

• 论 著 •

血清 AST 自主研发生化诊断试剂的临床研究*

余文婕, 王惠萱[△], 滕毅, 陈忠明, 阳红, 王珂, 贾雄飞

(中国人民解放军昆明总医院检验科 650032)

摘要:目的 对自主研发的血清天门冬氨酸氨基转移酶(AST)生化诊断试剂进行自身的性能评价,并与进口血清 AST 生化诊断试剂对血清 AST 试验检测的可比性及偏倚进行评估。**方法** 自主研发血清 AST 生化诊断试剂自身性能评价:做空白吸光度、重复性和线性检测。依据美国临床实验室标准化委员会(CLSI)EP9-A 文件标准,科学设计试验方案,与进口德国 Olympus 生化诊断试剂进行比对和偏倚评估研究。**结果** 自主研发 AST 生化诊断试剂空白吸光度、重复性和线性检测均符合要求,两组试剂对临床标本 AST 的检测结果系统误差符合国际标准。**结论** 自主研发 AST 生化诊断试剂与进口生化诊断试剂两者间具有良好的相关性,并且自身性能良好,安全性和有效性符合临床应用要求。

关键词: 天冬氨酸氨基转移酶类; 诊断; 指示剂和试剂; 生物医学研究

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.16.001

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)16-1787-02

Clinical application of independently researched and developed diagnostic reagent for the detection of serum AST*

She Wenjie, Wang Hui-xuan[△], Teng Yi, Chen Zhongming, Yang Hong, Wang Ke, Jia Xiongfei

(Department of Clinical Laboratory, Kunming General Hospital of PLA, 650032, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the performance of independently researched and developed diagnostic reagent for the detection of serum aspartate aminotransferase(AST) and its comparability and bias with imported diagnostic reagent. **Methods** The performance of independently researched and developed reagents was evaluated by the testing of blank absorbance, repeatability and linearity. According to the document EP9-A of Clinic and Laboratory Standard Institute (CLSI), the comparability and bias between independently researched and developed reagent and imported diagnostic reagent of Olympus from German were assessed. **Results** The blank absorbance, repeatability and linearity of independently researched and developed AST diagnostic reagent were all in line with the requirements. The systematic errors between the two different reagents were also in line with international standards. **Conclusion** There is fine correlation between independently researched and developed AST diagnostic reagent and the imported reagent, and the performance, safety and validity of the former could meet the requirements of clinical practice.

Key words: aspartate aminotransferases; diagnosis; indicators and reagents; Comparability; biomedical research

近年来随着检验医学的快速发展,中国临床生化试剂的潜在市场相当巨大,如果能够实现国产试剂研发并替代进口试剂,不仅能节约成本减少支出,减轻老百姓看病就医的负担,而且将大大振兴民族产业,在体外诊断试剂方面缩小与国外的差距。为此,本研究用进口和自主研发的天门冬氨酸氨基转移酶(AST)生化诊断试剂^[1-3],对临床血清 AST 的检测结果进行分析和实验比对研究^[4-8],现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集成都军区昆明总医院日常进行 AST 检测的无溶血、无黄疸患者新鲜血清标本,根据样本入选标准和剔除标准:≤40 U/L,40~100 U/L 和 ≥100 U/L 范围内选定 100 份标本,剔除测定值小于线性下限 10 U/L 和测定值大于线性高限 800 U/L 的标本,其中男 67 份,女 33 份;年龄最大 91 岁,最小 5 岁。≤40 U/L 33 份,占 33%;40~100 U/L 28 份,占 28%;≥100 U/L 39 份,占 39%。

1.2 试剂与仪器 对照方法(X):Olympus AST 诊断试剂,批号为 LOT 7546;速率法;配套校准品批号为 LOT 0113;配套质控品水平 1,批号为 LOT 50025 2010-06-01;水平 2,批号为 LOT 0026 2010-06-01。实验方法(Y):中生 AST 诊断试剂,批号为 LOT 090091;速率法;配套校准品批号为 LOT 08011;配套质控品水平 1 与水平 2 批号均为 LOT 090081 201008。采

