映个体近期真实的叶酸及营养水平,而血清叶酸只能体现极短时间内个体的叶酸水平,且极易受饮食的影响。全血叶酸的检测指标应受到更多的重视。其次,由于全血叶酸检测步骤远比血清叶酸检测复杂,成本也高出许多,与现阶段临床快速便捷的诊断需要相违背,在全血叶酸检测工艺尚未能够完全满足临床需求的事实下,血清叶酸检测项目的规范化尤为重要。

全球有 16.2 亿人贫血,而孕前或妊娠中的妇女中这一比例达到 42%^[20]。铁和叶酸的补充孕前或妊娠中的妇女应特别重视。研究证实,正常人在服用叶酸片后在 2 h-4 h 内达到峰值,约 8 小时后趋于稳定,正在参与叶酸补服的孕前或妊娠中的妇女进行叶酸检测时,如果直接进行血清叶酸检测,增补的叶酸停留在血清中尚未被红细胞吸收,检测结果不能够最真实的反应个体叶酸水平。建议在检测个体血清叶酸时前让个体提前 2 d-3 d 停止补服叶酸,并进行空腹采血。

叶酸和 B₁₂ 的不稳定性对样本的采集和保存提出了较高要求。各厂商试剂盒以及前人学者的研究,一般建议在 2 h 之内完成对新采集样本的检测,不能及时检测的应置于 2℃-8℃ 环境保存并在 8 h 内完成检测,-20℃ 冻存样本应在 1w 内完成检测,样本在转移和储存过程中应注意冷藏、封闭和避光。

临床应用与研究对叶酸、B₁₂ 检测手段的进步的重要性不言而喻,对叶酸、B₁₂ 试剂盒的开发,检测标准的建立有十分重要的意义。在厂商与临床的配合中,临床应用过程中的规范性需要得到广大临床工作者的广泛注意。

综上所述,关于叶酸和维生素 B₁₂ 的检测,准确快捷低成本的全自动化学发光检测法仍将是主流。如此,检测标准的建立迫在眉睫,这需要科研机构的学者专家、临床工作者和各厂商试剂研发实验室的共同努力。一方面需要明确 FBP、IF 的作用机制,促进叶酸和 B₁₂ 结构形式转变及预处理工艺方面的学术交流并达成共识;另一方面需要临床工作者通过良好的认识和操作为研究反馈真实有效的指导;还需要试剂开发厂商明确工作重点,不盲目迎合并真正致力于临床研究。

参考文献

- [1] Blehaut H, Mircher C, Ravel A, et al. Effect of leucovorin (folinic acid) on the developmental quotient of children with Down's syndrome (trisomy 21) and influence of thyroid status [J]. Plos One, 2010,5 (1) :e8394.
- [2] Williams PJ, Bulmer JN, Innes BA, et al. Possible roles for folic acid in the regulation of trophoblast invasion and placental development in normal early human pregnancy[J]. Biol Reprod, 2011,84(5):1148.
- [3] Ba Y, Yu H, Liu F, et al. Relationship of folate, vitamin B12 and methylation of insulin-like growth factor-II in maternal and cord blood[J]. Eur J Clin Nutr, 2011,65(4): 480-485.
- [4] 彭科怀,杨长晓,刘广辉. 高效液相色谱法测定添加维生素保健食品中叶酸[J]. 预防医学情报杂志, 2015,2(31): 124.
- [5] Margherita G, Kevin H, Colin M, et al. A novel HPLC method for the concurrent analysis and quantitation of seven water-soluble Vitamins in biological fluids (Plasma and Urine): A Validation Study and Application[J]. The Scientific World Journal, 2012:1.
- [6] Pfeiffer CM, Hughes JP, Durazo-Arvizu RA. Changes in measurement procedure from a radio-assay to a microbiologic assay necessitate adjustment of serum and RBC folate concentrations in the U.S. population from the NHANES 1988-2010[J]. J Nutr, 2012,142(5):894-900.
- [7] 郝玲,郑俊池,田耀华,等. 血浆叶酸两种常用检测方法检测结果的比较[J]. 北京大学学报(医学版), 2004,36 (2):210-214.
- [8] Wilson DH, Herrmann R, Hsu S, et al. Ion capture assay for folate with the abbott IMx analyzer [J]. Clin Chem, 1995, 41(12 Pt 1):1780-1781.
- [9] Smith RD, Loo JA, Edmonds CG, et al. Sensitivity consideration for large molecule detection by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry[J]. J of Chromatogr, 1990,516(1):157-165.
- [10] Gunter EW, Bowman BA, Caudill SP, et al. Results of an international round robin for serum and whole-blood folate[J]. Clin Chem, 1996,42(10):1689-1694.
- [11] Minam V, Karin A. The binding of folic acid and 5-methyltetrahydrofolate to folate-binding proteins during gastric passage differs in a dynamic in vitro gastrointestinal model[J]. J Nutr, 2004,134(1):31-37.
- [12] 罗伟,郝常明. 维生素 B₁₂ 的研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2002,1(3):15-18.

