

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.15.012

甲氧基肾上腺素和甲氧基去甲肾上腺素化学发光免疫检测方法的建立及分析性能评估

许君艳, 庄路阳, 王 丹, 杨 敏

郑州安图生物工程股份有限公司, 河南郑州 450000

摘 要:目的 构建甲氧基肾上腺素(MN)和甲氧基去甲肾上腺素(NMN)的化学发光免疫检测试剂。方法 将 MN、NMN 的特异性抗体分别包被到磁微粒表面,通过标本前处理工艺将待测物生物素化,把与生物素特异性结合的亲和素用辣根过氧化物酶(HRP)标记,通过免疫反应,可以形成固相化的抗体-待测物-生物素-亲和素-HRP 免疫反应产物。结果 分别建立了 MN、NMN 的校准曲线,通过性能评估试验测得该检测试剂与多种结构类似物均无明显的交叉反应;MN 检测试剂的分析灵敏度为 10.21 ng/mL, NMN 检测试剂的分析灵敏度为 6.91 ng/mL; MN、NMN 检测试剂变异系数分别为 4.79%~5.25%、3.85%~4.73%;且两种检测试剂的稳定性评估结果显示试剂稳定性较好。结论 该研究成功构建了 MN、NMN 化学发光免疫检测试剂。

关键词:甲氧基肾上腺素; 甲氧基去甲肾上腺素; 化学发光免疫检测; 性能评估

中图法分类号:R446.61

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2021)15-2189-04

Establishment and analysis performance evaluation of chemiluminescence immunoassay method for metanephrine and methoxy normetanephrine

XU Junyan, ZHUANG Luyang, WANG Dan, YANG Min

Autobio Diagnostics Co., Ltd, Zhengzhou, Henan 450000, China

Abstract: **Objective** To construct a chemiluminescence immunoassay reagent for metanephrine (MN) and methoxy normetanephrine (NMN). **Methods** The specific antibodies of MN and NMN were respectively coated on the surface of magnetic particles, and the analyte was biotinylated through the sample pretreatment process, and the avidin was labeled with horseradish peroxidase (HRP), through the immune reaction, the immobilized antibody-analyte-biotin-avidin-HRP immune reaction product might be formed. **Results** The calibration curves of MN and NMN were established. The performance evaluation test showed that there was no obvious cross-reaction between the detection reagent and various structural analogs; the analytical sensitivity of the MN detection reagent was 10.21 ng/mL, and the analytical sensitivity of the NMN detection reagent was 6.91 ng/mL; the coefficients of variation of the detection reagents for MN and NMN were 4.79%—5.25% and 3.85%—4.73% respectively. And the stability evaluation results of the two detection reagents show that the reagents are stable. **Conclusion** This study successfully constructs the chemiluminescence immunoassay reagent for MN and NMN.

Key words: metanephrine; methoxy; normetanephrine; chemiluminescence immunoassay; performance evaluation

嗜铬细胞瘤和副神经节瘤(PGLs)是罕见的内分泌肿瘤,分别在肾上腺和神经节出现。PGLs 最常见的临床表现是高血压,多数患者表现为难治性高血压,伴随有头痛、心悸、多汗、头晕、恶心、胸闷、腹痛等症状^[1-4]。随着研究者和临床专家们对 PGLs 发病机制和相关标志物的认识不断深入,以及检测技术的不断发展,检测血浆或尿液中的甲氧基肾上腺素

(MN)和甲氧基去甲肾上腺素(NMN)被认为是目前辅助诊断 PGLs 的最有效手段^[5-7]。

由于我国对 MN、NMN 的检测以质谱技术为主,缺乏化学发光免疫分析法检测产品,本研究依据国内首次公开的技术与资料^[8-9],建立针对 MN 和 NMN 的化学发光免疫检测技术。该技术具有快速、经济、自动化程度高、检测准确等优点,便于临床的推广和

作者简介:许君艳,女,主要从事继发性高血压生化指标的免疫学检测技术研究。

本文引用格式:许君艳,庄路阳,王丹,等.甲氧基肾上腺素和甲氧基去甲肾上腺素化学发光免疫检测方法的建立及分析性能评估[J].检验医学与临床,2021,18(15):2189-2192.