用日本 Olympus AU5421 自动生化分析仪。

1.3 方法 由专业技术人员严格按照本实验室的标准操作规程进行实验。(1)定标:分别用 X 和 Y 各自配套定标液进行试剂定标。(2)质量控制:分别用 X 和 Y 的配套 2 个浓度质控液进行质控操作,各重复 3 次,结果都在控。(3)检测:每天选取高、中、低值临床血清标本各 10 份,分别用两种诊断试剂以 1~10 号顺序进行 AST 测定,再按相反顺序 10~1 号重复测定。检测在 2 h 内完成,以上步骤重复 10 d,将所得结果整理打印,进行后续分析。

1.4 统计学处理 研发试剂自身的性能研究采用统计软件 SPSS 13.0 对测定数据进行分析,两种诊断试剂对血清 AST 测定结果在 Excel 2003 上编制程序进行分析。

2 结果

2.1 自主研发试剂盒临床性能评价结果 (1)空白吸光度:在波长 340 nm(光径 1 cm)处,以蒸馏水为检测样本,重复测定两次。实测结果:试剂空白吸光度 1、2 分别为 1.586 9、1.585 9,均大于或等于 1.000;试剂空白吸光度变化率($\Delta A/\min$)1、2 分别为 0.001 2、0.001 0,均小于或等于 0.008,符合试剂盒的设计要求。(2)重复性:用 AST 试剂盒重复测定两个浓度水平的血清样品各 20 次,计算不同样品测定值的均值(\bar{x})和标准差(s)。重复测定结果的变异系数(CV)均小于或等于 8%,表明

* 基金项目:国家高技术研究发展计划“863 计划”(2006AA020901)。 [△] 通讯作者, E-mail:43jyk@163.com。

符合试剂盒的设计要求。(3)线性:在 10~800 U/L 范围内,用接近线性范围上限的高浓度和低浓度人血清样品,按比例混合成 9 个稀释浓度。将此为样品,分别用 AST 测定试剂盒测定每个浓度样品,重复测定 3 次,对测定数据进行多项式拟合,结果此试剂的线性呈二阶线性。

2.2 两种试剂临床比对和偏倚评估

2.2.1 两种试剂的均值结果 X 试剂对 AST 测定结果的均值为:155.86 U/L;Y 试剂对 AST 测定结果的均值为:156.20 U/L,两均值无显著差异。

2.2.2 方法内重复性检查 计算得到 X 方法两次测定值的标准化值的均值(DX')=0.030 0;Y 方法两次测定值的标准化值的均值(DY')=0.034 0。结果显示:DX' ≤ 4 DX',DY' ≤ 4 DY',两方法均重复性好,符合相关性实验要求。

2.2.3 离群点检查 进行两种方法间的绝对偏差、相对偏差及绝对和相对偏差平均值的计算,结果显示: E = 3.89, E' = 0.04。Eij ≤ 4 E;Eij' ≤ 4 E',无离群点存在。

2.2.4 进行线性回归及散点图、偏倚图分析 r²=0.997 4,满足 EP9-A 文件 r ≥ 0.975 0 或(r² ≥ 0.950 0)的要求。继而对数据进行散点图及偏倚图分析,结果见图 1~4。Y 平均值与 X 均值线性关系良好;Y 单个观测值与 X 平均值线性关系良好;两种方法对同一份血清 AST 的测定均值偏差较小,分布较合理;(Y)单个观察值与(X)均值相比偏差较小,分布较合理。

