

蛋白,提高纯度。纯度鉴定:将制备的人 IgG 进行 SDS-PAGE 和 PAGE(还原条件和非还原条件)检测,电泳结果显示,DEAE-Sepharose F. F 层析后得到的蛋白还原条件为 2 条蛋白条带,非还原条件为 1 条带^[7-8]。对 DEAE-Sepharose F. F 层析得到的样品进行 HPLC 纯度分析,结果表明通过以上分离纯化得到的样品,其纯度可以达到 97%。

2.2 抗人 IgG 多克隆抗体效价及纯度 双向琼脂扩散实验经过 24 h 扩散后,在抗原、抗体孔 1:32 以下一对相应的抗原、抗体形成 1 条清晰白色的沉淀线。可知检测的抗体效价为 1:32,为单一抗体;ELISA 法检测效价为 1:64 000,纯化后的抗体 ELISA 法检测背景干净、清晰。

2.3 实验条件确定 比较研究了免疫透射比浊法测定血清 IgG 的实验条件,用本法测定免疫比浊蛋白成分,重复性、准确性及敏感性较好,操作简单,但应严格控制实验条件,稀释后的血清抗体,勿反复冻融,可根据最小用量分装,-20℃ 存放。

2.4 试剂性能分析 精密性:IgG 批内、批间 CV 分别为 1.04% 和 2.62%。准确度:IgG 参考定值 11.73 g/L,参考范围 8.82~14.70 g/L,自配试剂测定值 11.62 g/L。线性:用高浓度的参考血清作线性测定,速率法的线性范围上限高达 60.15 g/L,最大干扰率 4.8%。

3 讨 论

使用 PEG-6000 沉淀血清中 IgG,较硫酸铵分级沉淀,优点在于沉淀用缓冲液溶解后不必透析,可直接上柱,从而减少了损失,在完成 DEAE-Sepharose F. F 预装的情况下,整个操作过程 1 d 内即可完成,简单易行。辛酸在 pH4.2~4.8,1:3 以

• 检验试剂评价 •

上稀释的标本很少产生或完全不产生 IgG 沉淀,非 IgG 蛋白则完全沉淀。虽然亲和层析法纯化能得到令人满意的纯度抗体。但这一方法会丢失抗血清中高亲和力的抗体,因此,确定选用经济而适宜的 DEAE-Sepharose F. F 层析进一步提高纯化倍数。免疫动物时,纯化的 IgG 用量适中为好,弗氏完全佐剂必须澄清,多点皮内注射多个淋巴结。纯化后的抗体在进行 SDS-PAGE 电泳时出现 2 条带,是由于抗体在进行电泳时经过煮沸等操作使蛋白重链和轻链分离。

用制备兔抗人 IgG,在该实验条件下配制 IgG 免疫透射比浊试剂,重复性、准确性、敏感性及线性好,抗干扰能力强。

参考文献

- [1] 范丽娟,潘道东. 免疫初乳中 IgG 的分离与纯化[J]. 食品科学, 1997,26(8):146-149.
- [2] 白丽. 应用辛酸硫酸铵法提取小鼠腹水和血清中的 IgG 抗体[J]. 大理医学院学报,2000,10(3):2-4.
- [3] 汪家政,范明. 蛋白质手册[M]. 北京:科学出版社,2000:1.
- [4] 王廷花,李官华,Xin FZ. 抗体理论与技术[M]. 北京:科学出版社,2005:77-87.
- [5] 叶应妩,王毓三. 全国临床检验操作规程[M]. 2 版. 南京:东南大学出版社,1997:360-361.
- [6] 赵娟. 免疫透射比浊法测定血清多种蛋白成分方法学研究[J]. 中国热带医学,2003,3(2):203-204.

