

游离甲状腺素时间分辨荧光免疫试剂盒的研制

陈创奇¹, 冯健明², 赵可辉², 吴道贫² (1. 广东省妇幼保健院, 广州 510010; 2. 广东省广州市丰华生物工程有限公司 510730)

【摘要】 目的 研制一种人游离甲状腺素(FT4)时间分辨荧光免疫分析法(TRFIA)试剂盒。方法 采用直接竞争法建立 FT4 检测方法(固相包被 T4-复合物, 与样本中的 FT4 竞争结合 Eu 标记的 T4 单克隆抗体), 并对该试剂盒各项性能指标进行评价。结果 该试剂盒的分析灵敏度为不高于 2.0 pmol/L, 工作范围为 2.0~120.0 pmol/L。分析内变异系数为 4.4%~5.7%、分析间变异系数为 6.5%~8.2%, 其总变异系数小于 9.0%。与 T3、FT3、rT3 和 rT4 的交叉反应率分别为: 1.12%、0.34%、0.56% 和 1.51%。稳定性试验表明该试剂盒可以在 2~8 °C 稳定 1 年, 37 °C 稳定 7 d。用该试剂盒对 500 份健康人血清标本进行测试, 统计该试剂盒的正常参考值范围是 11.5~22.7 pmol/L。200 份血清标本用本试剂盒与国外的化学发光试剂盒同时检测 FT4, 其相关系数为 0.993。结论 该试剂盒各项指标均达到临床检测要求, 可替代国外化学发光法的同类产品试剂盒。

【关键词】 游离甲状腺素; 时间分辨荧光免疫分析; 试剂盒; 研制

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2012.10.025 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)10-1203-03

Preparation of A Time Resolved Fluoroimmunoassay Kit for the Detection of Human Free Thyroxine CHEN Chuang-qi¹, FENG Jian-ming², ZHAO Ke-hui², WU Dao-pin² (1. Guangdong Maternal And Child Health Hospital, Guangzhou 510010, China; 2. Guangzhou Fenghua Bioengineering Co., Ltd., Guangzhou 510730, China)

【Abstract】 **Objective** To prepare a kit for the detection of human Free Thyroxine (FT4) in serum by time resolved fluoroimmunoassay (TRFIA). **Methods** Competitive reaction method was used to build an method of TRFIA for the detection of FT4 (solid phase was coated with T4 complex, and competitively binded to Eu labeled T4 monoclonal antibody with FT4). And the performance of the kit was evaluated. **Results** The analytical sensitivity was not higher than 1.5 pmol/L, and the working range of the kit was 2.0-120.0 pmol/L. The analytical sensitivity was 1.5 pmol/L. The intra and inter assay coefficients of variation were 4.4%-5.7% and 6.5%-8.2%, respectively. The percentage of cross reactivity with T3, FT3, rT3 and rT4 was 1.12%, 0.34%, 0.56% and 1.51%, respectively. The TRFIA FT4 reagents can be stored at 2-8 °C for one year and at 37 °C for 7 days. The cutoff value for TRFIA FT4 kit in healthy subjects (n=500) was 11.5-22.7 pmol/L, in according to 500 cases of health sample serum with this kit. The correlation coefficient of blood samples detection results (n=185) between home made and foreign commercially available CLIA FT4 kit (SIEMENS) was 0.993. **Conclusion** FT4 TRFIA kit was a valuable diagnostic kit for clinical application with better sensitivity, specificity, and accuracy.