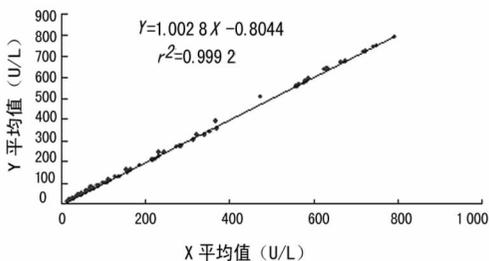


图 1 Y 平均值与 X 平均值线性关系图

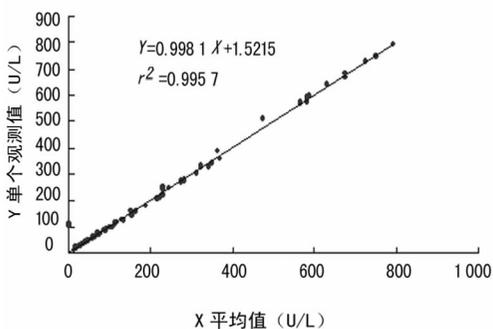


图 2 Y 单个观测值与 X 平均值线性关系图

2.2.5 系统误差的估计值及其置信区间计算 根据美国 CALL'88 允许变异,Y 与 X 的偏倚要求应该小于 1/2 CLIA'88 允许误差,因此将 AST 的医学决定水平浓度定为 30 U/L(Xc = 30)。将 Xc 代入回归方程,计算两检测法之间的系统误差的估计值(Bc)和置信区间(|B_Clow, B_Chight|),根据 Bc = a + (b-1)Xc 得到 Xc 水平下的系统误差的 95%的可信区间 |B_Clow, B_Chight| = [-3.67, 1.99],根据允许误差 = ±BIAS% × Xc = ±20% × 137.9 = [-6, 6],可见 |B_Clow, B_Chight| 小于允许误差,因此系统误差符合临床要求。

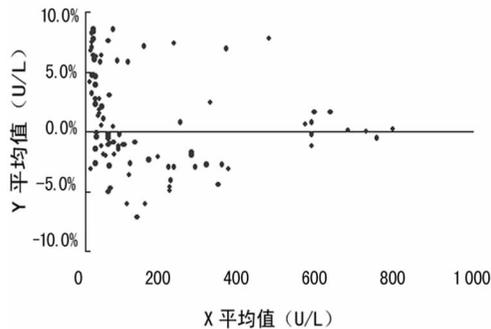


图 3 两方法均值相对偏差的偏置曲线图

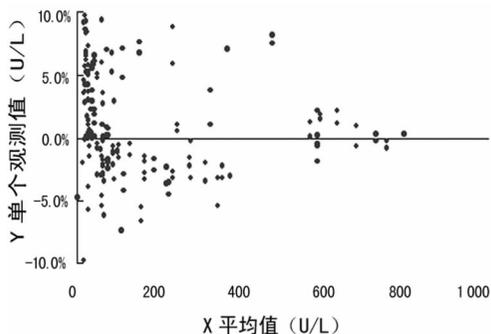


图 4 Y 单个值与 X 均值相对偏差的偏置曲线图

3 讨论

临床生化检验是医院最常用、最基本且相对便宜的检测项目。其中 AST 作为最基础的检测项目广泛存在于人体,在心、肝、骨骼肌、肾和红细胞内有较高浓度,这些组织的损伤或疾病,如心肌梗死、病毒性肝炎、肝坏死、肝硬化、营养不良等都会引起血清或血浆中 AST 水平的升高[9]。AST 的测定方法通常有连续监测法和赖氏终点比色法。赖氏终点比色法虽然价格低廉,但准确性和重复性较差,线性范围窄。连续监测法具有操作简便、快速、准确和重复性好的优点,成为目前应用最广泛的方法。

本研究为了加大体外诊断试剂的自主研发和创新,强化“产学研”相结合的技术创新体系建设,大幅度提升中国体外诊断试剂的生产力和国际竞争力[10]。本研究为了对自主研发的 AST 生化诊断试剂盒的安全性、有效性进一步确认,使用对照试剂盒和受试试剂盒对同一批血清样本进行检测,比较检测结果,验证该试剂盒与对照试剂盒是否实质性等效,以及是否对临床检测具有同样的安全性和有效性。