(收稿日期:2011-02-01)

在日立 7180 生化仪上使用开放试剂测试肾功能项目的探讨

吴爱成

(广东省深圳市宝安区观澜人民医院检验科 518110)

摘要:目的 探讨在日立 7180 生化仪上是否能够使用上海科华生物工程股份有限公司(下称科华公司)的试剂盒测试肾功能项目。**方法** 选定肾功能测试常用的 3 个项目,尿素氮、肌酐及尿酸,对其进行灵敏度、精密性、线性、对比和干扰实验测试。**结果** 科华公司肾功能 3 个项目试剂盒的灵敏度符合要求;批内变异系数和总变异系数均小于 5.00%;线性范围与罗氏公司原装试剂基本接近;方法学比较的相关系数均大于 0.975;黄疸、脂血与溶血对结果的干扰均小于 10%。**结论** 在日立 7180 生化仪上可以使用科华公司的试剂代替罗氏原装试剂,进行肾功能 3 个项目的测试。

关键词:设备和供应; 灵敏度; 精密性; 线性范围; 方法学比较; 干扰实验

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.11.041

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)11-1228-03

日立 7180 生化仪由于速度快、故障率低、操作简单,一直深受各大、中型医院检验科的青睐^[1]。日立 7180 生化仪与瑞士罗氏公司生产的试剂盒、校准品联合使用成为封闭检测系统之后,其样本结果具有溯源性。但是很多用户认为日立公司提供的原装封闭试剂价格昂贵,从而限制了这款仪器的推广使用。现探讨在日立 7180 生化仪上使用开放试剂进行肾功能测试的可行性,并报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择符合要求的门诊及住院患者的血清标本,-20℃ 保存。罗氏公司实验室质控血清和校准品,难以获得的高、低值标本可以用质控血清代替。

1.2 仪器及试剂 采用日立 7180 生化仪。BUN、Crea 和 UA

试剂由上海科华公司提供,方法学比较的试剂盒由罗氏公司提供。胆红素纯品和高浓度脂血溶液购自 Sigma 公司。

1.3 方法

1.3.1 设置项目信息 在日立 7180 生化仪上的项目信息中填入开放试剂的名称、反应的波长、反应类型、计算单位及精确的小数位、反应方向、定标液的信息、试剂 1 和试剂 2 的加入体积,试剂空白和反应计算的起始时间和终止时间等。

1.3.2 定标与新鲜血清赋值 (1)采用 CFAS 校准品、原装配套试剂在日立 7180 生化仪上对上述 3 个项目分别进行定标。(2)挑选 BUN、Crea 和 UA 浓度分别在 8.0 mmol/L、160 μmol/L、500 μmol/L 附件的新鲜血清标本在分析仪上重复测试 3 次,记录各个项目的均值。(3)使用科华公司的试剂盒,以

上述浓度确定的新鲜血清作为校准品,对开放试剂进行定标,获得肾功能 3 项开放试剂在日立 7180 生化仪上的标准曲线和定标参数^[2-3]。测试质控品,确保各个项目结果在控,然后进行下一步实验。

1.3.3 灵敏度实验 (1)测试样本浓度要求:BUN 约 0.5 mmol/L, Crea 约 20 μmol/L, UA 约 5 μmol/L。(2)测试样本制备:参照“测试样本浓度要求”分别收集 3 mL 满足要求的极低值患者血清直接作样本;若收集的低值患者血清浓度高于上述要求,可用去离子水将收集的患者血清经适当稀释获得,分别重复测试 BUN、Crea 和 UA 各 40 次,计算重复测试的(±s)值,以(±3s)值作为灵敏度结果^[4]。

1.3.4 精密度实验 (1)准备 2 个水平的质控血清作为待测标本,一个在正常值范围附近,另一个为异常值。用去离子水严格按照说明书要求溶解多瓶质控血清,相同浓度水平的质控血清充分混匀在一起,并分装多个小瓶,置冰箱冻存。(2)每天分 2 批测定标本,各批实验至少间隔 2 h,每批测定 2 个浓度水平,每个水平重复 2 次,总共实验 20 d。(3)计算批内精密度和总精密度^[5-6]。

