

• 行业研究 •

抗菌肽 Sc-ly 应用于肌酐酶法检测试剂盒性能分析^{*}

章玉胜,康 建,汪 岜,张 帅

(美康生物科技股份有限公司,浙江宁波 315104)

摘要:目的 分析抗菌肽 Sc-ly 应用于肌酐酶法检测试剂盒,考察其对试剂盒储存稳定性、抑菌效果的影响,并对试剂性能进行评价。方法 通过 37 ℃储存稳定性试验、加菌试验考察检测试剂储存稳定性和抑菌效果,并对检测试剂线性范围、精密度进行统计分析,与对照试剂比较相关性,分析其准确性。结果 抗菌肽 Sc-ly 应用于肌酐酶法检测试剂盒储存稳定性良好,37 ℃储存 21 d,检测质控品偏差小于 5%;37 ℃放置 10 d,对 *Escherichia coli*、*Staphylococcus aureus*、*Bacillus subtilis* 表现良好抑菌作用。试剂盒在 0~1 800 μmol/L 具有良好线性, $Y=0.9923X-2.7227, R^2=0.9990$,批内精密度和天间精密度 CV 均小于 5%。与对照试剂比较,回归方程为 $Y=0.9884X+0.9441, R^2=0.9986$,显现良好的相关性,测定结果准确可靠。结论 抗菌肽 Sc-ly 应用于肌酐酶法检测试剂,试剂具有良好的储存稳定性和抑菌作用,且试剂盒主要性能指标良好。

关键词:抗菌肽; 肌酐; 性能分析**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2019.19.021**文章编号:**1673-4130(2019)19-2390-03**中图法分类号:**R446.1**文献标识码:**AAnalysis of performance of creatinase enzymatic test kit applying antimicrobial peptide Sc-ly^{*}

ZHANG Yusheng, KANG Jian, WANG Yi, ZHANG Shuai

(Medicalsystem Biotechnology Co, Ltd. Ningbo, Zhejiang 315104, China)

Abstract: Objective To analyze the creatinine enzymatic test kit applying antimicrobial peptide Sc-ly and investigate its effect on storage stability and antimicrobial effect and evaluate the performance of the kit. **Methods** The storage stability and antimicrobial effect of the test kit was investigated by storage stability test at 37 ℃ and by adding bacteria test. The linear range and precision of test kit were analyzed statistically, and the accuracy was analyzed by compared with the control kit. **Results** The storage stability of creatinase test kit applying the antimicrobial peptide Sc-ly was good. The deviation of detection of quality control products was less than 5% after stored at 37 ℃ for 21 d. The kit had good antimicrobial effect on *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis* after placed at 37 ℃ for 10 d. The kit had good linearity between 0 and 1 800 μmol/L, $Y=0.9923X-2.7227, R^2=0.9990$. The intra-batch and inter-day precision CV were less than 5%. The regression equation was $Y=0.9884X+0.9441, R^2=0.9986$. The test kit shows correlation well with the control kit, and the results were accurate and reliable. **Conclusion** Antimicrobial peptide Sc-ly can be used in creatinase assay kit, which has good storage stability and antimicrobial effect, and the main performance is good.

Key words: antimicrobial peptide; creatinine; analysis of performance

抗菌肽(AMPs)是一类广泛存在于自然界生物体中的小肽类物质,它是机体先天性免疫系统的重要组成部分^[1]。由于抗菌肽对细菌、真菌等生物体有着广泛的抑制作用,具有广谱抗菌防腐性能,使得抗菌肽在医药、食品等领域有着良好的应用前景^[2]。肌酐是人体肌肉代谢的产物,主要由肌酸通过不可逆的非酶脱水反应缓慢形成,再释放到血液中,随尿排泄,基本

不受饮食和运动等影响,可通过肾小球滤过,在肾小管内很少会被再次吸收^[3]。血清肌酐浓度测定是评价肾小球滤过率的有效指标,可有效反映肾脏功能的实质损伤程度,在临幊上检测对于判断肾脏等病情具有重要意义^[4]。传统肌酐酶法检测试剂盒常用的防腐剂为 NaN_3 等化学防腐剂,具有一定毒性。本实验选择具有广谱抗菌效果、环保无毒的抗菌肽 Sc-ly

^{*} 基金项目:宁波市十三五海洋经济创新发展示范项目(NBHY-2017-S4)。

作者简介:章玉胜,男,高级工程师,主要从事体外诊断试剂研究。

本文引用格式:章玉胜,康建,汪屹,等.抗菌肽 Sc-ly 应用于肌酐酶法检测试剂盒性能分析[J].国际检验医学杂志,2019,40(19):2390-2392.

