

• 临床检验研究论著 •

人血清胱抑素 C 化学发光免疫分析检测系统的建立*

孔海霞¹, 余晓林², 徐道晶¹, 刘萍^{1,3}, 雷鹏¹, 王世鑫^{2△}, 翁亚光^{1▲}

(1. 重庆医科大学检验医学院, 重庆 400016; 2. 天津市东丽区东丽医院, 天津 300162;

3. 博奥赛斯(天津)生物科技有限公司, 天津 300162)

摘要:目的 建立可用于人血清胱抑素 C(Cys C)检测的化学发光免疫分析(CLIA)系统。方法 制备抗人 Cys C 多克隆及单克隆抗体,以单克隆抗体包被发光板,以辣根过氧标记多克隆抗体作为游离抗体,以夹心法为检测原理,建立 Cys C CLIA 检测系统;对自建检测系统进行方法学评价,并与罗氏 MODULAR P800 颗粒增强透射免疫分析(PETIA)系统进行比对。结果 自建 CLIA 检测系统线性范围为 0.05~20 mg/L,灵敏度为 0.05 mg/L,标准曲线线性相关系数为 0.999 7,批内、批间变异系数均小于 5%;与罗氏 MODULAR P800 PETIA 检测系统检测结果的相关系数为 0.980 2。结论 成功建立人血清 Cys C CLIA 检测系统,该检测系统灵敏度高、精密度好、稳定性高,能够满足临床应用要求。

关键词:胱抑素 C; 多克隆抗体; 单克隆抗体; 化学发光免疫分析

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.06.015

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)06-0673-03

Construction of chemiluminescence immunoassay system for the detection of Cystatin C*

Kong Haixia¹, Yu Xiaolin², Xu Daojing¹, Liu Ping^{1,3}, Lei Peng¹, Wang Shixin^{2△}, Weng Yaguang^{1▲}

(1. Department of Medical Laboratory, Chongqing University of Medical Science, Chongqing 400016;

2. Dongli Hospital of Tianjin, Tianjin 300162; 3. Petek Biotechnology Co., Ltd, Tianjin 300162, China)

Abstract: Objective To construct chemiluminescence immunoassay(CLIA) system for the detection of serum Cystatin C(Cys C). **Methods** Polyclonal and monoclonal antibody specific for human Cys C were prepared. Microwell was coated by monoclonal antibody. Polyclonal antibody was labeled with horse radish peroxidase (HRP). CLIA system, based on sandwich method, was constructed, evaluated and compared with Roche MODULAR P800 system. **Results** The constructed CLIA system was with linear range of 0.05—20 mg/L, sensitivity of 0.05 mg/L, correlation coefficient of 0.999 7 for standard curve and within-run and between-run coefficient of variability less than 5%. The correlation coefficient between constructed system and Roche MODULAR P800 system was 0.980 2. **Conclusion** CLIA system for the detection of human Cys C was successfully constructed with high sensitivity, fine precision and stability, and might be suitable for clinical application.

Key words: cystatin C; polyclonal antibody; monoclonal antibody; chemiluminescence immunoassay

由于胱抑素 C(Cys C)在人体血液中的浓度不受性别、年龄、操作等肾外因素的影响是反映肾小球滤过率的理想内源性标志物,临床常用于评价肾小球功能,广泛应用于肾功能早期损伤判定、化疗药物损害肿瘤患者肾功能的分析等领域^[1-8]。Cys C 检测方法包括放射免疫测定法(RIA)、时间分辨荧光免疫测定法(TRFIA)、酶联免疫测定法(EIA)、溶胶颗粒免疫分析(SPIA)、颗粒增强透射免疫比浊法(PETIA)和颗粒增强散射免疫比浊法(PESIA)等^[9-11],其中 PETIA 和 PISIA 反应时间短、精密度好,但仪器依赖进口且价格昂贵。化学发光免疫分析(CLIA)具有灵敏度高、特异性强、线性范围宽、稳定性好、价格低廉、无放射性危害等优势,且目前尚无可用于 Cys C 检测的 CLIA 方法。本研究即以研发血清 Cys C CLIA 检测试剂盒为目的。