1.3.5 线性测试方法 (1)线性实验使用 7 个浓度水平,高值标本应高于线性上限 30%,低值标本应低于线性下限。(2)收集低浓度 X1 混合血清,高浓度 X7 混合血清。其余血清按照以下方法配制:X2 为 5 份 X1+1 份 X7, X3 为 4 份 X1+2 份 X7, X4 为 3 份 X1+3 份 X7, X5 为 2 份 X1+4 份 X7, X6 为 1 份 X1+5 份 X7,配制的样本浓度=(X1×V1+ X7×V7)/(V1+V7)。(3)所有实验和数据收集在同一天工作日内完成,分析序列应随机排列。每个浓度标本重复 4 次,记录测定结果,计算线性范围^[7]。

1.3.6 方法学比较 (1)方法学比较的标本应全部来源于健康人群或患者,全部标本浓度在线性范围内均匀分布,共 40 例。(2)每天测定 8 例标本,每例标本都用科华试剂和罗氏试剂进行双份测定,至少连续 5 d。测定时,先对标本排序,按照顺序 1~8 测定第 1 次,再按照顺序 8~1 测定第 2 次,收集实验数据。(3)对实验数据进行分析,计算两种方法的线性回归方程和相关系数^[8]。

1.3.7 干扰实验 (1)黄疸干扰原液制备:准确称取一定量胆红素纯品,溶解于一定体积 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液中,充分混匀后作为黄疸干扰物质溶液,干扰物胆红素的浓度至少 600 mg/dL;溶血干扰原液制备:以新鲜全血自制溶血干扰物,血红蛋白浓度至少 120 g/L;脂血干扰原液制备:采用高浓度脂血溶液,干扰物浓度至少 150 g/L。(2)收集足量待评估项目正常浓度和高值浓度 2 个水平患者血清各 10 mL,等分成 2 份。一份加入 1/20 体积的干扰物质溶液的溶剂,作为基础样本溶液,编号为 1#;向另外一份加入 1/20 体积的干扰物质原液,作为高值干扰成分溶液,编号为 11#;将 1# 溶液和 11# 溶液分别按 9:1、8:2、7:3、6:4、5:5、4:6、3:7、2:8、1:9 体积比,混匀为 2#、3#、4#、5#、6#、7#、8#、9#、10# 样本。1# 和 11# 样本中干扰成分的浓度分别为 C1 和 C11,中间样本干扰成分的理论浓度由下列公式定义:配制的样本浓度=(C1×V1+ C11×V11)/(V1+V11)。(3)随机测试 11 个干扰物质样本,每个样本重复测试 3 次,取均值为干扰样本待测项目的结果。以 1# 样本测试结果为基础值,按文献^[9]计算干扰率。

2 结果

2.1 灵敏度和线性范围 见表 1。

表 1 灵敏度和线性范围实验结果

指标	灵敏度	线性范围
BUN(mmol/L)	0.95	1.51~48.32
Crea(μmol/L)	26.32	28.72~868.09
UA(μmol/L)	5.21	5.47~940.23

2.2 精密度实验结果 见表 2。

表 2 精密度实验结果

指标	均值	批内 CV(%)	总 CV(%)
BUN(mmol/L)	4.32	2.77	3.69
	19.34	1.89	2.43
Crea(μmol/L)	55.17	3.65	4.88
	256.86	2.41	3.87
UA(μmol/L)	250.41	2.87	3.41
	535.62	2.03	2.62

2.3 对比实验相关性分析 见表 3。

表 3 对比实验相关性分析

指标	浓度范围	相关系数(r)	斜率	截距
BUN(mmol/L)	1.61~35.54	0.985	1.003	-0.624
Crea(μmol/L)	35.34~756.46	0.987	0.902	-3.003
UA(μmol/L)	20.69~800.15	0.991	0.965	8.05