使用,更好地辅助 PPGLs 的临床诊断。

1 材料与方法

1.1 材料 MN 与 NMN 纯品购自 TRC 公司,结构类似物纯品购自阿拉丁;MN 的特异性多克隆抗体与 NMN 的特异性多克隆抗体均购自郑州伊美诺生物技术有限公司,辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素(SA-HRP)购自上海生工公司。表面包裹有羧基功能基团的磁微粒购自德国 Merk 公司。生物素酰氨基己酰-6-氨基己酸 N-羧基琥珀酰亚胺酯购自百灵威科技公司。

1.2 试剂的配制 (1)检测试剂稀释液的配制:配制 Tris-HCl 缓冲液(0.05 mol/L, pH7.4),加入 0.5%(m/v)的牛血清清蛋白,0.1%(m/v)的 Proclin 300。(2)磁微粒包被:按照磁珠供应商提供的操作指南将 MN 抗体或 NMN 抗体包被于磁微粒表面,抗体/磁微粒的比例为 25 μg/mg。包被完成的磁微粒储存于上述检测试剂稀释液中,磁微粒终水平为 1 mg/mL;制备完成的两种磁微粒混悬液于 2~8 ℃ 储存备用。(3)SA-HRP 溶液的配制:将 SA-HRP 按照 1/5 000 (v/v)的比例加入上述检测试剂稀释液中,振荡混匀,2~8 ℃ 储存备用。(4)校准品的配制:校准品稀释液为 0.1 mol/L 的盐酸溶液,溶液中加入不同水平的 MN 和 NMN 纯品,制备出一组 MN 水平为 0、20、60、200、600、2 000 ng/mL, NMN 水平为 0、30、90、300、900、3 000 ng/mL 的混合校准品,2~8 ℃ 储存备用。

1.3 实验仪器 郑州安图生物工程股份有限公司生产的 AutoLumo A2000 全自动检测分析仪。

1.4 方法

1.4.1 标本制备 特异性评估标本的制备:交叉品选择了儿茶酚胺类物质代谢过程中的结构类似物,如 L 型多巴(L-Dopa)、3-甲氧酪胺(3-MT)、多巴胺(DA)、肾上腺素(E)、去甲肾上腺素(NE)以及 MN、NMN。将 MN 与 NMN 的交叉品分别添加到校准品稀释液中,配置成高、低水平的交叉标本。重复性评估标本的制备:校准品稀释液中加入不同水平的 MN 和 NMN 纯品,配制出高、中、低 3 个水平的标本。稀释线性评估标本的制备:将 MN、NMN 纯品添加到校准品稀释液中,使 MN 水平为 3 000 ng/mL 左右、NMN 水平为 4 000 ng/mL 左右,将该标本作为高值,校准品稀释液作为低值,将高值和低值按照一定比例混合,制备出涵盖整个校准区间的系列标本。

1.4.2 标本酰化处理 将适量生物素酰氨基己酰-6-氨基己酸 N-羧基琥珀酰亚胺酯溶解于 DMSO 中,混匀,作为酰化剂备用。取 100 μL 各个水平的校准品以及其他标本加入等体积 Tris-HCl 缓冲液(0.5 mol/L, pH8.0)混匀。校准品及标本中加入上述配制的酰化剂,使生物素酰氨基己酰-6-氨基己酸 N-羧基

琥珀酰亚胺酯的终水平为 0.5 mg/mL,彻底混匀。

1.4.3 标本检测 将酰化处理后的校准品及标本转移至反应杯中,使用 AutoLumo A2000 全自动检测分析仪进行检测。MN 或 NMN 的检测试剂分别检测处理好的系列校准品,并按照四参数法拟合剂量反应曲线(校准曲线),用于检测标本的结果计算。

1.4.4 特异性评估 复孔检测经酰化处理的交叉品,并计算检测结果的均值。按照以下公式计算交叉率:交叉率=添加标本的检测结果/交叉品的添加水平×100%。

1.4.5 分析灵敏度评估 重复检测 0 水平的校准品(校准品稀释液)20 次,剔除离群值后计算反应信号值的均值($\bar{x}$)与标准差(s),将 $\bar{x}+2s$ 代入校准曲线计算水平值,即为检测试剂的分析灵敏度。

1.4.6 重复性评估 每个重复性标本经酰化处理后,各重复测定 20 次,剔除离群值后计算水平值的 $\bar{x}$ 与 s ,根据公式:变异系数(CV)= $s/\bar{x}\times 100\%$,计算检测试剂的 CV。