应用于肌酐酶法检测试剂盒, 用于替代 NaN_3 , 验证其对试剂盒稳定性及性能的影响^[5-6]。

1 材料与方法

1.1 材料来源 本实验材料抗菌肽 Sc-ly, 由浙江万里学院包永波博士惠赠。制备方法为克隆花蛤抗菌肽基因序列, 通过 *E. coli* 重组表达, 包涵体变复性方式获得具有抑菌活性的抗菌肽。血清样本来源于美康中医院提供的新鲜无明显溶血、脂血和黄疸的样本。

1.2 仪器与试剂 检测试剂为美康生物科技股份有限公司自主研发生产的含有 Sc-ly 作为防腐剂的肌酐酶法检测试剂盒, 对照试剂为含有 NaN_3 的常规市售试剂盒。校准品、质控品均为美康生物生产, 其中质控高值为 $360.6 \mu\text{mol/L}$, 低值为 $125.0 \mu\text{mol/L}$ 。检测仪器为日立公司生产的 7180 全自动生化分析仪。

1.3 方法

1.3.1 储存稳定性 将两组试剂分别放置于 37°C 下, 分别于第 3、7、10、14、21 天, 测定质控品, 比较两组试剂热储后检测结果的差异。

1.3.2 抑菌实验 将两组试剂分别添加不同的 100 CFU/mL *Escherichia coli*、*Staphylococcus aureus*、*Bacillus subtilis*, 37°C 放置 5、10 d, 观察抑菌效果。

1.3.3 线性范围 将 $1800 \mu\text{mol/L}$ 线性高值样本与生理盐水按 $10:0, 9:1, 8:0, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9, 0:10$ 进行稀释, 每个样本重复测 3 次, 以样本预期值为 X 轴, 以实测均值为 Y 轴绘图, 计算线性回归方程。

1.3.4 精密度实验 参考 EP6-A2 文件指南, 做精密度试验^[7]。用检测试剂分别对同一份病理值样本、正常值样本各连续测定 20 次, 分别计算批内精密度 CV。用检测试剂分别对同一份病理值样本、正常值样本各进行检测, 每天 2 次, 共进行 10 d, 计算天间精密度 CV。

1.3.5 准确度实验 分别用两组试剂测定正常样本和病理样本各 20 份, 其中以对照试剂测定结果作为 X 轴, 以检测试剂测定结果为 Y 轴, 计算线性回归方程, 分析相关性, 评价对照试剂测值准确性。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行分析。线性范围验证时, 采用 Pearson 相关系数, 并对其进行直线回归分析。准确度评价对回归方程进行相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 储存稳定性 37°C 储存 21 d, 检测试剂质控检测结果与靶值偏差仍在 5% 以内。而对照试剂组储存 10 d 维持 5% 以内的靶值偏差, 21 d 靶值偏差已达 8.30%。见表 1、2。

2.2 抑菌实验 检测试剂加入 *Escherichia coli*、*Staphylococcus aureus*、*Bacillus subtilis*, 37°C 放置 10 d 后, 均观察不到菌落生长。对照试剂在 5 d, 观察

不到菌落生长, 而 10 d 后观察到轻微混浊, 菌落有不同程度的轻微生长。见表 3。

表 1 检测试剂 37°C 下质控品检测稳定性结果

项目	0 d	3 d	7 d	10 d	14 d	21 d
质控品 1($\mu\text{mol/L}$)	125.2	124.4	124.7	123.1	122.5	122.1
偏差 1(%)	0.16	-0.48	-0.24	-1.52	-2.0	-2.32
质控品 2($\mu\text{mol/L}$)	360.9	360.2	361.1	358.5	357.4	355.2
偏差 2(%)	0.08	-0.11	0.14	-0.58	-0.89	-1.50