2.4 干扰实验结果 见表 4。

表 4 干扰实验结果(%)

指标	黄疸	脂血	溶血
BUN	6.94	9.65	4.02
Crea	8.11	6.31	8.34
UA	7.23	5.47	7.31

3 讨论

封闭生化检测系统因为使用了具有溯源性的校准品,其结果稳定、可靠。开放试剂在封闭系统的使用,因为缺乏与之配套的校准品,导致样本测试结果相差很大。因此在本实验中,作者采用封闭生化检测系统对患者新鲜血清标本赋值的方法,使其成为开放试剂的校准品,从而较好地保证结果的溯源性^[10-13]。

本实验中,肾功能 3 项主要是在肾脏功能异常时出现升高,具有临床诊断意义。项目的灵敏度分别为 BUN 0.95 mmol/L、Crea 26.32 μmol/L、UA 5.21 μmol/L,与试剂盒宣称的指标相当;精密度实验中,3 项指标的批内变异系数和总变异系数都小于 5.00%,可以满足临床检验的要求,只有 Crea 的总变异系数达到 4.88%,可能与 Crea 的分析方法采用固时间法有关。BUN、Crea 和 UA 的线性范围分别为 1.51~48.32 mmol/L、28.72~868.09 μmol/L、5.47~940.23 μmol/L;而罗氏试剂说明书提供的可测试范围分别为 0.3~50 mmol/L、

18~1 330 $\mu\text{mol/L}$ 、4.2~1 190 $\mu\text{mol/L}$ ，线性范围上限均略低于罗氏试剂，但都远远超出医学决定水平，基本能满足临床检验诊断的需求。通过和罗氏公司原装试剂进行比较，发现此 3 项的相关系数都达到了 0.975 以上，证明两类试剂之间存在着较好的可比性。3 项都系统地评估了对黄疸、脂血和溶血的抗干扰能力，实验结果显示干扰率均小于 10%，而且本实验所选择的干扰源的浓度都非常高，因此认为，3 个试剂盒具有良好的抗干扰能力。

实验中选定的 3 项，基本能满足一般医院检验科的肾功能测试项目的需求，而使用科华公司的试剂，成本远低于原装试剂。但是使用开放试剂在日立 7180 生化仪上进行测试，应通过质控测试保证仪器处于正常工作状态。用户应该每天作 2 次质控测试，一次安排在样本测试之前，另外一次将质控品穿插在样本中进行测试。另外，还需要定期参加卫生部的室间质评，确保仪器性能符合要求。

参考文献

[1] 何平. 日立 7180 全自动生化分析仪工作中的故障及排除[J]. 现代检验医学杂志, 2007, 22(6): 128.
 [2] 江传慧, 陈燕. 检验结果互认面临的问题与对策[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(12): 1234-1235.
 [3] 田峰, 文道林, 王林纤. 新鲜血清作为校准品在开放系统溯源中的应用[J]. 中国热带医学, 2010, 10(4): 502-503.
 [4] 冯仁峰. 临床检验质量管理技术基础[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2003: 66-99.

[5] 陈唐勇, 章登珊, 万腊根. 生化仪检测系统精密度的评估方法与结果分析[J]. 实验与检验医学, 2009, 27(5): 461-462.
 [6] 高光强, 刘刚. 贝克曼 LX-20 生化分析仪的性能验证[J]. 临床工程, 2010, 25(8): 87-89.
 [7] 夏勇, 李卫宁, 邹德学, 等. Olympus AU5400 生化分析仪性能的评价[J]. 检验医学与临床, 2009, 6(18): 1539-1542.
 [8] National Committee for Clinical Laboratory Standard. EP9-A2 User comparison of quantitative clinical laboratory using patient sample; proposed guideline second edition[S]. Wayne, PA: CLSI, 2002.
 [9] National Committee for Clinical Laboratory Standard. EP7 Interference testing in clinical chemistry: proposed guideline [S]. Wayne, PA: CLSI, 2002.
 [10] 杨振华, 王治国. 临床实验室质量管理规范[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 153-160.
 [11] 黄国清, 王珍桂, 刘秋爽. 两种不同检测系统总二氧化碳检测结果的量值溯源性和可比性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(8): 789-791.
 [12] 张雯艳, 钱丽娜, 丁家华. 临床实验室检测系统和溯源[J]. 中华检验医学杂志, 2006, 30(1): 1-3.
 [13] 刘远程, 郭永灿, 张帮林, 等. 非配套检测系统溯源性的建立及其确认[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(6): 531-532.

