

• 论 著 •

建立磁微粒化学发光免疫分析法检测血清 CTX^{*}

周阳春¹, 丁世家², 唐彦^{3△}, 谭晶³, 张铭锐³

(1. 四川省自贡市第一人民医院检验科, 四川自贡 643000; 2. 重庆医科大学检验医学院, 重庆 400016;

3. 重庆市中医骨科医院检验科, 重庆 400010)

摘要:目的 建立磁微粒化学发光免疫分析法检测血清 I 型胶原蛋白 C 末端交联肽(CTX)。方法 将异硫氰酸荧光素(FITC)标记的抗体 R1、碱性磷酸酶标记的配对抗体 R2(R1、R2 为抗 CTX 单克隆抗体)和待测标本结合形成复合物。复合物通过抗 FITC 抗体特异性结合到磁微粒上,在磁场作用下,复合物与未结合的其他物质分离。加入酶促化学发光底物,底物发生酶促反应,形成发光反应,在检测范围内,发光强度与标本中的 CTX 水平成正比。评价所建立方法的最低检测限、精密度、线性范围、回收率等性能指标。结果 所建立的检测方法线性范围为 0.01~6.00 ng/mL,在此线性范围内, $r \geq 0.990$;检测限为 0.009 8 ng/mL;批内与批间精密度分别为 2.6%~5.9%和 4.1%~8.1%;回收率在 98.9%~102.6%;检测结果与罗氏公司生产的 CTX 试剂盒的检测结果显示具有显著相关性。结论 该研究所建立的磁微粒化学发光免疫分析法用于检测血清 CTX 能够满足临床需求,具有较好的推广运用价值。

关键词: I 型胶原蛋白 C 末端交联肽; 磁微粒; 化学发光免疫分析法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.18.014 **中图法分类号:**R446.1

文章编号:1673-4130(2020)18-2236-04 **文献标识码:**A

Establish magnetic particle chemiluminescence immunoassay for detecting serum CTX^{*}

ZHOU Yangchun¹, DING Shijia², TANG Yan^{3△}, TAN Jing³, ZHANG Mingrui³

(1. Department of Clinical Laboratory, the First People's Hospital of Zigong City, Zigong, Sichuan

643000, China; 2. School of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University,

Chongqing 400016, China; 3. Department of Clinical Laboratory, Chongqing Orthopaedic

Hospital of Traditional Chinese Medicine, Chongqing 400010, China)

Abstract: **Objective** To establish magnetic particle chemiluminescence immunoassay for detecting serum collagen type I C-terminal cross-linked peptide (CTX). **Methods** Fluorescein isothiocyanate (FITC) labeled antibody R1 and alkaline phosphatase labeled antibody R2 (R1 and R2 were anti-CTX monoclonal antibodies) were combined with the detected specimen to form a complex. The complex was specifically bound to magnetic particle by anti-FITC antibody, under the action of magnetic field, the complex was separated from other substances which were not bound. When enzyme catalyzed chemiluminescence substrate was added, the substrate reacts enzymously to form the luminescent reaction, within the detection range, the luminous intensity was directly proportional to the CTX level in the specimen. The minimum detection limit, precision, linear range and recovery rate of the method were evaluated. **Results** The linear range of the method was 0.01—6.00 ng/mL, and $r \geq 0.990$ in this linear range. The detection limit was 0.009 8 ng/mL. The intra assay and inter assay precisions were 2.6%—5.9% and 4.1%—8.1% respectively. The recovery rates were in the range of 98.9%—102.6%. There was a significant correlation between the detection results and the results of CTX kit produced by Roche. **Conclusion** The magnetic particle chemiluminescence immunoassay established by the research could meet clinical needs for detecting serum CTX, and has a good value for promotion and application.