表 2 对照试剂 37°C 下质控品检测稳定性结果

项目	0 d	3 d	7 d	10 d	14 d	21 d
质控品 1($\mu\text{mol/L}$)	125.4	124.3	123.9	123.5	117.33	114.44
偏差 1(%)	0.32	-0.56	-0.88	-1.2	-6.14	-8.45
质控品 2($\mu\text{mol/L}$)	361.1	360.0	358.2	353.4	340.8	330.7
偏差 2(%)	0.14	-0.17	-0.67	-2.00	-5.49	-8.30

表 3 检测试剂与对照试剂的抑菌效果

试剂	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
检测试剂			
5 d	-	-	-
10 d	-	-	-
对照试剂			
5 d	-	-	-
10 d	++	+	++

注: “-” 培养液澄清(无菌生长); “+” 培养液不澄清(极少量菌生长); “++” 培养基液微浑浊(少量菌生长); “+++” 为培养液明显浑浊(菌明显生长)

2.3 线性范围 检测试剂检测不同稀释浓度下的肌酐浓度, 实测值与理论值之间具有良好的相关性。 $Y = 0.9923X - 2.7227, R^2 = 0.9990$, Pearson 相关系数 $r = 0.9994 > 0.990$, 且 $P < 0.05$, 说明线性良好。表明检测试剂在检测浓度范围内($0 \sim 1800 \mu\text{mol/L}$)具有良好线性。见图 1。

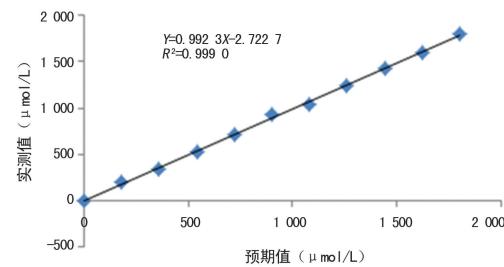


图 1 检测试剂检测不同浓度肌酐实测值与理论值回归图

2.4 精密度实验 检测试剂连续 20 次测定正常值、病理值样本 CV 值, 分别为 1.38% 和 2.68%; 检测试剂连续 10 d 20 次检测正常值、病理值样本 CV 值, 分别为 1.54% 和 3.09%, 检测试剂批内精密度和天间精密度均小于试剂说明书的 5% 要求。见表 4、5。

表4 批内精密度分析

测试样本	\bar{x} ($\mu\text{mol/L}$)	s ($\mu\text{mol/L}$)	CV(%)
病理值样本	190.31	2.58	1.38
正常值样本	59.18	1.59	2.68

表5 天间精密度分析

测试样本	\bar{x} ($\mu\text{mol/L}$)	s ($\mu\text{mol/L}$)	CV(%)
病理值样本	189.79	2.92	1.54
正常值样本	58.97	1.82	3.09

2.5 准确度实验 检测试剂与对照试剂分别测定40份样本,将测定结果进行回归分析。回归方程: $Y=0.9884X+0.9441$, $R^2=0.9986$, $P<0.05$,表明两组试剂在测定血清中肌酐具有良好的相关性,检测试剂测值准确性良好。见图2。