1.4.7 稀释线性评估 复孔检测经酰化处理的稀释线性标本,计算检测结果的均值,并按照稀释比例计算出每支标本的理论水平;比较、分析理论水平与实测水平的一致性。

1.4.8 稳定性评估 将 MN 检测试剂的组分(MN 抗体包被的磁微粒混悬液、SA-HRP 溶液和校准品)和 NMN 检测试剂的组分(NMN 抗体包被的磁微粒混悬液、SA-HRP 溶液和校准品)放置于 37 ℃ 温箱中,7 d 后取出,作为 37 ℃ 组。将配置好的校准品作为标本,分别将 37 ℃ 组和对照组试剂(4 ℃ 放置的试剂组分)拟合校准曲线后,同步检测校准品,并计算检测水平,分别比较 4 ℃ 组和 37 ℃ 组试剂检测水平之间的偏差。

2 结果

2.1 特异性 交叉品添加水平以及交叉率见表 1。结果显示, MN 抗体与 L-Dopa、3-MT、DA、E、NE 和 NMN 的交叉率小于 1%, NMN 抗体与 L-Dopa、3-MT、DA、E、NE 和 MN 的交叉率小于 1%。

表 1 两种检测试剂的特异性评估

交叉品类型	添加水平 (ng/mL)	MN 抗体 交叉率(%)	NMN 抗体 交叉率(%)
L-Dopa	10 000	0.00	0.00
	100	0.02	0.00
3-MT	10 000	0.00	0.05
	100	0.11	0.01
DA	10 000	0.00	0.01
	100	0.11	0.04
E	10 000	0.32	0.00

续表 1 两种检测试剂的特异性评估

交叉品类型	添加水平 (ng/mL)	MN 抗体 交叉率(%)	NMN 抗体 交叉率(%)
NE	100	0.06	0.00
	10 000	0.00	0.25
MN	100	0.00	0.12
	20 000	100.00	0.19
NMN	200	100.00	0.26
	30 000	0.25	100.00
	300	0.13	100.00

2.2 分析灵敏度 MN、NMN 检测试剂对 0 水平的校准品的 20 次重复检测结果无离群值(与 $\bar{x}$ 的偏差 $>4s$); MN 检测试剂的分析灵敏度为 10.21 ng/mL, NMN 检测试剂的分析灵敏度为 6.91 ng/mL。

2.3 重复性 观察检测结果,确认无离群值;重复性结果见表 2。数据显示, MN 检测试剂的 CV 为 4.79%~5.25%, NMN 检测试剂的 CV 为 3.85%~4.73%,可以满足临床使用的一般要求。

表 2 不同水平标本的 CV

标本	MN			NMN		
	$\bar{x}$ (ng/mL)	<i>s</i> (ng/mL)	CV (%)	$\bar{x}$ (ng/mL)	<i>s</i> (ng/mL)	CV (%)
低水平	37.64	1.98	5.25	83.86	3.96	4.73
中水平	160.99	7.71	4.79	283.45	10.90	3.85
高水平	1 016.71	49.52	4.87	1 989.97	85.50	4.30

表 3 检测试剂的稳定性评估

标本	MN			NMN		
	对照组(ng/mL)	37 ℃组(ng/mL)	偏差(%)	对照组(ng/mL)	37 ℃组(ng/mL)	偏差(%)
水平 1	18.71	20.46	-8.56	18.58	17.01	9.22
水平 2	45.57	47.93	-4.91	37.47	34.71	7.93
水平 3	106.53	111.17	-4.17	103.01	106.88	-3.62
水平 4	204.58	209.32	-2.26	282.81	293.53	-3.65
水平 5	570.96	566.08	0.86	853.55	844.82	1.03
水平 6	2 108.49	2 017.16	4.53	3 034.31	3 127.65	-2.98

3 讨 论

研究表明,PPGLs 的大多数临床后遗症和并发症与高血压有关,可以导致心、脑、肾血管系统的严重并发症,占社区高血压病例的 0.1%~0.6%,从而造成巨大的社会经济负担^[1-4]。PPGLs 的生化诊断指标是检测血浆或 24 h 尿液中 MN 和 NMN,液相色谱电化学检测法(LC-ECD)是 MN 和 NMN 最初的检测技术,后来被串联质谱法(如 LC-MS/MS)或免疫测定方法取代^[10-11]。LC-MS/MS 因其高灵敏度、高特异度