Key words: collagen type I C-terminal cross-linked peptide; magnetic particle; chemiluminescence immunoassay

* 基金项目: 重庆市渝中区科技计划项目(20180132)。

作者简介: 周阳春, 女, 副主任技师, 主要从事临床医学检验研究。△ 通信作者, E-mail: yan77526@yeah.net。

本文引用格式: 周阳春, 丁世家, 唐彦, 等. 建立磁微粒化学发光免疫分析法检测血清 CTX[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(18): 2236-

骨质疏松症是一种骨代谢异常疾病。骨质疏松症患者由于骨量减少、骨组织微结构破坏,导致脆性增加,骨折风险增加^[1]。在骨基质的有机成分中,I 型胶原的含量超过 90%^[2],正常骨代谢时 I 型胶原降解形成的小片段分子会进入血液循环,并通过肾脏排泄。生理或病理性骨吸收增强时,I 型胶原的降解增加,血清中的小片段降解产物水平也随之升高。血清 I 型胶原蛋白 C 末端交联肽(CTX)是 I 型胶原蛋白的稳定降解产物之一,由 C 末端肽 $\alpha 1$ 链经过 β 异构化和消旋化形成^[3-6]。CTX 是国际骨质疏松基金会推荐的灵敏度相对较高的骨转换标志物^[7],也是最典型的骨吸收标志物之一^[8]。血清 CTX 水平可反映破骨细胞活性。在骨吸收增加的患者中血清 CTX 水平升高,经抗吸收治疗后其水平可恢复至正常。在骨质疏松症或其他骨病中,建议通过检测血清 CTX 来监测抗吸收治疗的有效性^[6]。本研究研制了 1 种操作简便、灵敏度高、准确性好的 CTX 定量检测磁微粒化学发光免疫分析法,以期临床诊治骨质疏松症提供实验室数据支撑。

1 资料与方法

1.1 仪器与试剂 抗 CTX 单克隆抗体 R1 与 R2 购自 Medix Biochemica 公司,CTX 抗原购自 Biotest 公司,磁微粒购自美国 Invitrogen 公司,CTX 标准品购自瑞士罗氏公司。仪器为江苏泽成生物技术有限公司生产的 CIA1200 型化学发光仪和瑞士罗氏公司生产的 Cobas e601 全自动电化学发光免疫分析系统。

1.2 方法

1.2.1 缓冲液制备 采用磷酸盐缓冲液(PBS)体系,pH 值为 5~6;将 10~20 g 的 $\text{Na}_2\text{PO}_3\text{H} \cdot 12\text{H}_2\text{O}$,1~2 g 的 $\text{NaPO}_3\text{H}_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$,1~5 g 的绵羊血清,3~10 g 的新生牛血清,1~5 g 的马血清加入至 1 L 纯化水中,充分搅拌至完全溶解,用 4 mol/L HCl 调节 pH 值,制得抗试剂缓冲液。

1.2.2 异硫氰酸荧光素(FITC)标记抗体 R1 的制备 首先用抗试剂缓冲液将 FITC 配制成水平为 1~5 mg/mL 的 FITC 溶液,然后按照 R1 抗体:FITC 溶液=1.0:1.5~1.0:1.1 的质量比将二者转移到棕色玻璃瓶里,充分混匀;充分反应后使用 pH 值为 8~9 的碳酸盐缓冲液平衡,然后使用凝胶层析分离纯化得到 FITC 标记的抗体 R1;避光-20℃保存。

1.2.3 碱性磷酸酶(ALP)标记抗体 R2 的制备 首先用抗试剂缓冲液将 ALP 配制成水平为 1~5 mg/mL 的 ALP 溶液,然后按照 ALP:R2 抗体=1:10~1:2 的质量比将二者转移至棕色玻璃瓶中,充分混匀;充分反应后使用 pH 值为 8~9 的碳酸盐缓冲液平衡,然后使用凝胶层析分离纯化得到 ALP 标记的抗体 R2;避光-20℃保存。