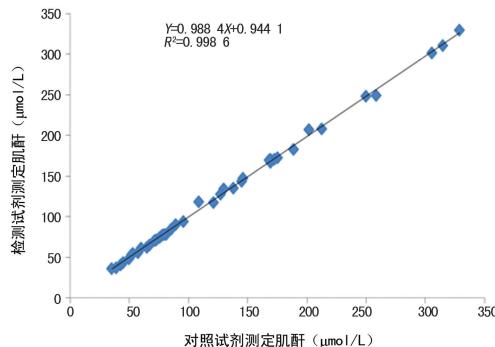


图2 检测试剂与对照试剂测定肌酐结果的相关性

3 讨 论

由于我国目前的诊断试剂防腐剂主要为化学类防腐剂和抗菌药物类防腐剂,前者存在着毒性大、环境污染等问题,后者容易引起细菌的耐药性,两者均对产品质量造成一定影响^[8]。而来源于海洋生物的抗菌肽,由于其独特的抗菌机制,具有分子量小、水溶性好、耐热性强、无免疫原性、广谱的杀菌作用、高效的抗菌活性等优点,被认为是新一代防腐剂^[9]。本文研究表明,来源于海洋生物、*E. coli* 重组表达的抗菌肽 Sc-ly,应用于肌酐酶法试剂盒中。相较于含有 NaN_3 常规试剂盒,检测试剂储存稳定性有明显提升,37℃储存21 d后,测定质控品偏差在5%以内;且对常见微生物表现为良好的抑菌效果,37℃下10 d均无微生物生长。试剂在0~1 800 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内呈现良好线性;批内批间差CV值为1.38%、2.68%,天间精密度CV值为1.54%、3.09%,均符合试剂盒说明书5%的要求。与对照试剂测值具有良好的相关性,测定结果准确可靠。检测试剂可有效用于临床检测。

根据国家的分级诊疗政策的逐步推广,慢病管理

主要由基层医院,如社区医院、村卫生所等医疗机构承担。而肌酐检测试剂能够用于肾病患者长期的检测管理,在基础医院得到越来越广泛的应用。但是,配合小型自动生化仪等即时检验仪器检测肌酐时,所用的肌酐试剂为单次分装检测试剂,在运输和储存过程中时间长,缺乏有效冷链条件,这对于试剂的稳定性提出的极高的要求^[10-11]。抗菌肽在低浓度下不仅起到防腐抗菌作用,同时抗菌肽作为小分子蛋白类物质,本身对于试剂盒中酶等生物活性物质具有热稳定性作用。本文研究表明,抗菌肽作为防腐剂可以应用于肌酐检测试剂盒中。但是,抗菌肽作为小分子多肽,本身缺乏完整的蛋白质结构,本身稳定性如何,是否已发生变性作用,是否需要改善提高,需进一步研究^[12]。

参考文献

- [1] MENDEZ S P. The human cathelicidin hCAP18/LL-37: a multifunctional peptide involved in mycobacterial infections[J]. Peptides, 2010, 31(9): 1791-1798.
- [2] 汪吴晶,高金燕.抗菌肽的作用机制、应用及改良策略[J].动物营养学报,2017,29(11):3885-3892.
- [3] NAH H, LEE S G, LEE K S, et al. Evaluation of bilirubin interference and accuracy of six creatinine assays compared with isotope dilution-liquid chromatography mass spectrometry[J]. Clin Biochem, 2016, 49(3): 274-281.
- [4] 刘倩予.血清肌酐浓度的临床应用进展[J].国外医学临床生物化学与检验医学分册,1994,15(6):255-258.
- [5] 侯赣生.肌酐检测工具酶的高效表达及其酶学性质分析[D].广州:华南理工大学,2017.
- [6] 彭会,王克坚.海洋鱼类和甲壳类抗菌肽的研究进展与应用前景[J].渔业研究,2016,38(3):254-262.
- [7] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Comparison and bias estimation using patient samples (second edition): EP6-A2 [S]. Wayne, PA, USA: NCCLS, 2002.
- [8] 黄倩云,吴恩应,李慧,等.体外诊断试剂防腐剂的选择策略[J].生物技术通讯,2013,20(4):592-594.
- [9] 黎观红,洪智敏,贾永杰,等.抗菌肽的抗菌作用及其机制[J].动物营养学报,2011,23(4):546-555.
- [10] 王烈喜,王尔茂.抗菌肽的作用机制及其应用的研究进展[J].食品工程,2008,22(2):31-33.
- [11] BROGDEN K A. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria[J]. Nat Rev Microbiol, 2005, 3(3): 238-250.
- [12] JENSSSEN H, HAMILL P, HANCOCK R E. Peptide antimicrobial agents[J]. Clin Microbiol Rev, 2006, 19(3): 491-511.