1 材料与方法

1.1 材料 2.5 kg 左右雄性新西兰大白兔,6~8 周龄 Balb/c 小鼠(军事医学科学院实验动物中心)。弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、辣根过氧化物酶(HRP)、鲁米诺(美国 Sigma 公司),对碘酚(美国 Aldrich 公司),Cys C 抗原(美国 Fitzgerald 公司)、Lowry 蛋白定量试剂盒(北京博陵科为生物有限公司),

羊抗兔 IgG-HRP、羊抗鼠 IgG-HRP(北京中杉公司)。Hi TrapTM Protein A 亲和层析柱(美国 Pharmacia 公司),Bioscience PETECK96-1 型微孔板发光分析仪、BIOS-401 型微孔板脱水机[博奥赛斯(天津)生物科技有限公司],微孔板(北京金灿华公司),自动化酶免分析仪 SM-3(美国 Thermo 公司),紫外分光光度计 7252PC(上海光谱仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 抗原合成 使用碳化二亚胺试剂制备 Cys C 纯品与牛血清清蛋白(BSA)耦联物(Cys C-BSA)。

1.2.2 抗人 Cys C 多克隆抗体的制备及纯化 将 400 μg Cys C-BSA(溶于 0.9%生理盐水 500 μL 中)与等体积弗氏完全佐剂充分混合乳化后,于雄性新西兰大白兔后肢及皮下多点注射,以后每 2 周免疫 1 次(以弗氏不完全佐剂取代弗氏完全佐剂,其余同上)。免疫接种 4~5 次,每次免疫后的第 10~14 天,从兔耳静脉采血,间接酶联免疫吸附法(ELISA)测定抗体效价,抗体效价满足试验要求后制备兔抗血清。用 60%的硫酸铵对经免疫的家兔血清进行分级沉淀,溶解沉淀后用 Biogel P-10 柱除盐,冻干浓缩;用 pH7.4、0.1 mol/L Tris-HCl 溶解,在 Hi TrapTM Protein A 亲和层析柱上样后分别以 pH7.4、

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(30771788)。 通讯作者,△:E-mail:wshx-001@163.com;▲:E-mail:yaguangweng@126.com。

100 mmol/L Tris-HCl 和 pH7.4、10 mmol/L Tris-HCl 为流动相进行洗脱,分步收集。十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测蛋白纯度;以 Lowry 蛋白定量试剂盒检测抗体浓度。

1.2.3 抗人 Cys C 单克隆抗体的制备及纯化 将 Cys C-BSA 与等体积弗氏完全佐剂混合后按 25 微克/只免疫 Balb/c 小鼠,3 周后的第 2 次免疫剂量减半,与弗氏不完全佐剂混合,以后每 2 周免疫 1 次;第 4 次免疫 3 d 后腹腔注射 50 μg 完全抗原加强免疫,3 d 后取免疫小鼠脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞进行细胞融合,常规方法筛选阳性杂交瘤细胞,以有限稀释法进行克隆化;经克隆化建株的杂交瘤细胞扩大培养后,注入经石蜡处理的 Balb/c 小鼠腹腔制备单抗腹水;腹水经辛酸-硫酸铵法纯化处理后,间接酶联免疫吸附法(ELISA)测定抗体效价,Lowry 蛋白定量试剂盒测定纯化后单克隆抗体的浓度。