1.2.4 磁微粒构建 (1)将充分混匀的羧基磁珠浓缩液放入反应瓶中,将该反应瓶在磁场内放置 15~20

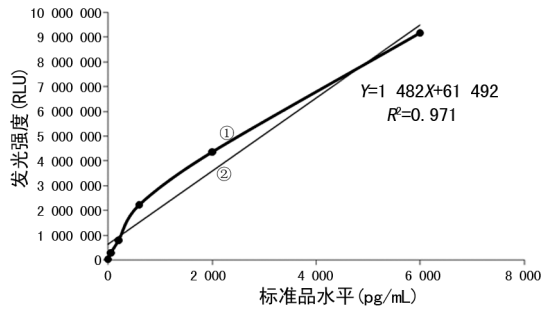
min,待羧基磁珠全部沉降后吸去上清,向反应瓶中加入相当于反应瓶中羧基磁珠体积 2~5 倍的磁微粒缓冲液,振荡清洗 20~30 min;再将反应瓶置于磁场中 15~20 min 后吸去上清;重复清洗羧基磁珠 3 遍;最后将羧基磁珠溶液定容到 10~50 mg/mL,混匀待用;所述磁微粒缓冲液的配制方法:将 12.12~15.26 mg 的三羟甲基氨基甲烷,5.82~8.58 mg 的氯化钠,50~60 g 的甲基纤维醚加入 1 L 纯化水中,充分搅拌至完全溶解。(2)连接反应:将羧基磁珠溶液与抗 FITC 抗体按 100:1 的质量比混合,在 2~8℃内保持混匀状态反应 18 h。(3)反应瓶在磁场中放置 15 min,待羧基磁珠沉降后用磁微粒缓冲液清洗 3 遍,随后定容至 10 mg/mL,2~8℃保存,制得所需磁微粒试剂。

1.2.5 反应原理 FITC 标记的抗体 R1 与 ALP 标记的配对抗体 R2 和待测标本结合形成“三明治”复合物。随后加入连有抗 FITC 抗体的磁微粒,通过抗 FITC 抗体与 FITC 的特异性结合使抗原抗体免疫复合物结合到磁微粒上。在外加磁场的作用下,将免疫反应形成的复合物与未结合的其他物质分离,清洗复合物后,加入酶促化学发光底物。底物在酶作用下被催化裂解,形成不稳定的激发态中间体,当激发态中间体回到基态时发出光子,形成发光反应,在检测范围内,发光强度值与标本中的 CTX 水平成正比。

1.3 统计学处理 采用 SPSS22.0 软件进行数据分析。相关性分析采用线性相关。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CTX 标准曲线 本研究所设计的 CTX 试剂盒溯源程序采用化学发光免疫分析法,由于无国家标准品,故采用罗氏公司生产的标准品标定试剂盒标准品,6 个水平梯度的标准品测得对应的发光强度值,经直接拟合生成标准曲线,线性方程为 $Y=1\,482X+61\,492$, $R^2=0.971$,见图 1。



注:①为不同水平标准品对应的发光强度值的连线;②为其拟合生成的标准曲线。

图 1 CTX 标准曲线

2.2 最低检测限 用零水平校准品作为标本进行检测,重复检测 20 次,得出 20 次检测结果的发光强度值,计算其均数($\bar{x}$)和标准差(s),得出 $\bar{x}+2s$,将 $\bar{x}+2s$ 代入 CTX 标准曲线方程中,求出最低检测限为

0.009 8 ng/mL,与罗氏公司生产的 CTX 试剂盒(以下称罗氏 CTX 试剂盒)基本相同。

2.3 精密度 批内精密度用同一批次 3 个水平的标本各重复检测 10 次,3 个标本检测结果的变异系数(CV)分别为 5.9%、3.8%、2.6%。批间精密度用不同批次 3 个水平的标本各重复检测 10 次,3 个标本检测结果的 CV 分别为 8.1%、6.1%、4.1%。

2.4 回收率 在已知 5 个不同水平的 CTX 血清标本中加入不同水平的 CTX 抗原,使得血清中 CTX 最终期望水平为 200 pg/mL,实际检测水平分别为 205.2、204.2、203.6、199.4、197.8 pg/mL。计算对应的回收率分别为 102.6%、102.1%、101.8%、99.7%、98.9%,平均回收率为 101.0%,表明添加物与血清被测物一致,准确性好。