(下转第 356 页)

实验室巡礼

国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心

国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心位于福建省厦门市厦门大学翔安校区椭圆楼，2005年获科技部批准依托厦门大学组建，2009年以“优秀”通过科技部的验收。中心受科技部委托作为理事长单位于2009年牵头组建全国“体外诊断产业技术创新战略联盟”并被科技部批准为全国试点联盟之一。实验室具备培养硕士、博士和博士后的资格。已建立了包括基因工程疫苗、细胞模型、动物模型、诊断试剂、抗体工程、生物信息学及结构生物学技术、管式化学发光检测系统、感染机制研究



平台等在内的11个关键技术体系。实验室面积10600 m²，拥有价值8000万元的仪器设备，包括冰冻电子显微镜、透射电子显微镜、激光共聚焦型高内涵成像分析系统、高速分析型流式细胞仪、分选型流式细胞仪、分析系高速离心机、DNA测序仪、自动化液体处理工作站、中央水机系统、磁珠提取纯化系统、程序冷冻仪等。

该实验室以传染病诊断试剂和疫苗为主攻方向，在诊断试剂和疫苗研制、诊断技术创新、单克隆抗体研制与创新、人鼠嵌合技术模型等方面独具特色，建立了大肠杆菌类病毒颗粒疫苗技术体系，研制出全球首个重组戊肝疫苗并成功上市，研制的国内首个宫颈癌疫苗(HPV 16/18)、国内首个尖锐湿疣疫苗(HPV 6/11)已经分别进入Ⅲ期、I期临床试验。研制的艾滋病系列、病毒性肝炎系列诊断试剂盒已获得48项注册证书并均实现上市销售，其中6种获得欧盟CE认证，1种获得台湾注册证书。先后承担各类国家级科研项目27项，省市课题18项，包括863计划项目、国家科技重大专项项目、国家科技支撑计划项目、国际科技合作项目、国家自然科学基金等。获国家科技进步二等奖、国家技术发明二等奖、中国专利金奖、教育部提名国家科技进步二等奖、福建省科学技术重大贡献奖、福建省科技进步一等奖等奖项。获得授权专利28件，其中3件获得包括美国、印度、韩国等在内的8个国家/地区的专利授权。先后在“N Engl J Med”“Lancet”“Science”“PNAS”“Gut”“Hepatology”“Plos Pathogens”“J Hepatology”等国际知名SCI刊物上发表论文100多篇。参编专著5部。

夏宁邵教授、张军教授、葛胜祥副教授是中心体外诊断方向的共同带头人，目前正在大力推动中心全自动化学发光免疫检测平台的建设。张军教授已入选中组部“万人计划”第一批科技创新领军人才、科技部创新人才推进计划中青年科技创新领军人才、教育部新世纪优秀人才，长期从事从事分子病毒学和生物制品研究，在诊断试剂、基因工程疫苗、临床试验方面取得了一系列研究成果并积累了丰富的研究经验。



公司简介

中山大学达安基因股份有限公司依托中山大学雄厚的科研平台,以分子诊断技术为主导,集临床检验试剂和仪器的研发、生产、销售以及全国连锁医学独立实验室临床检验服务为一体的生物医药高科技集团公司,拥有7家研究机构、50多家全资或合资的下属企业。由公司自主研发的荧光定量PCR检测(FQ-PCR)系列产品在国内的市场覆盖率稳居行业第一。



公司优势

- ★ 自主品牌的通道空间
- ★ 完善的售前和售后服务
- ★ 中山大学雄厚的科研平台
- ★ 自主知识产权的临床诊断试剂
- ★ 国内专业诊断产品供应商的首选之一

多元化产品系列



企业使命

- ★ 不断完善创新机制,以全面的技术创新、管理创新、经营模式创新,探索生命的奥秘,以一流的产品和服务推动公司的不断成长。
- ★ 关爱社会、回馈社会,推动健康产业的发展。



公司总部

地址:广州市高新技术开发区科学城香山路19号(510665)
电话:020-32290789 传真:020-32290158

营销中心

电话:020-32068328 传真:020-32068820
Http://www.daangene.com