1.2.4 CLIA 检测系统的建立 (1)包被板的制备:用包被缓冲液将抗 Cys C 单克隆抗体稀释至 2.5 μg/mL 的溶液,按每孔 100 μL 加入微孔板,37 ℃包被 2 h 后去除孔内液体,洗板 3 次,拍干,按每孔 200 μL 加入封闭液,37 ℃封闭 2 h,去除孔内液体,拍干后烘干,加入适量干燥剂,2~8 ℃密封保存。(2)酶结合物的制备:采用常规高碘酸钠氧化法制备^[12],以酶稀释液稀释,采用方阵滴定法确定酶结合物工作浓度。(3)质控品的配制:将适量 Cys C 抗原加入 Cys C 阴性人血清中,配制高、低值质控品(QcH、QcL)。(4)CLIA 检测步骤:取包被抗 Cys C 单克隆抗体的微孔板,每孔加入 25 μL 校准品或样品,75 μL 抗 Cys C 多克隆抗体-HRP 工作液。室温下震荡 10 s,37 ℃水浴 20 min;洗板,加入发光液,避光 5 min 后在 Bioscience PE-TECK96-1 型微孔板发光分析仪上读数。

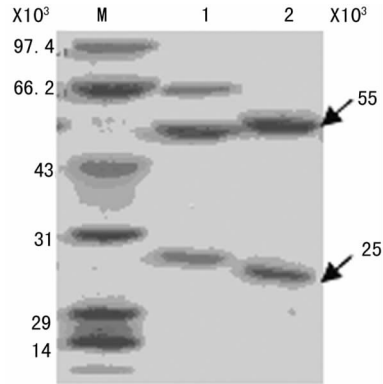
1.2.5 方法学评价 (1)线性范围:用 Log(X)-Logit(Y)数学模型进行线性回归处理,得到校准品剂量-反应曲线的回归直线,样品中 Cys C 浓度和由光学系统检测的相对光单位(RLU)呈反比,校准品线性相关系数绝对值不小于 0.990 0。(2)灵敏度:制备标准曲线,测定 10 孔零值发光值,计算($\bar{x}-2s$),将此值代入标准曲线,所得浓度值即为灵敏度。(3)精密性:每天测 QcH、QcL 各 10 孔,计算 QcH 和 QcL 检测结果的变异系数(CV%),即为批内精密性(CV_{批内});相同方法连续检测 3 d, QcH 和 QcL 各 30 孔,计算各自的 CV%,即批间精密性(CV_{批间})。(4)特异度:用稀释液配制浓度为 10 000 mg/L 的血红蛋白(Hb)、人免疫球蛋白(Ig)、三酰甘油(TG)、维生素 C(VitC)溶液,用本系统进行检测,分析交叉反应性。(5)临床参考区间的建立:随机选择体检健康男性 229 例,平均年龄 42.0 岁,女性 218 例,平均年龄 43.2 岁,采集空腹静脉血,常规离心分离血清(排除溶血、脂血或黄疸血清标本),根据检测结果确定自建系统的参考区间[95%置信区间(95%CI)]。(6)与进口 PETIA 检测系统比较:随机选取 118 例血清标本,采用本系统及进口罗氏检测系统(MODULAR P800 及配套试剂)于同日内进行检测,对两种检测系统的结果进行相关性分析。(7)稳定性:取同一批 2 个试剂盒,分别于 37 ℃、4 ℃保存 7 d 后同时平衡至室温,制作标准曲线,比较 2 个试剂盒检测相同校准品或样品的结果。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行数据分析,不同检测系统检测结果比较采用配对 *t* 检验,相关性分析采用线性相关和回归分析;检测结果不一致原因分析采用配对资料的

χ^2 检验;显著性检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 抗体效价、纯度及浓度 纯化抗人 Cys C 多克隆及单克隆抗体效价分别为 1:100 000 和 1:160 000,浓度分别为 2.56、2.86 mg/mL,SDS-PAGE 检测均在相对分子质量 55×10^3 及 25×10^3 处有 1 条明显条带(见图 1)。



M:蛋白分子标记物;1:纯化抗人 Cys C 多克隆抗体;2:纯化抗人 Cys C 单克隆抗体。

图 1 SDS-PAGE 检测纯化抗人 Cys C 抗体

2.2 线性范围和灵敏度 自建 Cys C 检测系统线性范围为 0.05~20 mg/L,标准曲线回归方程为 $Y=1.044\ 7X+4.372\ 9$ ($r=0.999\ 7$),灵敏度为 0.05 mg/L。