本研究本着支持民族产业发展,依据美国临床实验室标准化委员会(CLSI)EP9-A 文件标准,进行了自主研发试剂的临床试验评价[4]。结合临床工作情况选择不同 AST 浓度的患者新鲜血清标本 100 份,在 Olympus AU5421 生化分析仪上,评价国产与进口生化诊断试剂临床测定值的相符性,以方法学比对评估的系统误差小于 1/2 CLIA'88 的允许误差范围属临床可接受水平,结果显示国产与进口生化诊断试剂测定值相符,说明国产生化试剂在临床应用方面具有相同的应用价值[5]。

参考文献

[1] 丛玉隆,冯仁丰,陈晓东. 临床实验室管理学[M]. 北京:中国医药科技出版社,2004:111-123. (下转第 1791 页)

达^[8],而 BCR-ABL 通过 JAK/STAT 信号传导途径,主要是 STAT3 激活白血病细胞中 NGAL 基因的表达^[9]。进一步研究证明 NGAL 与肿瘤的侵袭、转移及凋亡密切相关。研究发现,在乳腺癌肿瘤组织中 NGAL 无论从 mRNA 水平还是蛋白水平都是过表达,而在其癌旁组织中导管上皮几乎消失; Bauer 等^[4]研究也表明 NGAL 的表达与乳腺癌细胞的淋巴结转移、不良组织学分级、HER-2/neu 表达及类固醇激素受体阴性等高度相关;研究也表明 NGAL 是一个促肿瘤生长因子,能够对抗氧化应激所诱导的肺腺癌细胞 A549 发生凋亡^[10]。由此可见,NGAL 参与了许多肿瘤的发生和发展,但 NGAL 在肿瘤中的许多功能尚需进一步研究。应用 NGAL 多克隆抗体通过免疫印迹、免疫组化等方法观察 NGAL 在病变组织中的表达情况对相关疾病的诊断、预后及疗效观察具有重要意义。

选择合适的表达载体对重组蛋白的产生相当重要,本研究用 pET28a 表达载体,原核蛋白得到了高效表达。pET28a 表达载体是一种高效的大肠埃希菌表达系统,当目的基因被克隆至载体的多克隆位点(T7 Lac 强启动子的下游)后,宿主菌在 IPTG 诱导作用下能产生大量的 T7RNA 聚合酶,后者特异性地识别表达载体的 T7 启动子序列,并且 Rosetta DE3 补充了大肠杆菌缺乏的 6 种稀有密码子对应的 tRNA,能够提高外源基因、特别是真核基因在原核表达系统中的表达水平,从而高效表达目的蛋白。

抗体是研究基因功能的重要工具,制备一种效价高、特异性好的抗体,是研究疾病相关基因的表达、定位和生物学功能非常重要的一步。本实验室构建的 pET28a-NGAL 融合蛋白在实验设计之初采用 HIS 标签亲和层析纯化,但是实验过程中发现蛋白在大肠杆菌中高水平表达形成包涵体,自包涵体中溶解出目的蛋白需经过洗涤、溶解、复性、透析脱盐等多个步骤,在这个过程中易造成蛋白变性、浓度降低,使所纯化的融合蛋白难以达到预期的纯度且纯化步骤繁琐、费时。包涵体的形成虽然影响目的蛋白的正确折叠,却不会影响蛋白的免疫原性,因此本实验组使用 KCl 对凝胶进行短暂染色,直接从聚丙烯酰胺凝胶上切割下含有 NGAL 的凝胶条带无需去除 KCl, PBS 溶解切碎后的凝胶作为抗原直接免疫家兔制备 NGAL 抗血清,进一步简化了免疫原的制备过程。本研究组制备的兔抗人 NGAL 多克隆抗血清不仅能与重组体表达的融合蛋白结合,也能与纯化后的融合蛋白结合,说明融合的目的蛋白对 NGAL 抗原性没有影响,制备的 NGAL 抗血清能特异性地识别 NGAL 蛋白,可用于进一步的功能检测。随后通过免疫组化检测 NGAL 在乳腺癌组织中的表达,结果显示在乳腺癌组