2.4 稀释线性 将每个标本的实测水平值作为横坐标,理论水平作为纵坐标进行相关性分析。结果显示,建立的 MN、NMN 检测方法均有较好的稀释线性(图 1~2)。

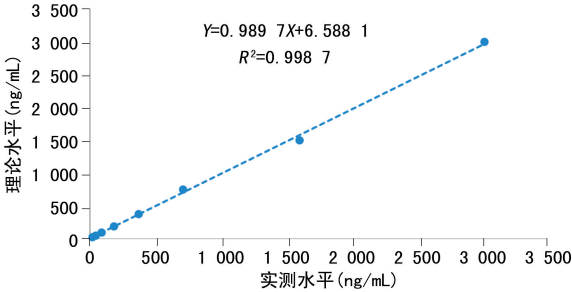


图 1 MN 稀释线性评估结果

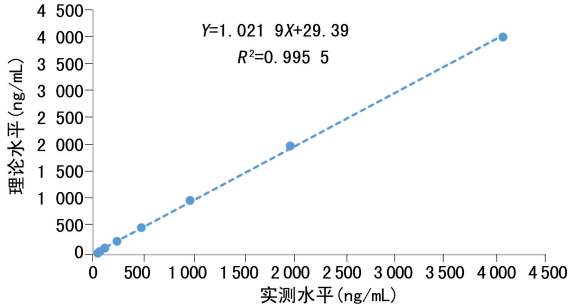


图 2 NMN 稀释线性评估结果

2.5 稳定性评估 稳定性评估的目的是评估试剂长期放置后检测结果的准确性,结果见表 3。数据显示, MN 两组检测试剂的水平 1 的偏差略大, NMN 两组检测试剂的水平 1、水平 2 的结果偏差略大,但是均 $<\pm 10\%$ 。

等优点逐渐被广泛用于 MN、NMN、其他儿茶酚胺类物质及其代谢物的检测,但不同实验室间的检测结果差异大,无可比性^[12]。同时,由于免疫学检测技术的局限性, MN 和 NMN 的检测目前尚无统一的标准。

无论何种检测技术,都需要对标本进行萃取或解离以实现检测的准确性;免疫学方法为了提高免疫反应的特异性,往往在萃取步骤后会进行酰化处理。 MN 和 NMN 在血液和尿液中均以两种形式存在:游离态和硫酸化 MN 和 NMN。具有临床指导意义的是

血浆中游离的 MN 和 NMN 或 24 h 尿液中总 MN 和 NMN^[6-7,13]。在临床检测中,为了检测尿液中的总 MN 和 NMN,一般通过高温酸解或硫酸酯酶水解的方法^[14]将硫酸化 MN 和 NMN 转化为游离 MN 和 NMN。本研究使用的标本为稀释液中添加游离 MN 和 NMN 化学纯品,不涉及硫酸化 MN 和 NMN 的解离,因此标本的前处理仅涉及酰化处理。

为了验证本次建立的检测方法的准确性和稳定性,对检测试剂的特异性、分析灵敏度、重复性、稀释线性及稳定性进行了评估。评估特异性使用的交叉品为 MN、NMN 在体内合成、转化通路的结构类似物质,各交叉品之间仅有 1~2 个化学基团的区别。表 1 中的交叉率显示,本研究选用的两种抗体具有较强的特异性,可以实现 MN、NMN 的特异性检测。本次研究构建的检测试剂盒分析灵敏度为 10.21 ng/mL (MN)和 6.91 ng/mL (NMN)。根据国内外学者对健康人血浆、24 h 尿液中 MN、NMN 水平的研究结果^[5-6,13,15-16],本研究构建的检测试剂预计可以实现对尿液标本中 MN、NMN 的检测。MANZ 等^[11]构建的 MN 和 NMN 的免疫检测产品,其检测限为 7.5 pg/mL (MN)和 15.0 pg/mL (NMN),可以检测出血浆标本中 MN、NMN 的水平。本次构建的检测试剂还需要进一步提升灵敏度,以实现血浆标本中更低水平的靶物质检测。本次研究评估的是检测试剂的分析内(批内)重复性,反映的是检测系统的随机误差。标本选用了低、中、高 3 个水平,目的是为了评估在不同水平区间检测试剂的重复性表现。稀释线性验证是为了明确检测试剂在一定量值区间内的检测准确度,结果显示, MN 在 23.44~3 000.00 ng/mL 具有良好的稀释线性, NMN 在 31.25~4 000.00 ng/mL 具有良好的稀释线性,说明本次构建的 MN、NMN 检测试剂在一定区间可以实现准确检测。稳定性评估结果显示,建立的 MN 检测方法的偏差为-8.56%~4.53%,建立的 NMN 检测方法的偏差为-3.65%~9.22%,偏差符合一般体外诊断试剂的要求,说明两个检测试剂的稳定性较好。