【Key words】 free-thyroxine; time-resolved fluoroimmunoassay; kit

甲状腺疾病是内分泌领域的第二大疾病。游离甲状腺素(FT4)是甲状腺功能实验室诊断和疗效观察的重要指标, 准确测量患者血清中 FT4 含量非常重要^[1]。目前, 临床检测 FT4 的常用试剂盒有酶联免疫吸附试验(ELISA)、化学发光免疫测定法(CLIA)和时间分辨荧光免疫分析法(TRFIA)。第一代 TRFIA 以 Perkin ElmerTM 公司产品为代表, FT4 检测采用间接竞争法。该试剂盒需要分 2~3 步孵育, 最终反应时间达 130 min 或以上, 操作较为复杂。本试剂盒采用一步竞争法, 操作步骤比间接竞争二步法更为简便快捷, 在各种性能分析评估中也有较大优势, 可接近或达到国外化学发光法试剂检测 FT4 的同等水平。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器 抗 FT4 单克隆抗体及 FT4 抗原均购于 Fitzgerald 公司; 羧基修饰的 T4 复合物购自美国 Biotek 公司; DTTA-Eu³⁺ 标记原料购自 PerkinElmer 公司; Sephacryl-TMS-200 为 GE Healthcare 产品; 96 孔微孔反应板(8×12)为深圳金灿华公司的产品; FT4 质控血清购自为美国 Bio-Rad 公司, LOT. 40240。荧光计数仪为 PerkinElmer 公司的 DELFIAOR 1420。全自动化学发光分析系统为德国 Siemens 公司的 ADVIA Centaur Systems。600 份血清样本收自广东省妇幼保健院, 其中 150 份异常样本(临床判定为甲状腺功能亢进或甲

状腺功能减低样本)和 500 份正常血清样本(临床判定为甲状腺功能正常), 以上样本均是清晨空腹时用静脉穿刺法采集静脉血, 让其凝集, 用离心法分离出血清, 并置于 -20 °C 环境中保存。

1.2 试剂盒组分的制备

1.2.1 固相包被抗原的制备 用 50 mmol/L、pH4.2 的磷酸盐缓冲液将包被抗原稀释至 6 μg/mL, 然后 200 μL/孔加入(8×12)微孔反应板中, 4 °C 过夜, 倾去包被液, 加入含有 0.5% BSA 的封闭液 250 μL/孔, 37 °C 下放置 2 h 后, 倾去封闭液, 板块向外离心 5 min, 真空抽干, 封热塑膜, 2~8 °C 环境保存。

1.2.2 Eu³⁺ 标记抗体的制备与纯化 将 1 mg 的抗 FT4 单克隆抗体加入 Millipore 公司带有滤膜的离心管中, 10 000 r/min 离心 5~6 min, 弃去滤液, 往柱中心加入标记缓冲液(50 mmol/L 硫酸氢钠 pH 9.4), 10 000 r/min 离心 5~6 min, 弃去滤液, 重复上述步骤 4 次。最后一次将离心管取出, 弃掉滤液, 将离心柱的滤芯反装入离心管中, 往离心柱中加入 200 μL 标记缓冲液, 静置 1 min, 9 000 r/min 离心 5~6 min 收集滤液, 即为待标记的抗体原料。将 0.5 mg 的 DTTA-Eu³⁺ 标记原料加入到 1 mg 标记抗体中, 混匀后 4 °C 静置(46±2)h 进行标记孵育。标记完成后上样过 SephacrylTMS-200 柱层析(1.6 cm×80 cm)分离纯化, 用洗脱液(50 mmol/L 的 Tris-HCl)洗脱, 同

时使用自动部分收集器收集流出液(1 mL/管),逐管测量吸光度(A = 280 nm),取峰管中的钬标记物进行混合,以 PerkinElmer 公司 Eu³⁺ 标记试剂盒中的 Eu³⁺ 为标准,测定混合峰管的 Eu³⁺ 浓度。所得标记率(Eu³⁺ mol/IgG mol)为 12,蛋白质回收率为 87%。

1.2.3 参考标准品的制备 用去激素人血清作为校准品稀释液将 FT4 抗原配制成浓度梯度为 0、2、10、20、60、120 pmol/L 的一系列校准溶液,采用国家标准品对配制的校准品进行校准。以每瓶 0.5 mL 的规格进行分装,冻干,并于 -20 °C 干燥环境中保存。

1.3 操作程序

1.3.1 FT4 TRFIA 试剂盒操作程序 微孔反应板按次序加入 25 μL/孔的校准品或待测样本,再加入用分析缓冲液按 1:100 倍稀释的钬标记抗体工作液 200 μL/孔,室温下缓慢振荡(微量振荡器)60 min,洗板 6 次,拍干。向每孔中加入增强液 200 μL,于室温下缓慢振荡 5 min 后置于 Perkin Elmer 公司的 DELFIA® 1420 时间分辨荧光免疫分析检测仪进行检测,在 30 min 内完成检测。