2.3 精密性 自建 Cys C 检测系统 CV_{批内}、CV_{批间} 在 2.22%~3.52%,见表 1。

表 1 Cys C CLIA 检测系统 CV_{批内}、CV_{批间} 分析(%)

质控品	批次	CV _{批内}	CV _{批间}
QcL	第 1 批	2.42	2.61
	第 2 批	3.11	
	第 3 批	2.22	
QcH	第 1 批	3.52	3.13
	第 2 批	2.71	
	第 3 批	2.65	

2.4 特异度 浓度为 10 000 mg/L 的 Hb、Ig、TG、VitC 对 CLIA 检测系统的交叉反应均小于 0.01%。

2.5 临床参考区间 CLIA 检测 Cys C 的临床参考区间(95%CI)为 0.50~1.90 mg/L。

2.6 与进口 PETIA 检测系统比较 118 例血清标本,自建检测系统测定值为(2.93±3.42)mg/L,罗氏 MODULAR P800 测定值为(2.79±3.08) mg/L,差异无统计学意义($P>0.05$)。以自建系统检测结果为纵坐标,以罗氏 MODULAR P800 测定结果为横坐标,进行线性回归分析,回归方程为 $Y=0.932\ 2X+0.089\ 4$ ($r=0.980\ 2$, $P<0.001$),线性回归系数为 0.932 2($P<0.001$)。118 例血清标本中有 2 例(占 1.69%)测定结果不一致,经重复检测,检测结果无明显改变。以罗氏 MODULAR P800 检测系统为参考方法,经配对四格表分析(见表 2),自建检测系统的灵敏度、特异度、误诊率、漏诊率、粗一致率分别为 96.08%、100.00%、0.00%、3.92%和 98.31%。

2.7 稳定性 稳定性试验结果见表 3;其中 4 ℃保存试剂检测各浓度校准品检测结果相关系数、回归系数分别为 0.999 9

和 1.23, 37℃ 保存试剂检测结果相关系数、回归系数分别为 0.999 5 和 1.22。

表 2 两种不同检测系统比较 (n)

自建系统	罗氏 MODULAR P800		合计
	阳性	阴性	
阳性	49	0	49
阴性	2	67	69
合计	51	67	118

表 3 稳定性试验结果 (mg/L) *

校准品浓度 (mg/L)	4℃ 保存试剂	37℃ 保存试剂
0.0	0.00	0.00
0.5	0.49	0.49
1.0	1.00	0.94
2.5	2.59	2.40
8.0	7.98	8.25
20.0	19.75	18.39

* : 相同浓度校准品不同温度保存试剂检测结果比较, $P>0.05$ 。

3 讨 论

本研究首次建立了人血清 Cys C CLIA 检测系统,其原理是将 Cys C 单克隆抗体和多克隆抗体分别用于包被及标记,在包被有抗 Cys C 单克隆抗体的微孔板中加入血清标本或校准品及 HRP 标记多抗后,在微孔板中形成包被单抗-抗原-多抗-HRP 复合物,去除游离成分后加入 HRP 的作用底物,于第5~15 分钟测定各加样孔在 425 nm 处的 RLU。RLU 与样品 Cys C 浓度呈正相关,根据 RLU-浓度标准曲线即可获得样品中的 Cys C 含量。

本研究结果显示,自建检测系统灵敏度高(达 0.05 mg/L),精密度高(2.22%~3.52%),试剂盒性能稳定,且与 PETIA 检测系统相比,CLIA 检测系统没有颗粒自凝现象,是检测精密度和试剂稳定性得到了保证。更重要的是,自建检测 CLIA 检测系统与进口 PETIA 检测系统具有良好的结果相关性($r=0.980\ 2$)。后续将进一步扩大样本量并与不同进口检测系统进行比对,对检测条件进行优化。

综上所述,本研究建立的人血清 Cys C CLIA 检测系统不仅实现了快速、全自动化检测,而且已具备灵敏度高、精密度高、稳定性高等优点,能够满足临床应用要求。

参考文献

[1] Gokkusu CA,Ozden TA,Gol H,et al. Relationship between plasma Cystain C and creatininie in chronic renal diseases and Tx-transplant patients[J]. Chin Biochem,2004,37(2):94-97.

