

• 检验技术与方法 •

人促卵泡激素酶催化化学发光免疫分析检测试剂的研发

施利琴, 周 晔

(上海交通大学医学院附属新华医院崇明分院检验科, 上海 202150)

摘 要:目的 利用化学发光免疫分析技术来开发人血清促卵泡激素(hFSH)的检测试剂,并对该试剂的各项指标进行评价。
方法 双抗夹心法检测人血清中的促卵泡激素的含量。结果 人血清中 hFSH 的检测范围是 1~150 mIU/mL,灵敏度是 0.25 mIU/mL,批内和批间的精密度小于 15%。与人黄体生成素(hLH),人促甲状腺素(hTSH)和人绒毛膜促性腺激素(HCG)的交叉率分别是 0.2%、0.18%和 0.035%。30 份血清样本的测量值与进口试剂比对的相关系数是 0.955。
结论 基于化学发光开发的免疫诊断试剂的各项指标符合要求。

关键词:卵泡刺激素; 化学发光; 免疫分析

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.23.039

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)23-2900-02

人促卵泡激素(hFSH)是由垂体前叶分泌的糖蛋白激素,由两条多肽链(即 α 和 β 亚单位)组成,hFSH 的 α 亚单位由 89 个氨基酸残基组成,并与 hFSH、人促甲状腺素(hTSH)和人绒毛膜促性腺激素(HCG)的 α 亚单位的结构基本相似, β 亚单位在上述激素之间是不同的。hFSH 是研究下丘脑-垂体-性腺轴功能的常规检查方法。目前,血清中的 hFSH 的检测,有酶标法、磁微粒分离酶联免疫法、放射免疫法、时间分辨荧光免疫分析法等^[1-4]。化学发光免疫分析法具有灵敏度高,操作简便,重复性较好,检测范围较宽等优点^[5]。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 化学发光分析仪是 Berthold 公司;磁分离架,自制。FSH 抗体来自于 Abcam 公司,FSH 抗原来自 Fitzgerald 公司,FSH 国家标准品来自中国药品生物制品检定所。碱性磷酸酶(ALP)来自上海晶科生物有限公司。磁珠来自 Dynal 公司。

1.2 方法

1.2.1 磁珠与抗体交联 采用 EDC/NHS 方法活化 200 μ L 10%羧基磁珠,洗涤后,加入 1 mg FSH 包被抗体,4 $^{\circ}$ C 过夜,洗涤后,加入封闭液,4 $^{\circ}$ C 过夜。

1.2.2 抗体与 ALP 交联 用 5%戊二醛先与 1 mg ALP 在 4 $^{\circ}$ C 反应 30 min,透析后,加入 1 mg 标记抗体,在 4 $^{\circ}$ C 过夜,加入 50 mg/mL 石朋氢化钠 10 μ L 还原后透析。

1.2.3 国家标准品和校准品的配制 用 5%牛血清蛋白,50 mmol/L(pH=7.4)的缓冲液分别稀释 FSH 抗原或国家标准品成 0、1、5、15、50、150 mIU/mL 等一系列的校准品或国家标准品溶液(稀释时,国家标准品和校准品按照同比例系数同时稀释,以消除稀释误差)。每瓶 0.5 mL 分装,冻干保存。

1.2.4 加样方式 向 1.5 mL 离心管中加入 25 μ L 标本或校准品(或国家标准品),再依次加入 25 μ L 碱性磷酸酶标记抗体和 50 μ L 磁珠包被抗体,在 37 $^{\circ}$ C 反应 30 min,在磁分离架上洗涤后,加入 100 μ L 碱性磷酸酶发光底物,室温反应 10 min 后在化学发光分析仪上读数。

1.3 统计学处理 采用 SPSS11.0 进行统计学分析,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 校准品定值实验 校准品与相应浓度的国家标准品同时分析检测,使用双对数函数拟合,两条剂量-反应曲线基本平行, $P>0.05$,以 hFSH 国家标准品为对照品,校准品实测效价与标示效价的比值为 0.91~1.09(表 1)。剂量-反应曲线的线

性相关系数 $R=0.996$,表明剂量反应线性关系良好。标准曲线的线性范围为 1~150 mIU/mL。

表 1 校准品与国家标准品的比值

标准品 编号	国家标准品 (mIU/mL)	校准品 (mIU/mL)	比值	比值区间
A	0	0	—	—
B	1	0.94	0.94	0.91~1.05
C	5	5.15	1.03	0.95~1.07
D	15	15.9	1.06	0.99~1.08
E	50	52.6	1.05	0.97~1.09
F	150	153.5	1.02	0.97~1.07