1.3.2 全自动化学发光分析系统操作程序 按照 ADVIA Centaur® Systems 要求装载样本及试剂包,系统自动执行检测程序。

2 结果

2.1 剂量-反应曲线 以 Perkin Elmer 公司的 DELFIA® 1420 时间分辨荧光免疫分析检测仪测定荧光值与各参考标准品浓度值,用 Log-Logit 进行数学模型拟合,并自动绘制校准曲线。其剂量-反应曲线线性相关系数绝对值=0.997 3(图 1),由此表明本试剂盒制备的试剂具有良好的剂量-反应线性关系。

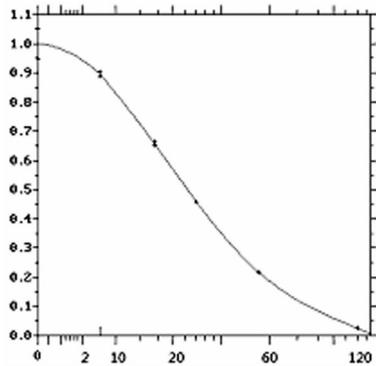


图 1 FT4 时间分辨荧光免疫分析试剂盒标准曲线

2.2 试剂检测灵敏度及线性范围 以参考校准品 A 点(零校准品)作为待测样本做 20 个复孔,计算其平均荧光值以及标准差。以 A 点测定荧光值的平均值减去 2 个标准差所得的荧光值代入标准曲线方程,计算出的浓度为其灵敏度。本试剂盒灵敏度为 1.5 pmol/L,不高于 2.0 pmol/L。按照 EP6-A 要求进行评价,试剂检测线性范围为:2.0~120.0 pmol/L。

2.3 精密度 通过对 Bio-Rad 公司 FT4 3 个血清质控品(Q1、Q2、Q3,其浓度为 8.84、23.2、41.3 pmol/L)进行 10 个复孔测定,分 3 次试验,然后根据数值计算出变异系数。其分析内变异系数小于 6.0%、分析间变异系数小于 8.5%、总变异系数小于 9.0%(表 1),符合试剂盒检定的要求。

2.4 特异性(交叉反应) 将 FT4 浓度为 17.6 pmol/L 的样本平分 5 等分,其中 4 等分中分别加入 T3、FT3、rT3 和 rT4 纯品至表 2 所示浓度。5 份样本在本试剂盒的复孔测定浓度及计算的交叉反应率(表 2),符合试剂盒设计要求。

2.5 稳定性 取自制同一批次(20101021)的 3 盒试剂分别做

以下处理,即运输 7 d、加速降解以及标准品的反复冻融,从本实验结果观察,参考标准品的各点荧光值无明显变化,且本底荧光值无明显升高或降低。表明试剂盒参考标准曲线无明显漂移,满足试剂盒稳定性要求。

表 1 精密度测定(%)

质控血清	总平均值 (pmol/L)	分析内变异系数	分析间变异系数	总变异系数
1	8.84	5.7	8.2	8.8
2	23.2	4.2	7.4	8.1
3	41.3	4.4	6.5	6.7

表 2 试剂盒特异性测定

交叉反应物	加入交叉反应物浓度	FT4 测定值 (pmol/L)	交叉反应率 (%)
T3	200 nmol/L	18.02	1.12
FT3	213 pmol/L	17.88	0.34
rT3	240 nmol/L	17.97	0.56
rT4	250 nmol/L	18.13	1.51
本底样本	—	17.82	—

注:—表示无数据。

2.6 与化学发光法的比较 应用自制 TRFIA 试剂与 Siemens 公司的试剂盒对临床血清样本的 FT4 浓度进行检测,比较两种试剂盒的检测性能(表 3、4 与图 2)。

表 3 自制试剂盒与 Siemens 化学发光试剂盒的性能比较

试剂盒	灵敏度 (pmol/L)	线性范围 (pmol/L)	精密度(%)	稳定性
自制	1.5	2~120	<10	好,2~8 °C 可稳定 1 年
Siemens	1.3	2~80	<10	好,2~8 °C 可稳定 1 年

表 4 自制试剂盒与 Siemens 化学发光试剂盒的检测效能比较

Siemens 化学发光试剂盒	自制 FT4 试剂盒			合计
	高值	正常值	低值	
高值	50	2	0	52
正常值	1	110	1	112
低值	0	3	18	21
合计	51	115	19	185