综上所述,本研究建立的化学发光免疫法检测试剂对待测物有较高的特异性,可以初步实现 MN、NMN 的特异性检测,同时检测试剂具有较好的重复性、稀释线性及稳定性。本研究初步完成 MN、NMN 化学发光免疫法检测试剂的开发,可以通过进一步的研究继续提升该试剂的性能,为 MN、NMN 免疫学检测技术的发展和临床应用做出技术支持。

参考文献

[1] 曾正陪. 嗜铬细胞瘤的诊断及其发病机制研究[J]. 中华

内分泌代谢杂志, 2005, 21(5): 395-397.
 [2] PAPPACHAN J M, TUN N N, ARUNAGIRINATHAN G, et al. Pheochromocytomas and hypertension[J]. Curr Hypertens Rep, 2018, 20(1): 3-9.
 [3] 洪小瑜, 戴亚丽, 吴佩娴, 等. 嗜铬细胞瘤和副神经节瘤 61 例临床分析[J]. 广东医科大学学报, 2020, 38(5): 603-605.
 [4] 王新宇, 王梦琳, 王浩. 68 例嗜铬细胞瘤和副神经节瘤患者临床特点分析[J]. 河南医学高等专科学校学报, 2020, 32(3): 282-286.
 [5] LENDERS J W, DUH Q Y, EISENHOFER G, et al. Pheochromocytoma and paraganglioma: an endocrine society clinical practice guideline [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2014, 99(6): 1915-1942.
 [6] LENDERS J W, PACAK K, WALTHER M M, et al. Biochemical diagnosis of pheochromocytoma: which test is best[J]. JAMA, 2002, 287(11): 1427-1434.
 [7] 中华医学会内分泌学会肾上腺学组. 嗜铬细胞瘤和副神经节瘤诊断治疗的专家共识[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2016, 32(3): 181-187.
 [8] 庄路阳. 甲氧基肾上腺素发光免疫检测试剂盒: CN109444415A[P]. 2019-03-08.
 [9] 庄路阳. 甲氧基去甲肾上腺素发光免疫检测试剂盒: CN109444416A[P]. 2019-03-08.
 [10] GREBE S K, SINGH R J. LC-MS/MS in the clinical laboratory: where to from here[J]. Clin Biochem Rev, 2011, 32(1): 5-31.
 [11] MANZ B, KUPER M, BOOLTINK E, et al. Development of enantioselective immunoassays for free plasma metanephrines[J]. Ann N Y Acad Sci, 2004, 1018: 582-587.
 [12] 刘庆香, 周伟燕, 张传宝. 儿茶酚胺及其代谢物的检测现状 & 标准化期望[J]. 中华检验医学杂志, 2020, 43(3): 322-327.
 [13] GROUZMANN E, DROUARD-TROALEN L, BAUDIN E, et al. Diagnostic accuracy of free and total metanephrines in plasma and fractionated metanephrines in urine of patients with pheochromocytoma[J]. Eur J Endocrinol, 2010, 162(5): 951-960.
 [14] GLAUSER M, METRAILLER M, GERBER-LEMAIRE S, et al. Enzyme and acid deconjugation of plasma sulfated metanephrines[J]. Clin Chim Acta, 2014, 430: 125-128.
 [15] PEASTON R T, GRAHAM K S, CHAMBERS E, et al. Performance of plasma free metanephrines measured by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the diagnosis of pheochromocytoma [J]. Clin Chim Acta, 2010, 411(7/8): 546-552.
 [16] 李明, 卢琳, 陈适, 等. 高效液相色谱电化学联用测定尿甲氧基肾上腺素和甲氧基去甲肾上腺素[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(12): 3375-3377.