[2] MacIsaac RJ,Premaratne E,Jerums G,et al. Estimating glomerular filtration rate in diabetes using serum Cystatin C[J]. Clin Biochem,2011,11(32):61-67.

[3] Kim DJ,Kang HS,Choi HS,et al. Serum cystatin C level is a useful marker for the evaluation of renal function in patients with cirrhotic ascites and normal serum creatinine levels[J]. Korean J Hepatolo,2011,17(2):130-138.

[4] Grubb A,Bjork J,Nyman U,et al. Cyatain C, a marker for successful aging and glomerular filtration rate,is not influenced by inflammation[J]. Scand J Clin Laborat Invest,2011,71(1):145-149.

[5] Horio M,Imai E,Yasuda Y,et al. Performance of serum cystatin C versus serum creatinine as a marker of glomerular filtration rate as measured by insulin renal clearance[J]. Clin Exp Nephrol,2011,15(6):868-876.

[6] Lertnawapan R,Bian A,Rho YH,et al. Cystatin C, renal function,and atherosclerosis in rheumatoid arthritis[J]. J Rheumatol,2011,38(11):2297-2300.

[7] Vassalos A,Young D,MacArthur K,et al. Cystatin C: influence of perfusion and myocardial injury on early (<24 h) renal function after pediatric cardiac surgery[J]. Paediatr Anaesth,2011,21(12):1185-1191.

[8] Cho SY, Lee HJ, Suh JT, et al. Cystatin C/creatinine ratio in pediatric kidney disease[J]. Clin Exp Nephrol,2011,15(6):976-977.

[9] Ristiniemi N,Savage S,Bruun L,et al. Evaluation of a new immunoassay for Cystatin C,based on a double monoclonal principle,in men with normal and impaired renal function[J]. Nephrol Dial Transplant,2012,27(2):682-687.

[10] 王建琼,牛华,刘莉,等. 透射比浊和散射比浊测定血清胱抑素 C 的方法学评价[J]. 国际检验医学杂志,2011,3(32):340,368.

[11] 黄思敏. 血清胱抑素 C 测定对慢性肾功能不全的诊断评价[J]. 实用预防医学,2009,16(12):571-572.

[12] 董雪,钟青萍,黄安诚,等. 河豚毒素直接竞争 ELISA 检测方法的研究[J]. 现代食品科技,2009,25(8):977-981.

(收稿日期:2011-10-08)

(上接第 672 页)

sediment analysis[J]. Lab Hematol,1999,5(1):123-129.

[7] Mahon CR, Smith LA. Standardization of the urine microscopic examination[J]. Clin Lab Sic,2002,3(1):328-330.

[8] 黄平,周云丽. 尿有形成分检验的现状与发展趋势[J]. 国际检验医学杂志,2009,30(11):1095.

[9] 赖利华,邓济甦,彭楷,等. Sysmex UF-1000i 尿液有形成分分析仪的性能评价[J]. 重庆医学,2009,38(19):2404-2408.

[10] 从玉隆,马俊龙. 尿液有形成分镜检与自动化检测方法学利弊和互补分析[J]. 中华检验医学杂志,2009,32(5):609.

[11] 马晓露,刘艳,李艳莲. 尿液有形成分显微镜检查复检标准的探讨[J]. 大连医科大学学报,2010,32(3):339-342.

[12] 梁可斌. 尿液有形成分检查的难点与疑点[J]. 中华检验医学杂志,2009,32(6):605-608.

(收稿日期:2011-10-03)