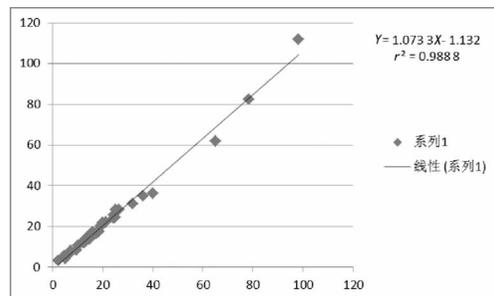


图 2 自制试剂盒与 Siemens 试剂盒血样测试相关回归分析

2.7 正常值参考范围 取已确诊为甲状腺功能正常的 500 份健康人血清样本,其中男 233 例,年龄 15~62 岁;女 267 例,年龄 14~76 岁。用本试剂盒检测,统计得出 500 份健康人血清的 FT4 均值(\bar{x})为 17.1 pmol/L,标准差(s)为 2.8。根据 95% 的甲状腺功能正常的健康人群浓度范围,统计确定正常参考范围为:11.5~22.7 pmol/L。各实验室在使用该试剂盒进行

FT4 浓度测定时,应根据各地区标本的差异设定自己的参考值范围。

3 讨 论

血清中总甲状腺激素(T4、T3)绝大部分和运载蛋白结合,并且只有含量极微的 FT4、FT3 方能穿透血管屏障进入组织并与靶细胞作用发挥其功能。应用 FT4 对诊断甲状腺功能亢进时不受患者血清结合蛋白的异常影响,可避免增加 T4 与结合蛋白的结合时出现假性升高^[2]。因此血清 FT4、FT3 测定较 T4、T3 测定更能准确反映甲状腺功能^[3]。TRFIA 测定是继放射免疫酶免疫荧光免疫化学发光免疫测定之后的新一代标记免疫测定技术,具有灵敏度高、快速、灵活、试剂无放射性污染的特点^[4]。TRFIA 问世以来得以迅速发展,国外已可生产 40 余种商品试剂盒,包括甲状腺激素、甾体激素、肿瘤相关抗原、多肽类及蛋白类激素等。近年来,我国一些单位也相继开展了有关方面的研究和开发,从螯合物的合成、试剂盒的研制、时间分辨荧光仪的制造到振荡器、洗涤器的配套,均取得了进展。为我国深入开发和广泛应用这一先进技术创造了有利条件。

本文所研制的游离甲状腺素测定试剂盒 TRFIA 在原理上采用直接竞争法(一次加样,60 min 孵育),96 孔测试只需 2 min,使测定过程较放射免疫分析法试剂和酶免试剂简便快捷,该试剂标记物没有衰变期和酶的不稳定性,其货架期一般可达到 1.0~1.5 年,使运输和贮存更为方便。与国际知名品牌化学发光试剂盒的性能比较显示,灵敏度、批内精密度相仿,自制试剂盒检测线性范围为 2~120 pmol/L,优于 Siemens 试剂盒的 2~120 pmol/L,二者对样品的检测效能呈显著相关性, $Y=1.073 3X-1.132, r=0.99, P<0.05$ 。有文献报道,在检测甲状腺功能血清学项目(甲状腺素、FT3、FT4)上 TRFIA

完全能够替代放射免疫分析法^[5-6],并且还具有精密度及灵敏度高,抗干扰能力强,可报告范围宽等优点。TRFIA 与化学发光法在乙型肝炎病毒表面抗原的定量检测上的灵敏性、准确性基本相当,在临床上可互为补充。相比进口昂贵的游离甲状腺素试剂和设备,试剂盒和 TRFIA 系统均能实现国产化,价格低廉,更适合我国国情发展的需要。

参考文献

- [1] 胡珺,黄宪章,徐宁,等.不同检测系统游离甲状腺素测定结果的可比性研究[J].实用医学杂志,2007,23(7):1063-1065.
- [2] 李小平,何云南,胡庆武.甲亢患者测定血清 T3、T4、FT3、FT4 和 sTSH 浓度的临床应用探讨[J].放射免疫学杂志,2010,23(4):443-444.
- [3] 陶义训.免疫学和免疫学检验[M].上海:上海医科大学出版社,1999:716.
- [4] Tarasenko YI, Yu Y, Jordan PM, et al. Effect of growth factors on proliferation and phenotypic differentiation of human fetal neural stem cells[J]. J Neurosci Res, 2004, 78(5):625-636.
- [5] 张登灿.时间分辨免疫荧光技术检测 3 项血清指标的临床应用[J].检验医学与临床,2011,8(14):1769-1771.
- [6] 梁秀云.时间分辨荧光免疫法和化学发光免疫分析法检测人血清乙肝病毒表面抗原浓度的差异性分析[J].医学信息:上旬刊,2011,24(15):4946-4947.