(收稿日期: 2011-02-01)

(上接第 1226 页)

大于 0.975, 说明测定值与理论值符合性良好。但需特殊指明的是, 本研究所取的线性高值标本由于留取标本浓度的限制, 均未达到试剂说明书线性范围高值。

CRR 测定结果表明最大稀释倍数为 1 : 10 时, BUN、Crea、UA 的稀释回收率分别为 107.22%、99.12%、99.02%，灵敏度均符合 $CV < 20\%$ ，由此可计算获得 BUN、Crea、UA 的 CRR 分别为 0.4~557 mmol/L、7.8~22 945 $\mu\text{mol/L}$ 、3.8~13 695 $\mu\text{mol/L}$ ，CRR 范围较宽，基本满足临床需求。

CLIA'88 要求实验室选择最少 20 个健康个体标本进行生物参考区间的统计学验证，若只有不超过 10% 的结果在生物参考区间外，说明健康个体的检测值在生物参考区间内^[10]。罗氏 Modular 系统验证结果均在实验室规定的生物参考区间内，说明该参考区间符合临床要求。

综上所述，罗氏 Modular 全自动生化分析仪的主要验证结果较为理想，说明罗氏 Modular 全自动生化分析仪性能良好，能够满足临床生化检验的要求。

参考文献

[1] 林莉, 石文, 彭玉莲, 等. 罗氏 COBAS 400 全自动生化分析仪检测系统性能验证试验[J]. 现代医学仪器与应用, 2007, 20(3): 50-53.
 [2] 温冬梅, 兰海丽, 缪丽韶, 等. 应用 NCCLS 相关文件验证和评价 ADVIA1650 检测系统性能[J]. 国际检验医学杂志, 2008, 29(8): 737-739.

[3] Clinical and Laboratory Standard Institute. EP5-A2 Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods[S]. Wayne, PA: CLSI, 2004.
 [4] Clinical and Laboratory Standard Institute. EP9-A2 Method comparison and bias estimation using patient sample[S]. Wayne, PA: CLSI, 2002.
 [5] 张秀明, 温东梅, 袁勇. 临床生物化学检验质量管理与标准操作程序[M]. 北京: 人民军医出版社, 2010: 70-73.
 [6] 徐建华, 黄宪章, 庄俊华, 等. 罗氏 Modular 全自动生化分析仪酶学指标检测性能验证[J]. 检验医学, 2010, 25(2): 81-85.
 [7] Centers for Disease Control and Prevention(CDC), Centers for Medicare and Medicaid Services (CMS), Department of Health and Human Services(HHS). Medicare, Medicaid, and CLIA programs: laboratory requirements relating to quality systems and certain personnel qualifications. Final rule[J]. Fed Regist, 2003, 68(16): 3639-3714.
 [8] 冯仁丰. 临床检验质量管理技术基础[M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2003: 28-30.
 [9] 张科, 张德太. NCCLS EP9-A2 在不同生化检测系统间测定误差的评价[J]. 国际检验医学杂志, 2008, 29(12): 1144-1145.
 [10] 张心菊, 吴炯, 郭玮, 等. 强生 Vitros950 生化检测系统性能验证[J]. 检验医学, 2006, 21(6): 564-569.

(收稿日期: 2011-03-09)