织细胞中 NGAL 阳性染色主要以细胞质为主,说明自制的抗体也可用于细胞内源性的检测。为进一步验证自制抗 NGAL 多克隆抗体,本研究下一步将构建 NGAL 真核表达载体,转染宿主细胞,以此抗体检测真核细胞内 NGAL 的表达。

参考文献

- [1] Flo TH, Smith KD, Sato S, et al. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron[J]. Nature, 2004, 432(7019): 917-921.
- [2] 何小洁, 杨毅. NGAL 与糖尿病肾病[J]. 国际检验医学杂志, 2008, 29(9): 806-807.
- [3] Haase M, Bellomo R, Devarajan P, et al. Accuracy of neutrophil gelatinase-associated lipocalin(NGAL) in diagnosis and prognosis in acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis[J]. Am J Kidney Dis, 2009, 54(6): 1012-1024.
- [4] Bauer M, Eickhoff JC, Gould MN, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) is a predictor of poor prognosis in human primary breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 2008, 108(3): 389-397.
- [5] Zhang H, Xu L, Xiao D, et al. Upregulation of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in oesophageal squamous cell carcinoma: significant correlation with cell differentiation and tumour invasion [J]. J Clin Pathol, 2007, 60(5): 555-561.
- [6] Hu L, Hittelman W, Lu T, et al. NGAL decreases E-cadherin-mediated cell-cell adhesion and increases cell motility and invasion through Rac1 in colon carcinoma cells[J]. Lab Invest, 2009, 89(5): 531-548.
- [7] 黄华, 陈林兴, 陈慎仁, 等. NGAL 在慢性粒细胞性白血病中的表达及其诊断意义[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(6): 313-314.
- [8] Iannetti A, Pacifico F, Acquaviva R, et al. The neutrophil gelatinase-associated lipocalin(NGAL), a NF-kappaB-regulated gene, is a survival factor for thyroid neoplastic cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(37): 14058-14063.
- [9] Sheng Z, Wang SZ, Green MR. Transcription and signalling pathways involved in BCR-ABL-mediated misregulation of 24p3 and 24p3R[J]. EMBO J, 2009, 28(7): 866-876.
- [10] Roudkenar MH, Halabian R, Ghasemipour Z, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin acts as a protective factor against H (2)O(2) toxicity[J]. Arch Med Res, 2008, 39(6): 560-566.

(收稿日期: 2011-05-09)

(上接第 1788 页)

- [2] National Committee for Clinical Laboratory. EP9-A2 Method comparison and bias estimation using patient samples[S]. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory, 1995.
- [3] 刘斌剑, 郑淑辉, 胡俊, 等. 不同检测系统生化指标测定结果的偏倚评估与可比性研究[J]. 中华医学杂志, 2007, 31(1): 13-16.
- [4] 杨剑虹, 倪红兵. 不同检测系统常用血清酶测定结果对比及偏倚评估[J]. 检验医学与临床, 2008, 5(22): 1366-1369.
- [5] 初开秋, 任立晟, 田清武, 等. 同种项目在不同生化分析仪测定结果的偏倚评估与可比性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2008, 29(9): 853-854.
- [6] 刘月芳, 刘正洁. 国产与进口生化试剂的分析与比较[J]. 中国医

药导刊, 2009, 11(2): 286-287.

- [7] 夏昌宇, 刘岩, 郭红雁, 等. 中国四家参考实验室间 ALT 和 AST 的测定结果比对分析[J]. 中华检验医学杂志, 2009, 32(5): 499-503.
- [8] 王珏, 张勤寂. 室内两种检测系统测定血清酶的可比性研究[J]. 检验医学与临床, 2009, 6(2): 88-89.
- [9] 郭良友, 陈亚洁, 刘键. 血清 AST/ALT, PAB, TBA 在肝炎诊断中的重要意义[J]. 中国民康医学, 2011, 23(1): 27-28.
- [10] 王惠莹, 贾雄飞, 滕毅, 等. 不同试剂检测血清 ALT 结果的可比性及偏倚评估研究[J]. 现代检验医学杂志, 2009, 24(5): 61-63.

(收稿日期: 2011-05-09)