(收稿日期:2011-12-22)

(上接第 1202 页)

然 CRP 不是肿瘤标志物之一,但是有学者提出,如果 CRP 持续增高,则肿瘤的可能性很大,并且晚期恶性肿瘤患者血清 CRP 常常是升高的^[4]。健康人血清中含有 LDH,它广泛分布于细胞质中,参与糖代谢中。肺癌患者的 LDH 升高,考虑可能是与代谢加速、肿瘤细胞坏死、细胞膜通透性改变等有关^[5]。LDH 可敏感地反映细胞代谢状态,提示无氧酵解、缺氧、恶性转化等状态。有研究表明,恶性肿瘤组织的血清 LDH 酶活力可高达正常值的 6 倍^[6],并且 LDH 测定简便、价格便宜。CEA 是一种广谱性肿瘤标志物,是肿瘤细胞自身产生的蛋白质。作为广泛的肿瘤标志物,CEA 诊断的特异性不高^[7]。3 项指标对于肺癌的检测均有临床意义。本研究显示,两组患者 3 项指标检查结果对比,观察组血清 CEA、LDH 水平均高于对照组,差异有统计学意义($P<0.01$);观察组血清 CRP 水平低于对照组,差异有统计学意义($P<0.01$),但是 CRP 早期诊断有一定局限性,并且需要排除细菌感染和组织损伤等。有文献报道,LDH 随着疾病进展检出率增加^[8],单一检测一项指标对于疾病诊断均有限^[9],但是联合 3 项指标对于疾病的诊断意义更加明确。本研究显示,联合检测 CRP、LDH 和 CEA 对肺癌诊断的敏感性为 54.5%,特异性为 70.3%,准确性为 68.3%,均明显高于各项标志物单独检测,差异有统计学意义($P<0.01$)。

综上所述,联合检测肺癌患者血清 CRP、LDH 和 CEA 3 项指标对于临床诊断有重要意义,可以提高诊断的敏感性、特异性和准确性,值得临床推广应用。

参考文献

- [1] 陈建萍,康云平.肺癌患者治疗前后血清 CRP 和 CY-

FRA21-1 水平的观察[J].现代预防医学,2006,5(10):1985-1989.

- [2] 陈红涛,张红雨,舒小春,等.肺癌患者血清 CRP、LDH、CEA 联合检测的临床意义[J].国际检验医学杂志,2009,7(9):856-857.
- [3] 潘国忠,赵彦叶,范煜东,等.原发性高血压患者高敏 C-反应蛋白及尿微量清蛋白/尿肌酐比值的相关性[J].中华临床医师杂志:电子版,2011,5(18):5341-5345.
- [4] 周忠敬.血清 CA-125、CEA 和 CRP 联合检测在肺癌诊断中的价值[J].现代医院,2010,8(2):76-77.
- [5] 韦仕高.肺癌患者血清 CEA 和 CRP 水平变化的临床意义[J].临床肺科杂志,2010,2(4):564.
- [6] 翟国凤.血清 CRP、CEA 和纤维蛋白原联合检测在肺癌诊治中的临床意义[J].浙江中西医结合杂志,2011,11(2):94-96.
- [7] 罗兴雄,陈马秀,陈成江.血清 ADA 和 CRP 联合检测在肺结核、肺癌鉴别诊断中的临床价值[J].山东医药,2011,4(16):68-69.
- [8] 程玉萍,华川.C 反应蛋白测定在肿瘤中的临床应用[J].华北国防医药,2005,17(3):202.
- [9] 张原琪,康礼新,邱春江.肺癌患者血清乳酸脱氢酶变化的临床意义[J].临床肺科杂志,2010,15(12):1712-1713.

(收稿日期:2011-12-24)