2.5 线性范围 将接近线性范围上限的高水平标本按一定比例稀释为至少 5 种水平,其中低水平标本须接近线性区间的下限。将每一水平的标本重复检测 3 次,计算平均水平,将平均水平和稀释比例以最小二乘法进行直线拟合,并计算相关系数(r)。CTX 线性范围为 0.01~6.00 ng/mL,在此线性范围内, $r \geq 0.990$ 。

2.6 与罗氏 CTX 试剂盒检测结果的相关性 将 100 份临床血液标本同时用本研究设计的 CTX 试剂盒与罗氏 CTX 试剂盒进行检测,对检测结果进行相关性分析,结果显示,两种试剂盒检测结果具有显著相关性,线性方程为 $Y=1.079X-31.390$, $R^2=0.991$,见图 2。

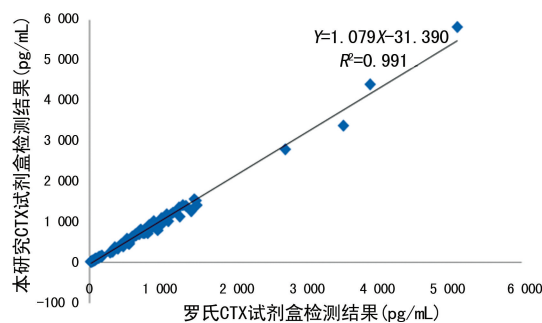


图 2 相关性分析

3 讨 论

目前,临床多通过双能 X 线检测骨密度(BMD)来诊断骨质疏松症及评估其严重程度^[9],但该方法受到诸多限制,如不能反映骨质量,无法早期预测骨质疏松症等^[1]。骨代谢标志物分为两类,即骨吸收标志物和骨形成标志物。骨吸收标志物包括酸性磷酸酶(ASP)、脱氧吡啶酚(DPD)、氨基端肽(NTX)、CTX、I 型胶原交联羧基末端肽(ICTP);骨形成标志物包括骨特异性碱性磷酸酶(BALP)、I 型前胶原羧基端前肽(PICP)、I 型前胶原氨基端前肽(PINP)、骨钙素(OC)等^[10]。联合应用骨代谢标志物和 BMD 可以明显提高骨质疏松症的诊断准确性。研究显示,骨代谢标志物的水平变化明显早于 BMD,且其水平检测有

助于鉴别原发性和继发性骨质疏松症,为临床判断骨转换类型、预测骨丢失速率、评估骨折风险、了解病情进展、选择干预措施及监测药物疗效等提供参考依据^[11]。中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会推荐将 PINP 和 CTX 作为骨转换标志物^[9]。国外研究发现,CTX 不仅能够评价骨的代谢活动,而且能够监测骨质疏松症的药物治疗效果^[12-13]。国内也有研究显示,血清 CTX 在监测抗骨吸收治疗效果方面灵敏度较高^[3,10]。