—:无数据。

2.2 灵敏度实验 同时以 0.00 mIU/mL 校准品浓度做 12 次重复测量得到的 RLU(相对光单位)值,以 1 mIU/mL 校准品浓度做 2 次重复测量得到的 RLU 值,分别计算两个校准品浓度所对应的 RLU 值的均值 X_0 和 X_1 ,以及 0 mIU/mL 校准品浓度所对应的 RLU 值的标准偏差 S ,均值 X_0 与 2 倍标准偏差 S 的和所对应的浓度值为 0.22 mIU/mL 就是所要求的灵敏度。

计算公式:

$$\text{灵敏度(mIU/mL)} = 2 \times S \times 1 / (X_1 - X_0)$$

S :校准品浓度为 0 mIU/mL 时,12 次重复测量的 RLU 值的标准偏差。 X_0 :校准品浓度为 0 mIU/mL 时,12 次重复测量的 RLU 值的平均值。 X_1 :校准品浓度为 1 mIU/mL 时,2 次重复测量的 RLU 值的平均值。

2.3 精密度实验 取质控血清,即质控品 1、2 和 3,每批各做 10 个重复,分别做 3 批实验,计算其测量平均值 \bar{X} 和标准偏差 S ,求 CV 。得到 CV 小于 10%。

计算公式: $CV=S/\bar{X}$

$$S_0 = (\text{最大测量值} - \text{最小测量值}) / 2$$

$\bar{X} \pm S_0$ 是指 10 个重复的测量值都在 $(\bar{X} - S_0, \bar{X} + S_0)$ 区间内。

2.4 特异性 含有 250 mIU/mL 的人黄体生成素(hLH)、300 mIU/mL 的人促甲状腺素(hTSH)和 2 000 mIU/mL 的人绒毛膜促性腺激素(HCG)标本经过此试剂盒测定的值分别为 0.5、0.55、0.7 mIU/mL,所以它们的交叉率分别是 0.2%、0.18%和 0.035%。

2.5 临床标本的测量 测量 30 份临床标本,与雅培的测量值相比,得到相关性公式: $Y=0.965X-7.3637, r=0.955, P<0.05$ 。

表 2 批间和批内精密度					
质控品	理论浓度 (mIU/mL)	批内精密度($n=10$)			批间精密度 ($n=30$)CV(%)
		第 1 批	第 2 批	第 3 批	
		CV(%)	CV(%)	CV(%)	
质控品 1	5	4.6	5.8	4.2	8.8
质控品 2	30	5.6	6.4	7.0	8.6
质控品 3	100	6.2	6.5	5.7	9.8

3 讨 论

血清中的 hFSH 含量对诊断、监控和治疗人体各种相关疾病有重要的参考意义,也是诊断、监控和治疗相关疾病的评价指标之一^[6-12]。

本试剂盒是利用碱性磷酸酶催化底物发光的原理和抗原抗体反应的特异性相结合来检测人血清中的 hFSH 的含量。本试剂盒的灵敏度为 0.22 mIU/mL,线性范围是 1~150 mIU/mL。而且本试剂盒的批内和批间变异系数都小于 10%,符合诊断试剂的要求。两个抗体的破坏性试验表明,在 37℃ 放置 7 d 后,与 4℃ 相比,灵敏度和精密度、准确度等都没有变化,表明稳定性很好,但是 hFSH 抗原稳定性不好,需要制成冻干粉保存。

参考文献

[1] 吴端宗,林国诚. ELISA 测定血清 LH、FSH 的方法学评价[J]. 现代检验医学杂志,2002,17(2):15-16.

• 检验技术与方法 •

[2] 章尧,唐术成. 血清 FSH、LH 磁微粒分离酶联免疫法检测评价[J]. 蚌埠医学院学报,1997,22(6):425-426.

[3] 刘德喜,胡金贵. 纸片血清标本 FSH 及 LH 放射免疫测定研究[J]. 武警医学,1996,7(4):210.

[4] 王鲁卿,邢怀广,胡燕君. 血清 E-2、FSH、LH 检测在绝经期妇女中的意义分析[J]. 放射免疫学杂志,2005,18(5):407-408.

[5] 李鼎,陆云,刘兴党. 促甲状腺素受体抗体化学发光免疫分析法与没脸免疫分析法的对比研究[J]. 标记免疫分析与临床,2012,9(3):178-179.

[6] 彭丽. 胰岛素增敏剂治疗对多囊卵巢综合征内分泌代谢紊乱的疗效观察[J]. 中外医疗,2012,22(1):85-86.

[7] 胡克翠,胡玲. 艾灸三阴交和关元对女性海洛因依赖者月经不调及性激素水平的调整作用[J]. 安徽中医学院学报,2012,31(1):30-34.

[8] 范文玲,杨慧敏,范玉香. 子宫切除术后对卵巢功能的影响[J]. 河北医药,2012,34(2):207-208.

[9] 鲁艳芬,张守信,赵俊杰,陈磊. 生殖激素水平与精索静脉曲张程度的关系探讨[J]. 当代医学,2012,18(7):109-110.

[10] 谢光斌,朱磊磊. 妇科疾病及相关研究[J]. 国际妇产科学杂志,2012,39(1):13-17.

[11] 胡卫东,项立,高天俊. 空蝶鞍综合征女性患者激素水平研究[J]. 中华妇幼临床医学杂志,2012,8(1):18-19.

[12] 张婷婷,徐宝剑. 夜尿促性腺激素检测对女童性早熟的诊断价值[J]. 实用临床医药杂志,2012,16(3):47-49.

(收稿日期:2012-08-08)

糖化血红蛋白不同检测方法的方法学比对与分析

张成禄,于新发,谢健敏,余一海,林志远,吴建辉,黄木荣,梁瑞珍
(南方医科大学附属顺德第一人民医院,广东顺德 528300)

摘 要:**目的** 比较 VARIANT II 分析系统与 ultra2 分析系统测定糖化血红蛋白(HbA1c)的结果差异,以便为糖尿病的正确诊疗提供可靠的依据。**方法** 参考美国临床实验室标准化委员会颁布的 EP9-A2 文件,在 2 台糖化血红蛋白分析仪(VARIANT II 和 ultra2)均处于正常状态下,双份检测新鲜抗凝全血,获取 HbA1c 检测数据。以 ultra2 分析仪为目标系统,VARIANT II 分析仪为实验系统,建立回归方程,以医学决定水平或参考值作为自变量(Xc)计算预期偏倚和相对偏倚,以卫生部临检中心允许误差范围的 1/2 为判断标准,判断偏倚是否可接受。**结果** 在糖化血红蛋白的医学决定水平为 10.0 时,相对偏倚(SE%)为 6.0%,在糖化血红蛋白的医学决定水平为 16.0 时,相对偏倚(SE%)为 9.2%,均小于或等于卫生部临检中心允许误差范围(±20.0%)的 1/2。**结论** 采用 VARIANT II 与 ultra2 分析仪检测 HbA1c,所获结果具可比性,可为临床提供可接受的 HbA1c 检验结果。

关键词: 血红蛋白 A,糖基化; 偏倚; 实验室技术和方法
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.23.040

文献标识码: A **文章编号:** 1673-4130(2012)23-2901-02

由于糖化血红蛋白分析仪测定原理及方法不同而导致检验结果及参考值存在差异。为此本文参考美国临床和实验室标准化协会颁布的 EP9-A2 文件^[1],对本实验室所使用的 2 台糖化血红蛋白分析仪测定结果执行比对试验,以确保为临床提供准确、可比的糖化血红蛋白检验数据。

1 材料和方法

1.1 标本来源 采集健康体检者或住院患者新鲜全血。
1.2 仪器和试剂 BIO-RAD 公司生产的 VARIANT II 糖化血红蛋白分析仪;PRIMUS DIAGNOSTICS 公司生产的 ultra2

糖化血红蛋白分析仪。所用的试剂均为相应厂家配套试剂,所有试剂均在有效期内使用。质控物均为原装配套质控物。EDTA-K₂ 抗凝真空采血管购自美国 BD 公司。
1.3 实验方法 检验人员熟悉每一检测系统的各个实验环节,熟悉评价方案。以 ultra2 糖化血红蛋白分析仪为目标(比较)系统,VARIANT II 糖化血红蛋白分析仪为实验系统。实验系统和比较系统分别测定质控物,各项指标在控后检测实验样本。使用当天采集的标本,使 50% 的实验标本分析物的含量在参考区间外。每天检测 8 份标本,连续检测 5 d,共检测