化学发光免疫分析法是 90 年代新发展起来的一种微量及痕量分析方法,具有无污染、高灵敏度、线性范围宽、操作简便快速和标记物稳定等优点。近年来,在改进和完善原有发光试剂和体系的同时,新发光试剂的合成、新体系的研发及与其他技术的联合应用将化学发光免疫分析法推进到了一个新的高度^[14]。本研究在国内首次建立了 CTX 磁微粒化学发光免疫分析法,整个方法体系的建立包括酶标抗体的制备技术、磁微粒构建技术、底物制备技术等核心技术。在酶标抗体制备技术中,本研究在抗体的非结合位点上创新性地接了一个“桥”,通过这个“桥”与 ALP 和 FITC 连接,这样就不会影响抗体标记的 ALP 和 FITC 的活性及结合力。磁微粒是高分子材料包裹磁粉,并经过表面活化处理后与抗体连接形成的一个复合体。在表面活化中,磁微粒不发生团聚,不吸附杂质蛋白,是试剂具有高特异性、准确性、可靠性的重要保证,本研究采用合适的活化剂对高分子材料进行活化,在活化的同时加入分散剂,阻止活化期间的团聚,同时选择合适的缓冲液及 pH 值,确保制备出的磁性微珠直径在 0.8~1.2 μm 。为了降低非特异性结合,本研究采用了两种封闭剂,首先使用一种封闭剂封闭剩余的活化基团,然后用另一种封闭剂与高分子材料进行物理吸附,以阻断非特异性结合,从而充分保证了产品的高特异性。本研究研制的 CTX 试剂盒检测限为 0.009 8 ng/mL,线性范围在 0.01~6.00 ng/mL,与罗氏 CTX 试剂盒相当。罗氏 CTX 试剂盒采取双抗体夹心法原理,本研究与罗氏 CTX 试剂盒在标本检测结果方面具有较好的相关性。不足之处在于本研究研制的试剂盒制备过程稍显复杂,工业化技术要求较高。此外,本研究涉及的核心技术目前未见报道,扩展能力强,相关技术正在申请专利。

4 结 论

本研究初步建立的磁微粒化学发光免疫分析法用于检测 CTX 能满足临床需求,整个过程均可实现全自动操作,提高了检测速度,可减轻检验工作者的工作强度。此外,本研究也为 CTX 的检测提供了一种灵敏、简便、快速、经济的方法,有利于骨质疏松症的诊断及治疗效果评价,具有较好的推广运用价值。

(下转第 2243 页)

- 3507.
- [6] LV Y F, DAI H, YAN G N, et al. Downregulation of tumor suppressing STF cDNA 3 promotes epithelial-mesenchymal transition and tumor metastasis of osteosarcoma by the Wnt/GSK-3 β /beta-catenin/Snail signaling pathway[J]. *Cancer Lett*, 2016, 373(2): 164-173.
 - [7] PAOLONI M, DAVIS S, LANA S, et al. Canine tumor cross-species genomics uncovers targets linked to osteosarcoma progression[J]. *BMC Genomics*, 2009, 10: 625.
 - [8] KRESSE S H, RYDBECK H, SKARN M, et al. Integrative analysis reveals relationships of genetic and epigenetic alterations in osteosarcoma [J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e48262.
 - [9] KELLY A D, HAIBE-KAINS B, JANEWAY K A, et al. MicroRNA paraffin-based studies in osteosarcoma reveal reproducible independent prognostic profiles at 14q32[J]. *Genome Med*, 2013, 5(1): 2-11.
 - [10] SUBRAMANIAN A, TAMAYO P, MOOTHA V K, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(43): 15545-15550.
 - [11] HANZELMANN S, CASTELO R, GUINNEY J. GSEA: gene set variation analysis for microarray and RNA-seq data[J]. *BMC Bioinformatics*, 2013, 14(8): 7-15.
 - [12] YOSHIHARA K, SHAHMORADGOLI M, MARTINEZ E, et al. Inferring tumour purity and stromal and immune cell admixture from expression data[J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 2612.
 - [13] UHLEN M, ZHANG C, LEE S, et al. A pathology atlas of the human cancer transcriptome[J]. *Science*, 2017, 357(6352): 2507-2513.
 - [14] JIANG X, ZHANG Z, SONG C, et al. Glaucoalyxin A reverses EMT and TGF- β 1-induced EMT by inhibiting TGF- β 1/Smad2/3 signaling pathway in osteosarcoma[J]. *Chem Biol Interact*, 2019, 307: 158-166.
 - [15] LOU Y, DIAO L, CUENTAS E R, et al. Epithelial-mesenchymal transition is associated with a distinct tumor microenvironment including elevation of inflammatory signals and multiple immune checkpoints in lung adenocarcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(14): 3630-3642.
 - [16] MAK M P, TONG P, DIAO L, et al. A patient-derived, pan-cancer EMT signature identifies global molecular alterations and immune target enrichment following epithelial-to-mesenchymal transition[J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(3): 609-620.
 - [17] ISELLA C, TERRASI A, BELLOMO S E, et al. Stromal contribution to the colorectal cancer transcriptome[J]. *Nat Genet*, 2015, 47(4): 312-319.
 - [18] ISELLA C, TERRASI A, BELLOMO S E, et al. Corrigendum: stromal contribution to the colorectal cancer transcriptome[J]. *Nat Genet*, 2016, 48(10): 1296-1298.

(收稿日期: 2020-01-02 修回日期: 2020-06-25)

(上接第 2238 页)

参考文献

- [1] 杨国君, 吕龙. I 型胶原蛋白 C 末端交联肽 (CTX) 与骨质疏松症的相关性研究[J]. *内蒙古医科大学学报*, 2018, 40(5): 522-525.
- [2] SZULC P, DELMAS P D. Biochemical markers of bone turnover in men[J]. *Calcif Tissue Int*, 2001, 69: 229-234.
- [3] 王抒, 张军宁, 乔田奎. 血清 I 型前胶原氨基端前肽、I 型前胶原羧基端前肽、I 型胶原羧基端肽在骨转移性癌诊断中的应用[J]. *中国临床医学*, 2011, 18(4): 456-458.
- [4] SUGIMOTO T, NAKAMURA T, NAKAMURA Y, et al. Profile of changes in bone turnover markers during once-weekly teriparatide administration for 24 weeks in postmenopausal women with osteoporosis[J]. *Osteoporos Int*, 2014, 25(3): 1173-1180.
- [5] BAI Y H. Study on the role of bone metabolic-markers in the treatment of postmenopausal osteoporosis in women [J]. *Int J Lab Hematol*, 2017, 38(20): 2926-2929.
- [6] 及金宝, 林兴喜, 朱翔蓉, 等. 骨代谢标志物对社区绝经后骨质疏松症患者发生髋部骨质疏松及骨折的评估作用[J]. *中国全科医学*, 2016, 19(14): 1625-1628.
- [7] LIU T T, LIU D M, XUAN Y, et al. The association between the baseline bone resorption marker CTX and incident dysglycemia after 4 years[J]. *Bone Res*, 2017, 5(3): 235-241.
- [8] HERRMANN M, SEIBEL M J. The amino and carboxy-terminal corss-linked telopeptides of collagen type I, NTX-I and CTX-I: a comparative review[J]. *Clin Chim Acta*, 2008, 393(2): 57-75.
- [9] 夏维波, 章振林, 林华, 等. 原发性骨质疏松症诊疗指南 (2017)[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2019, 25(3): 281-309.
- [10] 王清华, 林坚平, 沈宁江, 等. 根据 I 型胶原氨基端肽、I 型胶原羧基端肽、骨钙素及骨特异性碱性磷酸酶早期诊断骨不连[J]. *中国组织工程研究*, 2016, 20(51): 7611-7621.
- [11] MOHAMED Y, HAIFA H, DATEL O, et al. The role of biochemical markers of bone turnover in the diagnosis of osteoporosis and predicting fracture risk[J]. *Tunis Med*, 2014, 92(5): 304-310.
- [12] COSMAN F, DEBEUR S J, LEBOFF M S, et al. Clinician's guide to prevention and treatment of osteoporosis [J]. *Osteoporos Int*, 2014, 25(10): 2359-2381.
- [13] CABRAL H W, ANDOLPHI B F, FERREIRA B V, et al. The use of biomarkers in clinical osteoporosis[J]. *Rev Assoc Med Bras*, 2016, 62(4): 368-376.
- [14] 周文光, 孔悦, 魏培德, 等. 一种全自动高精度化学发光免疫测定仪的研制[J]. *医疗卫生装备*, 2013, 34(5): 16-17.

(收稿日期: 2020-01-02 修回日期: 2020-06-15)